

## شناسایی کلستریدیوم سپتیکوم به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

دکتر محمد همتی\*، دکتر احمد مرشدی<sup>۱</sup>، دکتر قاسم یوسف بیگی<sup>۲</sup>، دکتر محسن فتحی نجفی<sup>۱</sup>

دریافت مقاله: ۱۰ آبانماه ۱۳۸۳  
پذیرش نهایی: ۱۰ اردیبهشت ماه ۱۳۸۴

### Diagnosis of *Clostridium Septicum* Using Polymerase Chain Reaction (PCR)

Hemmaty, M.<sup>1</sup>, Morshedy, A.<sup>2</sup>, Yosofbeigi, Gh.<sup>2</sup>, Fathi Najafi, M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Razi vaccine and serum research institute of Mashhad, Mashhad-Iran.

<sup>2</sup>Department of pathobiology, Faculty of veterinary medicine, University of Urmia, Urmia-Iran.

**Objective:** Identification and confirmation of *Clostridium septicum* in isolated Clostridia from sheep-dung samples by PCR.

**Design:** Laboratory study.

**Samples:** Twenty eight Clostridia were isolated from 100 sheep-dung of Urmia.

**Procedure:** Sheep-dung samples were collected and Clostridia isolated according to microbial tests. the DNA of isolates were extracted and used for PCR. PCR was performed by using designed primer for hemolysin gene (alpha toxin) of *Cl. Septicum*. A vaccine strain of *Cl. Septicum* and *Cl. pefringenes* types B, C and D were used as positive and negative control, respectively.

**Results:** Six out of 28 isolates and also vaccine strain showed 270 bp band on agarose gel electrophoresis, suggesting conserved segment for hemolysin in *Cl. septicum*. On the other hand, other isolates such as *Clostridium fallax*, *Cl. perfringenes*, *Cl. novoy B*, *Cl. bifermentnas*, *Cl. carnis*, *Cl. Subterminale*, *Cl. rummosum*, *Cl. innocum* were negative.

**Conclusion:** Since the DNA fragment of 270-bp was not amplified for *Cl. perfringens*, *Cl. novoyi*, *Cl. fallax*, *Cl. innocum*, *Cl. carnis*, *Cl. subterminale*, *Cl. bifermentance* and *Cl. ramusum*, this condition confirmed specificity of this primer. Hence, PCR can be useful for rapid detection or identification of *Cl. septicum* in clinical or environmental samples. *J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran. 61, 1: 47-50, 2006.*

**Keywords:** *Clostridium septicum*, PCR, hemolysin(alpha toxin)

**Corresponding author's email:** m\_hemmaty@yahoo.com

هدف: تایید تشخیص کلستریدیوم سپتیکوم با استفاده از پرایمرهای اختصاصی به روش (PCR) در بین کلستریدیوم‌های جدا شده از مدفوع گوسفندان منطقه ارومیه. طرح: مطالعه آزمایشگاهی.

نمونه‌ها: ۲۸ سویه کلستریدیوم جدا شده از صد نمونه مدفوع گوسفندی منطقه ارومیه. روش: نمونه برداری از مدفوع تازه گوسفندی، انجام آزمایشات استاندارد میکروب شناسی برای جداسازی کلستریدیها، استخراج DNA از سویه‌ها، انجام PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده از قطعه ژنی آلفا-توکسین.

نتایج: آزمون بر روی تمامی ۲۸ سویه به اضافه سویه واکنشی کلستریدیوم سپتیکوم به عنوان شاهد مثبت و سه تیپ B, C, D از کلستریدیوم پرفرنژانس به عنوان شاهد منفی انجام گردید. پس از انجام عملیات استخراج DNA، با پرایمر اختصاصی قطعه‌ای از ژن همولیزین کلستریدیوم سپتیکوم (توکسین آلفای باکتری) عملیات PCR صورت پذیرفت. هر شش سویه کلستریدیوم سپتیکوم به اضافه سویه واکنش در ژل آگارز باند ۲۷۰ جفت بازی را از خود نشان دادند که به عنوان قطعه مورد نظر در ژن همولیزین کلستریدیوم سپتیکوم تلقی گردید. تمامی گونه‌های دیگر کلستریدیای استفاده شده، با این پرایمر منفی بودند.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج بدست آمده، می‌توان پیشنهاد استفاده از روش PCR با پرایمرهای اختصاصی برای تشخیص سریع و اختصاصی کلستریدیوم سپتیکوم را توصیه نمود. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ۱۳۸۵، دوره ۶۱، شماره ۱، ۵۰-۴۷. واژه‌های کلیدی: واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، همولیزین، آلفا-توکسین، کلستریدیوم سپتیکوم.

