استفاده از آنتی‌ژن‌های ۱۸ و ۳۶ کیلودالتونی مایکوباکتریوم لپره برای تشخیص نمونه بیماران ایرانی مبتلا به جذام با روش مولکولی PCR

وحیدصادقی[۱]، دکتر نادر مقصودی[۲]، دکتر یحیی دولتی[۳]، علی اصغر دلدار[۱]، دکتر مهران حیدری سراج[۴]

۱ـ مجتمع دانشگاهی علوم، مرکز تحقیقات علوم و فناوری زیستی، گروه پژوهشی مهندسی ژنتیک، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، ۲ـ مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، ۳ـاستاد، ۴ـ متخصص پوست، مرکز آموزش و پژوهش بیماری‌های پوست و جذام، دانشگاه علوم پزشکی تهران

زمینه و هدف: مایکو باکتریوم لپره یک مایکوباکتریوم اجباری درون سلولی است که در سلول‌های پوست، اعصاب محیطی و ماکروفاژها، تکثیر می‌یابد و عامل بیماری جذام می‌باشد. رشد نکردن در محیط‌های کشت آزمایشگاهی (in vitro) و طولانی بودن زمان تکثیر (حدوداً ۱۴-۱۱ روز) از ویژگی هایی است که کار با این باکتری را در آزمایشگاه با مشکل روبرو کرده است. یکی از روش‌هایی که امروزه برای تشخیص میکروارگانیزم‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد، بهره‌گیری ازروش واکنش زنجیرهای پلیمراز (PCR) است. در این مطالعه با بهره‌گیری از دو آنتی‌ژن شاخص مایکوباکتریوم لپره نسبت به تشخیص آزمایشگاهی آن، به روش PCR اقدام شد.

روش اجرا: پرایمرهای اختصاصی برای ژن‌های کدکننده آنتی‌ژن‌های ۱۸ و ۳۶ کیلودالتونی مستقیماً بر نمونه‌های بیوپسی پوست ۱۵ بیمار ایرانی مبتلا به جذام مورد استفاده قرار گرفتند.

یافته‌ها: با این روش، قطعات خاصی از ژن‌های اختصاصی M.leprae با پرایمرهای طراحی شده در ۵ بیمارتکثیر یافت.

نتیجه‌گیری: باتوجه به تکرارپذیری آزمایش و تأیید آن توسط آنزیم‌های محدودگر و تعیین توالی در کشور آلمان، این دو سایت می‌تواند به عنوان جایگاه‌های اختصاصی و مناسب برای تشخیص مولکولی افراد مقیم در مناطق آلوده به جذام، افراد مشکوک به جذام و بیماران جذامی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: جذام، تشخیص مولکولی، مایکوباکتریوم لپره، PCR

دریافت مقاله ۸۳/۷/۲۷ اعلام قبولی: ۸۳/۹/۵ فصلنامه بیماری‌های پوست ۱۳۸۴؛دوره ۸ (۵) : ۳۸۸-۳۹۳

مقدمه

مایکوباکتریوم لپره با ژنومی برابر bp ۳/۲۶۸/۲۰۳ عامل بیماری جذام است که هنوز هم یکی از معضلات بهداشت جهانی خصوصاً در برخی از مناطق کشورهای پیش رفته، آسیا، امریکای لاتین و افریقا است. این باکتری انگل اجباری درون سلولی است که می‌تواند بافت‌های پوست، اعصاب محیطی و برخی از اندام‌ها را آلوده کند(۱،۲).

رشد نکردن در محیط‌های کشت آزمایشگاهی (in vitro)، طولانی بودن دوره رشد و رشد در دمای پایین (۳۰ درجه سانتی گراد) از ویژگی‌های این باکتری است که

مؤلف مسوول: وحید صادقی ـ تهران، پاسداران، میدان حسین آباد، مرکز آموزشی و پژوهشی علوم

پست الکترونیک: vsadeghi@hotmail.com

تحقیق در این زمینه را با محدودیت روبرو می‌کند(۳،۴). باتوجه به دوره کمون این بیماری (گاهی تا ۵ سال)، تشخیص در اولین مرحله بیماری و شروع درمان در این مرحله، می‌تواند از پیش‌رفت بیماری و ایجاد صدمات جبران‌ناپذیر به بیمار جلوگیری کند. لذا وجود روشی برای تشخیص بیماری آن هم در مراحلی که تعداد باکتری در بیمار بسیار کم است و روش‌های جاری نیز تشخیص را غیرممکن می‌کند، بسیار اهمیت خواهد بود.

