

## ● مقاله تحقیقی

# شناسایی DNA مایکوپلازماها در سرم بیماران آرتریت روماتوئید به وسیله PCR

### چکیده

**زمنیه:** مایکوپلازماها به عنوان عامل آرتریت روماتوئید (RA) در تعدادی از حیوانات شناخته شده‌اند. بر عکس، نقش مایکوپلازماها در آرتریت روماتوئید انسانی هنوز در حاله‌ای از ابهام بوده و قابل بحث می‌باشد. از تلاش‌های انجام شده با استفاده از به کارگیری روش‌های روتین برای تشخیص مایکوپلازماها 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 پلیمرز (PCR)، افق‌های روشنی را جهت تشخیص اسیدنوکلئیک مایکوپلازما در این بیماری پیچیده، به وجود آورده است. جهت تحقیق بر روی این موضوع که آیا مایکوپلازماها 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 مایکوپلازمای استاندارد و هدف ژنی ۱۶ S rRNA طراحی گردید. این روش طراحی شده جهت شناسایی مایکوپلازما 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 مایکوپلازما، در ۱۲ مورد از ۱۰۰ نمونه Anti CCP مثبت (۱۲٪)، ۴ مورد از ۱۰۰ نمونه Anti CCP منفی (۴٪)، 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 مایکوپلازما در بیماران RA را آشکار نماییم.

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

**واژگان کلیدی:** آرتریت روماتوئید، پی‌سی‌آر، مایکوپلازما، SPP

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۶/۲/۲۳

تاریخ اصلاح نهایی: ۱۳۸۶/۴/۲

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۶/۲/۶



دکتر محمدحسن شاه‌حسینی<sup>۱\*</sup>

دکتر فرهاد غریب‌دوست<sup>۲</sup>

الهه اللهیاری<sup>۳</sup>

دکتر حمیدرضا خرم‌خورشید<sup>۴</sup>

دکتر جلیل وندیوسفی<sup>۵</sup>

۱. دانشیار بیوتکنولوژی پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی

۲. استاد روماتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۳. کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی

۴. استادیار ژنتیک پزشکی، دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی

۵. دانشیار میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی

\* نشانی نویسنده مسئول: تهران، بزرگراه آشناسان، بلوار مبعث، بهارستان نهم، پلاک ۱۴، طبقه ۴ غربی، تلفکس: ۲۲۰۶۰۲۰۷  
پست الکترونیک: shahhosseiny@yahoo.com



## مقدمه

مایکوپلازماها کوچکترین باکتری‌های خودتکثیر پلئومورف، با قطری حدود ۲۰۰-۵۰۰ 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 ارگانسیم‌های منحصر بفرد در طبیعت، عامل بیماری در طیف وسیعی از جانداران و از جمله انسان هستند [۱-۲].

مایکوپلازماها 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 میکروارگانسیم‌ها طیفی از آثار و پیامدها را بر روی بافت‌ها و سلول‌های میزبان تولید می‌نمایند. در کنار تأثیر بر روی رشد سلول و مورفولوژی، مایکوپلازماها 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 مایکوپلازماها 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 مایکوپلازما پنترانس، مایکوپلازما فرمنتانس و مایکوپلازما پیروم، می‌توانند وارد برخی بافت‌ها و سلول‌ها شده و موجب بیماری‌های حاد و مزمن با طیف وسیعی از علائم و نشانه‌ها شوند [۵، ۶]. نشان داده شده است مایکوپلازماها 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 [۷، ۸]. در سال ۱۹۹۷ دانشمندی بنام هافمن، شواهدی سرولوژیک از عفونت‌های مایکوپلازمایی فعال و غیرفعال در بیماران با آرتریت روماتوئید و RA جوانی یافت؛ اما در مایع سینوویال این بیماران هیچ DNA مایکوپلازمایی با واکنش زنجیره‌ای پلیمرز PCR یافت نشد [۹].

آرتریت روماتوئید، 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 روماتوئید

(RF) است. فاکتور روماتوئید، آنتی‌بادی از کلاس IgM است که با گاماگلوبولین واکنش داده و در ۸۰-۶۰٪ بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید دیده می‌شود. RF حساس بوده اما یک فاکتور ویژه برای آرتریت روماتوئید نیست چرا که در افراد سالم و در بیماران با عفونت‌های مختلف یا دیگر بیماری‌های اتوایمیون (مانند لوپوس اریتماتوز سیستمیک، سندرم شوگرن، اسکلرودرما و...) هم دیده شده است [۱۰].

