تعیین هویت مولکولی آسپرژیلوس پارازیتیکوس و فلاووس در نمونه‌های علوفه با روش Duplex PCR و مقایسه با روش‌های کشت و مستقیم

ناهید پدرام*[۱]، منصور بیات[۱]، محمدحسن شاه‌حسینی[۳ و ۲]، سعید بکائی[٤]، محمد قهری[٥]

چکیده

آسپرژیلوزیس بیماری عفونی انسان و طیور است که موجب مشکلات عدیده در آنها می‌شود. هدف اصلی این مطالعه، ارزشیابی دو روش آزمایشگاهی (سنتی و مولکولی) در تشخیص آسپرژیلوس فلاوس و پارازیتیکوس و مقایسه این دو روش می‌باشد. بعد از استخراج DNAهای سوش‌های استاندارد **آسپرژیلوس** پارازیتیکوس و فلاووس به همراه پرایمرهای هر قارچ و تست PCR، ژن‌های هر قارچ تکثیر و محصول PCR به روش TA cloning با استفاده از پلاسمید PTZ57R کلون گردید پس از بهینه‌سازی تست‌های PCR و Duplex PCR ۵۰ نمونه به روش Duplex PCR، کشت و آزمایش مستقیم آزمایش شدند. در تست اپتیمایز شده PCR، محصول bp ۳٤۳ و bp ٤۱۳ **آسپرژیلوس** پارازیتیکوس و فلاووس به ترتیب تکثیر گردید. ۵۰ نمونه علوفه به روش Duplex PCR ، کشت و آزمایش مستقیم آزمایش شدند. در آزمایش Duplex PCR ، کشت و آزمایش مستقیم بر روی نمونه‌ها، ۱۳ نمونه با Duplex PCR و ۱۵ نمونه با آزمایش مستقیم و کشت مثبت شد و ۲٦ نمونه با هر دوروش منفی بودند. نتایج بدست آمده از آزمایشات فوق توسط آزمون MacNemar بین نتیجه مستقیم و کشت از یک سو و نتیجه Duplex PCR از سوی دیگر انجام شده توافق بین دو تست می‌باشد P=0.824. طبق نتایج بدست آمده از نظر تشخیص، تفاوت معنی داری بین دوروش آزمایشگاهی وجود نداشت هرچند روش Duplex PCR پاسخ‌دهی سریعتری نسبت به روش‌های سنتی داشت و قادر به تشخیص **آسپرژیلوس**پارازیتیکوس در نمونه‌ها شد.

واژگان کلیدی: *آسپرژیلوس فلاووس،آسپرژیلوس پارازیتیکوس، Duplex PCR، علوفه*

تاریخ دریافت: ۹٤/۲/۱ تاریخ پذیرش: ۹٤/٦/۱۳

مقدمه

آسپرژیلوزیس یکی از عفونت‌های دستگاه تنفسی طیور می‌باشد که با واگیری و تلفات بالا در پرندگان جوان همراه است. بیماری با تظاهرات متفاوتی نظیر علائم عصبی، جلدی، گوارشی، چشمی و سیستمیک همراه می‌باشد(۲ و ۱). چون در غالب موارد دستگاه تنفسی مورد تهاجم است به آن پنومومایکوزیس نیز می‌گویند(۳). بیماری در جوجه‌ها و طیور جوان شایع بوده به طوریکه جوجه‌های ۳-۱ روزه حساسیت زیادی به قارچ آسپرژیلوس نشان می‌دهند اما با افزایش سن نسبت به این عفونت مقاومت ایجاد می‌شود(٤). سم حاصله از این قارچ را بنام آفلاتوکسین می‌نامند آفلاتوکسین‌ها از مهمترین مایکو توکسین‌ها محسوب می‌شوند که از متابولیسم‌های ثانویه گونه‌های خاصی از قارچ‌ها از جمله آسپرژیلوس *پارازیتیکوس* و آسپرژیلوس *فلاووس* حاصل می‌شوند. آفلا توکسین M1 در اثر تبدیل بیولوژیکی آفلاتوکسین B1 در کبد حیوان تولید گردیده و در شیر، ادرار و مدفوع حیوان دیده می‌شود. کنترل و اندازه‌گیری AFM1 ازموارد مهمی است که بایستی به آن توجه بیشتری شود. عمومی‌ترین آفلاتوکسین‌ها شامل G1،B1,B2 و G2 است که از بین این ٤ گونه، آفلاتوکسین B1 در مورد صدمه به دام و محصولات آن بیشترین اهمیت را دارد. محصولات دام حاوی آفلاتوکسین، باعث بیماری‌های زیادی در انسان می‌شود(۵). هرچند روش‌های گوناگونی برای پیشگیری از قارچ‌زدگی خوراک پیش از به مصرف رسیدن آن معرفی شده است، با این حال خواه ناخواه بخشی از خوراک انبار شده جهت مصرف دام، دچار فساد قارچی شده که می‌تواند همراه با تولید سمومی باشد که به مصرف دام می‌رسد. لذا چون به ناچار مقادیری از سموم قارچی همیشه به مصرف دام می‌رسد، بهتر است تلاش شود کـه در درجه اول وجود قارچ

