

## مقایسه‌ی آزمون‌های کشت و PCR برای تشخیص عفونت‌های تنفسی مایکوپلازما پنومونیه

دکتر محمدحسن شاه حسینی\*، دکتر مسعود مردانی\*\*، زهرا حسینی\*\*\*، دکتر حمیدرضا خرم خورشید\*\*\*\*،

امیرعباس رحیمی\*\*\*\*\*، دکتر جلیل وند- یوسفی\*\*\*\*\*

نویسنده‌ی مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهریار/شهرقدس، گروه میکروبیولوژی shahhosseiny@yahoo.com

دریافت: ۸۵/۱۰/۱۷ پذیرش: ۸۵/۱۲/۲۰

### چکیده

**زمینه و هدف:** مایکوپلازما پنومونیه عامل گرفتاری‌های تنفسی مانند گلودرد، فارنژیت، رینیت، تراکتوبرونشیت و هم‌چنین مسئول بیش از بیست درصد موارد پنومونی‌های کسب شده از جامعه است. روش‌های متداول تشخیص مایکوپلازما پنومونیه دارای محدودیت‌هایی است، بنابراین نیاز به کارگیری روش‌های دقیق دیگر کاملاً احساس می‌گردد. روش‌های مولکولی، از جمله واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) دارای پتانسیل زیادی جهت تشخیص دقیق و سریع این عامل بیماری‌زا بوده و در نتیجه می‌توانند امکان شروع هر چه سریع‌تر درمان آنتی‌بیوتیکی بیماری را فراهم نمایند. در این مطالعه سعی شده است روش کشت و PCR مقایسه شده و یک روش سریع و عملی PCR برای شناسایی مایکوپلازما پنومونیه طراحی و بررسی شود.

**روش بررسی:** بر روی نمونه‌های کلینیکی ۱۰۰ بیمار که با شکایات تنفسی به بیمارستان مراجعه کرده بودند، کشت و PCR انجام شد. یک روش PCR حساس با استفاده از پرایمرهای P4A و P4B و هدف ژنی PI cytoadhesin، طراحی و بر روی نمونه‌های سوآپ جمع‌آوری شده از بیماران به‌کار گرفته شد. محصول PCR (۳۴۵ bp) به‌وسیله‌ی روش PCR-Cloning در پلاسمید pTZ57R کلون گردید و جهت تعیین توالی مورد استفاده قرار گرفت.

**یافته‌ها:** همه نمونه‌های کشت مثبت دارای نتیجه‌ی PCR مثبت هم بودند. در ۳۳ نمونه‌ی دیگر که از نظر کشت منفی بودند آزمایش PCR مثبت بود، در نتیجه ۴۳ نمونه از ۱۰۰ نمونه (۴۳ درصد) دارای نتیجه‌ی مستقیم مثبت PCR بودند. حد شناسایی سنجش مولکولی حاضر در حد ۱۰ ارگانیسیم مایکوپلازما پنومونیه ارزیابی شد. در عین حال با ۱۱ نمونه مایکوپلازما پنومونیه مورد استفاده و همین‌طور ۱۷ گونه‌ی باکتریایی دیگر مورد استفاده در آزمون ویژگی هیچ محصولی تکثیر نگردید.

**نتیجه‌گیری:** این مطالعه دلالت بر این موضوع دارد که PCR یک روش حساس و قابل اعتماد برای تشخیص سریع مایکوپلازما پنومونیه در نمونه‌های عفونت‌های تنفسی است.

**واژگان کلیدی:** مایکوپلازما پنومونیه، تشخیص، کشت، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

---

\* دکترای تخصصی بیوتکنولوژی (فراورده‌های بیولوژیک)، استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهریار/شهرقدس

\*\* متخصص عفونی، استاد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

\*\*\* کارشناس ارشد میکروبیولوژی، مربی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهریار/شهرقدس

\*\*\*\* متخصص ژنتیک، استادیار دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی

\*\*\*\*\* کارشناس ارشد ژنتیک، مربی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهریار/شهرقدس

\*\*\*\*\* دکترای تخصصی میکروبیولوژی، دانشیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج

## مقدمه

محصول بستگی دارد (۶). پرایمرهای طراحی شده عموماً جهت بخش‌های مشترک ژن *rRNA* ۱۶ S (۱۹)، ژن اپرون *ATPase* (۲۰)، ژن *P1* (۲۱، ۲۲، ۲۳، ۲۴) و یا هدف‌های دیگر مانند ژن فاکتور طویل‌سازی *tuf* (۲۵) طراحی شده است. ژن *P1* پروتئینی با وزن مولکولی 169 KDa را در باکتری مایکوپلازما پنومونیه کد می‌کند که نقش مهمی را در شدت بیماری‌زایی این باکتری از جهت چسبیدن به سلول‌های هدف ایفا می‌نماید (۲۶). اگر چه ژن‌های مشابهی در سایر گونه‌های مایکوپلازما مشاهده می‌شود، ولی بخش‌های به شدت ثابت موجود در توالی ژن *P1* مایکوپلازما پنومونیه، آن را از نظر طراحی پرایمرهای مخصوص گونه، جذاب نموده است (۲۷). هدف مطالعه‌ی حاضر که در سال ۱۳۸۵ در دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهریار انجام گردید، روش کشت و *PCR* جهت شناسایی مایکوپلازما پنومونیه در نمونه‌های کلینیکی و بهینه نمودن روش تشخیص کلینیکی است.

