مطالعات علوم زیستی و زیست فناوری
دوره ۷، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۰
صفحات ۴۹- ۲۷

Online ISSN: ٤٤٩٣-٢٤٧٦
Print ISSN: ٢٠٢٠-٢٥٣٨
www.irijournals.com

جداسازی و شناسایی مایکوپلاسماهای آلوده‌کننده ریه شترهای استان کرمان

بابک خیر خواه[۱]، حسن لطفعلی پور[۲]

[۱] هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان

[۲] کارشناسی ارشد میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان

چکیده

بیماری‌های ناشی از مایکوپلاسماها مثال بارزی از بیماری‌های چند عاملی هستند. عواملی مثل عفونت های مکرر، ازدحام دامها، شرایط آب و هوایی، سن، ژنتیک دام و استرس‌های ناشی از حمل و نقل تعیین‌کننده‌های مهمی در چگونگی عاقبت عفونت مایکوپلاسمایی می‌باشند با وجود پژوهش‌های مختلف انجام شده در جهان در خصوص مایکوپلاسماها، جداسازی این گونه‌ها در شتر تاکنون در استان کرمان انجام نشده بود. از اینرو با توجه به تفاوت سویه‌های مختلف در بیماریزائی و نیز تفاوت در تمایل باکتری به بافت‌های مختلف جداسازی آنها در دام‌های مختلف ضروری به نظر می‌رسد. هدف از این تحقیق جداسازی و شناسایی مایکوپلاسماهای ریه شترهای استان کرمان به روش PCR بود. در این پژوهش توصیفی-مقطعی در ۶ ماهه دوم سال ۱۳۹۳، ۵۵ نمونه ریه شتر به روش نمونه‌گیری هدف دار از شترهایی که در کشتارگاه شهر زرند کشتار شدند اخذ شد. پس از افزودن محیط انتقالی PPLO Broth در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در کمتر از ۲۴ ساعت به آزمایشگاه ارسال شدند و با انجام PCR جداسازی جنس صورت گرفت. نتایج این تحقیق با پرایمر اختصاصی مایکوپلاسما و جداسازی برخی از گونه‌های آن را برای اولین بار درکرمان را تأیید نمود و تشخیص عفونت‌های ناشی از مایکوپلاسما را امکان پذیر نمود و تخمینی از وضعیت عفونت در استان کرمان را نشان داد.

واژه‌های کلیدی: مایکوپلاسما، عفونت ریه، شتر، PCR.

مقدمه

شتر یکی از سازش پذیرترین حیوانات صحراست که قادر است برای روزها، گرسنگی و تشنگی را تحمل کرده و صبورترین حیوان خشکی قلمداد می‌شود (Chazel et al. 2010). مایکوپلاسماها از کوچک‌ترین باکتری‌هایی هستند که زندگی آزاد دارند و در محیط کشت فاقد سلول زنده رشد می‌کنند. بعضی از مایکوپلاسماها بخشی از فلور طبیعی نواحی مخاطی هستند و تعدادی نیز در بیماری‌های دستگاه تنفسی و ادراری تناسلی انسان نقش دارند. کشت این باکتری‌ها سخت، گران و با اتلاف وقت همراه است زیرا این باکتری‌ها رشد سخت داشته و نیاز به محیط مکمل‌های اختصای و غذایی مخصوص و نیز مهارت و تجربه کافی دارند. تشخیص سرولوژیک نیز به دلیل هتروژنی و واکنش‌های متقاطع با مشکلاتی همراه است (Ozedmir et al. 2005). بعضی از مایکوپلاسماها به عنوان فلور طبیعی مجاری تنفسی و ادراری - تناسلی محسوب می گردند ولی نقش آنها در ایجاد عفونت در این مناطق مشخص شده است. عفونت ناشی از مایکوپلاسما پنومونیه[1] در اغلب نقاط دنیا شایع است و تخمین زده شده که ۳۰-۱۰ درصد همه عفونت‌های حاد بخش تحتانی دستگاه تنفس به وسیله این میکروب پدید می آید. پنومونی به عنوان ششمین علت مرگ شناخته شده است. مایکوپلاسما به همراه کلامیدیا از علل ایجاد کننده پنومونیه آتیپیک هستند که اغلب موارد عفونت های تنفسی آن به صورت منفرد یا همراه با همه گیری های فامیلی دیده می-شود. در بسیاری از پژوهش‌هایی که صورت گرفته نیمی از موارد بیماری مزمن تنفسی عامل آن مایکوپلاسما پنومونیه است و در نیمی دیگر از موارد سایر میکروب ها دخالت دارند (Sakhaei et al. 2009).هدف این مقاله جداسازی و شناسایی مایکوپلاسماهای آلوده کننده ریه شترهای استان کرمان ۱۳۹۳ است.

مایکوپلاسماپوتری‌فاسینس برای اولین بار در سال ۱۹۷۴ از ورم‌پستان بزها درکالیفرنیا و فرانسه جدا شد. عوامل دیگری مانند مایکوپلاسما آگالاکتیه، مایکوپلاسما آرژنینی، مایکوپلاسما کاپریکولوم و مایکوپلاسما مایکوئیدس نیز به عنوان عامل بیمار ذکر شده‌اند. (قادرسهی و همکاران ۱۳۸۵). جداسازی و تشخیص عفونت های مایکوپلاسمایی بصورت یک مشکل جدی همیشه وجود داشته است. مشکلات موجود در جداسازی و تشخیص مایکوپلاسماها با روش کشت محققین را ترغیب کرد تا از تکنیک-های مولکولی جدیدتر و وسیع‌تر مانند PCR برای تشخیص آگالاکسی واگیردار استفاده کنند (Hotzel et al, 1996; Tola et al. 1996; Peyreaud et al. 2003; Manso Silvan et al. 2007)

تکنیک PCR برای جداسازی عامل بیماری آگالاکسی واگیردار بصورت کامل در سال ۱۹۹۷ مورد استفاده قرار گرفت و اثبات شد که برای تشخیص آگالاکسی واگیردار مناسب است. برای این تشخیص از نمونه‌هایی شامل شیر، سوآب بینی، سوآب مهبل و مایع مفصلی استفاده شد (Dedieu et al. 1995; Hotzel et al, 1996; Tola et al. 1996; Tola et al. 1997; Greco et al. 2001; Peyreaud et al. 2003; Manso Silvan et al. 2007).

PCR روش‌حساسی جهت تشخیص مایکوپلاسما است. سنجش PCR بر مبنای سکانس‌های ثابت و مشترک‌در 16SrRNAیک تکنیک مفید و قابل اعتماد باحساسیت، ویژگی و دقت بالایی جهت شناسایی آلودگی‌های مایکوپلاسمایی-درکشت سلولی و سایر فراورده‌های بیلوژیک است. به وسیلهPCR می توان با سرعت‌بیشتر مایکوپلاسماهارا شناسایی‌و در نتیجه می توان امکان شروع هر چه سریعتر راه‌های پیشگیری و درمان آنتی بیوتیکی بیماری را فراهم نمود (Kheirkhah et al. 2011).

[1] *Mycoplasma pneumoniae*

PCR یک روش سریع و موثر برای جداسازی مستقیم مایکوپلاسما پوتری فاسینس و سایر عواملی که می‌توانند سبب آگالاکسی در بز شوند می‌باشد. این تکنیک جدید (PCR) برای تشخیص سریع‌گونه های مایکوپلاسماپوتری‌فاسینس به عنوان یک روش بهتر برای شناخت و شیوع عفونت‌های ایجاد شده توسط مایکوپلاسماپوتری‌فاسینس‌مفید بود (Peyread et al. 2003). ویژگی روش‌های کشت و PCR برای تشخیص مایکوپلاسمااپوتری‌فاسینس ۱۰۰٪ می‌باشد ولی روش PCR نسبت به روش کشت از میزان حساسیت بالاتری برای جداسازی مایکوپلاسما پوتری‌فاسینساز سوآب بینی (Awan et al. 2009) و در نمونه‌های شیر (Tola et al. 1997) برخوردار است. به هر حال روش PCR یک روش بسیار سریع و موثرتر از روش استاندارد کشت برای جداسازی مایکوپلاسما پوتری فاسینساز بزها می‌باشد (Peyread et al. 2003).

محققین زیادی روش PCR را برای تشخیص انواع مایکوپلاسما بر پایه تکثیر توالی‌های l6S rRNA استوار نمودند که می‌تواند در سطح جنس و گونه مایکوپلاسما را تشخیص دهد (van Kuppeveld et al. 1992, Zendulkova et al, 2007). توالی l6S rRNA در این میکروارگانیسم‌ها اساس طبقه‌بندی سیستماتیک قرار گرفت (Weisburg et al. 1989).

مطالعات منظم کامپیوتری بر روی این توالی‌های rRNA، وجود مناطق پر تراکم توالی‌ها و نواحی که می‌توانند در سطح جنس و گونه توالی متفاوتی داشته باشند را مشخص کرده است. این وضعیت برای آغازگرهای اختصاصی جنس و گونه دارای مزیت می‌باشد. ملکول‌های rRNA بخشی از ساختمان تمامی ریبوزوم‌ها را شکل می‌دهند و بنابراین می‌توانند به عنوان یک هدف برای آزمایش PCR مستقل از ژن بیان کننده مورد استفاده قرار گیرند. علاوه بر این، rRNA بصورت طبیعی به تعداد زیاد وجود دارد (بیش از ۱۰ هزار مولکول در هر سلول)(Waters & McCutchan, 1990).

با وجود موارد ذکر شده، rRNA یک هدف خوب برای آزمایش PCR با حساسیت بالا می‌باشد. تاکنون در مورد جداسازی و تعیین هویت مولکولی مایکوپلاسما پوتری فاسینس از ضایعات بیماری در بز در ایران از تکنیک PCR کمک گرفته نشده است. این کار می تواند در پیشگیری و کنترل بیماری موثر باشد (حسنی طباطبائی و فیروزی، ۱۳۹۰).

طبقه بندی مایکوپلاسماها

مایکوپلاسما در سال ۱۸۹۸ برای اولین بار توسط نوکارد[۲] و روکس[۳] شناسایی گردید. ۶۰ سال بعد, نواک نام مایکوپلاسما را به عنوان نام ژنریک اجرامی که فاقد دیواره سلولی‌اند پیشنهاد کرد (Ozedmir et al. 2005).

