تحقیقی

شناسایی میکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس به روش واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) درنمونه های شیر خام گاو های شهرکرد

رضا شرافتی چالشتری
دانشجوی دکترای تخصصی بهداشت مواد غذائی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران

امیر شاکریان
دانشیار بهداشت مواد غذایی ،دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد

حسن ممتاز
استادیار میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد

فرهاد شرافتی چالشتری
مربی گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد

نویسنده مسئول: فرهاد شرافتی چالشتری
تلفن: ۰۳۸۱-۳۳۳۴۶۹۱
پست الکترونیک:sharafati33@yahoo.com
آدرس: شهرکرد-رحمتیه-دانشکده پزشکی- گروه میکروب شناسی

وصول مقاله: ۸۸/۶/۱۴
اصلاح نهایی: ۸۸/۱۰/۲
پذیرش مقاله:۸۸/۱۰/۲۰

چکیده

زمینه و هدف: *پاراتوبرکلوزیس یا بیماری یون بیماریای با آلودگی مزمن در نشخوارکنندگان است . این بیماری از مایکوباکتریوم آویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس(MAP) ایجاد می شود و سبب خسارات اقتصادی زیادی در گله های شیری جهان شده است و آن را عاملی در سبب شناسی بیماری کرون در انسان می شناسند . هدف از این مطالعه شناسایی پاراتوبرکلوزیس به روش PCR در نمونه های شیر خام گاوهای شهرکرد بود.*

روش بررسی: *در این مطالعه مقطعی تعداد ۱۰۰ نمونه شیر خام از گاو های تعدادی از گاوداریهای صنعتی و نیمه صنعتی شهرکرد به روش تصادفی انتخاب شد و سپس DNAاز تمامی نمونه ها به روش فنل-کلروفورم استخراج گردید و به روش PCR بررسی شدند. نتایج به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند*

یافته ها: *براساس نتایج این مطالعه ۳نمونه(۳٪) از نمونه های شیر از نظر مایکوباکتریوم آویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس مثبت بودند.*

نتیجه گیری: *با توجه به نتایج به دست آمده تشخیص MAP از نمونه های شیر ، روش Milk -PCR می تواند تست ارزشمندی برای شناسایی مایکوباکتریوم آویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس در گله های شیری باشد.*

واژه‌های کلیدی: *شیر ، مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس ، واکنش زنجیره پلیمراز*

