Orginal Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iranian J Med Microbiology: Volume 7, Number 3 (12-2013)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Design of Primers for Pertussis Diagnosis by Real Time-PCR and Determination of its Sensitivity and Specificity in Comparison with Commercial Kits.

Hamidreza Monavari[1], Samile Nourbakhsh[2], Mitra Barati[2], Anahita Izadi[2], Seyed Ali Mosavi[2], Shima Javadi nia[2]

1. Department of Virology and Anti-Microbial Resistance Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
2. Pediatric Infectious Research Center, IRAN medical university, Tehran, Iran

Article Information

Article history:
Received:2013/07/01
Accepted:2013/10/01
Available online:2014/05/05

article subject:
Molecular Microbiology

IJMM 1392; 7(3): P 1-7

Corresponding author at:
Dr. Hamidreza Monavari
Department of Virology and Anti-Microbial Resistance Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Email:
hrmonavari@yahoo.com

Abstract

Background and Aim: Pertussis vaccination in this country has been going on for many years and active infection or vaccination will provide immunity in 85% of cases. However, every 2-5 years outbreaks in unprotected adults creates an epidemic for children and infants. Based on conserved genomic sequences, Real time PCR could be an easy, cost- benefit, fast and highly sensitive method for pertussis detection.

Materials and Methods: A total of 170 nasopharyngeal swabs of infants with history of cough for more than 2 weeks were collected. In the first stage, *Bordetella pertussis* bacteria detection was performed by culture and followed by Real time PCR using a commercial kit and then repeated with newly designed primers.

Results: Performance of our home made primers for detecting pertussis using Real Time PCR in comparison with those by commercial kit was acceptable based on diagnostic classical guidance (WHO) and the (CDC).

Conclusions: Real time PCR test with new primers in comparison with culture techniques is more suitable, high sensitivity and can provide more informative values for pertussis detection.

Copyright © 2014 Iranian journal of medical microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Monavari H, Nourbakhsh S, Barati M, Izadi A, Mosavi S, Javadi nia S. Design of primers for pertussis diagnosis by Real Time PCR and determination of its sensitivity and specificity in comparison with commercial kits.. Iranian J Med Microbiology. 2013; 7 (3) 7 (3):1-7

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۷ – شماره ۳ – پاییز ۱۳۹۲

Journal homepage: www.ijmm.ir

طراحی پرایمرهای اختصاصی بوردتلا *پرتوسیس* با استفاده از تکنیک Real-time PCR و مقایسه حساسیت و ویژگی آن‌ها با کیت تجاری

سید حمیدرضا منوری[۱]، ثمیله نوبخش[۲]، میترا براتی[۲]، آناهیتا ایزدی[۲]، سید علی جواد موسوی[۲]، شیما جوادی نیا[۲]، مریم اسقائی[۱]، حمیدرضا ملائی[۱]

۱. گروه ویروس‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

۲. مرکز تحقیقات عفونی اطفال دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت:۱۳۹۲/۰۴/۱۰

پذیرش:۱۳۹۲/۰۷/۱۰

انتشار آنلاین:۱۳۹۳/۰۲/۱۵

موضوع:

میکروب‌شناسی مولکولی

IJMM 1392; 7(3): P 1-7

نویسنده مسئول:

دکتر سید حمیدرضا منوری

گروه ویروس‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

تلفن: ۰۲۱۸۸۶۰۲۲۰۵

پست الکترونیک:

hrmonavari@yahoo.com

چکیده

زمینه و اهداف: در کشور ما واکسیناسیون سیاه‌سرفه سال‌هاست که انجام می‌شود و در ۸۵٪ موارد ایمنی کامل به وسیله واکسیناسیون و یا احیاناً ابتلا به بیماری ایجاد گردیده است؛ لذا همه‌گیری های ۵-۲ ساله ناشی از شیوع مجدد در بزرگسالان غیر ایمن است که سبب ابتلا کودکان و شیرخواران می‌شود. روش Real-time PCR با توجه به نواحی ژنومی محافظت‌شده و میزان اختصاصیت پرایمر مورد استفاده می‌تواند یک روش جایگزین آسان، ارزان، سریع و با حساسیت بالا باشد.

