

# ارزیابی روش تشخیص سالمونلا آبورتوس اویس بر اساس کپی IS200 ویژه سروار

دکتر غلامرضا نیکبخت بروجنی<sup>۱\*</sup> دکتر حسن تاج بخش<sup>۱</sup> دکتر اشکان جبلی<sup>۲</sup>

دریافت مقاله: ۲ تیرماه ۱۳۸۳

پذیرش نهایی: ۴ آذرماه ۱۳۸۳

## Evaluation of Salmonella abortusovis detection by primers related to serovar specific IS200

Nikbakht Brujeni, GH.,<sup>1</sup> Tadjbakhsh, H.,<sup>1</sup> Jebelli, A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran. <sup>2</sup>Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.

**Objective:** Evaluation of primers designed due to the serovar specific IS200 copy for detecting Salmonella abortusovis strains isolated in Iran.

**Design:** Observational study.

**Samples:** Ninety seven Salmonella abortusovis strains.

**Procedure:** PCR amplification was carried out by serovar specific primers and different strains according to PCR results were studied by IS200 fingerprinting analysis.

**Results:** All strains could be classified in 2 distinct genotypes by 2 kb and 900 bp amplicons in PCR amplification. These two genotypes were related to two different profiles with 11 and 9 kb band respectively in IS200 fingerprinting.

**Conclusion:** PCR amplification by serovar specific primers was capable of grouping the strains in 2 major genotypic patterns. *J.Fac.Vet.Med. Univ. Tehran. 60,3:283-286,2005.*

**Keywords:** salmonella, Abortusovis, PCR, IS200

**Corresponding author's email:** [nikbakht@ut.ac.ir](mailto:nikbakht@ut.ac.ir)

هدف: ارزیابی پرایمرهای طراحی شده ویژه سروار در تشخیص سویه‌های سالمونلا آبورتوس اویس جدا شده در ایران.

طرح: مطالعه مشاهده‌ای.

نمونه‌ها: تعداد ۹۷ سویه سالمونلا آبورتوس اویس.

روش: آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای مربوط به کپی IS200 اختصاصی سروار بر روی تمامی سویه‌ها صورت گرفت و پروفایل‌های متفاوت از لحاظ نتایج PCR با استفاده از روش انگشت نگاری IS200 مورد بررسی بیشتر قرار گرفتند.

نتایج: سویه‌های مورد آزمایش را می‌توان با توجه به نتایج PCR به دو گروه با افزوده‌های ۲ کیلو باز و ۹۰۰ جفت باز تقسیم نمود. تمامی سویه‌های واجد افزوده‌های ۲ کیلو باز در PCR، دارای باند ۱۱ کیلو باز در انگشت نگاری IS200 بودند و تمامی سویه‌های واجد افزوده‌های ۹۰۰ جفت باز در PCR، واجد باند ۹ کیلو باز در نتایج انگشت نگاری IS200 بودند.

نتیجه‌گیری: با استفاده از پرایمرهای ویژه سروار می‌توان سویه‌های سالمونلا آبورتوس اویس جدا شده در ایران را به دو ژنوتیپ عمده تفکیک نمود. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ۱۳۸۴، دوره ۶۰، شماره ۳، ۲۸۶-۲۸۳.

واژه‌های کلیدی: سالمونلا، آبورتوس اویس، PCR، IS200.

سالمونلا آبورتوس اویس به گوسفند عادت یافته و عامل عمده سقط جنین گوسفند در اروپا و غرب آسیا است. (۲، ۳، ۴، ۹، ۱۵، ۱۶) علامت مشخص عفونت ایجاد سقط و مرگ و میر بره‌های نوزاد است. سقط در گله هر زمانی در طی دو ماه آخر آبستنی ممکن است رخ دهد و جنین شاید زنده بدنیا بیاید یا روزها قبل از دفع در رحم بمیرد. جفت ماندگی نیز ممکن است رخ دهد اما معمولاً با جنین دفع می‌شود (۸). مرگ و میر همیشه عموماً کم است. در شرایط تجربی همه میش‌های سقط کرده بهبودی بی‌مخاطره‌ای داشته و طی ۲۴ ساعت شروع به غذا خوردن کرده‌اند. مرگ میش‌ها به نظر می‌رسد که بیشتر به دلیل عفونت‌های ثانویه رحم باشد (۸).

