جداسازی *مایکوپلاسما آگالاکتیه* با دو روش کشت و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در گوسفندان مبتلا به بیماری آگالاکسی واگیر در شهرستان بافت

بابک خیرخواه[۱*]، سیدعلی پوربخش[۲]، عباس اشتری[۲]، کیومرث امینی[۳]

چکیده

مایکوپلاسما آگالاکتیه بعنوان مهمترین عامل بیماری آگالاکسی واگیردار در بسیاری از کشورهای مدیترانه و خاورمیانه از جمله در ایران مطرح است. دام‌های مبتلا معمولاً دچار عفونت پستان همراه با قطع ناگهانی شیر، تورم مفاصل، التهاب ملتحمه‌ی چشم، لاغری و ضعف عمومی می‌شوند که سبب خسارات اقتصادی شدید به دامداران می‌گردد. هدف از این تحقیق جداسازی و شناسائی *مایکوپلاسما آگالاکتیه* با استفاده از دو روش کشت و PCR در گوسفندان مشکوک به بیماری آگالاکسی در شهرستان بافت در سال ۱۳۸۸بود. این بررسی به مدت یکسال در چهار فصل مختلف در گوسفندان شهرستان بافت انجام شد. از گله‌های مشکوک نمونه‌گیری هدف‌دار بعمل آمده و نمونه‌ها شامل شیر، سوآب چشم و پانکسیون مایع مفصلی با دو روش کشت در محیط اختصاصی PPLO و PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی در ناحیه ژن 16S rRNA و ژن لیپوپروتئین، جهت جداسازی و شناسائی *مایکوپلاسما آگالاکتیه* مورد ارزیابی قرار گرفتند. در روش کشت از مجموع ۱۷ نمونه‌ی اخذ شده، در ۸ نمونه پرگنه‌های بشکل تخم‌مرغ نیمرو مشاهده گردید و بعنوان مایکوپلاسما شناسائی شد و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی در آزمایش PCR بعنوان جنس مایکوپلاسما مورد تأیید قرار گرفتند. در روش PCR نیز در ۸ نمونه جنس *مایکوپلاسما* جداسازی شد و تنها یک نمونه بعنوان *مایکوپلاسما آگالاکتیه* مورد شناسائی قرار گرفت. این اولین گزارش از جداسازی *مایکوپلاسما آگالاکتیه* از گوسفندان مبتلا به بیماری آگالاکسی با استفاده از دو روش کشت و PCR در ایران است. این مطالعه نشان داد ۸۷/۵ درصد از عوامل بیماری آگالاکسی در شهرستان بافت را گونه یا گونه‌های دیگر مایکوپلاسما تشکیل می‌دهند.

واژگان کلیدی: *مایکوپلاسما آگالاکتیه، گوسفند، PCR ، PPLO.*

تاریخ دریافت: ۸۹/۸/۷ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۲/۱۶

مقدمه

بیماری آگالاکسی واگیردار(Contagious agalactia) به عنوان یکی از بیماریهای عفونی دام که در دنیا شیوع فراوان دارد

۱*- گروه دامپروری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بافت، بافت، ایران. *(babakkheirkhah@iaubaft.ac.ir)*

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

۳- گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساوه، ساوه، ایران.

Detection of *Mycoplasma agalactiae* by culture and Polymerase Chain Reaction (PCR) methods from affected sheep to contagious agalactiae in Baft County

Kheirkhah, B.[1*], Pourbakhsh, S.A.[2], Ashtari, A.[2], Amini, K.[3]

1- Department of Animal Science, Baft Branch, Islamic Azad University, Baft, Iran (Babakkheirkhah@iaubaft.ac.ir)*

2- Reference Mycoplasma Laboratory, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran.

3- Department of Microbiology, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran

Mycoplasma agalactiae is the etiological agent of contagious agalactia that is a serious disease affecting sheep and goat. It occurs mainly in Mediterranean country and western Asia including Iran. It is characterized by mastitis and decline and subsequent failure of milk production, arthritis, keratoconjuctivitis and in appetence. The aim of the study was to detection of *Mycoplasma agalactiae* by culture and PCR method from affected sheep in Baft.

