مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره چهارم، شماره چهاردهم، بهار ۱۳۹۳

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

جداسازی *مایکوپلاسماسینوویه* آلوده کننده ریه شترمرغهای استان کرمان

حمید تبیانیان[۱]، سید حنیف میر حسینی[۲،*]، با بک خیر خواه[۳]، مهدی حسن شاهیان[۴]

[۱] فوق لیسانس میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، تهران، ایران.
[۲] فوق لیسانس میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات کرمان، گروه میکروبیولوژی،کرمان، ایران.
[۳] دکتری میکروبیولوژی،استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بافت، گروه میکروبیولوژی، بافت، ایران.
[۴] دکتری میکروبیولوژی، استادیار، دانشگاه شهید باهنر کرمان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، کرمان، ایران.

چکیده:

سابقه و هدف: عفونت مایکوپلاسمایی ریه شترمرغ از جمله عفونتهای مسری در شترمرغ است. مایکوپلاسماهای شترمرغ در ابتدا باعث بیماریهایی در دستگاه تنفس میشوند که دارای علائمی نظیر التهاب بینی، نای و همچنین آسیب شدید ریه در ارتباط با این بیماری میشوند. در این تحقیق، جداسازی مایکوپلاسما سینوویه آلوده کننده ریه شترمرغهای مزارع پرورشی استان کرمان و مقایسه دو روش کشت و واکنش زنجیرهای چندگانه (PCR) جهت تایید مایکوپلاسمای آلوده کننده ریه شترمرغها مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها: نمونه گیری تصادفی چندگانه در کشتارگاههای شترمرغ استان کرمان از بخشهای مختلف ریه شترمرغهای کشتار شده بلافاصله پس از کشتار در شش ماهه اول سال ۱۳۹۱ صورت گرفت. نمونه ها بصورت موازی تحت دو روش کشت و PCR قرار گرفتند. سپس محصول PCR بر اساس تکثیر قطعهای از ژن ۱۶S rRNA توسط دستگاه UV مشاهده شد.

یافته ها: مشاهده پرگنههای تخممرغی بر روی محیط جامد PPLO Agar نتیجه کشت مثبت از لحاظ جنس مایکوپلاسما ارزیابی گردید. از سوی دیگر نتایج مولکولی پس از حرکت دادن محصول PCR بر ژل آگارز مشاهده شد.

نتیجه گیری: هرچند که پژوهشهای گذشته نشان میدهند که میزان آلودگی در گله های طیور صنعتی کشور بسیار بیشتر از میزان شیوع در مزارع پرورش شترمرغ کرمان میباشد اما آلودگی در مزارع پرورش شترمرغ میتواند بعنوان مخزنی برای انتشار باکتری در مرغداریهای صنعتی علیرغم تمامی پیشگیریهای صورت گرفته باشد.

کلمات کلیدی: عفونت ریه، شتر مرغ، مایکوپلاسما سینوویه، واکنش زنجیرهای چندگانه.

مقدمه

عفونتهای ریه شترمرغ از جمله عفونتهای مسری در شترمرغ (غیر وابسته به جنس) میباشند. مشکلات تنفسی در شترمرغ-ها میتوانند بواسطه مایکوپلاسماهای خاصی ایجاد شوند که منجر به عوارض مستقیم و غیر مستقیم در شترمرغها می-گردد [۲]. اعضای جنس مایکوپلاسما اغلب در مجاری تنفسی، ادراری_تناسلی و مفاصل حیوانات ایجاد بیماری میکنند. کوچکترین ژنوم مایکوپلاسماها کمی بیش از دو برابر اندازه ژنوم برخی ویروسهای بزرگ است. آنها بطور کامل نسبت به پنیسیلین مقاومند چون فاقد دیواره سلولی هستند اما بوسیله تتراسیکلین یا اریترومایسین مهار میشوند. مایکوپلاسماها تمایل به اتصال به غشای سلولهای میزبان دارند [۱۴]. مایکوپلاسما سینوویه(*M.synoviae*) یکی از عوامل بیماریزا مهم ماکیان و بوقلمون است که همه ساله خسارت اقتصادی زیادی به صنعت طیور وارد مینماید. اگر چه اولین بار مایکوپلاسما سینوویه (*M.synoviae*)به عنوان عامل بیماری سینوزیت عفونی معرفی شد، اما امروزه علاوه بر سینوزیت عفونی به عنوان عامل سایر بیماریهای تنفسی و عفونتهای کیسه های هوایی نیز شناخته شده است. علیرغم پیشرفتهای ایجاد شده در روشهای کنترل و ریشه کنی، مایکوپلاسما سینوویه(*M.synoviae*) کماکان

