خون
فصلنامه پژوهشی
تابستان ۸۴ دوره ۲ شماره ۴

کاربرد و ارزشیابی PCR در تشخیص مالاریا در اهداکنندگان خون استان سیستان و بلوچستان

مینا مقتدایی[۱]، دکتر غلامحسین ادریسیان[۲]، دکترصدیقه امینی کافی‌آباد[۳]، شهرام سمیعی[۴]، دکتر حسین کشاورز[۵]، دکتر مهدی ناطق‌پور[۶]

چکیده

سابقه و هدف

مالاریا پس از هپاتیت ویروسی و ایدز یکی از عوارض شایع ناشی از انتقال خون درمناطق مالاریاخیز است. پیشگیری از مالاریای ناشی از انتقال خون بستگی به غربالگری اهداکنندگان خون وحذف نمونه‌های آلوده دارد. به‌منظور غربالگری نمونه‌های خون از روش‌های انگل‌شناسی، سرولوژی ومولکولی استفاده شده است.

مواد و روش‌ها

مطالعهٔ انجام شده از نوع تحلیلی بود. در این مطالعه از ۱۲۰ اهداکننده خون شهرستان ایرانشهر دراستان سیستان وبلوچستان خون‌گیری به‌عمل آمد. نمونه‌ها از نظر آزمایش گسترش‌های نازک و ضخیم خون محیطی، آزمایش ایمونوفلوئورسانس غیرمستقیم و تکنیک PCR مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها

نتایج آزمایش میکروسکوپی گسترش نازک و ضخیم خون محیطی از نظر وجود انگل مالاریا در تمام موارد منفی بود. آزمایش IFA با استفاده از آنتی‌ژن پلاسمودیوم ویواکس در ۳۸ نفر و با آنتی‌ژن پلاسمودیوم فالسیپاروم در ۶ نفر از اهداکنندگان، عیار $\frac{۱}{۲۰}$ ± تا $\frac{۱}{۳۲۰}$ آنتی‌بادی را نشان داد (۱۷ نفر از گروه اول و ۴ نفر از گروه دوم، سابقه ابتلا به مالاریا در گذشته داشتند). آزمایش PCR با استفاده از روش سیلیکا در تخلیص DNA و آغازگرهای اختصاصی پلاسمودیوم‌های ویواکس و فالسیپاروم و میزان حساسیت ۲ تا۳ انگل در هر میکرولیتر خون برای همه افراد مورد مطالعه نتیجه منفی داشت.

نتیجه گیری

طبق گزارش‌های موجود، آزمایش میکروسکوپی گسترش‌های خون، علی‌رغم سادگی و ارزان بودن، پرزحمت و وقت‌گیر است و برای شناسایی و یافتن مقادیر کم انگل در اهداکنندگان بی‌علامت خون و غربالگری گروه بزرگی ازاین افراد، روشی غیرحساس می‌باشد، آزمایش IFA نیز حضور واقعی عفونت را همیشه نشان نمی‌دهد. ثابت شده است که روش‌های مولکولی و از جمله PCR حساس‌تر و اختصاصی‌تر از آزمایش‌های قراردادی میکروسکوپی بوده و مزیت بزرگ آن‌ها قابلیت شناسایی عفونت در بیماران با میزان پایین انگل می‌باشد. در این بررسی شاید به‌علت کم بودن تعداد افراد تحت مطالعه و یا محدود بودن طول دوره بررسی با روش PCR، مورد مثبتی مشاهده نشده و یا احتمال دارد، میزان انگل در افراد بررسی شده از۲ تا۳ انگل درهر میکرولیتر خون کم‌تربوده باشد.

کلمات کلیدی: مالاریا، انتقال خون، PCR، IFA، اهداکنندگان

تاریخ دریافت: ۸۳/۸/۱۲
تاریخ پذیرش: ۸۴/۳/۲۲

۱- مؤلف مسؤول: کارشناس ارشد انگل شناسی- مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران- صندوق پستی ۱۱۵۷-۱۴۶۶۵
۲- متخصص علوم آزمایشگاهی- استاد دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران
۳- متخصص آسیب شناسی تشریحی و بالینی- استادیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۴- کارشناس ارشد بیوشیمی- مربی مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۵- Ph.D انگل شناسی- استاد دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران
۶- Ph.D انگل شناسی- دانشیار دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

مالاریا مهم‌ترین و گسترده‌ترین بیماری انگلی انسان‌ها است. هر سال تقریباً ۳۰۰ تا ۵۰۰ میلیون نفر به مالاریا مبتلا می‌شوند و از این تعداد ۲ تا ۳ میلیون نفر بر اثر این بیماری می‌میرند(۱). در ایران نیز مالاریا یکی از بیماری‌های شایع و بومی است، ۷۰٪ موارد مالاریا در جنوب شرقی کشور گزارش می‌شود (۲).

انتقال مالاریا از طریق انتقال خون در صورتی که به موقع تشخیص داده نشود و درمان نگردد، ممکن است سبب مرگ گیرنده خون شود. به خصوص هنگامی که عامل آن پلاسمودیوم فالسیپاروم باشد(۳). در ایران مواردی از مالاریای ناشی از انتقال خون طی سال‌های ۱۳۵۲-۱۳۴۲ گزارش شده که در مجموع ۳۴۴ مورد بوده و در اکثر این موارد پلاسمودیوم مالاریه عامل مالاریایی ناشی از انتقال خون بوده است (۳).

اگر چه در اکثر کشورهااز جمله ایران، معمولاً از خون بیمارانی که دارای عفونت مالاریایی هستند و یا طی سه سال گذشته مبتلا به مالاریا بوده‌اند، در ترانسفوزیون استفاده نمی‌شود، اما با وجود حاملین بدون علایم بالینی مالاریا در مناطق مالاریاخیز و همچنین در مورد افرادی که سابقه ابتلا به مالاریا را به یاد ندارند، لازم است که غربالگری اهداکنندگان خون در مراکز پایگاه‌های انتقال خون این مناطق صورت گیرد (۳).

