DOI: 10.22092/vj.2017.111106.1324
شماره ۱۱۸ بهار ۱۳۹۷
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

فیلوژنی سویه‌های واکسن *مایکوپلاسما آگالاکتیه* موجود در ایران با استفاده از روش Multi Locus Sequence typing (MLST)

• **خاطره کبیری**
گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران
• **کیوان تدین (نویسنده مسئول)**
دکترای تخصصی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
• **سید علی پوربخش**
دکترای تخصصی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
• **جمیله نوروزی**
گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۲۹-۰۳-۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: ۱۵-۰۷-۱۳۹۶
Email: k.tadayon@rvsri.ir

چکیده

مایکوپلاسما آگالاکتیه یکی از عوامل اصلی ایجاد آگالاکسی در نشخوارکنندگان کوچك می‌باشد. ایران یکی از کانون‌های اصلی اپیدمی‌های سالانه این بیماری در جهان شناخته می‌شود. واکسن کشته آگالاکسی با استفاده از سه سویه بومی شیراز، طالقان و لرستان در موسسه رازی تولید می‌شود. به منظور شناسایی ویژگی‌های ژنتیکی این سویه‌ها سیستم تایپینگ Multi Locus Sequence typing (MLST) با تمرکز بر روی ۵ ژن *metS* ، *gyrB*، *gltX*، *dnaA* و *tufA* و بر اساس پروتکل پیشنهادی بانك بین‌المللی MLST م. آگالاکتیه اجرا گردید. بر اساس نتایج بدست آمده هر سه سویه در لوکوس *dnaA* آلل ۱ ، در لوکوس *gltX* آلل ۲۱، در لوکوس *gyrB* آلل ۲، در لوکوس *metS* آلل ۲ و در لوکوس *tufA* آلل ۱ را ارائه نمودند. در لوکوس *gltX* آلل مربوط به سه سویه ایرانی جدید و بدون سابقه گزارش قبلی شناسایی گردید. بدین ترتیب یك تیپ ژنتیکی sequence type (ST33) جدید با شباهت زیاد به ST4 که پیش از این در بانك بین المللی MLST ثبت شده است شناسایی گردید. ما معتقدیم ویژگی‌های پرورش دام در ایران اقتضا می‌نماید که کمپلکس یا کمپلکس‌های کلونال بومی م. آگالاکتیه در فضای جغرافیایی ایران انتشار داشته باشند.

کلمات کلیدی: مایکوپلاسما آگالاکتیه، آگالاکسی، MLST ، کلونال کمپلکس، Sequence Type

● Veterinary Researches & Biological Products No 118 pp: 93-99

Phylogeny of *Mycoplasma agalactiae* vaccine strains in Iran, a molecular study based on multilocus sequence typing

By: Kabiri, Kh., Department of Microbiology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.; Tadayon, K., (Corresponding Author), Agricultural Research, Education and Extention Organization (AREEO), Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran.; Poorbakhsh, S.A., Agricultural Research, Education and Extention Organization (AREEO), Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran. And Norouzi, J., Department of Microbiology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Email: k.tadayon@rvsri.ir

Received: 2017-06-19 Accepted: 2017-07-10

Mycoplasma agalctiae (Ma) is a principle agent in etiology of agalaxy. Iran remains a major world stronghold for agalaxy with numerous annual outbreaks. Three indigenous Ma strains of Lorestan, Taliqan and Shiraz are used in preparation of agalaxy vaccine at Razi institute. In order to characterize genetic properties of these strains a MLST genotyping system consisting of five genes (*dnaA, gltX, gyrB, metS, tufA*) based on guidelines recently developed was employed. In consequence, at *dnaA, gltX, gyrB, metS* and *tufA* loci of all the three strains alleles 1, 21, 2, 2 and 1 were identified, respectively. The *gltX* allele (21) was shown to be new with no previous record in the MLST database. A new sequence type (ST33) with close similarity to ST4 was assigned to these stains. Given the characteristics of the Iranian animal farming sector, we assume circulation of more clonal complex or complexes of Ma in the Iranian environment is expectable.

