

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

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 مایکوپلازما، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات: poursaba@yahoo.com

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

چکیده

مایکوپلازما بویس از عوامل اصلی ایجاد پنومونی، ورم پستان و آرتريت مایکوپلازمائی در گاو می‌باشد. هدف از این مطالعه، شناسایی مایکوپلازما 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 مایکوپلازمای مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی ارجاع می‌شد، اجرا گردید. نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سلسیوس و در مدت کمتر از ۲۴ ساعت به آزمایشگاه ارسال و به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه می‌شدند و پس از فیلتر شدن به محیط اختصاصی PPLO، در انکوباتور CO₂ دار به مدت ۷-۱۰ 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 مایکوپلازما بر اساس ژن *16SrRNA* و برای تشخیص گونه بویس از جستجوی وجود ژن *uvrC* استفاده گردید. از تعداد ۳۲۸ نمونه، ۵۸ مورد (۱۷/۶۹ درصد) در محیط کشت PPLO مثبت شناخته شدند. از نظر حضور ژن مربوط به جنس مایکوپلازما، تعداد ۹۷ نمونه (۲۹/۵۷ درصد) مثبت شناخته شدند که از این تعداد، ۱۴ نمونه (۴/۲۶ 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 مایکوپلازما بویس در نمونه‌های شیر معرفی کرده و نشان داد که میزان حضور مایکوپلازما 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: مایکوپلازما بویس، ژن *uvrC*، ورم پستان، گاو، PCR.

مقدمه

بیماری‌های ناشی از مایکوپلازماها 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 مایکوپلازما 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. فیروز منتشر و آسیب‌های گرانولوماتوزی حاوی چرک، از علایم بارز درمانگاهی ابتلا به ورم پستان ناشی از مایکوپلازما بویس می‌باشد (Mosaferi and Haghghat, 2003).

مایکوپلازما بویس برای اولین بار توسط هاله و همکاران، در سال ۱۹۶۱ 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، مایکوپلازما 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

مایکوپلازما بویس عامل مایکوپلازما سموز گاوی و از عوامل اصلی بروز ورم پستان، پنومونی و آرتريت گاو در سراسر جهان می‌باشد که به ندرت باعث ایجاد عفونت گوش میانی، آبسه‌های زیرجلدی، مننژیت، تورم ملتحمه چشم و پلی‌آرتريت 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، آندومتریوت و سالپنژیت نیز گزارش شده است (Nicholas and Ayling, 2003). گاو به عنوان میزبان اختصاصی مایکوپلازما بویس عمل می‌کند، هرچند جدایه‌هایی از این باکتری در گاو‌میش، نشخوارکنندگان کوچک و حتی در انسان یافت شده است (Ghadersohi, 1997). در ابتدا مایکوپلازما بویس تحت عنوان مایکوپلازما آگالاکتیه وارپته بویس طبقه‌بندی می‌گردید (McAuliffe *et al.*, 2006)، اما بعدها مشخص شد که بر اساس تجزیه و تحلیل مقایسه‌ای توالی ژن *16SrRNA*، شباهت ۹۹/۷۴ درصدی بین دو گونه بویس و آگالاکتیه وجود دارد و به عنوان یک گونه مجزا دسته‌بندی و معرفی گردید (Foddai *et al.*, 2005).

مایکوپلازما 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).

