مطالعه مقایسه‌ای روش‌های کشت و PCR جهت تشخیص آلودگی شیر خام گاوهای به ظاهر سالم به *مایکوباکتریوم اوویوم* تحت گونه *پاراتوبرکلوزیس*

یونس انزابی*[۱و۲]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز، دانشکده دامپزشکی، استادیار گروه پاتوبیولوژی، تبریز، ایران.
۲- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز، ایران.
* نویسنده مسئول مکاتبات: anzabi@iaut.ac.ir
(دریافت مقاله: ۹۲/۱۲/۲ پذیرش نهایی:۹۳/۵/۲۸)

چکیده

مایکوباکتریوم اوویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس **عامل بیماری یون گاوی است که به عنوان یک بیماری‌های عفونی مزمن محسوب می‌شود. نکته مهم از نظر بهداشت مواد غذایی، نقش احتمالی این باکتری در ایجاد بیماری کرون در انسان می‌باشد. شیوع بالای آلودگی با این باکتری در گاوهای شیری در سرتاسر جهان گزارش شده است. در این ارتباط تشخیص باکتری مذکور در شیر دام‌های سالم و مشکوک به آلودگی از مهم‌ترین اقدامات جهت جلوگیری از گسترش عفونت محسوب می‌شود. کشت در محیط اختصاصی به عنوان روش مرجع برای تشخیص این باکتری می‌باشد. اما در عین حال، روش PCR با شناسایی میکروارگانیسم‌های کند رشد نظیر *مایکوباکتریوم اوویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس*، این امکان را فراهم می‌کند تا در زمان بسیار کوتاه بتوان از این روش به عنوان یک آزمایش تشخیصی با حساسیت بالا استفاده کرد. لذا در پژوهش حاضر، آزمایش‌های کشت و PCR بر روی نمونه‌های خامه و رسوب شیر ۱۶۰ رأس گاو شیری به ظاهر سالم، انجام گردید. با بررسی یافته‌های حاصله بر اساس آزمون آماری کاپا مشاهده گردید، توافق بین کشت و PCR با محصول bp ۴۰۰ تقریباً کامل، توافق بین کشت و PCR با محصول bp ۲۲۸ اساسی و توافق بین دو آزمایش PCR با محصولات متفاوت ذکر شده هم اساسی برآورد گردید. در نهایت با مقایسه توافق بین دو آزمایش PCR استفاده شده در این پژوهش با روش کشت اختصاصی به عنوان آزمایش استاندارد طلایی تشخیص باکتری مذکور در نمونه‌ها، می‌توان اعلام کرد که آزمایش PCR می‌تواند به عنوان یک روش سریع و دقیق جایگزینی مناسب به جای روش‌های متداول در تشخیص *مایکوباکتریوم اوویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس* علی‌الخصوص به‌عنوان یک آزمایش غربالگری در مورد نمونه شیر گاوها مطرح شود.**

واژه‌های کلیدی: ***مایکوباکتریوم اویوم پاراتوبرکلوزیس*****، بیماری کرون، شیرگاو، کشت، PCR**

مقدمه

بیماری یون یا Paratuberculosis از جمله بیماری‌های عفونی مزمن و مهم از نظر اقتصادی است که گریبان‌گیر صنعت گاوداری می‌باشد. این بیماری غیرقابل درمان، به صورت آنتروکولیت گرانولوماتوز، لنفادنیت و تورم عروق لنفاوی موضعی ظاهر می‌شود که علامت شاخص این بیماری کاهش وزن پیش‌رونده و کاهش تولید شیر دام می‌باشد. عامل مسبب بیماری که قرابت زیادی با *مایکوباکتریوم اویوم* دارد در نامگذاری جدید به عنوان *تحت گونه اویوم* یعنی *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* خوانده می‌شود (حسنی طباطبائی و فیروزی، ۱۳۸۰؛ Lilenbaum *et al.*, 2007).

بیماری یون انتشار جهانی دارد و شیوع آن در کشورها در حال افزایش است. طبق بررسی‌های سازمان دامپزشکی، وجود بیماری مذکور در اغلب استان‌های کشورمان به اثبات رسیده است. هم‌چنین در گزارش‌های مختلف، شیوع بالاتری از این بیماری در گاوهای شیری نسبت به گاوهای گوشتی ذکر شده است. در ایران نیز شیوع بالای این باکتری در شیرهای خام و پاستوریزه گزارش گردیده است (خاکپور و همکاران، ۱۳۹۰؛ Botsaris *et al.*, 2010; Anzabi and Hanifian, 2012)

در بیماری مذکور منبع اصلی عفونت، مدفوع دام‌های آلوده بوده و تماس نزدیک دام مستعد با مدفوع آلوده یک عامل مهم در شیوع بیماری است. بر همین اساس به‌نظر می‌رسد که انتقال بیماری در شرایط طبیعی، در اثر خوردن آب و غذای آلوده به مدفوع دام آلوده صورت می‌گیرد. البته نکته مهم در این خصوص توجه به این مسأله است که دوره کمون طولانی (۲ سال یا بیشتر) باعث می‌شود که دفع باکتری از دام آلوده، از حدود ۱۸ ماه قبل از بروز علایم آشکار وجود داشته باشد. آلودگی سر پستان با مدفوع و حضور آن در آغوز و شیر ممکن است منجر به بلع جرم به میزان زیاد توسط گوساله گردد (انزابی و همکاران، ۱۳۸۷؛ خاکپور و همکاران، ۱۳۹۰؛ Grant *et al.*, 2010)

با توجه به این نکته که اسهال مزمن و مقاوم به درمان از علایم بارز این بیماری است و این مسأله می‌تواند موجب آلودگی شیر و محیط دامداری‌ها گردد. بر همین اساس مطالعات انجام یافته در این مورد هم حاکی از افزایش احتمال آلودگی ثانویه شیر به هنگام شیر دوشی دستی می‌باشد (Hanifian *et al.*, 2013). البته این مشکل زمانی پیچیده‌تر خواهد شد که در یک گاوداری از شیرهای به ظاهر غیرآلوده دام‌های مذکور برای تغذیه سایر گوساله‌ها نیز استفاده شود (Okura *et al.*, 2012; Eltholth *et al.*, 2009; Fathi *et al.*, 2011).

