نشریه تازه ها در میکروب‌شناسی دامپزشکی
وبگاه: nfvm.uoz.ac.ir
دو فصلنامه - شاپا چاپی: ۲۶۴۵-۴۴۹۱ شاپا الکترونیکی: ۲۶۷۶-۵۰۰۴
دانشگاه زابل
دانشکده دامپزشکی

۱

دوره ۸، شماره ۱، بهار ۱٤۰٤، صفحات ۱- ۱۰

جداسازی و شناسایی *مایکوپلاسما آگالاکتیه* از گوسفند و بز در استان گلستان

پرستو پورغفور لنگرودی*

عضو هیات علمی، بخش تحقیقات بیماری‌های باکتریایی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، ایران.

دریافت مقاله: ۲۱ اردیبهشت ۱۴۰۲، بازنگری: ۰۳ تیر ۱۴۰۲، پذیرش نهایی: ۸ تیر ۱۴۰۲

10.22034/NFVM.2023.383539.1173

چکیده

بیماری آگالاکسی یک بیماری عفونی و مسری در گوسفند و بز است که عامل آن *مایکوپلاسما* می‌باشد. اولین مطالعه بیماری آگالاکسی در استان گلستان است که با شناسائی کانون‌های بیماری و نمونه‌گیری از دام‌های مبتلا با روش کشت، سویه‌های دخیل در بیماری آگالاکسی جداسازی و سپس به روش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، *مایکوپلاسما آگالاکتیه* مورد شناسایی و تائید قرار گرفت. در این پژوهش نمونه‌های اخذ شده شامل شیر، سوآپ از ضایعات چشم و واژن و پونکسیون از مایعات مفصلی گوسفند و بزهای مشکوک انجام شد. در آزمایش جداسازی بر روی نمونه‌های اخذ شده، جنس *مایکوپلاسما* در نمونه‌های بزی و گوسفندی به‌ترتیب ۵۴/۱۷ و ۹۸/۲۷ درصد تشخیص داده شد. به‌طوری که جنس *مایکوپلاسما* در نمونه‌های شیر، سوآپ چشمی و سوآپ واژنی بزی به‌ترتیب ۷۷/۷۸، ۴۲/۸۵ و۰درصد بود. همچنین در نمونه‌های شیر، سوآپ چشمی، سوآپ واژنی، مایع مفصلی و ترشحات جنین سقط شده گوسفندی به‌ترتیب ۱۰۰ درصد، ۹۶/۳۰، ۱۰۰ ،۱۰۰ و۰درصد جنس *مایکوپلاسما* جدا شد. برای بررسی تأیید حضور جنس *مایکوپلاسما* و *مایکوپلاسما آگالاکتیه* با استفاده از روش PCR و تکثیر ژن ۱۶SrRNA باند اختصاصی جنس در ۱۶۳bp و آغازگر FS2 جهت شناسائی گونه توانائی آغاز تکثیر قطعه‌ای از ژن لیپوپروتئین در ۳۷۵bp انجام شد. تمامی نمونه‌های مثبت جنس جهت جداسازی گونه *آگالاکتیه* مورد ارزیابی قرار گرفتند. نمونه‌های مثبت با عامل *مایکوپلاسما آگالاکتیه* در بزها (۷۶/۹۲ درصد) و گوسفندان (۲۴/۵۷ درصد) به‌دست آمد. نتایج نشان می‌دهد که گونه‌های دیگر غیر از *مایکوپلاسما آگالاکتیه* در بزها (۰۸/ ۲۳ درصد) و گوسفندان (۷۵/۴۳ درصد) می‌تواند وجود داشته باشد.

واژگان کلیدی: *گوسفند و بز، گلستان، مایکوپلاسما آگالاکتیه، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: poorghafoor@gmail.com

مقدمه

آگالاکسی در اروپا، آفریقای شمالی و قسمت‌هایی از آسیا شیوع دارد یک بیماری عفونی و مسری در گوسفند و بز (غیر وابسته به جنس) می‌باشد. معمولاً بلافاصله بعد از زایمان بروز کرده و از طریق سه شکل ورم پستان، آرتریت و کونژکتیویت شناخته می‌شود. حیوانات آبستن ممکن است سقط کنند. این بیماری در حیوانات جوان به‌علت عوارض ریوی، کشنده است. این جرم از شیر دفع شده و می‌تواند در بین دو دوره شیردهی در عقده‌های لنفاوی پستان ساکن گردد (۱).

گرچه این بیماری تلفات زیادی ندارد ولی به‌علت طولانی بودن دوره بیماری خسارت اقتصادی زیادی به همراه دارد. تولید شیر حتی پس از بهبودی دام نیز به حالت عادی بر نمی‌گردد. همچنین بالا بودن میزان سقط جنین در گله از جمله خسارات اقتصادی شناخته شده است. در جهت مقابله با بیماری هر ساله جمعیت گوسفند و بز استان با واکسن تولیدی مؤسسه رازی مایه‌کوبی شده ولی در بعضی گله‌ها علی‌رغم انجام منظم مایه‌کوبی همچنان درگیر بیماری می‌شوند (۲).

