

شناسایی باکتری‌های رایج ورم پستان در تانک شیر گاوداری‌ها با روش PCR

مهدی وجگانی* سید مصطفی پیغمبری حسن حکیمی

گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

(دریافت مقاله: ۱ خرداد ماه ۱۳۸۵، پذیرش نهایی: ۱ آذر ماه ۱۳۸۵)

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی میزان آلودگی تانک شیر دامداری‌ها به پاتوژن‌های اصلی ورم پستان به روش PCR بود. تعداد ۴۴ نمونه شیر از تانک حمل شیر دامداری‌ها اخذ و سربعاً به آزمایشگاه ارسال شد. DNA باکتریایی استخراج و با استفاده از پرایمرهای یونیورسال که بر اساس ژن مشترک باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، استرپتوکوکوس آگالاکتیه، استرپتوکوکوس دیس گالاکتیه، اشیریشیا کلی، استرپتوکوکوس یوبریس و استرپتوکوکوس پارایوبریس طراحی شده بود واکنش PCR انجام شد. از ۴۴ نمونه اخذ شده، ۲۸ نمونه مثبت (۶۳/۶ درصد) یافت شد. درصد نمونه‌های مثبت برای دامداری‌های با تولید زیر ۳، ۱۰-۳، و بیش از ۱۰ تن به ترتیب ۴۸، ۸۵، و ۱۰۰ بود. روش PCR سرعت و دقت لازم را برای تشخیص معمول پاتوژن‌های اصلی ورم پستان داشت. پرایمرهای Universal به کار رفته در این مطالعه قادر بود باکتری‌های فوق‌الشاره که از عوامل مهم ورم پستان هستند را تشخیص دهد.

واژه‌های کلیدی: ورم پستان، PCR، استافیلوکوکوس اورئوس، استرپتوکوکوس آگالاکتیه، استرپتوکوکوس دیس گالاکتیه.

مواد و روش کار

نمونه‌گیری: مجموعاً ۴۴ نمونه شیر از تانک شیر دامداری‌های اطراف تهران اخذ گردید. نحوه نمونه‌گیری بدین ترتیب بود که در محل کارخانه شیر پاستوریزه از تانک حمل شیر ارسالی از سوی دامپرووری‌ها نمونه‌گیری انجام شد. ابتدایه وسیله همزن شیر تانک به خوبی مخلوط شده و سپس نمونه لازم داخل لوله استریل دارای درپوش مناسب اخذ گردید. ۱۸ نمونه شیر مخزن از کارخانه شیر پاستوریزه واقع در جاده قدیم کرج و ۲۶ نمونه از کارخانه شیر پاستوریزه کامنوش واقع در ورامین اخذ گردید. نمونه‌ها در کنار یخ تا آزمایشگاه حمل شد و تا فرآوری بیشتر در یخچال در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری گردید.

استخراج DNA: برای استخراج DNA باکتریایی از شیر (با هدف یکی از پاتوژن‌های: استافیلوکوکوس اورئوس، استرپتوکوکوس آگالاکتیه، استرپتوکوکوس دیس گالاکتیه، استرپتوکوکوس یوبریس، استرپتوکوکوس پارایوبریس و یا اشیریشیا کلی) از روش جوشاندن و همچنین کیت تجاری استفاده شد. که روش جوشاندن (۶) کفایت لازم را نداشت لذا از کیت استخراج DNA تجاری (Roche, Germany) طبق پروتکل تشریح شده در کاتالوگ کیت استفاده شد. به طور خلاصه ۲۰۰ میکرولیتر شیر به همراه ۲۰۰ میکرولیتر بافر متصل شونده و ۴۰ میکرولیتر Proteinase K در یک میکرو تیوب ۰/۵ میلی لیتر مخلوط شدند و در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه نگهداری گردیدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانل به میکرو تیوب فوق اضافه و به هم زده شد. یک فیلتر تیوب را در داخل لوله جمع‌آوری قرار داده و مخلوط تهیه شده در داخل آن ریخته شد و به مدت یک دقیقه در دور ۸۰۰۰rpm (Sigma I-15K, Germany) سانتریفوژ شد. سپس فیلتر تیوب در داخل لوله جمع‌آوری جدید قرار گرفت، ۵۰۰ میکرو لیتر بافر حذف کننده ممانعت کننده‌ها به آن اضافه شد و به مدت یک دقیقه در دور ۸۰۰۰rpm

