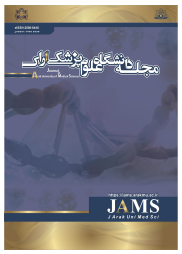
JAMS

مجله دانشگاه علوم پزشکی اراک

دوره بیست و یک، شماره چهار، مرداد و شهریور ۱۳۹۷

journal homepage: http://jams.arakmu.ac.ir



مقاله پژوهشی

مقایسه تشخیص سویه کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با روش Flash PCR و روش مرسوم کشت

علیرضا مرادآبادی[۱]، محمد ارجمندزادگان[۲*]، نوید امامی[۳]، منیژه کهبازی[۴]، اعظم احمدی[۳]، سعید فلاحت[۳]، سید حسین حسینی[۳]، مهدی کارگران[۳]، پریسا خسروی[۳]

۱. گروه هماتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران.

۲. گروه میکوبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی (IDRC)، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران.

۳. مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی (IDRC)، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران.

۴. گروه اطفال، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی (IDRC)، ،دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۱/۰۷

تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۴/۲۵

تاریخ انتشار: ۹۷/۰۵/۰۱

واژگان کلیدی:

بیماری سل

مایکوباکتریوم توبرکلوزیس

تشخیص

روش Flash PCR

روش کشت

***نویسنده مسئول:**

محمد ارجمندزادگان

آدرس پستی: ایران، اراک، دانشگاه علوم پزشکی اراک، مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی (IDRC)، دانشکده پزشکی، گروه میکوبیولوژی و ایمونولوژی.

تلفن: +98 918 860 2576

نمابر:

E-mail:
arjomandzadegan@arakmu.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: رنگ‌آمیزی‌های زیل نلسون، فلوئورسنت و نیز کشت، روش‌های استاندارد تشخیص بیماری سل هستند. در این تحقیق، کارائی روش Flash PCR با روش مرسوم کشت مقایسه شد.

مواد و روش‌ها: تعداد ۵۶ نمونه خلط از بیماران مشکوک به سل پس از ارزیابی با روش زیل نلسون و کشت در لوون اشتاین جانسن، به روش چلکس تحت استخراج DNA قرار گرفتند. جهت بررسی مولکولی از کیت مخصوص Flash PCR که محتوی پروب‌ها و پرایمرها برای تکثیر ژن IS6110 بود، استفاده شد. کنترل مثبت و کنترل منفی موجود در کیت به‌کار گرفته شد و دستگاه MTC410، جهت تکثیر و دستگاه FD-12 جهت بررسی نتایج مورد استفاده قرار گرفتند. علاوه بر این، نمونه‌ها با کمک ژل آگارز نیز الکتروفورز شدند.

یافته‌ها: از ۵۶ نمونه خلط بیماران مشکوک به سل، تعداد ۲۰ نمونه در ارزیابی میکروسکوپی و کشت، مثبت و ۳۶ نمونه منفی بودند. هم‌چنین، بررسی مولکولی با استفاده از روش FLASH-PCR مشخص کرد که تمامی ۲۰ نمونه مثبت، در این روش مولکولی نیز مثبت شدند. به‌علاوه، ۳ نمونه خلط که با روش کشت و رنگ آمیزی منفی شده بودند در روش FLASH-PCR مثبت شدند. یکی از ۳ بیمار مورد بحث با نظر پزشک تحت درمان حمله‌ای برای درمان سل با دریافت آنتی بیوتیک‌های ایزونیازید، پیرازینامید و اتامبوتول قرار گرفت. تمامی نتایج با کمک الکتروفورز معمول نیز تایید گردیدند.

نتیجه‌گیری: مواردی که احتمالا به دلیل تعداد باکتری اندک در نمونه یا نقص در نمونه‌برداری، منفی می‌شوند، با روش FLASH-PCR امکان مثبت شدن آن‌ها وجود دارد. بنابراین، با توجه به هزینه اندک، برای استفاده روتین پیشنهاد می‌شود.

تمامی حقوق انتشار این اثر، متعلق به دانشگاه علوم پزشکی اراک می‌باشد.

