اپیدمیولوژی مولکولی سوش‌های مایکوپلاسما بویس جدا شده از عفونت‌های ورم پستان بالینی در گاو

محسن ایمان‌دار[۱]، سیدعلی پوربخش[۲*]، محمود جمشیدیان[۱]، تقی زهرایی‌صالحی[۱]

چکیده

مایکوپلاسما بویس از گونه‌های بیماری‌زای اصلی و شایع‌ترین عامل ایجاد پنومونی، ورم پستان و آرتریت در گاو می‌باشد. هدف از این مطالعه، ارزیابی اپیدمیولوژی مولکولی (سن، میزان تولید، اندازه گله، نوع ترشحات بافت پستان، میزان افت تولید و سابقه ورم پستان بالینی) سوش‌های مایکوپلاسما بویس جدا شده از عفونت‌های ورم پستان بالینی در گاو بود. نمونه‌گیری از ۳۲۸ گاو مبتلا به ورم پستان بالینی (Purposive sampling) در گله‌های شیری صنعتی انجام شد. نمونه‌ها در کنار یخ و تا ۲٤ ساعت به آزمایشگاه مرجع مایکوپلاسمای مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، ارسال شدند. جداسازی و شناسایی توسط روش‌های کشت وPCR در حد جنس و گونه انجام گرفت و ۳۱ جدایه با روش تعیین توالی نوکلئوتیدی تأیید شدند. یکی از جدایه‌ها با سویه رفرانس مایکوپلاسما بویس PG45 ATCC25523 قرابت ژنتیکی ۱۰۰٪ داشت. یکی از جدایه‌ها از نظر توالی نوکلئوتیدی متفاوت با بقیه بود و سایر جدایه‌ها، همولوژی ۹۹/۷٪ داشتند. بیشترین موارد مثبت متعلق به گروه سنی ٦-٤ سال و گله‌های با اندازه ۸۰۰ رأس به بالا بود و از این نظر، اختلاف آماری معنی‌داری وجود داشت (P<۰/۰۵). بر حسب میزان تولید و افت تولید متعاقب با عفونت، اختلاف معنی‌داری بین نمونه‌های مثبت مشاهده نگردید (P>۰/۰۵). نتایج نشان داد با ترشحات بافت پستان نمی‌توان این نوع ورم پستان را بطور قطعی تشخیص داد. بیشتر نمونه‌های مثبت در تاریخچه خود سابقه ورم پستان داشتند. نتیجه اینکه میزان حضور مایکوپلاسما بویس در موارد اورام پستان بالینی گاوها در ایران بالا است و رعایت اصول امنیت زیستی و قرنطینه‌ای بایستی در رأس برنامه‌های کنترلی قرار گیرد.

واژگان کلیدی: *مایکوپلاسما بویس، اپیدمیولوژی، PCR، گاو، ورم پستان بالینی*

تاریخ دریافت: ۱۳۹٦/۳/۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹٦/٦/۱۳

مقدمه

مایکوپلاسما بویس از گونه‌های بیماری‌زای اصلی و شایع‌ترین عامل ایجاد پنومونی، ورم پستان، آرتریت و اوتیت در گاو می‌باشد (۱۵). همچنین این عامل از موارد سقط جنین، کاهش باروری اسپرم، منتریت و تورم ملتحمه گزارش شده است (۱۰ و ٤). ورم پستان یکی از مشکلات اساسی گله‌های شیری را تشکیل می‌دهد که ورم پستان مایکوپلاسمایی از مهمترین آنهاست. گونه‌های مختلف مایکوپلاسما از جمله مایکوپلاسما کاناندنسیس، مایکوپلاسما بویجنیتالیوم، مایکوپلاسما آلکالیسنس، مایکوپلاسما کاپریکولوم، مایکوپلاسما کالیفورنیکوم، مایکوپلاسما دیسپار، گونه‌های نامگذاری نشده ST-6 و گروه ۷ از موارد بالینی ورم پستان جدا شده‌اند، اما مایکوپلاسما بویس شایع‌ترین عامل مسبب ورم پستان مایکوپلاسمایی در گاو می‌باشد (۱). مایکوپلاسما بویس فاقد دیواره‌ی سلولی و فضای پری‌پلاسمی بوده و ژنوم بسیار کوچکی دارد که سبب حساسیت بالای آن در محیط می‌شود؛ با این حال شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد قادر است بیش از ۲ ماه در شیر ٤ درجه‌ی سانتیگراد زنده بماند (۱۵).

این نوع ورم پستان بسیار مسری بوده و با درگیر نمودن هر چهار کارتیه پستان، باعث افت شدید و ناگهانی تولید شیر می‌شود. خیلی از گاوها هرگز به شیردهی برنمی‌گردند و ممکن است ۷۵٪ گاوهای عفونی از گله حذف شوند (۲). این ورم پستان در گله‌های شیری بزرگ شایع‌تر است و ورود دام جدید به گله، خطر بروز آن را افزایش می‌دهد(۹). گاوهای شیرده در تمامی سنین و مراحل شیرواری حساس هستند ولی به نظر می‌رسد گاوهایی که در اوایل شیرواری با افزایش اندازه‌ی غده‌ی پستانی روبرو هستند و امکان ایجاد خیز در بافت پستان وجود دارد، بیشتر دچار این نوع ورم پستان شوند. انتقال مایکوپلاسما بویس در گاو از پستان به اندام‌های دیگر و بالعکس امکان‌پذیر بوده که احتمالاً این انتقال به شکل معمول یعنی گسترش واگیری در زمان شیردوشی باشد (۱۲).

