ارزیابی فراوانی مایکوپلاسما در مخازن شیر گاوداری های صنعتی و نیمه صنعتی شهرستان شهرکرد با دو روش کشت و PCR

دکتر علی شریف زاده[۱] *، دکتر عبدالحمد حسنی طباطبائی[۲]، دکتر سیدعلی پوربخش[۳]

چکیده

در بین عوامل ایجاد کننده ورم پستان مایکوپلاسماها، که بیشتر بـه شـکل تحـت درمانگاهی یا مزمن (S.C.C) دام را آلوده مـی کننـد، نـسبت بـه سـنوات قبـل افزایش یافته اند. بدین جهت در مناطق مختلف دنیا برنامه های خاصـی جهـت کنترل و پیشگیری از آنها تدوین شده است. به منظور مـشخص شـدن وضـعیت آلودگی به مایکوپلاسماها، درمخازن شیر کلیـه۶۱ گاوداریهـای صـنعتی و نیمـه صنعتی شهرستان شهرکرد از زمستان ۸۳ لغایت زمستان ۸٤ نمونه گیری صورت گرفت و با دو روش کشت و PCR به جستجوی این باکتری ها پرداخته شد. از آنجـا کـه گونـه‌هـای بـویس(bovis) بـا حـدت بـالا، بـوی جنیتالیوم(bovigenitalium) و آلکالسنس(alkalescens) با حدت متوسـط و بوی رینیس (bovirhinis)با حدت کم نیز در بروز این بیماری نقش ایفا می کنند لذا با استفاده از آزمایش هـای بیوشـیمیایی در روش کـشت و پرایمرهـای گونه‌های بویس، بوی جنیتالیوم، آلکالسنس و بـوی رینـیس در روش PCR بـه جستجوی این گونه ها پرداخته شد. نتایج آزمون های کشت و PCR که تأییـد کننده یکدیگر بود میزان آلودگی این مخازن به گونه بویس را ۳/۳٪ و بـه گونـه آلکالسنس را ٤/۹٪ برآورد کرد. در این تحقیـق مخـازن شـیر مـورد مطالعـه بـه گونه‌های بوی رینیس و بوی جنیتالیوم آلوده نبودند. با توجه به نتایج این تحقیق و نقش مایکوپلاسماها به خصوص گونه بویس به عنـوان یکـی از عوامـل مهـم ورم پستان واگیردار که باعث افزایش S.C.C و افت تولید شیر می شـود لـزوم توجه بیشتر به این مشکل و کنترل و پیشگیری از آن بسیار ضروری به نظـر مـی رسد.

واژگان کلیدی : *ورم پستان، مایکوپلاسما ، PCR*

Study on frequency of mycoplasma in bulk tank milks of industrial and semi-industrial dairy farms at shahrekord by culture and PCR methods

Sharifzadeh.A[1] , Hassani Tabatbaei.A[2] , Poorbakhsh.S.A[3]

1-Department of Microbiology, Faculty of veterinary Medicine Islamic Azad University, Shahrekord branch, Iran
2-Department of Microbiology, Faculty of veterinary Medicine Tehran University, Iran
3-Razi Research institue , Karaj , Iran

Since the rate of mastitis due to mycoplasma infectious in both subclinical and chronic forms have increased then before in the world, the special programs have been developing to prevention and control of the infection .To identify infection of this bacteria, the present study was carried out in 61industrial and semi-industerial dairy farms. During the winter of 2004 till winter of 2005 .Since M.bovis with high virulance, M. bovigenitalium and M.alkalescens with medium virulence and M.bovirhinis with low virulence have been reported to produce mastitis in dairy cows, so the biochemical tests in cultivation method and of M.bovis, M.bovigenitalium, M.alkalescens and M.bovirhinis species in PCR method was used. The results of culture and PCR methods were almost at the same and contamination rates in bulk-tank milk for M.bovis and M.alkalescens species were 3.3% and 4.9% respectively .
There was no evidence for infection of M.bovirhinis and M.bovigenitalium species. This study showed the role of mycoplasmas especially M.bovis species which is classified among contigious mastitis agents that cause S.C.C increase and milk loss in dairy cows and it is necessary to use prevention and control methods to eliminate this agent from dairy cows.

