Archive of SID

کاربرد PCR در تشخیص مایکوباکتریوم توبرکولوزیس کمپلکس

داریوش شیرانی[۱]، دکتر ناصر گلبانگ[۱*]

۱- گروه زیستشناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان

Title: *Application of PCR in diagnosis of Mycobacterium tuberculosis complex*

Authors: *Shirani D,(MSc); Golbang N,(PhD).*

Introduction: *Laboratory diagnosis of tuberculosis is based on direct smear and culture, the latter being especially time - consuming. The aim of this study was to compare three laboratory methods for diagnosis of tuberculosis: direct smear, culture and polymerase chain reaction (PCR).*

Methods: *One hundred clinical specimens were collected from Molla-Hadi-Sabzevari health center in Isfahan, Iran. PCR was based on MT1 and MT2 primers common to all species of Mycobacterium tuberculosis complex (M. tuberculosis, M. africanum, M. microti and M. bovis). Primers amplified a 225 bp PCR product. Also a polymerase chain reaction enzyme linked immunoassay (PCR-ELISA) was employed for some of the clinical specimens. The PCR product was the tag in which anti-digoxigenin antibody was bound in the subsequent ELISA. The PCR product was bound to a streptavidin-coated microtitration plate through a biotinylated capture probe.*

Results: *Out of 50 individuals in control group, there was no positive result of PCR. In patient group 48 out of 50 were positive PCR. The sensitivity of the culture, the direct Ziel-Nelson smear and the PCR were %88, %82 and %96, respectively.*

Conclusion: *According the results of this study it is concluded that PCR is more sensitive than culture and direct smear.*

Keywords: *PCR , Mycobacterium tuberculosis, diagnosis.*

Hakim 2006; 9(1):16-21.

*نویسنده مسؤول: دانشگاه اصفهان، گروه زیستشناسی، تلفن: ۰۳۱۱-۷۹۳۲۴۶۳، نمابر: ۰۳۱۱-۷۹۳۲۴۵۶

پست الکترونیک: agolbang@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

چکیده:

مقدمه: *تشخیص آزمایشگاهی توبرکولوزیس بر پایه آزمایش مستقیم و کشت می‌باشد. مشکل عمده، زمان‌بر بودن کشت مایکوباکتریوم توبرکولوزیس است. هدف از این مطالعه مقایسه سه روش آزمایشگاهی لام مستقیم، کشت و PCR برای تشخیص توبرکولوز بود.*

روش‌کار: *تعداد ۱۰۰ نمونه بالینی از مرکز پزشکی ملاهادی سبزواری در اصفهان گردآوری شد. PCR با استفاده از آغازگرهای MT1 و MT2 انجام شد که این آغازگرها DNA تمام سویه‌های مجموعه میکوباکتریوم توبرکولوزیس (میکوباکتریوم توبرکولوزیس، میکوباکتریوم آفریکانوم، میکوباکتریوم میکروتی و میکوباکتریوم بوویس) را تکثیر داد. آغازگرها یک محصول PCR حاوی ۲۲۵ جفت باز را بوجود آوردند. همچنین یک PCR-ELISA در مورد بعضی از نمونه‌های بالینی انجام شد. محصول PCR از طریق یک شناساگر بیوتنیله شده به استرپتاویدین پوشش داده شده روی چاهک متصل شد و آنگاه به کمک آنتی‌کر دیگوکسیژنین و آنزیم متصل به آن شناسایی شد.*

نتایج: *از ۵۰ فرد گروه کنترل هیچکدام PCR مثبت نداشتند. درحالی‌که در میان ۵۰ فرد بیمار، ۴۸ نفر PCR مثبت و ۲ نفر PCR منفی داشتند. بنابراین حساسیت کشت، لام مستقیم و PCR به‌ترتیب ۸۸٪، ۸۲٪ و۹۶٪ بود.*

نتیجه‌گیری: *با توجه به یافته‌های این تحقیق مشخص می‌شود که حساسیت PCR بیشتر از کشت و لام مستقیم است.*

گلواژگان: *PCR، مایکو باکتریوم توبرکولوزیس، تشخیص.*

مقدمه

بیماری سل در اثر باکتری‌های مجموعه مایکوباکتریوم توبرکولوزیس (مایکوباکتریوم بوویس، مایکوباکتریوم میکروتی، مایکوباکتریوم آفریکانوم و مایکوباکتریوم توبرکولوزیس) ایجاد می‌شود (۱).

