مقایسه روش Real-time PCR با استفاده از پرایمر همگانی 23s rRNA و روش کشت خون در تشخیص سپتی‌سمی

علی غلامی
محمدرضا عربستانی*

گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران.

دریافت: ۱۳۹٤/۰۷/۰۵ پذیرش: ۱۳۹٤/۰۸/۱۷ آنلاین: ۱۳۹٤/۱۱/۲۸

چکیده

زمینه و هدف: در سراسر دنیا عفونت‌های جریان خون (Blood Stream Infections, BSI) دارای میزان شیوع و مرگ‌ومیر بالایی هستند که بین ۲۰٪ تا ۷۰٪ متغیر می‌باشد. بنابراین هدف از این مطالعه یافتن یک روش کارآمد برای تشخیصی سپتی‌سمی در کنار روش کشت، با استفاده از پرایمر همگانی *23S rRNA* در تشخیص بیماران مشکوک به سپتی‌سمی بود.

روش بررسی: این مطالعه از نوع توصیفی- مقطعی می‌باشد که از مهر ۱۳۹۳ تا خرداد ۱۳۹٤ در بیمارستان‌های آموزشی شهر همدان در دو مرحله آنالیتیکی و کلینیکی انجام گرفت. در مرحله آنالیتیکی حساسیت و اختصاصیت پرایمر با دو باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیاکلی* و همچنین آزمایش بر روی نمونه‌های DNA غیر باکتریایی مانند نمونه سلولی انسان و نمونه سلولی قارچ ارزیابی شد. در مرحله کلینیکی ۱۲۱ نمونه بیمار مشکوک به سپتی‌سمی از بخش مراقبت‌های ویژه بیمارستان‌های شهر همدان، با روش Real-time polymerase chain reaction (PCR) و روش کشت خون بررسی گشت و نتایج آنها با هم مقایسه گردید.

یافته‌ها: حساسیت به‌دست‌آمده برای *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیاکلی*، دو رونوشت نامبر و پایین‌ترین حد DNA قابل شناسایی برای پرایمر 5fg می‌باشد. در روش Real-time PCR تعداد ۵۷/۷۸٪ (۷۰ مورد) از نمونه‌ها مثبت و ۱۳٪/۲۲ (۱٦ مورد) از نمونه‌ها توسط روش کشت مثبت گردید. همبستگی یا توافق کاپا ۰/۲ به‌دست آمد که نشان‌دهنده توافق ضعیف بین دو روش است.

نتیجه‌گیری: حساسیت روش *Real-time PCR* نسبت به روش کشت خون بیشتر است و به‌علت حساسیت بالا می‌توان از این پرایمر برای آزمایشات غربالگری نمونه خون بیماران مشکوک به سپتی‌سمی استفاده کرد.

کلمات کلیدی: کشت خون، *23 s rRNA*، Real-time PCR، سپتی‌سمی.

*نویسنده مسئول: همدان، دانشگاه علوم پزشکی همدان، دانشکده پزشکی، گروه میکروب‌شناسی،
کدپستی: ٦٥١٧٦١٩٦٥٣ تلفن: ۰۸۱-۳۸۳۸۰۷۷
E-mail: mohammad.arabestani@gmail.com

مقدمه

در سراسر دنیا عفونت‌های جریان خون دارای میزان شیوع و مرگ و میر بالایی هستند که حدود مرگ و میر بین ۲۰٪ تا ۷۰٪ متغیر می‌باشد.[۱-۳] بنابراین تشخیص سریع و به‌موقع در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی یک امر ضروری است. از آنجایی‌که روش‌های کشت میکروبی از حساسیت کمی برخوردار می‌باشند و گزارش نتایج با تاخیر صورت می‌گیرد، بنابراین به‌کارگیری روش‌های تشخیصی سریع‌تر و حساس‌تر مانند روش‌های تشخیصی بر پایه اسید نوکلئیک لازم و ضروری است.[٤-٦] در طی سال‌های اخیر برای یک روش غربالگری تلاش‌های فراوانی صورت گرفته که به‌طور عمده تمرکز آن‌ها بر روی شناسایی عوامل سپتی‌سمی از روی توالی‌های *16S rRNA* بوده است و به‌علت داشتن نتایج مثبت کاذب و همچنین حساسیت پایین آن در برخی موارد (در افراد بالغ 10^3 الی 10^4 Colony forming unit (CFU)/ml گزارش شده

