تشخیص گونه *مایکوپلاسما سینوویه* در نمونه‌های بالینی با استفاده از روش VlhA-PCR

حسین انصاری[۱]، سید علی پوربخش[۲*]، نریمان شیخی[۳]، محمد حسن بزرگمهری فرد[۳]، عباس اشتری[٤]

۱. دانشجوی دوره دکترای تخصصی بیماریهای طیور، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات تهران، تهران، ایران
۲. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران
۳. گروه علوم درمانگاهی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات تهران، تهران، ایران
٤. آزمایشگاه رفرانس مایکوپلاسما، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران
* *نویسنده مسئول مکاتبات:* *a.pourbakhsh@rvsri.ir*

(دریافت مقاله: ۸۸/۹/۲۱، پذیرش نهایی: ۸۹/۳/۸)

چکیده

***مایکوپلاسما سینوویه* به عنوان یکی از اصلی‌ترین پاتوژن‌های پرندگان، خسارات اقتصادی فراوانی را به صنعت مرغداری وارد می‌کند. هدف اصلی این مطالعه شناسایی گونه *مایکوپلاسما سینوویه* در نمونه‌های بالینی با استفاده از روش VlhA-PCR می‌باشد. برای بررسی تیتر سرمی، تعداد ۳۷۵ نمونه سرمی از ۲۵ گله مادر گوشتی اخذ و بر روی آن تست (Rapid Serum Agglutination) RSA انجام گردید که ۱٤۳ نمونه، معادل ۱۹ گله در آزمایش RSA مثبت گردید. جهت نمونه‌برداری برای (Polymerase Chain Reaction) PCR از ۲۵ گله‌ای که ۱۹ گله آن در تست RSA مثبت شده بودند، ۲۰ گله انتخاب و سوآپ-های استریل از شکاف کامی، نای، کیسه هوایی و ریه از آنها تهیه گردید. سه سوآپ از سه پرنده داخل یک لوله آزمایش حاوی یک میلی‌لیتر PBS انداخته شد و به آزمایشگاه منتقل گردید تا برای انجام PCR مورد استفاده قرار گیرد. در این مطالعه، از پرایمرهای اختصاصی برای ژن VlhA استفاده شد. محصول PCR تولیدی توسط پرایمرهای اختصاصی، در ۸ گله، باند ٤۰۰-۳۵۰ جفت بازی را برای همه سویه‌های فیلدی بر روی ژل الکتروفورز تشکیل داد. VlhA-PCR با حساسیت بسیار بالا می‌تواند در تشخیص قطعی عفونت با *مایکوپلاسما سینوویه* در آزمایشگاه به کار برده شود.**

مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، ۱۳۸۸، دوره ۳، شماره ٤، ٦۸۱-٦۷۳.

کلمات کلیدی: مایکوپلاسما سینوویه، نمونه‌های بالینی، PCR، ژن VlhA

مقدمه

مایکوپلاسما سینوویه یکی از عوامل بیماری‌زای مهم ماکیان و بوقلمون است که همه ساله خسارت اقتصادی زیادی به صنعت طیور وارد می‌نماید. اگرچه اولین بار *مایکوپلاسما سینوویه* به عنوان عامل بیماری سینوویت عفونی معرفی شد، اما امروزه علاوه بر سینوویت عفونی به عنوان عامل بیماری تنفسی و عفونت کیسه‌های هوائی نیز شناخته شده است (۳، ٦ و ۱۲).

با وجود پیشرفت‌های ایجاد شده در روش‌های کنترل و ریشه‌کنی، مایکوپلاسما سینوویه همچنان در صنعت طیور خصوصاً در گله‌های مرغ مادر از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. شکل تنفسی عفونت *مایکوپلاسما سینوویه* بیشتر به صورت عفونت تحت بالینی قسمت فوقانی دستگاه تنفس رخ می‌دهد. حالت بالینی عفونت به شکل تنفسی، خصوصاً هنگامی

که *مایکوپلاسما سینوویه* با بیماری‌های ویروسی مانند بیماری نیوکاسل یا برونشیت عفونی و یا واکسیناسیون با ویروس‌های زنده فوق همراه می‌شود، بروز می‌کند که با عفونت کیسه‌های هوایی همراه است و باعث شدیدتر شدن بیماری می‌شود. در برخی موارد، عفونت سیستمیک شده و به سینوویت عفونی منجر می‌شود که یک بیماری عفونی حاد تا مزمن ماکیان و بوقلمون‌ها است و به‌طور عمده غشاء سینوویال مفاصل و غلاف تاندون‌ها را درگیر می‌کند. متعاقب آن سینوویت اکسوداتیو و بورسیت ایجاد می‌گردد (۳، ٦ و ۸).

