

جداسازی و شناسایی مایکوپلازما آگالاکتیه (*Mycoplasma agalactiae*) با استفاده از دو روش کشت و واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) از شیر گوسفندان منطقه ماسال (استان گیلان) مهدی محمدپور*^۱، سید علی پوربخش^۲، علیرضا آبتین^۳، حسین نادری^۴

۱- کارشناس ارشد میکروبیولوژی (تهران، فلاح، خیابان سجاد جنوبی، کوچه خوارزمی، پلاک ۱۱۳).
۲- Ph.D. میکروبیولوژی (دانشیار)، آزمایشگاه مرجع مایکوپلازما، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج، ایران.
۳- دکتری دامپزشکی، آزمایشگاه مرجع مایکوپلازما، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج، ایران.
۴- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، رشت، سلکی سر، دانشگاه علوم و تحقیقات.

چکیده

سابقه و هدف: بیماری آگالاکسی واگیردار ((Contagious agalactiae)، یک بیماری عفونی دامی در گوسفند و بز محسوب می‌شود که منجر به عفونت پستان، بیماری مفاصل زانو، کدورت قرنیه چشم و سقط جنین در دام می‌گردد. مایکوپلازما آگالاکتیه مهمترین عامل این بیماری در گوسفند و بز می‌باشد.

هدف از این تحقیق جداسازی و شناسایی مایکوپلازما آگالاکتیه به کمک روش های تشخیصی کشت و PCR از شیر گوسفندان مشکوک به بیماری، در منطقه ماسال از توابع استان گیلان بود.

مواد و روش ها: در این تحقیق از ۵ گله گوسفندی که علائم ظاهری بیماری را داشتند، ۲۵ نمونه از ترشحات پستان اخذ شد که پس از کشت در محیط PPLO broth، DNA با استفاده از کیت Roche استخراج و مورد آزمون PCR قرار گرفتند. آزمون PCR بر روی نمونه های استخراجی با استفاده از پرایمر های اختصاصی با محصولاتی به طول ۲۷۰bp در ژن ۱۶S rRNA برای جنس مایکوپلازما و ۳۷۵bp در ژن لیپوپروتئین برای گونه مایکوپلازما آگالاکتیه انجام شد.

یافته ها: از مجموع ۲۵ نمونه که ابتدا در محیط PPLO Broth (جهت غنی سازی و رشد) و سپس در محیط PPLO Agar جهت رشد و تشکیل پرگنه کشت داده شدند، تعداد ۹ نمونه (۳۶ درصد) با تشکیل پرگنه، مثبت تشخیص داده شدند. در آزمون PCR جنس مایکوپلازما، ۱۷ نمونه (۶۸ درصد) مثبت با باند مشخص ۲۷۰bp و تعداد ۵ نمونه (۲۹/۴ درصد) با باند مشخص ۳۷۵bp در آزمون PCR گونه مایکوپلازما آگالاکتیه، مثبت گزارش شدند. از مجموع ۲۵ نمونه دریافتی تعداد ۸ نمونه در دو روش کشت و PCR مثبت، تعداد ۷ نمونه در هر دو روش منفی، تعداد ۱ نمونه کشت مثبت و PCR منفی و تعداد ۹ نمونه PCR مثبت و کشت منفی شدند.

نتیجه گیری: نتایج حاصله نشان داد که PCR بعنوان روش جایگزین مطمئنی برای کشت، در جداسازی و شناسایی مایکوپلازما آگالاکتیه قابل استفاده می‌باشد. مایکوپلازما آگالاکتیه برای نخستین بار از موارد مشکوک به بیماری از شیر گوسفندان منطقه ماسال گیلان جداسازی شد که بعنوان مهمترین عامل آگالاکسی در این منطقه شناخته نشد.

کلمات کلیدی: مایکوپلازما آگالاکتیه، آگالاکسی، کشت، PCR، گوسفند

مقدمه

مایکوپلازما ها بر اساس قرار گیری در کلاس مولیکوتکس ها کوچکترین پروکاریوت فاقد دیواره سلولی و خود همانند ساز می‌باشند. اثبات شده که این باکتری حاوی دست های از ژن ها میباشد که فاز

*نویسنده مسئول مکاتبات: تهران، فلاح، خیابان سجاد جنوبی، کوچه خوارزمی، پلاک ۱۱۳.

