

# شناسایی مولکولی عوامل مایکوپلاسمایی در موارد مشکوک به پلور و پنومونی واگیر بزبان

زهرانیکو صفت<sup>۱</sup> ناهیداطیابی<sup>۲\*</sup> سیدعلی پوربخش<sup>۳</sup> مصطفی پیغمبری<sup>۲</sup> غلامرضا افشاری<sup>۲</sup>

(۱) دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران- ایران.

(۲) گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران- ایران.

(۳) آزمایشگاه فرانس مایکوپلازما، موسسه تحقیقات واکنس و سرم سازی رازی کرج- ایران.

(دریافت مقاله: ۸ اردیبهشت ماه ۱۳۸۷، پذیرش نهایی: ۲۰ شهریور ماه ۱۳۸۷)

## چکیده

پلور و پنومونی واگیر بزبان از مهمترین عفونت‌های شایع در منطقه خاورمیانه است. تا کنون گزارشی از شناسایی و جداسازی گونه‌های درگیر در ایران وجود ندارد. هدف از این مطالعه، جداسازی و شناسایی مولکولی عوامل مایکوپلاسمایی موارد مشکوک به این بیماری در گله‌های بز می باشد. مجموع ۱۰۰ نمونه ریه از ۲۰ گله مشکوک به پلور و پنومونی، از کشتارگاه‌هایی در نزدیکی کرمانشاه، در طول سال ۱۳۸۶-۱۳۸۴ جمع‌آوری و به آزمایشگاه میکروبیولوژی منتقل شدند. ضایعات ماکروسکوپی شامل هپاتیزایسیون ریوی با زخم‌های خاکستری و سفید (جامد شدن) و ظاهر منقوط و فیبری و یا بدون فیبرین بودند. نمونه‌ها در محیط کشت PPLO براث و آگار کشت داده شدند. پس از پاساژهای متعدد، از ۴ گله مشکوک، تک کلونی تخم مرغی شکل مایکوپلازما جدا شد (۲۲/۲ درصد). سپس DNA نمونه‌ها به روش فنل-کلروفورم استخراج شدند و تحت واکنش PCR با استفاده از پرایمر اختصاصی جنس قرار گرفتند. علاوه بر ۴ نمونه مثبت قبلی در کشت، نمونه‌های ۵ گله دیگر آلودگی به جنس مایکوپلازما را در واکنش PCR نشان دادند (۴۵ درصد). بررسی نمونه‌ها در واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی از نظر کلاستر مایکوئیدس، گونه‌های کاپری کولوم کاپری پنومونیه و مایکوئیدس مایکوئیدس کلونی بزرگ در کنار گونه آگالا کتیه (به عنوان کنترل منفی) نشان داد که آلودگی به این گونه‌ها وجود ندارد. با این وجود اعلام وضعیت عاری بودن گله‌های بز در ایران، از نظر ابتلا به پلور و پنومونی واگیر نیازمند تحقیقات وسیعتر و مطالعه تعداد نمونه‌های بیشتر در آینده است.

واژه‌های کلیدی: پلور و پنومونی واگیر بزبان، مایکوپلازما کاپری کولوم کاپری پنومونی، روش کشت، روش PCR، بز.

تقریباً غیرممکن بوده و نیازمند بازنگری در استراتژی‌های بکار رفته در تشخیص عفونت مایکوپلاسمایی است. اگرچه هنوز از روش کشت به عنوان روش استاندارد طلایی (Gold Standard) در تشخیص استفاده می‌شود، اما دشواری‌های فراوان روش کشت و عدم دستیابی سریع به نتیجه، استفاده متداول از آن را مشکل نموده است. بنابراین تحقیقات امروزه سعی بر استاندارد کردن روش‌های مولکولی شناسایی جدایه‌های گونه‌های مایکوپلازما دارد (۲۱). این مطالعه به بررسی عفونت‌های تنفسی ناشی از مایکوپلازماهای پاتوژن *M. ccp* و *M. mmLC*، از طریق کشت و PCR پرداخته است.

## مواد و روش کار

**نمونه‌های ریه:** مطالعه بر روی ۲۰ گله بز مشکوک به پنومونی مایکوپلاسمایی با علائم واگیری زیاد، سرفه مداوم، ترشحات بینی، اختلال تنفسی و کاهش وزن همراه با قطع شیردهی و عدم پاسخ به آنتی‌بیوتیک‌های تجویز شده در فاصله زمانی سال‌های ۱۳۸۶-۱۳۸۴ در دشت‌های اطراف کرمانشاه انجام گرفت. پس از بررسی لاشه‌ها در کشتارگاه، از هر گله ۳-۵ نمونه از ریه‌های مشکوک با ثبت ضایعات ماکروسکوپی اخذ شد و در مجاورت کیسه یخ به آزمایشگاه بیمارستان آموزشی و پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران و آزمایشگاه فرانس مایکوپلازما در موسسه واکنس و سرم سازی رازی ارسال گردیدند.