در این رابطه در مرکز انتقال خون هلال احمر رشت مدت‌ها نمونه خون اهداکنندگان حرفه‌ای با روش معمولی میکروسکوپی آزمایش می‌شد بدون این که حتی در یک مورد موفق به تشخیص عفونت مالاریا در حاملین انگل شده باشند. در صورتی که با آزمایش سرولوژی ۱۶۵ نمونه خون تهیه شده از همان اهداکنندگان در سال ۱۳۵۴، در ۶ مورد پادتن‌های مالاریا با عیارهای نسبتاً بالا تشخیص داده شد و در یک مورد با روش تغلیظ، تعداد کمی انگل پلاسمودیوم مالاریه دیده شد (۳).

در پایگاه انتقال خون زاهدان نیز در اوایل دهه ۶۰، بیش از ۲ هزار نمونه خون از اهداکنندگان تهیه و توسط تکنسین‌های آزمایشگاه ریشه‌کنی مالاریای زاهدان آزمایش گردید و نتیجه آزمایش از نظر وجود انگل در تمام موارد منفی گزارش شد. در صورتی که در بررسی مقدماتی که در همان زمان در آزمایشگاه نوبنیاد سرولوژی مالاریای پایگاه انتقال خون زاهدان انجام گرفت، تعداد قابل ملاحظه‌ای موارد مثبت سرولوژی با عیار نسبتاً بالا در بین اهداکنندگان دیده شد و در مواردی هم انگل به تعداد کم در گسترش‌های تهیه شده از خون تغلیظ نشده مشاهده گردید (۳).

برای غربالگری اهداکنندگان خون و یافتن حاملین بدون علامت مالاریا در مناطق مالاریاخیز، لازم است که روش‌های کامل‌تر و حساس‌تری به کار گرفته شوند تا از وقوع مالاریای ناشی از انتقال، پیشگیری به‌عمل آید. به این جهت درمطالعه حاضر، ارزیابی وکاربرد PCR در شناسایی حاملین سالم انگل مالاریا در بین اهداکنندگان خون منطقه آندمیک و مقایسه آن با روش‌های قراردادی تشخیصی مالاریا از جمله آزمایش گسترش‌های خونی از نظر وجود انگل و روش سرولوژی IFA[1] مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تحلیلی بود. از۱۲۰ اهداکننده خون مراجعه‌کننده به پایگاه انتقال خون ایرانشهر در سال ۱۳۸۱، نمونه‌گیری به عمل آمد. به این ترتیب که نمونه خون جهت PCR در لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد EDTA و برای آزمایش IFA در لوله‌های بدون ماده ضدانعقاد جمع‌آوری شد.

همچنین گسترش‌های نازک و ضخیم خون از این افراد تهیه گردید. گسترش‌ها پس از تهیه و خشک شدن در شرایط آزمایشگاه، با روش گیمسا رنگ‌آمیزی شدند و بعد با عدسی روغنی 100X میکروسکوپ نوری از نظر وجود انگل مالاریا مورد بررسی قرار گرفتند.

درمراحل راه‌اندازی آزمایش PCR برای تشخیص مالاریا از دو روش تخلیص سیلیکا[2] یا جاذب[3] و ۱۰۰- شلکس[4] استفاده شد(۴).

1- Indirect Flourecent Antibody
2- Silica
3- Sorbent
4- Chelex

Archive of SID
www.SID.ir

در روش شلکس ۳ میکرولیتر از نمونه خون به ۲۰۰ میکرولیتر محلول ۵٪ شلکس اضافه شد. پس از ورتکس و یکنواخت کردن مخلوط این دو و قرار گرفتن در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه (جوشاندن به منظور لیز شدن)، عمل سانتریفوژ به مدت ۲ دقیقه در۱۰۰۰۰rpm صورت گرفت. مایع رویی جهت عمل تکثیر در ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

در روش سیلیکا ۵۰ میکرو لیتر خون به ۵۰۰ میکرو لیتر بافر لیز کننده (GITC ۸M، Tris - HCI با pH = ۶/۴ ، EDTA ۳۶ mM با pH = ۸ و ۰/۲٪ Triton®X-۱۰۰) افزوده و ورتکس شد. به مخلوط فوق پس از قرار گرفتن در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه،۳۰ میکرولیتر جاذب اضافه وبعد باعمل ورتکس مخلوط گردید. پس از۲۰ دقیقه روتاتور (۲۰rpm) و ۱۵ ثانیه سانتریفوژ کردن در ۸۰۰۰rpm و تخلیه مایع رویی، رسوب ته میکروتیوب دو مرتبه با بافر شستشو به میزان ۵۰۰ میکرو لیتر(GITC ۴ M و Tris-HCI ۱۰۰mM با pH= ۶/۴) و سه مرتبه با اتانول ۷۰٪ به مقدار ۱۰۰۰ میکرولیتر شستشو داده شد. سپس عمل خشک شدن رسوب ته میکروتیوب و تبخیر الکل باقیمانده در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت.

در مرحله بعد ۵۰ میکرولیتر از بافر جداکننده (آب مقطر استریل عاری از نوکلئاز)، به رسوب اضافه و ورتکس شد و پس از انکوباسیون به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد و سانتریفوژ شدن به مدت۳۰ ثانیه در ۱۰۰۰۰ rpm، مایع رویی برداشت و در دمای۷۰- درجه سانتی‌گراد جهت تکثیر ذخیره شد.