امروزه استفاده از روش مولکولی PCR در بسیاری از کشورها برای تشخیص این بیماری و دیگر بیماری‌های عفونی مورد استفاده قرار می‌گیرد(۷-۵). دراین مطالعه برای شناسایی باکتری در نمونه‌های انسانی از ژن‌های کدکننده آنتی‌ژن‌های ۱۸ و ۳۶ کیلودالتونی که اختصاصی مایکوباکتریوم لپره است(۸،۹) استفاده شد.

روش اجرا

- جمع آوری نمونه: از بیمارستان بابا باغی تبریز و مرکز بهداشت آزادگان تهران تعداد ۱۵ نمونه‌ی مربوط به بیوپسی پوست از محل ضایعه بیماران جذامی با پانچ ۴ میلی‌متر و در شرایط ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد (ازت مایع) به آزمایشگاه انتقال یافت.

- استخراج DNA: ابتدا نمونه در بافر TE (0.01 M tris, 0.002 M EDTA-pH.8) 300μl TE Buffer هموژن شد و سپس در بافر لیزکننده قرار گرفت(۶،۷).

(300μl Lysis Buffer [1 mg/ml Proteinase k, 0.05% Tween20, 100mMtris-HCI pH 8.5])

و به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و سپس ۱۵ دقیقه در دمای ۹۷ درجه سانتی گراد (برای غیرفعال کردن پروتئیناز K) نگه داری و با روش فنل کلروفرم DNA استخراج و در شرایط ۲۰ نگهداری شد.

- طراحی پرایمر: پس از تهیه توالی ژن‌ها از سایت NCBI و با استفاده از برنامه نرم‌افزاری GeneRunner توالی پرایمرها تعیین شد.

Primers:
Ag 36 kDa (Sense: 5'-CTC CAC CTG GAC CGG CGA T-3' & Antisense: 5'-GAC TAG CCT GCC AAG TCG-3')
Ag 18 kDa (Sense: 5'-GAA CGC AAC GTA GTC ACC GT-3' & Antisense: 5'-AAC GGA GAT CTT GCG CGG TT-3')

- واکنش PCR: با استفاده از DNA استخراج شده واکنش PCR طبق شرایط زیر صورت گرفت.

[200 ng of DNA, 125μM dNTPs, 20 Pmol of each primer, 1 X Q solution] and 1.5 μl PCR Buffer 10X ([10mM Tris-HCI (pH=8.3), 500 mM MgCI2] and 1.25 U Taq Polymerase

و برنامه:

Ag 18 kDa (94 10' / 94 2' / 58 2' / 72 c 2' / 72 10')
Ag 36 kDa (94 10' / 94 2' / 55 2' / 72 c 2' / 72 10')

پس از تکثیر ژن، ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR روی ژل آگارز ۱/۲٪ الکتروفورز و با رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید، نتایج با UV مورد بررسی قرار گرفت.

- هضم آنزیمی: با مشاهده باندهای مورد نظر در روی ژل، برای تأیید آزمایش، محصول PCR در معرض آنزیم EcoRv قرار گرفت و هضم صورت گرفت.

- تعیین توالی: پس از تأیید، با کمک تست هضم آنزیمی، محصول PCR برای تعیین توالی به کمپانی MWG آلمان ارسال و نتیجه آن دریافت شد.

یافته‌ها

درجدول شماره ۱ نتایج آزمایش میکروسکوپی، آزمایش PCR و مرحله بالینی بیماری افراد تحت مطالعه نشان داده شده است. به دلیل دریافت دارو، اسمیر بسیاری از این بیماران منفی بود که به نظر می‌رسد در آسایشگاه دوران نقاهت را طی کرده‌اند. باتوجه به مشکلات تهیه نمونه و بررسی نتایج بالینی این بیماران، برخی ازنتایج

اسمیرها به ۶ ماه قبل از نمونه‌گیری مربوط است. در این بررسی نتایج PCR ، ۵ بیمار مثبت بود و با انجام آزمایش تکمیلی (هضم آنزیمی و تعیین توالی) این نتایج مورد تأیید قرار گرفت. از ۱۵ نمونه تهیه شده، تعداد ۱۰ نمونه به بیمارانی مربوط بود که مدت طولانی (بیش از یک سال) تحت درمان چند دارویی (MDT) قرار داشتند به طوری که منفی بودن پاسخ PCR آن‌ها پیش‌بینی می‌شد. تعداد ۵ نمونه به بیماران درمان نشده یا در ابتدای درمان مربوط بود که نتایج PCR آن‌ها مثبت شد که این امر یا به دلیل دقت این روش در مقایسه با روش‌های معمول است یا این که امکان بازگشت بیماری در این افراد وجود دارد.

