ارمغان زاهدی
دکترطاهره ناجی

تشخیص پلاسمودیوم فالسیپاروم در نمونه ادرار و بزاق انسان با روش PCR

تشخیص فعلی یا غربالگری برای عفونت مالاریا مستلزم خون گیری از سرانگشت و یا خونگیری وریدی است که خطرات و محدودیت هایی را برای بررسی ایجاد می کند.این مطالعه روش PCR را در تشخیص پلاسمودیوم فالسیپاروم در نمونه ادرار و بزاق انسان نشان می دهد و روش PCR به عنوان یک روش کاربردی مناسب می باشد که ژنوتیپ عفونت های مالاریا را نشان می دهد.

کشورهای بومی به دنبال اتخاذ استراتژی های موثرتر و رژیم های درمانی برای کنترل مالاریا از طریق بخش های دولتی و خصوصی RBM هستند که بر اهمیت تشخیص و نظارت اپیدمیولوژیک تاکید می شود. با دانش موجود در چرخه زندگی انگل تشخیص یا غربالگری عفونت مالاریا از طریق نمونه گیری از انگشت صورت می گیرد. نیاز به خون گیری باعث بروز مشکلات دربرخی جوامع با تابوهای خون و شمار محدودیت برای اندازه گیری های مکرر همراه است به ویژه در کودکان که بیشترین درصد ابتلا به مالاریا را تشکیل می دهند.

این مطالعه در مجاورت موسسه مالاریا در Macha واقع در ۸۰ کیلومتری شمال Choma در استان جنوبی زامبیا انجام شد. جمعیت ساکن که۱۸۰۰۰۰ برآورد شده افراد و کشاورزانی از قبیله باتونگا بودند که افراد حاضر در تمام سنین مورد مطالعه قرار گرفتند.

پلاسمودیوم فالسیپاروم: گونه ای از مالاریا است که شیوع آن بیشتر در کشورهای فقیروگرمسیری و نیمه گرمسیری آفریقاست. انتقال مالاریا توسط پشه آنوفل از طریق بزاق پشه به پوست انسان تزریق می شود و بعد وارد جریان خون شده که در این مرحله اسپوروزویت نام دارد. بعد از طریق جریان خون به کبد رفته و به یک سلول کبد حمله می کند و تبدیل به شیزونت می شود. سپس ٤٠٠٠ مروزویت تولید می شود و این ها به گلبول های قرمز جدید حمله می کنند و در نهایت در اثر تجمع گلبول های قرمز باعث ایجاد انسداد در سیستم گردش خون می شود.

تکنیک PCR

واکنش زنجیره ای پلی مرازی که شامل سه مرحله است:

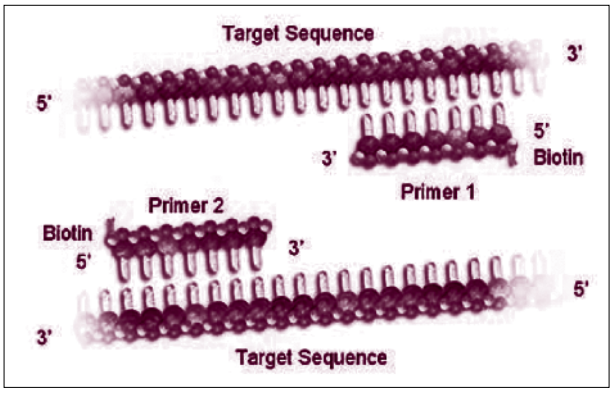
دناتوراسیون یا Denaturing: که در این مرحله دو رشته DNA از هم باز می شوند که این کار با حرارت بالای ۹۵ درجه سانتی گراد و به مدت پنج دقیقه انجام می شود.

