Archive of SID

تشخیص گونه *مایکوپلاسما گالی‌سپتیکوم* به‌وسیله 16S rRNA PCR با پرایمرهای اختصاصی در نمونه‌های بالینی

سید علی پوربخش[1*]، افشین ذاکری[2]، نریمان شیخی[3]، سعید چرخکار[3]، عباس اشتری[4]

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات تهران، ایران، ایران
۲. دانشجوی دوره دکترای تخصصی بیماریهای طیور، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات تهران، ایران، ایران
۳. گروه علوم درمانگاهی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات تهران، تهران، ایران
٤. آزمایشگاه رفرانس مایکوپلاسما، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج، کرج، ایران
* نویسنده مسئول مکاتبات: *a.pourbakhsh@rvsri.ir*

(دریافت مقاله: ۸۸/۳/۱٦، پذیرش نهایی: ۸۸/۱۰/۱٤)

چکیده

***مایکوپلاسما گالی‌سپتیکوم* به عنوان یکی از اصلی‌ترین پاتوژن‌های پرندگان، خسارات اقتصادی فراوانی را به صنعت مرغداری وارد می‌کند. هدف اصلی این مطالعه شناسایی گونه *مایکوپلاسما گالی‌سپتیکوم* در نمونه‌های بالینی با استفاده از روش 16S rRNA PCR می‌باشد. برای بررسی تیتر سرمی، ۱۸ فارم تخم‌گذار تجارتی و ۸ فارم مادر گوشتی انتخاب و تست RSAT (Rapid Serum Agglutination Test) انجام گردید. جهت نمونه‌برداری برای PCR (Polymerase Chain Reaction)، از ۱۷ فارمی که در تست RSAT مثبت شده بودند، ۱۰ فارم انتخاب و ۱۰۹ سوآپ استریل از شکاف کامی، نای، کیسه هوایی و ریه از هر فارم تهیه گردید. سه سوآپ از سه پرنده داخل یک لوله آزمایش حاوی یک میلی‌لیتر PBS انداخته شد و به آزمایشگاه منتقل گردید تا برای انجام PCR مورد استفاده قرار گیرد. در این مطالعه، پرایمرهای اختصاصی برای ژن 16S rRNA استفاده شد. پرایمرهای مورد استفاده برای ژن 16S rRNA کاملاً اختصاصی *مایکوپلاسما گالی‌سپتیکوم* می‌باشد و با تمام مایکوپلاسماها و دیگر باکتری‌های موجود در نای طیور قابل تفریق است. از ۲٦ فارم مورد آزمایش، ۱۷ فارم در تست سرمی RSAT مثبت شدند. محصول PCR تولیدی توسط پرایمرهای اختصاصی، در ۱۰ فارم، ٤٦ نمونه معادل ٤۲/۲ درصد در PCR ، باند ۵۳۰ جفت بازی را برای همه سویه‌های فیلدی بر روی ژل الکتروفورز تشکیل داد. 16S rRNA PCR با حساسیت بالا می‌تواند در تشخیص قطعی عفونت با *مایکوپلاسما گالی‌سپتیکوم* در آزمایشگاه به کار برده شود.**

مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، ۱۳۸۸، دوره ۳، شماره ۲، ۵۰۱-٤۹۳.

کلمات کلیدی: *مایکوپلاسما گالی‌سپتیکوم*، نمونه‌های بالینی، PCR

مقدمه

با توجه به اهمیت بیماری *مایکوپلاسما گالی‌سپتیکوم* از جنبه اقتصادی و با توجه به ایجاد بیماری مزمن تنفسی (CRD) و با در نظر گرفتن تحمیل هزینه‌های درمانی زیاد و عدم پاسخ‌دهی مناسب و عدم بروز حداکثر عملکرد پرندگان آلوده به این باکتری، استفاده از روش‌های تشخیصی مطمئن و سریع که بتواند در شرایط خاص در حداقل زمان ممکن و با درصد احتمال بسیار بالا این عامل را تشخیص دهد، بسیار ضروری به نظر می‌رسد. تشخیص به موقع مایکوپلاسما هم از

