Medical Journal
of
Tabriz University of Medical Sciences and Health Services

Original Article

Detection of *Mycobacterium avium paratuberculosis* in pasteurized milk by PCR according to the search of *IS900* gene sequence

Younes Anzabi*, Arash Khaki

Department of Pathobiology, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
*Corresponding author; E-mail: anzabi@iaut.ac.ir

Received: 17 November 2015 Accepted: 26 January 2016 First Published online: 9 July 2017
Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2017 August;39(3):7-14

Abstract

Background: *Mycobacterium avium subsp paratuberculosis (M.a.p)* causes chronic intestinal inflammation in dairy cattle and eventually leads to Johne's disease. In some studies, mentioned bacteria has been detected and isolated from milk. As regards, during the milking process; milk could get contaminated with chattels feces,therefore the extent of contamination of milk depends on hygienic methods prior and during of milking and the preparation and delivery to the consumer market processes too.So,the aim of this study was determined the prevalence of mentioned bacteria in pasteurized milk in Ardebil province by PCR method for the first time.

Methods: In total; 330 commercially pasteurized milk samples were purchased from various production centers of Ardebil province and 50ml from each sample were centrifuged for M.a.p DNA extraction. Extracted DNA was evaluated for the presence of M.a.p's specific sequence of *IS900* by two protocol of PCR assay.

Results: M.a.p DNA was detected in 33cases (10% of samples) by assay with F90,F91 primers, 22 cases (6.66% of samples) by assay with FP25, RP26 primers and 11 cases (3.33% of samples) by assay with both pairs primers.

Conclusions: The results obtained from this study; demonstrate a relatively high occurrence of M.a.p in pasteurized milk. In addition, regarding the possible etiological role of M.a.p in the development of Crohn's diseases (Infectious Bowel Disease), it is considered as a serious concern for public health.

Keywords: PCR, Mycobacterium avium paratuberculosis, milk, gene sequence

How to cite this article: Khosravi-Darani K, Sohrabvandi S, Zoghi A. [Intra-cellular Biosynthesis of Gold Nanoparticles by Fungus Penicillium chrysogenum]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2017 August;39(3):7-14. Persian.

© 2017 The Author(s). This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

مقاله پژوهشی

تشخیص *مایکوباکتریوم اویوم پاراتوبرکلوزیس* در شیر پاستوریزه به روش PCR بر اساس جستجوی توالی ژنی *IS900*

یونس انزابی*، آرش خاکی

گروه پاتوبیولوژی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران
* نویسنده رابط؛ ایمیل: anzabi@iaut.ac.ir

دریافت: ۱۳۹۴/۸/۲۶ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۱/۶ انتشار برخط: ۱۳۹۶/۴/۱۸
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز. مرداد و شهریور ۱۳۹۶؛ ۳۹(۳): ۷-۱۴

چکیده

زمینه: *مایکوباکتریوم اویوم پاراتوبرکلوزیس* باعث التهاب مزمن روده در گاوهای شیری و در نهایت منجر به بیماری یون می‌شود. در مطالعات مختلف، وجود باکتری مذکور در شیر تشخیص داده شده و از آن جدا شده است. با توجه به اینکه در طی فرایند دوشش، شیر می‌تواند با مدفوع دامها آلوده شود، بنابراین میزان آلودگی شیر به شیوه‌های بهداشتی استفاده شده قبل و هنگام دوشش و نیز مراحل آماده سازی و عرضه به بازار مصرف بستگی دارد. لذا هدف از این مطالعه، تعیین حضور باکتری فوق برای اولین بار در شیرهای پاستوریزه عرضه شده در استان اردبیل با استفاده از روش PCR بود.

روش‌کار: در مجموع ۳۳۰ نمونه شیر پاستوریزه تجاری از مراکز تولیدی مختلف استان اردبیل خریداری شده و ۵۰ میلی لیتر از هر نمونه جهت استخراج DNA *مایکوباکتریوم اویوم پاراتوبرکلوزیس* سانتریفیوژ شده و استفاده گردید. DNA استخراج شده برای بررسی حضور باکتری مذکور در نمونه‌ها بر اساس جستجوی توالی اختصاصی *IS900* در ژنوم این باکتری به کمک دو نوع پروتکل PCR مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها: وجود DNA *مایکوباکتریوم اویوم پاراتوبرکلوزیس* در۳۳ مورد (۱۰٪ نمونه ها) با استفاده از آغازگرهای F90 و F91 ، در۲۲ مورد (۶/۶۶٪ نمونه‌ها) با استفاده از آغازگرهای FP25 و RP26 و در ۱۱ مورد (۳/۳۳٪ نمونه‌ها) هم با هر دو جفت آغازگر تشخیص داده شد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصله از این مطالعه نشان داد که شیوع نسبتا بالایی از آلودگی به باکتری مذکور در شیر پاستوریزه وجود دارد. با توجه به اینکه باکتری مذکور به عنوان علت احتمالی در توسعه بیماری کرون انسان (نوعی بیماری التهابی روده) نیز مطرح می‌باشد، به نظر می‌رسد که این یافته یک نگرانی جدی در مورد سلامت عمومی است.

