

شناسایی مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه پاراتوبرکلوزیس (*Map*) در گاوهای شیری استان کرمان با استفاده از روش‌های کشت میکروبی، PCR و nested PCR

مهدی سلطانی*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۴/۱۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۶/۲۵

چکیده

مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه پاراتوبرکلوزیس (*Map*) عامل بیماری یون یا پاراتوبرکلوزیس است که با اسهال غیرقابل درمان، کاهش وزن و کاهش تولید مشخص می‌شود. به سبب شیوع بالا در گله‌های گاو شیری، *Map* خسارات زیادی را به صنایع مرتبط با دامپروری وارد می‌کند. احتمال دارد *Map* در برخی از بیماری‌ها مانند بیماری کرون در انسان نیز نقش داشته باشد. اولین گام در کنترل بیماری یون، شناسایی حیوانات بیمار تحت بالینی است. برای ارزیابی وضعیت آلودگی *Map* در استان کرمان، از سه روش کشت، واکنش PCR و nested PCR روی نمونه‌های مدفوع استفاده شد. سویه جدایه‌های شناسایی شده *Map* نیز تعیین گردید. این مطالعه اولین گزارش در مورد شناسایی *Map* در گله‌های گاو شیری در جنوب شرق ایران است. مقایسه روش‌های استفاده شده در این مطالعه نشان داد روش Nested PCR برای شناسایی *Map* توان بالاتری دارد. تمامی جدایه‌های شناسایی شده در این مطالعه مربوط به سویه گاوی بودند. با توجه به امکان انتقال *Map* از طریق شیر حیوانات آلوده به انسان، بایستی معیارهای بسیار دقیق برای کنترل بیماری یون در نظر گرفته شود تا احتمال انتقال آلودگی به انسان به حداقل برسد. بر خلاف سل گاوی، به بیماری یون توجه کمتری شده است، بنابراین در نظر گرفتن استانداردهای شدیدتر برای مقابله با مشکلات احتمالی اقتصادی و بهداشتی حاصل از این بیماری ضروری به نظر می‌رسد. از نتایج مطالعه حاضر می‌توان برای طرح‌ریزی تحقیقات آینده و اتخاذ تصمیمات مدیریتی مناسب در موضوع *Map* استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: بیماری یون، کشت میکروبی، کرمان، مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه پاراتوبرکلوزیس، PCR، nested PCR

شده است (۲۴).

مقدمه

اگرچه شناسایی سریع و اختصاصی بیماری مبنای اصلی هر طرح کنترل آلودگی است، طبیعت سختگیرانه *Map*، دیواره سلولی سخت، دوره نهفتگی طولانی، انتشار نامحسوس باکتری به مدت طولانی، نشانه‌های بالینی مبهم در مراحل اولیه بیماری و نیز نوسان در پاسخ‌های ایمنی میزبان موجب شده تا شناسایی زودهنگام *Map* به امری چالش‌برانگیز مبدل گردد (۲۵). شناسایی *Map* به جداسازی ارگانیزم زنده (کشت)، پیگیری اثرات آن در سیستم ایمنی میزبان (ELISA) و یا تکثیر ژنوم *Map* (PCR) بستگی دارد. مدت‌هاست کشت مدفوع به‌عنوان روش استاندارد طلایی برای شناسایی *Map* معرفی شده است اما موانعی مانند سرعت رشد بسیار کند *Map*، مشکلات موجود در حذف آلودگی و نیز هزینه بالای این روش باعث شده تا محققین در پی یافتن روش‌هایی جایگزین برای آن باشند. راهکارهای مبتنی بر PCR برای بهره‌گیری از مزایای PCR (حساسیت، اختصاصیت و سرعت بالا) برای شناسایی *Map* مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۶).

تعیین سویه بیماری‌زا در مطالعات اپیدمیولوژی بسیار اهمیت دارد.

مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه پاراتوبرکلوزیس (*Map*) یک باکتری بسیار کند رشد است که دستگاه گوارش را درگیر کرده و موجب بیماری یون می‌شود. این بیماری یک التهاب مسری پیش‌رونده در روده کوچک نشخوارکنندگان است که مشخصه آن اسهال غیرقابل درمان می‌باشد. این باکتری توان بقا در شرایط سخت مانند کلرزنی آب و پاستوریزه کردن شیر را دارد که احتمال انتقال آن از مسیره‌های مختلف به حیوانات غیرمیتلا را افزایش می‌دهد (۲۱). با در نظر گرفتن مقاومت ذاتی، راه‌های مختلف انتقال و نقش در ایجاد یا توسعه برخی بیماری‌های انسانی مانند بیماری کرون، *Map* به‌عنوان یکی از مهمترین عوامل ایجادکننده بیماری مشترک بین انسان و دام مطرح

۱- استادیار گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده علوم محیطی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران.

(Email: soltani59@gmail.com)

(*- نویسنده مسئول)

تنهایی و دو لوله حاوی محیط HEYM همراه با ۲ میلی‌گرم در لیتر مایکوباکتین J کشت داده شدند. نمونه‌های کشت داده شده برای ۴ ماه در دمای ۳۷ °C انکوبه شدند و در فواصل دو هفته‌ای مورد بررسی قرار گرفتند.

استخراج DNA

از یک کیت تجاری بر پایه گوانیدین تیوسیانات - سیلیکا ژل (Diatom DNA prep 100, Gordiz, Russia) برای استخراج DNA از نمونه‌های مدفوع استفاده شد. به‌طور خلاصه، ۵۰۰ میلی‌گرم نمونه مدفوع به دو بخش تقسیم شده و هر بخش در یک میکروتیوب اپندورف ۱/۵ میلی‌لیتری با ۲۰ میکرولیتر پروتئیناز K و یک میلی‌لیتر lysis reagent مخلوط شدند و برای ۱۰ دقیقه به شدت ورتکس گردیدند. سپس میکروتیوب‌ها به مدت ۱ ساعت در دمای ۶۵ °C انکوبه شدند و در طول انکوباسیون هر ۵ دقیقه یک بار ورتکس شدند. بعد از سانتریفوژ در ۵۰۰۰ g به مدت ۲۰ دقیقه، فاز مایع رویی دو میکروتیوب به یک میکروتیوب جدید منتقل شدند و با ۲۰۰ میکرولیتر lysis reagent مخلوط شدند. تیوب به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ °C انکوبه گردید، سپس تیوب‌ها ورتکس شدند و ۳۰ میکرولیتر سیلیکاژل (عامل جاذب) به تیوب‌ها افزوده شد و برای ۱۰ دقیقه در دمای اتاق به آرامی مخلوط شدند. بعد از سانتریفوژ به مدت ۲۰ ثانیه در ۵۰۰۰ g، مایع رویی دور ریخته شد و ۲۰۰ میکرولیتر lysis reagent به پلت افزوده و ورتکس شد. سپس ۴۰۰ میکرولیتر بافر نمکی به تیوب‌های همگن شده افزوده شد و به آرامی مخلوط گردید. بعد از سانتریفوژ به مدت ۲۰ ثانیه در ۵۰۰۰ g، مایع رویی دور ریخته شد و ۵۰۰ میکرولیتر lysis reagent به پلت افزوده و ورتکس شد. پس از سانتریفوژ و دور ریختن مایع رویی، جهت افزایش کیفیت DNA و خارج شدن مواد نامطلوب باقیمانده، مرحله شستشو یک بار دیگر تکرار شد. سپس تیوب‌ها برای ۵ دقیقه در دمای ۶۵ °C انکوبه شدند تا پلت باقیمانده خشک شود. سپس پلت در ۷۵ میکرولیتر محلول Extra Gene حل شد و برای ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ °C انکوبه شدند. سپس تیوب‌ها ورتکس شدند و برای ۲ دقیقه در ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شدند. در نهایت مایع رویی حاوی DNA به یک میکروتیوب جدید منتقل شده و کیفیت نمونه DNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز و طیف‌سنجی با نانودراپ (Thermo ND1000 Fisher Scientific, USA) بررسی شد. نمونه‌های DNA تا زمان استفاده در دمای ۲۰ °C - نگهداری شدند.