۱. مقدمه

بیماری سل میان انسان و دام مشترک است. در توصیف بیماری سل همین بس که ۲۰ میلیون نفر مبتلا به آن در جهان وجود دارد و هر ساله ۵ میلیون نفر به این رقم افزوده می‌گردد (۱، ۲). در سال‌های اخیر، گسترش سویه‌های مقاوم به دارو باعث نگرانی سلامت جامعه شده است (۳، ۴). سویه‌های مقاوم به دارو دارای قدرت مرگ و میر بیشتری نسبت به سویه‌های حساس به دارو در بیماران با نقص سیستم ایمنی هستند (۴، ۵). سل یکی از قدیمی‌ترین بیماری‌های شناخته شده در انسان است. با توجه به شیوع بالای آن در ایران، استفاده از روش تشخیصی PCR که سرعتی بیش از کشت و دارای حساسیت و ویژگی بیش از تشخیص با استفاده از اسمیر دارد، می‌تواند موجب تشخیص سریع و صحیح بیماری و درمان آن و بدین ترتیب کنترل بیماری در جامعه شود (۶). تشخیص سریع گونه‌های مقاوم به دارو در برنامه‌ریزی برای درمان بسیار ضروری و حیاتی است (۷، ۸). سل هنوز یکی از مهم‌ترین علل مرگ و میر در بسیاری از کشورهاست. با توجه به وقت‌گیر بودن روش‌های معمول تشخیص سل مثل کشت که ۳ تا ۸ هفته زمان می‌برد، لازم است روش‌های سریع تشخیصی مورد ارزیابی قرار گیرد (۹). در ضمن، تشخیص سریع گونه‌های مقاوم به دارو می‌تواند یک راهکار انتخابی برای درمان موثر و جلوگیری از انتقال عفونت به دیگران باشد (۹، ۱۰). روش‌های مرسوم تشخیص عفونت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس غیر قابل اعتماد و زمان بر هستند (۱۱، ۱۲). کشت و رنگ‌آمیزی‌های زیل نلسون و فلوئورسنت روش‌های استاندارد تشخیص سل هستند. وقت‌گیر بودن و گاه دقت پایین آن‌ها مطرح‌کننده نیاز به روش‌های تشخیصی سریع‌تر و دقیق‌تر می‌باشد، روش‌هایی که بتوانند در موارد عدم دسترسی به نمونه مناسب جهت اسمیر و کشت جایگزین اقدامات تهاجمی گردند و علاوه بر آسان و سریع بودن دقت تشخیصی قابل قبول داشته باشند (۱۳).

در سال‌های اخیر، بیشتر توجهات جهت تشخیص سریع معطوف به روش PCR شده است (۱۱). ژن‌های بسیاری جهت تشخیص اختصاصی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به روش PCR مورد بررسی قرار گرفته اند (۱۴، ۱۵). Fluorescent amplification-based specific hybridization PCR (FLASH-PCR) با بهره گیری از قدرت تشخیص فلورسانس بعد از تکثیر DNA به عنوان یک روش تشخیصی سریع و حساس برای عوامل بیماری‌زا معرفی شده است (۱۵، ۱۶). آبراموا و همکاران از روش FLASH-PCR جهت تشخیص اختصاصی عوامل بیماری زایی هم‌چون قارچ‌های S.tritici و S.nodorum استفاده کردند (۱۷). ریازانتسو و همکاران نیز روشی مشابه را جهت تشخیص خاصیت سمیت قارچ Fusarium به‌کار گرفتند (۱۶). ذکر این نکته ضروری است که روش FLASH-PCR توسط دستگاه ارزان قیمتی انجام می‌شود و نتایج حاصل از آن طی چند ساعت به دست می‌آید (۱۵). از طرف دیگر، این روش امکان آلودگی را کاهش داده، در حالی که آلودگی در روش الکتروفورز غیر قابل انکار است (۱۷، ۱۸).

ژن IS6110 یکی از بهترین اهداف جهت بررسی توسط روش PCR است (۲۱-۱۹). چندین کپی (۱۰ تا ۲۰) از این ژن در مایکوباکتریوم توبرکلوزیس وجود دارد و این در حالی است که فقط یک کپی از این ژن در مایکوباکتریوم بویس وجود دارد (۲۲، ۲۳). بنابراین ژن IS6110 هدف خوبی برای بالا بردن حساسیت روش PCR جهت تشخیص مایکوباکتریوم توبرکلوسیس است.

هدف از انجام این تحقیق بررسی ارزش تشخیصی عفونت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به کمک روش FLASH PCR نسبت به روش مرسوم کشت است. امید می‌رود با توجه به وقت‌گیر بودن و وجود عوامل خطای بسیار در روش کشت بتوان از این روش برای تشخیص هرچه سریع‌تر عفونت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس استفاده کرد.

۲. ملاحظات اخلاقی

این مقاله منتج از طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی اراک با کد اخلاق ۹۲-۱۵۴-۸ می‌باشد.

