Downloaded from ncmbjpiau.ir at 4:17 +0430 on Sunday June 20th 2021

مجله تازههای بیوتکنولوژی سلولی – مولکولی
دوره پنجم، شماره هجدهم – بهار ۱۳۹۴

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

جداسازی و شناسایی مایکوپلاسما آگالاکتیه(Mycoplasma agalactiae) با استفاده از دو روش کشت و واکنش زنجیره ای پلیمراز(PCR) از شیر گوسفندان منطقه ماسال(استان گیلان)

مهدی محمدپور*[1]، سید علی پوربخش[2]، علیرضا آبتین[3] ،حسین نادری[4]

۱-کارشناس ارشد میکروبیولوژی(تهران، فلاح، خیابان سجاد جنوبی، کوچه خوارزمی، پلاک ۱۱۳.
۲-Ph.Dمیکروبیولوژی(دانشیار)، آزمایشگاه مرجع مایکوپلاسما، موسسه تحقیقات واکسن وسرمسازی رازی، کرج، ایران.
۳-دکتری دامپزشکی، آزمایشگاه مرجع مایکوپلاسما، 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 می شود که منجر به عفونت پستان، بیماری مفاصل زانو، کدورت قرنیه چشم و سقط جنین در دام می گردد. مایکوپلاسما آگالاکتیه مهمترین عامل این بیماری در گوسفند و بز می باشد.

هدف از این تحقیق جداسازی و شناسایی مایکوپلاسما 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 bp۲۷۰ در ژن ۱۶S rRNA برای جنس مایکوپلاسما و ۳۷۵bp در ژن لیپوپروتئین برای گونه مایکوپلاسما آگالاکتیه انجام شد.

یافته ها: از مجموع ۲۵ نمونه که ابتدا درمحیط PPLO Broth (جهت غنی سازی و رشد) و سپس در محیط PPLO Agar جهت رشد و تشکیل پرگنه کشت داده شدند، تعداد ۹ نمونه(۳۶درصد) با تشکیل پرگنه، مثبت تشخیص داده شدند. در آزمون PCR جنس مایکوپلاسما، ۱۷ نمونه(۶۸درصد) مثبت با باند مشخص bp۲۷۰ و تعداد ۵ نمونه(۲۹/۴درصد) با باند مشخصbp۳۷۵ در آزمون PCR گونه مایکوپلاسما 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 PCRبعنوان روش جایگزین مطمئنی برای کشت، در جداسازی و شناسایی مایکوپلاسما اگالاکتیه قابل استفاده می باشد. مایکوپلاسما 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: مایکوپلاسما آگالاکتیه، آگالاکسی، کشت، PCR، گوسفند

مقدمه

مایکوپلاسما ها بر اساس قرار گیری در کلاس مولیکوتکس ها کوچکترین پروکاریوت فاقد دیواره سلولی و خود همانند ساز می باشند. اثبات شده که این باکتری حاوی دست های از ژن ها میباشد که فاز تغییر لیپوپروتیین 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 می باشد. 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

*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

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 4:17 +0430 on Sunday June 20th 2021

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).

مایکوپلاسما آگالاکتیه(Mycoplasma agalactiae) یکی از عوامل ایجاد این بیماری در گله های گوسفند و بز می باشد. سویه هایی مانند مایکوپلاسما مایکوئیدس ((Mycoplasma mycoides، مایکوپلاسماکاپریکولوم (Mycoplasma capricolum) و مایکوپلاسماپوتریفیسنس (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 مایکوپلاسما آگالاکتیه در نمونه های شیر گوسفند توسط واکنش PCR مدنظرقرار گرفت(۱۹).

آبتین و همکاران در سال ۲۰۱۲ توانستند برای اولین بار نسبت به جداسازی و شناسایی مایکوپلاسما 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 مایکوپلاسما آگالاکتیه را از گوسفندان و بز های شهرستان بافت در استان کرمان جداسازی کنند(۲).

