مجله دنیای میکروب ها
سال دوم، شماره یک، ۱۳۸۸
صفحات ۲۲ - ۱۹

Original Article

تشخیص مایکوباکتریوم پاراتوبرکیلوسیس به روش Nested PCR در گاوهای شیری مشکوک به بیماری یون

دکتر عباس دوستی*[1]، سعادت مشکلانی[1]

[1]مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد

چکیده

سابقه و هدف: یون یک بیماری مزمن روده ای در نشخوار کنندگان اهلی و وحشی می باشد که عامل ایجاد آن مایکوباکتریوم پاراتوبرکیلوسیس است. این باکتری عامل بیماریزای مشترک بین انسان و دام است که گسترش جهانی دارد و نیازمند روشی مطمئن برای پیشگیری و کنترل می‌باشد. هدف از این پژوهش ارائه روشی سریع و دقیق براساس Nested PCR برای تشخیص مایکوباکتریوم پاراتوبرکیلوسیس در مدفوع گاو می‌باشد.

مواد و روش ها: از تعداد ۱۲۰ نمونه مدفوع گاو های مشکوک به بیماری یون، استخراج DNA صورت گرفت. سپس با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *IS900* واکنش Nested PCR تنظیم و انجام شد. محصولات PCR بدست آمده روی ژل آگارز الکتروفورز گردید.

یافته ها: از مجموع ۱۲۰ نمونه مورد بررسی، ۲۲ مورد (۱۸/۳۳ درصد) به مایکوباکتریوم پاراتوبرکیلوسیس آلوده بودند که در آزمون PCR مثبت تشخیص داده شدند.

نتیجه گیری: تکنیک Nested PCR یکی از روش‌های سریع، مطمئن و کم هزینه برای تشخیص مایکوباکتریوم پاراتوبرکیلوسیس محسوب می‌شود.

واژگان کلیدی: مایکوباکتریوم پاراتوبرکیلوسیس، Nested-PCR، یون، گاو شیری

دریافت مقاله: زمستان ۸۷ پذیرش برای چاپ: بهار ۸۸

مقدمه

مایکوباکتریوم پاراتوبرکیلوسیس عامل بیماری یون یک باکتری اسیدفست می‌باشد (۱و۲). این باکتری موجب ایجاد ضخامت و چین خوردگی مخاط روده نشخوارکنندگان می‌گردد (۳). گزارشاتی مبنی بر ارتباط این باکتری با بیماری کرون در انسان وجود دارد و گسترش جهانی این باکتری ناشی از صادرات دام از کشور های اروپایی به سایر نقاط جهان تشخیص داده شده است (۱، ۲و ۴). راه انتقال باکتری از طریق شیر و مدفوع حیوان آلوده می‌باشد و بهترین برنامه‌ی کنترل این بیماری، حذف دام آلوده است (۳و ۴). هرچند که خسارات ناشی از مرگ و میر در گله های درگیر چندان زیاد نیست (حدود ۱٪ در کل گله) اما به دلیل کاهش تولید، هزینه های گزافی بر اقتصاد جامعه تحمیل می شود (۱). دفع مایکوباکتریوم پاراتوبرکیلوسیس از طریق شیر گاو توسط Taylor و همکاران در سال ۱۹۸۱ گزارش شد (۶). Larsen و همکاران در سال ۱۹۸۱ این باکتری را از اندام های تناسلی و منی گاوهای نر جدا سازی نمودند (۷). در تحقیق دیگر Greig و همکاران در سال ۱۹۹۷ در اسکاتلند مشخص نمودند که ۶۷ درصد خرگوش ها آلوده به این باکتری می باشند (۸). Sweeney و همکاران اولین پژوهشگرانی بودند که در سال ۱۹۹۴ موفق شدند با تکنیک الایزا نسبت به ردیابی و تشخیص این عامل عفونی اقدام کنند. ایشان میزان آلودگی نمونه های شیر دامهای تحت بررسی را تا ۱۵ درصد اعلام نمودند (۹). در سال ۲۰۰۴ Grant و همکاران از روش کشت

*)آدرس برای مکاتبه: شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، صندوق پستی ۱۶۶
پست الکترونیک: Adleishmania@yahoo.com
تلفن: ۰۹۱۳۳۸۳۸۸۳۰

به منظور تشخیص مایکوباکتریوم استفاده کردند (۱۰). با توجه به مشکلات مربوط به روش کشت و جداسازی باکتری از مدفوع و عدم دقت کافی روش های سرولوژیکی به ویژه الایزا، استفاده از روش های مولکولی برای تشخیص این باکتری اهمیت زیادی دارد. هدف از انجام این پژوهش تشخیص بیماری یون از طریق ردیابی مایکوباکتریوم پاراتوبرکیلوسیس به وسیله Nested PCR می باشد.

