New Cell Mol Biotech
j.9/35 , 2019

Research article

Scan online to view this article

# Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in synovial fluid from patients with arthritis using PCR

**Pasha Talebi Charmchi[1] *, Mohammad Hassan Shahhosseiny[1,2] , Mahsa Malekmohammadi Kalahroudi[1], Hoda Kavousi[3]**

1-Iranian Gene Fanavar Institute (IGF), Tehran,Iran
2-Department of Microbiology – Shahr-e-Qods Branch – Islamic Azad University –Iranian Gene Fanavar Institute (IGF), Tehran
3- Rheumatology Research Center- Tehran University of Medical Sciences- Tehran , Iran

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 15:13 +0330 on Monday February 10th 2020

## Abstract

**Aim and Background**: Bacterial arthritis is one of the arthritis diseases known that can rapidly cause joint damage. Among the bacteria causing septic arthritis, *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) is one of those that rarely produce arthritis. The aim of this study is to examine the presence of MTB in synovial fluid of patients with arthritis using Polymerase Chain Reaction (PCR)

**Materials and Methods**: This study was carried out on 70 synovial fluid samples gathered from Shariati Hospital. DNA was extracted using Phenol-Chloroform standard extraction technique. PCR test optimized on the basis of *IS6110* target gene. Samples were analyzed by PCR test after evaluation of specificity and sensitivity of PCR.

**Results**: PCR test was optimized and the 317-bp amplicon detected by 1.5% agarose gel electrophoresis. Limit of detection (LOD) was estimated as 100 copy/Reaction. MTB DNA was detected in 4 (5.7%) synovial fluid samples of patients with arthritis.

**Conclusion**: First step in treatment is rapid and accurate diagnosis. MTB have some characteristics including slow generation making the identification difficult and exhausting through culturing and biochemical tests that sometimes leads to ambiguous results. Results of this study confirm that MTB could play a role in bacterial arthritis and rapid diagnosis using PCR provides us with accurate treatment.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*, Diagnosis, Synovial, PCR.



Corresponding author:
Iranian Gene Fanavar Institute (IGF), Tehran,Iran

Email: pasha64t@gmail.com

www.SID.ir

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی مولکولی
دوره ۹ - شماره ۳۵ - تابستان ۱۳۹۸
مقاله تحقیقی

Archive of SID

برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

# تشخیص مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در مایع مفصلی بیماران مبتلا به آرتریت با استفاده از روش PCR

پاشا طالبی چرمچی *[۱]، محمدحسن شاه حسینی [۲]، مهسا ملک محمدی کلهرودی [۱]، هدا کاوسی [۳]

۱ -مؤسسه ایرانیان ژن فناور (IGF)، تهران، ایران
۲ -گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهر قدس ، تهران، ایران.
۳ -مرکز تحقیقات روماتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

## چکیده

**سابقه و هدف:** آرتریت باکتریایی یکی از انواع آرتریت‌های شناخته شده است که به‌سرعت باعث تخریب مفاصل می‌شود. از بین باکتری‌های مولد آرتریت عفونی، *مایکوباکتریوم تربرکلوزیس* (MTB) یکی از باکتری‌هایی است که می‌تواند به‌طور نادر ایجاد کننده این عارضه باشد. هدف از این مطالعه بررسی وجود *مایکوباکتریوم تربرکلوزیس* در مایع مفصلی بیماران مبتلا به آرتریت از طریق روش PCR است.

**مواد و روش‌ها:** این مطالعه بر روی مایع مفصلی ۷۰ بیمار مراجعه کننده به بیمارستان شریعتی تهران که دچار آرتریت بوده‌اند صورت گرفت. DNA از مایع مفصلی این ۷۰ بیمار با روش فنل کلروفرم استخراج شد. پرایمر، برای ژن هدف *IS6110* انتخاب و بعد از تأیید حساسیت و اختصاصیت، تست PCR بهینه بر روی نمونه‌ها انجام و مورد ارزیابی قرار گرفتند.

**یافته‌ها:** تست PCR بهینه و آمپلیکون ۳۱۷ bp به‌وسیله آگاروزژل الکتروفورز ۱/۵٪ مشاهده گردید. حد تشخیص تست $۱۰۰^{copy}/_{Reaction}$ و با ویژگی صد درصد ارزیابی گردید. DNA *مایکوباکتریوم توبر کلوزیس* در ۴ نمونه مایع مفصلی بیماران مبتلا به آرتریت (۷/۵٪) دیده شد.

**نتیجه‌گیری:** اولین قدم در درمان بیماری، تشخیص درست و سریع آن است. *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* مشخصه‌هایی از قبیل رشد کند دارد که شناسایی این باکتری را از طریق کشت و تست‌های بیوشیمیایی مشکل و طاقت فرسا می‌کند. نتایج این مطالعه مؤید آرتریت‌های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* موجود است که تشخیص سریع و به‌موقع آن‌ها از طریق PCR امکان درمان صحیح آن‌ها را مهیا می‌نماید.