*۱- گروه تخصصی قارچ‌شناسی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران (nahidpedram@gmail.com)

۲- گروه میکروبیولوژی، واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۳-موسسه ایرانیان ژن فاور(IGF)، تهران، ایران

٤-گروه بهداشت مواد غذائی - دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

۵-گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم و مهندسی، دانشگاه امام حسین(ع)، تهران ایران

درجه اول وجود قارچ آسپرژیلوس در علوفه سریعا شناسایی شودتا با بهره گیری از انواع ترکیبات بایندر، حداقل از میزان جذب شدن آن تا حد امکان کاسته شود تا کمترین اثرات سوء بر بهداشت دام و انسان ایجاد گردد. این در حالیست که قسمت عمده از خسارات حاصل از آلودگی قارچی در دامها هنوز آشکار نگردیده است و تنها مسمومیت حاد و بعضی از انواع مسمومیت‌های مزمن شناخته شده است. لذا توصیه شده است که موارد تحت درمانگاهی و برخی از اشکال مزمن اینگونه مسمومیت‌ها، باید بیشتر مورد مطالعه قرار گیرد تا ابعاد خسارات ناشی از جذب این سموم روشن‌تر گردد. از طرفی باید توجه داشت که متابولیت‌های بعضی از قارچ‌ها مانند آفلاتوکسین M1 که درشیر دام‌ها براثر مصرف علوفه آلوده به سموم مربوط به قارچ آسپرژیلوس ترشح می‌شود، در کبد انسان ذخیره شده و می‌تواند موجب سرطان گردد. متأسفانه گزارش‌های فراوانی از حضور غلظت‌های بالای افلاتوکسین M1 در شیر و مواد لبنی مصرفی بخش‌های مختلف کشور وجود دارد و از آنجا که این سم در عمل پاستوریزه کردن از بین نمی‌رود، می‌بایست برای کاهش آن در شیر با میزان جذب آن تاثیر گذاشت. هرچند مصرف بنتونیت روشی به نسبت ارزان برای مقابله با این عارضه ها عنوان شده است ولی میزان تاثیر آن در گله های مختلف به خوبی در داخل کشور مورد بررسی قرار نگرفته است و تخمین درستی از موفقیت آن در کنترل خسارات در دسترس نمی‌باشد، لذا بعلت مشکلات عدیده‌ای که این قارچ و مایکوتوکسین های حاصله از آن که برای انسان و دام و دامداری‌ها می‌نماید بهتر است در اوائل حضور آن در بیمار یا علوفه با روش‌های آزمایشگاهی معتبر تشخیص داده شود. امروزه تعداد این بیماران، بدلیل افزایش موارد پیوند عضو و نیز سرطان‌ها و ایدز رو به افزایش است. این قارچ‌ها در این بیماران ایجاد آسپرژیلوزیس مهاجم می‌نماید. آسپرژیلوزیس مهاجم نیاز به تشخیص سریع اولیه دارد. روش‌های معمول شناسائی قارچ‌ها از جمله اسمیر مستقیم،کشت و نمونه‌های پاتولوژیک آنچنان که باید سریع نیستند و یا از حساسیت لازم برخوردار نمی‌باشند(٦). روش‌های ایمونولوژیک مانند روش‌های ردیابی آنتی بادی و آنتی ژن نیز اگرچه سریع هستند، اما فاقد ویژگی و دقت لازم هستند و بعضا در بیماران دارای نقص در سیستم ایمنی که در تولید آنتی بادی مشکل دارند قابل انجام نمی‌باشند(۱۹ و ۷). روش‌های مولکولی از جمله Duplex PCR امروزه به شکل وسیعی به کمک ما آمده‌اند. این روش‌ها هم حساسیت لازم و هم ویژگی کافی و نیز سرعت مناسب را دارا هستند. تشخیص آسپرژیلوس *فلاووس و پارازیتیکوس* درعلوفه باروش سریع و دقیق برای دامداریها بسیار ارزشمند است. چون با تشخیص سریع قادر به حذف و پاکسازی علوفه‌های حاوی آسپرژیلوس شده و در نتیجه خروج آلودگی، مانع اثرات مزمن آفلاتوکسین های ایجاد کننده در علوفه‌ها توسط آسپرژیلوس‌ها می‌شویم. روش Duplex PCR در تشخیص آسپرژیلوس *فلاووس و پارازیتیکوس* در نمونه‌های علوفه تاکنون در ایران مورد استفاده قرار نگرفته است. ضمنا در این پژوهش تشخیص آسپرژیلوس در علوفه‌ها با دو روش سنتی کشت و آزمایش مستقیم نیز اندازه‌گیری شده و هر دو روش در تشخیص باهم مقایسه می‌گردند.