Key Words: *Mastitis, Mycoplasma, PCR*

مقدمه

ورم پستان یکی از بیماری های پر هزینه و همه گیر در گلـه های گاو شیری سراسر جهان است. این بیماری در اثر تکثیر میکرو ارگانیسم های بیماری زا در غـدد پـستان ایجـاد مـی شـود کـه منجـر بـه کـاهش تولیـد شـیر، تغییـر کیفیـت و افزایش SCC می شود. منبع اولیه اکثـر عفونـت هـا کـار- تیه‌های گاوان آلوده ای است که به شکل تحت درمانگـاهی یا مزمن حامل عفونت اند .معمولا گاوان مسن گله چنین

۱ – گروه آموزشی میکروبیولوژی ،دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد ، شهرکرد – ایران
۲ – گروه آموزشی میکروبیولوژی ،دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران ، تهران – ایران
۳ – مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج ، کرج – ایران

حالتی را دارند. حداقل ۵۰ ٪ گله های گـاو شـیری اسـترالیا به شکل تحت درمانگاهی این عفونت مبتلا بوده و بـر آورد می شود که این بیماری در هر سـال خـسارتی بـالغ بـر ٦۰ میلیون دلار به صنعت دامپروری این کـشور زیـان وارد مـی کند (۱و٤). مایکوپلاسما هـا بـه عنـوان سـومین عامـل ورم پـستان مـسری پـس از اسـتافیلوکوکوس اورئـوس و اسـترپتوکوکوس آگالاکتیـه قـرار دارنـد (۲). هـر چنـد کـه تاکنون۱۱ گونه مایکوپلاسما در این بیمـاری تـشخیص داده شده اسـت ولـی مهـم تـرین گونـه در ایـن بیمـاری گونـه بـویس(bovis) اسـت(۱۱و۱۰). گونـه هـای آلکالـسنس(alkalescens)، کانـادنس(canadens)، کـالیفرنیکوم(californicum) و بـوی جنیتـالیوم (bovigenitalium) بـا حـدت متوسـط و گونـه بـوی رینیس(bovirhinis) با حدت کم نیز در این بیماری دخیـل است(۱۲و٦) .در اروپـا، امریکـای شـمالی و اسـترالیا اخیـراً گونه بویس به عنوان یک عامل مهم ورم پـستان کـه باعـث افزایش S.C.C و افت تولید شیر می شـود گـزارش شـده است (۵).

هم چنین این عفونت مهمترین مشکل پستانهای بظاهر سالم گاوهای شیری در استرالیا گزارش شده اسـت. یکـصد cfu در هر میلی لیتر از این بـاکتری مـی توانـد پـس از کلـونیزه شدن در پستان و طی یـک دوره کمـون حـداقل ٦-۲ روزه باعث باعث بیماری شود. گاوهای مبتلا علائـم افـت تولیـد شیر، غیر طبیعی شدن رنگ شیر، سفت شـدن قـوام آن و در مراحل پیشرفته رسوب دانه هـای شـنی را بـه همـراه تـورم کارتیه‌ها نشان خواهنـد داد (۳). ایـن گاوهـا ممکـن اسـت بعلت مقاومت به درمان در طول عمر آلوده باقی مانده و بـه دفع باکتری بشکل متناوب ادامه دهند. گوساله‌های گلـه نیـز ممکن است بعلت عدم رعایت موازین بهداشتی یا تغذیه بـا شیر آلوده به بیماری مبتلا شوند (۹و۸و۷).

از آنجـا کـه تـاکنون علیـرغم عـدم تـشخیص عوامـل ورم پستان‌هایی که به درمان پاسخ نمی‌دهنـد تحقیقـی در زمینـه نقـش مایکوپلاسـما هـا در ورم پـستان در ایـران صـورت نگرفته است، لذا ایـن تحقیـق بـه منظـور مـشخص نمـودن فراوانی گونه بویس و سایر گونه‌های غالب مایکوپلاسما در مخازن شیر گاوداریهای صـنعتی و نیمـه صـنعتی شهرسـتان شهرکرد صورت پذیرفت.

