JVM Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره سیزدهم، شماره دوم، ۱۳۹۶، پیاپی ۳۵: ۳۸-۲۹

شناسایی عفونت مایکوپلاسما سینوویه در مرغان مادر گوشتی واکسینه شده

منصور میاحی*[۱]، زهرا برومند [۱]، سید علی پوربخش [۲]، رمضان علی جعفری [۱]، حسین گلیوری [۳]

۱- گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۲- آزمایشگاه مرجع مایکوپلاسما، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی‌رازی کرج، ایران

۳- دانشجوی دوره دکترای تخصصی بهداشت و بیماری‌های طیوردانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۰/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۲/۱۳

چکیده

مایکوپلاسما سینوویه یکی از مهمترین عوامل بیماری‌زای پرندگان است و خسارت‌های اقتصادی زیادی را به صنعت مرغداری وارد می‌کند، این مطالعه با هدف تشخیص احتمالی آلودگی گله‌های مرغ مادر گوشتی واکسینه شده و نتاج آن‌ها به سویه‌های وحشی مایکوپلاسما سینوویه و بررسی کارایی واکسن ضد مایکوپلاسما سینوویه در گله‌های مرغ مادر گوشتی انجام شد. به همین منظور در سنین ۴۰ و ۶۰ هفتگی هر نوبت ۲۰ سواپ نای و ۲۰ نمونه خون از ۲۰ مزرعه مرغ مادر گوشتی واکسینه شده بر ضد مایکوپلاسما سینوویه و نتاج آن‌ها گرفته شد. تمام گله‌های مورد آزمایش قبل از واکسیناسیون از نظر عدم آلودگی به مایکوپلاسما سینوویه تأیید شده بودند. سواپ نای به لوله‌های درپوش‌دار حاوی محیط انتخابی مایکوپلاسما منتقل شده و در دمای ۴ درجه سانتی گراد در کم‌تر از ۲۴ ساعت به آزمایشگاه ارسال شدند. در آزمایشگاه میزان پادتن ضد مایکوپلاسما سینوویه به ۲ روش آزمایش آگلوتیناسیون سریع روی لام و الیزا اندازه‌گیری شد. نمونه‌های سواپ‌های نای توسط آزمون High Resolution Melting)HRM با استفاده از ژن vlhA، به منظور تفریق سویه‌های واکسن و سویه‌های وحشی مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد واکسیناسیون گله‌های مادر به خوبی توانسته تا سن ۴۰ هفتگی گله‌ها را از ابتلا به بیماری محافظت و عیار پادتن مناسبی ایجاد نماید ولی با افزایش سن میزان محافظت کاهش یافت و یک مزرعه گله‌ی مادر (۵٪) در سن ۶۰ هفتگی و نتاج آن آلودگی به مایکوپلاسما سینوویه متمایز از میکوپلاسما سینوویه به کار رفته در واکسن زنده را نشان دادند. این مطالعه نشان داد واکسیناسیو ن با واکسن‌های فعلی ضد مایکوپلاسما سینوویه نمی‌تواند حفاظت کامل در مادران گوشتی در سنین بالا ایجاد نماید و احتمال انتقال آلودگی به نتاج نیز وجود دارد و گله‌های واکسینه شده باید به روش‌های مولکولی کنترل و بررسی شوند.

کلمات کلیدی: *مایکوپلاسما سینوویه، گله مادر گوشتی، آگلوتیناسیون سریع، الایزا، HRM PCR*

* نویسنده مسئول: منصور میاحی

آدرس: استاد علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز. تلفن:

پست الکترونیک: mansoormayahi@scu.ac.irm_mayahi@yahoo.com

مقدمه

باکتری مایکوپلاسما سینوویه، از جنس مایکوپلاسما، یکی از گونه‌های کلاس Mollicutes، در رده‌ی mycoplasmatales می‌باشد. این باکتری یک سروتیپ دارد ولی بین سویه‌های آن هتروژنی وجود دارد و تمایلات بافتی و بیماری زایی آن نیز متفاوت می‌باشد (۱۶). در این بیماری انتقال افقی و عمودی وجود دارد. انتقال جانبی به آسانی و از طریق تماس مستقیم رخ می‌دهد. انتقال عمودی نیز در ماکیانی که به شیوه تجربی و عمودی آلوده می‌شوند رخ می‌دهد (۵). اولین بار اولستن، سینوویت عفونی مرتبط با *مایکوپلاسما سینوویه* را توصیف کرد. ماکیان و بوقلمون‌ها میزبان طبیعی آن می‌باشند. عفونت طبیعی در ماکیان در سنین پایین و حتی در یک هفتگی مشاهده شده است ولی به طور معمول عفونت‌های حاد هنگامی مشاهده می‌شوند که ماکیان ۷-۴ هفته سن داشته باشند. در گله‌های ماکیان با مشکلات بالینی سینوویت بین ۲ تا ۷۵ درصد متغییر است و به طور معمول ۵ تا ۱۵ درصد می‌باشد. درگیری تنفسی معمولاً بدون نشانه است اما ۱۰۰-۹۰ درصد پرندگان ممکن است آلوده شوند و مرگ و میر ۱ تا ۱۰ درصد است (۲۰ و ۲۱). هنگامی که این عفونت با بیماری نیوکاسل، برونشیت عفونی یا هر دو ترکیب شود می‌تواند سبب ضایعات کیسه‌های هوایی شود. در سایر مواقع، درگیری مایکوپلاسما سینوویه سیستمیک می‌شود و منجر به سینوویت عفونی و بیماری عفونی حاد تا مزمن در ماکیان و بوقلمون شده که در این صورت ابتدا غشاهای سینوویالی مفصلی و صفحات تاندونی درگیر می‌شود و در نهایت ممکن است به سینوویت اگزوداتیو، تنوواژینیت و یا بورسیت منجر شود (۹). لنگش و بیماری‌های تنفسی که در این آلودگی رخ می‌دهد، می‌تواند منجر به کاهش میزان رشد، کاهش تولید تخم و خسارت اقتصادی در شرایط صنعتی پرورش ماکیان شود. در گله‌های مادر گوشتی می‌تواند منجر به عفونت مایکوپلاسما سینوویه در نای جوجه‌های یک‌روزه، تخم‌های نابارور و مرگ جنینی در ۲۱-۶ روز پس از تلقیح شود (۲۰) و هنگامی که گله‌های مادر تجاری در طی تولید تخم آلوده شوند به نظر می‌رسد بالاترین میزان انتقال از طریق تخم در ۴-۶ هفته پس از عفونت می‌باشد (۴).

واکسنی از یک سویه زنده حساس به حرارت به نام MS-H از جدا شده از مزرعه در استرالیا به منظور پیش-گیری از وقوع بیماری در گله‌های مولد و جلوگیری از انتقال بیماری به تخم مرغ‌ها و نهایتاً جوجه‌های گوشتی تهیه شده است (۱۴) و بی خطر بودن و کارایی این واکسن در آزمایشگاه و در شرایط مزرعه اثبات شده است (۱۰،۱۱ و ۱۲) و مشخص شده ایمنی محافظت کننده ۴-۳ هفته پس از واکسیناسیون به وجود می‌آید و حداقل برای ۴۰ هفته دوام دارد (۷ و ۸). با این وجود، به دلیل اهمیت بالای انتقال عمودی در این بیماری، بازرسی و حذف گله‌های مادر آلوده به سویه‌های وحشی بهترین روش برای پیش‌گیری در مزارع پرورش طیور می‌باشد. یکی از بزرگترین مشکلات واکسن، مثبت نشان دادن گله‌های واکسینه شده در آزمایشات غربالگری می‌باشد، لذا شناسایی و حذف گله‌های آلوده با روش‌های غربال‌گری مرسوم همانند روش‌های سرولوژی امکان پذیر نمی‌باشد. تقریباً ۴-۲ هفته زمان برای گسترش پادتن در پرنده عفونی شده نیاز می‌باشد (۱۰) شناسایی مستقیم DNA مایکوپلاسما سینوویه در بافت‌ها و محیط کشت با استفاده از پرآب DNA توصیف شده است. این روش شناسایی، روش ساده و سریع برای شناسایی این ارگانیسم می‌باشد، اما ممکن است حساسیت کافی را نداشته باشد. روش PCR ساده،

سریع، با حساسیت بسیار بالا برای شناسایی DNA مایکوپلاسما سینوویه در بافت و یا محیط کشت می‌باشد. جدایه های مایکوپلاسما سینوویه از طریق تجزیه و تحلیل محدودالاثر DNA می‌توان تمایز داد (۱۳) تجزیه و تحلیل قسمت‌های حفاظت شده ژن VlhA به وسیله سکانس مستقیم و سایر تکنیک‌ها مکرراً برای شناسایی جدایه ها به کار رفته است (۶). این مطالعه با هدف تشخیص احتمالی آلودگی گله‌های مرغ مادر گوشتی واکسینه شده و نتاج آن‌ها به سویه-های وحشی *مایکوپلاسما سینوویه* و بررسی کارایی واکسن ضد *مایکوپلاسما سینوویه* در گله‌های مادر گوشتی واکسینه شده انجام شد.

مواد و روش کار

روش نمونه‌برداری

از ۲۰ مزرعه گله مرغ مادرگوشتی واکسینه شده در کشور که قبل از واکسیناسیون عدم آلودگی آن‌ها به مایکوپلاسما سینوویه تأیید شده بود در ۲ نوبت در سنین ۴۰ و ۶۰ هفتگی، ۲۰سواب نای (سواب در لوله آزمایش استریل) و ۲۰ نمونه-ی خون از هر مزرعه و نتاج آن‌ها گرفته شد. سواب نای به لوله‌های درپوش دار حاوی ۳ میلی لیتر محیط PPLO براث منتقل شدند و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در کمتر از ۲۴ ساعت به آزمایشگاه ارسال شدند. سپس به مدت۳۰ ثانیه ورتکس شدند و سواب خارج شد. نمونه‌ها به صورت الیکوت‌های ۰/۵ میلی لیتری جهت خالص سازی DNA آماده سازی شدند (۵). نمونه‌های سرمی در کمتر ۲۴ ساعت به آزمایشگاه انتقال داده شدند و حداکثر طی ۴۸ ساعت مورد آزمایش RSA و الیزا قرارگرفتند.

