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

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

چکیده

زمینه و هدف: تشخیص زودهنگام باکتریمی 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 باکتریمی را به‌سرعت 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 باکتریمی 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 باکتریمی 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 ۳۶-۳ ماه با میانه ۱۲/۵۰ ماه (۱۲۰-۱) قرار داشتند. ۴۵٪ بیماران پسر بودند. میانگین درجه حرارت بدن در زمان بستری ۰/۶±۳۸/۹ درجه سانتی‌گراد بود. فراوان‌ترین تشخیص‌های بالینی باکتریمی بدون کانون (۲۹٪)، پیلونفریت (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 ارگانیسم‌های مسوول باکتریمی نسبت به روش‌های مرسوم به‌نظر می‌رسد مفیدتر باشد.

کلمات کلیدی: باکتریمی، سپتی سمی، تب، تشخیص.

مقدمه

تشخیص سریع عفونت‌های باکتریال در کودکان بستری با تب منجر به درمان صحیح و زودرس شده و اطلاعات مهمی راجع به پیش آگهی 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 باکتریمی 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 باکتریمی کشت خون می‌باشد، ولی این تکنیک چند محدودیت 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.[۵و۶] البته مطالعات کمی نشان می‌دهد بررسی نمونه‌های خون با این روش ممکن است به‌دلیل باکتری‌های آلوده‌کننده دارای نتایج مثبت کاذب باشد.[۷و۸] در این

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-30]

مطالعه فراوانی باکتریمی با این روش در بیماران تب‌دار با تشخیص‌های متفاوت بالینی و پارامترهای آزمایشگاهی بررسی شد.

روش بررسی

در یک مطالعه مقطعی و توصیفی تحلیلی، ۱۰۰ کودک تب‌دار و مشکوک به باکتریمی که در مرکز طبی کودکان از پاییز ۸۳ تا پایان ۸۴ بستری شدند مورد بررسی قرار گرفتند. بیماران با علائم ویروسی مثل کوریزا، کونژنکتیویت و بثورات پوستی تیپیک ویروسی و یا دارای بیماری‌های زمینه‌ای مثل بدخیمی، ضعف سیستم ایمنی، نوتروپنی و افرادی‌که 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 $^{\circ}C$ ۳۸/۵ 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 به‌صورت روتین از بیماران گرفته شد. آزمایش PCR با روش زیر انجام گردیده است. برای جداسازی لکوسیت‌ها بعد از برداشتن پلاسما به‌طور کامل، ml ۱۰ از محلول لیزکننده گلبول قرمز (۰/۱۵۵ M از NH_4Cl+ ۱۰ mM سدیم بی‌کربنات ($NaHCO_3$) با PH= ۷/۲) به باقی‌مانده سلولی خون اضافه شد و به آرامی مخلوط گشت و پنج دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. سپس در دمای $^{\circ}C$ ۴ و دور ۴۰۰×g به‌مدت ده دقیقه سانتریوفوژ شد. مایع رویی در یک محلول دترجنت (ساولن) دور ریخته شد. دوباره مقدار ۱۰ml از محلول فوق به رسوب سلولی اضافه شد و به‌خوبی این رسوب حل شد و در شرایط ذکر شده در بالا سانتریوفوژ گشت. مایع رویی دور ریخته شد. رسوب سلولی حاصل در بافر فسفات نمکی (PBS) pH=۷/۲ حل گشته و در دمای $^{\circ}C$ ۲۰- نگهداری شد. به‌منظور لیز لکوسیت‌ها استخراج DNA از محلول لیزکننده ۰/۰۱M Tris HCl، ۰/۰۵M KCl، ۲۰Tween ۰/۴۵٪، Nonidet P40 ۰/۴۵٪ و ۰/۰۰۵M $MgCl_2$ و پروتئیناز K به‌میزان ۱۲۰µg/ml استفاده شد. بعد از سانتریفوژ در دور ۱۲۰۰۰ rpm به‌مدت ده دقیقه و دور ریختن مایع رویی، به رسوب سلولی (PBL) حاصل مقدار ۵۰۰µl از محلول لیزکننده فوق اضافه گشت و مدت یک شبانه روز دقیقه در دمای $^{\circ}C$ ۶۰ قرار گرفت تا پروتئیناز K فعال شود. برای غیرفعال کردن پروتئیناز K مدت ۱۵ دقیقه در دمای $^{\circ}C$ ۹۵ قرار گرفت. سپس برای حذف مواد آلی هم حجم Lysate حاصل از جوش، فنل متعادل شده در PH=۸ اضافه گردید و پس از ده دقیقه قرار گرفتن بر روی شکر، به‌مدت پنج دقیقه در ۸۰۰۰ 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، به‌مدت پنج دقیقه در ۸۰۰۰ دور مجددا" 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 ۰/۳ مولار رسانده شد سپس دو برابر حجم مایع رویی الکل اتیلیک مطلق اضافه گردید و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد به‌مدت دو ساعت نگهداری شد. پس از طی شدن زمان نگهداری در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد، با دور ۱۲۰۰۰ به‌مدت پنج دقیقه سانتریفوژ شده تا DNA غیر محلول رسوب نماید. پس از خارج کردن مایع رویی زمان داده شد تا میکروتیوب حاوی DNA کاملا خشک شود. برای شستشو با الکل اتانول ۷۰ درصد، ۱۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد به میکروتیوب حاوی DNA اضافه گردید و با دور ۱۲۰۰۰ به‌مدت پنج دقیقه سانتریفوژ شد. سپس مایع رویی خارج شده و زمان داده شد تا میکروتیوب حاوی DNA کاملا خشک شود. پس از خشک شدن، ۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به DNA اضافه گردید و درون بن ماری در حرارت ۳۷ درجه به‌مدت ۳۰ 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 آرین (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) TACCTTGTTACGACTTC -3'