تشخیص به موقع مایکوپلاسما هم از جهت پرورش‌دهندگان مادر، هم پرورش‌دهندگان جوجه‌های تجارتی 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 آنتی‌بیوتیک‌هایی که روی سنتز دیواره سلولی اثر می‌کنند، مقاوم می‌باشند. شکل کلونی‌ها مثل تخم‌مرغ پخته یا تکمه‌ای شکل می‌باشد. همچنین نسبت به احتیاجات پیچیدهٔ غذایی در صورت کمبودشان مقاوم هستند. بعضی از مایکوپلاسما فقط یک نوع حیوان را آلوده می‌کنند ولی بعضی‌ها قادرند در چندین حیوان مختلف ایجاد بیماری نمایند. مایکوپلاسماها در گیاهان، جانوران و انسان و حشرات ایجاد بیماری می‌کنند. به طور عمومی مایکوپلاسماها در سطح مخاطی کلونیزه می‌شوند و اکثراً غیرمهاجم هستند ولی بعضی گونه‌ها مثل *مایکوپلاسما گالی‌سپتیکوم* قادر به سوراخ کردن سلول‌ها هستند. مایکوپلاسماها به‌طور اولیه به غشای مخاطی دستگاه تنفس و یا ادراری- تناسلی، چشم و مفاصل تمایل دارند. بسیاری از آنها به‌عنوان انگل‌های سطحی شناخته می‌شوند و به‌ندرت بافت‌ها را مورد تهاجم قرار می‌دهند. البته انتشار آنها به اندام‌های مختلف، بیانگر حداقل یک عفونت عمومی زودگذر است. به‌طور 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 نمی‌باشد (۳، ٦ و ۸).

با استناد به آنالیز توالی ژن 16S rRNA تصور می‌شود که مایکوپلاسماها حدود ٦۰۰ میلیون سال قبل با از دست دادن قسمت‌های غیر ضروری از ژنوم خود از جمله ژن‌های سنتز دیواره سلولی از باکتری‌های گرم مثبت و مشخصاً کلستریدیوم‌ها مشتق شده‌اند (۱۵).

تاکنون ۲۳ گونه مختلف مایکوپلاسما از پرندگان جدا شده که ماکیان و بوقلمون میزبان ۱٦ گونه از آنها می‌باشند. در این میان تنها چهار گونه برای طیور بیماری‌زا هستند که شامل *مایکوپلاسما گالی‌سپتیکوم*، *مایکوپلاسما سینوویه*، *مایکوپلاسما مله آگریدیس* و *مایکوپلاسما آیوا* می‌باشد. به دلیل اهمیت نقش بیماری‌زایی مایکوپلاسماهای طیور، از سال‌ها قبل برنامه ریشه‌کنی از گله‌های مولد به اجرا درآمده است. با این وجود مایکوپلاسماها در گله‌های طیور حضور داشته و عفونت مایکوپلاسمایی همچنان یک معضل بزرگ صنعت طیور محسوب شده و در صورت آلوده شدن گله‌های مولد با ارزش، ممکن است کشتار شده و یا اینکه نتاج آنها ارزش صادرات و فروش خود را از دست بدهند (۳، ٦ و ۸).

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 مطلوب برای رشد $۳۷^{\circ C}$ است. با آنالیز ژن ریبوزوم 16S rRNA می‌توان ارتباط ژنتیکی بین مایکوپلاسماها را بررسی کرد. روش کشت مایکوپلاسما پرزحمت، زمان بر، گران و نیازمند شرایط استریل است. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز روش جایگزین سریع و اختصاصی برای کشت می‌باشد. در دهه ۱۹۹۰ روش‌های مولکولی برای شناسائی مایکوپلاسمای پرندگان توصیف شد. اساس تمام آنها مبتنی بر تکثیر یا شناسائی یک قطعه خاص از ژنوم می‌باشد. در این بین ژن 16S rRNA به دلیل ثبات قابل

توجه در گونه‌ها و حتی در میان جنس مورد توجه بیشتر قرار گرفته و با تکثیر، تعیین توالی و یا استفاده از پروب امکان شناسائی ارگانیسم فراهم می‌شود (۱، ٤، ۱۲ و ١٤).

تاکنون تلاش‌های زیادی جهت شناسائی و تفریق سویه‌های *مایکوپلاسما سینوویه* صورت پذیرفته است. ژنوم مایکوپلاسماها حاوی درصد قابل ملاحظه‌ای از توالی‌های تکراری می‌باشد. به‌طور مثال، در *مایکوپلاسما ژنیتالیوم* توالی MgPa حدود ٤/٧ درصد کل ژنوم را به‌خود اختصاص می‌دهند، همچنین در *مایکوپلاسما گالی‌سپتیکوم*، تعداد بیشتر توالی و بزرگتر ژن VLhA (یا PMGA) حدود ١٠/٤ درصد از کل ژنوم را به خود اختصاص داده است. این توالی‌ها نقش خودشان را در تنوع آنتی‌ژنیکی که در سطح سلول ایجاد می‌کنند، اجرا می‌کنند و کشف اندازه آنتی‌ژنیکی و تنوع فاز احتمالاً به‌عنوان یکی از بزرگ‌ترین پیشرفت‌ها در تحقیقات مایکوپلاسماها بوده همچنین تنوع فازی یا اندازه می‌تواند نقش کلیدی در حدّت، اتصال و دفاع میزبان، برای مایکوپلاسما داشته باشد (۹، ۱۰، ۱۱، ۱۳ و ١٦).

