مقاله اصیل پژوهشی

بررسی ارزش روش Polymerase Chain Reaction خون در تشخیص سل ریوی

علی‌اکبر حیدری[1]، محمدجواد قبولی[2]، کیارش قزوینی[3]، مریم مجتبوی[4]

چکیده

زمینه و هدف: کشت و رنگ‌آمیزی‌های زیل‌نلسون و فلوئورسنت، روش‌های استاندارد تشخیص سل هستند. وقت‌گیر بودن و گاه دقت پایین آنها مطرح‌کننده نیاز به روش‌های تشخیصی سریع‌تر و دقیق‌تر می‌باشد؛ روش‌هایی که بتوانند در موارد عدم دسترسی به نمونه مناسب جهت اسمیر و کشت، جایگزین اقدامات تهاجمی گردند و علاوه بر آسان و سریع‌بودن، دقت تشخیصی قابل قبول داشته باشند. هدف از این مطالعه، بررسی ارزش تشخیصی روش *Polymerase Chain Reaction (PCR)* خون در سل ریوی می‌باشد.

روش تحقیق: این مطالعه روایی یک روش تشخیصی، بر روی ۶۴ بیمار مبتلا به سل ریوی اثبات شده (بر اساس معیارهای پروتکل ملی سل) و ۲۸ فرد کاملاً سالم انجام گرفت. از تمام این افراد ۴/۵ میلی‌لیتر خون تهیه و با ۰/۵ میلی‌لیتر *EDTA* مخلوط گردید. آزمایش *PCR* پس از *DNA Extraction* با استفاده از پرایمر *SI 6110* انجام شد.

یافته‌ها: میانگین سنی گروه مورد، ۱۸/۶±۴۹/۸ و در گروه شاهد ۱۸/۵±۴۸/۲ بود و از این افراد به ترتیب ۴۸/۴٪ در گروه مورد و ۲۵٪ در گروه شاهد مرد بودند. *PCR* خون در ۲۳ بیمار مبتلا به سل ریوی، مثبت گزارش شد؛ اما هیچکدام از افراد گروه شاهد، *PCR* مثبت نداشتند که حساسیت ۳۵/۷٪ و ویژگی ۱۰۰٪ برای این آزمایش محاسبه می‌گردد.

نتیجه‌گیری: با در نظر گرفتن ویژگی ۱۰۰٪ *PCR* (علی‌رغم حساسیت کم)، در شرایطی که دسترسی به یک نمونه مناسب وجود ندارد، *PCR* مثبت خون نیاز به انجام اقدامات تهاجمی را برطرف می‌کند و با قطعی‌شدن سریع تشخیص و درمان زودرس، بیمار نجات می‌یابد.

واژه‌های کلیدی: سل، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، *PCR*، حساسیت، ویژگی

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. ۱۳۹۱؛ ۱۹(۱): ۳۴-۴۳

دریافت: ۱۳۸۹/۰۹/۲۷ پذیرش: ۱۳۹۰/۱۰/۲۰

[1] نویسنده مسؤول، دانشیار، بخش عفونی، بیمارستان امام رضا (ع)، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ایران
آدرس پستی: مشهد، سناباد ۲۹، پلاک ۲۷۲- کدپستی: ۹۱۸۳۶۷۷۷۴۶
تلفن: ۸۵۱۵۰۰۱ نمابر: ۸۴۱۲۳۵۱ پست الکترونیکی: *heydariaa@mums.ac.ir*
[2] استادیار، بخش عفونی، بیمارستان امام رضا(ع)، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ایران
[3] استادیار، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ایران
[4] متخصص بیماری‌های عفونی، بیمارستان سوانح طالقانی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ایران

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

سل از شایع‌ترین بیماری‌های عفونی انسان است که به عنوان یکی از بزرگترین قاتلین انسان‌ها در طول تاریخ شناخته می‌شود. در حال حاضر، بیش از ۲۰ میلیون نفر به بیماری سل مبتلا هستند (۱) که ۹۰٪ این موارد، به کشورهای در حال توسعه تعلق دارند. شیوع سل در ایران، بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی در ژوئن ۲۰۰۵، ۳۷ در هزار می‌باشد (۲).

رنگ‌آمیزی اسمیر و کشت نمونه خلط، قدم اول در بررسی بیمار مشکوک به سل ریوی محسوب می‌شوند. مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، ارگانیسمی با رشد آهسته است که کشت آن به ۳ تا ۸ هفته زمان نیاز دارد و استفاده از تکنیک‌های مدرن کشت، این زمان را تنها به ۹ تا ۱۶ روز کاهش می‌دهد. رنگ‌آمیزی فلوئورسنت نمونه‌های بالینی، از دیگر روش‌های استاندارد تشخیص است.