همچنین حدود ۶۰-۴۰ درصد بیماران مبتلاء به آرتریت روماتوئید 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

۱۸۰ شناسایی DNA مایکوپلازماها در سرم بیماران آرتریت روماتوئید به وسیله PCR ...

پیتید 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 روماتوئید مطرح است. آنتی‌بادی تولیدی بر علیه CCP به طور واضح از کلاس IgG بوده و دارای ویژگی ۹۷٪ برای آرتریت روماتوئید می‌باشد. این آنتی‌بادی در مراحل اولیه بیماری تولید و دارای ارزش پیشگویی بالایی است. مشاهده شده 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 آشکار شدن است [۱۱، ۱۲].

روش‌های تشخیص مایکوپلازماها 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 [۱۳-۱۵]. روش‌های برپایه کشت، تکنیک‌هایی وقت‌گیر (چندین هفته) با حساسیت نسبتاً پایین و نیازمند امکانات و همین‌طور تجربه کافی جهت تفسیر نتایج می‌باشند. برخی از مایکوپلازماها هم مانند مایکوپلازما هیورینیس<sup>۱</sup> به سختی در محیط کشت رشد می‌کنند. روش‌های غیرکشتی

1 - M. hyorhinis

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 پلیمرز یا PCR می‌باشد [۱۶]. روش‌های بیوشیمیایی مانند آدنوزین فسفوریلاز فاقد ویژگی هستند چرا که برخی باکتری‌ها مانند باسیلوس سوبتیلیس، اش‌ریشیا کلی، سالمونلا تیفی موروم، نوکلئوزید فسفوریلاز را تولید کرده و در ضمن برخی گونه‌های مایکوپلازما، مانند مایکوپلازما پنومونیه FH، مایکوپلازما پیروم، مایکوپلازما لیوفیلوم در عمل چیزی تولید نمی‌کنند. روش‌های بر پایه تلقیح به کشت‌های سلولی فاقد مایکوپلازما و حاوی اندیکاتور هم، به دلیل سه پاساژ و تکنیک نهایی تشخیصی (برای مثال رنگ‌آمیزی DNA با رنگ‌های فلوروسنت مانند ۴'، ۶-دی آمیدینو-۲-فینیل 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 مایکوپلازماها، جهت شناسایی همزمان اکثریت وسیع گونه‌های مایکوپلازمایی 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 مایکوپلازماها هستند [۲۱-۱۵]. ثابت شده است که روش‌های بر پایه تکثیر، برای شناسایی برخی قطعات خاص DNA ژنوم مایکوپلازما، 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 rRNA S ۱۶، یا بخش‌های rRNA ۲۳S-۱۶ S [۲۴-۲۲] و یا هدف‌های دیگر طراحی شده‌اند. سکانس ژن‌های rRNA تعداد زیادی از گونه‌های مایکوپلازما، تعیین ترادف شده است. مطالعات فیلوژنتیک سیستماتیک این ارگانیسیم‌ها و همین‌طور بررسی‌های کامپیوتری مقایسه‌ای این ترادف‌های ریبوزومی، مؤید بخش‌های به شدت ثابت و مشترک در همه انواع مایکوپلازماهایی است که جهت طراحی پرایمرهای PCR مناسب به کار می‌روند. با استفاده از تکنیک PCR دقیق‌تر می‌توان حضور مایکوپلازماها را در



مایع سینوویال بیماران آرتریت روماتوئید تحقیق نمود.

در این مطالعه ما فرض کرده‌ایم که عفونت‌های مزمن مایکوپلاسمایی احتمالاً در ارتباط با آسیب‌زایی آرتریت روماتوئید 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 مایکوپلازما که بر مبنای سکانس‌های ثابت و مشترک زیر واحد 16S rRNA طراحی شده است، حضور مایکوپلازما در سرم بیماران انتخاب شده، تحقیق گردید.