پست الکترونیکی: Mahdi_mohamadpour@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۹۲/۱۲/۱۸

تاریخ پذیرش: ۹۳/۸/۵

تغییر لیپوپروتئین ها را کد میکند. بنابراین باعث ایجاد تنوع آنتیژنی در سطح غشاء میشود (۱۰).

بیماری آگالاکسی یکی از مهمترین بیماری های عفونی در گوسفند و بز می‌باشد. این بیماری سبب قطع تولید شیر میگردد بطوری که تولید شیر حتی پس از بهبود دام نیز به میزان عادی برنمیگردد. همچنین فلجی و تورم مفاصل، لنگش (۱۷)، پنومونی (۸)، کوری موقت یا دائم بدنبال تورم قرنیه و ملتحمه چشم و در ن هایت لاغری و ضعیف شدن

انجام گردید. نمونه ها در محیط انتقالی که حاوی مواد مغذی و آنتی سبتیک (استات تالیم و پنی سیلین) می باشد، در کنار یخ و در دمای ۴ درجه سانتی گراد، ظرف مدت کمتر از ۲۴ ساعت به آزمایشگاه مرجع مایکوپلازما موسسهی واکسن و سرم سازی رازی ارسال، بصورت موازی و تحت دو روش کشت و PCR نسبت به جداسازی عامل بیماری اقدام شد.

پس از ارسال نمونه ها به آزمایشگاه، نمونه ها در ۵ میلی لیتر محیط PPLO Broth جهت غنی سازی برای یک دوره حدود ۲۴ ساعته در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوباسیون شدند. پس از اتمام غنی سازی نمونه ها، جهت جداسازی و شناسایی مایکوپلازما آگالاکتیه تحت دو روش کشت و PCR، نمونه را چندین بار پیتاژ کرده، حدود ۰/۷ میلی لیتر را جهت استخراج DNA داخل تیوپ ۱/۵ میلی لیتر ریخته، از باقیمانده نمونه جهت کشت استفاده شد (۱۸).

روش کشت

نمونه مورد نظر جهت کشت با استفاده از فیلتر های مخصوص سرسرنگی PVDF که دارای روزه هایی با قطر ۰/۴۵ میکرومتراند، در ۵ میلی لیتر PPLO Broth با فشار کم و به آرامی ریخته شد (۱۸). سپس این محیط در انکوباتور Co_۲ دار قرار گرفته و ۵-۳ روز تحت نظر قرار گرفت. این محیط به دلیل دارا بودن فنل رد قرمز رنگ است که در صورت رشد باکتری تغییر رنگ داده و به رنگ زرد متمایل میشود. علاوه بر این تغییر رنگ، ایجاد کدورت دال بر رشد باکتری در محیط است. در هر صورت محیط ها مجدداً در PPLO Broth پاساژ داده و پس از ۲۴ تا ۴۸ ساعت، ۰/۲ میلیلیتر از هر کدام از محیط های مایع، روی محیط PPLO Agar در پلیت کشت داده شده، به انکوباتور Co_۲ دار منتقل و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۷۲ ساعت انکوبه گردیدند. محیط های کشت PPLO Agar هر روز با میکروسکوپ نوری و با بزرگنمایی ۴۰x از نظر رشد و تشکیل پرگنه های مخصوص به شکل تخم مرغ نیمرو تحت بررسی قرار گرفتند (۱۸).

روش PCR

۰/۷ میلی لیتر از نمونه ها جهت استخراج DNA، پس از غنی سازی اولیه با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت Roche با نام تجاری High Pure PCR Template Preparation Kit طبق دستور العمل شرکت سازنده استفاده، پس از استخراج نسبت به تکثیر DNA الگو به روش PCR اقدام شد.

برای انجام PCR در آزمایش تشخیص جنس و گونه یک روش اتخاذ گردید. بدین صورت که در تشخیص گونه، ابتدا مواد مخلوط اصلی (Master Mix) طبق جدول شماره ۱ داخل میکروتیوپ ۰/۲ میلی لیتر ریخته شد. ۰/۱ حجم باقیمانده یعنی ۱/۸۱ میکرولیتر از DNA را داخل

دام ها نیز مشاهده میشود که به بدلیل طولانی بودن دوره بیماری در دامداری ها، خسارت اقتصادی زیادی به همراه دارد. بالا بودن میزان سقط جنین در گله از جمله خسارت های اقتصادی شناخته شده است (۱۱).

