Original Article

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۱۸، شماره ۱، بهار ۸۷، صفحات ۱۷ تا ۲۰

بررسی ارزش PCR در تشخیص سل در نمونه‌های ادرار

فروزان محمدی[۱]، شهرزاد جابری انصاری[۲]، محمد ورهرام[۳]، مریم شیخ الاسلامی[۴]، شیرین کریمی[۵]، پریسا فرنیا[۶]

[۱] دانشیار، بخش پاتولوژی، پژوهشکده سل و بیماری های ریوی، بیمارستان دکتر مسیح دانشوری، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران
[۲] دندانپزشک، دانشجوی دوره دستیاری آسیب شناسی دهان، دانشکده دندانپزشکی شهید بهشتی تهران
[۳] پزشک، مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی، پژوهشکده سل و بیماری های ریوی، بیمارستان دکتر مسیح دانشوری، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران
[۴] کارشناس ارشد انگل شناسی، بخش پاتولوژی، پژوهشکده سل و بیماری های ریوی، بیمارستان دکتر مسیح دانشوری، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران
[۵] استادیار، بخش پاتولوژی، پژوهشکده سل و بیماری های ریوی، بیمارستان دکتر مسیح دانشوری، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران
[۶] دانشیار، بخش میکروب شناسی، پژوهشکده سل و بیماری های ریوی، بیمارستان دکتر مسیح دانشوری، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران

چکیده

سابقه و هدف: *علی‌رغم پیشرفت‌های زیادی که در امر بهداشت و سلامت عمومی صورت گرفته، تعداد مبتلایان به توبرکلوز در سال-های اخیر به طور روز افزونی در حال افزایش است. در این مطالعه، روش PCR برای کشف DNA مایکوباکتریوم توبرکلوزیس نمونه‌های ادرار مورد بررسی قرار گرفت.*

روش بررسی: *در این مطالعه آزمون‌های تشخیصی، کلیه نمونه‌های ادرار که از سال ۱۳۷۷ تا ۱۳۸۳ برای آنها PCR انجام شده بود مورد بررسی قرار گرفت. در موارد مشکوک Nested PCR نیز برای نمونه انجام گرفت و جواب این آزمون به عنوان پاسخ نهایی در نظر گرفته شد. در نهایت، جواب کشت و اسمیر مستقیم نمونه‌ها با نتیجه PCR آنها مقایسه گردید.*

یافته‌ها: *از مجموع ۵۰۹ نمونه، در ۲ نمونه هر سه آزمون کشت و اسمیر و PCR مثبت بود. در۵ مورد کشت و اسمیر مثبت و PCR منفی بود. در ۲ نمونه اسمیر منفی و دو آزمون دیگر مثبت و در دو نمونه نیز کشت منفی و دو آزمون دیگر مثبت بود. در ۴ مورد تنها کشت مثبت بود. در ۴ نمونه فقط اسمیر و در ۱۹ نمونه تنها PCR مثبت شد. روش PCR در مقایسه با دو روش کشت و اسمیر، حساسیت ۳۱ درصد، ویژگی ۹۶ درصد، ارزش اخباری مثبت ۳۱ درصد و ارزش اخباری منفی ۹۶ درصد داشت.*

نتیجه‌گیری: *با توجه به حساسیت پایین PCR نمونه‌های ادراری، این روش برای مشخص نمودن بیماران کاربرد چندانی نخواهد داشت، ولیکن به عنوان تعیین سلامت افراد سالم و بررسی سیر درمان، با در نظر گرفتن ویژگی بالای آزمون، قابل استناد خواهد بود.*

واژگان کلیدی: *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، PCR، ادرار.*

مقدمه

علی‌رغم پیشرفت‌های فراوانی کـه در امـر بهداشـت و سـلامت عمومی جوامع مختلف صورت گرفته است، تعداد مبتلایـان بـه توبرکلوز در سالهای اخیر به طور روزافزونـی در حـال افـزایش است. از طرفی روش‌های سنتی تشخیص توبرکلوز نیز پیچیـده و مستلزم صرف زمان زیاد می‌باشد. به همین دلیل روش‌هـایی نظیـر یـافتن ژنـوم بـاکتری بوسـیله PCR (واکـنش زنجیـره پلی‌مرازی) و یا یافتن آنتی‌ژن‌های مایکوباکتریوم توسـط روش ایمونوهیستوشیمی می‌تواند در این زمینه راهگشا باشد (۱).