مواد و روش کار

تهیه سوش‌های آسپرژیلوس فلاووس و پا رازیتیکوس و **روش کشت:** ابتدا سوش‌های استاندارد آسپرژیلوس *فلاووس* متعلق به کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران PTCC با شماره 004(IR 111) و سوش آسپرژیلوس *پارازیتیکوس* تهیه شده از انجمن قارچ‌شناسی ایران در محیط مایع GYEP (Glocose Yeast Extract pepton) کشت و سپس بعد از رشد، ۵۰۰ میکرولیتر از محیط کشت مایع برداشته و در دور ۱۲۰۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. مایع رویی دور ریخته شد و رسوب حاصله در ۱۰۰ میکرولیترآب دوبار تقطیر

استریل دیونیزه شده به حالت سوسپانسیون در آمد وسپس DNA آن با روش فنل کلروفرم استخراج گردید(۸).

استخراج DNA از سوش استاندارد

۱۰۰ میکرولیتراز سوش استاندارد کشت داده شده در محیط کشت مایع برداشته و سپس در مرحله اول ۵۰۰ میکرو لیتر محلول بافر لیز کننده با ترکیب (Proteinase K= , SDS= %10 Tris-Hcl=50 Mm, 250 ug/ml) به آن اضافه شد و در مرحله دوم، ۱۰ میکرو لیتر پروتئاز به مدت ۱۰ ثانیه مخلوط گردید. در مرحله سوم به مدت ۲۰ دقیقه در هیتربلاک ٦٥ درجه قرارداده شد و بعد از خارج نمودن، هم حجم محلول داخل لوله محلول فنل کلروفرم بر روی آن اضافه گردید(بعد از ۳۰ دقیقه مایع روئی را در لوله جدید منتقل نموده و هم حجم مایع مایع داخل لوله ایزوپروپانل به آن اضافه و سپس ۱۰ دقیقه در فریزر۲۰ – درجه سانتیگراد قرارداده شد و بعد از فریزر خارج نموده و پس از سانتریفوژ نمودن مایع روئی را دور ریخته، چون همیشه ایزوپروپانل باعث ته نشین شدن DNA در ته لوله می‌شود و مایع روئی فاقد DNA است که دور ریخته می‌شود و بعد از آن ۱۰۰۰ میکرولیتر الکل ۷۰ درصد در لوله حاوی DNA قارچ ریخته شد و بعد از ۱۰ بار وارونه نمودن لوله، سانتریفوژ لوله انجام گردید. در مرحله آخر مایع روئی لوله دکانته و لوله آزمایش را در هیتربلاک ٦٥ درجه قرار داده شد و بعد از آن ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر به آن اضافه گردید.

پرایمرهای ویژه آسپرژیلوس فلاووس و پا رازیتیکوس:

پرایمر اختصاصی استفاده شده برای آسپرژیلوس *فلاووس* AFLA-F و AFLA-R و آسپرژیلوس *پا رازیتیکوس* APA1 و APA2 در جدول ۱ آمده است (١٤).

جدول ۱ـ مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

نام پرایمر	توالی پرایمر	اندازه پرایمرها
AFLA-F	5’-GGT GGT GAA GAA GTC TAT CTA AGG-3’	٤١٣bp
AFLA-R	5’-AAG GCA TAA AGG GTG TGG AG -3	٤١٣bp
APA1	5’-GGA TTC GTG AGT GTC TTT AGG G -3’	٣٤٣bp
APA2	5’-GGT AAA TGC TCC GCA CAG TC -3’	٣٤٣bp

واکنش PCR: هر واکنش شامل ۵ میکرولیتر (DNA استخراجی از نمونه یا سوش)، ۲/۵ میکرولیتر از10x PCR Buffer، 0.5 µl (0.2 µm) میکرولیتر پرایمر جلویی و0.5 µl (0.2 µm) میکرولیتر پرایمر عقبی، ۰/۷۵ میکرولیتر از (MgCl2(50mM، ۰/۵ میکرولیتر از dNTP10mM، ۰/۳ میکرولیتر از آنزیم Taq DNA polymerase 5u/µl، ۱۵ میکرو لیتر آب دو بار تقطیر استریل در حجم نهایی ۲۵ میکرو لیتر می‌باشد. برنامه دمادهی به صورت دناتوراسیون اولیه در دمای ٩٤ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، دمای چسبیدن (Anneal) ۳۰ ثانیه ٦٦ درجه سانتی گراد، مرحله پلیمریزاسیون (Extend)در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد، ۳۰ ثانیه و تعداد سیکل‌ها ۳۵ سیکل می‌باشد پلیمرایزاسیون نهایی به مدت ۵ دقیقه در ٩٤ درجه سانتی گراد بود(۱۲). از این نمایه حرارتی جهت بهینه‌سازی آزمایش‌های Monoplex PCR تشخیصی آسپرژیلوس پارازیتیکوس و فلاووس و همچنین تست D- PCR استفاده گردید.

