JVM Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره چهاردهم، شماره اول، ۱۳۹۷، پیاپی ۳۶: ۵۹-۵۱

جداسازی و شناسایی *مایکوپلاسما بووی‌جنیتالیوم* از شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان بالینی با روش‌های کشت و PCR

زهرا معصومعلی نژاد [۱]، سید علی پوربخش [۲*]

۱- کارشناسی ارشد گروه میکروبیولوژی، واحد سیرجان، دانشگاه آزاد اسلامی، سیرجان، ایران

۲-استاد گروه میکروبیولوژی، آزمایشگاه رفرانس مایکوپلاسما، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۲/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۸/۱۰

چکیده

هدف: مایکوپلاسما بووی‌جنیتالیوم یکی از پاتوژن‌های ایجاد کننده ورم پستان در گاوهای شیرده است. عوارض ناشی از این بیماری شامل کاهش شیر دهی، تغییر کیفیت شیر، تورم کارتیه‌ها، ورم مفاصل، عفونت دستگاه تنفسی، عفونت سیستم ادراری، عفونت گوش داخلی و سپتی سمی می‌باشد. هدف از این مطالعه، جداسازی و شناسایی مایکوپلاسما بووی جنیتالیوم از شیر گاو-های مبتلا به ورم پستان بالینی با روش‌های کشت و PCR بود. روش کار: در این مطالعه توصیفی در سال ۱۳۹۵، تعداد ۱۵۶ نمونه-ی شیر از گاوهای مشکوک به اورام پستان بالینی در گاوداری‌های صنعتی ایران اخذ گردید. نمونه‌ها در محیط PPLO broth و PPLO agar کشت داده شدند. برای استخراج DNA از روش فنل کلروفرم استفاده گردید. نمونه‌ها از نظر حضور جنس مایکوپلاسما و گونه مایکوپلاسما بووی جنیتالیوم به روش PCR مورد آزمایش قرار گرفتند. به منظور تشخیص این میکروارگانیسم به روش مولکولی از پرایمرهای اختصاصی Mbg F و Mbg R استفاده گردید. نتایج بدست آمده: در روش کشت از تعداد ۱۵۶ نمونه، ۵۷ (۳۷٪) نمونه کلنی‌های تخم مرغ نیمرو شده مایکوپلاسما را از خود نشان دادند؛ در حالیکه در آزمون PCR از این تعداد نمونه، ۶۲ (۴۰٪) نمونه از نظر حضور پرایمر جنس مایکوپلاسما مثبت گزارش گردید و در آزمون PCR اختصاصی گونه نیز، یک نمونه (۲٪) مثبت مایکوپلاسما بووی جنیتالیوم گزارش شد. نتیجه گیری: نتایج حاصل از این تحقیق، PCR را به عنوان یک روش سریع، با حساسیت و ویژگی بالا جهت تشخیص مایکوپلاسماها معرفی نمود.

کلمات کلیدی: مایکوپلاسما بووی جنیتالیوم، PCR، ورم پستان، گاو

* نویسنده مسئول: سید علی پوربخش

آدرس: گروه میکروبیولوژی، آزمایشگاه رفرانس مایکوپلاسما، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران. تلفن: ۰۹۱۲۱۳۲۵۴۱۱