آدرس نویسنده مسئول : ،دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات کرمان، گروه میکروبیولوژی،کرمان،ایران
Email :Hanif_gh68@yahoo.com
تاریخ دریافت مقاله: ۹۲/۴/۲۹
تاریخ پذیرش: ۹۳/۲/۱۴

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.4.14.11.6]

در صنعت طیور خصوصاً درگله های گوشتی و تخمگذار تجاری از اهمیت برخوردار است [۴،۵]. در برخی از موارد، عفونت سیستمیک شده و به سینوزیت عفونی منجر میشود که یک بیماری عفونی حاد تا مزمن ماکیان و بوقلمونها است و بطور عمده غشاء سینوویال مفاصل و غلاف تاندونها را درگیر مینماید [۶]. این بیماری برای اولین بار از آمریکا و در ماکیان (۱۹۵۴) و بوقلمون (۱۹۹۵) گزارش شد و از آن به بعد در سراسر جهان مورد شناسایی قرار گرفت. و پژوهشگران برای اولین بار سینوویت عفونی ناشی از مایکوپلاسما را توصیف کردند [۷]. مایکوپلاسما سینوویه(*M.synoviae*) از جمله باکتریهائی است که به سختی از گله های آلوده جدا میشود و کشت آن نیاز به محیطهای اختصاصی داشته و نیازمند زمان نسبتا زیادی است. به صورت کلی مایکوپلاسماها سخت رشد بوده و نیاز به شرایط ویژهای به منظور کشت دارند که در گونههای مختلف مقداری متمایز است و باید نیازمندی هر گونه به دقت بررسی و شرایط کشت آن فراهم باشد [۱،۶،۷]. در حضور عفونتهای پیچیده کننده امکان رشد موفق مایکوپلاسما در محیط کشت کاهش مییابد [۱۲،۱۵]. همچنین روش کشت زمانبر بوده و روش وقتگیری میباشد [۳،۱۳]. Lauerman و همکاران در سال ۱۹۹۳ جهت رفع این مشکل پرایمرهای اختصاصی گونه را برای مایکوپلاسما سینوویه از قسمت ۱۶S rRNA انتخاب نمودند و در روش PCR مورد ارزیابی قرار دادند با کمک پرایمرهای انتخاب شده در تحقیقشان ۵۵ جدایه از نظر مایکوپلاسما سینوویه PCR مثبت بودند و ۲۴ جدایه از مایکوپلاسمای دیگر طیور با این نوع پرایمر باند اختصاصی تشکیل ندادند. تجزیه و تحلیل دادههای بدست آمده از ۱۲۲گله که با روش فوق مورد آزمایش قرارگرفتند و مقایسه آن با روشهای کشت، سرولوژی (سرم پلیت تست ، هماگلوتیناسیون و الیزا) و نیز اپیدمیولوژی و تاریخچه بیماری نشان داد که روشPCR با پرایمر اختصاصی مایکوپلاسما سینوویه(*M.synoviae*) دارای ۸۲٪ حساسیت و ۱۰۰٪ ویژگی بود [۱۱]. Marois و همکاران در سال ۲۰۰۰ به منظور ردیابی مایکوپلاسما سینوویه زنده در نمونه های محیطی، زندهمانی مایکوپلاسما سینوویه(*M.synoviae*) و پایداری قسمت ۱۶S rRNA آن در پرندگانی که بصورت تجربی عفونی شده بودند بررسی شد و همچنین نشان دادند که پایداری۱۶S rRNA مایکوپلاسما تا حداکثر ۲۳ساعت بعد از مرگ مایکوپلاسما بود. بنابراین ردیابی حضور ۱۶S rRNA در روش RT-PCR بیانگر زنده بودن مایکوپلاسما یا مرگ آن در بازده زمانی کوتاهی قبل از نمونه گیری میباشد [۱۲]. هدف از این پژوهش جداسازی مایکوپلاسما سینوویه(*M.synoviae*) آلوده کننده ریه شترمرغهای استان کرمان به روش PCR در سال ۱۳۹۱ بود.