آدرس نویسنده مسئول: تهران، بیمارستان مسیح دانشوری، بخـش پـاتولوژی کلینیکـال آناتومیکـال، دکتـر شهرزاد جابری انصاری (**email**:researchoffice@nritld.ac.ir)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۶/۱۰/۳۰
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۷/۲/٤

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-09-05]

PCR تکنیکی است که بوسیله آن می‌توان قطعه خاصی از مولکول DNA مورد نظر را به تعداد بسیار زیاد تکثیر و ردیابی کرد و به این طریق تعداد بسیار اندک باکتری نیز در نمونه قابل شناسایی می‌شود (۲). در فرایند PCR از روی یک قطعه از رشته DNA، میلیون‌ها نسخه ساخته می‌شود و این امر، علت حساسیت بالای این روش است. این حساسیت بالای PCR در مواردی همچون یافتن مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در نمونه‌های خارج ریوی می‌تواند سودمند واقع شود (۲)، زیرا در این نمونه‌ها اکثراً تعداد باسیل بسیار اندک می‌باشد.

در خواست آزمایش سل در نمونه ادرار معمولاً زمانی از طرف پزشک صورت می‌گیرد که شک به سل کلیوی و یا سل دستگاه تناسلی وجود داشته باشد. هرچند در ۸-۵ درصد از مبتلایان به سل ریوی بدون اینکه علائم و شواهد بالینی و یا آزمایشگاهی از درگیری دستگاه ادراری یا تناسلی وجود داشته باشد،کشت ادرار مثبت می‌شود (۵-۳).

با توجه موارد فوق، در این تحقیق سعی شده است توانایی روش PCR برای پیدا کردن مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (MTB) در نمونه‌های ادرار در مقایسه با اسمیر و کشت مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روشها

این تحقیق، به صورت مشاهده‌ای و از نوع آزمون‌های تشخیصی است که بر اساس اطلاعات بخش PCR و بخش مایکوباکتریولوژی بیمارستان مسیح دانشوری انجام شد. اطلاعات مربوط به کلیه نمونه‌های ادرار که از سال ۱۳۷۷ تا ۱۳۸۳ برای آنها PCR انجام شده بود، مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌های ادرار مربوط به بیماران بستری در بیمارستان یا نمونه‌های خارج بیمارستانی به صورت جمع‌آوری ادرار ۲۴ ساعته بودند.

استخراج DNA به شیوه فنل-کلروفرم - ایزوامیل الکل (PCI) انجام شد و سپس PCR انجام گرفت. در موارد مشکوک Nested PCR نیز برای نمونه انجام گرفت و جواب این آزمون به عنوان پاسخ نهایی در نظر گرفته شد. برای اطمینان از صحت آزمایش PCR، کنترل‌های مثبت و منفی هر سری از آزمایشات نیز چک شد. اطلاعات مربوط به کشت و اسمیر ادرار بیماران نیز جمع‌آوری شد. لازم به دکر است که نمونه‌های مثبت در محیط کشت LG معمولاً در مدت ۴۰-۲۰ روز رشد می‌کنند. جهت اسمیر مستقیم نیز پس از دکانتامینه کردن نمونه‌ها، از آنها لام تهیه می‌شود

داده‌های به دست آمده به صورت فراوانی و درصد بیان شدند. برای بررسی میزان حساسیت و ویژگی آزمون PCR نسبت به روش‌های دیگر از تجزیه و تحلیل حساسیت و ویژگی استفاده گردید.

یافته‌ها

از مجموع ۵۰۹ نمونه، در ۲ نمونه هر سه آزمون کشت و اسمیر و PCR مثبت بود. در۵ مورد کشت و اسمیر مثبت و PCR منفی بود. در ۲ نمونه اسمیر منفی و دو آزمون دیگر مثبت و در دو نمونه نیز کشت منفی و دو آزمون دیگر مثبت بود. در ۴ مورد تنها کشت مثبت بود. در ۴ نمونه فقط اسمیر و در ۱۹ نمونه تنها PCR مثبت شد. تعداد نمونه‌هایی که هر سه آزمون آنها منفی شد، ۴۷۱ نمونه بود. مجموعاً در ۲۵ مورد، PCR مثبت شد. از میان ۵۵ نمونه ای که برای آنها Nested PCR انجام شد، تنها ۲ نمونه از نظر وجود DNA مایکوباکتریوم، مثبت و بقیه منفی شدند.