## مقدمه

پلور و پنومونی واگیر بزبان، بیماری تحلیل برنده تنفسی است که خسارت آن در مناطقی از آفریقا و آسیا بالغ بر ۱۰۰ میلیون دلار تخمین زده می‌شود. عامل اصلی این بیماری، مایکوپلازما کاپری کولوم کاپری پنومونی *Mycoplasma capricolum capripneumonia* (M. ccp) است که با قرار گرفتن بیماری در لیست B سازمان جهانی مبارزه با بیماری‌های واگیر، لزوم اهمیت شناسایی آن مشخص می‌شود. فرم کلاسیک این بیماری با علائم تب بالا، ابتلای فراوان، سرفه شدید، دیسترس تنفسی، مرگ و میر فراوان همراه است. در فرم غیرکلاسیک این بیماری که گونه‌های مشابه *ccp* در کلاستر مایکوئیدس از جمله گونه‌های مایکوئیدس مایکوئیدس کلونی بزرگ *Mycoplasma mycoides subgroup mycoides large colony* (M. mmLC)، مایکوئیدس مایکوئیدس کاپری *subgroup capri* (M. cc)، و کاپری کولوم کاپری کولوم (M. mc) در آن دخالت دارند، علائم بالینی ملایمتر بوده، اما خسارات اقتصادی گاه چند برابری شود. اخیراً شیوع بازپیدی از عفونت‌های تنفسی با منشأ مایکوپلازما در منطقه خاورمیانه در گله‌های بز بومی و وحشی گزارش شده است (۱۵، ۲). در این میان قابلیت میکروارگانیزم به ایجاد فتوتیپ‌های متنوع، منجر به فرار آن از دستگاه ایمنی میزبان گردیده است. در نتیجه با وجود آمدن ناقلین بدون علامت، مشکل کنترل و ریشه‌کنی بیماری افزایش یافته است. در این شرایط، حفظ وضعیت عاری بودن از عفونت، مشکل یا



نوکلئوتیدی، تنها در نمونه کنترل مثبت دیده شد (تصویر ۳). علاوه بر این، بررسی نمونه‌ها از نظر گونه آگالاکتیه نشان داد که قطعه ۳۷۵ جفت بازی در ژل الکتروفورز محصولات تکثیر شده نمونه‌ها وجود ندارد (تصویر ۴). هم چنین نمونه‌های مورد مطالعه از نظر آلودگی به گونه مایکوتیدس بیوتایپ کلونی بزرگ منفی بودند و قطعه ۱۹۵ جفت بازی در ژل الکتروفورز مشاهده نگردید (تصویر ۵).

### بحث

تحقیقات نشان می‌دهد که تشابه چهره بالینی و کالبدگشایی عنونت‌های تنفسی ناشی از مایکوپلازما با سایر عوامل باکتریایی، از جمله پاستورلوز، موجب شده است که عملاً امکان تشخیص دقیق آن از روی علائم بالینی امکان پذیر نباشد (۱۹، ۷). کمالین که در ۱۱ مورد مشابه، علیرغم بروز علائم فراگیر تنفسی با شیوع بالا در سطح گله و خط کشتار، میکروارگانیزم مایکوپلازما مشاهده نشد. در نتایج بدست آمده در این مطالعه، نیز مشخص شد که روش RCR حساسیت بیشتری در شناسایی میکروارگانیزم مایکوپلازما در بافت ریه مشکوک نسبت به روش کشت دارد. در مواقعی که میکروارگانیزم بهر علت از بین رفته باشد (بر اثر شرایط نگهداری نامناسب یا استفاده از آنتی بیوتیک در طول درمان) یا اینکه میزان آن بسیار کم باشد، با روش کشت قابل شناسایی نمی‌باشد و حضور آن تنها توسط RCR قابل اثبات است. بخصوص که در این مطالعه از روش استخراج فنل-کلرو فورم جهت افزایش حساسیت تشخیص PCR استفاده گردیده است. مطالعات قبلی انجام شده نیز نشان می‌دهند که با وجود اینکه روش کشت به عنوان استاندارد طلایی شناسایی مایکوپلازما معرفی شده است، ولی در مواردی قادر به شناسایی مایکوپلازما نمی‌باشد و علاوه بر این جداسازی ایزوله‌ها بسیار مشکل و وقتگیر است و نیازمند فراهم بودن شرایط خاص کشت مایکوپلازماهاست (۲۱). بررسی محیط‌های کشت در این مطالعه با رشد نمونه کنترل مثبت مایکوپلازما انجام شد. سپس به منظور تأیید وجود DNA مایکوپلازما در نمونه‌های ریه جمع‌آوری شده و اثبات عدم تأثیر مهار کننده‌های بافتی در واکنش PCR، از پرایمر اختصاصی جنس استفاده شد که با استفاده از توالی ژن‌های 16S rRNA به تکثیر قطعات ۱۶۳bp می‌پردازد (۶). با استفاده از این روش، مشاهده قطعه ۱۶۳bp در ژل الکتروفورز محصولات PCR در ۱۲ نمونه، وجود آلودگی مایکوپلازمایی در آنها اثبات شد (۴۵ درصد).

