Archive of SID

جداسازی و ردیابی مایکوپلاسما سینوویه از مزارع مرغ مادر دارای واکنش مثبت سریع سرمی با استفاده از روش کشت و واکنش زنجیره ای پلیمراز

هادی حق بین نظرپاک [۱]، سید علی پوربخش [۲*]، سعید چرخکار [۳]، نریمان شیخی [۳]، عباس اشتری [۴]

۱ـ دانشجوی دوره دکترای تخصصی بیماریهای طیور ـ دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات ـ تهران ـ ایران .

۲ـ دانشیار گروه پاتوبیولوژی دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات ـ تهران ـ ایران.

۳ـ دانشیار علوم درمانگاهی دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات ـ تهران ـ ایران.

۴ـ کارشناس آزمایشگاه رفرانس مایکوپلاسما ـ موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی ـ کرج ـ ایران.

*نویسنده مسئول: a.pourbakhsh@rvsri.ir

دریافت مقاله: ۱۵تیر ۸۸ پذیرش نهایی: ۲۱دی ۸۸

چکیده

مایکوپلاسما سینوویه از عوامل مهم ایجاد کننده بیماری در ماکیان است که موجب عفونت دستگاه تنفسی و سینوویت می‌گردد. جداسازی و ردیابی دقیق مایکوپلاسماسینوویه درگله‌های مرغ مادر کمک به جلوگیری از انتشار عامل پاتوژن در سطح گله‌های گوشتی می‌نماید. هدف از این تحقیق، جداسازی و شناسایی مایکوپلاسما سینوویه از مزارع مرغ مادر با استفاده از روش PCR وکشت می‌باشد. در این تحقیق ۳۰ نمونه ازگله‌هایی که دارای پاسخ مثبت تست سرولوژیک می‌باشند مورد کشت و PCR قرارگرفتند. سوابهای شکاف کامی حلقی ونایی ارسال شده در محیط PPLO Broth پس از غنی‌سازی کوتاه مدت فیلترشد وبه منظور پاساژ اقدام گردید. از پاساژ چهارم تمامی نمونه‌ها بر روی PPLO Agar کشت داده شد. همچنین از نمونه‌های اصلی دریافت شده استخراج DNA انجام شد ونمونه‌ها تحت برنامه PCR- MS قرار گرفتند. در کشت پس از قرارگیری در مجاورت آنتی سرم استاندارد اختصاصی MS تنها ۱۵ مورد در روش آگلوتیناسیون واکنش انجام داده وبه عنوان MS شناسایی گردیدند. درروش PCR نیز ۲۵ نمونه به عنوان گونه MS شناسایی گردید. نتایج به دست آمده حاکی از حساسیت بالاتر روش PCR در مقایسه باکشت می‌باشد. این مسأله به دلیل توانمندی روش PCR در ردیابی DNA است که در حضور MS حتی بعد از مرگ هم قابلیت ردیابی دارد، در حالی که جواب‌های مثبت روش کشت صرفا مشتمل بر مواردی است که در هنگام اخذ ونگهداری و انتقال نمونه آسیبی که منجر به نابودی عامل گردد وارد نشود و نیزشرایط مناسب رشدآن درمحیط کشت به طور کامل فراهم باشد. پژوهشنامه دامپزشکی، ۱۳۸۹، دوره ۶، شماره ۱، ۳۵-۳۱.

واژه‌های کلیدی: مایکوپلاسماسینوویه ,کشت ,PCR, جداسازی.

Isolation and detection of Mycoplasma synoviae from seropositive rapid reaction broiler breeder flocks by polymerase chain reaction and culture methods

Haghbin Nazarpak, H.[1], Pourbakhsh, S. A.[2]*, Charkhkar, S.[3], Sheikhi, N.[3], Ashtari, A.[4]

[1] Ph.D Student of Poultry Diseases, Faculty of Specialized Veterinary Sciences, Sciences & Researches Branch, Islamic Azad University , Tehran-Iran. [2]Associate Professor of Department of Pathobiology, Faculty of specialized veterinary sciences, Sciences & Researches Branch, Islamic Azad University , Tehran-Iran. [3]Associate Professor of Department of Clinical Sciences, Faculty of Specialized veterinary Sciences, Sciences & Researches Branch, Islamic Azad University , Tehran-Iran . [4]Mycoplasma Reference Laboratory Of Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj- Iran.

