Archive of SID

آیا می توان اواوسیستهای کریپتوسپوریدیوم فیکس شده به مدت طولانی را برای PCR بکار برد؟

دکتر محمد فلاح* ، دکتر هیروشی تاچی بانا** ، دکتر زون ـ جیا چنگ**

چکیده:

از سال ۱۹۸۷ که روش(Polymerase Chain Reaction) PCR ابداع شد تحول عظیمی در زمینه تشخیصی در پزشکی و حتی در زمینه های قضایی ، جنایی ، باستان شناسی و. . . پدید آمد. از این روش به دو شیوه: الف- تشخیص زودرس در مواردی مثل تشخیص ابتلا به برخی بیماریهای انگلی و عفونی همچون توکسوپلاسموز و سرخچه برای آگاهی از ابتلا و پیشگیری از عوارض مادرزادی بیماری ب- تشخیص دیررس برای آگاهی از ماهیت مواد باقیمانده از گذشته های دور یا نزدیک و کشف تشابهات و یا تفاوت های آن با مواد مفروض، می توان استفاده نمود. نمونه های بالینی مورد استفاده جهت PCR گاهی عمداً و گاهی سهواً به علت بی اطلاعی، در مواد فیکس کننده مثل فرمالین گذاشته می شود. هدف مطالعه حاضر این بود که بررسی کند آیا اینگونه مواد تشخیصی قابل استفاده در روش PCR هستند یا خیر.

دو نمونه مدفوع حاوی اواوسیست های کریپتوسپوریدیوم تهیه شده از گاو و دو نمونه انسانی همین انگل که مدت نسبتاً طولانی در محلول ۵٪ فرمالین فیکس شده بود برای استخراج DNA استفاده شد. پس از ۶ نوبت ذوب و انجماد، با روش فنل-کلروفرم-ایزوآمیل الکل، DNA آنها استخراج و برای واکنش های پلیمریزاسیون زنجیره ای مورد استفاده قرار گرفت.

این مطالعه نشان داد که با روش های معمول PCR ازنظر زمان های مورد استفاده در سه مرحله دناتوره کردن ، الحاق (anealing) و در نهایت پلیمرکردن (amplification) که به صورت روتین برای اغلب مواد تازه بکار می رود امکان انجام PCR برای مواد فیکس شده به مدت طولانی وجود ندارد. برای این گونه مواد برای انجام پذیر شدن PCR لازم است با افزایش دورها و دمای مرحله الحاق در محدوده ۵۳-۴۷ درجه، باند های واضح تر و بیشتری تولید نمود تا امکان مطالعه آن بر روی ژل فراهم گردد.

در نهایت این مطالعه ضمن تایید امکان انجام PCR با مواد فیکس شده به مدت طولانی، نشان داد که دو نمونه گاوی و انسانی ماهیتاً مشابه می باشند.

کلید واژه ها : فرم آلدئید / کریپتوسپوریدیوم / واکنش زنجیره ای پلیمراز

مقدمه :

مواد فیکس شده در فرمالین و تعبیه شده در پارافین FFPE (Formalin-fixed and paraffin-embedded) که غالبا هر گونه بافت برداشت شده توسط جراحی را شامل میشود، امروزه در پاتولوژی برای تهیه مقاطع آسیب شناسی کاربرد روزمره ای دارد. این نمونه ها البته مدت مدیدی در فرمالین نمی مانند و عمده مسئله آنها در استخراج DNA معضل اختلاط با پارافین و چگونگی زدودن پارافین از آنها میباشد. گرچه ذکر شده است که بخش عمده ای از نمونه های بافتی آرشیوی شامل مقاطع تعبیه شده در پارافین و لامهای

* دانشیار گروه انگل شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان
** عضو هیأت علمی گروه بیماریهای عفونی دانشگاه توکای یوکوهاما ، ژاپن
www.SID.ir

Archive of SID

رنگ شده و سایر مواد آرشیوی سیتولوژیک، از نظر مناسب بودن برای آنالیز RNA مورد تحقیق قرار نگرفته است(۱).