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-02-27]

است، اما چندین بررسی در نوزادان تا ۱۰ CFU/ml را نیز گزارش کرده‌اند)، خیلی مفید واقع نشده است.[۷و۸] با توجه به اینکه باکتری‌های زیادی از جنس و خانواده‌های متفاوت در ایجاد سپتی‌سمی نقش دارند،[۹] استفاده از پرایمرهای اختصاصی گونه‌ی باکتری کار بسیار دشواری است، به‌طور معمول از پرایمرهای همگانی مانند *16S rRNA* و *23S rRNA* استفاده می‌شود.[۱۰] با توجه به معایب پرایمر همگانی *16S rRNA* که در قسمت‌های بالا به آن اشاره شد،[۱۱] اکنون از پرایمر همگانی *23S rRNA* برای شناسایی افراد مبتلا به عفونت خون استفاده می‌شود که یکی از مزایای این پرایمر همگانی علاوه بر شناسایی تمام باکتری‌های عامل ایجادکننده‌ی سپتی‌سمی، عدم شناسایی بیشتر باکتری‌هایی است که سپتی‌سمی ایجاد نمی‌کنند یا به‌عنوان فلور نرمال بدن و یا باکتری‌های محیطی شناخته می‌شوند، می‌باشد.[۱۰]

از آنجایی که این بیماری در سرتاسر جهان و همچنین در کشور ما جزو موارد اورژانسی محسوب می‌شود، بنابراین هدف از این مطالعه یافتن یک روش تشخیصی کارآمد به‌منظور تشخیص سپتی‌سمی در کنار روش کشت، با استفاده از پرایمر همگانی *23S rRNA* توسط روش Real-time PCR و رنگ فلورسانس SYBR Green در تشخیص بیماران مشکوک به سپتی‌سمی بود که در مقایسه با روش کشت خون مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

این مطالعه از نوع توصیفی- مقطعی بود. روش اجرا به دو مرحله تقسیم شد، مرحله اول، آنالیتیکی و مرحله دوم کلینیکی بود. در مرحله اول، جهت تعیین حساسیت پرایمر مورد استفاده، از سوسپانسیون باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 25923) به‌عنوان معرف باکتری‌های گرم مثبت و *اشرشیاکلی* (ATCC 25922) به‌عنوان معرف باکتری‌های گرم منفی استفاده شد.

در ابتدا از باکتری‌های استافیلوکوک اورئوس و *اشرشیاکلی* غلظت نیم مک فارلند تهیه شد (OD نمونه‌ها اندازه‌گیری شد) و به‌طور مستقیم و همچنین به‌صورت مخلوط با خون اقدام به استخراج DNA گردید، سپس استخراج کل ژنوم به‌صورت دستی و کیت انجام گرفت. در مرحله بعد، آزمون PCR معـمولی انجام گرفت، توالی پرایمرهای مورد نظر (Bioneer, Seoul, South Korea) شامل:

PAN23S-R,5-GATGAnCCGACATCGAGGTGC-3PAN23S‹-F,5-TCGCTCAACGGATAAAAG-3

هر واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ µl شامل: ۱۲/۵ µl 2x Taq premix Mastermix (Pars Toos, Iran)، ۱ µl از پرایمر F، ۱ µl از پرایمر R، ۵ µl از DNA الگو و ۵/۵ µl آب دوبار تقطیر می‌باشد. برنامه چرخه حرارتی واکنش PCR به‌صورت واسرشته‌سازی اولیه در ۹۵ °C به‌مدت پنج دقیقه و سپس در ادامه ۳۵ چرخه PCR به‌ترتیب واسرشته‌سازی اولیه ۹۵ °C به‌مدت ۳۰ ثانیه، ۵۸ °C اتصال پرایمر طویل‌سازی ۷۲ °C به‌مدت یک دقیقه و در نهایت یک مرحله طویل‌سازی نهایی به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ °C انجام شد، سپس ژل آگارز ۲٪ تهیه و برای مشاهده محصولات PCR از دستگاه UV transilluminator (Vilber Lourmat Co., Japan) استفاده شد. پس از مشاهده باند اختصاصی اقدام به انجام واکنش Real-time PCR با رنگ فلورسانس SYBR Green (Avagen, Iran) گردید، که در روش Real-time PCR نیز توالی پرایمرها، توالی بیان‌شده در بالا بود و از نظر حجم واکنش نیز ۲۵ µl بود.

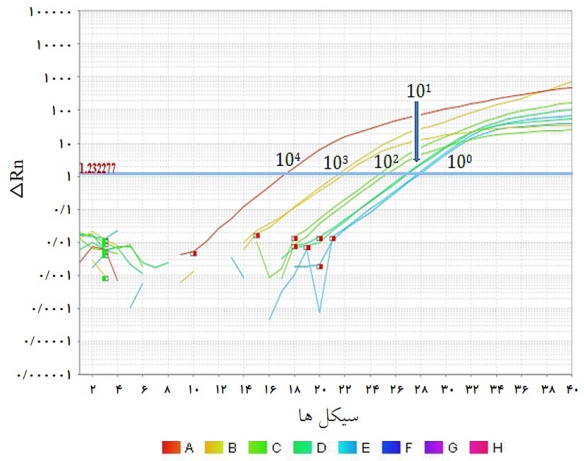
برنامه چرخه دمایی واکنش PCR به‌صورت واسرشته‌سازی اولیه (Initial denaturation) در ۹۵ °C به‌مدت پنج دقیقه و سپس در ادامه ۴۰ چرخه PCR به‌ترتیب واسرشته‌سازی اولیه ۹۵ °C به‌مدت ۳۰ ثانیه، ۵۸ °C اتصال پرایمر (Primer annealing) و طویل‌سازی (Extension) به‌مدت ۳۰ ثانیه توسط Step One Plus qPCR machine (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) انجام گرفت. پس از واکنش PCR، برای تایید محصولات تکثیرشده منحنی ذوب محصولات (Melting curve) با افزایش دما از ۵۵ °C تا ۹۵ °C انجام گرفت.

تعیین حساسیت واکنش PCR: ژنوم باکتری استخراج شده توسط NanoDrop 8000 UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) تعیین غلظت شد و از 10^4 CFU/ml تا ۱ رقت تهیه شد و با Real-time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. تعیین اختصاصیت واکنش PCR: مراحل اختصاصیت پرایمر با آزمایش بر روی نمونه‌های DNA غیر باکتریایی مانند نمونه‌ی سلولی انسان (از منابع کشت سلولی هلا تهیه شد) و نمونه‌ی سلولی قارچ (*آسپرژیلوس فومیگاتوس* و *کاندیدا آلبیکانس*) ارزیابی شد.

مراحل کلینیکی: نمونه‌گیری از بیماران طی سال‌های ۱۳۹۳ تا ۱۳۹۴ از بیمارستان‌های آموزشی شهر همدان انجام گردید، نحوه

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-02-27]

نمونه‌گیری به این صورت بود که پس از هماهنگی با پزشک مربوطه، از بیماران مشکوک به سپتی‌سمی که در بخش مراقبت‌های ویژه (ICU) بیمارستان‌های آموزشی بستری بودند (به‌جز بخش نوزادان، به‌علت حجم کم خون و مشکل خون‌گیری) دو نمونه خون گرفته شد که یکی برای کشت خون استفاده گردید و نمونه دیگر که در لوله‌های حاوی ضد انعقاد EDTA (K3) جمع‌آوری می‌شد، به‌طور مستقیم برای استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفت. با توجه به فرمول مقایسه بین دو روش، تعداد ۱۲۱ نمونه خون جمع‌آوری شد. پس از استخراج DNA، با روش Real-time PCR و اعمال مرحله Melt curve اقدام به بررسی وجود عفونت گردید و چندین نمونه از محصول PCR تعیین توالی شدند، و در نهایت نتایج Real-time PCR با نتایج کشت خون به‌دست‌آمده مقایسه شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از SPSS software, version 20 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) و فرمول توافق کاپا استفاده گردید P<۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد.



