مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۸۹، دوره ۶۵، شماره ۲، ۱۴۰-۱۳۵

شناسایی مایکوباکتریوم آویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس در نمونه‌های مدفوع گاوهای نژاد هلشتاین- فریزین با استفاده از روش‌های کشت و مولکولی

سید محمد سیدین[۱*] حسن تاجبخش[۲] تقی زهرایی صالحی[۲]

۱) موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه مشهد، مشهد- ایران.

۲) گروه میکرو بیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران- ایران.

(دریافت مقاله: ۲۹ دی ماه ۱۳۸۷، پذیرش نهایی: ۱۷ شهریور ماه ۱۳۸۸)

چکیده

مایکوباکتریوم آویوم تحت‌گونه پاراتوبرکلوزیس که به اختصار مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس نامیده می‌شود، عامل بیماری یون است. بیماری یون یا پاراتوبرکلوزیس نوعی التهاب روده مزمن و پیشرونده است که حیوانات اهلی و وحشی، وعمدتا نشخوارکنندگان به‌آن مبتلا می‌شوند. هدف اصلی این مطالعه شناسایی اشکال تحت بالینی بیماری یون است، که با دو روش کشت و مولکولی روی نمونه های مدفوع گاوهای نژاد هلشتاین فریزین استان خراسان رضوی انجام‌گرفت. از دام های با و بدون علائم بالینی یون بترتیب ۱۶ و ۱۰۳ نمونه مدفوع گرفته‌شد. علاوه بر روش Nested PCR مستقیم مدفوع، نمونه ها بر روی محیط های هررولد (Herrold's Media) فاقد و دارای مایکوباکتین جی کشت داده‌شدند. از میان نمونه‌های مدفوع دام‌های دارای علائم بالینی، (۸۱/۳درصد) ۱۳ و (۸۷/۵درصد) ۱۴ نمونه به ترتیب با روش‌های کشت و مولکولی مثبت تشخیص داده‌شدند. در حالی که بررسی نمونه‌های مدفوع دام‌های فاقد علائم بالینی نشان داد که (۱۱/۷درصد) ۱۲ و (۹/۷درصد) ۱۰ نمونه به ترتیب با روش‌های کشت و مولکولی مثبت می‌باشند. با توجه به نتایج حاصله پیشنهاد می‌گردد، ابتدا میزان شیوع آلودگی به پاراتوبرکلوزیس درگاوهای منطقه تعیین‌گردیده وسپس برنامه‌های کنترلی بر اساس میزان شیوع اجراشود.

واژه‌های کلیدی: شناسایی، مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس، مدفوع، PCR، کشت.

مقدمه

مایکوباکتریوم آویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس: عامل بیماری یون است که به اختصار مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس نامیده می‌شود(۱۶). بیماری یون یا پاراتوبرکلوزیس نوعی التهاب روده شدید، مزمن و پیشرونده است که حیوانات اهلی و وحشی و عمدتاً نشخوارکنندگان به‌آن مبتلا می‌شوند(۱۸). پاراتوبرکلوزیس را نمی‌توان با تشخیص‌ها و آزمایش‌های ظاهری روده مانند افزایش ضخامت آن مورد شناسایی قرارداد. تشخیص قطعی بیماری با انجام ترکیبی از تشخیص بالینی، آزمون‌های میکروسکوپیک، باکتریولوژیک، سرولوژیک، و آزمون‌های مولکولی امکانپذیر است. در مقایسه با سایر روش‌ها منابع معتبر، کشت مدفوع را به عنوان استاندارد مرجع standard Gold تشخیصی این باکتری معرفی می‌نمایند(۱۲،۱۴). از آنجا که دوره کمون بیماری یون در گاو بسیار طولانی است و در طی این زمان حیوانات آلوده تعداد بسیار زیادی باکتری عامل یون را دفع می‌نمایند و موجب آلودگی محیط می‌شوند، بنابراین کنترل بیماری یون بدون در نظرگرفتن آزمونی که بتواند ناقلین بدون علائم بالینی یون (تحت با لینی) را شناسایی کند، امکانپذیر نیست(۲،۳،۱۴). آزمون‌های ایمونولوژیک اگرچه برای غربالگری بیماری یون در گله مناسب، ارزانتر و سریع تر از سایر روش‌ها می‌باشند، ولی بدلیل آنکه ظهور آنتی بادی‌ها در بیماری یون دیر رس می‌باشد، این‌گونه آزمون‌ها حساسیت لازم را برای تشخیص اشکال تحت بالینی بیماری یون ندارند. درگذشته از آزمون‌های جلدی یونین و توبرکولین مرغی برای تشخیص پاراتوبرکلوزیس استفاده می‌شد ولی در حال حاضر به علت عدم حساسیت و ویژگی کافی مورد استفاده قرار نمی‌گیرند. به علت پروتئین‌های PPD مشترک در انواع مایکوباکتری‌ها، ممکن است در نتایج آزمون اینترفرون گاما نیز واکنش مثبت کاذب مشاهده شود. آزمون میکروسکوپیک مستقیم مدفوع روش سریع و ارزانی است، با این‌حال ویژگی و حساسیت این آزمون همیشه مورد شک و تردید بوده است و روش قابل اطمینانی برای ردیابی و شناسایی مایکو باکتریوم پاراتوبرکلوزیس در مدفوع گاو نیست(۱۲،۱۵). اگرچه ممکن است تکنیک‌های آمپلیفیکاسیون اسید نوکلئیک که به واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) شهرت دارند، به علت ممانعت کننده‌های داخل مدفوع روش مناسبی برای تشخیص مراحل اولیه بیماری یون نباشند، ولی با این وجود این روش‌ها سریع هستند و قابلیت شناسایی اشکال اسفرو بلاستی باکتری عامل پاراتوبرکلوزیس را نیز دارند. ردیف جایگزینی IS900 اختصاصی مایکوباکتریوم پاراتوبرکولوزیس است که ۱۴ تا ۱۸ کپی از آن داخل ژنوم این باکتری وجود دارد(۵). مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس باکتری سخت رشدی است که به آهستگی رشد می‌نماید. این باکتری مشابه همه مایکوباکتری‌ها زمانی روی محیط آزمایشگاهی رشد می‌نماید که مواد رشد مورد نیاز باکتری به محیط کشت اضافه شده باشد(۴،۵). تا کنون با روش‌ها و محیط‌های مختلف کشت، جداسازی مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس از شیر خام و پاستوریزه، آب پنیر، پنیر، خون، انواع آب‌ها، مدفوع... انجام شده است(۶،۷،۹،۱۳). در این میان آزمون کشت مدفوع، آزمون تشخیصی با ارزشی است که به عنوان معتبر ترین شاخص تشخیص عفونت در گاوهای زنده شناخته می‌شود. برتری عمده کشت مدفوع اینست که می‌تواند شش ماه و یا حتی ۱ تا ۳ سال قبل از ظهور

