تشخيص گونه *مايكوپلاسما گالي‌سپتيكوم* به‌وسيله ۱۶S rRNA PCR با پرايمرهاي اختصاصي در نمونه‌هاي باليني

سيد علي پوربخش[1*]، افشين ذاكري[2]، نريمان شيخي[3]، سعيد چرخكار[3]، عباس اشتري[4]

۱. گروه ميكروبيولوژي، دانشكده علوم تخصصي دامپزشكي دانشگاه آزاد اسلامي واحد علوم وتحقيقات تهران، ايران، ايران
۲. دانشجوي دوره دكتراي تخصصي بيماريهاي طيور، دانشكده علوم تخصصي دامپزشكي دانشگاه آزاد اسلامي واحد علوم وتحقيقات تهران، ايران، ايران
۳. گروه علوم درمانگاهي، دانشكده علوم تخصصي دامپزشكي دانشگاه آزاد اسلامي واحد علوم وتحقيقات تهران، تهران، ايران
۴. آزمايشگاه رفرانس مايكوپلاسما، مؤسسه تحقيقات واكسن و سرم سازي رازي كرج، كرج، ايران
*نويسنده مسئول مكاتبات: a.pourbakhsh@rvsri.ir
(دريافت مقاله: ۸۸/۳/۱۶، پذيرش نهايي: ۸۸/۱۰/۱۴)

چكيده
مايكوپلاسما گالي‌سپتيكوم به عنوان يكي از اصلي‌ترين پاتوژن‌هاي پرندگان، خسارات اقتصادي فراواني را به صنعت مرغداري وارد مي‌كند. هدف اصلي اين مطالعه شناسايي گونه *مايكوپلاسما گالي‌سپتيكوم* در نمونه‌هاي باليني با استفاده از روش 16S rRNA PCR مي‌باشد. براي بررسي تيتر سرمي، ۱۸ فارم تخم‌گذار تجارتي و ۸ فارم مادر گوشتي انتخاب و تست RSAT (Rapid Serum Agglutination Test) انجام گرديد. جهت نمونه‌برداري براي PCR (Polymerase Chain Reaction)، از ۱۷ فارمي كه در تست RSAT مثبت شده بودند، ۱۰ فارم انتخاب و ۱۰۹ سوآپ استريل از شكاف كامي، ناي، كيسه هوايي و ريه از هر فارم تهيه گرديد. سه سوآپ از سه پرنده داخل يك لوله آزمايش حاوي يك ميلي‌ليتر PBS انداخته شد و به آزمايشگاه منتقل گرديد تا براي انجام PCR مورد استفاده قرار گيرد. در اين مطالعه، پرايمرهاي اختصاصي براي ژن 16S rRNA استفاده شد. پرايمرهاي مورد استفاده براي ژن 16S rRNA كاملاً اختصاصي *مايكوپلاسما گالي‌سپتيكوم* مي‌باشد و با تمام مايكوپلاسماها و ديگر باكتري‌هاي موجود در ناي طيور قابل تفريق است. از ۲۶ فارم مورد آزمايش، ۱۷ فارم در تست سرمي RSAT مثبت شدند. محصول PCR توليدي توسط پرايمرهاي اختصاصي، در ۱۰ فارم، ۴۶ نمونه معادل ۴۲/۲ درصد در PCR ، باند ۵۳۰ جفت بازي را براي همه سويه‌هاي فيلدي بر روي ژل الكتروفورز تشكيل داد. 16S rRNA PCR با حساسيت بالا مي‌تواند در تشخيص قطعي عفونت با *مايكوپلاسما گالي-سپتيكوم* در آزمايشگاه به كار برده شود.
مجله دامپزشكي دانشگاه آزاد اسلامي واحد تبريز، ۱۳۸۸، دوره ۳، شماره ۲، ۵۰۱-۴۹۳.
كلمات كليدي: *مايكوپلاسما گالي‌سپتيكوم*، نمونه‌هاي باليني، PCR

مقدمه
با توجه به اهميت بيماري *مايكوپلاسما گالي‌سپتيكوم* از جنبه اقتصادي و با توجه به ايجاد بيماري مزمن تنفسي (CRD) و با در نظر گرفتن تحميل هزينه‌هاي درماني زياد و عدم پاسخ‌دهي مناسب و عدم بروز حداكثر عملكرد پرندگان آلوده به اين باكتري، استفاده از روش‌هاي تشخيصي مطمئن و سريع كه بتواند در شرايط خاص در حداقل زمان ممكن و با درصد احتمال بسيار بالا اين عامل را تشخيص دهد، بسيار ضروري به نظر مي‌رسد. تشخيص به موقع مايكوپلاسما هم از جهت پرورش‌دهندگان مرغ مادر، هم پرورش‌دهندگان جوجه‌هاي تجارتي و هم از نظر سازمان دامپزشكي حائز اهميت مي-

باشد (۱۵). مايكوپلاسماها پروكاريوتهاي بسيار كوچكي هستند كه فاقد ديواره سلولي بوده و به اين دليل در مقابل آنتيبيوتيك-هايي كه روي سنتز ديواره سلولي اثر ميكنند، مقاوم ميباشند. شكل كلونيها مثل تخممرغ پخته (fried egg) يا دكمهاي شكل ميباشد. همچنين نسبت به احتياجات پيچيدة غذايي در صورت كمبودشان مقاوم هستند. بعضي از مايكوپلاسماها فقط يك نوع حيوان را آلوده ميكنند (host specific) ولي بعضيها قادرند در چندين حيوان مختلف ايجاد بيماري نمايند. مايكوپلاسماها در گياهان، جانوران، انسان و حشرات ايجاد بيماري ميكنند. بهطور عمومي، مايكوپلاسماها در سطح مخاطي كلونيزه ميشوند و اكثراً غيرمهاجم هستند ولي بعضي گونهها مثل *مايكوپلاسما گالي‌سپتيكوم* قادر به سوراخ كردن سلولها هستند. مايكوپلاسماها بهطور اوليه به غشاي مخاطي دستگاه تنفس و يا ادراري تناسلي، چشم و مفاصل تمايل دارند. بسياري از آنها بهعنوان انگلهاي سطحي شناخته ميشوند و بهندرت بافتها را مورد تهاجم قرار ميدهند. البته انتشار آنها به اندامهاي مختلف، بيانگر حداقل يك عفونت عمومي زودگذر است.