Razin در مطالعه‌ای به بررسی کاربرد انواع پرایمرهای مخصوص جنس در تشخیص آلودگی‌های مایکوپلازمایی می‌پردازد و عنوان می‌کند جفت شدن پرایمر با مناطقی غیر از 16S rRNA، موجب تشکیل اتصالات ناهمگون فراوان در ناحیه 3' پرایمر اختصاصی Reverse و متعاقباً بروز نتایج کاذب می‌شود (۱۸). در تحقیقات مشابه، میزان عفونت مایکوپلازمایی در عفونت تنفسی بز ۲۰ درصد، ۴۷ درصد و ۶۱ درصد گزارش شده است (۵، ۱). از آنجا که اکثر پاتوژن‌های تنفسی مایکوپلازمایی و گونه‌های مورد مطالعه

کشت و جداسازی: با استفاده از فیلترهای استات سلولز ۴۵ درصد میکرومتری، تزریق عصاره نمونه‌ها به محیط کشت مایع PLO برات انجام شد. پس از قرار دادن محیط‌های مایع در انکوباتور حاوی ۸/۶ درصد  $CO_2$  و درجه حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد، به مدت ۷ روز، تیوب‌ها هر روزه از نظر ایجاد کدورت مورد بررسی قرار گرفتند. محیط‌هایی که حداقل پس از ۴۸ ساعت تغییر رنگ داده بودند، به محیط کشت مایع جدیدی انتقال داده شده و پس از رشد مناسب، در محیط کشت جامد PLO با پاساژهای متعدد، تک کلونی مایکوپلازما بدست آمد. بررسی محیط کشت مایکوپلازمایی مورد استفاده، با مقایسه با رشد نمونه کنترل مثبت تأیید شد.

آزمایش PCR: استخراج DNA نمونه‌ها به روش فنل کلرو فورم انجام شد. با استفاده از پرایمر اختصاصی جنس مایکوپلازما (Roche)، (جدول ۱) نمونه‌ها در دستگاه ترموسایکلر اپندورف (Ependorph) تکثیر شدند. سپس محصولات تکثیر شده به وسیله الکتروفورز بر روی ژل آگار ۱ درصد در TBE بافر (۱۰۰ میلی مولار Tris-HCl، ۵۰ میلی مولار اسید بوریک و ۲ میلی مولار EDTA) حاوی ۰/۵ gr/ml اتیدیوم بروماید بررسی شدند. الکتروفورز ژل در تانک‌های حاوی TBE بافر به مدت حداقل یک ساعت با ولتاژ ۱۰۰ صورت گرفت. سپس ژل زیر اشعه UV در دستگاه UV transilluminator و با مارکر bp DNA Ladder-۱۰۰ بررسی شدند. نمونه‌هایی که از نظر جنس مایکوپلازما مثبت بودند، در قطعه ۱۶۳bp قرار داشتند (تصویر ۲). سپس این نمونه‌ها از نظر گونه‌های M. agalactia، M. mmLC و M. ccp با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و تحت برنامه‌های ذیل مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۲ و ۳). جهت شناسایی جنس مایکوپلازما، روش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت. هر مخلوط حاوی ۴ میکرولیتر  $MgCl_2$  (۲ مولار)، ۲/۵ میکرولیتر PCR بافر 10X (۱۰۰ میلی لیتر Tris-HCl، ۵۰ میلی مولار KCl، 3. PH=8) بود. ۰/۵ میکرولیتر از هر کدام از نوکلئوتیدها (۵ میلی مولار)، ۰/۱ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها و ۰/۲۵ میکرولیتر (۵U/ml) از آنزیم DNA تگ پلیمراز را مخلوط کرده و سپس با استفاده از DNA رقیق شده با آب دو بار تفتیپ به ۱۰، حجم محلول را به ۲۵ میکرولیتر رساندیم.

### نتایج

با مشاهده ضایعات ماکروسکوپی در نمونه‌های ریه بز از ۲۰ گله مشکوک به پنومونی مایکوپلازمایی، که شامل خونریزی، کبدی شدن ریه همراه با زخم‌های سفید و خاکستری جامد، مرمی شدن ریه، وجود فیبرین یا بدون وجود فیبرین در هر لوب بودند، کشت و آزمایش PCR انجام شد. پس از انجام پاساژهای متوالی، تک کلونی ویژه مایکوپلازما از نمونه‌های ۴ گله از مجموع ۲۰ گله جدا شد (۲۲/۲ درصد) (تصویر ۱) (جدول ۴). در الکتروفورز محصولات تکثیر شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با پرایمر اختصاصی جنس، قطعه ۱۶۳ جفت باز نوکلئوتیدی علاوه بر نمونه‌های ۴ گله ذکر شده، در ۵ گله دیگر نیز مشاهده شد (۴۵ درصد) (تصویر ۲).

در نمونه‌های مثبت از نظر کلاستر مایکوتیدس، قطعه ۵۴۸ جفت باز



جدول ۱- پرایمرهای استفاده شده در واکنش تکثیر.