شکل ۱: نتایج تعیین حساسیت واکنش PCR در خصوص باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* از رقت CFU/ml ۱۰^۴ تا ۱.

منحنی‌ها نشان‌دهنده رقت‌های تعیین حساسیت می‌باشند که برای کاهش خطای رقت‌سازی، از هر رقت دو نمونه استفاده شد.

یافته‌ها

در مرحله آنالیز پرایمر، حساسیت به‌دست‌آمده برای روش استخراج در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیاکلی* دو مرتبه تکرار شد که هر دو مرتبه نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* تا CFU ۱۰ شناسایی شد اما نمونه *اشرشیاکلی* یک مرتبه تا CFU ۲ و مرتبه دوم تا CFU ۱۰ توسط این پرایمر شناسایی گردید. همچنین، کمیت ژنوم شناسایی شده توسط این پرایمر نیز اندازه‌گیری شد که در هر دو باکتری گفته‌شده تا fg DNA ۵ به‌دست آمد (شکل ۱).

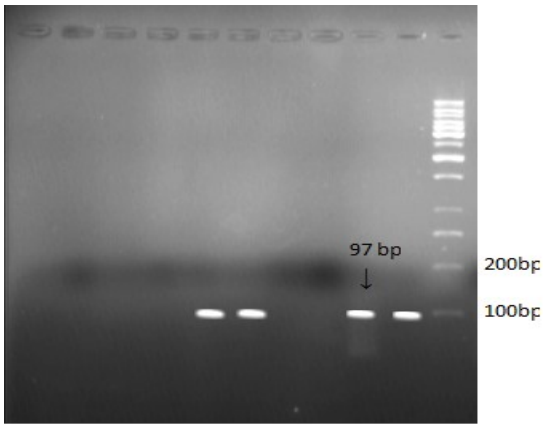
در مرحله کلینیکی، از بین ۱۲۱ نمونه خون جمع‌آوری‌شده از بیماران مشکوک به سپتی‌سمی در بخش ICU، تعداد ۱۶ مورد با روش کشت خون مثبت گردید؛ این در صورتی است که تعداد ۷۰ مورد با روش Real-time PCR مثبت شد. جزییات بیشتر در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱: مقایسه نتایج تست تشخیصی Real-time PCR و کشت خون*

تعداد کل	نتایج Real-time PCR				
	منفی	مثبت			
۱۶	۰	۱۶	تعداد	مثبت	نتایج کشت خون
٪۱۳/۲۲	۰	۱۳٪/۲۲	درصد کشت خون		
۱۰۵	۵۱	۵۴	تعداد	منفی	
٪۸۶/۷۷	٪۴۲/۱۴	٪۴۴/۶۲	درصد کشت خون		
۱۲۱	۵۱	۷۰	تعداد		تعداد کل
٪۱۰۰	۴۲٪/۱۵	٪۵۷/۸۵	درصد کشت خون		