IS900 PCR

آغازگرهای مورد استفاده و شرایط PCR در جدول ۱ گزارش شده‌اند.

برخلاف نوع گاوی (C)، کشت سویه‌های گوسفندی (S) از بافت‌ها و مدفوع حیوانات آلوده به *Map* بسیار مشکل‌تر است (۳۰). انجام RFLP روی توالی درون جایگیر ۹۰۰ (IS900) بسیار وقت‌گیر است و نیاز به حجم DNA زیادی دارد، لذا برای استفاده به‌عنوان یک روش معمول برای تعیین سویه مناسب نیست (۲۷). در مقابل، کشف پنج جهش نقطه‌ای در توالی درون جایگیر ۱۳۱۱ (IS1311) به توسعه یک روش هضم اندونوکلاز (Restriction endonuclease assay: REA) برای تمایز سریع بین سویه‌های *Map* کمک کرده است (۲۹).

استان کرمان در جنوب شرق ایران تقریباً ۱۱ درصد از مساحت ایران را به خود اختصاص داده است که به سبب اقلیم گرم و خشک، میانگین بارش سالانه آن بسیار پایین‌تر از میانگین کشوری است. از آنجا که هیچ گزارش منتشر شده‌ای از وضعیت آلودگی به *Map* در کرمان وجود ندارد، هدف مطالعه حاضر بررسی وضعیت حضور *Map* در گاوهای شیری با استفاده از ۳ روش تشخیصی مختلف (کشت میکروبی، PCR و Nested PCR) و نیز تعیین سویه *Map* با استفاده از روش IS1311 PCR-REA بود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

تعداد ۲۱۲ نمونه مدفوع از ۴ مزرعه پرورش گاو شیری قرار گرفته در استان کرمان جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها با استفاده از دستکش پلاستیکی یک بار مصرف و بدون استفاده از روان‌کننده از رکتوم تهیه شدند. تقریباً ۲ گرم نمونه مدفوع به دو بخش ۱ گرمی تقسیم شده و به ظروف پلاستیکی استریل و غیرقابل نشت منتقل شدند. نمونه‌ها بعد از برچسب‌گذاری، روی یخ نگهداری شده و به سرعت به آزمایشگاه انتقال یافتند. نمونه‌های مورد استفاده برای PCR و کشت به‌صورت جداگانه آماده‌سازی شدند تا از ایجاد آلودگی‌های احتمالی جلوگیری شود.

کشت

نمونه مدفوع (۱ گرم) با استفاده از شیکر افقی به مدت ۳۰ دقیقه با ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل مخلوط شد. بعد از ساکن نگه داشتن به مدت ۳۰ دقیقه، ۵ میلی‌لیتر از مایع رویی به ۲۵ میلی‌لیتر هگزادسیل پیریدینیوم کلراید (HPC) (۰/۷۵ درصد (Merck, Germany) افزوده شد و در طی سه روز با تکان دادن آرام در دمای اتاق آلودگی‌زدایی شد. بعد از سانتریفوژ در ۲۰۰۰ g به مدت ۱۵ دقیقه، مایع رویی دور ریخته شد و پلت باقی مانده در ۱ میلی‌لیتر PBS حل شد و به‌عنوان مایع تلقیح استفاده شد. برای هر نمونه، ۳۰۰ میکرولیتر از مایع تلقیح روی یک لوله حاوی محیط HEYM به

جدول ۱- توالی آغازگرها و شرایط دمایی واکنش‌های PCR
Table 1- Primers' sequences and PCR thermal conditions

مرجع Reference	طول محصول (bp) Product length (bp)	شرایط دمایی واکنش Thermal condition	توالی Sequence	نام آغازگر Primer name	توالی هدف Target
(13)	413	94 °C- 5 min; 40x: 94 °C- 40 sec, 62 °C- 30 sec, 72 °C- 1 min;	GAAGGGTGTTCGGGGCCGTCGCTTAGG	P90	IS900
		72 °C- 5 min 94 °C- 5 min;	GGCGTTGAGGTGCGATCGCCACGTGAC	P91	
(2)	298	40x: 94 °C- 1 min, 58 °C- 1 min, 72 °C- 3 min;	ATGTGGTTGCTGTGTTGGATGG	AV1	IS900 (nested)
		72 °C- 7 min 94 °C- 3 min;	CCGCCGCAATCAACTCCAG	AV2	
		40x: 94 °C- 35 sec, 62 °C- 25 sec, 72 °C- 1 min; 72 °C- 5 min	GCGTGAGGCTCTGTGGTGAA	M56	
(12)	608		ATGACGACCGCTTGGGAGAC	M119	IS1311

تعیین سویه

تعیین سویه با استفاده از روش PCR-REA IS1311 انجام گرفت (۲۹). توالی آغازگرها و شرایط دمایی واکنش در جدول ۱ آورده شده‌اند. مخلوط واکنش شامل غلظت نهایی Tris-HCl ۱۰ میلی‌مولار، کلرید پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار، کلرید منیزیم ۱/۲۵ میلی‌مولار، ۲۰۰ میلی‌مول از هر dNTP، ۲۰۰ میکامول از هر یک از آغازگرها، ۱ واحد آنزیم DNA Taq پلی‌مراز و ۲۰ نانوگرم از DNA الگو در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر بود. محصولات PCR مانند قبل بررسی شدند و حضور باند ۶۰۸ جفت بازی به‌عنوان نمونه مثبت تفسیر شد.