مواد و روش‌کار

نمونه برداری و انجام RSAT

۳۷۵ نمونه سرمی از ۲۵ گله مادر گوشتی اخذ گردید و جهت انجام تست RSA به آزمایشگاه سرولوژی انتقال یافت. برای انجام تست RSA مراحل زیر انجام شد:

یک حجم از سرم (تقریباً معادل ۳۰λ) روی یک کاشی سفید ریخته و یک حجم از آنتی‌ژن رنگی *مایکوپلاسما سینوویه* به آن اضافه گردید. به منظور مخلوط نمودن آنتی‌ژن و سرم، کاشی به‌شکل دورانی تکان داده شد. در صورت وجود آنتی‌بادی علیه مایکوپلاسما سینوویه پدیده آگلوتیناسیون اتفاق می‌افتاد که با گرد هم‌آمدن ذرات معلق در مایع مشخص می‌گردید (سرم مرغ حداکثر در مدت ۲ دقیقه و سرم بوقلمون در مدت ۳ دقیقه با آنتی ژن آگلوتینه می‌شود). در خصوص تأیید تشخیص *مایکوپلاسما سینوویه* کلیه سرم‌های مثبت مرحله قبل به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری ٥٦ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و آزمایش تکرار گردید (جهت غیرفعال‌سازی واکنشگرهای غیر اختصاصی). سرم‌های مثبت مرحله قبل با PBS رقیق و آزمایش تکرار شد در صورتی‌که سرم‌ها در رقت یک هشتم با آنتی‌ژن *مایکوپلاسما سینوویه* آگلوتینه می‌شدند از نظر تست سریع مثبت و در صورت عدم آگلوتیناسیون منفی قلمداد می‌شدند. جهت تسریع و سهولت کار مراحل ٤ و ٥ ادغام شده یعنی ابتدا رقت $\frac{1}{8}$ تهیه گردید و سپس به‌مدت ۳۰ دقیقه در بن‌ماری ٥٦ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و بعد آزمایش را تکرار گردید. نتیجه این آزمایش به صورت مثبت (+) یا منفی (-) گزارش شد (٤).

نمونه‌برداری جهت PCR

جهت نمونه‌برداری برای PCR، از ۲۰ گله‌ای که ۱۹ گله آنها در تست RSA مثبت شده بودند، سوآپ‌های استریل از شکاف کامی، نای، کیسه هوایی و ریه تهیه گردید. سه سوآپ از سه پرنده داخل یک لوله آزمایش حاوی یک میلی‌لیتر PBS انداخته و به آزمایشگاه منتقل شد تا برای انجام PCR مورد استفاده قرار گیرد.

مراحل استخراج DNA به روش فنل کلروفورم

ابتدا مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از نمونه مورد نظر بعد از قرار دادن در همزن به درون میکروتیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری انتقال داده شد و جهت رسوب‌گیری به مدت ۱۵ دقیقه در۱۳۰۰۰ دور سانتریفوژ گردید (نمونه‌ها حاوی ذرات بزرگ بودند که ابتدا به مدت ۵ دقیقه در ۳۰۰۰ دور سانتریفوژ شدند و محلول رویی به تیوب جدید منتقل گردید و تیوب حاوی مواد ته‌نشین شده حذف گردید. سپس مراحل بعدی روی محلول رویی انجام گردید). پس از سانتریفوژ، تیوب‌های نمونه‌ها تخلیه گردید و در حد ۱۰۰ میکرولیتر در ته آن باقی ماند. سپس هم‌حجم مقدار باقی‌مانده (۱۰۰ میکرولیتر) در تیوب، بافر لیزکننده اضافه

گردید. سپس به خوبی مخلوط گردیده آنگاه در همزن، تکان داده شد و در بن‌ماری ٥٦ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤-٣/٥ ساعت قرار داده شد. ترکیبات تشکیل دهنده بافر لیز کننده در زیر آمده است. به ازاء هر ۲۰۰ میلی‌لیتر از محلول بالا، ۲۰ میلی لیتر پروتئیناز K اضافه گردید.

Lysis Buffer :	
Tris-Hcl	50 Mm (pH=8)
SDS	1%
NaCl	100 Mm
EDTA	50 Mm
Proteinase K	1ml (2mg/µl)

در این مرحله تریس با pH برابر ۸ نقش بافر، EDTA به عنوان مهارکننده آنزیم‌های DNAase، SDS به عنوان حل کننده چربی‌های موجود در غشاء سلول و نمونه و پروتئیناز K به عنوان هضم‌کننده پروتئین‌ها و اتصالات بین سلولی عمل می‌کند. در این مرحله نمونه‌ها حاوی DNA آزاد شده از مولکول پروتئین و چربی می‌باشند. اما هنوز مخلوطی از مواد اضافه موجود است که به آن شیره خام (crude lysate) می‌گویند.