مایکوپلازما آگالاکتیه (*Mycoplasma agalactiae*) یکی از عوامل ایجاد این بیماری در گله های گوسفند و بز می باشد. سویه هایی مانند مایکوپلازما مایکوئیدس (*Mycoplasma mycoides*)، مایکوپلازما کاپریکولوم (*Mycoplasma capricolum*) و مایکوپلازما پوتریفیسنس (*Mycoplasma putrefaciens*) در ایجاد علائم این بیماری در ایران دخیل هستند (۳).

بر طبق آمار رسمی سازمان دامپزشکی کشور، بیماری آگالاکسی در تمام مناطق دامپرور کشور وجود داشته، گوسفند و بز را مبتلا می کند. اکثر مولفان خارجی حساسیت بز را بیشتر از گوسفند ذکر کرد هاند، ولی در ایران این امر صادق نیست و گوسفند حساسیت بیشتری نشان میدهد. همچنین حیوانات نر و ماده به یک نسبت به بیماری حساسیت نشان میدهند، منت ها در دام های نر و حیوانات نابالغ، علائم بیماری منحصر به علایم چشمی و مفصلی است (۱).

در مطالع های که توسط Tola و همکاران در سال ۱۹۹۷ صورت گرفت، جداسازی مایکوپلازما آگالاکتیه در نمونه های شیر گوسفند توسط واکنش PCR مدنظر قرار گرفت (۱۹).

آبتین و همکاران در سال ۲۰۱۲ توانستند برای اولین بار نسبت به جداسازی و شناسایی مایکوپلازما آگالاکتیه از گوسفندان استان قم با استفاده از روش های کشت و PCR اقدام نمایند (۴).

خیرخواه و همکاران نیز در سال ۲۰۱۱ توانستند برای اولین بار با استفاده از روش های کشت و PCR مایکوپلازما آگالاکتیه را از گوسفندان و بز های شهرستان بافت در استان کرمان جداسازی کنند (۲).

در مطالعه دیگری مرادی بیدهدی و همکاران با استفاده از روش های فوق توانستند از گوسفندان و بز های استان کردستان مایکوپلازما آگالاکتیه را جداسازی و شناسایی کنند (۱۶).

از آنجا که منطقه ماسال با توجه به شرایط آب و هوایی خود، در پرورش گوسفند در استان گیلان حائز اهمیت می باشد و تا به امروز گزارش دقیقی از شناسایی و جداسازی عوامل موثر در بیماری آگالاکسی در این استان وجود نداشته است، لذا در این مطالعه سعی شده است برای اولین بار جداسازی و شناسایی مایکوپلازما آگالاکتیه از گوسفندان منطقه ماسال از توابع استان گیلان با استفاده از کشت و PCR انجام و گزارش شود.

مواد و روش کار

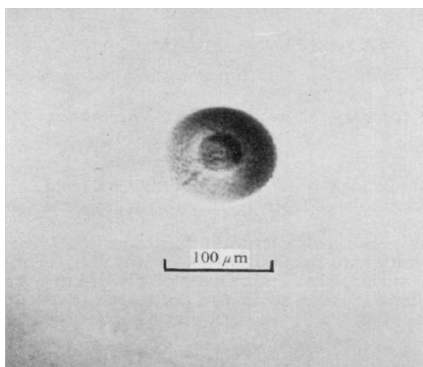
با توجه به اینکه در فصول زمستان و ب هار میزان شیوع این بیماری افزایش می یابد، در ماه های بهمن ۱۳۹۰ و خرداد ۱۳۹۱ از ۵ گلهی مشکوک بر اساس گزارشات دامپزشکان نمونهگیری مبتنی بر هدف

های شناسایی عمومی مایکوپلازما ها شامل پرایمر MGSO-GPO با ۲۷۰ bp نوکلئوتید بوده که قادر به شناسایی و تکثیر قطع های از ژن rRNA ۱۶S هستند (۱۳). پرایمر های شناسایی جنس مایکوپلازما آگالاکتیه شامل پرایمر FS۱-FS۲ با ۳۷۵ bp نوکلئوتید بوده که توانایی آغاز تکثیر قطعه ای از ژن لیپوپروتئین را دارند (۱۹).

