

جستجوی ژنومی کمپلوباکتر فتوس و لپتوسپیرا ایتروگانس در جنین‌های

سقط شده گوسفند در استان‌های منتخب ایران به روش PCR

فاطمه کبیری^۱، محمدرضا محزونیه^۲، عزیزاله ابراهیمی کهریزسنگی^۳، اعظم مختاری^{۳*}

چکیده

که با وجود امکانات پیشرفته هنوز عامل بسیاری از موارد سقط جنین ناشناخته باقی مانده است.

طیف وسیعی از عوامل عفونی شامل انواع باکتری‌ها، ویروس‌ها و انگل‌ها و عوامل فیزیکی و غیره از عوامل سقط جنین هستند. بسیاری از عوامل سقط جنین بدون در نظر گرفتن خسارت اقتصادی و کاهش ناباروری در دام باعث ایجاد بسیاری از بیماری‌های مشترک بین انسان و دام می‌شوند و این مسأله از نظر بهداشت جوامع انسانی نیز دارای اهمیت است. کمپلوباکتر فتوس و لپتوسپیرا ایتروگانس به عنوان دو عامل مهم سقط جنین در کنار سایر عوامل سقط از اهمیت خاصی برخوردارند زیرا هر دو از بیماری‌های مهم ژئونوز می‌باشند.

لپتوسپیروز یکی از عوامل مهم خسارات اقتصادی در دام‌های اهلی است. بیشتر آلودگی‌های این باکتری تحت بالینی است. با این همه سقط، مرده‌زایی و تولد نوزادان ضعیف که تلفات بالا دارند از عوارض بیماری در گاو، گوسفند، اسب و خوک می‌باشد. سقط معمولاً در نیمه دوم آبستنی مشاهده می‌شود.

سقط جنین ناشی از لپتوسپیروز را تنها با روش‌های آزمایشگاهی می‌توان از سایر موارد سقط جنین تشخیص داد (۱۰) و (۳). این بیماری تک‌گیر بوده و تشخیص بالینی آن مشکل است. واکنش‌های متقاطع می‌تواند بین لپتوسپیروهای هم‌گروه اتفاق بیفتد (۱۶). کمپلوباکتر فتوس معمولاً مسئول ایجاد سقط جنین در دام می‌باشد، عامل عفونت‌های فرصت‌طلب در افراد ضعیف و زنان باردار بوده و ایجاد باکتری می‌تواند تب می‌نماید، عامل سپتی سمی کشنده و مننژیت در نوزادان است.

سقط جنین عامل زبان‌های اقتصادی حائز اهمیت به سرمایه دامی کشور و موجب کاهش باروری و تولید است. عوامل عفونی مسئول بخشی از موارد سقط جنین در گوسفند و اغلب، واگیردار و مشترک بین انسان و دام هستند، لذا از نظر بهداشت عمومی نیز مورد توجه قرار گرفته‌اند. کمپلوباکتر فتوس و لپتوسپیرا ایتروگانس از جمله عوامل عفونی سقط جنین گوسفندی در سراسر جهان بوده و خسارات بهداشتی اقتصادی ناشی از آنها قابل توجه است. نظر به اهمیت سقط جنین‌های کمپلوباکتریایی و لپتوسپیرویی در گوسفند در مطالعه حاضر عفونت‌های حاصل از کمپلوباکتر فتوس تحت گونه فتوس و لپتوسپیرا ایتروگانس در ۹۸ نمونه محتویات شیردان جنین‌های سقط شده گوسفند با روش PCR در استان‌های اصفهان، چهارمحال و بختیاری و خراسان رضوی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد، میزان آلودگی به کمپلوباکتر فتوس در نمونه‌های بررسی شده، ۴/۹ درصد بوده و نمونه آلوده به لپتوسپیرا یافت نشد. در کل نتایج این پژوهش نشان می‌دهد کمپلوباکتر فتوس در بروز بخشی از موارد سقط جنین گوسفند نقش دارد. با توجه به روش‌های مختلف تشخیصی لپتوسپیروز، به نظر می‌رسد هر روش تشخیصی نقاط ضعفی داشته و نمی‌توان صرف استفاده از یک آزمون به طور قطع حضور این عامل را منفی دانست. بنابراین توصیه می‌شود به طور هم‌زمان از چند روش استفاده شود تا بتوان با مقایسه نتایج حاصل به تشخیص دقیق‌تری دست یافت.

واژگان کلیدی: PCR، سقط جنین، کمپلوباکتر فتوس، لپتوسپیرا ایتروگانس

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۲/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۵/۳/۸

مقدمه

هر ساله صنعت دامپروری با زبان‌های اقتصادی زیادی به علت بروز سقط جنین روبرو می‌شود. این خسارات به طور عمده ناشی از کاهش تولد بره و کاهش تولید شیر و عوارض پس از سقط جنین نظیر عفونت‌های رحمی، تأخیر در آبستنی بعدی، ناباروری و جفت ماندگی است (۱۸).

