Archive of SID

جستجوی *مایکوباکتریوم بوویس* در گاوهای مشکوک به بیماری سل گاوی در گاوداری‌های شهرستان ارومیه با استفاده از روش PCR

محمد حسین صادقی زالی[1*]، صفر فرج نیا[2]، رضا مؤدب[3]، هادی کریمخانی[4]، رضا دلشاد[5]، کامران جهانبخش[3]

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکدهٔ دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه، ارومیه، ایران
۲. مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
۳. مرکز تحقیقات سل و بیماریهای ریه، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
۴. دانشجوی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه، ارومیه، ایران
۵. کارشناس آزمایشگاه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه، ارومیه، ایران
* نویسنده مسئول مکاتبات: m_hosein_sadeghi@yahoo.com

(دریافت مقاله: ۸۸/۱۱/۱۵، پذیرش نهایی: ۸۹/۷/۱۰)

چکیده

سل گاوی یکی از مهم‌ترین بیماری‌های مشترک بین انسان و دام در تمام جهان است. در سال‌های اخیر موارد ابتلا به سل انسانی با منشأ گاوی در حال افزایش بوده و بهداشت جامعه را مورد مخاطره قرار داده است. *مایکوباکتریوم بوویس* عامل سل گاوی بوده و علاوه بر ابتلاء حیوانات مزرعه‌ای و پستانداران وحشی باعث ایجاد مخزن در بین آنها شده و امر کنترل بیماری را مشکل می‌سازد. هدف از این مطالعه جستجوی *مایکوباکتریوم بوویس* در خون و عقده‌های لنفاوی گاوهای مشکوک به بیماری سل گاوی با روش PCR است که با استفاده از جفت پرایمرهای JB21 – JB22 یک قطعه از ژنوم *M. bovis* را به اندازهٔ bp ۵۰۰ مورد شناسایی قرار می‌دهد. در مطالعهٔ حاضر از ۱۰۰ رأس گاو مشکوک به بیماری سل، نمونه‌گیری انجام شد و نمونه‌ها پس از آلودگی‌زدایی با روش پتروف با رنگ‌آمیزی ذیل نیلسن مورد آزمایش مستقیم میکروسکوپی قرار گرفته و در محیط کشت لونشتاین جانسون حاوی پیرووات سدیم کشت داده شدند. برای انجام آزمایش PCR از نمونه‌ها عمل استخراج DNA با استفاده از CTAB و پروتئیناز K انجام گرفت. محصول نهایی PCR تحت الکتروفورز در ژل آگارز قرار گرفته و به‌وسیلهٔ اتیدیوم برماید آشکارسازی گردید. از ۱۰۰ نمونه مشکوک، ۱ مورد (۱٪) در روش ذیل- نیلسن، ۲ مورد (۲٪) در روش کشت میکروبی و ۸ مورد (۸٪) در آزمایش PCR مثبت به ثبت رسیدند. نتایج نشان می‌دهد روش PCR با جفت پرایمرهای JB21– JB22 با حساسیت و ویژگی بالا، بهترین روش جستجوی *مایکوباکتریوم بوویس* در دام‌های آلوده به بیماری سل گاوی است.

مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، ۱۳۸۹، دوره ۴، شماره ۱، پیاپی ۱۳، صفحات: ۷۸۰-۷۷۳.

کلید واژه‌ها: مایکوباکتریوم بوویس، سل گاوی، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

مقدمه

مایکوباکتریوم‌ها اجرام میله‌ای شکل، اسید پایدار، غیر متحرک، هوازی، فاقد هاگ و اکسیداتیو هستند که در انسان و حیوانات باعث عفونت‌های مهمی می‌شوند (۱). یکی از بیماری‌های مهم حاصل از مایکوباکتریوم‌ها بیماری سل گاوی

www.SID.ir

Archive of SID

است که در اثر *مایکوباکتریوم بوویس* ایجاد می‌شود و علاوه بر اینکه گاو را مبتلا می‌سازد، انسان و گونه‌های حیوانی دیگر نظیر سگ، گربه، گوسفند، بز، اسب، گورکن و سایر گونه‌های پستانداری را نیز مبتلا می‌کند ولی پرندگان در برابر این جرم مقاوم هستند (١ ٢١ و ٢٣).

سل گاوی از نظر میزان شیوع و اهمیت اقتصادی، مهم‌ترین سل دامی است و به‌علت مشترک بودن این بیماری و خسارات اقتصادی ناشی از ماهیت مزمن و پیشرونده آن، برنامه‌های ریشه‌کنی در سرأسر جهان برای این بیماری در حال اجرا می‌باشد. میزان گسترش آن بر حسب وضعیت دامپروری، نژاد گاو و اجرای مقررات بهداشتی در کشورهای مختلف متفاوت است (١، ٢، ٣، ١٤، ٢١ و ٢٢). در سال‌های اخیر تعداد مبتلایان به توبرکلوزیس انسانی با منشأ گاوی در حال افزایش بوده است (١٩).

