Archive of SID

مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۰، دوره ۶۶، شماره ۲، ۱۲۲-۱۱۷

# تشخیص و تفریق اولیه تعدادی از جدایه‌های مایکوپلاسما سینوویه ایران به روش PCR براساس تکثیر بخشی از ناحیه انتهایی 5 ژن *VlhA*

سید علی غفوری[1*] محمد حسن بزرگمهری فرد[2] وحید کریمی[2] محمد حسین ناظم شیرازی[1] امیر نورمحمدی[3] حسین حسینی[4]

۱) بخش سلولی مولکولی مرکز تشخیص وکنترل دارو وفراورده‌های بیولوژیک سازمان دامپزشکی، تهران، تهران - ایران.
۲) گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه، تهران، تهران - ایران.
۳) دانشکده دامپزشکی دانشگاه ملبورن، ملبورن - استرالیا.
۴) دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد تهران، تهران - ایران.

(دریافت مقاله: ۳۱ فروردین ماه ۱۳۸۹، پذیرش نهایی: ۲ مرداد ماه ۱۳۸۹)

## چکیده

**مایکوپلاسماسینوویه بعنوان یک عامل بیماریزای دخیل در عوارض تنفسی ولنگش، خسارات اقتصادی قابل توجهی را متوجه صنعت طیور در ایران می‌سازد. لذا تشخیص سریع وقطعی آلودگی و نیز تفریق سویه‌ها از ابزارهای کلیدی در پیشگیری و کنترل می‌باشد. هدف از این مطالعه جداسازی میکروارگانیزم و تشخیص، شناسایی و نیز تفریق سویه‌های رایج درایران بویژه سویه‌های فیلد وواکسن به‌روش مولکولی بود. از ۱۱ مرغداری در مناطق مختلف کشور هرکدام تعداد ۲۰ نمونه خون جهت آزمایش تست سریع آگلوتیناسیون والایزا، ۱۰ نمونه سواب نای وشکاف کامی وبافت بمنظور کشت و نیز ۹ نمونه سواب جهت آزمایش PCR اخذگردید. بمنظور تشخیص این میکروارگانیزم بروش مولکولی، علاوه بر پرایمرهای *16srRNA*، برای اولین بار در کشور از جفت پرایمر مربوط به انتهای آمینی ژن *VlhA* استفاده‌گردید. نتایج حاصله از روش PCR با استفاده از جفت پرایمر اخیر نشان داد که علاوه بر امکان شناسایی گونه مایکوپلاسماسینوویه در مورد نمونه‌های مورد آزمایش، اندازه محصول PCR بدست آمده در سویه‌های مختلف شامل جدایه‌های بدست‌آمده، سویه استاندارد وسویه واکسن بین ۳۵۰ تا ۴۰۰ جفت باز متفاوت بود. مقایسه نتایج این روش با روشهای سرولوژی و جداسازی ونیز روش PCR معمول با استفاده از پرایمرهای مربوط به ژن *16srRNA* از یکسو و نیز اختلاف اندازه در باندهای ایجادشده در سویه‌های مختلف از سوی دیگر دلالت برآن دارد که روش PCR با استفاده از پرایمرهای مربوط به ژن *vlhA* می‌تواند در مورد نمونه‌های بالینی بعنوان یک روش با حساسیت وویژگی بالا جهت تشخیص گونه مایکوپلاسماسینوویه و نیز تفریق اولیه سویه‌ها اعم از واکسن یا سویه فیلد مطرح باشد.**

**واژه‌های کلیدی:** مایکوپلاسماسینوویه، جداسازی، تفریق، *VlhA*، PCR.

## مقدمه

مایکوپلاسماسینوویه یک عامل بیماری‌زای عفونی در ماکیان و بوقلمون بوده و سبب ایجاد خسارات اقتصادی قابل توجهی به صنعت طیور می‌گردد. با توجه به برخی مشکلات مربوط به تشخیص در روش های رایج مثل سرولوژی و جداسازی باکتری، طراحی روش‌های تشخیصی قابل اطمینان و سریع در پیشگیری از انتشار عفونت در گله‌ها و کنترل آن در سطح مزارع پرورشی بیش از پیش ضروری به نظر می‌رسد. تست غربالگری سرولوژی هنوز بعنوان یک آزمون سریع و اولیه مطرح بوده ولی ممکن است در تشخیص عفونت‌های تحت بالینی و به‌ویژه در ابتدای آلودگی گله، دارای حساسیت کافی نبوده ونیز به دلیل ویژگی پایین، روش کاملی جهت تشخیص قطعی آلودگی با مایکوپلاسما سینوویه و تصمیم‌گیری قطعی در مورد گله مربوطه نباشد (۴،۱۵).