بافتهای FFPE بطور روزافزونی برای آنالیز بیان ژن بکار میروند. در مطالعه ای با روش reverse transcription وPCR ، ترجمه گلوکز-۶-فسفات دهیدروژناز در یک سری از نمونه های هیستولوژیک و سیتولوژیک آرشیوی نشان داده شده است(۱). نمونه های هیستولوژیک بسیاری شامل مقاطع به تازگی تهیه شده در پارافین، لام های رنگ شده با هماتوکسیلین و ائوزین، لام های رنگ شده براساس ایمونولوژیک و مغز استخوان آهک زدایی شده بوده است. نمونه های سیتولوژیک، گسترش های سرویکس و آسپیره های سوزنی و غیر سوزنی رنگ شده و رنگ نشده و رسوبات سلولی را تشکیل می داده است(۲). مشخص شده که اکثر مواد آرشیوی برای نسخه برداری معکوس(RT) قطعه های کوچک با میزان موفقیت کلی ۹۵٪، ۷۹٪ برای جفت بازهای مختلف جواب داده است(۲). نه رنگ آمیزی و نه نگهداری طولانی مدت در فیکساتیو حتی تا ۱۵ سال تاثیر منفی قابل توجهی بر روی RT-PCR نداشته است(۳). درنهایت نتیجه گرفته اند که مواد آرشیوی فیکس شده بافتی و نمونه های سیتولوژیک منابع با ارزشی برای تحقیقات مولکولی براساس RT-PCR می باشند(۴).

نمونه های دیگری نظیر بافت مخاطی دهان برای بیان ژن در سطح RNA (۵)، نمونه هایی از ملانوما متاستاتیک و کانسرهای ریه و کولون و پوست و کلیه و آدنوم تیروئید برای این منظور مورد استفاده قرار گرفته است(۶). در مطالعه دیگری که برای درک تغییرات در RNA در بافتهای فیکس شده انجام گردیده اظهار شده که اصولا" نمونه های آرشیوی فیکس شده با فرمالین برای مطالعات مولکولار بیولوژی نمونه های ضعیفی شناخته می شوند زیرا ازنظر قابلیت حل شدن توسط عوامل chaotropic مقاوم هستند. گرچه گفته شده است که پروتئیناز K کاملا مواد فیکس شده را محلول کرده و تقریبا معادل نمونه تازه RNA را استخراج می کند(۷). همچنین در مطالعه ای DNA از بلوک های FFPE از نمونه های آماس گرانولومایی، گرانولوم جذام و توبرکولوز آتیپیک تهیه شد. نتیجه یافته های هیستولوژیک و ایمونوهیستو شیمیایی با نتایج PCR مقایسه گردید. در این مطالعه نمونه های جذام و توبرکولوز در 382bp باند نشان دادند. مطالعه نشان داد که بررسی براساس PCR با استفاده از DNA تهیه شده از FFPE اطلاعات مفیدی برای تمایز توبرکولوز از انواع دیگر گرانولوما فراهم می کند(۸).

محققین اظهار می دارند آنالیز مولکولی تغییرات در ژنومی برای درک مکانیسم هایی که بوسیله آن عامل شیمیایی باعث رشد تومورها یا تغییر در آن می شوند ضروری است ارزیابی پلی مورفیسم میکروساتلیت ، ازدست دادن هتروزیگوسیتی، موتاسیون ها و آرایش مجدد ژنی به مقایسه اختصاصی تومورها با ضایعات پیش بدخیمی بافت های طبیعی یابین تومورهای مشابه کمک می کند(۹).

از آنجا که اغلب مطالعات انجام شده، بر روی بافت های فیکس شده نظیر تومورها و یا نمونه های سیتولوژیک بوده و در مورد تک یاخته های روده ای نگهداری شده در فیکساتیو فرمالین مطالعه چندانی صورت نگرفته و بدلیل آنکه در بسیاری از حیطه های تشخیصی پزشکی ممکن است مواد بالینی مدت مدیدی در داخل فیکساتیوهای قوی نظیر فرمالین قرار گیرند و در مواقع لزوم نسبت به استخراج DNA و تعیین ماهیت آنها اقدام شود، این مطالعه برای تعیین امکان پذیر بودن چنین فرآیندی انجام گردید.

