نفس، سال ۶، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۸، صفحات ۳۸ تا ۴۴

تشخیص مولکولی مایکوپلاسما پنومونیه در بیماران مبتلا به بیماری انسداد ریوی مزمن در بیمارستان مسیح دانشوری

الهه نوبهار[۱]، فرزانه حسینی[۲]، عبدالرضا محمدنیا[۳و۴*]

۱) گروه سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران
۲) گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران
۳) مرکز تحقیقات بیماری‌های مزمن تنفسی، پژوهشکده سل و بیماری‌های ریوی، مرکز آموزشی، پژوهشی و درمانی سل و بیماری‌های ریوی بیمارستان دکتر مسیح دانشوری
۴) گروه بیوتکنولوژی و پزشکی مولکولی، دانشکده فن‌آوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده:

بیماری انسداد مزمن ریه (COPD) یک بیماری مزمن ریوی است که مشخصه آن انسداد پیشرونده مجاری تنفسی به صورت برگشت‌ناپذیر است که به سه صورت آمفیزم، برونشیت مزمن و بیماری راه‌های هوایی کوچک رخ می‌دهد. هدف این مطالعه تشخیص مایکوپلاسما پنومونیه در ترشحات تنفسی بیماران مبتلا به COPD به روش PCR بود.

در این مطالعه ۱۰۰ بیمار مبتلا به COPD مورد ارزیابی قرار گرفتند که از این تعداد، ۵۴ نفر مرد و ۴۶ نفر زن بودند. ۴۴ نفر از بیماران مقیم شهر بودند و مابقی در روستا اقامت داشتند. آزمایشات مولکولی با استفاده از کیت‌های تجاری و با استفاده از پرایمرهای طراحی شده انجام گردید.

در ۱۰۰ نمونه بررسی شده، موارد مثبت از نظر باکتری مایکوپلاسما پنومونیه تعداد ۴ مورد با روش کیت و ۳ مورد با روش دوم PCR گزارش گردید.

به طور کلی می‌توان چنین بیان نمود که روش مولکولی PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی قادر است مایکوپلاسما پنومونیه را در ترشحات تنفسی شناسایی نماید.

واژگان کلیدی: مایکوپلاسما پنومونیه، بیماری‌های انسداد مزمن ریه (COPD)، راه‌های هوایی، روش مولکولی PCR

* **نویسنده مسئول:**
دکتر عبدالرضا محمدنیا، مرکز تحقیقات بیماری‌های مزمن تنفسی، پژوهشکده سل و بیماری‌های ریوی، مرکز آموزشی، پژوهشی و درمانی سل و بیماری‌های ریوی بیمارستان دکتر مسیح دانشوری، پست الکترونیک: mohamadnia.ar@gmail.com

مقدمه:

مایکوپلاسما پنومونیه[1] عامل مطرح در عفونت‌های تنفسی از قبیل گلودرد، فارنژیت[2]، تراکئوبرونشیت[3] و سایر عفونت‌های تنفسی به ویژه در افراد با انسداد مزمن ریه می‌باشد. از این رو نقش احتمالی مایکوپلاسما پنومونیه در بیماری مزمن انسدادی ریه[4] (COPD) مورد بررسی قرار گرفته است [۱].

بیماری مزمن انسدادی ریه نوعی بیماری انسدادی ریوی است که با مسدود بودن مسیر هوایی به صورت مزمن مشخص می‌شود [۲]. افراد مبتلا به COPD گاهی اوقات ممکن است به عفونت‌های باکتریایی مبتلا شوند [۳].

به مانند عفونت با استرپتوکوکوس پنومونیه[5]، مایکوپلاسما پنومونیه و کلامیدیا پنومونیه[6] نیز بطور معمول همراه با بیماری COPD شناسایی می‌گردند [۴-۶].

مایکوپلاسماها باکتری‌های فاقد دیواره سلولی هستند و تنها ارگانیسم‌های دارای استرول در غشای سیتوپلاسمی هستندکه خود توان ساخت آن را ندارند و از محیط کسب می‌کنند. نداشتن دیواره سلولی باعث مقاوم شدن این باکتری‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌های موثر بر دیواره مانند پنی‌سیلین‌ها شده است [۷].

روش‌های معمول قابل دسترس برای تشخیص روزمره عفونت‌های مایکوپلاسما پنومونیه شامل کشت، سرولوژی و تکنیک‌های مبتنی بر تکثیر اسید نوکلئیک می باشند [۸].