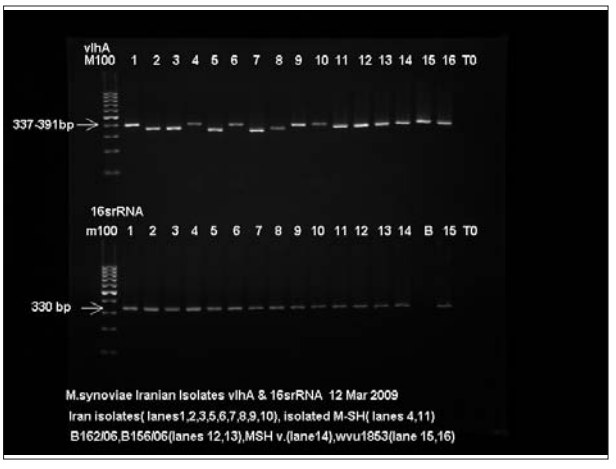
همچنین کشت مایکوپلاسماها به دلیل صرف هزینه و وقت زیاد و نیز در برخی موارد عدم توانایی در جداسازی، کاربرد این روش را بعنوان یک آزمون معمول کمرنگ می‌سازد (۴). بنابراین تست‌های مبتنی بر PCR اکنون بطور معمول جهت تشخیص مایکوپلاسماهای بیماری‌زای طیور استفاده می‌شود. معمولاً این تست‌ها براساس تکثیر بخشی از ژن *16srRNA* صورت گرفته (۱۰،۱۷) و برخی بصورت کیتهای تجارتی در دسترس می‌باشند. ماهیت پایدار و ثابت این ژن در یک گونه توانایی این آزمون را در حد تشخیص گونه مایکوپلاسما سینوویه محدود ساخته و اجازه تفریق سویه ای را نمی دهد (۳،۱۲).

تست PCR مایکوپلاسما سینوویه براساس ژن کدکننده پروتئین هماگلوتینین (*VlhA*) توسط برخی محققین طراحی گردیده است (۲،۴،۱۱،۱۲،۱۳). انتهای '5 ژن *VlhA* بصورت یک کپی منفرد بوده و توالی آن در بین سویه‌های مایکوپلاسما سینوویه متفاوت است (۱۸). این قطعه از ژن شامل بخش‌های تکراری کدکننده پلی پتیدهای غنی از پرولین بنام RI و RII بوده و نیز شامل ناحیه‌ای بنام RIII است که بسیار پلی مورفیک می‌باشد. این ویژگی‌ها این قطعه از ژن *VlhA* را بعنوان ناحیه مناسبی برای تعیین سویه به روش‌های مولکولی در جدایه‌های مختلف مطرح می‌سازد (۴،۱۱،۱۳). هدف از این مطالعه تشخیص و شناسایی اولیه سویه‌های مایکوپلاسما سینوویه جدا شده از تعدادی از مزارع پرورش طیور به روش PCR با استفاده از پرایمرهای مربوط به ژن *VlhA* و مقایسه آن با نتایج آزمایشات سرولوژی، جداسازی و نیز مقایسه آن با روش PCR

* نویسنده مسؤول: تلفن: ۰۲۱-۴۴۱۸۰۸۲۷ نمابر: ۰۲۱-۴۴۱۸۰۸۲۷ Email: s_ali_ghafouri@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID




تصویر ۱ـ نمای شماتیک ژن *vlhA* که دو پروتئین MSPB و MSPA راکد می‌کند. ژن مربوط به ناحیه کد کننده MSPB بدو بخش Conserved (محافظت شده) و (Variable متغیر) تقسیم می‌شود. جایگاه پرایمرهای Forward و Reverse بکار رفته در این مطالعه روی تصویر مشخص شده است.

معمول (براساس تکثیر بخشی از ژن *16srRNA*) می‌باشد.

## مواد و روش کار

**تهیه نمونه**. از ۱۱ گله پرورش طیور شامل ۵ گله مادر گوشتی (۲ گله واکسینه با واکسن MS-H و ۳ گله غیرواکسینه)، ۱ گله مادر تخمگذار، ۳ گله تخمگذار تجارتی و ۲ گله گوشتی که در آزمایش سرولوژی (تست سریع آگلوساسیون و الایزا) مثبت گردیدند نمونه برداری و از نظر آلودگی با مایکوپلاسما سینوویه مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین سویه استاندارد WVU1853، سویه واکسنی MS-H متعلق به شرکت Bioproperties استرالیا و نیز سویه‌های B162/06 و B156/07 اخذ شده از دانشگاه لیورپول انگلستان و نیز سویه WVU1853 مربوط به آنتی ژن تست آگلوتیناسیون سریع متعلق به شرکت Intervet هلند نیز بعنوان مقایسه مورد آزمایش قرار گرفتند.

از هر یک از گله‌های مورد نظر تعداد ۲۰ نمونه خون جهت تأیید مجدد نتایج سرولوژی اعلام شده قبلی به روش تست سریع آگلوتنیاسیون با آنتی ژن متعلق به شرکت (Intervet , Netherland) و نیز آزمایش الایزا با استفاده از کیت متعلق به شرکت (Biocheck,USA) اخذ گردید. به منظور انجام آزمایش PCR روی نمونه‌های بالینی بطور مستقیم ۹ نمونه سواپ با میله آلومینیومی بانوک پلی استرازنای و شکاف کامی در پرندگان زنده و در صورت وجود پرنده تازه تلف شده از بافت نای، کیسه‌های هوایی و مفصل اخذ و هر ۳ نمونه در یک لوله استریل حاوی ۱cc PBS قرار داده شد . به منظور کشت و جداسازی عامل نیز ۱۰ نمونه سواب و بافت، به طور جداگانه در لوله‌های حاوی ۵ میلی لیتر محیط کشت مایع Frey حاوی ۱۲ درصد سرم خوک و با ترکیب ارائه شده توسط Frey و همکاران (۹) غوطه ور و در دمای معمولی به آزمایشگاه منتقل گردیدند.