بهطور كلي، گونههاي مايكوپلاسما و احتمالاً سويههاي خاصي تمايل بيشتري به بعضي از بافتها يا اندامها دارند هر چند اين تمايل الزاماً به معني حذف كامل از ساير اندامها نيست (۱۷).

با استناد به آناليز توالي ژن ۱۶S rRNA تصور ميشود كه مايكوپلاسماها حدود ۶۰۰ ميليون سال قبل با از دست دادن قسمتهاي غيرضروري از ژنوم خود از جمله ژن-هاي سنتنز ديواره سلولي از باكتريهاي گرم مثبت و مشخصاً *كلستريديومها* مشتق شدهاند.

تاكنون ۲۳ گونه مختلف مايكوپلاسما از پرندگان جدا شده كه ماكيان و بوقلمون ميزبان ۱۶ گونه از آنها ميباشند. در اين ميان تنها چهار گونه براي طيور بيماريزا هستند كه شامل *مايكوپلاسما گالي‌سپتيكوم*، *مايكوپلاسما سينوويه*، *مايكوپلاسما مله آگريديس* و *مايكوپلاسما آيوا* ميباشد. به دليل اهميت نقش بيماريزايي مايكوپلاسماهاي طيور، از سالها قبل برنامه ريشهكني از گلههاي مولد به اجرا درآمده است. با اين وجود مايكوپلاسماها در گلههاي طيور حضور داشته و عفونت مايكوپلاسمايي همچنان يك معضل بزرگ صنعت طيور محسوب شده و در صورت آلوده شدن گلههاي مولد با ارزش، ممكن است كشتار شده و يا اينكه نتاج آنها ارزش صادرات و فروش خود را از دست بدهند. مايكوپلاسماها از كلاس Mollicutes، شاخه I يعني Mycoplasmatales و جنس I يعني mycoplasma هستند و بيش از ۱۰۰ گونه دارند. داراي DNA بوده و براي رشد به كلسترول نياز دارد. درجه حرارت اپتيمم براي رشد ۳۷ درجهسانتيگراد است. با آناليز ژن ريبوزوم ۱۶srRNA ميتوان ارتباط ژنتيكي بين مايكوپلاسماها را بررسي كرد.

روش كشت مايكوپلاسما پرزحمت، كند، گران و نيازمند شرايط استريل است. واكنش زنجيرهاي پليمراز روش جايگزين سريع و اختصاصي براي كشت ميباشد. در دهه ۱۹۹۰ روشهاي مولكولي براي شناسائي مايكوپلاسماي پرندگان توصيف شد. اساس تمام آنها مبتني بر تكثير يا شناسائي يك قطعه خاص از ژنوم ميباشد. در اين بين ژن ۱۶S rRNA به دليل ثبات قابل توجه در گونهها و حتي در ميان جنس مورد توجه بيشتر قرار گرفته و با تكثير، تعيين توالي و يا استفاده

از پروب، امكان شناسائي ارگانيسم فراهم مي‌شود (۱۰، ۱۵ و ۱۶).

مواد و روشكار

- نمونه برداري و انجام RSAT

۳۷۲ نمونه سرمي از ۲۶ فارم شامل ۸ فارم مادر گوشتي و ۱۸ فارم تخم‌گذار تجارتي اخذ گرديد و جهت انجام تست RSAT به آزمايشگاه سرولوژي انتقال يافت. براي انجام RSAT مراحل زير انجام شد:

يك حجم از سرم (تقريباً معادل 30µl) را روي يك كاشي سفيد ريخته و يك حجم از آنتي‌ژن رنگي *مايكوپلاسما گالي‌سپتيكوم* به آن اضافه گرديد. به منظور مخلوط نمودن آنتي ژن و سرم، كاشي به‌شكل دوراني تكان داده شد. در صورت وجود آنتي‌بادي عليه *مايكوپلاسما گالي‌سپتيكوم* پديدة آگلوتيناسيون اتفاق مي‌افتاد كه با گرد هم آمدن ذرات معلق در مايع مشخص گرديد (سرم مرغ حداكثر در مدت ۲ دقيقه و سرم بوقلمون در مدت ۳ دقيقه با آنتي ژن آگلوتينه مي‌شود). در خصوص تأييد تشخيص *مايكوپلاسما گالي-سپتيكوم* كليه سرم‌هاي مثبت مرحله قبل به مدت ۳۰ دقيقه در بن ماري ۵۶ درجه سانتي-گراد قرار داده شد و آزمايش تكرار گرديد (جهت غير فعال سازي واكنشگرهاي غير اختصاصي). سرم‌هاي مثبت مرحله قبل را با PBS رقيق نموده و آزمايش تكرار شد در صورتي‌كه سرم‌ها در رقت يك هشتم با آنتي ژن *مايكوپلاسما گالي‌سپتيكوم* آگلوتينه شوند از نظر تست سريع مثبت و در صورت عدم آگلوتيناسيون منفي قلمداد مي‌شدند. جهت تسريع و سهولت كار مي‌توان مراحل ٤ و ٥ را ادغام نمود. يعني ابتدا رقت $\frac{1}{8}$ تهيه نمود و سپس به‌مدت ۳۰ دقيقه در بن ماري ۵۶ درجه سانتي‌گراد قرار داد و بعد آزماش را تكرار نمود. نتيجه اين آزمايش به صورت مثبت (+) يا منفي (-) گزارش شد (۵).