۱- گروه میکروبیولوژی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

*۲- آزمایشگاه مرجع مایکوپلاسما، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران

(Poursaba@yahoo.com)

مهمترین مکانیسم ایجاد آسیب و صدمه به سلول، اتصال به سلول‌های میزبان می‌باشد. مایکوپلاسما بویس دارای خانواده‌ای از آنتی‌ژن‌ها بنام لیپوپروتئین‌های سطحی غشاء (Variable surface lipoproteins)Vsp_s می‌باشد که یکی از آنها لیپوپروتئین ایمنوژنیک P48 است. P48 یک لیپوپروتئین غشایی ٤٨ کیلو دالتونی است که با خانواده لیپوپروتئین‌های فعال کننده ماکروفاژها یا MALP (Macrophage activation lipoproteins) همخوانی دارد و منجر به تحریک این رده از سلول‌های ایمنی می‌گردد (۳).

ورم پستان ناشی از مایکوپلاسما بویس ممکن است تحت بالینی، بالینی و مزمن باشد. گاو مبتلا فاقد علایم عمومی بوده و به طور معمول اشتهایش حفظ می‌شود. با شروع ناگهانی ورم پستان، کاهش سریع تولید شیر و ترشح غیرطبیعی به طور آشکار در یک کارتیه یا تعداد بیشتری از کارتیه‌ها وجود دارد که در اکثر موارد هر چهار کارتیه مبتلا می‌شوند. گاوهایی که به تازگی زایمان کرده‌اند، آشکارترین علایم را نشان می‌دهند. در بعضی موارد بزرگ شدن غدد لنفی بالای پستان و تورم در مفاصل رخ می‌دهد که منجر به لنگش می‌شود. شیر در مرحله اول شیردوشی کاملاً طبیعی است، هرچند در حالت سکون مایع کدر چسبناک شبیه آب پنیر برجای می‌ماند. ترشحات ممکن است از رنگ صورتی روشن همراه با خون تا رنگ قهوه‌ای یا خاکستری متغیر باشد. در عرض چند روز، ترشح کاملاً چرکی یا به صورت دلمه می‌شود. کارتیه‌های عفونی شده متورم می‌شوند ولی تورم یکنواخت، سخت و تقریباً بدون درد است. پاسخ به درمان خیلی ضعیف بوده و پستان‌های متورم به طور آشکار آتروفی پیدا می‌کنند (۲).

این باکتری برای اولین بار در سال ۱۹٦۱ میلادی در آمریکا از شیر یک گاو مبتلا به ورم پستان جدا گردید و در ابتدا تحت عنوان مایکوپلاسما بوی‌ماستایتیدیس نامگذاری شد. بعدها بر اساس تشابهات آنتی‌ژنیکی، بیوشیمیایی و بالینی با عامل آگالاکسی واگیر، در گروه ۵ مایکوپلاسما آگالاکتیه واریته‌ی بویس طبقه‌بندی گردید (١٤). با پیشرفت روش‌های تشخیصی و تعیین توالی ژن 16SrRNA به عنوان یک گونه‌ی مجزا دسته‌بندی گردید و تحت عنوان "مایکوپلاسما بویس" نامگذاری شد. تجزیه و تحلیل مقایسه‌ای توالی ژن 16SrRNA نشان داد، بین دو گونه بویس و آگالاکتیه ۸ تفاوت نوکلئوتیدی وجود دارد (۵). در فاصله بین سال‌های ۱۹٦٤ تا ۲۰۰۰، این عفونت در اثر نقل و انتقال حیوانات به شکل سریع و گسترده‌ای در بسیاری از کشورهای جهان از قبیل: فلسطین اشغالی، اسپانیا، استرالیا، فرانسه، انگلستان، چکسلواکی، آلمان، دانمارک، سوئیس، مراکش، کُره جنوبی، برزیل، ایرلند شمالی، جمهوری ایرلند و شیلی گسترش یافت؛ در سال ۲۰۰۷ به عنوان یک عامل مهم ورم پستان بالینی در ایالات متحده، استرالیا و اروپا شناخته شد، طوری که از سال ۲۰۰۸ به بعد افزایش تعداد موارد حاد این بیماری قابل مشاهده است (۲۱). در اپیدمیولوژی این ورم پستان ایمنی میزبان، بقاء جرم در محیط، مدیریت گله و شرایط فیزیولوژیک دام دخالت دارند. تحقیقات متعددی در جهت اپیدمیولوژی این بیماری در نقاط مختلف جهان انجام گرفته که نقش اندازه گله (۱۷)، مدیریت ضعیف در گله‌های بزرگ (۱۵) و واردات دام جدید به گله (۹) در افزایش رخداد بیماری توضیح داده شده است. در حال حاضر اطلاعات اندکی در مورد میزان شیوع ورم پستان مایکوپلاسما بویس و عوامل دخیل در همه‌گیر شناسی آن در ایران وجود دارد که مطالعات قبلی عمدتاً بر اساس روش‌های سرمی یا مولکولی بوده و بدون تعیین فاکتورهای خطر بیماری و با هدف بررسی وجود یا عدم وجود عامل در یک منطقه خاص انجام گرفته است (۸). هدف از این مطالعه، ارزیابی فاکتورهای اپیدمیولوژیک از قبیل سن، میزان تولید، اندازه گله، نوع ترشحات بافت پستان، میزان افت تولید و سابقه ورم پستان بالینی در سوش‌های مایکوپلاسما بویس جدا شده از عفونت‌های ورم پستان بالینی در گاو با استفاده از روش‌های کشت و PCR بود.

