مجله دنیای میکروب‌ها
سال یازدهم شماره دوم (پیاپی ۳۵) تابستان ۱۳۹۷
صفحات ۱۳۱-۱۲۳

Original Article

همسانی ژنتیکی سویه های واکسن *مایکوپلاسما آگالاکتیه* جدا شده از طالقان، لرستان و شیراز در ایران

خاطره کبیری[۱]، کیوان تدین*[۲]، سید علی پوربخش[۳]، جمیله نوروزی[۴]

[۱]دانشجوی دکتری، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، [۲]دانشیار، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، [۳]استاد، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، [۴]استاد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران.

چکیده

سابقه و هدف: ایران یکی از اصلی ترین کانون های فعالیت *مایکوپلاسما آگالاکتیه* در دام های نشخوارکننده در جهان شناخته است. سه سویه بومی طالقان، لرستان و شیراز برای تولید تنها نمونه واکسن کشته علیه آگالاکسی در ایران مورد استفاده قرار می گیرند. این مطالعه با هدف آگاهی از ارتباط ژنتیکی میان این سویه ها انجام شد.

مواد و روش ها: از هر سه سویه بومی طالقان، لرستان و شیراز کشت تازه در محیط آبکوشت PPLO تهیه و ماده ژنتیکی با روش جوشاندن استخراج گردید. چهار واکنش مستقل PCR بر مبنای ٤ لوکوس VNTR5، VNTR9، VNTR17 و VNTR19 تنظیم و در مورد هر سه سویه اجرا گردید. توالی نوکلئوتیدهای تمامی محصولات PCR تعیین گردید.

یافته ها: نتایج به دست آمده بر مبنای توالی نوکلئوتیدها در هر ٤ لوکوس وجود همسانی کامل در میان ژنوم سه سویه را نشان داد. از طرف دیگر به جز لوکوس VNTR19 سویه های سه گانه ایرانی در هر سه لوکوس دیگر با سویه شاخص PG2 *مایکوپلاسما آگالاکتیه* همسان مشاهده شدند. در لوکوس VNTR19 تنها تفاوت مشهود اضافه شدن ۳ نوکلوتید به طول این لوکوس در سویه های ایرانی بود.

نتیجه گیری: همسانی ژنتیکی در میان سه سویه ایرانی می تواند نشانه فعالیت یک یا چند کلون های بومی اجدادی باکتری در جغرافیای ایران باشد که در طول تاریخ دامپروری این کشور پیدایش و تکامل یافته اند. در نتیجه ضعف در اعمال سیاست های کنترل بیماری به صورت هموژن و غالب منتشر شده است. در توضیح چگونگی شباهت میان سه سویه ایرانی و سویه PG2 می توان آنرا به تشابه تصادفی در فرآیند تکاملی (حالت هموپلازی) و یا متاثر از مداخلات انسانی از راه فعالیت های دامپروری مانند واردات دام از خارج مربوط دانست. اعمال روش های استاندارد ژنوتایپینگ بر روی تعداد بیشتر جدایه های ایرانی می تواند به درک صحیح این موضوع کمک نماید.

واژگان کلیدی: *مایکوپلاسما آگالاکتیه*، آگالاکسی، MLVA، دسته بندی ژنتیکی، سویه های واکسن.

دریافت مقاله: مهر ماه ۹۶ پذیرش برای چاپ: آذر ماه ۹۶

مقدمه

بیش از ۲۰۰ سال از شناسایی آگالاکسی در نشخوارکنندگان می گذرد. به دلیل اهمیت خسارت های اقتصادی گسترده ناشی از این بیماری گزارش موارد آن توسط کشورها به سازمان بهداشت جهانی دام الزامی می باشد. به دنبال شناسایی بیماری در ایران در سال ۱۳۱۷ جداسازی اولین جدایه های *مایکوپلاسما آگالاکتیه* (*Mycoplasma agalactiae*) عامل بیماری از گله های دام در سال ۱۳۳۸ توسط فتح اله انتصار

*) آدرس برای مکاتبه: تهران، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی
تلفن: ۰۹۱۲٤۹٦۸۹۰۷ پست الکترونیک: k.tadayon@rvsri.ac.ir