**واژه‌های کلیدی:** آرتریت ، PCR، *مایکو باکتریوم تربرکلوزیس* ، مایع مفصلی، تشخیص

## مقدمه

سل بیماری باستانی شناخته شده‌ای است که توسط *مایکوباکتریم‌توبرکلوزیس (Mycobacterium tuberculosis)* با درگیری ریوی همراه بوده و دلیل مرگ سالیانه ۵/۱ میلیون نفر است. این بیماری تهدیدی بزرگ در برابر بشریت بوده که طی چند ده گذشته شاهد ظهور مجدد آن بوده‌ایم (۶،۱۰،۲۱). تظاهرات کلینیکی سل به دو صورت ریوی و خارج ریوی دیده می‌شود. سل خارج ریوی به‌طور معمول اندام‌هایی چون

**نویسنده مسئول:**
مؤسسه ایرانیان ژن فناور (IGF)، تهران، ایران
پست الکترونیکی: pasha64t@gmail.com
تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۵/۲۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۹/۲۱

www.SID.ir

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 15:13 +0330 on Monday February 10th 2020

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 15:13 +0330 on Monday February 10th 2020

گره‌های لنفاوی، شکم، دستگاه تناسلی ادراری، پوست، مفاصل و استخوان‌ها و هم‌چنین مننژها را درگیر می‌کند (۱۶). درگیری مفاصل و استخوان‌ها حدود ۱۰٪ تا ۳۵٪ موارد سل خارج ریوی را به خود اختصاص می‌دهند که به‌طور معمول در مفاصلی که تحمل کننده وزن بدن هستند از قبیل زانو و لگن دیده می‌شود (۵،۳۰).

آرتریت باکتریایی از آتریت‌های شناخته شده‌ای است که به‌سرعت باعث تخریب مفاصل می‌شود. ورود باکتری به مفاصل ممکن است از طریق جراحی یا به ندرت حین آسپیراسیون و تزریق ایجاد شود. سن بیمار، سیستم ایمنی تضعیف شده و بیماری‌های قبلی مرتبط با مفاصل، از فاکتورهای مستعد کننده این بیماری به شمار می‌آیند (۷،۸). LAN درسال ۱۹۹۲، با استفاده از آنتی‌بادی Antimycobacterial موفق به شناسایی آنتی‌ژن‌های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* با روش ELISA در مایع سینویال بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید شدند. در این مطالعه از بین ۶۵ نمونه ۴۷٪ آن مثبت تشخیص داده شد (۱۴).

تشخیص زودهنگام آرتریت ناشی از MTB برای حفظ مفصل و عضروف اهمیت ویژه‌ای دارد. (۲۸) لازمه تشخیص آرتریت باکتریایی شناسایی باکتری در مایع مفصلی توسط رنگ‌آمیزی و یا کشت است (۸). در صورتی‌که نمونه حاوی مقادیری بیش‌تر از ۱۰۰۰۰ باسیل در میلی‌لیتر باشد رنگ‌آمیزی زیل نلسون روشی برای تأیید حضور باسیل اسیدفست است. استفاده از محیط کشت لون اشتاین و رادیومتریک و غیر رادیومتریک از دیگر روش‌های تشخیصی است که مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۷،۱۹). با وجود رشد کند باکتری که مانع تشخیص سریع عفونت می‌شود روش‌های کشت و رنگ‌آمیزی از معمول‌ترین متدهای شناسایی آرتریت عفونی بعد از تهیه مایع مفصلی است که به ۶ تا ۸ هفته زمان احتیاج است و تنها ۲۵٪ تا ۴۰٪ بیماران کشت مثبت خواهند داشت (۳،۱۱،۲۰). با وجود ارائه متدهای تشخیص سریع *مایکوباکتریم توبرکلوزیس*، روش‌های اختصاصی برای تشخیص این باکتری توسط تکنیک‌های تکثیر نوکلئیک اسید امکان‌پذیر شده است (۳۲). برای مثال PCR با حساسیت ۵۵٪ تا ۹۰٪ و اختصاصیت ۹۹٪، روشی برای شناسایی سریع و مستقیم این باکتری به شمار می‌آید (۳).

با توجه‌به تشخیص سریع و از طرفی رشد کند این باکتری در محیط کشت، نیاز به استفاده از روش‌های مولکولی بیش‌تر احساس می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی وجود *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* در مایع مفصلی بیماران مبتلا به آرتریت با استفاده از روش مولکولی PCR است.

## روش کار

### نمونه

براساس رضایت آگاهانه، مایع مفصلی ۷۰ بیمار مبتلا به آرتریت مراجعه کننده به بیمارستان شریعتی با میانگین سنی ۵۲ سال توسط پزشک متخصص در بخش روماتولوژی جمع‌آوری گردید و به مؤسسه ایرانیان ژن فناور انتقال یافت.