در کلیه موارد PCR انجام شده، کنترل مثبت آزمایش، کار کرده بود که این نشان دهنده صحت PCR انجام شده است و در کنترل منفی نیز آلودگی وجود نداشت. البته این موضوع احتمال انتقال آلودگی به طور موردی را کاملا بر طرف نمی‌سازد؛ به این معنی که هنوز احتمال اینکه نمونه‌ای بطور اتفاقی آلوده شده و جواب مثبت کاذب ایجاد کرده باشد وجود دارد. در اینگونه موارد مقایسه جواب اسمیر مستقیم و کشت که به عنوان استاندارد تشخیصی (Gold Standard) تلقی می‌شود با جواب PCR موضوع را مشخص می‌کند.

با توجه به مشاهدات، روش PCR در مقایسه با دو روش کشت و اسمیر، حساسیت ۳۱ درصد، ویژگی ۹۶ درصد، ارزش اخباری مثبت (PPV) ۳۱ درصد و ارزش اخباری منفی (NPV) ۹۶ درصد داشت.

جدول ۱- نتایج PCR، کشت و اسمیر نمونههای ادراری از نظر مایکوباکتریوم توبرکلوزیس

	PCR (+)	PCR (-)	مجموع
کشت (+)			
اسمیر (+)	۲	۵	۷
اسمیر (-)	۲	۴	۴
کشت (-)			
اسمیر (+)	۲	۴	۶
اسمیر (-)	۱۹	۴۷۱	۴۹۰
مجموع	۲۵	۴۸۴	

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-09-05]

بحث

کشت استاندارد تشخیصی (Gold Standard) سل است، هر چند برای این کار به طور متوسط ۶ تا ۸ هفته زمان لازم است که این زمان بستگی به نوع نمونه و میزان باسیل‌های موجود در آن دارد. در عین حال، عواملی نظیر سلامت محیط کشت، شرایط نگهداری کشت، نحوه انتقال نمونه به محیط کشت، انتقال آلودگی و حتی مصرف داروی ضد TB در زمان انجام نمونه‌گیری نیز می‌تواند بر نتیجه آزمایش مؤثر باشد (۶).

شناسایی DNA باسیل از طریق روش PCR در مقایسه با کشت بسیار سریع‌تر است، ولی با روش‌های موجود هنوز حساسیت کمتری از کشت دارد. این حساسیت پایین در مورد نمونه‌های خارج ریوی از جمله ادرار بیشتر به چشم می‌خورد. در تحقیق Kafwabulula M و همکارانش بر روی نمونه ادرار ۶۳ بیمار مبتلا به سل تأیید شده با کشت، حساسیت دو روش متفاوت PCR، ۲۸/۶ و ۵۵/۶ درصد به دست آمد (۷). Torrea و همکارانش نیز حساسیت آزمون PCR را برای ادرار بیماران با سل ریوی کشت مثبت و بیماران با سل ریوی کشت منفی بررسی کردند و حساسیتی معادل ۴۰/۵ تا ۶۶/۷ درصد به دست آوردند (۸).

در تحقیق حاضر حساسیت روش PCR برای تشخیص مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در مقایسه با کشت ۳۰/۷ درصد به دست آمد. اختصاصیت PCR نیز در مقایسه با کشت ۹۶/۱ درصد بود. علت این اختلاف حساسیت، می تواند بررسی ادرار بیماران دارای سل ریوی با کشت مثبت در تحقیقات قبلی باشد. در حالی‌که تحقیق اخیر بر روی کلیه نمونه‌های ارسالی به این آزمایشگاه انجام شد. از طرفی با بررسی میزان حساسیت این تحقیق (۳۰/۸ درصد) و دو روش استفاده شده در گزارش Kafwabulua (۲۸/۶ و ۵۵/۶ درصد) می توان نتیجه گرفت که مراحل انجام PCR می‌تواند در میزان حساسیت آزمایش تأثیرگذار باشد.