واکنش REA با افزودن ۱۰ میکرولیتر از محصول IS1311 PCR، ۲ میکرولیتر از هر یک آنزیم‌های محدودالایر *HinfI* و *MseI* (Thermo Fisher Scientific, USA)، ۲ میکرولیتر بافر 10X (همراه با آنزیم) و آب مقطر تا حجم ۲۰ میکرولیتر تهیه شد. مخلوط هضم به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ °C انکوبه گردید و محصول هضم با الکتروفورز روی ژل آگارز ۴ درصد و به کمک دستگاه UVidoc Gel Documentation System (UVitec, UK) بررسی شد.

نتایج و بحث

ظاهر شدن کلتی‌های مثبت *Map* در محیط کشت بین ۳ تا ۴ ماه به طول انجامید. در نهایت، در ۳۲ نمونه از ۲۱۲ نمونه (۱۵/۱ درصد) مورد بررسی رشد *Map* مشاهده شد و هویت همه کلتی‌های *Map* ظاهر شده در محیط کشت با استفاده از روش PCR IS900 و واکنش REA با آنزیم *AlwI* تأیید شد (شکل ۱). هیچ‌یک از جدایه‌های *Map* روی محیط کشت فاقد مایکوباکتین J رشد نکردند. در ۴۴ نمونه از نمونه‌های مورد بررسی با روش PCR (۲۰/۷ درصد)،

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل تریس-HCl ۱۰ میلی‌مولار، کلرید پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار، کلرید منیزیم ۱/۵ میلی‌مولار، ۲۰۰ میلی‌مول از هر dNTP، ۲۰۰ میکامول از هر آغازگر، ۱ واحد آنزیم DNA Taq پلی‌مراز و ۱۰۰ نانوگرم DNA الگو انجام شد. در هر سری واکنش از کنترل مثبت و منفی استفاده شد. محصولات با الکتروفورز روی ژل آگارز ۲ درصد بررسی شدند و نتایج با استفاده از دستگاه UVidoc Gel Documentation System (UVitec, UK) ثبت شدند. در صورت وجود باند با طول ۴۱۳ جفت باز نمونه مثبت در نظر گرفته شد. برای جلوگیری از نتایج مثبت کاذب، از روش REA با استفاده از آنزیم *AlwI* استفاده شد (۳). نمونه‌های مثبت PCR با استفاده از کیت QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Germany) از ژل استخراج شدند و برای تأیید قطعه تکثیر شده تعیین توالی شدند.

IS900 nested PCR

واکنش مطابق روش شرح داده شده پیش از این انجام شد (۲). سه میکرولیتر از فرآورده تکثیر PCR IS900 به‌عنوان الگو در این واکنش مورد استفاده قرار گرفت. آغازگرهای مورد استفاده و شرایط دمایی واکنش در جدول ۱ آورده شده‌اند. محصولات مطابق روش گفته شده در بالا بررسی شدند.

حد تشخیص (Limit of detection)

برای تعیین حد تشخیص واکنش‌های PCR، DNA استخراج شده از سویه *Map* کشت شده و تأیید شده با استفاده از طیف‌سنج نانودراپ ND1000 اندازه‌گیری شده و رقت سریالی از آن تهیه گردید (۱ میکروگرم تا ۱ فمتوگرم) و حداقل حد تشخیص PCR و nested PCR ثبت شد (۸).

روش سریع، آسان و کارآمد برای استخراج DNA از نمونه‌ها استفاده شد (۲۳). همچنین تجزیه آنزیمی و فشار مکانیکی به شکستن دیواره سلولی *Map* و افزایش راندمان استخراج DNA کمک کرد. چنان‌که در نتایج مشخص است، می‌توان نتیجه گرفت که به‌عنوان یک روش سریع و ارزان که بازدهی خوبی دارد و موجب افزایش حساسیت PCR و nested PCR شده است، می‌توان از آن به‌عنوان یک رویه معمول در آزمایشگاه‌های تشخیصی برای برنامه‌های کنترل یون استفاده کرد. توالی IS900 در ژنوم *Map* بین ۱۴ تا ۲۰ نسخه دارد که این امر باعث شده این توالی به یک هدف مناسب و بسیار حساس برای تشخیص *Map* تبدیل شود (۷). به هر حال، با شناسایی چند جایگاه مشابه IS900، منحصر به فرد بودن IS900 در *Map* با تردید روبه‌رو شده است، لذا همراه کردن IS900 PCR با روش REA با هدف فراهم کردن حساسیت و اختصاصیت بالا برای تشخیص *Map* انجام شده است (۳).

روش nested PCR IS900 به‌طور ذاتی در تکثیر مقادیر بسیار اندک الگوی آغازین نیز موفق است. از طرف دیگر، احتمال افزایش نتایج مثبت کاذب در اثر آلودگی نمونه‌ها مهم‌ترین عیب روش nested PCR است (۱۹)، لذا برای پیشگیری از مشکلات احتمالی بیشترین احتیاط را در نظر داشت. به هر حال، این امر در مطالعه حاضر مشکلی ایجاد نکرد.

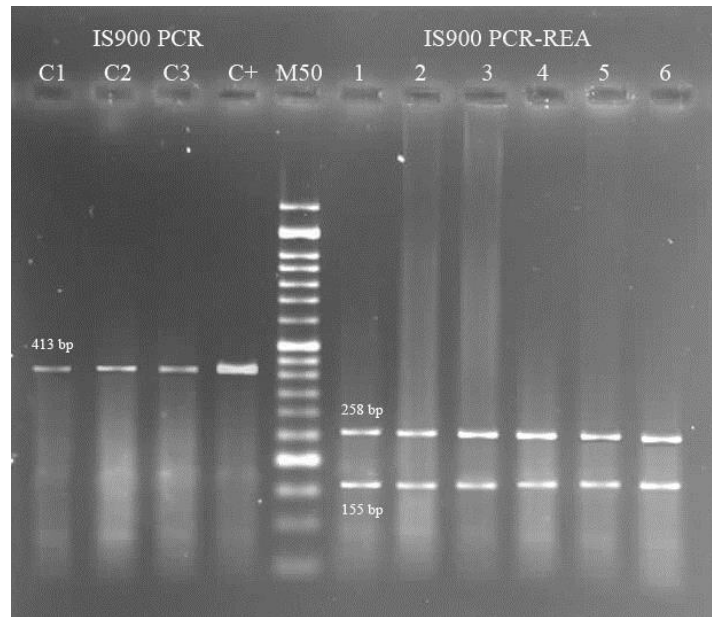
نتایج مطالعه حاضر با مطالعه توحیدی مقدم و همکاران (۲۰۱۰) که توان روش‌های PCR و nested PCR برای شناسایی *Map* در نمونه‌های شیر و مدفوع را مقایسه کردند همخوانی داشت (۲۶). در مقایسه با مطالعه آنها، فاصله کمتر بین نتایج روش‌های مبتنی بر PCR در مطالعه حاضر را می‌توان به راندمان بهتر روش‌های استخراج DNA نسبت داد. به هر حال، تشخیص مستقیم *Map* در نمونه‌های مدفوع و شیر با استفاده از روش nested PCR را می‌توان به‌عنوان آزمونی ارزشمند برای شناسایی حیوانات آلوده و برآورد شیوع آلودگی در سطح گله به کار برد.