نکته مهم در رابطه با *مایکوباکتریوم اوویوم پاراتوبرکلوزیس*، نقش احتمالی این باکتری در ایجاد بیماری کرون در انسان (Crohn's disease) می‌باشد. به‌طوریکه در بررسی‌های مختلف از افراد مبتلا به بیماری کرون باکتری مذکور جداسازی و شناسایی شده و نیز اکثر آنتی بیوتیک‌هایی که در مورد بیماری کرون مؤثر بوده است همان ترکیباتی می‌باشد که بر علیه باکتری *مایکوباکتریوم اوویوم پاراتوبرکلوزیس* هم مورد استفاده قرار گرفته است. از طرف دیگر شباهت‌های موجود در علایم بالینی و نیز علایم کالبدگشایی بیماری یون و کرون، نقش احتمالی باکتری فوق در اتیولوژی بیماری کرون را قوت بخشیده است. لذا در بسیاری از پژوهش‌های مرتبط، باکتری مذکور به‌عنوان یک مخاطره

بهداشتی در سلامت عمومی انسان‌ها مطرح شده است (Fellows *et al.*, 1990; Anadolu *et al.*, 1999; Harris and Barletta, 2001; Rodreguez-Lazaro, *et al.*, 2005; Klanicova *et al.*, 2012).

با توجه به مطالب ذکر شده به نظر می‌رسد که شناسایی دام‌های دفع‌کننده فاقد علایم بیماری و بدون عفونت‌های آشکار مهم‌ترین کار در کنترل بیماری مذکور در دام‌ها و احتمالاً پیشگیری از بیماری کرون در انسان خواهد بود که به این منظور کشت نمونه‌ها بهترین روش جداسازی و شناسایی *مایکوباکتریوم اوویوم پاراتوبرکلوزیس* می‌باشد. اما در این بین استفاده از روش تشخیصی PCR در مقابل روش کشت باکتریایی این اجازه را می‌دهد که با امکان شناسایی میکروارگانیسم‌های کند رشد نظیر عامل بیماری یون، در زمان بسیار کوتاه و به شکل سریع بتوان از این روش مولکولی به عنوان یک آزمایش تشخیصی با حساسیت بالا استفاده کرد (Chiodini, 1990; Englund *et al.*, 1999; Haghkhah *et al.*, 2008).

لذا بر اساس مطالب فوق، هدف این پژوهش آزمایش PCR و کشت نمونه‌های شیر گاوهای به ظاهر سالم بود تا با مقایسه نتایج حاصل، روشی سریع و دقیق برای مشخص کردن آلودگی شیر گاو به *مایکوباکتریوم اوویوم پاراتوبرکلوزیس* معرفی گردد.

مواد وروش‌ها

نمونه‌برداری

در این تحقیق با مراجعه به ۸ گاوداری صنعتی اطراف شهر تبریز که اولاً تعداد گاوهای دوشای تقریبا یکسان داشته و ثانیاً سابقه بیماری یون در پرونده بهداشتی گاوهایشان در گذشته ثبت گردیده بود، به روش تصادفی ساده از هر گاوداری ۲۰ نمونه شیر از گاوهای به ظاهر سالم اخذ گردید.

روش آزمایش

بر روی تمامی نمونه‌های شیر، ابتدا دو آزمایش PCR با استفاده از ۲ جفت پرایمر اختصاصی مربوط به عنصر *IS900* ژنوم باکتری *مایکوباکتریوم اوویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس* انجام گردید. سپس در مورد هر نمونه شیری که به هر کدام از آزمایشات PCR جواب مثبت داد، آزمایش کشت اختصاصی به منظور جداسازی باکتری مذکور انجام گرفت.

استخراج DNA از جدایه‌ها

به منظور استخراج DNA باکتری عامل بیماری یون از نمونه‌ها بر مبنای روش سدیم دودسیل سولفات (SDS)، CTAB/NaCl و پروتئیناز K بشرح زیر عمل شد:

ابتدا مقدار کافی از نمونه‌ها (رسوب و خامهٔ شیرهای مورد آزمایش که با انجام سانتریفوژ در شتاب ۳۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه، بدست آمده بودند) به ۳۰۰ میکرولیتر از بافر 1XTE موجود در میکروتیوب‌های استریل منتقل شد. سپس برای غیرفعال کردن باکتری‌ها، میکروتیوب‌های مذکور به مدت بیست دقیقه در ۸۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. در ادامه ۵۰ µl از لیزوزیم ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به میکروتیوب‌ها اضافه و تکان داده شده و برای حصول نتیجه بهتر به مدت ٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. سپس ٦۰ µl از محلول ۱۰٪ SDS و همچنین ۸ µl از پروتئیناز K به میکروتیوب‌ها اضافه شده و پس از هم‌زدن به صورت over night در دمای ٦۰ درجه سلسیوس انکوبه گردید. در ادامه کار ۱۰۰µl از محلول کلریدسدیم ۵ مولار و ۸۰µl از محلول CTAB/NaCl به میکروتیوب‌ها اضافه و تکان