جدول ۱ـ اجزاء محیط Frey جهت کشت مایکوپلاسما سینوویه.

| | |
|---|---|
| Mycoplasma borth base (BBL) | 22.5 g |
| Glucose | 3 g |
| Swine serum | 120 ml |
| Nicotinamide adenlne dinucleotide (NAD) | 0.1 g |
| Cysteine hydrochloride | 0.1 g |
| Phenol red(1%) | 2.5 ml |
| Thallium acetate (10%) | 5 ml |
| Potassium penicilin G | 1.000.000 units |
| Distilled $H_2O$ | 1000 ml |
| Adjust pH to 7.8 with 209 % NaOH and filler sterllize | |

**جداسازی و شناسایی میکروارگانیزم**. نمونه‌های غوطه ور در محیط کشت مایع پس از انتقال به آزمایشگاه، به مدت ۱ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد گذاشته شد و بعد از آن لوله‌ها به مدت ۱۵ ثانیه به آرامی ورتکس و سواپ از لوله خارج و حذف گردید. سپس محیط های مایع حاوی نمونه در انکوباتور ۳۷درجه سانتیگراد حاوی ۵ درصد Co2 قرار گرفتند. از نمونه‌هایی که بعد از ۲۴ ساعت رنگ قرمز آنها به نارنجی تغییر می‌کرد مقدار ۱ میلی لیتر برداشت و جهت شناسایی قطعی مایکوپلاسما سینوویه مورد آزمایش PCR قرار می‌گرفتند. درصورت مثبت شدن نمونه‌ها در PCR، نمونه کشت مایع به محیط آگار Frey (۲درصد آگار) تلقیح شده و درصورت مشاهده کلونی مایکوپلاسما مجدداً از یک کلونی برداشت و به محیط مایع تلقیح می‌گردید و این کار مجدداً تکرار می‌شد(۲بار) تا کلونی تک مایکوپلاسما سینوویه تهیه گردد. به منظور حذف عوامل باکتریایی غیرمایکوپلاسمایی در تمام مراحل انتقال و پاساژ در محیط های مایع از فیلتر سرنگی ۰/۴۵ میکرون استفاده گردید.

**استخراج و تهیه DNA**. استخراج DNA از نمونه‌های مستقیم و نیز نمونه‌های حاصل از کشت در محیط مایع، پس از فیلتراسیون با فیلتر سرنگی ۰/۴۵ میکرون، به روش Boiling(۱،۲۱) صورت گرفت. در نهایت مایع استخراج شده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (ND-1000,USA Nanodrop) از نظر میزان DNA استخراج شده در طول موج ۲۶۰ مورد طیف سنجی قرار گرفتند.

**آزمایش PCR *16srRNA*** جهت تشخیص مایکوپلاسما سینوویه. درمورد قطعه مورد نظر روی ژن *16srRNA* از پرایمرهای MS-F با توالی 5'- TGACTAGTTGATGGAAACCA -3' و MS-R با توالی 5'- CCTTCCTCCCAATTACTCG -3' که محصول PCR ۳۳۰ جفت بازی تولید می‌کند استفاده گردید(۱۹). آزمایش PCR توسط ترموسایکلر MJ research متعلق به کمپانی Watertown,MA و در یک حجم PCR ۵۰ میکرولیتری شامل ۰/۲ میلی مول dNTP، ۲/۵ واحد آنزیم Taq DNA Ploymerase، ۵ میکرولیتر بافر واکنش، ۰/۵ میلی مول از هر یک از پرایمرهای MS-F و MS-R و ۲/۵ میلی مول Mgcl2 و ۱ میکرولیتر نمونه

www.SID.ir

Archive of SID

DNA و نهایتاً آب عاری از DNA تا حجم ۵۰ میکرولیتر صورت گرفت. برنامه واکنش شامل مرحله اول در دمای ۹۴ درجه‌سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه، ۳۶ سیکل شامل دمای ۹۴درجه سانتیگراد (۱ دقیقه)، ۵۲ درجه سانتیگراد (۱ دقیقه) و ۷۲ درجه سانتیگراد (۱ دقیقه) و مرحله Extention نهایی در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه بود.

**آزمایش Duplex PCR** جهت شناسایی همزمان مایکوپلاسما سینوویه و مایکوپلاسما گالی سپتیکوم . با توجه به امکان رشد مایکوپلاسما گالی سپتیکوم در محیط کشت و به منظور تشخیص موارد آلودگی احتمالی با این باکتری کلیه نمونه‌ها مطابق ترکیب و برنامه فوق ولی با اضافه کردن پرایمرهای مربوط به مایکوپلاسما گالی سپتیکوم بنام MG1273f با توالی 5-GTTGCAAATCCCTAAGGTGG- 3 و MG1427r با توالی 5-TTAGCAACACGGTTTTAGAT- 3 مورد آزمایش قرار گرفتند(۳).