شرایط تکثیر

مقدار ۳ میکرولیتر از مخلوط اصلی شماره۱[1] (الیگونوکلئوتیدها یا dNTP با غلظت نهایی ۲۰۰µM، آغازگرها[2] با غلظت نهایی ۰/۲ میکرومول ساخته شده در بخش کیت‌سازی سازمان انتقال خون) در انتهای میکروتیوب ریخته شد و بعد ۲ قطره یا به میزان ۳۰ میکرو لیتر از روغن Din – Oil (سیگما) بر روی آن قرار گرفت. سپس ۱۷/۵ میکرولیتر از مخلوط شماره۲[3] (۱۲/۸۷۵ µM، ddH_20 و گلیسرول ۱۰٪ و $MgC1_2$ ۱/۵ mM و بافر ۱۰X با غلظت نهایی 1X که شامل Tris-HCI ۱۰۰mM با pH=۹، KCI ۵۰۰mM و ۱٪ Triton ® X - 100 بود و تک DNA پلیمراز[4] با غلظت نهایی ۰/۰۲۵U/µL) و ۵ میکرو لیتر از DNA به آن افزوده شد.

آغازگرهای مورد استفاده تهیه شده در بخش کیت‌سازی سازمان انتقال خون جهت PCR عبارت بودند از:

برای پلاسمودیوم فالسیپاروم

K114-P_1:5'- CGC TAC ATA TGC TAG TTG CCA GAC,
K114-P_2:5'- CGT GTA CCA TAC ATC CTA CCA AC

برای پلاسمودیوم ویواکس

P.v-1:5'- CGT GAA AAT CGA AGC TAT CGA
P.v- PCR PV-2:5'-TCC CTG CCC CGC TGT TGC

DNA پلاسمودیوم‌های ویواکس و فالسیپاروم به عنوان شاهد یا کنترل مثبت وآب مقطر استریل عاری از نوکلئاز (ddH_2O) به عنوان شاهد یا کنترل منفی در مرحله تکثیر در نظر گرفته شدند.

شرایط تکثیر به صورت: جداسازی ابتدایی در ۹۳ درجه سانتی گراد، به مدت ۱۲۰ ثانیه و ۱ دور، جداسازی در ۹۳ درجه سانتی گراد، به مدت ۳۰ ثانیه و ۴۰ دور، اتصال پرایمرها به رشته‌های هدف در ۵۵ درجه سانتی گراد، به مدت ۶۰ ثانیه و ۴۰ دور، طویل شدن در ۷۲ درجه سانتی گراد، به مدت ۶۰ ثانیه و ۴۰ دور و طویل شدن نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد، به مدت ۳۰۰ ثانیه و ۱ دور در ترمال سایکلر (مدل Hybaide) اجرا شد.

1- Master.mix
2- Primers
3- Super.mix
4- Taq DNA polymerase

Archive of SID
www.SID.ir

آشکارسازی محصولات PCR

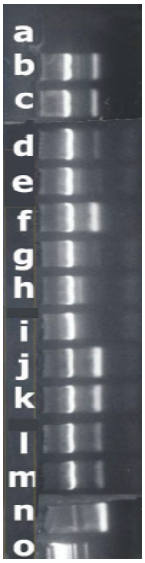
محصولات تکثیر یافته PCR، توسط الکتروفورز آنالیز و آشکار شدند. یک ژل آگارز ۲٪ استاندارد (سیگما) بدین منظور استفاده شد. رنگ‌آمیزی DNA با استفاده از یک محلول اتیدیوم بروماید (مرک) با غلظت ۰/۵mg/ml صورت گرفت. هر ژل با نور ماوراءبنفش، مرئی و سپس با دوربین پولاروید عکس‌برداری شد.

قطعه۲۰۶bp(base pair) حضور پلاسمودیوم فالسیپاروم و قطعه ۱۸۳bp وجود پلاسمودیوم ویواکس را در ژل نشان می‌دادند. لازم به توضیح است که عدم حضور ممانعت‌کننده‌ها در PCR با آنالیز و آشکارسازی ژن HLA-DR مشخص شد.

یافته‌ها

آزمایش میکروسکوپی گسترش نازک و ضخیم خون محیطی از نظر وجود انگل مالاریا در تمام ۱۲۰ مورد داوطلب اهداکننده خون نتیجه منفی داشت. بدین ترتیب که برای هر فرد ابتدا گسترش ضخیم و سپس گسترش نازک خون محیطی به دقت بررسی شد. نمونه خون تهیه شده از اهداکنندگان با روش سرولوژی ایمونوفلوئورسانس غیر مستقیم (IFA) با استفاده از آزمایش آنتی‌ژن‌های پلاسمودیوم ویواکس و پلاسمودیوم فالسیپاروم تهیه شده از بیماران مالاریایی مورد آزمایش قرار گرفت که ۳۸ مورد از آن‌ها با آنتی‌ژن پلاسمودیوم ویواکس عیار $\frac{1}{20}$ ± تا $\frac{1}{320}$ آنتی‌بادی را دارا بودند (۱۷ نفر از این افراد سابقه ابتلا به مالاریا را در گذشته به یاد داشتند). ۶ مورد نیز از آنتی‌ژن پلاسمودیوم فالسیپاروم با عیار $\frac{1}{20}$ ± تا $\frac{1}{320}$ آنتی‌بادی برخوردار بودند که ۴ نفر از آنها سابقه ابتلا به مالاریا را در گذشته ذکر می‌کردند.

آزمایش PCR با روش تخلیص سیلیکا و استفاده از آغازگرهای اختصاصی پلاسمودیوم ویواکس و پلاسمودیوم فالسیپاروم و میزان حساسیت۲ تا ۳ انگل در هر میکرولیتر خون برای همه افراد مورد مطالعه نتیجه منفی داشت (شکل‌های ۱ و۲).