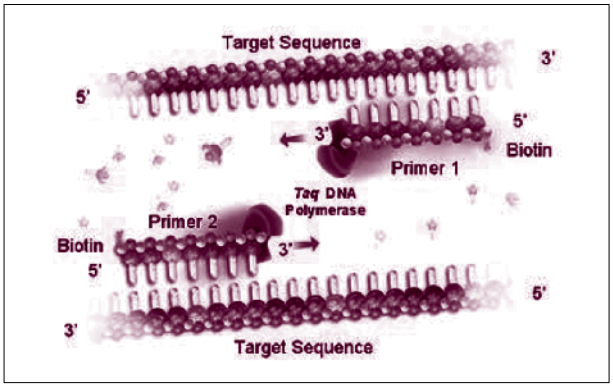
مرحله هیبرید یا دو رگه شدن یا Anneealing: مرحله ای که در آن دما را پایین می آورند تا پرایمرها به قسمت های مکمل خودشان متصل شوند که با دمای ۵۵ درجه سانتی گراد و سی ثانیه و سپس دمای ۷۲ درجه و سی دقیقه فعالیت می کند که این مرحله حدود سی بار تکرار می شود.

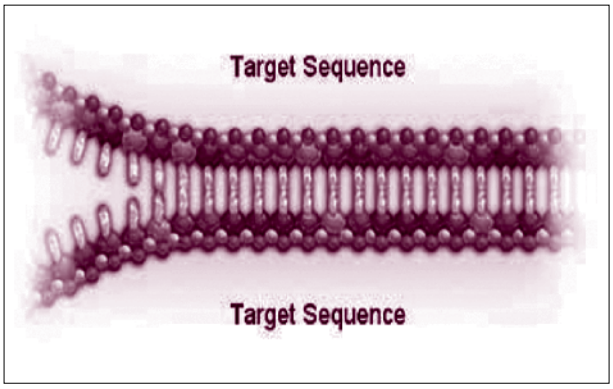
مرحله توسعه یافتن یا Extention: هدف این مرحله تکمیل رشته های نیمه ساخته شده است و دمای موردنیاز برای فعالیت آنزیم دمای ۷۲درجه سانتی گراد است.

پرایمر: قطعات ۱۸تا ۲۵ نوکلوتیدی هستند که به صورت تک رشته بوده و مکمل دو انتهای قطعه مورد نظر جهت انجام PCR است.

Nested PCR: برای مواقعی استفاده می شود که میزان DNA کم باشد. در این روش ابتدا با پرایمرهای اختصاصی که خارج از منطقه مورد نظر است میزان DNA را زیاد می کنند و سپس محصول PCR اول الگویی می شود برای PCR دوم که با پرایمر های اختصاصی انجام می شود.







طرح بحث

عفونت مالاریا ابتدا با تراکم کم از انگل مورد بررسی قرار گرفت با میانگین هندسی از ۷۷۵ انگل غیرجنسی/میکرولیتر. تطبیق منظمی از چند شکلی ژنوتیپ های Msp2 در نمونه ادرار پیدا شد. بزاق و تجمع سلول های خونی محیطی فرد دارای ژنوتیپ های متفاوت بین افراد مختلف بود.بازده محصول PCR به طور قابل توجهی به میزان DNA استخراج شده در این روش بستگی داشت.تراکم انگل و مجموعه پرایمر($P<0.001$) استخراج کیت و عملکرد محصول PCR بیش از دو برابر از روش Chelex برای هر دو نمونه ادرار و بزاق داشت.

عفونت پلاسمودیوم فالسیپاروم با روش PCR در مقیاس بزرگ غربالگری انگل مالاریا و بررسی های اپیدمیولوژیک می تواند بدون نیاز به جمع آوری خون و نمونه گیری به وسیله سوزن امکان پذیر است.

این مطالعه آینده نگر با این فرضیه که عفونت پلاسمودیوم فالسیپاروم قابل تشخیص با روش PCR از نمونه ادرار یا بزاق از میزبان انسانی انجام شد.و افراد در نقاط تعیین شده مرکزی برای غربالگری بیماری مالاریا توسط میکروسکوپ انتخاب شدند.

