جدا سازی و شناسایی مایکوپلاسماهای عامل بیماری آگالاکسی مسری در گوسفند و بز استان اردبیل با استفاده از روش کشت و PCR

حاجی زاده، ا. *[۱]، موذنی جولا، غ.ر. [۲]، اخلاقی، ف. [۱] ، ناصری راد، ع.ا.[۲] ، معترض، ب. [۳] ، سلیمانی، س.[۱]، اسدپور، م. [۱]، سخاوتی، م. [۲]، احمدی نیا، ر. [۱]، اسحاقی، ع.[۱].

دریافت: ۱۳۹۱/۰۴/۰۵ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۰/۰۷

خلاصه

سندرم آگالاکسی مسری، یک بیماری عفونی با علایم متعدد است که نشخوارکنندگان کوچک را درگیر می نماید. به طور عمده ۴ گونه *مایکوپلاسما آگالاکتیه*، *مایکوپلاسما مایکوئیدس* تحت گونه کاپری، *مایکوپلاسما کاپریکولوم* تحت گونه *کاپریکولوم و مایکوپلاسما پوتریفسینس* جزو عوامل مسبب این سندرم محسوب می شوند.

به دلیل وجودکانون های متعدد مشکوک به سندرم آگالاکسی مسری در استان اردبیل و لزوم شناسایی عوامل بیماری زا، مطالعه ای به منظور جداسازی و شناسایی عوامل مذکور با استفاده از روش کشت و PCR انجام گرفت. جهت افزایش شانس دستیابی به نمونه های مثبت حاوی عوامل بیماری زا ، فقط از دام های مشکوک به بیماری نمونه گیری به عمل آمد. از ۱۵۱ نمونه اخذ شده ، ابتدا فیلتراسیون و سپس در محیط های اختصاصی کشت داده شدند. پس از رشد کلنی ها، عمل جداسازی و تخلیص DNA توسط کیت انجام و در نهایت برای شناسایی و تعیین هویت مایکوپلاسماهای دخیل در بیماری، آزمایش های DGGE و PCR انجام پذیرفت. در نتیجه ۳۳ نمونه پس از کشت رشد نمودند (۲۱/۸۵٪ کل نمونه ها). از این تعداد ۱۸ نمونه مخلوط و ۱۵ نمونه یکدست بودند. از این رو در مجموع ۵۳ جدایه به شرح زیر جداسازی و شناسایی شد: ۲۵ جدایه (۴۷/۲ ٪ کل جدایه ها) *مایکوپلاسما آگالاکتیه*، ۲۳ جدایه (۴۳/۴ ٪ کل جدایه ها) *مایکوپلاسما پوترفسینس*، ۴ جدایه (۷/۵ ٪ کل جدایه ها) *مایکوپلاسما کاپریکولوم* تحت گونه کاپریکولوم، ۱ جدایه (۱/۹ ٪ کل جدایه ها) *مایکوپلاسما مایکوئیدس* تحت *گونه کاپری*. این نتایج موید وجود عوامل بیماریزای دیگری غیر از *مایکوپلاسما آگالاکتیه* در بروز سندرم آگالاکسی مسری در استان اردبیل است.

واژه‌های کلیدی: *مایکوپلاسما*، آگالاکسی مسری، اردبیل، DGGE , PCR

---

۱. مدیریت کنترل کیفی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، حصارک، کرج، ایران.

۲. بخش تحقیق و تولید واکسن های هوازی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، حصارک، کرج، ایران.

۳. اداره کل دامپزشکی استان اردبیل، اردبیل ، ایران.

