Archive of SID

مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد
سال نهم، شماره دوم، تابستان ۱۳۸۰، ص ۵۵

ارزیابی واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) در تشخیص لیشمانیوز جلدی بر

روی نمونه های پوستی بیوپسی شدهٔ پارافینی

دکتر اکبر صفائی [۱] ـ دکتر محمدحسین معتضدیان [۲] ـ دکتر محمد واسعی [۳]

چکیده

در این مطالعه از واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) در تشخیص لیشمانیوز جلدی به وسیلهٔ آغازگرهای (Primers) اختصاصی بر روی DNA به دست آمده از بلوک های پارافینی نمونه های پوستی بیوپسی شده استفاده گردید. با این روش قسمتی از DNA کینتوپلاستی که حاوی ۱۲۰ جفت باز می باشد تکثیر داده می شود و به وسیله الکتروفورزیس وجود DNA انگل بررسی می گردد. در تمام ۳۲ بیماری که از نظر بالینی مشکوک به لیشمانیوز جلدی بوده و در بررسی میکروسکوپی جسم لیشمن مشاهده شده بود PCR مثبت گردید و از ۲۹ بیماری که از نظر بالینی مشکوک به لیشمانیوز جلدی بوده اما در بررسی میکروسکوپی جسم لیشمن مشاهده نگردیده بود PCR در ۲٤ مورد (۸۲/۷٪) مثبت گردید. PCR بر روی ۱۰ بیماری که از نظر بالینی و یافته های هیستومورفولوژیکی بیماریهای پوستی دیگری غیراز لیشمانیازیس مطرح بوده است و مشکوک به لیشمانیوز جلدی نبوده اند، در تمام موارد منفی بود. حساسیت تست (PCR) در تشخیص ٦۱ بیماری که از نظر بالینی مشکوک به بیماری لیشمانیوز جلدی بوده اند ۹۱/۸٪ بود در صورتیکه تشخیص به وسیلهٔ یافته های هیستومورفولوژیکی حساسیتی معادل ۵۱/٦ درصد داشت. این یافته ها نشان دهندهٔ این است که (PCR) بر روی DNA به دست آمده از بلوک های پارافینی نمونه های پوستی بیوپسی شده یک روش ارزشمند در تشخیص لیشمانیوز جلدی، مخصوصا در مواردی که جسم لیشمن مشاهده نمی شود می باشد.

واژه های کلیدی: لیشمانیوز جلدی، واکنش زنجیره ای پلی مراز، تشخیص بر روی بلوکهای پارافینی

مقدمه

لیشمانیازیس یکی از بیماریهای شایع در جنوب ایران می باشد که به صورت لیشمانیوز جلدی، احشائی و جلدی ـ مخاطی دیده می شود. روش های تشخیص زیادی جهت این بیماری مورد استفاده قرار می گیرد که از آن جمله می توان تهیه اسمیر مستقیم،بیوپسی پوستی، کشت در محیط های آزمایشگاهی، تلقیح به حیوانات آزمایشگاهی، تست بیوپسی، سرولوژی و آنتی بادی منوکلونال را نام برد [۱و۲و۳]. در حال حاضر روشهای معمول جهت تشخیص قطعی بیماری بر اساس مشاهده جسم لیشمن در اسمیر مستقیم و بیوپسی بافتی یا کشت در محیط های آزمایشگاهی و تلقیح به حیوانات می باشد [۲]. تشخیص به وسیلهٔ مشاهدهٔ جسم لیشمن در نمونه های اسمیر مستقیم و بیوپسی از ویژگی و حساسیت بالائی برخوردار نمی

۱ـ دستیار گروه آسیب شناسی
۲ـ استادیار گروه میکروبیولوژی
۳ـ استادیار گروه آسیب شناسی
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شیراز

www.SID.ir

Archive of SID

باشد [۲و٤] و کشت در محیط های آزمایشگاهی و تلقیح به حیوانات آزمایشگاهی روش های وقت گیر و پردردسری هستند و در ضمن حساسیت و ویژگی بالائی ندارند [۱و٤].

