مقـاله مروری

روش های تشخیص مایکوباکتریوم های پاتوژن انسانی با نگرش مولکولی

مهدی رشـدی ملکی[1*]، مریم ضیـائی نافچی[2]

[1] استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ملکان، ملکان، ایران

[2] استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

* نشانی نویسنده مسئول:

استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ملکان، ملکان، ایران

نشانی الکترونیک:

me.roshdi@iau.ac.ir

چکیده

زمینه: جنس مایکوباکتریوم شامل بیش از ۱۶۰ گونه است،که برخی از آنها برای انسان بیماریزا هستند. انواع بیماری ها، از جمله بیماری های ریوی، عفونت های پوست و بافت نرم، لنفادنیت و بیماری های منتشره، توسط مایکوباکتریوم ها ایجاد می‌شوند. تشخیص دقیق گونه ها در درمان صحیح بیماری های ناشی از مایکوباکتریوم‌ها از اهمیت بالایی برخوردار است. متداول ترین روش های مورد استفاده برای تشخیص مایکوباکتریوم ها شامل علائم بالینی و آزمایش نمونه ها، روش های میکروسکوپی، سرولوژی، رادیولوژی، آزمون های بیوشیمیایی، کشت، تکنیک های برپایه تقویت اسیدهای نوکلئیک (NAATs) از جمله PCR، تکثیر و توالی یابی ژن ها و غیره می‌باشد. دراین مقاله مروری، پیشرفت‌های اخیر در آزمایش‌های مولکولی برای تشخیص سل و سایر بیماری های مایکوباکتریایی را با در نظر گرفتن حساسیت و ویژگی آنها مورد بررسی قرار می دهیم.

واژگان کلیدی: تشخیص، مایکوباکتریوم، روش های مولکولی

مقدمه

جنس مایکوباکتریوم شامل بیش از ۱۶۰ گونه است،که برخی از آنها برای انسان و حیوان بیماریزا یا بالقوه بیماریزا و برخی از آنها ساپروفیت هستند. این جنس به ۳ گروه اصلی شامل اعضای مجموعهٔ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (MTBC: Mycobacterium tuberculosis complex)، مایکوباکتریوم لپره (Mycobacterium Leprae) و مایکوباکتریوم های غیرتوبرکلوزی (NTM: nontuberculous mycobacteria) تقسیم می‌شوند. مهم‌ترین پاتوژن این جنس مجموعهٔ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس عامل بیماری سل است (۱). برآوردهای جهانی کنونی نشان می‌دهد که حدود یک سوم جمعیت جهان به MTB آلوده هستند و سالانه ۸/۸ میلیون نفر به این بیماری مبتلا می‌شوند. انواع بیماری ها، از جمله بیماری های ریوی، عفونت های پوست و بافت نرم، لنفادنیت و بیماری های منتشره توسط مایکوباکتریوم ها ایجاد می شوند. علاوه بر این، گزارش‌های فزاینده‌ای از عفونت‌های مایکوباکتریوم های غیر توبرکلوزی نه تنها در افراد دارای نقص سیستم ایمنی، بلکه در افراد دارای ایمنی سالم نیز وجود دارد. NTM ممکن است باعث عفونت بدون علامت و بیماری علامت دار در انسان ها شود. آنها بسیاری از نقاط بدن را آلوده می کنند اما در درجه اول باعث بیماری ریوی، لنفادنوپاتی گردنی و ضایعات موضعی پوست و بافت نرم می شوند (۲،۳).

طبقه بندی، مورفولوژی و اپیدمیولوژی

اعتقاد بر این است که مایکوباکتری ها از قدیمی ترین باکتری ها بر روی زمین هستند و در همه جا حضور دارند. مایکوباکتریوم ها، باکتری های میله ای شکل و باریکی هستند که گاهی اشکال رشته ای مانند میسیلیوم های قارچی از خود نشان می‌دهند. از اینرو نام «مایکوباکتریا» به معنی قارچ مانند (پیشوند لاتین «myco» هم به معنای قارچ و هم به معنای موم است. استفاده از آن در اینجا مربوط می شود به ترکیبات «مومی» در دیواره سلولی) باشد. همه اعضای این جنس هوازی بدون اسپور، غیر متحرک، فاقد کپسول و باکتری های تک سلولی هستند. شکل سلول از کوکوباسیل گرفته تا باسیل های دراز، تقریباً ۰/۸ — ۰/۲ میکرون عرض و ۱۰–۱ میکرون طول متفاوت است. مایکوباکتریوم ها به عنوان باکتری های گرم مثبت طبقه بندی می شوند اما اکثر آنها با رنگ آمیزی گرم به خوبی رنگ نمی گیرند. ویژگی منحصر به فرد مایکوباکتریوم ها اسید – فست بودن آنهاست. پایداری اسیدی اساساً به دلیل دیواره سلولی منحصر به فرد ضخیمی است که از لایه ای از لیپیدها، پپتیدوگلیکان ها و آرابینومانان ها تشکیل شده است (۴،۵). بسیاری از گونه های مایکوباکتریوم به راحتی با رشد روی سوبستراهای ساده سازگار می شوند و از آمونیاک یا اسیدهای آمینه به عنوان منبع ازت و گلیسرول به عنوان منبع کربن در حضور نمک های معدنی استفاده می‌کنند. میزان مطلوب (Optimum) دمای رشد با توجه به نوع گونه بسیار متفاوت بوده و از ۲۳ درجه سلسیوس تا بیش از ۵۰ درجه سلسیوس متغیر است. کشت برخی از گونه ها ممکن است دشوار باشد و از نظر نیازهای رشد سختگیر و مشکل پسند هستند. گاهی بیش از ۲ سال طول می کشد تا در محیط کشت رشد یابند. علاوه بر این، برخی از گونه ها چرخه های تولید مثل بسیار طولانی دارند. یک چرخه تقسیم برای M. leprae ممکن است بیش از ۲۰ روز طول بکشد (۶). در سال ۱۹۵۴ Timp و Runyon همه مایکوباکتری ها را بر اساس سرعت رشد، تولید یا عدم تولید رنگدانه، مورفولوژی کلنی و خصوصیات تست های بیوشیمیایی به چهار گروه طبقه بندی کردند. همچنین ارگانیسم هایی که درکمتر از ۷ روز در محیط های کشت جامد کلنی تشکیل میدهند به عنوان مایکوباکتریوم های با رشد سریع (RGM: rapidly growing mycobacteria) و آنهایی که در مدت زمان بیش از ۷ روز کلنی تشکیل میدهند به عنوان مایکوباکتریوم های با رشد آهسته (SGM: slowly growing mycobacteria) نامیده شدند (۷).

M.tuberculosis یک پاتوژن اجباری برای انسان‌ها است و به ندرت در سایر پستانداران شناسایی شده است. این باکتری از فردی به فرد دیگر منتقل می شود و هیچ مخزن زیست محیطی قابل توجهی ندارد. تعدادی از NTM های مهم بالینی در خاک، آب، حیوانات اهلی و وحشی، شیر و سایر مواد غذایی یافت می شوند. آنها ممکن است نمونه های بالینی را از محیط آلوده کنند یا به طور موقت در سطوح و بخش های بدن رشد کنند. به نظر می رسد اغلب عفونت های NTM از طریق استنشاق یا تلقیح ارگانیسم ها از مخزن طبیعی به دست می آیند. هیچ مدرک محکمی دال بر انتقال بیماری NTM از انسان به انسان یا حیوان به انسان وجود ندارد (۱۰–۸).

۲–۱– ویژگی های بالینی و بیماری‌زایی

۵ نوع اصلی بیماری های ناشی از مایکوباکتریوم وجود دارد که عبارتند از:

سل، عفونت های ریوی مشابه سل، عفونت های موضعی پوست و بافت نرم، درگیری موضعی غدد لنفاوی و بیماری منتشره.

سل (TB: Tuberculosis)

تظاهرات بالینی و نتیجه نهایی سل به حدت (Virulence) پاتوژن و ماهیت پاسخ ایمنی میزبان بستگی دارد. هنگامی که فردی هوای حاوی قطرات را استنشاق می کند، بیشتر قطرات بزرگتر در دستگاه تنفسی فوقانی (به عنوان مثال، بینی و گلو) قرار می گیرند، جایی که احتمال ایجاد عفونت بعید است. با این حال، هسته های قطرات ممکن است به کیسه های هوایی کوچک ریه (آلوئول‌ها) که در آن عفونت شروع می شود، برسد. هنگامی که ارگانیسم ها به ریه ها می رسند، چهار پیامد بالقوه وجود دارد: (i) پاسخ اولیه میزبان می تواند کاملا مؤثر باشد و همه ارگانیسم‌ها را از بین ببرد. در این حالت بیمار