*نویسنده مسؤول: **A.HAJIZADEH@rvsri.ac.ir**

مقدمه

سندرم آگالاکسی مسری، یک بیماری عفونی واگیر در گوسفند و بز است که حدود ۲۰۰ سال پیش شناسایی شد. به نظر می رسد که از نظر ابتلا به بیماری بزها نسبت به گوسفندان حساس تر بوده و علایم در آن ها حادتر است. عامل بیماریزای این بیماری در اکثر نقاط جهان جداسازی و مورد شناسایی قرار گرفته است ولی در کشورهایی که پرورش دام کوچک در آن ها پر رونق است، مثل منطقه مدیترانه، بالکان، غرب آسیا و خاورمیانه، شمال ، مرکز و شرق آفریقا، از اهمیت بیشتری برخوردار است (Azevedo و همکاران، ۲۰۰۶، Razin و همکاران ۱۹۹۸). بیماری به صورت فوق حاد، حاد، مزمن و بدون علایم عارض می گردد. عامل این بیماری از طریق بلع غذای آلوده، تنفس گرد و غبار آلوده و یا به صورت مستقیم از طریق نوک پستان وارد بدن دام شده و پس از دوره کمون ۱– ۸ هفته ای و ایجاد سپتی سمی در اندام های مختلف از جمله پستان، چشم و مفاصل، لوکالیزه می شود. علایم بیماری با تب و بی اشتهایی شروع شده و به دلیل فیبروزه شدن غدد پستان شیردهی به مرور قطع می شود. سپس چشم ها و مفاصل درگیر می شوند که کراتیت و لنگش (۵– ۱۰ درصد مبتلایان) جزو عوارض آن است (طباطبایی و فیروزی ۱۳۸۰، Zendulkova و همکاران، ۲۰۰۷). هر چند درصد ابتلای به این بیماری ۳۰– ۶۰ درصد بوده و مرگ و میر ناشی از آن در دام های بالغ بالا نیست (کمتر از۲۰ درصد)، با این حال بروز بیماری حاد در میش های آبستن می تواند به مرگ نتاج بیانجامد (۴۰–۷۰ درصد). این بیماری بر اثر قطع تولید شیر، سقط جنین در میش های آبستن و هزینه های درمان، خسارت اقتصادی فراوانی تحمیل می نماید به طوری که تنها خسارت ناشی از کاهش شیر در منطقه خاور میانه سالانه در حدود ۳۰ میلیون دلار است (Tola و همکاران، ۱۹۹۷ ؛ Madanat و همکاران ، ۲۰۰۱). در بروز این بیماری به طور عمده ۴ گونه مختلف *مایکوپلاسما* به صورت گروهی و یا به تنهایی دخالت دارند که عبارتند از: *مایکوپلاسما آگالاکتیه* (Ma) [1] ، *مایکوپلاسما مایکوئیدس کاپری* (Mmc or MmmLC) [2] (Leach و همکاران، ۱۹۸۹)، *مایکوپلاسما پوترفسینس*(Mp) [3] و *مایکوپلاسما کاپریکولوم کاپریکولوم* (Mcc)[4] که علاوه بر ایجاد علایم مذکور، می توانند باعث بروز پنومونی ، وولوواژینایتیس گرانولار، بالانوپوستیت، متریت سیستیک نزله ای، سالپنژیت و دژنراسیون بیضه ها در دام های مبتلا گردند، (Peyraud و همکاران، ۲۰۰۳ ؛ OIE ، ۲۰۰۸ ؛ Viley و همکاران ،۲۰۰۶؛ Shahram و همکاران، ۲۰۰۹). به علت قرابت فیلوژنیک بین گوسفند و بز، اکثر گونه های مایکوپلاسما به جز چند استثنا، در بین آن ها مشترک است.

با این حال گونه های متعلق به خوشه مایکوئیدس عمدتا از بزها، جداسازی و شناسایی شده اند (Solsona ، ۱۹۹۶). وجود بیش از ۷۹ میلیون گوسفند و بز (۵۴ میلیون راس گوسفند، ۲۵ میلیون راس بز) با ارزشی در حدود ۱۵۸ تریلیارد ریال ، ضرورت توجه بیشتر به شناسایی دقیق عوامل مسبب و مراقبت از بروز آن را در بین دام های کشور دوچندان می نماید. بیماری آگالاکسی در اکثر مناطق ایران گزارش و تشخیص داده شده و خسارت اقتصادی حاصل از شیوع آن در سطح گله های موجود در کشور بسیار بالاست.

محققینی که مطالعات مشابهی در کشور انجام داده اند به طور عمده موفق به جداسازی و شناسایی *مایکوپلاسما آگالاکتیه* شده و تنها در یک گزارش به شناسایی *مایکوپلاسما مایکوئیدس* اشاره شده است (اعرابی و ستوده نیا، ۱۳۶۳). با توجه به این که در غالب موارد گوسفند و بز باهم نگهداری و پرورش داده می شوند، احتمال وجود سایر گونه های مایکوپلاسما به غیر از آگالاکتیه دور از ذهن نیست به طوری که در برخی از موارد علی رغم انجام واکسیناسیون (واکسن کشته حاوی گونه *مایکوپلاسما آگالاکتیه*) مواردی از بروز بیماری گزارش گردیده است.

مطالعه حاضر در جهت پاسخگویی به این فرضیه که آیا عوامل دیگری غیر از *مایکوپلاسما آگالاکتیه* در بروز سندرم آگالاکسی مسری در کشور دخالت دارند طراحی و به دلایل زیر در استان اردبیل اجرا گردید:

۱. داشتن جمعیت بالای گوسفند و بز (۲/۵ میلیون راس)
۲. وجود عشایر و کوچ رو بودن دام ها
۳. مرزی بودن استان و تبادلات دام
۴. آمار بالای ابتلای دام ها به بیماری

مواد و روش ها

نمونه برداری

پس از معاینه موارد مشکوک به بیماری و مشاهده علایم (ورم پستان– کراتوکونژنکتیویت– ورم مفاصل– علایم تنفسی)، تعداد ۱۵۱ نمونه مرضی از بزها و گوسفندان ۶ شهرستان مختلف استان اردبیل شامل: شیر(۹۰ مورد)، مایع اشک (۳۰ مورد) ، مایع مفصلی (۱۲ نمونه) و سرم خون (۱۹ مورد) به روش آسپتیک جمع آوری و با انتقال به داخل محیط نگهدارنده بلافاصله در شرایط زنجیره سرد به موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی ارسال گردید. برای نگهداری و حمل نمونه های جمع آوری شده، از ظروف شیشه ای استریل درپوش دار استفاده شد.

1. *Mycoplasma agalactiae (Ma)*
2. *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* (Mmc) or *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC (MmmLC)
3. *Mycoplasma putrefaciens (Mp)*
4. *Mycoplasma capricolum* subsp. *Capricolum* (Mcc)

کشت

نمونه ها ابتدا بر روی محیط PPLO براث و سپس محیط PPLO آگار کشت داده شده و هر کدام به مدت ۳- ۲۱ روز در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. از روز سوم محیط های کشت مایع از نظر کدورت و محیط های کشت جامد از نظر تشکیل کلنی مورد بررسی قرار گرفتند (Razin و همکاران، ۱۹۸۳). برای جلوگیری از آلودگی، کارهای مربوط به کشت در زیر کابینت لامینار فلو (Beasat FLR2448) BSC II انجام گردید.