بدلیل آنکه عوامل باکتریایی و ویروسی متنوعی باعث بروز سقط در گوسفندان می‌شوند، تشخیص سقط ناشی از سالمونلا آبورتوس اویس اساساً با یافته‌های آزمایشگاهی امکانپذیر است. آزمون‌های تشخیص سرمی گوسفندان ممکن است در سطح گله رهنمون باشند ولی تشخیص قطعی با جدا سازی مستقیم جرم میسر می‌شود (۸، ۱۰). معمولاً تشخیص باکتری با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و سروتیپینگ صورت می‌گیرد. سیستم‌های

(۱) گروه میکروب شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

(۲) دانش آموزانه دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

\* نویسنده مسؤول: [nikbakht@ut.ac.ir](mailto:nikbakht@ut.ac.ir)



تشخیص بیوشیمیایی ID E 32 و API 20 E قادر به تفکیک آبورتوس از تیفی نمی‌باشند و سروتایپینگ در نهایت برای تفریق باکتری از سایر سروتیپ‌های سالمونلا مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱، ۵، ۱۱). در صورتی که پرایمرهای مناسبی در اختیار باشد از روش PCR نیز می‌توان برای تشخیص سالمونلا آبورتوس اویس استفاده کرد.

IS200 یکی از عناصر جایگزینی است که در سالمونلا آبورتوس اویس به خوبی حراست شده است. در تایپینگ سویه‌های مختلف باکتری، Schiaffino و همکاران در سال ۱۹۹۶ دریافتند که ژنوم تمامی سویه‌های آبورتوس اویس مورد مطالعه در هضم آنزیمی PstII بانندی حدود ۹ کیلو باز ایجاد کرده که در هیبریدیزاسیون با پروب IS200 مشخص می‌شود (۱۳). با این احتمال که این باند برای سروار اختصاصی است Beuzon و همکاران در سال ۱۹۹۷ باند IS200 ویژه سروار در سیستم کلونینگ تهیه و سپس ردیف نوکلئوتیدی آن را مشخص کردند. این محققین همچنین پرایمرهایی را بر اساس ردیف‌های مشخص شده طراحی کرده‌اند تا در روش افزوده سازی PCR جهت تشخیص باکتری به کار رود (۷).



ایزوآمیل الکل مخلوط و سانتریفوژ می‌شد. پس از بار سوم انتقال مایع روبه یک لوله تمیز جهت رسوب DNA از ایزوپروپانول استفاده شده و رسوب DNA پس از اضافه کردن یک میلی لیتر اتانل ۷۰ درصد و سانتریفوژ ۱۲/۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه خشک و در میکرولیتر بافر TE حل می‌گشت. در خاتمه یک میکرولیتر RNase (۰/۱mg/ml) (Fermentas co.) اضافه شده و یک شب در ۴ درجه سانتیگراد قرار می‌گرفت.