مواد و روش کار: در یک مطالعه کاربردی ۱۷۰ سوآب نازوفارنژیال از کودکان شیرخوار باسابقه سرفه بیش از ۲ هفته به دست آوردیم. در اولین مرحله تشخیص باکتری *بوردتلا پرتوسیس* با روش کشت و Real-time PCR با استفاده از کیت خارجی انجام شد و سپس با پرایمرهای جدید طراحی‌شده، آزمایش تکرار گردید.

یافته‌ها: عملکرد پرایمرهای مذکور به منظور تشخیص بیماری سیاه‌سرفه بر اساس یافته‌های کیت تجاری و راهنمای کلاسیک تشخیصی (*WHO*) و (*CDC*) قابل‌قبول است. در این پروژه نتایج حاصل از کیت تجاری با روش طراحی‌شده مطابقت داشته و حداقل کپی قابل‌تشخیص در این روش ۱۰ *copies/ml* در مقایسه با کیت تجاری که ۲۰ *copies/ml* بود بدست آمد. همچنین در این روش حساسیت و ویژگی ۱۰۰٪ بدست آمد.

نتیجه‌گیری: آزمون Real-time PCR با پرایمرهای جدید، در مقایسه با روش کشت، آزمون تائیدی مناسب‌تر، با حساسیت، ویژگی و ارزش های اخباری بالاتر برای تشخیص بیماری است. با این روش می‌توان به تشخیص سریع‌تر بیماران و درمان آنها پرداخت و از سایر عوارض بیماری جلوگیری کرد.

کلمات کلیدی: *بوردتلا پرتوسیس*، Real-time PCR.

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

عامل بیماری سیاه‌سرفه *بوردتلا پرتوسیس* (*Bordetella pertussis*) یک کوکوباسیل گرم منفی هوازی است که مخزن آن انسان بوده و بیماری بسیار واگیرداری ایجاد می‌کند که تمام سنین را تحت تأثیر قرار می‌دهد؛ ولی در کودکان شایع‌تر و خطرناک‌تر است (۱،۲). سیاه‌سرفه می‌تواند منجر به اختلال خواب، تشنج و ندرتاً بیماری مغزی و مرگ گردد. ابتلا به بیماری یا واکسیناسیون در ۸۵٪ موارد ایمنی کامل ایجاد می‌کند (۳).

سطح ایمونوگلوبولین در بدن فرد واکسینه یا مبتلا شده به تدریج کاهش‌یافته به طوری که بعد از ۱۰ سال دیگر هیچ‌گونه محافظتی نخواهد داشت و لذا به همین دلیل سطح آنتی بادی های مادری جهت محافظت جنین و نوزاد کافی نخواهد بود. تغییرات چشمگیری در همه‌گیری این بیماری نسبت به گذشته به وجود آمده است که همراه با افزایش شمار مبتلایان است که ابتلا مجدد در افراد واکسینه یا قبلاً مبتلا شده سبب بیشتر این

