تشخیص و ردیابی مایکوپلاسما سینوویه از مرغداری‌های صنعتی با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر اساس ژن vlhA

معصومه مقامی[۱]، سیدعلی پوربخش*[۲]، علیرضا همایونی‌مهر[۳]، حمیدرضا مهاجرانی[٤]، عباس اشتری[۲]، محمدعلی بیات‌زاده[۲]

چکیده

مایکوپلاسما سینوویه مهمترین عامل بیماریزا در ماکیان است و همه ساله خسارات اقتصادی قابل توجهی را متوجه صنعت طیور در ایران می سازد. مایکوپلاسما سینوویه قادر به بیان لیپوپروتئین هماگلوتینین متغیر(VlhA) Variable lipoprotein hemagglutinin A می باشد که نقش مهمی در ایجاد بیماری ایفا می کند. هدف اصلی این مطالعه تشخیص و شناسایی جدایه های مایکوپلاسما سینوویه بر اساس ژن vlhA بود. از گله های طیور صنعتی سه استان (تهران، مرکزی و قزوین) که دارای علائم مشکوک به آلودگی بودند، توسط سوآپ های کتانی و از شکاف حلقی کامی، نای و کیسه‌های هوائی نسبت به نمونه گیری اقدام شد. در این مطالعه ضمن جداسازی و شناسایی مایکوپلاسما با استفاده از روش کشت و آزمون PCR جنس مایکوپلاسما، نسبت به آزمون PCR برای ناحیه محافظت شده ژن vlhA مایکوپلاسما سینوویه نیز مبادرت گردید و بدین ترتیب علاوه بر پرایمرهای اختصاصی جنس مایکوپلاسما از جفت پرایمر مربوط به ناحیه محافظت شده انتهای آمینی ژن vlhA استفاده گردید. در نتایج مشاهده شد که محصول PCR تولیدی برای پرایمرهای اختصاصی ژن vlhA در نمونه های مثبت مایکوپلاسما سینوویه، ۳۵۰-۴۰۰ جفت بازی برای هر جدایه بر روی ژل الکتروفورز تشکیل داده شد و از بین ٤۳ نمونه مورد مطالعه، در روش کشت، ۲۸(٦۵٪) نمونه مثبت مشاهده گردید و در آزمون PCR جنس مایکوپلاسما، ۳۳(۷٦٪) نمونه و همچنین ۲٤(۵۵٪) نمونه در آزمون PCR ژن vlhA مایکوپلاسما سینوویه، مثبت گزارش شدند. نتایج این مطالعه نشان می دهد که آزمون PCR در ناحیهٔ ۵' ژن vlhA مایکوپلاسما سینوویه جهت شناسایی جدایه‌ها کاربردی بوده و همچنین به علت دربرداشتن نواحی RI، RII و ناحیه پلی مورفیسم RIII، با کارایی و حساسیت بالا، می تواند جهت تشخیص و ردیابی گونه مایکوپلاسما سینوویه مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: مایکوپلاسما سینوویه، لیپوپروتئین هماگلوتینین متغیر، ژن vlhA، PCR ،تشخیص، ردیابی.

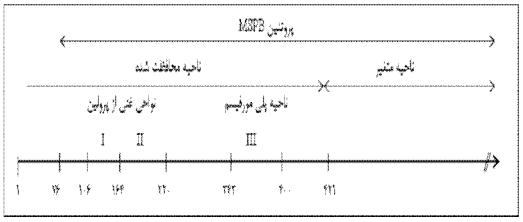
تاریخ دریافت: ۹۱/۷/۵ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۰/۸