آماده‌سازي محيط كشت و بررسي عملكرد محيط‌هاي كشت:

محيط‌هاي متعددي جهت كشت مايكوپلاسما وجود دارد. يكي از محيط‌هايي كه تقريباً تمامي نيازهاي مايكوپلاسماي طيور در آن به‌كاررفته و به‌طور گسترده‌اي در ايالات متحده استفاده مي‌شود محيط كشت Frey است. محيط ديگري كه براي كشت مايكوپلاسما به‌كار مي‌رود محيط كشت PPLO مي‌باشد. علاوه‌بر محيط كشت پايه، جهت غني‌سازي محيط بايد مواد ديگري نيز به آن اضافه شود. هر دو محيط در اين مطالعه استفاده شده است (۱). يكي از مهم-ترين جنبه‌هاي كشت مايكوپلاسماها به‌ويژه مايكوپلاسماهاي پرندگان بررسي محيط كشت جهت اطمينان از توانايي آن در حمايت از رشد مايكوپلاسما مي‌باشد و ممكن است مايكوپلاسما به دليل عدم كارآيي محيط توانايي رشد در آن محيط را نداشته باشد. لذا حتي پس از تغيير در يكي از اجزاء حتماً بايد محيط كشت مورد آزمايش قرار گيرد. مهم‌ترين اجزائي كه ممكن است در نارسائي محيط كشت دخيل باشند شامل عصاره مخمر، سرم و آگار مي‌باشند. كه در اين ميان عصاره مخمر به‌ويژه عصاره‌هاي تجارتي مورد توجه ويژه بايد قرار گيرند. لذا توصيه بر استفاده از عصاره مخمر تازه تهيه شده در آزمايشگاه مي‌باشد. پس از تهيه محيط‌هاي كشت فوق توانايي آنها در حمايت از رشد مايكوپلاسما با استفاده از سويه كم پاساژ *مايكوپلاسما گالي‌سپتيكوم* مورد تأييد قرار گرفت. همچنين از تمام اجزاء محيط كشت و محيط كشت نهايي جهت اطمينان از عاري بودن از آلودگي ميكروبي كشت ميكروبي به‌عمل آمد (۱).

نمونه‌برداري جهت كشت:
نمونه‌ها از گله‌هاي مادر گوشتي و تخم‌گذار تجارتي اخذ گرديد. در اين مطالعه جهت كشت و جداسازي از گله‌هائي نمونه‌برداري صورت گرفت كه قبلاً در RSAT نتايج مثبت به‌دست آمده بود. در اين مطالعه ۵۱۰ نمونه از ۱۷ فارم مادر گوشتي و تخم گذار تجارتي اخذ گرديد.

نمونه‌برداري از پرندگان زنده:
نمونه در پرنده زنده از شكاف كامي (Chonal cleft) اخذ گرديد. با استفاده از سوآب كتاني استريل از ناي يا شكاف كامي نمونه تهيه شد و پس از تلقيح در لوله آزمايش حاوي محيط كشت مايكوپلاسما سوآب دور انداخته شد و سپس درب لوله آزمايش محكم بسته شد. نمونه‌ها به‌صورت انفرادي و با دقت به منظور جلوگيري از آلوده شدن جمع‌آوري شد. هر نمونه پس از اخذ، سريعاً در داخل فلاسك حاوي بسته‌هاي يخ قرار گرفت. نمونه‌ها در داخل فلاسك سريعاً به آزمايشگاه منتقل گرديد و در انكوباتور ۳۷ درجه قرار گرفت (۱).

نمونه‌برداري از پرندگان تلف شده:
نمونه‌ها از پرندگان كالبدگشايي شده از ناي، يا كيسه هوايي و ريه با كمك سوآب كتاني اخذ شد. بقيه مراحل همانند نمونه‌برداري از پرندگان زنده بود.

كشت و جداسازي:
پس از قراردادن نمونه‌ها در انكوباتور، محيط‌هاي كشت، روزانه مورد بررسي قرار مي‌گرفت. تغيير رنگ در ۲۴ ساعت اول ناشي از آلودگي باكتريايي يا رشد مايكوپلاسماهاي ساپروفيت قلمداد شده و اين نمونه‌ها از انكوباتور حذف مي‌گرديدند. در روزهاي بعد هر تغيير رنگي از قرمز به زرد و كدر شدن محيط سريعاً پاساژ داده شده و به‌طور همزمان به محيط كشت مايع و جامد انتقال داده مي‌شد. نمونه‌هايي كه تا ده روز هيچ تغيير رنگي نداشتند نيز در روز دهم پاساژ داده و به محيط مايع و جامد منتقل مي‌شدند. به‌هرحال نمونه‌هاي اصلي تا يك ماه در انكوباتور حفظ شده و درصورتي كه شواهدي از رشد در آنها با ساب كالچر آنها مشاهده نمي‌شد به‌عنوان نمونه منفي حذف مي‌گرديدند. محيط‌هاي كشت جامد در انكوباتور حاوي ۵% CO_2 با اتمسفر بسيار مرطوب قرار گرفته و هر روز جهت شناسايي پرگنه مايكوپلاسمايي توسط ميكروسكوپ مورد بررسي قرار مي‌گرفت (۱).