Abstract

Mycoplasma synoviae (MS) is one of the main disease in fowl which cause infections of respiratory system and tenosynovitis. Characterization and successful detection of MS in broiler breeder farms help to prevent distribution of MS in broiler farms.The aim of this study was isolation and characterization of MS in broiler breeder farms by culture and polymerase chain reaction (PCR) techniques. Thirty specimens which obtained from flocks with positive serum reactions were studied by culture and PCR techniques. After collecting of Choanal cleft and tracheal swabs in PPLO broth , a short-term incubation was occurred and then filtered and a serial passage was performed. In the fourth passage, all of the specimens cultured on PPLO agar, in addition ,original specimens used to extract of DNA and MS-PCR technique. Results showed that 15/30 were positive by culture (Approved by using of standard MS specific antiserum) and 25/30 were positive by PCR. These observations highlight the higher sensitivity of PCR rather than culture. These results may be observed because of PCR ability to detect DNA after mycoplasma´s death. However positive results of culture obtained when there were not defect on swabbing and handling of specimens which can cause harmful effects on MS and accordingly suitable environment for growth of MS was exactly prepared. ***Vet. Res. Bull. 6,1: 31-35,2010.***

Keywords: Mycoplasma synoviae, Culture, PCR, Isolation.

www.SID.ir

مقدمه

مایکوپلاسما سینوویه از عوامل مهم ایجاد کننده بیماری در ماکیان و بوقلمون در سراسر دنیا است که موجب عفونت تحت بالینی دستگاه تنفسی فوقانی می‌گردد. در مواردی که عفونت سیستمیک گردد موجب سینوویت عفونی شده و یک بیماری عفونی حاد تا مزمن ماکیان و بوقلمون که مشتمل بر درگیری اولیه غشاء سینوویال مفاصل، غلاف تاندون‌ها است را بوجود می‌آورد که به صورت سینوویت اکسوداتیو، تنووازنیت، بورسیت دیده می‌شود.

مایکوپلاسما سینوویه در صورت همراه بودن با بیماری نیوکاسل و یا بیماری برونشیت عفونی و یا هر دوی آنها می‌تواند موجب ایجاد ضایعات در کیسه‌های هوایی گردد.

با توجه به اینکه مایکوپلاسما سینوویه علاوه بر انتقال افقی، دارای انتقال عمودی نیز بوده و به نتاج انتقال می‌یابد، از این رو شناسایی و ردیابی دقیق مایکوپلاسما سینوویه در گله‌های مرغ مادر اولین مرحله در کمک به جلوگیری از انتشار عامل پاتوژن در سطح گله‌های گوشتی می‌باشد(۱،۱۰،۱۱،۱۲).

هدف از این تحقیق، جداسازی و شناسایی مایکوپلاسما سینوویه از مزارع مرغ مادر با استفاده از تکنیک PCR و کشت می‌باشد.

مواد و روش کار

در این تحقیق به تعداد ۳۰ نمونه از گله‌هایی که دارای پاسخ مثبت تست سرولوژیک بودند به عنوان گله‌های مورد آزمایش انتخاب گردیدند. از هر گله حداقل ۱۰ سواب شکاف کامی حلقی و نایی اخذ گردید و سواب‌ها به شیشه‌های درپوش دار (یونیورسال) حاوی محیط PPLO براث انتقال داده شد و در دمای ۴ درجه سانتیگراد در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل شدند.

