استعمال طريقة الطبعه وتقنية البلمرة بالوقت الحقيقي Real-Time PCR في تشخيص طفيلي المقوسه الكونديه *Toxoplasma gondii* في ذكور الجرذان البيض المصابه تجريبيا بالطفيلي

تاريخ الاستلام 2014/9/22 تاريخ القبول 2014/11/25

غيداء عباس جاسم
فرع الاحياء المجهرية
كلية الطب البيطري
جامعة القادسيه

مي ناجي الخناق*
قسم علوم الحياة
كلية التربيه
جامعة القادسيه

E-mail: ma_na_ka_1979@yahoo.com

الخلاصة

تهدف الدراسه الحاليه الى عزل طفيلي المقوسه الكونديه واحداث الاصابه التجريبيه وتشخيص هذه الاصابه باستعمال طريقة الطبعه وطريقه Real-Time PCR في مختلف اعضاء ذكور الجرذان البيض مثل الدماغ, الكبد والخصيه.شملت الدراسه الحاليه 30 من ذكور الجرذان البيض *Rattus norvegicus* بعمر(60-70) يوما وبمعدل اوزان 200-250 غرام .لوحظت الاكياس النسجيه للطفيلي في جميع الطبعات المحضره للاعضاء الدماغ ،الكبد والخصيه وباعداد واحجام مختلفه ،كما كانت نسبة الاصابه بالطفيلي بتقنيه Real-Time PCR في الدماغ 26% بينما كانت في كل من الكبد والخصيه 20% .سجلت الدراسه الحاليه امكانيه عزل طفيلي المقوسه الكونديه وتشخيصه باستعمال طريقة الطبعه المباشره وتقنية Real-Time PCR في انسجة الاعضاء للحيوانات التجريبيه.

الكلمات المفتاحيه : داء المقوسات , الطبعه, المشيمه, الاكياس النسجيه, Real-Time PCR .

---

*البحث مستل من اطروحة دكتوراه للباحث الثاني

المقدمه

ان طفيلي *Toxoplasma gondii* وهو طفيلي داخل خلوي اجباري يمكنه اصابة جميع الخلايا ذات الانويه مسببا الامراضيه كما ان له القدره على التلاعب وبفعالية في استجابة المضيف والاستفاده منها في

تضاعفه وانتشاره(1)اكتشف لاول مره عام1908 من قبل Nicolle&Manceaux(2).

تتضمن دورة حياة الطفيلي مضيفين هما المضيف النهائي (عائلة القطط) والتي تطرح اكياس البيض Oocysts مع برازها والمضيف الوسطي (اللبائن والطيور) والتي تتطور في انسجتها كالدماغ وانسجة العضلات الى الاكياس النسجيه tissue cysts للطفيلي بعد ابتلاع اكياس البيض او استهلاك لحوم الحيوانات المصابه غير المطبوخه جيدا كما تكتسب الاصابه عن طريق البيئه من التربه الملوثه والماء او الخضروات غير المغسوله جيدا او عن طريق الانتقال المشيمي (3،4)،كما قد تنتقل في عمليات نقل الدم ومستلمي الاعضاء (5)،وقد ينتقل عن طريق استهلاك حليب الحيوانات المصابه والحاوي على الطور سريع التكاثر(6) . ان الاكياس النسجيه للطفيلي يمكن ان تتطور في انسجة العديد من الاعضاء كالرئه،الكبد والكليه وهي اكثر شيوعا في الانسجه العصبيه والعضليه بضمنها الدماغ ،العيون،العضلات الهيكليه والعضله القلبيه (7) ،كما ان المصير النهائي للاكياس النسجيه قد يكون بتحطم تللك الاكياس وتحرر الطور البطيء التكاثر منها او انه قد يتحطم بفعل الاستجابه المناعيه للمضيف (8).يتم تشخيص طفيلي المقوسه الكونديه بالطرق المباشره وغير المباشره فبينما تستعمل الطرق غير المباشره المصليه بصوره واسعه للاشخاص المؤهلين مناعيا بالكشف عن الاجسام المضاده للطفيلي IgG, IgM لتمييز الاصابه الحاده عن الاصابه المزمنه تستعمل الطرق المباشره للاشخاص المثبطين مناعيا اذ يتم تشخيص الطفيلي بالعزل والمقاطع النسجيه اضافة الى ان الطفيلي يمكن ان يشخص من خلال خزعات الانسجه ،الدم والبول للكشف عن الماده النوويه DNA للطفيلي بتقنية PCR او Real-Time PCR (9).ان الجرذان هي النموذج الافضل لدراسة داء المقوسات في البشر ذلك لان داء المقوسات المزمن فيها مشابهه للبشر(10،11) ولذلك يمكن تطبيق نتائج الدراسات الخاصه بها على داء مقوسات البشري(12). تهدف الدراسه الحاليه الى تشخيص طفيلي المقوسه الكونديه بالاعتماد على طريقة الطبعه المباشره كتشخيص اولي وتاكيد الاصابه بالاعتماد على الطريقه الجزيئيه باستخدام تقنية Real-Time PCR للكشف عن الماده النوويه DNA للطفيلي في كل من الدماغ والكبد والخصيه في ذكور الجرذان المصابه تجريبيا بالعالق الحاوي على الطفيلي والمعزول من نماذج المشيمه للنساء المجهضات المصابات به.

المواد وطرائق العمل

عزل وتحضير الطفيلي

عزل طفيلي المقوسه الكونديه من نموذجي وةمشيمه للنساء المجهضات المصابات بالطفيلي حسب طريقه (11)بعد التاكد من وجود الطفيلي في تلك النماذج باستعمال طريقة المسحه المباشره (الطبعه)،اذ تم تقطيع النسيج الى قطع صغيره ومزجه مع كميه متساويه من المحلول الفسلجي وهرسه بالهاون ثم تصفيته بالشاش للتخلص من القطع كبيره الحجم , بعد ذلك طُرد الراشح بجهاز الطرد المركزي بسرعة 3000دوره/دقيقه لمده 10دقائق بعدها تم التخلص من العالق ثم عُلق الراسب بالملح الفسلجي واعيدت العمليه ثلاث مرات ثم اضيف للناتج 1000 وحده بنسلين و 100 غم سيتريبتومايسين لمنع التلوث.(13)استعملت شريحة العد haemocytometerلعد الاكياس النسجيه للطفيلي في عالق المشيمه المحضر وتم تخفيف النموذج للوصول الى 300 كيس نسجي لكل مل. تم حقن كل حيوان بـ 0.3 mlمن العالق المحضر داخل التجويف البريتوني وبعد ثمانية اسابيع من الاصابه التجريبيه تم تحضير حيوانات التجربه التي تم تخديرها باستعمال 0.3 كيتامين و 0.1 زايلازين ثم اجريت عملية التشريح

للحصول على الاعضاء الدماغ,الكبد والخصيه لغرض تشخيص الطفيلي في تلك الاعضاءبطريقة الطبعه المباشره اولا ثم تقنية Real-Time PCR ثانيا.

