# تشخیص مولکولی برخی از عوامل سقط جنین گوسفندی و تعیین فراوانی آنها در استان چهار محال و بختیاری با روش واکنش زنجیره‌ای پلی مراز دو تایی

دکتر علی شریف زاده[۱*]، دکتر عباس دوستی[۲] ، دکتر خدیجه خاکسار[۲]


## چکیده

سالمونلا ابورتوس اویس و بروسلا از جمله عوامل مهمی هستند که باعث سقط جنین گوسفندی در سراسر جهان می شوند. هر دو باکتری هر چند از لحاظ سرولوژی تشخیص داده می‌شوند ولی تعدادی از عوامل باعث نتایج مثبت یا منفی کاذب می‌گردد. روشهای مستقیم جداسازی باکتری‌شناسی نیز معمولا قابل انجام است ولی این روشها مشکل، زمان بر و خطرناک است. PCR با موفقیت برای جستجوی بروسلا و سالمونلا ابورتوس اویس بطور مجزا بکار برده شده است. در این تحقیق روشMPCR برای جستجوی عوامل جنین‌های سقط شده گوسفندی معرفی شده است. در این تحقیق آزمایش MPCR روی ۵۴ نمونه از محتویات شیردان جنینهای سقط شده گوسفندی انجام گرفت. ۱۰ نمونه به بروسلا، ۲۴ نمونه به سالمونلا ابورتوس اویس، ۶ نمونه به بروسلا و سالمونلا ابورتوس اویس به شکل توأم آلوده بودند. در ۱۴ نمونه نیز آلودگی تشخیص داده نشد. سادگی و توانایی جستجوی دو باکتری به شکل همزمان در یک لوله از جمله محاسنی است که می‌توان این روش را بجای روشهای تشخیصی مرسوم پیشنهاد نمود.


***واژگان کلیدی:*** *MPCR ،بروسلا، سالمونلا ابورتوس اویس، سقط*

## مقدمه

هر ساله صنعت دامپروری جهان دچار زیانهای اقتصادی سنگینی بواسطه مرگ و میر رویان یا سقط جنین 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 (۹، ۱۰و۱۱). هر چند عوامل مسبب سقط جنین در دو گروه عفونی و غیر عفونی طبقه‌بندی می‌شوند ولی ۹۰-۸۰٪ موارد تشخیص داده شده را عوامل عفونی تشکیل داده و کمتر به عوامل غیر عفونی توجه می‌شود (۱۲و۱۳). با وجود اینکه شیوع سقط جنین در حیوانات اهلی گسترش جهانی دارد ولی درصد مواردی که عامل سقط جنین تشخیص داده می‌شود بسیار پایین است. برای مثال در گاو در کشورهای کانادا، نیوزیلند و و استرالیا تنها ۳۶٪ تا ۲۳٪ عوامل سقط جنین تشخیص داده می‌شود (۵، ۶ و۱۴). از سوی دیگر درصد سقط جنین‌های گزارش شده بوسیله دامپروران و دامپزشکان همواره پایین تر از موارد واقعی در سطح گله دامهای اهلی است. برای مثال نشان داده شده است که برای هر سقط جنین گزارش شده بوسیله

**A Multiplex PCR for the detection of Brucella spp. and Salmonella abortus ovis from aborted ovine fetus in Charmahal va Bakhtyari province**

**Sharifzadeh, A.[1*], Doosti, A.[2], Khaksar, K.H.[2]**
*1*- Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Sharekord Branch, Sharekord, Iran*
*2- Veterinary General Office of Chaharmahal va Bakhtyari Province, Sharekord, Iran*

*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.*
The detection of these agents in aborted ovine fetuses by multiplex PCR is described. The mPCR was applied to 54 fetal stomach contents. 10 samples collected from ovine fetus were *Brucella spp.* 24 samples collected were *salmonella abortus ovis.* 14 samples collected were negative and 6 samples had mix infection by *Brucella spp*. and *Salmonella abortus ovis* .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*

۱*- گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران
۲- اداره کل دامپزشکی استان چهار محال و بختیاری، شهرکرد، ایران

مراکز دامپزشکی در ناحیه Guelph,Ontario در کانـادا ۳/۴ جنین در هر گله سقط شده است (۸). با وجود اینکه عوامل اصلی سقط جنین اغلب بدون توجـه بـه ناحیـه جغرافیـایی یکسان است ولی برخی از بیماریها بطور مـشخص محـدود به ناحیه خاصی می شوند. در مجموع نمـودار شـیوع سـقط جنین تغییراتی نسبت به ناحیه جغرافیایی، آب و هوا، تغذیه، میزان تحرک حیوانات، جمعیت گلـه، وضـعیت بهداشـتی و برنامه های واکسیناسیون نشان می دهد بطوری که تغییـرات معناداری در هـر کـدام از ایـن عوامـل مـی توانـد موجـب تغییـرات بعـدی در شـیوع دیگـری بیمـاری گـردد (۱، ۲، ۳، ۴ و۷).