سقط جنین علت‌های مختلفی دارد و شدت آن به حدی است

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

۲- استاد، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

۳- استادیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
a.mokhtari@alumni.ut.ac.ir

نیاز به نمونه‌برداری صحیح و کسب اطلاعات دقیق از روند بالینی سقط‌ها از قبیل میزان و زمان رخداد سقط جنین‌ها احساس می‌شود.

PCR روشی است سریع و دقیق که حساس‌تر از روش کشت بوده و دارای ویژگی بیشتری نسبت به تست‌های سرولوژیک برای تشخیص می‌باشد. در این تحقیق با انجام روش PCR برای تشخیص دو عامل عفونی کمپیلوباکتر فتوس و لپتوسپیرا ایتروگانس در سقط جنین گوسفندان، اقدام گردید تا درک صحیحی از وضعیت شیوع این دو عامل بیماری‌زا در موارد سقط جنین به‌دست بیاید.

مواد و روش کار

در این مطالعه گذشته نگر از محتویات شیردان ۹۸ جنین سقط شده گوسفند از استان‌های اصفهان، چهارمحال و بختیاری و خراسان‌رضوی (در فاصله تیرماه ۹۲ تا خردادماه ۹۳) نمونه‌گیری انجام شد. به منظور انجام بررسی‌های لازم، نمونه‌ها در لوله‌های استریل قرار داده شد و به صورت منجمد به پژوهشکده بیماری‌های مشترک و آزمایشگاه میکروپزشناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد منتقل گردید. در این پژوهش، سن جنین‌های سقط شده که از آنها نمونه‌گیری به عمل آمد، بالای چهارماه بود.

استخراج DNA با استفاده از کیت (Gene All cell SV mini 250 p, Cat.no:108-1521) محصول کشور کره جنوبی طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. سپس با استفاده از نمونه‌های DNA استخراج شده از محتویات شیردان جنین سقط شده واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با پرایمرهای اختصاصی انجام گرفت.

حجم هر واکنش PCR انجام شده در این پژوهش ۲۵ میکرولیتر در نظر گرفته شد که این حجم شامل: DNA ۲μl Red Taq polymerase ۱۲/۵μl و ۵۰۰μg/μl

کمپیلوباکتر فتوس یکی از مهم‌ترین عوامل عفونی سقط بوده که عمدتاً در دو ماه آخر آبستنی سبب سقط جنین می‌شوند. میزان بروز سقط جنین در نواحی مختلف بر اساس شرایط و مدیریت پرورش گوسفند و وجود عوامل عفونی خاص متفاوت است (۵ و ۴).

کمپیلوباکتر فتوس عامل مهم سقط جنین عفونی در گوسفند است. در بسیاری از گله‌ها، این باکتری به صورت همزیست روده‌ای، برای مدت‌های طولانی و بدون علائم ظاهری وجود دارد (۱۵).

کمپیلوباکتر در میش‌ها سبب سقط در شش هفته آخر آبستنی می‌گردد. همچنین تولد نوزاد نارس، مرده زایی (تولد بره مرده)، تب، اسهال، ترشحات شدید واژن قبل از سقط یا زایمان و متريت پس از دفع جنین، تورم جفت به همراه نکروز خونی کوتیلدون‌ها را موجب می‌شود. جنین‌ها معمولاً اتولیز شده و در کبد نقاط نکروز زرد نارنجی دیده می‌شود. در بعضی از تحقیقات بیان شده که اگر آلودگی یا عفونت در ابتدای آبستنی رخ دهد منجر به جذب مجدد جنین می‌گردد و اگر عفونت در میانه آبستنی رخ دهد منجر به سقط در طی ۱۰ تا ۲۰ روز بعد می‌شود و نهایتاً اگر عفونت در اواخر آبستنی باشد منجر به تولد بره ضعیف و یا مرده می‌گردد (۱).

انتقال بیماری از طریق خوردن مواد آلوده به ترشحات جنین سقط شده می‌باشد. پس از بلع مواد آلوده، باکتری از روده به رحم رفته و منجر به صدمه رساندن به بافت‌های رحم و جنین می‌شود. معمولاً ۲۰٪ از میش‌ها در گله در اثر آلودگی با کمپیلوباکتر سقط خواهند نمود اما در بعضی از گله‌های حساس شیوع سقط جنین تا ۸۰٪ نیز می‌رسد. میش‌های مسن ایمن خواهند شد اما ۵ تا ۱۰٪ از گله آلوده هر سال، سقط را ادامه می‌دهند.

برای تشخیص عوامل ایجاد سقط جنین، از یک طرف روش‌های دقیق تشخیص دهنده مورد نیاز بوده و از طرفی دیگر

جستجوی ژنومی کمپیلوباکتر فتوس و لپتوسپیرا ایترروگانس در جنین‌های سقط شده گوسفند در استان‌های منتخب ایران به روش PCR

توالی‌های طراحی شده مجدداً بلاست شده تا بهترین توالی با حساسیت و ویژگی مناسب به کار گرفته شود. توالی هر پرایمر و طول امپلیکون آن در جدول ۱ قابل مشاهده است. به منظور تأیید محصولات به دست آمده در واکنش PCR، ۵۰ میکرولیتر از محصولات PCR برای تعیین توالی به شرکت تکاپوزیست ارسال شد.