مقدمه

ورم پستان، التهاب غدد پستان می‌باشد که معمولاً ناشی از عفونت‌های باکتریایی است. ورم پستان به عنوان پر هزینه‌ترین بیماری گاو شیری در سرتاسر جهان مطرح است و سالیانه خسارات زیادی به صنعت دامپرووری در جهان وارد می‌سازد. خسارات اقتصادی آن ناشی از کاهش تولید، دور ریختن شیر، افزایش حذف، هزینه‌های درمان و دامپزشک و... می‌باشد (۱۳، ۹، ۸، ۲). باکتری‌های اصلی ایجاد کننده ورم پستان را به دو دسته واگیردار (استافیلوکوکوس اورئوس، استرپتوکوکوس آگالاکتیه و مایکوپلاسما بویس) و محیطی (اشیریشیا کلی، استرپتوکوکوس دیس گالاکتیه و استرپتوکوکوس یوبریس) تقسیم بندی می‌کنند (۱۳، ۲۰، ۸). هنوز یک واکنش موثر علیه ورم پستان گاو در دسترس نیست و پیش‌گیری نیازمند تست‌های حساس، سریع و اختصاصی برای تشخیص باکتری‌های اصلی که ضررهای سنگینی را به صنعت دامپرووری می‌رسانند، می‌باشد. روش‌های سنتی که برای تشخیص ورم پستان به کار می‌روند، سخت و زمان‌بر است (۵). روش‌های مولکولی، ابزارهایی کارا برای توسعه آزمایش‌های تشخیصی جدید می‌باشند. روش‌های جدید با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (Polymerase chain reaction, PCR) که بر پایه سکانس‌های نواحی ۱۶S و ۲۳SrDNA می‌باشند به خوبی و با موفقیت برای تشخیص خیلی از باکتری‌ها به کار رفته‌اند (۱۴، ۱۱). پرایمرهای Uni678، Uni888 و Uni1870 و Uni2308 بر اساس ژن مشترک باکتری‌ها استافیلوکوکوس اورئوس، استرپتوکوکوس آگالاکتیه، اشیریشیا کلی، استرپتوکوکوس دیس گالاکتیه، استرپتوکوکوس یوبریس و استرپتوکوکوس پارایوبریس طراحی شده است و قادر است هر کدام از این باکتری‌ها را که در نمونه شیر موجود باشند، تشخیص دهد (۱۴). هدف از این مطالعه بررسی میزان آلودگی تانک شیر دامداری‌های اطراف تهران به این پاتوژن‌ها با روش PCR می‌باشد.



ایران) جهت رنگ آمیزی و بعد به مدت ۱۰ دقیقه در ظرف حاوی آب مقطر جهت شستشو قرار داده شد. باندهای DNA روی ژل، بلافاصله، با استفاده از نور ماوراء بنفش ترانس ایلومیناتور و دوربین عکسبرداری از ژل (UVP, UK; Visi-Doc-It system; مشاهده و تصویربرداری شدند. برای تعیین وزن ملکولی پلاسمیدها از نرم افزار کامپیوتری (Seqaid II (Ver. 3.5, Kansas State University استفاده شد.

نتایج

DNA ده نمونه شیر از تانک مخزن بوسیله روش جوشاندن استخراج گردید و بوسیله پرایمرهای Uni1870 و Uni2308، واکنش PCR انجام شد ولی در هیچ یک از نمونه‌ها باندی مشاهده نشد. به این نتیجه رسیدیم که جوشاندن کارایی کافی برای استخراج DNA نمونه‌های بالینی همچون شیر را ندارد و به همین جهت استخراج DNA با استفاده از کیت تجاری شد. واکنش PCR بر روی ۱۷ نمونه شیر با استفاده از پرایمرهای Uni1870 و Uni2308 و بر روی ۲۶ نمونه شیر با استفاده از پرایمرهای Uni678 و Uni888 صورت گرفت. وزن باند حاصله از پرایمرهای Uni1870 و Uni2308 ۴۳۸bp، و وزن باند حاصله از پرایمرهای Uni678 و Uni888 ۲۱۰bp بود (تصویر ۱).