۳. مواد و روش‌ها

نمونه‌ها

تعداد ۵۶ نمونه خلط از بیماران مشکوک به سل مراجعه کننده به مرکز سل استان مرکزی از تاریخ ۱۳۹۳/۱/۱۵ تا تاریخ ۱۳۹۳/۶/۳۰ جمع آوری شدند. نمونه‌ها با رنگ‌آمیزی مستقیم به روش زیل نلسون و روش‌های مرسوم مورد بررسی قرار گرفتند.

کشت نمونه‌ها

کشت مستقیم خلط روی محیط لون اشتاین جانسون انجام شده و نمونه‌ها از نظر رشد کلنی مورد بررسی قرار گرفتند.

استخراج DNA

تمامی ۵۶ نمونه خلط، تحت استخراج DNA و بررسی مولکولی قرار گرفتند. بدین منظور خلط توسط محلول سود (NaOH) رقیق شد. پس از گذشت ۱۵ دقیقه، نمونه‌ها در داخل سانتریفوژ با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه قرار داده شدند. به رسوب حاصل چند قطره متیل رد جهت بررسی PH اضافه شد. PH رسوب حاصل با استفاده از HCl به PH خنثی نزدیک گردید. رسوب حاصل به میکروتیوب‌های حاوی بافر TAE و چلکس اضافه شد.

میکروتیوب‌های حاوی نمونه به مدت ۴۵ دقیقه در حرارت ۹۵ درجه قرار داده شد. سپس جهت جداسازی چلکس میکروتیوب‌ها سه بار به مدت ۱۰دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه در سانتریفیوژ قرار داده شدند و هر بار مایع رویی از روی ذرات چلکس برداشته شد. نمونه‌ها بعد از جداسازی با رعایت زنجیره سرد به آزمایشگاه حمل گردید.

Flash PCR

تکثیر برای حجم ۳۵ میکرولیتر طراحی شد. محتوای کلی مواد واکنش شامل آنزیم taq، نمونه، بافر و روغن معدنی بود که به میکروتیوب‌های موجود در کیت (DNA-Technology، روسیه) که حاوی پرایمرها و پروب‌ها بود اضافه شد. جهت کنترل نیز از کنترل مثبت و کنترل منفی موجود در کیت (DNA-Technology، روسیه) استفاده شد. دستگاه MTC410 (DNA-Technology، روسیه) جهت تکثیر DNA به‌کار رفت. دوره‌های تکثیر در جدول ۱ به طور خلاصه بیان شده است.

جدول ۱. دوره‌های تکثیر

مراحل	دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان (ثانیه)	تعداد سیکل
دناتوراسیون اولیه	۹۴	۹۰	۱
دناتوراسیون هر چرخه	۹۴	۵۰	
اتصال پرایمر	۶۴	۵۰	۴۵
طویل شدن	۷۲	۵۰	
خاتمه	۷۲	۹۰	۱

تیوب‌های تکثیر DNA جهت بررسی فلورسانس به دستگاه FD-12 (DNA-Technology، روسیه) منتقل شدند. هر کدام از نمونه‌ها توسط نرم‌افزار Gene 4.4i مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۱). در روش FLASH-PCR، از تکثیر ژن IS6110 به عنوان ژن هدف اختصاصی در مایکوباکتریوم توبرکلوسیس جهت تشخیص استفاده می‌شود. جهت مشاهده نتایج تکثیر در روش FLASH-PCR تیوب‌های حاوی نمونه با دستگاه FD-12 مورد ارزیابی قرار می‌گیرند. به عنوان کنترل داخلی و صحت استخراج DNA ژن دیگری در کیت توسط شرکت سازنده، در کنار ژن IS6110 مورد ارزیابی قرار گرفت. در دستگاه FD-12 میزان فلورسانس پروب ژن IS6110 بررسی شد.