www.SID.ir

Archive of SID

جهت پرورش‌دهندگان مرغ مادر، هم پرورش‌دهندگان جوجه‌های تجارتی و هم از نظر سازمان دامپزشکی حائز اهمیت می‌باشد (۱۵). مایکوپلاسماها پروکاریوت‌های بسیار کوچکی هستند که فاقد دیواره سلولی بوده و به این دلیل در مقابل آنتی‌بیوتیک‌هایی که روی سنتز دیواره سلولی اثر می‌کنند، مقاوم می‌باشند. شکل کلونی‌ها مثل تخم‌مرغ پخته (fried egg) یا دکمه‌ای شکل می‌باشد. همچنین نسبت به احتیاجات پیچیدهٔ غذایی در صورت کمبودشان مقاوم هستند. بعضی از مایکوپلاسماها فقط یک نوع حیوان را آلوده می‌کنند (host specific) ولی بعضی‌ها قادرند در چندین حیوان مختلف ایجاد بیماری نمایند. مایکوپلاسماها در گیاهان، جانوران، انسان و حشرات ایجاد بیماری می‌کنند. به‌طور عمومی، مایکوپلاسماها در سطح مخاطی کلونیزه می‌شوند و اکثراً غیرمهاجم هستند ولی بعضی گونه‌ها مثل *مایکوپلاسما گالی‌سپتیکوم* قادر به سوراخ کردن سلول‌ها هستند. مایکوپلاسماها به‌طور اولیه به غشای مخاطی دستگاه تنفس و یا ادراری تناسلی، چشم و مفاصل تمایل دارند. بسیاری از آنها به‌عنوان انگل‌های سطحی شناخته می‌شوند و به‌ندرت بافت‌ها را مورد تهاجم قرار می‌دهند. البته انتشار آنها به اندام‌های مختلف، بیانگر حداقل یک عفونت عمومی زودگذر است. به‌طور کلی، گونه‌های مایکوپلاسما و احتمالاً سویه‌های خاصی تمایل بیشتری به بعضی از بافت‌ها یا اندام‌ها دارند هر چند این تمایل الزاماً به معنی حذف کامل از سایر اندام‌ها نیست (۱۷).

با استناد به آنالیز توالی ژن 16S rRNA تصور می‌شود که مایکوپلاسماها حدود ۶۰۰ میلیون سال قبل با از دست دادن قسمت‌های غیرضروری از ژنوم خود از جمله ژن‌های سنتنز دیواره سلولی از باکتری‌های گرم مثبت و مشخصاً *کلستریدیوم‌ها* مشتق شده‌اند.

تاکنون ۲۳ گونه مختلف مایکوپلاسما از پرندگان جدا شده که ماکیان و بوقلمون میزبان ۱۶ گونه از آنها می‌باشند. در این میان تنها چهار گونه برای طیور بیماری‌زا هستند که شامل *مایکوپلاسما گالی‌سپتیکوم*، *مایکوپلاسما سینوویه*، *مایکوپلاسما مله آگریدیس* و *مایکوپلاسما آیوا* می‌باشد. به دلیل اهمیت نقش بیماری‌زایی مایکوپلاسماهای طیور، از سال‌ها قبل برنامه ریشه‌کنی از گله‌های مولد به اجرا درآمده است. با این وجود مایکوپلاسماها در گله‌های طیور حضور داشته و عفونت مایکوپلاسمایی همچنان یک معضل بزرگ صنعت طیور محسوب شده و در صورت آلوده شدن گله‌های مولد با ارزش، ممکن است کشتار شده و یا اینکه نتاج آنها ارزش صادرات و فروش خود را از دست بدهند. مایکوپلاسماها از کلاس Mollicutes، شاخه I یعنی Mycoplasmatales و جنس I یعنی mycoplasma هستند و بیش از ۱۰۰ گونه دارند. دارای DNA بوده و برای رشد به کلسترول نیاز دارد. درجه حرارت اپتیمم برای رشد ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد است. با آنالیز ژن ریبوزوم 16srRNA می‌توان ارتباط ژنتیکی بین مایکوپلاسماها را بررسی کرد.

روش کشت مایکوپلاسما پرزحمت، کند، گران و نیازمند شرایط استریل است. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز روش جایگزین سریع و اختصاصی برای کشت می‌باشد. در دهه ۱۹۹۰ روش‌های مولکولی برای شناسائی مایکوپلاسمای پرندگان توصیف شد. اساس تمام آنها مبتنی بر تکثیر یا شناسائی یک قطعه خاص از ژنوم می‌باشد. در این بین ژن 16S rRNA به دلیل ثبات قابل توجه در گونه‌ها و حتی در میان جنس مورد توجه بیشتر قرار گرفته و با تکثیر، تعیین توالی و یا استفاده از پروب، امکان شناسائی ارگانیسم فراهم می‌شود (۱۰، ۱۵ و ۱۶).

مواد و روش‌کار

- نمونه برداری و انجام RSAT

۳۷۲ نمونه سرمی از ۲۶ فارم شامل ۸ فارم مادر گوشتی و ۱۸ فارم تخم‌گذار تجارتی اخذ گردید و جهت انجام تست RSAT به آزمایشگاه سرولوژی انتقال یافت. برای انجام RSAT مراحل زیر انجام شد:

www.SID.ir

Archive of SID

یک حجم از سرم (تقریباً معادل ۳۰λ) را روی یک کاشی سفید ریخته و یک حجم از آنتی‌ژن رنگی *مایکوپلاسما گالی‌سپتیکوم* به آن اضافه گردید. به منظور مخلوط نمودن آنتی ژن و سرم، کاشی به‌شکل دورانی تکان داده شد. در صورت وجود آنتی‌بادی علیه *مایکوپلاسما گالی‌سپتیکوم* پدیدهٔ آگلوتیناسیون اتفاق می‌افتاد که با گرد هم آمدن ذرات معلق در مایع مشخص گردید (سرم مرغ حداکثر در مدت ۲ دقیقه و سرم بوقلمون در مدت ۳ دقیقه با آنتی ژن آگلوتینه می‌شود). در خصوص تأیید تشخیص *مایکوپلاسما گالی‌سپتیکوم* کلیه سرم‌های مثبت مرحله قبل به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری ۵۶ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و آزمایش تکرار گردید (جهت غیر فعال سازی واکنشگرهای غیر اختصاصی). سرم‌های مثبت مرحله قبل را با PBS رقیق نموده و آزمایش تکرار شد در صورتی‌که سرم‌ها در رقت یک هشتم با آنتی ژن *مایکوپلاسما گالی‌سپتیکوم* آگلوتینه شوند از نظر تست سریع مثبت و در صورت عدم آگلوتیناسیون منفی قلمداد می‌شدند. جهت تسریع و سهولت کار می‌توان مراحل ٤ و ٥ را ادغام نمود. یعنی ابتدا رقت $\frac{۱}{۸}$ تهیه نمود و سپس به‌مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری ۵۶ درجه سانتی‌گراد قرار داد و بعد آزماش را تکرار نمود. نتیجه این آزمایش به صورت مثبت (+) یا منفی (-) گزارش شد (۵).

