مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی
دوره ۱۲، شماره ۲: از ۵۱-۵۹
تابستان ۱۳۸۸

تشخیص دو گونه بورلیا میکروتی و بورلیا پرسیکا عوامل تب راجعه با روش PCR-RFLP و آغازگرهای اختصاصی

نیره چوبدار[۱]، جواد رفیع‌نژاد[۲]، نورایر پیازک[۳]، زکیه تلمادره‌ای[۴]، فاطمه محترمی[۱]، محمدعلی عشاقی[۲*]

۱- کارشناس ارشد، گروه حشره‌شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی تهران، تهران، ایران
۲- دانشیار، گروه حشره‌شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی تهران، تهران، ایران
۳- استادیار، بخش انگل‌شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۴- استادیار، گروه حشره‌شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی تهران، تهران، ایران

دریافت مقاله: ۸۸/۰۲/۲۸ پذیرش مقاله: ۸۸/۰۶/۰۷

چکیده

هدف: در این مطالعه کارآیی روش مولکولی PCR-RFLP و PCR اختصاص به گونه به‌عنوان روش‌های نوین و سریع برای تعیین آلودگی نمونه‌های خون آلوده به بورلیا پرسیکا و بورلیا میکروتی عوامل تب راجعه بررسی شد.
مواد و روش‌ها: DNA بورلیا از خون حاوی بورلیا پرسیکا و بورلیا میکروتی با پارازیتمی بالا استخراج شد و به کمک آغازگرهای اختصاصی مناطق حفاظت شده دو ژن مختلف GlpQ و 16S rDNA تکثیر و تعیین توالی شد؛ سپس برای افتراق بین دو گونه نقشه فیزیکی و محل برش آنزیمی روی مولکول DNA هر گونه تعیین و نشانگرهای مولکولی مورد نظر شناسایی شد. سپس کارایی آنزیم‌های برش‌دهنده انتخابی در واکنش‌های PCR-RFLP برای تفکیک و شناسایی دو گونه از همدیگر بررسی شدند. همچنین با توجه به اختلافات موجود در توالی ژن GlpQ آغازگرهای اختصاص به گونه برای تشخیص دو گونه طراحی و آزمایش شدند.
نتایج: نتایج مطالعه نشان داد که روش PCR می‌تواند آلودگی را به‌خوبی در نمونه‌های خون آلوده مشخص نماید. به‌دنبال PCR، آنزیم‌های *Dra*I، *Hinf*I، *Eco*RI، *Ssp*I، *Taq*I برای ژن GlpQ و آنزیم *Taq*I برای ژن 16S rDNA قادرند دو گونه بورلیا پرسیکا و بورلیا میکروتی را از هم تفکیک نمایند. همچنین با آغازگرهای اختصاصی ژن GlpQ، جفت آغازگر 795r و BMGLPF محصول PCR اختصاصی برای بورلیا میکروتی به‌طول ۴۵۱ جفت‌باز و جفت آغازگر 128f و BPGLPR محصول اختصاصی برای بورلیا پرسیکا به‌طول ۲۵۲ جفت‌باز تولید می‌کنند که تشخیص دو گونه را امکان‌پذیر می‌سازد.
نتیجه‌گیری: در این مطالعه روش PCR-RFLP و PCR با آغازگرهای اختصاصی برای نخستین بار برای تمایز دو گونه بورلیا میکروتی و بورلیا پرسیکا استفاده شد. آغازگرهای اختصاصی (BMGLPF/R) این مطالعه و PCR-RFLP بسیار خوب عمل نموده و با توجه به سرعت و دقت بالای آن‌ها می‌توانند جایگزین روش کلاسیک و وقت‌گیر تعیین آلودگی و تشخیص این دو گونه شوند و برای استفاده در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی ایران و سایر مناطق آلوده در خاورمیانه توصیه شود.

کلیدواژگان: بورلیا پرسیکا، بورلیا میکروتی، PCR با آغازگر اختصاص به گونه، PCR به‌همراه آنزیم‌های هضم‌کننده، ایران

***نشانی مکاتبه:** تهران، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، گروه حشره شناسی پزشکی، صندوق پستی: ۱۴۱۵۵-۶۴۴۶
Email: moshaghi@sina.tums.ac.ir

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-15]

۱- مقدمه

بورلیاها (*Borrelia spp.*) دسته‌ای از باکتری‌ها با پیکره نازک و نرم و فنری شکل هستند که طول آنان ۸-۳۰ میکرون و قطرشان ۰/۲-۰/۸ میکرون است [۱، ۲]. حرکت آن‌ها توسط تاژک‌هایی که تحت فرمان مراکز حرکتی بوده و در حد فاصل جدار داخلی و خارجی میکروب است، صورت می‌گیرد [۳]. تعداد تاژک از مهم‌ترین خصوصیت طبقه‌بندی گونه‌های بورلیاست.