از نظر طبقه بندی مایکوپلاسماها اعضای رده مولیکوتس و کوچک ترین یاخته ها از گروه پروکاریوت ها هستند. آنها فاقد دیواره سلولی بوده، دارای غشا سیتوپلاسمی، ریبوزوم و یک مولکول DNA هستند. به دلیل فقدان دیواره در رده مولیکوتس (پوست نرم) طبقه بندی شده‌اند. در این رده یک راسته بنام مایکوپلاسماتالس، و سه خانواده به اسامی مایکوپلاسماتاسه، آکوله پلاسماتاسه[۴] و اسپیروپلاسماتاسه[۵] قرار دارد (قادر سهی و همکاران. ۱۳۸۵).

[2] Nocard
[3] Rox
[4] *Acholeplasmatacea*
[5] *Spiroplasmatace*

خانواده مایکوپلاسماتاسه دارای دو جنس مهم می‌باشد. جنس اول مایکوپلاسماها هستند که بیش از هفتاد گونه از آنها شناسایی شده اند که بسیاری از آنها برای انسان و حیوانات بیماریزا هستند. جنس دوم، اوره آپلاسما هستند که بر اساس هیدرولیز اوره، متمایز می شوند. مایکوپلاسماها اوره آز منفی و اوره آپلاسما اوره آز مثبت می باشند.

خانواده آکوله پلاسماتاسه دارای جنس آکوله پلاسما است، که در این جنس ۱۰ گونه شناخته شده وجود دارد، ولی اهمیت آنها در بیماریزایی دام ها هنوز مشخص نشده است. آنها یکی از آلوده کننده های کشت سلولی و سرم هستند.

خانواده سوم راسته مایکوپلاسماتالس، اسپیروپلاسماتاسه است. جنس اسپیروپلاسما در این خانواده قرار دارد. گونه های موجود در این جنس برای نباتات و بندپایان بیماریزا هستند (شیمی. ۱۳۷۶).

جدول۱: برخی از خصوصیات عمومی مایکوپلاسماها (Sakhaei et al. 2009).

مایکوپلاسما	ویژگی
فاقد دیواره سلولی و پپتید و گلیکان است که توسط غشاپلاسمایی محصور شده است	دیواره سلولی
پلی مورفیک است و به اشکال رشته ای و شاخه ای دیده می شود	شکل سلول
بوسیله تقسیم دو تایی و جوانه زدن	تولید مثل
نیاز به کلسترول واسیدهای چرب با زنجیر بلند برای رشد	متابولیسم
معمولا فاقد حرکت	حرکت
فاقد ضمیمه	ضمیمه
عدم توانایی از اندوسپور	اندوسپور

جدول۲: خصوصیات تفریقی جنس‌های راسته مایکوپلاسماتالس (شریف زاده، ۱۳۸۴)

جنس	میزبان	نیاز به کلسترول	سایر خصوصیات
مایکوپلاسما	حیوانات	+	تعدادی از آنها برای حیوانات بیماری‌زا, PH مناسب برای اینها ۷/۵ و قطر میکروکلنی ها ۰/۶-۰/۱ میلی‌متر است (اوره‌آز منفی).
اورآپلاسما	حیوانات	+	تعدادی از آنها با برخی بیماریها مشاهده می‌شوند, PH مناسب برای رشد آنها ۶, اوره آز مثبت و قطر میکروکلنی‌ها ۰/۵-۰/۰۱ میلی‌متر است. (اصطلاحاً به مایکوپلاسمای T معروف است).
آکوله‌پلاسما	حیوانات, خاک, فاضلاب	-	تعدادی از اینها ساپروفیت و تعدادی با برخی بیماریها در حیوانات مشاهده می‌شوند, قطر میکروکلنی‌ها ۱-۰/۱ میلی‌متر است.
اسپیروپلاسما	گیاهان, حشرات	+	برخی باعث بیماریهایی در گیاهان و حشرات می‌گردند, این باکتریها به اشکال مارپیچی و متحرک مشاهده می‌گردند.
آن‌ائروپلاسما	شکمبه	متغیر	همزیست، بی‌هوازی

	گوسفند و گاو		
ترموپلاسما	چشمه‌های اسیدی داغ	-	ساپروفیت, دمای مناسب رشد ۵۹ درجه سانتی‌گراد و PH مناسب ۲-۱ است.

سه گونه مایکوپلاسمای بیماریزا در انسان، مایکوپلاسما پنومونیه، مایکوپلاسما هومینیس[۶] و اوروپلاسما اوره‌لیتیکوم[۷] هستند که به ترتیب اختلالات تنفسی و یوروجنیتال را به وجود می آورند. بیماری زاترین گونه ها در نشخوارکنندگان، متعلق به شاخه مایکوئیدس است که در دسته اسپیروپلاسما جای گرفته است (Bascunana et al. 1994). اعضا این شاخه که عمدتاً مسئول عفونت های تنفسی هستند. از نظر خصوصیات آنتی ژنتیکی و فنوتیپی، وجه اشتراک زیادی دارند که تمایز و تفکیک آنها را در تست‌های متعارف آزمایشگاهی با چالش رو برو می‌کند.

ژن 16SrRNA

امروزه مشخص شده است که انواع ویژه‌ای از ماکرومولکول‌های سلولی می‌توانند به عنوان کورنومترهای تکاملی عمل نمایند. مطالعه توالی منومرهای سازنده ماکروملکول‌های سلولی نشان داده است که فاصله تکاملی میان دو گونه را می‌توان از تفاوت بین توالی نوکلئوتیدها یا اسیدهای آمینه ماکروملکول‌های هومولوگ موجود در دو گونه اندازه‌گیری کرد. تعداد توالی‌های متفاوت در یک مولکول ویژه با تعداد تغییرات موتاسیونی پایدار تثبیت شده در DNA دو موجود، در جریان تنوع آنان از یک جد مشترک، متناسب می باشد. به خاطر قدمت فرایند پروتئین سازی و نقش اساسی ریبوزوم در آن، به نظر می رسد که مولکول RNA ریبوزومی بهترین مولکول‌ها برای تعیین روابط میان باکتری ها باشند، زیرا مولکول‌های rRNA بسیار قدیمی هستند، از نظر عملکرد ثابت می باشند، به طور جهانی در میان باکتری ها گسترده‌اند و به طور نسبتاً خوبی در طول فواصل تکاملی بدون تغییر باقی مانده‌اند، همچنین به آسانی و حتی بدون کلون کردن قابل خالص سازی از موجودات هستند (شریف زاده، ۱۳۹۴).

استفاده از 16SrRNA به عنوان ابزار فیلوژنتیکی اولین بار در سال ۱۹۷۰توسط کارل ووس[۸] در ایالت شیکاگو پایه گذاری گردید. ژن 16SrRNA به دلیل شباهت‌های قابل توجه در بین گونه‌ها و حتی در میان جنس مورد توجه بیشتری قرار گرفته که با تکثیر، تعیین توالی و یا استفاده از پروب، امکان شناسایی ارگانیسم فراهم شد. امروزه بررسی ارتباط های فیلوژنی مولیکوت‌ها بر روی مناطق ریبوزومی RNA که بسیار حفاظت شده است، متمرکز گردیده است. این مناطق حفاظت شده به نسبت کل ژنوم مایکوپلاسما، بسیار کمتر دستخوش تغییر می‌شوند. ویسبرگ[۹] در مطالعه‌ای توالی کامل ژن 16SrRNA را در بالغ از ۴۰ گونه مولیکوت‌ها و باکتری‌های دیواره‌دار تعیین کرد. این تحقیقات نشان داد که مولیکوت‌ها در گروه استرپتوکوکوس، لاکتوباسیل و باسیل که باکتری های G^+ با محتوای اندک G+C هستند, قرار می‌گیرند و از نیاکان کلستریدیوم ها مشتق شده اند (شریف زاده، ۱۳۹۴;European Pharmacopeia. 2002).

[6] *Mycoplasma hominis*
2AURUPLASMAAAURHLYTYKUM
[8] . Carl woese
[9] . Weisburg

متابولیسم

مایکوپلاسماها بی‌هوازی‌های اختیاری هستند. بعضی به صورت مطلوب در اتمسفری با ۱۰-۵ ٪CO_2 رشد می‌کنند. مایکوپلاسماهای بی‌هوازی غیر پاتوژن در شکمبه گوسفند و گاو یافت می‌شود (Adehan et al. 2007). پروکاریوت، با زندگی آزاد بوده و عموماً کند رشد هستند. مایکوپلاسماها در دو گروه فیزیولوژیک وسیع الطیف تخمیری و غیر تخمیری قابل تقسیم بندی هستند. در ارگانیسم‌های تخمیری ،آدنوزین تری فسفات ATP در مسیر گلیکولیز حاصل می شود اما در مایکوپلاسماهای غیر تخمیری، مسیر آرژنین دی هیدرولاز احتمالا منبع اصلی برای تولیدATP می باشد. آنزیم ATPase در همراهی با غشاء سلول در تمام مایکوپلاسماها وجود دارد. اغلب آنزیم‌هایی که در بیوسنتز لیپید مایکوپلاسما شرکت دارند نیز متصل به غشاء هستند (Kheirkhah et al. 2011).

فاکتورهای بیماریزائی

بیشتر مولیکوتس‌ها زندگی همزیستی دارند و در بسیاری از بندپایان به عنوان همزیست یافت می‌شوند (Hackett & Clark, 1989). عفونت با مایکوپلاسماهای پاتوژن به ندرت به صورت حاد رخ می‌دهد و عمدتاً به صورت مزمن می‌باشد. در حقیقت مایکوپلاسماها نوعی زندگی انگلی داشته و معمولاً با میزبان‌هایشان زندگی هماهنگی دارند. اخیراً تا اندازه‌ای انگیزه مرور بحث‌ها در مورد نقش مایکوپلاسماها در بیماری های به اتیولوژی (سبب شناسی) انواع بیماری های ناشناخته که مرتبط با مایکوپلاسماها هستند برمی‌گردد. امکان نقش داشتن مایکوپلاسماها به عنوان کوفاکتور در بیماریزایی ایدز و بیماری‌های دیگر که از نظر سبب شناسی هنوز مبهم هستند مثل سندرم خستگی مزمن[10] و آرتریت های مختلف وجود دارد. درحالی‌که ارتباط مایکوپلاسماها با بسیاری از این بیماری ها مشکوک باقی مانده، امکان تأثیر مایکوپلاسماها در ایجاد ضایعات ایدز توجه بسیاری را در دهه‌های اخیر به خود جلب کرده است. مطالعات معتبر انجام شده درباره مایکوپلاسماهای مرتبط با ایدز به طور قابل ملاحظه‌ای دانش بشر درباره بیولوژی سلولی مایکوپلاسما و تعدیل سیستم ایمنی توسط این باکتری را ارتقاء داده است هرچند که نقش مایکوپلاسماها در فعال سازی ایدز هنوز بحث‌انگیز و مبهم می‌باشد(Brenner et al. 1996).

