جدا سازی و شناسایی مایکوپلاسما گالی سپتیکوم از مرغداری‌های گوشتی شهرستان قائم شهر

امید طیبی‌درازکلا[۱]، سیدعلی پوربخش[۲*]، منصور بنانی[۲]، پیمان حجتی[۳]، زهرا صلاحی[۲]، مه‌زاد ارمی[۲]

چکیده

مایکوپلاسموز از شایع‌ترین بیماری‌ها در صنعت طیور می باشد. مایکوپلاسما گالی سپتیکوم از بیماری زا ترین انواع مایکوپلاسمای طیور است. هدف از این مطالعه جداسازی و شناسایی مایکو پلاسما گالی سپتیکوم از مرغداری های گوشتی شهرستان قائم شهر با استفاده از روش های میکروبیولوژی و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (polymerase chain Reaction) (PCR) بود. در این مطالعه از۸۱ مرغداری گوشتی شهرستان قائم شهر، نمونه گیری انجام گرفت. از شکاف کامی- حلقی، نای، سیرنکس و کیسه‌های هوایی طیور مشکوک نمونه برداری انجام شد. پس از انتقال نمونه ها به آزمایشگاه باکتری شناسی، اقدام به کشت در محیط‌های PPLO براث و آگار شد. بر روی کلیه نمونه‌های اخذ شده واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی جنس مایکوپلاسما و گونه مایکوپلاسما گالی سپتیکوم در ناحیه 16S rRNA انجام گردید. در این تحقیق از مجموع ۸۱ مرغداری نمونه برداری شده، تعداد ۲۰ مرغداری از نظر کشت، ٤٠ مرغداری در آزمایش PCR از نظر جنس مایکوپلاسما و ۱۰ مرغداری در آزمایش PCR از نظر گونه مایکوپلاسما گالی سپتیکوم مثبت بودند. از ۲۰ گله ای که در کشت مثبت تشخیص داده شدند، تمامی آنها در PCR جنس مایکوپلاسما تایید ولی ۹ گله در آزمون PCR برای گونه مایکوپلاسما گالی سپتیکوم تایید شدند. نتایج نشان می‌دهد که مرغداری های گوشتی شهرستان قائم شهر به مایکوپلاسما گالی سپتیکوم آلوده می باشند و توصیه می شود جهت شناسایی عامل بیماری و تشخیص سریع آن از آزمایش PCR استفاده گردد.

واژگان کلیدی: *جداسازی ،شناسایی، مایکوپلاسما گالی سپتیکوم، مرغداری‌های گوشتی، شهرستان قائم شهر.*

تاریخ دریافت: ۹۰/۲/۳ تاریخ پذیرش: ۹۰/۵/۲۹

مقدمه

با توجه به اهمیت بیماری مایکوپلاسما گالی سپتیکوم از جنبه اقتصادی و با توجه به اینکه گونه مایکوپلاسما گالی سپتیکوم عامل درگیری‌های تنفسی، افت تولید(گوشت و تخم مرغ)، افـزایش مـرگ و میـر ناشـی از بیمـاری‌هـای ویروسی مانند برونشیت عفونی و آنفلوانزای طیور است و با در نظر گرفتن تحمیل هزینه‌های درمانی زیاد و عدم پاسخ‌دهی مناسب، استفاده از روش‌های تشخیصی مطمئن و سریع که بتواند در شرایط خاص در حداقل زمان ممکن و با درصد احتمال بسیار بالا این عامل را تشخیص دهد، بسیار ضروری به نظر می‌رسد. تشخیص به موقع مایکوپلاسما هم از جهت پرورش دهندگان و هم از نظر سازمان دامپزشکی حائز اهمیت می‌باشد. مایکوپلاسماها پروکاریوت‌های بسیار کوچکی هستند که فاقد دیواره سلولی بوده و به این دلیل در مقابل آنتی بیوتیک‌هایی که روی سنتز دیواره سلولی اثر می‌کنند، مقاوم می‌باشند. شکل کلونی‌ها مثل تخم مرغ نیمرو (fried egg) یا دکمه‌ای شکل می‌باشد. همچنین نسبت به احتیاجات پیچیدهٔ غذایی در صورت کمبودشان مقاوم هستند. بعضی از مایکوپلاسماها فقط یک نوع حیوان را آلوده می‌کنند (host specific) ولی بعضی‌ها قادرند در چندین حیوان مختلف ایجاد بیماری نمایند. مایکوپلاسماها در گیاهان، جانوران، انسان و حشرات ایجاد بیماری می‌کنند. به طور عمومی، مایکوپلاسماها در سطح مخاطی کلونیزه می‌شوند و اکثراً غیر مهاجم هستند ولی بعضی گونه‌ها مثل مایکوپلاسما گالی سپتیکوم قادر به سوراخ کردن سلول‌ها هستند. مایکوپلاسمـاهـا بـه طور اولیه به غشای مخاطی دستگاه تنفس و یا ادراری تناسلی، چشم و مفاصل تمایل دارند. بسیاری از آنها به عنوان انگل‌های سطحی شناخته می‌شوند و به ندرت بافت‌ها را مورد تهاجم قرار می‌دهند. البته انتشار آنها به انـدام‌های مختلف، بیانگر حداقل یک عفونت عمومی زودگذر