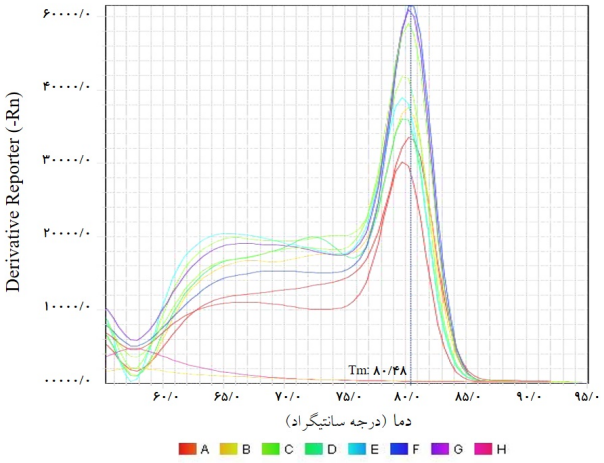
* مقایسه حساسیت و اختصاصیت روش Real-time PCR در مقایسه با روش کشت خون (به‌عنوان روش استاندارد)

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-02-27]



شکل ۲: الکتروفورز محصول PCR

چاهک از راست به چپ: ۱: مارکر kbp ۱ شرکت فرمتاس، ۲: استاف اورئوس ATCC 22423 (کنترل مثبت)، ۳: *اشرشیاکلی* ATCC25922 (کنترل مثبت)، ٤: کنترل منفی، ٥: نمونه کلینیکی (منفی)، ٦ و ۷: نمونه کلینیکی (مثبت)



شکل ۳: منحنی‌های حاصل از دمای ذوب منحنی (Melt curve)

دمای Tm محصول PCR را نشان می‌دهند. دمای منحنی ذوب محصولات PCR: ۸۱ °C

تمامی محصولات PCR تعیین توالی شده از موارد مثبت real time که در اندازه ۹۷ bp بودند، به‌طور دقیق توالی‌های *23s rDNA* باکتری‌ها (محدوده‌ای از باکتری‌های با توانایی ایجاد سپتی‌سمی) را نشان داد. تصویر باندهای محصول PCR الکتروفورز شده بر روی ژل ۲٪ در اندازه ۹۷ bp در شکل ۲ نشان داده شده است.

باکتری‌های شناسایی‌شده با روش کشت خون شامل *استافیلوکوک اورئوس* (هفت مورد)، *پسودوموناس آئروژینوزا* (دو مورد)، *استافیلوکوک اپیدرمیدیس* (دو مورد)، *استافیلوکوک ساپروفیتیکوس* (یک مورد)، *اشرشیاکلی* (سه مورد) و *انتروباکتر کلوآسه* (یک مورد) بود. نتیجه انجام مرحله منحنی ذوب (Melting curve) پس از تکثیر، برای نمونه‌های متفاوت در دمای ۸۱–۷۹ °C به‌دست آمد (شکل ۳).

طی آنالیزهای آماری، توافق کاپا (Kappa agreement) برای نتایج دو روش، کشت خون و Real-time PCR معادل ۰/۲۰به‌دست آمد که این نمایانگر توافق ضعیف بین این دو روش است.

بحث

در روش Real-time PCR تعداد ۵۷/۸۵٪ (۷۰ مورد) از نمونه‌ها مثبت و تعداد ۱۳/۲۲٪ (۱٦ مورد) از نمونه‌ها توسط روش کشت مثبت گردید؛ این در صورتی بود که هیچ‌کدام از موارد مثبت شده با روش کشت، با روش Real time منفی نشد اما ٤٤/٦٢٪ (٥٤ مورد) از موارد مثبت در روش Real time با روش کشت خون منفی گشت، ٤٢/١٥٪ (٥١ مورد) منفی مشترک در هر دو روش وجود داشت. همبستگی یا توافق کاپا ۰/۲ بود که نشان‌دهنده توافق ضعیف بین دو روش است و این امر می‌تواند به چندین دلیل باشد.

عوامل عبارتند از عدم جداسازی باکتری‌های کشته‌شده در خون به‌دلیل استفاده از آنتی‌بیوتیک توسط روش کشت خون، حساسیت پایین روش کشت خون در جداسازی باکتری‌های سخت رشد و مشکل‌پسند، حساسیت بالای پرایمر استفاده شده در جداسازی غلظت خیلی پایین باکتری در نمونه خون، همچنین احتمال آلودگی نمونه‌های خون در طی پروسه‌ی استخراج و انجام واکنش Real-time PCR و به‌دست آمدن نتیجه مثبت کاذب به‌علت حساسیت بالای پرایمر همگانی می‌باشد.