انجام پذیرفت. یافته های محققین در سال های پس از آن، پراکندگی گسترده آگالاکسی در جغرافیای ایران را نشان داده اند (۷-۲). در سال ۱۳٤۱ نخستین نمونه واکسن ایرانی بر علیه آگالاکسی تولید گردید. در طول چهار دهه گذشته تولید واکسن کشته آگالاکسی در ایران با به کارگیری سه سویه بومی طالقان، لرستان و شیراز ادامه داشته است (۸). بر خلاف تفاوت های آنتی ژنی شناخته شده در میان سویه های *مایکوپلاسما آگالاکتیه*، مطالعات اولیه ژنتیکی تنها سطح محدودی از تنوع را در جمعیت این باکتری نشان داده است (۹). اما در سال های اخیر با معرفی و توسعه روش های ژنوتایپینگ و ساب تایپینگ مولکولی مانند VNTR (Variable Number of Tandem Repeat) و MLST (Multilocus Sequence Typing) تنوع ژنتیکی قابل توجهی در میان سویه های این باکتری مشاهده شده است (۱، ۱۰ و ۱۱).

در اپیدمیولوژی مدرن بیماری های عفونی، شناخت جمعیت پاتوژن از نظر ژنتیکی و ارتباطات میان سویه و یا سویه های عامل بیماری متناسب با مولفه های جغرافیا، زمان و میزبان با اتکا بر روش های مولکولی مورد ارزیابی و بررسی قرار می گیرند. در روش MLVA (Multiple Locus Variable Number of Tandem Repeat) تعداد تکرارهای قطعات متشکله از چندین نوکلئوتید که به نام واحد تکرار شونده (tandem repeat) شناخته می شوند، در ژنوم سویه های باکتری مورد مطالعه به صورت مقایسه ای مورد بررسی قرار می گیرد. این قطعات تقریباً در تمام نقاط ژنوم اعم از ژن ها و مناطق بین ژن ها امکان وجود دارند. مجموع واحدهای تکرار شونده در هر منطقه مشخص از ژنوم بنام لوکوس VNTR شناخته می شوند که ممکن است در جمعیت باکتری هدف از نظر تعداد تکرارها در هر لوکوس متنوع ظاهر گردند (۱۰).

در تکنیک MLVA با انتخاب لوکوس های مختلف مناسب از نظر اندازه هر واحد تکرار شونده و پلی مورفیسم طولی، توانایی افتراق میان سویه ها/جدایه های باکتری فراهم می گردد. در این تکنیک وابسته به PCR هر لوکوس به صورت مستقل با استفاده از پرایمرهای مناسب، تکثیر و تعداد تکرارها بر اساس اندازه محصول ازدیاد یافته (amplification) و یا تعیین توالی مشخص می گردد. بدین ترتیب متناسب با تعداد لوکوس ها یک شناساگر چند رقمی به هر سویه/جدایه مورد بررسی اختصاص داده می شود (۱، ۱۰ و ۱۱).

از مزایای دیگر این روش قابلیت تشکیل بانک اطلاعات قابل انتقال از طریق اینترنت و اشتراک میان آزمایشگاه های مختلف می باشد. در سال ۲۰۰۸ میلادی مک آلیف (Mc Aulif) با بررسی ژنوم سویه Ma PG2 موفق به شناسایی ٤ لوکوس VNTR گردید و از آن در توسعه یک روش ژنوتایپینگ *مایکوپلاسما آگالاکتیه* استفاده نمود که اکنون کاربرد بین المللی دارد (۱۲).

هدف از این مطالعه شناخت ژنتیکی مقایسه ای سویه های سه گانه *مایکوپلاسما آگالاکتیه* طالقان، شیراز و لرستان با استفاده از تکنیک مک آلیف بود.

مواد و روش ها

الف) کشت باکتری و استخراج ماده ژنتیکی: در مورد هر سویه یک ویال شیشه ای حاوی سویه فریز شده *مایکوپلاسما آگالاکتیه* طالقان (*M. agalactiae* Taliqan) و *مایکوپلاسما آگالاکتیه* شیراز (*M. agalactiae* Shiraz) و *مایکوپلاسما آگالاکتیه* لرستان (*M. agalactiae* Lorestan) موجود در آرشیو خزانه بذر واکسن موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی انتخاب گردید. پس از ذوب در دمای محیط از محتویات ویال برای تلقیح ۲ لوله کشت فالکون (٤٥ میلی لیتر) محیط اختصاصی PPLO broth (غنی شده با ۱۵٪ سرم استریل اسب) استفاده شد. ظروف کشت به مدت ۷۲ ساعت تا هنگام مشاهده کدورت ناشی از رشد در انکوباتور شیکردار(۳۷ °C) نگهداری شدند. در پایان این مدت لوله های کشت سانتریفیوژ (۳۰۰۰ g به مدت ۵ دقیقه) شدند و رسوب به دست آمده (از دو لوله) در یک میکروفیوژ تیوب واشردار جمع آوری شد. برای غیر فعال کردن باکتری ۵۰۰ میکرولیتر بافر TE اضافه و لوله میکروفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه در عمق بن ماری محتوی آب در حال جوش نگهداری شد. پس از سانترفیوژ (۳۰۰۰ g به مدت ۵ دقیقه) و حذف

رسوبات از روماند در آزمایش های مولکولی به صورت مستقیم استفاده گردید (۱۳).

