شناسایی مولکولی استرپتوکوکوس یوبریس از گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی با روش PCR

سیدرضا عمادی[۱]، پرویز تاجیک[۱*]، محمود بلورچی[۱]، محمدامین اسلامپور[۲]

چکیده

با پیشرفت روش‌های پایش و کنترل ورم پستان‌های مسری و با توسعه گله‌های گاو شیری بر اهمیت عوامل محیطی ورم پستان چون استرپتوکوکوس یوبریس افزوده شده است. مطالعه حاضر به منظور ارزیابی فراوانی استرپتوکوکوس یوبریس از گاوهای مبتلا به ورم پستان تحت بالینی انجام گرفته است. مطالعه در ٤ گله گاو شیری در استان تهران انجام گرفت. نمونه از کارتیه‌های مبتلا به موارد تحت بالینی ورم پستان که به روش آزمون ورم پستان کالیفرنیا (California Mastitis Test) تشخیص داده می شدند اخذ و جهت کشت و جداسازی DNA (Deoxyribonucleic acid) با استفاده از کیت های تجاری جداسازی DNA و انجام PCR (Polymerase Chain Reaction) ارسال می شدند. محصول نهایی در ۲ درصد ژل آگارز با ولتاژ ۸۰ به مدت ۲ ساعت تحت الکتروفورز قرار می گرفت. از مجموع ۸۵ نمونه ٦٤ مورد در اندازه ٤٤٥ باز باند دادند. در مجموع ٦/٦ درصد گاوها مبتلا به ورم پستان تحت بالینی با عامل استرپتوکوکوس یوبریس بودند. در نتیجه روش‌های پایش و کنترل ورم پستان در ارتباط با عوامل محیطی چون استرپتوکوکوس یوبریس می بایست بیشتر مورد توجه قرار گیرند و همچنین می‌توان از روش‌های دقیق تر و سریعتر مولکولی جهت شناسایی آن استفاده کرد.

واژگان کلیدی: *استرپتوکوکوس یوبریس، گاو شیری، PCR*

تاریخ دریافت: ۹۵/٦/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۵/۹/۱۷

مقدمه

ورم پستان با عامل استرپتوکوکوس یوبریس در گله‌های شیری رو به افزایش می‌باشد. این پاتوژن مسبب هر دو نوع ورم پستان بالینی و تحت بالینی در گاو می‌شود و در گله‌های شیری در حال بزرگ شدن مشکل ساز می‌باشد (۱۱). ورم پستان‌های تحت بالینی، امروزه معضل مهم در گلـه‌های شیری بزرگ است و ۱۵-٤۰ برابر شیوع بیشتری از موارد بالینی دارد و زیان‌های اقتصادی بیشتری را سبب می‌گردد (۸). مطالعات روی نمونه‌های بالینی و تحت بالینی ورم پستان جهت شناسایی فراوانی و شیوع این پاتوژن در کشورهای گوناگون انجام گرفته است (۱۵ و ١٤، ۳). در غالب مطالعات انجام گرفته فراوانی این پاتوژن به روش‌های سرولوژیک و مورفولوژیک مورد ارزیابی قرار گرفته است و از آنجا که در گروه بندی لانسفیلد استرپتوکوکوس یوبریس در هیچیک از گروه‌ها قابل طبقه بندی نبوده است و نیز علی رغم اینکه کشت، روش استاندارد طلایی در جداسازی باکتری است این روش بسیار وقت‌گیر می‌باشد به طوری که بین ۲-۱ روز جهت رشد و ۲ روز جهت تفریق باکتری نیاز است که در مجموع ٤ روز به طول می انجامد (۱۸)، ضمن اینکه با این روش استرپتوکوکوس یوبریس از باکتری استرپتوکوکوس پارایوبریس قابل تفریق نیست(۷). تشخیص سریع و درست عفونت نیز در کمک به درمان و استفاده از آنتی بیوتیک مناسب کمک کننده است (۱۲). لذا از روش‌های مولکولی و آزمون واکنش زنجیری پلیمراز (Polymerase Chain Reaction) به منظور جداسازی استفاده شده که بسیار معتبر تر و نتایج آن قابلیت استناد بیشتری دارند (۱۱ و ٦). استفاده از نواحی خاص ژن مثل rDNAS ١٦ توانایی تفریق و جداسازی باکتری را به خوبی میسر می‌سازد (۱۷ و ٤). هدف از انجام این مطالعه ارزیابی فراوانی استرپتوکوکوس یوبریس‌های جدا شده از موارد تحت بالینی ورم پستان گاو می‌باشد.