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 پلیمرز (polymerase chain reaction; PCR) برای تشخیص مایکوپلازما بویس در نمونه‌های بالینی ضروری به نظر می‌رسد (Foddai et al., 2005; Rossetti et al., 2010). تکنیک PCR برای شناسایی عامل مایکوپلازما بویس از ورم پستان به طور کامل در سال ۱۹۹۷ مورد استفاده قرار گرفت و اثبات شد که برای تشخیص ورم پستان مایکوپلازمایی 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 ساکنس‌ها می‌باشد که به عنوان ژن هدف در تشخیص جنس باکتری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. پرایمرهای این ژن نسبت به این مناطق حفاظت شده اختصاصی‌اند و می‌توانند یک جنس خاص را مورد شناسایی قرار دهند. دانشمندان از روش PCR بر پایه تکثیر توالی‌های *16SrRNA* استفاده نموده‌اند که می‌تواند مایکوپلازماها را در سطح جنس تشخیص دهد (Hirose et al., 2001). جهت تشخیص مایکوپلازما بویس بایستی از یک جایگاه ژنی که بتواند آن را در حد گونه و به شکل اختصاصی تر تشخیص دهد، استفاده شود. با کاربرد ژن *uvrC* در مطالعات مختلف ثابت شده است که این ژن برای تفریق گونه بویس از سایر گونه‌های مایکوپلازما بسیار مفید است (Foddai et al., 2005). ژن *uvrC* 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).

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 (Fu et al., 2014)، و شرق آسیا مانند چین (Ahmad et al., 2014) (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 ۴۸/۶۷ 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 مایکوپلازما بویس وجود ندارد، لذا وجود روش‌های آزمایشگاهی ضروری می‌باشد. روش‌های تشخیص مایکوپلازما بویس عمدتاً به سه بخش کشت مستقیم باکتری روی محیط‌های اختصاصی، روش‌های سرولوژی و مولکولی تقسیم می‌شود. جداسازی و شناسایی مایکوپلازما 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 ۱۴-۱۰ روز پس از شروع علائم بالینی می‌توان آنتی‌بادی علیه مایکوپلازما بویس را ردیابی نمود. این روش‌ها بسیار

Thomas et al., 2004). بنابراین، هدف از این مطالعه، شناسایی مایکوپلازما بویس از موارد اورام پستان بالینی در گاوداری‌های صنعتی با استفاده از کشت و روش PCR بر اساس ژن‌های *I6SrRNA* و *uvrC* بود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه در فاصله سال‌های ۱۳۹۴ لغایت ۱۳۹۵ روی تعداد ۳۲۸ نمونه شیر گاو مبتلا به ورم پستان بالینی که در طول یک سال به آزمایشگاه مرجع مایکوپلازما 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 علائم بالینی ورم پستان را از خود نشان می‌دادند، نمونه‌گیری از شیر به عمل می‌آمد. سپس نمونه‌ها در کنار یخ (دمای ۴ درجه سلسیوس) و حداکثر تا ۲۴ ساعت به آزمایشگاه رفرانس مایکوپلازما مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی واقع در حصارک کرج ارسال می‌شدند.

پس از جداسازی عامل و کشت خالص در محیط اختصاصی PPL0 (BBL, Becton Dickinson and Company, Cockeysville, 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 مایکوپلازما مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی 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 مایکوپلازما 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 *I6SrRNA* مایکوپلازما جهت ردیابی جنس مایکوپلازما و قطعه ژنی *uvrC* اختصاصی گونه مایکوپلازما بویس به عنوان پرایمرهای هدف استفاده شدند (جدول ۱). به منظور بهینه‌سازی روش PCR، مقادیر و غلظت‌های مختلفی از $MgCl_2$ ، dNTPs، DNA ژنومی و همچنین دماهای مختلف برای اتصال پرایمرها مورد استفاده قرار گرفتند. در خصوص ژن *I6SrRNA*، واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل بافر PCR (10X) ۲/۵ میکرولیتر، dNTPs ۰/۵ میکرولیتر، پرایمرهای M₁F و M₃R هر کدام به مقدار ۰/۱ میکرولیتر، ۰/۲۵ واحد آنزیم Taq پلیمرز، ۲ میکرولیتر $MgCl_2$ ، 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 میکرولیتر شامل بافر PCR (10X) ۲/۵ میکرولیتر، ۲ میکرولیتر $MgCl_2$ ، dNTPs ۱ میکرولیتر، پرایمرهای MbouvrC-R و MbouvrC-L هر کدام ۰/۴ میکرولیتر،

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 مایکوپلازما بویس PG45 ATCC25523 موجود در آزمایشگاه رفرانس مایکوپلازما مؤسسه رازی و کنترل منفی PPLO Broth در نظر گرفته شد. جهت تأیید نهایی، محصول به دست آمده برای تعیین توالی ارسال گردید.