**آزمون PCR:** افزوده سازی PCR برای تشخیص سالمونلا آبورتوس اویس بر اساس روش Beuzon و همکاران در سال ۱۹۹۷ صورت گرفت (۷). در این روش از پرایمرهای زیر استفاده شد:

Forward: 5' CGATGAAAGCGTAAATAAGG 3'

Reverse: 5' TTC TCT TGT CAG TCT CAAAC 3'

در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر غلظت مواد استفاده شده به ازای هر واکنش بدین قرار است: ۱/۵MgCl<sub>2</sub> میلی مول، ۲۰۰dNTPs میکرومول، از هر پرایمر ۱ میکرومول، پلیمرز یک واحد و ۱ میکرولیتر از DNA استخراج شده از باکتری‌ها. چرخه‌های حرارتی شامل ۳ مرحله بودند. مرحله یکم با ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه، مرحله دوم که طی ۳۰ چرخه صورت گرفت و هر چرخه شامل سه گام می‌شد: ۹۴ درجه بمدت ۳۰ ثانیه (گام اول)، ۵۲ درجه بمدت ۳۰ ثانیه (گام دوم) و ۷۲ درجه بمدت ۶۰ ثانیه (گام سوم) و مرحله سوم ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه.

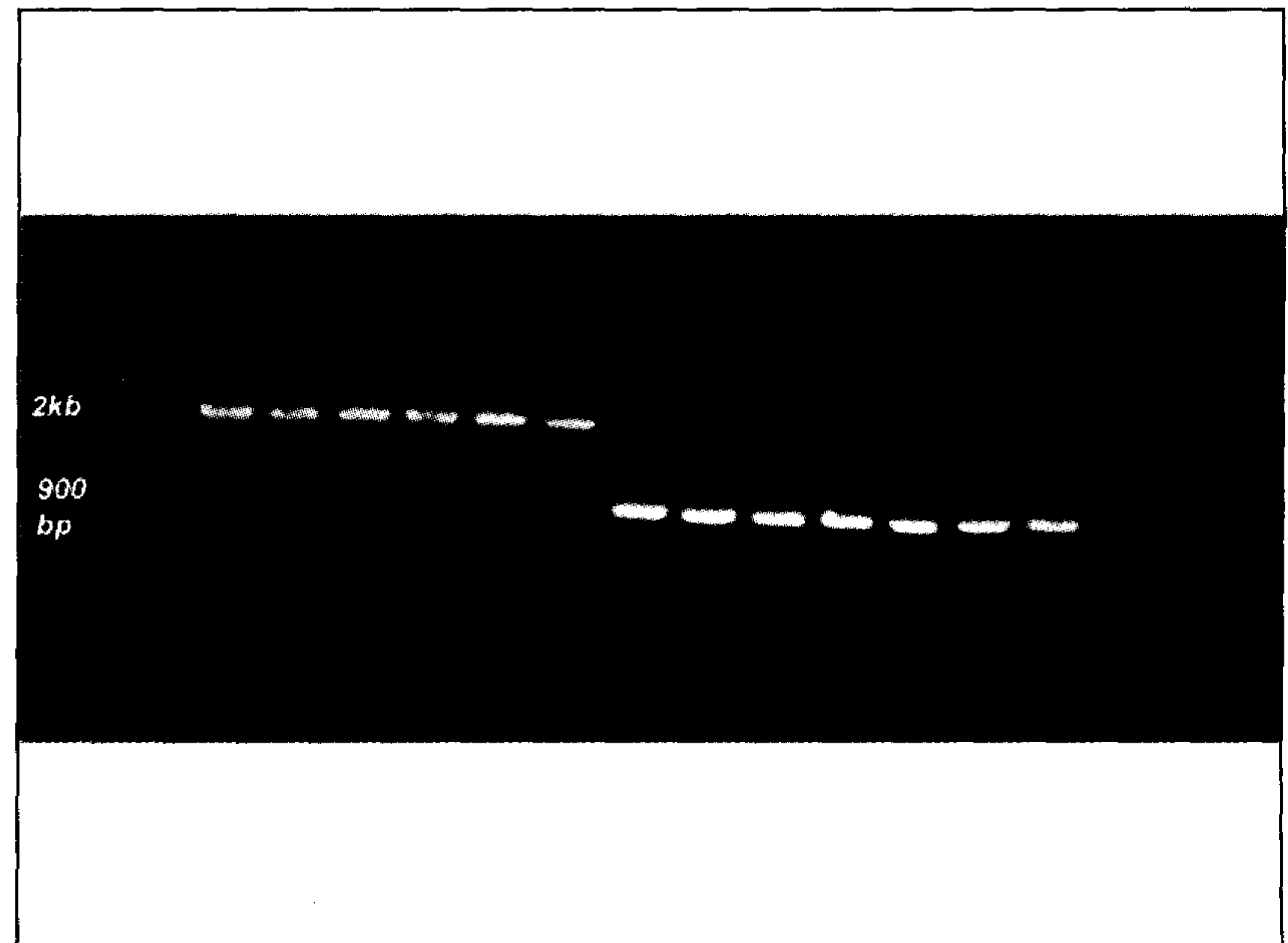
**هضم آنزیمی:** جهت هضم آنزیمی DNA از آنزیم‌های Pst I، Eco R1 و Hind III استفاده گردید. پس از اضافه نمودن یک واحد آنزیم برای ۱۰۰۰ نانوگرم DNA، مخلوط به مدت ۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد قرار می‌گرفت. برای جداسازی باندهای DNA هضم شده از الکتروفورز (BIO-RAD) بر روی ژل آگارز با غلظت ۰/۸ درصد در بافر تریس استات EDTA استفاده شد. شرایط آزمایش باروش Sambrook و همکاران در سال ۱۹۸۹ تطبیق یافته بود (۱۲).

