جهت تهیه فایل ورد این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

تشخیص بروسلوز گاوی با PCR

ناصر گلبانگ*، مجید صادقی زاده و ابوالفضل ارجمند راد***

*گروه زیست شناسی دانشگاه اصفهان

**گروه ژنتیک دانشگاه تربیت مدرس

چکیده

به‌منظور تشخیص بروسلوز در گاو از ۵۰ نمونه خون گاو که با آزمایش سرولوژی مثبت بودند و ۴۵ نمونه خون که که با آزمایش سرولوژی منفی بودند DNA استخراج شد. این DNA برای تکثیر ژن آنتی ژن 31KDa بروسلا که یک پروتئین غشایی می‌باشدباروش PCR مورد استفاده قرار گرفت. محصولات PCR با الکتروفورز ژل آگارز ۲ درصد مشاهده شد.نتیجه PCR ۳۰ نمونه از ۵۰ نمونه(۶۰٪) خون گاوها که با آزمایش های سرولوژی مثبت بودند، مثبت بود و ۲۰ نمونه(۴۰٪)از ۵۰ نمونه فوق منفی بود. همچنین نتیجه PCR ۱۲ نمونه از ۴۵ نمونه خون سرولوژی منفی، مثبت بود.نتایج بدست آمده نشان داد که PCR قادر به تشخیص همه موارد بروسلوز مثبت نمی باشد. بنابراین ترکیبی از روش PCR و روش سرولوژی برای تشخیص بروسلوز پیشنهاد می‌شود. روش PCR و سرولوژی هردو دارای نتایج کاذب هستند. با توجه به نتایج بدست آمده، نمونه‌های شیر و ترشحات واژن برای انجام PCR پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: بروسلا و واکنش زنجیره ای پلیمراز(PCR)

مقدمه

بروسلوز (تب مالت) یک بیماری مشترک بین انسان و حیوان است که توسط باکتریهای جنس *بروسلا* ایجاد می‌شود. بروسلاها باکتری های گرم منفی ، هوازی بدون کپسول و اسپور و درون سلولی اختیاری هستند که در انسان و حیوانات باعث بیماری بروسلوز (تب مالت) می‌شوند. بر اساس بیماریزایی و میزبان، جنس بروسلا به ۷ گونه تقسیم می‌شود:

۱- *Brucella abortus* که در گاو بیماری ایجاد می‌کند.

۲- *B. melitensis* که میزبان اصلی آن گوسفند و بز است.

۳- *B. suis* که میزبان آن خوک است.

٤- *B. canis* که در سگها بیماری ایجاد می‌کند.

٥- *B. ovis* که در قوچها بیماری ایجاد می‌کند.

٦- *B. neotomae* که از موش درختی جداسازی شده است.

۷- *B. maris* که میزبان آن پستانداران دریایی است(۱،۲،۳ و۷).

جهت تهیه فایل ورد این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

بیماری تب مالت با دو روش باکتریولوژیک (کشت) و سرولوژی تشخیص داده می‌شود. روش کشت یک روش مطمئن در تشخیص بروسلا می‌باشد اما این روش بسیار مشکل، وقت‌گیر و خطرناک است و حساسیت آن پایین می‌باشد (۱، ۷ و ۱۶). روش سرولوژی یک روش سریع و آسان می‌باشد که اساس آن وجود آنتی بادی ضد بروسلا در سرم می‌باشد . اما این روش تشخیص خیلی مطمئن نیست چون برخی فاکتور ها می‌توانند باعث نتایج مثبت و منفی کاذب شوند(۱، ۷ و ۱۶).