This survey was on all sheep and consume 1 year in 4 seasons in Baft. Dubious herds were under purposive sampling and samples were including milk secretion, conjunctival swab and synovial fluid. These samples enriched in PPLO broth media and for *Mycoplasma* species detection cultured in PPLO agar media and were characterized by amplification of 16S ribosomal RNA genes showed specific amplicon at 163 bp in PCR method. Positive specimens examined for *M. agalactiae* detection by amplification of lipoprotein gene that showed specific amplicon at 375 bp. From 17 samples, 8 Mycoplasma species identify that at one sample *M. agalactiae* species detected and *M. agalactiae* confirmed in 12.5 percent of *Mycoplasma* samples. This is the first report of *M. agalactiae* detection from affected sheep by two methods: culture and PCR method in Iranian sheep.

This study shown 87.5 percent of contagious agalactia agents in Baft County are related to other species. However, in different sources main agent of 90 percent of this infection was *M. agalactiae* species.

Key words: *Mycoplasma agalactiae – sheep – PCR – PPLO*

Archive of SID

www.SID.ir

همواره سبب خسارت‌های اقتصادی در گله‌های گوسفند و بز می‌شود. این بیماری که در بسیاری از کشورهای خاورمیانه و مدیترانه در دام‌های اهلی و حیوانات وحشی وجود دارد(۹) همـراه بـا شیـوع بالا در گله‌های دامی سبب قطع تولید شیـر می‌گردد که اغلب یکطرفه می‌باشد؛ همچنین طوفانی از سقط در گله، زمین‌گیری و عدم تحرک مناسب دام، تورم مفاصل، لنگش(۱۶)، پنومونی(۸)، کوری موقت یا دائم بدنبال تورم قرنیه و ملتحمه چشم و در نهایت لاغری و ضعیف شدن دام‌ها نیز مشاهده می‌شود که اغلب دامداران را مجبور به کشتار دام در ابتدای بیماری می‌کند تا روند مزمن بیماری سبب لاغری بیشتر گوسفند و بز نشود. گرچه این بیماری تلفات چندانی ندارد اما به دلیل طولانی بودن دوره بیماری در دامداری‌ها خسارت اقتصادی زیادی به همراه دارد. تولید شیر حتی پس از بهبودی دام نیز به میزان عادی برنمی‌گردد. همچنین بالا بودن میزان سقط جنین در گله از جمله خسارت‌های اقتصادی شناخته شده است. شهرستان بافت در جنوب غربی استان کرمان با وجود تنوع اقلیم برای دامدارای در تمامی فصول سال مناسب است و بیماری‌های دامی متنوعی در این شهرستان وجود دارد که از آن جمله بیماری آگالاکسی واگیراست.

بسیاری از گزارشات عامل اصلی این بیماری را *مایکوپلاسما آگالاکتیه (Mycoplasma agalactiae)* می‌دانند به عنوان مثال در کشور اسپانیا *مایکوپلاسما آگالاکتیه* عامل ۹۰ درصد از واگیری‌های این بیماری بوده است(۱۲). مایکوپلاسماها پروکاریوت‌های بسیار کوچکی هستند که فاقد دیواره‌ی سلولی بوده و تنها توسط پرده‌ی سیتوپلاسمی احاطه می‌شوند. این باکتری‌ها برای رشد به کلسترول نیاز دارند. جنس‌های مختلف مایکوپلاسما در گوسفند و بز، گاو، طیور و حیوانات آزمایشگاهی سبب ایجاد بیماری می‌شود. در گوسفند و بز غیر از *مایکوپلاسما آگالاکتیه*، عوامل دیگری مانند *مایکوپلاسما مایکوئیدس (Mycoplasma mycoides)*، *مایکوپلاسما آرژنینی (Mycoplasma argenini)*، *مایکوپلاسما مایکوئیدس* واریته مایکوئیدس و *مایکوپلاسما پوتری‌فیسنس (Mycoplasma putrefaciens)* نیز به عنوان عامل بیماری آگالاکسی ذکر شده‌اند(۱۷ و ۳). اگر چه اکثر تحقیقات در دنیا حساسیت بز به بیماری را بیشتر از گوسفند می‌دانند ولی در ایران گوسفندان بیشتر از بزها به بیماری مبتلا می‌شوند و در ایران عامل اصلی بیماری مایکوپلاسما آگالاکتیه می‌باشد(۳ و ۱). که در سال ۱۹۸٤ میلادی (۱۳٦۳ هجری شمسی) توسط محققین مؤسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی از موارد بیماری جدا شده است.

