Archive of SID

Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره پانزدهم، شماره دوم، ۱۳۹۸، پیاپی ۳۹: ۶۴-۵۷

جستجوی ژنومی *بروسلا ملی تنسیس، سالمونلا آبورتوس اویس، کلامیدوفیلا آبورتوس و کوکسیلا بورنتی* در سقط‌جنین گوسفندان با یک روش طراحی شده PCR چندگانه

محمد رضا محزونیه[1*]، محمود احسانی[2]، عزیزالله ابراهیمی[3]، فاطمه کبیری[4]، اعظم مختاری[3]

۱- استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی و پژوهشکده بیماریهای مشترک انسان و دام، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

۲- دانشجوی دکترای باکتری شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

۳- استادیارگروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

۴- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۷/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۲/۷

چکیده

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چندگانه (Multiplex PCR) یک روش پیشرفته از تکنیک‌های تشخیص مولکولی است که امکان شناسایی همزمان چند عامل بیماریزا را در یک نمونه فراهم می کند. مزایای استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چندگانه در مقایسه با نتایج تشخیص به دست آمده با روشهای متداول دیگر توسط محققان مختلف بررسی شده است. در این پژوهش از PCR چندگانه طراحی شده در آزمایشگاه به‌منظور شناسایی هم‌زمان عوامل مهم سقط‌جنین گوسفندان شامل: *Brucella melitensis*، *Salmonella abortusovis*، *Chlamydophila abortus* و *Coxiella burnetii*، استفاده شد. برای این منظور تعداد ۹۸ نمونه محتویات شیردان جنین‌های سقط شده از سه منطقه جغرافیایی ایران شامل استان‌های اصفهان، چهارمحال و بختیاری و خراسان رضوی، مورد آزمایش قرار گرفت. میزان آلودگی در نمونه‌های بررسی‌شده، ۱۵/۳ درصد *Brucella melitensis*، ۱۱/۲ درصد *Salmonella abortusovis*، ۷/۱ درصد *Chlamydophila abortus* و صفر درصد *Coxiella burnetii* بود. در کل نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که *Brucella melitensis*، *Salmonella abortusovis* و *Chlamydophila abortus* از مهمترین عوامل سقط جنین نشخوارکنندگان کوچک بوده و از آزمون PCR چندگانه، به‌خوبی می‌توان برای تشخیص عوامل سقط‌جنین در گوسفند و بز استفاده کرد.

کلمات کلیدی: PCR چندگانه، سقط، *بروسلا ملی تنسیس، سالمونلا آبورتوس اویس، کلامیدوفیلا آبورتوس و کوکسیلا بورنتی*

*نویسنده مسئول: دکتر محمدرضا محزونیه

آدرس: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران تلفن: ۰۳۸۳۲۳۲۴۴۰۱

پست الکترونیک: mahzounieh@sku.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

پرورش گوسفند در سراسر دنیا در گستره‌ای از نواحی بیابانی و خشک تا نواحی سرد به‌منظور تولید پشم و گوشت صورت می‌گیرد. قسمت عمده سودمندی پرورش گوسفند به بره زایی مربوط است و هرگونه اختلال در آن موجب کاهش سود و خسارات اقتصادی می‌شود. سقط‌جنین در تمام مناطق پرورش گوسفند از مهم‌ترین رخدادهایی است که این صنعت را متأثر می‌نماید. مشکل عمده در ارتباط با عوامل عفونی سقط بوده که عمدتاً در دو ماه آخر آبستنی رخ می‌دهد. زمانی که میزان رخداد سقط از ۲٪ فراتر رفت اقدامات آزمایشگاهی برای تشخیص توصیه می‌گردد. میزان بروز سقط‌جنین در نواحی مختلف بر اساس شرایط و مدیریت پرورش گوسفند و وجود عوامل عفونی خاص متفاوت است (۲).

بروسلا باکتری داخل یاخته‌ای اختیاری است و عامل یک بیماری مشترک بین انسان و حیوان بوده که باعث سقط‌جنین در گاو، گوسفند، بز و خوک می‌شود. این باکتری ازنظر متابولیسمی، نسبتاً غیرفعال است. *Brucella melitensis* در حالت معمولی بزها را آلوده می‌کند و گوسفند و بز مخازن اصلی *Brucella melitensis* برای انسان می‌باشند (۵).