مقدمه

بیماری یون بیماری آنزئوتیک، در فهرست B بیماریهای (Office International des Epizooties) است و از عفونتهای مزمن نشخوارکنندگان می باشد و از مایکوباکتریوم آویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس ایجاد می شود(۱). در ایران بیماری یون را برای اولین بار خلیلی و طلاچیان شناختند و عامل بیماری را از مدفوع ماده گاوهای نژاد جرسی وارداتی شرکت نفت آبادان جدا کردند و منشاء عفونت را دامهای وارداتی گزارش نمودند(۲) این بیماری باعث کاهش تولید شیر، همچنین به علت اثر بر روی ترکیبات شیر باعث کاهش چربی، پروتئین و افزایش سلولهای سوماتیک در آن می شود، به طوری که در مطالعه ای کاهش تولید شیر ۱/۵۸تا ۷/۲ کیلو گرم در روز بوده است (۳،۴و۵). افزایش حساسیت به سایر بیماریها، از دست رفتن ارزش ژنتیکی، از دست دادن بازار صادرات، افزایش هزینه های درمانی، کاهش وزن در هنگام کشتار، حذف پیش از موعد، ضریب تبدیل غذایی ضعیف، ضایعات مالی در فروش دامهای یونی(تخمین زده می شود سالیانه ۲۰۰ تا ۲۵۰ میلیون دلار در آمریکا خسارت وارد می کند)، افزایش فاصله زمانی بین گوساله زایی ایجاد می شود و از نظر اقتصادی جزء بیماریهای مهم به شمار می آید. این بیماری در خیلی از کشورها باید به مقامات بهداشتی و دامپزشکی گزارش گردد (۶و۷). در مطالعه شاراما و همکاران در گاوهای شیری شمال هند برای تشخیص بیماری یون، ۶٪ از نمونه ها را در روش PCR شیر مثبت تشخیص دادند(۶). مایکوباکتریوم آویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس عامل بیماری کرون در انسان بوده ، حجم زیادی از مقالات علمی، حاکی از وجود این باکتری در سبب شناسی بیماری کرون می باشد که یک بیماری مزمن آماسی تحلیل برنده دستگاه گوارش انسان است. در مطالعه ای در ایران در طی ۱۰ سال از سال ۱۹۹۲ تا ۲۰۰۲ میزان شیوع بیماری در مردان۱/۳٪ و در زنان ۱٪ گزارش شده است(۸). انسان می تواند از طریق شیر خام و پاستوریزه و همچنین گوشت و محیط به عنوان یک منبع فرعی، در معرض مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس قرار گیرد(۹و۱۰). اخیراً شواهدی مبنی بر وجود باکتری در شیر پاستوریزه نیز ارائه شده است. در تحقیقاتی که در ایالات متحده آمریکا بر روی حساسیت حرارتی مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس در شیر انجام شده، داده است که چنانچه میزان باکتری در شیر خام بیش از ۱۰۰ CFU/ml (Colony Forming Unit/Milliliter) باشد عامل بیماری در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه بقا می یابد و به نظر می رسد افزایش زمان به ۲۵ ثانیه برای غیر فعال کردن این باکتری موثرتر است(۱۰). پس با توجه به اهمیت اقتصادی این بیماری صنعت دامپروری و به منظور شناسایی روشی ارزشمند و سریع در تشخیص مایکوباکتریوم آویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس، این مطالعه با هدف شناسایی بیماری یون به روش PCR در نمونه های شیر خام گاوهای شهرکردطراحی شد.

روش بررسی

در این مطالعه مقطعی تعداد ۱۰۰ نمونه شیر خام را از مخزن شیردوش گاوهای تعدادی از گاوداریهای صنعتی و نیمه صنعتی منطقه شهرکرد به روش تصادفی ساده انتخاب کردیم و نمونه های اخذ شده را در کنار یخ به مجموعه آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد ارسال کردیم.

به منظور استخراج DNA از نمونه های شیر ابتدا حدود ۲۰ میلی لیتر از نمونه های شیر را با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۸ دقیقه سانتریفوژ و رسوب حاصل از نمونه ها با۵۰۰ میکرولیتر بافر لیز کننده(Lysis buffer) ، (۰/۵M) EDTA ، Tris-HCl (۱۰۰mM)، SDS (۱۰%) ، Nacl (۵M)، Proteinase K (۲۰mg/ml) مخلوط کردیم و به مدت ۲-۳ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار دادیم. در مرحله بعد ۲۵۰ میکرولیتر فنل، ۲۴۰ میکرولیتر کلروفرم و ۱۰ میکرولیتر ایزو آمیل الکل را روی هر نمونه لیز شده اضافه نموده بعد از ۳۰ – ۶۰ ثانیه ورتکس، در rpm ۱۱۰۰۰ به مدت ۴ دقیقه سانتریفوژ کردیم. بعد از جدا کردن فاز رویی و افزودن هم حجم آن اتانل مطلق، لوله ها را ۵ دقیقه در rpm ۴۰۰۰ سانتریفوژ نموده ، بعد از شستشوی DNA رسوب کرده با اتانل ۷۰٪، DNA تخلیص شده در ۱۰۰ میکرولیتر بافر TE (۰/۵M PH=۸ EDTAو ۱M Tris PH=۷) حل کردیم.(۱۱)

برای اجرای PCR از پرایمرهای اختصاصی جنس مایکوباکتریوم آویوم تحت گونه پاراتوبرکولوزیس Para TB -F: 5`- GGTCGCGTCATTCAGAATC -3`