**تهیه پروپ IS200:** پلاسمید PIZ46 که حامل دی مر IS200 بود. باروش لیز قلیایی جدا شده و باروش استاندارد خالص سازی شد. قطعه ۰/۶ کیلوباز که با اثر آنزیم EcoRI بر روی پلاسمید PIZ46 پدید می‌آمد. از ژل آگارز جدا و سیستم Gen clean خالص سازی شد. پروب‌های به دست آمده با استفاده از روش کمولومینسانس نشاندار شدند.

**آمیخته گری با پروپ IS200:** ابتدا قطعات مجزای DNA هضم شده بر روی ژل آگارز دناتوره شده و سپس به پرده‌های غشایی نایلون انتقال می‌یافتند. تمامی اعمال پیش از آمیخته گری و پس از آن بر اساس روش شرح داده شده توسط ساترن انجام گرفتند (۱۴).

## نتایج

نتایج آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی سرور در جدول ۱ نشان داده شده است. همان گونه که مشاهده می‌شود سویه‌های مورد آزمایش را می‌توان به دو گروه با افزوده‌های ۲ کیلوباز و ۹۰۰ جفت باز تقسیم نمود. سرو تیپ تیفی موریوم افزوده‌ای کمتر از ۲۰۰ جفت باز داشته است. در کل تنها ۱۶ سویه از مجموع کل باکتری‌های مورد مطالعه باندهای ۲ کیلوباز را تولید کردند.



تصویر ۱- نتایج PCR بر روی سویه‌های سالمونلا آبورتوس اویس با استفاده از پرایمرهای اختصاصی سرور

(A) سویه‌های آبورتوس اویس مربوط با پروفایل فاقد باند ۹ کیلو بازر آزمون ساترن بلات (B) سویه‌های آبورتوس اویس مربوط با پروفایل واجد باند ۹ کیلو بازر آزمون ساترن بلات (C) سالمونلا تیفی موریوم

ما در این تحقیق به ارزیابی پرایمرهای مذکور در تشخیص سویه‌های سالمونلا آبورتوس اویس جدا شده در ایران پرداختیم.