بعد از ٤ ساعت نمونه‌ها خارج شدند و هم‌حجم آن (۱۰۰ میکرولیتر نمونه + ۱۰۰ میکرولیتر بافر لیز کننده جمعاً ۲۰۰ میکرولیتر) فنل اشباع شده به نمونه‌ها اضافه گردید تا DNA از شیره خام با استفاده از حلال‌های غیرقطبی استخراج گردد. نمونه‌ها خوب تکان داد شد و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور سانتریفوژ گردید (سانتریفوژ از نوع رومیزی معمولی بدون یخچال با دمای نزدیک به دمای اتاق بود). نمونه‌ها دو فاز تشکیل دادند که به آرامی با سمپلر فاز رویی کشیده شد و به تیوپ جدید انتقال یافت و فاز زیر آن به همراه تیوب دور انداخته شد. هم‌حجم با فاز رویی که توسط سمپلر کشیده شده بود (در حد ۱۵۰ میکرولیتر)، به تیوب، مخلوط فنل- کلروفورم (که از قبل به نسبت مساوی با هم مخلوط شده‌اند) اضافه شد. تیوب‌ها به خوبی تکان داده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور سانتریفوژ گردید.

نمونه‌ها دو فاز تشکیل دادند که به آرامی با سمپلر فاز رویی کشیده شد و به تیوپ جدید انتقال یافت و فاز زیر آن به همراه تیوب دور انداخته شد. هم‌حجم با فاز رویی که توسط سمپلر کشیده شده بود (در حد ۱۵۰ میکرولیتر)، به تیوب، کلروفورم اضافه شد. تیوب‌ها به خوبی تکان داده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور سانتریفوژ گردید.

محلول رویی با سمپلر کشیده شد و به تیوب‌های جدید انتقال یافت. یک دهم حجم آن استات سدیم ۳ مولار جهت تغلیظ و ته‌نشین کردن DNA اضافه شد (محلول استات سدیم باعث یونیزه شدن DNA گشته و حل شدن آن را کاهش می‌دهد) و به آرامی مخلوط گردید و دو برابر حجم نمونه، الکل مطلق ۱۰۰-۹٦ درجه سرد اضافه شد. به مدت ۲۰- ۱۵ دقیقه نمونه‌ها در فریزر ۲۰ درجه سانتی‌گراد زیر صفر قرار داده شد. نمونه‌ها از فریزر خارج گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور سانتریفوژ شد (سانتریفوژ از نوع رومیزی معمولی بدون یخچال با دمای نزدیک به دمای اتاق بود). مایع رویی تیوپ تخلیه شد و بعد از تکان دادن، جهت خشک شدن الکل موجود در تیوپ، زیر هود قرار داده شد (باید دقت گردد تا نمونه موجود در تیوپ بیش از حد خشک نگردد چون باعث شکسته شدن DNA می‌گردد که برای انجام مطالعه مطلوب نمی‌باشد). ۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به نمونه (DNA) اضافه شد و به یخچال انتقال یافت (در صورتی‌که فاصله زمانی آزمایش طولانی باشد نمونه‌ها باید در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شوند (۳، ٦، ۷، ۱۲ و ١٤).

VlhA-PCR و تشخیص گونه *مایکوپلاسما سینوویه*

به منظور تأیید نمونه‌ها از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز استفاده شد. پرایمرهای استفاده شده اختصاصی ژن VlhA-PCR در *مایکوپلاسما سینوویه* بودند و این پرایمرها جهت

شناسائی MS در کشت خالص و یا نمونه بالینی استفاده شده‌اند (۵، ۱۰ و ۱۳). پرایمرها عبارت بودند از:

نام پرایمر	توالي نوکلئوتيدي
MScons-F	TACTATTAGCAG CTAGTGC
MScons-R	AGTAACCGATCCGCTTAAT’

تمامی راکسیون‌ها در ترموسایکر Gradient Mastercycler (Eppendroff، آلمان) انجام گرفت و برنامه آن به‌صورت زیر بود:

نام مرحله	درجه حرارت	مدت زمان	تعداد چرخه
دناتوراسیون اولیه	۹٤	۲‘	۱
دناتوراسیون ثانویه	۹٦	۱۵“	۳۵
اتصال پرایمر	٥٤	۱۵“	۳۵
گسترش اولیه	۷۲	۲۰“	۳۵
گسترش نهایی	۷۲	٥‘	۱

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد و در تمامی موارد کنترل‌های مثبت و منفی هم‌زمان استفاده شد و اجزاء آن عبارت بودند از:

Water	17.36µl
PCR Buffer (10X)	2.50 µl
dNTP (10mM)	0.75 µl
F primer (20 pmole/ µl)	0.15 µl
R primer (20 pmole/ µl)	0.15 µl
Taq DNA polymerase (5U/ µl)	0.10 µl
MgC12 (50mM)	2.00 µl
Template DNA	1.94 µl

