مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۸۸، دوره ۶۴، شماره ۳، ۲۱۰-۲۰۵

شناسایی مولکولی عوامل مایکوپلاسمایی در موارد مشکوک به پلورو پنومونی واگیر بزان

زهرانیکوصفت[۱] ناهیداطیابی[۲]* سیدعلی پوربخش[۳] مصطفی پیغمبری[۲] غلامرضاافشاری[۲]

۱) دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران-ایران.
۲) گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران-ایران.
۳) آزمایشگاه رفرانس مایکوپلاسما، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج- ایران.

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

چکیده

پلوروپنومونی واگیر بزان از مهمترین عفونت‌های شایع در منطقه خاورمیانه است. تا کنون گزارشی از شناسایی و جداسازی گونه‌های درگیر در ایران وجودندارد. . هدف از این مطالعه، جداسازی وشناسایی مولکولی عوامل مایکو پلاسمایی موارد مشکوک به این بیماری در گله‌های بزمی باشد. مجموع ۱۰۰ نمونه ریه از ۲۰ گله مشکوک به پلوروپنومونی، از کشتارگاه‌هایی در نزدیکی کرمانشاه، در طول سال ۱۳۸۶-۱۳۸۴ جمع آوری و به آزمایشگاه میکروبیولوژی منتقل شدند. ضایعات ماکروسکوپی شامل هپاتیزایسیون ریوی با زخم‌های خاکستری وسفید (جامد شدن) وظاهر منقوط و فیبرینی 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 مایکوپلاسما جداشد (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 مایکوپلاسما را در واکنش PCR نشان دادند (۴۵ درصد). بررسی نمونه‌ها در واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی از نظر کلاستر مایکوییدس، گونه‌های کاپری کولوم کاپری پنومونیه و مایکوئیدس مایکوئیدس کلونی بزرگ در کنار گونه آگالاکتیه (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 پلوروپنومونی واگیر نیازمند تحقیقات وسیعتر و مطالعه تعداد نمونه‌های بیشتر در آینده است.

واژه‌های کلیدی: پلوروپنومونی واگیر بزان، مایکوپلاسما کاپری کولوم کاپری پنومونی، روش کشت، روش PCR، بز.

مقدمه

پلوروپنومونی واگیر بزان، 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، مایکوپلاسما 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. فر م 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. M درکلاستر مایکوئیدس از جمله گونه‌های مایکوئیدس مایکوئیدس کلونی بزرگ. *Mycoplasma mycoides* subgroup coides large colony (M. mmLC)، مایکوئیدس مایکوئیدس کاپری *subgroup capri* *Mycoplasma mycoides* (M. mc) وکاپری کولوم کاپری کولوم (M. cc) در آن دخالت دارند، علائم بالینی ملایمتربوده، اما خسارات اقتصادی گاه چند برابرمی شود. اخیرا شیوع بازپدیدی از عفونت‌های تنفسی با منشاء مایکوپلاسما در منطقه خاورمیانه در گله‌های بز بومی و وحشی گزارش شده است (۲،۱۵). در این میان قابلیت میکروارگانیسم به ایجاد فنوتیپ‌های متنوع، منجر به فرار آن از دستگاه ایمنی میزبان گردیده است. در نتیجه با بوجود آمدن ناقلین بدون علامت، مشکل کنترل و ریشه کنی بیماری افزایش یافته است. در این شرائط، حفظ وضعیت عاری بودن از عفونت، مشکل یا تقریبا 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 وعدم دستیابی سریع به نتیجه، استفاده متداول از آن را مشکل نموده است. بنابراین تحقیقات امروزه سعی بر استاندارد کردن روش‌های مولکولی شناسایی جدایه‌های گونه‌های مایکوپلاسما دارد (۲۱). این مطالعه به بررسی عفونت‌های تنفسی ناشی از مایکوپلاسماهای پاتوژن ccp. M و mmLC. M، 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 آنتی بیوتیک‌های تجویز شده در فاصله زمانی سال‌های ۱۳۸۶-۱۳۸۴ در دشت‌های اطراف کرمانشاه انجام گرفت. پس از بررسی لاشه‌ها در کشتارگاه، از هر گله ۵-۳ 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 رفرانس مایکوپلاسما در موسسه واکسن و سرم سازی رازی ارسال گردیدند.