ب) تعیین هویت: از دستورالعمل پیشنهادی (Subramaniam) مارکر اختصاصی (ژن *uvrC*) برای اطمینان از هویت هر سه سویه استفاده شد (۱٤). بدین ترتیب (PCR-MAGAUVRC با پرایمرهای MAGAUVRC1-L و MAGAUVRC1-R) به کار گرفته شد (جدول ۱).

ج) تکنیک MLVA

۱- انتخاب لوکوس های MLVA و پرایمر: از پرایمرهای پیشنهادی مک آلیف (Mc Aulif) برای تکثیر بخش های هدف ژن های VNTR5، VNTR9، VNTR17 و VNTR19 استفاده شد (جدول۱). واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) امکان استفاده از یک دستورالعمل مشترک از نظر دما، زمان و اجزا در مورد تمامی واکنش های PCR با اتکا به روش های موجود مورد توجه قرار گرفت (۱۵). از کیت تجارتی آماده مصرف (Ampliqon®, Denmark) محتوی $MgCl_2$ (۰/۳ میلی مولار)، تئوین ۲ درصد، Tris-HCl pH ۸/۵، هر dNTP (۰/٤ میلی مولار)، $(NH_4)_2SO_4$، آمپلیکون Taq DNA پلی مراز (۰/۲ واحد در میکرولیتر) همراه با رنگ قرمز خنثی و ترکیب تثبیت کننده استفاده شد. برای آماده سازی واکنش های PCR از آب مقطر دوبار تقطیر به عنوان کنترل منفی و نیز برای تنظیم حجم نهایی واکنش ها استفاده گردید. تمامی واکنش های PCR هم حجم (۱۲ µL) تنظیم گردیدند. به طوری که در هر واکنش ٦ میکرولیتر از کیت و ۲/۵ میکرولیتر نمونه ماده ژنتیکی همراه با ۱ میکرولیتر از محلول کاری (با غلظت ۵ پیکومول در هر میکرولیتر) هر یک از پرایمرها استفاده شد. مقدار ۰/۳٦ میکرولیتر از محلول کلرید منیزیم (۵۰ میلی مولار) تنها در PCR-MLST به واکنش ها اضافه شد. برنامه PCR شامل مرحله مقدماتی واسرشت ابتدایی (۹۵ درجه سلیسیوس به مدت ٤۵ ثانیه) و پس از آن ۳۰ چرخه متوالی متشکل از مراحل واسرشت (۹۵ درجه سلیسیوس به مدت ٤۵ ثانیه)، اتصال (٤۵ ثانیه در دمای ۷۲ °C)، تکثیر در دمای ۹۵ درجه سلیسیوس به مدت ۱ دقیقه بود. در پایان یک چرخه نهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه اجرا گردید. در نهایت محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد الکتروفورز شدند.

۲- *تعیین توالی نوکلئوتیدها:* محصولات PCR در هر ۳ سویه و هر ٤ لوکوس VNTR توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی تعیین توالی شدند. نتایج به دست آمده به کمک نرم افزارهای Chromas lite Version 2.1. (16) و Clustal (17) پردازش و در نهایت توالی دقیق نوکلئوتیدها در تمامی محصولات شناسایی گردید.

