

بررسی میزان شیوع عفونت‌های مایکوپلاسمایی در التهاب قرنیه و ملتحمه عفونی گاو

افشین رئوفی^۱، پرهام متقیان^{۱*}، امید مددگار^۲، آریا بدیعی^۳

چکیده

التهاب قرنیه و ملتحمه عفونی گاو شایع‌ترین بیماری چشمی گاوها در سرتاسر جهان می‌باشد. افزون بر موراکسلا بویس بعنوان عامل اصلی بیماری، ویروس رینوتراکتیک عفونی گاو و گونه‌های مایکوپلازما به احتمال بعنوان مهم‌ترین عوامل خطر ساز در التهاب قرنیه و ملتحمه عفونی گاو مطرح می‌باشند. این مطالعه با هدف بررسی میزان شیوع گونه‌های مایکوپلازما در کیسه ملتحمه گاوهای شیری و ارتباط آن با مراحل مختلف التهاب قرنیه و ملتحمه عفونی انجام شد. مجموعاً ۶۰ نمونه از چشم‌های مبتلا و سالم از گاوداری‌های صنعتی شیری در طی همه‌گیری‌های بیماری اخذ شد. واکنش زنجیره ای پلیمرز جهت ارزیابی حضور گونه‌های مایکوپلازما در کیسه ملتحمه بکار گرفته شد. در این مطالعه، در بین موارد مثبت حاصله در آزمون PCR، ۶۱/۸٪ را مبتلایان و ۳۸/۲٪ را موارد سالم تشکیل می‌دادند. از این بین به ترتیب ۲۳/۸٪ به التهاب ملتحمه، ۳۳/۳٪ به التهاب قرنیه و ۴۲/۹٪ به زخم قرنیه مبتلا بودند. همچنین چشم‌های مبتلا نسبت به چشم‌های سالم درصد بالاتری از موارد مثبت مایکوپلازما را دارا بودند، هر چند این اختلاف از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. افزون بر آن، در بین موارد مثبت، موارد شدیدتر درصد بالاتری داشتند. بنابراین عفونت با گونه‌های مایکوپلازما ممکن است در پاتوژنز و شدت ضایعات مرتبط با التهاب قرنیه و ملتحمه عفونی گاو نقش داشته باشند.

واژگان کلیدی: مایکوپلازما، التهاب قرنیه و ملتحمه عفونی، گاو شیری

تاریخ دریافت: ۹۴/۷/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۱/۲۵

مقدمه

التهاب قرنیه و ملتحمه عفونی گاو (چشم صورتی، IBK) شایع‌ترین بیماری چشمی گاوهاست و در سرتاسر جهان مشاهده می‌شود. مبتلایان زخم قرنیه، ادم قرنیه، ترس از نور، بلغارواسپاسم و ریزش اشک را نشان می‌دهند. تحریک چشم با نور آفتاب شدید، گرد و غبار، گرده و دانه و داسه‌های گیاهان علوفه‌ای از عوامل مهم مستعد کننده‌ی عفونت به شمار

می‌روند (۲ و ۳). عامل اصلی بیماری کوکو باسیل گرم منفی، موراکسلا بویس (*Moraxella bovis*) می‌باشد. سایر عوامل نظیر موراکسلا اویس (*Moraxella ovis*)، مایکوپلازما بووکولی (*Mycoplasma bovoculi*) و گونه‌های کلامیدیا نیز مد نظر قرار گرفته اند (۱۵ و ۱). گونه‌های مایکوپلازما به تنهایی در غیاب موراکسلا بویس یا به همراه آن ممکن است سبب بروز کوئزونکتیویت در گاوان شوند و بنابراین ممکن است شدت بیماری را افزایش داده و در پاتوژنز آن نقش داشته باشند (۸ و ۶). در بین گونه‌های مایکوپلازما، مایکوپلازما بووکولی و مایکوپلازما بویس به تنهایی از سواب‌های چشمی مبتلایان جدا شده‌اند (۱۰ و ۷). سایر گونه‌ها مثل مایکوپلازما آرژینینی (*Mycoplasma arginini*) ممکن است جدا شوند اما به نظر نمی‌رسد در ایجاد بیماری نقش داشته باشند (۵). گونه‌های بوویژنیتالوم (*Mycoplasma bovigenitalium*)، بوری راینیس (*Mycoplasma bovirhinis*) و بووکولی از گاوان گله‌های مبتلا به کوئزونکتیویت و برونکوپنومونی جدا شده‌اند (۹). در حقیقت چون تمامی آزمایشگاه‌های تشخیصی بطور معمول جداسازی مایکوپلازماها را انجام نمی‌دهند، شیوع مایکوپلازماها نامشخص می‌باشد.