آماده‌سازی محیط کشت و بررسی عملکرد محیط‌های کشت:

محیط‌های متعددی جهت کشت مایکوپلاسما وجود دارد. یکی از محیط‌هایی که تقریباً تمامی نیازهای مایکوپلاسمای طیور در آن به‌کاررفته و به‌طور گسترده‌ای در ایالات متحده استفاده می‌شود محیط کشت Frey است. محیط دیگری که برای کشت مایکوپلاسما به‌کار می‌رود محیط کشت PPLO می‌باشد. علاوه‌بر محیط کشت پایه، جهت غنی‌سازی محیط باید مواد دیگری نیز به آن اضافه شود. هر دو محیط در این مطالعه استفاده شده است (۱). یکی از مهم‌ترین جنبه‌های کشت مایکوپلاسماها به‌ویژه مایکوپلاسماهای پرندگان بررسی محیط کشت جهت اطمینان از توانایی آن در حمایت از رشد مایکوپلاسما می‌باشد و ممکن است مایکوپلاسما به دلیل عدم کارآیی محیط توانایی رشد در آن محیط را نداشته باشد. لذا حتی پس از تغییر در یکی از اجزاء حتماً باید محیط کشت مورد آزمایش قرار گیرد. مهم‌ترین اجزائی که ممکن است در نارسائی محیط کشت دخیل باشند شامل عصاره مخمر، سرم و آگار می‌باشند. که در این میان عصاره مخمر به‌ویژه عصاره‌های تجارتی مورد توجه ویژه باید قرار گیرند. لذا توصیه بر استفاده از عصاره مخمر تازه تهیه شده در آزمایشگاه می‌باشد. پس از تهیه محیط‌های کشت فوق توانایی آنها در حمایت از رشد مایکوپلاسما با استفاده از سویه کم پاساژ *مایکوپلاسما گالی‌سپتیکوم* مورد تأیید قرار گرفت. همچنین از تمام اجزاء محیط کشت و محیط کشت نهایی جهت اطمینان از عاری بودن از آلودگی میکروبی کشت میکروبی به‌عمل آمد(۱).

نمونه‌برداری جهت کشت:

نمونه‌ها از گله‌های مادر گوشتی و تخم‌گذار تجارتی اخذ گردید. در این مطالعه جهت کشت و جداسازی از گله‌هائی نمونه‌برداری صورت گرفت که قبلاً در RSAT نتایج مثبت به‌دست آمده بود. در این مطالعه ۵۱۰ نمونه از ۱۷ فارم مادر گوشتی و تخم گذار تجارتی اخذ گردید.

نمونه‌برداری از پرندگان زنده:

نمونه در پرنده زنده از شکاف کامی (Chonal cleft) اخذ گردید. با استفاده از سوآب کتانی استریل از نای یا شکاف کامی نمونه تهیه شد و پس از تلقیح در لوله آزمایش حاوی محیط کشت مایکوپلاسما سوآب دور انداخته شد و سپس درب لوله آزمایش محکم بسته شد. نمونه‌ها به‌صورت انفرادی و با دقت به منظور جلوگیری از آلوده شدن جمع‌آوری شد. هر نمونه پس از اخذ، سریعاً در داخل فلاسک حاوی بسته‌های یخ قرار گرفت. نمونه‌ها در داخل فلاسک سریعاً به آزمایشگاه منتقل گردید و در انکوباتور ۳۷ درجه قرار گرفت (۱).

www.SID.ir

Archive of SID

نمونه‌برداری از پرندگان تلف شده:

نمونه‌ها از پرندگان کالبدگشایی شده از نای، یا کیسه هوایی و ریه با کمک سوآب کتانی اخذ شد. بقیه مراحل همانند نمونه‌برداری از پرندگان زنده بود.

