

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 سرم‌سازی رازی کرج، ایران

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

تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۲/۱۳

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۰/۱۴

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 سوپ‌نای 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. سوپ‌نای به لوله‌های درپوش‌دار حاوی محیط انتخابی مایکوپلاسما منتقل شده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در کم‌تر از ۲۴ ساعت به آزمایشگاه ارسال شدند. در آزمایشگاه میزان پادتن ضد مایکوپلاسما سینوویه به روش آزمایش آگلوتیناسیون سریع روی لام و الیزا اندازه‌گیری شد. نمونه‌های سوپ‌های نای توسط آزمون (High Resolution) 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 مایکوپلاسما سینوویه به کار رفته در واکسن زنده را نشان دادند. این مطالعه نشان داد واکسیناسیون 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، الیزا، 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 بیماری‌زایی 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 ماکیان 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 هفته‌گی 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 متغیر است و به طور معمول ۵ تا ۱۵ درصد می‌باشد. درگیری تنفسی معمولاً بدون نشانه است اما ۹۰-۱۰۰ 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، تنوآزینیت 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 پیش‌گیری از وقوع بیماری در گله‌های مولد و جلوگیری از انتقال بیماری به تخم مرغ‌ها و نهایتاً جوجه‌های گوشتی تهیه شده است (۱۴) و بی‌خطر 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 پرایم 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،

میکروتیوپ تا هنگام آزمایش نگه‌داری شدند. قبل از انجام آزمایش، سرم‌ها در دمای اتاق قرار گرفته تا دمای سرم‌ها با دمای آنتی‌ژن مایکوپلازما سینوویه یک‌سان شود. جهت انجام آزمایش یک حجم سرم (تقریباً معادل ۳۰ میکرولیتر) روی یک لام ریخته و یک حجم از آنتی‌ژن رنگی مایکوپلازما 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 مایکوپلازما سینوویه

نمونه‌های سوآپ نایی توسط آزمون HRM با استفاده از ژن *vlhA* PCR (توالی یک ناحیه محافظت شده با یک کپی در ژن *vlhA* مایکوپلازما 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 ۶-۸ VP/PH به محیط‌ها اضافه شد، این محیط‌ها در انکوباتور CO₂ دار قرار گرفتند و ۷-۱۰ 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.

سریع، با حساسیت بسیار بالا برای شناسایی DNA مایکوپلازما سینوویه در بافت و یا محیط کشت می‌باشد. جدایه‌های مایکوپلازما سینوویه از طریق تجزیه و تحلیل محدودالانثر DNA می‌توان تمایز داد (۱۳) تجزیه و تحلیل قسمت‌های حفاظت شده ژن *vlhA* به وسیله سکانس مستقیم و سایر تکنیک‌ها مکرراً برای شناسایی جدایه‌ها 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 مایکوپلازما سینوویه و بررسی کارایی واکسن ضد مایکوپلازما سینوویه در گله‌های مادر گوشتی واکسینه شده انجام شد.

مواد و روش کار

روش نمونه‌برداری

از ۲۰ مزرعه گله مرغ مادر گوشتی واکسینه شده در کشور که قبل از واکسیناسیون عدم آلودگی آن‌ها به مایکوپلازما سینوویه تأیید شده بود در ۲ نوبت در سنین ۴۰ و ۶۰ هفتگی، ۲۰ سوآب نای (سوآب در لوله آزمایش استریل) و ۲۰ نمونه-ی خون از هر مزرعه و نتاج آن‌ها گرفته شد. سوآب 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 مدت ۳۰ ثانیه ورتکس شدند و سوآب خارج شد. نمونه‌ها به صورت الیکوت‌های ۰/۵ میلی لیتری جهت خالص سازی DNA آماده سازی شدند (۵). نمونه‌های سرمی در کمتر از ۲۴ ساعت به آزمایشگاه انتقال داده شدند و حداکثر طی ۴۸ ساعت مورد آزمایش RSA و الیزا قرار گرفتند.

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 و در

استخراج DNA

استخراج DNA نمونه‌های مورد مطالعه با استفاده از روش فنل - کلروفرم و در سه مرحله 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، بافر لایز 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 یخچال ۴ C (در صورت نگهداری طولانی مدت فریزر ۲۰C-) انتقال داده شد (۱۵).

آمپلیفیکاسیون PCR و آنالیز نمودار HRM

از دو پرایمر الیگونوکلوئیدی 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 vIhA مایکوپلاسما سینوویه استفاده شد. آمپلیفیکاسیون در ۲۰ میکرولیتر حجم واکنشی شامل ۲ میکرولیتر بافر ۱۰X PCR، ۱ میکرولیتر پرایمر مخلوط شده (۲۵ μM)، ۰/۲ میکرولیتر dNTP (۱۰ mM)، ۱ میکرولیتر کلرید منیزیم ۵۰ mM، ۱/۶ میکرولیتر زنجیره نوکلئیک اسید SYTO ۹ سبز، ۰/۲۵ میکرولیتر DNA پلیمرز تنگ (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 سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه، در ۵۴ درجه سانتی گراد 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

نتایج

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

منحنی ذوب 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. آمپلیکون‌ها با استفاده از کیت خالص سازی PCR (کیازن) 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 پرایمرهایی 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 *vlhA* 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 سویه مایکوپلازما سینوویه واکسن تهیه شده از ژن بانک (AF464936.1) جهت مقایسه استفاده شد.