وقت‌گیر بودن این روش‌ها (۳ تا ۸ هفته برای کشت) و در مواردی دقت پایین آنها (به ویژه در روش های رنگ‌آمیزی که نتیجه، کاملاً وابسته به فرد می‌باشد)، مطرح‌کننده نیاز به روش‌هایی سریع‌تر و دقیق‌تر است. بعلاوه، با شیوع عفونت *HIV*، استفاده گسترده از استروئیدها و سایر داروهای سرکوب‌کننده ایمنی و افزایش تعداد گیرندگان پیوند و نقص ایمنی حاصل از این بیماری‌ها و روش‌های درمانی، موارد سل ریوی اسمیر–منفی و سل خارج ریوی افزایش یافته است و نسبت قابل توجهی از این بیماران در زمان مراجعه بسیار بدحال بوده؛ بیماری در آنان به سرعت پیشرفت می‌کند. با توجه به سیر بیماری در این افراد و لزوم ایزولاسیون سریع‌تر و حتی طولانی‌تر این بیماران، لازم است تشخیص قطعی بیماری در زمان کوتاهی داده شده؛ درمان مناسب آن به سرعت آغاز گردد چرا که شروع زودرس درمان در این گروه، نه تنها نجات‌دهنده حیات آنان است که از سرایت بیماری به اطرافیان آنان و پرسنل مراقبت‌کننده نیز جلوگیری می‌نماید. علاوه بر این، با در نظر گرفتن مواردی که به دست آوردن نمونه جهت اسمیر و کشت مستلزم انجام اقدامات تهاجمی است (سل ریوی اسمیر–منفی) و یا شرایطی که امکان دستیابی به نمونه تشخیصی کمتر است (نظیر سل منتشر) و یا وضعیت بالینی بیمار اجازه انجام روش‌های تهاجمی را نمی‌دهد (نظیر بیماران دچار کاهش سطح هوشیاری)، بهره‌مندی از یک روش آسان و سریع که نیاز به روش‌های خاص یا تهاجمی نمونه‌گیری نداشته، در عین حال دقت تشخیصی قابل قبولی داشته باشد ضروری به نظر می‌رسد.

در سال‌های اخیر، تشخیص مولکولی به روش‌های تقویت اسیدهای نوکلئیک[1] که تحت عنوان *PCR* شناخته می‌شوند، جایگزین روش‌های تشخیصی قدیمی شده است. هدف اصلی این روش‌ها، تعیین یک قطعه *DNA* اختصاصی در ارگانیسم‌های مختلف می‌باشد که به روش *PCR* تکثیر یافته و به عنوان محصول *PCR* مورد شناسایی قرار می‌گیرد. در این روش‌ها قادر به شناسایی تعداد بسیار اندک میکروارگانیسم (کمتر از ۱۰ میکروارگانیسم، در مقایسه با حداقل ۱۰،۰۰۰ میکروارگانیسم برای مثبت‌شدن اسمیر خلط) در نمونه‌های بالینی می‌باشد. مزیت دیگر این روش، آماده‌شدن سریع نتایج آن، طی چند ساعت (در مقایسه با چند روز تا چند هفته برای اسمیر و کشت) است. با این وجود، حساسیت *PCR*، کمتر از کشت است و هزینه انجام آن نیز بالاست. در مورد نمونه‌های تنفسی، حساسیت این روش‌ها مابین میزان رنگ‌آمیزی اسید–فاست و کشت می‌باشد؛ به طوری که در مورد نمونه‌های اسمیر مثبت، حساسیت و ویژگی آن به ۹۵٪ می‌رسد؛ در حالی که این مقادیر برای موارد اسمیر منفی به ترتیب ۴۰ تا ۷۷ درصد و بیش از ۹۵٪ است (۳).

با توجه به نکات ذکر شده و در نظر گرفتن این واقعیت که خون‌گیری از بیماران یک روش بدون خطر است و به طور معمول برای تمام افراد بستری شده انجام می‌شود. این روش می‌تواند وسیله تشخیصی مناسبی برای بیماران مشکوک به سل نیز باشد. هدف از این مطالعه، بررسی ارزش تشخیصی

[1] *Rapid Nucleic Acid Amplification Tests (RNAAT)*

Archive of SID
www.SID.ir

PCR نمونه‌های خون به منظور شناسایی شواهد حضور مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در خون افراد مبتلا به سل ریوی و خارج ریوی است.

روش تحقیق

این مطالعه روایی یک روش تشخیصی، در درمانگاه سل و بخش عفونی بیمارستان امام رضا(ع) مشهد و آزمایشگاه میکروب‌شناسی بیمارستان قائم(عج) انجام شده، شامل ۶۴ بیمار سرپایی و بستری مبتلا به سل اثبات شده و ۲۸ فرد کاملاً سالم می‌باشد. با توجه به اهداف مطالعه، از روش نمونه‌گیری مبتنی بر هدف برای جمع‌آوری نمونه‌ها استفاده شده است. ۶۴ بیماری که طی مهرماه ۱۳۸۷ لغایت فروردین ماه ۱۳۸۸، به طور متوالی به درمانگاه سل بیمارستان امام رضا(ع) مشهد مراجعه کردند یا با تشخیص سل ریوی در بخش بیماری‌های عفونی بیمارستان امام رضا(ع) مشهد بستری شدند، به عنوان گروه بیماران، تحت بررسی قرار گرفتند. گروه افراد سالم نیز به طور متوالی از میان بیماران سرپایی که در فروردین ماه ۱۳۸۸ با تشخیصی بجز بیماری‌های عفونی به آزمایشگاه کلینیک ویژه بیمارستان امام رضا(ع) مشهد مراجعه کرده بودند، انتخاب شدند.