### استخراج DNA

استخراج DNA از مایع مفصلی به‌روش استاندارد فنل-کلروفرم انجام گردید (۹). به این ترتیب که در ابتدا به‌دلیل ویسکوزیته بالای نمونه و تسهیل جابه‌جایی آن با سمپلر، ۶۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به ۱۰۰ میکرولیتر از مایع مفصلی موجود در لوله اضافه و پیپتاژ گردید. نمونه به‌مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش به‌منظور تسهیل در لیز شدن باکتری جوشانده شد. هم حجم نمونه فنل اضافه و بعد از ورتکس کوتاه، در دور ۱۰۰۰۰rmp به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. فاز رویی به لوله جدید منتقل و هم حجم به آن کلروفرم اضافه و بعد از ورتکس کردن کوتاه، در دور ۱۰۰۰۰rmp سانتریفوژ شد. یک‌دهم حجم فاز رویی استات سدیم ۳ مولار و دو برابر آن اتانول سرد مطلق اضافه گردید. بعد از ۱۰ بار معکوس کردن در دور ۱۳۰۰۰rmp به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. جهت شستشو ۵۰۰ میکرولیتر اتانول سرد ۷۰٪ به مایع رویی اضافه، ۱۰ بار اینورت و در دور ۱۳۰۰۰rmp به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. تمام محتویات مایع رویی خالی و بعد از خشک شدن در دمای ۶۵ درجه به‌مدت ۵ دقیقه، مقدار ۶۰ میکرومتر بافر TE اضافه شد.

### پرایمر و شرایط PCR

پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه بر اساس ژن هدف *IS6110* که به‌طور اختصاصی در اعضای خانواده مایکوباکتریوم یافت می‌شود انتخاب گردید (۲۶). پرایمرها در جدول شماره ۱ نشان داده شده‌اند.



www.SID.ir

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 15:13 +0330 on Monday February 10th 2020

جدول ۱-ترادف پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر DNA مایکوباکتریوم توبرکلوزیس

| | | Amplicon | Reference |
|---|---|---|---|
| Forward Primer | FMTB317 5'-CCT GCGAGC GTA GGC GTCGG-3' | 317 bp | ۲۶ |
| Reverse Primer | RMTB317 5'-TCA GCC GCG TCC ACG CCG CCA-3' | | Reference ۲۶ |

برای انجام واکنش PCR از ۵/۲ میکرولیتر بافر، ۷۵/۰ میکرولیتر $MgCl_2$ (۵۰ mM)، ۵/۰ میکرولیتر مخلوط dNTP (۱۰ mM)، ۵/۰ میکرولیتر از پرایمر پیشرو و همین-طور پسرو (۰/۲ mM) و ۵/۱ واحد آنزیم Taq Polymerase در حجم ۲۵ میکرولیتر استفاده گردید.

در این مطالعه با توجه به سکانس پرایمر، از PCR با سیکل دو مرحله‌ای استفاده شد. پروفایل حرارتی با دمای دناتوراسیون ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه و دمای آنلینگ و پلی-مریزاسیون ۶۹ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۹۰ ثانیه و طی ۳۵ سیکل انجام شد. در ادامه محصول PCR به‌دست آمده بر روی ژل آگاروز ۵/۱ درصد و در کنار سایز مارکر، الکتروفورز گردید و باندهای آمپلیکون مورد بررسی قرار گرفت.

### حساسیت و اختصاصیت

جهت بررسی اختصاصی بودن پرایمرها از میکروارگانیسم‌هایی چون *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium fortuitum Mycobacterium avium*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium szulgai*و *Mycobacterium bovis* که از انستیتو پاستور ایران بخش بانک سلولی تهیه شد استفاده شده است. تست PCR بهینه شده از جهت حد تشخیص نیز بررسی گردید.

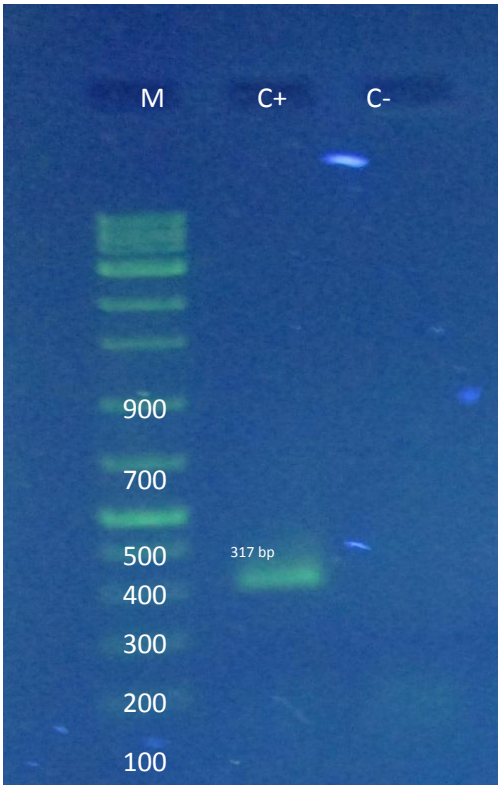
حد تشخیص از طریق روش تهیه رقت سریال و با استفاده از یک DNA ی MTB و فرمول Genome Copy Number (GCN) که از کاتالوگ کمپانی ترمو فیشر استخراج شده بود به‌دست آمد.