مواد و روش ها

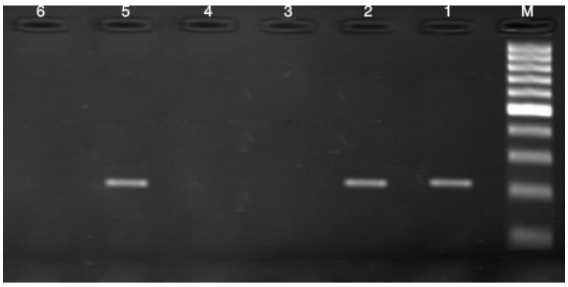
این پژوهش به صورت توصیفی-مقطعی بر روی ۱۲۰ نمونه مدفوع گاوهای مشکوک به بیماری یون (واجد علایم کلینیکی)، در شهرستان شهرکرد انجام شد. به منظور استخراج DNA از کیت استخراج DNA ساخت شرکت سیناژن (DNA Purification DNP^{TM} KIT) استفاده شد. DNA های استخراج شده تا زمان انجام PCR در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. البته با توجه به غلظت بالای عوامل بازدارنده ی PCR در مدفوع، قبل از استخراج DNA، نمونه ها به نسبت ۱ به ۵۰ رقیق سازی شدند. آزمایش Nested-PCR از زوج پرایمر های طراحی شده برای شناسایی ژن IS900 از روشی که به وسیله، De Meneghi در سال ۲۰۰۵ استفاده شد (۳). در تمامی آزمایشات PCR از شاهد مثبت و منفی استفاده شد. به عنوان کنترل مثبت از DNA سویه استاندارد باکتری مذکور استفاده شده است و کنترل منفی دارای کلیه واکنشگر های PCR بجز DNA الگو می باشد که هم حجم آن آب مقطر اضافه می گردد.

PCR مرحله اول: برای انجام مرحله اول PCR از پرایمرهای ISo-1F: 5-GTTCGGGGCCGTCGCTTAGG-3 و ISo-1R: 5-GAGGTCGATCGCCCACGTGA-3 استفاده شد. واکنش گرهای مربوط به PCR مرحله اول در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر با هم مخلوط گردیدند. این مخلوط شامل ۲/۵ میکرولیتر از DNA ی الگو، ۰/۲ میکرومول از هر پرایمر، ۲۰۰ میکرومول dNTP Mix، ۱/۵ میکرومول $MgCl_2$ و ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR و ۲/۵ واحد از آنزیم Taq DNA Polymerase که همگی از شرکت سیناژن ایران تهیه شده اند، می‌باشد. سپس ۲۰ میکرولیتر روغن معدنی استریل برای جلوگیری از آلودگی و تبخیر، به مخلوط واکنش PCR اضافه گردید. واکنش گرهای PCR روی یخ با هم مخلوط شد و بلافاصله نمونه ها در دستگاه ترموسایکلر (Mastercycler Gradient, Eppendorf, Germany) قرار داده شدند و برنامه ی حرارتی مورد استفاده شامل: ۹۵ درجه سانتی گراد ۵ دقیقه، سپس ۳۰ چرخه دمایی به ترتیب ۹۴ درجه سانتی گراد ۱ دقیقه، ۵۸ درجه سانتی گراد ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی گراد ۱ دقیقه و یک مرحله نهایی ۷۲ درجه سانتی گراد ۵ دقیقه تنظیم گردید.

PCR مرحله دوم: برای انجام مرحله دوم PCR از پرایمرهای ISi-2F: 5-CCGCTAATTGAGAGATGCGATTGG-3 و ISi-2R: 5-AATCAACTCCAGCAGCGCGGCCTCG-3 استفاده شد. در این مرحله همه شرایط مانند مخلوط واکنش گرهای PCR و برنامه زمانی و دمایی مطابق مرحله اول بود با این تفاوت که DNA الگوی مورد استفاده شامل ۲/۵ میکرولیتر از محصول PCR مرحله اول می باشد که به نسبت ۱ به ۱۰۰ رقیق می گردد و به مخلوط واکنش اضافه می شود. سپس محصولات PCR با ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز گردید و توسط اتیدیوم برماید رنگ آمیزی شد و با استفاده از نور UV مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج

کیفیت DNA های استخراج شده پس از الکتروفورز روی ژل آگارز، مشاهده و مورد تایید قرار گرفت و برای انجام Nested-PCR مناسب تشخیص داده شد. از ۱۲۰ نمونه مورد مطالعه با روش PCR، در ۲۲ نمونه (۱۸/۳۳٪) باند ۲۳۰ جفت بازی مشاهده شد (شکل ۱). با توجه به استفاده از کنترل مثبت و منفی در تمامی مراحل آزمون‌های انجام شده لذا نمونه‌هایی که به این روش، از لحاظ حضور مایکوباکتریوم پاراتوبرکیلوسیس مثبت گزارش شدند، از دقت کافی با ارزش تشخیصی و کاربردی برخوردارند.



