مجله دنیای میکروب‌ها
سال هفتم شماره دوم (پیاپی ۱۹) تابستان ۱۳۹۳
صفحات ۱۰۸-۹۷

Original Article

# طراحی کنترل داخلی به منظور تشخیص *مایکوباکتریوم توبرکیلوسیس* در روش PCR

**محمدحسن شاه حسینی*[۱]، مریم قهری[۲]، الهام مسلمی[۳]**

[۱]دانشیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهر قدس، گروه میکروب شناسی، [۲]کارشناس ارشد، موسسه ایرانیان ژن فناور، تهران، [۳]استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شرق، گروه میکروب شناسی

## چکیده

*سابقه و هدف:* سل به عنوان دومین علت مرگ و میر ناشی از عفونت شناخته شده است. روش های مولکولی مانند PCR، تکنیک های مناسبی برای شناسایی *مایکوباکتریوم توبرکیلوسیس* (MTB) هستند. بروز نتایج متفاوت در آزمایشگاه های مختلف، از معایب این تکنیک مولکولی است. این مطالعه با هدف طراحی، ساخت و کاربرد کنترل داخلی در روش PCR به منظور تشخیص MTB انجام شد.

*مواد و روش ها:* به منظور ساخت کنترل داخلی ویژه MTB، ابتدا پرایمرهای ویژه آزمون PCR برای تشخیص مولکولی بهینه و سپس حساسیت و ویژگی آن مشخص گردید. پرایمرهای مرکب (Composite Primer) برای IC-MTB نیز طراحی، تکثیر و سپس کلون شد. IC-MTB تکثیر شده در پلاسمید pTZ57R الحاق و در باکتری *اشریشیا کلی* JM107 ترانسفورم و کلون گردید. تعداد حداقل IC در هر واکنش PCR از طریق رقیق سازی و همچنین طیف پاسخ PCR همراه با کنترل داخلی مورد بررسی قرار گرفت.

*یافته ها:* اندازه محصول تشخیصی MTB با پرایمرهای اختصاصی آن برابر با ۲۴۵ جفت باز و محصول IC-MTB برابر با ۶۶۰ جفت باز بود. که از نظر اندازه، اختلاف مطلوب را با هم دارند. تعداد حداقل IC در هر واکنش ۱۰۰۰ عدد تعیین شد. حداقل و حداکثر حساسیت روش PCR همراه با IC برای DNA باکتری *مایکوباکتریوم توبرکیلوسیس* بین ۱۰ میلیون تا ۱۰ باکتری محاسبه گردید. در ارزیابی ویژگی با عوامل مختلف نیز هیچ محصول ناخواسته ای مشاهده نشد.

*نتیجه گیری:* استفاده از یک کنترل داخلی در روش PCR می تواند خطاها را در آزمون تشخیص مولکولی *مایکوباکتریوم توبرکیلوسیس* شناسایی نماید. در واقع تکثیر IC نشان دهنده انجام صحیح تمامی مراحل تکثیر و تشخیص می باشد.

*واژگان کلیدی:* کنترل داخلی، PCR، *مایکوباکتریوم توبرکیلوسیس*، PCR-Cloning، رقابتی.

دریافت مقاله: دی ماه ۹۲ پذیرش برای چاپ: فروردین ماه ۹۳

## مقدمه

با وجود پیشرفت های فراوانی که امروزه در زمینه بهداشت و سلامت عمومی در جوامع مختلف صورت گرفته است اما تعداد مبتلایان به بیماری سل در سال های اخیر به طور چشمگیری در حال افزایش بوده است. به طوری که این بیماری به عنوان دومین علت مرگ و میر ناشی از عفونت شناخته شده است (۱). سل (Tuberculosis) یکی از بیماری های عفونی بالقوه کشنده می باشد که پس از چندین دهه کاهش در میزان بروز آن، همزمان با شیوع ایدز در جهان این بیماری نیز رو به افزایش نهاده است (۲). سازمان بهداشت جهانی تخمین زده است که اگر کنترل شیوع این بیماری در جهان بیشتر نگردد در فاصله زمانی بین سال های ۲۰۰۰ تا ۲۰۲۰ نزدیک به یک میلیارد نفر از مردم جهان آلوده به این باکتری خواهند بود و

*) آدرس برای مکاتبه: شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهر قدس، گروه میکروب شناسی.
تلفن: ۰۹۱۲۳۳۰۴۰۶۹ پست الکترونیک: shahhosseiny@yahoo.com

۲۰۰ میلیون نفر بیمار می گردند و ۳۵ میلیون نفر نیز خواهند مرد (۳). در حال حاضر بیماری سل از طرف سازمان بهداشت جهانی به عنوان فوریت جهانی اعلام شده است (۴). امروزه تقریباً، ۸ میلیون نفر در سال به سل مبتلا می شوند و تخمین زده می شود که ۱/۳ درصد جمعیت جهان به طور نهفته به سل آلوده هستند (۵).

یکی از مهمترین دلایل عدم موفقیت در کنترل این بیماری فقدان روش تشخیصی ساده ای است که ویژگی و حساسیت بالایی داشته و قابل استفاده متداول در تمامی مراکز تشخیصی باشد. اساس تشخیص سل ریوی، آزمایش مستقیم و ساده خلط بیماران مشکوک است. آزمایش میکروب شناسی خلط، مهم ترین، در دسترس ترین و ارزان ترین وسیله تشخیص سل ریوی به ویژه در بالغین در کشورهای توسعه یافته می باشد (۶).

کشت خلط نسبت به آزمایش مستقیم خلط از حساسیت بیشتری برخوردار است اما نتایج آزمایش معمولاً پس از ۴ تا ۸ هفته مشخص می گردد. همچنین انجام کشت خلط نیازمند مرکزی مجهز با تکنسین های ورزیده است که در همه جا میسر نمی باشد. از طرفی کشت خلط به منظور تعیین هویت *مایکوباکتریوم* (*Mycobacterium*) و بررسی مقاومت میکروب در برابر داروهای ضد سل نیز استفاده می گردد (۷). کنترل بیماری سل در جهان به دلیل روش های تشخیصی کند و غیر حساس، به خصوص برای تشخیص فرم های مقاوم به دارو در بیماران آلوده به ویروس HIV، بسیار محدود شده است (۸).