در این مطالعه دامداری‌ها را بر اساس میزان تولید به دامداری‌های با تولید کمتر از ۳ تن، دامداری‌های با تولید ۳-۱۰ تن، و دامداری‌های با تولید بیش از ۱۰ تن تقسیم شدند. در مجموع از ۴۴ نمونه اخذ شده ۲۸ نمونه مثبت (۶۳/۶ درصد) و ۱۶ نمونه منفی (۳۶/۴ درصد) بود. نتایج حاصل از PCR همه نمونه‌ها نشان داد که در دامداری‌های با تولید زیر ۳ تن از جمع ۲۷ نمونه، ۱۳ مورد مثبت (۴۸ درصد) و ۱۴ مورد منفی (۵۲ درصد) بودند و در دامداری‌های با تولید ۳ تا ۱۰ تن از جمع ۱۴ نمونه، ۱۲ مورد مثبت (۸۵ درصد) و ۲ مورد منفی (۱۵ درصد) بودند. گر چه میزان آلودگی در دامداری‌های بیش از ۱۰ تن ۱۰۰ درصد به دست آمده است ولی با توجه به کم بودن نمونه‌ها (۳ نمونه) نمی‌توان به این نتیجه اعتماد کافی داشت. پرایمرهای Universal به کار رفته در این مطالعه قادر بود باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، استرپتوکوکوس آگالکتیه، استرپتوکوکوس دیس گالاکتیه، انتریشیا کلی، استرپتوکوکوس یوبریس و استرپتوکوکوس پارایوبریس که از عوامل مهم ورم پستان هستند را تشخیص دهد.

بحث

با توجه به اینکه هنوز واکنش مؤثری علیه ورم پستان گاو موجود نیست، برای پیشگیری از بیماری و انجام برنامه‌ریزی‌های کنترلی به آزمایش‌های حساس، سریع، و اختصاصی نیاز است تا باکتری‌های اصلی عامل ورم پستان گاو را شناسایی کند. به منظور اطلاع از وضعیت آلودگی گله‌ها به ورم پستان، می‌توان اقدامات مختلفی از جمله کشت از تک تک گاوها، SCC، CMT، و... انجام داد یا اینکه روی نمونه تانک شیر اقدامات مشابهی را مثل اندازه‌گیری SCC تانک شیر، کشت از تانک شیر یا انجام PCR روی نمونه تانک شیر به

سانتریفوژ گردید. سپس بار دیگر فیلتر تیوب را در داخل لوله جمع‌آوری جدید قرار گرفت، ۵۰۰ میکرو لیتر از بافر شستشو به آن اضافه شد و به مدت یک دقیقه در دور ۸۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردید. مرحله شستشوی یکبار دیگر تکرار شد. مایع رویی داخل لوله جمع‌آوری تخلیه شد، فیلتر تیوب در داخل آن قرار گرفت و به مدت ۱۰ ثانیه در دور ۱۴۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردید. سپس فیلتر تیوب در داخل یک میکرو تیوب ۱/۵ میلی لیتر تمیز قرار داده شد و ۲۰۰ میکرو لیتر از Buffer Elution (که از قبل در ۷۰ درجه سانتیگراد گرم شده بود) در آن ریخته و به مدت یک دقیقه در دور ۸۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. میکرو تیوب ۱/۵ میلی لیتر حاوی DNA بود که به عنوان الگو (Template) در PCR مورد استفاده قرار گرفت. سو به استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 25923) به عنوان کنترل مثبت در نمونه شیر استریل کشت داده شد و به روش‌های فوق DNA آن استخراج و در PCR مورد استفاده قرار گرفت.