این بیماری (به‌خصوص در بز) به‌صورت سندرم و با عوامل *مایکوپلاسمائی* مختلف دیگری غیر از آگالاکتیه عارض می‌گردد. بیماری مربوط به *مایکوپلاسما آگالاکتیه* می‌بایست از دیگر عوامل و گونه‌های مایکوپلاسما همچون *مایکوپلاسما کاپریکولوم کاپریکولوم*، *مایکوپلاسما پوتریفسینس*، *مایکوپلاسما مایکوئیدس کاپری* و *مایکوپلاسما مایکوئیدس مایکوئیدس* تیپ کلنی بزرگ تشخیص داده شود (۳، ۴، ۵).

قادرسهی و اخلاقی گزارش کردند که علاوه بر *مایکوپلاسما آگالاکتیه* (۳۱ درصد) سویه‌های *مایکوپلاسما مایکوئیدس* (۲۵ درصد)، *مایکوپلاسما کاپریکولوم*(۲۲ درصد) و *مایکوپلاسما پوتریفسینس* (۵ درصد) در بروز بیماری آگالاکسی در ایران نقش دارند (۶، ۷). اعرابی و ستوده‌نیا گزارش کردند که مایکوپلاسماهای جداشده از شیر بز و گوسفند بر اساس تخمیر کربوهیدرات‌های مختلف، به‌خصوص گلوکز مقایسه شده‌اند و برای اولین بار *مایکوپلاسما مایکوئیدس مایکوئیدس* از ایران جداسازی و گزارش شده است (۸).

اعرابی و ستوده‌نیا۴۹۰ نمونه شیر از نواحی مختلف کشور جمع‌آوری و بررسی کردند که از این میان ۹۶ نمونه از نظر آزمایش‌های بیوشیمیائی مثبت بوده و از این تعداد ۲۳ نمونه از نظر سرولوژیکی *مایکوپلاسما آگالاکتیه* تشخیص داده شد. همچنین این محققین انجام برنامه واکسیناسیون دام‌ها را در سرتاسر کشور توصیه کردند (۹).

ستوده‌نیا و همکاران در مورد واکنش متقاطع مابین دو سویه آگالاکتیه لرستان و AIK2 در سرم گوسفندان واکسینه با واکسن زنده، در ابتدا تعداد ۱۴ رأس بز و گوسفند با واکسن آگالاگسی ایمن کردند و سپس ۷/۵ ماه بعد با سویه حاد AIK2 چلنج دادند. سرم به‌دست آمده از خون آنها توسط آزمایش ممانعت از رشد با پادگن‌های سویه لرستان و AIK2 مجاور گردید و نتیجه‌گیری شد که هر دو پادگن واکنش مشابهی در برابر پادتن‌های تولید شده در دام‌های واکسینه دارند (۱۰).

روز باسکونا*و همکاران پس از کشت و جداسازی *مایکوپلاسما مایکوئیدس* از نمونه‌های مشکوک در ارتباط با نحوه شناسائی سویه F38 *مایکوپلاسما مایکوئیدس* به روش PCR تحقیق نموده و موفق به تعیین توالی DNA آن شدند (۱۱). سولسونا[]و همکاران پس از کشت و جداسازی ۳۱ سویه *مایکوپلاسما آگالاکتیه*، آن را از نظر یکنواختی پروتئینی و متغیر بودن پادگن، مورد بررسی قرار دادند (۱۲). تولا[]و همکاران روی نمونه‌های شیر گوسفندان مبتلا به تورم پستان در ۴ منطقه ایتالیا نسبت به جداسازی و شناسائی *مایکوپلاسما آگالاکتیه* اقدام نمودند و نتیجه‌گیری کردند که این روش یک روش سریع

*- Ros Bascunana

[]- Solsona

[]- Tola

و اختصاصی برای جستجو و جداسازی *مایکوپلاسما آگالاکتیه* است (۱۳، ۱۴). زدولکووا* و همکاران از گوسفندان و بزهای مبتلا به آگالاکسی در اردن نمونه‌برداری کردند و بر روی آنها آزمایش PCR انجام دادند و در نهایت توانستند *مایکوپلاسما آگالاکتیه* را از نمونه‌ها جداسازی نمایند (۱۵).

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری: جمعیت مورد بررسی در این پژوهش، گوسفند و بزهای استان گلستان بود. نمونه‌گیری مبتنی بر هدف انجام گرفت. بدین صورت که به‌مدت سه سال بر اساس گزارشات دامپزشکان و سایر همکاران بخش خصوصی، گله‌های مشکوک مورد بررسی و معاینات قرار گرفت. نمونه‌ها به‌صورت دوشش از ترشحات پستان، سوآب از ضایعات چشم، سواپ واژنی وپونکسیون از مایعات مفصلی از دام‌های بیمار بسته به اینکه کدام عضو درگیر شده باشد انجام شد (۱۵، ۱۶). ترشحات پستانی، سوآب چشمی و واژنی پس از افزودن به محیط انتقالی[] PPLO Broth و مایعات مفصلی بدون اضافه کردن محیط انتقالی به لوله‌های درپوش‌دار انتقال یافته و در مجاورت یخ در کمتر از ۲۴ ساعت به آزمایشگاه مرجع مایکوپلاسما ارسال و به‌صورت موازی تحت دو روش کشت و PCR نسبت به جداسازی عامل بیماری اقدام شد. پس از ارسال نمونه‌ها به آزمایشگاه، نمونه‌ها در ۵ میلی‌لیتر محیط PPLO Broth جهت غنی‌سازی برای یک دوره حدود ۲۴ ساعته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون شدند .پس از اتمام غنی‌سازی نمونه‌ها، جهت جداسازی و غنی‌سازی مایکوپلاسما آگالاکتیه تحت دو روش کشت و PCR ، نمونه را چندین بار پیپتاژ کرده، حدود ۰/۵ میلی‌لیتر را جهت استخراج DNA داخل تیوپ ۱/۵ میلی‌لیتر ریخته از باقیمانده نمونه جهت کشت استفاده شد (۱۷).

