

**Εφαρμογή πρωτότυπης μοριακής μεθόδου
ανάδειξης και ταυτοποίησης μυκοβακτηριδίων
σε αρχειακά υλικά παραφίνης
με ιστολογικές αλληλώσεις
κοκκιωματώδους φλεγμονής***

.....
I. Οικονομόπουλος,¹
B. Γοργούλης,¹
Π. Ζαχαράτος,¹
Α. Κοτσίνας,¹
Ν. Γούτας,²
Χ. Κίττας¹
.....

¹Εργαστήριο Ιστολογίας-Εμβρυολογίας,
Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Αθηνών
²Παθολογοανατομικό Εργαστήριο,
Ευγενίδειο Θεραπευτήριο

ΣΚΟΠΟΣ Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν ο σχεδιασμός μιας διαγνωστικής μεθόδου που να επιτρέπει την ανάδειξη και ταυτοποίηση ορισμένων από τα σημαντικότερα παθογόνα μυκοβακτηρίδια απευθείας από υλικά μονιμοποιημένα σε παραφίνη. Η μέθοδος αυτή θα εχρησιμοποιείτο για τη διαγνωστική διερεύνηση περιστατικών φυματίωσης, σαρκοείδωσης και νόσου του Crohn. **ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΣ** Με τη χρήση τριών ειδικά σχεδιασμένων ολιγονουκλεοτιδίων-εκκινητών και ενός ανιχνευτή (probe), σχεδιάστηκε ένας συνδυασμός αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης και DNA υβριδισμού, που επιτρέπει την ανάδειξη και ταυτοποίηση των *Mycobacterium tuberculosis complex*, *Mycobacterium avium complex*, *Mycobacterium intracellulare* και *Mycobacterium paratuberculosis*. **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ** Η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί απευθείας σε υλικά μονιμοποιημένα σε παραφίνη και να ανιχνεύσει, με σημαντική ειδικότητα, έως και ένα βακτηριδιακό κύτταρο. Η εξέταση, άλλωστε, επιλεγμένων υλικών από ασθενείς με νόσο του Crohn και σαρκοείδωση απέδειξε την εμπλοκή σε περιστατικά αυτών των νόσων, αντίστοιχα, των *Mycobacterium paratuberculosis* και *Mycobacterium tuberculosis complex*, χωρίς όμως να γίνει δυνατή και η ανάδειξή τους με καλλιέργεια. **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ** Η προτεινόμενη μέθοδος μπορεί σε ελάχιστο χρονικό διάστημα να διακρίνει μερικά από τα σημαντικότερα παθογόνα μυκοβακτηρίδια αναφορικά ακόμα και με είδη που έχουν μεγάλη γενετική συγγένεια. Η διαδικασία μπορεί να εφαρμοστεί για τη διάγνωση της φυματίωσης απευθείας σε υλικά μονιμοποιημένα σε παραφίνη, αλλά και για τη μελέτη ορισμένων νόσων με σκοτεινή αιτιοπαθογένεια, όπως η σαρκοείδωση και η νόσος του Crohn.

Application of an innovative molecular method for the detection and identification of mycobacteria on archive paraffin embedded samples with histological evidence of granulomatous inflammation

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρητηρίου

Νόσος του Crohn
Σαρκοείδωση

Β' Βραβείο

Έπαθλο «Σωτήρης Παπασταμάτης» 1999

Η φυματίωση είναι μια νόσος που, απ' ό,τι φαίνεται, γεννήθηκε μαζί με τον άνθρωπο.^{1,2} Περισσότερο από 100 χρόνια μετά την ανακάλυψη του υπεύθυνου βακίλου από τον Koch, η νόσος συνεχίζει και σήμερα να αποτελεί απειλή για εκατομμύρια ανθρώπους. Υπολογίζεται ότι τουλάχιστον το ένα τρίτο του συνολικού πληθυσμού της γης είναι μολυσμένο από το *Mycobacterium tuberculosis*, ενώ 90.000.000 και-

νούργια περιστατικά θα εμφανιστούν στην περίοδο μεταξύ 1990- 1999,³ από τα οποία τα 30.000.000 θα είναι θανατηφόρα.⁴ Το επίπεδο της παρεχόμενης ιατρικής περίθαλψης, η ηλικία, το φύλο, αλλά κυρίως οι συνθήκες διαβίωσης και η εμφάνιση ανοσοκατασταλτικών νοσημάτων, αποτελούν βασικές παραμέτρους στην εξάπλωση της νόσου.⁵ Εκτός όμως από τις ασθένειες που αποδεδειγμένα προκαλούνται από τα μυκοβακτηρίδια, είναι πιθανό ότι αυτά εμπλέκονται και σε δύο άλλα νοσήματα με σκοτεινή αιτιοπαθογένεια, τη σαρκοείδωση^{6,7} και τη νόσο του Crohn.⁸

* Η μελέτη πραγματοποιήθηκε με την οικονομική υποστήριξη της Γενικής Γραμματείας Έρευνας και Τεχνολογίας (ΓΓΕΤ)

Η διάγνωση της φυματίωσης, ακόμη και σήμερα, βασίζεται στην εφαρμογή ειδικών μεθόδων χρώσης και καλλιέργειας. Η τελευταία αναγνωρίζεται ως η μέθοδος αναφοράς και παρουσιάζει ευαισθησία που φτάνει τους 100 βακίλους/mL δείγματος, ενώ για τη διεξαγωγή της απαιτείται χρονικό διάστημα 3–7 εβδομάδων.⁹ Το διάστημα αυτό επιμηκύνεται για ακόμη 2–3 εβδομάδες, στην περίπτωση που χρειαστεί να διεξαχθούν και βιοχημικές δοκιμές για την ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους.¹⁰ Με το σύστημα BACTEC, αν και το απαιτούμενο χρονικό διάστημα για την πρώτη απομόνωση είναι σημαντικά μικρότερο (15–22 ημέρες),¹¹ δεν επιλύεται το πρόβλημα που δημιουργείται από την αδυναμία καλλιέργειας ατελών μορφών ή εξασθενημένων, από την επίδραση φαρμάκων και χημικών ουσιών, μυκοβακτηριδίων.⁷ Η εξέταση επιχρισμάτων με τη μέθοδο Ziehl-Nielsen απαιτεί συγκεντρώσεις μεγαλύτερες ή ίσες των 10.000 μυκοβακτηριδίων/mL δείγματος¹² και παρουσιάζει ευαισθησία που κυμαίνεται στο 22–78% των αποδεδειγμένων με καλλιέργεια περιστατικών,⁷ ενώ δεν επιτρέπει τη διάκριση του *Mycobacterium tuberculosis* από τα άλλα μυκοβακτηριδιακά είδη.¹³ Ήδη εδώ και χρόνια διατίθενται στο εμπόριο ολιγονουκλεοτίδια-ανιχνευτές για την ανάδειξη των σημαντικότερων μυκοβακτηριδίων (Gene Probe, San Diego, California, SNAP system, Syngene Inc, San Diego, California), η ευαισθησία τους όμως είναι παρόμοια με αυτή της Ziehl-Nielsen και για το λόγο αυτόν, η χρησιμότητά τους σε κλινικά υλικά είναι περιορισμένη.¹⁴

Με την παρούσα μελέτη σχεδιάσαμε μια διαγνωστική διαδικασία, που βασίζεται στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR) και επιτρέπει την ανάδειξη και ταυτοποίηση των *Mycobacterium tuberculosis* complex (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti*), *Mycobac-*

terium avium complex (*M. avium* MAIS2, *M. avium* serovar 7, *M. avium* WP M21, *M. paratuberculosis* Linda, *M. paratuberculosis* C286, *M. paratuberculosis* ATCC 19698) και *Mycobacterium paratuberculosis*, με την απευθείας εφαρμογή της σε υλικά μονιμοποιημένα σε παραφίνη. Η διαδικασία αυτή επέτρεψε την ταχύτατη διάκριση ακόμη και μεταξύ μυκοβακτηριδιακών ειδών με μεγάλη γενετική συγγένεια, ενώ κατέστησε δυνατή τη μελέτη επιλεγμένων περιστατικών φυματίωσης, σαρκοείδωσης και νόσου του Crohn.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Υλικό

Οι μοριακές τεχνικές που αναπτύχθηκαν, εφαρμόστηκαν δοκιμαστικά σε καλλιέργειες διαφόρων ειδών μυκοβακτηριδίων, αλλά και σε DNA που απομονώθηκε από ανάλογο υλικό. Πηγή του υλικού αυτού ήταν το Νοσοκομείο Νοσημάτων Θώρακος Αττικής και το Κτηνιατρικό Κέντρο Ερευνών Shropshire (Shropshire Veterinary Investigation Center) της Μεγάλης Βρετανίας, που διέθεσαν απομονωμένα και ταυτοποιημένα μυκοβακτηρίδια και αντίστοιχο DNA (πίν. 1).

Εκτός των παραπάνω, η προτεινόμενη διαδικασία εφαρμόστηκε και σε επιλεγμένα δείγματα ιστών μονιμοποιημένων σε παραφίνη (ΙΜΠ), από περιστατικά φυματίωσης, σαρκοείδωσης και νόσου του Crohn. Τα υλικά αυτά διακρίθηκαν σε τέσσερις ομάδες:

Ομάδα Α: Εβδομήντα πέντε δείγματα ΙΜΠ επιλεγμένα από περιστατικά με σαφείς ιστολογικές ενδείξεις τυροειδούς κοκκιοματώδους νέκρωσης, τυπικής με αλλοιώσεις φυματίωσης. Οι ιστολογικές τομές εξετάστηκαν επίσης με τη μέθοδο Ziehl-Nielsen, ενώ αντίστοιχο υλικό από τα συγκεκριμένα περιστατικά χρησιμοποιήθηκε και για καλλιέργεια. Σε 35 δείγματα από το παραπάνω σύνολο διαπιστώθηκε η παρουσία οξεάντοχων βακίλων με τη μέθοδο Ziehl-Nielsen, ενώ σε 39 περιπτώσεις οι αντίστοιχες καλλιέργειες επέτρεψαν την ανίχνευση μυκοβακτηριδίων.

Πίνακας 1. Οι αντιδράσεις των τριών διαγνωστικών PCR, στα υλικά αναφοράς.