پس از بررسی نتایج PCR، هر دو باند bp ۲۳۰ و ۵۳۰ در ۵ نمونه (به طور جداگانه) مشاهده شد(تصاویر شماره ۱ و ۲).

با هضم آنزیمی روی محصول PCR (Ag 36 kDa) ، برش صورت گرفت و دو باند bp ۳۷۰ و ۱۶۱ نیز مشاهده شد که تأیید صحت آزمایش است(تصویر شماره ۳).

با انجام آزمایش تعیین توالی، نتایج توسط نرم‌افزار GeneRunner ، با قطعه ژن اصلی مقایسه شد که صحت قطعه ژن تکثیر شده مورد تأیید قرار گرفت (تصویر شماره ۴).

جدول شماره ۱ـ مقایسه نتایج آزمایش میکروسکوپی با آزمایش PCR در ۱۵ بیمار مبتلا به جذام

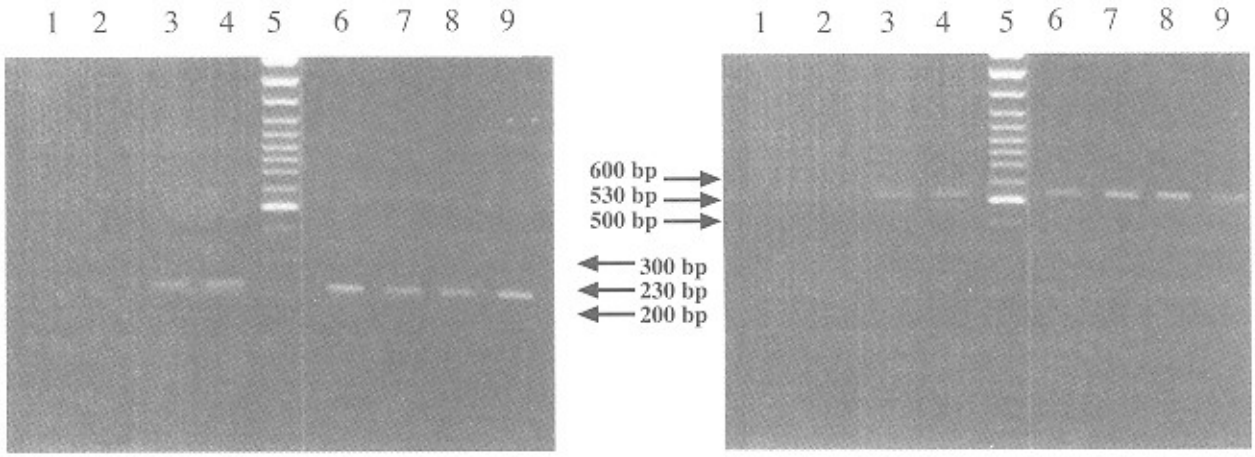
کد بیمار	نتایج استخراج		نتایج آزمایش میکروسکوپی	نتایج آزمایش PCR	نوع بیماری*
	OD	$C\mu g/\mu l$			
۱	۲/۴	۰/۵۱	+	+	LL
۲	۱/۶۱	۰/۸۵	+	–	LL
۳	۱/۵	۰/۳۳	–	–	LL
۴	۱/۷۹	۳/۰۲	+	–	LL
۵	۱/۸۵	۰/۶۵	–	–	LL
۶	۱/۴	۰/۳۹	+	+	LL
۷	۱/۲	۰/۴۷	–	–	LL
۸	۰/۷۵	۱	–	–	TT
۹	۱	۱	–	–	LL
۱۰	۰/۹۲	۱/۱۵	–	–	LL
۱۱	۰/۹۷	۱/۲	–	–	LL
۱۲	۱/۲	۰/۹۸	–	–	LL
۱۳	۱/۳	۱	–	–	LL
۱۴	۲	۰/۴	–	–	TT
۱۵	۱/۶۸	۲/۵۶	+	+	LL

* LL=lepromatous و TT= tuberculoid

بحث

در این مطالعه نمونه بیوپسی پوست ۵ بیمار از ۱۵ بیمار جذامی به روش PCR مثبت شد.