مواد و روش کار

جامعه‌ی آماری تمامی گاوهای موجود در گله‌های شیری صنعتی بوده و نمونه‌گیری از نوع مبتنی بر هدف (Purposive sampling) انتخاب گردید. روش مطالعه توصیفی ـ آماری، روش گردآوری اطلاعات میدانی ـ کتابخانه‌ای و ابزار گردآوری اطلاعات تجهیزات آزمایشگاهی بود. این تحقیق از اردیبهشت ماه سال ۱۳۹٤ تا خرداد ۱۳۹۵ بر روی تعداد ۳۲۸ نمونه شیر گاو اخذ شده از موارد اورام پستان بالینی موجود در گاوداری‌های شیری صنعتی صورت گرفت که از این تعداد ۳۲، ۲۷، ٤٤، ۳۵، ٥٤، ۳۰، ۳٦، ۲٤، ۲۰ و ۲٦ نمونه به ترتیب مربوط به شهرهای قزوین، نظرآباد، کرج، تبریز، تهران، ورامین و شهر ری، گرمسار و سمنان، کرمان و استانهای گلستان و مازندران بود. جهت جمع‌آوری اطلاعات دام‌ها، یک نمونه فرم پرسشنامه تهیه و تنظیم شد که اطلاعات مربوط به نمونه بر روی این فرم‌ها ثبت گردید. از گاوهای مبتلا که حداقل یکی از علایم بالینی ورم پستان را نشان می‌دادند، نمونه‌گیری از شیر بعمل آمد. نمونه‌ها در کنار یخ (دمای حدود ٤ درجه سانتیگراد) و حداکثر تا ۲٤ ساعت به آزمایشگاه مرجع مایکوپلاسما مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج ارسال شدند. پس از جداسازی عامل و کشت خالص در محیط اختصاصی PPLO (BBL, Becton Dickinson and Company, Cockeyville, Sparks, MD, USA) ، در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و Co_2 حدود ۱۰-۵٪، استخراج DNA به روش فنل ـ کلروفرم انجام گرفت (۱۹). سپس آزمایش MG-PCR جهت تأیید جنس مایکوپلاسما انجام شد و در صورت مثبت شدن، با آغازگر اختصاصی گونه‌ی بویس MB-PCR انجام گردید (۱۱ و ۷). کنترل مثبت، سویه‌ی استاندارد مایکوپلاسما بویس PG45 ATCC25523 موجود در آزمایشگاه مرجع مایکوپلاسما مؤسسه رازی و کنترل منفی PPLOBroth در نظر گرفته شد.

پس از تکثیر محصولات PCR و تشکیل باندهای اختصاصی، عمل خالص سازی DNA با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت سیناکلون Purification Kit (Cat. No. DP1603) انجام شد و محصول بدست آمده تعیین توالی گردید. در این پژوهش، قطعه‌ای از ژن 16SrRNA مایکوپلاسما جهت ردیابی جنس و قطعه ژنی P48 اختصاصی گونه بویس به عنوان پرایمرهای هدف استفاده گردید (جدول۱).

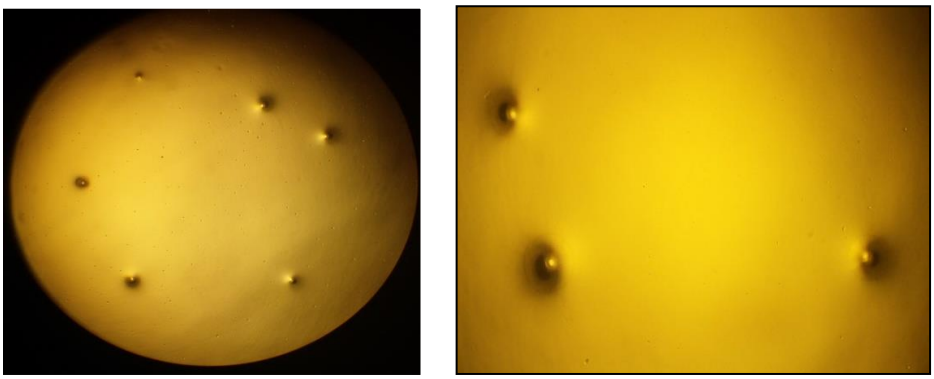
جدول۱ـ توالی‌های نوکلئوتیدی و آغازگرهای مورد استفاده در تشخیص جنس مایکوپلاسما و گونه‌ی مایکوپلاسما بویس به روش PCR

نام پرایمر	ژن هدف	سکانس	طول(bp)	منبع
M_1F **M_3R**	16SrRNA	٥′-GCTGCGGTGAATACGTTCT-٣′ ٥′-TCCCCACGTTCTCGTAGGG-٣′	١٦٣	(Kojima et al., ١٩٩٧)
IMB-F **IMB-R**	P48	٥′-GCTTCATGTGGTGATAAATACTTTA-٣′ ٥′-CTATTTTTGTGTTTCTTTAGCCAAT-٣′	١٣٤١	(Fu et al., ٢٠١٤)

الکتروفورز محصولات به همراه مارکر bp ۱۰۰ بر روی ژل آگاروز ۱٪ و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید ۰/۵ unit/µl (با ولتاژ ۱۰۰ به مدت ۱ ساعت) انجام و بر روی صفحه دستگاه U.V.Translluminator(BioRad, Hercules, CA, USA) تصویر تهیه گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آمار توصیفی و استنباطی انجام و متغیرها به کمک جداول فراوانی و تقاطعی آنالیز شدند. در آمار تحلیلی و با هدف ارزیابی متغیرهای مختلف از قبیل سن، میزان تولید، اندازه گله، نوع ترشحات بافت پستان، میزان افت تولید و سابقه ورم پستان بالینی، داده‌ها با استفاده از آزمون مربع کای Chi-square و رگرسیون خطی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

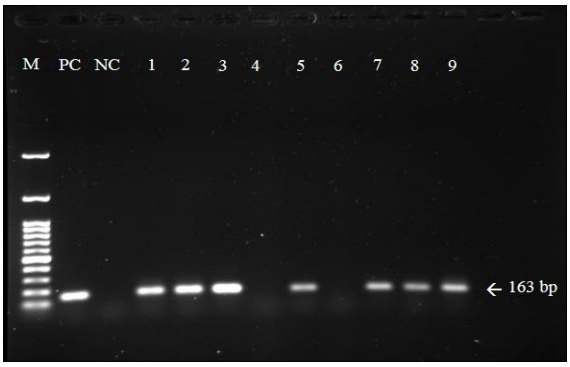
نتایج

از تعداد ۳۲۸ نمونه‌ی شیر اخذ شده، ۵۸ نمونه (۱۷٪/٦۹) از نظر رشد در محیط کشت PPLO آگار مثبت شدند و پرگنه‌های شبیه تخم مرغ نیمرو شده در زیر میکروسکوپ نوری را از خود نشان دادند (نگاره۱).

