Archive of SID

تشخیص مولکولی بروسلوزیس و لپتوسپیروزیس در سقط جنین با روش Multiplex PCR

علی شریف زاده[1]*، عباس دوستی[1] ، محسن جعفریان[2]، عباس رفیعی[3]

۱- گروه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی ، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی- شهرکرد –ایران

۲- گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی ، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی- شهرکرد –ایران

۳- دانش آموخته دانشکده دامپزشکی ، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی- شهرکرد –ایران

***نویسنده مسئول:** *drsharifzadeh_ali@yahoo.com*

چکیده:

بروسلوزیس و لپتوسپیروزیس از جمله بیماری های مهمی هستند که باعث سقط جنین گاو در سراسر جهان میگردند. هرچند تشخیص این دو بیماری با روش های سرولوزی قابل انجام است ولی معمولا عوامل زیادی در اینگونه از روش های غیر مستقیم باعث نتایج مثبت یا منفی کاذب میگردد. روش های مستقیم جداسازی باکتری شناسی نیز برای تشخیص این عفونت ها قابل انجام است ولی این روش ها مشکل ، زمان بر و خطرناک است. روش PCR با موفقیت برای جستجوی بروسلا و لپتوسپیرا بطور مجزا بکار گرفته شده است. در این مطالعه به تنظیم روش Multiplex PCR برای جستجوی همزمان این دو باکتری و سپس تعیین فراوانی این عوامل بطور مستقیم از محتویات جنین های سقط شده گاوی پرداخته شده است. سادگی وامکان جستجوی همزمان دو باکتری در یک لوله باعث شده است تا ما روش Multiplex PCR را بعنوان یک روش مناسب وجایگزین روشهای کشت مرسوم پیشنهاد نمائیم.

واژگان کلیدی: Multiplex PCR، بروسلا، لپتوسپیرا، سقط جنین، کشت

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

بیماری های بروسلوزیس و لپتوسپیروزیس بطور گسترده ای در سراسر دنیا منتشر شده است و اهمیت این دو بیماری نه تنها به خسارات اقتصادی برای دام محدود نمی شود بلکه جنبه انتقال به انسان نیز در مورد هر دو عفونت،اهمیت این دو بیماری را مضاعف نموده است. ناهنجاری های تولید مثلی از قبیل سقط و یا زایمان های زودرس ممکن است تنها علائم درمانگاهی این بیماری های باکتریائی درگاوهای آبستن باشد. هر ساله صنعت دامپروری جهان دچار زیان های اقتصادی سنگینی بواسطه مرگ و میر رویان یا سقط جنین ناشی از این دو باکتری میشود. سقط جنین از نظر اقتصادی بسیار با اهمیت و زیان های اقتصادی آن قابل توجه است زیراصرف نظراز کاهش تولدگوساله باعث واردآمدن زیان های اقتصادی سنگینی بر اثر کاهش تولید شیر و عوارض ثانویه آن، از جمله ناباروری و سایرزیان های مدیریتی به دامدار می شود. هر چندعوامل مسبب سقط جنین در دو گروه عفونی و غیر عفونی طبقه بندی می شود ولی ۹۰-۸۰درصد موارد تشخیص داده شده را عوامل عفونی تشکیل داده و کمتر به عوامل غیر عفونی توجه می شود (۱،۲). با وجود اینکه شیوع سقط جنین در حیوانات اهلی گسترش جهانی دارد ولی درصد مواردی که عامل سقط جنین تشخیص داده می شود بسیار پایین است. برای مثال در گاو در کشورهای کانادا ،نیوزیلند و استرالیا تنها ۳۶_۲۳درصد عوامل سقط جنین تشخیص داده می شود. با وجود اینکه عوامل اصلی سقط جنین اغلب بدون توجه به ناحیه جغرافیایی یکسان است ولی برخی از بیماری ها بطور مشخص محدود به ناحیه خاصی می شود. در مجموع نمودار شیوع سقط جنین تغییراتی نسبت به ناحیه جغرافیایی ، آب و هوا، تغذیه ، میزان تحرک حیوانات ، جمعیت گله ، وضعیت بهداشتی و برنامه های واکسیناسیون نشان می دهد بطوری که تغییرات معناداری در هر کدام از این عوامل می تواند موجب تغییرات بعدی در شیوع بعدی بیماری گردد.

