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

فاطمه کبیری[۱]، محمدرضا محزونیه[۲]، عزیزاله ابراهیمی‌کهریزسنگی[۳]، اعظم مختاری*[۳]

چکیده

سقط جنین عامل زیان‌های 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. *کمپیلو باکتر فتوس* و *لپتوسپیرا اینتروگانس* ازجمله عوامل عفونی سقط جنین گوسفندی در سراسر جهان بوده و خسارات بهداشتی اقتصادی ناشی از آنها قابل توجه است. نظر به اهمیت سقط جنین‌های کمپیلوباکتریایی و لپتوسپیرایی در گوسفند در مطالعه حاضر عفونت‌های حاصل از *کمپیلوباکتر فتوس* تحت گونه فتوس و *لپتوسپیرا اینتروگانس* 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 *کمپیلوباکتر فتوس* در نمونه‌های بررسی شده، ٤/٩ درصد بوده و نمونه آلوده به لپتوسپیرا یافت نشد. در کل نتایج این پژوهش نشان می‌دهد *کمپیلوباکتر 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 ازیک 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، کمپیلوباکتر فتوس، لپتوسپیرا اینتروگانس*

تاریخ دریافت: ۹٤/۱۲/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۵/۳/۸

مقدمه

هر ساله صنعت دامپروری با زیان‌های اقتصادی زیادی به علت بروز سقط جنین روبرو می‌شود. این خسارات به طور عمده ناشی ازکاهش 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 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. *کمپیلوباکتر فتوس* و *لپتوسپیرا اینتروگانس* به عنوان دو عامل مهم سقط جنین در کنار سایر عوامل سقط از اهمیت خاصی برخوردارند زیرا هر دو از بیماری‌های مهم زئونوز 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 معمولا 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 لپتوسپیراهای هم گروه اتفاق بیفتد(۱٦). *کمپیلوباکتر فتوس* معمولاً مسئول ایجاد سقط جنین در دام می‌باشد، عامل عفونت‌های فرصت‌طلب در افراد ضعیف و زنان باردار بوده و ایجاد باکتریمی و تب می‌نماید، عامل سپتی سمی کشنده و منتژیت در نوزادان 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

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 ٤).

کمپیلوباکتر فتوس عامل مهم سقط جنین عفونی در گوسفند است. در بسیاری از گله ها، این باکتری به صورت همزیست روده‌ای، برای مدت‌های طولانی و بدون علایم 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 متریت 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 آواخر آبستنی باشد منجر به تولد بره ضعیف و یا مرده می‌گردد (۱).

انتقال بیماری از طریق خوردن مواد آلوده به ترشحات جنین سقط شده می باشد. 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 اثرآلودگی 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 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 روشPCR برای تشخیص دو عامل عفونی *کمپیلوباکتر فتوس* و *لپتوسپیرا اینتروگانس* در سقط جنین گوسفندان، اقدام گردید تا درک صحیحی از وضعیت شیوع این دو عامل بیماری زا 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 میکروب‌شناسی 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:108-152l) محصول کشور کره جنوبی طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. سپس با استفاده از نمونه‌هایDNA استخراج شده از محتویات شیردان جنین سقط شده واکنش زنجیره‌ای پلیمراز 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 (۵۰۰µg/µl) و ۱۲/۵µl محلول Red Taq polymerase (

mastermix 2X، Ampliqon، ID NO: 5200300، محصول دانمارک)، ۰/۵ µl از هر یک از پرایمرها با غلظت ۱۰ 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، 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.

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	پرایمرF	ACACTGGAGGACAACAGTTA	۵۳۲
	16S ribosomal RNA	پرایمرR	TTTACCCCTACACCACCAAT	
لپتوسپیرا اینتروگانس	*secY* gene	پرایمرF	TACGGTGGATTCATTCCAGG	۳۹۵
	secY gene	پرایمرR	AAAGGCGCTCACAAAGAATC	

برنامه حرارتی PCR عبارت بود از: سیکل حرارتی اول شامل ۹٤ºC به مدت ۳ دقیقه، سیکل حرارتی دوم متشکل از: ۳۰ چرخه و شامل ۹٤ºC به مدت ٤٥ ثانیه، ۵۲ºC به مدت ٤٥ ثانیه و ۷۲ºC به مدت ٤٥ ثانیه و در پایان سیکل حرارتی سوم به صورت ۷۲ ºC به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت (جدول۲).