از آنجایی که روش های سنتی برای تشخیص *مایکوباکتریوم توبرکیلوسیس* های (*Mycobacterium tuberclusis*) مقاوم به دارو هفته ها و حتی ماه ها به طول می انجامد، روش های سریع مولکولی بسیار مورد توجه قرار گرفته اند (۹). ضرورت وجود و طراحی تکنیک های تشخیص مولکولی زمانی مورد توجه قرار گرفت که مشخص شد روش های متداول تشخیص بیماری های عفونی مانند سل، دارای حساسیت پایینی می باشند. همچنین گاهی میکروارگانیسم قادر به رشد در محیط آزمایشگاه نبوده و نیازمند محیط کشت پیچیده و یا زمان انکوباسیون طولانی برای رشد می باشد.

تکثیر اسید نوکلئیک و روش های هیبریدیزاسیون، بیومولکول ها را در نمونه های بالینی تشخیص داده و در کوتاه کردن زمان لازم برای تشخیص و تعیین میکروارگانیسم در نمونه های بالینی مؤثر می باشند (۱۰). اولین و مهمترین روشی که در آن تعداد مولکول های هدف افزایش می یابد، تکنیک PCR است. امروزه این تکنیک جایگاه بسیار مهمی را در جنبه های مختلف میکروب شناسی تشخیصی، پیدا کرده است (۱۴-۱۱).

از آنجایی که خطر آلودگی تحت شرایط آزمایشگاهی معمول اجتناب ناپذیر است، تلاش ها باید در راستای کمک به کم کردن خطاها و ریسک های ایجاد شده در روند تکثیر باشد. اساسی ترین قدم در تثبیت دستورالعمل ها جهت تکثیر DNA های وسیع الطیف، حذف آلودگی ها است. آلودگی می تواند از هر منبعی مانند نمونه ها، اعمال آزمایشگاهی و سایر شرایط ایجاد گردد (۱۵).

کنترل ها یک الزام بسیار مهم در روش های PCR به حساب می آیند. به ویژه کنترل منفی که حاوی ساده ترین عنصر یعنی آب می باشد. اگر کنترل منفی، مثبت گردد به معنی آلودگی است و آزمون باید مجدداً تکرار گردد. اگر این مسئله تکرار شود نشان دهنده یک آلودگی عمومی در آزمایشگاه است. در این صورت تمام واکنش گر ها باید تعویض شوند و دستگاه ها و اتاق ها نیز باید کاملاً تمیز گردند. انجام این عمل، کاری ملال آور است. زیرا برای رهایی از اسید نوکلئیک باید از مواد شیمیایی قوی مانند هیدروکلریک اسید یا سفید کننده استفاده شود (۱۰).

چندین احتمال نیز برای پدید آمدن جواب منفی کاذب در روش PCR وجود دارد مانند خطاهای انسانی، مشکلات تکنیکی، غلظت کم DNA هدف در یک نمونه انسانی. از این میان خطاهای انسانی اجتناب ناپذیرند. مشکل اساسی متدهای PCR شناخته شده حتی آنهایی که امروزه استفاده می شوند، نداشتن یک کنترل داخلی (IC) است. بر خلاف کنترل مثبت خارجی، کنترل داخلی یک توالی از سکانس هدف از DNA موجود در لوله است که به طور همزمان با توالی هدف تکثیر

می شود. در یک PCR بدون کنترل داخلی، یک پاسخ منفی (بدون باند یا سیگنال) می تواند به معنای نبود توالی هدف در واکنش باشد. اما همچنین ممکن است به معنی باز داشته شدن واکنش، ناشی از عملکرد نادرست دستگاه ترموسایکلر، مخلوط واکنشگر ناصحیح PCR ، فعالیت ضعیف DNA پلیمراز و یا حضور مواد بازدارنده در نمونه باشد. بلعکس در یک PCR که دارای کنترل داخلی است، همیشه یک کنترل سیگنال (signal control)، حتی زمانی که در توالی هدف وجود ندارد تولید می شود، این امر می تواند عدم موفقیت PCR را نمایان سازد (۱۵). هدف از این مطالعه طراحی کنترل داخلی (IC) در روش PCR به منظور تشخیص *مایکوباکتریوم توبرکیلوسیس* بود.

## مواد و روش ها

*الف) تهیه DNA الگو:* در این مطالعه DNA سوش استاندارد (*Mycobacterium tuberculosis* strains H37Rv) ازآزمایشگاه مایکوباکتریولوژی بیمارستان مسیح دانشوری تهیه گردید.

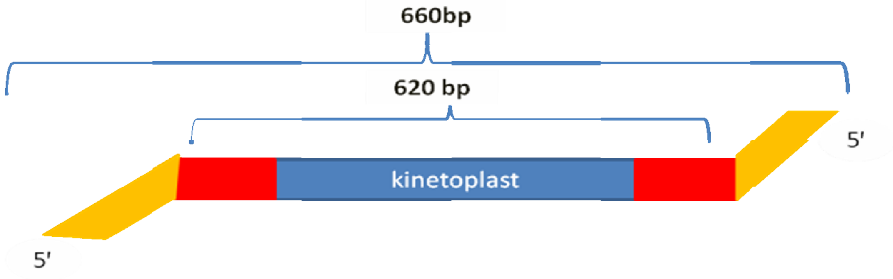
*ب) بهینه سازی روش PCR:* در این مطالعه به منظور تشخیص *مایکوباکتریوم توبرکیلوسیس* و تکثیر ژن IS6110 از پرایمر های MTBF و MTBR استفاده گردید (جدول ۱) (۱۶). واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۴ میکرولیتر آب دو بار تقطیر، ۲/۵ میکرولیتر ۱۰X PCR buffer، ۰/۷۵ میکرولیتر ($MgCl_2$(۵۰mM)، ۰/۵ میکرولیتر dNTP، ۱ میکرولیتر از هر کدام از پرایمر ها، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase و ۵ میکرولیتر DNA الگو انجام شد.