۳- *آنالیز بیواینفورماتیک:* قطعات هم ارز VNTRti، VNTR14، VNTR17 و VNTR19 از لوکوس های تعیین توالی شده در سه سویه تحت بررسی شناسایی و تعداد تکرارهای VNTR در هر لوکوس تعیین گردید. برای آگاهی از ارتباطات تکاملی میان سه سویه ایرانی و جدایه های *مایکوپلاسما آگالاکتیه* از سایر نقاط جهان نمودار eBURST با استفاده از نرم افزار PHYLOViZ (www.phyloviz.net/goeburst/)

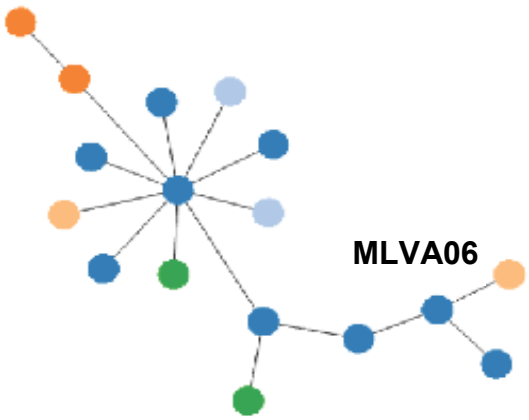
جدول ۱: اطلاعات مربوط به لوکوس های ژنتیکی مورد مطالعه در این تحقیق در سویه *مایکوپلاسما آگالاکتیه* PG2 و سویه های سه گانه ایرانی واکسن.

لوکوس	توالی پرایمر ('3 → '5)	اندازه واحد تکرار شونده بر حسب جفت باز	اندازه محصول PCR بر اساس جفت باز (تعداد تکرارها در لوکوس)	
			سویه های سه گانه واکسن لرستان و شیراز و طالقان	سویه آزمایشگاهی *M. agalctiae* PG2
AG	F- ATT AAA GTA TGA TTG AAT ATT R- CAT GAT CTT GAG GAC ATA AGC		NA	
VNTR5	F- GCT GGC AAG ACT GAT AAT GGC R- AGC TGG CGC AGA TGT TGA AT	۲٤	(۲/۳) ٦۲٦	(۲/۳) ٦۲٦
VNTR14	F- TGC TCT CGC TGC ATC TCA AA R- TTC AGC ATT ACC GCT TGT GT	۱۳	(۲) ٦۳۷	(۲) ٦۳۷
VNTR17	F- ATA CAG CAC TTG GCC TGC TT R- TGC AAA CAT AGG ATA TGC TGA AC	۱٤	(۳/٦) ۵۳۳	(۳/٦) ۵۳۳
VNTR19	F- ACG TTG AAG CTT TGT GTT CCT R- TCA CTA CCT TTA ATT GCA GCC TCA	۲۲	(۲/٤) ۵۹٤	(۲/۳) ۵۹۱

رسم گردید (۱۸).

یافته ها

در آزمایش PCR-AG یک قطعه به طول ۱/۷ kb توسط هر سه سویه تولید گردید و هویت هر سه سویه طالقان لرستان و شیراز را به عنوان *مایکوپلاسما آگالاکتیه* تایید کرد. در بررسی مقایسه ای طول لوکوس های چهارگانه و توالی نوکلئوتیدی آنها میان سه سویه ایرانی و سویه مرجع *مایکوپلاسما آگالاکتیه* PG2 ساختار کاملاً یکسان در لوکوس های VNTR5، VNTR14، VNTR17 مشاهده گردید. در لوکوس VNTR19 ژنوم سه سویه ایرانی معادل ۳ نوکلئوتید بلندتر از سویه PG2 ظاهر گردیدند. در بررسی ارتباطات فیلوژنیکی میان سویه های ایرانی



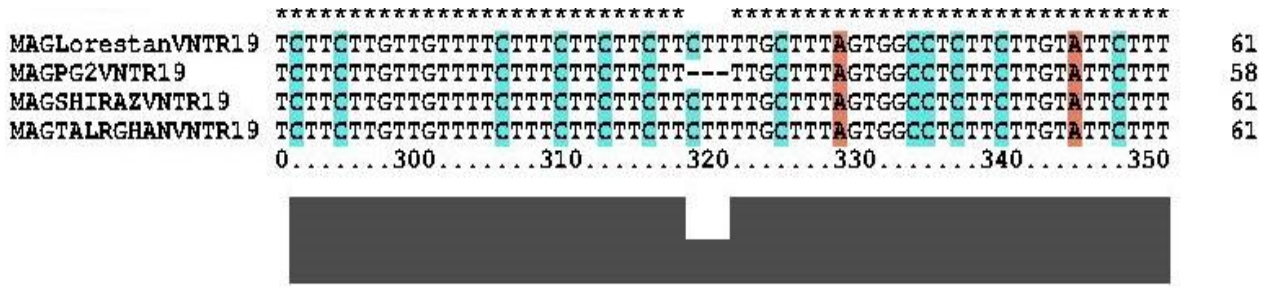
شکل ۱: تصویر eBURST بیانگر ارتباط ژنتیکی میان ۱۷ تیپ ژنتیکی MLVAشناسایی شده توسط نوول (۱) لوکوس های مورد استناد در تعیین تیپ های ژنتیکی در این بانک شامل VNTR5 و VNTR14 و VNTR17 و VNTR19 می باشند. هر دایره رنگی یک تیپ ژنتیکی را نشان

و سایر نقاط جهان بر اساس یافته های VNTR یک نمودار eBURST رسم گردید (شکل ۱).

