تشخیص سریع کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس: روش PCR با استفاده از قطعه الحاقی ۶۱۱۰

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۷/۱۰/۰۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۷/۱۱/۱۵

مهدی روحانی[۱*]، احمد خورشیدی[۱]
رضوان منیری[۱]، مهناز طرفه[۱]
فاطمه عبدالشاه[۲]، محمود صفاری[۱]
غلامرضا شجری[۱]، غلامعباس موسوی[۳]

۱- گروه میکروب‌شناسی و ایمنی‌شناسی
۲- درمانگاه مسلم بن عقیل کاشان
۳- گروه آمار

دانشگاه علوم پزشکی کاشان

*نویسنده مسئول: کاشان، کیلومتر ۵ جاده راوند، بلوار پزشک، گروه میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کاشان تلفن: ۰۳۶۱ ۵۵۵۰۰۲۱
email: kia_rohani@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: سل هنوز یکی از مهم‌ترین علل مرگ و میر در بسیاری از کشورهاست. با توجه به وقت‌گیر بودن روش‌های معمول تشخیص سل مانند روش کشت، لازم است روش‌های سریع تشخیصی نظیر PCR مورد ارزیابی قرار گیرد. با توجه به اهمیت درمان سریع سل و به‌منظور تعیین حساسیت و ویژگی روش سریع تشخیص مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با استفاده از قطعه الحاقی ۶۱۱۰ (IS6110) به‌روش PCR این مطالعه در دانشگاه علوم پزشکی کاشان انجام پذیرفت. ***روش بررسی:*** این مطالعه از نوع ارزش تشخیصی بوده که بر روی ۲۴۸ نمونه خلط بیماران مشکوک به سل مراجعه‌کننده به درمانگاه مسلم کاشان در ۱۳۸۶ انجام پذیرفت. نمونه خلط پس از انجام هموژنیزاسیون و آلودگی‌زدایی بر روی محیط لون اشتاین جانسون کشت گردید، DNA مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، با استفاده از روش جوشاندن استخراج گردید. سپس دو قطعه ۱۲۳ جفت بازی و ۲۴۵ جفت بازی از قطعه الحاقی ۶۱۱۰ تکثیر و با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز شناسایی گردید. حساسیت، ویژگی، ارزش تشخیصی مثبت و منفی روش سریع تشخیص مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با استفاده از قطعه الحاقی ۶۱۱۰ تعیین گردید. ***یافته‌ها:*** در این مطالعه از مجموعه ۲۴۸ نمونه خلط اخذ شده از ۱۲۴ بیمار ۴۰ نمونه اسمیر مثبت (۱۶/۱٪) و ۳۲ نمونه دارای نتیجه کشت مثبت (۱۲/۹٪) بودند. حساسیت، ویژگی روش سریع تشخیص مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با استفاده از قطعه الحاقی ۶۱۱۰ به‌ترتیب ۹۳/۷۵ و ۹۹/۱ درصد بود. ***نتیجه‌گیری:*** روش سریع تشخیص مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با استفاده از قطعه الحاقی ۶۱۱۰ نسبت به کشت دارای سرعت زیاد، حساسیت مناسب و ویژگی بالایی می‌باشد.

کلمات کلیدی: کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، تشخیص سریع، قطعه الحاقی ۶۱۱۰، PCR.

