مجله بیوتکنولوژی کشاورزی

علمی-پژوهشی و ISC

تشخیص تعدادی از عوامل باکتریایی سقط جنین در گوسفند افشاری با استفاده از Real Time PCR و تعیین حساسیت آغازگر مربوط به *کمپیلوباکتر*

معصومه صالح[1]، محمد طاهر هرکی نژاد*[2]، وحید سلمانی[3]

[1] دانش آموخته دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان

[2] استادیار دانشکده کشاورزی و پژوهشکده فناوری های نوین زیستی و دانشگاه زنجان

[3] پژوهشکده فناوری های نوین زیستی دانشگاه زنجان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۲/۱۷، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۸/۲۲

چکیده

ارایه روشی مناسب برای تشخیص سریع و دقیق باکتری‌های مولد بیماری سقط جنین از اولویت‌های کنترل و درمان به موقع این بیماری است. هدف از این تحقیق بهینه کردن یک روش مبتنی بر Real Time PCR به صورت همزمان برای چهار باکتری مهم مولد سقط جنین (*کمپیلوباکتر، بروسلا، یرسینیا و سالمونلا*) بود. تعداد ۲۱۷ نمونه سواب واژینال (۱۳۲ نمونه از دام‌های سقط کرده و ۸۵ نمونه از دام‌هایی که بره‌های سالم به دنیا آوردند) از گوسفندهای استان زنجان گرفته شده و برای سه باکتری *سالمونلا، یرسینیا* و *بروسلا* نیز نمونه‌های خالص آن‌ها از مرکز جمع‌آوری قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران PTCC خریداری شد. پس از استخراج DNA، آغازگر های اختصاصی *بروسلا، سالمونلا و یرسینیا* بر روی نمونه DNA باکتری-های خریداری شده مورد بررسی قرار گرفتند و پس از مشخص شدن *کمپیلوباکتر* به عنوان عامل سقط جنین در تعدادی از نمونه‌های استان زنجان (٦٨ نمونه مثبت از ۱۳۲ دام سقط کرده و ۲۹ نمونه از ۸۵ دام سالم)، دقت آغازگر *کمپیلوباکتر* در رقت‌های مختلف با استفاده از Real Time PCR نیز سنجیده شد. نتایج این بررسی نشان داد که همه باکتری‌ها در شرایط یکسان با آغازگرهای اختصاصی خود به صورت همزمان با Real Time PCR قابل تکثیر بوده و آغازگر *کمپیلوباکتر* نیز در تمام رقت‌های ایجاد شده حتی تا یک کپی از ژنوم هم قادر به تشخیص و تکثیر باکتری بوده است.

کلمات کلیدی: *Real Time PCR، کمپیلوباکتر، سقط جنین، گوسفند افشاری.*

*نویسنده مسئول: محمد طاهر هرکی نژاد تلفن: ۰۲٤۳۳۰٥٤۲٤٦ Email:Taher.harkinezhad@znu.ac.ir

مقدمه

یکی از مسایل عمده در صنعت دامپروری که دامپزشکان و دامداران در رابطه با بیماری‌های گوسفند و بز با آن مواجه‌اند، سقط جنین می‌باشد. سقط جنین که از عوامل مهم واصلی زیان‌های اقتصادی در گله‌های گوسفند و بز به حساب می-آید، توسط چندین عامل عفونی و غیرعفونی ایجاد می‌گردد (Striaton, 1998). باکتری‌ها مهمترین علت سقط جنین‌های عفونی در دام‌های اهلی هستند (Sadeghi *et al.,* 2008; Agerholm *et al.,* 2006). تشخیص بسیاری از این باکتری‌ها اغلب مبتنی بر جدا سازی باکتری با استفاده از کشت نمونه از افراد مشکوک به بیماری و یا تعیین تیتر آنتی بادی ویژه مربوط به بیماری بوده است که هر یک مشکلات و محدودیت‌هایی دارند. امروزه استفاده از روش‌های مبتنی بر اسیدهای نوکلئیک در تشخیص بیماری‌ها جایگاه ویژه‌ای پیدا کرده است. انجام آزمایش‌ها با استفاده از PCR به دلیل آنکه مبتنی برتشخیص DNA باکتری است و با توجه به اینکه مستقیما قادر به تشخیص باکتری عامل بیماری است، برای تصمیم‌گیری در مورد راه حل مناسب، برای مواجهه با بیماری ارجحیت ویژه‌ای دارد (Hajia *et al.,* 2007; Ghosian Moghadam *et al.,* 2008; Maleknejad *et al.,* 2007; Mohammadabadi *et al*., 2004; Mohammadabadi *et al.,* 2011). در یک بررسی بر روی تشخیص کمپیلوباکتر در ۱۰۵ جنین سقط شده گاو در ترکیه از چهار روش ایمنوهیستوشیمیایی، پاتولوژی، میکروبیولوژی و Real- Time PCR روش Real- Time PCR بهترین و دقیقترین روش با بیشترین تعداد نمونه مثبت شناخته شد (Tuzcu *et al.,* 2010). در این مطالعه هدف، بهینه کردن Real Time PCR برای تشخیص همزمان چهار باکتری *کمپیلوباکتر*[1]، *بروسلا*[2]، *یرسینیا*[3] و *سالمونلا*[4] بود که پس از تشخیص کمپیلوباکتر به عنوان عامل سقط جنین در استان زنجان تست حساسیت این باکتری نیز در تعدادی از نمونه‌های مثبت مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری

تعداد ۲۱۷ نمونه سواب واژینال (۱۳۲ نمونه از دام‌های سقط کرده و ۸۵ نمونه هم از دام‌هایی که بره‌های سالم به دنیا آوردند) از گوسفندهای استان زنجان گرفته شده و برای سه باکتری (سالمونلا، یرسینیا و بروسلا) نیز نمونه‌های خالص آن‌ها از مرکز جمع‌آوری قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران PTCC[5] خریداری شد.

