مجله دنیای میکروب ها
سال دوم، شماره دوم، ۱۳۸۸
صفحات ۱۰۴-۱۰۱

Original Article

مقایسه روش‌های کشت و مولکولی در تشخیص عوامل سقط جنین بروسلایی و سالمونلایی 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: باکتری‌های سالمونلا ابورتوس اویس و بروسلا از مهم‌ترین عوامل سقط جنین گوسفند در سراسر دنیا می باشند. روش‌های مستقیم جداسازی باکتری شناسی برای تشخیص این آلودگی‌ها قابل انجام است اما این روش‌ها مشکل، زمان بر و خطرناک می‌باشند. هدف از این پژوهش، مقایسه روش های متداول باکتری شناسی و مولکولی برای شناسایی باکتری‌های یاد شده می‌باشد.

مواد و روش ها: در این پژوهش به صورت مقطعی ـ توصیفی، ۳۸ نمونه جنین سقط شده از گله های مختلف گوسفند در استان چهار محال 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 توام 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

سالمونلا ابورتوس اویس و بروسلا بطور گسترده‌ای در سراسر جهان منتشر شده‌اند. سالیانه صنعت دامپروری جهان دچار زیان‌های اقتصادی سنگینی بواسطه مرگ و میر رویان یا سقط جنین ناشی از این باکتری‌ها می‌شود. سقط جنین از نظر اقتصادی بسیار با اهمیت و زیان‌های اقتصادی آن قابل توجه است زیرا صرف نظر از کاهش تولد بره و بزغاله باعث وارد آمدن زیان‌های اقتصادی سنگینی بر اثر کاهش تولید شیر و عوارض ثانویه آن پس از سقط جنین از جمله ناباروری و سایر زیان‌های مدیریتی به دامدار می‌شود. ناهنجاری‌های تولید مثلی از قبیل سقط جنین و یا زایمان‌های زودرس ممکن است تنها علائم درمانگاهی این بیماری‌های 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 می‌شود (۵،۴ و ۶).

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

*) آدرس برای مکاتبه: گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد.
پست الکترونیک: Adleishmania@yahoo.com

که عوامل اصلی سقط جنین اغلب بدون توجه به ناحیه جغرافیایی یکسان هستند اما، برخی از بیماری‌ها بطور مشخص به ناحیه خاصی محدود می‌شود. در مجموع میزان شیوع سقط جنین وابسته به مناطق جغرافیایی، شرایط آب و هوا، تغذیه، میزان تحرک حیوانات، جمعیت گله، وضعیت بهداشتی و برنامه‌های واکسیناسیون می‌باشد، تغییرات معنا دار هر کدام از عوامل یاد شده می‌تواند در شیوع بعدی بیماری موثر باشد (۷-۱۱). از آنجاکه علائم این عفونت‌ها در امر تشخیص تعیین کننده نیستند، بنابراین تشخیص این عفونت‌ها به آزمون‌های آزمایشگاهی وابسته است. معمولا برای تشخیص بروسلوز از روش‌های سرولوژیک و به منظور تشخیص سالمونلوز از روش‌های کشت آزمایشگاهی و برای تعیین سروتیپ سالمونلاهای جدا شده از آنتی سرم‌های منوکلونال اختصاصی استفاده می‌گردد (۵).

روش‌های کشت و واکنش زنجیره ای پلیمراز چند گانه روش‌های تشخیصی مهم دیگری هستند که بطور مستقیم قادر به تشخیص آلودگی هستند و در این تحقیق اساس کار را تشکیل می‌دهند. هدف از این پژوهش، مقایسه روش‌های متداول باکتریولوژی و مولکولی برای تشخیص باکتری‌های سالمونلا ابورتوس اویس و بروسلا می‌باشد.

