مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی
دوره ۱۲، شماره ۳: از ۹-۱۶
پاییز ۱۳۸۸

ارزیابی روش‌های مولکولی PCR و Xenodiagnosis برای تعیین آلودگی کنه‌های نرم اورنیتودوروس تولوزانی به بورلیا پرسیکا

جواد رفیع‌نژاد[۱]، نیره چوبدار[۲]، علی‌رضا برمکی[۲]، نورایر پیازک[۳]، فاطمه محترمی[۲]، تقی سطوت[۴]، امید بنفشی[۵]، بهروز تقی‌لو[۶]، ناصح ملکی‌رواسان[۷]، محمّدعلی عشاقی[۱*]

۱- دانشیار، گروه حشره‌شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی تهران، تهران، ایران
۲- کارشناس ارشد، گروه حشره‌شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی تهران، تهران، ایران
۳- دانشیار، بخش انگل‌شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
۴- کارشناس، گروه انگل‌شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی تهران، تهران، ایران
۵-کارشناس ارشد، معاونت بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
۶- کارشناس ارشد، معاونت بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی زنجان، زنجان، ایران
۷- کارشناس ارشد، گروه انگل‌شناسی و حشره‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

دریافت مقاله: ۸۸/۰۴/۲۴ پذیرش مقاله: ۸۸/۰۷/۲۱

چکیده

هدف: تب راجعه کنه‌ای بیماری حاد عفونی است که توسط اسپیروکتی به نام بورلیا پرسیکا ایجاد و توسط کنه‌های نرم اورنیتودوروس تولوزانی منتقل می‌شود. این بیماری در خاورمیانه و نیز مناطق زیادی از کشور ایران دیده می‌شود. یکی از مشکلات موجود درباره این بیماری تعیین آلودگی در کنه‌ها برای تعیین ناقل بیماری است که به روش کلاسیک گزنودیاگنوزیز انجام می‌شود که عبارت است از خون‌دهی کنه‌ها روی حیوان حساس آزمایشگاهی و بررسی میکروسکوپی خون حیوان پس از ۷-۱۴ روز، که روشی ناکارامد و طولانی مدت است. در این مطالعه کارایی دو روش مولکولی PCR و کلاسیک گزنودیاگنوزیز برای تعیین آلودگی کنه‌های اورنیتودوروس تولوزانی به بورلیا پرسیکا مقایسه شده است.

مواد و روش‌ها: نمونه‌های کنه از مناطق شمال غرب کشور جمع‌آوری و روی خوکچه هندی آلوده به بورلیا خونخواری نمودند. برای آزمایش‌های کلاسیک پس از هضم کامل خون، این کنه‌ها مجدداً روی خوکچه‌های سالم خونخواری نموده و پس از ۵ تا ۱۴ روز، آلودگی خون آن‌ها به بورلیا با بررسی‌های میکروسکوپی مشخص شد. برای PCR، DNA بورلیا همراه با DNA کنه‌ها استخراج و به کمک آغازگرهای اختصاصی ژن 16S-rDNA، ژنوم بورلیا تکثیر و سپس تعیین توالی شد. در این مطالعه همچنین تأثیر جنس کنه (ماده و نر)، گذشت زمان و حداقل آلودگی لازم برای عملکرد PCR ارزیابی شد.

نتایج: بررسی‌های مولکولی به کمک آغازگرهای اختصاصی ژن 16S-rDNA نشان داد که روش PCR می‌تواند آلودگی را در تمامی کنه‌های آلوده مشخص نماید در حالی که روش کلاسیک قادر به تشخیص آلودگی در (۱۳/۳ درصد) نمونه‌های آلوده بود. جنس کنه (ماده و نر) و گذشت زمان پس از خونخواری (بلافاصله تا هضم کامل خون) تأثیری بر نتایج واکنش PCR نداشت. ضمن این‌که وجود یک بورلیا کافی بود تا نتیجه واکنش PCR مثبت شود.

