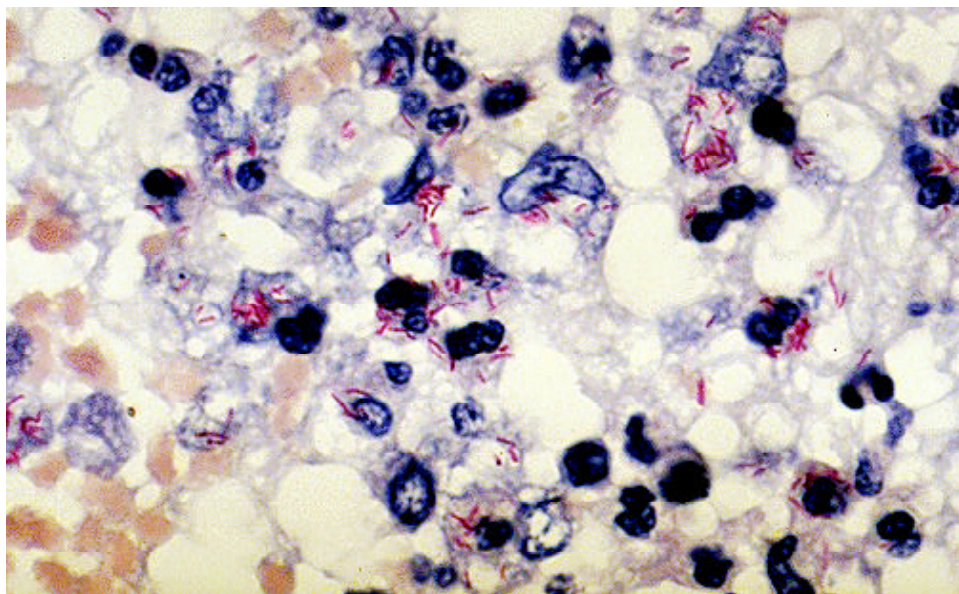




PCR-analys för påvisning av **Mycobacterium tuberculosis-komplexet**

Malin Johansson har i sitt examensarbete utarbetat en molekylärbiologisk metod för att påvisa tuberkelbakterier i paraffinerad vävnad. Arbetet har skett vid Capiro Diagnostiks mikrobiologiska laboratorium i Skövde i samarbete med Pavel Burian, överläkare vid Capiro Diagnostiks laboratorium för patologi och cytologi i Skövde.Handledare har varit Helena Enroth, Med Dr. Klinisk mikrobiologi, Capiro Diagnostik.



*Påvisning av *M. tuberculosis* i infärgad vävnad (Ziehl-Neelsen). Bakterierna lyser röda mot de ljusblå cellerna och de mörkblå cellkärnorna.*

Tuberkulos, TB, är den infektionssjukdom som orsakar flest dödsfall hos vuxna i hela världen och cirka 30 miljoner människor infekteras varje år. I Sverige är det årligen cirka 500-600 nya fall. Drabbade individer i Sverige utgörs till största delen av utrikes födda individer och infödda svenskar över 65 år. Tuberkulos är väldigt smittsamt då bakterierna lätt överförs via aerosoler som kan finnas i upphostningar från en patient med öppen lungtuberkulos.

Oftast är det lungorna som blir angripna vid infektion men även lymfkörtlar, njurar, skelett, hud, binjurar, tarm etc kan invaderas. Sjukdomsförloppet är oftast långdraget och även utan behandling kan patienterna leva länge. Så småningom sker dock en progressiv nedbrytning av angripna organ, kaverner (håligheter) utvecklas och i en del fall avlider patienten av sin tuberkulos i detta stadium.

Risken att utveckla tuberkulos är störst under de två första åren efter smittotillfället,

fortsättning sid 6-7 >>

I DETTA NUMMER

▼ sid 2

Disputation i klinisk kemi
Av Andreia Bunescu

▼ sid 3-5

Nukleärmedicin
Diagnostik med radioaktiva ämnen

▼ sid 8-9

Från helblodsglukos till plasmaglukos

▼ sid 10-12

Hemovigilans
Nytt direktiv

PCR-analys för **Mycobacterium tube** i formalinfixerad, para

Malin Johansson, M
Helena Enroth, Med Dr, Klinisk mik

men risken kvarstår dock hela livet.

Vid behandling av tuberkulos används bl a Isoniazid, Rifampicin, Pyrazinamid, Etambutol och Streptomycin. Läkemedlen kombineras alltid för att vara effektiva på g a att *M. tuberculosis* är resistent mot flera antibiotika. Hos en immunkompetent individ pågår behandlingen under lång tid, ofta mellan 6-12 månader.