Αριθμός στελεχών	Είδος	Αποτελέσματα PCR			
		Mtb1-2 (243 zβ)	MAC1-2 (91 zβ)	M16SU-D (509 zβ)	PRAVMPAR (παραγωγή φωτός)
50	<i>M. tuberculosis</i>	50	–	–	–
25	<i>M. avium intracellulare</i>	–	25	25	–
2	<i>M. africanum</i>	1	–	–	–
4	<i>M. microti</i>	4	–	–	–
1	<i>M. marinum</i>	–	–	–	–
7	<i>M. gordonae</i>	–	–	4	–
12	<i>M. kansasii</i>	–	–	–	–
13	<i>M. smegmatis</i>	–	–	10	–
15	<i>M. bovis</i>	15	–	–	–
2	<i>M. xenopi</i>	–	–	–	–
15	<i>M. paratuberculosis</i>	–	8	15	15

– Αρνητικό αποτέλεσμα, zβ: Ζεύγη βάσεων

Ομάδα Β: Είκοσι πέντε δείγματα ΙΜΠ επιλεγμένα από περιστατικά με σαφείς ιστολογικές ενδείξεις μη τυροειδούς κοκκιοματώδους νέκρωσης, τυπικής με αλλοιώσεις σαρκοειδωσης. Οι ιστολογικές τομές εξετάστηκαν επίσης με τη μέθοδο Ziehl-Nielsen, ενώ αντίστοιχο υλικό από τα συγκεκριμένα περιστατικά χρησιμοποιήθηκε και για καλλιέργεια. Σε κανένα από τα παραπάνω δείγματα δεν διαπιστώθηκε παρουσία οξεάντοκων βακίλων με τη μέθοδο Ziehl-Nielsen, ενώ και οι αντίστοιχες καλλιέργειες δεν ανέδειξαν την παρουσία μυκοβακτηριδίων. Οι ασθενείς της ομάδας αυτής είχαν υποβληθεί σε ανοσοκατασταλτική αγωγή, που συνήθως ακολουθείται σε περιστατικά σαρκοειδωσης, τα αποτελέσματα της οποίας αξιολογήθηκαν και υπό το πρίσμα των δεδομένων που προέκυψαν με τη μοριακή ανάλυση των συγκεκριμένων δειγμάτων.

Ομάδα Γ: Είκοσι δείγματα ΙΜΠ επιλεγμένα από περιστατικά με σαφείς ιστολογικές ενδείξεις νεκρωτικής εντερίτιδας, τυπικής με αλλοιώσεις νόσου του Crohn. Οι ιστολογικές τομές εξετάστηκαν επίσης με τη μέθοδο Ziehl-Nielsen, ενώ αντίστοιχο υλικό από τα συγκεκριμένα περιστατικά χρησιμοποιήθηκε και για καλλιέργεια. Τόσο η μία όσο και η άλλη μέθοδος δεν ανέδειξαν την παρουσία οξεάντοκων βακίλων και μυκοβακτηριδίων, αντίστοιχα.

Ομάδα Δ: Πενήντα δείγματα ΙΜΠ, που προέρχονταν από επιλεγμένα περιστατικά ασθενών του Λαϊκού Νοσοκομείου Αττικής και του Ευγενίδειου Θεραπευτηρίου. Για τα περιστατικά αυτά ζητήθηκε η διεξαγωγή μοριακής ανάλυσης σε τομές παραφίνης που προέρχονταν από βιοψίες πνεύμονα (30), επιχώριων λεμφογαγγλίων (10), νωπιαίου μυελού (4) και παχέος εντέρου (6). Οι ασθενείς αυτής της ομάδας παρουσίαζαν κλινική ή/και ιστολογική εικόνα που έθετε την υποψία φυματίωσης. Όλα τα υλικά εξετάστηκαν και με τη μέθοδο Ziehl-Nielsen, ενώ στα πνευμονολογικά περιστατικά έγινε και καλλιέργεια πτυέλων και βρογχικού εκπλύματος, που ανέδειξε σε 22, από τις 30 συνολικά περιπτώσεις, την παρουσία μυκοβακτηριδίων.

Μέθοδοι

Εξαγωγή DNA. Σε φιαλίδιο 2 mL τοποθετούνται 2–3 τομές παραφίνης πάχους 10 μm. Το υλικό ξεπλένεται διαδοχικά σε ξυλόλη 60 °C, απόλυτη αιθανόλη και αιθανόλη 75%, έως την πλήρη αποπαραφίνωσή του. Το προϊόν της παραπάνω διαδικασίας ή μερικές αποικίες, στην περίπτωση που η μέθοδος εφαρμόζεται σε καλλιέργειες μυκοβακτηριδίων, πέπτεται με SDS και πρωτεΐνωση Κ και επωάζεται στους 50 °C για 30 min έως 12 ώρες.¹⁶ Από το διάλυμα απομακρύνονται οι ανεπιθύμητες πρωτεΐνες με δύο πλύσεις με φαινόλη και στη συνέχεια με μία σε φαινόλη-χλωροφόρμιο-ισοαμυλική αλκοόλη. Το DNA κατακρημνίζεται με αιθανόλη και διαλύεται σε 50 μL νερού ποιότητας υγρής χρωματογραφίας.¹⁶

Προσδιορισμός εναισθησίας. Δέκα στελέχη από *Mycobacterium tuberculosis* complex και ίδιος αριθμός από *Mycobacterium avium* complex και *M. paratuberculosis* χωρίστηκαν σε δύο ομάδες και καλλιεργήθηκαν σε 7H9 Broth με Middlebrook ADC Enrichment Bacto, σε φιαλίδια των 2 mL με βιδωτό καπάκι. Για καθένα από τα στελέχη αυτών των ομάδων παρασκευάστηκαν δεκαδικές αραιώσεις, από τις οποίες η μία

σειρά χρησιμοποιήθηκε για μετρήσεις οπτικής πυκνότητας στα 600 nm και η άλλη για τον προσδιορισμό colony forming units (cfu)/mL διαλύματος με τη μέθοδο Miles-Misra.^{15,17} Παράλληλα, έγιναν και μετρήσεις οπτικής απορρόφησης για τον προσδιορισμό της ποσότητας και ποιότητας του παραγόμενου DNA,¹⁸ τόσο σε καθαρές καλλιέργειες όσο και σε ΙΜΠ. Με βάση αυτές τις μετρήσεις και τη γνωστή¹⁹ αναλογία DNA/αριθμού μυκοβακτηριδίων, έγινε και ένας δεύτερος προσδιορισμός εναισθησίας.

Προσδιορισμός ειδικότητας. Για τον προσδιορισμό της ειδικότητας, χρησιμοποιήθηκαν 10 δείγματα ΙΜΠ που δεν παρουσίαζαν καμία ιστολογική αλλοίωση και ήταν αρνητικά με καλλιέργεια και με τη μέθοδο Ziehl-Nielsen. Η προτεινόμενη μέθοδος δοκιμάστηκε επίσης σε διάφορα είδη μυκοβακτηριδίων, αλλά και σε συγγενικά βακτηριακά είδη (*Rhodococcus*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Actinomyces*, *E. coli*). Τέλος, εκτός από καλλιέργειες βακτηριδίων και αρνητικά δείγματα, χρησιμοποιήθηκαν και δείγματα ενοφθαλμισμένα με διάφορα είδη μυκοβακτηριδίων, καθώς επίσης και κλινικά υλικά.

Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης. Τα ολιγονουκλεοτίδια-εκκινητές, που χρησιμοποιήθηκαν (πίν. 2), σχεδιάστηκαν με βάση τη χαρτογράφηση των γονιδίων, όπως αυτή έχει δημοσιευθεί σε γονιδιακές τράπεζες (Genbank). Στα πλαίσια κάθε γονιδίου αναζητήθηκαν ειδικές περιοχές για τις ομάδες μυκοβακτηριδίων που θέλαμε να ταυτοποιήσουμε, με σύγκρισή τους με άλλες αλληλουχίες, ώστε να στοιχειοθετηθεί η ειδικότητά τους (NCBI BLAST Search). Τέλος, με τη χρήση ειδικού λογισμικού προγράμματος, που επιτρέπει τη μελέτη της αλληλεπίδρασης των επιλεγμένων εκκινητών, έγινε η τελική τους σχεδίαση και προσδιορίστηκε η βέλτιστη θερμοκρασία επικόλλησης (OLIGO 5).

Mtb1 και 2: Αυτό το ζεύγος των εκκινητών ενισχύει μια περιοχική μεγέθους 243 ζευγών βάσεων (zβ), της ανοσογόνου πρωτεΐνης MPB64, που είναι ειδική²⁰ για το *Mycobacterium tuberculosis* complex.

Πίνακας 2. Διαγνωστική αξιολόγηση με βάση όλα τα πιθανά αποτελέσματα του προτεινόμενου συνδυασμού εκκινητών.

Μυκοβακτηρίδια	Ζεύγη ολιγονουκλεοτιδίων-εκκινητών			
	Mtb1-2	M16SU-D	MAC1-2	PRAVMPAR
<i>M. tuberculosis</i> complex ¹	+	-	-	-
<i>M. intracellulare</i> ²				
<i>M. smegmatis</i>				
<i>M. gordonae</i>	-	+	-	-
<i>M. avium</i> ³	-	+	+	-
<i>M. paratuberculosis</i>	-	+	+	+
<i>M. paratuberculosis</i>	-	+	-	+

¹*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti*

²Ο συγκεκριμένος συνδυασμός αντιδράσεων σημαίνει την παρουσία οποιουδήποτε από τα τρία αυτά είδη, χωρίς να είναι δυνατό σε αυτή τη φάση να γίνει περαιτέρω διάκριση μεταξύ τους

³Συνδυασμός ειδικός του *Mycobacterium avium*, που καθιστά δυνατή τη διάκρισή του από το πολύ συγγενικό *M. intracellulare*

Mtb1(184–197): 5'-GCT CTG TTG TTC GGG TGT GGC CA-3'

MTb2 (404–427): 5'-GAT ATT CAA TTC GTA GGG GGC TT-3'

MAC1 και 2: Αυτό το ζεύγος εκκινητών ενισχύει μια περιοχή μεγέθους 91 zβ, από τη μεταθετή περιοχή IS1110,²¹ που είναι ειδική²² αποκλειστικά για το *M. avium* complex και όχι για το *M. intracellulare*.

MAC1 (1353–1370): 5'-CAG GCA GAG GGT GGC CG-3'

MAC2 (1427–1444): 5'-CGA ATC ACC CCC GAT CA-3'

M16SD2 και M16SU: Αυτό το ζεύγος εκκινητών ενισχύει μια περιοχή μεγέθους 509 zβ, από το γονίδιο 16S rRNA του *M. intracellulare*, και είναι ειδική των *M. intracellulare*, *M. avium*, *M. paratuberculosis*, *M. smegmatis* και *M. gordonae*.