گونه‌های مختلف بورلیا در طبیعت به‌صورت مستقل و آزاد یافت نشده بلکه زندگی خارج سلولی داشته و در مایعات بدن میزبان مهره‌دار (پلاسما، مایع بین‌سلولی و مایع نخاعی) و مایع همولنف میزبان بی‌مهره زیست کرده و توسط برخی از بندپایان خون‌خوار به مهره‌داران منتقل می‌شوند [٤، ٥].

حضور باکتری‌ها در خون حیوانات مبتلا به بورلیوزیس (Borreliosis) کوتاه بوده و در هنگام ساخت آنتی‌کور برعلیه تمام آنتی‌ژن‌های متغیر بورلیا، آن‌ها محیط خون را ترک و در بافت مغزی ماندگار شده و با وجود نبودن نشانه‌ای از بورلیا در خون، تا مدت‌ها پس از آخرین تب و بهبودی هنوز بورلیا در بافت مغز وجود دارد [۱]. مدت ماندگاری بورلیا در مغز بسته به نوع حیوان و گونه بورلیا متفاوت است [٦].

طبقه‌بندی بورلیا براساس قدرت بیماری‌زایی آن در حیوانات حساس آزمایشگاهی و شناخت مخازن و ناقلین متفاوت بوده و شامل بورلیاهای منتقل شده به‌وسیله شپش‌ها، کنه‌های سخت و کنه‌های نرم است [٥].

بورلیاهای منتقل شده توسط کنه‌های نرم جنس ارنیتودوروس (*Ornithodoros*) بین ۲۵-۲۸ گونه هستند که ۱۲ گونه از آن‌ها به‌عنوان عوامل تب راجعه انسانی شناخته شده‌اند [۱]. بورلیا پرسیکا (*Borrelia persica*) مهم‌ترین و شایع‌ترین عامل تب‌های بازگرد کنه‌ای (Tick Borne Relapsing Fever) در کشورهای خاورمیانه از جمله بخش‌های زیادی از کشور ایران (استان‌های آذربایجان شرقی و غربی، اردبیل، کردستان، همدان و زنجان) است [۷، ۸]. از دیگر عوامل تب‌های بازگرد کنه‌ای در ایران بورلیا میکروتی (*B.microtii/microtti*) است که توسط کنه اورنیتودوروس اراتیکوس (*O.erraticus*) نگهداری و منتقل می‌شود ولی بیماری ناشی از آن خفیف‌تر از بیماری ناشی از بورلیا پرسیکا است [۹، ۱۰].

تب راجعه کنه‌ای بیماری حاد عفونی است که توسط این میکروارگانیسم ایجاد می‌شود. سیر بیماری شامل حملات متناوب تب است که با فواصل چند روزه بدون تب از هم متمایز می‌شوند و عوارضی چون درگیری کبد، کلیه و دردهای عضلانی را به‌همراه دارد، مهم‌ترین عارضه ایجاد شده، عوارض عصبی است که شامل فلج چشم، منتژیت، فلج نصف بدن، آنسفالیت و درگیری اعصاب نخاعی است. یکی از مشکلات موجود در رابطه با این بیماری عدم تعیین آلودگی با توجه به علایم بالینی است [٥].

شناسایی گونه بورلیا به‌طور متداول با تزریق انگل به حیوان حساس آزمایشگاهی و بررسی میکروسکوپی خون حیوان پس از ۷-۱۰ روز انجام می‌شود که بسیار ناکارامد و طولانی مدت است و امکان چنین آزمایشی در آزمایشگاه‌های مراکز بهداشتی مناطق بومی و آزمایشگاه‌های تشخیص طبی وجود ندارد. همچنین با توجه به طولانی بودن زمان آزمایش، عدم ایجاد آلودگی در حیوان آزمایشگاهی در صورت کم بودن میزان اسپیروکت (Spirokeet) و موارد منفی اشتباه (False-negative) امروزه از روش‌های جایگزین به‌ویژه روش‌های مولکولی PCR استفاده می‌شود [۱۱-۱۳].

در این مطالعه کارایی روش تشخیص مولکولی PCR به کمک آغازگرهای (Primers) اختصاص به گونه و نیز روش PCR-RFLP (PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism)، امکان شناسایی گونه بورلیا پرسیکا از بورلیا میکروتی بررسی شد. این مطالعه برای اولین بار در دنیا در زمینه شناسایی افتراق بین بورلیا پرسیکا و بورلیا میکروتی انجام شده است.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-15]

۲- مواد و روش‌ها

خون خوکچه هندی حاوی بورلیا پرسیکا و خون نوزاد خرگوش حاوی بورلیا میکروتی با پارازیتمی (Parasitemia) بالا از بخش انگل‌شناسی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. DNA بورلیا با روش کیت Bioneer (کره جنوبی) استخراج شد. با استفاده از واکنش‌های PCR استاندارد مناطق حفاظت شده ژن GlpQ (Glycerophosphodiester phosphodiesterase) و بخشی از ژن رایبوزومال DNA (16S rDNA) به کمک آغازگرهای اختصاصی جنس بورلیا که قادرند تمام گونه‌های جنس بورلیا را تکثیر نمایند، انجام شد [۱۲، ۱۳].