*) نویسنده مسؤول: تلفن: ۶۱۱۱۷۱۹۵-۰۲۱، نمابر: ۶۶۹۳۳۲۲۲-۰۲۱ Email: natyabi@ut.ac.ir

کشت و جداسازی: با استفاده از فیلترهای استات سلولز ۴۵درصد میکرومتری، تزریق عصاره نمونه‌ها به محیط کشت مایع PPLO براث انجام شد. پس از قرار دادن محیط‌های مایع در انکوباتور حاوی ۶/۸درصد Co_2 ودرجه حرارت ۳۷درجه 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 PPLO با پاساژهای متعدد، تک کلونی مایکوپلاسما بدست آمد. بررسی محیط کشت مایکوپلاسمای مورد استفاده، با مقایسه با رشد نمونه کنترل مثبت تائید شد.

آزمایش PCR: استخراج DNA نمونه‌ها به روش فنل کلروفورم انجام شد. با استفاده از پرایمر اختصاصی جنس مایکوپلاسما (Roche)، (جدول ۱) نمونه‌ها در دستگاه ترموسایکلر اپندورف (Ependorph) تکثیر شدند.

سپس محصولات تکثیر شده به وسیله الکتروفورز بر روی ژل آگار ۱درصد در TBE بافر (۱۰۰ میلی مولار Tris - HCl، ۵۰ میلی مولار اسید بوریک و ۲ میلی مولار EDTA) حاوی ۰/۵gr/ml اتیدیوم بروماید بررسی شدند. الکتروفورز ژل در تانک‌های حاوی TBE بافر به مدت حداقل یک ساعت با ولتاژ ۱۰۰صورت گرفت. سپس ژل زیر اشعه UV در دستگاه transluminator UV و با مارکر bp ۱۰۰-DNA Ladder بررسی شدند. نمونه‌هایی که از نظر جنس مایکوپلاسما مثبت بودند، در قطعه ۱۶۳bp قرار داشتند (تصویر ۲). سپس این نمونه‌ها از نظر گونه‌های M .mmLC، M .agalctia و M .ccp با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و تحت برنامه‌های ذیل مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۱و۲و۳). جهت شناسایی جنس مایکوپلاسما، روش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت. هر مخلوط حاوی ۴ میکرولیتر $MgCl_2$ (۲مولار)، ۲/۵ میکرولیتر PCR بافر ۱۰X (۱۰۰ میلی لیتر Tris-HCl، ۵۰۰ میلی مولار KCl، 3. PH=8) بود. ۰/۵ میکرولیتر از هرکدام از نوکلئوتیدها (۵ میلی مولار)، ۰/۱ میکرولیتر از هرکدام 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 تقطیر ۱به۱۰، حجم محلول را به ۲۵ میکرولیتر رساندیم.

نتایج

با مشاهده ضایعات ماکروسکوپی در نمونه‌های ریه بز از ۲۰ گله مشکوک به پنومونی مایکوپلاسمایی، که شامل خونریزی، کبدی شدن ریه همراه با زخم‌های سفید و خاکستری جامد، مرمری 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 مایکوپلاسما از نمونه‌های ۴ گله از مجموع ۲۰ گله جدا شد (۲۲/۲درصد) (تصویر ۱) (جدول ۴). در الکتروفورز محصولات تکثیر شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با پرایمر اختصاصی جنس، قطعه ۱۶۳ جفت باز نوکلوتیدی علاوه بر نمونه‌های ۴ گله ذکر شده، در ۵ گله دیگر نیز مشاهده شد (۴۵درصد) (تصویر ۲).