حيوانات التجربه

تضمنت 30 من ذكور الجرذان البيض *Rattus norvegicus*بعمر(60-70) يوما وبمعدل اوزان 200-250غرام وضعت في اقفاص بلاستيكيه نظيفه ومفروشه بنشارة الخشب التي يتم تغييرها كل ثلاثة ايام وزودت بقناني الارواء والعليقه وبكميات كافيه يوميا اما الظروف المختبريه 20-25 م مع اضاءه لـ 12يوميا ووجود مفرغة هواء ومراوح ومكيفات.

طريقة الطبعه

تم تحضير الطبعات الخاصه بانسجة مشيمه النساء المجهضات المصابات بالطفيلي والتي جمعت من صالة الولادة لمستشفى البتول للولادة في مدينة الكوت والتي تم اعتمادها كمصدر للاصابه التجريبيه, حضرت الطبعات بفصل الاعضاء المذكورة واخذ جزء من العضو وعمل مسحه على شريحه زجاجيه نظيفه من جهه قطع العضو وعلى امتداد الشريحه الزجاجيه والتي تجفف بعد ذلك بالهواء وتثبت باستعمال الكحول المثيلي وتصبغ بصبغة كيمزا وتفحص تحت المجهر لرؤية اطوار الطفيلي (14).

Real-Time PCR

تم تصميم البادئات الخاصة بجين B1 المسؤول عن تشخيص طفيلي المقوسة الكوندية في عينات الانسجة وذلك باستخدام موقع بنك الجينات -Genebank NCBI لأستخراج التسلسل الكامل للجين (B1) ذو الوزن الجزيئي 30 KDa باستخدام برنامج Primer3plus لتصميمه واستخدامه في فحص ال Real-Time PCR وتم تجهيز البادئات من قبل شركة Bioneer الكورية:

الجدول (1): يمثل البادئات التي استخدمت في هذا الدراسة مع تسلسلها النيوكليوتيدي وناتج فحص PCR :

Primer	Sequence		PCR product
B1	F	'3-GCGACATGGACGAGATGCT-'5	95bp
	R	'3-GTTGGCCTTCGCCGACC- 5 .'	

تم أجراء فحص Real-Time PCR وذلك لتحري عن طفيلي المقوسة الكوندية Toxoplasma gondii باستخدم البادئات الخاصة بجين B1 ذو الوزن الجزيئي 30 KDa الخاص بالطفيلي وحسب طريقة(15)، وكما يأتي يتكون الفحص من عدة خطوات:

استخلاص الحمض النووي Genomic DNA extraction

تم أجراءاستخلاص الحمض النووي من العينات النسيجية لذكور الفئران(15) باستخدام عدة االاستخلاص الخاصة(Genomic DNA extraction kit USA) المجهزة من شركة Geneaid الامريكية وتم أجراء الاستخلاص حسب تعليمات الشركة كآلاتي:

تم قطع 250غم من عينة الانسجة ووضعت في انبوبة قياس 1.5ml وتم اضافة 300 ميكروليتر من محلول حل الخلايا Cell lysis buffer وباستخدام خرزات دقيقة Micropestle لسحق النسيج.

حضنت العينات في الحمام المائي وبدرجة حرارة 60م° لمدة 10 دقائق لأكمال عملية تحليل الخلايا.

تم اضافة 100 ميكروليتر من محلول Protein Removal Buffer وذلك تحليل البروتين الخلوي ومزجت جيدا باستخدام جهاز المازج Vortex لمدة 10 ثواني ومن ثم حضنت على الثلج لمدة 5 دقائق.

وضعت العينات في جهاز الطرد المركزي بسرعة 12000 دورة / دقيقة لمدة 3 دقائق.

نقل السائل الطافي (Supernatant) الى انبوبة معقمة حجم 1.5ml ومن ثم تم اضافة كحول Isopropanol ومزجت جيدا باستخدام جهاز ال Vortex لمدة 10 ثواني.

وضعت المزيج في جهاز الطرد المركزي بسرعة 12000 دورة / دقيقة لمدة 5 دقائق.

تم التخلص من السائل الطافي ومن ثم اضيف 300 ميكروليتر من محلول الايثانول 70% لغسل حبيبات الحمض النووي.

وضعت المزيج في جهاز الطرد المركزي بسرعة 12000 دورة / دقيقة لمدة 3 دقائق.

تم التخلص من السائل الطافي ومن ثم تركت الأنابيب الفارغة في الهواء لمدة 10 دقائق.

اخيرا تم اضافة 50 ميكروليتر من محلول دارىء الازالة Elution buffer وضعت الانابيب في الحمام المائي وبدرجة حرارة 60م لمد 30 دقيقة وذلك لاذابة حبيبات الحمض النووي. ومن ثم خزن العينات بدرجة حرارة 20C- لحين اجراء فحص ال Real-Time PCR.

فحص الحامض النووي المستخلص DNA profile

تم الكشف عن الحمض النووي DNA المستخلص من العينات الانسجة(الدماغ، الكبد،الخصية) لذكور الجرذان المستعملة في الاصابة التجريبية وذلك من خلال استخدام جهاز Nanodrop spectrophotometer(THERMO.USA)الخاص بالكشف وقياس تركيز الاحماض النووي (DNA and RNA) حيث يتم الكشف الحمض النووي من خلال تحديد تركيز الحمض النووي DNA ng\µl وقياس نقاوة الحمض النووي DNA من خلال قراءة الامتصاصية بطول موجي يتراوح بين(260- nm 280) وتم استخدام الجهاز النحو التالي :

بعد تشغيل جهاز Nanodrop تم اختيار برنامج قياس الحمض النووي نوع DNA .