M16SD2 (68–93): 5'-GTG GGC AAT CTG CCC TGC ACT TCG G-3'

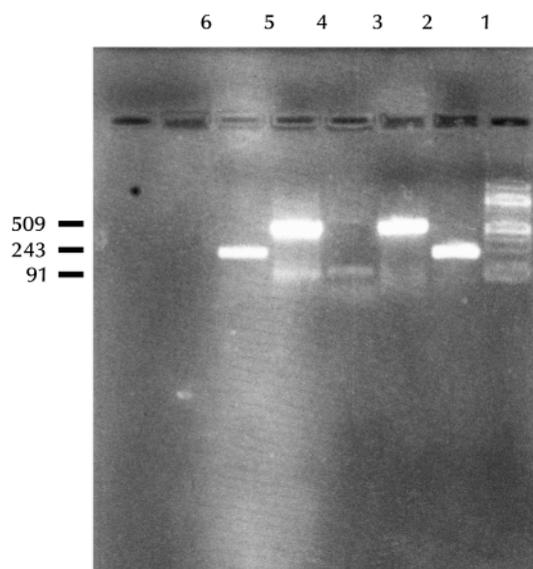
M16SU (481–668): 5'-GCC CGC ACG CTC ACA GTT AAG CCG T-3'

Η διαδικασία της PCR που ακολουθήθηκε, πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο hot start,¹⁶ σε θερμικό κυκλοποιητή Perkin Elmer 9600. Κάθε αντίδραση, συνολικού όγκου 50 μL, προετοιμάζεται με 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,4 σε θερμοκρασία δωματίου), 1,5 mM MgCl₂, 0,25 μM από κάθε ολιγονουκλεοτίδιο-εκκινητή, 200 μM από καθένα από τα τέσσερα δεσοξυριβοζονουκλεοτίδια (ATP, TTP, CTP, GTP), 2,5 units Taq πολυμεράσης, 0,05–0,1 μg DNA, νερό υγρής χρωματογραφίας (HPLC) ή αντίστοιχης ποιότητας. Στο τέλος, η αντίδραση σφραγίζεται με λίγες σταγόνες ορυκτέλαιου (mineral oil). Το θερμοκρασιακό μοτίβο που χρησιμοποιήθηκε και για τα τρία ζεύγη εκκινητών περιλαμβάνει, μετά την αρχική επώαση στους 94 °C για 10 min, την επικόλληση στους 62 °C για 0,5 min, επέκταση στους 72 °C για 1 min και, τέλος, αποδιάταξη στους 94 °C για 0,5 min. Η εναλλαγή των τριών τελευταίων θερμοκρασιακών επιπέδων επαναλαμβάνεται για 30 κύκλους και ολοκληρώνεται, με μία επώαση στους 72 °C για 7 min.

Στα πλαίσια των μέτρων προστασίας για την αποφυγή ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων λόγω της μεταφοράς προϊόντος από προηγούμενα θετικά δείγματα (φαινόμενο μεταφοράς, carry over effect²³), η μέθοδος μπορεί να τροποποιηθεί ώστε να περιλάβει την ουρακίλη-N-γλυκοσιλίωση [UDG (GIBCOBRL)].

Το προϊόν των αντιδράσεων PCR ηλεκτροφορεύεται σε ηλεκτροφόρο 2%, στην οποία έχει προστεθεί και βρωμιούχο αιθίδιο. Το χρωματισμένο DNA φωτογραφίζεται με film Polaroid σε οθόνη εκπομπής υπεριώδους φωτός (εικ. 1).

Για την εντόπιση ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων λόγω του φαινομένου μεταφοράς, ανάμεσα στα δείγματα που εξετάστηκαν υπήρχαν και ορισμένα (20% του συνόλου των δειγμάτων), στα οποία το DNA είχε αντικατασταθεί από νερό (αρνητικοί μάρτυρες). Εκτός αυτών, χρησιμοποιήθηκε και ίδιο ποσοστό από δείγματα ΙΜΠ που είχαν ενοφθαλμιστεί με μυκοβακτηριακό DNA (θετικοί μάρτυρες). Τόσο τα πρώτα



Εικόνα 1. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων ενίσχυσης υλικών μονιμοποιημένων σε παραφίνη. *Στήλη 1:* DNA Marker (100 bp DNA Ladder, New England Biolabs). *Στήλη 2:* Προϊόν 243 ζευγών βάσεων ενδεικτικό παρουσίας *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Στήλη 3:* Προϊόν 509 ζευγών βάσεων ενδεικτικό παρουσίας *M. intracellulare*, *M. avium*, *M. paratuberculosis*, *M. smegmatis* και *M. gordonae*. Το δείγμα αυτό αποδείχθηκε αρνητικό στον υβριδισμό με τον ανικνευτή PRAVMPAR και αρνητικό με τους εκκινητές MAC1–2, με αποτέλεσμα να χαρακτηριστεί *M. intracellulare*-θετικό. *Στήλη 4:* Προϊόν 91 ζευγών βάσεων ενδεικτικό παρουσίας *Mycobacterium avium* complex. *Στήλη 5:* Προϊόντα 91 και 509 ζευγών βάσεων από δείγμα που αντέδρασε θετικά και με τα δύο ζεύγη εκκινητών, αλλά και με τον ανικνευτή PRAVMPAR. Το δείγμα κρίθηκε *M. paratuberculosis*-θετικό. *Στήλη 6:* Προϊόν 243 ζευγών βάσεων ενδεικτικό παρουσίας *Mycobacterium tuberculosis* complex.

όσο και τα δεύτερα επεξεργάζονταν μαζί με τα προς εξέταση δείγματα, κάτι που επιτρέπει την εντόπιση επιμόλυνσης, σε οποιοδήποτε στάδιο της διαδικασίας και αν συμβεί. Αυτή η μορφή ελέγχου κρίθηκε προτιμότερη από την εναλλακτική της χρήσης εσωτερικού μάρτυρα (internal control), δεδομένου ότι η τελευταία θα αύξανε κατά πολύ το κόστος αλλά και την πολυπλοκότητα της διαδικασίας. Επίσης, επειδή διαφορετικά ολιγονουκλεοτίδια-εκκινητές εμφανίζουν διαφορετική ευαισθησία στην ενίσχυση και αναστολή,²⁴ η χρήση εσωτερικού μάρτυρα θα καθιστούσε την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων δυσχερέστερη.

Για την αποφυγή της πιθανότητας ψευδώς θετικού αποτελέσματος λόγω της παρουσίας σαπροφυτικών μυκοβακτηριδίων στο νερό της αντίδρασης, χρησιμοποιήσαμε νερό υγρής χρωματογραφίας ή αντίστοιχης ποιότητας. Εξάλλου, δεδομένου του κινδύνου να προκληθεί το ίδιο εξαιτίας του νερού που χρησιμοποιείται κατά τη διαδικασία της μονιμοποίησης των ιστών σε παραφίνη, χρησιμοποιήθηκαν ως αρνητικοί μάρτυρες και δείγματα ΙΜΠ αρνητικά σε μυκοβακτηρίδια.

Southern blotting

Για τη διαπίστωση της ειδικότητας ενίσχυσης των προϊόντων PCR, παρασκευάστηκαν ειδικά σεσημασμένα ολιγονουκλεοτίδια-ανιχνευτές για καθένα από τα τρία προϊόντα DNA. Η διαδικασία σήμανσης με χημειοφωταύγεια, αλλά και η μέθοδος ανίχνευσης που χρησιμοποιήθηκε, είναι αυτή που περιγράφεται στο εγχειρίδιο της ECL (ECL detection system Amersham International plc, Amersham Place, Buckinghamshire, England).

Εκτός όμως των προηγούμενων ανιχνευτών, που σκοπό είχαν να ανιχνεύσουν απλώς μια δεδομένη αλληλουχία στο τεμαχίδιο DNA που ενισχύει το κάθε ζεύγος εκκινητών, σχεδιάστηκε και ένας ανιχνευτής, ο οποίος επικολλάται σε μια ποικιλόμορφη περιοχή της αλληλουχίας που ενισχύεται από το τρίτο ζεύγος εκκινητών (M16SD2 και M16SU). Ο ανιχνευτής αυτός σχεδιάστηκε με βάση την ειδική σύνθεση της περιοχής αυτής για το *M. paratuberculosis* και είναι σε θέση να διακρίνει αυτό το είδος από το σύνολο των ειδών (*M. intracellulare*, *M. avium*, *M. paratuberculosis*, *M. smegmatis* και *M. gordonae*) που ανιχνεύονται από το παραπάνω ζεύγος εκκινητών.

PRAVMPAR (132–161): 5'-GGA TAG GAC CTC AAG ACG CAT GTC TTC T-3'.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ευαισθησία

Η ευαισθησία για όλα τα ζεύγη εκκινητών καθορίστηκε για δείγματα ΙΜΠ στα 10^4 – 10^5 cfu/mL, για υγροποιημένες τομές ιστών μονιμοποιημένων σε παραφίνη και στα 10^6 cfu/mL για υγρές καλλιέργειες μυκοβακτηριδίων. Μετρήσεις οπτικής πυκνότητας απέδειξαν ότι ενίσχυση ήταν εφικτή από διαλύματα υγρών καλλιέργειών μυκοβακτηριδίων 1:1500 με δείκτη ανάπτυξης 0,001 OD στα 600 nm. Η ελάχιστη ποσότητα DNA, που κρίθηκε απαραίτητη για να δώσουν οι παραπάνω μέθοδοι το αναμενόμενο αποτέλεσμα, προσδιορίστηκε στα 50 fg, που αντιστοιχεί σε 10 μυκοβακτηρίδια,¹⁹ ενώ για το συνδυασμό PCR και Southern blotting με τον ανιχνευτή PRAVMPAR, η παραπάνω ποσότητα μειώθηκε στα 5 fg (1 βακτηριακό κύτταρο).

Σε αυτό το επίπεδο ευαισθησίας διαπιστώθηκε αυξημένο ποσοστό ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων, που παρατηρήθηκαν πιο έντονα στα υλικά παραφίνης και λιγότερο στις καθαρές καλλιέργειες. Η χρήση νερού υγρής χρωματογραφίας και της uracil DNA glycosidase, σε συνδυασμό με τα αυστηρότατα μέτρα προστασίας που τηρήθηκαν κατά τη διάρκεια των δοκιμών (φυσικός διαχωρισμός των σταδίων της αντίδρασης με αξιοποίηση χώρων αφιερωμένων στην PCR, υλικά αποκλειστικής χρήσης, αποστειρώσεις), βοήθησαν ώστε οι αρνητικοί μάρτυρες να δώσουν το αναμενόμενο αρνητικό αποτέλεσμα.