در آزمایش های MLVA تمامی ٤ لوکوس در هر سه سویه با استفاده از یک پروتکل PCR تکثیر شدند. نتایج حاصل از ژل الکتروفورز در تطابق با یافته های تعیین توالی نوکلئوتید، انطباق کامل میان سه سویه در مناطق ژنتیکی مورد بررسی را نشان داد. در لوکوس های VNTR5، VNTR14، VNTR17 و VNTR19 طول قطعات هدف در هر سه سویه به ترتیب برابر با ٦٢٦، ٦٣٧، ٥٣٣ و ٥٩٤ جفت باز تعیین گردید (شکل ۲).

بحث

در سال های اخیر ژنوتایپینگ به روش MLVA در مورد بسیاری از *مایکوپلاسما*ها معرفی و تکامل یافته است. به طوری که علاوه بر *مایکوپلاسما آگالاکتیه* در مورد *مایکوپلاسما هایورینیس* (*M. hyorhinis*) (۱۹)، *مایکوپلاسما هایونمونیه* (*M. hyopneumoniae*) (۲۰)، *مایکوپلاسما بوویس* (*M. bovis*) (۲۱)، *مایکوپلاسما کالیفورنیکوم* (*M. californicum*) (۲۲)، *مایکوپلاسما هومینیس* (*M. hominis*) (۲۳)، *مایکوپلاسما ژنیتالیوم* (*M. genitalium*) (۲٤) و *مایکوپلاسما مایکویدس* (*M. mycoides*) (۲۵) نیز این تکنیک مورد استفاده قرار گرفته است. یکسان بودن ژنوم سه سویه بومی ایران در ٤ لوکوس VNTR مورد بررسی و تفاوت همزمان این سویه ها با سویه غیر ایرانی PG2 در لوکوس VNTR19 می تواند نشان دهنده تعلق سه سویه ایرانی به یک کلون بومی ایران باشد. از طرف دیگر یافته های ژنتیکی به دست آمده از بررسی مقایسه ای ژن P40 در میان سه سویه طالقان، لرستان و شیراز ضمن شناسایی



شکل ۲: هم ترازی مقایسه ای نوکلئوتیدها در لوکوس VNTR19 میان سه سویه واکسن ایران و سویه PG2 *مایکوپلاسما آگالاکتیه*.

درجاتی از تمایز و تفاوت میان این سویه ها (بالاترین میزان تشابه ژنتیکی میان سویه های شیراز و طالقان به میزان ۹۹/۷ درصد و کمترین آن معادل ۷٤/٦ درصد بین دو سویه شیراز و طالقان نشان داده اند که این سویه ها قابل تفکیک و دارای هویت مستقل می باشند (۲٦).

یادآوری می گردد که بر اساس سوابق موجود در موسسه رازی وجود تفاوت در ویژگی های بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی میان این سویه ها در پیشینه اطلاعات آنها در موسسه رازی ثبت گردیده است. در میان ۱٦ تیپ ژنتیکی گزارش شده توسط نوول (Nouvel) در میان جدایه هایی از اروپا و اتیوپی ژنوتیپ سه سویه ایرانی شباهت بسیار زیاد به تیپ MLVA06 مربوط به سویه PG2 از خود نشان دادند (۱). یکی از دلایل احتمالی که می تواند این شباهت را توضیح دهد وقوع هموپلازی می باشد. به این معنا که امکان پیدایش و وقوع ژنوتایپ های یکسان بدون ارتباط فیلوژنی وجود دارد.

پرورش گوسفند و بز میزبان های اصلی *مایکوپلاسما آگالاکتیه* در ایران از قدمت تاریخی برخوردار می باشد. ایران یکی از خواستگاه های اصلی پرورش گوسفند در جهان شناخته می شود(۲۷ و ۲۸). شواهد دال بر وقوع هموپلازی در *مایکوپلاسما*ها پیش از این نشان داده شده است (۲۹). از طرف دیگر وجود ژنوتیپ های هموپلازیک در جمعیت *مایکوباکتریوم بوویس* ایران که گله های گاو ایران را مورد تهاجم قرار می دهند مورد توجه قرار گرفته است (۳۰).