به دنبال گزارش مـوارد متعـدد سـقط جنـین در گوسـفندان اسـتان چهـار محـال و بختیـاری و بررسـی هـای میکروبیولوژیـک و سـرولوژیک محـدود بـه عمـل آمـده از برخی نقاط استان کـه حـاکی از حـضور چـشمگیر برخـی عفونتها در بین گوسفندان استان بود تحقیق حاضر بـا روش مولکولی جهت مشخص کـردن شـایع تـرین عوامـل سـقط استان در فاصـله زمـانی پـاییز ۱۳۸۵ تـا بهـار ۱۳۸۶ انجـام گرفت.

## مواد و روش کار

الف) نمونه ها: در این تحقیق در مجموع تعداد ۵۴ نمونه از محتویات شیردان جنینهای سقط شده گوسفندی ارجاعی به شبکه دامپزشکی استان چهـار محـال و بختیـاری در فاصـله زمانی پاییز و زمستان ۸۵ اخذ و سپس اقدام به منجمد کردن و ارسال به آزمایشگاه مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانـشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد می‌گردید.

کنترل مثبت: کنترل مثبت مورد استفاده در مراحـل مختلـف این طرح در مورد جنس بروسلا، واکسن $S_{19}$ از نـوع سـویه زنده تخفیف حدت یافته بروسلا ابورتوس بـود و در مـورد سالمونلا ابورتوس اویس نیز باکتری‌های جدا شده از اسـتان چهار محال و بختیـاری از گـروه میکروبیولـوژی دانـشگاه تهران بود.

ب) استخراج DNA: از میان روشهای مختلف موجود استخراج DNA با استفاده از کیت ویژه با نام high yield DNA purification kit $_{DNP}$l عرضه شده توسط شرکت سیناژن صورت می گرفت. مراحل استخراج مطابق دستورالعمل ارائه شده همراه کیت مذکور انجام می‌شد.

ج) آزمایشات مولکولی: پس از بررسیهای مختلف و ارزیابی حالات گوناگون از نظر میزان و ترکیب مواد و دمای مراحل مختلف قسمتهای دو گانه آزمایشات مولکولی راه انـدازی و به شرح زیر انجام گرفت:

ج-۱) پرایمرها

در این تحقیق پرایمر های طراحی شـده اختـصاصی جـنس بروسلا (PCR/BRUCE) واختصاصی گونه ابورتوس اویس سالمونلا ($PCR/SA_O$) با توالی زیر استفاده می‌گردید:

**Bruce-5' –CTA TTA TCC GAT TGG TGG TCT G-3'**
**Bruce -5' –GGT AAA GCG TCG CCA GAA GG -3'**
**$SA_O$ -5'- GCC GAA GAT GAG TGT GTC CAG TT-3'**
**$SA_O$ -5'- CCG TGT TCT TAC CCA CCG TAT C-3'**

ج-۲) واکـنش زنجیـره ای پلـی مـراز چندگانـه (Multiple Polymerase Chain Reaction)

آزمون $_M$PCR با استفاده از *PCR buffer 10x* به میزان ۰/۷۵ میکـرو لیتـر، *50mM* M $gCL_2$ بـه میـزان ۱ میکرولیتـر، $dNtp_{(Mix)}$ به میـزان ۰/۷۵ میکـرو لیتـر، از هـر پرایمـر ۱/۵ میکـرو لیتـر، *DNA* بـه میـزان ۲ میکـرو لیتـر، *taq DNA polymerase 5u/ml* بـه میـزان ۰/۱۵ میکرولیتـر، $H_2O$ بـه میزان ۱۵ میکرولیتر و با حجم کلـی ۲۵ میکرولیتـر صـورت گرفت. پس از افزودن اجـزاء PCR در حجـم‌هـای فـوق و سانتریفوژ کردن لوله‌ها، لوله‌ها در داخل دستگاه PCR قـرار داده می‌شد. در دستگاه PCR مرحله مرحله قبل از واسرشت شدن به مـدت ۴ دقیقـه در دمـای ۹۴ درجـه سـانتی گـراد