نمونه‌ها به منظور کشت برای یک دوره کوتاه مدت ۶ ساعته در دمای انکوباسیون ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد تا غنی سازی اولیه صورت پذیرد. سپس PPLO براث حاوی نمونه فیلتراسیون گردید و این عمل توسط فیلترهای مخصوص سر سرنگی MW Type که دارای روزنه‌هایی با قطر ۰/۴۵ میکرومتراند، انجام شد. به این منظور با استفاده از سرنگ‌های استریل، ۲ میلی لیتر از محلول براث کشت شده را برداشته و سرنگ را در دهانه فیلتر قرار داده و با فشار کم و به آرامی محلول را وارد محیط کشت دوم که PPLO براث بود منتقل کرده و در انکوباتور CO2 دار (۷ درصد) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۳-۵ روز تحت نظر قرار گرفت. پس از گذشت ۴ پاساژ متوالی نمونه‌ها در محیط کشت PPLO براث، تمامی موارد بر روی محیط PPLO Agar کشت گردید. سپس نمونه‌های کشت شده بر روی آگار با گذشت ۷ تا ۱۰ روز با کمک میکروسکوپ نوری و با بزرگنمایی 40X بررسی گردیدند. در صورت مشاهده پرگنه، آلودگی جنس مایکوپلاسما تأیید می‌گردید. همزمان محیط‌های کشت PPLO براثی که از نظر رشد مایکوپلاسما مثبت بودند سانتریفوژ شده و رسوب آن با آنتی سرم اختصاصی مایکوپلاسما سینوویه متعلق به شرکت SPAFAS کانادا مواجه شده و مثبت یا منفی بودن آگلوتیناسیون آن مورد ارزیابی قرار گرفت.

آزمایش مولکولی با PCR مخصوص گونه MS بر روی پرگنه‌های موجود بر روی آگار PPLO اجرا گردید تا پاسخ‌های آنتی سرم استاندارد MS نیز مورد ارزیابی قرار گیرد. به این منظور از پرگنه‌های رشد پیدا نموده به تعداد یک کلونی از پلیت آگار PPLO انتخاب و در محیط براث BHI وارد نموده و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده و سپس نیم سی سی از آن را به میکروتیوپ جهت بررسی با کمک روش PCR انتقال دادیم.

به منظور استفاده ازروش PCR از نمونه‌های اصلی دریافت شده، استخراج DNA به روش فنل و کلروفورم صورت پذیرفت و PCR بر روی عصاره حاصله به منظور ردیابی DNA مایکوپلاسما سینوویه با کمک پرایمرهای اختصاصی گونه , MSطراحی شده بر اساس ژن 16s rRNA پیشنهادی Lauerman و همکاران (۱۹۹۳) اجرا گردید(جدول ۱) که در صورت وجود محصول PCRمورد نظر در هنگام الکتروفورز ژل آگارز در ردیف ۲۰۷bp باند تشکیل می‌نماید (۱۳).

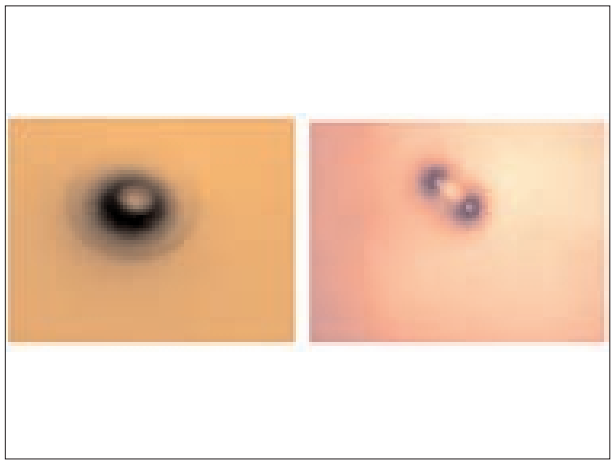
جدول۱- پرایمرهای اختصاصی گونه MS ارائه شده توسط Lauerman و همکاران(۱۳).

جایگاه	توالی
۱۱۹۴-۱۲۱۳	MS-1(5'-GAAGCAAAATAGTGATATCA-3')
۱۳۸۱-۱۴۰۰	MS-2(5'-GTCGTCTCCGAAGTTAACAA-3')

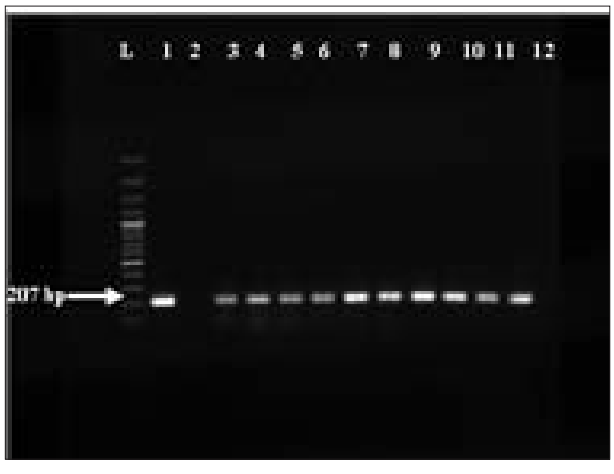
مخلوط اصلی به منظور واکنش PCR برای هر نمونه آماده گردید. مقادیر لازم برای تهیه مخلوط اصلی شامل ۲/۵ میکرولیتر PCR Buffer (10X) و ۴ میکرولیتر MgCl2-- (25mM)، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs (10 mM) و ۰/۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- Ladder مورد استفاده در این مطالعه (Ruler 100pb plus DNA Ladder Gene)، پرگنه های رشد یافته بر روی محیط PPLO Agar.