Ampliqon, mastermix 2X, ID NO: 5200300. (محصول دانمارک)، از هر یک از پرایمرها با غلظت ۱۰ μl ۰/۵ و پیکومول و ۹/۵ μl آب مقطر دیونیزه استریل بود. پس از مخلوط کردن، میکروتیوب‌های PCR در داخل دستگاه ترموسایکلر (Corbett-Research، استرالیا) قرار داده شد. پرایمرها با استفاده نرم‌افزار BLAST در سایت NCBI و سایت primer3 طراحی گردید. پس از طراحی پرایمر،

جدول ۱- پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه

نام باکتری	نام ژن	نوع پرایمر	توالی پرایمر (5' به 3')	طول باند
کمپیلوباکتر فتوس	16S ribosomal RNA gene	پرایمر F	ACACTGGAGGACAACAGTTA	۵۳۲
	16S ribosomal RNA	پرایمر R	TTTACCCCTACACCACCAAT	
لپتوسپیرا ایترروگانس	secY gene	پرایمر F	TACGGTGGATTCAATCCAGG	۳۹۵
	secY gene	پرایمر R	AAAGGCGCTCACAAAGAATC	

پس از انجام PCR، نمونه‌ها در ژل آگاروز ۱/۵٪ (سیناژن، ایران، شماره کاتالوگ MR7730C) با استفاده از سایز مارکر با نام تجاری GeneRuler 50 bp DNA مورد الکتروفورز قرار گرفتند.

نتایج

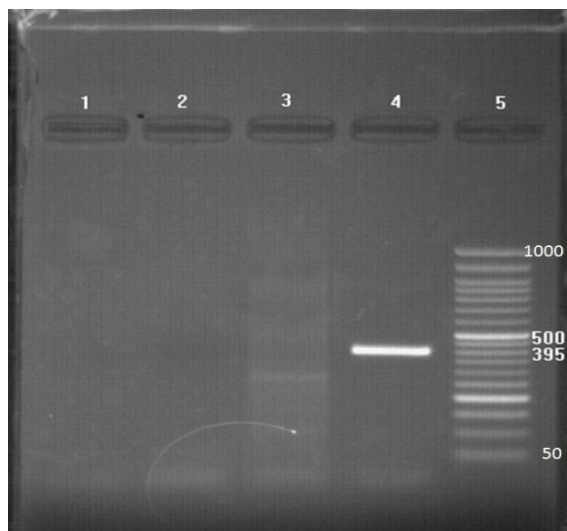
در این مطالعه ۹۸ نمونه مورد آزمایش PCR قرار گرفت که در مجموع ۵ نمونه از نظر وجود ژن کمپیلوباکتر فتوس مثبت بودند. در جدول (۳) تعداد و درصد کل نمونه‌های بررسی شده ذکر شده است. آنالیز آماری نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS IBM نسخه ۲۲ تفاوت معنی‌داری بین میزان شیوع باکتری در بین استان‌های مختلف مورد بررسی نشان نداد.

برنامه حرارتی PCR عبارت بود از: سیکل حرارتی اول شامل ۹۴°C به مدت ۳ دقیقه، سیکل حرارتی دوم متشکل از: ۳۰ چرخه و شامل ۹۴°C به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۲°C به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲°C به مدت ۴۵ ثانیه و در پایان سیکل حرارتی سوم به صورت ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت (جدول ۲).

کنترل مثبت لپتوسپیرا ایترروگانس (ATCC 43642) از موسسه رازی تهران - کرج تهیه شد و کنترل مثبت کمپیلوباکتر فتوس از کلکسیون میکروبی دانشگاه شهرکرد (ATCC 27374) تهیه گردید.

جدول ۲- برنامه حرارتی دستگاه ترموسایکلر

مرحله	دما (سانتی‌گراد)	مدت	تعداد سیکل
دنا تورا سیوان اولیه	۹۴	۳ دقیقه	۱
دنا تورا سیوان	۹۴		
اتصال	۵۲	۴۵ ثانیه	۳۰
پیشروی	۷۲		
پیشروی نهایی	۷۲	۵ دقیقه	۱



نگاره ۲- تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR = ۱ کنترل منفی، ۲ و ۳- نمونه‌های منفی لپتوسپیلا، ۴- کنترل مثبت لپتوسپیلا/ اینتروگانس، ۵- GeneRuler 50 bp DNA Ladder, Fermenta)La50

پس از تعیین توالی، هم ترازوی توالی گرفته شده از خوانش سکانس محصولات PCR به خوبی کفایت جداسازی ژن‌های مورد نظر را تأیید نمود.

