بررسی میزان فراوانی مایکوپلاسما آرژینینی در ریه شتران مبتلا به پنومونی، ذبح شده در کشتارگاه صنعتی مشهد

مریم ایزدی[1]، جعفر نویدمهر[2*]، مصطفی جعفرپور[1]، سعید زیبایی[3]

۱ـ گروه میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، تنکابن ـ ایران.

۲ـ بخش تولید واکسن های بیهوازی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه شمال شرق، مشهد ـ ایران.

۳ـ بخش تحقیق و توسعه، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه شمال شرق، مشهد ـ ایران.

*نویسنده مسئول: *jafarnavidmehr@yahoo.com*

دریافت مقاله: ۱۵ بهمن ۸۹، پذیرش نهایی: ۲۰ اردیبهشت ۹۰

چکیده

بازرسی کشتارگاهی شترهای کشتارشده، در کشتارگاه صنعتی مشهد حاکی از این است که پنومونی در بین شتران کشتار شده به وفور دیده می‌شود. مایکوپلاسماها که کوچکترین میکروارگانیسم‌ها با زندگی آزاد می‌باشند از عوامل مطرح در پنومونی شتران بشمار می‌روند. مایکوپلاسما آرژینینی از حیوانات مبتلا به پنومونی و پلوروپنومونی خصوصاً گاو، گوسفند و بز جدا می‌شود. این میکروارگانیسم در ریه شتران مبتلا به پنومونی نیز گزارش شده است اما این موضوع تاکنون در ایران مورد توجه و مطالعه آزمایشگاهی قرار نگرفته است. در این مطالعه با استفاده از کشت و روش مولکولی Nested PCR به تشخیص این میکروارگانیسم پرداختیم. از ۱۰۰ نمونه ریه مبتلا به پنومونی توسط روش کشت ۴۳ مورد مثبت مایکوپلاسما جداگردید. سپس با روش مولکولی Nested PCR و با بهره گیری از دو پرایمر اختصاصی که در برگیرنده ناحیه spacer در ایران RNA ریبوزومی مایکوپلاسما آرژینینی بودند، مورد بررسی قرارگرفتند که از ۴۳ نمونه ۱۹ مورد از نظر مایکوپلاسما آرژینینی مثبت بودند. بنابراین طبق نتایج حاصل در این تحقیق برای اولین بار در ایران مایکوپلاسما آرژینینی با روش PCR Nested از ریه شتران مبتلا به پنومونی جداسازی و معرفی گردید. مجله میکروبیولوژی دامپزشکی، ۱۳۹۰، دوره ۷، شماره ۱، ۳۴-۳۱.

واژه‌های کلیدی: مایکوپلاسما آرژینینی، پنومونی، شتر، Nested PCR.

مقدمه

عفونت‌های ریوی، خصوصاً پنومونی، از بیماری‌های مهم حیوانات اهلی هستند. شیوع آن در شتر، گاو، بوفالو و نشخوارکنندگان کوچک در کشورهای مختلف رخ می‌دهد. پنومونی ممکن است بوسیله باکتری‌ها، مایکوپلاسماها، ویروس‌ها، انگل‌ها و قارچ‌ها ایجاد شود (۷ و ۲).

Evaluation of *Mycoplasma arginini* abundance in slaughtered camels with pneumonia in Mashhad industrials abattoir

Izadi,M.[1], Navidmehr,J.[2*], Jafarpoor,M.[3], Zibaee,S.[4]

[1]*Department of Microbiology, Tonekabon branch, Islamic Azad University, Tonekabon-Iran.*

[2]*Department of anaerobic vaccine production , Razi Vaccine & Serum Research Institute, Mashhad, Mashhad-Iran.*

[3]*Department of research and development, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Mashhad, Mashhad-Iran.*

Abstract

A study on slaughtered camels in Mashhad industrial abattoir showed that pneumonia is a serious disease among camels. So it seems to be necessary to detect the different agents for camel pneumonia such as Mycoplasma. These are the smallest free living organisms which lack cell wall. *Mycoplasma arginini* has been isolated from different animals with pneumonia and pleuropneumonia like cows, sheep and goats. It has also been reported from camels, but in Iran there is no report about it. In this study we used both culture and molecular methods for detecting it. Out of 100 specimens 19 were positive. All of positive sample were approved by Nested PCR by using two specific primers for spacer region of the rRNA. This study was the first one in Iran. ***J. Vet. Microbiol. 7,1:31-34, 2011.***

Keywords: *Mycoplasma arginini*, Pneumonia, Camel, Nested PCR.