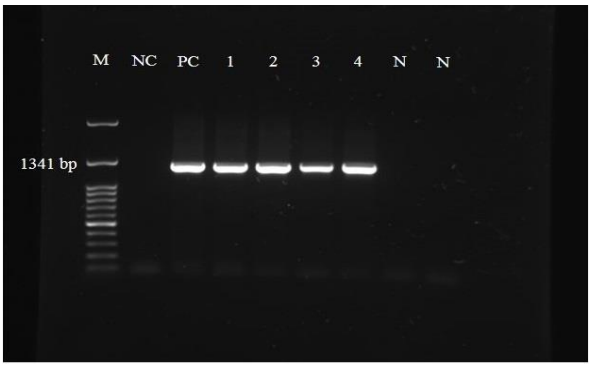


نگاره۱ـ کلونی‌های مایکوپلاسما بویس بر روی محیط کشت PPLO آگار

از نظر حضور ژن مربوط به جنس مایکوپلاسما در آزمون PCR، تعداد ۹۷ نمونه (۲۹٪/۵۷) باند ۱۶۳ جفت بازی را از خود نشان دادند(نگاره۲). نمونه‌های مثبت، از لحاظ حضور ژن P48 مایکوپلاسما بویس مورد آزمون PCR اختصاصی قرار گرفتند که تعداد ۳۱ نمونه (۳۱٪/۹۶) مثبت و ٦٦ نمونه (٦۸٪/۰٤) منفی شدند (نگاره۳).



نگاره ۲ـ تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR با آغازگر جنس مایکوپلاسما و باند ۱٦۳ bp در تعدادی از نمونه‌ها،M: مارکر ۱۰۰bp، PC: کنترل مثبت (*M.bovis*ATCC 25523/ PG45)، NC: کنترل منفی، گوده‌های ۳-۱، ۵، ۷-۹: نمونه‌های مایکوپلاسما مثبت



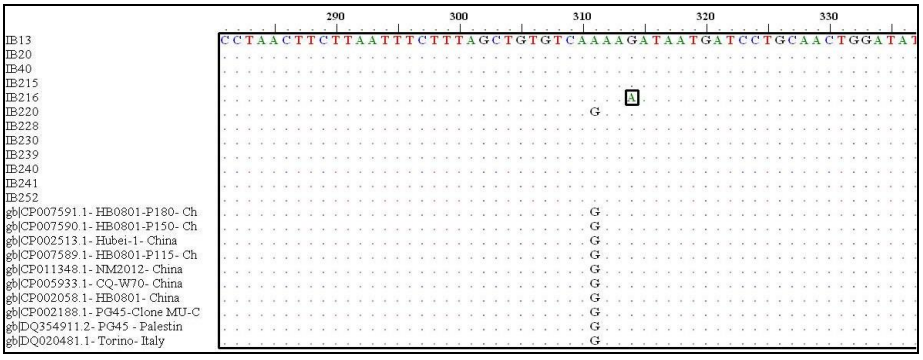
نگاره ۳ـ تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR با آغازگر اختصاصی P48 گونه‌ی بویس و باند ۱۳٤۱ bp در تعدادی از نمونه‌ها،M: مارکر ۱۰۰bp، PC: کنترل مثبت (*M.bovis*ATCC 25523/ PG45)، NC: کنترل منفی، گوده‌های ۱ تا ٤: نمونه‌های مثبت، N: نمونه منفی (*M.agalactiae* NCTC 10123)

در این پژوهش، نمونه‌های شیر از مناطق مختلف کشور به آزمایشگاه مرجع مایکوپلاسما مؤسسه رازی ارجاع گردید که تمامی شهرها دارای حداقل یک نمونه مثبت مایکوپلاسما بویس بودند (جدول٤).

جدول٤ـ تعداد نمونه‌های مثبت مایکوپلاسما بویس در شهرهای مختلف کشور

شهر	قزوین	نظرآباد	کرج	تبریز	تهران	ورامین، شهرری	سمنان، گرمسار	کرمان	گلستان	مازندران
تعداد نمونه مثبت	۲	۲	٦	۱	۹	٤	۳	۲	۱	۱

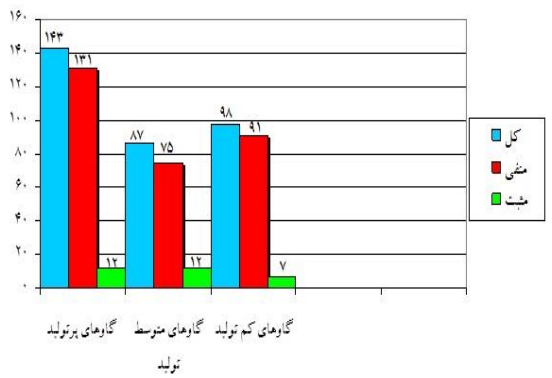
جدایه‌های این تحقیق در بانک جهانی ژن و با شماره دسترسی KX772789 تا KX772800 ثبت گردید و با استفاده از نرم‌افزار مولکولی Bio-Edit (Clustal W) هم‌ردیف نمودن توالی‌ها و مقایسه‌ی آنها با یکدیگر صورت گرفت. نتایج حاصل نشان داد جدایه‌ی مربوط به نظرآباد از نظر فیلوژنیک با جدایه‌های موجود در بانک جهانی ژن قرابت ۱۰۰ درصدی دارد و بر اساس توالی‌های نوکلئوتیدی با آنها در یک دودمان قرار گرفت. علاوه بر این، جدایه کرج با جدایه‌های بانک ژنی ۹۹/۷۰٪ مشابهت دارد. مقایسه‌ی جدایه‌های حاضر در این تحقیق نشان داد دو جدایه‌ی فوق قرابت ۹۹/۷۰٪ با یکدیگر دارند و میزان قرابت هر کدام با جدایه‌های حاضر در این تحقیق ۹۹/۸۰٪ می‌باشد. تمامی جدایه‌های حاضر در این تحقیق از نظر فیلوژنیک شباهت ۹۹/۸۰٪ با جدایه‌های حاضر در بانک جهانی ژن دارند. جدایه‌ی کرج با هیچکدام از جدایه‌های حاضر و نیز جدایه‌های بانک ژنی قرابت ژنتیکی ۱۰۰ درصدی نداشته و به عنوان یک جدایه جدید که از قبل در بانک جهانی ژنی ثبت نشده بود، شناسایی گردید (نگاره٤).