۰/۳ واحد آنزیم Taq پلیمرز، 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.

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

منبع	طول محصول PCR	سکانس (۵'–۳')	ژن هدف	نام پرایمر	مشخصات پرایمرها
Kojima et al., 1997	163bp	GCTGCGGTGAATACGTCT	<i>16SrRNA</i>	M ₁ F	پرایمرهای جنس
		TCCCCACGTTCTCGTAGGG		M ₃ R	
Subramaniam et al., 1998	1626bp	TTACGCAAGAGAATGCTTCA	<i>uvrC</i>	MbouvrC-L	پرایمرهای گونه
		TAGGAAAGCACCTATTGAT		MbouvrC-R	

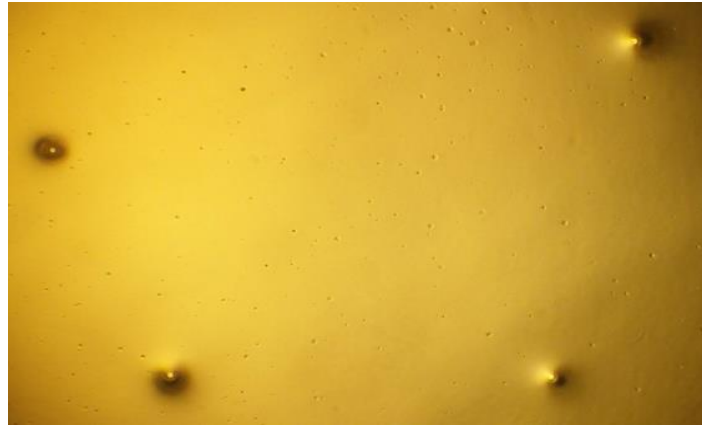
(CA, USA) تصویر تهیه گردید. پس از خالص‌سازی، محصولات PCR به دست آمده جهت تعیین توالی نوکلئوتیدی به شرکت Bioneer گره جنوبی ارسال و گونه مایکوپلازما بویس تأیید گردید.

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. Transilluminator (BioRad, Hercules,)

یافته‌ها

از تعداد ۳۲۸ نمونه شیر اخذشده، ۵۸ نمونه (۱۷/۶۹ درصد) از نظر رشد در محیط کشت PPLO

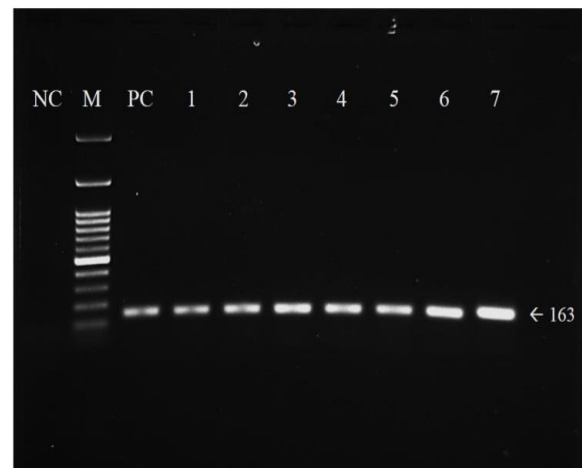
آگار مثبت شدند و پرگنه‌های شبیه تخم‌مرغ نیم‌رو شده در زیر میکروسکوپ نوری را از خود نشان دادند (شکل ۱).



