Archive of SID

مقایسه چهار روش مشاهده مستقیم، الایزا، کشت و Nested PCR در بررسی آلودگی شیر مخزن دامداری‌ها به باکتری *مایکوباکتریوم آویوم* تحت گونه پاراتوبرکولوزیس

آریا بدیعی[۱]، فرهاد موسی خانی[۲*]، عباس برین[۳]، امیر حمیدی[٤]، محسن ظفری[٤]

۱. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم بالینی، کرج، ایران
۲. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، دانشکده دامپزشکی، گروه پاتوبیولوژی، کرج، ایران
۳. دانشگاه تهران، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم پایه، تهران، ایران
٤. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، کرج، ایران
* نویسنده مسئول مکاتبات: *fmoosakhani@kiau.ac.ir*

(دریافت مقاله: ۸۹/۱۱/۲۱، پذیرش نهایی: ۹۰/۳/۱۸)

چکیده

عامل بیماری یون، باکتری *مایکوباکتریوم آویوم* تحت گونه پاراتوبرکولوزیس است و هر ساله زیان فراوانی در سطح جهانی، از قبیل کاهش تولید، افت شاخص‌های تولید مثلی و حذف دام مبتلا را متوجه صنعت گاو شیری، می‌نماید. از دیگر سوی، این باکتری را یک پاتوژن زئونوز می‌دانند و تحقیقات جدید احتمال می‌دهند که این باکتری در ایجاد بیماری کرون در انسان، نقش داشته باشد. هدف این مطالعه مقایسه روش‌های تشخیص آزمایشگاهی الایزا، مشاهده مستقیم، کشت و Nested-PCR در شیر بالک تانک جهت تشخیص آلودگی شیر مخزن گله‌ها به باکتری مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه پاراتوبرکولوزیس، می‌باشد. بدین منظور نمونه‌گیری از مخزن ۱۰۰ دامداری صنعتی استان تهران صورت پذیرفت و این نمونه‌ها با هر چهار روش کشت شیر، مشاهده مستقیم، Nested-PCR و الایزا مورد بررسی قرار گرفتند که تعداد ۸۲ نمونه (۸۲٪) در محیط کشت مثبت بوده‌اند، ۹٤ نمونه (۹٤٪) در تست IS900 Nested PCR مثبت بوده‌اند و ۹۸ نمونه (۹۸٪) با الایزا مثبت بوده‌اند. اما از کل نمونه‌های تست شده تنها ۳۳ نمونه (۳۳٪) در مشاهده مستقیم مثبت بودند. تعداد چهار نمونه وجود داشت که در تست الایزا مثبت بودند ولی در تست PCR منفی شدند. این چهار نمونه به علاوه ۱۲ نمونه دیگر که الایزای آنها مثبت بود، در مجموع ۱٦ نمونه در محیط کشت، رشد باکتری نداشتند. در مجموع نتایج این مطالعه ارجحیّت Nested PCR بر سایر روش‌های استفاده شده در این تحقیق را، تأیید می‌نماید. در ضمن نتایج این مطالعه نشان دهنده میزان بالای آلودگی به این باکتری در دامداری‌های استان تهران می‌باشد که نیازمند اقدامات جدی‌تری است.

مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، ۱۳۹۰، دوره ۵، شماره ٤، پیاپی ۲۰، صفحات: ۱۳۷۸-۱۳٦۹.

کلید واژه‌ها: یون، *مایکوباکتریوم آویوم* تحت گونه پاراتوبرکولوزیس، گاو، Nested-PCR، الایزا، کشت شیر، مشاهده مستقیم

مقدمه

یون یا پاراتوبرکلوز، یک بیماری مزمن عفونی و تحلیل‌برنده است که شیوع جهانی دارد و اساساً در نشخوارکنندگان ایجاد می‌شود. عامل این بیماری یعنی باکتری *مایکوباکتریوم آویوم* تحت گونه پاراتوبرکولوزیس اغلب در گاو و در مقیاس کمتری در نشخوارکنندگان کوچک، یعنی گوسفند و بز وجود دارد و ایجاد بیماری می‌کند. دوره کمون طولانی، اسهال، افت تولید و

www.SID.ir

Archive of SID

لاغری مفرط، مشخصه‌های اصلی بیماری در گاو می‌باشند (۸ و ۲۰). این بیماری که صنعت دام در سطح جهانی با آن درگیر است، هرساله خسارات فراوانی از قبیل کاهش تولید، افت شاخص‌های تولید مثلی و حذف دام مبتلا را متوجه دامداران می‌سازد. گسترش بیماری به بسیاری از کشورها، از طریق صادرات دام‌های دارای نژاد اصیل و آلوده که بیماری بالینی نشان نمی‌دادند، صورت پذیرفته است (٤، ١٤ و ١٥).

در کشور ما ایران هم به دلیل تعداد فراوان دامداری‌های صنعتی که از سیستم فشرده نگه‌داری استفاده می‌کنند، این بیماری اهمیت ویژه‌ای پیدا کرده است و حتی بعد از گذشت چندین سال از شناسایی این بیماری در ایران، هنوز سیاست مناسبی برای مقابله با آن اجرا نشده است (۱).

از دیگرسوی، این باکتری را یک پاتوژن زئونوز می‌دانند و تحقیقات جدید احتمال می‌دهند که این باکتری در ایجاد بیماری کرون در انسان، نقش داشته باشد. عده‌ای از محققان نیز بیان می‌کنند که حتی ممکن است بعد از پاستوریزاسیون شیر نیز این جرم بیماری‌زا در شیر، زنده باقی بماند و از این طریق به عنوان یک عامل تهدیدکننده سلامتی در سطح جامعه مطرح شود (۲۸، ۲۹، ۳۰ و ۳۱).