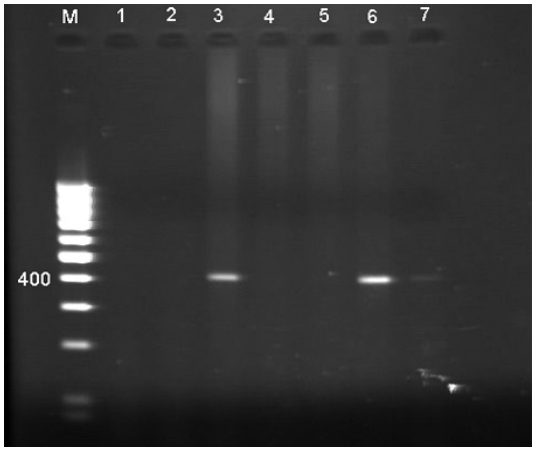
Para TB R: 5`-TCTCAGACAGTGGCAGGTG -3` استفاده شد(۱۲). برای آزمایش PCR و تکثیر قطعه ژنی مورد نظر از دستگاه Master cycler gradient (Eppendorf Germany Co)با حجم ۵۰ میکرو لیتر، واجد ۵ میکرو لیتر PCR buffer 10X، ۲ میلی مول MgCl2، ۲۰۰ میکرومول dNTP، ۲ میکرومول از زوج پرایمرهای R و F، ۱ واحد آنزیم ۱ واحدی Taq DNA Plymerase و ۱ میکروگرم از DNA هر نمونه با برنامه حرارتی، یک سیکل ۹۴ درجه ۶ دقیقه، ۳۴ سیکل تکراری ۹۴ درجه ۵۰ ثانیه، ۵۸ درجه ۵۰ ثانیه، ۷۲ درجه ۴۵ ثانیه و سیکل انتهایی ۷۲ درجه ۱۰ دقیقه مورد استفاده قرار گرفت.

برای جداسازی DNA بر روی ژل آگارز درصد ژل با توجه به اندازه قطعه محصول PCR تعیین می شود. در این آزمایش PCR، از ژل ۱٪ آگارز استفاده گردید. برای این کار ۱ گرم پودر آگارز در ۱۰۰ میلی لیتر محلول بافرTBE ۱Xحل شده، برای رنگ آمیزی ژل آگارز، یک قطره محلول رنگ اتیدیوم بروماید داخل محلول ریخته می شود. سپس مخلوط را در مایکروویو حرارت داده تا محلول کاملاً همگن و شفاف گردد و پس از کاهش دمای محلول، آن را به آرامی بر روی قاب مخصوص الکتروفورز ریخته که قبلاً با شانه ای چاهک های آن تنظیم گردیده است. پس از جامد شدن ژل، شانه به آرامی خارج می شود(۱۱).

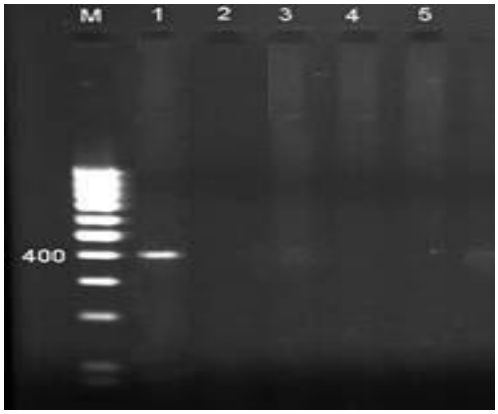
جهت انجام الکتروفورز، ژل را در تانک مخصوص الکتروفورز قرار داده و مقدار کافی بافرTBE ۱X به تانک اضافه نموده و سپس ۲۰ میکرولیتر محصول PCR را از درون هر یک از ویالها با ۲ میکرولیتر محلول لودینگ بافر(Loading Buffer) مخلوط کرده و نمونه ها با دقت در چاهکهای ژل ریخته می شوند. ۵ میکرولیتر از مارکر DNA (۱۰۰bp-ladder) در چاهک آخر اضافه نموده و سپس درب تانک الکتروفورز بسته می شود. پس از تنظیم جریان برق روی ولتاژ ۹۰، حدود ۴۰- ۴۵دقیقه صبر کرده تا محصولات PCR آماده شوند. ژل به آرامی برداشته می شود و در اتاقک UV با تابیدن اشعه ماوراء بنفش نتایج قابل رویت می شود(۱۱). تجزیه و تحلیل اطلاعات با استفاده از نرم افزار SPSS انجام گرفت.