مواد و روش‌ها

محیط کشت و جداسازی مایکوپلاسما

جامعه آماری این پژوهش تمامی شترمرغهای پرورشی(۶۵ عدد شترمرغ) بوده که در شش ماهه اول سال ۱۳۹۱ مورد نمونهگیری تصادفی چندگانه در کشتارگاههای شترمرغ استان کرمان قرار گرفتند. نمونه ها شامل بخشهای مختلف ریه شترمرغ های کشتار شده بلافاصله پس از کشتار بودند که در کمتر از ۲۴ ساعت بدون افزودن محیط انتقالی در دمای ۴ درجه سانتیگراد در کنار یخ به آزمایشگاه تخصصی گروه پژوهشی میکروب شناسی پاسارگاد ارسال گردیدند و نسبت به تأیید جنس و گونه باکتری عامل اقدام شد. از آنجا که مایکوپلاسما سینوویه (*M.synoviae*)به محیط کشت اختصاصی نیاز دارد و محیط کشت کامل و از قبل آماده شده برای آن در دسترس نمیباشد از این رو تهیه محیط کشت مناسب و استاندارد، نخستین اقدام برای کشت و جداسازی باکتری محسوب میشود لذا در این تحقیق نسبت به تهیه محیط کشت اختصاصی در آزمایشگاه اقدام شد. دو نوع محیط کشت اختصاصی شامل محیط PPLO Agar و PPLO Broth (از شرکت زیست کاوش ایرانیان تهیه شده است)برای مایکوپلاسما سینوویه(*M.synoviae*) وجود دارد که محیط کشت دوم فاقد آگار میباشد. لذا نمونه های مورد نظر در محیط PPLO Broth در یک دوره ۲۴ ساعته در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد غنی سازی شده اند و سپس برای شناسای مولکولی PCR و جداسازی باکتری به محیط PPLO Agar انتقال و مورد آزمایش قرار گرفتند [۱۶].

استخراج DNA

مقدار ۰/۵ میلیلیتر از محیط مایع حاوی نمونه ریه شترمرغ مورد آزمون را بعد از قرار دادن در شیکر به میکروتیوپ ۱/۵ میلیلیتر منتقل کرده و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰rpm

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.4.14.11.6]