کلید واژه‌ها: PCR ، مایکوباکتریوم اویوم پاراتوبرکلوزیس، شیر، توالی ژنی

نحوه استناد به این مقاله: انزابی ی، خاکی آ. تشخیص مایکوباکتریوم اویوم پاراتوبرکلوزیس در شیر پاستوریزه به روشPCR بر اساس جستجوی توالی ژنی IS900. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز. ۱۳۹۶؛ ۳۹(۳): ۷-۱۴

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.
این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تبریز تحت مجوز کریتیو کامنز (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

مقدمه

مایکوباکتریوم اویوم پاراتوبرکلوزیس (M.a.p) باعث التهاب مزمن روده در گاوهای شیری و در نهایت منجر به بیماری یون (پاراتوبرکلوزیس) می‌شود (۱). بیماری مذکور در دام‌های اهلی سراسر جهان شایع بوده و تاثیر قابل توجهی در اقتصاد جهانی دارد. اعتقاد بر این است که آلودگی اولیه گوساله‌ها توسط M.a.p به طور معمول با مصرف آغوز و شیر آلوده به باکتری مذکور و یا از طریق محیط آلوده انجام می گیرد، اما علائم بالینی بیماری پس از ۵-۲ سال آشکار می-گردد (۲). دام‌های بدون علائم بالینی می‌توانند M.a.p را از طریق مدفوع و شیر خود تا ۱۸ ماه قبل از نشان دادن هر گونه علائم عفونت بالینی دفع کرده و به عنوان حامل عمل کنند. همچنین دام‌های دارای علائم بالینی می‌توانند به عنوان حامل فعال بیش از ۵×۱۰^{۱۲} عدد از باکتری مذکور را در روز از طریق مدفوع دفع کنند که می‌توانند برای چندین ماه در محیط دوام بیاورند (۳). حضور این باکتری به تعداد حدود CFU ۸-۲ در۵۰ میلی‌لیتر از شیرگاوهای دارای علائم بالینی و نیز گاوهای مبتلا به عفونت تحت بالینی هم گزارش شده است (۴). همچنین در گزارش‌های مختلف، شیوع بالاتری از این بیماری در گاوهای شیری ذکر شده است (۵). در ایران نیز شیوع بالای این باکتری در شیرهای خام و پاستوریزه گزارش گردیده است (۷و۶و۲). با توجه به اینکه شیر می‌تواند در طی فرایند دوشش با مدفوع دام‌ها آلوده شود، بنابراین میزان آلودگی شیرهای مصرفی غالبا به شیوه‌های بهداشتی قبل و در حین شیر دوشی و نیز اعمال انجام گرفته بر روی آن در مرحله آماده‌سازی و عرضه به بازار مصرف بستگی دارد (۸). از طرف دیگر گزارشهائی وجود دارد که باکتری M.a.p را در توسعه بیماری التهابی روده (بیماری کرون) یک علت احتمالی می‌دانند. بطوریکه در بررسی‌های مختلف از افراد مبتلا به بیماری کرون باکتری مذکور جداسازی و شناسایی شده و نیز اکثر آنتی بیوتیک‌هایی که در مورد بیماران مبتلا به کرون مؤثر بوده‌اند همان ترکیباتی هستند که علیه باکتری *مایکوباکتریوم اویوم پاراتوبرکلوزیس* هم مورد استفاده قرار گرفته است. همچنین شباهت‌های موجود در علائم بالینی و نیز علائم کالبد شکافی بیماری یون در دام‌ها و بیماری کرون در انسان، احتمال دارا بودن نقش اصلی توسط باکتری فوق جهت ابتلا و توسعه بیماری کرون را قوت می‌بخشد (۱۱-۹). لذا در سال-های اخیر احتمال آلودگی بهM.a.p باعث نگرانی قابل توجهی در صنایع لبنی در سراسر جهان شده و در بسیاری از پژوهش‌های مرتبط، باکتری مذکور به عنوان یک مخاطره بهداشتی در سلامت عمومی انسان‌ها نیز مطرح شده است (۱۲و۳). وجود باکتری M.a.p علاوه بر مدفوع، در بسیاری از قسمت‌های بدن دام‌ها و همچنین در شیر و محصولات لبنی نیز شناسایی شده است (۱۶-۱۳و۲). همچنین در مطالعات مختلف، باکتری مذکور در شیر پاستوریزه مخصوصا در شیرهای پاستوریزه شده به روش پاستوریزاسیون با درجه حرارت بالا در طی زمان کوتاه (HTST) به عنوان مثال در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه که احتمال زنده ماندن باکتری فوق وجود دارد، تشخیص و نیز از آن جدا شده است (۱۸و۱۷و۳و۲). اما مسئله قابل توجه در تشخیص حضور M.a.p در نمونه‌های مختلف این است که، رشد آهسته این باکتری در آزمایشگاه (بیش از ۱۸ هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) و عدم وجود محیط کشت انتخابی مناسب برای جداسازی این میکروارگانیسم، کار آزمایشگاهی بر روی این باکتری را دشوار کرده است (۳). اگر چه تشخیص M.a.p از طریق کشت و جداسازی به عنوان مناسب‌ترین روش استاندارد و شاخصی برای تشخیص این باکتری در نظر گرفته می‌شود، ولی هیچ کدام از تکنیک‌های بکار رفته برای کشت استاندارد نبوده و توانایی آزمایشگاه های مختلف جهت این عمل به طور قابل توجهی با همدیگر متفاوت است (۱۹). از سوی دیگر، ایجاد حساسیت مناسب در روش کشت دشوار می‌باشد، چرا که به عنوان مثال مواد شیمیایی آلوده زدا که جهت جلوگیری از رشد میکروارگانیسم های مزاحم در نمونه‌ها و سرعت بخشیدن به رشد M.a.p استفاده می‌گردند و نیز وجود باکتری‌های در حال رشد در فلور طبیعی میزبان، باعث کشتن شدن و یا کاهش میزان زنده ماندن M.a.p در نمونه‌ها می‌شود (۲۰). بنابراین با توجه به مشکلاتی که در روش‌های مرسوم ذکر شده وجود دارد، عقیده بر این می‌باشد که روش PCR قادر است وجود M.a.p را در نمونه‌های بالینی، محیطی و نیز محصولات غذائی، بهتر مشخص کند (۲۱). در ایران، به دلیل به بالا بودن تعداد M.a.p در گاوهای شیری تعیین میزان آن در انواع شیرهای پاستوریزه مصرفی، از نظر بهداشت عمومی بسیار مهم بوده و میزان آلودگی شناسائی شده هم می‌تواند توسط سازمان ایمنی مواد غذایی جهت ایجاد مقررات ملی برای کنترل مواد غذایی بیماری‌زا مورد بررسی و استفاده قرار گیرد (۲۲و۲). بنابراین، هدف از این مطالعه، تعیین میزان شیوع M.a.p در شیرهای پاستوریزه مصرفی در استان اردبیل (واقع در شمال غرب ایران) برای اولین بار با استفاده از روش مولکولی PCR بر مبنای جستجوی سکانس اختصاصی *IS900* در ژنوم باکتری مذکور بود.