مقدمه

سل (Tuberculosis) یکی از بیماری‌های عفونی بالقوه کشنده می‌باشد که پس از چندین دهه کاهش در میزان بروز آن همزمان با شیوع ایدز در جهان این بیماری نیز رو به افزایش نهاده است. سازمان بهداشت جهانی تخمین زده است که اگر کنترل شیوع این بیماری در جهان قوی‌تر نگردد در فاصله زمانی بین سال‌های ۲۰۰۰ تا ۲۰۲۰ نزدیک به یک میلیارد نفر از مردم جهان آلوده جدید به این باکتری بوده و ۲۰۰ میلیون نفر بیمار می‌گردند و ۳۵ میلیون نفر خواهند مرد.[۱] به‌همین علت در حال حاضر بیماری سل از طرف سازمان جهانی بهداشت به عنوان فوریت جهانی اعلام شده است. در تشخیص عفونت سل عوامل متعددی نظیر اپیدمیولوژی بیماری در منطقه، تاریخچه بیمار، علائم بالینی، رادیوگرافی ریه، اسمیر و کشت خلط، تست‌های پوستی، آزمایشات بیوشیمیایی و روش‌های ملکولی مانند PCR اهمیت دارند.[۲] یکی از مشکلاتی که در بیماری سل وجود دارد، سرعت در تشخیص این بیماری می‌باشد. روش رنگ‌آمیزی مستقیم از دقت و حساسیت پایینی برخوردار است و کشت خلط زمان طولانی را می‌طلبد. بنابراین نیاز به روشی آسان و حساس به‌عنوان مکمل و تایید تشخیص بالینی احساس می‌گردد. PCR از حساسیت، دقت و سرعت کافی برخوردار است.[۳و۴] جایگاه‌های متفاوتی در ژنوم مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مورد مطالعه قرار گرفته است؛ از جمله قطعه الحاقی ۶۱۱۰ (IS6110)، آنتی‌ژن‌های 65KDa (Gro EL)، 38KDa (PhoS) و 23KDa (MPB64)[۵] که در بین این نواحی، IS6110 به‌علت تکرار در ژنوم مایکوباکتریوم توبرکولوزیس، بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرد.[۶] خصوصیت تکراری بودن این قطعه در ژنوم مایکوباکتریوم

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ on Saturday, September 14, 2013
[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2023-09-26]

توبرکلوزیس باعث افزایش حساسیت PCR می‌شود که از تکثیر یک توالی DNA واحد به‌دست می‌آید. به این معنی که یک DNA واحد دارای چندین بخش قابل تکثیر می‌باشد و احتمال اتصال پرایمرها در حضور مقادیر اندک DNA نیز افزایش می‌یابد. نکته دیگر در مورد این قطعه حضور آن تنها در مایکوباکتریوم‌های کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس است که این خود یک نکته مناسب دیگر برای به‌کارگیری این قطعه در تشخیص مولکولی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می‌باشد.[۷] ولی در برخی مناطق دنیا مانند هندوستان سویه‌هایی مشاهده شده است که فاقد این قطعه الحاقی بوده‌اند اما مطالعات در مناطق دیگر جهان از جمله برزیل هرگز عدم حضور این قطعه الحاقی را گزارش ننموده‌اند.[۸-۱۰] در صورتی که شناسایی قطعه الحاقی ۶۱۱۰ از حساسیت و ویژگی کافی در مقایسه با سایر روش‌ها برخوردار باشد، می‌توان از آن به‌عنوان یک تست مناسب و رایج در تشخیص استفاده نمود. در رابطه با ارزش تشخیصی شناسایی قطعه الحاقی ۶۱۱۰ گزارش‌ها ضد و نقیض می‌باشند. هدف از این مطالعه تعیین حساسیت، ویژگی، ارزش پیشگویی مثبت و ارزش پیشگویی منفی شناسایی قطعه الحاقی ۶۱۱۰ در تشخیص سریع سل می‌باشد.