Levisohn و همکاران (۲۰۰۴) مایکوپلازما بووکولی و مایکوپلازما بویس را از سواب‌های اخذ شده از ملتحمه گوساله‌های جوان مبتلا به التهاب قرنیه و ملتحمه عفونی جدا کردند. در این همه‌گیری، گونه‌های موراکسلا و دیگر باکتری‌های مرتبط جدا نشدند (۷). بر اساس مطالعه Schnee

* ۱- گروه بیماری‌های داخلی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران (p.mottaghian@ut.ac.ir)

۲- گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۳- گروه علوم بالینی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران

بالینی، ۲) التهاب قرنیه و ملتحمه بدون وجود زخم قرنیه، ۳) التهاب قرنیه و ملتحمه همراه با زخم قرنیه قابل مشاهده (بدون استفاده از رنگ‌آمیزی فلورسئین).

نمونه‌ها یا استفاده از سواب پنبه ای استریل که با محلول نرمال سالین استریل مرطوب شده بود، از کیسه ی ملتحمه چشم دام‌ها اخذ شد و درون لوله‌ای استریل حاوی ۱/۵ میلی‌لیتر فسفات بافر سالین در جوار یخ به آزمایشگاه منتقل و در دمای منفی هفتاد درجه‌ی سلسیوس ذخیره شدند.

کیت DNPTM سیناژن جهت استخراج DNA گونه‌های مایکوپلازما از نمونه‌های اخذ شده بکار گرفته شد. نمونه‌های منجمد در دمای اتاق ذوب شدند و بر اساس دستورالعمل سازنده محتوی DNA آن‌ها استخراج گردید. کیت واکنش زنجیره ای پلیمرز (پی سی آر) سیناژن جهت تشخیص جنس مایکوپلازما بکار گرفته شد. بطور خلاصه، ۵ میکرولیتر از محلول DNA استخراج شده با ۲۰ میکرولیتر میکس PCR و ۰/۲ میکرولیتر Taq DNA مخلوط می‌شد. برنامه ی حرارتی با استفاده از دستگاه ترموسایکلر MJ Mini - Bio-RadTM (thermal cycler) به شرح زیر انجام شد: ۲ دقیقه در ۹۴ درجه سلسیوس و متعاقباً ۳۵ سیکل شامل ۱۵ ثانیه در ۹۴ درجه سلسیوس، ۱۵ ثانیه در ۵۲ درجه سلسیوس و ۳۵ ثانیه در ۷۲ درجه سلسیوس و نهایتاً یک دوره‌ی ۵ دقیقه‌ای در ۷۲ درجه سلسیوس. در پایان محصولات PCR به میزان ۱۰ میکرولیتر با استفاده از ژل آگاروز ۱/۵٪ الکتروفورز و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید و نوردهی با اشعه‌ی ماورای بنفش تحت ارزیابی قرار گرفتند. مشاهده‌ی قطعات با اندازه‌ی ۲۸۰ bp بعنوان نتیجه‌ی مثبت تلقی شد. تعدادی از نمونه‌های مثبت با استفاده از آنالیز توالی نوکلئوتیدها تایید شدند. ارزیابی آماری با استفاده از نرم افزار SPSS 20.0 انجام شد. آزمون کای مربع جهت بررسی وجود اختلاف آماری بین متغیرهای مختلف بکار گرفته شد.

