Archive of SID

استفاده از تکنیک تشخیصی واکنش زنجیر پلیمراز در تأیید تشخیص بزهای آلوده به مایکو باکتریوم

دکتر شاهین فکور[1] دکتر محمد قلی ناد علیان[2]* دکتر عبدالمحمد حسنی طباطبائی[2] دکترمحمدجواد قراگوزلو[3] دکتر علی کریمی[4]

دریافت مقاله: ۱۵ بهمن ماه ۱۳۸۱
پذیرش نهایی: ۶ آبان ماه ۱۳۸۲

هدف: ارزیابی ارزش تشخیصی آزمون واکنش زنجیر پلیمراز در تأیید نمونه هایی که آزمایشات میکروبیولوژیک،حضور مایکوباکتریوم را اثبات کرده است.

طرح: مشاهده ای.

حیوانات: هزار رأس بز و اندامهای دارای ضایعات قابل رؤیت در دامهای راکتیو.

روش: انجام آزمایش داخل جلدی مقایسه ای توبرکولین، اندازه گیری محل تزریق، انجام معاینات بالینی و کالبدگشایی در دامهای راکتور مثبت و مشکوک، نمونه برداری از اندام و بافتهای دارای ضایعات قابل رؤیت، انجام مطالعات باکتری شناسی، انجام آزمایش واکنش زنجیر پلیمر از (PCR) توسط کیت Hot start PCR.

نتایج: از مجموع هزار رأس بز ۷ رأس واکنش مثبت و ۴ رأس واکنش مشکوک نشان دادند. انجام آزمایش PCR بر روی نمونه های مربوطه به ۱۱رأس دام فوق ۴ مورد مایکوباکتریم توبرکولوزیس کمپلکس را نشان داد که با نتایج حاصل از آزمایشات باکتری شناسی کاملاً همخوانی داشت. (جداسازی *مایکوباکتریوم بویس* در سه نمونه و *مایکوباکتریوم توبرکولوزیس* در یک نمونه).

نتیجه گیری: ضمن اینکه این مطالعه اولین تحقیق در ایران در زمینه مایکوباکتریوم در بز می باشد، اولین گزارش استفاده از تکنیک تشخیصی PCR در تأیید تشخیص آلودگی به *مایکوباکتریوم توبرکولوزیس* کمپلس در نشخوارکنندگان کوچک نیز هست. و به تبع آن علاوه بر اثبات اینکه وقوع سل در بز در کشور ایران قابل انتظار است. ارزش تشخیصی واکنش زنجیر پلیمراز را در تشخیص آلودگی نمونه های ارسالی به آزمایشگاه به مایکوباکتریوم نشان می دهد. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، (۱۳۸۳)، دوره ۵۹، شماره ۱، ۱۰۰-۹۷.

واژه های کلیدی: بز، مایکوباکتریوم، PCR ، سل.

سل یک بیماری عفونی گرانولوماتوزی است که با ضایعات گرانولومایی ندولار توصیف می شود و توسط باسیل های اسید پایدار جنس مایکوباکتریوم ایجاد می شود. برخلاف تصور بسیاری از افراد، بز و گوسفند به بیماری سل حساس هستند و بز ممکن است به عنوان مخزن عفونت برای گاو حائز اهمیت باشد و یا ممکن است مستقیماً انسان را آلوده کند (۱،۲،۳،۴،۱۳،۲۴،۲۵).

تکنیکهای تشخیصی متعددی برای شناسایی بیماران مبتلا یا افراد آلوده به مایکوباکتریوم وجود دارد، مانند آزمایش واکنش افزایش حساسیت تأخیری، آزمایشات باکتری شناسی، آزمایشات خونی (سنجش پرولیفراسیون لنفوسیت ها، سنجش گاما اینترفرون و الایزا) و تکنیکهای تشخیصی مولکولی که در این مطالعه علاوه بر بهره جستن از دو تکنیک اول و دوم، روش

۱) گروه آموزشی علوم درمانگاهی آموزشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج، سنندج - ایران.
۲) گروه آموزشی علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
۳) گروه آموزشی پاتولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
۴) بخش مایکوباکتریولوژی انستیتو پاستور تهران، تهران - ایران.
*) نویسنده مسؤول nadalian@ut.ac.ir

