مجله علمی سازمان نظام پزشکی جمهوری اسلامی ایران، دوره ۲۵، شماره ۲، تابستان ۱۳۸٦: ۱۹۱-۱۷۸

● مقاله تحقیقی

شناسایی DNA مایکوپلاسماها در سرم بیماران آرتریت روماتویید به وسیله PCR

دکتر محمدحسن شاه‌حسینی [۱] *
دکتر فرهاد غریب‌دوست [۲]
الهه اللهیاری [۳]
دکتر حمیدرضا خرم‌خورشید [۴]
دکتر جلیل وندیوسفی [۵]

۱. دانشیار بیوتکنولوژی پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی
۲. استاد روماتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۳. کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی
٤. استادیار ژنتیک پزشکی، دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی
۵. دانشیار میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی

*نشانی نویسنده مسئول: تهران، بزرگراه آبشناسان، بلوار مبعث، بهارستان نهم، پلاک ١٤، طبقه ٤ غربی، تلفکس: ۲۲۰٦۰۲۰۷
پست الکترونیک: shahhosseiny@yahoo.com

چکیده

زمینه: مایکوپلاسماها به عنوان عامل آرتریت روماتویید (RA) در تعدادی از حیوانات شناخته شده‌اند. بر عکس، نقش مایکوپلاسماها در آرتریت روماتویید انسانی هنوز در هاله‌ای از ابهام بوده و قابل بحث می‌باشد. از تلاش‌های انجام شده با استفاده از به کارگیری روش‌های روتین برای تشخیص مایکوپلاسماها در RA، جهت ارتباط دادن عوامل مذکور به این بیماری نتایج مناسبی حاصل نشده است. اما پیشرفت‌های اخیر در تکنیک‌های مولکولی، به ویژه کاربرد واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، افق‌های روشنی را جهت تشخیص اسیدنوکلئیک مایکوپلاسما در این بیماری پیچیده، به وجود آورده است. جهت تحقیق بر روی این موضوع که آیا مایکوپلاسماها در ارتباط با پاتوژنز RA انسانی هستند، از تکنیک PCR برای تشخیص حضور احتمالی آنها استفاده شد.

روش کار: یک روش PCR خیلی حساس با طیف وسیع و با استفاده از پرایمرهای SHAH-GPO-3، MGSO و گونه‌های مایکوپلاسمای استاندارد و هدف ژنی ١٦ S rRNA طراحی گردید. این روش طراحی شده جهت شناسایی مایکوپلاسما در نمونه‌های Anti-CCP مثبت و منفی، کنترل‌های سالم و همین‌طور نمونه‌های RA تأیید شده بالینی، مورد استفاده واقع شد.

یافته‌ها: سکانس‌های مشترک و ثابت جنس مایکوپلاسما، در ۱۲ مورد از ۱۰۰ نمونه Anti CCP مثبت (۱۲٪)، ٤ مورد از ۱۰۰ نمونهAnti CCP منفی (٤٪)، ۱۰ مورد از ۹۱ نمونه بالینی مثبت (حدود ۱۱٪) و یک مورد از ۱۰۰ نمونه سرم کنترل سالم مورد آزمایش به وسیله PCR مخصوص جنس بهینه شده، از طریق تکثیر قطعه صحیح، تشخیص داده شد. با استفاده از پرایمرهای مخصوص جنس، ما قادریم عفونت ناشی از همه اعضاء جنس مایکوپلاسما در بیماران RA را آشکار نماییم.

نتیجه‌گیری: این نتایج مؤید ارتباط بین عفونت‌های مایکوپلاسمایی در حداقل تعدادی از بیماران آرتریت روماتویید می‌باشد. با این وجود، تحقیقات بیشتری جهت مشخص کردن نقش این ارگانیسم‌ها در پاتوژنز RA مورد نیاز است.

واژگان کلیدی: آرتریت روماتویید، پی‌سی‌آر، مایکوپلاسما، SPP

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸٦/۲/٦ تاریخ اصلاح نهایی: ۱۳۸٦/٤/۲ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸٦/۳/۲۳

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

مایکوپلاسماها کوچکترین باکتری‌های خودتکثیر پلئومورف، با قطری حدود ۵۰۰-۲۰۰ نانومتر و فاقد دیواره سلولی هستند. به دلیل اندازه کوچک و ویژگی انعطافی، این باکتری‌ها از سوراخ‌های فیلترهای باکتریولوژیک به سادگی عبور کرده و از این طریق باعث آلودگی می‌گردند. این ارگانیسم‌های منحصر بفرد در طبیعت، عامل بیماری در طیف وسیعی از جانداران و از جمله انسان هستند [۲-۱].

مایکوپلاسماها اغلب در سطوح خارجی سلول‌های میزبان یافت می‌شوند؛ اما برخی از آنها به بافت‌ها و سلول‌های میزبان هجوم آورده و در داخل آنها تکثیر می‌نمایند. این میکروارگانیسم‌ها طیفی از آثار و پیامدها را بر روی بافت‌ها و سلول‌های میزبان تولید می‌نمایند. در کنار تأثیر بر روی رشد سلول و مورفولوژی، مایکوپلاسماها قادرند اعمال بیوشیمیایی، ایمونولوژیک و متابولیک سلول‌های میزبان را تحت تأثیر قرار دهند [۳، ۴]. به طور معمول این دسته از باکتری‌ها در حفره دهانی و دستگاه گوارش به طور همزیست یافت می‌شوند. پیش‌تر مایکوپلاسماها را با پتانسیل کم بیماری‌زایی، در نظر می‌گرفتند. این باکتری‌ها پس از ورود به جریان خون، از این طریق در ارگان‌های مهم وارد و متمرکز می‌گردند. با این وجود برخی گونه‌ها مانند مایکوپلاسما پنترانس، مایکوپلاسما فرمنتانس و مایکوپلاسما پیروم، می‌توانند وارد برخی بافت‌ها و سلول‌ها شده و موجب بیماری‌های حاد و مزمن با طیف وسیعی از علائم و نشانه ها شوند [۵، ۶]. نشان‌داده شده است مایکوپلاسماها دارای ارتباط پیچیده‌ای با سیستم ایمنی می‌باشند. این باکتری‌ها به طرق مختلف از معرض سیستم ایمنی مخفی شده و با دیگر عوامل عفونی دارای سینرژیسم هستند [۵، ۷، ۸]. در سال ۱۹۹۷ دانشمندی بنام هافمن، شواهدی سرولوژیک از عفونت‌های مایکوپلاسمایی فعال و غیرفعال در بیماران با آرتریت روماتویید و RA جوانی یافت؛ اما در مایع سینوویال این بیماران هیچ DNA مایکوپلاسمایی با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز PCR یافت نشد [۹].

آرتریت روماتویید، یکی از معمول‌ترین بیماری‌های اتوایمیون است که قریب به یک درصد جمعیت دنیا از آن متأثر می‌باشند. این بیماری با التهاب غشاء سینوویال که به طور متقارن از مفاصل کوچک به بزرگ پخش می‌شود، مشخص می‌گردد. نشانه اولیه بیماری شامل التهاب دردناک مفاصل انگشتان با سفتی یا خشکی صبحگاهی است. تشخیص سریع یا زود هنگام و درمان سریع، موجب کنترل بیماری می‌گردد. معمول‌ترین تست سرولوژیک جهت تشخیص این بیماری، مشخص کردن فاکتور روماتویید (RF) است. فاکتور روماتویید، آنتی‌بادی از کلاس IgM است که با گاماگلوبولین واکنش داده و در ۸۰٪-۶۰ بیماران مبتلا به آرتریت روماتویید دیده می‌شود. RF حساس بوده اما یک فاکتور ویژه برای آرتریت روماتویید نیست چرا که در افراد سالم و در بیماران با عفونت‌های مختلف یا دیگر بیماری‌های اتوایمیون (مانند لوپوس اریتماتوزسیستمیک، سندرم شوگرن، اسکلرودرما و...) هم دیده شده است [۱۰].