۱- دانش آموخته دکترای حرفه ای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد گرمسار، دانشگاه آزاد اسلامی، سمنان ، ایران
۲*- آزمایشگاه رفرانس مایکوپلاسما، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی ،کرج، ایران a.pourbakhsh@rvsri.ir
۳- گروه بیماریهای طیور، دانشکده دامپزشکی، واحد گرمسار، دانشگاه آزاد اسلامی، سمنان، ایران

است. به طور کلی، گونه‌های مایکوپلاسما و احتمالاً سویه‌های خاصی تمایل بیشتری به بعضی از بافت‌ها یا اندام‌ها دارند هر چند این تمایل الزاماً به معنی حذف کامل از سایر اندام‌ها نیست. تاکنون ۲۳ گونه مختلف مایکوپلاسما از پرندگان جدا شده که ماکیان و بوقلمون میزبان ۱۶ گونه از آنها می‌باشند. در این میان تنها چهارگونه برای پرندگان بیماری‌زا هستند که شامل مایکوپلاسما گالی سپتیکوم، مایکوپلاسما سینوویه، مایکوپلاسما مله آگریدیس و مایکوپلاسما آیوا می‌باشد. مایکوپلاسماها از کلاس Mollicutes، شاخه I یعنی Mycoplasmatales و جنس I یعنی mycoplasma هستند و بیش از ۱۰۰ گونه دارند. دارای DNA بوده و برای رشد به کلسترول نیاز دارند. درجه حرارت اپتیمم برای رشد ۳۷ درجه سانتی‌گراد است. با آنالیز ژن ریبوزوم 16SrRNA می‌توان ارتباط ژنتیکی بین مایکوپلاسماها را بررسی کرد. شناسایی و ردیابی این باکتری توسط روش‌های سرولوژی «مثل RSA و ELISAو مولکولی «PCR» انجام می‌پذیرد که اقداماتی برای تشخیص بیماری و در نتیجه درمان، پیشگیری و در نهایت ریشه‌کنی آن هستند (۱۹ و ۱،۲،۳،٤،۷،۱۱،۱٤،۱۵،۱٦،۱۷).

هدف این مطالعه جداسازی و شناسایی مایکو پلاسما گالی سپتیکوم در مرغداری‌های گوشتی شهرستان قائم شهر با استفاده از روش‌سهای میکرو بیولوژی، و واکنش PCR و در نهایت مقایسه این روش‌ها و معرفی مناسب ترین روش تشخیص سریع آزمایشگاهی جهت شناسایی این عامل بیماری‌زا بود.

مواد و روش کار

جمع‌آوری نمونه: در این تحقیق از ۸۱ مرغداری گوشتی شهرستان قائم شهر نمونه گیری انجام گرفت. نمونه های بافتی با سوآب برداری از نای، شکاف کامی، کیسه های هوایی و سیرنکس جمع آوری شدند. سپس سوآب ها داخل ۵ – ۳ میلی لیتر محیط PPLO براث تلقیح گردیدند و به آزمایشگاه منتقل شدند. از هر گله حداقل از ۵ پرنده سوآب برداری صورت گرفت.