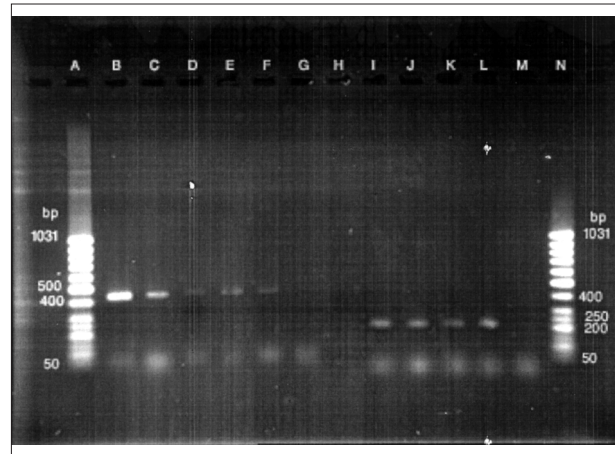
واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR): پرایمرهای مورد استفاده از شرکت TIB MOLBIOL (آلمان) تهیه شدند. سکتاس انواع پرایمرهای استفاده شده در جدول ۱ آورده شده است. واکنش PCR بر اساس روش Riffon و همکاران (۱۴) طراحی و مورد استفاده قرار گرفت. تمام واکنش‌ها در حجم نهایی ۱۰۰ میکرو لیتر انجام شد. هر مخلوط واکنش حاوی ۱۰ میکرو لیتر 10x PCR buffer، ۳ میکرو لیتر ۵۰ mM MgCl₂، ۰.۱ mM dNTPs، ۵ μM از هر پرایمر، ۲/۵ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase و ۵ میکرو لیتر از DNA الگو و آب دی‌یونیزه استریل تارسیدن به حجم نهایی ۱۰۰ میکرو لیتر که به تیوب‌های ۰/۲ میلی لیتر مخصوص PCR اضافه شد. برنامه تکثیر در ترموسایکلر (Eppendorf, Germany) بدین شرح انجام شد: ابتدا ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه، سپس ۳۵ سیکل شامل مراحل denaturation در ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه، annealing در ۵۶ درجه سانتیگراد (برای پرایمرهای Uni678 و Uni888) و ۵۸ درجه سانتیگراد (برای پرایمرهای Uni1870 و Uni2308) به مدت یک دقیقه، extension در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه، و در آخر تکثیر نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد. فرآورده‌های PCR در یخچال در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. الکتروفورز فرآورده‌های PCR هم به روش توصیه شده Sambrook and Russell (۱۵) انجام شد. اساس این روش استفاده از آگاروز ۱/۷ درصد حل شده در TAE 1x (Tris Acetate-EDTA) است. مخلوط ۸ میکرو لیتر از فرآورده PCR هر نمونه مورد بررسی با ۴ میکرو لیتر buffer Gel-loading به داخل هر گوده ژل افزوده شد. این بافر مرکب از ۲۵/۰ گرم بروموفنل بلو و ۴ گرم ساکاروز در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر بود. جهت تعیین وزن ملکولی پلاسمیدهای جدایه‌های مورد آزمایش بر روی هر ژل از مارکر ۵۰ 50bp DNA ladder (Fermentas, Germany) استفاده شد. نحوه آماده‌سازی مارکر تجاری بر اساس توصیه کارخانه سازنده صورت گرفت. با استفاده از دستگاه ژل الکتروفورز (Applex, France) و بافر TAE 1x جریانی به ظرفیت ۸۰ ولت به مدت یک ساعت از ژل عبور داده شد. سپس ژل به مدت ۲۰ دقیقه در ظرف حاوی محلول اتیدیوم بروماید (10mg/ml) (سیناژن،



جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه.

نام پرایمر	سکانس پرایمرها
Uni678 (Forward)	5'-AGTGGAAATCCATGTGTAGC-3'
Uni888 (Reverse)	5'-GAGTGCTTAATGCGTTAGCT-3'
Uni1870 (Forward)	5'-TGGAAGGTTAAGAGGAGTGG-3'
Uni2308 (Reverse)	5'-GCCTCCGTACCTTTTAGGA-3'