## روش بررسی

**سویه‌های باکتریایی:** گونه‌های مولیکوتس به‌کار رفته در این مطالعه عبارتند از: مایکوپلازما پنومونیه (NCTC 10119)، مایکوپلازما آرچینینی، مایکوپلازما هیورینیس، مایکوپلازما ارال، مایکوپلازما سینوویه، مایکوپلازما گالیناروم (رازی ۱۳۵۰ و ۱۳۴۶)، مایکوپلازما گالسیپتیکوم (رازی ۱۳۵۵)، مایکوپلازما اوپانومونیه (رازی ۱۳۶۴)، مایکوپلازما آگالاتیا (رازی ۱۳۴۳)، اوره آپلازما اوره آلیتیکوم (رازی ۱۳۶۹) و اکول پلازما لیدلاوی. به‌علاوه میکروارگانیزم‌های استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس، استرپتوکوکوس پیورزنز، استرپتوکوکوس پنومونیه، باسیلوس سوبتیلیس، باسیلوس میکویئدس، گونه‌های کورینه باکتریوم، گونه‌های کلاستریدیوم، اتروکوکوس فکالیس، اشیشیاکلی، گونه‌های

مایکوپلازما پنومونیه یکی از عوامل عفونت بخش فوقانی و تحتانی تنفس در انسان بوده و تصویر کلینیکی آن به‌صورت تراکتوبرونشیت کند پیشرونده همراه با بی‌قراری و سرفه‌های خشک است (۱، ۲). طیف بیماری‌زایی این باکتری، از شکل‌های ملایم فارنژیت و تراکتوبرونشیت تا موارد پنومونی حاد را شامل می‌شود (۳). مطالعات اپیدمیولوژیک نشان داده است که این باکتری مسئول بیش از ۲۰ درصد پنومونی‌های کسب شده از جامعه می‌باشد (۱، ۴). طیف گسترده‌ای از تظاهرات خارج تنفسی مانند عوارض هماتولوژیک، گوارشی، کلیوی، عضلانی - اسکلتی، قلبی - عروقی، ایمونولوژیک، درماتولوژیک و نورولوژیک در ارتباط با این باکتری گزارش شده است (۵). در حال حاضر کشت، روش‌های تشخیص سرولوژیک و تکنیک‌های تکثیر اسیدنوکلیک سه روش قابل دسترس برای تشخیص روتین عفونت‌های مایکوپلازما پنومونیه محسوب می‌شوند. اصولاً روش‌های مبتنی بر کشت، تکنیک‌هایی وقت‌گیر با حساسیت نسبتاً پایین و نیازمند امکانات و هم‌چنین تجربه‌ی کافی جهت تفسیر نتایج هستند (۶). روش‌های سرولوژیک هم به دلیل حساسیت نسبتاً کم، واکنش متقاطع و نیاز به سرم‌های فاز حاد و نقاهت روشی ایده‌آل به شمار نمی‌روند (۵، ۶). در سال‌های اخیر جهت غلبه بر این مشکلات، روش‌های تکثیر اسید نوکلئیک مانند واکنش زنجیره‌ای پلیمر از (*Polymerase chain reaction [PCR]*)، توسعه‌ی فراوانی یافته است (۷، ۸). امروزه روش‌های تشخیصی بر اساس *PCR* به دلیل داشتن حساسیت، ویژگی و دقت بیشتر، روش‌هایی مناسب جهت تشخیص عواملی هم‌چون مایکوپلازما پنومونیه به شمار می‌روند (۹-۱۸). میزان حساسیت و دقت *PCR*، در شناسایی برخی قطعات خاص ژنوم مایکوپلازما تا حد زیادی به نوع نمونه، روش استخراج *DNA*، ژن هدف، پرایمرهای طراحی شده و روش شناسایی

سالمونلا، گونه‌های شیگلا، گونه‌های پروتئوس، هلیکوباکتر پیلوری، ساکارومیسس سرویزیه، گونه‌های اسپریژیلوس، کاندیدا آلبیکنس، و هم‌چنین سلول‌های انسانی و موشی از جهت آزمون ویژگی پرایمرهای مورد استفاده در PCR، مورد آزمایش و ارزیابی قرار گرفتند.

**نمونه‌های دستگاه تنفس:** در این مطالعه از ناحیه‌ی گلو ۱۰۰ بیمار (۴۳ درصد مرد و ۵۷ درصد زن) با طیف سنی بین ۳ تا ۸۰ سال، که به علت ابتلا به عفونت‌های تنفسی به بیمارستان میلاد و لقمان حکیم تهران مراجعه و یا بستری شده بودند، به‌وسیله سوآپ نمونه‌گیری به عمل آمد (۲۲،۲۸). سوآپ‌های گرفته شده به لوله‌های ۱/۵ میلی‌لیتر حاوی محیط‌های انتقال فاقد گلوکز اضافه و سریعاً با استفاده از محیط‌های انتقالی به آزمایشگاه میکروبی‌شناسی دانشگاه منتقل گردید. در آزمایشگاه، پس از آماده‌سازی نمونه‌های تنفسی، ابتدا آن‌ها را از فیلتر میلی‌پور ۰/۴۵ میکرون عبور داده و سپس از محلول صاف شده با استفاده از تیپ استریل، هم‌زمان به محیط PPLO-agar حاوی گلوکز و آنتی بیوتیک‌های پنی‌سیلین (۲۰۰۰ واحد در میلی‌لیتر)، آمفوتریسین B (۲/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر)، تلقیح صورت گرفت (۲۹). همه‌ی محیط‌های تلقیح شده در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. پلیت‌ها به مدت سه هفته از روز سوم به بعد از جهت تغییر رنگ و رؤیت کلنی مورد مطالعه قرار گرفتند. محیط‌هایی که در طی کمتر از ۵ روز به رنگ زرد تغییر یافتند، به علت امکان آلودگی با غیر مایکوپلازماها، از مطالعه خارج شدند و چنانچه در طی ۵ تا ۱۲ روز تغییر رنگ در محیط‌ها ظاهر می‌گردید، احتمال کشت مثبت مایکوپلازما افزایش می‌یافت. با استفاده از بزرگ‌نمایی کم میکروسکوپ کلنی‌ها رؤیت می‌گردید.