**آزمایش *vlhA* PCR** جهت تشخیص مایکوپلاسماسینوویه. درمورد تکثیربخشی از ناحیه انتهایی ۵' ژن *V1hA*[9] محققین مختلف از پرایمرهای متفاوتی استفاده نموده‌اند(۲،۳،۱۱،۱۲،۱۳). با توجه به مقایسه اولیه کارآیی این پرایمرها و نظر به حساسیت و ویژگی جفت پرایمر مورد استفاده توسط Hammond و همکاران در سال ۲۰۰۹ بنام *v1hA*F با توالی C - 3 ATTAGCAGCTAGTGCAGTGGC - 5 و *v1hA*R2 با توالی 3 - AGT AAC CGA TCC GCT TAA TG -5، در این مطالعه از آنها استفاده شد. ویژگی این پرایمرها در حد تشخیص اختصاصی مایکوپلاسماسینوویه و عدم تشکیل باند در مورد ۲۲ گونه مایکوپلاسمایی دیگر بوده و حساسیت آن در حد 1 cfu/100 ul و در رقت $10^{-3}$ می‌باشد(۱۲). آزمایش PCR در یک حجم ۵۰ میکرولیتری شامل ۰/۲ میلی مول dNTP، ۰/۵ میلی مول از هر پرایمر، ۵ میکرولیتر بافر واکنش، ۲/۵ میلی مول Mgcl2، ۲/۵ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase و یک میکرولیتر نمونه DNA و آب عاری از DNA تا حجم ۵۰ میکرولیتر صورت گرفت. برنامه واکنش همانند برنامه قبلی صورت گرفت. محصول PCR بدست آمده روی ژل آگاروز ۲ درصد و بافر TBE 10x و با استفاده از اتیدیوم بروماید(۰/۲ میکروگرم در میلی لیتر) در جریان ۱۰۰ v و به مدت ۱ ساعت و در مقایسه با مارکر ۱۰۰ قرائت گردیدند.

## نتیجه

از تعداد ۲۲۰ نمونه سرم آزمایش شده، ۱۸۲ نمونه(۸۳درصد) در تست سریع آگلوتیناسیون با رقت ۱/۸ و ۱۸۷ نمونه(۸۵درصد) در آزمایش الایزا مثبت گردیدند. در مجموع از نظر نتایج سرولوژی، تمامی گله‌های مورد آزمایش در سرولوژی مثبت بودند(جدول ۱).

از تعداد ۱۱۰ نمونه کشت داده شده مربوط به ۱۱ گله مورد آزمایش در محیط مایع Frey، تعداد ۷۹ نمونه(۷۲درصد) مربوط به ۹ گله دچار تغییر رنگ شدند که تمام این نمونه‌ها در آزمایش PCR از نظر

جدول۲ ـ نتایج آزمایشات سرولوژی روی گله‌های مورد مطالعه

| | تعدادگله مثبت | تعداد گله منفی | تعداد نمونه مثبت | تعداد نمونه منفی | تعداد کل | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | گله | نمونه |
| آزمایش آگلوتیناسیون سریع | ۱۱ | ۰ | ۱۸۲ | ۳۸ | ۱۱ | ۲۲۰ |
| آزمایش الایزا | ۱۱ | ۰ | ۱۸۷ | ۳۳ | ۱۱ | ۲۲۰ |
| کشت و جداسازی | ۹ | ۰ | ۷۹ | ۲ | ۱۱ | ۱۱۰ |
| PCR (16*srRNA*) | ۱۱ | ۰ | ۳۱ | ۲ | ۱۱ | ۳۳ |
| PCR (*vlhA*) | ۱۱ | ۰ | ۲۹ | ۴ | ۱۱ | ۳۳ |

مایکوپلاسماسینوویه مثبت تشخیص داده شده و نهایتا از هر گله ۱ جدایه به‌شکل کلونی خالص تهیه شد(جدول۱).

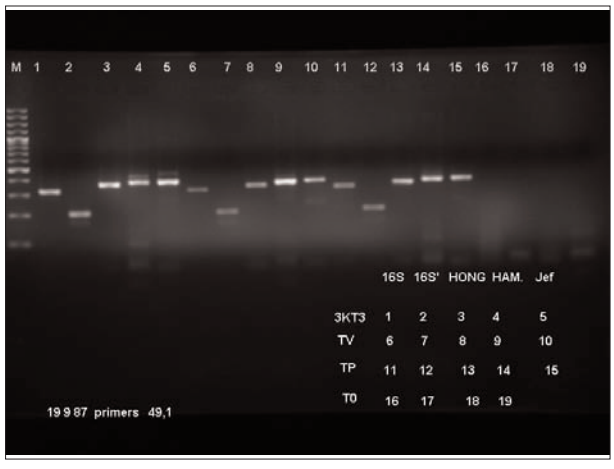
نکته دیگر این‌که امکان کشت‌های متوالی و نیز تهیه کلونی روی آگار از نمونه‌هایی که محیط کشت مایع قرمز را به زرد کامل تغییر داده بودند وجود نداشت. در مورد استفاده از سرم اسب در محیط کشت تنها ۴۲درصد از نمونه‌های مثبت در محیط حاوی سرم خوک در محیط دارای سرم اسب نیز تغییر رنگ دادولی پاساژهای متوالی روی محیط آگار و براث حاوی سرم اسب تا مرحله تهیه پرگنه خالص بجز ۱ مورد با موفقیت همراه نبود. از نمونه‌های مفصل نیز باکتری جدا نگردید.