Salmonella abortusovis عامل بااهمیت سقط‌جنین در گوسفندان و مرگ‌ومیر بره‌های نوزاد نواحی اروپا، بریتانیا و خاورمیانه است. و اغلب در حیوانات به دنبال استرس‌های حمل‌ونقل، گرسنگی، تراکم و آبستنی بروز می‌کند. گوسفند میزبان اختصاصی *Salmonella abortusovis* بوده و باکتری به مقدار زیادی در جفت، ترشحات واژنی و جنین سقط‌شده وجود دارد و دام‌های مبتلا تا مدتی بعد از سقط، عامل بیماری را از راه واژن دفع می‌کنند (۱۸).

Chlamydophila abortus باکتری گرم منفی داخل سلولی اجباری است که عامل عفونی سقط جنین انزئوتیک میش‌ها به‌حساب می‌آید و به‌عنوان یکی از عوامل اصلی کاهش تولید در دنیا شناخته‌شده است. در بسیاری از کشورها این میکروارگانیسم یکی از مهم‌ترین عوامل سقط‌جنین در گوسفندان بوده و در بزها نیز بیماری مشابه میش‌ها ایجاد می‌کند. همچنین گاو، خوک و اسب نیز به آن آلوده می‌شوند. سقط‌جنین‌های ناشی از این جرم یک عامل عمده زیان اقتصادی و مسئله جدی در کشورهایی است که در آن‌ها پرورش گوسفند اهمیت دارد (۸).

Coxiella burnetii باکتری کوچک داخل سلولی که در فاگوزوم‌ها تکثیر پیداکرده و سلول‌ها را آلوده می‌کند. میزبان‌های *Coxiella burnetii* وسیع بوده و در پستانداران، پرندگان و تعدادی از جنس‌های کنه‌ها، گوسفندان، بزان، گاوها و حتی در خرگوش‌ها، سگ‌ها و گربه‌ها وجود داشته و به‌عنوان یک منبع اولیه برای بیماری انسانی (تب کیو) هستند و در سراسر جهان تشخیص داده‌شده است در نشخوارکنندگان سقط‌جنین، ناباروری و تولد نوزادان ضعیف در اثر ابتلا به *Coxiella burnetii* ایجاد می‌شود. گوسفند و بز حساسیت بیشتری در مقایسه با گاو، در سقط‌جنین ناشی از آلودگی به این جرم از خود نشان می‌دهند. لازم به ذکر است که در شرایط بالینی، سقط‌جنین در بز در مقایسه با گوسفند بیشتر معمول بوده و بزها میزان زیادتری از جرم را در زمان زایمان و سقط ترشح می‌کنند (۱۳).

روش‌های بیوتایپینگ این باکتری‌ها شامل کشت و جداسازی، حساسیت به فاژها، آگلوتیناسیون با

www.SID.ir

Archive of SID

آنتی‌سرم‌های اختصاصی، آزمون‌های بیوشیمیایی از قبیل رشد در محیط‌های حاوی رنگ‌ها و نیز تولید سولفید هیدروژن و غیره می‌باشد. کشت نمونه‌ها، فرآیندی پرهزینه و وقت‌گیر بوده و نیازمند تمدید دوره انکوباسیون خواهد بود. علاوه بر آن بعضی از گونه‌های این باکتری‌ها جزو عوامل بیماری‌زای خطرناک است که کار با آن‌ها برای کارکنان آزمایشگاه خطرناک است.