این پرایمرها تعداد ۹۹۷ جفت باز از ژن 16S rRNA را Amplify می‌کنند. پس‌از استخراج DNA از سوش‌های‌استاندارد، PCRیونیورسال با شرایط DNA، ۰/۱-۱µg، ۲/۵mM MgCl2، ۰/۴mM dNTP، ۲۰ پیکومول Primer، پنج واحد DNA Taqpolymerase، پنج میکرومول بافر X PCR انجام گرفت. با آب مقطر حجم واکنش به ۵۰ میکرولیتر رسید و با ترموسایکلر اپندرف واکنش Amplification با این مراحل

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-30]

انجام گرفت. دناتوراسیون در ۹۴ درجه به‌مدت ۳۰ ثانیه، آنیلینگ در ۵۵ درجه به‌مدت ۴۵ ثانیه و extension در ۷۲ درجه به‌مدت ۳۰ ثانیه انجام گرفت. این مراحل ۳۰ دفعه تکرار شدند و قبل از این مراحل پره دناتوراسیون به‌مدت پنج دقیقه و بعد از مراحل فوق نیز Postextenssion به‌مدت 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 الکتروفورتیک 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 کمّی با میانگین± 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 (95s%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 ۲۹/۹۶±۲۶/۳۱ ماه و میانه ۱۲/۵۰ ماه (۱۲۰-۱) بود. فراوانی بیماران پسر و دختر به‌ترتیب ۴۵٪ و ۵۵٪ بود. ۳۵٪ کودکان در فصل بهار، ۲۸٪ در فصل زمستان، ۲۵٪ در فصل پاییز و ۱۲٪ در فصل تابستان مراجعه کردند. ۴۳٪ از بیماران سابقه مصرف آنتی‌بیوتیک قبل از بستری در بیمارستان نداشتند. سابقه مصرف آنتی‌بیوتیک خوراکی و تزریقی قبل از بستری به‌ترتیب برای ۴۵٪ و ۱۲٪ وجود داشت. میانگین (دامنه) درجه حرارت بدن در زمان بستری ۳۸/۹۸±۰/۵۷ (۴۰/۷-۳۸/۵) درجه سانتی‌گراد بود. فراوان‌ترین تشخیص‌های بالینی بیماران به شامل باکتریمی بدون کانون (۲۹٪)، پیلونفریت (۲۴٪)، پنومونی (۲۲٪)، مننژیت (۷٪)، گاستروانتریت (۵٪) و سایر موارد (سلولیت- آبسه- آرتریت سپتیک- گاسترانتریت و غیره) (۱۸٪) بود. میانگین (±SD) ESR ۴۵/۱۲±۳۴/۰۱ (با دامنه ۱۴۰-۲) میلی‌متر بر ساعت بود. میانگین (±SD) سلول‌های سفید WBC/mm^3 ۱۴۰۵۰/۵۰±۶۳۴۹/۳۹ (با دامنه ۳۱۲۰۰-۱۰۰۰) بود. CRP در ۵۲٪ بیماران منفی بود. فراوانی تیتر ۱:۲۰، ۱:۴۰، ۱:۸۰و۱:۱۶۰ به‌ترتیب ۷، ۱۵، ۲۴ و ۱ درصد بود. ۱۲٪ بیماران کشت مثبت خون داشتند و PCR در ۱۹٪ بیماران مثبت گزارش شد که شامل ۱۱ بیمار با کشت مثبت و هشت بیمار با کشت منفی بود. فراوانی PCR مثبت در بیماران با کشت مثبت به‌طور معنی‌دار نسبت به بیماران با کشت منفی بالاتر بود. (p=۰/۰۰۱) از بیماران با PCR مثبت هشت نفر دختر و ۱۱ نفر پسر بودند. اختلاف درجه حرارت در بین گروه‌های مختلف مشابه بود (p=۰/۳۹۲). متوسط WBC بین گروه‌ها اختلاف معنی‌دار داشت (p=۰/۰۰۲). بیشترین میزان متوسط WBC در مبتلایان به مننژیت بود که به‌طور معنی‌دار از کودکان با تشخیص باکتریمی و سایر عفونت‌ها بالاتر بود {۲۱۱۱۴/۲۹±۴۶۹۶/۶۰ در برابر ۱۱۶۰۵/۱۷±۵۶۵۶/۶۱ (p=۰/۰۰۲) و ۱۲۷۸۸/۸۹±۷۶۳۷/۲۸ (p=۰/۰۱۸)}. بیشترین میزان متوسط ESR در پیلونفریت مشاهده شد که به‌طور معنی‌دار از کودکان با تشخیص باکتریمی بالاتر بود (۵۷/۸۷±۳۰/۵۴ در برابر ۳۰/۱۰±۲۳/۲۵، p=۰/۰۲۳). CRP اختلاف‌معنی‌دار نداشت (p=۰/۳۹۸) و در مبتلایان به مننژیت از بقیه بالاتر بود (جدول ۱). آنالیز رگرسیون خطی نشان داد بین ESR و میزان WBC بیماران همبستگی معنی‌دار آماری وجود دارد به‌ازای افزایش ۵۰۰ سلول گلبول سفید خون محیطی یک میلی‌متر در ساعت به‌میزان ESR بیماران افزوده می‌شود (شکل ۱). فراوانی PCR مثبت در بین مبتلایان به مننژیت از سایر

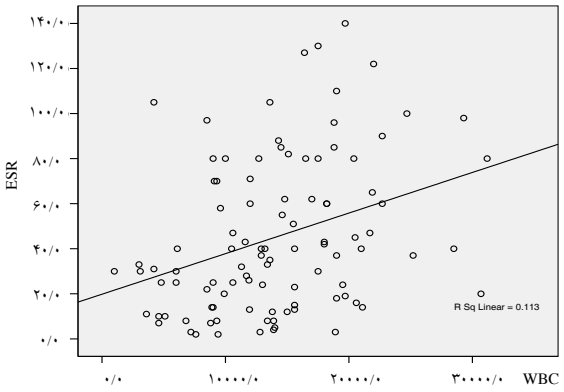
[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-30]