نگاره٤ ـ توالی‌های نوکلئوتیدی بدست آمده تعدادی از نمونه‌های جدا شده مایکوپلاسما بویس و مقایسه با سویه‌های حاضر در NCBI

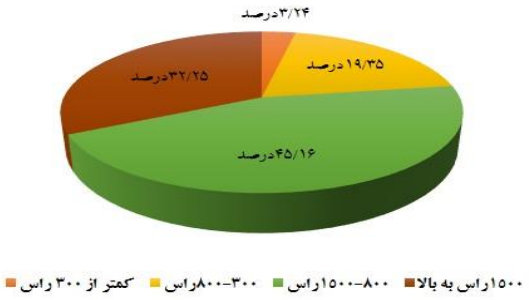
آنالیز نتایج بر اساس سن دام‌ها نشان داد تعداد ٦٥ مورد (۲ نمونه مثبت و ٦٣ نمونه منفی) مربوط به گروه سنی ٣٦-٢٤ ماهه (گروه ۱) با ٦/٤٥٪، ٥٦ مورد (٤ نمونه مثبت و ٥٢ نمونه منفی) مربوط به گاوهای ٤٨-٣٦ ماهه (گروه ۲) با ١٢/٩٢٪، ٧٦ مورد (۸ نمونه مثبت و ٦٨ نمونه منفی) مربوط به گروه سنی ٤٨-٦٠ ماهه (گروه ۳) با ٢٥/٨٪، تعداد ٤٢ نمونه (١٢ نمونه مثبت و ۳۰ نمونه منفی) مربوط به گاوهای ٧٢-٦٠ ماهه (گروه ٤) با ٣٨/٨٪ و ٨٩ مورد (٥ نمونه مثبت و ٨٤ نمونه منفی) با ١٦/١٢٪ مربوط به گروه گاوهای با سن ٧٢ ماه به بالا (گروه ٥) بوده است. با توجه به آنالیز آماری داده‌ها و وجود اختلاف بسیار معنی‌دار (P<٠/٠١) بین گروه‌های سنی، گروه‌ها مجدداً دو به دو با هم مقایسه شدند تا مشخص گردد بین کدامین دو گروه مختل اختلاف معنی‌دار وجود دارد. بدین ترتیب مشخص شد بین گروه‌های ۱ و ٤، گروه‌های ۲ و ٤ و گروه‌های ٥ و ٤ اختلاف بسیار معنی‌دار (P<٠/٠١) و بین گروه‌های ۱ و ۳، ۲ و ٥، ۳ و ٤ و گروه‌های ۳ و ٥ اختلاف معنی‌دار می‌باشد (P<٠/٠٥). این در حالی است که در مقایسه اختلاف گروه‌های ۱ با ۲، گروه‌های ۱ با ٥ و نیز مقایسه گروه‌های ۲ با ۳ هیچ اختلاف معنی‌داری به چشم نمی‌خورد (P>٠/٠٥).

آنالیز نتایج بر اساس میزان تولید دام‌ها نشان داد از نظر فراوانی نسبی نمونه‌های مثبت، ٣٨/٧١٪ نمونه‌ها به گاوهای پُرتولید، ٣٨/٧١٪ گاوهای متوسط تولید و ٢٢/٥٨٪ به گاوهای کم تولید تعلق داشتند. با تجزیه و تحلیل داده‌ها اختلاف آماری چشمگیری بین گاوها از این نظر مشاهده نشد. نمودار۱ تعداد فراوانی مطلق نمونه‌های مثبت بر حسب میزان تولید را نشان می‌دهد.



نمودار ۱ـ توزیع فراوانی مطلق نمونه‌های مثبت مایکوپلاسما بویس بر حسب میزان تولید

آنالیز نتایج بر حسب اندازه گله نشان داد، تعداد ٤٠ نمونه مربوط به گله‌های با اندازه کمتر از ۳۰۰ رأس (۱ نمونه مثبت و ۳۹ نمونه منفی) با فراوانی نسبی ۳/۲٤٪، تعداد ٤۹ نمونه به گله‌های با جمعیت ۸۰۰-۳۰۰ رأس (٦ نمونه مثبت و ٤۳ نمونه منفی) با ۱۹/۳۵٪، ۱۰۵ نمونه مربوط به گاوداری‌های با جمعیت ۸۰۰-۱۵۰۰ رأس (١٤ نمونه مثبت و ۹۱ نمونه منفی) با ٤٥٪/١٦ و ١٣٤ نمونه به گاوداری‌های با جمعیت ۱۵۰۰ رأس به بالا (۱۰ نمونه مثبت و ١٢٤ نمونه منفی) با ۳۲/۲۵٪ تعلق داشتند. تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان از اختلاف معنی‌دار بین فراوانی نمونه‌های مثبت بر حسب اندازه گله داشت (P<۰/۰۵) (نمودار۲).