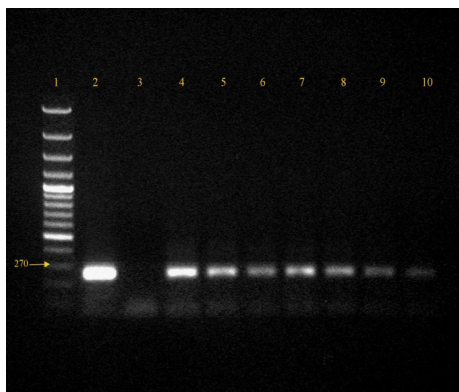
یافته ها

در این مطالعه دو روش کشت و PCR بصورت موازی و غیر وابسته به هم در تشخیص جنس باکتری استفاده شد. از مجموع ۲۵ نمونه اخذ شده، تعداد ۹ نمونه (۳۶ درصد) با مشاهده پُرگنه های تخم مرغی شکل بر روی محیط کشت آگار، کشت مثبت ارزیابی شدند (شکل شماره ۱). همچنین در آزمایش PCR، تعداد ۱۷ نمونه (۶۸ درصد) جنس مثبت (شکل شماره ۲) شدند که از این تعداد ۵ نمونه (۲۹/۴ درصد) با استفاده از آغازگر های شناسایی گونه، مثبت تشخیص داده شدند (شکل شماره ۳).

با نگاهی دیگر، از مجموع ۲۵ نمونه، تعداد ۸ نمونه در کشت و PCR جنس هر دو مثبت و تعداد ۷ نمونه در هر دو روش منفی بدست آمدند. تعداد ۱ نمونه PCR منفی و کشت مثبت و تعداد ۹ نمونه PCR مثبت و کشت منفی بودند.



شکل ۱- تصویر میکروسکوپی (۴۰x) پُرگنه های مشاهده شده بر روی محیط PLO Agar



شکل ۲- بررسی محصول PCR جنس مایکوپلازما بر روی ژل ۱٪. ۱ : مارکر (۱۰۰ bp DNA ladder)، ۲ : کنترل مثبت (باند نمونه استاندارد

ظرف اضافه کرده و با توجه به اینکه حجم باید به ۲۵ میکرولیتر برسد، باقیمانده را (۱۶/۲۹ میکرولیتر) از H₂O پر کردیم. قابل توجه اینکه برای کنترل منفی چون DNA نداریم، ۱۸/۱ میکرولیتر H₂O اضافه شد.

جدول ۱- ترکیبات لازم برای ساخت Master Mix به تفکیک جنس

و گونه

آزمایش تشخیص گونه	آزمایش تشخیص جنس	مواد مورد نیاز
۲,۵	2.5	PCR buffer
۲	2	MgCL2
۰,۲	0.5	dntps
۱+۱	0.1+0.1	Primer
0.2 (1 unit)	0.25(1.25unit)	Taq
۶,۹	5.45	Total

پس از آماده شدن نمونه، مخلوط حاصل در حجم ن هایی ۲۵ میکرولیتر به دستگاه ترموسایکلر Gradient Mastercycler روشن شده و درجه حرارت آن برای مراحل مختلف تنظیم گردیده بود، انتقال داده شد و انجام PCR با درجه حرارت و زمان مناسب گونه مایکوپلازما آگالاکتیه طبق جدول شماره ۲ انجام گردید (۱۸).

جدول ۲- مراحل حرارتی آزمایش PCR در تشخیص گونه مایکوپلازما

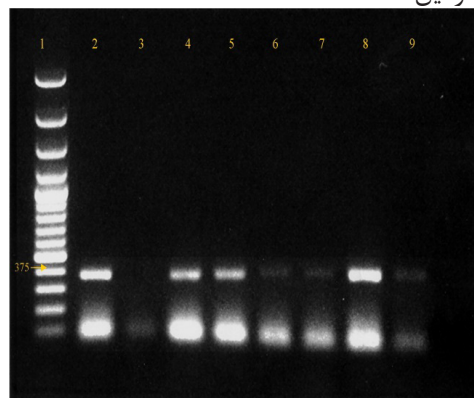
نام مرحله	درجه حرارت	مدت زمان	تعداد چرخه
واسرشت اولیه	95°	5min	1
واسرشت ثانویه	94°	1min	35
اتصال پرایمر ها	5°c	1min	
گسترش اولیه	7°c	1min	
گسترش ن هایی	72°	10min	1