با وجود مطالعات منتشر نشده در خصوص عامل بیماری، تاکنون در رابطه با شناسائی عامل بیماری بصورت توأم با روش‌های کشت و PCR در حد جنس و گونه در گله‌های گوسفند و بز در کشور تحقیقی صورت نگرفته است و سویه‌ی واکسینال در سال ۱۳٤۸ آن هم در مناطق خاصی از کشور (استان لرستان، شهرستان‌های طالقان و شیراز) توسط روش کشت جدا شده است. در پژوهشی که توسط مرادی بیدهندی در استان کردستان صورت گرفته است از بزها و گوسفندان بیمار و سالم *مایکوپلاسما آگالاکتیه* جدا شده و توالی نوکلئوتیدی یک جدایه در بانک ژن ثبت شده است در این تحقیق فقط از شیر دام‌های مذکور نمونه‌گیری بعمل آمده است(۱۵). هدف از این پژوهش جداسازی و شناسائی *مایکوپلاسما آگالاکتیه* با استفاده از دو روش کشت و PCR در گوسفندان مشکوک به بیماری آگالاکسی در شهرستان بافت در سال ۱۳۸۸بود.

مواد و روش کار

در این بررسی نمونه‌گیری بصورت هدف‌دار (Purposive Sampling) صورت گرفت و جامعه آماری تمامی گوسفندان شهرستان بافت بودند. این مطالعه در چهار فصل مختلف درسال ۱۳۸۸ در شهرستان بافت انجام شد و از گله‌های مشکوک نمونه‌گیری بعمل آمد. نمونه‌ها بصورت سوآب

www.SID.ir

ضایعات چشمی، دوشش از پستان و پانکسیون مایعات مفصلی دام‌هائی که یکی از علائم بالینی (تورم مفاصل، التهاب ملتحمه یا قرنیه‌ی چشم و قطع ناگهانی شیر) را نشان می‌دادند اخذ گردید. در ۱۷ گله علائم اصلی آگالاکسی تأیید شد و نمونه‌گیری از بارزترین ضایعات صورت گرفت. سوآب چشمی پس از افزودن محیط انتقالی (PPLO Broth) و ترشحات پستان و مایعات مفصلی بدون اضافه کردن محیط انتقالی به لوله‌های درپوش‌دار انتقال یافته و در دمای ٤ درجـه‌ی سانتی‌گراد در مدت زمان کمتر از ٢٤ ساعت به آزمایشگاه مرجع مایکوپلاسما مؤسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی انتقال یافتند. محیط انتقالی حاوی پنی‌سیلین و استـات تالیـوم بود که مانع از رشد بسیاری از باکتری‌ها می‌شود درحالیکه برای *مایکوپلاسما آگالاکتیه* چنین تأثیری نداشته و با حذف سایر باکتری‌ها زمینه را برای رشد این باکتری مساعد می‌نماید(۷). نمونه‌هائی که در محیط PPLO Broth به آزمایشگاه مذکور ارسال شدند ابتـدا برای یک دوره‌ی ٢٤ ساعته در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد غنی‌سازی شده و سایر نمونه‌ها (مایع مفصلی یا شیر) پس از انتقال به آزمایشگاه به محیط PPLO Broth انتقال یافته و سپس جهت غنی‌سازی در یک دوره‌ی ٢٤ ساعته در دمای ۳۷ درجـه سانتـی‌گـراد انکوبه گردیدند. پس از این مرحله‌ی غنی‌سازی تمامی محیط‌های PPLO Broth حاوی نمونه جهت جداسازی و شناسائی *مایکوپلاسما آگالاکتیه* بصورت موازی تحت دو روش کشت و PCR قرار گرفتند.

۱ـ روش کشت

پس از غنی‌سازی، ۲ میلی‌لیتر از محیط‌های حاوی نمونه توسط فیلترهای مخصوص سرسرنگی (Millipore co) که دارای روزنه‌هایی با قطر ۰/٤٥ میکرومتراند در محیط‌های PPLO Broth جدید فیلتر گردیدند. این محیط‌ها با استفاده از ۱۰ میلی‌لیتر محیط پایه و افزودن تقویت‌کننده‌ها ساخته شدند. [2.1% (W/V)PPLO Broth (Biolife), 0.01% (W/V) glucose, and 0.002% (W/V) phenol red]