آزمایش PCR و DGGE

گونه های استاندارد زیر از آزمایشگاه VLA انگلستان تهیه و مورد استفاده قرار گرفت:

1. *Mycoplasma agalactiae* NCTC 10123
2. *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides* LC type NCTC 10137
3. *Mycoplasma capricolum subsp. capricolum* NCTC 10154
4. *Mycoplasma putrefaciens* NCTC 10155

کیت تجاری DNPTM جهت تخلیص DNA و کیت تجاری PCR Master Kit از شرکت سیناژن تهیه و مورد استفاده قرار گرفت. پرایمرهای اختصاصی از شرکت Eurofins تهیه و مورد استفاده قرار گرفت.

استخراج DNA به وسیله کیت و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. پس از حصول DNA ، با استفاده از دستگاه نانودراپ غلظت DNA استخراج شده از هر نمونه تعیین گردید. تکثیر قطعه DNA و شناسایی نمونه های مثبت از نظر رشد مایکوپلاسما به وسیله کیت و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت.

ابتدا آزمایش DGGE[1] مطابق دستورالعمل (McAuliffe و همکاران، ۲۰۰۵؛ Nicholas و همکاران، ۲۰۰۸) انجام پذیرفت. سپس آزمایش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی به ترتیب بر روی جنس مایکوپلاسما، خوشه مایکوئیدس و سپس گونه های مختلف انجام گرفت (Bashiruddin و همکاران، ۱۹۹۴؛ Grand و همکاران، ۲۰۰۴) (جدول های ۱ و ۲).

1.Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

نتایج

پس از کشت ۱۵۱ نمونه اخذ شده ،تعداد ۳۳ نمونه (۲۱/۸۵٪) رشد نمودند که کلنی های حاصل از نظر شکل ظاهری در مشاهده میکروسکوپی دارای مشخصات *مایکوپلاسما* (Fried egg) بودند. بلافاصله آزمایش PCR با پرایمر اختصاصی برای تشخیص جنس *مایکوپلاسما* در نمونه های مثبت انجام گرفت که همگی مورد تایید قرار گرفتند (تصویر۱). پس از انجام آزمایش DGGE، مشخص گردید ۱۸ مورد از ۳۳ نمونه رشد کرده مخلوط (Mix) می باشند (وجود همزمان چند گونه در یک نمونه)(تصویر ۲). به منظور تعیین هویت و تایید جدایه ها، آزمایش PCR با پرایمر های اختصاصی انجام گرفت که در نهایت نتایج زیر حاصل شد (جدول های ۳ و ۴ و تصویر های ۳ الی ۶).

بحث

سندرم آگالاکسی یک بیماری مسری است که نشخوارکنندگان کوچک را درگیر نموده و همه ساله خسارات فراوانی بر دامداران تحمیل می نماید. با توجه به پرورش گوسفند و بز در سرتاسر کشور ، مطالعات مختلفی به منظور شناسایی توزیع جغرافیایی بیماری و جداسازی و شناسایی عوامل دخیل در آن به عمل آمده است از جمله: در مطالعه ای ۴۹۰ نمونه شیر از نواحی مختلف کشور جمع آوری و بررسی گردید که ۹۶ نمونه از نظر آزمایشات بیوشیمیایی حاوی مایکوپلاسما بودند و از میان آنها نیز ۲۳ نمونه از نظر سرولوژیکی، *مایکوپلاسما آگالاکتیه* تشخیص داده شدند. (اعرابی و ستوده نیا، ۱۳۶۵). در همین راستا ستوده نیا و همکاران (۱۳۶۷) در مطالعه ای ضمن اثبات این که گونه به کار رفته در واکسن ساخت موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، قادر به ایجاد ایمنی در دام های واکسینه می باشد، بر انجام واکسیناسیون سراسری علیه بیماری مذکور تاکید نمودند.

همانطور که ذکر گردید، ۴ گونه *مایکوپلاسما آگالاکتیه* ، *مایکوپلاسما مایکوئیدس* تحت گونه *کاپری*، *مایکوپلاسما کاپریکولوم* تحت گونه *کاپریکولوم* و *مایکوپلاسما پوتریفسینس* در بروز سندرم آگالاکسی مسری دخیل هستند. هر چند در مطالعه ای توسط ستوده نیا و اعرابی (۱۳۶۳) بر اساس تخمیر کربوهیدرات های مختلف به خصوص گلوکز، از شیر بز و گوسفند علاوه بر *مایکوپلاسما آگالاکتیه* ، *مایکوپلاسما مایکوئیدس* جداسازی و گزارش گردید ولی به دلیل محدودیت تشخیص توسط روش های مرسوم (روش های سرولوژیک، الایزا و بیوشیمیایی)، گزارش مستدل و ثابت شده ای در خصوص جداسازی و شناسایی مجدد این گونه از کشور ارایه نشده است.

