مقایسه میزان آلودگی به مایکوپلاسما آگالاکتیه (Mycoplasma agalactiae) در گوسفندان و بزهای مبتلا به آگالاکسی واگیردار در استان کرمان

سیدعلی پوربخش*[۱]، سودابه حمیداوی‌محمدپور[۱]، بابک خیرخواه[۲]، علیرضا آبتین[۱]، عباس اشتری[۱]، مهرداد شمس‌الدینی‌بافتی[۱]

چکیده

مایکوپلاسما آگالاکتیه بعنوان عامل آگالاکسی واگیردار در گوسفند و بز شناخته شده است. این بیماری در بسیاری از نقاط جهان وجود دارد و در ایران نیز گزارش گردیده است. هدف از این تحقیق مقایسه میزان آلودگی به *مایکوپلاسما آگالاکتیه* در گوسفندان و بزهای مبتلا به آگالاکسی واگیردار با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در استان کرمان بود. این مطالعه مقایسه‌ای به مدت ٦ ماه بر روی نمونه‌های دریافتی مشکوک به آگالاکسی واگیردار در گوسفندان و بزهای استان کرمان انجام گرفت. نمونه‌های دریافتی شامل ترشحات ملتحمه چشم، شیر و مایع مفصلی بود. جنس *مایکوپلاسما* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی در ناحیه ژن 16S rRNA با روش PCR و تشکیل باند ۱٦۳ جفت باز در نمونه های دریافتی شناسایی گردید. سپس تمامی نمونه‌های مثبت با استفاده از آغازگرهای اختصاصی در ناحیه لیپو پروتئین سطحی با تشکیل باند ۳۷۵ جفت باز جهت ردیابی گونه مایکوپلاسما آگالاکتیه مورد ارزیابی قرار گرفتند. از مجموع ۱٤۲ نمونه گوسفند و ۸۵ نمونه بز، تعداد ۵۹(٤۱٪) نمونه گوسفندان و تعداد ٤٦(۵٤٪) نمونه بزها از نظر جنس *مایکوپلاسما* مثبت بودند. همچنین تعداد ۱۷(۲۹٪) نمونه از گوسفندان و تعداد ۲۸(٦۱٪) نمونه از بزها به گونه مایکوپلاسما *آگالاکتیه* آلودگی داشتند. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که آلودگی به *مایکوپلاسما آگالاکتیه* در بزها بیشتر از گوسفندان است. بنابراین *مایکوپلاسما آگالاکتیه* یکی از عوامل اصلی بیماری آگالاکسی واگیردار گوسفند و بز در استان کرمان می‌باشد.

واژگان کلیدی: *آگالاکسی واگیردار، مایکوپلاسما آگالاکتیه، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، گوسفند و بز، کرمان.*

تاریخ دریافت: ۹۲/۱/۲٦ تاریخ پذیرش: ۹۲/۳/٦

مقدمه

آگالاکسی واگیردار یک بیماری عفونی و مسری در گوسفند و بز می‌باشد که در فصول زمستان و بهار شیوع زیادی می‌یابد(۵). ایـن بیماری همراه با شیوع بالا در سطح گله سبب قطع ناگهانی شیر، لاغری دام، سقط جنین، تورم قرنیه و ملتحمه چشم، تورم مفاصل، لنگش و سایر علائم بالینی می‌شود که در بره‌ها و بزغاله‌ها تلفات می‌تواند به دلیل سپتی‌سمی و پنومونی بالا باشد. در دام‌های بالغ مبتلا گرچه 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 و کاهش تولید شیر در گله از عوارض شناخته شده این بیماری است (۹). بیماری به صورت یک سندرم با عوامل مایکوپلاسمائی مختلف و از همه مهمتر *مایکوپلاسما آگالاکتیه* عارض می‌گردد (۱۰). در برخی پژوهش‌ها نشان داده شده است که *مایکوپلاسما آگالاکتیه* عامل اصلی ایجاد این بیماری بوده و گونه‌های دیگر مانند *مایکوپلاسما مایکوئیدس*، *مایکوپلاسما کاپریکولوم* و *مایکوپلاسما پوتریفیسنس* در ایجاد علائم این بیماری در ایران دخیل هستند(۱۰). شدت نسبی علائم بالینی در گوسفندان در مقایسه با بزها بستگی به عفونت مایکوپلاسمایی داشته و با منطقه متغیر است و تفاوتهای نژادی در حساسیت نسبت به بیماری وجود دارد (۱٤). جداسازی و تعیین هـویت مـولکولـی جـدایه‌های *مایکوپلاسما آگالاکتیه* در بزهای مبتلا به بیماری آگالاکسی به روش کشت و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در استان کرمان صورت گرفته است.