سانتریفوژ گردید، سپس محلول رویی را تخلیه نموده، حدود ۱۰۰ میکرولیتر رسوب در ته لوله باقی میماند و مراحل استخراج DNA روی رسوب انجام گردید. کنترل مثبت استفاده شده جهت انجام واکنشهای PCR سویهی استاندارد مایکوپلاسما سینوویه(*M.synoviae*) (MS-NCTC ۱۰۱۲۴-۰۵) وکنترل منفی PPLO Broth بودند. حجم با رسوب باقی مانده در میکروتیوب (۱۰۰ میکرولیتر) به آن بافر لیز کننده اضافه گردید سپس رسوب و بافر بخوبی مخلوط شده و ۴ ساعت در بن ماری ۵۶ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. در این مرحله فنل اشباع اضافه شده، پس از اینکه با ورتکس نمونه کاملاً با فنل مخلوط شد با سانتریفوژ ۱۳۰۰۰ rpm بمدت ۱۵ دقیقه فنل از فاز آبی جدا گردید. محلول روئی را به تیوپ جدید منتقل کرده و هم حجم آن از محلول فنل و کلروفرم که با حجم مساوی با یکدیگر مخلوط شدهاند اضافه گردید. پس از مخلوط شدن و تکان دادن، نمونه در ۱۳۰۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. پس از سانتریفوژ دو فاز تشکیل که فاز رویی به میکروتیوب جدید منتقل و هم حجم آن کلروفرم اضافه شد. سپس با ورتکس کاملاً مخلوط شده به مدت ۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردید. در این مرحله به مقدار ۰/۱ حجم نمونه، استات سدیم ۳ مولار به فاز رویی اضافه شده و پس از مخلوط گشتن، به میزان دو برابر حجم نمونه به آن اتانول مطلق سرد افزوده و به مدت ۲۰ دقیقه نمونه در سرمای ۲۰- درجه سانتیگراد قرار داده شد. پس از زمان انکوباسیون در سرما نمونه به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ شده تا DNA غیر محلول رسوب نماید. سپس محلول روئی کاملاً تخلیه و در مرحلهی بعدی DNA رسوب داده شده با اتانول ۷۰ درجه شستشو شد. این مرحله با اضافه نمودن ۲۰۰ میکرولیتر الکل ۷۰ درجه به رسوب، سر و ته کردن لوله و سپس سانتریفوژ به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۳۰۰۰ rpm انجام گردید. سپس میکروتیوب کاملاً تخلیه شده و تکان محکمی داده تا محتویات آن خارج شود. در ادامه میکروتیوب را در محیط آزمایشگاه به صورت وارونه و یا در زیر هود قرار داده تا جداره آن خشک شود. مقدار ۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به DNA اضافه نموده و تا زمان انجام آزمایش داخل یخچال نگهداری شد [۹].

PCR

برای انجام آزمایش PCR دو پرایمر جلودار و برگشتی مورد استفاده قرار گرفت که توالیهای نوکلئوتیدی و ویژگی آغازگرهای مورد استفاده در تشخیص مایکوپلاسما سینوویه*M.synoviae*) (در جدول ۱ نشان داده شده است. تکثیر DNA در اندازه کلی ۳۵.۲۵ µL که شامل ۱۷.۵ µL DNA ، ۰.۱ µL از هر پرایمر ،۰.۵ µL (۱۰ mM) dNTP mix ،µL ۴ Mgcl۲ (۲۵ mM)، ۲.۵ µL بافر PCR (۱۰X) و ۰.۲۵ µL (Tag DNA polymerase ۵units/ µL (سینا ژن). مخلوط واکنش در ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه دنیچر شده و سپس دمای ۹۴ درجه سانتیگراد و زمان ۱ دقیقه برای انالینک و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه برای تکثیر تنظیم گردید. محصولات PCR در ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد. کنترل مثبت و منفی شامل همه آزمایشات میباشد. هر میکرو لیتر ازقسمت مساوی محصولات PCR با ۲ میکرولیتر از بافر (۶x) مخلوط شد و محصولات PCR و DNA ladder (۱۰۰bp) بر روی ژل آگاروز ۱ درصد جدا شده اند و رنگ امیزی با ۰.۵µL/ml از اتیدیوم بروماید استفاده شده و سپس محصول PCR توسط دستگاه UV مشاهده شد [۹].