به منظور اجرای هر واکنش PCR و تایید صحت عملکرد تست در هنگام اجرای روش PCR نیاز به یک شاهد مثبت و یک شاهد منفی می باشد. در این تحقیق کنترل منفی متشکل از همه اجزای واکنش PCR بدون حضور DNA بود (برای اطمینان از عدم آلودگی محیط کشت). و برای کنترل مثبت از DNA نمونه استاندارد باکتری مایکوپلازما آگالاکتیه (NCTC ۱۰۱۲۳) استفاده گردید (شاهد مثبت باید فقط یک باند بدهد). در یک چاهک نیز مارکر که خطکشی برای وزن باند ساخته شده میباشد ریخته شد. چاهک ها به ترتیب شامل: چاهک اول مارکر، چاهک دوم کنترل مثبت، چاهک سوم کنترل منفی و چاهک های چهارم تا چاهک آخر، جهت بارگیری نمونه ها در نظر گرفته شد.

در این مطالعه از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد که با سایبر رنگ آمیزی شده بود، استفاده شد. پس از پایان مرحله الکتروفورز، بوسیله دستگاه پرتوتاب ماوراء بنفش (UV Transluminator) تصویر برداری صورت پذیرفته و محصول PCR در دمای ۴ درجهی سانتیگراد نگهداری شد (۱۸).

در این طرح برای انجام PCR از آغازگر هایی استفاده شد. پرایمر

۱۰۱۲۳ (M. agalactiae (NCTC در ناحیه ۱۶۳bp، ۳ : کنترل منفی (محیط کشت بدون تلقیح باکتری)، باند های ۴ تا ۱۰ : نمونه های مورد آزمایش در این مطالعه.



شکل ۳- بررسی محصول PCR گونه میکوپلازما آگالاکتیه بر روی ژل ۱٪ : مارکر (۱۰۰bp DNA ladder)، ۲ : کنترل مثبت (باند نمونه استاندارد ۱۰۱۲۴-۰۵ MS-NCTC در ناحیه ۲۰۷bp)، ۳ : کنترل منفی (محیط کشت بدون تلقیح باکتری)، باند های ۴ تا ۹ : نمونه های مورد آزمایش در این مطالعه.

بحث

در این مطالعه جداسازی و شناسایی میکوپلازما آگالاکتیه بعنوان یکی از مهمترین عوامل بیماری آگالاکسی از شیر گوسفندان مشکوک به بیماری، با استفاده از روش کشت و PCR در منطقه ماسال انجام شد. با بدست آمدن نتایج این گزارش، ضمن اینکه برای اولین بار حضور میکوپلازما آگالاکتیه در گله های گوسفند ماسال به تائید رسید، روش PCR نیز بعنوان روشی مناسب در تشخیص سریع بیماری اعلام شد (۵ و ۹). با توجه به خسارت های اقتصادی در جمعیت های دامی و با وجود تلاش هایی که در خصوص پیشگیری و کنترل این بیماری صورت گرفته (۳ و ۱۶)، انجام چنین تحقیقاتی در شناخت بهتر بیماری و عامل آن موثر است.

میکوپلازما آگالاکتیه از جمله باکتری هایی است که به سختی از گله های آلوده جدا میشود و روش های معمول در تشخیص میکوپلازما ها عمدتاً بر پایه روش های کلاسیک مانند تست های بیوشیمیایی و ایمونوفلورسنت قرار دارد. این روش ها وقتگیر هستند، تفسیر نتایج آن ها اغلب دشوار بوده، با ایجاد واکنش های متقاطع سرمی، ایجاد جواب های مثبت و منفی کاذب می کنند (۱۰ و ۲۰). علاوه بر این، روش های دیگری مانند روش کشت و روش مولکولی وجود دارند که هر یک از این روش ها دارای معایب و مزایایی هستند.