کنترل مثبت *لپتوسپیرا اینتروگانس* (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

تعداد سیکل	مدت	دما (سانتی‌گراد)	مرحله
۱	۳ دقیقه	۹٤	دناتوراسیون اولیه
۳۰	٤٥ ثانیه	۹٤	دناتوراسیون
		۵۲	اتصال
		۷۲	پیشروی
۱	۵ دقیقه	۷۲	پیشروی نهایی

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.

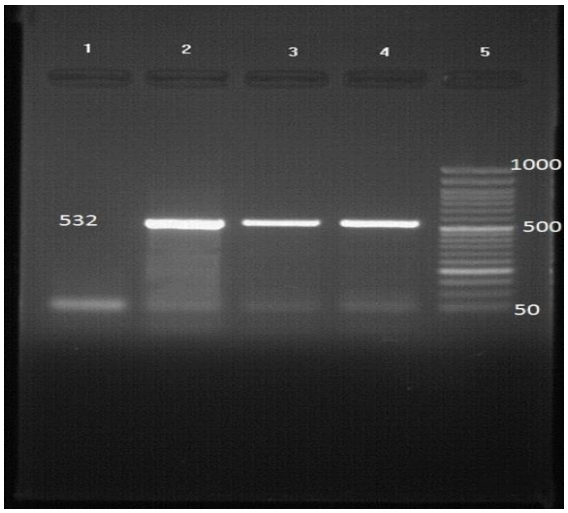
نتایج

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 SPSSS IBM نسخه ۲۲ تفاوت معنی‌داری بین میزان شیوع باکتری در بین استان‌های مختلف مورد بررسی نشان نداد.

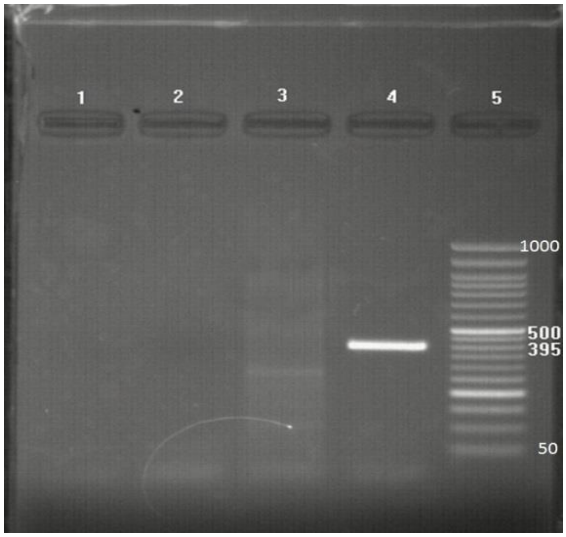
جدول ۳- شیوع *کمپیلوباکتر فتوس* در استان‌های مورد مطالعه

استان	تعداد نمونه	جمع موارد مثبت	درصد
اصفهان	۳۹	۳	۷,٦
چهارمحال و بختیاری	۲۷	۲	۷,٤
خراسان رضوی	۳۲	۰	۰
جمع	۹۸	۵	٤,۹

در این مطالعه در تصاویر ژل الکتروفورز مشاهده باند ۵۳۲bp برای *کمپیلوباکتر فتوس* و باند ۳۹۵bp برای *لپتوسپیرا اینتروگانس* نشان‌دهنده نتایج مثبت بود (نگاره‌های ۱ و۲).



