پنجمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران
3-5 آذر ماه 1386، سالن اجلاس سران
The 5th National Biotechnology Congress of Iran
24-26 Nov, 2007, Summit Meeting Conference Hall, Tehran- Iran

تعیین بابزیا اویس در کنه های ناقل با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR)

نویسندگان : غلامرضا رزمی [1]*، محمد رضا باسامی [2] و مریم گنجعلی

آدرس :*1- دانشگاه فردوسی- دانشکده دامپزشکی ، گروه پاتوبیولوژی ، صندوق پستی : 1793-91775 2- دانشکده دامپزشکی

دانشگاه فردوسی ، گروه علوم درمانگاهی

چکیده: به منظور شناسایی کنه های ناقل بابزیا اویس در گوسفندان شهرستان مشهد، مطا لعه ای با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) انجام گرفت. طی فصول بهار وتابستان 1358 نسبت به جمع آوری کنه، از روی گوسفندان مشکوک به آلودگی بابزیا اقدام گردید. ابتدا کنه ها بااستفاده از کلید تشخیص مورد شناسایی قرار گرفتند. آنگاه نسبت به استخراج DNA نمونه های کنه ای اقدام شد. تکنیک PCR برای تعیین بابزیا اویس بااستفاده ازدو پرایمر اختصاصی طراحی شده انجام گرفت. نتایج یکی از پرایمر ها، روی نمونه های کنترل مثبت خون رضایت بخش بود. نتایج PCR با استفاده از این پرایمر ، وجود باند اختصاصی 550 bp را روی ژل آگار ، در 2 نمونه از 20 نمونه DNA رپی سفالوس سینگوینوس ، 7 نمونه از 13 نمونهDNA هیالوما مارژیناتوم و 4 نمونه از 7 نمونه DNA هیالوما آناتولیکم نشان داد. با توجه به نتایج بدست آمده بنظر می رسد هیالوما مارژیناتوم و هیالوما آناتولیکم اهمیت بیشتری در انتقال بابزیا اویس در گوسفندان این منطقه داشته باشند

واژه های کلیدی: بابزیا اوویس، کنه ، PCR

مقدمه:

بابزیوز یکی از بیماریهای مهم تک یاخته ای در گوسفندان می باشد که توسط کنه سخت منتقل می شود و با علائم تب، کم خونی ، زردی ، لاغری، همگلوبینوری و مرگ ومیر بروز می نماید.(1و4) . بابزیا اویس و بابزیا موتازی بعنوان گونه های بیماری زا و شایع در گوسفندان و بز های ایران شناخته شده اند (6). مطالعات انجام شده در ایران نشاندهنده شیوع نسبتا بالای بیماری در ایران است. شناسایی کنه های سخت ناقل بیماری در هر منطقه اهمیت فراوانی در کنترل و پیشگیری بیماری دارد. تاکنون مطالعات اندکی در این باره صورت گرفته است. رزمی و همکاران با استفاده از رنگ آمیزی تعداد زیادی از گسترش های تهیه شده از همولنف و تخم کنه های ماده خونخورده، توانسند آلودگی کنه های رپی سفالوس سینگوینوس و هیالوما مارژیناتوم را به اووکینت بابزیا به اثبات برساند(10) .باین وجود ، بعلت انتقال ارثی بابزیا در کنه طی نسلهای متوالی بدون دخالت میزبان مهره دار و وجود چند گونه بابزیا در گوسفند ، نقش هر یک از این کنه ها بدرستی در انتقال بابزیا اویس بعنوان گونه شایع در بین گوسفندان این منطقه مشخص نگردید. بهمین دلیل در این مطالعه با استفاده از روش حساس و دقیق PCR ، نقش کنه های الوده کننده گله های گوسفند شهرستان مشهد در انتقال بابزیا اوویس مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها:

در این مطالعه طی فصول بهار و تابستان سال 1385 ، کنه های سخت از روی بدن 27 راس گوسفند مشکوک به بابزیا جمع آوری شد. همزمان نسبت به خونگیری از ورید وداج و تهیه گسترش خونی نازک از ورید گوش گوسفندا ن اقدام گردید. در آزمایشگاه انگل شناسی، ابتدا گسترش های خونی با گیمسا رنگ آمیزی شد و از نظر آلودگی به بابزیا اویس با استفاده از میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند . علاوه بر این ، نمونه های کنه جمع آوری شده با کمک لوپ حشره شناسی وبراساس کلید تشخیص کنه ها(7) مورد شناسایی قرار گرفتند . آنگاه کنه های واجد جنس و گونه مشابه در ظروف جداگانه قرار گرفتند . در مجموع 40 نمونه حاوی کنه یکسان تهیه شد . پس از زدن برچسب ، نمونه های کنه تا هنگام استخراج DNA در فریزر منهای 20درجه