Keyword: *Mycoplasma agalactia,* Agalaxy, MLST, Clonal complex, Sequence type

مقدمه

آگالاکسی یک بیماری عفونی مخصوص نشخوارکنندگان کوچک و همراه با تظاهرات بالینی ناشی از التهاب در پستان، مفاصل و همچنین ملتحمه چشم دام می‌باشد. آگالاکسی جزو بیماری‌های است که گزارش موارد وقوع آن در کشورهای عضو سازمان جهانی بهداشت دام (OIE)، الزامی است (۱). با وجود گسترش جهانی، این بیماری بطور عمده در کشورهای منطقه مدیترانه به صورت بومی دیده می‌شود. مایکوپلاسما آگالاکتیه عامل اصلی ایجاد آگالاکسی شناخته می‌شود اما مایکوپلاسما کاپریکولوم زیر گونه کاپریکولوم و مایکوپلاسما مایکوئیدس زیرگونه کاپره نیز به دفعات از دام‌های بیمار در بسیاری از کشورهای جهان جداسازی گردیده است (۲). لویی دلپی رئیس وقت موسسه رازی (بنگاه حصارك) در کتاب "بیماری‌های ساری دام در ایران" در سال ۱۳۱۷ به وجود آگالاکسی در میان دام‌های ایران و روش‌های درمانی آن اشاره نمود. نخستین جدایه‌های ایرانی مایکوپلاسما آگالاکتیه از دام‌های بیمار در سال ۱۳۳۸جمع‌آوری (۳, ۴) و در ۱۳۴۱ اولین نمونه‌های واکسن بر علیه این بیماری در موسسه رازی تولید و روانه بازار گردید. واتسون در ۱۹۶۸ میلادی به استفاده از یک سویه مایکوپلاسما آگالاکتیه ایرانی اخذ شده از موسسه رازی در آزمایشات بیماری‌زایی اشاره می‌نماید (۵). العبیدی در سال ۱۹۷۲ میلادی به استفاده از دو سویه ایرانی مایکوپلاسما بنام‌های قلعه مرغی و S-۵-۶۴ در تحقیق خود اشاره نمود که آن‌ها را از موسسه رازی دریافت نموده بود (۶).

از سال ۱۳۵۰ تا زمان حاضر تولید واکسن آگالاکسی در ایران با بکارگیری سه سویه بومی طالقان، لرستان و شیراز (۳, ۷) و بروش غیرفعال نمودن باکتری با استفاده از فرمالین ادامه یافته است. علیرغم همه اقدامات بهداشتی انجام پذیرفته، ایران همچنان یکی از مناطق اصلی حضور بیماری در آسیا شناخته می‌شود و کانون‌های متعدد آن در بسیاری از مناطق جغرافیایی ایران بصورت پیوسته گزارش می‌گردند (۸-۱۰).

در کنترل آگالاکسی توانایی شناسایی منشاء وقوع اپیدمی‌های بیماری منوط به کاربرد روش‌های ژنوتایپینگ با قدرت تشخیص افتراقی بالا میان سویه‌های عامل بیماری می‌باشد. مطالعات اولیه مولکولی نشان داده‌اند که مایکوپلاسما آگالاکتیه از نظر ژنتیکی هموژن می‌باشد. استفاده از روش PFGE بر روی جدایه‌های این باکتری در ایتالیا تفاوت ژنتیکی قابل توجهی را نشان نداده است (۱۱). در سال‌های اخیر ژنوم دو سویه م. آگالاکتیه جدا شده از بز در اسپانیا به نامهای PG2 و ۵۶۳۲ بطور کامل تعیین توالی گردیده است (۱۲) و بدین‌ترتیب زمینه معرفی و توسعه تکنیک‌های ژنوتایپینگ مولکولی Variable analysis (Number of Tandem Repeat (VNTR (۱۳) و همچنین Multilocus Sequence Typing (MLST) analysis را فراهم نموده است. در تکنیک

