شناسایی گونه‌های مختلف مایکوباکتریوم در ضایعات پوستی سارکوئیدوز با استفاده از روش PCR - RFLP

دکتر مهین ولیخانی[1]، دکتر اکبر میرصالحیان[2]، دکتر حسین مرتضوی[3]، دکتر سیدداوود منصوری[4]، بابک پوراکبری[5]، دکتر فریده مهتی پور[6]

۱ـ استاد، ۲ـاستادیار، گروه پوست؛ ۳ـ دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ٤ـ استاد، گروه بیماریهای عفونی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی؛ ۵ـ کارشناس ارشد میکروبیولوژی؛ ٦ـ دستیار، گروه پوست، دانشگاه علوم پزشکی تهران

مقدمه: سارکوئیدوز یک بیماری مولتی سیستم گرانولوماتوز با علت نامشخص است. نمونه‌های بافتی بیماران سارکوئیدوز اخیراً از نظر وجود ژنوم مایکوباکتریوم با استفاده از روش polymerase chain reaction مورد بررسی قرار گرفته‌اند.

هدف: شناسایی گونه‌های مختلف مایکوباکتریوم با روش polymerase chain reaction restricted fragment length polymorphism (PCR-RFLP) در ضایعات پوستی سارکوئیدوز.

روش اجرا: در این مطالعه از پوست ۲۰ بیمار مبتلا به سارکوئیدوز نمونه‌برداری شد. معیار انتخاب بیماران علائم بالینی همراه با وجود گرانولوم naked در میکروسکوپ نوری و رد سایر تشخیص‌های بالینی بود. بلوک پارافینی نمونه‌برداریهای پوستی این بیماران جهت شناسایی ژنوم گونه‌های مختلف مایکوباکتریوم با روش PCR-RFLP مورد استفاده قرار گرفت. چهار نمونه از بلوکهای پارافینی بیماران با تشخیص توبرکولوز پوستی و PCR مثبت به عنوان شاهد مثبت و ۱۰ نمونه پوستی با تشخیص‌های غیر از توبرکولوز به عنوان گروه شاهد منفی انتخاب گردید.

یافته‌ها: در این مطالعه ژنوم مایکوباکتریوم در هیچیک از نمونه‌برداریهای پوستی بیماران سارکوئیدوز شناسایی نگردید.

نتیجه‌گیری: یافته‌های این مطالعه نقش گونه‌های مختلف مایکوباکتریوم را در پاتوژنز بیماری سارکوئیدوز تایید نمی‌نماید.

واژه‌های کلیدی: سارکوئیدوز، مایکوباکتریوم، نمونه‌برداری پوستی

فصلنامه بیماریهای پوست، بهار ۱۳۸۳؛ ۲۷: ۱۷۰-۱۶۶

مقدمه

سارکوئیدوز یک بیماری مولتی سیستم گرانولوماتوز با علت نامشخص است. اخیراً نقش مایکوباکتریوم توبرکولوزیس و مایکوباکتریوم‌های آتیپیک در پاتوژنز سارکوئیدوز مطرح شده است و تعدادی از محققین وجود گونه های مختلف مایکوباکتریوم را در نمونه‌های بافتی مختلف اثبات کرده‌اند(۱،۲). نمونه‌های لاواژ برونکوآلوئولر، مایع مغزی نخاعی، نمونه بافتی ریه، گره لنفاوی و پوست بیماران در مطالعات مختلف جهت بررسی استفاده شده و نتایجی بین ۵۰-۰ درصد گزارش شده‌است

مؤلف مسئول: دکتر فریده مهتی پور ـ تهران، میدان وحدت اسلامی، بیمارستان رازی، بخش پوست

(۳،٤). این مطالعات باعث شده تا محققین ارتباط و همراهی بین عفونت مایکوباکتریوم و سارکوئیدوز را مطرح سازند(۷-۵). با توجه به اینکه چنین مطالعه‌ای در کشور ما انجام نشده است، بر آن شدیم تا مطالعه‌ای را بر روی نمونه‌های پوستی بیماران سارکوئیدوز با همکاری بیمارستان رازی و بخش میکروبیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام دهیم و با توجه به حساسیت روش PCR-RFLP در یافتن DNA مایکوباکتریوم و سایر ارگانیسم‌ها، در مطالعه خود از این روش جدید استفاده کردیم(۸،۹).