معیارهای ورود به مطالعه برای گروه بیماران مبتلا به سل ریوی، تشخیص قطعی سل ریوی بر اساس معیارهای ذکر شده در پروتکل کشوری مبارزه با سل بوده است (۱):
۱- دو نوبت اسمیر خلط مثبت. ۲- یک نوبت اسمیر خلط مثبت بعلاوه رادیوگرافی قفسه سینه منطبق با سل ریوی (در مبتلایان به سل ریوی). ۳- کشت مثبت نمونه بالینی. ۴- مشاهده مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در اسمیر مایع یا بافت در هیستوپاتولوژی و یا مشاهده گرانولوم با نکروز کازئوز (در سل خارج ریوی)
گروه افراد سالم نیز بر اساس این معیارها انتخاب شدند: از کارکنان بهداشتی نباشند، سابقه ابتلا به سل نداشته باشند، و اطرافیان و خانواده آنان نیز به سل مبتلا نشده باشند. کلیه افراد نیز پس ارائه توضیحات کامل در مورد اهداف و ویژگی‌های طرح تحقیقاتی و اخذ رضایت کتبی از آنان، همانند گروه مورد، ۴/۵ میلی‌لیتر خون تهیه و با ۰/۵ میلی‌لیتر EDTA مخلوط شد.

پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه، از کیت آماده مصرف (Qiamp DNA Mini kit; QiagenGmbH, QIAGEN Hilden, Germany) که برای تخلیص DNA با وزن مولکولی بالا از خون و سایر نمونه‌های بالینی مناسب است، به منظور استخراج ژنوم استفاده شد. پس از لیزکردن نمونه‌ها و دناتوره‌کردن پروتئین‌های متفرقه به وسیله بافر مناسب و پس از اضافه‌کردن Proteinase K(QIAGEN Protease)، نمونه‌ها در دمای ۵۶ درجه انکوبه شدند؛ Lysateها به داخل QIAGEN Genomic-tips بارگیری شدند و در زمانی که سایر اجزای سلولی از محیط خارج می‌شدند، DNA به ستون باند شد. نمونه به دست آمده مجدداً شستشو داده شد تا سایر اجزای باقیمانده نیز از محیط خارج شوند. DNA با وزن مولکولی بالا که پس از طی مراحل ذکر شده به دست آمده بود، پس از اضافه کردن ایزوپروپانول سرد برای ۵ دقیقه با ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. سوپرناتانت ایجاد شده، از محیط حذف و Template DNA با اتانول سرد ۷۰٪ شستشو داده شد. DNA مجدداً سانتریفوژ شد؛ اتانول ۷۰٪ خارج گردید و پلت در مجاورت هوا خشک شد. پلت DNA در ۵۰ میکرولیتر بافر Tris-EDTA (TE) حل شد. برای انجام یک دوره فرایند فوق تقریباً ۱۵۰ دقیقه زمان سپری شد.

نمونه‌های حاصل در حجم واکنش ۲۵ میکرولیتر شامل: یک میکرولیتر از محلول dNTP ۱۰mM (Boehringer Mannheim Corp, USA) و یک میکرولیتر از محلول ۲۰pM از هر پرایمر (Isogen Life Science, Maarssen, The Netherlands)، ۰/۲۵ میکرولیتر از Taq U Polymerase (Fermentase)، ۵/۱ میکرولیتر از ۲۵mM MgCl2، ۵/۲ میکرولیتر از بافر PCR۱۰X و ۲ میکرولیتر از

www.SID.ir
Archive of SID

DNA template و بقیه حجم آب مقطر به وسیله *PCR* بسط داده شدند. پارامترهای تکثیر[1] شامل تقلیب اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه است که به دنبال آن ۴۰ سیکل، هر یک شامل تقلیب در ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، اتصال در ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و طویل‌سازی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۴۵ ثانیه انجام می‌شود. جهت تکثیر از دستگاه ترموسایکلر گرادیان *(Touchgene, Gradient)* استفاده گردید. محصولات بسط‌یافته نهایی با استفاده از الکتروفورز ژل *(Padideh Nojan Pars, Iran)* (به وسیله ژل آگاروز ۱/۵٪ و اتیدیوم بروماید *(Sigma)*) شناسایی شدند.

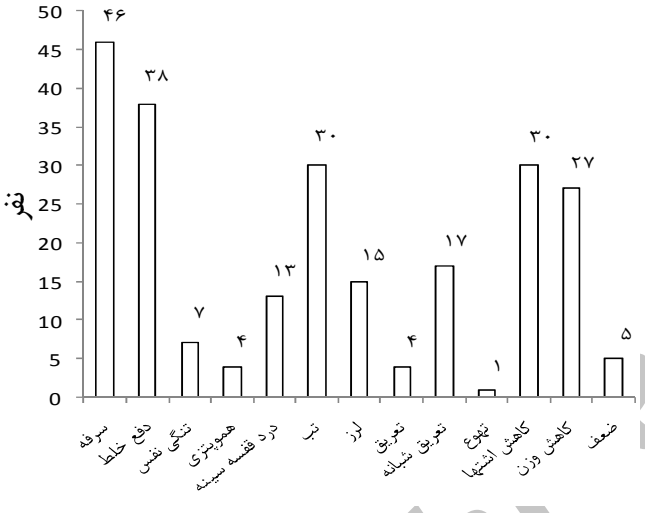
جهت تحلیل آماری اطلاعات به دست آمده (شامل ویژگی‌های جمعیت‌شناختی، بالینی و نتایج مربوط به *PCR* خون) از آمار توصیفی استفاده شد.

یافته‌ها

از ۶۴ بیمار مبتلا به سل، ۴۸/۴٪ مذکر و ۵۱/۶٪ مؤنث بودند (به ترتیب ۳۱ و ۳۳ بیمار) و میانگین سنی آنان، ۱۸/۶±۴۹/۸ سال (محدوده سنی ۲۲ تا ۸۴ سال) بود. ۳۵ بیمار، ملیت خود را اعلام کردند که ۷۷/۱٪ آنان ایرانی و ۳۲/۹٪ آنان افغانی بودند. میانگین سنی بیماران مذکر ۱۶/۴±۴۹/۱ (محدوده سنی ۲۵ تا ۷۲ سال) و میانگین سنی بیماران مؤنث ۲۰/۵±۵۱/۹ (محدوده سنی ۲۲ تا ۸۴ سال) بود. ۳۷/۵٪ بیماران، مذکر و ۱۰/۵٪ بیماران مؤنث افغانی بودند.

