

## 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\* - دکتر محمد 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 قدیمی ترین بیماری های انسانی است. قبل از ابداع و به کارگیری روش های مولکولی، به دلیل طولانی بودن زمان روش های تشخیصی میکروبیولوژیک (کشت، تست های بیوشیمیایی)، تشخیص و شروع درمان بیماری نیاز به تجربه و تیزهوشی بالینی داشت. روش های میکروسکوپی (اسمیر نمونه ها) و کشت نیز هر کدام محدودیت های خاص خود را دارند، که از جمله مسأله رشد آهسته (۴-۸ هفته ای) مایکوباکتریوم ها در محیط کشت می باشد. لذا دستیابی به روش های تشخیصی سریع تر از زمانی به نظر می رسد. 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 روش ها: در این بررسی ۱۶۹ نمونه از بیماران بیمارستان بوعلی شهر زاهدان که اسمیر مثبت داشتند بر روی محیط لونتین - جانسون کشت داده شده و پس از انجام ساب کالچر و تست های 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 قرار گرفت.

نتایج: اطلاعات به دست آمده نشان داد که از ۱۶۹ مورد اسمیر مثبت، ۱۵۰ مورد کشت مثبت وجود داشت که پس از انجام تست های بیوشیمیایی مربوطه ۸۶ مورد از آنها مایکوباکتریوم توبرکلوزیس تشخیص داده شد. به طور کلی، نتایج حاصل به قرار زیر است: حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و منفی تست PCR در این مرکز به ترتیب ۹۱/۸۶٪، ۹۶/۸۷٪، ۹۷/۵۳٪ و ۸۹/۸۵٪ می باشد.

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

کلید واژه ها: حساسیت و ویژگی / عفونت / مایکوباکتریوم توبرکلوزیس / واکنش زنجیره ای پلیمرازی

#### مقدمه

گزارش شده که ۹۰٪ آنها از کشورهای در حال توسعه می باشد. در این کشورها به دلیل سطح پایین بیماریابی و گزارش دهی ناقص ارقام گزارش شده جزئی از کل می باشد (۲). از سال ۱۹۸۵ میزان موارد بیماری سل در اثر بروز بیماری ایدز شروع به افزایش نمود و در اکثر کشورهای جهان از جمله کشورهای توسعه یافته به معضل بهداشتی تبدیل گردید.

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

بیماری سل از قدیمی ترین بیماری های باکتریایی شناخته شده در انسان است. انسان تنها مخزن شناخته شده برای مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می باشد (۱). این بیماری اغلب ریه ها را درگیر می کند اما می تواند دیگر اعضای بدن را نیز درگیر کند (۲). در حال حاضر شیوع و بروز بیماری سل در کشورهای در حال توسعه و پیشرفته در حال افزایش است به نحوی که از اوایل دهه ۱۹۹۰ سالانه تقریباً ۳/۵ تا ۴ میلیون مورد جدید توبرکلوزیس (اعم از اشکال ریوی و خارج ریوی) به W.H.O

استوار است، بر تشخیص سریع تر و دقیق تر این بیماران و درمان مناسب آنان تاکید شده است. بررسی میکروسکوپی خلط با یک نمونه آزمایش به طور تخمینی در ۴۰-۳۰ موارد و در صورت آزمایش نمونه های متعدد در ۷۵-۶۵ موارد مثبت می شود برای مثبت شدن نمونه خلط حداقل باید ۱۰/۰۰۰ باسیل در یک سی سی نمونه خلط وجود داشته باشد. کشت مایکوباکتریایی به دلیل رشد آهسته ۴-۸ هفته ای مایکوباکتری از جمله مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، عملاً باعث تأخیر در تشخیص و آغاز درمان می شود (۱، ۳و۲).

یکی از تکنیک های تشخیصی خیلی موثر که قطعات اختصاصی DNA باکتری را تکثیر و از نتیجه تکثیر در شناسایی سریع تر باکتری استفاده می کند، تست واکنش پلی مرز زنجیره ای (PCR) می باشد (۱، ۴و۲).

با توجه به مسائل یادشده و با عنایت به شیوع بالای بیماری سل ریوی در ایران و به ویژه در استان سیستان و بلوچستان با داشتن بالاترین میزان بروز بیماری سل علی الخصوص اسمیر مثبت به عنوان آلوده ترین کانون بیماری در کل کشور (یعنی با میزان بروز سل ریوی اسمیر مثبت در کل استان درحد ۳۲/۲۷ درصد هزار درمقایسه با میزان ۸/۷۳ درصد هزار در کل کشور) (۵) 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 روش ها

این مطالعه بر روی بیماران با علائم ریوی و اسمیر خلط مثبت از نظر باسیل اسید فاست (Acid Fast Bacilli)، مراجعه کننده به بیمارستان بوعلی شهرستان زاهدان، در سال ۱۳۸۰ و ۱۳۸۱، 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 رنگ آمیزی اختصاصی مایکوباکتری بوده است. برای انجام مطالعه، ابتدا نمونه خلط با استفاده از سودو-N-استیل-L-سیستین هموژنیزه و دکانتامینه گردیده و سپس از نظر وجود AFB مورد بررسی قرار می گرفت.