این میکروارگانیسم‌ها ازجمله عوامل باکتریایی سقط‌جنین در اواخر آبستنی محسوب می‌شوند و قبل از سقط‌جنین هیچ‌گونه علائم مشخص کلینیکی مشاهده نمی‌شود و معمولاً اولین علامت ناشی از عفونت به این باکتری‌ها سقط‌جنین و یا تولد بره‌های ضعیف و مرده است. میش‌های آلوده این باکتری‌ها را از طریق جفت و ترشحات رحمی وارد محیط می‌کنند و باعث آلودگی سایر گوسفندان از راه بلع یا تنفس می‌شوند. آلودگی انسان‌ها نیز با بعضی از این عوامل به‌خصوص *Brucella melitensis* باعث زیان‌های بهداشتی فراوانی در جامعه می‌شود. یکی از مهم‌ترین راههای مبارزه با این عوامل پیشگیری و تشخیص سریع آلودگی در حیوانات می‌باشد. بررسی میکروسکوپی مانند تهیه اسمیر نیز با مشکلاتی همچون اشتباه در تفکیک و تمایز باکتری‌ها با همدیگر به‌خصوص میکروارگانیسم‌هایی همچون *بروسلا* و *کلامیدوفیلا* همراه است. ازآنجاکه باکتری *کلامیدوفیلا* و *کوکسیلا* در شرایط آزمایشگاهی (*in vitro*) رشد نکرده و معمولاً با آزمایش‌های تشخیصی روتین متوجه حضور آن نمی‌شوند، جستجوی ژنومی آن‌ها توصیه می‌شود. تاکنون آزمایش‌های متعدد سرولوژیکی جهت تشخیص عفونت‌های ناشی از این عوامل و بر اساس آنتی‌ژن‌های آن‌ها صورت گرفته است، اما به علت واکنش‌های متقاطع فراوان بین آنتی‌ژن‌های باکتریایی با یکدیگر و سایر باکتری‌های گرم منفی نیاز به روشی دقیق و مناسب جهت تشخیص این باکتری‌ها می‌باشد. با توجه به موارد اشاره‌شده جستجوی ژنوم با روش‌های تشخیص مولکولی جهت شناسایی ارگانیسم بسیار موردتوجه است.

روش کار و نمونه‌گیری

در این مطالعه نمونه‌گیری از محتویات شیردان جنین‌های سقط شده ۹۸ گوسفند از استان‌های اصفهان (۳۹ نمونه)، چهارمحال و بختیاری (۲۷ نمونه) و خراسان رضوی (۳۲ نمونه) که برای آزمایش علت سقط به مراکز آزمایشگاهی ارسال گردیده بود، جمع‌آوری گردید.

استخراج DNA با استفاده از کیت (GeneAll cell, Seul, Korea) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. در این پژوهش پرایمرهای *Coxiella burnetii* بر اساس ژن (*IS1111a*) و *Chlamydophila abortus* بر اساس ژن (*pmp 90/91*) که توسط Berri و همکاران در سال ۲۰۰۹ طراحی‌شده بود، انتخاب گردید (۴). و پرایمرهای *Salmonella abortusovis* بر اساس ژن (*invA*) و پرایمرهای *Brucella melitensis* بر اساس ژن (*omp31*) با استفاده از نرم‌افزار BLAST در سایت NCBI و سایت primer3 طراحی گردید.

اختصاصی بودن و همولوگی این پرایمرها جهت استفاده در این مطالعه توسط نرم‌افزار BLAST در سایت NCBI موردبررسی و تأیید قرار گرفت.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- پرایمرهای استفاده‌شده در این مطالعه

