

شناسایی مولکولی مایکوپلازما گالی سبتیکوم در طیور 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

چکیده:

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

مواد و روش: از تعداد ۱۴۵ پرندۀ نمونه سوپای 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 سوپا 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 مایکوپلازما گالی سبتیکوم نقش ضروری در درک اپیدمیولوژی و گسترش بیماری بازی می‌کند چرا که آنها ایجاد اطلاعاتی می‌کنند که برای تشخیص و پیگیری همه‌گیری‌های جدید نیاز است. نظر به میزان آلودگی بالای طیور بومی به مایکوپلازما گالی سبتیکوم نیازمند اقدام‌های کنترلی بیش‌تری جهت جلوگیری از سرایت این جرم به مزارع پرورشی است.

واژه‌های کلیدی: مایکوپلازما گالی سبتیکوم، آگلوتیناسیون سریع سرم، طیور روستایی، PCR، ژن 16S rRNA

مقدمه

مایکوپلازماها 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

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

طبقه‌بندی شده‌اند. در این کلاس خانواده مایکوپلازما تاسه‌آ قرار گرفته که شامل جنس‌های مایکوپلازما و اوره‌پلازما است (۱). به‌احتمال نخستین تشخیص دقیق بیماری مایکوپلازما 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 ارگانسیم‌های 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

بافتی و هم‌چنین محیط کشت فاقد سلول، رشد دهد (۷). مایکوپلازما گالی‌سپتیکوم، نخستین بار توسط عملیات سروتایپینگ از سایر مایکوپلازماهای پرندگان جدا شد و به عنوان سروتایپ A در نظر گرفته شد. گونه مایکوپلازما گالی‌سپتیکوم در سال ۱۹۶۰ میلادی، توسط Edward و Kanarek معرفی شد. در سال ۱۹۹۳ میلادی، با استفاده از تکنیک‌های مولکولی، فنوتیپ‌ها و شباهت‌های آنتی‌ژنیک مایکوپلازما گالی‌سپتیکوم و سایر مایکوپلازماها شناسایی گردید (۸). دستیابی به تشخیص سریع، دقیق قطعی مایکوپلازما 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 رایید آگلوتیناسیون و الیزا برای بررسی مایکوپلازما در طیور صنعتی مورد استفاده می‌شود. از آنجا که تست‌های سرولوژی به‌علت پدیده تداخل متقابل با گونه‌های دیگر مایکوپلازما و هم‌چنین حضور فاکتورهای غیراختصاصی متغیر در سرم، حساسیت و اختصاصیت کافی در تشخیص سویه‌های مایکوپلازما را ندارند و گاهی باعث بروز جواب‌های مثبت کاذب می‌شوند لذا جداسازی و کشت مایکوپلازما علی‌رغم زمان‌بر بودن و سخت رشد بودن مایکوپلازما در محیط آزمایشگاهی به‌عنوان روش قطعی تأیید نهایی مایکوپلازما در طیور مورد استفاده قرار می‌گرفت. در چند سال اخیر با ابداع روش مولکولی PCR این تکنیک به‌عنوان اصلی‌ترین روش در تشخیص قطعی مایکوپلازما 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 مایکوپلازما 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 مایکوپلازما 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 مایکوپلازما در طیور بسیار حایز اهمیت است لذا در روش‌های جدید PCR به نام Multiplex PCR گونه‌های مختلف مایکوپلازما به‌طور هم‌زمان شناسایی می‌گردند (۲۱).

تاکنون بررسی بیماری مذکور بر روی طیور بومی و تشخیص میزان آلودگی به مایکوپلازما صورت نگرفته است. از آنجایی که اغلب این پرندگان در نزدیکی روستاهای مشرف به مزارع پرورشی طیور هستند و نیز به نوعی زمینه‌ساز بسیاری از سایر بیماری‌های پرندگان هستند، لذا ضروری به نظر می‌رسد تا مطالعه‌ای در این خصوص صورت گیرد. هدف از تحقیق حاضر تشخیص مایکوپلازما 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 سوآپ 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 سوآپ، 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 مایکوپلازما 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 سوآپ اخذ شده ابتدا در ورتکس به‌مدت ۳۰ ثانیه ورتکس شدند. سپس محتویات لوله‌ها به میکروتیوب ۱/۵ سی سی انتقال داده شدند و به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۱۴۰۰g سانتریفیوژ گردیدند. مایع‌رویی با استفاده از پیت پاستور دور

