

تشخیص گونه مایکوپلازما 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^۴

۱. دانشجوی دوره دکترای تخصصی بیماریهای طیور، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات 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 و تحقیقات تهران، تهران، ایران

۴. آزمایشگاه رفرانس مایکوپلازما، 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

مایکوپلازما سینوویه به عنوان یکی از اصلی‌ترین پاتوژن‌های پرندگان، خسارات اقتصادی فراوانی را به صنعت مرغداری وارد می‌کند. هدف اصلی این مطالعه شناسایی گونه مایکوپلازما سینوویه در نمونه‌های بالینی با استفاده از روش VlhA-PCR می‌باشد. برای بررسی تیتسریمی، تعداد ۳۷۵ نمونه سرمی از ۲۵ گله مادر گوشتی اخذ و بر روی آن تست RSA (Rapid Serum Agglutination) انجام گردید که ۱۴۳ نمونه، معادل ۱۹ گله در آزمایش RSA مثبت گردید. جهت نمونه‌برداری برای PCR (Polymerase Chain Reaction) از ۲۵ گله‌ای که ۱۹ گله آن در تست RSA مثبت شده بودند، ۲۰ گله انتخاب و سوآپ‌های استریل از شکاف کامی، نای، کیسه هوایی و ریه از آنها تهیه گردید. سه سوآپ از سه پرندۀ 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 ۴۰۰-۳۵۰ 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 مایکوپلازما سینوویه در آزمایشگاه به کار برده شود.

مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، ۱۳۸۸، دوره ۳، شماره ۴، ۶۸۱-۶۷۳.

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

مقدمه

و عفونت کیسه‌های هوایی نیز شناخته شده است (۳، ۶ و ۱۲). با وجود پیشرفت‌های ایجاد شده در روش‌های کنترل و ریشه‌کنی، مایکوپلازما سینوویه همچنان در صنعت طیور خصوصاً در گله‌های مرغ مادر از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. شکل تنفسی عفونت مایکوپلازما سینوویه بیشتر به

مایکوپلازما سینوویه یکی از عوامل بیماری‌زای مهم ماکیان و بوقلمون است که همه ساله خسارت اقتصادی زیادی به صنعت طیور وارد می‌نماید. اگرچه اولین بار مایکوپلازما سینوویه به عنوان عامل بیماری سینوویت عفونی معرفی شد، اما امروزه علاوه بر سینوویت عفونی به عنوان عامل بیماری تنفسی

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، ۶ و ۸).

با استناد به آنالیز توالی ژن 16S rRNA تصور می‌شود که مایکوپلازماها حدود ۶۰۰ 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 کلاستریدیوم‌ها مشتق شده‌اند (۱۵).

تاکنون ۲۳ گونه مختلف مایکوپلازما از پرندگان جدا شده که ماکیان و بوقلمون میزبان ۱۶ گونه از آنها می‌باشند. در این میان تنها چهار گونه برای طیور بیماری‌زا هستند که شامل مایکوپلازما گالی‌سپتیکوم، مایکوپلازما سینوویه، مایکوپلازما مله آگریدیس و مایکوپلازما آیوا می‌باشد. به دلیل اهمیت نقش بیماری‌زایی مایکوپلازماهای طیور، از سال‌ها قبل برنامه ریشه‌کنی از گله‌های مولد به اجرا درآمده است. با این وجود مایکوپلازماها در گله‌های طیور حضور داشته و عفونت مایکوپلازمایی 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، ۶ و ۸).

مایکوپلازماها 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 کلاسترول نیاز دارند. درجه حرارت مطلوب برای رشد 37°C است. با آنالیز ژن ریبوزوم 16S rRNA می‌توان ارتباط ژنتیکی بین مایکوپلازماها را بررسی کرد. روش کشت مایکوپلازما 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 شناسایی مایکوپلازمای پرندگان توصیف شد. اساس تمام آنها مبتنی بر تکثیر یا شناسایی یک قطعه خاص از

صورت عفونت تحت بالینی قسمت فوقانی دستگاه تنفس رخ می‌دهد. حالت بالینی عفونت به شکل تنفسی، خصوصاً هنگامی که مایکوپلازما 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، ۶ و ۸).