مواد و روش کار

در این تحقیق از مخازن شیر کلیه٦۱ گاوداری شیری صنعتی و نیمه صنعتی شهرستان شهرکرد در فاصله زمـانی زمـستان ۸۳ تا زمستان ۸٤ نمونـه بـرداری صـورت پـذیرفت. بـرای نمونه گیری از شیر هر ۱۰ رأس گاو بسته بـه سیـستم شـیر دوشی، یک نمونه گرفته و سپس نمونه در مجاورت یـخ بـه آزمایشگاه ارسال می گردید. ۱/۵ میلی لیتر از هـر نمونـه را به داخل لوله‌های اپندروف ریخته و سپس با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه بمدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ می گردید. پـس از سانتریفوژ ۳۰۰ میکرولیتر از رسوب برداشته شده و به ۲۷۰۰ میکرولیتر محیط مایع مایکوپلاسـما (PPLO broth) تلقـیح می گردید. هم زمـان بـا تلقـیح ۳۰۰ میکرولیتـر از رسـوب نمونـه بـه داخـل محـیط مـایع مایکوپلاسـما، یـک لـوپ (۵میکرولیتـر) از رسـوب بـه طـور مـستقیم روی محـیط مایکوپلاسما آگار نیز تلقیح میگردید. در مرحله بعد از رقت ۱/۱۰ نمونه شیر در داخل محیط مایکوپلاسـما بـراث، ۳۰۰ میکرولیتر برداشـت کـرده و بـه ۲۷۰۰ میکـرو لیتـر محـیط مایکوپلاسما براث دیگر تلقیح میگردیـد. ایـن عمـل رقیـق سازی متوالی در داخل محیط مایکوپلاسما براث تا رقـت 10^{-4} ادامه می یافت و در نهایت از لوله آخـر ۳۰۰ میکرولیتـر به بیرون ریخته می‌شد . لوله های آزمایش همگی در حالیکه در هر دقیقه یکبار می چرخیدند بـه مـدت ۷ روز در دمـای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری و در طی ایـن مـدت در صورت مشاهده تغییر رنگ محیط از قرمز به نـارنجی یـا زرد، اقدام به فیلتر نمـودن محـیط (فیلتـر ۰/٤۵ میکـرون) و تلقیح داخل محیط مایکوپلاسما براث دیگر میگردید. پس از

طی مدت گرمخانه گذاری اقدام به تلقیح ۵۰ میکرولیتر از رقیق ترین لوله به محیط مایکوپلاسما آگار(PPLO Agar) میگردید. پلیت های تلقیح شده بمدت ١٤ روز در گرمخانه ۳۷ درجه سانتیگراد و ۱۰٪ Co_2 قرار داده می‌شد. در مرحله بعد محیط‌های مایکوپلاسما آگار با دقت با میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار می‌گرفت . پرگنه‌های مایکوپلاسما در داخل این محیط شبیه تخم مرغ نیمرو(Friedd egg) مشاهده می‌شدند ولی برای تفکیک مایکوپلاسماها از باکتری‌های L-Form ، آکوله پلاسماها و اورآپلاسما پس از خالص کردن پرگنه‌های مایکوپلاسما، از رنگ آمیزی دینس (Diens staining)، تست حساسیت به دیجیتونین و تست اوره آز اصلاح شده کمک گرفته می‌شد. هم چنین از آزمایشهای تخمیر گلوکز، هیدرولیزآرژینین، همولیز گلبولهای قرمز، نیاز به استرول و تست فسفاتاز نیز برای شناسایی گونه های مختلف مایکوپلاسماهای جدا شده بهره گرفته می شد. در مرحله دوم تحقیق با توجه به اینکه طبق مطالعات محققین مختلف حداقل تعداد قابل جستجوی مایکوپلاسما در روش PCR بالاتر از $100 \, CFU/ml$ میباشد، از رسوب نمونه های شیر اخذ شده در مرحله قبل در محیط مایع مایکوپلاسما غنی سازی شد تا در صورت کم بودن تعداد مایکوپلاسما، تعداد آن در این محیط افزایش یابد. پس از گرمخانه گذاری محیط مایع مایکوپلاسما در شرایط فوق و ایجاد کدورت نسبی با سرعت ۲۰۰۰۰ دور در دقیقه بمدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ میگردید. پس از سانتریفوژ مایع رو دور ریخته شده و هم حجم رسوب انتهای لوله، از با فرتجزیه کننده مایکوپلاسما اضافه میگردید.

