# روش‌های آزمایشگاهی سریع تشخیص بیماری سل

رویا علوی‌نائینی،[۱] بتول شریفی‌مود،[۲] ملیحه متانت،[۱] سیداحمد هاشمی[۳]

۱. دانشیار بیماری‌های عفونی، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی زاهدان
۲. استاد بیماری‌های عفونی، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی زاهدان
۳. پزشک، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی زاهدان

تاریخ دریافت مقاله: ۸۹/۱۱/۱۹
تاریخ پذیرش مقاله: ۹۰/۲/۲۱

Downloaded from zjrms.ir at 22:18 +0430 on Wednesday May 15th 2019

## چکیده

**زمینه و هدف:** سل کماکان یکی از معضلات مهم بهداشتی بسیاری از کشورهای در حال توسعه و کم درآمد می‌باشد. با توجه به حساسیت پایین اسمیر و طولانی بودن جواب نتایج کشت نمونه‌ها در این مقاله مروری سعی شده روش‌های تشخیص سریع سل مورد بحث قرار گیرد.

**مواد وروش کار:** برای استخراج منابع لازم از مقالات PubMed وEmbase از سال‌های ۱۹۹۰ تا ۲۰۱۰ استفاده شده است. از واژه‌های کلیدی سل، مایکوباکتریوم سلی و تست‌های تشخیصی سریع جهت جمع‌آوری اطلاعات استفاده گردید. در این مقاله مروری دقت تست‌های متعدد تشخیص سریع سل مورد بحث قرار گرفته است.

**یافته‌ها:** از میان روش‌های متعدد تشخیص سریع بیماری سل، بررسی‌های سرولوژیک و آنزیمی نظیر آدنوزین دآمیناز و سیتوکین‌ها در مطالعات گوناگون نتایج متغیری داشته‌اند. در کل تست‌های آمپلیفیکاسیون اسید نوکلئیک در بررسی نمونه‌های خلط اسمیر مثبت ازدقت بالایی برخوردارند. اختصاصیت این تست‌ها درسل ریوی و حتی خارج ریوی بسیار بالا گزارش شده است. کشت‌های سریع مایع (رادیومتریک و غیررادیومتریک) نیز در مقایسه با کشت معمول در محیط جامد از سرعت و دقت بالاتری برخوردار بودند.

**نتیجه‌گیری:** نتایج حاصل از مطالعات گزارش شده نشان داد که علی‌رغم تحقیقات متعدد به‌عمل آمده در زمینه تشخیص بیماری سل، اسمیر میکروسکوپیک و کشت نمونه‌ها، هنوز جزو راه‌های تشخیص اصلی بیماری شناخته می‌شوند. نیاز به تجهیزات مجهز و گران‌قیمت و پرسنل مجرب معمولا استفاده روتین روش‌های نوین تشخیص سریع بیماری را با مشکل مواجهه ساخته است. تحقیقات در زمینه ساختن کیت‌های تشخیصی سریع بیماری سل ادامه دارد. **[م ت ع پ ز، ۱۳۹۰؛ ۱۳(۷):۷-۱]**

**کلیدواژه‌ها: سل، مایکوباکتریوم سلی، تست‌های تشخیصی سریع**

## مقدمه

بیماری سل در کشور ما به‌خصوص استان سیستان و بلوچستان هنوز به عنوان یک معضل بهداشتی شناخته شده، وجود دارد. میزان بروز سالیانه بیماری سل در استان سیستان و بلوچستان در طی سال‌های اخیر بین ۴۰ تا ۷۰ در صد هزار جمعیت برآورد شده و میزان بروز سالیانه سل ریه خلط مثبت در طی این مدت بین ۲۵ تا ۲۹ در صدهزار نفر جمعیت گزارش شده است.[۱،۲]

از نگرانی‌های موجود در زمینه کنترل بیماری سل، تأخیر در تشخیص ودرمان بیماری است که طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۰۶ این تأخیر، از زمان شروع علائم تا شروع درمان در ایران ۱۲۷ روز بوده و بیشترین تاخیر مربوط به تأخیر تشخیصی بوده است. تا سال ۲۰۱۳ سازمان بهداشت جهانی شناسایی موارد سل ریوی به روش اسمیر میکروسکوپیک را تا ۷۰ درصد برآورد کرده است.[۳] آن‌چه مسلم است با وجود روش‌های تشخیصی متعدد بیماری سل ریه که شایعترین فرم بیماری می‌باشد، سازمان بهداشت جهانی اسمیر میکروسکوپیک خلط را به‌عنوان راه تشخیص اصلی بیماری می‌شناسد. لذا تشخیص سل ریوی غالبا براساس مجموعه علائم بالینی، رادیوگرافی قفسه صدری و نتایج اسمیر میکروسکوپیک خلط داده می‌شود.