سطح پوشش واکسیناسیون کشوری بر علیه آگالاکسی متناسب با جمعیت گوسفند و بز نمی باشد و وقوع اپیدمی های متعدد آن از مناطق و مراکز دامپروری سرتاسر کشور به صورت پیوسته گزارش می گردد. بدین ترتیب با محدود بودن میزان تاثیر مداخلات انسانی در کنترل جمعیت *مایکوپلاسما آگالاکتیه* انتظار وجود و فعالیت میدانی سویه های قدیمی در ایران قابل انتظار می باشد. بدین ترتیب این احتمال وجود دارد که شباهت ژنتیکی میان سه سویه ایرانی و سویه غیر ایرانی PG2 تصادفی و در نتیجه وقوع اثر هموپلازی باشد. با این وجود، به دلیل واردات دام زنده به کشور در ۱۰۰ سال اخیر که با هدف اصلاح نژاد دام ها صورت پذیرفته است احتمال ورود پاتوژن های باکتریایی مانند *مایکوباکتریوم* ها مورد توجه قرار گرفته است (۳۰).

یکی دیگر از احتمالات در توضیح شباهت میان سویه های ایرانی و سویه PG2 می تواند نقش واردات دام زنده باشد. با این حال با توجه به فقدان اطلاع کافی از سطح تنوع ژنتیکی در جمعیت *مایکوپلاسما آگالاکتیه* در ایران در حال حاضر اظهار نظر دقیق در این زمینه متکی بر انجام مطالعات اپیدمیولوژیک جامع تر خواهد بود.

نتیجه گیری

در جمع بندی یافته ها به نظر می رسد جمعیت *مایکوپلاسما آگالاکتیه* در ایران که سویه های سه گانه واکسن آگالاکسی حال حاضر ایران نمونه های آن می باشند متشکل از کلون یا کلون هایی هستند که تحت تاثیر مداخلات انسانی از طریق اعمال سیاست های دامپروری سنتی گوسفند و بز در سراسر کشور فرصت گسترش یافته اند. روش های استاندارد شده ژنتیکی مانند MLVA در شناسایی ساختار این جمعیت موثر هستند. اما شناخت کامل تر این جمعیت و اظهار نظر در مورد منشا آن وابسته به تعمیم این نوع تحقیقات به کل کشور باقی خواهد ماند.

تشکر و قدردانی

حمایت مالی و پشتیبانی لجستیکی این پژوهش به صورت کامل توسط موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی و از محل ردیف بودجه های تحقیقاتی فراهم گردیده است. نویسندگان این مقاله، همکاری و مشارکت دکتر رایناک قادری، مهندس محمد سخاوتی و مهندس علی اکبر ناصری راد در بازیافت و تجدید کشت سویه های واکسن، انجام عملیات آزمایشگاهی و علاوه بر آن جمع آوری اطلاعات تاریخی مربوط به پیشینه سویه ها را ارج می نهند. مقاله حاضر، بخشی از یافته های رساله دکتری، خاطره کبیری دانشجوی دکترای دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال می باشد.