روش آزمایش‌های سرولوژی

آزمون آگلوتیناسیون سریع سرم روی لام

برای جداسازی سرم خون مرغان مادر گوشتی و نتاج آن‌ها، نمونه‌ها با دور RPM ۱۸۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و سرم‌ها جمع‌آوری شده ودر میکروتیوپ تا هنگام آزمایش نگه‌داری شدند. قبل از انجام آزمایش، سرم ها در دمای اتاق قرار گرفته تا دمای سرم‌ها با دمای آنتی‌ژن مایکوپلاسما سینوویه یک‌سان شود. جهت انجام آزمایش یک حجم سرم (تقریباً معادل ۳۰ میکرولیتر) روی یک لام ریخته و یک حجم از آنتی‌ژن رنگی مایکوپلاسما به آن اضافه شد. به منظور مخلوط نمودن آنتی‌ژن و سرم، لام به شکل دورانی تکان داده شد در صورت مثبت بودن در مدت دو تا سه دقیقه پدیده آگلوتیناسیون اتفاق می‌افتاد. قبل از آزمایش، جهت غیرفعال‌سازی واکنش‌گرهای غیر اختصاصی، کلیه سرم‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در بن‌ماری ۵۶ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد (۱۳). برای حصول اطمینان و اخذ نتیجه کامل، آزمایش با رقت ۱/۸ تکرار گردید

آزمایش الیزا

جهت انجام این آزمایش از کیت symbiotic استفاده شد و طبق دستورالعمل شرکت سازنده مراحل آزمایش انجام گردید.

جداسازی و شناسایی مایکوپلاسما سینوویه

نمونه‌های سواپ نایی توسط آزمون HRM با استفاده از ژن vlhAPCR(توالی یک ناحیه محافظت شده با یک کپی در ژن *vlhA* مایکوپلاسما سینوویه) بررسی شدند (۸). نمونه‌ها ابتدا برای یک دوره کوتاه شش ساعته در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوباسیون شدند و تمامی محیط‌های حاوی نمونه توسط فیلترهای مخصوص فیلتراسیون،، سپس pplo براث با ۶/۷PH–۸ به محیط‌ها اضافه شد، این محیط‌ها در انکوباتور CO2 دار قرار گرفتند و ۱۰–۷ روز تحت نظر بودند و با مشاهده تغییر رنگ، نمونه به محیط pplo آگار انتقال یافتند. علاوه بر آن پاساژ مجدد در محیط pplo براث انجام شد.

استخراج DNA

استخراج DNA نمونه‌های مورد مطالعه با استفاده از روش فنل- کلروفرم و در سه مرحه آزاد سازی DNA، حذف مواد آلی و حذف املاح - تغلیظ DNA انجام گرفت. برای این منظور ۰/۵ میلی لیتر از محیط براث حاوی نمونه بمدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. به رسوب حاصله ۱۰۰ میکرولیتر PBS (بافر فسفات سالین) افزوده شد. پس از آن، به میزان هم حجم، بافرلایز کننده به سوسپانسیون حاصله اضافه گردید و لوله‌ها در بن ماری ۵۶C انکوبه شد. بعد از گذشت ۴ ساعت نمونه‌ها از بن ماری خارج و هم حجم محتویات لوله‌های حاوی نمونه، فنل اشباع اضافه و مخلوط حاصله پس از انجام ورتکس به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. پس از سانتریفوژ فاز فوقانی برداشت شد و به لوله‌های جدید انتقال یافت. به هریک از لوله‌ها به میزان هم حجم محتویات، مخلوط فنل- کلروفرم (با نسبت ۱ به ۱) افزوده شد. سانتریفوژ مخلوط حاصله، پس از انجام ورتکس، بمدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور انجام گرفت. مجدداً" فاز فوقانی برداشت شد و به لوله‌های جدید منتقل گردید. به هریک از لوله‌ها کلروفرم به میزان هم حجم محتویات اضافه شد. پس از انجام ورتکس، مخلوط حاصله در ۱۳۰۰۰ دور بمدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. فاز فوقانی به لوله‌های جدید انتقال یافت و به میزان یک دهم حجم محتویات، استات سدیم ۳ مولار به لوله‌ها اضافه شد و بخوبی مخلوط گردید. سپس اتانول سرد و خالص به میزان دو برابر حجم محتویات اضافه گردید. لوله‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در ۲۰C- قرار داده شد. سپس ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. کل محتویات مایع داخل لوله‌ها به آرامی تخلیه شد. در ادامه ۲۰۰ میکرولیتر الکل اتانول ۷۰ درصد به DNA ته لوله‌ها اضافه گردید و پس از سر و ته کردن محتویات، بمدت ۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ انجام گرفت. سپس لوله‌ها کاملاً" تخلیه و به صورت وارونه قرار داده شد تا جداره آنها خشک شود. لوله‌های حاوی DNA پس از افزودن ۵۰ میکرو لیتر آب مقطر استریل جهت نگهداری تا زمان آزمایش به یخچالC ۴ (در صورت نگهداری طولانی مدت فریزر ۲۰C-) انتقال داده شد (۱۵).