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

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-23]

نتیجه‌گیری: این مطالعه اولین ارزیابی تشخیص مولکولی عامل تب راجعه بومی به روش PCR در ایران است و به لحاظ سرعت، دقت و کارایی بالا می‌تواند جایگزین روش کلاسیک شود و برای تشخیص آلودگی در ایران و سایر مناطق آلوده در خاورمیانه توصیه شود.

کلیدواژگان: بورلیا پرسیکا، اورنیتودوروس تولوزانی، تب راجعه بومی، PCR، ایران

۱- مقدمه

تب راجعه کنه‌ای (Tick-borne Relapsing Fevere: TBRF) بیماری حاد عفونی است که از ویژگی‌های عمده آن حملات متناوب تب و لرز است. عامل اصلی این بیماری در ایران بورلیا پرسیکا (*Borrelia persica*) بوده که از طریق گزش کنه ارنیتودوروس تولوزانی (*Ornithodoros tholozani*) انتقال می‌یابد. این بیماری از مشکلات مهم بهداشتی منطقه خاورمیانه و از جمله بخش‌های زیادی از کشور ایران به‌ویژه استان‌های آذربایجان شرقی و غربی، اردبیل، کردستان، همدان و زنجان است [۱، ۲]. تشخیص قطعی آلودگی کنه‌ها به عامل بیماری به روش کلاسیک گزنودیاگنوزیز (Xenodiagnosis) انجام می‌شود که شامل خوندهی کنه‌ها روی خوکچه هندی و یا له کردن کنه‌ها و تزریق مایع له شده به خوکچه هندی و سپس تهیه لام خونی از خوکچه و جستجوی اسپیروکت‌ها (Spirochetes) در لام از روز چهارم به‌مدت ۱۰ روز است. امکان انجام این مراحل آزمایشگاهی بسیار مشکل و زمان‌بر است. موارد منفی کاذب (False-negative) و آلوده نشدن در حیوان آزمایشگاهی در صورت کم بودن میزان اسپیروکت از سایر معایب روش کلاسیک محسوب می‌شود. امروزه از روش‌های مولکولی به‌ویژه روش PCR در تشخیص آلودگی‌های انگلی، باکتریایی و ویروسی در بسیاری از بیماری‌ها استفاده می‌شود. این روش با حساسیت و ویژگی بالا امکان تشخیص سریع و دقیق عامل بیماری را فراهم می‌نماید. روش PCR برای تعیین آلودگی حشرات به عوامل بیماری‌زا مانند آلودگی پشه‌ها به انگل مالاریا [۳- ٦] یا پشه خاکی‌ها به لشمانیا [۷- ۱۰] در سطح وسیعی تا به حال انجام شده است. همچنین آلودگی کنه‌های سخت به عامل بیماری لایم (Lyme disease) (انواع دیگری از بورلیاها) در کشورهای آفریقایی و اروپایی با موفقیت انجام شده است [۱۱- ١٤] ولی تاکنون در ایران از روش PCR برای تعیین آلودگی کنه‌ها و نمونه‌های زیستی مانند خون به بورلیا پرسیکا استفاده نشده است.

هدف این مطالعه ارزیابی روش مولکولی PCR برای تعیین آلودگی کنه‌های نرم اورنیتودوروس تولوزانی به بورلیا پرسیکا و مقایسه آن با روش کلاسیک بوده است. همچنین در این مطالعه برای اولین بار اثر گذشت زمان پس از خونخواری کنه و جنس کنه (نر و ماده) بر واکنش PCR و نیز حداقل انگل لازم برای مثبت شدن PCR بررسی شده است.

۲- مواد و روش‌ها

در این مطالعه کنه‌های نرم خانواده آرگازیده (Argasidae) از مناطق آلوده شهرستان‌های ماه‌نشان (زنجان) و بیجار (کرمانشاه) از مرغداری‌ها و طویله‌ها در زمستان ۱۳۸٦ و بهار ۱۳۸۷ به‌صورت زنده جمع‌آوری شد و نمونه‌های گونه اورنیتودوروس تولوزانی به کمک کلید ریخت‌شناختی شناسایی و جداسازی شدند [۱۵].