بهبود یافته و هیچ شانسی برای ابتلا به سل ندارد. (ii) ارگانیسم می تواند بلافاصله پس از عفونت رشد و تکثیر کرده و باعث ایجاد بیماری بنام سل اولیه شود. (iii) باسیل ها ممکن است به حالت غیر فعال مانده و بیماری ایجاد نکنند. این حالت به عنوان عفونت نهفته شناخته می‌شود که تنها با تست پوستی توبرکولین مثبت نشان داده می شود. (IV) ممکن است ارگانیسم های نهفته دوباره فعال شده و باعث بروز بیماری پس از عفونت اولیه شوند. برخی از باسیل ها ممکن است بلافاصله در اثر فرآیند فاگوسیتوز از بین بروند. اگر باسیل‌ها بتوانند از دفاع اولیه جان سالم به در ببرند، در ماکروفاژهای آلوئولی تکثیر می‌شوند، تعداد کمی از باسیل‌ها وارد جریان خون شده و منتشر می‌شوند (۱۱). تکثیر داخل سلولی باسیل تنها با ایجاد ایمنی سلولی خاص متوقف می‌شود، که حدود ۶ تا ۸ هفته پس از عفونت تنظیم می‌شود. هنگامی که پاسخ ایمنی به نام ازدیاد حساسیت وابسته به سلول (cell-mediated hypersensitivity) ایجاد شد، سلول‌های T معمولاً به تست پوستی توبرکولین (تست PPD) پاسخ داده و یک سفتی و ضایعهٔ قرمز رنگ مشخصی در محل تزریق ایجاد می‌کنند. برخی از سیگنال‌های سلول T واکنش های التهابی ایجاد می‌کنند؛ سیگنال های دیگر سلول‌های تخصصی را برای کشتن باسیل‌ها و جداسازی ماکروفاژهای آلوده در کپسول های ریز و سخت به نام توبرکل‌ها (tubercles) جذب و فعالیت می‌کنند. یک توبرکل، از چند لنفوسیت کوچک و مجموعهٔ فشرده ای از ماکروفاژهای فعال تشکیل شده است که گاهی به سلول های اپیتلوئید (epitheloid) یا سلول های غول پیکر چند هسته ای (gi-ant cells) تمایز می‌یابند. فعال شدن انبوه ماکروفاژها که در داخل توبرکل‌ها اتفاق می افتد اغلب منجر به آزادسازی متمرکز آنزیم‌های لیتیک می‌شود (۴). این آنزیم‌ها سلول‌های سالم مجاور را از بین می‌برند و در نتیجه ناحیه‌ای دایره‌ای از بافت نکروزه ایجاد می‌کنند که در نهایت ضایعاتی با قوام پنیری تشکیل می‌دهند. هنگامی که این ضایعات موردی بهبود می‌یابند، کلسیفیه می‌شوند و در اشعه ایکس قابل مشاهده هستند، جایی که به آنها کمپلکس Ghon می‌گویند. برای اکثر افراد با عملکرد طبیعی ایمنی، به نظر می‌رسد عفونت اولیه با M.tuberculosis پس از ایجاد ایمنی سلولی متوقف می‌شود، اگرچه تعداد کمی از باسیل‌های زنده در گرانولوما ممکن است باقی بمانند. اگر ایمنی سلولی قادر به کنترل آن نباشد، عفونت فرد به سمت یک بیماری فعال به نام سل اولیه پیشرونده پیشرفت می‌کند (۱۲). افراد آلوده به MTB حدود ۱۰ درصد خطر ابتلا به این بیماری در طول زندگی را دارند. ۹۰ درصد باقیمانده آلوده خواهند ماند، اما تا پایان عمر خود عاری از بیماری خواهند بود (۱۳).

عفونت های ریوی شبیه سل

بیماری مزمن ریوی شایع ترین تظاهرات بالینی موضعی مایکوباکتریوم های غیرتوبرکلوزی (NTM) است. کمپلکس MTB شایع‌ترین پاتوژن ایجاد کننده بیماری ریه است و پس از آن M. avi-um complex (MAC), M.kansasii, M.abscessus, M. for-tuitum, M.szulgai, M.simiae, M.xenopy, M.malmoense M.celatum, M.asiaticum و M.shimodii نیز عفونت ریوی ایجاد می‌کنند. عفونت‌های تنفسی ناشی از NTM اغلب با شرایط مختلفی مانند بیماری مزمن انسدادی ریه (COPD)، فیبروز کیستیک ریه، برونشکتازی، آمفیزم ریه، سل ریوی از قبل درمان شده و سرطان ریه همراه است. سایر شرایط مستعدکننده عبارتند از: دیابت شیرین، لوسمی، لوپوس اریتماتوز سیستمیک (SLE)، الکلیسم مزمن، ایدز و بیماران پیوندی (۱۴،۱۵). تفسیر NTM در خلط بیماران HIV مثبت مشکل خاصی را ارائه می دهد، زیرا این بیماران اغلب بدون شواهدی از بیماری ریوی با NTM آلوده می شوند (۱۵،۱۶).

عفونت های موضعی پوست و بافت نرم

عفونت های پوستی و بافت نرم در بیماران دارای سیستم ایمنی در نتیجه تماس مستقیم با منابع آب آلوده از طریق تلقیح پس از ضربه تصادفی، جراحی و تزریق است. ضایعات پوست ممکن است در اثر تلقیح مایکوباکتریوم های فرصت طلب به خراش های سطحی ایجاد شود. چنین عفونت‌هایی معمولاً توسط M.marinum ایجاد می‌شوند و در استفاده کنندگان از استخرها و نگهبانان ماهی‌های استوایی رخ می‌دهند، از این رو به نام‌های «گرانولومای استخر» و «انگشت شیطون ماهی» نام‌گذاری شده‌اند. گونه‌های دیگری مانند M.kan-sasii, M.abscessus و M.chelonae باعث ایجاد ضایعات مشابه می‌شوند. عفونت‌های ناشی از M.ulcerans منجر به نکروز بافت زیر پوستی و زخم ثانویه پوست می‌شود. آبسه های مایکوباکتریایی پس از تزریق، معمولا به دلیل گونه های تند رشد M.fortuitum, M.ab-scessus و M.chelonae هستند (۱۹-۱۷).

این عفونت‌ها ممکن است به صورت تک گیر به عنوان مثال در افراد دیابتی، یا بصورت اپیدمی زمانی که چند نفر با یک دسته آلوده از یک واکسن یا دارو واکسینه یا درمان میشوند، رخ دهد (۲۰،۲۱). عفونت های مشابه در نتیجهٔ جراحات ناشی از اعمال جراحی توسط تند رشدها ایجاد می‌شود. شیوع جدی عفونت های استرنوم بدنبال جراحی قلب باز و همچنین موارد عفونت قرنیه توسط گونه‌های تند رشد گزارش شده است (۲۲). M.Haemophilium یک علت نادر ضایعات پوستی ندولر یا اولسراتیو و عفونت‌های گزارش شده در افراد دارای نقص سیستم ایمنی، به ویژه در دریافت کنندگان کلیوی بوده است (۲۴، ۱۷).

درگیری موضعی غدد لنفاوی

لنفادنوپاتی ناشی از NTM معمولاً گردنی، یک طرفه و خود محدود شونده است و بیشتر موارد در کودکان زیر ۵ سال رخ می‌دهد.

شایع ترین گونه های موجود در لنفادنیت در کودکان M.avium,

M.intracellulare, M.scrofulaceum, M.malmoense, M.kansasii, M.haemophilum و M.interjectum هستند. در بزرگسالان، عفونت ممکن است به عنوان بخشی از عفونت منتشره رخ دهد (۲۵).

بیماری های منتشره

این شکل از بیماری خارج ریوی شبیه به بیماری ناشی از کمپلکس MTB است. بنابراین، ضایعات منفرد یا چندگانه ممکن است در استخوان، دستگاه ادراری، سیستم عصبی مرکزی، غدد لنفاوی و پوست رخ دهد. در سایر موارد، عفونت شبیه سل منتشر شده با درگیری چند اندام است. در چنین مواردی شواهد بافت شناسی کمی از پاسخ ایمنی وجود دارد یا اصلاً وجود ندارد. در واقع، مغز استخوان ممکن است مملو از باسیل های اسید فست باشد در حالی که وقتی با روشهای معمول هماتولوژیک رنگ‌آمیزی می‌شود، طبیعی به نظر می رسد. چنین بیماری منتشره معمولاً همراه با نقص ایمنی مادرزادی یا اکتسابی که بر ایمنی سلولی تأثیر می گذارد، از جمله استفاده از (داروهای سرکوب‌کننده سیستم ایمنی به دنبال جراحی پیوند و ایدز رخ می‌دهد. بیشتر موارد بیماری منتشره به واسطهٔ کمپلکسM. avium (MAC یا M.chelonae است (۱۶،۲۵،۲۶).

تشخیص

به طور کلی تشخیص احتمالی عفونت مایکوباکتریایی بر اساس شرح حال بیمار، تظاهرات بالینی، یافته‌های رادیولوژیکی و حضور باسیل های اسید فست باسیل (AFB) در نمونهٔ بیمار است. متداول‌ترین روش های مورد استفاده برای تشخیص بیماری های مایکوباکتریایی در جدول ۱ فهرست شده اند. علائم بالینی و یافته های رادیولوژیک، اگرچه برای تشخیص اولیه مفید هستند، اما ممکن است همیشه پیش بینی کامل بیماری را ارائه نکنند. آزمایشات سرولوژیکی برای تشخیص سل اغلب بی نتیجه هستند. روش تشخیص میکروسکوپی اگرچه سریع، آسان و خاص بود. با این حال، فاقد حساسیت بوده و برای مثبت شدن به بیش از ۱۰۰۰۰ باسیل در هر میلی لیتر خلط نیاز هست. علاوه بر این، میکروسکوپ نمی تواند بین سلول‌های زنده و غیر زنده، بین گونه‌های مختلف مایکوباکتریوم و کمپلکس M.tuberculosis حساس یا مقاوم به دارو تمایز قائل شود (۲۷). تشخیص دقیق و سریع میکروبیولوژیکی سل و سایر عفونت های مایکوباکتریایی با جمع آوری مناسب نمونه و انتقال سریع نمونه به آزمایشگاه شروع می‌شود، زیرا برخی از آزمایشات، مانند اسمیر AFB و روش های تقویت اسید نوکلئیک (NAA: nucleic acid amplification) ظرف ۲۴ تا ۴۸ ساعت پس از دریافت نمونه می‌تواند قابل اعتماد باشد. در صورتی که پردازش نمونه‌ها به تأخیر بیفتد، نمونه ها بایستی به درستی در یخچال نگهداری شوند، زیرا NTM ها در طبیعت و در همه جا حاضر هستند و گاهی اوقات ممکن است به عنوان آلاینده های آزمایشگاهی جدا شوند (۱۴).