مطابق تخمین‌های سازمان جهانی بهداشت، هر سال هشت میلیون مورد جدید سل گزارش می‌شود و هر سال سه میلیون نفر در جهان در اثر بیماری سل از بین می‌روند که ۹۵٪ این موارد مرگ و میر درکشورهای در حال توسعه اتفاق می‌افتد (۲).

در حال حاضر مقاومت دارویی و اپیدمی‌های ویروس ایدز دو مشکل اساسی در جهت کنترل بیماری سل هستند (۳). امروزه تشخیص بیماری سل به‌طور مرسوم از طریق آزمایش‌های میکروسکپی و کشت انجام می‌شود. آزمایش‌های میکروسکپی ساده بوده و در هر آزمایشگاهی قابل انجام است ولی این روش از حساسیت پایینی برخوردار است (٤). درحالی‌که کشت، روشی حساس و اختصاصی است اما وقت‌گیر بوده و ٦ تا ۱۰ هفته زمان لازم دارد (۲).

در دهه گذشته مطالعات زیادی جهت تشخیص مایکوباکتریوم توبرکولوزیس توسط PCR انجام گرفته است در این آزمایش‌ها از روش‌های مختلف جهت استخراج DNA و از توالی‌های مختلفی به‌عنوان توالی هدف برای PCR استفاده شده است. حساسیت و اختصاصیت این روش‌ها متفاوت و بین ٦۰٪ تا ۱۰۰٪ گزارش شده است (٥).

پروب‌های نوکلئیک اسید اختصاصی برای مایکوباکتریوم توبرکولوزیس در دسترس هستند ولی آنها حساسیت لازم را برای شناسایی مستقیم در نمونه‌های بالینی فراهم نمی‌کنند (٦). هدف از این تحقیق، مقایسه PCR با روش کشت و لام مستقیم در تشخیص آزمایشگاهی بیماری سل بود.

روش‌کار

جمع‌آوری نمونه‌ها

۱- نمونه‌های بالینی

تعداد ۱۰۰ نمونه بالینی شامل خلط (٥۰ نمونه)، برونش (٤٤ نمونه)، مایع پلور (۱ نمونه)،

www.SID.ir

Archive of SID

ادرار (٤ نمونه) و شیره معده (۱ نمونه) از مرکز بهداشت ملاهادي سبزواري اصفهان تهیه شد. در این مرکز پس از هموژنیزاسیون نمونه‌ها مقداري از هر نمونه، جهت بررسي‌هاي میکروسکپي، کشت و PCR استفاده شد. هموژنیزاسیون نمونه‌ها با هیدروکسید سدیم انجام شد. کشت نمونه‌ها روي محیط لوون اشتین جنسن و رنگ‌آمیزي نمونه‌ها به روش زیل نلسن انجام شد.

۲۰۰ میکرولیتر از هر نمونه همراه با ۵۰۰ میکرولیتر از TE بافر در یك اپندورف به‌طور جداگانه ریخته شد و درب اپندروف محکم بسته شد و براي انجام PCR به گروه زیستشناسي دانشگاه اصفهان انتقال داده شد.

۲- نمونه‌هاي حاصل از کشت مایکوباکتریوم توبرکولوزیس

چند کلني از مایکوباکتریوم توبرکولوزیس که روي محیط کشت لوون‌اشتین جنسن رشد یافته بود همراه با ۵۰۰ میکرولیتر از TE بافر به یك اپندورف انتقال داده شد و براي آزمایش PCR از مرکز ملاهادي به آزمایشگاه میکروب‌شناسي گروه زیستشناسي منتقل شد.

۳- نمونه‌هاي باکتریایي جهت تعیین اختصاصیت PCR

براي این منظور از باکتري‌هاي مختلفي استفاده شد. این باکتري‌ها از کلکسیون بخش میکروب‌شناسي گروه زیستشناسي، گروه میکروب‌شناسي دانشکده پزشکي اصفهان و از سازمان پژوهش‌ها و تحقیقات صنعتي ایران جمع‌آوري شد.