این بافر شامل $NaCL10\ mM$ ، TrisHCL(PH = 7/4)20mM ، $EDTA1mM$ ، بود که به میزان $SDS\%0/5$ و $100\ \mu g/ML$ پروتئیناز K نیز به آن اضافه گردیده بود. از با فرتجزیه کننده مایکوپلاسما به مدت یک شب روی رسوب انتهای لوله اپندروف در داخل بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده می شد و پس از یک شب گرمخانه گذاری هم حجم سلولهای تجزیه شده ، فنل اشباع اضافه میگردید. پس از ۳ دقیقه تکان دادن ، لوله بمدت ۳ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دورسانتریفوژ میگردید. در مرحله بعد مایع رو به آرامی به لوله اپندروف دیگری منتقل و هم حجم آن فنل، کلروفرم، ایزوامیل الکل به نسبت ٠/٤ : ٩/٦ : ١٠ اضافه میگردید. پس از ۳ دقیقه تکان دادن این مخلوط و ۳ دقیقه سانتریفوژ در ۱۳۰۰۰ دورمجدداً مایع رویی با دقت برداشت می شد و پس از انتقال آن به لوله دیگر، هم حجم آن کلروفرم، ایزوامیل الکل به نسبت ٠/٤ : ٩/٦ اضافه میگردید. در این مرحله مخلوط به مدت ۳ دقیقه تکان داده می شد و مجدداً پس از ۳ دقیقه سانتریفوژ در ۱۳۰۰۰ دور مایع رو به لوله مجزای دیگری انتقال می یافت. سپس از استات سدیم به میزان $1/10$ حجم مایع رویی و از اتانل مطلق به میزان دو برابر حجم مایع رویی اضافه و پس از ۳ دقیقه تکان دادن بمدت ۵ دقیقه در ۲۰/۰۰۰ دور سانتریفوژ می گردید. در پایان این مرحله رسوب DNA بصورت واضح در مقابل نور قابل رؤیت بود.

در این مرحله نیز مایع رو دور ریخته می شد و پس از خشک شدن لوله اپندورف به میزان ۵۰ میکرولیتر آب مقطر به رسوب انتهای لوله اضافه می گردید و پس از یکنواخت کردن به جهت باز شدن رشته های DNA از یکدیگر، این لوله به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤٨ درجه سانتیگراد قرار می گرفت. DNA تهیه شده به روش فوق سپس برای مراحل بعدی آزمایش نگهداری می گردید. برای ارزیابی DNA استخراج شده، غلظت DNA با استفاده از دستگاه بیوفتومتر در طول موج ٢٦٠ نانومتر قرائت می شد و در صورت غلیظ بودن به میزان کافی رقیق می گردید. درمرحله بعد ۵ میکرولیتر از DNA آماده شده در ژل واجد ۰/۸

درصد آگارز، الکتروفورز می گردید. در صوت مشاهده DNA در داخل ژل پس از رنگ آمیزی ، اقدام به فریز کردن DNA در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد تا زمان استفاده می گردید. مرحله بعد آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای چهارگونه مهم دخیل در ورم پستان صورت گرفت. این پرایمرها شامل :

Mbo F (5-GGCTCTCATTAAGAATGTC-3) و Mbo R (5-TTTTAGCTCTTTTTGAACAAAT-3) در مورد گونه بویس

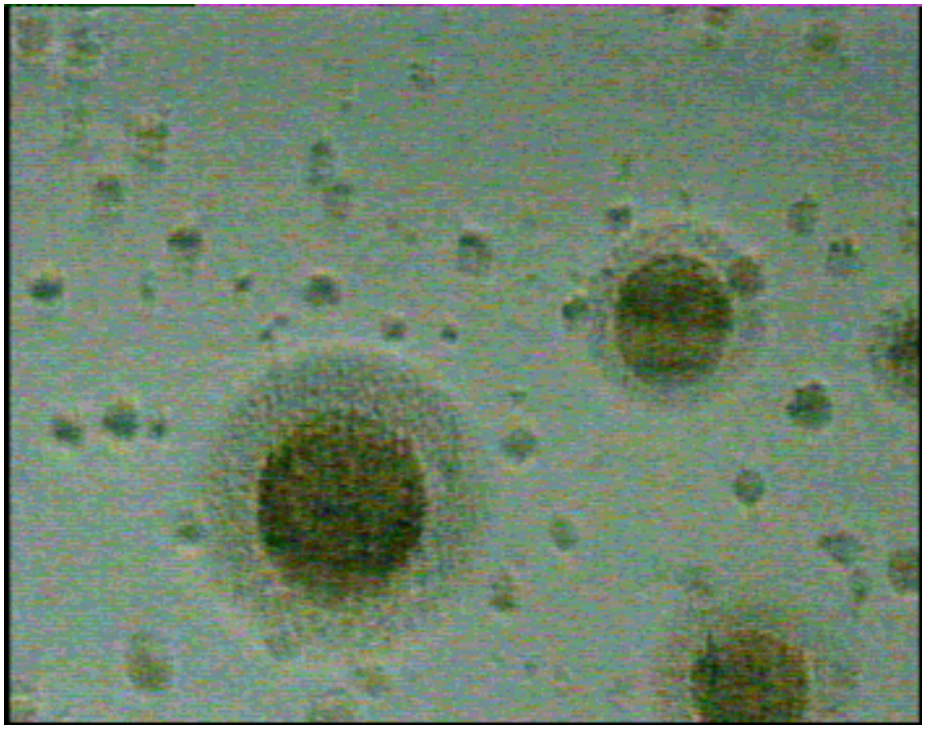
Mak F(5-GCTGTTATAGGGAAAGAAAACT-3) و MakR(5-AGAGTCCTCGACATGACTCG-3) در مورد گونه آکالسنس