ژن	سایز bp	هدف شناسایی	توالی	نام پرایمر	مرجع
23S rRNA	۱۱۰-۱۰۲	جنس مایکوپلاسما	CTA AGG TDA GCG AGW DAA CTA TAG* CCC CYC WTS YTT YAC TGM GGC	Myc23F1729 Myc23R1837	Hotzel
Cap-21	۲۶۵-۲۵۳	خوشه مایکویدس	TAT ATG GAG TAA AAA GAC AAT GCA TCA TAA ATA ATT G	P1 P2	Hotzel
؟	۳۷۵	Ma	AAA GGT GCT TGA GAA ATG GC GTT GCA GAA GAA AGT CCA ATC A	FS1 FS2	Moradi
ArcB	۳۱۶	Mp	AAA TTG TTG AAA AAT TAG CGC GAC CAT ATC ATC AAC TAG ATT AAT AGT AGC ACC	Mput1 Mput 2	Peyraud
lppA	۱۰۴۹	MmmLC	CAA TCC AGA TCA TAA AAA ACC T CTC CTC ATA TTC CCC TAG AA	MMMLC2-L MMMLC1-R	Hotzel
lppA	۱۳۵۶	Mcc	AGA CCC AAA TAA GCC ATC C A CTT TCA CCG CTT GTT GAA TG	MCCPL1-L MCCPL1-R	Hotzel

*Degenerate nucleotides: D= A,G,T W= A,T Y= C,T S= G,C M= A,C

جدول-۱ پرایمرهای اختصاصی مورد استفاده در این مطالعه

ردیف	نوع عملیات	Mmc	Ma	Mcc	Mp
۱	Lid Temp.	۱۱۰° C	۱۱۰ ° C	۱۱۰ ° C	۱۱۰° C
۲	Initial denaturing	۹۴° C	۹۵° C	۹۴° C	۹۴° C
	Time(Sec.)	۳۰۰	۳۰۰	۱۲۰	۳۰۰
۳	Denaturing	۹۴° C	۹۴° C	۹۴° C	۹۴° C
	Time(Sec.)	۳۰	۶۰	۳۰	۳۰
۴	Anealing	۴۹° C	۵۵° C	۴۸° C	۶۴° C
	Time(Sec.)	۳۰	۶۰	۱۵	۳۰
۵	Extention	۷۲° C	۶۵° C	۷۲° C	۷۲° C
	Time(Sec.)	۶۰	۶۰	۱۵	۳۰
۶	Cycles	۳۵	۳۵	۳۳	۲۵
۷	Final step	۷۲° C	۶۷° C	۷۲° C	۷۲° C
	Time(Sec.)	۶۰۰	۶۰۰	۶۰۰	۴۲۰
۸	bp	۱۰۴۹	۳۷۵	۱۳۵۶	۳۶۰

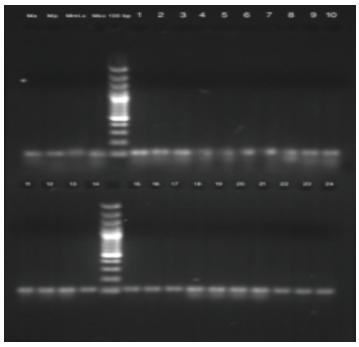
جدول۲. برنامه دما- زمان مورد استفاده برای انجام آزمایش PCR اختصاصی هر یک از گونه ها

گونه دام	ناحیه نمونه گیری	تعداد کل نمونه اخذ شده	نتایج حاصل از کشت در PPLO براث و آگار		نتایج حاصل از آزمایش PCR بر روی نمونه های کشت مثبت (جنس)	
			مثبت	منفی	مثبت	منفی
گوسفند	شیر	۷۴	۲۳	۵۱	۲۳	۰
	مایع مفصلی	۱۲	۱	۱۱	۱	۰
	مایع اشکی	۳۰	۲	۲۸	۲	۰
	سرم خون	۱۹	۰	۱۹	–	–
تعداد کل		۱۳۵	۲۶	۱۰۹	۲۶	۰
گونه دام	ناحیه نمونه گیری	تعداد کل نمونه اخذ شده	تایج حاصل از کشت در PPLO براث و آگار		نتایج حاصل از آزمایش PCR بر روی نمونه های کشت مثبت (جنس)	
			مثبت	منفی	مثبت	منفی
بز	شیر	۱۶	۷	۹	۷	۰
	مایع مفصلی	–	–	–	–	–
	مایع اشکی	–	–	–	–	–
	سرم خون	–	–	–	–	–
تعداد کل		۱۶	۷	۹	۷	۰

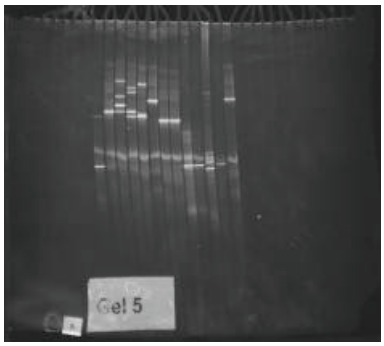
جدول ۳. آمار نمونه های اخذ شده و نتایج حاصل از کشت و PCR

جنس و گونه جدایه ها	گوسفند	بز	کل جدایه	درصد
Mycoplasma agalactiae	۲۱	۴	۲۵	٪۴۷/۲
Mycoplasma purefaciens	۱۸	۵	۲۳	٪۴۳/۴
Mycoplasma capricolum subsp. Capricolum	۰	۴	۴	٪۷/۵
Mycoplasma mycoides subsp. capri	۰	۱	۱	٪۱/۹