روش کشت: نمونه‌هائی که در محیط PPLO Broth به آزمایشگاه ارسال شدند ابتدا برای یک دوره‌ی حدود ۲۴ ساعته در دمای ۳۷ درجه انکوباسیون گردیدند. نمونه‌های مایع مفصلی پس از انتقال به آزمایشگاه به محیط PPLO Broth انتقال یافته و برای یک دوره حدود ۲۴ ساعته در دمای ۳۷ درجه انکوباسیون شدند. تمامی محیط‌های PPLO Broth حاوی نمونه، توسط فیلترهای مخصوص سرسرنگی PVDF[] که دارای روزنه‌هایی با قطر ۰/۴۵ میکرومتراند، فیلتراسیون شدند. با استفاده از سرنگ‌های استریل ۲ میلی‌لیتر از محلول براث کشت شده را برداشته، سرنگ را در دهانه فیلتر قرار داده و با فشار کم و به آرامی محلول وارد محیط کشت دوم PPLO Broth (pH 6-8) گردید. سپس این محیط در انکوباتور Co_2 دار قرار گرفته و ۵-۳ روز تحت نظر قرار گرفت. این محیط به‌دلیل دارا بودن فنل رد قرمز رنگ است که در صورت رشد باکتری تغییر رنگ داده و به رنگ زرد متمایل می‌شود. علاوه بر این ایجاد کدورت دال بر رشد باکتری در محیط است (رشد باکتری همیشه سبب تغییر رنگ نمی‌شود). پس از گذشت زمان لازم تغییر رنگ یا ایجاد کدورت مشاهده و ثبت گردید و در هر صورت محیط‌ها مجدداً در PPLO Broth پاساژ داده شد و پس از ۲۴ تا ۴۸ ساعت، ۰/۲ میلی‌لیتر از هر کدام از محیط‌های مایع روی محیط آگار مایکوپلاسما در پلیت کشت داده شده، به انکوباتور Co_2 دار منتقل و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۱ روز انکوبه گردیدند. محیط‌های کشت PPLO جامد هر روز با میکروسکوپ نوری و با بزرگنمایی ۴۰x(شکل ۱) از نظر رشد و تشکیل پرگنه‌های مخصوص تحت بررسی قرار گرفتند. چنانچه تغییر رنگ یا ایجاد کدورت در محیط PPLO Broth ناشی از آلودگی مایکوپلاسمائی باشد باید

*- Zendulkova

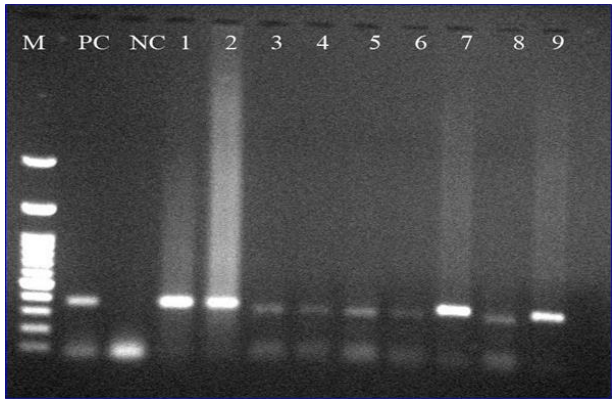
	Gms / Litre
from	250.000
mal tissue	10.000
	5.000
	7.8±0.2

l, standardized to suit performance parameters

[] Poly Vinylidene Fluride

در محیط آگار نیز پرگنه مخصوص تشکیل گردد. در صورت مشاهده‌ی پرگنه شبیه به تخم‌مرغ نیمرو، حضور مایکوپلاسما در نمونه تلقی شد (۱۷).

شکل ۱- تصویر میکروسکوپی ۴۰x پرگنه‌های مشاهده شده بر روی PPLOagar (۲)



شکل ۲- الکتروفورزیز ژل آگار و رنگ‌آمیزی محصولات PCR با اتیدیوم بروماید جهت تشخیص جنس *مایکوپلاسما* (M مارکر، PC نمونه کنترل مثبت، NC نمونه کنترل منفی، نمونه‌های مشکوک)

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 فنل-کلروفرم و پروتوکل کوجیما و همکاران مورد استفاده قرار گرفت (۱۸). کنترل مثبت استفاده شده جهت انجام واکنش‌های PCR سویه‌ی استاندارد *مایکوپلاسما آگالاکتیه* (NCTC 10123) و کنترل منفی PPLO Broth بودند. در این پژوهش-ترخیص DNA با استفاده از کیت تجاری PCR Maser Kit تهیه شده از شرکت سیناژن انجام شد- با استفاده از آغازگرهای شناسایی جنس که قادر به تکثیر قطعه‌ای از ژن 16S rRNA به اندازه ۱۶۳ جفت باز بودند و از آغازگرهای FS2 و FS1 که جهت شناسایی گونه *مایکوپلاسما* توانایی تکثیر قطعه‌ای از ژن لیپوپروتئین به اندازه ۳۷۵ جفت باز ویژه گونه *آگالاکتیه* به‌عنوان DNAهای هدف استفاده گردید (جدول ۱).