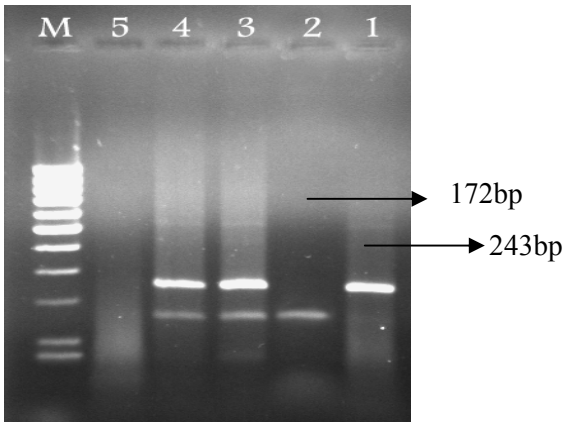
صورت می‌گرفت. در مرحله دوم که ۳۰ بار تکرار می‌شد واسرشت شدن به مدت ۱ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، Annealing به مدت ۴۰ ثانیه در دمای ۵۷ درجه سانتی گراد و Extension به مدت ۴۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد صورت می‌گرفت.مرحله Extension نهایی نیز به مدت سه دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد صورت می‌گرفت.

ج-۳) الکتروفورز(Electrophoresis)

جهت بررسی تکثیر احتمالی قطعات هدف در واکنشهای مذکور (۲۴۳ باز در مورد جنس بروسلا و ۱۷۲ باز در مورد سالمونلا ابورتوس اویس)، ۷/۵ میکرولیتر از محصولات PCR با بافر ویژه (loading buffer) مخلوط گردیده و در کنار یک مارکر مناسب (100bp)در ژل آگارز ۱/۵٪ با استفاده از TBE (Tris Borate EDTA) بعنوان حلال آگارز و نیز بافر الکتروفورز، الکتروفورز 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 ۵۴ نمونه مورد بررسی در این تحقیق، ۲۴ نمونه (۴۴/۴٪) واجد آلودگی به سالمونلا ابورتوس اویس، ۱۰نمونه (۱۸/۶٪) واجد آلودگی به جنس بروسلا، ۶ نمونه (۱۱/۱٪) واجد آلودگی توأم جنس بروسلا و سالمونلا ابورتوس اویس بودند. همچنین در ۱۴ نمونه (۲۵/۹٪) نیز هیچ آلودگی با پرایمرهای بروسلا و سالمونلا ابورتوس اویس با استفاده از آزمایش MPCR مشخص نگردید. طول قطعه مورد نظر در خصوص جنس بروسلا ۲۴۳ باز و در مورد سالمونلا ابورتوس اویس ۱۷۲ باز بود که در نگاره ۱ نمایان است.




نگاره۱- تصویر الکتروفورز محصولات MPCR :۱- جنس بروسلا ۲- سالمونلا ابورتوس اویس ۳- بروسلا و سالمونلا ابورتوس اویس ۴-کنترل مثبت ۵- کنترل منفی

## بحث

گونه‌های مختلف باکتری بروسلا (ملی تنسیس، ابورتوس، اویس) و سالمونلا ابورتوس اویس در اروپا و خاور میانه از جمله ایران یکی از عوامل سقط در دو ماه آخر آبستنی است. نظر به اهمیت سقط جنین ناشی از بروسلا در حال حاضر واکسن $Rev_1$ که در مؤسسه رازی تهیه می‌گردد در بره‌های یک تا چهار ماهه تزریق می‌شود. همچنین در خصوص سالمونلا ابورتوس اویس نیز در ایران تاج بخش و نادعلیان در سال ۱۹۸۰ واکسن کشته سالمونلا ابورتوس اویس را به منظور ایجاد ایمنی در میش‌ها تهیه نمودند که البته مورد استفاده قرار نمی گیرد. هدف از این تحقیق از یکسو تعیین میزان فراوانی عوامل اصلی سقط در گوسفندان استان چهار محال و بختیاری بود و از سوی دیگر معرفی روش MPCR جهت تشخیص سریع عوامل اصلی سقط در این ناحیه، که بر اساس نتایج قسمت اول ۴۴/۴٪ از سقط‌ها به جهت آلودگی به سالمونلا ابورتوس اویس، ۱۸/۶٪ از