## روش کار

**سویه‌های باکتریایی:** در این مطالعه گونه‌های متعلق به مولیکوتس به کار رفته عبارت بودند از: مایکوپلازما پنومونیه (۱۰۱۱۹ NCTC)، مایکوپلازما آرجینینی، مایکوپلازما هیورینیس، مایکوپلازما ارال، مایکوپلازما سینوویه، مایکوپلازما گالیناروم (رازی ۱۳۵۰ و ۱۳۴۶)، مایکوپلازما گالیسپتیکوم (رازی ۱۳۵۵)، مایکوپلازما اویانومونیه (رازی ۱۳۶۴)، مایکوپلازما آگالاکتیا (رازی ۱۳۴۳)، اوره آپلازما اوره آلیتیکوم (رازی ۱۳۶۹) و اکول پلازما 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، اسپریتیلوس 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 مایکوپلازما در مرحله انتهای فاز لگاریتمی برای ۳۰ دقیقه در  $g \ 12/000$  سانتی‌فیوژ شد (سویه‌های لیوفیلیزه در یک میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر استریل، حل شد و به طور مستقیم و بدون سانتریفیوژ 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 از محلول DNG به لوله حاوی ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی و یا صد میکرولیتر سرم، اضافه و بلافاصله ورتکس گردید. لوله 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 ده‌هزار دور در دقیقه سانتریفیوژ 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 ده‌هزار دور در دقیقه سانتریفیوژ 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

جدول ۱ - ترادف پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر DNA مایکوپلازماها	
	Sequence(5'-----3')
<b>Forward Primer</b>	SHAH-GPO-3, 5'-GGGAGCAAACAGGATTAGATACCT-3'
<b>Reverse Primer</b>	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 می ماند؛ لذا بهتر است تا ارتفاعی از دیواره لوله با استفاده از ۱۰۰ میکرولیتر حلال نهایی شسته شود. از سلول های انسانی و موشی هم به طریق فوق، DNA استخراج شد.

DNA ژنومیک باکتری های غیرمایکوپلازمایی از طریق جوشاندن همراه با درجنت غیریونی تریتون 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 تریتون 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 ۲۶۰ به ۲۸۰ 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]، 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 در میکس ۲۵ میکرولیتری PCR، با استفاده از پرایمرهای جلویی و عقبی مخصوص نواحی مشترک یا همسان rRNA ۱۶ S، با غلظت نهایی ۰/۴ میکرومول (یک میکرولیتر از غلظت ده میلی مولار)، ۲/۵ میکرولیتر از بافر PCR (۱۰X) (سیناژن)، ۱/۵ میلی مولار MgCl<sub>2</sub> (از غلظت ۵۰ mM

(سیناژن))، ۰/۲ میلی مولار مخلوط dNTP (۱۰ mM) (سیناژن) و با استفاده از ۲ واحد آنزیم (۵ μ/1uL) Taq، (Taq DNA Polymerase سیناژن) و چرخه های حرارتی ۹۴ درجه سانتی گراد دودقیقه یک سیکل، ۹۴ درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه، ۷۰ درجه سانتی گراد ۲۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد ۲۰ ثانیه و طی 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، بر روی 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 فرمتانس و در وکتور pTZ57R این کیت، انجام گرفت. به طور خلاصه در ابتدای 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



### 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 مایکوپلازما 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 3-GPO-SHAH به MGSO، حساسیت و در عین حال ویژگی آن را افزایش دادیم. همین‌طور با افزایش دمای چسبیدن پرایمرها به سکانس‌های مکمل (حدود  $70^{\circ}\text{C}$ )، شرایط سختی را نیز بالا بردیم. سکانس rRNA S ۱۶ انواع و اقسام گونه‌های مایکوپلازمایی را از GeneBank بدست آورده و پرایمرهای تغییر یافته را براساس این ترادها و شماره‌های دسترسی (Accession number)، بررسی نمودیم. بنابراین با تغییر پرایمر 3-GPO و طراحی 3-GPO-SHAH و با استفاده از DNA‌های مایکوپلازما پنومونیه، مایکوپلازما سینوویه، مایکوپلازما ارال،

بوده، لذا دو عدد از آن‌ها به نام pSHA272-1 و pSHA272-2 به صورت راندوم انتخاب و با استفاده از روش لیزقلیایی، از آنها پلاسمید استخراج شد. در مرحله 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 مایکوپلازما پنومونیه با واحد کلنی‌ساز (CFU) مشخص، استخراج DNA از رقت‌ها و انجام آزمون PCR 1-272-SHAH-p 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 باکتریوم sp، کلاستریدیوم sp، انتروکوکوس فکالیس، اشریشیا کلی، سالمونلا sp، شیگللا sp، پروتئوس sp، هلیکوباکتر پیلوری و همین‌طور DNA سلول‌های یوکاریوت پست، رت و انسان انجام شد.