کشت (Culture)

جداسازی مایکوباکتریوم ها با استفاده از کشت، حساس بوده و به عنوان "گلد استاندارد" در نظر گرفته می‌شود و تخمین زده شده که در هر میلی لیتر از نمونه، ۱۰–۱۰۰ باسیل زنده را شناسایی کند (۲۸). مزیت دیگر کشت، این است که امکان شناسایی و آزمایش گونه های خاص را برای شناسایی الگوهای حساسیت دارویی فراهم می کند. با ظهور سل مقاوم به دارو، آزمایش های دقیق، سریع و مقرون به صرفه برای تشخیص MDR-TB (Multiple Drug Resistant-TB)

جدول ۱. متداول ترین روش های مورد استفاده برای تشخیص مایکوباکتریوم

روش	مزایا	معایب
علائم و نشانه های بالینی	سریع	اختصاصی نیست، قطعی نیست، همیشه وجود ندارد
رادیولوژی (اشعه ایکس، CT، MRI)	به راحتی در دسترس است	غیر مشخص و غیر قطعی
سرولوژی	سریع، مقرون به صرفه	حساس و غیر اختصاصی نیست
میکروسکوپی	سریع، مقرون به صرفه	حساسیت و ویژگی محدود
کشت مرسوم (بر پایه تخم مرغ/آگار)	مخصوص، مقرون به صرفه	زمان بر (۴ تا ۱۰ هفته)
کشت مایع خودکار	مخصوص	نیاز به ۲ الی ۳ هفته زمان – گران
سنجش هیبریداسیون پروب	سریع	گران قیمت، نیاز به تخصص فنی و برای همه گونه‌ها در دسترس نیست
PCR	سریع	گران قیمت، تخصص فنی و کنترل کیفیت در هر مرحله
تعیین توالی (سکانسینگ)	سریع – گلد استاندارد	گران

۱–۳–۱– تکنیک های فنوتیپی

و XDR-TB (Extensively Drug Resistant-TB) چالشی را برای فعالیت های کنترل سل ایجاد می کند. اکثر آزمایشگاه‌ها در منطقه بومی بیماری، برای کشت به محیط معمولی لونشتاین – جانسون (L.J Media) متکی هستند و از آزمون‌های بیوشیمیایی مختلف برای شناسایی مایکوباکتریوم‌ها استفاده می‌کنند. این روش‌ها پیچیده، پر زحمت و زمان‌بر هستند و در بسیاری از اوقات نمی‌توانند شناسایی دقیق را ارائه دهند. هدف تکنیک‌های فنوتیپی جدیدتر تشخیص سریع‌تر با استفاده از فعالیت‌های متابولیکی باکتری‌های در حال رشد است. تکنیک های پیشرفته خودکاری مبتنی بر کشت مایع (Bactec 460, MB/BacT, MGIT 960, ESP II, Versa TREK) می‌توانند تغییرات وابسته به رشد مانند تولید گاز CO_2 و یا مصرف O_2 توسط سلول‌های زنده را اندازه گیری کرده به تشخیص سریع بیماری کمک کنند. در این سیستم‌ها از محیط کشت میدلبروک مایع 7H9 غنی شده استفاده می‌شود. سیستم‌های کشت مایع، هنگامی که با پروب‌های DNA یا سنجش سل (Capilia TB assay) Capilia ترکیب می‌شود، برای شناسایی سریع گونه، قادر است در ۲ هفته برای اکثریت قریب به اتفاق نمونه های اسمیر خلط مثبت و در عرض ۳ هفته برای نمونه های اسمیر منفی نتایج مثبت ایجاد کند. Capilia TB یک روش ایمونوکروماتوگرافی ساده و سریع بر اساس تشخیص آنتی ژن MPB 64 است که به طور خاص توسط اعضای MTBC ترشح می‌شود (۱۱).

مایکوباکتریوفاژها

در این فناوری از مایکوباکتریوفاژها برای آلوده کردن MTB زنده و شناسایی باسیل‌ها با استفاده از روش تقویت فاژ (FASTPlaque TB™) یا تشخیص نور (تکنیک فاژ گزارشگر لوسیفراز) استفاده می‌شود. برای این منظور ژن لوسیفراز کرم شب‌تاب را وارد ژنوم مایکوباکتریوفاژ می‌کنند. در صورتیکه فاژ MTB را آلوده کند، باسیل زنده آنزیم لوسیفراز تولید میکند. محصول این آنزیم یک فوتون است که توسط لومینومتر یا فیلم مشخص می‌گردد. سنجش های مبتنی بر تقویت به صورت تجاری در دسترس هستند و دارای ویژگی ۹۹٪ – ۹۸/۷٪ و حساسیت ۷۰ الی ۷۵٪ در مقایسه با روش LJ معمولی هستند. به طور کلی، آزمایش‌های فاژی، ۲ تا ۳ روز زمان می‌برند و به زیرساخت آزمایشگاهی مشابه با زیرساخت مورد نیاز برای انجام کشت مایکوباکتریوم نیاز دارند (۳۱–۲۹).

کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)

HPLC بر اساس مشاهداتی است که هر گونهٔ مایکوباکتریوم مجموعه‌ای منحصر به فرد از اسیدهای مایکولیک، اسیدهای چرب α و β – هیدروکسی را که از اجزای دیواره سلولی هستند، سنتز می کنند. HPLC می تواند الگویی ایجاد کند که به طور قابل اعتمادی بیش از ۵۰ گونهٔ مایکوباکتریوم را شناسایی و متمایز کند. می‌توان آن را در چند ساعت از کشت های خالص انجام داد. هزینه تجهیزات اولیه برای HPLC در دسترس بودن آن را محدود می‌کند. با توجه به محدودیت‌های مختلف روش‌های فنوتیپی و HPLC در سال های اخیر، تکنیک های مولکولی به طور فزاینده ای توسعه یافته و بسیار محبوب هستند. زیرا سریع، قابل اعتماد و بسیار حساس بوده و می توانند به طور مستقیم برای تعداد زیادی از نمونه های بالینی استفاده شوند (۳۳،۳۴).

۲–۳–۱– تکنیک های بیولوژیکی مولکولی

روش‌های مولکولی مزایای متعددی نسبت به تکنیک‌های مبتنی بر کشت دارند و شامل زمان چرخش کوتاه‌تر، عدم نیاز به کشت ارگانیسم، امکان کاربرد مستقیم در نمونه‌های بالینی، خطرات زیستی کمتر و امکان سنجی بصورت خودکار است. تست‌های تقویت اسید نوکلئیک (NAA: nucleic acid amplification)، که به آن‌ها تست‌های تقویت مستقیم نیز گفته می‌شود، به عنوان کیت‌های تجاری در دسترس هستند و یا به طور گسترده در سنجش‌های داخلی استفاده می‌شوند.

سیستم جامع تجزیه و تحلیل زیستی (COBAS[1] Amplicor)

تست Amplicor MTB بر واکنش های زنجیره ای پلیمراز استاندارد (PCR) تکیه دارد. یک قطعه ۵۸۴ جفت بازی از ژن 16S rRNA که شامل یک ناحیه خاصی از یک گونه است، با استفاده از پرایمرهای بیوتینیله شده (biotinylated primers) تکثیر می‌شود. سپس با استفاده از دانه های مغناطیسی پوشیده شده با پروب های خاص امکان حذف سایر DNA ها با شستشو فراهم می شود. تشخیص محصول خاص تقویتی با افزودن یک مزدوج آویدین – آنزیم در معرض یک ماده کروموژنیک انجام می‌شود. در این سیستم برای کنترل آلودگی از یوراسیل -N- گلیکوزیلاز (UNG) در مستر میکس استفاده می کند.آنزیم یوراسیل -N- گلیکوزیلاز که قبل از تکثیر به نمونه ها اضافه می شود، می تواند به طور خاص محصولاتی را که قبلاً از طریق فرآیند PCR انجام شده اند، تخریب کند بدون آنکه آسیبی به DNA هدف برسد. بررسی متون علمی نشان میدهد، ویژگی این تست تایید شده توسط USFDA نزدیک به ۱۰۰٪ است. حساسیت آن از ۹۰ تا ۱۰۰٪ در نمونه های اسمیر مثبت و از ۵۰ تا ۹۵/۹٪ در نمونه های اسمیر منفی می‌باشد (۳۵،۳۶).