داده شد تا محلول شیری رنگ مشاهده گردد. سپس در این حالت میکروتیوب‌ها به مدت ده دقیقه در دمای ٦٥ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد. در ادامه ٧٠٠ µl از محلول chloroform/isoamylalchol به میکروتیوب‌ها اضافه کرده و به طور مختصر تکان داده و سپس به مدت هشت دقیقه در شتاب ١١٠٠٠ g سانتریفوژ گردید. پس از پایان سانتریفوژ، مایع رویی به میکروتیوب‌های تازه منتقل و سپس ٠/٦ حجم (حدود ٤٢٠µl) ایزوپروپانول اضافه شده و به منظور مخلوط کردن، میکروتیوب‌ها به آرامی سروته گردید. پس از مدتی اسیدهای‌نوکلئیک در میکروتیوب‌ها ظاهر گردید، که در این حالت به فریزر ٢٠- درجه سلسیوس منتقل و حدود سی دقیقه در این دما نگه‌داری شدند. در ادامه میکروتیوب‌ها در شتاب ١٢٠٠٠ g به مدت پانزده دقیقه سانتریفوژ و سپس مایع رویی بیرون ریخته شده و حدود ١ میلی‌لیتر اتانول ٧٠٪ سرد شده در فریزر برروی رسوب‌ها اضافه و در ادامه به آرامی سه بار سروته گردیده و دوباره درشتاب ١٢٠٠٠ g به مدت پنج دقیقه سانتریفوژ شدند. پس از اتمام سانتریفوژ، اتانول بیرون ریخته شد و رسوب‌ها در دمای اتاق خشک گردید. در نهایت ١٠٠µl از بافر 1XTE بر روی رسوب‌ها (حاوی DNA استخراجی) اضافه و در ٢٠- درجه سلسیوس نگه‌داری شد (خاکپور و همکاران،١٣٩٠؛ Supply *et al.*, 2001; Sola *et al.*, 2003).

پرایمرهای مورد استفاده برای انجام PCR

با استفاده از مقالات موجود و با مراجعه به بانک ژنی و بررسی سکانس *IS900* کروموزوم باکتری *مایکوباکتریوم اویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس* ٢ جفت پرایمر به شرح زیر و از طریق سفارش به شرکت طوبی نگین تهران (تهران – ایران) تهیه و استفاده گردید (Pillai and Jayarao, 2002; Bhide *et al.*, 2005):

F-90: GTT-CGG-GGC-CGT-CGC-TTA-GG
R-91: GAG-GTC-GAT-CGC-CCA-CGT-GA
FP-25: CCA-GGG-ACG-TCG-GGT-ATG-GC
RP-26: GGT-CGG-CCT-TAC-CGG-CGT-CC

برنامه‌های مورد استفاده جهت انجام PCR

مخلوط واکنش PCR شامل ١ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای F-90 و R-91 (با غلظت ٠/٥ میکرومولار)، DNA الگو به میزان ٥ میکرولیتر (١٠٠ نانوگرم) و آنزیم Taq DNA پلی‌مراز (٥ واحد در میکرولیتر) به میزان ٠/٤ میکرولیتر که به همراه مخلوط بازهای آلی سه فسفاته (١٠ میکرو مولار) به مقدار ١ میکرولیتر و کلریدمنیزیوم (٥٠ میکرو مولار) به مقدار ٢/٥ میکرولیتر و با اضافه کردن ٥ میکرولیتر از بافر 10X PCR و نیز ٣٤/١ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه استریل بود. تمامی مواد PCR از شرکت طوبی نگین تهران تهیه گردید. واکنش با حجم نهائی ٥٠ میکرولیتر به میکروتیوب‌های استریل انتقال یافت. شرایط دمایی ترمال سایکلر (Eppendorf, Germany) عبارت بود از یک سیکل با دمای ٩٤ درجه سلسیوس به مدت ٥ دقیقه (دناتوراسیون اولیه)، ٣٥ سیکل شامل ٩٤ درجه سلسیوس به مدت ٤٠ ثانیه (دناتوراسیون)، ٦٥ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه (اتصال پرایمرها) و دمای ٧٢ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه (برای عمل توسعه). بالاخره برای توسعه نهایی یک سیکل دمای ٧٢ درجه سلسیوس به مدت ٧ دقیقه استفاده گردید. طی روند PCR و اعمال برنامه دمایی و زمانی فوق، قطعه‌ای به اندازه ٤٠٠bp تکثیر داده شد که در عمل الکتروفورز با مقدار ٧/٥ µl از محصول PCR و در آگاروز ١٪ باند

آن مشخص گردید که با استفاده از دستگاه ژل داکیومنت عکس آنها تهیه شد. نمونه‌ای از این محصول در شکل ۱ نشان داده شده است.