روش بررسی

این مطالعه توصیفی ارزش تشخیصی بر روی ۲۴۸ نمونه خلط مبتلایان و یا مشکوک به سل ریوی در کاشان طی سال ۱۳۸۶ انجام پذیرفت. نمونه‌های خلط با روش استاندارد هضم و آلودگی‌زدایی گردید.[۱۱] DNA از نمونه‌های خلط با روش جوشاندن استخراج گردید. هر نمونه دو بار در ۱۰/۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و رسوب آن در یک میلی‌لیتر آب مقطر استریل حل گردید، سپس این محلول برای ۲۰ دقیقه در 85^{oc} قرار داده تا کشته شدن باکتری‌ها و استخراج DNA به‌صورت همزمان انجام شود. در این مطالعه از یک نمونه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (سویه جدا شده کلنیکی) به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. واکنش PCR با تغییر دمای اتصال پرایمرها (Annealing) و غلظت آنها بهینه شد. مخلوط واکنش در حجم ۵۰ میکرولیتر که شامل Tris-HCl ۱۰ میلی‌مولار (PH 8.4)، KCl ۵۰ میلی مولار، $MgCl_2$ ۲/۵ میلی‌مولار، پرایمرهای با غلظت ۱۵ پیکومول، غلظت بهینه از dNTPs (شرکت سیناژن، تهران، ایران) و یک میکرولیتر از آنزیم Taq Polymerase ۵۰ واحدی (شرکت سیناژن،

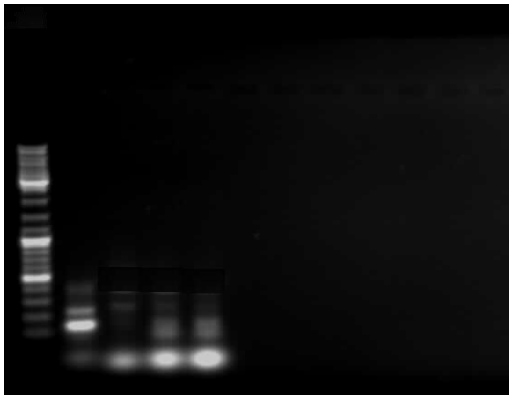
جدول-۱: پرایمرهای مورد استفاده و قطعات تکثیر شده

اندازه قطعه	توالی پرایمرها	هدف پرایمرها
123bp	5'CC'TGCGAGCGTAGGCGTCGG3' 5'CTCGTCCAGCGCCGCTTCGG3'	IS6110
245bp	5'CGTGAGGGCATCGAGGTGGC3' 5'GCGTAGGCGTCGGTGACAAA3'	IS6110

تهران، ایران) تهیه و 5µl از DNA استخراج شده به آنها اضافه گردید. واکنش PCR به‌صورت واسرشته سازی اولیه (Denaturation) در 94^{oc} به‌مدت پنج دقیقه و سپس در ۳۵ سیکل PCR به‌ترتیب واسرشته سازی 94^{oc} به‌مدت ۴۵ ثانیه، اتصال پرایمر 68^{oc} به‌مدت ۴۵ ثانیه و طویل‌سازی (Extension) 72^{oc} به‌مدت ۴۵ ثانیه انجام گرفت. سپس 5µl از محصولات PCR در ژل آگارز ۱/۲ درصد و اتیدیوم بروماید در دستگاه ژل داکومنتیشن (مدل InGenius، شرکت SYNGENE کشور آمریکا) مورد شناسایی قرار گرفتند. توالی پرایمرها و قطعات مورد استفاده در جدول ۱ آورده شده است.

یافته‌ها

از ۲۴۸ نمونه خلط مورد آزمایش ۴۰ نمونه (۱۶/۱٪) با رنگ‌آمیزی ذیل نلسون باسیل اسید فاست را نشان دادند (اسمیر مثبت). ۳۲ نمونه (۱۲/۹٪) دارای کشت مثبت بودند. ۳۲ نمونه (۱۲/۹٪) از نظر PCR مثبت بودند. در این مطالعه مشاهده هر یک از باندهای تکثیر شده (قطعات ۱۲۳ و ۲۴۵ جفت باز) به‌عنوان جواب مثبت PCR در نظر گرفته شد (شکل ۱). جدول ۲ پاسخ‌های کشت، اسمیرو PCR را در



شکل-۱: تکثیر DNA بر نمونه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس جدا شده از کشت. خط ۱ Ladder 100 جفت بازی، خط ۲ نمونه کنترل مثبت که تکثیر قطعات ۱۲۳ و ۲۴۵ جفت باز را نشان می‌دهد. خطوط ۳، ۴ و ۵ نمونه کنترل منفی می‌باشد.