همچنین حدود ۶۰-۴۰ درصد بیماران مبتلاء به آرتریت روماتویید اتوآنتی‌بادی بر علیه Epidermal filaggerin (کراتین RA، فاکتور آنتی‌پری نوکلئر) در سرمشان ایجاد می‌شود. فیلاگرین یک پروتئین پوستی است که موجب اتصال فیلامنت‌های کراتین به یکدیگر می‌شود. اتو آنتی‌بادی‌های تولید شده بر علیه فیلاگرین به وسیله تست ایمونوفلورسانس غیرمستقیم مشخص شده است. در سال‌های اخیر نشان داده شده است که آمینواسید نادر سیترولین که در فیلاگرین وجود دارد، یکی از اجزاء اندک اپی‌توپهای آنتی‌ژنیک است. تست ELISA با استفاده از پپتید سنتزی سیترولینه شده به عنوان آنتی‌ژن هدف، یک تست جایگزین مفید بجای ایمونوفلورسانس غیرمستقیم است. یک مطالعه مستقیم نشان داد که در صورت استفاده از پپتید سیترولینه سیکلیک Cyclic-Citrullinated-Peptide بجای

Archive of SID

www.SID.ir

پپتید سیترولینه خطی به عنوان سوبسترای تست الایزا حساسیت از ۴۹٪ به ۶۸٪ افزایش خواهد یافت. تعیین آنتی‌بادی بر علیه CCP، در حال حاضر به عنوان یک مشخصه به شدت ویژه و جدید برای آرتریت روماتویید مطرح است. آنتی‌بادی تولیدی بر علیه CCP به طور واضح از کلاس IgG بوده و دارای ویژگی ۹۷٪ برای آرتریت روماتویید می‌باشد. این آنتی‌بادی در مراحل اولیه بیماری تولید و دارای ارزش پیشگویی بالایی است. مشاهده‌شده بیماران با Anti-CCP مثبت دارای آسیب‌های بیشتری نسبت به RF هستند (برای Anti-CCP نودوهفت درصد و برای RF شصت و سه درصد). این آنتی‌بادی در مراحل اولیه بیماری در ۷۹٪ بیماران قابل آشکارشدن است [۱۱، ۱۲].

روش‌های تشخیص مایکوپلاسماها را می‌توان به دو دسته ۱- روش‌های بر پایه کشت و ۲- روش‌های غیرکشتی که از جهت سرعت، قابلیت اعتماد، ویژگی و حساسیت تفاوت‌هایی چند با هم دارند، تقسیم‌بندی نمود [۱۵-۱۳]. روش‌های برپایه کشت، تکنیک‌هایی وقت‌گیر (چندین هفته) با حساسیت نسبتاً پایین و نیازمند امکانات و همین‌طور تجربه کافی جهت تفسیر نتایج می‌باشند. برخی از مایکوپلاسماها هم مانند مایکوپلاسما هیورینیس[1] به سختی در محیط کشت رشد می‌کنند. روش‌های غیرکشتی شامل ۱- غربالگری آدنوزین فسفوریلاز (Adop) ۲- تکنیک نشانگر کشت سلول ۳- رنگ‌آمیزی DNA با رنگ‌های فلوروکروم ۴- دو رگه‌سازی اسیدنوکلئیک و ۵- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز یا PCR می‌باشد [۱۶]. روش‌های بیوشیمیایی مانند آدنوزین فسفوریلاز فاقد ویژگی هستند چرا که برخی باکتری‌ها مانند باسیلوس سوبتیلیس، اشریشیا کلی، سالمونلا تیفی موریوم، نوکلئوزید فسفوریلاز را تولید کرده و در ضمن برخی گونه‌های مایکوپلاسما، مانند مایکوپلاسما پنومونیه FH، مایکوپلاسما پیروم، مایکوپلاسما لیپوفیلوم در عمل چیزی تولید نمی‌کنند. روش‌های بر پایه تلقیح به کشت‌های سلولی فاقد مایکوپلاسما و حاوی اندیکاتور هم، به دلیل سه پاساژ و تکنیک نهایی تشخیصی (برای مثال رنگ‌آمیزی DNA با رنگ‌های فلوئورسنت مانند ′ ۴، ۶-دی آمیدینو-۲-فنیل ایندول دی‌هیدروکلراید یا بیس‌بنزایمیدازول فلوروکروم هوخست ۳۳۲۵۸، یا سنجش‌های بر پایه الایزا با آنتی‌بادی‌های ویژه) وقت‌گیر می‌باشند. روش‌های بر پایه رنگ‌آمیزی و دو رگه‌سازی هم دارای حساسیت کم و ویژگی پایین هستند. بنابراین اکثریت روش‌های در دسترس شناسایی مایکوپلاسماها، جهت شناسایی همزمان اکثریت وسیع گونه‌های مایکوپلاسمایی مناسب نیستند [۱۴]. جهت غلبه بر این مشکلات، روش‌های تکثیر اسیدنوکلئیک مانند PCR، در دهه اخیر توسعه فراوانی یافته است. روش‌های بر پایه PCR به دلیل داشتن حساسیت، ویژگی و دقت بیشتر، روش‌هایی مناسب جهت تشخیص طیف وسیعی از مایکوپلاسماها هستند [۲۱-۱۵]. ثابت شده است که روش‌های بر پایه تکثیر، برای شناسایی برخی قطعات خاص DNA ژنوم مایکوپلاسما، دارای سرعت و ویژگی می‌باشند. با این وجود، میزان حساسیت این تکنیک تا حد زیادی به ۱- روش استخراج DNA ۲- ژن هدف ۳- پرایمرهای طراحی شده ۴- روش شناسایی محصول ۵- نوع نمونه و بسیاری فاکتورهای دیگر بستگی دارد. پرایمرهای طراحی شده معمولاً جهت بخش‌های مشترک ژن 16 S rRNA، یا بخش‌های 16 S -23S rRNA [۲۴-۲۲] و یا هدف‌های دیگر طراحی شده‌اند. سکانس ژن‌های rRNA تعداد زیادی از گونه‌های مایکوپلاسما، تعیین ترادف شده است. مطالعات فیلوژنتیک سیستماتیک این ارگانیسم‌ها و همین‌طور بررسی‌های کامپیوتری مقایسه‌ای این ترادف‌های ریبوزومی، مؤید بخش‌های به شدت ثابت و مشترک در همه انواع مایکوپلاسماهایی است که جهت طراحی پرایمرهای PCR مناسب به کار می‌روند. با استفاده از تکنیک PCR دقیق‌تر می‌توان حضور مایکوپلاسماها را در

1 - M. hyorhinis

Archive of SID
www.SID.ir

مایع سینوویال بیماران آرتریت روماتویید تحقیق نمود.

در این مطالعه ما فرض کرده‌ایم که عفونت‌های مزمن مایکوپلاسمایی احتمالاً در ارتباط با آسیب‌زایی آرتریت روماتویید می‌باشند. البته بیماران RA با توجه به حساسیت و ویژگی بالای آزمون Anti-CCP، از طریق این آزمون انتخاب شده‌اند. با استفاده از پرایمرهای مخصوص جنس مایکوپلاسما که بر مبنای سکانس‌های ثابت و مشترک زیر واحد 16S rRNA طراحی شده است، حضور مایکوپلاسما در سرم بیماران انتخاب شده، تحقیق گردید.

روش کار

سویه‌های باکتریایی: در این مطالعه گونه‌های متعلق به مولیکوتس به کار رفته عبارت بودند از: مایکوپلاسما پنومونیه (NCTC ۱۰۱۱۹)، مایکوپلاسما آرجینینی، مایکوپلاسما هیورینیس، مایکوپلاسما ارال، مایکوپلاسما سینوویه، مایکوپلاسما گالیناروم (رازی ۱۳۵۰ و ۱۳۴۶)، مایکوپلاسما گالیسپتیکوم (رازی ۱۳۵۵)، مایکوپلاسما اویاپنومونیه (رازی ۱۳۶۴)، مایکوپلاسما آگالاکتیا (رازی ۱۳۴۳)، اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم (رازی ۱۳۶۹) و اکول‌پلاسما لیدلاوی. به علاوه میکروارگانیسم‌های استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس، استرپتوکوکوس پیوژنز، استرپتوکوکوس پنومونیه، باسیلوس سوبتیلیس، باسیلوس میکوییدس، کورینه باکتریوم sp، کلاستریدیوم sp، انتروکوکوس فکالیس، اشریشیا کلی، سالمونلا sp، شیگلا sp، پروتئوس sp، هلیکوباکتر پیلوری، ساکارومیسس سرویزیه، آسپرژیلوس sp، کاندیدا آلبیکنس و همین‌طور سلول‌های انسانی و موشی از جهت آزمون ویژگی پرایمرهای مورد استفاده در PCR، مورد ارزیابی و آزمایش قرار گرفتند.

نمونه : سرم‌های Anti-CCP مثبت و منفی (از هر کدام ۱۰۰ نمونه) و صد سرم کنترل سالم و همین‌طور ۹۱ سرم افراد مبتلا به RA (تأیید شده از جهت بالینی) از آزمایشگاه مرکز تحقیقات روماتولوژی دانشگاه علوم پزشکی تهران، جمع‌آوری گردید. نمونه‌های مثبت با استفاده از کیت الایزای EUROIMMUN (انگلستان) از جهت آزمون Anti-CCP تأیید گردیدند.

