حساسیت MTB-PCR خون در تشخیص مایکوباکتریوم توبرکلوزیس

محبوبه حاجی عبدالباقی[۱]
حسین‌علی عالیشاه[*۲]
مهرناز رسولی نژاد[۲]، عباس بهادر[۳]
مهران ایزدی[۲]، احمد رضا مبین[۲]

۱. گروه عفونی، مرکز تحقیقات ایدز ایران
۲. گروه عفونی
۳. گروه میکروب‌شناسی

دانشگاه علوم پزشکی تهران

[*] نویسنده مسئول: تهران، انتهای بلوار کشاورز، بیمارستان امام خمینی، بخش عفونی تلفن: ۰۹۱۱-۱۹۱۴۳۰۷
email: dr_allishah@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: سل هنوز یکی از مهمترین علل مرگ و میر در بسیاری از کشورهاست. با توجه به وقت‌گیر بودن روش‌های معمول تشخیص سل مثل کشت که ۸-۳ هفته زمان می‌برد، لازم است روش‌های سریع تشخیصی مثل Polymerase Chain Reaction (PCR) مورد ارزیابی قرار گیرد. ***روش بررسی:*** در یک مطالعه مقطعی از ۹۵ بیمار مبتلا به سل ریوی و خارج ریوی سه میلی‌لیتر خون سیتراته تهیه و پس از DNA extraction به‌وسیله کیت تجاری QIAGEN، با استفاده از پرایمر IS1081 آزمایش PCR انجام شد. ***یافته‌ها:*** از ۹۵ بیمار در این طرح با میانگین (±SD) سنی ۲۰/۳±۴۴/۴، ۳۶ بیمار زن (۳۷/۹٪) و ۵۹ بیمار مرد (۶۲/۱٪) بودند. این افراد شامل ۶۹ مورد سل ریوی و ۲۶ مورد سل خارج ریوی بودند که در ۳۲ مورد (۳۳/۷٪) PCR مثبت و ۶۳ مورد (۶۶/۳٪) PCR منفی شد. حساسیت PCR سلول‌های منو نوکلئر خون محیطی Peripheral Blood Mononuclear Cell –Mycobacterium Tuberculosis PCR (PBMC- MTB PCR) برای سل ریوی ۴۴/۱٪، سل خارج ریوی ۱۹/۲٪ و برای سل منتشر ۱۰/۰٪ بود. ***نتیجه‌گیری:*** حساسیت PBMC- MTB PCR برای تشخیص سل ریوی و خارج ریوی پائین بوده و با توجه به تاثیر فاکتورهای متعدد در نتیجه و هزینه زیاد استفاده از این روش، به‌کارگیری آن به‌عنوان یک روش مکمل در تائید تشخیص موارد قویا مشکوک به بیماری سل پیشنهاد می‌گردد. این روش نمی‌تواند به‌عنوان روش تشخیصی جانشین اسمیر و کشت که روش استاندارد تشخیصی سل می‌باشند به‌کار گرفته شود.

کلمات کلیدی: سل، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، Polymerase Chain Reaction (PCR).

مقدمه

سل tuberculosis یکی از قدیمی‌ترین بیماری‌های شناخته شده‌ای است که در انسان ایجاد می‌شود و در صورت عدم درمان در بیش از ۵۰ درصد موارد بعد از پنج سال با مرگ و میر همراه خواهد بود.[۱] توبرکلوز بعد از HIV دومین علت مرگ و میر ناشی از بیماری‌های عفونی در جهان می‌باشد و در سال ۱۹۹۳ سازمان جهانی بهداشت از این بیماری به‌عنوان اورژانس بهداشت جهانی یاد کرده است.[۲] ۹۰٪ موارد سل متعلق به کشورهای در حال توسعه می‌باشد.[۱] بر اساس گزارش سازمان جهانی بهداشت در ژوئن ۲۰۰۵ شیوع توبرکلوزیس در ایران ۳۷ درصد هزار می‌باشد و مرگ و میر ناشی از آن ۳/۳ در هر صد هزار نفر در سال است.[۳] از سال ۱۹۸۵ با شیوع HIV و شیوع سل در این افراد و سرایت سل از این افراد به دیگران، سل مقاوم به چند دارو Multi Drug Resistance (MDR) هم رو به افزایش گذاشت و اپیدمی‌هایی از سل مقاوم به چند دارو در گروه‌های پر خطر (مثل IDUها، بی‌خانمان‌ها و HIV^+ها) به‌وقوع پیوست و انتقال از این گروه به افراد HIV^- و (کارکنان امور بهداشتی) HCWها صورت گرفت.[۴] از آنجا که در سل ریوی، همه بیماران قادر به دادن نمونه خلط مناسب نیستند و یا گاهی تعداد ارگانیسم دفعی در خلط برای مثبت کردن خلط کافی نیست (کمتر از 10^4 ارگانیسم در ml خلط) و MTB نیز ارگانیسمی کند رشد بوده و ایجاد کلنی‌های قابل رویت در محیط کشت جامد ۸-۳ هفته و در محیط BACTEC براساس تعداد میکروارگانیسم دفعی ۱۶-۹ روز طول می‌کشد (مثبت شدن کشت) و با شیوع HIV تعداد موارد اسمیر منفی و خارج ریوی افزایش یافته است و حال عمومی این افراد نیز معمولاً بد بوده و به‌علت شیوع بیشتر موارد MDR در این افراد و لزوم ایزولاسیون سریعتر و طولانی‌تر این افراد و آغاز سریعتر درمان جهت کنترل بیماری و