اساس مولکولی بیماری‌زایی مایکوپلاسما تا حد زیادی بحث انگیز باقی مانده است تصویر بالینی عفونت های مایکوپلاسمایی در انسان‌ها و حیوانات بیشتر دلالت بر ارتباط با پاسخ های ایمنی و التهابی میزبان دارد تا اثرات سمی مستقیم به وسیله ترکیبات سلولی مایکوپلاسمایی. بیماری‌زائی مایکوپلاسماها با توکسین‌های بسیار موثر آنها مرتبط نیست. محصولات توکسیک تولید شده از طریق متابولیسم مایکوپلاسماها به نرمی و ملایمت تولید می‌شوند مثل پراکسید هیدروژن و رادیکال های سوپراکسید که به عنوان عامل خطر یا عامل آسیب اکسیداتیو به غشاهای سلولی میزبان شناخته شده‌اند. آمونیوم آزاد شده از اوره هیدرولیز شده به وسیله اوره‌آز موثر اوره‌آ پلاسما ممکن است به عنوان یک فاکتور بیماری‌زائی تلقی شود که احتمالاً بلافاصله بر روی بافت‌های مجاور اوره‌آ پلاسماها تاثیر می‌گذارند (Ligon & Kenny, 1991).

فاکتور بیماری زای دیگری که مرتبط با عفونت اوره‌آ پلاسمایی می‌باشد به وسیله کیم و همکارانش مطرح شده است. آنها دریافتند که کاهش قابل توجه در تولید پروستاگلاندین E_2، $F_2\alpha$ به وسیله سلول های اندومتریال گاوی که عفونت رایج از طریق اوره‌آپلاسما دایورسوم[11] گاوی می‌باشد صورت می‌گیرد. پروستاگلاندین‌ها برای پیوند و پایداری بارداری‌ها ضروری

1. Chronic fatigue
2 Aureaplasmadayursum

هستند. اوره‌آ پلاسماها قادرند که تولید پروستاگلاندین‌ها را مختل کنند که احتمالاً از طریق فعالیت فسفولیپازهای A_2 موثر بر آنها این عمل صورت می‌گیرد (Kim et al. 1994).

طبقه بندی شاخه مایکوئیدس

اعضا این شاخه شامل مایکوپلاسما مایکوئیدس مایکوئیدس کلونی کوچک (MmmSC) مایکوپلاسما مایکوئیدس مایکوئیدس کلونی بزرگ (MmmLC) مایکوپلاسما کاپری کولوم کاپری پنومونی (Mccp), مایکوپلاسما کاپری کولوم کاپری کولوم (Mcc), مایکوپلاسما مایکوئیدس کاپری (Mmc), سروتیپ ۷ سویه گاوی(M.bsg7) مایکوپلاسما پوتری فیکنس[۱۲]، مایکوپلاسما کووتی[۱۳]، مایکوپلاسما یستی[۱۴] می باشند. دو گونه آخر جز مایکوپلاسماهای ساپروفیت اند که بیماریزایی آنها در شرایط عادی در نشخوارکنندگان نامعلوم است و پوتری فیکنس از مبتلایان به سندروم نقص ایمنی انسان نیز جدا شده است (Pettersson et al. 1996).

خسارات اقتصادی ناشی از بیماری زایی و حضور اعضا این شاخه در نشخوارکنندگان، از اهمیت زیادی برخوردار است، که از مهمترین معضلات مطرح اقتصادی در صنعت دامپروری در آفریقا و اخیراً در اروپاست که برای سالیان متمادی کشورهای زیادی را درگیر کرده است (Ozedmir et al. 2005).

روش‌های تشخیص آزمایشگاهی مایکوپلاسما

جهت شناسایی مایکوپلاسماها روش های مختلفی وجود دارد که در زیر به آنها اشاره خواهیم کر:

۱. کشت میکروبی
۲. بررسی خواص مورفولوژیکی مانند رنگ آمیزی
۳. بررسی خواص متابولیکی و بیوشیمیایی مانند الکتروفورز پروتئین‌های سلول، بتاگلوکوزیداز (برای آکوله پلاسماها) و فرمانتاسیون قندها
۴. روش‌های سرولوژیک
۵. روش‌های مولکولی

آزمایش‌های سرولوژیک مایکوپلاسماها

الف-آزمایش ممانعت از رشد میکروارگانیسم توسط سرم ویژه آزمایش ممانعت از رشد که برپایه جلوگیری از رشد در آگار در اطراف دیسک اشباع شده با آنتی سرم مخصوص است . این آزمایش اختصاصی ترین روش سرولوژیکی بوده و بیشترین استفاده را برای شناسایی گونه های مایکوپلاسما دارد . هر چند برای این کار سرم خیلی قوی نیاز است که البته همیشه نمی تواند در دسترس باشد .

ب- آزمایش ایمونوفلورسانس که این روش بر پایه شناسایی کلنی های مایکوپلاسما برروی آگار به وسیله آزمایش مستقیم یا غیر مستقیم آنتی بادی فلورسانس است .آزمایش ایمونوفلورسانس شاید سریع ترین آزمایش برای تشخیص باشد . در ضمن ثابت شده است این آزمایش بسیار اختصاصی و تنها آزمایشی است که توانایی تشخیص بین یک سری کلنی های مخلوط از

[12] *Mycoplasma putrificans*
[13] *Mycoplasma cowetti*
[14] *Mycoplasma yeasti*

سروتایپ های مختلف در پلیت های مشابه را می دهد . این موضوع بیشترین اهمیت را در کنترل خلوص کلنی یا در نمونه های کلینیکی در مواردی که نمونه حاوی بیش از یک گونه یا سروتیپ باشد ، را دارد .سایر روش های سرولوژیک مانند پادتن مونوکلونال ، آزمایش ثبوت مکمل[۱۵] ، ایمونودیفیوژن ، آگلوتیناسیون مستقیم و غیر مستقیم ، ایمونوپراکسیداز، الایزا[۱۶] و بررسی میزان عیار آنتی بادی در سرم نیز می تواند مورد استفاده قرار گیرد (حسنی طباطبائی و همکاران ۱۳۹۰).

مروری بر پیشینه‌ی تحقیق

تحقیقات انجام شده در خارج کشور

در یک پژوهشی تحت عنوان استفاده از یک روش اختصاصی (PCR) برای جداسازی مایکوپلاسماپوتری‌فاسینس، یکی از عوامل بیماری آگالاکسی واگیردار در بزها که در سال ۲۰۰۳ انجام شد موفق به شناسایی مایکوپلاسماپوتری‌فاسینس به روش PCR شدند که تا آن زمان بر اساس ایزوله‌ها وتکنیک‌های شناسایی‌که محدودیت‌هایی‌داشتندانجام‌می‌گرفت. این‌تکنیک‌جدید (PCR) برای تشخیص سریع‌گونه های مایکوپلاسماپوتری‌فاسینس به عنوان‌یک روش بهتر برای شناخت و شیوع عفونت‌های ایجاد شده توسط مایکوپلاسماپوتری‌فاسینسمفید خواهد بود (Peyread et al, 2003[۱۷]).

در سال ۲۰۰۹ شیوع مایکوپلاسما کاپریکولوم کاپریکولوم و مایکوپلاسما پوتری فاسینس را در بزها درمنطقه پیشین بلوچستان پاکستان بررسی‌کردند ۴۰گله بز در منطقه پیشین بلوچستان پاکستان برای موارد مسری ذات الریه در بز در سال ۲۰۰۸ مورد بررسی قرار گرفتند.۳۰ راس بز مشکوک به CCPP[۱۸] پس از اتمام معاینه بر اساس علائم تنفسی مطالعه شدند. این ۲ سویه از گونه های مایکوپلاسما توسط آزمایش مهار رشد و واکنش زنجیره ای پلی مراز مورد شناسایی قرار گرفتند.۱۲ نمونه مایکوپلاسما کاپریکولوم کاپریکولوم از سواب بینی و ۱۲ نمونه از سواب‌های ریه جدا شد. در حالی که تنها ۲نمونه مایکوپلاسماپوتری‌فاسینس از سواب‌های بینی و ۱ نمونه از سواب‌های ریه جدا شد.محل زندگی این مایکوپلاسما شناخته نشده و تزریق تعداد کمی از این میکروب به اندازه ۵۰ عدد در داخل پستان برای ایجاد ورم پستان کافی است.ورم پستان حاصل علائم بالینی جز کاهش شیر و پیدایش یاخته‌های التهابی در آن همراه نیست. فقط کارتیه تزریق شده مبتلا می شودو پس از بهبود آن قطعه پستان لااقل تا ۱ سال در برابر آلودگی مجدد ایمن می باشد (Awan et al.2009)[۱۹]

درتحقیقی که بوسیله رودریگز[۲۰] در ۱۹۹۷درامریکا صورت‌گرفت از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز PCRهمراه با الگوهای هضم محدود شده با اندونوکلئاز برای مایکوپلاسماپوتری‌فاسینس استفاده شد. PCR انجام شدومحصولات بوسیله ژل الکتروفورز و اولتراویولت بررسی شدند. DNAبوسیله آنزیم های محدودکننده هضم گردید و ومحصولات بوسیله ژل الکتروفورزبررسی شد. این‌تست‌هاشباهت‌آشکاربین‌محصولات‌حاصل‌ازPCRمایکوپلاسماپوتری‌فاسینس وسایر مایکوپلاسماها را نشان می دهد و همچنین سکانس16SrRNA مایکوپلاسماپوتری‌فاسینس دارای همولوژی بالایی با سکانس 16SrRNA اعضاء مایکوپلاسمامایکوئیدس است .