*۱- گروه مامایی و بیماری های تولید مثل دام، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
ptajik@ut.ac.ir
۲- گروه مامایی و بیماری های تولید مثل دام، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

مواد و روش کار

جامعه آماری

مطالعه در ٤ گله گاو شیری در استان تهران و در طول دوره شیرواری انجام پذیرفت. گاوهایی که هیچ گونه بیماری دیگری شامل عفونت‌های رحمی، مشکلات داخلی و لنگش نبودند و طی دو ماه متوالی تعداد سلول‌های سوماتیک بالای ۲۰۰۰۰۰ سلول در هر میلی لیتر شیر را دارا بودند و درمان آنتی بیوتیک داخل پستانی و سیستمیک دریافت نکرده بودند انتخاب و وارد مطالعه می‌شدند. در مجموع ۹٦٥ نمونه از ٥٢٤ گاو مبتلا به ورم پستان تحت بالینی جمع‌آوری شد. جهت شناسایی کارتیه مبتلا به ورم پستان تحت بالینی از آزمون ورم پستان کالیفرنیایی (California Mastitis Test) استفاده شد. CMT به روش شالم و نورلندر انجام گرفت (۱۹). به کارتیه‌ها درجه ۰-٤ داده شد. صفر، بدون واکنش (هیچگونه ژل تشکیل نمی شد و ترکیب مایع باقی می‌ماند)، ۱ واکنش جزیی (رگه‌های نازک تشکیل می‌شد)، ۲ مثبت ضعیف، ۳ مثبت و ٤ مثبت قوی. مواردی که رتبه ۱ و بالاتر داشتند به عنوان شاخص ورم پستان تحت بالینی شناخته و جمع‌آوری می‌شدند.

کشت و جداسازی نمونه‌ها

تمام آزمایشات جهت کشت و جداسازی عامل میکروبی در یک آزمایشگاه و توسط یک فرد انجام گرفت تا اطمینان حاصل شود که کیفیت و روش‌های تشخیص یکپارچه بوده است. نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه و قبل از کشت به خوبی مخلوط شدند سپس زیر هود و در کنار شعله با استفاده از آنس استریلمیزان یک لوپ از شیر به روش خطی در پلیت های ۳ خانه شامل بلاد آگار (LaboratoriosConda S.A., Madrid, Spain) حاوی ٥٪ خون دفیبرین گوسفند، محیط ادواردز (HiMedia Laboratories, Mumbai, India) شامل ٥٪ خون دفیبرین گوسفند و آگار مک کانکی (LaboratoriosConda S.A., Madrid, Spain) بوده است و طبق دستورالعمل در محصول آماده شده بود کشت داده می‌شدند. پلیت‌ها به مدت ٤٨-٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری می‌شدند. در نمونه‌هایی که روی محیط آگار خوندار و ادواردز رشد کرده و فاقد رشد در محیط مک کانکی بودند از خانواده استرپتوکوکسی در نظر گرفته شده و جهت ارزیابی PCR مورد استفاده قرار می گرفتند.

استخراج DNA و آزمون واکنش زنجیری پلیمراز (PCR)

مواد به کار رفته در این آزمون شامل میکروتیوب ۱/٥ و ۲ میلی لیتری، کیت استخراج DNA باکتری گرم مثبت (Sinaclon, Tehran, Iran)، آب دیونیزه استریل (Sinaclon, Tehran, Iran)، میکروسانتریفیوژ، صفحه داغ لرزان و سمپلر بود. استخراج DNA طبق دستورالعمل موجود در شرکت سازنده انجام پذیرفت.

برای انجامPCR پرایمرها توسط شرکت سیناژن (تهران، ایران) سنتز شد. پرایمرها از ناحیه ژنی 16S rRNA استرپتوکوکوس یوبریس طراحی شد (حسن و همکاران ۲۰۰۱) که اطلاعات آن در جدول ذیل قابل مشاهده است:

جدول ۱- پرایمرها و توالی ژن‌های مورد استفاده جهت انجام آزمون PCR

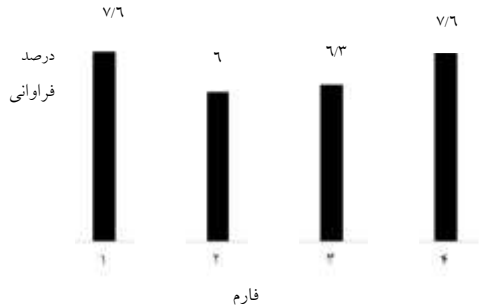
نام پرایمر	توالی ژن (۳-٥)	طول	اندازه محصول PCR (bp)
Ub-I	CGC ATG ACA ATA GGG TAC A	۱۹	٤٤٥
Ub-II	GCC TTT AAC TTC AGA CTT ATC A	۲۲	