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ on Saturday, September 14, 2013

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2023-09-26]

جدول-۲: تشخیص مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در خلط با Multiplex PCR

کشت	اسمیر	PCR		مجموع
		مثبت	منفی	
مثبت	مثبت	۲۲(٪۸/۹)	۶(٪۲/۴)	۲۸
	منفی	۲(٪۰/۸)	۲(٪۰/۸)	۴
	مجموع	۲۴	۸	۳۲
منفی	مثبت	۸(٪۳/۲)	۴(٪۱/۶)	۱۲
	منفی	۰(٪۰)	۲۰۴(٪۸۲/۲)	۲۰۴
	مجموع	۸	۲۰۸	۲۱۶
مجموع		۳۲(٪۱۳)	۳۲(٪۱۲/۹)	۲۱۶(٪۸۷/۱)

جدول-۳: حساسیت، ویژگی، ارزش‌پیشگویی مثبت و منفی PCR و اسمیر (مقایسه با کشت)

روش	ارزش‌اخباری منفی	ارزش‌اخباری مثبت	ویژگی	حساسیت
PCR	٪۹۶/۴	٪۸۴/۲	٪۹۷/۲	٪۸۰
اسمیر	٪۹۸/۱	٪۷۲/۷	٪۹۴/۷	٪۸۸/۹

کنار یکدیگر نشان می‌دهد. میانگین سنی بیماران ۲۱/۵±۵۲/۵۲ و با میانه ۵۶ سال و نمای ۶۵ سال و از حداقل دو تا حداکثر ۹۵ سال متغیر بود. از ۲۴۸ بیمار مورد مطالعه ۱۱۶ نفر (۴۶/۸ درصد) مرد و ۱۲۲ نفر (۴۹/۲ درصد) زن بودند. ۲۳۸ بیمار مورد جدید بیماری (۹۵/۹ درصد) و ۱۰ مورد (۴/۱ درصد) دارای عفونت مجدد بودند. ۱۷۴ نفر از بیماران (۷۰/۲ درصد) ایرانی و ۷۴ نفر (۲۹/۸ درصد) غیر ایرانی (افغانی یا عراقی) بودند.