*۱- آزمایشگاه رفرانس مایکوپلاسما، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران
(a.pourbakhah@rvsri.ac.ir)
۲- گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بافت، بافت، ایران.

Archive of SID
www.SID.ir

نتایج این تحقیق جداسازی *مایکوپلاسما آگالاکتیه* از بزهای مبتلا را برای اولین بار در ایران تأیید نمود. ضمن اینکه نتایج نشان می‌دهد این باکتری عامل اصلی بیماری آگالاکسی در بزهای استان کرمان است (۱۰). در پژوهش دیگری عنوان گردید که عامل اصلی بیماری آگالاکسی در گوسفندان شهرستان بافت گونه آگالاکتیه نبوده و اغلب جدایه‌های بیماریزا را سایر گونه‌های مایکوپلاسمائی تشکیل می‌دهند (۲). ضمن اینکه دو پژوهش مذکور در یک دوره زمانی معین صورت نگرفته‌اند. در سایر استان‌های کشور نیز به منظور بررسی وضعیت عفونت‌های *مایکوپلاسما آگالاکتیه* در گله‌های گوسفند و بز پژوهش هایی انجام گردیده است(۱۳و ۲،۱۰). برطبق آمار رسمی سازمان دامپزشکی کشور بیماری آگالاکسی در تمامی مناطق کشور وجود داشته و گوسفند و بز را مبتلا می‌کند. جداسازی و شناسایی عامل بیماری آگالاکسی در دام‌های مبتلا و بررسی هویت مولکولی آن کمک شایانی به شناخت عامل بیماری موجود در منطقه و کشور خواهد کرد و این مهم از اولویت‌های مؤسسات پژوهشی کشور است. استان کرمان بعنوان پهناورترین استان کشور از جمعیت بالای گوسفند و بز برخوردار است و پرورش این دام‌ها خصوصاً در بین عشایر استان بسیار مرسوم می‌باشد. سالیانه خسارات اقتصادی زیادی بدلیل وجود این بیماری در این استان ایجاد می‌شود و هنوز جنبه‌های مجهول در خصوص هویت عامل بیماری وجود دارد. بسیاری از گزارشات در دنیا عامل اصلی این بیماری را *مایکوپلاسما آگالاکتیه* می‌دانند. یک مطالعه در شمال اردن جهت بررسی آلودگی *مایکوپلاسما اگالاکتیه* با استفاده از روش الایزا بر روی گله‌های بز و گوسفند صورت گرفت و تفاوت چندانی را در شیوع آگالاکسی مسری در دام های مذکور نشان نداد (٤) و در اسپانیا *مایکوپلاسما آگالاکتیه* عامل ۹۰ درصد از واگیری‌های این بیماری بوده است (۸). اگر چه اکثر تحقیقات در دنیا حساسیت بز به بیماری را بیشتر از گوسفند می‌دانند ولی گزارشات در ایران عنوان می‌کنند که گوسفندان بیشتر از بزها به بیماری مبتلا می‌شوند و عامل اصلی بیماری، *مایکوپلاسما آگالاکتیه* می‌باشد (۱). در پژوهشی دیگر از بزها و گوسفندان بیمار و سالم *مایکوپلاسما آگالاکتیه* جدا شده و توالی نوکلئوتیدی آنها در بانک ژن ثبت شده است. در این تحقیق فقط از شیر دام‌های مذکور نمونه‌گیری بعمل آمده است (۱۳). تاکنون پژوهش مستقلی بصورت مقایسه‌ای در خصوص میزان آلودگی به این عامل بین گوسفندان و بزها در استانهای کشور با استفاده از روش نوین PCR صورت نگرفته است. در بسیاری تحقیقات عنوان شده است که PCR از تست های معمول سریع‌تر است و می‌تواند بعنوان یک روش قابل اعتماد در جداسازی *مایکوپلاسما آگالاکتیه* از دام‌های بیمار بکار رود (١٦و١٠). در این پژوهش نیز از واکنش PCR که یکی از روش‌های پیشرفته در تشخیص عوامل میکروبی است، استفاده گردید. هدف از این تحقیق مقایسه میزان آلودگی به *مایکوپلاسما آگالاکتیه* در گوسفندان و بزهای مبتلا به آگالاکسی واگیردار با استفاده از روش PCR در استان کرمان بود.

