

دانشگاه تهران

دانشكده دامپزشكي

جهت دريافت درجه دكتراي تخصصي كلينيكال پاتولوژي

موضوع

بررسي عفونت ريوي *مايكوپلاسمايي ناشي از مايكوپلاسما مايكوئيدس واريته مايكوئيدس* و *مايكوپلاسما كاپري كولوم واريته كاپري كولوم* در گوساله‌ها و بزهاي كشتارشده به روش **PCR**

اساتيد راهنما:

نگارش:

فهرست

**عنوان صفحه**

**الف- مقدمه 1**

**ب-چکيده 3**

**فصل اول:کليات 5**

**1- تاريخچه 6**

**2- خصوصيات کلي مايکوپلاسما 6**

**3- مقاومت مايکوپلاسماها 8**

**4- طبقه بندي مايکوپلاسماها 9**

**5- طبقه بندي کلاستر مايکوئيدس 12**

**6- فيلوژني 14**

**7- ساختمان 15**

**1-7-ساختمان مايکوپلاسما مايکوئيدس 15**

**2-7- ساختمان مايکوپلاسما کاپري کولوم 17**

**8- بيولوژي مولکولي 19**

**9- توالي‌هاي تکراري 23**

**10- پروتئينهاي سطحي 25**

**11- فاکتور حدت 30**

**12- آناليز پروتئين 32**

**13- طبقه بندي سويه‌ها 34**

**14- مشخصات گونه مايکوئيدس 35**

**15- کشت و رشد گونه مايکوئيدس 38**

**16- کشت و رشد گونه کاپري کولوم 41**

**1-16- محيط Thiacourt 41**

**17- بيماري پلوروپنوموني واگير گاوان 44**

**1-17- علائم باليني 45**

**2-17- علائم کالبدگشايي بيماري 47**

**3-17- پاتوژنز 50**

**1-3-17- مکانيسمهاي مقابله با دستگاه ايمني 53**

**4-17- اختصاصيت ميزبان 57**

**5-17- انتقال بيماري 58**

**6-17- سير همه گيري 59**

فهرست

**عنوان صفحه**

**1-6-17- مخزن 59**

**2-6-17- راه انتقال 59**

**7-17- پيشگيري و کنترل 60**

**1-7-17- اقدامات لازم براي حفاظت مناطق عاري از بيماري 61**

**2-7-17- اقدامات لازم هنگام شيوع بيماري 62**

**3-7-17- اقدامات لازم در مناطق آلوده بومي 63**

**18- بيماري پلوروپنوموني واگير بزان 63**

**1-18- علائم باليني 64**

**2-18- علائم کالبد گشايي 66**

**19- گونه مايکوپلاسما کاپريکولوم کاپريکولوم 69**

**1-19- سندروم MASKePs 70**

**2-19- علائم باليني 71**

**3-19- علائم کالبد گشايي 71**

**4-19- سندروم آگالاکتيه واگير 73**

**20- گونه مايکوپلاسما کاپري 73**

**1-20- بيماريزايي 73**

**2-20- علائم کالبد گشايي 74**

**21- سير همه‌گيري 75**

**1-21-مخزن 75**

**2-21-راه انتقال 76**

**3-21-جمعيت ميزبان 77**

**22-پيشگيري وکنترل 77**

**1-22- اقدامات لازم براي محافظت مناطق عاري از بيماري 77**

**2-22- اقدامات لازم هنگام شيوع بيماري 78**

**3-22- اقدامات لازم در مناطق آلوده بومي 78**

**23-واکسن 79**

**1-23-واکسن MmmLC 79**

**2-23-واکسن Mccp 79**

**3-23-واکسن Mcc 79 79-اختصاصيت ميزبان در کلاستر مايکوئيدس .................. 80**

فهرست

