Archive of SID

شناسایی *مایکوپلاسما بویس* در گاوهای مبتلا به ورم پستان بالینی با استفاده از کشت و روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز بر اساس ژن‌های *16SrRNA* و *uvrC*

محسن ایمان‌دار[۱]، سیدعلی پوربخش[۲*]، محمود جمشیدیان[۱]، تقی زهرایی صالحی[۱]

۱- گروه میکروبیولوژی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۲- آزمایشگاه رفرانس مایکوپلاسما، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران.
*نویسنده مسئول مکاتبات: poursaba@yahoo.com

(دریافت مقاله: ۹۶/۶/۲۴ پذیرش نهایی: ۹۷/۸/۱۹)

چکیده

مایکوپلاسما بویس از عوامل اصلی ایجاد پنومونی، ورم پستان و آرتریت مایکوپلاسمائی در گاو می‌باشد. هدف از این مطالعه، شناسایی *مایکوپلاسما بویس* در گاوهای مبتلا به ورم پستان بالینی با استفاده از کشت و روش زنجیره‌ای پلیمراز بود. این مطالعه روی تعداد ۳۲۸ نمونه شیر گاو مبتلا به ورم پستان بالینی که در طول یک سال به آزمایشگاه مرجع مایکوپلاسمای مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی ارجاع می‌شد، اجرا گردید. نمونه‌ها در دمای ٤ درجه سلسیوس و در مدت کمتر از ٢٤ ساعت به آزمایشگاه ارسال و به مدت ٢٤-١٨ ساعت در ٣٧ درجه سلسیوس انکوبه می‌شدند و پس از فیلتر شدن به محیط اختصاصی PPLO، در انکوباتور Co_2دار به مدت ١٠-٧ روز از نظر رشد پایش می‌شدند. همزمان DNA نمونه‌ها به وسیله روش فنل- کلروفرم استخراج و خالص‌سازی شده و از روش PCR برای تشخیص جنس مایکوپلاسما بر اساس ژن *16SrRNA* و برای تشخیص گونه بویس از جستجوی وجود ژن *uvrC* استفاده گردید. از تعداد ٣٢٨ نمونه، ٥٨ مورد (١٧/٦٩ درصد) در محیط کشت PPLO مثبت شناخته شدند. از نظر حضور ژن مربوط به جنس مایکوپلاسما، تعداد ٩٧ نمونه (٢٩/٥٧ درصد) مثبت شناخته شدند که از این تعداد، ١٤ نمونه (٤/٢٦ درصد) ژن اختصاصی گونه بویس (*uvrC*) را نشان دادند. نتایج این مطالعه روش PCR را به عنوان یک تست سریع و قابل اعتماد در شناسایی *مایکوپلاسما بویس* در نمونه‌های شیر معرفی کرده و نشان داد که میزان حضور *مایکوپلاسما بویس* در گله‌های شیری در ایران بالا است و می‌تواند به عنوان یکی از عوامل اصلی مسبب ورم پستان بالینی در گاو مطرح باشد.

کلیدواژه‌ها: ***مایکوپلاسما بویس*، ژن *uvrC*، ورم پستان، گاو، PCR.**

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

مایکوپلاسما بویس عامل مایکوپلاسموز گاوی و از عوامل اصلی بروز ورم پستان، پنومونی و آرتریت گاو در سراسر جهان می‌باشد که به ندرت باعث ایجاد عفونت گوش میانی، آبسه‌های زیرجلدی، منتژیت، تورم ملتحمه چشم و پلی‌آرتریت نیز می‌شود (Pfützner and Sachse, 1996; Foddai *et al.*, 2005; Cremonesi *et al.*, 2007; Karahan *et al.*, 2010). این باکتری از موارد تجربی اختلالات باروری از قبیل سقط جنین، کاهش باروری اسپرم، آندومتریت و سالپنژیت نیز گزارش شده است (Nicholas and Ayling, 2003). گاو به عنوان میزبان اختصاصی *مایکوپلاسما بویس* عمل می‌کند، هرچند جدایه‌هایی از این باکتری در گاومیش، نشخوارکنندگان کوچک و حتی در انسان یافت شده است (Ghadersohi, 1997). در ابتدا *مایکوپلاسما بویس* تحت عنوان *مایکوپلاسما آگالاکتیه* واریته بویس طبقه‌بندی می‌گردید (McAuliffe *et al.*, 2006)، اما بعدها مشخص شد که بر اساس تجزیه و تحلیل مقایسه‌ای توالی ژن *16SrRNA*، شباهت ۹۹/۷٤ درصدی بین دو گونه بویس و آگالاکتیه وجود دارد و به عنوان یک گونه مجزا دسته‌بندی و معرفی گردید (Foddai *et al.*, 2005).

مایکوپلاسما بویس به طور عمده منجر به ایجاد خسارات اقتصادی ناشی از بیماری‌های تنفسی در اروپا (Nicholas and Ayling, 2003) و نیز خسارات وارده در بخش ورم پستان، کاهش ضریب تبدیل غذایی، کاهش وزن دام و کاهش ارزش لاشه کشتاری در کشورهای خاورمیانه، شرق آسیا و ایالات متحده آمریکا می‌شود (McAuliffe *et al.*, 2006).

بیماری‌های ناشی از مایکوپلاسماها به سه دسته تقسیم می‌شوند: الف) بیماری‌هایی که بروز سپتی‌سمی مهم‌ترین مشخصه آنهاست، ب) بیماری‌هایی که موضعی شدن و بروز آماس در حفرات سروزی و یا مفاصل اتفاق می‌افتد، و ج) بیماری‌های موضعی دستگاه تنفسی، تناسلی، غده پستان و ملتحمه چشم. در گله مبتلا به ورم پستان ناشی از *مایکوپلاسما بویس*، ممکن است مشکلاتی از قبیل لنگش، مشکلات باروری، پنومونی گوساله‌ها و بیماری‌های تنفسی در گاوهای بالغ نیز دیده شود (Stokka *et al.*, 2001). در گاوهای شیرده شروع ناگهانی تورم پستان، کاهش سریع تولید شیر و ترشح غیرطبیعی به طور آشکار در یک کارتیه یا تعداد بیشتری از کارتیه‌ها وجود دارد. در اکثر موارد هر چهار کارتیه مبتلا می‌شوند و یک گاو پرتولید ممکن است افت تولیدی تا حد رسیدن به تولید صفر، بین یک شیردوشی و شیردوشی بعدی پیدا کند. فیبروز منتشر و آسیب‌های گرانولوماتوزی حاوی چرک، از علایم بارز درمانگاهی ابتلا به ورم پستان ناشی از *مایکوپلاسما بویس* می‌باشد (Mosaferi and Haghighat kaghazchian, 2003).