حساسیت اسمیر میکروسکوپیک خلط با رنگ‌آمیزی زیل نلسون در بررسی‌های گوناگون بین ۲۰ تا ۷۰ درصد متغیر می‌باشد و وجود حداقل $10^5$ باسیل در هر میلی‌لیتر خلط برای مثبت شدن آن لازم است.[۴] برای افزایش این حساسیت از روش‌هایی مثل استفاده از هیپوکلریت سدیم (bleach) و رنگ‌آمیزی فلورسنت (اورامین-رودامین) استفاده می‌شود.[۴]

در بسیاری از آزمایشگاه‌های تحقیقاتی از جمله مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری زاهدان ابتدا جهت تشخیص بیماری سل ریه از روش اسمیر میکروسکوپیک خلط با رنگ‌آمیزی اورامین-رودامین با میکروسکوپ فلورسانت استفاده می‌شود و در صورت مثبت بودن نتایج اسمیر خلط رنگ آمیزی زیل نلسون انجام شده و نمونه‌ها با میکروسکوپ نوری بررسی می‌گردند و تمام نمونه‌های مشکوک به سل ریوی در محیط Lowenstein–Jensen (LJ)کشت داده می‌شوند که قادر است تا ۱۰۰ باسیل در هر میلی‌لیتر خلط را شناسایی کند.[۴،۵] محیط‌های کشت رایج مایکوباکتریوم سلی در محیط جامد حاوی تخم مرغ شامل LJ و Ogawa media بوده و محیط‌های محتوی آگار شامل C Middle brook 7H9-7H10-7H11 می‌باشند.[۵] تشخیص قطعی این بیماری مانند سایر بیماری‌های عفونی اکثرا با کشت نمونه خلط در محیط اختصاصی داده می‌شود. برای رشد مایکوباکتریوم سلی در محیط LJ بین ۳ تا ۸ هفته زمان لازم است لذا روش‌های سریعتر تشخیص این بیماری همواره ذهن محققان را به خود معطوف داشته است. آن‌چه در ادامه به مرور آن می‌پردازیم روش‌های متعدد تشخیص سریع بیماری سل در طی دهه‌های اخیر می‌باشد.

## روش کار

برای استخراج منابع لازم از مقالات PubMed و Embase در طی سال‌های ۱۹۹۰ تا ۲۰۱۰ در زمینه روش‌های تشخیص سریع سل استفاده شده است. به این منظور واژه‌های کلیدی نظیر سل، مایکوباکتریوم سلی و

آدرس نویسنده مسئول: زاهدان، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری
۱ email: malihemetanat@yahoo.com

Downloaded from zjrms.ir at 22:18 +0430 on Wednesday May 15th 2019

تست‌های تشخیصی سریع مورد جستجو قرار گرفت و تنها مقالاتی مورد مطالعه قرار گرفتند که در آن‌ها روش‌های تشخیص سریع بیماری وجود داشت. در این مقاله مروری دقت تست‌های متعدد تشخیص سریع سل مورد بررسی قرار گرفته است.

## روش‌های تشخیصی سریع بیماری سل

**تست‌های سرولوژیک:** بسیاری از روش‌های سرولوژیک جهت تشخیص بیماری سل ابداع شده است. در این روش‌ها آنتی‌ژن‌های گوناگون جهت یافتن آنتی‌بادی های موجود در خون و مایعات بدن به‌کار گرفته می‌شود. در میان این روش‌های سریع تشخیصی می‌توان تست ثبوت مکمل (Complement fixation=CF)، تست هماگلوتیناسیون، رادیوایمونواسی (Radioimmunoassay) و الایزا را نام برد.[۶-۸]

آنتی‌ژن‌های بسیاری جهت بررسی آنتی‌بادی‌ها مورد استفاده قرار گرفته‌اند. به‌عنوان مثال (early) secretory antigenic target-6، Ag85A، TB10.4، Rv3881c، ESAT-6 lipoarabinomannan(LAM)، Ara6-phosphate-binding 38-kDa antigen، A60 Antigen، BSA protein و Kp90 ImCRAC antigen که با روش الایزا برای یافتن آنتی‌بادی‌های IgA و IgG و IgM استفاده شده‌اند. گاهی برای افزایش حساسیت و اختصاصیت تست‌ها از ترکیبی از آنتی‌ژن‌ها برای یافتن پاسخ‌های هومورال استفاده می‌شود.[۷-۱۱]

از روش ایمونوکروماتوگرافی نیز برای شناسایی این آنتی‌بادی‌ها استفاده می‌شود. برای این منظور از تست‌های نواری استفاده می‌گردد که آغشته به چند آنتی‌ژن (معمولاً ۲ یا ۵ آنتی‌ژن) مایکوباکتریوم است که در عفونت فعال ترشح می‌شوند. این تست ابتدا در مجاورت سرم و سپس در مجاورت anti-human IgG چسبیده به ذرات طلای کلوئیدی انکوبه شده که درصورت وجود آنتی‌بادی نوارهای صورتی رنگ ایجاد می‌کنند.[۱۱]

در مجموع این روش‌های آزمایشگاهی بسیارسریع بوده و غالبا کم هزینه می‌باشند ولی اکثر آن‌ها از دقت بالایی برخوردار نمی‌باشند. حساسیت این تست‌ها بین ۸۸-۱۶ درصد و اختصاصیت آن‌ها بین ۱۰۰-۶۲ درصد گزارش شده است.[۴،۶،۸] این تست‌ها بیشتر درمواردی نظیر سل ریوی اسمیر منفی، کودکان و افراد سالمند که نمونه‌گیری دشوار است و یا برخی موارد سل خارج ریوی (لنفادنیت سلی) به‌عنوان تست‌های تکمیلی به‌کار گرفته می‌شوند و هنوز به‌عنوان تست‌های اولیه و غربالگری مورد تأیید نمی‌باشند.[۱۰،۱۲] براساس دستورالعمل WHO زمانی می‌توان تستی را جایگزین تست استاندارد طلایی کشت نمود که حساسیت بالای ۸۰ درصد و اختصاصیت بالای ۹۵ درصد داشته باشد. این تست‌ها تحت تاثیر عوامل مختلف قرارمی‌گیرند. به‌عنوان مثال در بعضی موارد مثل بیماران مبتلا به ایدز یا به‌دنبال تزریق واکسن BCG یا وجود مایکو باکتریوم‌های غیر سلی نتایج این تست‌ها تغییر می‌کند.[۱۰،۱۲-۱۵] ارزش تشخیصی این تست‌ها به زمینه استفاده آن‌ها بستگی دارد. در صورت نتایج منفی در یک جمعیت با شیوع پایین سل، برای رد بیماری مفیدند و در صورت نتایج مثبت در صورت ظن بالینی بالا در بیماران علامت‌دار، برای تصمیم‌گیری‌های بالینی کمک کننده‌اند.[۱۵،۱۷]