مواد و روش کار

نمونه‌برداری. جامعه آماری این پژوهش تمامی گوسفندان و بزهای استان کرمان بوده و نمونه‌های دریافتی از دام‌های مشکوک به بیماری آگالاکسی واگیردار بودند. در این مطالعه از گوسفندان و بزهای استان کرمان طی ٦ ماه به ترتیب ١٤٢ و ٨٥ نمونه مشکوک دریافت گردید. نمونه‌ها بصورت سوآب از ضایعات چشمی، دوشش از پستان و پانکسیون مایعات مفصلی دام‌های مبتلا تهیه شدند. پس از افزودن محیط انتقالی (PPLO Broth) در دمای ٤ درجه سانتی گراد در مدت زمان کمتر از ٢٤ ساعت به آزمایشگاه رفرانس مایکوپلاسما موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی ارسال شدند و مورد مطالعه مولکولی قرار گرفتند. نمونه‌های دریافتی بصورت دو سوکور (Double blind) بدون در نظر گرفتن نوع حیوان ابتدا برای یک دوره ٢٤ ساعته در دمای ٣٧ درجه سانتی‌گراد غنی‌سازی شده و پس از این مرحله جهت جداسازی و شناسائی *مایکوپلاسما آگالاکتیه* با روش مولکولی PCR مورد آزمایش قرار گرفتند.

www.SID.ir

روش PCR. برای انجام آزمایش PCR در این تحقیق ابتدا ۰/۵ میلی‌لیتر نمونه‌های غنی‌شده سانتریفوژ شده و رسوب باکتری تهیه گردید. برای استخراج DNA باکتری روش شیمیائی فنل ـ کلروفرم و پروتکل Kojima و همکاران مورد استفاده قرار گرفت (۱۲). برای کنترل منفی از محیط PPLO Broth و برای کنترل مثبت از سویه استاندارد *مایکوپلاسما آگالاکتیه* (NCTC 10123) استفاده شد. در این مطالعه با استفاده از آغازگرهای شناسائی جنس که قادر به تکثیر قطعه‌ای از ژن 16S rRNA به اندازه ۱۶۳ جفت باز بودند و از آغازگرهای FS2 و FS1 که جهت شناسائی گونه توانائی تکثیر قطعه‌ای از ژن Lipoprotein به اندازه ۳۷۵ جفت باز را دارند بر اساس جدول ۱ استفاده شد.

جدول ۱: توالی نوکلئوتیدی آغازگرهای مورد استفاده در تشخیص جنس *مایکوپلاسما* و گونه *مایکوپلاسما آگالاکتیه* به روش PCR

Primer	Target gene	Sequence	Length (bp)	Reference
M1F	16S rRNA	F: 5′-GCTGCGGTGAATACGTTCT-3′	163	Kojima et al. 1997
M3R		R: 5′-TCCCCACGTTCTCGTAGGG-3′		
FS1	Lipoprotein	F: 5′-AAAGGTGCTTGAGAAATGGC-3/	375	Tola et al. 1997
FS2		R:5′-GTTGCAGAAGAAAGTCCAATCA-3′		

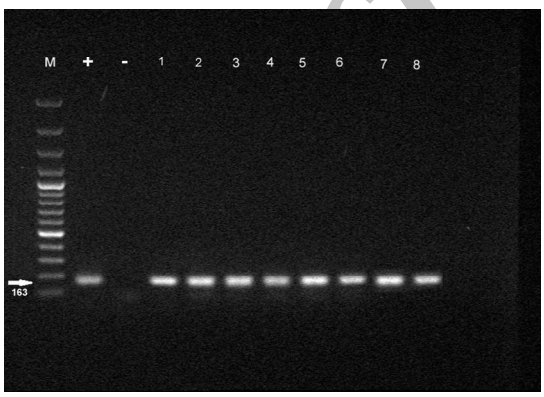
محصول PCR در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و هر میلی‌لیتر از محصول PCR با ۲ میلی‌لیتر از loading buffer (4x) مخلوط و محصول در ژل آگارز یک درصد که با سایبر رنگ شده بود حرکت داده شد و تحت الکتروفورز مورد ارزیابی قرار گرفت. در سه چاهک اول به ترتیب مارکر، کنترل مثبت و کنترل منفی قرار گرفتند. باندهای ایجاد شده پس از انتقال به دستگاه پرتوتاب ماوراء بنفش (UV Transluminator) مشاهده و تصاویر حاصل ثبت گردیدند.