MbgF(5-CGTAGATGCCGCATGGCATTTACGG-3) و MbgR(5-CATTCAATATAGTGGCATTTCCTAC-3) در مورد گونه بوی جنیتالیوم و

Mbr F (5-GCTGATAGAGAGATCTATCG-3) و Mbr R (5-ATTACTCGGGCAGTCTCC-3) در مورد گونه بوی رینیس بود. آزمون PCR با استفاده از PCR buffer 10x به میزان ۰/۷۵ میکرولیتر، $MgcL_2$ ۵۰mM به میزان ۱ میکرولیتر، $dNTP_{(mix)}$ به میزان ۰/۷۵ میکرولیتر، از هر پرایمر ۱/۵ میکرولیتر، DNA به میزان ۲ میکرولیتر، Taq DNA Polymerase 5u/ml به میزان ۰/۱۵ میکرولیتر و H_2O به میزان ۱۵/٦ میکرولیتر و با حجم کلی ۲۵ میکرولیتر صورت می گرفت .پس از افزودن اجزاء PCR در حجم های فوق و Spin کردن تیوبها، تیوبها در داخل دستگاه PCR قرار داده می شد. در دستگاه PCR مرحله Predenaturation بمدت ٦ دقیقه در دمای ۹٤ درجه سانتیگراد صورت می‌گرفت. در مرحله دوم که ۳۳ بار تکرار می شد، denaturation بمدت ۱ دقیقه در دمای ۹٤ درجه سانتیگراد می شد، Annealing بمدت ۱ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد و Extension به مدت ۱ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد صورت می‌گرفت. مرحله Extension نهایی نیز به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد صورت می‌گرفت. محصولات PCR سپس به ژل واجد ۱/٦٪ آگارز TAE 1x (Tris , EDTA 1mM acetate 40mM) با ولتاژ ۱۲۰، الکتروفورز می شد و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید در داخل دستگاه قرائت می گردید.