روش‌کار

در طول یک دوره ۱۰ ماهه (از اسفند ۱۳۹۲ تا دی ماه ۱۳۹۳)، مجموعا تعداد ۳۳۰ عدد نمونه شیر پاستوریزه (با۱/۵٪ چربی) آماده برای عرضه به بازار مصرف، از۹ مرکز تولیدی واقع در سطح استان اردبیل به طور تصادفی ساده جمع آوری شده و بلافاصله در شرایط استاندارد به آزمایشگاه بیوتکنولوژی گروه بهداشت مواد غذائی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز انتقال می‌یافت. سپس ۵۰ میلی‌لیتر از هر نمونه شیر در دور g ×۴۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ می‌شد. لایه چربی و آب شیر با دقت دور ریخته شده و از پلت‌های حاصله در ته لوله برای استخراج DNA باکتری M.a.p استفاده می‌شد (۱۸). DNA ژنومی باکتری M.a.p با توجه به پروتکل شرح داده شده توسط Djønne و همکاران، البته با اعمال برخی تغییرات در آن استخراج شد (۱۴). بدین منظور، پلت‌های هر یک از نمونه‌ها (به دست آمده از نمونه‌های شیر سانتریفوژ شده) جداگانه با ۱ میلی‌لیتر از بافر لیز کننده که حاوی ۲mM از EDTA، ۴۰۰ mM نمک طعام، ۱۰mM تریس اسید کلردریک و نیز۰/۶٪ SDS و ۲۰ میلی‌گرم پروتئیناز K بود (همگی از شرکت سیگما –آلدیریچ، آمریکا)، مخلوط گردیده و pH نهائی معادل ۸ تنظیم می‌گردید. سپس جهت لیز شدن باکتری‌ها از دمای جوش به مدت ۱۵ دقیقه و سپس دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب استفاده می‌شد. در ادامه DNA باکتری به کمک۵۰۰ میکرولیتر از محلول حاوی فنل: کلروفرم: ایزوآمیل الکل (همگی مرک، آلمان) با نسبت ۱:۲۴:۲۵ و pH=۶/۷ استخراج گردیده و سپس لوله‌های آزمایش در دور g×۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ می شد. سپس فاز آبی حاصله جمع‌آوری شده و به یک لوله جدید منتقل و در ادامه DNA با استفاده از اتانول مطلق سرد شده (۲۰°C–) رسوب داده می‌شد. DNA به دست آمده در ۳۰ میکرولیتر آب مقطر فاقد آنزیم‌های نوکلئازی (شرکت سیناژن، تهران، ایران) حل می‌شد. در نهایت میزانDNA استخراج شده با استفاده ازدستگاه اسپکتروفتومتر (Nano Drop Technologies, Wilmington, DE, USA) اندازه‌گیری می شد. لازم به ذکر است که بدین منظور از نسبت جذب A260 / A280 برای مشخص‌کردن آلودگی احتمالی با DNA ناخواسته، استفاده می‌گردید (۲۳). به منظور تشخیص توالی اختصاصی *IS900* در DNA های استخراج شده از نمونه‌ها با استفاده از PCR از آغازگرهای زیر استفاده شد:

F-90: 5′-GTT CGG GGC CGT CGC TTA GG-3′
R-91: 5′-GAG GTC GAT CGC CCA CGT GA -3′

که طی روند PCR جفت پرایمر بالا محصولی به اندازه ۴۰۰ جفت باز تولید می‌کنند و

FP-25: 5′-CCA GGG ACG TCG GGT ATG GC -3′
RP-26: 5′- GGT CGG CCT TAC CGG CGT CC-3′

که طی روند PCR جفت پرایمر بالا محصولی به اندازه ۲۲۸ جفت باز تولید می‌کنند (۲). مخلوط استفاده شده در واکنش PCR، شامل ۱۲/۵ میکرولیتر از مستر میکس ۲X، ۶۰ پیکومول از هر یک از آغازگرهای ذکر شده در بالا (شرکت سیناژن، تهران، ایران) و ۲۵ نانوگرم از DNA الگو (استخراج شده از هریک از نمونه های شیر پاستوریزه) بود که با اضافه کردن آب مقطر فاقد آنزیم‌های نوکلئازی (شرکت سیناژن، تهران، ایران) حجم نهایی مخلوط مذکور را به ۲۵ میکرولیتر رسانده و سپس آن را با ۵ میکرولیتر روغن معدنی (شرکت سیناژن، تهران، ایران) مخلوط می‌کردیم. همچنین در این آزمایش یکی از سویه‌های استاندارد M.a.p (DSM 44133, Braunschweig-Germany) به عنوان کنترل مثبت و نیز آب مقطر عاری از DNA وRNA به عنوان کنترل منفی استفاده می‌شد. برنامه PCR با استفاده از جفت آغازگرهای F90 و F91 تحت شرایط زیر انجام می‌شد: دناتوراسیون اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۵ چرخه تکراری در شرایط ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت۴۰ ثانیه (دناتوره شدن اصلی)، ۶۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱دقیقه جهت اتصال آغازگرها و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه جهت توسعه اولیه و در نهایت ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه جهت توسعه نهایی محصول (با اندازه ۴۰۰ جفت باز). همچنین برنامه PCR با آغازگرهای FP25 و RP26 هم تحت شرایط زیر انجام شد: دناتوراسیون اولیه در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴ دقیقه و سپس ۳۵ چرخه تکراری درشرایط ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه (دناتوره شدن اصلی)، ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه جهت اتصال آغازگرها و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه جهت توسعه اولیه و در نهایت ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه جهت توسعه نهایی محصول (با اندازه۲۲۸ جفت باز). همچنین نمونه‌های شیر به طور همزمان بدون استفاده از DNA الگو (کنترل منفی) و با کنترل فرآیند PCR هم مورد آزمایش قرار می‌گرفتند. در نهایت با استفاده از ۵ میکرولیتر از محصول PCR مربوط به جفت آغازگرهای F-90 و R-91 بر روی ژل آگارز ۱٪ (Invitrogen, California, USA) و نیز همان مقدار از محصول PCR مربوط به جفت آغازگرهایFP-25 و RP-26 بر روی ژل آگارز ۱/۲٪ (Invitrogen, California, USA) عمل بارگذاری محصولات ذکر شده انجام می‌گردید. سپس اتیدیوم بروماید (۱میکروگرم/ میلی‌لیتر) برای رنگ‌آمیزی

DNA استخراجی مورد استفاده قرار می‌گرفت. لازم به یادآوری است که دو نوع DNA سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی (شرکت فرمنتاز، آلمان) هم در ژل‌های مذکور به منظور تعیین اندازه قطعه محصولات PCR استفاده می‌شد (همانطور که در شکل شماره ۱ دیده می‌شود). برای تصویربرداری از ژل‌ها هم ازدستگاه Box™ gel documentation (شرکت سینژن کمبریج، انگلستان) استفاده می‌شد (۸و۶و۲).