**عنوان صفحه**

**25-تشخيص افتراقي 80**

**1-25-شناسايي عامل بيماري زا 81**

**1-1-25-بررسي ميکروسکوپيک اگزوداي ريه از طريق تهيه اسمير يا برش بافتي 81**

**2-25- تشخيص آزمايشگاهي 81**

**1-2-25- روش کشت و جداسازي 81**

**1-1-2-25- انتخاب نمونه ها 82**

**2-1-2-25- آماده سازي نمونه ها 82**

**3-25- تستهاي بيوشيمي 83**

**4-25- روشهاي سرولوژي 85**

**1-4-25- عوامل موثر در آزمايشات سرولوژي 85**

**2-4-25- تست مهاري رشد 87**

**3-4-25- تست ايمونو فلورسانس 88**

**4-4-25- تست رسوب ژلي 88**

**5-4-25- تست فيکساسيون کامپلمان 89**

**6-4-25- تست ممانعت از هماگلوتيناسيون 89**

**7-4-25- تست آگلوتيناسيون لاتکس 90**

**8-4-25- تست اليزاي رقابتي 91**

**9-4-25- ساير تستهاي تشخيصي 94**

**5-25 - مشکلات روشهاي سنتي 94**

**6-25- تشخيص با استفاده از PCR 95**

**فصل دوم: روش کار**

**26- روش کار 101**

**1-26- جمع آوري نمونه 101**

**1-1-26- مواد لازم 101**

**2-1-26- بخش جمع آوري نمونه 101**

**3-1-26- نمونه برداري 103**

**2-26- کشت و جداسازي نمونه ها 104**

**1-2-26- مواد لازم 104**

فهرست

**عنوان صفحه**

**2-2-26- طرز تهيه محيط کشت اختصاصي براي جداسازي مايکوپلاسماي نشخوار کنندگان 106**

**1-2-2-26- مواد لازم 106**

**2-2-2-26- روش تهيه محيط کشت 107**

**3-26- استخراج DNA مايکوپلاسما 109**

**1-3-26- روش استخراج DNA از نمونه هاي ارسالي 109**

**4-26- فرايند PCR 110**

**1-4-26- مواد لازم 110**

**2-4-26- آماده سازي مواد جهت واکنش PCR 112**

**1-2-4-26- افزوده سازي DNA نمونه‌ها 112**

**2-2-4-26- افزوده سازي DNA کلونيهاي جدا شده 115**

**3-2-4-26- تهيه مخلوط اصلي اوليه 115**

**3-4-26- پرايمرها 115**

**4-26- واکنش PCR 117**

**5-26- تهيه ژل الکتروفورز 118**

**1-5-26- طرز تهيه محلول اتيديوم برمايد 119**

**6-26- الکتروفورز 121**

**7-26- رويت باندهاي ايجاد شده 122**

**فصل سوم: نتايج**

**27- نتايج 124**

**1-27- جداسازي 124**

**1-1-27- بررسي عملکرد محيط کشت 124**

**2-1-27- نتايج کشت نمونه هاي ارسالي 124**

**1-2-1-27- نتايج روز پنجم 125**

**2-2-1-27- نتايج روزهفتم تا دهم 125**

**3-2-1-27- نتايج روزپانزدهم 126**

**2-27- نتايج PCR 126**

**1-2-27- نتايج PCR نمونه ها با پرايمر جنس 126**

**2-2-27- تائيد کلوني هاي جدا شده 127**

**3-2-27- نتايج PCR نمونه ها با پرايمر کلاستر مايکوئيدس 127**

**4-2-27- نتايج PCR نمونه ها با پرايمر گونه آگالاکتيه 128**

**5-2-27- نتايج PCR نمونه ها با پرايمر گونه مايکوئيدس کلوني بزرگ 129**

**3-27- نتايج کالبد گشايي 130**

**1-3-27- معيار انتخاب 130**

فهرست

**عنوان صفحه**

**فصل چهارم: بررسي نتايج**

**نمودارها 131**

**فصل پنجم: بحث**

**28- بحث 139**

**1-28- ضايعات کالبد گشايي 139**

**2-28- ميزان وقوع عفونت تنفسي مايکوپلاسما 141**

**3-28- روش کشت 142**

**4-28- روش PCR 147**

**5-28- فراواني گونه ها 152**

**29- خلاصه انگليسي 159**

**30- منابع 160**

فهرست تصاوير

عنوان صفحه