از طرف دیگر برنامه مورد استفاده با پرایمرهای FP-25 و RP-26 نیز در دستگاه ترمال سایکلر در مراحل مختلف آزمایش PCR **به این** صورت **بود که در** سیکل اول **برای** انجام عمل دناتوراسیون به مدت ٤ دقیقه دمای ۹٤ درجه سلسیوس بر روی نمونه‌ها اعمال گردید. هم‌چنین در سیکل‌های اصلی هم که ۳۵ بار تکرار شدند، جهت انجام عمل مذکور از همان دما ولی به مدت ۳۰ ثانیه و برای اتصال از دمای ۷۰ درجه سلسیوس طی همان مدت زمان و برای عمل توسعه هم از دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ٤۰ ثانیه استفاده شد. بالاخره در سیکل آخر هم برای توسعه نهایی محصول آزمایش PCR، از همان دما در مدت ۷ دقیقه استفاده گردید. برنامه مذکور هم با استفاده از مقدار ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای FP-25 و RP-26 (با غلظت ۰/۵ میکرومولار) و DNA استخراجی الگو به میزان ٦ میکرولیتر (۱۰۰ نانوگرم) و آنزیم DNA Taqپلی‌مراز (۵ واحد در میکرولیتر) به میزان ۰/٤ میکرولیتر که به همراه دیگر اجزای آزمایش یعنی مخلوط بازهای آلی سه فسفاته (۱۰ میکرو مولار) به مقدار ۰/۵ میکرولیترو کلرید منیزیوم (۵۰ میکرو مولار) به مقدار ۱/۵ میکرولیتر و با اضافه کردن ۵ میکرولیتر از بافر PCR 10X و نیز ۳٤/٦ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه استریل، که همگی از شرکت طوبی نگین تهران تهیه شده بود، با حجم نهائی ۵۰ میکرولیتر در میکروتیوب‌های استریل ریخته شده و در میکروپلیت مخصوص دستگاه ترمال سایکلر شرکت (Eppendorf – Germany) قرار داده شد. مطابق برنامه مذکور نیز در طی روند PCR قطعه‌ای به اندازه ۲۲۸ bp تکثیر داده شد که در عمل الکتروفورز با مقدار ۷/۵ µl از محصول PCR و در آگاروز ۱/۲٪ باند آن مشخص گردید که با استفاده از دستگاه ژل داکیومنت عکس آنها نیز تهیه شد که نمونه‌ای از آن هم در شکل شماره ۱ نشان داده شده است (انزابی و همکاران، ۱۳۸٤؛ خاکپور و همکاران، ۱۳۹۰).

کشت اختصاصی نمونه‌ها

بدین منظور نمونه‌های شیر که در ظروف ۵۰ میلی‌لیتری استریل اخذ شده بود در شتاب ۳۰۰۰g به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ شده و سپس، عمل آلوده‌زدایی هم بر روی رسوب و هم برروی خامه حاصله بطور جداگانه با استفاده از محلول ۰/۷۵ ٪HPC (هگزا دو سیل پریدنیوم کلراید) (Merck-Germany) استریل تازه تهیه شده انجام گرفت (Dundee *et al.*, 2001). سپس محتویات آلوده‌زدایی شده هر کدام از لوله‌های مذکور را بار دیگر در شتاب ٤۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ و مایع رویی را خالی شد و رسوب حاصله را ابتدا در ۲/۵ میلی‌لیتر PBS-T مخلوط و پس از کنترل pH و مخلوط کردن به منظور یکنواخت‌سازی کامل آن‌ها، هر نمونه آماده به ٤ قسمت مساوی تقسیم و تحت شرایط استریل به ٤ محیط کشت هرولد حاوی زرده تخم‌مرغ که قبلاً در لوله‌های آزمایش نسبتاً بلند بصورت مورب و در شرایط کاملا استریل تهیه شده بود انتقال یافت. لازم به ذکر است ۳ عدد از محیط‌های مذکور حاوی ۲mg /۱۰۰۰ml مایکوباکتین و یک محیط هم بدون مایکوباکتین بود (G.L. Gilmour and Wood, 1996; Whittington *et al.*, 1999). همچنین

برای جلوگیری از آلودگی ثانویه نمونه‌ها در طی دوره طولانی مدت انکوباسیون، به محیط‌های کشت مذکور آنتی‌بیوتیک‌های زیر (Sigma-Aldrich, USA) اضافه گردید: کاربینیسیلین (۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)، تری‌متوپریم (۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر)، پلی‌میکسین B (۲۰۰ واحد در میلی‌لیتر) و آمفوتریسین B (۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر). در نهایت انکوباسیون محیط کشت‌های فوق در شرایط هوازی و دمای ۳۷ درجه سلسیوس و به مدت ۱۶- ۲۴ هفته انجام گردید (Gilmour and G.LWood, 1996; Whittington *et al.*, 1999).

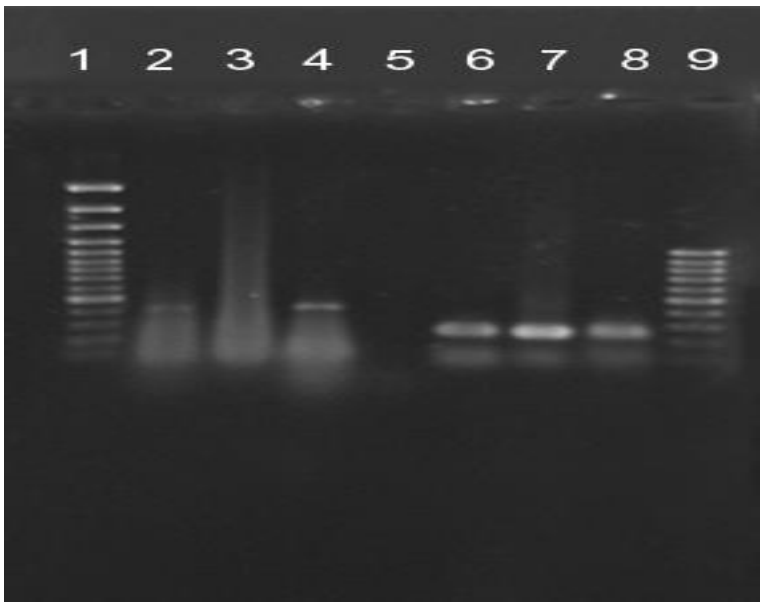
آنالیز آماری

با توجه به اینکه هدف اصلی از انجام تحقیق حاضر، مقایسه توافق (agreement) روش کشت به عنوان آزمایش استاندارد طلایی (Gold Standard) تشخیص باکتری عامل بیماری یون و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) به عنوان روشی سریع و اختصاصی به این منظور و در نتیجه معرفی آزمایشی مناسب و کارا برای تشخیص باکتری مذکور در نمونه‌ها بود، لذا بدین منظور از روش آماری تطابقی کاپا (Kappa test) در این خصوص استفاده گردید.