در مطالعه دیگری مرادی بیدهندی و همکاران با استفاده از روش های فوق توانستند از گوسفندان و بز های استان کردستان مایکوپلاسما 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 مایکوپلاسما 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 انجام گردید. نمونه ها در محیط انتقالی که حاوی مواد مغذی و آنتی سپتیک(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 مایکوپلاسما 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 مایکوپلاسما آگالاکتیه تحت دو روش کشت و PCR، نمونه را چندین بار پیپتاژ 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 روزنه 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_2 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_2 دار منتقل و در دمای۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۷۲ ساعت انکوبه گردیدند. محیط های کشت PPLO Agar هر روز با میکروسکوپ نوری و با بزرگنمایی x۴۰ 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 استخراجDNA 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 شماره۱ داخل میکروتیوپ ۰/۲ میلی لیتر ریخته شد.۰/۱ حجم باقیمانده یعنی ۱/۸۱ میکرولیتراز DNAرا داخل

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 4:17 +0430 on Sunday June 20th 2021

ظرف اضافه کرده و با توجه به اینکه حجم باید به ۲۵ میکرولیتر برسد، باقیمانده را (۱۶/۲۹میکرولیتر) از H_2O پر کردیم. قابل توجه اینکه برای کنترل منفی چون DNA نداریم،۱۸/۱ میکرولیترH_2O اضافه شد.

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

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

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

جدول ۲- مراحل حرارتی آزمایش PCR در تشخیص گونه مایکوپلاسما

نام مرحله	درجه حرارت	مدت زمان	تعداد چرخه
واسرشت اولیه	95°c	5min	1
واسرشت ثانویه	94°c	1min	35
اتصال پرایمر ها	57°c	1min	
گسترش اولیه	72°c	1min	
گسترش ن هایی	72°c	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 نمونهٔ استاندارد باکتری مایکوپلاسما آگالاکتیه(NCTC ۱۰۱۲۳) استفاده گردید(شاهد مثبت باید فقط یک باند بدهد). دریک 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 نظرگرفته شد.

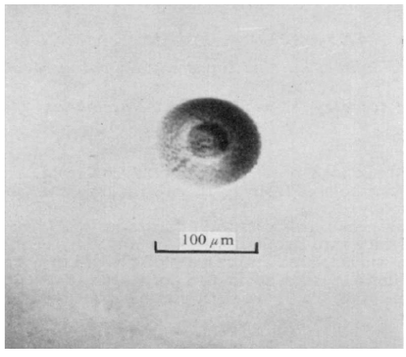
در این مطالعه از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد که با سایبر رنگ آمیزی شده بود، استفاده شد. پس از پایان مرحله الکتروفورز، بوسیله دستگاه پرتوتاب ماوراء بنفش (UV Transluminator) تصویر برداری صورت پذیرفته و محصول PCR در دمای ۴ درجهی سانتیگراد نگهداری شد (۱۸).

در این طرح برای انجام PCR از آغازگر هایی استفاده شد. پرایمر های شناسایی عمومی مایکوپلاسما ها شامل پرایمر MGSO-GPO با bp۲۷۰ نوکلئوتید بوده که قادر به شناسایی و تکثیر قطع های از ژن ۱۶S rRNA هستند(۱۳). پرایمر های شناسایی جنس مایکوپلاسما آگالاکتیه شامل پرایمر FS۱-FS۲ باbp ۳۷۵ نوکلئوتید بوده که توانایی آغاز تکثیر قطعه ای از ژن لیپوپروتئین را دارند(۱۹).

