بررسی مقایسه ای کشت باکتریال و واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) در تشخیص آلودگی سیستم تولید مثل به باکتری *Haemophilus Somnus* گاوهای شیری نژاد هلشتاین

مسعود طالب خان گروسی [1]، حسین کیوانی [2]، سیدعلی ناجی [3]، پرویز هورشتی [4]،
سید عبدالمحمد طباطبائی [5] و محمود بلورچی [6]

۱- استادیار بخش مامایی و بیماریهای تولید مثل دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد ۲- استادیار بخش ویروس شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران ۳- دستیار بخش ویروس شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران ۴- دانشیار بخش مامایی و بیماریهای تولید مثل دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران ۵- استاد گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران

چکیده

تعداد ۲۲۶ رأس گاو شیری نژاد هلشتاین از نظر آلودگی سیستم تولید مثلی به باکتری هموفیلوس سومنوس *Haemophilus Somnus (HS)* در ۳ گروه تحقیقاتی مورد بررسی قرار گرفتند. از (٪۷/۵۲)۱۷ رأس دامهای تحت بررسی ، باکتری HS جداگردید. از ۱۰۳ رأس دام مبتلا به انواع اختلالات و بیماریهای تولید مثلی، ٦٦ رأس دام سالم آبستن و ۵۷ رأس دام سالم غیر آبستن به ترتیب: (٪۵/۸۲)٦ رأس، (٪۱/۵۲) یک رأس و (٪۷/۵)۱۰ رأس باکتری HS جدا گردید. ۳۹ رأس از دامهای تحت مطالعه مورد بررسی واکنش زنجیرهای پلی مراز (PCR) قرار گرفتند جمعاً (٪٦٤/۱)۲۵ رأس دارای واکنش مثبت در این بررسی بودند. از ۱٦ رأس دام بیمار، ۷ رأس دام سالم آبستن و ۱٦ رأس دام سالم غیر آبستن در PCR به ترتیب (٪٦۸/۷۵)۱۱ رأس، (٪۸۵/۷۱)٦ رأس و (٪۵۰)۸ رأس آلودگی به HS را نشان دادند در کشت باکتریال گروه دامهای بیمار، بافت رحم بیشترین (٪۳/۸۸) میزان آلودگی را داشته، در حالیکه در گروه کنترل دامهای غیر آبستن، بالاترین (٪۱۲/۲۸) میزان آلودگی متعلق به بافت واژن بود. در بررسی PCR بافتهای رحم، واژن و سرویکس دامهای تحت بررسی، به ترتیب: رحم دامهای بیمار (٪۵۰ ،۸ رأس)، سرویکس دامهای غیر آبستن(٪۲۵، ٤ رأس) و واژن دامهای سالم آبستن(٪۸۵/۷۱، ٦ رأس) بیشترین آلودگی را نشان دادند.). اطلاعات بدست آمده با استفاده از آزمون مربع کای مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

واژه های کلیدی: هموفیلوس سومنوس، PCR، کشت باکتریال، سیستم تولید مثل، گاوهای شیری

مقدمه

هموفیلوس سومنوس کوکوباسیل پلی مرفیک گرم منفی با گسترهٔ وسیع جغرافیایی است،این باکتری قادر به ایجاد ضایعات تولید مثلی گاوهای ماده ومتعاقباً تحت تأثیر قرار دادن شاخصهای باروری در سطح گله می باشد (۱،۲،۳،٤،۵،٦،۷،۸) تاکنون آلودگی هموفیلوس سومنوس در ایران مورد بررسی قرار نگرفته است. در همین راستاء اهداف پژوهش می توانند با استفاده از روشهای تشخیصی کشت باکتریال و (PCR) پاسخگوی سؤالات ذیل باشند:۱- آیا این باکتری در مراکز پرورش گاوهای شیری حضور دارد؟ ۲ـ آیا این باکتری در دامهای مبتلا به بیماریهای تولید مثلی و اختلالات باروری مطرح است؟ ۳ـ آیا این باکتری در دامهای سالم آبستن و غیر آبستن هم یافت می شود؟ ٤ـ رشد این باکتری در محیط کشت چگونه است؟ ۵- آیا می توان از روش تشخیصی (PCR)در شناخت آلودگی این باکتری استفاده کرد؟

مواد و روشها

در این بررسی از ۲۲٦ رأس گاو شیری نژاد هلشتاین دامپروریهای صنعتی با ظرفیت های ۲۵۰۰-۱۵۰ رأس، و با مدیریت و ثبت مشخصات صحیح و تقریباً یکسان نمونه گیری بعمل آمد. دامهای تحت بررسی به ۳ گروه تقسیم شدند که عبارتند از ۱- گروه درمان که شامل دامهای مبتلا به انواع واقسام بیماریهای تولید مثلی بوده اند (۱۰۳رأس)،۲- گروه کنترل یک، شامل دامهای سالم ابستن(٦٦رأس)، ۳- گروه کنترل ۲، شامل دامهای سالم غیر آبستن (۵۷ رأس). دامهای گروه درمان ، در سنین مختلف پس از زایش بوده که مبتلا به بیماریهای مختلف تولید مثلی در ۳ ارگان رحم، سرویکس و واژن بوده اند. نمونه گیری گروههای درمان و دامهای سالم آبستن از ۳ ارگان رحم، سرویکس و واژن (جمعاً ٤۸۰ نمونه)بعمل آمد. اما نمونه گیری از گاوهای آبستن، از ۲ بافت سرویکس و واژن (جمعاً ۱۳۲ مورد) تهیه گردیدنمونه های تهیه شده، جهت کشت به محیط حمل و نقل استوارت منتقل گردید، و پس از گذشت ۲٤ تا ٤۸ ساعت در انکوباتور $37^{\circ}C$ ، بر روی محیط عصاره قلب و مغز حاوی

مخمر (BHIYA) (Brain Heart Infusion Yeast Agar) در شرایط بیهوازی (CO2 10%) با استفاده از گاز پک کشت داده شد. در بررسی PCR از ۳ بافت رحم، سرویکس و واژن دامهای گروه درمان (۱۶ رأس) و دامهای سالم غیر آبستن (۱۶ رأس) و ۲ بافت واژن و سرویکس دامهای سالم آبستن (۷ رأس) استفاده گردید. نمونه ها تا انجام آزمایشات مربوطه در دمای C° ۲۱- نگهداری شدند. پرایمرهای مورد نیاز بر اساس پروتکل ارائه شده توسط Genebank انگلستان در سازمان انتقال خون کشور تهیه شد(۹). اطلاعات بدست آمده با استفاده از آزمون مربع کای مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

نتایج و بحث

در کشت باکتریال مشخص گردید که (۷/۵۲٪) ۱۷ رأس از ۲۳۶ رأس دامها، آلوده به باکتری هموفیلوس سومنوس می باشند. اما، در بررسی PCR ۳۹ رأس دام تحت بررسی (٦٤/١٪) ۲۵ رأس ، آلوده به باکتری هموفیلوس سومنوس می باشند (جدول شماره یک). در بررسی PCR، نمونه های تهیه شده از ۱٦ رأس دام بیمار، ۷ رأس دام سالم آبستن و ۱٦ رأس دام سالم غیر آبستن به ترتیب:(٦٨/٧٥٪) ١١ رأس، (٨٥/٧١٪) ٦ رأس و (٥٠٪) ٨ رأس آلوده به باکتری هموفیلوس سومنوس بودند (جدول شماره ۳). تعداد دامهای آلوده به باکتری هموفیلوس سومنوس در دامهای مبتلا به بیماریهای تولید مثل(۱۰۳ رأس)، دامهای سالم آبستن (٦٦رأس) و دامهای سالم غیر آبستن (۵۷ رأس) به ترتیب: (٥/٨٣٪) ٦ رأس، (١/٥٢٪) یک رأس و (١٧/٥٪) ۱۰ رأس بودند

جدول۱- توزیع مقایسه ای کشت باکتریال و PCRدر تشخیص آلودگی سیستم تولید مثل گاوهای شیری به *Haemophilus Somnus*

نوع آزمایش		دامهای بیمار			دامهای سالم آبستن			دامهای سالم غیر آبستن			جمع کل		
		+	-	جمع	+	-	جمع	+	-	جمع	+	-	جمع
		(٪)	(٪)		(٪)	(٪)		(٪)	(٪)	(٪)	(٪)	(٪)	
کشت		٦	۹۷	۱۰۳	۱	٦٥	٦٦	۱۰	٤٧	٥٧	۱۷	۲۰۹	۲۳٦
		٥/٨٢	۹٤/۱۸		۱/٥۱	۹۸/٤۸		۱۷/٥٤	۸۲/٤٥		۷/٥۲	۹۲/٤۸	
PCR		۱۱	٥	۱٦	٦	۱	۷	۸	۸	۱٦	۲٥	۱٤	۳۹
		/۷٥	۳۱/۲٥		۸٥/۷۱	۱٤/۲۸		٥۰	٥۰		٦٤/۱	۳٥/۸۹	
		٦۸											

اختلاف معنی دار است (P>0.05)

شناسایی و تشخیص باکتری هموفیلوس سومنوس بدلیل تغییر پذیر بودن مرفولوژی و خصوصیت بیوشیمیایی آن مشکل می باشد.بر اساس اظهارات Stephen و همکارانش (۱۹۸۱) ممکن است این مسله بدلیل رشد سریع باکتریها و مخفی شدن هموفیلوس سومنوس توسط سایر باکتریها باشد (۱۰). لذا تشخیص این باکتری از طریق کشت ، کم و مشکل می باشد (جدول شماره یک). بررسی انجام شده توسط Qystein Argen و همکارانش (۱۹۹۸) ، توانائی آزمایش واکنش زنجیرهای پلی مراز (PCR) در کشت های مخلوط را مورد ارزیابی قرار داد ونشان داد که PCR آزمایش اختصاصی جهت شناسائی هموفیلوس سومنوس در کشت های خالص و نا خالص است (۹).لذا براساس جدول شماره یک و ۲ ، میزان تشخیص این باکتری در موارد تشخیص این باکتری از نمونه های مستقیم تولید مثل دامهای بیمار، سالم آبستن و غیر آبستن به اثبات رسید. با توجه به رشد کند و بطئی این باکتری در محیط های کشت و امکان مخفی ماندن آن توسط سایر باکتریها، می تواند بررسی جامع تری با استفاده از روش سریع و دقیق PCR انجام گیرد.

جدول۲- توزیع آلودگی ارگانهای مختلف سیستم تولید مثل گاوهای شیری به هموفیلوس سومنوس بر اساس PCR

نوع دام	ارگان								
	رحم			سرویکس			واژن		
	+ (٪)	- (٪)	جمع	+ (٪)	- (٪)	جمع	+ (٪)	- (٪)	جمع
دام بیمار	۸ (۵۰٪)	۸ (۵۰٪)	۱۶	۳ (۱۸/۷۵٪)	۱۳ (۸۱/۲۵٪)	۱۶	۵ (۳۱/۲۵٪)	۱۱ (۶۸/۷۵٪)	۱۶
سالم آبستن	-	-	-	۱ (۱۴/۲۸٪)	۶ (۸۵/۷۱٪)	۷	۱ (۱۴/۲۸٪)	۶ (۸۵/۷۱٪)	۷
سالم غیر آبستن	۴ (۲۵٪)	۱۲ (۷۵٪)	۱۶	۴ (۲۵٪)	۱۲ (۷۵٪)	۱۶	۹ (۵۶/۲۵٪)	۷ (۴۳/۷۵٪)	۱۶
جمع	۱۲	۲۰	۳۲	۸	۳۱	۳۹	۱۵	۲۴	۳۹

منابع

1-Humphrey. L. R and Stephens. L. R. (1983). 'Haemophilus Somnus': Areview. Veterinary bulletin. Vol. 53. No. 11. P: 987-1004.

2- Kannene. J.B, Coe. P. H, Gibson. C. D, Yamini. B, Martinez. R. O. and Morrow. D. A (1986). The role of Haemophilus somnus in early embryonic death. I. The effect of the organisem on embryos by day 8 post breeding . Theriogenilogy. Vol. 26, No. 2, P: 189- 197.

3-Kannene. J. B. Gibson. C. D, Coe. P. H and Morrow. D. A. (1986). The role of Haemophilus somnus in bovine early embryonic death . II. Persistence of the organisme in the uterus following interuterine exposure. Theriogenology . Vol. 26. No. 6, P: 795-801.

4- Kannene. J. B, Coe. P. H, Gibson. C. D, Yamini. B, Morrow. D. A and Martinez. R. D. (1987). The role of Haemophilus somnus in bovine early embryonic death. III. The effect of the organisme on embryos by day 21 post breeding . Theriogenology. Vol. 27. No. 5, P: 737-749.

5- Robert Higgins, Jean R. Martin, Yres Larouch and Gerard Goyette. (1987). Mastitis caused by Haemophilus somnus in a dairy cow. Can. Vet. J. Vol. 28, No. 3, 117- 118.

6- Robert S. J. Stephen. (Reprint 1991) Veterinary Obstetrics and Genital Diseases (theriogenology). Edwards Brothers, inc. P: 469- 471 & 848.

7- Saunders J. R, Janzen. E. D (1980). Haemophilus somnus infection: A ten years (1969- 1978) retrospective study of losses in cattle herd in Western Canada. Can. Vet. J. 21, 119-123.

8- Van Dreumel. A. A and Kirstead (1975) Abortion associated with Haemophilus somnus infection a bovine fetus. Can. Vet. J. Vol. 16, No. 12, P: 367-370.

9-Qystein Angen, Peter Ahrens, Conny Tegtmeier. (1998)Development of a PCR test for identification of Haemophilus Somnus in pure and mix culture. Veterinary Microbiology. 63. !. 39-48.

10- Waldham. D. G. Hall. R.F , Meiners. W. A, Hagen. C. S, Frank. F.W (1974). Haemophilus somnus infection in the cow: a possible contributing factor to weak calf syndrome isolation and animal inoculation studies. Am. J. Vet. Res, 35, 1401-1403.

The comparative survey of bacterial culture and polymerase chain reaction (PCR) of the genital system of Haemophilus Somnus infectious of Holstein dairy cattle

Talebkhan Garoussi. M., Keyvanee. H., Najee. S. A., Hovarashtee. P

Tabatabaee A. M, Bolourche. M.

Abstract:

Two hundred and twenty six Holstein dairy cattle into 3 groups were examined for Haemophilus Somnus infectious of reproduction system. The differences were assessed using X2 corrected for countinuity. The infectious rate was (7.52%). It was isolated from 6(5.82%), 1(1.52%) and 10(17.5%) of treatment, pregnant and non-pregnant groups, respectively.Thirty nine cows were examined for poly merase chaine reaction (PCR). Twenty five (64.1%) cows showed positive response in PCR Sixteen, 7 and 16 genital system of cows were examined for PCR in treatment, pregnant and non pregnant control groups, respectively Eleven(68.75%), 6(85.71%) and 8(50%) had positive response in cows of above groups. In bacteriological investigation, uterine tissue had the highest infectious (3.88%). Whereas, vagina had the highest (12.28%) H. somnus infectious in non pregnant control group. In PCR examination, uterus (No: 8, 50%), cervix (No: 4, 25%) and vagina (No: 6, 85.71%) had the highest infectious in treatment, non-pregnant and pregnant control groups, respectively. The differences between bacterial culture and PCR methods were significant in reproduction system of H. somnus infectious diagnosis.