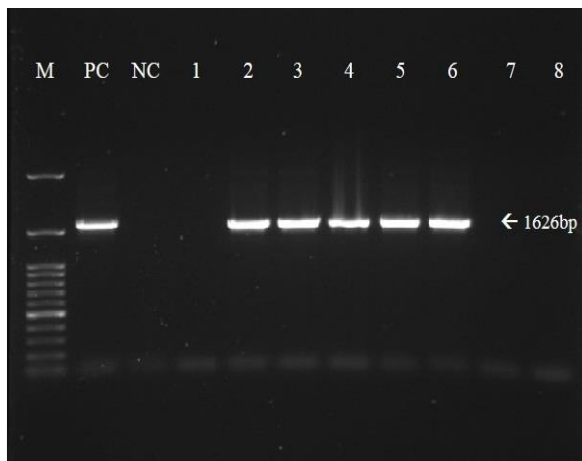
شکل ۱- کلونی‌های مایکوپلاسما بویس بر روی محیط کشت PPLO آگار (درشت‌نمایی ۴×).

از تعداد کل نمونه‌ها، از نظر حضور ژن مربوط به جنس مایکوپلاسما در آزمون PCR، تعداد ۹۷ نمونه (۲۹/۵۷ درصد) مثبت باند ۱۶۳ 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، ۱۴ نمونه (۴/۲۶ درصد) از نظر حضور ژن *uvrC* مثبت شدند (شکل ۳).



شکل ۲- تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR با آغازگر اختصاصی جنس مایکوپلاسما که باند ۱۶۳ bp در تعداد ۷ نمونه جنس مثبت مشاهده می‌شود. M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، PC: کنترل مثبت (*M. bovis* PG45)، NC: کنترل منفی.



شکل ۳- تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR با آغازگر اختصاصی گونه *uvrC* مایکوپلاسما بویس که باند ۱۶۲۶ 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.

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 ۴).

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).

جدول ۲- فراوانی نمونه‌ها بر اساس نتایج کشت و PCR جنس مایکوپلاسما

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



شکل ۴- Blast و Alignment یکی از جدایه‌های بدست آمده مایکوپلاسما بویس در سایت جهانی NCBI

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

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

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 مایکوپلازما 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). از بین ۱۷ گله شیری، ۱۷۲ گاو مبتلا به ورم پستان مایکوپلازمایی را با روش PCR تشخیص دادند که از این تعداد، ۱۴۹ نمونه از لحاظ مایکوپلازما بویس مثبت گزارش گردید. در این مطالعه، مایکوپلازما بویس به عنوان مهم‌ترین عامل عفونت ورم پستان مایکوپلازمایی در گاوها شناسایی شد (Sayin *et al.*, 2016).

تست‌های مولکولی بر پایه استفاده از پرایمرهای اختصاصی، از شانس بالایی برای تشخیص ارگانیزم 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 مایکوپلازما 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 مایکوپلازما بویس

دیگر متفاوت است. در مطالعه مشکلائی و همکاران در سال ۲۰۱۱، آزمایش PCR که بر پایه تکثیر قطعه ژنومی *16SrRNA* و تولید باندهای ۲۷۶ جفت‌بازی و با هدف بررسی میزان شیوع ورم پستان تحت‌بالینی در گله‌های شیری استان چهارمحال و بختیاری انجام گرفت، میزان شیوع ورم پستان مایکوپلازمایی ۴۸/۶۷ درصد گزارش گردید (Moshkelani *et al.*, 2011). در مطالعه دیگری که در منطقه مغان اردبیل و روی ۸۰ نمونه شیر اخذ شده 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 مایکوپلازمایی در تعدادی از گله‌های گاو شیری اطراف مشهد، میزان آلودگی ورم پستان مایکوپلازمایی 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 (Khan Garousi *et al.*, 2006).

