

نتایج PCR عمومی ESR، CRP و CBC در تشخیص عفونت‌های باکتریال

چکیده

شهلا افشار پیمان^۱
ستاره ممیشی^{۲*}

۱- گروه کودکان، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله الاعظم
۲- گروه کودکان دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

* نویسنده مسئول: تهران، خیابان دکتر قریب، بیمارستان مرکز طبی کودکان، دانشگاه علوم پزشکی تهران
تلفن: ۶۶۴۲۸۹۹۶
email: smamishi@sina.tums.ac.ir

زمینه و هدف: تشخیص زودهنگام باکتری می در کودکان اهمیت زیادی دارد و اطلاعات مهمی راجع به پیش‌آگهی بیماران و انتخاب آنتی‌بیوتیک مناسب فراهم می‌کند، که در نتیجه آن موربیدیتی و مرگ و میر در بیماران کاهش می‌یابد. از طرفی تشخیص عوامل باکتریال از ویرال همیشه راحت نیست بنابراین اگر بتوانیم باکتری می را به سرعت در بیمار تشخیص بدهیم از مصرف غیرضروری آنتی‌بیوتیک پیشگیری شده و عوارض مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها هم کاهش می‌یابد. استفاده از روش PCR موجب شناسایی پاتوژن‌ها در زمان کوتاه‌تر و مناسب‌تر شده است. در این مطالعه هدف ما بررسی فراوانی باکتری می در تشخیص‌های بالینی خاص با روش universal PCR در بیماران تب‌دار بستری در مرکز طبی کودکان و مقایسه آن با آزمایش‌های معمول بوده است. **روش بررسی:** ۱۰۰ کودک تب‌دار و مشکوک به باکتری می که با شکایت تب بستری شدند، تحت بررسی قرار گرفتند. از همه بیماران نمونه‌های خون برای کشت CBC، ESR، CRP و PCR تهیه شد. **یافته‌ها:** ۶۵٪ کودکان در طیف سنی ۳-۳۶ ماه با میانگین ۱۲/۵۰ ماه (۱-۱۲۰) قرار داشتند. ۴۵٪ بیماران پسر بودند. میانگین درجه حرارت بدن در زمان بستری ۳۸/۹±۰/۶ درجه سانتی‌گراد بود. فراوان‌ترین تشخیص‌های بالینی باکتری می بدون کانون (۲۹٪)، پیلوفریت (۲۴٪)، پنومونی (۲۲٪) بود ۱۲ بیمار کشت مثبت خون و ۱۹ بیمار PCR مثبت داشتند. شدت تب و وضعیت یافته‌های آزمایشگاهی WBC، ESR و CRP در بین بیماران با نتایج کشت خون و PCR مثبت یا منفی اختلاف معنی‌دار نداشت. **نتیجه‌گیری:** روش universal PCR برای تشخیص ارگانسیم‌های مسوول باکتری می نسبت به روش‌های مرسوم به نظر می‌رسد مفیدتر باشد.

کلمات کلیدی: باکتری می، سپتی سمی، تب، تشخیص.

مقدمه

دارد: به زمان طولانی جهت پاسخگویی نیاز دارد (۴۸-۲۴ ساعت)؛ از حساسیت پائینی (۴۰٪) در بسیاری از حالات بالینی برخوردار است و حساسیت آن در اثر مصرف آنتی‌بیوتیک کمتر هم می‌شود.^۴ استفاده از ESR، CBC، CRP هم به‌عنوان روش‌های کمکی ذکر شده است اما هیچ‌یک از حساسیت بالایی برخوردار نیستند. استفاده از روش‌های تشخیص ملکولی از جمله universal PCR در یک‌سری از مطالعات اخیر مفید توصیف شده است، زیرا با این روش می‌توان مقادیر بسیار کمی از اجزای پاتوژن‌ها را (DNA، RNA) در خون کشف کرد. انجام این روش در زمان کوتاه‌تری مقدور است (شش ساعت) و تحت تاثیر درمان قبلی با آنتی‌بیوتیک‌ها قرار نمی‌گیرد.^۵ البته مطالعات کمی نشان می‌دهد بررسی نمونه‌های خون با این روش ممکن است به دلیل باکتری‌های آلوده‌کننده دارای نتایج مثبت کاذب باشد.^۶ در این