سواب‌های مستقیم مربوط به نمونه‌های مثبت در آزمایش سرولوژی و نیز میکروبیولوژی (تغییر رنگ در محیط مایع Frey) در آزمایش PCR با پرایمرهای مربوط به ژن 16*srRNA* مربوطه تأیید گردیدند و روی ژل آگاروز ۲درصد باندی باندازه ۳۳۰ جفت باز تشکیل دادند(تصویر۲). علاوه بر این نمونه‌های مربوط به دو گله که در کشت و جداسازی، عاملی جدا نگردید در آزمایش PCR بر روی سواب‌های مستقیم نای و شکاف کامی مثبت تشخیص داده شدند. تنها ۲ نمونه از مجموع ۳۳ نمونه پول شده (هر ۳ سواب مستقیم در یک لوله) در آزمایش PCR مستقیم منفی گردیدند اما در مجموع تمام گله‌های مورد آزمایش در PCR مستقیم از نظر مایکوپلاسما سینوویه مثبت تشخیص داده شدند(جدول ۱). همچنین باندهای حاصل از نمونه‌های مأخوذه از محیط کشت بدلیل تکثیر باکتری در آن در همه موارد قویتر از باندهای مربوط به سواب مستقیم همان نمونه بود. نمونه‌های مأخوذه از مفصل در PCR، منفی تشخیص داده شدند.

با استفاده از پرایمرهای مربوط به ناحیه '5 ژن *V1hA*، تمامی نمونه‌ها مورد آزمایش قرار گرفتند که نتایج با نتایج مربوط به PCR معمول (براساس تکثیر بخشی از 16*srRNA*) همخوانی داشت. اندازه باند موارد مثبت روی ژل آگاروز با یکدیگر و نیز با سویه واکسن و سویه‌های B162/06 و B156/07 و نیز سویه استاندارد WVU1853 تقریبا بین ۳۵۰ تا ۴۰۰ جفت باز متفاوت بود(تصویر۱).

www.SID.ir

Archive of SID




تصویر ۲ـ مقایسه پرایمرهای مختلف *16srRNA* و *v1hA* از نظر توانایی در تشخیص مایکوپلاسما سینوویه. نمونه 3KT3 یکی از جدایه‌های ایران، TV نمونه واکسن، TP سویه استاندارد WVU1853 و T0 کنترل منفی می‌باشد.

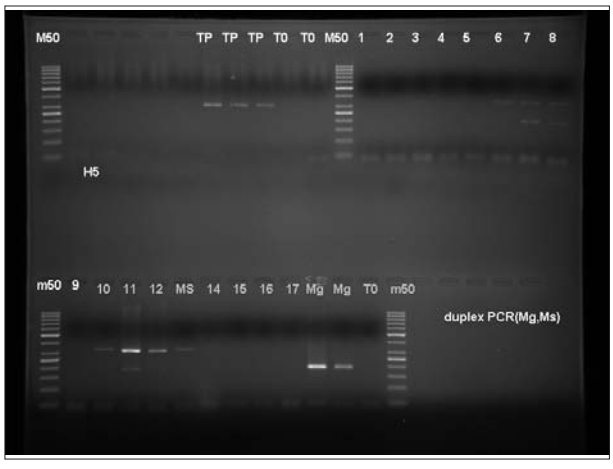
نتایج تشخیص همزمان مایکوپلاسما سینوویه و گالی سپتیکوم با استفاده از روش PCR Duplex حاکی از عدم آلودگی نمونه‌های مربوط به ۱۰ گله و وجود آلودگی توأم با مایکوپلاسما گالی سپتیکوم و مایکوپلاسما سینوویه در ۳ نمونه (سواب مستقیم و نمونه اخذ شده از محیط کشت مایع تغییر رنگ یافته) از یک گله گوشتی بود (تصویر ۲).

## بحث

جز در مراحل ابتدایی آلودگی، به نظر می‌رسد نتایج آزمایش PCR در مقایسه با نتایج جداسازی، همخوانی بیشتری با نتایج سرولوژی داشته ولی در مرحله شروع آلودگی، به دلیل عدم وجود آنتی بادی فقط با آزمایش PCR یا جداسازی عامل، امکان تشخیص آلودگی می‌باشد (۸). در هر صورت تکیه صرف بر نتایج سرولوژی جهت تشخیص قطعی وضعیت آلودگی گله با مایکوپلاسما سینوویه قابل توصیه نمی‌باشد (۷)، ضمن اینکه حتی غربالگری اولیه با تست سرولوژی نیز می‌تواند منجر به از قلم افتادن تعدادی از گله‌های واجد آلودگی اخیر گردد (۱۵).