**تصوير شماره 1: کلوني تخم مرغي شکل مايکوپلاسما پس از سومين ساب کالچر 125**

**تصوير شماره 2: آزمايش PCR براي تشخيص جنس مايکوپلاسما در نمونه ريه 127**

**تصوير شماره 3: آزمايش PCR براي تشخيص کلاستر مايکوئيدس در نمونه ريه 128**

**تصوير شماره 4: آزمايش PCR براي تشخيص گونه آگالاکتيه درنمونه ريه 129**

**تصوير شماره 5: آزمايش PCR براي تشخيص گونه مايکوئيدس مايکوئيدس کلوني بزرگ 130**

فهرست جداول

عنوان صفحه

**جدول1: طبقه بندي مايکوپلاسما 11**

**جدول 2: معرفي اعضا کلاستر مايکوئيدس و خصوصيات بيماريزايي آنها 11**

**جدول 3: احتياجات غذايي براي رشد مايکوپلاسماهاي کلاستر مايکوئيدس 39**

**جدول 4 : مقادير موردنياز جهت تهيه مخلوط اصلي اوليه 112**

**جدول 5: مواد مورد نياز واکنش تکثير 114**

**جدول6 : پرايمرهاي استفاده شده در واکنش تکثير 116**

**جدول 7 : برنامه واکنش پرايمرها 118**

**جدول8: : فرمول تهيه محيط TBE(5X) 120**

**جدول9: ميزان اتيديوم برومايد مصرفي جهت ساختن مقادير متفاوت ژل 120**

فهرست نمودارها

عنوان صفحه

**نمودار شماره 1: درصد مايکوپلاسماي جدا شده به روش کشت در عفونت تنفسي**

**گله‌هاي مورد مطالعه 132**

**نمودارشماره 2: درصد حضور مايکوپلاسما درعفونت تنفسي گله‌هاي مورد**

**مطالعه به روشPCR 132**

**نمودار شماره3 : مقايسه روشهاي کشت و PCR در تشخيص مايکوپلاسما ي موجود در عفونت تنفسي گله‌هاي مورد مطالعه 133**

**نمودار شماره4: مقايسه نتايج کشت وPCR نمونه‌ها در گله‌هاي مورد مطالعه (n=100) 133**

**نمودار شماره 5: مقايسه نتايج کشت و PCR مايکوپلاسما در گاو (n=50) 134**

**نمودار شماره 6: مقايسه نتايج کشت و PCR مايکوپلاسما در گله هاي گوسفند (n=30) 134**

**نمودار شماره 7: مقايسه نتايج کشت و PCR در گله‌هاي بز (n=20) 135**

**نمودار شماره8: نمودار شماره 8:مقايسه نتايج تشکيل کدورت در محيط براث و PCR مايکوپلاسما در گله‌هاي مورد مطالعه (n=100) 135**

**نمودار شماره 9: نمودار شماره9:مقايسه نتايج ايجاد کدورت در محيط براث و جداسازي مايکوپلاسما در گله‌هاي مورد مطالعه (n=100) 136**

**نمودار شماره 10: نمودار شماره10: مقايسه نتايج تشکيل کدورت در محيط براث و PCR مايکوپلاسما
در گله‌هاي گاو(n=50) 136**

**نمودار شماره 11: نمودار شماره 11:مقايسه نتايج تشکيل کدورت در محيط براث و PCR مايکوپلاسما
در گله‌هاي بز (n=20) 137**

**نمودار شماره12: مقايسه نتايج تشکيل کدورت در محيط براث و PCR مايکوپلاسما در گله‌هاي گوسفند (n=30) 137**

**مقدمه**

عفونت پلوروپنوموني واگير،‌ بيماري تحليل برنده تنفسي است كه با جاي گرفتن در طبقه‌بندي بيماريهاي سازمان جهاني كنترل بيماريهاي واگير، لزوم و اهميت شناسايي آن مشخص شده است. عامل اصلي اين بيماري، گونه مايكوپلاسما مايكوئيدس مي‌باشد كه تايپ كلوني كوچك آن[[1]](#footnote-1) بطور اختصاصي به گله‌هاي گاو، خسارات فراواني ناشي از همه‌گيري گسترده و مرگ و مير فراوان تحميل كرده است.