خون حاوی بورلیا پرسیکا با پارازیتمی (Parasitemia) حدود ۵۰- ۸۰ باکتری در هر شان میکروسکوپ از بخش انگل‌شناسی انستیتو پاستور ایران تهیه شد، سپس تعداد پنج سر خوکچه هندی (Guinea pigs) نر به وزن تقریبی ٤۰۰ گرم با تزریق ۱/۵ میلی‌لیتر خون حاوی بورلیا پرسیکا آلوده شدند و از روز پنجم بعد از تزریق، خوکچه‌های آلوده (٤ عدد) با بررسی‌های میکروسکوپی مشخص شدند. سپس ٦٤ عدد کنه

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-23]

بالغ (۳۲ نر و ۳۲ ماده) اورنیتودوروس تولوزانی در دسته‌های چهارتایی روی خوکچه‌های آلوده خونخواری نمودند. کنه‌های خون خورده به دو دسته تقسیم شدند و آلودگی بورلیایی در آن‌ها با دو روش کلاسیک گزنودیاگنوزیز (۳۲ عدد کنه) و مولکولی PCR (۳۲ عدد کنه) مطالعه شد.

۲-۱- روش کلاسیک

کنه‌های خون خورده از خوکچه‌های هندی آلوده به بورلیا تا هضم کامل خون و تمایل مجدد به خونخواری از میزبان جدید در شرایط آزمایشگاهی به‌مدت ۳۰ تا ۳٤ روز نگهداری شدند تا کاملاً شکم آن‌ها از خون خالی شد. در طول زمان هضم خون، بورلیا نیز در بدن کنه تکثیر می‌یابد و ارگان‌های مختلف از جمله خون و غدد بزاقی کنه‌ها آلوده به بورلیا می‌شوند و در خونخواری بعدی بورلیا به همراه بزاق کنه به میزبان جدید منتقل می‌شوند [١٦]. از بین رفتن برجستگی شکم، محو شدن رنگ قرمز خون، و برگشت بدن و شکم به حالت تخت یا صاف اولیه مبنای هضم کامل خون در نظر گرفته شد. مجدداً این کنه‌ها روی یک خوکچه هندی سالم قرار داده شدند تا مجدداً خونخواری کنند (برای هر کنه یک خوکچه هندی سالم در نظر گرفته شد). یک عدد خوکچه هندی سالم به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. جستجو برای یافتن انگل در خون خوکچه با گرفتن یک قطره خون از لاله گوش حیوان و تهیه گسترش ضخیم و رنگ‌آمیزی با گیمسا (Giemsa) و بررسی میکروسکوپی با بزرگنمایی ۱۰۰۰ برابر از روز پنجم بعد از آلودگی به‌مدت ده روز انجام گرفت.

۲-۲- روش PCR

همزمان با ارزیابی روش PCR برای تعیین آلودگی کنه‌ها به بورلیا، بررسی تأثیر زمان پس از خونخواری و جنس کنه بر کارایی PCR نیز انجام شد. برای بررسی تأثیر زمان، هشت زمان مختلف ۱) بلافاصله پس از خونخواری، ۲) یک ساعت، ۳) دو ساعت، ٤)چهار ساعت، ٥) هشت ساعت، ٦) ١٦ ساعت، ۷) ۳۰ ساعت، و ۸) پس از هضم کامل خون و خالی شدن شکم در نظر گرفته شد. سپس ۳۲ عدد کنه‌های اورنیتودوروس تولوزانی خونخواری کرده از حیوان آلوده به ۸ گروه ٤ تایی تقسیم شدند به نحوی که در هر گروه دو عدد کنه نر و ۲ عدد کنه ماده وجود داشت. هر گروه به یکی از زمان‌های فوق اختصاص یافت و DNA بورلیا موجود در بدن کنه‌ها به‌همراه DNA کنه‌ها به‌ترتیب در زمان‌های مختلف پس از خونخواری به روش استاندارد فنل- کلروفرم استخراج شدند [۱۷]. علاوه بر این DNA بورلیا موجود در خون تهیه شده از انستیتو پاستور به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