بحث

سایر مطالعات از مناطق مختلف جهان میزان حساسیت روش PCR را، با روش‌های مختلف استخراج DNA بین ۹۰-۸۰٪ برای تشخیص کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بیان نموده‌اند.[۶] در این مطالعه از مجموع ۳۲ نمونه که دارای نتیجه PCR مثبت بودند ۳۰ نمونه (٪۹۳/۷۵) توسط کشت مورد تایید قرار گرفت و ۲۲ نمونه (٪۶۴/۴۵) نیز توسط اسمیر و کشت هر دو مثبت شدند. به استثنای شش نمونه همه نمونه‌هایی که دارای نتیجه اسمیر مثبت و کشت مثبت بودند، نتیجه PCR آنها نیز مثبت بود. در اکثر موارد کار شده در نقاط مختلف جهان میزان حساسیت روش PCR با توجه به روش‌های استخراج DNA سخت‌تر انجام شده توسط آنها بین ۹۰-۸۰٪ اعلام شده است.[۶] میزان حساسیت، ویژگی و ارزش پیشگویی مثبت و منفی در بیماران با سل ریوی که از نظر میکروبیولوژیک تایید شده‌اند و آنهایی که مورد تایید قرار نگرفته‌اند بسیار متغیر می‌باشد.[۱۲] Pao با استفاده از آنتی‌ژن ۶۵ کیلودالتونی موجود در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس حساسیت و ویژگی روش PCR را به‌ترتیب ۱۰۰٪ و ۶۲/۶٪ به‌دست آورده‌اند.[۱۳] Querol نیز با آزمون ۳۱۴ نمونه تنفسی با استفاده از پرایمر IS6110 در مقایسه با کشت حساسیت ۹۷٪ را به‌دست آورده‌اند.[۱۴] Thoe نیز در سنگاپور در مقایسه کیت‌های Amplicor و PCR قطعه IS6110 میزان حساسیت و ویژگی را به‌ترتیب ۸۶/۵٪ و ۸۳/۶٪ به‌دست آورده‌اند.[۱۵] در این مطالعه مقدار کم نمونه به‌کار گرفته شده، نمونه‌های نامساوی به‌کار رفته و عدم حضور قطعه IS6110 به‌عنوان دلایل عدم تکثیر و شناسایی نمونه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ذکر شده است. Rajalahti که از سیستم Cobas Amplicor استفاده نموده‌اند حساسیت روش MTB PCR را حدود ۸۳٪ محاسبه نموده‌اند.[۱۶] حساسیت، ویژگی، ارزش تشخیصی مثبت و منفی حاصل از تست PCR انجام شده در مطالعه حاضر در جدول ۳ ارائه شده است. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که روش Multiplex PCR می‌تواند، با توجه به برتری‌هایی که بسیار سریع‌تر و حساس‌تر از روش‌های کلاسیک شناسایی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می‌باشد، روش تشخیص سل را بهبود بخشد. در مطالعه حاضر، ما کارآیی روش PCR را در نمونه‌های خلط با هدف قرار دادن قطعه الحاقی ۶۱۱۰ در کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مورد ارزیابی قرار دادیم. در این مطالعه برخی نمونه‌ها علی‌رقم کشت مثبت دارای نتیجه PCR منفی بودند (دو نمونه) که این مورد می‌تواند مربوط به تعداد کپی‌های کم IS6110 در ژنوم این نمونه‌ها یا توزیع غیر یکنواخت باکتری‌ها در نمونه خلط باشد، همان‌گونه که این احتمال در مطالعات دیگران نیز مورد توجه قرار گرفته است.[۱۷و۱۸] روش‌های تشخیص سریع مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می‌تواند بر مراقبت از بیماران نیز تاثیرات بسیاری داشته باشد. این تاثیرات از جنبه‌های متفاوتی قابل بررسی می‌باشد. در واقع، در بیماران اسمیر مثبت که دارای نتیجه PCR مثبت می‌شوند، نشان‌دهنده آن است که باکتری عامل بیماری باسیل سل بوده و بیمار باید تا زمانی که نتیجه اسمیر آن منفی گردد نگهداری و مراقبت شود. اما نتیجه منفی PCR می‌تواند نشان‌دهنده حضور یک عفونت مایکوباکتریایی غیر توبرکلوزیسی باشد و بیمار باید از آزمایشات جداسازی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس رها شده و درمان مناسب‌تری برای وی در نظر گرفته شده است. تاثیرات بالقوه

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ on Saturday, September 14, 2013

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2023-09-26]