Mykobakterier

Genus *Mycobacterium* inkluderar obligata parasiter, saprofyter och opportunistiska patogener. Mykobakterier är aeroba, ej motila, ej sporbildande bakterier. I syntetiskt medium eller i en infekterad värd är generationstiden för *M. Tuberculosis* 24 timmar.

I och med värdens aktiverade, cellmedierade immunförsvar stänger bakterien av sitt metaboliska system och förblir vilande i den infekterade vävnaden. Om värdens immunsystem försvagas senare i livet kan bakterien reaktiveras och orsaka ett utbrott av tuberkulos.

Genetiska studier har visat att fem arter av mykobakterier är närbesläktade. Dessa arter brukar tillsammans benämnas *Mycobacterium tuberculosis*-komplexet och inkluderar *M. tuberculosis*, *M. tuberculosis* subsp. *canetti*, *M. bovis*, *M. africanum* och *M. microti*. Samtliga arter kan orsaka tuberkulos. På kliniska laboratorium är chansen dock mycket liten att påträffa någon annan bakterie än *M. tuberculosis* i ett patientprov.

Biokemiska egenskaper

Mykobakterier karakteriseras bland annat av sin komplexa cellvägg, vilken består av ett extra hölje utöver peptidoglykanskiktet. Detta hölje är rikt på ovanliga lipider, glykolipider och polysackarider.

M. tuberculosis kan producera samtliga essentiella aminosyror, vitaminer och enzymatiska co-faktorer samt metabolisera ett spektra av kolhydrater, alkoholer, ketoner och karboxylsyror. Bakteriens genom består av 4 411 529 baspar och har ett G/C-innehåll på 65.5%. Genomet är rikt på duplicerade "housekeeping" gener och repetitiva DNA-sekvenser. Mykobakterier räknas som grampositiva, trots att den "feta" cellväggen gör det omöjligt att gramfärga bakterierna.

Den vanligaste färgmetoden för identifiering i vävnadssnitt kallas Ziehl-Neelsen, vilket är en karbol-fuchsin-baserad färg. Mykobakterier brukar benämnas syrafasta stavar eftersom karbolfuchsinfärgen går att tvätta bort med surgjord alkohol från andra bakterier som saknar detta lipidrika cellhölje.

Analysprincip

En molekylärbiologisk kvalitativ DNA-baserad analys, real-tids PCR, används för detektion av *M. tuberculosis* arvs-massa i formalinfixerad, paraffin-inbäddad vävnad. DNA-extraktion från paraffininbäddad vävnad utförs med hjälp av MagAttract DNA Mini M48 Kit i kombination med preparationsroboten Biorobot M48 (Qiagen).

DNA från bakterier i vävnaden frigörs och därefter mångfaldigas en del av den repetitiva sekvensen IS6110 (123 baspars fragment) i *M. tuberculosis* arvs-massa med PCR-teknik på ett realtids-PCR instrument, Rotorgene 3000. Den repetitiva sekvensen återfinns i cirka 16 kopior i genomet hos *M. tuberculosis*, vilket ökar analysens känslighet.

En del av β -globingenen (268 baspars fragment) från de humana cellernas arvs-massa används som internkontroll för amplifieringen. Meto-



T v: Malin Johansson som i sitt examensarbete har utpåvisa tuberkelbakterier i paraffinerad vävnad. Arbetet i mikrobiologiska laboratoriet i Skövde i samarbete med Capio Diagnostik. Handledare har varit Helena Enroth, Diagnostik. T h: Carina Ljung, biomedicinsk analytiker i färdigpreparerade glas.

den kan beskrivas som sekvensspecifik genförstärkning, där ett stort antal specifika kopior tillverkas under PCR-reaktionen utifrån sekvensen hos mål-DNAt.

Detektion av *M. tuberculosis*

De amplifierade, mångfaldigade, genfragmenten från genen IS6110 detekteras med en fluorescerande probe, dvs en fluorescein-inmärkt oligonukleotid, direkt i PCR-instrumentet under tiden som reaktionen sker. Denna probe känner igen och binder till mål-DNAt. Fluorescensen i proverna ökar därför i takt med att DNAt kopieras.