مایکوپلاسما بویس برای اولین بار توسط هاله و همکاران، در سال ۱۹٦۱ از شیر یک گاو مبتلا به ورم پستان در آمریکا جدا گردید (Ghadersohi *et al.*, 1997). این بیماری بعدها در اثر حمل و نقل حیوانات در بسیاری از کشورهای جهان گسترش یافت (Nicholas and Ayling, 2003). از آن زمان تا سال ۲۰۰۷، *مایکوپلاسما بویس* به عنوان عامل مهم ایجاد تورم پستان بالینی در ایالات متحده، استرالیا و اروپا شناخته شده است. از سال ۲۰۰۸ به بعد افزایش تعداد

www.SID.ir

Archive of SID

موارد حاد این ورم پستان در اروپا قابل مشاهده است (Rossetti *et al.*, 2010). در سال‌های اخیر، این باکتری در برخی کشورهای خاورمیانه مانند ترکیه (Karahan *et al.*, 2010)، مصر (Osman *et al.*, 2008)، پاکستان (Ahmad *et al.*, 2014) و شرق آسیا مانند چین (Fu-Rong *et al.*, 2012) و ژاپن (Hidetoshi *et al.*, 2010) جداسازی شده است. در ایران اطلاعات اندکی در خصوص شیوع این نوع ورم پستان در گاو وجود دارد. در یک مطالعه صورت گرفته در ایران، میزان شیوع آلودگی ٤٨/٦٧ درصد گزارش شده است (Moshkelani *et al.*, 2011).

با توجه به گسترش سریع این نوع ورم پستان، عدم وجود واکسن مؤثر و اینکه باکتری نسبت به درمان با هیچ آنتی‌بیوتیکی پاسخ مناسبی از خود نشان نمی‌دهد، وجود یک روش تشخیصی سریع و قابل اعتماد که بتواند حیوانات آلوده را در مراحل اولیه بیماری مورد شناسایی قرار دهد، لازم و ضروری به نظر می‌رسد. نشانه بالینی اختصاصی برای تشخیص عفونت ورم پستان *مایکوپلاسما بویس* وجود ندارد، لذا وجود روش‌های آزمایشگاهی ضروری می‌باشد. روش‌های تشخیص *مایکوپلاسما بویس* عمدتاً به سه بخش کشت مستقیم باکتری روی محیط‌های اختصاصی، روش‌های سرولوژی و مولکولی تقسیم می‌شود. جداسازی و شناسایی *مایکوپلاسما بویس* با روش کشت ممکن است هفته‌ها طول بکشد و برخی آزمایشگاه‌ها قابلیت‌های لازم و تجهیزات مورد نیاز برای کشت را نداشته باشند. با روش‌های سرولوژی نیز حدود ١٤-١٠ روز پس از شروع علایم بالینی می‌توان آنتی‌بادی علیه *مایکوپلاسما بویس* را ردیابی نمود. این روش‌ها بسیار دشوار و وقت‌گیر بوده و تشخیص عفونت با تأخیر صورت می‌گیرد. به منظور غلبه بر این معایب، وجود تکنیک‌های مولکولی ارزشمند و سریع مانند واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (polymerase chain reaction; PCR) برای تشخیص *مایکوپلاسما بویس* در نمونه‌های بالینی ضروری به نظر می‌رسد (Foddai *et al.*, 2005; Rossetti *et al.*, 2010). تکنیک PCR برای شناسایی عامل *مایکوپلاسما بویس* از ورم پستان به طور کامل در سال ۱۹۹۷ مورد استفاده قرار گرفت و اثبات شد که برای تشخیص ورم پستان مایکوپلاسمایی در نمونه‌های شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان بالینی مناسب است (Ghadersohi *et al.*, 1997). *16SrRNA* یک ژن تاریخی، پر کاربرد و مشتمل بر نواحی حفاظت شده‌ای از سکانس‌ها می‌باشد که به عنوان ژن هدف در تشخیص جنس باکتری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. پرایمرهای این ژن نسبت به این مناطق حفاظت‌شده اختصاصی‌اند و می‌توانند یک جنس خاص را مورد شناسایی قرار دهند. دانشمندان از روش PCR بر پایه تکثیر توالی‌های *16SrRNA* استفاده نموده‌اند که می‌تواند مایکوپلاسماها را در سطح جنس تشخیص دهد (Hirose *et al.*, 2001). جهت تشخیص *مایکوپلاسما بویس* بایستی از یک جایگاه ژنی که بتواند آن را در حد گونه و به شکل اختصاصی‌تر تشخیص دهد، استفاده شود. با کاربرد ژن *uvrC* در مطالعات مختلف ثابت شده است که این ژن برای تفریق گونه بویس از سایر گونه‌های مایکوپلاسما بسیار مفید است (Foddai *et al.*, 2005). *uvrC* ژن اختصاصی و پایدار گونه بویس بوده و برای ردیابی سریع آن از شیر و نمونه‌های بافتی مورد استفاده قرار گرفته است (Subramaniam *et al.*, 1998;

www.SID.ir

Archive of SID

Thomas *et al.*, 2004). بنابراین، هدف از این مطالعه، شناسایی *مایکوپلاسما بویس* از موارد اورام پستان بالینی در گاوداری‌های صنعتی با استفاده از کشت و روش PCR بر اساس ژن‌های *16SrRNA* و *uvrC* بود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه در فاصله سال‌های ۱۳۹٤ لغایت ۱۳۹۵ روی تعداد ۳۲۸ نمونه شیر گاو مبتلا به ورم پستان بالینی که در طول یک سال به آزمایشگاه مرجع مایکوپلاسمای مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی ارجاع می‌شد، اجرا گردید. جامعه آماری، گاوهای موجود در گله‌های شیری صنعتی و نمونه‌گیری از نوع مبتنی بر هدف (purposive sampling) انتخاب شد. از گاوهای مبتلا که حداقل یکی از علایم بالینی ورم پستان را از خود نشان می‌دادند، نمونه‌گیری از شیر به‌عمل می‌آمد. سپس نمونه‌ها در کنار یخ (دمای ٤ درجه سلسیوس) و حداکثر تا ٢٤ ساعت به آزمایشگاه رفرانس مایکوپلاسما مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی واقع در حصارک کرج ارسال می‌شدند.