قمنا تصفير ركيزة المقياس مرتين باستخدام ورق نشاف خاص بالجهاز وذلك بوضع 1 مايكروليتر من(ddH2O) باستخدام ميكروبايبيت معقمة على سطح ركيزة المقياس وجراء التصفير وبعها قمنا بتنظيف الركيزة لقياس العينات.

3- قمنا بالضغط على زر ok لبدء عملية قياس تركيز ال DNA وذلك باستخدام 1 ميكروليتر من كل عينة من ال DNA المستخلص ومن ثم قمنا بتنظيف ركيزة مقياس الجهاز مرة اخرى لقياس العينة الاخرى.

4- وكذلك تم تحديد نقاوة عينات ال DNA المستخلص بقراءة الامتصاصية جهاز Nanodrop Spectrophotometer على طولين موجيين 280/260 نانوميتر حيث ان الحمض النووي DNA المستخلص يعتبر نقي عندما تكون نسبة الامتصاصية هي (1.8).

تحضير مزيج Real- Time PCR master mix

تم تحضير مزيج تفاعل البلمرة بالوقت الحقيقي PCR Real-Time باستخدام عدة ال AccuPower® 2X GreenStarTM qPCR Master Mix المجهزه من قبل شركة Bioneer الكورية وحسب تعليمات الشركة ، بعد ذلك تم وضع مكونات مزيج تفاعل Real-Time PCR التي ذكرت في الجدول (2) الى انابيب بيضاء معتمة حجم 0.2 ml خاصة بجهاز ال Real-Time PCR ومن ثم ونقلت جميع الانابيب الى جهز الطرد المركزي المازج (Exispin) vortex centrifuge بسرعة 3000

دورة/دقيقة لمدة 3 دقائق وثم وضعت في جهاز Real- Time PCR .

الجدول (2): مكونات مزيج Real- Time PCR master mix

PCR master mix	2X Green star master mix	25 µL
	DNA template	5 µL
	forward primer 10 pmol	1µL
	reverse primer 10 pmol	1 µL
	DEPC water	18 µL
	Total	50 µL

حالات الدورات الحرارية لفحص تفاعل السلسلة المتبلمر في الوقت الحقيقي Thermocycler Real- Time PCR Conditions

تم تطبيق الدورات الحرارية لفحص ال Real- Time PCR وذلك بالاعتماد على تعليمات الشركة لعدة AccuPower® 2X GreenStarTM qPCR Master Mix وكذلك من خلال حساب درجة الـ Tm البادئات وذلك باستخدام جهاز الـ MiniOpticon Real-Time PCR system BioRad. USA .

تحليل نتائج فحص تفاعل السلسلة المتبلمر في الوقت الحقيقيReal-TimePCR

تم تحليل نتائج فحص ال Real-Time PCR وذلك من خلال منحى التضخم Amplification plot المعتمد على رقم خط جهد العتبه Throushold cycler number (CT) value حيث تكون العينة موجبة عندما تتجاوز خط العتبة وكذلك تم تحديد خصوصية الفحص للعينات الموجبة من خلال منحنى الانصهار melt peak حيث تكون العينات موجبة اذا كان ظهورها في نفس درجة الانصهار والتي تتراوح في التضخم الحقيقي الجين من 80-90 °C Tm.

النتائج والمناقشه

أظهرت نتائج الدراسة الحالية الخاصة بتحديد نسب الاصابة في ذكور الجرذان التي تمت اصابتها تجريبيا بعالق المشيمة الحاوي على الطفيلي وبعد ثمانية اسابيع من الاصابة، اذ ظهر وجود الطفيلي وبنسبة اصابة مرتفعة بلغت 100 % ولجميع الجرذان المحقونة والبالغ عددها 30 جرذ حقن بعالق المشيمة وبالاعتماد على الطبعات والمسحات النسيجية ولجميع الاعضاء المدروسة مع عدم تسجيل فروق معنوية ، اذ ظهرت الاكياس النسيجية للطفيلي في كما في الصورة (1، 2، 3) لكل من الدماغ،الكبد،الخصية . ان استعمال طريقه الطبعه في الكشف عن اطوار الطفيلي تعد طريقه ناجحه للتشخيص الاولي عن وجود الطفيلي في الاعضاء والسوائل الجسميه(17)،اذ تمكن (18) من عزل الطفيلي واحداث الاصابة التجريبية في 14 جرذا ولم تتفق النتائج التي حصل عليها مع دراستنا في احداث الاصابة اذ كانت الاصابة في 5 جرذان وبنسبة (35.7%) 2 منها ذكور و 3 اناث وتم تشخيص الاصابة بطريقة الطبعة لسائل التجويف البريتوني ، كما تم تشخيص الاصابة بطريقة الطبعة ايضا في الاعضاء اذ وجد الطفيلي في المسحات المحضرة لاعضاء الدماغ، الكبد،القلب،الطحال والعقد اللمفاوية ولكنه لم يشخص في المسحات المحضرة من الرئة، الرحم، العضلات والصفاق peritoneum .