محصول واکنش در ژل آگارز ۱/۵ ٪ حاوی سایبر گرین (سینا ژن Cat.No.: MR7730C) در بافر TBE 0/5 x الکتروفورز گردید. بعد از خالص‌سازی محصول PCR، با استفاده از کیت T/A cloning فرمتاس (cat:K1214) و وکتور، pTZ57/RT کلون گردید.

به منظور بررسی حساسیت آزمایش، رقت‌های مختلف DNA قارچ از یک میلیون کپی DNA (غلظت۱- ۱۰) تا یک کپی DNA (غلظت ٦- ۱۰) تهیه گردید این تست به منظور سنجش حساسیت پرایمرها بوده و بیانگر این است که این پرایمرها تا چه رقتی از قارچ راقادر به شناسایی می‌باشد.

به منظور بررسی ویژگی آزمایش، DNA میکرو ارگانیسم‌های مختلف از جمله *کریپتوکوکوس نئوفورمنس*، گونه‌ای از *فوزاریوم*، *فوزاریوم سولانی*، *کاندیدیا آلبیکنس*، *اشرشیاکلی*، *ویروس هپاتیت B*، DNA انسانی به همراه DNA قارچ آسپرژیلوس *فلاووس* و پرایمرهای اختصاصی قارچ را در لوله‌های مختلف قرار داده و تست PCR انجام شد. تست ویژگی برای قارچ آسپرژیلوس *پارازیتیکوس* نیز جداگانه انجام گرفت.

تهیه نمونه از علوفه برای استخراج DNA

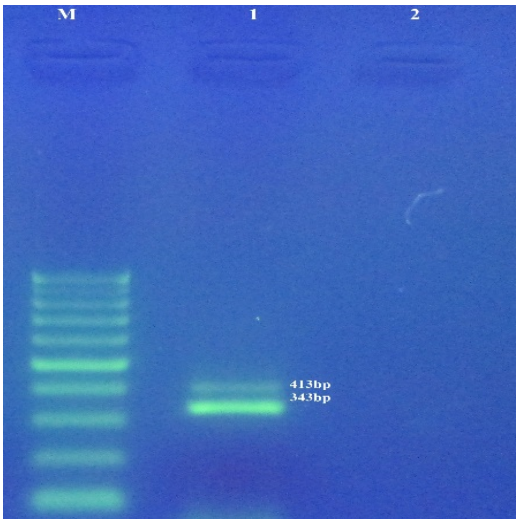
۵۰ نمونه علوفه از کلینیک دامهای بزرگ دانشکده دامپزشکی واحد علوم و تحقیقات بطور تصادفی تهیه گردید. ۰/۱ گرم از هر نمونه علوفه با ترازو وزن شد. سپس در لوله آزمایش قرار داده و در روی لوله آب مقطر ریخته، سپس لوله حاوی نمونه مخلوط گردید. پس از آن، ۲۰ دقیقه لوله در رک بی‌حرکت قرار داده شد تا عمل ته نشینی در لوله حاوی نمونه انجام شود. سپس آب روی لوله‌ها را درلوله‌های جدید انتقال داده و لوله‌های جدید به مدت ۱۰ دقیقه و با دور ۱۰۰۰ سانتریفوژ گردید. بعد از سانتریفوژ مایع رویی دکانته شده و سپس ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر در لوله ریخته پس از مخلوط نمودن برای استخراج DNA ۱۰۰ میکرولیتر از مخلوط به روش کلروفرم جهت استخراج DNA مورد بررسی قرار گرفت.

جهت انجام آزمایش Duplex PCR، ١٤ میکرولیتر آب دو بار تقطیر استریل دیونیزه، ۰/۵ میکرولیتر از هر ٤ پرایمر (آسپرژیلوس *پارازیتیکوس فلاووس*)، ۲/۵ میکرولیتر از بافر 10x PCR ، ۰/۷۵ میکرولیتر از MgCl2(50mM)، ۰/۵ میکرولیتر از dNTP10mM، ۰/۳ میکرولیتر از آنزیم Taq DNA polymerase ۵u/µl، ۵ میکرولیتر از DNA های استخراج شده از نمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفت(۱۷).

انجام آزمایش مستقیم و کشت بر روی نمونه‌ها: در ابتدا محیط کشت سابورو دکستروز آگار حاوی کلرامفنیکل (SC) به میزان ۵۰ میلی گرم در لیتر تهیه و سپس نمونه‌های علوفه بصورت نشاکاری یا نقطه‌ای در محیط مذکور کشت نموده و در صورت رشد کلنی‌های کپکی به منظور شناسائی از آنها اسلاید کالچر انجام گرفت.