این باکتري‌ها شامل موارد زیر بود: انتروباکتر، کلبسیلا پنومونیه، سالمونلا تیفي، استرپتوکوکوس فکالیس، پنوموکوك، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، استرپتوکوکوس گروه A، لیستریا مونوسیتوژنز، کورینه باکتر، نوکاردیا، باسیلوس پلي میکسا، باسیلوس تورنجنسیس، سودوموناس مالئي، باسیلوس سرئوس، اسپوروسارسینا، پروتئوس میرابیلیس و شیگلا. همچنین از قارچ‌هاي آسپرژیلوس نیجر و ساکارومایسس سرویزیه نیز استفاده شد.

آغازگرها در واکنش PCR

توالي آغازگرهاي استفاده شده در این زمینه به‌صورت زیر بود:

MT_1: 5′-CGTGAGGGCATCGAGGTGGC-

MT_2: 5′-GCGT, AGGCGTCGGTGACAAA

با استفاده از این پرایمرها قسمتي از توالي IS6110 مایکوباکتریوم توبرکولوزیس تکثیر داده شد و یك محصول با ۲۲۵bp بدست آمد و نتایج حاصله با کشت و لام مستقیم مقایسه شد.

نشاندار کردن شناساگر (پروب) با بیوتین: توالي شناساگر به‌صورت زیر بود:

MT: 5ĠAACGGCTGATGACCAAACT 3́

شناساگر با استفاده از کیت (Roche cat: No . 1812149) Biot in – Chem - Link نشاندار شد.

استخراج DNA: استخراج DNA به روش جوشاندن انجام شد.

اپندورف‌هاي ۱/۵میلي‌لیتري حاوي ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه و ۰/۵ میلي‌لیتر TE بافر در بن‌ماري به مدت ۲۰ دقیقه جوشانده شد. سپس در دور 13000g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد و مایع رویي جهت انجام PCR استفاده شد.

گروه کنترل و گروه بیماران: ۱۰۰ بیمار مشکوك به سل به دوگروه تقسیم شدند.

۱- گروه بیماران: شامل افرادي بودند که نتیجه آزمایش‌هاي کشت یا لام مستقیم و یا هر دو مثبت بود و در نهایت تحت درمان ضد سل قرار گرفتند.

۲- گروه کنترل: شامل افرادي بودند که نتیجه آزمایش‌هاي کشت و لام مستقیم آنها منفي بود و مبتلا به بیماري‌هاي غیرسلي بودند.

www.SID.ir

Archive of SID

تعیین ویژگی (اختصاصیت) PCR
برای انجام این کار DNA باکتری‌های مختلف با روش جوشاندن استخراج گردید و سپس با استفاده از پرایمرهای MT1 و MT2 ویژه مایکوباکتریوم توبرکولوزیس PCR انجام شد.

تعیین حساسیت (حد شناسایی) PCR
واکسن BCG به مدت ۲۰ دقیقه جوشانده شد و پس از سانتریفوژ از ۰/۵ میلی‌لیتر از مایع فوقانی سری رقت تهیه شد. برای هر نمونه رقیق شده PCR انجام شد.
PCR: برای انجام PCR از پرایمرهای MT1 و MT2 استفاده گردید (۷). از آب مقطر به‌عنوان کنترل منفی و از DNA استخراج شده از واکسن BCG به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.
مطابق جدول ۱، غلظت و حجم‌های مورد نظر برای انجام PCR استفاده گردید:

جدول ۱- غلظت و حجم‌های مواد برای انجام PCR

نام مواد	غلظت اولیه	حجم به‌کار رفته برحسب میکرو لیتر	غلظت نهایی
PCR buffer ۱۰x	۱۰۰ mMTris-Hcl,۵۰ MMKcl	۲/۵	۱ x
dNTPs	۱۰ mM	۰/۵	۰/۲ mM
$Mgcl_2$	۵۰ mM	۱	۲ mM
Primer1	۱۰۰ Pmol	۰/۷	۰/۸Pmol ۲
Primer2	۱۰۰ Pmol	۰/۷	۰/۸Pmol ۲
Taq DNA polymerase	۵ Unit	۰/۲	۱ Unit
Distilled Water		۱۴/۴	
DNA		۵	