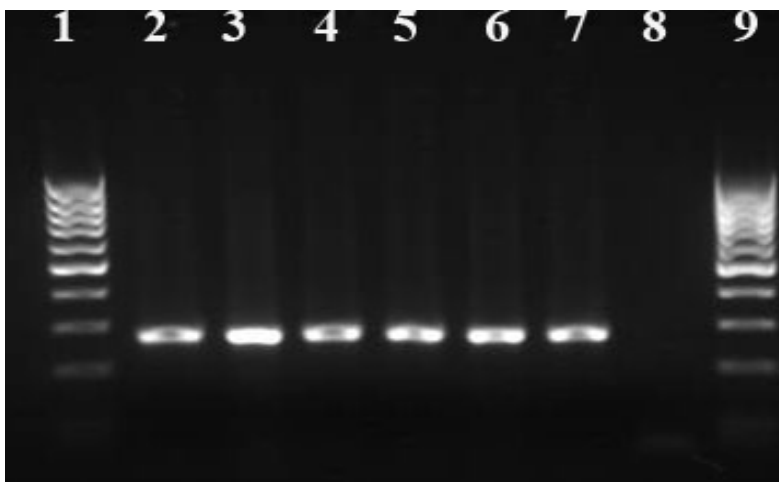
محیط C-medium این کیت، سلول‌های مستعد سویه DH5-alfa باکتری اشریشیاکلی آماده گردید. سپس عمل Ligation با استفاده از کیت مذکور انجام گرفت. مخلوط لایگیشن به مدت چهار ساعت در دمای اتاق (۲۲ درجه سانتی‌گراد) انکوبه شد. بعد طی پروتکل کیت، مرحله ترانسفورماسیون انجام گرفت. کلنی‌های سفید بر روی پلیت حاوی آمپی‌سیلین ( $50\ \mu\text{g/ml}$ ) به علاوه ماده 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  $37^{\circ}\text{C}$  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 پارافلم بسته شد و ۱۵ دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شدند 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 آگارز ۲٪، مشاهده گردید. تمامی کلنی‌ها واجد قطعه مورد نظر

تمام مایکوپلازماهای مورد آزمایش، جفت پرایمر مورد استفاده منتج به محصول ۲۷۲ جفت بازی گردید (شکل ۱).

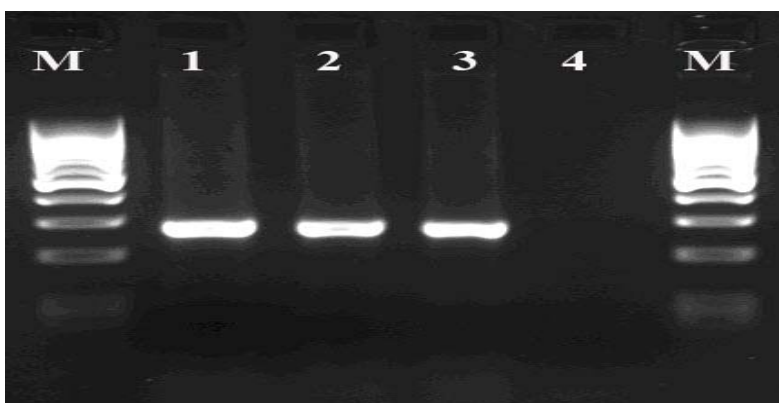
در این مطالعه سعی شد از روش استخراج DNA ساده و سریع استفاده شود؛ لذا از کیت DNG Plus استفاده گردید. بنابراین مرحله استخراج DNA این بررسی، روشی سریع و نسبتاً حساس است.