آمپلیفیکاسیون PCR و آنالیز نمودار HRM

از دو پرایمر الیگونوکلئوتیدی به نام‌های Link (5′- TACTATTAGCAGCTAGTGC-3′) و MSCons-R (59-AGTAACCGATCCGCTTAAT- 39) به منظور آمپلیفیکاسیون ۴۰۰-۳۵۰ جفت باز انتهای ′5 حفاظت شده تک رونوشت ژن‌های vlhA مایکوپلاسما سینوویه استفاده شد. آمپلیفیکاسیون در ۲۰ میکرولیتر حجم واکنشی شامل ۲ میکرولیتر بافر PCR ۱۰X، ۱ میکرولیتر پرایمر مخلوط شده (µM۲۵)، ۰/۲ میکرولیتر dNTP mM۱۰، ۱ میکرولیتر کلرید منیزیم ۵۰ mM، ۱/۶ میکرولیتر زنجیره نوکلئیک اسید SYTO ۹ سبز، ۰/۲۵ میکرولیتر DNA پلیمراز تگ (۵ واحد در هر میکرولیتر) و ۲ میکرولیتر DNA تمپلیت. تمام واکنش‌های آمپلیفیکاسیون و آنالیز منحنی ذوب با رزولوشن بالا در ترموسایکلر Rotor Gene (RG6000, Corbette Research) انجام گرفت. ترکیب واکنشی در دمای ۹۶ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه انکوبه گردید، سپس ۴۰ سیکل در دمای ۹۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، در ۵۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه انجام شد. سنجش نوری در کانال سبز (القاء در ۴۷۰ نانومتر و ردیابی در ۵۱۰ نانومتر) در طول مرحله گسترش ثبت گردید. بعد از کامل شدن ۴۰ سیکل PCR، اطلاعات

منحنی‌ذوب با افزایش دما از ۷۰ تا ۹۹ درجه سانتی‌گراد در ۰/۲ درجه سانتی‌گراد s^{-1} و ثبت فلورسانس به دست آمد. آنالیز منحنی HRM با استفاده از نرم‌افزار Rotor-Gene ۱.۷.۲۷ انجام شد و الگوریتم HRM تهیه گردید (۷).

تعیین توالی و آنالیز تعیین توالی نوکلئوتیدی. آمپلیکون ها با استفاده از کیت خالص سازی PCR (کیاژن) و به وسیله شستشو در ۳۰ میلی لیتر H2O خالص گردید و سپس تحت تعیین توالی خودکار (Big Dye (chemistry, Applied Biosystems در هر دو جهت و با استفاده از همان پرایمر هایی که در PCR استفاده شد، قرار گرفت. توالی‌های نوکلئوتیدی با یکدیگر و با توالی‌هایی که از قبل در GenBank موجود بودند، مقایسه گردید. درخت فیلوژنتیکی بر اساس توالی نوکلئوتیدی ژن *vlh*A با استفاده از پکیج MEGA ۶ با روش اتصال مجاور (تعداد تفاوت‌ها) و تا ۱۰۰۰ رونوشت خودراه انداز ترسیم گردید (۱۶ و ۲۲). در این مطالعه از سویه‌ی مایکوپلاسما سینوویه واکسن تهیه شده از ژن بانک (AF464936.1) جهت مقایسه استفاده شد.

نتایج

نتایج آزمایش‌های سرولوژی و شناسایی مایکوپلاسما از گله‌های مرغ مادر گوشتی در سنین ۳۰ و ۶۰ هفتگی و نتاج آن‌ها در جداول ۱ و ۲ آمده است. آزمایش‌های سریع سرم روی لام و آزمایش الیزا گله‌های مادر در سنین ۴۰ و ۶۰ هفتگی نشان می‌دهد تمام گله-ها از نظر عیار پادتن ضد مایکوپلاسما مثبت بودند. کلیه نمونه‌های گله‌های مادر در سنین ۳۰ و ۶۰ هفتگی از نظر آلودگی به مایکوپلاسما با آزمایش PCR (به استثنای گله مادر ردیف ۱۷ در سن ۶۰ هفتگی) منفی بودند. آزمایش‌های سریع سرم روی لام و آزمایش الیزای نتاج گله‌های مادر در سنین ۳۰ و ۶۰ هفتگی نشان دهنده حضور پادتن ضد مایکوپلاسما در سرم خون نتاج در هر دو آزمایش می‌باشد.