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

آغازگر	ژن هدف	توالی	طول(bp)	منبع
FS1	16S rRNA	F: 5-GCTGCGGTGAATACGTTCT-3 R: 5-TCCCCACGTTCTCGTAGGG-3	163	Kojima et al. 1997
FS2	Lipoprotein	F: 5-AAAGGTGCTTGAGAAATGGC-3	375	Tola et al. 1997

محصول PCR در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و هر میلی‌لیتر از محصول PCR با ۲ میلی‌لیتر از(×4) Loading Buffer مخلوط و محصول در ژل آگار یک درصد که با سایبر رنگ شده بود حرکت داده شد و تحت الکتروفورز مورد ارزیابی قرار گرفت. در سه چاهک اول به‌ترتیب مارکر، کنترل مثبت و کنترل منفی قرار گرفتند.

باندهای ایجاد شده پس از انتقال به دستگاه پرتوتاب ماوراء بنفش مشاهده و تصاویر ثبت شد.

نتایج

در این مطالعه طی سه سال از ۱۷۵ گوسفند مشکوک و ۲۴ بز مشکوک نمونه‌گیری شد (جدول ۲، ۳ و ۴).

جدول ۲- پراکندگی نتایج کشت و PCR جنس مایکوپلاسما

نتایج آزمایش			تعداد نمونه							جمع	
			بز		گوسفند						
کشت	PCR	شیر	سوآب چشمی	سوآب واژن	شیر	سوآب چشمی	سوآب واژن	مایع مفصلی	ترشحات جنین سقط‌شده	بز	گوسفند
+	+	۶	۶	۰	۱۳	۲۲	۱۴	۱	۰	۱۲	۵۰
+	-	۰	۱	۰	۰	۱	۰	۰	۰	۱	۱
-	+	۱	۰	۰	۳	۴	۰	۰	۰	۱	۷
-	-	۲	۷	۱	۳۸	۵۹	۱۲	۱۱	۱	۱۰	۱۲۱
جمع		۹	۱۴	۱	۵۴	۸۶	۲۶	۱۲	۱	۴	۱۷۹
		۲۴			۱۷۹ (از یک گوسفند چند نمونه گرفته شده است)					۲۰۳	

جدول ۳- پراکندگی نتایج کشت و PCR جنس مایکوپلاسما و گونه *مایکوپلاسما آگالاکتیه*

نوع دام	نوع نمونه (تعداد نمونه)	نتایج					
		کشت		PCR جنس مایکوپلاسما		PCR گونه *مایکوپلاسما آگالاکتیه*	
		+	-	+	-	+	-
بز	شیر (۹)	۶	۱	۷	۰	۶	۱
	سوآب چشمی (۱۴)	۷	۰	۶	۱	۴	۳
	سوآب واژن (۱)	۰	۱	۰	۱	۰	۱
جمع	۲۴	۱۳	۲	۱۳	۲	۱۰	۵
گوسفند	شیر (۱۶)	۱۳	۳	۱۶	۰	۴	۱۲
	سوآب چشمی (۲۷)	۲۳	۴	۲۶	۱	۵	۲۲
	سوآب واژن (۱۴)	۱۴	۰	۱۴	۰	۴	۱۰
	مایع مفصلی (۱)	۱	۰	۱	۰	۱	۰
	ترشحات جنین سقط شده (۱)	۰	۰	۰	۰	۰	۰

جدول ۴- پراکندگی نتایج PCR جنس مایکوپلاسما و گونه *مایکوپلاسما آگالاکتیه*

نتایج آزمایش PCR		تعداد نمونه								جمع	
		بز			گوسفند						
جنس	گونه	شیر	سواب چشمی	سواب واژن	شیر	سواب چشمی	سواب واژن	مایع مفصلی	ترشحات جنین سقط شده	بز	گوسفند
+	+	۶	۴	۰	۴	۵	۴	۱	۰	۱۰	۱۴
+	-	۱	۲	۰	۱۲	۲۱	۱۰	۰	۰	۳	۴۳
-	+	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
-	-	۰	۰	۱	۰	۱	۰	۰	۱	۱	۲
جمع		۷	۶	۱	۱۶	۲۷	۱۴	۱	۱	۱۴	۵۹
		۱۴			۵۹					۷۳	