۱. Comprehensive Bio-Analytical System

سیستم BD ProbTec ET

سیستم BD ProbeTec ET از DNA پلیمراز و تقویت جابجایی رشته هم‌دما (SDA: strand displacement amplification) برای تولید کردن کپی‌های فراوانی از IS6110 به عنوان یک توالی الحاقی در MTB استفاده می‌کند. زمان چرخه از ۳/۵ تا ۴ ساعت است. مقالات، میزان حساسیت این سیستم را از ۹۸/۵٪ تا ۱۰۰٪ برای نمونه های اسمیر مثبت و برای نمونه های اسمیر منفی متغیر (۰/۳۳٪ – ۱۰۰٪) گزارش کرده‌اند (۳۸، ۳۷). سنجش‌های PCR داخلی عمدتاً در کشورهای در حال توسعه مورد استفاده قرار می‌گیرند، جایی که NAA تجاری گران است و در توالی‌های ژن هدف، پروتکل‌ها و روش‌های آزمایشگاهی متفاوت هستند. دقت تست PCR داخلی نسبت به کیت های تجاری ناهمگن‌تر می‌باشد (۳۹). تست‌های داخلی آزمایشگاهی PCR بسیار حساس (۹۶٪) و اختصاصیت آن (۹۷٪ تا ۱۰۰٪) است، با این حال، ارتباط آن با بیماری بالینی باید مورد بررسی قرار گیرد (۴۰،۴۱). شناسایی مولکولی مایکوباکتریوم هایی که ژن های مختلفی مانند IS6110، 16S rRNA، ژن پروتئین شوک حرارتی ۶۵ کیلو دالتون (hsp 65)، ژن‌های پروتئین ۳۲ کیلو دالتونی، ژن کد کننده ۱۲۶ کیلو دالتونی پروتئین فیوژن، ژن RD و rpoβ را مورد هدف قرار می دهند، گزارش شده است (۴۸–۴۲). متداول‌ترین توالی‌های DNA مایکوباکتریایی مورد استفاده برای PCR عبارتند از IS6110 (IS986)، 16S rRNA و ژن کدکننده ۶۵ کیلو دالتونی. یک توالی الحاقی (IS) که IS6110 نامگذاری شده است برای کمپلکس MTB اختصاصی است و عموماً در ۱ تا ۲۰ کپی در هر سلول رخ می دهد و آن را به یک هدف ایده آل برای تقویت در پروتکل های PCR داخلی تبدیل می کند. تشخیص عنصر الحاقی IS6110 با روش PCR در سل ریوی و خارج ریوی، در مقایسه با کشت، دارای حساسیت ۸۳/۵٪، ویژگی ۹۹٪ و پیش‌بینی مثبت ۹۴/۲ درصدی است (۴۶).

روش PCR Restriction Enzyme Analysis (PCR RE)

روش PCR RE بر اساس تکثیر یک قطعه ژن هدف توسط PCR و سپس هضم محصول تکثیر شده با آنزیم های محدود الاثر (RE) مختلف است. سپس محصولات حاصل از واکنش هضم در الک روفورز ژل آگارز از هم جدا شده و قابل مشاهده می شود. در چندین مطالعه اخیر، PCR RE در مقایسه با روش های مرسوم عملکرد خوبی داشته است (۵۱–۴۷). این روش ساده و مقرون به صرفه برای چندین ژن مانند gyrB، hsp65، rpoβ، 16S rRNA و dnaJ برای تمایز سریع ایزوله‌های بالینی نزدیک مانند M.avium زیرگونه avi-um و M.avium زیرگونه paratuberculosis و زیرگونه M.kan-sasii استفاده شده است (۵۱–۴۷). در سال ۲۰۰۰، Lee و همکاران قطعه ۳۶۰ جفت باز از ژن rpoβ را تکثیر کردند و با آنزیم های محدود الاثر Sau 3 Al، Hae III، MSP I و Hinc II هضم کردند تا اکثر مایکوباکتریوم ها را به سطح گونه ها و زیرگونه ها تمایز دهند (۴۹). علاوه بر تمایز گونه‌های M.chelonae، M.abscessus و M. fortuitum از هم، تمایز M.avium از M.paratuberculosis و M. intracellulare و همچنین تمایز M.marinum از M.ulcerans و تمایز تیپ های ۱ و ۲ M.celatum، روش rpoB-PCR-RE اجازه تمایز ۶ زیر گونه از M.kansasii را هم داد.

توالی یابی بر پایه PCR

توالی یابی بر پایه PCR به عنوان استاندارد طلایی برای شناسایی گونه های مایکوباکتریایی مناسب می‌باشد. این روش شامل تکثیر DNA مایکوباکتریایی با پرایمرهای اختصاصی جنس و توالی‌یابی آمپلیکون‌ها می‌باشد. ارگانیسم از طریق مطابقت توالی نوکلئوتیدی با توالی مرجع شناسایی می‌گردد. معمولاً، تنها یک واکنش توالی یابی جهت شناسایی قطعی مورد نیاز است. این روش امکان ردیابی مستقیم گونه‌های مایکوباکتریایی که قابل رشد در محیط‌های کشت آزمایشگاهی مرسوم نمی باشند را فراهم می‌کند و چند گونه ناشناخته با این روش شناسایی شده‌اند (۳۷،۵۲،۵۳). بیشترین هدفی که به صورت رایج به کار برده شده است، ژن کد کننده 16S rRNA می‌باشد. این ژن در تمام گونه های باکتریایی وجود دارد و شامل نواحی حفاظت شده و نواحی متغیر می‌باشد و به همین دلیل به هدفی ایده آل برای اهداف تاکسونومی تبدیل شده است. توالی یابی دو ناحیه بسیار متغیر ژن 16S rRNA امکان شناسایی اکثر گونه‌های مایکوباکتریایی را فراهم می‌کند. به هر حال، اعضای کمپلکس MTB قابل تمایز نمی باشند. به عنوان مثال، M.kansa-sii یک توالی همسان با گونه های غیر بیماریزا M.gastri دارد. چند ژن هدف دیگر از جمله پروتئین ۳۲ کیلو دالتونی (۴۵)، پروتئین ۶۵ کیلو دالتونی شوک حرارتی (۵۴) و فاصله گذار رونویسی‌کننده داخلی (۴۳) (internal transcribed spacer)، برای گونه های شناسایی شده از طریق توالی یابی به خوبی مشخص شده اند. در سال ۱۹۹۹، کیم و همکاران گزارش دادند که آنالیز توالی های مقایسه ای (انطباقی) ژن RNA پلیمراز دربرگیرنده ناحیه مرتبط با مقاومت به RIF در MTB، برای شناسایی گونه های مایکوباکتریایی قابل استفاده می باشد (۵۲).

Loop– mediated Isothermal Amplification (LAMP)

تکثیر ایزوترمال (هم دما) متصل به حلقه

LAMP یک پلتفرم NA نوین، سریع و ساده می باشد که توسط کمپانی ژاپنی .Eiken Chemical Co., Ltd (Tokyo ,Japan) ایجاد شده است (۵۵). مهم ترین مزیت آن، سرعت، سادگی و عدم نیاز به چرخه دمایی (ترمال سایکلر) می‌باشد که نتیجه کار را تسهیل می کند. در این تکنولوژی از چهار پرایمر مختلف که به طور اختصاصی برای شناسایی شش ناحیه مجزا بر روی ژن هدف طراحی شده اند، استفاده می‌شود و فرآیند واکنش در یک دمای ثابت (ایزوترمال) با استفاده از واکنش جایگزینی رشته انجام می گیرد. تکثیر و ردیابی محصولات ژنی می‌تواند در یک مرحله از طریق انکوباسیون مخلوطی از نمونه ها، پرایمرها، DNA پلیمراز با فعالیت جایگزینی رشته و سوبستراها در یک دمای ثابت کامل شود. در حال حاضر، شواهد محدودی در مورد دقت LAMP برای شناسایی TB وجود دارد. مطالعاتی در حال انجام می باشند تا کارآیی تست را بررسی و عملکرد آن را با تست های مرسوم مقایسه کنند.

Real-Time PCR
(PCR در زمان واقعی)

این روش به صورت موفقیت آمیزی به طور مستقیم برای ردیابی سریع مایکوباکتری ها و تست مقاومت دارویی در نمونه های بالینی به کار برده شده است. کاوشگرهای مختلفی مورد استفاده قرار گرفته اند از جمله: کاوشگر TaqMan، کاوشگرهای انتقال انرژی رزونانس فلورسنس (FRET)، بیکن مولکولی (beacons) و بیوپروب‌ها (کاوشگرهای زیستی). مهم ترین مزیت تکنیک Real-Time PCR سرعت بالا و خطر آلودگی کمتر می باشد و مهم ترین ایراد آن، نیازمند بودن به تجهیزات گران و معرف ها و پرسنل فنی ماهر می باشد. در این روش نتایج به طور متوسط ۱/۵ الی ۲ ساعت پس از استخراج DNA به دست می‌آیند. این تکنیک سرانجام توانست در آزمایشگاه‌های مرجع انجام شود و در موقعیت‌هایی می‌تواند در مدیریت بیماران TB کمک کند.

