تعیین میزان حساسیت و ویژگی تست PCR در مقایسه با نتایج کشت در تشخیص عفونت با M. Tuberculosis

دکتر محمد نادری*- دکتر تقی ناصرپور فریور**- دکتر بتول شریفی مود*- دکتر حمیدرضا کوهپایه*- دکترمحمد نبی احمدی***

* استادیار گروه بیماریهای عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان

** استادیار گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان

*** دستیارگروه بیماریهای عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان

چکیده

مقدمه: بیماری سل یکی از قدیمی‌ترین بیماری‌های انسانی است. قبل از ابداع و به‌کارگیری روش‌های مولکولی، به دلیل طولانی‌بودن زمان روش‌های تشخیصی میکروبیولوژیک(کشت، تست های بیوشیمیایی)، تشخیص و شروع درمان بیماری نیاز به تجربه و تیزهوشی بالینی داشت. روش‌های میکروسکوپیک (اسمیر نمونه ها) و کشت نیز هر کدام محدودیت‌های خاص خود را دارند،که ازجمله مسألهٔ رشد آهسته (٤-٨ هفته ای) مایکوباکتریوم ها در محیط کشت می باشد. لذا دستیابی به روش‌های تشخیصی سریع‌ترالزامی به نظر می‌رسد. یکی از این روش های تشخیصی PCR می باشد.

هدف: از آنجا که تاکنون هیچ روش تشخیصی آزمایشگاهی به عنوان جایگزین کشت شناخته نشده است ، این مطالعه به منظور تعیین حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و منفی آزمایش PCR نسبت به کشت انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این بررسی ١٦٩ نمونه از بیماران بیمارستان بوعلی شهر زاهدان که اسمیرمثبت داشتند بر روی محیط لونشتین - جانسون کشت داده شده و پس از انجام ساب کالچر و تست‌های بیوشیمیایی مربوطه نتایج حاصل با نتایج بدست آمده از تست PCR (با هدف IS 6110 و پرایمرهای Drb, Dra) که به طور هم‌زمان روی نمونه ها انجام شده بود،مورد مقایسه قرارگرفت.

نتایج :اطلاعات به دست آمده نشان داد که از ١٦٩ مورد اسمیر مثبت، ١٥٠ مورد کشت مثبت وجود داشت که پس از انجام تست های بیوشیمیایی مربوطه ٨٦ مورد از آنها مایکوباکتریوم توبرکلوزیس تشخیص داده شد. به طورکلی، نتایج حاصل به قرارزیراست: حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و منفی تست PCR دراین مرکز به ترتیب ٪٩١/٨٦ ، ٪٩٦/٨٧ ، ٪٩٧/٥٣و ٪٨٩/٨٥ می باشد.

نتیجه گیری: استفاده از این تست همراه با کشت و تست های بیوشیمیایی بواسطه سرعت زیادتر آن توصیه می گردد.

کلید واژه ها: حساسیت و ویژگی/ عفونت/ میکوباکتریوم توبرکولوزیس / واکنش زنجیره ای پلیمرازی

مقدمه

بیماری سل ازقدیمی‌ترین بیماری‌های باکتریایی شناخته شدهٔ درانسان است. انسان تنها مخزن شناخته شده برای مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می‌باشد(١). این بیماری اغلب ریه ها را درگیر می کند اما می تواند دیگر اعضای بدن را نیز درگیر کند(٢). درحال حاضرشیوع و بروز بیماری سل درکشورهای درحال توسعه و پیشرفته درحال افزایش است به نحوی که از اوایل دههٔ ١٩٩٠ سالانه تقریباً ٣/٥ تا٤ میلیون مورد جدید توبرکلوزیس (اعم از اشکال ریوی و خارج ریوی) به W.H.O گزارش شده که ٪٩٠ آنها از کشورهای درحال توسعه می‌باشد. در این کشورها به دلیل سطح پایین بیماریابی و گزارش‌دهی ناقص ارقام گزارش شده جزئی از کل می‌باشد(٢). از سال ١٩٨٥میزان موارد بیماری سل دراثر بروز بیماری ایدز شروع به افزایش نمود و در اکثرکشورهای جهان ازجمله کشورهای توسعه یافته به معضل بهداشتی تبدیل گردید.