با موفقیت به کار رفته اند (۱۰،۱۴،۱۶). از مزایای مهم PCR، امکان استفاده از چند نانوگرم اسید نوکلئیک موجود در نمونه بالینی، حذف مرحله کشت و آنالیز آسان آن است و اینکه در عرض چند ساعت می توان به نتیجه رسید (۱۴). Phuektes و همکاران (۱۱) در استرالیا ۱۱۷ نمونه شیر از یک گله دارای عفونت تحت بالینی کشت دادند که ۶۶ مورد (۵۶/۴ درصد) منفی بود و استافیلوکوکوس اورئوس از ۷ مورد، استرپتوکوکوس آگالاکتیه از ۱۷ مورد، استرپتوکوکوس دیس گالاکتیه از ۲ مورد، استرپتوکوکوس یوبریس از یک مورد، استافیلوکوک های کواگولاز منفی از یک مورد، اشریشیا کلی از یک مورد، کورینه باکتریوم بویس از ۸ مورد واز ۱۳ مورد دیگر گونه های کورینه باکتریوم جدا گردید. Phuektes و همکاران در همین مطالعه روی همین ۱۱۷ نمونه شیر Multiplex PCR که باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس، استرپتوکوکوس آگالاکتیه، استرپتوکوکوس دیس گالاکتیه و استرپتوکوکوس یوبریس را تشخیص می دهد، انجام دادند که در مجموع ۶۱ نمونه (۵۲/۱ درصد) مثبت بود که از این ۶۱ نمونه مثبت، ۲۱ مورد استافیلوکوکوس اورئوس، ۲۰ مورد استرپتوکوکوس آگالاکتیه، ۴ مورد استرپتوکوکوس دیس گالاکتیه و ۱۶ مورد استرپتوکوکوس یوبریس بود (۱۱). Phuektes و همکاران (۱۰) در مطالعه ای دیگر در استرالیا روی ۱۷۶ نمونه تانک شیر از ۴۲ گله Multiplex PCR که باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس، استرپتوکوکوس آگالاکتیه، استرپتوکوکوس دیس گالاکتیه و استرپتوکوکوس یوبریس را تشخیص می دهد انجام دادند. از این ۱۷۶ نمونه شیر، ۴۳ مورد (۲۴/۴ درصد) از نظر هر چهار باکتری منفی بود. ۷۲ مورد از نظر یک گونه و ۶۱ مورد بیش از یک نمونه مثبت بود. معمول ترین گونه موجود در تانک شیر استرپتوکوکوس یوبریس بود که در ۷۸ نمونه (۴۴ درصد) وجود داشت استرپتوکوکوس دیس گالاکتیه، استرپتوکوکوس آگالاکتیه و استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب در ۴۹ مورد (۲۸ درصد)، ۳۸ مورد (۲۲ درصد) و ۲۸ مورد (۱۶ درصد) تشخیص داده شد (۱۱). Ghrazoo و همکاران (۲) در مطالعه ای بر روی گاوداری های صنعتی شهرستان کرج نشان دادند که باروش کشت از نظر میزان الودگی کارتیبه ها (QIR) در جمعیت مورد مطالعه آنها ۵۶/۲ درصد گاوها مبتلا به ورم پستان بودند. در مطالعه حاضر که بر روی تانک شیر دامداری های اطراف تهران انجام شد ۲۸ نمونه (۶۳/۶ درصد) مثبت و ۱۶ نمونه (۳۶/۴ درصد) منفی بود. نتایج حاصل از این مطالعه با نتایج به دست آمده به وسیله Phuektes و همکاران (۱۰،۱۱) و همچنین Ghrazoo و همکاران (۲) مطابقت دارد. در صورت طراحی



تصویر ۱- تصویر از ژل آگارز ۱/۷ درصد. ستون های A و N مارکر DNA 50bp، تصویر مثبت کنترل استافیلوکوکوس اورئوس (استخراج DNA به وسیله کیت)، C کنترل مثبت استافیلوکوکوس اورئوس (استخراج DNA به وسیله جوشاندن)، D تا G نمونه های تکثیر شده با استفاده از پرایمرهای Uni1870 و Uni2308، H کنترل منفی و I تا M نمونه های تکثیر شده با استفاده از پرایمرهای Uni678 و Uni888 را نشان می دهند.