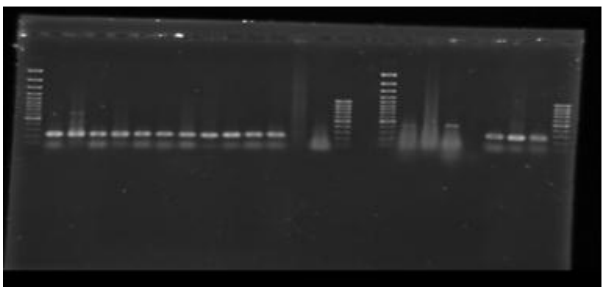
یافته‌ها

از مجموع ۳۳۰ نمونه شیر پاستوریزه آزمایش شده، DNA باکتری *مایکوباکتریوم اویوم پاراتوبرکلوزیس* در ۲۲ مورد یعنی در۶/۶۶٪ از نمونه‌ها با استفاده از جفت آغازگرهای F90 و F91، در ۳۳ مورد (۱۰٪ از نمونه‌ها) با استفاده ازجفت آغازگرهای FP25 و RP26 و فقط در مورد ۱۱ نمونه (۳/۳۳٪ نمونه‌ها) همزمان با هر دو جفت آغازگر شناسایی شد (جدول ۱ و شکل ۱).

جدول۱: تعداد و درصد نمونه‌های مثبت شیرهای پاستوریزه آزمایش شده با استفاده از دو روش PCR

	نتایج آزمایشات انجام گرفته در نمونه‌های مورد آزمایش بر مبنای حضور توالی اختصاصی *IS900*	
مشخص شدن DNA با استفاده از جفت آغازگرهای F90, F91	مشخص شدن DNA با استفاده از جفت آغازگرهای FP25, RP26	تعداد و درصد موارد مثبت و منفی
+	–	۲۲ (٪۶/۶۶)
–	+	۳۳ (٪۱۰)
+	+	۱۱ (٪۳/۳۳)

۱ ۲ ۳ ۴ ۵ ۶ ۷ ۸ ۹ ۱۰ ۱۱ ۱۲ ۱۳ ۱۴ ۱۵ ۱۶ ۱۷ ۱۸ ۱۹ ۲۰ ۲۱ ۲۲ ۲۳ ۲۴ ۲۵



شکل۱: نمونه‌ای از نتایج مثبت در ژل الکتروفورز شده محصولات ۲۲۸ جفت بازی (چاهک‌های ۲ تا ۱۲) **و** ۴۰۰ جفت بازی (چاهک های۱۸و۲۰) **مربوط به آزمایشات** PCR **انجام گرفته بر روی نمونه‌ها (سایز مارکر۱۰۰ جفت بازی نوع ۱ در چاهک های** ۱و۱۷ **و نیز سایز مارکر۱۰۰ جفت بازی نوع ۲ در چاهک های** ۱۵و۲۵ **مشخص می‌باشد. چاهک‌های** ۱۳-۱۴و۱۹ **جواب‌های منفی و نیز چاهک‌های** ۲۲ تا ۲۴ **کنترل مثبت و** ۱۶و۲۱ **کنترل منفی را نشان می‌دهند).**