پس از جداسازی عامل و کشت خالص در محیط اختصاصی PPLO (BBL, Becton Dickinson and Company, Cockeyville, Sparks, MD, USA) در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و Co_2 حدود ۱۰-۵ درصد، به طور هم‌زمان DNA هر یک از نمونه‌ها به طور مستقیم از شیر استخراج می‌شد. قبل از استخراج DNA، در آزمایشگاه مرجع مایکوپلاسمای مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج عمل رسوب‌گیری روی نمونه‌ها انجام می‌شد، به این صورت که مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از نمونه مورد نظر بعد از قرار گرفتن در شیکر به میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شده و به مدت ۱۵ دقیقه با ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ می‌گردید. سپس محلول رویی تخلیه شده و از مقدار حدود ۱۰۰ میکرولیتر رسوب باقی‌مانده در ته لوله برای استخراج DNA نمونه‌ها استفاده می‌شد. DNA نمونه‌ها با روش فنل-کلروفرم جداسازی گردید (Pourbakhsh *et al.*, 2010). بر روی DNA استخراج شده هر یک از نمونه‌ها واکنش PCR جهت شناسایی جنس مایکوپلاسما انجام می‌گرفت و در مرحله بعدی اگر نمونه‌ها مثبت می‌شدند، واکنش PCR جهت شناسایی گونه بویس با پرایمرهای اختصاصی انجام می‌گرفت. در این بررسی، قطعه‌ای از ژن *16SrRNA* مایکوپلاسما جهت ردیابی جنس مایکوپلاسما و قطعه ژنی *uvrC* اختصاصی گونه *مایکوپلاسما بویس* به عنوان پرایمرهای هدف استفاده شدند (جدول ۱). به منظور بهینه‌سازی روش PCR، مقادیر و غلظت‌های مختلفی از MgCl2، dNTPs، DNA ژنومی و همچنین دماهای مختلف برای اتصال پرایمرها مورد استفاده قرار گرفتند. در خصوص ژن *16SrRNA*، واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل بافر PCR (10X) ۲/۵ میکرولیتر، dNTPs ۰/۵ میکرولیتر، پرایمرهای M_1F و M_3R هر کدام به مقدار ۰/۱ میکرولیتر، ۰/۲۵ واحد آنزیم Taq پلیمراز، ۲ میکرولیتر MgCl2، DNA الگو ۲ میکرولیتر و آب مقطر استریل ۱۷/۵۵ میکرولیتر راه‌اندازی گردید (Kojima *et al.*, 1997). این مقادیر در مورد ژن *uvrC* نیز به این ترتیب بود: حجم نهایی ۲۵ میکرولیتری شامل بافر PCR (10X) ۲/۵ میکرولیتر، ۲ میکرولیتر MgCl2، dNTPs ۱ میکرولیتر، پرایمرهای MbouvrC-L و MbouvrC-R هر کدام ۰/٤ میکرولیتر،

www.SID.ir

Archive of SID

۰/۳ واحد آنزیم Taq پلیمراز، DNA الگو ۲ میکرولیتر و آب مقطر استریل ۱۶/۴ میکرولیتر (Subramaniam *et al.*, 1998).

مخلوط حاصل به دستگاه ترموسایکلر Gradient Mastercycler (Eppendorf, Germany) انتقال داده شد. واکنش PCR برای قطعه ژنی *16SrRNA* در ۳۰ چرخه شامل مراحل واسرشت‌سازی (denaturation) در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال (annealing) در دمای ۵۶ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله تکثیر (extension) در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه انجام شد (Kojima *et al.*, 1997). همچنین مرحله واسرشت اولیه به مدت ۷/۵ دقیقه و تکثیر پایانی به مدت ۵ دقیقه منظور گردید.

در مورد ژن *uvrC*، واکنش PCR در ۳۵ چرخه شامل مرحله واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال در دمای ۵۲ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و تکثیر در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه انجام گرفت. مرحله واسرشت اولیه به مدت ۲ دقیقه و تکثیر پایانی به مدت ۷ دقیقه نیز لحاظ شد (Subramaniam *et al.*, 1998).

کنترل مثبت مورد استفاده جهت انجام واکنش‌های PCR، سویه استاندارد *مایکوپلاسما بویس* PG45 ATCC25523 موجود در آزمایشگاه رفرانس مایکوپلاسما مؤسسه رازی و کنترل منفی PPLO Broth در نظر گرفته شد. جهت تأیید نهایی، محصول به دست آمده برای تعیین توالی ارسال گردید.

جدول ۱- توالی‌های نوکلئوتیدی و آغازگرهای مورد استفاده در تشخیص جنس مایکوپلاسما و گونه *مایکوپلاسما بویس*

مشخصات پرایمرها	نام پرایمر	ژن هدف	سکانس (′۳-′۵)	طول محصول PCR	منبع
پرایمرهای جنس	M_1F	*16SrRNA*	GCTGCGGTGAATACGTTCT	163bp	Kojima *et al.*, 1997
	M_3R		TCCCCACGTTCTCGTAGGG		
پرایمرهای گونه	MbouvrC-L	*uvrC*	TTACGCAAGAGAATGCTTCA	1626bp	Subramaniam *et al.*, 1998
	MbouvrC-R		TAGGAAAGCACCCTATTGAT		

