مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره هشتم، شماره سی و دوم- پائیز۱۳۹۷

Research Article
مقاله تحقیقی

شناسایی مولکولی *مایکوپلاسما گالی سپتیکوم* درطیور بومی روستایی شهرستان ارومیه در سال ۱۳۹۵

نسرین حسینی[۱]، مهدی دیلمقانی*[۲]

۱- دانشگاه آزاد واحد ارومیه، ارومیه، ایران
۲- دپارتمان سلولی و مولکولی، آزمایشگاه ممتاز منطقه‌ای شمالغرب، ارومیه، ایران

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 13:30 +0430 on Tuesday April 9th 2019

چکیده:

سابقه و هدف: *مایکوپلاسما گالی‌سپتیکوم* اصلی‌ترین پاتوژن مایکوپلاسما با اهمیت اقتصادی است که دارای گسترش جهانی است. عفونت با *مایکوپلاسما گالی‌سپتیکوم* دارای تظاهرات بالینی متنوعی است. اما حتی در صورت فقدان علائم بالینی آشکار، تأثیر اقتصادی آن می تواند آشکار باشد. هدف از مطالعه حاضر شناسایی مولکولی *مایکوپلاسما گالی سپتیکوم* و بررسی فراوانی آن در طیور بومی شهرستان ارومیه است.

مواد و روش: از تعداد ۱۴۵ پرنده نمونه سواپ نای و خون در شرایط استریل گرفته شد و در مجاورت یخ به آزمایشگاه ارسال گردید. بر روی نمونه‌های خون آزمون آگلوتیناسیون سریع انجام شد و بر روی نمونه‌های سواپ پس از استخراج DNA آزمون PCR با هدف ژن 16S rRNA انجام پذیرفت.

یافته‌ها: بر اساس آزمون آگلوتیناسیون سریع سرم ٪۲۴/۸ طیور روستایی مثبت بودند. انجام آزمون PCR بر روی ۱۴۵ اخذ شده با استفاده از پرایمرهای تکثیر دهنده قطعه‌ای از ژن 16S rRNA نشان داد که ٪۶۳/۴ آلودگی از نظر *Mycoplasma gallisepticum* وجود دارد.

نتیجه‌گیری: روش‌های مطمئن برای تمایز سویه‌های *مایکوپلاسما گالی‌سپتیکوم* نقش ضروری در درک اپیدمیولوژی و گسترش بیماری بازی می کند چرا که آنها ایجاد اطلاعاتی می‌کنند که برای تشخیص و پیگیری همه‌گیری‌های جدید نیاز است. نظر به میزان آلودگی بالای طیور بومی به *مایکوپلاسما گالی‌سپتیکوم* نیازمند اقدام‌های کنترلی بیش‌تری جهت جلوگیری از سرایت این جرم به مزارع پرورشی است.

واژه‌های کلیدی: *مایکوپلاسما گالی‌سپتیکوم*، آگلوتیناسیون سریع سرم، طیور روستایی، PCR، ژن 16S rRNA

مقدمه

مایکوپلاسماها ساده‌ترین و کوچک‌ترین یاخته‌ها از گروه پروکاریوت‌ها بوده که به‌طور مستقل قادر به رشد و تکثیرند. آنها دیواره سلولی ندارند و دارای غشاء سیتوپلاسمی، ریبوزوم و یک مولکول DNA هستند که به‌دلیل فقدان دیواره سلولی از یوباکتری‌ها مجزا شده‌اند این باکتری‌ها در کلاس مولیکوتس طبقه‌بندی شده‌اند. در این کلاس خانواده مایکوپلاسماتاسهآ قرار گرفته که شامل جنس‌های *مایکوپلاسما*و *اوره‌پلاسما* است (۱). به‌احتمال نخستین تشخیص دقیق بیماری مایکوپلاسموز در بوقلمون‌ها، در سال ۱۹۰۵ میلادی و توسط Dodd در انگلستان صورت پذیرفت.

وی بیماری فوق را Epizootic Pneumoenteritis نامید. در سال ۱۹۳۸ میلادی، Dickinson و Hinshaw بیماری یادشده را التهاب عفونی سینوس‌های بوقلمون نامیدند. اما در سال ۱۹۳۵ میلادی، Nelson اجسام کوکوباسیلی شکل مرتبط با بیماری کوریزای جوجه‌ها را شناسایی کرده بود. وی بعدها ارگانیسم‌های فوق را با نوعی کوریزای عفونی با ظهور آهسته و رشد طولانی مدت، مرتبط دانست. سرانجام، Nelson موفق شد تا اجسام یاد شده را در جنین تخم مرغ، کشت

نویسنده مسئول:
دپارتمان سلولی و مولکولی، آزمایشگاه ممتاز منطقه‌ای شمالغرب، ارومیه، ایران
پست الکترونیکی: mdilmaghani@gmail.com
تاریخ دریافت: ۳۰/۳/۱۳۹۶
تاریخ پذیرش: ۲۶/۹/۱۳۹۶