[1] *Campylobacter*
[2] *Brucella*
[3] *Yersinia*
[4] *Salmonella*
[5].Persian Type Culture Collection

استخراج DNA

استخراج DNA از سواب‌های واژینال میش-های زنجان و همچنین باکتری‌های بروسلا، سالمونلا و یرسینیا با استفاده از خالص سازی فنل-کلروفرم انجام گرفت. به طور خلاصه نمونه‌های سواب موجود در میکروتیوب‌های ۲ میلی لیتری ذوب شده و یک میلی لیتر از بافر STD (Tween20 ٪ ۰/۰۵ ,$MgCl_2.6H_20$ ۰/۰۰۲۵M M ۰/۰۱M Tris-HCl [pH 8.3], ۰/۰۵KCl,) به آن‌ها اضافه گردید. نمونه‌ها به مدت یک دقیقه در ×g ۱٦۰۰۰ سانتریفیوژ شده و رسوب حاصل در ۲۰۰ میکرولیتر از بافر TE (Tris- EDTA) حاوی ۱۰ درصد SDS (Sodium Dodecyl Solfate) حل شد. نمونه‌ها به مدت یک ساعت در ٥٦ درجه سانتی‌گراد انکوبه شده و نهایتا DNA نمونه‌ها با خالص سازی فنل کلروفرم استخراج شدند.

طراحی آغازگر

برای طراحی اختصاصی آغازگرها، توالی های گرفته شده برای باکتری های مختلف از سایت NCBI (*www.**ncbi**.nlm.nih.gov*)توسط نرم افزار ClC Main Workbench مقایسه[1] گشته و آغازگرهای پیشرو و پیرو از قسمت‌های متغیر[2] توالی‌ها طراحی شدند. این آغازگرها پس از طراحی توسط نرم افزارهای Fast PCR (برای بررسی دایمر)، Mfold (برای بررسی تاخوردگی[3] آغازگر) و Blast (برای تست اینکه آیا آغازگر، توالی‌های مشابه یا DNA موجود دیگر را تکثیر می کند یا خیر ؟) مورد بررسی قرار گرفتند. آغازگرها در جدول زیر آورده شده‌اند.

PCR معمولی و الکتروفورز نمونه‌ها

واکنش PCR با حجم نهایی ۲٥ میکرولیتر حاوی ٥۰ میلی مولار KCl، ۲۰ میلی مولار Tris-HCl (pH=۸/۳)، دو میلی‌مولار MgCl2، ۰/۱ درصد Tween20، ۲۰۰ میکرومولار از هر dNTP ، ۱/۲٥ میکرومولار از هر آغازگر و ۰/۸ واحد Taq Enzyme انجام گرفت. پس از واسرشته‌سازی اولیه به مدت پنج دقیقه و در دمای ۹٥°C، ۳۰ سیکل به صورت ۹٥°C (برای واسرشته سازی به مدت یک دقیقه) ، ٥۲°C تا٥٥°C (برای اتصال پرایمر به مدت یک دقیقه) و ۷۲°C (برای بسط و تکثیر به مدت یک دقیقه) انجام شده و در نهایت یک بسط نهایی در دمای ۷۲°C به مدت پنج دقیقه انجام گردید. سپس نمونه‌ها برای اطمینان از تکثیر باند مربوطه بر روی ژل آگارز ۱/۳ درصد الکتروفورز شدند.

Real Time PCR

برای انجام واکنش های Real Time PCR از دستگاه Rotor- Gene (مدل ۳۰۰۰ ساخت کمپانی Corbett Research) استفاده شد. برای

[1]. alignment
[2]. variable
[3]. Folding or hairpain

تکثیر هر یک جفت آغازگر، یک مخلوط اصلی (همه مواد واکنش به استثنای DNA) تهیه گردید. حجم نهایی هر واکنش ۲۵ میکرولیتر تنظیم گردید.

لیست اجزای به کار رفته در واکنش به همراه غلظت نهایی آن‌ها در جدول ۲-٤ آمده است.

جدول ۱- خصوصیات آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش.

Table 1- The characteristics of used primers in this study.

Primers آغازگرها	Gene ژن	طول تکثیر Amplicon Length	Bactery باکتری	Reference منبع
F: ACGGTAACAGGAAGMAG R: TATTAACCACAACACCT	16s rRNA	bp 402	*Salmonella enterica*	Trkov and Avgusˇtin ,2003
F: GACGCCATCCAGGAACAG R: GTATACGATCTGGTCCTGC	ompA	200 bp	*Brucella ovis*	**این پژوهش** This study
F: TTTGTTAGGGAAGAACCATG R: CGCAATGGGTATTCCTGGT	16s rRNA	265 bp	*Campylobacter fetus*	**این پژوهش** This study
F: CTCTTCTACTTATGATATCGG R: ACATTACAGCCAGGTATACGT	ompA	166 bp	*Yersinia tuberculosis*	**این پژوهش** This study

جدول ۲- مواد مورد استفاده جهت واکنش Real Time PCR.

Table 2- Used materials for the Real Time PCR.