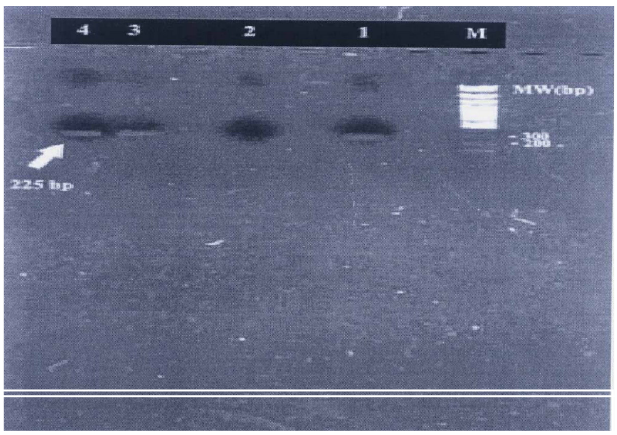
در روش PCR – ELISA به نسبت یک به نوزده از dUTP نشاندار شده با DIG بجای dTTP استفاده گردید.
برنامه حرارتی در یک ماشین PCR (Techen) به‌صورت زیر انجام شد:
940C (3 min), [940C/1min, 650C/1 min, 720C/ 2min]* 30, 720C/4min.

شناسایی محصول PCR
پنج روش الکتروفورز با ژل آگارز ۰/۸ درصد انجام شد. بدین ترتیب که از ژل آگارز حاوی اتیدیوم بروماید و بافر ۱× TBE استفاده شد. ۲ میکرولیتر لودینگ بافر و ۸ میکرولیتر محصول PCR در یک میکروتیوب کاملا مخلوط شده و به چاهک ژل منتقل گردید. از کنترل‌های مثبت و منفی و نیز DNA مارکر برای تخمین وزن مولکولی محصول استفاده شد. ولتاژ ۵۵ ولت به مدت ۲ ساعت برقرار گردید برای مشاهده باندها از دستگاه Gel-documentation (B.P.66Torcy-Z.I.sud) استفاده شد.

روش ELIZA جهت شناسایی محصول PCR
برای این منظور از کیت DIG Detection ELISA (Cat.No.1531042, Roche) استفاده گردید.

یافته‌ها

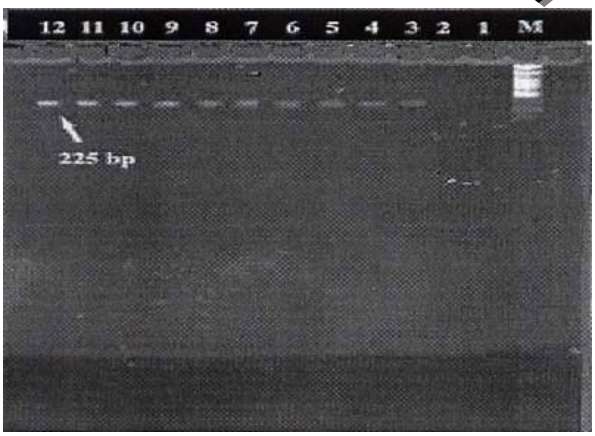
شکل ۱ و ۲ نتایج PCR در مورد نمونه‌های بالینی را نشان می‌دهد. خلاصه نتایج کشت، لام مستقیم و PCR در جدول ۲ آمده است.
گروه کنترل: از ۵۰ نمونه متعلق به ۵۰ بیمار غیر سلی هیچکدام PCR مثبت نداشتند.



شکل ۱- نتایج PCR در مورد نمونه‌های بالینی
شماره ۳ و ۴، نمونه‌های بالینی که نتیجه PCR آنها مثبت گزارش شد. شماره ۲، کنترل منفی. شماره ۱، کنترل مثبت. M=Marker

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲ - نتایج PCR در مورد رقت‌های مختلف PCR جهت تعین حساسیت پرایمرها. شماره ۱۲: رقت۱، شماره ۱۱: رقت۱/۲، شماره ۱۰: رقت ۴/ ، شماره ۹: رقت ۱/۸، شماره ۸: رقت۱/۱۶، شماره ۷: رقت ۱/۳۲، شماره ۶: رقت ۱/۶۴، شماره ۵: رقت ۱/۱۲۸، شماره ۴: ۱/۲۵۶، شماره ۳: رقت۱/۵۱۲، شماره۲: ۱/۱۰۲۴، شماره۱: کنترل منفی. M=Marker

گروه بیماران: از تعداد ۵۰ بیمار که داراي علایم بالیني سل بودند و در نهایت تحت درمان قرار گرفتند، تعداد دو مورد PCR منفي داشتند لذا حساسیت بالیني PCR معادل ۹۶% و ویژگي بالیني معادل ۱۰۰% بود.