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 13:30 +0430 on Tuesday April 9th 2019

بافتی و هم‌چنین محیط کشت فاقد سلول، رشد دهد (۷). *مایکوپلاسما گالی‌سپتیکوم*، نخستین‌بار توسط عملیات سروتایپینگ از سایر *مایکوپلاسما*های پرندگان جدا شد و به‌عنوان سروتایپ A در نظر گرفته شد. گونه *مایکوپلاسما گالی سپتیکم* در سال ۱۹۶۰ میلادی، توسط Edward و Kanarek معرفی شد. در سال ۱۹۹۳ میلادی، با استفاده از تکنیک‌های مولکولی، فنوتیپ‌ها و شباهت‌های آنتی‌ژنیک *مایکوپلاسما گالی‌سپتیکوم* و سایر *مایکوپلاسماها* شناسایی گردید (۸). دست‌یابی به تشخیص سریع، دقیق قطعی مایکوپلاسما با توجه به اهمیت اقتصادی آن برای مسئولین بهداشتی و دامپزشکان فارم‌های مادر و اجداد اهمیت فراوانی دارد زیرا تشخیص زود هنگام و قطعی می‌تواند مدیریت بهداشتی فارم را در حفظ سلامت عمومی گله جلوگیری از پیشرفت بیماری و انتخاب سیاست‌های درمانی مناسب یاری نماید.

در حال حاضر دو روش سرولوژی راپید آگلوتیناسیون و الایزا برای بررسی *مایکوپلاسما* در طیور صنعتی مورد استفاده می‌شود. از آنجا که تست‌های سرولوژی به‌علت پدیده تداخل متقابل با گونه‌های دیگر *مایکوپلاسما* و هم‌چنین حضور فاکتورهای غیراختصاصی متغیر در سرم، حساسیت و اختصاصیت کافی در تشخیص سویه‌های مایکوپلاسما را ندارند و گاهی باعث بروز جواب‌های مثبت کاذب می‌شوند لذا جداسازی و کشت *مایکوپلاسما* علی‌رغم زمان‌بر بودن و سخت رشد بودن *مایکوپلاسما* در محیط آزمایشگاهی به‌عنوان روش قطعی تأیید نهایی مایکوپلاسمای طیور مورد استفاده قرار می‌گرفت. در چند سال اخیر با ابداع روش مولکولی PCR این تکنیک به‌عنوان اصلی‌ترین روش در تشخیص قطعی مایکوپلاسما مورد استقبال مدیران بهداشتی فارم‌های صنعتی قرار گرفته است روش PCR از تکنولوژی مهندسی مولکولی بهره گرفته که از نظر اصول علمی مشابه با همانندسازی DNA در داخل سلول است به‌طوری‌که قطعه خاصی از DNA به‌طور آنزیماتیک همانندسازی می‌گردد تا میزانی که بتوان محصول را با روش‌هایی هم‌چون الکتروفورزد در ژل آشکار نمود در این روش می‌توان ژن ویرولان عامل پاتوژن را برای تکثیر انتخاب نمود و در نتیجه با یک آزمایش سویر پاتوژن یا آپاتوژن را نیز می‌توان تشخیص تفریقی‌دار برای دست‌یابی به جواب قطعی وجود عفونت مایکوپلاسما در طیور فقط حضور چند کپی از ژن مورد نظر کافی است تا به‌وسیله سوآپ از نای برداشته شود و در اثر تکثیر متوالی نتیجه قطعی حاصل گردد از طرف دیگر از آزمایش PCR نتیجه مثبت مایکوپلاسموزیس در همان روز اول عفونت حاصل می‌شود که در مقایسه با روش‌های سرولوژی حداقل ۲ تا ۳ هفته زودتر می‌توان به نتیجه قطعی دست یافت. از آنجا که تشخیص هم‌زمان چند سویه مایکوپلاسما در طیور بسیار حایز اهمیت است لذا در روش‌های جدید PCR به نام Multiplex PCR گونه‌های مختلف مایکوپلاسما به‌طور هم‌زمان شناسایی می‌گردند (۲۱).

تاکنون بررسی بیماری مذکور بر روی طیور بومی و تشخیص میزان آلودگی به *مایکوپلاسموز*صورت نگرفته است. از آنجایی‌که اغلب این پرندگان در نزدیکی روستاهای مشرف به مزارع پرورشی طیور هستند و نیز به نوعی زمینه‌ساز بسیاری از سایر بیماری-های پرندگان هستند، لذا ضروری به نظر می‌رسد تا مطالعه‌ای در این خصوص صورت گیرد. هدف از تحقیق حاضر تشخیص *مایکوپلاسما گالی‌سپتیکوم* در طیور بومی و نیز بررسی میزان پراکندگی جرم مذکور در بین طیور مختلف روستایی است.