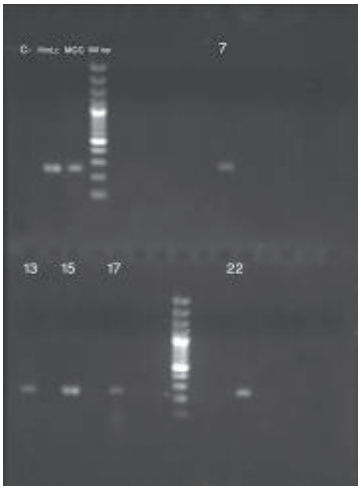
جدول ۴. نتایج حاصل از آزمایش PCR با پرایمر اختصاصی



تصویر ۱. نتایج حاصل از آزمایش PCR با پرایمر اختصاصی برای تشخیص جنس مایکوپلاسما (۳۳ نمونه مثبت در سایز ۱۰۲-۱۱۰ bp)

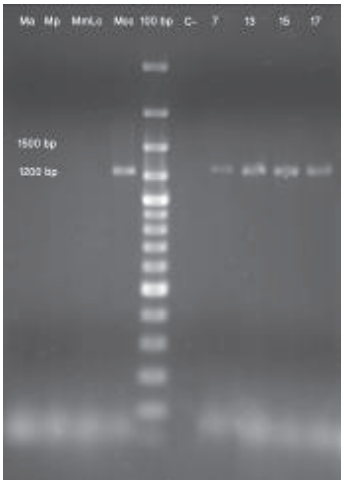


تصویر ۲. مخلوط بودن نمونه ها
(نتایج حاصل از روش DGGE)

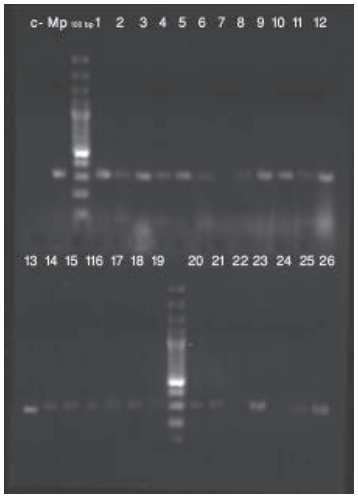


تصویر ۳. نتایج حاصل از آزمایش PCR با پرایمر اختصاصی برای تشخیص خوشه مایکوئیدس
(۵ نمونه مثبت در سایز ۲۵۳ -۲۶۵ bp)

تصویر ۴. نتایج حاصل از PCR با پرایمر اختصاصی برای شناسایی مایکوپلاسما آگالاکتیه
(۲۵ مورد مثبت در سایز ۳۷۵ bp)



تصویر ۵. نتایج حاصل از PCR با پرایمر اختصاصی برای شناسایی مایکوپلاسما کاپریکولوم
(۴ نمونه مثبت در سایز ۱۳۵۶ bp)



تصویر ۶. نتایج حاصل از PCR با پرایمر اختصاصی برای شناسایی مایکوپلاسما پوترفسینس
(۲۳ نمونه مثبت در سایز ۳۱۶ bp)

در سال های اخیر به دلیل حساسیت بالا، اختصاصی بودن روش، سرعت تشخیص و سهولت قرائت و تفسیر، محققین بیشتر به سمت مطالعات مولکولی به خصوص استفاده از روش PCR گرایش پیدا کرده اند از جمله: Tola و همکاران (۱۹۹۶و ۱۹۹۷) نسبت به جداسازی و شناسائی *مایکوپلاسما آگالاکتیه* به روش PCR بر روی نمونه های شیر گوسفندان مبتلا به تورم پستان در ۴ منطقه ایتالیا اقدام نمودند و نتیجه گیری کردند که این روش یک روش سریع و اختصاصی برای جستجو و جدا سازی *مایکوپلاسما آگالاکتیه* است. Zendulkova و همکاران (۲۰۰۶) از گوسفندان و بز های مبتلا به آگالاکسی در اردن نمونه برداری کرده و بر روی آنها آزمایش PCR را انجام دادند و در نهایت توانستند *مایکوپلاسما آگالاکتیه* را از نمونه ها جدا سازی نمایند. Al–Momani و همکاران (۲۰۰۳) از گوسفندان و بز های مبتلا به آگالاکسی در اردن نمونه برداری کرده و بر روی آنها آزمایش PCR انجام داده و در نهایت توانستند گونه های مختلف عامل بیماری آگالاکسی را از نمونه ها جدا سازی نمایند. در ایران نیز برای جداسازی و شناسایی عوامل مایکوپلاسمایی سندرم آگالاکسی مسری با استفاده از روش PCR تلاش فراوانی به عمل آمده است. از جمله: Pirali وEbrahimi (۲۰۰۷) از مایع اشک و شیر ۲۶ گله (۱۰۱ گوسفند و بز) نمونه برداری و به روش PCR آن ها را آزمایش کردند که در نتیجه ۲۰٪ دام ها آلوده به *مایکوپلاسما آگالاکتیه* تشخیص داده شدند. Moradi و همکاران (۱۳۸۹) با استفاده از روش کشت و PCR ، از ۳۶۷ نمونه شیر جمع آوری شده از استان کردستان موفق به جداسازی ۱۲ مورد مایکوپلاسما و شناسایی ۵ مورد *مایکوپلاسما آگالاکتیه* گردیدند. خیرخواه و همکاران (۱۳۹۰) با استفاده از روش کشت و PCR از ۱۷ نمونه اخذ شده موفق به جداسازی ۸ مورد مایکوپلاسما و شناسایی ۱ نمونه *مایکوپلاسما آگالاکتیه* از گوسفندان مبتلا در شهرستان بافت شدند. با در نظر گرفتن نتایج به دست آمده توسط سایر محققینی که مطالعات مشابه انجام داده بودند و استفاده از تجارب و توصیه های ایشان، در این مطالعه سعی گردید صرفا دام های مشکوک به بیماری انتخاب و بسته به عضو درگیر (پستان– چشم– مفصل– سیستمیک) نمونه لازم به صورت آسپتیک جمع آوری شود. از طرفی برای حفظ و زنده نگهداشتن عوامل بیماری زا (جهت انجام مراحل بعدی تحقیق) از محیط نگهدارنده در داخل ظروف استریل استفاده شد (Razin و همکاران، ۱۹۸۳). در این مطالعه علیرغم بطئی (حداقل ۵ – ۱۰ روز) و غیر اختصاصی بودن روش کشت برای تفریق مایکوپلاسماها ولی با توجه به نیاز به دستیابی به نمونه های زنده و امکان تکثیر و تخلیص جدایه ها، پیش از انجام PCR از روش کشت استفاده گردید. با این حال بیش از نیمی از نمونه ها از نظر کشت و رشد مایکوپلاسما منفی شدند. از جمله دلایل احتمالی عدم رشد آن ها می توان به موارد زیر اشاره کرد:

الف) عدم رعایت شرایط مناسب اخذ، نگهداری و ارسال نمونه از سوی همکاران و از بین رفتن عامل بیماری زا

ب) عدم وجود مایکوپلاسما در نمونه اخذ شده علی رغم وجود علایم بالینی مشابه با آگالاکسی که می تواند ناشی از درگیری با عوامل بیماری زای دیگر باشد (اشتباه در تشخیص بیماری).

ج) استفاده از آنتی بیوتیک و یا کورتون از سوی دامداران، پیش از اطلاع و مراجعه همکاران برای اخذ نمونه

د) عدم تشخیص رشد مایکوپلاسما در محیط کشت به دلیل کمی میزان جرم

ه) کهنه شدن محیط نگهداری و انتقال به دلیل نگهداری طولانی مدت تا اخذ نمونه

و) کند و سخت رشد بودن مایکوپلاسماها

از طرفی با توجه به امکان وجود نمونه های مخلوط در بین نمونه های جمع آوری شده، پیش از انجام آزمایش PCR از روش DGGE استفاده گردید.در مطالعات اپیدمیولوژیک در سطح گله، هر چند روش ELISA روشی مقرون به صرفه و روش تشخیصی جایگزین نسبتا سریعی است اما صحت (Specifity) و دقت (Sensitivity) نتایج آن در مقایسه با PCR کمتر است. از طرفی الایزاهای شناساگر آنتی بادی، تنها پس از افزایش تیتر آنتی بادی بعد از ۲ هفته از ابتلای به بیماری، قادر به تشخیص بوده و حتی از شناسایی دام های مبتلا به فرم مزمن بیماری نیز عاجزند (McAuliffe و همکاران، ۲۰۰۳). از این رو به منظور تایید نتایج حاصل از روش DGGE و نیز شناسایی جدایه ها با استفاده از پرایمر اختصاصی جنس و گونه، از روش PCR استفاده شد (Awan و همکاران، ۲۰۰۹؛ Taylorو همکاران، ۱۹۹۲). با توجه به وجود بز و گوسفند در سرتاسر کشور که عمدتا در کنار هم نگهداری و پرورش داده می شوند، شناسایی گونه های مختلف مایکوپلاسمای عامل سندرم آگالاکسی مسری در کشورهای همجوار (Shahzad ، ۲۰۱۰ ؛ Madanat و همکاران ، ۲۰۰۱)، قاچاق دام و تبادل دام در مرزهای کشور و مواردی از این دست، وجود گونه های مایکوپلاسما غیر از آگالاکتیه در کشور حتمی است. با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه که به جداسازی و شناسایی ۴ گونه منجر گردید، وجود تنوع گونه ای در بین عوامل دخیل در ایجاد سندرم آگالاکسی در کشور ثابت گردید. از این رو پیشنهاد می شود سیاست های پیشگیری و مراقبت مرتبط با این بیماری در کشور مورد تجدید نظر قرار گرفته و بیش از پیش مورد توجه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

بی شک اجرای این پروژه بدون همکاری و مساعدت همکاران محترم در اداره کل مبارزه، بررسی و مراقبت بیماری های سازمان دامپزشکی کشور، اداره کل دامپزشکی استان اردبیل، مدیریت روابط علمی و بین الملل، بخش تحقیق و تولید واکسن های هوازی دام، بخش تحقیق و تشخیص بیماری های باکتریایی دام، اداره خریدهای خارجی، مدیریت کنترل کیفی و به خصوص آزمایشگاه VLA انگلستان امکان پذیر نبود. از این رو بر خود لازم می دانیم از کلیه عزیزانی که ما را در انجام موفق این پروژه یاری نموده و در مراحل مختلف از هر گونه راهنمایی و مساعدت دریغ ننمودند تشکر و قدردانی نماییم از جمله:

جناب آقای دکتر عبدالمحمد طالب شوشتری
جناب آقای دکتر محسن لطفی
جناب آقای دکتر محسن مشکوه
جناب آقای دکتر صمد یگانه
جناب آقای دکتر پژواک خاکی
جناب آقای دکتر ابوالفضل خفری
Dr. Gosney Faye

جناب آقای دکتر حبیب الله پایکاری
جناب آقای دکتر سعید عطایی
جناب آقای دکتر سبحانی
جناب آقای دکتر کیوان تدین
سرکار خانم دکتر سهیلا مرادی
جناب آقای دکتر مراد مرادی
Dr. Roger Ayling

Journal of Veterinary Laboratory Research 4 (2012) 271-281

Isolation and identification of Mycoplasmas causing contagious Agalactia syndrome in sheep & goats by using culture method and PCR in Ardebil province

Hajizadeh, A.*[1], Moazeni, J.G.[2], Akhlagi, F.[1], Naserirad, A.[2], Motarez, B.[3], Soleimani S.[1], Asadpour, M.[1], Sekhavati, M.[2], Ahmadinia, R.[1], Eshagi, A.[1].

Received: 25.06.2012 Accepted: 27.12.2012

Abstract

Contagious Agalactia (CA) syndrome is an infectious disease with a set of symptoms in small ruminants. In general, 4 strains are considered as it's causative agents including *Mycoplasma agalactiae*, *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* Large colony type or *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*, *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum*, *Mycoplasma putrefaciens*

Existence of multiple foci suspected of CA disease in Ardebil province and necessity for finding out their causative agents, made us to isolate and identify the probable agents by using culture method and PCR. Samples were collected only from suspected animals to increase the chance of obtaining the positive samples, and then cultured in PPLO broth and agar after filtration. DNA purification was done by using kit. Identification of the isolates was carried out by DGGE and PCR. Among the 151collected samples only 33 samples grew, 18 of them were mixed. Finally the following results were obtained:

25 isolates were *Mycoplasma agalactiae* (47.2% of all isolates)

23 isolates were *Mycoplasma putrefaciens* (43.4% of all isolates)

4 isolates were *Mycoplasma capricolum capricolum* (7.5% of all isolates)

1 isolates was *Mycoplasma mycoides capri* (1.9% of all isolates)

These results revealed that Mycoplasmas other than *Mycoplasma agalactiae* are exist among infected small animals in Ardebil province.

Keywords: Mycoplasma, Agalactia, Ardebil, PCR, DGGE.

1. Quality control management, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Hesarak, Karaj, Iran.

2. Aerobic Vaccine Production and Research Department, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Hesarak, Karaj, Iran.

3. Veterinary General Directorate Office, Ardebil, Iran.

*Corresponding author: **A.HAJIZADEH@rvsri.ac.ir**

منابع

اعرابی، ع؛ ستوده نیا، ا. ۱۳۶۳. جداسازی و انجام آزمایش تخمیرکربوهیدرات در خصوص *مایکوپلاسما آگالاکتیه* و *مایکوپلاسما مایکوئیدس* تحت گونه های *مایکوئیدس*. مجله آرشیو رازی، ۳۴- ۳۵ ، ۶۷-۷۰.

اعرابی، ع؛ ستوده نیا، ا. ۱۳۶۵. بیماری آگالاکسی و توزیع جغرافیائی آن در گوسفندان و بزهای ایران . مجله آرشیو رازی ، ۳۶-۳۷ ، ۷۵-۷۸

خیرخواه، ب.؛ پوربخش، ع.؛ اشتری، ع. ۱۳۹۰ . جداسازی *مایکوپلاسما آگالاکتیه* با دو روش کشت و واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) در گوسفندان مبتلا به بیماری آگالاکسی واگیر در شهرستان بافت . مجله بیوپاتولوژی مقایسه ای ایران ، **۸ (۱)**، ۴۲۳-۴۳۰.

ستوده نیا، ا.؛ اعرابی، ع. ؛ ناصری، ع. ۱۳۶۷. واکنش متقاطع مابین دو سویه آگالاکتیه لرستان و AIK۲ در سرم گوسفندان واکسینه با واکسن زنده. مجله آرشیو رازی ، ۳۸- ۳۹ ، ۷۳-۷۶

طباطبایی، ع.؛ فیروزی، ر. ۱۳۸۰. بیماریهای باکتریایی دام، چاپ اول، انتشارات دانشگاه تهران

Al-Momani, W., Halablab, M.A., Abo-Shehada, M.N., Miles, K., McAuliffe, L., Nicholas, R.A.J. 2006. Isolation and molecular identification of small ruminant mycoplasmas in Jordan. Small Ruminant Research, **65**, 106-112.

Awan, M.A., Abbas, F., Yasinzai, M., Nicholas, R. A.J., Ayling, R.D., Attique, M.A., Ahmed, Z. 2009. Prevalence of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* and *Mycoplasma putrefaciens* in goats in pishin district of balochestan. Pakistanian Veterinary Journal, **29(4)**,179-185.