تتفق دراستنا مع العديد من الدراسات الاخرى التي سجلت احداث الاصابة التجريبية والكشف عنها بطريقة الطبعة حيث سجل (19) وجود الاكياس النسجية لطفيلي المقوسة الكوندية في السائل المنوي لذكور الجرذان المصابة تجريبيا بطريقة الطبعة ، كما استعملت طريقة الطبعة في الدراسة التي اجراها (20) اذ كشف عن وجود الطفيلي في نماذج الدماغ للجرذان المصابة تجريبيا ، وفي دراسة (21) تم تحضير طبعات من السائل البريتوني بعد 10 – 14 يوم من الاصابة التجريبية للجرذان بالطفيلي المعزول من نماذج المشيمة للنساء المجهضات وتمت ملاحظة الطور السريع التكاثر فيها وبنسبة 40% وبعد 6 – 8 اسابيع من الاصابة تم تحضير طبعات لاعضاء الدماغ ، الكبد، الطحال، العضلات والكلية لملاحظة الاكياس النسجية للطفيلي والحاوية على الطور بطيء التكاثر فيها، ووجد (22)الطفيلي في الاصابة التجريبية للفئران فقد استعملت طريقة الطبعة ايضا لكل من الدماغ والرئة لاثبات وجود الطفيلي فيها،اما (23) فقد لاحظت وجود الطور السريع التكاثر الهلالي الشكل ذو النهاية الامامية المستدقة والخلفية الدائرية للطفيلي في المسحات المحضرة للسائل البريتوني للفئران المصابة تجريبيا بعد 7 ايام من الاصابة اما بعد 5 اسابيع من الاصابة فقد لوحظ وجود الاكياس النسجية للطفيلي في الطبعات المحضرة للدماغ لجميع الفئران التجريبية،وفي الدراسة التي اجرتها (24)عزلت الطفيلي من مصادرمتعددةهي اجنة الضأن المجهضة،لحوم الضأن،حليب الضأن،لحوم فروج اللحم،نماذج ترب الحدائق المنزلية السائل المنوي للرجال في حالتي العقم الاولي والثانوي بالاضافة الى مشايم النساء المجهضات بفعل الطفيلي واستعمل كمصدر لاحداث الاصابة التجريبية للفئران وبعد شهر من الاصابة تم التحري عن وجود الطفيلي بوجود الاكياس النسجية وبطريقة الطبعة لجميع مصادر الاصابة لجميع فئران التجربة ، اما (25) فقد اثبتت حدوث الاصابة التجريبية بالطفليلي المعزول من اجنة الضأن المجهضة في الفئران التجريبية وذلك بتحضير طبعات لنماذج الدماغ وتشخيص اكياس الطفليلي فيها، وفي الدراسة التي اجراها (26) حصل على الطور سريع التكاثر للطفليلي في الطبعات المحضرة لنماذج الدم والسائل البريتوني للفئران المصابة تجريبيا بالطفليلي خلال الاسبوع الاول من الاصابة،اما(27) فقد سجلت نسبة الاصابة الكلية بطفيلي المقوسات في الارانب الاليفة بطريقة الطبعة والتي كانت 82% منها للذكور 72% وللاناث 92% وفي الفئران المصابة تجريبيا من عالق الدماغ لتلك الارانب فقد شخص وجود الطفيلي بطريقة الطبعة لتلك الفئران وكانت الاصابة الاعلى في نماذج الدماغ، ثم الكبد،الطحال،الرئة،القلب،الخصية،الرحم،الكلية اما اقل اصابة فقد كانت في العضلات مصنفة حسب اعداد الاكياس النسجية للطفليلي في كل عضو، وفي اصابة تجريبية لطفيلي المقوسة الكوندية في الارانب فقد تم تشخيص الطور السريع التكاثر للطفيلي في الطبعات الماخوذة من الكبد والكلية بعد سبعة ايام من الاصابة حسب الدراسة التي اجراها(28)،وفي دراسة تجريبية اجرتها (29) فقد تمكنت من احداث الاصابة التجريبية عند حقن الطفيلي المعزول من نماذج المشيمة للنساء والنعاج والماعز في بيض الدجاج وتم تاكيد الاصابة بملاحظة الطفيلي في الطبعات المحضرة لراسب للسائل اللقانقي لذلك البيض،بينما كانت نسبة الاصابه في اعضاء الدجاج المحلي في محافظة السليمانيه وهي الكبد،الكليه،الطحال 38.46 % ، 20.51 % ، 12.82 % على التوالي حسب الدراسه التي اجراها(17) وباستعمال طريقة الطبعه ولهذا فهي طريقة ناجحة للكشف الاولي عن وجودالطفيلي في الاعضاء وسوائل الجسم.

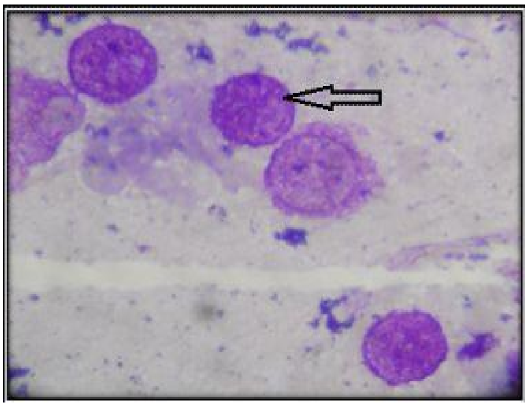
ان نسبة الاصابة بطفيلي المقوسة الكوندية باستعمال طريقةReal Time PCR موزعة حسب الاعضاء المدروسة (الدماغ،الكبد،الخصية) الماخوذة من الجرذان التي حقنت بعالق المشيمة ان اعلى نسبة اصابة مسجلة كانت في نماذج انسجه الدماغ وبلغت26% لوجود10عينات موجبة من اصل 30 عينة ، اما نسبة الاصابة التي سجلت في الكبد والخصية فقد كانت 20% لوجود 6 حالات موجبة من مجموع 30عينة كما في الشكل (1)،(2)،(3) .ان Real-time PCR سهل

الاستعمال وذو نتائج اسرع من PCR التقليدية وهو ذو اهمية في التقليل من خطر التلوث (30)، هو شكل محسن موثوق لتحليل PCR يزود ببيانات كمية عن الطفيلي ولانة لايتطلب فتح انابيب الاختبار بعد عملية التضخيم فهو يقلل من خطر التلوث البيئي (31)، يعتمد هذا الاختبار على تضخيم قطع من DNA والتي تكرر 200-300 مرة والتي يتم الكشف عنها في السائل الامنيوني والعديد من الانسجة للفئران المصابة وهو يسمح بتقدير عدد اكياس الطفيلي في الدماغ وهو يستعمل بنجاح لتحديد عيارية الطور سريع التكاثر الموجود في النموذج (32).كما ان لهذه الطريقة معدل منخفض من النتائج الموجبة الكاذبة ولة انواع عديدة مختلفة والتي تسمح بالتشخيص السريع والموثوق فهناك العديد من الدراسات التي تؤكد على انها الطريقة الاكثر موثوقية عند وجود التتابع المستهدف بنسخ متعددة مقارنة بذو النسخة الواحدة(33).اذ يمكن للتحليل الجزيئي ان يكشف عن الكميات القليلة لـDNA فهو اداة تشخيصية حساسة بديلة وان جين B1 هو الجين المستهدف كونة الجين الاكثر حساسية والذي يستعمل بصورة واسعة للكشف عن الطور السريع التكاثر والاكياس في جميع سلالات الطفيلي (34) .