مواد و روش کار

نمونه گیری

در بازه زمانی فروردین سال ۱۳۹۵ تا آخر همان سال، نمونه‌های سواپ نای هر پرنده (درمجموع ۱۴۵ نمونه) در لوله آزمایش استریل محتوی ۱ الی ۲ سی سی PBS استریل اخذ گردید. نمونه‌ها در مجاورت یخ به آزمایشگاه انتقال داده شدند تا استخراج DNA صورت گیرد (جدول ۱). همراه با اخذ سواپ، خون هر پرنده پس از مقیدسازی از ورید بالی با استفاده از سرنگ استریل اخذ گردید. از نمونه‌های خون جهت انجام آزمون تست سریع سرم گیری انجام شد.

آزمون تست سریع

در این آزمون ۲۵ میکرولیتر نمونه سرم هر پرنده و ۲۵ میکرولیتر از آنتی‌ژن *مایکوپلاسما گالی‌سپتیکوم* (Soleil, France) بر روی کارد تست مخلوط گردیدند. سپس به‌مدت ۲ دقیقه بر روی شیکر قرار گرفت و نتایج آن قرائت شد.

استخراج DNA

نمونه‌های سواپ اخذ شده ابتدا در ورتکس به‌مدت ۳۰ ثانیه ورتکس شدند. سپس محتویات لوله‌ها به میکروتیوب ۱/۵ سی‌سی انتقال داده شدند و به‌مدت ۱۵ در دقیقه در ۱۴۰۰۰g سانتریفیوژ گردیدند. مایع‌رویی با استفاده از پیپت پاستور دور

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 13:30 +0430 on Tuesday April 9th 2019

ریخته شد و رسوب حاصله در ۲۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه استریل حل شد. میکروتیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد در هیتینگ بلاک قرار داده شدند. سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه روی یخ قرار گرفتند و پس از این به‌مدت ۵ دقیقه در ۱۴۰۰۰g سانتریفیوژ شدند. مایع‌رویی محتوی DNA در میکروتیوب دیگر جمع‌آوری گردید تا در آزمون PCR مورد استفاده قرار گیرد (۱).

آزمون PCR

مشخصه‌های کامل پرایمرها (۱) جهت انجام PCR در جدول ۲ آورده شده‌اند. PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و با استفاده از ترکیب‌های زیر انجام شد:

- PCR buffer 10X: 2.5 µl (Cinnagen, Iran)
- dNTP1 µl (Cinnagen, Iran)
- Each primer: 2 µl (Cinnagen, Iran)
- Tag polymerase: 0.2 µl (Cinnagen, Iran)
- Distilled Water: 11.3 µl (Fermentase, Germany)
- $MgCl_2$: 1 µl (Fermentase, Germany)
- Template DNA: 5µl

در این واکنش آب مقطر استریل به‌جای DNA برای کنترل منفی افزوده گردید. برای کنترل مثبت نیز از آنتی‌ژن *مایکوپلاسما گالی سپتیکوم* استفاده گردید. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf, Germany) به‌ترتیب زیر به انجام رسید (۱):

- واسرشت اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه
- سپس ۴۰ سیکل که هر سیکل شامل
  - ۳۰ ثانیه واسرشت، در ۹۴ درجه سانتی‌گراد
  - ۳۰ ثانیه اتصال پرایمرها، در ۵۵ درجه سانتی‌گراد
  - ۶۰ ثانیه سنتز، در ۷۲ درجه سانتی‌گراد
- ۷۵ دقیقه سنتز نهایی، در ۷۲ درجه سانتی‌گراد.

الکتروفورز محصول‌های تکثیر شده بر روی ژل آگاروز ٪۲ حاوی اتیدیوم بروماید (۱۰mg/ml) در ۸۰ ولت به مدت ۱ ساعت انجام گردید. بعد از مشاهده ژل در ترانس ایلیومیناتور (Uvitec, Europe) تصویربرداری و ثبت اطلاعات انجام گرفت.

نتایج

نتایج آزمون تست سریع: نتایج آزمون تست سریع در جدول ۳ آورده شده است. بر این اساس از تعداد ۱۴۵ نمونه اخذ شده تعداد ۳۶ نمونه (٪۲۴/۸) در رقت ۱/۸ مثبت و تعداد ۱۰۹ نمونه (٪۷۵/۲) منفی بودند.

نتایج آزمون PCR

با استفاده از روش PCR ۱۴۵ نمونه سواب مورد بررسی قرار گرفتند. جفت پرایمر آورده شده در جدول۲ به خوبی توانست ژن مورد نظر را که شامل ژن 16S rRNA با اندازهbp ۱۸۵ بود، تکثیر کند (شکل۱). در کنترل منفی که آب مقطر به جای اسید نوکلئیک اضافه گردید محصولی مشاهده نشد.