هر چند که روش کشت در بسیاری از منابع به عنوان روشی استاندارد در تشخیص میکوپلازما ها محسوب می شود، ولی دارای هزینه بالا بوده و زمانبر می باشد. روش کشت توانمندی ردیابی عفونت فعال میکوپلازما آگالاکتیه را داراست. نتایج مثبت روش کشت وابستگی زیادی به مرحله بیماری عفونی، نحوه و محل اخذ نمونه و شرایط انتقال نمونه (بدون

آسیب به حیات باکتری) و اجرای روش کشت دارد (۱۴). در مطالعه ای که توسط Zendulkova و همکاران با عنوان جداسازی میکوپلازما آگالاکتیه توسط واکنش PCR در گله های گوسفند و بز اردن در سال ۲۰۰۷ انجام شد، از ۱۵ گوسفند و ۲۰ بز بیمار جمعاً ۱۰۷ سوآپ بینی، ملتحمه، واژن و کانال گوش خارجی اخذ شد. در این مقاله عنوان شده است که تغییر رنگ محیط کشت نمیتواند دال بر رشد یا عدم رشد میکوپلازما آگالاکتیه باشد زیرا رشد این باکتری همیشه سبب اسیدی شدن محیط نمیشود (۲۰).

McAuliffe و همکارانش در سال ۲۰۰۵ در تحقیقی جهت تشخیص عفونت میکوپلازمایی بر پایه کشت و تست های سرولوژیکی بیان داشتند که این دو روش بسیار وقت گیر و پر هزینه می باشند. بسیاری از PCR های اختصاصی به این منظور ارائه شدند که این خصوصیات نامطلوب را جبران کنند (۱۵).

Gray و همکارانش در سال ۱۹۸۴ در تحقیقی بیان می کنند که مولکول RNA از قسمت ریبوزومی می تواند به عنوان هدف اصلی PCR انتخاب گردد. این انتخاب بر اساس میزان بیان ژنی آن صورت گرفته است زیرا rRNA به صورت طبیعی دارای کپی های زیادی می باشد و بنابراین هدفی خوب جهت یک آزمون PCR با حساسیت بالا است (۱۲). در روش PCR به دلیل تکثیر DNA سلول زنده و یا بقایای DNA باکتری کشته شده، رابطه ای بین زنده بودن و فعال بودن عفونت با ردیابی DNA عامل عفونی وجود نداشته و صرفاً در صورت ردیابی RNA عامل عفونی می توان آن را دال بر حضور عفونت فعال دانست (۱۴).

در مطالعه ای که توسط آبتین و همکاران در سال ۱۳۹۱ بر روی گوسفندان استان قم صورت گرفت، از مجموع ۱۰۲ نمونه، ۱۸/۶ درصد نمونه ها در کشت PPLO Agar مثبت تشخیص داده شدند و ۵۷/۸ درصد نمونه ها در آزمون PCR جنس میکوپلازما مثبت گزارش شد که از این مقدار، ۳۲/۲ درصد نمونه ها در PCR، گونه مثبت بودند (۴). در مطالعه مشابهی که توسط خیر خواه و همکاران در سال ۱۳۹۰ بر روی گوسفندان شهرستان بافت کرمان انجام شد، از مجموع ۵۷ نمونه، ۱۵/۷ درصد نمونه ها کشت مثبت و ۵۴/۳ درصد از نمونه ها PCR جنس مثبت بودند که از این میزان ۳۳/۳ درصد نمونه ها گونه مثبت شدند (۲).

در مطالع های که توسط Tola و همکاران بر روی ۴۴۴ نمونه صورت پذیرفت، جداسازی میکوپلازما آگالاکتیه در نمونه های شیر گوسفند توسط کشت و واکنش PCR مدنظر قرار گرفت. محققین در این طرح به این نتیجه رسیدند که بهترین روش برای جداسازی میکوپلازما آگالاکتیه به صورت مستقیم از شیر گوسفند، روش PCR است. زیرا اولاً نتایج فقط پس از ۵ ساعت قابل گزارش است که با روش کشت این زمان حداقل به ۷ تا ۱۰ روز می رسد، ثانیاً در پروسهی اسیدی شدن شیر ممکن است که زنده ماندن و رشد میکوپلازما کاهش یابد (۱۹).

هزينه كمتر و حساسيت بيشتر بوده و همچنين نتايج اين مطالعه نشان مى دهد كه مايكوپلازما آگالاکتیه یکی از مهمترين عوامل مولد بيمارى آگالاکسى محسوب مى شود.

تقدير و تشكر

مطالب حاضر، حاصل تلاش دوستانم در آزمایشگاه مرجع مايكوپلازما موسسه تحقيقات واكسن و سرمسازى رازى مى باشد. بدین وسیله از ايشان تقدير به عمل مى آورم.