روش‌های مبتنی بر کشت، وقت‌گیر، هزینه‌بر و با اختصاصیت نسبتا پایین هستند که نیازمند تجهیزات آزمایشگاهی وکارشناس باتجربه جهت تفسیر نتایج می‌باشند. آزمایشات سرولوژیک نیز به دلیل بروز واکنش‌های متقاطع (مثبت و منفی کاذب)، حساسیت نسبتا پایین و نیازمندی به سرم‌های مختلف فاز بیماری (حاد و مزمن) ایده آل نیستند. به همین دلیل، در سال‌های اخیر برای غلبه بر چنین مشکلاتی، استفاده از آزمایشات مبتنی بر تکثیر اسید نوکلئیک، مانند واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[7] (PCR) توسعه فراوانی یافته‌اند [۹]. PCR به دلیل داشتن حساسیت، دقت بالا و صرفه‌جویی در زمان، روش مناسبی جهت مقاصد تشخیصی باکتری‌های مایکوپلاسما پنومونیه می‌باشد.

هدف این مطالعه تشخیص مولکولی مایکوپلاسما پنومونیه در بیماران مبتلا به بیماری انسداد ریوی مزمن در بیمارستان مسیح دانشوری می باشد.

مواد و روش‌ها:

این مطالعه از نوع مقطعی- توصیفی می‌باشد که پس از اخذ مجوز از کمیته اخلاق در سال ۱۳۹۷ در بیمارستان دکتر مسیح دانشوری دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام شد. در ابتدا با نظر پزشک متخصص ریه از ترشحات تنفسی بیماران مبتلا به COPD که مشکوک به عفونت با باکتری بودند تعداد ۱۰۰ نمونه جمع‌آوری گردید. معیارهای ورود به مطالعه داشتن علائم تنفسی مثل سرفه خشک پایدار، تب، خس‌خس، تنگی نفس، خلط و از این قبیل و نیز معیارهای خروج از مطالعه علائمی مثل آسم، آلرژی و بیماری سل بودند.

مراحل آماده‌سازی نمونه‌ها جهت انجام آزمایشات به این ترتیب بود که ابتدا نمونه‌های خلط بیماران جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. سپس با بافر فسفات سالین نمونه‌ها چند بار شسته شده و سانتریفوژ گردیدند. آنگاه مایع رویی دور ریخته شد، به محتویات میکروتیوب‌ها پروتئیناز K اضافه گردید، در دمای ۵۶ درجه سانتیگراد به مدت ۲ ساعت انکوبه شدند و نهایتا استخراج DNA بر روی نمونه‌ها انجام گرفت .

مراحل استخراج DNA با استفاده از کیت Genomic DNA Extraction Kit شرکت GeNet Bio انجام و خلوص DNAها توسط روش اسپکتروفتومتری در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر بررسی گردید.

نمونه‌ها به دو روش بررسی شدند. ابتدا بررسی مولکولی به روش PCR و با استفاده از کیت موسسه ایرانیان ژن فناور PCR (Mycoplasma pneumoniae detection kit; Cat. No. IGF113) انجام گردید.

در مرحله بعدی، واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای

[1] Mycoplasma pneumonia
[2] Pharyngitis
[3] Tracheobronchitis
[4] Chronic obstructive pulmonary disease
[5] Streptococcus pneumonia
[6] chlamydia pneumonia
[7] Polymerase chain reaction

اختصاصی طراحی شده برای ژن (P1) انجام شد (جدول ۱).

واکنش PCR به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر از master mix شرکت Amplicon، ۰/۳ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای F و R، ۵ میکرولیتر از DNA و مابقی آب مقطر، برای ۳۵ سیکل و با استفاده از دستگاه ترموسایکلر BOECO انجام گردید. جدول ۲ دماها و زمان‌های واکنش را نشان می‌دهد. در نهایت محصولات واکنش PRC بر روی ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز و نتایج بررسی شدند.

روش های آماری:

نتایج جمع‌آوری شده با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ و با استفاده از آزمون‌های آماری تجزیه و تحلیل شدند و حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و ارزش اخباری منفی گزارش گردیدند.

یافته‌ها:

در این مطالعه ۱۰۰ بیمار مبتلا به COPD مورد ارزیابی قرار گرفتند. از این تعداد ۵۴ نفر مرد و ۴۶ نفر زن بودند. از نظر جنسی تفاوت معنادار نبود (P-Value>۰/۰۵). میانگین سنی بیماران ۱۰/۲ ±۶۰/۲ محاسبه گردید.