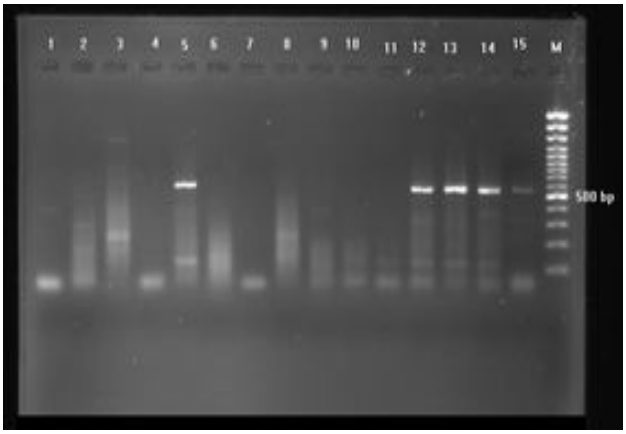
سانتیگراد قرار گرفتند. هنگام استخراج DNA ، نمونه های کنه از فریزر خارج و در یک هاون استریل واجد PBS خرد گردید. محتویات خرد شده کنه از صافی استریل عبور داده شد تا کوتیکول و بافتهای سخت کنه جدا شود. سپس DNA مایع بدست آمده، بوسیله کیت تجاری (شرکت سینا ژن) طبق دستور کار شرکت سازنده استخراج شد. آنگاه کمیت و کیفیت DNA بوسیله الکتروفورزیس و با کمک دستگاه UV لومیناتور بررسی گردید. نمونه های DNA استخراج شده تاهنگام عملیات PCR.به فریزر منهای 20درجه سانتیگراد منتقل شدند. برمبنای مطالعات انجام شده قبلی در باره بابزیا اوویس در گوسفند (2و5)، دو پرایمراختصاصی

پرایمر اول : F: 5′-TGGGCAGGACCTTGGTTCTTCT -3′ و R: 5′-CCGCGTAGCGCCCGGCTAAATA-3′

پرایمر دوم: F: 5′-GCGACGAATCCTTGTGGCAC-3′ و R: 5′-GCTCAAAACCCTGGTCG-3′ برای این منظور طراحی گردید . ابتدا عملیات PCR بر روی کنترل مثبت انجام گردید ، که پرایمر 1 پاسخ مناسبی به نمونه های مثبت داد . بهمین دلیل عملیات PCR بر روی نمونه های DNA کنه با استفاده از پرایمر 1 انجام گرفت. بطور خلاصه سیستم واکنش PCR برای حجم 50 میکرو لیتر طراحی شده بود. اجزای واکنش PCR و حجم هر یک به ترتیب : 2/5 میکرو لیتر PCR buffer ، 0/5 میکرولیتر dNTP، یک میکرولیتر Mg Cl 2، 1/25 میکرولیتر پرایمر F ،1/25 میکرولیتر پرایمرR ، 0/2 میکرولیتر Tag DNA polymerase، 1/33 میکرولیتر آب دیونیزه استریل و 5 میکرولیتر DNA استخراجی از نمونه بودند. پس از تهیه این مخلوط ، نمونه ها در دستگاه ترمال سیکلر گذاشته شد و جهت 35 سیکل ، زمان و درجه حرارت لازم دستگاه به شرح ذیل تنظیم گردید. هر سیکل PCR شامل 95 درجه سانتیگراد بمدت 5 دقیقه و94 درجه سانتیگراد بمدت یک دقیقه برای Denaturation time ، 52 درجه سانتیگراد برای Annealing time، 72 درجه سانتگراد بمدت 1دقیقه برای Extention time بود. در پایان محصول PCR برروی ژل آگاروز 2 درصد الکتروفورز شده ، سپس ژل با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و با دستگاه UV لومیناتور با اشعه UV بررسی و عکس برداری شد.

نتایج و بحث :

در این مطالعه با استفاده از پرایمر اختصاصی اول، 40 نمونه DNA کنه مورد آزمایش PCR قرار گرفت . از مجموع 20 نمونه DNA رپی سفالوس سینگوینوس 2 نمونه ، از 13 نمونهDNA هیالوما مارژیناتوم 7 نمونه و از 7 نمونه DNA هیالوما آناتولیکم 4 نمونه ، باند مثبت 550 bp را برای بابزیا اوویس نشان دادند. (تصویر 1)



تصویر 1- نتایج آزمایش PCR بر روی 15 نمونه کنه در ژل آگار2٪، وجود باند DNA به اندازه 550bp در نمونه های 5، 12، 13، 14 ، 15 و عدم تکثیر ان در سایر نمونه ها ، ستون M (مارکرمولکولی، Ladder 100) . نمونه 5 مربوط به DNA رپی سفالوس سینگوینوس ، نمونه 12 مربوط به DNA هیالوما مارژیناتوم، نمونه 13، 14و 15 مربوط به DNA هیالوما آناتولیکم