## مواد و روش کار

در مجموع تعداد ۹۷ سویه سالمونلا آبورتوس اویس در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفتند. سویه‌های مذکور در ۶ استان مختلف ایران جدا شده بودند: ۲۱ سویه در استان تهران؛ ۷ سویه در استان اصفهان؛ ۳۴ سویه در استان چهارمحال و بختیاری؛ ۲۳ سویه در خراسان؛ ۱۰ سویه فارس و یک سویه در استان گیلان. تمامی سویه‌ها به غیر از استان فارس و چهارمحال و بختیاری بین سالهای ۱۳۴۳ تا ۱۳۴۹ جدا شده بودند. سویه‌های استان فارس بین سالهای ۱۳۸۰ تا ۱۳۸۱ و سویه‌های استان چهارمحال و بختیاری بین سالهای ۱۳۷۷ و ۱۳۷۸ جدا شده بودند. یکی از سویه‌ها در سال ۱۳۴۹ از انگلستان دریافت شده بود. تمامی سویه‌ها بر اساس خواص بیوشیمیایی و سرو تایپینگ، سرور آبورتوس اویس شناخته شدند. سرو تیپ تیفی موریوم جهت مقایسه با سرو تیپ آبورتوس اویس مورد استفاده قرار گرفت.

**استخراج DNA:** استخراج توسط فنل بر اساس روش Ausuble و همکاران در سال ۱۹۸۷ صورت گرفت (۶). ۱/۵ میلی لیتر از کشت ۱۸ ساعته باکتری در محیط LB در ۱۲/۰۰۰ دور به مدت دو دقیقه سانتریفوژ گردید. رسوب باکتری در ۵۶۷ میکرومتر بافر TE حل گشته و پس از اضافه نمودن ۳۰ میکرولیتر SDS (۱۰ درصد) و ۳ میکرولیتر پروتئیناز K (۲۰mg/ml) به مدت یک ساعت در گرم خانه ۳۷ درجه سانتیگراد قرار می‌گرفت. سپس ۱۰۰ میکرولیتر M5 NaCl و ۸۰ میکرولیتر CTAB/NaCl اضافه شده و مخلوط در ۶۵ درجه برای ده دقیقه قرار داده می‌شد. در این مرحله فنل - کلروفرم - ایزوآمیل الکل به میزان هم حجم به آن اضافه شده، مخلوط گشته و در ۱۲/۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ می‌شد (Spectrafuge, Labnet co.). مایع رو دوبار دیگر با فنل کلروفرم





IS200 را در وضعیت مشابه با آبورتوس اویس ندارند قطعات ۲۰۰ جفت، باز را تولید خواهند کرد (۷).