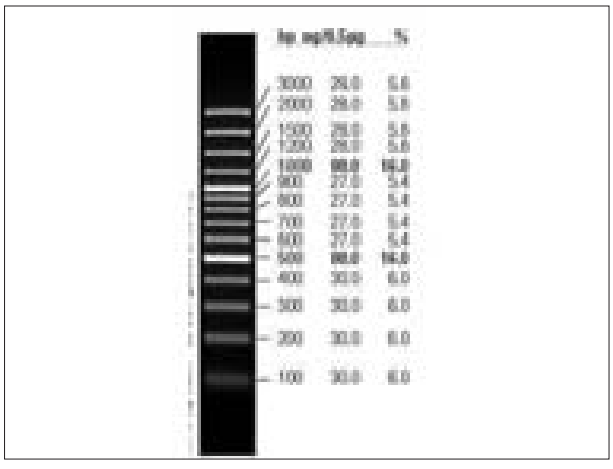


شکل۳- محصول PCR ژن rRNA 16S با استفاده از پرایمرهای MS-1 و MS-2 (نمونه‌هایگله های مختلف: Lane 3-12 , شاهد منفی : Lane 2 , شاهد مثبت: Lane 1 L: Gene Ruler 100bp plus DNA Ladder,).

(100 pM)، ۱unit آنزیم Taq DNA polymerase بود.

پس از آماده شدن نمونه‌ها، مخلوط حاصل در حجم نهایی ۲۵ میکرو لیتر برای هر نمونه به دستگاه ترموسایکلر (آلمان، cycler Eppendorff Gradient Master) که از قبل برنامه ریزی گردیده بود منتقل شد. این برنامه شامل مراحل واسرشت اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۰ سیکل به صورت واسرشت ثانویه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و اتصال پرایمرها در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه و گسترش اولیه در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه که در نهایت به یک گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه ختم می‌شود.

محصول PCR با کمک روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ در ولتاژ ۱۰۰ و آمپراژ ۵۰ به مدت یک ساعت قرار داده شده و در نهایت با



شکل۲- پرگنه رشد یافته بر روی محیط PPLO Agar.

کمک دستگاه (Bio RAD, California, USA) UV transilluminator نتایج قرائت گردید.

نتایج

پس از قرارگیری کشت‌ها در مجاورت آنتی سرم استاندارد اختصاصی MS تنها ۱۵ مورد از موارد رشد یافته بر روی آگار PPLO در آزمایش آگلوتیناسیون با آنتی سرم اختصاصی مایکوپلاسما سینوویه واکنش انجام داده و به عنوان گونه MS شناسایی گردیدند (تصویر ۱،۲). با استفاده از روش PCR بر روی پرگنه‌های موجود بر روی PPLO Agar نیز همین نتایج بدست آمد. در روش PCR بر روی نمونه‌های اصلی دریافت شده، تنها ۲۵ نمونه در هنگام الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز در ردیف ۲۰۷bp (شکل ۱) باند ایجاد نمودند و به عنوان گونه MS شناسایی گردیدند (شکل ۳).