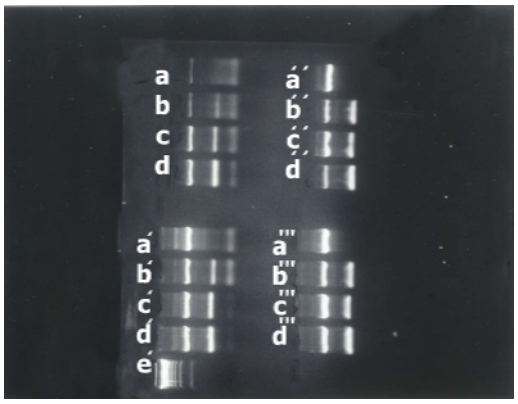
شکل ۱ : نتیجه آزمایش PCR بر روی رقت‌های $\frac{1}{10}$ ، $\frac{1}{100}$ و $\frac{1}{1000}$ نمونه خون مثبت ازنظرپلاسمودیوم ویواکس و پلاسمودیوم فالسیپاروم و مخلوطی ازخون‌های آلوده‌به پلاسمودیوم ویواکس و پلاسمودیوم فالسیپاروم به‌منظور تعیین حساسیت تکنیک PCR.
a : کنترل فاقد نمونه (کنترل منفی)
b و c و d و e : به ترتیب رقت‌های $\frac{1}{10}$ ، $\frac{1}{100}$ ، $\frac{1}{1000}$ و $\frac{1}{10000}$ نمونه خون مثبت از نظر پلاسمودیوم ویواکس
f و g و h و i : به ترتیب رقت‌های $\frac{1}{10}$ ، $\frac{1}{100}$ ، $\frac{1}{1000}$ و $\frac{1}{10000}$ نمونه خون مثبت از نظر پلاسمودیوم فالسیپاروم
j و k و l و m : به ترتیب رقت‌های $\frac{1}{10}$ ، $\frac{1}{100}$ ، $\frac{1}{1000}$ و $\frac{1}{10000}$ نمونه خون مثبت از نظر پلاسمودیوم فالسیپاروم و ویواکس
n : کنترل با DNA پلاسمودیوم فالسیپاروم و ویواکس (کنترل مثبت)
o : شاخص اندازه DNA

شکل ۲ : نتیجه آزمایش PCR بر روی رقت‌های $\frac{1}{10}$ ، $\frac{1}{100}$ نمونه خون بیمار مبتلا به پلاسمودیوم فالسیپاروم
a : کنترل فاقد نمونه (کنترل منفی)
b تا h : نمونه خون اهداکنندگان
i و j و k : به ترتیب رقت‌های $\frac{1}{10}$ ، $\frac{1}{100}$ و $\frac{1}{1000}$ نمونه خون آلوده به پلاسمودیوم فالسیپاروم
l : کنترل با DNA پلاسمودیوم فالسیپاروم (کنترل مثبت)

www.SID.ir
Archive of SID

جهت تأیید عمل تخلیص واطمینان از یافتن موارد مثبت، در هر مرتبه کاری از نمونه‌های بیماران مبتلابه پلاسمودیوم ویواکس و پلاسمودیوم فالسیپاروم، به عنوان نمونه مثبت استفاده شد. هم‌چنین در هر نوبت کاری تخلیص، از نمونه خون یک فرد سالم از نظر مالاریا به‌عنوان نمونه منفی برای اطمینان از عدم آلودگی، آزمایش به عمل آمد.

میزان انگل در خون نمونه‌های مثبت از نظر پلاسمودیوم ویواکس و پلاسمودیوم فالسیپاروم با روش شمارش تعداد انگل در گسترش ضخیم خون محیطی در برابر ۲۰۰ گلبول سفید و با فرض وجود ۸۰۰۰ گلبول سفید در هر میکرولیتر خون بیمار مشخص شد و تعیین میزان حساسیت تکنیک PCR برای تشخیص انگل مالاریا با آزمایش PCR بر روی هر کدام از رقت‌های $\frac{1}{10}$، $\frac{1}{100}$، $\frac{1}{1000}$، $\frac{1}{10000}$ نمونه‌های مثبت از نظر پلاسمودیوم‌های ویواکس و فالسیپاروم صورت گرفت که با توجه به مثبت شدن نتیجه PCR تا رقت $\frac{1}{1000}$ ، میزان انگل شمارش شده ۲ تا۳ انگل در هر میکرولیتر خون برآورد شد (شکل‌های ۳ و ۴).



شکل ۳ : مقایسه نتایج آزمایش PCR با استفاده از دو روش تخلیص شلکس و سیلیکا و دو کیت تکثیر Promega و Avicenna

a و a´ و a´´ و a´´´ : کنترل با نمونه خون منفی ازنظر پلاسمودیوم ویواکس و پلاسمودیوم فالسیپاروم

b و b´ و b´´ و b´´´ : نمونه خون مثبت ازنظر پلاسمودیوم ویواکس

c و c´ و c´´ و c´´´ : نمونه خون مثبت ازنظر پلاسمودیوم فالسیپاروم

d و d´ و d´´ و d´´´ : نمونه خون مثبت ازنظر پلاسمودیوم ویواکس و پلاسمودیوم فالسیپاروم

e : شاخص اندازه DNA

(a و b و c و d : روش شلکس و کیت Promega، **a´** و **b´** و **c´** و **d´** : روش سیلیکا و کیت Promega ، **a´´** و **b´´** و **c´´** و **d´´** : روش شلکس و کیت Avicenna **a´´´** و **b´´´** و **c´´´** و **d´´´** : روش سیلیکا و کیت Avicenna)

شکل۴ : نتیجه آزمایش PCR پلاسمودیوم ویواکس بر روی نمونه خون اهداکنندگان

a : کنترل فاقد نمونه (کنترل منفی)

b : کنترل با نمونه خون منفی از نظر پلاسمودیوم ویواکس (نمونه خون منفی)

c تا o : نمونه خون اهداکنندگان

p : کنترل با نمونه خون مثبت از نظر پلاسمودیوم ویواکس (نمونه خون مثبت)

q : کنترل با DNA پلاسمودیوم ویواکس (کنترل مثبت)