Application of Polymerase Chain Reaction to confirm mycobacterium infection in goat

Fakour,Sh.,[1] Nadalian,M.Gh.,[2] Tabatabaei, A,H.,[2] Gharagozlou, M.J.,[3] Karimy, A.[4]

[1]*Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University of Sanandaj, Sanandaj - Iran.*[2]*Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.* [3]*Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine,University of Tehran, Tehran-Iran.* [4]*Department of Mycobacteriology, Pasteur Institute, Tehran-Iran.*

Objective: Evaluation of PCR test to confirm the samples that showed mycobacterium infection.

Designe: Observational study.

Animals: One thousand goats, lymph nodes and organs with visible lesion in reactor goats.

Prócedure: At first the goats were tested by CIDT method. Measuring thikness of skin, clinical and necropsy examination in reactor and suspicious goats. Sampling of organs with visible lesion. Bacteriologic test and PCR by (Hot start PCR) kit. The type of primer used in study was IS116.

Results: In all goats which were studied, 7 goats responded positive and 4 suspicious. In 11 goats under study ,4 show mycobacterium tuberculosis complex by PCR test.those result were compare with result of bacteriology tests.

Clinical implications: Not only this study is the first research about mycobacterium in goat in Iran,but also is the first research to confirm mycobacterium tuberculosis complex infection in small ruminant and evaluation PCR test for diagnosis mycobacterium in samples. ***J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran. 59, 1: 97-100, 2004.***

Key words: Goat,mycobacterium,PCR,tuberculosis.

Corresponding author email:nadalian@ut.ac.ir

تشخیصی مولکولی نیز مورد ارزیابی قرار گرفته است. در این مطالعه روش آمپلی فیکاسیون و تکنیک متداول این روش که PCR است بر روی نمونه های ارسالی به بخش مایکوباکتریولوژی انستیتو پاستور انجام گردید(۳،۴،۱۳،۲۳).

واکنش زنجیر پلیمراز به طور وسیعی در تعیین و تشخیص کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکولوزیس* در نمونه های بالینی (به خصوص خلط) انسانهای بیمار ارزیابی شده است. اما فقط چند گزارش در به کارگیری این روش در تشخیص سل حیوانی وجود دارد (۱۳).

در ارتباط با برخی از عوامل عفونی مانند *مایکوباکتریوم لپره* روشهای کشت یا سرم شناسی معتبری در دسترس نیست یا اینکه این روشها نیاز به وقت بیشتری دارند مانند *مایکوباکتریوم توبرکولوزیس* یا *بویس* که مراحل کشت، جداسازی و تشخیص تفریقی آنها حداقل به چند هفته وقت نیاز

www.SID.ir

Archive of SID

دارد و از طرفی هم به دلیل عدم توانایی برخی از آزمایشگاهها در انجام آزمایشات تشخیص تفریقی نهایتاً به مشاهدات اولیه بالینی وابسته خواهد شد. معرفی تکنیکهای هیبریدیزاسیون و آمپلی فیکاسیون اسیدنوکلئیک این امکان را به آزمایشگاههای بالینی می دهد که زمان لازم برای تشخیص و تعیین عوامل بیماریهای عفونی را کاهش دهند و نقش و اثر آزمایشگاهها را در تشخیص بیماریهای عفونی زیادتر از گذشته کنند (۳،۴). هدف از انجام این مطالعه ارزیابی ارزش تشخیصی آزمون واکنش زنجیر پلیمراز در تأیید نمونه هایی می باشد که آزمایشات میکروبیولوژیک، حضور یا عدم حضور مایکوباکتریوم را اثبات کرده است. لذا این آزمون در نمونه هایی که نتیجه کشت میکروبی آنها مثبت یا منفی بوده است انجام گردید.