Matters name نام ماده	Used Amount مقدار استفاده شده
SYBR Grean PCR Master Mix	12.5µl
Forward Primer آغازگر پیشرو	1µl
Reverse Primer آغازگر پیرو	1µl
DNA Sample DNA نمونه	3µl
RNase free water RNase آب استریل بدون	7.5µl
total جمع	25µl

جدول۳– برنامه زمانی و دمایی مورد استفاده در واکنش Real Time PCR.

Table3- Temperature and Time Program in Real Time PCR.

مرحله Stage		زمان Time	دما Temperature	چرخه Cycle
1	تیمار اولیه Hold 1	2 min	50°C	۱دور 1 Cycle
2	فعال‌سازی اولیه Hold 2	5 min	95°C	۱ دور 1 Cycle
3	واسرشت‌سازی Denaturation	20 sec	95°C	٤٠ دور 40 Cycle
4	اتصال آغازگر Annealing	20 sec	52°C	
5	تکثیر قطعه مورد نظر Extension	20 sec	60°C	

بررسی حساسیت آغازگر مربوط به باکتری کمپیلوباکتر با استفاده از Real time PCR

به جز PCR معمولی، آغازگرهای تشخیص دهنده باکتری کمپیلوباکتر با استفاده ازReal PCR time و به منظور بررسی حساسیت آغازگر مربوطه نیز مورد بررسی قرار گرفتند. به این صورت که یکی از محصولات PCR تکثیر شده برای این باکتری، نانودراپ شده و با توجه به غلظت به دست آمده و طول قطعه، تعداد باکتری در هر میکرولیتر (copy number) بافر محاسبه گردید سپس از این مخلوط PCR با تعداد باکتری‌های مشخص رقت‌های مختلف از ^{10} ۱۰ تا یک نسخه از باکتری تهیه گردید پس از انجام Real time PCR در تعدادی از این رقت ها مشخص گردید که آغازگرهای مورد نظر قدرت تشخیص این باکتری را در هر رقت از باکتری دارند و همه رقت های باکتری مورد نظر منحنی تکثیر را با توجه به غلظت‌شان نشان دادند. در نهایت منحنی استاندارد برای مقایسه رقت‌های مختلف و همچنین به دست آوردن غلظت نمونه‌های دیگر در C_t های مشخص رسم گردید.

تهیه منحنی استاندارد به منظور برآورد کارایی واکنش

ابتدا نمونه‌ای از DNA باکتری (استخراج شده از نمونه‌های سقطی میش‌های افشاری) مورد نظر توسط PCR تکثیر شده و سپس یک سری از رقت‌های شناخته شده DNA مورد نظر(محصولات PCR) برای تهیه منحنی استاندارد و تخمین مقدار آغازین DNA مورد نظر برای ارزیابی کارایی واکنش به‌کار رفت. لگاریتم غلظت شناخته شده از هر سری رقت محور xها بر غلظت ارزش واحد C_tبرای آن غلظت رسم شد.

کاربرد منحنی استاندارد حاصل از واکنش Real time PCR

جهت به دست آوردن غلظت نمونه‌های مجهول بر حسب مقادیر C_t، از ژن 16s rRNA کمپیلو باکتر پس از تعیین تعداد کپی ها و تهیه رقت های مختلف و منحنی استاندارد به دست آمده با ضریب تبیین ۰/۸۵ به بالا استفاده گردید.

محاسبه تعداد نسخه‌های توالی باکتری

برای به دست آوردن تعداد نسخه های باکتری در یک میکرو لیتر، غلظت محصول مورد نظر به همراه طول قطعه تکثیر شده با استفاده از لینک calculator for determining the number of copies of tempelet (*cels.uri.edu/gsc/cndna.html*) محاسبه شده و رقت‌های مختلف ایجاد گردید.

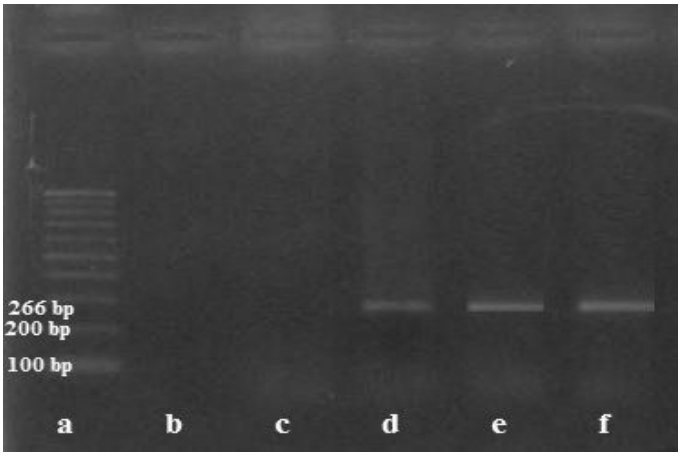
نتایج و بحث

نتایج PCR معمولی

پس از انجام PCR برای نمونه‌های DNA موردنظر در استان زنجان ٦٨ مورد از ۱۳۲ نمونه گرفته شده از میش‌های سقط‌کرده و با بره ناقص (۵۱/۹ درصد) و همچنین ۲۰ مورد از ۸۵ نمونه دام‌هایی که بره‌های سالم بدنیا آورده بودند دارای نتایج PCR مثبت برای کمپیلوباکتر بودند (۲۳/۵۲ درصد) (شکل ۱) که یکی از این نمونه‌های مثبت برای تست حساسیت استفاده گردید. در بررسی این نمونه‌ها با آغازگرهای سالمونلا، بروسلا و یرسینیا هیچ مورد مثبتی یافت نشد و هر یک از DNA باکتری‌های خریداری شده به خوبی با آغازگر اختصاصی خود تکثیر یافتند (شکل ۲).