### آنالیز آماری

برای بررسی آماری بین متغیرهای موجود درجمعیت مورد مطالعه از آزمون کای اسکوئر استقلال به کمک نرم‌افزار SPSS ورژن ۲۴ استفاده شد.

## یافته‌ها

با توجه به شرایط بهینه شده از نظر مواد مصرفی در واکنش و پروفایل حرارتی، واکنش PCR انجام و باند ۳۱۷ bpرویت گردید (شکل شماره ۱).



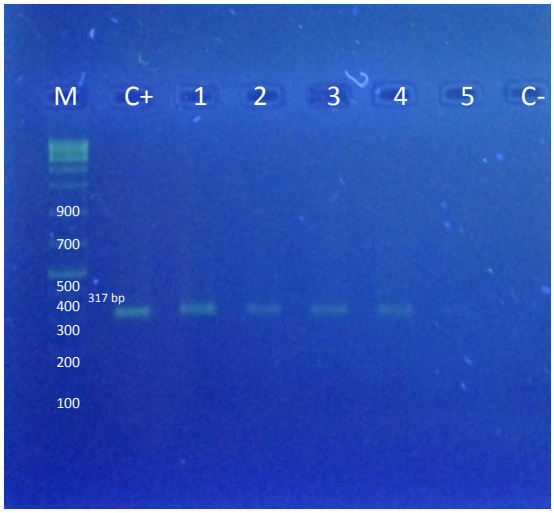

شکل شماره ۱- آزمون PCR بهینه شده تشخیص *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* که در آن M نشانگر سایز مارکر 1 kb DNA ladder (bioflux) و C+ کنترل مثبت (DNA *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس*) و C- کنترل منفی است

نتایج حاصل از تست PCR برای تعیین حد تشخیص *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* ۱۰۰ copy/reaction محاسبه گردید (شکل شماره ۲).



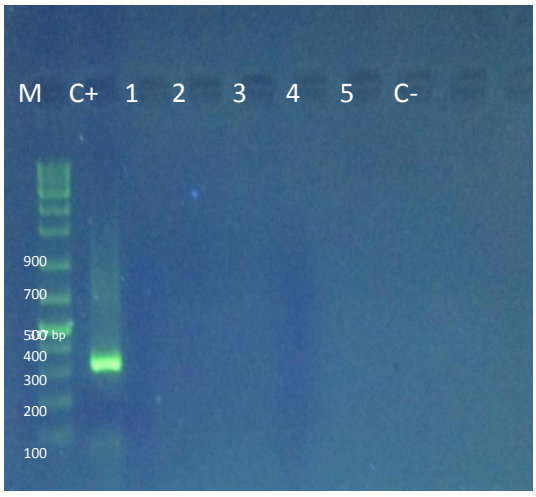
www.SID.ir

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی مولکولی
Downloaded from ncmbjpiau.ir at 15:13 +0330 on Monday February 10th 2020



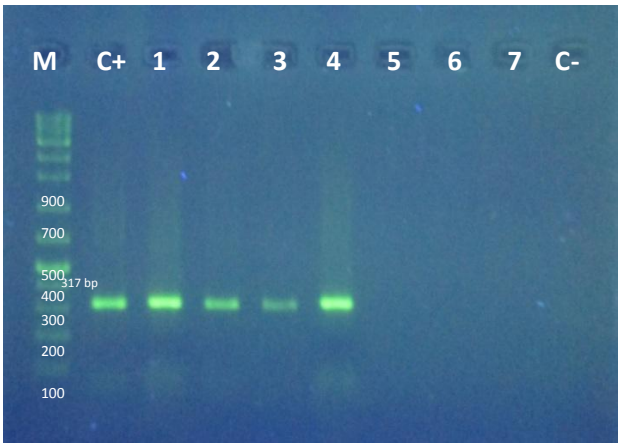

شکل شماره ۲- آزمون حد تشخیص (LOD) که در آن M نشانگر سایز مارکر 1 kb DNA ladder (bioflux)، C+ کنترل مثبت، ستون ۱ DNA صد هزار باکتری در یک واکنش PCR، ستون ۲ DNA ده هزار باکتری در یک واکنش PCR، ستون ۳ DNA هزار باکتری در یک واکنش PCR، ستون ۴ DNA صد باکتری در یک واکنش PCR، ستون ۵ DNA ده باکتری در یک واکنش PCR و C- کنترل منفی است.