موارد مثبت وجود باکتری مایکوپلاسما پنومونیه با روش کیت ۴ از ۱۰۰ نفر و با روش دوم PCR ۳ از ۱۰۰ نفر بدست آمد.

در شکل ۱ نمونه‌ای از الکتروفوزر ژل آگارز و باندهای تشکیل شده محصولات PCR برای باکتری مایکوپلاسما پنومونیه با استفاده از کیت استاندارد نشان داده شده است. حضور باند ۳۴۵ جفت باز در مقایسه با نشانگر DNA، نشاندهنده تست مثبت است.

همچنین در شکل ۲ نمونه‌ای از الکتروفوزر ژل آگارز و باندهای تشکیل شده محصولات PCR برای باکتری مایکوپلاسما پنومونیه با استفاده از پرایمرهای طراحی شده نشان داده شده است. حضور باند ۲۷۷ جفت باز در مقایسه با نشانگر DNA، نشاندهنده تست مثبت است. فراوانی نسبی[1] برای مایکوپلاسما پنومونیه ۴٪ محاسبه گردید.

نتایج حساسیت و ویژگی، ارزش اخباری مثبت و منفی در مورد این باکتری با روش PCR در مقابل کیت‌های موجود در جدول ۴ نشان داده شده است.

بحث:

بیماری مزمن انسدادی ریه، نوعی بیماری انسدادی ریوی است که با محدود بودن علامت مسیر هوایی به صورت مزمن شناسایی می‌شود. اصلی‌ترین نشانه‌های این بیماری شامل مواردی همچون تنگی نفس، سرفه و ایجاد خلط سینه است[۱۱,۱۰].

در تحقیق حاضر ۱۰۰ بیمار مبتلا به COPD مورد ارزیابی قرار گرفتند که از این تعداد، ۵۴ نفر مرد و ۴۶ نفر زن بودند. نتایج نشان داد که جنسیت افراد اختلاف آماری معناداری ندارند (P-value>۰/۰۵). میانگین سنی بیماران ۱۰/۲±۶۰/۲ بود. همچنین نتایج نشان داد که حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و ارزش اخباری منفی در مورد باکتری مذکور با روش PCR به ترتیب ۷۵٪، ۱۰۰٪، ۱۰۰٪ و ۹۹٪ بودند.

در یک مطالعه توصیفی- مقطعی، امیریان و همکاران (۱۳۹۵) جهت شناسایی مولکولی مایکوپلاسما پنومونیه با استفاده از ژن P1 در بیماران مبتلا به سندرم انسدادی مزمن ریوی، تعداد ۱۲۰ نمونه از ترشحات تنفسی بیماران مبتلا به COPD (عفونت‌های مزمن ریوی) را طی یک سال (۱۳۹۳-۱۳۹۴) جمع‌آوری نمودند و پس از استخراج ژنوم، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و روش مولکولی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) شناسایی باکتری را انجام دادند. نتایج نشان داد که بیشترین فراوانی عفونت تنفسی مایکوپلاسما پنومونیه در گروه سنی ۴-۲۱ سال و کمترین فراوانی در گروه سنی ۰ تا ۳ سال بود. نتایج مطالعات ایشان نشان داد که از ۱۲۰ نمونه جمع‌آوری شده ۸ نمونه (۶/۶ درصد) از نظر مایکوپلاسما پنومونیه مثبت بودند و ژن P1 را حمل می‌کردند [۶].

Zibo Zhou و همکاران در سال ۲۰۱۵ دو ژن را در مایکوپلاسما پنومونیه بررسی کردند. بررسی هر دو ژن 16 srRNA و P1 به کمک واکنش‌های PCR نشان داد که هر دو ژن به عنوان فاکتورهای تشخیصی مناسب هستند. در مطالعه حاضر نیز ژن P1 برای تشخیص

[1] Relative frequency

جدول ۱ - مشخصات پرایمر استفاده شده

پارامتر	ژن P1
پرایمر F	AGGCTCAGGTCAATCTGGCGTGGA
طول پرایمر	۲۴
پرایمر R	GGATCAAACAGATCGGTGACTGGGT
طول پرایمر	۲۵
اندازه مجصول	۳۴۵

