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

[Downloaded from hakim.tums.ac.ir on 2026-05-07]

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 وMT2 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 (۴). درحالی‌که کشت، روشی حساس و اختصاصی است اما وقت‌گیر بوده و ۶ 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 ۶۰٪ تا ۱۰۰٪ گزارش شده است (۵).

پروب‌های نوکلئیک اسید اختصاصی برای مایکوباکتریوم توبرکولوزیس در دسترس هستند ولی آنها حساسیت لازم را برای شناسایی مستقیم در نمونه‌های بالینی فراهم نمی‌کنند (۶). 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 (۵۰ نمونه)، برونش (۴۴ نمونه)، مایع پلور (۱ نمونه)، ادرار (۴ نمونه) و شیره معده (۱ نمونه) از مرکز بهداشت ملاهادی سبزواری اصفهان تهیه شد. در این مرکز پس از هموژنیزاسیون نمونه‌ها مقداری از هر نمونه، جهت بررسی‌های میکروسکپی، کشت و PCR استفاده شد. هموژنیزاسیون نمونه‌ها با هیدروکسید سدیم انجام شد. کشت نمونه‌ها روی محیط لوون اشتین جنسن و رنگ‌آمیزی نمونه‌ها به روش زیل نلسن انجام شد.

[Downloaded from hakim.tums.ac.ir on 2026-05-07]

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

۲- نمونه‌های حاصل از کشت مایکوباکتریوم توبرکولوزیس

چند کلنی از مایکوباکتریوم توبرکولوزیس که روی محیط کشت لوون‌اشتین جنسن رشد یافته بود همراه با ۵۰۰ میکرولیتر از TE بافر به یک اپندورف انتقال داده شد و برای آزمایش PCR از مرکز ملاهادی به آزمایشگاه میکروب‌شناسی گروه زیست‌شناسی منتقل شد.

۳- نمونه‌های باکتریایی جهت تعیین اختصاصیت PCR

برای این منظور از باکتری‌های مختلفی استفاده شد. این باکتری‌ها از کلکسیون بخش میکروب‌شناسی گروه زیست‌شناسی، گروه میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی اصفهان و از سازمان پژوهش‌ها و تحقیقات صنعتی ایران جمع‌آوری شد.

این باکتری‌ها شامل موارد زیر بود: انتروباکتر، کلبسیلا پنومونیه، سالمونلا تیفی، استرپتوکوکوس فکالیس، پنوموکوک، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، استرپتوکوکوس گروه A، لیستریا مونوسیتوژنز، کورینه باکتر، نوکاردیا، باسیلوس پلی میکسا، باسیلوس تورنجنسیس، سودوموناس مالئی، باسیلوس سرئوس، اسپوروسارسینا، پروتئوس میرابیلیس و شیگلا. همچنین از قارچ‌های آسپرژیلوس نیجر و ساکارومایسس سرویزیه نیز استفاده شد.

آغازگرها در واکنش PCR

توالی آغازگرهای استفاده شده در این زمینه به‌صورت زیر بود:

MT_1: $5'$-C G T G A G G G C A T C G A G G T G G C-

MT_2: $5'$-G C G T, A G G C G T C G G T G A C A A A

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

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

MT: 5́GAACGGCTGATGACCAAACT 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.

اپندورف‌های ۱/۵میلی‌لیتری حاوی ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه و ۰/۵ میلی‌لیتر TE بافر در بن‌ماری به مدت ۲۰ دقیقه جوشانده شد. سپس در دور 13000g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد و مایع رویی جهت انجام PCR استفاده شد.

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

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

۲- گروه کنترل: شامل افرادی بودند که نتیجه آزمایش‌های کشت و لام مستقیم آنها منفی بود و مبتلا به بیماری‌های غیرسلی بودند.

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 MT2 و MT1 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 میکرولیتر	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	۲/۸ Pmol
Primer2	۱۰۰ Pmol	۰/۷	۲/۸ Pmol
Taq DNA polymerase	۵ Unit	۰/۲	۱ Unit
Distilled Water		۱۴/۴	
DNA		۵	

[Downloaded from hakim.tums.ac.ir on 2026-05-07]

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.

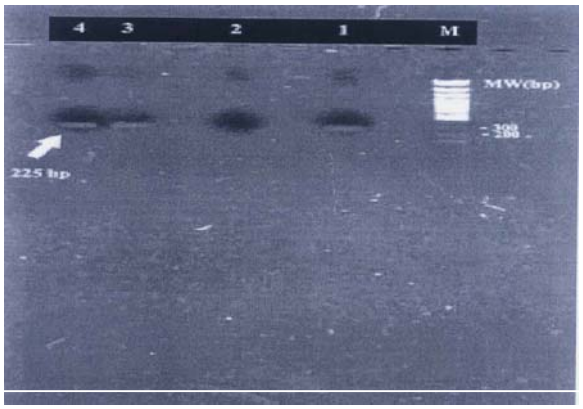
روش ELIZA جهت شناسایی محصول PCR

برای این منظور از کیت DIG Detection ELISA (Cat.No.1531042, Roche) استفاده گردید.