این روش بر مراقبت بیماران در کاهش هزینه‌های نگهداری آنها به وضوح روشن است. به‌صورت خلاصه، روش‌های تکثیر اسید نوکلئیک می‌تواند صحه‌ای بر نتایج اسمیر مثبت بگذارد و به‌صورت بالقوه نیز در افرادی که دارای علایم کلینیکی واضح سل می‌باشند اما نتیجه اسمیر آنها منفی‌است، می‌تواند توجیهی‌بر حضور مایکوباکتریوم توبرکلوزیس باشد. دستور کارهای اخیر مرکز کنترل بیماری‌های آمریکا (CDC) این اصل را تایید می‌نماید.[۱۹] در مواردی که نتیجه اسمیر منفی می‌باشد، بهتر است شروع درمان تا اعلام نتیجه کشت نگهداری گردد زیرا در این حالت احتمال انتقال بیماری به دیگران کاهش می‌یابد، هرچند در مواردی که علایم بیماری شدید می‌باشد می‌توان درمان را آغاز نمود. علاوه بر تاثیرات روش‌های مولکولی در تشخیص سریع و درمان بهتر بیماری سل، این روش‌ها می‌توانند مستقیماً بر روی نمونه‌های کلینیکی انجام شده و در آزمایشگاه‌های طبی و دامپزشکی مورد استفاده قرار گرفته و در ایجاد بهداشت عمومی مناسب تاثیرگذار باشند. همچنین این روش‌ها می‌توانند در تشخیص عفونت‌های خارج ریوی سل نیز به‌خصوص منتژیت سلی مفید باشند.[۲۰] نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که PCR می‌تواند به‌عنوان یک روش روتین در تشخیص کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در کاشان مورد استفاده قرار گیرد. به‌عنوان یک روش دیگر می‌توان با اضافه کردن پرایمرهای اختصاصی گونه‌های مختلف مایکوباکتریوم به‌خصوص مایکوباکتریوم بوویس برای افتراق بین گونه‌های مختلف مایکوباکتریوم که می‌توانند در انسان یا حیوانات ایجاد بیماری نمایند نیز از روش Multiplex PCR استفاده نمود. *سپاسگزاری:* از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کاشان که با تصویب طرح تحقیقاتی شماره ۸۵۲۳، همچنین آقای پوربابایی، خانم زمانی و سایر افراد ما را یاری نموده‌اند قدردانی می‌نماییم.

References

1. Sohn KY, Shrestha S, Khagi A, Malla SS, Pokharel BM. Polymerase chain reaction detection of mycobacterium tuberculosis from sputum. *J Nepal Med Assoc* 2003; 42: 65-70.
2. Fredricks DN, Relman DA. Application of polymerase chain reaction to the diagnosis of infectious diseases. *Clin Infect Dis* 1999; 29: 475-86.
3. Laifer G, Widmer AF, Frei R, Zimmerli W, Fluckiger U. Polymerase chain reaction for Mycobacterium tuberculosis: impact on clinical management of refugees with pulmonary infiltrates. *Chest* 2004; 125: 981-6.
4. Salian NV, Rish JA, Eisenach KD, Cave MD, Bates JH. Polymerase chain reaction to detect Mycobacterium tuberculosis in histologic specimens. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 1150-5.
5. Gengvinij N, Pattanakitsakul SN, Chierakul N, Chaiprasert A. Detection of Mycobacterium tuberculosis from sputum specimens using one-tube nested PCR. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2001; 32: 114-25.
6. Ogusku MM, Salem JI. Analysis of different primers used in the PCR method: Diagnosis of tuberculosis in the state of Amazonas. *Brazil J bras Pneumol* 2004; 30 :343-9.
7. Eisenach KD, Cave MD, Bates JH, Crawford JT. Polymerase chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for Mycobacterium tuberculosis. *J Infect Dis* 1990; 161: 977-81.
8. van Soolingen D, de Haas PE, Hermans PW, Groenen PM, van Embden JD. Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1987-95.
9. Salem JI, Marója MF, Carvalho FF, Lima MO, Feuillet A. Mycobacteria other than tubercle bacilli in sputum specimens from patients in Manaus Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica* 1989; 19: 349-54.
10. Salem JI, Gontijo Filho P, Lévy-Frébault V, David HL. Isolation and characterization of mycobacteria colonizing the healthy skin. *Acta Leprol* 1989; 7 Suppl 1: 18-20.
11. Kent P, Kubica G. Public Health Mycobacteriology: A guide for the level III laboratory. Atlanta, Ga: US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control, 1985.
12. Torrea G, Van de Perre P, Ouedraogo M, Zougba A, Sawadogo A, Dingtoumda B, et al. PCR-based detection of the Mycobacterium tuberculosis complex in urine of HIV-infected and uninfected pulmonary and extrapulmonary tuberculosis patients in Burkina Faso. *J Med Microbiol* 2005; 54: 39-44.
13. Pao CC, Yen TS, You JB, Maa JS, Fiss EH, Chang CH. Detection and identification of Mycobacterium tuberculosis by DNA amplification. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1877-80.
14. Querol JM, Farga MA, Granda D, Gimeno C, García-de-Lomas J. The utility of polymerase chain reaction (PCR) in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Chest* 1995; 107: 1631-5.
15. Se Thoe SY, Tay L, Sng EH. Evaluation of Amplicor- and IS6110-PCR for direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex in Singapore. *Trop Med Int Health* 1997; 2: 1095-101.
16. Rajalahti I, Vuorinen P, Nieminen MM, Miettinen A. Detection of Mycobacterium tuberculosis complex in sputum specimens by the automated Roche Cobas Amplicor Mycobacterium Tuberculosis Test. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 975-8.
17. Kafwabulula M, Ahmed K, Nagatake T, Gotoh J, Mitarai S, Oizumi K, et al. Evaluation of PCR-based methods for the diagnosis of tuberculosis by identification of mycobacterial DNA in urine samples. *Int J Tuberc Lung Dis* 2002; 6: 732-7.
18. Jouveshomme S, Cambau E, Trystram D, Szpytma M, Sougakoff W, Derenne JP, et al. Clinical utility of an amplification test based on ligase chain reaction in pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 1096-101.
19. Centers for Disease Control and Prevention: Morbidity and Mortality Weekly Report. Update: nucleic acid amplification tests for tuberculosis. *MMWR* 2000; 49: 593-4.
20. Kaul KL. Molecular detection of Mycobacterium tuberculosis: impact on patient care. *Clin Chem* 2001; 47: 1553-8.