جدول ۲ – دماها و زمان‌های واکنش PCR

Initial denaturation	۵ دقیقه	۹۵ ^{oc}
۳۵ سیکل	۱ دقیقه	۹۵ ^{oc}
	۱ دقیقه	۵۳ ^{oc}
	۱ دقیقه	۷۲ ^{oc}
Final extension	۵ دقیقه	۷۲ ^{oc}

جدول ۳- ویژگی های دموگرافیک بیماران شرکت کننده در مطالعه

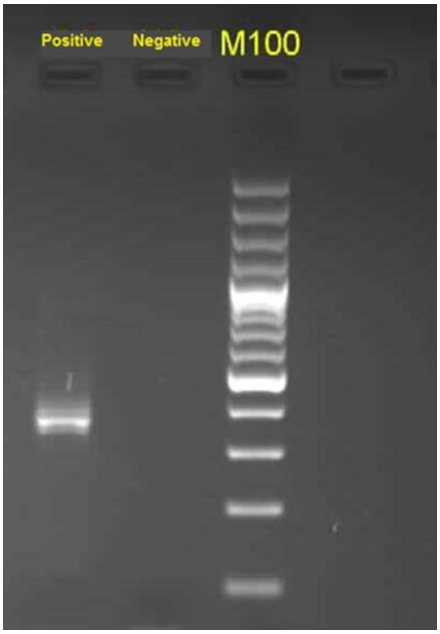
ویژگی ها	تعداد	
جنس	مرد	۵۴
	زن	۴۶
بیمار	بستری	۸۲
	سرپایی	۱۸
میانگین سنی	۶۰/۲ ± ۱۰/۲	

جدول ۴- حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و منفی

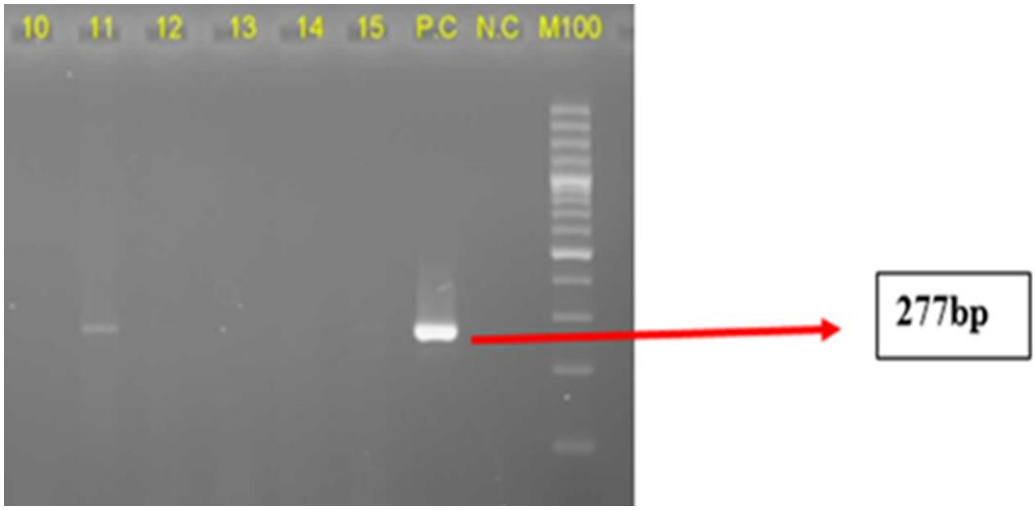
شاخص	درصد
حساسیت	٪۷۵
ویژگی	٪۱۰۰
ارزش اخباری مثبت	٪۱۰۰
ارزش اخباری منفی	٪۹۹

مایکوپلاسما پنومونیه استفاده شد و حساسیت ٪۷۵ به دست آمد [۱۲].

به طور کلی می توان بیان نمود که مایکوپلاسما پنومونیه درموارد عفونی بیماران مبتلا به سندرم انسدادی مزمن ریوی وجود دارد. همچنین روش مولکولی PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی قادر است مایکوپلاسما پنومونیه را در ترشحات تنفسی شناسایی نماید. این نتایج ممکن است درمان اختصاصی بخشی از بیماران با علایم COPD را تسهیل نماید. البته مطالعات تکمیلی با ژن‌های دیگری از این باکتری‌ها و در تعداد بیشتری از بیماران توصیه می‌گردد تا بتوان جواب‌های دقیق‌تری را هم ارائه نمود.



