

## مقایسه روش های معمول باکتریولوژیک با روش واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) در تشخیص سریع منزدیت سلی

دکتر محمد یوسف علیخانی<sup>۱</sup>، محمد مهدی اصلانی<sup>۲</sup>، دکتر هادی پیری دوگاهه<sup>۳</sup>، دکتر محمد حسین دهقان<sup>۳</sup>

E-mail: alikhani43@yahoo.com

<sup>۱</sup> نویسنده مسئول: استاد یار گروه میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان  
<sup>۲</sup> استادیار گروه میکروب شناسی<sup>۳</sup> دانشیار گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

### چکیده

**زمینه و هدف:** بیماری سل در کشورهای در حال توسعه شیوع بالای داشته و میزان مرگ و میر ناشی از منزدیت سلی، قویا در ارتباط با تأخیر در تشخیص و درمان می باشد. واکنش زنجیره ای پلی مراز (Polymerase Chain Reaction) PCR به عنوان یک ابزار تشخیصی برای شناسایی بیماری سل استفاده شده است. حصول سریع نتایج و حساسیت بالاتر PCR در مقایسه با روش های معمول باکتریولوژیک موجب شده که PCR روش مناسبی در تشخیص بیماری سل، بویژه در منزدیت سلی، در مواردیکه که تشخیص مشکل است و یا تشخیص سریع مورد نیاز است باشد. اگرچه، احتمال نتایج مثبت و منفی کاذب را باید مورد توجه قرار داد. هدف از انجام این مطالعه مقایسه روش PCR با روش های معمول باکتریولوژیک (کشت و رنگ آمیزی ذیل-نلسون) برای شناسایی مایکوباکتریوم توبرکولوزیس در نمونه های مایع مغزی نخاعی (Cerebro Spinal Fluid) CSF بدیناران مشکوک به منزدیت سلی بوده است.

**روشن کار:** تعداد ۲۵ بیمار که از نظر بالینی و بر اساس علایم کلینیکی و یافته های بیوشیمیایی به عنوان منزدیت سلی تشخیص احتمالی داده شده بودند و ۱۰ بیمار مشکوک به منزدیت ویرال و با منزدیت ناشی از دیگر باکتری ها غیر از مایکوباکتریوم توبرکولوزیس در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند. بر روی نمونه های ارسالی بعد از انجام آزمایشات روتین باکتریولوژی (تئیه اسپیر مستقیم و کشت)، DNA Extraction و سپس آزمایش PCR بصورت NESTED OLIGO انجام گرفت و نتایج بدست آمده با هر سه روش مورد مقایسه و ارزیابی قرار گرفت.

**یافته ها:** از ۲۵ نمونه جمع آوری شده، PCR در ۹ مورد (۳۶٪) مایکوباکتریوم توبرکولوزیس را در نمونه های CSF شناسایی نمود (طی دوبار تکرار آزمایش روی نمونه با PCR). در حالیکه کشت تنها در ۲ مورد (۸٪) و لام مستقیم با رنگ آمیزی ذیل نلسون در یک مورد (۴٪) مثبت بودند. در ضمن هیچیک از ۱۰ نمونه CSF که مشکوک به منزدیت های ویرال و یا منزدیت ناشی از دیگر باکتری ها بودند با روش PCR نتیجه مثبت نشان ندادند.

**نتیجه گیری:** نتایج فوق نشان می دهد که روش PCR یک روش حساس و سریع در تشخیص منزدیت سلی است. بطوری که زمان بدست آوردن نتایج را از چندین هفته با روش های روتین باکتریولوژیک به یک تا دو روز خصوصا در بیماران اسپیر منفی کاهش می دهد. این امر در بیماری منزدیت سلی که یک اورژانس پزشکی محسوب می گردد و نیاز به تشخیص سریع و شروع فوری درمان دارد بسیار حائز اهمیت می باشد.