به طور کلی از ۹۸ نمونه مورد بررسی (جدول ۵)، میزان کل آلودگی در استان اصفهان ۷/۶٪، استان چهارمحال و بختیاری ۷/۴٪ آلودگی کمپیلوباکتر فتوس مشخص گردید و در استان خراسان رضوی آلودگی صفر درصد بود. آلودگی به لپتوسپیلا اینتروگانس در نمونه‌های جدا شده از شیردان مشاهده نگردید (جدول ۴).

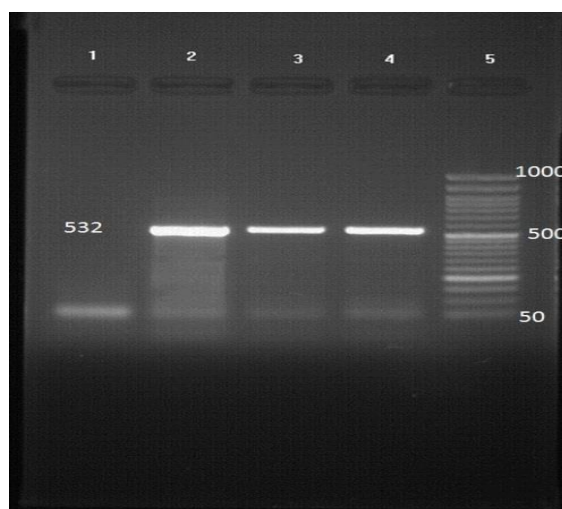
جدول ۴- نتایج کلی PCR در نمونه‌های سقط جنین

موارد مثبت	اصفهان		چهارمحال و بختیاری		خراسان رضوی		جمع	
	مثبت	درصد	مثبت	درصد	مثبت	درصد	مثبت	درصد
کمپیلوباکتر فتوس	۳	۷/۶۹	۲	۷/۴	۰	۰	۵	۴,۹
لپتوسپیلا/ اینتروگانس	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
جمع موارد مثبت	۳	۷/۶۹	۲	۷/۴	۰	۰	۵	۴,۹
تعداد نمونه‌ها	۳۹		۲۷		۳۲		۹۸	۱۰۰

جدول ۳- شیوع کمپیلوباکتر فتوس در استان‌های مورد مطالعه

استان	تعداد نمونه	جمع موارد مثبت	درصد
اصفهان	۳۹	۳	۷,۶
چهارمحال و بختیاری	۲۷	۲	۷,۴
خراسان رضوی	۳۲	۰	۰
جمع	۹۸	۵	۴,۹

در این مطالعه در تصاویر ژل الکتروفورز مشاهده باند ۵۳۲bp برای کمپیلوباکتر فتوس و باند ۳۹۵bp برای لپتوسپیلا/ اینتروگانس نشان‌دهنده نتایج مثبت بود (نگاره‌های ۱ و ۲).



نگاره ۱- تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR، ۱= کنترل منفی، ۲- کنترل مثبت کمپیلوباکتر فتوس، ۳ و ۴= نمونه‌های مثبت کمپیلوباکتر فتوس ۵- GeneRuler 50 bp DNA Ladder, Fermentas) La50

بحث

اطلاعات به دست آمده به نظر می‌رسد مجموعه عوامل دخیل در بروز سقط جنین در این سه استان تنوع بیشتری داشته و باید مورد بررسی دقیق قرار بگیرند. در مطالعه حاضر در استان خراسان رضوی نمونه مثبت یافت نشد و به نظر می‌رسد بررسی‌های بیشتر با تعداد نمونه بیشتر می‌تواند درک صحیح‌تری از میزان شیوع این باکتری در این استان در اختیار ما قرار بدهد.

صالح و همکاران در سال ۱۳۹۱ با تهیه سواب‌های واژینال از ۲۱۷ گوسفند افشاری استان زنجان (۱۲۹ نمونه از میش‌های سقط‌کرده و ۳ نمونه از میش‌هایی که بره نارس به دنیا آورده بودند و ۸۵ نمونه از میش‌های سالم) که به منظور تعیین DNA باکتری به روش PCR (در باکتری‌های کوکسیلا بورنتی، کلامیدوفیلا آبورتوس، سالمونلا انتریکا، یرسینیا انترکولیتیکا، کمپیلوباکتر فتوس و لپتوسپیروا ایتروگانس) انجام شده بود تنها DNA کمپیلوباکتر در نمونه‌ها تشخیص داده شد و ۵۱/۲٪ از جنین‌های سقط شده آلوده به کمپیلوباکتر فتوس بودند (۱۵). از تفاوت میزان شیوع این مطالعه و مطالعه حاضر نتیجه‌گیری می‌شود که عوامل جغرافیایی نظیر آب و هوا، درصد رطوبت و نوع تغذیه بر روی نوع و درصد عواملی که باعث سقط جنین می‌شوند، تأثیر دارد.