اگرچه این مطالعه اولین تلاش برای ارزیابی وضعیت آلودگی *Map* در استان کرمان بود، مطالعات بسیاری در دیگر نقاط ایران انجام گرفته که می‌توان از آنها جهت مقایسه نتایج بهره برد. با بررسی نمونه‌های مدفوع، در مجموع شیوع *Map* در دیگر نواحی و استان‌های مرکزی ایران مانند اصفهان، فارس و چهارمحال و بختیاری بین ۱/۱ تا ۳۱/۸ درصد در جمعیت‌های مورد بررسی بوده‌اند. با در نظر گرفتن اینکه بیشتر مقادیر گزارش شده حاصل بررسی شیوع بیماری در حیوانات آلوده یا مشکوک به آلودگی بوده است، برآوردهای به‌دست آمده در مطالعه حاضر نشان می‌دهد احتمال دارد شیوع *Map* در استان کرمان حتی بالاتر از دیگر بخش‌های ایران مرکزی باشد اما برای دستیابی به نمایی واقعی‌تر از وضعیت آلودگی به *Map* در استان کرمان نیاز به مطالعات بیشتری است.

تکثیر قطعه ۴۱۳ جفت بازی ژن IS900 مشاهده شد (شکل ۲). هویت همه سویه‌های شناسایی شده توسط PCR نیز با IS900 PCR REA تأیید شد. با استفاده از روش nested PCR تعداد نمونه‌های مثبت به ۵۲ مورد (۲۴/۵ درصد) رسید (شکل ۳). مطابق انتظار، روش nested PCR نسبت به PCR معمولی حساسیت بالاتری را نشان داد. توان تشخیص PCR معمولی نیز بالاتر از روش کشت بود. به هر حال، مقایسه روش‌های کشت، PCR و nested PCR در مطالعه حاضر نشان داد که به‌عنوان یک روش آسان و ارزان، روش nested PCR توان بهتری در شناسایی آلودگی به *Map* در نمونه‌های مدفوع دارد که می‌تواند در فرآیندهای تشخیصی مورد استفاده قرار گیرد.

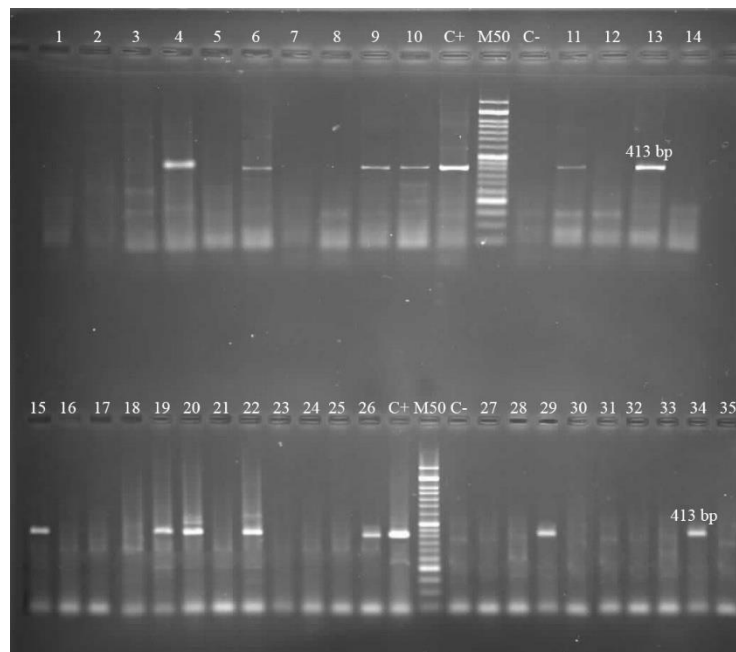
مشکلات قابل توجه در شناسایی بیماری یون (به‌ویژه در مراحل اولیه) غالباً از ماهیت سخت‌گیر الگوی رشد *Map* ناشی می‌شود که منجر به افزایش زمان نهفتگی، نوسان در فاز رشد لگاریتمی تکثیر باکتری و گستردگی پیچیده آسیب‌های ناشی از بیماری می‌شود (۱۱). گرچه کشت مدفوع به‌عنوان استاندارد طلایی برای تشخیص یون مطرح شده است (۹)، استفاده از آن به‌عنوان یک روش تشخیصی معمول با محدودیت‌های زیادی مواجه است، بنابراین روش‌های تشخیصی مبتنی بر PCR؛ که نسبت به کشت حساسیت بیشتری دارند؛ جایگزین روش کشت شده‌اند. این واقعیت در نتایج این مطالعه نیز منعکس شده است. حساسیت کمتر کشت حاصل چند عامل مانند نیاز به محیط کشت بسیار انتخابی، استفاده از روش کشت نسبتاً غیر حساس و آلودگی‌زدایی شیمیایی شدید (که موجب کاهش زنده‌مانی سلول می‌شود) است که در نهایت به افزایش زیاد حد تشخیص روش کشت منجر می‌شود (۱۰). همچنین کشت یک ویژگی وابستگی به دوز دارد به این معنا که هرچه تعداد باکتری در مایع تلقیح کمتر باشد احتمال رشد باکتری در محیط کشت کمتر می‌شود (۲۸). از طرف دیگر، تنها سلول‌های *Map* زنده قابلیت ارزیابی با کشت را دارند در حالی که PCR می‌تواند DNA کل *Map* را شناسایی کرده و با سرعت بیشتر تعداد بیشتری از حیوانات آلوده را تشخیص دهد (۱۰). با این حال، بایستی به خاطر داشت که میزان نتیجه مثبت در کشت *Map* نشان‌دهنده حداقل میزان آلودگی است چرا که زنده‌مانی سلول‌های *Map* در اثر تأثیرات نامطلوب آلودگی‌زدایی شیمیایی بسیار کاهش می‌یابد (۵).