**واژه های کلیدی:** توبرکولوزیس، تشخیص سریع، واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR)، منزدیت سلی

پذیرش: ۸۶/۵/۲۷

دریافت: ۸۶/۱/۲۰

### مقدمه

توبکولوزیس خارج ریوی است که در ۷-۱۲ درصد بیماران سلی در کشور های در حال توسعه اتفاق می افتد [۲]. بدلیل تظاهرات بالینی غیر اختصاصی و

بیماری سل عامل بیش از دو میلیون مرگ و میر در دنیا می باشد [۱]. منزدیت سلی خطرناک ترین فرم

مبلا به منزیت ویرال و یا مشکوک به منزیت ناشی از دیگر باکتری ها غیر از مایکوباکتریوم توبرکولوزیس بودند در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفتند. یک قسمت از نمونه جهت انجام آزمایشات روتین شامل کشت روی محیط لونشتاین جانسون (L.J) و تهیه گستره برای رنگ آمیزی ذیل نلسون مطابق روش های استاندارد [۱۱] و قسمت دیگر بمنظور انجام آزمایش PCR استفاده شد. برای استخراج DNA از روش ۱۰ mM Tris-HCL, 1 mM TE (Na-EDTA, PH 8) استفاده گردید [۱۲]. بطور خلاصه، یک میلی لیتر از نمونه CSF را در بافر TE مخلوط نموده و بمدت ۱۵ دقیقه در آب جوش انکوبه، فریز کرده و مجدداً ذوب می شد. این عمل سه بار تکرار و نهایتاً در ۱۰۰۰ rpm ۱۰۰۰ سانتریفیوژ و مایع رویی آن تا زمان استفاده در فریزر -۲۰ درجه سانتیگراد و Nested PCR نگهداری شد. در این مطالعه از روش PCR و آغازگرهای داخلی (C,D) به منظور تکثیر ناحیه ای اختصاصی از DNA مایکو باکتریوم توبرکولوزیس که کد کننده پروتئین MBP70<sup>۳</sup> می باشد استفاده گردید [۱۲]. این ناحیه ۴۹۲ جفت باز دارد که دو قطعه از این قطعات یک جفت آغاز گر سنتز گردید. ترادف آغاز گر ها عبارت بودند از:

A: 5'-GAA-TGT-CGC-AGG-ACC-CGG-TC-3' ،  
 B: 5'-CTT-GAG-GCT-GTT-ACC-CTG-AC-3' ،  
 C: 5'-CTC-AAT-CCG-CAA-GTA-AAC-CT-3' ،  
 D: 5'-GTT-ACC-CTG-ACC-GGT-CAC-CG-3'  
 واکنش PCR در حجم ۳۰ میکرولیتر انجام گرفت.  
 مخلوط واکنش حاوی 2mmol/L KCL 50mmol/L Tris-HCL pH8.4 .02μmol mol each dNTPs MIX (Fermentase Co)  
 Taq DNA 5ng/μ DNA(target) 0.2μ primers  
 1unit polymerase (Fermentase Co)

<sup>3</sup> Mycobacterium Protein 70

فقدان تست آزمایشگاهی سریع، حساس و اختصاصی، تشخیص این بیماری مشکل بوده و علی رغم دسترسی به شیمی درمانی مؤثر میزان مرگ و میر بیماری بالا می باشد. تأخیر در تشخیص ارتباط مستقیم با نتیجه بیماری دارد، بطوری که در ۲۰-۲۵ درصد بیمارانی که سریعاً تحت درمان قرار نمی گیرند عوارض نورولوژیک ظاهر می گردد [۳,4]. متدهای متداول باکتریولوژیک برای تشخیص سریع منزیت سلی مناسب نیستند زیرا تعداد کم باکتری در نمونه مایع مغزی نخاعی<sup>۱</sup> مانع از تشخیص بوسیله روش اسمر مستقیم بوده و حساسیت و ویژگی این روش بسیار متغیر گزارش می گردد [۵]. تعیین باکتری از طریق کشت به دلیل رشد آرام باکتری به ۶-۸ هفته زمان نیاز دارد و معمولاً نتایج منفی کاذب حاصل می گردد [۶]. منزیت سلی جزء موارد اورژانس پزشکی محسوب می شود و تشخیص بیماری در مراحل اولیه حیاتی می باشد و اغلب بصورت احتمالی و بر اساس یافته های بالینی تشخیص داده می شود. چندین روش مولکولی جدید برای تشخیص سریع منزیت سلی توسعه یافته است [۶,۷]. حساسیت این روش ها بسیار متغیر و از ۹٪ [۹] تا ۵/۹۰٪ [۱۰] گزارش شده است. نقش PCR<sup>۲</sup> در تشخیص روتین منزیت سلی نامشخص بوده و نیاز به ارزیابی های بیشتری دارد. در این مطالعه مقایسه بین روش Nested PCR و روش های معمول باکتریولوژیک (اسمر مستقیم و کشت) در تشخیص منزیت سلی بر روی نمونه های CSF مورد بررسی قرار گرفته است. مهمترین ویژگی روش Nested PCR حساسیت بیشتر آغازگرهای داخلی موردن استفاده می باشد.