References

1. Nouvel LX, Marenda MS, Glew MD, Sagne E, Giammarinaro P, Tardy F, Poumarat F, Rosengarten R, Citti C. Molecular typing of *Mycoplasma agalactiae*: tracing European-wide genetic diversity and an endemic clonal population. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2012; 35(5): 487-496.
2. Noaman V. Identification of *Mycoplasma agalactiae* by conventional and molecular methods on small ruminants in central zone of Iran. Comp Clin Path. 2015; 24(3): 653-657.
3. Khezri M, Pourbakhsh SA. A survey of *Mycoplasma agalactiae* in small ruminants with contagious agalactiae syndrome in Iran. Bangladesh J Vet Med. 2014; 12(1): 67-72.
4. Mohammadpour SH, Pourbakhsh SA, Kheirkhah B. Isolation and identification of *Mycoplasma agalactiae* by polymerase chain reaction (PCR) in suspected sheep samples in Kerman Province, Iran. Afr J Microbiol Res. 2013; 7(10): 885-889.
5. Khezri M, Pourbakhsh SA, Ashtari A, Rokhzad B, Khanbabaie H. Isolation and prevalence of *Mycoplasma agalactiae* in Kurdish sheep in Kurdistan, Iran. Vet World. 2012; 5(12): 727-731.
6. Bidhendi SM, Khaki PLangroudi RP. Isolation and identification of *Mycoplasma agalactiae* by culture and polymerase chain reaction in sheep and goat milk samples in Kordestan province, Iran. Arch Razi Inst. 2011; 66(1): 11-16.
7. Amir Momen H, Roshdi Maleki M. Identification of *Mycoplasma agalactiae* in milk by culture and PCR methods in Hamedan of Iran. Ind J Fundament Appl Life Sci. 2014; 4 (S4): 2175-2180.
8. Sotoodehnia A, Moazenijula A, Rad AN, Jabbari A. Preparation of agalactia vaccine in fermentor. Arch Razi Inst. 2007; 62(1): 45-48.
9. Tola S, Idini G, Manunta D, Casciano I, Rocchigiani AM, Angioi ALeori G. Comparison of *Mycoplasma agalactiae* isolates by pulsed field gel electrophoresis, SDS-PAGE and immunoblotting. FEMS Microbiol Lett. 1996; 143(2-3): 259-65.
10. De la Fe C, Amores J, Tardy F, Sagne E, Nouvel LX, Citti C. Unexpected genetic diversity of *Mycoplasma agalactiae* caprine isolates from an endemic geographically restricted area of Spain. BMC Vet Res. 2012; 8: 146.
11. McAuliffe L, Gosney F, Hlusek M, de Garnica ML, Spergser J, Kargl M, Rosengarten R, Ayling RD, Nicholas RA, Ellis RJ. Multilocus sequence typing of *Mycoplasma agalactiae*. J Med Microbiol. 2011; 60(6): 803-811.
12. McAuliffe L, Churchward CP, Lawes JR, Loria G, Ayling RD, Nicholas RA. VNTR analysis reveals unexpected genetic diversity within *Mycoplasma agalactiae*, the main causative agent of contagious agalactia. BMC Microbiol. 2008; 8: 193.
13. Ataee RA, Golmohammadi R, Alishiri GH, Mirnejad R, Najafi A, Esmaeili D, Jonaidi-Jafari N. Simultaneous detection of *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma arthritidis* in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis by Multiplex PCR. Arch Iran Med. 2015; 18(6): 345-350.

14. Subramaniam S, Bergonier D, Poumarat F, Capaul S, Schlatter Y, Nicolet J, Frey J. Species identification of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* based on the *uvrC* genes by PCR. Mol Cell Probes. 1998; 12(3): 161-169.

15. Prats-van der Ham M, Tatay-Dualde J, de la Fe C, Paterna A, Sanchez A, Corrales JC, Contreras A, Gomez-Martin A. Detecting asymptomatic rams infected with *Mycoplasma agalactiae* in ovine artificial insemination centers. Theriogenol. 2017; 89: 324-328.

16. Notifiable diseases: Contagious agalactia pathogen confirmed in Wales. Vet Rec. 2014; 175 (19): 468.

17. Ruiz-Fons F, Gonzalez-Barrio D, Aguilar-Rios F, Soler AJ, Garde JJ, Gortazar C, Fernandez-Santos Mdel R. Infectious pathogens potentially transmitted by semen of the black variety of the Manchega sheep breed: Health constraints for conservation purposes. Anim Reprod Sci. 2014; 149(3-4): 152-157.

18. do Nascimento NC, Santos AP, Guimaraes AM, Sanmiguel PJ, Messick JB. *Mycoplasma haemocanis*- the canine hemoplasma and its feline counterpart in the genomic era. Vet Res. 2012; 43: 66.

19. Dos Santos LF, Clavijo MJ, Sreevatsan S, Rovira A, Moreira MA, Pieters M. Genotyping of *Mycoplasma hyorhinis* using multiple-locus variable number tandem repeat analysis. J Microbiol Methods. 2015; 111: 87-92.

20. Pantoja LG, Pettit K, Dos Santos LF, Tubbs R, Pieters M. *Mycoplasma hyopneumoniae* genetic variability within a swine operation. J Vet Diagn Invest. 2016; 28(2): 175-179.

21. Pinho L, Thompson G, Rosenbusch R, Carvalheira J. Genotyping of *Mycoplasma bovis* isolates using multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis. J Microbiol Methods. 2012; 88(3): 377-385.

22. Hata E, Suzuki K, Hanyu H, Itoh M, Higuchi H, Kobayashi H. Molecular epidemiology of cases of *Mycoplasma californicum* infection in Japan. Appl Environ Microbiol. 2014; 80(24): 7717-7724.