۴. یافته‌ها

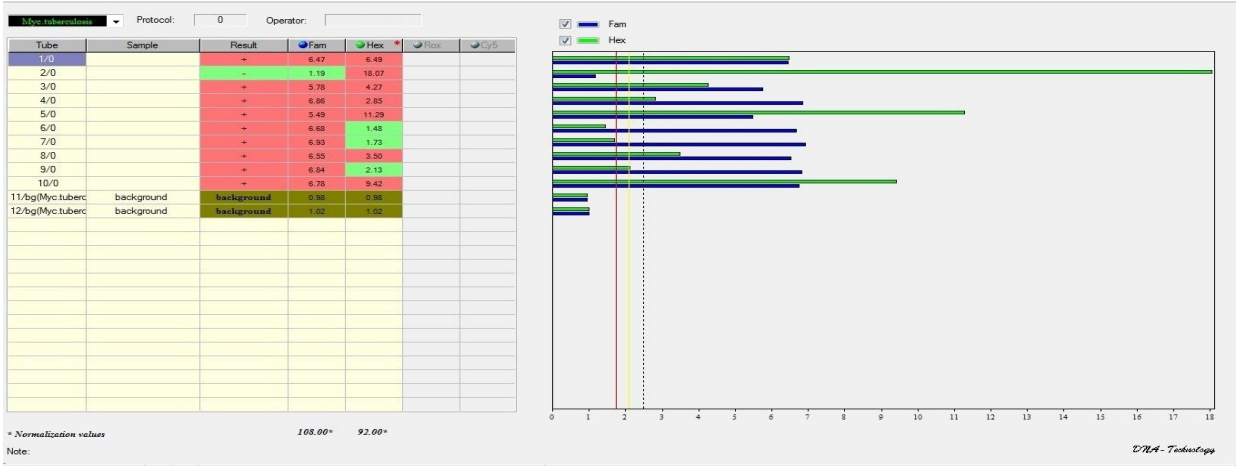
نتایج زیل نلسون و کشت

از ۵۶ نمونه خلط مورد بررسی، تعداد ۲۰ نمونه (۳۵/۸ درصد از کل بیماران) در ارزیابی میکروسکوپی و کشت مثبت و ۳۶ نمونه با نتیجه کشت و زیل نلسون منفی (۶۴/۲ درصد از کل بیماران مشکوک) بودند. محاسبات انجام شده برای دقت، ویژگی و حساسیت روش FLASH PCR به ترتیب ۰/۹۴، ۰/۹۲ و ۱ به دست آمد.

نتایج FLASH-PCR

بررسی‌های مولکولی با استفاده از روش FLASH-PCR نیز مشخص کرد که تمامی ۲۰ نمونه‌ای که در بررسی کشت و رنگ آمیزی مثبت شده بودند، در این روش نیز مثبت گزارش شدند، اما ۳ نمونه که در روش کشت و رنگ‌آمیزی منفی شده بودند در روش FLASH-PCR مثبت شدند.

همان‌طور که در شکل ۱ دیده می‌شود، نمونه اول و دوم به ترتیب به عنوان کنترل داخلی مثبت و منفی هستند. در بخش نمودارها، نمودار سبز رنگ که با نشان‌گر FAM شناسایی می‌شود و میزان فلورسانت آن را دستگاه FLASH-PCR به صورت ستون نمایش می‌دهد، برای ژن کنترل یا ژن انسانی برای کنترل استخراج DNA است و نمودار آبی رنگ که با نشان‌گر Hex شناسایی می‌شود و میزان فلورسانت آن را دستگاه FLASH-PCR به صورت نمودار نشان می‌دهد. میزان فلورسانتی که از هریک از رنگ‌ها توسط دستگاه شناسایی می‌شود، نشان‌گر میزان تکثیر ژن طی مرحله PCR است. دو نمونه ی آخر به عنوان back ground بوده که برای حذف فلورسانس زمینه در دستگاه FD-۱۲ (DNA technology، روسیه) خوانش می‌شوند.



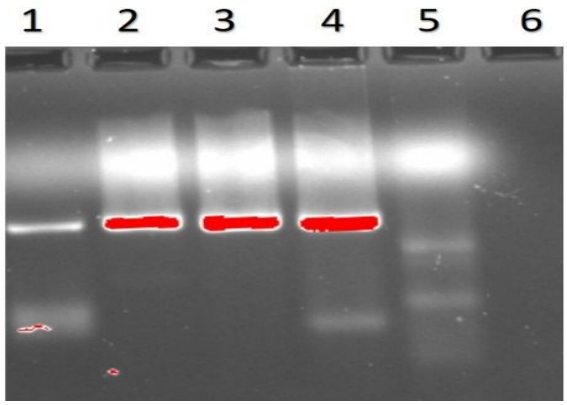
شکل ۱. نتایج FLASH-PCR حاصل از خوانش با دستگاه FD-12 که در آن نمودارهای ستونی نشان دهنده فلورسانس ساطع شده حاصل از تکثیر DNA می‌باشد. ستون‌های سبز رنگ ژن کنترل جهت انجام تکثیر DNA و ستون آبی ژن هدف برای مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می‌باشد.