جدول ۱. نتایج آزمایش‌های سرولوژی و شناسایی مولکولی مایکوپلاسما از گله‌های مادردر سن ۴۰ هفتگی و نتاج آن‌ها

ردیف (گله مادر)	RSA مادر		میانگین آزمایش الیزا گله‌های مادر	PCR مادر		RSA نتاج		PCR نتاج		میانگین آزمایش الیزای نتاج
	+	−		+	−	+	−	+	−	
۱	۲۰	۰	۴۱۸۸	۰	۲۰	۱۵	۵	۰	۲۰	۲۹۷۳
۲	۱۹	۱	۳۸۳۹	۰	۲۰	۱۴	۶	۰	۲۰	۲۹۱۷
۳	۲۰	۰	۲۸۵۰	۰	۲۰	۱۹	۱	۰	۲۰	۲۲۸۰
۴	۱۶	۴	۳۹۰۰	۰	۲۰	۲۰	۰	۰	۲۰	۲۹۲۵
۵	۲۰	۰	۴۳۵۶	۰	۲۰	۱۹	۱	۰	۲۰	۳۱۷۹
۶	۲۰	۰	۴۹۸۰	۰	۲۰	۱۸	۲	۰	۲۰	۳۴۸۶
۷	۲۰	۰	۳۰۵۰	۰	۲۰	۱۹	۱	۰	۲۰	۲۱۶۵
۸	۱۳	۷	۴۲۵۲	۰	۲۰	۱۶	۴	۰	۲۰	۳۲۳۱
۹	۲۰	۰	۲۸۹۰	۰	۲۰	۲۰	۰	۰	۲۰	۲۲۵۴
۱۰	۲۰	۰	۳۸۸۸	۰	۲۰	۲۰	۰	۰	۲۰	۳۱۴۹
۱۱	۱۹	۱	۴۰۱۰	۰	۲۰	۱۸	۲	۰	۲۰	۳۱۲۷
۱۲	۲۰	۰	۱۳۶۸	۰	۲۰	۱۹	۱	۰	۲۰	۱۰۹۴
۱۳	۲۰	۰	۳۵۷۶	۰	۲۰	۱۹	۱	۰	۲۰	۲۷۸۹
۱۴	۱۸	۲	۳۳۶۵	۰	۲۰	۱۶	۴	۰	۲۰	۲۷۵۹
۱۵	۱۹	۱	۲۹۸۸	۰	۲۰	۱۸	۲	۰	۲۰	۲۱۲۲
۱۶	۱۸	۲	۲۹۹۰	۰	۲۰	۱۳	۷	۰	۲۰	۲۲۷۲
۱۷	۱۷	۳	۳۳۵۸	۰	۲۰	۱۶	۴	۰	۲۰	۲۴۸۴
۱۸	۲۰	۰	۳۶۲۰	۰	۲۰	۲۰	۰	۰	۲۰	۳۰۰۴
۱۹	۲۰	۰	۳۳۲۵	۰	۲۰	۱۶	۴	۰	۲۰	۲۵۲۷
۲۰	۲۰	۰	۳۱۱۰	۰	۲۰	۱۹	۱	۰	۲۰	۲۶۴۳

جدول ۲. نتایج آزمایش‌های سرولوژی و شناسایی مولکولی مایکوپلاسما از گله‌های مادردر سن ۶۰ هفتگی و نتاج آن‌ها

ردیف (گلـــه مادر)	RSA مادر		میانگین آزمایش الیزا گله‌های مادر	PCR مادر		RSA نتاج		PCR نتاج		میانگین آزمایش الیزای نتاج
	+	−		+	−	+	−	+	−	
۱	۲۰	۰	۳۹۸۸	۰	۲۰	۲۰	۰	۰	۲۰	۲۸۳۱
۲	۲۰	۰	۳۲۳۹	۰	۲۰	۲۰	۰	۰	۲۰	۲۴۲۹
۳	۲۰	۰	۲۵۷۶	۰	۲۰	۲۰	۰	۰	۲۰	۲۰۳۵
۴	۲۰	۰	۳۴۶۳	۰	۲۰	۲۰	۰	۰	۲۰	۲۵۲۷
۵	۲۰	۰	۴۱۴۹	۰	۲۰	۲۰	۰	۰	۲۰	۳۰۶۱
۶	۲۰	۰	۴۷۵۰	۰	۲۰	۲۰	۰	۰	۲۰	۳۶۱۰
۷	۲۰	۰	۲۱۷۵	۰	۲۰	۲۰	۰	۰	۲۰	۱۷۱۸
۸	۲۰	۰	۴۰۵۹	۰	۲۰	۲۰	۰	۰	۲۰	۲۸۱۴
۹	۲۰	۰	۲۳۸۰	۰	۲۰	۲۰	۰	۰	۲۰	۱۶۶۶
۱۰	۲۰	۰	۳۶۵۸	۰	۲۰	۲۰	۰	۰	۲۰	۲۵۹۷
۱۱	۱۸	۲	۳۵۲۰	۰	۲۰	۲۰	۰	۰	۲۰	۲۸۸۶
۱۲	۱۹	۱	۱۰۲۵	۰	۲۰	۲۰	۰	۰	۲۰	۷۱۷۰
۱۳	۲۰	۲۰	۲۹۸۲	۰	۲۰	۲۰	۰	۰	۲۰	۲۱۷۵
۱۴	۱۹	۱	۲۸۷۰	۰	۲۰	۲۰	۰	۰	۲۰	۲۲۳۸
۱۵	۲۰	۰	۲۷۵۰	۰	۲۰	۲۰	۰	۰	۲۰	۲۲۸۲
۱۶	۱۸	۲	۲۴۵۰	۰	۲۰	۲۰	۰	۰	۲۰	۲۰۸۲
۱۷	۲۰	۰	۴۱۷۵	۲۰	۱۸	۲۰	۰	۵	۱۵	۳۵۴۸
۱۸	۲۰	۰	۲۹۶۵	۰	۲۰	۲۰	۰	۰	۲۰	۲۳۴۲
۱۹	۲۰	۰	۳۰۱۰	۰	۲۰	۲۰	۰	۰	۲۰	۲۵۵۸
۲۰	۲۰	۰	۲۹۸۵	۰	۲۰	۲۰	۰	۰	۲۰	۲۲۷۷

