مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۸۷، دوره ۶۳، شماره ۱، ۷۳-۶۹

شناسایی باکتری‌های رایج ورم پستان در تانک شیر گاو داری‌ها با روش PCR

مهدی وجگانی* سید مصطفی پیغمبری حسن حکیمی

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

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

چکیده

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

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

مقدمه

ورم پستان، التهاب غدد پستان می‌باشد که معمولاً ناشی از عفونت‌های باکتریایی است. ورم پستان به عنوان پر هزینه‌ترین بیماری گاو شیری در سرتاسر جهان مطرح است و سالیانه خسارات زیادی به صنعت دامپروری در جهان وارد می‌سازد. خسارات اقتصادی آن ناشی از کاهش تولید، دور ریختن شیر، افزایش حذف، هزینه‌های درمان و دامپزشک و ... می‌باشد(۱۳، ۹، ۸، ۲). باکتری‌های اصلی ایجاد کننده ورم پستان را به دو دسته واگیردار (استافیلوکوکوس اورئوس، استرپتوکوکوس آگالاکتیه و مایکوپلاسما بویس) و محیطی(اشریشیا کلی، استرپتوکوکوس دیس گالاکتیه و استرپتوکوکوس یوبریس) تقسیم بندی می‌کنند(۱۳،۸،۲). هنوز یک واکسن موثر علیه ورم پستان گاو در دسترس نیست و پیش‌گیری نیازمند تست‌های حساس، سریع و اختصاصی برای تشخیص باکتری‌های اصلی که ضررهای سنگینی را به صنعت دامپروری می‌رسانند، می‌باشد. روش‌های سنتی که برای تشخیص ورم پستان به کار می‌روند، سخت و زمان‌بر است(۵). روش‌های مولکولی، ابزارهایی کارا برای توسعه آزمایش‌های تشخیصی جدید می‌باشند. روش‌های جدید با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Ploymerase chain reaction, PCR) که بر پایه سکانس‌های نواحی ۱۶S و ۲۳SrDNA می‌باشند به خوبی و با موفقیت برای تشخیص خیلی از باکتری‌ها به کار رفته‌اند(۱،۱۴،۱۶). پرایمرهای Uni678 و Uni888، Uni1870 و Uni2308 براساس ژن مشترک باکتری‌ها استافیلوکوکوس اورئوس، استرپتوکوکوس آگالاکتیه، اشریشیا کلی، استرپتوکوکوس دیس گالاکتیه، استرپتوکوکوس یوبریس و استرپتوکوکوس پارا یوبریس طراحی شده است و قادر است هر کدام از این باکتری‌ها را که در نمونه شیر موجود باشند، تشخیص دهد(۱۴). هدف از این مطالعه بررسی میزان آلودگی تانک شیر دامداری‌های اطراف تهران به این پاتوژن‌ها با روش PCR می‌باشد.

مواد و روش کار

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

استخراج DNA: برای استخراج DNA باکتریایی از شیر (با هدف یکی از پاتوژن‌های: استافیلوکوکوس اورئوس، استرپتوکوکوس آگالاکتیه، استرپتوکوکوس دیس گالاکتیه، استرپتوکوکوس یوبریس، استرپتوکوکوس پارایوبریس و یا اشریشیا کلی) از روش جوشاندن و همچنین کیت تجاری استفاده شد. که روش جوشاندن(۶) کفایت لازم را نداشت لذا از کیت استخراج DNA تجاری (Roche, Germany) طبق پروتکل تشرح شده در کاتالوگ کیت استفاده شد. به‌طور خلاصه ۲۰۰ میکرولیتر شیر به همراه ۲۰۰ میکرولیتر بافر متصل شونده و ۴۰ میکرولیتر Proteinase K در یک میکرو تیوب ۰/۵ میلی لیتر مخلوط شدند و در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه نگهداری گردیدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانل به میکروتیوب فوق اضافه و به‌هم زده شد. یک فیلتر تیوب را در داخل لوله جمع‌آوری قرار داده و مخلوط تهیه شده در داخل آن ریخته شد و به مدت یک دقیقه در دور ۸۰۰۰rpm (Sigma 1-15K, Germany) سانتریفوژ شد. سپس فیلتر تیوب در داخل لوله جمع‌آوری جدید قرار گرفت، ۵۰۰ میکرو لیتر از بافر حذف کننده ممانعت کننده‌ها به آن اضافه شد و به مدت یک دقیقه در دور ۸۰۰۰rpm