نمونه برداری: ابتدا محیط کشت PPLO براث را در کنار شعله و با رعایت شرایط استریل در ظروف یونیورسال به میزان حدود ۸ – ۵ میلی لیتر محیط مایع در هر ظرف تقسیم گردید. سپس در محل نمونه برداری اقدام به تهیه نمونه شد. بدین صورت که ابتدا سوآب استریل در ظرف ذکر شده به محیط براث آغشته و سپس سوآب با محل اخذ نمونه تماس داده شد. در مرحله بعدی سوآب در ظرف یونیورسال قرار داده و درب آن به خوبی بسته شد.

ارسال نمونه ها به آزمایشگاه: سوآب های تهیه شده که در محیط PPLO براث قرار داده شده بودند(۱٤و۳،٦)، بین۱٤ – ۹ ساعت در کنار یخ به آزمایشگاه میکروب شناسی بخش تحقیق و تشخیص بیماری‌های طیور موسسه رازی منتقل شدند.

کشت: پس از انتقال نمونه ها به آزمایشگاه در محیط براث که رنگ آن قرمز روشن (به دلیل وجود معرف فنل و PH قلیایی) بود ابتدا شیشه ها به خوبی تکان داده شد. سپس یک میلی لیتر از محتویات براث انتقالی به لوله آزمایشی که حاوی ۵ میلی لیتر براث(پاساژ اوّل) بود با استفاده از فیلتر افزوده شد. بعد از گذشت حداقل ٤۸ ساعت و شرایط انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و محیط Co2 دار، لوله های آزمایش مورد بازدید قرارگرفت. در صورت مشاهده کدورت و تغییر رنگ آنها، به براث (پاساژ دوّم) انتقال داده شدند (از فیلترهای مخصوص سر سرنگی Type MV که دارای روزنه هایی با قطر ٤۵/ . میکرومتر بود همانند قبل استفاده شد و براث (پاساژ اوّل) در انکوباتور با شرایط مذکور قرار داده شد). پس از گذشت زمان مذکور در صورت مشاهده و یا حتی عدم مشاهده زرد رنگ شدن محیط براث (پاساژ اوّل)، این بار (بین ۳ – ۵ روز) از محیط کشت براث (پاساژ اوّل) در محیط کشت PPLO آگار هم، به روش خطی کشت شد و پس از مدت ۷۲ ساعت به بعد

در شرایط گرمخانه فوق با بزرگ نمایی ۱۰ میکروسکوپ نوری مورد مشاهده قرار گرفت(٤و٣).

قابل ذکر است که در صورت عدم مشاهده تغییر رنگ در براث (پاساژ اوّل) (براث بعد از محیط انتقال) بین ۵ — ۳ روز بعد از انتقال به براث (پاساژ اوّل) بدون انجام فیلتراسیون، یک میلی لیتر از براث به ۵ میلی لیتر محیط براث جدید منتقل می‌شد و پس از گذشت ٤٨ ساعت از براث (پاساژ اوّل) به محیط PPLO آگار، کشت انجام می‌گرفت و بعد از گذشت ۷۲ ساعت با میکروسکوپ نوری و با بزرگ نمایی۱۰، پلیت حاوی PPLO آگار را که از براث (پاساژ اوّل) کشت داده شده بود بررسی می‌شد (۳).