جنس مایکوپلاسما متعلق به خانواده مایکوپلاسماتاسه آز راسته مایکوپلاسماتالس در کلاس مولیکوتس می باشد (۶). همه مایکوپلاسماها انگل های اجباری با میزبان های اختصاصی هستند (۳). بیشتر اعضای کلاس مولیکوتس از دیگر پروکاریوتها به دلیل داشتن ژنوم کوچک، فعالیت‌های متابولیکی و آنزیماتیکی محدود و رشد وابسته به کلسترول

متفاوت اند (۱).

مایکوپلاسماها مولد تعداد زیادی از بیماری‌ها در انسان و حیوانات می‌باشند و به طور رایج در ارتباط با پنومونی، آرتریت، ورم ملتحمه چشم، نازایی و سقط جنین مشاهده می‌گردند. تشخیص اختصاصی عفونت های مایکوپلاسمایی به دلیل محدودیت تست های تشخیصی رایج و مشابهت آنها در بیماریهایی که ایجاد می‌کنند اغلب مشکل است. مایکوپلاسماها به شدت سخت رشد هستند، بعضی از آنها معمولاً برای کشت به هفته‌ها زمان نیاز دارند و به تست‌های سرولوژیکی زیادی غیراختصاصی و غیرحساس اند (۵).

مایکوپلاسماها یک تهدید بزرگ برای حیوانات مزرعه بشمار می‌روند. مایکوپلاسما مایکوئیدس (mycoides Mycoplasma) زیرگونه مایکوئیدس (mycoides) با کلونی کوچک (SC) و مایکوپلاسما مایکوئیدس (mycoides Mycoplasma) زیر گونه کاپری (capri) بزرگترین عامل پلوروپنومونی به ترتیب در گاو، گوسفند و بز هستند. اطلاعات کمی درباره نقش مایکوپلاسماها در اتیولوژی پنومونی شتران وجود دارد که قسمتی از آن مربوط به فقدان تحقیقات بر روی وقوع مولیکوتها مثل (Mycoplasma، Ureaplasma یا Acholeplasma) در شتران است (۳).

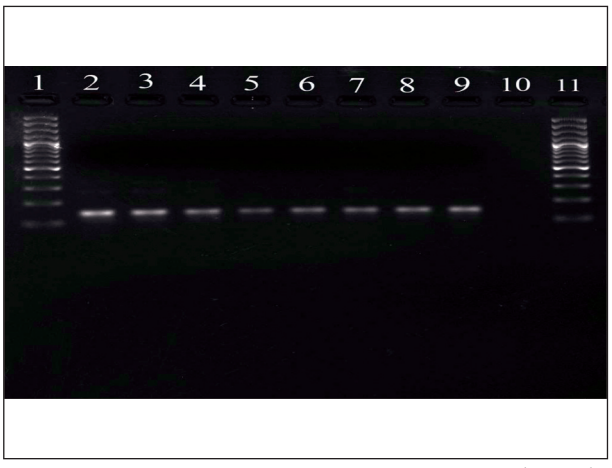
مایکوپلاسما آرژینینی انگل پستانداران با محدوده میزبانی تقریباً وسیعی می‌باشد. این میکروارگانیسم با فراوانی بالایی در مجرای تنفسی و با فراوانی کمتری در چشم و دستگاه تناسلی گوسفند، بز و گاو یافت می‌شود. همچنین به میزان کمتری در خوک، اسب، سگ، گربه اهلی و وحشی گزارش شده است. این میکروارگانیسم به دفعات از سرم‌های گاوی استفاده شده در کشت بافت جداسازی شده است (۴).

در تکنیک‌های مرسوم که برای تشخیص مایکوپلاسما استفاده می‌شوند، کشت نمونه‌ها روی محیط انتخابی حداقل به یک هفته برای بدست آمدن نتیجه نیاز دارد حال آنکه PCR در مدت زمان کوتاهی نتیجه را اعلام می‌نماید (۸).