Ett positivt PCR-resultat för IS6110-genen betyder att provet innehåller någon av de närbesläktade organismerna inkluderade i *M. tuberculosis* kom-

ör påvisning av erculosis-komplexet raffinbäddad vävnad

on, Molekylärbiolog
: mikrobiologi, Capio Diagnostik AB



ar utarbetat en molekylärbiologisk metod för att
Arbetet har skett vid Capiro Diagnostiks
ete med Pavel Burian, överläkare klinisk patologi,
Enroth, Med Dr. Klinisk mikrobiologi, Capiro
alytiker vid laboratoriet i Skövde kontrollerar

plexet, d v s *M. tuberculosis*, *M. canetti*, *M. bovis*, *M. africanum* och *M. microti*. Genfragmenten från β -globingenen detekteras med ett fluoriserande ämne, SYBR green, som binder ospecifikt till allt dubbelsträngat DNA som finns amplifierat i provet.

Analysen avslutas med en smältkurveanalys av den inmärkta produkten, där man kan kontrollera att den specifika smältpunkten överensstämmer med den förväntade från β -globingenen.

Detektion av internkontroll

Ett positivt PCR-resultat för β -globingenen betyder att DNA-extraktionen har lyckats för just detta provmaterial, d v s att det finns tillräcklig mängd med långa fragment av humant DNA för att

kunna utföra PCR-reaktionen för β -globingenen på ett tillfredsställande sätt. Eftersom β -globingenen fungerar som internkontroll för PCR-reaktionen så antar man att också DNA-extraktionen av *M. tuberculosis* i samma provmaterial fungerat tillfredsställande.

Känslighet och specificitet

Den validering som utförts mot 23 patientprover med misstänkt TB visar att metoden är känslig och specifik.

I 12 av dessa 23 prover kunde *M. tuberculosis* DNA påvisas, i 10 av dessa 12 fall hade TB konfirmerats sedan tidigare. I 20/23 prover (87%) detekterades β -globingenen, men i de övriga tre proverna var arvsmassan fragmenterad och förstörd av bland annat formalinfixeringen så att PCR-reaktionen ej kunde ske optimalt. Dessa tre prover är då ej bedömbara enligt våra kriterier.

Känsligheten för *M. tuberculosis* beräknades till 1 genomkopia/reaktion för IS6110-genen. Specificiteten för reaktionen testades mot andra bakterier som kan förekomma i luftvägarna och mot andra arter av mykobakterier som ej ingår i *M. tuberculosis* komplexet, t ex *M. avium*, *M. malmoense*, *M. kansasii*, *M. abscessus*, *M. goodii*, *M. chelonae* och *M. fortuitum*. Alla dessa arter var, som förväntat, negativa med denna PCR-metod.

Användning inom klinisk patologi

Metoden ska ses som ett komplement vid misstanke om TB orsakad av *M. tuberculosis*, eller någon av de andra arterna inkluderade i *M. tuberculosis*-komplexet, där färgning av syrafasta stavar i formalinfixerad, paraffinbäddad vävnad är svårtolkad eller negativ.

Klossar med formalinfixerat,

paraffinbäddat provmaterial från olika slags vävnad, t ex lunga, lymfkörtlar och hud kan analyseras. Snitt från autolyserad vävnad rekommenderas ej då provmaterialet är degraderat vilket försvårar DNA-extraktionen.

Tre rör med två stycken 10 μ m paraffinsnitt behövs för en säker analys då bakterierna kan vara ojämnt fördelade i provmaterialet. Proverna bedöms med avseende på båda generna som analyserats, IS6110 och β -globin. Proverna svaras ut som *M. tuberculosis* DNA påvisat eller *M. tuberculosis* DNA ej påvisat. Om kontrollgenen för β -globin ej amplifierats betraktas provet som ej bedömbart.

Slutsats

Slutsatsen är att PCR-metoden fungerar tillfredsställande på flera olika sorters vävnad, med en känslighet och specificitet som är godtagbar för denna applikation på formalinfixerad, paraffinbäddad vävnad. ■■

Referenser:

Cole ST et. al. Review: Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature 1998; 393: 537-544.

Jackson LWY et. al. Molecular detection of *Mycobacterium tuberculosis* in tissues showing granulomatous inflammation without demonstrable acid-fast bacilli. Diagnostic Molecular Pathology 2000; 9: 67-74.

Johansson M, Högskolan i Skövde, HT 2003. Examensarbete i molekylärbiologi, 20p. (Kan rekvideras vid intresse). A qualitative probebased real-time PCR for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in paraffin-embedded tissues.

Smith I. Review: *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. Clinical Microbiology Reviews 2003; 16: 463-496.