بحث

با پیشرفت روش‌های تشخیص مولکولی از جمله تکنیک PCR اهمیت و ارزش استفاده از آن در تشخیص بیماری‌ها روز به روز بیشتر شده است که این امر در ارتباط با تشخیص بیماری یون نیز به اثبات رسیده است، به طوریکه 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 M.a.p توصیف کرده است (۷). در پژوهشی در سال ۲۰۰۷ در هند، سه آزمایش تشخیصی الایزا، کشت و PCR به شکل مقایسه ای بر روی شیر گاوهای بومی انجام گرفته که در میان آنها روش PCR شیر بهترین نتایج را نشان داده است (۲۴). پژوهش دیگری که در هندوستان بر روی گاومیش‌های آبی که دارای علائم بالینی بیماری یون بوده‌اند انجام گرفته نشان داده که از مجموع۲۰ نمونه‌ی مربوط به دامهای مذکور، تعداد ۱۴ نمونه به آزمایش تشخیصی PCR و فقط ۶ نمونه به کشت اختصاصی جواب مثبت داده‌اند (۲۵). اما در پژوهشی که در ایتالیا انجام گرفته است، ابتدا گوسفندان با آزمایش 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 ۴ نمونه از ۱۴ دام سرم منفی به آزمایش PCR شیر جواب مثبت داده‌اند (۲۶). در مطالعه حاضر هم، مشخص گردید که باکتری M.a.p را می‌توان سریع‌تر و با حساسیت بالاتر با استفاده از دو روش PCR *IS900* شناسایی کرد. بر این اساس، روش مبتنی بر PCR با جفت آغازگرهای FP25 و RP26 نسبت به روش مبتنی بر PCR با جفت آغازگرهای F90 و F91 شیوع بالاتری از باکتری مذکور را نشان داد. این یافته‌ها با تفاوت های مشاهده شده درشیوع باکتری فوق در نتایج بدست آمده توسط Ellingson و همکاران در سال ۲۰۰۵ و Donaghy و همکاران در سال ۲۰۰۸ مطابق می‌باشد (۲۷و۱۷). البته به نظر می رسد که در این مورد خاص ؛ نوع آغازگری که استفاده می‌شود نیز مهم بوده و دارای نقشی اختصاصی است. همچنین با توجه به اینکه مشاهده می‌شود نتایج برخی از تحقیقات ذکر شده در بالا که مربوط به نتایج PCR شیر می‌باشد با نتایج تحقیق حاضر مقداری متفاوت می‌باشد لذا به نظر می‌رسد که یکی از علل آن می‌تواند مربوط به وجود متابولیت‌هائی شبیه یون‌های کلسیم در نمونه‌های شیر باشد که ممکن است واکنش PCR را مهار کرده و لذا نتایج متفاوت حاصل شود. از طرف دیگر به نظر می‌رسد که یکی دیگر از دلایل عدم همخوانی نتایج پژوهش حاضر با نتایج حاصله در برخی از تحقیقات مشابه

که به آنها اشاره شد، می‌تواند به دلیل تفاوت در پروتکل استخراج DNA باشد. چرا که عقیده بر این است موضوع مذکور باعث می‌شود که به دلیل عدم تهیه DNA الگوی مناسب، حساسیت آزمایش PCR تغییر یابد (۲۸). از طرف دیگر تحقیقات مختلفی در ارتباط با تعیین غیر فعال شدن باکتری M.a.p در شیر پاستوریزه انجام شده است که این یافته‌ها به طور کلی نشان داده است که باکتری مذکور به طور کامل در عمل پاستوریزاسیون شیر در دمای ۷۲°C طی مدت ۱۵ ثانیه غیر فعال نمی‌شود (۱۸و۵و۳). همچنین یافته‌های مطالعات مختلف در سال ۱۹۹۸ منجر به این شد که صنایع لبنی بریتانیا مبادرت به افزایش زمان پاستوریزاسیون شیرهای تجاری (۲۵ ثانیه به جای ۱۵ ثانیه در دمای ۷۲°C) به منظور افزایش میزان قدرت‌کشندگی عمل پاستوریزاسیون نمایند (۲۹و۳). در یک بررسی ملی در انگلستان، از مجموع ۵۶۷ نمونه شیر پاستوریزه تجاری آزمایش شده که به منظور بررسی حضور جایگاه ژنی اختصاصی در DNA باکتری M.a.p انجام گرفت، در۶۷ مورد (۱۱/۷٪ نمونه‌ها) جایگاه ژنی مذکور توسط روش PCR *Immunomagnetic* شناسائی گردیده و یافته‌های این پژوهش تایید کردند که M.a.p این توانائی را دارد که در فرآیند پاستوریزاسیون تجاری بر اساس استفاده از دمای بالا در زمان کوتاه (HTST)، حتی گاهی در مواردی که مدت زمان اعمال حرارت به ۲۵ ثانیه هم افزایش یافته است، زنده بماند. البته نگارندگان یافته مذکور نتوانستند تفاوت بین باکتری‌های کشته شده و زنده مانده با قابلیت رویشی را مشخص کنند (۳۰و۳). در پژوهش حاضر علی‌الرغم اثبات شیوع بالای وجود باکتری M.a.p در شیرهای پاستوریزه عرضه شده به بازار مصرف، به دلیل ویژگی‌های آزمایش PCR، تفاوت بین باکتری‌های کشته شده و زنده مانده با قابلیت رویشی مشخص نگردید.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه شیوع بالایی از آلودگی به باکتری M.a.p (۱۰ درصد با استفاده از PCR مبتنی بر جفت آغازگرهای FP25 و RP26 و ۶/۶۶ درصد توسط برنامه PCR با جفت آغازگرهای F90 و F91) را در شیر پاستوریزه نشان داد. لذا با توجه به شرایط دامداری در کشور ما به نظر می‌رسد که بالا بودن تعداد باکتری مذکور در شیر، غالبا به روش دوشش شیر با دست در گاوداری‌های سنتی ارتباط دارد. به عبارت دیگر، در مناطقی که در آنها دام‌ها در مزارع سنتی کوچک به جای مراکز صنعتی پرورش یافته و در آنها به جای استفاده از دستگاه شیردوش، با دست شیردوشی انجام می گیرد، میزان وقوع M.a.p بالاتر می‌باشد. با توجه به این نکته که اسهال مزمن و مقاوم به درمان از علائم بارز بیماری یون می‌باشد لذا این مسئله می‌تواند موجب آلودگی شیر و محیط دامداری‌ها گردد. بر همین اساس مطالعات انجام یافته در این مورد حاکی از افزایش احتمال آلودگی ثانویه شیر به هنگام شیر دوشی دستی می‌باشد (۲۳). بنابراین پایبندی به روش‌های بهداشتی مناسب در حین شیردوشی و دست نزدن به شیر ضروری می‌باشد. علاوه بر این با توجه به بهره‌گیری از روش پاستوریزاسیون HTST بر روی شیرهای مورد مصرف انسان در ایران، تاکید بر انجام این عمل در مدت زمان کافی و با شدت عملیات حرارتی مناسب برای غیرفعال کردن M.a.p ضروری به نظر می‌رسد. از طرف دیگر با توجه به نقش M.a.p به عنوان علت احتمالی در توسعه بیماری کرون، این یافته‌ها می‌تواند به عنوان یک نگرانی جدی برای سلامت عمومی در نظر گرفته شود.