بعضی معتقدند که زیستگاه اصلی کلستریدیها دستگاه گوارش است و وجود باکتری در خاک نشانگر آلودگی خاک به مدفوع می‌باشد ولی منطقی‌تر بنظر می‌رسد که زیستگاه اصلی اغلب بی‌هوازیها را خاک بدنیم. باکتری با بلع مواد گیاهی وارد دستگاه گوارش می‌شود و بعضی بصورت موقت یا دائمی با شرایط زندگی در دستگاه گوارش خومی‌گیرند. کلستریدیها اگر چه معمولاً زندگی ساپروفیتی دارند ولی بعضی از گونه‌ها بعنوان عوامل بیماری‌زاد انسان و دام شناخته شده‌اند (۱). کلستریدیوم سپتیکوم نیز مانند سایر کلستریدیها عمدتاً در خاک و دستگاه گوارش زیست می‌کند. باکتری از خاک مناطق مختلف جدا شده است. آلوده بودن لباس به این باکتری می‌تواند ناشی از آلودگی مستقیم یا غیر مستقیم به مدفوع باشد. در گزارشات متعدد از بیماری‌های مختلفی از انسان و دام و حتی از حفرات سلی و از ادرار انسان نیز

(۱) موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه مشهد، مشهد - ایران.

(۲) گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، ارومیه - ایران.

\* نویسنده مسؤول: m\_hemmaty@yahoo.com

جدا شده است (۷).

کلستریدیوم سپتیکوم عامل ادم بدخیم، براكسی و شاربن علامتی کاذب در حیوانات و قانقاریای گازدار در انسان است. این باکتری از جهات مختلف به کلستریدیوم شوویی عامل شاربن علامتی گاو و گوسفند شباهت دارد. این دو باکتری هر یک چهار توکسین اصلی به نامهای آلفا، بتا، گاما و دلتا



گردید. در انتها برای آنگیری و ایجاد رسوب و تولید کلاف DNA ۱۵۰ میلی مولار کلرور سدیم همراه دو حجم اتانول مطلق استفاده شد و سپس برای رسوب کامل DNA در ۲۰- درجه برای مدت ۲ ساعت و یا یک شب قرار داده شد. رسوب حاصله پس از ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ در ۱۲۰۰۰rpm در دمای ۴ درجه جمع آوری و مجدداً با اتانول ۷۰ درصد شستشو گردید. DNA حاصله در شرایط خلا خشک گردید و در آب دوبار تقطیر استریل حل شد و برای آزمایشات بعدی در ۴ درجه ذخیره شد. کمیت و کیفیت DNA بوسیله الکترو فورز و همچنین باروش اسپکتروفتومتری در نسبت طول موجهای ۲۸۰:۲۶۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت.

۳- PCR: ژن همولیزین کلاستریدیوم سپتیکوم از ۱۳۲۹ جفت باز تشکیل شده است (۲). پرایمر قسمتی از این ژن مطابق نظر Takeuchi و همکاران در سال ۱۹۹۷ تهیه گردید (Fermentas). این قسمت شامل ۲۷۰ زوج باز می باشد. پرایمرهای جلو (F) Forward و برعکس (R) Reverse واجد ۲۰ جفت باز بترتیب زیر می باشند:

F: 5'-AATTCAGTGTGCGGCAGTAG-3'

R: 5'-CCTGCCCAACTTCTCTTTT-3'

ترادف پرایمر F نوکلئوتیدهای شماره ۶۱۱ تا ۶۳۰ از ژن همولیزین را شامل می شود و سکانس پرایمر R مکمل نوکلئوتیدهای شماره ۸۶۱ تا ۸۸۰ است (۱۰). سیستم واکنش PCR برای حجم ۱۰۰ میکرولیتر طراحی گردید و غلظت نهایی ۲ میکروگرم از DNA هر نمونه، غلظت ۲۰ پیکومول از هر پرایمر، ۲۰۰ میکرومول از dNTPs، یک واحد بین المللی از (CinnaGen- Taq polymerase (Recombinant و ۱۰ میکرولیتر از بافر (10X) واجد  $MgCl_2$  و بقیه تا ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه گردید. این مخلوط ابتدا بمدت ۵ دقیقه برای جدا شدن دو رشته DNA از هم در ۹۴ درجه قرار گرفت. هر سیکل PCR شامل Denaturation time در ۹۴ درجه، Annealing در ۵۵ درجه و Extention time در ۷۲ درجه هر یک بمدت یک دقیقه روی دستگاه ترمال سایکلر (ساخت شرکت Techgene مدل TECHNE) برای انجام ۳۵ سیکل تنظیم گردید. در انتها یک مرحله Final extention بمدت ۵ دقیقه جهت تکمیل رشته های DNA انجام شد. محصول PCR بر روی ادرصد ژل آگارز همراه با مارکر (DNA Ladder Gene Ruler® 50bp) الکترو فورز گردید. سپس ژل با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و بادستگاه UV لومیناتور (Transilluminator, UVP, USA) با اشعه UV بررسی گردید و با دستگاه (B&L systems, Netherlands) ImaGo عکس برداری شد.

### نتایج و بحث

طول دوره انکوباسیون بطور معمول برای کلاستریدیوم سپتیکوم ۷۲-۴۸ ساعت است (۱) با نزدیک شدن به این زمان باکتری بتدریج وارد مرحله سکون و مرگ می گردد و در این مراحل سیستم اتولیز به حداکثر فعالیت خود می رسد و بهمراه توکسین بتا (DNase) مترشح از باکتری، ژنوم را در مراحل

تولید میکنند که از نظر فعالیت های بیولوژی به یکدیگر شباهت دارند. علاوه این دو باکتری واجد آنتی ژنهای مشترکی هستند که بروش آزمایشات تثبیت عوامل کمپلمان، ایمونوفلوروسنت آنتی بادی و ELISA قابل ردیابی است (۱،۹).

در حال حاضر تفریق بیماری ناشی از این دو عامل با مجموعه علائم کلینیکی، تعیین نوع توکسین، جداسازی و شناسایی باکتری انجام می شود (۸،۹). انجام این آزمایشات پیچیده، چندین روز کار آزمایشگاهی نیاز دارد. واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) یک تکنیک ژنتیک ملکولی است که در شرایط آزمایشگاهی قادر به تکثیر اسید نوکلئیک است. با این تکنیک می توان باکتری را سریعتر و مستقیماً از نمونه های کلینیکی و یا حتی در نمونه محیط طبیعی مورد شناسایی قرار داد (۴،۹). این تحقیق بر آن است که با شناسایی قسمتی از ژن همولیزین (توکسین آلفا) کلاستریدیوم سپتیکوم بروش PCR بسیار سریعتر و اختصاصی تر از روشهای رایج این باکتری را مورد شناسایی قرار دهد.

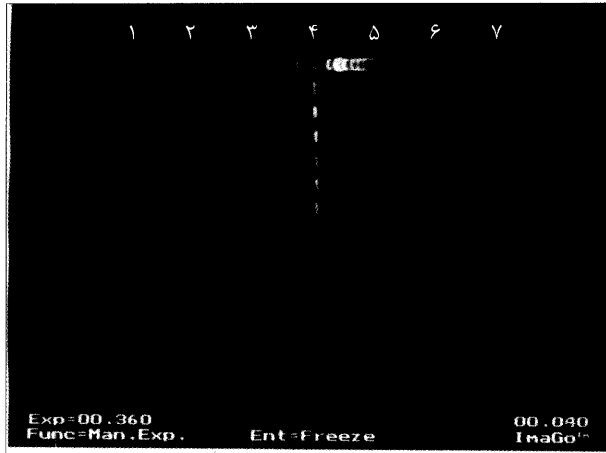
### مواد و روش کار

۱- نمونه برداری: در مطالعه قبلی تعداد ۱۰۰ نمونه مدفوع گوسفندی در منطقه ارومیه با کشت و آزمایشات بیوشیمیایی مورد بررسی باکتری شناسی قرار گرفت و کلاستریدیوم فالاکس، ک. پرفرنزئس، ک. کارنيس، ک. نوویی تیپ B، ک. روموزوم، ک. ساب ترمیناله، ک. بایفرمنتانس و ک. اینوکوم و شش سویه از ک. سپتیکوم جداسازی و با آزمون های میکروب شناسی مورد شناسایی قرار گرفتند.

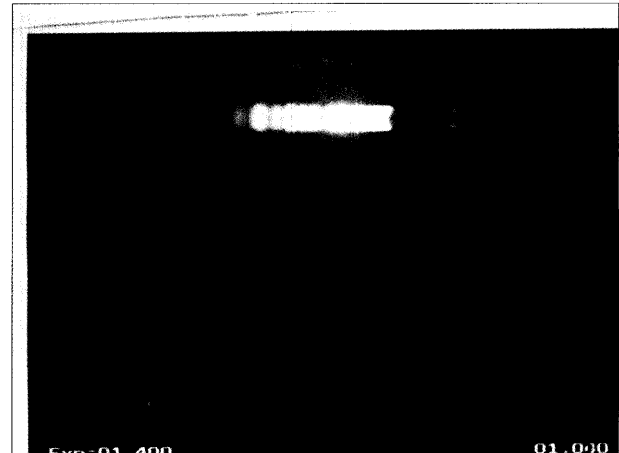
۲- استخراج DNA: عملیات استخراج DNA بر روی تمامی انواع گونه های جداسازی شده باضافه سویه واکنشی ک. سپتیکوم بعنوان شاهد مثبت و سه تیپ B, C, D از سویه واکنشی ک. پرفرنزئس بعنوان شاهد منفی انجام شد. باکتریها در شرایط بی هوازی (جار واجد گاز پک A ساخت Merck) بمدت ۲۴ ساعت در تيو گلیکولات کشت داده شدند. پس از سانتریفیوژ، از رسوب پیکره باکتریها با ۳۰۰ میکرولیتر بافر TE (Tris 10mM, EDTA 1mM pH 8.0) سوپانسیون تهیه گردید. در ابتدا با کتریها با  $100 \mu\text{g/ml}$  الیزوزیم (Roche) برای مدت ۱۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد تیمار گردید. سپس ادرصد سدیم دودسیل سولفات (SDS) و  $100 \mu\text{g/ml}$  پروتئیناز K (Fermentas) به نمونه اضافه شد و در ۳۷ درجه برای مدت ۳۰-۲۰ دقیقه جهت لیز سلولی قرار گرفت.

در ادامه، ترسیب پروتئین با فنل (equilibrated phenol) انجام گردید و پس از سانتریفیوژ ۱۰۰۰۰ دور بمدت ۱۰ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد، فاز مایع رویی جدا و هم حجم آن کلروفرم- ایزوآمیل الکل (۱:۲۴) اضافه شد. مدت ۲ دقیقه در دمای اتاق آهسته مخلوط و سپس برای مدت ۲ دقیقه در ۱۰۰۰۰rpm سانتریفیوژ گردید. ۴ میکرولیتر از فاز مایع رویی بر روی ژل آگارز ادرصد الکترو فورز گردید تا از صحت مراحل استخراج و وجود DNA تا این مرحله اطمینان حاصل گردد. برای حذف RNA اسید نوکلئیک استخراج شده با  $100 \mu\text{g/ml}$  آنزیم RNase A (Roche) برای مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه تیمار





تصویر ۲- چاهک شماره ۱ مارکر ۵۰ جفت بازی، چاهک‌های دو تا هفت محصول PCR نمونه‌های ک. سپتیکوم و چاهک‌های ۸ و ۹ و ۱۰ سویه واکسنی ک. پرفرنزس تیپ‌های B, C, D و چاهک‌های بعدی بترتیب ک. نوویی تیپ B، ک. فالاکس وک. بایفرمنتانس و چاهک آخر متعلق به شاهد مثبت سویه واکسنی ک. سپتیکوم است.



تصویر ۱- چاهک شماره ۱ مارکر ۵۰ جفت بازی، چاهک‌های دو تا هفت محصول PCR نمونه‌های ک. سپتیکوم و چاهک‌های ۸ و ۹ و ۱۰ سویه واکسنی ک. پرفرنزس تیپ‌های B, C, D و چاهک‌های بعدی بترتیب ک. نوویی تیپ B، ک. فالاکس وک. بایفرمنتانس و چاهک آخر متعلق به شاهد مثبت سویه واکسنی ک. سپتیکوم است.

کلاستریدیوم سپتیکوم کلاو در میان کلاستریدیا که میزان درصد G+C آنها بین ۴۵ تا ۲۱ درصد است از کمترین میزان G+C برخوردار است (۱).

توکسین آلفای کلاستریدیوم سپتیکوم از نظر فعالیت بیولوژیکی و ایمنی به توکسین آلفای کلاستریدیوم شوویی شباهت دارد و با روش‌های ایمونولوژی نمی‌توان این دو را از هم تفریق کرد. در صورتیکه با روش PCR می‌توان توکسین این دو باکتری را از یکدیگر متمایز نمود. با این روش همچنین می‌توان ۲۸ باکتری را در هر میکرو لیتر بصورت PCR مستقیم (بدون گذراندن مراحل استخراج DNA) تشخیص داد (۸). PCR انجام شده بوسیله پرایمرهای فوق جهت نمونه‌های کلاستریدیوم فالاکس، ک. پرفرنزس، ک. کارنيس، ک. نوویی تیپ‌های A, B, C, ک. رموزوم، ک. ساب ترمیناله، ک. بایفرمنتانس، ک. اینوکوم و سویه واکسن ک. پرفرنزس سه تیپ B, C, D نتایج مثبتی را نشان نداد (تصاویر ۱، ۲). بنابراین ویژگی این روش با استفاده از پرایمرهای اختصاصی آلفا توکسین جهت تشخیص ک. سپتیکوم بسیار بالا بوده و می‌توان آنرا بعنوان روشی صد در صد اختصاصی معرفی نمود. این نتیجه با نتایج حاصل از مطالعه Takeuchi بر روی ۱۰ سویه از ک. سپتیکوم، ۴ سویه از ک. شوویی، ۲ سویه از هر یک از تیپ‌های B, C, E، ک. پرفرنزس، تیپ A, B، ک. نوویی، ک. همولیتیکوم، اکتینومیسس پیوژنس و استافیلوکوکوس اورئوس همخوانی دارد. همچنین این پرایمر با ژن آئرو لیزین آ. هیدرو فیلا، و همچنین با توکسین انواع متعددی از میکرو بیها شامل آلفا همولیزین آئرو موناس هیدرو فیلا، بتا همولیزین آئرو موناس سالموندیسیدا، همولیزین باسیلوس سرئوس، پرفرینزلیزین O از کلاستریدیوم پرفرنزس، لیستر یولیزین از لیستر یا مونوسیتوژنس، الوئولیزین از پنی باسیلوس الویی، بتا همولیزین پزودوموناس پاسی موبیلیس، الفاهمولیزین استافیلوکوکوس اورئوس، بتا همولیزین اس. اورئوس، استرپتولیزین D از استرپتوکوکوس کنیس، استرپتولیزین O از استرپتوکوکوس اکوبی سیمیلیس و پنومولیزین استرپتوکوکوس پنومونیه هیچگونه همولوژی نداشت. با توجه به این

استخراج مورد تهدید قرار می‌گیرد. لذا از کشت ۲۴ ساعته باکتری یعنی در اوج مرحله لگاریتمی رشد برای استخراج DNA استفاده گردید.

در مرحله لگاریتمی رشد مقدار RNA بخاطر شرایط تکثیر باکتری و تولید انواع پروتئینها در حداکثر مقدار خود است. RNA بصورت یک اسمیر پهن و بیشتر ژنوم باکتری بر روی ژل آگارز پس از استخراج DNA مشاهده گردید. بنابراین برای حذف آن از آنزیم RNaseA استفاده گردید. روشهای دیگری نیز برای استخراج DNA از بیهواز بیهوا گزارش گردیده است (۹، ۱۰).

از آنجا که اسیدهای نوکلئیک در طول موج ۲۶۰ نانومتر و پروتئینها (بر اساس وجود سه هسید آمینه آروماتیک) در ۲۸۰ نانومتر جذب نوری بیشتری دارند، با بدست آوردن نسبت این دو می‌توان نسبت خلوص اسید نوکلئیک و مقدار آن را تعیین نمود. وجود پروتئینها از خلوص DNA می‌کاهد بنابراین گاهی پس از برآورد این نسبت تکرار مرحله فنل - کلرو فرم ایزو آمیل الکل ضروری است. مقدار DNA استخراج شده را نیز می‌بایست برآورد نمود چرا که در مرحله PCR باید مقدار دقیقی از آن مورد استفاده قرار گیرد. چنانچه در طول موج ۲۶۰ نانومتر جذب نوری مساوی یک گردد مقدار DNA موجود مساوی ۵۰ μg/ml خواهد بود (۳، ۴).

حضور تنها یک باند واضح با وزن بالا در ژل الکتروفورز نشانگر خالص بودن DNA نو میک از سایر اسیدهای نوکلئیک از قبیل DNA سیتوپلاسمی و RNA است. هر شش نمونه کلاستریدیوم سپتیکوم و سویه واکسن پس از PCR و الکتروفورز باند ۲۷۰ جفت بازی را نشان دادند (تصویر ۱). این قطعه ۲۷۰ زوج بازی قسمتی از ژن همولیزین یا توکسین آلفای کلاستریدیوم سپتیکوم است (۹). توکسین آلفا، توکسین اصلی باکتری است که دارای اثر کشندگی بر روی گلبولهای قرمز انسان و اثر کشندگی بر روی موش است (۱، ۲). ژن این پروتئین واجد ۱۳۲۹ زوج باز هسته‌ای است که از نظر وجود بازهای A-T بسیار غنی می‌باشد و قریب به ۸۵-۷۵ درصد آنرا تشکیل می‌دهند (۲). البته



## References

- Hatheway, C.L., Johnson, E.A. (2000): Clostridium: The spore-bearing anaerobes, Topley and Wilson's Microbiology and microbial infections. 9th edition. Albert Balows. Brain I Duwden. PP: 732-768
- Imagawa, T., Dohi, Y., Higashi, Y. (1994): Cloning, nucleotide sequence and expression of a hemolysin gene of *Clostridium septicum*. FEMS Microbiology letters. 117(3):287-292
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989): Molecular cloning a laboratory manual. 2 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. PP: 14.2-14.29
- Sambrook, J., Russell, D.W. (2002): Molecular cloning a laboratory manual. 3rd. Cold Spring Harbor Laboratory Press. PP: 8,18-8,96
- Sasaki, K., Yamamoto, K., Kojima, A., Norimatsu, M. and Tamura, Y. (2000): Rapid identification and differentiation of pathogenic clostridia in gas gangrene by polymerase chain reaction based on the 16S-23S rDNA spacer region. Res Vet Sc. 69 (3): 289-294
- Sasaki, Y., Kojima, A., Aoki, H., Ogikubo, Y., Takikawa, N. and Tamura, Y. (2002): Polygenetic analysis and PCR detection of *Clostridium chauvoei*, *C. haemolyticum*, *C. novyi types A and B* and *C. septicum* based on the flagellin gene. Vet Mic. 86: 257-267
- Smith, L.D.S. (1975): The pathogenic anaerobic bacteria. Thomas Books: 109-115, 579-580
- Songer, j. G. (1997): Molecular and immunological methods for the diagnosis of the clostridial disease. The clostridia: Molecular Biology and Pathogenesis. Academic press. PP: 491-501
- Takeuchi, Sh., Hashizume, N., Kinoshita, T., Kaidoh, T. and Tamora, Y. (1997): Detection of *Clostridium septicum* hemolysin gene by polymerase chain reaction. J Vet Med Sci. 59 (9): 853-855
- Wren, B.W., Mullany, P., Lamb, F.I. (1991): Genetics and Molecular Biology. Anaerobic Microbiology a practical approach. Oxford University Press. PP: 145-161.

یافته‌ها بنظر می‌رسد که این روش شناسایی برای همولیزین ک.سپتیکوم اختصاصی باشد.

برای تشخیص کلستریدیوم سپتیکوم بروش PCR از ژنهای دیگری چون ژن تاژک (Flagellin gene) و همچنین 23s rDNA spacer region-16s نیز استفاده شده است (۶، ۵). از ژن توکسین سایر کلستریدیا چون نورو توکسین کلستریدیوم بوتولینیوم، توکسین A و B کلستریدیوم دیفیسیل و توکسین‌های اصلی کلستریدیوم پرفرنزنس نیز در تشخیص بروش PCR این باکتریها کمک گرفته شده است (۹).

عملیات تشخیص باکتری بوسیله PCR مستقیم در آزمایشگاه در زمانی کمتر از ۳-۴ ساعت قابل انجام است. با توجه به حساسیت و ویژگی بالای PCR همچنین سرعت عمل آن با این روش می‌توان تمامی مناطق کشور را از نظر وجود انواع کلستریدیا مورد آزمایش غربالگری قرار داد و نقشه اپیدمیولوژی کشور را از نظر توزیع انواع کلستریدیا ترسیم نمود. همچنین با این روش می‌توان تنوع ژنتیکی حاکم بر هر نوع را نیز مورد بررسی قرار داد.

## تشکر و قدردانی

بدینوسیله از همکاری بخش‌های تحقیقات و تشخیص موسسه رازی مشهد و گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه که در انجام این پروژه اینجانب را یاری نموده‌اند تشکر و قدردانی می‌نمایم.