جدول۱: توالیهای نوکلئوتیدی و آغازگرهای مورد استفاده در تشخیص مایکوپلاسما سینوویه به روش PCR

Primer	Target gene	Sequence	Length (bp)
	16S rRNA	F: 5/-GCTGCGGTGAATACGTTCT-3/	163
		R: 5/-TCCCCACGTTCTCGTAGGG-3/	
MS-1	16S rRNA	F: 5/-GAAGCAAAATAGTGATATCA-3/	207
MS-2		R:5/-GTCGTCTCCGAAGTTAACAA-3/	

نتایج

نتایج این مطالعه بر پایه جداسازی مایکوپلاسما سینوویه (*M.synoviae*)با استفاده از دو روش کشت (در محیط مایع و روی آگار) و PCR بصورت موازی برای تشخیص موارد مثبت حاصل گردید. نتایج کشت بر روی محیط جامد PPLO Agar با مشاهده پرگنههای تخممرغی شکل ویژه مایکوپلاسما بر روی محیط کشت با میکروسکوپ نوری ثبت گردید و در صورت مشاهده پرگنههای مذکور نتیجه کشت مثبت از لحاظ جنس مایکوپلاسما ارزیابی گردید (شکل۱). برای تشخیص گونه باکتری از روش کشت نمیتوان استفاده کرد. از سوی دیگر بصورت موازی

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.4.14.11.6]

از روش PCR برای نمونه های غنی شده در تشخیص جنس و گونه استفاده شد و نتایج پس از حرکت دادن محصول PCR بر ژل آگارز مشاهده شد (شکلهای۲ و ۳)، همچنین فراوانی نمونه ها در جدول ۳و۲ نمایش داده شده است.

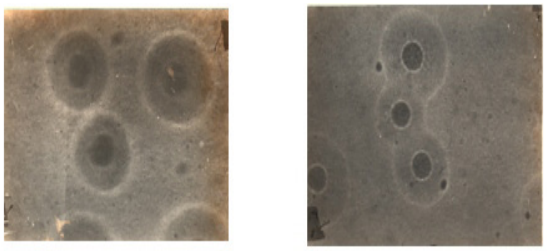
جدول۲: فراوانی نمونه ها بر اساس نتایج کشت، PCR جنس مایکوپلاسما و PCR گونه سینوویه

	کشت		PCR جنس		PCR گونه	
	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد	فراوانی	درصد
مثبت	۱۷	۳۲	۲۵	۴۷	۱۳	۲۵
منفی	۳۶	۶۸	۲۸	۵۳	۱۲	۲۲
جمع	۵۳	۱۰۰	۵۳	۱۰۰	۲۵	۴۷

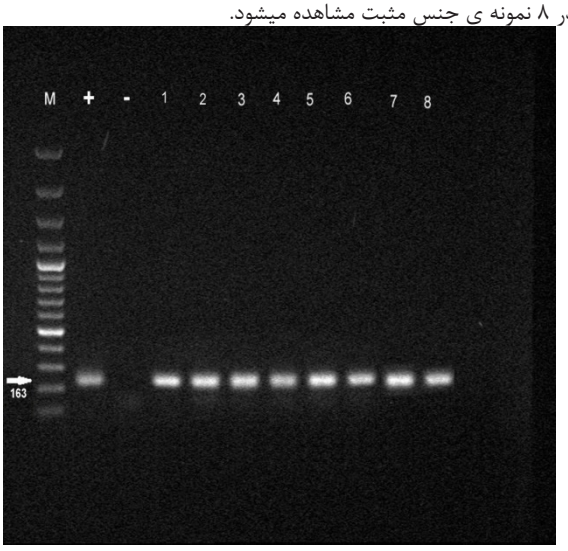
جدول۳: فراوانی نمونه ها بر اساس نتایج کشت و PCR جنس مایکوپلاسما

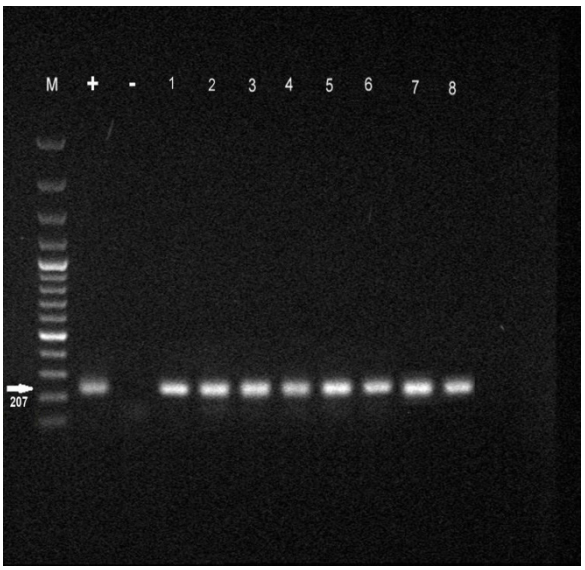
کشت	PCR	تعداد نمونه
+	+	۱۴
-	-	۲۵
+	-	۳
-	+	۱۱
جمع کل		۵۳