---

[15] . Complement fixetion test

[16] .Enzym linked immunosorbant assay (ELISA)

Peyread [17]۱

۲-Contagious caprin pleura pneumonia

3awan

[20] Redriguez

تحقیقات انجام شده در ایران

قادرسهی و همکاران در یک طرح تحقیقاتی تحت عنوان شناسایی مایکوپلاسما آگالاکیته و دیگر عوامل مسبب آگالاکسی در گوسفند و بز بوسیله PCR و کشت در ایران که در سال ۱۳۸۵ در موسسه واکسن وسرم سازی رازی انجام شده است، جهت دسترسی به بذر عوامل‌مایکوپلاسمائی بیماری آگالاکسی‌گوسفند و بز، حدود ۲۰۰۰ نمونه را تحت آزمایش PCR وکشت قرار دادند. این تحقیق در ۱۷ استان‌کشور انجام شده است. نمونه‌های ذکر شده از حیوانات سالم و بیمار اخذ شده است و شیر، سوآب چشمی و مایع مفصلی به عنوان نمونه استفاده شد. از نمونه اصلی PCR صورت گرفته و سپس کشت نمونه‌ها مورد مطالعه قرار گرفت. در این طرح برای انجام PCR از آغازگرهایی که قادر به شناسایی وتکثیر قطعه‌ای از ژن ۱۶srRNAهستند استفاده شده و پرایمرهای شناسائی عمومی مایکوپلاسماها شامل پرایمر MGSO-GPOکه‌محتوی ۷۱۵جفت‌نوکلئوتید بوده و پرایمرهای شناسائی جنس مایکوپلاسما آگالاکتیه شامل‌پرایمر FS1-FS2 که شامل ۳۷۵ جفت نوکلئوتید می‌باشنددر این تحقیق‌مورد استفاده قرارگرفته‌اند. محققین این طرح مدعی هستند که مایکوپلاسما آگالاکتیه عامل اصلی ایجاد این بیماری بوده و سویه‌های دیگری غیر از مایکوپلاسما آگالاکتیه (۳۱٪) مانند مایکوپلاسمامایکوئیدس(۲۵٪) ، مایکوپلاسماکاپریکولوم (۲۲٪) و مایکوپلاسما پوتریفیسنس (۵٪) نیز در این بیماری دخیل هستند (قادرسهی و همکاران، ۱۳۸۵)

در تحقیقی که توسط خیرخواه و همکاران صورت گرفت جداسازی و تعیین هویت مولکولی عامل بیماری آگالاکسی (مایکوپلاسما آگالاکتیه) در بزهای مبتلا به بیماری آگالاکسی به روش کشت و PCR در استان کرمان صورت گرفت. از ۵۷ نمونه‌ی اخذ شده، در ۳۱ نمونه جنس مایکوپلاسما تائید شده که باند اختصاصی ۱۶۳ جفت باز را روی ژل آگارز نشان دادند. از موارد مثبت جنس، در۱۹مورد گونه‌ی آگالاکتیه مثبت بودند و باند ۳۷۵ جفت باز مشاهده گردید. سپس بر روی جدایه‌های حاصله PCR بر اساس ژن هدف لیپوپروتئین انجام گرفت و محصول PCR خالص سازی و تعیین توالی گردید. درادامه با استفاده از برنامه‌ی نرم‌افزاری Bio Edit (Clustal W) هم‌ردیف‌کردن توالی‌ها انجام شد و این توالی‌ها با توالی مایکوپلاسما آگالاکتیه‌های موجود در بانک ژن مقایسه گردید. سپس ماتریکس شباهت توالی‌ها ارائه شد و با استفاده از نرم افزار MEGA (Ver. 5.04) و با روش Neighbor-joining درخت فیلوژنتیک رسم گردید. نتایج این تحقیق جداسازی مایکوپلاسما آگالاکتیه از بزهای مبتلا را برای اولین بار در ایران تأیید نمود. همچنین عوامل بیماری از لحاظ تشابه ژنتیکی در دو دودمان کاملا مجزا واقع شدند و بین کلیه جدایه‌های هر دو دودمان باکتری با سویه‌ی واکسینال مایکوپلاسما آگالاکتیه مورد استفاده در مؤسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی تشابه ژنتیکی ناچیری وجود دارد (خیرخواه و همکاران، ۱۳۹۰).

طرز تهیه محیط کشت اختصاصی انتقالی برای مایکوپلاسما

مواد لازم:

محیط کشت اختصاصی مایکوپلاسما به دو شکل براث یا آب گوشت PPLO و محیط آگار پلیت PPLO می باشد که تفاوت آن ها در عدم وجود آگار در محیط کشت براث است.

جدول۳: ترکیبات محیط کشت آبگوشت PPLO (Swayne et al. 1998)

محیط	اجزای تشکیل دهنده	مقدار
PPLO آبگوشت	آبگوشت PPLO بدون کریستال ویوله	۷/۱۴ گرم
	گلوکز	۱۰ گرم
	سرم اسب یا خوک	۱۵۰ میلی گرم
	عصاره تازه مخمر	۱۰۰ میلی گرم
	هیدروکلراید سیستئین	۰/۱ گرم
	نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید NAD	۰/۱گرم
	فنل رد (۱٪)	۲/۵ میلی گرم
	استات تالیوم (۱۰٪)	۵-۲/۵ میلی گرم
	پنی سیلین جی پتاسیم	$۱۰^{۶}$ واحد بین المللی
	آب مقطر	۱۰۰۰ میلی لیتر

واکنش PCR جهت شناسایی جنس مایکوپلاسما

الف- مخلوط PCR برای جنس مایکوپلاسما

در این تحقیق ابتدا بر روی DNA استخراج شده هر یک از نمونه ها واکنش PCR جهت شناسایی جنس مایکوپلاسما بر اساس برنامه نوشته شده در جدول(۴) انجام شد.در مرحله بعد اگر نمونه ها مثبت بودند واکنش PCR جهت شناسایی کلاستر مایکوئیدس انجام شد.

پس از ساختنMaster mix بر اساس فرمول مخصوص جنس مایکوپلاسما مخلوط را داخل میکروتیپ ها پخش کرده و پس از ورتکس و اسپین داخل دستگاه ترموسیکلر قرار می دهیم.

جدول ۴: مخلوط PCR برای جنس مایکوپلاسما

PCR buffer	2/5 µL
$Mgcl_2$	2 µL
dNTPs	0/5 µL
Primers	0/1+0/1 µL
Taq	0/25 µL
total	5/45 µL

25 – 5/45 = 19/55(DNA+ H_2O) DNA: 2 µL H_2O : 19/55-2= 17/55

ب- برنامه سیکل حرارتی جنس مایکوپلاسما در دستگاه ترموسایکلر

پس از آماده شدن نمونه، مخلوط حاصل در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر به دستگاه ترموسایکلر (آلمان ، Gradient Masterrcycler (Eppendorf که از قبل روشن شده و درجه حرارت آن برای مراحل مختلف تنظیم گردیده بود، انتقال

داده شد. برنامه تنظیم درجه حرارت و زمان برای انجام مراحل PCR جنس مایکوپلاسما بـا اسـتفاده از پرایمرهـای جلـودار و برگشتی بر اساس جدول (۵) انجام شد (Kojima et al, 1997).

جدول ۵: برنامه تنظیم درجه حرارت و زمان برای انجام مراحل PCR جنس مایکوپلاسما (Kojima et al, 1997).

Mycoplasma 30 cycle					
Stage					
Temperature	**94**	**94**	**56**	**70**	**72**
Time	**7/5min**	**30sec**	**30sec**	**1min**	**5min**

واکنش PCR جهت شناسایی کلاستر مایکوئیدس

الف- مخلوط PCR کلاستر مایکوئیدس

پس از مثبت شدن جنس مایکوپلاسما واکنش PCR جهت شناسـایی کلاسـتر مایکوئیـدس بـر اسـاس برنامـه ذکـر شـده در جدول(۶) انجام شد. در مرحله بعد اگر نمونه ها مثبت بودند واکنش PCR جهت شناسایی گونه مایکوپلاسما پـوتری فاسـینس انجام شد.

پس از ساختنMaster mix بر اساس فرمول مخصوص کلاستر مایکوئیدس مخلوط را داخل میکروتیپ ها پخش کرده و پـس از ورتکس و اسپین داخل دستگاه ترموسیکلر قرار می دهیم.

جدول ۶: مخلوط PCR برای کلاستر مایکوئیدس

PCR buffer	**2/5 µL**
$Mgcl_2$	2 µL
dNTPs	0/2 µL
Primers	0/2 +0/2 µL
Taq	0/2 µL
total	5/3 µL

25 – 5/3 = 19/7(DNA+ H_2O) DNA: 2 µL H_2O : 19/7-2= 17/7

ب- برنامه سیکل حرارتی در دستگاه ترموسایکلر

پس از آماده شدن نمونه، مخلوط حاصل در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر به دستگاه ترموسایکلر که از قبل روشـن شـده و درجـه حرارت آن برای مراحل مختلف تنظیم گردیده بود، انتقال داده شد و انجام PCR با درجه حرارت و زمان مناسب برای کلاسـتر مایکوئیدس براساس جدول (۷) انجام گردید.

جدول ۷: برنامه تنظیم درجه حرارت و زمان برای انجام مراحل PCR کلاستر مایکوئیدس (Bascunana et al. 1994)

Mycoplasma mycoides 30cycle					
Stage					
Temperature	**95**	**95**	**62**	**72**	**72**
Time	**4min**	**45sec**	**1min**	**2min**	**4min**

واکنش PCR جهت شناسایی گونه مایکوپلاسما پوتری فاسینس

الف- مخلوط PCR مایکوپلاسما پوتری فاسینس

پس از مثبت شدن جنس مایکوپلاسما و کلاستر مایکوئیدس واکنش PCR جهت شناسایی گونه مایکوپلاسما پوتری فاسینس بر اساس برنامه ذکر شده در جدول (۸) انجام شد.

پس از ساختنMaster mix بر اساس فرمول مخصوص گونه مایکوپلاسما پوتری فاسینس مخلوط را داخل میکروتیپ ها پخش کرده و پس از ورتکس و اسپین داخل دستگاه ترموسیکلر قرار می دهیم.

جدول ۸: مخلوط PCR برای گونه مایکوپلاسما پوتری فاسینس

PCR buffer	2/5 µL
$Mgcl_2$	2 µL
dNTPs	0/2 µL
Primers	0/2 +0/2 µL
Taq	0/2 µL
total	5/3 µL

25 – 5/3 = 19/7(DNA+ H_2O) DNA: 2 µL H_2O : 19/7-2= 17/7

ب- برنامه سیکل حرارتی مایکوپلاسما پوتری فاسینس در دستگاه ترموسایکلر

پس از آماده شدن نمونه، مخلوط حاصل در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر به دستگاه ترموسایکلر که از قبل روشن شده و درجه حرارت آن برای مراحل مختلف تنظیم گردیده بود، انتقال داده شد و انجام PCR با درجه حرارت و زمان مناسب برای مایکوپلاسما پوتری فاسینس براساس جدول (۹) انجام گردید.

