

## شناسایی مولکولی مایکوپلازما گالی سپتیکوم در طیور بومی روستایی شهرستان

ارومیه در سال ۱۳۹۵

نسرین حسینی<sup>۱</sup>، مهدی دیلمقانی<sup>۲\*</sup>

۱- دانشگاه آزاد واحد ارومیه، ارومیه، ایران

۲- دپارتمان سلولی و مولکولی، آزمایشگاه ممتاز منطقه‌ای شمالغرب، ارومیه، ایران

### چکیده:

**سابقه و هدف:** مایکوپلازما گالی سپتیکوم اصلی‌ترین پاتوژن مایکوپلازما با اهمیت اقتصادی است که دارای گسترش جهانی است. عفونت با مایکوپلازما گالی سپتیکوم 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 سپتیکوم و بررسی فراوانی آن در طیور بومی شهرستان ارومیه است.

**مواد و روش:** از تعداد ۱۴۵ پرنده نمونه سوپای 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 سوپای 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 سپتیکوم 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 سپتیکوم نیازمند اقدام‌های کنترلی بیش‌تری جهت جلوگیری از سرایت این جرم به مزارع پرورشی است.

**واژه‌های کلیدی:** مایکوپلازما گالی سپتیکوم، 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 ارگانیسیم‌های 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

حاصل گردد از طرف دیگر از آزمایش PCR نتیجه مثبت مایکوپلاسموزیس در همان روز اول عفونت حاصل می شود که در مقایسه با روش های سرولوژی حداقل ۲ تا ۳ هفته زودتر می توان به نتیجه قطعی دست یافت. از آنجا که تشخیص هم-زمان چند سویه مایکوپلاسمای در طیور بسیار حایز اهمیت است لذا در روش های جدید PCR به نام Multiplex PCR گونه-های مختلف مایکوپلاسمای به طور هم زمان شناسایی می گردند (۲۱).

تاکنون بررسی بیماری مذکور بر روی طیور بومی و تشخیص میزان آلودگی به مایکوپلاسموز صورت نگرفته است. از آنجایی-که اغلب این پرندگان در نزدیکی روستاهای مشرف به مزارع پرورشی طیور هستند و نیز به نوعی زمینه ساز بسیاری از سایر بیماری-های پرندگان هستند، لذا ضروری به نظر می رسد تا مطالعه ای در این خصوص صورت گیرد. هدف از تحقیق حاضر تشخیص مایکوپلاسمای گالی سپتیکوم 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، نمونه-های سوآپ نای هر پرنده (درمجموع ۱۴۵ نمونه) در لوله آزمایش استریل محتوی ۱ الی ۲ سی سی PBS استریل اخذ گردید. نمونه ها 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 نمونه های 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 آنتی ژن مایکوپلاسمای گالی سپتیکوم ( Soleil, France) بر روی کارد تست مخلوط گردیدند. سپس به مدت ۲ دقیقه بر روی شیکر قرار گرفت و نتایج آن قرائت شد.

### استخراج DNA

نمونه های سوآپ اخذ شده ابتدا در ورتکس به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس شدند. سپس محتویات لوله ها به میکروتیوب ۱/۵ سی سی انتقال داده شدند و به مدت ۱۵ در دقیقه در ۱۴۰۰g سانتریفیوژ گردیدند. مایع رویی با استفاده از پپیت پاستور دور

بافتی و هم چنین محیط کشت فاقد سلول، رشد دهد (۷). مایکوپلاسمای گالی سپتیکوم، نخستین بار توسط عملیات سروتایپینگ از سایر مایکوپلاسمای پرندگان جدا شد و به-عنوان سروتایپ A در نظر گرفته شد. گونه مایکوپلاسمای گالی سپتیکوم در سال ۱۹۶۰ میلادی، توسط Edward و Kanarek معرفی شد. در سال ۱۹۹۳ میلادی، با استفاده از تکنیک های مولکولی، فوتیپها و شباهت های آنتی ژنیک مایکوپلاسمای گالی سپتیکوم و سایر مایکوپلاسمای شناسایی گردید (۸). دستیابی به تشخیص سریع، دقیق قطعی مایکوپلاسمای با توجه به اهمیت اقتصادی آن برای مسئولین بهداشتی و دامپزشکان فارم های مادر و اجداد اهمیت فراوانی دارد زیرا تشخیص زود هنگام و قطعی می تواند مدیریت بهداشتی فارم را در حفظ سلامت عمومی گله جلوگیری از پیشرفت بیماری و انتخاب سیاست های درمانی مناسب یاری نماید.