بحث و نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج کشت و روش PCR، جنس *مایکوپلاسما* و گونه *مایکوپلاسما آگالاکتیه* از بزها و گوسفندان استان گلستان جدا و تأیید گردید. به‌طوری که مشخص شد در دام‌های مشکوک به بیماری آگالاکسی مسری در بزها ۵۴/۱۷ درصد و نمونه‌های گوسفندی ۹۸/۲۷ درصد به جنس *مایکوپلاسما* آلوده بودند. در تحقیق حاضر تمامی نمونه‌هایی که از نظر جنس *مایکوپلاسما* مثبت تشخیص داده شدند برای جداسازی گونه آگالاکتیه تحت آزمایش PCR قرار گرفتند و درصد نمونه‌های گونه *آگالاکتیه* در گوسفندان از نمونه شیر (۳۰/۷۶ درصد)، سواپ چشم (۲۱/۷۳ درصد)، واژن (۲۵/۵۷۵۷ درصد۲۵) و مایع مفصلی (۱۰۰ درصد)، البته فقط یک مورد مایع مفصلی *مایکوپلاسما* مثبت بود. در بزها از شیر (۱۰۰ درصد) و سواب چشم (۵۷/۱۴ درصد) جدا شد. اما در هیچ‌کدام از نمونه‌های بز گونه *آگالاکتیه* از سواپ واژن جدا نگردید. که این یافته، نتایج برخی از تحقیقات دیگر در ایران و همچنین نتایج پژوهش‌های صورت گرفته در خارج از ایران را تائید می‌نماید، که آلودگی با گونه‌های دیگر *مایکوپلاسما* در بز را عامل ایجاد آگالاکسی ذکرکرده‌اند (۲۰، ۲۲، ۲۳).

طبق تحقیقی که در استان اردبیل انجام شد از ۱۵۱ مورد مشکوک نمونه گیری شد ۳۳ نمونه در کشت مثبت بودند و کلاً پس از انجام PCR ۲۵ نمونه *مایکوپلاسما آگالاکتیه* بودند (۱۹). به دنبال شیوع مشکوک آگالاکسی در اردبیل نمونه‌گیری از ۱۱۶ گوسفند و ۱۶ بز مبتلا به نوع حاد بیماری انجام شد. ۳۳ نمونه (۲۵ درصد) برای نمونه‌های *مایکوپلاسما* مثبت بودند (۲۰). خضری و همکاران در نمونه‌های اخذ شده از گوسفندان منطقه کردستان گزارش کردند که جنس *مایکوپلاسما* در آزمایش کشت و PCR به‌ترتیب در ۳۴/۸ و ۶۶/۷ در صد نمونه‌ها تشخیص داده شد (۲۱). عزی و همکاران در بررسی پنومونی مایکوپلاسمائی در کشتارگاه زیاران، ۲۸۲ نمونه از ۱۲۱۶۸ نمونه ریه ضبطی در کشتارگاه زیاران را به‌طور هفتگی و در طول یک سال مورد مطالعه قرار دادند. این محققین گزارش کردند که جنس *مایکوپلاسما* از ۴ مورد گوسفند و ۲ مورد بز جداسازی گردید که با آزمایش PCR جنس *مایکوپلاسما* نیز تائید گردید (۲۲). 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 اقدام شد. به‌طوری که موارد ابتلا به آگالاکسی با عامل *مایکوپلاسما آگالاکتیه* در بزها (۷۶/۹۲ درصد) و گوسفندان (۲۴/۵۶ درصد) به‌دست آمد. به عبارت دیگر در این دام‌ها گونه‌های دیگر غیر از *مایکوپلاسما آگالاکتیه* در بزها و گوسفندان می‌تواند وجود داشته باشد. حسنی طباطبائی و فیروزی گزارش کردند عامل اصلی بیماری آگالاکسی در گوسفند و بز *مایکوپلاسما آگالاکتیه* می‌باشد (۴). مرادی و همکاران با