نمونه‌برداري جهت PCR:
هدف اصلي اين مطالعه شناسايي گونه *مايكوپلاسما گالي‌سپتيكوم* با استفاده از روش ۱۶S rRNA PCR مي‌باشد.
جهت نمونه‌برداري براي PCR، از ۱۷ فارمي كه در تست RSAT مثبت شده بودند، ۱۰ فارم انتخاب و ۱۰۹ سوآپ استريل از شكاف كامي، ناي، كيسه هوايي و ريه از هر فارم تهيه گرديد. سه سوآپ از سه پرنده داخل يك لوله آزمايش حاوي يك ميلي‌ليتر PBS انداخته و به آزمايشگاه منتقل شد تا براي انجام PCR مورد استفاده قرار گيرد (۱).

مراحل استخراج DNA به روش فنل كلروفورم:
ابتدا مقدار ۵۰۰ ميكروليتر از نمونه مورد نظر بعد از قرار دادن در شيكر به درون ميكروتيوپ ۱/۵ ميلي‌ليتري انتقال داده شد و جهت رسوب‌گيري به مدت ۱۵ دقيقه در۱۳۰۰۰ دور سانتريفوژ گرديد (نمونه‌ها حاوي ذرات بزرگ بودند كه ابتدا به مدت ۵ دقيقه در ۳۰۰۰

دور سانتريفوژ شدند و محلول رويي به تيوپ جديد منتقل گرديد و تيوپ حاوي مواد ته‌نشين شده دور انداخته شد. سپس مراحل بعدي روي محلول رويي انجام گرديد). پس از سانتريفوژ، بافر ليزكننده اضافه گرديد. سپس به خوبي مخلوط گرديده و در شيكر، تكان داده شد و در بن‌ماري ٥٦ درجه سانتي‌گراد به مدت ٤-٣/٥ ساعت قرار داده شد. تركيبات تشكيل دهنده بافر ليزكننده در زير آمده است. به ازاء هر۲۰۰ ميلي‌ليتر از محلول بالا، ۲۰ ميلي‌ليتر پروتئيناز K اضافه گرديد.

Lysis Buffer	
Tris-Hcl	٥٠ Mm (pH=٨)
SDS	١٪
NaCl	١٠٠ Mm
EDTA	٥٠ Mm
Proteinase K	١ml (٢mg/µl)

در اين مرحله تريس با pH برابر ۸ نقش بافر، EDTA به عنوان مهاركننده آنزيم‌هاي DNAase، SDS به‌عنوان حل‌كننده چربي‌هاي موجود در غشاء سلول و نمونه و پروتئيناز K به عنوان هضم كننده پروتئين‌ها و اتصالات بين سلولي عمل مي‌كند. در اين مرحله نمونه‌ها حاوي DNA آزاد شده از مولكول پروتئين و چربي مي‌باشند. اما هنوز مخلوطي از مواد اضافه موجود است كه به آن شيره خام (crude lysate) مي‌گويند.
بعد از ٤ ساعت نمونه‌ها خارج شدند و هم‌حجم آن (١٠٠ ميكروليتر نمونه + ١٠٠ ميكروليتر بافر ليز كننده جمعاً ٢٠٠ ميكروليتر) فنل اشباع شده به نمونه‌ها اضافه گرديد تا DNA از شيره خام با استفاده از حلال‌هاي غير قطبي استخراج گردد. نمونه‌ها خوب تكان داد شد و به مدت ١٥ دقيقه در ١٣٠٠٠ دور سانتريفوژ گرديد (سانتريفوژ از نوع روميزي معمولي بدون يخچال با دماي نزديك به دماي اتاق بود). نمونه‌ها دو فاز تشكيل دادند كه به آرامي با سمپلر فاز رويي كشيده شد و به تيوپ جديد انتقال يافت و فاز زير آن به همراه تيوپ دور انداخته شد. هم حجم با فاز رويي كه توسط سمپلر كشيده شده بود (در حد ١٥٠ ميكروليتر)، به تيوپ، مخلوط فنل- كلروفورم (كه از قبل به نسبت مساوي با هم مخلوط شده‌اند) اضافه شد. تيوپ‌ها به خوبي تكان داده شد و به مدت ١٥ دقيقه در ١٣٠٠٠ دور سانتريفوژ گرديد.
نمونه‌ها دو فاز تشكيل دادند كه به آرامي با سمپلر فاز رويي كشيده شد و به تيوپ جديد انتقال يافت و فاز زير آن به همراه تيوپ دور انداخته شد. هم حجم با فاز رويي كه توسط سمپلر كشيده شده بود (در حد ١٥٠ ميكروليتر)، به تيوپ، كلروفورم اضافه شد. تيوپ‌ها به خوبي تكان داده شد و به مدت ١٥ دقيقه در ١٣٠٠٠ دور سانتريفوژ گرديد (سانتريفوژ از نوع روميزي معمولي بدون يخچال با دماي نزديك به دماي اتاق بود). محلول رويي با سمپلر كشيده شد و به تيوپ‌هاي جديد انتقال يافت. يك دهم حجم آن استات سديم ٣ مولار جهت تغليظ و ته‌نشين كردن DNA اضافه شد (محلول استات سديم باعث يونيزه شدن DNA گشته و حل شدن آن را كاهش مي‌دهد) و به آرامي مخلوط گرديد و دو برابر حجم نمونه، الكل مطلق ١٠٠- ٩٦ درجه سرد اضافه شد. به مدت ٢٠- ١٥دقيقه نمونه‌ها در فريزر ٢٠ درجه سانتي‌گراد زير صفر قرار داده شد. نمونه‌ها از فريزر خارج گرديد و به مدت ١٥ دقيقه در ١٣٠٠٠ دور سانتريفوژ شد

(سانتريفوژ از نوع روميزي معمولي بدون يخچال با دماي نزديك به دماي اتاق بود). مايع رويي تيوپ تخليه شد و بعد از تكان دادن، جهت خشك شدن الكل موجود در تيوپ، زير هود قرار داده شد (بايد دقت گردد تا نمونه موجود در تيوپ بيش از حد خشك نگردد چون باعث شكسته شدن DNA مي‌گردد كه براي انجام مطالعه مطلوب نمي‌باشد). ۵۰ ميكروليتر آب مقطر استريل به نمونه (DNA) اضافه شد و به يخچال انتقال يافت (درصورتي‌كه فاصله زماني آزمايش طولاني باشد نمونه‌ها بايد در فريزر ۲۰- درجه سانتي-گراد قرار داده شوند) (۲، ۵، ۶، ۹، ۱۳ و ۱۷).