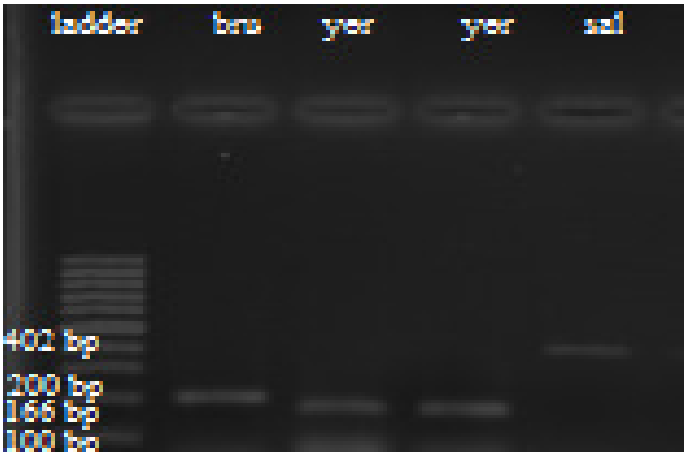
نتایج توالی‌یابی برای قطعه تکثیر شده با پرایمرهای مربوط به کمپیلوباکتر

قطعه تکثیر شده توسط جفت پرایمر اختصاصی برای جنس کمپیلوباکتر یک قطعه bp ٢٦٦ برای ژن ١٦srRNAبود (شکل ۱). که پس از تکثیر، از روی ژل آگارز استخراج و خالص سازی شده و با استفاده از سیستم ABI 3730XL DNA Bioneer Analyzer کره جنوبی توالی‌یابی شد (شکل ۳). عمل تطابق (Blast) برای توالی خوانده شده با توالی‌های موجود در پایگاه داده‌های بیولوژیکی NCBI انجام شد که این توالی۱۰۰ درصد مشابهت را با توالی ژن ١٦s rRNA گونه‌های مختلف کمپیلوباکتر نشان داد. سپس توالی خوانده شده با ژن ١٦ s rRNA که طراحی پرایمر از روی آن انجام شد مورد مقایسه (Alignment) با برنامه VECTOR NTI قرار گرفت (شکل ٤). به طور کلی نتایج توالی‌یابی، یافته‌های مارا برای وجود کمپیلوباکتر تایید نمود.



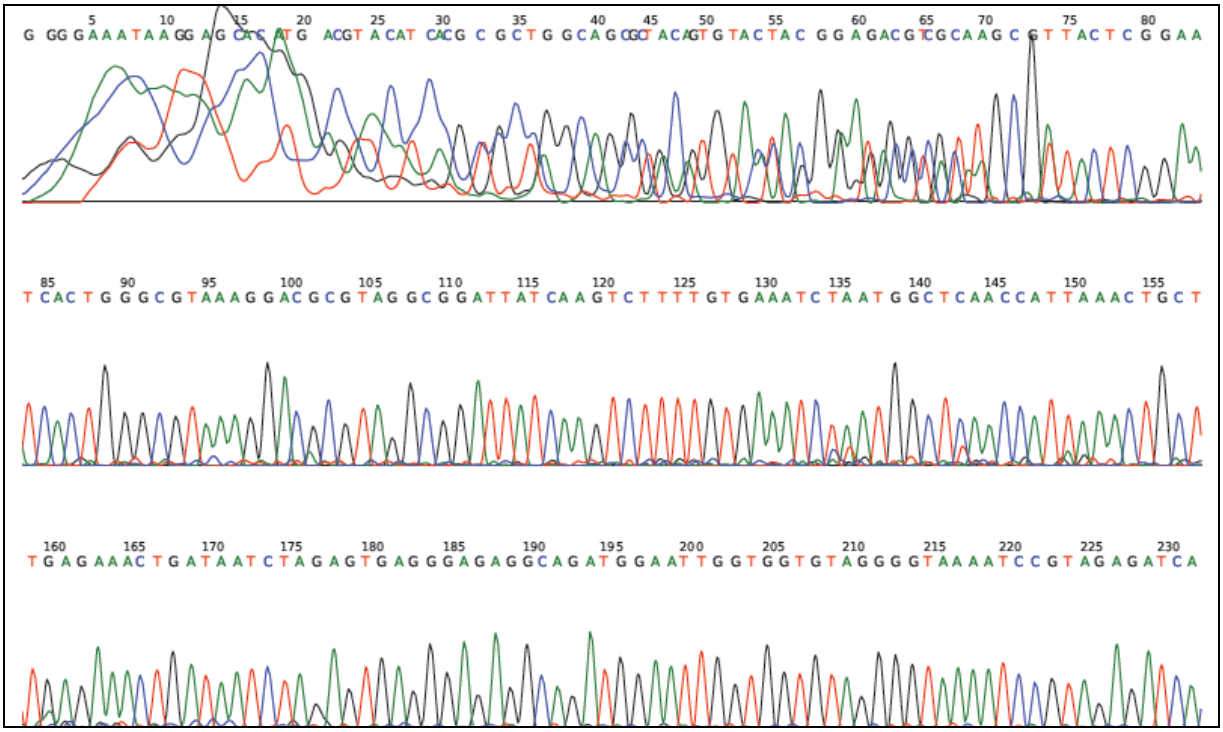
شکل ۱- تکثیر اختصاصی DNA هدف با استفاده از PCR و آغازگرهای اختصاصی جنس *کمپیلوباکتر* و چاهک‌ها به ترتیب، a: DNA Ladder 100 bp، b: کنترل منفی، c: نمونه دام سالم، d، e و f نمونه‌های سقطی که باند مربوط به کمپیلوباکتر را نشان داده‌اند (در نمونه کنترل منفی به جای DNA، از آب مقطر استریل استفاده شد).

