

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

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

چکیده:

از سال ۱۹۸۷ که روش PCR (Polymerase Chain Reaction) 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 او اوسیست 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 از نظر زمان های مورد استفاده در سه مرحله دناتور کردن، الحاق (annealing) و در نهایت پلیمر کردن (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 ۵۳-۷۴ 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 پلیمرز

مقدمه:

کاربرد روزمره ای دارد. این نمونه ها البته مدت مدیدی در فرمالین نمی ماندند 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 آرشویی شامل مقاطع تعبیه شده در پارافین و لامهای

مواد فیکس شده در فرمالین و تعبیه شده در پارافین (FFPE) (Formalin-fixed and paraffin-embedded) که غالباً هر گونه بافت برداشت شده توسط جراحی را شامل میشود، امروزه در پاتولوژی برای تهیه مقاطع آسیب شناسی

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

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 مطالعه‌ای با روش reverse transcription و PCR، ترجمه گلوکز-۶-فسفات دهیدروژناز در یک سری از نمونه‌های هیستولوژیک و سیتولوژیک آرشیوی نشان داده شده است(۱). نمونه‌های هیستولوژیک بسیاری شامل مقاطع به تازگی تهیه شده در پارافین، لام‌های رنگ شده با همتوکسیلین و اتوزین، لام‌های رنگ شده براساس ایمونولوژیک و مغز استخوان آهک زدایی شده بوده است. نمونه‌های سیتولوژیک، گسترش‌های سرویکس و آسپیره‌های سوزنی و غیر سوزنی رنگ شده و رنگ نشده و رسوبات سلولی را تشکیل می‌دهد است(۲).

مشخص شده که اکثر مواد آرشیوی برای نسخه برداری معکوس (RT) قطعه‌های 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). در نهایت نتیجه گرفته‌اند که مواد آرشیوی فیکس شده بافتی و نمونه‌های سیتولوژیک منابع با ارزشی برای تحقیقات مولکولی براساس RT-PCR می‌باشند(۴).

نمونه‌های دیگری نظیر بافت مخاطی دهان برای بیان ژن در سطح RNA (۵)، نمونه‌هایی از ملانوما متاستاتیک و کانسره‌های 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 اصولاً "نمونه‌های آرشیوی فیکس شده با فرمالین برای مطالعات مولکولار بیولوژی نمونه‌های ضعیفی شناخته می‌شوند زیرا از نظر قابلیت حل شدن توسط عوامل chaotropic مقاوم هستند. گرچه گفته شده است که پروتئیناز K کاملاً مواد فیکس شده را محلول کرده و تقریباً معادل نمونه تازه RNA را استخراج می‌کند(۷). همچنین در مطالعه‌ای DNA از بلوک‌های FFPE از نمونه‌های آماس گرانولومایی، گرانولوم جذام و توبرکولوز آتیپیک تهیه شد. نتیجه یافته‌های هیستولوژیک و ایمونوهیستوستو شیمیایی با نتایج PCR مقایسه گردید. در این مطالعه نمونه‌های جذام و توبرکولوز در 382bp

روش کار:

نمونه‌های اووسیست 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 اووسیست‌ها با عبور دادن از گاز چهار لایه بطور نسبی صاف شدند. سپس با فرمالین - اتر و محلول فسفات بافر تغلیظ شدند. بعد به کمک چگالی فیکول از سایر مواد زائد خالص سازی شدند. در پایان برای زدودن فرمالین، این نمونه‌ها 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 مجدداً سه بار با محلول فسفات بافر شست و شو شدند. خلوص نمونه‌ها با آزمایش میکروسکوپی تعیین گردید (۱۰).

برای متلاشی کردن اووسیست‌ها در ۳۰۰ میکرولیتر بافر لیز کننده (حاوی ۵۰ mM EDTA، ۱۰۰ mM Tris، ۲۵۰ mM سوکروز، و ۸ X100 /٪ شناور شده،

سختی هیبرید و پلیمر می گردد لکن در هر صورت انجام PCR غیر ممکن نیست.

بحث:

این مطالعه مستقیماً 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 نهایتاً جواب داد لکن با توجه به غلظت نسبتاً 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 کریپتوسپورییدیوزیس 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 از نظر ویروس استریل گردد تا خطر آلودگی پرسنل آزمایشگاه را نداشته باشد و سپس مورد آزمایش قرار گیرد (۱۵).

اغلب مطالعات انجام شده براساس PCR 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

شش بار متناوب با روش انجماد (۷۶- درجه ۱۰ دقیقه) و ذوب (آب جوش، ۲ دقیقه) دیواره اواوسیست ها شکسته شده و سپس مدت ۳ ساعت با ۵۰ میکرولیتر پروتئیناز K (۱۰ mg/ml) در دمای ۵۶ درجه انکوبه شدند و در نهایت 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 معمولاً 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. بدنال آن ۲۵ 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 نسبتاً واضحی تشکیل شده که با مقایسه با مارکر نوع کریپتوسپورییدیوم 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) کریپتوسپورییدیوم پارووم 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 اساساً نمونه های نامناسبی برای انجام PCR به روش معمول می باشند. اولاً شکستن و متلاشی نمودن نمونه برای استخراج مواد ژنتیکی بسیار دشوار، زمان بر و در برخی موارد غیر ممکن است. ثانیاً DNA استخراج شده نیز بسیار بسه

- 10-5.
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 DC, Tadesse WM. Immunomagnetic capture PCR to detect viable *Cryptosporidium parvum* oocysts from environmental samples. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65:3471-3474

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 semiquantative, nonradiative 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 reaction. *J Clin Biol Pathol* 1998; 1(1)

- 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. Comparison 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. Parameters affecting polymerase chain reaction detection of waterborne *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl Microbiol Biotechnol* 1997 : 48(3), 325-30.