Ειδικότητα

Η ειδικότητα των προτεινομένων μεθόδων καθορίστηκε με τη διαδικασία που περιγράφηκε ήδη, ώστε να διαπιστωθεί και στην πράξη αν τα χαρακτηριστικά τους είναι σύμφωνα με τα κριτήρια του σχεδιασμού τους. Για το σκοπό αυτόν, όπως έχει ήδη αναφερθεί, χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες διαφόρων ειδών βακτηριδίων και μυκοβακτηριδίων. Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν (πίν. 1), αποδείχθηκε η απόλυτη ειδικότητα των εκκινητών, τόσο σε επίπεδο γένους όσο και σε επίπεδο είδους.

Το ζεύγος των εκκινητών Mtb1–2 ανίχνευσε το σύνολο σχεδόν (98,59%, 70 από σύνολο 71) των ειδών που ανήκουν στο *Mycobacterium tuberculosis complex* (πίν. 1), με εξαίρεση το ένα από τα δύο στελέχη *M. africanum*, που δεν αντέδρασε ως *Mycobacterium tuberculosis complex*, ίσως και λόγω εσφαλμένου μικροβιολογικού χαρακτηρισμού. Οι εκκινητές MAC1–2 ανίχνευσαν το 82,5% (33 από σύνολο 40) των ειδών που ανήκουν στο *Mycobacterium avium complex* (*M. avium* MAIS2, *M. avium* serovar 7, *M. avium* WP M21, *M. paratuberculosis* Linda, *M. paratuberculosis* C286, *M. paratuberculosis* ATCC 19698). Οι εκκινητές M16SU-D2 ανίχνευσαν το 100% (25 από σύνολο 25) των στελεχών *Mycobacterium avium* και *M. intracellulare* και το 100% (15 από σύνολο 15) των στελεχών *M. paratuberculosis*, ενώ από τα 7 στελέχη *M. gordonae* ανιχνεύτηκαν μόνο 4 και από 13 *M. smegmatis* μόνο τα 10. Σε συνδυασμό με την παραγωγή του προϊόντος DNA μεγέθους 509 zB, που παράγεται από τους τελευταίους εκκινητές, η εφαρμογή του ανιχνευτή PRAVMPAR ανίχνευσε το 100% των στελεχών του είδους *M. paratuberculosis*.

Κλινικά υλικά

Από τα 75 δείγματα της ομάδας Α, που εμφάνιζαν ιστολογικά αλλοιώσεις τυροειδούς κοκκιοματώδους νέκρωσης, 59 (79%) βρέθηκαν θετικά με τη συγκεκριμένη μέθοδο (πίν. 3). Από αυτά, 38 δείγματα (50,6%) ταυτοποιήθηκαν ως *Mycobacterium tuberculosis complex*, 7 (9%) ως *Mycobacterium avium complex*, ενώ, εκτός από τα προηγούμενα, υπήρξαν και 14 (19%) που αντέδρασαν θετικά στους εκκινητές M16SU-D2, χωρίς κανένα από αυτά να δώσει θετική αντίδραση με τον ανιχνευτή PRAVMPAR. Το τελευταίο είναι ενδεικτικό ότι αυτά τα 14 δείγματα ανήκαν στην ομάδα *M. intracellulare*, *M. gordonae*, *M. smegmatis* (πίν. 2). Από το σύνολο των 35 Ziehl-Nielsen-θετικών δειγμάτων, μόνο τα 31 (86%) ήταν PCR-θετικά, ενώ και τα 39 θετικά δείγματα με την καλλιέργεια ήταν και PCR-θετικά (πίν. 3). Φαίνεται επομένως ότι, αν και όλα τα υλικά αυτής της ομάδας, που αναδείχθηκαν θετικά με

Πίνακας 3. Συγκριτική παρουσίαση αποτελεσμάτων.

Ομάδες (δείγματα)	PCR				Καλλιέργεια			Ziehl-Nielsen
	<i>M. tuberculosis</i> complex	<i>M. avium</i> complex ¹	M16SU-D2 +	PRAVMPAR +	<i>M. tuberculosis</i> complex	<i>M. avium</i> complex ³	<i>M. paratuberculosis</i>	
Ομάδα Α (75)	38 (50,6%)	7 (9,3%)	14 (19%) ²	0	38 (50,6%)	1 (1,33%)	0	35 (46,6%)
Ομάδα Β (25)	6 (24%)	0	0	0	0	0	0	0
Ομάδα Γ (20)	0	2 (10%)	5 (25%)	7 (35%)	0	0	0	0
Ομάδα Δ (50)	33 (66%)	4 (8%)	0	0	28 (56%)	0	0	22 (44%)

¹*M. avium* complex: *M. avium* MAIS2, *M. avium* serovar 7, *M. avium* WP M21, *M. paratuberculosis* Linda, *M. paratuberculosis* C286, *M. paratuberculosis* ATCC 19698

²*M. intracellulare*, *M. gordonae*, *M. smegmatis*

³*M. avium* και *M. intracellulare*

καλλιέργεια, ήταν επίσης θετικά και με την προτεινόμενη μέθοδο, 4 από τα Ziehl-Nielsen-θετικά δείγματα ήταν αρνητικά στην PCR. Το συγκεκριμένο αποτέλεσμα επαληθεύτηκε με την επανάληψη των δύο μεθόδων και τη χρήση καινούργιων θετικών και αρνητικών μαρτύρων.

Από τα 25 δείγματα της ομάδας Β, με ιστολογικές αλλοιώσεις μη τυροειδούς κοκκιοματώδους νέκρωσης τυπικής περιστατικών σαρκοειδωσης, 6 (24%) βρέθηκαν θετικά με τη συγκεκριμένη μέθοδο (πίν. 3), τα οποία και ταυτοποιήθηκαν ως *Mycobacterium tuberculosis* complex. Αντίθετα, η καλλιέργεια και η Ziehl-Nielsen δεν έδωσαν κανένα θετικό αποτέλεσμα.

Από τα 20 δείγματα της ομάδας Γ, που αποτελούνταν από βιοπτικά υλικά εντέρου μονιμοποιημένα σε παραφίνη και προέρχονταν από περιστατικά με υποψία νόσου του Crohn, σε 7 (35%) συνολικά δείγματα ανιχνεύτηκε η παρουσία μυκοβακτηριδιακού DNA με τους εκκινητές MAC1-2 και M16SU-D2. Από αυτά τα δείγματα, 2 (10%) ταυτοποιήθηκαν ως *Mycobacterium avium* complex, ενώ, εκτός αυτών, υπήρξαν και 5 (25%) που αντέδρασαν θετικά και με τους εκκινητές M16SU-D2 (πίν. 3). Το σύνολο των 9 δειγμάτων έδωσε θετική αντίδραση και με τον ανιχνευτή PRAVMPAR, ταυτοποιώντας αυτά τα μυκοβακτηρίδια ως *M. paratuberculosis*. Καμία από τις άλλες μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν (Ziehl-Nielsen και καλλιέργεια) δεν επέτρεψε τη διασταύρωση του ανωτέρου αποτελέσματος (πίν. 3).

Τα δείγματα της ομάδας Δ (πίν. 3) περιελάμβαναν 30 βιοψίες πνεύμονα, ενώ σε 22 από αυτές τις περιπτώσεις η καλλιέργεια βρογχοπνευμονικού εκπλύματος (BAL) και πτυέλων ανέδειξε την παρουσία *Mycobacterium tuberculosis*, γεγονός που επαληθεύτηκε και με την PCR. Η τελευταία όμως ανέδειξε και 4 ακόμη περιστατικά, που χαρακτηρίστηκαν ως *Mycobacterium avium* complex. Η Ziehl-Nielsen ανέδειξε οξεάντοχους βακίλους μόνο σε 16 από το σύνολο των 22 περιστατικών. Συμφωνία μεταξύ PCR, καλλιέργειας και

Ziehl-Nielsen υπήρξε και για 6 από τα 10 δείγματα επιχώριων λεμφογαγγλίων, που προέρχονταν άλλωστε από την ομάδα των 22 προηγούμενων περιστατικών, για τα οποία είχε γίνει και η ανάλογη βιοψία. Τέλος, σε μία περίπτωση από τις 4 του νωτιαίου μυελού και σε 4 από τις 6 του παχέος εντέρου (και οι 6 προέρχονταν από τον ίδιο ασθενή με υποψία νόσου του Crohn), η PCR επιβεβαίωσε την παρουσία *Mycobacterium tuberculosis* complex.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα τελευταία χρόνια, η εκτεταμένη έρευνα στο χώρο της μοριακής μελέτης της φυματίωσης έχει οδηγήσει στη δημοσίευση ενός σημαντικού αριθμού διαγνωστικών διαδικασιών, που βασίζονται στην PCR και εφαρμόζονται σε κλινικά δείγματα.²⁵⁻²⁹ Οι μέθοδοι αυτές είναι μάλλον πολύπλοκες για εφαρμογή σε επίπεδο ρουτίνας, δεδομένου ότι χρησιμοποιούν σε μεγάλο βαθμό τεχνικές όπως το Southern blotting ή τον DNA υβριδισμό. Εκτός αυτού, όμως, σε όλες τις περιπτώσεις επιτρέπουν απλώς την ανίχνευση του *Mycobacterium tuberculosis* complex ή του *Mycobacterium avium intracellulare* complex, χωρίς να δίνεται η δυνατότητα περαιτέρω διαγνωστικής διερεύνησης. Διάφορες μέθοδοι, που διατίθενται και στο εμπόριο,³¹⁻³³ και βασίζονται είτε στη χρήση PCR, είτε στη χρήση ολιγονουκλεοτιδίων-ανιχνευτών, παρουσιάζουν την ίδια αδυναμία της εντόπισης μόνο της μίας ή της άλλης ομάδας μυκοβακτηρίων, ενώ σε αρκετές περιπτώσεις εμφανίζουν ευαισθησία που συγκρίνεται μόνο με αυτή της Ziehl-Nielsen.^{14,27} Τέλος, αν και το κόστος τους σταδιακά γίνεται μικρότερο, η χρήση τους δικαιολογείται μόνο από εξειδικευμένα εργαστήρια.