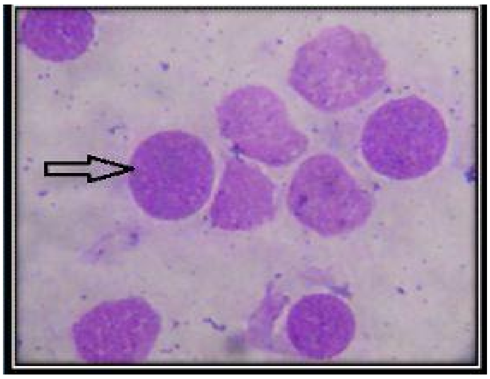
ان تقنية Real Time PCR قد تم تطويرها بنجاح لتكون على درجة عالية من الحساسية والخصوصية كما انها طريقة سريعة للكشف عن المادة النووية DNA للطفيلي في نماذج الدم،سائل النخاع الشوكي،السائل الامنيوني والانسجة (35) اتفقت دراستنا الحالية مع الدراسة التجريبية التي اجراها (36)على الفئران لتشخيص الاصابة التجريبية في الدماغ اذ سجل وجود الطفليلي ولكنة اختلف عنا في زيادة نسبة الاصابة بالطفيلي في هذا العضو واللتي بلغت 60% ،كما شخص (1) وجود طفيلي المقوسة الكوندية في نماذج الدماغ والخلايا اللمفاوية المحيطية للفئران المصابة تجريبيا ،اما (37) فقد اتفق مع دراستنا الحالية في تسجيل نسبة اصابة بداء المقوسات بلغت 100% بالكشف عن المادة النووية لطفيلي المقوسات باستعمال تقنيةReal Time PCR في نماج السائل المنوي للارانب المصابة تجريبيا بالطفيلي،اما (35) فقد كان متقاربا معنا في نسبة الكشف عن وجود المادة النووية لطفيلي المقوسة الكوندية في 64 نموذج لسائل النخاع الشوكي لمرضى الايدز باستعمال تقنية Real Time PCR اذ سجل نسبة اصابة كلية بلغت 32.8 %،اما (38) فقد تقارب معنا في تشخيص الطفيلي في مرضى الاصابات العصبية وبنسبة اصابة بلغت 18.8% في مرضى داء المقوسات المخي Cerebral Toxoplasmosis اما في المرضى المصابين ببقية الاصابات عصبية فقد انخفضت النسبة عن ما سجلنها وبلغت 7.4% .

اما في بقية الدراسات التجريبية والتشيخصية عن طفيلي المقوسات فقد اتفقت معنا في تشخيص الطفيلي باستعمال تقنيةReal Time PCR ولكنها لم تتفق معنا في انخفاض النسب التي سجلتها مقارنة بالنسب التي سجلت في دراستنا الحالية،ففي ثلاثة انواع من القوارض استعملت تقنية Real Time PCR لتشخيص الاصابة بالكشف عن وجود المادة النووية للطفيلي في نماذج الدماغ و القلب وبنسب اصابة بلغت, 14.3% 10.3% 6.5%, لكل نوع منها،وفي دراسة مسحية كشف (16)عن الطفيلي في نماذج لحوم الخنازير في مدينة بانكوك في تايلند وبنسبة اصابة منخفضة بلغت 1.38% ، اما استعمال تقنيةReal Time PCR كطريقة تشخيصية في اصابات البشر بداء المقوسات فقد سجلت ولنماذج مختلفة فقد استعمل(39) نماذج الدم،سائل النخاع الشوكي CSF والسائل الامنيوني Amniotic fluid للكشف عن المادة النووية للطفيلي،اما في نماذج مصل الدم فقد شخص (40) الطفيلي باستعمال تقنية Real Time PCR،اما في الدم،السائل الامنيوني Amniotic fluid وسائل الغدد اللمفاوية للنساء الحوامل فقد تم تشخيص الطفيلي من قبل (30) باستعمال تقنيةReal Time PCR و تقنية -nested PCR اما(3)فقد اثبت وجود المادة النووية للطفليلي في 300 نموذج للسائل الامنيونيAmniotic fluid للنساء الحوامل وبنسبة اصابة بلغت 1.3% ،كما كانت نسبة الاصابة بالطفيلي بين مرضى الايدز33.6% في نماذج

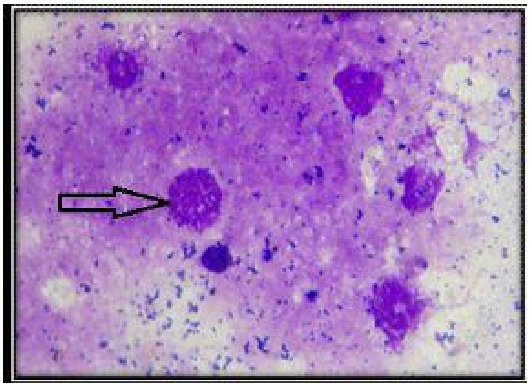
الدم وسائل النخاع الشوكي حسب دراسة (41). ان النتائج التي يتم الحصول عليها قد لاتتفق مع نتائج الاختبارات الاخرى والتي لها درجة كبيرة من الحساسية مقارنة بـPCR كما ان عدم الكشف عن وجود الطفيلي في بعض النماذج للسائل المنوي والانسجة لا يعني عدم وجود الطفيلي فمن المحتمل ان جزء من النتائج السالبة الكاذبة تنتج عن تقنية استخلاص الـDNA اضافة الى ان mg 50 من المادة النووية(المضيف+ الطفيلي) المستعملة لكل عينة تفاعل يمكن ان تحتوي على كمية غير كافية من المادة النووية للطفيلي(43) ;(42) ،كما ان حساسية الاختبار يمكن ان تتاثر بالاخطاء في طريقة العمل او نتيجة لظروف تخزين العينات(44).