چون میزبان اصلی این باکتری ها حیوانات است و از حیوانات به انسان منتقل می‌شود بنابراین

برای پیشگیری از شیوع بیماری بروسلوز درجوامع انسانی باید باکتری در حیوانات کنترل گردد. در اغلب کشورهای جهان برای کنترل بروسلوز، دامهای بیمار از طریق آزمایشهای سرولوژی شناسایی می‌شوند و دامهای آلوده به بروسلا کشتار می‌گردند. آزمایشهای معمول سرولوژی که برای شناسایی دام آلوده استفاده می‌شود عبارتند از : آزمایش رزبنگال، آزمایش رایت یا آزمایش آگلوتینا سیون لوله ای و آزمایش ۲- مرکاپتو اتانل (2ME) (۱، ۷ و ۱۶). آزمایش رزبنگال یک آزمایش ساده و سریع است و اولین آزمایش تشخیصی است که روی دامها انجام می‌شود. دامهایی که با این آزمایش منفی باشند به عنوان بروسلوز منفی محسوب می‌شوند و دامهایی که با این آزمایش مثبت باشند تحت آزمایشهای تکمیلی رایت و2ME قرار می‌گیرند. دامهایی که سرم آنها با این دو آزمایش تکمیلی نیز مثبت باشد به عنوان بروسلوز مثبت تلقی می‌شوند (۱،۷ و۱۶).

عوامل زیادی وجود دارند که در آزمایشهای سرولوژی باعث نتایج مثبت و منفی کاذب می‌گردند که مهمترین آن شباهت آنتی ژنی *بروسلا* با برخی باکتریهای گرم منفی است(۷ و ۱۰). بعد از درمان بروسلوز نیز تا مدت طولانی مقدار IgM در سرم بالاست که خود می‌تواند باعث ایجاد واکنشهای مثبت کاذب شود(۳ و ۱۰). گزارش های متعددی مبنی بر واکنش متقاطع آنتی ژنهای باکتریهای غیر *بروسلا* با آنتی بادی ضد بروسلایی وجود دارد. مهمترین باکتری که با *بروسلاها* واکنش متقاطع دارد *یرسینیا آنتروکولیتیکا* سویه O:9 است که مهمترین عامل ایجاد واکنشهای مثبت کاذب است. واکنش متقاطع *E.coli* سویهٔ O:157 با بروسلا نیز به دفعات گزارش شده است (۱۵ و ۲۰). واکنش متقاطع بروسلا با باکتریهای *ویبریو کلرا، فرانسیلا و سالمونلا* نیز گزارش گردیده است (۳،۷،۱۰،۱۵ و۲۰).

هدف این تحقیق بررسی امکان تشخیص بروسلوز گاوی از طریق PCR روی نمونه خون گاو و مقایسهٔ آن با نتایج سرولوژی بوده است.

روش کار

تهیهٔ نمونهٔ خون

از دامداری‌های اطراف اصفهان خون‌گیری به‌عمل آمد. ناحیه ابتدایی دم گاو که دارای رگ خونی غنی و بزرگ است با ساولن و الکل ضدعفونی شد و با استفاده از سوزن خون‌گیری استریل مخصوص دام‌ها که دارای دو سر تیز می‌باشد خون‌گیری بعمل آمد. یک سر سوزن در رگ و سر دیگر به درون درب لوله پلاستیکی لوله فرو برده شد. به دلیل خلاء موجود در لوله خون از رگ وارد لوله می‌شد.

برای آزمایش PCR، خون حاوی ماده ضد انعقاد برای استخراج DNA استفاده شد. ۱۰ ml از هر نمونه خون تهیه شده از دامها با ۰/۵ M EDTA ۱ ml مخلوط

جهت تهیه فایل ورد این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

شد تا از لخته شدن آن جلوگیری شود. ۵۰ نمونه خون از ۵۰ گاو که با سه روش سرولوژی رزبنگال، رایت و دو مرکاپتواتانول از نظر بروسلوز مثبت بودند جهت PCR انتخاب شدند. ضمناً ٤٥ نمونه از ٤٥ گاو که از نظر سرولوژی منفی بودند به‌عنوان گروه کنترل انتخاب شدند. گاوها طبق نظر دامپزشک عارضه عفونی دیگری نداشتند. گروه کنترل واکسن بروسلا دریافت کرده بودند. برای آزمایشهای سرولوژی از خون فاقد ماده ضد انعقاد استفاده شد.