همچنین بر روی محصولات تخلیص نمونه‌های مثبت از نظر پلاسمودیوم ویواکس و پلاسمودیوم فالسیپاروم و مخلوط آن‌ها با هر دو روش شلکس و سیلیکا، عمل تکثیر از نظر HLA-DR با استفاده از کیت تکثیر ساخته شده توسط بخش کیت‌سازی سازمان انتقال خون صورت گرفت تا از صحت و درستی مرحله تخلیص اطمینان حاصل گردد. در ارزیابی و مقایسه، دو روش شلکس و سیلیکا هر دو از حساسیت خوبی برخوردار بودند. گرچه به نظر می‌رسد که روش شلکس به لحاظ نیاز به مقدار کمتر نمونه و کوتاه بودن زمان انجام مراحل تخلیص، نسبت به روش سیلیکا ایده‌آل‌تر باشد، ولی در روش سیلیکا به دلیل استفاده از چندین مرحله شستشو جهت حذف ممانعت کننده‌های موجود در خون، باندهای غیراختصاصی کمتری مشاهده گردید. لذا در انجام آزمایش PCR بر روی نمونه‌های خون اهداکنندگان، روش سیلیکا به کار گرفته شد (شکل ۵).

Archive of SID
www.SID.ir

در بدو کار از دو کیت اویسنا (Avicenna ساخته شده در بخش کیت‌سازی انتقال خون) و پرومگا (Promega) به منظور عمل تکثیر استفاده شد که در مقایسه این دو کیت، مخلوط شماره۲ و مخلوط اصلی شماره۱ مربوط به انتقال خون به لحاظ دارا بودن محصولات مثبت با باندهای پررنگ‌تر و شدت بیشتر و عدم وجود باندهای غیر اختصاصی نسبت به کیت پرومگا قابلیت بیشتری از خود نشان دادند. بنابراین در مراحل تکثیر آزمایش PCR از کیت سازمان انتقال خون استفاده گردید. در نتایج به دست آمده از PCR مربوط به پلاسمودیوم ویواکس، یک باند دیگر علاوه بر باند اختصاصی پلاسمودیوم ویواکس دیده شد که ارتباط با ژنوم انسان داشته و در واقع نوعی کنترل داخلی برای کار انجام یافته، محسوب می‌شد. در مقابل در نتایج حاصل از PCR پلاسمودیوم فالسیپاروم، باند کنترل داخلی دیده نشد و یا بسیار کم رنگ ظاهر گردید.

شکل۵ : نتیجه آزمایش PCR پلاسمودیوم فالسیپاروم بر روی نمونه خون اهداکنندگان
a : کنترل فاقد نمونه (کنترل منفی)
b : کنترل با نمونه خون منفی از نظر پلاسمودیوم فالسیپاروم (نمونه خون منفی)
c تا o : نمونه خون اهداکنندگان
p : کنترل با نمونه خون مثبت از نظر پلاسمودیوم فالسیپاروم (نمونه خون مثبت)
q : کنترل با DNA پلاسمودیوم فالسیپاروم (کنترل مثبت)

وجود باند کنترل داخلی دلیلی بر عدم وجود ممانعت کننده در نمونه تحت آزمایش و یا حین کار است. لذا برای اثبات عدم وجود ممانعت کننده در PCR پلاسمودیوم فالسیپاروم، محصولات مرحله تخلیص و یا DNA با آب عاری از نوکلئاز به نسبت $\frac{۱}{۱۰}$ رقیق شد و سپس برای عمل تکثیر مورد استفاده قرار گرفت تا اگر ممانعت کننده واکنش در نمونه موجود است، با انجام رقیق‌سازی میزانش به حداقل برسد و ممانعتی برای PCR نباشد (شکل ۶).

شکل۶ : وجود کنترل داخلی در PCR پلاسمودیوم ویواکس و اثبات عدم وجود ممانعت‌کننده در PCR پلاسمودیوم فالسیپاروم
a : کنترل فاقد نمونه (کنترل منفی)
b تا i : نمونه خون اهداکنندگان
j : کنترل با DNA پلاسمودیوم فالسیپاروم (کنترل مثبت)

بحث

مالاریا از نظر انتشار، میزان ابتلا و مرگ و میر مهم‌ترین بیماری انگلی در دنیا است (۵). با گسترش مقاومت انگل به داروهای ضد مالاریا و افزایش مشکلات در کنترل این بیماری در مناطق مالاریاخیز، تشخیص سریع و صحیح مالاریا مهم بوده و برای درمان درست و به موقع آن لازم می‌باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

همچنین مواردی از عفونت‌های تحت حاد یا مزمن و نامشخص با میزان انگل در خون بسیار پایین و اکثراً بدون علایم بالینی در مناطق آندمیک از نظر مالاریا وجود دارد که مهاجرت آنان به مناطقی که خطر انتقال مالاریا وجود دارد، سبب بروز مالاریا می‌شود و یا اگر این افراد به عنوان دهنده خون استفاده گردند، در گیرنده خون، مالاریای حاد ایجاد شده و در مواردی سبب مرگ می‌گردد. لذا استفاده از یک روش تشخیصی حساس و دقیق برای پیدا کردن حاملین بدون علایم بالینی انگل مالاریا به ویژه در اهداکنندگان خون که از تعداد انگل پایین برخوردار هستند بسیار مهم است (۶).

تشخیص حضور انگل‌های مالاریا در خون در مقادیر کمتر از حد شناسایی میکروسکوپی، مشکل اساسی و مهم در بانک‌های خون و نیز در مطالعات اپیدمیولوژیک می‌باشد (۷). به طور معمول تشخیص آزمایشگاهی مالاریا بر پایه آزمایش میکروسکوپی گسترش‌های خونی است که به عنوان یک روش استاندارد جهت تشخیص مالاریا و افتراق بین گونه‌های پلاسمودیوم‌های انسانی براساس مورفولوژی اشکال خونی می‌باشد.