23. Ferandon C, Peuchant O, Renaudin H, Bebear C. Diversity of *Mycoplasma hominis* clinical isolates from Bordeaux, France, as assessed by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. BMC Microbiol. 2013; 13: 120.

24. Cazanave C, Charron A, Renaudin H, Bebear C. Method comparison for molecular typing of French and Tunisian *Mycoplasma genitalium*-positive specimens. J Med Microbiol. 2012; 61(Pt 4): 500-506.

25. Nwankpa ND, Manso-silvan L, Lorenzon S, Yaya A, Lombin LH, Thiaucourt F. Variable Number Tandem Repeat (VNTR) analysis reveals genetic diversity within *Mycoplasma mycoides mycoides* small colony isolates from Nigeria. Vet Microbiol. 2010; 146(3-4):354-355.

26. Mahdavi S, Salehi TZ, Madani R, Keyvanfar H. Comparative study of homology of cytoplasmic membrane protein 40 KDa of *Mycoplasma agalactiae* in isolated strains in Iran. Afr J Microbiol Res. 2009; 3(9): 528-532.

27. Candela MG, Serrano E, Sevila J, Leon L, Caro MR, Verheyden H. Pathogens of zoonotic and biological importance in roe deer (*Capreolus capreolus*): Seroprevalence in an agro-system population in France. Res Vet Sci. 2014; 96(2): 254-259.

28. Murai K, Lehenbauer TW, Champagne JD, Glenn K, Aly SS. Cost-effectiveness of diagnostic strategies using quantitative real-time PCR and bacterial culture to identify contagious mastitis cases in large dairy herds. Prev Vet Med. 2014; 113(4): 522-535.

29. Sanna G, Lecca V, Foddai A, Tola S. Development of a specific immunomagnetic capture-PCR for rapid detection of viable *Mycoplasma agalactiae* in sheep milk samples. J Appl Microbiol. 2014; 117(6): 1585-1591.

30. Gomez-Martin A, Uc N, Vieira LA, Gadea J, Cadenas J, Sanchez A, De la Fe C. Survival capacity of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp capri in the diluted semen of goat bucks and their effects on sperm quality. Theriogenol. 2015; 83(5): 911-919.

Journal of Microbial World
Volume 11, No. 2, June 2018

Original Article

Homogeneity of *Mycoplasma agalactiae* vaccine strains isolated from Taliqan, Lorestan, and Shiraz in Iran

Khatereh Kabiri[1], Keyvan Tadayon[2], Seyyed Ali Pourbakhsh[3], Jamileh Nowroozi[4]

[1]Ph.D. student, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Tehran North Branch, Tehran, Iran. [2]Associate Professor, Veterinary Bacterial Vaccines Section, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. [3]Professor, Mycoplasma Laboratory, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. [4]Professor, Department of Microbiology, Tehran North Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Iran continues to hold one of the most currently active world foci of agalaxy in ruminants. The three local strains of Taliqan, Lorestan, and Shiraz have been used for many years in preparation of the only commercially available killed vaccine against agalaxy in the Iranian market. This study was conducted to determine the genetic link between these strains.
Materials & Methods: All three strains of Taleghan, Lorestan, and Shiraz were cultivated freshly on PPLO agar media. The genetic material was extracted by boiling method. In order to investigate the genomic relations between these strains, a Multi-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) strategy concentrating on 4 VNTR loci of 5, 9, 17, and 19 was employed. The nucleotide sequences of all PCR products were determined, as well.
Results: Nucleotide sequence analysis showed an identical MLVA pattern by all the three strains. When compared to the *Mycoplasma agalactiae* PG2 laboratory strain, the only VNTR19 locus was different between Iranians and the PG2 strain, with respect to a 3bps addition at this locus in Iranian strain.
Conclusion: The identical genetic pattern of the three Iranian strains is likely an indication of the activity of one or more indigenous ancestral clone in the geography of Iran that has been appeared and evolved throughout its livestock history and became homogeneous and predominant due to the absence of efficient disease control policies. The similarity between three Iranian and the PG2 strains might be due to homoplasy or human intervention through animal husbandry activities such as livestock importation. Applying standard genotyping methods to a larger number of local isolates help to better assess this observation.

Keywords: *Mycoplasma agalactia*, Agalaxy, MLVA, Genotype, Vaccine strains.

Correspondence to: Keyvan Tadayon

Tel: +98 9124968907

E-mail: k.tadayon@rvsri.ac.ir

Journal of Microbial World 2018, 11(2): 123-131.