یافته ها

از مجموع ۱۰۰ نمونه شیر مورد مطالعه ۳ نمونه(۳٪) در آزمون PCR مثبت بودند. ژل حاصل از نتیجه نمونه های PCR در تصاویر شماره۱ و ۲ نشان داده شده است. میانگین مثبت بودن و انحراف معیار در هر کدام از نمونه های آزمون PCR به ترتیب ۰/۰۳ و ۰/۱۷۱ به دست آمد.



تصویر شماره ۱- ژل حاصل از آزمایش PCR روی شیر خام گاوهای مورد مطالعه جهت شناسایی مایکوباکتریوم آویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس در نمونه های شیر خام شهرکرد(ستون M= مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA، ستون های۶،۳و۷= نمونه های مثبت، ستون های ۵و ۴،۲،۱ = نمونه های منفی).



شماره ۲- ژل حاصل از آزمایش PCR روی شیر خام گاوهای مورد مطالعه جهت شناسایی مایکوباکتریوم آویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس در نمونه های شیر خام شهرکرد(ستون M= مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA، ستون۱ = کنترل مثبت، ستون های۲ ،۳و۴= نمونه های منفی، ستون ۵- کنترل منفی).

بحث

بیماری یون بیماری روده ای گرانولوماتوز و مزمن است که در طیف وسیعی از نشخوارکنندگان ممکن است ایجاد شود. این بیماری غالباً به صورت دهانی- مدفوعی و همچنین از طریق شیر و جفت آلوده انتقال می یابد(۱۳و۱۴). PCR نیز امروزه به عنوان یک روش مدرن و سریع در تشخیص استفاده می شود ولی اطلاعات درباره حساسیت و ویژگی PCR در مقالات مختلف متفاوت است(۱۵،۱۶و۱۷). با توجه به نتایج مطالعه حاضر شناسایی مایکوباکتریوم آویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس با آزمون Milk – PCR، ۳٪ بود.

ساین و همکاران، در مطالعه ای در سال ۲۰۰۷ بررسی حساسیت Milk-ELISA و IS900 PCR مدفوعی و کشت مدفوع و کشت شیر در گوسفندها و بزها، نشان دادند که حساسیت کشت مدفوع ۸۴/۶٪ ، کشت شیر ۹۶/۱٪ ، Milk -ELISA ۸۸/۴٪ و PCR مدفوعی ۲۳٪ بود (۱۸). در بررسی حاضر روش مورد استفاده Milk-PCR بوده که ۳٪ نمونه های شیر گاوها مثبت بودند.