محققان و دانشمندان این روش را یک روش کلاسیک و انتخابی برای تشخیص مالاریا در مناطق آندمیک و جهت افتراق گونه‌های مالاریا در موارد حاد معرفی کرده و انجام روزانه آزمایش گسترش نازک خون محیطی به منظور تعیین وجود انگل را یک شاخص مهم برای درمان موفقیت‌آمیز یا نارسایی احتمالی درمان دارویی دانسته‌اند (۸،۹).

آزمایش گسترش نازک و ضخیم خون محیطی را اگر چه به عنوان روش انتخابی در تشخیص مالاریا می‌دانند و در واقع روشی ساده، ارزان، مناسب، معمولاً سریع و نسبتاً صحیح است و نیاز به وسایل گران‌قیمت و تجهیزات آزمایشگاهی زیاد ندارد اما پرزحمت و وقت‌گیراست (به خصوص وقتی که تعداد زیادی نمونه آنالیز می‌شوند و اسلایدها به‌طور جداگانه و تک تک باید بررسی گردند) و وجود افراد بسیار ورزیده و ماهر و آموزش دیده برای افتراق صحیح به خصوص وقتی که چند انگل هم زمان (عفونت مختلط) حضور دارند و همچنین در بیماران با مقادیر کم انگل در خون الزامی است (۱۱-۸).

از دیگر معایب آزمایش گسترش خون محیطی، حساسیت محدود آن در تعیین مقادیر کم انگل در خون و عفونت‌های مختلط و امکان تشخیص‌های نادرست گونه‌ها در این موارد است (۸،۱۲). حساسیت مورد انتظار را برای گسترش ضخیم خون محیطی و توسط یک فرد با تجربه حدود ۵۰ انگل در هر میکرولیتر خون و حتی کمتر و به طور متوسط ۵۰۰ انگل در هر میکرولیتر خون برای بیشتر آزمایشگاه‌های تشخیص طبی ذکر کرده‌اند (۱۳، ۹).

ثابت شده است که روش‌های مولکولی و از جمله PCR حساس‌تر واختصاصی‌تر ازآزمایش‌های میکروسکوپی بوده و مزیت بزرگ آن‌ها قابلیت شناسایی و تعیین عفونت در بیمارانی با مقادیر کم انگل در خون است که با آزمایش گسترش خونی ممکن است تشخیص داده نشوند (۱۱، ۱۰، ۸).

PCR به ویژه در تعیین و شناسایی عفونت‌های مختلط حساس است، همچنین در مواردی که افتراق گونه‌های انگل مالاریا با مقادیر پایین توسط آزمایش میکروسکوپی مشکل بوده، PCR در زمینه تشخیص آن‌ها موفق و مؤثر بوده است (۱۴). این روش ساده، تکرار پذیر، دارای حساسیت بالا و در موارد تعداد زیاد نمونه روشی سریع است و احتیاج به آموزش اختصاصی و ویژه برای تعبیر و تفسیر نتایج نداشته و تحت تأثیر ذهنیات و تصورات مشاهده‌گر قرار نمی‌گیرد. PCR می‌تواند برای غربالگری وسیع و انبوه از طریق اتوماسیون به ویژه در بزرگسالان که اغلب عفونت پلاسمودیوم فالسیپاروم کمتر از حدآزمایش میکروسکوپی دارند به‌کار رود (۱۶، ۱۵،۱۰).

ابتلای پی در پی و مرتب افرادی که در مناطق آندمیک زندگی می‌کنند و معمولاً دارای تعداد انگل غیر قابل تشخیص به روش میکروسکوپی هستند، سبب می‌شود که روش‌های حساس‌تری مثل PCR به عنوان یک مکمل روش میکروسکوپی جهت تعیین مخازن انگل مالاریا و کنترل بیماری و جلوگیری از مالاریای ناشی از انتقال خون ضروری باشد (۱۶).

Archive of SID

www.SID.ir

روش‌های سرولوژی نیز در یافتن اهداکنندگان خون برخوردار از انگل کم، مطلوب نیستند (۱۲). اگر چه در تشخیص‌های سرولوژی مالاریا مناسب‌ترین روش، آزمایش IFA است و سادگی و حساسیت رضایت‌بخش، مزایای اصلی این روش می‌باشد، اما دارای معایبی نیز هست که از آن جمله می‌توان به این موارد اشاره کرد: نتایج مثبت آزمایش IFA، سریع و به زودی طی ۱ تا ۲ روز پس از ظهور پارازیتمی ایجاد شده و پس‌از درمان نیزکاهش می‌یابد. به‌طوری که ۳ تا۶ ماه پس از عفونت منفی می‌شود، همچنین این آزمایش قابل اتوماسیون و ماشینی شدن نیست. لذا تعداد سرم‌ها و نمونه‌هایی‌که روزانه مورد بررسی قرار می‌گیرند، محدود می‌گردد. قرائت نتایج آزمایش IFA ذهنی است و با مشاهده نتایج مثبت ضعیف تحت تأثیر قرار می‌گیرد. ضرورت وجود یک میکروسکوپ فلوئورسنت گران‌قیمت نیز یکی از معایب دیگر روش مذکور است(۱۷).

نکته مهم دیگر این که معمولاً روش‌های سرولوژیک و تشخیص آنتی‌بادی، سابقه قبلی ابتلابه مالاریا را درساکنین مناطق آندمیک نشان می‌دهند(۵).