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۰۵۱۱-۸۴۳۱۷۸۰ نمابر: ۰۵۱۱-۸۴۲۰۴۳۰ Email: m.seyyedin@rvsri.ir

عفونت و آشکار شدن علائم بالینی، گاوهای آلوده را شناسایی و تشخیص دهد. ویژگی این آزمون حدود ۱۰۰درصد است، ولی تخمین میزان حساسیت آن مسئله‌ای پیچیده و دشوار است، با اینحال عموما" حساسیت حدود ۵۰درصد برای این آزمون قابل قبول است. حساسیت تا ۸۷/۷ درصد نیز برای این آزمون گزارش شده است که قطعا" این موضوع وابسته به مرحله بیماری و میزان دفع باکتری از مدفوع است(۵). هدف اصلی این مطالعه تائید پاراکلنیکی بیماری یون، و شناسایی اشکال تحت بالینی این بیماری در دامداری‌های تحت مطالعه بود. همچنین از باکتری‌های جدا شده برای ژنوتایپینگ و بررسی اپیدمیولوژی مولکولی در مطالعات آینده استفاده خواهد شد.

مواد و روش کار

نمونه‌گیری: تمامی نمونه‌های مدفوع درون ظرف‌های در پیچ داری که از قبل شسته، استریل و شماره گذاری شده بود، جمع آوری شدند. تعداد ۱۱۹ نمونه مدفوع به‌طور مستقیم و با تخریش مخاط از رکتوم حیوانات تحت مطالعه گرفته شد. اغلب نمونه‌ها از گاوهایی گرفته شد که فاقد علائم بیماری بودند. ۱۶ نمونه از گاوهایی گرفته شدکه بخوبی علائم بالینی بیماری یون را نشان می‌دادند و ۱۰۳ نمونه مابقی به لاور تصادفی از دام‌هایی گرفته شد که در زمان اخذ نمونه فاقد علائم بالینی بوده‌اند. تعداد ۵۳ نمونه از ۱۰۳ نمونه فوق مربوط به گاوهایی بود که در زمان نمونه‌گیری و بطور همزمان در دامداری تحت مطالعه، گاو بیمار دارای علائم بالینی وجود داشت (دام‌های مجاور با دام دارای علائم بالینی) و ۵۰ نمونه از حیواناتی گرفته شد که در زمان نمونه‌گیری در مجاورت آن‌ها دام بیماری وجود نداشت. کلیه نمونه‌ها بعد از جمع آوری در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل شده و ۱۰ گرم از هر نمونه تا زمان کشت باکتری حدوداً بمدت ۳ ماه در دردمای ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

کشت باکتریایی: برابر دستورالعمل پیشنهادی OIE یک گرم از هر نمونه مدفوع بداخل یک لوله آزمایش (تیوب) ۵۰ میلی لیتری حاوی ۲۰ میلی لیتر آب مقطر استریل منتقل گردید، سپس لوله حاوی مدفوع در دمای آزمایشگاه بمدت ۳۰ دقیقه روی شیکر قرار داده شد. بعد از شیکر لوله‌های آزمایش بمدت ۳۰ دقیقه بدون حرکت رها شدند تا قطعات بزرگتر محیط رسوب نمایند. پس از طی زمان فوق، ۵ میلی لیتر از مایع بالایی بداخل یک تیوب ۵۰ میلی لیتری حاوی ۲۰ میلی لیتر هگزا دیسیل پیریدینیوم کلراید (HPC) chloride Hexadecylpyridinium ۷۵/. درصد ریخته شد. جهت اطمینان از مخلوط شدن کامل نمونه‌ها، چندین بار تیوب‌ها به آرامی واژگون شدند تا اطمینان حاصل شود که دو نمونه مایع بخوبی مخلوط شده‌اند. نمونه‌ها بمدت ۱۸ تا ۲۰ ساعت بدون حرکت در دمای آزمایشگاه قرار داده شدند. بعد از طی زمان فوق، مایع رویی دور ریخته شد و حدود ۱۰۰ تا ۱۵۰ مایکرولیتر از رسوب کف هر نمونه بداخل ۴ محیط کشت هرولد انتقال داده شد، سه تا از این محیط‌ها حاوی مایکوباکتین جی و یکی فاقد مایکوباکتین بود. محیط‌های کشت داده شده بمدت ۲۰ هفته در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شد و بعد از ۶ هفته، به لاور هفتگی مورد بررسی قرار گرفتند.