الکتروفورز

قالب ژل آگاروز

صفحات شیشه‌ای، شانه و تیغه‌های کناری را با استفاده از یک ماده شوینده کاملاً تمیز شد (ضخامت شانه و تیغه کناری باید یکسان باشد) و با استفاده از آب مقطر دیونیزه آبکشی گردید. صفحات شیشه‌ای با استفاده از اتانول ۹۵ درجه کاملاً آبگیری شد و در مجاورت هوا خشک شد. قالب ژل از طریق قرار دادن تیغه‌های کناری در سطح داخلی صفحه پشتی و سپس قرار دادن صفحهٔ رویی بر روی تیغه‌ها بسته شد. به‌طوری‌که تیغه‌ها کمی خارج‌تر از لبه پلیت‌های شیشه‌ای قرار داده شد به‌طوری‌که پس از قرار دادن صفحهٔ شیشه‌ای روبی تیغه‌ها به آرامی فشار داده شد تا در جای خود بین دو صفحه قرار گیرند. اطراف و زیر قالب با استفاده از یک نوار چسب با کیفیت خوب آب‌بندی شد. (۱).

آماده کردن مخلوط ژل آگارز

ژل مورد استفاده در این تحقیق آگارز ۲ درصد بود که با توجه به درصد مورد نظر پودر آگارز توزین شده و به آن بافر TBE (Tris base, boric acid and ETDA) اضافه شد (۲ گرم پودر آگارز در ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول آگارز).

برای تهیه TBE 2٪ از TBE ۲۵٪ استفاده شد به‌طوری‌که ۲۰ میلی‌لیتر از این محلول با ٤۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط گردید. برای آماده کردن ژل ابتدا ۰/۳۵ گرم از ژل آگارز (Agarose MP،Roche) در ۳۵ میلی‌لیتر از بافر TBE ۲٪ در یک ارلن ریخته شد و با استفاده از حمام آب‌جوش حرارت داده شد. حرارت دادن تا حل شدن کامل آگارز ادامه یافت. پس

از سرد شدن دمای آن به حدود ۵۰ درجه، ۱/۷ لاندا اتیدیوم بروماید (ETBr) به آن اضافه شد (این نسبت‌ها برای یک کیت حاوی ژل ۱۵ گودی کافی می‌باشد). سپس محلول با دقت و به آرامی بدون ایجاد حباب هوا در قالب ژل ریخته شد. برای این منظور از حذف کننده حباب‌های هوا (Air bubble remover) استفاده گردید. از تراز سنج جهت یکنواخت پخش شدن ژل در تمام سطوح تانک الکتروفورز استفاده گردید. سپس در ژل و در محل خود قرار داده شد و تا جامد شدن کامل، ژل در دمای اتاق قرار گرفت. پس از آن شانه خارج و ژل در دستگاه الکتروفورز قرار گرفت و محلول ۲٪ TBE تا پوشاندن کامل سطح ژل در تانک ریخته شد. ۱۰ µl از محصول PCR با دو میکرولیتر از بافر بارگذاری (Loading buffer) مخلوط (محلول 1x) و در گوده‌های ژل قرار داده شد. پس از اتمام بارگذاری نمونه‌ها، الکترودها به منبع تغذیه متصل شده، ژل در جریان ثابت ۱۰۰ ولت به مدت ٤٥ دقیقه قرار گرفت. ژل روی دستگاه UV (BioRAD, Bio-Rad Lab.- California, USA) قرار گرفته و از آن عکس تهیه شد.

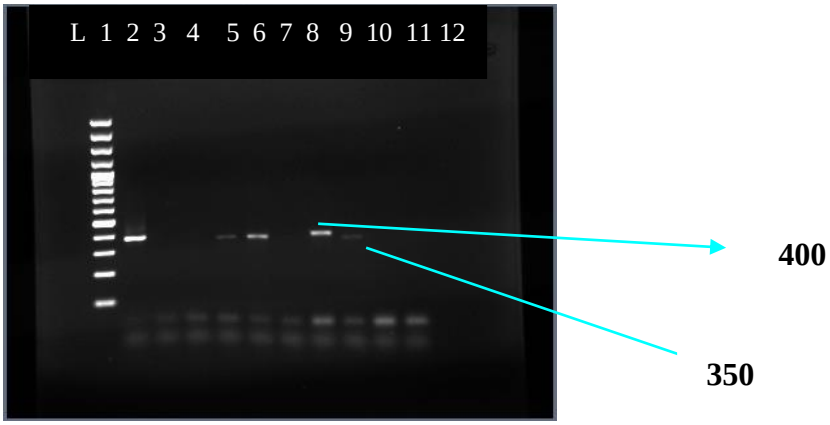
نتایج

نتایج حاصل از تست RSA:

از ۳۷۵ نمونه سرمی اخذ شده از ۲۵ فارم، ۱۹ فارم در تست RSA مثبت شدند. به‌طور کلی از ۳۷۵ نمونه اخذ شده، ۱٤۳ نمونه در تست RSA مثبت، ۲۰۳ نمونه منفی و از ۲۹ نمونه سرمی مشکوک، ۱۰ نمونه در رقت یک هشتم مثبت اعلام گردیدند.