در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر Major Science با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ °C و در ادامه ۴۰ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ °C به مدت ۴۵ ثانیه، طویل شدن در دمای ۷۲ °C به مدت ۱ دقیقه (به علت نزدیک بودن دمای اتصال و پلیمریزاسیون این دو مرحله با هم تلفیق شده اند) و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه انجام شد.

به منظور تعیین ویژگی، استخراج DNA از چندین گونه مختلف *مایکوباکتریوم* مانند *M. chelonae*، *M. avium*، *M. gordonae*، *M. szulgai*، *M. kansasii*، *M. intracellular*، *M. xenopi* و چند گونه باکتری غیر مایکوباکتریوم صورت گرفت و واکنش PCR بر روی آنها انجام شد. به منظور تعیین حساسیت از رقت های مختلف (DNA از ۱۰۰ ng/µl تا ۲۵ fg/µl) *مایکوباکتریوم توبرکیلوسیس* H37Rv استفاده گردید و واکنش های PCR بر روی آنها انجام شد (۱۰ و ۱۲).

تعداد نسخه ژنوم *مایکوباکتریوم* بر اساس این اصل که هر ۵ fg از DNA معادل با یک نسخه ژنوم *مایکوباکتریوم توبرکیلوسیس* است، محاسبه گردید.

*ج) طراحی کنترل داخلی:* به منظور ساخت کنترل داخلی به روش رقابتی، از پرایمرهای ژن کینتوپلاست انگل *لیشمانیا* که محصولی ۶۲۰ جفت بازی سنتز می نماید، استفاده شد (جدول ۱) (۱۷ و ۱۸). به دو انتهای '۵ این قطعات پرایمری، دو قطعه اضافی (پرایمرهای متصل شونده به IS6110 باکتری *مایکوباکتریوم توبرکیلوسیس*) اضافه گردید. کاربست آن در PCR منجر به تکثیر قطعه ای می گردد که در دو سر آن




شکل ۱: روش ساخت کنترل داخلی

جدول۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تشخیص DNA *مایکوباکتریوم توبرکیلوسیس* و تکثیر اینترنال کنترل.

| نام پرایمر | توالی پرایمر ( '3'—'5') |
|---|---|
| **MTB-F** | 5'- CgT-gAg-ggC-ATC-gAg-gTg-gC-3' |
| **MTB-R** | 5'- gCg-TAg-gcg-TCg-gTg-ACA-AA-3' |
| **ICRMTB** | 5'- GCG-TAG-GCG-TCG-GTG-ACA-AAA-GGG-ATT-GGT-GTA-AAA-TAG-GC-3' |
| **ICFMTB** | 5'- CGT-GAG-GGC-ATC-GAG-GTG-GCT-CGC-AGA-ACG-CCC-CTA-CC-3' |

پرایمرهای MTB وجود دارد (شکل ۱).

*د) بهینه سازی روش PCR برای تکثیر کنترل داخلی (pICMTB):* مقادیر بهینه شده برای تکثیر قطعه کنترل داخلی شامل ۱۳ میکرولیتر آب دو بار تقطیر، ۲/۵ میکرولیتر ۱۰X PCR buffer، ۰/۷۵ میکرولیتر $MgCl_2$، ۰/۵ میکرولیتر dNTP، ۱ میکرولیتر از هرکدام از پرایمرها، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase و ۵ میکرولیتر از DNA ی لیشمانیا *تروپیکا* بود.

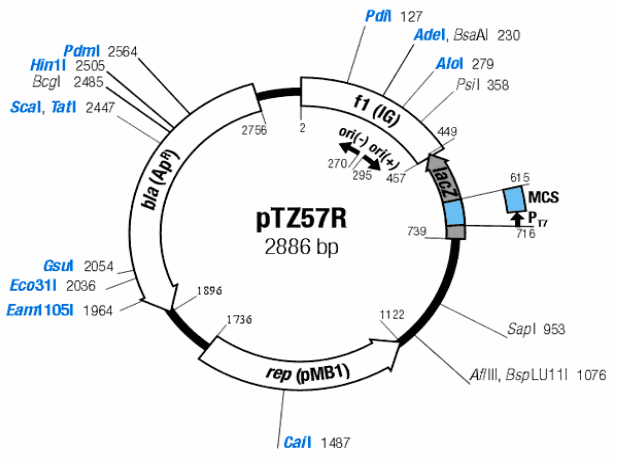
پروفایل حرارتی بهینه شده برای تکثیر کنترل داخلی نیز شامل واسرشت شدن در دمای ۹۳ °C به مدت ۴۰ ثانیه، دمای اتصال در دمای ۵۵ °C به مدت ۳۰ ثانیه، طویل شدن در دمای ۷۲ °C به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ °C به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد (۱۷ و ۱۸).

قطعه حاصل با پلاسمید (pTZ57R شرکت فرمنتاز) (شکل ۲) به مدت ۱ ساعت در دمای ۲۲ °C چسبانده و سپس در باکتری *اشریشیا کلی* JM107 ترانسفورم گردید. محصول به دست آمده از طریق غربالگری آبی/سفید در محیط حاوی آمپی سیلین، X-GAL و IPTG انتخاب گردید. کلون های مناسب از طریق استخراج پلاسمید با کیت استخراج پلاسمید و روش PCR، تائید گردیدند.

*ه) استخراج پلاسمید:* به منظور استخراج پلاسمید نوترکیب از باکتری میزبان از کیت بیونیر کره (k-3112) که بر اساس مخلوطی از روش آلکالاین دناتوراسیون (لیز قلیایی) و روش کروماتوگرافی است استفاده گردید. سپس با روش PCR، پلاسمیدهای حاوی محصول PCR و کنترل داخلی با استفاده از پرایمرهای تشخیصی تائید گردیدند.

*و) بهینه سازی غلظت مناسب DNA الگو و کنترل داخلی:* به منظور بهینه کردن روش PCR ای که برای DNA *مایکوباکتریوم توبرکیلوسیس* به همراه کنترل داخلی باشد، از DNA *مایکوباکتریوم توبرکیلوسیس* رقت تهیه شد. با توجه به اینکه هر fg ۵ از DNA را معادل یک باکتری می دانیم (۱۹) از DNA ی با تعداد مشخص *مایکوباکتریوم توبرکیلوسیس*، رقت های **۵۰۰fg / ۵۰pg /۵pg / ۵۰۰pg / ۵۰ng / ۵۰۰ng** و **۵fg / ۵۰fg** تهیه گردید. همچنین رقت های از ۱ تا ۱۰۰۰۰۰۰ پلاسمید حاوی کنترل داخلی نیز، تهیه شد.