گفتنی است که در مقایسه تعیین توالی محصول PCR با ژن اصلی، تعداد معدودی از نوکلئوتیدها هم‌خوانی نداشتند که این می‌تواند از اشکال احتمالی دستگاه در قرائت نمونه باشد یا به امکان وجود اختلاف در سوش بومی ایران با سوش‌های غیربومی مربوط شود و این موضوعی است که به بررسی بیش‌تر نیازدارد. از مشکلات موجود در بیماری جذام دوره طولانی کمون این بیماری است که در این دوره، باکتری به تعداد کم و در قسمت‌های خاصی از اندام‌ها پنهان می‌ماند و عموماً به کمک روش‌های جاری تشخیصی قابل شناسایی نیست. لذا روش تشخیص مولکولی با ردیابی آنتی‌ژن‌های ویژه این باکتری امکان تشخیص دقیق این باکتری را حتی زمانی فراهم می‌کند که تعداد آن‌ها ناچیز باشد (۱۰و۴). گزارش‌های فراوانی از مقایسه میان روش‌های مختلف تشخیصی وجود دارد که در آن‌ها بیش‌ترین دقت و به‌ترین امکان شناسایی به روش‌های مولکولی اختصاص یافته است(۱۲و۱۱و۵). در این تحقیق و با استفاده از این روش با طراحی پرایمرهای اختصاصی امکان تشخیص دقیق این باکتری مهیا شد و این روش برای شناسایی بیماران خصوصاً برای افرادی توصیه می‌شود که در مناطق ریسک‌پذیر و در مجاورت بیماران جذامی زندگی می‌کنند.

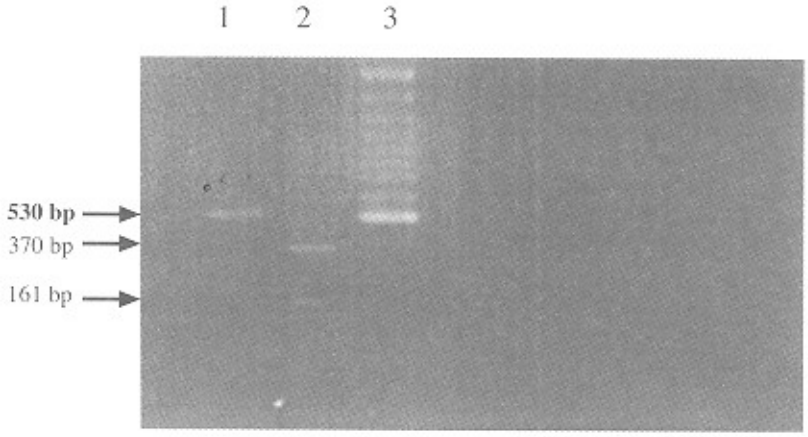


تصویر شماره ۱ ـ نتیجه PCR نمونه‌های مثبت مربوط به آنتی ژن 36kDa (530bp)

۱ـ کنترل منفی
۲ـ DNA نرمال (ژنومیک انسانی)
۳ـ بیمار شماره ۱
۴ـ بیمار شماره ۳
۵ـ مارکر (100bp)
۶ـ بیمار شماره ۶
۷- بیمار شماره ۷
۸-بیمار شماره ۱۱
۹ـ کنترل مثبت

تصویر شماره ۲ـ نتیجه PCR نمونه‌های مثبت مربوط به آنتی‌ژن 18kDa (230bp)

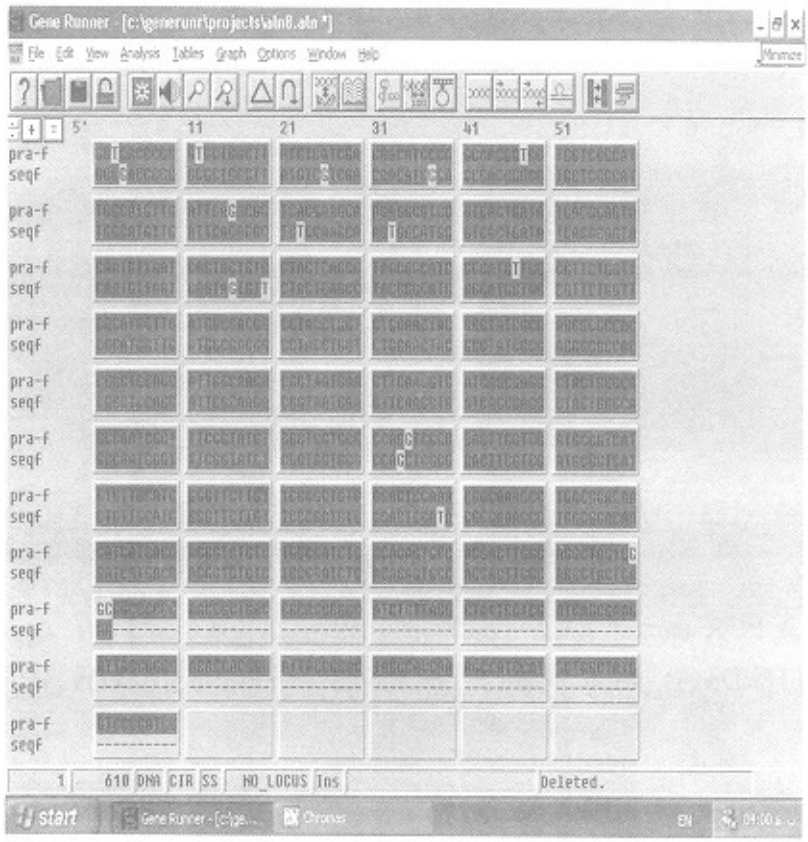
۱ـ کنترل منفی
۲ـ DNA نرمال (ژنومیک انسانی)
۳ـ بیمار شماره ۱
۴ـ بیمار شماره ۳
۵ـ مارکر (100bp)
۶ـ بیمار شماره ۶
۷ـ بیمار شماره ۷
۸ـ بیمار شماره ۱۱
۹ـ کنترل مثبت