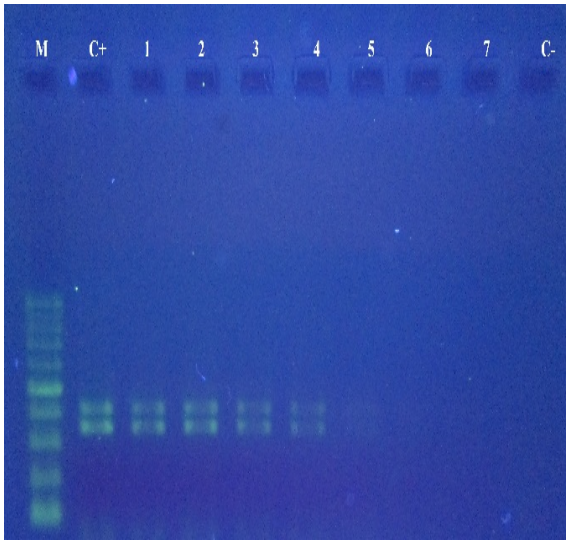
نتایج

اندازه قطعات بدست آمده با استفاده از پرایمرهای ویژه آسپرژیلوس *پارازیتیکوس* bp ۳٤۳ و آسپرژیلوس *فلاووس* bp ٤۱۳ می‌باشند(نگاره ۱) .



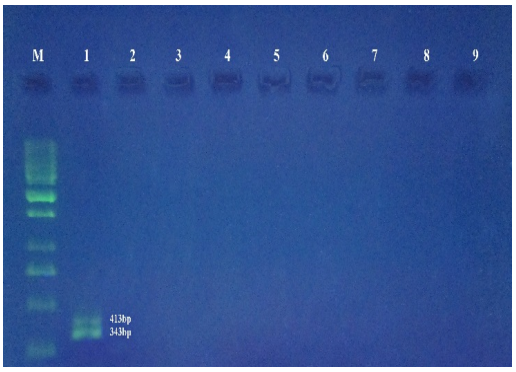
نگاره ۱ـ تست D- PCR بهینه شده (آمپلیکون‌های ۳٤۳bp آسپرژیلوس *پارازیتیکوس* و bp ٤۱۳ آسپرژیلوس *فلاووس*) در تشخیص آسپرژیلوس *پارازیتیکوس وفلاووس*. M: سایز مارکر فرمتاس 100bp DNA Ladder، چاهک ۱: کنترل مثبت استاندارد. قطعه تکثیر شده bp ۳٤۳ آسپرژیلوس *پارازییتکوس* و bp ٤۱۳ آسپرژیلوس *فلاووس*، چاهک ۲: کنترل منفی استاندارد

حساسیت تست D-PCR با پرایمرهای اختصاصی آسپرژیلوس *فلاووس و پارازیتیکوس* قادر به تشخیص حداقل ۱۰۰ کپی از DNA مربوط به هر قارچ آسپرژیلوس *فلاووس و پارازیتیکوس* بود(نگاره ۲).



نگاره ۲ـ نتایج بررسی حساسیت تست،M : سایز مارکر فرمنتاس 100bp DNA Ladder،C+ : کنترل مثبت

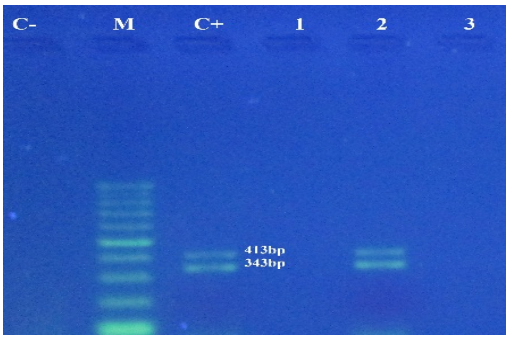
چاهک ۱: رقت۱- ۱۰ معادل ۱۰۰۰۰۰۰ نسخه از DNA آسپرژیلوس *فلاووس، آسپرژیلوس پارازیتیکوس*، چاهک ۲ : رقت ۲- ۱۰ معادل ۱۰۰۰۰۰ نسخه از DNA آسپرژیلوس *فلاووس*، آسپرژیلوس *پارازیتیکوس*، چاهک ۳: رقت۳- ۱۰ معادل ۱۰۰۰۰ نسخه از DNA آسپرژیلوس فلاووس، آسپرژیلوس پارازیتیکوس، چاهک ٤: رقت ٤- ۱۰ معادل ۱۰۰۰ نسخه از DNA آسپرژیلوس فلاووس، آسپرژیلوس پارازیتیکوس، چاهک ٥ : رقت ٥- ۱۰ معادل ۱۰۰ نسخه از DNA آسپرژیلوس فلاووس ، آسپرژیلوس پارازیتیکوس، چاهک ٦ : رقت ٦- ۱۰ معادل ۱۰ نسخه از DNA آسپرژیلوس فلاووس، آسپرژیلوس پارازیتیکوس، چاهک ۷: رقت ۷- ۱۰ معادل ۱ نسخه از DNA آسپرژیلوس فلاووس، آسپرژیلوس پارازیتیکوس،C- : کنترل منفی