کشت و جداسازی:

پس از قراردادن نمونه‌ها در انکوباتور، محیط‌های کشت، روزانه مورد بررسی قرار می‌گرفت. تغییر رنگ در ٢٤ ساعت اول ناشی از آلودگی باکتریایی یا رشد مایکوپلاسماهای ساپروفیت قلمداد شده و این نمونه‌ها از انکوباتور حذف می‌گردیدند. در روزهای بعد هر تغییر رنگی از قرمز به زرد و کدر شدن محیط سریعاً پاساژ داده شده و به‌طور همزمان به محیط کشت مایع و جامد انتقال داده می‌شد. نمونه‌هایی که تا ده روز هیچ تغییر رنگی نداشتند نیز در روز دهم پاساژ داده و به محیط مایع و جامد منتقل می‌شدند. به‌هرحال نمونه‌های اصلی تا یک ماه در انکوباتور حفظ شده و درصورتی که شواهدی از رشد در آنها با ساب کالچر آنها مشاهده نمی‌شد به‌عنوان نمونه منفی حذف می‌گردیدند. محیط‌های کشت جامد در انکوباتور حاوی ۵٪ CO_2 با اتمسفر بسیار مرطوب قرار گرفته و هر روز جهت شناسایی پرگنه مایکوپلاسمایی توسط میکروسکوپ مورد بررسی قرار می‌گرفت (۱).

نمونه‌برداری جهت PCR:

هدف اصلی این مطالعه شناسایی گونه *مایکوپلاسما گالی‌سپتیکوم* با استفاده از روش 16S rRNA PCR می‌باشد. جهت نمونه‌برداری برای PCR، از ۱۷ فارمی که در تست RSAT مثبت شده بودند، ۱۰ فارم انتخاب و ۱۰۹ سوآپ استریل از شکاف کامی، نای، کیسه هوایی و ریه از هر فارم تهیه گردید. سه سوآپ از سه پرنده داخل یک لوله آزمایش حاوی یک میلی‌لیتر PBS انداخته و به آزمایشگاه منتقل شد تا برای انجام PCR مورد استفاده قرار گیرد (۱).

مراحل استخراج DNA به روش فنل کلروفورم:

ابتدا مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از نمونه مورد نظر بعد از قرار دادن در شیکر به درون میکروتیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری انتقال داده شد و جهت رسوب‌گیری به مدت ۱۵ دقیقه در۱۳۰۰۰ دور سانتریفوژ گردید (نمونه‌ها حاوی ذرات بزرگ بودند که ابتدا به مدت ۵ دقیقه در ۳۰۰۰ دور سانتریفوژ شدند و محلول رویی به تیوپ جدید منتقل گردید و تیوپ حاوی مواد ته‌نشین شده دور انداخته شد. سپس مراحل بعدی روی محلول رویی انجام گردید). پس از سانتریفوژ، بافر لیزکننده اضافه گردید. سپس به خوبی مخلوط گردیده و در شیکر، تکان داده شد و در بن‌ماری ٥٦ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤-٣/٥ ساعت قرار داده شد. ترکیبات تشکیل دهنده بافر لیزکننده در زیر آمده است. به ازاء هر۲۰۰ میلی‌لیتر از محلول بالا، ۲۰ میلی‌لیتر پروتئیناز K اضافه گردید.

Lysis Buffer	
Tris-Hcl	50 Mm (pH=8)
SDS	1%
NaCl	100 Mm
EDTA	50 Mm
Proteinase K	1ml (2mg/µl)

در این مرحله تریس با pH برابر ۸ نقش بافر، EDTA به عنوان مهارکننده آنزیم‌های DNAase، SDS به‌عنوان حل‌کننده چربی‌های موجود در غشاء سلول و نمونه و پروتئیناز K به عنوان هضم کننده پروتئین‌ها و اتصالات بین سلولی عمل می‌کند. در این مرحله نمونه‌ها حاوی DNA آزاد شده از مولکول پروتئین و چربی می‌باشند. اما هنوز مخلوطی از مواد اضافه موجود است که به آن شیره خام (crude lysate) می‌گویند.

www.SID.ir

Archive of SID

بعد از ٤ ساعت نمونه‌ها خارج شدند و هم‌حجم آن (۱۰۰ میکرولیتر نمونه + ۱۰۰ میکرولیتر بافر لیز کننده جمعاً ۲۰۰ میکرولیتر) فنل اشباع شده به نمونه‌ها اضافه گردید تا DNA از شیره خام با استفاده از حلال‌های غیر قطبی استخراج گردد. نمونه‌ها خوب تکان داد شد و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور سانتریفوژ گردید (سانتریفوژ از نوع رومیزی معمولی بدون یخچال با دمای نزدیک به دمای اتاق بود). نمونه‌ها دو فاز تشکیل دادند که به آرامی با سمپلر فاز رویی کشیده شد و به تیوپ جدید انتقال یافت و فاز زیر آن به همراه تیوپ دور انداخته شد. هم حجم با فاز رویی که توسط سمپلر کشیده شده بود (در حد ۱۵۰ میکرولیتر)، به تیوپ، مخلوط فنل- کلروفورم (که از قبل به نسبت مساوی با هم مخلوط شده‌اند) اضافه شد. تیوپ‌ها به خوبی تکان داده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور سانتریفوژ گردید.