مارکر مورد استفاده، Gene ruler DNA Ladder Mix ساخت شرکت Fermentas با فاصله ۱۰۰ جفت باز از ۱۰۰ تا ۲۰۰۰ جفت باز بود. الکتروفورز محصولات به همراه مارکر ۱۰۰ bp بر روی ژل آگاروز ۱ درصد و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید ۰/۵ unit/µl (با ولتاژ ۱۰۰ به مدت ۱ ساعت) انجام و بر روی صفحه دستگاه U.V.Transluminator (BioRad, Hercules, CA, USA) تصویر تهیه گردید. پس از خالص‌سازی، محصولات PCR به‌دست آمده جهت تعیین توالی نوکلئوتیدی به شرکت Bioneer کُره جنوبی ارسال و گونه *مایکوپلاسما بویس* تأیید گردید.

www.SID.ir

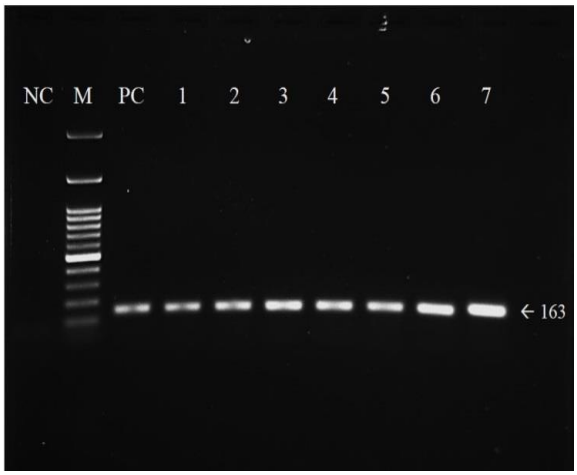
Archive of SID

یافته‌ها

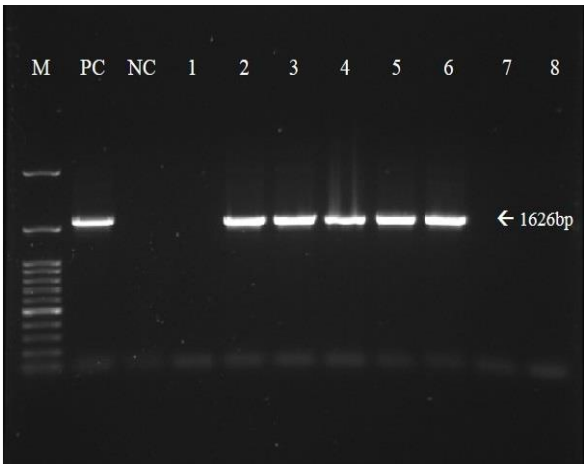
از تعداد ۳۲۸ نمونه شیر اخذشده، ۵۸ نمونه (۱۷/۶۹ درصد) از نظر رشد در محیط کشت PPLO آگار مثبت شدند و پرگنه‌های شبیه تخم‌مرغ نیمروشده در زیر میکروسکوپ نوری را از خود نشان دادند (شکل ۱).

شکل ۱- کلونی‌های *مایکوپلاسما بویس* بر روی محیط کشت PPLO آگار (درشت‌نمایی ×٤٠).

از تعداد کل نمونه‌ها، از نظر حضور ژن مربوط به جنس مایکوپلاسما در آزمون PCR، تعداد ۹۷ نمونه (۲۹/۵۷ درصد) مثبت باند ۱٦۳ جفت بازی را از خود نشان دادند (شکل ۲). همه ۹۷ نمونه مثبت از نظر جنس مایکوپلاسما، از لحاظ حضور ژن *uvrC* *مایکوپلاسما بویس* مورد آزمون PCR اختصاصی گونه بویس قرار گرفتند. از این تعداد، ١٤ نمونه (٤/٢٦ درصد) از نظر حضور ژن *uvrC* مثبت شدند (شکل ۳).



شکل ۲- تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR با آغازگر اختصاصی جنس مایکوپلاسما که باند ۱٦۳ bp در تعداد ۷ نمونه جنس مثبت مشاهده می‌شود. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، PC: کنترل مثبت (*M. bovis* PG45 ATCC 25523)، NC: کنترل منفی.



شکل ۳- تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR با آغازگر اختصاصی *uvrC* گونه *مایکوپلاسما بویس* که باند ١٦٢٦ bp در تعداد ۵ نمونه مثبت از نظر *مایکوپلاسما بویس* مشاهده می‌شود. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، PC: کنترل مثبت (*M. bovis* PG45 ATCC 25523)، NC: کنترل منفی.

www.SID.ir

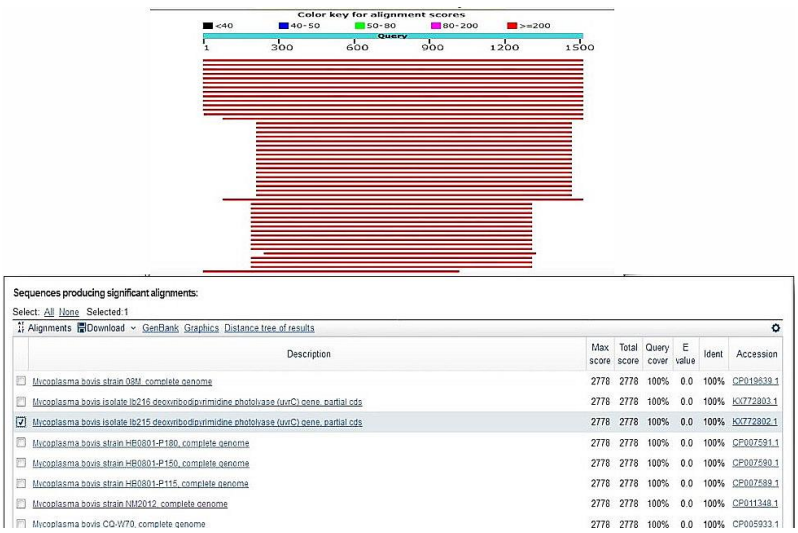
Archive of SID

مقایسه نتایج کشت و PCR نشان داد همه ۵۸ نمونه کشت مثبت در آزمون PCR جنس هم مثبت بودند. ۳۹ نمونه نیز کشت منفی و PCR جنس مثبت شدند. همه ۲۳۱ نمونه‌ای که از نظر PCR منفی بودند، از نظر کشت نیز منفی شدند. در ضمن هیچ نمونه‌ای وجود نداشت که کشت‌اش مثبت و PCR اش منفی باشد (جدول ۲).