برای انجام آزمون PCR از سویه استاندارد IBRC-M 10804 استرپتوکوکوس یوبریس که از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی (تهران، ایران) تهیه شده بود به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. سایر مواد مورد استفاده شامل 100bp DNA

Ladder آماده مصرف (سیناژن، تهران، ایران)، PCR Master Mix آماده مصرف (سیناژن، تهران، ایران)، آب دیونیزه، بافر TBE (Tris/Borate/EDTA) (سیناکلون، تهران، ایران)، آگارز (سیناکلون، تهران، ایران)، میکروتیوب ۱/۵ و ۰/۲ میلی‌لیتری، سمپلر و سرسمپلر بوده است. روش انجام PCR بدین ترتیب بوده که ۱ میکرولیتر از پرایمرها، ۱۲/۵ میکرولیتر از مسترمیکس آماده مصرف، ۲/۵ میکرولیتر از DNA نمونه که قبلا استخراج شده بوده را با هم مخلوط و با ۸ میکرولیتر آب دیونیزه استریل به حجم ۲۵ میکرولیتر رسانده و سپس به خوبی مخلوط کرده و میکرو تیوب‌ها را در ترموسایکلر قرار می‌دهیم. برنامه مورد استفاده جهت انجام PCR به این ترتیب بوده که مرحله قبل PCR شامل یک چرخه ۹٤ درجه سانتی گراد گرما به مدت ۲ دقیقه، ۳۰ چرخه شامل مراحل تقلیب (دناتوره شدن) در ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ٦۰ ثانیه، مرحله گداخت یا اتصال در ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه، مرحله الحاق در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۹۰ ثانیه و سر انجام مرحله نهایی که یک چرخه آماده سازی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه بوده انجام گرفت و محصول نهایی در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد در ترموسایکلر نگهداری می‌شدند. محصول نهایی به میزان ۲۰ میکرولیتر در ۲٪ ژل آگاروز با ولتاژ ۸۰ و به مدت ۲ ساعت تحت الکتروفورز قرار گرفت و از نشانگر نردبان DNA ۱۰۰ باز جهت اندازه گیری اندازه مولکول‌ها مورد استفاده قرار گرفت. ژل ها نهایتا توسط ژل داک (Gel doc) تحت امواج فرابنفش مشاهده و عکس‌برداری شدند. ارزیابی فراونی استرپتوکوکوس یوبریس در گله‌ها با استفاده از رگرسیون لجستیک با دستور GENMODE مورد سنجش قرار گرفت. حدود اطمینان ۹۵٪ و سطح معنی‌داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. نتایج با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.2 مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج

از مجموع کشت‌های اولیه انجام گرفته ۸۵ سویه مشکوک به خانواده استرپتوکوکسی بودند که از آن ها استخراج DNA انجام و مورد ارزیابی PCR قرار گرفتند ٦٤ نمونه در ٤٤۵ bp باند دادند. در مجموع گله‌ها ٦/٦ ٪ موارد تحت بالینی ورم پستان با استفاده از روش PCRآلوده به استرپتوکوکوس یوبریس تشخیص داده شدند. فراوانی استرپتوکوکوس یوبریس در گله‌های مختلف به تفکیک در نمودار ۱ مشخص شده است که اختلاف معنی‌دار در فراوانی آن در گله‌های مختلف دیده نشد (P>۰/۰۵).



نمودار ۱- درصد فراوانی استرپتوکوکوس یوبریس‌های جدا شده از موارد تحت بالینی ورم پستان در ٤ گله گاو شیری در استان تهران.

بحث

هدف از انجام مطالعه حاضر بررسی فراوانی استرپتوکوکوس یوبریس‌های جدا شده از موارد تحت بالنی ورم پستان به روش PCR بوده است. نشان داده شده است که با کاهش اهمیت عوامل مسری ورم پستان مثل استرپتوکوکوس آگالاکتیه بر اهمیت پاتوژن‌هایی چون استرپتوکوکوس یوبریس افزوده شده است(۱). از دهه ۸۰ میلادی شیوع استرپتوکوکوس یوبریس به عنوان عامل مهم ورم پستان در گله‌های شیری کل جهان شروع به افزایش یافته است (۲۰و۷). این پاتوژن به عنوان فلور میکروبی در لوزه‌ها، دستگاه تناسلی، مدفوع و محیط گاو یافت می‌شود و از همین طریق نیز باعث آلودگی پستان می‌شود بنابراین کنترل آن نیازمند انجام مراقبت بسیار از دام و محیط آن