از آنجا که علائم این عفونت ها تعیین کننده در امر تشخیص نیستند، بنابراین تشخیص این عفونتها به آزمون های آزمایشگاهی وابسته است.علیرغم اینکه برای تشخیص آلودگی به هر دو باکتری روش های سرولوزی متعددی بر اساس جستجوی پادتن های اختصاصی در سرم برنامه ریزی شده است ولی این آزمونها بدلایل متعددی رضایت بخش نیستندچراکه عوامل متعددی باعث نتایج مثبت یا منفی کاذب میگردد. روش های مستقیم بر اساس کشت و جداسازی باکتری در میزبان از بهترین روش های تشخیصی هستند ولی این روش ها مشکل زمان بر و خطرناک است.پس از طراحی آزمایش واکنش

www.SID.ir

Archive of SID

زنجیره ای پلیمراز، مقالات متعددی به تشخیص بروسلا (۳و۴و۵و۶و۷و۸و۹و۱۰و۱۱)
و لپتوسپیرا (۱۲و۱۳و۱۴و۱۵و۱۶) بطورمجزاپرداخته اند. روش Multiplex PCR روشی است که میتواند در یک لوله آزمایش، چند ردیف متفاوت نوکلئوتیدی DNAراجستجو نماید(۱۷و۱۸). در این تحقیق ما با استفاده پرایمرهای جدید آزمون Multiplex PCR رابرای جستجوی بروسلاولپتوسپیرا تنظیم و سپس فراوانی این عوامل را تعیین گردید .

مواد و روش کار:

الف) نمونه ها:در طی بهار ۸۷ از ۳۹ جنین سقط شده گاوی مربوط به مناطق مختلف شهرستان شهرکرد نمونه ها جمع آوری میگردید.نمونه ها شامل محتویات شیر دان جنینهای سقط شده بود که به آزمایشگاه مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد ارسال و فریز می گردید.

ب)کنترل مثبت:کنترل مثبت مورد استفاده در مراحل مختلف این طرح در مورد جنس بروسلا، واکسن S_{19} از نوع سویه زنده تخفیف حدت یافته بروسلا ابورتوس بود و در مورد لپتوسپیرانیز باکتری های جداشده از موسسه رازی بود.

ج) استخراجDNA: از میان روش های مختلف موجود استخراج DNA با استفاده از کیت ویژه با نام high yield DNA purirfication $_{DNP}$l kit عرضه شده توسط شرکت سیناژن صورت می رفت. مراحل استخراج مطابق دستورالعمل ارائه شده همراه کیت مذکور انجام می شد.

د) آزمایشات مولکولی: پس از بررسی های مختلف و ارزیابی حالات گوناگون از نظر میزان و ترکیب مواد و دمای مراحل مختلف قسمت های دو گانه آزمایشات مولکولی راه اندازی و بشرح زیر انجام گرفت:

د-۱) پرایمرها: در این تحقیق پرایمر های جدید طراحی شده اختصاصی جنس بروسلا (PCR/BRUCE) واختصاصی جنس لپتوسپیرا (PCR/LEP) باتوالی زیر استفاده می گردید :

Bruce-5' –CTA TTA TCC GAT TGG TGG TCT G-3
Bruce -5' –GGT AAA GCG TCG CCA GAA GG -3'
LEP-5'- GCG CGT CTT AAA CAT GCA AG-3
LEP $_{-5'-}$ CTT AAC TGC TGC CTC CCG TAG-3'