دردهه اخیر محققین با استفاده از تکنیک PCR توانستند کنه های ناقل تیلریا و بابزیا را در گوسفند ،گاو و اسب را شناسایی نمایند (3و8و9). با توجه به اهمیت گونه بابزیا اویس در گوسفندان ایران، در این مطالعه نیز سعی گردید کنه های ناقل بابزیا اوویس در گوسفند با روش PCR مورد شناسایی قرار گیرد. با توجه به نتایج موفقت آمیز مطالعات حبیبی و همکاران (5) و اکتاس و همکاران (2) در شناسایی بابزیا اوویس در خون گوسفندان آلوده ، ازدو پرایمر اختصاصی جهت این مطالعه استفاده شد . با توجه به نتایج رضایت بخش PCR با پرایمر اختصاصی اولی، نمونه های DNA کنه با این پرایمر مورد آزمایش قرار گرفتند . نتایج بدست آمده کاملا با نتایج اکتاس و همکاران (2) منطبق بود ، در نمونه های مثبت باند اختصاصی 550 bp بابزیا اویس مشاهده گردید. در این مطالعه ، در نمونه های DNA هر سه کنه رپی سفالوس سینگوینوس ، هیالوما مارژیناتوم و هیالوما آناتولیکوم واکنش مثبت در آزمایش PCR مشاهده شد که نشاندهنده اهمیت نقش هر سه کنه در انتقال بابزیا اویس می باشد. اخیرا شایان و همکاران (2007) نیز با استفاده از تکنیک PCR نقش گونه های مختلف جنس رپی سسفالوس را در انتقال بابزیا اویس در ایران به اثبات رسانده اند . باتوجه به نتایج بدست آمده در این مطالعه ، بنظر می رسد کنه های هیالوما مارژیناتوم و هیالوما مارزیناتوم نقش بیشتری در انتقال بابزیا اویس در گوسفندان این منطقه داشته باشند.

منابع :

1-رفیعی ، عزیز(1357) .، تک یاخته شناسی دامپزشکی و مقابسه ای. تهران انتشارات دبیرخانه شورای پژوهشهای علمی کشور. وزارت علوم و آمزش عالی.

2- Aktas, M ., et al (2005). Development of a polymerase chain reaction method for diagnosis of Babesia ovis infection in sheep and goats. Vet.Parasitol 133: 277-281.

3-Battsetseg, B., et al (2001). Detection Baesia cabbali and Babesia equi in Dermacentor nuttali adult ticks. Int . J. Parasitol. 31: 384-386.

4- Fischer ,M., et al .(1989) . Manual of tropical Veterinary Parasitology.CAB international , London..PP: 303-391.

5-Habbibi, G.R., et al (2005). Detection of Babesia ovis using polymerase chain reaction. Arch.Razi. Ins. 57:1-10.

6- Hashemi-Fesharaki,G.R.1997. Tick-borne disease of sheep and goats and their related vector of iran. Parassitologi. 39: 115-117.

7- Hoogstraal, H.(1959).African Ixididae. Research report, Vol. 1. Novel Medical, Washington, 1100pp.

8- Kirvar, E., et al (1998). Detection of Theileria lestoquardiin ticks, sheep, goats using polymerase chain reaction. Ann.N.Y.Acad.Sci. 849: 52-62.

9-Olivera , C ., et al (1997). Detection of Theileria annulata by PCR in Ticks collected from cattle in Muritania . Exp. Appl. Acarol. 21: 279-291.
10-Razmi. G.R., et al (2002). An epidemiological study on ovine babesiosis in the Mashhad suburb area , Province of Khorasan , Iran. Vet Parasitol. 108: 109-115.
11- Shayan, P., et al (2007). Determination of Rhipicephalus spp. as vectors for *babesia ovis* in Iran . Parasitology research. 101: 1029-1033.

Detection of *Babesia ovis* in tick vectors by using PCR

G.R.Razmi[1], M.R.Basami[2], M. Ganjali[1]
1-Department of Pathobiology, School of Veterinary Medicine,Ferdowsi University of Mashhad,
P.O.Box: 91775-1793
2--Department of Clinical , School of Veterinary Medicine,Ferdowsi University of Mashhad

A study was done to identify of tick vectors of *Babesia ovis* by using PCR. During spring and summer of 2006, a number of ticks were collected from sheep suspected to be infected with *Babesia spp*. First, the ticks were identified by diagnostic keys, then, the DNA of tick samples were extracted by DNA extraction Kit(Cinnagen). The PCR technique were done by two designed primers for detection of *Babesia ovis*. The results showed that just one of primers had acceptable reaction on control positive samples . Results of PCR by using with this primer were shown that 2 of 20 DNA samples of *Rhipicephalus sanguienus* , 7 of 13 DNA samples of *Hyalomma marginatum* and 4 of 7 DNA samples of *Hyalomma anatolicum* had 550 bp specific band on agarose gel electrophoresis. Based on the results , it seems that *Hyalomma marginatum* and *Hyalomma anatolicum* have more important in the transmission of *Babesia ovis* in sheep of this area.
Keywords: *Babesia ovis*, tick, PCR