عمل آورد (۲،۳،۴،۵،۷،۸،۹،۱۲،۱۳). در حال حاضر روش تشخیصی پاتوژن های ورم پستان، کشت در محیط آزمایشگاه است که به عنوان استاندارد طلایی مطرح است اما دارای معایبی است از جمله جدانشدن هیچ میکروارگانیسمی در نمونه شیر که می تواند دلایل متعددی داشته باشد از جمله، گاوهایی که به صورت تحت بالینی آلوده هستند ممکن است میکروارگانیسم را به صورت متناوب و به میزان کم از طریق شیر دفع کنند و یا تعداد میکروارگانیسم بیماری زا در غده پستانی آنها بسیار کم باشد. بعضی مواقع نیز به دلیل وجود باقیمانده آنتی بیوتیکی در نمونه شیر، باکتری در محیط کشت رشد نمی کند. البته حضور لکوسیت ها در نمونه شیر موارد ورم پستان بالینی و در نمونه شیری که SCC بالا دارد نیز ممکن است از رشد باکتری ممانعت به عمل آورد. روش پر زحمت و وقت گیر نیز می باشد به طوری که تعیین گونه باکتری به وسیله روش های بیوشیمیایی استاندارد ممکن است به بیش از ۴۸ ساعت زمان نیاز داشته باشد (۱۱). بر کشت شیر مخزن نیز معایبی مترتب است از جمله اینکه هیچ روش استاندارد برای جمع آوری و کشت نمونه های شیر مخزن پایهریزی نشده است. محل برداشتن نمونه از تانک شیر، مقدار نمونه، تعداد نمونه ها و فراوانی نمونه گیری باعث تفاوت در نتیجه کار می شود. تکنیک های مختلف باکتریولوژیکی در آزمایشگاه های تشخیصی برای جدا کردن و تشخیص میکروارگانیسم ها در نمونه های شیر به کار برده می شود که می تواند روی نتیجه آزمایش اثر بگذارد. تحقیق های بعضی محققان نیز خاطر نشان کرده است که کشت نمونه های شیر حساسیت پایینی برای تعیین باکتری های اصلی عامل ورم پستان دارد (۵).

روش های مولکولی ابزاری کارآمد برای تست های تشخیصی جدید می باشند. روش های جدید با استفاده از PCR که بر پایه سکانس های ۱۶S و ribosomal RNA ۲۳S می باشند، برای شناسایی تعداد زیادی از باکتری ها



References

1. Forsman, P., Timisjarvi, A., Alatosava, T. (1997) Identification of staphylococcal and streptococcal causes of bovine mastitis using 16S-23S rRNA spacer region. *Microbiol.* 143: 3491-3500.
2. Ghragozloo, F., Vojgani, M., Erfanmanesh, A., Bahonar, A. (2001) Mastitis control by bacteriological monitoring and somatic cell count (SCC) in dairy farms around karadj. *Proceedings of the 1st milk industry meeting.*
3. Ghadersohi, A., Coelen, R.J., Hirst, R.G. (1997) Development of a specific DNA probe and PCR for the detection of *mycoplasma bovis*. *Vet. Microbiol.* 56:87-98.
4. Ghadersohi, A., Hirst, R.G., Forbes-Fanlknor, J., Coelen, R.J. (1999) Preliminary studies on the prevalence of *mycoplasma bovis* mastitis in dairy cattle in Australia. *Vet. Microbiol.* 65: 185-194.
5. Godkin, M.A., Leslie, K.E. (1993) Culture of a bulk tank milk as a mastitis screening test: A brief review. *Can. Vet. J.* 34:601-605.
6. Hakimi, H. (2005) Detection of some bacteria implicated in bovine mastitis in bulk tank milk by polymerase chain reaction. DVM thesis. Faculty of Veterinary Medicin, University of Tehran, Tehran, Iran.
7. Hirsh, D.C., Maclachlan, N.J., Walker, R.L. (2004) *Veterinary Microbiology*, 2nd Ed. pp. 240-249.
8. Nicholas, R.A.J., Ayling, R.D. (2003) *Mycoplasma bovis*: disease, diagnosis, and control. *Res. Vet. Sci.* 74:105-112.
9. Philpot, W.N., Nickerson, S.C. (2005) *Winning the fight against mastitis*. Westfolio Surge Publication, US.
10. Phuektes, P., Browning, G.F., Anderson, G., Mansoll, P.D. (2003) Multiplex polymerase chain reaction as a mastitis screening test for *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, and *Streptococcus uberis* in bulk tank milk. *J. Dairy Res.* 70:149-155.
11. Phuektes, P., Mansoll, P.D., Browning, G.F. (2001) Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcal* causes of bovine mastitis. *J. Dairy Sci.*