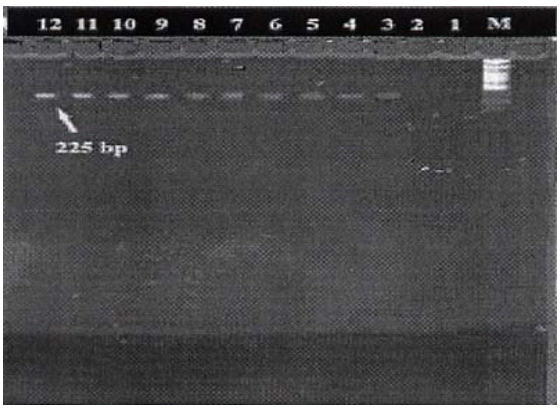
یافته‌ها

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



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 دارای علایم بالینی سل بودند و در نهایت تحت درمان قرار گرفتند، تعداد دو مورد PCR منفی داشتند لذا حساسیت بالینی PCR معادل ۹۶٪ و ویژگی بالینی معادل ۱۰۰٪ بود.

حساسیت بالینی برای کشت معادل ۸۸٪ و برای 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 بیماران	+	–	–	۱
	–	+	–	۱
	+	+	+	۳۸
	–	+	+	۵
	+	–	+	۲
	–	–	+	۳

تعین ویژگی (اختصاصیت) پرایمرها

باکتری‌های مختلف توسط PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (MT1 ,MT2) مورد بررسی قرار گرفتند. پرایمرهای DNA هیچ‌کدام از آنها را تکثیر ندادند.

[Downloaded from hakim.tums.ac.ir on 2026-05-07]

تعیین حساسیت (حد تشخیص) پرایمرها

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

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

بحث

مطالعات مختلف نشان می‌دهد که PCR همیشه قادر نیست بیماری فعال را از عفونت ساده توبرکولوزیس تشخیص دهد (۸). حساسیت روش‌های میکروسکپی متفاوت گزارش شده، اگرچه بیشتر نویسندگان حساسیت آن را ۶۰٪ گزارش کرده‌اند (۴). بعنوان مثال Salian و همکارانش در سال ۱۹۹۸ جهت تشخیص بیماری سل برای نمونه‌های بافت PCR انجام دادند و حساسیت ۱۰۰٪ و ویژگی ۹۳٪ بدست آوردند (۹). Ahmed و همکارانش در سال ۱۹۹۸ جهت تشخیص بیماری سل، برای نمونه‌های خون PCR انجام دادند و حساسیت ۵۰٪ بدست آوردند (۱۰). Cheng و همکارانش در سال ۲۰۰۴ برای تشخیص بیماری سل، از نمونه‌های تنفسی، PCR انجام دادند و حساسیت معادل ۷۸/۳٪ بدست آوردند (۱۱). Hoek و همکارانش در سال ۱۹۹۵ برای تشخیص بیماری سل از نمونه‌های بافت PCR انجام داده و حساسیت ۹۲/۱٪ و اختصاصیت ۹۹/۸٪ بدست آوردند (۱۲). در این مطالعه حساسیت بالای PCR می‌تواند ناشی از دو عامل باشد:

۱- استفاده از IS6110 برای توالی هدف بخاطر حضور چندین کپی از این توالی در مایکوباکتریوم توبرکولوزیس.

۲- استفاده از روش جوشاندن جهت استخراج DNA

در صورتی‌که هر دو آزمایش لام مستقیم و PCR منفی باشد و مشکوک به بیماری سل باشیم تکرار آزمایش PCR لازم است (۱۳). اگرچه استفاده روتین از روش PCR هزینه‌بر می‌باشد اما موقعی که همراه با آزمایش لام مستقیم باشد، PCR یک روش مفید برای تشخیص سریع مایکوباکتریوم توبرکولوزیس در نمونه‌های بالینی محسوب می‌شود. موقعی‌که علایم بالینی واضح است و لام مستقیم منفی است PCR یک روش مناسب برای تعیین عفونت می‌باشد (۱۴). PCR حساس‌تر از لام مستقیم است و نسبت به کشت، زمان کمتری را در بر می‌گیرد. نتایج نشان می‌دهد که بین کشت و PCR همچنین بین لام مستقیم و PCR از لحاظ آماری اختلاف وجود دارد، ولی این اختلاف بین کشت و لام مستقیم مشاهده نمی‌شود. محققین نتایج متفاوتی از لحاظ حساسیت و اختصاصیت PCR بدست آورده‌اند. یک دلیل آن می‌تواند به‌خاطر روش‌های مختلف جهت تهیه نمونه و مورد دیگر می‌تواند نحوه انجام مطالعه باشد (۵).

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که در برخی موارد، نتایج کشت و PCR با یکدیگر مطابقت ندارد. علت این موضوع می‌تواند به‌خاطر تفاوت در حساسیت این دو روش و همچنین به‌خاطر نتایج کاذب که در اثر آلودگی در هنگام انجام PCR ایجاد می‌شود باشد. در این تحقیق استخراج DNA و انجام PCR در بخش‌های مجزا در آزمایشگاه انجام شد و از کنترل‌های منفی و مثبت استفاده گردید. بنابراین نتایج کشت منفی و PCR مثبت احتمالاً نمی‌تواند ناشی از نتایج مثبت کاذب باشد.

منابع

۱- هاریسون. اصول طب داخلی هاریسون ۲۰۰۱. تهران: مترجم: سیامک 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.

[Downloaded from hakim.tums.ac.ir on 2026-05-07]

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

[Downloaded from hakim.tums.ac.ir on 2026-05-07]