د-۲) واکنش زنجیره ای پلیمراز چندگانه :

آزمون Multiplex PCR با استفاده از PCR buffer 10x به میزان ۰/۷۵ میکرو لیتر، $mgCL_2$ 50mM به میزان ۱ میکرولیتر، $dNtp_{(Mix)}$ به میزان ۰/۷۵ میکرو لیتر ، از هر پرایمر ۱/۵ میکرو لیتر ، DNA به میزان ۲ میکرو لیتر، taq DNA polymerase 5u/ml به میزان ۰/۱۵ میکرولیتر ، H_2O به میزان ۱۵ میکرولیتر و با حجم کلی ۲۵ میکرولیتر صورت گرفت . پس از افزودن اجزاء

www.SID.ir

Archive of SID

PCR در حجم های فوق و spin کردن لوله ها، لوله هادر داخل دستگاه PCR قرار داده می شد. در دستگاه PCR مرحله تقلیب(predenaturation) به مدت ۴ دقیقه در دمای ۹۷ درجه سانتی گراد صورت می گرفت. در مرحله دوم که ۳۰ بار تکرار میشد denaturation به مدت ۱ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد،اتصال(Annealing)به مدت ۴۰ ثانیه در دمای ۵۷ درجه سانتی گراد وطویل شدن (Extension) به مدت ۴۰ ثانیه دردمای ۷۲درجه سانتی گرادصورت می گرفت.مرحله Extension نهایی یا طویل شدن نهایی نیز به مدت سه دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد صورت می گرفت.

د-۳) الکتروفورز(Electrophoresis) :

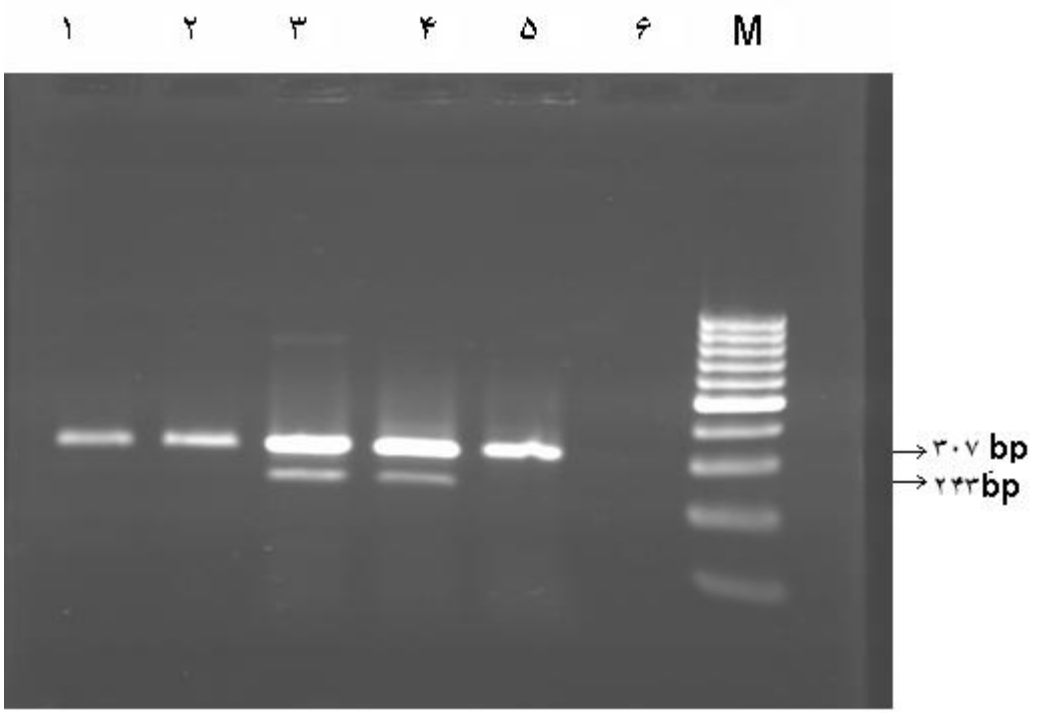
جهت بررسی تکثیر احتمالی قطعات هدف در واکنش های مذکور (۲۴۳ باز در مورد جنس بروسلا و ۳۰۷ باز در مورد جنس لپتوسپیرا)، ۷/۵ میکرولیتر از محصولات pCR با بافر ویژه (loading buffer) مخلوط گردیده و در کنار یک مارکر مناسب (100bp)در ژل آگارز ۱/۵درصد. با استفاده از TBE (Tris Borate EDTA) بعنوان حلال آگارز و نیز بافر الکترو فوز، الکتروفروز شدند . پس از گذشت مدت زمان لازم جهت به حرکت در آمدن محصولات PCR (۳۰ الی ۴۵ دقیقه) ژل با استفاده از اتیدیوم بروماید (5mg/ml) رنگ آمیزی شده و پس از شست و شو با دستگاه ترانس لومیناتور زیر نور ماوراء بنفش بررسی و نتایج مشاهده و ثبت گردید.