نمودار ۲ـ توزیع فراوانی نسبی نمونه‌های مثبت مایکوپلاسما بویس بر حسب اندازه گله

از نظر وجود ترشحات غیرطبیعی بافت پستان و وضعیت ظاهری نمونه، از ۳۱ نمونه مثبت مایکوپلاسما بویس، ۱۵ نمونه (٤٨٪/٤) دارای ظاهر زرد رنگ متمایل به کرمی و لخته‌دار (ریز و درشت)، ۱۲ نمونه (۳۸٪/۷) دارای رنگ سفید و شبیه به ظاهر شیر بوده و تعداد ٤ نمونه (۱۲٪/۹) نیز دارای ظاهری به رنگ صورتی متمایل به ارغوانی و در برخی موارد کاملاً خونی بودند.

از ۳۱ نمونه مایکوپلاسما بویس، تعداد ۱۰ نمونه (۳۰٪/٦۹) دچار قطع کامل تولید شیر شده بودند و تعداد ١٤ نمونه (٤٥٪/١٦) کاهش ۵۰-۳۰ درصدی تولید را از خود نشان دادند. ۷ نمونه (۲٤٪/۱۵) نیز کاهش تولید شیر نداشتند و یا با کاهش حدود ۱۰ درصدی (جزئی) تولید شیر روبرو بوده‌اند. از نظر سابقه ورم پستان (بدون در نظر گرفتن نوع، تعداد و عامل آن)، از کل ۳۲۸ نمونه، ١٤٢ گاو سابقه ورم پستان به تعداد ۱ الی ۱۰ بار بسته به سن دام داشته‌اند. از تعداد ۳۱ نمونه مثبت مایکوپلاسما بویس، ٢٤ رأس (۷۷٪/٤۱) سابقه ورم پستان داشتند که از نظر آماری، اختلاف معنی‌داری وجود دارد (P<۰/۰۵).

بحث

مایکوپلاسما بویس از عوامل مهم ورم پستان مایکوپلاسمایی در گاو است که سبب ایجاد خسارت‌های اقتصادی در گله‌های شیری می‌گردد. تاکنون در رابطه با شناسایی عامل بیماری و عوامل مؤثر در همه‌گیرشناسی آن در کشور تحقیقی صورت نگرفته است. ضرورت جداسازی، تعیین هویت باکتری و شناخت جنبه‌های اپیدمیولوژیک آن برای کمک به سیستم دامپروری کشور از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد. نتایج این مطالعه نشان داد از ۳۲۸ نمونه شیر مبتلا به ورم پستان، ۳۱ نمونه (۹٪/٤٥) از نظر حضور مایکوپلاسما بویس مثبت‌اند. میزان وقوع این ورم پستان در نمونه‌های شیر در مطالعه حاضر کمتر از میزان آن در شرایط مشابه در ایتالیا دارد (۲۰)؛ در حالیکه این مقدار بیشتر از کشورهایی مانند مصر (١٦) می‌باشد. پس می‌توان گفت میزان آلودگی در موارد اورام پستان بالینی در

نقاط مختلف دنیا متغیر بوده و از ناحیه‌ای به ناحیه‌ی دیگر متفاوت است که می‌توان آن را ناشی از تفاوت در روش‌های تشخیصی و مدیریت بهداشتی گله‌های شیری دانست.

هم‌ردیف نمودن توالی جدایه‌ها و مقایسه‌ی آنها با یکدیگر نشان داد جدایه‌ای از مایکوپلاسما بویس با عنوان جدایه‌ی نظرآباد از نظر فیلوژنیک با جدایه‌های موجود در بانک جهانی ژن (Palestine–PG45، Torino-Italy، PG45-Clone MU-NM2012-China، CQ-W70-China، CloneA2 USA و Hubei-1-China) همولوژی ۱۰۰٪ دارد و بر اساس توالی‌های نوکلئوتیدی با آنها در یک دودمان قرار گرفت؛ علاوه بر این، جدایه کرج با جدایه‌های بانک ژنی ۹۹/۷۰٪ مشابهت نشان داد. سایر جدایه‌های این تحقیق از نظر فیلوژنیک شباهت ۹۹٪/۸۰ با جدایه‌های حاضر در بانک جهانی ژن دارند که این تفاوت به نوکلئوتید شماره ۳۱۱ مربوط می‌شود. نکته قابل توجه اینکه جدایه‌ی کرج با هیچکدام از جدایه‌های حاضر و نیز جدایه‌های بانک ژنی قرابت ژنتیکی کامل ندارد که این تفاوت به نوکلئوتید ۳۱٤ (آدنین) تعلق دارد. مقایسه‌ی جدایه‌ها با هم نشان داد دو جدایه‌ی فوق قرابت فیلوژنیک ۹۹/۷۰٪ بین خودشان دارند و میزان قرابت هر کدام با جدایه‌های حاضر در این تحقیق ۹۹/۸۰٪ می‌باشد. دلیل این اختلافات اندک در نوکلئوتیدها می‌تواند بروز تفاوت در سکانسینگ جدایه‌ها باشد، زیرا توالی ژن جدایه‌های مایکوپلاسما بویس جدا شده در این تحقیق بزرگ بود ولی توالی ژن استاندارد موجود در بانک ژنی کوچکتر از قطعات جدا شده ما بود، لذا به ناچار در نرم‌افزار بیوانفورماتیکی این قطعات اضافی را حذف نمودیم تا در مقایسه با ژن‌های استاندارد موجود در بانک ژنی اختلالی بوجود نیاید. انجام آنالیز مقایسه‌ای جدایه‌های گزارش شده با سایر کشورهای جهان می‌تواند در تعیین و تغییر استراتژی‌های پیشگیری و کنترل این بیماری مفید واقع شود، طوری که می‌توان با مطالعه و بررسی بیشتر بر روی جدایه‌های بدست آمده یک واکسن مؤثر طراحی و کیت‌های تشخیص مایکوپلاسما بویس از قبیل الیزا را در داخل کشور تولید نمود.