برای تفسیر نتایج در این نمودارها نمونه‌هایی که در آن‌ها نمودار سبز رنگ دارای افزایش فلورسانس بیش از حد پایه تعیین شده، استخراج DNA موفق داشته و تکثیر ژن کنترل در آن‌ها انجام شده است. نمونه‌های فاقد نمونه ژنومی جهت حذف رنگ زمینه استفاده شده است.

نمودار آبی رنگ در این نمودار نشان از تکثیر ژنIS6110 در ژنوم مایکوباکتریوم دارد و اگر میزان فلورسانس آن بیش از حد آستانه تعیین شده توسط back ground باشد، به عنوان نمونه‌های مثبت از نظر وجود باکتری مایکوباکتریوم در نظر گرفته می‌شود.

الکتروفورز نمونه وجود باند اختصاصی تکثیری را نشان می‌دهد (شکل ۲). در این الکتروفورز باند سبک‌تر که بالا قرار می‌گیرد ژن کنترل داخلی بوده و باند پایینی حاکی از تکثیر ژن اختصاصیIS6110 در مایکوباکتریوم است.

همان‌طور که دیده می‌شود، دانسیته باند در نمونه‌های مختلف متفاوت است و این می‌تواند تفاوت در میزان خوانش فلورسانس در جواب‌های دستگاه FLASH-PCR باشد.



شکل ۲. ستون اول و چهارم نمونه‌های مثبت و ستون‌های دوم و سوم نمونه‌های منفی هستند. ستون پنجم راهنمای 100bp و ستون ششم نمونه‌های فاقد DNA است.

از بین۳۶ نمونه بررسی شده که با روش مرجع کشت به صورت منفی گزارش شده بود، ۳ نمونه با روش FLASH-PCR به صورت مثبت گزارش شد که با پی‌گیری‌های انجام شده یکی از بیماران مورد مطالعه با نظر پزشک به صورت حمله‌ای تحت درمان با آنتی بیوتیک‌های ایزو نیازید، اتامبوتول و پیرازینامید قرار گرفته و علایم بیماری از قبیل تورم ریه برطرف شده است.

۵. بحث

بیماری سل هنوز هم یکی از مهم‌ترین علل مرگ و میر در بسیاری از کشورهاست. در فرآیند درمان این بیماری ضرورت دارد روش‌هایی سریع برای تشخیص گونه‌های مقاوم به دارو استفاده شود (۲۴). مقایسه سه روش کشت، رنگ‌آمیزی زیل نلسون و FLASH-PCR نشان می‌دهد که روش رنگ‌آمیزی قدرت تشخیصی برابر با روش کشت دارد، به دلیل این‌که تمامی نمونه‌هایی که در آزمون رنگ‌آمیزی مثبت بودند در روش کشت نیز مثبت شدند. اما روش FLASH-PCR که بر اساس روش مولکولی و تکثیر قطعه‌ی ژنی اختصاصی IS6110 در مایکوباکتریوم توبرکلوسیس است، دارای قدرت تشخیصی بیشتری بوده و در مواردی که تعداد باکتری کمتر از حدی باشد که در روش کشت و رنگ‌آمیزی قابل شناسایی باشد بتوان افراد آلوده را تشخیص داد.

در مطالعه‌ای اس.ال.آبراموا و همکاران از روش FLASH-PCR برای تشخیص قارچ‌های Septoria tritici و Stagonospora nodorum به صورت مولکولی استفاده کردند. در این مطالعه، تکثیر ناحیه ژنی ITS1 مورد بررسی قرار گرفت و برای تایید گونه قارچ از روش استاندارد کشت استفاده شد. این مطالعه روی ۱۶ نمونه Septoria tritici و ۱۳ نمونه Stagonospora nodorum انجام گرفته است (۱۷). هم‌چنین ریازانتسو و همکاران از روش FLASH-PCR برای تشخیص قارچ بیماری‌زای Fusarium graminearu، F. culmorum، F. poae، F. langsethiae، F. avenaceum و F. tricinctum استفاده کردند. در این مطالعه، از تکثیر ژن tef-1α برای شناسایی در ۳۸ ایزوله مختلف از قارچها استفاده شد (۱۵). ایمانی فولادی و همکاران در مطالعه دیگری در زمینه مایکوباکتریوم بر روی انواع نمونه‌های ریوی و خارج ریوی بیماران مبتلا به سل از قبیل لاواژ ریه، نمونه‌های زخم و دیگر نمونه‌ها، روش FLASH-PCR را با روش‌های مرسوم کشت و رنگ‌آمیزی اسمیر به روش اسید فست مقایسه کردند. در مطالعه آن‌ها، حساسیت و ویژگی تست FLASH-PCR به ترتیب ۹۳/۳۳ و ۹۲/۵ درصد به دست آمد (۲۲). این موضوع نشان می‌دهد که روش FLASH-PCR دارای حساسیت بالا نسبت به روش‌های مرسوم برای تشخیص است و هم‌چنین می‌تواند طی زمانی کوتاه اجرا شود (۲۰، ۲۵) تفاوت مطالعه حاضر با تحقیق فوق این است که جداسازی ژنوم در این تحقیق متفاوت بوده و اثبات شد که روش چلکس برای کارشناس بسیار سریع‌تر و بهتر بوده و به ویژه «با خطر کمتر» برای مایکوباکتریوم عمل می‌کند. هم‌چنین، نوع نمونه‌های بالینی این تحقیق کاملا متفاوت بوده و روی نمونه‌های خلط که «روتین» آزمایشگاه‌ها است کار انجام شد. نتایج و حساسیت و ویژگی دو تحقیق نیز متفاوت بوده و تحقیق حاضر، نتایج بهتری ارائه نمود.