*ز) بهینه کردن روش PCR مایکوباکتریوم توبرکیلوسیس همراه کنترل داخلی:* هدف از تعریف غلظت DNA ایده آل IC برای PCR، تائید غلظت بهینه IC است که با تارگت، کمترین رقابت در تکثیر را انجام دهد. به منظور به دست آوردن غلظت بهینه، غلظت های متفاوت پلاسمید حاوی IC و DNA ی *مایکوباکتریوم توبرکیلوسیس* استاندارد مورد بررسی قرار گرفت. مقادیر اجزا مورد استفاده در یک روش PCR حاوی کنترل داخلی شامل ۱۳ میکرولیتر آب دو بار تقطیر، ۲/۵




شکل ۲: وکتور pTZR57R

میکرولیتر ۱۰X PCR buffer، ۰/۷۵ میکرولیتر $MgCl_2$، ۰/۵ میکرولیتر dNTP، ۱میکرولیتر از هرکدام از پرایمر های ویژه تکثیر DNA MTB، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase ، ۱ میکرولیتر کنترل داخلی (حاوی ۱۰۰۰ کنترل داخلی) و ۵ میکرولیتر DNA الگو بود. الگوی حرارتی نیز مطابق برنامه حرارتی بهینه شده برای تکثیر DNA MTB تنظیم گردید.

## یافته ها

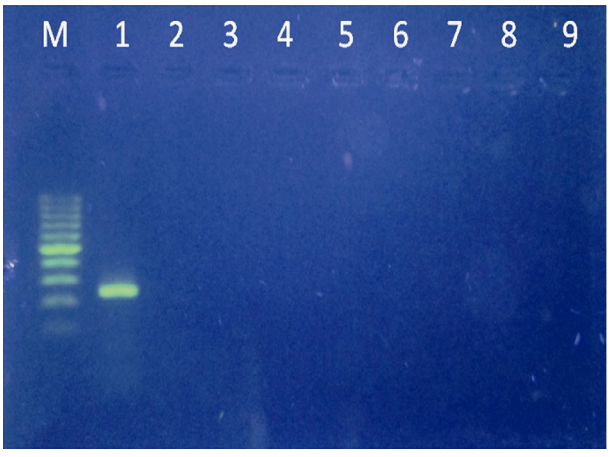
روش PCR با استفاده از DNA استخراج شده از سوش استاندارد H37Rv، بهینه گردید. بدین منظور پس از استخراج DNA از باکتری، غلظت محلول حاوی DNA ژنومی سه بار اندازه گیری و متوسط غلظت به عنوان غلظت واقعی در نظر گرفته شد. سپس این محلول با آب مقطر استریل، رقیق سازی گردید تا غلظت نهایی ۱ ng/µl به دست آید. این غلظت با اندازه گیری در طول موج ۲۶۰ nm تائید گردید. با پیدا کردن جایگاه اتصال پرایمرها بر روی توالی هدف IS6110 و همچنین تعیین ترادف مشخص شد که محصول PCR به دست آمده از این طریق، ۲۴۵ جفت باز طول دارد.

اختصاصیت آزمون با گونه های یاد شده در قسمت ب بررسی شد و نتیجه اختصاصیت ۱۰۰٪ تعیین گردید (شکل ۳).

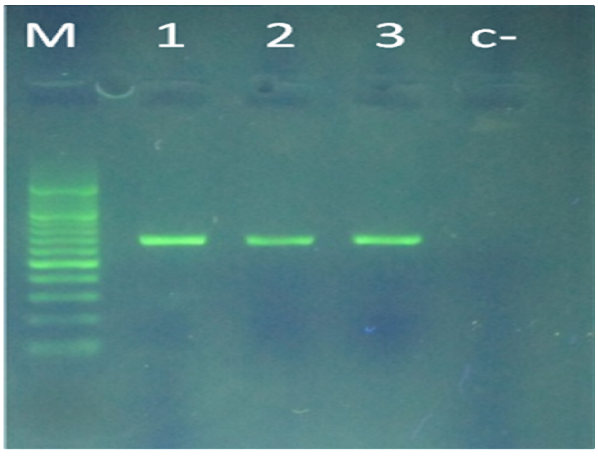
همچنین حساسیت آزمون نیز با مقادیر ۱۰۰pg، ۱۰pg، ۱pg، ۱۰۰fg، ۵۰fg، ۲۵fg، ۰fg (به عنوان کنترل منفی) از DNA مربوط به *مایکوباکتریوم توبرکیلوسیس* H37Rv بررسی شد. نتایج نشان داد که حساسیت آزمون برابر با ۵۰ fg، و یا معادل ۱۰ باکتری بوده است.

پس از تکثیر کنترل داخلی، هضم این قطعه با پلاسمید pTZ57R و انتخاب کلون ها به طریق غربالگری سفید/آبی روش PCR برای کلون های حاوی کنترل داخلی انجام شد. در این مطالعه اندازه محصول PCR برابر با ۶۶۰ bp بود (شکل ۴).