MLST توالی نوکلئوتیدها در قطعات داخلی تعداد مشخصی از ژن‌های حیاتی در تشخیص قطعی جدایه‌ها/سویه‌های پاتوژن بکار گرفته می‌شوند. در مورد هر ژن هدف، توالی‌های مختلف به عنوان آلل‌های متمایز شناخته می‌شوند و در مورد هر جدایه/سویه تجمیع آلل‌های مرتبط با ژن‌های مورد بررسی تشکیل یک الگو می‌دهند که با عنوان ST (sequence type) شناخته می‌شود (۱۴). علاوه بر توانایی نشان دادن ارتباطات تکاملی میان باکتری‌ها، تکنیک MLST دارای مزایای دیگری نظیر تولید اطلاعات مشخص، واضح و قابل انتقال از طریق اینترنت و اشتراک میان آزمایشگاه‌های سرتاسر جهان می‌باشد. بانک اطلاعات بین‌المللی متمرکز MLST در سال ۲۰۰۴ معرفی (۱۵) و در سال ۲۰۱۱ قسمت مربوط به مایکوپلاسما آگالاکتیه بر مبنای روش پیشنهادی مک آلیف فعال گردید (۲). در این بانک اطلاعات (قابل دسترسی از طریق https://pubmlst.org/magalactiae) تا پایان ماه می ۲۰۱۷ میلادی تعداد ۳۲ تیپ ژنتیکی (ST) و ۹۵ آلل ثبت شده است.

در مطالعه حاضر به منظور آگاهی از ساختار ژنتیکی و همچنین شناخت مقایسه‌ای ارتباطات تکاملی میان سویه‌های سه گانه مایکوپلاسما آگالاکتیه مورد استفاده در تولید واکسن در ایران با سایر مناطق جهان از تکنیک MLST استفاده شده است.

مواد و روش‌ها

بازیافت باکتری و فراهم‌آوری ماده ژنتیکی: سه ویال شیشه‌ای محتوی سویه‌های *M. agalactiae* Taliqan و *M. agalactiae* Shiraz و *M. agalactiae* Lorestan از فریزر خزانه بذر واکسن بخش تولید واکسن‌های هوازی دامپزشکی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی انتخاب و از محتویات آن‌ها پس از ذوب برای تلقیح (۵ میلی‌لیتر) ۲ لوله کشت فالکون هریک محتوی ۴۵ میلی‌لیتر محیط اختصاصی PPLO

جدول ۱- اطلاعات مربوط به لوکوس‌های ژنتیکی مورد استفاده در تحقیق بر مبنای ژنوم سویه *Mycoplasma agalactiae* PG2

PCR locus	PCR Primer (۵' → ۳')	Start	Stop	PCR amplicon (size (bp	Sequence analyzed (bp)	Alleles reported
UVRC	F- CTC AAA AAT ACA TCA ACA AGC R- CTT CAA CTG ATG CAT CAT AA	۵۸۴۱۲۶	۵۸۵۷۵۲	۱۶۲۷	NA	NA
dnaA	F-TAA CGT AAC CCC AAA CTC AC R- CAT AAT TCA GGC GTC ATC TT	۱۷۱	۹۳۲	۷۶۲	۶۷۲	۲۰
gltX	F- GCC TTG CCT ACA AAT CTT AT R- ATA GTT GCT TAA GCG CAA AC	۶۶۹۸۴۳	۶۷۰۶۳۴	۷۹۲	۶۹۹	۲۰
gyrB	F- CAA TAC ACA TCA ACC TTC CA R- AGC AGA GTT ACC TTC GAC AA	۸۵۵۳۲۵	۸۵۵۸۴۳	۵۱۹	۴۰۸	۱۸
metS	F- GCC TGT AAA TTA GCC CTT CT R-TTT TAA CCA AAA ATC AAG CTG	۲۳۷۷۲۰	۲۳۸۴۷۵	۷۵۶	۶۸۷	۲۱
tufA	F- GAA CAT GAT TAC TGG TGC TG R- ACG GCC TTT TTC AAA TTC TA	۳۸۲۷۶۱	۳۸۳۵۴۱	۷۸۱	۶۸۱	۱۶
Total				۳۶۱۰	۳۱۴۷	۹۵