مسئله اصلی که استفاده از روش‌های تشخیصی مبتنی بر PCR را محدود کرده و حساسیت آنها را کاهش می‌دهد کیفیت نامناسب DNA استخراج شده در اثر مقاومت دیواره سلولی مایکوباکتریایی و نیز حضور ممانعت‌کننده‌های متعدد PCR است (۱۶) بنابراین بهینه کردن فرآیندهای استخراج DNA در این مسیر اهمیت فراوانی می‌یابد. به این منظور، آماده‌سازی اولیه نمونه برای به‌دست آوردن DNA با کیفیت مناسب ضروری است (۲۵). در مطالعه حاضر، از یک



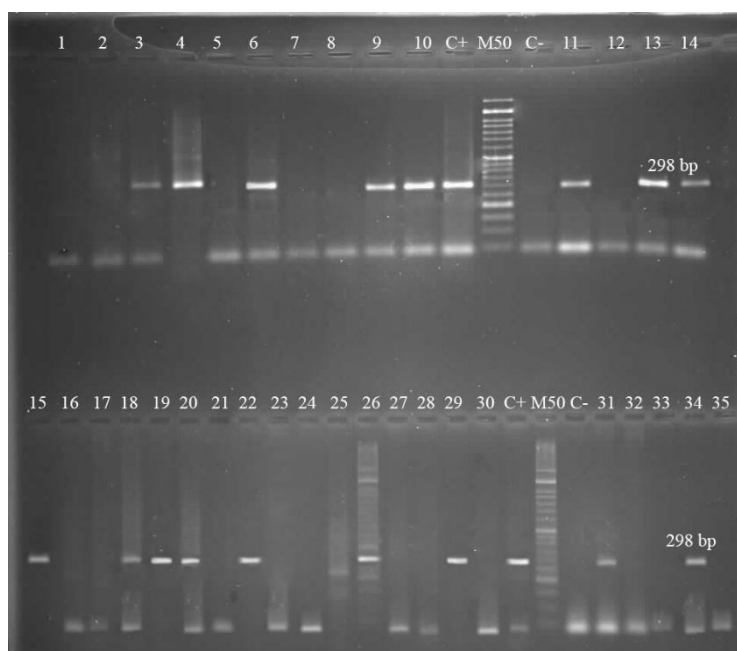
شکل ۱- تأیید نتایج مثبت کشت با روش‌های IS900 PCR و IS900 PCR-REA (لاین‌های C1 تا C3 نمونه‌های DNA استخراج شده از نمونه‌های مثبت کشت، لاین C+: کنترل مثبت، لاین‌های ۱ تا ۳: REA روی نتایج مثبت کشت، لاین‌های ۴ تا ۶: REA روی نتایج مثبت PCR)

Figure 1- Confirmation of positive culture results using IS900 PCR and IS900 PCR-REA (C1 to C3: culture positive IS900 PCR; C+: positive control; 1 to 3: REA on culture positive results; 4 to 7: REA on PCR positive results)



شکل ۲- الکتروفورز محصولات IS900 PCR (M50: نشانگر وزنی ۵۰ جفت بازی، C-: کنترل منفی، C+: کنترل مثبت)

Figure 2- Electrophoresis of IS900 PCR results (M50: 50 bp size marker, C-: negative control, C+: positive control)



شکل ۳- الکتروفورز محصولات IS900 nested PCR (M50: نشانگر وزنی ۵۰ جفت بازی، C-: کنترل منفی، C+: کنترل مثبت)

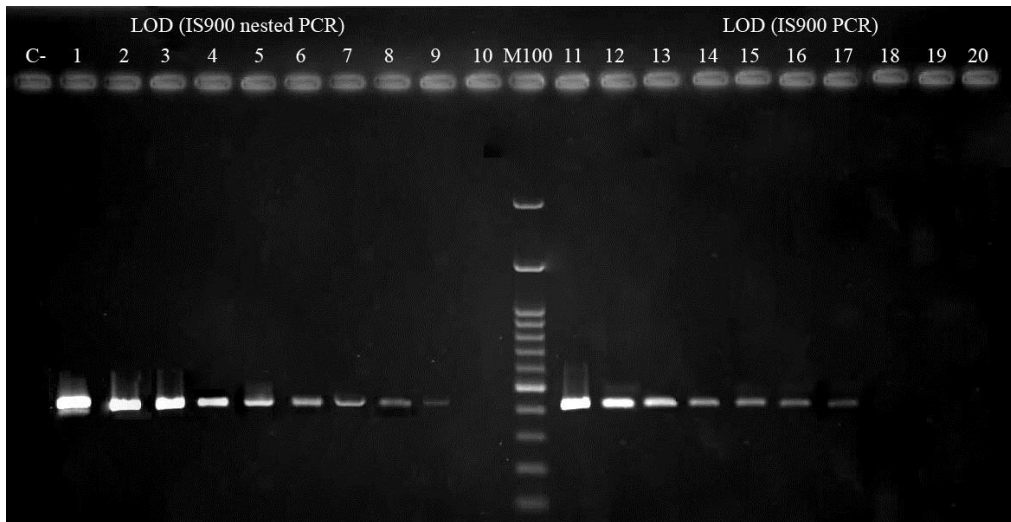
Figure 3- Electrophoresis of IS900 nested PCR results (M50: 50 bp size marker, C-: negative control, C+: positive control)

را مجاز دانسته‌اند. از طرف دیگر، ویتینگتون و همکاران (۲۰۰۱) با شناسایی سویه S در گاوهای آلوده به *Map* در ایسلند، خطر انتقال آلودگی از گوسفند به گاو را اثبات نمودند (۲۹). به هر حال، اکنون مشخص شده است که سویه‌های *Map* هیچ نوع اختصاصیت سویه‌ای ندارند لذا امکان جداسازی سویه‌های C یا S از گاو یا گوسفند وجود دارد (۱۷). با بهره بردن از ویژگی‌های مطلوب روش‌های مبتنی بر PCR، امکان تمایز سریع بین سویه‌های *Map*، پیگیری منشأ آلودگی، راه‌های انتقال بیماری، ابداع روش‌های تشخیصی جدید، طراحی واکسن‌های کارآمد، مطالعات اپیدمیولوژیک و کمک به ریشه‌کنی بیماری یون و سیاست‌های کنترل آن وجود دارد (۲۴).

حضور چهار باند مشخص بعد از فرآیند PCR-REA IS1311 برای تمامی جدایه‌های به‌دست آمده در این تحقیق، نشان داد همه آنها به سویه C تعلق دارند (شکل ۵). توالی به‌دست آمده جایگاه IS1311 در این مطالعه کاملاً با توالی‌های منتشر شده برای سویه C مطابقت داشت. در مطالعه حاضر سویه S مشاهده نگردید که با مطالعات انجام گرفته در استان خراسان رضوی مطابقت داشت (۱۴) و (۲۲) یافت نشدن سویه S در این مطالعه عجیب نبود چرا که پراکنش آن در جمعیت‌های گاو بسیار محدود است. همچنین از آنجا که مطالعات اندکی در مورد تعیین سویه *Map* در ایران انجام گرفته است، احتمال یافتن سویه S در جمعیت گاوهای ایران در صورت انجام تحقیقات گسترده‌تر وجود دارد.