در حال حاضر دو روش سرولوژی رایج آگلوتیناسیون و الایزا برای بررسی مایکوپلاسمای در طیور صنعتی مورد استفاده می-شود. از آنجا که تست های سرولوژی به علت پدیده تداخل متقابل با گونه های دیگر مایکوپلاسمای و هم چنین حضور فاکتورهای غیراختصاصی متغیر در سرم، حساسیت و اختصاصیت کافی در تشخیص سویه های مایکوپلاسمای ندارند و گاهی باعث بروز جواب های مثبت کاذب می شوند لذا جداسازی و کشت مایکوپلاسمای علی رغم زمان بر بودن و سخت رشد بودن مایکوپلاسمای در محیط آزمایشگاهی به عنوان روش قطعی تأیید نهایی مایکوپلاسمای طیور مورد استفاده قرار می-گرفت. در چند سال اخیر با ابداع روش مولکولی PCR این تکنیک به عنوان اصلی ترین روش در تشخیص قطعی مایکوپلاسمای مورد استقبال مدیران بهداشتی فارم های 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 به طوری که قطعه خاصی از DNA به طور آنزیماتیک همانندسازی می گردد تا میزانی که بتوان محصول را با روش هایی هم چون الکتروفورزد در ژل آشکار نمود در این روش می توان ژن ویرولان عامل پاتوژن را برای تکثیر انتخاب نمود و در نتیجه با یک آزمایش سویر پاتوژن یا آپاتوژن را نیز می توان تشخیص تفریقی دار برای دستیابی به جواب قطعی وجود عفونت مایکوپلاسمای در طیور فقط حضور چند کپی از ژن مورد نظر کافی است تا به وسیله سوآپ از نای برداشته شود و در اثر تکثیر متوالی نتیجه قطعی

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). 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 مایکوپلازما شامل مایکوپلازما گالی-سپتیکوم، آیوا، سینیویه، مله آگریدیس، گالیناروم، گالیناسوم، کلواکال، اینرس، گالوپاوینوس و گلیکوفیلوم هستند (۱۹). مایکوپلازما گالی-سپتیکوم 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 مایکوپلازما گالی-سپتیکوم با استفاده از تکنیک‌های 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 به‌عنوان یک روش جایگزین برای روش‌های جداسازی معمول است (۷، ۱۰، ۱۲، ۱۳، ۱۷، ۲۹). هر چند کشت مایکوپلازما یک استاندارد طلایی است اما روش‌های کشت مایکوپلازما گالی-سپتیکوم سخت و زمان بر است (۸، ۱۹، ۲۲، ۲۵) و نمی‌تواند ارگانسیم را از موارد مزمن و پرندگان درمان شده که غلظت مایکوپلازما گالی-سپتیکوم در چنین شرایطی پایین استو نیز مواد ضد مایکوپلاسمایی، آنتی‌سرم و ممانعت‌کنندگان 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 مایکوپلازما گالی-سپتیکوم از نمونه‌های فیلدی مناسب‌تر است. نمونه‌های اخذ شده از پرندگان درمان

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 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 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  $\mu$ l (Cinnagen, Iran)
- dNTP1  $\mu$ l (Cinnagen, Iran)
- Each primer: 2  $\mu$ l (Cinnagen, Iran)
- Tag polymerase: 0.2  $\mu$ l (Cinnagen, Iran)
- Distilled Water: 11.3  $\mu$ l (Fermentase, Germany)
- MgCl<sub>2</sub>: 1  $\mu$ l (Fermentase, Germany)
- Template DNA: 5 $\mu$ l