**آدنوزین دآمیناز و سیتوکین‌ها:** آنزیم‌های تولید شده توسط لنفوسیت‌ها مثل آدنوزین دآمیناز (ADA) جهت تشخیص سل پلور و مننژ مورد مطالعه قرار گرفته است. این تست جهت تشخیص سریع سل ریه کمک‌کننده نمی‌باشد اما در تشخیص سل پلور و هم‌چنین سل مننژ که غالبا براساس یافته‌های بالینی و پاراکلینیکی ساده گذاشته می‌شود کمک کننده بوده و حساسیت نسبتا بالایی دارد. مطالعات بیشتری در زمینه سل پریکارد و پریتوئن لازم است تا بتوان در این زمینه اظهارنظر کرد.[۱۷-۲۰]

پژوهش‌های متعددی نیز در مورد سیتوکین‌هایی نظیر اینترفرون گاما (IFN-γ) و Tumor necrosis factor (TNF) انجام شده است. به‌طور کلی این روش‌های تشخیصی نیز مانند تست‌های سرولوژیک از دقت زیادی برخوردار نمی‌باشند. روش‌های سنجشی اینترفرون گاما (IGRA) براساس پاسخ لنفوسیت‌های T حساس شده به آنتی‌ژن‌های اختصاصی مایکوباکتریوم توبرکولوزیس (MTB) یعنی ESAT-6 و culture filtrate protein 10 (CFP10) انجام می‌شود. البته روش‌های اولیه با آنتی‌ژن‌های موجود در PPD انجام می‌شد. این آنتی‌ژن‌ها بر روی ژن‌هایی که در ناحیه region of difference 1 (RD1) مایکوباکتریوم توبرکولوزیس قرار گرفته کد می‌شوند که این ژن در M.bovis و BCG وبیشتر مایکوباکتریوم‌های غیرسلی وجود ندارد و به همین دلیل درافراد واکسینه شده با BCG و تماس قبلی با مایکوباکتریوم‌های غیرسلی واکنش متقاطع کمتری دارد. آنتی ژن دیگری نیز در روش QFT-GIT استفاده می‌شود به نام TB7.7 (Rv2654) که به peptide-4 (P4) معروف است وبرای مایکوباکتریوم سلی اختصاصی است.[۲۱-۲۳]

در حال حاضر دو نوع IFN-γ assays تجاری موجود است که مورد تأیید اداره غذا و دارو (FDA) و مرکز مبارزه و کنترل بیماری‌ها (CDC) می‌باشد: ۱- QuantiFERON-TB assay (Cellestis) که انواع ارتقایافته آن یعنی QFT-GOLD و QFT-GIT نیز موجود است که از نمونه خون کامل استفاده می‌شود.[۱۵،۲۱-۲۴] ۲- T SPOT-TB (Oxford Immunotec) test که از سلول‌های مونونوکلئار خون محیطی (PBMC) استفاده شده و به روش الایزا برای بررسی تولید اینترفرون گاما استفاده می‌شود. از این روش در برخی مطالعات برای بررسی وجود سل در بیماران مشکوک اسمیر منفی در لاواژ برونکوآلوئولار استفاده می‌گردد.[۴،۲۱-۲۴] این روش‌ها نسبت به تست پوستی سل(TST)حساسیت واختصاصیت بالاتر داشته وارتباط بهتری با تماس قبلی با مایکوباکتریوم‌های سلی به خصوص در شرایط با بروز پایین دارد.[۲۲،۲۴] مرکز مبارزه و کنترل بیماری‌های آمریکا استفاده از این تست‌ها را درهمه مواردی که TST اندیکاسیون دارد توصیه می‌کند و جایگزینی TST را با QuantiFERON- TBGold برای تشخیص سل فعال و نهفته پیشنهاد می‌کند. در صورت مثبت بودن این تست بیمار احتمالاً به مایکوباکتریوم سلی آلوده است ونیازی به پیگیری با TST ندارد. قبل ازاین‌که تشخیص سل نهفته مطرح گردد باید با ارزیابی‌های طبی بیماری سل رد شود ودر صورتی‌که نتیجه تست منفی شود؛ بیماری سل غیرمحتمل است مگر آن‌که علائم و نشانه‌های بیماری حاکی از وجود سل باشد.[۲۵]

Downloaded from zjrms.ir at 22:18 +0430 on Wednesday May 15th 2019

مزایای تست‌های گاما اینترفرون شامل یک‌بار مراجعه بیمارجهت بررسی، سرعت بیشتر پاسخ‌دهی در مقایسه با TST؛ فقدان پدیده بوستر؛ خطای کمتر درخواندن تست و عدم تاثیر واکسیناسیون BCG روی نتایج آن است. معایب این تست‌ها شامل لزوم انجام سریع آزمایش ظرف ۱۲ ساعت پس از نمونه‌گیری و وجود خطا در تفسیرتست می‌باشد. در حال حاضر IGRA قادر نیست عفونت نهفته را از عفونت فعال افتراق دهد. وجود آلرژی، عدم یا کاهش پاسخ سلولی در شرایط ضعف سیستم ایمنی باعث منفی شدن TST می‌شود اما در مورد IGRA تحقیقات بیشتری مورد نیاز است.[۲۳،۲۶] در برخی مقالات حساسیت و اختصاصیت تست‌های IGRA و به‌خصوص QFT-G با آنتی‌ژن‌های recombinant برای تشخیص سل ریوی و خارج ریوی یکسان گزارش شده ولی جمعیت بررسی شده در این مطالعات کافی نبوده لذا جهت کاربرد بالینی نیاز به مطالعات بیشتری است.[۲۷]