پس از انجام PCR، توالی‌های نوکلئوتیدی آنها از دو طرف با آغازگرهای جلودار و برگشتی مشخص گردید و گونه *مایکوپلاسما بویس* مورد تأیید قطعی قرار گرفت (Wise *et al.*, 2011). جدایه‌های تحقیق حاضر با شماره دسترسی KX772801 لغایت KX772803 در بانک جهانی ژن (National Center of Biotechnology Information) ثبت گردید (شکل ٤).

جدول۲- فراوانی نمونه‌ها بر اساس نتایج کشت و PCR جنس مایکوپلاسما

تعداد نمونه	کشت	PCR
۵۸	+	+
۲۳۱	-	-
۰	+	-
۳۹	-	+
۳۲۸	جمع کل	



شکل ٤- Blast و Alignment یکی از جدایه‌های بدست آمده *مایکوپلاسما بویس* در سایت جهانی NCBI

بحث و نتیجه‌گیری

مطالعاتی در زمینه بررسی ورم پستان مایکوپلاسمایی در ایران صورت گرفته است که این مطالعات عمدتاً بر اساس روش‌های سرمی و مولکولی بوده است. در این مطالعات، همه گونه‌های مایکوپلاسما مورد بررسی قرار گرفته‌اند و نمونه‌ها از مراحل مختلف بیماری اخذ شده است. بررسی میزان آلودگی در این مطالعات نشان می‌دهد آلودگی از منطقه‌ای به منطقه

www.SID.ir

Archive of SID

دیگر متفاوت است. در مطالعه مشکلانی و همکاران در سال ۲۰۱۱، آزمایش PCR که بر پایه تکثیر قطعه ژنومی *16SrRNA* و تولید باند ۲۷۶ جفت بازی و با هدف بررسی میزان شیوع ورم پستان تحت‌بالینی در گله‌های شیری استان چهارمحال و بختیاری انجام گرفت، میزان شیوع ورم پستان مایکوپلاسمایی۴۸/۶۷ درصد گزارش گردید (Moshkelani *et al.*, 2011). در مطالعه دیگری که در منطقه مغان اردبیل و روی ۸۰ نمونه شیر اخذشده از گاوهای شیری با روش‌های کشت در محیط Hyflick و تست ایمنوپراکسیداز انجام گرفت، تعداد ۳۹ نمونه معادل ۴۸/۷۵ درصد موارد بالینی ورم پستان از لحاظ حضور *M. bovis* مثبت شدند (Ghazaei, 2006). در مطالعه دیگری توسط طالب خان گروسی و همکاران در سال ۸۵ با هدف بررسی فراوانی ورم پستان مایکوپلاسمایی در تعدادی از گله‌های گاو شیری اطراف مشهد، میزان آلودگی ورم پستان مایکوپلاسمایی ۱۵/۳۸ درصد گزارش گردید. در این مطالعه، روش Nested-PCR به عنوان یک تست با حساسیت و ویژگی بالا جهت شناسایی این عامل پاتوژن معرفی گردید (Taleb Khan Garousi *et al.*, 2006).

ارزیابی روش‌های کشت و PCR در مورد مایکوپلاسماها با استفاده از ژن‌هایی برای تعیین جنس و تشخیص گونه *مایکوپلاسما بویس* حساسیت و ویژگی بالایی دارند. در مطالعه‌ای جهت مقایسه روش‌های کشت و PCR بر روی نمونه‌های شیر ورم پستان، حساسیت و ویژگی روش PCR به ترتیب ۹۶/۲ و ۹۹/۱ درصد گزارش شد (Baird *et al.*, 1999). پینوو و همکاران در سال ۲۰۰۱، حساسیت PCR را در ردیابی *مایکوپلاسما بویس* موجود در شیری که ۲ سال نگه‌داری شده ۱۰۰ درصد گزارش نمودند، این در حالی است که حساسیت کشت آن ۲۷ درصد بود. بنابراین، روش PCR را به عنوان یک روش مناسب، جهت شناسایی و جداسازی *مایکوپلاسما بویس* از نمونه‌های شیر معرفی نمودند (Pinnow *et al.*, 2001). در مطالعه‌ای دیگر در ژاپن که توسط هیدتوشی و همکاران در سال ۲۰۱۰ انجام گرفت، از تعداد ۱۶۸۵ نمونه شیر غنی‌سازی شده در محیط کشت اختصاصی، با استفاده از روش PCR تعداد ۱۵۲ نمونه مثبت شد که میزان حساسیت و ویژگی این تست به ترتیب ۹۸/۷ درصد و ۹۹/۷ درصد تعیین گردید و در مجموع روش PCR به عنوان یک روش سریع و مؤثر برای شناسایی گونه بویس در نمونه‌های شیر گاوها پیشنهاد گردید (Hidetoshi *et al.*, 2010). سایین و همکاران در ترکیه از بین ۱۷ گله شیری، ۱۷۲ گاو مبتلا به ورم پستان مایکوپلاسمایی را با روش PCR تشخیص دادند که از این تعداد، ۱۴۹ نمونه از لحاظ *مایکوپلاسما بویس* مثبت گزارش گردید. در این مطالعه، *مایکوپلاسما بویس* به عنوان مهم‌ترین عامل عفونت ورم پستان مایکوپلاسمایی در گاوها شناسایی شد (Sayin *et al.*, 2016).

تست‌های مولکولی بر پایه استفاده از پرایمرهای اختصاصی، از شانس بالایی برای تشخیص ارگانیسم در هر دو نوع عفونت حاد و مزمن برخوردار هستند. در پژوهش‌های متعددی که در سایر کشورهای جهان انجام شده، از ژن *uvrC* به عنوان یک ژن هدف در تشخیص *مایکوپلاسما بویس* استفاده شده است. در مطالعه انجام گرفته توسط توماس و همکاران در سال ۲۰۰۴، ژن *uvrC* به عنوان یک ژن هدف و ثابت جهت تقویت (amplification) توالی سویه‌های *مایکوپلاسما بویس*

www.SID.ir

Archive of SID

معرفی گردید (Thomas *et al.*, 2004). روزتی و همکاران در سال ۲۰۱۰ یک روش Real-time PCR اختصاصی و جدید برای ارزیابی ژن *uvrC* طراحی نمودند که برای تشخیص *مایکوپلاسما بویس* به طور مستقیم از شیر و نمونه‌های بافتی و بدون نیاز به روش استخراجِ DNA مورد استفاده قرار گرفت (Rossetti *et al.*, 2010).