روش کار:

نمونه های اواوسیست کریپتوسپوریدیوم از منشاء انسان و گاو که به مدت طولانی و بین ۸ تا ۱۲ سال در فرمالین ۱۰-۵٪ فیکس شده بود برای استخراج DNA و انجام آزمایش PCR مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا اواوسیست ها با عبور دادن از گاز چهار لایه بطور نسبی صاف شدند. سپس با فرمالین ـ اتر و محلول فسفات بافر تغلیظ شدند. بعد به کمک چگالی فیکول از سایر مواد زاید خالص سازی شدند. در پایان برای زدودن فرمالین، این نمونه ها به کمک محلول فسفات بافر و با سانتریفوژ با دور بالا سه بار شست و شو گردیدند. بعد در هیپوکلریت سدیم ۱۰٪ به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شده و مجددا سه بار با محلول فسفات بافر شست و شو شدند. خلوص نمونه ها با آزمایش میکروسکپی تعیین گردید (۱۰).

برای متلاشی کردن اواوسیست ها در ۳۰۰ میکرولیتر بافر لیز کننده (حاوی 50 mM EDTA، ۱۰mM Tris ، ۲۵۰ mM سوکروز، و تریتون X100 ۸٪) شناور شده ،

www.SID.ir

Archive of SID

شش بار متناوب با روش انجماد (۷۶- درجه ۱۰ دقیقه) و ذوب(آب جوش ،۲دقیقه) دیواره اواوسیست ها شکسته شده و سپس مدت ۳ ساعت با ۵۰ میکرولیتر پروتئیناز K(۱۰mg/ml) در دمای۵۶ درجه انکوبه شدند و درنهایت با روش فنل-کلروفرم DNA آنها استخراج گردید(۱۱).

با تغییراتی که در برخی زمانهای مراحل سه گانه واکنش پلیمرکردن زنجیره ای داده شد پس از تلاش فراوان هیبریداسیون و پلیمرکردن انجام گردید. برای این منظور مرحله الحاق که معمولا در دمای ۴۸ درجه انجام می شود تا دمای ۵۳ درجه افزایش داده شد. در این شرایط بود که مختصری DNA برای استفاده در دستگاه الکتروفورز بدست آمد. بطور خلاصه زمانهای پلیمریزاسیون به صورت زیر بود: دو سیکل در دمای ۹۴ درجه ۵ دقیقه، ۵۲ درجه ۵ دقیقه و ۷۲ درجه ۵ دقیقه. بدنبال آن ۳۵ سیکل ۹۴ درجه یک دقیقه، ۶۰ درجه یک دقیقه و ۷۲ درجه ۲ دقیقه وسیکل نهایی ۷۲ درجه ۱۰ دقیقه. محصول آمپلی فیکاسیون، در آگارز ژل ۱/۵٪ الکتروفورز شد و با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی گردید.

نتایج :

با مطالعه باندهای تشکیل شده پس از ژل الکتروفورز مشخص شد که در محدوده ۱۶۵bp باندهای نسبتا واضحی تشکیل شده که با مقایسه با مارکر نوع کریپتوسپوریدیوم تایید شد. گرچه باندها همانند نمونه های تازه واضح و روشن نبود. این مسئله به خاطر بازیافت کمتر DNA و دشواری آمپلی فیکاسیون بوده است.

پس از تعیین خطوط مربوط بر روی ژل و مقایسه آن با مارکر، مشخص شد که هر چهار نمونه بررسی شده (۲ نمونه با منشاء انسانی و ۲ نمونه با منشاء گاوی) کریپتوسپوریدیوم پاروم می باشند و تفاوتی بین ایزوله های انسانی و حیوانی وجود ندارد و هر دو ایزوله در محدوده ۱۶۵ bp باندهای مشابه تشکیل دادند.