در نمونه‌های مثبت از نظر کلاستر مایکوئیدس، قطعه ۵۴۸ جفت باز 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 مایکوئیدس 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 عفونت‌های تنفسی ناشی از مایکوپلاسما با سایر عوامل باکتریایی، از جمله پاستورلوز، موجب شده است که عملا امکان تشخیص دقیق آن از روی علائم بالینی امکان پذیر نباشد (۱۹، ۷). کما این که در ۱۱ مورد مشابه، علیرغم بروز علائم فراگیر تنفسی با شیوع بالا در سطح گله و خط کشتار، میکرو ارگانیسم مایکوپلاسما مشاهده نشد. در نتایج بدست آمده در این مطالعه، نیز مشخص شد که روش RCR حساسیت بیشتری در شناسایی میکرو ار گانیسم مایکوپلاسما در بافت ریه مشکوک نسبت به روش کشت دارد. در مواقعی که میکروارگانیسم 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 نمی باشد و حضور آن تنها توسط RCR قابل اثبات است. بخصوص که در این مطالعه از روش استخراج فنل-کلروفورم جهت افزایش حساسیت تشخیص PCR استفاده گردیده است. مطالعات قبلی انجام شده نیز نشان می‌دهند که باوجود اینکه روش کشت به عنوان استاندارد طلایی شناسایی مایکوپلاسما معرفی شده است، ولی در مواردی قادر به شناسایی مایکوپلاسما نمی باشد و علاوه بر این جداسازی ایزوله‌ها بسیار مشکل و وقتگیر است و نیازمند فراهم بودن شرایط خاص کشت مایکوپلاسماهاست (۲۱). بررسی محیط‌های کشت در این مطالعه با رشد نمونه کنترل مثبت مایکوپلاسما انجام شد. سپس به منظور تائید وجود DNA مایکوپلاسما در نمونه‌های ریه جمع آوری شده و اثبات عدم تاثیر مهار کننده های 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 مایکوپلاسمایی در آنها اثبات شد (۴۵درصد).

Razin در مطالعه‌ای به بررسی کاربرد انواع پرایمرهای مخصوص جنس در تشخیص آلودگی‌های مایکوپلاسمایی 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 متعاقبا بروز نتایج کاذب می‌شود (۱۸). در تحقیقات مشابه، میزان عفونت مایکوپلاسمایی در عفونت تنفسی بز ۲۰درصد، ۴۷درصد و ۶۱درصد گزارش شده است (۱،۵). از آنجا که اکثر پاتوژن‌های تنفسی مایکوپلاسمایی و گونه‌های مورد مطالعه

جدول۱- پرایمرهای استفاده شده در واکنش تکثیر.

مشخصات پرایمر	ترتیب نوکلوتیدها	محصول RCR	رفرانس
پرایمر مخصوص جنس مایکوپلاسما	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′-TTA AAT 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′-CGA AAG CGG CTT	۵۴۸bp	Bascunana (۱۹۹۴)
پرایمر مخصوص گونه آگالاکتیه	TGA GAA ATG GC-3′ Reverse:5′-GTT GCA GAA GAA AGT CCA ATC A-3′ Forward:5′- AAA GGT GCT	۳۷۵bp	Tola (۱۹۹۷)

جدول۲- 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
DNA Tag پلیمراز	5U/ml	0 .25	0 .1	0 .1	0 .1
$\frac{Template.DNA}{Diluted.water}$	Xng ۱/۱۰	17 .55	17 .7	16 .65	17 .4
Total	حجم کل برحسب لیتر	25	25	25	25

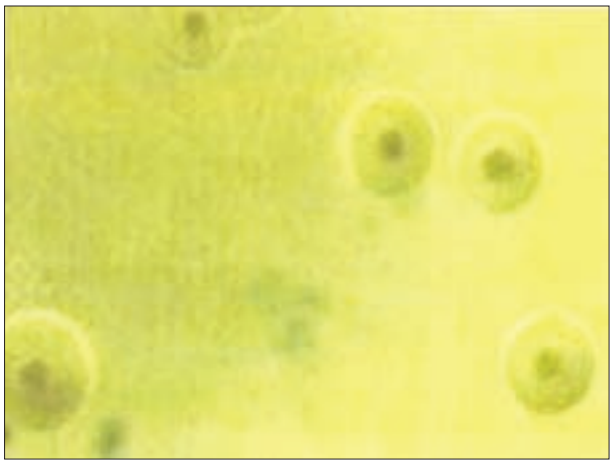
جدول۳- برنامه واکنش پرایمرها.