**استخراج DNA:** مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌ی صاف‌شده به درون یک لوله‌ی ۱/۵ میلی‌لیتر منتقل و ۵۰ میکرولیتر روغن معدنی استریل روی آن اضافه شد. سپس لوله به مدت ۱۵

دقیقه در دمای جوش حرارت داده شد. بلافاصله بعد از حرارت، لوله‌ها در rpm ۱۴۰۰۰ سانتریفوژ شده و مقدار ۵۰ میکرولیتر از مایع روی سدیمان به یک لوله‌ی جدید منتقل شد. از سوش‌های باکتریایی مورد استفاده با استفاده از کیت استخراج DNG-Plus (سیناژن)، داکسی ریبونوکلوئیک اسید (deoxyribonucleic acid [DNA]) استخراج گردید. به‌طور خلاصه کشت مایکوپلازما در مرحله‌ی انتهای فاز لگاریتمی برای ۳۰ دقیقه در rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ شد (سویه‌های لیوفلیزه، در یک میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر استریل حل شد و به‌طور مستقیم و بدون سانتریفوژ کردن وارد مرحله‌ی استخراج گردید). رسوب سلولی حاصل در ۱۰۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل سوسپانسیون گردید. ۵۰۰ میکرولیتر از محلول DNG به لوله‌ی حاوی ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی اضافه و بلافاصله ورتکس گردید. لوله‌ی حاوی سوسپانسیون و DNG یا Lysate، ۲۰ ثانیه شدیداً ورتکس گردید. به Lysate، ۳۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اضافه و سپس ۱۰ بار لوله وارونه گردید. لوله سپس به مدت ۱۰ دقیقه در حرارت اتاق در rpm ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شد. مایع رویی به آرامی و با وارونه کردن لوله تخلیه شد. با استفاده از سمپلر، مایع باقیمانده بر روی رسوب نیز برداشته شد. به رسوب حاصل، ۱ میلی‌لیتر اتانل ۷۵ درجه اضافه و با ۱۰ مرتبه وارونه کردن لوله، محتویات آن به خوبی مخلوط شد. سپس به مدت ۵ دقیقه در rpm ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ و مایع رویی تخلیه و مجدداً مرحله‌ی فوق تکرار شد. مایع رویی تخلیه و با وارونه کردن لوله بر روی دستمال کاغذی، الکل‌های باقیمانده خارج شد. لوله‌ی حاوی رسوب به مدت ۵ دقیقه در حرارت ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، جهت خشک کردن DNA قرار داده شد. رسوب حاصل در ۱۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه‌ی استریل، یا جهت نگهداری طولانی در تریس ۱۰ میلی‌مولار با پی - اچ (pH) ۸ حل گردید. از سلول‌های انسانی و موشی هم به طریق فوق DNA استخراج

سپس، ۴۰ میکرولیتر از مایع رویی رسوب و زیر روغن، به لوله‌ی جدید منتقل گردید. از این DNA در مراحل بعدی به عنوان الگو استفاده شد.

**پرایمر و شرایط PCR:** پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه، پرایمرهای مخصوص ژن P1 adhesin مایکوپلازما پنومونیه (۳۱-۲۹، ۶) است (جدول ۱).

شد. DNA ژنومیک باکتری‌های غیر مایکوپلازمایی از طریق جوشاندن همراه با دترجنت غیریونی تراپتون ایکس ۱۰۰ (یک هزارم)، بدین طریق به دست آمد. یک کلنی از باکتری مورد نظر را در ۵۰ میکرولیتر از آب دوبار تقطیر استریل دیونیزه حاوی تراپتون ایکس ۱۰۰، سوسپانسیون کرده و ۵۰ میکرولیتر روغن معدنی استریل به آن اضافه شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای جوش، حرارت داده شد. بعد از سانتریفوژ در ۱۴۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ و

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر DNA مایکوپلازما پنومونیه.

Sequence(5'-----3')	
P4A	5'AGG CTC AGG TCA ATC TGG CGT GGA 3'
P4B	5'GGA TCA AAC AGA TCG GTG ACT GGG T3'

یافت. چرخه‌های حرارتی شامل یک سیکل دو دقیقه‌ای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۴۰ سیکل متوالی (شامل ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه) و یک سیکل پلیمریزاسیون نهایی ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه بود. محصول PCR با سایز مورد نظر ۳۴۵ جفت باز، در کنار سایز مارکر و کنترل مثبت و منفی، بر روی ژل آگاروز ۲ درصد و با استفاده از اتیدیوم بروماید و نور UV بررسی گردید.

ساخت کنترل مثبت از طریق **PCR-Cloning**: عمل کلون کردن قطعه‌ی ۳۴۵ جفت بازی با استفاده از کیت T/A Cloning کمپانی فرمتانس و در وکتور pTZ57R این کیت، انجام گرفت. محصول PCR مستخرج از ژل مستقیماً برای عمل کلونینگ استفاده شد. با استفاده از محیط C-medium این کیت، سلول‌های مستعد سویه‌ی DH5-alfa باکتری اشریشیاکلی آماده شد. سپس عمل

تکنیک تشخیصی PCR هم بر روی نمونه‌های اولیه‌ی صاف شده و هم چنین بر روی کلنی‌های رشد یافته بر روی محیط کشت (جهت تأیید کشت) انجام گردید. نمونه‌های کشت، با استفاده از یک سوآپ استریل و کشیدن آن به سطح محیط‌های واجد کلنی و انتقال آن به ۲۰۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل و رادیونیزه تهیه، و سپس استخراج DNA به روش جوشاندن انجام گردید. ۵ میکرولیتر از DNA ژنومیک حاصل در مخلوط ۲۵ میکرولیتری PCR، با استفاده از پرایمرهای جلویی و عقبی مخصوص ژن P1 adhesin با غلظت نهایی ۰/۴ میکرومول (یک میکرولیتر از غلظت ده میلی مولار)، ۲/۵ میکرولیتر از بافر PCR (۱۰ X) (سیناژن)، ۱/۵ میلی مولار کلرید منیزیم (MgCl<sub>2</sub>) (از غلظت ۵۰ میلی مولار (سیناژن))، ۰/۲ میلی مولار مخلوط dNTP (۱۰ میلی مولار) (سیناژن) و با استفاده از ۲ واحد آنزیم (۵ واحد در میکرولیتر) Taq DNA Polymerase (سیناژن) تکثیر

(CFU) مشخص، استخراج DNA از رقت‌ها و انجام آزمون PCR؛ ۲: رقیق‌سازی پلاسمید pSHA345-1 و انجام PCR بر روی محلول‌های حاوی مقادیر مشخص از پلاسمید. آزمون ویژگی هم با استفاده از تمام میکروارگانیسم‌های ذکر شده در بخش سویه‌های باکتریایی و همین‌طور DNA سلول‌های یوکاریوت، موش و انسان انجام شد.

**توالی یابی:** توالی DNA در جهت جلویی با استفاده از امکانات تعیین توالی اتوماتیک خاتمه‌دهنده رنگی به روش ختم زنجیره‌ی Dideoxy-Chain Termination انجام گردید.