پست الکترونیک: poursaba@yahoo.com

مقدمه

ورم پستان یکی از مشکلات اساسی گله‌های گاو شیری در سراسر جهان است که در اثر تکثیر میکروارگانیسم-های بیماری زا در غدد پستان ایجاد می‌شود و منجر به کاهش تولید شیر، تغییر کیفیت، سفت شدن قوام آن و در مراحل پیشرفته باعث تورم کارتیه‌ها می‌شود (۱). منبع اولیه اکثر عفونت‌ها، ورم کارتیه گاوان آلوده‌ای است که به شکل تحت حاد یا مزمن حامل عفونت اند. معمولاً گاوهایی که سن بالاتری دارند این حالت را بیشتر از خود نشان می‌دهند، گوساله‌ها نیز ممکن است به علت عدم رعایت موازین بهداشتی از جمله تغذیه با شیر آلوده به این بیماری مبتلا شوند (۵). در مقایسه با سایر پاتوژن‌های مولد ورم پستان، *مایکوپلاسما*ها به عنوان سومین پاتوژن مسری پس از *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* قرار دارند (۳). درانگلستان سالیانه حدود ۱/۹ میلیون گاو تحت تأثیر عفونت مایکوپلاسمایی قرار می‌گیرند که خسارت ۵۴ میلیون پوندی به صنعت گاوداری وارد می‌کنند (۹ و ۱۳). بیماری در سطح گله با جداسازی عامل از تانک شیر یا نمونه‌ی گاو با ورم پستان بالینی تشخیص داده می‌شود (۴). در استرالیا ۵۰٪ از گله‌های گاو شیری به شکل تحت حاد به این عفونت مبتلا هستند و برآورد می‌شود سالیانه خسارتی بالغ بر ۶۰ میلیون دلار به صنعت دامپروری این کشور وارد می‌شود (۲۰). علاوه بر این، حدود ۱۵۷۰۰۰ گوساله، سالانه به علت عفونت‌های مایکوپلاسمایی تلف می‌شوند که این میزان بالغ بر ۹۹ میلیون پوند تخمین زده شده است (۸). عفونت مایکوپلاسمایی از ناحیه قوزک پا به غده پستانی وارد شده و سبب آلودگی و ورم پستان در این ناحیه می‌گردد (۱۶). این نوع ورم پستان در گاوداری‌های صنعتی بزرگ شایع است (۲). از علائم ورم پستان مایکوپلاسمایی می‌توان به تب شدید و واگیر اشاره نمود که باعث مقاومت در برابر درمان و یا کاهش اثر درمانی می‌شود که گاوها در طول عمرآلوده باقی مانده و به دفع باکتری به شکل متناوب ادامه می‌دهند و گوساله‌های جوان با خوردن شیر آلوده دچار عفونت غشای مخاطی دستگاه تنفسی، سیستم ادراری، تورم مفاصل، عفونت گوش داخلی و سپتی سمی می‌شوند (۱۸). کنترل ورم پستان مایکوپلاسمایی از طریق شناسایی، تشخیص، جداسازی و حذف گاوهای آلوده امکان پذیر است (۶ و ۱۰). تاکنون هیچ تحقیق و گزارشی مربوط به M. bovigenitalium درموارد اورام پستان بالینی در ایران انجام نشده است لذا این تحقیق به منظور جداسازی و شناسایی *مایکوپلاسما بووی جنیتالیوم* از موارد اورام پستان بالینی در گاوداری‌های صنعتی (قزوین، تهران، البرز، تبریز، سمنان، گلستان، مازندران، ری، ورامین و گرمسار) با روش‌های کشت و PCR صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

این تحقیق توصیفی در سال ۱۳۹۵ بر روی نمونه‌های شیر گاوهای مبتلا به ورم پستان بالینی (هنوز آنتی بیوتیکی دریافت نکرده بودند) در سطح ۲۲ گاوداری صنعتی انجام گرفت. نمونه‌ها در محیط انتقالی در کنار یخ و در دمای ۴ درجه سلسیوس، ظرف مدت کمتر از ۲۴ ساعت به آزمایشگاه مرجع مایکوپلاسما موسسه‌ی واکسن و سرم سازی رازی ارسال و با استفاده از دو روش کشت و PCR نسبت به جداسازی در سطح جنس و گونه مورد نظر اقدام گردید.

روش کشت

پس از ارسال نمونه‌ها به آزمایشگاه، ابتدا مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از هر نمونه به داخل ۵ میلی لیتر محیط PPLO براث جهت غنی‌سازی در شرایط گرمخانه ۳۷

درجه سلسیوس و Co2 دار برای یک دوره حدود ۲۴ ساعته نگهداری شدند. پس از اتمام غنی‌سازی، نمونه مورد نظر با استفاده از فیلترهای باکتریایی با قطر ۰/۴۵ میکرومتر به داخل لوله آزمایش حاوی ۵ میلی لیتر محیط PPLO براث انتقال داده شد (پاساژ اول). لوله-های آزمایش مجدداً در گرمخانه CO2 دار با دمای ۳۷ درجه سیلسیوس قرار داده شدند و هر ۲۴ ساعت یک بار به مدت ۳ الی ۵ روز وضعیت رشد نمونه، کنترل و بررسی گردید. پس از گذشت زمان مذکور، ۵۰۰ میکرولیتر از هر کدام از محیط‌های مایع، روی محیط PPLOآگار در پلیت کشت داده شد و به گرمخانه CO2دار منتقل و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت گرمخانه گذاری شد. محیط‌های کشت PPLO آگار هر روز با میکروسکوپ نوری و با بزرگنمایی x ۴ از نظر رشد و تشکیل پرگنه‌های مخصوص به شکل تخم مرغ نیمرو شده تحت بررسی قرار گرفتند.