Figure 1- Specific amplification of target DNA by PCR and specific primers for *Campylobacter and lans respectively: a:* DNA Ladder 100 bp. b: negative control. c: healthy samples. d, e and f: aborted samples that were positive for campylobacter (in negative control was used of sterile distilled water instead DNA).



شکل ۲- باندهای مربوط به تکثیر کنترل مثبت باکتری‌ها. bru: باکتری *بروسلا*، yer: باکتری *یرسینیا* و sal: *سالمونلا*.

Figure 2- bands related to amplification of bacteria positive controls. bru: *Brucella*, yer: *Yersinia* and sal: *Salmonella.*



GGGGAAATAAGGAGCACATGACGTACATCACGCGCTGGCAGCGCTACAGTGTACTA
CGGAGACGTCGCAAGCGTTACTCGGAATCACTGGGCGTAAAGGACGCGTAGGCGGA
TTATCAAGTCTTTTGTGAAATCTAATGGCTCAACCATTAAACTGCTTGAGAAACTGAT
AATCTAGAGTGAGGGAGAGGCAGATGGAATTGGTGGTGTAGGGGTAAAATCCGTAG
AGATCACCAGGAATACCCATTGCGA

شکل ۳- نتایج توالی‌یابی برای محصول PCR پرایمرهای اختصاصی *کمپیلوباکتر* با خوانش از سر Forward

Figure 3- The results of sequencing for PCR product of specific primers for *Campylobacter* with the reading of the forward.

```
                1                                                  50
  Cam 2    (1) TTTTGTTAGGGAAGAACCATGACGGTACCTAACGAATAAGCACCGGCTAA
CAM-NCBI   (1) TTTTCTTAGGGAAGAAATTTGACGGTACCTAAGGAATAAGCACCGGCTAA
Consensus  (1) TTTT TTAGGGAAGAA  TGACGGTACCTAA GAATAAGCACCGGCTAA
               51                                                 100
  Cam 2   (51) CTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTACTCGGAA
CAM-NCBI  (51) CTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTACTCGGAA
Consensus  (51) CTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTACTCGGAA
              101                                                150
  Cam 2  (101) TCACTGGGCGTAAAGGACGCGTAGGCGGATTATCAAGTCTTTTGTGAAAT
CAM-NCBI (101) TCACTGGGCGTAAAGGACGCGTAGGCGGATTATCAAGTCTTTTGTGAAAT
Consensus  (101) TCACTGGGCGTAAAGGACGCGTAGGCGGATTATCAAGTCTTTTGTGAAAT
              151                                                200
  Cam 2  (151) CTAATGGCTCAACCATTAAACTGCTTGAGAAACTGATAATCTAGAGTGAG
CAM-NCBI (151) CTAATGGCTCAACCATTAAACTGCTTGAGAAACTGATAATCTAGAGTGAG
Consensus  (151) CTAATGGCTCAACCATTAAACTGCTTGAGAAACTGATAATCTAGAGTGAG
              201                                                250
  Cam 2  (201) GGAGAGGCAGATGGAATTGGTGGTGTAGGGGTAAAATCCGTAGAGATCAC
CAM-NCBI                                                         (201)
GGAGAGGCAGATGGAATTGGTGGTGTAGGGGTAAAATCCGTAGAGATCAC
Consensus  (201) GGAGAGGCAGATGGAATTGGTGGTGTAGGGGTAAAATCCGTAGAGATCAC
              251                                                300
  Cam 2  (251) CAGGAATACCCATTGCGA
CAM-NCBI  (251) CAGGAATACCCATTGCGA
Consensus  (251) CAGGAATACCCATTGCGA
```

شکل ٤- مقایسه (alignment) توالی موجود برای ژن ١٦s rRNA در سایت NCBI و توالی تکثیر شده برای *کمپیلوباکتر* در این پژوهش

Figure 4- alignment for available sequence of 16s rRNA gene in NCBI and *Campylobacters* amplified sequence in this study.

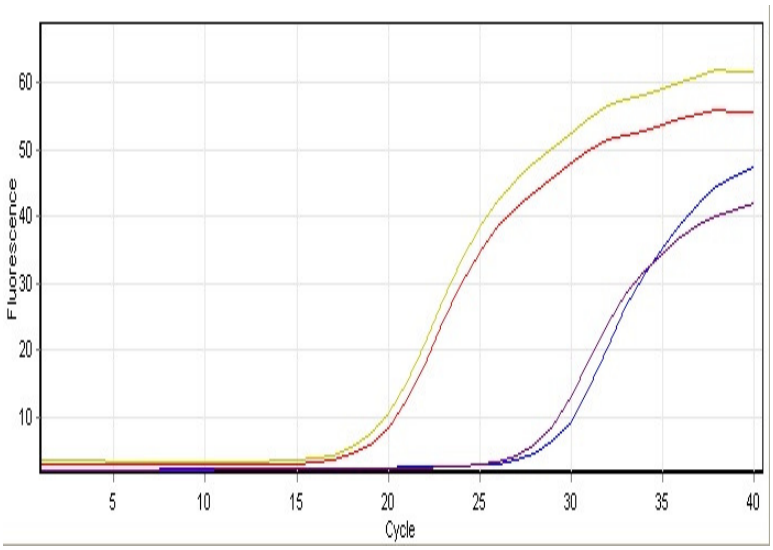
بررسی همزمان آغازگرها با استفاده از Real time PCR

همه آغازگرها در شرایط مساوی و در دمای اتصال ٥٢ °C به طور همزمان می‌توانند تکثیر را انجام دهند برای بررسی درستی این مطلب و همچنین بررسی و بهینه سازی تکثیر باکتری‌ها به روش Real time PCR این روش برای این چهار تا آغازگر که دارای نمونه مثبت بودند انجام گردید و نتایج به صورت زیر به دست آمد (شکل ٥ و ٦).