**روش‌های سریع کشت مایع:**

روش‌های رادیومتریک با استفاده ازکربن نشان‌دار سال‌ها مورد استفاده قرار گرفته است. خطرات ناشی ازپس‌مانده‌های رادیواکتیو و هزینه بالای آن از مضرات آن می‌باشد. البته روش‌های غیررادیومتریک نیز وجود دارد اما کشت رادیومتریک BACTEC 460 TB هنوز به‌عنوان سریعترین روش کشت مورد تائید می‌باشد. نتایج حاصل از آن در طی مدت ۱۴ تا ۱۷ روز مثبت می‌گردد. در کل روش‌های سریع کشت مایع از دقت بالایی برخوردار هستند.[۲۸-۳۰]

از میان این روش‌ها می‌توان به mycobacterial growth indicator tube اشاره کرد. در این روش آزمایشگاهی در انتهای لوله‌ی کشت، ترکیب فلورسنت‌دار اکسیژنه وجود دارد که در صورت وجود مایکوباکتریوم، اکسیژن مصرف شده و فلورسنت آزاد می‌شودکه با لامپ اشعه ماورای بنفش (UV) شناسایی می‌گردد. این روش در طی ۸ روز مثبت می‌گردد. از این روش برای تشخیص حساسیت دارویی هم استفاده می‌شود.[۴،۲۹،۳۰]

از دیگر روش‌های سریع کشت می‌توان به روش microscopic observation drug susceptibility (MODS) اشاره نمود. اساس این روش تلقیح نمونه خلطی است که تحت Liquefaction و decontamination با N-استیل سیستئین و هیدروکسید سدیم قرار گرفته و داخل محیط مایع انتخابی 7H9 کشت داده می‌شود. با این روش می‌توان میکروکلونی‌های تیپیک مایکوباکتریوم توبرکلوزیس را زیر میکروسکوپ نوری مشاهده نمود و حتی می‌توان حساسیت داروها و رشد باکتری را در آن با محیط فاقد دارو مقایسه نمود. این روش در طی ۷ روز رشد باکتری را نشان می‌دهد. حساسیت آن حتی از روش BACTEC نیز بیشتر است اما تجهیزات و ایمنی-زیستی (biosafety) بالایی لازم دارد.[۳۰-۳۲]

**تست‌های آمپلیفیکاسیون اسید نوکلئیک:** با روش Nucleic acid amplification tests (NAATs) تشخیص مولکولی مقادیر اندک ماده ژنتیکی DNAیا RNA میکروارگانیسم‌ها به‌وسیله آمپلیفیکاسیون امکان‌پذیراست که شامل واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) یا Nucleic acid probe می‌باشد. حساسیت و اختصاصیت NAATs برای نمونه‌های اسمیر مثبت بالای ۹۵ درصد است ولی برای نمونه‌های اسمیر منفی حساسیت پایین‌تر بوده ولی اختصاصیت کماکان بالاست. این روش‌ها به‌عنوان تست تکمیلی جهت تشخیص سل استفاده می‌گردد ولی هیچ‌گاه جایگزین اسمیر و کشت نمی‌باشد. در این میان PCR به‌خصوص در بیماران مبتلا به سل ریوی خلط منفی اختصاصیت بالا ولی حساسیت کمتری نسبت به کشت دارد.[۶] در موارد مننژیت سلی و سل پلور این روش آزمایشگاهی بسیار کمک کننده می‌باشد.[۳۳،۳۴]

اکثر این تست‌ها براساس تلقیح (Insertion) سکانس IS6110 در کپی‌های متعدد مایکوباکتریوم سلی انجام می‌گردند. اما ژن‌های مایکوباکتریایی دیگری نیز با PCR قابل شناسایی می‌باشند ازجمله 16S rRNA، recA، rpoB ، gyrB، 65-kDa heat Shock protein، 16S-23S internal transcribed spacer، MPB70، SecA1؛ که برخی از این ژن‌ها و پلی‌مورفیسم آن‌ها اختصاصی جنس و گونه وحتی اختصاصی مایکوباکتریوم‌های غیرسلی می‌باشند.[۳۴-۳۶]

در حال حاضر دونوع تجاری از کیت‌های NAATs مورد تأیید FDA می‌باشد که درهردو روش آمپلیفیکاسیون 16S ribosomal با استفاده از یک پروب DNA انجام می‌شود. Amplified M. tuberculosis direct test (AMTD)(Gen-Probe): در یک مطالعه حساسیت ۱۰۰-۹۴ درصد و اختصاصیت ۹۶ درصد درنمونه خلط داشته است.