بیشترین موارد مثبت به ترتیب به گروه سنی ٦٠–٧٢ ماهه (٥–٦ ساله) با ۳۸/۸٪ و گروه سنی ٦٠–٤٨ ماهه (٤–٥ ساله) با ۲٥٪/۸ تعلق داشت؛ به عبارت دیگر گاوهای ٦–٤ ساله در مجموع نزدیک به دو سوم موارد مثبت را به خود اختصاص داده‌اند. گاوهای شیرده در تمام سنین ممکن است به این نوع ورم پستان مبتلا شوند. این بیماری معمولاً در گله‌هایی که بهداشت شیردوشی ضعیف است، رخ می‌دهد و ممکن است از طریق دست کارگران شیردوش از گاوی به گاو دیگر منتقل گردد؛ لذا بنظر می‌رسد رخداد بالای بیماری در این سنین به دلیل حضور دفعات بالای گاوها در سالن شیردوشی باشد، هر چند نمی‌توان ضعف سیستم ایمنی را که با افزایش سن بیشتر می‌شود، نادیده گرفت. در مطالعه‌ای که توسط Fu-Rong Zhao و همکاران در چین انجام گرفت، گاوهای با سن یک سال با ۱۰/٥٪ بالاترین میزان شیوع را داشتند و گاوهای سه ساله با ۹/٦۱٪ در رده دوم قرار گرفتند. در این مطالعه، رابطه معناداری بین میزان شیوع با سن و تعداد آبستنی در گله وجود نداشت (٦). یافته‌های مطالعه حاضر با نتایج مطالعه Fu و همکاران همخوانی ندارد اما تئوری احتمال رخداد این نوع ورم پستان در هر سنی در گاو را اثبات می‌نماید.

آنالیز نتایج از نظر فراوانی نسبی بر حسب میزان تولید نشان داد بیشتر نمونه‌های مثبت به گاوهای متوسط تولید و پُرتولید تعلق داشتند و تنها ۲٥٪ نمونه‌های مثبت به گاوهای کم تولید تعلق داشت. مایکوپلاسما بویس به عنوان یک پاتوژن قوی برای ایجاد ورم پستان در گاو مطرح می‌باشد و وجود استرس ناشی از تولید بالا می‌تواند تأثیر بسزایی در وقوع ورم پستان در گاوهای شیری داشته باشد.

بیشترین موارد مثبت به ترتیب به گله‌های با جمعیت ۱٥۰۰– ۸۰۰ رأس با ٤٥/١٦٪ و گله‌های با تعداد ۱٥۰۰ رأس به بالا با

۳۲٪/۲۵ اختصاص داشت؛ نتایج این بخش از تحقیق حاضر با نتایج تمامی مطالعات و یافته‌های قبلی همخوانی دارد، طوریکه مطالعات قبلی نشان می‌دهد رخداد بیماری در گله‌های بزرگ شایع‌تر است (۲۰ و ۱۸). تحقیقات در ایالات متحده آمریکا نشان می‌دهد افزایش ورم پستان مایکوپلاسمایی با افزایش اندازه‌ی گله در ارتباط است (۱۷). در ایالت کالیفرنیا نشان داده شده است خطر ابتلا به ورم پستان مایکوپلاسما بویس و امکان یافتن یک نمونه مثبت در گله‌های بزرگ با تعداد بیش از ۳۵۰ رأس، ۱۵ برابر بیشتر از گله‌های با تعداد کمتر از ۳۵۰ رأس و در داخل مخازن شیر فله آنها می‌باشد. تراکم بالا و مدیریت ضعیف در گله‌های بزرگ به عنوان مهمترین عامل ابتلای دام به این بیماری محسوب می‌گردد (۱۵).

از نظر وجود ترشحات غیرطبیعی بافت پستان و وضعیت ظاهری، ٤٨/٤٪ نمونه‌ها دارای ظاهری زرد رنگ متمایل به کرمی و لخته‌دار (ریز و درشت)، ۳۸٪/۷ دارای رنگی سفید و ظاهری شبیه به شیر بوده و ۱۲/۹٪ نیز دارای ظاهری به رنگ صورتی متمایل به ارغوانی و در برخی موارد کاملاً خونی بودند. طبق یافته‌های قبلی پژوهشگران، ترشح کارتیه‌های مبتلا در مراحل اولیه بیماری در حین شیردوشی کاملاً طبیعی به نظر می‌رسد؛ رفته رفته ممکن است ترشحات چسبناک و شبیه آغوز یا پنیر نرم شوند. ترشحات به مرور به رنگ صورتی روشن همراه با خون درمی‌آید یا تغییر رنگ به صورت قهوه‌ای یا خاکستری ایجاد می‌شود. سپس ترشحات کاملاً چرکی و کرمی رنگ یا به صورت دلمه می‌شود ولی لخته‌های بزرگ و سفت وجود ندارد (۲). مقایسه نتایج حاضر با یافته‌های قبلی نشان داد نمونه‌های مثبت اخذ شده در این تحقیق، از مراحل مختلف عفونت با ورم پستان مایکوپلاسما بویس اخذ شده است و نمی‌توان از روی وضعیت ظاهری نمونه‌ی شیر و ترشحات غیرطبیعی، این نوع ورم پستان را مورد تشخیص قطعی و نهایی قرار داد.

از تعداد نمونه‌های مثبت مایکوپلاسما بویس، نزدیک به ۷۵٪ از نمونه‌ها با قطع کامل تولید شیر یا کاهش ۵۰-۳۰ درصدی روبرو بوده‌اند. طبق یافته‌های قبلی، گاو مبتلا به ورم پستان مایکوپلاسما بویس با کاهش چشمگیر یا قطع تولید ممکن است مواجه گردد هرچند بسیاری از عفونت‌ها در یک گاو مبتلا به عفونت تحت بالینی، افزایش مشخصی در کاهش میزان تولید شیر را از خود نشان نمی‌دهد (۱۳). در این تحقیق بیشتر موارد اورام پستان، بالینی بودند. مایکوپلاسماهای ورم پستان‌زا، معمولاً در غشاهای مخاطی تنفسی و ادراری گاوهای سالم یافت می‌شوند. با این حال عواملی مثل زایمان، تغییرات شدید درجه حرارت، حمل و نقل، ضربه‌های خارجی و یا بیماری‌های دیگر ممکن است این اجازه را بدهد که این عامل به طور مستقیم به بافت پستان یا دیگر بافت‌های بدن وارد شده و منجر به بروز ورم پستان بالینی در حیوان شود.