برای PCR از آغازگرهای مربوط به جنس بورلیا [۱۸] که بخش 16S از ژن رایبوزمال DNA (16S-rDNA) را در تمام گونه‌های جنس بورلیا به‌طول ۵۲۳ جفت‌باز تکثیر می‌نماید، استفاده شد. توالی آغازگر جلودار (REC4) 5'-ATGCTAGAAACTGCATGA-3' و توالی آغازگر عقب‌دار (REC9) 5'-TCGTCTGAGTCCCATCT-3' است. ابتدا شرایط واکنش‌های PCR برای نمونه‌های خون آلوده به بورلیا پرسیکا به‌عنوان (شاهد مثبت) بهینه‌سازی (Optimized) شد. برای انجام واکنش از ژلاتین ۱ درصد (۰/۲۵ میکرولیتر)، Taq ۱/۲۵ واحد (۰/۲۵ میکرولیتر)، $MgCl_2$ ۱/۵ میلی‌مولار (۰/۷۵ میکرولیتر)، بافر ۱۰X (۲/۵ میکرولیتر)، dNTPs ۲۰۰ میکرومولار (۱ میکرولیتر)، ۵ میکرومول آغازگر Rec4 و Rec9 هریک (۳/۲ میکرولیتر)، ddH_2O (۸/۸۵ میکرولیتر) و DNA نمونه (۵ میکرولیتر) با حجم کلی ۲۵ میکرولیتر و برنامه حرارتی ۹٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت دو دقیقه سپس ۳۵ چرخه، ۹۳ درجه سانتی‌گراد یک دقیقه، ٤٥ درجه سانتی‌گراد یک دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد یک دقیقه و سپس ۷۲ درجه سانتی‌گراد هفت دقیقه استفاده شد. ۳ تا ۵ میکرولیتر از محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد و باندهای به‌دست آمده به کمک اتیدیوم بروماید (Ethidium bromide) روی دستگاه UV Transilluminator مشاهده و در مقایسه با نشانگرهای

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-23]

(Markers) مولکولی ۱۰۰ جفت‌بازی Ladder (سیناژن، ایران) طول باند به‌دست آمده تعیین شد.

برای تعیین حساسیت عددی روش مولکولی (حداقل بورلیای لازم برای مثبت شدن واکنش PCR)، ابتدا ۱ میکرولیتر از خون آلوده روی یک لام گسترش تهیه شد و پس از رنگ‌آمیزی با گیمسا تعداد اسپیروکت‌ها در تمام شان‌های میکروسکوپ گسترش شمارش شد. پس از محاسبه میزان بورلیای موجود در هر میکرولیتر از خون، رقت‌های سریالی با تعداد ۱– ۳، ٤– ٦، ۷– ۱۰ و بیشتر از ۱۰ عدد بورلیا در نمونه خون آلوده تهیه شد و DNA خون‌های آلوده به روش‌های فوق استخراج و به روش PCR بررسی شدند.

از آب مقطر استریل، کنه غیر آلوده و خون غیرآلوده خوکچه هندی به‌عنوان کنترل منفی در واکنش‌های PCR استفاده شد.

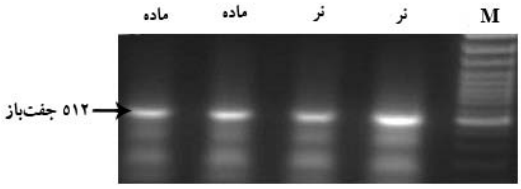
برای تعیین توالی و مقایسه نمونه‌های مورد مطالعه با سایر بورلیاهای موجود در بانک جهانی ژن‌ها (GenBank) محصولات PCR پس از خالص‌سازی برای تعیین توالی به مرکز تخصصی Seq lab آلمان ارسال شد. سپس به کمک نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی Blast (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi) توالی‌های به‌دست آمده با توالی‌های موجود در بانک جهانی ژن‌ها مقایسه شد.