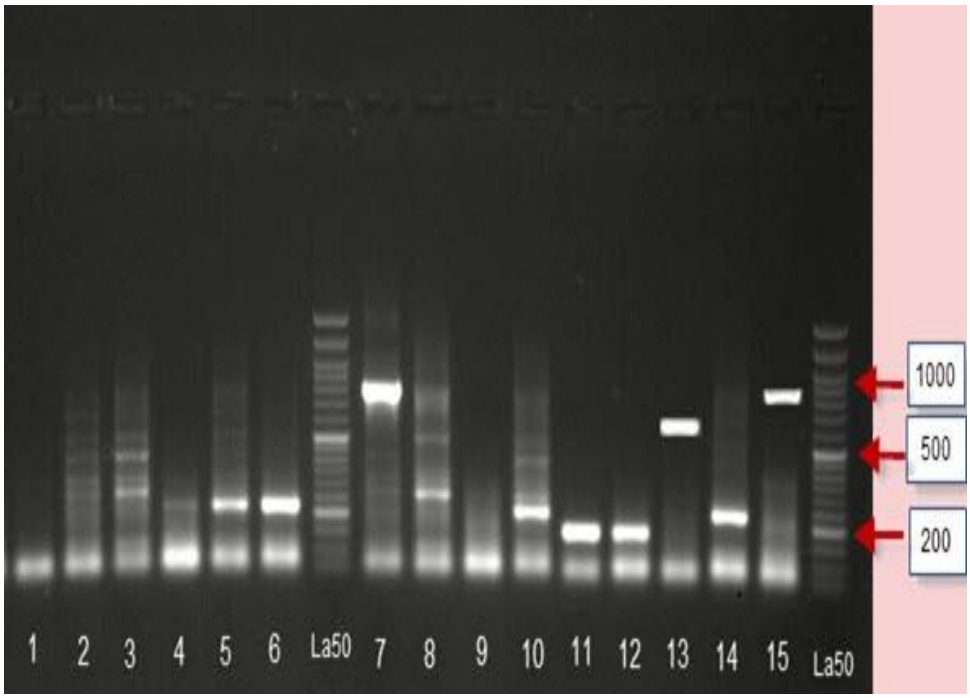
نام باکتری	نوع پرایمر	توالی پرایمر	طول باند
Chlamydophila abortus	پرایمرF	CTCACCATTGTCTCAGGTGGA	۸۲۱
	پرایمرR	ACCGTAATGGGTAGGAGGGGT	
Coxiella burnetii	پرایمرF	TATGTATCCACCGTAGCCAGT	۶۸۷
	پرایمرR	CCCAACAACACCTCCTTATTC	
Brucella melitensis	پرایمرF	AACCTCAGCGGCGACGAAAG	۲۲۵
	پرایمرR	TACACCTGCACCAAGCGTCC	
Salmonella abortusovis	پرایمرF	TCGCGCCCAAATACCGAAGA	۱۶۵
	پرایمرR	ACACACTCATCTTCGGCGGG	

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز روی DNA های استخراج‌شده از محتویات شیردان جنین سقط شده با پرایمرهای جنس و گونه انجام گرفت.

دماهای استفاده‌شده در این مطالعه با توجه به Tm محاسبه‌شده برای پرایمرها شامل: سیکل اول ۹۴°c به مدت ۳ دقیقه، سیکل حرارتی دوم متشکل از ۳۰ سیکل است که شامل ۹۴°c به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۲°c به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲°c به مدت ۴۵ ثانیه، سیکل حرارتی سوم ۷۲°c به مدت ۵ دقیقه بود و سپس محصولات PCR توسط ژل آگاروز ۱/۲٪ الکتروفروز گردید.

نتایج

در این آزمایش از روش PCR چندگانه به‌منظور شناسایی هم‌زمان *Brucella melitensis* ، *Salmonella abortusovis*، *Chlamydophila abortus* و *Coxiella burnetii* در سقط‌جنین گوسفندان استفاده گردید.



نگاره ۱: تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR چندگانه

۱= کنترل منفی، ۱۲ کنترل مثبت *Salmonella abortusovis* ، ۱۳ کنترل مثبت *Coxiella burnetii* ، ۱۴ کنترل مثبت *Brucella melitensis* و ۱۵ کنترل مثبت *Chlamydophila abortus* می‌باشد. ۵، ۶ و ۱۰ = نمونه‌های مثبت *Brucella melitensis*، ۷ = نمونه مثبت *Chlamydophila abortus* و ۱۱ نمونه مثبت *Salmonella abortusovis* می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

از ۹۸ نمونه موردبررسی تعداد ۱۵ نمونه *Brucella melitensis* ، ۱۱ نمونه *Salmonella abortusovis* و ۷ نمونه *Chlamydophila abortus* شناسایی گردید که به تفکیک استان‌ها در جدول شماره ۲ ذکرشده است.