در تحقیق حاضر، از ژن IS6110 جهت بررسی در روش FLASH-PCR برای تشخیص مایکوباکتریوم توبرکلوزیس

استفاده شد، چون در ژنوم مایکوباکتریوم توبرکلوزیس چندین نسخه از این ژن وجود دارد که باعث افزایش حساسیت دقت و ویژگی روش می‌شود (۱۱).

در این مطالعه، در ۵۶ نمونه‌ی بررسی شده تعداد ۲۰ نمونه که با روش مرجع کشت مورد تایید قرار گرفته بودند با روش FLASH-PCR مورد بررسی مجدد قرار گرفتند که همه‌ی ۲۰ نمونه به صورت مثبت تایید شدند.

مقایسه روش FLASH-PCR با روش کشت نشان می‌دهد که حساسیت روش FLASH-PCR بیش از روش کشت است، ولی این روش فاقد ویژگی جهت بررسی عفونت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می‌باشد. تعدادی از نمونه‌ها که در روش کشت منفی بودند در روش FLASH-PCR مثبت می‌شدند. علت این موضوع می‌تواند از بین رفتن باکتری یا آسیب به آن طی مراحل انجام کشت، مصرف دارو توسط بیمار و یا ناکافی بودن تعداد باکتری جهت رشد در محیط کشت باشد. هم‌چنین بررسی‌ها نشان می‌دهد که اگر کشت نمونه به تاخیر بیفتد تعداد باکتری به طور محسوسی کاهش می‌یابد بنابراین به آزمایشگاه‌ها توصیه می‌شود به فاکتور زمان دقت کنند (۲۶).

۶. نتیجه‌گیری

روش FLASH-PCR نسبت به روش کشت دارای حساسیت بالاتری بوده، ولی از ویژگی پایین‌تری نسبت به این روش کشت برخوردار است. به عبارت بهتر، مواردی که احتمالا به دلیل تعداد باکتری اندک در نمونه یا نقص در نمونه‌برداری، منفی می‌شوند، با این روش امکان مثبت‌شدن آن‌ها وجود دارد.

۷. تقدیر و تشکر

بدین‌وسیله از معاونت تحقیقات و فن‌آوری و مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی دانشگاه علوم پزشکی اراک به دلیل حمایت مالی و پشتیبانی تجهیزات تشکر به عمل می‌آید.

۸. سهم نویسندگان

تمامی نویسندگان معیارهای استاندارد نویسندگی بر اساس پیشنهادات کمیته بین المللی ناشران مجلات پزشکی را دارا بودند.

۹. تضاد منافع

بدین‌وسیله نویسندگان تصریح می‌نمایند که هیچ‌گونه تضاد منافعی در خصوص پژوهش حاضر وجود ندارد.