## روش کار

تعداد ۲۵ بیمار که از نظر بالینی و بر اساس علایم درمانگاهی و یافته های بیوشیمیایی به عنوان منزیت سلی تشخیص احتمالی داده شده بودند و ۱۰ بیمار که

<sup>1</sup> Cerebro Spinal Fluid

<sup>2</sup> Polymerase Chain Reaction

### یافته‌ها

حساسیت و ویژگی PCR برای تشخیص مایکوباتریوم توبرکولوزیس با استفاده از DNA تعدادی از سایر گونه‌های مایکوباتریوم و همین طور باکتری‌های دیگر مورد ارزیابی قرار گرفت. آغازگرهای مورد استفاده جز با DNA مایکوباتریوم توبرکولوزیس با هیچ نمونه دیگری واکنش مثبت نشان ندادند. حساسیت آغازگرهای خارجی با استفاده از رقت‌های سریال مطابق استاندارد مک فارلن، ۳۰ سلول در واکنش و حساسیت آغازگرهای داخلی برابر ۳ سلول در واکنش تعیین گردید. ۳۵ نمونه CSF از بیماران مشکوک به منزیت با استفاده از روش‌های روتین باکتریولوژیک و Nested PCR مورد مطالعه قرار گرفت. اسمیر با رنگ آمیزی ذیل-نلسون تنها در یک مورد (۴٪) و کشت در ۲ مورد (۸٪) از نمونه‌های CSF از نظر وجود مایکوباتریوم توبرکولوزیس مثبت بودند. PCR اولیه بوسیله آغازگرهای خارجی ۴ مورد (۱۶٪) و با آغازگرهای داخلی ۹ مورد (۳۶٪) از نظر وجود DNA مایکوباتریوم توبرکولوزیس مثبت بود (جدول ۱).

در ۱۰ نمونه CSF که مشکوک به منزیت غیر سلی بودند، اسمیر مستقیم، کشت بر روی محیط لونشتاین جانسن و PCR منفی بود.

تکثیر بمیزان ۳۴ سیکل در ۹۴°C بمدت ۳۰ ثانیه، ۶۰°C بمدت ۹۰ ثانیه و ۷۲°C بمدت ۱۲۰ ثانیه با استفاده از دستگاه ترمومیکلر Eppendorf انجام گرفت. یک کنترل منفی حاوی تمام مواد واکنش بجز الگو DNA و یک کنترل مثبت با الگوی شناخته شده H37Rv استخراج شده از سوبویه استاندارد مایکوباتریوم توبرکولوزیس (جهت سنجش کارآیی بافرها، آنزیم و شاخص‌های سیکل حرارتی [۱۳]) و یک کنترل داخلی (کنترل تکثیر) حاوی آغازگرهای مربوط به ژن بتا گلوبین انسانی (۵۲۹ bp) در هر سری از واکنش‌ها استفاده می‌شد. هنگام استفاده از آغازگرهای داخلی از دمای اتصال ۵۲°C و غلظت ۴ میلی مولار کلرید منیزیم واز محصول واکنش اول (با آغازگرهای خارجی B) به عنوان DNA الگو استفاده می‌شد. بعد از تکثیر، ۱۰ میکرولیتر از محصول واکنش بر روی آگارز ۱/۵٪ حاوی اتیدیوم بروماید الکتروفورز و با استفاده از دستگاه ترانس لومیناتور آنالیز می‌گردید، بطوری که وجود باند با وزن مولکولی MTB (۳۲۲ bp) در نشان گر مایکوباتریوم توبرکولوزیس (MTB) در نمونه بود و در صورت عدم مشاهده باندی با وزن مولکولی فوق با استفاده از آغازگرهای داخلی (C,D) روی محصول واکنش اول، Nested PCR انجام می‌گرفت که در این حالت باند با وزن مولکولی ۲۲۳ bp مشخص کننده وجود MTB بود.

جدول ۱. مقایسه نتایج PCR، کشت و اسمیر مستقیم در بیماران مشکوک به منزیت سلی و منزیت غیر سلی

گروه بیماران	تعداد	مثبت با کشت	مثبت با اسمیر	مثبت با اولیه PCR	PCR مثبت با
منزیت سلی	۲۵	(٪۸)	(٪۱)	(٪۱۶)	(٪۳۶)
منزیت غیر سلی	۱۰	(٪۰)	(٪۰)	(٪۰)	(٪۰)