نمونه‌ها دو فاز تشکیل دادند که به آرامی با سمپلر فاز رویی کشیده شد و به تیوپ جدید انتقال یافت و فاز زیر آن به همراه تیوپ دور انداخته شد. هم حجم با فاز رویی که توسط سمپلر کشیده شده بود (در حد ۱۵۰ میکرولیتر)، به تیوپ، کلروفورم اضافه شد. تیوپ‌ها به خوبی تکان داده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور سانتریفوژ گردید (سانتریفوژ از نوع رومیزی معمولی بدون یخچال با دمای نزدیک به دمای اتاق بود). محلول رویی با سمپلر کشیده شد و به تیوپ‌های جدید انتقال یافت. یک دهم حجم آن استات سدیم ۳ مولار جهت تغلیظ و ته‌نشین کردن DNA اضافه شد (محلول استات سدیم باعث یونیزه شدن DNA گشته و حل شدن آن را کاهش می‌دهد) و به آرامی مخلوط گردید و دو برابر حجم نمونه، الکل مطلق ۱۰۰-۹٦ درجه سرد اضافه شد. به مدت ۲۰- ۱۵دقیقه نمونه‌ها در فریزر ۲۰ درجه سانتی‌گراد زیر صفر قرار داده شد. نمونه‌ها از فریزر خارج گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور سانتریفوژ شد (سانتریفوژ از نوع رومیزی معمولی بدون یخچال با دمای نزدیک به دمای اتاق بود). مایع رویی تیوپ تخلیه شد و بعد از تکان دادن، جهت خشک شدن الکل موجود در تیوپ، زیر هود قرار داده شد (باید دقت گردد تا نمونه موجود در تیوپ بیش از حد خشک نگردد چون باعث شکسته شدن DNA می‌گردد که برای انجام مطالعه مطلوب نمی‌باشد). ۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به نمونه (DNA) اضافه شد و به یخچال انتقال یافت (درصورتی‌که فاصله زمانی آزمایش طولانی باشد نمونه‌ها باید در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شوند) (۲، ۵، ٦، ۹، ۱۳ و ۱۷).

PCR و تشخیص گونه مایکوپلاسما *گالی‌سپتیکوم*:

به منظور تأیید نمونه‌ها از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز استفاده شد. پرایمرهای استفاده شده اختصاصی ژن 16S rRNA در *مایکوپلاسما گالی‌سپتیکوم* بودند و این پرایمرها جهت شناسائی MG در کشت خالص و یا نمونه بالینی استفاده شده‌اند (۳، ۹، ۱۰ و ۱۱). پرایمرها عبارت بودند از:

نام پرایمر	توالی نوکلئوتیدی
MG-10F	5'-AACACCAGAGGCGAAGGCGAGG3'
MG-11R	5'-ACGGATTTGCAACTGTTTGTATTGG-3'

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد و در تمامی موارد کنترل‌های مثبت و منفی همزمان استفاده شد و اجزاء آن عبارت بودند از:

Water	17.36µl
PCR Buffer (10X)	2.50 µl
dNTP (10mM)	0.75 µl
F primer (20 pmole/ µl)	0.15 µl
R primer (20 pmole/ µl)	0.15 µl
Taq DNA polymerase (5U/ µl)	0.10 µl
MgC12 (50mM)	2.00 µl
Template DNA	1.94 µl

www.SID.ir

Archive of SID

تمامی واکنش‌ها در ترموسایکر Gradient Mastercycler (Eppendroff، آلمان) انجام گرفت و برنامه آن به‌صورت زیر بود:

جداشدن اولیه DNA	94C	5min
۳۰ سیکل شامل جداشدن، جفت شدن و طویل شدنDNA	94C 58C 72C	30sec 60sec 30sec
طویل شدن انتهائی	72C	10min

الکتروفورز:

قالب ژل آگاروز

صفحات شیشه‌ای، شانه و تیغه‌های کناری با استفاده از یک ماده شوینده کاملاً تمیز شد (ضخامت شانه و تیغه کناری باید یکسان باشد) و با استفاده از آب مقطر دیونیزه آبکشی گردید. صفحات شیشه‌ای با استفاده از اتانول ۹۵ درجه کاملاً آبگیری و در مجاورت هوا خشک شد. قالب ژل از طریق قرار دادن تیغه‌های کناری در سطح داخلی صفحه پشتی و سپس قرار دادن صفحهٔ رویی بر روی تیغه‌ها بسته شد. به‌طوریکه تیغه‌ها کمی خارج‌تر از لبه پلیت‌های شیشه‌ای قرار داده شد به‌طوری‌که پس از قرار دادن صفحهٔ شیشه‌ای رویی تیغه‌ها به آرامی فشار داده شد تا در جای خود بین دو صفحه قرار گیرند. اطراف و زیر قالب با استفاده از یک نوار چسب با کیفیت خوب آب‌بندی شد. نشت نکردن نوار چسب‌ها پس از افزودن ژل آگاروز بسیار اهمیت دارد (۱).