دارد (۲۰). جداسازی و شناسایی باکتری به روش‌های معمول کشت بسیار وقت گیر و هزینه بر است (۱۸). ضمن اینکه درک فراوانی پاتوژن استرپتوکوکوس یوبریس در گله‌ها در کمک به درمان و اعمال روش‌های کنترل و پایش می‌تواند موثر باشد. غالب مطالعات انجام گرفته شیوع استرپتوکوکوس یوبریس را به روش کشت مورد ارزیابی قرار دادند. در فنلاند از ۱۱/۶۱٪ موارد تحت بالینی ورم پستان جدا شده است(۱۰). ۶/۳٪ از موارد بالینی ورم پستان در کشور کانادا استرپتوکوکوس یوبریس بوده است(۱٤). در کشور نروژ ۰/٤٪ موارد نمونه‌های شیر اخذ شده از کارتیه ها را استرپتوکوکوس یوبریس شامل شده است (۱۵). در مطالعه حاضر احتمال جداسازی باکتری غیر از استرپتوکوکوس یوبریس بسیار پایین بوده است که نشان دهنده این است که آزمون مورد استفاده دارای حساسیت و ویژگی بالایی می‌باشد. آنچه در استفاده از روش‌های مولکولی جداسازی اهمیت دارد توانایی تفریق استرپتوکوکوس یوبریس از استرپتوکوکوس پارا یوبریس می‌باشد که به روش‌های بیوشیمیایی و سرولوژیک قابل تمایز نیستند (٦). مطالعات متفاوت و مختلفی نیز جهت شناسایی ۲ گونه استرپتوکوکوس یوبریس از استرپتوکوکوس پارایوبریس انجام گرفته است (۱۸ و ۱۷، ۱۳، ۹، ٦، ۲). در نتیجه امکان این که پاتوژنی غیر از استرپتوکوکوس یوبریس جدا شده باشد تقریبا صفر می‌باشد. مطالعهای که صرفا فراوانی استرپتوکوکوس یوبریس را به تنهایی و با استفاده از روش PCR مورد ارزیابی قرار دهد وجود نداشته تنها مطالعات موجود مربوط به Phuektes و Gillespie بوده که آنها از روش Multiplex PCR استفاده کردند (۱٦و ۵). این مطالعه می‌تواند به عنوان پایه ای جهت ارزیابی و مقایسه وضعیت کنترل عوامل محیطی ورم پستان در سال های آینده در کشور مورد استفاده قرار گیرد و نشان می‌دهد که با استفاده از روش PCR ضمن اخذ اطلاعات دقیق تر، در وقت و هزینه نیز صرفه جویی صورت می‌پذیرد. مطالعات پیشین که در ایالات متحده، کانادا و هلند انجام شده گزارش کرده که ۲٦-۱٤ درصد موارد بالینی ورم پستان با عامل استرپتوکوکوس یوبریس بوده است (۸).در کشور ما نیز در سال‌های اخیر با اعمال روش‌های مناسب درمان خشکی، حذف موارد مزمن و پایش ورم پستان پیشرفت‌های مناسبی جهت کنترل عوامل مسری ورم پستان گاو انجام شده است. هرچند که فراوانی استرپتوکوکوس یوبریس کمتر از مطالعات سایر کشورها بوده ولی در مطالعه حاضر با توجه به فراوانی استرپتوکوکوس یوبریس های جدا شده از ورم پستان تحت بالینی می‌تواند زنگ خطری باشد که می‌بایست همزمان با اعمال روش‌های کنترلی جهت کاهش ورم پستان‌های مسری مورد توجه قرار گیرد. از جمله روش‌ها جهت کنترل استرپتوکوکوس یوبریس می‌توان تمیز نگه داشتن بستر، استفاده از بسترهای حاوی ماسه و جلوگیری از ازدحام گاو در بهاربندها یا راهروها را توصیه کرد که تا حد بسیار زیادی می‌تواند در کاهش این پاتوژن موثر واقع شوند.

تشکر و سپاسگذاری

نویسندگان از کلیه پرسنل و مسئولین آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران و آزمایشگاه باکتری‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران به ویژه جناب آقای دکتر اشرافی مراتب قدردانی را دارند.

