



مقایسه روش های کشت و مولکولی در تشخیص عوامل سقط جنین بروسلائی و

سالمونلائی در گوسفندان شهرستان شهرکرد

دکتر علی شریف زاده^{۱*}، دکتر عباس دوستی^۲، محسن جعفریان^۳

^۱ گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، ^۲ مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد،

^۳ گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد

چکیده

سابقه و هدف: باکتری های سالمونلا ابورتوس اویس و بروسلا از مهم ترین عوامل سقط جنین گوسفند در سراسر دنیا می باشند. روش های مستقیم جداسازی باکتری شناسی برای تشخیص این آلودگی ها قابل انجام است اما این روش ها مشکل، زمان بر و خطرناک می باشند. هدف از این پژوهش، مقایسه روش های متداول باکتری شناسی و مولکولی برای شناسایی باکتری های یاد شده می باشد. مواد و روش ها: در این پژوهش به صورت مقطعی-توصیفی، ۳۸ نمونه جنین سقط شده از گله های مختلف گوسفند در استان چهارمحال و بختیاری جمع آوری گردید. سپس با استفاده از روش های مستقیم کشت و PCR چندگانه (mPCR) نمونه ها مورد ارزیابی قرار گرفتند. یافته ها: ۵ مورد (۱۳/۱٪) از نمونه ها به بروسلا، ۱۹ مورد (۵۰٪) از نمونه ها به سالمونلا ابورتوس اویس و ۴ مورد (۱۰/۶٪) از نمونه ها به بروسلا و سالمونلا ابورتوس اویس به شکل توأم آلوده بودند. در ۱۰ مورد (۲۶/۳٪) از نمونه ها نیز هیچ آلودگی در روش mPCR تشخیص داده نشد. در بررسی های باکتری شناسی ۵ مورد (۱۳/۱٪) از نمونه ها آلوده به بروسلا، ۹ مورد (۲۳/۷٪) آلوده به سالمونلا ابورتوس اویس و در ۲۴ (۶۳/۲٪) نمونه نیز هیچ آلودگی تشخیص داده نشد. نتیجه گیری: با توجه به سادگی و توانایی جستجوی هم زمان باکتری ها با روش PCR چند گانه، استفاده از آن برای تشخیص هم زمان سالمونلا ابورتوس اویس و بروسلا پیشنهاد می شود.

واژگان کلیدی: mPCR، بروسلا، سالمونلا ابورتوس اویس، سقط جنین، کشت

دریافت مقاله: بهار ۸۸ پذیرش برای چاپ: تابستان ۸۸

مقدمه

می شود. ناهنجاری های تولید مثلی از قبیل سقط جنین و یا زایمان های زودرس ممکن است تنها علائم درمانگاهی این بیماری های باکتریایی در میش های آبستن باشد (۲، ۱ و ۳). به طور کلی عوامل ایجاد کننده سقط جنین در دو گروه عوامل عفونی و عوامل غیر عفونی طبقه بندی می شوند. اما ۸۰ تا ۹۰ درصد موارد تشخیص داده شده را عوامل عفونی تشکیل می دهند و کمتر به عوامل غیر عفونی از جمله وضعیت تغذیه ای و بهداشتی توجه می شود (۴، ۵ و ۶).

با وجود شیوع گسترده جهانی سقط جنین در حیوانات اهلی، میزان تشخیص عامل سقط جنین بسیار پایین است. از طرفی با این

سالمونلا ابورتوس اویس و بروسلا بطور گسترده ای در سراسر جهان منتشر شده اند. سالیانه صنعت دامپروری جهان دچار زیان های اقتصادی سنگینی بواسطه مرگ و میر رویان یا سقط جنین ناشی از این باکتری ها می شود. سقط جنین از نظر اقتصادی بسیار با اهمیت و زیان های اقتصادی آن قابل توجه است زیرا صرف نظر از کاهش تولد بره و بزغاله باعث وارد آمدن زیان های اقتصادی سنگینی بر اثر کاهش تولید شیر و عوارض ثانویه آن پس از سقط جنین از جمله ناباروری و سایر زیان های مدیریتی به دامدار

* آدرس برای مکاتبه: گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد.

پست الکترونیک: Adleishmania@yahoo.com

کربن و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرما گذاری گردید. باکتری های بروسلا و سالمونلا ابورتوس اویس از روی ویژگی های ظاهری، کشت و آزمون های بیوشیمیایی شناسایی گردیدند.

ج) استخراج DNA: استخراج DNA با استفاده از کیت ویژه با نام DNPTM yield DNA purification kit (Cat. No. DN8115C) عرضه شده توسط شرکت سیناژن صورت گرفت. مراحل استخراج مطابق دستورالعمل ارائه شده همراه کیت مذکور انجام شد.