واکنش زنجیره ای پلی مراز روشی است که می تواند لیشمانیوز جلدی را حتی در صورت وجود تعداد بسیار کمی انگل، تشخیص دهد [۱و٥]. در حال حاضر الیگو نوکلئوتیدهای آغازگر اختصاصی برای DNA کینتوپلاستی انگل لیشمانیا در دسترس می باشد [٦و٧و٨] و از آنها در تشخیص بیماری بر روی بافت تازه، یخ زده و بلوک های پارافینی استفاده شده است [۷و۸و۹]. روشی که بطور معمول جهت آماده سازی بافت ها برای بررسی در آزمایشگاههای آسیب شناسی مورد استفاده قرار می گیرد تهیه بلوک پارافینی از بافت ها می باشد به همین خاطر در این مطالعه توانائی PCR در تشخیص لیشمانیوز جلدی بر روی DNA به دست آمده از نمونه های پوستی بیوپسی شده پارافینی بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی که جسم لیشمن دیده می شود ارزیابی شده است و از آن در تشخیص بیمارانی که از نظر بالینی مشکوک به لیشمانیوز جلدی بوده اند اما در بررسی میکروسکوپی جسم لیشمن مشاهده نشده، استفاده گردیده است.

روش بررسی

۱ـ انتخاب نمونه ها: **در این مطالعه ۷۱ بیمار مبتلا به ضایعات پوستی که بیوپسی آنها در طی سالهای ۱۳۷۱ الی ۱۳۷۸ به بخش آسیب شناسی دانشکدهٔ علوم پزشکی شیراز فرستاده شده است مورد بررسی قرار گرفتند و بر اساس یافته های بالینی و هیستومورفولوژیکی به سه گروه تقسیم شدند. گروه اول: ۳۲ بیمار که از نظر بالینی مشکوک به لیشمانیوز جلدی بوده اند و در بررسی میکروسکوپی جسم لیشمن مشاهده گردید. گروه دوم: ۲۹ بیماری که از نظر بالینی مشکوک به لیشمانیوز جلدی بوده اند اما در بررسی میکروسکوپی جسم لیشمن مشاهده نگردید. گروه سوم: ۱۰ بیمار که از نظر بالینی و هیستومورفولوژیکی مشکوک به لیشمانیوز جلدی نبوده اند و مبتلا به ضایعات پوستی دیگر بوده اند که شامل چهار بیمار مبتلا به جذام، دو بیمار مبتلا به اگزمای مزمن، یک بیمار مبتلا به لیکن سیمپلکس مزمن (licken simplex chronicus)، یک بیمار مبتلا به لیکن پلان، یک بیمار مبتلا به کراتوزپالموپلانتار (Palmoplantar keratosis) و یک بیمار مبتلا به خال پوستی بود.**

۲ـ استخراج DNA: جهت استخراج DNA از بلوک های پارافینی سه عدد برش ۱۵ میکرونی توسط میکروتوم تهیه گردید و در داخل لوله های ۱/۵ سی سی اپندورف (Eppendorf) گذاشته شدند. جهت جلوگیری از آلودگی DNA بعد از برش هربلوک، تیغه برش، گیرهٔ تیغه و محیط اطراف کاربا محلول سدیم هیپوکلریت ^{mM} ۱۰۰تمیز می گردید [۱۰]. نمونه های بریده شده به وسیله الکل وازیلول پارافین زدائی شدند و پس از خشک شدن، بافت ها به وسیلهٔ میله های شیشه ای استریل شده خرد گردیدند و به هر لوله ۱۰۰ میکرولیتر با فر (Tris – Hcl 10mM, EDTA 1mM)TE اضافه گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب جوش گذاشته شدند. سپس نمونه ها با دور ۱٤۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوز گردیدند و از محلول روئی به عنوان منبع DNA جهت انجام PCR استفاده گردید [۹]. این محلول تا قبل از انجام آزمایش به لوله های استریل منتقل شدند و در دمای $^{\circ}$ ٤c نگهداری گردیدند.