مشخصات پرایمر	ترتیب نوکلوتیدها	محصول RCR	رفرانس
پرایمر مخصوص جنس مایکوپلازما	5'-GCT GTG AAT ACG TTC T-3' Reverse 5'-TCC CCA CGT TCT CGA G-3' Forward	۱۶۳bp	East (۱۹۸۳)
پرایمر مخصوص گونه مایکوئیدس مایکوئیدس کلونی بزرگ	CAA TTC CTC TT-3' Reverse:5'-TTAAAT AAG TTT GTA TAT GAA T-3' Forward : 5'-ACT GAG	۱۹۵bp	Hotzel (۱۹۹۶)
پرایمر مخصوص کلاستر مایکوئیدس	ACT GGC TTG TT-3 Reverse:5'- GTG AGA TTA GCT CCC CTT CAC AG-3' Forward :5'-CGAAAG CGG CTT	۵۴۸bp	Bascunana (۱۹۹۴)
پرایمر مخصوص گونه آگالاکتیه	TGA GAAATG GC-3' Reverse:5'-GTT GCA GAA GAAAGT CCAATCA-3' Forward:5'- AAA GGT GCT	۳۷۵bp	Tola (۱۹۹۷)

جدول ۲- مواد مورد نیاز واکنش تکثیر.

Materials	Concentration	Mycoplasma Volume(ml)	M .mmLC Volume(ml)	M .ccp Volume(ml)	M .agal Volume(ml)
Buffer	10X	2.5	2.5	2.5	2.5
MgCl2	2mM	4	4	4	4
dNTPS	5mM	0.5	0.5	0.75	0.7
Primer F	پیکومول	0.1	0.1	0.5	0.15
Primer R	پیکومول	0.1	0.1	0.5	0.15
پلیمرز Tag DNA	5U/ml	0.25	0.1	0.1	0.1
Template.DNA Diluted.water	Xng ۱/۱۰	17.55	17.7	16.65	17.4
Total	حجم کل بر حسب لیتر	25	25	25	25

جدول ۳- برنامه واکنش پرایمرها.

	Mycoplasma spp	Duration	MmmLC	Duration	Mccp	Duration	M. agalactia	Duration
Denaturation Tem 1	94°	7.5'	95°c	4'	94°c	5'	95°c	5"
Denaturation Tem 2	94°	30"	95°c	45"	94°c	45"	94°c	1"
Anealing tem	56°	30"	62°c	1'	62°c	1'	57°c	2"
Extension	72°	1'	72°c	2'	72°c	1'	65°c	1"
Final Extension	72°	1'	72°c	7'	72°c	7'	65°c	10"
Cycles	30		30		30		30	

جدول ۴- مقایسه نتایج PCR و کشت.

تعداد کل نمونه‌ها	نتایج منفی	نتایج مثبت	
۲۰	۱۶	۴	روش کشت
۲۰	۱۱	۹	روش RCR

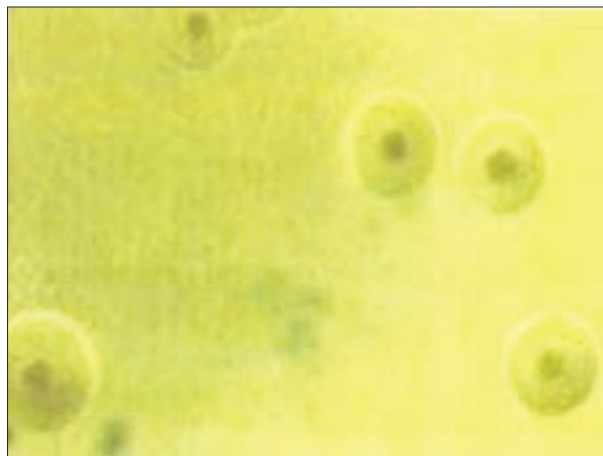
الکتروفورز را افزایش می‌دهد، منتها اغلب تفسیر الگوهای الکتروفورز حاصله، پیچیده و مبهم است (۲۲). در عوض، استفاده از روش PCR-nested CAP21 که در آن دوسری پرایمر بکار می‌رود، وقت گیر است (۹). هم چنین در این روش گونه‌های M.ccp و M.bsg7 (M.bovine serogroup 7) پس از رانده شدن روی ژل از نظر ساینز قطعات، قابل تفکیک نیستند و در نتیجه، این روش در جداسازی M.ccp چندان معتبر نیست (۲۲، ۲۳). به هر حال هنوز روش قابل استنادی جهت شناسایی اختصاصی گونه‌های کاپری پنومونی و مایکوئیدس کلونی بزرگ بدون استفاده از آنزیم معرفی نشده است (۱۲). از این رو در این مطالعه، از توالی 16S rRNA جهت تمایز M.ccp از دیگر گونه‌ها استفاده شد و به منظور کاهش اثر ممانعت کننده‌های بافتی، نمونه‌ها با آب دی‌پارکتیو به نسبت ۱۰:۱ رقیق شدند. در بررسی نمونه‌ها از گونه‌های آگالاکتیه و F38 اهدایی از ترکیه، به ترتیب به عنوان کنترل منفی و کنترل مثبت استفاده گردیده است. از آنجا که تمام اعضا کلاستر مایکوئیدس دارای دو اپرون هستند، تحت تاثیر آنزیم Pst-I بر روی محصولات آمپلی فیکاسیون متعاقب PCR کلاستر مایکوئیدس (۵۴۸bp)، ایجاد دو باند ۱۲۸bp