نتایج جداسازی، حاکی از ۶۸ درصد موفقیت در تشخیص عامل می‌باشد. نظر به این‌که احتمال آلودگی همزمان با دو یا چند گونه مایکوپلاسما وجود داشته و از طرفی با توجه به این‌که محیط ویژه رشد مایکوپلاسما سینوویه جهت رشد مایکوپلاسماهای دیگر مثل مایکوپلاسما گالی سپتیکوم نیز مناسب می‌باشد، به نظر می‌رسد انجام آزمایش PCR بتواند در شناسایی و تفریق گونه ای مایکوپلاسما روی نمونه‌های مثبت مایکوپلاسما سینوویه در کشت کمک نماید. به هر حال در صورت نیاز به مطالعات بعدی و نیز در برخی موارد مثل حضور سویه‌های آتیپیک هنوز روش جداسازی عامل علیرغم وقت گیر و هزینه بردار بودن بعنوان یک روش ارزشمند مطرح می‌باشد (۷،۱۴).

آزمایش PCR جهت تشخیص مایکوپلاسما سینوویه پیشتر گزارش




تصویر ۳ـ آزمایش Duplex PCR با استفاده از پرایمرهای *16srRNA* جهت تشخیص همزمان مایکوپلاسما گالی سپتیکوم و مایکوپلاسما سینوویه. نمونه‌های ۷، ۸ و ۱۱ مربوط به یک گله تخمگذار به هردوگونه مایکوپلاسمایی آلوده بوده (باند ۲۰۹ و ۳۳۰ جفت بازی) و نمونه ۶، ۱۰ و ۱۲ فقط به مایکوپلاسما سینوویه آلوده هستند.

شده است (۲،۳،۱۰،۱۱،۱۲،۱۷). برخی از این مطالعات براساس تکثیر بخشی از ناحیه انتهایی و۵ روی ژن *V1hA* بوده است که از نظر موقعیت و اندازه قطعه تکثیر یافته ،تفاوتهایی در حد یک تا چند نوکلئوتید دارند. با توجه به ویژگی و حساسیت بالای روش Hammond و پرایمرهای مورد استفاده، در این مطالعه از پرایمرهای مذکور استفاده گردید (۳،۱۱،۱۲،۱۳). پرایمرهای مربوط به ژن *16srRNA* به دلیل پایداری و تغییرات ناچیز نوکلئوتیدی در سویه‌های مختلف گونه مایکوپلاسما سینوویه در مناطق و مقاطع زمانی متفاوت، روش قابل قبولی جهت تشخیص آلودگی با این گونه حتی در مواردی که آزمونهای سرولوژی و جداسازی قادر به تشخیص نمونه‌های مثبت نمی باشند، قلمداد می‌گردد. در این بررسی جهت PCR معمول (براساس تکثیر بخشی از ژن *16srRNA*) از پرایمرهایی استفاده شد که محصول ۳۳۰ جفت بازی ایجاد نمایند تا بتواند براحتی از محصول ۲۰۹ جفت بازی مربوط به پرایمرهای استفاده شده جهت تشخیص مایکوپلاسما گالی سپتیکوم به ویژه در آزمایش PCR Duplex قابل تفریق باشد (۴،۱۸).

پرایمر R1 بکار گرفته شده توسط Bencina (۴) احتمالاً به دلیل قرار گفتن در ناحیه بسیار متغیر ژن *V1hA* ،در برخی موارد قادر به تشخیص برخی سویه‌ها نبوده و باعث ایجاد نتایج منفی کاذب می‌گردد. از طرفی پرایمرهای مورد استفاده توسط Hong (۱۲) به دلیل در بر نگرفتن ناحیه متغیر RIII احتمالاً نتواند در تفریق اولیه سویه‌ها و جدایه‌های مایکوپلاسما سینوویه کمک نماید. این در حالیست که پرایمر *v1hA*R2 استفاده شده توسط Hammond (۱۱) و Jeffery (۱۳) به دلیل نداشتن دو نقیصه فوق می‌تواند علاوه بر داشتن حساسیت کافی در تفریق اولیه جدایه‌ها نیز کمک نماید. همچنین طبق مطالعه Hammond و همکاران (۱۲) پرایمرهای بکار رفته توسط ایشان با هیچ‌یک از ۲۲ گونه مایکوپلاسمای دیگر واکنش نداده و از طرفی حتی در برخی سویه‌ها تا

www.SID.ir

Archive of SID

رقت $10^{-5}$ (نزدیک به ۱ پیکوگرم) از نمونه DNA، قادر به تشخیص عامل بوده است در حالی‌که در چنین رقتی هیچ کلونی حتی در محیط کشت رشد نمی‌کند.