روش اجرا

در این مطالعه ۲۰ بیمار مبتلا به سارکوئیدوز پوستی مراجعه کننده به درمانگاههای پوست بیمارستان رازی تهران طی سال‌های ۱۳۷۹ تا ۱۳۸۱ انتخاب شدند. این مطالعه از نوع case series بوده و با در نظر گرفتن شرایط مطالعه (هزینه اجرای طرح و زمان انجام مطالعه) حجم نمونه بصورت نمونه گیری آسان، ۲۰ نفر معین گردید. علائم بالینی منطبق با سارکوئیدوز پوستی، مشاهدهٔ naked granuloma در میکروسکوپ نوری، آزمون مانتوی منفی و حذف سایر تشخیص‌های بالینی به عنوان معیار انتخاب بیماران در نظر گرفته شد. نمونه بلوک پارافینه نمونه‌برداریهای پوستی این بیماران جهت آزمایش PCR-RFLP مورد استفاده قرار گرفت. به جهت کنترل کیفی آزمایشگاهی ۱۰ مورد نمونه پوستی بیماری‌های غیر از سارکوئیدوز به عنوان شاهد منفی بطور تصادفی از بایگانی آسیب شناسی همان مرکز انتخاب شد. این ۱۰ نمونه شامل ٤ مورد درماتیت تماسی، یک مورد گرانولوم جسم خارجی، یک مورد مورفه‌آ، ۲ مورد پسوریازیس و ۲ مورد لیکن پلان بود. ٤ مورد بلوک پارافینهٔ نمونه پوستی بیماران توبرکولوزپوستی که دارای PCR مثبت بودند، به عنوان شاهد مثبت آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گرفت.

استخراج DNA و طراحی پرایمر:

پارافین موجود در تکه‌های بریده شده از بلوک‌های پارافینه باگزیلول حذف شده و سپس بافر لیزکننده اضافه گردید.DNA استخراج‌شده‌با روش فنل- کلروفرم تخلیص وبااستفاده‌از الکل‌اتیلیک‌مطلق‌واستات سدیم تغلیظ شد(۸). سپس‌جهت‌بررسی کیفیت DNA استخراج شده از نمونه‌های بافتی مورد آزمایش، واکنش PCR با پرایمرهای GH_2O(5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3') PCO_4(5'-CCACTTCATCCACGTTCACC-3') انجام شد که قطعه‌ای به اندازه ۲٦۸ جفت باز از ژن بتاگلوبین انسانی را تکثیر می کند(۸). در صورت مشاهده باند مربوطه، DNA استخراج شده جهت انجام واکنش PCR مایکوباکتریوم مناسب در نظر گرفته می‌شد.

واکنش PCR :

واکنش PCR با پرایمرهای SP1 (5'-ACCTCCTTTCTAAGGAGCACC-3')و (5'-GATGCTCGCAACCACTATCCA-3') SP_2 انجام شد. این پرایمرها قطعه‌ای به اندازه ۲۰۵ تا ۳۱۸ جفت باز (بسته به گونه مایکوباکتریوم) از ژن 16S-23S مایکوباکتریوم را تکثیر می کنند که این ژن در بین تمام مایکوباکتریوم‌ها مشترک است(۸،۹). محصول PCR روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید نوارهای DNA توسط دستگاه UV-Transillumination قابل مشاهده شدند و از آنها عکس گرفته شد. در هر سری از واکنش‌های PCR از آب مقطر جهت کنترل منفی و از ژنوم سویه استاندارد مایکوباکتریوم توبرکولوز به عنوان شاهد مثبت استفاده گردید.

مرحله RFLP:

محصولات PCR بطور جداگانه تحت هضم آنزیمی قرار گرفتند. این آنزیم‌ها با اثر محدود عبارت بودند از : Dde I, MSP I, Taq I, Cof I, Hae III با AvaII و Hinf I (تهیه شده از شرکت فرمنتاس) که مطابق با توصیه‌های شرکت تولید کننده استفاده شدند. پس از هضم آنزیمی، محصول بر روی ژل آگاروز ٤ درصد الکتروفورز شد و در کنار شاخص وزنی DNA الگوی قطعات ایجاد شده مورد بررسی قرار گرفت(۸،۹).

یافته‌ها

بیماران ما با توجه به علائم بالینی منطبق با سارکوئیدوز همراه با مشاهدهٔ naked granuloma در میکروسکوپ نوری و بعد از حذف سایر تشخیص‌های بالینی وارد مطالعه شده بودند. آزمون مانتوی این بیماران منفی بود. ١٤ بیمار فقط دارای علائم پوستی سارکوئیدوز بودند و ٦ مورد علاوه بر علائم پوستی گرفتاری ریوی نیز داشتند. ۱۳ بیمار زن و ۷ بیمار مرد بودند. طیف سنی بیماران از ۲۲ تا ۵۹ سال و متوسط سن آنها ۳٦ سال بود. ۱۷ نفر از بیماران سابقه درمان قبلی (بوسیله کورتون موضعی یا سیستمیک) داشته و فقط ۳ بیمار قبلاً درمان نشده بودند. ژنوم گونه‌های مختلف مایکوباکتریوم در هیچیک از نمونه‌برداریهای پوستی چه در بیماران سارکوئیدوز و چه در گروه شاهد منفی با روش PCR-RFLP شناسایی نگردید، در حالی که نمونه‌های سل پوستی بررسی شده همگی مثبت بودند.