broth غنی شده با ۱۵ درصد سرم استریل اسب استفاده شد. ظروف کشت بمدت ۷۲ ساعت در انکوباتور شیکردار در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و تا هنگام مشاهده کدورت ناشی از رشد قابل رویت نگهداری شدند. لوله‌های کشت سپس سانتریفوژ (۳۰۰۰ g به مدت ۵ دقیقه) و پس از تخلیه مایع فوقانی رسوبات در هر دو لوله به یک میکروفیوژ تیوب مجهز به O-ring انتقال یافت. پس از افزودن ۵۰۰ میکرولیتر بافر TE لوله میکروفیوژ به بن ماری محتوی آب در حال جوش انتقال و بمدت ۱۵ دقیقه در عمق بن ماری تگهداری شد تا باکتری غیرفعال گردد. محتویات لوله پس از سانترفیوژ (۳۰۰۰ g به مدت ۵ دقیقه) و انتقال به لوله جدید بصورت مستقیم در آزمایش‌های مولکولی مورد استفاده قرار گرفت.

تعیین هویت

برای اطمینان از هویت باکتری در مورد هر سه سویه وجود مارکر ژنتیکی اختصاصی مایکوپلاسما آگالاکتیه که بخشی از ژن *uvrC* می‌باشد در ژنوم سه سویه تحت آزمون مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۶). برای این منظور موجویت این مارکر با استفاده از PCR و با استفاده از پرایمرهای MAGAUVRC1-L و MAGAUVRC1-R آزمایش گردید. جزئیات پروتکل PCR این در جدول ارائه شده است (جدول ۱).

اجرای تکنیک MLST

انتخاب لوکوس‌های MLST و پرایمر: از پرایمرهای پیشنهادی مک آلیف برای تکثیر بخش های هدف ژن‌های metS ، gyrB، gltX، dnaA و tufA استفاده شد (جدول۱).

PCR

به منظور ارزیابی امکان استفاده از یک پروتکل واحد دما/زمان و اجزاء یکنواخت واکنش‌های PCR از روش استفاده شد. همه واکنش‌های PCR هم حجم (۱۲ µL) تنظیم گردیدند. از کیت آمپلیکون (Ampliquor®, Denmark) برای آماده‌سازی واکنش‌های PCR و از آب مقطر دوبار تقطیر به عنوان کنترل منفی و همچنین برای تنظیم حجم واکنش‌ها استفاده گردید. اجزاء هر واکنش شامل ۶ µL از کیت و ۱ µL از محلول هر یک از پرایمرها (با غلظت ۵ پیکامول در هر میکرولیتر) و ۲/۵ µL نمونه ماده ژنتیکی می گردید. فقط در PCR-MLST ۰/۳۶ µL از محلول کلرید منیزیوم (۵۰ میلی مولار) استفاده شد.

آمپلیفیکاسیون در دو مرحله مقدماتی (یک نوبت) Initial denaturation تحت شرایط ۴۵ s /۹۵ درجه سانتی‌گراد و در مرحله بعد برای ۳۰ چرخه متوالی متشکل از مراحل Denaturation ۴۵ s /۹۵ درجه سانتی‌گراد، annealing برای ۴۵ ثانیه، Extension با دمای ۶۰ S /۹۵ درجه سانتی‌گراد اجرا گردید. در پایان این مرحله یک چرخه نهایی (Final extension) ۶۰ s /۷۲ درجه سانتی‌گراد اجرا گردید. ارزیابی تولید محصولات آمپلیفیکاسیون از طریق ژل الکتروفورز (آگاروز ۱,۵ درصد پیش رنگ شده با Red Safe ®) در میدان الکتریکی (V/cm۲ برای ۲ ساعت) انجام گرفت.

تعیین توالی نوکلئوتیدهای محصولات PCR

همه محصولات آمپلیفیکاسیون مربوط به ۵ لوکوس در هر ۳ سویه تعیین توالی و نتایج با بکارگیری نرم افزارهای Chromas lite Version ۲,۱ (۱۷) و Clustal (۱۸) پردازش گردیدند تا توالی دقیق نوکلئوتیدها در هر لوکوس و در هر سویه مشخص گردد.