خسارات اقتصادی مربوط به بیماری یون، به دلیل کاهش راندمان خوراک، کاهش تولید شیر، کاهش چربی و پروتئین شیر، کاهش باروری، افزایش وقوع ورم پستان، حذف زودرس و کاهش وزن لاشه گاوهای حذفی می‌باشد (٤، ٦، ۱۷ و ۲۳).

به دلیل طبیعت مزمن بیماری و خصوصیات باکتری مولد آن، تست‌های تشخیصی رایج، کفایت لازم را در تشخیص دام آلوده را ندارند و یا از سرعت لازم برخوردار نیستند. همین موضوع یکی از مشکلات اساسی در مبارزه با بیماری در همه سطوح است (۸، ۲۰ و ۲۳).

تست‌های تشخیصی رایج، اکثراً تشخیص دام آلوده در سطح انفرادی را هدف قرار داده‌اند و برای شناسایی گله‌های آلوده، تست تشخیصی مشخصی، توصیه نشده است. شناسایی گله آلوده در بررسی همه‌گیری‌شناسی بیماری و اتخاذ سیاست‌های درست در مبارزه با بیماری نقش به‌سزایی را بازی می‌کند (۱۲ و ١٤).

می‌توان از شیر بالک تانک گله، به‌عنوان یک ابزار جهت پایش وضعیت کل گله، سود ببریم. به‌علاوه این امکان وجود دارد که در صورت شناسایی شیر آلوده، برای تغذیه گوساله‌ها از سیاست‌های مناسب و فراخور وضعیت هر گله، مانند پاستوریزاسیون، شیر خشک و ... استفاده نمود (۱۰ و ٢٦).

هدف در این مطالعه مقایسه روش‌های تشخیص آزمایشگاهی الایزا، مشاهده مستقیم، کشت و Nested-PCR شیر بالک تانک جهت تشخیص آلودگی به باکتری *مایکوباکتریوم آویوم* زیرگونه پاراتوبرکولوزیس می‌باشد.

مواد و روش‌ها

روش نمونه‌گیری از شیر مخزن:

برای نمونه‌گیری، تعدادی از دامداری‌های صنعتی اطراف تهران در نظر گرفته شدند. این واحدهای دامداری، بین ۱۰۰ تا ۲۵۰۰ رأس دام دوشا داشتند. نمونه از شیر یک وعده شیردوشی کلیه گاوهای شیری هر وعده اخذ شد.

قبل از نمونه‌گیری، مخزن کاملاً تخلیه و شستشو شد. سرد کن و همزن تانک بایستی از ابتدا روشن باشد. بعد از اتمام کامل یک وعده شیردوشی کل دام‌های شیری گله و بعد از گذشت حداقل نیم ساعت از اتمام شیردوشی، به منظور هم خوردن کافی شیر و مخلوط شدن آن، نمونه‌گیری از درب بالایی تانک صورت گرفت. برای نمونه‌گیری ابتدا قیچی و غلاف تلقیح را با الکل ۷۰٪ تمیز نموده و فرصت می‌دهیم تا الکل خشک شود. قسمت انتهایی غلاف را از سمت سبز رنگ بریده و بر نوک سرنگ سوار می‌کنیم. سپس برای برداشت شیر، به اندازه طول غلاف به عمق شیر رفته و با سرنگ نمونه را برمی‌داریم و شیر را در داخل ظرف نمونه‌گیری استریل می‌ریزیم. حداقل حجم مورد نیاز برای نمونه‌گیری، ۱۰۰ میلی‌لیتر می‌باشد. نمونه‌ها در کنار یخ و در داخل یخچال سفری و یا یخدان یونولیتی، به

www.SID.ir

Archive of SID

آزمایشگاه انتقال یافت. زمان‌بندی نمونه‌گیری به گونه‌ای بود که شیر هر دامداری، در همان روز نمونه‌گیری و پس از انتقال به آزمایشگاه، کشت داده شد و گسترش جهت مشاهده مستقیم بر روی لام داده شد. در ضمن مقادیر مورد نیاز برای الیزا و PCR به ترتیب درون یخچال و فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد، نگه‌داری شدند. تست الیزا در فاصله ٢٤ ساعت پس از رسیدن نمونه‌ها به آزمایشگاه، انجام گردید (۱۰، ١٦ و ٢٦).

روش انجام تست الایزای شیر:

از تست الایزا جهت اندازه‌گیری کمی آنتی‌بادی علیه عامل بیماری یون موجود در شیر استفاده گردید. در این مطالعه ما از کیت الایزای آنتی‌بادی یون ساخت شرکت®SVANOVA به نام (SVANOVIRTM) استفاده نمودیم. این کیت از روش الایزای غیرمستقیم، جهت اندازه‌گیری آنتی‌بادی علیه یکی از آنتی‌ژن‌های باکتری MAP، بهره می‌برد. این آنتی‌بادی در بدن دام آلوده به باکتری MAP، تولید شده و از طریق سرم خون وارد بافت پستان گردیده، از طریق شیر تولیدی دفع می‌گردد (۲۷).