انجام آزمایش توبرکولین گاوی گرچه برای شناسایی دام‌های آلوده روشی آسان و مؤثر است ولی از حساسیت و ویژگی بالایی برخوردار نمی‌باشد. لذا، انجام آزمایشات حساس‌تر و دقیق ضروری به‌نظر می‌رسد (١ و ١٤).

جهت تشخیص سل گاوی در دام‌های زنده می‌توان از خلط، مایع جنب، مایع مغزی نخاعی، مایع مفصلی، خون، عقده‌های لنفاوی، بیوپسی، مایع حاصل از شستشوی نای و نایژه و یا بقیه مواد مشکوک اقدام به تهیه نمونه کرد (١ و ٢).

در دام‌های تلف شده نیز می‌توان از نمونه‌های تازه تهیه شده و یا فیکس شده در فرمالین ١٠ درصد مثل عقده‌های لنفاوی استفاده نمود (١).

نمونه‌های تهیه شده ابتدا مورد آلوده‌زدایی و تغلیظ قرار می‌گیرند و توسط بافرهای مناسب خنثی می‌گردند سپس از رسوب‌های حاصله جهت انجام آزمایشات مختلف نظیر آزمایش مستقیم میکروسکپی با استفاده از روش رنگ‌آمیزی ذیل- نیلس، کشت در محیط‌های آگاردار انتخابی نظیر لوین اشتاین- جنسن حاوی پیروات سدیم (٠/٤ درصد) می‌توان استفاده کرد (١، ٢ ٤، ١،١، ١٥ و ١٨).

در تحقیق حاضر از روش PCR استفاده گردید که طبق مقالات معتبر، روشی حساس، دقیق و سریع برای شناسایی *مایکوباکتریوم بوویس* در نمونه‌های مرضی است. در این بررسی جفت پرایمرهای JB21-JB22 طراحی گردید که در ژل الکتروفورز در محدوده ٥٠٠ bp ایجاد باند می‌نماید. همچنین از سویه استاندارد *مایکوباکتریوم بوویس* (ATCC/19210) به‌عنوان کنترل مثبت بهره گرفته شد.

نمونه‌هایی که DNA ژنومیک آنها استخراج شده بودند، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی در واکنش PCR وارد گردیده و نهایتاً محصول PCR در ژل آگارز الکتروفورز گردیدند و با کنترل مثبت مورد بررسی قرار گرفتند. با توجه به نتایج به‌دست آمده از آزمایشات مختلف نشان داده شد که روش PCR در مقایسه با سایر روش‌ها، روش ارجح در تشخیص عامل بیماری سل گاوی است.

مواد و روش‌ها

در تحقیق حاضر مجموعاً از ١٠٠ رأس گاو با سن بالای ١/٥ سال که مشکوک به بیماری سل گاوی بودند، عمل نمونه‌برداری انجام گرفت. این تحقیق در سطح گاوداری‌های شهرستان ارومیه انجام گرفت و در آن گاوهای نر و ماده مشکوک که دچار لاغری، کاهش راندمان تولید و افت تولید شیر بوده و در آستانه اعزام به کشتارگاه صنعتی ارومیه بودند، از هر کدام دو نمونه (یکی نمونه خون و دیگری نمونه عقده لنفاوی رتروفارنژیال) اخذ گردید. سپس نمونه‌های اخذ شده به آزمایشگاه منتقل گردید و عمل آلوده‌زدایی و تغلیظ و در نهایت استخراج DNA از آنها به‌عمل آمد.

DNA ژنومیک استخراج شده از هر یک از نمونه‌ها به همراه پرایمرهای اختصاصی (JB21, JB22) در واکنش PCR وارد گردید. پس از انجام PCR نهایتاً محصول PCR در ژل آگارز الکتروفورز گردید و وجود باکتری *مایکوباکتریوم بوویس* از

www.SID.ir

Archive of SID

طریق مشاهده باند PCR در محدوده ۵۰۰bp مشخص گردید. در تحقیق حاضر از سویه ATCC/19210 و سویه مثبت محلی به عنوان شاهد مثبت استفاده گردید (۲۰).