References

1. Bannalikar A.S., Rishendra V. Detection of Mycobacterium avium &Mycobacterium tuberculosis from human sputum cultures by PCR-RFLP analysis of hsp65 gene & pncA PCR. Indian journal of Medical Research. 2006; (123): 165-172.
2. Mohamed A.M., Abou El-Ella G.A., Nasr E.A. Phenotypic and Molecular typing of tuberculous and nontuberculous Mycobacterium species from slaughtered pigs in Egypt. Journal of Veterinary Diagnosis Investigation. 2009; (21): 48-52.
3. Aragon, Lina Marcela, et al. "Rapid detection of specific gene mutations associated with isoniazid or rifampicin resistance in Mycobacterium tuberculosis clinical isolates using non-fluorescent low-density DNA microarrays." Journal of Antimicrobial Chemotherapy 57.5. 2006; 825-831.
4. Watterson SA, Wilson SM, Yates MD, Drobniewski FA. Comparison of three molecular assays for rapid detection of rifampin resistance in Mycobacterium tuberculosis. J Clin Microbiol. 1998; 36: 1969-1973.
5. Musial CE, Tice LS, Stockman L, Roberts GD. Identification of mycobacteria from culture by using the Gen-Probe Rapid Diagnostic system for Mycobacterium avium complex and Mycobacterium tuberculosis complex. J Clin Microbiol. 1988; 26: 2120-2123.
6. Raviglione MC, O'Brien RJ. Tuberculosis. In: Kasper F, Hauser F, editors. Harrison's principlesof internal medicine. New York: MacGraw-Hill. 2012; 1340-1385.
7. Maurya V, Vijayan VK, Shah A. Smoking and tuberculosis: an association overlooked. Int J Tuberc Lung Dis. 2002; 6: 942-51.
8. Sekiguchi J, Miyoshi-Akiyama T, Augustynowicz Kopeć E, Zwolska Z, Kirikae F, Toyota E. Detection of multidrug resistance in Mycobacterium tuberculosis. J Clin Microbiol. 2007; 45: 179-192.
9. Dalovisio JR, Montenegro-James S, Kemmerly SA, Genre CF, Chambers R, Greer D, et al. Comparison of the Amplified Mycobacterium tuberculosis (MTB) Direct Test, Amplicor MTB PCR, and IS6110-PCR for detection of MTB in respiratory Specimens. Clin Infect Dis. 1996; 23: 1099-106.
10. Mäkinen J, Marttila HJ, Marjamäki M, Viljanen MK, Soini H. Comparison of Two Commercially Available DNA Line Probe Assays for detection of multidrug-Resistant Mycobacterium tuberculosis. J Clin Microbiol. 2006; 44: 350-352.
11. Negi SS, Basir SF, Gupta S, Pasha ST, Khare S, Lal S. Comparative study of PCR, smear examination and culture for diagnosis of cutaneous tuberculosis. J Commun Dis. 2005; 37: 83-92.
12. Negi S, Gupta S, Khare S, Lal S. Comparison of various microbiological tests including polymerase chain reaction for the diagnosis of osteoarticular tuberculosis. Indian J Med Microbiol. 2005; 23: 245-248.
13. National Technical Committee on TB. TB Country Guide. 3rd ed. Tehran: Disease Management Center, Ministry ofHealth and Medical Education. 1381; 5.
14. Eshghinejad, FA, Farazi A, Eshrati B, Khalili H, Shojapour M, Ahmadi A and Arjomandzadegan M. Detection of Major Genetic Groups of Mycobacterium tuberculosis isolated from tuberculosis patients in Markazi province by polymorphism determination in kat G and gyr A genes. AMUJ. 2012; 26-34.
15. Ryazantsev D, Abramova S, Evstratova S, Gagkaeva T, Zavriev S. FLASH-PCR diagnostics of toxigenic fungi of the genus & lt; i & gt; Fusarium & lt;/i & gt. Bioorg Khim. 2008; 34: 716-24.
16. Abd-Elsalam K, Bahkali AH, Moslem M, De Wit PJGM Verreet J-A. Detection of Mycosphaerella graminicola in Wheat Leaves by a microsatellite dinucleotide specific-primer. Int J Mol Sci. 2011; 12: 682-93.
17. Abramova S, Ryazantsev D, Voinova T, Zavriev S. Diagnostics of phytopathogen fungi; Septoria tritici and Stagonospora nodorum by fluorescent amplification-based specific hybridization (FLASH) PCR. Bioorg Khim. 2008; 34: 97-102.
18. Ryazantsev D, Zavriev S. An efficient diagnostic method for the identification of potato viral pathogens. Molecular Biology. 2009; 43: 515-23.
19. Noordhoek GT, Kolk AH, Bjune G, Catty D, Dale JW, Fine PE, et al. Sensitivity and