کاغذصافی واتمن (واتمن شماره۳MM) و یک لکه و نمونه خون با حفظ درجه حرارت زیر بغل و سابقه علایم در طی دو روز گذشته جمع آوری شد و اسلایدها مورد بررسی قرار گرفت. در MIAM روز بعد طیف ادرار و بزاق نمونه (۵ میلی لیتر) جمع آوری شد. از تمام افراد حاضر در لوله های استریل نمونه ادرار یا بزاق کامل پس ازآن به یک میلی لیتر تقسیم شد. تکرار مقدار در لوله های میکروسانتریفیوژ در آزمایشگاه و یا بلا فاصله استخراج و ذخیره شد برای استخراج بعدی در دمای منفی ۲۰ درجه نمونه خون اضافی نیز بر روی کاغذ فیلتر جمع آوری شد و از کاغذ صافی جداگانه برای ادرار و بزاق استفاده شد.

روش ها

نمونه ادرار و بزاق از ۵۱ نمونه که شامل ٤٧نمونه مثبت و٤ نمونه منفی از افراد گرفته شد و بعد از یک روز مجموعه ای از اسلاید های خون و لکه های خون از کاغذ فیلتر به دست آمد.

DNA پلاسمودیوم فالسیپاروم از خون–ادرار و بزاق استخراج شد و در گروه های جداگانه به روش Chelex و یا کیت Qiagen-DNAeasy (ادرار و بزاق تنها) قرار گرفت. نمونه های خون و ادرا و بزاق برای انجام PCR در دسته های جداگانه قرار گرفتند.انواع مختلف نمونه برای پلی مورفیسم Msp2 و الگو های قطعات محدود در اسیدآمینه DHFR کدون۵۹ مورد بررسی قرار گرفت. بازده محصول PCR به میزان ۱.٦ برابر بیشتر از ادرار بود.به ازای هر واحد افزایش در تراکم انگل احتمال افزایش ۱.۸ برابر محصول PCR وجود داشت.حداکثر بازده محصول PCR برای مجموعه پرایمر با کوتاه ترین محصول از PCR بدست آمد.

مجموع ادرار و بزاق (۱ میلی لیتر)در یک تیوپ

```
5′ ..GCAT...TTGG....//....GCGC...ATAT.. 3′
3′ ..CGTA...AACC....//....CGCG...TATA.. 5′
```

Figure 1. Nested PCR strategy. Segment of DNA with dots representing nondiscript DNA sequence of unspecified length. The double lines represent a large distance between the portion of DNA illustrated in this figure. The portions of DNA shown with four bases in a row represent PCR primer binding sites, though real primers would be longer.

```
5′ ..GCAT...TTGG....    ....GCGC...ATAT.. 3′
                                ←tata
      gcat→
3′ ..CGTA...AACC....    ....CGCG...TATA.. 5′
```

Figure 2. The first pair of PCR primers (blue with arrows) bind to the outer pair of primer binding sites and amplify all the DNA in between these two sites.

```
5′ GCAT...TTGG....//....GCGC...ATAT 3′
3′ CGTA...AACC....//....CGCG...TATA 5′
```

Figure 3. PCR product after the first round of amiplificaiton. Notice that the bases outside the PCR primer pair are not present in the product.

میکروسانتریفیوژ ۱.۵ میلی لیتر به مدت ۳ دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد. مایع رویی به میزان ۰.۱ میلی لیتر جدا شده و دور ریخته می شود و سپس محلول باقی مانده دوباره به حالت تعلیق در یک میلی لیتر محلول ماده موثر از PBS۱٪*۱ در دمای اتاق به مدت ۲۰ دقیقه باقی ماند و این مرحله مجدد انجام شد و پس از تخلیه مایع رویی سیستم تعلیق ۱۰۰ میکرو لیتر از Chelex۲۰٪ در اتوکلاو قرار داده شد. سپس مخلوط ۱۳ دقیقه جوشیده و در نهایت به مدت دقیقه جوشیده و در نهایت به مدت ۳ دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد. مایع رویی حاصل حاوی DNA با دقت به یک تیوپ میکروسانتریفیوژ منتقل شد در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی گراد.