آغازگر جلودار (REC 4) با توالی 5′-ATGCTAGAAACTGCATGA-3′ و آغازگر عقب‌دار (REC 9) دارای توالی 5′-TCGTCTGAGTCCCCATCT-3′ است. این آغازگرها اختصاصی جنس بورلیا بوده و قطعه‌ای به‌طول ۵۲۳ جفت‌باز از بخش 16S ژن رایبوزومال بورلیا را تکثیر می‌نمایند.

به‌منظور تکثیر ژن GlpQ از دو جفت آغازگر 128f & 340r و 128f & 795r استفاده شد.

آغازگرجلودار (128f) با توالی 5′-CAGAACATACCTTAGAAGCTCAAGC-3′ و آغازگرهای عقب‌دار (340r) و (795r)؛ به‌ترتیب دارای توالی‌های 5′-GTGATTTGATTTCTGCTAATGTG-3′ و 5′-GGGTATCCAAGGTCCAT-3′ است. آغازگرهای 128f و 795r قطعه‌ای به‌طول ٦٦٨ جفت‌باز و آغازگرهای 128f و 340r قطعه‌ای به‌طول ۲۱۲ جفت‌باز از ژن GlpQ انواع بورلیا را تکثیر می‌نمایند.

برای انجام واکنش PCR از کیت Bioneer (کره جنوبی) استفاده شد که حاوی تمامی مواد لازم برای انجام واکنش بوده و تنها به میزان ۱۰-۲۰ پیکومول از آغازگرهای Rec9 & Rec4 یا ۱۰-۲۰ پیکومول از آغازگرهای 128f، 795r و 340r، و ۱ میکروگرم از نمونه DNA (معادل حدود ۵ میکرولیتر از ۱۰۰ میکرولیتر DNA استخراج شده) به آن افزوده شده و حجم کلی با استفاده از آب مقطر دوبار تقطیر شده (ddH_2O) به ۲۰ میکرولیتر رسید. سپس واکنش PCR در دستگاه ترموسایکر طبق برنامه حرارتی مربوط به هر آغازگر انجام شد و DNA ژن‌های هدف تکثیر شد. نمونه‌هایی از دو ژن تکثیر شده از هر گونه برای تعیین توالی به آلمان ارسال شدند.

۲-۱- تعیین نوع گونه بورلیا با PCR-RFLP و آغازگرهای اختصاصی

برای افتراق بین دو گونه بورلیا، پس از تعیین توالی ژن 16S rDNA و GlpQ بورلیا میکروتی و پرسیکا، با استفاده از نرم‌افزار Nubcutter (http:/tools.neb.com/nebcutter) نقشه فیزیکی و محل برش آنزیمی روی مولکول DNA هر گونه تعیین و نشانگرهای (Markers) مولکولی مورد نظر شناسایی شد. از میان آنزیم‌های پیشنهادی نرم‌افزار Nebcutter آنزیم‌های *Taq*I، *Ssp*I، *Eco*RV، (*Eco*321)، *Hinf*I، *Dra*I (*Aha*III) برای ژن GlpQ و آنزیم *Taq*I برای ژن 16S rDNA انتخاب شدند. سپس با کمک واکنش RFLP و به‌کارگیری آنزیم‌های برش‌دهنده شناسایی شده دو گونه از همدیگر تفکیک و شناسایی شدند. به‌طور کلی بسته به کیفیت محصول PCR بین ۱۰-۱۵ میکرولیتر محصول PCR با ۲/۵ میکرولیتر بافر توصیه شده (بافر R برای آنزیم‌های *Taq*I، *Eco*RV و *Hinf*I، بافر G برای آنزیم *Ssp*I و بافر B برای آنزیم *Dra*I) و ۵ واحد (۱ میکرولیتر) آنزیم مربوط مخلوط و با آب مقطر دوبار تقطیر شده، حجم به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. برای جلوگیری از تبخیر مخلوط یک قطره روغن معدنی به لوله آزمایش اضافه شده و بسته به نوع آنزیم در حرارت مناسب (همه آنزیم‌های فوق در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و آنزیم *Hinf*I در ٦٥ درجه سانتی‌گراد) داخل انکوباتور به‌مدت

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-15]

٦-١٢ ساعت (شب تا صبح) نگهداری شدند. سپس ١٥ میکرولیتر محصول واکنش PCR-RFLP در ژل آگارز ٢ درصد حاوی اتیدیوم بروماید (Ethidium bromide) الکتروفورز شده و نتایج به کمک دستگاه عکاسی (Gel documentary) تصویربرداری شد. نتایج واکنش PCR-RFLP به کمک نشانگر مولکولی ١٠٠ جفت بازی (CinnaGen، ایران) مقایسه و اندازه‌گیری شد.

همچنین برای طراحی آغازگر اختصاصی تفکیک کننده دو گونه، توالی ژن 16S rDNA و GlpQ بورلیا میکروتی و پرسیکا را مقایسه نموده و با توجه به اختلافات موجود در دو گونه، طراحی آغازگر انجام گرفت.