۳ـ تهیه نمونه کنترل مثبت و منفی

جهت تهیه نمونه کنترل مثبت ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت حاوی انگل پروماستیگوت را با ٤۰۰ میکرولیتر از پلاسمای شخص سالم مخلوط کرده سپس به آن ترومبوپلاستین بافتی و کلسیم اضافه گردید تا به صورت لخته درآید. از این لخته بلوک پارافینی تهیه شد و از این بلوک همانند روش قبلی برش صورت گرفت و DNA آن استخراج گردید و به عنوان نمونه کنترل مثبت در نظر گرفته شد. جهت نمونه کنترل منفی به جای D NA در واکنش PCR از آب مقطر استفاده شد.

٤ـ آزمایش PCR:

www.SID.ir

Archive of SID

جهت انجام PCR از آغازگر A ۱۳ (TGGGGGAGGGGCGTTCT ۳′ ۵′) و B ۱۳ (ATTTTACACCAACCCCAGTT ۳′ ۵′) جهت تکثیر قسمتی از DNA کینتوپلاست که حاوی ۱۲۰ جفت باز می باشد استفاده گردید [۹و۶]. محلول PCR تهیه شده شامل ۲/۵ میکرولیتر از محلول ۲۵ میلی مول داکسی نوکلئوزید تری فسفات (dNTP)، ۲ میکرولیتر از محلول ۲۵ میلی مول کلرید منیزیم، ۲/۵ میکرولیتر از بافر PCR 10X، ۰/۲ میکرولیتر از محلول ۵ واحد در میکرولیتر Taq DNA polymerase، ۰/۵ میکرولیتر از آغازگر ۱۳A، ۰/۵ میکرولیتر از آغاز گرB۱۳، ۳ میکرولیتر از محلول حاوی DNA استخراج شده و ۱۳/۸ میکرولیتر آب مقطر جهت رساندن حجم محلول PCR در دستگاه ترموسیکلر با برنامه ریز جهت یک دور گذاشته شدند: ۱ـ درجه حرارت ۹٤c° به مدت یک دقیقه جهت جداشدن زنجیره های DNA از هم ۲ـ درجه حرارت ۵٤c° به مدت یک دقیقه جهت چسبیدن آغازگرها به زنجیره های تکی DNA ۳ـ درجه حرارت ۷۲c° به مدت یک دقیقه جهت گسترش زنجیره جدید DNA این برنامه برای هرسری تست PCR۲۵ بار تکرار می گردید [۹]. لازم به ذکر است که در هر سری PCR یک نمونه کنترل مثبت و یک نمونه کنترل منفی نیز گذاشته می شد تا جلو خطاهای احتمالی گرفته شود. پس از انجام PCR جهت تشخیص واکنش ۱۰ میکرولیتر از محلول PCR را داخل چاهک های مخصوص ژل اگاروز ۱/۲٪ که به آن اتیدیوم بromید جهت رنگ آمیزی DNA اضافه شده است ریخته و سپس الکتروفورز انجام می گردید و از نظر وجود باند DNA مورد نظر توسط لامپ uv مورد بررسی قرار می گرفت و در صورت وجود باند DNA مثبت تلقی می شد.

نتایج

۱ـ PCR بر روی DNA بدست آمده از بلوک های پارافینی ۳۲ بیماری که از نظر بالینی مشکوک به لیشمانیوز جلدی بوده اند و در بررسی میکروسکوپی نیز جسم لیشمن مشاهده شده بود در تمام موارد مثبت بود و منفی کاذب وجود نداشت.

۲ـ PCR بر روی DNA بدست آمده از بلوک های پارافینی ۲۹ بیماری که از نظر بالینی مشکوک به لیشمانیوز جلدی بوده اند ولی در بررسی میکروسکوپی جسم لیشمن مشاهده نشده بود در ۲٤ مورد (۸۲/۷٪) مثبت و در ۵ مورد (۱۷/۳٪) منفی بود.