تغییرات اپیدمیولوژیک می‌باشد که منجر به همه‌گیری این بیماری هر ۲-۵ سال در سطح جهان می‌شود (۴). پرتوسیس در شیرخواران کمتر از ۶ ماه توجه ویژه‌ای را می‌طلبد. این سن بیش‌ترین میزان مبتلایان را تشکیل می‌دهد و شدت بیماری در این افراد بیشتر است. تعداد بستری و مرگ ناشی از بیماری در این سن بیشتر است. در ضمن این کودکان سن کمی جهت محافظت با واکسیناسیون علیه بیماری را دارند، چرا که هنوز واکسیناسیون آن‌ها کامل نشده است (۵). شایع‌ترین علت مرگ ناشی از پرتوسیس در شیرخواران جوان، پنومونی است که ممکن است با آپنه، تشنج و انسفالوپاتی عارضه دار همراه باشد (۶). واکسیناسیون پرتوسیس در نقاط مختلف جهان فرق می‌کند ولیکن در هیچ منطقه‌ای قبل از ۶ هفتگی (یک ونیم ماهگی) توصیه نمی‌شود (۴). WHO واکسیناسیون پرتوسیس را در سن ۶، ۱۰ و ۱۴ هفتگی بیشتر پیشنهاد می‌کند (۷). در حال حاضر عفونت علامت‌دار پرتوسیس در گروه‌هایی که محافظت ایمنی در آنها کامل نیست مثل کودکان بالای سن ۱۰ سال و کمتر از ۵ ماه بیشتر دیده می‌شود (۸). بزرگ‌سالان و بچه‌های بزرگ‌تر منبع عمده عفونت برای شیرخواران می‌باشند (۹)؛ لذا تشخیص سریع و قطعی بیماری برای درمان دقیق و پیشگیری از انتشار بیماری ضروری است. تشخیص بیماری سیاه‌سرفه در آزمایشگاه بر اساس کشت (استاندارد طلایی) می‌باشد ولی کشت حساسیت کمی داشته و حداقل ۴ روز زمان جهت ارائه نتایج نیاز دارد. همچنین نتیجه کشت به کیفیت و کمیت نمونه‌ها، انتقال سریع و تجربه تکنسین آزمایشگاه بستگی دارد (۱۰). به همین دلیل امروزه استفاده از روش‌های مولکولی جهت تشخیص سریع بوردتلا پرتوسیس و سایر عوامل ایجادکننده بیماری‌های تنفسی بسیار زیاد شده است (۱۱). در این بین، تکنیک Real-time PCR یک روش مناسب و سریع و اختصاصی جهت شناسایی آن است. برخلاف کشت نتایج Real-time PCR تحت اثر زنده بودن باکتری در طی انتقال یا ذخیره‌سازی قرار نمی‌گیرد (۱۲, ۱۳). لذا در سال‌های اخیر Real-time PCR به عنوان روش حساس و با اختصاصیت بالا برای تشخیص *بوردتلا پرتوسیس* در نمونه‌های بالینی مورد استفاده قرار گرفته است (۴, ۷, ۸, ۱۴). در این مطالعه جهت تشخیص وجود *بوردتلا پرتوسیس* در نمونه‌های نازفارنکس، آزمون‌هایی به روش کشت و Real-time PCR با کاربرد دو نوع پرایمر تجاری وارداتی و طراحی‌شده داخلی انجام گرفت. هدف اصلی در این پژوهش مقایسه و ارزیابی حساسیت و ویژگی سه آزمون فوق می‌باشد.

مواد و روش‌ها:

بیماران و نمونه‌ها

در این مطالعه ۱۷۰ کودک شیرخوار زیر ۶ ماه که سرفه‌های بیش از ۲ هفته داشتند و از مهر ۸۹ تا مهر ۹۰ به درمانگاه عفونی بیمارستان دانشگاهی حضرت رسول اکرم (ص) مراجعه کرده بودند، انتخاب شدند. پس از پذیرش و اخذ رضایت‌نامه و جمع‌آوری اطلاعات دموگرافیک آنها توسط فوق تخصص عفونی کودکان از نظر علائم بالینی مورد بررسی قرارگرفته و با توجه به عدم وجود جسم خارجی، ریفلاکس، سینوزیت ثابت‌شده، آسم و یا برونشیت، با استفاده از ۲ عدد سواپ داکرون برای هر بیمار، از ناحیه نازوفارنژیال آنها نمونه‌گیری انجام گردید. سواپ اول به صورت سترون جهت کشت باکتری به آزمایشگاه ارسال شد و سواپ دوم در PBS که از آب بدون DNase و RNase تهیه شده بود، قرار داده شد و پس از چند بار چرخاندن سواپ خارج گردید. در آزمایشگاه جهت آزمایش‌های مولکولی همه نمونه تا قبل از استخراج DNA در ۸۰- سلسیوس درجه نگهداری شدند.

کشت نمونه‌های بالینی از نظر باکتری *بوردتلا پرتوسیس*

در این مطالعه جهت بررسی حضور *بوردتلا پرتوسیس* و جداسازی باکتری در نمونه از روش کشت استفاده گردید. برای کشت اولیه از محیط Bordet-Gengou (آگار سیب‌زمینی – خون – گلیسرول) همراه پنی سیلین G و محیط دارای شارکول حاوی پادزیست سفالکسین (۴۰ µg/ml) و بدون سفالکسین استفاده شد و سپس به مدت ۱۰ تا ۱۲ روز در دمای ۳۶° C در محیط مرطوب انکوبه گردید. بعد از گذشت ۲۴ ساعت اولیه، روزانه کشت‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. بدین گونه که از کلنی های مشکوک لام تهیه و پس از تثبیت کردن و رنگ‌آمیزی گرم و مشاهده کوکوباسیل های گرم منفی آزمایش‌های تکمیلی از قبیل آزمایش اکسیداز، نیترات، اوره آز، کاتالاز و تست حرکت بر روی آنها انجام گرفت.