استخراج DNA

۵۰۰ میکرولیتر از نمونه کشت مایع در میکروتیوپ ۱/۵ میکرولیتری به مدت ۱۵ دقیقه در rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. سپس مایع رویی را تخلیه کرده و به رسوب باقی مانده حدود ۱۰۰ میکرولیتر بافر لیز کننده اضافه گردید و در بن ماری ۵۶ درجه سلسیوس، به مدت ۲/۵ الی ۳ ساعت قرار داده شد. سپس نمونه خارج شد حدود ۲۰۰ میکرولیتر فنل اشباع شده به نمونه اضافه گردید و تکان داده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. مایع رویی با سمپلر کشیده و به تیوب جدید انتقال داده شد. هم حجم فاز رویی (۱۵۰ میکرولیتر) مخلوط فنل کلروفرم اضافه گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد. مایع رویی کشیده و به تیوپ جدید انتقال داده شد. هم حجم با مایع رویی (۱۵۰ میکرولیتر) کلروفرم اضافه گردید. تیوپ به خوبی تکان داده و به مدت ۱۵ دقیقه در rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. محلول رویی با سمپلر کشیده و به تیوپ جدید منتقل گردید. ۰/۱ حجم آن استات سدیم سه مولار اضافه کرده و به آرامی مخلوط شدند و دو برابر حجم (مجموع‌های نمونه و استات) به نمونه اتانول سرد اضافه گردید و به مدت ۱۵ الی ۲۰ دقیقه نمونه در فریزر ۲۰ - درجه سلسیوس قرار داده شد. سپس نمونه به مدت ۱۵ دقیقه در rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد. تیوب تخلیه شده و به آن ۲۰۰ میکرولیتر الکل ۷۰ درصد اضافه شد که به مدت ۵ دقیقه با rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. پس از تخلیه و خشک شدن، ۵۰ میکرولیتر آب مقطر به نمونه اضافه شد.

روش PCR

برای انجام PCR در آزمایش تشخیص جنس و گونه از یک روش در حجم‌های ۲۵ میکرولیتر استفاده شد. بدین صورت که در تشخیص گونه، ابتدا مواد مخلوط اصلی (Master Mix) شامل ۲/۵ میکرولیتر (PCR Buffer 10x)، ۲ میکرولیتر ($MgCl_2$25mM)، ۰/۵ میکرولیتر (dNTPs 10mM)، ۰/۳ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای اختصاصی (100pM)، ۰/۲۵ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase و ۱۶/۱۵ میکرولیتر آب دیونیزه و ۳ میکرولیتر DNA(با غلظت ۱/۹ نانوگرم) نمونه مورد نظر استفاده شد.

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده در واکنش PCRجهت شناسایی جنس مایکو پلاسما (۱۲)

Sequence 5´to 3´PCR product Target	primers
M1F: GCTGCGGTGAATACGTTCT 163 bp 16SrRNA M3R: TCCCCACGTTCTCGTAGGG	Mycoplasma Genus

جدول ۲: پرایمرهای مورد استفاده در واکنش PCR جهت شناسایی گونه مایکو پلاسما بووی جنیتالیوم (۱۱)

Sequence 5´to 3´PCR product Target	primers
MbgF: CGTAGATGCCGCATGGCATTTACGG 312bp 16SrRNA MbgR: CATTCAATATAGTGGCATTTCCTAC	Mycoplasma bovigeniyalium

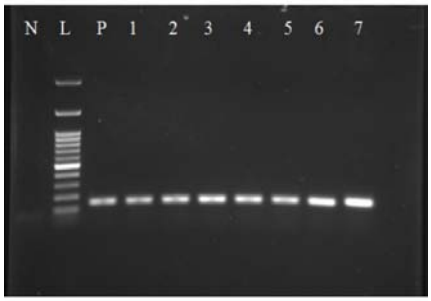
پس از افزودن اجزای PCR و آماده شدن نمونه‌ها، تیوپ‌ها در دستگاه ترموسایکلر با برنامه دمایی و زمانی زیر قرار داده شد: واسرشت اولیه ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴ دقیقه، سپس به دنبال آن ۳۸ چرخه دمایی که هر چرخه شامل ۹۴ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه، ۵۰ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه و ۷۲ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه که هرکدام به ترتیب اختصاص به مراحل واسرشت ثانویه، اتصال پرایمر و گسترش اولیه بود. مرحله نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۷ دقیقه صورت گرفت.

برای بررسی محصول PCR تکثیر شده از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد که با بافر TAE ساخته و با سایبر رنگ آمیزی شده بود، استفاده شد. پس از پایان مرحله الکتروفورز، ژل در دستگاه UVITEC-Gel Documentation تصویر برداری شده و مورد بررسی قرار گرفت.