Amplicor M. tuberculosis test (Amplicor; Roche Diagnostic Sytems, Inc, NJ, USA): در یک مطالعه حساسیت ۹۷ درصد و اختصاصیت ۱۰۰-۹۹ درصد درنمونه خلط داشته است.[۳۷]

البته به جز دو روش فوق روش‌هایی دیگری نیز وجود دارند ازجمله PCR خانگی (In-house PCR) که سکانس IS6110 ویا ژن 65-kDa Antigen را شناسایی می‌کند.[۳۸،۳۹]

از روش‌های دیگر PCR بررسی ژن secA1 در خلط و نمونه‌های شستشوی دهان با نرمال سالین است که نتایج قابل قبولی داشته است. البته در نمونه‌های شستشوی دهان حساسیت کمتر بوده و تحت تأثیر عوامل متعددی از جمله تعداد باسیل در نمونه‌ها قرار می‌گیرد.[۳۴،۳۹]

درمواردی که امکان گرفتن نمونه خلط وجود ندارد مانند اطفال و یا سل خارج ریوی و یا در افراد مبتلا به ایدز که احتمال مثبت شدن اسمیر پایین است، از روش تشخیصی Transrenal DNA استفاده می‌شود. شناسایی قطعات DNA مایکوباکتریوم آزاد شده با روش NAATs در ادرار حساسیت و اختصاصیت متغیری داشته است.[۴۰]

از روش‌های دیگر وابسته به PCR می‌توان به PCR-restriction fragment length polymorphism analysis (RFLP) اشاره کرد. پس از انجام آمپلیفیکاسیون با آنزیم‌های اختصاصی، DNA را به قطعات کوچکتر می‌شکنند. این آنزیم‌ها توالی‌های پالیندرومیک (توالی‌های معکوس تکراری) را شناسایی و DNA را از این نقطه می‌شکنند. به‌دلیل این‌که این توالی‌ها متعدد بوده ودر باکتری‌ها وسلول‌های مختلف، متفاوت می‌باشند با استفاده از نشانگرها یا پروب‌های اختصاصی می‌توان قطعات مشخصی ازDNA باکتری

Downloaded from zjrms.ir at 22:18 +0430 on Wednesday May 15th 2019

را هیبرید و با روش‌هایی مثل ژل الکتروفورز شناسایی نمود. از این روش برای بررسی‌های اپیدمیولوژیک مثل تعیین منبع اپیدمی استفاده می‌شود.[۴۱]

در مطالعات مختلف از NAATs برای بررسی وجود سل در نمونه‌های مختلف ازجمله خلط، نمونه‌های شستشوی دهان، ترشحات ناشی از BAL، مایع پلور، مایع مغزی نخاعی، ادرار، آسپیراسیون لنف‌نود، نمونه‌های بافتی مانند غدد لنفاوی استفاده می‌شود. این روش‌ها علاوه بر بالابردن سرعت نتایج قادرند تا حد زیادی مایکوباکتریوم سلی را از غیرسلی افتراق دهند.[۴،۴۲،۴۳]

امروزه پای PCR به محدوده تعیین حساسیت دارویی باکتری‌ها از جمله سل باز شده و سرعت تعیین مقاومت دارویی را افزایش داده است. با استفاده از این روش ژن‌های خاصی که درمقاومت دارویی مؤثر هستند شناسایی می‌شوند، مثلاً ژن rpoB که یک سکانس اختصاصی میکروب سل است به‌علت پلی‌مورفیسم‌هایی که درآن اتفاق می‌افتد باعث ایجاد مقاومت در برابر ریفامپین می‌گردد. از تکنیک heminested RT-PCR برای بررسی ژن rpoB استفاده می‌شود. این تست ازحساسیت و اختصاصیت نسبتا بالایی برخوردار است.[۴۴،۴۵]

حساسیت و اختصاصیت NAATs در مطالعات مختلف، متفاوت است که این تفاوت‌ها ناشی از اختلاف در شیوع جمعیتی سل، نمونه مورد آزمایش، روش آزمایش و تعداد باسیل موجود درنمونه است. موارد منفی کاذب به علت وجود مهارکننده‌ها در نمونه‌ها می‌تواند ایجاد شود و موارد مثبت کاذب به علت آلودگی نمونه‌ها در طی فرایند آماده‌سازی و واکنش متقاطع با DNA سایرمایکوباکتری‌ها و عفونت نهفته سلی پدید می‌آید.[۴۲،۴۶]

براساس گزارش CDC این روش‌ها جایگزین اسمیر میکروسکوپی و کشت نمی‌باشد. هزینه بالای این روش‌های تشخیصی و نیاز به آزمایشگاه‌های مجهز مانع از استفاده متداول آن در کشورهای در حال توسعه شده است.[۴۷]

**تست‌های مایکوباکتریوفاژ** (Mycobacteriophage based methods): تست‌هایی که براساس مایکوباکتریوفاژانجام می‌شود را می‌توان تقریبا معادل PCR در کشورهای کم درآمد به‌شمار آورد. این تست‌ها به آسانی قابل انجام بوده و هزینه نسبتا کمی دارند. در این متد آزمایشگاهی کشت مایکوباکتریوم سلی را با مایکوباکتریوفاژ آلوده می‌کنند تا به‌وسیله تکثیر فاژ قابل تشخیص باشد.[۴۸،۴۹]

**سایر روش‌های تشخیصی سریع بیماری سل:** از بررسی‌های سریع دیگر می‌توان به کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا High-performance liquid chromatography (HPLC) اشاره نمود. در این روش اسید مایکولیک آنالیز شده در میکروارگانیسم با اشعه ماورای بنفش یا فلورسانس مشخص می‌گردد. حساسیت و اختصاصیت این تست بالا است اما هزینه بالا، نیاز به آزمایشگاه مجهز و پرسنل مجرب استفاده روتین آن‌را محدود کرده است.[۵۰]