بحث

به دلیل اهمیت بیماری مایکوپلاسما سینوویه در ایجاد بیماری‌های تنفسی و مفصلی، استفاده از روش‌های مبتنی بر شناسایی DNA برای تشخیص این باکتری از بافت‌ها و جدایه‌های آزمایشگاهی ضروری به نظر می‌رسد (حسینی،۱۳۸۶). مایکوپلاسما سینوویه دارای لیپوپروتئین متغیر هماگلوتینین (vlhA) است که توسط ژن vlhA به صورت یک پروتئین منفرد بیان می‌شود، ژنvlhA لیپوپرتئینی سطحی با نواحی متغیر و ثابت، تولید می‌کند (۲۵). پروتئینvlhA پس از همانندسازی به دو پروتئین مجزا شکسته می‌شود، لیپوپروتئین MSPBقطعه‌ی N-terminal وMSPA ، قطعه‌ی C-terminalکه به طور مستقیم در اتصال دخالت دارد. تظاهر این لیپوپروتئین ممکن است با هماهنگی هم صورت گیرد (۲, ۲۵). پروتئین MSPB شامل یک توالی تکرار شده‌ی پشت سرهم و غنی از پرولیناس تکه ناحیه‌ی PRR را کد می‌کند. نکته‌ی جالب این است که طول ناحیه‌یPRR ، در میان سویه‌های مایکوپلاسما سینوویه متفاوت است. علاوه بر این جمعیت‌های کلونی مایکوپلاسما سینوویه قادرند اندازه‌های متغیری ازپروتئینMSPB را سنتز کنند (۲ و ۵). مطالعات نشان می‌دهند تعیین سویه‌ها و دسته‌بندی آن‌ها بر اساس ژن vlhA باید به عنوان روش ابتدایی مورد استفاده قرار گیرند (۳ و ۱۵). این مطالعه به منظور تفریق سویه‌های واکسن مورد استفاده درکشور و سویه‌های وحشی در مزارع مرغ مادر و گوشتی انجام گرفت. نمونه‌های سواب اخذ شده توسط آزمون