در بزرگ کلاستر مایکوئیدس قرار دارند، نمونه‌ها با پرایمر اختصاصی کلاستر مایکوئیدس، مورد بررسی قرار گرفتند. تحقیقات نشان داده است که سایر گونه‌های مایکوپلاسمای تنفسی (اوی پنومونی و آرژنینی) در ریه بز، بصورت ساپروفیت هستند و نمی‌توانند زخم‌های ریوی ایجاد کنند (۲۵). شناسایی گونه‌های کلاستر مایکوئیدس مایکوپلازما و بخصوص کاپری پنومونی با روش‌های سرولوژی و بیوشیمی به دلیل تشابه فراوان آنتی ژنیکی و بروز واکنش‌های متقاطع از ویژگی پایینی برخوردار است (۱۷). در این راستا، مطالعات مولکولی غالباً مبتنی بر آنالیز توالی‌های CAP-21 و 16S rRNA همراه با استفاده از پرایمر اختصاصی کلاستر مایکوئیدس و سپس بکارگیری آنزیم‌های محدود الاثر است (۴، ۹، ۱۲). دقت در انتخاب آنزیم‌هایی که جایگاه اثرشان خارج از نواحی hot spot ژنوم باشد، تکرار پذیری الگوهای متعاقب





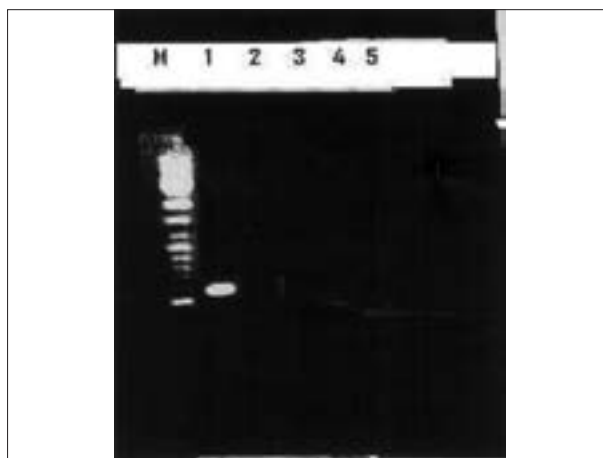
تصویر ۲- آزمایش PCR برای تشخیص جنس مایکوپلازما در نمونه ریه و تکثیر قطعه ۱۶۳ bp در نمونه‌های مثبت. ستون M: مارکر DNA (MW marker ladder 100). ستون ۱: نمونه کنترل مثبت (نمونه واکسن آگالاکتیه). ستون ۱۲-۲: تشخیص مایکوپلازما در نمونه‌های بافتی. ستون ۱۳: آزمایش نمونه ریه (کنترل منفی).



تصویر ۱- کلونی تخم مرغی شکل مایکوپلازما پس از سوئین ساب کالچر.



تصویر ۴- آزمایش PCR برای تشخیص گونه آگالاکتیه در نمونه‌ها و تکثیر قطعه ۳۷۵ bp در نمونه‌های مثبت. ستون M: مارکر DNA (MW marker ladder 100). ستون ۱: نمونه کنترل مثبت (نمونه واکسن آگالاکتیه). ستون ۷-۲: تشخیص گونه آگالاکتیه در نمونه‌های بافتی. ستون ۸: آزمایش نمونه ریه با گونه آگالاکتیه (کنترل منفی).



تصویر ۳- آزمایش PCR برای تشخیص کلاستر مایکوئیدس در نمونه‌ها و تکثیر قطعه ۵۴۸ bp در نمونه‌های مثبت. ستون M: مارکر DNA (MW marker ladder 100). ستون ۱: نمونه کنترل مثبت نمونه سویه (F38). ستون ۴-۲: تشخیص کلاستر مایکوئیدس در نمونه‌های بافتی. ستون ۵: آزمایش نمونه ریه با گونه آگالاکتیه (کنترل منفی).

و ۴۲۰ می‌کنند. که محل اثر آنزیم در جایگاه نوکلئوتیدهای ۸۴۵ تا ۸۵۰ از rRNA 16S قرار دارد. اپرون rrnB در گونه M.ccp، بدلیل موتاسیون نقطه‌ای (A/G) فاقد جایگاه اثر آنزیم است، به همین دلیل سه باند ۵۴۸، ۴۲۰ و ۱۲۸ تشکیل می‌شود که جایگاه آن در محل دومین ژن نوکلئوتیدهای ۱۰۶۴ و ۱۱۵۵ است (۳). Pettersson (۱۹۹۸) در تحقیقی دیگر نشان داد که این آنزیم در گونه M.ccp، سه باند ۷۸۵، ۷۰۳ و ۸۲ با مکانیسم مشابه ایجاد می‌کند (۱۶). امدار این دوروش، به دلیل وجود rRNA هضم نشده (متعاقب اتصالات ناهمگون) از نظر تنوری، احتمال ایجاد الگوی مشابه M.ccp توسط گونه‌های دیگر در الکتروفوروز وجود دارد (۲۲). این امر موجب نتایج مثبت کاذب می‌شود. به همین علت، در این مطالعه به منظور کاهش نتایج کاذب، از گونه آگالاکتیه که در خارج از این کلاستر قرار دارد، به عنوان کنترل منفی استفاده شد.