پرایمرهایی که دمای ذوب آنها یکی باشد و هر جفت پرایمر برای یکی از پاتوزن های ورم پستان اختصاصی باشد و محصول تولید شده از نظر وزن مولکولی متفاوت باشد، می توان با به کارگیری Multiplex PCR روی نمونه های شیر به طور همزمان همه پاتوزن های ورم پستان را تشخیص داد. واکنش PCR هنگامی که مستقیماً روی نمونه های بالینی مانند شیر، ادرار، خون و مدفوع برای تشخیص پاتوزن های به کار گرفته شود حساسیت کمتری نسبت به روش کشت از خود نشان می دهد. تحقیقات نشان می دهد که مواد ممانعت کننده واکنش PCR در نمونه های بالینی وجود دارند که علیرغم استفاده از روش های خالص سازی DNA ممکن است در فرآوردۀ تخلیص شده باقی بمانند. Heme موجود در نمونه های خون و لیپوپلی ساکاریدها به علت مداخله در عمل آنزیم Taq باعث ممانعت از انجام PCR می شوند. برای فائق آمدن بر مشکلات ممانعت کننده ها در PCR و برای افزایش حساسیت آن، اقدام به غنی سازی نمونه اصلی می شود تا تعداد کافی باکتری برای شناسایی توسط PCR بوجود آید. در این صورت حتی زمانی که تعداد باکتری در نمونه اصلی 1CFU/ml باشد می توان الودگی به آن باکتری را شناسایی نمود.

حساسیت های مختلف واکنش های PCR به دست آمده از روش های مختلف استخراج DNA، نشان می دهد که نه تنها حالات PCR بلکه پروتکل های استخراج DNA برای بهبود روش های به کار رفته روی نمونه های بالینی تاثیر گذار است.

روش های استخراج بدون استفاده از کیت (که شامل مراحل آنزیمی است) در صورتی که به توانند حذف یون های کلسیم از نمونه های شیر را که به عنوان ممانعت کننده مهم در واکنش PCR مطرح است بهبود بخشند باعث افزایش حساسیت واکنش PCR می شوند (۱۴). در این مطالعه برای استخراج DNA از کیت تجاری استفاده گردید. استفاده از این کیت در حال حاضر هزینه بالایی دارد و در ضمن به نظر می رسد روش استخراج DNA به وسیله کیت نسبت به سایر روش ها حساس تر و دقیق تر است و به علاوه کار کردن با کیت بسیار ساده تر از سایر روش ها است. در صورتی که PCR به صورت یک روش تشخیصی روتین در آزمایشگاه در آید هزینه تمام شده برای انجام هر نمونه کاهش می یابد و بالطبع قیمت کیت استخراج DNA هم کاهش خواهد یافت.

تشکر و قدردانی

این طرح از محل اعتبار قطب گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران انجام پذیرفت.



- 84:1140-1148.
12. Pinnow, C.C., Butler, J.A., Sachse, K., Hotzel, H., Timms, L.L. and Rosenbusch, R.F. (2001) Detection of mycoplasma bovis in preservative-treated field milk samples. *J. Dairy Sci.* 84:1690-1695.
 13. Radosits, O.M., Gay, C.G., Blood, D.C., Hinchcliff, K.W. (2000): *Veterinary Medicine*. 9th Ed. pp.604-687.
 14. Riffon, R., Sayasith, K., Khalil, H., Duberuil, P., Drolet, M. and Lagage, J. (2001) Development of a rapid and sensitive test for identification of major pathogens in bovine mastitis by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 39:2584-2589.
 15. Sambrook, J., Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbour, NY.
 16. Whitehead, T.R., Cotta, M.A. (2000) Development of molecular methods for identification of streptococcus bovis from human and ruminal origins. *FEMS Microbiol. Lett.* 182:237-240.



DETECTION OF COMMON BACTERIA IMPLICATED IN BOVINE MASTITIS IN BULK TANK MILK BY POLYMERASE CHAIN REACTION

Vojgani, M.* , Peighambari, S. M., Hakimi H.

Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran - Iran.

(Received 22 May 2006 , Accepted 21 November 2006)

Abstract:

This study was conducted to detect the common bacteria implicated in bovine mastitis in bulk tank milk by polymerase chain reaction (PCR). Forty-four milk samples from bulk tank milk were obtained and submitted to our laboratory. To detect *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis*, and *Streptococcus parauberis*, two sets of universal primers were used. The PCR reaction was set up as described in previous literature. Using universal primers, PCR amplification results demonstrated 28 positive samples (63.6%) of 44. The percentages of positive samples for farms with production rates of <3, 3-10, and 10< tones were 48, 85, and 100%, respectively. In the present study, we concluded that using universal primers, a simplex PCR is able to detect common important bacteria implicated in bovine mastitis.

Key words: Mastitis, PCR, *S. aureus*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*.

*Corresponding author's email: vodjgani@ut.ac.ir, Tel: 021-66929534, Fax: 021-66923748