براساس اختلافات مشاهده شده در بخشی از ژن GlpQ بورلیا میکروتی و بورلیا پرسیکا یک آغازگر جلودار به‌نام BMGLPF با توالی 5′-CCTTAGCGAAAGATTTGATCCT-3′ طراحی شد که با کمک آغازگر یونیورسال (Universal) عقب‌دار 795r برای نمونه‌های دو گونه آزمایش شد. همچنین یک آغازگر عقب‌دار به‌نام BPGLPR با توالی 5′-GCTGGGTCTTTGTTTTTTTGG-3′ طراحی شد که به‌صورت جفت با آغازگر یونیورسال جلودار 128F برای نمونه‌های دو گونه آزمایش شد.

بررسی توالی ژن 16S rDNA دو گونه پرسیکا و میکروتی نشان داد که این دو گونه در این بخش از ژن تنها در شش موقعیت اختلاف دارند و بر این اساس دو آغازگر اختصاصی BP16SF و BM16SR طراحی شد به‌طوری که آغازگر جلودار به‌نام BP16SF با توالی 5′-ACACTTGGTGTTAATTGAGAGA-3′ با آغازگر یونیورسال عقب‌دار Rec9 و آغازگر عقب‌دار BM16SR با توالی 5′-TCGTCTGAGTTCCCATCT-3′ با کمک آغازگر یونیورسال جلودار Rec4 به‌صورت جفت جفت برای نمونه‌های دو گونه آزمایش شدند.

٣- نتایج

٣-١- نتایج واکنش PCR-RFLP در ژن GlpQ برای تفکیک بورلیا میکروتی از بورلیا پرسیکا

آنزیم‌های هضم‌کننده انتخاب شده از بین آنزیم‌های پیشنهادی نرم‌افزار Nebcutter نشان داد که تفکیک دو گونه بورلیا پرسیکا و بورلیا میکروتی به کمک واکنش‌های PCR-RFLP امکان‌پذیر است.

آنزیم *Dra*I در بخش تکثیر شده ژن GlpQ گونه بورلیا میکروتی جایگاهی ندارد ولی در بورلیا پرسیکا روی جایگاه‌های ٢٩٠ و ٤٢٤ جفت‌باز، دو جایگاه برش وجود دارد، بدین ترتیب محصول PCR گونه بورلیا پرسیکا به‌طول ٦٦٨ جفت‌باز به سه قطعه با طول ١٤٩، ٢٢٦ و ٢٩٣ جفت‌باز شکسته می‌شود.

آنزیم *Hin*fI در بخش تکثیر شده ژن GlpQ بورلیا میکروتی جایگاهی ندارد ولی در بورلیا پرسیکا در موقعیت ٢٢٨ جفت‌باز دارای یک جایگاه برش است همین امر موجب می‌شود تا محصول PCR به‌طول ٦٦٨ جفت‌باز به دو قطعه با طول ٢٢٩ جفت‌باز و ٤٣٩ جفت‌باز تبدیل شود.

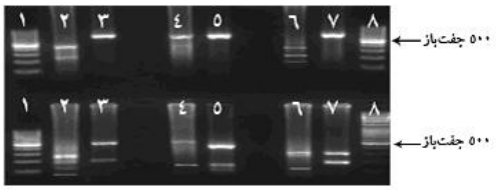
آنزیم *Taq*I در موقعیت ١٨٤ جفت‌باز ژن GlpQ از بورلیا میکروتی دارای یک جایگاه برش است و موجب تبدیل محصول PCR به‌طول ٦٦٨ جفت‌باز به دو قطعه با طول ١٨٤ جفت‌باز و ٤٨٤ جفت‌باز می‌شود؛ در حالی‌که جایگاه برش این آنزیم در بورلیا پرسیکا روی موقعیت‌های ١٥٦، ٢٢٣، ٤٤٩ جفت‌باز است و موجب تبدیل محصول PCR به چهار قطعه با طول ٧٧ ، ١٥٦، ١٩٤ و ٢٦١ جفت‌باز می‌شود.

آنزیم *Eco*RV در بورلیا میکروتی دارای دو جایگاه برش روی ژن GlpQ در موقعیت ٨٦ جفت‌باز و ٥٣٤ جفت‌باز است و موجب تبدیل محصول PCR به‌طول ٦٦٨ جفت‌باز به سه قطعه با طول ٨٦، ١٨٤ و ٤٤٨ جفت‌باز می‌شود؛ در حالی‌که جایگاه برش این آنزیم در بورلیا پرسیکا فقط در موقعیت

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-15]

۵۳٤ جفت‌باز است و موجب تبدیل محصول PCR به دو قطعه با طول ۱۳٤ جفت‌باز و ۵۳٤ جفت‌باز می‌شود.