مواد و روش ها

الف) نمونه گیری: درطی 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 بودکه 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 درمورد سالمونلا ابورتوس اویس نیز باکتری‌های جدا شده از موارد سقط جنین گوسفندی در استان چهار محال و بختیاری بود که توسط بخش باکتری‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران مورد تایید قطعی قرار گرفته بود.

ب) بررسی های باکتری شناسی: نمونه‌ها روی محیط مک کانکی آگار و به شکل موازی روی محیط ژلوز خوندار حاوی ۷٪ خون دفیبرینه گوسفند واجد مکمل و فاقد مکمل بروسلا تلقیح گردید. پلیت های ژلوز خوندار در گرمخانه حاوی ۱۰٪ دی اکسید کربن و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرما گذاری گردید. باکتری‌های بروسلا و سالمونلا ابورتوس اویس از روی ویژگی‌های ظاهری، کشت و آزمون‌های بیوشیمیایی شناسایی گردیدند.

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

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

ه) آغازگرها: در این پژوهش پرایمرهای اختصاصی، به وسیله نویسندگان مقاله برای جنس بروسلا (PCR/Bruce) واختصاصی 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 (*Multiplex Polymerase Chain Reaction*): آزمون mPCR با استفاده از PCR buffer 10X به میزان ۲/۵ 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، (5U/ml) Taq DNA polymerase به میزان ۰/۱۵ میکرولیتر، H_2O به میزان ۱۵ میکرولیتر و با حجم کلی ۲۵ میکرولیتر صورت گرفت. پس از افزودن اجزای PCR در حجم‌های فوق و مخلوط کردن آنها، لوله‌ها در داخل دستگاه PCR (eppendorf, 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 سانتی‌گراد، اتصال (Annealing) به مدت ۴۰ ثانیه در دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد وطویل شدن (Extension) به مدت ۴۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد صورت گرفت. مرحله طویل شدن‌نهایی (Extension) نیز به مدت سه دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد صورت گرفت.

ز) الکتروفورز: به منظور بررسی تکثیر احتمالی قطعات هدف در واکنش‌های یاد شده (۲۴۳ جفت باز در مورد جنس بروسلا و ۱۷۲

جفت باز در مورد سالمونلا ابورتوس اویس)، 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 داده‌ها با استفاده از نسخه پانزدهم نرم افزار *spss* و آزمون مربع کای مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مرز معنی داری در $p < ۰/۰۵$ قرار داده شد.

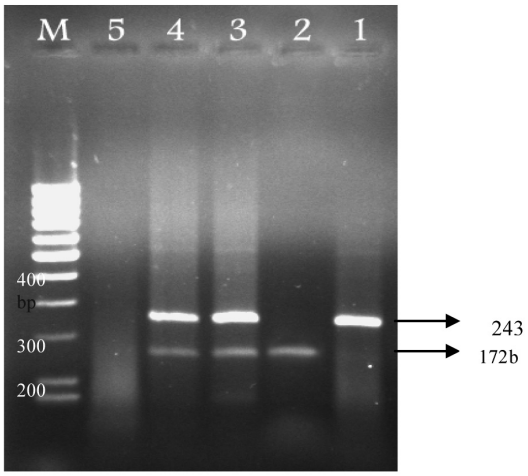
نتایج

در بررسی‌های 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 اویس آلودگی داشتند و در ۲۴ نمونه (۶۳/۲٪) نیز هیچ آلودگی تشخیص داده نشد. در روش mPCR نیز ۵ مورد (۱۳/۱٪) از نمونه‌ها آلوده به بروسلا، ۱۹ مورد (۵۰٪) آلوده به سالمونلا ابورتوس اویس، 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 اویس 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 باکتری‌های سالمونلا ابورتوس اویس و بروسلا وجود دارد.