در تحقيق حاضر، ۳۶ درصد نمونه ها از لحاظ كشت مايكوپلازما مثبت بوده و ۶۸ درصد نمونه ها در PCR تشخيص جنس مايكوپلازما مثبت گزارش گرديد، همچنين ۴/۲۹ درصد نمونه هاى گرفته شده در PCR گونه ي مايكوپلازما آگالاکتیه مثبت گزارش گرديدند. نتايج فوق در توافق نتايج محققين قبلى كه تاكيد كرده بودند كه PCR جايجزين مناسبى براى كشت است، مى باشد.

با توجه به اينكه عامل بيمارى عمدتاً از چشم، پستان و مفصل جدا مى شود(۱۶)، آزمایشات متعدد در نقاط مختلف دنيا نشان داد كه محل ضايعه اى كه بيشترين ميزان جداسازى عامل بيمارى را دارد متفاوت مى باشد. بطورى كه Belloy بيشترين عامل بيمارى را از مفصل و كمترين را از چشم و Zendulkova برخلاف آن، بيشترين را از چشم و كمترين را از مفصل جدا كردند. Tola، آبتين و خير خواه، بيشترين تعداد را از شير و كمترين را از مفصل جدا كردند (۲ و ۴ و ۷ و ۱۹ و ۲۰).

در پژوهشى كه بيهندى و همكاران در سال ۲۰۱۱ انجام دادند، بهترين محل نمونهگيرى براى جداسازى عامل بيمارى را به ترتيب ترشحات پستان و مايعات مفصلی عنوان كردند و به هيچ عنوان سواپ چشمى براى جداسازى مايكوپلازما آگالاکتیه مناسب نبود. نتايج حاصل از اين تحقيق نشان مى دهد كه پستان مى تواند محل مناسبى براى نمونه گيرى، جداسازى و شناسايى مايكوپلازما آگالاکتیه باشد و مى تواند موافق با نتايج و ادعا هاى آبتين و خير خواه و Tola باشد.

همچنين در اين مطالعه تعداد ۹ عدد از نمونه ها PCR مثبت ولى از نظر كشت منفى گزارش شدند. محققان در توضيح يافته هاى خود بيان نمودند كه تفاوت در ميان پاسخ هاى حاصله از روش كشت و PCR مى تواند به دليل وجود سلول هاى مايكوپلازمای مرده و يا مايكوپلازمای غير قابل كشت باشد(۱۴).

نتايج در کشور هاى كه سيستم پرورش متمرکز گوسفند و بز دارند، نشان داد كه مايكوپلازما آگالاکتیه عامل اصلى آگالاکسى است(۱۱) اما در گوسفندان منطقه مورد مطالعه، اين آمار متفاوت است. بدین صورت كه عامل اصلى بيمارى آگالاکسى در گوسفندان منطقه ماسال گونه آگالاکتیه نبوده (تن ها ۴/۲۹ در صد) و اغلب جدایه هاى بيماريزا را ساير گونه هاى مايكوپلازمایى تشكيل مى دهند كه با يافته هاى حاصل از نمونه هاى كرمان و قم مطابقت دارد(۲ و ۴).

گرچه اين مطالعه نشان داد كه مايكوپلازما آگالاکتیه در ايجاد بيمارى آگالاکسى در گوسفندان استان گيلان موثر است، اما پيشنهاد مى شود تا اين مطالعه در سطح وسيع ترى انجام شده و موارد جنس مثبت عفونت مايكوپلازمایى اما گونه منفى از نظر آگالاکتیه، بررسى و ساير گونه هاى دخیل در ايجاد بيمارى آگالاکسى تعيين گردند.