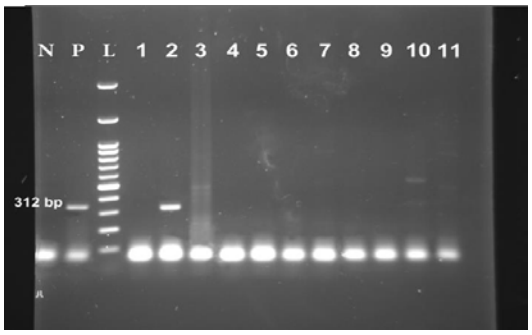
یافته‌ها

نتایج حاصل از کشت بر روی تعداد ۱۵۶ نمونه شیر گاو مبتلا به ورم پستان بالینی که از گاو داری‌های صنعتی جمع آوری شده بود نشان داد که از مجموع این نمونه‌ها که ابتدا در محیط PPLO براث (جهت غنی‌سازی و رشد) وسپس در محیط PPLO آگار جهت رشد وتشکیل کلنی کشت داده شدند، تعداد ۵۷ نمونه (۳۷٪) به عنوان نمونه‌ی مثبت جنس مایکوپلاسما تشخیص داده شد (شکل ۱). در آزمون PCR جنس *مایکوپلاسما*، از مجموع ۱۵۶ نمونه مورد مطالعه، ۶۲ (۴۰٪) نمونه مثبت و ۹۴ (۶۰٪) نمونه نیز منفی گزارش شدند. نتایج نمونه های مثبت با استفاده از روش PCR برای تشخیص جنس *مایکوپلاسما* با پرایمر مربوطه et (Akemi Kojima al. 1997) محصول PCR با باند 163bp را نشان داد (شکل ۲). اجرای روش PCR برای گونه *مایکوپلاسما بووی جنیتالیوم* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی گونه ((Kobayashi et al. 1998 با محصول PCR با باند ۳۱۲ bp صورت پذیرفت (شکل ۳). از مجموع ۶۲ نمونه‌ی جنس مثبت، ۱(۲٪) نمونه در آزمون PCR اختصاصی گونه مایکوپلاسما بووی جنیتالیوم مثبت و ۶۱ (۹۸٪) نمونه نیز منفی گزارش شدند. طوری که حدود ۴۰٪ از گاوداری‌ها، آلوده به مایکوپلاسما بودند که ۱۵٪ آن مربوط به شهر قزوین می‌باشد.

شکل ۱: تصویر میکروسکوپی (بزرگنمایی ۴) کلنی‌های *مایکوپلاسما* در محیط PPLO آگار



شکل ۲: بررسی محصول PCR جنس *مایکوپلاسما* بر روی ژل ۱ درصد: N کنترل منفی (محیط کشت بدون تلقیح باکتری)، L: مارکر (DNA Ladder100bp)،:P کنترل مثبت (باند نمونه استاندارد NCTC 10123 در ناحیه bp163)، باندهای ۱ تا ۷: نمونه‌های مورد آزمایش در این مطالعه.



شکل ۳: بررسی محصول PCR گونه *مایکوپلاسما بووی جنیتالیوم* بر روی ژل ۱٪: N: کنترل منفی (محیط کشت بدون تلقیح باکتری)، P: کنترل مثبت (باند نمونه استاندارد ATCC 14173 در ناحیه 312bp)، L: مارکر (DNA Ladder 100bp)، باند ۱ نمونه منفی، باند ۲ نمونه مثبت، باندهای ۳ تا ۱۱ نمونه‌های مورد آزمایش در این مطالعه.