شکل ۱- نتایج حاصل از Nested PCR برای تشخیص مایکوباکتریوم پاراتوبرکیلوسیس. M سایز مارکر (bp)۱۰۰، شماره‌های ۱و۲ نمونه‌های آلوده و شماره‌های ۳و۴ نمونه های منفی می‌باشند. شماره ۵ و۶ به ترتیب کنترل مثبت و منفی می‌باشد.

بحث

موفقیت برنامه های کنترل بیماری یون به وجود یک روش تشخیصی سریع و دقیق نیاز دارد که بوسیله آن بتوان حیوانات ناقل این عامل عفونی را تشخیص و کنترل نمود. با وجود ابداع روش‌های گوناگون تشخیص مایکوباکتریوم پاراتوبرکیلوسیس، در حیوانات، اما بکارگیری بسیاری از این تکنیک ها مستلزم صرف وقت و هزینه های گزافی می‌باشد. با کشف واکنش زنجیره‌ای پلیمراز محققان نسبت به بکارگیری این روش ارزشمند در تشخیص عوامل عفونی، به ویژه میکروارگانیسم‌های غیر قابل کشت و یا دیر رشد تشویق شدند. مایکوباکتریوم پاراتوبرکیلوسیس که عامل بیماری یون در دام ها می‌باشد، به علت بیماریزایی مشترک بین انسان و حیوان و خسارات ناشی از کاهش تولید در گله های درگیر از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد.

Nebbia و همکاران در سال ۲۰۰۶ با استفاده از تکنیک Nested-PCR اقدام به تشخیص مولکولی مایکوباکتریوم در شیر گوسفند و بز نمودند. نتایج تحقیقات این محققان نشان داد، که در دام های آلوده و دارای باکتری (سرم مثبت) در ۹ راس از ۱۵ راس دام با روش PCR آلوده تشخیص داده شدند و در دام‌هایی که نسبت به این عامل عفونی سرم منفی بودند، ۴ مورد از بین ۱۴ مورد مثبت تشخیص داده شدند (۳). همچنین روش جدید PCR توسط محققین دیگری با روش رنگ آمیزی طلا و نقره مورد مقایسه قرار گرفت و نتایج آن نشان دهنده حساسیت کمتر روش رنگ آمیزی طلا و نقره نسبت به روش PCR در تشخیص عامل بیماری یون بود (۱۱).

برخی از پژوهش های صورت گرفته در سال های اخیر نشان داده است که روش PCR ساده و یک مرحله ای در برخی از موارد قادر به تشخیص دقیق عامل عفونی مایکوباکتریوم پاراتوبرکیلوسیس به ویژه در شرایط مقدار کم DNA الگو نیست. به همین دلیل برای تشخیص این عامل عفونی در این تحقیق از روش مطمئن تر و حساس‌تر Nested-PCR به دلیل توانایی جستجو و تکثیر مقادیر بسیار اندک DNA، استفاده شد. از طرفی تشخیص مایکوباکتریوم پاراتوبرکیلوسیس در مدفوع از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. زیرا مهمترین راه انتشار این باکتری، پخش مدفوع حیوانات آلوده در محیط می باشد. یکی از مزایای روش بکار رفته در این مطالعه این است که، به صورت مستقیم و بدون نیاز به کشت و یا اطلاع از وضعیت بالینی و کلینیکی دام می‌توان به بررسی نمونه های مدفوعی گرفته شده از دام پرداخت و با اطمینان زیادی سلامت و یا آلودگی دام مربوطه را نسبت به مایکوباکتریوم پاراتوبرکیلوسیس گزارش نمود. با توجه به اینکه حیوان آلوده علائم بالینی خاصی از خود بروز نمی‌دهد و به دلیل بقای مایکوباکتریوم پاراتوبرکیلوسیس در طول پاستوریزاسیون (۵)، لذا تشخیص سریع و دقیق این باکتری با استفاده از روش Nested-PCR اهمیت زیادی دارد.

نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق حاضر نمایانگر توانایی و دقت آزمایش طراحی شده برای تشخیص و تکثیر مناسب ژن *IS900* در مخلوط واکنش می باشد. به دلیل آن که ژنوم مایکوباکتریوم پاراتوبرکیلوسیس دارای ۱۰کپی از ژن *IS900* می باشد لذا تکثیر ژن مذکور با PCR توان تشخیص بیماری یون را حتی در مراحل اولیه بیماری که تعداد میکروارگانیسم ها ناچیز است دارا می باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد به دلیل حمایت‌های مالی و اجرایی کمال امتنان را دارند.

References

1. Donaghy, J.A. Totton, N.L. and Rowe, M.T. Evaluation of culture media for the recovery of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from Cheddar cheese. Letters in Applied Microbiology, 2003;37(4):285-291.
2. Vannuffel, P.C. Dieterich, B. Naerhuyzen, P. Gilot, M. Coene, R. Fiasse, and C. and Cocito.. Occurrence, in Crohn's disease, of antibodies directed against a species-specific recombinant polypeptide of *Mycobacterium paratuberculosis*. clinical and diagnostic laboratory immunology, 1994;1:241-243.
3. De Meneghi, D. Nebbia, P. Robino, P. and Zoppi, S. detection and excretion pattern of *Mycobacterium avian* subspecies *paratuberculosis* of milk of asymptomatic sheep and goats by nested-PCR. ScienceDirect, 2006;66:116-120.
4. Kalis, C.H.J. Hesselink, J.W. Russchen, E.W. Barkema, H.W. Collins, M.T. and Visser, I.J.R.. Factors influencing the isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from bovine fecal samples. The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 1999;11:345-351.
5. Collins, M. and Michael, T. *Mycobacterium paratuberculosis*: A potential food-borne pathogen? Journal of Dairy Science. Dec., 1997;80(12):3445-3448.
6. Taylor, T.K. Wilks, C.R. and McQueen, D.S. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from the milk of a cow with Johnse's disease. Veterinary Record, 1981;109:534-533.
7. Larsen, A.B. Stalheim, H.V. Hughes, D.E. Appell, L.H. Richards, W.D. and Himes, E.M. *Mycobacterium paratuberculosis* in semen and genital organs of a semendonor bull. Journal of the American veterinary medical Association, 1981;179:169-171.
8. Greig, A. Stevenson, K. Perez, V. Pirie, A.A. Grant, J.M. and Sharp, J.M. paratuberculosis in wild rabbits. Veterinary Record, 1997;140:141-143.
9. Sweeney R.W. Whitlock, R.H., Rosenberger, and A.E: *Mycobacterium paratuberculosis* cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows. Journal of Clinical Microbiology, 1992;30:166-171.
10. Grant, I.R. and Rowe, M.T: Effect of chemical decontamination and refrigerated storage on the isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from heat-treated milk. Letters in Applied Microbiology, 2004;38:283-288.
11. Whitlock, R.H. Rosenberger, and A.E: Fecal culture protocol for *Mycobacterium paratuberculosis*: a recommended procedure. Proc 94th Annu Meet US Anim Health Assoc, Denver, 1990;12(6):280-285.

Journal of Microbial World
Volume 2, No. 1, 2009

Detection of *Mycobacterium paratuberculosis* by Nested PCR in dairy cattles suspected to john's disease

Abbas Doosti[1], Saadat Moshkelani[1]

[1]Biotechnology Research Center, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran

Abstract

Backgorund and Objectives: Johne's disease is a chronic intestinal disease of domestic and wild ruminants that is caused by *Mycobacterium paratuberculosis*. So that *Mycobacterium paratuberculosis* is a widespread zoonotic disease. It is necessary to prevent it and the elimination of its agent needs the attention of corresponding managers. The aim of this study is based on the use of Nested PCR as an accurate and rapid method to detection of *Mycobacterium paratuberculosis* bovine feces.

Material and Methods: Fecal samples from 120 dairy cattle were collected and DNA extraction was performed from the samples. Then, samples were evaluated with specific primers for the *Mycobacterium paratuberculosis*-specific IS900 gene by Nested-PCR assay. Finally, PCR products were electrophoresis on agarose gel.

Results: In total, from 120 samples were enrolled in this study, 22 specimen (18.33%) were found positive on the basis of Nested-PCR analysis.

Conclusion: Nested PCR technique is considered as a fast, reliable and affordable assay to detect *Mycobacterium paratuberculosis.*

Keywords: Mycobacterium paratuberculosis, Nested-PCR, John's disease, Dairy cattles

Correspondence to: Abbas Doosti
Tel: (+98)9133838830
Email: adleishmania@yahoo.com
Journal of Microbial World 2009, 2(1), 19-22