	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 Extenstion	72°	1'	72°c	7'	72°c	7'	65°c	10"
Cycles	30		30		30		30	

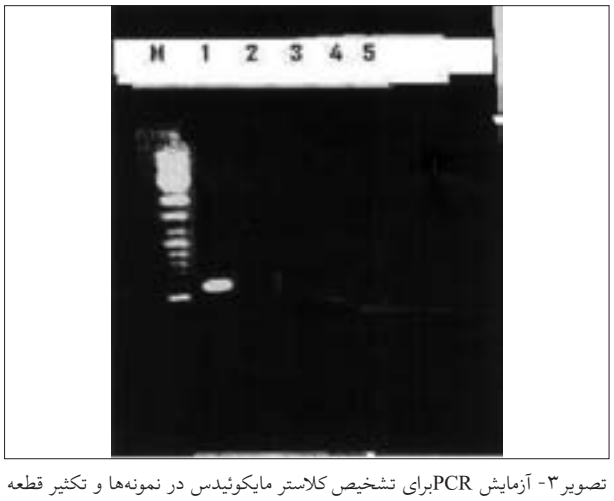
جدول۴- مقایسه نتایج PCRوکشت.

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

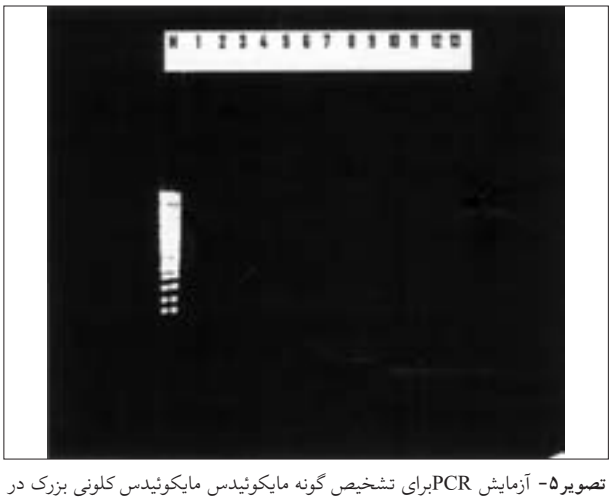
در بز در کلاستر مایکوئیدس قرار دارند، نمونه‌ها با پرایمر اختصاصی کلاستر مایکوئیدس، مورد بررسی قرار گرفتند. تحقیقات نشان داده است که سایر گونه‌های مایکوپلاسمای تنفسی (اوی پنومونی و آرژنینی) در ریه بز، بصورت ساپروفیت هستند و نمی توانند زخم‌های ریوی ایجاد کنند(۲۵). شناسایی گونه‌های کلاستر مایکوئیدس مایکوپلاسما وبخصوص کاپری پنومونی با روش‌های سرولوژی و بیوشیمی به دلیل تشابه فراوان آنتی ژنیکی و بروز واکنش‌های متقاطع از ویژگی پایینی برخورداراست(۱۷). در این راستا، مطالعات مولکولی غالبا مبتنی بر آنالیز توالی‌های CAP-21 و 16S rRNA همراه با استفاده از پرایمر اختصاصی کلاستر مایکوئیدس و سپس بکارگیری آنزیم‌های محدودالاثر است (۱۲،۹،۴). دقت درانتخاب آنزیم‌هایی که جایگاه اثرشان خارج از نواحی hot spot ژنوم باشد، تکرار پذیری الگوهای متعاقب الکتروفورز را افزایش می‌دهد، منتها اغلب تفسیر الگوهای الکتروفورز حاصله، پیچیده و مبهم است(۲۲). در عوض، استفاده از روش PCR-nested CAP21که در آن دو سری 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 سایز 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 16 S rRNA جهت تمایز M.ccp از دیگر گونه‌ها استفاده شد و به منظور کاهش اثر ممانعت کننده‌های بافتی، نمونه‌ها با آب دو بار تقطیر به نسبت ۱به ۱۰ 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



تصویر۱- کلونی تخم مرغی شکل مایکوپلاسماپس از سومین ساب کالچر.