جدول ۹: برنامه تنظیم درجه حرارت و زمان برای انجام مراحل PCR مایکوپلاسما پوتری فاسینس (Peyroud et al. 2003)

Mycoplasma putrefasines 35 cycle					
Stage					
Temperature	**94**	**94**	**52**	**72**	**72**
Time	**3min**	**15sec**	**15sec**	**15sec**	**5min**

بررسی محصولات PCR

الکتروفورز روشی که بررسی محصولات PCR را بطور کیفی یا نیمه کمی، وجود یا عدم وجود و یا مقدار تولید محصول را با استفاده از آن مورد ارزیابی قرار می‌دهد. در این مطالعه از الکتروفورز برروی ژل آگارز و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید استفاده گردید. پس از پایان مرحله الکتروفورز، در دستگاهUV Transilluminator تصویربرداری و قرائت صورت پذیرفت.

طرز تهیه بافر TBE جهت ساخت ژل الکتروفورز

برای ساخت بافرx ۲۵، مواد مورد نظر شامل:Tris base,Acetic acid,EDTA,DDWرا بر اساس مقادیر ذکر شده در جدول (۱۰) به صورت یکنواخت حل تا شفاف گردد. جهت ساخت ژل الکتروفورز و استفاده در تانک الکتروفورز از بافر ۱x استفاده شد. برای تهیه بافر ۱x، ۴۰سی‌سی از بافر ۲۵xساخته شده را با آب دیونیزه به حجم ۱۰۰۰میلی‌لیتر رسانیده شد و بافر ۲۵x تبدیل به بافر۱x گردید.

جدول ۱۰: مقادیرو مواد لازم جهت تهیه بافر TBE25X (۱۰۰۰CC)

Tris base	**11.2gr**
boric Acid	**28.55gr**
EDTA	**6.3gr**
DDW	**1000cc**

نحوه الکتروفورز محصولات PCR

تهیه ژل

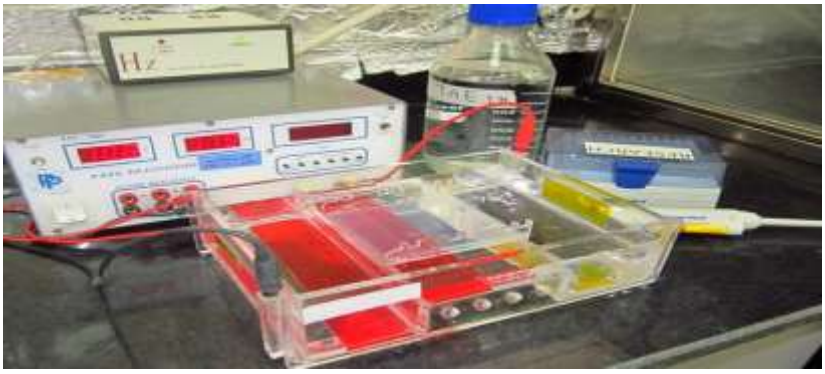
ژل مورد استفاده در این تحقیق دو درصد بوده که با توجه به درصد مورد نظر، پودر آگارز(سیناژن) توزین شده و بافر TBE به آن اضافه شد. (یک گرم پودر آگارز در ۱۰۰ سی‌سی محلول TBE).ابتدا ظرف نگهدارنده ژل و شانه متناسب با نمونه انتخاب و سپس با آب مقطر شستشو شده و بخوبی خشک گردید و سپس دو طرف ظرف نگهدارنده بوسیله نوار چسب پوشانیده شده تا مانع خروج آگارز مایع قبل از بستن و سفت شدن گردد. ظرف نگهدارنده در یک مکان تراز و بدون لغزش قرار داده شده و شانه را درون آن تنظیم کرده تا برای ریختن ژل آماده شود. ارلن محتوی ژل و بافر TBE را در یک مایکروویو قرار داده تا پودر در بافر حل شود و یک محلول شفاف بدست آید. پس از شفاف شدن ژل را سرد کرده و با محلول اتیدیوم بروماید به نسبت ۰/۵ میکروگرم به ازای هر میلی‌لیتر رنگ می‌شود (به علت ایمن نبودن اتیدیوم بروماید این کار بهتر است با دستکش و ماسک صورت گیرد) ژل مذاب را درون ظرف نگهدارنده ریخته تا زمان بستن ژل باید صبر نمود.

جدول ۱۱: مقادیر و مواد لازم برای تهیه ژل آگارز

line	cast	TBE Buffer	Agarose	Ethidium bromide
۱	۷	۲۰	۰/۲	۱
۲	۱۰	۳۰	۰/۳	۱/۵
۳	۱۵	۴۰	۰/۴	۲

تصویر ۱: کست محتوی ژل ساخته شده و وسایل مورد نیاز

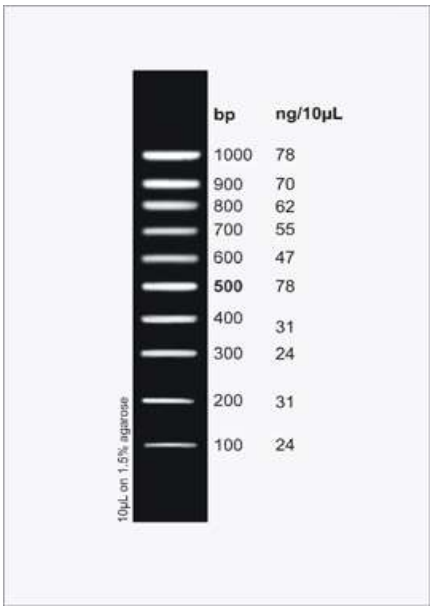
پس از آماده شدن ژل، تانک به وسیلهٔ بافرTBE1x پر گردید به طوری که ۳-۲ میلی‌متر از بافر بالاتر از ژل را بپوشاند سپس شانه قرار داده شده به آرامی خارج گردید. قطر ژل حداکثر ۵ میلی‌متر مناسب است.



تصویر۲: کست محتوی ژل درون تانک الکتروفورز

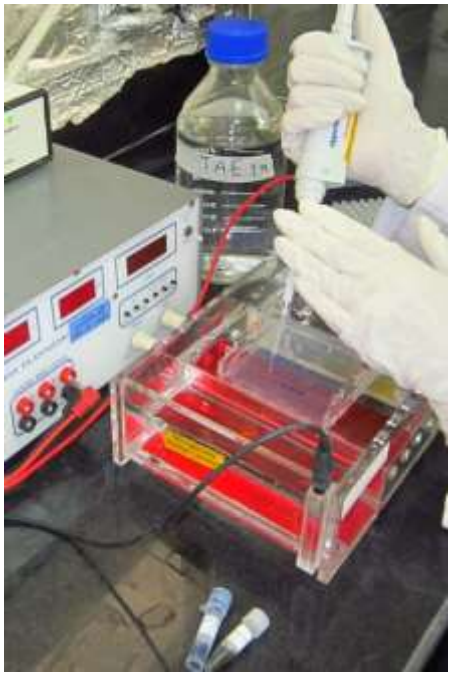
Run کردن نمونه‌ها

محصول PCR به نسبت ۱۰ به ۲ با بافر لودینگ مخلوط شده و این عمل بر روی نوار آلومینیومی انجام گرفت. برای سهولت کار در این تحقیق ۲ میکرولیتر از بافر لودینگ را به تعداد نمونه‌ها روی نوار چسب ریخته بخوبی با سمپلر ابتدا چندین بار پیپتاژ کرده و سپس در حالیکه سمپلر را به صورت عمودی نگهداشته، به آرامی به میزان ۱۰ میکرولیتر از مخلوط حاصله را وارد چاهکهای ایجاد شده در ژل آگارز کردیم . هنگام ریختن مخلوط محصول PCR وبافر لودینگ با دقت بسیاری صورت گیرد به طوری که سر سمپلر نه زیاد در قسمت بالایی چاهک و نه به کف چاهک قرار گیرد تا باعث پاره شدن چاهک نشود. ازبافر لودینگ جهت سنگین شدن محصول PCR و عدم خروج آن از چاهک‌ها استفاده شد. بافر لودینگ دارای ترکیب ۲۵٪ Bromophenol blue، ۰/۲۵درصدXylon cyanol FF، ۴۰٪ Sucrose می باشد. پس از قرار دادن نمونه‌ها و کنترل در داخل چاهک‌ها, مارکر به میزان ۳ میکرولیتر به داخل یکی از گوده‌ها (ترجیحاً چاهک اول) منتقل گردید. مارکر مورد استفاده در این تحقیق Gene ruler DNA Ladder Mix ساخت شرکت Fermentas با فاصلهٔ ۱۰۰ جفت باز از وزن ۱۰۰ تا وزن ۱۳۰۰ جفت باز بود.



تصویر ۳ : Ladder مورد استفاده دراین مطالعه

سپس تانک الکتروفورز را به دستگاه مولد برق وصل نموده و ولتاژ تنظیم شد. ظرف نگهدارنده محتوی ژل طوری درون تانک الکتروفورز قرار داده می‌شود که چاهک‌ها در طرف قطب منفی تانک قرار گیرند. تانک را به جریان متصل کرده و ولتاژ روی ۱۰۰ تا ۱۱۰تنظیم می‌شود و آمپراژ تقریباً نصف آن می‌باشد. پس از یک ساعت ژل بررسی شده و از میزان رنگی که در ژل پیشروی کرده می‌توان زمان مشاهده ژل در دستگاه را تخمین زد.