specificity of PCR for detection of Mycobacterium tuberculosis: a blind comparison study among seven laboratories. J Clin Microbiol. 1994; 32: 277-84.
20. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, vanSoolingen D, Kuijper S, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology. J Clin Microbiol. 1997; 35: 907-914
21. Hosseini MJ, Imani Fooladi AA. Miliary tuberculosis with empyema, a case report. Jundishapur J Microbiol. 2010; 3: 129-132.
22. Cave MD, Eisenach KD, Templeton G, Salfinger M, Mazurek G, Bates JH, et al. Stability of DNA fingerprint pattern produced with IS6110 in strains of Mycobacterium tuberculosis. J Clin Microbiol. 1994; 32: 262-266.
23. Ramaswamy S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in Mycobacterium tuberculosis: 1998 update. Tuber Lung Dis. 1998; 79: 3-29.
24. Von Mutius E, Pearce N, Beasley R, Cheng S, von Ehrenstein O, Björkstén B, Weiland S. International patterns of tuberculosis and the prevalence of symptoms of asthma, rhinitis, and eczema. Thorax. 2000; 55: 449-453.
25. Consolo VF, Albani CM, Berón CM, Salerno GL, Cordo CA. A conventional PCR technique to detect Septoria tritici in wheat seeds. Australasian Plant Pathology. Australasian Plant Pathology. 2009; 38: 222-7.
26. Banavaliker JN, Bhalotra B, Sharma DC, Goel MKKhandekar PS, Bose M. Identification of Mycobacterium tuberculosis by polymerase chain reaction in clinical specimens. Indian journal of tuberculosis. 1998; 45: 15-18.

JAMS
Journal of Arak University of Medical Sciences
2018; 21(4)
Journal Homepage: http://jams.arakmu.ac.ir

ORIGINAL RESEARCH

Comparison of Detection of Clinical Isolates of Mycobacterium Tuberculosis by Flash PCR and Conventional Culture Method

Ali Reza Morad Abadi[1], Mohammad Arjomandzadegan[2*], Navid Emami[3], Manijeh Kahbazi[4], Azam Ahmadi[3], Saeed Falahat[3], Seyyed Hossein Hosseini[3], Mehdi Kargaran[3], Parisa Khosravi[3]

1. Department of Hematology, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran.
2. Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, Infectious Diseases Research Center (IDRC), Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.
3. Infectious Diseases Research Center (IDRC), Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.
4. Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Infectious Diseases Research Center (IDRC), Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.

ARTICLE INFORMATION

Article history:
Received: *27 January 2018*
Accepted: *16 July 2018*
Published online: *23 July 2018*

Keywords:
Tuberculosis
Mycobacterium tuberculosis
Detection
Flash PCR
Culture method

**** Corresponding Author:***
Mohammad Arjomandzadegan; Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, Infectious Diseases Research Center (IDRC), Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.
Tel: *+98 918 860 2576*
Fax:
Email: *arjomandzadegan@arakmu.ac.ir*

ABSTRACT

Background and Aim: Ziehl Nelson staining, fluorescent and also culture are the standard methods for the diagnosis of tuberculosis. In this study, the performance of conventional cultivation methods was compared with Flash PCR.

Materials and Methods: A total of 56 sputum samples from patients with suspected tuberculosis in Tuberculosis Center of Arak city were collected and Ziehl–Neelsen and culture in Löwenstein–Jensen medium were accomplished. Moreover, DNA from all of the 56 sputum samples was extracted by Chelex100 method. Molecular evaluation was accomplished by Flash PCR kit containing probes and primers for gene amplification IS6110. Positive and negative controls together with samples were used in a MTC410 apparatus for amplification. FD-12 apparatus was used to evaluate the results. In addition, electrophoresis on agarose was used for confirmation of the results.

Findings: From 56 sputum samples of suspected TB patients, 20 samples were positive and 36 samples were negative on microscopic evaluation and culture methods. FLASH-PCR molecular analysis showed that all of 20 positive samples were positive in molecular methods, too. On the other hand, three of sputum samples that were negative by culture and staining were positive in FLASH-PCR method. One of these 3 patients, received Isoniazid, pyrazinamide and ethambutol antibiotic by responsible medicine. All results were confirmed using conventional electrophoresis.

Conclusion: In some negative samples, possibly because of the small number of bacteria in sample or a defect in the sampling, the Flash PCR may due good advantages. Therefore, due to the low cost, this method is recommended for routine use.

© Copyright (2018) Arak University of Medical Sciences

Cite this article as: Morad Abadi AR., Arjomandzadegan M., Emami N., et al. Comparison of Detection of Clinical Isolates of Mycobacterium Tuberculosis by Flash PCR and Conventional Culture Method. J Arak Uni Med Sci. 2018; 21(4): 77-85.

This open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution NonCommercial 4.0 License (CC BY-NC 4.0).