تقویت‌کننده‌ها شامل ۲۰ میلی‌لیتر سرم اسب، ۱ میلی‌لیتر عصاره‌ی مخمر ۲۵٪، ۱میلی‌لیتر بی ـ نیکوتین‌آمیدآدنین‌دی‌نوکلئوتید ۱٪، ۰/۵ میلی‌لیتر استات تالیوم ٤٪، و ۰/۵ میلی‌لیتر از ۵۰۰۰۰ واحد پنی‌سیلین جی پتاسیم است. محیط‌های جدید در انکوباتور CO_2 دار قرار داده شده و ۷–۵ روز تحت نظر قرار گرفتند. پس از گذشت زمان ذکر شده وضعیت کدورت محیط‌ها مشاهده و ثبت گردید(۱۸). ایجاد کدورت دال بر رشد باکتری در محیط بود و در دو مرحله‌ی دیگر محیط‌ها مجدداً در PPLO Broth پاساژ داده شدند و در پایان هر مرحله ۰/۲ میلی‌لیتر از آن به محیط PPLO Agar انتقال یافت. این محیط حاوی ۳/۵٪ محیط پایه بود. کشت‌های PPLO Agar به انکوباتور CO_2 دار منتقل شده و پس از ۷۲ ساعت با میکروسکوپ نوری و با بزرگنمایی ٤٠x از نظر رشد و تشکیل پرگنه‌های تخم‌مرغ نیمرو کوچک بررسی شدند. در صورت مشاهده‌ی پرگنه، آلودگی به جنس *مایکوپلاسما* تشخیص داده شد و سپس جهت تأیید جنس باکتری، پرگنه‌های خالص تحت آزمایش PCR قرار گرفتند.

۲ـ روش PCR

نمونه‌های مورد استفاده در آزمایش PCR شامل نمونه‌های غنی‌شده و نمونه‌های حاصل از پرگنه‌های کشت باکتری روی محیط PPLO Agar بودند. برای انجام آزمایش PCR در این تحقیق ابتدا با استفاده از روش سانتریفوژ از ۰/۵ میلی‌لیتر نمونه، رسوب باکتری تهیه گردید. برای استخراج DNAی باکتری روش شیمیائی فنل ـ کلروفرم و پروتکل Kojima و همکاران مورد استفاده قرار گرفت. برای کنترل منفی از محیط PPLO Broth و برای کنترل مثبت از سویه‌ی مرجع *مایکوپلاسما آگالاکتیه* (NCTC 10123) استفاده شد. در این مطالعه با استفاده از آغازگرهای شناسائی جنس که قادر به تکثیر قطعه‌ای از ژن 16S rRNA بودند و از آغازگرهای FS2 و FS1 که جهت شناسائی گونه توانائی آغاز تکثیر قطعه‌ای از ژن Lipoprotein را دارند بر اساس جدول ۱ استفاده شد و برنامه PCR در جدول ۲ تشریح شده است.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- توالی‌های نوکلئوتیدی و آغازگرهای مورد استفاده در تشخیص *مایکوپلاسما آگالاکتیه* به روش PCR

Primer	Target gene	Sequence	Length (bp)	Reference
	16S rRNA	F: 5′-GCTGCGGTGAATACGTTCT-3′	163	Kojima et al. 1997
		R: 5′-TCCCCACGTTCTCGTAGGG-3′		
FS1	Lipoprotein	F: 5′-AAAGGTGCTTGAGAAATGGC-3/	375	Tola et al. 1997
FS2		R: 5′-GTTGCAGAAGAAAGTCCAATCA-3′		

جدول ۲- مراحل حرارتی آزمایش PCR (۱۸)

مرحله	دما	زمان	چرخه
Prog.1: Predenature	۹٤° c	٦	۱
Prog.2: Seg.1: Denature Seg.2: Annealing Seg.3: Extension	۹٤° c ٥٥° c ۷۰° c	۱ ۱ ۱	۳۳
Prog.3: Full extension	۷۲° c	۷	۱

سپس محصول PCR در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد(۱۸).

هر میلی‌لیتر از محصول PCR با ۲ میلی‌لیتر از loading buffer(6x) مخلوط و محصول در ژل آگارز ۱ درصد که با اتیدیوم بروماید رنگ شده بود حرکت داده شد و تحت الکتروفورز مورد ارزیابی قرار گرفت. در سه چاهک اول به ترتیب مارکر، کنترل مثبت و کنترل منفی قرار گرفتند. باندهای ایجاد شده پس از انتقال به دستگاه پرتوتاب ماوراء بنفش (UV Transluminator) مشاهده و تصویر حاصل ثبت گردیدند.

نتایج

از ۱۷ نمونه‌ی اخذ شده، بر اساس کشت در محیط PPLO Agar و مشاهده پرگنه‌های شاخص مایکوپلاسما توسط میکروسکوپ نوری(نگاره ۱)، در ۸ نمونه جنس مایکوپلاسما مثبت ارزیابی شد.