نتایج آزمون PCR نشان داد که از تعداد ۱۴۵ نمونه اخذ شده ۹۲ نمونه (٪۶۳/۴) مثبت و تعداد ۵۳ نمونه (٪۳۶/۶) منفی هستند (نمودار ۱). هم‌چنین تمامی نمونه‌هایی که در آزمون تست سریع در رقت ۱/۸ مثبت بودند در آزمون PCR نیز مثبت شدند. نتایج آزمون PCR در جدول ۴ آورده شده است.

بحث

گونه‌های مختلف مایکوپلاسما شامل *مایکوپلاسما گالی-سپتیکوم*، *آیوا*، *سینوویه*، *مله آگریدیس*، *گالیناروم*، *گالیناسئوم*، *کلواکال*، *اینرس*، *گالوپاوینوس* و *گلیکوفیلوم* هستند (۱۹). *مایکوپلاسما گالی‌سپتیکوم* مسئول بیماری مزمن جوجه‌ها و سینوزیت در بوقلمون است. عفونت در گله‌های طیور به‌خاطر کاهش تولید تخم‌مرغ، تبدیل غذایی ضعیف و حذف لاشه منجر به ضرر اقتصادی فراوانی می‌شود (۲).

تشخیص *مایکوپلاسما گالی‌سپتیکوم* با استفاده از تکنیک‌های مختلفی قابل انجام است. نظیر کالبد گشایی جهت مشاهده جراحات، سرولوژی جهت ارزیابی پاسخ ایمنی نظیر آزمون الایزا و جستجوی *مایکوپلاسما گالی‌سپتیکوم* جهت پیدا کردن ارگانیسم یا DNA آن با استفاده از کشت و جداسازی و PCR (۲۶). استفاده از روش PCR برای شناسایی اسید نوکلئیک به‌عنوان یک روش جایگزین برای روش‌های جداسازی معمول است (۷،۱۰،۱۲،۱۳،۱۷،۲۹). هر چند کشت *مایکوپلاسما* یک استاندارد طلایی است اما روش‌های کشت *مایکوپلاسما گالی-سپتیکوم* سخت و زمان بر است (۸،۱۹،۲۲،۲۵) و نمی‌تواند ارگانیسم را از موارد مزمن و پرندگان درمان شده که غلظت *مایکوپلاسما گالی‌سپتیکوم* در چنین شرایطی پایین استو نیز مواد ضد مایکوپلاسمایی، آنتی‌سرم و ممانعت کنندگان مختلف وجود دارد، شانس جداسازی را کاهش داده و زمان جداسازی را افزایش می‌دهد (۱۸). ثابت شده است که PCR نسبت به کشت برای تشخیص *مایکوپلاسما گالی‌سپتیکوم* از نمونه‌های فیلدی مناسب‌تر است. نمونه‌های اخذ شده از پرندگان درمان

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 13:30 +0430 on Tuesday April 9th 2019

شده PCR مثبت بودند، در حالی‌که، نمونه‌های مشابه در روی محیط اختصاصی از نظر کشت منفی بودند طوری‌که با آزمون PCR ٪۹۷ و با کشت ٪۶۷ نمونه‌ها مثبت شدند (۱۴،۳۰).

در یک مطالعه در چهار محال و بختیاری با استفاده از روش PCR قطعه‌ای از ژن 16S rRNA جهت شناسایی *مایکوپلاسما گالی‌سپتیکوم* تکثیر گردید. در این روش از ۳۲۴ نمونه ۹۶ نمونه (٪۲۹/۶۳) بر اساس آنالیز PCR مثبت بودند. میزان فراوانی این جرم در شهرکرد، بروجن، فارسان و لوردگان به‌ترتیب برابر ۳۰/۵۰، ۳۸/۵۵، ۲۲/۸۸ و ٪۱۸/۶۰ بود (۲). در مطالعه‌ای دیگر در طیور تخم‌گذار، گوشتی و مادر در پاکستان با استفاده از روش کشت ٪۲۷/۳ *مایکوپلاسما گالی‌سپتیکوم* جداسازی گردید که ٪۳۹/۳ مربوط به سواب نایی، ٪۱۵/۹ بافت نایی، ٪۲۷/۴ بافت ریه و ٪۲۵ کیسه های هوایی می شد. با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز اسید نوکلئیک جرم مذکور از ٪۶۸/۱۸ سواب نایی، ٪۴۲/۴۷ بافت نایی، ٪۳۱/۸۵ بافت ریوی و ٪۵۰ کیسه‌های هوایی شناسایی گردید (۱۶).