روش‌های تشخیصی سریع دیگری نیز وجود دارد که هنوز در مرحله تحقیقاتی می‌باشند. در این میان می‌توان به تست گلوتارآلدئید اشاره کرد. در این روش یک میلی‌لیتر گلوتارآلدئید ۲/۵ درصد را با یک میلی‌لیتر خون بیمار در حرارت ۲۲°C به‌تدریج مخلوط کرده و تکان می‌دهیم تا پدیده انعقادی یا تشکیل ژل مشاهده گردد. میانگین مدت زمان تشکیل ژل در بیماران مبتلا به سل ریه به‌طور معنی‌داری کمتر از بیماران مبتلا به عفونت ریوی غیرسلی و گروه کنترل بوده است. حساسیت و اختصاصیت این روش آزمایشگاهی در چندین مطالعه انجام شده بین ۸۶ تا ۸۹ درصد گزارش شده است.[۵۱-۵۳]

تست پاتو (Patho-TB test) نیز از روش‌های تشخیصی سریع دیگری است که به‌تازگی توسط انستیتو پاستور ایران ابداع گردیده است. در این روش آزمایشگاهی آنتی‌ژن‌های موجود در نمونه خلط بیمار با آنتی‌بادی‌های اختصاصی ضد آن‌ها واکنش نشان می‌دهد. نهایتا آنتی‌بادی‌ها نیز با طلای کونژوگه شده واکنش نشان داده که به‌صورت تغییر رنگ صورتی و قرمز رنگ روی فیلتر مشخص می‌گردد. حساسیت و اختصاصیت این روش تشخیصی به‌ترتیب ۷۰ درصد و ۹۰ درصد می‌باشد.[۵۴]

با توجه به این‌که روش‌های تشخیص متداول سل نظیر اسمیر مستقیم از حساسیت پایینی برخوردار است ونتایج کشت نمونه‌ها نیز مستلزم زمان طولانی می‌باشد لذا ضرورت استفاده از روش‌های سریع تشخیصی همواره اهمیت ویژه‌ای داشته است. از آن‌جا که این روش‌های تشخیصی اکثراً روش‌های نوینی بوده و نیاز به تجهیزات پیشرفته و پرسنل آموزش‌دیده دارند و از طرفی هنوز در مطالعات محدودی بررسی شده‌اند و بسیاری از این مطالعات در جمعیت‌های محدود یا در جوامع با شیوع پایین سل بوده است گاهی نتایج متناقضی به‌دست آمده است. بسیاری از این روش‌ها هنوز تکنیک استانداردی نداشته؛ لذا برای بکارگیری این روش‌ها در سطح وسیع به‌خصوص در کشورهای با منابع محدود، نیاز به مطالعات گسترده‌تری دارد تا بتوان به‌عنوان جایگزینی برای اسمیر مستقیم و کشت باشد. در هر حال می‌توان از این روش‌ها، با توجه به شرایط بیمار و امکانات موجود در محل به‌عنوان تست‌های مکمل تشخیصی استفاده کرد.

## *References*


1. Incidence of tuberculosis in Iran. Ministry of health and medical education. Center for disease control. Available from: http://www.cdc.hbi.ir/Accessed January December 26, 2010.
2. Moghtaderi A, Alavi-Naini R, Rahimi-Movaghar V. Tuberculous myelopathy: Current aspects of neurologic sequels in the southeast of Iran. Acta Neurol Scand 2006; 113: 267-272.
3. World Health Organization. Diagnostic and treatment delay in tuberculosis. 2006. www.emro.who.int/dsaf/ dsa710. pdf/ Accessed May 2009.
4. Palomino JC. Nonconventional and new methods in the diagnosis of tuberculosis: Feasibility and applicability in the field. Eur Respir J 2005; 26(2): 339-50.
5. Coban AY, Cihan CC, Bilgin K, et al. Blood agar for susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis against first-line drugs. Int J Tuberc Lung Dis 2006; 10(4): 450-3.
6. Cruciani M, Mengoli C. An overview of meta-analyses of diagnostic tests in infectious diseases. Infect Dis Clin Nam 2009; 23: 225-67.
7. Kochak HE, Seyedalinaghi S, Zarghom O, et al. Evaluation of serological tests using A60 antigen for