تايپ كلوني بزرگ اين گونه[[2]](#footnote-2) همراه با دو گونه ديگر بنامهاي مايكوپلاسما كاپري كولوم كاپري كولوم[[3]](#footnote-3) و مايكوپلاسما مايكوئيدس كاپري[[4]](#footnote-4) فرم غيركلاسيك پلوروپنوموني واگير را در گله‌هاي گوسفند و بز بوجود آورده‌اند. اين بيماري در فرم كلاسيك، که عامل آن مايکوپلاسما کاپري کولوم کاپري پنوموني[[5]](#footnote-5) شناخته مي‌شود، خسارات اقتصادي سهمگيني در گله‌هاي بز و گوسفند موجب گرديده است.

از آنجائيكه منطقه خاورميانه جزو مناطق مشكوك به آلودگي پلوروپنوموني واگير محسوب مي‌شود، حفظ وضعيت عاري بودن از عفونت در اين منطقه، مشكل يا تقريبا غيرممكن بوده و نيازمند بازنگري درراهبردهاي بكار رفته به منظور تشخيص و كنترل اين عفونت‌هاست. عدم برخورداري از خصوصيت پاتوگونوميك تشخيصي و پاتولوژيكي‌، مسير بيماريزايي ناشناخته و تنوع فنوتيپي بسيار پيچيده ارگانيسم در مواجهه با دستگاه ايمني ميزبان، بر مشكل شناسايي آن افزوده است. علاوه بر اين ، ابقا طولاني مدت باکتري در محل عفونت و وجود ناقلين بدون علامت‌، برنامه كنترل بيماري را با چالش روبرو كرده است.

از اين رو، شناسايي و بكارگيري روشهاي تشخيصي و تفريقي گونه‌هاي كلاستر مايكوپلاسما مايكوئيدس كه هركدام استراتژي جداگانه اي در برخورد با عفونت گله‌ها دارند، از اهميت ويژه‌اي برخوردار است.

 از آنجايي كه مايكوپلاسماهاي پاتوژن در محيط كشت به سختي رشد مي‌كنند، استفاده متداول از روش كشت و جداسازي، شناسايي عفونت گله‌ها را با مشكل روبرو كرده است.

از طرف ديگر، عمدتا به دليل تشابه آنتي ژنتيكي بين گونه‌هاي كلاستر مايكوئيدس و ساير گونه‌هاي مايكوپلاسما، روشهاي سرولوژي از دقت و ويژگي كافي در تمايز گونه‌ها برخوردار نيستند. لذا به رهيافت روش‌هاي مولكولي مانندPCR بعنوان روشي سريع، دقيق و با حساسيت و ويژگي مطلوب در كنترل عفونت گله‌ها، توجه ويژه‌اي مي‌شود.

 هدف از اين مطالعه، بررسي عفونت‌هاي تنفسي ناشي از كلاستر مايكوئيدس در گله‌هاي نشخواركنندگان از طريق كشت و PCR مي‌باشد.

**چكيده :**

 كلاستر مايكوپلاسما مايكوئيدس در برگيرنده مهمترين پاتوژنهاي تنفسي نشخواركنندگان است كه ساليانه، خسارات اقتصادي سنگيني بر صنعت دامپروري كشورهاي جهان وارد مي‌كند. اخيرا شيوعهاي بازپديدي از عفونتهاي پلوروپنوموني نشخواركنندگان در منطقه خاورميانه گزارش شده است. در اين شرايط تعيين وضعيت گله‌هاي كشور از نظر آلودگي به گونه‌هاي پاتوژن اين كلاستر، از اهميت خاصي برخوردار است. هنوز گزارشي از شناسايي و جداسازي گونه‌هاي درگير از عفونت پلوروپنوموني در ايران بدست نيامده است. عدم برخورداري از خصوصيت پاتوگونوميك در نمونه‌هاي باليني و دشواريهاي فراوان جداسازي ميكروارگانيسم، به ضرورت شناسايي و بكارگيري روشهاي تشخيصي جايگزين افزوده است.