بحث و نتیجه گیری

بر اساس نتایج این تحقیق، ۲٪ نمونه ها در آزمون PCR *مایکوپلاسما بووی جنیتالیوم* تشخیص داده شد که نشان می‌دهد این نوع ورم پستان در گاوداری‌های صنعتی شیوع پایینی داشته و به سختی از گله‌های آلوده جداسازی می‌شود با توجه به ایجاد خسارات اقتصادی در جمعیت های دامی و نیز تلاش هایی که در خصوص پیشگیری و کنترل این بیماری صورت گرفته است، آزمایشات معمول برای تشخیص جنس *مایکوپلاسما* که بر اساس روش های کلاسیکی مثل تست بیوشیمیایی و آزمایشات فلورسانت می باشند، سودمند است ولی دارای مشکلاتی از جمله وقتگیر بودن، دشوار بودن تفسیر نتایج و همچنین جواب‌های مثبت و منفی کاذب می‌باشند (۱۹). یکی دیگر از روش‌های شناسایی مایکوپلاسماها، روش کشت است که با توجه به کند رشد بودن این جنس بسیار زمان بر بوده و از سوی دیگر امکان تشخیص تفریقی گونه‌های مختلف *مایکوپلاسما* از روی بررسی کلونی‌ها امکانپذیر نمی‌باشد (۵). روش کشت علیرغم اینکه در مورد بسیاری از بیماری های عفونی یک روش طلائی و دقیق محسوب می گردد، در مورد جستجوی *مایکوپلاسما* در شیر بدلیل وجود مواد ممانعت کننده‌ی طبیعی یا مصنوعی و به دلیل نیاز به مواد افزودنی بسیار زیاد به محیط بسته به گونه‌ی *مایکوپلاسما*، ممکن است کمتر مصداق داشته باشد (۱ و ۲). نتایج مثبت روش کشت وابستگی زیادی به مرحله بیماری عفونی، نحوه و محل اخذ نمونه و شرایط انتقال نمونه و اجرای روش کشت دارد (۴). لذا در این مطالعه از روش دقیق PCR که دارای حساسیت و ویژگی بالاتری از لحاظ تشخیص می‌باشد، استفاده گردید.

در مطالعه‌ای که در شهرکرد با استفاده از روش کشت و PCR توسط Sharif zadeh و همکاران (۱۳۸۵) با هدف ارزیابی فراوانی مایکوپلاسما در مخازن شیر گاوداری های صنعتی و نیمه صنعتی صورت گرفت میزان آلودگی این مخازن به گونه‌ی *مایکوپلاسما بوویس* ۳/۳٪ و آلودگی به گونه‌ی *مایکوپلاسما آلکالسنس* ۴/۹٪ برآورد شد، در حالیکه مخازن شیر مورد مطالعه در این تحقیق آلودگی به گونه‌های *بووی رینیس* و *بووی جنیتالیوم* را نشان ندادند که نشان دهنده‌ی شیوع کم این دو گونه در گاوداری های ایران بوده و تا حدودی با نتایج ما مطابقت دارد (۱۷).

در مطالعه‌ای که توسط Roy و همکاران در سال ۲۰۰۷ با هدف " بررسی ورم پستان ناشی از مایکوپلاسما بووی جنیتالیوم انجام گرفت از دو روش کشت و PCR جهت شناسایی *مایکوپلاسما بووی جنیتالیوم* استفاده شد که این گونه در عفونت‌های پستانی جداسازی و شناسایی نگردید (۱۶).

در مطالعه‌ی دیگری که توسط Kobayashi و همکاران در سال ۱۹۹۸ انجام شد، جهت شناسایی سه گونه‌ی *مایکوپلاسما بووی جنیتالیوم*، *مایکوپلاسما آلکالسنس*، *مایکوپلاسما بووی رینیس* توسط پرایمرهای اختصاصی 16 SrRNAبرای هر گونه به روش PCR انجام شد که در این مطالعه برای شناسایی گونه بووی جنیتالیوم

پرایمرهای MbgF و MbgR استفاده گردید تناسب پرایمرهای طراحی شده بر پایه‌ی ژن16SrRNA برای تشخیص گونه‌های *مایکوپلاسما* قبلاً توسط وَن کوپولد و همکاران در سال ۱۹۹۴ نشان داده شده بود، همچنین Blast کردن پرایمرها در سایت NCBI اختصاصیت پرایمرهای مورد نظر را نشان داد، طوری که این پرایمرها از حساسیت و ویژگی بالایی برخوردار بوده و به طور اختصاصی قادر به شناسایی گونه‌ی *مایکوپلاسما بووی جنیتالیوم* بودند که در این تحقیق تنها یک جدایه از بین ۱۵۶ نمونه مورد مطالعه شناسایی گردید. (۱۱).