از آنجائی که اساس مبارزه درکنترل بیماری سل بر تشخیص سریع بیماری و درمان کامل همه بیماران سلی

استوار است، برتشخیص سریع‌تر و دقیق‌تر این بیماران و درمان مناسب آنان تاکید شده است. بررسی میکروسکوپی خلط با یک نمونه آزمایش به طور تخمینی در ٪٤٠-٣٠ موارد و در صورت آزمایش نمونه های متعدد در٪٧٥- ٦٥ موارد مثبت می‌شود برای مثبت شدن نمونه خلط حداقل باید ١٠/٠٠٠ باسیل در یک سی‌سی نمونه خلط وجود داشته باشد. کشت مایکوباکتریایی به دلیل رشد آهسته٤-٨ هفته‌ای مایکوباکتریا از جمله مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، عمـــلاً باعث تأخیر در تشخیص و آغاز درمان می‌شود(١، ٢و٣).

یکی از تکنیک های تشخیصی خیلی موثر که قطعات اختصاصی DNA باکتری را تکثیر و از نتیجه تکثیر در شناسایی سریع‌تر باکتری استفاده می کند، تست واکنش پلی‌مراز زنجیره‌ای (PCR) می باشد(١،٢و٤).

با توجه به مسائل یادشده و با عنایت به شیوع بالای بیماری سل ریوی در ایران و به ویژه دراستان سیستان وبلوچستان با داشتن بالاترین میزان بروز بیماری سل علی‌الخصوص اسمیر مثبت به عنوان آلوده‌ترین کانون بیماری در کل کشور(یعنی با میزان بروزسل ریوی اسمیر مثبت در کل استان درحد ٣٢/٢٧ درصدهزار درمقایسه با میزان ٨/٧٣ درصدهزار درکل کشور)(٥) استفاده از روش های تشخیصی سریع مدنظر بوده است. لذا این بررسی جهت تعیین حساسیت و ویژگی تست PCR در مقایسه با کشت انجام شده است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه بر روی بیماران با علائم ریوی و اسمیرخلط مثبت ازنظر باسیل اسید فاستAFB (Acid Fast Bacilli)، مراجعه کننده به بیمارستان بوعلی شهرستان زاهدان، درسال ١٣٨٠ و ١٣٨١، بدون توجه به سن، جنس و نژاد صورت گرفته است. معیار ورود به مطالعه مثبت شدن اسمیر خلط و معیار خروج از آن منفی شدن اسمیر خلط پس از رنگ‌آمیزی اختصاصی مایکوباکتری بوده‌است. برای انجام مطالعه، ابتدا نمونه خلط با استفاده از سودوN-استیل-L سیستئین هموژنیزه و دکانتامینه گردیده وسپس از نظر وجود AFB مورد بررسی قرار می‌گرفت.

نمـــونـــه‌های مثبـت برای کشت وتست PCR انتخـــاب

می‌شدند. برای کشت نمونه‌های اسمیر مثبت، از محیط لونشتین-جانسون (Lowenstein- Jensen) از شرکت مرک استفاده شد و مایکو باکتریوم‌های کند رشد و غیرکروموژن برای انجام تست‌های بیوشیمیایی تجمع نیاسین و احیاء نیترات به منظور تعیین هویت، مورد بررسی قرار گرفتند. از دیگر سو، بعد از مثبت شدن اسمیر خلط بیماران از نظر AFB، هم زمان با کشت نمونه‌ها در محیط اختصاصی، این نمونه‌ها از نظر وجود و یا عدم وجود DNA مایکوباکتریوم توبرکولوزیس با روش PCR مورد بررسی قرار می‌گرفتند. واکنش PCR نمونه‌ها با استفاده از کیت MTB (شرکت سیناژن ایران) و روشhome made با هدف IS 6110 و با پرایمرهای Drb و Dra(به ترتیب با توالی‌های 5-GGT TTT GGG TCT GAC GAC-3 و 5-CCG AGA GGG GAC GGA AAC-3 ساخت شرکت DNA Technology A/S- دانمارک)، مواد شیمیایی(اتانل، کلروفرم، بروبانل و.. شرکت مرک آلمان)،