استخراج DNA : از نمونه‌های سرم و همین‌طور گونه‌های باکتریایی مورد استفاده با به کارگیری کیت استخراج DNG-Plus (سیناژن)، DNA استخراج گردید. به طور خلاصه کشت مایکوپلاسما در مرحله انتهای فاز لگاریتمی برای ۳۰ دقیقه در g ۱۲/۰۰۰ سانتریفوژ شد (سویه‌های لیوفیلیزه در یک میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر استریل، حل شد و به طور مستقیم و بدون سانتریفوژ کردن وارد پروسه استخراج گردید). رسوب سلولی حاصل در ۱۰۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل، سوسپانسیون گردید. در مورد نمونه‌های سرم از ۱۰۰ میکرولیتر سرم استفاده شد. ۵۰۰ میکرولیتر ازمحلول DNG به لوله حاوی ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی و یا صد میکرولیتر سرم، اضافه و بلافاصله ورتکس گردید. لولهٔ حاوی سرم/سوسپانسیون و DNG یا Lysate، ۲۰ ثانیه شدیداً ورتکس گردید. به Lysate، ۳۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول اضافه و سپس ۱۰ بار لوله وارونه گردید. لوله سپس به مدت ۱۰ دقیقه در حرارت اتاق در دهزار دور در دقیقه سانتریفوژ و مایع‌رویی به آرامی و با وارونه کردن لوله، تخلیه شد. با استفاده از سمپلر، مایع باقیمانده بر روی رسوب نیز برداشته و به رسوب حاصل، ۱ میلی‌لیتر اتانل ۷۵ درجه اضافه و ۱۰ مرتبه با وارونه کردن لوله، به خوبی مخلوط شد. به مدت ۵ دقیقه در دهزار دور در دقیقه سانتریفوژ و مایع‌رویی تخلیه و مجدداً مرحله فوق تکرار گردید. مایع‌رویی تخلیه و با وارونه کردن لوله بر روی دستمال کاغذی، الکل‌های باقیمانده خارج و لوله حاوی رسوب به مدت ۵ دقیقه در حرارت ۶۵ درجه سانتی‌گراد، جهت خشک کردن DNA قرار داده شد. رسوب حاصل در مورد نمونه‌های سرم در ۳۰ و در مورد نمونه‌های باکتریایی در ۱۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه استریل یا جهت نگهداری

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱ - ترادف پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر DNA مایکوپلاسماها	
	Sequence(5'------3')
Forward Primer	SHAH-GPO-3, 5'-GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT-3'
Reverse Primer	MGSO, 5'-TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC-3'

طولانی در تریس ۱۰ mM با pH=۸ حل گردید. باتوجه به نوع روتور به کاررفته در اغلب سانتریفوژها مقداری از DNA،گاه تا میزان ۵۰ درصد به جدار دیواره لوله متصل باقی می‌ماند؛ لذا بهتر است تا ارتفاعی از دیواره لوله با استفاده از ۱۰۰ میکرولیتر حلال نهایی شسته شود. از سلول‌های انسانی و موشی هم به طریق فوق، DNA استخراج شد.

DNA ژنومیک باکتری‌های غیرمایکوپلاسمایی از طریق جوشاندن همراه با دترجنت غیریونی ترایتون ایکس ۱۰۰ (یک هزارم)، بدین طریق بدست آمد. یک کلنی از باکتری مورد نظر را در ۵۰ میکرولیتر از آب دو بار تقطیر استریل دیونیزه حاوی ترایتون ایکس ۱۰۰، سوسپانسیون کرده و ۵۰ میکرولیتر روغن معدنی استریل به آن اضافه شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای جوش، حرارت داده شد. بعد از سانتریفوژ در ۱۴/۰۰۰ g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ و سپس، ۴۰ میکرولیتر از مایع رویی رسوب و زیر روغن، به لوله جدید منتقل گردید. از این DNA در مراحل بعدی به عنوان الگو استفاده شد. DNA ژنومیک انسان نیز به وسیله کیت DNG Plus استخراج گردید.

۱۰ میکرولیتر از DNA به دست آمده با روش DNG، با استفاده از ۲ میکرولیتر بافر راهنما در ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز شد. هم چنین با استفاده از اسپکتروفتومتر میزان جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر و نسبت ۲۶۰به۲۸۰ آن نیز (خلوص آن ۱/۸ - ۱/۶) به دست آمد.

پرایمر و شرایط PCR : پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه، پرایمرهای مخصوص جنس GPO-3 و MGSO [۲۲، ۲۴] است که پرایمر جلویی یعنی GPO-3 آن در این مطالعه از طریق افزودن دو نوکلئوتید GT در '۵ آن تغییر پیدا کرد (جدول ۱).

۵ میکرولیتر از DNA ژنومیک حاصل درمیکس ۲۵ میکرولیتری PCR، با استفاده از پرایمرهای جلویی و عقبی مخصوص نواحی مشترک یا همسان rRNA S ۱۶، با غلظت نهایی ۰/۴ میکرومول (یک میکرولیتر از غلظت ده میلی‌مولار)، ۲/۵ میکرولیتر از بافر PCR (۱۰X) (سینژن)، ۱/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$ (از غلظت ۵۰mM (سینژن))، ۰/۲ میلی‌مولار مخلوط dNTP (۱۰mM) (سینژن) و با استفاده از ۲ واحد آنزیم(5µ/1uL) Taq، Taq DNA Polymerase (سینژن) و چرخه‌های حرارتی ۹۴ درجه سانتی‌گراد دودقیقه یک سیکل، ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، ۷۰ درجه سانتی‌گراد ۲۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۲۰ ثانیه وطی ۴۰ سیکل PCR و پلیمریزاسیون نهایی ۷ دقیقه، تکثیر یافتند. محصول PCR با سایز مورد نظر ۲۷۲ جفت باز، در کنار سایز مارکر و کنترل مثبت و منفی، برروی ژل آگاروز ۲ درصد و با استفاده از اتیدیوم بروماید ونور UV بررسی گردید.

ساخت کنترل مثبت از طریق PCR-CLONING : عمل کلون کردن قطعه ۲۷۲ جفت بازی با استفاده از کیت T/A Cloning کمپانی فرمنتانس و در وکتور pTZ57R این کیت، انجام گرفت. به طور خلاصه در ابتداً محصول PCR مورد نظر را روی ژل برده و پس از اطمینان از خالص بودن آن، مستقیماً برای عمل کلونینگ استفاده شد. سپس با استفاده از

Archive of SID
www.SID.ir

محیط C-medium این کیت، سلول‌های مستعد سویه DH5-alfa باکتری اشریشیاکلی آماده گردید. سپس عمل Ligation با استفاده از کیت مذکور انجام گرفت. مخلوط لایگیشن به مدت چهار ساعت در دمای اتاق (۲۲ درجه سانتی‌گراد) انکوبه شد. بعد طی پروتکل کیت، مرحله ترانسفورماسیون انجام گرفت. کلنی‌های سفید بر روی پلیت حاوی آمپی‌سیلین (۵۰ µg/ml) به علاوه مادهٔ X-Gal و IPTG انتخاب شدند. کلنی‌های سفید حاوی ژن مورد نظر می‌باشند. سپس به صورت راندوم ۱۰ عدد از کلنی‌های سفید انتخاب گردیده و کشت خطی بر روی پلیت LB agar واجد آمپی‌سیلین داده شد و مجدداً در ۳۷°C به صورت over night انکوبه گردید. پس از این مدت یک یا دو کلنی به تیوب‌های ۱/۵cc حاوی ۵۰ میکرولیتر آب دیونیزه اضافه شد. یک قطره روغن معدنی استریل نیز به آن افزوده و به شدت ورتکس گردید. سپس درب تیوب‌ها با پارافیلم بسته شد و ۱۵ دقیقه در حمام آب جوش قرارداده‌شدند تا غشاء باکتری‌ها پاره و پلاسمید خارج گردد. تیوب‌ها به مدت یک دقیقه در میکروسانتریفوژ با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردیده و سپس از مایع‌رویی برای PCR استفاده گردید. PCR با مواد و مقادیر ذکر شده قبلی انجام داده شد و محصول بر روی ژل آگارز۲٪ مشاهده گردید. تمامی کلنی‌ها واجد قطعه مورد نظر بوده، لذا دو عدد از آن ها به نام pSHA272-1 و pSHA272-2 به صورت راندوم انتخاب و با استفاده از روش لیزقلیایی، از آنها پلاسمید استخراج شد. در مرحلهٔ بعد PCR را با استفاده از پلاسمیدهای استخراج شده، انجام داده و محصول بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ بررسی گردید. از پلاسمیدهای حاصل به عنوان کنترل مثبت و همین‌طور جهت تعیین توالی، استفاده شد.