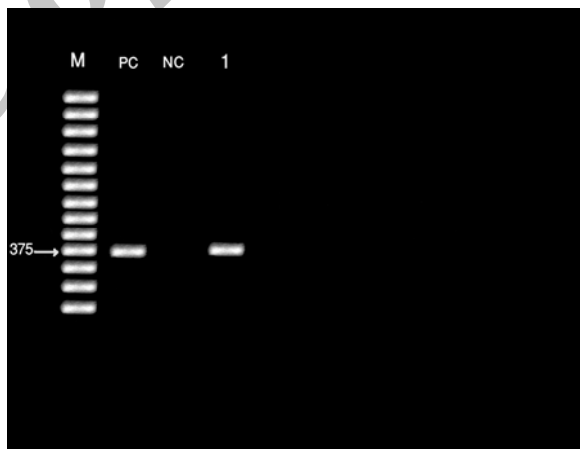
نگاره ۱- تصویر میکروسکوپی پرگنه‌های مشاهده شده بر روی محیط PPLO Agar

در آزمایش PCR نیز که بصورت تکرار برای هر نمونه‌ی کشت شده انجام شد نتایج یکسان بود بدین‌صورت که هم از نمونه‌های غنی‌شده و هم از پرگنه‌های خالص ایجاد شده‌ی هر نمونه در محیط جامد، استفاده گردید و نتیجه‌ی حرکت محصول PCR پس از استفاده از آغازگر شناسائی جنس تشکیل باند ۱٦۳ bp در هر ۸ نمونه بود (نگاره ۲). جهت شناسائی گونه‌ی باکتری در آزمایش PCR از آغازگر شناسائی گونه استفاده گردید و نتیجه‌ی حرکت محصول PCR بر روی ژل آگارز تشکیل باند ۳۷۵ bp در یک نمونه از ۸ نمونه‌ای بود که در آزمایشات PCR قبلی جنس مایکوپلاسمای آنها تأیید شده بود(نگاره ۳).

Archive of SID
www.SID.ir

نگاره ۲- تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR با استفاده از آغازگر اختصاصی جنس مایکوپلاسما. باندهای bp ۱۶۳ در ۸ نمونه‌ی جنس مثبت مشاهده می‌شود.

M: Marker 100bp; PC: Positive Control [*M. agalactiae* (NCTC 10123)]; NC: Negative Control.



نگاره ۳- تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR با استفاده از آغازگر اختصاصی گونه‌ی *مایکوپلاسما آگالاکتیه* (FS1_FS2). باندهای bp ۳۷۵ در یک نمونه‌ی گونه مثبت مشاهده می‌شود.

M: Marker 100bp; PC: Positive Control [*M. agalactiae* (NCTC 10123)]; NC: Negative Control.

در این تحقیق پس از انجام معاینات بالینی از شاخص‌ترین ضایعات مشاهده شده در هر گله نمونه‌گیری انجام گردید. حدود ۷۰ درصد نمونه‌ها از ضایعات چشمی، ۱۸ درصد از ضایعات مفاصل و ۱۲ درصد از ضایعات پستان بودند. فراوانی و درصد هر کدام در جدول ۳ مشخص شده است. این جدول نشان می‌دهد که موارد مثبت جنس و گونه از کدام ضایعات بوده است.

جدول۳- توزیع فراوانی مطلق و نسبی نمونه‌های اخذ شده و جنس و گونه‌ی آنها بر اساس محل ضایعه‌ی نمونه برداری

تعداد / محل ضایعه	تعداد نمونه‌ی اخذ شده		تعداد جنس مثبت	
	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد
چشم	۱۲	۷۰/۵۹	٦	۷۵
پستان	۲	۱۱/۷٦	۲	۲۵
مفصل	۳	۱۷/٦۵	۰	۰
جمع	۱۷	۱۰۰	۸	۱۰۰

در این مطالعه از دو روش کشت و PCR بصورت موازی برای تشخیص موارد مثبت جنس استفاده شد. جدول ٤ مقایسه‌ی نتایج دو روش ذکر شده را نشان می‌دهد که بصورت غیر وابسته به هم ثبت شده‌اند. آزمایشPCR بصورت تکرار برای هر نمونه انجام شد. بدین‌صورت که هم از نمونه‌های غنی‌شده و هم از پرگنه‌های ایجاد شده‌ی هر نمونه در محیط جامد استفاده شد. جدول ۵ مقایسه‌ی نتایج دو روش ذکر شده را بازگو می‌کند.