DNTP(deoxyribonucleotide triphosphate) وTaq (Taq polymerase) شرکت الفبازیست بزوه انجام گردید. روش استخراج DNA، مواد و بافرهای مورد استفاده و شرایط تکثیر(٩٣ درجه سانتی گراد ٦٠ ثانیه، ٧٢ درجه ٣٠ ثانیه، سیکل ٣٧ دوری ٩٣ درجه ٢٠ ثانیه،

۷۲ درجه ۳۰ ثانیه و در انتها یک سیکل ۹۳ درجه ۲۰ ثانیه و ۷۲ درجه ۱۲۰ ثانیه) مطابق دستورالعمل موجود در کیت سینازن در نظر گرفته شد. سپس محصولات PCR روی زل آکارز۲٪ الکتروفورز کردید. در فرایند PCR از آب مقطر به عنوان کنترل منفی و از DNA استخراج شده موجود در کیت به عنوان کنترل مثبت استفاده شد و نمونه‌هائی که در الکتروفورز، باندی مشابه کنترل مثبت کیت‌داشتند(۱۶۳bp) مثبت در نظر گرفته شدند.

نتایج

اطلاعـــات به دست آمده دراین مطالعه نشان می‌دهد که از مجمـــوع ۱۶۹ مورد اسمیر مثبت، ۱۵۰ مورد کشت مثبت وجود داشته که پس از انجام تست های بیوشیمیای نیاسین ونیترات ۸۶ مورد از آنها مایکوباکتریوم توبرکلوزیس تشخیص داده شد.ازطرفی بنابر نتایج حاصل ازتستPCR، به طورکلی۸۱ مورد ازتست‌هایPCR نیزمثبت گردید.

در این میان ۷ مورد کشت مثبت MTB و PCR منفی (منفی کاذب) و ۲ مورد PCR مثبت و کشت منفی (مثبت کاذب) وجود داشت(جدول ۱).

بنابراین متعاقب مقایسهٔ نتایج کشت و PCR میزان حساسیت، ویژگی، ارزش اخبـــاری مثبت و منفی تست PCR دراین مطالعه به ترتیب ٪۹۱/۸۶، ٪۹۶/۸۷، ٪۹۷/۵۳، ٪۸۹/۸۵ می باشد.

جدول ۱: نتائج حاصل ازمقایسه نتایج کشت و PCR

کشت / PCR	+	-	جمع
+	۷۹	۲	۸۱
-	۷	۶۲	۶۹
جمع	۸۶	۶۴	۱۵۰

بحث و نتیجه گیری

بیماری سل که از قدیمی‌ترین بیماری‌های شنـــاخته شدهٔ باکتریایی درانسان است و توسط مایکوباکتریوم ها ایجاد می گردد(۱و۲)، اگر در انسان(به عنوان تنها مخزن مایکوباکتریوم توبرکلوزیس) تشخیص داده نشود و درمان به موقع و مناسب نگردد طی پنج سال دربیش از نیمی از موارد کشنده است(۲).

چون اســـاس مبارزه در برنامه کنترل بیماری سل ، تشخیص سریع بیماری و درمان کامل بیماران سلی می‌باشد، تاکید عمده عبارت است از دستیابی به روش‌های هرچه سریع‌تر و دقیـــق‌تر تشخیصی برای بیماری سل. در این مطالعه حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و منفی تست PCR در این مرکز به ترتیب: ٪۹۱/۸۶، ٪۹۶/۸۷، ٪ ۹۷/۵۳ و ٪۸۹/۸۵ تعیین گردید. با مراجعـــه به نتایج سایر مطالعات که در کشورهای مختلف جهان از جمله در ایران درطی سال‌های ۱۳۷۸ و ۱۳۷۹ در مرکز آموزشی پژوهشی، درمانی سل و بیماری‌های ریوی تهران(۶) ودر کشور کانـــادا درسال ۱۹۹۶ میلادی (۷)، در کشور تایوان درسال ۲۰۰۰ میلادی(۸) و در فرانسه درسال ۱۹۹۵ میلادی(۹) انجام گرفته است. مشاهده می‌شود که نتایج این مطالعهٔ با نتایج حاصل از سایر مطالعات هماهنگی دارد. لذا با توجه به این نتایج استفاده از این تست به عنوان سریع‌ترین تست تشخیصی موجود، برای تشخیص عفونت با مایکوباکتریوم توبرکلوزیس همراه با کشت و تست‌های بیوشیمیایی توصیه می گردد.