حساسیت و ویژگی: جهت بررسی حساسیت جفت پرایمرهای به کار رفته، از دو روش استفاده شد: ۱- تهیه رقت از سوسپانسیون مایکوپلاسما پنومونیه با واحد کلنی‌ساز (CFU) مشخص، استخراج DNA از رقت‌ها و انجام آزمون PCR ۲- رقیق‌سازی پلاسمید pSHA-272-1 و انجام PCR بر روی محلول‌های حاوی مقادیر مشخص از پلاسمید.

آزمون ویژگی هم با استفاده از تعداد زیادی از میکروارگانیسم‌ها مانند استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس، استرپتوکوکوس پیوژنز، استرپتوکوکوس پنومونیه، باسیلوس سوبتیلیس، باسیلوس میکویئدس، کورینه باکتریوم‌sp، کلاستریدیوم‌sp، انتروکوکوس فکالیس، اشریشیا کلی، سالمونلاsp، شیگلاsp، پروتئوس‌sp، هلیکوباکتر پیلوری و همین‌طور DNA سلول‌های یوکاریوت پست، رت و انسان انجام شد.

توالی‌یابی

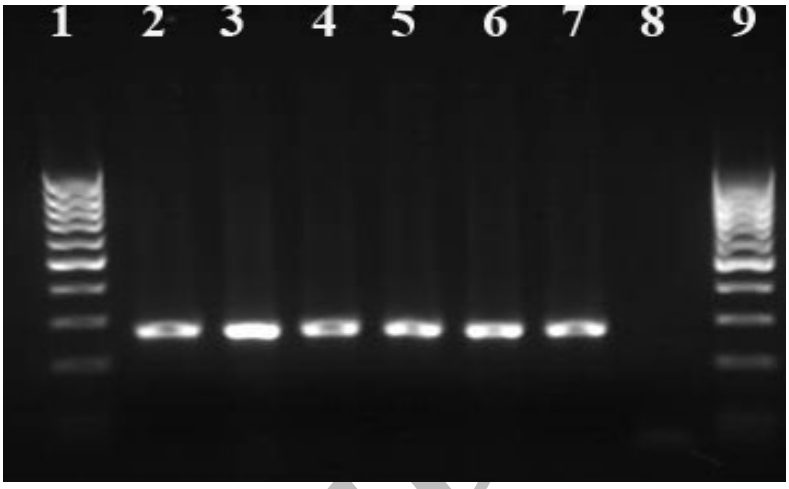
توالی DNA در جهت جلویی با استفاده از امکانات سکانس اتوماتیک ترمیناتور رنگی به روش ختم زنجیره Dideoxy-Chain Termination انجام و محصول، تأیید گردید.

نتایج

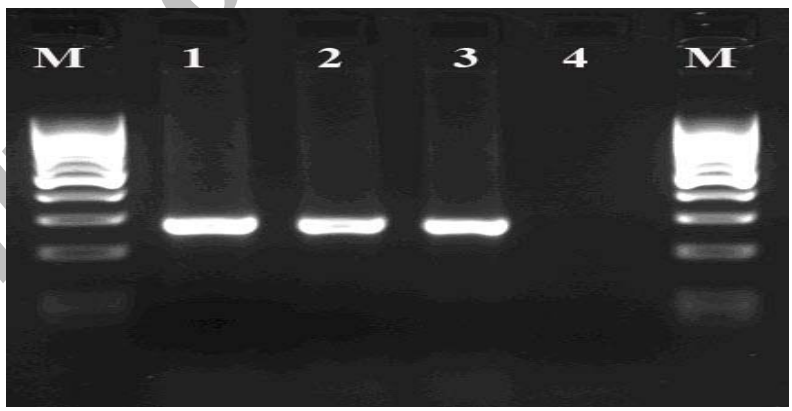
در این مطالعه سعی شد روشی مولکولی با حساسیت بالا جهت پی بردن به حضور مایکوپلاسما در نمونه سرم‌های Anti-CCP مثبت و منفی، کنترل‌های سالم و همین‌طور افراد مبتلا به RA، طراحی کنیم؛ لذا با تغییر دادن پرایمرهای GPO-3 و اضافه کردن دو باز در ابتدای آن و نزدیک کردن دمای چسبیدن پرایمر SHAH-GPO-3 به MGSO، حساسیت و در عین حال ویژگی آن را افزایش دادیم. همین‌طور با افزایش دمای چسبیدن پرایمرها به سکانس‌های مکمل (حدود C ۷۰°)، شرایط سختی را نیز بالا بردیم. سکانس ۱۶ S rRNA انواع و اقسام گونه‌های مایکوپلاسمایی را از GeneBank بدست آورده و پرایمرهای تغییر یافته را براساس این ترادف‌ها و شماره‌های دسترسی (Accession number)، بررسی نمودیم. بنابراین با تغییر پرایمر GPO-3 و طراحی SHAH-GPO-3 و با استفاده از DNAهای مایکوپلاسما پنومونیه، مایکوپلاسما سینوویه، مایکوپلاسما ارال،

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- آگاروز ژل الکتروفورز نتایج تکثیر PCR با استفاده از پرایمرهای SHAH-GPO-3 و MGSO : ستون ۱ و ۹- سایز مارکر DNA Ladder ۱۰۰ bp (فرمنتاس)، ستون ۲- مایکوپلاسما آرجینینی، ستون ۳- مایکوپلاسما هیورینیس، ستون ٤- مایکوپلاسما ارال، ستون ٥- مایکوپلاسما فرمنتاس، ستون ٦- اکولپلاسما لیدلاوی، ستون ۷- مایکوپلاسما پنومونیه، ستون ۸- کنترل منفی (آگاروز ۲٪ و بافر TBE 0.5X).



شکل ۲- نتایج PCR قطعه ۲۷۲ جفت بازی کلون شده و ساخت پلاسمیدهای pSHAH272-1 و pSHAH272-2 :

ستون M- سایز مارکر DNA Ladder ۱۰۰ bp (فرمنتاس)، ستون ۱- کنترل مثبت، ستون ۲ و ۳- پلاسمیدهای به ترتیب pSHAH272-1 و pSHAH272-2، ستون ٤- کنترل منفی (آگاروز ۲٪ و بافر TBE 0.5X).

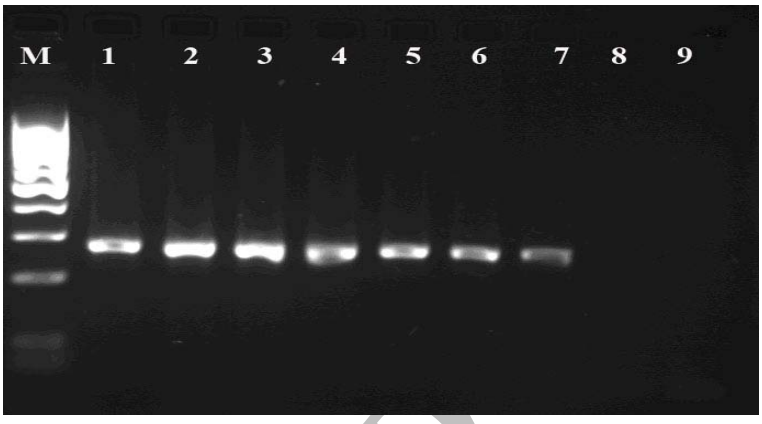
مایکوپلاسما آرجینینی، مایکوپلاسما هیورینیس، مایکوپلاسما گالیناروم، مایکوپلاسما گالی سپتیکوم، مایکوپلاسما اویاپنومونیه، مایکوپلاسما آگالاکتیا، اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم و اکول پلاسما لیدلاوی، تکنیک PCR را بهینه نمودیم. با تمام مایکوپلاسماهای مورد آزمایش، جفت پرایمر مورد استفاده منتج به محصول ۲۷۲ جفت بازی گردید (شکل ۱).

در این مطالعه سعی شد از روش استخراج DNA ساده و سریع استفاده شود؛ لذا از کیت DNG Plus استفاده گردید. بنابراین مرحله استخراج DNA این بررسی، روشی سریع و نسبتاً حساس است.