PCR و تشخيص گونه مايكوپلاسما *گالي‌سپتيكوم*:

به منظور تأييد نمونه‌ها از روش واكنش زنجيره‌اي پلي‌مراز استفاده شد. پرايمرهاي استفاده شده اختصاصي ژن ۱۶S rRNA در *مايكوپلاسما گالي‌سپتيكوم* بودند و اين پرايمرها جهت شناسائي MG در كشت خالص و يا نمونه باليني استفاده شده‌اند (۳، ۹، ۱۰ و ۱۱). پرايمرها عبارت بودند از:

نام پرايمر	توالي نوكلئوتيدي
MG-۱۰F	۵'-AACACCAGAGGCGAAGGCGAGG-۳'
MG-۱۱R	۵'-ACGGATTTGCAACTGTTTGTATTGG-۳'

واكنش PCR در حجم ۲۵ ميكروليتر انجام شد و در تمامي موارد كنترل‌هاي مثبت و منفي همزمان استفاده شد و اجزاء آن عبارت بودند از:

Water	۱۷,۳۶µl
PCR Buffer (۱۰X)	۲,۵۰ µl
dNTP (۱۰mM)	۰,۷۵ µl
F primer (۲۰ pmole/ µl)	۰,۱۵ µl
R primer (۲۰ pmole/ µl)	۰,۱۵ µl
Taq DNA polymerase (۵U/ µl)	۰.۱۰ µl
MgC۱۲ (۵۰mM)	۲,۰۰ µl
Template DNA	۱.۹۴ µl

تمامي واكنش‌ها در ترموسايكر Gradient Mastercycler (Eppendroff، آلمان) انجام گرفت و برنامه آن به‌صورت زير بود:

جداشدن اوليه DNA	**۹۴C**	**۵min**
۳۰ سيكل شامل جداشدن، جفت‌شدن و طويل شدنDNA	۹۴C ۵۸C ۷۲C	۳۰sec ۶۰sec ۳۰sec
طويل شدن انتهائي	۷۲C	۱۰min

الكتروفورز:

قالب ژل آگاروز

صفحات شيشه‌اي، شانه و تيغه‌هاي كناري با استفاده از يك ماده شوينده كاملاً تميز شد (ضخامت شانه و تيغه كناري بايد يكسان باشد) و با استفاده از آب مقطر ديونيزه آبكشي گرديد. صفحات شيشه‌اي با استفاده از اتانول ۹۵ درجه كاملاً آبگيري و در مجاورت هوا خشك شد. قالب ژل از طريق قرار دادن تيغه‌هاي كناري در سطح داخلي صفحه پشتي و سپس قرار دادن صفحة رويي بر روي تيغه‌ها بسته شد. به‌طوريكه تيغه‌ها كمي خارج‌تر از لبه پليت‌هاي شيشه‌اي قرار داده شد به-طوري‌كه پس از قرار دادن صفحة شيشه‌اي رويي تيغه‌ها به آرامي فشار داده شد تا در جاي خود بين دو صفحه قرار گيرند. اطراف و زير قالب با استفاده از يك نوار چسب با كيفيت خوب آببندي شد. نشت نكردن نوار چسب‌ها پس از افزودن ژل آگاروز بسيار اهميت دارد (۱).

آماده كردن مخلوط ژل آگاروز:

جهت شناسائي و رويت محصول PCR از الكتروفورز (Apelex، فرانسه) نمونه‌ها در روي ژل آگاروز ۱% و بافر ۱% TAE استفاده شد. براي تهيه ۱% TAE از ۲۵% TAE (Tris base , Acetic acid and ETDA) استفاده شد به‌طوريكه ۲۰ ميلي‌ليتر از اين محلول با ٤۸۰ ميلي‌ليتر آب مقطر مخلوط گرديد. براي آماده كردن ژل ابتدا ۰/۳۵ گرم از ژل آگاروز (Agarose MP، Roche) در ۳۵ ميلي‌ليتر از بافر ۱% TAE در يك ارلن ريخته شد و با استفاده از حمام آبجوش حرارت داده شد. حرارت دادن تا حل شدن كامل آگاروز ادامه يافت. پس از سردشدن دماي آن به حدود ۵۰ درجه ، ۱,۷ لاندا اتيديوم بروماید (ETBr) به آن اضافه شد (اين نسبت‌ها براي يك كست حاوي ژل ۱۵ گودي كافي مي‌باشد). سپس محلول با دقت و به آرامي و بدون ايجاد حباب هوا در قالب ژل ريخته شد. براي اين منظور از حذف‌كننده حباب‌هاي هوا (Air bubble remover) استفاده گرديد. از ترازسنج جهت يكنواخت پخش شدن ژل در تمام سطوح تانك الكتروفورز استفاده گرديد. سپس در ژل و در محل خود قرار داده شد و تا جامدشدن كامل، ژل در دماي اتاق قرار گرفت. پس از آن شانه خارج و ژل در دستگاه الكتروفورز قرار گرفت و محلول ۱% TAE تا پوشاندن كامل سطح ژل در تانك ريخته شد. µl ۱۰ از محصول PCR با دو ميكروليتر از بافر بارگذاري (Loading buffer) مخلوط (محلول ۱x) و در گوده‌هاي ژل قرار داده شد. پس از اتمام بارگذاري نمونه‌ها، الكترودها به منبع تغذيه متصل شده، ژل در جريان ثابت ۱۰۰ ولت به مدت ٤۵ دقيقه قرار گرفت. ژل روي دستگاه UV (BioRAD, Bio-Rad Lab.- California, USA) قرار گرفته و از آن عكس تهيه شد (۱۳).