جدول ۲. نتایج PCR بیماران مشکوک به منزیت سلی

تعداد نمونه‌ها	PCR مثبت	کشت منفی	کشت مثبت	PCR منفی	کشت منفی
اسمیر مثبت	(٪۱)	(٪۱)	(٪۴)	(٪۰)	(٪۰)
اسمیر منفی	(٪۲۴)	(٪۶۴)	(٪۲)	(٪۰)	(٪۰)

سرعت بیشتری داشت. روش های معمول فقد حساسیت لازم و سرعت عمل می باشد، بطوری که کشت به مدت ۶ الی ۸ هفته زمان انکوباسیون نیاز دارد و اسمر هم علی رغم سهولت و سرعت عمل از حساسیت و ویژگی پایینی برخوردار بوده و تنها جنس مایکوباکتریوم را شناسایی می نماید و همین طور باید حداقل  $^{10}$  بакتری در یک میلی لیتر نمونه موجود باشد تا بتوان از طریق لام مستقیم نتیجه مثبت بدست آورد [۱۸، ۱۷].

در PCR میزان اختصاصی بودن روش بوسیله انتخاب ترادف تکثیر شده تحت تأثیر قرار می گیرد. در این بررسی یک قسمت از ژن کد کننده پروتئین MBP70 برای تکثیر انتخاب شد، زیرا این پروتئین برای مجموعه مایکوباکتریوم توبرکولوزیس اختصاصی است [۱۵، ۱۲].

از طرفی حساسیت روش با افزایش دفعات دستکاری نمونه ها ممکن است کاهش یابد، برای رفع این مشکل دستکاری قسمت کوچکی از نمونه در یک زمان و جمع آوری نمونه ها در دو حجم جداگانه، که یکی از آنها جهت موقع ضروری ذخیره می گردد توصیه می شود. نتایج مثبت با PCR ممکن است که بوسیله آلودگی داخل و یا خارج آزمایشگاهی ایجاد گردد. در این تحقیق وجود آلودگی های وابسته به آزمایشگاه تقریبا با اطمینان رد می شود زیرا در تمام مراحل آزمایش از کنترل های مثبت و منفی استفاده می گردد. مهمترین ویژگی Nested PCR با استفاده از آغازگرهای داخلی افزایش حساسیت آن می باشد Nested PCR در ۹ مورد (۳۶٪) در مقایسه با PCR اولیه DNA مایکوباکتریوم توبرکولوزیس را در نمونه های CSF شناسایی نمود.

### نتیجه گیری

بطور کلی نتایج این مطالعه نشان می دهد که ویژگی صد درصد برای روش PCR امکان پذیر می باشد و چنانچه از یک روش استاندارد جهت

در مقایسه تمام نتایج در دو گروه اسمر مثبت و اسمر منفی، یک مورد (۴٪) از نمونه های اسمر مثبت با PCR هم مثبت بود (۱۰۰٪) و در نمونه های اسمر منفی، ۳ مورد (۱۲/۵٪) با PCR اولیه و ۹ مورد (۳۶٪) DNA با استفاده از آغازگرهای داخلی از نظر وجود مایکوباکتریوم توبرکولوزیس مثبت بود (جدول ۲). از ۲۲ (۹۱/۶٪) نمونه CSF که با اسمر مستقیم و Nested کشت منفی بودند، ۶ مورد (۲۴٪) با استفاده از PCR نتیجه مثبت نشان دادند. از ۲۵ نمونه CSF جمع آوری شده از بیماران مشکوک به منژیت سلی، ۱ مورد (۴٪) با هر سه روش کشت، اسمر مستقیم و PCR مثبت بود و ۲ مورد (۸٪) با کشت و PCR موردن (۲۴٪) فقط با PCR مثبت بوده است (جدول ۲). بطور کلی میزان موارد مثبت با PCR تقریبا چهار برابر نسبت به موارد مثبت با کشت و ۹ برابر نسبت به رنگ آمیزی ذیل نلسون افزایش نشان می دهد.

### بحث

این مطالعه نشان داد که PCR روش مفیدی برای تشخیص اختصاصی و سریع منژیت سلی با کارآیی بالاتر نسبت به روش های میکروسکوپیک و کشت می باشد (جدول ۱).

دقت و صحت نتایج این مطالعه با نتیجه منفی که در تمام نمونه های بدست آمده از بیماران مشکوک به منژیت غیر سلی حاصل گردید، نشان داده شده است. نتایج بدست آمده در نمونه های بیماران مشکوک به منژیت سلی نشان می دهد که Nested PCR می تواند تمام نمونه های کشت مثبت را شناسایی کند که با نتایج سایر مطالعات مطابقت دارد [۱۵، ۱۴].