علائم ذکر شده توسط این بیماران (نمودار ۱) شامل این موارد بود: سرفه (۸۸/۵٪)، دفع خلط (۷۳/۱٪)، تب (۵۵/۷٪)، کاهش اشتها (۵۵/۷٪)، کاهش وزن (۵۱/۹٪)، تعریق شبانه (۳۲/۷٪)، لرز (۲۸/۹٪)، درد قفسه سینه (۲۵/۰٪)، تنگی نفس (۱۷/۵٪)، ضعف و بی حالی (۹/۶٪)، تعریق (۷/۷٪)، هموپتزی (۷/۷٪) و تهوع (۱/۹٪).

این بیماران قبل از اثبات تشخیص، به طور متوسط ۹۲/۰±۷۹/۵ روز علامت‌دار بودند (از ۷ روز تا یک سال). میانگین دوره علامت‌دار در زنان، ۹۰/۵±۱۰۱/۶ در مردان ۶۲/۳±۸۰/۸ روز بود؛ همچنین در بیماران ایرانی و افغانی، طول مدت این دوره به ترتیب ۸۳/۸±۸۶/۰ (از ۷ روز تا یک سال) و ۵۵/۷±۹۵/۰ (محدوده یک تا ۶ ماه) روز بود. ۲۳/۵٪ بیماران مورد مطالعه، سابقه ابتلا یکی از اطرافیان به سل را ذکر می‌کردند (نمودار ۲).



نمودار ۱- شکایات اصلی بیماران در زمان تشخیص بیماری

نمودار ۲- سابقه تماس با بستگان نزدیک مبتلا به سل

[1] *Amplification Factors*

www.SID.ir

میانگین سنی این بیماران ۱۴/۹±۳۵/۵ و نسبت آن در زنان و مردان برابر بود (۵۰٪). میانگین سنی زنانی که سابقه تماس با بیماری سل را داشتند، ۱۰/۱±۳۲/۸ سال (از ۲۳ تا ۵۲ سال) و در مردان ۱۷/۴±۳۸/۵ سال (از ۲۷ تا ۶۹ سال) بود. این بیماران ۳۶/۸±۵۱/۵ روز (از ۷ تا ۱۲۹ روز) قبل از مراجعه علامت‌دار بوده‌اند. میانگین دوره علامت‌دار بیماری در زنان و مردان این گروه به ترتیب ۲۸/۲±۴۴/۵ (از ۷ تا ۹۰ روز) و ۴۳/۵±۵۹/۸ روز (از ۱۰ تا ۱۲۹) بوده است.

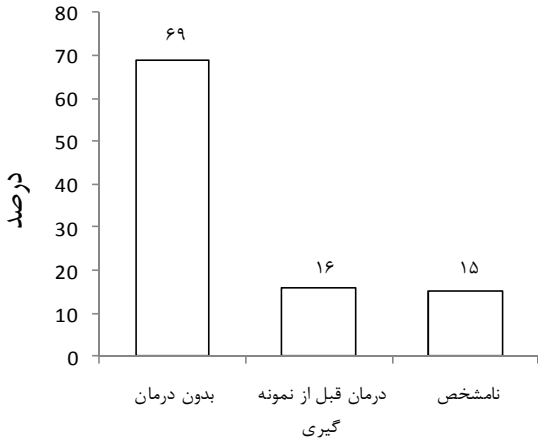
تشخیص سل ریوی در ۹۸/۴٪ موارد (۶۳ بیمار) به وسیله مثبت‌شدن اسمیر خلط و در یک مورد (۱/۶٪ از موارد) به وسیله اسمیر BAL اثبات شده بود.

۱۸/۵٪ بیماران، قبل از نمونه‌گیری جهت انجام تست PCR تحت درمان قرار گرفته بودند و میانگین دوره درمان ۱/۶±۵/۴ (از ۳ تا ۷ روز) بود (نمودار۳). رژیم ۴ دارویی استاندارد (شامل دو ماه ایزونیازید، ریفامپین، پیرازینامید و اتامبوتول و ۴ ماه ایزونیازید و ریفامپین)، درمان تجویزشده در تمام این بیماران بود.

PCR خون در ۳۵/۹٪ بیماران (۲۳ بیمار) مثبت بود. ۷۳/۹٪ این افراد، مؤنث (۱۷ مورد) و ۲۲/۱٪ آنان مذکر (۶ مورد) بودند. متوسط سن در بیمارانی که PCR مثبت داشتند، ۱۸/۸±۴۷/۱ و در افراد با PCR منفی ۱۸/۲±۵۱/۴ سال بود. ۶۵٪ گروهی که PCR منفی و ۹۳/۳٪ گروهی که PCR مثبت داشتند، ایرانی بودند. میانگین دوره بیماری در گروه با PCR مثبت ۱۰۶/۸±۱۰۲/۲ و در گروه با PCR منفی ۶۰/۱±۸۶/۸ بود. سابقه تماس با فرد مبتلا به سل ریوی در ۳۰٪ این بیماران وجود داشت.