طراحی پرایمرهای جدید

ابتدا با وارد شدن به سایت PubMed سکانس ژنومی یازده آلل مربوط به ژن Pertactin *بوردتلا پرتوسیس* با فرمت FASTA

جمع‌آوری شد که عبارت‌اند از: AJ011091, (prn1); AJ011092 (prn3);AJ011015 (prn4); AJ011016 (prn2)AJ011093 (prn5); AJ132095(prn6); AJ133784 (prn7); AJ133245 (prn8);AJ315611 (prn9); AJ784875 (prn10); AJ507642 (prn11

پس از انجام BLAST با (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) استفاده از سایت EBI تحت Multiple Alignment قرار گرفتند (تصویر شماره ۱). بدین ترتیب ناحیه‌های با حداقل تغییر بین گونه‌های مختلف شناسایی شد. در این مطالعه ۲۰۰ نوکلئوتید با استفاده از نرم‌افزار و در نظر گرفتن نواحی اختصاصی از نواحی محافظت‌شده برای جنس *بوردتلا پرتویس* و کدون های شروع و اختتام و توالی های ثبت‌شده در بانک ژنی، طراحی پرایمرها و پروب با استفاده از نرم‌افزار Beacon designer ver8 (Primerbiosoft,USA) انجام گردید. در این پژوهش توالی پرایمرهای اختصاصی به همراه پروب اختصاصی از نواحی کاملاً محافظت‌شده برای *B.pertussis* با insertion sequence IS481 طراحی و به ترتیبی که در جدول (۱) مشاهده می‌شود توسط شرکت international AG Metabion سنتز گردید. لازم به ذکر است که پروب مورد نظر به صورت TaqMan و Dual labeled بوده که با رنگ های FAM و BHQ-1 نشان‌دار گردید.

کیت تجاری

در مقایسه با روش طراحی‌شده جهت شناسایی *بوردتلا پرتوسیس* از کیت تجاری شرکت primerdesignآلمان استفاده شد؛ که در توضیحات مربوط به آن این‌گونه ذکر شده بود که پرایمرهای طراحی‌شده از ناحیه Toxin promotor می‌باشند.

آماده سازی نمونه‌ها برای انجام Real-time PCR

استخراج DNA از نمونه‌ها با استفاده از کیت High pure PCR template Preparation (ساخته شرکت Roche) انجام شد. همه نمونه‌ها مطابق با دستورالعمل کیت با ۲۰۰µL از نمونه‌ها در هر استخراج تخلیص شدند و DNA های تخلیص شده در ۲۰- درجه سلسیوس ذخیره شد.

واکنش Real-time PCR

ده میکرولیتر از DNA استخراج‌شده به ده میکرولیتر از مخلوط واکنش حاوی ۵ واحد آنزیم Polymerase Taq Man، ۰/۰۱٪ ژلاتین، ۰/۶ میکرومول از هر پرایمر، ۰/۲ میکرومول پروب، ۲۰۰ میکرومول از هر dNTP و ۵ میکرولیتر از بافر 10X اضافه گردید. تیوبها سپس در دور بالا سانتریفیوژ شده و در دستگاه Rotorgene6000 (corbett,Australia) قرار گرفتند.