جهت بررسی و تأیید ویژگی سنجش PCR مخصوص گروه مایکوپلازما، 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 همین طور جهت تعیین ترادف استفاده گردید. ترادف حاصل با سکانس‌های موجود از طریق برنامه BLAST، مطابقت داده شد و Identity حدود صد درصد 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 مایکوپلازما پنومونیه با واحد سازنده کلنی مشخص هم



شکل ۱- آگاروز ژل الکتروفورز نتایج تکثیر PCR با استفاده از پرایمرهای SHAH-3 و GPO-3 : ستون ۱ و ۹- سایز مارکر DNA Ladder ۱۰۰ bp (فرمتاس)، ستون ۲- مایکوپلازما آرچینینی، ستون ۳- مایکوپلازما هیورینیس، ستون ۴- مایکوپلازما ارال، ستون ۵- مایکوپلازما فرمتاس، ستون ۶- اکولپلازما لیدلوی، ستون ۷- مایکوپلازما پنومونیه، ستون ۸- کنترل منفی (آگاروز ۲٪ و بافر 0.5X TBE).



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 (فرمتاس)، ستون ۱- کنترل مثبت، ستون ۲ و ۳- پلاسمیدهای به ترتیب pSHAH272-1 و pSHAH272-2، ستون ۴- کنترل منفی (آگاروز ۲٪ و بافر 0.5X TBE).

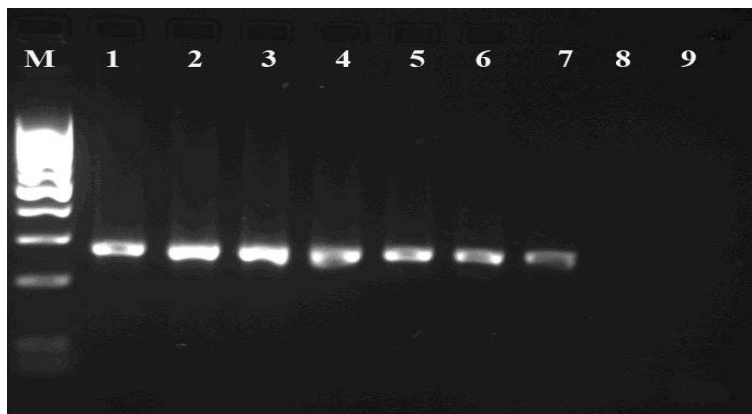
مایکوپلازما آرچینینی، مایکوپلازما	مایکوپلازما آرچینینی، مایکوپلازما
هیورینیس، مایکوپلازما گالیناروم،	آپلازما اوره آلیتیکوم و اکول پلازما
مایکوپلازما گالی سپتیکوم، مایکوپلازما	لیدلوی، تکنیک PCR را بهینه نمودیم. با



اعضای جنس‌های خویشاوند و منسوب با مایکوپلازماها، 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 به‌طور غیرمتمرکز و دور از ناحیه ۳' پرایمر طراحی شده، می‌باشد. بنابراین اعضای جنس مولیکوتس به وسیله کاربرد این پرایمر، تکثیر می‌گردند. در ضمن، این تطبیق‌ها بیانگر این موضوع هم هستند که پرایمر به‌کار رفته منحصر به جنس مایکوپلازما نمی‌باشد و اعضاء جنس اوره آپلازما، اسپروپلازما و اکول پلازما نیز در استفاده از این پرایمرهای بخش S rRNA ۱۶، تکثیر می‌یابند. به دلیل این که فقط یک بخش مخصوص مایکوپلازما تعیین هویت شد، لذا الیگونوکلئوتید Shah-GPO3 به عنوان پرایمر ۵'، در جفت پرایمر مخصوص جنس، مورد استفاده واقع شد.

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

دیده نشد. در دمای چسبیدن  $70^{\circ}C$ ، جفت پرایمر مورد بررسی، یک باند اختصاصی ۲۷۲ جفت باز با همه گونه‌های مایکوپلازمایی مورد آزمایش و همین‌طور با همه گونه‌های مولیکوتس ایجاد نمود. فقط یک بخش، یعنی نوکلئوتیدهای ما بین ۱۰۲۹ تا ۱۰۵۵ سکانس S rRNA ۱۶ مایکوپلازماها پتانسیل و معیارهای مناسب جهت پرایمر مخصوص جنس را دارد. مطابقت این بخش با سکانس rRNA چندین میکروارگانیزم، 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 میکروارگانیزم، شامل



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

ستون M - سایز مارکر ۱۰۰ bp DNA Ladder (فرمتاس)، ستون ۱- کنترل مثبت، ستون ۲ الی ۸ حاوی نمونه‌های مشخص و به ترتیب ستون ۲ (۳۱۲۵۰ CFU)، ستون ۳- (۶۲۵۰ CFU)، ستون ۴- (۱۲۵۰ CFU)، ستون ۵- (۲۵۰ CFU)، ستون ۶- (۵۰ CFU)، ستون ۷- (۱۰ CFU)، ستون ۸- (۲ CFU)، ستون ۹- کنترل منفی (آگاروز ۲٪ و بافر 0.5X TBE).