چهار بیمار با PCR مثبت (۱۷/۴٪)، قبل از انجام نمونه‌گیری تحت درمان ضدّ سل قرار گرفته بودند و میانگین دوره درمان در آنان ۱/۸±۴/۸ روز (از ۳ تا ۷ روز) بود. در گروه با PCR منفی هم ۱۷/۱٪ از بیماران قبل از نمونه‌گیری داروی ضدّ سل دریافت کرده بودند و میانگین دوره درمان در آنان ۱/۲±۵/۸ روز (از ۴ تا ۷ روز) بود.

گروه شاهد شامل ۲۸ فرد کاملاً سالم، ۷۵/۰٪ مؤنث و ۲۵/۰٪ مذکر و با میانگین سنی ۱۸/۵±۴۸/۲ سال بود. نتیجه PCR خون در تمام افراد این گروه منفی بود. با در نظرگرفتن نتایج PCR در گروه‌های بیماران و افراد سالم، حساسیت و ویژگی PCR خون برای تشخیص سل ریوی به ترتیب ۳۵/۴ و ۱۰۰ درصد می‌باشد.



نمودار ۳- سابقه شروع درمان قبل از انجام نمونه‌گیری (به منظور انجام PCR)

بحث

مطالعاتی که تا به امروز در مورد تعیین ارزش PCR خون در تشخیص سل ریوی و خارج ریوی انجام شده، از نظر کانون درگیری و ویژگی‌های بیماران (ریوی و خارج ریوی، اسمیر مثبت و اسمیر منفی، با ایمنی کارآمد یا دچار نقایص ایمنی مختلف به ویژه $HIV/AIDS$) بسیار ناهمگون هستند. با توجه به نتایج به دست آمده از این مطالعه (حساسیت ۳۵/۴٪ و ویژگی ۱۰۰٪)، حساسیت PCR خون برای تشخیص سل ریوی چندان قابل قبول نیست؛ در حالی که ویژگی ۱۰۰٪ آن یک مزیت عمده، به ویژه در موارد عدم دسترسی به یک نمونه تشخیصی مناسب به شمار می‌رود.

حساسیت PCR خون در تشخیص انواع بالینی سل (سل ریوی، خارج ریوی و منتشر) در مطالعات مختلف از ۲۰ تا ۹۵ درصد گزارش شده است (۴-۵). این مقادیر برای سل ریوی کمتر بوده است (۰ تا ۴۳/۸ درصد) (۶-۷)؛ هرچند در بعضی

www.SID.ir
Archive of SID

موارد مقادیر ۹۳٪ نیز گزارش شده است (۸). با این وجود اغلب این مطالعات، نتایجی مشابه به نتایج حاصل از مطالعه ما را گزارش نموده‌اند. در مطالعه‌ای که در اسپانیا انجام شد (شامل ۵۷ بیمار مشکوک یا مبتلا به سل و ۲۶ فرد سالم به عنوان گروه شاهد)، *PCR* خون در ۴۲٪ از کل بیماران بررسی‌شده (مشکوک به سل؛ موارد اثبات شده سل ریوی، خارج ریوی، یا منتشر) مثبت بوده است؛ ۴۱٪ مبتلایان به سل ریوی *PCR* خون یا ادرار مثبت داشتند (۹). مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۴ در پاکستان انجام شد و شامل ۹۶ بیمار مبتلا به سل ریوی بود، نشان داد که *PCR* در این گروه از بیماران حساسیت ۲۰/۰٪ دارد و ویژگی آن بیشتر از ۹۴/۴٪ نیست (۱۰). البته نکته مهم در مورد این مطالعه پایین‌بودن تعداد موارد اسمیر–مثبت (۳۵/۴٪) و کشت–مثبت (۶۲/۵٪) است که می‌تواند به علت میزان پایین *PCR* مثبت باشد. در مطالعه‌ای که در فرانسه انجام شده و شامل ۹۰ بیمار بستری در بیمارستان بود، *nested-PCR* برای ۲۳ بیمار که دچار سل بودند، انجام گردید. حساسیت *PCR* خون در این بیماران، ۳۰/۴٪ بود؛ اما ویژگی آن، ۹۶٪ در افراد سالم و ۸۳/۶٪ در بیماران بستری گزارش شد. در گروهی که به سل ریوی مبتلا بودند، *PCR* خون فقط در ۲۲/۲٪ موارد مثبت شده بود (۱۱). در مطالعه دیگری که طی سال‌های ۲۰۰۳ تا ۲۰۰۵ در برزیل و با استفاده از روش *nested-PCR* بر روی نمونه‌های خون ۱۲۰ کودک مشکوک به سل (نهفته، ریوی و خارج ریوی) انجام شده بود، حساسیت *PCR* خون برای تشخیص سل ریوی ۱۸/۱۸٪ و برای تشخیص سل خارج ریوی ۵۵/۵۶٪ بود (حساسیت کلی ۲۶/۱۵٪). در این مطالعه، ویژگی *PCR* خون برای تشخیص عفونت سلی ۹۲/۷۳٪ گزارش گردید (۱۲). میزان پایین *PCR* مثبت (که عملاً منعکس‌کننده شیوع و شدت مایکوباکتریمی است) در این بیماران را می‌توان با در نظرگرفتن تفاوت در تکنیک انجام *PCR* و میزان پایین سل ریوی اسمیر– مثبت (۳۵٪ در مقایسه با ۱۰۰٪ بیماران بررسی شده در مطالعه ما) توجیه کرد؛ هرچند طولانی‌تر بودن دوره علامت‌دار قبل از مراجعه، در بیمارانی که در مطالعه ما بررسی شده بودند نیز می‌تواند دلیلی برای بالاتر بودن میزان نتایج مثبت مطالعه ما باشد. در مطالعه دیگری که طی سال‌های ۱۳۸۳–۱۳۸۴ در بیمارستان امام خمینی (ره) تهران، با استفاده از پرایمر *IS 1081* و بر روی ۹۵ بیمار مبتلا به سل ریوی و خارج ریوی انجام شد، حساسیت *PCR* خون به طور کلی ۳۳/۷٪ و برای سل ریوی ۴۴/۱٪ بود. ۷۶/۸٪ از مبتلایان به سل ریوی، اسمیر خلط مثبت داشتند (۱۳). در یک مطالعه که شامل ۴۰ بیمار *HIV* منفی مبتلا به سل ریوی اسمیر–مثبت بود، *PCR* خون محیطی با حساسیت، ویژگی و دقت به ترتیب ۴۰، ۱۰۰ و ۶۰ درصد همراه بود (۱۴). در مطالعه دیگری که با استفاده از پرایمر *IS 1081* در سال ۱۹۹۸ در مؤسسه تحقیقات ملی کارنال هند انجام شده و شامل ۱۶ بیمار مبتلا به سل ریوی بود، ۴۳/۸٪ بیماران *PCR* مثبت داشتند. در این مطالعه بیماران دچار نقص ایمنی از جمله مبتلایان به *HIV/AIDS* از مطالعه خارج شده بودند (۱۵). ساختار این مطالعه با توجه به اینکه فقط سل ریوی در بیماران *HIV* منفی را بررسی کرده، مشابه مطالعه ما می‌باشد و میزان بالاتر نتایج *PCR* مثبت را می‌توان با تعداد کم نمونه‌ها توجیه کرد؛ همچنین با در نظر گرفتن این مسئله که مطالعه فوق بدون در نظر گرفتن گروه شاهد انجام شده است، مثبت‌شدن ۴۳/۸٪ *PCR* را نمی‌توان به عنوان حساسیت این تست در نظر گرفت و این نقص نیز با در نظر گرفتن تعداد قابل توجه گروه شاهد در مطالعه ما جبران شده است.