شکل ۱:تصویر میکروسکوپی (×۴۰) پرگنه های مشاهده شده بر روی محیط PPLO Agar



شکل ۲: بررسی محصول PCR جنس مایکوپلاسما بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد با استفاده از آغازگر اختصاصی جنس مایکوپلاسما. باندهای bp ۱۶۳ در ۸ نمونه ی جنس مثبت مشاهده میشود.





شکل ۳: بررسی محصول PCR گونه مایکوپلاسما سینوویه*M.synoviae*) (بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد با استفاده از آغازگر اختصاصی گونه _FS۱) (FS۲. باندهایbp ۲۰۷ در ۸ نمونه گونه مثبت مشاهده میشود.

بحث

با توجه به نتایج کشت و PCR در این مطالعه، میزان آلودگی به مایکوپلاسما سینوویه(*M.synoviae*) در مزارع شترمرغ استان کرمان بسیار بالاست و در مقایسه این دو تکنیک، میزان واقعی آلودگی مزارع پرورش شترمرغ استان کرمان به مایکوپلاسما سینوویه(*M.synoviae*) توسط آزمون PCR میزان بسیار بالایی گزارش شد که در مقایسه با روش کشت بسیار نزدیکتر به واقعیت میباشد. پوربخش و همکاران در سال ۲۰۱۰ درتحقیقی با هدف بکارگیری روشهای اختصاصی کشت و PCR جهت شناسایی و جداسازی مایکوپلاسما سینوویه(*M.synoviae*) از مزارع مرغ مادر گوشتی استان تهران ۴۷۵ نمونه از ۲۳ مزرعه را ابتدا در محیطهای اختصاصی PPLO براث و آگار کشت دادند سپس آنها را تحت آزمون PCR برروی ژن ۱۶S rRNA قراردادند. از ۱۴۶ کشت آگار مثبت دارای کلنی مایکوپلاسما، ۸۵ آگار از نظر حضور مایکوپلاسما سینوویه با استفاده از آگلوتیناسیون با آنتیسرم اختصاصی مایکوپلاسما سینوویه (*M.synoviae*)مثبت گزارش شدند ۱۲۲ نمونه نیز توسط آزمون PCR مثبت گزارش گردید. بر این اساس آنها نتیجه گرفتند که آلودگی به مایکوپلاسما سینوویه(*M.synoviae*) در مزارع مرغ مادر گوشتی استان تهران وجود دارد و نیز آزمون PCR به عنوان یک روش موثر و با صرفه جویی بالاتر در وقت میتواند

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.4.14.11.6]