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

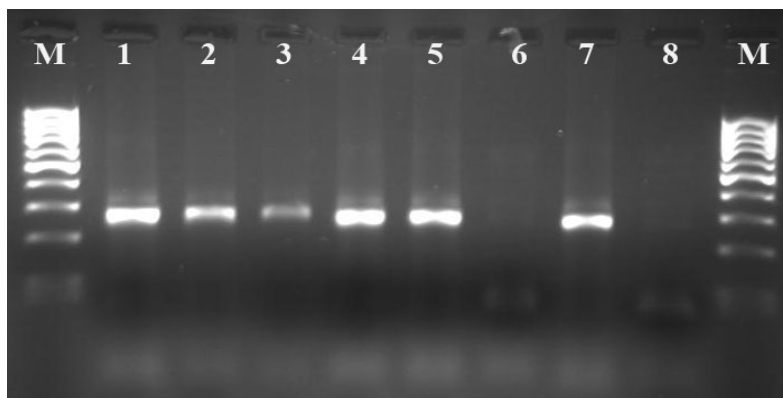
در آزمون ویژگی پرایمرهای SHAH-GPO3 و MGSO، هیچ محصول خواسته‌ای (۲۷۲ bp) با DNA باکتری‌های غیرمایکوپلازمایی مانند میکروارگانیزم‌های استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس، استرپتوکوکوس پیوژنز، استرپتوکوکوس پنومونیه، باسیلوس سوبتیلیس، و باسیلوس میکوئیدس، کورینه باکتریوم sp، کلاستریدیوم sp، انتروکوکوس فکالیس، اشیریشیا کلی، سالمونلا sp، شیگلا sp، پروتئوس sp، هلیکوباکتریلوری، و همین‌طور DNA انسان و موش و یوکاریوت‌های پست مانند ساکارومیسس سرویزیه، اسپرژیلوس sp، کاندیدا آلبیکنس،



آماري نشان داد. نتايج تکثير در بيماران زن و مرد شبیه یکدیگر بود. در اين مطالعه تنها از پرايمرهای مخصوص جنس مایکوپلازما استفاده شد و پرايمرهای ویژه جهت گونه‌های شایع به کار نرفت.

### بحث

اگر چه علت اصلی سندرم آرتریت روماتوئید هنوز در حاله‌ای از ابهام است؛ اما عوامل عفونی معمولاً در ایجاد بيماری‌های خودایمنی دخالت دارند. شباهت‌های پاتولوژیک و کلينيکی قابل توجه مابين برخی عوامل عفونی در گونه‌های حیوانی و برخی بيماری‌های روماتیسمی انسانی مانند آرتریت روماتوئید، روز به روز بیشتر تحقيق روی عوامل میکروبی مسبب اين بيماری را، موجب گردیده است. لیست طویلی از میکروارگانيسم‌ها شامل باکتری‌های روده‌ای هوازی و بی‌هوازی، چندین ویروس و مایکوپلازما، به عنوان عوامل دخیل در اين بيماری 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 مایکوپلازماها در ابتلا به آرتریت بدست آمده است [۵، ۷، ۸، ۲۵، ۲۶]. در این بررسی، DNA جنس



شکل ۴- نتایج آگاروز ژل الکتروفورز نمونه‌های Anti-CCP مثبت با استفاده از پرايمرهای SHAH-GPO-3 و MGSO: ستون M - سایز مارکر DNA Ladder ۱۰۰ bp (فرمتاس)، ستون ۱ - کنترل مثبت، ستون ۲ الی ۵ و ۷ - نمونه‌های Anti-CCP مثبتی که PCR آنها مثبت شده است، ستون ۶ - نمونه Anti-CCP مثبتی که PCR آن منفی شده است، ستون ۸ - کنترل منفی (آگاروز ۲٪ و بافر 0.5X TBE)