البته در بعضی از مطالعات نسبت مثبت شدن *PCR* بسیار بالا و قابل توجه بوده است. به عنوان مثال، در مطالعه‌ای که در سال ۱۹۹۷ در ایتالیا انجام شده بود، ۲۶ بیمار از ۳۰ بیمار مورد مطالعه *PCR* خون مثبت داشتند (۱۶)؛ همچنین در مطالعه دیگری که نتایج آن در سال ۱۹۹۶ منتشر شد، *PCR* خون در تمام بیماران مبتلا به سل منتشر (صرف نظر از ابتلا به عفونت *HIV*) و تمام بیماران *HIV* مثبت مبتلا به سل

Archive of SID
www.SID.ir

خارج ریوی مثبت بود (۱۷). این نسبت بالای مثبت‌شدن PCR را می‌توان به سوگیری ($Bias$) در انتخاب بیماران مورد مطالعه، حجم اندک نمونه‌ها و یا روش‌های دقیق‌تر انجام PCR نسبت داد. یک مطالعه که در سال ۱۹۹۹ در چین انجام شده و نتایج دو روش $IS\ 6110\ Single\ Tube$ $Nested\ PCR$ و $Amplisensor\text{-}PCR$ را در نمونه‌های خون ۲۰۰ بیمار مبتلا به سل ریوی مقایسه کرده بود، میزان مثبت‌شدن این دو تست به ترتیب ۶۰/۵ و ۶۳/۵ درصد گزارش شد (۱۸). در این مطالعه نیز میزان بالای مثبت‌شدن PCR را می‌توان با حساسیت بیشتر روش $Amplisensor$ و یا بالاتر بودن احتمالی مبتلایان به نقص ایمنی که فرد را مستعد مایکوباکتریمی می‌کند، مرتبط دانست. در مطالعه دیگری که در چین و با استفاده از روش $Triton\ X\text{-}100$ بر روی نمونه خون ۸۹ بیمار مبتلا به سل ریوی اسمیر مثبت انجام شده بود، ۷۳٪ نمونه‌ها PCR مثبت داشتند؛ نویسندگان این مقاله نیز میزان بالای مثبت‌شدن PCR را به روش به کار رفته نسبت داده بودند (۱۹).

در مطالعه‌ای که در دانشگاه نیویورک انجام و از سکانس $IS\ 6110$ استفاده شده بود، تشخیص سل در ۲۶ بیمار (۶۳٪ موارد) که اسمیر خلط آنها منفی بود، به وسیله PCR قطعی شد؛ اما در پیگیری‌های بعدی تشخیص نهایی در ۵ نفر از این بیمارن سل نبود و تشخیص سل در ۲ بیمار از ۴۴ بیماری که PCR منفی داشتند به اثبات رسید (منفی کاذب) (۲۰). در بررسی ما، معیار ورود به مطالعه داشتن نمونه بالینی مثبت از نظر سل بود (اسمیر مثبت خلط در ۶۳ بیمار و اسمیر مثبت BAL در یک مورد) و موارد مشکوک یا آنها که بر اساس تشخیص بالینی بیماری سل برای آنها مطرح شده بود، از مطالعه حذف شدند؛ همچنین در انتخاب گروه شاهد سعی شد احتمال ابتلا به سل یا تماس نزدیک با فرد مبتلا به حداقل برسد. تمامی این تلاش‌ها به منظور به حداقل رساندن موارد مثبت یا منفی کاذب، به منظور افزایش دقت تشخیصی PCR بود.