ارزیابی روش‌های کشت و PCR در مورد مایکوپلازماها با استفاده از ژن‌هایی برای تعیین جنس و تشخیص گونه مایکوپلازما 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 مایکوپلازما بویس موجود در شیری که ۲ سال

دو روش کشت در محیط PPL0 و روش Nested-PCR استفاده گردید. در این مطالعه، تنها ۱ رأس گاو به عنوان نمونه مایکوپلازما 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 ۴ 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 مایکوپلازما بود. سپس نمونه‌های مثبت به دست 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 (Karahana et al., 2010).

در مطالعه حاضر، نمونه‌های شیر از گاوهای مبتلا به ورم پستان بالینی اخذ گردید، هر چند که مایکوپلازما بویس سبب ورم پستان تحت‌بالینی و مزمن در گاو نیز می‌گردد. فوکس و همکاران در سال ۲۰۰۸، مایکوپلازما 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 ۲۳۶ نمونه و با استفاده از روش‌های CMT، ELISA و PCR انجام گرفت، میزان آلودگی با مایکوپلازما بویس در موارد ورم پستان بالینی ۱۴/۷۳ درصد و تحت بالینی ۹/۰۹ درصد گزارش شد (Osman et al., 2008).

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 مایکوپلازما بویس به طور مستقیم از شیر و نمونه‌های بافتی و بدون نیاز به روش استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفت (Rossetti et al., 2010).

در این مطالعه بررسی میزان آلودگی نشان داد از تعداد ۹۷ نمونه مثبت مایکوپلازما، ۱۴ نمونه معادل ۲۹/۵۷ درصد به گونه مایکوپلازما بویس تعلق دارند. مقایسه نتایج مطالعه حاضر با سایر نقاط جهان نشان داد میزان آلودگی بسیار متفاوت می‌باشد، طوری که 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 ۲۴۴ 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 مایکوپلازما منفی بودند. این مطالعات، نیوزیلند را به عنوان یک منطقه عاری از این ارگانیزم 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 مایکوپلازما بویس انجام گرفت، از

پژوهش‌های متعدد در جهان، مایکوپلازما بویس را به‌عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل ایجادکننده 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 مایکوپلازما بویس در نمونه‌های تنفسی و شیر گاوها با روش Real-time PCR معادل ۲/۴ درصد برآورد گردید (Cai et al., 2005). در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۱ در جنوب شرقی فرانسه که با هدف ارزیابی میزان شیوع مایکوپلازما بویس در موارد ورم پستان بالینی به‌وسیله روش کشت و PCR بر روی ۸۲۸ نمونه شیر انجام گرفت، میزان آلودگی گاوهای شیری ۰/۴۴ درصد (کمتر از ۱ درصد) اعلام شد. نتایج نشان داد که میزان عفونت پستان با مایکوپلازما بویس در فرانسه بسیار ناچیز می‌باشد (Arcangioli et al., 2011). مقایسه یافته‌های تحقیق حاضر با این مطالعات نشان داد میزان آلودگی کمتر از کشورهای مثل انگلستان و بیشتر از میزان مشابه آن در کانادا و فرانسه می‌باشد.

مطالعه حاضر اولین گزارش در خصوص شناسایی مولکولی مایکوپلازما 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، به‌عنوان یک تکنیک سریع و قابل اعتماد جهت تشخیص مایکوپلازما بویس معرفی کرد و نشان داد مایکوپلازما 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 مایکوپلازما 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 مایکوپلازما بویس مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی به‌دلیل همکاری بی‌شائبه‌شان و همچنین حوزه معاونت تحقیقات و فن‌آوری این مؤسسه به‌دلیل حمایت مالی، ارائه امکانات و تجهیزات آزمایشگاهی جهت انجام این پژوهش سپاسگزاری نمایند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافی ندارند.

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 Continuous Education Practice Veterinary*, 16: 541-551.

- 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., Bolotovskii, 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 Haghghat 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., Ash, 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.

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 CO₂ 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. Ninety-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.