برای آزمایش شیر مخزن، مطابق دستورالعمل خود کیت، مقدار ۲۵ میکرولیتر از شیر را به مدت ۱۰ دقیقه در g× ۲۰۰۰ سانتریفیوژ کرده و فاز چربی را خارج نمودیم. مایع باقی مانده را به نسبت ۱:۱۰ با بافر رقیق‌کننده کیت (PBS–Tween) مخلوط کرده و حجم ۱۰۰ میکرولیتر از این مخلوط درون هر چاهک ریخته شد. برای انجام هر بار تست، از دو کنترل مثبت و منفی در کنار نمونه‌ها استفاده گردید. بقیه مراحل تست نیز مطابق دستورالعمل خود کیت صورت گرفت. تفسیر نتایج نمونه‌ها، برأساس نسب OD نمونه به OD کنترل مثبت و منفی، که از رابطه PP (درصد مثبت بودن) محاسبه می‌شود، صورت گرفت (۵ و ۱۲)

$$PP\% = \frac{\text{Mean OD value}_{\text{sample or neg.control}}}{\text{Mean OD value}_{\text{positive control}}} \times 100$$

روش انجام کشت شیر:

از میان محیط‌های کشت مختلف باکتری *مایکوباکتریوم آویوم* تحت گونه پاراتوبرکولوزیس (MAP)، محیط کشت هرولداگ Herrold's Egg Yolk Medium (HEYM)، جهت انجام کشت شیر در این مطالعه انتخاب گردید. برای انجام کشت به حجم ۳۰ میلی‌لیتر از شیر مخزن مورد نیاز است. شیر را در فالکون ۵۰ میلی‌لیتری ریخته و به مدت ۳۰ دقیقه، در سرعت rpm ۲۵۰۰ و در دمای اتاق سانتریفیوژ نمودیم. سپس مایعات رویی را دور ریخته و رسوب (Pellet) حاصل را نگه داشتیم. رسوب را در حجم ۳۰ میلی‌لیتر از محلول ٪۰/۹ هگزا دسیل پریدنیوم کلراید (Hexadecylpyridinium chloride) معلق کرده و به مدت ۱۲ تا ۱۸ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دادیم تا عمل آلوده‌زدایی از شیر صورت پذیرد. بعد از گذشت این زمان، لوله‌ها را از انکوباتور خارج کرده و به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت rpm ۲۵۰۰ سانتریفیوژ نمودیم. بر روی رسوب به دست آمده از این مرحله، یک میلی‌لیتر از محلول آنتی‌بیوتیکی و ضد قارچ، ریخته شد. ترکیب این محلول به ترتیب زیر می‌باشد:

100 µg/ml naladixic acid
100 µg/ml vancomycin
50 µg/ml amphotericin B

مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از هر یک از سوسپانسیون‌های به دست آمد را، به چهار لوله حاوی محیط کشت HEYM منتقل نمودیم که سه عدد از این لوله‌ها حاوی مایکوباکتین است و یک عدد بدون مایکو باکتین بود. سپس لوله‌ها را برای مدت یک هفته با درب نیمه باز، به حالت افقی درون انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دادیم. هدف از این کار خارج نمودن گازهای اضافه تولیدی و رطوبت اضافی سطح محیط کشت است. بعد از گذشت یک هفته، درب لوله‌های محیط کشت را محکم کرده و لوله‌ها به حالت عمودی درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. از هفته ششم، هر هفته یک بار، یک گسترش از سطح محیط کشت تهیه نموده و پس از رنگ‌آمیزی

www.SID.ir

Archive of SID

ذیل-نیلسون، با میکروسکوپ مشاهده شدند تا نمونه‌های مثبت را شناسایی نماییم. این کار را تا هفته بیستم ادامه دادیم. نمونه‌هایی که تا این زمان منفی هستند را منفی در نظر گرفتیم (۲۱ و ۲۵).

روش انجام Nested-PCR شیر:

استخراج DNA:

برای انجام Nested-PCR شیر، حجم ۱۰ میلی‌لیتر شیر نیاز است. ابتدا باید عمل استخراج DNA از شیر صورت پذیرد و سپس روی DNA استخراج شده، Nested-PCR انجام شود. جهت استخراج DNA از نمونه شیر مخزن، شیر را داخل فالکون ریخته و به آن ۱۰۰ میکرولیتر از Triton X 100 اضافه کرده و به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ٤۵۰۰ rpm سانتریفیوژ نمودیم. لایه چربی و فاز مایع را از فالکون خارج کرده و پلیت به دست آمده را به میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیترمنتقل کردیم.

بر روی پلیت، ٤۰۰ میکرولیتر از بافر لیزکننده مایکوباکتریوم ریخته و به مدت یک شب (Over night) در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دادیم. این بافر با استفاده از فرمول زیر قابل ساخت است:

2 ml 2 M ، 8 ml 5 M NaCL،(86.6 ml H2O
400 µl 0,5 M ،3 ml 20% SDS، TrisHCl (pH 8)
220 µl 15.6 mg/ml proteinase K)،EDTA

در مرحله بعدی میکروتیوب‌ها را در ظرف حاوی مخلوط گرانول‌های یخ خشک و اتانول وارد کرده و فرصت دادیم تا فریز شوند. بعد بر روی Heat block، که از پیش بر روی ۵۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شده است، قرار دادیم تا ذوب شوند. این عمل فریز انجماد و ذوب را برای دو مرتبه دیگر تکرار کردیم. در مرحله بعدی ٤۰۰ میکرولیتر فنل به میکروتیوب‌ها اضافه شد و به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس گردید. سپس به مدت دو دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد و با سرعت rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ کرده و فاز مایع را به یک میکروتیوب جدید انتقال دادیم. همان مرحله را با مخلوط فنل/ کلروفرم/ ایزوآمیل الکل که به نسبت ۲۵:۲٤:۱ مخلوط شده‌اند، تکرار نمودیم و یکبار نیز با کلروفرم/ ایزوآمیل الکل که به نسبت ۲٤:۱ مخلوط شده‌اند، این عمل تکرار شد. به آخرین فاز مایعی که به‌دست می‌آمد، ٤۰ میکرولیتر از سدیم استات ۳ مولار و ۸۰۰ میکرولیتر از اتانول خالص اضافه کرده و به خوبی مخلوط نمودیم.