Gurturk و همکاران در یک مطالعه اپیدمیولوژیک از سال ۲۰۰۱ تا ۲۰۰۲ در ترکیه با روش‌های سرولوژیک نشان دادند کمپیلوباکتر عامل بروز سقط جنین گوسفند در ۳۸٪ موارد بوده است (۱۴). بیشتر بودن میزان شیوع باکتری در این مطالعه تا حد زیادی به دلیل نوع آزمایش مورد استفاده برای تشخیص است که حساسیت و ویژگی کمتری نسبت به PCR دارد.

صادقی و همکاران در سال ۱۳۷۸ در استان مرکزی از ۷۰ نمونه جنین سقط شده مورد آزمایش (۱/۴٪) کمپیلوباکتر را به روش کشت میکروبی جدا نمودند (۶). تاجبخش و همکاران نیز در سال ۱۳۷۹، ۴۰۲ نمونه سواب واژینال از گوسفنداری‌های تهران و اصفهان تهیه کرده و به روش کشت میکروبی شیوع

سقط جنین‌های کمپیلوباکتریایی در گوسفند ممکن است حالت همه‌گیر یا طوفانی پیدا کند که در این صورت تا حدود ۷۰٪ دام‌های گله سقط می‌نمایند. مطالعات مختلفی که روی عوامل سقط جنین در مناطق مختلف صورت گرفته نتایج متفاوتی را در رابطه با علت اصلی سقط نشان می‌دهد با وجودی که عوامل اصلی سقط جنین اغلب بدون توجه به ناحیه جغرافیایی یکسان است اما برخی از آنها بطور مشخص محدود به ناحیه خاصی می‌شوند. با وجود این شیوع سقط جنین تغییراتی را در رابطه با ناحیه جغرافیایی، آب و هوا، تغذیه، جمعیت گله، وضعیت بهداشتی گله، دام‌های وحشی و برنامه‌های واکسیناسیون نشان می‌دهد. جداسازی باکتری کمپیلوباکتر فتوس با روش‌های کشت و لپتوسپیروا ایتروگانس با روش سرولوژی امکان پذیر است. به منظور تشخیص از تست آگلوتیناسیون میکروسکوپی می‌توان استفاده نمود. روش‌های کشت و جداسازی باکتری نیز در تشخیص این باکتری استفاده می‌شود ولی به دلیل زمان‌بر بودن و نیاز به تأیید ثانویه با سایر تست‌ها توصیه نمی‌شود. روش‌های سرولوژیک به دلیل عدم تشخیص سریع و زود هنگام بیماری کارآمد نمی‌باشند نقطه ضعف دیگر آگلوتیناسیون میکروسکوپی (MAT) وقت گیر بودن آن است. همچنین استفاده از کشت زنده خطر عفونت انسان را بیشتر می‌کند (۱۵). لذا استفاده از روش‌های مولکولی با حساسیت و ویژگی بسیار بالا به عنوان جایگزین روش‌های سرولوژیک منطقی به نظر می‌رسند و به همین دلیل در مطالعه حاضر از این روش برای شناسایی باکتری‌ها استفاده گردید.

نتایج مطالعه احسانی و همکاران به روش PCR در مورد سقط جنین در این مناطق نشان داد که نزدیک به ۳۳/۷٪ موارد سقط مربوط به بروسلا، کلامیدوفیلا و سالمونلا بوده است، لیکن مطالعه حاضر نشان داد عامل ۴/۹٪ آنها کمپیلوباکتر فتوس است که در استان‌های اصفهان و چهارمحال و بختیاری در درجه سوم اهمیت پس از بروسلا و سالمونلا قرار می‌گیرد. با توجه به

مختلف استان‌های تهران، گیلان، مازندران و خراسان را بررسی کردند. نتایج این بررسی نشان داد که ۳۱٪ گاوها و ۱۷٪ گوسفندان به ترتیب درجه اهمیت، با سروتیپ‌های گریپوتیفوزا، پومونا و ایکتره‌موراژیة واکنش سرمی مثبت داشتند و از میان نمونه‌های سرمی مربوط به شتر یک نفر نسبت به سروتیپ ایکتره‌موراژیة واکنش سرمی مثبت نشان داد. دو سال بعد همین محقق موفق به جداسازی سروتیپ گریپوتیفوزا از دام‌ها و خود صاحب دامپروری آلوده ای در اطراف کرج شد (۸).

ابراهیمی و همکاران در سال ۸۱ طی بررسی که روی ۴۰۰ نمونه سرم انسانی جمع آوری شده از مناطق عشایری فارس و کوه‌رنگ به روش MAT انجام دادند و در مطالعه آنها ۵۲/۵٪ از افراد آلوده به باکتری لپتوسپیرا تخمین زده شدند که به نظر می‌رسد شیوع بیماری در جمعیت عشایر تاحد زیادی مربوط به ارتباط به شیوع بیماری در دام‌ها است (۱۲).