جایگزینی مناسب برای کشت باشد [۱۳]. در این تحقیق نیز مشخص شد که آزمون PCR موثرتر از روش کشت می باشد چرا که در مدت زمان کوتاه تری، دقت بالاتری و همچنین باصرفه جویی بسیار زیاد در هزینه ها می باشد و نیز بهترین روش جهت تشخیص مایکوپلاسما سینوویه(*M.synoviae*) نیز PCR می باشد. مطالعات زیادی در خصوص میزان آلودگی گله های تجاری در ایران و خارج از کشور انجام گردیده اما در رابطه با سایر مخازن عامل عفونت نیز تحقیقاتی انجام گردیده اما در ایران تحقیق مستقلی صورت نگرفته است. مایکوپلاسما سینوویه(*M.synoviae*) در اسپانیا از گنجشکهای خانگی جدا شده است. Kieven و Fletcher دریافتند که گنجشکها میتوانند به طور تجربی آلوده شوند اما بطور طبیعی کاملاً مقاوم بودند. خرگوش، موش صحرایی(rat)، خوکچه هندی، موش، خوک و بره به آلوده سازی تجربی مقاوم هستند. در خصوص جداسازی این عامل بیماری از شترمرغهای کشور تاکنون تحقیقی انجام نشده و این پژوهش برای اولین بار در استان کرمان انجام گرفت. مایکوپلاسماها یکی از عوامل بیماریزای مهم طیور هستند که همه ساله خسارات اقتصادی زیادی به صنعت طیور وارد می نمایند. خسارات اقتصادی مایکوپلاسماها چه به صورت اولیه بر اثر مشکلات تنفسی و ابتلای مفاصل یا بر اثر همزمانی آن با عفونتهای پیچیده ویروسی و میکروبی، تحت شرایط نامناسب بهداشتی و مدیریتی بروز مینماید. عواملی چون کاهش بازده غذایی، افزایش مصرف آنتیبیوتیکها، کاهش تولید تخم مرغ، افزایش تلفات جنینی، پائین آمدن کیفیت جوجهها، ایجاد واکنشهای زیانبار واکسنهای زنده ویروسی و حساس کردن گله به عفونتهای تنفسی بر اهمیت عفونتهای مایکوپلاسمائی افزوده است [۸]. در مطالعه حاضر ۴۷ درصد از نمونه ها درآزمون PCR جنس مایکوپلاسما مثبت گزارش شدند و ۲۵ درصد از این نمونه ها از نظر گونه مایکوپلاسما سینوویه(*M.synoviae*) مثبت بودند که این میزان بالایی از نمونه های آلوده را نشان میدهد و یک هشدار جدی جهت شناسایی سریع و مستقیم مایکوپلاسما سینوویه(*M.synoviae*) درمزارع پرورش شترمرغ طیور میباشد. این مطالعه یک روش تشخیص بسیار سریع مایکوپلاسما سینوویه(*M.synoviae*) را نسبت به کشت ارائه داد. در این مطالعه تعداد ۱۱ عدد از نمونه ها PCR مثبت ولی از نظر کشت منفی گزارش شدند که به دلایل مختلفی امکان رخ دادن این موضوع وجود دارد از جمله اشکال درکشت و عدم دقت کاربر با ناکارآمدی نیازمندیهای رشد در محیطهای کشت پیچیده PPLO براث / آگار مانند سرم، NAD،CO۲ و دیگر مواد موثر در کشت اشکال و اشتباه در انتقال صحیح نمونه ها به آزمایشگاه و عدم رعایت شرایط انتقال که گاهی منجر به مرگ جدایههای مایکوپلاسما سینوویه(*M.synoviae*) در دمای اتاق میگردد. در پژوهشهای مشابه Kuppeveld و همکارانش در سال ۱۹۹۲ با همردیف سازی کامپیوتری توالیهای ژن۱۶S rRNA مایکوپلاسماها، تشخیص و شناسایی نواحی متغیر توالیهای جنس و گونه را امکان پذیر ساختند [۱۰]. در این پژوهش نیز از ژن ۱۶S rRNA بعنوان ژن هدف جهت جداسازی عامل عفونت استفاده شد. نتایج این پژوهشها سریعتر، حساستر و کم هزینهتر بودن آزمون PCR در مقایسه با روش سنتی کشت را به عنوان روشی جایگزین جهت تشخیص آلودگی به مایکوپلاسما سینوویه(*M.synoviae*) تأیید مینماید. در مجموع هرچند که پژوهشهای گذشته نشان میدهند که میزان آلودگی در گله های طیور صنعتی کشور بسیار بیشتر از میزان شیوع در مزارع پرورش شترمرغ کرمان میباشد اما آلودگی در مزارع پرورش شترمرغ میتواند بعنوان مخزنی برای انتشار باکتری در مرغداریهای صنعتی علیرغم تمامی پیشگیریهای صورت گرفته باشد. این تفسیر، لزوم مراقبت و پیشگیری در مزارع شترمرغ را تشریح کرده که حتی نیاز به اعمال برنامههای واکسیناسیون را در شترمرغ ها توجیه میکند.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.4.14.11.6]

منابع

[1]. Bardbury JM, Avian Mycoplasmas. In: poultry Diseases, 5th edition, 2001; 178-194.