آماده کردن مخلوط ژل آگاروز:

جهت شناسائی و رویت محصول PCR از الکتروفورز (Apelex، فرانسه) نمونه‌ها در روی ژل آگاروز ۱٪ و بافر ۱٪ TAE استفاده شد. برای تهیه ۱٪ TAE از ۲۵٪ TAE (Tris base , Acetic acid and ETDA) استفاده شد به‌طوریکه ۲۰ میلی‌لیتر از این محلول با ٤٨٠ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط گردید. برای آماده کردن ژل ابتدا ۰/۳۵ گرم از ژل آگاروز (Agarose MP،Roche) در ۳۵ میلی‌لیتر از بافر ۱٪ TAE در یک ارلن ریخته شد و با استفاده از حمام آب‌جوش حرارت داده شد. حرارت دادن تا حل شدن کامل آگاروز ادامه یافت. پس از سردشدن دمای آن به حدود ۵۰ درجه ، ۱,۷ لاندا اتیدیوم بروماید (ETBr) به آن اضافه شد (این نسبت‌ها برای یک کست حاوی ژل ۱۵ گودی کافی می‌باشد). سپس محلول با دقت و به آرامی و بدون ایجاد حباب هوا در قالب ژل ریخته شد. برای این منظور از حذف‌کننده حباب‌های هوا (Air bubble remover) استفاده گردید. از ترازسنج جهت یکنواخت پخش شدن ژل در تمام سطوح تانک الکتروفورز استفاده گردید. سپس در ژل و در محل خود قرار داده شد و تا جامدشدن کامل، ژل در دمای اتاق قرار گرفت. پس از آن شانه خارج و ژل در دستگاه الکتروفورز قرار گرفت و محلول ۱٪ TAE تا پوشاندن کامل سطح ژل در تانک ریخته شد. ۱۰ µl از محصول PCR با دو میکرولیتر از بافر بارگذاری (Loading buffer) مخلوط (محلول ۱x) و در گوده‌های ژل قرار داده شد. پس از اتمام بارگذاری نمونه‌ها، الکترودها به منبع تغذیه متصل شده، ژل در جریان ثابت ۱۰۰ ولت به مدت ٤٥ دقیقه قرار گرفت. ژل روی دستگاه UV (BioRAD, Bio-Rad Lab.- California, USA) قرار گرفته و از آن عکس تهیه شد (۱۳).

نتایج

نتایج حاصل از تست RSAT:

از ۳۷۲ نمونه سرمی اخذ شده از ۲٦ فارم، ۱۷ فارم در تست RSAT مثبت شدند. این ۱۷ فارم شامل ۳ فارم مادر گوشتی و ١٤ فارم تخم گذار تجارتی بود. به‌طورکلی از ۳۷۲ نمونه اخذ شده، ۱۳۷ نمونه در تست RSAT مثبت، ۲۰۲ نمونه منفی و از ۳۳ نمونه سرمی مشکوک، ۱۰ نمونه در رقت یک هشتم مثبت اعلام گردیدند.

نتایج حاصل از کشت:

از ۵۱۰ نمونه جمع آوری شده از ۱۷ فارم با تعداد ۳۰ نمونه از هر فارم، ۲٥٤ نمونه مثبت معادل ٤٩/٨٪ *مایکوپلاسما گالی‌سپتیکوم* جداسازی گردید. از ۱۷ فارم، ۳ فارم باکتری