در این مطالعه بررسی میزان آلودگی نشان داد از تعداد ۹۷ نمونه مثبت مایکوپلاسما، ١٤ نمونه معادل ۲۹/۵۷ درصد به گونه *مایکوپلاسما بویس* تعلق دارند. مقایسه نتایج مطالعه حاضر با سایر نقاط جهان نشان داد میزان آلودگی بسیار متفاوت می‌باشد، طوری‌که میزان حضور باکتری در نمونه‌های شیر در این مطالعه کمتر از میزان حضور آن در شرایط مشابه در ایتالیا (Radaelli *et al.*, 2011) و بیشتر از فرانسه (Arcangioli *et al.*, 2011) می‌باشد. این متغیر بودن نتایج را می‌توان ناشی از تفاوت در روش‌های تشخیصی و مدیریت بهداشتی گله‌های شیری دانست. در مطالعه‌ای در نیوزیلند، تعداد ٢٤٤ نمونه از مخازن شیر فله اخذ شده و با روش‌های کشت و PCR مورد آزمون قرار گرفتند که هیچ نمونه مثبتی گزارش نگردید. در یک بررسی سرولوژیک دیگر در سال ۱۹۹۹ در نیوزیلند با استفاده از روش CFT (ثبوت عناصر مکمل)، تمامی نمونه‌ها از نظر حضور آنتی‌بادی ضد مایکوپلاسما منفی بودند. این مطالعات، نیوزیلند را به عنوان یک منطقه عاری از این ارگانیسم معرفی نمود (Mcdonald *et al.*, 2009). در مطالعه‌ای که توسط کامپا و همکاران در تایلند در سال ۲۰۰۷ روی ۵۱۱ نمونه از گاوهای شیری با هدف بررسی میزان شیوع ورم پستان *مایکوپلاسما بویس* انجام گرفت، از دو روش کشت در محیط PPLO و روش Nested-PCR استفاده گردید. در این مطالعه، تنها ۱ رأس گاو به عنوان نمونه *مایکوپلاسما بویس* مورد شناسایی قرار گرفت که معادل ۱/۸ درصد برآورد گردید (Kampa *et al.*, 2009). در مطالعه‌ای دیگر که در سال ۲۰۱۰ توسط کاراهان و همکاران انجام شد، تعداد ۹۰ نمونه ورم پستان از ٤ گله شیری در شرق ترکیه جمع‌آوری گردید. ابتدا DNA الگو از نظر حضور ژن *16SrRNA* بررسی گردید که ایجاد باند با طول ۲۸۰bp در روی ژل الکتروفورز معرف جنس مایکوپلاسما بود. سپس نمونه‌های مثبت به‌دست آمده برای تشخیص گونه بویس از نظر حضور ژن *mb-mp81* (*Mycoplasma bovis* membrane protein 81) مورد ارزیابی قرار گرفتند که نتایج نشان داد تعداد ۱۹ نمونه (معادل ۲۱/۱ درصد) آلوده به گونه بویس هستند (Karahan *et al.*, 2010).

در مطالعه حاضر، نمونه‌های شیر از گاوهای مبتلا به ورم پستان بالینی اخذ گردید، هر چند که *مایکوپلاسما بویس* سبب ورم پستان تحت‌بالینی و مزمن در گاو نیز می‌گردد. فوکس و همکاران در سال ۲۰۰۸، *مایکوپلاسما بویس* را از شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان بالینی که حداقل یکی از علایم درمانگاهی ورم پستان را از خود نشان می‌دادند، جدا نمودند (Fox *et al.*, 2008). در مطالعه‌ای که توسط عثمان و همکاران در سال ۲۰۰۸ در مصر بر روی ٢٣٦ نمونه و با استفاده از روش‌های CMT، ELISA و PCR انجام گرفت، میزان آلودگی با *مایکوپلاسما بویس* در موارد ورم پستان بالینی ١٤/٧٣ درصد و تحت بالینی ۹/۰۹ درصد گزارش شد (Osman *et al.*, 2008).

www.SID.ir

Archive of SID

پژوهش‌های متعدد در جهان، *مایکوپلاسما بویس* را به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل ایجاد کننده ورم پستان بالینی در گاوهای شیری معرفی می‌کند (Kirk and Lauerman, 1994; Gunning and Shepherd, 1996). در انگلستان، تحقیق انجام‌شده توسط جاستیک-آلن با روش‌های کشت و Real-time PCR، میزان آلودگی ۸/۳ درصدی را نشان داد (Justice–Allen *et al.*, 2011). در تحقیق مشابهی در کانادا توسط کای و همکاران در سال ۲۰۰۵، میزان شیوع *مایکوپلاسما بویس* در نمونه‌های تنفسی و شیر گاوها با روش Real-time PCR معادل ۲/٤ درصد برآورد گردید (Cai *et al.*, 2005). در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۱ در جنوب شرقی فرانسه که با هدف ارزیابی میزان شیوع *مایکوپلاسما بویس* در موارد ورم پستان بالینی به‌وسیله روش کشت و PCR بر روی ۸۲۸ نمونه شیر انجام گرفت، میزان آلودگی گاوهای شیری ۰/٤٤ درصد (کمتر از ۱ درصد) اعلام شد. نتایج نشان داد که میزان عفونت پستان با *مایکوپلاسما بویس* در فرانسه بسیار ناچیز می‌باشد (Arcangioli *et al.*, 2011). مقایسه یافته‌های تحقیق حاضر با این مطالعات نشان داد میزان آلودگی کمتر از کشورهایی مثل انگلستان و بیشتر از میزان مشابه آن در کانادا و فرانسه می‌باشد.