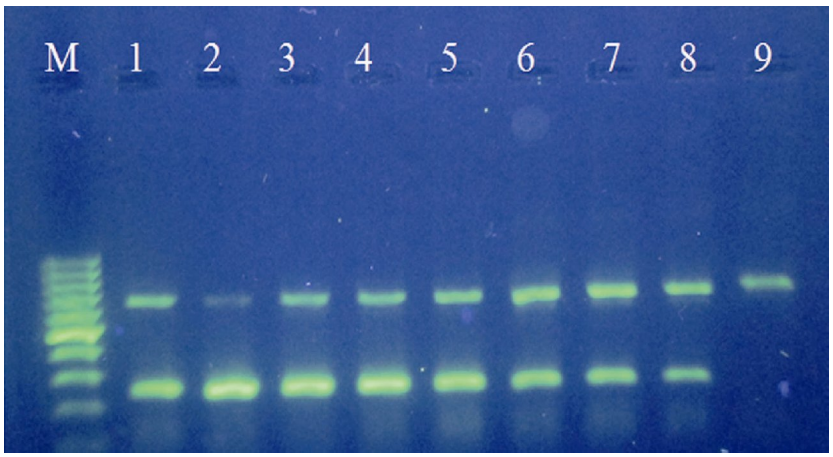
تعیین مناسب ترین غلظت کنترل داخلی برای استفاده در مخلوط واکنش PCR بسیار ضروری است. زیرا مقدار بیش از حد کنترل داخلی خود می تواند باعث ایجاد نتیجه منفی کاذب گردد. با تهیه رقت های مختلف از کنترل داخلی و تکثیر این رقت ها در روش PCR، مناسب ترین رقت به دست آمد. رقت های ساخته شده از یک میلیون تا یک پلاسمید حاوی کنترل داخلی بودند. در این مطالعه ۱۰۰۰ پلاسمید حاوی کنترل داخلی، به عنوان بهترین رقت انتخاب گردید. سپس از این




شکل ۳: تعیین اختصاصیت آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی *مایکوباکتریوم توبرکیلوسیس*. M) سایز مارکر (۱۰۰ جفت بازی)، ستون ۱) *M.tuberculosis*، ستون ۲) *M.chelonae*، ستون ۳) *M.fortuitum*، ستون ۴) *M.xenopi*، ستون ۵) *M.kansasii*، ستون ۶) *M.szulgai*، ستون ۷) *M.intracellulare*، ستون ۸) *M.avium*، ستون ۹) *M.gordonae*




شکل ۴: نتایج آزمون PCR سه کلون مثبت در ژل اگاروز ۱/۵٪ و بافر ۰/۵ X TBE. M) سایز مارکر (۱۰۰ جفت بازی) (Thermo scientific)، ستون های ۱ تا ۳) سه کلون تائید شده به وسیله واکنش زنجیره ای پلی مراز با محصول تکثیری ۶۶۰ جفت بازی.




شکل ۵: نتایج آزمون PCR مایکوباکتریوم *توبرکیلوسیس* با کنترل داخلی. M) سایز مارکر (۱۰۰ جفت بازی)، ستون ۱) کنترل مثبت حاوی DNA صد هزار باکتری *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* و هزار پلاسمید حاوی کنترل داخلی (pIC MTB ۱)، ستون ۲) DNA صد میلیون باکتری و هزار پلاسمید حاوی کنترل داخلی، ستون ۳) DNA ده میلیون باکتری و هزار پلاسمید حاوی کنترل داخلی، ستون ۴) DNA یک میلیون باکتری و هزار پلاسمید حاوی کنترل داخلی، ستون ۵) DNA صد هزار باکتری و هزار پلاسمید حاوی کنترل داخلی، ستون ۶) DNA ده هزار باکتری و هزار پلاسمید حاوی کنترل داخلی، ستون ۷) DNA هزار باکتری و هزار پلاسمید حاوی کنترل داخلی، ستون ۸) DNA **صد** باکتری و هزار پلاسمید حاوی کنترل داخلی، ستون ۹) DNA ده باکتری و هزار پلاسمید حاوی کنترل داخلی.

غلظت کنترل داخلی همراه با رقت های مختلفی از DNA هدف، استفاده شد. به این صورت که یک روش PCR با ۱۰۰۰ پلاسمید حاوی کنترل داخلی و رقت های از ۱۰۰ میلیون تا ۱۰ DNA ی *مایکوباکتریوم توبرکیلوسیس* ،گذاشته شد. نتایج نشان داد که و نتیجه که در این طیف از غلظت DNA ی هدف، رقابت به حدی نیست که از تکثیر یکی از DNA ها ممانعت به عمل آورد. بنابراین طیف کارکرد کنترل داخلی روش PCR تشخیص *مایکوباکتریوم توبرکیلوسیس* بین ۱۰ عدد باکتری تا ۱۰۰ میلیون باکتری محاسبه گردید (شکل ۵).

## بحث

در این مطالعه به منظور ساخت کنترل داخلی، پرایمرهای مرکب برای IC-MTB نیز طراحی، تکثیر و سپس کلون گردید. همچنین طیف پاسخ PCR همراه با کنترل داخلی مورد بررسی قرار گرفت. اندازه محصول تشخیصی MTB با پرایمرهای اختصاصی آن برابر با ۲۴۵ جفت باز و محصول IC-MTB برابر با ۶۶۰ جفت باز بود. همچنین تعداد حداقل IC در هر واکنش PCR ۱۰۰۰ عدد تعیین و حداقل و حداکثر حساسیت روش همراه با IC برای DNA باکتری *مایکوباکتریوم توبرکیلوسیس* بین ۱۰ میلیون تا ۱۰ باکتری محاسبه گردید.

پیشرفت های شگرف بیوتکنولوژی و زیست شناسی مولکولی در سال های اخیر موجب تغییر در روش های تشخیصی عوامل میکروبی مانند سل، از فرم کلاسیک به روش های مولکولی (عمدتاً PCR) گردیده است. نتایج منفی و مثبت کاذب که به دلایل مختلف در تکنیک PCR رخ می دهد از مشکلات مهم این تکنیک به شمار می روند. استفاده از یک کنترل داخلی در تشخیص مولکولی، می تواند این خطاها را شناسایی نماید. در این مطالعه سعی شد با روشی هوشمندانه یک اینترنال کنترل رقابتی جهت آزمون تشخیص PCR *مایکوباکتریوم توبرکیلوسیس* ساخته شود.

سل یکی از قدیمی ترین بیماری های شناخته شده در انسان است. مدارک اولیه از سل انسانی به هزاران سال پیش بر می گردد. با وجود قدمت زیاد این عامل بیماری زای انسانی، هنوز عامل مولد این بیماری، دومین علت مرگ و میر ناشی از بیماری های عفونی را به خود اختصاص داده است. اگرچه این بیماری اغلب در کشور های در حال توسعه و شرایط اقتصادی نامناسب

شایع است، اما در بسیاری از کشور های صنعتی نیز به دلیل مهاجرت، ظهور گونه های مقاوم به دارو و همه گیری ایدز شیوع این بیماری دیده می شود.