Downloaded from zjrms.ir at 22:18 +0430 on Wednesday May 15th 2019

diagnosis of tuberculosis. Acta Med Iran 2010; 48(1): 21-6.
8. Ben-selma W, Harizi H, Marzouk M, et al. Evaluation of the diagnostic value of measuring IgG, IgM and IgA antibodies to mycobacterial A60 antigen in active tuberculosis. Diagn Microbiol Infect Dis 2010; 68(1): 55-9.
9. Khalilzadeh S, Hosseini M, Baghaie N, et al. [Serodiagnosis of tuberculosis in children using A60 antigen] Persian. Tanaffos 2002; 1(2): 15-9.
10. Beyene D, Lumc Franken K, Yamuah L, et al. Serodiagnosis of tuberculous lymphadenitis using a combination of antigens. J Infect Dev Ctries 2010; 4(2): 96-102.
11. Pottumarthy S, Wells VC, Morris AJ. A comparison of seven tests for serological diagnosis of tuberculosis. J Clin Microbiol 2000; 38(6): 2227-31.
12. Yokoyama T, Rikimaru T, Kinoshita T, et al. Clinical utility of lipoarabinomannan antibody in pleural fluid for the diagnosis of tuberculous pleurisy. J Infect Chemother 2005; 11(2): 81-3.
13. Nyendak MR, Lewinsohn DA, Lewinsohn DM. New diagnostic methods for tuberculosis. Curr Opin Infect Dis 2009; 22(2): 174-82.
14. Pottumarthy S, Morris A. A comparison of seven tests for serological diagnosis of tuberculosis. Clin Microbiol 2000; 38(6): 2227-31.
15. Dorman SE. New diagnostic tests for tuberculosis: Bench, bedside and beyond. Clin Infect Dis 2010; 50(Suppl 3): S173-7.
16. Moghtaderi A, Alavi-Naini R, Izadi S and Cuevas LE. Diagnostic risk factors to differentiate tuberculous and acute bacterial meningitis. Scand J Infect Dis 2009; 41(3): 188-94.
17. Moghtaderi A, Niazi AA, Alavi-Naini R, et al. Comparative analysis of cerebrospinal fluid adenosine deaminase in tuberculous and non-tuberculous deaminase in tuberculous and non-tuberculous meningitis. Clin Neurol Neurosurg 2010; 112: 459-462.
18. Chierakul N, Damrongchokpipat P, Chaiprasert A and Arjratanakul W. Antibody detection for the diagnosis of tuberculous pleuritis. Int J Tuberc Lung Dis 2001; 5(10): 968-72.
19. Goto M, Noguchi Y, Koyama H, et al. Diagnostic value of adenosine deaminase in tuberculous pleural effusion: A meta-analysis. Ann Clin Biochem 2003; 40(Pt 4): 374-81.
20. Eintracht S, Silber E, Sonnenberg P, et al. Analysis of adenosine deaminase isoenzyme-2 (ADA(2) in cerebrospinal fluid in the diagnosis of tuberculosis meningitis. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2000; 69(1): 137-8.
21. Kalantri Y, Hemvani N, Chitnis DS. Evaluation of whole blood IFNgamma test using PPD and recombinant antigen challenge for diagnosis of pulmonary and extra-pulmonary tuberculosis. Indian J Exp Biol 2009; 47(6): 463-8.
22. Gerald H, Mazurek M, Jereb J, et al. Updated guidelines for using interferon gamma release assays to detect mycobacterium tuberculosis infection United States morbidity and mortality weekly report. Recommendat Report 2010: 25; 59(RR-5).
23. Pai M, Dheda K, Cunningham J, et al. T-cell assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: moving the research agenda forward. Lancet Infect Dis 2007; 7(6): 428-38.
24. Pai M, Joshi R, Dogra S, et al. T-cell assay conversions and reversions among household contacts of tuberculosis patients in rural India. Int J Tuberc Lung Dis 2009; 13(1): 84-92.
25. Centers for disease control and prevention national center for HIV/AIDS, viral hepatitis, STD, and TB prevention division of tuberculosis elimination; targeted testing and the diagnosis of latent tuberculosis infection and tuberculosis disease. Atlanta, Georgia 2008. http://www.cdc.gov/TB/education/ssmodules/pdfs/Module3.pdf
26. Detjen AK, Keil T, Roll S, et al. Interferon-gamma release assays improve the diagnosis of tuberculosis and nontuberculous mycobacterial disease in children in a country with a low incidence of tuberculosis. Clin Infect Dis 2007; 45(3): 322-8.
27. Franken PJ, Timmermans F, Prins C, et al. Comparison of Mantoux and QuantiFERON TB gold tests for diagnosis of latent tuberculosis infection in army personnel. Clin Vaccine Immunol 2007; 14(4): 477-480.
28. Pheiffer C, Carroll NM, Beyers N, et al. Time to detection of Mycobacterium tuberculosis in BACTEC systems as a viable alternative to colony counting. Int J Tuberc Lung Dis 2008; 12(7): 792-8.
29. Chang CL, Park TS, Oh SH, et al. Reduction of contamination of mycobacterial growth indicator tubes with a modified antimicrobial combination. J Clin Microbiol 2002; 40(10): 3845-7.
30. Iseman MD, Heifets LB. Rapid detection of tuberculosis and drug-resistant tuberculosis. N Engl J Med 2006; 355(15): 1606-8.
31. Moore DA, Evans CA, Gilman RH, et al. Microscopic-observation drug-susceptibility assay for the diagnosis of TB. N Engl J Med 2006; 355(15): 1539-50.
32. Palomino JC, Martin A, Portaels F. MODS assay for the diagnosis of TB. N Engl J Med 2007; 356(2): 188.
33. Moon JW, Chang YS, Kim SK, et al. The clinical utility of polymerase chain reaction for the diagnosis of pleural tuberculosis. Clin Infect Dis 2005; 41(5): 660-6.
34. Cousins DV, Wilton SD, Francis BR and Gow BL. Use of polymerase chain reaction for rapid diagnosis of tuberculosis. J Clin Microbiol 1992; 30(1): 255-8.
35. Tortoli E, Nanetti A, Piersimoni C, et al. Performance assessment of new multiplex probe assay for identification of mycobacteria. J Clin Microbiol 2001; 39(3): 1079-84.
36. Jatana SK, Nair MN, Lahiri KK and Sarin NP. Polymerase chain reaction in the diagnosis of tuberculosis. Indian Pediatr 2000; 37(4): 375-82.
37. Rajakumar K, Shafi J, Smith RJ, et al. Use of genome level-informed PCR as a new investigational approach for analysis of outbreak-associated Mycobacterium tuberculosis isolates. J Clin Microbiol 2004; 42(5): 1890-6.
38. Piersimoni C, Scarparo C, Piccoli P, et al. Performance assessment of two commercial amplification assays for direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex from respiratory and extrapulmonary specimens. J Clin Microbiol 2002; 40(11): 4138-42.
39. Gomez-Pastrana D, Torronteras R, Caro P, et al. Comparison of amplicor, in-house polymerase chain reaction, and conventional culture for the diagnosis of tuberculosis in children. Clin Infect Dis 2001; 32(1): 17-22.
40. Schirm J, Oostendorp LA, Mulder JG. Comparison of amplicor, in-house PCR, and conventional culture for