تشخیص سریع عفونت‌های باکتریال در کودکان بستری با تب منجر به درمان صحیح و زودرس شده و اطلاعات مهمی راجع به پیش‌آگهی بیماران و انتخاب آنتی‌بیوتیک مناسب فراهم می‌کند، که در نتیجه آن موربیدیتی و مرگ و میر در بیماران کاهش می‌یابد. همچنین تشخیص عوامل باکتریال از ویرال در بیماران تب‌دار و بدحال تنها براساس علائم بالینی در بسیاری از مواقع مشکل می‌باشد. اگر بتوانیم باکتری می را در همان ساعات اولیه در بیمار به اثبات برسانیم از درمان غیرضروری آنتی‌بیوتیک وسیع‌الطیف پیشگیری شده و مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها کاهش می‌یابد. از این رو هزینه‌ها و اقامت بیماران در بیمارستان کاهش خواهد یافت.^{۱-۳} روش مرسوم برای تشخیص قطعی باکتری می کشت خون می‌باشد، ولی این تکنیک چند محدودیت

پروتئیناز K مدت ۱۵ دقیقه در دمای 95°C قرار گرفت. سپس برای حذف مواد آلی هم حجم Lysate حاصل از جوش، فنل متعادل شده در $\text{PH}=8$ اضافه گردید و پس از ده دقیقه قرار گرفتن بر روی شکر، به مدت پنج دقیقه در 8000 دور سانتریفوژ شد تا دو فاز فنلی و آبی تشکیل گردد. عمل بعدی اضافه کردن کلروفرم بود که هم حجم نمونه به آن اضافه گردید و پس از ده دقیقه قرار گرفتن بر روی شکر، به مدت پنج دقیقه در 8000 دور مجدداً سانتریفوژ شد تا دو فاز کلروفرم و آبی تشکیل گردد. فاز رویی با استفاده از سمپلر به میکروتیوب دیگری منتقل شد. برای تغلیظ DNA با استفاده از استات سدیم سه مولار، غلظت نهایی استات سدیم را در حجم مایع رویی برداشته شده به 0.3 مولار رسانده شد سپس دو برابر حجم مایع رویی الکل اتیلیک مطلق اضافه گردید و در دمای 20°C - درجه سانتیگراد به مدت دو ساعت نگهداری شد. پس از طی شدن زمان نگهداری در دمای 20°C - درجه سانتیگراد، با دور 12000 به مدت پنج دقیقه سانتریفوژ شده تا DNA غیر محلول رسوب نماید. پس از خارج کردن مایع رویی زمان داده شد تا میکروتیوب حاوی DNA کاملاً خشک شود. برای شستشو با الکل اتانول 70 درصد، 100 میکرولیتر اتانول 70 درصد به میکروتیوب حاوی DNA اضافه گردید و با دور 12000 به مدت پنج دقیقه سانتریفوژ شد. سپس مایع رویی خارج شده و زمان داده شد تا میکروتیوب حاوی DNA کاملاً خشک شود. پس از خشک شدن، 50 میکرولیتر آب مقطر استریل به DNA اضافه گردید و درون بن ماری در حرارت 37 درجه به مدت 30 دقیقه انکوبه شد تا DNA در آب مقطر حل شود. پس از طی این مراحل، نمونه‌ها آماده انجام آزمایش PCR شدند. برای راهاندازی Universal PCR از پرایمرهای ذیل استفاده شده است. پرایمرها جهت PCR از شرکت فرآیند دانش آراین (آلمان) تهیه شد. همچنین مواد مصرفی مثل کلروفرم - گلیسرول - الکل و غیره از شرکت کاسپین ایران تهیه شد.