در مناطق مالاریاخیز و افراد بومی، یا کسانی که سابقه ابتلا به مالاریا را در گذشته داشته‌اند، مثبت بودن آزمایش، همیشه دلیل بر وجود انگل در خون نیست. از طرف دیگر در ابتدای بیماری که آنتی‌بادی هنوز در خون ظاهر نشده است، منفی بودن IFA دلیل بر عدم ابتلای شخص به مالاریا نمی‌باشد (۱۸). بنابراین روش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی گونه‌های پلاسمودیوم با قابلیت تکثیر DNA اختصاصی انگل و ایجاد میلیون‌ها کپی از آن، روش حساس‌تر و اختصاصی‌تر جهت تشخیص مالاریا می‌باشد (۱۲).

در مطالعه حاضر، ۷ نفر از اهداکنندگان که دارای تیتر قابل توجه آنتی‌بادی ($\frac{1}{80}$، $\frac{1}{160}$، $\frac{1}{320}$) مالاریا بودند، سابقه ابتلا به مالاریا نداشتند و نیز افرادی که طی۱تا ۳ سال گذشته به این بیماری مبتلا شده‌بودند، نتیجه آزمایش منفی و یا عیار $\frac{1}{20}$ برای IFA را نشان دادند. با توجه به منفی بودن نتایج PCR برای اهداکنندگان خون، به نظر می‌رسد که افراد مذکور در زمان تهیه خون، یا ابتلا به بیماری مالاریا نداشتند و یا اگر واجد آن بودند، میزان انگل در خونشان کمتر از ۲ در هر میکرولیتر خون بوده است. بنابراین آزمایش سرولوژی در این رابطه امکان دارد افرادی که ابتلا به مالاریا داشته و در عین حال واجد آنتی‌بادی‌های این بیماری نیستند را شناسایی نکند و در مقابل سبب محرومیت افراد سالم از اهدای خون گردد.

نتیجه‌گیری

باتوجه به این که آزمایش میکروسکوپی و تکنیک PCR در این بررسی، وجود انگل را در اهداکنندگان خون نشان نداده است، وجود پادتن سابقه ابتلا گذشته به مالاریا را در عده‌ای از اهداکنندگان خون که فاقد انگل در خون بوده‌اند، نشان می‌دهد. بنابراین به‌نظر می‌رسد که تکنیک PCR برای غربالگری اهداکنندگان خون مناطق آندمیک و انتخاب افراد سالم از نظر انگل مالاریا ابزاری مفید بوده و حساسیت و ویژگی بیشتری داشته باشد. در مقابل روش سرولوژی IFA سابقه عفونت گذشته را نشان می‌دهد.

پیشنهاد

تکنیک PCR علی‌رغم پر هزینه و گران قیمت بودن، به دلیل حساسیت و تأثیر بیشتر در تشخیص عفونت مالاریا و یافتن حاملین سالم و بدون علایم بالینی انگل مالاریا در مناطق آندمیک به ویژه در مراکز انتقال خون پیشنهاد و توصیه می‌گردد. هزینه بالا و نیاز به شرایط توصیه شده آزمایشگاهی برای جلوگیری از نتایج مثبت کاذب (به علت آلودگی نمونه‌ها با محصولات قبلی PCR) مسایلی هستند که درارتباط با استفاده از PCR بیشتر مطرح می‌باشند (۱۹).

پیشرفت در سرعت روش‌های تخلیص DNA، توسعه و تکامل ترمال سایکلرها و امکان استفاده از لایت سایکلرهای جدید، تکثیر DNA انگل مالاریا را در تشخیص‌های حاد هم در حیطه مطالعه و هم در آزمایشگاه فراهم نموده است (۱۳). استفاده از روش PCR دوگانه[1] با به کار بردن دو جفت آغازگر اختصاصی که حساسیت و ویژگی بیشتری در تعیین و شناسایی اسیدهای نوکلئیک و توانایی شناسایی

1- Nested PCR

Archive of SID
www.SID.ir

مقادیر کم‌تر از حساسیت به دست آمده در مطالعه حاضر (۱/۳ انگل، ۰/۰۰۵ انگل و ۰/۰۰۱ انگل) را دارند توصیه می‌گردد.

در هرحال به مطالعات و تحقیقات بیشتری در زمینه استفاده از PCR در مراکز انتقال خون مناطق آندمیک و از جمله ایران نیاز است.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله نویسندگان مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از آقایان دکتر علی طالبیان، دکتراسماعیل صانعی مقدم و خانم دکتر پریسا بزرگ‌زاده همچنین پرسنل محترم کنترل کیفی مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون و پایگاه انتقال خون ایرانشهر اعلام می‌دارند.

منابع

1- Gal S, Fidler C, Turner S, *et al*. Detection of *PIasmodium falciparum* DNA in plasma. Annals of the New York Academy of Sciences. 2001; 945: 234-238.

۲- ادریسیان، غلامحسین، مروری بر وضعیت مالاریا در ایران، مجله دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی- ۱۳۸۱- جلد اول- شماره اول- صفحات ۵۰ تا ۶۰.

۳- ادریسیان، غلامحسین، مالاریای ناشی از انتقال خون در ایران. مجله نظام پزشکی، سال نهم، شماره ۱۳۶۴،۵، صفحات ۳۲۴-۳۱۴.

4- Harris E. A low-cost approach to PCR. Appropriate transfer of biomolecular techniques. 1998: 89-95, 133-139, 246-260.

5- Edrissian G, Afshar A, Mohseni G. Rapid immunochromatography test "ICT Malaria Pf" in diagnosis of *Plasmodium falciparum* and its application in the *in vivo* drug susceptibility test. Arch. Irn. Med; 2001; 4(1): 14-17.

6- Rubio JM, Benito A, Roche J, *et al*. Semi-nested, multiplex polymerase chain reaction for detection of human malaria parasites and evidence of *Plasmodium vivax* infection in equatorial Guinea. Am. J. Trop. Med. Hg., 1999; 60(2): 183-187.