*) نویسنده مسؤول: تلفن: ۶۶۹۸۹۵۳۴-۰۲۱ نمابر: ۶۶۹۲۳۷۴۸-۰۲۱ Email:vod jgani@ut.ac.ir

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

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR): پرایمرهای مورد استفاده از شرکت TIB MOLBIOL (آلمان) تهیه شدند. سکاتس انواع پرایمرهای استفاده شده در جدول ۱ آورده شده است. واکنش PCR براساس روش Riffon و همکاران (۱۴) طراحی و مورد استفاده قرار گرفت. تمام واکنش ها در حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر انجام شد. هر مخلوط واکنش حاوی ۱۰ میکرولیتر 10x PCR buffer، ۳ میکرولیتر از ۵۰ $MgCl_2$، 50mM، 0.1mM dNTPs، 5μM از هر پرایمر، ۲/۵ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase و ۵ میکرولیتر از DNA الگو و آب دیونیزه استریل تا رسیدن به حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر که به تیوب های ۰/۲ میلی لیتر مخصوص PCR اضافه شد. برنامه تکثیر در ترموسایکلر (Eppendorf, Germany) بدین شرح انجام شد: ابتدا ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه، سپس ۳۵ سیکل شامل مراحل denaturation در ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه، annealing در ۵۶ درجه سانتیگراد (برای پرایمرهای Uni678 و Uni888) و ۵۸ درجه سانتیگراد (برای پرایمرهای Uni1870 و Uni2308) به مدت یک دقیقه، extention در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه، و در آخر تکثیر نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد. فرآورده های PCR در یخچال در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. الکتروفورز فرآورده های PCR هم به روش توصیه شده Sambrook and Russell (۱۵) انجام شد. اساس این روش استفاده از آگاروز ۱/۷ درصد حل شده در TAE 1x (Tris Acetate-EDTA) است. مخلوط ۸ میکرولیتر از فرآورده PCR هر نمونه مورد بررسی با ۴ میکرولیتر buffer Gel-loading به داخل هر گوده ژل افزوده شد. این بافر مرکب از ۰/۲۵ گرم برموفنل بلوو ۴ گرم ساکاروز در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر بود. جهت تعیین وزن ملکولی پلاسمیدهای جدایه‌های مورد آزمایش برروی هر ژل از مارکر ۵۰ 50bp DNA ladder (Fermentas, Germany) استفاده شد. نحوه آماده‌سازی مارکر تجاری براساس توصیه کارخانه سازنده صورت گرفت. با استفاده از دستگاه ژل الکتروفورز (Applex, France) و بافر TAE 1x جریانی به ظرفیت ۸۰ ولت به مدت یک ساعت از ژل عبور داده شد. سپس ژل به مدت ۲۰ دقیقه در ظرف حاوی محلول اتیدیوم بروماید (10mg/ml) (سیناژن، ایران) جهت رنگ‌آمیزی و بعد به مدت ۱۰ دقیقه در ظرف حاوی آب مقطر جهت شستشو قرار داده شد. باندهای DNA روی ژل، بلافاصله، با استفاده از نور ماوراء بنفش ترانس ایلومیناتور و دوربین عکسبرداری از ژل (UVP, UK; Visi-Doc-It system) مشاهده و تصویربرداری شدند. برای تعیین وزن ملکولی پلاسمیدها از نرم افزار کامپیوتری (3.5, Kansas State University Seqaid II (Ver. استفاده شد.