آماده سازی عقده‌های لنفاوی اخذ شده از دام‌های مشکوک به سل گاوی

جهت هموژنیزاسیون نمونه‌های عقده‌های لنفاوی نیاز به هضم و گندزدایی است که برای این منظور به نمونه‌های خرد شده، سود ۴٪ اضافه گردید و نمونه‌ها با دقت له شد. سپس نمونه‌های حاوی سود به‌مدت ۱ دقیقه مخلوط گردید و به مدت ۳۰ دقیقه به سانتریفوژ با دور ۳۰۰۰ rpm منتقل شد. به رسوب حاصله محلول فنل‌فتالئین به‌عنوان اندیکاتور pH اضافه گردید و مخلوط شد. سپس اسیدکلریدریک ۱ نرمال به نمونه افزوده شد و مخلوط شد.

نمونه هموژن شده دارای pH =۷ بوده و آماده برای پروسه‌های آزمایشگاهی از قبیل رنگ‌آمیزی و کشت می‌باشد.

برای کشت در محیط‌های کشت اختصاصی سل، حدود ۲۰۰ لاندا از نمونه‌های هموژن شده مورد نیاز است.

آماده سازی خون اخذ شده از دام‌های مشکوک به سل گاوی

۲ میلی‌لیتر خون جمع‌آوری شده در لوله ونوجکت هپارینه، بعد از مخلوط کردن در لوله آزمایش استریل ریخته شد. سه برابر حجم خونی که به لوله‌ها منتقل شد، بافر لیز (Lysis Buffer) (1X) اضافه گردید و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و لوله‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۲۰۰۰rpm سانتریفوژ شد و مایع رویی دور ریخته شد. مراحل فوق تا رسیدن به پلت (Pellete) سفید متمایل به صورتی تکرار گردید.

پلت به‌دست آمده به‌مدت ۲۵ دقیقه در بن ماری ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد همچنین به نمونه‌ها محلول فنل فتالئین و HCL افزوده گردید.

روش استخراج DNA از خون و عقده لنفاوی

به نمونه‌های آماده سازی شده مواد زیر افزوده گردید:

- SDS ۱۰٪- پروتئیناز k - CTAB/NaCL (۱٪)- فنل/ کلروفرم - ایزوپروپانل - سانتریفوژت ترسیب با اتانو ل۷۰٪ - TE بافر

در تحقیق حاضر با استفاده از اطلاعات موجود در بانک ژنی، از پرایمرهای اختصاصی جهت جستجوی *مایکوباکتریوم بوویس* در نمونه‌های اخذ شده از گاوان مشکوک به سل گاوی استفاده گردید. پرایمرهای مورد استفاده JB21, JB22 است که توالی ژنومی آن به‌شرح زیر می‌باشد:

Primer JB21: 5'- TCGTCCGCTGATGCAAGTGC-3'
Primer JB22: 5'- CGTCCGCTGACCTCAAGAAG-3'

محصول حاصل از جفت پرایمر فوق در آزمایش PCR قطعه‌ای به اندازه ۵۰۰pb می‌باشد (۲۰).

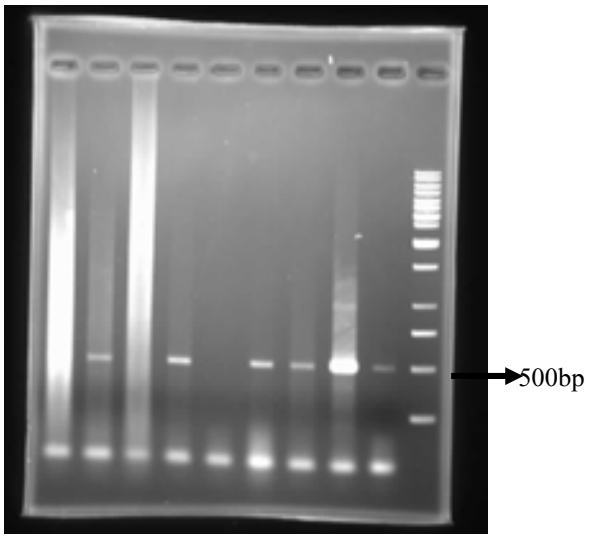
یافته‌ها

از مجموع ۱۰۰ رأس گاو مشکوک به بیماری سل گاوی، نمونه‌های اخذ شده پس از آلوده‌زدایی و تغلیظ، مورد آزمایش مستقیم میکروسکپی با استفاده از رنگ‌آمیزی ذیل-نیلسن و کشت در محیط لوین اشتاین- جنسن فاقد گلیسرول و حاوی ۰/۴٪ پیروات سدیم قرار گرفتند. سپس از تمامی نمونه‌ها به‌طور جداگانه عمل استخراج DNA ژنومیک به‌عمل آمد و نتایج زیر حاصل گردید:

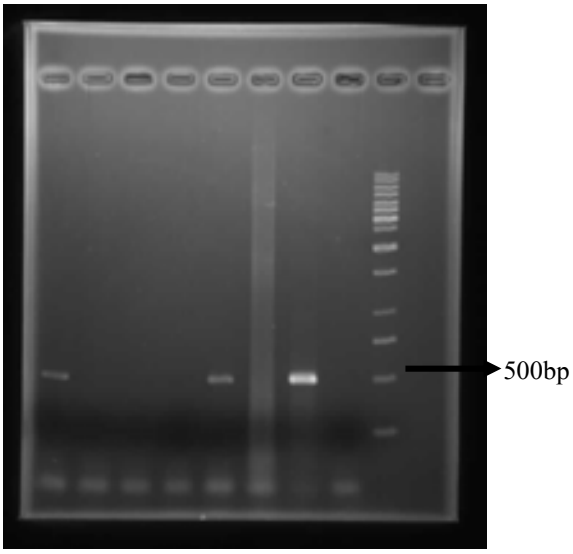
در آزمایش مستقیم میکروسکپی با استفاده از رنگ‌آمیزی ذیل- نیلسن، ۱ مورد (۱٪)، کشت در محیط لوین اشتاین- جنسن فاقد گلیسرول و دارای ۰/۴٪ پیروات، ۲ مورد (۲٪) و در آزمون PCR از بافی‌کوت، ۲ مورد (۲٪) و از عقده لنفاوی رتروفارنژیال، ۸ مورد (۸٪) از لحاظ وجود *مایکوباکتریوم بوویس* مثبت به ثبت رسید (نگاره‌های ۱ تا ۴).

www.SID.ir

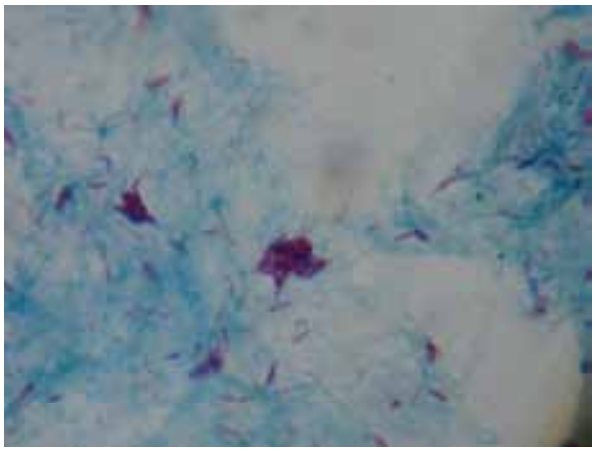
Archive of SID



نگاره ۱- الکتروفورز حاصل از آزمایش PCR روی نمونه‌های عقده لنفاوی رتروفارنژیال مورد مطالعه در گاوهای مشکوک به بیماری سل گاوی
- ستون شماره ۱۰= مارکریک کیلو بازی DNA
- ستون های شماره ۲، ۴، ۶و ۷ = نمونه های مثبت مورد مطالعه
- ستون شماره ۸ = نمونه کنترل مثبت سویه محلی
- ستون شماره ۹ = نمونه کنترل مثبت سویه استاندارد (ATCC/19210)
- ستون شماره ۵ = نمونه کنترل منفی)



نگـاره ۲- الکتروفورز حـاصل از آزمـایش PCR روی نـمونه های خون مـورد مطالعه در گاوهای مشکوک به بیماری سل گاوی
- ستون شماره ۹ = مارکریک کیلو بازی DNA
- ستون های شماره ۱و ۵ = نمونه های مثبت مورد مطالعه
- ستون شماره ۷ = نمونه کنترل مثبت
- ستون شماره ۸ = نمونه کنترل منفی



نگاره ۳- گسترش تهیه شده از نمونه‌های مثبت گاوان مشکوک به بیماری سل گاوی از لحاظ *مایکوباکتریوم بوویس* با استفاده از روش رنگ‌آمیزی ذیل- نیلسن

نگـاره ٤- پـرگنه *مایکوبـاکتریوم بـوویس* رشد داده شـده در محیط کشت لوین- اشتاین- جنسن حاوی پیروات سدیم (۰/۴٪).

www.SID.ir

Archive of SID

بحث و نتیجه‌گیری

مایکوباکتریوم‌ها باعث ایجاد عفونت‌های مهمی در حیوانات و انسان شده و منجر به خسارات اقتصادی می‌شوند. بیماری سل گاوی که در اثر *مایکوباکتریوم بوویس* ایجاد می‌شود از نقطه نظر بهداشت عمومی در جوامع انسانی و دامی بسیار حائز اهمیت است. سهولت و فراوانی انتشار عامل مسبب بیماری سل از حیوانات به انسان، خصوصاً در محیط‌هایی که بیماری سل گاوی تحت کنترل نمی‌باشد، می‌تواند این بیماری را به یک بیماری مشترک مهم تبدیل نماید.