مورفورولوژی پرگنه‌ها: تمام باکتری‌های جدا شده از روی محیط هرولد حاوی مایکوباکتین جی با توجه به شکل پرگنه و رنگ آمیزی اسید پایدار مورد بررسی قرار گرفتند.

استخراج DNA: استخراج DNA با روش جوشاندن و انجماد از باکتری‌های جدا شده تعدادی از پرگنه‌های باکتریایی روی هر یک از محیط‌های کشت حاوی مایکوباکتین جی برداشته شد و با ۲۵۰ مایکرولیتر آب مقطر استریل مخلوط گردید. سپس از محلول TE - Trinton 100 x با حجم برابر به سوسپانسیون فوق اضافه شد. بعد از انجام مرحله فوق سوسپانسیون موجود سه مرتبه و هر بار بمدت ۵ دقیقه به نوبت داخل آب جوش و از ت مایع قرار داده شد. بعد از این مرحله ۴۵۰ مایکرولیتر از گوانیدین ایزو تیوسیانات و ۲۵۰ مایکرولیتر از آمونیوم استات با pH=۶/۵ به سوسپانسیون فوق اضافه گردید و لوله‌های حاوی سوسپانسیون بمدت ۱۵ دقیقه داخل یخ قرار داده شد. پس از این مرحله مقدار ۵۰۰ مایکرولیتر کلروفرم -اکتانول (۱:۲۴) به سوسپانسیون افزوده شد و با چند بار معکوس کردن مخلوط شد. در مرحله بعدی سوسپانسیون حاوی کلروفرم - اکتانول بمدت ۵ دقیقه با دور ۹۶۰۰ g سانتریفیوژ گردید و فاز بالایی بداخل یک میکروتیوب جدید منتقل و این مرحله مجددا" تکرار شد. در مرحله بعدی DNA با ایزوپروپانل رسوب داده شد و سپس ۲ مرتبه با اتانول ۷۰ درصد شستشو داده شد. رسوب ایجاد شده در معرض هوا خشک گردید و سپس در ۱۰۰ مایکرولیتر آب دیونیزه حل شد(۱۱).

استخراج DNA از نمونه‌های مدفوع: یک گرم از نمونه مدفوع در ۲۰ میلی لیتر محلول ۵ درصد SDS بمدت ۳۰ ثانیه بخوبی همزده و مخلوط شد. سپس بمدت ۱۵ دقیقه اجازه داده شد تا مواد درون مدفوع رسوب نمایند، بعد از طی زمان فوق مایع بالایی رسوب بداخل یک لوله آزمایش ۱۵ میلی لیتری منتقل گردید و سه مرتبه با PBS شستشو داده شد. رسوب‌های حاصله در ۲ میلی لیتر PBS حل گردید و بعد از آن بداخل یک میکروتیوب در پیچ دار منتقل شد. سوسپانسیون حاصل با دور ۹۶۰۰g سانتریفیوژ شده و رسوب ایجاد شده در ۵۰۰ مایکرولیتر TE - Trinton 100 x حل گردید. سایر مراحل مشابه روش فوق است(۱۱).

آزمون Nested PCR: آزمون Nested PCR برای تشخیص مستقیم پاراتوبرکلوزیس از نمونه‌های مدفوع و همچنین تائید باکتری‌های جدا شده از سطح محیط هرولد حاوی مایکوباکتین جی با کمی تغییرات بر اساس گزارش جوزف ارومی Joseph Erume با کمی تغییرات انجام شد(۱۰). حجم نهایی مواد لازم برای آزمون Nested PCR ۵۰ مایکرولیتر در نظر گرفته شد، که شامل مقادیر ذیل است. مقدار ۵ مایکرولیتر از نمونه DNA با ۴۵ مایکرولیتر بافر شامل ۶۷ میلی‌مول Tris-HCl, pH 8.8، ۲ میلی‌مول MgCl2، ۱۰۰ مایکرولیتر از هر یک داکسی ریبونوکلئوتید تری فسفات‌های dGTP dTTP dATP dCTP، ۱ مایکرولیتر از هر یک از الیگونوکلئوتید پرایمرها، ۲/۵ واحد آنزیم پلیمراز Tag، داخل یک میکروتیوب اپندورف ۰/۵ میلی لیتری ریخته شد. هر یک از میکروتیوب‌های حاوی نمونه داخل یک ترموسایکلر gradient

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده در آزمون Nested PCR مربوط به ردیف نوکلئوتیدی IS900 منبع ۱۲.