Βάσει των σχετικών βιβλιογραφικών δεδομένων και στο βαθμό που οι συγγραφείς μπορούν να βεβαιώσουν, η παρούσα μελέτη περιγράφει έναν πρωτότυπο συνδυασμό μεθόδων, που επιτρέπει τη συνολική διαγνωστική διερεύνηση όχι μόνο περιστατικών φυματίωσης, αλλά γενικότερα νόσων με πιθανο-

λογούμενη εμπλοκή μυκοβακτηριδίων. Ο σχεδιασμός των ολιγονουκλεοτιδίων-εκκινητών, που κατέστησε δυνατή τη λειτουργία τους στις ίδιες θερμοκρασιακές συνθήκες, επιτρέπει τη ταυτόχρονη εξέταση ενός δείγματος με όλους αυτούς τους εκκινητές, καθιστώντας δυνατή την αιτιολογική διάγνωση και διάκριση ακόμη και μεταξύ πολύ συγγενικών μυκοβακτηριδίων, σε διάστημα 12–24 ωρών. Η περιοχική, άλλωστε, του γονιδίου 16S rRNA, που χρησιμοποιήθηκε για τη σχεδίαση του PRAVMPAR και η οποία περιγράφεται για πρώτη φορά, μπορεί να επιτρέψει –με τη σχεδίαση κατάλληλων ανιχνευτών– και τη διάκριση μεταξύ των *M. intracellulare*, *M. avium* complex, *M. smegmatis* και *M. gordonae*. Τέλος, τόσο η μέθοδος αυτή, όσο και η συνδυασμένη μελέτη της προαναφερθείσας ομάδας των μυκοβακτηριδιακών νοσημάτων (φυματίωση, σαρκοειδωση, νόσος του Crohn) αναφέρονται για πρώτη φορά.

Στην παρούσα μελέτη έγινε επιλογή κάποιων συγκεκριμένων περιοχών-στόχων με βάση τα ειδικά χαρακτηριστικά τους, αλλά και τα δεδομένα της σχετικής βιβλιογραφίας. Είναι χαρακτηριστικό ότι σε καμία από τις περιπτώσεις διαγνωστικών PCR δεν χρησιμοποιήθηκε η περιοχική IS6110, αν και θεωρείται από πολλούς ως η πλέον κατάλληλη γονιδιακή περιοχική για την ανίχνευση του *Mycobacterium tuberculosis* complex.^{34–36} Οι λόγοι που οδήγησαν σε αυτή την απόφαση ήταν ότι η περιοχική IS6110 ενοχοποιείται σε αρκετές περιπτώσεις για αυξημένο ποσοστό ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων,^{30,38} ενώ έχει αποδειχθεί ότι μερικές φορές απουσιάζει από στελέχη του *Mycobacterium tuberculosis* complex.^{38–40} Τα παραπάνω έχουν οδηγήσει και άλλους ερευνητές στο συμπέρασμα ότι δεν θα πρέπει να βασίζεται κανείς αποκλειστικά και μόνο στο IS6110 ως το μοναδικό στόχο ανίχνευσης της συγκεκριμένης ομάδας μυκοβακτηριδίων.³⁸ Η χρήση της IS1110 για τη διάγνωση του *Mycobacterium avium* complex θα μπορούσε, λόγω των χαρακτηριστικών των μεταθετών αλληλουχιών, να αποτελεί επίσης στοιχείο αμφισβήτησης. Αν και αρχικά περιγράφηκε ως ένα ιδιαίτερα κινητό στοιχείο,⁴¹ άλλες μελέτες απέδειξαν τη σταθερότητά του, όχι μόνο σε στελέχη εργαστηρίου, αλλά και σε στελέχη που απομονώθηκαν από ασθενείς.⁴² Για το *Mycobacterium avium* complex, συχνά χρησιμοποιείται η περιοχική 16S rRNA,¹⁹ ενώ για το *M. paratuberculosis*, εκτός από το προηγούμενο γονίδιο, τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται και η IS900 (πίν. 4), η οποία και θεωρείται ιδιαίτερα ειδική γι' αυτό το είδος μυκοβακτηριδίων.⁴³ Η γενετική ομοιότητα των δύο παραπάνω ειδών επέτρεψε τη συνδυασμένη εντόπισή τους και στη συνέχεια τη διάκρισή τους με τη χρήση του ειδικού ολιγονουκλεοτιδίου-ανιχνευτή. Το πρόβλημα που παρουσίασε η συγκεκριμένη μέθοδος, το οποίο άλλωστε ήταν αναμενόμενο ήδη από τη φάση του

σχεδιασμού της με τη μελέτη των στοιχείων που ήταν διαθέσιμα σε γονιδιακές τράπεζες, ήταν η αναπόφευκτη θετικότητα στελεχών που ανήκουν στα είδη *M. gordonae* και *M. smegmatis*. Αν και το τελευταίο πιστεύεται ότι θα λυνόταν με την επιλογή της IS900 αντί του γονιδίου 16S rRNA, η οδός αυτή δεν επιλέχθηκε, γιατί δεν θα επέτρεπε την ανίχνευση και διάκριση των *M. avium* και *M. intracellulare*. Οι εκκινητές MAC1–2 ανίχνευσαν μόνο 8 από τα 15 στελέχη *M. paratuberculosis* (πίν. 1), γεγονός που δείχνει ότι ο πολυμορφισμός του στοιχείου IS1110 δεν διευκολύνει το σχεδιασμό εκκινητών που να καλύπτουν διαγνωστικά όλα τα στελέχη του παραπάνω είδους. Άλλωστε, αυτός ήταν και ο λόγος σχεδιασμού των M16SU-D2. Οι εκκινητές αυτοί ταυτοποίησαν μόνο 10 από τα 13 στελέχη *M. smegmatis* και 4 από τα 7 *M. gordonae*. Προφανώς, οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν δεν καλύπτουν πλήρως τη γενετική ποικιλότητα των συγκεκριμένων ειδών, που δεν έχουν άλλωστε ιδιαίτερο διαγνωστικό ενδιαφέρον. Η αιτία γι' αυτή τη φαινομενική αδυναμία θα έπρεπε ίσως να αναζητηθεί στο μικρό σχετικά όγκο πληροφοριών των διαθέσιμων γονιδιακών τραπεζών για τα παραπάνω είδη μυκοβακτηριδίων.

Συγκρίνοντας την ευαισθησία των παραπάνω μεθόδων με άλλες μεθόδους διάγνωσης μυκοβακτηριδίων βασισμένες στην PCR ή και τον DNA υβριδισμό, διαπιστώνεται ότι το επίπεδο ευαισθησίας τους είναι ιδιαίτερα ικανοποιητικό. Για να είναι άλλωστε δυνατή η αντικειμενική αξιολόγηση και η συγκριτική εκτίμηση της ευαισθησίας της PCR, της καλλιέργειας και της Ziehl-Nielsen, ο προσδιορισμός ευαισθησίας έγινε με διάφορες μεθόδους. Αυτό όμως θεωρήθηκε σημαντικό και για έναν ακόμη λόγο. Η ύπαρξη σε πολλές περιπτώσεις μορφών με ατελές κυτταρικό τοίχωμα,^{44,45} ή και κατεστραμμένων από διάφορα χημικά μυκοβακτηριδίων, καθιστά καθεμία από αυτές τις τεχνικές αναξιόπιστη, δεδομένου ότι άλλες βασίζονται στη βιωσιμότητα των βακτηριδιακών κυττάρων και άλλες στην ποσότητα DNA που φέρουν. Ο συνδυασμός τους, επομένως, είναι ίσως απαραίτητος για την εξαγωγή ενός αντικειμενικού συμπεράσματος.

Με βάση τις παραπάνω μετρήσεις, διαπιστώθηκε σε όλες τις περιπτώσεις ότι η ευαισθησία των διαγνωστικών μεθόδων που εφαρμόστηκαν ήταν μικρότερη σε δείγματα ΙΜΠ από ό,τι σε καθαρές καλλιέργειες. Η παραμονή στο δείγμα έστω και μικρής ποσότητας παραφίνης οδηγεί σε ανομοιόμορφη κατανομή των μυκοβακτηριδίων στο δείγμα, που μπορεί σαφώς να επηρεάσει την ευαισθησία της μεθόδου. Αυτό όμως που είναι βέβαιο, ιδίως στην περίπτωση των προϊόντων βιοψίας, μονιμοποιημένων ή μη, είναι ότι η παρουσία μεγάλης ποσότητας ετερόλογου DNA (από τους ιστούς του ξενιστή) επηρεάζει αρνητικά την αντίδραση.⁴⁶

Το πρόβλημα των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων, που έχει παρατηρηθεί και από άλλους,^{47,48} αποδίδεται κυρίως στο φαινόμενο μεταφοράς (carry over effect). Σε γενικές γραμμές, η χρήση νερού ποιότητας υγρής χρωματογραφίας (HPLC) και του ενζύμου UDG, σε συνδυασμό με τα προαναφερθέντα μέτρα προστασίας, ήταν τις περισσότερες φορές αποτελεσματικά στην αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος.

Η εμφάνιση ψευδώς αρνητικών αποτελεσμάτων στις περισσότερες περιπτώσεις αποδόθηκε στην ύπαρξη αναστολέων της αντίδρασης στο κλινικό υλικό που προσκομίστηκε για εξέταση ή στην πολύ μικρή συγκέντρωση μυκοβακτηριδίων ή, τέλος, στην κακή ποιότητα (κατακερματισμό ή ακαθαρσίες) του DNA. Οι αναστολείς της αντίδρασης φαίνεται ότι έχουν σημαντικό ρόλο στην περίπτωση των υλικών που έχουν μονιμοποιηθεί σε παραφίνη, αν και γι' αυτή την κατηγορία δειγμάτων διαπιστώθηκε ότι ήταν μεγαλύτερης σημασίας η ανασταλτική επίδραση που έχει το κακής ποιότητας, λόγω κατακερματισμού, DNA, που είναι αποτέλεσμα της διαδικασίας μονιμοποίησης των ιστών στην παραφίνη.⁴⁹ Για το λόγο αυτό, σε όλες τις περιπτώσεις δειγμάτων αυτής της κατηγορίας, η ποιότητα του DNA ελέγχθηκε επιμελώς με την ηλεκτροφόρησή του και με μετρήσεις οπτικής πυκνότητας.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η αξιολόγηση των υλικών αναφοράς αλλά και των κλινικών δειγμάτων έγινε συγκριτικά με τη χρήση, εκτός των μεθόδων PCR, της ιστολογικής εξέτασης επιχρισμάτων, της χρώσης Ziehl-Nielsen και, όπου ήταν δυνατό, της καλλιέργειας.