روش کشت و جداسازی در نمونه‌های شیر گوسفندان و بزها در منطقه کردستان، وجود *مایکوپلاسما آگالاکتیه* را مورد بررسی قرار دادند ؛ ۳۶۷ نمونه شیر از گوسفند و بز گرفته شد. در کشت ۲۰ نمونه *مایکوپلاسما* مثبت بودند و در آزمایش PCR ۵ نمونه (۴ نمونه مربوط به گوسفندو ۱ نمونه مربوط به بز) *آگالاکتیه* مثبت بودند (۲۴). خیرخواه و همکاران از کرمان گزارش کردند که از ۱۴۲ نمونه گوسفندی ۵۹ نمونه *مایکوپلاسما* بودند و ۱۷ مورد *آگالاکتیه* ،و از ۸۵ نمونه مربوط به بز ۴۶ نمونه *مایکوپلاسما* که ۲۸ مورد *آگالاکتیه* ثبت شدند (۲۳). خیرآبادی و همکاران با بررسی بر روی ۲۶ گله گوسفند در منطقه چهارمحال بختیاری گزارش کردند گونه *مایکوپلاسما آگالاکتیه* به‌ترتیب در نمونه‌های سواب چشم و شیر ۲۲/۲ و ۱۷ در صد با آزمایش PCR مثبت تشخیص داده شد و در ۷۷ درصد گله‌ها حضور این گونه در نمونه‌ها تأیید گردید. همچنین این محققین گزارش کردند که ۲۰ درصد گله‌های مورد مطالعه مبتلا به آگالاکسی عفونی بودند (۲۶). پولادگر و همکاران گزارش کردند که آزمایش PCR مناسب‌ترین روش برای تشخیص گونه *مایکوپلاسما آگالاکتیه* می‌باشد به‌طوری که با این روش ۱۹/۱ درصد نمونه‌ها اخذ شده از منطقه خوزستان مثبت تشخیص داده شد (۲۷). در تحقیقی که حیدری و همکارانش در جنوب ایران با استفاده از روش PCR روی ۱۸۳جنین سقط شده گوسفند و ۱۱۷ جنین سقط شده بز انجام دادند ۴۶ نمونه *مایکوپلاسما آگالاکتیه* مثبت داشتند (۲۸). در بررسی که عبدی و همکارانش در سیستان و بلوچستان با استفاده از روش PCR روی ۷۸ جنین گوسفند سقط شده انجام دادند ۲۴ مورد مایکوپلاسما آگالاکتیه مثبت داشتند (۲۹). بیات زاده و همکارانش ۱۰۲ نمونه از شیر، ترشحات چشم، گوش و مفاصل گوسفند جمع‌آوری کردند و با استفاده از روش PCR ۱۹ نمونه *مایکوپلاسما آگالاکتیه* مثبت داشتند (۳۰). در بررسی نه ساله‌ای که در گوسفندداری‌های اوکراین انجام شد میزان آلودگی به آگالاکسی مسری از ۱/۱۳ ٪ به ۱۴/۴ ٪ افزایش داشت و بیان شد که با افزایش رطوبت هوا تظاهر ورم پستان بیشتر شده و در مواردی خشکی میزان شیوع ورم پستان نصف و بیشتر اشکال مختلط، مفصلی و چشمی بروز نمودند (۳۱). در تحقیقی که با استفاده از PCR روی ۲۵۱ نمونه شیر بز در برزیل انجام شد ۵۰ نمونه آگالاکسی مثبت بودند که اصرار داشتند باید عوامل مدیریتی درست در جهت جلوگیری از انتشار پاتوژن اعمال شود (۳۲). در بررسی دیگری که به روشPCR روی ۲۰۰نمونه شیر بز از سه استان مختلف عراق انجام شد ۱۲ مورد آگالاکسی مثبت بودند (۳۳). در تحقیقی که برای اولین بار در بلغارستان بر روی ۶۷ نمونه شیر گوسفند و بز انجام شد ۱۳ مورد *مایکوپلاسما آگالاکتیه* مثبت گزارش گردید (۳۴). در بررسی که در ترکیه از ۲۰۲ گوسفند و بز مشکوک به بیماری نمونه‌برداری شد که ۲۸۹ نمونه از شیر، سواپ بینی، سواپ چشم، مایع مفصلی و گوش نمونه‌برداری شد و با جدایه‌های به‌دست آمده پس از انکوباسیون با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی بررسی شدند هیچ‌کدام *مایکوپلاسما آگالاکتیه* نبودند (۳۵). نتایج آزمایش کشت و PCR نشان داد که حساسیت روش PCR برتر از روش کشت می‌باشد و زمانی که *مایکوپلاسما*ها در نمونه مقدارش کم باشد و یا به هر علت از بین رفته باشد به‌طور مثال در شرایط نگهداری نامناسب و یا استفاده از آنتی‌بیوتیک در دوره درمانی، با آزمایش کشت قابل شناسایی و ردیابی نمی‌باشد اما با استفاده از آزمایش PCR حضور آن قابل اثبات می‌باشد (۵، ۱۵، ۳۶، ۳۷). با توجه به تعدد نمونه‌های مورد استفاده در این تحقیق به نظر می‌رسد که مناسب‌ترین نمونه برای تأیید حضور جنس *مایکوپلاسما* در آزمایش‌های کشت و PCR در گوسفند شیر، سواپ واژن و سواب چشمی و در بز شیر و سواپ چشمی می‌باشد. همچنین مناسب‌ترین نمونه برای تشخیص گونه *آگالاکتیه* در گوسفند و بز نمونه‌های شیر می‌باشد. در تحقیقات مشابه از تمامی محل‌های مذکور جهت جداسازی عامل

بیماری استفاده شده است (۲۱، ۲۳، ۲۵، ۳۸).

سپاسگزاری

از همکاران محترم در آزمایشگاه رفرنس مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی به‌خصوص آقای دکتر پوربخش کمال تشکر و قدردانی را دارم.

References

1- Quinn PJ, Markey BK, Leonard FC, Fitz-Patrik ES, Fanning S, Hartinag PJ. Veterinary microbiology and microbial disease Second Edition, Wiley Blackwell. 2011; 373.

2- Mirian SJ, Pourbakhsh SA, Mohammadi AR, Hemidieh H, Ashtari A, Banani M, *et al*. Isolation and identification of Mycoplasmas which cause contagious Aga-lactia from sheep & goats in Tehran province. *NFVM*. 2019; 2(2): 66-74. [In Persian]

3- Lopes LFV, Silva EC da, Moraes ACA de, Silva ER da, Santoro KR, Batista Ângela MV, *et al*. Mycoplasma agalactiae and the Mycoplasma mycoides cluster in goat herds in the states of Pernambuco and Paraiba Brazil. *Semina: Ciências Agrárias*. 2019; 2261–2270.