U1: 5'- CCAGCAGCCGCGGTAATACG -3'

U2: 5'- ATCGG(C/T) TACCTGTGTTACGACTTC -3'

این پرایمرها تعداد ۹۹۷ جفت باز از ژن rRNA ۱۶S را Amplify می‌کنند. پس از استخراج DNA از سوش‌های استاندارد، PCR یونیورسال با شرایط DNA، $1\text{--}1\mu\text{g}$ ، 0.1 ، $2/5\text{mM}$ MgCl_2 ، 0.4mM dNTP، 20 پیکومول Primer، پنج واحد Taq polymerase DNA، پنج میکرومول بافر PCR انجام گرفت. با آب مقطر حجم واکنش به 50 میکرولیتر رسید و با ترموسایکلر اپندرف واکنش Amplification با این مراحل

مطالعه فراوانی باکتری می با این روش در بیماران تبار با تشخیص‌های متفاوت بالینی و پارامترهای آزمایشگاهی بررسی شد.

روش بررسی

در یک مطالعه مقطعی و توصیفی تحلیلی، 100 کودک تبار و مشکوک به باکتری می که در مرکز طبی کودکان از پاییز 83 تا پایان 84 بستری شدند مورد بررسی قرار گرفتند. بیماران با علائم ویروسی مثل کوریزا، کونژنکتیویت و بثورات پوستی تبییک ویروسی و یا دارای بیماری‌های زمینه‌ای مثل بدخیمی، ضعف سیستم ایمنی، نوتروپنی و افرادی که حاضر به همکاری نبودند، از مطالعه خارج شدند. از همه بیماران نمونه‌های خون برای کشت و بررسی PCR تهیه شد. در کلیه بیماران با تب بالای 38.5°C در یک نوبت و علائم بالینی به نفع عفونت باکتریال با یا بدون کانون مشخص علاوه بر آزمایشات روتین و کشت خون در محیط استاندارد سه سی‌سی خون جهت انجام PCR عمومی تهیه و سرم آن جدا شد. نمونه‌های خون لازم برای بررسی با روش PCR و همچنین کشت خون به صورت روتین از بیماران گرفته شد. آزمایش PCR با روش زیر انجام گردیده است. برای جداسازی لکوسیت‌ها بعد از برداشتن پلاسما به‌طور کامل، 10 ml از محلول لیزکننده گلبول قرمز (0.155 M $+\text{NH}_4\text{Cl}$ 10 mM سدیم بی‌کربنات (NaHCO_3) با $\text{PH}=7.2$) به باقی‌مانده سلولی خون اضافه شد و به آرامی مخلوط گشت و پنج دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. سپس در دمای 4°C و دور $400 \times \text{g}$ به مدت ده دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی در یک محلول دترجنت (ساوِلن) دور ریخته شد. دوباره مقدار 10 ml از محلول فوق به رسوب سلولی اضافه شد و به خوبی این رسوب حل شد و در شرایط ذکر شده در بالا سانتریفوژ گشت. مایع رویی دور ریخته شد. رسوب سلولی حاصل در بافر فسفات نمکی (PBS) $\text{PH}=7.2$ حل گشته و در دمای 20°C - نگهداری شد. به منظور لیز لکوسیت‌ها استخراج DNA از محلول لیزکننده 0.1 M Tris HCl، 0.05 M KCl، 0.05 M Tween 20 ، 0.45% ، 0.45% Nonidet P 40 و 0.05 M MgCl_2 و پروتئیناز K به میزان $120\mu\text{g/ml}$ استفاده شد. بعد از سانتریفوژ در دور 12000 rpm به مدت ده دقیقه و دور ریختن مایع رویی، به رسوب سلولی (PBL) حاصل مقدار $500\mu\text{l}$ از محلول لیزکننده فوق اضافه گشت و مدت یک شبانه روز دقیقه در دمای 60°C قرار گرفت تا پروتئیناز K فعال شود. برای غیرفعال کردن