فهرست منابع

1. Atyabi, N., Vodjgani, M., Gharagozloo, F., Bahonar, A. (2006):Prevalence of bacterial mastitis in cattle from the farms around Tehran. Iran. J. Vet. Res. 7:76-79.
2. Bentley, R.W., Leigh, J.A., Collins, M.D. (1993): Development and use of species-specific oligonucleotide probes for differentiation of *Streptococcus uberis*and *Streptococcus parauberis*. J. Clin. Microbiol. 31:57-60.
3. Ericsson Unnerstad, H., Lindberg, A., Persson Waller, K., Ekman, T., Artursson, K., Nilsson-Öst, M., Bengtesson, B. (2009): Microbial aetiology of acute clinical mastitis and agent-specific risk factors. Vet. Microbiol. 137:90-97.

4. Facklam, R. (2002): What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. Clin. Microbiol. Rev. 15:613-630.
5. Gillespie, B.E., Oliver, S.P. (2005): Simultaneous Detection of Mastitis Pathogens, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, and *Streptococcus agalactiae*by Multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction. J. Dairy. Sci. 88:3510-3518.
6. Hassan, A.A., Khan, I.U., Abdulmawjood, A., Lammler, C. (2001): Evaluation of PCR methods for rapid identification and differentiation of Streptococcus uberisand Streptococcus parauberis. J. Clin. Microbiol. 39:1618-1621.
7. Jayarao, B.M., Dore, J.J., Baumbach, G.A., Matthews, K.R., Oliver, S.P. (1991a): Differentiation of Streptococcus uberisfrom Streptococcus parauberisby polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis of 16S ribosomal DNA. J. Clin.Microbiol. 29:2774-2778.
8. Kader, M.A., Samad, M.A. Saha, S. (2003): Influence of host level factors on prevalence and economics of sub-clinical mastitis in dairy cows in Bangladesh. Indian. J. Dairy. Sci. 56:235–240.
9. Khan, I.U., Hassan, A.A., Abdulmawjood, A., Lammler, C., Wolter, W., Zschock, M. (2003): Identification and epidemiological characterization of Streptococcus uberisisolated from bovine mastitis using conventional and molecular methods. J. Vet.Sci. 4:213-224.
10. Koivula, M., Pitkälä, A., Pyörälä, S., Mäntyssari, E.A. (2007): Distribution of bacteria and seasonal and regional effects in a new database for mastitis pathogens in Finland. Acta. Agric. Scand. A. 57:89-96.
11. Kromker, V., Reinecke, F., Paduch, J.H., Grabowski, N. (2014): Bovine streptococcus uberisintramammary infections and mastitis. J. Clin. Microbiol. 3:157-164.
12. Milner, P., Page, K.L., Hillerton, J.E. (1997): The effects of early antibiotic treatment following diagnosis of mastitis detected by a change in the electrical conductivity of milk. J. Dairy. Res. 80:859-863.
13. Moetamedi, H., SeyfiabadShapouri, M., Ghorbanpoor, M., Jamshidian, M., Gooraninejad, S. (2007): A polymerase chain reaction based study on the subclinical mastitis caused by Streptococcus agalactiae, S. dysgalactiaeand S. uberisin cattle in Ahvaz. Iran. J. Vet. Res. 8(3):206-265.
14. OldeRiekerink, R.G., Barkema, H.W., Veenstra, W., Berg, F.E., Stryhn, H., Zadoks, R.N. (2007): Somatic cell count during and between milkings. J. Dairy. Sci. 90:3733-3741.
15. Osteras, O., Solverod, L., Reksen, O. (2005): Milk culture results in a large Norwegian survey-effects of season, parity, days in milk, resistance and clustering. J. Dairy. Sci. 89:1010-1023.
16. Phuektes, P., Browning, G. F., Anderson, G., Mansell, P.D. (2003): Multiplex polymerase chain reaction as a mastitis screening test for Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae, Streptococcus dysgalactiae and Streptococcus uberis in bulk milk samples. J. Dairy. Res. 70:149-155.
17. Prabhu, K.N., Isloor, S., Hegde, R., Rathnamma, D., Veeregowda, B.M. (2013): Development of polymerase chain reaction for detection of predominant streptococcal isolates causing subclinical bovine mastitis. Indian. J.Biotechnol. 12:208-212.
18. Riffon, R., Sayasith, K., Khalil, H., Dabreuil, P., Drolet, M., Lagace, 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.
19. Schalm, O.W., Noorlander, D.O. (1957): Experiments and observations leading to development of the California mastitis test. J. Am. Vet. Med.Assoc. 130:199-204.
20. Zadoks, R.N., Tikofsky, L.L., Boor, K.J. (2005b):Ribotyping of Streptococcus uberisfrom a dairy's environment, bovine feces and milk. Vet.Microbiol. 109 257-265.