تشخیص به موقع مایکوپلازما هم از جهت پرورش دهندگان مادر، هم پرورش دهندگان جوجه‌های تجارتي و هم از نظر سازمان دامپزشکی حائز اهمیت می‌باشد. مایکوپلازماها 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 تکه‌های شکل می‌باشد. همچنین نسبت به احتیاجات پیچیده غذایی در صورت کمبودشان مقاوم هستند. بعضی از مایکوپلازما فقط یک نوع حیوان را آلوده می‌کنند ولی بعضی‌ها قادرند در چندین حیوان مختلف ایجاد بیماری نمایند. مایکوپلازماها در گیاهان، جانوران و انسان و حشرات ایجاد بیماری می‌کنند. به طور عمومی مایکوپلازماها در سطح مخاطی کلونیزه می‌شوند و اکثراً غیرمهاجم هستند ولی بعضی گونه‌ها مثل مایکوپلازما گالی‌سپتیکوم قادر به سوراخ کردن سلول‌ها هستند. مایکوپلازماها 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 مایکوپلازما و

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 شناسایی ارگانیزم فراهم می‌شود (۱، ۴، ۱۲ و ۱۴).

تاکنون تلاش‌های زیادی جهت شناسایی و تفریق سویه‌های مایکوپلازما سینوویه صورت پذیرفته است. ژنوم مایکوپلازماها حاوی درصد قابل ملاحظه‌ای از توالی‌های تکراری می‌باشد. به‌طور مثال، در مایکوپلازما ژنیتالیوم توالی MgPa حدود ۴/۷ درصد کل ژنوم را به‌خود اختصاص می‌دهند، همچنین در مایکوپلازما گالی‌سپینیکوم، تعداد بیشتر توالی و بزرگتر ژن VLhA (یا PMGA) حدود ۱۰/۴ 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 مایکوپلازماها بوده همچنین تنوع فازی یا اندازه می‌تواند نقش کلیدی در حذت، اتصال و دفاع میزبان، برای مایکوپلازما داشته باشد (۹، ۱۰، ۱۱، ۱۳ و ۱۶).

مواد و روش کار

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 ۳۰۸) روی یک کاشی سفید ریخته و یک حجم از آنتی‌ژن رنگی مایکوپلازما سینوویه به آن اضافه گردید. به منظور مخلوط نمودن آنتی‌ژن و سرم، کاشی به‌شکل دورانی تکان داده شد. در صورت وجود آنتی‌بادی علیه مایکوپلازما سینوویه پدیده آگلوتیناسیون اتفاق می‌افتاد که با گرد هم آمدن 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

نمونه برداری جهت PCR

جهت نمونه برداری 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 میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری انتقال داده شد و جهت رسوب‌گیری به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ 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

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 تیوب 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 ۱۰۰-۹۶ 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 تیوب تخلیه شد و بعد از تکان دادن، جهت خشک شدن الکل موجود در تیوب، زیر هود قرار داده شد (باید دقت گردد تا نمونه موجود در تیوب 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 صورتی که فاصله زمانی آزمایش طولانی باشد نمونه‌ها باید در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شوند (۳، ۶، ۷، ۱۲ و ۱۴)).

Viha-PCR و تشخیص گونه مایکوپلازما سینوویه

به منظور تأیید نمونه‌ها از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز استفاده شد. پرایمرهای استفاده شده اختصاصی ژن Viha-PCR در مایکوپلازما سینوویه بودند و این پرایمرها جهت

گردید. سپس به خوبی مخلوط گردیده آنگاه در همزن، تکان داده شد و در بن‌ماری ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴-۳/۵ ساعت قرار داده شد. ترکیبات تشکیل دهنده بافر لیز کننده در زیر آمده است. به ازاء هر ۲۰۰ میلی‌لیتر از محلول بالا، ۲۰ میلی‌لیتر 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 ۴ 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 تیوب 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.