[2]. Botes A, Peyrot BM, Olivier AJ, burger WP, bellstedt DU, Identification of three novel mycoplasma species from ostriches in south Africa,vet microbial,2005; 8(3):4-5.

[3]. Evans JD, Thornton DL, Branton SL, Diagnosis of *Mycoplasma gallisepticum* from a Broiler Breeder Flock: Comparison of Three Diagnostics Methods. Int .J. Poult Scie, 2009; 8(2): 104-107.
[4].Hong Y, Gracia M, Leiting V, Bencina D, Zavala LD, Zavala G, Kieven SH, Specific detection and typing of *Mycoplasma synoviae* strains in poultry with PCR and DNA analysis targeting the hemagglutinin encoding gene *vlhA* , Avian Diseases,2004; 48(7): 606-616.
[5]. Kieven SH, Saif YM, Mycoplasmosis. In: Diseases of Poultry, 12th edition. Iowa State University Press,2008; 805-807.
[6]. Kieven SH, Ferguson-Noel N, *Mycoplasma synoviae* Infection. In: Diseases of Poultry, 12th edition. Iowa State University Press, 2008; 845-856.
[7]. Kieven SH, Ferguson-Noel N, Other Mycoplasmal Infection. In: Diseases of poultry, 12th edition.Iowa State University Press, 2008; 862-864.
[8]. Kieven SH, Fletcher OJ, Davis RB, Influence of strain of *Mycoplasma synoviae* and route of infection on development of synovitis or airsacculitis in broilers. Avian Diseases, 1975; 19(1): 126-135.
[9].Kojima A, Takahashi T, Kijima M, Ogikubo Y, Nishimura M, Nishimura S, Harasawa R, Tamura Y , Detection of Mycoplasma in avian live virus vaccines by polymerase chain reaction. Biologicals, 1997; 25(4): 365-371.
[10]. Kuppeveld FJM, Logt JTM, Angulo AF, Zoest MJ, Quint WGV, Niesters HGM, Galama JMD, Melchers WJG, Genus- and species-specific identification of Mycoplasmas by 16S rRNA amplification. Appl. Env. Microbiol, 1992; 20(5):145-156.
[11]. Lauerman LH, Hoerr FJ, Sharpton AR, Shah SM, Santen VL, Development and application of a polymerase chain reaction assay for *Mycoplasma synoviae*. Avian Diseases, 1993; 37(3): 829-834.
[12]. Marois C, Oufour-Gesbert F, kempf I, Detection of *Mycoplasma synoviae* in poultry environment samples by culture and polymerase chain reaction. Vet Microbiol, 2000; 73(5): 311-3ÍS.
[13]. Pourbakhsh SA, Shokril GR, Banani M, Elhamriia F, Ashtari A , Detection of Mycoplasma synoviae infection in broiler breeder farms of Tehran province using PCR and culture methods. Arc Razi Insti, 2010; 65(2): 75-81.
[14].Razin S, Adherence of pathogenic Mycoplasma to host cells. Biosc.Rep, 1997; 19(1): 367-372.
[15].Salisch H, Hinz KH, Graack HD, Ryll M , A comparison of a commercial PCR-based test to culture methods for detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in concurrently infected chickens. Avian Pathology, 1998; 27(6):142-147.
[16]. Swayne DE, Glisson RJ, Jackwood MW, Pearson JE, Reed WM, A labaratory manual for the isolation and identification of avian pathogens, The American Association of pathologist, Fourth edition,1998;74-80.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.4.14.11.6]