در مطالعه حاضر، بر اساس آزمون راپید که مرحله اول غربالگری طیور از نظر درگیری با MG است ٪۲۴/۸ طیور روستایی مثبت بودند که در این میان بوقلمون ٪۲۰، خروس ٪۴۲/۸، مرغ ٪۲۱/۸، اردک ٪۲۰ و غاز ٪۲۰ آلودگی نشان دادند. انجام آزمون PCR بر روی ۱۴۵ اخذ شده با استفاده از پرایمر های تکثیر دهنده قطعه‌ای از ژن 16S rRNA نشان داد که ٪۶۳/۴ آلودگی از نظر MG وجود دارد که در این میان بوقلمون ٪۸۰، خروس ٪۸۰، مرغ ٪۵۴/۵، اردک ٪۵۰ و غاز ٪۵۰ آلودگی نشان دادند. وجود این میزان آلودگی در طیور روستایی به نوعی می‌تواند مسبب وجود MG در طیور صنعتی باشد. بروز بالای *مایکوپلاسما گالی‌سپتیکوم* در مزارع طیور ممکن است به‌خاطر انتقال افقی از جوجه‌های آلوده، تخم‌مرغ-ها، پرندگان وحشی، وسایل نقلیه و ... به گله‌های جوجه سالم و حساس باشد. مدیریت ضعیف، جریان هوای سرد در طول زمستان، واکسیناسیون، تعداد بالای پرندگان پرورشی و پرورش دادن جوجه‌های با سنین مختلف در یک مکان، ممکن است به‌عنوان فاکتور مسبب بالقوه برای شکست ایمنی در برابر عفونت *مایکوپلاسما گالی‌سپتیکوم* در جوجه‌ها عمل کند (۲۸). علاوه‌بر آن، تهویه ناکافی، زباله آلوده، رفت و آمد مکرر جوندگان، پرندگان وحشی، حیوانات خانگی، افراد، بازدیدکنندگان با معیارهای امنیت زیستی ضعیف؛ برخی از فاکتورهای دخیل در بروز عفونت *مایکوپلاسما گالی‌سپتیکوم* است (۹).

نتایج مطالعه حاضر با سایر مطالعه‌ها نیز هم‌خوانی دارد. وجود *مایکوپلاسما گالی‌سپتیکوم* در ٪۸۲/۴ مرغ های تخم‌گذار، ٪۶۴/۸ مادر گوشتی و ٪۱۷/۱ مرغ گوشتی در مطالعه‌ای توسط Osman و همکاران مثبت اعلام شد (۲۶) و در ٪۲۵/۸ مزارع تجاری طیور با روش PCR توسط Faisal و همکاران از نظر وجود *مایکوپلاسما گالی‌سپتیکوم* مثبت شناسایی شده‌اند (۱۱).

در یک مطالعه بر روی طیور گوشتی و کبک هندی به روش RAPD-PCR مشخص شد که الگوی RAPD یکسانی دارند که می تواند نشان دهنده این باشد که منشأ عفونت یکی است و لذا نیازمند اعمال برنامه های خاص برای جلوگیری از گسترش عفونت است (۲۰).

کنترل *مایکوپلاسما گالی‌سپتیکومبه‌طور* عموم بر اساس ریشه-کنی از گله‌های طیور است. امروزه، توسعه گسترده صنعت طیور در مناطق مختلف دنیا، گاها همراه با گونه‌های مختلف پرندگان، انواع مختلف طیور تجاری، یا پرندگان وحشی در محیط با تماس نزدیک یکدیگر است. در چنین شرایطی حفظ گله‌های عاری از عفونت ممکن است پیچیده یا غیرممکن باشد، و پیامد یا وقوع مجدد مایکوپلاسما نیاز به ارزیابی مجدد استراتژی‌هایی است که برای مدیریت عفونت‌های مایکوپلاسمایی در صنعت طیور است. چنین به‌نظر می‌رسد که قدم اول در برنامه‌های کنترل *مایکوپلاسما گالی‌سپتیکوم* تعیین منشأ باکتری در همه‌گیری‌های متعدد است. بروز *مایکوپلاسما گالی‌سپتیکوم* در جوجه‌ها در کشورهای بسیاری بدون استراتژی کنترل یا در برخی کشورها در مرحله قبل از اعمال یک استراتژی کنترلی است (۱۵). علاوه‌بر آن، تحقیقات اخیر در روی همه‌گیری‌های مختلف بیماری‌های تنفسی فوقانی در کبک هندی و دیگر پرندگان شکاری نشان‌دهنده درگیری اغلب آنها با *مایکوپلاسما گالی‌سپتیکوم* است (۶،۲۱،۳۲). عفونت طبیعی با *مایکوپلاسما گالی‌سپتیکوم* در بسیاری از پرندگان دیگر نیز گزارش شده‌است که در برخی موارد با علائم بالینی مشخص همراه است. اما پاتوژنیسیته سویه‌های *مایکوپلاسما گالی‌سپتیکوم* به‌نسبت مربوط به میزبان است. پرندگان شکاری، به‌ویژه کبک هندی، به‌نظر به بیماری حادتری نسبت به ماکیان اهلی مبتلا می‌گردد (۵،۳۱).