مطالعه حاضر نشان داد که مطابق یافته برخی از محققین مواد فیکس شده در فرمالین اساسا نمونه های نامناسبی برای انجام PCR به روش معمول می باشند. اولا" شکستن و متلاشی نمودن نمونه برای استخراج مواد ژنتیکی بسیار دشوار، زمان بر و در برخی موارد غیر ممکن است. ثانیا" DNA استخراج شده نیز بسیار به سختی هیبرید و پلیمر می گردد لکن در هر صورت انجام PCR غیر ممکن نیست.

بحث:

این مطالعه مستقیما" بر روی اواوسیستهای فیکس شده در فرمالین از منشا انسانی و حیوانی انجام شد و نتیجه داد. در ابتدا استخراج DNA فوق العاده دشوار و وقت گیر بود. گرچه این روش نهایتا" جواب داد لکن با توجه به غلظت نسبتا زیاد اواوسیست در نمونه ها حساسیت آن به درستی مشخص نیست. برای تعیین حساسیت روش لازم است از نمونه های فیکس شده در مدت های متفاوت و با غلظت های متفاوت اواوسیست نمونه تهیه شده، DNA آنها استخراج و PCR شود و با هم مقایسه گردد. در مطالعات گذشته با افزودن اواوسیست به تعداد ۵۰۰ عدد به یک گرم مدفوع توانسته اند PCR انجام دهند لکن نتیجه افزودن ۱۰۰ اواوسیست منفی بوده است(۱۲). گرچه این تجربه در نمونه های فیکس نشده انجام شده و ضروری است تحقیق بر روی نمونه های فیکس شده نیز انجام گیرد. در برخی گزارش ها حتی وجود تنها یک اواوسیست در نمونه (۱۳) و یا ۱۰ اواوسیست را توانسته اند نشان دهند(۱۴).

گاهی در بیماران مبتلا به AIDS ضروری است نتیجه درمان کریپتوسپوریدیوزیس و نیز مدت زمان حامل بودن شخص تعیین گردد و با توجه به تعداد اندک اواوسیست، در این موارد روش های معمول رنگ آمیزی مدفوع مثل روش ذیل نیلسون اصلاح شده قادر به نشان دادن انگل نیست. از سویی با توجه به مخاطرات آزمایش نمونه مدفوع که ممکن است حاوی ویروس HIV باشد لازم است نمونه ابتدا فیکس و ازنظر ویروس استریل گردد تا خطر آلودگی پرسنل آزمایشگاه را نداشته باشد و سپس مورد آزمایش قرار گیرد(۱۵).

اغلب مطالعات انجام شده براساسPCR برای جست و جوی اواوسیست زنده در نمونه های مختلف بوده است زیرا این مسئله به لحاظ بهداشتی اهمیت دارد(۱۸-۱۶). در مطالعه بر روی نمونه های آب که ممکن است حاوی اواوسیست با منشاء نامشخص باشد نیز از این روش استفاده می شود(۱۹). این روش نیز برای یافتن ۱ تا ۱۰ اواوسیست در نمونه های آب حساسیت داشته است(۲۰). در این روش نیز نمونه ها را با فرمالین فیکس نموده اند

www.SID.ir

Archive of SID

لیکن مدت فیکساسیون کوتاه بوده و قابل مقایسه با نمونه های ما نمی باشد. نمونه هایی که در مطالعه حاضر بکار رفتند بین ۸ تا ۱۲ سال در فرمالین ۵٪ قرار داشتند و در جست و جوی متون مورد مشابهی که بر روی چنین نمونه هایی تحقیق شده باشد یافت نشد.

نتیجه نهایی مطالعه حاضر این است که علیرغم دشواری استخراج DNA از نمونه های فیکس شده در فرمالین به مدت بسیار طولانی، انجام PCR چنین نمونه هایی امکان پذیر است.