جلوگیری از سرایت به دیگران (افراد خانواده و HCWها) لازم است که هرچه سریعتر بتوان بیماری را تشخیص داده و درمان را آغاز کرد. لذا به‌کارگیری روش‌های جایگزین جدید نسبت به روش‌های سنتی قبلی در موارد اسمیر منفی و یا خارج ریوی (که نیاز به روش‌های تهاجمی مثل بیوپسی و تهیه بافت دارد) ضروری می‌نماید، تا زمان صرف‌شده جهت تشخیص و شروع درمان کاهش یابد.[۱] روش‌های جدید که Rapid Nucleic Acid Amplification Tests (RNAAT) نامیده می‌شود و تحت عنوان PCR شناخته می‌شوند قادر به مشخص کردن تعداد کم میکروارگانیسم (کمتر از ده میکروارگانیسم در مقایسه با ۱۰۰۰۰ میکروارگانیسمی که برای مثبت کردن خلط لازم است) در نمونه‌های کلینیکی بوده و در طی چند ساعت جواب حاضر می‌گردد (در مقایسه با چند روز تا چند هفته برای اسمیر و کشت). برای موارد اسمیر مثبت حساسیت و ویژگی تست‌های RNAAT بیش از ۹۵٪ می‌باشد و برای اسمیر منفی‌ها نیز ویژگی بسیار بالا دارد ولی حساسیت آن بین ۷۷-۴۰٪ متفاوت است (روی نمونه‌های تنفسی).[۲] حساسیت PCR کمتر از کشت است و هزینه زیاد دارد.[۱] تا قبل از شیوع ایدز ۸۰٪ موارد سل ریوی و ۲۰٪ خارج ریوی بود، ولی با شیوع ایدز تا ۳/۴ موارد سل در این افراد به‌صورت عفونت توأم ریوی و خارج ریوی یا ابتلاء خارج ریوی به‌تنهایی درآمد، که ناشی از انتشار هماتوژن می‌باشد. سل خارج ریوی در ۶۰-۴۰٪ مبتلایان به AIDS اثبات شده است[۱] لذا PCR خون از نظر MTB ممکن است در این افراد بتواند به تشخیص سریع‌تر کمک کرده و از ابهام تشخیصی و صرف هزینه‌های تشخیصی اضافی جلوگیری کرده و به نجات جان این بیماران و جلوگیری از انتشار بیماری و وخامت حال این گروه بیماران کمک کند. با توجه به شعار WHO مبنی بر درمان هر فرد یعنی پیشگیری سایر افراد (Treatment for one Is Prevention for ALL). مبارزه با سل مقرون به صرفه‌ترین سرمایه‌گذاری بهداشتی می‌باشد.[۵] لذا لازم است سل هر چه سریعتر تشخیص داده شده و درمان گردد. PCR مثل یک دستگاه فتوکپی DNA می‌باشد، که از چند ماده اولیه ساده (اجزاء همانندسازی طبیعی DNA) استفاده کرده و نسخه‌های بسیار زیادی از یک قطعه DNA را در لوله آزمایش می‌سازد. اگرچه PCR ساده به‌نظر می‌رسد ولی در واقع یک فرآیند پیچیده است که مواد مختلفی در آن نقش دارند.[۶] ما در این مطالعه به بررسی حساسیت PCR خون در تشخیص ابتلا به سل پرداختیم.

روش بررسی

مطالعه حاضر در بخش عفونی بیمارستان امام خمینی (ره) تهران طی ۱/۵ سال از ابتدای مهر ماه سال ۱۳۸۳ لغایت پایان اسفند ماه ۱۳۸۴ انجام شد و مطالعه‌ای از نوع مقطعی (Cross sectional) بوده و از ۹۵ بیمار مبتلا به سل با رضایت شرکت در مطالعه و بدون تحمیل هیچگونه هزینه یا وقت اضافه نمونه‌گیری به‌عمل آمد. معیارهای ورود به مطالعه شامل بیماران مبتلا به سل ریوی اسمیر مثبت (تعریف اسمیر مثبت: دو نوبت اسمیر خلط مثبت یا یک نوبت اسمیر خلط مثبت + CXR که کاملاً با سل مطابقت داشته باشد یا یک نوبت اسمیر خلط مثبت + یک نوبت کشت مثبت)، مبتلایان به سل خارج ریوی که ابتلاء به سل براساس پاتولوژی (گرانولوم + نکروزکازئوز و یا دیدن MTB در اسمیر مایع یا بافت) یا کشت نمونه اثبات شده باشد و عدم دریافت داروی ضدسل. معیارهای خروج از مطالعه شامل بیماران مبتلا به سل ریوی یا خارج ریوی که دارو دریافت کرده باشد (داروهای ریفامپین، ایزونیازید، اتامبوتول، پیرازین آمید، استرپتومایسین تا یک ماه قبل از مراجعه) و یا عدم رضایت بیمار مبنی بر شرکت در طرح و یا دادن نمونه بوده است. تجزیه و تحلیل داده‌ها به‌وسیله نرم افزار SPSS ویراست ۱۱/۵ انجام شد. پس از جمع‌آوری نمونه‌ها (سه میلی‌لیتر خون کامل سیتراته)، استخراج ژنوم توسط کیت آماده مصرف QIAGEN (ساخت شرکت QIAGEN کشور آلمان) که برای تخلیص DNA با وزن مولکولی بالا (High Molecular Weight DNA) از خون و هم از محیط کشت و سایر نمونه‌های کلینیکی می‌باشد، انجام شد. نمونه‌ها ابتدا لیز شده و پروتئین‌های متفرقه در بافر مناسب دناتوره شدند. (QIAGEN Protease Proteinase K) اضافه شد و نمونه‌ها برای دو ساعت در دمای ۵۶ درجه انکوبه شدند، Lysateها به‌داخل QIAGEN Genomic-tips بارگیری شدند و DNA به ستون باند شد درحالی‌که سایر اجزاء سلولی خارج می‌شدند. متعاقب شستشو برای خارج کردن سایر اجزاء باقیمانده، DNA دارای وزن مولکولی بالا رها شد و با افزودن ایزوپروپانول سرد هم حجم و سانتریفوژ در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه برای پنج دقیقه در پلت (چاهک) رسوب می‌نمود. متعاقباً مواد اضافه روی آن برداشته شد و دوباره پلت DNA با اتانول سرد ۷۰٪ شستشو داده شد. DNA مجدد سانتریفوژ گردید، اتانول ۷۰٪ برداشته و اجازه داده می‌شد تا پلت در