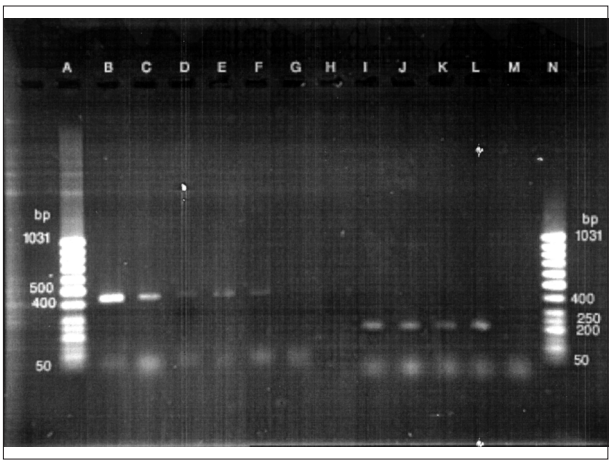
نتایج

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

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

بحث

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



تصویر۱- تصویر از ژل آگارز ۱/۷درصد. ستون‌های A و N مارکر 50bp DNA ladder، B کنترل مثبت استافیلوکوکوس اورئوس (استخراج DNA به وسیله کیت)، C کنترل مثبت استافیلوکوکوس اورئوس (استخراج DNAبه وسیله جوشاندن)، D تا G نمونه‌های تکثیر شده با استفاده از پرایمرهای Uni1870 و Uni2308، H کنترل منفی و I تا M نمونه‌های تکثیر شده با استفاده از پرایمرهای Uni678 و Uni888را نشان می‌دهند.

عمل‌آورد(۲،۳،۴،۵،۷،۸،۹،۱۲،۱۳). در حال حاضر روش تشخیصی پاتوژن‌های ورم پستان، کشت در محیط آزمایشگاه است که به عنوان استاندارد طلایی مطرح است اما دارای معایبی است از جمله جدا نشدن هیچ میکروارگانیسمی در نمونه شیر که می‌تواند دلایل متعددی داشته باشد از جمله، گاوهایی که به صورت تحت بالینی آلوده هستند ممکن است میکروارگانیسم را به صورت متناوب و به میزان کم از طریق شیر دفع کنند و یا تعداد میکروارگانسم بیماری‌زا در غده پستانی آنها بسیار کم باشد. بعضی مواقع نیز به دلیل وجود باقیمانده آنتی بیوتیکی در نمونه شیر، باکتری در محیط کشت رشد نمی‌کند. البته حضور لکوسیت‌ها در نمونه شیر موارد ورم پستان بالینی و در نمونه شیری که SCC بالا دارد نیز ممکن است از رشد باکتری ممانعت به عمل آورد. روش پر زحمت و وقت‌گیر نیز می‌باشد به‌طوری‌که تعیین گونه باکتری به وسیله روش‌های بیوشیمیایی استاندارد ممکن است به بیش از ۴۸ ساعت زمان نیاز داشته باشد(۱۱). بر کشت شیر مخزن نیز معایبی مترتب است از جمله اینکه هیچ روش استانداردی برای جمع‌آوری و کشت نمونه‌های شیر مخزن پایه‌ریزی نشده است. محل برداشتن نمونه از تانک شیر، مقدار نمونه، تعداد نمونه‌ها و فراوانی نمونه‌گیری باعث تفاوت در نتیجه کار می‌شود. تکنیک‌های مختلف باکتریولوژیکی در آزمایشگاه‌های تشخیصی برای جدا کردن و تشخیص میکرو ارگانیسم‌ها در نمونه‌های شیربه‌کار برده می‌شود که می‌تواند روی نتیجه آزمایش اثر بگذارد. تحقیق‌های بعضی محققان نیز خاطر نشان کرده است که کشت نمونه‌های شیر حساسیت پایینی برای تعیین باکتری‌های اصلی عامل ورم پستان دارد(۵).