نتایج:

از ۳۹ نمونه موردبررسی دراین تحقیق ، ۱۸ نمونه (۴۶ درصد) واجد آلودگی به جنس لپتوسپیرا، ۹ نمونه (۲۳ درصد) واجد آلودگی تؤام جنس بروسلا و لپتوسپیرا ودر ۱۲ نمونه (۳۱ درصد) نیز هیچ آلودگی با دو باکتری فوق با استفاده از آزمایش Multiplex PCR درتحقیق مامشخص نگردید. طول قطعه مورد نظر در خصوص جنس بروسلا ۲۴۳ باز و در مورد جنس لپتوسپیرا۳۰۷ باز بود که در تصویر زیر نمایان است.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل الکتروفورزمحصولات Multiplex PCR : ۵،۲،۱- نمونه لپتوسپیرا ۳- نمونه بروسلاولپتوسپیرا ۴- کنترل مثبت ۶- کنترل منفی

بحث:

گونه های مختلف باکتری بروسلا (ملی تنسیس، ابورتوس، اویس) و لپتوسپیرا در اروپا و خاور میانه از جمله ایران ازاصلی ترین عوامل سقط 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 غدایی آلوده می تواند وارد شده و منجر به با باکتریمی شود. باکتری به جفت حمله کرده و سقط اتفاق می افتد. هدف از این تحقیق بررسی امکان جایگزینی روش Multiplex PCR بجای روش کشت در تشخیص های مرسوم آزمایشگاه های تشخیصی بود بهمین جهت روش Multiplex PCR برای جستجوی همزمان دو باکتری بروسلا و لپتوسپیرا بطور مستقیم از محتویات شیردان جنینهای سقط شده بکار گرفته شد.نتایج کشت تحت تاثیر عوامل مختلفی از جمله تاخیر در ارسال نمونه(منتج به گندیدگی) ، درمان زودتر با آنتی بیوتیک ها، تعداد کم ارگانیسم های زنده در نمونه ونیازهای متعددکشت می باشد.هم چنین گرمخانه گذاری طولانی برای جداسازی ممکن است منجر به شکست جداسازی شود. ازآنجاکه در حال حاضرعلیرغم زمان طولانی و خطرناک بودن،از

www.SID.ir

Archive of SID

روش کشت برای تشخیص عوامل سقط استفاده میشود، به نظر می رسدباتوجه به حساسیت بالای روش Multiplex PCR ،این روش به عنوان جایگزینی مناسب بخصوص در موارد تشخیص مرسوم درمانگاهی و تحقیقاتی باشد.