منابع :

1. Huang LH, Zhang Y,Ye H, Hamadi AE. Archival histologic and cytologic specimens including stained and unstained materials and amenable to rt-PCR.
2. Ren ZP, Sallstorm J, Sundstorm C, Nister M, Olsson Y. Recovering DNA and optimizing PCR conditions from microdissected formalin-fixed and paraffin-embedded materials. Patobiology 2000; 68(4-5): 215-7.
3. Houze TA, Larsson PA, Hansson G, Gustavsson B. Detection of thymidylate gene expression levels in formalin-fixed paraffin-embedded tissue by semiquntative, nonradiactive reverse transcriptase polymerase chain reaction. Tumour Biol 1997;18(1): 53-68.
4. Bielawski K, Zaczek A, Lisowska U, Dybikowska A, Kowalska A, Falkiewicz B. The suitability of DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues for double differential polymerase chain reaction analysis. Int J Mo Med 2001; 8(5): 573-8.
5. Cairns MT, Church S, Johnston PG, OhenixKV, Marley JJ. Paraffin-embedded tissue as a source of RNA for grne expression analysis in oral malignancy. Oral Dis 1997; 3(3): 157-61
6. Gou J, Cheng L, Wen DR, Huang RR, Cochran AJ. Detection of tyrosinase mRNA in formalin-fixed, paraffin-embedded archival sections of melanoma, using the reverse transcriptase in situ polymerase chain [illegible] Pathol 1998; [illegible]
7. Masuda N, Ohnishi T, Kawamoto S, Monden M, Okubo K. Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples. Nucleic Acids Res 1999; 27(22): 4436-43.
8. Osaki M, Adachi H, Gomyo Y, Yoshida H, Ito H. Detection of Mycobacterial DNA in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens by duplex polymerase chain reaction: application to histopatologic diagnosis. Mod Pathol 1997; 10(1): 78-83.
9. Duddy SK, Gorospe S, Bleavins MR. Genetic analysis of multiple loci in microsamples of fixed paraffin-embedded tissue. Toxicol Sci 1998; 46(2): 317-23.
10. Morgan UM, Constantine CC, O'Donoghue P. Molecular characterization of Cryptosporidium isolates from human and other animals using random amplified polymorphic DNA analysis. Am J Trop Med Hyg 1995; 52(6): 559-564.
11. Balatbat AB, Jordan GW, Tang YJ. Detection of Cryptosporidium parvum DNA in human feces by nested PCR. J Clin Microbiol 1996: 1769-72
12. Gobet P, Buisson JC, Vagner O. Detection of Cryptosporidium parvum DNA in formed human feces by a sensitive PCR-based assay including uracil-N-glycosilate inactivation. J Clin Microbiol 1997: 234-256.
13. Laxer MA, Timblin BK, Patel RJ. DNA sequences for the specific detection of Cryptosporidium by the polymerase chain reaction. Am J Trop Med Hyg 1991; 45: 688-94.
14. Webster KA. Molecular methods for the detection and classification of Cryptosporidium. Parasitology Today 1993; 9: 263-6
15. Deng MQ, Cliver DO, Tadesse WM. Immunomagnetic capture PCR to detect viable Cryptosporidium parvum oocysts from [illegible]

www.SID.ir

Archive of SID

Detection of viable Cryptosporidium parvum oocysts by PCR. Appl Environ Microbiol 1995 : 4514-16.
17. Leng X, Mosier DA, Oberst RD. Simplified method for recovery and PCR detection of Cryptosporidium DNA from bovine feces. Appl Environ Microbiol 1996: 643-47.
18. Johnson DW, Pieniazek NJ, Griffin DW. Development of a PCR protocol for sensitive detection of Cryptosporidium oocysts in water samples. Appl Environ Microbiol 1995: 3849-55.
19. Morgan UM, Pallant L, Dwyer BW. Compparison of PCR and microbiology for detection of Cryptosporidium parvum in human fecal samples: clinical trial. J Clin Microbiol 1998 : 995-98.
20. Sluter SD, Tzipori S, Widmer G. Parametrs affecting polymerase chain reaction detection of waterborne cryptosporidium parvum oocysts. Appl Microbiol Biotechnol 1997 : 48(3), 325-30.

www.SID.ir