جدول شماره ۲-نتایج کلی PCR چندگانه در نمونه‌های سقط‌جنین

	اصفهان		چهارمحال بختیاری		خراسان رضوی		جمع	
	مثبت	درصد	مثبت	درصد	مثبت	درصد	مثبت	درصد
بروسلا ملی تنسیس	۸	۲۰/۵۱	۳	۱۱/۱۱	۴	۱۲/۵	۱۵	۱۵/۳۱
سالمونلا آبورتوس اویس	۵	۱۲/۸۲	۲	۷/۴۱	۴	۱۲/۵	۱۱	۱۱/۲۲
کلامیدوفیلا آبورتوس	۲	۵/۱۳	۱	۳/۷	۴	۱۲/۵	۷	۷/۱۴
کوکسیلا بورنتی	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
جمع موارد مثبت	۱۵	۳۸/۴۶	۶	۲۲/۲۲	۱۲	۳۷/۵	۳۳	۳۳/۶۷
تعداد نمونه‌ها	۳۹		۲۷		۳۲		۹۸	۱۰۰

بحث و نتیجه‌گیری:

هدف از این مطالعه بررسی موارد سقط جنین در گوسفندان در اثر عوامل عفونی با *Brucella melitensis* ، *Salmonella abortusovis* ، *Chlamydophila abortus* و *Coxiella burnetii* با روش PCR چندگانه می باشد. سقط‌جنین موجب بروز خسارت های زیاد اقتصادی و مشکلات ناشی از آن می‌شود. آمار دقیقی از میزان سقط‌جنین در دست نیست و گاهی در بعضی موارد در بیش از ۵۰ درصد گوسفندان گزارش می‌شود ولی به‌طورمعمول اگر ۱۵تا۲۰ درصد سقط‌جنین و تلفات روزهای اول بره‌ها را در نظر بگیریم و بر اساس نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق، عامل حدود ۳۴ درصد را *Brucella melitensis* ، *Salmonella abortusovis* ، *Chlamydophila abortus* بدانیم، خسارت اقتصادی هنگفتی در اثر این عوامل سقط‌جنین ایجاد می‌شود.

در این مطالعه به بررسی احتمال حضور این باکتری‌ها در موارد سقط‌جنین پرداخته‌شده است. برای این منظور از شیردان جنین‌های سقط شده گوسفند نمونه‌گیری انجام شد و بر روی نمونه‌ها آزمون PCR چندگانه انجام گرفت که مشخص گردید ۳۳/۷ درصد موارد سقط به علت باکتری‌های *Brucella melitensis* ، *Salmonella abortusovis* و *Chlamydophila abortus* می‌باشد. که میزان آلودگی به *Brucella melitensis* در استان اصفهان با ۲۰/۵۱ درصد بیشترین در مرحله بعد استان خراسان رضوی با ۱۲/۵ درصد و استان چهارمحال و بختیاری با ۱۱/۱۱درصد کمترین موارد مثبت را داشتند و میزان آلودگی به *Salmonella abortusovis* در استان اصفهان با ۱۲/۸۲ درصد بیشترین در مرحله بعد استان خراسان رضوی با ۱۲/۵ درصد و استان چهارمحال و بختیاری با ۷/۴۱درصد کمترین موارد مثبت را داشتند و میزان آلودگی به *Chlamydophila abortus* در استان خراسان رضوی با ۱۲/۵ درصد بیشترین در مرحله بعد استان

www.SID.ir

Archive of SID

چهارمحال و بختیاری با ۳/۷ درصد و استان اصفهان با ۲ درصد کمترین موارد مثبت را داشتند.

Asadi و همکاران در سال ۲۰۱۳ مطالعه‌ای بین سال‌های ۲۰۱۱ تا ۲۰۱۲ در خصوص بررسی میزان شیوع سرولوژیک تب کیو با استفاده از آزمون الایزای غیرمستقیم و شناسایی *Coxiella burnetii* در جنین‌های سقط شده به روش RT-PCR در گله‌های گوسفند و بز انجام دادند که درمجموع ۱۲۸۰ نمونه سرم و ۲۰۰ نمونه کبد، طحال و شیردان از ۶۷ جنین سقط شده مربوط به دامداری‌های شیراز و اصفهان و شیر تانک مخزن ۲۲ گله گوسفند و بز شیراز را بررسی نمودند که با استفاده از آزمون الایزای غیرمستقیم شیوع سرمی *Coxiella burnetii* ۱۹/۵٪ و با روش RT-PCR ۴۵/۵٪ از مجموع شیر مخازن مثبت تشخیص داده شد و همه نمونه‌های جنینی در این آزمایش منفی بودند (۱).