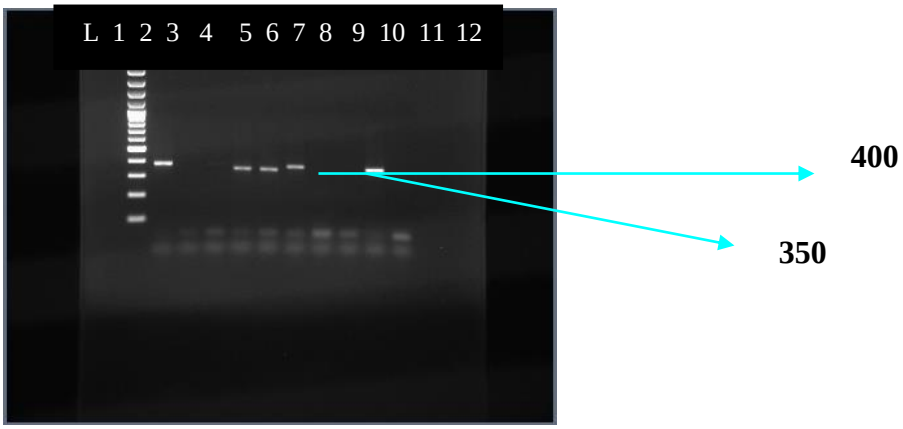
نتایج حاصل از VlhA-PCR و تشخیص گونه *مایکوپلاسما سینوویه*:

به منظور تأیید نمونه‌ها از روش PCR استفاده گردید. در این تحقیق تعداد ۲٤۰ نمونه اخذ گردید که از این تعداد ٤۸ نمونه (۸ فارم) معادل ۲۰ درصد در PCR باند ٤۰۰-۳۵۰ را بر روی ژل آگارز نشان دادند که نشان دهنده حضور *مایکوپلاسما سینوویه* است و MS-H نیز در این بازه قرار دارد. (نگاره‌های ۱ و ۲)



نگاره ۱- محصول PCR ژن VLhA با استفاده از پرایمرهای خارجی MSConsR و MSConsF

L: Gene Ruler 100 bp plus DNA ladder, Lane 1: Positive control (MS-H), Lane 2: Negative control, Lane 3-12: Field Isolated



نگاره ۲- محصول PCR ژن VLhA با استفاده از پرایمرهای خارجی MSConsR و MSConsF

L: Gene Ruler 100 bp plus DNA ladder, Lane 1: Positive control (MS-H), Lane 2: Negative control, Lane 3-12: Field Isolated

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به اهمیت بیماری *مایکوپلاسما سینوویه* از جنبه اقتصادی و با توجه به ایجاد بیماری‌های تنفسی و مفصلی و با در نظر گرفتن تحمیل هزینه‌های درمانی دو چندان و عدم پاسخ‌دهی مناسب و عدم بروز حداکثر عملکرد پرندگان آلوده به این باکتری، استفاده از روش‌های مبتنی بر شناسایی DNA برای تشخیص *مایکوپلاسما سینوویه* به‌طور مستقیم از بافت یا جدایه‌های آزمایشگاهی ضروری به نظر می‌رسد (۱). اگرچه می‌توان از پروب برای شناسائی *مایکوپلاسما سینوویه* استفاده نمود اما روش بسیار معمول، تکثیر قطعه اختصاصی از ژنوم باکتری است. برای این منظور کیت‌های تجاری نیز در دسترس هستند (۱). روش‌هایی برای تشخیص همزمان انواع مایکوپلاسما در نمونه‌های بالینی ابداع شده است که از آن جمله می‌توان به PCR چندگانه و PCR-RLFP اشاره کرد. نتایج PCR ظرف یک تا دو روز مشخص می‌شود در حالی‌که برای کشت و تعیین هویت ارگانیسم یک تا سه هفته زمان نیاز است. همچنین PCR قادر است نتایج دقیقی در حضور عفونت‌های مخلوط با چندین مایکوپلاسما، آلودگی با عفونت‌های باکتریایی ثانویه، مهارکننده‌های رشد مایکوپلاسما مثل آنتی بادی، آنتی بیوتیک، یا سایر عوامل میزبانی ارائه دهد (۱ و ۱۲). به‌ویژه رشد مایکوپلاسماهای ساپروفیت که رشد سریع‌تری در محیط غنی شده نسبت به *مایکوپلاسما سینوویه* دارند از مهم‌ترین مشکلات کشت می‌باشد.