Σε γενικές γραμμές, διαπιστώθηκε ότι για υλικά με μεγάλο αριθμό μυκοβακτηριδίων η συμφωνία των παραπάνω μεθόδων ήταν σημαντικότερη. Έτσι, υλικά Ziehl-Nielsen-θετικά, σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις αναδείχθηκαν και PCR-θετικά. Εξάιρεση στο τελευταίο αποτέλεσαν 4 μόνο δείγματα (πίν. 3, ομάδα Δ), που αν και ήταν Ziehl-Nielsen-θετικά, αναδείχθηκαν PCR-αρνητικά. Η φαινομενική αυτή αδυναμία της PCR δεν μπορεί να θεωρηθεί ουσιαστική, δεδομένου ότι για τα υλικά παραφίνης που προέρχονταν από περιστατικά θετικά και με καλλιέργεια, υπήρξε απόλυτη συμφωνία μεταξύ καλλιέργειας και PCR (πίν. 3). Η προαναφερθείσα ασυμφωνία Ziehl-Nielsen και PCR οφείλεται πιθανώς στο ότι τα PCR-αρνητικά στελέχη ήταν γενετικώς μη συγγενή με αυτά που ανιχνεύονται από τη μέθοδο ή ότι ίσως επρόκειτο για οξεάντοχα βακτηρίδια που δεν ανήκαν στο *Mycobacterium* spp.

Αντίθετα, σε όλες τις άλλες περιπτώσεις η Ziehl-Nielsen φαίνεται να είναι ανεπαρκής στην αξιολόγηση των δειγμάτων που δεν είναι βαρέως μολυσμένα, ιδίως αν πρόκειται για μυκοβακτηρίδια που δεν ανήκουν στο

Mycobacterium tuberculosis complex. Στην ομάδα Δ, η Ziehl-Nielsen ανίχνευσε μόλις 22 από τα 37 PCR-θετικά δείγματα (πίν. 3), που προέρχονταν όλα από την ομάδα των 33 *Mycobacterium tuberculosis* complex PCR-θετικών δειγμάτων.

Τέλος, ένα σημαντικό συμπέρασμα προκύπτει και σχετικά με την ιστολογική αξιολόγηση των δειγμάτων που προσκομίζονται από ασθενείς με υποψία φυματίωσης. Αν και στην παρούσα μελέτη η αξιολόγηση έγινε από ιδιαίτερα εκπαιδευμένο προσωπικό, φαίνεται ότι ένα ποσοστό έως και 30% από τα δείγματα αυτά, που ιστολογικά εμφάνιζαν τυπικές αλλοιώσεις φυματίωσης, δεν έφεραν ανιχνεύσιμα μυκοβακτηρίδια με όποια μέθοδο και αν εξετάστηκαν (Ziehl-Nielsen, καλλιέργεια, PCR). Το τελευταίο μπορεί ασφαλώς να αποδοθεί στην παρουσία ανεπαρκούς ποσότητας μυκοβακτηριδιακού DNA ή ακόμη και στην απουσία μυκοβακτηριδίων από τέτοιες αλλοιώσεις. Η παρατήρηση αυτή είναι σημαντική, γιατί σε πολλές περιπτώσεις στην κλινική πράξη αποφασίζεται η έναρξη θεραπείας μόνο με βάση την ιστολογική εικόνα, κάτι που, όπως φαίνεται, είναι αδόκιμο, δεδομένου ότι συχνά πρόκειται για μη μυκοβακτηριδιακές ή μη ενεργείς λοιμώξεις. Αντίθετα, υπάρχει και η περίπτωση περιστατικών που συνήθως σχετίζονται με ανοσοκαταστολή, τα οποία εμφανίζουν PCR-θετικό αποτέλεσμα αλλά όχι και αντίστοιχες ιστολογικές αλλοιώσεις.

Μια σχετική ασυμφωνία εμφανίζεται όμως και μεταξύ PCR και καλλιέργειας, ιδίως για τα είδη που δεν ανήκουν στο *Mycobacterium tuberculosis* complex. Φαίνεται (πίν. 3) όμως ότι σε αρκετές περιπτώσεις η καλλιέργεια δεν ανέδειξε στελέχη *Mycobacterium avium* complex και *Mycobacterium paratuberculosis*. Το αποτέλεσμα αυτό, τουλάχιστον αναφορικά στο δεύτερο μικρόβιο, ίσως να είναι αναμενόμενο, δεδομένης της δυσχερέστατης ανάδειξης με καλλιέργεια του *M. paratuberculosis*. Όσον αφορά στο *Mycobacterium avium* complex, η ασυμφωνία αυτή είναι αποτέλεσμα κυρίως της μεγάλης γενετικής ανομοιομορφίας αυτής της ομάδας, η οποία έχει διαπιστωθεί και από άλλους^{50,51} και συχνά δημιουργεί βάσιμα ερωτηματικά σχετικά με την τρέχουσα καθιερωμένη ονοματολογία των στελεχών της.

Ένα ακόμη σημαντικό εύρημα ήταν η εντόπιση, στην ομάδα Β, 6 περιστατικών θετικών σε παρουσία μυκοβακτηριδίων. Αν και τα τελευταία χρόνια γίνονται όλο και περισσότερες αναφορές στη σχετική βιβλιογραφία για την εμπλοκή των μυκοβακτηριδίων στην αιτιοπαθογένεια της σαρκοείδωσης, τα δεδομένα είναι έντονα αντιφατικά, αναφορικά κυρίως με τα υπεύθυνα είδη μυκοβακτηριδίων. Υπάρχουν αναφορές

που ενοχοποιούν αποκλειστικά το *Mycobacterium avium* complex, δηλώνοντας ότι DNA από *Mycobacterium tuberculosis* complex δεν ανευρέθηκε σε κανένα από αυτά τα περιστατικά,^{45,52} και άλλες στις οποίες αποδεικνύεται ακριβώς το αντίθετο, τόσο με μοριακές,^{5,53-55} όσο και με ανοσολογικές μεθόδους.^{56,57} Εξάλλου, όπως διαπιστώσαμε και εμείς, κανένα από τα παραπάνω περιστατικά δεν έδωσε θετικές σε μυκοβακτηρίδια καλλιέργειες, πιθανώς επειδή, όπως έχει ήδη προταθεί από άλλους, τα εμπλεκόμενα μυκοβακτηρίδια φέρουν ατελές κυτταρικό τοίχωμα.

Στην παρούσα μελέτη, αν και έγινε ειδικός σχεδιασμός για την ανάδειξη στελεχών του *Mycobacterium avium* complex που εμπλέκονται στα περιστατικά σαρκοείδωσης, δεν ανευρέθηκε κανένα που να ανήκει σε αυτό το είδος, ενώ, αντίθετα, βρέθηκαν 6 που ανήκαν στο *Mycobacterium tuberculosis* complex. Τα παραπάνω δεδομένα, σε συνδυασμό με τα στοιχεία της σχετικής βιβλιογραφίας, ίσως να υπαινίσσονται ότι η γενετική ποικιλομορφία των μυκοβακτηριδίων που εμπλέκονται στη σαρκοείδωση είναι μεγαλύτερη από ό,τι αρχικά είχε εκτιμηθεί. Ένα ακόμη ενδιαφέρον εύρημα, που προέκυψε από τη μελέτη των αποτελεσμάτων αυτής της κατηγορίας των δειγμάτων, είναι ότι και οι 6 ασθενείς, στους οποίους διαπιστώθηκαν μυκοβακτηρίδια, ανήκαν σε μια ομάδα 8 ατόμων που παρουσίαζαν μικρή ανταπόκριση στη συνήθη θεραπεία της σαρκοείδωσης (κορτικοστεροειδή, ανοσοκατασταλτικά φάρμακα, κυκλοσπορίνη). Αντίθετα, τα υπό-

λοιπα 17 άτομα, στα οποία δεν ανευρέθηκαν μυκοβακτηρίδια, παρουσίαζαν πολύ καλύτερη ανταπόκριση στη θεραπεία. Το εύρημα αυτό, αν και δεν μπορεί να αξιολογηθεί λόγω του μικρού μεγέθους του δείγματος, δείχνει την ανάγκη διεξαγωγής κλινικής μελέτης με σκοπό την εξακρίβωση της πιθανής αρνητικής επίδρασης των μυκοβακτηριδίων στη θεραπεία της σαρκοείδωσης. Το τελευταίο, άλλωστε, εύρημα συμφωνεί και με την πρόσφατα διατυπωθείσα άποψη ότι στη σαρκοείδωση επιτυγχάνονται καλύτερα θεραπευτικά αποτελέσματα με συνδυασμό αντιφυματικής και ανοσοκατασταλτικής αγωγής.⁴³

Ασυμφωνία όμως στη σχετική βιβλιογραφία (πίν. 4) υπάρχει αναφορικά και με τη νόσο του Crohn. Από το 1932, που ο Boril Crohn περιέγραψε μια νόσο με χαρακτηριστικά νεκρωτικής, συχνά ελκώδους κολίτιδας, η οποία πήρε και το όνομά του,⁵⁸ δεν έχει γίνει δυνατή η κατάδειξη του *M. paratuberculosis* ως αιτίου της νόσου, αν και υπάρχουν και επιδημιολογικά δεδομένα που τη συνδέουν με το συγκεκριμένο είδος μυκοβακτηριδίου.^{59,60}

Στην παρούσα μελέτη, διαπιστώθηκε η παρουσία *M. paratuberculosis* (πίν. 3, ομάδα Γ) σε ποσοστό 35% των περιστατικών στα οποία ιστολογικά είχε τεθεί διάγνωση νόσου του Crohn. Στην ομάδα Δ, διαπιστώθηκε η παρουσία μυκοβακτηριδίων σε 4 από τις 6 βιοψίες εντέρου που είχαν ληφθεί από ασθενή με ελκώδη νεκρωτική κολίτιδα. Μετά τη χειρουργική αφαίρεση των νεκρωτικών αλλοιώσεων ακολούθησε θεραπεία με

Πίνακας 4. PCR και ορολογικές μελέτες αναφορικά με τη σχέση μεταξύ *M. paratuberculosis*, νόσου του Crohn και ελκώδους κολίτιδας.