جدول ٤- مقایسه‌ی نتایج حاصل از کشت و PCR جهت تأیید جنس باکتری

نتایج کشت آگار	نتایج PCR	جمع
+	+	۸
_	_	۹
+	_	۰
_	+	۰
جمع کل		۱۷

جدول ۵- مقایسه‌ی نتایج حاصل از PCR نمونه‌های غنی شده و PCR نمونه‌ی کشت شده جهت تأیید جنس باکتری

نتایج PCRنمونه‌های غنی شده / نتایج PCR کشت	PCR +	PCR -	جمع
PCR +	۸	۰	۸
PCR -	۰	۹	۹
جمع	۸	۹	۱۷

Archive of SID
www.SID.ir

بحث

در این مطالعه با استفاده از روش کشت و PCR، نسبت به جداسازی و شناسائی *مایکوپلاسما آگالاکتیه* از گوسفندان مشکوک به بیماری آگالاکسی اقدام شد و برای اولین بار در کشور حضور *مایکوپلاسما آگالاکتیه* در گله‌های گوسفند مشکوک به بیماری گزارش گردید. با توجه به اینکه در مورد بوم شناختی (اکولوژی) *مایکوپلاسما آگالاکتیه* اطلاعات زیادی در دسترس نیست(۲)، انجام چنین تحقیقاتی در شناخت بهتر بیماری و عامل آن مؤثر است. *مایکوپلاسما آگالاکتیه* از جمله باکتری‌هائی است که به سختی از گله‌های آلوده جدا می‌شود و آزمایش‌های معمول جهت تشخیص جنس‌های مایکوپلاسما عمدتاً بر پایه روش‌های کلاسیک مانند تستهای بیوشیمیائی و آزمایشات ایمونوفلورسنت استوار است این روشها گرچه سودمند می‌باشند اما ممکن است با واکنشهای مثبت کاذب همراه باشد(۲۰) و مشکلاتی را به همراه دارد لذا استفاده از روشهای دقیق‌تر در سال‌های اخیر مطرح شده است که یکی از آنها واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) است. از آنجائی که بهترین و قطعی‌ترین روش شناسائی مایکوپلاسماها در دام روش PCR می‌باشد (۱۰ ،۵ ،٤) آزمایش مولکولی به روش PCR جهت تأیید جنس و گونه عامل از محیط‌های غنی‌شده و پرگنه‌های رشد یافته انجام گرفت و بنا به دلائل زیر از روش کشت و PCR بصورت توأم جهت جستجوی عوامل مایکوپلاسمائی بیماری استفاده شد.

روش‌های سرمی دقیق نبوده و فقط بعنوان آزمایش غربالگری در گله می‌توان از آنها استفاده کرد همچنین این روش‌ها نیاز به افزایش عیار پادتن دارند که ٤۰-۱۰ روز پس از آغاز علائم درمانگاهی بوجود(۱۳). ضمن اینکه در دوره‌ی کمون نیز نمی‌توان به جستجوی مایکوپلاسما پرداخت. واکنش‌های متقاطع سرمی نیز یک مشکل جدی هستند که حساسیت این واکنش را بیشتر تحت تأثیر قرار می‌دهد(۱۱).

استفاده از روش کشت به تنهایی نیازمند دوهفته یا بیشتر زمان انکوباسیون است و از دقت و حساسیت بالائی برخوردار نیست و احتمال خطا در این نوع آزمایش‌ها بالا است.

جهت اطمینان بیشتر در تأیید جنس و گونه‌ی باکتری عامل، واکنش PCR در دو مرحله انجام گردید: مرحله‌ی اول بر روی نمونه‌های ارسالی غنی شده پس از یک انکوباسیون ٢٤ ساعته، انجام گرفت و مرحله‌ی دوم پرگنه‌های ایجاد شده روی محیط PPLO Agar در واکنش PCR شرکت داده شدند. برای انجام واکنش PCR مرحله‌ی دوم نیاز به پرگنه‌های خالص باکتری بود که پاساژ مایکوپلاسماهای جدا شده در محیط‌های PPLO Broth و کشت در محیط PPLO Agar به همین منظور انجام شد. مضاف بر این با انجام کشت و بررسی شکل پرگنه‌های کوچک تخم‌مرغی توسط میکروسکوپ نوری و بدون رنگ‌آمیزی روی محیط جامد جنس باکتری نیز تأیید گردید. مقایسه‌ی نتایج حاصل از واکنش‌های PCR نمونه‌های غنی شده و پرگنه‌های رشد یافته نشان می‌دهد که نتایج در دو روش کاملاً یکسان است. با توجه به اینکه نتایج کشت و PCR یکسان بودند لذا روش PCR را می‌توان بعنوان یک روش مناسب در تشخیص سریع بیماری آگالاکسی و جداسازی عامل آن بجای روش کشت استفاده کرد و در مطالعات بعدی قابل استفاده و استناد خواهد بود.