د) آزمون های مولکولی: پس از بررسی های مختلف و ارزیابی حالات گوناگون از نظر میزان و ترکیب مواد و دمای مراحل دوگانه آزمایشات مولکولی راه اندازی و به شرح زیر انجام گرفت:

ه) آغازگرها: در این پژوهش پرایمرهای اختصاصی، به وسیله نویسندگان مقاله برای جنس بروسلا (PCR/Bruce) و اختصاصی گونه سالمونلا ابورتوس اویس (PCR/SAO) با توالی زیر طراحی گردید.

Bruce(F)-5'-CTA TTATCC GATTGGTGGTCTG-3'

Bruce(R)-5'-GGTAAAGCGTCGCCAGAAGG-3'

SAO(F)-5'-GCCGAAGATGAGTGTGTCCAGTT-3'

SAO(R)-5'-CCGTGTTCTTACCCACCGTATC-3'

و) واکنش زنجیره ای پلیمر از چندگانه (*Chain Reaction*)

(*Multiplex Polymerase*): آزمون mPCR با استفاده از

PCR buffer 10X به میزان ۲/۵ میکرو لیتر، $MgCl_2$ (50mM)

به میزان ۱ میکرو لیتر، dNTP(Mix) به میزان ۰/۷۵ میکرو لیتر، از

هر پرایمر ۱/۵ میکرو لیتر، DNA به میزان ۲ میکرو لیتر، (5U/ml)

Taq DNA polymerase به میزان ۰/۱۵ میکرو لیتر، H_2O به

میزان ۱۵ میکرو لیتر و با حجم کلی ۲۵ میکرو لیتر صورت گرفت. پس

از افزودن اجزای PCR در حجم های فوق و مخلوط کردن آنها، لوله ها

در داخل دستگاه PCR (ependorf, Mastercycler gradient)

قرار داده شد. در دستگاه PCR مرحله واسرشت شدن ابتدایی

(predenaturation) به مدت ۴ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد

صورت گرفت. در مرحله دوم که ۳۰ بار تکرار شد، واسرشت شدن

(denaturation) به مدت ۱ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد،

اتصال (Annealing) به مدت ۴۰ ثانیه در دمای ۵۷ درجه سانتی گراد

و طولیل شدن (Extension) به مدت ۴۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه

سانتی گراد صورت گرفت. مرحله طولیل شدن نهایی (Extension)

نیز به مدت سه دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد صورت گرفت.

ز) الکتروفورز: به منظور بررسی تکثیر احتمالی قطعات هدف

در واکنش های یاد شده (۲۴۳ جفت باز در مورد جنس بروسلا و ۱۷۲

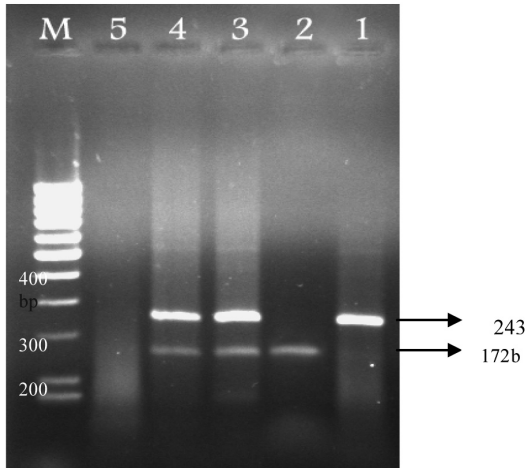
که عوامل اصلی سقط جنین اغلب بدون توجه به ناحیه جغرافیایی یکسان هستند اما، برخی از بیماری ها بطور مشخص به ناحیه خاصی محدود می شود. در مجموع میزان شیوع سقط جنین وابسته به مناطق جغرافیایی، شرایط آب و هوا، تغذیه، میزان تحرک حیوانات، جمعیت گله، وضعیت بهداشتی و برنامه های واکسیناسیون می باشد، تغییرات معنا دار هر کدام از عوامل یاد شده می تواند در شیوع بعدی بیماری موثر باشد (۷-۱۱). از آنجا که علائم این عفونت ها در امر تشخیص تعیین کننده نیستند، بنابراین تشخیص این عفونت ها به آزمون های آزمایشگاهی وابسته است. معمولا برای تشخیص بروسلا از روش های سرولوژیک و به منظور تشخیص سالمونلا از روش های کشت آزمایشگاهی و برای تعیین سروتیپ سالمونلا های جدا شده از آنتی سرم های منوکلونال اختصاصی استفاده می گردد (۵).