نتایج

در این مطالعه از گوسفندان و بزهای استان کرمان طی ٦ ماه به ترتیب ١٤٢ و ٨٥ نمونه مشکوک دریافت گردید. بر اساس روش PCR، با استفاده از آغازگر اختصاصی جنس، در (٤١٪)٥٩ مورد گوسفندان و (٥٤٪) ٤٦ مورد بزها آلودگی به مایکوپلاسما تائید شد (نگاره۱). جهت شناسائی گونه مایکوپلاسما در آزمایش PCR از آغازگر اختصاصی گونه استفاده و نتیجه حرکت محصول PCR بر روی ژل آگارز تشکیل باند ۳۷۵ جفت باز در ۲۸ نمونه بز و ۱۷ نمونه گوسفند بود (نگاره۲) که در آزمایشات PCR قبلی جنس مایکوپلاسمای آنها تأیید شده بود. نتایج این پژوهش نشان می‌دهدکه آلودگی به *مایکوپلاسما آگالاکتیه* در بزها (٦١٪) بیشتر از گوسفندان (٢٩٪) است (جدول ۲).

جدول۲ : فراوانی و درصد آلودگی به جنس مایکوپلاسما و گونه آگالاکتیه در نمونه‌های دریافتی گوسفندان و بزها

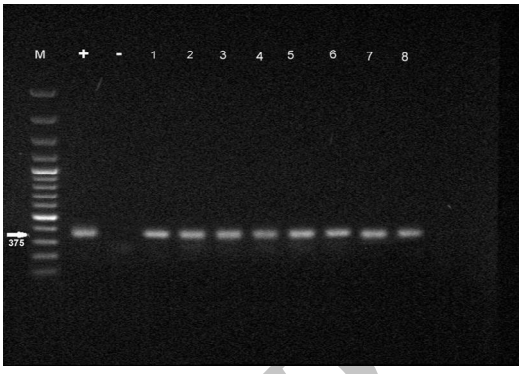
نتیجه PCR / نوع دام	تعداد نمونه	جنس مثبت		گونه مثبت	
		فراوانی	درصد	فراوانی	درصد
گوسفند	١٤٢	٥٩	٤١	١٧	٢٩
بز	٨٥	٤٦	٥٤	٢٨	٦١



نگاره ۱: بررسی محصول PCR جنس مایکوپلاسما بر روی ژل ۱٪ آگارز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (M1F-M3R). باندهای ١٦٣جفت باز در ۸ نمونه مشکوک به آگالاکسی. M: مارکر (100bp)، PC: کنترل مثبت، NC: کنترل منفی، ۱تا ۸ نمونه‌های مشکوک

Archive of SID

www.SID.ir



نگاره ۲: بررسی محصول PCR ژن *مایکوپلاسما آگالاکتیه* بر روی ژل ۱٪ آگارز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (FS1-FS2). باندهای ۳۷۵ جفت باز در ۸ نمونه مشکوک به آگالاکسی. M: مارکر (100bp)، PC: کنترل مثبت، NC: کنترل منفی، ۱تا ۸ نمونه‌های مشکوک.

مقایسه نتایج این پژوهش در نمونه‌های دریافتی گوسفند و بز بر اساس محل ضایعه با استفاده از آزمایش PCR در جدول ۳ نشان داده شده است. در هیچکدام از نمونه‌های جنس مثبت ضایعات چشمی، گونه مایکوپلاسما آگالاکتیه تأیید نگردید و بیشترین درصد آلودگی نمونه‌های دریافتی، به گونه آگالاکتیه در گوسفند از مایع مفصلی (٥٤٪) و در بز از شیر (٧٨٪) و مایع مفصلی (٧٥٪) بود.