Zakeri و همکاران در سال ۲۰۱۰ به روش ۷۵ Nested PCR نمونه از سرم گوسفندان اردبیل را به منظور جستجوی لپتوسپیرا/ایتروگانس مورد بررسی قرار دادند که ۱۷/۳۳٪ موارد مثبت بودند (۱۸) و در بررسی صورت گرفته توسط Frouhani و همکاران در سال ۲۰۱۴ بعد از انجام آزمایش PCR، باکتری لپتوسپیرا/ایتروگانس به عنوان عامل سقط جنین در ۸/۵۷٪ موارد سقط جنین در گوسفندهای تبریز شناسایی شد (۱۳). با توجه به همجواری جغرافیایی این دو ناحیه تفاوت میزان شیوع باکتری را هم به زمان نمونه‌گیری و بهبود و افزایش کنترل و پیشگیری بیماری‌های دامی و هم به نحوه نمونه‌گیری می‌توان نسبت داد.

حملی و همکاران نیز در سال ۹۲ به روش PCR فراوانی سقط جنین را در ۷۶ نمونه از محتویات شیردان سقط شده گاو در گاوداری‌های تبریز مورد بررسی قرار دادند. بعد از انجام آزمایش PCR مشخص شد تعداد سقط جنین لپتوسپیرایی ۱۶ مورد (۲۱٪) و موارد سقط کمپیلوباکتریایی ۳ مورد (۳/۹٪) بوده است (۴) به همین دلیل در این تحقیق پیش بینی می‌شد که

کمپیلوباکتر فتوس را از ۰/۶٪ تا ۱۳/۳٪ گزارش نمودند (۲). این در حالی است که زهرایی و همکاران در سال ۱۳۷۸ در یک همه‌گیری سقط جنین در یک گله گوسفندی در اطراف تهران از ۱۷۵ نمونه، ۸ مورد مثبت کمپیلوباکتر فتوس تحت گونه فتوس (۴/۵٪) را به روش کشت و جداسازی میکروبی به عنوان عامل سقط جنین مشخص کردند (۵). با توجه به نزدیک بودن نواحی جغرافیایی مورد بررسی تفاوت مشاهده شده در میزان شیوع را به عدم کفایت نسبی حساسیت و ویژگی روش‌های کشت و جداسازی میکروبی در تشخیص همه موارد بیماری نسبت داد.

در همین زمینه، قره‌خانی و همکاران در یک مطالعه مقطعی که با هدف تعیین میزان شیوع عوامل باکتریایی در جنین‌های سقط شده گوسفند در استان همدان انجام داده‌اند، ۲۲۶ نمونه سقط جنین ارجاعی دامداران به شبکه‌های دامپزشکی استان را طی سالهای ۱۳۸۸ تا ۱۳۸۹ مورد بررسی قرار دادند. در این نمونه‌ها عوامل باکتریایی از ۶۱ نمونه جدا گردیده بود و ۱۲ نمونه بروسلا، ۱ نمونه کمپیلوباکتر (۰/۴۴٪)، ۳۷ نمونه اشرشیاکلی و ۱۱ نمونه سایر باکتری‌ها جداسازی شده بود (۷). نتیجه این مطالعه با نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر هماهنگی داشته و تفاوت اندک میزان شیوع را به آب و هوا، شرایط مدیریت گله و دقت روش‌های تشخیصی می‌توان مرتبط دانست. مطالعه مشابه دیگری نیز توسط فیروزی و همکاران در سال ۱۳۸۲ با مطالعه روی ۱۹۸ نمونه محتویات معده و اندام‌های جنینی سقط شده گوسفندان انجام شده و آلودگی جنین‌های سقط شده در اطراف شیراز بر اثر کمپیلوباکتر را ۷/۵٪ گزارش کرد (۸) که با نتایج این تحقیق هم خوانی دارد.

در مورد شیوع گونه‌های مختلف لپتوسپیرا نیز مطالعاتی در دسترس است. اولین مطالعه در زمینه بیماری لپتوسپیروز در ایران مربوط به سال ۱۳۳۶ است که مقامی و همکاران در مؤسسه رازی واقع در حصارک کرج، نمونه‌های خون مربوط به ۳۰۰۰ رأس گاو و گوسفند و ۵ نفر شتر مربوط به مناطق

به طور کلی رعایت بهداشت در منطقه، مزارع و دامداری‌ها در کنار بهداشت فردی و شغلی مسائلی هستند که بر شیوع بیماری در منطقه تأثیر می‌گذارد. ضد عفونی آغل‌ها و آبشخورهایی که حیوانات مشکوک به بیماری از آن استفاده کرده‌اند بایستی صورت گیرد. در مواقعی که حیوان به هر دلیلی دچار سقط جنین می‌گردد، محل زایمان بایستی به طور کامل ضد عفونی شود. همچنین با مشاهده سقط و ناباروری در گله جهت تعیین علت سقط و در نهایت اقدامات کنترلی در گله باید سریعاً اقدام کرد. در برخورد با سقط جنین کمپیلوباکتریایی جداسازی میش‌های سقط کرده و از بین بردن مواد سقطی و بستر محل سقط به شکل مناسب برای محدود کردن انتشار بیماری حیاتی است (۱).