نتایج حاکی از آن است که درحدود ٤۷ درصد از نمونه‌های مشکوک آلودگی به جنس مایکوپلاسما تأیید شد که در مطالعات مشابه‌ی دیگر نیز میزان همه‌گیری بین ۳۰ تا ٦۰ درصد عنوان شده است از سوی دیگر عامل اصلی بیماری آگالاکسی در گوسفندان شهرستان بافت که یکی از بالاترین جمعیت‌های دام سبک را در کشور دارد گونه‌ی *آگالاکتیه* نیست زیرا فقط ۱۲/۵ درصد از *مایکوپلاسماهای* جدا شده *آگالاکتیه* بودند و ۸۷/۵ درصد را گونه یا گونه‌های دیگر تشکیل می‌دهند. هرچند

www.SID.ir

که در منابع مختلف عامل اصلی ۹۰ درصد از واگیری‌های این بیماری را گونه‌ی *آگالاکتیه* نامیده‌اند(۱۲). در برخی از منابع، عفونت با *مایکوپلاسما کانژنکتیوه (Mycoplasma conjunctivae)* درگوسفند و بز سبب ایجاد کراتیت و کونژنکتیویت ذکر شده است(٦). علاوه بر این عوامل دیگری نیز از عوامل مهم بیماری آگالاکسی ذکر شده‌اند(۲) که در تحقیقات بعدی بایستی مورد بررسی قرار گیرند.

در این مطالعه بیشتر نمونه‌ها از ضایعات چشمی گرفته شدند به هر حال ضایعات چشمی بارزتر و حساسیت برانگیز بوده و دامدار سریعاً این وضعیت را گزارش می‌دهد و در گله‌های دیگر شاید متوجه‌ی ضایعات مفاصل نیستند و به کاهش یا قطع شیر دام‌ها اهمیتی قائل نمی‌شوند و مراجعه‌ی مجری و همکاران طرح نیز بر اساس همین گزارشات دامداران، شبکه‌ی دامپزشکی شهرستان و دامپزشکان بخش خصوصی بوده است.

ضمن اینکه *مایکوپلاسما آگالاکتیه* بعنوان یکی از عوامل بیماری آگالاکسی برای اولین بار در کشور از موارد مشکوک به بیماری بصورت موازی تحت دو روش کشت و PCR جداسازی و شناسائی شد، با وجود پژوهش‌های مختلف انجام شده در ایران و جهان در خصوص *مایکوپلاسما آگالاکتیه*، تعیین توالی نوکلئوتیدی و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی *مایکوپلاسما آگالاکتیه* بعنوان یکی از عوامل بیماری آگالاکسی واگیر در گوسفند و بز تاکنون در ایران انجام نشده است و پیشنهاد می‌گردد در تحقیقات آینده مد نظر قرار گیرد.

تشکر و سپاسگزاری

این مقاله حاصل یک طرح پژوهشی می‌باشد که با حمایت مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بافت انجام شده است که بدینوسیله از این واحد دانشگاهی تشکر و قدردانی می‌شود. همچنین سپاسگزار تمامی کارکنان آزمایشگاه مرجع مایکوپلاسما مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی می‌باشیم.

فهرست منابع

۱- حسنی‌طباطبایی، ع.، فیروزی، ر. (۱۳۸۰): بیماریهای باکتریائی دام، چاپ اول، موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران، تهران، ایران، صفحه: ٤٨٤-٤٦٩.

۲- ذوقی، ا.، وندیوسفی، ج.، حاجی‌خانی، ر. (۱۳۸۳): پاتوژنز عفونتهای باکتریائی، چاپ اول، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران: ۵۰۳-۴۸۳.

۳- قادرسهی، ع.، اخلاقی، ا.، فیاضی، ز.، ناصری‌راد، ع.ا.، وندیوسفی، ج. (۱۳۸۵): شناسائی مایکوپلاسما آگالاکتیه و دیگر عوامل مسبب بیماری آگالاکسی در گوسفند و بز بوسیله‌ی PCR و کشت در ایران، مؤسسه‌ی واکسن و سرم سازی رازی: ۱۲-۱۰

4- Amores, J., Corrales, J. C., Martin, A. G. (2009): Comparison of culture and PCR to detect *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp. Capri in ear swabs taken from goats. Vet. Mic. 102:42-48.