Berii و همکاران در سال ۲۰۰۹ به این نتیجه رسیدند که multiplex PCR یک آزمایش سریع و هم‌زمان با حساسیت و ویژگی خوب برای تشخیص سه باکتری *Chlamydophila abortus* ، *Chlamydophila pecorum* ، *Coxiella burnetii* از نمونه‌های مدفوع، شیر، جفت و سواپ های واژینال می‌باشد (۴).

Ghorbanpoor و همکاران در سال ۲۰۰۷ مطالعه سرولوژیکی برای ردیابی *Chlamydophila abortus* با روش الیزا در استان خوزستان روی ۱۵۴ میش که سابقه سقط داشتند انجام دادند که شیوع آلودگی سرمی در اهواز ۸/۹ درصد ارزیابی گردید (۷). که با توجه به آلودگی ۷/۱ درصدی *Chlamydophila abortus* در مطالعه انجام‌شده می‌تواند تأییدی بر نتایج به‌دست‌آمده باشد.

Masula و همکاران در سال ۲۰۰۷ در مطالعه‌ای که در سال‌های ۲۰۰۳ تا ۲۰۰۵ در کشور ایتالیا روی نمونه‌های جفت و جنین سقط شده انجام دادند از ۱۰۷ مورد ۱۸/۱٪ جنین‌ها و ۱۳/۱٪ جفت‌ها آلوده به *Toxoplasma gondii* و ۱۳٪ جنین‌ها و ۶/۵٪ جفت‌ها آلوده به *Salmonella abortusovis* و ۱۰/۹٪ جنین‌ها و ۹/۲٪ جفت‌ها آلوده به *Coxiella burnetii* و ۲/۴٪ جنین‌ها و ۶/۵٪ جفت‌ها آلوده به *Chlamydophila abortus* بودند (۹).

Masula و همکاران در سال ۲۰۰۴ در یک تحقیق دیگر بین سال‌های ۱۹۹۹ تا ۲۰۰۲ تعداد ۹۳۴۹ نمونه سرم و ۵۱۷ نمونه سقطی (۴۲۲ جنین و ۹۵ جفت) از ۶۷۵ مزرعه گوسفند و ۸۲ مزرعه بز را در جزیره ساردینای ایتالیا موردبررسی قراردادند. سرم‌ها به‌صورت تصادفی بعد از سقط در دامداری‌ها جمع‌آوری و به روش الایزا برای شناسایی Ig اختصاصی *Coxiella burnetii* آزمایش کردند که ۲۵۵ (۳۸٪) از مزرعه گوسفندان و ۳۹ (۴۷٪) از مزرعه بزها مثبت بودند درحالی‌که به روش PCR از نمونه‌های جفت و جنین تعداد ۴۰ (۱۰٪) نمونه از گوسفندان و ۳ (۶٪) نمونه از بزها مثبت بودند (۱۰).

Mirnejad و همکاران در سال ۲۰۱۱ با طراحی Multiplex PCR برای تشخیص هم‌زمان *Brucella abortus* و *Brucella melitensis* به این نتیجه رسیدند که Multiplex PCR جایگزین مناسبی برای روش‌های کشت و سرولوژی می‌باشد (۱۱).

Moshkelani و همکاران در سال ۲۰۱۱ بامطالعه بر روی شیردان جنین‌های سقط شده با استفاده از تکنیک PCR در استان چهارمحال و بختیاری میزان آلودگی به *Brucella melitensis* را ۱۶/۴ درصد اعلام نمودند (۱۲). و با مطالعه انجام‌شده در این پژوهش که میزان کل آلودگی ۱۵/۳۰٪ بود مطابقت دارد.

www.SID.ir

Archive of SID

Sharifi Yazdi و همکاران در سال ۲۰۰۸ یک Multiplex PCR برای شناسایی هم‌زمان *بروسلاهای* بیماری‌زای گاوی و سویه‌های واکسن S19 و RB51 طراحی نمودند. که نتایج آن‌ها نشان می‌دهد Multiplex PCR می‌تواند به‌خوبی سویه‌های بیماری‌زا را از سویه‌های واکسن S19 و RB51 شناسایی کند (۱۷).