Συγγραφείς	Περιοχή-στόχος	Νόσος του Crohn	Ελκώδης κολίτιδα	Μάρτυρες	Σχέση
Sanderson et al ⁶²	IS900	26/40 (65%)	1/23 (4,3%)	5/40 (12%)	(+)
Dell'Isola et al ⁶³	IS900	3/18 (72%)	1/5 (20%)	7/29 (24%)	(+)
Suenaga et al ⁶⁴	IS900	10/10 (100%)	11/18 (61%)	14/16 (88%)	(;)
Dumonceau et al ⁶⁵	IS900	(0%)	(0%)	(0%)	(;)
Dumonceau et al ⁶⁵	16S rRNA	17/36 (47%)	6/13 (46%)	13/23 (57%)	(;)

Συγγραφείς	Αντιγόνο	Νόσος του Crohn	Ελκώδης κολίτιδα	Καρκίνος εντέρου	Μάρτυρες	Σχόλιο
Kreuzpaintner et al ⁶⁶	45/48 kd Διπλό αντιγόνο	65%	10%	5%	0	Υποστηρίζει τη συσχέτιση μεταξύ μυκοβακτηριδίων και νόσου του Crohn
Tanaka et al ⁶⁷	Πρωτοπλασματικό αντιγόνο	11/17	1/10 (64,7%)	1/20 (5%) (10%)	0/10 (0%)	Δεν υποστηρίζει τη συσχέτιση μεταξύ μυκοβακτηριδίων και νόσου του Crohn

(+): Θετική συσχέτιση μεταξύ *M. paratuberculosis*, περιστατικών νόσου του Crohn και ελκώδους κολίτιδας

(;): Αμφίβολη σχέση μεταξύ *M. paratuberculosis*, περιστατικών νόσου του Crohn και ελκώδους κολίτιδας

κορτικοστεροειδή, δεδομένου ότι πριν από την εφαρμογή της PCR το περιστατικό είχε αξιολογηθεί ως νεκρωτική αγγειίτιδα. Παρακολουθώντας τον ασθενή, διαπιστώθηκε ότι ενώ αρχικά παρουσίαζε βελτίωση, στη συνέχεια εμφάνισε στοματικά έλκη. Αφού με την PCR τεκμηριώθηκε η εμπλοκή μυκοβακτηριδίων και τέθηκε η υποψία νόσου του Crohn, χορηγήθηκε σουλφασαλαζίνη και αζαθειοπρίμη. Ο ασθενής, 15 μέρες αργότερα, δεν παρουσίαζε (κλινικά και αιματολογικά) συμπτώματα φλεγμονής, ενώ μετά από 6 μήνες παρέμενε ασυμπτωματικός με συνδυασμό των παραπάνω αντιβιοτικών και πρεδνιζολόνης. Αν και αυτό το εύρημα συμφωνεί με τη θεωρία εμπλοκής του συγκεκριμένου μυκοβακτηριδίου στη νόσο, αλλά και με τα προαναφερθέντα δεδομένα της νεότερης θεραπευτικής αντιμετώπισης της σαρκοειδωσης με συνδυασμό αντιβιοτικών και αντιφλεγμονωδών φαρμάκων, υπάρχουν αμφιβολίες για το αν η θεραπεία ήταν αποτέλεσμα της

αντιβακτηριδιακής επίδρασης των αντιβιοτικών ή της αντιφλεγμονώδους δράσης, που πολλά από αυτά παρουσιάζουν.⁶¹

Συμπερασματικά, η προτεινόμενη διαγνωστική διαδικασία μπορεί να αποτελέσει ένα ταχύ, αξιόπιστο και ακριβές μέσο αιτιολογικής διάγνωσης περιστατικών, στα οποία τίθεται υποψία εμπλοκής μυκοβακτηριδίων. Η απευθείας εφαρμογή της μεθόδου σε υλικά μονιμοποιημένα σε παραφίνη απλοποιεί κατά πολύ την υπόθεση της διάγνωσης, που μπορεί να γίνει με μικρό κόστος και χωρίς την ανάγκη χώρου υψηλής βιολογικής προστασίας. Η δυνατότητα, τέλος, ταχείας ταυτοποίησης μυκοβακτηριδίων σε περιστατικά φυματίωσης, σαρκοειδωσης και νόσου του Crohn, επιτρέπει την άμεση εφαρμογή ειδικής θεραπείας, που μπορεί να βελτιώσει την ποιότητα ζωής και τα ποσοστά θνητότητας ατόμων που έχουν προσβληθεί από αυτά τα νοσήματα.

ABSTRACT

Application of an innovative molecular method for the detection and identification of mycobacteria on archive paraffin embedded samples with histological evidence of granulomatous inflammation

I. IKONOMOPOULOS,¹ V. GORGOULIS,¹ P. ZACHARATOS,¹ A. KOTSINAS,¹
N. GOUTAS,² Ch. KITTAS¹

¹Department of Histology-Embryology, University of Athens, Medical School

²Department of Histopathology, Evgenidio Hospital, Athens, Greece

Archives of Hellenic Medicine 1999, 16(4):356–367

OBJECTIVE The aim of this study was to design a diagnostic procedure for the detection and identification of some of the more important pathogenic mycobacteria, using paraffin embedded tissue samples. This method would be applied for the diagnostic study of cases of tuberculosis, sarcoidosis and Crohn's disease. **METHOD** A combination of a polymerase chain reaction (PCR) and DNA hybridization assay, with three specifically designed pairs of primers and a probe, were used for the detection and identification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare* and *Mycobacterium paratuberculosis*. **RESULTS** The method was applied directly on paraffin embedded tissue samples and was shown to specifically detect the presence of even a single bacterial cell. The application of the assay on selected material from patients with Crohn's disease and sarcoidosis, demonstrated the implication of *Mycobacterium paratuberculosis* and *Mycobacterium tuberculosis* complex respectively, in forms which could not be demonstrated by culture. **CONCLUSIONS** The proposed method can rapidly detect and identify some of the most important pathogenic mycobacteria distinguishing species with great genetic similarity. The procedure can be applied directly on paraffin embedded tissue samples for the diagnosis of tuberculosis but also for the study of certain diseases with unknown etiology, such as sarcoidosis and Crohn's disease.

Key words: *Mycobacterium avium* complex, *Mycobacterium tuberculosis*

Βιβλιογραφία

- NERLICH AG, HAAS CJ, ZINK A, SZEIMIES U, HAGEDORN HG. Molecular evidence for tuberculosis in an ancient Egyptian mummy. *Lancet* 1997, 350:1404
- SALO WL, AUFDERHEIDE AC, BUIKSTRA J, HALCMBE TA. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA, in a pre-Colombian Peruvian mummy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91:2091–2094
- KOCHI A. The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organisation. *Tubercle* 1991, 28: 1–6
- DOLIN PJ, RAVIGLIONE MC, KOCHI A. Global tuberculosis incidence and mortality during 1990–1999. *Bull World Health Organ* 1994, 72:220–221