نمونه های مثبت برای کشت و تست PCR انتخاب

می شدند. برای کشت نمونه های اسمیر مثبت، از محیط لاونشتین-جانسون (Lowenstein- Jensen) از شرکت مرک استفاده شد و مایکو باکتریوم های کند رشد و غیر کروموزن برای انجام تست های بیوشیمیایی تجمع نیاسین و احیاء نترات 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 نمونه ها در محیط اختصاصی، این نمونه ها از نظر وجود و یا عدم وجود DNA مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با روش PCR مورد بررسی قرار می گرفتند. واکنش PCR نمونه ها با استفاده از کیت MTB (شرکت سیناژن ایران) و روش home made با هدف IS 6110 و با پرایمرهای Dra و Drb (به ترتیب با توالی های 5-GGT-3 GAC GAC TCT GGG TTT 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)،

Taq DNTP (deoxyribonucleotide triphosphate) و Taq polymerase) شرکت الفیازیس بروه انجام گردید. روش استخراج DNA، مواد و بافرهای مورد استفاده و شرایط تکثیر (۹۳ درجه سانتی گراد ۶۰ ثانیه، ۷۲ درجه ۳۰ ثانیه، سیکل ۳۷ دوری ۹۳ درجه ۲۰ ثانیه،

تعیین میزان حساسیت و ...

استفاده شد و نمونه‌هایی که در الکتروفورز، بان‌دی مشابه کنترل مثبت کیت داشتند (۱۶۳bp) مثبت در نظر گرفته شدند.

باکتریایی در انسان است و توسط مایکوباکتریوم‌ها ایجاد می‌گردد (۲ و ۱)، اگر در انسان (به عنوان تنها مخزن مایکوباکتریوم توپرکلوزیس) تشخیص داده نشود و درمان به موقع و مناسب نگردد طی پنج سال در بیش از نیمی از موارد کشنده است (۲).

چون اساس 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 دقیق‌تر 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 مراجعه به نتایج سایر مطالعات که در کشورهای مختلف جهان از جمله در ایران در طی سال‌های ۱۳۷۸ و ۱۳۷۹ در مرکز آموزشی پژوهشی، درمانی سل و بیماری‌های ریوی تهران (۶) و در کشور کانادا در سال ۱۹۹۶ میلادی (۷)، در کشور تایوان در سال ۲۰۰۰ میلادی (۸) و در فرانسه در سال ۱۹۹۵ میلادی (۹) انجام گرفته است. مشاهده می‌شود که نتایج این مطالعه 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 توپرکلوزیس همراه با کشت و تست‌های بیوشیمیایی توصیه می‌گردد.

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 آکارز ۲٪ الکتروفورز کردید. در فرایند PCR از آب مقطر به عنوان کنترل منفی و از DNA استخراج شده موجود در کیت به عنوان کنترل مثبت

### نتایج

اطلاعات به دست آمده در این مطالعه نشان می‌دهد که از مجموع ۱۶۹ مورد اسمیر مثبت، ۱۵۰ مورد کشت مثبت وجود داشته که پس از انجام تست‌های بیوشیمیایی نیاسین و نیترات ۸۶ مورد از آنها مایکوباکتریوم توپرکلوزیس تشخیص داده شد. از طرفی بنابر نتایج حاصل از تست PCR، به طور کلی ۸۱ مورد از تست‌های PCR نیز مثبت 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 مقایسه نتایج کشت و PCR میزان حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و منفی تست PCR در این مطالعه به ترتیب ۹۱/۸۶٪، ۹۶/۸۷٪، ۹۷/۵۳٪، ۸۹/۸۵٪ می‌باشد.

جدول ۱: نتایج حاصل از مقایسه 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 شناخته شده

### منابع

1. Haas DW. Mycobacterium Tuberculosis. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Principles and Practice of Infectious Disease. 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000: 2576-2607.
2. Raviglione MC, O'Brien R J. Tuberculosis. In: Braunwald E, Hauser SL, Fauci AS, Longo DL, Kasper DL, Jameson JL. Harrison'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 (Suppl.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.
- ۶- باستار، ش؛ فرنی، پ؛ محمدی، ف؛ قاضی سعیدی، ک؛ قدیری، ف؛ مسجدی، م؛ 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, et al. 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 Hsueh Tsa chill (Taipei) 2000; 63 (71): 521-6.
9. Carpentier E, Drouillard B, et al. Diagnosis of T.B; Laboratory of Bacteriology, Center Hospital Universitaire, Angers-France. J Clin 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.

# 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