۳ـ PCR بر روی DNA بدست آمده از بلوک های پارافینی ۱۰ بیماری که از نظر بالینی و هیستومورفولوژیکی مشکوک به لیشمانیازیس نبوده اند و بیماریهای پوستی دیگر مطرح بوده است در تمام موارد منفی بود و مورد مثبت کاذب وجود نداشت. (جدول ۱و تصویر۱).

جدول ۱: تست PCR در بیماران مبتلا و مشکوک به لیشمانیوز جلدی و بیماریهای پوستی دیگر

تشخیص بیماری	تعداد	موارد مثبت PCR
Cutaneous Leish	۳۳	(٪۱۰۰)۳۳
Suggestive of leish	۲۹	(٪۸۲/۷)۲٤
Skin disease other than leish	۱۰	(٪۰)۰

تصویر ۱: الکتروفورز محصولات PCR: ردیف شماره ۱ کنترل منفی، ردیف شماره ۲ کنترل مثبت، ردیف شماره ۳و٤ از گروه بیماریهای پوستی غیر از لیشمانیازیس، ردیف ۵و٦و۷ از گروه

www.SID.ir

Archive of SID

بیماران مشکوک به لیشمانیازیس که جسم لیشمن مشاهده شده است و ردیف ۸و۹و۱۰ از گروه بیماران مشکوک به لیشمانیازیس که جسم لیشمن مشاهده نشده است، ردیف ۱۱ مارکر DNA که آخرین باند آن معرف ٥٦٤ کیلو بایت می باشد.

بحث و نتیجه گیری

جهت تشخیص لیشمانیوز جلدی روش های بسیاری مورد استفاده قرار می گیرد که روش معمول بر اساس مشاهده جسم لیشمن در نمونه های اسیر مستقیم،بیوپسی بافتی یا کشت در محیط های آزمایشگاهی می باشد که جهت مثبت شدن نیاز به وجود تعداد زیادی جسم لیشمن می باشد [۱]. لیشمانیوز جلدی مزمن از نظر مورفولوژی به صورت یک ضایعه گرانولوماتوز مزمن می باشد و به ندرت جسم لیشمن مشاهده می شود بنابراین تشخیص قطعی بیماری و افتراق آن از بیماریهای گرانولوماتوز دیگر از جمله سل و جذام بسیار مشکل می باشد [۹].

PCR روشی است با حساسیت و ویژگی بالا که در تشخیص بسیاری از بیماریها از جمله بیماریهای عفونی مانند ویروس ها، باکتریها و انگل ها مورد استفاده قرار می گیرد. PCR قادر است لیشمانیوز جلدی را حتی در صورت وجود تعداد اندکی انگل تشخیص دهد [۵و۱]. در مطالعات قبلی از این روش بر روی DNA به دست آمده از نمونه های اسیر مستقیم، بافت تازه، بافت یخ زده و همچنین بلوک های پارافینی استفاده شده است [۱۱و۹و۸و۷].

در مطالعاتی که قبلا به وسیله PCR جهت تشخیص لیشمانیوز جلدی انجام شده همگی نشان دهنده حساسیت و ویژگی بالای این روش در مقابل روش های معمول دیگر می باشد [۱٤و۹]. در این مطالعه از بلوک های پارافینی نمونه های پوستی بیوپسی شده جهت PCR استفاده گردید و از روش جوشاندن جهت استخراج DNA استفاده شد که روش بسیار سریع و راحتی می باشد [۱۲و۹و۸و۷].