DNA Probe Hybridization
(هیبریداسیون کاوشگر DNA)

تکنولوژی کاوشگر DNA برای شناسایی ارگانیسم های فستیدیوس هنوز یکی از موفقیت آمیزترین روش‌های تشخیص مولکولی در سراسر جهان به شمار می رود. Accuprobe (Gen-Probe, San Diego, CA)، یک روش تجاری بر پایه کاوشگرهای DNA اختصاصی گونه می باشد که با rRNA هیبرید می‌شود. به منظور شناسایی تعداد محدودی از مایکوباکتری ها از جمله کمپلکس M.avium، MTB M.kansasii، MAC، M.intracellular و M.gordonae کاوشگرها به صورت گسترده ای در زمینه بالینی مورد ارزیابی قرار گرفته اند و نتایج حساسیت و اختصاصیت مطلوبی را در زمان ۲ ساعته نشان دادند. به طور کلی، کاوشگرهای DNA بیش از ۹۹ درصد اختصاصیت و حساسیت برای کمپلکس MTB جداسازی شده و تقریباً ۹۵ درصد حساسیت و بیش از ۹۹ درصد اختصاصیت برای نمونه های MAC جداسازی شده نشان می دهند (۶۱-۵۶). در موارد نادر در برخی از نمونه‌ها واکنش متقاطع بین کاوشگر کمپلکس MTB و ایزوله‌های M.terrae و M.celatum و کاوشگر کمپلکس M.avium به همراه گونه‌های اخیراً توصیف شده -M. parascrofulace، M.Palustre um و M.saskatchewanense گزارش شده است.

آزمون های کاوشگر خطی Line Probe Assays

آزمون کاوشگر خطی از تکنولوژی هیبریداسیون بلات خط معکوس به همراه کاوشگرهای مختلف اختصاصی DNA استفاده می‌کند که به صورت خطوط موازی بر روی یک نوار کاغذی یا غشای نایلونی تثبیت شده‌اند. DNA هدف، یک DNA تکثیر شده با PCR می باشد که از پرایمرهای بیوتینیله شده (biotinylated) و در نهایت انکوبه شده با یک نوار یا غشای پوشیده با کاوشگرهای اختصاصی گونه استفاده می‌کند. در نهایت هیبریدها از طریق رنگ‌سنجی (کالریمتری) یا واکنش کمی لومینسس تقویت شده (ECL) ردیابی می شوند (۶۴، ۳۶، ۳۷).

در حال حاضر، ۳ کیت رایج برای شناسایی گونه ها در بازار موجود می باشد. از جمله تست هایی که برای شناسایی مایکوباکتری ها و تست های مقاومت دارویی به کار می روند می‌توان به INNO-LiPA ،MYCOBACTERIA (Innogenetics NV ،Gent, Belgium) و Geno Type MTBC (Hain ،Germany) اشاره کرد (۶۶، ۶۵، ۳۷، ۳۶). مطالعات زیادی در مورد کاربرد آزمون LiPA بر روی ایزوله های MTB به منظور ردیابی مقاومت RIF انجام گرفت که بیشتر از ۹۵ درصد حساسیت و ۱۰۰ درصد اختصاصیت را نشان داد. در مطالعات بسیار کمی که از آزمون LiPA به طور مستقیم برای نمونه های بالینی استفاده شد، حساسیت بین ۱۰۰-۸۰ به دست آمد. از سوی دیگر، Geno Type MTBC مقاومت به INH و RIF را بر اساس بیشترین جهش های رایج به ترتیب در ژن های katG و rpoβ در نمونه های کشت تشخیص می دهد.

آرایه های DNA
(DNA Arrays)

اخیراً، ریز آرایه های DNA یا آرایه های اولیگونوکلئوتیدی با چگالی بالا (DNA Chip) برای شناسایی گونه های مایکوباکتری ها به کار برده شده اند. DNA chip به طور کلی شامل یک سطح شیشه ای می‌باشد که کاوشگرهای DNA متعددی همراه با هویت شناخته

شده بر روی آن تثبیت شده اند، به منظور هیبریداسیون مولکولی با محصولات اختصاصی تکثیر شده با PCR، که امکان آزمایش بیان ژن موازی یا ژنوتایپینگ را فراهم می کند (۶۷). این روش امکان آنالیزهای همزمان هزاران ژن را در زمان کوتاه آزمون فراهم می‌کند. این روش همچنین، برای آنالیزهای فیلوژنیک و تشخیص گونه ها مفید می باشد. برای شناسایی باکتری ها، این روش احتمالاً شامل برچسب گذاری RNA رونویسی شده از یک ژن هدف باکتری در شرایط آزمایشگاهی (in vitro)، در نمونه های آزمایشگاهی می باشد. سپس هیبریداسیون RNA برچسب گذاری شده رونویسی شده در شرایط آزمایشگاهی با کاوشگرهای الیگونوکلئوتیدی اختصاصی گونه بر روی یک ریزآرایه انجام می‌گیرد و معمولاً برای ردیابی برچسب از فلورسنس استفاده می شود.

Affymetrix Genechip که از مجموعه فراوانی از الیگونوکلئوتیدهای سنتزی به جای لکه گذاری بر روی یک لایه شیشه ای استفاده می کند، به طور موفقیت آمیزی با استفاده از ژن های 16S rRNA به عنوان هدف برای شناسایی گونه های مایکوباکتریوم جداسازی شده، به کار برده شد (۶۸، ۶۹).

DNAchip، Combichip ردیابی مقاومت دارویی مایکوباکتریایی اخیراً شرح داده شده یک میکروچیپ الیگونوکلئوتیدی جفت شده با PCR برای ردیابی مقاومت INH و RIF می‌باشد. این روش با توالی یابی و تست حساسیت دارویی در ۶۹ مورد مقاومت به INH و یا RIF و ۲۷ ایزوله MTB حساس به دارو بررسی گردید (۷۰). این روش امکان شناسایی ۸۴ درصد ایزوله های مقاوم به INH را بر اساس جهش های کدون ۳۱۵ ژن katG و inhA-15 و ۱۰۰ درصد ایزوله های مقاوم به RIF براساس ۷ کدون روی ژن rpoβ یعنی ۵۱۱، ۵۱۳، ۵۲۲، ۵۱۶، ۵۲۶، ۵۳۱ و ۵۳۳ را فراهم کرد. در مجموع اختصاصیت کلی برای ردیابی مقاومت نسبت به INH و RIF به ترتیب ۱۰۰ درصد و ۹۵/۳ درصد بود. به دلیل بالا بودن هزینه مربوطه، استفاده از ریزآرایه ها برای تشخیص مقاومت دارویی در TB هنوز خارج از دسترس بسیاری از آزمایشگاه‌های مایکوباکتریولوژی بالینی است.

GeneXpert

Xpert (R) MTB/RIF، تستی است که می تواند به طور همزمان MTB و مقاومت به ریفامپیسین (RIF) را تشخیص دهد. این تست از طریق شراکت بین Cepheid و موسسه خلاقانه تشخیص های نوین (FIND) دانشگاه پزشکی و دندانپزشکی نیوجرسی توسعه یافت. این سیستم بر اساس اصول کلی Real-time PCR و ردیابی آمپلیکون ها با استفاده از بیکن های مولکولی عمل می کند و قادر است یک تشخیص دقیق از بیماری را در کمتر از ۲ ساعت ارائه دهد. این سیستم اساساً برای متخصصان بالینی طراحی شده است. بنابراین، با استفاده از آن درمان مناسب می تواند به سرعت آغاز شود.

روش ها

۲-۱- آماده سازی نمونه

استخراج DNA. توانایی روش مولکولی برای تشخیص مایکوباکتری ها در نمونه های بالینی به دو عامل توالی هدف انتخاب شده و کارآیی روش استخراج DNA بستگی دارد. بیشترین روش های استفاده شده برای استخراج DNA، شامل Tris- EDTA (TE) استخراج با جوشاندن، استخراج از طریق لیز کردن (Infectio Diag-nostics, Inc., Valencia CA)، استخراج با سدیم دودسیل سولفات- تریتون X و سدیم دودسیل سولفات- تریتون X همراه با سونیک (صوت) می باشند.

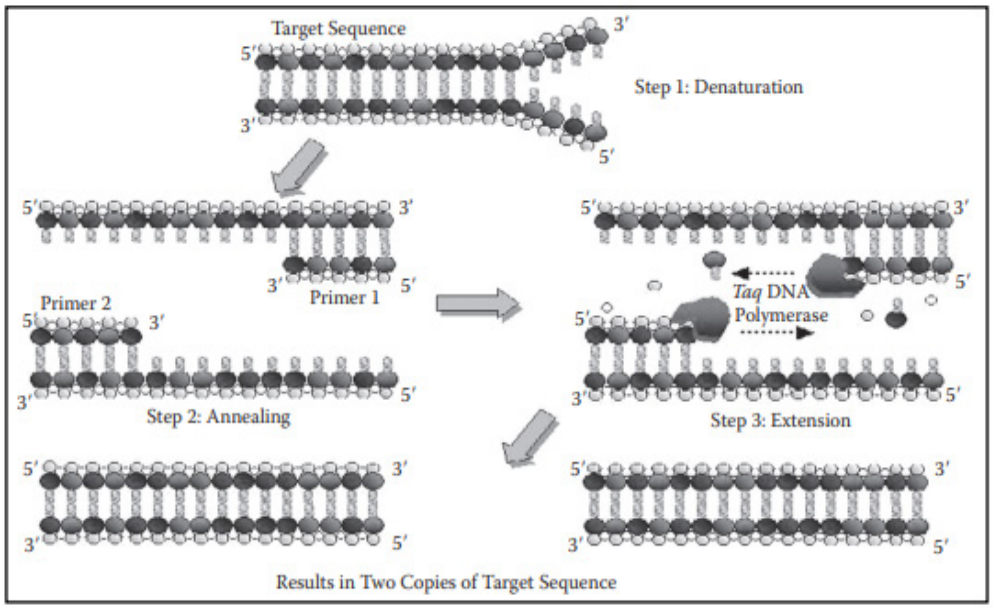
۲-۲- روش های ردیابی

PCR استاندارد

قاعده کلی: در DNA، PCR با استفاده از دو پرایمر و یک آنزیم (شکل ۱) توسعه می‌یابد. چرخه تکرار دمایی PCR با دناتوره شدن آمپلیکون DNA دو رشته‌ای آغاز می‌گردد. در ادامه از طریق آنیلینگ پرایمر با DNA هدف و محصولات PCR از طریق Taq پلیمراز در حضور داکسی نوکلئوزیدتری فسفات های (DNTPs) اضافی توسعه می‌یابند. به صورت تئوری در هر چرخه تعداد مولکول های اسیدنوکلئیک هدف دو برابر می شوند، بنابراین، پس از ۲۰ چرخه، میلیون برابر و پس از ۳۰ چرخه، بیلیون برابر آمپلیفیکاسیون حاصل می شود (۷۱).

روش: راه اندازی یک PCR پایه نیازمند چند ترکیب و معرف از جمله DNA الگو، دو پرایمر مکمل برای هر انتهای ۳ و رشته آنتی‌سنس DNA الگو، آنزیم Taq پلیمراز، داکسی نوکلئوزید تری فسفات ها، محلول بافر، کاتیون‌های دوظرفیتی، یون‌های منیزیم و یون‌های پتاسیم یک ظرفیتی می باشد. واکنش PCR به طور معمول در حجم ۱۰۰-۱۰ میکرولیتر درون تیوب‌های کوچک (حجم ۰/۲- ۰/۵ میلی لیتر) در دستگاه ترمال سایکلر انجام می‌گیرد. PCR معمولاً شامل ۴۰-۲۰ چرخه می باشد. محصولات تکثیر شده در PCR از طریق ژل الکتروفورز قابل ردیابی می‌باشند. اندازه محصولات PCR از طریق مقایسه با DNA Ladder (نشانگر وزن مولکولی) تعیین می‌شود. این نشانگر حاوی قطعات DNA با اندازه های مشخص می باشد که در کنار قطعات PCR بر روی ژل حرکت می کنند.

البته استفاده از کنترل منفی، کنترل مثبت و کنترل داخلی برای هر بچ PCR ضروری می باشد.



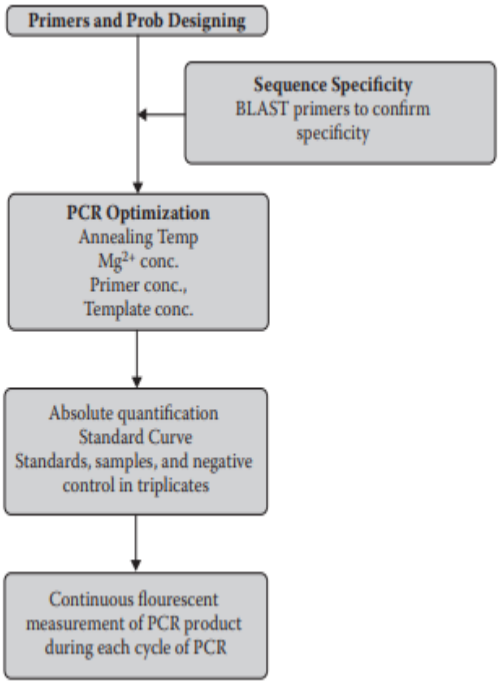
شکل۱. تکثیرDNA با PCR.

Real-Time PCR

قاعده کلی: در روش های Real-time PCR رنگ های فلورسنت یا کاوشگرهای DNA حاوی فلوروفور به منظور اندازه گیری مقدار محصول تکثیر شده به کار برده می شوند. کاوشگر TaqMan از دو نوع فلوروفور تشکیل شده است که جزئی از فلورسنت پروتئین های گزارشگر می باشند. کاوشگر می تواند به DNA الگو وابسته یا غیر وابسته باشد و قبل از شروع فعالیت پلیمراز، فلوروفور خاموش کننده (معمولاً یک رنگ با طول موج بلند مانند رنگ قرمز) فلورسنس را از فلوروفور گزارشگر احیا می کند (معمولاً یک رنگ با طول موج کوتاه مانند رنگ سبز). این کار را با استفاده از انتقال انرژی رزونانس فلورسنس انجام می دهد که نوعی مهار یک رنگ توسط رنگ دیگر بدون خارج کردن پروتون می باشد. رنگ گزارشگر در انتهای ۵ ′ و خاموش کننده، در انتهای ۳ ′ کاوشگر یافت شده اند. دو نوع دیگر از روش Real-time PCR وجود دارد: روش بیکن مولکولی و روش SYBR سبز. در روش بیکن مولکولی از کاوشگر گزارشگر استفاده می شود که به دور یک سنجاق سر پیچیده شده است. همچنین، یک رنگ خاموش کننده دارد که بایستی در تماس نزدیک با گزارشگر باشد تا بتواند کار خود را انجام دهد. یک تفاوت مهم روش بیکن مولکولی در مقایسه با روش TaqMan این است که کاوشگر در محصول PCR به صورت دست نخورده باقی می ماند و در هر چرخه مجدداً با هدف باند می شود.

روش: Real-time PCR یک ابزار تحقیقاتی قدرتمند استثنایی می باشد. همراه با کیت معرف صحیح و طراحی آزمایشی قادر است تولید سریع داده های معنادار با کیفیت بالا را در اختیار ما قرار دهد. یک جفت پرایمرو کاوشگر مناسب می تواند بر اساس راهنماهای طراحی تجربی و با استفاده از نرم افزارهای طراحی پرایمر، طراحی شود. دستور العمل های مربوط به کمیت های کلی Real-time PCR در شکل۲ خلاصه شده است.

نکته: چندین ژن Housekeeping بایستی در هر آزمایش به منظور طبیعی سازی و تلفیق استاندارد خارجی (RNA بیگانه) موجود باشند، همچنین ضروری است که مهارکننده های احتمالی PCR بین درمان ها و ران ها تشخیص داده شوند.



شکل۲. دستورالعمل های مربوط به Real-time PCR.

ژنوتایپینگ Genotyping

قاعده کلی: ژنوتایپینگ به فرآیند تعیین کردن ژنوتیپ ژنوم یک کمپلکس MTB با استفاده از آزمون های بیولوژیکی اشاره دارد. روش های کنونی شامل PCR توالی یابی DNA، کاوشگر های اولیگونوکلئوتید اختصاصی آلل (ASO) و هیبریداسیون به ریزآرایه های DNA می‌باشند. استفاده از تکنیک ژنوتایپینگ مایکوباکتریال از این جهت می‌باشد که DNA حاصل از منابع مختلف را مقایسه کند و یا اینکه یک ژنوم را از طریق مقایسه با یک استاندارد شناخته شده، شناسایی کند.

روش: آزمایشگاه های ژنوتایپینگ می توانند از سه روش ژنوتایپینگ استفاده کنند: اسپولیگوتایپینگ (Spoligotyping)، آنالیزهای واحدهای تکرارشونده پراکنده مایکوباکتریوم (MIRU) و آنالیزهای پلی مورفیسم طول قطعه محدود مستقر IS6110 (RFLP) که تحت عنوان انگشت نگاری (fingerprinting) شناخته می شود. آنالیزهای اسپولیگوتایپینگ و MIRU بر پایه PCR می‌باشند. این دو روش با یکدیگر به عنوان تست های ژنوتایپینگ PCR شناخته می شوند.

RFLP: آنالیزهای RFLP با روش استاندارد بین المللی انجام می‌شود (۷۲). به طور خلاصه، DNA ژنومی MTB استخراج گردید و با استفاده از PvuII هضم شد. قطعات DNA حاصل از انگشت نگاری با استفاده از ژل الکتروفورز از یکدیگر جدا شدند. سپس به یک غشای نایلونی با استفاده از روش ساترن بلاتینگ انتقال و با کاوشگر DNA حاوی توالی ۲۴۵ جفت باز IS6110 نشاندار شده با پراکسید از ترب کوهی کاوش شدند. هیبریداسیون کاوشگر به یک قطعه از ماهواره کوچک DNA منجر به ایجاد یک باند تیره بر روی کاغذ نیتروسلولزی اتورادیوگرافی گردید. الگوهای حاصل برای هر یک منحصربه فرد است.

اسپولیگوتایپینگ: اسپولیگوتایپینگ به طور کلی با یک کیت تجاری (Isogen Bioscience) انجام می شود. به طور خلاصه، این روش شامل تکثیر نواحی تکرار مستقیم (DR) ژنوم مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به روش PCR با استفاده از پرایمرهای بیوتینیله شده اختصاصی می باشد (۷۴، ۷۲).