سپس میکروتیوب‌ها را برای ۳۰ دقیقه در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده و بعد از آن به مدت ۲۰ دقیقه، در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد و با سرعت rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ کردیم تا DNA رسوب کند. رسوب DNA را با ۸۰۰ میکرولیتر اتانول سرد (Ice cold) شستشو داده و به مدت ۵ دقیقه، در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد و با سرعت rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ کردیم و بعد قسمت بالایی را خشک کرده و پلیت را خشک نمودیم. آنگاه بر روی پلیت DNA، ۵۰ میکرولیتر از بافر TE ریخته شد و DNA استخراج شده را در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد، نگه‌داری نمودیم (۲، ۳ و ۱۰).

مواد و برنامه انجام Nested-PCR

جهت بررسی وجود باکتری Map در شیر مخزن، تست Nested PCR با استفاده از پرایمر اختصاصی IS900، استفاده شد. توالی پرایمرها بر طبق روش Stabel و همکاران از محققان مرکز ملی بیماری‌های حیوانات ایالات متحده، انتخاب شد. پرایمرها ساخت کمپانی MWG آلمان بودند. برای انجام PCR، از ترمال سایکلر گرادیانت ساخت شرکت ESCO مدل Swift™ Maxi استفاده شد (۲٦).

توالی جفت پرایمر خارجی به ترتیب زیر است و اندازه قطعه هدف آن bp ٤۰۰ می‌باشد.

'MP 1 forward →5'-GTTCGGGGCCGTCGCTTAGG-3
'MP 2 reverse →5'-GAGGTCGATCGCCCACGTGA.- 3

توالی جفت پرایمر داخلی نیز به ترتیب زیر است و اندازه قطعه هدف آن bp ۱۹۸ می‌باشد.

'NMP 2 forward → 5'- GCTTAGGCTTCGAATTGCC - 3
'NMP 2 reverse → 5'- CTCCGTAACCGTCATTGTCC - 3

www.SID.ir

Archive of SID

در مرحله اول، در طول یک برنامه دمایی، سکانس هدف در DNA استخراج شده از نمونه‌ها، در صورت وجود ازدیاد می‌یابد و تکثیر می‌شود. اندازه قطعه هدف این مرحله ٤٠٠bp می‌باشد. در جدول شماره ١، مقدار غلظت مولاری و حجم مورد نیاز هر یک از مواد مصرفی در مرحله اول PCR که جفت پرایمرهای خارجی در آن عمل می‌کنند، آمده است (٢٦).

جدول ١- مقدار غظت و حجم مواد مورد نیاز PCR مرحله اول

ردیف	ترکیبات	غلظت نهایی	مقدارحجم مورد نیاز
١	D.W.		33.5µL
٢	10X PCR Buffer	1X	5µL
٣	dNTP mix (10 mM)	0.2 mM of each	1µL
٤	Forward primer MP1 (10 pmol/µl)	2 mM	2µL
٥	Reverse primer MP2 (10 pmol/µl)	2 mM	2µL
٦	Taq DNA Polymerase (5u/µl)	1.25 u/50µl	0.5µL
٧	MgCl2 (25 mM)	1.5 mM	3µL
٨	Template DNA		5µL
	حجم نهایی		50µL

برنامه دمایی مرحله اول ، به شرح زیر است:

٩٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤ دقیقه
٩٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ١ دقیقه
٦٢ درجه سانتی‌گراد به مدت ١ دقیقه
٧٢ درجه سانتی‌گراد به مدت ١ دقیقه و ٣٠ ثانیه
تکرار مراحل ٢ تا ٤ برای ٣٠ مرتبه
٩٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ٧ دقیقه

در مرحله دوم، محصول PCR مرحله قبل به یک میکروتیوب جدید منتقل شد و به عنوان الگو استفاده گردید. در این مرحله قطه توالی کوچک‌تر، که در دل قطعه اول جای دارد، با طول 198 bp تکثیر می‌گردد. برنامه دمایی مرحله دوم، مانند مرحله اول است، با این تفاوت که تعداد سیکل‌ها در این مرحله ٢٥ سیکل است (٢٦).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- مقدار غظت و حجم مواد مورد نیاز PCR مرحله دوم

ردیف	ترکیبات	غلظت نهایی	مقدارحجم مورد نیاز
۱	D.W.		34.5µL
۲	10X PCR Buffer	1X	5µL
۳	dNTP mix (10 mM)	0.2 mM of each	1µL
٤	Forward primer NMP1 (10 pmol/µl)	2 mM	2µL
٥	Reverse primer NMP2 (10 pmol/µl)	2 mM	2µL
٦	Taq DNA Polymerase (5u/µl)	1.25 u/50µl	0.5µL
۷	MgCl2 (25 mM)	1.5 mM	3µL
۸	Template DNA		2µL
	حجم نهایی		50µL

جهت بررسی محصول PCR از ژل آگارز ۲٪، رنگ‌آمیزی به‌وسیله رنگ اتیدیوم بروماید و DNA Marker 100bp استفاده گردید (۲ و ۳).