یافته‌ها

نتیجه آزمایش PCR در مورد خامه نمونه‌های شیر با محصول 228 bp شامل ۱۸ نمونه مثبت بود (۱۱/۲۵ ٪ موارد)، در حالیکه وقتی همین آزمایش بر روی رسوب نمونه‌ها انجام گردید، فقط تعداد ٦ نمونه (۳/۸۳٪) مثبت بودند. جالب اینکه در کشت اختصاصی نمونه‌های مذکور در محیط کشت جامد هرولد حاوی زرده تخم مرغ تعداد ۸ نمونه مثبت مشاهده شد که شامل ۵ ٪ از کل شیرهای مورد آزمایش می‌باشد. اما در آزمایش PCR با محصول ٤۰۰ bp در مورد خامه شیرهای مذکور فقط تعداد ۱۲مورد مثبت مشاهده شد (۷/۵٪ نمونه‌ها) و این در حالی‌است که وقتی رسوب همین نمونه‌ها با همان آزمایش بررسی شد باز هم فقط ٦ نمونه مثبت بود (۳/۸۳٪). هم‌چنین در کشت اختصاصی رسوب نمونه‌های مذکور در محیط کشت جامد هرولد حاوی زرده تخم مرغ نیز تعداد ٦ نمونه (۳/۸۳٪) مثبت مشاهده شد.

همچنین بر مبنای آزمون آماری کاپا (Kappa test)، توافق (agreement) بین کشت و PCR با محصول 400 bp ،تقریباً کامل (almost perfect) می‌باشد چرا که در این مورد K= 0.86 محاسبه گردید. اما باتوجه به اینکه در مورد توافق بین کشت و PCR با محصول 228 bp، نتیجه آزمون آماری مذکور نشان داد که K = 0.62 می‌باشد، لذا توافق بین دو آزمایش مذکور اساسی (substantial) می‌باشد و بالاخره توافق بین PCR با محصول 400 bp و PCR با محصول 228 bp نیز بر مبنای اینکه K= 0.75 محاسبه گردیده، اساسی (substantial) می‌باشد.



شکل ۱- ژل الکتروفورز شده آزمایشات PCR که در آن ردیف سوم DNA استخراجی و ردیف‌های ۲و۴ محصول PCR ۴۰۰bp و ردیف‌های ۶، ۷، ۸ محصول PCR ۲۲۸ bp و ردیف پنجم نیز یک نمونه منفی و همچنین ردیف‌های اول و نهم، دو نوع سایزمارکر ۱۰۰bp شرکت Fermentas (Germany) را نشان می‌دهند.

بحث و نتیجه‌گیری

با پیشرفت روش‌های تشخیص مولکولی از جمله تکنیک PCR اهمیت و ارزش استفاده از آن‌ها در تشخیص انواع بیماری‌ها روز به روز بیشتر شده که این امر در ارتباط با تشخیص بیماری یون نیز به اثبات رسیده است، بطوریکه در مطالعات متعدد استفاده از آزمایش PCR در مقایسه با سایر روش‌ها تعداد جواب‌های مثبت بیشتری را نشان داده و نیز حساسیت بالا و ویژگی مناسب این تکنیک را در تشخیص بیماری یون توصیف کرده است. مثلا پژوهشی که در سال ۱۳۹۰ در منطقه مغان توسط خاکپور و همکاران و با مقایسه نتایج حاصله از آزمایش مستقیم میکروسکوپیک و PCR انجام گرفته است، حساسیت بالای روش PCR را نشان داده است (خاکپور و همکاران،۱۳۹۰). البته نتایج تحقیق حاضر هم این امر را در مورد شیر دام‌های به ظاهر سالم نشان می‌دهد. هم‌چنین در این رابطه در پژوهش دیگری در سال ۲۰۰۷ در هند، سه آزمایش تشخیصی الایزا، کشت و PCR بشکل مقایسه‌ای بر روی شیر گاوهای بومی انجام گرفته که در میان آنها روش PCR شیر بهترین نتایج را نشان داده است. در پژوهش مذکور نیز مشابه پژوهش حاضر هم از رسوب و هم از خامه شیر برای استخراج DNA باکتری عامل بیماری یون استفاده شده است که در مقایسه نتایج، استفاده از رسوب (با ٦٢٪ نتایج مثبت) نسبت به خامه (با حدود ۵۰٪ نتایج مثبت) ارجح‌تر گزارش شده است (Sharma *et al.*, 2007). اما نتایج پژوهش حاضر با این مورد ذکر شده متفاوت می‌باشد چرا که در مورد نمونه‌های خامه شیر ۱۱/۲۵ ٪ مورد مثبت با استفاده از PCR با محصول ۲۲۸ bp و در مورد PCR با محصول ٤٠٠ bp فقط ۷/۵ ٪ مورد مثبت مشاهده شد و این در