مجاورت هوا خشک شود. پلت DNA در ۵۰ میکرولیتر بافر Tris-EDTA (TE) حل گردید. زمان لازم برای یک پروسه کامل آزمایش، ۱۵۰ دقیقه بود. در این مطالعه از پرایمر IS1081 که یک قطعه ۳۴۴ جفت باز را شامل می‌شود استفاده شد، که در وضعیت ۸۵ تا ۴۲۸ از ژن IS1081 قرار گرفته است. نمونه‌ها در ۲۵ µl مخلوط واکنش شامل: ۱ µl از dNTP ۱۰mM و ۱µl از ۲۰pM از هر پرایمر، ۰/۲۵ µl از U Taq Polymerase (Fermentase)، ۰/۵µl از $MgCl_2$ ۲۵mM و ۲/۵µl از بافر PCR ۱۰X و ۲µl از DNA template به‌وسیله PCR آمپلیفیه می‌شدند. پارامترهای آمپلیفیکاسیون شامل یک تقلیب اولیه در ۹۵ درجه برای پنج دقیقه که با ۴۰ سیکل هر یک شامل تقلیب در ۹۵ درجه برای ۳۰ ثانیه، اتصال (annealing) در ۵۶ درجه سانتیگراد برای ۳۰ ثانیه، و extension در ۷۲ درجه برای ۴۵ ثانیه ادامه می‌یافت. مرحله extension در سیکل ۴۰ برای پنج قبل از اینکه نمونه‌ها جستجو شوند نگهداری می‌شد. محصولات آمپلیفیه شده به‌وسیله الکتروفورز ژل با استفاده از ژل آگاروز ۱/۵٪ با ethidium bromide یافت می‌شدند. برای هر بیمار از ۱ml خون استفاده شده و آزمایش به‌صورت Douplicate برای هر فرد انجام شد. (برای هر بیمار دو بار آزمایش انجام شد تا از صحت آن اطمینان کامل حاصل شود).