نتیجه گیری

با توجه میزان آلودگی بالای طیور بومی به *مایکوپلاسما گالی-سپتیکوم* مطالعه‌های بیش‌تری برای بررسی احتمال سرایت

Archive of SID

www.SID.ir

این جرم از طیور بومی به واحدهای صنعتی پرورش طیور در شهرستان ارومیه نیاز است. هم‌چنین با توجه به اهمیت جرم مذکور نیازمند اقدام‌های کنترلی بیش‌تری جهت جلوگیری از سرایت آن است.

سپاسگزاری:

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه (نسرین حسینی) بوده و نویسندگان این مقاله مرتب تشکر و قدرانی خود را از معاون پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه ابراز می‌دارند.

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 13:30 +0430 on Tuesday April 9th 2019

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 13:30 +0430 on Tuesday April 9th 2019

جدول ۱: تعداد و نوع نمونه‌های اخذ شده

نوع نمونه / نوع پرنده	نمونه سواب	نمونه خون
بوقلمون	۲۵	۲۵
خروس	۳۵	۳۵
مرغ	۵۵	۵۵
اردک	۲۰	۲۰
غاز	۱۰	۱۰
جمع کل	۱۴۵	۱۴۵

جدول ۲: خصوصیت‌های پرایمرهای مورد استفاده برای آزمون PCR (۱)

نام پرایمر	ژن هدف	اندازه پرایمر (bp)	توالی پرایمر	اندازه قطعه (bp)
MG-F	16S rRNA	22	5’-GAG-CTA-ATC-TGT-AAA-GTT-GGT-C-3’	185
MG-R		20	5’-GCT-TCC-TTG-CGG-TTA-GCA-AC-3’	

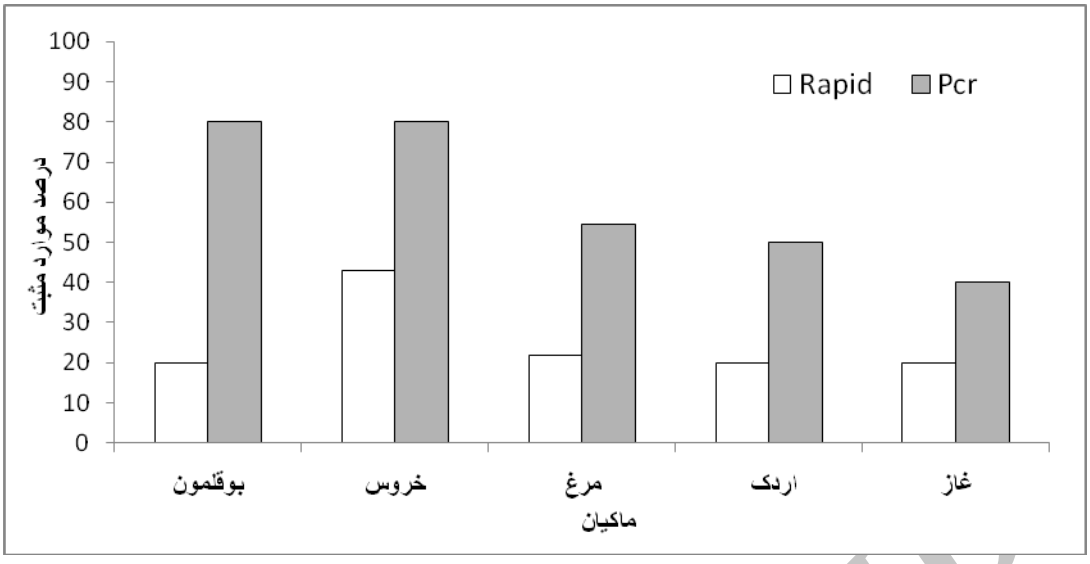
جدول ۳: نتایج آزمون راپید تست

نتیجه آزمون راپید / نوع پرنده	مثبت در رقت ۱/۸ (٪)	منفی (٪)
بوقلمون	۵ (۲۰٪)	۲۰ (۸۰٪)
خروس	۱۵ (۴۲/۸٪)	۲۰ (۵۷/۲٪)
مرغ	۱۲ (۲۱/۸٪)	۴۳ (۷۸/۲٪)
اردک	۴ (۲۰٪)	۱۶ (۸۰٪)
غاز	۲ (۲۰٪)	۸ (۸۰٪)
جمع کل	۳۶ (۲۴/۸٪)	۱۰۹ (۷۵/۲٪)