Sharifzadeh و همکاران در سال ۱۳۸۸ با مقایسه روش‌های کشت و مولکولی در تشخیص عوامل سقط‌جنین *Salmonella* و *Brucella* در گوسفند شهرستان شهرکرد اعلام نمودند با توجه به‌سادگی و توانایی جستجوی هم‌زمان باکتری با روش PCR چندگانه، استفاده از آن برای تشخیص هم‌زمان *سالمونلا آبورتوس‌اویس* و بروسلا پیشنهاد می‌شود (۱۸).

Truong و همکاران در سال ۲۰۱۲ با طراحی Multiplex PCR برای شناسایی هم‌زمان *Brucella* ، *Salmonella* و *Leptospira* اعلام نمودند Multiplex PCR جایگزین مناسب کشت و PCR تکی می‌باشد (۱۹).

با توجه به مطالعات ذکرشده و با عنایت به نتایج به‌دست‌آمده از پژوهش حاضر و مقایسه آن‌ها نشان می‌دهد عوامل عفونی باکتریایی نقش بسیار مهمی در ایجاد سقط‌جنین دارد وPCR چندگانه یک روش مؤثر برای تشخیص هم‌زمان این موارد می‌باشد.

تشکر و قدردانی:

بدین‌وسیله از زحمات سرکار خانم حاجیان و جناب آقای دکتر سید محمد حسینی کارشناسان محترم اداره کل دامپزشکی استان اصفهان و سرکار خانم شبنم گلبو که در تهیه نمونه‌ها مساعدت نمودند، قدردانی می‌شود.

منابع

1- Asadi, J., Kafi, M., Khalili, M. (2013): Seroprevalence of Q fever in sheep and goat flocks with a history of abortion in Iran between 2011 and 2012. *Veterinaria Italiana*. **49**: 163-168.

2- Aslani, M. R (1386). Abortion in Sheep: Main Factors and Their Diagnosis, Scientific Publikation Abortion Studies and Infant Mortality in Ruminants, p. 15-39.

3- Ayatollah, J., Mellat, A., Ayatollah, J., Hashemi, A., Taghipour, Z. Sh., Ghasemi, N. (1389). Application of PCR in diagnosis of infectious diseases, *Shaheed Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd*, **18**: 578-584.

4- Berri, M.U., RekikiK, A.B., Boumedine, K.S., Rodolakis, A. (2009): simultaneous differential detection of *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila pecorum* and *Coxiella burnetii* from aborted ruminant's clinical samples using multiplex PCR. *BioMed Central's Microbiology*. **9**:130.

5- Ebrahimi, A., Milan, J., Mahzoonieh, M., Khaksar, K. (2014): Shedding Rates and SeroPrevalence of Brucella melitensis in Lactating Goats of Shahrekord, Iran. *Jundishapur Microbiology*. **7**: 1-4.

6- Esmaili, H., Hamedi, M., Boroumandfar, S., Rezaei, A. (1391). Country Guide for the Diagnosis, Study and management of complications of abortion of ruminants, First Edition, *Veterinary Medicine, Tehran, Iran*, p. 138-103.

7- Ghorbanpoor, M., Goraninejad, D., Heydari, R. (2007): Serological study on enzootic abortion of ewes in Ahvaz, Iran. *Animal and Veterinary Advances*. **6**: 1194-1196.

8- Mahzounieh, M.R., Golboy, D.S., Pourahmad, R. (1393). The search for *Chlamydophila abortus* in cases of abortion of sheep in Chaharmahal and Bakhtiari province using Nested PCR method, *Veterinary Medicine*, **10**: 74-80.

9- Masala, G., Porcu, R., Daga, C., Denti, S., Canu, G., Patta C. (2007): detection of pathogens in ovine and caprine abortion samples from Sardinia, Italy, by

www.SID.ir

Archive of SID

PCR. *Veterinary Diagnostic Investigation*. **19**: 96-98.

10- Masala, G., Porcu, R., Sanna, G., Chessa, G., Cillara, G., Chisu, V. (2004): Occurrence, distribution, and role in abortion *of Coxiella burnetii* in sheep and goats in Sardinia, Italy, *Veterinary Microbiology*. **99**: 301-305.