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
باکتریمی	۳۸/۸۵±۰/۴۸	۱۱۶۰۵/۲±۵۶۵۶/۱۶	۳۰/۲±۲۳/۲۵	۰/۳۵±۰/۰۱۶
	(۳۸/۵-۴۰)	(۱۰۰۰-۲۲۷۰۰)	(۲-۱۱۰)	(۰/۰۰۶۲ -۰/۰۵)
پنومونی	۳۸//۹۲±۰/۶	۱۴۰۲۲/۷۲±۵۹۸۵/۵۳	۴۱/۵۰±۳۹/۴۶	۰/۳۳±۰/۰۱۳
	(۳۸-۴۰)	(۳۰۰۰-۳۰۷۰۰)	(۲-۱۴۰)	(۰/۰۲۵ -۰/۰۵)
منتژیت	۳۹/۲۱±۰/۳۹	۲۱۱۱۴/۲۸±۴۶۹۶/۶۰	۵۳/۴۳±۳۷/۲۲	۰/۰۳۷±۰/۲۲
	(۳۸-۳۹)	(۱۵۰۰۰-۲۸۵۰۰)	(۱۲-۱۳۰)	(۰/۰۱۲ -۰/۰۵)
پیلونفریت	۳۹/۰۲±۰/۶۴	۱۵۹۱۶/۶۶±۵۰۳۹/۶۴	۵۷/۹±۳۰/۵۴	۰/۳۱±۰/۰۱۶
	(۳۸-۴۱)	(۵۰۰۰-۲۹۳۰۰)	(۱۳-۱۰۵)	(۰/۰۱۲-۰/۰۵)
سایر علل	۳۹/۱۱±۰/۶۱	۱۲۷۸۸/۸۹±۷۶۳۷/۲۸	۵۳/۵۰±۳۷/۹	۰/۰۳۵±۰/۰۱۳
	(۳۸-۴۰)	(۴۲۰۰-۳۱۲۰۰)	(۳-۱۲۷)	(۰/۰۱۳-۰/۰۵)
جمع کل	۳۸/۹۸±۰/۵۷	۱۴۰۵۰/۵۰±۶۳۴۹/۳۸	۴۵/۱۲±۳۴/۰۱	۰/۰۳۶±۰/۰۱۶
	(۳۸-۴۱)	(۱۰۰۰-۳۱۲۰۰)	(۲-۱۴۰)	(۰/۰۰۶-۰/۰۵)

جدول-۲: مقایسه‌فراوانی نتیجه PCR دربین‌کودکان تب‌دار برحسب‌تشخیص بالینی

تشخیص بالینی	PCR منفی	PCR مثبت	جمع کل
باکتریمی	۲۳ (٪۷۹/۳)	۶ (٪۲۰/۷)	۲۹ (٪۱۰۰)
پنومونی	۱۹ (٪۸۶/۴)	۳ (٪۱۳/۶)	۲۲ (٪۱۰۰)
منتژیت	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)



شکل-۱: نمودار پراکندگی میزان WBC و ESR

بیماران بیشتر بود (٪۲۸/۶) اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها به‌دست نیامد (p=۰/۳۶۸) (جدول ۲). حساسیت، ویژگی، PPV، NPV و دقت تشخیصی PCR بر اساس نتایج کشت خون به‌ترتیب ٪۹۱/۶۷s CI%، ٪۹۰/۹۱s CI%، ٪۶۱/۱۱، ٪۹۸/۶۷ و ٪۹۱ محاسبه شد.

بحث

باکتریمی 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 باکتریمی جنبه تشخیصی ندارد. از طرف دیگر تشخیص زودهنگام باکتریمی 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 بیمارانی‌که 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 ارگانیسم‌های با رشد تأخیری باشد.[۱۱] هدف از این مطالعه بررسی نتایج پاراکلینیک به‌ویژه نتایج PCR در بیماران مشکوک به باکتریمی 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 به‌ترتیب

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-30]

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 باکتریمی که به‌وسیله PCR تشخیص داده نشده بود، شش مورد ناشی از ارگانیسم‌های 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 ارگانیسم‌ها 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 آنجایی‌که 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 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 باکتریمی 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 منتژیت) 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 باکتریمی مورد نیاز است. در مجموع به‌نظر می‌رسد روش universal PCR برای تشخیص ارگانیسم‌های مسئول باکتریمی نسبت‌به 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 ارگانیسم وجود ندارد، رویکرد معمول تفسیر تشخیص باکتریمی 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 خصوصا" 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.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-30]

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. Breitkopf 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.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-30]

Tehran University Medical Journal; Vol. 66, No. 3, Jun 2008: 169-175

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

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

* 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

Abstract

***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).

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-30]