**روش‌های آماری:** اطلاعات با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۳ تجزیه و تحلیل گردید. آزمون کاپا (Kappa) برای سنجش توافق دو روش کشت و PCR مورد استفاده واقع شد.

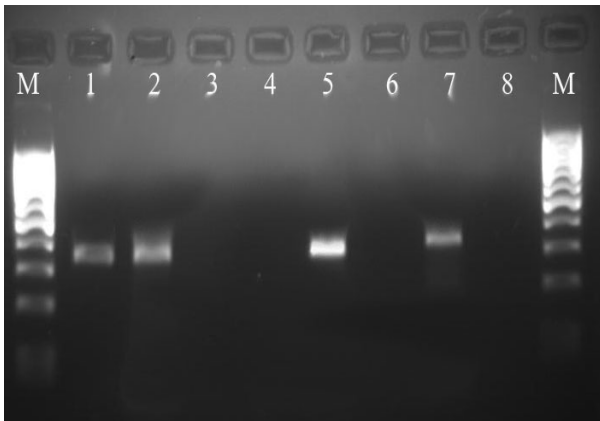
#### یافته‌ها

جهت بررسی و تأیید ویژگی سنجش PCR مخصوص گونه‌ی میکوپلازما پنومونیه، قطعه‌ی ۳۴۵ جفت بازی در پلاسمید pTZ57R و باکتری اشریشیاکلی DH5-alfa کلون و پلاسمیدهای pSHA345-1 و pSHA345-2 ساخته شد (شکل ۱). از این پلاسمید حاوی ژن مورد نظر، به‌عنوان کنترل مثبت (شکل ۲، ۱) و همین‌طور جهت تعیین توالی استفاده گردید. مقایسه‌ی توالی حاصل با سکانس‌های موجود از طریق برنامه‌ی BLAST، مطابقت حدود ۱۰۰ درصد را نشان داد. از طریق رقت‌سازی پلاسمید حاوی ژن، حساسیت تست و به عبارت دیگر حد تشخیص در حد ۱۰ کپی در نمونه‌ی مورد آزمایش به‌دست آمد. تعیین حساسیت از طریق رقیق‌سازی کشت میکوپلازما پنومونیه با واحد سازنده‌ی کلنی مشخص هم انجام شد و نتایج مشابهی به‌دست آمد (شکل ۱).

Ligation با استفاده از کیت مذکور انجام گرفت. مخلوط لایگیشن به مدت چهار ساعت در دمای اتاق (۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد) انکوبه گردید. بعد طی پروتکل کیت، مرحله‌ی ترانسفورماسیون انجام گردید. کلنی‌های سفید بر روی پلیت حاوی آمپی سیلین (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) بعلاوه ماده‌ی X-Gal و IPTG انتخاب شدند. کلنی‌های سفید حاوی ژن مورد نظر می‌باشند. سپس به صورت راندوم ۱۰ عدد از کلنی‌های سفید انتخاب گردیده و بر روی پلیت LB agar واجد آمپی‌سیلین کشت خطی داده شد و مجدداً در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. پس از این مدت یک یا دو کلنی به لوله‌های ۱/۵ میلی‌لیتر حاوی ۵۰ میکرولیتر آب دیونیزه اضافه کرده و یک قطره روغن معدنی استریل به آن افزوده و به شدت ورتکس گردید. سپس درب لوله‌ها با پارافیلیم بسته شد و ۱۵ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شدند، تا غشای باکتری‌ها پاره و پلاسمید خارج گردد. لوله‌ها به مدت یک دقیقه در میکروسانتریفوژ با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردیده و سپس از مایع رویی برای PCR استفاده گردید. PCR با مواد و مقادیر ذکر شده قبلی انجام داده شد، و محصول بر روی ژل آگارز ۲ درصد مشاهده گردید. تمامی کلنی‌ها واجد قطعه‌ی مورد نظر بوده، بنابراین دو عدد از آن‌ها به نام pSHA345-1 و pSHA345-2 به صورت راندوم انتخاب و با استفاده از روش لیز قلیایی از آن‌ها پلاسمید استخراج و در مرحله‌ی بعد PCR را با استفاده از پلاسمیدهای استخراج شده انجام داده و محصول بر روی ژل آگارز ۲ درصد بررسی گردید. از پلاسمیدهای حاصل به عنوان کنترل مثبت و همین‌طور جهت تعیین توالی استفاده شد.

**حساسیت و ویژگی:** جهت بررسی حساسیت جفت پرایمرهای مورد استفاده، از دو روش استفاده شد. ۱: تهیه‌ی رقت از سوسپانسیون میکوپلازما پنومونیه با واحد کلنی‌ساز

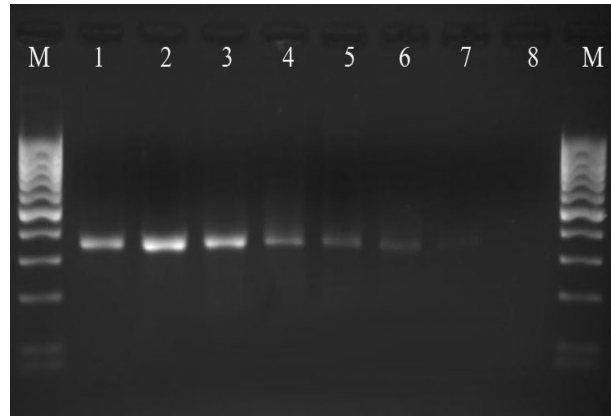
کلاستریدیوم، انتروکوکوس فکالیس، اشیریشیا کلی، گونه‌های سالمونلا، گونه‌های شیگلا، گونه‌های پروتئوس، هلیکوباکتر پیلوری، و همین‌طور DNA انسان و موش و یوکاریوت‌های پست مانند ساکارومیسس سرویزیه، گونه‌های آسپرژیلوس، کاندیدا آلبیکنس، دیده نشد.