۳- نتایج

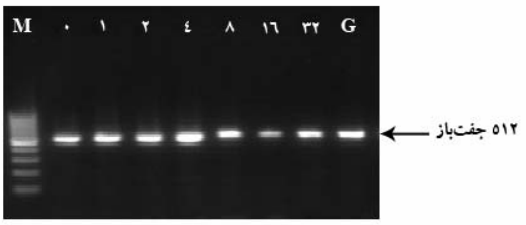
آغازگرهای معرفی شده برای سایر گونه‌های بورلیا برای تکثیر بخش 16S rDNA ژن رایبوزومال DNA بورلیا پرسیکا ایران به‌خوبی عمل کرد و باندی به‌طول ۵۲۳ جفت‌باز تولید نمود. این آغازگرها توانستند آلودگی بورلیایی را در نمونه‌های زیستی مانند خون خوکچه هندی و نیز کنه‌های اورنیتودوروس تولوزانی نشان دهند. آغازگرها کاملاً اختصاصی عمل می‌کنند و در حضور سایر میکروارگانیسم‌های موجود در بدن کنه، مقادیر بسیار زیاد DNA سلول‌های خونی خوکچه هندی و نیز DNA سلول‌های مختلف بدن کنه که مقدار نسبی آن‌ها صدها تا هزاران برابر DNA ژنوم بورلیا است، فقط ژن rDNA بورلیا را شناسایی و تکثیر می‌نماید.

حساسیت آغازگرها نسبت به تعداد بورلیای لازم برای موفقیت PCR بسیار بالا است. نتایج این مطالعه نشان داد که وجود تنها یک بورلیا در نمونه خون کافی است تا با واکنش‌های PCR بتوان به وجود ژنوم آن در نمونه‌های زیستی پی برد.

جنس کنه (نر و ماده) و گذشت زمان پس از خونخواری کنه از بلافاصله بعد از خونخواری تا هضم کامل خون بر میزان موفقیت واکنش PCR در تشخیص آلودگی به بورلیا تأثیری ندارد (شکل‌های ۱ و ۲).



شکل ۱ تأثیر جنس (نر و ماده) کنه بر موفقیت روش PCR برای تعیین آلودگی کنه‌ها به بورلیا پرسیکا؛ **M)** نشانگر ۱۰۰ جفت بازی (سیناژن، ایران)



شکل ۲ تأثیر گذشت زمان بر موفقیت روش PCR برای تعیین آلودگی کنه‌ها به بورلیا پرسیکا؛ اعداد بالای حفره‌ها نشان‌دهنده روزهای پس از خونخواری و G بیانگر نمونه‌های کنه که خون کاملاً در بدن آن‌ها هضم شده است. **M)** نشانگر ۱۰۰ جفت بازی (سیناژن، ایران)

نتایج مطالعات میکروسکوپی در ۳۰ رأس خوکچه هندی که مورد خونخواری کنه آلوده به بورلیا قرار گرفته بودند، تنها در ٤ مورد (۱۳/۳ درصد) مثبت بودند در حالی‌که همه موارد منفی (به استثناء یک مورد) یافت شده در این روش کاذب منفی بوده و در روش مولکولی PCR همگی مثبت بوده و

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-23]

آلودگی را نشان دادند. همچنین نتایج PCR روی ۳۲ نمونه کنه تغذیه نموده از خوکچه‌های هندی آلوده به بورلیا مثبت شد. نتایج مقایسه روش میکروسکوپی و مولکولی در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱ مقایسه نتایج دو روش کلاسیک گزنودیاگنوزیز و PCR برای تشخیص آلودگی بورلیایی درکنه‌های اورنیتودوروس تولوزانی، خون خوکچه‌های هندی از روز پنجم تا چهاردهم بعد از گزش توسط کنه‌های آلوده با روش میکروسکوپی آزمایش شد.

روش	تعداد آزمون	نوع نمونه	مثبت (درصد)	منفی (درصد)
کلاسیک	۳۰	خون خوکچه	٤ (۱۳/۳)	۳۲ (۸٦/٦)
PCR به دنبال کلاسیک	۳۰	کنه	۲۹ (۹٦/۷)	۱ (۳/۳)
PCR	۳۲	کنه	۳۲ (۱۰۰)	۰ (۰)

توالی بخش 16s-rDNA نمونه تعیین توالی شده بورلیا پرسیکا ایران به‌طول ۵۲۳ جفت‌باز با اطلاعات موجود در بانک جهانی ژن ۱۰۰ درصد شباهت دارد و از نظر روابط فیلوژنی به همراه بورلیا پرسیکا موجود در بانک جهانی ژن در شاخه‌ای مستقل در کنار سایر بورلیاها قرار می‌گیرد.