آنالیز بیوانفورماتیک: قطعات ژنتیکی هدف شامل ۶۷۲، ۶۹۹، ۴۲۰ ، ۶۸۷ و ۶۸۱ زوج باز به ترتیب از ژن‌های *dnaA, gltX, gyrB, metS* و *tufA* از سایت https://pubmlst.org/bigsdb?db=pubmlst_magalactiae_seqdef&page=downloadAlleles برداشت و قطعات هم ارز آن‌ها از لوکوس‌های تعیین توالی شده در سه سویه تحت بررسی مکان‌یابی و برش خوردند. با ارائه قطعات شناخته شده هر ژن از هر سویه به همین وب سایت آلل هر ژن شناسایی و تعیین گردیدند و الگوی ژنتیکی (ST) هر سویه نیز شناسایی گردید. برای آگاهی از ارتباطات تکاملی میان سه سویه ایرانی و جدایه‌های مایکوپلاسما آگالاکتیه از سایر نقاط جهان نمودار Minimum spanning tree با استفاده از نرم‌افزار BioNumerics ver ۶,۵ رسم گردید.

نتایج

در آزمایش PCR-UVRC یک قطعه بطول ۱/۷ kb توسط هر سه سویه تولید گردید و هویت هر سه سویه طالقان، لرستان و شیراز را به عنوان مایکوپلاسما آگالاکتیه مورد تایید قرار داد. در آزمایش‌های MLST همه ۵ لوکوس در هر سه سویه با استفاده از یک پروتکل PCR تکثیر گردیدند. با مراجعه به وب سایت بانک اطلاعات MLST مایکوپلاسما آگالاکتیه آلل مرتبط با هر ژن در سویه‌های تحت بررسی مشخص گردید. بدین ترتیب نشان داده شد که هر سه سویه طالقان، شیراز و لرستان بصورت مشترک دارای یک پروفایل یکسان ST بودند. هر سه سویه در لوکوس *dnaA* آلل ۱ در لوکوس *gltX* آلل ۲۱ در لوکوس *gyrB* آلل ۲ در لوکوس *metS* آلل ۲ و در لوکوس *tufA* آلل ۱ را تولید نمودند. در لوکوس *gltX* آلل مربوط به سه سویه ایرانی جدید و بدون سابقه گزارش قبلی شناسایی گردید و اقدام لازم برای ثبت آن در بانک اطلاعات صورت پذیرفت.

بحث

در طول سالهای پس از ۱۹۹۸ و معرفی تکنیک ژنوتایپینگ MLST این سیستم برای بسیاری از باکتری‌ها توسعه یافته است در حال حاضر بانک اطلاعات جامع در مورد هفت گونه مایکوپلاسما شامل *Mycoplasma agalactiae* (۲) و *Mycoplasma bovis* (۱۹) و *Mycoplasma hyopneumoniae* (۲۰) و *Mycoplasma hyorhinis* (۲۱) و *Mycoplasma iowae* و *Mycoplasma pneumoniae* (۲۲) و *Mycoplasma synoviae* (۲۳) توسعه یافته و در دسترس عموم می‌باشد.

در سال ۲۰۰۹، مهدوی با بررسی مقایسه‌ای ژن P40 سویه‌های سه گانه طالقان لرستان و شیراز بالاترین میزان تشابه ژنتیکی را میان دو سویه شیراز و طالقان (۹۹,۷ درصد) و کمترین میزان را میان دو سویه شیراز و طالقان (۷۴/۶ درصد) نشان داد (۲۴). این یافته‌ها با سوابق موجود از مشاهده تفاوت بین خصوصیات بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی این سویه‌ها در موسسه رازی سازگار می‌باشد (ستوده نیا اطلاعات منتشر نشده).