نام پرایمر	ردیف نوکلئوتیدی پرایمر	طول قطعه تکثیرشده
Para 1	5- TGA TCT GGA CAA TGA CGG TTA CGG A -3	563 bp
Para 2	5- CGC GGC ACG GCT CTT GTT- 3	
Para 3	5- GCC GCG CTG CTG GAG TTG A -3	210 bp
Para 4	5- AGC GTC TTT GGC GTC GGT CTT G -3	

جدول ۲- تعداد لوله‌های مثبت کشت داده شده به همراه تعداد پرگنه‌های مربوط به آن‌ها.

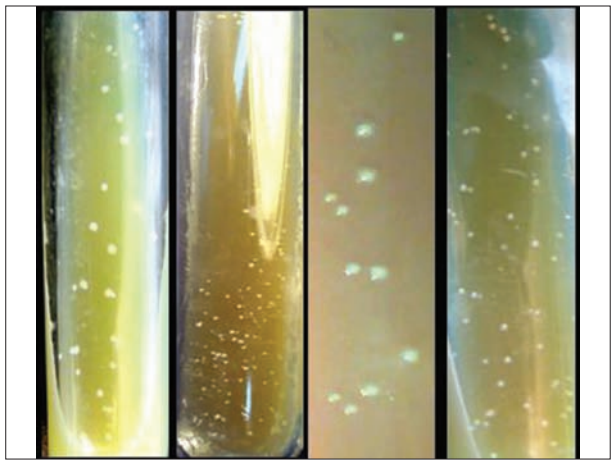
نمونه مدفوع	تعداد لوله‌های مثبت		
تعداد پرگنه‌ها	گاوهای با علائم بالینی	گاوهای بدون علائم بالینی	
		(مجاور)	(غیرمجاور)
(۱۱-۵۰)	-	۱۱	۱
(۵۱-۱۰۰)	۲۱	-	-
(۱۰۱-۲۵۰)	۱۲	-	-
جمع	۳۳	۱۱	۱

Eppendorf Mastercycler قرار داده شدند. سیکل‌ها و دمای لازم شامل ۵ دقیقه در دمای ۹۴، ۳۰ درجه سانتیگراد سیکل در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد با مدت زمان ۱ دقیقه، ۱ دقیقه در دمای ۵۸ درجه سانتیگراد، و نهایتا "۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد در نظر گرفته شدند. آزمایش Nested PCR با پرایمرهای جدول ۱ انجام شد. آزمون PCR اول با پرایمرهای para1 و para4 مربوط به ناحیه‌ای از ردیف جایگزینی IS900 منجر به تولید فرآورده bp ۵۶۳ شد. برای انجام آمپلیفیکاسیون Amplification بعدی، مقدار ۵ مایکرولیتر از محصول آزمایش PCR اول بداخل میکروتیوب‌های جدید حاوی مواد یکسان با آزمایش اول ریخته شد، با این استثناء که اینبار به جای پرایمرهای para1 و para4، یک مایکرولیتر از هریک از پرایمرهای para 2 و para3 داخل میکروتیوب‌های جدید ریخته شد. در این آزمون از DNA مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس سویه 316F به عنوان کنترل مثبت و از بافر استریل به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

الکتروفوروزیس با ژل آگاروز: هر یک محصولات PCR دوم داخل ژل آگاورز ۱/۲ درصد حاوی ۰/۰۵ درصد اتیدیوم بروماید قرار داده شدند، و با یک دستگاه ترانس ایلومیناتور اولتراویوله UV-light transilluminator مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج

نمونه‌هایی مثبت در نظر گرفته شدند، که باکتری مایکوباکتریوم پاراتوبر کلوزیس فقط روی محیط‌های کشت هررولد حاوی مایکوباکتین جی رشد کرده بود. نمونه‌هایی منفی در نظر گرفته شدند، که در پایان ۲۰ هفته روی هیچیک از محیط‌های کشت رشدی مشاهده نشد، و یا روی هر دو نوع محیط هررولد حاوی مایکوباکتین جی و فاقد مایکوباکتین جی باکتری رشد کرده بود. بعلاوه تمامی باکتری جدا شده با توجه به مدت زمان کشت طولانی، مورفولوژی پرگنه، رنگ آمیزی اسیدفاست، و آزمایش Nested PCR-IS900 مورد شناسایی و تائید قرار گرفتند.



تصویر ۱- پرگنه‌های مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس روی محیط هررولد حاوی مایکوباکتین جی.

مورفولوژی پرگنه باکتری‌های جدا شده: امکان مشاهده پرگنه‌های مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس روی محیط هررولد حاوی مایکوباکتین جی از هفته نهم به بعد فراهم گردید. پرگنه‌ها در ابتدا کوچک و به شکل سرسوزنی مشاهده شدند که حدود یک میلیمتر قطر داشتند ولی بتدریج به قطر آن‌ها افزوده می‌شد (۲ تا ۳ میلیمتر). پرگنه‌ها به شکل نیمکره، نیمه شفاف یا مات، سطح آن‌ها درخشان، صاف تا اندکی خشن و برنگ زرد کمرنگ مایل به سفید دیده می‌شدند. تمام باکتری‌های جدا شده از روی محیط هررولد حاوی مایکوباکتین جی با توجه به شکل پرگنه و رنگ آمیزی اسید پایدار مورد تائید قرار گرفتند (تصویر ۱).