تصویر ۵- آزمایش PCR برای تشخیص گونه مایکوئیدس مایکوئیدس کلونی بزرگ در نمونه‌ها و تکثیر قطعه ۱۹۵ bp در نمونه‌های مثبت. ستون M: مارکر DNA (MW marker ladder 100). ستون ۱۲-۱: تشخیص کلاستر مایکوئیدس در نمونه‌های بافتی. ستون ۱۳: آزمایش نمونه ریه با گونه آگالاکتیه (کنترل منفی).



جدایه‌های *ccp*، *M. ccp* ایران و اپرون *rnaA* که اساس تشخیص کلاستر مایکوپلاسمیدس در روش بکاررفته بشمار می‌رود، جای تامل دارد (۲۲). این نکته را هم باید در نظر داشت که تفاوت‌های میزان شیوع این گونه‌ها در کشورهای همسایه، می‌تواند ناشی از تفاوت در نوع تست‌های بکاررفته، تعداد نمونه‌ها و روش‌های نمونه‌گیری باشد. زیرا در گزارش‌هایی که بر پایه روش‌های Screening در سطح گله می‌باشد، به دلیل وجود واکنش‌های متقاطع سرولوژیکی، احتمال همپوشانی در میزان شیوع گونه‌های متشابه وجود دارد (۱۰، ۱۷).

اگرچه این مطالعه، صرفاً یک Pilot study جهت راه‌اندازی روش PCR برای تشخیص عفونت‌های ناشی از *M. ccp* و موارد مشابه در بز و متعاقباً، سرآغاز تخمینی از وضعیت عفونت در ایران بود، ولی می‌تواند بیانگر این نکته باشد که در حال حاضر این گونه و گونه *M. mmLC* در گله‌های بز منطقه مورد مطالعه وجود ندارد و یا عفونت به حدی کم است که نمی‌توان آن را با تعداد کم نمونه مشخص کرد. بنابراین، تشخیص و جداسازی گونه‌های مایکوپلاسم نیازمند جمع‌آوری تعداد زیادی نمونه از سایر مناطق و استفاده همزمان از روش‌های تأییدی تشخیص آلودگی است. با این حال، گزارش عدم آلودگی در طول مدت ۱ سال پس از در نظر گرفتن فرضیه کشتار آخرین نمونه مبتلا، می‌تواند وضعیت کشور ما را "عاری از آلودگی" عنوان کند (۲۴، ۲۵).

### تشکر و قدردانی

از همکاران آزمایشگاه خانم مریم هاشمیان، خانم مهزاد ارمی و خانم اعظم یزدانی که در انجام این طرح همکاری نمودند، سپاسگزاریم و موفقیت ایشان را آرزو مندیم.

### References

1. Adehan, K. (2006) The occurrence of *Mycoplasma* spp and other bacteria in pneumonic lungs of sheep and goats. *Folia Vet. Slovakia*. 50: 79-89.
2. Arif, A., Schulz, J. (2007) Contagious caprine pleuropneumonia outbreak in captive wild ungulates at AlWabra Wildlife preservation, State of Qatar. *J. Zoo. wildlife Med.* 38: 93-96.
3. Bascunana, C., Mattsson, J. G., Bolske, G., Johnsson, K. E. (1994) Characterization of the 16S-rRNA genes from *Mycoplasma* strain F38 and development of an identification system based on PCR. *J. Bacteriol.* 276: 2577-2586.
4. Bolske, G., Mattsson, J., Bascunana, C., Bergstrom, K., Wesonga, H., Johnsson, K. E. (1996) Diagnosis of contagious caprine pleuropneumonia by detection and identification of *Mycoplasma capricolum* capripneumonia by PCR and REA. *J. Clin.*

اگر چه گزارش‌های موردی از جداسدن گونه آگلاکتیه از زخم‌های ریوی ایجاد شده با گونه‌های گروه مایکوپلاسمیدس وجود دارد (۱)، اما برای اطمینان، ابتدا نمونه‌ها از نظر این گونه در مجاورت سویه واکسن آگلاکتیه بررسی شدند. قطعه ۳۷۵bp متعاقب واکنش 16S rRNA-PCR با پرایمر اختصاصی گونه آگلاکتیه (۲۰) تنها در نمونه کنترل واکنش مثبت مشاهده شد و سایر گونه‌های مورد آزمایش منفی بودند.