جهت بررسی و تأیید ویژگی سنجش PCR مخصوص گروه مایکوپلاسما، قطعه ۲۷۲ جفت بازی در پلاسمید pTZ57R و باکتری اشریشیا کلی DH5-alfa کلون و پلاسمیدهای pSHA272-1 و-pSHA272 2 ساخته شد (شکل ۲). از این پلاسمید حاوی اینسرت، به عنوان کنترل مثبت و همین‌طور جهت تعیین ترادف استفاده گردید. ترادف حاصل با سکانس‌های موجود از طریق برنامه BLAST،مطابقت داده شد و Identity حدود صددرصد به دست آمد. بنابراین نتایج تعیین ترادف ما با سکانس‌های موجود در بانک ژنی مطابقت داشت.

جهت ارزیابی حساسیت آزمون، از پلاسمید حاوی اینسرت با تعداد مشخص استفاده شد و بدین ترتیب از طریق رقت‌سازی پلاسمید حاوی اینسرت، حساسیت تست در حد ۱۰ کپی در نمونه مورد آزمایش به دست آمد. حساسیت از طریق رقیق‌سازی کشت مایکوپلاسما پنومونیه با واحد سازنده کلنی مشخص هم

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۳- آزمون حساسیت PCR بهینه شده با استفاده از نمونه‌های مشخص کلنی کانت شده (CFU مشخص):

ستون M – سایز مارکر bp DNA Ladder ۱۰۰ (فرمنتاس)، ستون ۱- کنترل مثبت، ستون ۲ الی ۸ حاوی نمونه‌های مشخص و به ترتیب ستون ۲ (۳۱۲۵۰ CFU)، ستون ۳- (CFU ٦٢٥٠)، ستون ٤- (١٢٥٠ CFU)، ستون ٥- (٢٥٠ CFU)، ستون ٦- (٥٠ CFU)، ستون ٧- (١٠ CFU)، ستون ٨- (٢ CFU)، ستون ٩- کنترل منفی (آگاروز ٢٪ و بافر TBE 0.5X).

انجام شد و نتایج مشابهی بدست آمد (شکل ۳).

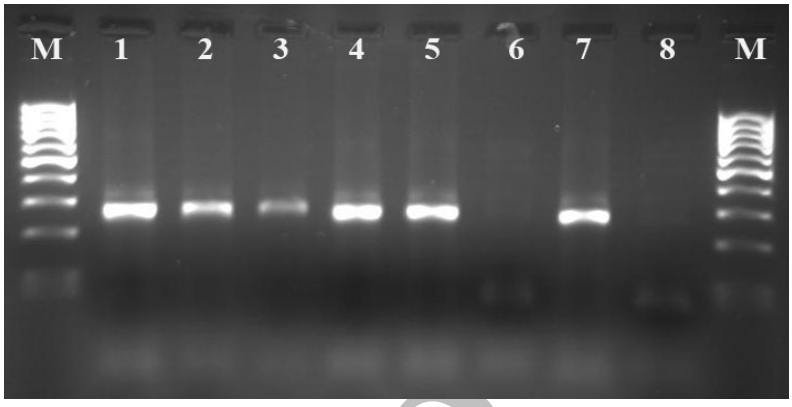
در آزمون ویژگی پرایمرهای SHAH-GPO3 و MGSO، هیچ محصول خواسته‌ای(۲۷۲ bp) با DNA باکتری‌های غیرمایکوپلاسمایی مانند میکروارگانیسم‌های استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس، استرپتوکوکوس پیوژنز، استرپتوکوکوس پنومونیه، باسیلوس سوبتیلیس، و باسیلوس میکوئیدس، کورینه باکتریوم sp، کلاستریدیوم sp، انتروکوکوس فکالیس، اشریشیا کلی، سالمونلا sp، شیگلا sp، پروتئوس sp، هلیکوباکترپیلوری، و همین‌طور DNA انسان و موش و یوکاریوتهای پست مانند ساکارومیسس سرویزیه، آسپرژیلوسsp، کاندیدا آلبیکنس، دیده نشد. در دمای چسبیدن C ° ۷۰، جفت پرایمر مورد بررسی، یک باند اختصاصی ۲۷۲ جفت باز با همه گونه‌های مایکوپلاسمایی مورد آزمایش و همین‌طور با همه گونه‌های مولیکوتس ایجاد نمود.

فقط یک بخش، یعنی نوکلئوتیدهای ما بین ۱۰۲۹ تا ۱۰۵۵ سکانس ۱۶ S rRNA مایکوپلاسماها پتانسیل و معیارهای مناسب جهت پرایمر مخصوص جنس را دارد. مطابقت این بخش با سکانس rRNA چندین میکروارگانیسم، کلروپلاست‌ها و همین‌طور یوکاریوت‌ها مؤید تعداد زیادی اتصال ناجور در قسمت '۵ این بخش (که مطابق انتهای '۳ پرایمر MGSO است) می‌باشد. اطلاعات بدست آمده از تطبیق این بخش با چندین میکروارگانیسم، شامل اعضای جنس‌های خویشاوند و منسوب با مایکوپلاسماها، یعنی استرپتوکوکوس، لاکتوباسیلوس، باسیلوس، کلاستریدیوم و اریزیپلوتریکس تأییدکننده این موضوع است که اختلافات زیادی ما بین آنها وجود دارد. همین‌طور تطبیق این بخش با گونه‌های متعدد موجود در مولیکوتس، موید هومولوژی و اختلافات کم، در حد یک یا دو نوکلئوتید و آن هم به طور غیرمتمرکز و دور از ناحیه '۳ پرایمر طراحی شده، می‌باشد. بنابراین اعضاء جنس مولیکوتس به وسیله کاربرد این پرایمر، تکثیر می‌گردند. در ضمن، این تطبیق‌ها بیانگر این موضوع هم هستند که پرایمر به کار رفته منحصر به جنس مایکوپلاسما نمی باشد و اعضاء جنس اوره آپلاسما، اسپیروپلاسما و اکول پلاسما نیز در استفاده از این پرایمرهای بخش S rRNA ۱۶، تکثیر می‌یابند. به دلیل این که فقط یک بخش مخصوص مایکوپلاسما تعیین هویت شد، لذا الیگونوکلئوتید Shah-GPO3 به عنوان پرایمر '۵، در جفت پرایمر مخصوص جنس، مورد استفاده واقع شد.

جهت تشخیص عفونت مایکوپلاسمایی در سرم افراد Anti-CCP مثبت، از پرایمرهای مخصوص جنس، استفاده نمودیم. سکانس 16S rRNA جنس مایکوپلاسما در ۱۲ مورد از ۱۰۰ نمونه Anti CCP مثبت (۱۲٪)، ۴ مورد از ۱۰۰ نمونهAnti CCP منفی (۴٪)، ۱۰ مورد از ۹۱ نمونه بالینی

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ٤- نتایج آگاروز ژل الکتروفورز نمونه‌های Anti-CCP مثبت با استفاده از پرایمرهای SHAH-GPO-3 و MGSO : ستون M – سایز مارکر bp DNA Ladder ۱۰۰ (فرمتاس)، ستون۱ – کنترل مثبت، ستون۲ الی ۵ و ۷ – نمونه‌های Anti-CCP مثبتی که PCR آنها مثبت شده است، ستون٦ – نمونه Anti-CCP مثبتی که PCR آن منفی شده است، ستون ۸ – کنترل منفی (آگاروز ۲٪ و بافر TBE 0.5X)



شکل ۵- نتایج آگاروز ژل الکتروفورز نمونه‌های کنترل سالم با استفاده از پرایمرهای SHAH-GPO-3 و MGSO: ستون M – سایز مارکر bp DNA Ladder ۱۰۰ (فرمتاس)، ستون۱– کنترل مثبت، ستون ۲ الی ۵– نمونه‌های کنترل سالم که PCR آنها منفی شده است، ستون٦– نمونه کنترل سالمی که PCR آن مثبت شده است، ستون ۷– کنترل منفی (آگاروز ۲٪ و بافر TBE X ۰/۵).