Downloaded from zjrms.ir at 22:18 +0430 on Wednesday May 15th 2019

detection of Mycobacterium tuberculosis in clinical samples. J Clin Microbiol 1995; 33(12): 3221-4.
41. Varma-Basil M, Pathak R, Singh K, et al. Direct early identification of Mycobacterium tuberculosis by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis from clinical samples. Jpn J Infect Dis 2010; 63(1): 55-7.
42. Ling DI, Flores LL, Riley LW and Pai M. Commercial nucleic-acid amplification tests for diagnosis of pulmonary tuberculosis in respiratory specimens: Meta-analysis and meta-regression. PLoS One 2008; 3(2): e1536.
43. Osores F, Nolasco O, Verdonck K, et al. Clinical evaluation of a 16S ribosomal RNA polymerase chain reaction test for the diagnosis of lymph node tuberculosis. Clin Infect Dis 2006; 43(7): 855-9.
44. Leao SC, Bernardelli A, Cataldi A, et al. Multicenter evaluation of mycobacteria identification by PCR restriction enzyme analysis in laboratories from Latin America and the Caribbean. J Microbiol Methods 2005; 61(2): 193-9.
45. Marin M, Garcia de Viedma D, Ruiz-Serrano MJ and Bouza E. Rapid direct detection of multiple rifampin and isoniazid resistance mutations in Mycobacterium tuberculosis in respiratory samples by real-time PCR. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48(11): 4293-300.
46. Trinker M, Hofler G, Sill H. False-positive diagnosis of tuberculosis with PCR. Lancet 1996; 348(9038): 1388.
47. Dinnes J, Deeks J, Kunst H, et al. A systematic review of rapid diagnostic tests for the detection of tuberculosis infection. Health Technol Assess 2007; 11(3): 1-196.
48. Prakash S, Katiyar SK, Purwar S and Singh JP. Clinical evaluation of the mycobacteriophage-based assay in rapid detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory specimens. Indian J Med Microbiol 2009; 27(2): 134-8.
49. Albert H, Trollip AP, Linley K, et al. Development of an antimicrobial formulation for control of specimen-related contamination in phage-based diagnostic testing for tuberculosis. J Appl Microbiol 2007; 103(4): 892-9.
50. Butler WR, Guthertz LS. Mycolic acid analysis by high-performance liquid chromatography for identification of Mycobacterium species. Clin Microbiol Rev 2001; 14(4): 704-26.
51. Alavi-Naini R, Hashemi M, Mohagegh-Montazeri M, et al. Glutaraldehyde test for rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis 2009; 13(5): 601-5.
52. Larsson S, Shrestha MP, Pokhrel BM, et al. The glutaraldehyde test as a rapid screening method for pulmonary tuberculosis: A preliminary report. Ann Trop Med Parasitol 1990; 84(2): 111-7.
53. Mathur ML, Sachdev R. Temperature affects the results of the glutaraldehyde test in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. Int J Tuberc Lung Dis 2005; 9(2): 200-5.
54. Alavi-Naini R, Metanat M, Alijani E and Mozaffar H. Patho-TB test for the rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis. JRMS 2009; 14(5): 301-7.

# *Rapid diagnostic tests for tuberculosis*

**Roya Alavi-Naini,[1] Batool Sharifi-Mood,[2] Maliheh Metanat,[1] S. Ahmad Hashemi[3]**

**Received: 8/Feb/2011**
**Accepted: 11/May/2011**

***Background*:** Tuberculosis (TB) is still an important heath issue in developing countries. According to low sensitivity of sputum smear and prolonged declaration of culture results, we reviewed rapid diagnostic tests for tuberculosis in this article.

***Materials and Method:*** Electronic databases (PubMed and Embase) were searched from 1990 to 2010 for rapid diagnostic tests. Key words like tuberculosis, Mycobacterium tuberculosis and rapid tests were used. In this review article we discussed about the accuracy of rapid diagnostic tests for the diagnosis of tuberculosis.

***Results:*** Serologic and enzyme tests such as adenosine deaminase and cytokines revealed different results. Nucleic acid amplification tests (NAATS) provided higher accuracy for sputum positive pulmonary TB. The specificity of NAATS was high in pulmonary and extra pulmonary tuberculosis. Automated liquid culture (radiometric and non-radiometric) had higher speed and accuracy in comparison to conventional solid media culture.

***Conclusion:*** Despite many efforts for rapid detection of TB, sputum microscopic smears and cultures remain the principal diagnostic tests for TB patients. Sophosticated equipments and experienced personels are usually required for performing some of the newer rapid diagnostic tests. Investigation for novel rapid diagnostic tests are ongoing. [ZJRMS, 2011; 13(7):1-7]

***Keywords:*** Tuberculosis, mycobacterium tuberculosis, rapid diagnostic tests

1. **Associate Professor of Infecious Diseases, Research Center for Infectious Diseases and Tropical Medicine, Zahedan University of Medical Sciences and Health Services, Zahedan, Iran.**
2. **Professor of Infecious Diseases, Research Center for Infectious Diseases and Tropical Medicine, Zahedan University of Medical Sciences and Health Services, Zahedan, Iran.**
3. **Physician, Research Center for Infectious Diseases and Tropical Medicine, Zahedan University of Medical Sciences and Health Services, Zahedan, Iran.**

***Please cite this article as:*** Alavi-Naini R, Sharifi-Mood B, Metanat M, Hashemi SA. Rapid diagnostic tests for tuberculosis. Zahedan J Res Med Sci (ZJRMS) 2011; 13(7): 1-7.



Downloaded from zjrms.ir at 22:18 +0430 on Wednesday May 15th 2019