آلودگی به عامل سل گاوی در انسان‌ها به‌واسطه نوشیدن شیر آلوده ایجاد می‌شود. البته انتقال آلودگی می‌تواند از راه تنفسی نیز صورت گیرد. با پاستوریزاسیون شیر، خطر انتقال آلودگی می‌تواند تقریباً به‌طور کامل از بین برود. *مایکوباکتریوم بوویس* در برابر حرارت، خشکی و اغلب ضدعفونی کننده‌ها مقاوم می‌باشد. این جرم در گرما، رطوبت هفته‌ها زنده باقی می‌ماند (١ ٨،و ١٠).

گرچه بیشترین موارد ابتلای انسان به بیماری سل مربوط به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس است، اما مایکوباکتریوم بوویس نیز عامل سل در انسان می‌باشد. ٦٠ سال قبل در ایالات متحده، گله‌های شیرده به شدت به باسیل‌های گاوی آلوده شدند و شیر این حیوانات، منشاء مشترکی را برای ابتلاء به سل گاوی فراهم نمود. انجام تست توبرکولین در گاوها و کشتار مواردی که واکنش مثبت داشتند به شدت، شیوع عفونت در گاوها را به کمتر از ١ درصد کاهش داد. عفونت سل در کشورهایی که شیر پاستوریزه مصرف می‌کنند تقریباً حذف شده است اما در هر حال تا زمان ریشه‌کنی کامل بیماری، بایستی *مایکوباکتریوم بوویس* را در تشخیص افتراقی بیماری سل در نظر گرفت (٣).

مایکوباکتریوم بوویس عامل ابتلا به سل خودبخودی در محدوده وسیعی از حیوانات از جمله گربه‌ها، سگ‌ها و راسته پستانداران است. در انسان راه ورود باسیل‌ها معمولاً از طریق دستگاه گوارش است. در سل گاوی ضایعات بیماری، خارج ریوی است که به ویژه در عقده‌های لنفاوی مزانتر، گردنی، استخوان‌ها و مفاصل دیده می‌شوند. هنگامی‌که *مایکوباکتریوم بوویس* از طریق استنشاقی وارد می‌شود، بیماری سل ریوی را نیز ایجاد می‌کند که از سل ریوی مربوط به *مایکوباکتریوم توبرکلوزی‌س* قابل تمایز نیست (٣).

در تحقیق حاضر از خون و عقده لنفاوی رتروفارنژیال ١٠٠ رأس گاو نر و ماده با سن بالای ١/٥ سال مشکوک به بیماری سل گاوی و در آستانه اعزام به کشتارگاه نمونه‌برداری در شرایط استریل انجام شد.

نمونه‌ها پس از آلوده‌زدایی و تغلیظ ابتدا مورد آزمایش مستقیم میکروسکوپی با استفاده از روش رنگ‌آمیزی ذیل-نیلسن (ZN) و کشت بر روی محیط کشت لوین اشتاین- جنسن فاقد گلیسرول و دارای پیروات سدیم (٠/۴ درصد) قرار گرفتند. از نظر مورفولوژی *مایکوباکتریوم بوویس* در گسترش‌های تهیه شده به روش ZN به‌صورت باسیل‌های قرمز در زمینه رنگ آبی مشاهده می‌شود که غالباً در مقایسه با باسیل‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کوتاه‌تر و چاق‌تر می‌باشد. برای رشد *مایکوباکتریوم بوویس* نیز بایستی از محیط‌هایی استفاده نمود که باعث افزایش سرعت رشد جرم شوند. لذا پیروات سدیم (٠/۴ درصد) به‌عنوان یک ماده مشوق رشد به محیط‌های کشت انتخابی بایستی افزوده گردد. از طرف دیگر این ارگانیسم بر خلاف *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* در حضور گلیسرول قادر به رشد است نیست لذا بایستی از محیط‌های فاقد گلیسرول برای رشد این ارگانیسم استفاده کرد. از لحاظ مشخصات کشت و احتیاجات غذایی، سرعت رشد *مایکوباکتریوم بوویس* آهسته و کند بوده و به ٨-٣ هفته زمان نیاز دارد. دمای مناسب گرمخانه‌گذاری، ٣٧ درجه سانتی‌گراد است. در شرایط هوازی، پرگنه‌های کرمی رنگ با مرکز خشن و برآمده ایجاد می‌نماید که به آسانی از محیط، قابل کنده شدن می‌باشد. در صورتی‌که پرگنه‌های حاصل از *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* خشن و چرمی

www.SID.ir

Archive of SID

شکل بوده و به زحمت از محیط کنده می‌شوند (۲، ۳، ۹ و ۱۴).