یکی از دلایل وجود حساسیت بالا در این پرایمر وجود چندین آلل از ژن *23s rDNA* در کروموزوم یک باکتری می‌باشد، برای نمونه، باکتری *اشرشیاکلی* دارای هفت آلل از ژن *23s rDNA* است. همچنین به‌منظور جلوگیری از آلودگی محیطی و به‌دست آمدن نتیجه مثبت

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-02-27]

کاذب، استفاده از محلول‌های فاقد نوکلئاز در حین کار کردن با این پرایمر لازم می‌باشد. در تعدادی پژوهش توسط پژوهشگران مختلف نتایج روش PCR معمولی و Real-time PCR در مقایسه با روش کشت خون به شرح زیر می‌باشد:

در مطالعه Arabestani و همکارانش که بر روی نمونه‌های خون بیماران مشکوک به سپتی‌سمی با پرایمر همگانی *16s rDNA* و روش PCR مرسوم انجام گرفت، نتایج PCR معادل ۲۷٪ و نتایج روش کشت خون ۲٤٪ بود، که روش PCR بهتر از کشت ارزیابی شد.[۱۲]

در مطالعه Westh و همکارانش بر روی بیماران سپتی‌سمی با روش Multiplex real-time PCR در مقایسه با کشت خون، نتایج، ۱۷٪ موارد مثبت با روش کشت و ۲٦٪ موارد مثبت با این روش را نشان داد که نتایج Real-time PCR از روش کشت خون بهتر بوده است.[۱۳]

در مطالعه Lehmann و همکارانش بر روی بیماران سپتی‌سمی با روش Multiplex real-time PCR در مقایسه با کشت خون، نتایج، ۱۳٪ موارد مثبت با روش کشت و ۲۵٪ موارد مثبت با روش Multiplex real-time PCR را نشان داد که نتایج Real-time PCR از روش کشت خون بهتر بوده است.[۱٤]

در مطالعه Tsalik و همکارانش که بر روی بیماران سپتی‌سمی با روش Multiplex real-time PCR در مقایسه با کشت خون انجام گرفت، پس از بررسی ۳۰٦ بیمار نتایج بررسی‌های کلینیکی و آزمایشگاهی نشان داد که ۱٤٪ موارد دارای SIRS غیر عفونی و ۸٦٪ دارای سپسیس بودند که از این تعداد ٤٦٪ عامل میکروبی آن شناسایی شد.[۱۵]

این مطالعه علاوه بر بهتر بودن نتایج Real-time PCR نسبت به روش کشت خون، نشان می‌دهد که موارد مثبت واقعی بیشتر از این میزانی است که توسط روش‌های تشخیصی مولکولی و کشت خون شناسایی می‌شود. با توجه به این مطالعه، احتمال اینکه نتایج ما در این مطالعه دقیق باشد دور از انتظار نیست و احتمال موارد مثبت کاذب در Real-time PCR کم است.

نتایج تعیین توالی پس از آنالیز در پایگاه ژنومی National Center for Biotechnology Information (NCBI) برای هر نمونه چندین باکتری را مشخص می‌نمود، به‌گونه‌ای که از بین تمامی باکتری‌های عامل سپتی‌سمی به چندین گونه خاص محدود می‌شد (توالی شناسایی‌شده با این پرایمر در باکتری‌های *اشرشیاکلی*، کلبسیلا، پسودوموناس و سراشیا مشابه است اما با بقیه باکتری‌ها متفاوت می‌باشند)، یعنی تشابه توالی محصول به‌دست‌آمده مختص هر گونه‌ی باکتری نبود، بلکه چندین گونه یا حتی جنس را در بر می‌گرفت. این به‌علت تفاوت در Single nucleotide polymorphisms (SNPs) موجود در توالی‌های شناسایی شده در بین باکتری‌های مختلف بود. همچنین اختلاف ۲ °C دمای Tm در دمای ذوب منحنی (۷۹ °C تا ۸۱ °C) در بین نمونه‌های مختلف نیز مربوط به همین اختلاف در یک یا چند نوکلئوتید در توالی مورد شناسایی در باکتری‌های مختلف است.