ت PCR بهینه شده از جهت ویژگی مورد ارزیابی قرار ت. DNA مربوط به دیگر میکروارگانیسم‌های مورد ارزیابی با پرایمرهای این آزمون قابل تکثیر نبودند و پس از انجام نروفورزهیچ‌گونه باندی در این واکنش‌ها حاصل نشدکه نشان نده اختصاصیت پرایمرهای *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* است کل شماره ۳).




شکل شماره۳- آزمون ویژگی که در آن M نشانگر سایز مارکر 1 kb DNA ladder (bioflux)، C+ کنترل (مثبت)، C- کنترل منفی، ستون ۱ DNA ی *مایکوباکتریوم چلونی*، ستون ۲ DNA ی *مایکوباکتریوم آویوم*، ستون ۳: DNA ی *مایکوباکتریوم فورتوایتوم*، ستون ۴ DNA ی *مایکوباکتریوم گزنوپی*، ستون ۵ DNA ی *مایکوباکتریوم کانزاسی*، ستون ۶ DNA ی *مایکوباکتریوم سزولگای* و ستون ۷ DNA ی *مایکوباکتریوم بوویس*

۴ نمونه از ۷۰ نمونهٔ مورد بررسی که در راندهای متعدد و در کنار کنترل مثبت و منفی بررسی شد مثبت گردید. ۴ نمونه مثبت همراه با دو نمونهٔ منفی در شکل شماره ۴ آمده است.




شکل شماره ۴- ارزیابی آزمون PCR بر روی نمونه‌های مایع سینوویال که در آن M نشانگر سایز مارکر 1 kb DNA ladder (bioflux)، C+ کنترل مثبت، C- کنترل منفی، ستون‌های ۱-۴ نشانگر چهار نمونهٔ مثبت از ۷۰ نمونه مورد بررسی و ستون‌های ۶-۷ نمونه‌های منفی هستند.

نتایج آزمون کای اسکوئر استقلال نشان می‌دهد که مقدار آماره کای اسکوئر ۴۶۵/۰ و سطح معناداری ۴۹۵/۰ حاصل شده است. بنابراین، فراوانی افراد سالم و بیمار در مردان و زنان در سطح اطمینان ۵٪ غیر معنادار است و فراوانی افراد سالم و بیمار در هر دو گروه مشابه است. لذا فرضیه مبنی‌بر رابطه بین جنسیت و بیماری رد می‌گردد و بیماری با جنسیت رابطه‌ای ندارد.

نتایج آزمون کای اسکوئر استقلال هم‌چنین نشان می‌دهد که مقدار آماره کای اسکوئر ۱۸۶/۱ و سطح معناداری ۲۷۶/۰ حاصل شده است. بنابراین، فراوانی افراد سالم و بیمار در زیر ۵۰ ساله‌ها و بالای ۵۰ ساله‌ها در سطح اطمینان ۵٪ غیرمعنادار است و فراوانی افراد سالم و بیمار در هر دو گروه مشابه است. لذا فرضیه مبنی‌بر رابطه بین سن و بیماری رد می‌گردد و بیماری با سن رابطه‌ای ندارد.



www.SID.ir

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 15:13 +0330 on Monday February 10th 2020

## بحث

آرتریت شامل گروهی از بیماری‌هایی است که منجر به تخریب مفاصل در هر منطقه‌ای از بدن می‌شود و به‌طور معمول با علائمی هم‌چون درد، سفتی و تورم همراه است. با وجود این‌که آرتریت بیماری ناشی از سن در نظر گرفته می‌شود، شیوع آن هم در مردان و هم در زنان کم‌تر از ۶۵ سال دیده می‌شود که البته بار سنگینی را هم از نظر اقتصادی و هم از نظر سلامت بر جامعه تحمیل می‌کند. این بیماری یکی از دلایل اصلی ناتوانی در آمریکا است. درسال ۲۰۰۳، ۸/۴۵ میلیون بزرگسال مبتلا به آرتریت گزارش شده که این تعداد تا سال ۲۰۳۰ پیش‌بینی شده است نزدیک‌به ۶۷ میلیون نفر افزایش یابد که البته این ارزیابی شامل افراد مشکوک به آرتریت نمی‌شود.