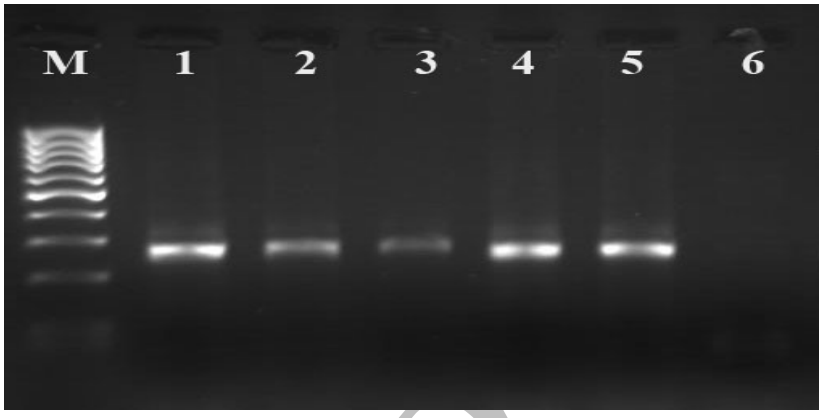
مثبت (حدود ۱۱٪) و یک مورد از ۱۰۰ نمونه سرم کنترل سالم مورد آزمایش به وسیله PCR مخصوص جنس بهینه شده، از طریق تکثیر قطعه صحیح، تشخیص داده شد (شکل ۶-۴). مقایسه بین بیماران آرتریت‌روماتویید تأیید شده بالینی با کنترل‌های سالم (با تست دقیق فیشر و P = ۰/۰۰۳) و همین‌طور نمونه‌های Anti-CCP مثبت با منفی(با تست دقیق فیشر و P = ۰/۰۳۸) و یا Anti-CCP مثبت با گروه کنترل‌های سالم (با تست دقیق فیشر و P = ۰/۰۰۲)، تفاوت معنی‌داری را از لحاظ آماری نشان داد. نتایج تکثیر در بیماران زن و مرد شبیه یکدیگر بود. در این مطالعه تنها از پرایمرهای مخصوص جنس مایکوپلاسما استفاده شد و پرایمرهای ویژه جهت گونه‌های شایع به کار نرفت.

بحث

اگر چه علت اصلی سندرم آرتریت‌روماتویید هنوز در هاله‌ای از ابهام است؛ اما عوامل عفونی معمولاً در ایجاد بیماری‌های خودایمنی دخالت دارند. شباهت‌های پاتولوژیک و کلینیکی قابل توجه مابین برخی عوامل عفونی در گونه‌های حیوانی و برخی بیماری‌های روماتیسمی انسانی مانند آرتریت روماتویید، روز به روز بیشتر تحقیق روی عوامل میکروبی مسبب این بیماری را، موجب گردیده است. لیست طویلی از میکروارگانیسم‌ها شامل باکتری‌های روده‌ای هوازی و بی‌هوازی، چندین ویروس و مایکوپلاسما، به عنوان عوامل دخیل در این بیماری فرض شده‌اند. اگر چه چند مطالعه آغازین بر روی عوامل عفونی مسبب، این ظن را تقویت نکرد؛ ولی مفهوم ماشه میکروبی برای RA بسیار جذاب می‌نمود. اخیراً شواهدی در افزایش نقش مایکوپلاسماها در ابتلا به آرتریت بدست آمده است [۵، ۷، ۸، ۲۵، ۲۶].

در این بررسی، DNA جنس

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ٦- نتایج آگاروز ژل الکتروفورز نمونه‌های آرتریت روماتویید بالینی مثبت با استفاده از پرایمرهای SHAH-GPO-3 و MGSO : ستون M – سایز مارکر bp DNA Ladder ۱۰۰ (فرمنتاس)، ستون۱- کنترل مثبت، ستون ۲ الی ۵- نمونه‌های PCR مثبت، ستون٦- کنترل منفی (آگاروز ۲٪ و بافر X ۰/۵ TBE).

مایکوپلاسما در تعدادی از سرم‌های Anti-CCP مثبت (این آزمون دارای ویژگی ۹۶٪ و حساسیت ۷۸٪ جهت آرتریت روماتویید است) شناسایی گردید. اگر چه تعداد نمونه ها در این مطالعه کافی اما زیاد نبود ولی با به کار بردن تست حساس PCR، موفق به شناسایی DNA مایکوپلاسما در حدود ۱۲٪ نمونه‌های Anti-CCP مثبت (نسبت به ۴٪ در نمونه‌های Anti-CCP منفی) و ۱۱٪ نمونه‌های آرتریت روماتویید بالینی (نسبت به ۱٪ کنترل‌های سالم) شدیم. این اعداد از لحاظ آماری کاملاً معنی‌دار می‌باشند. این اواخر مطالعات مشابهی بر روی مایع سینوویال، خون کامل و بافت مفصلی به روش‌های مختلف مولکولی، کشت و ایمونولوژیک انجام شده است [۲۹-۲۷]. در یک مطالعه جهت شناسایی عفونت مایکوپلاسمایی در بیماران مبتلا به آرتریت‌روماتویید، DNA جنس مایکوپلاسما در خون ۵۳/۶٪ بیماران مورد مطالعه، با استفاده از PCR و پرایمرهای مخصوص جنس ۱۶ S rRNA مشاهده گردید. البته در مطالعه‌ای از روش ساترن هیبریدیزاسیون جهت شناسایی محصول PCR استفاده شد که به مراتب حساس‌تر از روش آگاروز ژل الکتروفورزیس مورد استفاده در این مطالعه است [۵].

در این مطالعه سعی شده است یک سنجش PCR بر پایه پرایمرهای مخصوص گروه مایکوپلاسما و هدف ژنی ۱۶ S rRNA که مقاصد فوق را مهیا کند، توسعه داده شود. بر این مبنا با انتخاب سکانس‌های ۱۶ S rRNA تعداد زیادی مایکوپلاسما و صف‌بندی و تجزیه و تحلیل کامپیوتری با سکانس‌های دیگر پروکاریوتها، پرایمرهای Shah-GPO-3 و MGSO انتخاب شدند. تکثیر in-vitro به وسیله PCR و با استفاده از این جفت پرایمر، منتج به تکثیر سکانس اعضاء مولیکوت ذکر شده در بالا و عدم تکثیر هیچ نوع محصول با سایر پروکاریوت‌ها گردید و البته در این بررسی، مناسب بودن این پرایمرها جهت تشخیص مایکوپلاسما در نمونه‌های بالینی ثابت گردید. در عین حال نتایج سنجش PCR حاضر به وسیله تکنیک تعیین ترادف تأیید گردید. شرایط بهینه شده این مطالعه سبب تولید آمپلیکون اختصاصی با درجه بالایی از ویژگی و حساسیت و بدون هیچ محصول ناخواسته‌ای مانند مطالعه Dussurget، Van Kuppeveld و Haier [۵، ۲۲، ۳۰] گردید.

عفونت‌های مایکوپلاسمایی در بیماران با بیماری‌های التهابی مختلف، مانند اندوکاردیت [۳۱]، پریکاردیت [۳۲]، یا انسفالومیلیتیس [۳۳]، جایی که پدیده‌های ایمونولوژیک و اتوایمونولوژیک به صورت همراه وجود دارد، گزارش شده است. اگر چه اساس این عفونت‌ها خوب مشخص نشده، ولی روشن است که چندین گونه مایکوپلاسمای بیماری‌زا در ارتباط نزدیک با سطوح سلول‌های میزبان درآمده و از این طریق در ماشین ژنتیکی میزبان، رنگ و رویی فریبنده و سفسطه‌آمیز ایجاد می‌نمایند. عقیده بر این است این تغییر فنوتیپیک

Archive of SID

www.SID.ir

سطوح، نقش مهمی در برقراری و پایداری عفونت مایکوپلاسما، به واسطه توانایی طفره و گریز از سیستم ایمنی میزبان و همین‌طور تطبیق با تغییرات سریع شرایط زیستگاه‌های کوچک موجود در میزبان، بازی می‌نماید [۳۴]. در واکنش‌های غیراختصاصی ما بین مایکوپلاسماها و لنفوسیت B ، دلالت بر پاتوژنز بیماری و احتمالاً هدایت آن به واکنش‌های خود ایمن، نوسان ایمنی (modulation of immunity) و/یا پیشرفت و توسعه زخم در بیماری دارد [۳۵]. پتانسیل و نقش مایکوپلاسما در انواع مختلف بیماری‌های مفصلی، هنوز ناشناخته است، اما این عوامل، فاکتور یا کوفاکتور مهمی در ابتلا به این نوع بیماری‌ها هستند. بنابراین، ارتباط پیچیده ما بین عفونت‌های مایکوپلاسمایی و سیستم ایمنی میزبان، حداقل مسئول بخشی از پاتوژنز بیماری‌های التهابی روماتولوژیکی می‌باشد. برای مثال، بررسی‌ها نشان‌داده است مایکوپلاسما آرتریتیدیس [۳۶] در مدل‌های حیوانی موجب برانگیخته شدن آرتریت خودایمن می‌گردد. به علاوه، این گونه مایکوپلاسمایی موادی مانند رادیکال‌های اکسیژن و مواد تجمع‌کننده، ترشح می‌کند که روی گرانولوسیت‌های پلی‌مورف نوکلئر مؤثر بوده و عمل می‌کند. چندین مطالعه نشان‌داده است که عفونت‌های مایکوپلاسمایی منجر به افزایش میزان سیتوکین‌های پیش‌التهابی (Pro-infammatory cytokines)، مانند اینترلوکین ۱، ۲، ۴ و ۶ می‌گردند. بنابراین، مایکوپلاسما آرتریتیدیس و احتمالاً گونه‌های دیگر ممکن مسئول بخشی از پدیده خودایمنی در فازهای اولیه RA و پیشرفت آن باشند. پاسخ ایمنی ناقص یا نابجا (یا دیگر عفونت‌های در زیر قرار گرفته) برای توسعه و پیشرفت RA و دیگر بیماری‌های روماتیسمی، ممکن است ضروری باشد [۳۷].