تشخیص گونه‌های *مایکوپلاسما بووی جنیتالیوم*، *مایکوپلاسما بووی رینیس*، *مایکوپلاسما آلکالسنس* و *مایکوپلاسما بوویس* در نمونه‌ی شیر حاصل از گاوهایی با علائم بالینی ورم پستان به روش PCR توسط Hirose و همکاران در سال ۲۰۰۱ صورت گرفت. در این مطالعه که در استرالیا انجام شد، در ۷٪ موارد به عنوان گونه *مایکوپلاسما بوویس* (۲ نمونه از ۳۰ نمونه) جداسازی شد، در حالیکه در ۷۰٪ از نمونه‌ها *مایکوپلاسما بووی رینیس* (در ۲۲ نمونه از ۳۰ نمونه) جدا شد و دو گونه‌ی *مایکوپلاسما بووی جنیتالیوم* و *مایکوپلاسما آلکالسنس* در هیچ یک از نمونه‌ها جداسازی نگردید (هیروس و همکاران ۲۰۰۱). نتایج حاصل از این تحقیق با نتایج مطالعه حاضر همخوانی داشته و نشان دهنده اهمیت کمتر این گونه‌ها در ایجاد بیماری ورم پستان بالینی نسبت به سایر گونه‌های *مایکوپلاسما* است (۷).

Zaitoun و همکاران در سال ۲۰۱۰ وجود عفونت مایکوپلاسمایی در شیر بوفالوهای دارای علائم بالینی ورم پستان در مصر را مورد مطالعه قرار دادند. در این مطالعه، نمونه‌های شیر ۱۲۵۰ بوفالوی شیری در شهرهای Sohag و Assiut در مصر، طی ژانویه ۲۰۰۲ تا سپتامبر ۲۰۰۷ جمع آوری شده و با استفاده از روش PCR مورد بررسی قرار گرفت. حدود ۲۰/۲۲٪ از نمونه‌ها از نظر وجود *مایکوپلاسما* مثبت اعلام شدند که درصد شیوع گونه‌های *مایکوپلاسما بووی جنیتالیوم*، *مایکوپلاسما بووی رینیس* و *مایکوپلاسما* آرژنینی در این نمونه به ترتیب برابر با ۵۸/۶۲٪، ۳۱/۰۳٪ و ۱۰/۳۵٪ گزارش شد. نتایج حاصل نشان داد مایکوپلاسما بووی جنیتالیوم گونه غالب و شایع در نمونه‌های ورم پستان تحت حاد و مزمن ناشی از مایکوپلاسما می‌باشد. بنابراین می‌توان گفت در هر منطقه با توجه به شرایط حاکم بر صنعت گاوداری، شرایط منطقه‌ای، مدیریتی و نیز نژاد گاو، ممکن است گونه‌ی شایع متفاوت باشد (۲۱).

Nadeem و Rahman در سال ۲۰۱۲، گونه‌های مایکوپلاسمای مؤثر در ایجاد ورم پستان در گاوهای شیری را مورد مطالعه قرار داده و نشان دادند شیوع بالای گونه‌ی *بوویس* نسبت به گونه‌های *مایکوپلاسما بووی جنیتالیوم*، *مایکوپلاسما دیسپار*، *مایکوپلاسما بووی رینیس* را ۳۳٪ به ۱۰٪ دارد که نشان دهنده اهمیت گونه‌ی بویس در مقابل سایر گونه‌ها است (۱۴).

مطالعه‌ای تحت عنوان " بررسی شیوع گونه‌های *مایکوپلاسما* در شیر گله‌های شیری شمال غرب پرتغال" در سال ۲۰۱۴ توسط Pinho و همکاران انجام شد. در این مطالعه شیر ۱۶۴ گاو شیری به صورت تصادفی از بین ۱۲۳۴ گاو جمع آوری شد. کشت *مایکوپلاسما* در حدود ۳٪ از گله مثبت بود که در تشخیص گونه‌ها تنها دو نمونه از نظر وجود *مایکوپلاسما بووی جنیتالیوم* و *مایکوپلاسما کانادنس* مثبت بوده و بقیه نمونه‌ها تاییدی بر حضور گونه‌ی *مایکوپلاسما بوویس* بود. نمونه های مثبت مربوط به گاوهایی با علائم خفیف ورم پستان و یا گاوهایی بدون بروز علائم بالینی این بیماری بودند که این نتایج دقت

تشخیص روش های مولکولی حتی قبل از بروز علائم بالینی به منظور کنترل به موقع آن را نشان می‌دهد (۱۵). تولید شیر با کیفیت، هدف اصلی صنعت گاو شیری و اولین هدف کنترل ورم پستان در گله‌های گاو شیری می‌باشد. گله‌هایی که توانسته‌اند ورم پستان را کنترل کنند، باید یک سیستم مراقبتی فعال جهت ارزیابی وضعیت عوامل بیماریزا در محیط دامداری برقرار نمایند (۴ و ۶). علی رغم شناخت اهمیت کنترل ورم پستان در گله‌ها، تاکنون دامداران نتوانسته‌اند این بیماری را کنترل کنند به طوریکه این بیماری به عنوان مهمترین و اساسی‌ترین مشکلات گاوداری‌های صنعتی در همه کشورها شناسایی شده است (۱۰).