محدودیت های روش های کلاسیک، در تشخیص بیماری سل موجب شده است که محققین سرتاسر دنیا، تحقیقاتی را در زمینه بهینه سازی و راه اندازی روش های تشخیصی دقیق تر انجام دهند (۲۰ و ۲۱). مهمترین مشکل در ارتباط با تشخیص بیماری سل، مسائل مربوط به رشد آهسته این باکتری ها در محیط کشت است. به طوری که زمان تقسیم آنها حدود ۱۸ ساعت به طول می انجامد. به همین دلیل تمامی گزارشات میکروب شناسی مرتبط با کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکیلوسیس* با تأخیر چند هفته ای همراه است (۲۲). شناسایی و تشخیص زود هنگام بیماران مبتلا به سل، نقش مهمی در مؤثر بودن برنامه کنترل و مبارزه با سل داشته و از انتشار عفونت و بیماری به دیگر افراد جامعه جلوگیری می نماید (۲۳). لزوم یک روش تشخیصی سریع و حساس برای *مایکوباکتریوم توبرکیلوسیس* و دیگر *مایکوباکتریوم* ها موجب شده که در چند دهه اخیر، روش های مختلفی برای استفاده روتین در تشخیص مورد بررسی و ارزیابی قرار گیرد (۲۴).

در حال حاضر، PCR ساده ترین روش تکثیر اسید نوکلئیک بوده به طوری که در بین انواع مختلف روش های تشخیص مولکولی، بیشترین کاربرد را به خود اختصاص داده است (۲۵ و ۲۶). از زمانی که PCR به عنوان یک روش مولکولی برای تشخیص بیماری سل معرفی شد، مطالعات متعددی استفاده از آن را برای تشخیص *مایکوباکتریوم توبرکیلوسیس* در نمونه های بالینی بررسی کردند (۱، ۳ و ۵). مطالعات اولیه بر روی توالی های هدف مختلف متمرکز بودند. سپس این مطالعات به وسیله تحقیقات اولیه بر روی حساسیت و ویژگی آزمون با استفاده از طیف وسیعی از انواع روش های آماده سازی نمونه و دستورالعمل های تکثیری ادامه پیدا کرد (۲۲). با وجود راحتی کار، سرعت بالا و دقت زیاد، تکنیک PCR دارای مشکلاتی از جمله آلودگی می باشد. استفاده از پرایمرهای الیگونوکلئوتیدی حفاظت شده برای ژن های متنوعی که در چنین باکتری هایی وجود دارند می تواند مشکلاتی را به همراه داشته باشد، که به دلیل تکثیر همزمان DNA بیگانه با DNA هدف است. این پیچیدگی ها منجر به کاهش کارایی تکنیک PCR در خدمات تشخیصی می شود. به علاوه، آلودگی باعث افزایش نتایج مثبت کاذب می شود که در نتایج آزمایشات مولکولی ایجاد اختلال می نماید. کنترل دقیق آلودگی (از هر منبعی) کلید پذیرفته شدن این تکنیک در خدمات میکروب شناسی است. به منظور برطرف کردن این محدودیت ها اقدامات متفاوتی صورت گرفته است. از این میان می توان به رعایت احتیاطات لازم در هنگام جمع آوری نمونه ها، سازمان بندی صحیح محیط کار، آلودگی زدایی از مواد و تجهیزات آزمایشگاهی، برطرف نمودن آلودگی های مرتبط با پرسنل آزمایشگاهی و استفاده از انواع کنترل ها (کنترل های مثبت، منفی و کنترل های داخلی) در هنگام اجرای آزمون اشاره نمود (۱۰). در مطالعه حاضر طراحی، ساخت و کاربرد کنترل داخلی در روش PCR به منظور تشخیص *مایکوباکتریوم توبرکیلوسیس* مورد ارزیابی قرار گرفت.

با به کارگیری کنترل داخلی در روش های PCR می توان نتیجه آزمون را به این صورت تفسیر نمود که نمونه هایی که دارای سیگنال هدف هستند، بدون توجه به نتیجه کنترل داخلی، مثبت تفسیر می شوند. نمونه هایی که فاقد سیگنال هدف هستند، منفی تلقی می شوند. هر چند سیگنال کنترل داخلی آنها قابل ردیابی نباشد. نمونه هایی که برای هر دو سیگنال هدف و کنترل داخلی منفی هستند به عنوان نمونه های مخدوش (مهار شده) تفسیر می شوند (۲۷).

کنترل داخلی که کولک (Kolk) و همکاران در سال ۱۹۹۴ به منظور تشخیص *مایکوباکتریوم توبرکیلوسیس* طراحی نمودند، ۳۰۱ جفت باز بود. در حالی که این IC با ژن هدف که ۲۴۵ جفت باز داشت، از نظر اندازه اختلاف ناچیزی داشتند (۱۶). در این مطالعه سعی شد از ژنی برای ساخت IC استفاده شود که از اختلاف اندازه مناسبی با ژن هدف برخوردار باشد.

کورتز هررا (Cortez-Herrera) و همکاران در سال ۲۰۰۸ به

منظور ساخت کنترل داخلی رقابتی جهت بهینه نمودن تشخیص *مایکوباکتریوم توبرکیلوسیس* از IC به اندازه ۶۰۰ جفت باز استفاده کردند (۲۸). اما در مطالعه حاضر از ژن کینتوپلاست انگل *لیشمانیا* جهت طراحی و ساخت IC به روش رقابتی و PCR-Cloning استفاده گردید که اندازه ای برابر با ۶۶۰ جفت باز داشت. به کار گیری ژن کینتوپلاست انگل *لیشمانیا* برای ساخت کنترل داخلی در این مطالعه با یک روش هوشمندانه، این مزیت را به همراه داشت که کنترل داخلی ساخته شده، قابلیت تکثیر در طیف دمایی بهینه برای ژن هدف را دارد.