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ on Saturday, September 14, 2013

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2023-09-26]

Tehran University Medical Journal; Vol. 67, No. 3, Jun 2009: 173-177

Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex: PCR method using insertion sequence 6110

Rohani M.[1*]
Khorshidi A.[1]
Moniri R.[1]
Torfeh M.[1]
Abddoshah F.[2]
Saffari M.[1]
Shajari Gh R.[1]
Moosavi Gh A.[3]

1- Department of Microbiology & Immunology
2- Moslem Ben Aqil Health Care Center
3- Department of Statistics Immunology

Kashan University of Medical Sciences

Received: December 21, 2008 Accepted: February 03, 2009

Abstract

Background: Tuberculosis is an important cause of death in some countries. The world health organization estimates that if stronger measures are not taken up to control the prevalence of this disease, from 2000 to 2020 a billion people will be infected by the bacterium. According to time consuming of common detection methods of Mycobacterium tuberculosis such as culture, it is necessary to evaluate a rapid detection tests such as PCR. Rapid diagnosis of tuberculosis may have profound effects in patients' care According to importance of rapid detection and treatment of tuberculosis and for determine of sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of PCR by using IS6110 this study was done in Kashan university of medical science.

Methods: A total of 248 sputum samples from patients suspected of mycobacterial diseases were studied. DNA was extracted by boiling method. IS6110 PCR method by a specific pair of primers designed to amplify 123bp and 245bp sequences of the insertion sequence, 6110, in the *M. tuberculosis* genome was used to analyze sputum samples.

Results: 32 out of 248 (12.9%) of samples had positive culture. PCR yielded a sensitivity of 93.8**%** and specificity of 99.1% for the diagnosis of TB patients with TB confirmed by culture. There were two out of 32 (6.3%) PCR-positive cases among the patients with non-TB disease.

Conclusion: The findings of the present study indicate that Multiplex PCR may provide a faster method of detecting tuberculosis, thus enhancing diagnostic procedures and we conclude that the performance of an IS6110 PCR assay is valuable in the rapid diagnosis of tuberculosis.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis* complex, detection, IS6110, PCR.

* Corresponding author: Dept. of Microbiology & Immunology of Kashan University Of medical Sciences, 5th Kilometer of Ravand Road, Pezeshk Blvd., Kashan, IRAN
Tel: +98-361-5550021
email: kia_rohani@yahoo.com

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ on Saturday, September 14, 2013
[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2023-09-26]