و همکاران (۲۰۱۴) گله‌های با شیوع بالای مایکوپلازما بووکولی بیشتر مستعد همه‌گیری التهاب قرنیه و ملتحمه عفونی گاوان هستند (۱۳). با این وجود، در مطالعه Schottker-Wegner و همکاران (۱۹۹۰) وجود ارتباط بین یافته‌های بالینی و جداسازی مایکوپلازما مشاهده نشد (۱۴). Gupta و همکاران (۲۰۱۵)، نیز اخیراً با استفاده از آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) حضور گونه‌های مایکوپلازما را در مبتلایان به التهاب قرنیه و ملتحمه عفونی گاوان ارزیابی کرده بودند (۴). همانطور که ذکر گردید تاکنون تعدادی مطالعه جهت آشکار ساختن نقش مایکوپلازماها در پاتوژنز التهاب قرنیه و ملتحمه عفونی گاوان انجام شده است. در مطالعه ی حاضر برای اولین بار در ایران واکنش زنجیره‌ای پلیمرز جهت ارزیابی حضور گونه‌های مایکوپلازما در کیسه‌ی ملتحمه‌ی گاوهای مبتلا به التهاب قرنیه و ملتحمه عفونی و گاوهای سالم انجام شد. افزون بر آن، ارتباط بین عفونت با گونه‌های مایکوپلازما و شدت نشانه‌های بالینی مورد ارزیابی قرار گرفت.

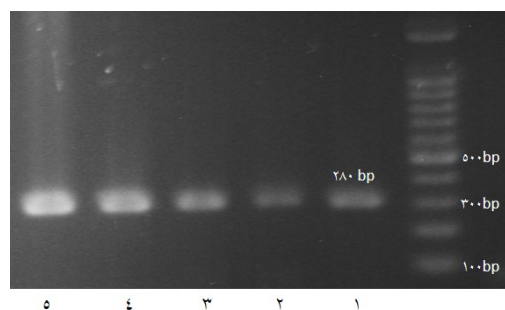
مواد و روش کار

نمونه‌ها از گاوداری های شیری صنعتی مختلف در سطح استان‌های تهران و البرز در طی سال های ۱۳۹۳ و ۱۳۹۴ جمع‌آوری شدند. همزمان با گزارش همه‌گیری التهاب قرنیه و ملتحمه عفونی گاوان در تمامی فصول، از تعدادی دام‌های مبتلا و سالم در سطح هر گله نمونه گیری شد. در کل ۶۰ نمونه (۳۳ دام مبتلا و ۲۷ دام سالم) و از هر دام فقط از یک چشم نمونه اخذ شد. نمونه‌گیری عمدتاً در گوساله‌ها و تلیسه‌ها (رده سنی کمتر از دو سال) انجام شد. تنها از ۵ راس گاو بالغ (۳ راس مبتلا و دو راس سالم) نمونه گیری به عمل آمد. تعداد نمونه اخذ شده بر اساس شدت همه‌گیری و حداکثر ۶ نمونه در هر گله تعیین می شد. موارد بالینی بر اساس شدت عارضه به ۳ گروه تقسیم شدند: ۱) کونژونکتیویت بعنوان تنها نشانه‌ی

نتایج

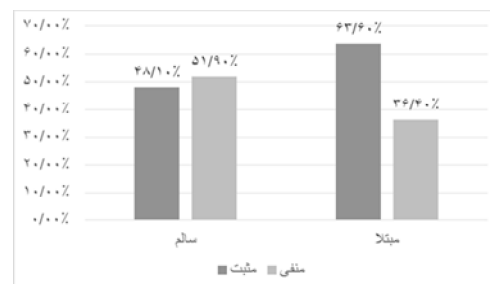
در مجموع، ۵۵٪ نمونه‌ها از گاو مبتلا به مراحل مختلف التهاب قرنیه و ملتحمه عفونی اخذ گردیدند. ۴۵٪ مابقی نمونه‌ها از گاو سالم گله که فاقد هر گونه نشانه‌ی بالینی بودند، در طی همه‌گیری‌ها اخذ شده بود. کونژونکتیویت و التهاب قرنیه و ملتحمه به ترتیب در ۳۰/۳ و ۳۳/۳٪ چشم‌های مبتلا مشاهده شد. ۳۷/۴٪ چشم‌های مبتلا نشانه‌های سازگار با مراحل مختلف زخم قرنیه را دارا بودند. ۱۲/۱٪ موارد بصورت دوطرفی درگیر بودند.

نگاره ۱ تعدادی از نتایج مثبت در آزمون PCR را نشان می‌دهد.