استخراج DNA: استخراج DNA مایکوپلاسما گالی سپتیکوم با استفاده از محیط های مایع اولیه که سوآب نمونه برداری شده در آن تلقیح شده بود صورت گرفت. ۵/. میلی لیتر از محیط مایع تلقیح شده ابتدا به مدت ۱۵ دقیقه با دور rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفوژ گردید. سپس مایع رویی دور ریخته و از رسوب ته آن حدود ۱۰۰ میکرولیترباقی گذاشته شد. سپس حدود ۱۰۰ میکرولیتر بافرلیزکننده اضافه شد و در ادامه شیک گردید. بعد به مدت حدود ٤ ساعت داخل بن ماری در دمای حدود ٥٦ درجه سانتی گراد قرار داده شد. بعد از این مدت نمونه خارج شد و حدود ۲۰۰ میکرولیتر فنل اشباع شده به نمونه اضافه شد. باز هم شیک گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور سانتریفوژ شد. نمونه که حالت دو فاز تشکیل داد و به آرامی با سمپلر فاز رویی کشیده و به تیوب جدید منتقل شد فاز زیر آن به همراه تیوب قبلی دور انداخته شد. هم حجم فاز رویی که توسط سمپلر کشیده شد به تیوب، مخلوط فنل – کلروفرم (به نسبت مساوی با هم مخلوط شده اند) اضافه شد. دوباره تکان داده و باز هم مثل قبل سانتریفیوژ گردید و دوباره مثل قبل فاز رویی برداشته و به تیوب جدید انتقال داده شد و فاز زیر آن به همراه تیوب دور انداخته شد. سپس هم حجم با فاز رویی که کشیده شد به نمونه کلروفرم اضافه گردید. تیوب به خوبی تکان داده شده و به مدت ۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور سانتریفوژ شد. محلول رویی را با سمپلر کشیده به تیوب جدید منتقل گردید. ۰/۱حجم نمونه کشیده شده استات سدیم ۳ مولار اضافه و به آرامی مخلوط شد و دوبرابر حجم مجموع حجم های نمونه و استات به نمونه اتانول مطلق اضافه گردید. سپس به مدت حدود ۲۰ دقیقه نمونه در دمای حدود ۲۰- درجه سانتی گراد قرار داده شد. نمونه را درآورده و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور سانتریفوژ گردید. حال تیوب برگردانده و تخلیه شد طوری که حدود ۲۰۰ میکرولیتر بماند و حدود ۲۰۰ میکرولیتر الکل ۷۰ درصد به آن اضافه کرده و به مدت ۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور سانتریفوژ گردید. تیوب را کاملاً تکان داده تا تخلیه گردد، سپس می گذاریم تاخشک شود. ۵۰ میکرولیتر آب مقطر به نمونه اضافه شد و در یخچال گذاشته تا مراحل بعدی انجام شود (۳).

تکثیر قطعه مورد نظر از ژنوم: روش PCR جهت شناسایی مایکوپلاسما گالی سپتیکوم در حجم های ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت. هر محلول حاوی $MgCl_2$ (کلرید منیزیم ۲ میلی مولار)، PCR بافر ، نوکلئوتیدها (dATP،dTTP,dGTP,dCTP) ،پرایمرها ،Taq DNA Polymerase و نمونه حاوی DNA بود (۱۹و ۱۳،۱۲،۱۰،۹،۷،۳).

پرایمرهای مورد نظر جهت انجام این آزمایش مربوط به قسمت 16S rRNA مایکو پلاسما و اختصاصی جنس بود. ترتیب نوکلئوتیدی پرایمر پیشرو جهت شناسایی جنس مایکوپلاسما عبارت بود از (۳):

5'-GCTGCGGTGAATACGTTCT-3'

و ترتیب نوکلئوتیدی پرایمر معکوس عبارت بود از(۳) :

5'-TCCCCACGTTCTCGTAGGG -3'

همچنین برای شناسایی مایکوپلاسما گالی سپتیکوم از یک جفت پرایمر اختصاصی این گونه استفاده گردید که ترتیب نوکلئوتیدی پرایمر پیشرو عبارت بود از(۳) :

5'-AACACCAGAGGCGAAGGCGAGG -3'

و ترتیب نوکلئوتیدی پرایمر معکوس عبارت بود از(۳) :

5'-ACGGATTTGCAACTGTTTGTATTGG -3'

برنامه دمایی که جهت همانندسازی DNA مایکوپلاسما گالی سپتیکوم داده شد عبارت بود از : دمای ابتدایی ۹٤ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، سپس به دنبال آن ۳۵ سیکل گرمایی که هر سیکل شامل ۹٤ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه که هرکدام به ترتیب اختصاص به مراحل واسرشت، اتصال پرایمر، و بسط داشت. مرحله نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت (۳).