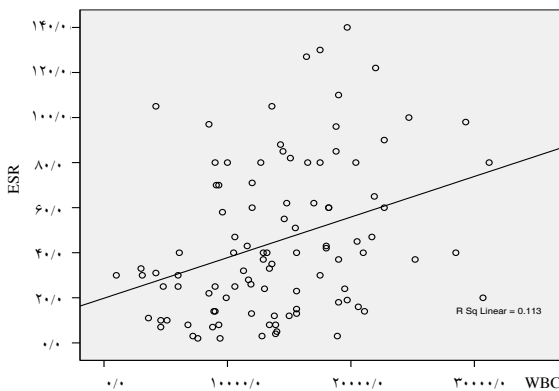
انجام گرفت. دنانوراسیون در ۹۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، آنیلینگ در ۵۵ درجه به مدت ۴۵ ثانیه و extension در ۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه انجام گرفت. این مراحل ۳۰ دفعه تکرار شدند و قبل از این مراحل پره دنانوراسیون به مدت پنج دقیقه و بعد از مراحل فوق نیز Postextension به مدت پنج دقیقه انجام شد. محصول PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید نوارهای DNA توسط UV Trans illuminator مشاهده و عکس گرفته شد. همزمان از آب مقطر استریل به‌عنوان کنترل منفی و از DNA استخراج شده از سوش‌های استاندارد به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. محصول حاصل از آزمایش PCR بر روی ژل آگاروز برده شد و در صورت مشاهده باند مورد نظر با توجه به حرکت الکتروفوریتیک و وزن آن در کنار شاخص وزنی DNA، نمونه از نظر باکتری‌های فوق مثبت در نظر گرفته شد. کنترل منفی و مثبت همراه نمونه‌های بیماران همواره باید به‌ترتیب منفی و مثبت می‌شدند در غیر این صورت آزمایش‌ها تکرار می‌گردید. سایر اطلاعات با مراجعه به پرونده بیماران، شرح حال و معاینه بالینی جمع‌آوری شد. متغیرها شامل سن، جنس، سابقه دریافت آنتی‌بیوتیک، فصل مراجعه، WBC، ESR، CRP، نتیجه کشت خون، میزان تب، تشخیص بالینی و نتیجه تست PCR بود. دستورالعمل کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه رعایت شد و بار اضافی مادی یا معنوی به بیماران تحمیل نگردید. از بیماران یا والدین آنها رضایت‌نامه کتبی دریافت شد. تحلیل با SPSS ویراست ۱۱/۵ انجام شد. مقادیر داده‌های کمی با میانگین \pm انحراف معیار (SD) و داده‌های کیفی به‌صورت فراوانی نسبی و مطلق گزارش گردید. حساسیت، ویژگی، Positive Predictive Value (PPV)، Negative Predictive Value (NPV) (کشت خون به‌عنوان تست استاندارد طلایی و تست مورد بررسی PCR می‌باشد و بنابراین دقت تشخیصی PCR بر اساس نتایج کشت خون محاسبه شد. از تست‌های آماری χ^2 و Fisher's Exact test برای مقایسه داده‌های کیفی با محاسبه Odds ratio (95%CI) و تست آنالیز واریانس (ANOVA) و Post Hoc برای مقایسه داده‌های پارامتریک استفاده شد.

یافته‌ها

۱۰۰ کودک تب‌دار و مشکوک به سپتی سمی مورد بررسی قرار گرفتند. دامنه سنی بیماران از یک ماه تا ده سال با میانگین

جدول ۱- مقایسه میانگین درجه حرارت، CRP، ESR و WBC در بین کودکان تب‌دار مبتلا به عفونت‌های مختلف (Mean ± SD)