شکل ۱ - الکتروفورز ژل آگارز با استفاده از کیت استاندارد



شکل۲ - الکتروفورز ژل آگارز با استفاده از پرایمرهای طراحی شده

سپاسگزاری:

بدین وسیله از زحمات اساتید دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم زیستی قدردانی و تشکر به عمل می‌آید.

منابع:

1) Spuesens EBM, Fraaij PLA, Visser EG, et al. Carriage of Mycoplasma pneumoniae in the upper respiratory tract of symptomatic and asymptomatic children: an observational study. PLoS Medicine, 2013;10(5):e1001444.
2) Ghoshal AG, Dhar R, Kundu S. Treatment of acute exacerbation of COPD. Journal of Association of physicians of India. 2012;60 Suppl:38-43.
3) Martinez, FJ. Pathogen-directed therapy in acute exacerbations of

chronic obstructive pulmonary disease. Proceedings of the American Thoracic Society. 2007;4(8):647-658.

4) Mohan A, Premanand R, Reddy LN, et.al. Clinical presentation and predictors of outcome in patients with severe acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease requiring admission to intensive care unit. BMC Pulmonary Medicine. 2006;6:27.

5) Hafizi M, Imani-Rastabi R, Mousavi M, Karimi A. The prevalence of acute Chlamydia pneumoniae infection in patients with acute exacerbation of the chronic obstructive pulmonary. Journal of Shahrekord Uuniversity of Medical Sciences, 2013;15(4):93-100.

6) Amirian S, Amini K, Parviz M. Molecular detection of Mycoplasma pneumoniae using P1 gene in patients with chronic obstructive pulmonary syndrome. Armaghane Danesh. 2016;21(5):455-464.

7) Aydemir O, Aydemir Y, Ozdemir M. The role of multiplex PCR test in identification of bacterial pathogens in lower respiratory tract infections. Pakistan Journal of Medical Sciences. 2014;30(5):1011-1016.

8) Johansson N, Kalin M, Tiveljung-Lindell A, Giske CG, Hedlund J. Etiology of community-acquired pneumonia: increased microbiological yield with new diagnostic methods. Clinical Infectious Diseases. 2010;50(2):202-209.

9) Wang Y, Medvid R, Melton C, Jaenisch R, Blelloch R. DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. Nature Genetics. 2007;39(3):380-385.

10) Vestbo J, Hurd SS, Agustí AG, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2013;187(4):347-365.

11) Han MK, Kazerooni EA, Lynch DA, et al. Chronic obstructive pulmonary disease exacerbations in the COPDGene study: associated radiologic phenotypes. Radiology, 2011;261(1):274-282.

12) Zhou Z, Li X, Chen X, et al. Comparison of P1 and 16S rRNA genes for detection of Mycoplasma pneumoniae by nested PCR in adults in Zhejiang, China. The Journal of Infection in Developing Countries. 2015;9(03):244-253.

Nafas, Vol. 6, No. 2, Summer 2019, Pages: 38-44

Original Article

Mycoplasma Pneumoniae Detection in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease by Molecular Method

Elaheh Nobahar[1], Farzaneh Hosseini[2], Abdolreza Mohamadnia[3,4*]

1) Department of Cell and Molecular Biology, School of Biological Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2) Department of Microbiology, School of Biological Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
3) Chronic Respiratory Diseases Research Center, National Research Institute of Tuberculosis and Lung Diseases (NRITLD), Tehran, Iran
4) Department of Biotechnology, School of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract:
Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a chronic lung disease characterized by irreversible progressive obstruction of the airways which occur in three forms including; emphysema, chronic bronchitis, and small airways disease. The aim of this study was to identify Mycoplasma pneumoniae in respiratory secretions of patients with COPD by PCR method.
Among the referral patients, 100 cases of COPD; consisting 54 men and 46 women; were participated in the study. To detect Mycoplasma pneumoniae in respiratory secretions, two methods of standard kits and PCR method with specific designed primers were compared.
The number of positive results for presence of Mycoplasma pneumonia was 4 out of 100 patients by kit method, while it was 3 out of 100 in the second PCR method.
In general, PCR is a suitable method for detecting mycoplasma pneumonia in patients with chronic obstructive pulmonary disease.
Keywords: Mycoplasma pneumonia, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), airways, PCR method.

[*] **Corresponding Author:**
Abdolreza Mohamadnia, PhD, Chronic Respiratory Diseases Research Center, National Research Institute of Tuberculosis and Lung Diseases (NRITLD), Tehran, Iran. Email: mohamadnia.ar@gmail.com