آزمایش های سرولوژی

مواردی از خون گاوهایی که با آزمایش رزبنگال مثبت بودند از آزمایشگاه میکروب‌شناسی دامپزشکی اصفهان تهیه و تحت آزمایشهای تکمیلی رایت و ۲-مرکاپتواتانل (2ME) قرار گرفتند. نمونه‌هایی که با آزمایشات رایت و2ME در رقت ۱/۱٦۰ به بالا مثبت بودند به عنوان دامهای بروسلوزی تلقی شدند. نمونه‌هایی که با آزمایش رزبنگال منفی بودند به عنوان دامهای بروسلوز منفی تلقی شدند(۴ و۷).

استخراج DNA

۵۰ نمونه خون سرولوژی مثبت و ٤٥ نمونه از دامهای سرولوژی منفی که حاوی ماده ضد انعقاد بودند برای استخراج DNA و PCR مورد استفاده قرار گرفتند.استخراج DNA از خون دامها با استفاده از کیت استخراج DNA از خون تام که توسط شرکت بیوژن مشهد تولید می‌شود (Cot .No CS134) انجام شد و در پایان DNA استخراج شده در(Tris-base-EDTA) ۳۰µl TE حل شد. در این کیت ۸ معرف وجود دارد که از شماره ۱ تا ۸ شماره‌گذاری شده و جهت استخراج DNA از ۳ml خون تام بکار می‌رود. روش کار در بروشور همراه کیت موجود است.

پرایمرها

دو پرایمر به نام B_4 به طول ۱۹ باز و B_5 به طول ۲۰ باز برای تکثیر یک ژن خاص از DNA بروسلا که آنتی ژن پروتئین غشائی 31 KDa را کد می‌کند استفاده شد. چون این ژن در تمام جنس بروسلا مشترک می‌باشد و هدف این تحقیق تشخیص کلی بروسلوز با روش PCR بود و تعیین گونه هدف نبود و لذا مورد استفاده قرار گرفت. توالی پرایمرها به صورت زیر می‌باشد:

5′-TGGCTCGGTTGCCAATATCAA-3′ B4:
3′-CGCGCTTGCCTTTCAAGGTCTG-5′ B5:

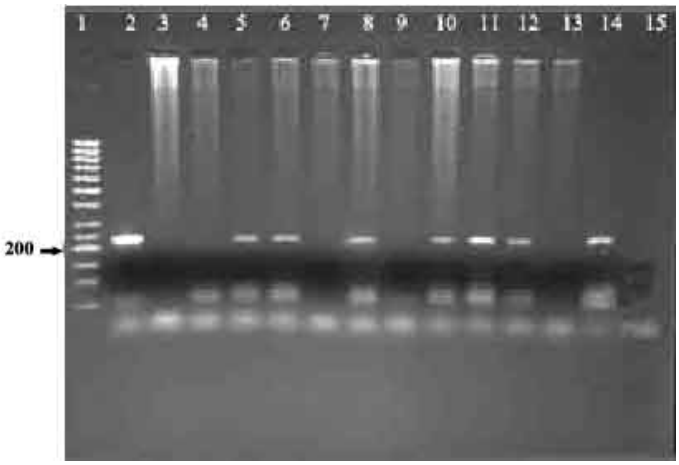
پرایمرهای B4 وB5 یک محصول 223 جفت بازی را بوجود می‌آورند(۵ و۱۴).