Sechi A و همکارانش در بررسی نمونه‌های ادرار بیماران HIV مثبت و منفی مشاهده نمودند که تعداد نمونه‌های ادراری که با روش PCR از نظر وجود مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مثبت شدند، در بیماران HIV مثبت، دو برابر بیماران HIV منفی بود که این اختلاف می‌تواند ناشی از وجود باسیل بیشتر در ادرار بیماران HIV مثبت باشد (۹).

از آنجا که ارگانیسم MTB به صورت متناوب در ادرار بیماران دفع می‌شود، لذا در نمونه‌های راندوم نسبت به ادرار ۲۴ ساعته احتمال بروز نتیجه منفی کاذب بیشتر است (۱۰). اگر چه در این تحقیق، نمونه ادرار ۲۴ ساعته بیماران مورد بررسی قرار گرفته است، عدم رعایت استانداردهای لازم جهت جمع‌آوری مناسب نمونه ادرار (توسط بیمار یا کارکنان ذیربط) و یا تأثیر آلودگی‌زدایی (Decontamination) می‌توانند میزان دستیابی به باسیل سل را در روش PCR کاهش دهند.

در ۵ موردی که PCR منفی و دو آزمون دیگر مثبت شده است، وجود ممانعت کننده های PCR می‌تواند توجیه کننده مسأله باشد. در ۴ موردی که اسمیر مثبت و دو آزمون دیگر منفی بود، می توان پیشنهاد نمود که وجود مایکوباکتریوم آتیپیک در آب مصرفی آزمایشگاه مسبب این مثبت شدن باشد. در ۲ موردی که کشت منفی و اسمیر و PCR مثبت شدند، علت می‌تواند مصرف داروهای ضد TB قبل از دادن نمونه باشد که سبب از بین رفتن حیات باکتری شده ولی هنوز باسیل کشته شده در اسمیر مشاهده شده و همچنین DNA آن باعث مثبت شدن PCR شده است. مقایسه میزان حساسیت روش PCR در نمونه ادرار مقالات مختلف با حساسیت به دست آمده از خلط (۸۳/۳ تا ۹۶/۸) (۱۵-۱۱) می تواند حاکی از وجود باسیل بیشتر در نمونه‌های ریوی نسبت به نمونه‌های خارج ریوی باشد.

از طرفی ممانعت کننده‌های PCR که از دلایل مهم منفی شدن PCR می‌باشند، می‌توانند بر نتیجه آزمایش اثر بگذارند. این عوامل می‌توانند ناشی از طبیعت نمونه‌های بیولوژیکی و یا روش و معرف‌های مورد استفاده در استخراج DNA باشند. بسیاری از این عوامل هنوز به خوبی شناسایی نشده‌اند، ولی عوامل شناخته شده‌ای نظیر وجود مقادیر بیش از حد SDS ، ترکیبات فنلی و فلزات سنگین (۱۶) که در فرایند استخراج DNA استفاده می‌شوند، وجود دارند. در تحقیق جاری، وجود ممانعت کننده‌های PCR در نمونه‌های ادرار در تعدادی از نمونه‌ها مشاهده شد که می‌تواند از علل پایین بودن حساسیت روش PCR در مورد نمونه‌های ادرار باشد. هم‌چنان‌که بنا به گزارش Vollenhoven (۱۰)، وجود ممانعت کننده‌های PCR در نمونه‌های ادرار حدود ۱۰ درصد بوده است. با توجه به این موضوع تکنیک انجام PCR برای ادرار نسبت به خلط شاید نیازمند تغییراتی برای بهره‌گیری از جواب دقیق‌تر باشد.

با توجه به کمتر بودن حساسیت PCR در ادرار نسبت به خلط پیشنهاد می‌شود تغییراتی در آزمون PCR برای بهره‌گیری بهتر صورت گیرد. با توجه به حساسیت پایین، این روش به عنوان یک ابزار آزمایشگاهی تشخیصی برای مشخص نمودن بیماران کاربرد چندانی نخواهد داشت، ولیکن به عنوان تعیین

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-09-05]

صحت سلامت افراد سالم و بررسی سیر درمان بیماران، با در نظر گرفتن ویژگی بالای آزمون، قابل استناد خواهد بود و می‌توان به عنوان یک آزمون کمکی از این روش استفاده نمود. از این مطالعه نتیجه‌گیری می‌شود که از نظر آماری بین نتایج PCR ، اسمیر مستقیم و کشت تطابق وجود دارد؛ علت کم بودن موارد مثبت وارد نمودن تمام نمونه‌های ادرار در مطالعه، صرف نظر از مثبت بودن کشت آنها و یا وجود مواد ممانعت کننده در ادرار است و با توجه به کمتر بودن حساسیت PCR در ادرار نسبت به خلط لازم است تغییراتی در آزمون PCR برای بهره‌گیری بهتر صورت گیرد.