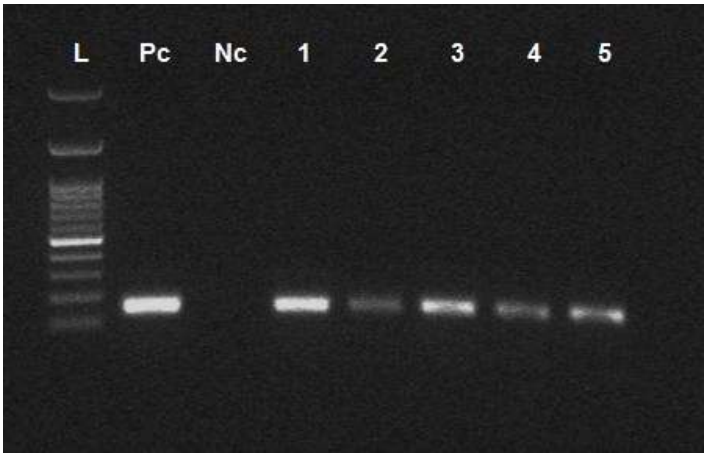
تصویر ۴: نحوه Run کردن نمونه ها

مشاهده و تفسیر ژل و باندها

پس از گذشتن زمان مذکور(۱ ساعت) ژل را از بافر خارج کرده با آب شستشو داده و آن را بر روی صفحه دستگاه UV Transluminator قرار داده و از آن تصویر گرفته شد. پس از انجام عکسبرداری، ذخیره کردن و تهیه پرینت، ژل با دستکش دور انداخته شد. سپس نتایج مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج PCR جنس مایکوپلاسما

تعداد ۵۵ نمونه از شترهای کشتار شده در کشتارگاه تهیه شد. واکنش PCR جنس مایکوپلاسما توسط پرایمر های اختصاصی جنسM1F وM3R از ژن ۱۶S rRNA صورت گرفت. در نتیجه این تست ۹/۱٪ نمونه از نظر جنس آلوده به مایکوپلاسما بودند. باندهای۱۶۳ جفت بازدر ۵ نمونه جنس مثبت مشاهده می‌شود.

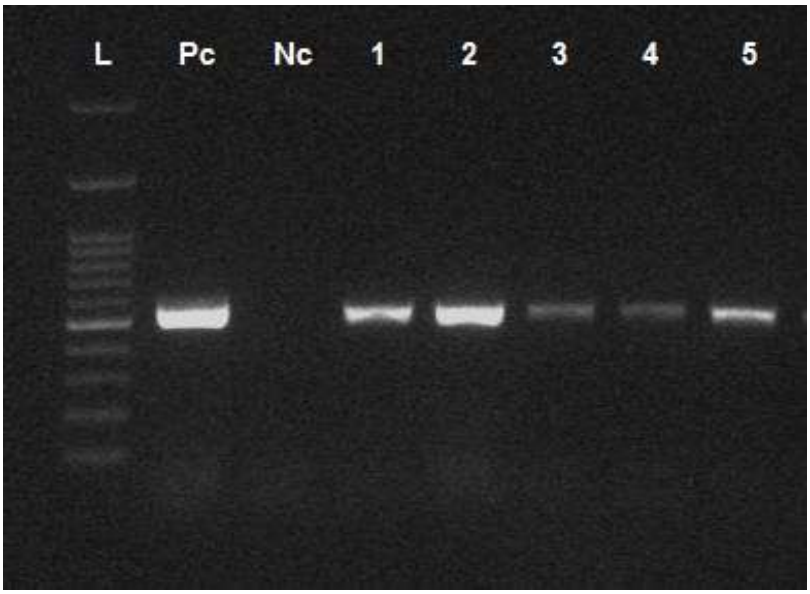


تصویر ۵: ژل الکتروفورز محصول PCR با استفاده از آغازگر اختصاصی جنس مایکوپلاسما

L: Laderer 100bp; PC: Positive Control [M. putrefacines]; NC: Negative Control;, 1-5 suspected samples.

نتایج PCR کلاستر مایکوئیدس

۵ نمونه جنس مثبت از نظر کلاستر مورد بررسی قرار گرفتند. واکنش PCR کلاستر مایکوئیدس توسط پرایمرهای اختصاصی MmcR و MmcF از ژن 16S rRNAصورت گرفت. باندهای ۵۴۸ جفت باز در ۵ (۱۰۰٪) نمونه کلاستر مثبت بودند.

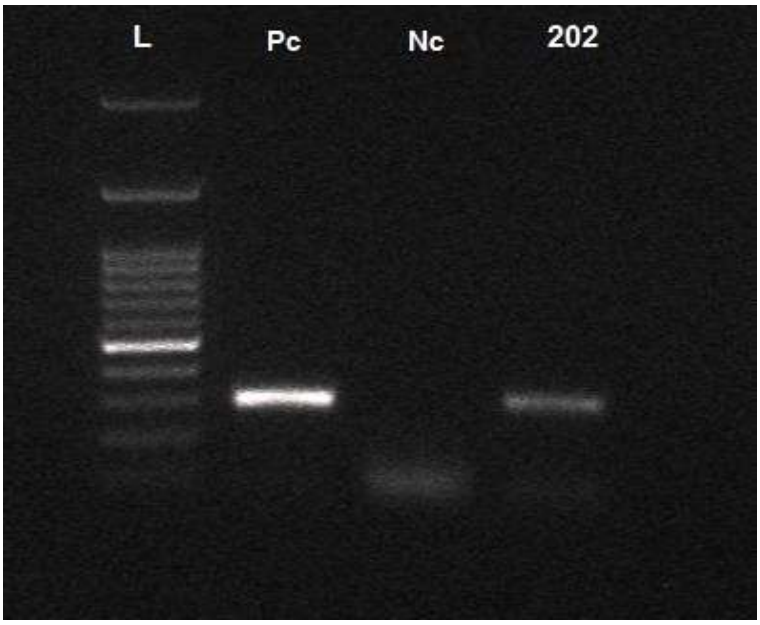


تصویر ۶: تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR با استفاده از آغازگر اختصاصی کلاستر مایکوئیدس

L: Laderer 100bp; PC: Positive Control [M. putrefacines]; NC: Negative Control; 1-5 positive Cluster mycoides.

نتایج PCR گونه مایکوپلاسما پوتری فاسینس

۵ نمونه‌ای که PCR کلاستر آنها مثبت شد از نظر گونه مورد بررسی قرار گرفتند. واکنش PCR گونه مایکوپلاسما پوتری فاسینس توسط پرایمر های اختصاصی گونه Mput1 و Mput2 از ژن لیپوپروتئین صورت گرفت. باندهای مثبت در ۳۱۶ جفت باز مشاهده می‌شود. بر اساس این تحقیق تنها یک نمونه مایکوپلاسما پوتری فاسینس بود که از نمونه ریه شترهای استان کرمان برای اولین بار در کرمان جداسازی گردید.



تصویر ۷: ژل الکتروفورز محصول PCR با استفاده از آغازگر اختصاصی گونه مایکوپلاسما پوتری فاسینس

L: Laderer 100bp; PC: Positive Control [M. putrefacines]; NC: Negative Control; 202 suspected samples.

از ۵۵ نمونه تهیه شده از استان کرمان، در ۵ نمونه جنس مایکوپلاسما تائید شد که از این تعداد همگی نمونه‌ها کلاستر مثبت بودند و تنها ۱ نمونه گونه مایکوپلاسما پوتری فاسینس بود.

بحث و نتیجه گیری

مایکوپلاسما کوچکترین پروکاریوت هایی هستند که توانای همانند سازی را دارند. نداشتن دیواره سلولی ویژگی شاخص این پروکاریوت هاست. مایکوپلاسماها ارگانیسم های اجباری هستند که به شکل ساپروفیت و یا به عنوان انگل در بسیاری از حیوانات و گیاهان یافت می شود (رحیمی و همکاران، ۱۳۹۲). مایکوپلاسماها یکی از عوامل بیماریزای مهم دامی هستند که همه ساله خسارات اقتصادی زیادی به صنعت دام کشور وارد می‌نمایند.

این پژوهش توانست برای اولین بار در کرمان توسط روش مولکولی PCR تشخیص عفونت‌های ناشی از مایکوپلاسماها در شتر را رقم بزند و راه را برای ادامه مسیر در آینده باز کند و نیز این پژوهش سرآغاز تخمینی از وضعیت عفونت در استان کرمان بود. اگرچه در سال های اخیر پژوهش‌هایی در خصوص جداسازی و شناسایی گونه‌های مایکوپلاسماها از دام‌های سالم و بیمار در ایران انجام شده است. (خیرخواه و همکاران،۱۳۹۰؛ قادرسهی و همکاران، ۱۳۸۵؛ Moradi bidhendi et al. 2011)، ولی تاکنون در رابطه با Setup پرایمرها و جداسازی مایکوپلاسماهای شتر به روش مولکولی PCR در کرمان هیچ گونه تحقیقی صورت نگرفته است، ضرورت چنین تحقیقاتی زمانی مشخص می‌گردد که توفیق چندانی در ریشه کنی و حذف بیماری‌های دامی مایکوپلاسمایی حاصل نشده است هرچند که کماکان پیشگیری در راس برنامه‌های کنترل این بیماری قرار دارد.

مایکوپلاسما از جمله باکتری‌هائی است که به سختی از گله‌های آلوده جدا می‌شود و آزمایش‌های معمول جهت تشخیص جنس‌های مایکوپلاسما عمدتاً بر پایه روش‌های کلاسیک مانند تستهای بیوشیمیائی و آزمایشات ایمونوفلورسنت استوار است این روش ها گرچه سودمند می‌باشند اما ممکن است با واکنش های مثبت کاذب همراه باشد (Zendulkova et al. 2007) و مشکلاتی را به همراه دارد که مطرح می شود. لذا استفاده از روش های دقیق تر در سال‌های اخیر مطرح شده است که یکی از آن ها واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) است.

PCR, مشکلات ناشی از روش کشت را هم ندارد و تشخیص را با حساسیت و ویژگی بالایی امکان پذیر می کند. نتایج PCR ظرف یک یا دو روز, (حداقل ۸ ساعت) مشخص می شوند. در حالی که برای کشت و تعیین هویت ارگانیسم یک تا سه هفته زمان نیاز دارد (Persson et al. 1999). هم چنین روش PCR قادر است نتایج دقیقی از حضور عفونت های مختلط با حضور چندین گونه مایکوپلاسما و آلودگی ثانویه با عفونت های باکتریایی را مشخص کند (Kannan et al. 2000; Le Grand et al. 2004).

مهار کننده های رشد مایکوپلاسما مثل آنتی بادی و آنتی بیوتیک, یا سایر عوامل میزبان در نتیجه تست PCR تاثیری ندارد به ویژه مایکوپلاسماهای ساپروفیت که رشد مایکوپلاسمای پاتوژن را در محیط کشت تحت تاثیر قرار می دهند به راحتی از نمونه ها قابل تفکیک می باشند (OIE 2004). نمونه هایی‌که به دلیل شرایط نامناسب نگاهداری از بین رفته باشند. در این روش قابل تشخیص می باشند (Bashiruddin et al. 1999).