بیش از ۱۰۰ نوع آرتریت وجود دارد که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به آرتریت عفونی اشاره کرد (۱۸،۳۱، ۱۷، ۱۲). با وجود روش‌های پیشرفتهٔ امروزی در زمینه تشخیصی آرتریت عفونی، این نوع بیماری‌ها در چند سال گذشته در حال افزایش بوده است. با توجه به عواملی نظیر افزایش سن، استفاده گسترده از داروهای سرکوب کننده سیستم ایمنی و افزایش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها که در افزایش آن نقش داشته ، نمی-توان از نقش باکتری‌ها چشم‌پوشی کرد (۷). طبق مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۷ توسط Ross انجام شد، به‌ترتیب شیوع باکتری‌هایی نظیر *استافیلوکوک*، *استرپتوکوک*، باکتری‌های گرم منفی میله‌ای نظیر *سودوموناس آئروژینوزا*، *اشرشیاکولای*، گونه‌های *پروتئوس و کلبسیلا* و هم‌چنین *نایسر یاگونوره‌آ و مایکو باکتریم توبرکلوزیس* از عوامل ایجاد کننده آرتریت عفونی به‌شمار می‌آیند (۲۳). قابل توجه است که آرتریت ناشی از *مایکو باکتریوم توبرکلوزیس*، که تشخیص آن یکی از مهم‌ترین مسائل بهداشتی در حوزه جوامع در حال توسعه است(۲)، ۱٪ تا ۳٪ بیماری‌های ایجاد شده توسط این باکتری و ۱٪ تا ۱۱٪ موار سل خارج ریوی را به خود اختصاص داده است (۲۸). اگرچه سوابق پزشکی و بررسی‌های رادیولوژیک، میکروبیولوژیک و ایمونولوژیک از روش‌های تشخیص این باکتری مهم به حساب می‌آیند (۱۵)، تشخیص DNA یک میکروارگانیسم در مقادیر بسیار کم با استفاده از روش‌های مولکولی هم‌چون واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، آزمونی سریع و حساس با اختصاصیت بالاتر نسبت‌به روش‌های دیگر همانند روش کشت که مستلزم زنده بودن باکتری در نمونه مورد نظر است محسوب می‌شود (۲۲).

مطالعه حاضر با هدف شناسایی *مایکوباکتریم توبرکلوزیس* در مایع مفصلی بیماران مبتلا به آرتریت با روش مولکولی طراحی و اجرا شد. تنها ۴ مورد (۷/۵٪)از ۷۰ نمونه مایع مفصلی بیماران مبتلا به آرتریت با روش مولکولی طراحی شده در این تحقیق از جهت *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* مثبت نشان داده شد.

بر روی مایع سینویال مطالعه‌های زیادی با روش‌های مختلفی هم‌چون مولکولی، کشت و ایمونو لورژیک جهت شناسایی عوامل مولد عفونی آرتریت انجام شده است (۴،۲۵).به‌عنوان مثال RYAN و همکاران در یک مطالعه گذشته‌نگر باکتری‌های جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت مفصلی باکتریایی را طی ۴ سال مورد بررسی قرار دادند. طبق نتایج حاصل، رایج‌ترین باکتری جدا شده *استافیلوکوکوس ارئوس* با ۹/۴۰ ٪ و بعد از آن به‌ترتیب *استرپتوکوک* (۳۸٪)، باسیل‌های گرم منفی (۱۹٪)،مایکوباکتریوم‌ها (۶/۶٪)، کوکسی‌های گرم منفی (۸/۳٪) بی‌هوازی‌ها (۴/۱٪) و باسیل‌های گرم مثبت (۶/۰٪) گزارش شده است (۲۴). در مطالعه‌ای دیگر که در سال ۱۹۹۴ توسط Jalal و همکاران انجام شد مایع مفصلی ۳۱ بیمار مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه که از ژن هدف متفاوتی به نام *APRT* (ژن کد کننده آنزیم آدنین فسفوریبوزیل ترانسفراز) در مقایسه با مطالعه اخیر برای طراحی پرایمر استفاده شده بود و همانند مطالعه حاضر، استخراج DNA توسط روش فنل – کلروفرم انجام شد. طبق نتایج به-دست آمده در این بررسی با وجود حساسیت بالای تست، برخلاف مطالعه اخیر هیچ DNA متعلق به *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* در نمونه‌ها یافت نشد (۱۳). نتایج به‌دست آمده در این مطالعه می‌تواند ناشی از تعداد نمونه کم مورد بررسی بوده باشد. هم‌چنین در سال Yeo – Jun Yun, 2005 و همکاران بررسی را بر روی نمونه‌های مفصلی با روش PCR انجام دادند. در این مطالعه بر خلاف پژوهش حاضر از روش bead-beating برای تخریب دیواره سلولی استفاده شد که البته به‌دلیل استفاده از فنول برای تخلیص DNA تفاوت چندانی با روش



www.SID.ir

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 15:13 +0330 on Monday February 10th 2020

استخراج مورد استفاده در مطالعه حاضر ندارد. هم‌چنین برخلاف مطالعهٔ اخیر از ژن هدف *rpoB* (ژن کد کننده زیر واحد بتا آنزیم RNA polymersa باکتریایی) در پژوهش Yeo استفاده شده و طبق نتایج حاصل، درصد بالاتری از نمونه‌ها (۵۳/ ٪۵) در مقایسه با مطالعه حاضر، مثبت گزارش داده شده است. با توجه‌به این‌که برای تأیید نمونه های منفی از روش IS6110 PCR استفاده شد، نتایج مثبت دراین مطالعه به مراتب بیش‌تر است که مشخص نیست آیا به خاطرحساسیت روش مورد استفاده است یا خیر ( ۳۲).