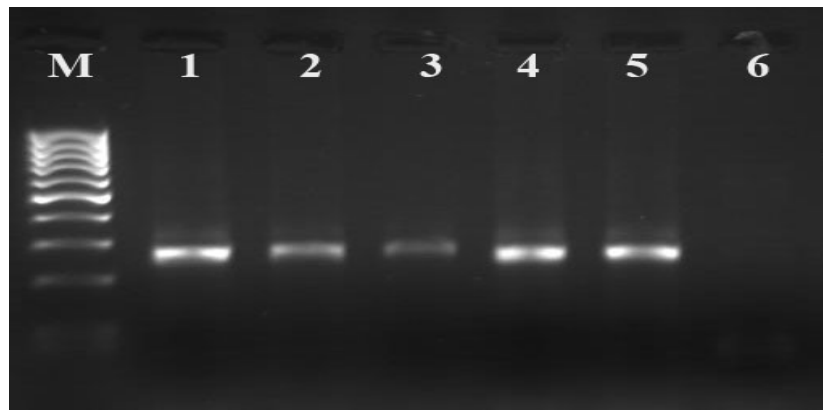
شکل ۵- نتایج آگاروز ژل الکتروفورز نمونه‌های کنترل سالم با استفاده از پرايمرهای SHAH-GPO-3 و MGSO: ستون M - سایز مارکر DNA Ladder ۱۰۰ bp (فرمتاس)، ستون ۱- کنترل مثبت، ستون ۲ الی ۵ - نمونه‌های کنترل سالم که PCR آنها منفی شده است، ستون ۶- نمونه کنترل سالمی که PCR آن مثبت شده است، ستون ۷- کنترل منفی (آگاروز ۲٪ و بافر 0.5X TBE)

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 ۴-۶). مقایسه بین بیماران آرتریت روماتوئید تأیید شده بالینی با کنترل‌های سالم (با تست دقیق فیشر و  $P = 0/003$ ) و همین‌طور نمونه‌های Anti-CCP مثبت با منفی (با تست دقیق فیشر و  $P = 0/038$ ) و یا Anti-CCP مثبت با گروه کنترل‌های سالم (با تست دقیق فیشر و  $P = 0/002$ )، تفاوت معنی‌داری را از لحاظ



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 Haier و Van Kuppeveld, Dussurget [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



شکل ۶- نتایج آگاروز ژل الکتروفورز نمونه‌های آرتریت روماتوئید بالینی مثبت با استفاده از پرایمرهای SHAH-GPO-3 و MGSO: ستون M - سایز مارکر bp DNA Ladder ۱۰۰ (فرمنتاس)، ستون ۱- کنترل مثبت، ستون ۲ الی ۵- نمونه‌های PCR مثبت، ستون ۶- کنترل منفی (آگاروز ۲٪ و بافر X ۰/۵ TBE).

مایکوپلاسمایی در بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید، DNA جنس مایکوپلاسمای در خون ۵۳/۶٪ بیماران مورد مطالعه، با استفاده از PCR و پرایمرهای مخصوص جنس rRNA S ۱۶ 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 مایکوپلاسمای و هدف ژنی rRNA S ۱۶ که مقاصد فوق را مهیا کند، توسعه داده شود. بر این مبنا با انتخاب سکانس‌های rRNA S ۱۶ تعداد زیادی مایکوپلاسمای و صف‌بندی و تجزیه و تحلیل کامپیوتری با سکانس‌های

مایکوپلاسمای در تعدادی از سرم‌های Anti-CCP مثبت (این آزمون دارای ویژگی ۹۶٪ و حساسیت ۷۸٪ جهت آرتریت روماتوئید است) شناسایی گردید. اگر چه تعداد نمونه‌ها در این مطالعه کافی اما زیاد نبود ولی با به کار بردن تست حساس PCR، موفق به شناسایی DNA مایکوپلاسمای در حدود ۱۲٪ نمونه‌های Anti-CCP مثبت (نسبت به ۴٪ در نمونه‌های Anti-CCP منفی) و ۱۱٪ نمونه‌های آرتریت روماتوئید 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 [۲۷-۲۹]. در یک مطالعه جهت شناسایی عفونت