جدول۳: فراوانی و درصد آلودگی مایکوپلاسمایی نمونه‌های دریافتی بر اساس محل ضایعه

تعداد / محل ضایعه		نمونه دریافتی		جنس مثبت		گونه مثبت	
		فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد
ترشحات چشم	گوسفند	۳۰	۲۱	۱۷	۵۷	۰	۰
	بز	۱۹	۲۲	۹	٤٧	۰	۰
شیر	گوسفند	۷۰	٤٩	۳۱	٤٤	۱۱	۳۵
	بز	۱۸	۲۱	۹	۵۰	۷	۷۸
مایع مفصلی	گوسفند	٤۲	۳۰	۱۱	۲٦	٦	٥٤
	بز	٤٨	٥٧	۲۸	٥٨	۲۱	۷٥

بحث

در این مطالعه، با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و با بهره‌گیری از آغازگرهای اختصاصی در ناحیه ژن 16S rRNA جنس مایکوپلاسما در نمونه های مشکوک به آگالاکسی واگیردار در گوسفندان و بزهای استان کرمان شناسایی گردید. سپس تمامی نمونه‌های مثبت با استفاده از آغازگرهای اختصاصی در ناحیه لیپو پروتئین سطحی جهت ردیابی گونه مایکوپلاسما آگالاکتیه مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفتند. نتایج حاصله نشان داد که آلودگی به *مایکوپلاسما آگالاکتیه* در بزها بیشتر از گوسفندان است و *مایکوپلاسما آگالاکتیه* یکی از عوامل اصلی بیماری آگالاکسی واگیردار گوسفند و بز در استان کرمان می باشد.

در مقایسه نتایج آزمایش PCR در سطح جنس در گوسفند و بز مشخص گردید که بزها با درصد بالاتری (٥٤٪) نسبت به گوسفندان (٤١٪) به مایکوپلاسما آلوده می‌گردند و همچنین موارد ابتلا به آگالاکسی با عامل *مایکوپلاسما آگالاکتیه* در بزها بیشتر از گوسفندان است، حال آنکه در تحقیقات گذشته در ایران گزارش شده است که گوسفندان بیشتر از بزها به این عامل بیماری آلوده می‌شوند و عامل اصلی بیماری آگالاکسی در

www.SID.ir
Archive of SID

گوسفند و بز، *مایکوپلاسما آگالاکتیه* می‌باشد (۱). در این مطالعه با استفاده از روش PCR، نسبت به مقایسه میزان آلودگی به *مایکوپلاسما آگالاکتیه* در گوسفندان و بزهای مشکوک به بیماری آگالاکسی واگیردار در استان کرمان اقدام شد. با توجه به اینکه در مورد اکولوژی این باکتری اطلاعات زیادی در دسترس نیست، انجام چنین تحقیقاتی در شناخت بهتر بیماری و عامل آن مؤثر است. اخیرا بر روی گله‌های گوسفند و بز در خصوص این بیماری مطالعات مشابهی صورت گرفته است، هرچند که این مطالعات بصورت پراکنده بوده و نتایج حاصل از آنها برای مقایسه میزان این بیماری در گوسفندان و بزها بر اساس عامل *مایکوپلاسما آگالاکتیه* مورد بحث قرار نگرفته است(۱۳و۲). *مایکوپلاسما آگالاکتیه* از جمله باکتری‌هایی است که به سختی از گله‌های آلوده جدا می‌شود و در گذشته آزمایش‌های معمول جهت تشخیص جنس‌های مایکوپلاسما عمدتاً بر پایه روش‌های کلاسیک مانند تست‌های بیوشیمیائی و آزمایشات ایمونوفلورسنت استوار بوده است. این روش‌ها گرچه سودمند هستند اما ممکن است با واکنش‌های مثبت کاذب همراه باشد(۱۷)، ضمن اینکه در دوره کمون نیز نمی‌توان به جستجوی مایکوپلاسما پرداخت. واکنش‌های متقاطع سرمی نیز یک مشکل جدی هستند که حساسیت این مطلب را بیشتر تحت تأثیر قرار می‌دهد(۷). از آنجائی که بهترین و قطعی‌ترین روش شناسایی مایکوپلاسماها در دام روش PCR می‌باشد (۵ و۳) در پژوهش حاضر نیز آزمایش مولکولی با این روش جهت تأیید جنس و گونه بصورت موازی برای نمونه‌های گوسفند و بز انجام گرفت. در تحقیق حاضر تمامی نمونه‌هایی که از نظر جنس مایکوپلاسما مثبت تشخیص داده شدند برای شناسایی گونه آگالاکتیه تحت آزمایش PCR قرار گرفتند و بیشترین درصد نمونه‌های مثبت در گوسفندان از مایع مفصلی (۵۴٪) و در بزها از شیر (۷۸٪) و مایع مفصلی (۷۵٪) جدا شد. اما در هیچکدام از نمونه‌های گوسفند و بز گونه آگالاکتیه از ضایعات چشم، جدا نگردید، که این یافته، نتایج برخی از تحقیقات دیگر در این استان و همچنین نتایج پژوهش‌های صورت گرفته در خارج از ایران را تائید می‌نماید(۱۰)، که عفونت با *مایکوپلاسما کانژنکتیو* در گوسفند و بز را عامل ایجاد ضایعات چشمی ذکر کرده‌اند(۶).