گزارش‌ها حاکی از آن است که از فرم غیر کلاسیک *CCPP*، گونه‌های *M. cc*، *M. c* و *M. mmLC* جدا شده‌اند (۲۳، ۱۰). مطالعات هیبریداسیون DNA و انگشت نگاری پروتئینی نشان می‌دهد که گونه‌های این کلاستر، از نظر ژنتیکی شباهت فراوانی به یکدیگر دارند به طوری که گونه *M. mm* و *ccp* در ۹۰ درصد موارد، شباهت ژنتیکی داشته و تفاوت آنها تنها در ۱۴ نوکلئوتید گزارش شده است (۳). حتی بیوتاایپ F38 این گونه، به عنوان زیر گروه کاپری کولوم شناخته شده است (۱۱).

گونه *M. mc* تا ۹۹/۹ درصد به گونه *M. mmLC* شباهت ژنتیکی دارد (۸). سایر اعضا این کلاستر مانند *M. bsg7*، *M. mmSC*، *M* که گاو میزبان اختصاصی آنهاست، نیز گزارش‌های نادری از جداسدن آنها از بز همراه با سایر عوامل موجود است. به همین دلیل گاه در روش RCR-RFLP امکان حضور باندهای ضعیف و قوی و نتایج گمراه کننده در بررسی نتایج الکتروفورزدر آلودگی‌های مخلوط اعضا کلاستر وجود دارد. بخصوص در زمانی که میزان آلودگی با *M. ccp* در نمونه کم باشد، نتایج مثبت و منفی کاذب گزارش می‌شود (۲۲).

در نمونه‌های مورد آزمایش، قبل از بکاربردن آنزیم *PstI*، قطعه ۵۴۸bp آنها در الکتروفورز محصولات نمونه کنترل مثبت مشاهده شد. این امر حاکی از منفی بودن نمونه‌های مورد مطالعه از آلودگی به گونه‌های کلاستر مایکوپلاسمیدس است.

نمونه‌ها با پرایمر اختصاصی *M. mmLC* نیز تحت واکنش rRNA-PCR 16S قرار گرفتند. نتایج، یافته‌های آزمایش قبل حاکی از عدم آلودگی به کلاستر مایکوپلاسمیدس را تأیید می‌کرد.

تحقیقات OIE در ۲۳ کشور احتمال حضور *M. ccp* را عنوان می‌کند، اما تاکنون این گونه تنها در ۱۱ کشور جدا شده است (۱۳). این امر موید مشکلاتی در جداسازی و تشخیص این میکروارگانیسم در مناطق مشکوک به آلودگی است.

از سوی دیگر، مطالعات فیلوژنی بر روی ۲۰ گونه از *M. ccp* در مناطق جغرافیایی متفاوت آسیا و اروپا نشان می‌دهد که با اینکه تفاوت‌های نوکلئوتیدی آنها تنها در یکی از دو اپرون مشاهده گردیده، ولی ۱۵ پلی مورفیسم در توالی 16S rRNA گزارش شده است (۱۶). این مشاهدات بیانگر آن است که توالی گونه *M. ccp* جدا شده در ترکیه، با جدایه‌های کشورهای امارات متفاوت است و تمامی بخش ژن کاذب حذف شده است. این امر نشان می‌دهد که منشاء جغرافیایی گونه‌ها در کشورهای همسایه، متفاوت بوده است (۱۳). با این اوصاف، احتمال حضور موتا سیونی در اپرون *rnaB*