تشخیص بالینی	درجه حرارت	WBC	ESR	CRP Titration
باکتری	۳۸/۸۵±۰/۴۸ (۳۸/۵-۴۰)	۱۱۶۰۵/۲±۵۶۵۶/۱۶ (۱۰۰۰-۲۲۷۰۰)	۳۰/۲±۲۳/۲۵ (۲-۱۱۰)	۰/۳۵±۰/۰۱۶ (۰/۰۰۶۲-۰/۰۵)
پنومونی	۳۸/۹۲±۰/۶ (۳۸-۴۰)	۱۴۰۲۲/۷±۵۹۸۵/۵۳ (۳۰۰۰-۳۰۷۰۰)	۴۱/۵۰±۳۹/۴۶ (۲-۱۴۰)	۰/۳۳±۰/۰۱۳ (۰/۰۲۵-۰/۰۵)
مننژیت	۳۹/۲۱±۰/۳۹ (۳۸-۳۹)	۲۱۱۱۴/۲۸±۴۶۹۶/۶۰ (۱۵۰۰۰-۲۸۵۰۰)	۵۳/۴۳±۳۷/۲۲ (۱۲-۱۳۰)	۰/۰۳۷±۰/۰۲۲ (۰/۰۱۲-۰/۰۵)
پیلونفریت	۳۹/۰۲±۰/۶۴ (۳۸-۴۱)	۱۵۹۱۶/۶۶±۵۰۳۹/۶۴ (۵۰۰۰-۲۹۳۰۰)	۵۷/۹±۳۰/۵۴ (۱۳-۱۰۵)	۰/۳۱±۰/۰۱۶ (۰/۰۱۲-۰/۰۵)
سایر علل	۳۹/۱۱±۰/۶۱ (۳۸-۴۰)	۱۲۷۸۸/۸۹±۷۶۳۷/۲۸ (۴۲۰۰-۳۱۲۰۰)	۵۳/۵۰±۳۷/۹ (۳-۱۲۷)	۰/۰۳۵±۰/۰۱۳ (۰/۰۱۳-۰/۰۵)
جمع کل	۳۸/۹۸±۰/۵۷ (۳۸-۴۱)	۱۴۰۵۰/۵۰±۶۳۴۹/۳۸ (۱۰۰۰-۳۱۲۰۰)	۴۵/۱۲±۳۴/۰۱ (۲-۱۴۰)	۰/۰۳۶±۰/۰۱۶ (۰/۰۰۶-۰/۰۵)



شکل ۱- نمودار پراکندگی میزان ESR و WBC

جدول ۲- مقایسه فراوانی نتیجه PCR در بین کودکان تب‌دار بر حسب تشخیص بالینی

تشخیص بالینی	PCR منفی	PCR مثبت	جمع کل
باکتری	۲۳ (%۷۹/۳)	۶ (%۲۰/۷)	۲۹ (%۱۰۰)
پنومونی	۱۹ (%۸۶/۴)	۳ (%۱۳/۶)	۲۲ (%۱۰۰)
مننژیت	۵ (%۷۱/۴)	۲ (%۲۸/۶)	۷ (%۱۰۰)
پیلونفریت	۲۱ (%۸۱/۵)	۳ (%۱۲/۵)	۲۴ (%۱۰۰)
سایر علل	۱۳ (%۷۲/۲)	۵ (%۲۷/۸)	۱۸ (%۱۰۰)
جمع کل	۸۱ (%۸۱)	۱۹ (%۱۹)	۱۰۰ (%۷۹/۳)

بیماران بیشتر بود (%۲۸/۶) اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها به‌دست نیامد (جدول ۲). حساسیت، ویژگی، PPV، NPV و دقت تشخیصی PCR بر اساس نتایج کشت خون به ترتیب %CI ۹۱/۶۷s، %CI ۹۰/۹۱s، %CI ۶۱/۱۱، %CI ۹۸/۶۷ و %CI ۹۱ محاسبه شد.

بحث

باکتری یکی از وخیم‌ترین و تهدیدکننده‌ترین بیماری‌های عفونی و کودکان محسوب می‌شود و ممکن است در اثر طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌های گرم مثبت و گرم منفی ایجاد شود و همراه با یا بدون کانون عفونی باشد.^۹ در عین حال هیچ یافته بالینی اختصاصی برای باکتری جنبه تشخیصی ندارد. از طرف دیگر تشخیص زودهنگام باکتری و عوارض آن مهم‌ترین بخش مراقبت محسوب می‌شود و برای اکثر موارد عفونت‌های جریان خون، درمان فوری مناسب حیاتی است. کشت‌های خون تأثیر مثبتی بر درمان آنتی‌بیوتیک داشته و باید قبل از درمان ضد میکروبی تهیه شود، ولی اطلاعات