شکل ۲: الکتروفورز ژل آگارز محصول PCR نمونه‌های بیماران با استفاده از پرایمرهای مخصوص گونه. ستون M: سایز مارکر، ستون ۱: کنترل مثبت، ستون ۲، ۵ و ۷: نمونه‌های بیماران که PCR آن‌ها مثبت شده است، ستون ۳ و ۴ و ۶: نمونه‌های بیماران که PCR آن‌ها منفی شده است، ستون ۸: کنترل منفی (بافر). (TBE 0.5X)

### بحث

یکی از عواملی که موجب کاهش مورتالیتی، موربیدیتی و نیز کاهش هزینه‌های بیماری‌های عفونی می‌گردد، تشخیص سریع و دقیق می‌باشد. روش‌های سنتی مبتنی بر کشت گرچه در مواردی هنوز به عنوان استاندارد طلایی مطرح است ولی عموماً ویژگی‌های یک روش مطلوب در شناسایی میکروارگانیسم‌ها و از جمله مایکوپلازما پنومونیه را ندارند (۷، ۸). در مطالعات مشابه که از تکنیک کشت به همراه روش‌های دیگر مثل روش PCR استفاده شده، نشان داده شده است که تکنیک کشت وقت‌گیر و دارای نتایج منفی کاذب زیادی می‌باشد (۱، ۳۲). در مواردی هم که درمان



شکل ۱: آزمون حساسیت PCR با استفاده از نمونه‌های کلنی شمارش شده مایکوپلازما پنومونیه (CFU مشخص). ستون M: سایز مارکر، ستون ۱: کنترل مثبت، ستون ۲ الی ۷ حاوی نمونه‌های مشخص و به ترتیب ستون ۲ (CFU 31250)، ستون ۳ (CFU 6250)، ستون ۴ (CFU 1250)، ستون ۵ (CFU 250)، ستون ۶ (CFU 50)، ستون ۷ (CFU 10)، ستون ۸: کنترل منفی (بافر). (TBE 0.5X)

جهت تشخیص عفونت مایکوپلاسمایی در نمونه‌های تنفسی، از پرایمرهای مخصوص گونه استفاده نمودیم. آزمون PCR مثبت در ۴۳ مورد از ۱۰۰ نمونه‌ی آزمایش شده (۴۳ درصد)، از طریق تکثیر قطعه‌ی صحیح، تشخیص داده شد (شکل ۲). در ۱۰۰ نمونه‌ی مورد آزمایش، ۱۰ مورد کشت مثبت به دست آمد. همه‌ی نمونه‌های کشت مثبت دارای نتیجه PCR مثبت هم بودند. ۳۳ نمونه‌ی دیگر وجود داشت که با روش PCR مثبت بودند ولی نتیجه‌ی کشت آن‌ها منفی بود. در آزمون ویژگی پرایمرهای P4A و P4B، هیچ محصول ناخواسته‌ای (۳۴۵ bp) با DNA باکتری‌های مایکوپلاسمایی غیر از مایکوپلازما پنومونیه، و همین‌طور باکتری‌های غیر مایکوپلاسمایی مانند استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس، استرپتوکوکوس پیوژنز، استرپتوکوکوس پنومونیه، باسیلوس سوبتیلیس، باسیلوس میکوئیدس، گونه‌های کورینه باکتریوم، گونه‌های

آنتی بیوتیکی پیش از نمونه گیری انجام شود، نتیجه ی کشت منفی گزارش می گردد. لذا برای تعیین هویت مایکوپلازما پنومونیه، روش کشت دارای نتایج ضعیفی بوده و بنابراین کاربرد روش های مولکولی هم چون PCR در اولویت است. در این مطالعه، روش PCR بر پایه ی پرایمرهای مخصوص گونه ی مایکوپلازما پنومونیه و هدف ژنی P1 Cytadhesin طراحی و اجرا شده است. بر این مبنا با بررسی توالی پرایمرهای مایکوپلازما و مقایسه ی آنها با توالی های دیگر پروکاریوت ها، پرایمرهای P4A و P4B انتخاب شدند (۲۹). در این بررسی، مناسب بودن این پرایمرها جهت تشخیص مایکوپلازما پنومونیه در نمونه های بالینی ثابت گردید. شرایط بهینه شده ی این مطالعه صرفاً موجب تولید محصول اختصاصی با درجه ی بالایی از ویژگی و حساسیت و بدون هیچ محصول ناخواسته ای بمانند مطالعه ی شارما (۲۹)، کادیوکس (۳۰) و تانگ (۳۱) گردید.

اگر چه تعداد نمونه ها در این مطالعه زیاد نمی باشد ولی با به کار بردن تست PCR، موفق به شناسایی مایکوپلازما در حدود ۴۳ درصد نمونه ها به روش مولکولی، و صرفاً در ۱۰ درصد نمونه ها به روش کشت شدیم. این اعداد از لحاظ آماری کاملاً معنی دار و دارای اختلاف زیادی می باشند. در این بررسی میزان تعداد نمونه های PCR مثبت ۴/۳ برابر نتایج کشت بود. در مطالعه وارینگ (۲۲) هم تعداد نمونه های PCR مثبت تقریباً ۳/۵ برابر بیشتر از نمونه های کشت نشان داده شد. در مطالعه ابل - هورن (۳۲) هم تعداد نمونه های PCR مثبت، ۳ برابر نمونه های کشت مثبت به دست آمد. در بررسی حاضر هم مشخص شد که PCR حداقل ۴ برابر حساس تر از روش کشت می باشد. با آزمون کاپا (Kappa) یا اندازه گیری توافق، شاخص به دست آمده ۰/۲۵ است. با توجه به این که این عدد کمتر از ۰/۴ می باشد بیانگر توافق ضعیف بین روش کشت و PCR است. از این رو عملاً در تصمیم گیری های بالینی استفاده از روش کشت جهت

تشخیص مایکوپلازما پنومونیه، توصیه نمی شود. از مسایل مهم در تشخیص مولکولی مایکوپلازما پنومونیه می توان به جنبه های تکنیکی هم چون نحوه ی جمع آوری نمونه، روش انتقال و پردازش نمونه، انتخاب ژن هدف و پروتکل تکثیر، اهمیت کنترل کیفی (نتایج منفی و مثبت کاذب) و معتبرسازی تکنیک (۶) اشاره نمود. نمونه هایی که تا به حال در مطالعات مختلف جهت شناسایی مایکوپلازما پنومونیه مورد استفاده واقع شده عبارتند از: نمونه ی خلط و لاواژ برونکوآلوآلار (BAL)، سوآپ گلو و نازوفارنژ، آسپیراسیون نازوفارنژ، آسپیراسیون تراکئال، مایع پلور، آسپیراسیون ترانس توراسیک. در یک مطالعه، نمونه های سوآپ نازوفارنژیال و گلو جهت تشخیص مایکوپلازما پنومونیه مورد مقایسه قرار گرفته و نتیجه گیری شده که سوآپ گلو از ارزش تشخیصی بالاتری نسبت به سوآپ نازوفارنژ برخوردار است (۲۸). هندا و همکارانش نیز سه نمونه خلط، BAL و سوآپ های گلو را با تکنیک Capillary PCR مقایسه کرده اند و بالاترین جواب مثبت را با نمونه ی سوآپ های گلو گرفته اند (۲۰). در مطالعه ی حاضر نیز از سوآپ گلو به عنوان نمونه استفاده شد.