انجام آزمایش PCR

آزمایش PCR در حجم ۲۵ µl انجام شد که حاوی ۱۰ mmol Tris-base و ۵۰ mM KCl و 2mM $MgCl_2$ و 200 µM از هر dNTP ، ۱ mM پرایمر و 1µg DNA الگو و ۲ واحد آنزیم Taq پلیمراز بود. PCR با دستگاه ترموسایکلر(Eppendorf) انجام شد. دمایی که در مرحله اول مورد استفاده قرار گرفت عبارت بود از: دمای ۹٤ °c به مدت ۵ دقیقه برای جدا شدن دو رشته DNA از یکدیگر.

۳۲ سیکل بعدی دارای چرخهٔ حرارتی به صورت زیر بود :

دمای دناتوراسیون به مدت ۱ دقیقه در ۹٤°c ، دمای اتصال به مدت ۱ دقیقه و در ٦۲°c و دمای گسترش



شکل۱- تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR از نمونه های سرولوژی مثبت با پرایمرهای B4 وB5
ستون ۱: مارکر (Gen ruller 100 bp DNA ladder) ستون ۲: کنترل مثبت (واکسن Rev1 حاوی بروسلاملی‌تنسیس ضعیف شده) ستون ۱۵: کنترل منفی (آب مفطر) و ستونهای ۳ تا ١٤ نمونه‌های سرولوژیکی مثبت که در بین آنها ستون های ۳، ٤، ۷، ۹ و ۱۳ فاقد محصول PCR و ستونهای ۵، ٦، ۸، ۱۰، ۱۱ و ۱۲ نشان دهنده محصول PCR با تعداد ۲۲۳ باز میباشند.

پرایمرها به مدت ۱ دقیقه در ۷۲°c و در پایان ۷ دقیقه در ۷۲°c برای گسترش پرایمرها (۱۷،۹ و۱۹).

الکترو فورز محصولPCR

برای الکتروفورز مقدار ۸µl از محصول PCR را با µl ۲ از رنگ (Loading dye) مخلوط و به روی آگارز ژل ۲٪ حاوی ۰/۵ میگروگرم اتیدیرم بروماید در ۱ ml آگارز ژل منتقل شد. نمونه‌ها در ولتاژ ۹۰ به مدت یک ساعت الکتروفوز شد و با Genruller 100bp DNA Ladder مقایسه شد و با نور UV در دستگاه ژل داکیومنتیشن (مدل Biometra) مشاهده گردید(۱۹).

نتایج و مشاهدات

خلوصDNA: خلوص DNA استخراج شده از نمونه های خون با اندازه‌گیری نسبت OD_{260}/OD_{280} ، بین ۱/۷۵ تا ۱/۹ بود که این مقادیر مناسب می باشند(۱۹).

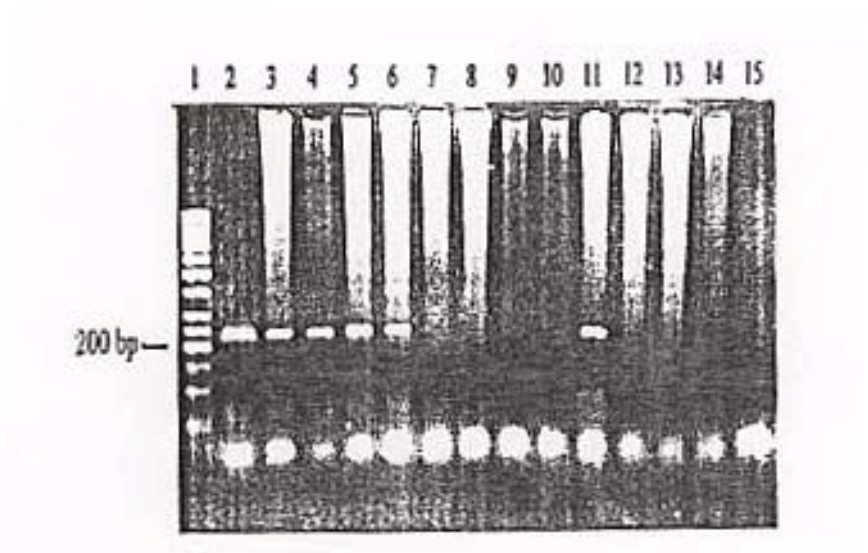
PCR نمونه‌های سرولوژی مثبت: DNA ۵۰ نمونه که از نظر آزمایش های سرولوژی مثبت بودند استخراج شد و تحت آزمایش PCR قرار گرفتند و محصول PCRبر روی ژل آگارز ۲٪ مشاهده شد. از بین ۵۰ نمونه سرولوژی مثبت ۳۰ نمونه با PCR مثبت (٦٠٪) و ۲۰ نمونه (٤٠٪) منفی بودند(شکل۱).