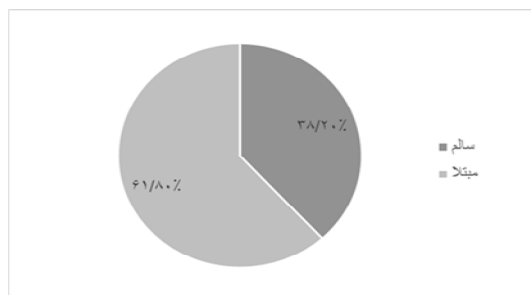


نگاره ۱- الکتروفورز تعدادی از نمونه‌های مثبت در آزمون پی سی آر شماره‌های ۱ تا ۴: تعدادی از نمونه‌های مثبت، شماره ۵: کنترل مثبت مایکوپلازما

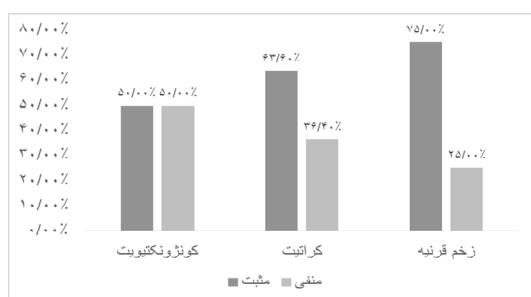
نتایج در نمودارهای ۱ تا ۴ بصورت خلاصه آورده شده‌اند. اختلاف معنی داری بین چشم‌های سالم و مبتلا و همچنین طبقه بندی انجام شده بر اساس شدت عارضه از لحاظ عفونت با گونه‌های مایکوپلازما در این مطالعه مشاهده نشد.



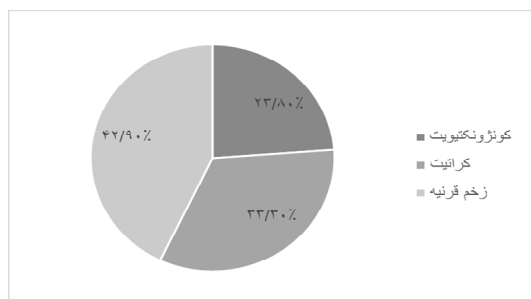
نمودار ۱- فراوانی نسبی موارد مثبت و منفی در آزمون پی سی آر بر اساس وضعیت بیماری



نمودار ۲. مقایسه براساس وضعیت سلامت در موارد مثبت آزمون PCR



نمودار ۳- فراوانی نسبی موارد مثبت و منفی در آزمون PCR بر اساس نوع عارضه



نمودار ۴. مقایسه بر اساس نوع عارضه در موارد مثبت آزمون PCR

بحث

در این مطالعه واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) جهت ارزیابی حضور گونه‌های مایکوپلازما در کیسه‌ی ملتحمه‌ی گاوهای مبتلا به التهاب قرنیه و ملتحمه عفونی و گاوهای سالم انجام شد. افزون بر آن ارتباط بین عفونت با گونه‌های مایکوپلازما و شدت نشانه‌های بالینی مورد ارزیابی قرار گرفت. با وجود آن که موراکسلا بویس بعنوان عامل اولیه مطرح است. نقش سایر گونه‌ها مثل موراکسلا اویس و موراکسلا بووکولی و گونه‌های

مطالعه Schottker-Wegner عفونت با میکوپلازماها غالباً در گاوهای جوان با سنین کمتر از ۲ سال (۶۲/۵٪) نسبت به گاوهای با سنین بالاتر (۱۹/۴٪) مشاهده شد (۱۴). به گونه ای مشابه در این مطالعه نیز ۲۰٪ (۱ از ۵ راس) گاو بالغ با میکوپلازماها آلوده بودند. با این وجود هیچ گونه تفاوت بارزی بین تظاهر بالینی در جوانان و بالغین مشاهده نمی شود.