4- Hassani tabatabaee A, Firoozi R. Livstook bacterial diseases. Tehran university. 2001; 469-484. [In Persian]

5- Razin S, Yogev D, Naot Y. Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998; 62(4): 1094–1156.

6- Ghader sohi A. Detection of Mycoplasma agalactiae and other mycoplasma agents cause agalactiae disease in sheep and goat using PCR and culture in Iran, proposal of a research hold in *RVSRI*. 2007. [In Persian]

7- Akhlaghi F. A study plan to identify Mycoplasma agalactiae and other causative agents of agalaxia disease in sheep and goats by polymerase chain reaction (PCR) and culture in Iran. Karaj: *RVSRI*, Ministry of Education and Research, Ministry of Jihad Construction, 01-0420317000-77. 2016. [In Persian]

8- Sotoudeh Nia A, Arabi I. Isolation and carrying out carbohydrate fermentation test regarding Mycoplasma agalactiae and Mycoplasma mycoides under Mycoides species. *Arch Razi Ins*. 1984; 34: 67-70. [In Persian]

9- Sotoudeh Nia A, Arabi I. Agalaxia disease and its geographical distribution in Iranian sheep and goats. *Arch Razi Ins*. 1986; 36: 75-78. [In Persian]

10- Sotoudeh Nia A, Arabi I, Naseri Rad AA. Cross reaction between two strains of Agalactia Lorestan and AIK2 in the serum of sheep vaccinated with live vaccine. *Arch Razi Ins*. 1988; 38: 76-73. [In Persian]

11- Ros Bascunana C, Mattsson J, Bolske G, Johansson KE. Characterization of the 16S rRNA genes from Mycoplasma sp. strain F38 and development of an identification system based on the polymerase chainreaction. *JB* 1994; 176(9): 2577–2586.

12- Solsona M, Lambert M. Genomic protein homogeneity and antigenic variability of Mycoplasma agalactiae. *Vet Mic*. 1996; 50(1-2): 45-58.

13- Tola S, Idini G, Manuta D, Galleri G. Rapid and specific detection of Mycoplasma agalactia by PCR. *Vet Mic*. 1996; 51(1-2): 77-84.

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

15- Zedulkova D, Madanat A, Lany P, Rosenbergova K, Pospisi Z. Detection of Mycoplasma agalactiae by Polymerase Chain Reaction in Jordanian Sheep and goat herds. *Acta vet Brono*. 2007; 76(1): 71-77.

16- Al-Momani W, Nicholas RA, Abo-Shehada MN. Risk factors associated with Mycoplasma agalactiae infection of small ruminants in northern Jordan. *Prev Vet Med*. 2008; 83(1): 1-10.

17- Lotfi M, Banani M, Pourbakhsh SA, Sakhaei D, Akhlaghi F, Asli E. Using PCR and culture methods for Mycoplasma testing in poliomyelitis vaccine. *Arch Razi Ins*. 2009; 64: 109-114.

18- Kojima A, Takahashi T, Kijima M, Ogikubo Y, Nishimura, Y, Ishimura S, *et al*. Detection of mycoplasma in avian live virus vaccines by polymerase chain reaction. *Bio*. 1997; 25(2): 365-371.

19- Hajizadeh A, Moazeni JG, Akhlagi F, Naserirad A, Motarez B, Soleimani S, *et al*. Isolation and identification of Mycoplasmas causing contagious Agalactia syndrome in sheep & goats by using culture method and PCR in Ardebil prov-

ince. *J Vet Lab Res*. 2012; 24(4): 271-281. [In Persian]

20- Hajizadeh A, Ghaderi R, Ayling R. Species of Mycoplasma causing contagious agalactia in small ruminants in Northwest Ir.*vet italia*. 2018; 54(3): 205-210.

21- Khezri M, Pourbakhsh, SA, Ashtari A, Rokhzad B, Khanbabaie H. Isolation and prevalence of Mycoplasma agalactiae in Kurdish sheep in Kurdistan, Iran. *Vet*. 2012; 5(12): 727-731. [In Persian]

22- Ezzi A, Pourbakhsh SA, Moradi bidhendi S. Study on Mycoplasma pneumonia at the Ziaran abattoir. *Arch. Razi Ins*. 2007; 62(3): 161-166. [In Persian]

23- Kheirkhah, B, Pourbakhsh, SA, Ashtari A, Amini K. Detection of Mycoplasma agalactiae by culture and Polymerase Chain Reaction (PCR) methods from affected sheep to contagious agalactiae in Baft County. *Comp Path*. 2011; 8(1): 423-430. [In Persian]

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

25- Moradi Bidhendi S, Khaki P, Pilehchian Langroudi 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*. 2011; 66: 11-16. [In Persian]

26- Kheirabadi KH, Ebrahimi A. Investigation of Mycoplasma agalactiae in milk and conjunctival swab samples from sheep flocks in west central, Iran. Pak. *J Biol Sci*. 2007; 10(8): 1346-1348. [In Persian]

27- Pooladgar AR, Rahimilarki E, Ghaem Maghami S, Hossieni SMH, Ghaleh Golab B. Application of PCR for diagnosis of contagious agalactia in Khuzestan province -Iran. *African J Mic Res*. 2011; 5(28): 5097-5101.