مقایسه باندهای به دست آمده از پرایمرهای *V1hA*-F و *V1hA*R2 نشان می‌دهد که بین جدایه‌های مختلف ایران و نیز سویه واکسنی H-MS و سویه استاندارد از نظر اندازه اختلاف وجود دارد، بطوری‌که باند مربوط به سویه واکسن به طور قابل توجهی از باند مربوط به سویه استاندارد WVU1853 و نیز جدایه‌های دیگر متفاوت است، در حالی‌که با استفاده از پرایمرهای مربوط به ژن *16srRNA* هیچ تفاوتی از نظر اندازه باند بین نمونه‌های مختلف وجود ندارد (تصویر ۱). این یافته با نتایج مطالعات محققین قبلی همخوانی دارد(۲،۱۱،۱۲،۱۳)، لذا با استفاده از پرایمرهای مربوط به ژن *V1hA* امکان تفریق اولیه سویه‌ها و نیز تفریق جدایه خاص از سویه واکسن (به شرط اختلاف اندازه محصول) وجود دارد. همچنین این محصول PCR بدلیل دربرگرفتن بخشی از ناحیه پلی مورفیک *v1hA*، در مطالعات مولکولی تکمیلی مثل تعیین توالی و RFLP، در مقایسه با ژن *16srRNA* دارای ارزش بیشتری می‌باشد(۱۱،۱۲). به همین دلیل در کشورهایی مانند استرالیا که دودمان واکسن مذکور جزء سویه‌های فیلدی است ویا در مناطقی که احتمالا سویه واکسنی بمرور زمان در زمره سویه‌های فیلدی قرار میگیزد تفاوتی بین اندازه باند سویه واکسن و فیلد وجود نداشته و نیاز به آزمایشات مولکولی تکمیلی می‌باشد.

از نتایج دیگر این بررسی همسان بودن اندازه باند سویه واکسن با جدایه اخذ شده از گله‌های واکسینه با واکسن MS-H حتی تا ۶۰ هفته بعد از واکسیناسیون می‌باشد که با توجه به تعداد کم نمونه‌های مربوط به گله‌های واکسینه مورد آزمایش اثبات عدم وجود آلودگی مایکوپلاسمایی در گله‌های واکسینه با واکسن حساس به حرارت MS-H نیاز به بررسی‌های بیشتر می‌باشد.

## تشکر وقدردانی

بدین وسیله از آقایان دکتر David Ley، عباس برین، سیاوش نیازی، فضل الله الهام نیا، رامین اکبریان، حسین مقصودلو و رضا حسن زاده و خانمها دکتر Janet M. Bradburry، دکتر معصومه فرشچیان، مریم اخلاقی، سحر ناز حاج آقازاده، ندا بنی صدر و آزاده احمدی بدلیل زحمات وهمکاریهای بیدریغ ایشان و نیز شرکت پارس فاطم بدلیل تامین بخشی از مواد مورد نیاز در این مطالعه سپاسگزاری می‌گردد.

## References

1. Ben Abdelmoumen Mardassi, B., Ben Mohamed, R., Gueriri, I., Boughattas, S., Mlik, B. (2005) Duplex PCR to differentiate between *Mycoplasma synoviae* and Mycoplasma gallisepticum on the basis of conserved species-specific sequences of their hemagglutinin genes. J. Clin. Microbiol. 43: 948-958.
2. Bencina, D., Drobnic-Valic, M., Horvat, S., Narat, M., Kleven, S. H., Dovc, P. (2001) Molecular basis of the length variation in the N-terminal part of *Mycoplasma synoviae* hemagglutinin. FEMS Microbiol. Lett. 203: 115-123.
3. Dufour-Gesbert F., Dheilly A., Marois C., Kempf I. (2005) Epidemiological study on *Mycoplasma synoviae* infection in layers. Vet. Microbiol. 114:148-154.
4. Ewing, L., Cookson, K. C., Phillips, R. A., Turner, K. R., Kleven, S. H. (1998) Experimental infection and transmissibility of *Mycoplasma synoviae* with delayed serological response in chickens. Avi Dis. 42: 230-238.
5. Fan, H. H., Kleven, S. H., Jackwood, M. W. (1995) Studies of intraspecies heterogeneity of *Mycoplasma synoviae*, M. meleagridis, and M. iowae with arbitrarily primed polymerase chain reaction. Avi. Dis. 39: 766-777.
6. Fan, H. H., Kleven, S. H. Jackwood, M. W. (1995) Application of polymerase chain reaction with arbitrary primers to strain identification of Mycoplasma gallisepticum. Avi Dis. 39: 729-738.
7. Feberwee, A., Mekkes, D. R., Wit, J. J., Hartman, E. G., Pijpers, A. (2005) Comparison of culture, PCR, and different serologic tests for detection of Mycoplasma gallisepticum and *Mycoplasma synoviae* infections. Avi Dis. 49:260-268.
8. Fiorentin, L., Mores, M., Trevisol, I., .Antunes, S., Costa, J., .Soncini, R., Vieira, N. (2003) Test Profiles of Broiler Breeder Flocks Housed in Farms with Endemic *Mycoplasma synoviae* Infection. Braz. J. Poult. Sci. 5: 37 - 43.
9. Frey, M. L., Hanson, R. P., Anderson, D. P. (1968) A

www.SID.ir

Archive of SID

medium for the isolation of avian mycoplasmas. Am. J. Vet. Res. 29: 2163-2171.