ولز و همکاران، در بررسی دیگری برای تشخیص شیوع مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس توسط PCR مدفوعی و Milk - ELISA، در ۱۸۰۸ نمونه در گاوهای شیری، PCR مدفوعی ۲۳٪ و Milk -ELISA ۲۵/۷٪ موارد مثبت را نشان دادند(۱۷). همچنین حق خواه و همکاران، در مطالعه ای ، در استان فارس به منظور تعیین میزان شیوع مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس بر روی نمونه های تانک شیر به روش IS900 nested PCR میزان آلودگی را بین ۸/۶٪ تا ۲۳٪ گزارش کردند (۱۹). تفاوتی که بین مطالعه حاضر و مقایسه با مطالعه های دیگر وجود دارد ممکن است ناشی از اختلافهای بین روشهای مختلف، تفاوت کیتهای تجاری و یا کیتهای بومی که گسترش یافته اند باشد(۲۰). همچنین مرحله شیرواری نیز موثر است به طوری که در شروع شیرواری موارد مثبت بالایی در Milk -ELISA و در اواخر شیرواری موارد مثبت زیادی در Serum-ELISA وجود دارد(۲۱). دفع MAP از شیر پایین و متناوب است و ممکن است در زمان جمع آوری نمونه شیر، دفع مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس در شیر وجود نداشته باشد(۱۷). از دلایل دیگر، مرحله بیماری دامها است. آنهایی که به صورت بالینی درگیر هستند و تعداد زیادی مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس را دفع می کنند نسبت به آنهایی که بیماری تحت بالینی دارند موارد تست مثبت، بیشتر است(۱۷و۲۲). همچنین چون این بیماری به صورت مزمن است تفاوت در سن گاوهایی که نمونه گیری می شوند (گاوهای زیر دو سال و بالای دو سال) در نتیجه آزمایشها موثر است(۲۳). از طرفی تست استاندارد (Gold standard) برای شناسایی مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس کشت این باکتری است اما نیاز به یک دوره انکوباسیون طولانی ۸ تا ۲۰ هفته برای رشد کلونیها دارد(۱۸). از دلایلی که میزان شیوع گله ای را کمتر نشان می دهد و ممکن است میزان شیوع بالاتری وجود داشته باشد، نمونه گیری از گله هایی است که آلوده به مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس نیستند(۱۹). حجم نمونه نیز موثر است به طوری که در مقایسه بررسی حاضر با مطالعه های دیگر حجم نمونه آنها بیشتر بود. وجود آنتی متابولیتهای شبیه یونهای کلسیم در شیر نیز ممکن است واکنش PCR را مهار کند(۱۵،۱۶و۱۸). اما استفاده از روش PCR در مقابل کشت و روشهای سرولوژیکی، این اجازه را می دهد که میکروارگانیسمهای کند رشد و همچنین میکروارگانیسمهای با سرعت رشد بالا را شناسایی نموده ، یک روش شناسایی با حساسیت بالا باشد(۱۵،۱۹و۲۴)

نتیجه گیری

بنابراین با توجه به اینکه برنامه های کنترلی پاراتوبرکلوزیس در ایران اختیاری است و این بیماری یک مشکل جدی در گله های شیری می باشد ، روشهای کنترلی پیشرفته ضرورت دارد(۱۹) و با توجه به نتایج به دست آمده در روشMilk -PCR و مقایسه آن با مطالعه های گذشته در مورد تست های سرولوژیک و روشهای کشت، تشخیص مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس از نمونه های شیر با روش Milk -PCR ممکن است تست ارزشمندی برای شناسایی MAP در گله ها باشد.

تشکر و قدردانی

از مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد جهت تامین امکانات و آقای دکتر مهدی گودرزی کمال تشکر و قدردانی به عمل می آید.

References

1- Boelaert F, Walravens K, Biront P, Vermeersch JP, Berkvens D, Godfroid J. *Prevalence of paratuberculosis(Johnes disease) in the Belgian cattle population.* Vet Microbiol. 2000 ;77(3-4):269-81.

2- Hasani tabatabai A, Firozi R. *Animal bacterial disease. 3 th ed. Tehran*: Tehran university pub. 2005; 398-423.

3- Beaudeau F, Belliard M, Joly A, Seegers H. *Reduction in milk yield associated with Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis (Map) infection in dairy cows*. Vet Res. 2007;38(4):625-34. 2007 ; 34.

4- Gonda MG, Chang YM, Shook GE, Collins MT, Kirkpatrick BW. *Effect of Mycobacterium paratuberculosis infection on production, reproduction, and health traits in. US Holsteins*. Prev Vet Med. 2007;80(2-3):103-19.

5- Hasonova L, PavlikI. *Economic impact of paratuberculosis in dairy cattle herds*: a review. Vet. Med. 2006; 51(5): 193–211.

6- Sharma G, Singh SV, Sevilla I, Singh AV, Whittington RJ, Juste RA, etal. *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*. Res Vet Sci. 2008;84(1):30-7.

7- Smith BP. *Large animal internal medcine. Mosby Inc.3 th ed*. United state of America. 2002.779-782.

8- Aghazade R, Zali MR, Bahrami A, Amin K, Ghahghaie F, Firouzi F. *Inflammatory bowel disease in IRAN:A review of 448 cases*. Arch Iran Med.2004; 7 (3): 210 – 216.