یافته‌ها

تعداد ۳۶ (۳۷/۹٪) بیمار زن و تعداد ۵۹ (۶۲/۱٪) بیمار مرد بودند. از نظر طیف سنی نیز دارای حداقل سن ۱۴ سال و حداکثر ۸۸ سال با میانگین سنی (±SD) ۲۰/۳±۴۴/۴ سال بودند. از کل ۹۵ مورد بیمار مبتلا به سل که از آنها نمونه‌گیری به‌عمل آمد، ۵۹ مورد (۶۲/۱٪) سل ریوی و ۲۶ مورد (۲۷/۴٪) سل خارج ریوی و ده مورد (۱۰/۵٪) سل منتشر بودند که موارد سل منتشر به‌علت داشتن علائم ریوی و برجسته‌تر بودن این علائم همگی در گروه سل ریوی طبقه‌بندی شده و کلا تعداد ۶۹ مورد (۷۲/۶٪) سل ریوی و ۲۶ مورد (۲۷/۴٪) سل خارج ریوی در مطالعه بررسی شدند. از ۶۹ مورد سل ریوی تعداد ۵۳ مورد (۷۶/۸۱٪) دارای اسمیر خلط مثبت بودند و ۱۶ مورد دیگر (۲۳/۲٪) نیز اسمیر خلط منفی داشتند که پنج مورد (۷/۲۷٪) با اسمیر BAL مثبت و یک مورد (۱/۴۴٪) نیز با اسمیر شیره معده و یک مورد (۱/۴۴٪) با کشت خلط مثبت تشخیص داده شدند و ۹ مورد بقیه بر اساس شواهد بالینی و اپیدمیولوژیک و یا طرح رادیوگرافیک درگیری ریوی تشخیص سل ریوی برای آنها گذاشته شد. از ۶۹ بیمار سل ریوی تعداد ۵۳ مورد اسمیر خلط مثبت و ۱۶ نفر (۲۳/۲٪) هم اسمیر منفی داشتند. از ۲۶ مورد سل خارج ریوی ۹ مورد سل عضلانی-اسکلتی بود، که شش مورد آن سل ستون فقرات ناحیه کمری و یک مورد سل ستون فقرات ناحیه گردنی و یک مورد آرتریت مچ دست مثبت و یک مورد نیز آرتریت زانو بود، پنج مورد لنفادنیت، دو مورد پلورال افیوژن، دو مورد یووئیت (ارجاع شده توسط همکاران چشم پزشک جهت درمان یووئیت سلی با توجه به نمای مشخصه آن)، شش مورد پریتونیت، یک مورد پریکاردیت و یک مورد سل پوستی بود. از این‌ها یک مورد آرتریت مچ دست و یک مورد لنفادنیت و دو مورد سل ستون فقرات کمری، اسمیر ترشحات مثبت داشته‌اند و از بقیه (۲۲ مورد) ۱۸ مورد بر اساس پاتولوژی و دو مورد یووئیت سلی و یک مورد پلورال افیوژن مزمن و یک مورد لنفادنیت بر اساس معاینه و شواهد بالینی تشخیص سل برای بیمار گذاشته شد. از ده مورد سل منتشر نیز تعداد پنج مورد اسمیر خلط مثبت داشته و پنج مورد دیگر نیز بر اساس طرح میلیری رادیوگرافی ریه و شواهد بالینی و اپیدمیولوژیک و زمینه‌ای تشخیص سل برای آنان گذاشته شد. از ۹۵ بیمار نمونه‌گیری شده بر اساس اطلاعات پرونده برای ۵۷ بیمار (۶۰٪) سرولوژی HIV درخواست شده بود که از این تعداد ۲۱ مورد (۲۲/۱٪) سرولوژی مثبت داشتند، که یک مورد مونث و مابقی مذکر بودند و ۳۶ مورد دیگر (۳۷/۹٪) سرولوژی منفی داشتند و برای ۴۰٪ باقی بیماران (۳۸ بیمار) به‌علت نداشتن ریسک فاکتور اساسا چنین درخواستی صورت نگرفته بود. در گروه سل ریوی برای ۴۳ بیمار درخواست آزمایش سرولوژی HIV شده بود که در این گروه ۱۹ نفر (۴۴/۲٪) نتیجه مثبت داشتند و ۲۴ نفر (۵۵/۸٪) نتیجه منفی داشتند. در گروه سل خارج ریوی نیز برای ۱۴ بیمار درخواست آزمایش شده بود که از این تعداد دو نفر (۱۴/۳٪) تست مثبت و ۱۲ نفر دیگر (۸۵/۷٪) نتیجه منفی داشتند. از بیماران توصیف‌شده فوق، آزمایش PCR بر روی خون طبق روش توضیح داده شده انجام گردید و نتایج PCR بر حسب نوع سل در جدول ۱ آمده است. بنابراین در کل ۸۴/۴٪ از PCRهای مثبت در گروه سل ریوی و ۱۵/۶٪ مابقی مربوط به گروه خارج ریوی بوده است و از کل PCRهای منفی نیز ۶۶/۷٪ در گروه سل ریوی و ۳۳/۳٪ در گروه خارج ریوی بود. با توجه به مثبت شدن ۲۶ مورد از PCR در گروه ریوی خالص می‌توان گفت

جدول-۱: نتایج PCR بر حسب نوع سل

PCR		نوع سل			جمع
		سل ریوی	سل خارج ریوی	سل منتشر	
مثبت	تعداد	۲۶	۵	۱	۳۲
	PCR%	٪۸۱/۳	٪۱۵/۶	٪۳/۱	٪۱۰۰
	TB%	٪۴۴/۱	٪۱۹/۲	٪۱۰/۰	٪۳۳/۷
منفی	تعداد	۳۳	۲۱	۹	۶۳
	PCR%	٪۵۲/۴	٪۳۳/۳	٪۱۴/۳	٪۱۰۰
	TB%	٪۵۵/۹	٪۸۰/۸	٪۹۰/۰	٪۶۶/۳
جمع	تعداد	۵۹	۲۶	۱۰	۹۵
	PCR%	٪۶۲/۱	٪۲۷/۴	٪۱۰/۵	٪۱۰۰
	TB%	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۱۰۰