از جمله محاسن روش Real Time بر دیگر روش ها به سرعت و حساسیت بالا، عدم نیاز به دستگاه بررسی ژل[1] (زیر اشعه UV) و در نتیجه به حداقل رساندن میزان آلودگی و توانایی در اندازه‌گیری میزان کپی‌های ژن اشاره نمود. در این مطالعه با طراحی آغازگرهای اختصاصی هر باکتری در شرایط یکسان با بقیه امکان تکثیر همزمان باکتری‌ها

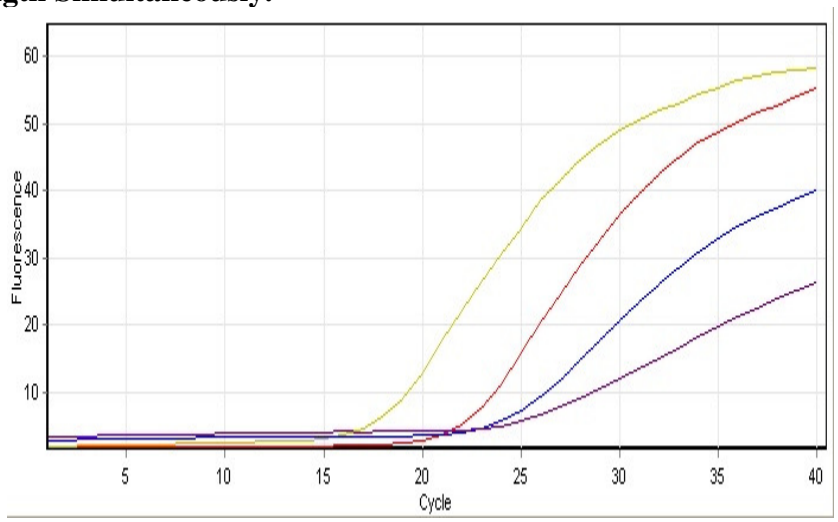
[1] Gel Document

فراهم شد. در مطالعه‌ای برای تشخیص عامل اسهال گاوی از Real- Time PCR برای تشخیص همزمان باکتری‌های کمپیلوباکتر ژژونی، شیگلا، یرسینیا و سالمونلا استفاده گردید (Wiemer et al., 2011).



شکل ٥- Real time PCR نمونه های مثبت دو باکتری *بروسلا* با طول قطعه bp ۲۰۰ و *یرسینیا* به طول bp ١٦٦ به طور همزمان.

Figure 5- Real time PCR of positive samples of *Brucella* with 200 bp length and *Yersinia* with 166 bp length Simultaneously.



شکل ٦- Real time PCR نمونه های مثبت دو باکتری سالمونلا (دو نمونه اول) به طول bp ٤٠٢ وکمپیلوباکتر (دو نمونه بعدی) با طول قطعه bp ٢٦٦ به طور همزمان.

Figure 6- Real time PCR of positive samples of *Salmonella* (two first samples) with 402 bp length and *Campylobacter* (two other samples) with 266 bp length Simultaneously.

تست حساسیت کمپیلوباکتر

در مورد باکتری کمپیلوباکتر یکی از نمونه-های مثبت پس از PCR و تعیین غلظت به روش گفته در رقت‌های مختلف تهیه گردید و هفت تا از این رقت‌ها در Real Time PCR مجددا مورد آزمون قرار گرفتند. تمامی این رقت‌ها با دقت بالا تکثیر شده و آغازگر اختصاصی کمپیلوباکتر توانست تا یک کپی از ژنوم را هم تکثیر کند. در یک بررسی Levett et al (2005) نیز برای تشخیص سویه‌های مختلف لپتوسپیرا و اختصاصی بودن آغازگرها از این روش استفاده کرده و توانستند کارایی آغازگرهای طراحی شده خود را در تمایز سویه‌های بیماری زا و غیر بیماری زای لپتوسپیرا نشان دهند. Fowden et al (2010) نیز در یک بررسی بر روی تشخیص گونه‌های کمپیلوباکتر در یک سیستم امنیت غذایی،حساسیت آغازگرهای این باکتری را به وسیله Real Time PCR تا ١٠ کپی از ژنوم در هر واکنش نشان دادند در این تحقیق اختصاصی بودن آغازگرها ١٠٠ درصد گزارش شده است.