مواد و روش کار

از میان یک هزار رأس بزی که طی آزمایش داخل جلدی مقایسه ای توبرکولین مورد مطالعه قرار گرفتند آنهایی که راکتور مثبت و یا مشکوک بودند پس از انجام معانیات بالینی و کالبدگشایی از بافتهای دارای ضایعات قابل رؤیت یا در صورت عدم وجود ضایعات قابل رؤیت از عقده های لنفاوی در دسترس، نمونه برداری به عمل می آمد و به آزمایشگاه آسیب شناسی بخش پاتولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران برای انجام آزمایشات هیستوپاتولوژی و قسمتی نیز به بخش مایکوباکتریولوژی انستیتو پاستور جهت انجام مطالعات باکتری شناسی و آزمایش واکنش زنجیر پلیمراز ارسال می گردید. آزمایش PCR در این مطالعه با کیت start PCR Hot و پرایمر IS116 صورت گرفته است و پرایمر کیت برای تشخیص *مایکوباکتریوم توبرکولوزیس کمپلکس* می باشد (۳،۴).

طرز تهیه DNA از نمونه: نمونه ابتدا به روش N استیل L سیستئین پاکسازی می شد و سپس ۰/۵ میلیمتر از نمونه پاکسازی شده به اضافه ۰/۵ میلی لیتر بافر T.E در یک اپندورف ریخته و ۱۵ دقیقه دربن ماری ۸۰ درجه قرار داده می شد سپس ۱۵ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰ ـ ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ و پس ازآن مایع رویی دور ریخته و روی رسوب ۵۰ λ T.E اضافه می گردید و بعد از آن نمونه ها سه بار فریز و ذوب می شدند. سپس روی آن ۵۰ λ، lysis buffer اضافه و به مدت یکساعت در ۵۵ درجه و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه قرار داده می شد. در نهایت با دور ۱۲۰۰۰ به مدت یک دقیقه سانتریفوژ و از مایع رویی که حاوی DNA است برای آزمایش PCR استفاده می شد.

آزمایش PCR توسط کیت (Hot start PCR):

۱- به ازای هر نمونه ۱۴λ بافر و λ ۱ مخلوط dNTP & primer بر داشته می شد. (primer این کیت برای تشخیص *M.Tuberculosis* و *M.Bovis* می باشد).

۲- روی آن یک پرل پارافین جامد انداخته و در ۸۵ درجه به مدت ۲۰ ثانیه قرار داده می شد تا پارافین ذوب شده و روی مخلوط PCR را بپوشاند.

۳- سپس مجدداً ۱۰λ بافر و ۰/۵λ آنزیم DNA پلیمر از (به ازای هر نمونه) داخل همان اپندورف اضافه کرده و سپس روی آن یک قطره روغن معدنی ریخته می شد تا سطح مواد را بپوشاند.

۴- سپس مقدار ۵λ از DNA به آن اضافه کرده سانتریفوژ و در دستگاه ترموسایکلر قرار می گرفت. سپس نمونه PCR را در ژل آگار ۲ درصد قرارداده الکتروفورز کرده و نتیجه را روی ترانس لومیناتور مشاهده می نمودیم. (بافر تانک TBE 0.5X بود).

ردیف	درجه حرارت سانتیگراد	زمان	دور
Denaturation 1	۹۴	یک دقیقه و سی ثانیه	یک دور
Annealing 2	۹۴	پنجاه ثانیه	پنج دور
	۶۴	چهل و پنج ثانیه	پنج دور
	۷۳	سی ثانیه	پنج دور
Extension 3	۹۵	بیست سانیه	چهل دور
	۶۳	بیست ثانیه	چهل دور
	۷۳	بیست ثانیه	چهل دور
4	۱۰	ذخیره	

نتایج

از مجموع یک هزار رأس بزی که توسط آزمایش مقایسه ای داخل جلدی توبرکولین مورد مطالعه قرار گرفتند ۷ رأس واکنش مثبت و ۴ رأس واکنش مشکوک به آزمایش را نشان دادند، که از مجموع یازده رأس دام راکتور، در چهار رأس آزمایشات باکتری شناسی نتیجه مثبت داشت، به عبارت دیگر مایکو باکتریوم از محیط کشت جدا و شناسایی گردید.