***PCR* نمونه‌های سرولوژی مثبت:** DNA ۵۰ نمونه که از نظر آزمایش‌های سرولوژی مثبت بودند استخراج شد و تحت آزمایش PCR قرار گرفتند و محصولPCRبر روی ژل آگارز ۲٪ مشاهده شد. از بین ۵۰ نمونه سرولوژی مثبت ۳۰ نمونه با PCR مثبت (٦٠٪) و ۲۰ نمونه (٤٠٪) منفی بودند(شکل۱).

PCR نمونه‌های سرولوژی منفی: ٤٥ نمونه‌ای که آزمایش سرولوژی آنها منفی بود مورد استخراج DNA و آزمایش PCR قرار گرفتند و محصولPCR روی آگارز ۲٪ مشاهده شد (شکل ۲). ۱۲ نمونه مورد آزمایش PCR مثبت (٢٦٪) و دارای محصول PCR با ۲۲۳ جفت باز بودند و فاقد باند مربوط به ۲۲۳ جفت باز بودند.

جدول شماره ۱ : نتایج PCR نمونه‌های خون گاو در دو گروه شاهد و آزمایش همراه با نتایج کلی سرولوژی نشان داده شده است.

سرولوژی (-)	سرولوژی (+)	
۱۲	۳۰	PCR (+)
۳۳	۲۰	PCR (-)
۴۵	۵۰	مجموع



شکل ۲- تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR از نمونه های سرولوژی منفی با پرایمرهای B4 وB5
ستون ۱: مارکر ، ستون ۲: کنترل مثبت(واکسن Rev1) و ستون ۱۵: کنترل منفی (آب مفطر). ستونهای ۳، ٤، ٥، ٦ و ۱۱ PCR مثبت و ستونهای ۷، ۸، ۹ ، ۱۰، ۱۲، ۱۳ و ١٤ PCR منفی هستند. باندهای کمتر از ۵۰ bp پرایمر هستند و باندهای بین bp ۱۰۰ و ۵۰ bp ، RNA هستند.

بحث

محققین زیادی از روش PCR برای شناسایی باکتریهای بروسلا استفاده کرده اند.آنها برای این منظور از نمونه های متعددی استفاده کردند. مانند باکتری خالص شده از محیط کشت، شیر گاو و گوسفند، شیر و خون گوسفند، پنیر ،اندامهای لنفی گاوهای آلوده، خون انسان و جنین سقط شدهٔ گاوها(۸،۹،۱۱،۱۲،۱۳،۱۴ و۱۷).

این نتایج نشان دادند که آزمایش PCR با DNA استخراج شده از اندامهای لنفی دام آلوده، جنین سقط شده و خون انسان حساسیت بالایی دارد اما با شیر، پنیر و خون دام حساسیت پایین است. Hamdy و همکاران (۲۰۰۲) از نمونه‌های شیر حیوانات آلوده به بروسلوز آزمایش PCR انجام دادند و در مجموع به این نتیجه رسیدند که PCR روش مطمئنی برای تشخیص بروسلوز به ویژه در حیوانات نیست.