میزان تولید پرگنه در محیط‌های کشت: میزان تولید پرگنه در محیط‌های کشت مذکور بین ۱۱ تا ۲۵۰ پرگنه متفاوت بود. بیشترین تعداد پرگنه در نمونه‌های دارای علائم بالینی و کمترین تعداد پرگنه در نمونه‌های دام‌های بدون علائم بالینی (تحت بالینی) مشاهده شد (جدول ۲).

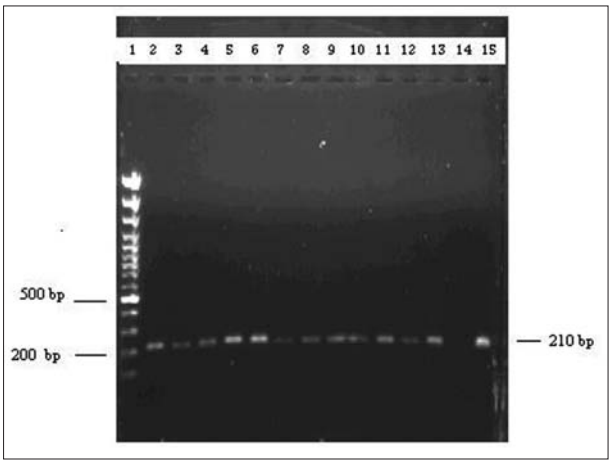
نتایج کشت باکتریایی: از میان ۱۶ نمونه مدفوع گاوهای دارای علائم بالینی، ۱۳ مورد (۸۱/۳ درصد)، پس از کشت مثبت شد. از ۱۰۳ نمونه مدفوع گاوهای فاقد علائم بیماری یون، تنها ۱۲ مورد (۴/۱ درصد) مثبت شدند، و این در حالی است که از این تعداد ۱۱ مورد (۲۰/۸ درصد) مربوط به گاوهایی بود که در مجاورت (تماس) با گاو مبتلا به شکل بالینی یون بودند و تنها ۱ مورد (۲ درصد) مربوط به گروه غیر مجاور بود (جدول ۳).

نتایج آزمون Nested PCR باکتری‌هایی که روی محیط هررولد حاوی مایکوباکتین رشد کرده بودند.

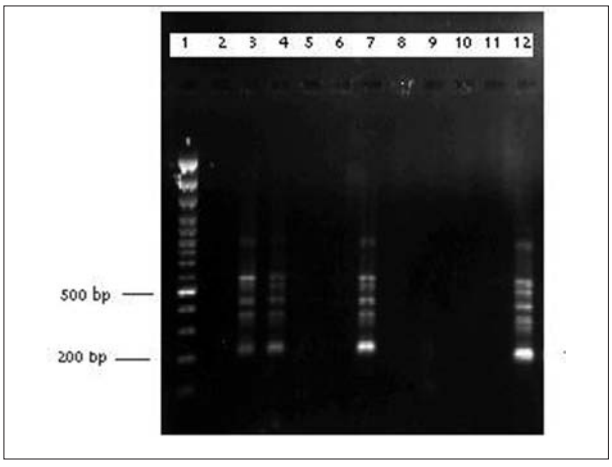
برای تائید مولکولی باکتری‌های رشد کرده روی محیط هررولد حاوی مایکوباکتین جی، تعدادی از هریک از این پرگنه‌ها با آزمون Nested PCR مورد بررسی و تائید قرار گرفتند. تمامی باکتری‌هایی که فقط روی محیط هررولد حاوی مایکوباکتین رشد کرده بودند، آزمون PCR آن‌ها مثبت شد. محصول نهایی PCR یا آمپلیفیکاسیون دوم قطعه ۲۱۰ بازی مربوط به ردیف نوکلئوتیدی IS900 بود، که در شکل ـ ۲ نشان داده شده است.

جدول۳- نتایج کشت باکتریایی و Nested PCR نمونه‌های مدفوع گاوهای با و بدون علائم بالینی بیماری یون.

نمونه مدفوع		مثبت				منفی				جمع	
		کشت		Nested PCR		کشت		Nested PCR		کشت Nested PCR	
		تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
با علائم بالینی		۱۳	۸۱/۳	۱۴	۸۷/۵	۳	۱۸/۷	۲	۱۲/۵	۱۶	۱۰۰
بدون علائم بالینی	مجاور	۱۱	۲۰/۸	۱۰	۱۸/۹	۴۲	۷۹/۲	۴۳	۸۱/۱	۵۳	۱۰۰
	غیرمجاور	۱	۲	-	-	۴۹	۹۸	۵۰	۱۰۰	۵۰	۱۰۰
جمع		۲۵	-	۲۳		۹۴	-	۹۵	-	۱۱۹	-



تصویر۲- نتایج آزمون PCR تعدادی از سویه‌های جدا شده از سطح محیط هررولد. مسیر اول حرکت Ladder . از مسیر دوم تا سیزدهم باندهایی با وزن مولکولی bp ۲۱۰ مربوط به تعدادی از نمونه‌های مثبت برداشت شده از محیط هررولد. مسیرچهاردهم مربوط به کنترل منفی و مسیر پانزدهم مربوط به کنترل مثبت (مایکو باکتریوم پاراتوبرکلوزیس *316F ATCC*).