نتایج این پژوهش بیانگر آن است که بهترین نمونه برای جداسازی عامل بیماری، مایع مفصلی در گوسفندان و شیر و مایع مفصلی در بزها می‌باشد. این پیشنهاد در راستای تشخیص بیماری نیز می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد. در تحقیقات مشابه در ایران و کشورهای همسایه از تمامی نمونه‌های مذکور جهت جداسازی عامل بیماری استفاده شده است (۱۵ و۹،۱۱،۱۳).

بطور کلی، بررسی میزان موارد آلودگی به عامل *مایکوپلاسما آگالاکتیه* در گوسفندان مشخص می‌کند که درصد بالایی از گوسفندان مبتلا به آگالاکسی واگیردار، آلوده به سایر گونه‌های مایکوپلاسما می‌باشند. این وضعیت در خصوص بزهای مبتلا به این بیماری وجود نداشته و عامل اصلی بیماری گونه آگالاکتیه می‌باشد. پیشنهاد می‌گردد در تحقیقات آینده جهت شناسایی عامل بیماری در موارد مشکوک به آگالاکسی در گوسفندان به بررسی و مطالعه سایر گونه‌های مایکوپلاسما پرداخته شود.

تشکر و سپاسگزاری

هزینه‌های این مطالعه از محل اعتبارات پروژه شماره ۸۷۰۴۳-۱۸-۱۸-۲ مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی تأمین و پرداخت شده است. بدین وسیله از معاونت آموزش و تحقیقات سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی وزارت جهاد کشاورزی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی تشکر و قدردانی می‌شود. همچنین از همکاری‌های صمیمانه سرکار خانم‌ها: سلیمه آهنگران، مهناز باباخانی و آقای مهدی حمزه و تمامی کارکنان آزمایشگاه رفرانس مایکوپلاسما مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج سپاسگزاری می‌گردد.

فهرست منابع

Archive of SID

www.SID.ir

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

۲- خیرخواه، ب.، پوربخش، س.ع.، اشتری، ع.، امینی، ک. (۱۳۹۰): جداسازی *مایکوپلاسما آگالاکتیه* در گوسفندان مبتلا بـه بیمـاری آگالاکسی در شهرستان بافت، مجله پـاتوبیولوژی مقایسـه‌ای، ۸ (۱):۴۳۰-٤٢٣.

3- 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. Micro. 102: 42-48.

4- Al-Momani, W., Nicholas, R.A., Abo-Shehada, M.N. (2008): Risk factors associated with Mycoplasma agalactiae infection of small ruminants in northern Jordan. Prev. Vet. Med. 83(1): 1-10.

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. Micro. 69: 1913-1919.

7- De La Fe, C., Assuncao, P., Rosales, R.S., Antunes, T., Poveda, J.B. (2006): Characterization 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.

8- 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, P: 1-6.

9- Kheirabadi, K. H., Ebrahimi, A. (2007): Investigation of Mycoplasma agalactiae in milk and conjunctival swab samples from sheep flocks in west central, Iran. Pak. J. Bio. Sc. 10(8): 1346-1348.

10- Kheirkhah, B., Pourbakhsh, S.A., Nadaliyan, M.G.H., Banani, M., Ashtari, A. (2011): Detection of Mycoplasma agalactiae by culture and polymerase chain reaction (PCR) methods from Iranian goats. African J. Micro. Res. 5(13): 1668-1672.

11- Kizil, O., Ozdemir, H. (2006): Clinical, haemological and biochemical studies in goats naturally infected with Mycoplasma agalactiae. Bull. Vet. Ins. Pulawy. 50: 325-328.

12- 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. Bio. 25: 365-371.

13- 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.

14- Radostits, O. M., Gay, C.C., Hinchcliff, K.W., Constable, R.D. (2007): Goats. 10th edition. Elsevier Saunders. P: 1138-1140.

15- 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.

16- Tola, S., Angioi, A., Rocchigiani, A. M. (1997): Detection of Mycoplasma agalactiae in sheep milk samples by polymerase chain reaction. Vet. Micro. 54(1): 17-22.

17- 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