7- Zalis MG, Ferreira-da-Cruz MF, Balthazar-Guedes HC, *et al*. Malaria diagnosis: Standardization of a polymerase chain reaction for the detection of *Plasmodium falciparum* parasites in individuals with low-grade parasitemia. Parasitol. Res. 1996;82:612-616.

8- Schindler HC, Montenegro L, Carvalho AB, Abath FG, and Jaureguiberry G. Development and optimization of polymerase chain reaction-based malaria diagnostic methods and their comparison with quantitative buffy coat assay. Am. J. Trop. Med. Hyg., 2001; 65(4): 355-361.

9- Moody A, Manser D. Laboratory practice for the diagnosis of malaria. CLI September. 2001.

10- Tham JM, Lee SH, Tan TMC, Ting RCY, Gara UAK. Detection and species determination of malaria parasites by PCR: Comparison with microscopy and with ParaSight-F and ICT Malaria Pf tests in a clinical environment. J. Clin. Microbiol, 1999; 37(5): 1269-273.

11- Zaman S, Tan L, Hing Chan H, *et al*. The detection of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* in DNA-extracted blood samples using polymerase chain reaction. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 2001; 95: 391-397.

12- Ty Hang VT, Be TV, Tran PN, *et al*. Screening donor blood for malaria by polymerase chain reaction. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1995; 89: 44-47.

13- Moody A. Rapid diagnostic tests for malaria parasites. Clin. Microbiol. Rev, 2002; 15(1): 66-78.

14- Pieroni P, Mills CD, Ohrt C, Harrington MA, Kain KC comparison of the Para Sikht^{TM} – F test and the ICT Malaria Pf^{TM} test with the polymerase chain reaction for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* malaria in travelers. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1998; 92: 166-9.

15- Mankhambo L, Kanjala M, Rudman S, Lema VM, Rogerson SJ. Evaluation of the optimal Rapid Antigen Test and Species-Specific PCR to detect Placental *Plasmodium falciparum* infection at delivery. J. Clin. Microbiol, 2002; 40(1): 155-158.

16- Postigo M, Mendoza-Leon A, Hilda A, Perez HA. Malaria diagnosis by the polymerase chain reaction: a field study in south-eastern Venezuela. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1998; 92: 509-511.

17- Contre Ras CE, Pance A, Marcano N, Gonzalez N, Bianco N. Detection of specific antibodies to *Plasmodium falciparum* in blood bank donors from malaria-endemic and non-endemic areas of Venezuela. Am. J. Trop. Med. Hyg., 1999; 60(6): 948-953.

18- Edrissian GH, Afshar A. A simple method of in vitro culture of *Plasmodium falciparum* in screw-capped vials. Iranian J of Health., 1982; 11(3,4):57-62.

19- Wilson SM, Snounou G, Brown KN, do Rosario VE. Detection of malaria by PCR. Tran. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1994; 88: 363.

Archive of SID

www.SID.ir

Application and evaluation of PCR in detection of malaria in donors of transfusion centers in Sistan-Baloochestan province in 2002

Moghtadaei M.[1](MS), Edrissian G.H.[2](DMT), Amini Kafiabad S.[1](MD), Samiei Sh.[1](MS), Keshavarz H.[2](PhD), Nateghpoor M.[2](PhD)

[1] *Iranian Blood Transfusion Organization-Research Center*
[2] *Health College and Health Research Institute of Tehran University of Medical Sciences*

Archive of SID

Abstract

Background and Objectives
After hepatitis and AIDS, malaria is the most prevalent transfusion outcome in endemic areas. Presence of asymptomatic carriers of malaria parasites in the endemic areas can be a source of infection in transmission of malaria by blood transfusion. Prevention of malaria caused by blood transfusion depends on screening blood donors and deleting infected blood samples. To screen blood samples, parasitological, serologic and molecular methods have been applied.

Materials and Methods
In this study 120 blood donors in Iranshahr in Sistan-Baloochestan province were tested with different methods of thick and thin blood films, Immuno-Fluorescent Antibody Test (IFAT), and Polymerase Chain Reaction (PCR).

Results
The result of all thick and thin blood films were negative. IFAT by using *P.vivax* antigen and *P.falciparum* antigen for 38 and 6 donors respectively showed a titre of antibody equal to ± 1/20-1/320 (17 of the former group and 4 of the latter had a history of malaria infection). The PCR assay using silica for DNA extraction and using *P.falciparum* specified primers with sensitivity rate equal to 2-3 parasites per microlitre of blood was negative for all subjects under study.

Conclusions
This study showed, although microscopic examination of blood smears was inexpensive and simple, but it is labor-intensive and time-consuming that makes it insensitive for detection of low-level parasitemia in asymptomatic donors and for screening a large number of specimen. IFAT would not always show the real existence of parasites and in spite of simplicity and sensitivity because of its disability to be automated is not suitable for screening a large number of specimen. On the other hand, IFAT in individuals with malaria history and absence of parasites in their blood may be positive for a long period. It was approved that molecular methods such as PCR were more sensitive and more specific than conventional microscopic examination and their great advantage was the ability to detect the infection with low-level parasitemia that may have been distinguished by blood films examination. In the present study, probably because of low number of specimen or limited study duration with PCR method, or probably since parasitemia exiting in the subjects under study was less than 2-3 parasites per microlitre of blood, we were not able to detect positive cases.

Key words: Malaria, Blood transfusion, PCR, IFA, Blood donors
SJIBTO 2005; 2(4): 105-114

Received: 2 Nov 2004
Accepted: 12 Jun 2005

Correspondence: Moghtadaei, M., MS of Parazitology, IBTO-Research Center
P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 88601501; Fax : (+9821) 88601551
E-mail: *mina_moghtadaei@yahoo.com*

www.SID.ir