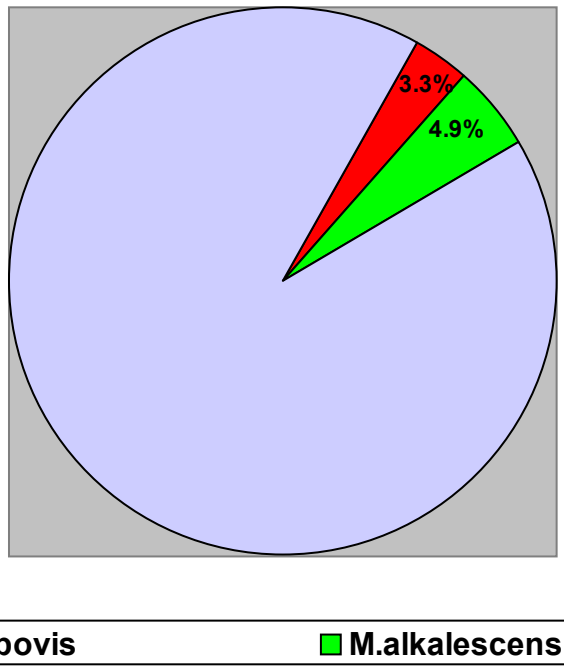
نتایج

در نهایت از کشت و بررسی نمونه‌های متعلق به مخازن شیر ٦۱ گاوداری صنعتی و نیمه صنعتی شهرستان شهرکرد، در مجموع از نمونه‌های متعلق به ۵ گاوداری پرگنه‌های مایکوپلاسما جدا گردید که پس از انجام تست‌های بیوشیمیایی در دو مورد گونه بویس مایکوپلاسما و در سه مورد گونه آلکالسنس مایکوپلاسما با تستهای بیوشیمیایی تأیید گردید. در مورد گونه بویس علاوه بر تست‌های بیوشیمیایی آزمایش آگلوتیناسیون با آنتی سرم اختصاصی این گونه صورت گرفت و تشخیص مرحله قبل تأیید گردید . شکل پرگنه این دو گونه مایکوپلاسما در تصاویر ۱و۲ نمایان است. با احتساب این تعداد موارد آلودگی، درصد آلودگی مخازن شیر گاوداریهای صنعتی و نیمه صنعتی شهرستان شهرکرد به گونه بویس ۳/۳٪ و به گونه آلکالسنس ٤/۹٪ برآورد گردید که در تصویر ۳ درصد فراوانی گونه های شایع مایکوپلاسما آمده است. نتایج آزمون PCR نیز که کاملاً با نتایج کشت همخوانی داشت در مورد گونه بویس قطعه‌ای با طول ۷۵۰ باز و در مورد گونه آلکالسنس قطعه‌ای با طول ٤۰۰ باز نشان می‌داد که این موارد نیز در تصاویر ٤ و ۵ نشان داده شده است. مارکر مورد استفاده در مورد گونه بویس مایکوپلاسما Kbp ۱ و در مورد گونه آلکالسنس مایکوپلاسما bp ۱۰۰ بود.

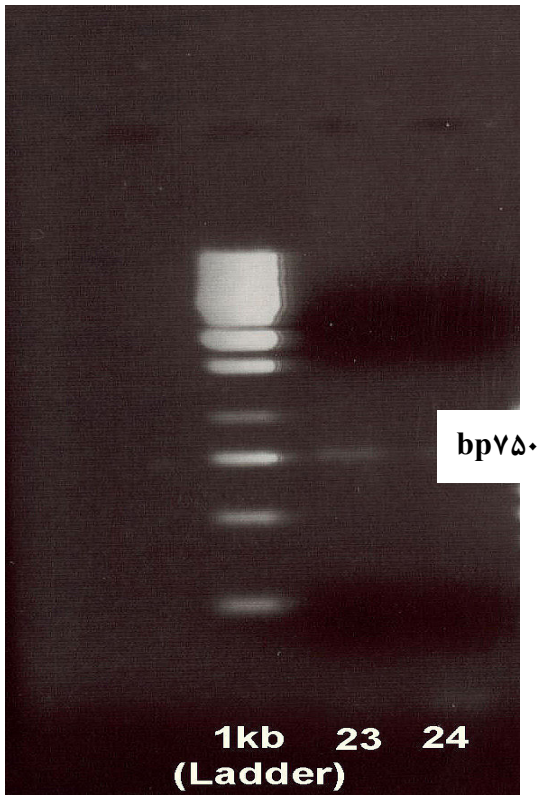


نگاره ۱ – پرگنه ی مایکوپلاسما بویس با بزرگ نمایی ۱۰

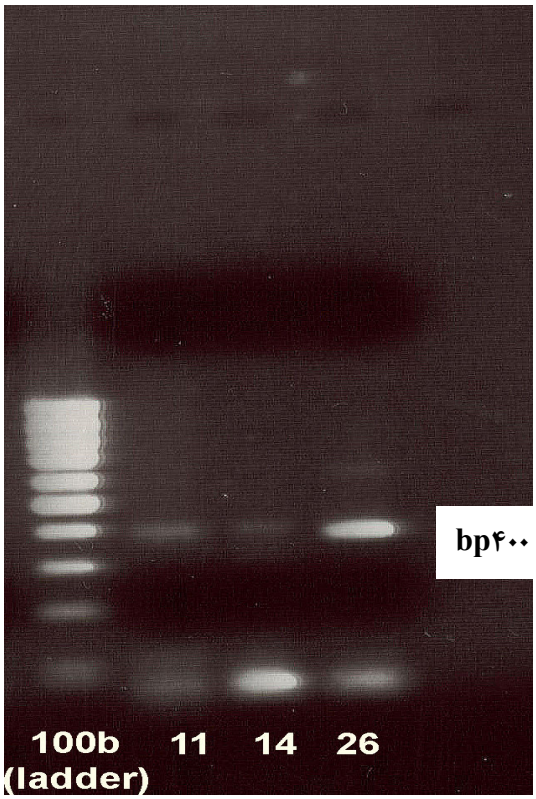
نگاره ۲– پرگنه ی مایکوپلاسما آلکالسنس با بزرگ نمایی ۱۰



نمودار ۱ – نمودار درصد فراوانی گونه های شایع مایکوپلاسما در مخازن شیر گاوداری های صنعتی و نیمه صنعتی شهرستان شهرکرد