حساسیت آزمایش PCR خون محیطی برای سل ریوی ۴۴/۱٪ و برای نوع خارج ریوی ۱۹/۲٪ و برای سل منتشر ۱۰/۰٪ است و با توجه به p=۰/۰۲ به‌دست آمده (بر اساس آزمون χ^2) می‌توان چنین نتیجه گرفت که PCR خون محیطی با نوع سل رابطه معنی‌داری دارد و در بیماران مبتلا به سل ریوی بیشتر مثبت می‌شود تا بیماران مبتلا به سل خارج ریوی و یا منتشر. از ۲۶ بیمار با سل ریوی و PCR مثبت ۲۳ نفر (۸۸/۵٪) اسمیر خلط مثبت داشته‌اند و از ۳۳ نفر با سل ریوی و PCR منفی نیز ۲۶ نفر (۷۸/۸٪) اسمیر مثبت داشته‌اند. یک مورد سل منتشر هم که PCR مثبت شده است دارای اسمیر مثبت بوده است. بنابراین رابطه معنی‌داری بین اسمیر مثبت خلط و مثبت شدن PCR وجود نداشت (p=۰/۳۲۵). در گروه خارج ریوی نیز از سه موردی که اسمیر ترشحات مثبت داشته‌اند دو مورد PCR مثبت داشته‌اند. نتایج حاصله از PCR در افراد با سرولوژی HIV در جدول ۲ آمده است. از ۵۷ مورد سرولوژی، ۲۱ مورد سرولوژی مثبت داشتند که ۱۲ بیمار HIV مثبت، PCR مثبت بود (۵۷/۱٪) و ۹ مورد (۴۲/۹٪) هم PCR منفی داشتند. در ۳۶ نفر که سرولوژی منفی داشتند تنها در ۹ مورد (۲۵٪) نتیجه PCR مثبت بود که با توجه به p=۰/۰۱۵ (بر اساس آزمون χ^2) به‌نظر می‌رسد بین سرولوژی مثبت HIV و PCR خون محیطی در افراد مبتلا به سل ارتباط معنی‌دار آماری وجود دارد و در صورت سرولوژی مثبت HIV، احتمال بیشتری برای مثبت شدن نتیجه PCR خون محیطی وجود دارد و ارزش بیشتری در تسریع تشخیص سل دارد. از ۱۸ بیمار مبتلا به سل ریوی و دارای نتیجه PCR مثبت ۱۱ نفر (۶۱/۱٪) سرولوژی مثبت HIV داشته‌اند. از یک مورد سل منتشر که PCR مثبت داشته سرولوژی مثبت نبوده است. از دو بیمار

جدول-۲: نتایج PCR بر حسب سرولوژی HIV

PCR	HIV^+	HIV^-	جمع
مثبت	۱۲ (٪۵۷/۱)	۹ (٪۴۲/۹)	۲۱ (٪۱۰۰)
منفی	۹ (٪۲۵/۰)	۲۷ (٪۷۵/۰)	۳۶ (٪۱۰۰)
جمع	۲۱ (٪۳۶/۸)	۳۶ (٪۶۳/۲)	۵۷ (٪۱۰۰)

با سل خارج ریوی که PCR مثبت داشتند یک نفر سرولوژی مثبت HIV داشت. در بیمارانی‌که سرولوژی انجام شد و براساس نوع سل و نتیجه PCR ارتباط معنی‌دار فقط در گروه سل ریوی دیده شد (p=۰/۰۳۳) بر اساس آزمون χ^2). یعنی فقط سل ریوی با PCR ارتباط معنی‌دار دارد. p برای سل خارج ریوی ۰/۱۱۹ و برای نوع منتشر ۰/۲۷۳ بود. از نظر ارتباط نتیجه PCR با دو فاکتور سرولوژی HIV و اسمیر دیده شد که در گروه PCR مثبت، از ۲۰ بیمار با PCR مثبت، ۱۱ نفر HIV مثبت بوده و از این ۱۱ نفر، ۹۰٪ (ده نفر) اسمیر مثبت و ۱۰٪ (یک نفر) اسمیر منفی داشتند. از این ۲۰ بیمار ۹ نفر سرولوژی HIV منفی داشتند که تمام ۹ نفر اسمیر مثبت داشتند. بنابراین در گروه PCR مثبت‌ها رابطه معنی‌داری بین HIV مثبت و اسمیر مثبت وجود نداشت (p=۰/۳۵۳). در گروه PCR منفی‌ها نیز ارتباط معنی‌داری بین همزمانی این دو فاکتور با PCR وجود نداشت (p=۰/۵۰۴).

بحث

مطالعاتی که تا به امروز در این مورد انجام شده، از نظر تعداد و نوع بیماری (ریوی یا خارج ریوی و اسمیر مثبت یا اسمیر منفی و دارای نقص ایمنی به‌خصوص HIV/AIDS یا بدون آن) بسیار هتروژن بوده است که کار نتیجه‌گیری را مشکل می‌نماید. تنها مطالعه‌ای که از پرایمر IS1081 استفاده کرده بود مطالعه احمد و همکاران در موسسه تحقیقات ملی کارنال هند در سال ۱۹۹۸ بود که بیماران نقص ایمنی و ایدز را نیز از مطالعه خارج کرده بودند و فقط روی ۱۶ بیمار مبتلا به سل ریوی انجام شده بود و نتیجه مثبت ۴۳/۷۵٪ را گزارش کردند[9] که در این مطالعه نیز از ۶۹ مورد سل ریوی ۲۷ مورد (۳۹/۱٪) دارای PCR مثبت و ۴۲ مورد (۶۰/۹٪) دارای PCR منفی بودند، که می‌توان گفت تقریبا نتایج همخوانی دارند. بر اساس این مطالعه حساسیت تست PCR خون محیطی ۴۴/۱٪ به‌دست آمده است که با مطالعه Taci در بیمارستان آموزشی و تحقیقاتی بیماری‌های قفسه سینه و جراحی توراسیک اتاتورک آنکارا مطابقت دارد که PCR در ۱۶ مورد از