روش های کشت و واکنش زنجیره ای پلیمر از چند گانه روش های تشخیصی مهم دیگری هستند که بطور مستقیم قادر به تشخیص آلودگی هستند و در این تحقیق اساس کار را تشکیل می دهند. هدف از این پژوهش، مقایسه روش های متداول باکتریولوژی و مولکولی برای تشخیص باکتری های سالمونلا ابورتوس اویس و بروسلا می باشد.

مواد و روش ها

الف) نمونه گیری: در طی یک فصل زایمان در بهار ۱۳۸۸ از ۳۸ جنین سقط شده گوسفندی مربوط به مناطق مختلف استان چهارمحال و بختیاری نمونه ها جمع آوری گردید. نمونه ها شامل محتویات جنین های سقط شده بود که حد اکثر ۲۴ ساعت پس از سقط با رعایت زنجیره سرد به مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد ارسال گردید. کنترل مثبت مورد استفاده در مراحل مختلف این پژوهش در مورد جنس بروسلا، واکسن S19 (سویه زنده تخفیف حدت یافته بروسلا ابورتوس) تهیه شده از موسسه واکسن و سرم سازی رازی و در مورد سالمونلا ابورتوس اویس نیز باکتری های جدا شده از موارد سقط جنین گوسفندی در استان چهار محال و بختیاری بود که توسط بخش باکتری شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران مورد تایید قطعی قرار گرفته بود.

ب) بررسی های باکتری شناسی: نمونه ها روی محیط مک کانکی آگار و به شکل موازی روی محیط ژلوز خوندار حاوی ۷٪ خون دیفیرینه گوسفند واجد مکمل و فاقد مکمل بروسلا تلقیح گردید. پلیت های ژلوز خوندار در گرمخانه حاوی ۱۰٪ دی اکسید



شکل ۱: تصویر الکتروفورز محصولات PCR: ۱- نمونه آلوده به جنس بروسلا ۲- نمونه آلوده به سالمونلا ابورتوس اوپس ۳- نمونه آلوده به بروسلا و سالمونلا ابورتوس اوپس ۴- کنترل مثبت ۵- کنترل منفی M سایز مارکر (۱۰۰bp).

واکسن کشته سالمونلا ابورتوس اوپس را به منظور ایجاد ایمنی در میش ها در ایران تهیه نمودند که البته مورد استفاده قرار نمی گیرد (۱۰ و ۱۲). نتایج کشت برای تشخیص باکتری های بروسلا و سالمونلا ابورتوس اوپس تحت تاثیر عوامل مختلفی از جمله تاخیر در ارسال نمونه (منتج به گنبدیگی)، درمان زود هنگام با آنتی بیوتیک ها، تعداد کم ارگانیزم های زنده در نمونه و نیازهای متعدد کشت می باشد. هم چنین گرمخانه گذاری طولانی برای جداسازی نیز ممکن است منجر به شکست جداسازی شود. مقایسه روش های کشت و mPCR در جستجوی آلودگی به این دو باکتری، نشان دهنده میزان بالاتر موارد مثبت در آزمون mPCR است. از آنجا که در حال حاضر با وجود زمان طولانی و خطرناک بودن، از روش کشت برای تشخیص عوامل سقط استفاده می شود، به نظر می رسد که روش mPCR بتواند جایگزین مناسبی برای شناسایی باکتری های یاد شده باشد.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج تحقیق یاد شده و در نظر گرفتن اینکه سقط جنین یک مشکل بسیار اساسی در گله های گوسفندی سطح کشور محسوب می شود به نظر می رسد که به دلیل سادگی، سرعت و توانایی جستجو کردن دو یا چند عامل به شکل موازی و هم زمان، بتوان از روش mPCR به عنوان روش جایگزین کشت. در تشخیص های درمانگاهی استفاده نمود.

جفت باز در مورد سالمونلا ابورتوس اوپس، ۷/۵ میکرولیتر از محصولات PCR با بافر ویژه (loading buffer) مخلوط و در کنار یک مارکر مناسب (100bp) در ژل آگارز ۱/۵٪ با استفاده از TBE (Tris Borate EDTA) الکتروفورز شدند. پس از گذشت ۳۰ تا ۴۵ دقیقه رنگ آمیزی ژل با استفاده از اتیدیوم بروماید (5mg/ml) انجام شده سپس نتایج با دستگاه ترانس لومیناتور زیر نور ماورای بنفش بررسی و ثبت گردید. سپس داده ها با استفاده از نسخه پانزدهم نرم افزار spss و آزمون مربع کای مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مرز معنی داری در $p < 0/05$ قرار داده شد.