لازم به یادآوری است که دمای Tm محصول PCR گزارش شده در مطالعه Gaibani و همکاران برای این پرایمر ۸۲ °C است،[۱۰] با توجه به آنالیزهای بیوانفورماتیکی که بر روی محصولات این پرایمر در باکتری‌های مختلف انجام گرفت، انتظار می‌رود که ۷۹ °C تا ۸۱ °C به‌دست آید (همان دمایی که در مطالعه کنونی حاصل شده است). این اختلاف بین دو مطالعه ممکن است به‌علت غلظت نمک‌های موجود در مسترمیکس‌های مختلف Real time و یا به‌خاطر دستگاه ترموسایکلر و نرم‌افزار آنالیزکننده داده‌ها در دو مطالعه باشد.

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، روش Real-time PCR نسبت به روش کشت خون دارای حساسیت بیشتری است و به‌علت حساسیت بالا می‌توان از این پرایمر با روش Real-time PCR برای آزمایشات غربال‌گری نمونه خون بیماران مشکوک به سپتی‌سمی استفاده کرد و برای محدود کردن دامنه باکتری‌های شناسایی‌شده یا از تعیین توالی کردن محصول PCR استفاده شود و یا اینکه موارد مثبت با کیت‌های چندتایی مخصوص گونه‌های میکروبی ایجادکننده سپتی‌سمی (Magicplex™) بررسی گردد. اما این روش به‌تنهایی نمی‌تواند جایگزین روش کشت گردد.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل پایان‌نامه تحت عنوان "مقایسه روش Real-time PCR با استفاده از پرایمر *23s r RNA* با روش کشت خون در تشخیص بیماران مشکوک به سپتی سمی" در مقطع کارشناسی ارشد در سال ۱۳۹۳ به شماره ۹۳٤۰۳۱۵۵٤ است که با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی همدان به انجام رسیده است. نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از این معاونت محترم ابراز می‌دارند.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-02-27]

References

1. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001;29(7):1303-10.
2. Fazzeli H, Arabestani MR, Esfahani BN, Khorvash F, Pourshafie MR, Moghim S, et al. Development of PCR-based method for detection of Enterobacteriaceae in septicemia. *J Res Med Sci* 2012;17(7):671-5.
3. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 2003;348(16):1546-54.
4. Fenollar F, Raoult D. Molecular diagnosis of bloodstream infections caused by non-cultivable bacteria. *Int J Antimicrob Agents* 2007;30 Suppl 1:S7-15.
5. Cockerill FR 3rd, Wilson JW, Vetter EA, Goodman KM, Torgerson CA, Harmsen WS, et al. Optimal testing parameters for blood cultures. *Clin Infect Dis* 2004;38(12):1724-30.
6. Iregui M, Ward S, Sherman G, Fraser VJ, Kollef MH. Clinical importance of delays in the initiation of appropriate antibiotic treatment for ventilator-associated pneumonia. *Chest* 2002;122(1):262-8.
7. Reier-Nilsen T, Farstad T, Nakstad B, Lauvrak V, Steinbakk M. Comparison of broad range 16S rDNA PCR and conventional blood culture for diagnosis of sepsis in the newborn: a case control study. *BMC Pediatr* 2009;9(1):5.
8. Clarridge JE. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clin Microbiol Rev* 2004;17(4):840-62.
9. Seifert H. The clinical importance of microbiological findings in the diagnosis and management of bloodstream infections. *Clin Infect Dis* 2009;48 Suppl 4:S238-45.
10. Gaibani P, Mariconti M, Bua G, Bonora S, Sassera D, Landini MP, et al. Development of a broad-range 23S rDNA real-time PCR assay for the detection and quantification of pathogenic bacteria in human whole blood and plasma specimens. *Biomed Res Int* 2013;2013:264651.
11. Kommedal Ø, Simmon K, Karaca D, Langeland N, Wiker HG. Dual priming oligonucleotides for broad-range amplification of the bacterial 16S rRNA gene directly from human clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2012;50(4):1289-94.
12. Arabestani MR, Fazzeli H, Nasr Esfahani B. Identification of the most common pathogenic bacteria in patients with suspected sepsis by multiplex PCR. *J Infect Dev Ctries* 2014;8(4):461-8.
13. Westh H, Lisby G, Breysse F, Böddinghaus B, Chomarat M, Gant V, et al. Multiplex real-time PCR and blood culture for identification of bloodstream pathogens in patients with suspected sepsis. *Clin Microbiol Infect* 2009;15(6):544-51.
14. Lehmann LE, Hunfeld KP, Steinbrucker M, Brade V, Book M, Seifert H, et al. Improved detection of blood stream pathogens by real-time PCR in severe sepsis. *Intensive Care Med* 2010;36(1):49-56.
15. Tsalik EL, Jones D, Nicholson B, Waring L, Liesenfeld O, Park LP, et al. Multiplex PCR to diagnose bloodstream infections in patients admitted from the emergency department with sepsis. *J Clin Microbiol* 2010;48(1):26-33.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-02-27]