حساسیت بالیني براي کشت معادل ۸۸% و براي لام مستقیم معادل ۸۲% محاسبه گردید.

جدول ۲- خلاصه نتایج کشت، لام مستقیم و PCR

نمونه	لام مستقیم	کشت	PCR	تعداد نمونه‌ها
گروه کنترل	-	-	-	۵۰
گروه بیمارا ن	+	-	-	۱
	-	+	-	۱
	+	+	+	۳۸
	-	+	+	۵
	+	-	+	۲
	-	-	+	۳

تعین ویژگي (اختصاصیت) پرایمرها

باکتري‌هاي مختلف توسط PCR با استفاده از پرایمرهاي اختصاصي مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (MT1, MT2) مورد بررسي قرار گرفتند. پرایمرهاي DNA هیچکدام از آنها را تکثیر ندادند.

تعیین حساسیت (حد تشخیص) پرایمرها

مقدار DNA استخراج شده از واکسن BCG معادل ۲۲۵/۶ میلي‌گرم در میلي‌لیتر بود. حداقل DNA قابل تکثیر توسط پرایمرها ۰/۴۴ میلي‌گرم در میلي‌لیتر بود.

PCR- ELISA: از ۱۰۰ نمونه بالیني تعداد ۲۸ نمونه توسط این روش مورد آزمایش قرار گرفت که ۱۰ مورد از آنها متعلق به گروه کنترل بود. نتایج به‌صورت جذب نوري در ۴۵۰ نانومتر بدست آمد. با توجه به فرمول ODm+-SD فاصله اطمینان براي گروه کنترل برابر ۰/۹۲ و ۰/۰۴ بود. بنابراین افرادي که جذب نوري بالاتر یا مساوي ۰/۹۲ داشتند به‌عنوان مثبت درنظر گرفته شدند.

بحث

مطالعات مختلف نشان مي‌دهد که PCR همیشه قادر نیست بیماري فعال را از عفونت ساده توبرکولوزیس تشخیص دهد (۸). حساسیت روش‌هاي میکروسکپي متفاوت گزارش شده، اگرچه بیشتر نویسندگان حساسیت آن را ۶۰% گزارش کرده‌اند (۴). بعنوان مثال Salian و همکارانش در سال ۱۹۹۸ جهت تشخیص بیماري سل براي نمونه‌هاي بافت PCR انجام دادند و حساسیت ۱۰۰% و ویژگي ۹۳% بدست آوردند (۹). Ahmed و همکارانش در سال ۱۹۹۸ جهت تشخیص بیماري سل، براي نمونه‌هاي خون PCR انجام دادند و حساسیت ۵۰% بدست آوردند (۱۰). Cheng و همکارانش در سال ۲۰۰۴ براي تشخیص بیماري سل، از نمونه‌هاي تنفسي، PCR انجام دادند و حساسیت معادل ۷۸/۳% بدست آوردند (۱۱). Hoek و همکارانش در سال ۱۹۹۵ براي تشخیص بیماري سل از نمونه‌هاي بافت PCR انجام داده و حساسیت ۹۲/۱% و اختصاصیت ۹۹/۸% بدست آوردند (۱۲). در این مطالعه حساسیت بالاي PCR مي‌تواند ناشي از دو عامل باشد:

www.SID.ir

Archive of SID

۱- استفاده از IS6110 براي توالي هدف بخاطر حضور چندين كپي از اين توالي در مايكوباكتريوم توبركولوزيس.
۲- استفاده از روش جوشاندن جهت استخراج DNA