در این تحقیق روش PCR برای تشخیص باکتری بروسلا در خون گاوها به کار گرفته شد. از ۵۰ نمونهٔ سرولوژی مثبت فقط در ۳۰ نمونه با PCR باکتری بروسلا

تشخیص داده شد و بقیه نمونه ها منفی بودند. نتایج نشان می‌دهد در کاربرد PCR و سرولوژی در تشخیص بروسلوز اختلاف زیادی هست که این اختلاف می‌تواند ناشی از علل زیر باشد:

۱- واکنشهای مثبت کاذب در سرولوژی به دلیل واکنش متقاطع بین بروسلا و برخی باکتریهای گرم منفی مثل یرسینیا ـ اشریشیاکلی، سالمونلا ، ویبریو کلرا

۲- عدم وجود باکتری در خون ، چون طول دورهٔ باکترمی درگاوها کوتاه است و باکتری ها پس از مدت کوتاهی از خون خارج شده و در رحم و غدد لنفاری و اندامهای لنفی نظیر طحال و تیموس و ... ساکن می‌شود.

۳- تعداد کم باکتری درخون که بعد از استخراج DNA مقدار DNA باکتری بسیار کم است یا وجود ندارد (پاسخ منفی کاذب در PCR).

٤- حالت مزمن بیماری که در آن باکتری در خون وجود ندارد.

همچنین ٤٥ نمونه خون که با آزمایش رزبنگال منفی بودند . تحت آزمایش PCR قرار گرفتند . از این نمونه ها ۱۲ نمونه با آزمایش PCR مثبت بودند (۲٦ ٪) که اختلاف معنی‌داری با نتایج سرولوژی دارد دلایل این اختلاف می‌تواند ناشی از علل زیر باشد :

۱- واکنشهای منفی کاذب در آزمایش رزبنگال

۲- عدم تولید آنتی بادی به حد کافی در دام به طوریکه در آزمایش رزبنگال قابل تشخیص نیست .

۳- واکسیناسیون دامها که ممکن است DNA در خون باشد ولی بیماری نباشد.

از این مشاهدات به طورکلی نتیجه می‌شود ترکیب PCRو آزمایش‌های سرولوژی می‌تواند به تقسیر بهتری بیانجامد. ضمناً لازم به ذکر است که هم روش‌های سرولوژی و هم روش‌های ملکولی نیاز به بهینه شدن بیشتری دارند. در مورد استخراج DNA باکتریها از خون هنوز روش کاملی ارائه نشده است و وجود DNA گلبولهای سفید همراه با DNA باکتری می‌تواند موجب نتایج منفی کاذب گردد.

پیشنهادات

۱- برای تأیید دامهایی که سرولوژی مثبت هستند آزمایش PCR خون و شیر با هم انجام شود ۲- به دلیل ساکن شدن باکتری در اندامهای تناسلی به ویژه رحم پیشنهاد می‌شود از ترشحات واژن و اندامهای تناسلی به ویژه در گاوهای آبستن استفاده شود.

۳- چون باکتری در دامهای مبتلا به بروسلوز به طور متناوب وارد خون می‌شود بهتر است که خونگیری به طور مرتب با فاصلهٔ زمانی مناسب(۱۰ روز) انجام شده و PCR شود.

٤- واکنشهای منفی در رزبنگال دیده شد بنابراین پیشنهاد می‌شود از دامهایی که رزبنگال منفی هستند با فاصلهٔ زمانی مناسب دوباره خونگیری شده و مورد آزمایش قرار گیرند.

منابع

۱. ذوقـی، اسـماعیل. ۱۳۶۹ تحقیقـاتی دربـارهٔ بروسـلوز. سازمان تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی.

۲. زارع، رضا. ۱۳۸۰. تب مالت بروسلوزیس. انتـشارات آستان قدس رضوی، شرکت به نشر

۳. منیر مادکور، ام. ۱۳۷۱. بروسلوزیس. ترجمه: دسته گلی، کامران و منیری، رضوان. تهران.