نتايج

نتايج حاصل از تست RSAT:

از ۳۷۲ نمونه سرمي اخذ شده از ۲٦ فارم، ۱۷ فارم در تست RSAT مثبت شدند. اين ۱۷ فارم شامل ۳ فارم مادر گوشتي و ۱٤ فارم تخم گذار تجارتي بود. به‌طوركلي از ۳۷۲ نمونه اخذ شده، ۱۳۷ نمونه در تست RSAT مثبت، ۲۰۲ نمونه منفي و از ۳۳ نمونه سرمي مشكوك، ۱۰ نمونه در رقت يك هشتم مثبت اعلام گرديدند.

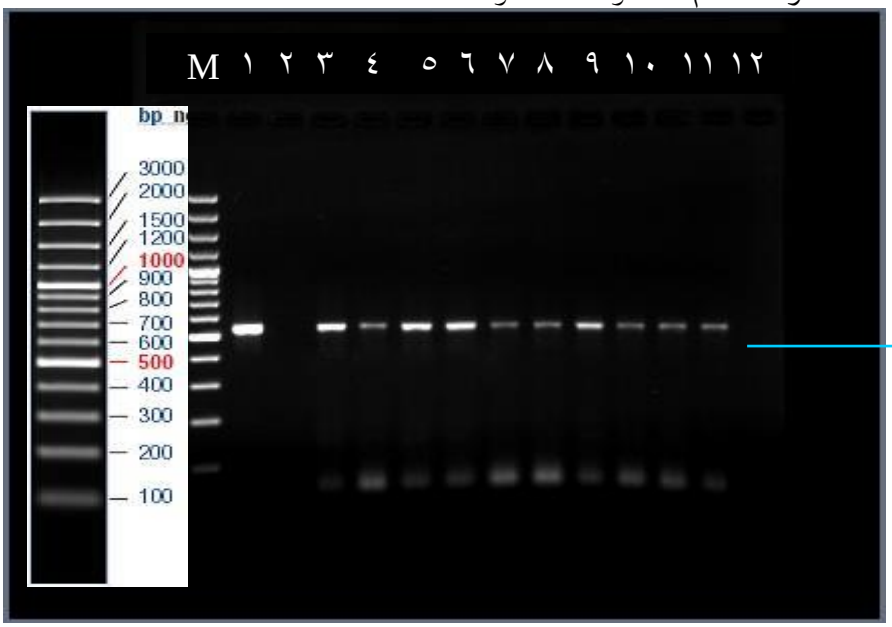
نتايج حاصل از كشت:

از ۵۱۰ نمونه جمع آوري شده از ۱۷ فارم با تعداد ۳۰ نمونه از هر فارم، ۲۵٤ نمونه مثبت معادل ٤۹/۸% *مايكوپلاسما گالي‌سپتيكوم* جداسازي گرديد. از ۱۷ فارم، ۳ فارم باكتري *مايكوپلاسما گالي‌سپتيكوم* جداسازي نگرديد. معمولاً اولين نشانه‌هاي رشد و تغيير رنگ در محيط مايع حدود روز پنجم مشاهده مي‌شد. اگر چه در برخي موارد شواهد رشد در نمونه‌ها تا روز بيست و دوم نيز رويت نشد. در مجموع محدوده زماني كه نمونه‌های اصلي شواهد تغيير رنگ و رشد را نشان مي‌دادند بين روزهاي پنجم تا بيست و پنجم بعد از نمونه‌برداري ثبت شد و نمونه‌هايي كه تا روز بيست و پنجم مثبت نشده بودند در ادامه انكوباسيون نيز تغيير رنگي نشان ندادند. به‌دنبال تغيير رنگ محيط كشت از قرمز به زرد كه ناشي از تخمير گلوكز و كاهش PH محيط مي‌بود، نمونه به‌عنوان مثبت فرض شده و مراحل زير جهت تأييد و خالص‌سازي انجام گرفت (۱). پاساژ نمونه مثبت به محيط مايع جديد و محيط جامد (۲) ذخيره‌سازي با استفاده از گليسرول ۵% در فريزر ۷۰ درجه سانتي‌گراد زير صفر (۳) بررسي حضور MG در محيط كشت مايع.

در صورت تأييد حضور MG در محيط آبگوشت، محيط جامد در انكوباتور CO۲ و با رطوبت بالا قرار مي‌گرفت تا رويت پرگنه انجام گيرد. پس از رويت پرگنه مايكوپلاسما، يك پرگنه انتخاب و به محيط مايع منتقل و پس از رشد و تغيير رنگ محيط، جدايه با استفاده از PCR تأييد مي‌شد.