نمونه‌های کنترل منفی و کنترل مثبت نیز مشابه با نمونه‌های بیماران تهیه شدند. جهت کنترل منفی از آب مقطر سترون و جهت کنترل مثبت از نمونه واکسن *بوردتلا پرتوسیس* استفاده شد که از مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی تهیه گردید. واکنش PCRدر ۴۵ سیکل انجام شد که قبل از شروع واکنش تیوبها به مدت ده دقیقه در ۹۵ درجه سلسیوس قرار گرفتند و سپس ۱۵ ثانیه در ۹۵ درجه سلسیوس و ۶۰ ثانیه در ۶۰ درجه سلسیوس قرار گرفتند. فلورسنت در ۶۰ درجه سلسیوس و در کانال سبز سنجیده شد. همچنین در مورد کیت تجاری مخلوط واکنش با مواد مشابه روش طراحی‌شده آماده گردیده و جهت کنترل مثبت و منفی از نمونه‌های موجود در کیت استفاده شد و در نهایت تیوبها با برنامه یکسان با روش طراحی‌شده در دستگاه قرار گرفتند. در این کیت نتایج به صورت کمی گزارش‌شده و C_t های پایین تر از ۳۸ در کانال Yellow به عنوان مثبت گزارش شدند و در نهایت منحنی استاندارد با استفاده از استانداردهای مشخص در کیت رسم و تعداد کپی در هر نمونه تعیین گردید.

روش تجزیه و تحلیل اطلاعات

اطلاعات جمع‌آوری شده برای تعیین تعداد نمونه مثبت و منفی برای باکتری ارزیابی شدند، آنالیز توصیفی انجام و اطلاعات به صورت تعداد (درصد) بیان گردیدند.

یافته‌ها

از مهرماه ۱۳۸۹ تا مهرماه ۱۳۹۰، ۱۷۰ کودک شیرخوار با سن زیر ۶ ماه با میانگین سنی ۲/۵ با (SD= ۲/۸) به درمانگاه مراجعه کردند. ۴۵/۹٪ (۷۸ نفر) نمونه‌ها پسر و ۵۴/۱٪ (۹۲ نفر) دختر بودند. در ۳۳/۵٪ (۵۷ نفر) از موارد بیماران سابقه تماس با افراد مبتلا به سرفه مزمن را داشتند و به میزان ۵۸/۲٪ (۹۹ نفر) از بیماران در پرتونگاری سینه آنها تغییراتی مشاهده شد (جدول ۲). آنالیز نتایج Real-time PCR نشان داد که ژنوم باکتری

جدول ۱: جدول ۱ مقایسه پرایمرهای استفاده‌شده با کیت تجاری جهت تشخیص *بوردتلا پرتوسیس*

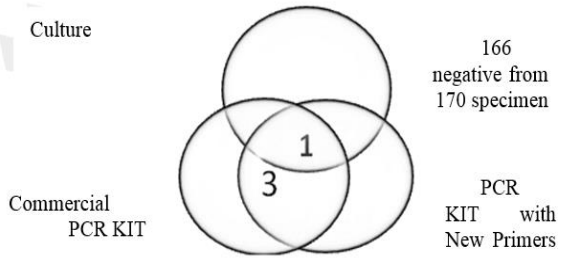
Target gene	3′ – Sequence 5′		Kit
toxin promoter	GAT TCA ATA GGT TGT ATG CAT GGT T	Forward	**Commercial Primer**
	TTC AGG CAC ACA AAC TTG ATG GGC G	Reverse	
Pertactin	TGCCGACTGGAACAACCA	Forward	**New Primer**
	CCATATCCAGGGTCCGAC	Reverse	
	ATCGTCAAGACCGGTGAGCGCC	Probe	

بوردتلا پرتوسیس در ۴(۲/۴٪) (۲ دختر و ۲ پسر) از نمونه‌ها حضور داشته است. همگی این ۴ نفر حداقل یکی از علائم بالینی به جز سرفه مانند خونریزی ملتحمه، کبودی و تشنج را داشتند. فقط در ۲ بیمار تب وجود داشت و در ۲ نفر از ۴ نفر تغییرات در رادیوگرافی سینه به صورت انفیلتراسیون و یا آتلکتازی خفیف و گذرا مشاهده شد. ۵۰٪ از این ۴ نفر در تماس با بیماران مبتلا به سیاه‌سرفه بودند. جهت توصیف مشخصات نمونه‌های پژوهش از آمار توصیفی شامل جدول توزیع فراوانی استفاده گردید (جدول ۲).