9- Donaghy JA, Rowe MT, Rademaker JL, Hammer P, Herman L, De Jonghe V, etal. *An inter-laboratory ring trial for the detection and isolation of Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis from raw milk artificially contaminated with naturally infected faeces*. Food Microbiol. 2008;25(1):128-35.

10- Grant IR, Ball HJ, Rowe MT.. Incidence of Mycobacterium paratuberculosis in Bulk Raw and commercially pasteurized cows' milk from approved dairy processing establishments in the United Kingdom. Appl Environ Microbiol. 2002;68(5):2428-35.

11- Nioton CR, Graham A. *PCR introduction to biotechnique. Translated to Persian by: Shahriarii F, Imamjomeh AA. Mashhad*: Astaneh ghods razavi pub. 2002; 10-52.

12- Möbius P, Hotzel H, Rassbach A, Köhler H. *Comparison of 13 single-round and nested PCR assays targeting IS900, ISMav2, f57 and locus 255 for detection of Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis*. Vet Microbiol. 2008;126(4):324-33

13- Berghaus RD, Lombard JE, Gardner IA, Farver TB. *Factor analysis of a Johne's disease risk assessment questionnaire with evaluation of factor scores and a subset of original questions as predictors of observed clinical paratuberculosis*. Prev Vet Med. 2005;72(3-4):291-309.

14- Collins MT, Wells SJ, Petrini KR, Collins JE, Schultz RD, Whitlock RH. *Evaluation of five – antibody detection tests for diagnosis of bovine paratubeculosis*. Clin Diagn Lab Immunol. 2005;12(6):685-92

15- Englund S, Ballagi-Pordány A, Bölske G, Johansson KE. *Single PCR and nested PCR with a mimic molecule for detection of Mycobacterium avium subsp paratuberculosis*. Diagn Microbiol Infect Dis. 1999 ;33(3):163-71.

16- Millar D, Ford J, Sanderson J, Whitey S, Tizard M. and Doran T. *IS 900 PCR to detect Mycobacterium paratuberculosis in retail milk supplies of whole pasteurized cow`s milk in England and Wales*. Appl Environ Microbiol. 1996;62: 3446-3452.

17- Wells SJ, Collins MT, Faaberg KS, Wees C, Tavornpanich S, Petrini KR, etal. *Evaluation of a rapid fecal PCR test for detection of Mycobacterium avium subsp paratuberculosis in dairy cattle*. Clin Vaccine Immunol. 2006;13(10):1125-30

18- Singh SV, Singh AV, Singh R, Sandhu KS, Singh PK, Sohal JS, etal. *Evaluation of highly sensitive indigenous milk ELISA kit with fecal culture, milk culture and fecal-PCR for the diagnosis of bovine Johne's disease (BJD) in India* . Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2007;30(3):175-86.

19- Haghkhah M, Ansari-Lari M, Novin-Baheran AM, Bahramy A. *Herd- level prevalence of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis by bulk-tank milk PCR in Fars province (Southern Iran) dairy herds*. Prev Vet Med. 2008;86(1-2):8-13.

20- Van Weering H, Van Schaik G, Van der Meulen A, Waal M, Franken P, van Maanen K. *Diagnostic performance of pourquier ELISA for detection antibodies against Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in individual milk and bulk milk samples of dairy herds*. Vet Microbiol. 2007; 125(1-2):49-58

21- Nielsen SS, Enevoldsen C, Gröhn YT. *The Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis ELISA response by parity and stage of lactation*. Prev Vet Med. 2002 ;54(1):1-10..

22- Whittington RJ, Sergeant ES. *Progress towards understanding the spread, distribution and control of Mycobacterium avium subsp paratuberculosis in animal populations*. Aust Vet J. 2001;79(4):267-78.

23- Diéguez FJ, Arnaiz I, Sanjuán ML, Vilar MJ, López M, Yus E. *Prevalence of serum antibodies to Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in cattle in Galacia(north west spain).* Prev Vet Med. 2007;82(3-4):321-6

24- Stable JR, Wells SJ, Wagner BA. *Relationships between fecal culture, ELISA, and bulk-tank milk test results for john`s disease in US dairy herds*. J Dairy Sci.2002; 85: 525-533.