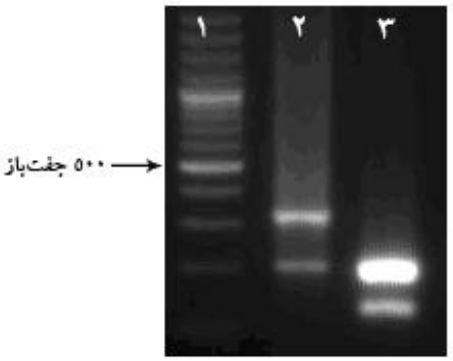
آنزیم *Ssp*I در ژن GlpQ بورلیا میکروتی دارای دو جایگاه برش در موقعیت ۱۷٤ و ۳۵۸ جفت‌باز است و موجب تبدیل محصول PCR به‌طول ٦٦۸ جفت‌باز به سه قطعه با طول ۱۷٤، ۱۸۵ و ۳۰۹ جفت‌باز می‌شود (در تصویر به دلیل نزدیک بودن باند ۱۷٤ و ۱۸۵ جفت‌باز هر دو باند یکی دیده می‌شود) در حالی‌که جایگاه برش در ژن GlpQ بورلیا پرسیکا در موقعیت‌های ۸٦ و ۳۵۸ جفت‌باز بوده و موجب تبدیل محصول PCR به‌طول ٦٦۸ جفت‌باز به سه قطعه با طول ۸٦، ۲۷۲ و ۳۰۹ جفت‌باز می‌شود (شکل ۱).



شکل ۱ الکتروفورز محصول PCR-RFLP ژن GlpQ در بورلیا پرسیکا **(ستون‌های ۲، ٤ و ٦)** و بورلیا میکروتی **(ستون‌های ۳، ۵ و ۷)**؛ به‌ترتیب ردیف بالا توسط آنزیم *Hinf*I (**ستون ۲:** ۲۲۹ و ٤۳۹ جفت‌باز، **ستون ۳:** ٦٦۸ جفت‌باز)، PCR هضم نشده (**ستون‌های ٤ و ۵:** ٦٦۸ جفت‌باز)، *Dra*I (**ستون ٦:** ۱٤۹، ۲۲٦ و ۲۹۳ جفت‌باز، **ستون ۷:** ٦٦۸ جفت‌باز)، و ردیف پایین *Taq*I (**ستون ۲:** ۷۷، ۱۵٦، ۱۹٤ و ۲٦۱ جفت‌باز، **ستون ۳:** ۱۸٤ و ٤۸٤ جفت‌باز)، *Eco*RV (**ستون ٤:** ۱۳٤ و ۵۳٤ جفت‌باز، **ستون ۵:** ۸٦، ۱۸٤ و ٤٤۸ جفت‌باز،) و *Ssp*I (**ستون ٦:** ۸٦، ۲۷۲ و ۳۰۹ جفت‌باز، **ستون ۷:** ۱۷٤، ۱۸۵ و ۳۰۹ جفت‌باز،)، **ستون‌های ۱ و ۸** نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت‌بازی MWM (طول باندهای نشانگر ۱۰۰ باز با هم اختلاف دارند)

۳-۲- نتایج واکنش PCR-RFLP در ژن 16S rDNA برای تفکیک بورلیا میکروتی از بورلیا پرسیکا

آنزیم *Taq*I در موقعیت ۲۰۵ و ۳۲٤ جفت‌باز محصول PCR ژن 16S rDNA بورلیا میکروتی دارای دو جایگاه برش است و موجب تبدیل محصول PCR به‌طول ۵۲۳ جفت‌باز به سه قطعه با طول ۱۱۹، ۱۹۹ و ۲۰۵ جفت‌باز می‌شود در حالی‌که جایگاه برش در بورلیا پرسیکا فقط در موقعیت ۳۲٤ جفت‌باز بوده و موجب تبدیل محصول PCR به دو قطعه با طول ۳۲٤ و ۱۹۹ جفت‌باز می‌شود (شکل ۲).