تصویر۳ - نتایج آزمون PCR Nested مستقیم مدفوع تعدادی از نمونه‌های مدفوع. مسیر اول حرکت Ladder . مسیرهای سوم، چهارم و هفتم نمونه‌های مثبت با ایجاد باندهایی به وزن ۲۱۰ جفت باز و مسیرهای دوم، پنجم، ششم، هشتم تا دهم نمونه‌های منفی، مسیر یازدهم نمونه کنترل منفی و مسیر دوازدهم مسیر کنترل مثبت (مایکو باکتریوم پاراتوبرکلوزیس *316F ATCC*).

نتایج Nested PCR مستقیم مدفوع: از میان ۱۶ نمونه مدفوع گاوهای دارای علائم بالینی، ۱۴ مورد (۸۱/۳ درصد) پس از کشت مثبت شد. دو نمونه از این نمونه‌ها که آزمون کشت آن منفی شده بود، آزمون Nested PCR آن مثبت شد و از طرف دیگر یک نمونه از نمونه‌هایی که آزمون کشت آن مثبت شده بود، آزمون PCR آن منفی شد. از ۱۰۳ نمونه مدفوع گاوهای فاقد علائم بیماری یون، ۱۰ مورد (۱۸/۹ درصد) مربوط به گروه مجاور با دام دارای علائم بالینی مثبت شدند، از این تعداد ۷ نمونه مشترک با نمونه‌های مثبت کشت باکتریایی بود و سه نمونه که آزمون کشت باکتریایی آن منفی شده بود، آزمون PCR آن‌ها مثبت شد. و هیچکدام از ۵۰ نمونه گروه غیرمجاور مثبت تشخیص داده نشدند (جدول۲). نتایج منفی و مثبت آزمون PCR تعدادی از نمونه‌های مدفوع و محصول PCR دوم که قطعه‌ای ۲۱۰ جفت بازی مربوط به ردیف نوکلئوتیدی IS900 بود، در تصویر ۳ نشان داده شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

سالیان متمادی است که حضور بیماری یون در ایران تائید شده است و خسارات جبران ناپذیری به صنعت دامپروری و تولیدات دامی کشور ما وارد می‌سازد(۱۱). علیرغم این‌که در دنیا مطالعات زیادی در رابطه با این بیماری صورت گرفته است، ولی متاسفانه درکشور ما با وجود گسترش روز افزون بیماری مطالعات بسیار محدودی در این زمینه انجام گرفته است، و یا حداقل در زمینه اجرای روش‌های جداسازی، شناسایی و بررسی مولکولی بیماری که درواقع الفبای اولیه در راه مبارزه و کنترل بیماری می‌باشد، تاکنون کار چندانی صورت نگرفته است. لذا در این مطالعه برای اولین بار با جداسازی و شناسایی مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس، وجود بیماری یون به‌صورت پاراکلینیکی در دامداری‌های گاوشیری استان خراسان رضوی مورد تائید قرار گرفت.

در بیماری یون با ادامه و توسعه بیماری و تغییر فاز آن از تحت بالینی به بالینی دفع باکتری از طریق مدفوع افزایش می‌یابد. در این مطالعه نیز همانطور که انتظار می‌رفت، بین نتایج بدست آمده از گاوهای دارای علائم بالینی و بدون علائم بالینی تفاوت قابل توجهی وجود داشت. این تفاوت بین تعداد لوله‌های مثبت و تعداد پرگنه‌های آن‌ها نیز وجود داشت. برای تشخیص پاراتوبرکلوزیس انجام یک آزمون به تنهایی کافی نیست، بنابراین بایستی با توجه به سن و مرحله بیماری حداقل از دو آزمون در تشخیص بیماری بهره برد. همانطور که نتایج PCR مستقیم مدفوع نشان داد، ممکن است نتایج نمونه‌های یک نوع آزمون خاص با آزمون دیگر مشابهت نداشته باشد و به صرف نتایج یک آزمون منفی نباید در مورد یک دام تصمیم‌گیری شود، لذا بهتر آنست که حداقل به‌لاور همزمان دو آزمون برای شناسایی دام‌های آلوده به کار گرفته شود. نتایج جداول ۲ و ۳ گویای موضوع فوق است. عمومی ترین راه انتقال بیماری از طریق سر پستان‌های آلوده، شیر و یا کلستروم آلوده می‌باشد. گاوهای مبتلا به شکل بالینی یون و یا حتی تحت

بالینی‌ها مقدار زیادی باکتری مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس را از طریق شیر ومدفوع دفع می‌نمایند، که با این عمل جدا از انتقال مستقیم باکتری، موجب آلودگی محیط، آب و غذای مصرفی حیوانات می‌شوند. در هر گرم از مدفوع گاوهای مبتلا به شکل بالینی بیماری یون حدود 10^8 باکتری مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس وجود دارد، که موجب انتشار آلودگی محیط می‌گردد، لذا همچنانکه نتایج جداول ۲ و ۳ نشان می‌دهد، در دو گروه مجاور و غیر مجاور با دام آلوده اثرات آلودگی محیط قابل تحمل است، وجود دام مبتلا به شکل بالینی که دفع باکتریایی بسیار بیشتری نسبت به اشکال تحت بالینی دارد، موجب آلودگی بیشتر محیط و افزایش تعداد مبتلایان گردیده است.