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	17.36 μl
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

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

نام پرایمر	توالی نوکلئوتیدی
MScons-F	TACTATTAGCAG CTAGTGC
MScons-R	AGTAACCGATCCGCTTAAT'

تمامی راکسیون‌ها در ترموسایکلر Gradient Mastercycler (Eppendorf، آلمان) انجام گرفت و برنامه آن به صورت زیر بود:

نام مرحله	درجه حرارت	مدت زمان	تعداد چرخه
دنا تورا سیون اولیه	۹۴	۲'	۱
دنا تورا سیون ثانویه	۹۶	۱۵''	۳۵
اتصال پرایمر	۵۴	۱۵''	۳۵
گسترش اولیه	۷۲	۲۰''	۳۵
گسترش نهایی	۷۲	۵'	۱

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 EDTA) اضافه شد (۲ گرم پودر آگارز در ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول آگارز).

برای تهیه ۲٪ TBE از ۲۵٪ TBE استفاده شد به طوری که ۲۰ میلی‌لیتر از این محلول با ۴۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط گردید. برای آماده کردن ژل ابتدا ۰/۳۵ گرم از ژل آگارز (Agarose MP.Roche) در ۳۵ میلی‌لیتر از بافر ۲٪ TBE در یک ارزن ریخته شد و با استفاده از حمام آب‌جوش حرارت داده شد. حرارت دادن تا حل شدن کامل آگارز ادامه یافت. پس

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 صفحه رویی بر روی تیغه‌ها بسته شد. به طوری که تیغه‌ها کمی خارج‌تر از لبه پلتهای شیشه‌ای قرار داده شد به طوری که پس از قرار دادن صفحه شیشه‌ای رویی تیغه‌ها به آرامی فشار داده شد تا در جای خود بین دو صفحه قرار گیرند. اطراف و

نتایج

نتایج حاصل از تست RSA:

از ۳۷۵ نمونه سرمی اخذ شده از ۲۵ فارم، ۱۹ فارم در تست RSA مثبت شدند. به طور کلی از ۳۷۵ نمونه اخذ شده، ۱۴۳ 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 مایکوپلازما

سینوویه:

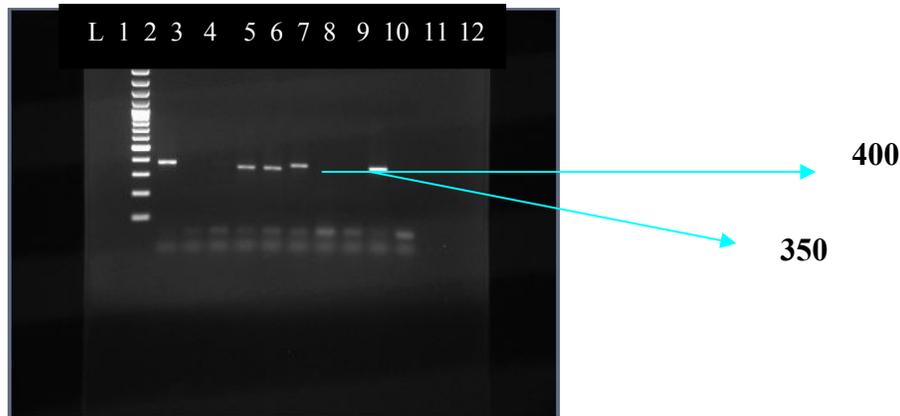
به منظور تأیید نمونه‌ها از روش PCR استفاده گردید. در این تحقیق تعداد ۲۴۰ نمونه اخذ گردید که از این تعداد ۴۸ نمونه (۸ فارم) معادل ۲۰ درصد در PCR باند ۳۵۰-۴۰۰ را بر روی ژل آگارز نشان دادند که نشان دهنده حضور مایکوپلازما سینوویه است و MS-H نیز در این بازه قرار دارد. (نگاره‌های ۱ و ۲)

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 ۱x) 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 ۴۵ دقیقه قرار گرفت. ژل روی دستگاه (BioRAD, Bio-) UV (Rad Lab.- California, USA) قرار گرفته و از آن عکس تهیه شد.