مطالعه حاضر اولین گزارش در خصوص شناسایی مولکولی *مایکوپلاسما بویس* در موارد اورام پستان بالینی در گاوهای ایران با استفاده از روش کشت و روش PCR بر اساس ژن‌های *16SrRNA* و *uvrC* می‌باشد. نتایج حاصل از این تحقیق، روش PCR را در مقایسه با روش کشت، به عنوان یک تکنیک سریع و قابل اعتماد جهت تشخیص *مایکوپلاسما بویس* معرفی کرد و نشان داد *مایکوپلاسما بویس* می‌تواند به‌عنوان یکی از عوامل اصلی ایجادکننده ورم پستان بالینی در گاوهای شیری ایران مطرح باشد. البته باید تحقیقات بیشتر و جامع‌تری در زمینه بررسی میزان شیوع و آلودگی ورم پستان ناشی از *مایکوپلاسما بویس* در کشور انجام گیرد تا بتوان راهکارهای مدیریتی و قرنطینه‌ای مناسبی برای مقابله و کنترل خسارات ناشی از این میکروارگانیسم در سطح گله‌های شیری و صنعتی اتخاذ نمود.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از پرسنل آزمایشگاه مرجع مایکوپلاسمای مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی به‌دلیل همکاری بی شائبه‌شان و همچنین حوزه معاونت تحقیقات و فن‌آوری این مؤسسه به دلیل حمایت مالی، ارائه امکانات و تجهیزات آزمایشگاهی جهت انجام این پژوهش سپاسگزاری نمایند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافعی ندارند.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

- Ahmad, Z.S., Babar, F., Abbas, M.A., Awan, M., Shafee, M.M., Tariq, M., *et al*. (2014). Prevalence of Mycoplasma bovis in respiratory tract of cattle slaughtered in Balochistan, Pakistan. Pakistan Veterinary Journal, 34(1): 46-49.
- Arcangioli, M.A., Chazel, M., Sellal, E., Botrel, M.A., Bezille, P., Poumarat, F., *et al*. (2011). Prevalence of Mycoplasma bovis udder infection in dairy cattle: preliminary field investigation in southeast France. New Zealand Veterinary Journal, 59(2): 75-78.
- Baird, S.C., Carman, J., Dinsmore, R.P., Walker, R.L. and Collins, J.K. (1999). Detection and identification of Mycoplasma from bovine mastitis infections using a nested polymerase chain reaction. Journal of Veterinary Diagnosis Investigation, 11: 432-435.
- Cai, H.Y., Bell-Rogers, P. and Parker, L. (2005). Development of a real-time PCR for detection of Mycoplasma bovis in bovine milk and lung samples. Journal of Veterinary Diagnosis Investigation, 17: 537-545.
- Cremonesi, P., Vimercati, C., Pisoni, G., Perez, G., Miranda, R., Castiglioni, A.B., *et al*. (2007). Development of DNA extraction and PCR amplification protocols for detection of Mycoplasma bovis directly from milk samples. Veterinary Research Communications, 31(1): 225-227.
- Foddai, A., Idini, G., Fusco, M., Rosa, N., De la Fe, C., Zinellu, S., *et al*. (2005). Rapid differential diagnosis of Mycoplasma agalactiae and Mycoplasma bovis based on a multiplex-PCR and a PCR-RFLP. Molecular and Cellular Probes, 19: 207-212.
- Fox, L.K., Kirk, J.H. and Britten, A. (2008). Mycoplasma mastitis: a review of transmission and control. Journal of Veterinary Medical Infectious Disease, Veterinary Public Health, 52: 153-160.
- Fu-Rong Z., Xue-Liang Z., Min-Jun X., Si-Yang H., Dong-Hui Z., Hui-Yan X., *et al*. (2012). First report of Mycoplasma bovis infection in dairy cattle in Guangzhou, subtropical southern China. African Journal of Microbiology Research, 6(27): 5668-5671.
- Ghadersohi, A., Coelen, R.J. and Hirst, R.G. (1997). Development of specific DNA probe and PCR for the detection of Mycoplasma bovis. Veterinary Microbiology, 56: 87-98.
- Ghazaei, C. (2006). Detection of mycoplasmal mastitis and determination of its prevalence rate in dairy cattle herds in Moghan-Ardabil state, Iran. Journal of Animal and Veterinary Advances, 5(4): 280-283.
- Gunning, R.F. and Shepherd, P.A. (1996). Outbreak of bovine Mycoplasma bovis mastitis. Veterinary Records, 139: 23-24.
- Hidetoshi, H., Hideto, M., Kazuhiro, K., Takehiro, O. and Tetsu, O. (2010). A simplified PCR assay for fast and mycoplasma mastitis screening in dairy cattle. Journal of Veterinary Science, 12(2): 191-193.
- Hirose, K., Kawasaki, H. and Dotani, K. (2001). Detection of Mycoplasma in mastitic milk by PCR analysis and culture method. Journal of Veterinary Medical Science, 63: 691-693.
- Justice-Allen, A., Trujillo, J., Goodell, G. and Wilson, D. (2011). Detection of multiple Mycoplasma species in bulk tank milk samples using real-time PCR and conventional culture and comparison of test sensitivities. Journal of Dairy Science, 94: 3411-3419.
- Kampa, J., Sukolapong, V., Buttasri, A. and Charoenchai, A. (2009). Prevalence of Mycoplasma bovis and Other Contagious Bovine Mastitis Pathogens in Bulk Tank Milk of Dairy Cattle Herds in Khon Kaen Province, Thailand. Thailand Journal of Veterinary Medicine, 39(3): 275-280.
- Karahan, M., Kalin, R., Atil, E. and Çetinkaya B. (2010). Detection of Mycoplasma bovis in cattle with mastitis and respiratory problems in eastern Turkey. Veterinary Record, 166: 827-829.
- Kirk, J.H. and Lauerman, L.H. (1994). Mycoplasma mastitis in dairy cows. Compendium of Continious Education Practice Veterinary, 16: 541-551.