استخراج کیت های تجاری: تمام ادرار یا نمونه بزاق بعد انجام سانتریفیوژ و دور ریختن مایع رویی DNA با استفاده از پروتکل خام طبق دستورالعمل کارخانه سازنده استخراج شد.

ژنوتیپی از پلاسمودیوم فالسیپاروم: ژنوتیپ در نمونه خون-ادرار و بزاق با استفاده از آغازگرهای خاص خانواده Nested PCR انجام شد.در این روش هضم آنزیمی توسط آنزیم محدود کننده برای اسیدآمینه DHFR در کدون ۵۹ انجام گرفت. مجموعه پرایمرهای اضافی شامل u۱-u۲/ u۳-u٤ که در دامنه DHFR قرار داشتند به دو صورت پرایمر اولیه کوتاه(۳۷۰bp) و پرایمر ثانویه(۲۲۹bp) طراحی شد.

برای هر دو حالت اولیه و ثانویه در واکنش Msp2 شامل مدت دو دقیقه دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه و به دنبال آن ۲۵ چرخه دناتوراسیون در ۹٤ درجه به مدت ٤۵ ثانیه و بعد مرحله آنالینگ به مدت ٤۵ ثانیه در ٦۱ درجه و مرحله اضافه شدن به مدت یک دقیقه در ٦۵ درجه و فرمت نهایی به مدت دو دقیقه در دمای ٦۵ درجه سانتی گراد بود.

پلی مورفیسم ها و الگوهای قطعات توسط الکتروفورز در ژل آگازر ۱.۵٪ قرار گرفت.

۱۲ میکرو لیتر از نمونه توسط اشعه uv مشاهده و محصول FC27 پس از آن در دو رشته برای هر نمونه لود شد.

ژنوتیپ MSP2 پلاسمودیوم فالسیپاروم در نمونه ادرار و بزاق:نمونه ادرار-بزاق و خون در دسته جداگانه با استفاده از پرایمرهای اختصاصی خانواده MSP۲ در Nested PCR قرار گرفتند و سپس در خطوط مجاور برای هر بیمار در طول الکتروفورز لود می شود.

نتایج

عملکرد محصول PCR با استفاده از روش استخراج DNA به طور قابل توجهی متفاوت است با درصد بازده متفاوت در بین مجموعه پرایمر.علاوه بر روش استخراج

```
5′ GCAT...TTGG....    ....GCGC...ATAT 3′
                            ←cgcg
          ttgg→
3′ CGTA...AACC....    ....CGCG...TATA 5′
```

Figure 4. Second pair of nested primers (red with arrows) bind to the first PCR product. The binding sites for the second pair of primers are a few bases "internal" to the first primer binding sites.

```
5′ TTGG....//....GCGC 3′
3′ AACC....//....CGCG 5′
```

Figure 5. Final PCR product after second round of PCR. The length of the product is defined by the location of the internal primer binding sites.

عملکرد محصول PCR به طور قابل توجهی وابسته به تراکم انگل و مجموعه پرایمر بود. به صورتی که به ازای هر واحد افزایش در ورود و تراکم انگل احتمال تقویت و افزایش ۱.۸ برابر وجود داشت.پرایمر DHFR از مجموعه u1 تا u4 بهترین موفقیت در تکثیر را داشتند. مطالعات حاضر نشان می دهد برای اولین بار است که عفونت پلاسمودیوم فالسیپاروم را می توان با استفاده از روش PCR در نمونه ادرار و بزاق انسان تشخیص داد. روش Nested PCR با پرایمر های خاص خانواده پلاسمودیوم فالسیپاروم و Msp2 نشان می دهد که عفونت تشخیص داده شده در نمونه بزاق و ادرار به طور منظم پیدا شده است که در ارتباط با خون محیطی فرد یکسان است. در عین حال در بیمار تغییرات چند شکلی Msp2 در نمونه مورد مطالعه مشهود بود. این یافته ها امکان رفع مشکل نمونه گیری خون و استفاده از سوزن را فراهم می کند و می توان با این روش غربالگری در مقیاس بزرگ و یا بررسی های اپیدمیولوژیک در رابطه با عفونت مالاریا را انجام داد.همچنین ژنوتیپ مولکولی در مطالعات بالینی و برنامه های نظارت بر اثر بخشی واکسن به مقدار زیادی تسهیل می شود.