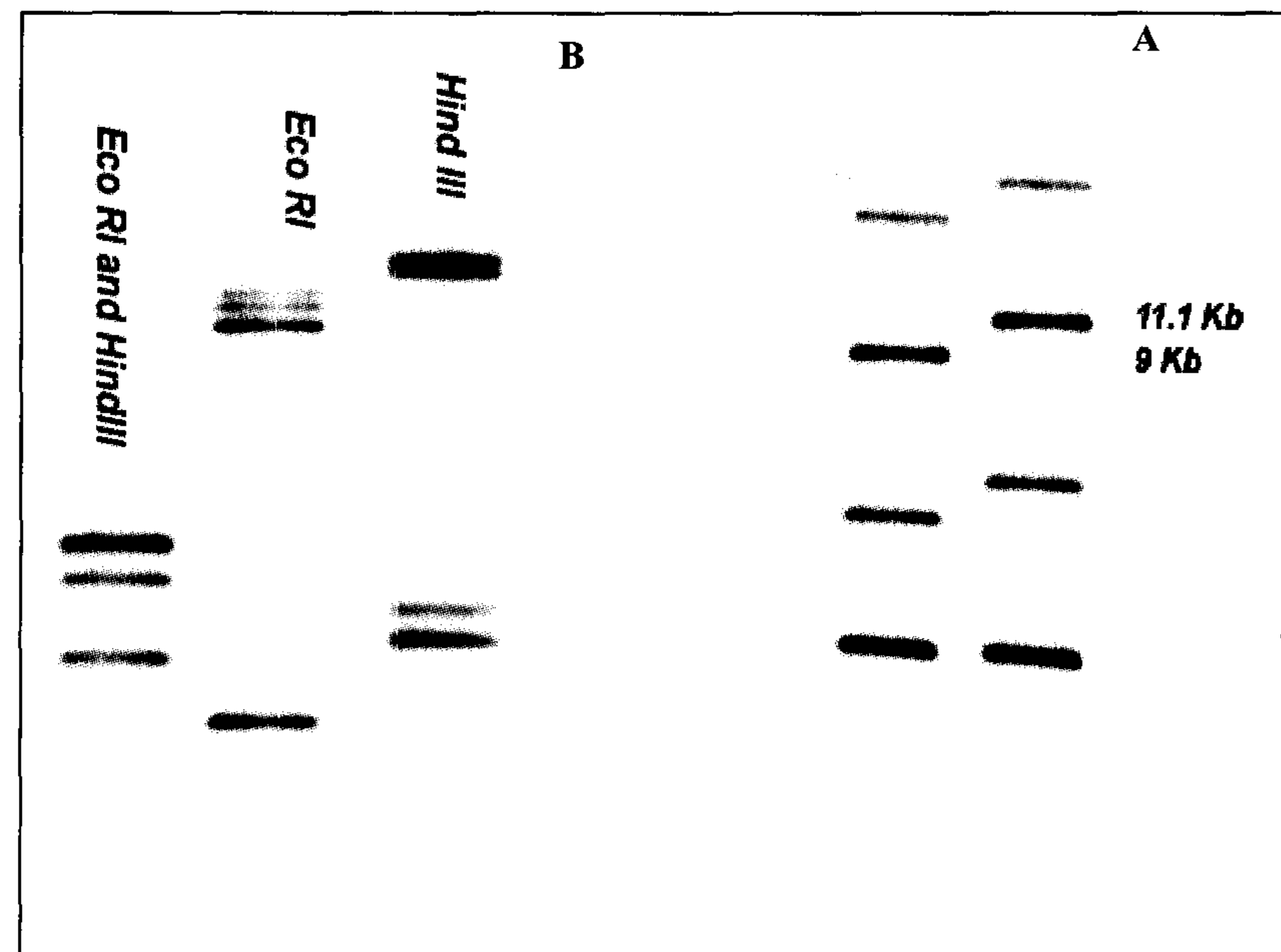
مادر بررسی خود بر روی سوبه‌های سالمونلا آبورتوس اویس جدا شده در ایران به دو ژنوتیپ متفاوت برخوردیم که در افزوده سازی PCR با استفاده از پرایمرهای مذکور باندهای ۹۰۰ جفت باز و ۲ کیلوباز را تولید کردند. البته تولید باندهای ۲ کیلوباز در استفاده از این پرایمرها در مورد سوبه فرانسوی نیز گزارش شده بود (۷). ولی جالب توجه آن بود که تمامی سوبه‌هایی که قطعات ۲ کیلوباز را در PCR نشان داده بودند در انگشت نگاری IS200 به جای باندهای ۹ کیلوباز، باندهای حدود ۱۱ کیلوباز را دارا بودند. (تصویر ۲ بخش A) تغییر محل باندها در ژنوم ممکن است به دلیل موتاسیون جایگزینی یا حذفی و یا موتاسیون در محل برش آنزیم باشد. به همین منظور با سایر آنزیم‌ها نیز برش آنزیمی صورت گرفت ولی در هضم آنزیمی با EcoRI، HindIII و هضم مضاعف با هر دو آنزیم تفاوتی بین سوبه‌های متفاوت از لحاظ پاسخ PCR مشاهده نشد. (تصویر ۲ بخش B) از یافته اخیر چنین بر می آید که موتاسیون در محل برش آنزیم بوده است ولی باندهای ۲ کیلوباز در PCR مؤید موتاسیون جایگزینی یا حذفی است.