در این تحقیق تمامی نمونه‌های اخذ شده از گاوهای مشکوک به بیماری سل گاوی مورد آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (RCR) نیز قرار گرفتند و نمونه‌های مورد بررسی با سوش استاندارد مایکوباکتریوم بوویس (ATCC/19210) و نیز سویه محلی، مقایسه و تطبیق داده شدند. جفت پرایمرهای مورد استفاده در تحقیق حاضر JB21, JB22 می‌باشند که در محدوده ۵۰۰bp در ژل الکتروفورز ایجاد باند می‌نمایند. جهت استخراج DNA باکتری از (N- cetyl- N, N- CTAB terimethyl ammouium bromide) که یک دترجنت کاتیونیک است، استفاده شد. ماده اخیر در شرایط یونی بالا با پروتئین، تشکیل کمپلکس می‌دهد که با افزودن کلروفرم و ایزوپروپانل، کمپلکس تشکیل شده جدا گردیده و DNA باکتری به‌صورت خالص از نمونه‌ها استخراج می‌شود.

برای تعیین حساسیت دستگاه PCR در جهت جستجوی *مایکوباکتریوم بوویس* از سوش استاندارد، رقت‌های سریال $۱۰^{۵}$-$۱۰^{۰}$ تهیه گردید که نتایج آزمایش PCR در نمونه‌های حاوی تعداد باکتری با غلظت $۱۰^{۵}$، $۱۰^{۴}$، $۱۰^{۳}$، $۱۰^{۲}$ (CFU) مثبت ارزیابی گردید و نمونه حاوی $۱۰^{۰}$(۱= $۱۰^{۰}$ باکتری) و $۱۰^{۱}$(۱۰= $۱۰^{۱}$ باکتری) منفی ثبت شد. لذا حساسیت دستگاه PCR تحقیق حاضر در حد شناسایی حداقل ۱۰۰ باکتری در نمونه‌های مورد آزمایش است. در بررسی انجام گرفته شده، نتایج به‌دست آمده شامل: آزمایش مستقیم میکروسکپی با استفاده از رنگ آمیزی اسید- پایدار، ۱ مورد (۱٪) مثبت گزارش گردید که این نتیجه می‌تواند به این دلیل باشد که تعداد کم مایکوباکتریوم موجود در ضایعات گاو را مشکل بتوان با استفاده از رنگ‌آمیزی ذیل - نیلسن (ZN) تائید نمود و امکان دارد، علت منفی گزارش شدن سایر نمونه‌های مثبت به ثبت رسیده در سایر آزمایشات، به خاطر تعداد اندک باسیل‌های اسید- پایدار باشد (۱۴).

همچنین در کشت میکروبی انجام گرفته در محیط کشت انتخابی *مایکوباکتریوم بوویس* (محیط کشت لوین اشتاین- جنسن، حاوی پیروات سدیم ۰/۴٪، فاقد گلیسرول) فقط دو مورد (۲٪) از لحاظ *مایکوباکتریوم بوویس* شناسایی گردید که این نیز می‌تواند به‌دلیل انکوباسیون طولانی مدت در نتیجه رشد آهسته پرگنه‌های ارگانیسم باشد که امکان آلودگی ثانویه و یا حتی کمبود مواد غذایی ضروری کاملاً محسوس است. گرچه روش کشت و تشخیص فنوتیپی هنوز به‌عنوان یک روش گلد استاندارد برای شناسایی *مایکوباکتریوم بوویس* شناخته شده است ولی با توجه به کاربرد روش‌های جدید تشخیصی از یک‌طرف و طولانی بودن مدت گرمخانه‌گذاری جهت رشد پرگنه‌ها از طرف دیگر، امروزه استفاده از این روش محدود شده است (۱ و ۱۰).

از سریع‌ترین روش‌های شناسایی و جستجوی *مایکوباکتریوم بوویس* در نمونه‌های اخذ شده از گاوهای مشکوک به بیماری سل گاوی، روش‌های ملکولی خصوصاً آزمایش PCR است (۴ ،۷ و ۲۴).

Barry و همکاران در سال ۱۹۹۳ با استفاده از روش PCR توانستند از خون گاوهای مبتلا به سل گاوی *مایکوباکتریوم بوویس* را شناسایی نمایند (۷).