در این مطالعه ۱۲/۱٪ (۴ از ۳۳) مبتلایان، ابتلای دو طرفی داشتند. در مطالعه Takele (۲۰۰۰) نیز ۱۴/۵٪ موارد بصورت دو طرفی مبتلا بودند (۱۵). در مطالعه حاضر، کونژونکتیویت تنها نشانه ی بالینی در ۳۰/۳٪ از چشم‌های مبتلا و التهاب قرنیه و ملتحمه بدون وجود زخم قرنیه در ۳۳/۳٪ چشم‌های مبتلا مشاهده شد. ۳۶/۴٪ چشم‌های مبتلا نشانه های سازگار با مراحل مختلف زخم قرنیه را دارا بودند. در بین موارد مثبت آزمون PCR، به ترتیب ۲۳/۶٪ را مبتلایان به التهاب ملتحمه، ۳۳/۳٪ را مبتلایان به کراتیت و ۴۲/۹٪ موارد را مبتلایان به زخم قرنیه تشکیل می دادند. از سوی دیگر، ۷۵٪ از چشم‌های مبتلا به زخم قرنیه در آزمون PCR مثبت بودند. ۶۳/۵٪ از چشم‌های مبتلا به التهاب قرنیه و ۵۰٪ موارد ابتلا به التهاب ملتحمه از لحاظ میکوپلازماها مثبت بودند. بر این اساس، با وجود آن که نتایج از لحاظ آماری معنی دار نبودند، هر چه شدت بیماری بالینی بیشتر بود، درصد عفونت با میکوپلازماها در چشم‌های مبتلا بیشتر بود. در مطالعه Schnee و همکاران (۲۰۱۴) شیوع عفونت با موراکسلا اویس، موراکسلا بووکولی و میکوپلازما بووکولی ارزیابی شد. نتایج این مطالعه نشان داد، گله‌های با شیوع بالای میکوپلازما بووکولی بیشتر مستعد همه‌گیری التهاب قرنیه و ملتحمه عفونی گاوان هستند (۱۳). همسو با نتایج حاصله در مطالعه مذکور، مشاهدات این مطالعه نیز بیانگر نقش موثر احتمالی گونه‌های میکوپلازما در پاتوژن التهاب قرنیه و ملتحمه عفونی گاوان می باشد.

در نتیجه بر اساس مشاهدات حاصله از این مطالعه، گونه‌های میکوپلازما در درصد بالاتری از چشم‌های مبتلا نسبت به

میکوپلازما بویژه میکوپلازما بووکولی در حال حاضر چندان شناخته شده نیست. همانطور که پیش تر ذکر شد، ویروس رینوترانکتیت عفونی گاو (IBR) و گونه‌های میکوپلازما به احتمال بعنوان عوامل خطر ساز در التهاب قرنیه و ملتحمه عفونی گاوان مطرح می باشند. گونه‌های میکوپلازما به تنهایی یا به همراه موراکسلا بویس ممکن است سبب بروز کونژونکتیویت در گاوان شوند و بنابراین ممکن است شدت بیماری را افزایش داده و در پاتوژن آن نقش داشته باشند (۱۲، ۱۱، ۸، ۶، ۳). بصورت تجربی اثبات شده است که تلقیح میکوپلازما بووکولی در چشم پیش از عفونت با موراکسلا بویس و موراکسلا اویس، شدت و طول مدت کلینزاسیون آن‌ها را افزایش می دهد. عفونت همزمان میکوپلازما بووکولی و گونه‌های موراکسلا نیز می تواند بیانگر نقش میکوپلازما بووکولی در توسعه ی سندروم التهاب قرنیه و ملتحمه گاوان باشد (۷).

Schottker-Wegner و همکاران (۱۹۹۰) ۲۶۲ سواب اخذ شده از ملتحمه ی ۱۷۸ گاو را از لحاظ وجود میکوپلازماها مورد ارزیابی قرار دادند. جداسازی از ۱۱۱ سواب ممکن شد. میکوپلازماها از ۴۳/۲٪ (۶۴ از ۱۴۸) نمونه‌های چشم مبتلا و ۴۱/۲٪ (۴۷ از ۱۱۴) چشم‌های سالم جدا شد (۱۴). در نتیجه هم پوشانی بین یافته های بالینی و جداسازی میکوپلازما مشاهده نشد. در مطالعه ی Gupta و همکاران (۲۰۱۵)، ۳۷/۵٪ نمونه‌های التهاب قرنیه و ملتحمه عفونی گاوان ارزیابی شده با آزمون واکنش PCR از لحاظ میکوپلازماها مثبت بود (۴). در مطالعه ی حاضر، ۵۶/۷٪ (۳۴ از ۶۰) از چشم‌ها از نظر وجود میکوپلازماها مثبت بودند. در بین موارد مثبت حاصله در آزمون PCR، ۶۱/۸٪ را مبتلایان و ۳۸/۲٪ را موارد سالم تشکیل می دادند. از سوی دیگر، ۶۳/۶٪ (۲۱ از ۳۳) از چشم‌های مبتلا و ۴۸/۱٪ (۱۳ از ۲۷) از چشم‌های سالم در آزمون PCR از لحاظ میکوپلازماها مثبت بودند. با این وجود هیچ اختلاف معنی داری بین چشم‌های مبتلا و سالم وجود نداشت. در