بحث

پاسخ گرانولومی در بیماری سارکوئیدوز احتمالاً یک پاسخ ایمنی به یک آنتی‌ژن خارجی است. به علت تشابهاتی که در نمای بافت شناسی بیماران مبتلا به سارکوئیدوز و بیماران توبرکولوزی وجود دارد، از مدت‌ها قبل نقش احتمالی مایکوباکتریوم توبرکولوزیس و دیگر گونه‌های مایکوباکتریا در ایجاد بیماری سارکوئیدوز مطرح بوده است(۳-۱). حتی عده‌ای از محققین احتمال قابل انتقال بودن بیماری را مطرح کرده‌اند(٤). پس از معرفی تکنیک PCR توسط Kary Mulis در سال ۱۹۸۵ تحول بزرگی در شناسایی ژنوم ارگانیسم‌ها و تعیین توالی آنها ایجاد شد. با توجه به حساسیت و ویژگی بالای روش PCR-RFLP نسبت به روشهای قبلی، استفاده از این تکنیک جدید در موضوع مورد بحث مرسوم شده است. PCR-RFLP یک روش تکمیلی است که امکان شناسایی گونه‌های مختلف مایکوباکتریایی را با انجام یک آزمایش مهیا می‌نماید(۸،۹). انجام این آزمایش بر روی ۲۰ نمونه پوست بیماران سارکوئیدوز نشان داد که نمونه‌های مورد مطالعه فاقد ژنوم مایکوباکتریایی است. نتایج حاصل از این مطالعه همسان با نتایج حاصل از مطالعات انجام شده توسط Vokurka و همکاران و نیز Thakker و همکاران است(۵،٦). هر چند باید توجه داشت که مطالعات مختلف میزان آلودگی بیماران سارکوئیدوز را به مایکوباکتریوم توبوکولوزیس و غیرتوبرکولوزیس بین صفر تا هشتاد درصد گزارش نموده‌اند(۷).

انتخاب نمونه بافتی بیماران مبتلا به سارکوئیدوز، طراحی پرایمر، DNA contamination و کیفیت DNA استخراج شده می‌تواند دلایلی برای طیف وسیع نتایج بدست آمده از مطالعات مختلف باشد. ما در این مطالعه، نمونه‌هایی را انتخاب کردیم که علاوه بر تابلوی بالینی بیمار و آزمون مانتوی منفی و رد سایر تشخیص‌های بالینی مطرح، گرانولوم naked نیز درلام آسیب شناسی بیمار مشاهده شده باشد. جهت بررسی اختصاصی بودن پرایمرهای انتخابی، واکنش PCR با سویه‌های مایکوباکتریوم استاندارد موجود، سایر جنسهای باکتریایی و ژنوم انسانی انجام شد و همچنین با نرم‌افزار Blast در

Gene bank مورد بررسی قرار گرفت. این بررسی‌ها نشان داد که پرایمرهای انتخابی برای گونه‌های مایکوباکتریوم کاملاً اختصاصی است و به ژنوم ارگانیسم‌های دیگر اتصال نمی‌یابد.

جهت جلوگیری از آلودگی DNA آزمایش PCR در سه فضای مجزا انجام گرفت (دو فضای Pre PCR، یک فضای Post PCR) و از کنترلهای مثبت و منفی در هر سری آزمایش PCR استفاده شد.

در این مطالعه پرایمرهای GH_{20} و PCO_4 جهت بررسی کیفیت DNA استخراج شده از بافت، مورد استفاده قرار گرفت که قطعه‌ای به اندازه ۲۶۸ جفت باز از ژنوم بتاگلوبین انسانی را تکثیر می‌کنند (۸،۹). در صورت مشاهده نوار اختصاصی مربوط به این ژن، DNA استخراج شده جهت انجام PCR مایکوباکتریوم مناسب در نظر گرفته می‌شود.

بعد از انجام تمام تمهیدات فوق، در نمونه‌های مورد مطالعه ژنوم مایکوباکتریایی شناسایی نشد و نقش مایکوباکتریوم در پاتوژنز سارکوئیدوز تأیید نگردید(تصویر شماره ۲).