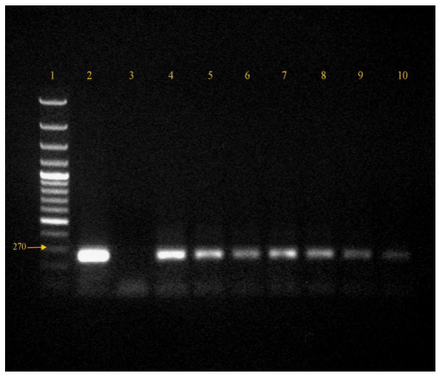
یافته ها

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 مشاهدهٔ پرگنه های تخم مرغی شکل بر روی محیط کشت آگار، کشت مثبت ارزیابی شدند(شکل شماره۱). 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 شناسائی 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.



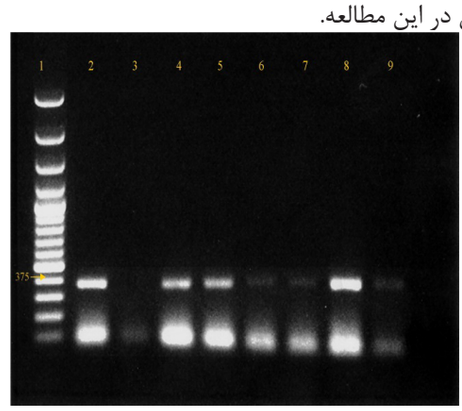
شکل۱-تصویر میکروسکوپی(x۴۰) پرگنه های مشاهده شده بر روی محیط PPLO Agar



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

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 4:17 +0430 on Sunday June 20th 2021

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



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

بحث

در این مطالعه جداسازی و شناسایی مایکوپلاسما 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 مایکوپلاسما آگالاکتیه در گله های گوسفند ماسال به تائید رسید، روش PCR نیز بعنوان روشی مناسب در تشخیص سریع بیماری اعلام شد(۵ و۶ و۹). 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.

مایکوپلاسما آگالاکتیه از جمله باکتری هایی است که به سختی از گله های آلوده جدا میشود و روش های معمول در تشخیص مایکوپلاسما ها عمدتاً بر پایهٔ 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 و۲۰). 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 مایکوپلاسما ها محسوب می شود، ولی دارای هزینه بالا بوده و زمانبر می باشد. روش کشت توانمندی ردیابی عفونت فعال مایکوپلاسما 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 مایکوپلاسما 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 مایکوپلاسما آگالاکتیه باشد زیرا رشد این باکتری همیشه سبب اسیدی شدن محیط نمیشود(۲۰).

McAuliffe و همکارانش در سال ۲۰۰۵ در تحقیقی جهت تشخیص عفونت مایکوپلاسمایی 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 از باکتری کشته شده، رابطه ای بین زنده بودن و فعال بودن عفونت با ردیابی DNA عامل عفونی وجود نداشته و صرفاً در صورت ردیابیRNA 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 مایکوپلاسما 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 مایکوپلاسما آگالاکتیه در نمونه های شیر گوسفند توسط کشت و واکنش PCR مدنظرقرار گرفت. محققین در این طرح به این نتیجه رسیدند که بهترین روش برای جداسازی مایکوپلاسما آگالاکتیه به صورت مستقیم از شیر گوسفند، روش PCR است. زیرا اولاً نتایج فقط پس از۵ 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 مایکوپلاسما کاهش یابد(۱۹).

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 4:17 +0430 on Sunday June 20th 2021

در تحقیق حاضر، ۳۶ درصد نمونه ها از لحاظ کشت مایکوپلاسما مثبت بوده و ۶۸ درصد نمونه ها در PCR تشخیص جنس مایکوپلاسما مثبت گزارش گردید، همچنین ۴ /۲۹ درصد نمونه های گرفته شده در PCR گونه ی مایکوپلاسما آگالاکتیه مثبت گزارش گردیدند. نتایج فوق در توافق نتایج محققین قبلی که تاکید کرده بودند که PCR جایگزین مناسبی برای کشت است، می باشد.