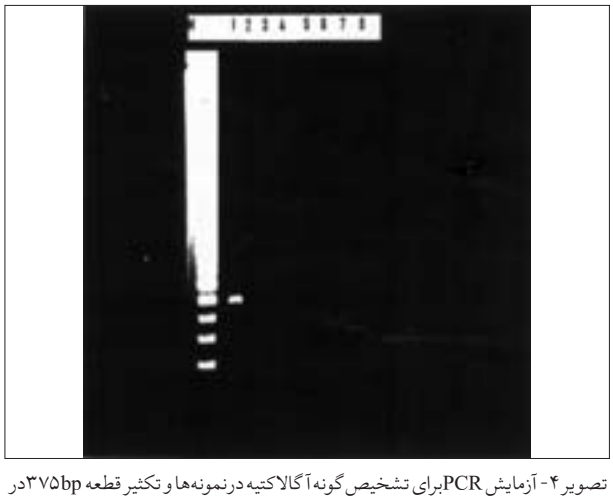


تصویر۳- آزمایش PCRبرای تشخیص کلاستر مایکوئیدس در نمونه‌ها و تکثیر قطعه ۵۴۸bp در نمونه‌های مثبت. ستون M: مارکر DNA(MW marker ladder 100)ستون ۱: نمونه کنترل مثبت نمونه سویه(F38). ستون ۴-۲ تشخیص کلاستر مایکوئیدس در نمونه‌های بافتی. ستون۵: آزمایش نمونه ریه با گونه آگالاکتیه(کنترل منفی).



تصویر۵- آزمایش PCRبرای تشخیص گونه مایکوئیدس مایکوئیدس کلونی بزرگ در نمونه‌ها و تکثیر قطعه ۱۹۵bp در نمونه‌های مثبت. ستون M: مارکر DNA(MW marker ladder 100). ستون ۱۲-۱ تشخیص کلاستر مایکوئیدس در نمونه‌های بافتی. ستون۱۳: آزمایش نمونه ریه با گونه آگالاکتیه(کنترل منفی).

تصویر۲- آزمایش PCR برای تشخیص جنس مایکوپلاسما در نمونه ریه و تکثیر قطعه ۱۶۳bp در نمونه‌های مثبت. ستون M: مارکر DNA(MW marker ladder 100). ستون ۱: نمونه کنترل مثبت(نمونه واکسن آگالاکتیه). ستون ۱۲-۲ تشخیص مایکوپلاسما در نمونه‌های بافتی. ستون ۱۳: آزمایش نمونه ریه(کنترل منفی).



تصویر۴- آزمایش PCRبرای تشخیص گونه آگالاکتیه درنمونه‌ها و تکثیر قطعه ۳۷۵bp در نمونه‌های مثبت. ستون M: مارکر DNA((MW marker ladder 100). ستون ۱: نمونه کنترل مثبت(نمونه واکسن آگالاکتیه). ستون ۷-۲تشخیص گونه آگالاکتیه در نمونه‌های بافتی. ستون۸: آزمایش نمونه ریه با گونه آگالاکتیه(کنترل منفی).

و ۴۲۰ می‌کنند. که محل اثر آنزیم در جایگاه نوکلوتیدهای 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 ۵۴۸bp، 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). امادراین دو روش، به دلیل وجود rRNA هضم نشده (متعاقب اتصالات ناهمگون) از نظر تئوری، احتمال ایجاد الگوی مشابه M .ccp توسط گونه‌های دیگر در الکتروفورز 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.

اگر چه گزارش‌های موردی از جداشدن گونه آگالاکتیه از زخم‌های ریوی ایجاد شده با گونه‌های گروه مایکوئیدس وجود دارد(۱)، اما برای اطمینان، ابتدا نمونه‌ها از نظر این گونه در مجاورت سویه واکسن آگالاکتیه بررسی شدند. قطعه ۳۷۵bp متعاقب واکنش 16S rRNA-PCR با پرایمر اختصاصی گونه آگالاکتیه(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 وانگشت نگاری پروتئینی نشان می‌دهد که گونه‌های این کلاستر، از نظر ژنتیکی شباهت فراوانی به یکدیگر دارند به طوری که گونه M.mm و ccp. M در ۹۰درصد موارد، شباهت ژنتیکی داشته و تفاوت آنها تنها در ۱۴ نوکلوتید گزارش شده است (۳). حتی بیوتایپ F38 این گونه، به عنوان زیر گروه کاپری کولوم شناخته شده است (۱۱).