Shah و همکاران در سال ۲۰۰۲ با استفاده از روش PCR و پرایمرهای pncATB- 1.2, pncAMT- 2 , JB21- JB22 توانستند *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* را از مایکوباکتریوم بوویس تشخیص افتراقی دهند (۲۱).

Nassar و همکاران با استفاده از پرایمرهای JB21- JB22 در برزیل توانستند از گله‌های گاوهای شیری *مایکوباکتریوم بوویس* را با استفاده از روش PCR جداسازی نمایند (۱۲).

Rodriguez و همکاران در تحقیقی با استفاده از روش PCR و پرایمرهای JB21- JB22 به‌همراه کشت میکروبی، در مورد *مایکوباکتریوم بوویس* تحقیقاتی به انجام رساندند (۱۹).

www.SID.ir

Archive of SID

Araujo و همکاران در کاراکاس بر روی ۷۲ نمونه جمع‌آوری شده از گاوهای مشکوک به بیماری سل گاوی به بررسی پرداختند. آنان در آزمون مستقیم میکروسکوپی به روش رنگ‌آمیزی ذیل- نیلسن ۲۳/۶٪ از نمونه‌ها و در روش PCR ۷۶/۵٪ از نمونه‌ها را از لحاظ شناسایی *مایکوباکتریوم بوویس* مثبت گزارش نمودند (۶).

Patel و همکاران به روش PCR از خون گاوها توانستند بیماری سل گاوی را تشخیص دهند (۱۳).

در بررسی حاضر نمونه‌های خون و عقده لنفاوی رتروفارنژیال اخذ شده از گاوهای مشکوک به بیماری سل گاوی مورد آزمایش PCR قرار گرفتند که ۸ مورد (۸٪) عقده لنفاوی رتروفارنژیال و ۲ مورد (۲٪) نمونه بافی کوت در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مثبت به ثبت رسید. چون *مایکوباکتریوم بوویس* اکثراً در اندام‌های مختلف خصوصاً در عقده‌های لنفاوی موضعی می‌شود لذا حضور جرم در خون به‌طور متناوب بوده و ممکن است در هنگام اخذ نمونه، جرمی در خون وجود نداشته و یا دستگاه PCR نسبت به حساسیت‌اش به‌خاطر مقادیر بسیار اندک جرم قادر به شناسایی عامل بیماری نبوده است.

سل گاوی به‌علت حدت آن در انسان نقش عمده‌ای در سلامت عمومی و سلامت حیوانات دارد به‌علاوه خسارات اقتصادی آن نیز حائز اهمیت است. بر طبق WHO عفونت با ***M. bovis*** حدود ۵٪ سل انسانی را در برزیل به‌خود اختصاص می‌دهد که به اهمیت بهتر کنترل و انتقال آن از گاو به انسان دلالت دارد. شیوع بیماری سل گاوی در برزیل از سال ۱۹۸۹ تا ۱۹۹۸، ۱/۳٪ تخمین زده شده است. شناسایی ***M. bovis*** توسط متدهای رایج بیوشیمیایی و کشت بسیار مشکل و وقت‌گیر است. استفاده از روش PCR در نمونه‌های بیولوژیکی جهت رسیدن به تشخیص نهایی این امکان را فراهم می‌آورد تا ظرف مدت ۴۸ ساعت دام‌های آلوده مورد شناسایی قرار گیرند. لذا آزمایش PCR روشی حساس، دقیق و سریع جهت شناسایی ***M. bovis*** در نمونه‌های اخذ شده از دام‌های آلوده است (۱ و ۱۶).

سپاسگزاری:

این تحقیق با حمایت مادی و معنوی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه انجام گرفته است.

منابع

۱. حسنی طباطبائی، ع. و فیروزی، ر. ۱۳۸۰. بیماری‌های باکتریایی دام. انتشارات دانشگاه تهران، صفحات: ۴۰۹- ۳۹۸.

۲. رحیمی، م.ک. و اطهری، ع. ۱۳۸۲. میکروب شناسی پزشکی جاوتز، (ترجمه). تالیف: گئو. اف. بروکس، جانت اس. باتل، استفان. مورس، آییژ، صفحات: ۴۶۸- ۴۵۱.

۳. رحیمی، م.ک. ۱۳۸۲. میکروب شناسی زینسر، (ترجمه). تالیف: جاکلیک و همکاران، آییژ، صفحه:۲۰۰.

۴. زهرایی صالحی، ت. و شایق، ج. ۱۳۸۶. میکروب شناشی دامپزشکی و بیماری‌های میکروبی (بیماری‌های باکتریایی)، (ترجمه). تالیف: کوئین. پ. جی.، مارکی. ب. ک.، کارتر. ام. ایی.، انتشارات دانشگاه تهران، صفحات: ۱۴۶-۱۳۳.