روش های مختلف استخراج DNA با یا بدون تیمار نمونه توسط محققین مختلف توضیح داده شده است. برخی از این روش های به کار رفته عبارتند از: ۱: رقیق کردن نمونه با سدیم کلراید ۰/۹ درصد، اضافه کردن سدیم دودسیل سولفات (SDS)، استخراج با فنل/کلروفرم و رسوب با استات سدیم و اتانول (۳۳)، ۲: پیش تیمار با پروتیناز K، اضافه کردن فنل/کلروفرم و رسوب با اتانول (۳۴)، ۳: تیمار با اسپوتازیم (Sputazyme) و هضم با پروتیناز K (۲۰)، ۴: انکوباسیون با Chelex و سدیم آزاید (۳۵)، ۵: تیمار با سونیکاسیون (امواج اولتراسوند) و یا جوشاندن (۳۶)، ۶: استخراج با فنل/کلروفرم/ایزوامیل الکل و سپس استخراج با اتر (۳۷) و ۷: استخراج با فنل/کلروفرم و رسوب به وسیله ی

CCU) و در برخی دیگر تعداد سلول یا مقدار DNA مورد استفاده واقع شده و حدود این واحدها هم متغیر تعریف شده است (۶). بنابراین فقدان یک روش ثابت برای ارزیابی متدهای مختلف به کار رفته، مقایسه بین آنها را مشکل کرده است. در نتیجه، نیاز به یک روش استاندارد و حساس جهت ارزیابی روش‌های مختلف، کاملاً احساس می‌شود. با وجود مراقبت‌های زیاد و فضا سازی مناسب جهت تکنیک‌های تکثیری هم چون PCR، باز امکان آلودگی با DNA در سیستم تشخیص مولکولی وجود دارد که در نتیجه باعث پاسخ مثبت کاذب می‌گردد. بنابراین کاربست کنترل‌های مناسب (کنترل مثبت، منفی و یا نوعاً کنترل درونی) در مراحل مختلف استخراج DNA، تکثیر و مرحله‌ی تشخیص، کمک شایانی به کاهش آلودگی و نشان دادن آن می‌نماید (۷، ۸).

مقایسه‌های بین لابراتواری نیازمند کنترل کیفی در تکنیک‌های تکثیر اسیدنوکلیک در شرایط آزمایشگاه می‌باشد. هدف مطالعه‌ی اورسی (۳۹) در سال ۲۰۰۳، ارزیابی کارایی چهار سنجش متفاوت در شناسایی مایکوپلازما پنومونیه به وسیله‌ی PCR در سه لابراتوار از طریق بررسی DNA استخراجی از نمونه‌های تنفسی بود. نتایج مثبت کاذب PCR در همه‌ی سه لابراتوار شرکت کننده در این مطالعه، ثبت گردید. در مطالعه دیگری که به وسیله یون (۳۸) انجام شد آلودگی و نتایج مثبت کاذب به تکرار مشاهده گردید. این آلودگی‌ها عمدتاً ناشی از نمونه‌های به شدت مثبت و همین‌طور نمونه‌های PCR مثبت قبلی بوده است. ابل - هورن (۳۲) به کارگیری تکنیک Nested-PCR را همراه با افزایش حساسیت و ویژگی و همین‌طور ریسک بیشتر آلودگی دانست. برای حل مشکل آلودگی، فضا سازی مناسب امری ضروری است که باعث کاهش نتایج مثبت کاذب می‌گردد. در این بررسی سعی شد با فضا سازی مناسب و به کارگیری تجهیزات مقتضی هر بخش،

استات سدیم یا سدیم کلراید (۱۶). در مطالعه‌ی حاضر از روش جوشاندن ساده در مورد نمونه‌های بالینی با نتایج مطلوب استفاده گردید. روش‌های استخراج با استفاده از کیت‌های تجارتي توسط محققینی مانند گنارپ (۲۸)، تانگ (۳۱) و گروندهال (۳۳) استفاده شده است. مطالعاتی که در آن، به مقایسه‌ی روش‌های مختلف استخراج DNA مایکوپلازما پنومونیه در تشخیص مولکولی پرداخته‌اند نادر است (۳۲). بر اساس نتایج ابل - هورن، تکنیک استخراج DNA با فنل/کلروفرم مستلزم صرف زمان زیاد و کاهش حساسیت است و همین‌طور بر اساس نتایج حاصله از تحقیق یون (۳۸)، روش یخ زدن/جوشاندن جهت تهیه‌ی DNA مایکوپلازما پنومونیه پیشنهاد گردیده است.

بخش‌های مختلفی از ژنوم مایکوپلازما پنومونیه مانند ژن S rRNA ۱۶ (۹، ۱۶، ۱۹)، ژن P1 Adhesin (۴۱-۳۹)، ژن tuf (۲۳) جهت تعیین هویت آن به وسیله‌ی PCR و تحت پروتکل‌ها و تکنیک‌های مختلف، مورد استفاده واقع شده است. در مطالعه‌ی یون (۳۸)، پرایمرهای ژن P1 Adhesin حساس‌تر از پرایمرهای 16 S rRNA ارزیابی شده است که شاید علت این امر وجود کپی‌های متعدد ژن P1-Cytadhesin باشد. در این مطالعه هم به دلیل ویژه بودن و همین‌طور توالی ثابت ژن P1، از آن به عنوان هدف تکثیر استفاده گردید. مقایسه‌ی روش‌های مختلف PCR به دلایل:

- ۱: اختلاف در جمع آوری نمونه، ۲: در روش‌های استخراج،
- ۳: حجم نمونه، ۴: ژن هدف، ۵: پرایمر، ۶: پارامترهای سیکل حرارتی، ۷: روش شناسایی، و ۸: اختلاف در انتقال نمونه‌ها، دارای مشکلات خاص خود می‌باشد. به علاوه، اختلافات زیادی در واحدهای به کار رفته در اندازه‌گیری حدود حساسیت روش‌ها، به چشم می‌خورد. به این معنی که در برخی مطالعات، واحد سازنده‌ی کلنی (CFU)، در برخی واحد تغییر رنگ (Color Changing Units)



ریسک آلودگی و خصوصاً مثبت‌های کاذب را با توجه به کنترل‌های مثبت و منفی به صفر نزدیک کنیم.