نگاره ۳ـ تست ویژگی،M : سایز مارکر فرمنتاس 1Kb DNA Ladder، لاین ۱: DNA آسپرژیلوس *فلاووس و پارازیتیکوس*، لاین۲الی ۸ : DNAهای مربوط به، *Cryptococcus neoformance* ، *Fusarium spp* ، *solani* *Fusarium* *Candidia albicance*، *Escherichia Coli* (E.Coli) *(HBV)*، *Hepatitis Bvirus* ، Human لاین۹: کنترل منفی

DNA های مربوط به، *Cryptococcus neoformance* ، *Fusarium spp* ، *solani* *Fusarium* *Candidia albicance*، *Escherichia Coli* (E.Coli) *(HBV)*، *Hepatitis Bvirus* ، Human

در آزمایش Duplex PCR، بر روی ۵۰ نمونه علوفه، ۱۱ نمونه آزمایش Duplex PCR مثبت و دارای آسپرژیلوس *فلاووس* بودند. ۲ نمونه از نظر آزمایش Duplex PCR مثبت و حاوی هر دو نوع آسپرژیلوس *فلاووس و پارازیتیکوس* و ۳۷ نمونه منفی بودند (نگاره ٤).



نگاره ٤ـ نتایج تست Duplex PCR بر روی نمونه‌های علوفه،C- کنترل منفی، M: سایز مارکر (100bp DNA Ladder (vivantis،C+ کنترل مثبت، چاهک۱: نمونه منفی ، چاهک ۲: نمونه مثبت از آسپرژیلوس *فلاووس* و آسپرژیلوس *پارازیتیکوس*، چاهک ۳: نمونه منفی

جدول ۲ـ فراوانی و درصد فراوانی توافق نتایج دو روش آزمایش در نمونه‌های علوفه

Duplex PCR	کشت و آزمایش مستقیم				
	مثبت		منفی		جمع
	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	
مثبت	٤	٨	٩	١٨	١٣
منفی	١١	٢٢	٢٦	٥٢	٣٧
جمع	١٥	٣٠	٣٥	٧٠	٥٠

نتایج بدست آمده از انجام آزمایشات فوق توسط آزمون Mac Nemar بین نتیجه مستقیم و کشت از یک سو و نتیجه Duplex PCR از سوی دیگر توافق بین دو تست می باشد (P=0.824).

بحث

مایکوتوکسین‌ها متابولیت‌های ثانویه قارچ‌ها می‌باشند که بسیار سمی هستند. این سموم باعث آلودگی انسان وحیوانات شده، بعد از ایجاد علائم مختلف باعث مرگ انسان و حیوانات می‌باشد. آفلاتوکسین‌ها از جمله مایکوتوکسین‌هایی هستند که توسط دو قارچ آسپرژیلوس *فلاووس* و آسپرژیلوس *پارازیتیکوس* ایجاد می‌شوند. مسمومیت با مایکوتوکسین‌ها، مایکوتوکسیکوزیس نامیده می‌شود(۱۳). کپک‌ها و مایکوتوکسین‌ها اثرات زیادی بر روی نشخوارکنندگان و بخصوص گاو گذاشته و باعث کاهش اشتها می‌شوند. چون قارچ‌ها از مواد مغذی خوراک برای رشد خودشان استفاده می‌کنند، ارزش غذایی خوراک را کاهش می‌دهند. کپک‌ها ممکن است میکروب‌های شکمبه را مهار کرده و قابلیت جذب شکمبه را کاهش دهند. مایکوتوکسین‌ها می‌توانند باعث بروز مشکلات هورمونی و ایمنی شوند، خصوصا در گاوهای شیری که تحت تنش هستند. همچنین می‌توانند باعث اسهال های متناوب، زبر شدن موهای بدن، ناراحتی‌های عمومی و سقط جنین زودرس شوند که به صورت چرخه نامنظم فحلی در گاو بروز می‌یابد. متاسفانه در اغلب اوقات مایکوتوکسین‌ها به جای مشکلات حاد باعث مشکلات مزمن می‌شوند چهار نوع مختلف افلاتوکسین به نام‌های B2،B1،G2،G1 (که قویترین و متداولترین آنها B1 است) در خوراک و محصولات دامی شناخته شده است. این سم در بدن توسط کبد متابولیزه شده و تبدیل به مایکوتوکسین‌های دیگر شده و از طریق تولیدات دامی به مصرف کنندگان آن منتقل می‌شود. چنانچه گاو شیری از خوراک آلوده به آفلاتوکسین B تغذیه نماید، آنزیم‌های موجود در کبد آنرا به آفلاتوکسن M تبدیل کرده که در شیر و ادرار دفع می‌شود. آفلاتوکسین M1 و M2 بترتیب از آفلاتوکسین‌های B1 و B2 حاصل می‌شوند. آفلاتوکسین B1 از عوامل تراتوژنیک، موتاژنیک و سرطانزای انسانی است (۱۱ و ۱۰). اهمیت گونه‌های آسپرژیلوس بیشتر در رابطه با خسارات اقتصادی و بهداشتی در زندگی مردم است. در حال حاضر تکنیک‌های تشخیصی رایج شامل مشاهده مستقیم، آزمایشات سرولوژی با استفاده از آنتی ژن گالاکتومانن و کشت ترشحات بیمار است. با توجه به وجود درصدهای متفاوت تشخیص قارچ در ترشحات بیماران در مقالات مختلف و همچنین انتظار تشخیص دقیق‌تر و به موقع بیماری توسط روش‌های مولکولی نسبت روش‌های کلاسیک رایج، این تحقیق پایه ریزی گردید تا با مقایسه روش‌های سنتی و مولکولی در انتخاب صحیح روش‌های تشخیصی گام موثری برداشته شود. از طرفی تشخیص سریع آلودگی در علوفه و مواد غذایی نیز در سالم‌سازی مواد غذایی نیز اهمیت فراوانی دارد که در این مطالعه سعی شده است این جنبه بهداشتی نیز مد نظر قرار گیرد(١٦).