تحقیقات زیادی درباره تشخیص مایکوپلاسما سینوویه صورت گرفته و روش‌های مختلفی نیز ارائه شده، به‌طوری که Ricardo و همکاران، روش‌های مختلفی همچون SPA, HI, ELISA و PCR را بررسی نمود و در این میان PCR را سریع‌تر و بهتر معرفی نمودند و در میان روش‌های PCR، بهترین نتیجه با سواب‌های تیمار شده با PBS به‌دست آمد و اعلام کردند روش استفاده از فنول برای استخراج DNA با روش غیر فنولی یکسان است (۱۵).

در سال ۱۹۹۳ Lauerman و همکاران از روی توالی ۱٦S,rRNA پرایمرهای اختصاصی گونه مایکوپلاسما را با نام‌های MS-1 و MS-2 طراحی کردند و بیان نمودند

حساسیت تست PCR با استفاده از این دو پرایمر ۸۲ درصد و اختصاصی بودن آن در مقایسه با تست‌های دیگر همچون روش کشت مایکوپلاسما SPA HI ,Elisa ۱۰۰ درصد می‌باشد (۱۰).

در سال ۲۰۰٤ Yang Hong و همکاران انتهای N ترمینال، ژن VlhA را که هماگلوتینین را کد می‌کند، به‌عنوان قسمت آلترناتیو *مایکوپلاسما سینوویه* در نظر گرفتند و از آن به‌عنوان نشخیص و شروعی برای تایپینگ نمونه فیلدی *مایکوپلاسما سینوویه* در طیور تجاری استفاده نمودند (۱۷).

Nathan Jeffery و همکاران در سال ۲۰۰۷ با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن VlhA و همچنین با استفاده از آزمون SSCP در میان ۳۵ جدایه‌های مختلف مایکوپلاسما سینوویه توانستند این جدایه‌ها را در ۱۰ پروفایل A تا J قرار دهند که باند حاصله از این پرایمرها ٤۰۰ جفت بازی است و جدایه‌های استرالیا در پروفایل A تا D قرار گرفتند در صورتی که جدایه‌های آمریکا در یکی از پروفایل‌های I، H، G، F، E و J قرار گرفتند.

آنها از روش آنالیزی HRM استفاده نمودند و اظهار داشتند که استفاده از PCR بر پایه SSCP یا HRM ژن VlhA بیشترین جهش‌ها را در میان جدایه‌های مایکوپلاسما سینوویه مشخص می‌کند. طبق نظر ایشان آنالیز HRM روشی سریع و مؤثر است که می‌توان در یک لوله در عرض کمتر از یک ساعت آن را انجام داد (۵).

Ben Abdelmoumen Mardasi و همکاران در سال ۲۰۰۵ با تأکید بر روی ژن VlhA و با استفاده از PCR دوبل از پرایمرهای MS1.2R0 MS1.2F0 و MS1-2R1i MS1-2F1i برای تشخیص *مایکوپلاسما سینوویه* استفاده کردند و بیان نمودند که این روش به حد کافی حساس و اختصاصی است که بتوان با استفاده از این پرایمرها در عفونت‌های توأم، *مایکوپلاسما سینوویه* را از *مایکوپلاسما گالی‌سپتیکوم* تفریق نمود (۲).

در این مطالعه، به منظور تأیید نمونه‌ها از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز استفاده شد. پرایمرهای استفاده شده اختصاصی ژن VlhA در *مایکوپلاسما سینوویه* بودند و این پرایمرها جهت شناسائی *مایکوپلاسما سینوویه* در کشت خالص و یا نمونه بالینی استفاده شده‌اند. با استفاده از این پرایمرها تمام سویه‌های فیلدی، محصول PCR ٤۰۰-۳۵۰ جفت بازی را تشکیل دادند (۱۳).

آزمون VlhA-PCR جهت تشخیص گونه مایکوپلاسما سینوویه با حساسیت ۹۸ درصد با پرایمرهای اختصاصی MScons-F و MScons-R با توجه به تشکیل باند ٤۰۰-۳۵۰ جفت بازی برای تمامی جدایه‌های فیلدی در این مطالعه و سویه واکسینال MSH، با توجه به مطالعه Jeffery و همکاران در ۲۰۰۷ و نتایج حاصل از این مطالعه، می‌تواند با حساسیت بالا مورد استفاده قرار گیرد (۵).

فهرست منابع

۱. حسینی، ا. (۱۳۸٦): تعیین هویت مولکولی *مایکوپلاسما سینوویه* جدا شده از مرغداری‌های صنعتی استان مازندران، رساله دکترای تخصصی بیماری‌های طیور، دانشکده دامپزشکی دانشگاه علوم تحقیقات تهران، صفحات: ۸۹-۱.