روش انجام مشاهده مستقیم

برای اجرای این روش، ابتدا مقدار ۱۰ میلی‌لیتر شیر را در ۲۵۰۰g سانتریفیوژ نموده و رسوب آن با استفاده از حرارت بر روی لام فیکس شد. سپس لام به روش ذیل نیلسن رنگ‌آمیزی شد. به این منظور، بر روی لام کربول فوشیل ریخته شد و بعد از گذشت ۱۵ دقیقه با اسید الکل، به مدت ۱۵ دقیقه و به دفعات متعدد رنگ‌زدایی انجام شد. سپس رنگ متیلن بلو به مدت بیست ثانیه بر روی لام ریخته شد و بعد با آب شسته و اجازه داده شد تا با هوا خشک گردد. لام با لنز 100X میکروسکوپ، به همراه روغن امولسیون، مشاهده شد (۱۹).

یافته‌ها

از میان ۱۰۰ نمونه شیر مخزن آزمایش شده در این مطالعه تعداد ۸۲ نمونه (۸۲٪) در محیط کشت مثبت بودند و کلنی باکتری Map در آنها رشد نشان داد. ولی در باقی نمونه‌ها، یعنی تعداد ۱۸ نمونه (۱۸٪) بعد از گذشت مدت زمان بیست هفته، کلنی در محیط کشت رشد نکرد و این نمونه‌ها در کشت منفی بودند.

از کل ۱۰۰ نمونه، تعداد ۹٤ نمونه شیر در تست IS900 Nested PCR مثبت بوده‌اند (۹٤٪).

بر طبق توصیه شرکت سازنده کیت الایزا، نمونه‌هایی که PP حاصل از تست الایزای آنها کمتر و یا مساوی با ۵ باشد را به عنوان منفی تلقی می‌شوند. مقادیرPP بین ۵ تا ۱۵ را به عنوان شیوع پایین و مقادیرهای بالاتر از ۱٦ را به عنوان شیوع بالا می‌شناسیم.

بر این اساس، تعداد ۲ نمونه (۲٪) در محدوده منفی، ٦٦ نمونه در محدوده شیوع پایین (٦٦٪) و ۳۲ نمونه در محدوده PP شیوع بالا (۳۲٪) قرار داشتند. در این مطالعه شیوع پایین و بالا در تست الایزا را به عنوان مثبت تلقی نمودیم. به عبارت دیگر از مجموع نمونه‌های آزمایش شده، ۹۸٪ با الایزا مثبت بوده‌اند و تنها ۲٪ منفی داشته‌ایم.

در تست مشاهده مستقیم به کمک رنگ‌آمیزی ذیل نیلسن، در ۳۳ نمونه (۳۳٪) کلامپ باکتری مشاهده شد.

تعداد چهار نمونه وجود داشت که در تست الایزا مثبت بودند ولی در تست PCR منفی شدند. این چهار نمونه به علاوه ۱۲ نمونه دیگر که الایزای آنها مثبت بود، در مجموع ۱٦ نمونه، در محیط کشت، رشد باکتری نداشتند.

تعداد ۸۲ نمونه در هر سه تست الایزا، کشت و Nested PCR مثبت بودند (۸۲٪). تعداد ۳۳ نمونه در هر چهار تست

www.SID.ir

Archive of SID

انجام شده مثبت بودند. تعداد ۱۲ نمونه وجود داشتند که حاصل کشت آن منفی بوده ولی در Nested PCR و الایزا، مثبت بودند.

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج حاصل در این مطالعه، علی‌رغم اینکه تست الایزا تعداد بیشتری از نمونه‌ها را به عنوان مثبت اعلام نمود، ولی تعداد چهار نمونه وجود داشت که در تست الایزا مثبت بودند ولی در تست PCR منفی شدند. این چهار نمونه به علاوه ۱۲ نمونه دیگر که الایزای آنها مثبت بود (در مجموع ١٦ نمونه) در محیط کشت نیز، رشد نداشتند. با توجه به اینکه اکثر منابع موجود، کشت در محیط کشت اختصاصی را به‌عنوان استاندارد طلایی در تشخیص باکتری Map می‌شناسند، می‌توان چنین نتیجه گرفت که در تست الایزای شیر مخزن، مثبت کاذب داریم. پس جواب‌های مثبت آن برای قضاوت بر روی وضعیت کلی گله، قابل اعتماد نمی‌باشد.

روش مشاهده مستقیم به کمک رنگ آمیزی ذیل نیلسن نیز فقط توانایی شناسایی ۳۳ عدد از موارد مثبت را دارا بود. منابع جدید از جمله OIE این روش را جهت شناسایی Map در شیر و مدفوع مناسب نمی‌دانند. نتایج این تحقیق نیز این موضوع را تایید می‌نماید (۲۰ و ۲۳).

استفاده از مقادیر بالاتر شیر به عنوان نمونه اولیه، شانس جداسازی DNA باکتری Map را بهبود می‌بخشد. از این رو ما در این مطالعه از میزان ۱۰ میلی‌لیتر شیر به عنوان نمونه اولیه در مرحله استخراج DNA، استفاده کردیم.

ما در این مطالعه از Nested PCR برای مطالعه مولکولی DNA استخراج شده از شیر مخزن استفاده کردیم.

مزایای این روش تغییر یافته PCR عبارتند از:

حساسیت در این روش به میزان زیادی بالاتر است.