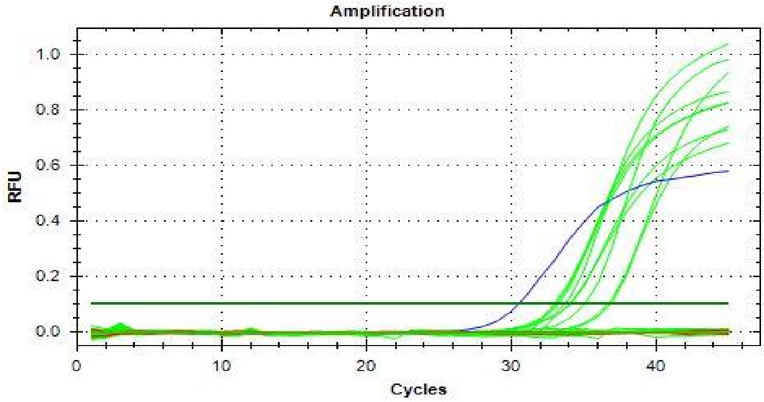
الصوره (1): كيس نسيجي في طبعات لدماغ ذكورالجرذان المصابة تجريبيا بطفيلي المقوسة الكوندية والمصبوغة بصبغة كيمزا100X



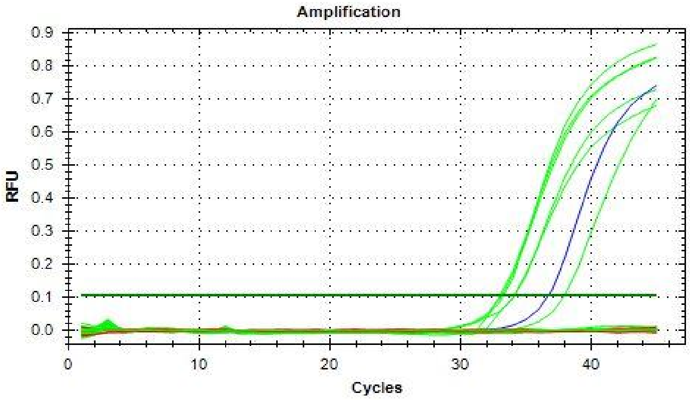
الصوره (2): كيس نسيجي في طبعات لكبد ذكورالجرذان المصابة تجريبيا بطفيلي المقوسة الكوندية والمصبوغة بصبغة كيمزا100X



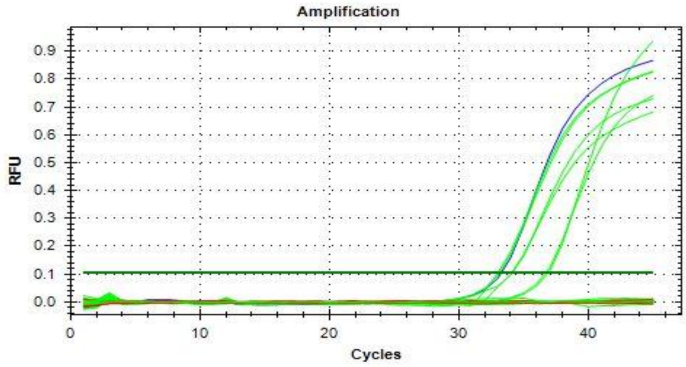
الصوره (3): كيس نسيجي في طبعات لخصيه ذكورالجرذان المصابة تجريبيا بطفيلي المقوسة الكوندية والمصبوغة بصبغة كيمزا100X



الشكل (1) : مخطط يوضح منحنى التضخم Amplification للعينات الموجبه والسالبه في جهاز RT-PCR لجين B1 ولصبغة Syper Green لطفيلي *T. gondii* في الدماغ لعينات ذكور الجرذان المصابه تجريبيا حقنت بعالق المشيمه اذ يمثل المحور السيني X عدد دورات PCR خلال التفاعل بينما يمثل المحور الصادي Y الصبغه المتالقه اذ يلاحظ تضخم حقيقي واضح في العينات الموجبه فوق خط العتبه Threshold line عدم وجود تضخم للجين في العينات السالبه اسفل خط العتبه .



الشكل (2) : مخطط يوضح منحنى التضخم Amplification للعينات الموجبه والسالبه في جهاز RT-PCR لجين B1 ولصبغة Syper Green لطفيلي *T. gondii* في الكبد لعينات ذكور الجرذان المصابه تجريبيا حقنت بعالق المشيمه اذ يمثل المحور السيني X عدد دورات PCR خلال التفاعل بينما يمثل المحور الصادي Y الصبغه المتالقه اذ يلاحظ تضخم حقيقي واضح في العينات الموجبه فوق خط العتبه Threshold line وعدم وجود تضخم للجين في العينات السالبه اسفل خط العتبه.



الشكل (3) : مخطط يوضح منحنى التضخم Amplification للعينات الموجبه والسالبه في جهاز RT-PCR لجين B1 ولصبغة Syper Green لطفيلي *T. gondii* في الخصيه لعينات ذكور الجرذان المصابه تجريبيا حقنت بعالق المشيمه اذ يمثل المحور السيني X عدد دورات PCR خلال التفاعل بينما يمثل المحور الصادي Y الصبغه المتالقه اذ يلاحظ تضخم حقيقي واضح في العينات الموجبه فوق خط العتبه Threshold line وعدم وجود تضخم للجين في العينات السالبه اسفل خط العتبه.