٤- بحث

در این پژوهش از روش مولکولی PCR برای تعیین آلودگی نمونه‌های خون و کنه‌های اورنیتودوروس تولوزانی به بورلیا پرسیکا با موفقیت استفاده شد. این مطالعه برای اولین بار در ایران صورت گرفته و به واسطه کارایی بسیار بالا و حساسیت فوق‌العاده می‌تواند جایگزین روش کلاسیک تشخیص آلودگی در کنه‌های ناقل باشد. علاوه بر این، روش PCR را می‌توان برای تشخیص بیماری تب راجعه در افراد تب‌دار مشکوک به مالاریا و سایر عوامل در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی به‌کار برد. این روش در افراد بیمار در دوره‌ای که پارازیتمی در خون کاهش پیدا می‌کند یا به صفر می‌رسد می‌تواند برای سایر بافت‌های بدن به‌کار گرفته شود. این روش با کارایی بسیار بالا می‌تواند در مناطق بومی بیماری که اکثراً از مراکز تخصصی و تحقیقاتی مجهز به حیوانات آزمایشگاهی دور هستند به‌خوبی راه‌گشا باشد و به‌سرعت آلودگی بورلیایی را در نمونه‌های مورد بررسی (خون یا هر بافت دیگر) مشخص نماید.

تشخیص به روش کلاسیک نیاز به زمان دارد (حداقل یک هفته) و همچنین به دلیل پایین بودن دقت، اطلاعات درستی برای تعیین آلودگی به عامل بیماری در اختیار نمی‌گذارد. روش PCR در مورد تعیین آلودگی موارد انسانی نیز به‌خوبی کارایی دارد و زمان تشخیص را کوتاه کرده و تجویز دارو به بیمار با سرعت بالاتری انجام می‌شود. مطالعات مشابهی توسط هالپرین (Halperin) و همکارانش (۲۰۰٦) در فلسطین اشغالی روی نمونه‌های خون آلوده انسانی و نیز بانت (Baneth) و همکارانش (۲۰۰۷) روی نمونه‌های خون حیوانات خانگی آلوده انجام گرفت، نشان داد که با استفاده از واکنش PCR امکان تشخیص سریع و دقیق آلودگی در نمونه‌های حاوی بورلیا وجود دارد [۱۹، ۲۰].

در مقایسه روش کلاسیک با مولکولی، روش PCR قادر به تشخیص ۱۰۰ درصد آلودگی شد در حالی‌که روش کلاسیک قادر به تشخیص آلودگی ۱۳/۳ درصد شد. نکته جالب این‌که اکثر موارد منفی روش کلاسیک کاذب بوده و پس از آزمون با PCR مثبت تشخیص داده شدند. این یافته با نتایج نوردسترند (Nordstrand) و همکارانش (۲۰۰۷) که روی خون افراد مشکوک به تب راجعه بومی در افریقا انجام شد مطابقت دارد. این محققان نشان دادند که ۱۰ و ۱۳ درصد موارد منفی تشخیص میکروسکوپی به‌ترتیب با روش PCR و روش الایزا (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA) (سرولوژی) مثبت هستند [۲۱].

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-23]

به دلیل اختلافات فیزیولوژیک بین جنس کنه نر و ماده از جمله اختلاف در مقدار خونخواری، هورمون‌های داخلی و از همه مهم‌تر تفاوت در کیفیت سیستم ایمنی در مقابله با عوامل بیماری‌زای خارجی احتمالاً کمیت و کیفیت بورلیا موجود در بدن کنه تحت تأثیر قرار می‌گیرد و میزان تکثیر و گسترش انگل در داخل بدن این دو جنس می‌تواند تفاوت کند. تفاوت در میزان آلودگی کنه‌های نر و ماده به بورلیا به‌صورت طبیعی گزارش شده است [۲۲، ۲۳]. این تفاوت می‌تواند کمیت و کیفیت DNA بورلیا و در نتیجه کارایی PCR را تحت تأثیر قرار دهد. به هرحال نتایج این مطالعه نشان داد که حساسیت روش PCR معمولی به حدی بالا است که قادر است کمترین مقدار DNA را شناسایی کند. برای تعیین تعداد اولیه انگل در هر جنس باید از روش‌های دیگری مانند Quantitative PCR استفاده نمود [۲٤، ۲۵].