TUMJ monthly Tehran University Medical Journal

Tehran University Medical Journal, February 2016; Vol. 73, No. 11: 784-790 *Original Article*

Comparison of Real-time PCR method and blood culture in diagnosis of septicemia

Ali Gholami M.Sc.
Mohammad Reza Arabestani Ph.D.*

Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Hamedan University of Medical Sciences, Hamedan, Iran.

Abstract

Received: 27 Sep. 2015 Accepted: 08 Nov. 2015 Available online: 17 Feb. 2016

Background: Bloodstream infections (BSI) have a high incidence and high mortality in the worldwide. The mortality rate is variable between 20-70%. Therefore, early and timely detection of BSI agent in clinical laboratories is necessary. The aim of this study was to determine an efficient diagnostic tool to septicemia in accompany of blood culture method by Real-time PCR (using panbacterial *23S rRNA* gene).

Methods: This cross-sectional study was conducted in two analytical and clinical stages in Hamadan University of Medical Sciences, Iran, from October 2014 to June 2015. In analytical stage, sensitivity (by serial dilution from 10^4 to 1 CFU/ml) and specificity of the primer were evaluated with the *Staphylococcus aureus* (as Gram positive indicator bacteria) and *Escherichia coli* (as Gram-negative indicator bacteria), human genome (from Hella cell culture), *Candida albicans* yeast and *Aspergillus fumigatus* fungus. In clinical stage, 121 blood samples were collected from patients suspected to sepsis in intensive care unit (ICU) from Hamadan University Hospitals. Finally, the results of Real-time PCR and blood culture methods were compared.

Results: The Real-time PCR showed a sensitivity ranging from 2 to 10 target copies per reaction to the whole blood for *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* respectively. The specificity of this method was evaluated and no false positive amplification was identified. 57.85% (70 cases) of the samples were positive by Real-time PCR and 13.22% (16 cases) of the samples were positive by blood culture. However, none of the cases that were positive by blood culture were negative in Real-time PCR. As well as, 44.62% (54 cases) of cases were positive by Real-time PCR but blood culture showed no bacteria in the samples, and 42.15% (51 cases) were negative by both methods. Correlation or agreement of Kappa was 0.20, that indicating poor agreement between the two methods.

Conclusion: Real-time PCR is more sensitive than blood culture and also, because of high sensitivity of this primer by Real-time PCR, we can use it for screening blood samples from suspected patients of sepsis.

Keywords: *23 s rRNA*, blood culture, real-time polymerase chain reaction, septicemia.

* Corresponding author: Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran. Postal code: 6517619653.
Tel: +98 81 3838077
E-mail: mohammad.arabestani@gmail.com

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2025-02-27]