بحث و نتیجه‌گیری

مایکوپلاسما سینوویه به عنوان یکی از عوامل ایجاد کننده عفونت‌های تنفسی و نیز ایجاد کننده تنوواژنیت, سینوویت و بورسیت در ماکیان و بوقلمون شناخته شده است. حضور درگیری‌های همزمان این عامل با سایر عوامل ایجاد کننده بیماریهای تنفسی می‌تواند به پیچیده تر شدن وضعیت پرنده منجر گردد. علاوه بر آن خسارات ناشی از انتقال عمودی بیماری به نتاج گله‌های مولد نیز بسیار مهم و جبران ناپذیر است و در گسترش عفونت در سطوح مختلف پرورشی موثر می‌باشد. گله‌های گوشتی مبتلا شده به بیماری (به صورت انتقال عمودی از گله‌های مرغ مادر و یا به صورت انتقال افقی) نتایج وزنی مطلوبی بدست

www.SID.ir

نیاورده و ضریب تبدیل قابل قبولی ندارند.

از این رو ردیابی و پایش سریعتر و دقیق تر عدم حضور عفونت مایکوپلاسما سینوویه در گله‌های مولد می تواند به پیشگیری و کنترل بیماری و ضررهای اقتصادی ناشی از آن در گله‌های دیگر کمک شایانی نماید(۱،۲،۱۰،۱۱،۱۲).

مایکوپلاسماها سخت رشد بوده و نیازمند به شرایط ویژه‌ای به منظور کشت می باشند که در گونه‌های مختلف مقداری متمایز می باشند و باید نیازمندی هر گونه به دقت بررسی و شرایط کشت آن فراهم باشد (۲،۱،۱۰، ۱۱،۱۲). در حضور عفونت‌های پیچیده کننده امکان رشد موفق مایکوپلاسما در محیط کشت کاهش می یابد.

علاوه بر آن روش کشت روش وقت گیری نیز می باشد(۱،۴).

نتایج حاصله از تحقیق مذکور که به منظور پایش گله‌های مرغ مادر گوشتی و بر اساس روش کشت و PCR در ۳۰ گله دارای واکنش سرمی مثبت طراحی گردید حاکی از حساسیت بیشتر وسرعت بالاتر روش PCR در مقایسه با کشت در ردیابی و پایش آلودگی با مایکوپلاسما سینوویه می باشد. این مسئله با یافته‌های حاصل از تحقیقات دیگر قرابت و همخوانی دارد (۱۶،۱۷)با این تفاوت که درآن مطالعات به صورت تجربی وآزمایشی به بررسی انتقال غیر مستقیم مایکوپلاسما سینوویه پرداخته شده است.

محققین در توضیح یافته‌های خود بیان نمودند که تفاوت در میان پاسخ‌های حاصله از روش کشت و PCR می تواند به دلیل وجود سلول‌های مایکوپلاسمای مرده و یا مایکوپلاسمای غیر قابل کشت باشد(۳،۱۶،۱۷).

به هر حال نتایج بدست آمده از تحقیق فوق با نتایج بدست آمده از تحقیقات مشابه بر روی مایکوپلاسما گالیسپتیکوم که عامل دیگر مایکوپلاسمایی مشکل آفرین در صنعت پرورش طیور است نیز همخوانی دارد(۸،۷،۹،۴،۱۹).

نکته قابل توجه آن است که پاسخ مثبت روش PCR بیانگر حضور مایکوپلاسما یا DNA مایکوپلاسما در محیط می باشد در حالیکه پاسخ مثبت روش کشت صرفاً مشتمل بر مواردی است که مایکوپلاسمای زنده قابل رشد در محیط In Vitro در نمونه‌ها وجود داشته باشد و همه مراحل روش کشت با دقت پایه ریزی و پی گیری گردد(۱،۱۵،۱۶،۱۷). به هر حال روش PCR نیز می تواند حاوی پاسخ‌های منفی کاذب و مثبت کاذب (۶)باشد که بستگی کامل به شرایط آزمایشگاه و روش انجام PCRو نوع و مقدار مواد واکنش و واکنشگرهای انتخاب شده هر آزمایشگاه دارد(۵)و به همین دلیل امکان رویت نتایج متفاوت وجود دارد(۴،۵). تحقیقات بیشتر در این زمینه می‌تواند با بررسی شرایط مختلف به منظورانتخاب بهترین نحوه نمونه برداری و بهینه سازی شرایط کشت ونیز ارزیابی توفیق واکنشگرهای مختلف روش PCR در ردیابی مناسبتر کمک کننده باشد.

منابع

۱- اوسط حسینی،ع.(۱۳۸۶) تعیین هویت مولکولی مایکوپلاسما سینوویه جدا شده از مرغداری‌های صنعتی استان مازندران. پایان نامه برای دریافت دکتری تخصصی بیماری‌های طیور، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران.