نگاره ۱- تصویرژل الکتروفورز محصول PCR، ۱= کنترل منفی، ۲- کنترل مثبت *کمپیلوباکتر فتوس*، ۳و٤ = نمونه‌های مثبت *کمپیلوباکتر فتوس* ۵-La50 (GeneRuler 50 bp DNA Ladder, Fermentas)



نگاره ۲- تصویرژل الکتروفورز محصول PCR ۱= کنترل منفی، ۲و۳- نمونه‌های منفی لپتوسپیرا، ٤-کنترل مثبت *لپتوسپیرا اینتروگانس*، ۵- GeneRuler 50 bp DNA Ladder, Fermenta)La50

پس از تعیین توالی، هم ترازی 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 (جدول۵)، میزان کل آلودگی در استان اصفهان ۷/٦٪، استان چهارمحال و بختیاری ۷/٤٪ آلودگی کمپیلوباکتر فتوس مشخص گردید و در استان خراسان رضوی آلودگی صفر درصد بود. آلودگی به لپتوسپیرا اینتروگانس در نمونه‌های جدا شده از شیردان مشاهده نگردید (جدول ٤).

جدول ٤- 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	۷/٦۹	۲	۷/٤	۰	۰	۵	٤,۹
لپتوسپیرا اینتروگانس	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
جمع موارد مثبت	۳	۷/٦۹	۲	۷/٤	۰	۰	۵	٤,۹
تعداد نمونه‌ها	۳۹		۲۷		۳۲		۹۸	۱۰۰

بحث

سقط جنین‌های کمپیلوباکتریایی در گوسفند ممکن است حالت همه‌گیر یا طوفانی پیدا کند که در این صورت تا حدود ۷۰٪ دام‌های گله سقط می نمایند. 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 ازآنها 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 بهداشی گله، دامهای وحشی و برنامه های واکسیناسیون نشان می دهد. جداسازی باکتری *کمپیلوباکتر فتوس* با روش‌های کشت و *لپتوسپیرا اینتروگانس* 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 نمی باشند 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 ٤/۹٪ 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 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 لپتوسپیرا اینتروگانس*) 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(١٤). 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 (١/٤٪) کمپیلوباکتر را به روش کشت میکروبی جدا نمودند.(٦) تاجبخش و همکاران نیز در سال ۱۳۷۹، ٤۰۲ نمونه سواپ واژینال از گوسفندداری‌های تهران و اصفهان تهیه کرده و به روش کشت میکروبی شیوع

کمپیلوباکتر فتوس را از ۰/٦٪ تا ۱۳/۳٪ گزارش نمودند(۲). این در حالی است که زهرایی و همکاران در سال ۱۳۷۸ در یک همه گیری سقط جنین در یک گله گوسفندی در اطراف تهران از ۱۷۵ نمونه، ۸ مورد مثبت *کمپیلوباکتر فتوس* تحت گونه فتوس (٤/٥٪) 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، ۲۲٦ 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 ٦۱ نمونه جدا گردیده بود و ۱۲ نمونه بروسلا، ۱ نمونه کمپیلوباکتر (۰/٤٤٪)، 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 دراطراف 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 ۱۳۳٦ 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 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 ایکتروهموراژیه واکنش سرمی مثبت داشتند و از میان نمونه‌های سرمی مربوط به شتر یک نفر نسبت به سروتیپ ایکتروهموراژیه 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 ٤۰۰ نمونه سرم انسانی جمع آوری شده از مناطق عشایری فارسان 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 می رسد شیوع بیماری در جمعیت عشایر تاحد زیادی مربوط به ارتباط به شیوع بیماری در دام‌ها است (۱۲).

Zakeriو همکاران درسال ۲۰۱۰ به روش Nested PCR ۷۵ نمونه از سرم گوسفندان اردبیل را به منظور جستجوی *لپتوسپیرا اینتروگانس* مورد بررسی قراردادند که ۱۷/۳۳٪ موارد مثبت بودند (۱۸) و در بررسی صورت گرفته توسط Froutani و همکاران در سال ۲۰۱٤ بعد از انجام آزمایش PCR، باکتری *لپتوسپیرا اینتروگانس* 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 می توان نسبت داد.