تکنیک تشخیصی واکنش زنجیر پلمیراز بر روی یازده نمونه ای که تحت مطالعات باکتری شناسی قرار گرفتند انجام گردید و نتایجی کاملاً مشابه با نتایج آزمایشات باکتری شناسی به دست آمد. بدین گونه که در ۴ نمونه مربوط به دامهای راکتور مثبت آزمایش مثبت بود و با توجه به نوع پرایمر استفاده شده حضور *مایکوباکتر یوم توبرکولوزیس کمپلکس* کاملاً اثبات گردید و در هفت نمونه ای که نتیجه کشت میکروبی آنها منفی بود آزمایش PCR نیزمنفی شد (تصویر۱).

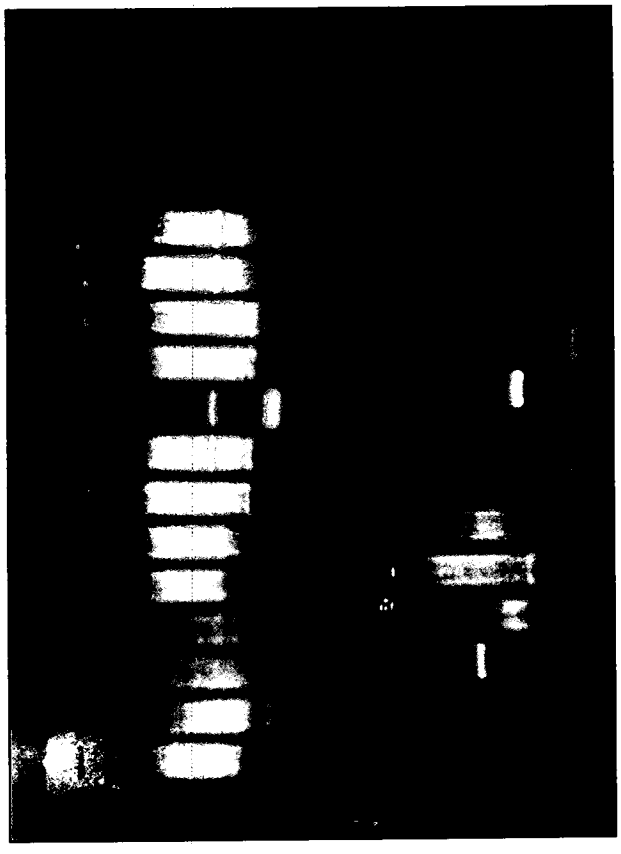
بحث

Aranaz و همکاران در سال ۱۹۹۶ در اسپانیا بر روی ۱۸۲ نمونه مربوط به دامهای اهلی شامل گاو، گوسفند و بز که از آنها *مایکوباکتریوم بویس* جدا شده بود آزمایش PCR را انجام دادند و در تمامی نمونه ها نتیجه واکنش زنجیر پلمیراز مثبت بود (۶).

در مطالعه ای در کشور برزیل در سال ۲۰۰۱، ۵۴ نمونه عقده لنفاوی بیوپسی شده از دامهای راکتور مثبت مورد مطالعه آزمایشگاهی، کشت میکروبی، مطالعه میکروسکوپی و PCR قرار گرفتند که در این میان ۴۲/۶ درصد در دو مطالعه اول مثبت بودند در حالیکه PCR، ۷۰/۳ درصد نتیجه مثبت داشت. یعنی نه تنها نمونه هایی که کشت آنها مثبت شده بود بلکه ۹ نمونه از عقده های لنفاوی که کشت منفی داشتند PCR مثبت را نشان

www.SID.ir

Archive of SID



تصویر ۱- آزمایش واکنش زنجیر پلیمراز در نمونه مثبت یا آلوده به *مایکوباکتریوم توبرکولوزیس کمپلکس*.

دادند(۲۲). در مطالعه ای مشابه که کفایت عمل سه روش کشت میکروبی، مطالعات میکروسکپی و تکنیک PCR در تشخیص *M.bovis* مقایسه شد که قدرت تشخیصی PCR حدود ۲۸/۵ برابر دو روش دیگر به دست آمد.