۴۰ بیمار (۴۰٪) مثبت و در ۲۴ مورد از ۴۰ بیمار (۶۰٪) منفی بود. هیچیک از کنترل‌ها PCR مثبت نداشتند. حساسیت، ویژگی و دقت کلی روش PCR به‌ترتیب ۴۰ و ۱۰۰ و ۶۰ درصد بود. همچنین نتیجه کلی ۳۳/۷٪ به‌دست آمده در مطالعه ما با مطالعه Honore که در بیمارستان سنت لوئین پاریس از ژانویه تا ژوئن ۱۹۹۸ و بر روی ۹۰ بیمار بستری و ۵۰ فرد سالم به‌عنوان کنترل انجام شده است مطابقت دارد. در مطالعه Honore برای ۲۳ بیمار تشخیص توبر- کلوزیس گذاشته شده در ۲۰ بیمار مبتلا به TB کشت مثبت بود، در هفت بیمار اسمیر از نظر باسیل اسید فاست مثبت بود. حساسیت اسمیر و کشت و nested PCR به‌ترتیب ۳۰/۴٪ و ۸۷٪ و ۳۰/۴٪ بود. ویژگی اسمیر و کشت هر دو ۱۰۰٪ بود. حساسیت nested PCR در بیماران مبتلا به TB ریوی پایین بود ولی در بیماران مبتلا به TB ریوی- خارج ریوی و TB خارج ریوی و TB منتشر افزایش یافت و به‌ترتیب به ۵۰٪ و ۳۳٪ و ۳۳٪ رسید.[10] در این مطالعه نیز برای بیماران خارج ریوی و منتشر همین نتایج به‌دست آمد. در این مطالعه حساسیت به‌دست آمده PCR خون محیطی از نظر مایکوباکتریوم توبرکلوزیس برای سل خارج ریوی ۱۹/۲٪ بوده که در مطالعه میرزا و همکاران در کراچی پاکستان برای لنفادنیت سلی ۶۳٪ تست PCR مثبت گزارش کردند که مطالعه روی ۴۸ بیمار مبتلا به لنفادنیت سلی صورت گرفته بود،[11] اما در این مطالعه تنها پنج بیمار مبتلا به لنفادنیت وجود داشت که از این تعداد تنها یک مورد دارای تست PCR خون محیطی مثبت بود (۲۰٪). ممکن است علت این تفاوت در دو مطالعه، هوموژن بودن جمعیت بیماران میرزا و پیشرفته‌تر بودن بیماری آنها (مثلا موارد لنفادنیت همراه با سل منتشر نیز وارد مطالعه شده باشد) و یا تعداد بیشتر این بیماران باشد و اگر ما هم همین تعداد بیمار مبتلا به لنفادنیت در دسترس داشتیم، احتمال داشت تا درصد بیشتری PCR مثبت داشته باشند. در مطالعه Del Prete در انستیتوی میکروبیولوژی پزشکی در دانشگاه باری ایتالیا در سال ۱۹۹۷ که از سکانس IS6110 به‌عنوان پرایمر استفاده شده بود ۲۶ مورد از ۳۰ مورد مثبت شده بود[12] که این نتیجه با سایر مطالعات و همچنین با مطالعه ما تفاوت داشت. در این مطالعه تنها یک مورد PCR مثبت در بیمار HIV مثبت مبتلا به سل خارج ریوی گزارش شد (از مجموع ۲۶ بیمار مبتلا به سل خارج ریوی) که در مطالعه Richter در مرکز پزشکی موهیمبیلی دارالسلام تانزانیا هم از ۱۰۳ بیمار HIV مثبت با سل خارج ریوی ۲۲ مورد (۲۲/۴٪) دارای PCR مثبت بودند.[13] در مطالعه Folgueira در گروه میکروبیولوژی بالینی بیمارستان دوسه د اکتبره مادرید اسپانیا در ۳۸ بیمار بستری مشکوک به سل لوکالیزه یا منتشر انجام گرفت (۱۵ بیمار HIV مثبت و ۲۳ بیمار HIV منفی) و نمونه خون محیطی آنها از نظر مایکوباکتریوم توبرکلوزیس PCR گردید. در ۳۲ نفر از این ۳۸ نفر با روشهای معمول هیستولوژیک و میکروبیولوژیک حقیقتا" وجود سل تأیید گردید. DNA مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در PCR سلولهای مونونوکلئر خون محیطی در ۹ نفر از ۱۱ بیمار HIV مثبت (۸۲٪) و در هفت نفر از ۲۱ بیمار HIV منفی (۳۳٪) تشخیص داده شد (p<۰/۰۱). درحالی‌که کشت‌های خون از نظر مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در یک نفر از هشت بیمار (۱۱/۵٪) و یک نفر از ۱۸ بیمار (۵/۵٪) مثبت شد. PCR در تمامی موارد TB منتشر چه HIV مثبت و چه HIV منفی، مثبت گزارش شد. (همچنین در تمام موارد سل خارج ریوی افراد HIV مثبت).[14] ولی در مطالعه ما نتایج گرفته شده با ۳۳٪ بیماران HIV منفی هماهنگ بوده ولی با نتایج بیماران مبتلا به سل منتشر مطابقت ندارد که ممکن است ناشی از selection بیماران و Bios در مطالعه با توجه به تعداد کمتر بیماران نسبت به ۹۵ بیمار ما، مایکوباکتریمی شدیدتر بیماران آنها و یا انجام دقیقتر آزمایش بوده باشد. در مطالعه Tan در انستیتوی بیماری‌های ریوی بیمارستان قفسه صدری ژوانگ ژوای چین در سال ۱۹۹۹ انجام شده که جهت مقایسه دو روش Amplisensor-PCR و SN-PCR (IS6110 single tube nested PCR) انجام گردید. میزان مثبت شدن برای MTB DNA به‌ترتیب ۶۰/۵٪ و ۶۳/۵٪ بود. میزان مثبت شدن PCR با دو روش فوق در مورد ۸۵ بیمار غیر مبتلا به سل ریوی به‌ترتیب ۴/۷٪ و ۸/۲٪ بود.[10] این نتایج بالاتر از نتایج حاصله از این مطالعه می‌باشد که ممکن است به‌علت حساسیت بیشتر روش Amplisensor-PCR باشد و یا اینکه تعداد بیشتری از بیماران آنها دارای سل منتشر و یا نقص ایمنی بوده و یا سایر بیماریهای زمینه‌ای بوده‌اند و مایکوباکتریمی داشته‌اند و ضمنا مثبت کاذب این مطالعه هم قابل تامل است. در مطالعه ما ۹ بیمار از ۲۴ بیمار HIV منفی ولی دارای اسمیر مثبت دارای PCR مثبت بوده‌اند (۳۷/۵٪) که در مطالعه Taci در ترکیه در سال ۲۰۰۳ میزان ۴۰٪ به‌دست آمد که با کمی اغماض می‌توان نتایج دو مطالعه را همخوان دانست.[15] در مطالعه Condos در مرکز مراقبت‌های پزشکی بحرانی و ریوی در دانشگاه پزشکی نیویورک انجام شده است و از سکانس