سطوح، نقش مهمی در برقراری و پایداری عفونت مایکوپلازما، به واسطه توانایی طفره و گریز از سیستم ایمنی میزبان و همین طور تطبیق با تغییرات سریع شرایط زیستگاه‌های کوچک موجود در میزبان، بازی می‌نماید [۳۴]. در واکنش‌های غیراختصاصی ما بین مایکوپلازماها و لنفوسیت B، دلالت بر پاتوژن 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 مایکوپلازما 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 مایکوپلازمایی و سیستم ایمنی میزبان، حداقل مسئول بخشی از پاتوژن بیماری‌های التهابی روماتولوژیکی می‌باشد. برای مثال، بررسی‌ها نشان داده است مایکوپلازما آرتريتيديس [۳۶] در مدل‌های حیوانی موجب برانگیخته شدن آرتریت خودایمن می‌گردد. به علاوه، این گونه مایکوپلازمایی موادی مانند رادیکال‌های اکسیژن و مواد تجمع‌کننده، ترشح می‌کند که روی گرانولوسیت‌های پلی‌مورف نوکلئو مؤثر بوده و عمل می‌کند. چندین مطالعه نشان داده است که عفونت‌های مایکوپلازمایی منجر به افزایش میزان سیتوکین‌های پیش‌التهابی (Pro-inflammatory cytokines)، مانند

اینترلوکین ۱، ۲، ۴ و ۶ می‌گردند. بنابراین، مایکوپلازما آرتريتيديس 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 ایشیتین 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 مایکوپلازمایی در بخش‌های بزرگی از زیرمجموعه لوکوسیت‌های خونی بیماران RA، این فرضیه که مایکوپلازماها 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 مایکوپلازماها 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 مایکوپلازماها 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 مایکوپلازما 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، نشان داده شده است 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 آلوده‌کننده یا اسیدنوکلیک



تجزیه شده که باعث ایجاد سیگنال فلورئورسانس خارج هسته‌ای گشته و بدین ترتیب حضور مایکوپلازما را مخفی می‌دارد، ناشی می‌شود [۴۱].

تکنیک هیبریدیزاسیون (دورگه‌سازی) بر پایه همان اصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (یعنی شناسایی اسیدنوکلئیک ویژه) بنا نهاده شده است. اگر چه هر دو روش به طور نسبی سریع هستند، اما فرقی‌هایی هم دارند. به طور مثال گاهی تفسیر نتایج هیبریدیزاسیون به دلایلی مشکل می‌شود؛ بدین معنی که گاهی افتراق بین سیگنال‌های مخصوص و سیگنال‌های غیرویزه، 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 مایکوپلازما در نمونه‌ها 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 فضا سازی 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 نشان داده است که با اختصاص فضاها و تجهیزات مناسب در زونهای پیش‌بینی شده، این امکان به صفر نزدیک می‌گردد. لذا به کار 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 نشان دادن آن می‌نماید [۲۱].

### نتیجه گیری:

اگر چه هنوز اطلاعات کمی درباره نقش احتمالی مایکوپلازماها 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 مایکوپلازمایی 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 پرهزمت) فاقد

معیارهای یک روش ایده‌آل جهت شناسایی طیف وسیع مولیکوتها (مایکوپلازماها) 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 مایکوپلازماها دارند. نتایج این مطالعه به طور روشنی دلالت بر این نکته دارد که سنجش PCR بر مبنای سکانس‌های ثابت و مشترک موجود در 16S rRNA، یک تکنیک مفید، ارزشمند و قابل اعتماد با حساسیت، ویژگی، دقت و قابلیت اعتماد بالا جهت شناسایی مایکوپلازماها در بیماری‌های مزمنی مانند آرتریت روماتوئید می‌باشد.

### سپاسگزاری

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

مراجعه

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.
۲۰. شاه‌حسینی محمدحسین. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز. چاپ اول. تهران: دانشگاه آزاد اسلامی. ۱۳۸۴: ۱-۲۵.
۲۱. شاه‌حسینی محمدحسین. مبانی تشخیص مولکولی. چاپ اول. تهران: دانشگاه آزاد اسلامی. ۱۳۸۴: 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, Diciocco 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. Schaefferbeke T, Gilroy 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.



28. Schaefferbeke 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 antipolypptide 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. Bakteriolog. 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.