با توجه به اینکه از بین ۱۵۶ نمونه شیر جمع آوری شده از گاوهای شیری با علائم بیماری ورم پستان جنس *مایکوپلاسما* برای تعداد ۶۲ نمونه (۳۹/۷۴٪) مثبت شد، این نتایج اهمیت *مایکوپلاسما* در ایجاد بیماری ورم پستان در منطقه‌ی مورد مطالعه نسبت به سایر باکتری‌های ایجاد کننده‌ی بیماری را نشان می‌دهد، از طرفی با توجه به اینکه *مایکوپلاسما بووی جنیتالیوم* در گله های شیری این کشور وجود دارد، نیاز به توجه بیشتر به این عامل پاتوژن در پروتکل‌های کنترل ورم پستان در سطح ملی و همچنین کنترل و نظارت بهداشتی در بحث واردات گاو و یا محصولات مرتبط با این صنعت را محرز می کند به عبارتی می‌توان گفت در پروتکل های مربوط به واردات یا صادرات گاو یکی از عواملی که حتماً باید در نظر گرفته شود تست‌های تشخیصی جنس *مایکوپلاسما* و به ویژه گونه‌ی *مایکوپلاسما بووی جنیتالیوم* است. و همچنین در پروتکل‌های درمانی ورم پستان مایکوپلاسمایی، در صورت نیاز به تشخیص تفریقی جهت انجام اقدامات درمانی اولین گونه‌ای که باید مورد توجه قرار گیرد، گونه‌ی *مایکوپلاسما بووی جنیتالیوم* می‌باشد.

تشکر و قدردانی

هزینه های این مطالعه از محل اعتبارات طرح شماره ۸۷۰۴۳- ۱۸-۱۸-۲ موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی تامین و پرداخت شده است. بدین وسیله از معاونت آموزش و تحقیقات سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی وزارت جهاد کشاورزی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی تشکر و قدردانی می شود. همچنین از دکتر بابک خیرخواه و همچنین از همکاری های صمیمانه دکتر عباس اشتری ، دکتر محسن ایماندار ، سرکار خانم سلیمه آهنگران سپاسگزاری می گردد.

References

1. Bushnell, RB. (2005). *Mycoplasma* mastitis: a review of Transmission and Control. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. **52**: 153-160.
2. Cullor, J. S., Tyrer, J. W. (2002). Large animal internal medicine,3th ed. *Mosby Company*. 1012-1032.
3. Fox, L. K., Kirk, J. H., Britten, A. (2005). *Mycoplasma* mastitis. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health*. **52**:153-160.
4. Ghadersohi, A., Hirst, R. G., Frobes, J., Coelen, R. G. (1999). Preliminary studies on the prevalence of *Mycoplasma bovis* mastitis in dairy cattle in Australia. *Veterinary Microbiology* **65**:185-94.
5. Gonzalez, R. N., Wilson, D. J. (2003). *Mycoplasma* mastitis in dairy herds. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. **19**:199-221.
6. Hale, H., Helmboldt, CF., Plastridge, W. N., Stula, E. F. (1962). Bovine mastitis caused by a *Mycoplasma* species. *Cornell University College of Veterinary Medicine*: 582-591.
7. Hirose, K., Kawasaki, Y., Kotani, K., Tanaka, A., Abiko, K., Ogawa, H.

(2001). Detection of *Mycoplasma* Milk by PCR Analysis and Culture Method. *Journal of Veterinary Medical Science* **63**: 691-693.