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 جدول ۲ به خوبی توانست ژن مورد نظر را که شامل ژن 16S rRNA با اندازه ۱۸۵ bp بود، تکثیر کند (شکل ۱). 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). هم چنین تمامی نمونه هایی 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

گونه های مختلف مایکوپلازما شامل مایکوپلازما گالی-سپتیکوم، آیوا، سینوویه، مله آگریدیس، گالیناروم، گالیناسوم، کلواکال، اینرس، گالوپایونوس و گلیکوفیلوم هستند (۱۹). مایکوپلازما گالی-سپتیکوم مسئول بیماری مزمن جوجه ها و سینوزیت در بوقلمون است. عفونت در گله های طیور به خاطر کاهش تولید تخم مرغ، تبدیل غذایی ضعیف و حذف لاشه منجر به ضرر اقتصادی فراوانی می شود (۲).

تشخیص مایکوپلازما گالی-سپتیکوم با استفاده از تکنیک های مختلفی قابل انجام است. نظیر کالبد گشایی جهت مشاهده جراحات، سرولوژی جهت ارزیابی پاسخ ایمنی نظیر آزمون الایزا و جستجوی مایکوپلازما گالی-سپتیکوم جهت پیدا کردن ارگانسیم یا DNA آن با استفاده از کشت و جداسازی و PCR (۲۶). استفاده از روش PCR برای شناسایی اسید نوکلئیک به عنوان یک روش جایگزین برای روش های جداسازی معمول است (۷۰، ۱۰، ۱۲، ۱۳، ۱۷، ۲۹). هر چند کشت مایکوپلازما یک استاندارد طلایی است اما روش های کشت مایکوپلازما گالی-سپتیکوم سخت و زمان بر است (۸، ۱۹، ۲۲، ۲۵) و نمی تواند ارگانسیم را از موارد مزمن و پرندگان درمان شده که غلظت مایکوپلازما گالی-سپتیکوم در چنین شرایطی پایین استو نیز مواد ضد مایکوپلاسمایی، آنتی سرم و ممانعت کنندگان مختلف وجود دارد، شانس جداسازی را کاهش داده و زمان جداسازی را افزایش می دهد (۱۸). ثابت شده است که PCR نسبت به کشت برای تشخیص مایکوپلازما گالی-سپتیکوم از نمونه های فیلدی مناسب تر است. نمونه های اخذ شده از پرندگان درمان

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

آزمون PCR

مشخصه های کامل پرایمرها (۱) جهت انجام PCR در جدول ۲ آورده شده اند. PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر و با استفاده از ترکیب های 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)
- MgCl₂: 1 µl (Fermentase, Germany)
- Template DNA: 5µl

در این واکنش آب مقطر استریل به جای DNA برای کنترل منفی افزوده گردید. برای کنترل مثبت نیز از آنتی ژن مایکوپلازما گالی-سپتیکوم استفاده گردید. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf, Germany) به ترتیب زیر به انجام رسید (۱):

- واسرشت اولیه در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه
 - سپس ۴۰ سیکل که هر سیکل شامل
 - ۳۰ ثانیه واسرشت، در ۹۴ درجه سانتی-گراد
 - ۳۰ ثانیه اتصال پرایمرها، در ۵۵ درجه سانتی-گراد
 - ۶۰ ثانیه سنتز، در ۷۲ درجه سانتی-گراد
 - ۷۵ دقیقه سنتز نهایی، در ۷۲ درجه سانتی-گراد.
- الکتروفورز محصول های 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 ایلومیناتور (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

شده PCR مثبت بودند، در حالی که، نمونه های مشابه در روی محیط اختصاصی از نظر کشت منفی بودند طوری که با آزمون PCR ۹۷٪ و با کشت ۶۷٪ نمونه ها مثبت شدند (۱۴،۳۰).