(High Resolution Melting)HRM با استفاده از ژن vlhA، به منظور تفریق سویه‌های واکسن و سویه‌های وحشی مورد بررسی قرار گرفتند. بررسی نتایج نشان داد واکسیناسیون گله‌های مادر به خوبی توانسته تا سن ۴۰ هفتگی گله‌ها را از ابتلا به بیماری محافظت و عیار پادتن مناسبی ایجاد نماید ولی با افزایش سن میزان محافظت کاهش می‌یابد و گله‌ی مادر ردیف ۱۷ که در آزمایش مولکولی در ۴۰ هفتگی منفی بود در آزمایش مجدد گله‌ی مادر گوشتی و نتاج آن‌ها در ۶۰ هفتگی مثبت شدند. در مورد شناسایی مایکوپلاسما سینوویه جدا شده از مزارع و مایکوپلاسما ناشی از واکسن‌های زنده به کار رفته در مزارع روش‌های مختلفی از جمله توالی ژن vlhA، روش PFGE و PCR-RFLP وجود دارد که در این مطالعه از روش توالی ژن vlhA استفاده شد آزمون (High Resolution Melting)HRM با استفاده از ژن vlhA، نشان داد مایکوپلاسماهای شناسایی شده متفاوت از مایکوپلاسمای به کار رفته در واکسن زنده بود. این امر نشان می‌دهد با افزایش سن محافظت واکسن کاهش می‌یابد و لازم است مراقبت بیشتری از گله‌ها در سنین بالاتر اعمال شود. تحقیقات زیادی درباره تشخیص *مایکوپلاسما سینوویه* صورت گرفته و روش‌های مختلفی همچون HI، SPA، ELISA و PCR بررسی شده و در این میان روش‌های PCR را سریع‌تر و بهتر معرفی کردند (Ricardo and Silveria1996). Yang Hong و همکاران (۲۰۰۴) انتهای N ژن vIhA را که کد کننده هماگلوتینین است را به عنوان قسمت متغیر *مایکوپلاسما سینوویه* در نظر گرفتند و از آن به عنوان تشخیص و شروعی برای تعیین نوع نمونه فیلدی *مایکوپلاسما سینوویه* در طیور تجاری استفاده نمودند.Jeffery و همکاران (۲۰۰۷) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن ر vIhA و همچنین با استفاده از آزمون SSCP در میان ۳۵ جدایه مختلف مایکوپلاسما سینوویه توانستند این جدایه‌ها را در ۱۰ پروفایل A تا J قرار دهند که باند حاصل از این پرایمرها ۴۰۰ جفت باز بود و جدایه‌های استرالیا در پروفایل A تا D قرار گرفتند در صورتی‌که جدایه‌های آمریکا در یکی از پروفایل‌های E،F ، G، H،I و J قرار گرفتند. آن‌ها از روش آنالیزی HRM استفاده نمودند و اظهار داشتند استفاده از PCR بر پایه SSCP یا HRM ژن VIhA بیشترین جهش‌ها را در میان جدایه‌های مایکوپلاسما سینوویه مشخص می‌کند. طبق نظر ایشان آنالیز HRM روشی سریع و مؤثر است که می‌توان در عرض کمتر از یک ساعت آن را انجام داد (۱،۲،۳، ۱۵ و ۱۶). انصاری و همکاران (۱۳۸۸) گونه *مایکوپلاسما سینوویه* را در نمونه‌های بالینی با استفاده از روش vlhA-PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن vIhA انجام دادند. آن‌ها بیان داشتند این روش با حساسیت بسیار بالا می‌تواند در تشخیص قطعی عفونت با *مایکوپلاسما سینوویه* در آزمایشگاه به کار برده شود. صیفی (۲۰۱۳) عوامل مستعد کننده و ایجادکننده عفونت مایکوپلاسما سینوویه مانند سن، اندازه گله، فصل و سویه پرنده و میزان شیوع سرمی را در گله‌های مادر گوشتی در استان مازندران مطالعه نمودن و رابطه-ای بین سویه مادر گوشتی و نژاد و اندازه گله با عفونت *مایکوپلاسما سینوویه* مشاهده نکردند (۱۹). این مطالعه نشان داد واکسیناسیو ن با واکسن‌های فعلی ضد *مایکوپلاسما سینوویه* نمی‌تواند حفاظت کامل در مادران گوشتی ایجاد نماید و احتمال انتقال آلودگی به نتاج نیز وجود دارد و گله‌های واکسینه شده باید به روش‌های مولکولی کنترل و بررسی شوند.

سپاسگزاری

نویسندگان وظیفه خود می‌دانند از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز که پژوهش فوق را حمایت مالی نمودند، تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

۱-انصاری، ح.، پوربخش، س.ع.، شیخی، ن.، بزرگمهری‌فرد، م.ح.، اشتری، ع. (۱۳۸۸) تشخیص گونه *مایکوپلاسما سینوویه* در نمونه‌های بالینی با استفاده از روش ر vlhA-PCR. *مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز*، دوره ۳، شماره ۴، ۶۷۳-۶۸۱.

۲-حسینی، ا. (۱۳۸۶): تعیین هویت مولکولی *مایکوپلاسما سینوویه* جدا شده از مرغداری‌های صنعتی استان مازندران، رساله دکترای تخصصی بیماری‌های طیور، دانشکده دامپزشکی دانشگاه علوم تحقیقات تهران.

3-Bayatzadeh MA, Pourbakhsh SA, Ashtari A, Abtin AR, Abdoshah M (2014) Molecular typing of Iranian field isolates *Mycoplasma synoviae* and their differentiation from the live commercial vaccine strain MS-H using vlhA gene. *British poultry science*:1-9.

4-Carnaghan R (1961) Egg transmission of infectious synovitis. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, **71**:279-285.

5-Ewing M, Lauerman L, Kleven S, Brown M (1996) Evaluation of diagnostic procedures to detect *Mycoplasma synoviae* in commercial multiplier-breeder farms and commercial hatcheries in Florida. *Avian Diseases*:798-806.

6-Harada K, Kijima-Tanaka M, Uchiyama M, Yamamoto T, Oishi K, Arao M, Takahashi T (2009) Molecular typing of Japanese field isolates and live commercial vaccine strain of *Mycoplasma synoviae* using improved pulsed-field gel electrophoresis and vlhA gene sequencing. *Avian Diseases*. **53**:538-543.

7-Jones JF, Whithear KG, Scott PC, Noormohammadi AH (2006) Duration of immunity with *Mycoplasma synoviae*: comparison of the live attenuated vaccine MS-H (Vaxsafe MS) with its wild-type parent strain, 86079/7NS. *Avian Diseases*. **50**:228-231.

8-Jones JF, Whithear KG, Scott PC, Noormohammadi AH (2006). Onset of immunity with *Mycoplasma synoviae*: comparison of the live attenuated vaccine MS-H (Vaxsafe MS) with its wild-type parent strain (86079/7NS). *Avian Diseases*. **50**:82-87.