8. Htzel, H., Heller, M., Sachse, K. (1999). Enhancement of *Mycoplasma bovis* detection in milk samples by antigen capture prior to PCR. Molecular and Cellular Probes **13**:175-178.
9. Jasper, D. E. (1981). Bovine *mycoplasma* mastitis. *Veterinary Science and Comparative Medicine* **25**:121-57.
10. Kirk, J. H., DeGraves, F., Riddell, F., Tyler, J. W. (1992). *Mycoplasma* mastitis in Alabama. *Alabama Veterinary Medical Association* 3:29.
11. Kobayashi, H., Hirose, K., Worarach, A. (1998). In vitro amplification of the 16S rRNA genes from *Mycoplasma bovirhinis*, *Mycoplasma alkalescens* and *Mycoplasma bovigenitalium* by PCR. *Journal of Veterinary Medical Science* **60**: 1299-1303.
12. Kojima, A., Takahashi, T., Kijima, M., Ogikubo, Y., Nishimura, M., Nishimura, S., et al. (1997). Detection of *Mycoplasma* in Avian Live Virus Vaccines by Polymerase Chain Reaction. *International Association of Buddhist Studies*. **25**: 365-371.
13. Kumar, A., Garg, D. N. (1991). Isolation of *mycoplasma* F-38 from the milk of matitic cows. *Veterinary Record*. **128**: 429 -441.
14. Nadeem, S., Rahman, S. U. (1996). Rapid Detection of *Mycoplasma Bovis* from Mastitis Milk Samples of Buffalo Using Polymerase Chain Reaction. *Journal of Applied Microbiology*. **80**:505-10.
15. Pinho, L. G., Thompson, M., Carvalheira, J. (2013). Management practices associated with the bulk tank milk prevalence of *Mycoplasma* spp. in dairy herds in Northwestern Portugal. *Preventive Veterinary Medicine* 1; **108**:21-7.
16. Roy, J. P., Francoz, D., Labrecque, O. (2008). Mastitis in a 7-week old calf caused by *Mycoplasma bovigenitalium*. *The Veterinary Journal*. **176**:403-404.
17. Sharifzadeh, A., Hassani Tabatbaei, A., pourbakhsh, S. A. (2006). Study on frequency of *Mycoplasma* in Bulk Tank Milks of Industrial and Semi-Industrial Dairy Farms at Shahrekord by culture and PCR Methods. *Iranian Journal of Veterinary Research*. 395-402.
18. Thomas, C. B., Willeberg, P., Jasper, D. E. (1981). Case-control study of bovine *mycoplasma* mastitis in California Am. *American journal of veterinary research*. **42**: 511-515.
19. Tully, J. G., Bove, J. M., Laigret, F., andwhitcomb, Rf. (1993). Revised taxonomy of the class Mollicutes: Proposed elevation of a monophyletic cluster of arthro associated Mollicutes to ordinal rank, with provision for familial rank to separate species with nonhelical morphology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **43**: 378-385.
20. Van den Bush, T. J., Rosenbusch, R. F. (2003). Characterization of the immune responseto *Mycoplasma bovislung infection*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 15; **94**:23-33.
21. Zaitoun, A. M. A. (2009). Molecular detection of *mycoplasma* infection in milk of clinically mastitic buffaloes. *Assiut Veterinary Medical Journal* **55**: 191-205.

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 14, Issue1, 2018

Isolation and Identification of *Mycoplasma bovigenitalium* from bovine milk suffering of clinical mastitis by culture and PCR methods

Masoumali Nejad, Z.[1], Pourbakhsh, S.A.[*2]

1. M.Sc Graduated in Department ofMicrobiology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Sirjan, Iran
2. Professor of Department of Microbiology, Mycoplasma reference laboratory, Razi vaccine and serum research institute, Karaj, Iran

Received Date: 18 may 2017 *Accepted Date: 1 November2017*

Abstract:*Background and Objectives: Mycoplasma bovigenitalium is one of the mastitis-causing pathogen in dairy cows. The complications of the disease arereduced feeding, changes in the quality and consistency ofits stiffness, swelling Cartier, arthritis, infection of the mucous membranes of the respiratory tract, urinary tract, ear infections and septicemia. The purpose of this study was to Isolation and Identification of Mycoplasma bovigenitalium from bovine milk suffering of clinical mastitis by culture and PCR methods.Materials and methods:In this descriptive study, 156 samples of milk collected from cows with clinical signs of mastitis in dairies industry. Samples were cultured in PPLO broth and PPLO agar. The bacteria DNAs were extracted by phenol/ chloroform method. The PCR assey applied for detection of M. bovigenitalium by molecular method used MbgF, MbgR specific primers.Results: In the culturing method from 156 samples, 57 (37%) samples were reported to be positive for Mycoplasmaand 5 (3%) were suspected to be positive.In the PCR test from 156 samples, 62 (40%) samples were positive for Mycoplasma. In the specific PCR test, 1 (2%) of these specimens were positive for Mycoplasma bovigenitalium.*
Conclusion: The use of the molecular method of PCR showed that it is a rapid diagnostic method with high sensitivity and specificity, which is used as a classical method.

Keywords: Mycoplasma bovigenitalium, PCR, Mastitis

**Corresponding author: Pourbakhsh, S.A.*
Address: Department of Microbiology, Mycoplasma reference laboratory, Razi vaccine and serum research institute, Karaj, Iran. Tel: +98 9121325411
Email: poursaba@yahoo.com