با توجه به نتایج به دست آمده از این مطالعه (حساسیت ۳۵/۴٪ و ویژگی ۱۰۰٪) در بیماران بدحالی که دچار علایم تنفسی هستند، به ویژه بیماران بستری در ICU، این علایم را می‌توان با اتیولوژی‌های مختلف توجیه کرد (سندرم دیسترس تنفسی بالغین ($ARDS$)، ادم حاد ریه، ترومبوامبولی ریه، پنومونی نوزوکومیال یا مرتبط با ونتیلاتور (VAP)، پنومونی‌های فرصت طلب (به‌ویژه در مبتلایان به نقص ایمنی زمینه‌ای یا سل ریوی). با توجه به اینکه گرفتن نمونه خلط در این بیماران امکان‌پذیر نیست و برنکوسکوپی نیز مقدور نمی‌باشد، در صورتی که شک بالینی قوی در مورد سل وجود داشته باشد (بر اساس شواهد اپیدمیولوژیک، سیر بالینی و سابقه طبی بیمار) و نتیجه PCR خون از نظر مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مثبت شود، تشخیص سل در بیمار قطعی شده؛ درمان سل به سرعت آغاز خواهد شد؛ اقدامی که می‌تواند نجات‌دهنده جان بیمار باشد و نیاز به انجام آزمایشات متعدد و گاه گران قیمت را مرتفع سازد؛ همچنین با توجه به اینکه بیماران بدحال دچار علایم تنفسی، اغلب تحت درمان با آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف قرار می‌گیرند و رژیم‌های درمانی تجویز شده نیز به دلیل عدم پاسخ بیمار به طور مکرر تعویض می‌شوند، قطعی‌شدن تشخیص سل ریوی و قطع رژیم‌های آنتی‌بیوتیکی (در صورت امکان و عدم ضرورت ادامه تجویز به یک دلیل دیگر) می‌تواند سبب محدود شدن مصرف آنتی‌بیوتیک و جلوگیری از ظهور سویه‌های مقاوم به دارو گردد.

نتیجه‌گیری

با در نظر گرفتن ویژگی ۱۰۰٪ PCR (علی‌رغم حساسیت کم)، در شرایطی که دسترسی به یک نمونه مناسب وجود ندارد، PCR مثبت خون نیاز به انجام اقدامات تهاجمی را برطرف می‌کند. همچنین، در شرایطی که سل ریوی به عنوان یکی از تشخیص افتراقی‌های مهم مطرح می‌باشد ولی وضعیت بالینی بیمار مطلوب نیست و تشخیص سریع و شروع

www.SID.ir
Archive of SID

درمان مناسب می‌تواند تأثیر قابل توجهی در پیش آگهی بیمار داشته باشد، انجام *PCR* خون می‌تواند با قطعی‌شدن سریع تشخیص و درمان زودرس، بیمار را از مرگ و یا ابتلا به ناتوانی‌های طولانی مدت نجات دهد.

تقدیر و تشکر

این مطالعه نتیجه طرح تحقیقاتی شماره ۸۶۶۵۲ مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد می‌باشد و نویسندگان از حمایت معاونت پژوهشی ان دانشگاه تشکر می‌نمایند.

منابع:

1- National Technical Committee on TB. TB Country Guide. 3rd ed. Tehran: Disease Management Center, Ministry of Health and Medical Education; 1381. pp:5.

2- WHO Report 2005: Global tuberculosis control. Available from: http://www.who.int/globalatlas/predefinedReports.

3- Barnes PF. Rapid diagnostic tests for tuberculosis-progress but not gold standard. Am J Respir Crit Care Med. 1997;155:1497-8.

4- Folgueira L, Delgado R, Palenque E, Aguado JM, Noriega AR. Rapid diagnosis of Mycobacterium tuberculosis bacteremia by PCR. J Clin Microbiol. 1996;34(3):512-5.

5- Condos R, McClune A, Rom WN, Schluger NW. Peripheral-blood-based PCR assay to identify patients with active pulmonary tuberculosis. Lancet. 1996;347(9008):1082-5.

6- Kolk AH, Kox LF, Kuijper S, Richter C. Detection of Mycobacterium tuberculosis in peripheral blood. Lancet. 1994; 344(8923): 694.

7- Ahmed N, Mohanty AK, Mukhopadhyay U, Batish VK, Grover S. PCR-based rapid detection of Mycobacterium tuberculosis in blood from immunocompetent patients with pulmonary tuberculosis. J Clin Microbiol. 1998; 36(10): 3094-5.

8- Gamboa F, Manterola JM, Lonca J, Matas L, Viñado B, Giménez M, et al. Detection and identification of mycobacteria by amplification of RNA and DNA in pretreated blood and bone marrow aspirates by a simple lysis method. J Clin Microbiol. 1997;35(8): 2124-8.

9- Rebollo MJ, San Juan Garrido R, Folgueira D, Palenque E, DÃ-az-Pedroche C, et al. Blood and urine samples as useful sources for the direct detection of tuberculosis by polymerase chain reaction. Diagn Microbiol Infect Dis. 2006;56(2):141-6.

10- Khan MA, Mirza SH, Abbasi SA, Butt T, Anwar M. Peripheral blood-based polymerase chain reaction in diagnosis of pulmonary tuberculosis. J Ayub Med Coll Abbottabad. 2006;18(2): 25-8.