فهرست منابع

۱- حسنی طباطبائی، ع.، فیروزی، ر. (۱۳۸۹): بیماری‌های باکتریایی دام، چاپ سوم، انتشارات و چاپ دانشگاه تهران، تهران، ایران: ٤٦٩-٤٨٤.

۲- مسافری، ص.، حقیقت کاغذچیان، م. (۱۳۸۲): بیماریهای پستان در حیوانات اهلی، چاپ اول، انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران: ۱۷۰-۱۵۹.

3. Adamu, L.Y., Wawegama, N.K., Browning, G.F., Markham, Ph.F. (2013): Membrane proteins of Mycoplasma bovis and their role in pathogenesis. Res. Vet. Sci. 95:321–325.
4. Cremonesi, P., Vimercati, C., Pisoni, G., Perez, G., Miranda, R., Castiglioni, A.B., Luzzana, M., Ruffo, G., and Moroni, P. (2007): Development of DNA extraction and PCR amplification protocols for detection of Mycoplasma bovisdirectly from milk samples. Vet. Res. Com. 31:225–227.
5. Foddai, A., Idini, G., Fusco, M., Rosa, N., De la Fe, C., Zinellu, S., Corona, L., Tola, S. (2005): Rapid differential diagnosis of Mycoplasma agalactiae and Mycoplasma bovis based on a multiplex-PCR and a PCR-RFLP. Mol. and Cell. Pro. 19:207–212.

6. Fu-Rong, Zh., Xue-Liang, Zh., Min-Jun, X., Si-Yang, H., Dong-Hui, Zh., Hui-Yan, X., Hui-Qun, S., and Feng-Cai, Zou. (2012): First report of Mycoplasma bovis infection in dairy cattle in Guangzhou, subtropical southern China. Afr. J. Mic. Res. 6(27):5668-5671.
7. Fu, P., Sun, Zh., Zhang, Y., Yu, Z., Zhang, H., Su, D., Jiang, F., Wu, W. (2014): Development of a direct competitive ELISA for the detection of Mycoplasma bovis infection based on a monoclonal antibody of P48 protein. Biomed-Central Vet. Res. 10:42.
8. Ghazaei, C. (2006): Detection of Mycoplasmalmastitis and determination of its prevalence rate in dairy cattle herds in Moghan-Ardabil state, Iran. J. Ani. Vet. Adv. 5(4):280-283.
9. Hotzel, H., Frey, J., Bashiruddin, J., and Sachs, K. (2003): Detection and Differentiation of Ruminant Mycoplasmas, Methods in Molecular Biology. In: PCR Detection of Microbial Pathogens: Methods and Protocols. Humana Press Inc. Totowa; 216:231-245.
10. Karahan, M., Kalin, R., Atil, E., Çetinkaya, B. (2010): Detection of Mycoplasma bovisin cattle withmastitis and respiratoryproblems in easternTurkey. Vet. Rec. 166:827-829.
11. Kojima, A., Takahashi, T., Kijima, M., Ogikubo, Y., Nishimura, Y., Nishimura, S., Harasawa, R., Tamura, Y. (1997): Detection of Mycoplasma in avian live virus vaccines by polymerase chain reaction. Biologicals. 25:365-71.
12. Kumar, A., Verma, A.K., Rahal, A. (2011): Mycoplasma bovis, A multi disease producing pathogen. Asi. J. Ani. Vet. Adv. 6(6):537-546.
13. 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. J. Vet. Int. Med. 25:772–783.
14. McAuliffe, L., Branko, K.R., Ayling, R.D., Nicholas, R.A. (2006): Molecular epidemiological analysis of Mycoplasma bovisisolates from the United Kingdom shows two genetically distinct clusters. J. Cli. Mic. 42:4556-4565.
15. Nicholas, R.A.J., Ayling, R.D. (2003): Mycoplasma bovis: disease, diagnosis and control. Res. Vet. Sci. 74:105-112.
16. Osman, K.M., Abd El-Razik, K.A., Barbar, E.E., ELShafey, D.Y.H., Arafa, A.A. (2008): Molecular typing of Mycoplasma species recovered from bovine mastitis. Glo. Vet. 2(6):360-368.
17. Park, A. (2014): Cattle Health and Welfare Group,Mycoplasma bovisInformation note. Ani. and Pla.Hea.Agc. CHAWG (December 2014). pp:1-4.
18. Passchyn, P., Piepers, S., De Meulemeester, L., Boyen, F., Haesebrouck, F., De Vliegher, S. (2012): Between-herd prevalence of Mycoplasma bovis in bulk milk in Flanders, Belgium. Res. Vet. Sci. 92:219–220.
19. Pourbakhsh, S.A., Shokri, G.R., Banani, M., Elhamnia, F., Ashtari, A. (2010): Detection of Mycoplasma synoviae infection in broiler breeder farms of Tehran province using PCR and culture methods. Arch. Razi. Ins. 65(2):75-81.
20. Radaelli, E., Castiglioni, V., Losa, M., Benedetti, V., Piccinini, R., Nicholas, R.A.J., Scanziani, E., Luini, M. (2011): Outbreak of bovine clinical mastitis caused by Mycoplasma bovis in a North Italian herd. Res. Vet. Sci. 91:251–253.
21. Rossetti, B.C., Frey, J., Pilo, P. (2010): Direct detection of Mycoplasma bovis in milk and tissue samples by real-time PCR. Mol. Cell.Pro.24:321-323.