PCR بر روی DNA به دست آمده از بلوک های پارافینی بیمارانی که از نظر بالینی مشکوک به لیشمانیوز جلدی بوده اند و جسم لیشمن مشاهده گردیده بود در تمام موارد مثبت بود و مورد منفی کاذب وجود نداشت و بر روی نمونه های بیمارانی که از نظر بالینی مشکوک به لیشمانیوز جلدی بوده اند اما در بررسی میکروسکوپی جسم لیشمن مشاهده نشده بود در ۸۲/۷ درصد مثبت گردید. همچنین PCR در بیمارانی که ضایعات پوستی دیگری غیر از لیشمانیوز پوستی داشتند در تمام موارد منفی بود و مورد مثبت کاذب وجود نداشت که این نشان دهنده ویژگی بالای این روش می باشد. در این مطالعه حساسیت PCR در تشخیص بیمارانی که از نظر بالینی مشکوک به لیشمانیازیس بوده اند ۹۱/۸ درصد و در مقابل به وسیله بررسی هیستوپاتولوژیکی ٥۱/٦ درصد بود. بنابراین PCR روشی راحت، سریع، مناسب و با حساسیت و ویژگی بالا جهت تشخیص لیشمانیوز جلدی می باشد و در موارد مزمن که با روش های دیگر امکان یافتن جسم لیشمن بسیار کم است و تشخیص قطعی بیماری مشکل است، بسیار کمک کننده می باشد. همچنین می توان از PCR به عنوان یک روش مناسب در مطالعات اپیدمیولوژیکی و در مطالعات گذشته نگر بر روی بلوک های پارافینی استفاده نمود.

References:

1-**Debra chester kalter.** *Laboratory tests for the diagnosis and evaluation of leishmanasis.* **Dermatol Clin 1994, 12(1): PP: 37-50.**

2- Suzanne A. Grevelink, Ethan A. Lerner. ***Leishmaniasis.*** J.Am. Acat. Dermatol, 1996, 34(2); PP: 257-272.

3- Navin TR, Arana FE, de Merida AM, et al. ***Cutaneous Leishmaniasis in Guatemala: Comparison of diagnostic method.*** Am J Trop Med Hyg, 1990, 42; PP: 36-42.

4- Kurban Ak, Malad JA, Farah FS, et al. ***Histopathology of cutaneous leishmaniasis,*** Arch Dermat, 1966, 93: PP: 396-401.

5- Wirth D, McMahon – Pratt D. ***Rapid identification of leishmania species by specefic***

www.SID.ir

Archive of SID

hybridization of kinetoplast DNA in cutaneous lesions. Proc Natl Acad Sci USA, 1982, 79; PP: 6999-7003.

6- Rodgers, M.R., popper, S.J. wirth, D.F. ***Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of leishmania.*** Experimental parasitology, 1990, 71; PP: 267-257.

7- Lopez M. Inga, R., Cangalaya, M., Echevarria, J., Llanos cuentas, A. orrege, C. & Arevalo , J. ***Diagnosis of leishmania using the polymerase chain reation: a simplified procedure for field work.*** American journal of Tropical Med, 1993, 49; PP: 384-356.

8- Smyth, A.J., Ghosh, A., Hassan, M.Q., et al. ***Rapid and sensitive detection of leishmania kinetoplast DNA from splenn and blood samples of kala – azar patient.*** Parasitology, 1992, 105; PP: 183-192.

9- Tamas, L, Tivadar. LM, Yohannes, N, et al, ***Detection of cutaneous leishmania infection in paraffin – embedded skin biopsies using, the polymerase chain reaction.*** Trans – Roy – Sco – Trop – Med – Hyg – 1995, 86; PP: 273-275.

10- Prince, A.M., Andrus, L. PCR: ***How to kill unwanted DNA.*** Biotechniques,1992,12;PP:358-360.

11- **Mimori – T, Sasali – J, Nakata – M, Gomez – EA ant et al.** *Rapid identification of leishmania species from formalin – fixed biopsy samples by polymorphism – species polymerase chain reaction.* **Gene, 1998 apr 14; 210(2); PP: 179-86.**

12- Belli – A; Rodriguez – B; Aviles – H; Harris – E. ***Simolified polymerase chain reaction detection of new world leishmania in clinical specimens of cutaneous leishmanianis.*** Am – J – Trop – Med – Hyg. 1998, Jan, 58(1); PP: 102-109.

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir