Assiut Vet. Med. J. Vol. 59 No. 136 January 2013

DETECTION OF CHLAMYDIAE BY POLYMERASE CHAIN REACTION IN BULLS SEMEN USED FOR ARTIFICIAL INSEMINATION IN SYRIA

SAMER KAMEL IBRAHIM
Faculty of Veterinary Medicine, Albaath University, Hama, Syria.

ABSTRACT

In order to exclude the role of bulls used in artificial insemination in venereal transmission of *chlamydiae* in cattle in Syria, a total of 45 Cryopreserved bull semen samples collected from bulls in production period. Also, 15 fecal samples collected from calves selected for the porpose of artificial insemination were included. The samples were examined by polymerase chain reaction (PCR) after DNA extraction from these samples. The test were repeated sex months later. The results show that all samples were negative by PCR for the presence of *Chlamydia* and *Chlamydophila* species. In conclusion, the fail in detection of *chlamydiae* in bulls semen suggests that these bulls would not play a role in semen born disease of *chlamydiae*.

Received at: 25/12/2012

Accepted: / /

Key words: *PCR, Chlamydiae, Semen, Artificial insemination.*

الكشف عن المتدثرات في السائل المنوي للثيران المستخدمة في التلقيح الصناعي في سورية بواسطة تفاعل البوليميراز المتسلسل

سامر كامل إبراهيم

من أجل استبعاد دور الثيران المستخدمة في إنتاج السائل المنوي في الجمهورية العربية السورية لغرض التلقيح الصناعي عند الأبقار في نقل العدوى التناسلية بالمتدثرات (الكلاميديا)، فقد تم فحص 45 عينة سائل منوي مأخوذة من ثيران في مرحلة الإنتاج. كما تم فحص 15عينات براز من عجول منتخبة من أجل التربية لغرض التلقيح الصناعي. تم فحص العينات باختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل وذلك بعد استخراج قالب الدنا (templet DNA) من تلك العينات. تم إعادة فحص عينات للسائل المنوى مجمعة من نفس الثيران بعد ستة أشهر بنفس التقنية من أجل التأكد من حالة الثيران. أشارت نتائج تفاعل البوليميراز المتسلسل إلى أن جميع العينات كانت سلبية لوجود أنواع الكلاميديا والكلاميدوفيلا في عينات السائل المنوي للثيران المختبرة. يستنتج من هذه النتائج أن الثيران المستخدمة في التلقيح الصناعي عند الأبقار في سورية لا تلعب دوراً في نقل العدوى التناسلية بالمتدثرات.

الكلمات المفتاحية: تفاعل البوليميراز المتسلسل، المتدثرات، السائل المنوي، التلقيح الصناعي.

INTRODUCTION
المقدمة

تصنف عائلة المتدثرات *Chlamydiacea* إلى جنسين هما جنس *Chlamydia* وجنس *Chlamydophila*. يضم جنس *Chlamydophila* ستة أنواع وهي المتدثرة الببغائية *C. psittaci* والمتدثرة الهرية *C.felis* والمتدثرة المجهضة *C. abortus* والمتدثرة *C. caviae* والمتدثرة *C. pecorum* والمتدثرة الرئوية *C. pneumoniae* . أما جنس *Chlamydia* فيضم ثلاثة أنواع وهي المتدثرة التراخومية *C. trachomatis* والمتدثرة الخنزيرية *C. suis* والمتدثرة *C. muridarum* وقد تم هذا التقسيم اعتماداً على 16S rRNA و 23S rRNA (OIE, 2008) و (Everett *et al.*, 1999).

يترافق داء الكلاميديا (المتدثرات) عند الأبقار مع أمراض عديدة تشمل التهاب الأمعاء والتهاب الرئة والتهاب الملتحمة والتهاب المفاصل. إضافة إلى ذلك فإن العديد من المشاكل التناسلية مثل الإجهاض والتهاب المهبل والتهاب الرحم وانخفاض الخصوبة وتكرار عدد مرات التلقيح تترافق مع العدوى بالكلاميديا (Amin, 2003; Kauffold *et al.*, 2007; Radostitis *et al.*,1994; Petit *et al.*, 2008).

عزلت الكلاميديا من الثيران من حالات التهاب البربخ (epididymis) ومن الخصي والغدد الجنسية الملحقة بعد العدوى التجريبية بالكلاميديا الببغائية (Storz *et al.*, 1976). وكذلك وجد أن الأبقار التي أعديت تناسلياً ب الكلاميديا أصيبت بالتهاب المهبل و/أو التهاب بطانة الرحم (DeGraves *et al.*, 2004). وفي هذا السياق فقد ذكر (Radostitis *et al.*, 1994) بأن العدوى التناسلية بالكلاميديا عند الأبقار ممكنة ولكنها نادرة الحدوث.

هناك دراسات قليلة عن وجود الكلاميديا في السائل المنوي عند الثيران، فقد أشار (Kauffold *et al.*, 2007) في ألمانيا إلى الكشف عن وجود الكلاميديا في 9.2 % من عينات السائل المنوي وكان أكثر الأنواع شيوعاً هو الكلاميدوفيلا الببغائية. وقد كشف (Amin, 2003) عن وجودها في 18 عينة سائل منوي من أصل 120 عينة مختبرة . وقال (Givens and Marley, 2008) أن الكلاميديا تسبب عدوى للقنوات الجنسية للثيران. وأشارت دراسات عديدة إلى الكشف عنها في السائل المنوي لذكور الخنازير (Kauffold *et al.*, 2006; Teankum *et al.*, 2006). من كل ما سبق ونظراً لإمكانية انتقال العدوى التناسلية بأنواع الكلاميديا والكلاميدوفيلا عبر السائل المنوي المعد للتلقيح الصناعي وكذلك من أجل ضمان جودة السائل المنوي المعد للتلقيح الصناعي في سوريا، فقد هدفت هذه الدراسة إلى التقصي عن وجود أنواع الكلاميديا والكلاميدوفيلا في عينات السائل المنوي باستخدام تقنية تفاعل البوليميراز المتسلسل لما تتمتع به هذه التقنية من دقة وحساسية عالية واختصار في الوقت والنفقات.

MATERIALS and METHODS
المواد والطرق المعملية

1- العينات: أرسلت 45 عينة سائل منوي مجمدة Cryopreserved من الثيران وذلك من محطة التلقيح الصناعي في محافظة دمشق التابعة لوزارة الزراعة والإصلاح الزراعي، وهي المحطة الأساسية في سوريا لإنتاج وتوزيع السائل المنوي المخصص للتلقيح الصناعي عند الأبقار. تراوحت أعمار الحيوانات بين 3-7 سنوات. كانت جميع الثيران سليمة إكلينيكياً وخالية من المشاكل التناسلية. وبعد ستة أشهر من الفحص الأول تم إعادة جمع السائل المنوي من تلك الثيران. تم نقل العينات إلى مخابر كلية الطب البيطري في خزان سائل آزوتي. بالنسبة لعينات الروث فقد تم جمعها من المستقيم مباشرة من عجول منتخبة لغرض التلقيح الصناعي ولكنها غير مدربة على جمع السائل المنوي.

2- استخلاص الدنا من عينات السائل المنوي والروث: DNA extraction from semen and fecal samples

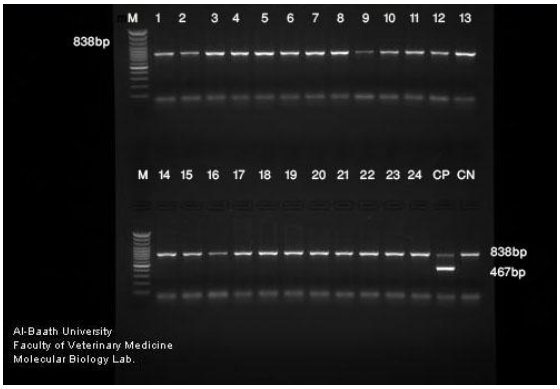
تم استخلاص الدنا من عينات السائل المنوي باستخدام عتيدة تجارية محضرة من قبل شركة QIAGEN الألمانية (QIAamp® DNA mini Kit, Qiagen, Hilden, Germany) و ذلك حسب توصيات الشركة المنتجة باتباع بروتوكول عزل الدنا من سوائل البدن باستخدام 200 ميكروليتر من عينة السائل المنوي بعد إذابته(Teankum *et al.*, 2007). أما بالنسبة لعينات الروث فقد تم استخلاص الدنا منها باستخدم عتيدة تجارية خاصة باستخلاص الدنا من الروث (QIAamp DNA Stool Mini Kit, Qiagen, Hilden, Germany) . تم حفظ عينات الدنا في المجمدة عند درجة حرارة -20م° لحين إجراء اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل.

3-تفاعل البوليميراز المتسلسل: Polymerase chain reaction

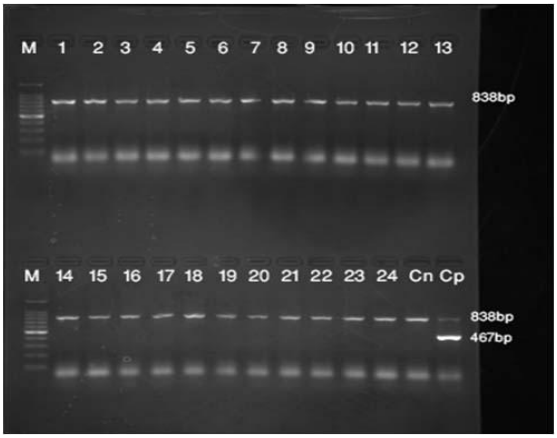
من أجل الكشف عن الدنا الخاص بالمتدثرات، تم إجراء تفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR) باستخدام عتيدة منتجة من قبل شركة(Bactotype® PCR Amplification Kite (WWW.biotype.de) Biotyp AG, Dresden , Germaeny. واسم العتيدة cat.No. 04-104 (Chamydia sp.)). تحتوي هذه العتيدة على مشرعات (Primers) نوعية لأنواع جنس الكلاميديا والكلاميدوفيلا. تم تحضير مزيج التفاعل حسب توصيات الشركة المنتج ة باستخدام 2.5 ميكروليتر من الدنا (purified DNA) وإضافة وحدة دولية واحدة من أنزيم Taq DNA polymerase (Takara Ex Taq, Japan). وكانت شروط التفاعل كما يلي: دورة واحدة بدرجة 94م° لمدة ثلاث دقائق، و 35 دورة بدرجات حرارة 94 م° لمدة 30 ثانية و 60 م° لمدة 30 ثانية و 72 م° لمدة 30 ثانية ودورة أخيرة بدرجة 72 م° لمدة 5 دقائق. أجريت جميع التفاعلات باستخدام المدور الحراري (Techne Tc 512 Thermal cycler). تم الكشف عن نواتج التفاعل بالرحلان الكهربائي في هلامة الأجاروز 2% (Peq gold universal No. 2) والمضاف له صبغة الإثيديوم بروماید بتركيز 1 ميكرغرام/مل في دارئة TBE من شركة تاكارا اليابانية. بعد الرحلان لمدة ساعة وشدة تيار 100 فولت، نقلت هلامة الأجاروز الى نظام التظهير بالأشعة فوق البنفسجية (UVipro Platinum) (Sambrook and Russell, 2001) . تعتبر النتيجة ايجابية في حال وجود أنطقة دنا(DNA Bands) ذات حجم 449 قاعدة آزوتية إضافة إلى وجود أنطقة دنا بحجم 838 قاعدة آزوتية (amplification control) وذلك مقارنةً مع معلم الوزن الجزيئي (100 bp DNA Ladder, PeqLab) وتعتبر النتيجة سلبية في حال وجود نطاق دنا حجم 838 قاعدة آزوتية فقط. تم استخدام شاهد إيجابي وشاهد سلبي مع كل مجموعة مختبرة.

RESULTS
النتائج

عند فحص 45 عينة دنا مستخلصة من 45 عينة سائل منوي مجمدة مأخوذة من ثيران منتقاة لغرض إنتاج السائل المنوي لغرض التلقيح الصناعي عند الأبقار في سورية، فقد دلت النتائج على أن جميع العينات كانت سلبية باختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل لوجود أنواع جنس الكلاميديا والكلاميدوفيلا. وكذلك كانت عينات الروث المأخوذة من العجول الفتية والمرباة في نفس المحطة سلبية لوجود أنواع جنس الكلاميديا والكلاميدوفيلا. وتوضح الصورة رقم (1) هذه النتائج. وعند إعادة الأختبار بعد ستة أشهر على عينات سائل منوي وروث مأخوذة من نفس الحيوانات في المرة الأولى، فقد كانت نتائج جميع العينات سلبية لوجود أنواع جنس الكلاميديا والكلاميدوفيلا، وتوضح الصورة رقم (2) هذه النتائج. وهذا يدل على أن هذه المحطة خالية من الإصابة.



الصورة رقم (1): نتائج فحص عينات السائل المنوي والروث ، يشير العمود M إلى معلم الوزن الجزيئي (100 bp DNA Ladder)، و تشير الأعمدة 1 حتى 24 إلى عينات سلبية لوجود أنواع الكلاميديا و الكلاميدوفيلا. يشير العمود Cp إلى الشاهد الإيجابي و العمود Cn إلى الشاهد السلبي.



الصورة رقم (2): نتائج فحص عينات السائل المنوي والروث بعد ستة أشهر من الأختبار الأول ، يشير العمود M إلى معلم الوزن الجزيئي(100 bp DNA Ladder)، و تشير الأعمدة 1 حتى 24 إلى عينات سلبية لوجود أنواع الكلاميديا و الكلاميدوفيلا. يشير العمود Cp إلى الشاهد الإيجابي والعمود Cn إلى الشاهد السلبي.

DISCUSSION
المناقشة

يعتبر التلقيح الصناعي وسيلة هامة جداً في التحسين الوراثي وكذلك في حفظ الصفات الوراثية للحيوانات، ولكنه من جهة أخرى قد يساهم في زيادة خطورة انتقال الأحياء الدقيقة الممرضة بما فيها أنواع الكلاميديا. لذلك من الضروري التأكد من خلو السائل المنوي من مسببات الأمراض التي تنتقل جنسياً قبل استخدامه في التلقيح الصناعي.

دلت نتائج هذه الدراسة على أن جميع العينات المختبرة المأخوذة من الثيران والعجول في محطة التلقيح الصناعي كانت خالية من وجود أنواع الكلاميديا والكلاميدوفيلا، ر وقد تم الأعتماد على تقنية PCR في هذه الدراسة للتخلص من مشاكل الاختبارات المصلية التي تعطي نتائج من الصعب مناقشتها بسبب وجود مناعة تصالبية بين المتدثرات وباقي الجراثيم سالبة الغرام حيث أن المستضدات المستخدمة هي سكريات شحمية (Qinn *et al.*,1999) وكذلك فقد أشار (Kauffold *et al.*, 2007) إلى عدم وجود أي ترابط ما بين نتائج الاختبارات المصلية ونتائج الكشف عن المتدثرات في السائل المنوي لنفس الثيران.

وعند مقارنة هذه النتائج مع نتائج الدراسات السابقة، فقد سجلت نسب إصابة أكبر عند الثيران في تلك الأبحاث فقد وجد (Kauffold *et al.*, 2007) أن 9.2% من عينات السائل المنوي و 18% من عينات الروث كانت إيجابية لوجود أنواع الكلاميديا والكلاميدوفيلا، مع ملاحظة أن هذه العينات مأخوذة من ستة حظائر من مناطق مختلفة في ألمانيا. وكذلك فقد وجد (Amin, 2003) أن 15% من عينات السائل المنوي تحوي على مستضدات أنواع الكلاميديا والكلاميدوفيلا وقد يكون السبب في ذلك أن الباحث حصل على عيناته من قطعان معروف أن الإصابة موجودة فيها. أما (Teankum *et al.*, 2007) فقد كشف عن وجودها في 6.6% من العينات ولكن كانت الكلاميديا الخنزيرة والمجهضة والببغائية في خمسة عينات والباقي جراثيم شبيهة الكلاميديا. اعتماداً على ما سبق يمكن أن يعزى سبب الاختلاف في النتائج إلى حالة الثيران التي أخذت منها العينات، نظام وأسلوب الإدارة والتربية، المنطقة الجغرافية. جدير بالذكر بان هذه المحطة هي محطة حكومية وهي الوحيدة من نوعها في سوريا والمخولة بإنتاج وتوزيع السائل المنوي، وتربى فيها فقط ذكور الحيوانات وتتبع فيها إجراءات صحية قياسية من حيث فترات الحجر الصحي والتأكد من سلامة الحيوانات قبل دخولها إلى المحطة.

REFERENCES
المراجع

Amin, A.S. (2003): Comparison of Polymerase Chain Reaction and Cell Culture for the Detection of Chlamydophila species in the Semen of Bulls, Buffalo-bulls, and Rams. The Veterinary Journal, 166: 86–92.

De Graves, F.J.; Kim, T.Y.; Jee, J.B.; Schlapp, T.; Hehnen, H.-R. and Kaltenboeck, B. (2004): Reinfection with Chlamydophila abortus by uterine and indirect cohort routes reduces fertility in cattle preexposed to Chlamydophila. Infect. Immun.,72: 2538–2545.

Everett, K.D.E.; Bush, R.M. and Andersen, A.A. (1999): Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. nov., each containing one monotypic genus of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int. J. System. Bact*., 49: 415–440.

Givens, M.D. and Marley, M.S.D. (2008): Pathogens that cause infertility of bulls or transmission via semen. Theriogenology, 70: 504–507.

Kauffold, J.; Henning, K.; Bachmann, R.; Hotzel, H. and Melzer, F. (2007): The Prevalence of Chlamydiae of Bulls from Six Bull Studs in Germany. Animal Reproduction Science, 102: 111–121.

Kauffold, J.; Melzer, F.; Henning, K.; Schulze, K.; Leiding, C.; Konrad and Sachse, K. (2006): Prevalence of Chlamydiae in Boars and Semen Used for Artificial Insemination Theriogenology, 65 : 1750–1758.

OIE Terrestrial Manual (2008): Enzootic Abortion of Ewes (ovine chlamydiosis). chapter 2-7-7, P: 1013-1020.

Petit, T.; Spergser, J.; Aurich, J. and Rosengarten, R. (2008): Prevalence of Chlamydiaceae and Mollicutes on the genital mucosa and serological findings in dairy cattle. Veterinary Microbiology, 127: 325–333.

Quinn, P.J.; Carter, M.E.; Marky, B.K. and Carter, G.R. (1998): Clinical Veterinary Microbiology, The chlamydiales, p310-315. Wolf Publishing.

*Radostitis, O.M.; Blood, D.C. and Gay, C.C. (1994):*Veterinary Medicine:Diseased caused by Chlamydia Psittaci, p.1143.

Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001): Molecular Cloning: Alabpratory Manual.(3rd Ed) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Storz, J.; Carroll, E.J.; Stephenson, E.H.; Ball, L. and Eugster, A.K. (1976): Urogenital infection and seminal excretion after inoculation of bulls and rams with chlamydiae. Am. J. Vet. Res., 37: 517–520.

Teankum, K.; Pospischil, A.; Janett, F.; Brugnera, E.; Hoelzle, L.E.; Hoelzle, K.; Weilenmann, R.; Zimmermann, D.R.; Gerber, A.; Polkinghorne, A. and Borel, N. (2007): Prevalence of Chlamydiae in Semen and Genital Tracts of Bulls, Rams and Bucks. Theriogenology, 67: 303–310.

Teankum, K.; Pospischil, A.; Janett, F.; Burgi, E.; Brugnera, E.; Hoelzle, K.; Polkinghorne, A.; Weilenmann, R.; Zimmermann, D.R. and Borel, N. (2006): Detection of Chlamydiae in Boar Semen and Genital Tracts. Veterinary Microbiology, 116: 149–157.