درسال ۱۹۹۸ تحقیقی توسط Ahmad (۱) بر روی مایع سینوویال و سرم ۹۵بیمار مبتلا به آرتریت روماتوئید از طریق ELISA انجام گرفت. نکته قابل توجه دراین مطالعه این است که با وجود تعداد نه چندان زیاد نمونه در مقایسه با مطالعه حاضر، درصد بالایی از آن‌ها مثبت تشخیص داده شد. در این تحقیق در سرم بیش از ۷۰٪ افراد مورد مطالعه با استفاده از آنتی‌بادی پلی‌کلونال، آنتی‌ژن‌های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* گزارش شد. این نتایج مثبت قابل توجه می‌تواند به‌دلیل نوع آنتی‌بادی و یا نتایج کاذب باشد که از نکات مهم در تست‌های غربالگری بر مبنای ELISA است. در این بررسی به‌وسیله مونوکلونال آنتی‌بادی مورد استفاده، در بیش از ۵۰٪ نمونه‌های مایع سینوویال، کمپلکس‌های آنتی‌ژن آنتی‌بادی شناسایی گردید که این نتایج می‌تواند ناشی از واکنش‌های متقاطع ایجاد شده باشد. در مطالعه دیگری که توسط Heijden در سال ۱۹۹۹ بر روی ۱۰۰ بیمار انجام شد با استفاده از روش تشخیصی PCR و سپس تعیین توالی، *Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium marinum* در ۲ بیمار مبتلا به آرتریت عفونی تشخیص داده شدند. گونه‌های دیگر تشخیص داده شده شامل *Mycobacterium hodleri* در ۱ بیمار مبتلا به آرتریت روماتوئید، *Mycobacterium smegmatis* در ۱ بیمار مبتلا به استئوآرتریت و ۲ بیمار مبتلا به آرتریت روماتوئید و *Mycobacterium austroafricanum* در ۱ بیمار مبتلا به کریستال آرتریت بودند. در این بررسی برخلاف مطالعه حاضر از ژن هدف *16S rRNA* استفاده شد و حساسیت تست ۵ کپی که به‌مراتب بیش‌تر از حساسیت روش مورد استفاده در مطالعه اخیر است گزارش شده است (۲۹).

## نتیجه‌گیری

اولین قدم در درمان بیماری، تشخیص درست و سریع آن است. *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* دارای مشخصه‌هایی است از قبیل رشد کند که شناسایی این باکتری را از طریق کشت و تست-های بیوشیمیایی مشکل و طاقت فرسا می‌کند. نتایج این مطالعه مؤید این نکته است که بخشی از آرتریت‌ها ناشی از *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* است که تشخیص سریع و به‌موقع آن از طریق PCR، امکان درمان به‌موقع آن‌ها را مهیا می‌نماید.

## سپاسگزاری

از مؤسسه دانش‌بنیان ایرانیان ژن فناور و پرسنل محترم آن که امکان انجام آزمون‌ها را در این مطالعه فراهم نمودند تقدیر و تشکر می‌شود.



www.SID.ir

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 15:13 +0330 on Monday February 10th 2020