نگاره ۳- آزمایش PCR به همراه پرایمر های گونهٔ بویس بر روی ژل به همراه مارکر ۱Kbp



نگاره ٤ ـ آزمایش PCR به همراه پرایمر های گونهٔ آلکالسنس بر روی ژل به همراه مارکر ۱۰ bp

بحث

هدف این بررسی تعیین میزان فراوانی گونه‌های مایکوپلاسما در مخازن شیر گاوداریهای صنعتی و نیمه صنعتی شهرستان شهرکرد بود که بر اساس نتایج این تحقیق ۸/۲٪ این مخازن آلوده به این باکتری بودند. از آنجا که در حال حاضر در میان روش‌های تشخیص عوامل ورم پستان بطور مرسوم در کشور هیچ گونه بررسی روی مایکوپلاسما صورت نمی‌گیرد، این مطالعه را می‌توان اولین گزارش ورم پستان با عامل مایکوپلاسما در گاوداریها تلقی کرد. در آیوای آمریکا نیز ۳/۳٪ مخازن شیر گاوداریها به این باکتری آلوده بوده‌اند (٤). در استرالیا، گونه بویس مایکوپلاسما با غلظت کم در مخازن شیر گاوداریها وجود دارد و از ۸۰٪ تانکهای شیر با S.C.C بالا این گونه جدا شده است (٤). بنظر می‌رسدکه تفاوت در سطح جستجوی گونه بویس در استرالیا با ایران، ژاپن، آیوا و حتی آمریکا مربوط به تفاوت در سطح انتشار عفونت در گله می باشد (٤) هر چند که در تحقیق حاضر نیز اگر نمونه‌های مخزن شیر با تکنیکهای حساس‌تری آنالیز شوند ممکن است فراوانی بالاتری گزارش شود. در روش کشت نظر به تناوب دفع این باکتری، جستجوی یک حیوان آلوده نیازمند تست مکرر است ضمن اینکه در دوره کمون نیز بوسیله کشت نمی‌توان به جستجوی مایکوپلاسما پرداخت . روش کشت علیرغم اینکه در مورد بسیاری از بیماری‌های عفونی یک روش طلائی و دقیق محسوب می‌گردد در مورد جستجوی مایکوپلاسما در شیر بدلیل وجود مواد ممانعت کننده طبیعی یا مصنوعی و به دلیل نیاز به مواد افزودنی بسیار زیاد به محیط بسته به گونه مایکوپلاسما ممکن است کمتر مصداق داشته باشد (٤) در تحقیق حاضر نیز جهت کاهش اثر مواد ممانعت کننده طبیعی یا مصنوعی و به منظور بالا بردن حساسیت این روش، نمونه‌های شیر در داخل محیط غنی کننده مایکوپلاسما براث تا رقت 10^{-4} رقیق گردید. روش‌های ایمونولوژیکی نیز برای جستجوی مایکوپلاسما در شیر نسبت به روش کشت کمتر توصیه می‌شود چرا که برای اعلام نتیجه مثبت در روشهای سرمی نیاز به افزایش عیار پادتنی است که ٤۰-۱۰ روز پس از آغاز علائم درمانگاهی بوجود می آید ضمن اینکه در دوره کمون نیز نمی‌توان به جستجوی مایکوپلاسماها پرداخت . واکنش‌های متقاطع سرمی نیز یک مشکل جدی است که حساسیت این واکنشها را بیشتر تحت تأثیر قرار می‌دهد (٦). با توجه به همین معایبی در واکنشهای سرمی ، روش کشت نسبت به این روش‌ها ترجیح داده می شود . هر چند که جستجو بوسیله کشت نیازمند دو هفته یا بیشتر زمان می باشد . با توجه به خصوصیات روش‌های فوق امروزه روش PCR که یکی دیگر از راههای تشخیص عفونت است که بخصوص با توجه به سرعت تشخیص آن بیشتر مورد توجه قرار گرفته است(٥). البته در روش PCR نیز نمونه‌هایی که واجد کمتر از 10^2 CFU/ml از این باکتری در هر میلی لیتر باشند جواب منفی کاذب خواهند داشت . علت این پدیده اندازه کوچک مایکوپلاسما، فقدان استحکام آن بدلیل نداشتن جدار و اتصال مایکوپلاسماها به ساختارهای پروتئینی و ته نشین شدن آنها می‌باشد. به دلیل عدم وجود DNA پس از استخراج در نمونه‌هایی که مایکوپلاسما به میزان کمتری وجود دارد در PCR جواب منفی کاذب مشاهده خواهد شد. البته این حالت صرفاً در مورد مایکوپلاسما مصداق دارد و در مورد سایر باکتریهای موجود در شیر که واجد دیواره هستند کمتر مصداق دارد. در برخی تحقیقات با استفاده از آنتی بادیهای مونوکلونال حساسیت روش PCR را به 2-20 CFU/ml نیز رسانده اند (۷). در تحقیق حاضر نیز با این دیدگاه اقدام به غنی سازی باکتریهای جدا شده در محیط مایکوپلاسما گردید. پس از زیاد شدن تعداد مایکوپلاسماها و ایجاد کدورت در دو مرحله رسوب گیری و سپس DNA استخراج گردید تا بتوان حساسیت آزمون