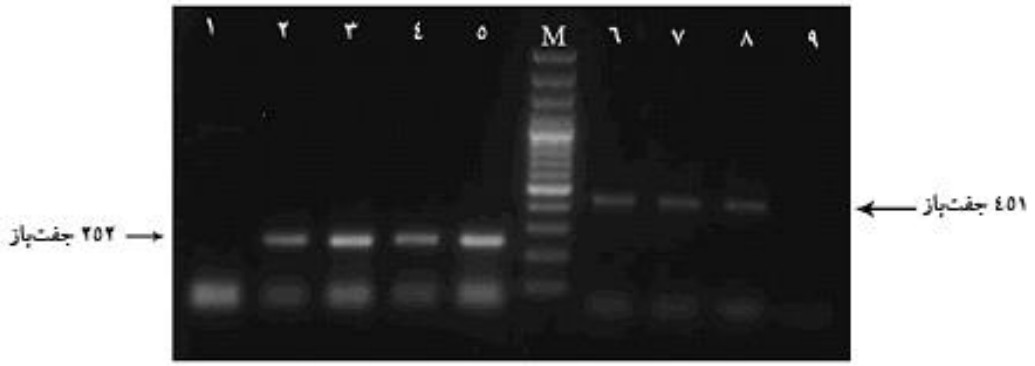


شکل ۲ الکتروفورز محصول PCR-RFLP بخشی از ژن 16SrDNA به‌طول۵۲۳ جفت‌باز در بورلیا پرسیکا **(ستون ۲)** و بورلیا میکروتی **(ستون ۳)** توسط آنزیم *TaqI*؛ این آنزیم محصول PCR مربوط به بورلیا پرسیکا را به دو قطعه ۳۲٤ و ۱۹۹ جفت‌بازی تبدیل می‌کند؛ در حالی‌که محصول PCR مربوط به بورلیا میکروتی را به سه قطعه ۱۱۹، ۱۹۹ و ۲۰۵ جفت‌بازی تقسیم می‌نماید. **ستون ۱)** نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت‌بازی MWM است.

۳-۳- طراحی آغازگرهای اختصاصی برای تشخیص بورلیا میکروتی و بورلیا پرسیکا

جفت آغازگر BMGLPF & 795r اختصاصی ژن GlpQ بورلیا میکروتی بوده و محصول PCR به‌طول ٤۵۱ جفت‌باز تولید می‌نماید ولی هیچ باندی برای بورلیا پرسیکا تولید نمی‌نماید. همچنین جفت آغازگر BPGLPR & 128f در ژن GlpQ بورلیا پرسیکا اختصاصی عمل کرده و تولید باندی به‌طول ۲۵۲ جفت‌باز نموده است؛ در صورتی که در بورلیا میکروتی باندی مشاهده نشد (شکل ۳).

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-15]



شکل ۳ الکتروفورز محصول PCR آغازگر اختصاصی بورلیا میکروتی و بورلیا پرسیکا در ژن GlpQ، الکتروفورز محصول PCR ستون‌های ۲-۵ مربوط به آغازگر اختصاصی بورلیا پرسیکا (به‌طول ۲۵۲ جفت‌باز) و ستون‌های ٦-۸ مربوط به آغازگر اختصاصی بورلیا میکروتی (به‌طول ٤٥١ جفت‌باز) است. ستون‌های ۱ و ۹ نمونه‌های بورلیا پرسیکا و بورلیا میکروتی است که با آغازگرهای اختصاصی گونه مقابل کار نکرده‌اند، **M** نشانگر ۱۰۰ جفت‌بازی MWM است.

نتایج واکنش‌های PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن 16S rDNA نشان داد که تنها جفت آغازگر Rec9 و BP16S برای بورلیا پرسیکا به‌خوبی عمل کرده و یک باند به‌طول ۳۲۰ جفت‌بازی اختصاصی تولید می‌نماید؛ اما این جفت آغازگرها برخلاف انتظار، باندهای غیراختصاصی به‌طول ۵۰۰ جفت‌باز و باندهای ضعیف‌تر به‌طول بیشتر از ۵۰۰ جفت‌باز برای میکروتی تولید می‌نماید. اگرچه باندهای ایجاد شده برای دو گونه فوق کاملاً متفاوت است، اما می‌تواند به‌عنوان یک روش برای شناسایی دو گونه از هم، استفاده شود. با این حال چون باندهای ایجاد شده برای میکروتی باندهای غیرقابل انتظار بوده‌اند، توصیه‌ای برای استفاده از این جفت آغازگر نمی‌شود. جفت آغازگر دوم این ژن (Rec4 & BM16S) که برای میکروتی طراحی شده بودند، نیز خوب عمل نکردند.

٤- بحث

افتراق گونه بورلیا پرسیکا از بورلیا میکروتی به کمک آغازگرهای اختصاصی و واکنش‌های RFLP به کمک آنزیم‌های برش‌دهنده *Taq*I، *Dra*I، *Ssp*I، *Eco*RV و *Hinf*I که طی این مطالعه معرفی شدند، برای اولین بار در جهان گزارش می‌شود.

در طراحی آغازگرهای اختصاصی مشخص شد که آغازگرهای طراحی شده روی ژن GlpQ بهتر از آغازگرهای طراحی شده بر ژن 16S rDNA عمل می‌کنند. علت این امر این است که اختلافات ژنتیکی بین دو گونه مورد نظر در ژن GlpQ بسیار بیشتر از 16S rDNA است. آغازگرهای طراحی شده از روی بخش داخلی ژن GlpQ انتخاب شده‌اند و اختصاص به دو گونه بورلیا پرسیکا و بورلیا میکروتی دارند. در واقع این آغازگرها حالت Semi-nested PCR نسبت به آغازگرهای طراحی شده قبلی توسط هالپرین (Halperin) و همکاران [۱۳] دارند. نتایج این مطالعه نشان دادند که آغازگرهای طراحی شده به‌خوبی سایر آغازگرهای طراحی شده توسط سایر محققین مانند راس (Ras) و همکاران [۱۲] عمل می‌کنند. تفاوت اصلی آغازگرهای طراحی شده کنونی با آغازگرهای محققین قبلی در اختصاصی بودن آن‌ها است به‌طوری که آغازگرهای قبلی برای تشخیص انواع بورلیاها بدون توجه به گونه آن‌ها کاربرد دارند؛ در حالی‌که آغازگرهای جدید برای تشخیص دو گونه بورلیا پرسیکا و بورلیا میکروتی کاربرد دارند. لازم به یادآوری است که در این مطالعه آغازگرهای اختصاصی و آنزیم‌های قطع‌کننده اختصاصی فقط در مورد دو گونه موجود در ایران آزمایش شدند و ممکن است در