5- Bashiruddin, J.B., Frey, J., Konigsson, M.H., Johansson, K.E., Hotzel, H., Diller, R., Santis, P., Botelho, A., Ayling, R.D., Nicholas, R.A.J., Thiaucourt, F., Sachse, K. (2005): Evaluation of PCR system for the identification and differentiation of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* : A collaborative trial. Vet. J. 169: 268-275.

6- Belloy, L., Janovsky, M., Vilei, M., Pilo, P. (2003): Molecular epidemiology of *Mycoplasma conjunctivae* in Caprinae: Transmission across species in natural outbreak. App. & Env. Mic. 69: 1913-1919.

7- Buonavoglia, D., Greco, G., Corrente, M. (2009): Long-term immunogenicity and protection against *Mycoplasma agalactiae* induced by an oil adjuvant vaccine in sheep. Res. Vet. Sci. 88:302-307.

8- Cokrevski, S., Crcev, D., Loria, G.R., Nicholas, R.A.J. (2001): Outbreaks of contagious agalactia in small ruminant in the republic of Macdonia. Vet. Rec. 148: 667-670.

Archive of SID

www.SID.ir

9- Contreras, A., Luengo, C., Sanchez, A., Corrales, J.C. (2003): The role of intramamary pathogens in dairy goats. Livestock Pro. Sci. 79: 273-283.
10- Dedieu, L.A., Mady, V., Lefevre, P.C. (1992): Development of a species – specific DNA probe for *Mycoplasma capricolnm*. Vet. Mic. 32:189-197.
11- De La Fe, C., Assuncao, P., Rosales, R.S., Antunes, T., Poveda, J.B. (2006): Characterisation of Protein and antigen variability among *Mycoplasma Mycoides* subsp *Mycoides LC* and *Mycoplasma agalactiae* field strains by SDS-PAGE and immunoblotting. Vet. J. 171: 532-538.
12- Garrido, F., Leon, L., Ladero, J.L., Cuellar, L., Diaz, M.A. (1987): Contagious agalactia and other mycoplasmal diseases of small ruminants, Office for Official Publications of the European Communities, Commissions of the European Community, Luxembourg, :1-6.
13- Kittelberger, R., O'Keefe, J.S., Meynell, R. (2006): Comparison of four diagnostic tests for the identification of serum antibodies in small ruminants infected with *Mycoplasma agalactiae*. New Zealand Vet. J. 54: 10-15(6).
14- Kojima, A., Takahashi, T., Kijima, M., Ogikubo, Y., Nishimura, Y., Nishimura, S., Arasawa, R., Tamura, Y. (1997): Detection of *mycoplasma* in avian live virus vaccines by polymerase chain reaction. Biologicals. 25: 365-371.
15- Moradi Bidhendi, S., Khaki, P., Pilehchian Langroudi, R. (2011): Isolation and identification of *Mycoplasma agalactiae* by culture and Polymerase Chain Reaction in sheep and goat milk samples in Kordestan province, Iran. Arch. Razi Ins. 66: 11-16.
16- Nicholas, R.A.J. (2002): Improvement in the diagnosis and control of disease of small ruminant caused by mycoplasmas. Small Ruminant Res. 45: 145-149.
17- Nicholas, M.M., Stalis, I.H., Clippinger, T.L., Busch, M., Nordhausen, R., Maalouf, G., Schrenzel, M.D. (2005): Systemic disease in Vaal rhebok (Pelea capreolus) caused by *Mycoplasmas* in the mycoides cluster. J. Clin. Mic. 43: 1330-1340.
18- Sakhaei, D., Pourbakhsh, S.A., Banani, M., Lotfi, M., Akhlaghi, F., Asli, E. (2009): Using PCR and culture method for *Mycoplasma* testing in poliomyelitis vaccine. Arch. Razi Ins. 64: 109-114.
19- Tola, S., Angioi, A., Rocchigiani, A.M. (1997): Detection of *Mycoplasma agalactiae* in sheep milk samples by polymerase chain reaction. Vet. Mic. 54(1): 17-22.
20- Zendulkova, D., Madanat, A., Lany, P. (2007): Detection of *Mycoplasma agalactiae* by Polymerase Chain Reaction in Jordanian Sheep and goat herds. Acta. Vet. Brono. 76: 71-77.

Archive of SID

www.SID.ir