منابع

۶- باستار، ش؛ فرنیا، پ؛ محمدی، ف؛ قاضی سعیدی، ک؛ قدیری ، ف؛ مسجدی ، م ر؛ ولایتی، ع: خلاصه مقالات پانزدهمین کنگره سراسری سل کشور. شیراز: دانشگاه علوم پزشکی شیراز.

7. Wobeser WL, Krajden M, Conly J, Simpson H, Yim BD, sta M,etal. Evaluation of Roche Amplicor PCR assay for Mycobacterium Tuberculosis. J Clin Microbiol 1996: 34(1): 134-9.

8.Su WJ, Tsou AP,Yang MH,Huang CY,Perng RP.Clinical Experience in Using PCR for Rapid Diagnosis of MTB. Chung Hua Hsued Tsa chill (Taipei) 2000: 63 (71): 521-6.

9.Carpentier E, Drouillard B, etal. Diagnosis of T.B; Laboratory of Bacteriology, Center Hospital Universitaire, Angers-France. J Cli Microbiol 1995: 33 (12):3106 -10.

10.Cho YJ, Hu Y, Mahmood A, Clinical Significance of a Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of Mycobacterium Tuberculosis. Am J Clin Pathol 1996: 105: 200-4.

1.Haas DW. Mycobacterium Tuberculosis. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Principles and Practice of Infectious Disease. 5thed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000: 2576-2607.

2.Raviglione MC, O`Brie R J. Tuberculosis. In: Braunwald E, Hauser SL, Fauci AS, Longo Dl, Kasper DL, Jameson JL. Harison's Principles of Internal Medicine. 15 th ed. New york: Mc Graw Hill, 2001: 1024-35.

3.Friedman N L. Tuberculosis: Current Concept and Treatment. 2nd Ed. Florida: Boca Roton, 2000: 33431.

4.Daniel TM. Rapid Diagnosis of Tuberculosis: Laboratory Techniques Applicable in Developing

Countries. Rev Infect Dis 1989: 11 (Supple.2): S 471.

۵- انصاری مقدم، ع؛ سرگلزایی مقدم ، م؛ حسن زهی، ع: خلاصه مقالات پانزدهمین کنگره سراسری سل کشور. شیراز: دانشگاه علوم پزشکی شیراز.

Determination of Sensitivity and Specificity of PCR in Comparison with Culture in Diagnosis of Infection with M. Tuberculosis

Naderi M., Naserpour Farivar T., Sharifi Moud B., Kouhpayeh H.R., Nabi Ahmadi M.

Abstract

Introduction: Tuberculosis is one of the oldest diseases of human. Before application of the molecular methods, because of the long duration of diagnostic- microbiologic procedures (culture and biochemical tests), the diagnosis and beginning of the therapy required experience and clinical intelligence.

The diagnostic microscopic assessment methods of the smear and culture of the specimens have their own limitations, one of which is the slow growth of mycobacteria (4-8 weeks) in the culture media.

Nevertheless, achievement to the more rapid diagnostic procedures is the main aim in this regard.

From the beginning of the last decade, PCR and other more rapid diagnostic assays for the diagnosis of the infections due to Mycobacterium tuberculosis have been used.

Objective: Since no laboratory diagnostic procedure has been known as the alternative to the culture, this study has been done for determination of sensitivity, specificity, positive and negative predictive values of the PCR test in comparison to the culture in this center.

Materials and Methods: In this study, 169 specimens from the patients with positive smears were cultured on the Lowenstein- Jensen media and after subculturing and related biochemical tests, the results obtained were compared with PCR test results (with IS 6110 target and Dra, Drb primers).

Results: Obtained data showed that from 169 smear positive cases, there were 150 positive cultures and after doing biochemical tests, 86 cases were detected as Mycobacterium tuberculosis.

According to these results, sensitivity, specificity, positive and negative predictive values of the PCR test in this center were 91.86%, 96.87%, 97.53% and 89.85% respectively.

Conclusion: Concomitant use of PCR with culture and biochemical tests is recommended.

Key words: Infection/ Mycobacterium Tuberculosis/ Polymerase Chain Reaction/ Sensitivity and Specificity