 علاوه بر اين، دستيابي به روشي كاربردي و سريع، در تشخيص عفونتهاي تنفسي گله‌ها و تخميني از وضعيت عفونت در ايران، مدنظر اين تحقيق بوده است.

در اين مطالعه‌، 100 نمونه ريه با ضايعات مشكوك به عفونتهاي تنفسي مايكوپلاسمايي از 100 گله مشكوك (50 گله گاو،30 گله گوسفند،20 گله بز) در اطراف كرمانشاه ، در سالهاي 1386-1384 جمع آوري شدند. ضايعات ماکروسکوپي شامل کبدي شدن ريه‌ها با زخم‌هاي خاکستري و سفيد(جامد شدن) و ظاهر منقوط با يا بدون فيبرين بودند. نمونه‌ها در محيط کشت PPLO براث و آگار کشت داده شدند. پس از پاساژهاي متعدد،از 23 گله مشکوک،تک کلوني تخم‌مرغي شکل مايکوپلاسما جداشد(11 گله گاو،8 گله گوسفند،4 گله بز).

اما در واكنش, PCR63 گله عفونت مايكوپلاسماي تنفسي نشان دادند (37 گله گاو، 17 گله گوسفند، 9 گله بز).

اين امر، مبين اين نكته است كه عليرغم اينكه جداشدن عامل مايكوپلاسمايي از نمونه‌ها در محيط كشت، اساس تعيين وضعيت عفونت‌هاي مايكوپلاسمايي قلمداد مي‌شود، اما سخت‌رشد بودن گونه‌هاي مورد مطالعه در محيط كشت و عدم دستيابي سريع به نتيجه، كارآيي اين روش تشخيصي را در پايش متداول عفونت گله‌ها زير سوال برده است.

 علاوه بر اين، بكاربردن آنتي بيوتيكهاي متنوع در دوره درمان و از بين رفتن ميكروارگانيسم در خلال جمع آوري نمونه، ‌نتايج رشد در محيط كشت مايكوپلاسما را دستخوش تغيير داده است.

از اين رو،‌ استفاده از روشهاي مولكولي PCR بعنوان يك روش كاربردي، حساس و سريع توصيه مي‌شود. پس از استخراج ‌DNA نمونه‌ها به روش فنل کلروفورم و جدا كردن نمونه‌هاي آلوده به مايكوپلاسما از طريق PCR ، با استفاده از پرايمر اختصاصي كلاستر مايكوئيدس نمونه‌هاي مايكوپلاسمايي تحت واكنش PCR قرار گرفتند.

باند bp 548، تنها در نمونه كنترل ( سويه F38) ديده شد. به منظور كنترل روند واكنش، نمونه‌ها با پرايمر اختصاصي مايكوئيدس كلوني بزرگ و پرايمر اختصاصي آگالاكتيه، به طور جداگانه PCR شدند كه نتيجه اين آزمايش، يافته‌هاي آزمايش قبلي را تائيد مي‌كرد.

 اگر چه اين تحقيق نشان داد كه عامل عفونتهاي تنفسي مشكوك در نمونه‌هاي مورد مطالعه نمي‌تواند از گونه‌هاي كلاستر مايكوئيدس باشد، منتهي تخمين ميزان عفونت در گله‌هاي مورد مطالعه، احتياج به تحقيقات وسيعتر با جمع‌آوري تعداد نمونه‌هاي بيشتر در مطالعات بعدي دارد.

1. - Mycoplsma mycoides mycoides biotype Small Colony (MmmSC) [↑](#footnote-ref-1)
2. - Mycoplasma mycoides mycoides biotype Large Colony (MmmLC) [↑](#footnote-ref-2)
3. - Mycoplasma capricolum capricolum (Mcc) [↑](#footnote-ref-3)
4. - Mycoplasma mycoides capri (Mmc)

5- Mycoplasma capricolum capripneumonia (Mccp) [↑](#footnote-ref-4)
5. [↑](#footnote-ref-5)