11- Honore S, Vincensini JP, Hocqueloux L, Noguera ME, Farge D, Lagrange P, et al. diagnostic value of a nested polymerase chain reaction assay on peripheral blood mononuclear cells from patients with pulmonary and extra-pulmonary tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis. 2001;5(8):754-62.

12- Lima JF, Montenegro LM, Montenegro Rde A, Cabral MM, Lima AS, Abath FG, et al. Performance of nested PCR in the specific detection of Mycobacterium tuberculosis complex in blood samples of pediatric patients. J Bras Pneumol. 2009 Jul;35(7): 690-7.

13- Hajiabdolbaghi M, Allishah H.A, Rasoolinejad M, Bahador A, Izadi M, Mobaien A.R Peripheral Blood Mononuclear Cell Mycobacterium tuberculosis PCR sensitivity in diagnosis of Tuberculosis Tehran University Medical Journal (TUMJ). 2008;65(11): 6-12.

14- Taci N, Yurdakul AS, Ceyhan I, Berktas MB, Oğretensoy M. Detection of Mycobacterium tuberculosis DNA from peripheral blood in patients with HIV-seronegative and new cases of smear-positive pulmonary tuberculosis by polymerase chain reaction. Respir Med. 2003;97(6):676-81.

Archive of SID

www.SID.ir

15- Leitritz L, Schubert S, Bücherl B, Masch A, Heesemann J, Roggenkamp A. Evaluation of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460TB systems for recovery of mycobacteria from clinical specimens of a university hospital with low incidence of tuberculosis. J Clin Microbiol. 2001; 39(10): 3764-7.

16- Pfyffer GE, Kissling P, Jahn EM, Welscher HM, Salfinger M, Weber R. Diagnostic performance of amplified Mycobacterium tuberculosis direct test with cerebrospinal fluid, other nonrespiratory, and respiratory specimens. J Clin Microbiol. 1996; 34(4):834-41.

17- Piersimoni C, Scarparo C, Piccoli P, Rigon A, Ruggiero G, Nista D, et al. Performance assessment of two commercial amplification assays for direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex from respiratory and extrapulmonary specimens. J Clin Microbiol. 2002v; 40(11): 4138-42.

18- Tan Y, Li Y, Zhang Y. Quantitative detection of Mycobacterium tuberculosis DNA in peripheral blood from patients with pulmonary tuberculosis by AmpliSensor-PCR technique. Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi. 1999;22(8):481-3.

19- Niang-Ndiaye M, Camara T, Cissokho S, Hane AA, Launois P. Value of PCR in the diagnosis of tuberculosis in samples negative by direct examination in HIV+ and HIV- patients. Dakar Med. 1993; 38(2):165-7.

20- Parsons LM, Brosch R, Cole ST, Somoskövi A, Loder A, Bretzel G, et al. Rapid and simple approach for identification of Mycobacterium tuberculosis complex isolates by PCR-based genomic deletion analysis. J Clin Microbiol. 2002;40(7): 2339-45.

Archive of SID

www.SID.ir

Abstract *Original Article*

Evaluation of blood Polymerase Chain Reaction methodin the diagnosis of pulmonary tuberculosis

A.A. Heydari[1], M.J. Ghabooli[2], K. Ghazvini[3], M. Mojtabavi[4]

Background and Aim: *Culture and specific staining (including Zeil-Nelson and fluorescent methods) are standard measures for the diagnosis of tuberculosis (TB). Because these methods are time-consuming and, sometimes, due to their low accuracy faster and more accurate methods are necessitated. Methods, which can substitute invasive procedures, when obtaining smear samples and culture is not possible; and in addition to being simple and fast, they have an acceptable diagnostic accuracy.*

The aim of the present study was to verify the diagnostic value of blood Polymerase Chain Reaction (PCR) method in pulmonary TB.

Materials and Methods: *This case-control study included 64 proven pulmonary TB cases (according to The National TB Protocol) and 28 subjects who were completely healthy. 4.5ml of blood was derived from each participant and then mixed with 0.5ml EDTA. Finally, DNA extraction and PCR testing using SI 6110 primers was performed for all blood samples.*

Results: *Mean age of the cases and controls was 49.8±18.6 and 48.2±18.5, respectively. 49.2% of the cases and 25% of controls were male. Blood PCR in 23 patients with TB was positive, but none of the controls had a positive PCR (thus, sensitivity of 35.7% and specificity of 100%).*

Conclusion: *With regard to specificity of 100% in PCR method (despite its low sensitivity), in conditions where there is no access to an appropriate specimen, a positive blood PCR can obviate invasive procedures and rapid and definitive diagnosis of the disorder and timely treatment of the patient, his life is saved.*

Key Words: *Tuberculosis, Mycobacterium tuberculosis, PCR, Sensitivity, Specificity*

Journal of Birjand University of Medical Sciences. 2012; 19 (1):34-43

Received: Saturday, December 18, 2010 Accepted: Tuesday, January 10, 2012

Archive of SID

[1] *Corresponding Author, Associate professor, Infectious Diseases Department, Imam Reza Hospital, Mashhad University of Medical Sciences, Iran heydariaa@mums.ac.ir*
[2] *Assistant professor, Infectious Diseases Department, Imam Reza Hospital, Mashhad University of Medical Sciences, Iran*
[3] *Assistant professor, Microbiology Research center, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Iran*
[4] *Infectious Diseases Specialist, Taleghani Trauma Hospital, Mashhad University of Medical Sciences, Iran*

www.SID.ir