بررسی نقش دیگر میکروارگانیسم‌ها به عنوان عامل و یا کوفاکتور در این نوع بیماری‌های مزمن هنوز تحت بررسی است. گزارش‌های مربوط به شناسایی ویروس ابشتین بار یا سایتومگالوویروس در نمونه‌های سینوویال هنوز مورد بحث و آنالیز است. به علاوه صحبت‌هایی هم از نقش رتروویروس‌ها و باکتری‌های انتروپاتوژنیک در RA شده است. تعیین هویت عفونت‌های مایکوپلاسمایی در بخش‌های بزرگی از زیرمجموعه لوکوسیت‌های خونی بیماران RA، این فرضیه که مایکوپلاسماها و احتمالاً دیگر عفونت‌های مزمن نقش مهمی به عنوان یک کوفاکتور مهم در ابتلاء به این بیماری دارد را پشتیبانی می‌نماید. البته تحقیقات بیشتری جهت تبیین نقش بالقوه مایکوپلاسماها در RA، در مقایسه با سایر فرم‌های آرتریت و بیماری‌های التهابی مزمن مورد نیاز است [۳۸، ۳۹].

اخیراً، مشخص شده است که آنتی‌بیوتیک مینوسیکلین داروی مؤثری بر روی درمان RA است. تتراسیکلین برای مدت‌های طولانی است که توسط روماتولوژیست‌ها به عنوان یکی از داروهای ضد RA استفاده می‌شود. دلیل این که چرا مینوسیکلین علائم و نشانه‌های کلینیکی RA را کم می‌کند، نامشخص است، اما پاسخ‌های برخی بیماران RA به مینوسیکلین شاید ناشی از حساسیت مایکوپلاسماها به تتراسیکلین باشد [۴۰].

مقایسه ما بین تکنیک PCR با کشت میکروبی، روش‌های رنگ‌آمیزی DNA با رنگ‌های فلوروکروم، و تکنیک هیبریدیزاسیون مؤید این موضوع است که PCR روشی حساس، سریع و کارآمد است. روش‌های کشت میکروبی مستلزم ۴-۱ هفته وقت در آزمایشگاه می‌باشند. به علاوه، می‌دانیم که هنوز برخی از سویه‌های مایکوپلاسما علی‌رغم پیشرفت‌های زیاد در کشت‌های میکروبی، غیرقابل رشد و یا به سختی و زحمت زیاد (مانند M. hyorhinis) رشد می‌نمایند [۴۱]. در مطالعات مشابه که از تکنیک کشت به همراه روش‌های دیگر مثل روش PCR استفاده شده، نشان‌داده شده‌است که تکنیک کشت دارای نتایج منفی کاذب زیادی می‌باشد.

مهم‌ترین عیب تکنیک رنگ‌آمیزی DNA با رنگ‌های فلوروکروم هم، مشکل تفسیر نتایج است. این اشکال از حضور باکتری‌های آلوده کننده یا اسیدنوکلئیک

Archive of SID
www.SID.ir

تجزیه شده که باعث ایجاد سیگنال فلوئورسانس خارج هسته‌ای گشته و بدین‌ترتیب حضور مایکوپلاسما را مخفی می‌دارد، ناشی می‌شود [۴۱].

تکنیک هیبریدیزاسیون (دورگه‌سازی) بر پایه همان اصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (یعنی شناسایی اسیدنوکلئیک ویژه) بنا نهاده شده است. اگر چه هر دو روش به طور نسبی سریع هستند، اما فرق‌هایی هم دارند. به طور مثال گاهی تفسیر نتایج هیبریدیزاسیون به دلایلی مشکل می‌شود؛ بدین معنی که گاهی افتراق بین سیگنال‌های مخصوص و سیگنال‌های غیرویژه، به دلیل حضور واکنش متقاطع ما بین باکتری‌های گرم مثبت مشکل می‌گردد [۴۲]. بنابراین، نتایج مثبت هیبریدیزاسیون، فقط زمانی مورد استناد است که کشت میکروبی، هیچ باکتری گرم مثبت دیگری را نشان ندهد. مزیت دیگر PCR حساسیت بالاتر آن نسبت به تکنیک‌های دو رگه‌سازی است. حساسیت روش هیبریدیزاسیون rRNA با DNA که حدود 10^3 تا 10^4 ارگانیسم می‌باشد، در مواردی مانع از تشخیص مایکوپلاسما در نمونه ها می‌گردد و بنابراین موارد فوق مبین برتری‌های تکنیک PCR نسبت به روش‌های کلاسیک، خصوصاً در مواردی است که تعداد عامل در نمونه کم می‌باشد.

علی‌رغم مراقبت‌های زیاد و فضاسازی مناسب جهت تکنیک‌های تکثیری همچون PCR، باز امکان آلودگی با DNA در سیستم تشخیص مولکولی وجود دارد که در نتیجه باعث مثبت‌های کاذب می‌گردد. البته تجربه نشان‌داده است که با اختصاص فضاها و تجهیزات مناسب در زونهای پیش‌بینی شده، این امکان به صفر نزدیک می‌گردد. لذا به‌کار بردن کنترل‌های مناسب (کنترل مثبت، منفی و یا نوعاً کنترل درونی) در مراحل مختلف استخراج DNA، تکثیر و مرحله تشخیص، کمک شایانی به کاهش آلودگی و نشان‌دادن آن می‌نماید [۲۱].

نتیجه گیری:

اگر چه هنوز اطلاعات کمی درباره نقش احتمالی مایکوپلاسماها در پاتوژنز بیماری‌های مزمن وجود دارد اما یافته‌های این بررسی حداقل نقش احتمالی این عوامل را به صورت یک فاکتور همراه یا عامل ثانویه تأیید می‌نماید. بنابراین، عفونت‌های مایکوپلاسمایی حداقل در بخشی از پاتوژنز RA، دخیل می‌باشد. به طور کلی می‌توان گفت روش‌های کلاسیک تشخیصی، به دلایل محدودیت‌های ذاتی (صرف وقت زیاد، حساسیت کم، نیاز به مهارت و تجربه زیاد و همین‌طور مراحل دشوار و پرزحمت) فاقد معیارهای یک روش ایده‌آل جهت شناسایی طیف وسیع مولیکوتها (مایکوپلاسماها) هستند. ولی روش‌های مولکولی همچون روش‌های تکثیر اسیدنوکلئیک در شرایط آزمایشگاه، به دلیل ویژگی‌های ذاتی، پتانسیل بالقوه و بالفعل، کاربرد فراوانی در تشخیص عواملی همچون مایکوپلاسماها دارند. نتایج این مطالعه به طور روشنی دلالت بر این نکته دارد که سنجش PCR بر مبنای سکانس‌های ثابت و مشترک موجود در ۱۶ S rRNA، یک تکنیک مفید، ارزشمند و قابل اعتماد با حساسیت، ویژگی، دقت و قابلیت اعتماد بالا جهت شناسایی مایکوپلاسماها در بیماری‌های مزمنی مانند آرتریت روماتویید می‌باشد.

سپاسگزاری

از خانم فاطمه اخلاقی، دکتر محسن لطفی و خانم سهیلا مرادی از موسسه رازی بخش مدیریت کنترل کیفی و میکروب‌شناسی برای در اختیار گذاشتن سوش‌های مایکوپلاسما، آقای دکتر کورش کمالی جهت مشاوره‌های آماری (دستیار تخصصی گروه اپیدمیولوژی و آمار زیستی دانشگاه علوم پزشکی تهران)، تشکر و قدردانی می‌نماییم.