IS6110 استفاده شده است ۲۶ نفر (۶۳٪) از آنهایی که اسمیر خلط منفی داشتند با روش PCR تشخیص داده شدند. در پنج بیمار که با روش PCR تشخیص سل گذاشته شده بود، تشخیص بالینی نهایی، سل را ثابت نکرد و دو نفر از ۴۴ مورد نتیجه PCR منفی در نهایت منفی کاذب بودند.[۱۶] ولی در این مطالعه دو مورد از ۹ مورد اسمیر منفی دارای PCR مثبت بوده‌اند (۲۲/۲۲٪) که به احتمال زیاد مربوط به HIV مثبت بودن بیماران آنها بوده است (در مطالعه کوندوس اکثر بیماران HIV مثبت بوده‌اند). بر اساس نتایج به‌دست آمده از این طرح و حساسیت به‌دست آمده ۴۴/۱٪ برای نوع ریوی و ۱۹/۲٪ برای نوع خارج ریوی و ۱۰٪ برای سل منتشر به‌نظر می‌رسد که حساسیت PCR خون محیطی برای تشخیص سل، چه ریوی و چه خارج ریوی و حتی منتشر پایین بوده و علیرغم اینکه بر اساس مطالعات مشابه، انتظار داشتیم در نوع خارج ریوی و منتشر میزان مایکوباکتریمی و در نتیجه میزان PCR خون محیطی بیشتر مثبت باشد ولی این انتظار برآورده نگردید، لذا به‌عنوان یک روش جانشین برای تشخیص مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در مواردی که ظن بالینی شدید به بیماری سل وجود دارد مطرح نبوده و قابل استناد نیست، کیفیت Extracted DNA، محصولات مهار کننده PCR، انتخاب سکانس هدف (Targeted Sequence)، و مهارت اپراتور انجام‌دهنده PCR عناصر اصلی تحت تاثیر قرار دهنده حساسیت تقویت‌کننده‌های ژنومیک (Genomic Amplificators) هستند و با توجه به هزینه زیاد آن، تا استاندارد سازی بیشتر این روش و یافتن راهی جهت افزایش حساسیت و ویژگی آن بهتر است هنوز از Acid Fast Staining نمونه‌های کلینیکی جهت Rapid Diagnosis، و از کشت به‌عنوان تست استاندارد طلایی در موارد مشکوک استفاده شود و از این روش تنها به‌عنوان یک روش اضافی و مکمل برای تشخیص و یا تائید تشخیص در بیماران بسیار بدحال و مشکوک به سل استفاده شود، به‌خصوص در انواع خارج ریوی که معضل تشخیص در مواردی که بدست آوردن نمونه مشکل یا غیر ممکن می‌باشد وجود دارد. در افراد HIV مثبت هم با توجه به حساسیت ۵۷/۱٪ به‌دست آمده، باز هم حساسیت پائین بوده و پیشنهاد می‌گردد که از PBMC MTB-PCR تنها به‌عنوان یک روش کمکی در تشخیص موارد شدیدا مشکوک استفاده شود.

References

1. Kasper DL. Harrison's principles of internal medicine. 16th ed. New York: McGraw-Hill: 2005.
2. Hass DW. Mycobacterial Disease. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th ed. New York: Churchill Livingstone: 2005; p. 2852-86.
3. WHO Report 2005: Global tuberculosis control. Available at: [http://www.who.int/globalatlas/predefinedReports/].