گونه M.mc تا ۹۹/۹درصد به گونه M.mmLC شباهت ژنتیکی دارد(۸). سایر اعضا این کلاستر مانند M .mmSC, M .bsg7 که گاو میزبان اختصاصی آنهااست، نیز گزارش‌های نادری از جدا شدن آنهاازریه بزهمراه با سایر عوامل موجوداست. 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 تنهادرالکتروفورزمحصولات نمونه کنترل مثبت مشاهده شد. این امر حاکی از منفی بودن نمونه‌های مورد مطالعه از آلودگی به گونه‌های کلاستر مایکوئیدس 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 مایکوئیدس را تائید 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.

ازسوی دیگر، مطالعات فیلوژنی بر روی ۲۰ گونه از M.ccp در مناطق جغرافیایی متفاوت آسیا و اروپا نشان می‌دهد که با اینکه تفاوت‌های نوکلوتیدی 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 جداشده در ترکیه، با جدایه‌های کشور امارات متفاوت است وتمامی بخش ژن کاذب حذف شده است. این امر نشان می‌دهد که منشاء جغرافیایی گونه‌هادر کشورهای همسایه، متفاوت بوده است(۱۳). با این اوصاف، احتمال حضور موتا سیونی در اپرون rrnB جدایه‌های ccp. M ایران واپرون rrnA که اساس تشخیص کلاستر مایکوئیدس 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 بکار رفته، تعداد نمونه‌ها و روش‌های نمونه گیری 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(۱۷، ۱۰).

اگر چه این مطالعه، صرفا یک Pilot study جهت راه اندازی روش PCR برای تشخیص عفونت‌های ناشی از ccp. M و موارد مشابه در بز ومتعاقبا، سرآغاز تخمینی از وضعیت عفونت در ایران بود، ولی می تواند 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 نمی توان آن را با تعداد کم نمونه مشخص کرد. بنا براین، تشخیص و جداسازی گونه‌های مایکوپلاسما نیازمند جمع آوری تعداد زیادتری نمونه از سایر مناطق و استفاده همزمان از روش‌های تائیدی 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(۲۲،۲۴).

تشکر وقدردانی

از همکاران آزمایشگاه خانم مریم‌هاشمیان، خانم مهزاد ارمی و خانم اعظم یزدانی که در انجام این طرح همکاری نمودند، سپاسگزاریم و موفقیت ایشان را آرزومندیم.

References

1. Adehan, K. (2006) The occuranc of Mycoplasma. spp an d other bacteria in pneumonic lungs of sheeps and goats. Folia Vet. Slovakia. 50: 79-89.
2. Arif, A., Schulz, J. (2007) Contagious caprine pleuropneumnia 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., Mattson, J., Bascunana, C., Bergstrom, K., Wesonga, H., Johnsson, K. E. (1996) Diagnosis of contagious caprine pleuropneumnia by detection and identification of Mycoplasma capricolum capripneumonia by PCR and REA. J. Clin.

Microbiol. 34: 785-791.

5. El Yazid, H. A., Balata, M. A., Wassif, I. M. (2007) Isolatin 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 occurance of Mycoplasma mycoides mycoides infection in a commertial 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 pleuropneumnia in Borana. Small Rum. Res. 70: 131-135.
8. Heranandez, L., Lopes, J., StJaquees, 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., Pfutzner, 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., Henrikx, P., Thiaucourt, F. (2002) Genetic evolution of Mycoplasma capricolum capripneumonia strains and molecular epidemiology of Contagious caprine pleuropneumnia by sequencing of locus H2. Vet. Microbiol. 85: 111-123.
14. Manso-Silvan, L., Perrier, X., Thiaucourt, F. (2007) Phylognic 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 pleuropneumnia 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 pleuropneumnia 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 pleuropneumnia 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 pleuropneumnia 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 characteriziation 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.

J. Vet. Res. 64, 3:205-210, 2009

MOLECULAR IDENTIFICATION OF MYCOPLASMA AGENTS IN SUSPECTED CONTAGIOUS CAPRINE PLEUROPNEUMONIA

Nikousefat, Z.[1], Atyabi, N.[2]*, Pourbakhsh, S. A.[3], Peyghambari, M.[2], Afshari, G. R.[2]

[1]*Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.*

[2]*Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran-Iran.*

[3]*Razi Vaccine and Serum Research Institue, 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 abbatoirs 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**