حالیست که در خصوص رسوب شیر نتیجه بدست آمده در هردو آزمایش PCR یکسان بوده و فقط ۳/۸۳ ٪ نمونه‌ها به این دو آزمایش جواب مثبت دادند. در این خصوص بنظر می‌رسد که به دلیل وجود چربی بیشتر در قسمت خامه شیر، باکتری مذکور به این بخش شیر تمایل بیشتری دارد. بطوریکه در ارتباط با این موضوع، حتی پژوهشی نشان داده است که عدم توجه به این موضوع می‌تواند به از دست رفتن بسیاری از میکروارگانیسم‌ها در قسمت خامه شیر در هنگام سانتریفوژ نمونه‌ها منجر شود که این مسئله بر جواب آزمایش‌های مذکور می‌تواند موثر باشد (Pillai and Jayarao, 2002). از طرف دیگر در پژوهشی که در سال ۲۰۰٤ در هندوستان بر روی گاومیش‌های آبی که دارای علائم بالینی بیماری یون بوده‌اند انجام گرفته است نشان داده شده که از مجموع ۲۰ نمونه مربوط به دام‌های مذکور تعداد ١٤ نمونه به آزمایش تشخیصی PCR و فقط ٦ نمونه به کشت اختصاصی جواب مثبت داده‌اند (Sivakumar *et al.*, 2004) که نتایج پژوهش حاضر هم این مهم را مخصوصا در مورد خامه شیر دام‌های **به** ظاهر سالم بخوبی نشان می‌دهد (۱۸ مورد مثبت با استفاده از PCR با محصول bp 228 و۱۲ مورد مثبت با استفاده از PCR با محصول bp 400، در حالیکه در کشت اختصاصی فقط ۸ مورد مثبت مشاهده شد).

اما در پژوهشی که در سال ۲۰۰۳ در ایتالیا انجام گرفته است، ابتدا گوسفندان با آزمایشی سرولوژیکی مورد مطالعه قرار گرفته و در ادامه نمونه‌های مثبت و منفی از نظر سرولوژیکی، از طریق PCR شیر آزمایش شدند که نتیجه این بوده که تعداد ۹ نمونه مربوط به ۱۵ دام سرم مثبت و نیز تعداد ٤ نمونه از ١٤ دام سرم منفی به آزمایش PCR شیر جواب مثبت داده‌اند (Nebbia *et al.*, 2003).

ساین و همکاران نیز در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۷ با بررسی حساسیت الایزای شیر، *IS900*- PCR شیر، کشت مدفوع و کشت شیر در مورد نمونه‌های مربوط به گوسفندان و بزها، نشان دادند که حساسیت روش‌های مذکور به ترتیب ۸۸/٤ ٪ ، ۲۳٪ ، ۸٤/٦٪ و ۹٦/۱٪ می‌باشد (Singh *et al.*, 2007). که نتایج تحقیقات مذکور در مورد PCR شیر با نتایج تحقیق حاضر مقداری متفاوت می‌باشد که یکی از علل آن می‌تواند مربوط به تفاوت سن دام‌هائی باشد که از آنها نمونه‌گیری شده است. در این خصوص، عقیده بر این است که چون بیماری یون غالبا بشکل مزمن دیده می‌شود لذا تفاوت در سن دام‌هایی که از آنها نمونه گرفته می‌شود در نتیجه آزمایشات موثر است (Slana *et al.*, 2008; Diegues *et al.*, 2007). همچنین شواهد حاکی از آن است که حجم نمونه نیز در این مورد می‌تواند موثر باشد. از طرف دیگر عقیده بر این است که وجود متابولیت‌هائی شبیه یون‌های کلسیم در نمونه‌های شیر ممکن است که واکنش PCR را مهار کرده و لذا نتایج متفاوت حاصل شود (Millar *et al.*, 1996; Englund *et al.*, 1999; Singh *et al.*, 2007).

همچنین با توجه به اینکه دفع باکتری عامل بیماری یون از طریق شیر در عین اینکه به مقدار بسیار کم بوده، همچنین حالت متناوب هم دارد لذا ممکن است که در زمان جمع‌آوری نمونه‌های شیر برای آزمایش، باکتری مذکور در شیر وجود نداشته و نتیجه آزمایش بشکل کاذب منفی درآید (انزابی و همکاران، ١٣٨٤؛ Wells *et al.*, 2006).

بنظر می‌رسد که یکی دیگر از دلایل عدم هم‌خوانی نتایج پژوهش حاضر با نتایج حاصله در برخی از تحقیقات مشابه که در بالا به آنها اشاره شد، می‌تواند در نحوه نمونه‌برداری و تفاوت در پروتکل استخراج DNA باشد. در واقع این موضوع باعث می‌شود که بدلیل عدم تهیه DNA الگوی مناسب، حساسیت آزمایش PCR تغییر یابد (Singh *et al.*, 2007). از طرف دیگر لازم بذکر است که باکتری مذکور در صورت تشکیل آرایش توده‌ای (Clump) در مقایسه با فرم سلول‌های منفرد این باکتری پایداری بیشتری در نمونه‌ها نسبت به عوامل نامساعد از خود نشان داده و لذا شانس جداسازی و شناسائی آن در نمونه‌ها افزایش پیدا می‌کند (Rowe *et al.*, 2000).

با توجه به نتایج حاصله از این تحقیق در خصوص بررسی آزمایشگاهی و تشخیص عفونت‌های پنهان ناشی از *مایکوباکتریوم اوویوم* تحت گونه *پاراتوبرکلوزیس* در دام‌ها از طریق مطالعه شیر آنها، می‌توان این موضوع مهم را مطرح نمود که مساله اختلاف در کارائی روش‌های تشخیص آزمایشگاهی در این مورد بسیار حائز اهمیت می‌باشد (نتایج تحقیق حاضر هم این موضوع را اثبات کرده است). همچنین مقایسه توافق بین دو آزمایش PCR استفاده شده در پژوهش حاضر با روش کشت اختصاصی به عنوان آزمایش استاندارد طلائی تشخیص باکتری مذکور در نمونه‌ها، به این موضوع مهم تاکید کرد که انتخاب نوع پرایمر نیز در افزایش حساسیت آزمایش PCR تاثیر و اهمیت بالائی دارد.