حساسیت Single PCR نسبت به Nested PCR کمتر می‌باشد، لذا پیشنهاد می‌گردد برای شناسایی مستقیم دام‌های آلوده از طریق مدفوع از روش Nested PCR استفاده شود. برای تشخیص بیماری در سطح (غربالگری بیماری) گله‌های مشکوک یا پاک، به علت عدم توانایی روش‌های سرولوژی در تشخیص دام‌هایی که مراحل اولیه بیماری را طی می‌نمایند و همچنین کاهش هزینه‌ها، استفاده از روش کشت همزمان چند حیوان پیشنهاد می‌گردد. در این روش مخلوطی از مدفوع ۵ تا ۱۰ حیوان برای غربالگری بیماری در سطح گله استفاده می‌گردد. البته زمانی که حضور بیماری در سطح گله تائید گردد، برای ردیابی و شناسایی دام‌های مبتلا باید از سایر روش‌ها برای شناسایی هریک از مبتلایان استفاده کرد(۱۵). همچنین از آنجا که شناسایی دام‌های آلوده بدون علائم بالینی در یک گله بیشترین اهمیت را دارد، لذا توصیه می‌گردد برای بالا بردن حساسیت کشت مدفوع، نمونه‌ها سانتریفیوژ شوند، اگرچه که ممکن است تعداد آلودگی‌های میکروبی از جمله آلودگی‌های قارچی افزایش یابد، ولی این امر معمولا" در تعداد کمی از نمونه‌ها و در روزهای اولیه بعد از کشت رخ می‌دهد، لذا بالا رفتن حساسیت کشت ارزش تکرار تعدادی نمونه را دارد. از طرف دیگر می‌توان برای کاهش تعداد آلودگی‌های قارچی و میکروبی از داروهای ضد قارچی مانند آمفوتریسین ب که تاثیر عمده آن روی سلول‌های یوکاریوت بویژه یوکاریوت‌های میکروبی مانند قارچ‌ها است، و آنتی بیوتیک‌های ضد باکتری‌های گرم مثبت وگرم منفی استفاده کرد. کاربرد بیدهای ایمونو مکنتیگ روش دیگری برای افزایش حساسیت کشت باکتریایی می‌باشد. به نظر می‌رسد، با توجه به نتایج این مطالعه، انجام برنامه‌های کنترلی ضروری باشد. پیشنهاد می‌گردد که ابتدا میزان شیوع بیماری تعیین گردد و سپس برنامه‌های کنترلی در سطح منطقه انجام شود. به علت چهره و جنبه‌های خاص بیماری یون از جمله دوره کمون طولانی و عدم آگاهی کافی از خطرات اشکال تحت بالینی آن، موجب شده است تا دامداران توجه کمتری نسبت به اهمیت بیماری یون داشته باشند. لذا برای کنترل بیماری، آگاه کردن دامداران، در کنار اجرای کارگاه‌های آموزشی تشخیصی برای مجریان آزمایشگاه‌های تشخیص دامپزشکی جهت آشنایی با روش‌های نوین تشخیصی، مفید خواهد بود.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تهران و دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران به جهت تأمین اعتبار طرح تحقیقاتی شماره ۷۵۰۴۰۰۱/۶/۱ تشکر و قدردانی می‌گردد. از همکاری معاونت محترم پژوهشی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی آقای دکتر پایکاری، ریاست و معاونت محترم پژوهشی موسسه رازی شعبه مشهد آقایان دکتر کیانی زاده و دکتر فتحی نجفی تشکر و قدردانی می‌گردد. تشکر ویژه از مدیر کل محترم اداره کل دامپزشکی خراسان رضوی آقای دکتر دستور و پرسنل محترم آن اداره کل به ویژه آقایان دکتر اعلمی، مهندس سورکی و دکتر رشتی باف که در اجرای این طرح با ما همکاری ارزنده‌ای داشتند.

References

1. Baharsefat, M., Amjadi, A., Ahourai, P. R., Yamini, B., Entessar, F., Hedayati, H. (1972) Maladie de Johne (Paratubercolose) Chezles Caprins Etles Ovins en Iran. Archives of Razi Vaccine and Serum Research Institute. 24:49-61.
2. Bhide, M., Chakurkar, E., Tkacikova, L., Barbuddhe, S., Novak, M., Mikula, I. (2006) IS900-PCR-based detection and characterization of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* from buffy coat of cattle and sheep. Vet. Microbiol. 112: 33-41.
3. Chia, WEI, W. U., Livesey, M., Schmoller, S. K., Manning, E. J. B., Steinberg, H., Davis, W. C., Hamilton, M. J., Talaat, A. M. (2000) Invasion and persistence of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis during early stages of Johne's disease in calves. Infect. Immun. 75: 2110-2119.
4. Collins, M. T. (2003) Paratuberculosis: review of present knowledge. Acta. Vet. Scand. 44: 217-21.
5. Cousins, D. V., Williams, S. N., Hope, A. Eamens, G. J. (2000) DNA fingerprinting of Australian isolates of Mycobacterium avium subsp paratuberculosis using IS900 RFLP. Aust. Vet. J. 78:184-90.
6. Donaghy, J. A., Totton, N. L., Rowe, M. T. (2004) Persistence of *Mycobacterium paratuberculosis* during manufacture and ripening of cheddar cheese. Appl. Environ. Microbiol. 70: 4899-4905.
7. Dundee, L., Grant, I. R., Ball, H. J., Rowe M. T. (2001) Comparative evaluation of four decontamination protocols for the isolation of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* from

milk. Lett. Appl. Microbiol. 33:173-177.