نتيجه گيرى

با توجه به نتايج حاصله، PCR در مقايسه با روش كشت، سريعتر، با

منابع

- ۱- حسنی طباطبایی ع، فیروزی ر. بیماری های باکتریائی دام. موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران. ۱۳۸۰؛ سال اول (شماره اول): ۴۸۴-۴۶۹.
- ۲- خیرخواه ب، پوربخش سع، اشتری ع، امینی ک. جداسازی میکوپلازما آگالاکتیه در گوسفندان مبتلا به بیماری آگالاکسی در شهرستان بافت. مجله پاتوبیولوژی مقایس های. ۱۳۹۰؛ سال هشتم (شماره اول): ۴۳۰-۴۲۳.
- ۳- قادرسهی ع، اخلاقی ا، فیاضی ز، ناصریراد عا، وندیوسفی ج. شناسائی میکوپلازما آگالاکتیه و دیگر عوامل مسبب بیماری آگالاکسی در گوسفند و بز بوسیله PCR و کشت در ایران. مؤسسهی واکسن و سرم سازی رازی. ۱۳۸۵؛ سال سوم (شماره دوم): ۱۰-۱۲.
- 4-Abtin A.R, Pourbakhsh S.A, Ashtari A, Bayatzadeh M.A, Barani S.M, Ahangaran S. Isolation and identification of *Mycoplasma agalactiae* by culture and polymerase chain reaction (PCR) from sheep of Qom province, Iran. Arch. Razi. Ins, 201311-16:(1)68 ؛
- 5-Amores J, Corrales J.C, Martin A.G. Comparison of culture and PCR to detect *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp. Capri in ear swabs taken from goats. Vet. Mic, 2009102:42-48 ؛
- 6-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. Evaluation of PCR system for the identification and differentiation of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis*: A collaborative trial. Vet. J, 2005268-275 :169 ؛
- 7-Belloy L, Janovsky M, Vilei M, Pilo P. Molecular epidemiology of *Mycoplasma conjunctivae* in Caprinae: Transmission across species in natural outbreak. App & Env. Mic, 200369:1913-1919 ؛
- 8-Cokrevski S, Crcev D, Loria G.R, Nicholas R.A.J. Outbreaks of contagious agalactia in small ruminant in the republic of Macedonia. Vet. Rec, 2001667-670 :148 ؛
- 9-Dedieu L.A, Mady V, Lefevre P.C. Development of a species – specific DNA probe for *Mycoplasma capricolnm*. Vet. Mic, 1992؛ 197 – 32:189.
- 10-De La Fe C, Assuncao P, Rosales R.S, Antunes T, Poveda J.B. Characterisation of Protein and antigen variability among *Mycoplasma Mycoides* subsp *Mycoides* LC and *Mycoplasma agalactiae* field strains by SDS-PAGE and immunoblotting. Vet. J, 2006؛ 532-538 :171.
- 11-Garrido F, Leon L, Ladero J.L, Cuellar L, Diaz M.A. Contagious agalactia and other mycoplasmal diseases of small ruminants. Office for Official Publications of the European Communities, Commissions of the European Community, Luxembourg, 1987؛ EUR 10984 EN:1-5.
- 12-Gray M.W, Sancioff D, Cedergren R.J. On the evolutionary descent of organisms and organelles: a global phylogeny based on a highly conserved structural core in small subunit ribosomal RNA. Nucleic Acids Research. 198412:5837-5852 ؛
- 13-Kuppeveld F.J.M.Van, Logt J.T.M, Van, Angulo A.F, Zoest M.J. van, Quint W.G.V, Niesters H.G.M, Galama J.M.D, Melchers W.J.G. Genus- and specie-specific identification of *Mycoplasmas* by 16S rRNA amplification. App & Env. Mic, 1993655:(2)59 ؛
- 14-Marois C, picault P, Kempf I. Experimental evidence of indirect transmission of *Mycoplasma synoviae*. Vet. R, 200536:759- ؛ 769.
- 15-McAuliffe L, Ellis R.J, Lawes R.J, Nicholas R.A. 16S ribosomal DNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis asingle generic test for decting and differentiatin mycoplasma species. Med. Mic. J,200554:731-739 ؛
- 16-Moradi Bidhendi S, Khaki P, PilehchianLangroudi R. 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. 201111-16 :66 ؛
- 17-Nicholas R.A.J. Improvement in the diagnosis and control of disease of small ruminant caused by mycoplasmas. Small Ruminant Res. 2002145-149 :45 ؛
- 18-Sakhaei D, Pourbakhsh S.A, Banani M, Lotfi M, Akhlaghi F, Asli E. Using PCR and culture methods for *Mycoplasma* testing in poliomyelitis vaccine. Arch. Razi Ins, 2009109-114 :64 ؛
- 19-Tola S, Angioi A, Rocchigiani A.M. Detection of *Mycoplasma agalactiae* in sheep milk samples by Polymerase Chain Reaction. Vet. Mic, 199717-22 :(1)54 ؛
- 20-Zendulkova D, Madanat A, Lany P, Rosenbergova K, Pospisi Z. Detection of *Mycoplasma agalactiae* by Polymerase Chain Reaction in Jordanian Sheep and goat herds. Acta. Vet1, 200771-77 :76 ؛