بررسی اختصاصی بودن آغازگرها

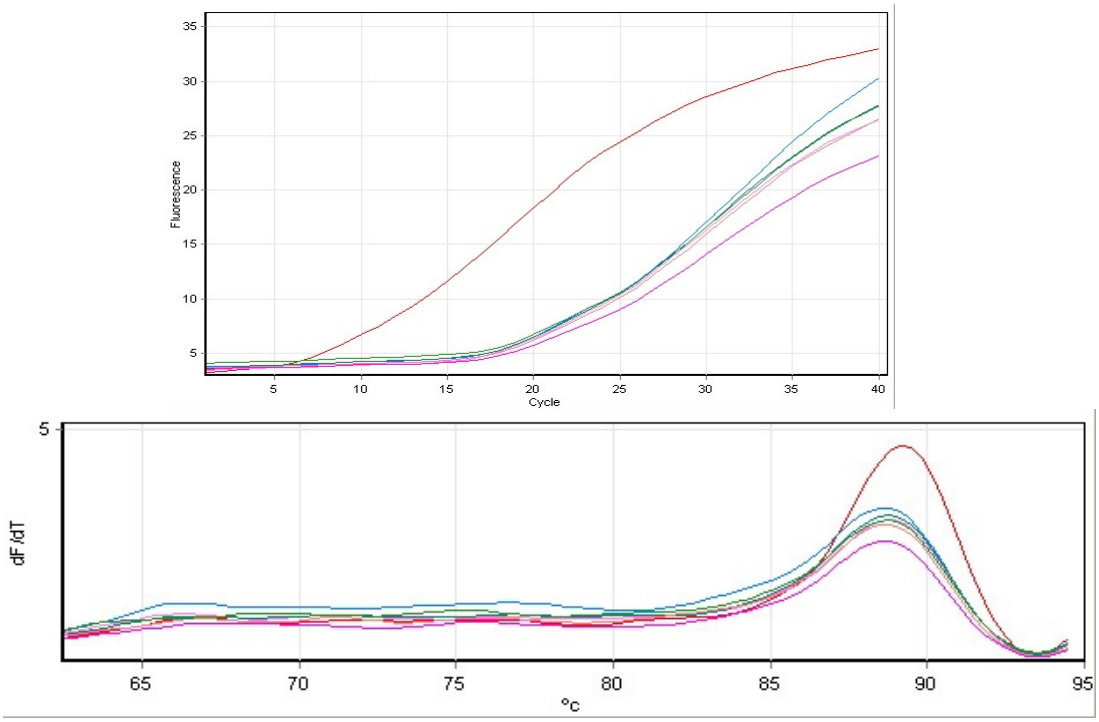
در همه نمونه‌ها هر آغازگر فقط DNA باکتری مربوط به خود را در صورت وجود باکتری در نمونه به طور اختصاصی تکثیر نموده و هیچیک از باکتری‌ها به هیچ وجه توسط آغازگرهای دیگر تکثیر نیافتند.

نتیجه‌گیری کلی

در این تحقیق نیز Real Time PCR روشی دقیق و حساس برای تشخیص باکتری‌های مربوط به سقط جنین بود. آغازگرهای طراحی شده در این بررسی دقت و کارایی لازم را برای تکثیر همزمان داشته و آغازگر مربوط به کمپیلوباکتر نیز توانایی تشخیص این باکتری را حتی در حضور یک کپی از ژنوم در هر میکرولیتر داشته است.

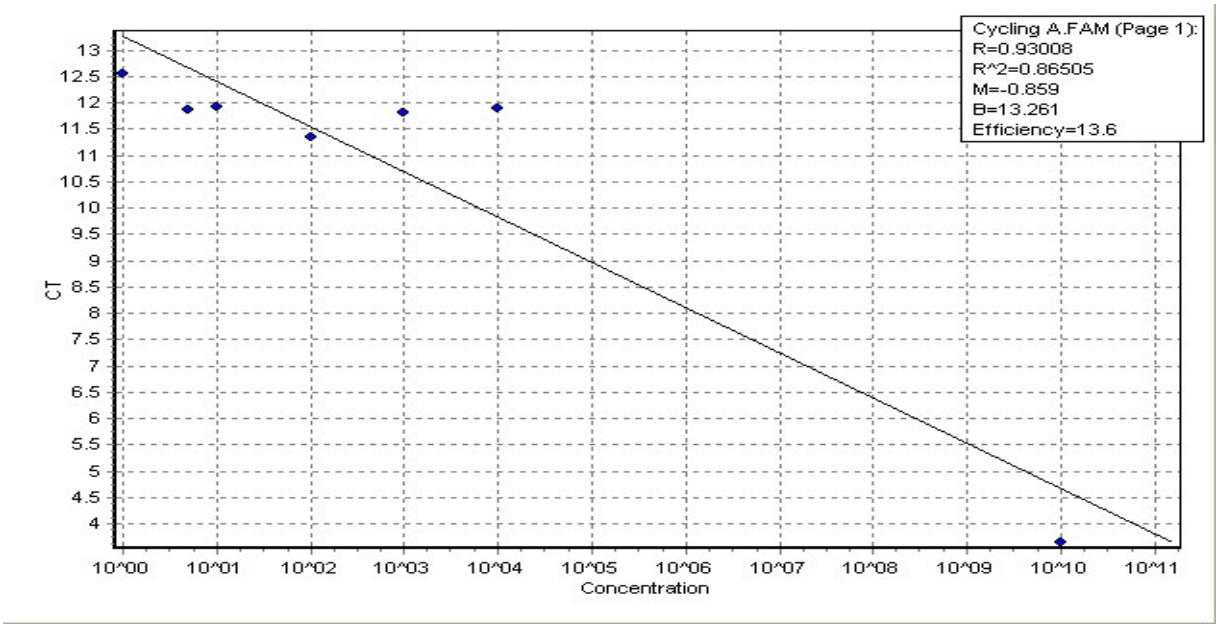
تقدیر و تشکر

بدین وسیله از سازمان جهاد کشاورزی استان زنجان: آقای مهندس رستمخانی برای همکاریهای بی دریغشان در تمام زمینه‌ها و همچنین آقایان مهندس موسوی و عیسی بیگلو بخاطر هماهنگی و همکاری در نمونه برداری کمال تشکر را دارد. همچنین از نظرات و پیشنهادات سازنده داوران محترم مقاله صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.



شکل ۷- نتایج تکثیر و ذوب رقت های مختلف برای *کمپیلوباکتر*.در منحنی ذوب (پایینی) مشتق فلئورسانس (محور yها) در مقابل دما (محور xها) نشان داده می‌شود.