Miller و همکاران در ایالات متحده امریکا در سال ۱۹۹۶ با مطالعه ای که به وسیله آزمایش PCR روی ۹۹ رأس گاو مبتلا به سل انجام دادند پس از ۳-۲ روز در ۹۳ درصد موارد نتیجه مثبت را به دست آوردند(۲۱) و در مطالعه ای که مصطفی و همکاران در خصوص مقایسه تعیین میزان حساسیت و ویژگی PCR با کشت میکروبی و مطالعه میکروسکوپی داشتند به ترتیب حساسیت و ویژگی ۸۵ درصد و ۱۰۰ درصدرادر PCR به دست آوردند.(۸)

همان گونه که در قسمت نتایج آمده است در این مطالعه هر ۴ نمونه ای که کشت میکروبی و مطالعه میکروسکوپی آنها مثبت بوده است نتیجه واکنش زنجیر پلیمراز هم مشابه بوده است و از سوی دیگر در مطالعاتی که محققین انجام داده اند آزمایش PCR نه تنها در نمونه هایی که کشت میکروبی آنها مثبت بوده است بلکه در بافتهایی که حاصل کشت آنها منفی بوده است نتیجه مثبت را در برداشته است و این بر کفایت عمل، حساسیت و ویژگی بالای این تکنیک تشخیصی دلالت دارد. به عنوان مثال در بافتهایی که تعداد جرم باکتری بسیار پایین است احتمال عدم رشد باکتری و عدم تشکیل پرگنه وجود دارد اما PCR با کپی برداری از اسید نوکلئیک موجود در بافت در طی کمتر از چند ساعت تعدادآن را به میلیون می رساند. از دیگر خصوصیات برجسته این تکنیک مدت کوتاه آزمایش است که می توان در طی کمتر از ۳-۲ روز نتیجه را به دست آورد و با توجه به اهمیت کنترل و مبارزه با بیماری سل در تأمین بهداشت عمومی، این کوتاهی زمان تشخیص می تواند بسیار حائز اهمیت باشد.

به طور کلی این مطالعه علاوه بر اثبات آلودگی بز به عامل بیماری سل در کشور ایران، به بیان ارزش تشخیصی مطالعات باکتریایی، هیستوپاتولوژی و مولکولی (PCR) پرداخت که قطعاً با انجام مطالعات تکمیلی و بویژه تخصصی تر در ارزیابی و مقایسه روشهای تشخیصی بیماری سل و همچنین بهره جستن از نتایج سایر محققین به نظر می رسد تکنیک تشخیصی PCR از قدرت تشخیصی، حساسیت و ویژگی بالاتری برخوردار است.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه تهران ومعاونت پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران به دلیل تقبل هزینه طرح پژوهشی، معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی سنندج و پرسنل اداره کل دامپزشکی استان کردستان، کارشناسان بخش مایکوباکتریولوژی انستیتو پاستور و نیز از پرسنل بخش آسیب شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران به دلیل همکاری خالصانه و صمیمانه نهایت تشکر و قدردانی را دارد.

References

۱. تاج بخش،ح. (۱۳۷۱): سل حیوانات و سرایت آن به انسان، کتاب مبانی سل شناسی، دفتر نشر فرهنگ اسلامی،تهران، صفحه: ۵۴۱-۴۷۳.

۲. حسنی طباطبایی، ع.م. (۱۳۸۰): بیماریهای باکتریایی دام. انتشارات دانشگاه تهران. صفحه: ۳۲۰-۳۰۰.

۳. فکور، ش. (۱۳۸۱): مطالعه ای در زمینه آلودگی به *مایکوباکتریوم بویس* در نشخوارکنندگان کوچک. پایان نامه جهت دریافت دکترای تخصصی بیماریهای داخلی دامهای بزرگ، شماره ۱۳۹.

۴. فکور. ش.، نادعلیان، م.، حسنی طباطبایی، ع.، قراگزلو، ج. و کریمی، ع. (۱۳۸۱): مطالعه ای در زمینه آلودگی مایکوباکتریوم در بز. مجله دانشکده دامپزشکی. دوره ۵۷ شماره ۳، صفحه: ۲۶-۲۱.

5. Acosta, A. and Real, F. (1998): Isolation of *Mycobacterium* kansasii from a Tuberculine - Positive Goat. Vet. Rec. 142: 8, 195 - 196.