روش های بیولوژی مولکولی که قبلا برای تشخیص سریع منژیت سلی استفاده می شدند، پرورب های DNA بود اما حساسیت رضایت بخشی نداشتند [۱۶].

PCR نسبت به پرورب DNA دارای این مزیت است که DNA الگو چندین بار تکثیر می یابد. در این مطالعه PCR نسبت به روش های متداول باکتریولوژیک برای تشخیص منژیت سلی حساسیت و

اعتماد برای تشخیص مننژیت سلی در مقایسه با روش  
های باکتریولوژیک خواهد بود.

استخراج DNA و کنترل آلدگی به موازات تمام  
مراحل PCR استفاده گردد، روشی سریع و قابل

## References

- 1- Brienze VM, Tonon AP, Pereira FT, Liso E, Tognola WA, Santos MA, Ferreira MU. Low sensitivity of polymerase chain reaction for diagnosis of tuberculous meningitis in southeastern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2001 Jul-Aug;34(4):389-93.
- 2- Shankar P, Manjunath N, Mohan KK, Prasad K, Behari M, Shriniwas , Ahuja GK. Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by polymerase chain reaction. *Lancet.* 1991 Jan 5;337(8732):5-7.
- 3- Molavi A, LeFrock JL. Tuberculous meningitis. *Med Clin North Am.* 1985 Mar;69(2):315-31
- 4- Thwaites GE, Caws M, Chau TT, Dung NT, Campbell JI, Phu NH, Hien TT, White NJ, Farrar JJ. Comparison of conventional bacteriology with nucleic acid amplification (amplified mycobacterium direct test) for diagnosis of tuberculous meningitis before and after inception of antituberculosis chemotherapy. *J Clin Microbiol.* 2004 Mar; 42(3):996-1002.
- 5- Thwaites G, Chau TT, Mai NT, Drobniowski F, McAdam K, and Farrar J. Tuberculous meningitis. *J Neurol Neurosurg Psych.* 2000; 68:289-99.
- 6- Caws MS, Wilson M, Clough C, Drobniowski F. Role of IS6110-target PCR, culture, biochemical, clinical and immunological criteria for diagnosis of Tuberculous meningitis. *J Clin Microbiol.* 2000 Sep; 38(9): 3150-5.
- 7- Daniel TM. New approaches to the rapid diagnosis of tuberculous meningitis. *J Infect Dis.* 1987 Apr; 155(4):599-602.
- 8- Daniel TM. Rapid diagnosis of tuberculosis: laboratory techniques applicable in developing countries. *Rev Infect Dis.* 1989 Mar-Apr; 11 Suppl 2:S471-8.
- 9- Nguyen LN, Kox LF, Pham LD, Kuijper S, Kolk AH. The potential contribution of the polymerase chain reaction to the diagnosis of tuberculous meningitis. *Archives of Neurology.* *Arch Neurol.* 1996 Aug; 53(8):771-6.
- 10- Liu PYF, Shi ZY, Lau YJ, Hu, BS. Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by a simplified nested amplification protocol. *Neurology.* 1994; 44: 1161-1164.
- 11- Baron EJ, Finegold M. *Diagnostic microbiology.* Toronto: Mosby, 8<sup>th</sup> ed. 1990:363-85.
- 12- Bahramand AR, Malkov IG, Samar G, Saifi M. Differentiation of Mycobacterium Tuberculosis – Bovis complex from atypical Mycobacteria by PCR. *Iran Jour Medi Scien* 1994;19(344):82-87.
- 13- Brown TA. *Essential Molecular Biology (A practical approach).* VOL (2); 1991:185-207.
- 14- Sritharan V, Barker RJ. A simple method for diagnosing M. tuberculosis infection in clinical samples using PCR. *Molec Cell Probes.* 1991; 5: 385-395.
- 15- Altamirano M, Kelly MT, Wong A, Bessuire ET, Black WA, Smith JA. Characterization of a DNA probe for detection of Mycobacterium tuberculosis complex in clinical samples by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1992 Aug;30(8):2173-6.
- 16- Grange JM .The rapid diagnosis of bacillary Tuberculosis. *Tubercle.* 1989; 70: 1-4.
- 17- Gordin F, Slutkin G. The validity of acid-fast smears in the diagnosis of Tuberculosis. *Arch Pathol Lab Med.* 1990; 114:1025-1027.
- 18- Sepkowitz KA, Raffalli J, Riley L, Kiehn TE, Armstrong D. Tuberculosis in the AIDS era. *Clin Microbiol Rev.* 1995 Apr; 8(2):180-99.