PCR را به حد مطلوبتری رساند. این فرآیند بخصوص از آنجا که مقدار نسبتاً زیاد پروتئینهای شیر و ممانعت کننده‌های DNA پلیمراز ممکن بود در طول تکثیر مشکلاتی را ایجاد کند نیز حائز اهمیت بود. بدیهی است بهمین دلیل نتایج آزمونهای کشت و PCR در این تحقیق کاملاً تأیید کننده یکدیگر بودند.

با عنایت به نتایج تحقیق فوق و با نظر به آنکه ورم پستان مایکوپلاسمایی یک مشکل همه‌گیردر گله‌های بزرگ گاوهای شیری سراسر جهان است که بشکل تحت درمانگاهی یا مزمن (S.C.C) دام را آلوده کرده و فراوانی آن در سالهای اخیر بطور چشمگیری افزایش یافته لذا لزوم تدوین برنامه‌های خاص جهت کنترل آن ضروری بنظر می‌رسد.

فهرست منابع

۱- حسنی طباطبائی ع. و فیروزی، ر.(۱۳۸۰) بیماری های باکتریایی دام، انتشارات دانشگاه تهران، صفحه ٤٨٤-٤٦٩ .

2- Cullor, J.S. and Tyrer. J.W,(2002) Large animal internal medicine, 3 th edition , Mosby Company, pp. 1012- 1032 .

3- Drost, J . Imms, L.L. and Rosenbusch, R.F, (1996)Detection of Mycoplasma bovis mastitis in Iowa dairy herds , Dairy Report, 104 : 104-106 .

4- Ghadersohi, A . Hirst, R.G . Frobes, J . and Coelen, R.G, (1999)Preliminary studies on the prevalence of Mycoplasma bovis mastitis in dairy cattle in Australia. Vererinary Microbiology, 65 : 185-194.

5- Ghadersohi, A. Coelen, R. J. and Hirst, R.G., (1997)Development of a specific DNA probe and PCR for the detection of Mycoplasma bovis, Veterinary Microbiology, 20: 627-625 .

6- Hirose. k. kawasaki: Y. kotanh, k. Tanaka, A. Abico, K. and Ogawa. H, (2001)Detection of Mycoplasma in mastitic milk by PCR analysis and culture method , J. Vet. Med. Sci , 63 : 691-693 .

7- Hotzel, H . Heller, M. and Sachse, k., (1999) Enhancement of Mycoplasma bovis detection in milk samples by antigen capture prior to PCR, Molecular and Cellular Journal, 13 :175-178 .

8- Kobayashi, H. Hirose, K. Worarach, A. Paugtes, P. Ito, N. Morozumi, T. and Yamamoto, K., (1998)In vitro Jamplification of the 16 srRNA genes from M. bovirhinis, M. alkalescens and M. bovigenitalium by PCR ,J.Vet.Med.Sci ,60 : 1200-1203.

9- Pinnow, C.C. Butler, J.A. Sachse, K. Hotzel, H. Timms, L.L. and Rosenbusch, R. F., (2001)Detection of Mycoplasma bovis in preservative – Treated Field milk samples, J.Dairy . Sci , 84:1640 – 1675.

10-Quinn, P.J. Carter, M.E. Markey, B. and Carter, G.R., 1994, Clinical veterinary microbiology, Mosby Wolf , PP . 320-326 .

11- Razin, S. Yogev, D. and Naot, Y., (1998) Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasma , Microbiol . Mol . Biol . Rev , 62: 1094-1156 .

12- Timoney, J.F. Gillespie, J.H. Scott, F. and Barlough, J.E. (1992)Hagan and bruner's microbiology and infectioun disease of domestic animal, Eighth edition, Comstock Publishing Associates , PP. 295-320 .