جدول2 : مقایسه نشانه‌های بالینی در جامعه مورد مطالعه جهت تشخیص *بوردتلا پرتوسیس*

نشانه‌های ظاهری بیماران	تعداد کل بیماران	تعداد بیماران بوردتلا مثبت که نشانه‌ها در آنها تظاهر یافته	فراوانی (٪)
سرفه	۱۷۰	۴	۱۰۰
تب	۸۵	۲	۵۰
علائم بالینی (خونریزی ملتحمه، کبودی، تشنج و)	۱۱۵	۱	۶۷,۶
تغییرات رادیوگرافیک	۹۹	۲	۵۸,۲
سابقه تماس	۵۷	۲	۳۳,۵
سابقه بیماری زمینه‌ای	۶۴	۱	۳۷,۶

در ارزیابی شاخص های مربوط به اعتبار آزمون‌های کشت و Real-time PCR با پرایمرهای تجاری و جدید از ۱۷۰ نمونه ۱ مورد کشت مثبت و ۴ مورد Real-time PCR مثبت گزارش شد (شکل ۱).



شکل ۱: ارتباط نتایج مثبت برای نمونه‌های *بوردتلا پرتوسیس* در سه روش آزمایش کشت، واکنش PCR با پرایمرهای تجاری و جدید.

حساسیت، ویژگی و ارزش‌های اخباری مثبت و منفی هر سه تست با جدول تشخیص بالینی بیماری سیاه‌سرفه بر اساس راهنمای کلاسیک تشخیصی World Health Organization (WHO)و Center for Diseases Control and Prevention (CDC)مقایسه گردید و اطلاعات بدست آمده در هر سه روش با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۶ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند (جدول ۳). میزان حساسیت و ویژگی روش Real-time PCR با پرایمرهای جدید در مقایسه با پرایمرهای تجاری که در کیت تجاری مورد استفاده موجود بود به ترتیب ۱۰۰٪ و ۱۰۰٪ می‌باشد درحالی‌که حساسیت و ویژگی روش کشت با Real-time PCR به ترتیب ۲۵٪ و ۱۰۰٪ می‌باشد. روش مورد پژوهش ما در رقت‌های مختلفی از DNA استخراج‌شده از نمونه واکسن سیاه‌سرفه و نمونه استاندارد باکتری غیرفعال شده ((ATCC 9340 and 9797 تهیه‌شده از موسسه واکسن‌سازی رازی، مورد ارزیابی قرار گرفت که حساسیت و اختصاصیت ۱۰۰٪ این روش تأیید شد.

جدول ۳: تعداد نتایج مثبت و منفی حاصل از آزمایش کشت، واکنش PCR با پرایمرهای تجاری و جدید و مقایسه حساسیت، ویژگی و ارزش اخباری مثبت و منفی این سه روش با استاندارد راهنمای تشخیصی مرکز جهانی پیشگیری و کنترل بیماری‌ها برای بیماری سیاه‌سرفه.

Test	*Expanded Standard		Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)	Agreement Rate (%)
Positive			Negative				
Culture							
Positive	1	0	25	100	100	98	**98**
Negative	3	166					
Commercial Primer							
Positive	4	0	100	100	100	100	**100**
Negative	0	166					
New Primer							
Positive	4	0	100	100	100	100	**100**
Negative	0	166					

Abbreviations: PPV: positive predictive value; NPV: negative predictive value.

*Either (1) culture positive, or (2) Commercial PCR Kit or Monavari PCR Kit positive with clinical features fulfilling the CDC clinical case definition.

بحث:

روش تشخیص معتبر و سریع برای اتخاذ درمان مناسب و پیشگیری سیاه‌سرفه ضروری می‌باشد. کشت که به عنوان استاندارد طلایی برای تشخیص *بوردتلا پرتوسیس* بکار می رود، اغلب فاقد حساسیت بوده و حداقل ۴ روز برای بدست آوردن نتیجه لازم وقت نیاز دارد (**۸, ۱۵**). امروزه چند روش PCR دارای حساسیت و اختصاصیت بالایی نسبت به کشت جهت تشخیص سیاه‌سرفه بکار می رود. در این بین، در سال های اخیر Real-time PCR به عنوان یک روش مناسب جهت تشخیص *بوردتلا پرتوسیس* به دلیل کاهش زمان تشخیص و حساسیت تشخیصی بالا توصیه گردیده است (**۱, ۱۴, ۱۶**). به همین دلیل این مطالعه جهت تشخیص *بوردتلا پرتوسیس* از کودکان شیرخوار کوچک‌تر از ۶ ماه با روش Real-time PCR انجام گردید. در بیشتر مطالعاتی که تاکنون جهت شناسایی *بوردتلا پرتوسیس* انجام شده است از ناحیه ژنومی IS481 و یا IS1001 جهت طراحی پرایمر و پروب استفاده‌شده و این در حالی است که نواحی فوق علاوه بر اینکه در *بوردتلا پرتوسیس* وجود دارند در سایر گونه‌های بوردتلا نیز وجود دارند؛ لذا در این مطالعه از ژن Pertactin که تولیدکننده یک پروتئین ۶۹ کیلو دالتونی از غشاء خارجی و یک عامل بیماری زا در باکتری *بوردتلا پرتوسیس* می‌باشد، استفاده گردید.