٤. قانع شیرازی رضا و همکاران. اپیدمیولوژی سل، در کتاب سل و اصول مبارزه با آن، مرکز تحقیقات بیماری سل استان فارس، چاپ دوم، انتشارات پرواز ۱۳۸۰، صفحات ۲۳ تا ۲۴.

٥. کمیته فنی کشوری مبارزه با سل، راهنمای کشوری مبارزه با سل، چاپ سوم، تهران: مرکز مدیریت بیماریهای وزارت بهداشت و درمان و آموزش پزشکی، ۱۳۸۱.

٦. کریمی م، زینعلی س. در ترجمه PCR مبانی و کاربردهای آزمایشگاهی، مولفین: مک فرسون ام جی، مولر اس جی. چاپ اول. تهران: انتشارات اندیشه ظهور، ۱۳۸۴.

7. Parandaman V, Narayanan S, Narayanan PR. Utility of polymerase chain reaction using two probes for rapid diagnosis of tubercular pleuritis in comparison to conventional methods. *Indian J Med Res* 2000; 112: 47-51.
8. Villegas MV, Labrada LA, Saravia NG. Evaluation of polymerase chain reaction, adenosine deaminase, and interferon-gamma in pleural fluid for the differential diagnosis of pleural tuberculosis. *Chest* 2000; 118: 1355-64.
9. 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: 3094-5.
10. 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: 481-3.
11. Mirza S, Restrepo BI, McCormick JB, Fisher-Hoch SP. Diagnosis of tuberculosis lymphadenitis using a polymerase chain reaction on peripheral blood mononuclear cells. *Am J Trop Med Hyg* 2003; 69: 461-5.
12. Del Prete R, Mosca A, D'Alagni M, Sabato R, Picca V, Miragliotta G. Detection of Mycobacterium tuberculosis DNA in blood of patients with acute pulmonary tuberculosis by polymerase chain reaction and non-isotopic hybridisation assay. *J Med Microbiol* 1997; 46: 495-500.
13. Richter C, Kox LF, Van Leeuwen JV, Mtoni I, Kolk AH. PCR detection of mycobacteraemia in tanzanian patients with extrapulmonary tuberculosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996; 15: 813-7.
14. Folgueira L, Delgado R, Palenque E, Aguado JM, Noriega AR. Rapid diagnosis of Mycobacterium tuberculosis bacteremia by PCR. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 512-5.
15. 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: 676-81.
16. Schluger NW, Condos R, Lewis S, Rom WN. Amplification of DNA of Mycobacterium tuberculosis from peripheral blood of patients with pulmonary tuberculosis. *Lancet* 1994; 344: 232-3.

Tehran University Medical Journal; Vol. 65, No. 11, Feb 2008: 6-12

Peripheral Blood Mononuclear Cell *Mycobacterium tuberculosis* PCR sensitivity in diagnosis of Tuberculosis

Hajiabdolbaghi M.[1]
Allishah H.A.[*2]
Rasoolinejad M.[2]
Bahador A.[3]
Izadi M.[2]
Mobaien A.R.[2]

1- Department of Infection Disease, Aids Research center
2- Department of Infection Disease
3- Department of Microbiology

Tehran University of Medical Sciences

* Corresponding author: Dept. of Infection Disease, Imam Khomeini Hospital, Keshavarz Blvd., Tehran.
Tel: +98-911-1914307
email: dr_allishah@yahoo.com

Abstract

Background: Tuberculosis is still one of the most important causes of mortality and morbidity in many countries and is the second only to human immunodeficiency virus as a cause of death worldwide resulting from a single infectious agent. In 1993, the World Health Organization declared tuberculosis a global public health emergency. Conventional methods for the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) infections are time consuming, as MTB culture requires 3-8 weeks for growth. To determine the sensitivity of polymerase chain reaction (PCR) in peripheral blood mononuclear cells (PBMC), we have evaluated Mycobacterium tuberculosis DNA in peripheral blood samples with PCR technique in adults with new cases of pulmonary and extra-pulmonary tuberculosis. Setting: Department of Infectious disease of Imam Khomeini Hospital, 2004- 2005, Tehran, Iran.

Methods: In this cross-sectional study, we evaluated MTB DNA extracted from 3ml citrated peripheral blood samples from 95 adults with new cases of pulmonary and extra-pulmonary tuberculosis. DNA extraction was performed using a commercial PCR kit with IS1081 primers. For prevention of cross contamination and reduction of false positives, all steps were performed under laminar hood.

Results: The 95 patients, 59 of whom were male, had a mean age 44.44 years (SD±20.26); 69 cases had pulmonary and 26 had extra-pulmonary tuberculosis. PCR was positive in 32 (33.7%) patients and negative in 63 (66.3%) cases. The overall sensitivity and accuracy of the PCR assay was 44.1% for pulmonary, 19.2% for extra-pulmonary and 10% for disseminated tuberculosis, respectively.

Conclusion: The low sensitivity of the IS1081 primer MTB-PCR assay on PBMC may pose problems for the rapid diagnosis of tuberculosis. However, further studies are needed to confirm this technique as an alternative test for the diagnosis of tuberculosis.

Keywords: Tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, PCR.