References

1. Jia, B, ; Lu, H.; Liu,Q. ; Yin , J.; Jiang, N. and Chen, Q.(2013). Genome- wide comparative analysis revealed significant transcriptome changes in mice after *Toxoplasma gondii* infection . Parasites & Vectors, 6(161) :1-12.
2. *Miro , G ; Montoya, A.; Fisher, M and Fuentes, I . (2008).* Toxoplasmosis –an update. *EJCAP. ;18 (3*):246-254.
3. Dabritz, H. and Miller, M.; Atwill,E.; Gardner,I.; Leutenegger,C.; Melli,A.and Conrad,P. (2007). Detection of *Toxoplasma gondii*-like oocysts in cat feces and estimates of the environmental oocyst burden. JAVMA.; Vol. 231, No. 11 :1-9.
4. Conrad,P. (2007). Detection of *Toxoplasma gondii*-like oocysts in cat feces and estimates of the environmental oocyst burden. JAVMA, Vol 231, No. 11 :1-9.
5. Khaki, A. ; Farzadi, L . Ahmadi, S.; Ghadamkheir, E. ; Khaki, A. shojaee, S. and Sahizadeh, R.(2011). Recovery of spermatogenesis by *Allium cepa* in *Toxoplasma gondii* infected rats . Afr. J. Pharm. Pharmacol . 5(7):903-907.
6. Dubey J, and Jones J, (2008). Toxoplasma gondii infection in humans and animals in the United States, Int. J. parasitol. 38 :1257–1278.
7. Costa, VM .and Langoni ,H.(2010). Detection of *Toxoplasma gondii* in the milk of experimentally infected Wistar female rats, J. Venom. Anim. Toxins. Incl. Trop. Dis.;16(2):368-374
8. Abu-Dalbou M, Ababneh M, Giadinis N, and Lafi S, (2010). Ovine and Caprine Toxoplasmosis (*Toxoplasma gondii*). IJVST .; 2(2): 61- 76.
9. Gharadaghi Y, Shojaee S, Khaki A, Hatef A, Ashtiani H, Rastegar H, and Fathiazad F, (2012). Modulating effect of Allium cepa on kidney apoptosis caused by *Toxoplasma gondii . Advanced Pharmaceutical Bulletin;* 2(1),1-6.
10. Calderaro, A.; Peruzzi,S.; Piccolo,G.; Gorrini,,C.; Montecchini,,S.; Rossi,,S.; Chezzi,C. and Dettori,g. (2009). Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection. *Int. J. Med. Sci.*; 6 (3):135-136.
11. Asgari q, Keshavarz H, Shojaee S, Motazedian M, Mohebal M, Miri R, Mehrabani D, and Rezaeian M, (2013). In Vitro and In Vivo Potential of RH Strain of *Toxoplasma gondii* (Type I) in Tissue Cyst Forming. *Iranian J. Parasitol. ; 8(3):367-375*
12. Afshari F, Imani A, Asl S , Farhang H , Ghasempour K , Ezzatzadeh A, and Ainechi N, (2013). Evaluation of Testosterone and Alkaline Phosphatase Activity Changes in Epidydimis of *Toxoplasma gondii* Infected Rats, Int. J. Women's Health Reproduction Sci.; 1(2): 1-8 .

13. Abdoli A, Dalimi A, and Movahedin M, (2012). Impaired reproductive function of male rats infected with *Toxoplasma gondii* Inst ꞔAndrologia , 44: 679–687.

14. Alkennay, E. and Hassan , S. (2010). Pathological study on some tissues of rat experimentally infected with Toxoplasma gondii. J. Edu. & Sci., 23 (3): 8-17.

15. ALKhaled, M. (2012).Serological and molecular study of toxoplasmosis in chicken and ducks in some regions of middle Euphrates. College of veterinary medicine ،university of Baghdad, PhD.Pp:135.

16. Yu, T. ; Kim, T. and Cipolla,R. (2010). Real-time Action Recognition by Spatiotemporal Semantic and Structural Forests. BMVC : 1-12.

17. Sutthikornchai, C. ; Mahitikorn, A. and Sukthana, Y . (2013). Quantitative PCR detection of *Toxoplasma gondii* in minced pork from selected morning markets in Bangkok, Thailand . *J. Trop. Med .Parasito. ;36:68- 74.*

18. Mohammed , A. and Abdullah, SH.(2013). Diagnostic Study of Toxoplasmosis in Domestic Chickens in Sulaimani Province . AL-Qadisiya Journal of Vet. Med. Sci.; 12 (2):63-69.

19. Al-taie, l. and Abdulla, s.(2008). *Toxoplasma gondii:* Experimental infection of Isolated local strain in Sulaimani Province . IRAQI J. MED. SCI.;6(3): 60 – 71.

20. Dalimi, A. and A bdoli, A. (2013). *Toxoplasma gondii* and Male Reproduction Impairment: A new Aspect of Toxoplasmosis Research. Jundishapur J. Microbiol.; 6(8):1-4.

21. Terpsidis K, Papazahariadou M, Taitzoglou I , Papaioannou N, Georgiadis M, and Theodoridis I, (2004). *Toxoplasma gondii*: Reproductive parameters in experimentally infected male rats. Exper. Parasitol. 121: 238–241.

22. Pena, H . ; Soares, R. ; Amaku, M . ; Dubey, J.and Gennari, S.(2006). *Toxoplasma gondii* infection in cats from Sa˜o Paulo state, Brazil:Seroprevalence, oocyst shedding, isolation in mice, and biologic and molecular characterization. Res Vete. Sci.; 81:58–67.

23. ياسين، ابتسام محسن (2005). تعديل الاستجابة المناعية ضد الإصابة بالمقوسات الكوندية باستخدام مستخلص السكر المتعدد الدهني لبكتريا القولون*Escherichia coli* . رسالة ماجستير.كلية التربية، جامعة الموصل. 107 صفحة.

24 أغوان، سرى سالم (2005). التحري عن بعض مصادر العدوى مع دراسة التأثيرات المناعية المرضية لطفيلي*Toxoplasma gondii* . أطروحة دكتوراه، كلية الطب البيطري،جامعة الموصل. 174 صفحة.

25 عبدالله، دنيا عبد الرزاق (2004). دراسة مصلية ونسيجية لداء المقوسات الكوندية في لحيوانات المجزورة والإصابة التجريبية في الفئران. رسالة ماجستير، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل. 90 صفحة.

Salibay C, and Calveria F, (2006). *Toxoplasma gondii* infection in

toxoplasmosis . Clin. Rev. Opinions.; 5(2): 11-17.

32 Khater, H.; Khater, N.; Barakat, A. (2013). Serological and molecular studies of ovine and human toxoplasmosis with a trial of treatment of infected ewes. *Sci. J. Vete. Advan.; 2(11) 157- 68.*

33 Gunel, T. ; Kalelioglu, I. ; Ermis , H. ; Has , R. and Aydinli , K. (2012). large scale pre-diagnosis of *Toxoplasma gondii* DNA genotyping by real-time PCR on amniotic fluid ., Biotechnol. & Biotechnol. Eq.; 26(2): 2913-291.