با توجه به مثبت شدن واکنش‌های PCR در مراحل مختلف پس از آلودگی (بلافاصله پس از خونخواری تا هضم کامل خون) در کنه‌های اورنیتودوروس تولوزانی مشخص می‌شود که با گذشت زمان بورلیا در بافت‌های بدن این کنه‌ها تکثیر می‌یابد و از دیواره معده عبور کرده و به خون (همولنف) و غدد بزاقی کنه راه می‌یابد و شانس آلودگی افزایش می‌یابد [۱٦]. علاوه بر این در بعضی از کنه‌ها، بورلیا از طریق تخم (Transovarial) به نسل بعد منتقل می‌شود [۲٦، ۲۷]. در حال حاضر اطلاعاتی در خصوص انتقال بورلیا از طریق تخم کنه‌ها به نسل بعد در دسترس نیست بنابراین توصیه می‌شود این موضوع در تحقیقات بعدی مورد توجه قرار گیرد.

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی می‌توان روش PCR را به‌عنوان یک روش جایگزین ساده و سریع برای تعیین آلودگی نمونه‌های زیستی (خون، بافت میزبان یا کنه‌های ناقل) معرفی کرد و آن را جایگزین روش ناکارامد، سخت و زمان‌بر کلاسیک نمود. توصیه می‌شود برای تسهیل تشخیص مولکولی، پروب‌های (Probes) حاوی ژن‌های اختصاصی را به‌صورت کیت‌های تشخیصی فراهم کرد. این پروب‌ها را می‌توان به‌نحوی طراحی نمود که نتیجه واکنش پروب با DNA نمونه مورد مطالعه به‌صورت واکنش‌های رنگی نشان داده شود. در این صورت تشخیص بسیار دقیق، راحت و سریع انجام شده و به‌کارگیری آن‌ها در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی امکان‌پذیر می‌شود.

۵- تشکر و قدردانی

دستاورد حاضر با پشتیبانی مالی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شده است.

٦- منابع

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

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

[3] Coleman RE, Sattabongkot J, Promstaporm S, Maneechai N, Tippayachai B, Kengluecha A, Rachapaew N, Zollner G, Miller RS, Vaughan JA, Thimasarn K, Khuntirat B. Comparison of PCR and microscopy for the detection of asymptomatic malaria in a Plasmodium falciparum/vivax endemic area in Thailand. Malar J 2006; 5: 121.

[4] Snounou G, Viriyakosol S, Zhu XP, Jarra W,

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-23]

Pinheiro L, do Rosario VE, Thaithong S, Brown KN. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. Mol Biochem Parasitol 1993; 61(2): 315-20.

[5] Johnston SP, Pieniazek NJ, Xayavong MV, Slemenda SB, Wilkins PP, da Silva AJ. PCR as a confirmatory technique for laboratory diagnosis of malaria. J Clin Microbiol 2006; 44(3): 1087-9.

[6] Zakeri S, Najafabadi ST, Zare A, Djadid ND. Detection of malaria parasites by nested PCR in south-eastern, Iran: evidence of highly mixed infections in Chahbahar district. Malar J 2002; 1: 2.

[7] Rodrigues EH, Felinto de Brito ME, Mendonça MG, Werkhäuser RP, Coutinho EM, Souza WV, Militão de Albuquerque Mde F, Jardim ML, Abath FG. Evaluation of PCR for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity in northeastern Brazil. J Clin Microbiol 2002; 40(10): 3572-6.

[8] Martín-Sánchez J, Pineda JA, Andreu-Lopez M, Delgado J, Macías J, De La Rosa R, Morillas-Márquez F. The high sensitivity of a PCR-ELISA in the diagnosis of cutaneous and visceral leishmaniasis caused by Leishmania infantum. Ann Trop Med Parasitol 2002; 96(7): 669-77.