6. Aranaz, A. and Liebana, E. (1996): Spacer Oligonucleotide Typing of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals: a tool for studying epidemiology of Tuberculosis. J. Clin. Microbiol. 34: 11, 2734 - 2740.

7. Arellano - Reynoso, B. Ramierz. (1999): Diagnosis of Tuberculosis in goat flucks using The duble in-tradermal Test and bacteriology. Tecnica Pecuaria - en Mexico. 37: 1, 55 - 58.

8. Mustafa, A.S. (1999): Detection of *Mycobacterium tuberculosis complex* and non tuberculosis Mycobacterium by PCR. Kuwait university research. Vol. 5: 61-67.

www.SID.ir

Archive of SID

9. Bernabe, A. and Gomez , M.A. (1990): Morphology of caprine tuberculosis. I. Pulmonary Tuberculosis. Anales - de - Veterinaria - de - Murcin. 7: 9 - 20.

10. Bernabe, A. and Gomes. (1991): Pathological chain of spontaneus dual infection of Tuberculosis and Paratuberculosis in goats. Small Ruminant. Res. 1,5:4, 377- 390.

11. Collins, C.H. and Granage, J.M.(1997): Tuberculosis Bacteriology. PP: 1- 3.

12. Colin, R. and Jerny, D. (1999): Mycobacteria Molecular Biology and Virulence. ed. Blackwell Science Ltd. PP: 180 -186.

13. Connie, R. Mahon. George Manuselis. (2000): Text Book of Microbiology Diagnostic. ed. W.B. Saunders Company. PP: 191- 200, 667-707.

14. Costello, E.O. and Grady, D. (1999): Study of restriction fragment length polymorphism analysis and spoligotyping for epidemiologyical investigation of *Mycobacterium bovis* infection. J. Clin. Microbiol. 37: 3217 - 3222.

15. Cousins, D.V. and Flancis, B.R. (1993): *Mycobacterium bovis* infection in a goat. Aus.Vet. J. 70: 7, 262 - 263.

16. Daivid. M. Sherman and mary C. Smith. (1994): Goat Medicine. ed. Lea & Febiger. P: 260.

17. Garai, D. and Som, T.L. (1992): Studies on the pathology of lymph nodes in goats. Indian. Vet. J. 16: 268- 270.

18. Gutierrez, M. and Garcia-Marin, J.F. (1999): *Cryptococcus neoformans* and *Mycobacterium bovis* causing granulomatous pneumonia in a goat. Vet. Pathol. 36: 445 - 448.

19 Linklater, K.A., Smith .M.C. (1993): Color Atlas of Disease and Disorder of the Sheep & Goat. ed. Mosby Wolfe. PP:36-113.

20. Liebana, E. and Aranaz, A. (1998): Evaluation of the gamma interferone assay for eradication of Tuberculosis in a goat herd. Aust. Vet. J. 76: 50 - 53.

21. Miller. Janice, M. (1998): Detection of *Mycobacterium bovis* in formalin fixed tissues of cattle by PCR. United state department of agriculture. Agricultural Research Service.

22. Ms.Zanini, (2001): *Mycobacterium bovis*, poly merase chain reaction identification in bovine lymph nodes biopsy from Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, Riode Janeiro. 96: 809-813.

23. O.I.E. Bovine Tuberculosis. Manual of Standards Diagnostic Tests and Vaccines 2000. Chapter 2.3.3. ed. O.I.E. Publications.

24. Quinn, P.J. and Carter, M. E. (1994): Clinical Veterinary Microbiology. ed. Mosby Wolf. PP: 156- 167.

25. Radostits, O.M., Blood, D.C. and Gay, C.C. (2000): Veterinary Medicine, 9th ed. Baillire Tindal, London. PP: 909-920.

26. Rothel, Js., Jones, Sh. (1990): A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon - gamma and its use for the detection of tuberculosis in cattle. Aust. Vet. J. 67: 134 - 137.

27. Susan, E. Aiello, Asamays. (2000): Merck Veterinary Manual.8th ed. Merck & Co; INC. PP:489-493.

28. Tsung, C.S. and Tsai, H.J. (1992): Goat tuberculosis in Taiwan. J. Vet .Med. and Anim. Husbandary. 59: 61-68.

www.SID.ir