نتایج

در بررسی های باکتری شناسی از ۳۸ نمونه مورد بررسی ۵ مورد (۱۳/۱٪) از نمونه ها آلوده به بروسلا، ۹ مورد (۲۳/۷٪) نیز به سالمونلا ابورتوس اوپس آلودگی داشتند و در ۲۴ نمونه (۶۳/۲٪) نیز هیچ آلودگی تشخیص داده نشد. در روش mPCR نیز ۵ مورد (۱۳/۱٪) از نمونه ها آلوده به بروسلا، ۱۹ مورد (۵۰٪) آلوده به سالمونلا ابورتوس اوپس، ۴ مورد (۱۰/۶٪) از نمونه ها آلوده به هر دو عامل و در ۱۰ مورد (۲۶/۳٪) از نمونه ها نیز هیچ آلودگی تشخیص داده نشد. طول قطعه مورد نظر در مورد جنس بروسلا ۲۴۳ جفت باز و در مورد سالمونلا ابورتوس اوپس ۱۷۲ جفت باز بود (شکل-۱).

با استفاده از آنالیز مربع کای مشخص شد که اختلاف معنی داری بین روش mPCR و کشت برای تشخیص باکتری های سالمونلا ابورتوس اوپس و بروسلا وجود دارد.

بحث

گونه های مختلف باکتری بروسلا (ملی تنسیس، ابورتوس، اوپس) و سالمونلا ابورتوس اوپس در اروپا و خاور میانه به ویژه ایران یکی از عوامل سقط جنین در دو ماه آخر آبستنی است. معمولا آلودگی با ورود دام آلوده اتفاق می افتد. این باکتری ها از راه های مختلفی از جمله تماس با ترشحات دام آلوده و یا بلع مواد غذایی آلوده می تواند وارد بدن دام شده و منجر به باکتری می شود. سپس به دلیل حمله باکتری به جفت، سقط جنین اتفاق می افتد (۱۱). در حال حاضر در ایران به دلیل اهمیت سقط جنین ناشی از بروسلا، واکسن Rev1 تهیه شده در مؤسسه واکسن و سرم سازی رازی به بره های یک تا چهار ماهه تزریق می شود. همچنین در مورد سالمونلا ابورتوس اوپس نیز تاج بخش و نادعلیان در سال ۱۹۸۰

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب قدردانی خود را از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد به دلیل پشتیبانی اجرایی در انجام این پژوهش اعلام می‌دارند.

References

1. Richtzenhain, L.J. Cortez, A. Heinemann, M.B. Soares, R.M. Sakamoto, S.M. vasconcelos, S.A. Higa, Z.M. Scarcelli, E. and Genovez, M.E. Multiplex PCR for the detection of *Brucella spp.* and *Leptospira spp.* DNA from aborted ovine fetuses. *Veterinary Microbiology*, 2002; 87(2): 139-147.
2. Romero, C. Gganzo, M. and Lopez-Goni, L. Specific detection of brucella DNA by per . *Journal of Clinical Microbiology*, 1995; 33: 615-617.
3. Salehi, M. pishva, E. salehi, R. Rahmani M. Isolation of *Brucella abortus* using PCR-RFLP analysis. *Iranian Journal of Public Health*, 2006; 35(4): 22-27.
4. LeyLa, G. kadri, G. and Umran, O. Comparison of polymerase chain reaction and bacteriological culture for the diagnosis of sheep brucellosis using aborted fetus samples . *Veterinary Microbiology*, 2003; 93: 53-61.
5. Masala, G. porcu, R. Daga, C. Denti scanu, G. patta, C. and Tola, S. Detection of pathogens in ovine and caprine abortion sample from sardinia, italy by PCR. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2007; 19(1): 96-98.
6. Sambrook, J. Fritsch, E.F. and Maniatis, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edition. Cold spring harbor laboratory press, new york, 1989; 2100.
7. Beuzon, C.R. Schiaffino, A. Leori, G. Cappu ccinell, p. rubino, S. and Casadesus, J. Identification of *Salmonella abortus ovis* by per amplification of a serovar - specific IS200 element. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997; 63(5): 2082-2085.
8. Fekete, A.J. and Halling, S.M. Preliminary development of a diagnostic test for *Brucella* using polymerase chain reaction. *Journal of Applied Bacteriology*, 1990; 69: 216-227.
9. Herman, L. and Ridder, H. Identification of *Brucella spp.* by using the polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992; 58: 2099-2101.
10. Kirkbride, C.A. *Laboratory diagnosis of livestock abortion*. Iowa state university press, Ames, IA, 1990; pp. 260.
11. Nielsen, K.J. and Duncan, J.R. *Animal Brucellosis*. CRC press, Boca Raton, 1990; 453.

۱۲- همت زاده. ف. شریف زاده. ع (۱۳۷۸) بررسی سرمی عفونت سالمونلا ابورتوس در گوسفندان استان چهارمحال و بختیاری . مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران . دوره ۵۴ . شماره اول . صفحه ۲۱-۱۵