جدول ۱. نتایج آزمایش‌های سرولوژی و شناسایی مولکولی مایکوپلازما از گله‌های مادر در سن ۴۰ هفتگی و نتایج آن‌ها

ردیف (گله مادر)	RSA مادر		میانگین آزمایش الیزا گله‌های مادر				RSA مادر		میانگین آزمایش الیزا برای نتایج	
	-	+	PCR مادر	نتایج PCR	نتایج RSA	نتایج PCR	-	+	-	+
۱	۰	۲۰	۰	۰	۱۵	۲۰	۰	۰	۰	۲۰
۲	۱	۱۹	۰	۰	۱۴	۲۰	۰	۰	۰	۲۰
۳	۰	۲۰	۰	۰	۱۹	۲۰	۰	۰	۰	۲۰
۴	۴	۱۶	۰	۰	۲۰	۲۰	۰	۰	۰	۲۰
۵	۰	۲۰	۰	۰	۱۹	۲۰	۰	۰	۰	۲۰
۶	۰	۲۰	۰	۰	۱۸	۲۰	۰	۰	۰	۲۰
۷	۰	۲۰	۰	۰	۱۹	۲۰	۰	۰	۰	۲۰
۸	۷	۱۳	۰	۰	۱۶	۲۰	۰	۰	۰	۲۰
۹	۰	۲۰	۰	۰	۲۰	۲۰	۰	۰	۰	۲۰
۱۰	۰	۲۰	۰	۰	۲۰	۲۰	۰	۰	۰	۲۰
۱۱	۱	۱۹	۰	۰	۱۸	۲۰	۰	۰	۰	۲۰
۱۲	۰	۲۰	۰	۰	۱۹	۲۰	۰	۰	۰	۲۰
۱۳	۰	۲۰	۰	۰	۱۹	۲۰	۰	۰	۰	۲۰
۱۴	۲	۱۸	۰	۰	۱۶	۲۰	۰	۰	۰	۲۰
۱۵	۱	۱۹	۰	۰	۱۸	۲۰	۰	۰	۰	۲۰
۱۶	۲	۱۸	۰	۰	۱۳	۲۰	۰	۰	۰	۲۰
۱۷	۳	۱۷	۰	۰	۱۶	۲۰	۰	۰	۰	۲۰
۱۸	۰	۲۰	۰	۰	۲۰	۲۰	۰	۰	۰	۲۰
۱۹	۰	۲۰	۰	۰	۱۶	۲۰	۰	۰	۰	۲۰
۲۰	۰	۲۰	۰	۰	۱۹	۲۰	۰	۰	۰	۲۰

جدول ۲. نتایج آزمایش‌های سرولوژی و شناسایی مولکولی مایکوپلازما از گله‌های مادر در سن ۶۰ هفتگی و نتایج آن‌ها

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

بحث

به دلیل اهمیت بیماری مایکوپلازما 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). مایکوپلازما سینوویه دارای لیپوپروتئین متغیر هم‌گلوتینین (vlhA) است که توسط ژن vlhA به صورت یک پروتئین منفرد بیان می‌شود، ژن vlhA لیپوپروتئینی سطحی با نواحی متغیر و ثابت، تولید می‌کند (۲۵). پروتئین vlhA پس از همانندسازی به دو پروتئین معجزا شکسته می‌شود، لیپوپروتئین MSPB قطعه‌ی N-terminal و MSPA، قطعه‌ی C-terminal که 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 ناحیه‌ی PRR، در میان سویه‌های مایکوپلازما سینوویه متفاوت است. علاوه بر این جمعیت‌های کلونی مایکوپلازما سینوویه قادرند اندازه‌های متغیری از پروتئین MSPB 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 در کشور و سویه‌های وحشی در مزارع مرغ مادر و گوشتی انجام گرفت. نمونه‌های سواب اخذ شده توسط آزمون

استفاده از آزمون SSCP در میان ۳۵ جدایه مختلف مایکوپلازما 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 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 استفاده از PCR بر پایه SSCP یا HRM از VIhA بیشترین جهش‌ها را در میان جدایه‌های مایکوپلازما 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 مایکوپلازما 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 مایکوپلازما سینوویه در آزمایشگاه به کار برده شود. صیفی (۲۰۱۳) عوامل مستعد کننده و ایجادکننده عفونت مایکوپلازما 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 مایکوپلازما سینوویه مشاهده نکردند (۱۹). این مطالعه نشان داد واکسیناسیون با واکسن‌های فعلی ضد مایکوپلازما 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.

HRM (High Resolution Melting) 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 مایکوپلازما سینوویه جدا شده از مزارع و مایکوپلازما 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 HRM (High Resolution Melting) با استفاده از ژن vlhA، نشان داد مایکوپلازما‌های شناسایی شده متفاوت از مایکوپلازما‌ی 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 مایکوپلازما 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 Yang Hong، 1996). همکاران (۲۰۰۴) انتهای N ژن vlhA را که کد کننده هم‌گلوپتینین است را به عنوان قسمت متغیر مایکوپلازما سینوویه در نظر گرفتند و از آن به عنوان تشخیص و شروعی برای تعیین نوع نمونه فیلدی مایکوپلازما سینوویه در طیور تجاری استفاده نمودند. Jeffery و همکاران (۲۰۰۷) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن vlhA و همچنین با

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

- 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.
- ۱-انصاری، ح.، پوربخش، س.ع.، شیخی، ن.، بزرگمهری-فرد، م.ح.، اشتری، ع. (۱۳۸۸) تشخیص گونه مایکوپلاسما سینوویه در نمونه های 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 مرغداری های صنعتی استان مازندران، رساله دکترای تخصصی بیماری های 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

- 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 Diseases*, **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(Beograd)*, **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 analysis targeting the Hemagglutinin encoding Gene VlhA, *Avian Diseases*, **48**:606-616.

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 transferred 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