تقدیر و تشکر

بدین‌وسیله از کلیه مسئولین و پرسنل محترم شبکه دامپزشکی استان اردبیل و نیز کارشناسان آزمایشگاه بیوتکنولوژی گروه بهداشت مواد غذائی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز به خاطر همکاری‌های لازم کمال تشکر را داریم.

References

1. Kralik P, Nocker A, Pavlik I. Mycobacterium avium subsp. Para tuberculosis viability determination using F57 quantitative PCR in combination with propidium mono azide treatment. *Int J Food Microbiology* 2010; **141**(31): 80-86. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.018
2. Anzabi Y. Comparison of culture and PCR methods for detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in raw milk of apparently healthy cattle. *Journal of Food Hygiene* 2014; **4**(13): 1-12. (Persian)
3. Grant IR, Hitchings EI, McCartney A, Ferguson F, Rowe MT. Effect of commercial-scale high-temperature, short-time pasteurization on the viability of Mycobacterium paratuberculosis in naturally infected cows' milk. *Appl Environ Microbiol* 2002; **68**(2): 602-607. doi: 10.1128/AEM.68.2.602-607.2002

4. Lund BM, Gould GW, Rampling AM. Pasteurization of milk and the heat resistance of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a critical review of the data. *Int. J. Food Microbiol* 2002; **77**: 135-145. doi: 10.1016/S0168-1605(02)00213-1
5. Botsaris G, Slana I, Liapi M, Dodd C, Economides C, Rees C, et al. Rapid detection methods for viable Mycobacterium avium subspecies Para tuberculosis in milk and cheese. *International Journal of Food Microbiology* 2010; **141**: S87-S90. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.016
6. Anzabi Y, Hanifian S. Detection of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in pasteurized milk by IS900 PCR and culture method. *African Journal Microbiology Research* 2012; **6**: 1453-1456. doi: 10.5897/AJMR11.1305
7. Khakpoor M, Fardin M, Ahmadi H, Nehzati A. The infection status of Mycobacterium avium paratuberculosis in traditional dairy cattle farms in Moghan region. *Journal of Food Hygiene* 2012; **2**(4): 45-53 (Persian)
8. Dundee L, Grant IR, Ball HJ, Rowe MT. Comparative evaluation of four decontamination protocols for the isolation of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis from milk. *Lett. Appl. Microbiology* 2001; **33**(3): 173-177. Doi: 10.1046/j.1472-765x.2001.00979.x
9. Harris N.B, Barletta R.G. Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in veterinary medicine. *Clinical Microbiology Reviews* 2001; **14**: 489-512. doi: 10.1128/CMR.14.3.489-512.2001
10. Rodreguez-Lazaro D, Dagostino M, Herrewegh A, Pla M, Cook N, Ikonomopoulos J. Real-time PCR-based methods for detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in water and milk. *International Journal of Food Microbiology* 2005; **101**: 93-104. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.09.005
11. Klanicova B, Slana I, Roubal P, Pavlik I, Kralik P. 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* 2012; **157**(2): 150-155. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.021
12. Gill CO, Saucier L, Meadus WJ. Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in dairy products, meat, and drinking water. *J Food Protect* 2011; **74**: 480-499. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-10-301
13. Corti S, Stephan R. Detection of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis specific *IS900* insertion sequences in bulk-tank milk samples obtained from different regions throughout Switzerland. *BMC Microbiology* 2002; **2**: 1-7. doi: 10.1136/vr.150.7.214
14. Djønne B, Jensen MR, Grant IR, Holstad G. Detection by immunomagnetic PCR of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in milk from dairy goats in Norway. *Veterinary Microbiology* 2003; **92**: 135-143. doi: 10.1016/S0378-1135(02)00355-3
15. Donaghy JA, Totton NL, Rowe MT. Persistence of Mycobacterium paratuberculosis during Manufacture and Ripening of Cheddar Cheese. *Appl. Environ. Microbiology* 2004; **70**: 4899-4905. doi: 10.1128/AEM.70.8.4899-4905.2004