## منابع


1. Ahmad A, Cheung NT, Afghan S, Raykundalia C, Situnayake RD, Catty D. Detection of Dnaj (Heat Shock Protein) and Other Mycobacterial related Antigens in Rheumatoid Arthritis using ELISA. Med J Islamic World Acad Sci. 1998; 11(2): 47-56.
2. Al-Sayyad MJ, Abumunaser LA. Tuberculous arthritis revisited as a forgotten cause of monoarticular arthritis. Ann Saudi Med. 2011; 31(4): 398–401.
3. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. Mycobacteria. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology. 26th ed. China: McGraw-Hill; 2013. p. 313-322.
4. Cimoli N, Malleson P, Thomas E, Middleton PJ. Mycoplasma pneumoniae associated arthropathy: confirmation of the association by determination of the antipolypaptide IgM response. J Rheumatol. 1989; 16(8) 1150-2.
5. De Araujo PS et al. Multifocal skeletal tuberculosis in an immunocompetent patient: a case report. BMC Infect Dis. 2015; 15: 235.
6. Delogu G, Sali M, Fadda G. The biology of mycobacterium tuberculosis infection. Mediterr J Hematol Infect Dis. 2013; 5(1): e2013070.
7. García-Arias M, Balsa A, Mola EM. Septic arthritis. Best Pract. Res. Clin. Rheumatol. 2011; 25(3) 407–421.
8. Goldenberg DL . Septic arthritis. Lancet. 1998; 351(9097): 197–202.
9. Green MR, Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 4th ed. Cold Spring Harbor Laboratory; 2012
10. HARRIES AD, DYE C. Tuberculosis. Ann Trop Med Parasitol. 2006; 100(5 and 6): 415–4.
11. Herold CD, Fitzgerald RL, Herold DA. Current techniques in mycobacterial detection and speciation. Crit Rev Clin Lab Sci. 1996; 33(2): 83-138.
12. Hootman JM, Helmick CG. Projections of US prevalence of arthritis and associated activity limitations. Arthritis Rheum. 2006; 54(1): 226-9.
13. Jalal H, Millar M, Linton C, Dieppe P. Absence of Mycobacterium tuberculosis DNA in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis. 1994; 53(10): 695-8.
14. Lan JL, WU CH. Detection of Mycobacterium tuberculosis antigen in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. Br J Rheumatol. 1992; 31(9): 615-8.
15. Lange C , Mori T. Advances in the diagnosis of tuberculosis. Respirology. 2010; 15(2): 220-40.
16. Lee JY. Diagnosis and treatment of extrapulmonary tuberculosis. Tuberc Respir Dis. 2015; 78(2): 47–55.
17. Lorig K et al. Living a healthy life with chronic conditions: Self management of heart disease, arthritis, diabetes, depression, asthma, bronchitis, emphysema and other physical and mental health conditions. 4th ed. Boulder (CO): Bull Publishing company; 2012.
18. Mathews CJ et al. Management of septic arthritis: a systematic review. Ann Rheum Dis. 2007; 66(4): 440-5.
19. Moudgil H, Leitch AG. Extra-pulmonary tuberculosis in Lothian 1980-1989: ethnic status and delay from onset of symptoms to diagnosis. Respir Med. 1994; 88(7): 507-10.




www.SID.ir

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 15:13 +0330 on Monday February 10th 2020

20. Noorbakhsh S, Zarabi V, Talebitaher M, Tabatabaee A, Beig ZA. Searching group A streptococcal polysaccharide antigens in synovial fluid of patients with arthritis. Razi j Med Sci. 2013; 20(112): 1-8.

21. Raviglione M, Sulis G. Tuberculosis 2015: burden, challenges and strategy for control and elimination. Infect Dis Rep. 2016; 8(2): 6570.

22. Razei A, Sorouri R, Aghamollaei H, Mousavi SL. Rapid detection of campylobacter jejuni by polymerase chain reaction and evolution of its sensitivity and specificity. Sci J Hamdan Univ Med Sci. 2017; 24(1): 56-62.

23. Ross JJ. Septic arthritis of native joints. Infect Dis Clin North Am. 2017; 31(2): 203-218.

24. Ryan MJ, Kavanagh R, Wall PG, Hazleman BL. Bacterial joint infections in England and Wales: analysis of bacterial isolates over a four year period. Br J Rheumatol. 1997; 36(3): 370-3.

25. Schaeverbeke T, Gilory 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(10) 824-8.

26. Shawar RM, el-Zaatari FA, Nataraj A, Clarridge JE. Detection of Mycobacterium tuberculosis in clinical samples by two-step polymerase chain reaction and nonisotopic hybridization methods. J Clin Microbiol. 1993; 31(1): 61-5.

27. Siddiqi S et al. Direct drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis for rapid detection of multidrug resistance using the Bactec MGIT 960 system: a multicenter study. J Clin Microbiol J. 2012; 50(2): 435-440.

28. Tseng CC, Huang RM, Chen KT. Tuberculosis arthritis: epidemiology, diagnosis, treatment. Clin Res Foot Ankle 2014; 2(2): 1000131.

29. Van Der Heijden IM, Wilbrink B, Schouls LM, Van Embden JD, Breedveld FC, Tak PP. Detection of mycobacteria in joint samples from patients with arthritis using a genus-specific polymerase chain reaction and sequence analysis. Rheumatology. 1999; 38(6): 547-53.

30. Verma R, Patil TB, Lalla R. Disseminated tuberculosis manifesting as pulmonary, meningeal and spinal tuberculosis in an immunocompetent patient. BMJ Case Reports. 2012; doi: 10.1136/bcr-2012-007778.

31. Wong R, Davis AM , Badley E, Grewal R, Mohammed M. The Arthritis Community Research & Evaluation Unit. 2010. p. 8-12. http://www.modelsofcare.ca/pdf/10-02.pdf

32. Yun YJ et al. Detection and Identification of Mycobacterium tuberculosis in Joint Biopsy Specimens by rpoB PCR Cloning and Sequencing. J Clin Microbiol. 2005; 43(1): 174-8.



www.SID.ir