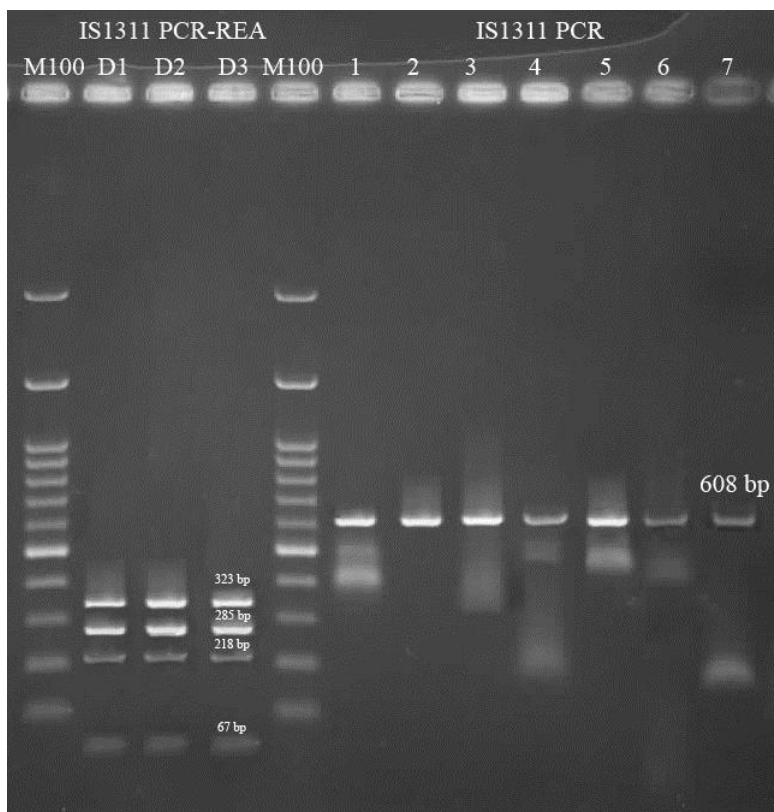
با در نظر گرفتن این واقعیت که یک نسخه از ژنوم معادل ۵ فمتوگرم DNA در نظر گرفته شده است (۱۸)، بررسی حساسیت با استفاده از سریال رقت DNA نشان داد که حداقل سطح تشخیص برای روش‌های PCR و nested PCR به‌ترتیب ۱ پیکوگرم (۲۰۰ ژنوم) و ۱۰ فمتوگرم (۲ ژنوم) بود (شکل ۴). حساسیت روش PCR مشابه مقادیر گزارش شده توسط انگلوند و همکاران (۱۹۹۹) بود اما حساسیت روش nested PCR در مطالعه آنها بالاتر (۱/۲ فمتوگرم) بود (۴). ایکونوموپولوس و همکاران (۲۰۰۴) نیز مقادیر حساسیت مشابهی را برای روش‌های PCR و nested PCR گزارش کردند در حالی که در یک مطالعه دیگر (۱۵) مقدار ۷ پیکوگرم (۱۴۰۰ ژنوم) به‌عنوان حساسیت nested PCR گزارش شده است. بر اساس نتایج به‌دست آمده، PCR معمولی در مقایسه با nested PCR از حساسیت کافی برای آزمون‌های تشخیصی روی نمونه‌های مزرعه‌ای برخوردار نیست. از آنجا که در روش استخراج DNA به‌کار رفته در این مطالعه حداقل دستوری نسبت به نمونه اعمال شد، خطر ایجاد آلودگی به حداقل رسید. بررسی ژن IS900 استخراج شده از ژل نشان داد که قطعه تکثیر شده در این مطالعه همخوانی کامل با توالی‌های منتشر شده IS900 داشت.

پیش از این تصور بر این بود که بر خلاف سویه C، سویه S ارتباطی با ایجاد بیماری در حیوانات به غیر از گوسفند ندارد (۲۷)، بنابراین برخی از راهکارهای کنترل بیماری، چرای گاوها در مراتع مورد استفاده گوسفندان و نیز پرورش گاوها و گوسفندان در کنار هم



شکل ۴- حد تشخیص واکنش‌های PCR و nested PCR (M100): نشانگر وزنی ۱۰۰ جفت بازی، C-: کنترل منفی، لاین‌های ۱ تا ۱۰ و ۱۱ تا ۲۰ به ترتیب با مقدار DNA الگوی ۱ میکروگرم، ۱۰۰ نانوگرم، ۱۰ نانوگرم، ۱ نانوگرم، ۱۰۰ پیکوگرم، ۱۰ پیکوگرم، ۱ پیکوگرم، ۱۰۰ فمتوگرم، ۱۰ فمتوگرم، ۱ فمتوگرم)

Figure 4- Limit of detection of PCR and nested PCR reactions (M100: 100 bp size marker, C-: negative control, 1 to 10 and 11 to 20: 1 µg, 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg and 1 fg DNA template, respectively)



شکل ۵- تعیین سویه *Map* به روش IS1311 PCR-REA (M100): نشانگر وزنی ۱۰۰ جفت بازی، لاین‌های ۱ تا ۷: تکثیر توالی IS1311، لاین‌های D1 تا D3: نتایج هضم اندونوکلاز)

Figure 5- *Map* strain typing using IS1311 PCR-REA (M100: 100 bp size marker, 1 to 7: IS1311 PCR results, D1 to D3: IS1311 PCR REA results)

در ایران، اطلاعات قابل اعتمادی برای طرح‌ریزی راهکارهای مؤثر برای محدود کردن بیماری در دسترس نیست. متأسفانه، بیماری یون خطرات بسیاری برای سلامت دام و نیز خسارت‌های اقتصادی فراوانی را برای صنایع مرتبط با دامپروری در پی دارد. روی هم رفته، با در نظر گرفتن هشدارهای ذکر شده، در نظر گرفتن استانداردهای بالای بهداشتی برای به حداقل رساندن احتمال انتقال آلودگی به جمعیت‌های غیرآلوده و کاهش مشکلات مرتبط با سلامت دام و نیز خسارت‌های اقتصادی حاصل از درگیری با *Map* ضرورت دارد.

سپاسگزاری

این مطالعه با استفاده از گرنت شماره ۹۴/۲۵۵۵ از پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان انجام گرفته است.

جالب توجه است که نژادهای بومی نسبت به عفونت‌های داخلی مانند پاراتوبوکلوژیس مقاومت نسبی دارند (۱). پراکنش آلودگی به *Map* در سطح کشوری با گسترش سریع گله‌های متراکم هولشتاین - فریزین در ایران مرتبط است لذا انتظار می‌رود که در ایران سویه‌های یکسانی یافت شود (۲۰). این فرضیه برای اثبات نیاز به تحقیق بیشتری دارد. شیوع *Map* در سیستم‌های پرورش صنعتی متراکم بالاتر بود که ممکن است به سبب تجمع تعداد زیادی حیوان در منطقه‌ای محدود، ادامه انتشار *Map* توسط حیوانات آلوده و مقاومت *Map* نسبت به شرایط نامساعد محیطی باشد (۷).