در این بررسی که با روش Duplex PCR و کشت و آزمایش مستقیم بر روی نمونه‌های علوفه انجام گرفت ۱۵ نمونه با دو روش سنتی مثبت و ۱۳ نمونه با روش مولکولی مثبت شدند که تفاوت چندانی بین انجام روش‌های سنتی با روش مولکولی از نظر جوابدهی وجود نداشت ولیکن در انجام روش‌های

سنتی مشکلاتی از جمله طول زمان بیشتر، کارشناس با تجربه زیاد از نظر تشخیص بصری، محیط مناسب برای رشد قارچ در محیط آزمایشگاه، آلودگی پلیت‌ها با دیگر قارچ‌های ساپروفیت، و... مواجه شدیم.

در یک بررسی که توسط Susever. S و همکاران در سال ۲۰۱۱ بر روی ۵۰ نمونه قارچی با روش کشت و آزمایش مستقیم و تست Multiplex PCR انجام گرفت ۲۷ نمونه مثبت و ۲۳ نمونه منفی با روش Multiplex PCR بود ولیکن باروش کشت و آزمایش مستقیم ۱۷ نمونه مثبت و ۳۳ نمونه منفی بودند. و در نهایت روش Multiplex PCR را بر روش‌های سنتی ترجیح داده شد بود (۱۸).

در مطالعه پدرام و همکاران در سال ۲۰۱٤ بر روی ۵۰ نمونه لاواژ ریه (BAL) به منظور تشخیص آسپرژیلوس *فلاووس* و *پارازیتیکوس*، از ۱۸ نمونه لاواژ ریه که با روش Duplex PCR مثبت بود فقط یک نمونه از نظر کشت و آزمایش مستقیم مثبت بود و با روش Duplex PCR علاوه بر اینکه ۱۸ نمونه مثبت شد یک نمونه از ۱۸ نمونه حاوی هر دو گونه آسپرژیلوس *فلاووس و پارازیتیکوس* بود (۱٦). در بررسی کنونی با روش سنتی گونه آسپرژیلوس *پارازیتیکوس* در نمونه‌های علوفه مشخص نشد.

Nguyen Thi Hue و همکارانش در سال ۲۰۱۳ با استفاده از ژن بیوسنتز آفلاتوکسین قادر به تشخیص دو جفت پرایمر آسپرژیلوس *فلاووس و پارازیتیکوس* شدند، سپس با استفاده از پرایمرهای موجود و DNA قارچ‌های مذکور و با انجام آزمایش Multiplex PCR بر روی نمونه‌های مواد غذایی، قادر به تشخیص هر دو نوع قارچ مذکور در مواد غذایی شدند(۱۵). در بررسی کنونی با استفاده از پرایمرهای مذکور قادر به شناسایی هر دو نوع آسپرژیلوس *فلاووس* و *پارازیتیکوس* در علوفه انجام گرفت.