Archive of SID

www.SID.ir

مراجع

1. *Maniloff J, Mcelhaney RN, Finch LR. Eds. Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis. 1st ed. Washington, DC: American Society of Microbiology. 1992: 1-10 .*
2. *Razin S. Molecular biology and genetics of mycoplasmas(mollicutes). Microbial Rev 1985; 49: 419-455*
3. *Razin S, Freundt EA. The Mycoplasmas. In:Krieg NR and Holt JG eds. Bergeys manual of systematic bacteriology. 9th ed. Baltimore: Williams and Wilkins; 1984: 740-793.*
4. *Baseman JB, Tully JG. Mycoplasmas: sophisticated, re-emerging, and burdened by their notoriety. Emerg Infect Dis 1997; 3: 21-32.*
5. *Haier J, Nasralla M, Franco AR, Nicolson GL. Detection of mycoplasmal infections in blood of patients with rheumatoid arthritis. Reumatology 1999; 38: 504-509.*
6. *Rawadi FA, Roman S, Gastredo M. Effects of Mycoplasma fermentans on the myelomonocytic lineage. J Immunol 1996; 156:670-680.*
7. *Johnson SM, Bruckner F, Collins D. Distribution of Mycoplasma pneumoniae and Mycoplasma salivarium in the synovial fluid of arthritis patients. J Clin Microbiol 2007; 45(3): 953-957.*
8. *Ramirez AS, Rosas A, Hernandez-Beriani JA. Relationship between rheumatoid arthritis and Mycoplasma pneumoniae: a case-control study. Rheumatology 2005; 44(7): 912-914.*
9. *Hoffman RW, O'sullivan FX, Schafermeyer KR. Mycoplasma infection and rheumatoid arthritis: analysis of their relationship using immunoblotting and an ultrasensitive polymerase chain reaction detection method. Arthritis Rheum 1997; 40: 1219-1228.*
10. *Visser H, et al. How to diagnose rheumatoid arthritis early. Arthritis Rheum 2002; 46: 357-365.*
11. *Quinn MA et al. Anti-CCP antibodies predict radiographic progression. Arthritis rheum 2001; 44(suppl. 9): Abstract 741.*
12. *Nogueira L. Performance of two ELIZAs for antifilaggrin autoantibodies, using either affinity purified or deiminated recombinant human filaggrin, in the diagnosis of rheumatoid arthritis. Ann rheum Dis 2001; 882-887.*
13. *Wang H, Kang F, Jelfs P, James G, and Gilbert GL. Simultaneous detection and identification of common cell culture contaminant and pathogenic mullicutes strain by reverse line blot hybridization. Appli Environ Microbiol 2004; 70(3): 1483-1486.*
14. *Sung H, Kang SH, Bae YJ, Hong JT, Chung YB, Lee CK, Song S. PCR-based detection of Mycoplasma species. J Microbiol 2006; 44(1): 42-49.*
15. *Stakenborg T, Vicca J, Verhelst R, Butaya P, Maes D, Naessens A, Claeys G, Ganck CD, Haesebrouck F, Vaneechoutte M. Evaluation of tRNA gene PCR for identification of Mollicutes. J Clin Microbiol 2005; 43(9): 4558-4566.*
16. *loens K, Uris D, Goossens H, Ieven M. Molecular diagnosis of Mycoplasma pneumoniae respiratory tract infections. J Clin Microbiol 2003; 41: 4915-4923.*
17. *Eldering JA, Felton C, Veillux A, Potts BJ. Development of a PCR method for Mycoplasma testing of chinese hamster ovary cell cultures used in the manufacture of recombinant therapeutic proteins. Biological 2004; 32(4): 183-193.*
18. *Uphoff CC, Drexler HG. Comparative PCR analysis for detection of Mycoplasma infections in continuous cell lines. In Vitro Cell Dev Biol Anim 2002; 38(2): 79-85.*
19. *Mardassi BB, Mohamad RB, Gueriri I, Boughattaas S, Mlik B. Duplex PCR to differentiate between Mycoplasma synoviae and Mycoplasma gallisepticum on the basis of conserved species-specific sequences of their hemagglutinin genes. J Clin Microbiol 2005; 43: 948-958.*
20. شاه‌حسینی محمدحسن. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز. چاپ اول. تهران: دانشگاه آزاد اسلامی. ۱۳۸٤ : ۱-۲۵.
21. شاه‌حسینی محمدحسن. مبانی تشخیص مولکولی. چاپ اول: تهران: دانشگاه آزاد اسلامی. ۱۳۸٤: ۹۳-۱۰۱.
22. *Van-kuppeveld FJ, Van-der-logt JT, Angulo AF, Van-Zoest MJ, Quint WG, Niesters HG, Galama JM, Melchers WJ. Genus- and species-specific identification of Mycoplasmas by 16S rRNA amplification. Appl Environ Microbiol 1992; 58: 2606-2615.*
23. *Rawadi G, Dussurget O. Advances in PCR-based detection of Mycoplasmas contaminating cell cultures. PCR methods Appl 1995; 4: 199-208.*
24. *Quirk JT, Kupinski JM, Dicioccio RA. Detection of Mycoplasma ribosomal DNA sequences in ovarian tumors by nested PCR. Gynecol Oncol 2001; 83: 560-562.*
25. *Horowitz S, Evinson B, Borer A, Horowitz J. Mycoplasma fermentans in rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides. J Rheumatol 2000; 27(12): 2747-53.*
26. *Hammond EE, Miller CA, Sneed L, Radcliffe RW. Mycoplasma-associated polyarthritis in a reticulated Giraffe. J Wildlife Dis 2003; 39(1): 233-237.*
27. *Schaeverbeke T, Gilory CB, Bebear C. Mycoplasma fermentans, but not M. penetrans, detected by PCR assays in synovium from patients with rheumatoid arthritis and other rheumatic disorders. J Clin Pathol 1996; 49: 824-8.*

Archive of SID
www.SID.ir

28. *Schaeverbeke T, Vernhes JP, Leqven L. Mycoplasmas and arthritides. Rev Rheum Eng Ed 1997; 64: 120-8.*
29. *Cimoli N, Malleson P, Thomas E, Middleton PJ. Mycoplasma pneumoniae associated arthropathy: confirmation of the association by determination of the antipolypaptide IgM response. J Rheumatol 1989; 16: 1150-2.*
30. *Dussurget O, Roulland-Dussoix D. Rapid, sensitive PCR-based detection of mycoplasmas in simulated samples of animal sera. Appl Environ Microbiol 1994; 60: 953-9.*
31. *Prattichizzo FA, Simonetti I, Galetta F. Carditis associated with Mycoplasma pneumoniae infection: Clinical aspects and therapeutic problems. Minerva Cardioangiol 1997; 45: 447-50.*
32. *O'Connor CM, Campbell PT, Van Trigt P, Corey GR. Mycoplasmal pericarditis: evidence of invasive disease. Clin Infect Dis 1993; 17(Suppl. 1) : S58-62.*
33. *Kumada S, Kusaka H, Okaniwa M, Kobayashi O, Kusunoki S. Encephalomyelitis subsequent to mycoplasma infection with elevated serum anti-Gal C antibody. Pediatr Neurol 1997; 16: 241-4.*
34. *Citti C, Rosengarten R. Mycoplasma genetic variation and its implication for pathogenesis. Wien Klin Wochenschr 1997; 109: 562-8.*
35. *Simecka JW, Ross SE, Cassell GH, Davis JK. Interactions of mycoplasmas with B cells: antibody production and nonspecific effects. Clin Infect Dis 1993; 17(Suppl. 1): S176-82.*
36. *Cole BC, Griffith MM. Triggering and Exacerbation of autoimmune arthritis by the Mycoplasma arthritidis superantigen MAM. Arthritis Rheum 1993; 36: 994-1002.*
37. *Kirchhoff H, Binder A, Runge M, Meier B, Jacobs R, Busche K. Pathogenic mechanisms in the Mycoplasma arthritidis polyarthritis of rats. Rheumatol Int 1989; 9: 193-6.*
38. *Takei M, Mitamura K, Fujiwara S, Horie T, Ryu J, Osaka S. Detection of Epstein-Barr virus-encoded small RNA 1 and latent membrane protein 1 in synovial lining cells from rheumatoid arthritis patients. Int Immunol 1997; 9: 739-43.*
39. *Aoki S, Yoshikawa K, Yokoyama T, Nonogaki T, Iwasaki S, Mitsui T. Role of enteric bacteria in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: evidence for antibodies to enterobacterial common antigens in rheumatoid sera and synovial fluids. Ann Rheum Dis 1996; 55: 363-9.*
40. *Tilley BC, alarcon GS, Heyse SP. Minocycline in rheumatoid arthritis. A 48-week, doubt-blind, placebo-controlled trial. MIRA Trial Group. Ann Intern Med 1995; 215: 81-9.*
41. *Bolske G. Survey of Mycoplasma infections in cell cultures and a comparison of detection methods. Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol Hyg 1988; A269: 331-340.*
42. *Johansson KE, Johansson I, Gobel UB. Evaluation of different hybridization procedures for the detection of Mycoplasma contamination in cell cultures. Mol Cell Probes 1990; 4: 33-42.*

Archive of SID

www.SID.ir