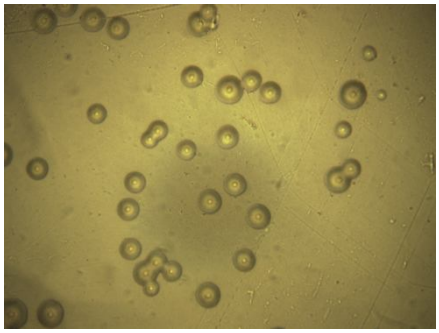
ردیابی محصول PCR: محصول PCR تکثیر شده به وسیله الکتروفورز بر روی ژل آگار ۱٪ در TBEبافر (۱۰۰میلی مولار Tris – Hcl، ۵۰ میلی مولار بوریک اسید و ۲ میلی مولار EDTA) حاوی ۵g/ml μ/. اتیدیوم بروماید بررسی شد(۳).

الکتروفورز از ژل در تانک های حاوی TBE بافر به مدت حداقل یک ساعت با ولتاژ ۱۰۰ صورت گرفت. سپس ژل زیر اشعه UV در دستگاه UV Transilluminator و با مارکر 100 bp DNA ladder مشاهده شد.

نتایج

نتایج کشت نمونه های ارسالی

از مجموع ۸۱ نمونه ای که در محیط PPLO براث و PPLO آگار کشت داده شدند در محیط PPLO براث و PPLO آگار ۲۰ نمونه رشد کردند (از لحاظ تغییر رنگ و رشد پرگنه). در زیر تصویری مشاهده می‌گردد که در این مرحله تهیه شده است(نگاره ۱).

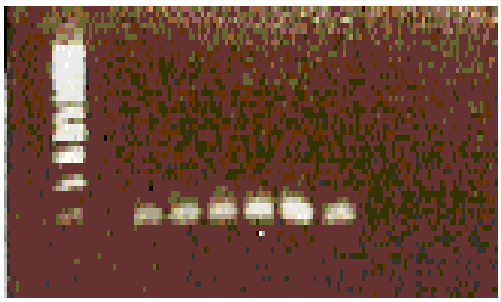


نگاره ۱ـ پرگنه‌های مایکوپلاسما با استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگ نمایی ۲۰۰X

نتایج PCR مربوط به جنس باکتری مایکو پلاسما

از تعداد ۸۱ نمونه، ٤۰ نمونه با پرایمر اختصاصی جنس مثبت شدند. در زیر تصویری که در این مرحله تهیه گردیده است آورده شده است (نگاره ۲).

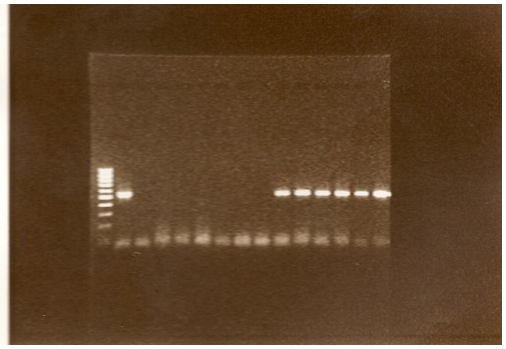
اندازه قطعه DNA آشکار شده برای جنس مایکوپلاسما bp ۱٦۳ می باشد. در ضمن مارکری هم که درتمام مراحل آزمایش استفاده شد 100 pb DNA ladder بود.



نگاره ۲ـ از چپ به راست شامل : مارکر، کنترل منفی، کنترل مثبت و ۵ نمونه‌ای که آشکار است در PCR جنس مایکو پلاسما مثبت بوده اند.

نتایج PCR مربوط به گونه باکتری مایکوپلاسما گالی سپتیکوم

نمونه‌هایی که در PCR جنس مایکوپلاسما مثبت شدند در مرحله بعد PCR برای گونه مایکوپلاسما گالی سپتکوم انجام گردید که از این ٤۰ نمونه ۱۰ نمونه مثبت شدند. تصویر پایین قسمتی از نتایج این مرحله را نشان می دهد (نگاره ۳). اندازه صحیح قطعه DNA مایکوپلاسما گالی سپتکوم که روی ژل آگار ٪ ۱ مشاهده می‌شود bp ۵۳۰ می‌باشد.