۵. کریمی، م. و زنیلی، س. ۱۳۸۳. مبانی و کاربردهای آزمایشگاهی PCR، (ترجمه). تالیف: مک فرسون. ام. جی.، مولر. اس. جی.، اندیشه ظهور، صفحات: ۱۵۵-۱.

6. Araujo, C.P. 2005. *Mycobacterium bovis* identification by molecular method from post- mortem in suspected cattle obtained in abattoirs of Mato Grosso do sul, Brazil. Mem inst oswaldo cruz, Riode Janeiro. 100(7):749-752.

www.SID.ir

Archive of SID

7. Barry, T. Glennon, M., Smith, T. and Gannon, F. 1993. Detection of *Mycobacterium bovis* in bovine blood by combined PCR and DNA probe methods. Vet. Rec. 132:66-67.
8. Banavalicer, J.N., Bhalotra, B., Sharma, D.C., Goel, M.K., Khanndekar, P.S. and Bose, M. 1997. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* by PCR in clinical specimens, Kingsway camp, Dellu- 110009.
9. Carter, G.R. and Wise, D.J. 2004. Essentials of Veterinary Mycology. Iowa State Press, U.S.A. p: 207- 211.
10. Hosek, J., Svastova, P., Moravkova, M., Pavlic, I. and Bartos, M. 2006 . Methods of mycobacterial DNA isolation from different biological material. Vet. Med. 5:180-192.
11. Monaghan, M.L., Dohert y, M.L., Collins, J.D., Kazda, J.F. and Quinn, P.J. 1994. The tuberculin test. Vet. Microbiology. 40:111-124.
12. Nassar, A.F.C., Miyashiro, S., Oliveria, C.G., Pachpco, W.A. and Ogata, R.A. 2006. Isolation and identification of bovine tuberculosis in a Brazilian herd. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 114:29- 33.
13. Patel, R.M., Joshi, C.G., Solanki, J.V. and Patel, P.R. 2001. PCR based detection of tuberculosis from blood using oligo primers in cattle. Indian Vet. 78:480- 482.
14. Quinn, P.J., Markey, B.K., Carter, M.E., Donnely, W.J. and Leonard, F.C.L. 2002. Veterinary Microbiology and Microbial Disease, Black well science Ltd, PP: 97- 105.
15. Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B.M. and Carter, G.R. 1994. Clinical Veterinary Microbiology. Wolfe Published. p: 25-156-157.
16. Ritelli, M., Amadori, M., Tagliabue, S. and Pacciarin i, M.L. 2003. Use of a macrophage cell line for rapid detection of *Mycobacterium bovis* in diagnostic samples. Vet. Microbiology. 94:105-120.
17. Romero, R.E., Garzon, D.L., Mejia, G.A., Monroy, W., Patarroyo, M.E. and Murillo, L. 1999. Identification of *Mycobacterium bovis* in bovine clinical samples by PCR species- specific primers. Vet. Press. 63(2):101-106.
18. Ronald, M. 2004. Microbiological Media. CRC Press, Third Edition. p: 1144-1149.
19. Rodriguez, J.G., Fissanoti, J.C., Portillo, P.D., Pataroyo, M.E., Romano, M.I. and Cataldi, A. 1999. Amplification of a 500- baseتpair fragment from cultured isolates of *Mycobacterium bovis.* Journal of Clinical Microbiology. p:2330-2332.
20. Rodriguez, J.G., Mejia, G.A, Protillo , P.D., Patarroyo, M.E. and Murillo, L.A. 1995. Species-specific identification of *Mycobacterium bovis* by PCR. Microbiology. 141:2131- 2138.
21. Shah. D.H., Verma, R., Bakshi, C.S. and Singh, R.K. 2002. AmultiplexتPCR for the differentiation of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. FEMS Microbiology Letters. 214:39- 43.
22. Songer, J.G., Post, K.W. 2005. Veterinary Microbiology, Bacterial and Fungal Agents of Animal Disease. Elsevier, Saunders. p:95-101.
23. Timoney, J.F., Gillespie, J.H., Scott, F.W. and Barlough, JE. 1988. Hagan and Bruner's Microbiology and Infectious Disease of Domestic Animals. Comstock Cornell, Eighth Edition. p: 270-289.
24. Yearsley, D., O' Rourke, J., O' Brien, T. and Egan, J. 1998. Comparison of three methods for the isolation of Mycobacteria from bovine tissue lesions. Vet Rec. 143:480-481.

www.SID.ir