بر اساس همین قابلیت از این ژن و روش برای ساخت کنترل داخلی آزمون تشخیص PCR برای میکروارگانیسم هایی از قبیل جنس *سالمونلا*، *مایکوپلاسما* و گونه های *مایکوپلاسما پنومونیه*، *اشریشیا کلی*، *هرپس سیمپلکس ویروس*، *ویروس هپاتیت B* استفاده و در حال تکوین و انجام می باشد.

دو شیوه کلی برای ساخت IC وجود دارد: ۱. ساخت کنترل داخلی رقابتی ۲. ساخت کنترل داخلی غیر رقابتی. با استفاده از تکنیک پرایمر مرکب، هدف و کنترل داخلی با یک جفت پرایمر، در همان شرایط (شرایط یکسان) و در همان لوله (در یک لوله) تکثیر می شوند. در این روش، همیشه رقابت بین DNA هدف و کنترل داخلی وجود دارد. بنابراین میزان کنترل داخلی جهت حد شناسایی یک نکته حساس و مهم می باشد. باید توجه داشت که میزان تکثیر دو قطعه DNA های متفاوت به وسیله یک جفت پرایمر می تواند باعث ممانعت یا تشدید تکثیر یکی از دو محصول گردد. این امر به میزان مولار، طول محصولات تکثیری، ترادف و ساختار ثانویه قطعات DNA و پارامترهای دیگر وابسته است.

رقابت کنترل داخلی می تواند موجب کاهش تکثیر و کم شدن بازده محصول PCR و متعاقب آن کاهش حد شناسایی گردد. بنابراین، یکی از مهمترین پارامترهایی که بایستی در نظر گرفته شود، غلظت کنترل داخلی در یک روش PCR است. زیرا غلظت زیاد DNA ی کنترل داخلی در یک آزمون PCR موجب رقابت آن با DNA ی هدف و کاهش محصول هدف می گردد. این خود می تواند موجب نتایج منفی کاذب گردد. در این مطالعه حد شناسایی برای PCR همراه با IC ساخته شده، تعیین گردید. به علاوه، اگر غلظت بالای کنترل داخلی انتخاب گردد عوامل ممانعت کننده در آزمون که موجب نتایج منفی کاذب می شوند، خصوصاً در زمانی که غلظت DNA ی هدف کم است مورد شناسایی قرار نمی گیرند.

دومین پارامتر مهم، اندازه کنترل داخلی است. افزایش سایز یک هدف نسبت به دیگری در تئوری، موجب تمایل واکنش به سمت محصول PCR هدف کوچکتر می گردد. بسیاری از محققین بدون توجه به سایز کنترل داخلی، عموماً رقابت توالی هدف در PCR با کنترل داخلی را به طور کلی مورد توجه قرار داده اند (۲۹ و ۳۰).

## نتیجه گیری

با توجه به شیوع بالا و رو به افزایش بیماری سل در دنیا و در نتیجه نیاز به اقدامات جهت کنترل این بیماری، به کارگیری روش های سریع در تشخیص این میکروارگانیسم از اولویت برخوردار می باشد. از آنجایی که وجود نواقصی در آزمون های مولکولی مانند روش PCR که متداول ترین این روش ها می باشد، می تواند بازدهی بالای این روش را زیر سوال ببرد، استاندارد کردن این آزمون بسیار ضروری به نظر می رسد.

علاوه بر اقدامات محیطی در جهت رفع آلودگی و در نتیجه کاهش میزان پاسخ های مثبت کاذب، استفاده از انواع کنترل ها برای چک کردن مراحل مختلف آزمون نیز حیاتی است. وجود یک کنترل داخلی در کنار کنترل های خارجی (کنترل های مثبت و منفی) تا حد بسیار زیادی این مشکل را در مورد روش PCR حل می نماید.

## تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر قدس به دلیل حمایت های مالی و از پرسنل محترم موسسه ایرانیان ژن فناور به دلیل فراهم آوردن امکانات و تجهیزات مورد نیاز کمال امتنان را دارند.

## References


**1.** Mortier E, Pouchot J, Girard L, Boussougant Y, Vinceneux P. Assessment of urine analysis for the diagnosis of tuberculosis. BMJ. 1996; 312: 27-28.

**2.** Pauwels RA, Buist AS, Calverley PM, Jenkins CR, Hurd SS; GOLD Scientific Committee Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary. Am J Respir Crit Care Med. 2001; 163(5): 1256-1276.

**3.** 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.

**4.** Fredricks DN, Relman DA. Application of polymerase chain reaction to the diagnosis of infectious diseases. Clin Infect Dis. 1999; 29(3): 475-486.

**5.** Gordin FM, Masur H. Current approaches to tuberculosis in the United States. JAMA. 2012; 18 (3): 283-289.

**6.** 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(5): 977-981.

**7.** Van Soolhingen D, de Hass 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 Microbial. 1993; 31(8): 1987-1995.

**8.** Catharina C. Boehme, Pamela Nabeta, Doris Hillemann, Mark P. Nicol, Shubhada Shenai, Fiorella Krapp, Jenny Allen, B.Tech., Rasim Tahirli, Robert Blakemore, Roxana Rustomjee, Ana Milovic, Martin Jones, Sean M. O'Brien, David H. Persing, Sabine Ruesch-Gerdes, Eduardo Gotuzzo, Camilla Rodrigues, David Alland, Mark D. Perkins. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. N Engl J Med. 2010; 363: 1005-1015.

**9.** Barnard M, Albert H, Coetzee G, O'Brien R, E. Bosman M. Rapid molecular screening for multidrug-resistant tuberculosis in a high-volume public health laboratory in South Africa. Am J Respir Crit Care Med. 2008; 177(7): 787-792.

**10.** Burkardt HJ. Standardization and quality control of PCR analyses. Clin Chem Lab Med. 2000; 38(2): 87-91.

**11.** Persing DH, Smith TF, Tenover & TJ White. Molecular microbiology: diagnostic principles and practices. American Society Microbiology. Washington. D.C; 2003.

**12.** Shahhosseiny MH. Basic molecular diagnosis. Publisher: Islamic Azad University; 2005. pp: 12-35.

**13.** Shahhosseiny MH, Rahimi AA. Molecular genetics: concepts & applications. Publisher: Islamic Azad University; 2007. pp: 180-210

**14.** Shahhosseiny MH, Tehrani R. Polymerase chain reaction (PCR). Publisher: Islamic Azad University; 2005. pp: 45-68.