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 MSConsF و MSConsR

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

عفونت‌های مخلوط با چندین مایکوپلازما، آلودگی با عفونت‌های باکتریایی ثانویه، مهارکننده‌های رشد مایکوپلازما مثل آنتی بادی، آنتی بیوتیک، یا سایر عوامل میزبانی ارائه دهد (۱ و ۱۲). به‌ویژه رشد مایکوپلازماهای ساپروفیت که رشد سریع‌تری در محیط غنی شده نسبت به مایکوپلازما سینوویه دارند از مهم‌ترین مشکلات کشت می‌باشد.

تحقیقات زیادی درباره تشخیص مایکوپلازما سینوویه صورت گرفته و روش‌های مختلفی نیز ارائه شده، به‌طوری که Ricardo و همکاران، روش‌های مختلفی همچون SPA, HI, PCR و ELISA 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 ۱۶S,rRNA پرایمرهای اختصاصی گونه مایکوپلازما را با نام‌های MS-1 و MS-2 طراحی کردند و بیان نمودند

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به اهمیت بیماری مایکوپلازما 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 مایکوپلازما سینوویه به‌طور مستقیم از بافت یا جدایه‌های آزمایشگاهی ضروری به نظر می‌رسد (۱). اگرچه می‌توان از پروب برای شناسایی مایکوپلازما 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 مایکوپلازما 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 ارگانیزم یک تا سه هفته زمان نیاز است. همچنین PCR قادر است نتایج دقیقی در حضور

از پرایمرهای MS1.2F0 MS1.2R0 و MS1-2R1i و MS1-2F1i برای تشخیص مایکوپلازما 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، مایکوپلازما سینوویه را از مایکوپلازما کالی‌سپتیکوم تفریق نمود (۲).

در این مطالعه، به منظور تأیید نمونه‌ها از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز استفاده شد. پرایمرهای استفاده شده اختصاصی ژن VlhA در مایکوپلازما سینوویه بودند و این پرایمرها جهت شناسائی مایکوپلازما سینوویه در کشت خالص و یا نمونه بالینی استفاده شده‌اند. با استفاده از این پرایمرها تمام سویه‌های فیلدی، محصول PCR ۴۰۰-۳۵۰ جفت بازی را تشکیل دادند (۱۳).

آزمون VlhA-PCR جهت تشخیص گونه مایکوپلازما سینوویه با حساسیت ۹۸ درصد با پرایمرهای اختصاصی MScons-F و MScons-R با توجه به تشکیل باند ۴۰۰-۳۵۰ 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).

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

در سال ۲۰۰۴ Yang Hong و همکاران انتهای N ترمینال، ژن VlhA را که هم‌گلو تینین را کد می‌کند، به‌عنوان قسمت آلترناتیو مایکوپلازما سینوویه در نظر گرفتند و از آن به‌عنوان تشخیص و شروعی برای تایپینگ نمونه فیلدی مایکوپلازما 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 مایکوپلازما سینوویه توانستند این جدایه‌ها را در ۱۰ پروفایل A تا J قرار دهند که باند حاصله از این پرایمرها ۴۰۰ جفت بازی است و جدایه‌های استرالیا در پروفایل A تا D قرار گرفتند در صورتی که 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 که استفاده از PCR بر پایه SSCP یا HRM ژن VlhA بیشترین جهش‌ها را در میان جدایه‌های مایکوپلازما 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

فهرست منابع

۱. حسینی، ا. (۱۳۸۶): تعیین هویت مولکولی مایکوپلازما سینوویه جدا شده از مرغداری‌های صنعتی استان مازندران، رساله دکتری 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 analysis 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 hemagglutinating 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 analysis targeting the Hemagglutinin encoding Gene VlhA, Avian Disease, vol, 48:606-616.
18. Yogev, D., Levison, S., Kleven, S.H., Halachmi, D. and Razhn, S. (1998): Ribosomal RNA gene probes to detect intraspecies heterogeneity in *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*. Avian Disease; 32: 220-231.