با توجه به اینکه عامل بیماری عمدتاً از چشم، پستان و مفصل جدا می شود(۱۶)، آزمایشات متعدد در نقاط مختلف دنیا نشان داد که محل ضایعه ای که بیشترین میزان جداسازی عامل بیماری را دارد متفاوت می باشد. بطوری که Belloy بیشترین عامل بیماری را از مفصل و کمترین را از چشم و Zendulkova برخلاف آن، بیشترین را از چشم و کمترین را از مفصل جدا کردند. Tola، آبتین و خیر خواه، بیشترین تعداد را از شیر و کمترین را از مفصل جدا کردند (۲ و ۴ و ۷ و ۱۹ و ۲۰).

در پژوهش‌ی که بیدهندی و همکاران در سال ۲۰۱۱ انجام دادند، بهترین محل نمونهگیری برای جداسازی عامل بیماری را به ترتیب ترشحات پستان و مایعات مفصلی عنوان کردند و به هیچ عنوان سوآپ چشمی برای جداسازی مایکوپلاسما آگالاکتیه مناسب نبود. نتایج حاصل از این تحقیق نشان می دهد که پستان می تواند محل مناسبی برای نمونه گیری، جداسازی و شناسایی مایکوپلاسما آگالاکتیه باشد و می تواند موافق با نتایج و ادعا های آبتین و خیرخواه و Tola باشد.

همچنین در این مطالعه تعداد ۹ عدد از نمونه ها PCR مثبت ولی از نظر کشت منفی گزارش شدند. محققان در توضیح یافته های خود بیان نمودند که تفاوت در میان پاسخ های حاصله از روش کشت و PCR می تواند به دلیل وجود سلول های مایکوپلاسمای مرده و یا مایکوپلاسمای غیر قابل کشت باشد(۱۴).

نتایج در کشور هایی که سیستم پرورش متمرکز گوسفند و بز دارند، نشان داد که مایکوپلاسما آگالاکتیه عامل اصلی آگالاکسی است(۱۱) اما در گوسفندان منطقهٔ مورد مطالعه، این آمار متفاوت است. بدین صورت که عامل اصلی بیماری آگالاکسی در گوسفندان منطقه ماسال گونه آگالاکتیه نبوده (تن ها ۲۹/۴در صد) و اغلب جدایه های بیماریزا را سایر گونه های مایکوپلاسمایی تشکیل می دهند که با یافته های حاصل از نمونه های کرمان و قم مطابقت دارد(۲ و ۴).

گرچه این مطالعه نشان داد که مایکوپلاسما آگالاکتیه در ایجاد بیماری آگالاکسی در گوسفندان استان گیلان موثر است، اما پیشن هاد می شود تا این مطالعه در سطح وسیع تری انجام شده و موارد جنس مثبت عفونت مایکوپلاسمایی اما گونه منفی از نظر آگالاکتیه، بررسی و سایر گونه های دخیل در ایجاد بیماری آگالاکسی تعیین گردند.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج حاصله، PCRدر مقایسه با روش کشت، سریعتر، با هزینه کمتر و حساسیت بیشتر بوده و همچنین نتایج این مطالعه نشان می دهد که مایکوپلاسما آگالاکتیه یکی از مهمترین عوامل مولد بیماری آگالاکسی محسوب می شود.

تقدیر و تشکر

مطالب حاضر، حاصل تلاش دوستانم در آزمایشگاه مرجع مایکوپلاسما موسسه تحقیقات واکسن و سرمسازی رازی می باشد. بدین وسیله از ایشان تقدیر به عمل می آورم.

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 4:17 +0430 on Sunday June 20th 2021

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 مایکوپلاسما 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 مایکوپلاسما آگالاکتیه و دیگر عوامل مسبب بیماری آگالاکسی در گوسفند و بز بوسیلهٔPCR و کشت در ایران. مؤسسهی واکسن و سرم سازی رازی.۱۳۸۵؛ سال سوم(شماره دوم): ۱۲-۱۰.

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 Macdonia. 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, Sancoff 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 ampilification. 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 ؛.