بر پایه تحقیقات زیادی که در رابطه با روش‌های تشخیصی لپتوسپیروز انجام شده، که به برخی از آنها نیز به طور مختصر اشاره گردید، این طور به نظر می‌رسد که هر روش تشخیصی محدودیت‌ها و معایب خاص خود را دارد. ضمن اینکه در اکثر مقالات مورد اشاره نتایج سرولوژی ذکر گردیده بود که با توجه به اینکه نوع آنتی بادی و تیتراژ IgM ذکر نشده بود نمی‌توان ارتباط این نتایج با سقط جنین را به خوبی مشخص کرد. زیرا تعداد زیادی از دام‌های مناطق آلوده دارای آنتی بادی ضد لپتوسپیروا هستند ولی ممکن است سقط به دلیل دیگری اتفاق افتاده باشد. بنابراین توصیه می‌شود از چند روش تشخیصی، به طور هم‌زمان استفاده شود تا بتوان با مقایسه نتایج حاصل به تشخیص دقیق‌تری دست یافت.

مطالعه حاضر نیز با هدف بررسی شیوع این دو باکتری، از شیردان جنین‌های سقط شده گوسفند نمونه‌گیری انجام شد و بر روی نمونه‌ها آزمون PCR انجام گرفت. نتایج نشان داد ۹/۴٪ از موارد سقط مربوط به کمپیلوباکتر فتوس بوده و آلودگی به لپتوسپیروا ایتروگانس در نمونه‌های شیردان دیده نشد. با توجه به این نتایج به نظر می‌رسد در مطالعات آینده حجم نمونه وسیع‌تر و به کارگیری چند روش تشخیصی به طور هم‌زمان برای به دست آوردن میزان دقیق شیوع باکتری در منطقه ضروری باشد.

نمونه شیردان سقط شده گوسفند هم نمونه خوبی برای جداسازی این دو باکتری باشد و به همین لحاظ در مطالعه حاضر نمونه‌های محتویات شیردان جنین‌های سقط شده برای نمونه‌گیری استفاده شد. از طرف دیگر، Silva و همکاران در سال ۲۰۱۲ در برزیل به این نتیجه رسیدند که PCR یک آزمایش سریع با حساسیت و ویژگی خوب برای تشخیص باکتری لپتوسپیروا از گوسفندان کشته شده است (۱۷) و به همین دلیل این روش در مطالعه حاضر به عنوان روش جستجوی باکتری مورد استفاده قرار گرفت.

Bal و همکاران در سال ۱۹۹۴ جهت پی بردن به این موضوع که PCR تا چه حد می‌تواند جانشین کشت باشد مطالعه‌ای انجام داده و نشان دادند با روش PCR، ۹۰٪ بیماران قابل شناسایی هستند و ثابت کردند که نمونه ادرار آن هم در مراحل مختلف بیماری نمونه مناسب‌تری برای تشخیص می‌باشد (۱۱). با توجه به این نتایج و تحقیق حاضر به نظر می‌رسد نوع نمونه گرفته شده و زمان اخذ نمونه نیز در آزمون PCR مهم باشد. هم‌چنان که از نمونه‌های شیردان نمونه مثبت یافت نشد. اگر چه گوسفندان آلودگی را از گاوها می‌گیرند ولی معمولاً بیماری در آنها تحت درمانگاهی بوده و منجر به مثبت شدن سرم بدون شکل‌گیری بیماری می‌شود (۱). نکته ای که در مورد PCR حائز اهمیت است این است که اگر روش‌های مقدماتی PCR کارآمد نباشند، بازدهی کافی در تهیه DNA مناسب به عنوان الگو در PCR ندارند و یا ناخالصی‌های باقی مانده در این پروسه‌ها در واکنش PCR ایجاد اختلال می‌کنند. با این وجود PCR به فراوانی برای تشخیص بعد از مرگ در مورد نمونه‌های سرم و ادرار استفاده می‌شود.

بررسی‌های متعددی که روی سروایدمیولوژی لپتوسپیروز در نواحی مختلف کشور انجام گرفته، نشان می‌دهد که نه تنها فراوانی سروتیپ‌ها در مناطق مختلف کشور متفاوت است بلکه در یک منطقه خاص نیز با گذشت زمان به تدریج سروتیپ‌های شایع تغییر می‌کند (۹).

تشکر و سپاسگزاری

این مطالعه با حمایت‌های مالی دانشگاه شهرکرد در قالب طرح پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد باکتری‌شناسی به شماره ۱۷۰/۲۱۷۹ انجام شد که بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی تشکر می‌گردد. همچنین نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از جناب آقای احسانی که زحمت جمع‌آوری نمونه‌ها را متقبل شدند تشکر نمایند.