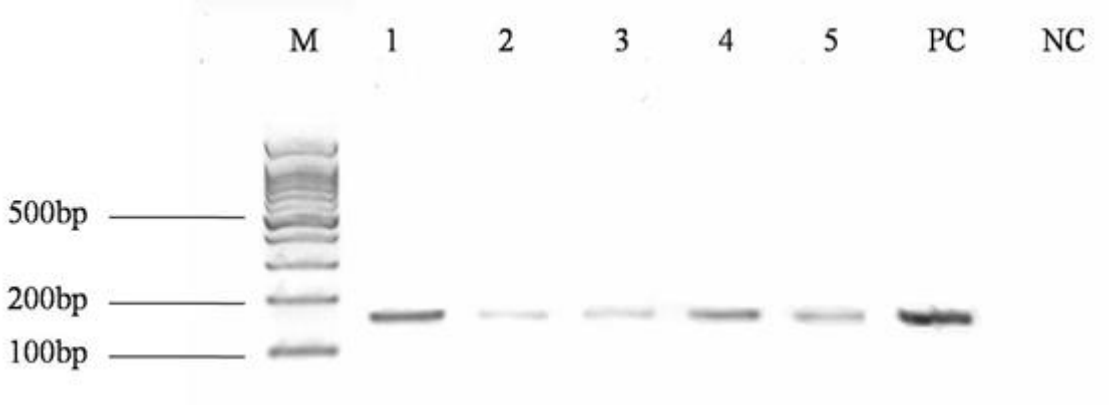
Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 13:30 +0430 on Tuesday April 9th 2019



نمودار ۱: مقایسه موارد مثبت آزمون راپید تست و PCR به درصد



شکل ۱: نتایج PCR . چاهک M: مارکر (Fermentas, Germany)1Kbp ؛ چاهک‌های ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ نمونه‌های مثبت؛ PC: کنترل مثبت؛ NC: کنترل منفی

www.SID.ir

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 13:30 +0430 on Tuesday April 9th 2019

منابع

1. Avian Mycoplasmosis, Chapter 2.3.5, OIE Terrestrial Manual 2008, Pp: 1-16. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.05_%20AVIAN_MYCO.pdf

2. Bagheri H. Detection of Mycoplasma gallisepticum in Chaharmahal Va Bakhtiari Province Poultry Using PCR. Glo. Vet 2011; **7**: 54-59

3. Bashiruddin JB, Frey J, Konigsson MH, Johansson KE, Hotzel H, Diller R, Santis P, Botelho A, Ayling RD, Nicholas RAJ, Thiaucourt F, Sachse K. , Evaluation of PCR system for the identification and differentiation of Mycoplasma agalactiae and Mycoplasma bovis: A collaborative trial. Vet J 2005; 169: 268-275.

4. Bencina D, Mrzel I, Rojs OZ, Bidovec A, Dovc A. Characterisation of *Mycoplasma gallisepticum* strains involved in respiratory disease in pheasants and peafowl. Vet Rec 2003**;** 152: 230–234.
5. Bradbury JM, Yavari CA, Dare CM. Mycoplasmas and respiratory disease in pheasants and partridges. Avian Path 2001; 30:391–396.

6. Callison SA, Riblet SM, Sun S, Ikuta N, Hilt D, Leiting V, Kleven SH, Suarez DL, Garcia M. Development and validation of a realtime Taqman polymerase chain reaction assay for the detection of Mycoplasma gallisepticum in naturally infected birds. Avian Dis 2006; 50: 537-544

7. Charlton BR, Bermudez AJ, Boulianne. *Avian Disease Manual*. Kennett square, Pa, USA: American association of avian pathologist. Edited by: Carlton B R.1996
8. Chin RP, Daft MB, Meteyer CU, Yamamoto R. Meningeo-encephalitis in commercial meat turkeys associated with Mycoplasma gallisepticum. Avian Dis 1991**;**35: 986-993.

9. Dulali, R.S. (2003). Sero-prevalence and pathology of mycoplasmosis in sonali chickens. MS Thesis. Dept. of Pathology. Faculty of Veterinary Science, Bangladesh Agricultural University, Mymensingh. Bangladesh.

10. Evans JD, Leigh SA. Differentiation of *Mycoplasma gallisepticum* vaccine strains ts-11 and 6/85 from commonly used *Mycoplasma gallisepticum* challenge strains by PCR. Avian Dis 2008; 52: 491-497.

11. Faisal Z, Ideris A, Hair-Bejo M, Omar A, Giap TG. The prevalance of *Mycoplasma gallisepticum* infection in chicken from peninsular Malaysia. J Vet Anim Adv 2011; 10: 1867-1874.

12. Feberwee A, Mekkes DR, de-Wit JJ, Hartman EG, Pijpers A. Comparison of culture, PCR, and different serologic tests for detection of Mycoplasma gallisepticum and Mycoplasma synoviae infections. Avian Dis 2005; 49: 260-268.