حملی و همکاران نیز در سال ۹۲ به روش PCR فراوانی سقط جنین را در ۷٦ 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 ۱٦ مورد (۲۱٪) و موارد سقط کمپیلوباکتریایی۳ مورد (۳/۹٪) بوده است (٤) به همین دلیل در این تحقیق پیش بینی می‌شد که

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 لپتوسپیرا 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 ۱۹۹٤ 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). باتوجه به این نتایج و تحقیق حاضر به نظر می رسد 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 معمولا بیماری در آنها تحت درمانگاهی بوده و منجر به مثبت شدن سرم بدون شکل گیری بیماری می‌شود(۱). نکته ای که در مورد PCR حائز اهمیت است این است که اگر روش های 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 سرواپیدمیولوژی لپتوسپیروز در نواحی مختلف کشور انجام گرفته، نشان می‌دهد که نه تنها فراوانی سروتیپ‌ها درمناطق مختلف کشور متفاوت است بلکه در یک منطقه خاص نیز با گذشت زمان به تدریج سروتیپ‌های شایع تغییر می‌کند (۹).

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 می گذارد. ضد عفونی آغل‌ها و آبشخورهایی که حیوانات مشکوک به بیماری از آن استفاده کرده اند 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 سریعا 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 تیتر 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 لپتوسپیرا 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 برروی نمونه‌ها آزمون PCR انجام گرفت. نتایج نشان داد ٤/۹٪ از موارد سقط مربوط به *کمپیلوباکتر فتوس* بوده وآلودگی به *لپتوسپیرا اینتروگانس* در نمونه‌های شیردان دیده نشد. با توجه به این نتایج به نظر می‌رسد در مطالعات آینده حجم نمونه وسیع‌تر و به کار گیری چند روش تشخیصی به طور هم‌زمان برای به دست آوردن میزان دقیق شیوع باکتری در منطقه ضروری باشد.

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. (۱۳۸٦): سقط جنین در گوسفند: عوامل اصلی و تشخیص آن‌ها، انتشارات قطب علمی مطالعات سقط جنین و مرگ و میر نوزاد دام‌های نشخوار کننده، چاپ اول: ٤١ و ٢٨.

۲- تاج بخش، ح.، احمدی، م. فخرزادگان، ف.، نادعلیان، م.ق. (۱۳۷۹): بررسی عفونت‌های ناشی از کمپیلوباکتر فتوس زیر گونه فتوس در گوسفندداری‌های اطراف تهران و اصفهان، مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ۵۵(۳): ۷۱-٦۹.

۳- حسنی طباطبایی، ع.، فیروزی، ر. (۱۳۸۰): بیماری‌های باکتریایی دام، چاپ اول، انتشارات دانشگاه تهران، تهران، ایران: ٤٤٧-٤٣١.

٤- حملی، ح.، جعفری جوزانی، ر.، نفوذی، ک.، اشرفی هلان، ج.، جباری نوقابی، ح. (۱۳۹۲): بررسی فراوانی سقط جنین‌های لپتوسپیرایی، کمپیلوباکتریایی و بروسلایی در گاوداری‌های شیری اطراف تبریز به روش مولکولی، مجله دامپزشکی ایران، ۹ (۲): ۵۹-۵۱.

۵- زهرایی صالحی، ت. (۱۳۷۸): همه گیری سقط جنین ناشی از کمپیلوباکترفتوس تحت گونه فتوس در یکی از گوسفندداری‌های اطراف تهران، مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ٥٤(۲): ١٤-١١.

٦- 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(٤): ۱-٦.

۷- فیروزی، ر. (۱۳۸۳): بررسی عوامل سقط جنین گوسفندان در اطراف شیراز، مجله دامپزشکی دانشگاه تهران، ٦١(١): ١٧-١٥.

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(٤): ۱۰۵-۱۰۵.

۹- مقامی، غ. (۱۳۵۹): نقش لپتوسپیروز در بچه اندازی ماده گاوهای اطراف تهران، انتشارات سازمان دامپزشکی، ۲۰: ۵۰-٦٦.

۱۰- هنرمند، ح.، اشراقی، س.، خرمی‌زاده، م.ر.، منصور قناعی، ف.، فلاح، م.ص. (۱۳۸٤): بررسی انتشار موارد مثبت لپتوسپیروز در استان گیلان به روش الایزا، مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گیلان، ٥٤: 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- Froutani, 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.