**15.** Millar BC, Xu J, Moore JE. Risk assessment of models and contamination management: implication for broad-range ribosomal DNA as a diagnostic tool in medical bacteriology. J Clin Microbiol. 2002; 4(5): 1575-1580.

**16.** Kolk AH, Noordhoek GT, de Leeuw O, Kuijper S, van Embden JD. *Mycobacterium smegmatis* strain for detection of *Mucobacterium tuberculosis* by PCR used as internal control for inhibition of amplification and for quantification of bacteria. J Clin Microbiol. 1994; 32(5): 1354-1356.

**17.** Mahboudi F, Abdolhassani M, Tehrani SR, Azimi M, Asmar M. Differentiation of old and new world Leishmania species at complex and species levels by PCR. Scaned J Infect Dis. 2002; 34(10): 756-758.

**18.** Mahboudi F, Abolhassan M, Yaran M, Mobtaker H, Azizi M. Identification and differentiation of Iranian Leishmania species by PCR amplification of kDNA. Scaned J Infect Dis. 2001; 33(8): 596-598.

**19.** Pandy BD, Poudel A, Yoda T, Tamaru A, Oda N, Fukushima Y, Lekhak B, Risal B, Acharya B, Sapkota B. Development of an in-house loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and evaluation in sputum samples of Nepalese patients. J Med Microbiol. 2008; 57(4): 439-443.

**20.** Hasan MM, Hossain MA, Paul SK, Mahmud C, Khan ER, Rahman MM, Rukunuzzaman M, Hasan MS, Kubayashi N. Evaluation of PCR with culture for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. Mymensingh Med J. 2012; 21(3): 399-403.

**21.** Poon LL, Wong BW, Ma EH, Chan KH, Chow LM, Abeyewickreme W, Horioke K, Wong BW, Njiru ZK. Sensitive and inexpensive molecular test for falciparum malaria: detecting *Plasmodium falciparum* DNA directly from heat-treated blood by loop-mediated isothermal amplifi cation. Clin Chem. 2006; 52(2): 303-306.

**22.** Roth A, Schaberg T, Mauch H. Molecular diagnosis of tuberculosis: current clinical validity and future perspectives. Eur Resp J. 1997; 10(8): 1877-1891.

**23.** Stead WW, Eisenach KD, Cave MD, Beggs ML, Templeton GL, Thoen CO, Bates JH. When did *Mycobacterium tuberculosis* infection first occur in the new world: an important question with public health implications. Am J Resp Crit Care Med. 1995; 151(4): 1267-1268.

**24.** Iwamoto T, Sonobe T, Hayashi K. Loop mediated isothermal amplification for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *M. avium*, *M. intracellulare* in sputum samples. J Clin Microbiol. 2003; 41(6): 2616-2622.

**25.** Brett-Major DM, Walsh TE. Laboratory diagnosis of tuberculosis in primary care. Dise Month J. 2006; 52(11-12): 450-458.

**26.** Huggett JF, McHugh TD, Zumla A. Tuberculosis: amplification- based clinical diagnostic techniques. Int J Biochem cell Biol. 2003; 35(10): 1407-1412.

**27.** Sachadyn P, Kur J. The construction and use of a PCR internal control. Mol Cell Probes. 1998; 12(5): 259-262.

**28.** Cortez-Herrera E, Sperhacke RD, Becker D, Kritski A, Zaha A, Rossetti ML. Internal control in PCR for *Mycobacterium tuberculosis*: usefulness and improvement of the diagnosis. Braz Arch Biol Technol. 2008; 51(4): 485-491.

**29.** Hoorfar J, Malorny B, Abdulmawjood A, Cook N, Wagner M, Fatch P. Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays. J Clin Microbiol. 2004; 42(5): 1863-1868.

**30.** Hoorfar J, Cook N. Critical aspects of standardization of PCR. Methods Mol Biol. 2002; 216 (69): 51-64.

Journal of Microbial World
Volume 7, No. 2, June 2014

Original Article

# Design of an internal control (IC) for molecular diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis*

**Mohammad Hassan Shahhosseiny**[1], **Maryam Ghahri**[2], **Elham Moslemi**[3]

[1] Associated Professor, Department Microbiology,Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Shahr-e-Qods, Iran.
[2] MS.c., Iranian Gene Fanavar Institute, Tehran, Iran.
[3] Assistant Professor, Department of Biology,Tehran Shargh Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

## Abstract

*Background & Objectives*: Tuberculosis is the second reason of deaths caused by known infectious agents. Although molecular approaches, such as PCR, are suitable techniques for detection of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), these techniques suffer of variable results in different laboratory conditions. This study aimed to design, manufacture and apply an internal PCR control used for detection of MTB.

*Materials & Methods:* To produce special MTB internal control, first individual PCR test primers was optimized for molecular detection of MTB, and then their sensitivity and specificity were measured. The composite primer for IC-MTB was also designed, replicated and colonized. The amplified IC-MTB was ligated to pTZ57R plasmid and was transformed into *E. coli* JM107. The minimum IC number in each PCR reaction was studied using dilution and PCR response spectrum with IC.

*Results:* The size of MTB diagnostic products with individual primers and IC-MTB were was 245 bp and 660 bp, respectively, which is a suitable difference in the size aspect. Minimum IC number was identified 1000 for each reaction. Minimum and maximum sensitivity PCR test by IC for MTB DNA was determined 10 and 10 million bacteria, respectively. No unwanted products were observed in characteristic tests by different agents.

*Conclusion:* Using an internal control as an inside control system we could detect the errors in MTB molecular diagnosis test. In fact, IC amplification is representative of correct procedure in amplification and detection steps.

*Keywords*: Internal control, PCR, *Mycobacterium tuberculosis,* PCR-Cloning, Competitive.

**Correspondence to**: Mohammad Hassan Shahhosseiny

Tel: +989123304069

E-mail: Shahhosseiny@yahoo.com

Journal of Microbial World 2014, 7(2): 97-108.