### تقدیر و تشکر

از خانم فاطمه اخلاقی، دکتر محسن لطفی و خانم سهیلا مرادی از موسسه رازی بخش مدیریت کنترل کیفی و میکروبی‌شناسی برای در اختیار گذاشتن سوش‌های مایکوپلازما، آقای دکتر کورش کمالی جهت مشاوره‌های آماری (دستیار تخصصی گروه اپیدمیولوژی و آمار زیستی دانشگاه علوم پزشکی تهران)، از دکتر سیروس زینلی (معاون پژوهشی پاستور) جهت مشاوره و کمک‌های علمی، دکتر شکرآ... محمدی محمودآبادی (بیمارستان میلاد) جهت تهیه‌ی نمونه و آقای سید مهدی تهرانی جهت تایپ و امور کامپیوتر تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

### نتیجه گیری

به‌طور کلی می‌توان گفت روش‌های کلاسیک تشخیصی، به‌دلایل محدودیت‌های ذاتی (صرف وقت زیاد، حساسیت کم، نیاز به مهارت و تجربه زیاد و همین‌طور مراحل دشوار و پرزحمت) فاقد معیارهای یک روش ایده‌آل جهت شناسایی مایکوپلازما پنومونیه است. ولی روش‌های مولکولی هم‌چون روش‌های تکثیر اسیدنوکلیک در شرایط آزمایشگاه، به دلیل پتانسیل بالقوه و بالفعل، کاربرد فراوانی در تشخیص عواملی هم‌چون مایکوپلازماها دارند. نتایج این مطالعه به‌طور روشنی دلالت بر این نکته دارد که سنجش PCR بر مبنای سکانس‌های ژن P1 یک تکنیک ارزشمند و قابل اعتماد جهت شناسایی مایکوپلازما پنومونیه در بیماری‌های تنفسی است.

### منابع

- 1- Waiters KB, Talkington DF. Mycoplasma pneumoniae and its role as a human pathogen. *Clin Microbiol Rev.* 2004; 17(4): 697- 728.
- 2- Clyde W, Jr A. Clinical overview of typical Mycoplasma pneumoniae infections. *Clin Infect Dis.* 1993; 17(suppl.1): S32- S6.
- 3- Jacobs E. Mycoplasma infections of the human respiratory tract. *Wien Klin Wochenschr.* 1997; 109: 574- 7.
- 4- Layani-Milon MP, Gras I, Valette M, Luciani J, Stagnara J, Aymard M. Incidence of upper respiratory tract Mycoplasma pneumoniae infections among outpatients in Rhone-Alpes, France, during five successive winter periods. *J Clin Microbiol.* 1999; 37: 1721- 6.
- 5- McMillan JA. Mycoplasma pneumoniae infection in pediatrics. *Semin Pediatr Infect Dis.* 1998; 9: 112- 9.
- 6- Ioens K, Uris D, Goossens H, Ieven M. Molecular diagnosis of Mycoplasma pneumoniae respiratory tract infections. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 4915- 23.

۷- شاه حسینی محمد حسن. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز. چاپ اول. تهران: دانشگاه آزاد اسلامی، ۱۳۸۴، صفحات ۲۵-۱.

۸- شاه حسینی محمد حسن. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز. چاپ اول. تهران: دانشگاه آزاد اسلامی، ۱۳۸۴، صفحات ۱۰۱-۹۳.

- 9- Van-kuppeveld FJ, Van-der-logt JT, Angulo AF, et al. Genus- and species-specific identification of Mycoplasmas by 16S rRNA amplification. *Appl Environ Microbiol.* 1992; 58: 2606- 15.
- 10- Yamazaki T, Narita M, Sasaki N, Kenri T, Arakawa Y, Sasaki T. Comparison of PCR for sputum samples obtained by induced cough and serological tests for diagnosis of Mycoplasma pneumoniae infection in children. *Clin Vac Immunol.* 2006; 13(6): 708-10.
- 11- Pitcher D, Chalker VJ, Sheppard C, George RC, Harrison TG. Real-time detection of Mycoplasma pneumoniae in respiratory samples with an internal processing control. *J Med Microbiol.* 2006; 55: 149-55.
- 12- Dumke R, Luck PC, Noppen C, Schaefer C, Baum HV, Marre R, Jacobes E. Culture-independent molecular subtyping of Mycoplasma pneumoniae in clinical samples. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(7): 2567-70.
- 13- Morozumi M, Nakayama E, Iwata S, Aoki Y, Hasegawa K, Kobayashi R. Simultaneous detection of pathogens in clinical samples from patients with community-acquired pneumonia by real-time PCR with pathogen specific molecular beacon probes. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(4): 1440-6.
- 14- Beersma MFC, Dirven K, Dam AP, Templeton KE, Claas ECJ, Goossens H. Evaluation of 12 commercial tests and the complement fixation test for Mycoplasma pneumoniae-specific immunoglobulin G(IgG) and IgM antibodies, with PCR used as the gold standard. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(5): 2277-85.
- 15- Shuvy M, Rav-Acha M, Izhar U, Ron M, Nir-Paz R. Massive empyema caused by Mycoplasma pneumoniae in an adult; a case report. *BMC Infect Dis.* 2006; 6(18): 1- 4.
- 16- Falguera M, Nogues A, Ruiz-Gonzales A, Garcia M, Puig T. Detection of Mycoplasma pneumoniae by Polymerase chain reaction in lung aspirates from patients with community-acquired pneumonia. *Chest.* 1996; 110: 972- 6.
- 17- Khanna M, Fan J, Pehler-Harrington K, Waters C, Douglass P. The pneumoplex assays, a multiplex PCR-enzyme hybridization assay that allows simultaneous detection of five organisms, Mycoplasma pneumonia, Chlamydia(Chlamydophila) pneumoniae, Legionella pneumophila, legionella micdadei, and Bordetella pertussis, and its real-time counterpart. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(2): 565- 71.
- 18- Ginevra C, Barranger C, Ros A, et al. Development and evaluation of Chlamylege, a new commercial test allowing simultaneous detection and identification of Legionella, Chlamydophila pneumoniae, and Mycoplasma pneumoniae in clinical respiratory specimens by multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(7): 3247-54.