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-15]

صورت افزودن سایر بورلیاهایی که قبلاً در ایران گزارش شده‌اند مانند بورلیا بالتازاردی (*B.baltazardi/bartarzardi*)، بورلیا لاتیشه‌وی (*B.latyschewii/latshywii*) و بورلیا کوکاسیکا (*B.caucasica*) [۵، ١٤]، جواب‌های اختصاص به گونه حاصل نشود. این موضوع بایستی با افزودن سایر بورلیاها در آزمایش بررسی شود.

آن‌چه مسلم است این که در محیط جغرافیایی ایران و سایر کشورهای مشابه که این دو گونه بورلیا به‌صورت گونه غالب وجود دارند [۹، ۱۰]، آغازگرهای اختصاصی این مطالعه و PCR-RFLP بسیار خوب عمل می‌نماید و می‌تواند قابل توصیه در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی به‌عنوان الگوی مناسب و آسانی برای تشخیص بیماری تب راجعه در افراد تب‌دار مشکوک باشد.

تشخیص بورلیاها در کنه‌ها براساس نوع کنه ناقل تا حدود زیادی امکان‌پذیر است زیرا اساساً بورلیاهای مختلف با کنه‌ها یا بندپایان خاصی سازش پیدا کرده‌اند. مثلاً بورلیا پرسیکا توسط کنه‌های نرم اورنیتودوروس تولوزانی (*O.tholozani*) و بورلیا میکروتی توسط کنه‌های اورنیتودوروس اراتیکوس منتقل می‌شوند؛ این خود اساس تشخیص بورلیا در مناطق مختلف است [۱، ۵]. اساس این روش تطابق ذاتی بین ناقل خاص و گونه بورلیای خاص است و در هر منطقه‌ای نوع کنه با نوع گونه بورلیا سازگاری اختصاصی پیدا کرده‌اند. بر این اساس فاکتورهای ۱- گونه کنه ۲- منطقه جغرافیایی مورد مطالعه ۳- نوع حیوان آزمایشگاهی مورد استفاده برای تشخیص آلودگی در روش گزنودیاگنوزیس (Xenodiagnosis) و ٤- انتقال تجربی بورلیا توسط بندپایان مختلف استفاده می‌شود [۵].

همچنین در این مطالعه با استفاده از روش مولکولی PCR برای اولین بار در دنیا بخشی از دو ژن 16S rDNA و GlpQ متعلق به بورلیا میکروتی تعیین توالی شد و اطلاعات مربوط به این گونه اولین گزارشی است که در بانک جهانی ژن‌ها با شماره‌های دسترسی EU914141-EU914144 ارایه شده‌اند.

در گذشته از روش‌های مختلفی مانند کشت باکتری در محیط کشت اختصاصی (Kelly) و آزمون‌های سرولوژی برای تشخیص بورلیاها استفاده می‌شد. کشت و جداسازی بورلیاها حدود ۲۱ روز طول می‌کشد و از طرف دیگر روش سرولوژی که زمان کمتری لازم دارد معمولاً دارای جواب‌های مثبت کاذب زیادی است. روش میکروسکوپی که در هنگام تب و در روزهای اولیه حمله بیماری قابل انجام است با تهیه اسلاید نازک و ضخیم خون و بررسی با میکروسکوپ زمینه سیاه یا بعد از رنگ‌آمیزی با گیمسا (Giemsa) به کمک میکروسکوپ معمولی انجام می‌گیرد [۱۵، ١٦]. روش میکروسکوپی در فواصل تب یا هنگامی که بیماری غیرمعمول یا با شدت کم بروز می‌کند به‌علت میزان کم و ناچیز باکتری در خون ناکارامد است. بررسی‌های کیفی فلورسنس بافیکوت (Quantitative Buffy Coat: QBC) نیز یک روش اختصاصی و حساس برای تشخیص بورلیا در انسان معرفی شده است [۱۷]. روش تزریق به موش حساس آزمایشگاهی نیز از روش‌های مرسوم محسوب می‌شوند [۵]. به هر حال هیچ‌کدام از این روش‌ها حساسیت و دقت روش‌های مولکولی را نداشته و عموماً کند و زمان‌گیر هستند [۱۱].

یکی از مشکلات مربوط به بیماری تب راجعه مربوط به مناطقی است که بیماری مالاریا نیز در منطقه مورد مطالعه وجود دارد. چون هر دو بیماری با عوارض تب مشخص می‌شوند اغلب به اشتباه بیماری مالاریا تشخیص داده شده و بیمارتحت درمان مالاریا قرار می‌گیرد [۱۰، ۱۸، ۱۹].