9-Landman W, Feberwee A (2004) Aerosol-induced *Mycoplasma synoviae* arthritis: the synergistic effect of infectious bronchitis virus infection. *Avian Pathology*. **33**:591-598.

10-Markham JF, Morrow CJ, Scott PC, Whithear KG (1998) Safety of a temperature-sensitive clone of *Mycoplasma synoviae* as a live vaccine. *Avian Diseases*:677-681.

11-Markham JF, Morrow CJ, Whithear KG (1998) Efficacy of a temperature-sensitive *Mycoplasma synoviae* live vaccine. *Avian Diseases*:671-676.

12-Markham JF, Scott PC, Whithear KG (1998) Field evaluation of the safety and efficacy of a temperature-sensitive *Mycoplasma synoviae* live vaccine. *Avian Diseases*:682-689.

13-Morrow C, Whithear K, Kleven S (1990) Restriction endonuclease analysis of *Mycoplasma synoviae* strains. *Avian Diseases*:611-616.

14-Morrow CJ, Markham JF, Whithear KG (1998) Production of temperature-sensitive clones of *Mycoplasma synoviae* for evaluation as live vaccines. *Avian Diseases*.667-670.

15-Jeffery, N., Gasser, Robin B., Steer, Penelope A. and Noormohammadi, Amir, A.. (2007): Classification of *Mycoplasma synoviae* strains using single-strand conformation polymorphism and high-resolution melting -curve analysis of the vlhA gene single-copy region, *Microbiology*, **153**: 2679-2688.

16- Pourbakhsh S. A., Maghami, M., Bayatzadeh, M., A. and Ahangary, S. (2013). The vlhA gene sequencing of Iranian *Mycoplasma synoviae* isolates. *Archives of Razi Institute*. **68**: 117-124.

17-Pourbakhsh S. A., Shokri G, Banani M, Elhamnia F, Ashtari A (2010) Detection of *Mycoplasma synoviae* infection in broiler breeder farms of Tehran province using PCR and culture methods. *Archives of Razi*, **65**:75-81.

18-Ricardo, M. and Silveria, L.F. (1996): polymerase chain reaction optimization for *Mycoplasma synoviae* diagnosis,*Avian Disease*s, **40**:218-222.

19-Seifi, S. (2013). Risk factors and seroprevalence of *Mycoplasma synoviae* infection in broiler farms in Mazandaran province, North Iran. *Acta Veterinaria*(Beogtrad), **63**:303-309.

20- Swayne, D. E., Glisson, J. R., McDougald, L. R., Nolan, L. K., Suarez, D. L., Nair, V. (2013). *Diseases of Poultry*,13th edition, Willey-Blackwell. Pp: 875-941.

21-Vardaman T (1976) The resistance and carrier status of meat-type hens exposed to *Mycoplasma synoviae*. *Poultry Science*: **55**:268-273.

22-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 Diseases*, **48**:606-616.

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 13, Issue 2, 2017

Detection of *Mycoplasma Synoviae* Infections in Vaccinated Broiler Breeder Flocks

Mayahi, M.[1*], Boroomand, Z.[1], Pourbakhsh, S.A.[2], Jafari, R.A.[1], Golivari, H.[3]

1. Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz-Iran
2. Mycoplasma Reference Laboratory, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj-Iran
3. DVSc candidate in avian health and diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz-Iran

Received Date: 3 January 2017 *Accepted Date: 3 March 2017*

Abstract: *Mycoplasma Synoviae is a major poultry pathogen which causes significant economic losses to the poultry industry. The aim of study was detection Mycoplasma synoviae infections in vaccinated broiler breeder flocks and their progeny. For this purpose, from 20 broiler breeder farms and their progeny 2 times in 40 and 60 weeks of age 20 tracheal swab and 20 blood samples from each broiler farm were collected. All 20 broiler breeder farms before vaccination against Myc.oplasma Synoviae were confirmed free from Mycoplasma synoviae infections. Tracheal swab transfered to cap tubes containing PPLO broth media and kept at 4°C less than 24 hrs send to laboratory for further proceeding. Antibody against Mycoplasma Synoviae was measured by rapid serum agglutination (RSA) and Elias tests. Tracheal swabs were examined by high resolution melting PCR(HRM PCR) for detection Mycoplasma Synoviae field isolate.. The results showed that vaccination broiler farm against Mycoplasma Synoviae upto 40 weeks could protect all broiler breeder farms from Mycoplasma Synoviae field infection and produce good antibody titers. With increasing age and at age 60 weeks one farms and its progeny was positive for Mycoplasma Synoviae which was differ from Mycoplasma Synoviae included in live vaccine. This study showed vaccination by present vaccine against Mycoplasma Synoviae in broiler breeder farms could not protect older broiler breeder farms in older ages and probably Mycoplasma Synoviae infection transferred to progeny. Therefore vaccinated farms should be monitor by molecular methods.*

Keywords: *Mycoplasma synoviae, broiler breeder, HRM PCR, ELISA, RSA.*

**Corresponding author: Mayahi, M.*
Address: Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz-Iran. Tel:
Email: m_mayahi@yahoo.com, mansoormayahi@scu.ac.ir