با استفاده از روش های ملکولی آزمایشات در تعداد زیاد قابل انجام است که می تواند برای اسکرین کردن گله به کار رود در این روش به راحتی می توان مبتلایان را در مراحل مختلف بیماری و همچنین ناقلین نهفته را مشخص کرد. اما شناسایی

DNA ارگانیسم های غیر زنده ناشی از عفونت های پیشین یا پس از درمان با آنتی بیوتیک, از اشکالات مطرح شده در روش PCR است (Bolske et al. 1996).

بنابراین با PCR می توان با سرعت بیشتر گونه های عامل این بیماری را شناسایی و در نتیجه می توان امکان شروع هر چه سریع تر راه های پیشگیری و درمان آنتی بیوتیکی بیماری را فراهم نمود.

ژن 16SrRNA به دلیل شباهت های قابل توجه در بین گونه ها و حتی در میان جنس مورد توجه بیشتری قرار گرفته که با تکثیر، تعیین توالی و یا استفاده از پروب، امکان شناسایی ارگانیسم فراهم شود. سنجش PCR بر مبنای سکانس های ثابت و مشترک در 16s RNA یک تکنیک مفید، قابل اعتماد با حساسیت، ویژگی و دقت بالایی جهت شناسایی آلودگی های مایکوپلاسمایی در کشت سلول و سایر فراورده های بیولوژیک است (Shahhoseini et al.2008).

در این تحقیق میکروارگانیسم‌هایی با مشخصات مایکوپلاسما از شترها جداسازی شد. تشخیص این جدایه‌ها به روش PCR صورت گرفت. در این تحقیق بنا به دلائل زیر از روش کشت و PCR جهت جستجوی عامل مایکوپلاسمائی بیماری استفاده شد:

۱- استفاده از روش‌های ایمونولوژیکی برای جستجوی مایکوپلاسما نسبت به روش های دیگر کمتر توصیه می‌شود زیرا در روش های سرمی نیاز به افزایش عیار پادتن است که ۴۰-۱۰ روز پس از آغاز علائم درمانگاهی بوجود می‌آید. ضمن اینکه در دوره‌ی کمون نیز نمی‌توان به جستجوی مایکوپلاسما پرداخت. واکنش های متقاطع سرمی نیز یک مشکل جدی است که حساسیت این واکنش را بیشتر تحت تأثیر قرار می‌دهد (Assuncao et al,2004; De la fe et al, 2006).

۲- استفاده از روش های کشت به تنهایی اولاً نیازمند دوهفته یا بیشتر زمان انکوباسیون است ثانیاً برای تشخیص گونه نیاز به رنگ‌آمیزی‌های متعارف (دینس و...) و تستهای آزمایشگاهی (بیوشیمیائی و.....) است که از دقت و حساسیت بالائی برخوردار نیستند و احتمال خطا در این گونه تست‌ها بالا است.

این تحقیق روش PCR را یک تست سریع و اختصاصی جهت شناسایی مایکوپلاسما پیشنهاد می‌کند. در این پژوهش از واکنش PCR که یکی از روش های پیشرفته در تشخیص عوامل میکروبی است، استفاده گردید. در پژوهش های مشابهی که در سایر نقاط دنیا صورت گرفته پیشنهاد یک روش مناسب برای تشخیص دقیق‌تر مایکوپلاسما همواره مد نظر بوده است (Roy et al, 2010; Tola et al, 1997). در بسیاری از این تحقیقات عنوان شده است که PCR از تست‌های معمول سریع‌تر است و می‌تواند به عنوان یک روش قابل اعتماد در جداسازی مایکوپلاسما از دام‌ها بکار رود(Tola et al. 1997) .

قادر سهی و همکاران در یک طرح تحقیقاتی تحت عنوان شناسایی مایکوپلاسما آگالاکتیه و دیگر عوامل مایکوپلاسمایی مسبب بیماری در گوسفند و بز به وسیله PCR و کشت در ایران که در سال ۱۳۸۵ در موسسه واکسن و سرم سازی رازی انجام شده است. جهت دسترسی به بذر عوامل مایکوپلاسمایی بیماری آگالاکسی گوسفند و بز حدود ۲۰۰۰ نمونه را تحت آزمایش PCR و کشت قرار دادند. این تحقیق در ۱۷ استان کشور انجام شده است. نمونه های ذکر شده از حیوانات سالم و بیمار اخذ شده است و شیر، سوآپ چشمی و مایع سینویال مفصلی به عنوان نمونه استفاده شد. از نمونه اصلی PCR صورت گرفت و سپس کشت نمونه ها مورد مطالعه قرار گرفت. در این طرح برای انجام PCR از آغازگرهایی که قادر به شناسایی و تکثیر قطعه ای از ژن 16SrRNA هستند استفاده شده و آغازگرهای شناسایی عمومی مایکوپلاسماها شامل آغازگر MGSO-GPO که محتوای ۷۱۵ جفت نوکلئوتید بوده و آغازگر شناسایی گونه مایکوپلاسما آگالاکتیه شامل آغازگرهای FS1 و FS2 که شامل ۳۷۵ جفت نوکلئوتید می باشد مورد استفاده قرار گرفته اند (قادرسهی و همکاران، ۱۳۸۵).

خیرخواه و همکاران در مطالعه‌ای که در استان کرمان بر روی ۳۰۰ راس بز با روش PCR و استفاده از ژن 16SrRNA انجام شد، نشان دادند که مهمترین عامل بیماری آگالاسی واگیر در این استان مایکوپلاسما آگالاکتیه است، نتیجه این مطالعه همچنین نشان داد که از ۵۷ نمونه مورد بررسی ۹ نمونه کلنی تخم مرغی شکل در محیط آگار ایجاد کردند، PCR با 16SrRNA مایکوپلاسمایی برای شناسایی گونه های متفاوت به کار برده شد، شناسایی ژن توسط PCR در ۳۱ نمونه مثبت بود که از این تعداد ۱۹ تا برای آگالاکتیه مثبت بود. [kherirkhah et al. 2011]

شاه حسینی و همکارانش در سال ۱۳۸۷ با مطالعه بر روی مایکوپلاسماها در نمونه های کشت سلولی و سایر فراورده های بیولوژیک با استفاده از پرایمرهای مخصوص جنس SHAH-GPO-3 و MGSO و گونه های استاندارد، روش PCR را از جهت حساسیت و ویژگی بررسی کردند. سپس از کشت سلولی DNA استخراج و با PCR آزمایش کردند. محصول تکثیری کلون و تعیین هویت گردید. که روش حساسی از PCR را تهیه و جهت تشخیص جنس مایکوپلاسما در آلودگی های فراورده های بیولوژیک توسعه دادند. ژن 16SrRNA به دلیل داشتن سکانس های مشترک و ثابت به عنوان ژن هدف جهت تکثیر با پرایمرهای تغییر یافته قرار گرفت. این روش حساس توسعه داده شده، با محصولی به اندازه ی 272bp، دارای حساسیتی در حد ۱۰ کپی از DNA ژنوم هدف بوده و با DNA بسیاری از میکروارگانیسم ها، رده های سلولی انسانی، واکنش متقاطع نداشته که پرایمرها دارای حساسیت و ویژگی فوق العاده بالایی بودند. که نتیجه این کار نشان داد که سنجش PCR بر مبنای سکانس های ثابت و مشترک موجوددر 16SrRNA یک تکنیک مفید، قابل اعتماد با حساسیت، ویژگی و دقت بالایی جهت شناسایی آلودگی مایکوپلاسمایی در کشت سلولی و سایر فراورده های بیولوژیک است (shahhoseini et al.2008).

Assunc¸ao و همکارانش در سال ۲۰۰۴ در جزایر کاناری با روش های سرمی به بررسی عوامل بیماری آگالاکسی واگیر دار در بزها پرداخت که یکی از مهم ترین معایب آن فاصله زمانی بین عفونت و شروع پاسخ سرمی قابل تشخیص می باشد که در نتیجه شناسایی عفونت یک تا سه هفته بسته به روش سرولوژی به تأخیر می افتد و نیز استفاده از روش های ایمونولوژیکی برای جستجوی مایکوپلاسما نسبت به روش های دیگر کمتر توصیه می‌شود ضمن اینکه در دوره‌ی کمون نیز نمی‌توان به جستجوی مایکوپلاسما پرداخت. واکنش های متقاطع سرمی نیز یک مشکل جدی است که حساسیت این واکنش را بیشتر تحت تأثیر قرار می‌دهد.

Kumar و همکارانش در سال ۲۰۱۱ در هند به جداسازی مایکوپلاسما کاپریکولوم کاپریکولوم در هند با پرایمرهای مورد استفاده در تحقیق حاضر پرداختند. نتیجه این مطالعه نشان داد که از ۱۰۰۰ نمونه مورد بررسی ۱۱ نمونه مثبت بود.

De la fe و همکارانش در سال ۲۰۰۷ به بررسی مایکوپلاسما کاپریکولوم کاپریکولوم در بزهای مبتلا به بیماری آگالاکسی در جزایر لانزاروت اسپانیا با روش PCR پرداختند، نتیجه این مطالعه و نیز مطالعات Assunc¸ao وGarrido و Gil و Kumar جداسازی کمتر از ۲٪ مایکوپلاسما کاپریکولوم کاپریکولوم از نمونه های مورد بررسی بوده است.

مایکوپلاسما کاپریکولوم کاپریکولوم یک عامل مهم بیماری در بزها است و با وجود اینکه درصد پایینی از آن در بزهای بیمار وجود دارد ولی از آن جا که بیماری زایی شدید داشته و باعث آسیب هایی به بزها می شود (Pilo et al, 2006) و در ایجاد بیماری های آگالاکسی، تنفسی، سپتی سمی و مشکلات اندام حرکتی در این حیوانات نقش دارد (Damassa et al, 1992)، پس کاملا" ضروری است که این باکتری شناخته شده و بیماریزایی آن کنترل شود.

تاکنون کارهای پراکنده زیادی در زمینه شناسایی مایکوپلاسماهای انجام شده و پیشرفت های کمی در توسعه ایمنی ایجاد شده است(Nicholas et al, 2002) ولی به دلیل شباهت‌های و محدودیت انواع ابزارهای در دسترس شیوع آن هرگز نشانه های موفقی نداشته است.