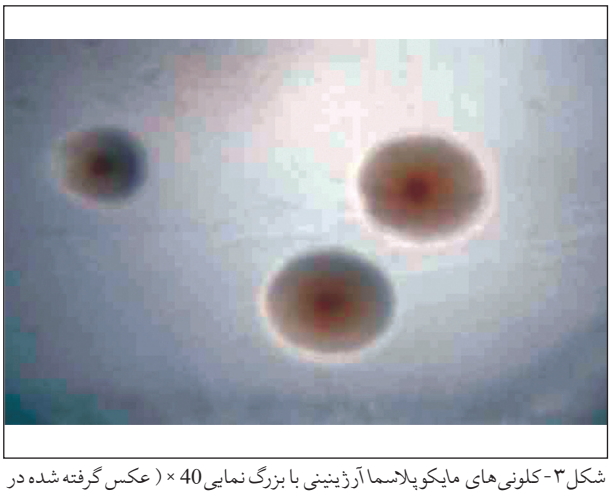
مواد و روش کار

در این مطالعه از ریه شتران ذبح شده در کشتارگاه صنعتی مشهد که مبتلا به پنومونی بودند نمونه برداری صورت گرفت و نمونه‌ها در محیط ترانسپورت (حاوی PPLO Broth و ۵ درصد سرم نرمال اسب) به مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی مشهد انتقال داده شدند. در آزمایشگاه در شرایط مناسب از نمونه‌ها در محیط اختصاصی PPLO Broth که شامل مایکوپلاسما براث، عصاره مخمر و سرم نرمال اسب بود کشت داده شد و بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه ساتنیگراد نمونه‌ها فیلتر شدند و سپس در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت تا یک هفته قرار داده شد و بعد از بررسی در صورت ایجاد کدورت ضعیف نمونه مشکوک تلقی گردید. آنگاه از این نمونه‌ها بر روی محیط جامد PPLO Agar که محتوی مایکوپلاسما آگار، عصاره مخمر و سرم نرمال اسب بود، تلقیح صورت گرفت و در جار مرطوب در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۳ تا ۵ روز جهت رویت کلنی‌ها نگهداری گردید سپس استخراج DNA صورت گرفت و سپس توسط پرایمرهای اختصاصی مایکوپلاسما آرژینینی Nested PCR انجام شد.

پرایمرهای بکار رفته در این مطالعه در PCR اول پرایمر فوروارد با توالی (ACACCATGGGAGCTGGTAAT :MAF) و پرایمر ریورس با توالی (CCCAAGGCAT-MAR: CTTCATCGACTTCCAGA) توانایی تکثیر قطعه ای از ژنوم میکروارگانیسم را با اندازه ۳۶۹bp و در PCR دوم پرایمر فوروارد با توالی (AGF:GTTCTTTGAAAACTGAAT1) و پرایمر ریورس با توالی (AGF: GCATCCACCAAAAACTCT2) توانایی تکثیر قطعه ای با اندازه ۱۴۵bp را دارا بودند. برای استخراج DNA از کیت استخراج سیناژن استفاده شد بدین صورت که از لوله‌هایی که حاوی PPLO Broth هستند و نمونه قبلاً در آن فیلتر شده است ۱ تا ۱/۵ میلی لیتر برداشته و درون میکروتیوب‌ها می‌ریزیم و میکروتیوب‌های حاوی نمونه را در دور g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ می‌کنیم و سپس با استفاده از دستورالعمل کیت استخراج DNA انجام شد. برای انجام PCR در این تحقیق از کیت خشک Gen Pak استفاده شد که بعد از اضافه کردن مواد لازم به تیوبها و مخلوط شدن کامل مواد، تیوبها به دستگاه (Thermocycler gradiant Ependorf، آلمان) منتقل شدند و تحت برنامه ای به شرح ذیل قرار گرفتند: ۹۴ درجه سانتیگراد ۱ دقیقه و بعد از آن ۳۰ سیکل شامل ۹۴ درجه سانتیگراد دمای دناتوره شدن ۳۰ ثانیه و ۵۵ درجه سانتیگراد دمای اتصال پرایمرها ۲ دقیقه و ۷۲ درجه سانتیگراد دمای طویل شدن یک دقیقه و پس از سپری شدن این ۳۰ سیکل، یک سیکل طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه پایان



شکل ۱ـشکل ژل اکتروفورز Nested PCR . ستون(۱): مارکر، ستون(۲): کنترل مثبت(مایکوپلاسما آرژینینی ـ موسسه رازی مشهد، تایید شده توسط انستیتو Colindal انگلستان)، ستون(۳-۹): نمونه‌های مثبت برای مایکوپلاسما آرژینینی، ستون(۱۰): کنترل منفی، ستون(۱۱): مارکر.



شکل۳- کلونی‌های مایکوپلاسما آرژینینی با بزرگ نمایی 40 × (عکس گرفته شده در موسسه واکسن و سرم سازی رازی مشهد).

بخش مراحل PCR اولیه بود (۸).

برای بررسی محصول PCR اول ژل آگارز ۱ درصد با استفاده از بافر TBE تهیه شد و نمونه‌ها در کنار (Ladder 100 Fermentas، لیتوانی) تحت تأثیر اختلاف پتانسیل الکتریکی معادل ۹۰v قرار گرفتند و بعد از گذشت زمان یک ساعت ژل مورد عکس برداری قرار گرفت. بعد از بررسی ژل برای نمونه‌ها PCR دوم انجام شد که بعد از انجام PCR توسط دستگاه Thermocycler مانند برنامه قبل برای بررسی محصول PCR ژل آگارز ۲٪ تهیه شد و نمونه‌ها در کنار Ladder تحت تأثیر اختلاف پتانسیل الکتریکی معادل ۹۰v قرار گرفتند و بعد از گذشت زمان یک ساعت از ژل عکس برداری صورت گرفت(شکل۲و۱).