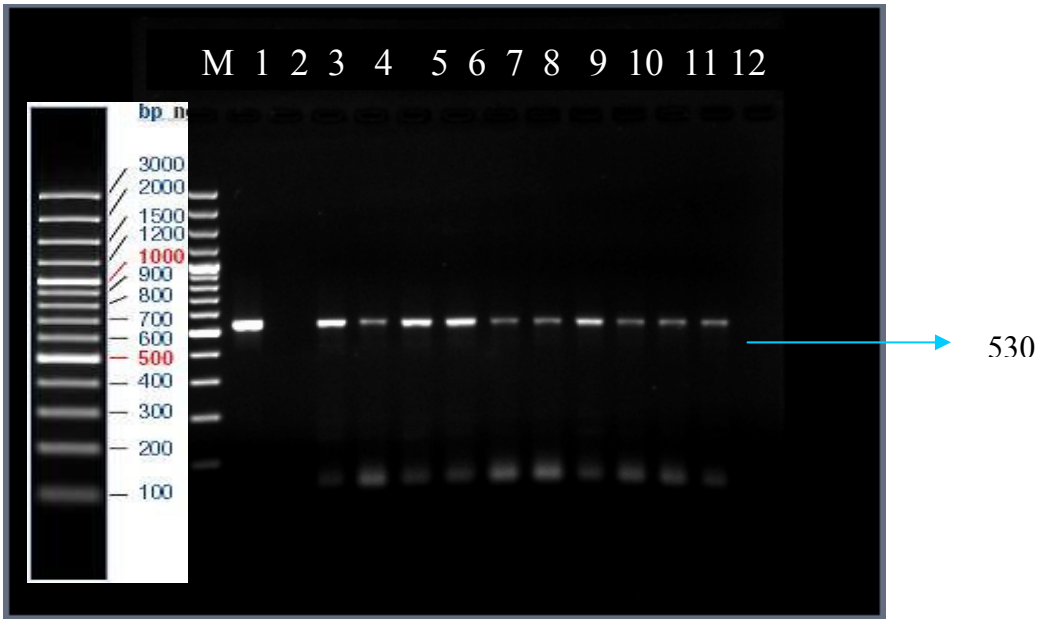
www.SID.ir

Archive of SID

مایکوپلاسما گالی‌سپتیکوم جداسازی نگردید. معمولاً اولین نشانه‌های رشد و تغییر رنگ در محیط مایع حدود روز پنجم مشاهده می‌شد. اگر چه در برخی موارد شواهد رشد در نمونه‌ها تا روز بیست و دوم نیز رویت نشد. در مجموع محدوده زمانی که نمونه‌های اصلی شواهد تغییر رنگ و رشد را نشان می‌دادند بین روزهای پنجم تا بیست و پنجم بعد از نمونه‌برداری ثبت شد و نمونه‌هایی که تا روز بیست و پنجم مثبت نشده بودند در ادامه انکوباسیون نیز تغییر رنگی نشان ندادند. به‌دنبال تغییر رنگ محیط کشت از قرمز به زرد که ناشی از تخمیر گلوکز و کاهش PH محیط می‌بود، نمونه به‌عنوان مثبت فرض شده و مراحل زیر جهت تأیید و خالص‌سازی انجام گرفت (۱). پاساژ نمونه مثبت به محیط مایع جدید و محیط جامد (۲) ذخیره‌سازی با استفاده از گلیسرول ۵٪ در فریزر ۷۰ درجه سانتی‌گراد زیر صفر (۳) بررسی حضور MG در محیط کشت مایع. در صورت تأیید حضور MG در محیط آبگوشت، محیط جامد در انکوباتور CO2 و با رطوبت بالا قرار می‌گرفت تا رویت پرگنه انجام گیرد. پس از رویت پرگنه مایکوپلاسما، یک پرگنه انتخاب و به محیط مایع منتقل و پس از رشد و تغییر رنگ محیط، جدایه با استفاده از PCR تأیید می‌شد.

نتایج حاصل از 16S rRNA PCR و تشخیص گونه *مایکوپلاسما گالی‌سپتیکوم*:

به منظور تأیید نمونه‌ها از روش PCR استفاده گردید. پرایمرهای استفاده شده کاملاً اختصاصی گونه *مایکوپلاسما گالی‌سپتیکوم* بودند (۳، ۹، ۱۰ و ۱۱) به‌طوری‌که محصول PCR تولید شده در تمام نمونه‌ها و سویه استاندارد ts-11، یک قطعه ۵۳۰ جفت بازی را تشکیل می‌داد که مشخص کننده *مایکوپلاسما گالی سپتیکوم* بود. از ۱۰۹ نمونه اخذ شده از ۱۰ فارم، ٤٦ نمونه معادل ٤٢/٢ درصد در PCR باند ۵۳۰ جفت بازی را بر روی ژل آگاروز نشان دادند. پرایمرهای استفاده شده کاملاً اختصاصی گونه *مایکوپلاسما گالی‌سپتیکوم* بودند (١٦) به‌طوری‌که محصول PCR تولید شده در تمام نمونه‌ها و سویه استاندارد ts-11، یک قطعه ۵۳۰ جفت بازی را تشکیل داد. اختصاصیت این تست با توجه به مطالعه قبلی محققین می‌باشد (نگاره ۱) (۳، ۹، ۱۰ و ۱۱).



نگاره۱- محصول PCR ژن 16S rRNA با استفاده از پرایمرهای MG- 10F و MG-11R.

M: Gene Ruler 100bp plus DNA Ladder. Lane 1: ts-11 واکسن، Lane 2: کنترل منفی

جدایه‌های فیلدی: Lane 3-12

www.SID.ir

Archive of SID

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به اهمیت بیماری *مایکوپلاسما گالی‌سپتیکوم* از جنبه اقتصادی و با توجه به ایجاد بیماری مزمن تنفسی (CRD) و با در نظر گرفتن تحمیل هزینه‌های درمانی دو چندان و عدم پاسخ‌دهی مناسب و عدم بروز حداکثر عملکرد پرندگان آلوده به این باکتری، استفاده از روش‌های مبتنی بر شناسایی DNA برای تشخیص MG به‌طور مستقیم از بافت یا جدایه‌های آزمایشگاهی ضروری به نظر می‌رسد (۱). اگرچه می‌توان از پروب برای شناسائی MG استفاده نمود، اما روش بسیار معمول، تکثیر قطعه اختصاصی از ژنوم باکتری است. برای این منظور کیت‌های تجاری نیز در دسترس هستند (۱). روش‌هایی برای تشخیص همزمان انواع مایکوپلاسما در نمونه‌های بالینی ابداع شده است که از آن جمله می‌توان به PCR چندگانه و PCR-RLFP اشاره کرد. نتایج PCR ظرف یک تا دو روز مشخص می‌شود، در حالی‌که برای کشت و تعیین هویت ارگانیسم یک تا سه هفته زمان نیاز است. همچنین PCR قادر است نتایج دقیقی در حضور عفونت‌های مخلوط با چندین مایکوپلاسما، آلودگی با عفونت‌های باکتریایی ثانویه، مهارکننده‌های رشد مایکوپلاسما مثل آنتی بادی، آنتی بیوتیک، یا سایر عوامل میزبانی ارائه دهد (۱ و ۱۷). به‌ویژه رشد مایکوپلاسماهای ساپروفیت که رشد سریعتری در محیط غنی شده نسبت به *مایکوپلاسما گالی‌سپتیکوم* دارند از مهم‌ترین مشکلات کشت می‌باشد. شناسائی DNA ارگانیسم‌های غیر زنده مثلاً پس از درمان با آنتی‌بیوتیک از معایب PCR است. در این مطالعه، به منظور تأیید نمونه‌ها از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز استفاده شد. پرایمرهای استفاده شده اختصاصی ژن 16S rRNA در *مایکوپلاسما گالی‌سپتیکوم* بودند و این پرایمرها جهت شناسائی MG در کشت خالص و یا نمونه بالینی استفاده شده‌اند. با استفاده از این پرایمرها تمام سویه‌های فیلدی، محصول PCR ۵۳۰ جفت باز را تشکیل دادند (۱۷). محصول PCR تولید شده توسط پرایمرهای اختصاصی 10F/11R تنها با *مایکوپلاسما گالی‌سپتیکوم* واکنش داده و با هیچکدام از ۲۲ گونه مختلف مایکوپلاسما واکنش نمی دهد (۱۷).