13. Ferguson NM, Hepp D, Sun S, Ikuta N, Levisohn S, Kleven SH, Garcia M. Use of molecular diversity of Mycoplasma gallisepticum by gene-targeted sequencing (GTS) and random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for epidemiological studies. Microbiol 2005; 151: 1883-1893.
14. Finklin M, Kleven SH. Evaluation of Diagnostic Methods for Mycoplasma gallisepticum in chickens on 50g/ton tylosin in the Feed. Presented at the Georgia veterinary medical association meeting, San Destin, FL 2006

15. Gharaibeh S, Al Roussan D. The use of molecular techniques in isolation and characterization of Mycoplasma gallisepticum from commercial chickens in Jordan. Int J Poult Sci 2008; **7**: 28–35.

16. Gondal M, Rabbani A, , Muhammad M, Yaqub K , Babar T, Sheikh ME, Ahmad AA, Shabbir A, Khan MZ MI. Characterization of *Mycoplasma gallisepticum* isolated from commercial poultry flocks. J Anim Plant Sci 2015; 25: 108-113

17. Hess M, Neubauer C, Hackl R. Interlaboratory comparison of ability to detect nucleic acid of Mycoplasma gallisepticum and Mycoplasma synoviae by polymerase chain reaction. Avian Path 2007; 36: 127-133.

18. Jordan FTW. *The Mycoplasmas*.1-48. J. G. Tully and R. T. Whitcomb (ed.), Avian mycoplasmas, 11. Academic Press, Inc. New York: 432-496.

19. Kempf I, Blanchard A, Gesbert F, Guittet M, Bennejean G. The polymerase chain reaction for *Mycoplasma gallisepticum* detection. Avian Path 1993; 22: 739-750

20. Khoshbakht R, Seifi S, Tabatabaei M, Shirzad Aski H, Ranjbar V, Abdi Hacheso B. *Mycoplasma*

Archive of SID

www.SID.ir

gallisepticum strains with identical random amplified polymorphic DNA (RAPD) patterns in chukar partridges (Alectoris chukar) and broilers: a case report. Vet Med 2013; 58: 284–288

21. Kleven S H, Rowland C N, Olson N O. *Mycoplasma synoviae* infection. In: Calnek BW, Beard CW, Barnes HJ, Reid WM, Yoder HW Jr editors. Diseases of Poultry. 9th. Ames, Iowa, USA: Iowa State University Press. 1991; pp. 223–231.
22. Ley DH. *Diseases of Poultry*. 11th Edition. Iowa State University Press. 2003; 122-144

23. Luttrell MP, Fischer JR, Stallknecht DE, Kleven SH. Field investigation of *Mycoplasma gallisepticum* infections in house finches (Carpodacus mexicanus) from Maryland and Georgia. Avian Dis 1996; 40: 335–341.

24. Naola MF, Hepp D Sun, Ikuta S, Levisohn N, Kleven S, Garcia SHM. Use of molecular diversity of *Mycoplasma gallisepticum* by gene-targeted sequencing (GTS) and random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for epidemiological studies. Microbiol 2005; 151: 1883–1893.

25. Nascimento ER, Yamamoto R, Herrick KR, Tait RC. Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma gallisepticum*. Avian Dis 1991; 35: 62-69.

26. Osman KM, Aly MM, Amin ZMS, Hasann BS. *Mycoplasma gallisepticum*: an emerging challenge to the poultry industry in Egypt. Rev scient tech 2009**;** 28:1015-1023.

27. Pakpinyo S, Pitayachamrat. Laboratory Diagnosis of *Mycoplasma gallisepticum* (MG) Infection in Experimental Layer Chicken Receiving MG Vaccines and MG organism. J Vet Med 2006; 36: 29-37

28. Pradhan MAM. Studies on Avian Mycoplasmosis: Prevalence, Isolation. Characterization and Antigenic properties. Ph.D. Thesis. Dept. of Microbiology and Hygiene, Faculty of Veterinary Science, Bangladesh Agricultural University, Mymensingh, Bangladesh 2002

29. Raviv ZN Ferguson N, Laibinis V, Wooten R, Kleven SH. Role of *Mycoplasma synoviae* in commercial layer, *Escherichia coli* Peritonitis Syndrome. Avian Dis 2007; 51: 685-690.

30. Stanley WA, Hofacre CL, Speksnijder G, Kleven SH, Aggrey SE. Monitoring *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* infection in breeder chickens after treatment with enrofloxacin. Avian Dis 2001; 45: 534-539.

31. Vitula F, Peckova L, Bandouchova H, Pohanka M, Novotny L, Jira D, Kral J, Ondracek K, Osickova J, Zendulkova D, Rosenbergova K, Treml F, Pikula J. *Mycoplasma gallisepticum* infection in the grey partridge Perdix perdix: outbreak description, histopathology, biochemistry and antioxidant parameters. BMC Vet Res 2011; 7: 34.

32. Welchman DD, Bradbury JM, Cavanagh D, Aebischer NJ. Infectious agents associated with respiratory disease in pheasants. Vet Rec 2002; 150: 658–664.

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 13:30 +0430 on Tuesday April 9th 2019

Archive of SID

www.SID.ir