شکل ۲ـ شکل ژل الکتروفورز PCR .ستون(۱): مارکر، ستون(۲): کنترل مثبت (مایکوپلاسما آرژینینی ـ موسسه رازی مشهد، تایید شده توسط انستیتو Colindal انگلستان)، ستون(۳): کنترل منفی، ستون(۴-۸): نمونه‌های مثبت برای مایکوپلاسما آرژینینی.

نتایج

از ۱۰۰ نمونه ریه که کشت داده شدند ۴۳ نمونه کدورت ضعیف نشان داد که برای هر ۱۰۰ مورد جهت جستجوی مایکوپلاسما آرژینینی PCR انجام شد که ۱۹ نمونه ایجاد باند اختصاصی نمودند و سپس عملیات Nested PCR برای ۱۰۰ نمونه انجام گردید که از این تعداد ۱۹ موردی (۱۹درصد) که در PCR اول مثبت بودند در این مرحله نیز از نظر مایکوپلاسما آرژینینی پاسخ مثبت نشان دادند.

از برخی از نمونه‌های مثبت بر روی محیط PPLO Agar کشت داده شد که شکل کلونی‌ها را می‌توان در شکل (۳) مشاهده نمود.

بحث و نتیجه‌گیری

نقش بعضی از گونه‌های مایکوپلاسما در بیماری‌های ریوی نزد انسان و بعضی دامها محرز گردیده است. بر طبق بررسی‌های انجام شده بیماری‌های ریوی شتر با منشا ویروسی به میزان زیاد اما با منشا مایکوپلاسماها کمتر مورد مطالعه قرار گرفته اند.فقط در دهه اخیر در سال ۲۰۰۱ حضور مایکوپلاسما آرژینینی در ریه شتران مبتلا به پنومونی توسط M.G.Elfaki در عربستان سعودی گزارش گردیده است. Elfaki و همکاران ۱۰۰ نفر شتر مبتلا به پنومونی در یک کشتارگاه محلی عربستان سعودی را برای جداسازی و تعیین خصوصیات M. arginini مورد آزمایش قرار دادند. هویت این ایزوله‌ها بیشتر به وسیله

تست دیسک مهار رشد با استفاده از یک پانل آنتی سرم اختصاصی در مقابل گونه‌های مایکوپلاسمایی انتخاب شده انجام شد که بر پایه پروفایل بیوشیمی و نتایج مهار رشد ایزوله‌های شتر به عنوان مایکوپلاسما آرژینینی شناسایی شدند. میزان جداسازی مایکوپلاسما آرژینینی از این نمونه‌ها ۸/۸درصد بود (۳). ما نیز توانستیم از ۱۹ مورد (۱۹درصد) ریه مبتلا، مایکوپلاسما آرژینینی را جدا کنیم. با عنایت به میزان حضور مایکوپلاسما آرژینینی در ریه مبتلا به پنومونی نزد شتران به نظر می‌رسد این میکروارگانیسم می‌تواند در ابتلا به بیماری تأثیر گذار باشد که البته این امر نیز باید مورد مطالعه بیشتر قرار گیرد.

منابع

۱. قلعه گلاب، ن.، کرامت، ا. (۱۳۸۲) شناسایی مایکوپلاسماهای بیماریزای طیور با روش RFLP-PCR. سیزدهمین کنگره دامپزشکی ایران، اسفند ۸۲.

2. Al-Tarazi, Y. H. (2001) Bacteriological and pathological study on pneumonia in the one-Humped camel (*Camelus dromedarius*) in Jordan. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux*, **54(2)**: 93-97.
3. Elfaki, M. G., Abbas, B., Mahmoud, O. M., Kleven, S. H. (2001) Isolation and characterization of *Mycoplasma arginini* from camels (*Camelus dromedaries*) with pneumonia. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, **25**: 49-57.
4. Garg, D. N. (2009) *Mycoplasma*s of zoonotic significance. College of Veterinary Sciences.C.C.S. Haryana Agricultural University Hisar-125 004, Haryana, India.
5. McAuliffe, L., Ellis, R. J., Lawes, J. R., Ayling, R. D., Nicholas, R. A. J. (2005) 16S rDNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis; a single generic test for detecting and differentiating *Mycoplasma* species. *Journal of Medical Microbiology*, **54**: 731-739.
6. Razin, S., Yogev, D., Naot, Y. (1998) Molecular Biology and Pathogenicity of *Mycoplasma*s. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **62**: 1094-1156.
7. Schwartz, H. J., Diolim, E. (1992) The one-humped camel (*Camelus dromedarius*) in Eastern Africa; A pictorial guide to diseases, health care and management. Weikersheim, Germany, Verlag Josef Margraf. 199-203.
8. Takara. PCR *Mycoplasma* Detection Set. http://www.takara-bio.com. TAKARA BIO INC.