در نهایت با توجه به نتایج بدست آمده از آزمایشات مختلف در پژوهش حاضر از یک طرف و توافق مشاهده شده بین آزمایشات مذکور با استفاده از تست کاپا از طرف دیگر و با تکیه بر تحقیقات گذشته در این مورد به جرات می‌توان اظهار داشت که آزمایش PCRبه عنوان یک روش سریع و دقیق، می‌تواند جایگزینی مناسب بجای روش استاندارد تشخیص باکتری *مایکوباکتریوم اوویوم پاراتوبرکلوزیس* یعنی کشت، مخصوصا به عنوان یک آزمایش غربالگری در مورد نمونه‌های شیر خام گاوها باشد، البته بنظر می‌رسد که توافق اعلام شده بین آزمایش‌های مذکور زمانی برقرار خواهد بود که بررسی‌های تشخیصی لازم برای جستجوی عامل بیماری یون، هم بر روی رسوب و هم بر روی خامه شیر خام انجام گیرد و لذا در مورد شیرهای پاستوریزه کارخانه‌ای توافق آزمایشات ذکر شده احتمالا فرق خواهد داشت (لازم به ذکر است که در یافته‌های پژوهش حاضر، نتایج مربوط به سه آزمایش انجام گرفته در مورد رسوب شیر یکسان ولی در مورد خامه شیر متفاوت می‌باشد).

منابع

- انزابی، یونس؛ حسنی طباطبائی، عبدالمحمد و اصغرزاده، محمد (۱۳۸٤). بررسی وضعیت آلودگی شیر گاو به باکتری *Mycobacterium avium paratuberculosis* با روش کشت و PCR در منطقه تبریز. مجله علوم دامپزشکی ایران. سال دوم، شماره ٤، صفحات: ۳۱۰ -۲۹۷.

- انزابی، یونس؛ فراشی بناب، صمد و مقدم، غلامعلی (۱۳۸۷). مطالعه کارآیی روش تشخیصی آزمایش مستقیم میکروبی، PCR IS900 و کشت میکروبی در تشخیص باکتری *مایکوباکتریوم اویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس* در مدفوع گاوهای به ظاهر سالم. مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز. دوره ۲، شماره٤ ، صفحات: ۳۱۷– ۳۰۹.
- حسنی طباطبائی، عبدالمحمد و فیروزی، رویا (۱۳۸۰). بیماری‌های باکتریائی دام. انتشارات دانشگاه تهران. صفحه ٤١٤.
- خاکپور، منصور؛ فردین، مسعود؛ احمدی، هیوا و نهضتی، آیدا (۱۳۹۰). وضعیت آلودگی شیر گاو به *مایکوباکتریوم اویوم* زیرگونه *پاراتوبرکلوزیس* در گاوداری‌های سنتی منطقه مغان. مجله بهداشت مواد غذائی. دوره۱، شماره٤، صفحات: ۵۳– ٤٥.
- Anadolu, R., Calikoghn, E., Karayalcin, S. and Gurgey, E. (1999). Cutaneous Crohn's disease: metastatic Crohn's is a misnomer'. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, 13 (1): 61-8.
- Anzabi, Y. and Hanifian, S. (2012). Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in pasteurized milk by IS900 PCR and culture method. African Journal Microbiology Research, 6: 1453-1456.
- Bhide, M., Chakurkar, E., Tkacikova, L., Barbuddhe, S., Novak, M. and Mikula, I. (2005). IS900-PCR based detection and characterization of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from buffy coat of cattle and sheep. Veterinary Microbiology, 112(1): 33-41.
- Botsaris, G., Slana, I., Liapi, M., Dodd, C., Economides, C., Rees, C., *et al.* (2010). Rapid detection methods for viable *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in milk and cheese. International Journal of Food Microbiology, 141: S87-S90.
- Chiodini, R.J. (1990). Characterization of *Mycobacterium paratuberculosis* and organisms of the *Mycobacterium avium Complex* by Restriction Polymorphism of the rRNA Gene Region. Journal of Clinical Microbiology, 28: 489-494.
- Diegues, F.J., Arnaiz, I., Sanjuan, M.L., Vilar, M.J., Lopez, M. and Yus, E. (2007). Prevalence of serum antibodies to Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in cattle in Galacia (North West Spain). Preventive Veterinary Medicine, 82(3-4): 321-6.
- Dundee, L., Grant, I.R., Ball, H.J. and Rowe, M.T. (2001). Comparative evaluation for four decontamination protocols for the isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from milk. Letters in Applied Microbiology, 33: 173-177.
- Eltholth, M.M., Marsh, V.R., Van Winden, S. and Guitian, F.J. (2009). Contamination of food products with *Mycobacterium avium paratuberculosis*: a systematic review. Journal of Applied and Environmental Microbiology, 107: 1061-1071.
- Englund, S., Ballagi, A., Bolske, G. and Johansson, K.E. (1999). Single PCR and nested PCR with a mimic molecule for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 33(3): 163-171.
- Fathi, R., Sarkarati, F., Eslami, M., Rezavand, B. and Nourizadeh, A. (2011). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cow milk using culture and PCR methods. Archives of Razi Institute, 66: 95-100.
- Fellows, I.W. Freeman, J.G. and Holmes, G.K.T. (1990). Crohns disease in the city of Derby. An International Journal of Gastroenterology and Hepatology, 31: 1262-1265.
- Gilmour, N. and G.L . Wood, G.W. (1996). Paratuberculosis (Johnes disease). OIE Manual. Chapter, 3.1.6, pp. 218-226.