34 Reischl, U. ; Bretagne, S. ; Krüger, D. ; Ernault, P. and Costa, J .(2003).Comparison of two DNA targets for the diagnosis of Toxoplasmosis by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. *BMC. Infec. Dis.*;3:1-7.

35 Klun, I.; Vujanić, M.; Yera, H.; Nikolić, A.; Ivović, V.; Bobić , B. ; Bradonjić S. ; Camet ,M J. and Djaković, O. (2011). *Toxoplasma gondii* infection in slaughter pigs in Serbia: seroprevalence and demonstration of parasites in blood. Vete. Res.; 2011, 42:17: (1-6).

36 Shi-guo, L. ; Hai-zhu, Z. ; Xin, L . ; Zhe, Z. Bin, H. (2006). Dynamic observation of polypide in semen and blood of rabbits infected with *Toxoplasma tachyzoites* . *Chin. Med. J .; 119(8):701-704.*

37 Cardona, N. Basto,N. Parra ,B . ; Zea , A. Pardo , C. Bonelo , A. ; Marin , E. (2011). Detection of *Toxoplasma* DNA in the Peripheral Blood of HIV-Positive

Philippines *Rattus* spp. confi rmed through bioassay in *Mus musculus* . *Vet. arhiv .; 76* (4): 351-361.

26 Aghwan, S, ; Al-Taee , A. and Suliman, E.(2010). Detection of *Toxoplasma gondii* infection in domestic rabbits by using multiple techniques . *Iraqi J.Vete.Scie.;24 (2) :65-69.*

27 Barakat A, (2007).Some diagnostic studies on male new zealand Rabbit experimentally infected with *Toxoplasma gondii* strain.global veterinaria.; 1 (1): 17-23.

28 الكناني، انتصار رحيم،الحمو ، رضاء ناظم والنعيمي، نبيل عناد صالح ،(2012) . دراسة التغيرات المرضيه النسجية وكيمياء النسج لاسخاد النساء والنعاج والمعز الخمجة بالمقوسة الكوندية *Toxoplasma gondii*. مجلة الأنبار للعلوم البيطرية،5 (1) :1-12 .

29 *Calderaro*, A . ; *Piccolo, G . ; Gorrini, C. ; Zerbini, S. ; Bommezzadri, S. ;Dettori, G and Chezzi, C.* Comparison between two Real-time PCR assays and a nested-PCR for the detection of *Toxoplasma gondii* . (2006). Acta.biomed .;77: 75-80.

30 Pinchart, B.; Bui, M.; Hidalgo, F.; Equy, V.; Marul, R. and Pelloux , H. (2007). ADAPTING A CONVENTIONAL PCR ASSAY FOR *TOXOPLASMA GONDII* DETECTION TO REAL-TIME QUANTITATIVE PCR INCLUDING A COMPETITIVE INTERNAL CONTROL Parasite.;14:149-154.

31 Sudan, V. ; Jaiswal , A. and Shanker , D. (2013). Recent trends in the diagnosis of

Patients with Neuro- opportunistic Infections by a Real-Time PCR Assay. J.of Neuroparasitolog (2):1-6.

38 Kupferschmidt , O. ; Kinger , D. ; Held , T.; Ellerbrok , H . ; Siegert , W. and Janitschke ,K .(2001). Quantitative detection of *Toxoplasma gondii* DNA in human body fluids by Taq Man polymerase chain reaction . CMI . 7(3): 120-124.

39 Amerizadeh , A. ; Khoo, B. ; The, A. ; Golkar, M. ; Karim, I . ; Osman, S. ; Yunus , M . and Noordin , R. (2013). Identification and real-time expression analysis of selected Toxoplasma gondii in-vivo induced antigens recognized by IgG and IgM in sera of acute toxoplasmosis patients. BMC Infect. Dis.; 13 (287):1-12.

40 Mesquita , R . ; Ziegler, P . ; Hiramoto, R .; Vidal , J. and Chioccola , v. (2010). Real-time quantitative PCR in cerebral toxoplasmosis diagnosis of Brazilian human immunodeficiency virus-infected patients. J.Med. Microb. ; 59:641–647.

41 Lopes W, Costa A , Souza F, Rodrigues J, Costa G, Soares V, and Silva G,(2009).Semen variables of sheep (*Ovis aries*) experimentally infected with *Toxoplasma gondii.* Ani. j. Rep. Sci. ;111 : 312– 319.

42 Scarpelli, L.; Lopes, W.; Migani, M.; Bresciani, K. and Costa, A. (2009). *Toxoplasma gondii* in experimentally infected *Bos Taurus* and *Bos indicus* semen and tissues. Pesq. Vet. Bras. ; 29(1):59-64.

43 Sroka,J . ; Fatla,A. and Dutkiewicz, J.(2006). Occurrence Of *Toxoplasma gondii* In Water From Wells Located On Farms . Ann. Agric. Environ. Med . ;13: 169–175.

Using the smear method and Real-Time PCR technique in diagnosis of *Toxoplasma gondii* parasite in white male rats experimentally infected by parasite

Receved :22/9/2014 Accepted : 25/11/2014

Ghaidaa Abbas Jasim and May Naji Al-Khanaq*

Department of Biology,College of Veterinary Medicine ,alqadysia University

Department of Biology, College of Science, Wasit University, Iraq.

Abstract

The present study aims to isolate *Toxoplasma gondii* parasite and causing the experimentally infection and diagnosis of this infection by using the smear method and Real-Time PCR technique in different organs of white male rats such as brain, liver and testes . from aborted placentae of infected women and experimentally infection of male rats then diagnosed of this infection by impression smear that produced . The present study included 30 white male rats *Rattus norvegicus* aged (60-70) days averaged weight (200-250)gm . tissue cysts of parasite were presence in all prepared smears of brain ,liver and testes organs in different size and numerous numbers ,the percentage of infection by using Real-Time PCR was 26% in brain and 20% in liver and testes .this study was recorded the possibility of isolation of *Toxoplasma gondii* parasite and and diagnosis by using impression smears method and Real-Time PCR technique in different tissues of the organs of the experimental animals.

Keywords :*Toxoplasma gondii,* placentae ,smears ,tissue cysts, toxoplasmosis.

Zoology Classification QL 700-739.8

---

*This research is a part of an Ph.D. Dissertation in the case of the second researcher