با عنایت به نتایج تحقیق فوق و با نظر به اینکه سقط یک مشکل بسیاراساسی دردامپروری های سطح کشور محسوب می شود به نظر می رسدبه جهت سادگی،سرعت و توانایی جستجو کردن دو یا چند عامل به شکل موازی وهمزمان می توان روش Multiplex PCR رابه عنوان روش جایگزین کشت معرفی نمود.

www.SID.ir

Archive of SID

REFERENCES:

1. Carter, R.G., Chengappa, M.M. 1991. Essentials of Veterinary Bacteriology and Mycology, 4th Edition. Lea & Febiger, Philadelphia, PA, p. 284.

2. Nielsen, K.H., Duncan, J.R. 1990. Animal Brucellosis. CRC Press, Boca Raton, FL, 453 pp.

3. Baily, G.G., Krahn, J.B., Drasar, B.S., Soker, N.G. 1992. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification, *Journal of Tropical Medicine & Hygiene* 95, 271–275.

4. Fekete, A., Bantle, A.J., Halling, S.M. 1990. Preliminary development of a diagnostic test for *Brucella* using polymerase chain reaction. *Journal of Applied Bacteriology* 69, 216–227.

5. Çetinkaya, H. Öngör, A. Muz, H.B. Ertas, H. Kalender . Ergogan, H.M. 1999 Detection of *Brucella* species DNA in the stomach content of aborted sheep fetuses by PCR. *Veterinary Record* 144, 239–240.

6. Leal-Klezevas, D.J., Martinez-Vasquez, I.O., López-Merino, A., Martinez-Soriano, J.P. 1995. Single-step PCR for the detection of *Brucella* ssp. from blood and milk of infected animals. *Journal of Clinical Microbiology* 33, 3087–3090.

7. Herman, L., De Ridder H. 1992. Identification of *Brucella* spp. by using the polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*. 58, 2099–2101.

8.. Gallien, P., Dorn, C., Alban, G., Staak, C., protz, D. 1998. Detection of *Brucella* species in organs of naturally infected cattle by polymerase chain reaction. Veterinary Record 142, 512–514.

9. Fekete, A., Bantle, J.A., Halling, S.M. 1992. Detection of *Brucella* by polymerase chain reaction in bovine fetal and maternal tissues. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.* 4, 79–83.

10. Queipo-Ortuño, M.I., Morata, P., Ocón, P., Manchado, P., de Dios Colmenero J. 1997. Rapid diagnosis of human brucellosis by peripheral-blood PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology* 35, 2927–2930.

11. Romero, C., Gamzo, C., Pardo, M., López-Goni I. 1995. Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 33, 615–617.

12. Heinemann, M.B., Garcia, J.F., Nunes, C.M., Moraes, Z.M., Gregori, F., Cortez, A., Vasconcellos, S.A., Visintin, J.A., Richtzenhain, L.J. 1999. Detection of leptospires in bovine semen by polymerase chain reaction. *Australian Veterinary Journal* 77, 32–34.

13. Heinemann, M.B., Garcia, J.F., Nunes, C.M., Gregori, F., Higa, Z.M.M., Vasconcellos, S.A., Richtzenhain, L.J. 2000. Detection and differentiation of *Leptospira* spp. serovars in bovine semen by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. *Veterinary Microbiology* 73, 261–267.

14. Kee, S. H., Kim, I.S., Choi, M.S., Chang, W.H. 1994. Detection of leptospiral DNA by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 32, 1035–1039.

15. Masri, S.A., Nguyen, P.T., Gale, P., Howard, C.J., Jung, S.C., 1997. A polymerase chain reaction assay for the detection of *Leptospira* spp. in bovine semen. *Canadian journal of veterinary research* 61, 15–20.

www.SID.ir

Archive of SID

16. Mérien, F., Amouriaux, P., Perolat, P., Baranton, G., Saint Girons, I., 1992. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology* 30, 2219–2224.

17. Dieffenbach, C.W., Dveksler, G.S., 1995. PCR Primer: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, p. 714.

18. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, p. 2100

www.SID.ir