8. Maunsell, F.P., Woolums, A.R., Francoz, D., Rosenbusch, R.F., Step, D.L., Wilson, D.J., Janzen, E.D. (2011): Mycoplasma bovis Infections in Cattle. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 25(4):772-783
9. Naglic, T., Sankovic, F., Madic, J., Hajsig, D., Seol, B., Busch, K. (1996): Mycoplasmas associated with bovine conjunctivitis and keratoconjunctivitis. *Acta Vet. Hung.* 44(1):21-4.
10. Pugh, G.W., D.E. Hughes, Schulz, V.D. (1976): Infectious bovine keratoconjunctivitis: experimental induction of infection in calves with mycoplasmas and Moraxella bovis. *Am. J. Vet. Res.* 37(5):493-5.
11. Pugh, G.W., Jr., D.E. Hughes, Packer, R.A. (1970): Bovine infectious keratoconjunctivitis: interactions of Moraxella bovis and infectious bovine rhinotracheitis virus. *Am. J. Vet. Res.* 31(4):653-62.
12. Rosenbusch, R.F. (1983): Influence of mycoplasma preinfection on the expression of Moraxella bovis pathogenicity. *Am. J. Vet. Res.* 44(9):1621-4.
13. Schnee, C., Heller, M., Schubert, E., Sachse, K. (2015): Point prevalence of infection with Mycoplasma bovoculi and Moraxella spp. in cattle at different stages of infectious bovine keratoconjunctivitis. *Vet. J.* 203(1):92-6.
14. Schottker-Wegner, H.H., A. Binder, Kirchhoff, H. (1990): Detection of mycoplasmas in eye swab specimens of cattle. *Zentralbl Veterinarmed B* 37(6):436-41
15. Takele, G., Zerihun, A. (2000): Epidemiology of Infectious Keratoconjunctivitis in Cattle in South-east Ethiopia. *Journal of Veterinary Medicine Series A* 47(3):169-173.

چشم‌های سالم مشاهده شدند. همچنین، با وجود آن که نتایج از لحاظ آماری معنی دار نبودند، هر چه شدت نشانه‌های بالینی بیشتر بود، درصد عفونت با مایکوپلاسمها در چشم‌های مبتلا بیشتر بود. بنابراین عفونت با گونه‌های مایکوپلاسمها ممکن است در شدت ضایعات مرتبط با التهاب قرنیه و ملتحمه عفونی گاو نقش داشته باشند. با این وجود جهت آشکار ساختن نقش گونه‌های مایکوپلاسمها در پاتوژنز التهاب قرنیه و ملتحمه عفونی گاو و تعیین آنها بعنوان فاکتورهای خطر مطالعات گسترده‌تری مورد نیاز می‌باشند.

فهرست منابع

1. Alexander, D. (2010): Infectious bovine keratoconjunctivitis: a review of cases in clinical practice. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 26(3):487-503.
2. Angelos, J.A. (2010): Moraxella bovoculi and infectious bovine keratoconjunctivitis: cause or coincidence? *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 26(1):73-8.
3. Brown, M.H., Brightman, A.H. Fenwick, B.W. Rider, M.A. (1998): Infectious Bovine Keratoconjunctivitis: A Review. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 12(4): 259-266.
4. Gupta, S., Chahota, R., Bhardwaj, B., Malik, P., Verma, S., Sharma, M. (2015): Identification of chlamydiae and mycoplasma species in ruminants with ocular infections. *Letters in Applied Microbiology* 60(2):135-139.
5. Hayman, B., Hirst R. (2003): Development of a semi-nested PCR for the improved detection of Mycoplasma bovis from bovine milk and mucosal samples. *Vet. Microbiol.* 91(2-3):91-100.
6. Kahn, C.M., Line, S. (2010): *The Merck veterinary manual.* Whitehouse Station, N.J.: Merck & Co.
7. Levisohn, S., Garazi, S., Gerchman, I., Brenner, J. (2004): Diagnosis of a mixed mycoplasma infection associated with a severe outbreak of bovine pinkeye in young calves. *J. Vet. Diagn. Invest.* 16(6):579-81.