8. Dunn, J. R., Kaneene, J. B., Grooms, D. L., Bolin, S. R., Bolin, C. A., Bruning, Fann, C. S. (2005) Effects of positive results for *Mycobacterium avium subsp paratuberculosis* as determined by microbial culture of feces or antibody ELISA on results of caudal fold tuberculin test and interferon-γ assay for tuberculosis in cattle. JAVMA. 226: 429-435.
9. Ellingson, J. L. E., Anderson, J. L., Koziczkowski, J. J., Radcliff, R. P., Sloan, S. J., Allen, S. E. Sullivan, N. M. (2005) Detection of Viable *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in retail pasteurized whole milk by two culture methods and PCR. J. Food Prot. 68: 966-972.
10. Erume, J., Spergser, J., Rosengarten, R. (2001) Rapid detection of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* from cattle and zoo animals by Nested PCR. Afri. Health Sci. 1: 83 - 89.
11. Garrido, J. M., Cortabarria, N., Oguiza, J. A., Aduriz, G., JUATE, R. A. (2000) Use of a PCR method on fecal samples for diagnosis of sheep paratuberculosis. Vet. Microbiol. 77: 379-386.
12. Office International Epizooties (OIE) (2004) Paratuberculosis (Johne's disease) Manual of Diagnostic Tests and Vaccine for Terrestrial Animals Chapter. 2.2.6.
13. Pickup, R. W., Rhodes, G., Bull, T. J., Arnott, S., Sidi-Boumedine, K., Hurley, M., Hermon, Taylor, J. (2006) *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in Lake Catchments, in River Water Abstracted for Domestic Use, and in Effluent from Domestic Sewage Treatment Works: Diverse Opportunities for Environmental Cycling and Human Exposure. Appl. Environ. Microbiol. 72: 4067-4077.
14. Radostits, O. M., Gay, C. C., Hinchcliffe, K. W., Constable, P. D. (2007) Veterinary Medicine. Saunders Ltd. London, UK. pp.1019 - 1040.
15. Ris, D. R., Hamel, K. L., Ayling, J. M. (1988) The detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine faeces by isolation and the comparison of isolation with the examination of stained smears by light microscopy. New Zealand Vet. J. 36: 112-114.
16. Songer, J. G., Post, K. W. (2005) Veterinary Microbiology. Elsevier, Saunders Ltd, Philadelphia, USA. pp. 7216-8717-2.
17. Sung, N., Collins, M. T. (2003) Variation in Resistance of Mycobacterium paratuberculosis to Acid Enviroments as a Function of Medium. Appl. Environ. Microbiol. 69:6833-6840.
18. Vansnick, E., Vercammen, F., Bauwens, L., D'Haese, E., Nelis, H., Geysen, D. (2005) A survey for *Mycobacterium avium subspecies paratuvercukosis* in the Royal Zoological Society of Abtwerp. Vet. J. 170: 249-256.

J. Vet. Res. 65, 2:135-140, 2010

IDENTIFICATION OF *MYCOBACTERIUM AVIUM SUBSP PARATUBERCULOSIS* IN FECAL SAMPLES OF HOLSTEIN-FRIESIAN CATTLE USING MOLECULAR AND CULTIVATION METHODS

Seyyedin, M.[1]*, Tadjbakhsh H.[2], Zahraei Salehi T.[2]

[1]*Department of Veterinary Research and Biotechnology. Razi Vaccine and Serum Research Institute of Mashhad, Mashhad-Iran.*

[2]*Departemnet of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran.*

(Received 19 January 2009 , Accepted 8 September 2009)

Abstract:

Mycobacterium avtum subspcies of *Paratuberculosis* is the cause of paratuberculosis or Johne's disease. Paratuberculosis is a chronic and progressive infectious enteric disease that affects domestic and wild animals, mostly ruminants. This study was carried out for detection of subclinical forms of Johne's disease using direct PCR and cultivation methods. A total 119 fecal samples were collected Holstein-Friesian cattle herds in Razavi khorasan province of Iran. Among these, 16 samples were taken from cows with advanced clinical signs of Johne's disease, 101 were taken from cows without clinical signs. The fecal samples were tested for presence of *Mycobacterium paratuberculosis* by directed Nested- PCR and culture on Herrold 's media with and without Mycobactin J. The samples of cows with clinical signs, 14(87.5%) and 13(81.3%) were positive by PCR and cultivation assays, respectively. These numderes for the 101 cows without clonical signs of Johne's disease were 10(9.7%) and 12(11.7%). In conclusion, according to the current report of bacterial detection from different places and the economic importance of John's disease, it is logical and essential that the prevalence rate of the disease in dairy cattle is initially determined by at least two different types of samples and tests and afterwards the control programs are adopted.

Keywords: Johne's disease, *Mycobacterium avium*, fece, Nested PCR, cultivation.

***Corresponding author's email: m.seyyedin@rvsri.ir, Tel: 0511 - 8431780, Fax: 0511 - 8420430**