مربوط به پاتوژن عفونت‌زا و حساسیت آن در زمان شروع درمان به ندرت فراهم می‌شود.^{۱۰} همچنین به‌خوبی مشخص شده که بخش عمده‌ای (%۷۰) از بیمارانی که از نظر بالینی سپتیک به‌نظر می‌رسند، کشت‌های خون منفی دارند که این مسأله ممکن است ناشی از درمان آنتی‌بیوتیک قبلی، حجم ناکافی نمونه خون، فاکتورهای شناخته شده یا نامشخص باکتریواستاتیک موجود در سرم یا ارگانسیم‌های با رشد تأخیری باشد.^{۱۱} هدف از این مطالعه بررسی نتایج پاراکلینیک به‌ویژه نتایج PCR در بیماران مشکوک به باکتری بود. از این رو به‌نظر می‌رسد با توجه به بالین بیماران و سیر پاسخگویی آنها به درمان این موارد مثبت PCR مثبت واقعی باشد. در یک مطالعه توسط Cursons با استفاده از تکنیک Universal PCR از مجموع ۱۰۱ نمونه برای ۲۵ مورد مثبت بوده، که از این تعداد ده نفر کشت خون منفی و ۱۵ نفر کشت خون مثبت داشته‌اند. حساسیت و ویژگی تست PCR به ترتیب

ناشی از جمع‌آوری نادرست نمونه‌های خون به‌سختی قابل کنار گذاشتن است، مگر اینکه بر اساس کرایتریای بالینی معمول نتایج کشت خون تفسیر شود. شدت تب و میزان یافته‌های آزمایشگاهی WBC، ESR و CRP در بین بیماران با نتایج کشت خون و PCR مثبت یا منفی اختلاف معنی‌دار نداشت. اما در گروه‌های مختلف بالینی با هم تفاوت داشت. در مطالعه Isaacman با بررسی سنجش PCR برای شناسایی باکتری پنوموکوکی بیمارانی که کشت خون مثبت داشتند، درجه حرارت بالاتر، شمارش WBC بیشتر و شمارش نوتروفیل کمتری نسبت به موارد کشت منفی بدون در نظر گرفتن نتایج PCR داشته‌اند، اختلاف معنی‌دار بین بیماران با PCR مثبت و کشت منفی با بیماران با PCR و کشت منفی از لحاظ این یافته‌های بالینی وجود نداشته است.^{۱۷} البته با توجه به اینکه تعداد بیماران در گروه‌های مورد مطالعه ما نیز یکسان نیست و در برخی تشخیص‌ها کمتر بوده است (مثل مننژیت) بنابراین در این باره نیاز به بررسی‌های بیشتر است. همچنین انجام مطالعات مروری سیستماتیک به‌همراه متاآنالیز نتایج بررسی قبلی در مورد میزان تاثیر روش PCR بر نحوه تشخیص و درمان بیماران مشکوک به باکتری می‌مورد نیاز است. در مجموع به‌نظر می‌رسد روش universal PCR برای تشخیص ارگانیزم‌های مسئول باکتری نسبت به روش‌های مرسوم آزمایشگاهی بر اساس زمینه بالینی بیماران حساسیت و ویژگی بیشتری دارد البته چون (تست gold standard برای ارزیابی نتایج مثبت کاذب یا واقعی PCR از لحاظ شناسایی ارگانیزم وجود ندارد، رویکرد معمول تفسیر تشخیص باکتری بر اساس داده‌های PCR یا کشت خون بر اساس زمینه کلی بالینی و سیر بیماری صورت می‌گیرد. هر چند این روش تا حدی سابژکتیو است، به‌نظر می‌رسد که روش آلترناتیوی برای تصمیم‌گیری بر اساس نتایج PCR و کشت وجود نداشته باشد. اما استفاده روتین از آن نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد خصوصاً که هزینه بالاتری نسبت به سایر روش‌ها دارد.