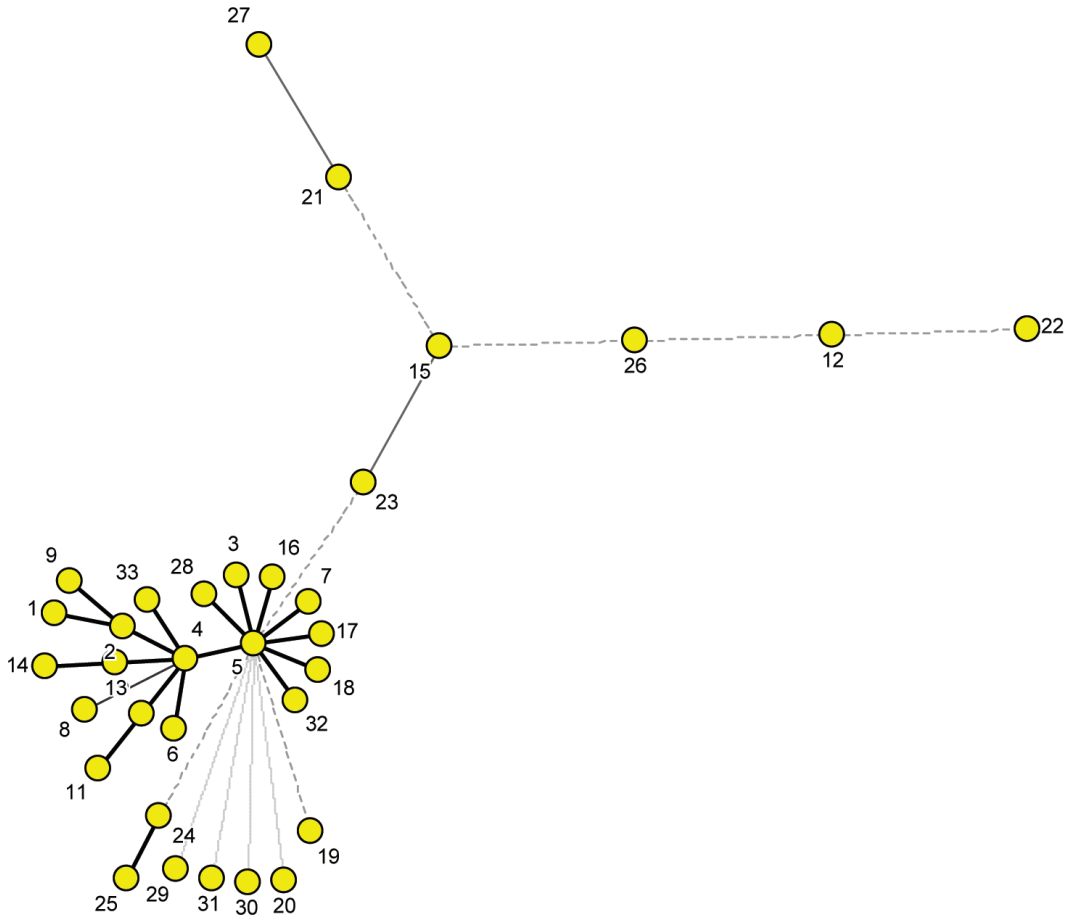
در مطالعه حاضر بررسی مقایسه‌ای ژنوتایپینگ به روش MLST بر روی هر سه سویه طالقان لرستان و شیراز منجر به شناسایی یک تیپ واحد ST33 گردید. اجرای یک سیستم تایپینگ مشابه بنام Multiple Locus Variable Number of Tandem repeat Analysis (MLVA) بر روی این سه سویه

نیز منجر به اخذ نتایج مشابهی شده است (تدین اطلاعات منتشر نشده) این مشاهدات می‌توانند نشان‌دهنده ارتباط بسیار نزدیک فیلوژنی میان این سه سویه باشند. در شکل یک، درخت minimum spanning tree تیپ مربوط به سه سویه ایرانی بیشترین شباهت را با تیپ ST۴ نشان می‌دهد که اتفاقا بنظر می‌رسد تیپ اجدادی (Founder) یک کمپلکس کلونال متشکل از ۱۰ تیپ (ST۱, ۲, ۶,۸, ۹, ۱۰, ۱۱, ۱۳, ۱۴, ۳۳) است. از آن‌جایی که در حال حاضر اطلاعی از تیپ‌های MLST دیگر سویه‌ها/جدایه‌های ایرانی مایکوپلاسما آگالاکتیه در دسترس نمی‌باشد لذا نمی‌توان راجع به وجود احتمالی تیپ‌های دیگر فوق در ایران اظهارنظر نمود. بررسی مقایسه‌ای میان ژنوم کامل دو سویه شناخته شده اسپانیایی مایکوپلاسما آگالاکتیه (PG۲ و ۵۶۳۲) نشاندهنده فعالیت‌های ژنتیکی گسترده در بیولوژی این سویه‌ها می‌باشد (۱۲). انجام یک مطالعه مشابه در ترکیه بر روی ۹ جدایه مایکوپلاسما آگالاکتیه منجر به شناسایی ۵ تیپ (ST) ژنتیکی گردید (۱).