روش‌های مولکولی ابزاری کارآمد برای تست‌های تشخیصی جدید می‌باشند. روش‌های جدید با استفاده از PCRکه بر پایه سکانس‌های ۱۶S و ۲۳S ribosomal RNA می‌باشند، برای شناسایی تعداد زیادی از باکتری‌ها

جدول۱- پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه.

نام پرایمر	سکانس پرایمرها
Uni678 (Forward)	5′-AGTGGAATTCCATGTGTAGC-3′
Uni888 (Reverse)	5′-GAGTGCTTAATGCGTTAGCT-3′
Uni1870 (Forward)	5′-TGGAAGGTTAAGAGGAGTGG-3′
Uni2308 (Reverse)	5′-GCCTCCGTTACCTTTTAGGA-3′

با موفقیت به کار رفته‌اند(۱،۱۴،۱۶). از مزایای مهم PCR، امکان استفاده از چند نانوگرم اسید نوکلئیک موجود در نمونه بالینی، حذف مرحله کشت و آنالیز آسان آن است و اینکه در عرض چند ساعت می‌توان به نتیجه رسید(۱۴).

Phuektes و همکاران(۱۱) در استرالیا ۱۱۷ نمونه شیر از یک گله دارای عفونت تحت بالینی کشت دادند که ۶۶ مورد (۵۶/۴درصد) منفی بود و استافیلوکوکوس اورئوس از ۷ مورد، استرپتوکوکوس آگالاکتیه از ۱۷ مورد، استرپتوکوکوس دیس گالاکتیه از ۲ مورد، استرپتوکوکوس یوبریس از یک مورد، استافیلوکوک‌های کواگولاز منفی از یک مورد، اشریشیا کلی از یک مورد، کورینه باکتریوم بویس از ۸ مورد واز ۱۳ مورد دیگرگونه‌های کورینه باکتریوم جدا گردید. Phuektes و همکاران در همین مطالعه روی همین ۱۱۷ نمونه شیر Multiplex PCR که باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، استرپتوکوکوس آگالاکتیه، استرپتوکوکوس دیس گالاکتیه و استرپتوکوکوس یوبریس را تشخیص می‌دهد، انجام دادند که در مجموع ۶۱ نمونه (۵۲/۱درصد) مثبت بود که از این ۶۱ نمونه مثبت، ۲۱ مورد استافیلوکوکوس اورئوس، ۲۰ مورد استرپتوکوکوس آگالاکتیه، ۴ مورد استرپتوکوکوس دیس گالاکتیه و ۱۶ مورد استرپتوکوکوس یوبریس بود(۱۱). Phuektes و همکاران (۱۰) در مطالعه‌ای دیگر در استرالیا روی ۱۷۶ نمونه تانک شیر از ۴۲ گله Multiplex PCR که باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، استرپتوکوکوس آگالاکتیه، استرپتوکوکوس دیس گالاکتیه و استرپتوکوکوس یوبریس را تشخیص می‌دهد انجام دادند. از این ۱۷۶ نمونه شیر، ۴۳ مورد (۲۴/۴درصد) از نظر هر چهار باکتری منفی بود. ۷۲ مورد از نظر یک گونه و ۶۱ مورد بیش از یک نمونه مثبت بود. معمول ترین گونه موجود در تانک شیر استرپتوکوکوس یوبریس بود که در ۷۸ نمونه (۴۴درصد) وجود داشت استرپتوکوکوس دیس گالاکتیه، استرپتوکوکوس آگالاکتیه و استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب در ۴۹ مورد (۲۸درصد)، ۳۸ مورد (۲۲درصد) و ۲۸ مورد (۱۶درصد) تشخیص داده شد(۱۱). Ghragozloo و همکاران(۲) در مطالعه‌ای بر روی گاوداری‌های صنعتی شهرستان کرج نشان دادند که با روش کشت از نظر میزان الودگی کارتیه‌ها (QIR) در جمعیت مورد مطالعه آنها ۵۶/۲درصد گاوها مبتلا به ورم پستان بودند. در مطالعه حاضر که بر روی تانک شیر دامداری‌های اطراف تهران انجام شد ۲۸ نمونه (۶۳/۶درصد) مثبت و ۱۶ نمونه (۳۶/۴درصد) منفی بود. نتایج حاصل از این مطالعه با نتایج به دست آمده به وسیله Phuektesو همکاران(۱۰،۱۱) و همچنین Ghragozloo و همکاران(۲) مطابقت دارد. در صورت طراحی