بنابراین روش‌های مولکولی ارائه شده به‌ویژه روش‌های ارائه شده در این مطالعه می‌تواند در تشخیص سریع و دقیق عامل بیماری به‌کار گرفته شوند و با تشخیص سریع و دقیق، بیمار به سرعت و صحیح مورد درمان قرار گیرد.

۵- تشکر و قدردانی

دستاورد حاضر حاصل طرح تحقیقاتی شماره ٦٢٦٨-٢٧-٠٣-٨٦ است که با پشتیبانی مالی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شده است.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-15]

٦-منابع

[1] Karimi Y. Relapsing Fever and its Epidemiology. Tehran: Pasteur Institute of Iran. 1981.

[2] Barbour AG, Hayes SF. Biology of Borrelia species. Microbiol Rev 1986; 50(4): 381- 400.

[3] Jahnson WB. Borrelia species (Relapsing Fever. I: Mandell, GL. Bennett, JE. Dolin, R. eds. Mandello.Dauglas and Bennett's. Principles and practiceof infectious disease. 4th ed. New York: Churchil Living Stone. 1995; p: 2114 -43.

[4] Geigy R. Relapsing fever in infectousblood disease of man and animal. Academic Press New York. 1968; p: 172-216.

[5] Assous MV, Wilamowski A. Relapsing fever borreliosis in Eurasia—forgotten, but certainly not gone! Clin Microbiol Infect 2009; 15(5): 407-14.

[6] Krieg N, Holt J. Bergeys manual of systemic bacteriology. section1: spirochetes, 1984; p: 38-62.

[7] Arshi S, Majid poor A, Sadeghi H, Asmar M, Emadi D, Derakhshan MH. Relapsing fever in Ardebil, a northwestern province of Iran. Arch Iranian Med 2002; 5: 141-5.

[8] Banafshi O. Study on distribution of soft ticks in indoor and on the infection of Ornithodorous tholozani to B.persica in Bijar district. Presented for the M.Sc., Tehran University of Medical Sciences, 2003.

[9] Assmar M, Soleimani M, Oreiz F, Piazak N, Hossini SM, Saghiri R, Zamani Z. Purification of Periplasmic Flagellar Antigen from Borrelia microtti. Scand J Infect Dis 2002; 34(4): 267–72.

[10] Masoumi Asl H, Goya MM, Vatandoost H, Zahraei SM, Mafi M, Asmar M, Piazak N, Aghighi Z. The epidemiology of tick-borne relapsing fever in Iran during 1997–2006. Travel Med Infect Dis 2009; 7(3): 160-4.

[11] Brahim H, Perrier-Gros-Claude JD, Postic D, Baranton G, Jambou R. Identifying relapsing fever Borrelia, Senegal. Emerg Infect Dis 2005; 11(3): 474–5.

[12] Ras NM, Lascola B, Postic D, Cutler SJ, Rodhain F, Baranton G, Raoult D. Phylogenesis of relapsing fever Borrelia spp. Int J Syst Bacteriol 1996; 46(4): 859-65.

[13] Halperin T, Orr N, Cohen R, Hasin T, Davidovitch N. Detection of relapsing fever in human blood samples from Israel using PCR targeting the glycerophosphodiester phospho-diestrase (GIPQ) gene. Acta Trop 2006; 98(2): 189-95.

[14] Karimi Y, Hovind-Hougen K, Birch-Andersen A, Asmar M. Borrelia persica and B. baltazardi sp. nov.: experimental pathogenicity for some animals and comparison of the ultrastructure. Ann Microbiol (Paris) 1979; 130B(2): 157–68.

[15] Barbour AG. Relapsing fever and other Borrelia infections. In: Guerrant RL, Walker DH & Weller PF, (eds). Tropical Infectious Diseases: Principles, Pathogens, and Practice. Churchill Livingstone, Philadelphia, 1999; p: 535–46.

[16] Johnson WD. Golightly LM. Borrelia species (relapsing fever). In: Mandell GL, Bennett JE & Dolin R, (eds). Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-15]

Diseases. Churchill Livingstone, New York, 2000; p: 2502–4.

[17] van Dam AP, van Gool T, Wetsteyn JC, Dankert J. Tick-borne relapsing fever imported from West Africa: diagnosis by quantitative buffy coat analysis and in vitro culture of Borrelia crocidurae. J Clin Microbiol 1999; 37(6): 2027–30.

[18] Larsson C, Bergström S. A Novel and Simple Method for Laboratory Diagnosis of Relapsing Fever Borreliosis. Open Microbiol J 2008; 2: 10-2.

[19] Nordstrand A, Bunikis I, Larsson C, Tsogbe K, Schwan TG, Nilsson M, Bergström S. Tickborne relapsing fever diagnosis obscured by malaria, Togo. Emerg Infect Dis 2007; 13(1): 117–23.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-05-15]