4. G, Alton, G. et al. Techniques for the brucellosis laboratory. Paris, INRA, (1988).

5. G. G., Baily, J. B., Krahn, B. S. Drasar, and N. G. Stoker, Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification.J. Trop. Med. Hyg. 95, 271-275. (1992).

6. B. J. Bricker. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. Veterinary microbiology. 90, 435 - 446. (2002).

7. European Commission. Brucellosis in sheep and goats. http: //europa. eu. int/comm/food/fs/sc/scah/out59_en. PDF. (2001).

8. A. , Fekete, J. A. Bantle, and S. M. Halliny, Detection of *Brucella* by polymerase chain reaction in bovine fetal and maternal tissues. J. Vet. Diagn. Invest. 4, 79 - 83. (1992).

9. P. Gallien, C. , Dorn, G. , Alban, C. Staak, and D. protz, Detection of *Brucella* species in organs of naturally infected cattle by polymerase chain reaction. Veterinary Record. 4, 512 -514. (1998).

10. B., Garin-Bastuji, N., Hummel, G., Gerbier, C., Cau, R., Pouillot, M. D. Costa., and J. J. Fontaine, Non specific serological reactions in the diagnosis of bovine brucellosis: experimental oral infection of cattle with repeated doses of *Yersinia enterocolitica* 0: 9. Veterinary Microbiology. 66, 223-233. (1999).

11. M. E. R. Hamdy, and A. S. Amin, Detection of *Brucella* species in the milk of infected cattle, sheep, goats and camels by PCR. The Veterinary Journal. 163, 299-30. (2002).

12. D. S. , Leal-Klevezas, I. O. , Martinez, A. Lopez-Merino, and J. P. Martinez- Soriano, Single-Step PCR, for the detection of *Brucella* spp. From blood and Milk of infected animals. J. Clin. Micribilo. 33, 3097 - 3090. (1995).

13. G., Leyla, G. Kadri, and O. Urman, Comparison of polymerase chain reaction and bacteriological culture for the diagnosis of sheep brucellosis using aborted fetus samples. Veterinary Microbiology. 93, 53 - 61. (2003).

14. G. M., Matar, I. A., Khneisser, A. M., Abdelnoor, Rapid laboratory confirmation of human brucellosis by PCR analysis of a target sequence on the 31-kilodalton *Brucella* antigen DNA. J. Clin. Microbiol. 34, 477 - 478. (1996).

15. K., Nielsen, P., Smith, J., Widdison, D., Gall, L., Kelly, W. Kelly, and P. Nicoletti, Serological relationship between cattle exposed to *Brucella abortus*, *Yersinia enterocolitica* 0:9 and *Escherichia coli* 0:157: H7. Veterinary Microbiology. Article in press. (2004).

16. K. Nielsen, Diagnosis of *Brucella* by serology.

Veterinary microbiology. 90, 447 - 459. (2002).

17. L. J., Richtzenhain. A. Cortez. and M. B. Heinemann. A multiplex PCR for the detection of *Brucella* spp. and Leptospira spp. DNA from aborted bovine fetuses. Veterinary Microbiology. 87, 139- 147. (2002).
18. C. , Romero, C. , Gamazo, M. , Pardo, I. , Lopez-Goni, Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. J. Clin. Microbiol. 33, 615 - 617. (1995).
19. J. Sambrook, and D. W. Russel, Molecular cloning. Cold Spring Harbor. New York. (2001).
20. V., Weynants, A. , Tibor, P. A. , Denoel. C. , Saegerman, J. , Godfroid, P. Thiange, and J. , J. Letesson, Infection of cattle with Yersinia entrocolitica 0:9 a cause of the false positive serological reactions in bovine brucellosis diagnostic tests. Veterinary Microbiology. 48, 101-112. (1996).