نیاز به پروب (کاوشگر) و تأییدهای بعدی کمتر است.

ویژگی این روش به‌خاطر حضور پرایمرهای درونی بالاتر است. به دلیل انتقال محصول PCR دور اول به لوله جدید، ممانعت کننده‌ها رقیق می‌شوند. چون در روش استخراج مورد استفاده ما، از فیلتر استفاده نشده است، احتمال حضور ممانعت‌کننده‌های PCR وجود دارد. همانگونه که اشاره شد، در Nested-PCR به دلیل انتقال محصولات دور اول به لوله جدید، ممانعت کننده‌ها هم رقیق می‌شوند (۲ و ۳).

تنها مطالعه‌ای که تا حدی با کار ما مشابهت داشت، مطالعه Sharma و همکارانش در هندوستان بود. این مطالعه برای مقایسه الایزای شیر، کشت شیر و PCR شیر در جهت تشخیص آلودگی یون در گاوهای شیری، صورت پذیرفت. از میان نمونه‌های شیر ۵۰ رأس گاوی که به هر سه روش الایزا، کشت و PCR بررسی شده بودند، ٨٤ ٪ در کشت مثبت بودند. بر طبق این مطالعه ۵۰٪ از کشت‌های انجام شده از چربی و ٦٢٪ از کشت‌های انجام شده از رسوب مثبت بوده است. محیط کشت مورد استفاده در این مطالعه، یعنی محیط HEYM، همان محیطی است که ما در این مطالعه، از آن استفاده کردیم. الایزا تنها توانست ۳۲/۱ ٪ از موارد مثبت را پیدا کند. اما روشی که برای استخراج و PCR در این مطالعه استفاده شده است، تنها ٦٪ از ۵۰ نمونه شیر را مثبت تشخیص داده است. همانطور که دیده می‌شود در این تحقیق حساسیت تست PCR بسیار پایین وحتی پایین‌تر از تست الایزا است. حتی خود آن محققان اذعان داشته‌اند که باید این روش بهینه گردد (۲۲).

این در حالی است که Buergelt و Williams در سال از دانشگاه فلوریدا در مطالعات خود نشان دادند که حتی دام‌هایی که نتیجه تست الایزای آنها، در محدوده مشکوک و منفی بوده، تست Nested PCR شیر می‌تواند مثبت باشد (۷).

Nielsen و همکارانش شیر مخزن ۹۰۰ گله از ٦ ناحیه کشور دانمارک را به وسیله تست الایزا مورد بررسی قرار داده‌اند و در مجموع ۷۰٪ از این گله‌ها آلوده بودند (١٦).

در مطالعه حق‌خواه و همکارانش در ایران که در استان فارس برای تعیین شیوع بیماری به وسیله PCR شیر مخزن انجام

www.SID.ir

Archive of SID

شد، از ۱۱۰ گله در سه منطقه استان فارس (شیراز، مرودشت و سپیدان)، تعداد ۱۲ گله (۱۱٪) بر اساس تست IS900-PCR مثبت بوده‌اند. شیوع بیماری در مناطق مختلف تفاوتی از ۸/٦٪ تا ۲۳٪ نشان می‌دهد. آمار پایین آلودگی گله‌ها در استان فارس با آمار به دست آمده در استان تهران در این تحقیق، تفاوت فاحشی دارد. البته در این مطالعه حجم نمونه شیر مخزن برای استخراج DNA، ۰/۵ میلی‌لیتر شیر بوده است. استفاده از مقادیر پایین نمونه شانس جداسازی باکتری را کاهش می‌دهد (۱۳).

استفاده از روش‌های مختلف استخراج DNA از نمونه شیر مخزن می‌تواند بر حساسیت PCR تاثیر گذار باشد و با بهبود روش استخراج DNA، می‌توان حساسیت تست را بهبود بخشید. البته باید به این نکته توجه داشت که کاربرد بسیاری از تکنیک‌های استخراج DNA در ایران، به دلیل در دسترس نبودن مواد و تجهیزات لازم، مانند تکنیک Bead beated عملی نیست.

در مطالعه‌ای که Stabel و همکارانش در ٦۱ گله از ۱۰ ایالت کشور آمریکا انجام داده‌اند، نتایج حاصل از الایزا و کشت مدفوع انفرادی گاوها را با نتایج حاصل از PCR و کشت شیر مخزن گله‌ها، مورد مقایسه قرار داده‌اند. تمام گله‌های انتخاب شده، حداقل یک مورد گاو الایزا مثبت داشتند. از هرکدام از گله‌های تحت بررسی در این مطالعه، علاوه بر نمونه‌گیری شیر مخزن برای PCR، متناسب با سایز گله تعدادی گاو انتخاب شده و از آنها کشت مدفوع به عمل آمد (در مجموع ۷۱۲ گاو که به صورت اتفاقی از ٦۱ گله انتخاب شده بودند). در این مطالعه ۳۵ فارم (٦۸٪) در تست IS900 Nested-PCR مثبت بودند. جالب توجه اینکه ۱۱ گله (٥۲/٤٪) از گله‌هایی که هیچ مورد مثبتی در کشت مدفوع نداشتند، در تست PCR مثبت بودند و بقیه موارد مثبت از ۲٤ گله‌ای بود که حد اقل ۱ مورد کشت مثبت مدفوع داشتند. ولی در ۷ گله که حداقل یک مورد کشت مثبت داشتند، جواب PCR شیر منفی بوده است.