لازم به ذکر است که در مطالعاتی هم که نتایج مثبت گزارش شده است، طیف وسیعی از مایکوباکتریوم‌های توبرکولوزیس و غیرتوبرکولوزیس شناسایی شده‌اند که خود این طیف وسیع میکروبی و تعدد گونه‌های مایکوباکتریایی دخیل در بیماری، برعلیه نظریه‌ای است که یک یا چند ارگانیسم مشخص را در پاتوژنز بیماری مؤثر می‌داند. دخیل بودن چنین طیف وسیعی از مایکوباکتریوم‌ها و همچنین متغیر بودن این طیف از بیماری به بیمار دیگر و از تحقیقی به تحقیق دیگر، حاکی از آن است که حداقل در حال حاضر در نظر گرفتن یک نقش ثابت و قطعی برای یک یا چند مایکوباکتریوم در اتیولوژی سارکوئیدوز نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد. این واقعیت که بیماران سارکوئیدوز که تحت درمان داروهای سرکوبگر قرار می‌گیرند، نشانه‌های برق آسای (فولمینانت) عفونت را نشان نمی‌دهند، نیز برعلیه یک اتیولوژی صرفاً عفونی بیماری می‌باشد(۱۲-۱۰).

یافته‌های ما در این مطالعه نقش بین گونه‌های مختلف مایکوباکتریوم را در پاتوژنز بیماری سارکوئیدوز تائید نمی‌نماید. با اینکه پاتوژنز این بیماری همچنان نامشخص است، ولی احتمالاً سارکوئیدوز نتیجه نهایی یک پاسخ ایمنی است که می‌تواند بوسیله طیف وسیعی از آنتی‌ژنهای خارجی شروع شود و به نظر می‌رسد این طیف وسیع می‌تواند عوامل عفونی را نیز شامل شود. ولی در نظر گرفتن صرفاً یک یا چند عامل عفونی در پاتوژنز بیماری، بدون در نظر گرفتن سایر آنتی‌ژنهای خارجی، در این مطالعه تأیید نشد. در هر صورت نتیجه نهایی این پاسخ ایمنی تشکیل گرانولوم بوده و درمان رایج ایمونوساپرسیو (نه درمان آنتی میکروبیال) جهت کنترل این بیماری ضروری است.

تشکر و قدردانی

از همکاری بخش آسیب شناسی بیمارستان رازی در انجام این طرح تحقیقاتی تشکر می‌شود.

منابع

1-Mangiapam G, Hance AJ. Mycobacteria and sarcoidosis. Sarcoidosis 1995; 12: 20-37.

2-Popper HH, Keleman H, Hoefler GB, et al. Presence of mycobacterial DNA in sarcoidosis. Hum Pathol 1997; 28: 796-800.

3-El-Zaakaru FA, Naser SA, Kalte DC. Identification of mycobacterium avium complex in sarcoidosis. J Clin Microbiol 1996; 34: 2240.

4-Almenoff PL, Johnson A, Lesser M, et al. Growth of acid fast L forms from the blood of patients with sarcoidosis. Thorax 1996; 51: 530.

5-Vokurka M, Lecossier D, Wallaert B, et al. Absence of DNA of mycobacterium tuberculosis complex in sarcoidosis. Am J Respir Crit Care Med 1997; 156: 1000-03.

6-Thakker B, Black M, Foulis AK. Mycobacterial nucleic acids in sarcoid lesions. Lancet 1992; 339: 1537.

7-Li N, Bajob H A, Kbba A. Identification of mycobacterial DNA in cutaneous lesions of sarcoidosis. J Cutan Pathol 1999; 26: 271-78.

8-Roth A, Reishl U, Steabel A, et al. Novel diagnostic algorithm for identification of mycobacterial DNA using genus-specific amplification of the 16S-23S RNA gene. J Clin Microbiol 2000, 38; 1094-2104.

9-Bauer HM, Ting Y, Greer CE, et al. Genital human papilloma virus infection in female students as determined by a PCR-based method. JAMA 1991; 265: 472-77.

10-Howard A, White JR CR. Sarcoidosis. In: Bolognia Jl, Jorizzo J, Rapini RP, et al(eds). Dermatology. London: Mosby, 2003: 1455-60.

11-Drake WP, Pei Z, Pride DT, et al. Molecular analysis of sarcoidosis tissues for mycobacterium species DNA. Emerg Infect Dis 2002; 8: 1334-41.

12-Eishi Y, Suga M, Ishige I, et al. Quantitative analysis of mycobacterial and propionibacterial DNA in lymph nodes of Japanese and European patients with sarcoidosis. J Clin Microbiol 2002; 40: 198-204.