در یک مطالعه در چهار محال و بختیاری با استفاده از روش PCR قطعه ای از ژن 16S rRNA جهت شناسایی مایکوپلازما گالی سبتیکوم 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 به ترتیب برابر ۳۰/۵۰، ۳۸/۵۵، ۲۲/۸۸ و ۱۸/۶۰٪ بود (۲). در مطالعه ای دیگر در طیور تخم گذار، گوشتی و مادر در پاکستان با استفاده از روش کشت ۲۷/۳٪ مایکوپلازما گالی سبتیکوم 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 زنجیره ای پلیمرز اسید نوکلئیک جرم مذکور از ۶۸/۱۸٪ سواب نایی، ۴۲/۴۷٪ بافت نایی، ۳۱/۸۵٪ بافت ریوی و ۵۰٪ کیسه های 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 قطعه ای 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 می تواند مسبب وجود MG در طیور صنعتی باشد. بروز بالای مایکوپلازما گالی سبتیکوم در مزارع طیور ممکن است به خاطر انتقال افقی از جوجه های آلوده، تخم مرغ ها، پرندگان وحشی، وسایل نقلیه و ... به گله های جوجه سالم و حساس باشد. مدیریت ضعیف، جریان هوای سرد در طول زمستان، واکسیناسیون، تعداد بالای پرندگان پرورشی و پرورش دادن جوجه های با سنین مختلف در یک مکان، ممکن است به عنوان فاکتور مسبب بالقوه برای شکست ایمنی در برابر عفونت مایکوپلازما گالی سبتیکوم در جوجه ها عمل کند (۲۸). علاوه بر 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 مایکوپلازما گالی سبتیکوم است (۹).

نتایج مطالعه حاضر با سایر مطالعه ها نیز هم خوانی دارد. وجود مایکوپلازما گالی سبتیکوم در ۸۲/۴٪ مرغ های تخم گذار، ۶۴/۸٪ مادر گوشتی و ۱۷/۱٪ مرغ گوشتی در مطالعه ای 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 مایکوپلازما گالی سبتیکوم مثبت شناسایی شده اند (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 مایکوپلازما گالی سبتیکوم به طور عموم بر اساس ریشه - کنی از گله های طیور است. امروزه، توسعه گسترده صنعت طیور در مناطق مختلف دنیا، گاها همراه با گونه های مختلف پرندگان، انواع مختلف طیور تجاری، یا پرندگان وحشی در محیط با تماس نزدیک یکدیگر است. در چنین شرایطی حفظ گله های عاری از عفونت ممکن است پیچیده یا غیرممکن باشد، و پیامد یا وقوع مجدد مایکوپلازما نیاز به ارزیابی مجدد استراتژی هایی است که برای مدیریت عفونت های مایکوپلازمایی در صنعت طیور است. چنین به نظر می رسد که قدم اول در برنامه های کنترل مایکوپلازما گالی سبتیکوم تعیین منشأ باکتری در همه گیری های متعدد است. بروز مایکوپلازما گالی سبتیکوم در جوجه ها در کشورهای بسیاری بدون استراتژی کنترل یا در برخی کشورها در مرحله قبل از اعمال یک استراتژی کنترلی است (۱۵). علاوه بر آن، تحقیقات اخیر در روی همه گیری های مختلف بیماری های تنفسی فوقانی در کبک هندی و دیگر پرندگان شکاری نشان دهنده درگیری اغلب آنها با مایکوپلازما گالی سبتیکوم است (۶،۲۱،۳۲). عفونت طبیعی با مایکوپلازما گالی سبتیکوم در بسیاری از پرندگان دیگر نیز گزارش شده است که در برخی موارد با علائم بالینی مشخص همراه است. اما پاتوژنسیته سویه های مایکوپلازما گالی سبتیکوم به نسبت مربوط به میزبان است. پرندگان شکاری، به ویژه کبک هندی، به نظر به بیماری حادثی نسبت به ماکیان اهلی مبتلا می گردد (۵،۳۱).

نتیجه گیری

با توجه میزان آلودگی بالای طیور بومی به مایکوپلازما گالی سبتیکوم مطالعه های بیش تری برای بررسی احتمال سرایت

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 پایان نامه (نسرین حسینی) بوده و نویسندگان این مقاله مرتب تشکر و قدردانی خود را از معاون پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه ابراز می دارند.