همچنین ۷۹٪ گله‌هایی که حداقل سه رأس گاو الایزا مثبت داشته‌اند، کشت شیر مخزن مثبت داشته‌اند. این درصد در گله‌هایی که یک یا دو رأس گاو الایزا مثبت داشته‌اند، برابر با ٤۹٪ است. این محققان بر این نکته تأکید داشته‌اند که حتی در گله‌های الایزا مثبتی که کشت مدفوع گاوها منفی می‌باشد، امکان آلودگی شیر به باکتری Map وجود دارد (۲٦).

در مطالعه Pillai و همکارش از دانشگاه پنسیلوانیای آمریکا نشان داده شد که اگر میزان آلودگی به باکتری در نمونه‌ها بالا و در حد ۱۰۰ CFU/ml باشد، حساسیت IS900 PCR کامل و ۱۰۰٪ است. در صورتی که اگر میزان آلودگی به باکتری در نمونه‌ها پایین و در حد ۱۰ CFU/ml باشد، حساسیت پایین‌تر و در حد ٥۰٪ است. در قسمت دوم از این تحقیق، شیر ۲۱۱ رأس گاو به‌وسیله کشت و PCR بررسی شد. در کشت ۹ نمونه مثبت (٤٪) ولی در PCR ٦۹ نمونه (۳۳٪) مثبت بودند. در قسمت سوم از این کار تحقیقی، تعداد ۲۰ نمونه شیر مخزن، از ۲۰ واحد مورد بررسی قرار گرفت که در از میان آنها ۱۰ نمونه با PCR مثبت بود و تنها یک نمونه با کشت مثبت شد. در مجموع، این محققان حساسیت تست PCR را بیشتر از کشت ارزیابی کرده‌اند. به علاوه میزان آلودگی را در مثبت شدن نتایج دخیل دانسته‌اند (۱۸).

در یک مطالعه گسترده که در سال ۲۰۰۱ و در کشور سوئیس انجام گردیده است، که از ۱۳۸٤ گله در مناطق مختلف سوئیس نمونه‌گیری شیر مخزن انجام شده و به‌وسیله IS900 Nested-PCR بررسی به عمل آمده، مشخص گردید که ۲۷۳ گله (۱۹/۷٪) از نظر وجود باکتری Map در شیرشان مثبت هستند. میزان شیوع در مناطق مختلف سوئیس، تفاوت فاحشی از ۱/۷٪ تا ٤۹/۲ ٪، نشان می‌دهد (۱۰).

Eamens و همکارانش از استرالیا پنج متد مختلف کشت مدفوع را مورد مقایسه قرار دادند و از این بین، ابتدا روشی که در آن آلوده‌زدایی با محلول HPC با غلظت ۰/۹٪ و کشت در محیط رادیومتریک BACTEC صورت می‌پذیرد، بیشترین

www.SID.ir

Archive of SID

حساسیت را دارا بود. بعد از آن روشی که در آن از همان محلول HPC با غلظت ۰/۹٪ جهت آلوده‌زدایی و از محیط HEYM جهت کشت استفاده شده بود، بهترین نتایج را در بر داشت (۱۲).

در این مطالعه از همین روش آلوده‌زدایی و همین محیط کشت استفاده شد. فرمولاسیون ساخت محیط کشت HEYM از دستورالعمل OIE که در دستنامه روش‌های تشخیصی و واکسن آن سازمان ذکر شده، اقتباس گردید (۱۲).

Ristow و همکارانش از برزیل در سال ۲۰۰٦ به مقایسه سه فرمولاسیون ساخت محیط HEYM پرداختند و اعلام کردند که فرمول پیشنهادی OIE بهترین نتیجه را به دنبال دارد (۲۱).

Dundee و همکارانش از دانشگاه کوینز ایرلند، چهار روش مختلف آلوده‌زدایی از شیر جهت کشت باکتری MAP را مقایسه نمودند و به این نتیجه رسیدند که استفاده از محلول HPC بهترین نتایج را در بر دارد (۱۱).

در خاتمه نتایج مطالعه ما همانند بسیاری از مطالعات، شیوع بالای این باکتری را در شیر تانک دامداری‌های استان تهران نشان می‌دهد که این امر اقدامات جدی به منظور کنترل و مبارزه با این عامل را طلب می‌نماید.

منابع

۱. حسنی طباطبایی، ع. و فیروزی، ر. ۱۳۸۰. بیماری‌های باکتریایی دام. چاپ اول، انتشارات دانشگاه تهران، صفحات: ٤۲۵–۳۹۸.

۲. شاه حسینی، م.ح. و سید رضای تهرانی، م . ۱۳۸٤. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز. چاپ اول، انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی واحد اسلامشهر– شهریار/ شهرقدس، صفحه: ۱٦۵.

۳. کریمی، م. و زینلی، س. ۱۳۸۳. PCR مبانی و کاربردهای آزمایشگاهی. (ترجمه)، تالیف: مکفرسون، ام. ج. مولر، اس. جی. چاپ اول، انتشارات اندیشه ظهور، صفحات: ۱۱۸– ۱.