آزمون 16S rRNA-PCR جهت تشخیص گونه *مایکوپلاسما گالی‌سپتیکوم* با پرایمرهای اختصاصی MG-10F و MG-10R با توجه به تشکیل باند ۵۳۰ جفت بازی برای تمامی سویه‌های فیلدی مورد استفاده در این مطالعه و سویه واکسینال ts-11 و نتایج حاصل از این مطالعه، می‌تواند با حساسیت ۱۰۰ درصد مورد استفاده قرار گیرد.

فهرست منابع

۱. حسینی، ح. (۱۳۸۵): مطالعات مولکولی جدایه‌های *مایکوپلاسما گالی‌سپتیکوم* از طیور، رساله دکترای تخصصّی بیماری‌های طیور، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، صفحات: ۱۲۰-۱.

2. Biomune. (2006):VECTORMUNE®FP-MG.http://www.biomune.company.com/chickens/vectormunefpmg.html.
3. Biro, J., Erdei, N., Szekely, I. and Stipkovits, L. (2006): Differentiation of *mycoplasma gallisepticum* strains using molecular methods. Acta Veterinaria Hungarica, 54: 437-448.
4. Bradbury, J.M. and Levisohn, S. Experimantal infections in poultry. In: Tully, J.G. (1996): Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmology. Volume II-Diagnostic Procedures, San Diego, CA: Academic Press. pp: 361-370.
5. Charlton, B.R., Bickford, A.A., Chin, R.P. and Walker, R.L. (1999): Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Mycoplasma gallisepticum* isolates from turkeys from the central valley of California. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 11:408-415.

www.SID.ir

Archive of SID

6. Charlton, B.R., Bickford, A.A., Walker, R.L. and Yamamoto, R. (1999): Complementary randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis patterns and primer sets to differentiate *Mycoplasma gallisepticum* strains. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 11: 158-161.
7. Collett, S.R. (2005): Monitoring broiler breeder flocks for *mycoplasma gallisepticum* infection after vaccination with ts- 11. Department of production animal studies, faculty of veterinary science, University of Pretoria, pp: 1-79.
8. Dennis, Y.M., Chiu, W.K. and Allen Chan, K.C. (2006): Clinical applications of PCR. Humana Press, pp: 4- 22.
9. Fan, H.H., Kleven, S.H. and Jackwood, M.W. (1995): Application of polymerase chain reaction with arbitrary primers to strain identification of *Mycoplasma gallisepticum*. Avian Dis., 39: 729-735.
10. Feberwee, A., Mekkes, D.R., de Wit, J.J., Hartman, E.G. and Pijpers, A. (2005): Comparison of culture, PCR, and different serologic tests for detection of mycoplasma gallisepticum and mycoplasma synoviae infections. Avian Dis., 49: 260-268.
11. Garcia, M., Ikuta, N., Levisohn, S. and Kleven, S.H. (2005): Evaluation and comparison of various PCR methods for detection of *Mycoplasma gallisepticum* infection in chickens. Avian Dis., 49: 125-32.
12. Gharaibeh, S. and Al Roussan, D. (2008): The use of molecular techniques in isolation and characterization of *mycoplasma gallisepticum* from commercial chicken in Jordan. Int. J. Poult. Sci., 7(1): 28-35.
13. Kempf, I., Blanchard, A. Gesbert, F. Guittet, M. and Bennejean, G. (1993): The polymerase chain reaction for *Mycoplasma gallisepticum* infection. Avian Pathol., 22: 739-750.
14. Khan, M.I. (2002): Multiplex PCR of Avian Pathogenic Mycoplasmas, in PCR Detection of Microbial Pathogens, by Joachim, Frey, Konard, Sachse Humana Press, pp: 223.
15. Kleven, S.H. (2008): Control of avian mycoplama infections in commercial poultry. Avian Dis., 52: 367-374.
16. Kleven, S.H. Mycoplasmosis. In: Saif, Y.M., Barnes, H.J., Gilsson, J.R., Fadly, A.M., Mc Dongald, L.R. and swayne, D.E. (2008): Diseases of Poultry. 12th ed., Iowa state university press, USA, pp: 805-808.
17. OIE terrestrial manual. (2008): Avian mycoplasmosis, chapter 2.3.5. pp: 482-496.

www.SID.ir