نتیجه گیری

هدف از این مقاله جداسازی و شناسایی مایکوپلاسماهای ریه شترهای استان کرمان به روش PCR بود. نتایج این تحقیق Setup پرایمر اختصاصی مایکوپلاسما و جداسازی برخی از گونه‌های آن را برای اولین بار در کرمان تأیید نمود و نیز توانست برای اولین بار در کرمان شروع روش‌های کشت و PCR برای تشخیص عفونت‌های ناشی از مایکوپلاسما را رقم بزند و نیز این پژوهش سرآغاز تخمینی از وضعیت عفونت در استان کرمان بود.

با وجود پژوهش‌های مختلف انجام شده در جهان در خصوص مایکوپلاسما ، Setup پرایمر و جداسازی این گونه‌ها در شتر تاکنون در کرمان انجام نشده بود. از اینرو با توجه به تفاوت سویه‌های مختلف در بیماریزائی و نیز تفاوت در تمایل باکتری به بافت‌های مختلف Setup و جداسازی آنها ضروری به نظر می‌رسید. بدین منظور پس از جداسازی جنس باکتری، جدایه‌های مثبت جهت انجام PCR باکتری انتخاب شدند.با توجه به نتایج پیشنهادات زیر بیان میشود:

۱- با توجه به تنوع ژنتیکی بالای این جنس بهتر است MultiPlex PCR برای سایر سویه های بیماریزای مطرح در شتر انجام شود.

۲- PCR طبق پروتکل استاندارد جهانی صورت گیرد تا بتوان شباهت‌ها و اختلافات سویه ها را در دنیا و اب سایر جدایه-های دام‌های دیگر با هم مقایسه کرد و از لحاظ اپیدمیولوژی منبع سویه های بیماری زا را شناسایی نمود.

۳- از آنجایی که نقش ژن‌های حدت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی چندگانه به اثبات رسیده لازم است که پس از بررسی پراکندگی این ژن‌ها، مقاومت آنتی‌بیوتیکی و حدت نیز ارزیابی گردد .

۴- پروفایل آنتی بیوتیکی این جنس نیز هرساله بررسی شود تا شیوه های درمانی مناسب برای مایکوپلاسماهای دامی ارائه گردد.

منابع

۱. اوسط‌حسینی س‌ع. ۱۳۸۶. تعیین هویت مولکولی مایکوپلاسما سینوویه جدا شده از مرغداری‌های صنعتی استان مازندران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، صفحات: ۳۴-۵.

۲. حسنی‌طباطبایی ع. فیروزی ر. ۱۳۹۰. بیماری‌های باکتریائی دام. چاپ اول. موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران، صفحات: ۴۸۴-۴۶۹.

۳. خیرخواه ب. پوربخش س ع. اشتری ع. امینی ک.۱۳۹۰. جداسازی مایکوپلاسما آگالاکتیه با دو روش

۴. ذوقی الف. یوسفی وند ج. حاجی‌خانی ر. ۱۳۸۳. پاتوژنز عفونت های باکتریائی. چاپ اول. دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، صفحات:۵۰۳-۴۸۳.

۵. رحیمی م‌ک. اطهری ع. ۱۳۹۲. میکروب شناسی پزشکی جاوتز، چاپ اول. انتشارات آییژ. صفحات: ۴۹۴-۴۸۷.

۶. شریف‌زاده ع. ۱۳۹۴. ارزیابی روش‌های مختلف جستجوی مایکوپلاسما در مخازن شیر گاوداری‌های صنعتی شهرستان شهرکرد, دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات تهران. صفحات: ۲۴-۳.

۷. شیمی ا. ۱۳۷۶. باکتری شناسی دامپزشکی و بیماری‌های باکتریایی. چاپ اول. انتشارات جهاد دانشگاهی. صفحات: ۴۵۶-۴۴۶.

۸. قادرسهی ع. اخلاقی ا. فیاضی ز. ناصری‌راد ع‌ا. وندیوسفی ج. ۱۳۸۵. شناسائی مایکوپلاسما آگالاکتیه و دیگر عوامل مسبب بیماری آگالاکسی در گوسفند و بز بوسیله‌ی PCR و کشت در ایران. مؤسسه‌ی واکسن و سرم سازی رازی. صفحات: ۱۲-۱۰.

9. Abdo E M. Nicolet J. Fery J. 2000. Antigenic and genetic characteristics LPPQ from Mycoplasma mycoides mycoides Small Colonay.Clin Diag Lab Immun.7:4,588-593.

10. Awan MA. Abbas F. Yasinza M. Nicholas RAJ. Babar S. Ayling R. Attique MA. Ahmed Z. 2009. Prevalence of Mycoplasma capricolum subspecies capricolum and Mycoplasma putrefaciens, in goats in Pishin district of Balochestan. Pakestan Vet.J.29:179-185.

11. Azevedao EO. Alcantara MDB. Nascimento ER. Tabosa IM. Barreto ML. Almeida JF. Araujo MO. Rodrigues ARO. Correa FR. Castro RS. 2006. Contagious agalactia by Mycoplasma agalactiae in small ruminants in Brazil: first report. Brazilian J. Microbiol. 37: 576-581.

12. Brenner C. Neyrolles O. Blanchard A. 1996. Mycoplasmas and HIV infection from epidemiology to their interaction with immune cells. Front. Biosci. 1: 42-54.

13. Buonavoglia D. Greco G. Corrente M. 2009. Long-term immunogenicity and protection against Mycoplasma agalactiae induced by an oil adjuvant vaccine in sheep. Res. Vet. Sci. 88: 302-307.

14. Calcutt M. Foecking M. 2011. Genome Sequence of Mycoplasma putrefaciens Type Strain KS1. J of Bacterilogy, Vol. 193:6094.

15. Carlyle Jones T. Duncan Hunt R. 1983. Veterinary Pathology, Fifth edition, Lea & Febiger, p: 518.

16. Carter GR. Wise Darla J. 2004. Essentials of veterinary bacteriology and mycology, Sixth edition, Lowa state Press, pp: 171-175.

17. Harasawa R. Koshimizu K. Takeda O. Uemori T. Asada K. Kado I.1991. Detection of Mycoplasma hypopneumoniae by tha Polymerase Chain Reaction. Mol. Cell. Probes 5: 103-109.

18. Harasawa R. Koshimizu K. Uemori T. Takeda O. Asada K. Kado I. 1990. The Polymerase Chain Reaction for Mycoplasma pulmonis. Microbiol. Immunol. 34: 393-395.

19. Hernandez L. Lopez J. St-Jacques M. Ontiveros L. Acosta J. Handel K. 2006. Mycoplasma mycoides subsp. Capri associated with goat respiratory disease and high flock mortality. Can. Vet. J. 47: 366-369.

20. Jones GE. 1985. The pathogenecity of some ovine or caprine mycoplasmas in lactating mammary gland of sheep and goats. J. Comp. Pathol. 95: 305-318

21. Jones GE.1987.Contagious agalactiae and other mycoplasmas diseases of small ruminants. Agri. Comm. Euro. Communities, 19-20 September 1985, Nice, France.

22. Kheirkhah B. Pourbakhsh SA. Nadalian MG. Banani M. Ashtari A. 2011. Detection of Mycoplasma agalactiae by cultur and PCR methods from Iranian goats.African journal of Microbiology Research vol.5(12) .1668-1672.

23. Lambert M. 1987. Contagious agalactiae of sheep and goats. Rev. Sci. Tech. 6: 699-711.

24. Leach RH. 1970. The occurrence of Mycoplasma arginini in several animal hosts.Vet. Rec. 87: 319-320.

25. Ligon JV. Kenny GE.1991. Virulence of Ureaplasmal urease for mice, Infect. Immun. 59: 1170-1171.

26. March J. Brodlie M. 2000. Comparsion of the virulence of European and frican isolates of Mycoplasma mycoides mycoides Small Colonay Using PCR analysis. J Vet Diag Invest 18:168-171.
27. Moradi Bidhendi S. Khaki P. Pilehchian Langroudi R. 2011. Isolation and identification of Mycoplasma agalactiae by culture and Polymerase Chain Reaction in Sheep and Goat Milk Samples in Kordestan province, Iran**.** Archives of Razi Institute, Vol. 66: 11-16
28. Muto A. 1990. The organization and evolution of transfer RNA genes in Mycoplasma Capri. Nuc Acids Res.18:17,5037-5043.
29. Nicholas RAJ. 1995. Mycoplasma mycoides mycoides Small Colonay:The agent of Contagios Bovine Pleuropneumoniae and the namber of the mycoid cluster.J com Path.113:1-27.
30. Nicholas RAJ. 2002. Improvement in the diagnosis and control of disease of small ruminant caused by mycoplasmas. Small Ruminant Res. 45: 145-149.
31. Ozedmir U. Loria G R. Godinho K S. Smpson R. Rawan T G. Ayling R D. Nicholas R A J. 2005. Mycoplasma capricoloum capripneumonia isolated from the outbreaks of contagious caprine pleuropnemonia in Turkey. Pendik Veterinar Microbiol J Dergisi. 36: (1-2), 47-51.
32. Pettersson B. Leitner T. Ronaghim M. Bolske G. Uhlen M. Johnsso K E. 1996. Phylogeny of the Mycoplasma mycoides Cluster as Determined by Sequence Analysis of the 16S rRNA Genes from the Two rRNA Operons. J of bacterial .178:14, 4131-4142.
33. Peyreaud A. Woubit S. Poveda JB. De La Fe C. Mercier P. Thiaucort F. 2003. A specific PCR for the detection of Mycoplasma putrefaciens. Mol. Cell. Probes 17: 289-294 .
34. Quinn PJ. Markey BK. Carter ME. Donnely WJ. Leonard FC. 2002. Bacterial causes of bovine mastitis, Vet. Microbiol. Microbial dis. 18: 43-45.
35. Radostits OM. Gay CC. Hinchcliff KW. Constable RD. 2007. Goats. 10th edition. Elsevier Saunders. pp: 1138-1140.
36. Razin S. 1994. DNA probes and PCR in diagnosis of mycoplasma infections. Mol Cell Probes. 8: 497-511.
37. Pilot F. Philippe J.M. Lemmers C. Chauvin J.P. Lecuit, T. (2006). Developmental control of nuclear morphogenesis and anchoring by charleston, identified in a functional genomic screen of Drosophila cellularisation. Development 133(4): 711--723.