در این واکنش آب مقطر استریل به جای DNA برای کنترل منفی افزوده گردید. برای کنترل مثبت نیز از آنتی‌ژن مایکوپلازما گالی-سپتیکوم استفاده گردید. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf, Germany) به ترتیب 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 سانتی-گراد
    - 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 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

نتایج مطالعه حاضر با سایر مطالعه‌ها نیز هم‌خوانی دارد. وجود مایکوپلازما 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 مایکوپلازما 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 مایکوپلازما گالی‌سپتیکوم به طور عموم بر اساس ریشه-کنی از گله‌های طیور است. امروزه، توسعه گسترده صنعت طیور در مناطق مختلف دنیا، گاه‌ها 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 مایکوپلازما نیاز به ارزیابی مجدد استراتژی‌هایی است که برای مدیریت عفونت‌های مایکوپلازمایی در صنعت طیور است. چنین به نظر می‌رسد که قدم اول در برنامه‌های کنترل مایکوپلازما گالی‌سپتیکوم تعیین منشأ باکتری در همه‌گیری‌های متعدد است. بروز مایکوپلازما گالی‌سپتیکوم در جوجه‌ها 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 همه‌گیری‌های مختلف بیماری‌های تنفسی فوقانی در کبک هندی و دیگر پرندگان شکاری نشان‌دهنده درگیری اغلب آنها با مایکوپلازما گالی‌سپتیکوم است (۶،۲۱،۳۲). عفونت طبیعی با مایکوپلازما گالی‌سپتیکوم در بسیاری از پرندگان دیگر نیز گزارش شده‌است که در برخی موارد با علائم بالینی مشخص همراه است. اما پاتوژنیسیته سویه‌های مایکوپلازما گالی‌سپتیکوم به نسبت مربوط به میزبان است. پرندگان شکاری، به‌ویژه کبک هندی، به نظر به بیماری حادثی نسبت به ماکیان اهلی مبتلا می‌گردد (۵،۳۱).

## نتیجه گیری

با توجه میزان آلودگی بالای طیور بومی به مایکوپلازما گالی‌سپتیکوم مطالعه‌های بیشتر برای بررسی احتمال سرایت

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 مایکوپلازما 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 به ترتیب 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٪ مایکوپلازما گالی‌سپتیکوم جداسازی گردید که ۳۹/۳٪ مربوط به سواب نایی، ۱۵/۹٪ بافت نایی، ۲۷/۴٪ بافت ریه و ۲۵٪ کیسه‌های هوایی می‌شد. با واکنش زنجیره‌ای پلیمرز 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 مایکوپلازما 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 مایکوپلازما گالی‌سپتیکوم در جوجه‌ها 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 گالی‌سپتیکوم است (۹).

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.

جدول ۱: تعداد و نوع نمونه‌های اخذ شده

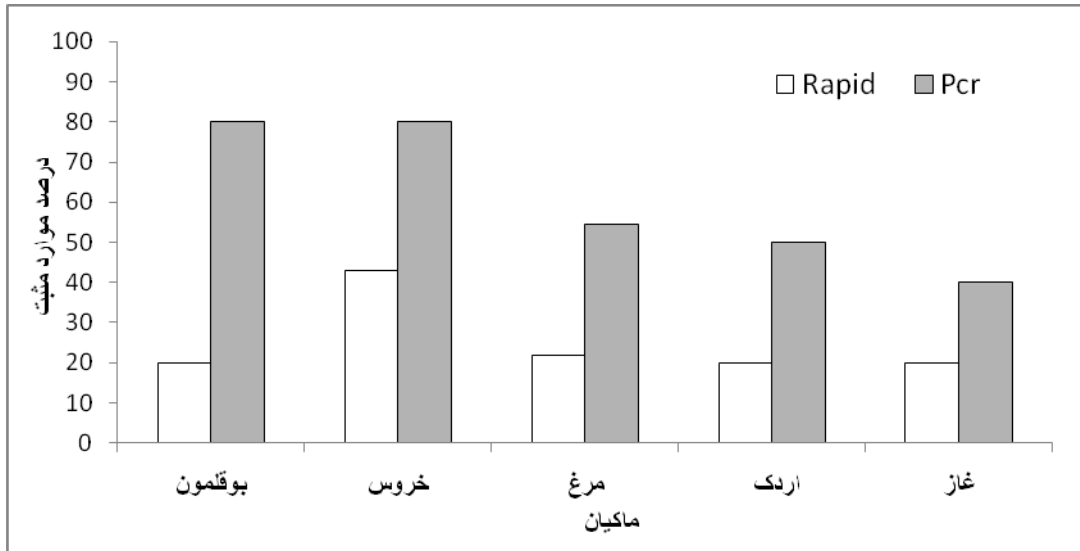
| نوع نمونه | نمونه سواب | نمونه     |
|-----------|------------|-----------|
| نوع پرنده |            | نوع پرنده |
| بوقلمون   | ۲۵         | ۲۵        |
| خروس      | ۳۵         | ۳۵        |
| مرغ       | ۵۵         | ۵۵        |
| اردک      | ۲۰         | ۲۰        |
| غاز       | ۱۰         | ۱۰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