2. Ben, B., Abdelmoumen Mardassi, R., Ben Mohamed, I., Gueriri, S. and Boughattasand B. (2005): Duplex PCR to differentiate between *mycoplasma synoviae* and *mycoplasma gallisepticum* on the basis of conserved species-specific sequence of their hemagglutinin gene,journal of clinical microbiology, pp: 48-958.
3. Bradbury, Y. (2001): Avian Mycoplasma. Work shop of European Mycoplasma specialist. World poultry Sci.J., 61: 355-357.
4. Fiorentin, L., Mores M., Trevison, I.M. and Antunes, S.C. (2003): Test profiles of broiler breeder flocks housed in farms with endemic *Mycoplasma synoviae* infection. Brazilian journal of poultry science, pp: 38-49.
5. Nathan, J. and Gasser, R. (2007): Classification of *mycoplasma synoviae* strains using single-strand conformation polymorphism and high-resolution melting-curve andlysis of the VlhA gene single-copy region, Microbiology, 153: 2679-2688.
6. Jordan, F., Mark, P., Denis A. and Trevor, F. (2002): Poultry Disease, fifth Edition, p: 178-193
7. Kiss, I., Matiz, K., Kaszanitsky, E., Chavez, Y. and Johnsson, K.E. (1997): Detection and identification of avian mycoplasma by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism assay. Vet. Microbial. pp
8. Kleven, S.H. (2008): Mycoplasmosis.In: Saif, Y.M., Barnes, H.J., Gilsson, J.R., Fadly, A.M., Mc Dongald, L.R. and swayne, D.E. Diseases of Poultry. 12th.ed. Iowa state university press (A Blackwell Publishing Company). pp: 719-722.
9. Lockaby, S.B., Hoerr, F.J., Lauerman, L.H., Smith, B.F., Samoylov, A.M., Toivio-Kinnucan, M.A.and et al (1999): Factors associated with virulence of Mycoplasma synoviae. Avian Dis. Apr-Jun, 43(2): 251-256.
10. Lauerman, H., Sharpton, A. (1993): Development and application of a polymerase chain reaction assay for mycoplasma synoviae, avian disease, vol. 37: 829-834.
11. Noormohamadi, A.H., Markham, P.F., Kanci, A., Whither, K.G. and Browing, G.F. (2002): A novel mechanism for control of antigenic variation in the hemagglutining gene family of Mycoplasma synoviae. Mol. Microbial. 35: 911-923.
12. Noormohamadi, A.H., Hemmatzadeh, F. and Whither, K.G. (2007): Safety and Efficacy of the Mycoplasma Synoviae MS-H Vaccine in Turkeys. Avian Disease Preprint; N/A-N/A.
13. OIE terrestrial manual. (2008): Avian mycoplasmosis, chapter ۳.۵.۶. pp: 482-512.
14. Ramirez, A., clive J., Naylor, P., Hammond, j. and Bradbury, M. (2006): Development and evaluation of a diagnostic PCR for Mycoplasma synoviae using primers located in The intergenic spacer region dna 23s rRNA gene. Veterinary Microbiology, 118: 76-82.
15. Ricardo, M. and Silveria, L.F. (1996): polymerase chain reaction optimization for mycoplasma synoviae diagnosis,avian disease , vol 40:218-222.
16. Senties-Cue, G., Shivaprasad, H.L., Chin, R.P. (2005): Systemic Mycoplasma synoviae infection in broiler chickens. Avian Pathol. Apr; 34(2): 137-42.s
17. Yang Hong ,Marcarmen Garcia, (2004): Specific Detection and typing of mycoplasma synoviae strains in poultry with pcr and DNA sequence analysiss targeting the Hemagglutinin encoding Gene VlhA, Avian Disease, vol, 48:606-616.
18. Yogev, D., Levision, S., Kleven, S.H., Halachmi, D. and Razhn, S. (1998): Ribosomal RNA gene probes to detect intraspecies heterogenecity hn Mycoplasma gallisepticum and Mycoplasma synoviae. Avian Disease; 32: 220-231.

Vet. J. of Islamic Azad Uni. Tabriz Branch. 3, 4:673-681, 2010

Detection of *Mycoplasma synoviae* in clinical samples by VlhA-PCR method

Ansari, H.[1], Pourbakhsh, S.A.*[2], Sheikhi, N.[3], Bozorgmehri Fard, M.H.[3], Ashtari, A.[4]

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

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

(Received: 2009/12/11, Accepted: 2010/5/24)

Abstract

As one of the major pathogens of avian species, *Mycoplasma Synoviae* causes significant economic losses to the poultry industry. The main purpose of this study was to detect *Mycoplasma Synoviae* in clinical samples using the VlhA-PCR method. For serological screening test, 373 serum samples were collected from 25 breeder farms and rapid serum agglutination test conducted which revealed that 143 samples equivalent to 19 breeder farms were positive. For VlhA-PCR assay, 20 of the previously mentioned breeder farms were selected and sterile swab were collected from the palatine cleft, trachea, air sacs and lungs. Three swabs from 3 birds were placed in a test tube containing 1 ml of PBS and transferred to the laboratory for PCR test. Specific primers for VIhA gene were employed in this study. The PCR product from specific primers showed 350-400 bp for all field isolated on electrophoresis gel in 8 farms. VlhA-PCR with high sensitivity could be employed in definitive diagnosis of *Mycoplasma Synoviae* infection in the laboratory.

Keywords: *Mycoplasma synoviae*, Clinical samples, PCR, VlhA gene