با توجه به شباهت‌های زیاد میان دو کشور همسایه ترکیه و ایران از نظر قدمت دامپروری، موقعیت جغرافیایی در منطقه مدیترانه و سیستم سنتی دامپروری و همچنین بزرگی گله‌های گوسفند و بز به عنوان میزبان‌های اصلی این پاتوژن که در حال حاضر در ایران از ۳۰ میلیون راس دام کوچک متجاوز می‌باشد و علاوه بر آن فعالیت مایکوپلاسما آگالاکتیه در پهنه‌ای گسترده از جغرافیای این کشور، انتظار می‌رود سطح قابل توجهی از تنوع ژنتیکی در جمعیت مایکوپلاسما آگالاکتیه ایران وجود داشته باشد. انجام مطالعات تکمیلی بر روی جدایه‌های دیگر ایرانی می‌تواند درستی این فرضیه را نشان دهد.

نتیجه‌گیری

اجرای تکنیک MLST بر روی سه سویه واکسینال مایکوپلاسما آگالاکتیه شامل لرستان، شیراز و طالقان که در موسسه رازی از آن‌ها برای تولید تنها



شکل ۱- درخت Minimum spanning tree بیانگر ارتباط ژنتیکی میان ۳۳ تیپ ژنتیکی شناسایی شده موجود در بانک اطلاعات (https://pubmlst.org/magalactiae/MLST). لوکوس‌های مورد استناد در تعیین تیپ‌های ژنتیکی در این بانک شامل *dnaA* و *gltX* و *gyrB* و *metS* و *tufA* می‌باشند.

هر دایره رنگی یک تیپ ژنتیکی (ST) را نشان می‌دهد. برای جزئیات به متن مراجعه شود.

واکسن تجارتی آگالاکسی موجود در بازار ایران استفاده می‌شود منجر به شناسایی یک تیپ ژنتیکی (ST) واحد گردید که بنظر می‌رسد پیش از این از سایر نقاط جهان گزارش نگردیده است. پاسخ به این سوال که آیا این تیپ معرف یک کلونال کمپلکس غالب مایکوپلاسما آگالاکتیه در ایران می‌باشد بستگی به انجام مطالعات تکمیلی مشابه بر روی جمعیت این پاتوژن در کشور خواهد داشت.

تشکر و قدردانی

انجام این تحقیق تحت حمایت کامل مالی و لجستیکی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج و از محل ردیف بودجه‌های تحقیقاتی مرکز صورت پذیرفته است. نویسندگان از دکتر رایناک قادری، دکتر محمد سخاوتی و مهندس علی اکبر ناصری‌راد بخاطر مشارکت موثر در بازیافت و تجدید کشت سویه‌های واکسن، انجام عملیات آزمایشگاهی و جمع‌آوری اطلاعات تاریخی مربوط پیشینه سویه‌ها تشکر می‌نمایند. خاطره کبیری دانشجوی دکترای دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال می‌باشد و مقاله حاضر ناظر بر بخشی از یافته‌های حاصل از اجرای پایان‌نامه تحصیلی نامبرده می‌باشد.

منابع مورد استفاده

1. Manso-Silvan, L., et al., Phylogeny and molecular typing of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* by multilocus sequencing. *Vet Microbiol,* 2012. 161(1-2): p. 104-12.

2. McAuliffe, L., et al., Multilocus sequence typing of Mycoplasma agalactiae. *J Med. Microbiol.,* 2011. 60(6): p. 803-811.

3. Sotoodehnia, A., et al., Preparation of agalactia vaccine in fermentor. *Arch. Razi Inst.*, 2007. 62(1): p. 45-48.

4. Bory, G. and F. Entessar, Etude analytique de l'immiunoprophylaxie de l'agalaxie contagieuse des chevres et des moutons. *Arch. Inst. Razi*, 1959. 11: p. 5.

5. Watson, W., et al., The pathogenicity of mycoplasma organisms isolated from sheep and goats in Turkey. *J Comp. Pathol.,* 1968. 78(3): p. 283-291.