28- Heidari S, Derakhshandeh A, Firouzi R, Ansari-Lari M, Masoudian M, Eraghi V. Molecular detection of Chlamydophila abortus, Coxiella burnetii, and Mycoplasma agalactiae in small ruminants' aborted fetuses in southern Iran. *Trop Animal Health Produc*. 2018; 50(4) :779–785. [In Persian]

29- Abadi EH, Saadati D, Najimi M, Hassanpour M. A Study on Mycoplasma agalactiae and Chlamydophila abortus in Aborted Ovine Fetuses in Sistan and Baluchestan region. *Arch Razi Inst*. 2019; 74(3): 295-301. [In Persian]

30- Bayatzadeh MA, Ashtari A, Pourbakhsh SA, Abtin AR, Barani SM, Ahangaran S. Isolation and identification of Mycoplasma agalactiae by culture and polymerase chain reaction (PCR) from sheep of Qom province, Iran. *Arch Razi Inst*. 2013; 68: 11–16. [In Persian]

31- Volodymyrovych Bohach M, Igorovych Bolotin V, Mykolaivych Bohach D, Tarasivna Piven O, Victorivna Pyvovarova I. Influence of natural and climatic conditions on the distribution and forms of contagious agalactia in sheep in Bessarabia, Ukraine. *J Vet Res*. 2022; 66(3): 345-351.

32- Rodrigo AT, MatosSandra B, SantosRenato V, AlvesEdnaldo J, SilvaMelânia L, MarinhoJosé Wilton P. Ocurrence and risk factors associated with Mycoplasma agalactiae infection in dairy goat herds of Paraíba State, Brazil Livestock Diseases Pesq. *Vet. Bras*. 2019; 39(2): 123-128.

33- Mohanad M, Jameel S, Hasso M. Molecular detection of Mycoplasma agalactiae and Mycoplasma capricolum in mastitic and non mastitic milk of goats by using Real Time Polymerase Chain Reaction. *Iraqi J Vet Med*. 2018; 42(1): 1-6.

34- Vstative C, Uromova V. Molecular detection of Mycoplasma agalactiae by qPCR in sheep and goats from Bulgaria. *Bulg J Vet Med*. 2023.

35- Karatekeil U, Kenar Beytullah. An investigation of contagious agalactia disease of sheep and goats in isparta and afyonkarahisar in Turkey. *India J Anim Res*. 2022; 56(3): 358-361.

36- Amores J, Corrales JC, Martin AG. Comparison of culture and PCR to detect Mycoplasma agalactiae and Mycoplasma mycoides subsp. Capri in ear swabs taken from goats. *Vet. Mic*. 2009; 102: 42-48.

37- Bashiruddin JB, Frey J, Konigsson MH, Johansson KE, Hotzel H, Diller HR, *et al*. Evaluation of PCR system for the identification and differentiation of Mycoplasma agalactiae and Mycoplasma bovis: A collaborative trial. *Vet J*. 2005; 169(2): 268-275.

38- Kizil O, Ozdemir H. Clinical, haemological and biochemical studies in goats naturally infected with Mycoplasma agalactiae. Bulletin Vet. *Ins. Pulawy*. 2006; 50: 325-328.

New Findings in Veterinary Medicine
Homepage: nfvm.uoz.ac.ir
Semiannual - Print ISSN: 2645-4491 Online ISSN: 2676-5004

Volume 8, Issue 1, Spring 2025, pages: 1-10

Isolation and identification of *Mycoplasma agalactiae* from sheep and goat, in Golestan province

Parastoo poorghafour langeroodi

1- Faculty Member, Department of Bacterial Diseases Research, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Iran.

Receive: May 11, 2023; Revise: June 24, 2023; Accept: June 29, 2023

10.22034/nfvm.2023.383539.1173

Summary

Contagious agalactia is a serious disease in sheep and goats caused by Mycoplasma. In this study, according of veterinary organization reports, the animals involved with contagious agalactia disease identification in Golestan province. Strains involved in disease identification by culture method, and then by PCR using specific primers to detect *Mycoplasma agalactiae* was confirmed. In this study, milk samples, swabs of lesions of the eye and ear and puncture of the joint fluid of sheep and goats were suspicious. The genus Mycoplasma in isolation test of sheep and goat samples were 54.17% and 98.72%, respectively. As of the genus Mycoplasma in milk, eye and ear swabs and joint fluid of sampling goat were 77.78%, 42.85%, and0%, respectively. In milk samples, eye and ear swabs and joint fluid of sheep were 100%, 96.30% 100% and 100%, respectively. To confirm the presence of Mycoplasma genus and *Mycoplasma agalactiae*, gene was amplified by using PCR. The SrRNA 16 primer was bands specific gender with bp163 and FS2 primer was ability to identify species by amplified fragment of the gene Lipoprotein with bp 375. All positive genus Mycoplasma samples were made to isolate *Mycoplasma agalactiae*. Positive samples caused by *Mycoplasma agalactiae* in goats and sheep were 76.92% and 24.57%, respectively. Results show that other species of *Mycoplasma agalactiae* in goats (23.08%) and sheep (75.43%) can exist.

Keywords: *sheep and goat, golestan, Mycoplasma agalactiae, polymerase chain reaction*