MIRU-VNTR: تایپینگ توالی های تکراری پشت سر هم با تعداد متنوع مایکوباکتریال (MIRU) یک نام اختصاصی کمپلکس MTB از آنالیزهای لوکوس های متعدد متفاوت در تعداد قطعات پشت سر هم (VNTR) می باشد. این روش بر پایه تکثیر به روش PCR با استفاده پرایمرهای اختصاصی برای نواحی کناری VNTRها و تعیین اندازه آمپلیکون ها که بیانگر تعداد کپی های VNTR تکثیر شده می باشد. استفاده از آن ها داده های تایپینگ را در قالب عددی قابل انتقال فراهم می کند که برای مطالعه اپیدمیولوژی مولکولی جهانی عوامل عفونی مناسب است (۷۶، ۷۵).

بحث و چشم انداز آینده

درک این نکته که هیچ آزمونی وجود ندارد که بتواند به تنهایی مایکوباکتری‌ها به ویژه مایکوباکتریوم های آتیپیک (NTM) را شناسایی کند، مهم می باشد. بسیاری از گونه های جدید ممکن است حتی با تمامی آزمون ها هم قابل تشخیص نباشند. وجود انبوهی از گونه ها یک چالش اضافی برای آزمایشگاه های مایکوباکتریولوژی بالینی ایجاد می کند تا امکان ارائه خدمات به موقع را فراهم کنند. علاوه بر این، بعضی از گونه ها (از جمله M. haemophilum و M. genavense) به شرایط رشدی خاصی نیاز دارند و نیازمند همکاری دقیق بین پزشک درخواست کننده آزمایش و متخصص آزمایشگاهی که آزمایش را انجام می دهد، می باشند. برای غلبه بر این کاستی های روش های مرسوم، در سال های اخیر، تکنیک های مولکولی به طور فزاینده ای مورد توجه قرار گرفته اند. زیرا آنها سریع، قابل اعتماد، بسیار حساس و اختصاصی هستند و برای تعداد زیادی از نمونه ها قابل انجام می باشند. نکته مهم این است که برخی از این آزمایش‌های مولکولی تایید شده توسط WHO می‌توانند جهش‌های ژن مایکوباکتریایی مرتبط با مقاومت دارویی را شناسایی کنند و به پزشکان این امکان را می‌دهند تا درمان موثرتر را انجام دهند.

آزمون های(Accuprobe (Gen-Probe, San Diego, Calif. و PCR در مقایسه با تست های فنوتیپی به طور گسترده تری در کشورهای توسعه یافته برای شناسایی گونه های مایکوباکتری ها مورد استفاده قرار گرفته و به طور قابل ملاحظه ای با گذر زمان پیشرفت و به طور رایج استفاده می شود. به هر حال، نتایج حاصل از این تست ها بایستی با گزارش بالینی مطابقت داشته باشد و در صورت عدم انطباق نتایج، پزشک باید به آزمایشگاه اطلاع بدهد. روش ریزآرایه DNA برای آینده نویدبخش می باشد، زیرا انجام دادن آن آسان است و می تواند به راحتی خودکار شود و امکان شناسایی تعداد زیادی از گونه های مایکوباکتریایی را در یک واکنش فراهم می کند. به هر حال، به دلیل نیاز به تجهیزات اضافی و پرسنل آموزش دیده این روش ها پر هزینه می باشند و هنوز دسترسی آسانی به رویه های معمول در آزمایشگاه مایکوباکتریولوژی بالینی به دست نیاورده اند، به ویژه در کشورهایی کم درآمدی که TB

بومی می باشد. در چنین کشورهای با منابع محدود، تشخیص عفونت های مایکوباکتریایی به صورت تجربی بر اساس روش های بالینی–رادیولوژیکی و یا آزمایش باسیل اسید فست(AFB) با اسمیر خلط انجام می گیرد. به دلیل کمبود امکانات اکثر آزمایشگاه ها در کشورهای بومی بیماری مایکوباکتری ها را از طریق کشت تشخیص نمی دهند و عفونت های ناشی از مایکوباکتریوم های آتیپیک (NTM) کمتر تشخیص داده شده است.

امروزه، تکنیک ها و تجهیزات به طور فزاینده ای در حال پیچیده شدن و گران شدن می باشند و به روز رسانی آزمایشگاه های محلی به منظور انجام این آزمون ها دشوار است. نظر به اینکه با این روش ها، تحویل نمونه و یا ارتباطات نتایج را می توان به سرعت و راحتی انجام داد، به ندرت از آزمایشگاه های مرجع استفاده می شود و تست های مولکولی پیچیده رویکرد عملی‌تری خواهد بود.

منابع

1. Soini, H., and Musser, J.M., Molecular diagnosis of mycobacteria, Clin. Chem., 47, 809, 2001.

2. Rosenzweig, D.Y., Nontuberculous mycobacterial disease in the immunocompetent adult, Semin. Respir. Infect., 11, 252, 1996.

3. Saubolle, M.A. et al., Mycobacterium haemophilium: Microbiology and expanding clinical and geographical spectra of disease in humans, Clin. Microbiol. Rev., 9, 435, 1996.

4. Ananthanarayan, R., and Pannikar, C.K.J., Mycobacterium tuberculosis. In Ananthanarayan, R., and Pannikar, C.K.J. (Editors), Textbook of Microbiology, pp. 324–337, Orient Longman, Madras, 1996.

5. Jenkins, P.A., The microbiology of tuberculosis. In Davis, P.D.O. (Editor), Clinical Tuberculosis, p. 33, Chapman & Hall, London, 1994.

6. Dodge, O.G., Mycobacterial skin ulcers in Uganda: Histopathological aspects, J. Pathol. Bacteriol., 88, 169, 1964.

7. H, Tomioka. [Bacteriology of mycobacteria: taxonomic and morphological characteristics]. Nihon Rinsho 1998 Vol. 56 Issue 12 Pages 3001-7.

8. O'Brian, R.J., Geiter, L.J., and Snider, D.E., The epidemiology of non tuberculous mycobacteria disease in the United States: Results from national survey, Am. Rev. Respir. Dis., 135, 1007, 1987.

9. Matoss, E.D. et al., Nontuberculous mycobacteria at a multiresistant tuberculosis reference centre in Bahia: Clinicoepidemiological aspects, Braz. J. Infect. Dis., 8, 296, 2004.

10. Choudhari, S. et al., Clinical significance of nontuberculous mycobacteria isolates in a Canadian tertiary care center, Clin. Infect. Dis., 21, 128, 1995.

11. Schluger, N.W., and Rom, W.N., The host immune response to tuberculosis, Am. J. Resp. Crit. Care Med., 157, 679, 1998.

12. Danneenberg, A.M.J., and Tomashifski, J.F., Jr., Pathogenisis of pulmonary tuberculosis. In Fishmann, A.P. (Editor), Pulmonary Diseases and Disorders, 3rd ed., p. 2447, McGraw Hill, New York, 1998.

13. Bloom, B.R., and Murray, C.J.L., Tuberculosis: Commentary on a reemergent killer, Science, 257, 1055, 1992.

14. Katoch, V.N., Infections due to non tuberculous mycobacteria (NTM), Indian J. Med. Res., 120, 290, 2004.

15. Graybill, J.R., et al., Disseminated mycobacteriosis due to Mycobacterium abscessus in two recipients of renal homograft, Am. Rev. Respir. Dis., 109, 4, 1974.

16. Iseman, M.D. et al., Disease due to Mycobacterium aviumintracellulare, Chest, 87, 139S, 1985.

17. ATS guidelines 2007, David E. Griffith, Timothy Aksamit, Barbara A. Brown-Elliott. An Official ATS/IDSA statement: Diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases, Am. J. Respir. Crit. Care Med., 175, 367, 2007.

18. Collins, C.H. et al., Mycobacterium marinum infectious in man, J. Hyg. (Lond)., 94, 135, 1985.

19. Grange, J.M., Infections caused by opportunist mycobacteria: A review, J. Royal Soc. Med., 79, 226, 1986.

20. Jackson, P.G. et al., Injection abscesses due to Mycobacterium chelonae occurring in a diabetic patient, Tubercle, 62, 277, 1981.

21. Borghans, J.G., and Standford, J.L., Mycobacterium chelonae in abscesses after injection of diphtheria-pertussis-tetanuspolio vaccine, Am. Rev. Respir. Dis., 107, 1, 1973.

22. Kuritaky, J.N. et al., Sternal wound infections and endocarditis due to organisms of the Mycobacterium fortuitum complex, Ann. Intern. Med., 98, 938, 1983.

23. Gangadharam, P.R.J., Lanier, J.D., and Jones, D.E., Keratitis due to Mycobacterium kansasii, Tubercle., 59, 55, 1978.

24. Moulsdale, M.T. et al., Infection by Mycobacterium haemophilum, a metabolically fastidious acid-fast bacillus, Tubercle., 64, 29, 1983.

25. Cohen, R.J. et al., Occult infections with M. intracellulare in bone-marrow biopsy specimens from patients with AIDS, N. Engl. J. Med., 308, 1475, 1983.

26. Graybill, J.R. et al., Disseminated mycobacteriosis due to Mycobacterium abscessus in two recipients of renal homograft, Am. Rev. Respir. Dis., 109, 4, 1974.

27. Gordin, F., and Slutlin, G., The validity of acid-fast smears in the diagnosis of tuberculosis, Arch. Pathol. Lab. Med., 114, 1025, 1990.

28. Kent, and Kubica, G.P., Public health mycobacteriology a guide for level III lab. Atlanta, GA: U.S. Department of health and human services, Public health services. Center for disease control, 64, 1985.