نتايج حاصل از PCR ۱۶S rRNA و تشخيص گونه *مايكوپلاسما گالي-سپتيكوم*:

به منظور تأييد نمونه‌ها از روش PCR استفاده گرديد. پرايمرهاي استفاده شده كاملاً اختصاصي گونه *مايكوپلاسما گالي‌سپتيكوم* بودند (۳، ۹، ۱۰ و ۱۱) به‌طوري‌كه محصول PCR توليد شده در تمام نمونه‌ها و سويه استاندارد ts-۱۱، يك قطعه ۵۳۰ جفت بازي را تشكيل مي‌داد كه مشخص كننده *مايكوپلاسما گالي سپتيكوم* بود. از ۱۰۹ نمونه اخذ شده از ۱۰ فارم، ٤٦ نمونه معادل ٤۲/۲ درصد در PCR باند ۵۳۰ جفت بازي را بر روي ژل آگاروز نشان دادند. پرايمرهاي استفاده شده كاملاً اختصاصي گونه *مايكوپلاسما گالي-سپتيكوم* بودند (۱٦) به‌طوري‌كه محصول PCR توليد شده در تمام نمونه‌ها و سويه استاندارد ts-۱۱، يك قطعه ۵۳۰ جفت بازي را تشكيل داد. اختصاصيت اين تست با توجه به مطالعه قبلي محققين مي‌باشد (نگاره ۱) (۳، ۹، ۱۰ و ۱۱).



نگاره ۱- محصول PCR ژن ۱٦S rRNA با استفاده از پرايمرهاي MG- ۱۰F و MG-۱۱R.
M: Gene Ruler ۱۰۰bp plus DNA Ladder. Lane ۱: ts-۱۱ واكسن: Lane ۲، كنترل منفي: Lane ۳-۱۲ جدايه‌هاي فيلدي:

بحث و نتيجه‌گيري

با توجه به اهميت بيماري *مايكوپلاسما گالي‌سپتيكوم* از جنبه اقتصادي و با توجه به ايجاد بيماري مزمن تنفسي (CRD) و با در نظر گرفتن تحميل هزينه‌هاي درماني دو چندان و عدم پاسخدهي مناسب و عدم بروز حداكثر عملكرد پرندگان آلوده به اين باكتري، استفاده از روشهاي مبتني بر شناسايي DNA براي تشخيص MG به‌طور مستقيم از بافت يا جدايه‌هاي آزمايشگاهي ضروري به نظر مي‌رسد (۱). اگرچه مي‌توان از پروب براي شناسائي MG

استفاده نمود، اما روش بسيار معمول، تكثير قطعه اختصاصي از ژنوم باكتري است. براي اين منظور كيت‌هاي تجاري نيز در دسترس هستند (۱). روش‌هايي براي تشخيص همزمان انواع مايكوپلاسما در نمونه‌هاي باليني ابداع شده است كه از آن جمله مي‌توان به PCR چندگانه و PCR-RLFP اشاره كرد. نتايج PCR ظرف يك تا دو روز مشخص مي‌شود، در حالي‌كه براي كشت و تعيين هويت ارگانيسم يك تا سه هفته زمان نياز است. همچنين PCR قادر است نتايج دقيقي در حضور عفونت‌هاي مخلوط با چندين مايكوپلاسما، آلودگي با عفونت‌هاي باكتريايي ثانويه، مهاركننده‌هاي رشد مايكوپلاسما مثل آنتي بادي، آنتي بيوتيك، يا ساير عوامل ميزباني ارائه دهد (۱ و ۱۷). به‌ويژه رشد مايكوپلاسماهاي ساپروفيت كه رشد سريعتري در محيط غني شده نسبت به *مايكوپلاسما گالي‌سپتيكوم* دارند از مهم‌ترين مشكلات كشت مي‌باشد. شناسائي DNA ارگانيسم‌هاي غير زنده مثلاً پس از درمان با آنتي‌بيوتيك از معايب PCR است. در اين مطالعه، به منظور تأييد نمونه‌ها از روش واكنش زنجيره‌اي پلي‌مراز استفاده شد. پرايمرهاي استفاده شده اختصاصي ژن ۱۶S rRNA در *مايكوپلاسما گالي‌سپتيكوم* بودند و اين پرايمرها جهت شناسائي MG در كشت خالص و يا نمونه باليني استفاده شده‌اند. با استفاده از اين پرايمرها تمام سويه‌هاي فيلدي، محصول PCR ۵۳۰ جفت باز را تشكيل دادند (۱۷). محصول PCR توليد شده توسط پرايمرهاي اختصاصي ۱۰F/۱۱R تنها با *مايكوپلاسما گالي‌سپتيكوم* واكنش داده و با هيچكدام از ۲۲ گونه مختلف مايكوپلاسما واكنش نمي دهد (۱۷).

آزمون ۱۶S rRNA-PCR جهت تشخيص گونه *مايكوپلاسما گالي‌سپتيكوم* با پرايمرهاي اختصاصي MG-۱۰F و MG-۱۰R با توجه به تشكيل باند ۵۳۰ جفت بازي براي تمامي سويه‌هاي فيلدي مورد استفاده در اين مطالعه و سويه واكسينال ts-۱۱ و نتايج حاصل از اين مطالعه، مي‌تواند با حساسيت ۱۰۰ درصد مورد استفاده قرار گيرد.

فهرست منابع

۱. حسيني، ح. (۱۳۸۵): مطالعات مولكولي جدايه‌هاي *مايكوپلاسما گالي‌سپتيكوم* از طيور، رساله دكتراي تخصصّي بيماري‌هاي طيور، دانشكده دامپزشكي دانشگاه تهران، صفحات: ۱۲۰-۱.

۲. Biomune. (۲۰۰۶):VECTORMUNE®FP-MG.http://www.biomune.company.com/chickens/vectormunefpmg.html.

۳. Biro, J., Erdei, N., Szekely, I. and Stipkovits, L. (۲۰۰۶): Differentiation of *mycoplasma gallisepticum* strains using molecular methods. Acta Veterinaria Hungarica, ۵۴: ۴۳۷-۴۴۸.

۴. Bradbury, J.M. and Levisohn, S. Experimantal infections in poultry. In: Tully, J.G. (۱۹۹۶): Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmology. Volume II-Diagnostic Procedures, San Diego, CA: Academic Press. pp: ۳۶۱-۳۷۰.