نگاره ۳ـ از چپ به راست شامل : مارکر، کنترل مثبت، کنترل منفی و ۱۲ نمونه ای که در آزمایش قبل با پرایمر جنس مایکوپلاسما مثبت بوده اند ولی با پرایمر گونه مایکو پلاسما گالی سپتیکوم ٦ نمونه مثبت شدند.

نتایج در جدول(۱) به صورت خلاصه آمده است.

جدول ۱ـ نتایج بدست آمده توسط آزمایشات مولکولی و کشت صورت گرفته

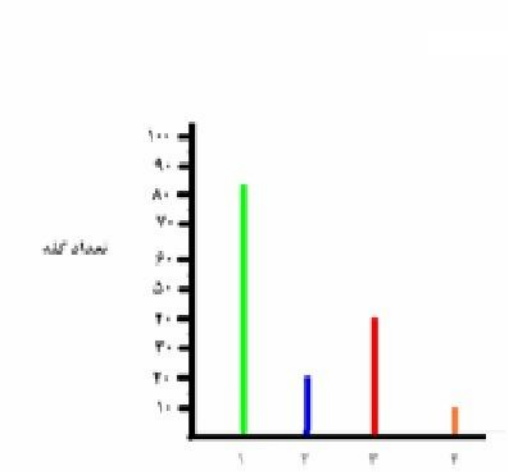
آزمایش	تعداد گله مثبت	تعداد گله منفی	تعداد کل گله
کشت	۲۰	٦۱	۸۱
PCR جنس	٤۰	٤۱	۸۱
PCR گونه	۱۰	۷۱	۸۱

۱ـ گله های مرغداری مورد تحقیق

۲ـ گله های کشت مثبت

۳ـ گله های PCR مثبت برای جنس مایکوپلاسما

٤ـ گله های PCR مثبت برای گونه مایکوپلاسما گالی سبتیکوم



نمودار ۱ـ نتایج بدست آمده برای گله‌ها توسط آزمایشات میکروبیولوژی و مولکولی را نشان می‌دهد.

بحث

دراین مطالعه نشان داده شد که مرغداری های گوشتی شهرستان قائم شهر با استفاده از روش های میکروبیولوژی و انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) به مایکوپلاسما گالی سپتیکوم آلوده می باشند. مایکوپلاسموز در طیور برای اولین بار در سال ۱۹۵۵ به وسیله سهراب و بهار صفت در ایران شناسایی شد و در سال ۱۹٥٦ جانگرا و سهراب در گله های طیور در مناطق مختلفی از کشور، آلودگی وسیعی از مایکوپلاسما را با استفاده از آزمایش های سرولوژیکی تایید نمودند (٤). هم اکنون رد یابی مایکو پلاسما به صورت معمول با روش های کشت و سرولوژی صورت می پذیرد. ولی این روش ها دارای نواقصی می باشند(٤).

در این مطالعه از ۲۰ گله ای که در کشت مثبت تشخیص داده شدند، ۹ مورد توسط PCR برای گونه مایکوپلاسما گالی سپتیکوم تایید شد و تمامی آنها توسط PCR جنس مایکوپلاسما تایید شدند. تعداد ٤۰ گله از نظر جنس مایکوپلاسما در PCR مثبت شدند و علیرغم اینکه از این تعداد فقط در ۱۰ گله مایکوپلاسما گالی سپتیکوم به وسیله PCR شناسایی شد و نیز با توجه به مطالعاتی که در کشورهای مختلف جهان در مورد سایر گونه‌های بیماری زای مایکوپلاسما در ماکیان صورت گرفته (۱۸و۱۷،۱۲،۷،۳)، این امر را می‌توان به حضور گونه‌های دیگر مایکوپلاسما نسبت داد. لازم به ذکر است که در مورد PCR برای گونه مایکوپلاسما گالی سپتیکوم، ۱۰ گله مثبت گزارش شدند که ۹ مورد توسط کشت تایید شد و ۱ گله در کشت مورد تایید قرار نگرفت و با توجه به اینکه تست PCR در شناسایی DNA اختصاصی عامل عفونت زا صرف نظر از زنده یا مرده بودن آن عمل می‌کند این امر را می‌توان به عواملی از جمله امکان از بین رفتن عامل در فاصله زمانی نمونه برداری تا انتقال به آزمایشگاه و عدم رشد آن در محیط کشت PPLO، خطای آزمایشگاه، سخت رشد بودن مایکوپلاسما ها، مصرف آنتی بیوتیک در گله، عدم استفاده مناسب از احتیاجات رشد مایکوپلاسما در آزمایشگاه و مهمتر از همه حساسیت و دقت بالای آزمایش PCR در قیاس با کشت نسبت داد. شایان ذکر است که در سال ۱۳۸٤ در مطالعه ای که داداشی و همکاران در مزارع مرغ مادر استان سمنان انجام دادند از ۷۰ نمونه ۱۲مورد از نظر حضور مایکوپلاسما در کشت مثبت و در آزمایش PCR، از نظر مایکو پلاسما گالی سپتیکوم همه موارد منفی بود ولی از نظر جنس مایکو پلاسما ۹ نمونه مثبت بوده است که شاید دلیل این نتایج ناشی از شرایط فارمهای آن مکان و نوع گله باشد(۳).