اگرچه بیماری یون در سطح جهانی کمتر مورد توجه قرار گرفته است اما وضعیت در کشورهای در حال توسعه مانند ایران به مراتب بدتر است. از آنجا که ثابت شده است امکان انتقال *Map* از طریق شیر خوراکی به انسان وجود دارد، کنترل و پیشگیری بیماری از مبدأ از بیشترین اهمیت برخوردار است. برخلاف سل گاوی، به سبب فقدان برنامه ملی برای کنترل آلودگی پاراتوبوکلوژیس در گله‌های گاو شیری

منابع

1. Ansari-Lari, M., M. Haghkhal, A. Bahramy, and A. M. N. Baهران. 2009. Risk factors for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Fars province (Southern Iran) dairy herds. *Tropical Animal Health and Production*, 41(4):553-557.
2. Corti, S. and R. Stephan. 2002. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* specific IS900 insertion sequences in bulk-tank milk samples obtained from different regions throughout Switzerland. *BMC Microbiology*, 2(1):1.
3. Cousins, D., R. Whittington, I. Marsh, A. Masters, R. Evans, and P. Kluver. 1999. Mycobacteria distinct from *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolated from the faeces of ruminants possess IS 900-like sequences detectable by IS 900 polymerase chain reaction: implications for diagnosis. *Molecular and Cellular Probes*, 13(6):431-442.
4. Englund, S., A. Ballagi-Pordány, G. Bölske, and K.-E. Johansson. 1999. Single PCR and nested PCR with a mimic molecule for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 33(3):163-171.
5. Grant, I. and M. Rowe. 2004. Effect of chemical decontamination and refrigerated storage on the isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from heat-treated milk. *Letters in Applied Microbiology*, 38(4):283-288.
6. Hanifian, S. and S. Khani. 2016. Tracking of *Mycobacterium avium Paratuberculosis* Load in Milk Production Chain: A Real-Time qPCR and Culture Assay. *Journal of Food Safety*, 36(1):136-141.
7. Hanifian, S., S. Khani, A. Barzegari, and J. Shayegh. 2013. Quantitative real-time PCR and culture examination of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* at farm level. *Veterinary Microbiology*, 162(1):160-165.
8. Ikononopoulos, J., M. Gazouli, I. Pavlik, M. Bartos, P. Zacharatos, E. Xylouri, E. Papalambros, and V. Gorgoulis. 2004. Comparative evaluation of PCR assays for the robust molecular detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Journal of Microbiological Methods*, 56(3):315-321.
9. Jayarao, B., S. Pillai, D. Wolfgang, D. Griswold, C. Rossiter, D. Tewari, C. Burns, and L. Hutchinson. 2004. Evaluation of IS900-PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in cattle using quarter milk and bulk tank milk samples. *Foodborne Pathogens & Disease*, 1(1):17-26.
10. Kralik, P., I. Slana, A. Kralova, V. Babak, R. H. Whitlock, and I. Pavlik. 2011. Development of a predictive model for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in faeces by quantitative real time PCR. *Veterinary Microbiology*, 149(1):133-138.
11. Liapi, M., G. Botsaris, I. Slana, M. Moravkova, V. Babak, M. Avraam, A. Di Provvio, S. Georgiadou, and I. Pavlik. 2015. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* sheep strains isolated from Cyprus sheep and goats. *Transboundary and emerging diseases*, 62(2):223-227.
12. Marsh, I., R. Whittington, and D. Cousins. 1999. PCR-restriction endonuclease analysis for identification and

- strain typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium* based on polymorphisms in IS1311. *Molecular and Cellular Probes*, 13(2):115-126.
13. Millar, D., J. Ford, J. Sanderson, S. Withey, M. Tizard, T. Doran, and J. Hermon-Taylor. 1996. IS900 PCR to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in retail supplies of whole pasteurized cows' milk in England and Wales. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(9):3446-3452.
 14. Nassiri, M., M. Jahandar, M. Soltani, M. Mahdavi, and M. Doosti. 2012. Identification and strain determination of *M. paratuberculosis* (MAP) by PCR and REA methods based on IS900 and IS1311 insertion segments. *Agricultural Biotechnology*, 4(1):83-96. (In Persian).
 15. Nebbia, P., P. Robino, S. Zoppi, and D. De Meneghi. 2006. Detection and excretion pattern of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in milk of asymptomatic sheep and goats by Nested-PCR. *Small Ruminant Research*, 66(1):116-120.
 16. Rapp, D. 2010. DNA extraction from bovine faeces: current status and future trends. *Journal of Applied Microbiology*, 108(5):1485-1493.
 17. Rónai, Z., A. Csivincsik, M. Gyuranecz, Z. Kreizinger, Á. Dán, and S. Jánosi. 2015. Molecular analysis and MIRU-VNTR typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* strains from various sources. *Journal of Applied Microbiology*, 118(2):275-283.
 18. Sanderson, J., M. Moss, M. Tizard, and J. Hermon-Taylor. 1992. *Mycobacterium paratuberculosis* DNA in Crohn's disease tissue. *Gut*, 33(7):890-896.
 19. Sevilla, I. A., J. M. Garrido, E. Molina, M. V. Geijo, N. Elguezabal, P. Vázquez, and R. A. Juste. 2014. Development and evaluation of a novel multicopy-element-targeting Triplex PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(12):3757-3768.
 20. Shahmoradi, A. H., R. Arefpajohi, K. Tadayon, and N. Mosavari. 2008. Paratuberculosis in Holstein-Friesian cattle farms in central Iran. *Tropical Animal Health and Production*, 40(3):169-173.
 21. Shariati, S. H., A. Alaei, R. Keshavarz, N. Mosavari, A. Rabbani, M. Niegowska, L. A. Sechi, and M. M. Feizabadi. 2016. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Iranian patients with type 1 diabetes mellitus by PCR and ELISA. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 10(08):857-862.
 22. Soltani, M., M. R. Nassiry, F. Shahroudi, and B. Sadeghi. 2010. PCR-restriction endonuclease analysis for strain typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* based on polymorphisms in IS 1311. *Middle East Journal of Scientific Research*, 5(4):311-315.
 23. Soltani, M., M. R. Nassiry, F. E. Shahroudi, and M. R. Bassami. 2008. Detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in feces and milk samples from holstein dairy cows by PCR. *Biotechnology*, 7(3):582-585.
 24. Stevenson, K. 2015. Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and the influence of strain type on infection and pathogenesis: a review. *Veterinary Research*, 46(1):1.
 25. Sting, R., M. Hrubenja, J. Mandl, G. Seemann, A. Salditt, and S. Waibel. 2014. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in faeces using different procedures of pre-treatment for real-time PCR in comparison to culture. *The Veterinary Journal*, 199(1):138-142.
 26. Tohidi Moghadam, M., S. Sarv, F. Moosakhani, and A. Badiie. 2010. Detection of *Mycobacterium avium* Subspecies *paratuberculosis* in Milk and fecal Samples in Dairy Cattle by PCR and Nested-PCR. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9(24):3055-3061.
 27. Whittington, R., A. Hope, D. Marshall, C. Taragel, and I. Marsh. 2000. Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: IS900 restriction fragment length polymorphism and IS1311 polymorphism analyses of isolates from animals and a human in Australia. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(9):3240-3248.
 28. Whittington, R., I. Marsh, S. McAllister, M. Turner, D. Marshall, and C. Fraser. 1999. Evaluation of Modified BACTEC 12B Radiometric Medium and Solid Media for Culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from Sheep. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(4):1077-1083.
 29. Whittington, R., I. Marsh, and R. Whitlock. 2001. Typing of IS 1311 polymorphisms confirms that bison (*Bison bison*) with paratuberculosis in Montana are infected with a strain of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* distinct from that occurring in cattle and other domesticated livestock. *Molecular and Cellular Probes*, 15(3):139-145.
 30. Whittington, R. J. 2009. Factors affecting isolation and identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from fecal and tissue samples in a liquid culture system. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(3):614-622.

Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Kerman Province's Dairy Cows using Microbial Culture, PCR and Nested PCR Methods

M. Soltani^{1*}

Received: 09-07-2017

Accepted: 16-09-2017

Introduction *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*Map*) is a very slow growing bacterium that solely infect the digestive tract and leads to Johne's disease (JD) that is characterized by intractable diarrhea. Considering innate resistance and different transmission modes of *Map* and its possible role in development or progression of some human diseases (mainly Crohn's disease), strong zoonotic potential has been proposed for *Map*. Diagnosis of JD depends on isolation of viable *Map* (culture), tracking of its consequences on host immune system (ELISA) or amplification of *Map* genome (PCR). Fecal culture considered as gold standard for *Map* detection but obstacles like very slow growth rate of *Map*, decontamination issues and its high expenses led to development of alternatives like PCR based approaches to gain PCR advantages like high sensitivity, specificity and rapidity for diagnosis of *Map*. Since no published report was found on *Map* infection status in Kerman, the current study aimed to investigate the presence of *Map* in bovine feces samples using 3 different detection methods including culture, IS900 PCR and IS900 nested PCR. Also IS1311 PCR-REA was used for strain typing of *Map* isolates.

Materials and Methods 212 fecal samples were taken from 4 dairy cattle farms located in Kerman province, southeast Iran. The fecal fractions for culture and PCR were prepared separately to inhibit potential cross-contaminations. Per each sample, 300 μ l of prepared inoculum was cultured on slope of Herrold's egg yolk medium (HEYM) alone, and two HEYM + 2.0 mg/L of mycobactin J slopes. Inoculated slopes were incubated at 37 °C for 4 months and monitored at biweekly intervals. After extraction of DNA from fecal samples, PCR reaction performed in 25 μ l volume and products were analyzed by electrophoresis on 2% agarose gels. The samples were considered as positive if 413 bp amplified band was present. To avoid false positive results, a REA approach using *AlwI* restriction enzyme was adopted. For IS900 nested PCR reaction, 3 ml from IS900 PCR products were used as template. Resultant products were screened as before. To evaluate the limit of detection of PCR reactions, the DNA extracted from confirmed *MAP* field strain culture was 10 fold serially diluted (1 μ g – 1 fg) and the minimum detection level of PCR and nested PCR were observed. Strain typing of *Map* isolates was based on IS1311 PCR-REA.

Results and Discussion It takes 3-4 months of incubation for appearance of *MAP* positive colonies. *Map* was detected in 32/212 (15.1%) of cultured samples. All colonies were verified as *MAP* using IS900 PCR and REA with *AlwI*. 44 positive samples were detected by IS900 PCR (20.7%) while nested PCR was able to find 52 infected samples (24.5%). All isolates detected by PCR based methods were also verified as *MAP* by IS900 PCR-REA. According to expectations, nPCR offered higher sensitivity than conventional PCR. However, comparing the methods used in the present study showed that as a simple and cheap assay, nested PCR is inherently successful in amplification even with rare amount of starting template and has the better ability to detect the *Map* infection in fecal samples and can be used as a routine method in diagnostic processes. Although this study was the first attempt to access the *Map* infection status in Kerman province, as summarized in table 3, many studies were conducted all around Iran that can be compared with. Altogether, *Map* incidence in other central Iran provinces (Isfahan, Fars and Chaharmahal and Bakhtiari) were between 14.1 to 31.8 percent of tested populations based on examination of fecal samples. Considering that most of reported values came from clinically infected or suspected animals, the estimates obtained in this study showed the possibility that the *Map* incidence in Kerman province may be higher than other parts of central Iran, but it more investigations needed to create a realistic scheme of *Map* infection status in Kerman province. Remembering that a copy of genome was considered as equivalent to 5 fg of DNA, sensitivity analysis using serially diluted DNA preparations revealed that the minimum detection level were 1 pg (200 genomes) and 10 fg (2 genomes) for PCR and nested PCR, respectively. According to results, compared to nested PCR, conventional PCR is not sensitive enough for diagnostic tests on field samples. Analysis of fragments produced after IS1311 REA showed the presence of explicit patterns of four bands for all obtained isolates that is the indication of *MAP* C type. Obtained DNA

1- Assistant professor, Department of Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran.

(*- Corresponding author email: soltani59@gmail.com)

sequences from the amplified IS1311 locus was exactly consistent with previously published sequence for *MAP* C type. S type was not detected in current study that was consistent with results of researches performed in Razavi Khorasan province. Failure to find S *Map* strain was not surprising, since its global prevalence in cow population is very low and hard to find. Also, there are few papers dealing with *Map* strain typing in Iran, so it is conceivable to find S *Map* type in Iran's cattle population if more research conducted in this respect.

Conclusion Although paratuberculosis is a global neglected disease, the situation is worse in developing countries like Iran. Contrary to bovine tuberculosis, due to absence of a national program to control paratuberculosis infection in Iran's dairy herds, no reliable data is available for arrangement of tools for efficient restriction of disease which leads to inadequate attention to JD and eventually receive the least priority to control. Unfortunately, paratuberculosis as an overlooked disease, is a severe hazard for cows' health and also for economic activities related to dairy cattle industry. On the other hand, *Map* is still considered as an important suspicious zoonotic agent which cause serious health problems for humans. Meanwhile, considering aforementioned warnings, enactment of crucial health standards is vital to minimize the chance of infection transmission to non-infected populations and alleviating health problems and economic losses due to *Map* infection.

Keywords: Culture, Detection, Johne's disease, *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*, nested PCR, PCR