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

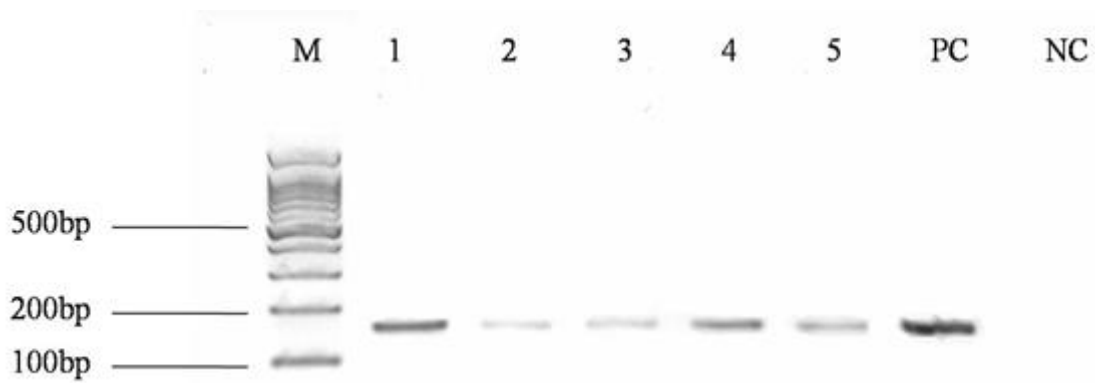
| نام پرایمر | ژن هدف   | اندازه پرایمر (bp) | توالی پرایمر                        | اندازه قطعه (bp) |
|------------|----------|--------------------|-------------------------------------|------------------|
| MG-F       | 16S rRNA | 22                 | 5'-GAG-CTA-ATC-TGT-AAA-GTT-GGT-C-3' | 185    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

جدول ۳: نتایج آزمون راپید تست

| نوع پرنده | نتیجه آزمون راپید | مثبت در رقت ۱/۸ (%) | منفی (%) |
|-----------|-------------------|---------------------|----------|
| بوقلمون   | ۵ (۲۰٪)           | ۲۰ (۸۰٪)            |          |
| خروس      | ۱۵ (۴۲/۸٪)        | ۲۰ (۵۷/۳٪)          |          |
| مرغ       | ۱۲ (۲۱/۸٪)        | ۴۳ (۷۸/۳٪)          |          |
| اردک      | ۴ (۲۰٪)           | ۱۶ (۸۰٪)            |          |
| غاز       | ۲ (۲۰٪)           | ۸ (۸۰٪)             |          |
| جمع کل    | ۳۶ (۲۴/۸٪)        | ۱۰۹ (۷۵/۳٪)         |          |



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



شکل ۱: نتایج PCR. چاهک M: مارکر 1Kbp (Fermentas, Germany)؛ چاهک‌های ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ نمونه‌های 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](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*. 11<sup>th</sup> 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, Tremel 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.