[9] Osman OF, Oskam L, Kroon NC, Schoone GJ, Khalil ET, El-Hassan AM, Zijlstra EE, Kager PA. Use of PCR for diagnosis of post-kala-azar dermal leishmaniasis. J Clin Microbiol 1998; 36(6): 1621-4.

[10] Gangneux JP, Menotti J, Lorenzo F, Sarfati C, Blanche H, Bui H, Pratlong F, Garin YJ, Derouin F. Prospective value of PCR amplification and sequencing for diagnosis and typing of old world Leishmania infections in an area of nonendemicity. J Clin Microbiol 2003; 41(4): 1419–22.

[11] Lebech AM, Hansen K. Detection of Borrelia burgdorferi DNA in urine samples and cerebrospinal fluid samples from patients with early and late Lyme neuroborreliosis by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1992; 30(7): 1646-53.

[12] Lebech AM. Polymerase chain reaction in diagnosis of Borrelia burgdorferi infections and studies on taxonomic classification. APMIS Suppl 2002; 105: 1-40.

[13] Priem S, Rittig MG, Kamradt T, Burmester GR, Krause A. An optimized PCR leads to rapid and highly sensitive detection of Borrelia burgdorferi in patients with Lyme borreliosis. J Clin Microbiol 1997; 35(3): 685-90.

[14] Skotarczak B. Isolation of Borrelia burgdorferi sensu lato in ticks Ixodes ricinus by polymerase chain reaction (PCR). Wiad Parazytol 2000; 46(1): 93-9.

[15] Zaim M, Shayeghi M. Pictorial key of ticks and mites. Faculty of Health and Institute of Health Research, Tehran University of Medical Sciences, 2007. (Persian)

[16] Schwan TG, Piesman J. Vector interactions and molecular adaptations of lyme disease and relapsing fever spirochetes associated with transmission by ticks. Emerg Infect Dis 2002; 8(2): 115-21.

[17] Ballinger-Crabtree ME, Black WC 4th, Miller BR. Use of genetic polymorphisms detected by

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-23]

the random-amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) for differentiation and identification of Aedes aegypti subspecies and populations. Am J Trop Med Hyg 1992; 47(6): 893-901.

[18] 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.

[19] Halperin T, Orr N, Cohen R, Hasin T, Davidovitch N, Klement E, Kayouf R, Baneth G, Cohen D, Yavzori M. Detection of relapsing fever in human blood samples from Israel using PCR targeting the glycerophosphodiester phosphodiesterase (GlpQ) gene. Acta Trop 2006; 98(2): 189-95.

[20] Baneth G. Relapsing Fever Borreliosis in Pets. 1st World Small Animal Veterinary Congress. Prague. 2007.

[21] 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.

[22] Alekseev AN, Dubinina HV, Rijpkema SG, Schouls LM. Sexual transmission of Borrelia garinii by male Ixodes persulcatus ticks (Acari, Ixodidae). Exp Appl Acarol 1999; 23(2): 165-9.

[23] Alekseev AN, Dubinina HV. Exchange of Borrelia burgdorferi between Ixodes persulcatus (Ixodidae:Acarina) sexual partners. J Med Entomol 1996; 33(3): 351-4.

[24] Ornstein K, Barbour AG. A reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay of Borrelia burgdorferi 16S rRNA for highly sensitive quantification of pathogen load in a vector. Vector Borne Zoonotic Dis 2006; 6(1): 103-12.

[25] Lima CM, Zeidner NS, Beard CB, Soares CA, Dolan MC, Dietrich G, Piesman J. Differential infectivity of the Lyme disease spirochete Borrelia burgdorferi derived from Ixodes scapularis salivary glands and midgut. J Med Entomol 2005; 42(3): 506-10.

[26] Shanbaky NM, Helmy N. First record of natural infection with Borrelia in ornithodoros (Ornithodoros) savignyi. Reservoir potential and specificity of the tick to Borrelia. J Egypt Soc Parasitol 2000; 30(3): 765-80.

[27] Lane RS, Manweiler SA. Borrelia coriaceae in its tick vector, Ornithodoros coriaceus (Acari: Argasidae), with emphasis on transstadial and transovarial infection. J Med Entomol 1988; 25(3): 172-7.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2024-04-23]