- Grant, I.R. and Rees, C.E.D. (2010). Mycobacterium. In: Liu, D., (Ed.), Molecular detection of food borne pathogens. CRC Press, New South Wales, pp. 229-243.
- 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(1-2): 8-13.
- Hanifian, S., Khani, S., Barzegari, A. and Shayegh, J. (2013). Quantitative real-time PCR and culture examination of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* at farm level. Veterinary Microbiology, 162: 160-165.
- Harris, N.B. and Barletta, R.G. (2001). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in veterinary medicine. Clinical Microbiology Reviews, 14: 489-512.
- Klanicova, B., Slana, I., Roubal, P., Pavlik, I. and Kralik, P. (2012). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* survival during fermentation of soured milk products detected by culture and quantitative real time PCR methods. International Journal of Food Microbiology, 157: 150-155.
- Lilenbaum, W., Marassi, C.D. and Oelemann, W.M.R. (2007). Paratuberculosis: an update. Brazilian Journal of Microbiology, 38: 580-590.
- Millar, D., Ford, J., Sanderson, J., Withey, S., Tizard, M., Doran, T., *et al*. (1996). IS900 PCR to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in retail supplies of whole pasteurized cow's milk in England and Wales. Journal of Applied and Environmental Microbiology, 17: 3446-52.
- Nebbia, P., Robino, P., Zoppi, S. and De Meneghi, D. (2003). Detection and excretion pattern of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk of asymptomatic sheep and goats by Nested-PCR. Small ruminant research, 66: 1-3.
- Okura, H., Toft, N. and Nielsen, S.S. (2012). Occurrence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk at dairy cattle farms: A systemic review and meta-analysis. Veterinary Microbiology, 157: 253-263.
- Pillai, S.R. and Jayarao, B.M. (2002). Application of IS900 PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* directly from raw milk. Journal of Dairy Science, 85: 1052-1057.
- Rodreguez-Lazaro, D., DAgostino, M., Herrewegh, A., Pla, M., Cook, N. and Ikonomopoulos, J. (2005). Real-time PCR-based methods for detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in water and milk. International Journal of Food Microbiology, 101: 93-104.
- Rowe, M.T., Grant, I.R., Dundee, L. and Ball H.J. (2000). Heat resistance of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. Irish Journal of Agriculture and Food Research, 39: 203-208.
- Sharma, G., Singh, S.V., Sevilla, I., Singh, A.V., Whittington, R.j., Just, R.A., *etal*. (2007). Evaluation of indigenous milk ELISA with culture and m-PCR for the diagnosis of Bovine Johnes (BJD) in lactating Indian dairy cattle. Research Veterinary Science, 84(1): 30-37.
- Sola, C., Filliol, I., Legrand, E., Lesjean, S., Locht, C., Supply, P., *et al*. (2003). Genotyping of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using MIRUs: association with VNTR and spoligotyping for molecular epidemiology and evolutionary genetics. Infection, genetics and evolution, 3: 125-133.
- Singh, S.V., Singh, A.V., Singh, R., Sandhu, K.S., Singh, P.K. and Sohal, J.S. (2007). Evaluation of highly sensitive indigenous milk ELISA kit with fecal culture, milk culture and fecal-PCR for the diagnosis of bovine Johnes disease (BJD) in India. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 30(3): 175-186.
- Sivakumar, P., Tripathi, B.N. and Nem, S. (2004). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in intestinal and lymph node tissues of water buffaloes (Bubalus bubalis) by PCR and bacterial culture. Veterinary Microbiology, 108(3-4): 263-270.
- Slana, I., Kralik, P., Kralova, A. and Pavlik, I. (2008). On-farm spread of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw milk studied by IS900 and F57 competitative PCR and culture examination. International Journal of Food Microbiology, 128: 250-257.
- Supply, P., Lesjean, S., Savine, E., Kremer, K., Van Soolingen, D. and Locht, D. (2001). Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. Journal of Clinical Microbiology, 39: 3563-3571.

- Wells, S.J., Collins, M.T., Faaberg, K.S., Wees, C., Tavornpanich, S. and Petrini, K.R. (2006). Evaluation of a rapid fecal PCR test for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in dairy cattle. Clinical and Vaccine Immunology, 13(10): 1125-1130.
- Whittington, R.J., Marsh, I., McAllister, S., Turner, M.J., Marshall, D.J. and Fraser, C.A. (1999). Evaluation of modified BACTEC 12B radiometric medium and solid media for the culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from sheep. Journal of Clinical Microbiology, 37: 1077-1083.

Comparison of culture and PCR methods for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw milk of apparently healthy cattle

Anzabi, Y.[1,2*]

1- Department of Pathobiology, College of Veterinary Medicine, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
2-Biotechnology Research Center, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
*Corresponding author email: anzabi@iaut.ac.ir
(Received: 2014/2/21 Accepted: 2014/8/19)

Abstract

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* is the etiological agent for Johne's disease which is known as chronic disease in cattle and may attribute to Crohn's disease in human. High prevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* has been reported in dairy cattle worldwide. Recognition of infected animals is a major factor to control the spread of the organism. In this regard, detection of the bacterium in milk of clinically suspicious and apparently healthy cows is the best way to control the infection. Although isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by culture assay is considered as the gold standard, PCR method helps us to recognize the occurrence of slow-growing microorganisms in a short period of time with high sensitivity. In this survey, a total number of 160 cow milk was sampled and cream layer together with the pellet of each sample was tested by PCR and culture technique. Using Kappa statistics it was revealed an almost perfect agreement between culture and PCR assay with a product size of 400 bp; however, the agreement between culture and PCR with product size of 228 bp was found substantial. Results showed a substantial agreement between PCR with product sizes of 400 bp and 228 bp. Comparing the agreement between the two PCR approaches with culture assay as gold standard test, it was assumed that PCR could be a robust and rapid method to detect *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk. Consequently, PCR can be introduced as a screening test for detection of the bacterium in cow milk.

Key words: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, Johne's disease, Crohn's disease, Cow milk, Culture, PCR