29. Mole, R.J., and WO'C Maskell, T., Review phage as a diagnostic the use of phage in TB diagnosis, J. Chem. Technol. Biotechnol., 76, 683, 2001.

30. Shenai, S., Rodrigues, C., and Mehta, A.P., Evaluation of a new phage amplification technology for the rapid diagnosis of tuberculosis, Int. J. Med. Microbiol., 20, 194, 2002.

31. Kalantri, S. et al., Bacteriophage-based tests for the detection of Mycobacterium tuberculosis in clinical specimens: A systematic review and meta-analysis, BMC Infect. Dis., 5, 59, 2005.

32. Jacob, W.R. et al., Rapid assessment of drug susceptibilities of Mycobacterium tuberculosis by means of luciferase reporter phages, Science, 260, 819, 1993.

33. Butler, W.R., and Kilburn, J.O., Identification of major slowly growing pathogenic Mycobacteria and Mycobacteria gordonae by high performance liquid chromatography of their mycolic acids, J. Clin. Microbiol., 26, 50, 1988.

34. Butler, W.R., and Guthertz, L.S., Mycolic acid analysis by high-performance liquid chromatography for identification of Mycobacterim species, Clin. Microbiol. Rev., 14, 704,

2001.

35. Eing, B.R., Becker, A., Sohns, A., and Ringelmann, R. Comparison of Roche Cobas Amplicor Mycobacterium tuberculosis assay with in-house PCR and culture for detection of M. tuberculosis, J. Clin. Microbiol., 36, 2023,

1998.

36. Pai, M., Kalantri, S., and Dheda, K., New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis: Part II. Active tuberculosis and drug resistance, Expert Rev. Mol. Diagn., 6, 423, 2006.

37. Tortoli, E., and Palomino, J.C., New diagnostic methods. In Tuberculosis, Chapter 14, p. 441, 2007.

38. Bergmann, J.S., and Woods, G.L., Clinical evaluation of the BD-ProbeTec Strand Displacement Amplification Assay for rapid diagnosis of tuberculosis, J. Clin. Microbiol., 36, 2766, 1998.

39. Piersimoni, C., and Scarparo, C., Relevance of commercial amplification methods for direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex in clinical samples, J. Clin. Microbiol., 41, 5355, 2003.

40. Chengtao, H., and Weishilbourn, R.M., The polymerase chain reaction (PCR) is the most widely used technique for the study of DNA. Applications of PCR have been extended significantly by the development of long PCR, Curr. Issues Mol. Biol., 1, 77, 1999.

41. Johansen, I.S., Rapid diagnosis of mycobacterial diseases and their implication on clinical management, Dan. Med. Bull., 53, 28, 2006.

42. M. R. Maleki, H. S. Kafil, N. Harzandi and S. R. Moaddab. Identification of nontuberculous mycobacteria isolated from hospital water by sequence analysis of the hsp65 and 16S rRNA genes. J Water Health 2017 Vol. 15 Issue 5 Pages 766-774.

43. Roth, A. et al., Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences, J. Clin. Microbiol., 36, 139, 1998.

44. Verma, A., Rattan, A., and Tyagi, J.S., Development of 23S rRNA based PCR for the detection of mycobacteria, Indian J. Biochem. Biophys., 31, 288, 1994.

45. Soini, H., Bottger, E.C., and Viljanen, M.K., Identification of mycobacteria by PCR-based sequence determination of the 32-kilodalton protein gene, J. Clin. Microbiol., 32, 2944, 1994.

46. Cave, M.D. et al., Stability of DNA fingerprint pattern produced with IS6110 in strains of Mycobacterium tuberculosis, J. Clin. Microbiol., 32, 262, 1994.

47. Telenti, A. et al., Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis, J. Clin. Microbiol., 31, 175, 1993.

48. Vaneechoutte, M. et al., Identification of Mycobacterium species by using amplified ribosomal DNA restriction analysis, J. Clin. Microbiol., 31, 2061, 1993.

49. Lee, H. et al., Species identification of mycobacteria by PCR–restriction fragment length polymorphism of the rpoβ gene, J. Clin. Microbiol., 38, 2966, 2000.

50. Roth, A. et al., Novel diagnostic algorithm for identification of mycobacteria using genus-specific amplification of the 16S-23S rRNA gene spacer and restriction endonucleases, J. Clin. Microbiol., 38, 1094, 2000.

51. Magalhaes, V.D. et al., Reliability of hsp65-RFLP análisis for identification of species in cultured strains and clinical specimens,

J. Microbiol. Methods, 49, 295, 2002.

52. Kim, B.J. et al., Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (rpoB), J. Clin. Microbiol., 37, 1714, 1999.

53. Kapur, V. et al., Rapid Mycobacterium species assignment and unambiguous identification of mutations associated with antimicrobial resistance in Mycobacterium tuberculosis by automated DNA sequencing, Arch. Pathol. Lab. Med., 119, 131, 1995.

54. McNabb, A. et al., Assessment of partial sequencing of the 65-kiodalton heat shock protein gene (hsp 65) for routine identification of mycobacterium species isolated from clinical sources, J. Clin. Microbiol., 42, 3000, 2004.

55. Zhu R.Y., et al. Use of visual loop-mediated isothermal amplification of rimM sequence for rapid detection of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium bovis, J Microbiol. Methods., 78(3), 339, 2009.

56. Bull, T.J., and Shanson, D.C. Evaluation of a commercial chemiluminescent Gen Probe system “AccuProbe” for the rapid identification of mycobacteria including “MAIC X”, isolated from blood and other sites, from patients with AIDS. J. Hosp. Infect., 21, 143, 1992.

57. Tortoli, E. et al. Evaluation of a commercial DNA probe assay for the identification of Mycobacterium kansasii, Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 13, 264, 1994.

58. Tortoli, E., Simonetti, M.T., and Lavinia, F., Evaluation of reformulated chemiluminescent DNA probe (Accuprobe) for culture identification of Mycobacterium kansasii, J. Clin. Microbiol., 34, 2838, 1996.

59. Saito, H. et al., Identification and partial characterization of Mycobacterium avium and Mycobacterium intracellulare by using DNA probes, J. Clin. Microbiol., 27, 994, 1989.

60. Gonzales, R., and Hanna, B.A., Evaluation of Gen-Probe DNA hybrodozatopn system for the identification of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium avium-intracellulare, Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 8, 69, 1987.

61. Shenai, S., Rodrigues, C., and Mehta, A., Rapid diagnosis of tuberculosis using transcription mediated amplification, Indian J. Med. Microbiol., October, 19, 184, 2001.

62. Torkko, P. et al., Mycobacterium palustre sp nov., a potentially pathogenic slow-growing mycobacterium isolated from veterinary and clinical specimens, and Finnish stream water, Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 52, 1519, 2002.

63. Turenne, C.Y. et al., Mycobacterim, parascrofulaceum sp, nov., a novel slowly growing, scotochromogenic clinical isolates related to Mycobacterium interjectum and Accuprobe positive for Mycobacterium avium complex, Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 54, 659, 2004.

64. Shenai, S., Rodrigues, C., and Mehta, A., Rapid speciation of 15 clinically relevant mycobacteria with simultaneous detection of resistance to rifampicin, isoniazid and streptomycin in M. tuberculosis complex, Int. J. Infect. Dis., 13, 46, 2009.

65. Tortoli, E., Mariottini, A., and Mazzarelli, G., Evaluation of INNO-LiPA MYCOBACTERIA V2: Improved reverse hybridization multiple DNA probe assay for mycobacterial identification, J. Clin. Microbiol., 41, 4418, 2003.

66. Martin, A., and Porteals, F., Drug resistance and drug resistance detection. In Tuberculosis, Chapter 19, p. 635, 2007.

67. Fukushima, M. et al., Development of DNA microarray method to detect and identify pathogenic bacteria, Jpn. J. Electrophoresis, 45, 235, 2004.

68. Troesch, A. et al., Mycobacterium species identification and rifampicin resistance testing with high-density DNA probe arrays, J. Clin. Microbiol., 37, 1079, 1999.

69. Fukushima, M. et al., Detection and identification of Mycobacterium species isolates by DNA microarray, J. Clin. Microbiol., 41, 2605, 2003.

70. Caoli, J.C. et al., Evaluation of the TB-Biochip oligonucleotide microarray system for rapid detection of rifampin resistance in Mycobacterium tuberculosis, J. Clin. Microbiol., 44, 2378, 2006.

71. Erlich, H.A., PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplifications, Stockton Press, New York, 1989.

72. van Embden, J.D. et al., Strain identification of Mycobacte-

rium tuberculosis by DNA fingerprinting: Recommendations for a standardized methodology, J. Clin. Microbiol., 31, 406, 1993.

73. Kamerbeek, J. et al., Simultaneous detection and strain differentiation

of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology, J. Clin. Microbiol., 35, 907, 1997.

74. Groenen, P.M.A. et al., Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of Mycobacterium tuberculosis: Application for strain differentiation by a novel typing method, Mol. Microbiol., 10, 1057, 1995.

75. Supply, P. et al., Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of Mycobacterium tuberculosis based on mycobacterial interspersed repetitive units, J. Clin. Microbiol., 39, 3563, 2001. doi: 10.1128/

JCM.39.10.3563–3571.2001.

76. Klevytska, A. et al., Identification and characterization of variable- number tandem repeats in the Yersinia pestis genome, J. Clin. Microbiol., 39, 3179, 2001.