Figure 7- Results for amplification and melt of different dilutions of *Campylobacter*. In melt curve the derivative of fluorescence (Y axis) vs. temperature (X axis) is shown.



شکل ۸- رسم منحنی استاندارد در غلظت‌های مختلف نمونه‌های *کمپیلوباکتر*.

Figure 8- The standard curve for different concentrations of *Campylobacter* samples.

منابع

Agerholm JS, Aalbæk B, Fog-Larsen AM, Boye M, Holm E, Jensen TK, Lindhardt T, Buxton D, Larsen LE (2006). Veterinary and medical aspects of abortion in Danish sheep. APMIS 114: 146-52.

Firouzi R (2005). Study of Bacterial causes of abortion in sheep around Shiraz. Veterinary Research 61: 15-17 (in Persian).

Fowden S, Winterberg K, Powell J, Elijah LW, Thatcher S, Andrews K (2010). Development of a Multiplex Real-time PCR Assay for the Detection of *Campylobacter* Species for use on a Food Security System Platform. Presented at International Association for Food Protection.

Ghosian Moghadam MH, Kayvani Amine H, Zahra'i Salehi T, Khazrayi Nia P, Fallah N (2008). Comparison of culture and polymerase chain reaction (PCR) with Wright test in the diagnosis of brucellosis. Medical Technology 74: 51 (in Persian).

Hajia M, Zargar A, Farzaneh khah M, Soudbakhsh A, Saraf nezhad AF (2007). Evaluation of PCR techniques in clinical samples obtained from patients with suspected brucellosis. Diagnosis 49: 11-15.

Levett PN, Morey RE, Galloway RL, Turner DE, Steigerwalt AG, Mayer LW (2005). Detection of pathogenic leptospires by real-time quantitative PCR. Medical Microbiology 54: 45–49.

Maleknejad P, Peeri-DoGaheh H, AmirZargar A, Jafari S, Fatollahzadeh B (2007). Diagnosis of brucellosis by use of BACTEC blood culture and confirmation by PCR. Veterinary Research 62: 83-86.

Mohammadabadi MR, Soflaei M, Mostafavi H, Honarmand M (2011). Using Polymerase Chain Reaction for Early Diagnosis of Bovine Leukemia Virus Infection in Some Native Cattle. Genetics and molecular research 10: 2658-63.

Mohammadabadi MR, Shaikhaev GO, Sulimova GE, Obydur R, Mozafari MR. (2004). Detection of Bovine Leukemia Virus proviral DNA in Yaroslavl, Mongolian and Black Pied cattle by PCR. Cellular & Molecular Biology Letters 9: 766-768.

Sadeghi M, Ghaem maghami Sh, Bakhshesh M, Moradi S, Ganji A, Ahmadi M (2008). Prevalence of bacterial abortion in sheep and goats in Markazi Province. Veterinary Medicine Islamic Azad University 4: 1-8.

Striaton A (1998). Diseases of sheep. First edition Translated by Rasekhi S, Saberi shakib J. Press Center Publications Nourbakhsh Tehran (in Persian).

Tuzcu M, Oruc E, Tuzcu N, Yoldas A, Yigin A (2010). Diagnosis of Campylobacteriosis in the aborted bovine foetuses by Pathological, Immunohistochemical, Microbiological and Real Time PCR. Kafkas University Faculty of Veterinary Medicine 16 (3): 509-514.

Wiemer D, Loderstaedt U, Wulffen HV, Priesnitz S, Fischer M, Tannich E, Hagen RM (2011). Real-time multiplex PCR for simultaneous detection of *Campylobacter jejuni*, *Salmonella*, *Shigella* and *Yersinia* species in fecal samples. Medical Microbiology 301: 577– 584.

Detection of some bacterial causes of abortion in Afshari sheep using Real Time PCR detection and sensitivity assessment of *Campylobacter* primers

Saleh M.[1], Harkinezhad M.T.*[2], Salmani V.[3]

[1] MSc Student –graduated from University of Znajan
[2] Assistant Professor of faculty of Agriculture and Research Institute of Modern Biological Techniques-University of Zanjan
[3] Research Institute of Modern Biological Techniques-University of Zanjan

Abstract

The present a method for fast and accurate detection of abortion bacterial agents is the most priority of control and treatment for this disease. The aim of this study was the optimization of Real Time PCR for simultaneous detection of four of the most important bacteria causing abortion (*Campylobacter, Brucella, Yersinia* and *Salmonella*). 217 vaginal swab samples (132 samples from aborted and 85 samples from non-aborted ewes) were collected from some rural regions of Zanjan province. Pure samples of *Brucella, Yersinia* and *Salmonella* were also purchased from Persian Type Culture Collection (PTCC). After DNA extraction, specific primers of *Brucella*, *Salmonella* and *Yersinia* were examined on each purchased bacteria DNA sample. With 68 positive samples from 132 aborted ewes and 29 positive samples from 85 healthy ewes, *Campylobacter* was distinguished as a main factor of abortion in rural areas of Zanjan. The precision of *Campylobacters* primer was also assessed using Real Time PCR in different dilutions. The results showed that all bacteria in the same condition concurrently were amplified with Real Time PCR using specific primers and *Campylobacters* primer is able to identify and amplifying of bacteria in all dilutions even when just one copy is available.

Keywords: *Real Time PCR, Campylobacter, abortion, Afshari sheep.*

* Corresponding Author: Harkinezhad .T. Tel: 024 33054246 Email: Taher.harkinezhad@znu.ac.ir