4. Abbas, B. and Riemann, H.P. 1983. Diagnosis of Johne's disease (paratuberculosis) in northern California cattle and a note on its economic significance. Calif. Vet. 37: 16.
5. Abbas, B., Riemann, H.P. and Lonnerdal, B. 1983. Isolation of specific peptides from Mycobacterium paratuberculosis protoplasm and their use in enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of paratuberculosis (Johne's disease) in cattle. Am. J. Vet. Res. 44: 2229-2236.
6. Benedictus, G., Dijkhuizen, A.A. and Stelwagen, J. 1987. Economic losses due to paratuberculosis in dairy cattle. Vet. Rec. 121: 142-146.
7. Buergelt, C.D., Williams, J.E. 2004. Nested PCR on blood and milk for the detection of Mycobacterium avium subsp paratuberculosis DNA in clinical and subclinical bovine paratuberculosis. Australian Veterinary Journal. 82(8): 497-503.
8. Chiodini, R.J., Van Kruiningen, H.J. and Merkal, R.S. 1984. Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): The current status and future prospects. Cornell Vet. 74: 218-262.
9. Collins, M.T., and Sockett, D.C. 1993. Accuracy and economics of the USDA-licensed enzyme-linked immunosorbent assay for bovine paratuberculosis. JAVMA. 203: 1456-1463.
10. Corti, S. and Stephan, R. 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: 2-7.
11. Dundee, L., Grant, I.R., Ball, H.J. and Rowe, M.T. 2001. Comparative evaluation of four decontamination protocols for the isolation of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis from milk. Letters in Applied Microbiology. 33:173-177.

www.SID.ir

Archive of SID

12. Eamens, G.J., Whittington, R.J., Marsh, I.B., Turner, M.J., Saunders, V., et al. 2000. Comparative sensitivity of various faecal culture methods and ELISA in dairy cattle herds with endemic Johne's disease. Veterinary Microbiology. 77: 357-367.
13. Haghkhah, M., Ansari-Lari, M., Novin-Baheran, A.M. and Bahramy, A. 2008. Herd-level prevalence of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis by bulk-tank milk PCR in Fars province (southern Iran) dairy herds. Preventive Veterinary Medicine. 86:8-13.
14. Johnson-Ifearulundu, Y.J. and Kaneene, J.B. 1997. Epidemiology and economic impact of subclinical Johne's disease: A review. Vet. Bull. 67: 437-447.
15. Johnson-Ifearulundu, Kaneene, Y.J., Sprecher, J.B., Gardiner, D.J. and Lloyd, J.W. 2000. The effect of subclinical Mycobacterium paratuberculosis infection on days opens in Michigan, USA, Dairy Cows. Preventive Veterinary Medicine. 46: 171-181.
16. Nielsen, S.S., Thamsborg, S.M., Houe, H. and Bitsch, V. 2000. Bulk-tank milk ELISA antibodies for estimating the prevalence of paratuberculosis in Danish dairy herds. Preventive Veterinary Medicine. 44: 1-7.
17. Ott, S.L., Wells, S.J. and Wagner, B.A. 1999. Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. Prev. Vet. Med. 40:179-192.
18. Pillai, S.R. and Jayarao, B.M. 2002. Application of IS900 PCR for detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis directly from raw milk. American Dairy Science Association. 85:1052-1057.
19. Quinn, P.J., Markey, B.K., Carter, M.E. and Donnelly, W.J.C. 2002. Veterinary microbiology and microbial disease. Blackwell Sience Ltd. U.S.A., First Edition. p: 97-105.
20. Radostits, O.M., Gay, C.C., Hinchcliff, K.W. and Constable, P.D. 2007. Vetrinary medicine, a textbook of the disease of cattle, horses, sheep, pigs and goats. Saunders, Philadelphia, Tenth Edition. p: 1017-1044.
21. Ristow, P., Silva, M.G., Fonseca, L.S. and Lilenbaum, W. 2006. Evaluation of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis faecal culture protocols and media. Pesq. Vet. Bras. 26(1): 1-4.
22. Sharma, G., Singh, S.V., Sevilla, I., Singh, A.V., Whittington, R.J. and Juste, R.A. 2008. Evaluation of indigenous milk ELISA with m-culture and m-PCR for the diagnosis of Bovine Johne's disease (BJD) in lactating Indian dairy cattle. Research in Veterinary Science. 84: 30-37.
23. Smith, B.P. 2009. Large animal internal medicine. Mosby Elsevier, USA, Forth Edition. p: 881-887.
24. Sockett, D.C., Conrad, T.A., Thomas, C.B. and Collins, M.T. 1992. Evaluation of four serological tests for bovine paratuberculosis. J. Clin. Microbiol. 30: 1134-1139.
25. Stabel, J.R. 1996. An improved method for cultivation of Mycobacterium paratuberculosis from bovine fecal samples and comparison to three other methods. J. Vet. Diagn. Invest. 9: 375-380.
26. Stabel, J.R., Wells, S.J. and Wagner, B.A. 2002. Relationships between fecal culture, ELISA, and bulk tank milk test results for Johne's disease in US dairy herds. American Dairy Science Association. 85: 525-531.
27. Sweeney, R.W., Whitlock, R.H., Buckley, C.L. and Spencer, P.A. 1995. Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle. J. Vet. Diagn. Invest. 7: 488-493.
28. Sweeney, R.W., Whitlock, R.H. and Rosenberger, A.E. 1992. Mycobacterium paratuberculosis cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows. J. Clin. Microbiol. 30: 166-171.
29. Taylor, J.H. 2000. Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in the causation of Crohn's disease. World Journal of Gastroenterology. 6(5): 630-632.
30. Taylor, J.H. and Bull, T. 2002. Crohn's disease caused by Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis- a public health tragedy whose resoution is long overdue. J. Med. Microbial. 51: 3-6.
31. Taylor, J.H. and El-Zaatari, F.A.K. 2004. The Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis problem and its relation to the causation of Crohn disease. IWA Publishing, London, UK. p: 74-95.

www.SID.ir