به هر حال چنین می‌توان نتیجه گرفت که محل برش آنزیم‌های Hind III و EcoRI بعد از محل موتاسیون (Downstream) و محل برش آنزیم Pst I قبل محل موتاسیون (Upstream) قرار گرفته‌اند.

در مجموع این تحقیق نشان می‌دهد که با استفاده از پرایمرهای ویژه سرووار می‌توان سوبه‌های سالمونلا آبورتوس اویس جدا شده در ایران را به دو ژنوتیپ عمده تفکیک نمود. از سوی دیگر می‌توان اظهار داشت که هنوز بهترین آنزیم برای تایپینگ سوبه‌های سالمونلا آبورتوس اویس در روش انگشت نگاری IS200 آنزیم Pst I است، چرا که به خوبی تفاوت‌های ژنومی را در بین سوبه‌های مختلف باکتری مشخص می‌نماید.

## References

۱. تاج بخش، ح، نیکبخت بروجنی، غ. (۱۳۸۳): بررسی خواص بیوشیمیایی و الگوهای انتقال مقاومت آنتی بیوتیکی جهت بیوتایپینگ، سوبه‌های سالمونلا آبورتوس اویس جدا شده از استان چهارمحال بختیاری، مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، در دست چاپ
۲. تاج بخش، ح. (۱۳۵۵): وضعیت سالمونلوزهای دامی ایران، هشتمین کنگره دامپزشکی ایران، تهران.
۳. تاج بخش، ح، محزونیه، م. (۱۳۷۸): آنتی ژن‌های سالمونلا آبورتوس اویس و ره یابی سرم شناسی برای تشخیص موارد آلودگی با کمک آنتی ژن‌های اختصاصی، مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، شماره ۲، دوره ۵۴، صفحه: ۴۸ - ۴۳.
۴. تاج بخش، ح، نظری آریا، ع. ا. (۱۳۵۸): جغرافیای بیماری‌های واگیر مناطق بیابانی ایران، نامه دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، شماره ۳ و ۴ دوره ۲۵، صفحه: ۴۵ تا ۶۸.
۵. زهرایی صالحی، ت. (۱۳۷۸): سالمونلا، انتشارات دانشگاه تهران، شماره ۲۴۲۹
6. Ausubel, M., Brent, R., Kingston, E., Moore, D., Smith, J.K. and Struhl, J. (1987): Current protocols in



تصویر ۲- نتایج آزمون انگشت نگاری ساترن بر علیه IS200 با آنزیم Pst I (A) و آنزیم‌های EcoRI، HindIII و هضم مضاعف با هر دو آنزیم (B)

بر روی سوبه‌های واجد افزوده‌های ۲ کیلوباز و ۹۰۰ جفت باز هضم آنزیمی با آنزیم‌های Pst I، EcoRI و HindIII و همچنین هضم آنزیمی همزمان HindIII و EcoRI نیز صورت گرفت که نتایج آزمون انگشت نگاری IS200 آنها در تصویر ۲ مشخص شده است.

تمامی سوبه‌های واجد افزوده‌های ۲ کیلوباز در PCR، فاقد باندهای ۹ کیلوباز در انگشت نگاری IS200 بودند و تمامی سوبه‌های واجد افزوده‌های ۹۰۰ جفت باز در PCR، واجد باندهای ۹ کیلوباز در نتایج انگشت نگاری IS200 بودند.

تنها اثر هضم آنزیمی Pst I قادر به تفکیک سوبه‌های فوق بوده و سایر آنزیم‌ها پرو فایل‌های مشابهی را در آزمون انگشت نگاری IS200 نشان دادند. به عبارت دیگر هضم آنزیمی EcoRI و HindIII به طور جداگانه و همچنین هضم آنزیمی همزمان EcoRI و HindIII قادر به تفکیک سوبه‌های واجد افزوده‌های ۲ کیلوباز و ۹۰۰ جفت باز نبودند.