11- Mirnejad, R., Doust, H., Kachuei, R., Mortazavi, S., Khoobdel, M., Ahamadi, A. (2012): Simultaneous detection and differentiates of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* by combinatorial PCR. *Asian Pacific Tropical Medicine*. 24-28.

12- Moshkelani, S., Javaheri, M., Fatahpour, H., Alirezaei, M. (2011): Detection of *Brucella melitensis* from aborted caprine fetuses in Iran. *Global Veterinary*. **6**:495-497.

13- Niemczuk, K., Szymańska, M. (2012): Epidemiology, Zoonotic Aspect and Current Epidemiological Situation of *Q Fever* in Poland. *National Veterinary Research Institute*. **51**: 380-392.

14- Papp, J., Shewen, P. (1996): Localization of chronic *Chlamydia psittaci* infection in the reproductive tract of sheep. *Infectious Diseases*.**174**:1296-1302.

15- Rad, M., Naseri, Z., Malvandi, A. (2012): Detection of *Chlamydophila abortus* from Ovine Abortion by Cell Culture and PCR. The 13th Iranian and the 2nd International Congress of Microbiology. *Ardabil University of Medical Sciences*:210.

16- Rodolakis, A. (2006): *Q fever*, state of: Epidemiology, diagnosis and prophylaxis. *Small ruminant Research*. **62**: 121-124.

17- Sharifi Yazdi, H., Khazraiinia, P., Zahraei Salehi, T., Behroozikhah, A.M. (2008): Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for differentiation of field strain isolates and vaccine strains S19 and RB51 of *Brucella* in Iran. *Veterinary Research, Shiraz University*. **9**: 19-24.

18- Sharifzadeh, A., Dostadi, A., Jafarian, M. (2009). Comparison of Cultures and Molecular Methods in the Detection of *Brucella* and *Salmonella* Abortion Factors in Shahrekord Sheep. *World of Microbes Magazine*, **2**: 104-101.

19- Truong, Q., Byung-il, Y., Tae-Wook, H. (2012): Development of a multiplex PCR to identify *Salmonella*, *Leptospira* and *Brucella* species in *tissue samples Korean Veterinary Research*. **52**: 75-82.

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 15, Issue 2, 2019

Molecular detection of *Brucella melitensis, Salmonella abortusovis, Chlamydophila abortus* and *Coxiella burnetii* in aborted ewes with in-house multiplex PCR method

***Mahzounieh, M.*[*1], *Ehsani, M.*[2], *Ebrahimi, A.*[3], *Kabiri, F.*[4], *Mokhtari, A.*[3]**

1- Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine and Research Institute of Zoonotic Diseases, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

2- Ph.D. student of bacteriology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

3- Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

4- Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

Received: 06 October 2018 *Accepted: 26 April 2020*

Abstract

Multiplex polymerase chain reaction (mPCR) is an advanced method of molecular diagnostic techniques which allows for simultaneous detection of multiple pathogens in the same sample. The advantages of the multiplex PCR method were assessed by various researchers by comparing the diagnosis results obtained with different other conventional methods. An in-house multiplex PCR method was designed and evaluated for detection of Brucella melitensis, Salmonella abortusovis, Chlamydophila abortus and Coxiella burnetii, which are the most frequent agents in ewe's abortion. For this purpose, 98 samples of abomasal liquid's contents of the aborted fetuses were collected from three geographic areas of Iran include Isfahan, Khorasan Razavi and Chaharmahal and Bakhtiari provinces and tested by multiplex PCR. Brucella melitensis Salmonella abortusovis and Chlamydophila abortus were found in 15.3%, 11.2% of 7.14% of samples respectively. Coxiella burnetii was not found in any sample. In general, the results of this study were showed that Brucella melitensis, Salmonella abortusovis, Chlamydophila abortus are the most important pathogens of ewe's abortion and this in-house multiplex PCR test can be used to identify the causative agent of abortion in ewe in one tube.

Keywords: multiplex PCR, Abortion, Sheep, Brucella melitensis, Salmonella abortusovis, Chlamydophila abortus, Coxiella burnetiid

**Corresponding author: Mahzounieh, M.*

Address: Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

Tel: 038-32324401

E-mail: mahzounieh@sku.ac.ir

www.SID.ir