نتایج حاصل از این سه روش بر روی نمونه‌ها، حاکی از این است که در تشخیص هر دو نوع آسپرژیلوس *فلاووس* و *پارازیتیکوس* بین سه روش آزمایشگاهی Duplex PCR ، کشت و آزمایش مستقیم تفاوت چندانی وجود ندارد ولیکن با استفاده از روش‌های مولکولی در مدت زمان کوتاه و با دقت بالا قادر به تشخیص میکروارگانیسم‌های مختلف در هر نوع نمونه‌ای می‌باشیم. با استفاده از روش‌های مولکولی در تشخیص نیازمند به تکنیسین با تجربه بصری نخواهیم بود و با آموزش حداقل یک سال به یک تکنیسین، او را ماهر برای شناخت انواع میکروارگانیسم‌ها در هر نمونه‌ای خواهیم نمود. صحت و دقت آزمایشات مولکولی نسبت به روش‌های سنتی بالاتر بود بعلت اینکه دو مورد آسپرژیلوس *پارازیتیکوس* با روش Duplex PCR در این بررسی مشاهده گردید در حالیکه با روش‌های کشت و آزمایش مستقیم فقط آسپرژیلوس *فلاووس* شناسایی شد. بنابراین صحت و دقت آزمایشهای مولکولی نسبت به روشهای سنتی بالاتر است.

تشکر و سپاسگزاری

از آزمایشگاه دامپزشکی شهریار که در جمع‌آوری نمونه‌های علوفه همکاری نموده‌اند و از موسسه ایرانیان ژن فناور که در انجام آزمایشات مولکولی همکاری نمودند تشکر می‌گردد.

فهرست منابع

1- Ainsworth, G.C., Rewell, R.E.(1949): The incidence of aspergillosis in captive wild birds. J.Comp. Pathol. Therap. 59: 213-24.
2- Akbari, J.G., Varma, P.K.(2005): Clinical profile and surgical outcome for pulmonary aspergilloma: A single center experience. 80:1067-1072.
3- Archibald, R.G. (1913):Aspergillosis in the Sudan ostrich. J.Comp. Pathol. Therap.26: 171-73.

4- Asakura, A., Nakagawa, S.(1906): Immunological studies of aspergillosis in birds. Mycopathol. Mycol. Appl. 2 (18): 249-56.
5- Babras, M.A., Radhakrishnan, C.V.(1967): Aspergillosis in chicks and a trial of hamycin in an outbreak. Hindustan. Antibiotic. Bull .9: 244-45.
6- Baker, A.Z., Courtenay, D., Wright, M.D.(1934): Observations on fungal pneumonia in the domestic fowl. Vet .J. 90: 385-89.
7- Bodin, E., Gautier. L.(1906): Note sur une toxine producte par aspergillus fumigatus. Ann .Inst. Pasteur.20: 209-24.
8- Chute, H.L., Witter, J.F., Rountree, J.L. (1955): The pathology of a fungus infection associated with a capnizing injury.J.Am .Vet. Med.Ass .127: 207-9.
9- Chute, H.L., Lacombe, E.(1956):The fungus flora of chickens with infections of the respiratory tract.J.Am.Vet.Res.17: 763-65.
10- Davis, N.D., Diener, U.L., Agnihotri, V.P.(1967): Production of aflatoxins B1 and G1 in chemically defined medium Mycopathol. Mycol. Appl. 28;31(3):251–256.
11- Davis, N.D.(1967): Production of aflatoxins B1 and G1 in chemically defined medium. Mycopathol. Mycol. Appl. Apr 28:31(3):251–256.
12- Dinner, U.L., Cole, R.J., Sanders, T.H.(2013): Epidemiology of aflatoxin formation by aspergillus flavus. Annu .Rev.Phytopathol.Vol.25:249-270.
13- Shahhosseiny, M.H.(2010): Polymerase chain reaction. 2nd edition. P.20
14- Jelinek, C.P., Pohland, G. E.(1989): Worldwide occurrence of mycotoxins in food and feeds, an update. J. Assoc. Off. Anal.Chem. 72**:**223-247.
15- Nguyen, H.U.(2013):Detection of toxic aspergillus species in food by a multiplex PCR. 4th international conference on biomedical engineering in vietnam. IFMBE. Proceedings. 40: pp. 184–189.
16- Pedram, N., Bayat , M., Shahhosseiny, M.H., Bokaei, S., Ghahri. M. (2014): Multiplex PCR diagnosis of aspergillus parasiticus and flavus in respiratory samples in tuberculosis-suspicious bronchoalveolar lavage (BAL).Biochem. Cell. Arch.Vol. 14:No. 2.
17- Pinel, C., Fricker. H., Lebeau. B. (2003): Detection of circulating aspergillus fumigatus galactomannan value and limits of the platelia test for diagnosing invasive aspergillosis .J. Clin. Microbiol.41:2184-6.
18- Altschul, S.F. (1990): Basic local alignment search tool. J. Mol .Biol.215(3): 403-410.
19- Susever, S., Yegenoglu, Y.(2011): Evaluation of the significance of molecular methods in the diagnosis of invasive fungal infections comparison with conventional methods. Mikrobiyol. Bul.45(2):325-35.