References

1. Sands KE, Bates DW, Lanken PN, Graman PS, Hibberd PL, Kahn KL, et al. Epidemiology of sepsis syndrome in 8 academic medical centers. *JAMA* 1997; 278: 234-40.
2. Harris KA, Hartley JC. Development of broad-range 16S rDNA PCR for use in the routine diagnostic clinical microbiology service. *J Med Microbiol* 2003; 52: 685-91.
3. Rothman RE, Majmudar MD, Kelen GD, Madico G, Gaydos CA, Walker T, Quinn TC, et al. Detection of bacteremia in emergency department patients at risk for infective endocarditis using universal

16S rRNA primers in a decontaminated polymerase chain reaction assay. *J Infect Dis* 2002; 186: 1677-81.

4. Goldenberger D, Künzli A, Vogt P, Zbinden R, Altwegg M. Molecular diagnosis of bacterial endocarditis by broad-range PCR amplification and direct sequencing. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2733-9.

5. Rantakokko-Jalava K, Nikkari S, Jalava J, Eerola E, Skurnik M, Meurman O, et al. Direct amplification of rRNA genes in diagnosis of bacterial infections. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 32-9.

۶۵٪ و ۸۷٪ محاسبه شده است. در عین حال کشت خون این نمونه‌ها در ۲۲ مورد مثبت بوده که از این تعداد هفت نفر PCR منفی و ۱۵ نفر PCR مثبت داشته‌اند. از هفت مورد باکتری که به‌وسیله PCR تشخیص داده نشده بود، شش مورد ناشی از ارگانیزم‌های گرم مثبت بوده است.^{۱۱} در مطالعه Jordan و Durso از ۵۴۸ نمونه خون از نوزادان بستری در NICU که مشکوک به سپسیس بودند، در ۲۷ مورد PCR مثبت بوده، که از این تعداد تنها یک مورد PCR منفی داشته است. اما نمونه‌ای خون ۵۲۰ بیمار دیگر فاقد سطح قابل شناسایی باکتری به‌وسیله هر دو روش PCR و کشت بوده است.^{۱۳} در یک مطالعه دیگر توسط Jordan با تکنیک PCR، DNA سوش‌های کاندیدا در ۲۶ نمونه از ۲۷ نمونه خون نوزادان مبتلا به کاندیدا که با کشت تأیید شده بود شناسایی شد.^{۱۴} همچنین در بررسی Laforgin در چهار مورد سپسیس اثبات شده با روش کشت، و دو مورد کشت منفی، سنجش PCR مثبت بوده است.^{۱۵} در مطالعه Anthony از ۱۵۸ نمونه کشت خون مثبت، ۱۱۹ مورد (۷۵/۳٪) به‌درستی توسط روش PCR شناسایی شده است.^{۱۶} بنابراین حساسیت PCR در شناسایی سپسیس باکتریایی بیش از روش‌های کشت مرسوم بوده که می‌تواند ناشی از توانایی PCR در شناسایی سطوح باکتریایی پایین از حد لازم برای کشت خون باشد. تکنیک‌های PCR در اغلب موارد برای تأیید تشخیص سندرم‌های بالینی اختصاصی و از نمونه‌های کشت خون مثبت انجام شده است، در عین حال PCR در تشخیص ارگانیزم‌ها از نمونه‌ای مستقیم خون، سرم، buffy coat یا نمونه‌های کشت منفی نیز موفق بوده است، این نتایج حاکی از آن است که روش‌های مبتنی بر PCR ممکن است نسبت به روش‌های باکتریولوژی مرسوم حساس‌تر باشد. از آنجایی که به‌علت حساسیت گسترده تکنیک PCR هر آلودگی در طی جمع‌آوری نمونه خون یا در فرآیند آزمایشگاهی می‌تواند منجر به نتایج مثبت کاذب شود. به‌کارگیری روتین از کنترل‌های منفی و مثبت برای دوری از آلودگی آزمایشگاه ضرورت دارد. آلودگی