در این مطالعه ابتدا کلیه نمونه‌ها با کیت تجاری مورد آزمایش قرارگرفته و پس از اطمینان از مثبت بودن آنها (مثبت بودن هر سه تکرار)، آزمایش بر روی کلیه نمونه‌ها با روش طراحی‌شده به صورت سه بار تکرار برای هر نمونه انجام گرفت و نتایج کاملاً با کیت تجاری یکسان بود.همچنین جهت ارزیابی حداقل محدوده تشخیصی، یکی از نمونه‌های مثبت به صورت لگاریتمی رقیق‌شده و آزمایش مجدداً بر روی آن تکرار شده و مشخص شد که در روش طراحی‌شده، حداقل کپی از ژنوم که تشخیص داده می‌شود ۱۰ copies/ml می‌باشد و این در حالی بود که همان تیتر از نمونه توسط کیت تجاری مورد آزمایش قرار گرفت و نتیجه آزمایش منفی شد و حساسیت کیت تجاری ۲۰ copies/ml تعیین گردید.

در مطالعه‌ای که توسط Mastrantonia و همکارانش در ایتالیا انجام شد از ۶۸۱ نمونه نازفارنژیال کودکان با سرفه‌های بیش از ۷ روز ۱۵/۳٪ موارد مثبت جدا کردند(**۱۷**). در این مطالعه میزان تشخیص از ۱۷۰ کودکی سرفه‌های بیش از ۲ هفته داشتند ۴ مورد (۲/۴٪) ایزوله گشت که تقریباً مشابه میزان تشخیص مطالعه فوق می‌باشد. لازم به ذکر است که میزان تفاوت های مشاهده‌شده می‌تواند ناشی از نوع نمونه، نحوه نمونه‌گیری و نوع PCR باشد. این مطالعه همانند مطالعه García-Martínez نشان داد که Real-time PCR روشی حساس و مناسبی جهت تشخیص *بوردتلا پرتوسیس* در نمونه‌های نازوفارنژیال کودکان

می‌باشد (**۱۸**). این مطالعه نشان داد که میزان تشخیص *بوردتلا پرتوسیس* با روش Real-time PCR حدود ۲/۴٪ بود. هرچند که در مطالعه Martinez میزان تشخیص *بوردتلا پرتوسیس* حدود ۳۴٪ بود (**۱۸**). Agreement Rate، توانایی یک تست تشخیصی را در شناسایی صحیح بیمار مشخص می‌نماید که در مورد آزمون‌های استاندارد بایستی ۱۰۰ درصد باشد (**۱۳**) و با توجه به (جدول ۳) روش Real-time PCR با پرایمرهای جدید نیز به این هدف نائل شده است که با نتایج حاصل از کیت تجاری کاملاً همخوانی داشت اما این‌گونه به نظر می‌رسد که توانایی کیت تجاری در تشخیص و شناسایی باکتری مورد نظر در نمونه‌هایی که بار میکربی کمتر از ۲۰ copies دارند، ضعیف عمل کرده و حساسیت کیت سبب عدم شناسایی این‌گونه موارد می‌شود.

نتایج نشان داد که میزان حساسیت، ویژگی و ارزش‌های اخباری مثبت و منفی و Agreement Rate در تکنیک Real-time PCR با کاربرد هر دو سری پرایمرهای خارجی و پرایمرهای جدید باهم همپوشانی داشته و هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. میزان حساسیت روش کشت باکتری *بوردتلا پرتوسیس* در مقایسه با روش Real-time PCR کمتر درحالی‌که میزان ویژگی هر سه تست یکسان بود.