در مطالعه‌ای که پوربخش و همکاران در سال ۱۳۸۸ در ۱۸ فارم تخم گذار تجارتی و ۸ فارم مادرگوشتی انجام دادند از ۱۷ فارمی که در تست RSAT مثبت شده بودند، ۱۰ فارم انتخاب و نمونه برداری بافتی صورت گرفت. پس از انجام PCR از پرایمرهای اختصاصی برای ژن 16S rRNA استفاده شد که اختصاصی مایکوپلاسما گالی سپتیکوم بودند و در نهایت نشان دادند که 16S rRNA PCR با حساسیت بالا می‌تواند در تشخیص قطعی عفونت با مایکوپلاسما گالی سپتیکوم در آزمایشگاه به کار برده شود. البته یکی از اهداف این مطالعه جدا سازی مایکوپلاسما گالی سپتیکوم از مرغداری‌های شهرستان قائم شهر بود. بنابراین سعی شد تا از مرغداری‌هایی نمونه برداری شود که احتمال جداسازی این عامل عفونی بیشتر باشد. کشت مایکوپلاسما گالی سپتیکوم به دلایلی همچون مشکل پسند بودن عامل، عدم حضور ارگانیسم زنده در نمونه دریافتی، زمان بر بودن آن و وجود پرگنه‌هایی به غیر از مایکوپلاسماگالی سپتیکوم، مشکل است (۲۰و۱۸،۱۱،٤).

از مزایای بسیار قابل توجه PCR این است که شاید تنها به ۲ – ۱ روز جهت ردیابی مایکوپلاسما نیاز باشد و تشخیص عامل بستگی به وجود جرم زنده ندارد (۱۳و۸،۱۲).

این تحقیق این نکته را هم تایید می‌کند که میزان واقعی آلودگی در گله ها با کمک تکنیک مولکولی مانند PCR جهت ردیابی مایکوپلاسما گالی سپتیکوم بسیار مفید است. در ضمن PCR برای رد یابی مایکوپلاسما گالی سپتیکوم اختصاصی تر از روش کشت می باشد. با توجه به اینکه جداسازی و تعیین هویت این عامل با استفاده از کشت زمان بر است و اثبات حضور آن بخصوص با روش های سرولوژی منوط به خسارات اقتصادی زیادی برای مرغداری است پس PCR کمکی بزرگ برای مرتفع ساختن این چنین مشکلات است. نتایج این تحقیق نشان دادکه مایکوپلاسما گالی سپتیکوم در مرغداری های گوشتی شهرستان قائم شهر وجود دارد و تا کنون هیچ تحقیقی که با این گستردگی این دو تست را بطور هم زمان با شرایط مذکور انجام دهد منتشر نشده است. این مطالعه نشان می دهد که روش های مولکولی مانند PCR می تواند بطور روتین و با دقتی بالاتر از روش‌های متداول در کارهای تشخیصی بکارگرفته شود.

فهرست منابع

۱. جردن، اف.تی.دبلیو.، (۱۳۷۷): بیماری‌های طیور، انتشارات واحد آموزش و پرورش معاونت کشاورزی، چاپ اول.