5. CONNOLLY MA, CHAULET P, RAVIGLIONE MC. Epidemiology of tuberculosis. *European Respiratory Monograph*, 1997:51–55
6. POPPER HH, KLEMEN H, HOEFLER G, WINTER E. Presence of mycobacterial DNA in sarcoidosis. *Hum Pathol* 1997, 28:769–800
7. VAGO L, BARBERIS M, GORI A, SCARPELLINI P, SALA E, NEBULONI M ET AL. Nested polymerase chain reaction for *Mycobacterium tuberculosis* IS6110 sequence on formalin-fixed paraffin-embedded tissues with granulomatous diseases for rapid diagnosis of tuberculosis. *Am J Clin Pathol* 1998, 109:411–415
8. SANDERSON JD, MOSS MT, TIZARD MLV, HERMON-TAYLOR J. *Mycobacterium paratuberculosis* DNA in Crohn's disease tissue. *Gut* 1992, 33:890–896
9. PFALLER MA. Application of new technology to the detection, identification and antimicrobial susceptibility testing for mycobacteria. *Clin Infect Dis* 1994, 101:329–337
10. CENTERS FOR DISEASE CONTROL. Tuberculosis morbidity—United States, 1991. *MMWR* 1992, 41:240
11. BEAVIS KG, LICHTY MB, JUNGKIND DL, GIGER O. Evaluation of Amplicor PCR for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* from sputum specimens. *J Clin Microbiol* 1995, 33:2582–2586
12. WARDS PJ, COLLINS DM, DE LISLE GW. Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. *Vet Microbiol* 1995, 43:227–240
13. DOUGLAS FM, CURRY JI. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum sediments by Amplicor PCR. *J Clin Microbiol* 1995, 15:2686–2691
14. PAO CC, LIN SS, WU SY, JUANG WM, CHANGI CH, LIN JY. The detection of mycobacterial DNA sequences in uncultured clinical samples with cloned *Mycobacterium tuberculosis* DNA probes. *Tubercle* 1988, 69:27–36
15. BARROW GI, FELTHAM RKL (eds). *Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria*. 3rd ed. New York, University Press, 1993:92–93
16. SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Press, 1989
17. ROBERTS D (ed). *Practical Food Microbiology*. Public Health Laboratory Service, London, 1995:103–107
18. BRIAN W, BAINBRIDGE W. Microbiological techniques for molecular biology: bacteria and phages. In: *Essential Molecular Biology*. Oxford University Press, Oxford, 1994:13–40
19. KOX LFF, VAN LEEUWEN S, KNIJPER H, JANSEN HM, KOLK AHJ. PCR assay based on DNA coding for 16S rRNA for detection and identification of mycobacteria in clinical samples. *J Clin Microbiol* 1995, 33:3225–3233
20. ΙΚΟΝΟΜΟΠΟΥΛΟΣ JA, GORGOLIS V, ZACHARATOS P, KOTSINAS A, TSOI E, KARAMERIS A ET AL. Multiplex PCR assay for the detection of mycobacterial DNA directly from sputum. *In Vivo* 1998, 12: 547–552
21. HERNANDEZ P, FOMUKONG NG, HELLYER T, BROWN IN, DALE JW. Characterization of IS1110, a highly mobile genetic element from *Mycobacterium avium*. *Mol Microbiol* 1994, 12:717–724
22. ΙΚΟΝΟΜΟΠΟΥΛΟΣ JA, GORGOLIS V, ZACHARATOS P, RASIDAKIS G, KITAS CH. Multiplex PCR assay for the detection of mycobacterial DNA sequences in cases with clinicopathological evidence of tuberculosis and sarcoidosis. *Mod Pathol* (Accepted)
23. VAN SOOLINGEN D, HERMANS PWM, DE HAAS PEW, SOLL DR, VAN EMBDEN JDA. Occurrence of stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: Evaluation of an insertion sequence dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1991, 29: 2578–2586
24. BUTCHER PD, HUTCHINSON NA, DORAN TJ, DALE JW. The application of molecular techniques to the diagnosis and epidemiology of mycobacterial diseases. *J Appl Bacteriol* 1996, 81:53S–71S
25. BRISSON-NOEL A, AZNAR C, CHUREAU C, NGUYEN S, PIERRE C, BARTOLI M ET AL. Diagnosis of tuberculosis by DNA amplification in clinical practice evaluation. *Lancet* 1991, 338:364–366
26. DEL PORTILLO P, MURILLO LA, PATARROYO ME. Amplification of species specific DNA fragment of *M. tuberculosis* and its possible use in diagnosis. *J Clin Microbiol* 1991, 29:2163–2168
27. KOX LE, JANSEN HM, KUIJPER S, KOLK AH. Multiplex PCR assay for the immediate identification of infecting species in patients with mycobacterial disease. *J Clin Microbiol* 1997, 35:1492–1498
28. MARSHALL BG, SHAW RJ. *Tuberculosis*. European Respiratory Monograph, Wilson R. Sheffield, UK, 1996:30–47
29. McFADDEN JJ, FIDLER HM. Mycobacteria as possible causes of sarcoidosis and Crohn's disease. *J Appl Bacteriol* 1996, 81:47S–52S
30. ABE C, HIRANO K, WADA M, KAZUMI Y, TAKAHASHI M, FUKASAWA Y ET AL. Detection of *M. tuberculosis* in clinical specimens by PCR and Gen-Probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct Test. *J Clin Microbiol* 1993, 31:3270–3274
31. SUDRA P, TEN DAM G, KOCHI A. Tuberculosis: A global overview of the situation today. *Bull World Health Organ* 1992, 70:149–159
32. DEVALLOIS A, PICARDEAU M, GOH K, SOLA C, VINCENT V, RASTOGI N. Comparative evaluation of PCR and commercial DNA probes for detection and identification of species level of *M. avium* and *M. intracellulare*. *J Clin Microbiol* 1996, 34:2756–2759
33. DOUGLAS FM, CURRY JI. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum sediments by Amplicor PCR. *J Clin Microbiol* 1995, 15:2686–2691
34. BUTCHER PD, HUTCHINSON NA, DORAN TJ, DALE JW. The application of molecular techniques to the diagnosis and epidemiology of mycobacterial diseases. *J Appl Bacteriol* 1996, 81:53–71
35. MACADAM RA, HERMANS PWM, VAN SOOLINGEN D, ZAINUDDIN AG, CATTY D, VAN EMBDEN JD ET AL. Characterization of the *M. tuberculosis* insertion sequence belonging to the IS3 family. *Mol Microbiol* 1990, 4:1607–1613
36. VAN EMBDEN JD, CAVE MD, CRAWFORD JD, DALE JW, EISENACH KD, GICQUEL B ET AL. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 1993, 31:406–409
37. CLARRIDGE JE III, SHAWAR RM, SHINNICK TM, PLIKAYTIS BB. Large scale use of polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in a routine mycobacteriology laboratory. *J Clin Microbiol* 1993, 31:2049–2056
38. DAS S, CHAN SL, ALLEN BW, MITCHISON DA, LOWRIE DB. Application of DNA fingerprinting with IS986 to sequential mycobacterial isolates obtained from pulmonary tuberculosis patients in Hong Kong before, during and after short course chemotherapy. *Tubercle Lung Dis* 1993, 74:47–51
39. VAN SOOLINGEN D, HERMANS PWM, DE HAAS PEW, SOLL DR, VAN EMBDEN JDA. Occurrence of stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: Evaluation of an insertion sequence dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1991, 29: 2578–2586
40. YUEN LKW, ROSS BC, JACKSON KM, DWYER B. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* strains from Vietnamese patients

- by Southern blot hybridization. *J Clin Microbiol* 1993, 31:1615–1618
41. THIERRY D, VINCENT V, CLEMENT F, GUESDON JC. Isolation of specific DNA fragments of *Mycobacterium avium* and their possible use in diagnosis. *J Clin Microbiol* 1993, 31:1048–1054
 42. ARBEIT RD, SLUTSKY A, BARBER TW, MASLOW JN, NIEMCZYK S, FALKINHAM JO ET AL. Genetic diversity among strains of *Mycobacterium avium* causing monoclonal and polyclonal bacteremia in patients with AIDS. *J Infect Dis* 1993, 167:1384–1390
 43. ELLINGSON JL, BOLIN CA, STABEL JR. Identification of a gene unique to *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and application to diagnosis of paratuberculosis. *Mol Cell Probes* 1998, 12:133–142
 44. COLLINS CH, GRANGE JM, RUSSEL AD, ADREW PW. Mycobacterial disease—Old Problems, New Solutions. Society for Applied Bacteriology Symposium Series 1996, 81:405–475
 45. ROOK GAW, AL ATTIYAH R. Cytokines and the Koch phenomenon. *Tubercle* 1991, 72:13–20
 46. HENRY A, ERLICH HA. *PCR Technology*. Stockton Press, USA, 1989:1–15
 47. FORBES BA, HICKS KES. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens in a clinical laboratory by PCR. *J Clin Microbiol* 1993, 31:1688–1694
 48. SHAH SJ, LIU J, BUXTON D, STONE B, NIETUPSKI R, OLIVE MD ET AL. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* directly from human sputum by Q-Beta Replicase-Amplified Assay. *J Clin Microbiol* 1995, 33:322–328
 49. GORGOUILIS V, GIATROMANOLAKI A, KARAMERIS A, TSATSANIS C, ANINOS D, OZANNE B ET AL. Epidermal growth factor receptor expression in squamous cell lung carcinomas: an immunohistochemical and gene analysis in formalin-fixed, paraffin-embedded material. *Virchow Arch [A] Pathol Anat Histopathol* 1993, 423:295–302
 50. MOSS MT, SANDERSON JD, TIZARD M, HERMON-TAYLOR J, EL-ZAATARI FA, MARKESICH DC ET AL. PCR detection of *Mycobacterium paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp *silvaticum* in long term cultures from Crohn's disease and control tissues. *Gut* 1992, 33:1209–1213
 51. HERNANDEZ P, FOMUKONG NG, HELLYER T, BROWN IN, DALE JW. Characterization of IS1110, a highly mobile genetic element from *Mycobacterium avium*. *Mol Microbiol* 1994, 12:717–724
 52. POPPER HH, KLEMEN H, HOEFLER G, WINTER E. Presence of mycobacterial DNA in sarcoidosis. *Hum Pathol* 1997, 28:769–800
 53. CANNONE M, VAGO L, PORINI G, BONETTO S, CASSI C, BRAMERIO M ET AL. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA using nested polymerase chain reaction in lymph nodes with sarcoidosis, fixed in formalin and embedded in paraffin. *Pathologica* 1997, 89:512–516
 54. FIDLER H, ROOK GA, JOHNSON MN, McFADDEN. Search for mycobacterial DNA in granulomatous tissues from patients with sarcoidosis using the polymerase chain reaction. *Am Rev Respir Dis* 1993, 147:777–778
 55. BOCART D, LECOSSIER D, DE LASSENCE A, VALEYRE D, BATESTI JP, HANCE AJ. A search for mycobacterial DNA in granulomatous tissues from patients with sarcoidosis using the polymerase chain reaction. *Am Rev Respir Dis* 1992, 145:1142–1148
 56. LITVINOV VI, CHERNOUSOVA LN, SAFONOVA SG, KALININA OA, KULIKOVSKAIA NV, KAPINA MA ET AL. Interaction of mycobacteria isolated from sarcoidosis patients with antituberculosis antibodies. *Probl Tuberk* 1997, 5:36–38
 57. ALAVI HA, MOSCOVIC EA. Immunolocalization of cell-wall-deficient forms of *Mycobacterium tuberculosis* complex in sarcoidosis and in sinus histiocytosis of lymph nodes draining carcinoma. *Histol Histopathol* 1996, 11:683–694
 58. CROHN BB, GINZBURG L, OPPENHEIMER GD. Regional ileitis. *JAMA* 1932, 99:1323–1329
 59. MAYBERRY JF, HITCHENS RAN. Distribution of Crohn's disease in Cardiff. *Soc Sci Med* 1978, 12:137–138
 60. VAN KRUININGEN HJ, COLUMBEL JF, CARTUN RW, WHITLOCK RH, KOOPMANS M, KANGRO HO ET AL. An in-depth study of Crohn's disease in two French families. *Gastroenterology* 1992, 103:351–360
 61. PRANTERA C, KOHN A, MANGIAROTTI R, ANDREOLI A, LUZI C. Antimycobacterial therapy in Crohn's disease: Results of a controlled, double-blind trial with a multiple antibiotic regimen. *Am J Gastroenterol* 1994, 89:513–518
 62. SANDERSON JD, MOSS MT, TIZARD MLV, HERMON-TAYLOR J. *Mycobacterium paratuberculosis* DNA in Crohn's disease tissue. *Gut* 1992, 33:890–896
 63. DELL'ISOLA B, POYART C, GOULET O, MOUGIENOT JF, SADOUN-JOURNO E, BROUSSE N ET AL. Detection of *Mycobacterium paratuberculosis* by polymerase chain reaction in children with Crohn's disease. *J Infect Dis* 1993, 169:449–451
 64. SUENAGA K, YOKOYAMA Y, OKAZAKI K, YAMAMOTO Y. Mycobacteria in the intestine of Japanese patients with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 1995, 90:76–80
 65. DUMONCEAU J, VAN GOSSUM A, ADLER M, FONTEYNE PA, VAN VOOREN JP, DEVIERE J ET AL. No *Mycobacterium paratuberculosis* found in Crohn's disease using polymerase chain reaction. *Dig Dis Sci* 1996, 41:421–426
 66. KREUZPAINTNER G, DAS PK, STONKHORST A, SLOB AW, STROHMEYER G. Effect of intestinal resection on serum antibodies to the mycobacterial 45/48 kilodalton doublet antigen in Crohn's disease. *Gut* 1995, 37:361–366
 67. TANAKA K, WILKS M, COATS PJ. *Mycobacterium paratuberculosis* and Crohn's disease. *Gut* 1991, 32:43–45

Corresponding author:

I. Ikonomopoulos, Medical School of Athens, University of Athens, 75 Mikras Asias street, GR-115 27 Goudi, Athens, Greece