۲- حسینی، ح. (۱۳۸۵) مطالعه مولکولی جدایه‌های مایکوپلاسما گالیسپتیکوم از طیور. پایان نامه برای دریافت دکتری تخصصی بیماری‌های طیور، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران.

3-Dallo, S F., Baseman, J B. (2000) Intracellular DNA replication and long- term survival of pathogenic mycoplasmas,*Microb.Patholog*, **29**: 301-309.

4-Evans, J.D., Thornton, D.L., Branton, S.L. (2009) Diagnosis of Mycoplasma gallisepticum from a Broiler Breeder Flock: Comparison of Three Diagnostics Methods. *International Journal of Poultry Sciences*, **8 (2)**: 104-107.

5-Hess, M., Neubauer, C., Hackl, R. (2007) Interlaboratory comparison of ability to detect nucleic acid of Mycoplasma gallisepticum and Mycoplasma synoviae by polymerase chain reaction. *Avian Pathol*, **36 (2)**:127-133.

6-Hill, D. (1995) Mycoplasma field issues, diagnostics. *Poultry Digest*, **54**: 32-34.

7-Kempf, I., Blanchard, A., Gesbert, F., Guittet, M., Bennejean, G. (1993) The polymerase chain reaction for Mycoplasma gallisepticum detection. *Avian Pathology*, **22**: 739-750

8-Kempf,I., Gesbert, F., Guittet, M., Bennejean, G. (1994) Mycoplasma gallisepticum infection in drug-treated chickens: comparison of diagnosis methods including polymerase chain reaction.Zentralblatt für Veterinärmedizin, Reihe B., **41**: 597-602.

9-Kleven, S.H. (1994) Summary of discussions, Avian

www.SID.ir

Mycoplasma Team, International Research Program on Comparative Mycoplasmology,University of Ljubljana, Domzale, Slovenia,*Avian Pathology*, **23**: 587-594.

10-Kleven, S.H. (2008) Mycoplasmosis. In: Diseases of Poultry, 12th edition.Saif,Y.M.,Iowa State University Press, PP:805-807

11-Kleven, S.H., Ferguson-Noel, N. (2008) Mycoplasma synoviae Infection.In:Diseases of Poultry, 12th edition.Saif,Y.M.,Iowa State University Press, PP: 845-856.

12-Kleven,S.H., Ferguson-Noel, N (2008) Other Mycoplasmal Infection. In: Disease of poultry., 12thedition.Saif,Y.M.,Iowa State University Press,PP:862-864.

13-Lauerman, L.H., Hoerr, F.J., Sharpton, A.R., Shah, S.M.,van Santen, V.L. (1993) Development and application of a polymerase chain reaction assay for Mycoplasma synoviae. *Avian Diseases*, **37**:829-834

14-Levisohn, S., Dykstra, M.J. (1987) A quantitative study of single and mixed infection of the chicken trachea by Mycoplasma gallisepticum. *Avian Diseases*, **31**: 1-12.

15-Marois,C., Oufour-Gesbert,F., Kempf, I. (2000) Detection of mycoplasma synoviae in poultry environment samples by culture and polymerase chain reaction. *Veterinany microbiology*, **73**: 311-318.

16-Marois,C., Picault,P., Kobisch,M., Kempf, I. (2005) Experimental evidence of indirect transmission of Mycoplasma synoviae. *Vet, Res*., **36**:759-769.

17-Marois, C., Savoye, C., Kobisch, M., Kempf, I. (2002) A reverse transcription-PCR assay to detect viable mycoplasma synoviae in poultry environmental samples. *Veterinary microbiology*, **89**:17-28.

18-Salisch, H., Hinz, K-H., Graack. H-D., Ryll, M. (1998) A comparison of a commercial PCR-based test to culture methods for detection of Mycoplasma gallisepticum and Mycoplasma synoviae in concurrently infected chickens. *Avian Pathology*, **27**: 142-147.

19-Yagihashi, T., Tajima, M. (1986) Antibody responses in sera and respiratory secretions from chickens infected with Mycoplasma gallisepticum. *Avian Diseases*, **30**: 543-550.

www.SID.ir