تشکر و قدر دانی

نویسندگان مقاله از کارکنان مرکز تحقیقات عفونی اطفال و آزمایشگاه بیمارستان حضرت رسول اکرم (ص) تهران به خاطر تهیه نمونه و همکاری تشکر می‌نمایند.

References

1. Scheifele DW, Halperin SA, Ochnio JJ, Ferguson AC, Skowronski DM. A modified vaccine reduces the rate of large injection site reactions to the preschool booster dose of diphtheria-tetanus-acellular pertussis vaccine: results of a randomized, controlled trial. Pediatr Infect Dis J. 200;24(12):1059-66.

2. Forsyth K, Nagai M, Lepetic A, Trindade E. Pertussis immunization in the global pertussis initiative international region: recommended strategies and implementation considerations. Pediatr Infect Dis J. 2005;24(5 Suppl):S93-7.

3. Baptista PN, Magalhaes V, Rodrigues LC, Rocha MA, Pimentel AM. Source of infection in household transmission of culture-confirmed pertussis in Brazil. Pediatr Infect Dis J. 2005;24(11):1027-8.

4. Greenberg DP. Pertussis in adolescents: increasing incidence brings attention to the need for booster immunization of adolescents. Pediatr Infect Dis J. 2005;24(8):721-8.

5. Wheeler JG, Simmons AL. Pertussis update. Pediatr Infect Dis J. 2005;24(9):829-30.

6. Celentano LP, Massari M, Paramatti D, Salmaso S, Tozzi AE. Resurgence of pertussis in Europe. Pediatr Infect Dis J. 2005;24(9):761-5.

7. Halperin SA. Canadian experience with implementation of an acellular pertussis vaccine booster-dose program in adolescents: implications for the United States. Pediatr Infect Dis J. 2005;24(6 Suppl):S141-6.

8. Hay JW, Ward JI. Economic considerations for pertussis booster vaccination in adolescents. Pediatr Infect Dis J. 2005;24(6 Suppl):S127-33.

9. Davis JP. Clinical and economic effects of pertussis outbreaks. Pediatr Infect Dis J. 200;24(6 Suppl):S109-16.

10. Edwards KM. Overview of pertussis: focus on epidemiology, sources of infection, and long term protection after infant vaccination. Pediatr Infect Dis J. 2005;24(6 Suppl):S104-8.

11. Caro JJ, Getsios D, El-Hadi W, Payne K, O'Brien JA. Pertussis immunization of adolescents in the United States: an economic evaluation. Pediatr Infect Dis J. 2005;24(5 Suppl):S75-82.

12. Moraga F, Roca J, Mendez C, Rodrigo C, Pineda V, Martinez A, et al. Epidemiology and surveillance of pertussis among infants in Catalonia, Spain, during 1997-2001. Pediatr Infect Dis J. 2005;24(6):510-3.

13. Forsyth K, Tan T, von Konig CH, Caro JJ ,Plotkin S. Potential strategies to reduce the burden of pertussis. Pediatr Infect Dis J. 2005;24(5 Suppl):S69-74.

14. Tan T, Plotkin S. Controlling pertussis: considerations for the future. Pediatr Infect Dis J. 2005;24(5 Suppl):S98.

15. Wirsing von Konig CH, Campins-Marti M, Finn A, Guiso N, Mertsola J, Liese J. Pertussis immunization in the global pertussis initiative European region: recommended strategies and implementation considerations. Pediatr Infect Dis J. 2005;24(5 Suppl):S87-92.

16. Tan T, Halperin S, Cherry JD, Edwards K, Englund JA, Glezen P, et al. Pertussis immunization in the global pertussis initiative North American region: recommended strategies and implementation considerations. Pediatr Infect Dis J. 2005;24(5 Suppl):S83-6.

17. 171 Stefanelli P, Mastrantonio P, Hausman SZ, Giuliano M, Burns DL. Molecular characterization of two Bordetella bronchiseptica strains isolated from children with coughs. J Clin Microbiol. 1997;35(6):1550-5.

18. García-Martínez J, Chaves F, Salto E, Otero JR. Bordetella pertussis detection by real-time PCR, immunofluorescence and culture: prospective evaluation and molecular epidemiology. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2006 ;24(8):500-4.