بحث

گونه های مختلف باکتری بروسلا (ملی تنسیس، ابورتوس، اویس) و سالمونلا ابورتوس اویس 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 باکتری‌ها از راه‌های مختلفی از جمله تماس با ترشحات دام آلوده و یا بلع مواد غذایی آلوده می‌تواند وارد بدن دام شده و منجر به باکتریمی شود. سپس به دلیل حمله باکتری به جفت، سقط جنین اتفاق می‌افتد (۱۱). در حال حاضر در ایران به دلیل اهمیت سقط جنین ناشی از بروسلا، واکسن Rev1 تهیه شده در مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی به بره‌های یک تا چهار ماهه تزریق می‌شود. همچنین در مورد سالمونلا ابورتوس اویس نیز تاج بخش و نادعلیان در سال ۱۹۸۰



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

واکسن کشته سالمونلا ابورتوس اویس را به منظور ایجاد ایمنی در میش‌ها در ایران تهیه نمودند که البته مورد استفاده قرار نمی‌گیرد (۱۰ و ۱۲). نتایج کشت برای تشخیص باکتری های بروسلا و سالمونلا ابورتوس اویس تحت تاثیر عوامل مختلفی از جمله تاخیر در ارسال نمونه (منتج به گندیدگی)، درمان زود هنگام با آنتی‌بیوتیک‌ها، تعداد کم ارگانیسم‌های زنده در نمونه و نیازهای متعدد کشت می‌باشد. هم چنین گرمخانه گذاری طولانی برای جداسازی نیز ممکن است منجر به شکست جداسازی شود. مقایسه روش‌های 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 می‌شود، به نظر می‌رسد که روش mPCR بتواند جایگزین مناسبی برای شناسایی باکتری‌های یادشده باشد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج تحقیق یاد شده و در نظر گرفتن اینکه سقط جنین یک مشکل بسیار اساسی در گله‌های گوسفندی سطح کشور محسوب می‌شود به نظر می‌رسد 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 تشخیص‌های درمانگاهی استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب قدردانی خود را از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر کرد 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. vasconcellos, 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. Ggamzo, M. and Lopez-Goni, L. Specific detection of brucella DNA by pcr . 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 pcr 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.

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

Journal of Microbial World
Volume 2, No. 2, 2009

The comparison between molecular and bacteriological detection for identification of abortion agents caused by Brucella and Salmonella in sheep in Shahrekord town

Ali Sharifzadeh[*1], Abbas Doosti[2], Mohsen Gaafarian[1]

[1]Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine , Islamic Azad University, Shahrekord branch, Shahrekor, Iran
[2]Biotechnology Research Center, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran

Abstract

Background and Objective: Brucella spp and *Salmonella abortus ovis* are important causes of ovine abortion around the world. Both Bacteria can be serologically diagnosed, but many factors may cause false positive and negative results. Direct methods based on bacteriological isolation are usual, but they are difficult, time consuming and dangerous. Polymerase chain reaction (PCR) have been successfully described for the detection of *Brucella spp.* and *Salmonella abortus ovis.*

Materials and Methods: The detection of these agents in aborted ovine fetuses by multiplex PCR is described. The mPCR was applied to 38 fetal stomach contents. 5(13.1%) samples collected from ovine fetus were *Brucella spp.*

Results: 19 (50%) samples collected were *salmonella abortus ovis*. 10 (26.3%) samples collected were negative and 4 (10.6%) samples collected were *Brucella spp.* and *Salmonella abortus ovis*.in Bacteriological examination 5(13.1%) samples collected from ovine fetus were *Brucella spp*. 9(23.7%) samples collected were *salmonella abortus ovis* and 24 (63.2%) samples collected were negative.

Conclusion: Simplicity and the possibility of detection of both bactera in a single tube reaction support the use of the mPCR in the routine diagnosis.

Key words: Multiplex PCR, *Brucella spp*, *Salmonella abortus ovis*, Abortion, culture

Correspondence to: Dr. Ali Sharifzadeh
Email: adleshmania@yahoo.com
Journal of Microbial world 2009, 2(2), 101-104