- Microbiol. 34: 785-791.
5. El Yazid, H. A., Balata, M. A., Wassif, I. M. (2007) Isolation and identification of Mycoplasma species from sheep and goats under desert condition. Vet. Med. J. Giza. Egypt. 55: 389-410.
  6. East, N. E., DeMassa, A. J. (1983) Milk born occurrence of Mycoplasma mycoides mycoides infection in a commercial goat herd. J. Am. Vet. Med. Asso. 182: 1338-1341.
  7. Gelagay, A., Teshale, S. W., Amsalu, G., Esayas. (2007) A prevalence of Contagious caprine pleuropneumonia in Borana. Small Rum. Res. 70: 131-135.
  8. Heranandez, L., Lopes, J., StJaques, M., Ontiveros, L., Acosta, J., Handel, K. (2006) Mycoplasma mycoides capri associated with goat respiratory disease and high flock mortality. Can. Vet. J. 74: 366-369
  9. Hotzel, H., Sachse, K., Pftzner, H. (1996) A PCR scheme for differentiation of organisms belonging to Mycoplasma mycoides cluster. Vet. Microbiol. 49: 41-43.
  10. Hugar, D. H., Babu, H. (2007) Isolation and identification of Mycoplasma from respiratory tract of goats. Indian. Vet. J. 84: 352-355.
  11. Ikheloa, J. O., Ajuwape, ATP., Ojo, M. O., Alaka, O.O., Adetosoye, A. L. (2004) Biochemical characterization and serological identification of Mycoplasma spp isolated from pneumonic lungs of goats slaughtered in abattoir in Northern Nigeria. Small Rum. Res. 52: 93-97.
  12. LeGrand, D. (2004) Assessment of PCR for routine identification of Mycoplasma mycoides cluster in ruminants. Vet. Res. 35: 635-649.
  13. Lorenzon, S., Wesonga, HL., Taleghiorgis, T., Maikano, Y., Angaya, M., Henriks, P., Thiaucourt, F. (2002) Genetic evolution of Mycoplasma capricolum capripneumonia strains and molecular epidemiology of Contagious caprine pleuropneumonia by sequencing of locus H2. Vet. Microbiol. 85: 111-123.
  14. Manso-Silvan, L., Perrier, X., Thiaucourt, F. (2007) Phylogenic of the Mycoplasma mycoides cluster based on analysis of the five conserved protein-coding sequences and possible implications for the taxonomy of the group. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57: 2247-2258.
  15. Ozedmir, U., Loria, G. R., Godinho, K. S., Sampson, R., Rowan, T. G., Alying, R. D., Nicholas, RAJ. (2005) Mycoplasma capricolum capripneumonia isolated from the outbreaks of Contagious caprine pleuropneumonia in Turkey. Pendik Vet. Microbiol. J. Dergisi. 36: 47-51.
  16. Pettersson, B., Bolske, G., Thiaucourt, F., Uhlen, M., Johnsson, K. E. (1998) Molecular evolution of Mycoplasma capricolum capripneumonia strains based on polymorphisms in the 16S-rRNA genes. J. Bacteriol. 180: 2350-2358.
  17. Ranjesh, A., Kumar, M., Singh, VP. (2007) Contagious caprine pleuropneumonia in goats. Indian Vet. J. 84: 775-776.
  18. Razin, S. (1994) DNA probes and PCR in diagnosis of mycoplasma infection. Mol. cell. probes. 8: 497-511.
  19. Shiferaw, G., Tariku, S., Ayelet, G., Abebe, Z. (2006) Contagious caprine pleuropneumonia and Manhemia hemolytica associated with acute respiratory disease of goats and sheep in Africa. Rev. Sci. Tech. Int. Epiz. 25: 1153-1163.
  20. Tola, S., Idini, D., Galleri, G., Angioi, P. P., Rocchigiani, A. M., Leori, G. (1997) Detection of M. agalactiae in sheep milk samples by PCR. Vet. Microbiol. 54: 17-22.
  21. Udit, J., Paul, B. C., Yadav, S. K. (2007) Characterization of Contagious caprine pleuropneumonia by PCR. Indian J. Anim. Sci. 77: 826-864.
  22. Woubit, S., Lorenzon, S., Peyraud, A., Manso-Silvan, L., Thiaucourt, F. (2004) A specific PCR for the identification of Mycoplasma capricolum capripneumonia. Vet. Microbiol. 104: 2 125-132.
  23. Xin, J. Q., Yuan, I., Jiahua, Z., ShouPing, H., Liang, W. (2007) Molecular characterization of a strain of Mycoplasma capricolum capripneumonia isolated from goats. Chin. J. Prev. Vet. Med. 29: 243-247.
  24. Yigezu, L. K., Tariku, S., Ayelet, G., Roger, F. (2004) Respiratory mycoplasmosis of Small Ruminants in Ethiopia. Ethiopian Vet. J. 8: 67-74.



## MOLECULAR IDENTIFICATION OF MYCOPLASMA AGENTS IN SUSPECTED CONTAGIOUS CAPRINE PLEUROPNEUMONIA

Nikousefat, Z.<sup>1</sup>, Atyabi, N.<sup>2\*</sup>, Pourbakhsh, S.A.<sup>3</sup>, Peyghambari, M.<sup>2</sup>, Afshari, G.R.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.

<sup>2</sup>Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran-Iran.

<sup>3</sup>Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Tehran-Iran.

(Received 28 April 2008 , Accepted 11 September 2008)

---

### Abstract:

Contagious Caprine Pleuropneumonia (CCPP) is one of the common infections in the middle east regions. So far, there has not been received any report about isolation and identification of these agents in Iran. The aim of this study is to diagnose and isolate mycoplasma agents in suspected goat flocks. Total of 100 pneumonic lung specimen from 20 CCPP suspected flocks were collected from abattoirs close to Kermanshah during 1384-1386 and had been sent to Microbiology Lab. Gross lesions showed hepatization with grey and white lesions (consolidation) and motley appearance with or without fibrin. The minced tissue were inoculated to PPLO broth agar. After multiple passages, typical mycoplasma colony was isolated from 4 flocks (22/2%). Mycoplasma DNA was also extracted based on phenol-chloroform method and subjected to generic PCR with specific primers. In addition to the perivious positive samples from tissue culture, 5other flocks also showed contamination with Mycoplasma organisms in PCR tests(45%). Then, the samples were determined for Mycoplasma mycoides cluster infection, *M. capricolum* capripneumonia and *M. mycoides mycoides* (L. C), using *M. agalactia* as negative control, with specific primers in PCR, there has showed no contamination to these strains. However, to declare "free status " from CCPP in goat flocks requires more developed researches and much more samples in further investigation.

**Key words:** pleuropneumonia, *Mycoplasma capricolum capripneumonia*, goat, culture, PCR.

\*Corresponding author's email: natyabi@ut.ac.ir, Tel: 021-61117053, Fax: 021-66933222