در صورتي‌كه هر دو آزمايش لام مستقيم و PCR منفي باشد و مشكوك به بيماري سل باشيم تكرار آزمايش PCR لازم است (۱۳). اگرچه استفاده روتين از روش PCR هزينه‌بر مي‌باشد اما موقعي كه همراه با آزمايش لام مستقيم باشد، PCR يك روش مفيد براي تشخيص سريع مايكوباكتريوم توبركولوزيس در نمونه‌هاي باليني محسوب مي‌شود. موقعي‌كه علايم باليني واضح است و لام مستقيم منفي است PCR يك روش مناسب براي تعيين عفونت مي‌باشد (۱٤). PCR حساستر از لام مستقيم است و نسبت به كشت، زمان كمتري را در بر مي‌گيرد. نتايج نشان مي‌دهد كه بين كشت و PCR همچنين بين لام مستقيم و PCR از لحاظ آماري اختلاف وجود دارد، ولي اين اختلاف بين كشت و لام مستقيم مشاهده نمي‌شود. محققين نتايج متفاوتي از لحاظ حساسيت و اختصاصيت PCR بدست آورده‌اند. يك دليل آن مي‌تواند به‌خاطر روش‌هاي مختلف جهت تهيه نمونه و مورد ديگر مي‌تواند نحوه انجام مطالعه باشد (۵).

نتايج اين تحقيق نشان مي‌دهد كه در برخي موارد، نتايج كشت و PCR با يكديگر مطابقت ندارد. علت اين موضوع مي‌تواند به‌خاطر تفاوت در حساسيت اين دو روش و همچنين به‌خاطر نتايج كاذب كه در اثر آلودگي در هنگام انجام PCR ايجاد مي‌شود باشد. در اين تحقيق استخراج DNA و انجام PCR در بخش‌هاي مجزا در آزمايشگاه انجام شد و از كنترل‌هاي منفي و مثبت استفاده گرديد. بنابراين نتايج كشت منفي و PCR مثبت احتمالاً نمي‌تواند ناشي از نتايج مثبت كاذب باشد.

منابع

۱- هاريسون. اصول طب داخلي هاريسون ۲۰۰۱. تهران: مترجم: سيامك درخشان انتشارات شهراب ۱۳۷۳

2- Bergmnann JS, Woods GL. Clinical evaluation of the roche amplicor PCR Mycobacterum tuberculosis test for detection of M. tuberculosis in respiratory specimecs. J Clin Microb 1996; 34:1083-5.

3- Wang SX, Tany L. Evaluation of three nucleic acid amplification methods for direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex in respiratory specimens. J Clin Microbiol 1999; 37: 1932-4.

4- Querol JM, Farga MA, Granda D, et al. The utility of polymerase chain reaction (PCR) in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. Chest 1995; 107: 1631-5.

5- Tan MF, NG WC, Chan SH, et al. Comparative usefulness of PCR in the detection of Mycobacterium tuberculosis in different clinical specimens. J Med Microbiol 1997; 46: 164-9.

6- Eisenach KD, Sifford MD, Cave D, et al. Detection of Mycobacterium tuberculosis in sputum samples using a polymerase chain reaction. Am Rev Respir Dis 1991;144: 1160-3.

7- Wong CF, Yew WW, Chan CY, et al. Rapid diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis via fibreoptic bronchoscopy: utility of polymerase chain reaction in bronchial aspirates as an adjunct to transbronchial biopsies. Respir Med1998; 92: 815-9.

8- Schluger NW, Kinney D, karkin TJ, et al. Clinical utility of the polymerase chain reaction in the diagnosis of infections due to Mycobacterium tuberculosis. Chest 1995; 105: 1116-21.

9- Salian N, et al. Polymerase chain reaction to detect Mycobacterium tuberculosis in histologic specimens. Am J Respir Crit Car Med 1998; 158: 1150-5.

10- Ahmed N, et al. PCR-based rapid detection of Mycobacterium tuberculosis in blood from immuno competent patients with pulmonary tuberculosis. J Clin Microbiol 1998; 36: 3094-5.

11- Cheng VCC, et al, Clinical evaluation of the polymerase chain reaction for the rapid diagnosis of tuberculosis. J Clin Pathol 2004; 57: 281-5.

12- Noordhoek GT, Kaan JA, Mulder S, et al. Routine application of the polymerase chain reaction for detection of Mycobacterium tuberculosis in clinical samples. J Clin Pathol 1995; 48: 210-4.

13- Kolk AH, Kox LFF, Leeuwen JV, et al. Clinical utility of the polymerase chain reaction in the diagnosis of extra pulmonary tuberculosis. Eur Respir J 1998; 11: 1222-6.

14- Noordhoek GT, Kaan JA, Mulder S, et al. Routine application of the polymerase chain reaction for detection

www.SID.ir

Archive of SID

of Mycobacterium tuberculosis in clinical samples. J Clin Pathol 1995; 48: 810-4.

www.SID.ir