۲. چارلتون، بی.آر.، (۱۳۸۳): راهنمایی بیماری‌های پرندگان، انتشارات دانشگاه شیراز.

۳. داداشی، م.ت.، (۱۳۸٤): ردیابی مایکوپلاسما گالی سپتیکوم از مزارع مرغ مادر استان سمنان با استفاده از روش PCR ، پایان نامه دکتری عمومی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار، دانشکده دامپزشکی.

٤. شفیعی، م.ت.، (۱۳۸۲): شناسایی موارد آلوده به مایکوپلاسما گالی سپتیکوم در مرغداری‌های صنعتی شهرستان گرمسار، پایان نامه دکتری عمومی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار، دانشکده دامپزشکی.

5. Avakian, A.p., kleven, S.H. , and Glisson, J.R., (1998): Evaluation of the specificity and sensitivity of two commercial Enzyme-linked immunosorbent assay Kits, the serum plate agglutination test and the hemagglutination inhibition test for antibodies formed in Response to Mycoplasma gallisepticum, Avian Diseases. 32:262-272.

6. Cynthina M., Boettger, E.Dohms,(2004): Development of methods to separate Mycoplasma gallisepticum, presented at the 76th Northeastern conference on Avian Diseases.

7. Dupiellet J.P., Vuillaume A., Rousselot D., Bove J.M.und Brad bury J.M, (1990): Serological and molecular studies on Mycoplasma gallisepticum strains .Zentralblatt Bakteriol Mikrobiol Hygsuppl. 20:859-864.

8. Fan, H.H, and kleven, S.H., and Jackwood, M.w., and Johanson, K.E., and pettersson.B., and Levisiohn,S., (1995): Species identification of avian mycoplasmas by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis ,Avian disease. 39:398-407.

9. Garcia, M., Jackwood, M.W., and Levisohn, S., and Kleven, S.H., (1995): Detection of Mycoplasma gallisepticum, M.Synoviae, and M.iowae by multi-species polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism, Avian disease, 39:606-616.
10. Garcia M.lkuta N., Levihn S.und kleven S.H., (2005): Evaluation and comparison of various PCR methods For Detection of Mycolasma gallisepticum infection in chickens, Avian Dis. 49:125-132.
11. Hirsh, C.D.,and Zee,Y.c., (1998): Veterinary microbiology.
12. H. Salisch, K-H.Hinz, H-D.Graach and M.Ryll, (2007): A comparison of a commerial PCR-based test to culture methods for detectiom of Mycoplasma gallisepticum and Mycoplasma synociae in concurrently infected chickens, Avian pathology. 142:288-312.
13. Kiss I., Matiz K., kaszanyitzky E., chavez Y.und Johansson K.E., (1997): Detection and identification of avian mycoplasmas by polymerase chain reaction.Veterinary Microbial. 58:23-30.
14. Kleven, S.H., (2003): Mycoplasmosis .In:saif, Y.M., Barnes, H.J., Glisson, J.R., Fadly, A.M., Dougald,Mc.and swayne , D.E., (eds). Diseases of poultry, 11th edn. Iowa state press. P:719-722.
15. Levisohn, S., and S.H.kleven, (2000): Avian mycolasmosis (Mcoplasma gallisepticum), P:425-442.
16. Ley D.H, (2003): Mycoplasma gallisepticum Infection.In:Y.M.Saif (ed.) Diseases of poultry, 11th ed .,Ames, Iowa state press, Black well. P:722-744.
17. Ley, D.H., Yoder, H.w., (1997): Mycoplasma gallisepticum infection, Diseases of poultry, wolfe, P:194-207.
18. Saif, Y.M., et al., (2002): Disease of poultry, 11th edition.
19. silveira, R.M., and Fiorentin, L.and Marques ,E.K., (1999): Polymerase chain reaction optimization for Mycoplasma gallisepticum and M.synoviae diagnosis,Research note. P:218-222.
20. Winner, F., R.Rosengarten,and C.Citti., (2000): In vitro cell invasion of Mycoplasma gallisepticum. Infect.Immun. 68:4238-4244.