Azevedo, E. O., Alcântara, M.D.B., Nascimento, E.R., Tabosa, I.M., Barreto, M.L., Almeida, J.F., Araújo, M.D.O., Rodrigues, A.R.O., Riet-Correa, F., Castro, R.S. 2006, Contagious agalactia by Mycoplasma agalactiae in small ruminant in Brazil. Brazilian Journal of Microbiology, **37(4)**, São Paulo.

Bashiruddin, J.B., Taylor, T.K., Gould, A. R. 1994. A PCR-based test for the specific identification of Mycoplasma mycoides subspecies mycoides SC. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation **6**, 428-434.

Grand, D., Saras, E., Blond, D. 2004. Assessment of PCR for routine identification of species of the Mycoplasma mycoides cluster in ruminants. Veterinary Research. **35**, 635-649.

Hotzel, H., Frey, J., Bashiruddin, J., Sachse, K. 2003. Methods in molecular biology, PCR detection and differentiation of ruminant Mycoplasma. Humana press Inc, Totowa, NJ **216**,231-243.

Leach, R.H., Costas, M., Mitchelmore, D.L. 1989. Relationship between *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* Large-colony Strains and M. *mycoides* subsp. *capri*, as Indicated by numerical analysis of one-dimensional SDS-PAGE protein patterns, Journal of General Microbiology, **135**, 2993-3000.

Madanat, A., Zendulkova, D., Pospisil, Z. 2001. Contagious agalactia of sheep and goats. A review. Acra Veterinaria BRNO, **70**, 403-412.

McAuliffe, L., Ellis, R.J., Ayling, R. D., Nicholas, R. A.J. 2003. Differentiation of Mycoplasma Species by 16S Ribosomal DNA PCR and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Fingerprinting. Journal of Clinical Microbiology, **41(10)**, 4844–4847.

McAuliffe, L., Ellis, R. J., Lawes, J. R., Ayling, R. D., Nicholas, R. A. J. 2005. 16S rDNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis, a single generic test for detecting and differentiating Mycoplasma species Fingerprinting. Journal of Medical Microbiology, **54**, 731-739.

Moradi. B.S., Khaki, P., Pilehchian, R. 2011. Isolation and identification of *Mycoplasma agalactiae* by culture and Polymerase Chain Reaction in Sheep and Goat Milk Samples in Kordestan province, Iran. Archives of Razi Institute, **66(1)**, 11-16.

Nicholas, R., Ayling, R., McAuliffe L. 2008. Mycoplasma disease of ruminants, Biddles Ltd, Kings Lynn, Norfolk.

OIE Terrestrial Manual. 2008. Contagious agalactia, chapter 2.7.5. 992-999.

Peyraud, A., Woubit, S., Poveda, J.B. 2003. A specific PCR for the detection of Mycoplasma putrefaciens, one of the agents of the contagious agalactiae syndrome of goats. Molecular and Cellular Probes, **17**, 289-294.

Pirali, K., Ebrahimi, A. 2007. Investigation of Mycoplasma agalactiae in milk and conjunctival swab samples from Sheep flocks in west central, Iran. Pakistanian Journal of Biological Sciences, **10(8)**, 1346-1348.

Razin,S., Tully, J.G. 1983. Methods in Mycoplasmalogy, Vol. **1**, 495-497.

Razin,S., Yogev, D., Naot,Y. 1998. Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. Microbiology and Molecular Biology Review. **62(4)**, 1094–1156.

Shahram, M., Nicholas, R. A. J., Wood, A. P. Kelly, D. P. 2010. Further evidence to justify reassignment of Mycoplasma mycoides subspecies mycoides Large Colony type to *Mycoplasma mycoides* subspecies *capri*. Systematic and Applied Microbiology, **33(1)**, 20 – 24.

Shahzad,W. 2010. Prevalence of caprine Mycoplasmosis in different areas of Pakistan, University of Veterinary and Animal Sciences, Lahore.

Solsona, M., Lambert, M. 1996. Genomic protein homogeneity and antigenic variability of Mycoplasma agalactiae. Veterinary Microbiology, **50**, 45-58.

Taylor, T.K. Bashiruddin, J.B. Gould, A.R. 1992. Relationships between members of the Mycoplasma mycoides cluster as shown by DNA probes and sequence analysis, International Journal of Systematic Bacteriology, 593-601.

Tola, S.G., Manuta, I.D., Galleri, G. 1996. Rapid & specific detection of *Mycoplasma agalactia* by PCR. Veterinary Microbiology, **51**, 77-84.

Tola , S., Angioi , A., Rocchigiani, A.M., Idini, G., Manunta , D., Galleri, G., Leori, G. 1997. Detection of Mycoplasma agalactiae in sheep milk samples by polymerase chain reaction. Veterinary Microbiology, **54(1)**,17-22.

Viley, E. M. Korczak, Bo˙zena. M. Frey, J. 2006. Mycoplasma mycoides subsp. capri and Mycoplasma mycoides subsp. mycoides LC can be grouped into a single subspecies. Veterinary Research. **37**, 779–790.

Zendulkova, D. Madanat, A. Lany, P. 2007. Detection of *Mycoplasma agalactiae* by Polymerase Chain Reaction in Jordanian Sheep and goat herds. Acta Veterinaria, Brno, **76**, 71-77.