پرایمرهایی که دمای ذوب آنها یکی باشد و هر جفت پرایمر برای یکی از پاتوژن‌های ورم پستان اختصاصی باشد و محصول تولید شده از نظر وزن مولکولی متفاوت باشد، می‌توان با به کارگیری Multiplex PCR روی نمونه‌های شیر به‌طور همزمان همه پاتوژن‌های ورم پستان را تشخیص داد.

واکنش PCR هنگامی‌که مستقیماً روی نمونه‌های بالینی مانند شیر، ادرار، خون و مدفوع برای تشخیص پاتوژن‌ها به‌کار گرفته شود حساسیت کمتری نسبت به روش کشت از خود نشان می‌دهد. تحقیقات نشان می‌دهد که مواد ممانعت کننده واکنش PCR در نمونه‌های بالینی وجود دارند که علیرغم استفاده از روش‌های خالص‌سازی DNA ممکن است در فرآورده تخلیص شده باقی بمانند. Heme موجود در نمونه‌های خون و لیپوپلی ساکاریدها به علت مداخله در عمل آنزیم Taq باعث ممانعت از انجام PCR می‌شوند. برای فائق آمدن بر مشکلات ممانعت کننده‌ها در PCR و برای افزایش حساسیت آن، اقدام به غنی‌سازی نمونه اصلی می‌شود تا تعداد کافی باکتری برای شناسایی توسط PCR بوجود آید. در این صورت حتی زمانی که تعداد باکتری در نمونه اصلی 1CFU/ml باشد می‌توان الودگی به آن باکتری را شناسایی نمود.

حساسیت‌های مختلف واکنش‌های PCR به دست آمده از روش‌های مختلف استخراج DNA، نشان می‌دهد که نه تنها حالات PCR بلکه پروتکل‌های استخراج DNA برای بهبود روش‌های به کار رفته روی نمونه‌های بالینی تاثیر گذار است.

روش‌های استخراج بدون استفاده از کیت (که شامل مراحل آنزیمی است) در صورتی که به توانند حذف یون‌های کلسیم از نمونه‌های شیر را که به‌عنوان ممانعت کننده مهم در واکنش PCR مطرح است بهبود ببخشند باعث افزایش حساسیت واکنش PCR می‌شوند(۱۴). در این مطالعه برای استخراج DNA از کیت تجاری استفاده گردید. استفاده از این کیت در حال حاضر هزینه بالایی دارد و در ضمن به نظر می‌رسد روش استخراج DNA به وسیله کیت نسبت به سایر روش‌ها حساس‌تر و دقیق‌تر است و به‌علاوه کار کردن با کیت بسیار ساده‌تر از سایر رو ش‌ها است. در صورتی که PCR به صورت یک روش تشخیصی روتین در آزمایشگاه در آید هزینه تمام شده برای انجام هر نمونه کاهش می‌یابد و باالطبع قیمت کیت استخراج DNA هم کاهش خواهد یافت.

تشکر وقدردانی

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

References

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

84:1140-1148.

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

J.Vet.Res. 63,1:69-73,2008

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

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

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

(Received 22 May 2006 , Accepted 21 November 2006)

Abstract:

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

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

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