www.SID.ir

Archive of SID

- Kojima, A., Takahashi, T., Kijima, M., Ogikubo, Y., Nishimura, Y., Nishimura, S., *et al*. (1997). Detection of mycoplasma in avian live virus vaccines by polymerase chain reaction. Biologicals, 25: 365-71.
- McAuliffe, L., Branko, K.R., Ayling R.D. and Nicholas, R.A. (2006). Molecular epidemiological analysis of Mycoplasma bovis isolates from the United Kingdom shows two genetically distinct clusters. Journal of Clinical Microbiology, 42: 4556-4565.
- McDonald, W.L., Rawdon, T.G., Fitzmaurice, J., Bolotovski, I., Voges, H., Humphrey, S., *et al*. (2009). Survey of bulk tank milk in New Zealand for Mycoplasma bovis, using species-specific nested PCR and culture. New Zealand Veterinary Journal, 57(1): 44-49.
- Mosaferi, S. and Haghighat Kaghazchian, M. (2003). Mastitis in Farm Animals. 1st ed., Iran: Tabriz, Islamic Azad University Press, pp: 159-170. [In Persian]
- Moshkelani, S., Rabiee, S. and Javaheri-Koupaei, M. (2011). Occurrence of Mycoplasma in bovine mastitic milk in Iran. Research Opinions in Animal and Veterinary Sciences, 1(11): 694-696.
- Nicholas, R.A.J. and Ayling, R.D. (2003). Mycoplasma bovis: disease, diagnosis and control. Research in Veterinary Science, 74: 105-112.
- Osman, K.M., Abd El-Razik, K.A., Barbar, E.E., ELShafey, D.Y.H. and Arafa, A.A. (2008). Molecular typing of mycoplasma species recovered from bovine mastitis. Global Veterinaria, 2(6): 360-368.
- Pfützner, H. and Sachse, K. (1996). Mycoplasma bovis as an agent of mastitis, pneumonia, arthritis and genital disorders in cattle. Review Scientific Technical Journal, 15: 1477-1494.
- 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. Journal of Dairy Science, 84: 1640-1645.
- Pourbakhsh, S.A., Shokri, G.R., Banani, M., Elhamnia, F. and Ashtari, A. (2010). Detection of Mycoplasma synoviae infection in broiler breeder farms of Tehran province using PCR and culture methods. Archives of Razi Institute, 65(2): 75-81.
- Radaelli, E., Castiglioni, V., Losa, M., Benedetti, V., Piccinini, R. and Nicholas, R.A.J. (2011). Outbreak of bovine clinical mastitis caused by Mycoplasma bovis in a North Italian herd. Research in Veterinary Science, 91: 251-253.
- Rossetti, B.C., Frey, J. and Pilo, P. (2010). Direct detection of Mycoplasma bovis in milk and tissue samples by real-time PCR. Molecular and Cellular Probes, 24: 321-323.
- Sayin, Z., Aslı, S., Uçkun S.U., Uslu, A., Hadimli, H.H., Aras, Z., *et al*. (2016). Mycoplasma infections in dairy cattle farms in Turkey. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 40: 1-6.
- Stokka, G.L., Lechtenberg, K. and Edwards, T. (2001). Lameness in Feedlot Cattle. Veterinary Clinical North Amer-Food Animal Practice, 17(1): 196-202.
- Subramaniam, S., Bergonier, D., Poumarat, F., Capaul, S., Schlatter, Y., Nicolet, J., *et al*. (1998). Species identification of Mycoplasma bovis and Mycoplasma agalactiae based on the uvrC genes by PCR. Molecular and Cellular Probes, 12: 161-169.
- Taleb Khan Garousi, M., Navid Mehr, J. and Rahimi, R. (2006). Preliminary study on the prevalence of mycoplasma mastitis in a number of herds of dairy cattle around Mashhad. Journal of Veterinary Research, University of Tehran, 61(4): 321-323. [In Persian]
- Thomas, A., Dizier, I., Linden, A., Mainil, J., Frey, J. and Vilei, E.M. (2004). Conservation of the uvrC gene sequence in Mycoplasma bovis and its use in routine PCR diagnosis. The Veterinary Journal, 168: 100-102.
- Wise, K.S., Calcutt, M.J., Foecking, M.F., Roske, K., Madupu, R. and Methe, B.A. (2011). Complete genome sequence of Mycoplasma bovis type strain PG45 (ATCC 25523). Infection and Immunity, 79(2): 982-983.

www.SID.ir

Archive of SID

Veterinary Clinical Pathology, Vol.12, No 47, Autumn 2018

Identification of *Mycoplasma bovis* in cows with clinical mastitis using culture and Polymerase Chain Reaction based on *16SrRNA* and *uvrC* genes

Imandar, M.[1], Pourbakhsh, S.A.[2*], Jamshidian, M.[1], Zahraei Salehi, T.[1]

1- Department of Microbiology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2- Mycoplasma Reference Laboratory, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran.
*Corresponding author's email: poursaba@yahoo.com
(Received: 2017/9/15 Accepted: 2018/11/10)

Abstract

Mycoplasma bovis is one of the main causes of pneumonia, mastitis and arthritis in cattle. The aim of this study was to identify the *M. bovis* in cows with clinical mastitis using culture and PCR based on *16SrRNA* and *uvrC* genes. A total of 328 milk samples were obtained from cattle with clinical mastitis in industrial dairy herds. Samples were sent to the Mycoplasma reference laboratory, Razi Vaccine and Serum Research Institute at 4°C in less than 24 hr and incubated for 18-24 hr at 37°C. After filtering to specific PPLO medium, they were incubated in the presence of Co_2 and were monitored for 7-10 days. Simultaneously, DNA of the samples was extracted and purified by Phenol-Chloroform method and PCR was used to detect mycoplasma genus based on *16SrRNA* and detection of *M. bovis* species based on *uvrC* genes. Out of 328 samples, 58 samples were positive in PPLO agar media. Ninty-seven samples (29.57%) were positive for mycoplasma gene, of which 14 samples (4.26%) showed specific gene of *M. bovis*. The results of this study introduced the PCR method as a rapid and reliable test for detection of *M. bovis* in milk specimens. The results also showed that the presence of *M. bovis* in dairy herds in Iran is high and it can be considered as one of the main causes of the clinical manifestation of cattle mastitis.

Conflict of interest: None declared.
Keywords: *Mycoplasma bovis*, *uvrC* gene, Mastitis, Cow, PCR.

www.SID.ir