- 19- Loens K, Ursi D, Ieven M, et al. Detection of Mycoplasma pneumoniae in spiked clinical samples by nucleic acid sequence based amplification. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 1339-45.
- 20- Honda J, Yano T, Kusaba M, et al. Clinical use of capillary PCR to diagnosis Mycoplasma pneumoniae. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 1382- 4.
- 21- Welti M, Jatou K, Altwegg M, Sahli R, Wenger A, Bille J. Development of a multiplex real time quantitative PCR assay to detect Chlamydia pneumoniae, Legionella pneumophila and Mycoplasma pneumoniae in respiratory tract specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2003; 45: 85-95.
- 22- Waring AL, Halse TA, Csiza CK, Carlyn CJ, Arruda-Musser K, Limburger RJ. Development of a genomic-based PCR assay for detection of Mycoplasma pneumoniae in a large outbreak in New York state. *J Clin Microbiol* 2001. 39: 1385- 90.
- 23- Nour M, Trabelsi A, Maatouk N, Hammami M. Amplification of P1 and 16S rRNA genes by nested PCR for detection of Mycoplasma pneumoniae in paediatric patients. *Pathol Biol.* 2005; 53: 9- 14.
- 24- Miyashita N, Saito A, Kohno S, et al. Multiplex PCR for the simultaneous detection of Chlamydia pneumoniae, Mycoplasma pneumoniae and Legionella pneumoniae in community-acquired pneumonia. CAP Study Group. *Respir Med.* 2004; 98: 542- 50.
- 25- Luneberg E, Jensen JS, Frosch M. Detection of Mycoplasma pneumoniae by polymerase chain reaction and nonradioactive hybridization in microtitre plate. *J Clin Microbiol.* 1993; 31: 1088-94.
- 26- Svenstrup HF, Nielsen PK, Drasbek M, Birkelund S, Christiansen G. Adhesin and inhibition assay of Mycoplasma genitalium and M. pneumoniae by immunofluorescence microscopy. *J Med Microbiol.* 2002; 51: 361- 73.
- 27- Su CJ, Tryon VV, Baseman JB. Cloning and sequence analysis of cytoadhesin P1 gene from Mycoplasma pneumoniae. *Infect Immun.* 1987; 55: 3023-3029.
- 28- Gnarp J, Lunback A, Sundelof B. Comparison of nasopharyngeal and throat swabs for the detection of Chlamydia pneumoniae and Mycoplasma pneumoniae by polymerase chain reaction. *Scan J Infect Dis.* 1997; Suppl 104: 11-12.
- 29- Sharma S, Brousseau R, Kasatiya S. Detection and confirmation of Mycoplasma pneumoniae in urogenital specimens by PCR. *J Clin Microbiol.* 1998; 36(1): 277-80.
- 30- Cadieux N, Lebek P, Brousseau R. Use of triplex polymerase chain reaction for the detection and differentiation of Mycoplasma pneumoniae and Mycoplasma genitalium in the presence of human DNA. *J Gen Microbiol.* 1993; 139: 2431-7.
- 31- Tong CYW, Donnelly C, Harvey G, Stillis M. Multiplex polymerase chain reaction for the simultaneous detection of Mycoplasma pneumoniae and Chlamydia psittaci in respiratory samples. *J Clin Pathol.* 1999; 52: 257-63.

- 32- Abele-Horn M, Busch U, Nitschko H, et al. Molecular approaches to diagnosis of pulmonary diseases due to *Mycoplasma pneumoniae*. *J Clin Microbiol.* 1998; 36: 548-51.
- 33- Grondhal B, Puppe W, Kuhne I, Weigl JA, Schmitt HJ. Rapid identification of nine microorganisms causing acute respiratory tract infections by single tube multiplex reverse transcription PCR: feasibility study. *J Clin Microbiol.* 1999; 37: 1-7.
- 34- Corsaro D, Valassina M, Venditti D, Venard V, Le Faou A, Valensin PE. Multiplex PCR for rapid and differential diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in respiratory infections. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1999; 35: 105-8.
- 35- Kessler HH, Dodge DE, Pierer K, et al. Rapid detection of *Mycoplasma pneumoniae* by an assay based on PCR and probe hybridization in a nonradioactive microwell plate format. *J Clin Microbiol.* 1997; 35: 1592-94.
- 36- Buck GE, OHára LC, Summersgill JT. Rapid, sensitive detection of *Mycoplasma pneumoniae* in simulated clinical specimens by DNA amplification. *J Clin Microbiol.* 1992; 30: 3280-3.
- 37- Waries ME, Toikka P, Saarinen T, et al. Diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in children. *J Clin Microbiol.* 1998; 36: 3155-9.
- 38-Ieven M, Ursi D, Van Bever H, Quint W, Niesters HG, Goossens H. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* by two polymerase chain reactions and role of *M.pneumoniae* in acute respiratory tract infections in pediatric patients. *J Infect Dis.* 1996; 173: 1445-52.
- 39- Ursi D, Ieven M, Noordhoek GT, Ritzler M, Zandleven H, Altwegg M. An interlaboratory comparison for the detection of *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory samples by the polymerase chain reaction. *J Microbiol Methods.* 2003; 53: 289-94.
- 40- Leng Z, Kenny GE, Roberts MC. Evaluation of the detection limits of PCR for identification of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical samples. *Mol Cell Probes.* 1994; 8: 125-30.
- 41- De Barbeyrac B, Bernet-Poggi C, Febrer F, Renaudin H, Dupon M, Bebear C. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* and *mycoplasma genitalium* in clinical samples by polymerase chain reaction. *Clin Infect Dis.* 1993; 17(Suppl. 1): S83-9.