6. Makhoul IR, Sujov P, Smolkin T, Lusky A, Reichman B. Epidemiological, clinical, and microbiological characteristics of late-onset sepsis among very low birth weight infants in Israel: a national survey. *Pediatrics* 2002; 109: 34-9.
7. Fredricks DN, Relman DA. Application of polymerase chain reaction to the diagnosis of infectious diseases. *Clin Infect Dis* 1999; 29: 475-86.
8. Ley BE, Linton CJ, Bennett DM, Jalal H, Foot AB, Millar MR. Detection of bacteraemia in patients with fever and neutropenia using 16S rRNA gene amplification by polymerase chain reaction. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998; 17: 247-53.
9. Kaplan SL. Bacteremia and Septic Shock. In: Feigin Rd, Cherry JD, Demmler GJ, Kaplan SL. Textbook of Pediatric Infectious Diseases. 5th ed. Philadelphia: Saunders; 2004; p. 810-7.
10. Barlett JG, McGowan Jr, Shulman JA. Bloodstream Invasion In: Gorbach SL, Barlett JG, Blacklow NR. Infectious Diseases. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott, Williams Wilkins; 2004; p. 552-7.
11. Cursons RT, Jeyerajah E, Sleigh JW. The use of polymerase chain reaction to detect septicemia in critically ill patients. *Crit Care Med* 1999; 27: 937-40.
12. Breikopf C, Hammel D, Scheld HH, Peters G, Becker K. Impact of a molecular approach to improve the microbiological diagnosis of infective heart valve endocarditis. *Circulation* 2005; 111: 1415-21.
13. Jordan JA, Durso MB. Comparison of 16S rRNA gene PCR and BACTEC 9240 for detection of neonatal bacteremia. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2574-8.
14. Jordan JA. PCR identification of four medically important *Candida* species by using a single primer pair. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 2962-7.
15. Laforgia N, Coppola B, Carbone R, Grassi A, Mautone A, Iolascon A. Rapid detection of neonatal sepsis using polymerase chain reaction. *Acta Paediatr* 1997; 86: 1097-9.
16. Anthony RM, Brown TJ, French GL. Rapid diagnosis of bacteremia by universal amplification of 23S ribosomal DNA followed by hybridization to an oligonucleotide array. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 781-8.
17. Isaacman DJ, Zhang Y, Reynolds EA, Ehrlich GD. Accuracy of a polymerase chain reaction-based assay for detection of pneumococcal bacteremia in children. *Pediatrics* 1998; 101: 813-6.

Diagnosis of bacteremia in febrile patients: PCR versus other routine methods

Abstract

Afsharpaiman Sh.¹
Mamishi S.^{2*}

1- Department of Pediatrics,
School of Medicine, Baghiat Allah
University

2- Department of Infectious
Disease, School of Medicine,
Infectious Diseases Research
Center, Tehran University of
Medical Sciences

Background: Early diagnosis of bacteremia and its complications is the most important part of care and management of the patients. The utility of polymerase chain reaction (PCR) techniques have been shown to identify pathogens in less and more optimal time. The aim of our study was to evaluate prevalence of bacteremia using universal PCR in febrile patients admitted in Pediatric Medical Center comparing other routine methods like blood culture.

Methods: One hundred febrile children suspected to septicemia who were admitted in Pediatric Medical Center, were included. From all patients whole blood samples were obtained for blood culture and PCR.

Results: Of all patients, 65% were 3 to 36 months old. The frequency of male and female patients was 45 and 55, respectively. The prior oral and parental antibiotic therapy had been taken for 45 and 12 patients. The mean temperature of body was 38.98 ± 0.57 at presenting time. Twelve patients were positive blood culture. Nineteen patients had positive PCR test which consisted of 11 patients with positive blood culture. The severity of fever and laboratory findings such as WBC, ESR, and CRP had no significant difference between patients with positive and negative blood culture and PCR.

Conclusion: universal PCR technique is more sensitive and specific than conventional blood culture and other methods to diagnose bacterial infection.

Keywords: Bacteremia, fever, sepsis, Polymerase Chain Reaction (PCR).

* Corresponding author: Dept. of
Pediatric Infectious Disease, Children
Medical Center Hospital, School of
Medicine, Tehran University of
Medical Sciences, No.62, Gharib St.,
Keshavarz Blvd., Tehran, IRAN
Tel: +98-21-66428996
email: smamishi@sina.tums.ac.ir