واقعیت این است که این روش بیشتر در عفونت هایی که با تراکم کم انگل همراه است کاربرد بیشتری دارد. اصلاح روش استخراج DNA و به حداکثر رساندن بازده محصول PCR برای رسیدن به سطح مطلوب با نمونه های خون وجود دارد. همچنین جدا از میزان تراکم انگل روش و صحت استخراج DNA و طراحی پرایمر برای رسیدن به نتیجه ای مطلوب بسیار مهم است.

منابع:

1. Nabarro D: Roll back malaria.
Parassitologia 1999, 41:501-504. PubMed Abstract
2. Duffy EP, Mutabingwa TK: Rolling back malaria in epidemic South Africa.
PLOS Medicine 2005, 2:e368. PubMed Abstract | Publisher Full Text | PubMed Central Full Text
3. Barnes KI, Durrheim DN, Little F, A. J, Mehta U, Allen E, Dhlamini SS, Tsoka J, Bredenkamp B, Mthembu DJ, White NJ, Sharp BL: Efficacy of artemether-lumefantrine policy and inproved vector control on malaria burden in Kwazulu-Natal, South Africa.
PLOS Medicine 2005, 2:e330. PubMed Abstract | Publisher Full Text | PubMed Central Full Text
4. Ayala E, Lescano AG, Gilman RH, Calderon M, Pinedo VV, Terry H, Cabrera L, Vinetz JM: Polymerase chain reaction and molecular genotyping to monitor parasitological response to anti-malarial chemotherapy in the Peruvian Amazon.
Am J Trop Med Hyg 2006, 74:546-553. PubMed Abstract | Publisher Full Text
5. Brockman A, Paul RE, Anderson TJ, Hackford I, Phaiphun L, Looareesuwan S, Nosten F, Day KP: Application of genetic markers to the identification of recrudescent Plasmodium falciparum infections on the northwestern border of Thailand.
Am J Trop Med Hyg 1999, 60:14-21. PubMed Abstract | Publisher Full Text
6. WHO: Assessment and monitoring of antimalarial drug efficacy for the treatment of uncomplicated falciparum malaria. Geneva: World Health Organization; 2003.

طرح اشتراک نیم بها

eshterak.ir

معاونت مطبوعاتی و اطلاع رسانی وزارت فرهنگ و ارشاد اسلامی با همکاری شرکت پست و مجریان توزیع در بخش خصوصی با هدف گسترش فرهنگ مطالعه و حمایت از مطبوعات

طرح تخفیف اشتراک تا سقف ۵۰ درصد را اجرا می کند.

- تسهیلات برای اشتراک روزنامه ها و مجلات به ترتیب تا سقف ۵۰۰ و ۲۵۰۰ تومان به ازای هر نسخه
- هزینه ارسال عادی از مشترک دریافت نمی شود.
- برای ثبت اشتراک کافی است به سایت eshterak.ir مراجعه نمایید.
- تاکنون بالغ بر یکصد و پنجاه نشریه به این طرح پیوسته اند.
- افزایش قیمت نشریه در طول دوره اشتراک مشمول مشترکان قبلی نمی شود.

(اشتراک نشریات در این مرحله صرفا در تهران پذیرفته می شود)