REFERENCES

1. Bass GB Jr, Farer LS, Hopewell PC, Jacobs RF, Snider DE Jr. Diagnostic standards and classification of tuberclosis. Am Rev Respir Dis 1990;142:725-35.
2. Van Vollenhoven P, Heyns CF, de Beer PM, Whitaker P, Van Helden PD, Victor T. Polymerase chain reaction in the diagnosis of urinary tract tuberculosis. Urol Res 1996;24:107-11.
3. Bentz RR, Dimcheff DG, Nemiroff MJ, Tsang A, Weg JG. The incidence of urine cultures positive for Mycobacterium tuberculosis in a general tuberculosis patient population. Am Rev Respir Dis 1975;111:647-50.
4. Favez G, Nicca B, Pressia O. Recherch systematique la bacillurie asymptomatique chez 120 tuberculeux pulmonaries non selsctionnes. Schweiz Med Wschr 1972 ;102: 877-80.
5. Barbezat CI. Tuberculose renal systematique chez des tuberculeux pulmonaries non selsctionnes. Schweiz Rundschua Med 1981;70:241-50.
6. Mortier E, Pouchot J, Girard L, Boussougant Y, Vinceneux P. Assesment of urine analysis for the diagnosis of tuberculosis. BMJ 1996;312:27-28.
7. Kafwabulua M, Ahmed K, Nagatake T, Gotho J, Mitarai S,Oizumi K, et al. Evaluation of PCR-based methods for the diagnosis of tuberculosis by identification of mycbacterial DNA in urine samples. Int J Tuberc Lung Dis 2002;6:732-37.
8. Torea G, Van de Perre P, Ouedraogo M, zougba A, Sawadogo A, Dingtoumda B, et al. PCR-based detection of the mycobacterium tuberculosis complex in urine of HIV-infected and uninfected pulmonary and extrapulmonary tuberculosis patients in Burkina Faso. J Med Microbiol 2005;54:39-44.
9. Sechi LA, Pinna MP, Sanna A, Pirina P, Ginesu F, Saba F, et al. Detection of mycobacterium tuberculosis by PCR analysis of urine and other clinical samples from AIDS and non-HIV-infected patients. Mol Cell Probes 1997;11:281-85.
10. van Vollenhoven P, Heyns CF,de Beer PM, Whitaker P, van Helden PD, Victor T. Polymerase chain reaction in the diagnosis of urinary tuberculosis. Urol Res 1996;24:107-12.
11. Tansuphasiri U, Boonrat P, Rienthong S. Direct identification of Mycobacterium tuberculosis from sputum on Ziehl-Neelsen acid fast stained slides by use of silica-based filter combined with polymerase chain reaction assay. J Med Assoc Thai 2004;87:180-89.
12. Kivihya-Ndugga L, van Cleeff M, Juma E, Kimwomi J, Githui W, Oskam L, et al. Comparison of PCR with the routine procedure for diagnosis of tuberculosis in a population with high prevalences of tuberculosis and human immunodeficiency virus. J Clin Microbiol 2004;42:1012-15.
13. Wang G, Ye D, Peng Y. Studies on 5 kinds of methods combination for detection of smear and culture negative pulmonary tuberculosis. Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi 2000;23:47-49.
14. Phulpoto MA, Qayyum S, Rizvi N, Khuhawar SM. Diagnostic yield of fast plaque TB test for rapid detection of Mycobacterium in tuberculosis suspects. J Pak Med Assoc 2005;55:57-60.
15. Ginesu F, Pirina P, Sechi LA, Molicotti P, Santoru L, Porcu L, et al. Microbiological diagnosis of tuberculosis: a comparison of old and new methods. J Chemother 1998;10:293-300.
16. Wilson IG. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. Appl Environment Microbiol 1997;63:3741-51.

[Downloaded from tmuj.iautmu.ac.ir on 2025-09-05]