## بحث

در تایپینگ سوبه‌های مختلف باکتری با استفاده از پروب اختصاصی IS200، اسکیا فینو و همکاران در سال ۱۹۹۶ دریافتند که ژنوم سوبه‌های آبورتوس اویس دارای کپی‌های متعدد IS200 هستند و بر اساس محل قرار گرفتن این کپی‌ها در ژنوم می‌توان سوبه‌های مختلف را تفکیک نمود. این محققین نشان دادند که در هضم آنزیمی ژنوم با Pst I و سپس هیبریدیزاسیون با پروب IS200 در تمامی پرو فایل‌های به دست آمده از سوبه‌های آبورتوس اویس مورد مطالعه آنها باندهای حدود ۹ کیلوباز حضور دارد (۱۳). با این احتمال که این باندها برای سرووار اختصاصی است Beuzon و همکاران در سال ۱۹۷۷ IS200 ویژه سرووار را در سیستم کلونینگ تهیه و سپس ردیف نوکلئوتیدی آن را مشخص کرده‌اند. بر اساس اطلاعات به دست آمده پرایمرهایی توسط این محققین طراحی و برای تشخیص باکتری با استفاده از روش افزوده سازی PCR معرفی شده است. DNA باکتری‌هایی که واجد IS200 ویژه سرووار هستند با این پرایمرها در PCR قطعات حدود ۹۰۰ جفت باز تولید خواهند کرد و سایر سرو تیپ‌های سالمونلا که





- molecular biology. Sigma, U.S.A pp: (11)2-9.
7. Beuzon, C., Schiaffino, A., Leori, G., Cappuccinelli, P., Rubino, S. and Casadesus, J.(1997): Identification of *Salmonella abortusovis* by PCR amplification of a serovar-specific IS200 element. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:2082-2085.
  8. Jack.E.J. (1968): *Salmonella abortusovis*: an Atypical salmonella. *Vet. Record.* 82:558-561.
  9. Pardon, P., Sanchis, R., Marly, J., Lantier, F., Guilloteau, L., Buzoni-Gatel, D., Oswald, I., Pepin, P., Kaeffer, M., Berthon, B. and M. Y. Popoff (1990): Experimental ovine salmonellosis (*Salmonella abortusovis*). pathogenesis and vaccination. *Research. in Microbiology (France. )* 141:945-953.
  10. Pardon, P., Sanchis, R., Marly, J., Lantier, F., Pepin, M. and M. Popoff(1988):. Ovine salmonellosis caused by *Salmonella abortus ovis*. *Ann. Rech. Vet.* 19:221-235.
  11. Plagemann, O.(1989): Differential diagnosis of *Salmonella abortus ovis* and *Yersinia pseudotuberculosis* isolated from abortions in ewes. *J. Vet. Med. Series. B* 36:509-514.
  12. Sambrook.F, Fritsch, E. and Maniatis, T. (1989): *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press.pp: 200-475
  13. Schiaffino, A., Beuzon, C. R., Uzzau, S., Leori, G., Cappuccinelli, P., Casadesus, J. and Rubino, S.(1996): Strain typing with IS200 fingerprints in *Salmonella abortusovis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2375-2380.
  14. Southern, E. M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol. Biol.* 98:503-517.
  15. Tadjebakhche, H. and Gatel, A.(1972): Epidemiological study of a severe outbreak of ewe abortions due to *Salmonella abortusovis* in Khorasan, Iran. *Archive of the Faculty of Veterinary Medicine, Tehran. University. , Iran* 1:60-64.
  16. Travnicek, M., Dravecky, T., Balascak, J. and Prochazka, R.(1986): Bivalent vaccine against *Chlamydia psittaci* and *Salmonella abortusovis* infection in sheep. *Veterinarstvi* 36: 12:548.