۵. Charlton, B.R., Bickford, A.A., Chin, R.P. and Walker, R.L. (۱۹۹۹): Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Mycoplasma gallisepticum* isolates from turkeys from the central valley of California. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, ۱۱:۴۰۸-۴۱۵.

۶. Charlton, B.R., Bickford, A.A., Walker, R.L. and Yamamoto, R. (۱۹۹۹): Complementary randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis patterns and primer sets to differentiate *Mycoplasma gallisepticum* strains. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, ۱۱: ۱۵۸-۱۶۱.

۷. Collett, S.R. (۲۰۰۵): Monitoring broiler breeder flocks for *mycoplasma gallisepticum* infection after vaccination with ts- ۱۱. Department of production animal studies, faculty of veterinary science, University of Pretoria, pp: ۱-۷۹.

۸. Dennis, Y.M., Chiu, W.K. and Allen Chan, K.C. (۲۰۰٦): Clinical applications of PCR. Humana Press, pp: ٤- ۲۲.
۹. Fan, H.H., Kleven, S.H. and Jackwood, M.W. (۱۹۹٥): Application of polymerase chain reaction with arbitrary primers to strain identification of *Mycoplasma gallisepticum*. Avian Dis., ۳۹: ۷۲۹-۷۳٥.
۱۰. Feberwee, A., Mekkes, D.R., de Wit, J.J., Hartman, E.G. and Pijpers, A. (۲۰۰٥): Comparison of culture, PCR, and different serologic tests for detection of mycoplasma gallisepticum and mycoplasma synoviae infections. Avian Dis., ٤۹: ۲٦۰-۲٦۸.
۱۱. Garcia, M., Ikuta, N., Levisohn, S. and Kleven, S.H. (۲۰۰٥): Evaluation and comparison of various PCR methods for detection of *Mycoplasma gallisepticum* infection in chickens. Avian Dis., ٤۹: ۱۲٥-۳۲.
۱۲. Gharaibeh, S. and Al Roussan, D. (۲۰۰۸): The use of molecular techniques in isolation and characterization of *mycoplasma gallisepticum* from commercial chicken in Jordan. Int. J. Poult. Sci., ۷(۱): ۲۸-۳٥.
۱۳. Kempf, I., Blanchard, A. Gesbert, F. Guittet, M. and Bennejean, G. (۱۹۹۳): The polymerase chain reaction for *Mycoplasma gallisepticum* infection. Avian Pathol., ۲۲: ۷۳۹-۷٥۰.
۱٤. Khan, M.I. (۲۰۰۲): Multiplex PCR of Avian Pathogenic Mycoplasmas, in PCR Detection of Microbial Pathogens, by Joachim, Frey, Konard, Sachse Humana Press, pp: ۲۲۳.
۱٥. Kleven, S.H. (۲۰۰۸): Control of avian mycoplama infections in commercial poultry. Avian Dis., ٥۲: ۳٦۷-۳۷٤.
۱٦. 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. (۲۰۰۸): Diseases of Poultry. ۱۲th ed., Iowa state university press, USA, pp: ۸۰٥-۸۰۸.
۱۷. OIE terrestrial manual. (۲۰۰۸): Avian mycoplasmosis, chapter ۲,۳,٥. pp: ٤۸۲-٤۹٦.

Detection of *Mycoplasma gallisepticum* by ١٦S rRNA PCR with specific primers in clinical samples

Pourbakhsh, S.A.[١*], Zakeri, A.[٢], Sheikhi, N.[٣], Charkhkar, S.[٣], Ashtari, A.[٤]

١-Department of Microbiology, Faculty of Specialized Veterinary Sciences, Islamic Azad University, Science & Research Branch, Tehran, Iran
٢-Ph.D Student of Poultry Diseases, Faculty of Specialized Veterinary Sciences, Islamic Azad University, Science & Research Branch, Tehran, Iran
٣-Department of Clinical Science, Faculty of Specialized Veterinary Sciences, Islamic Azad University, Science & Research Branch, Tehran, Iran
٤- Mycoplasma Reference Lab. of Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karadj, Iran

**Corresponding author's email:* *a.pourbakhsh@rvsri.ir*

(Received: ٢٠٠٩/٦/٦**, Accepted:** ٢٠١٠/١/٤**)**

Abstract

Mycoplasma gallisepticum (MG) as one the major pathogens of birds, causes significant economic losses in poultry industry. The main purpose of the present study was to detect *Mycoplasma gallisepticum* in clinical samples using the ١٦*S rRNA* PCR method. For serological screaming test, ١٨ commercial laying farms and ٨ broiler breeder farms were selected and rapid serum agglutination test (RSAT) was performed. For polymerase chain reaction sampling, ١٠ of the ١٧ farms that were positive in RSAT were selected and ١٠٩ sterile swab samples were collected from the palatine cleft, trachea, air sacs and lungs in each farm. Three swabs from three birds were placed in test tube containing ١ ml of phosphate buffered saline and transferred to laboratory form PCR testing. In this study, specific primers for ١٦*S rRNA* gene were used. The aforementioned primers are totally specific for MG and can be differentiated from other Mycoplasma and bacteria present in the trachea of poultry of the ٢٦ farms examined, ١٧ farms were positive in RSAT serologic test. The ٥٣٠ bp PCR product produced by specific primers of all field strains appeared on electrophoresis gel in ٤٦ samples from ١٠ farms accounting to ٤٢,٢٪.The ١٦S rRNA PCR with very high sensitivity can be employed in definitive diagnosis of *Mycoplasma gallisepticum* infection in vitro.

Keywords: *Mycoplasma Gallisepticum,* Clinical samples, PCR