6. Al-aubaidi, J.M., A.H. Dardiri, and J. Fabricant, Biochemical characterization and antigenic relationship of *Mycoplasma mycoides* subsp. mycoides, Freundt and *Mycoplasma mycoides* subsp. capri (Edward) Freundt. *Int J Syst Evol Microbiol,* 1972. 22(3): p. 155-164.

7. Baharsefat, M., B. Yamini, and P. Ahourai, *Mycoplasma agalactiae.* V. Comparison of three different contagious agalactia vaccine. *Inst Razi Arch*, 1971. 23: p. 6.

8. Kheirabadi, K. and A. Ebrahimi, Investigation of *Mycoplasma agalactiae* in milk and conjunctival swab samples from sheep flocks in west central, Iran. *Pakistan J Biol. Sci.: PJBS,* 2007. 10(8): p. 1346-1348.

9. Kheirkhah, B., et al., The molecular characterization of *Mycoplasma agalactiae* isolates from Iranian goats when compared with other Iranian isolates and vaccinal strains. *African J Microbiol. Res.,* 2013. 7(4): p. 324-329.

10. Khezri, M. and S. Pourbakhsh, A survey of *Mycoplasma agalactiae* in small ruminants with contagious agalactiae syndrome in Iran. *Bangladesh J of Vet. Med.*, 2014. 12(1): p. 67-72.

11. Nouvel, L.X., et al., Molecular typing of *Mycoplasma agalactiae*: tracing European-wide genetic diversity and an endemic clonal population. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis,* 2012. 35(5): p. 487-96.

12. Nouvel, L.X., et al., Comparative genomic and proteomic analyses of two *Mycoplasma agalactiae* strains: clues to the macro- and micro-events that are shaping mycoplasma diversity. *BMC Genomics*, 2010. 11: p. 86.

13. McAuliffe, L., R.D. Ayling, and R.A. Nicholas, Identification and characterization of variable-number tandem-repeat markers for the molecular epidemiological analysis of *Mycoplasma mycoides* subspecies mycoides SC. FEMS Microbiol Lett, 2007. 276(2): p. 181-8.

14. Maiden, M.C., et al., Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA,* 1998. 95(6): p. 3140-5.

15. Jolley, K.A., M.S. Chan, and M.C.J. Maiden, MLSTdbNet–distributed multi-locus sequence typing (MLST) databases. BMC Bioinformatics, 2004. 5(1): p. 86.

16. Subramaniam, S., et al., Species identification of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* based on the *uvrC* genes by PCR. Mol Cell Probes, 1998. 12(3): p. 161-9.

17. Stucky, B.J., SeqTrace: a graphical tool for rapidly processing DNA sequencing chromatograms. *J Biomol Tech,* 2012. 23(3): p. 90-3.

18. Li, W., et al., The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. *Nucleic Acids Res*, 2015. 43(W1): p. W580-4.

19. Manso-Silván, L., et al., Phylogeny and molecular typing of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* by multilocus sequencing. *Vet Microbiol,* 2012. 161(1): p. 104-112.

20. Mayor, D., et al., Multilocus sequence typing (MLST) of Mycoplasma hyopneumoniae: a diverse pathogen with limited clonality. *Vet Microbiol,* 2008. 127(1-2): p. 63-72.

21. Tocqueville, V., et al., Multilocus sequence typing of Mycoplasma hyorhinis strains identified by a real-time TaqMan PCR assay. J Clin Microbiol, 2014. 52(5): p. 1664-71.

22. Brown, R.J., et al., Development of a multilocus sequence typ-

ing scheme for molecular typing of *Mycoplasma pneumoniae. J Clin Microbiol*, 2015. 53(10): p. 3195-203.

23. El-Gazzar, M., et al., Development of Multilocus Sequence Typing (MLST) for *Mycoplasma synoviae. Avian Dis,* 2017. 61(1): p. 25-32.

24. Mahdavi, S., et al., Comparative study of homology of cytoplasmic membrane protein 40 KDa of *Mycoplasma agalactiae* in isolated strains in Iran. *African J Microbiol. Res*, 2009. 3(9): p. 528-532.