جدول ۱: تعداد و نوع نمونه‌های اخذ شده

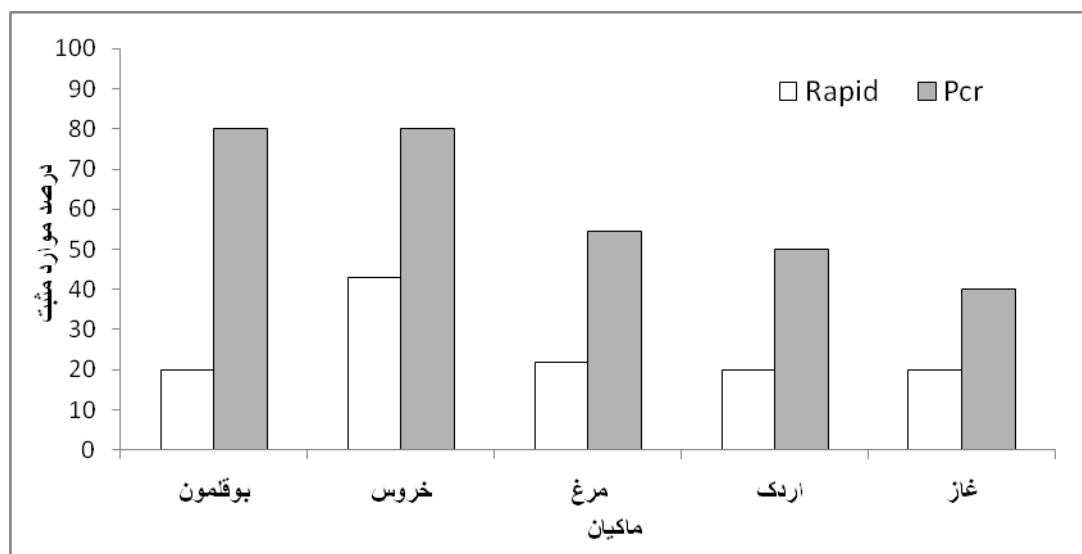
نوع نمونه	نمونه سواب	نمونه
نوع پرنده		نمونه خون
بو قلمون	۲۵	۲۵
خروس	۳۵	۳۵
مرغ	۵۵	۵۵
اردک	۲۰	۲۰
غاز	۱۰	۱۰
جمع کل	۱۴۵	۱۴۵

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

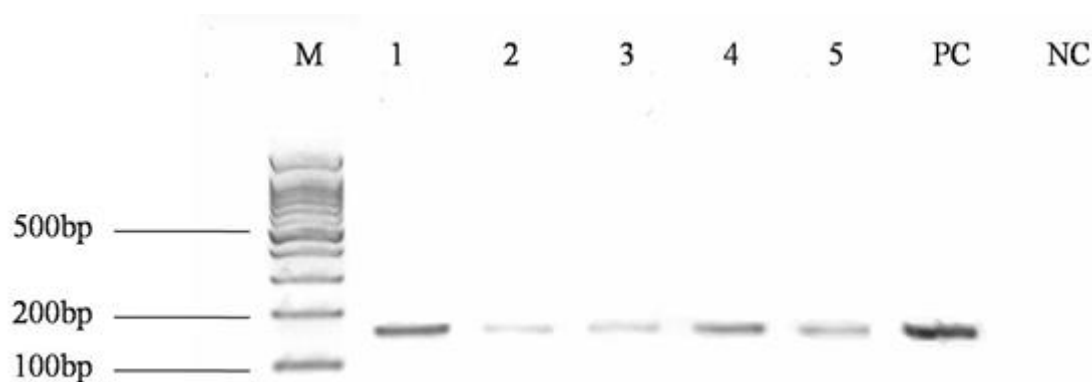
نام پرایمر	ژن هدف	اندازه پرایمر (bp)	توالی پرایمر	اندازه قطعه (bp)
MG-F	16S rRNA	22	5'-GAG-CTA-ATC-TGT-AAA-GTT-GGT-C-3'	185
MG-R		20	5'-GCT-TCC-TTG-CGG-TTA-GCA-AC-3'	

جدول ۳: نتایج آزمون راپید تست

نتیجه آزمون راپید	مثبت در رقت ۱/۸ (%)	منفی (%)
نوع پرنده		
بو قلمون	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٪)



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



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

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 prevalence 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*

- 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.