16. Herthnek D, Nielsen SS, Lindberg A, Bölske G. A robust method for bacterial lysis and DNA purification to be used with real-time PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* in milk. *J Microbiol Meth* 2008; **75**(2): 335-340. doi: 10.1016/j.mimet.2008.07.009
17. Ellingson JLE, Anderson JL, Koziczkowski JJ, Radcliff RP, Sloan SJ, Allen SE, et al. Detection of viable Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in retail pasteurized whole milk by two culture methods and PCR. *J Food Protect* 2005; **68**(5): 966-972. doi: 10.4315/0362-028X-68.5.966
18. Grant IR, Williams AG, Rowe MT, Muir DD. Efficacy of various pasteurization time-temperature conditions in combination with homogenization on inactivation of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in milk. *Appl Environ Microbiology* 2005; **71**: 2853-2861. doi: 10.1128/AEM.71.6.2853-2861.2005
19. Slana I, Paolicchi F, Janstova B, Navratilova P, Pavlik I. Detection methods for Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis in milk and milk products: a review. *Vet Med* 2008; **53**: 283-306.
20. Sergeant ESG, Whittington RJ, More SJ. Sensitivity and specificity of pooled faecal culture and serology as flock-screening tests for detection of ovine paratuberculosis in Australia. *Prev Vet Med* 2002; **52**: 199-211. doi: 10.1016/S0167-5877(01)00261-6
21. Whittington RJ, Marshall DJ, Nicholls PJ, Marsh IB, Reddacliff LA. Survival and Dormancy of Mycobacterium avium subsp.paratuberculosis in the Environment. *Appl Environ Microbiology* 2004; **70**: 2989-3004. doi: 10.1128/AEM.70.5.2989-3004.2004
22. Doosti A, Moshkelani S. Application of IS900 nested-PCR for detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis from faecal specimens. *Bulg J Vet Med* 2010; **13**: 92-97.
23. Hanifian S, Khani S, Barzegari A, Shayegh J. Quantitative real-time PCR and culture examination of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis at farm level. *Veterinary Microbiology* 2013; **162**(1): 160-165. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.08.026
24. Sharma G, Singh S.V, Sevilla I, Singh A.V, Whittington R.J, Just R.A, et al. 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* 2007; **84**(1): 30-37. doi: 10.1016/S0034-5288(07)00256-1
25. Sivakumar P, Tripathi B.N, Nem S. Detection of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in intestinal and lymph node tissues of water buffaloes (Bubalus bubalis) by PCR and bacterial culture. *Veterinary Microbiology* 2004; **108**(3-4): 263-270. doi: 10.1016/j.vetmic.2005.04.002

26. Nebbia P, Robino P, Zoppi S, DeMeneghi D. Detection and excretion pattern of Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis in milk of asymptomatic sheep and goats by Nested-PCR. *Small ruminant research* 2003; **66**: 116-120. doi: 10.1016/j.smallrumres.2005.07.049
27. Donaghy JA, Rowe MT, Rademaker JLW, Hammer P, Herman L, De Jonghe V, et al. An interlaboratory ring trial for the detection and isolation of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis from raw milk artificially contaminated with naturally infected faeces. *Food Microbiology* 2008; **25**: 128-135. doi: 10.1016/j.fm.2007.06.007
28. Singh S.V, Singh A.V, Singh R, Sandhu K.S, Singh P.K, Sohal J.S. 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* 2007; **30**(3): 175-186. doi: 10.1016/j.cimid.2006.12.002
29. Klanicova B, Slana I, Roubal P, Pavlik I, Kralik P. 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* 2012; **157**: 150-155. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.021
30. Wuhib Y. Ayele, Svastova P, Roubal P, Bartos M, Pavlik I. Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis Cultured from Locally and Commercially Pasteurized Cow's Milk in the Czech Republic. *Appl Environ Microbiology* 2010; **71**(3): 1210-1214. doi: 10.1128/AEM.71.3.1210-1214.2005