سقطها به جهت آلودگی به بروسلا و ۱۱/۱٪ از سقطها به جهت آلودگی توأم با هر دو باکتری می باشد. بنظر می‌رسد که به دلیل برنامه‌های پیشگیری که بخصوص در مورد بروسلا هر ساله صورت می‌گیرد، به تدریج سقطهای بروسلایی در حال محدود شدن بوده و سقطهای با سایر عوامل از جمله سالمونلا ابورتوس اویس خود را نشان می‌دهد. همچنین از آنجا که در حال حاضر علیرغم زمان طولانی و خطرناک بودن، از روش کشت برای تشخیص عوامل سقط استفاده می‌شود، به نظر می‌رسد با توجه به حالت حساسیت بالای روش MPCR، این روش به عنوان جایگزینی مناسب بخصوص در موارد تشخیص مرسوم درمانگاهی باشد. با عنایت به نتایج تحقیق فوق و با نظر به اینکه سقط یک مشکل بسیار اساسی در گله‌های گوسفندی سطح کشور محسوب می‌شود به نظر می‌رسد که در خصوص سالمونلا ابورتوس اویس بخصوص با توجه به فراوانی آن حداقل در استان چهار محال و بختیاری واکسیناسیون امری لازم و ضروری می‌باشد. از طرف دیگر سادگی، سرعت و توانایی جستجو کردن دو یا چند عامل به شکل موازی و و همزمان از جمله محاسنی است که می‌توان روش MPCR را به عنوان روش جایگزین کشت بخصوص در مورد روشهای مرسوم تشخیص درمانگاهی معرفی کرد.

## فهرست منابع


۱- حسنی طباطبایی. ع و فیروزی. ر (۱۳۸۰). بیماری‌های باکتریایی دام، انتشارات دانشگاه تهران، صفحات ۲۵۲ و ۳۲۰.

2. Beuzon, C.R., Schiaffino, A., Leori, G., Cappu Ccinell, P., Rubino, S. And Casadesus, J. (1997): Identification of Salmonella abortus ovis by PCR amplification of a serovar–specific IS200 element. Appl . Env. Microbiol. 63(5): 2082-2085.
3. Fekete, A.J. and Halling, S.M. (1990): Preliminary development of a diagnostic test for Brucella using polymerase chain reaction. J. Appl . Bacteriol. 69: 216 – 227.
4. Herman, L. and Ridder, H. (1992): Identification of Brucella spp. by using the polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol. 58: 2099 – 2101.
5. kirkbride, C.A. (1990): Laboratory diagnosis of livestock abortion. Iowa state University press. Ames. IA. Pp: 260.
6. LeyLa, G., kadri, G. And Umran, O. (2003): Comparison of polymerase chain reaction and bacteriological culture for the diagnosis of sheep brucellosis using aborted fetus samples. vet .Microbiol. 93: 53-61.
7. Masala, G., Porcu, R., Daga, C.D., Scanu, G., Patta, C. and Tola, S. (2007): Detection of pathogens in ovine and caprine abortion sample from Sardinia, Italy by PCR. J.Vet .Di. Invest. 19(1): 96-98.
8. Murray, R.D. (1990): A field investigation of causes of abortion in cattle. Vet. Rec. 127: 543-547.
9. Nielsen, K.J. and Duncan, J.R. (1990): Animal Brucellosis. CRC press. Boca Raton FL. Pp: 453.
10. Ocholi, R.A., kwaya, J.k.P., Ajogi, I. and Bale, J.O.O. (2005): Abortion due to Brucella abortions in sheep in Nigeria. Rev .Sci.Tech.Off.Int .Epiz. 24(3): 973-979.
11. 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. (2002): Multiplex PCR for the detection of Brucella spp. and Leptospira spp. DNA from aborted ovine fetuses. Vet. Microbiol. 87(2):139-147.
12. Romero, C., Ggamzo, M. and Lopez–Goni, L. (1995): Specific detection of Brucella DNA by PCR. J. Clin. Microbiol. 33: 615 – 617.
13. Salehi, M., Pishva, E., Salehi, R. and Rahmani, M. (2006) :Isolation of Brucella abortus using PCR-RFLP analysis. Iranian. J. Pub. Hlth. 35(4): 22-27.
14. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis,T. (1989): Molecular cloning:a laboratory manual. 2nd edition. Cold spring harbor laboratory press. New York. Pp: 2100.