فهرست منابع

- ۱- اصلانی، م. ر. (۱۳۸۶): سقط جنین در گوسفند: عوامل اصلی و تشخیص آن‌ها، انتشارات قطب علمی مطالعات سقط جنین و مرگ و میر نوزاد دام‌های نشخوارکننده، چاپ اول: ۴۱ و ۲۸.
- ۲- تاج بخش، ح، احمدی، م. فخرزادگان، ف، نادعلیان، م. ق. (۱۳۷۹): بررسی عفونت‌های ناشی از کمپیلوباکتر فتوس زیر گونه فتوس در گوسفنداری‌های اطراف تهران و اصفهان، مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ۵۵(۳): ۷۱-۶۹.
- ۳- حسینی طباطبایی، ع، فیروزی، ر. (۱۳۸۰): بیماری‌های باکتریایی دام، چاپ اول، انتشارات دانشگاه تهران، تهران، ایران: ۴۷-۴۳۱.
- ۴- حملی، ح، جعفری جوزانی، ر، نفوذی، ک، اشرفی هالان، ج، جبباری نوقایی، ح. (۱۳۹۲): بررسی فراوانی سقط جنین‌های لپتوسپیروسی، کمپیلوباکتریایی و بروسلائی در گاوداری‌های شیری اطراف تبریز به روش مولکولی، مجله دامپزشکی ایران، ۹(۲): ۵۹-۵۱.
- ۵- زهرایی صالحی، ت. (۱۳۷۸): همه‌گیری سقط جنین ناشی از کمپیلوباکتر فتوس تحت گونه فتوس در یکی از گوسفندداری‌های اطراف تهران، مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ۵۴(۲): ۱۱-۱۴.
- ۶- صادقی، م، قائم مقامی، س، بخشش، م، مرادی، س، گنجی، ع، احمدی، م. (۱۳۸۷): بررسی فراوانی سقط جنین‌های باکتریایی گوسفند و بز در استان مرکزی، نشریه پژوهش‌های بالینی دام‌های بزرگ (دامپزشکی)، ۲(۴): ۱-۶.
- ۷- فیروزی، ر. (۱۳۸۳): بررسی عوامل سقط جنین گوسفندان در اطراف شیراز، مجله دامپزشکی دانشگاه تهران، ۶۱(۱): ۱۷-۱۵.
- ۸- قره‌خانی، ج، کریمی، ا، صادقی، ب، رسولی، م. (۱۳۹۱): بررسی عوامل باکتریایی سقط جنین گوسفندان در استان همدان، مجله علمی تحقیقات آزمایشگاهی دامپزشکی، ۱(۴): ۱۰۵-۱۰۵.
- ۹- مقامی، غ. (۱۳۵۹): نقش لپتوسپیروز در بچه اندازی ماده گاوهای اطراف تهران، انتشارات سازمان دامپزشکی، ۲۰: ۵۰-۶۶.
- ۱۰- هنرمند، ح، اشراقی، س، خرمی‌زاده، م. ر، منصور قناعی، ف، فلاح، م. ص. (۱۳۸۴): بررسی انتشار موارد مثبت لپتوسپیروز در استان گیلان به روش الیزا، مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گیلان، ۵۴: ۸۰-۷۱.
- 11-Bal, A.E., Gravekamp, C., Hartkeerl, R.A. (1994): Detection of leptospirosis in urine by for early diagnosis of leptospirosis. J. Clin. Microbiol. 32(8):1894-1898.
- 12-Ebrahimi, A., Alijani, L. (2003): Serological survey of human leptospirosis in tribal areas of west central Iran, Iran J. Med. Sci. 28(2): 94-95.
- 13- Frouhani, P., Hamali, H., Jafari Jozani R., Abdollahpour, G., Nofouzi, K., Norsaadat, G., (2014): A survey on abortions caused by *Leptospira* spp. in sheep flocks located on the suburb of Tabriz-Iran. Wulfenia. 21(1): 134-144.
- 14- Gürtürk, K., Ekin, I.H., Aksakal, A., Solmaz, H. (2002): Detection of *Campylobacter* antibodies in sheep sera by a Dot-ELISA using acid extracts from *C. fetus* ssp. *fetus* and *C. jejuni* strains and comparison with a complement fixation test J. Vet Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health. 49: 146-151.
- 15-Lilenbaum, W., Souza, G.N. (2003): . Factors associated with bovine in Rio de Janeiro, Brazil. Res. Vet. Sci. 75 :249-251.
- 16-Saleh, M., Harkinezhad, M.T., Marefat, A. (2013): An outbreak of abortion in Afshari sheep with probable involvement of *Campylobacter fetus*. Iran. J. Vet. Med. 7(1):51-56.

- 17- Silva., R.C., Costa, V.M., Shimabukuro, F.H., Richini-Pereira, V.B., Menozzi, B.D., Langoni, H. (2012): Frequency of *Leptospira* spp. in sheep from Brazilian slaughterhouses and its association with epidemiological variables. *Pesq. Vet. Bras.* 32(3):194-198.
- 18- Zakeri, S., Khorami, N, Ganji, Z.F., Sepahian, N., Malmasi, A.A., Gouya, M.M., Djadid, N.D. (2010): *Leptospira wolffii*, a potential new pathogenic *Leptospira* species detected in human, sheep and dog. *Infect, Genet. Evol.* 10(2):273-277.