10. Garcia, M., Jackwood, M. W., Head, M., Levisohn, S., Kleven, S. H. (1996) Use of species-specific oligonucleotide probes to detect Mycoplasma gallisepticum, M. synoviae and M. iowae PCR amplification products. J. Vet. Diagn. Investig. 8: 56-63.
11. Hammond, P. P., Ramirez, A. S., Morrow, C. J., Bradburry, J. M. (2009) Development and evaluation of an improved diagnostic PCR for *Mycoplasma synoviae* using primers located in the haemagglutinin encoding gene *vlhA* and its value for strain typing. Vet. Microbiol. 136: 61-68.
12. Hong, Y., Garcia, M., Leiting, V., Bencina, D., Dufour-Zavala, L., Zaval, G., Kleven, S. H. (2004) Specific detection and typing of *Mycoplasma synoviae* strains in poultry with PCR and DNA sequence analysis targeting the hemagglutinin encoding gene *vlhA*. Avi Dis. 48: 606-616.
13. Jeffery, N., Gasser, R. B., Steer, P. A., Noormohammadi, A. H. (2007) Classification of *Mycoplasma synoviae* strains using single-strand conformation polymorphism and high-resolution melting-curve analysis of the *vlhA* gene single copy region. Microbiol. 153: 2679-2688.
14. Kempf, I., Gesbert, F., Guittet, M. (1997) Experimental infection of chickens with atypical Mycoplasma gallisepticum strain: comparison of diagnostic methods. Vet. Sci. 63:211-213.
15. Kleven, S. H., Rowland, G. N., Kumar, M. C. (2001) Poor serologic response to upper respiratory infection with *Mycoplasma synoviae* in turkeys. Avi Dis. 48: 719-723.
16. Kleven, S. H., Jordan, F. T. W., Bradburry J. M. (2004) Avian Mycoplasmosis. In: Manual of standard for diagnostic tests and vaccines. ($5^{th}$ ed.) Office International des Epizootics, Paris, France.
17. 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*. Avi Dis. 37: 829-834.
18. Noormohammadi, A. H., Markham, P. F., Kanci, A., Whithear, K. G., Browning, G. F. (2000) A novel mechanism for control of antigenic variation in the hemagglutinin gene family of *Mycoplasma synoviae*.Mol. Microbiol. 35: 911-923.
19. Noormohammadi, A. H., Hemmatzadeh, F., WhithearKevin, G. (2007) Safety and efficacy of the *Mycoplasma synoviae* MS-H vaccine in turkeys. Avi Dis. 51:550-554
20. Ramirez, A. S., Naylor, C. J., Hammond, P. P., Bradbury, J. M. (2006) Development and evaluation of a diagnostic PCR for *Mycoplasma synoviae* using primers located in the intergenic spacer region and the 23SrRNA gene. Vet. Microbiol. 118: 76-82.

www.SID.ir

Archive of SID


# IDENTIFICATION AND PRIMARY DIFFERENTIATION OF IRANIAN ISOLATES OF *MYCOPLASMA SYNOVIAE* USING PCR BASED ON AMPLIFICATION OF CONSERVED 5' END OF *VLHA* GENE

**Ghafouri, S.A.[1*], Bozorgmehrifard, M.H.[2], Karimi V.[2], Nazemshirazi, M.H.[1], Noormohammadi, A.[3], Hosseini, H.[4]**

[1]*Department of Molecular Biology, Central Veterinary Laboratory of I.V.O., Tehran, Tehran- Iran.*

[2]*Department of poultry diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran- Iran.*

[3]*Department of poultry diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Melbourne University, Melbourne-Australia.*

[4]*Department of poultry diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University of Tehran Branch, Tehran- Iran.*

(Received 20 April 2010 , Accepted 24 July 2010)

***Abstract:***

*Mycoplasma synoviae*, (MS) as a pathogen involving in respiratory and locomotor disorders, causes many economic losses on poultry industry in Iran. Therefore, early and reliable diagnosis and also strain differentiation is a key to prevention and control. The aim of this study was the isolation, detection, and differentiation of Iranian isolates especially field and vaccine strains using PCR. Eleven serologically positive flocks from different parts of country were selected. From each flock, 20 blood samples were provided for serum plate agglutination test and ELISA; 10 swabs were taken from trachea, cleft palate, and tissues for MS isolation; and 9 swabs were collected for PCR identification. For the first time in Iran, the primers complementary to the single-copy conserved 5' end of *vlhA* gene were used for detection of MS by PCR. Results obtained from serology, isolation, and PCR using primers related to 16s rRNA and *vlhA* genes were analyzed and compared. PCR results, in addition to identification of Mycoplasma species, revealed variable sizes of 350-400 bp among standard strain, vaccine strains, and Iranian field isolates. The findings of this study demonstrated that the *vlhA* gene-targeted PCR is a sensitive and specific test for detection of M. *synoviae*, and an efficient tool for primary typing of its different strains.

**Key words:** *Mycoplasma synoviae*, *vlhA*, Isolation, differentiation, PCR.

***Corresponding author's email: s_ali_ghafouri@yahoo.com, Tel: 021-44180827, Fax: 021-44180827**

www.SID.ir