تصویر شماره ۳ـ نتیجه Digestion مربوط به قطعه 530 bp(Ag36 kDa)

۱ـ محصول PCR مربوط به یکی از نمونه‌های مثبت (530bp) ۲ـ نمونه Digest شده قطعه 530bp(370&161bp)

۳ـ مارکر (100bp)



تصویر شماره ٤ـ نتیجه مقایسه توالی محصول PCR و ژن اصلی به کمک برنامه Gene Runner

تشکر و قدردانی

از زحمات آقایان دکتر سیدحسین طباطبایی و دکتر علی خامسی‌پور در مرکز آموزش و پژوهش بیماری‌های پوست و جذام، آقای دکتر فیوآل و آقای نجفی و سایر همکاران در بیمارستان بابا باغی تبریز، خانم نادمی و همکاران در مرکز بهداشت آزادگان تهران صمیمانه تقدیر و تشکر می‌شود.

References

1-Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. Nature 2001; 409: 1007-11.

2-Matsuoka, Maeda S, Kai M, et al. Mycobacterium leprae typing by genomic diversity and global distribution of genotypes. Int J Lepr Other Mycobact Dis 2000; 68: 121-28.

3-Soto CY, Moreno PA, Valencia JT, et al. Isolation, characterization, molecular cloning and amplification of species-specific M.leprae antigen. Int J Leprosy 1999; 67: 392-402.

4-Santo AR, Nery JC, Nadia C, et al. Molecular diagnosis use of the polymerase chain reaction in the diagnosis of leprosy. J Med Microbiol 1997; 46: 170-72.

5-Job KC, Jayakumar D, Williams DL, Gillis TP. Role of polymerase chain reaction in the diagnosis of early leprosy. Int J Leprosy 1997; 65: 461-64.

6-Wichitwechkarn J, Karnjan S, Shuntawuttisettee S,et al. Detection of Mycobacterium leprae infection by PCR. J Clin Microbiol 1995; 33: 45-49.

7-Rafi A, Donoghue HD, Stanford JL. Application of PCR for the detection of Mycobacterium leprae DNA in specimens from treated leprosy patients. Int J Leprosy 1995; 63: 42-47.

8-Donoghue HD, Holton J, Spigelman M. Molecular diagnosis PCR primers that can detect low levels of Mycobacterium leprae DNA. J Med Microbiology 2001; 50: 177-82.

9-Sharma RK, Katoch K, Shivannavrar CT, et al. Detection of Mycobacterium leprae by gene amplification, combined ethidium-bromide staining and prob hybridization. Int J leprosy 1996; 64: 409-16.

10-Klatser PR, Van Beers S, Madjid B, et al. Detection of Mycobacterium leprae nasal carriers in populations for which leprosy is endemic. J Clin Microbiol 1993; 31: 2947-51.

11-Kampirapap K, Singtham N, Klatser PR, Wiriyawipa S. DNA amplification for detection of leprosy and assessment of efficacy of leprosy chemotherapy. Int J Leprosy 1998; 66: 16-21.

12-Shi L, Yajima M, Kowatsu K, et al. Comparison of polymerase chain reaction, immunohistochemistry and conventional histopathology in the diagnosis of early leprosy in Sichuan province of China. Jpn J Leprosy 2000; 69: 147-56.