مقدمه

مایکوپلاسما سینوویه یکی از عوامل مهم بیماریزای ماکیان و بوقلمون در سرتاسر جهان است(۱۰) که با اُستئوآرتریت، سینوویت و جراحات مفصلی همراه است و همه ساله خسارت اقتصادی زیادی به صنعت طیور وارد می‌نماید(۱٤و ۱۰). مایکوپلاسما سینوویه دارای لیپوپروتئین متغیر هماگلوتینین (VlhA) است که توسط ژن vlhA به صورت یک پروتئین منفرد بیان می شود، ژن vlhA، لیپوپروتئینی سطحی با نواحی متغیر و ثابت، تولید می‌کند(۱٦). پروتئین VlhA پس از همانندسازی به دو پروتئین مجزا شکسته می‌شود، لیپوپروتئین MSPB قطعه N-terminal و MSPA ، قطعه C-terminal که به طور مستقیم در اتصال دخالت دارد. تظاهر این لیپوپروتئین‌ها ممکن است با هماهنگی هم صورت بگیرد(۱٦و ۵). پروتئین MSPB شامل یک توالی تکرار شده پشت سر هم و غنی از پرولین است(نگاره ۱) که ناحیه PRR را کد می‌کند (ناحیه I و II)، یک ناحیه خیلی پلی مورفیسم در میان سوش‌های مایکوپلاسما سینوویه (RIII، نوکلئوتید ۳٤۳-٤۰۰) و یک ناحیه متغیر (نوکلئوتید ٤۲۱-۱۰۲٤) که به علت نوترکیبی مکرراً تغییر می‌کند(۵). طول MSPB به علت وقوع Insertion یا Deletion در ناحیه کد کننده PRR، در میان سویه‌های مایکوپلاسما سینوویه متفاوت است. علاوه بر این، جمعیت‌های کلونی مایکوپلاسما سینوویه قادرند، سایزهای متغیری از پروتئین‌های MSPB، سنتز کنند(۵).

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات مرکزی، اراک، ایران
۲*. آزمایشگاه رفرانس مایکوپلاسما، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران.
a.pourbakhsh@rvsri.ir
۳. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اراک، اراک، ایران
٤. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات مرکزی- اراک، اراک، ایران

Archive of SID
www.SID.ir



نگاره ۱: شکل شماتیکی از ناحیه محافظت شده و ناحیه متغیر که بر روی ژن vlhA واقع شده اند.

تشخیص سریع این میکروارگانیسم برای جلوگیری از انتشار عفونت ضروری می باشد(۷). معمولاً تشخیص موقتی عفونت مایکوپلاسمای سینوویه با استفاده از آزمایش‌های سرولوژی انجام می گیرد، در صورتیکه تشخیص قطعی بواسطه جداسازی و شناسایی ارگانیسم صورت می گیرد؛ در ضمن، مورد اخیر عموماً گران و وقت گیر می باشد(برای انجام مستلزم ۱-۲ هفته می باشد) روش PCR روی نمونه های مستقیم و نیز نمونه های حاصل از کشت در محیط مایع و آگار توسط محققین زیادی در نقاط مختلف جهان انجام پذیرفته است (۱۲). شناسایی جدایه های مایکوپلاسما سینوویه برای ردیابی همه گیری این میکروارگانیسم مفید می باشد و در کشورهایی که گله ماکیان با سویه MS-H، واکسینه می شوند دارای اهمیت می باشد(۹). جهت تشخیص جنس مایکوپلاسما پرایمرهای مختلفی با هدف تکثیر بخش هایی از ژن 16S rRNA، طراحی گردیده است (۱۲). تعدادی از محققین جهت بررسی و تفریق مایکوپلاسما سینوویه، آزمون PCR مبتنی بر ژن کد کننده پروتئین هماگلوتینین(VlhA) را طراحی کردند(۹و ۸، ۷، ۵). از آنجایی که انتهای ´۵ ژن vlhA به صورت یک کپی منفرد بوده و توالی آن در بین جدایه‌های مایکوپلاسما سینوویه متفاوت است (۱۶)، این ویژگی‌ها این قطعه از ژن vlhA را به عنوان ناحیه مناسبی برای تعیین سویه با کمک روش‌های مولکولی در جدایه های مختلف، مطرح می سازد (۹و ۸، ۷، ۵).

هدف مطالعه حاضر تشخیص و ردیابی توالی نوکلئوتیدی ناحیه محافظت شده انتهای ´۵ ژن vlhA در جدایه های مایکوپلاسما سینوویه حاصل از موارد مشکوک به بیماری در مرغداری‌های صنعتی استان‌های تهران و قزوین، مرکزی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی به ژن vlhA و مقایسه نتایج روش‌های کشت و PCR با استفاده پرایمرهای اختصاصی جنس مایکوپلاسما(بر اساس تکثیر بخشی از ژن 16sr RNA)، با روش PCR بر مبنای ژن vlhA بود.

مواد و روش کار

نمونه‌برداری. از گله های طیور صنعتی سه استان (تهران، مرکزی و قزوین)، که دارای علائم مشکوک به آلودگی بودند با در نظر گرفتن این که خود و گله های مادر، واکسن MS را دریافت نکرده باشند، نمونه گیری به عمل آمد. نمونه ها توسط سوآپ های کتانی و از شکاف حلقی کامی، نای و کیسه های هوائی تهیه گردید. سوآپ ها به لوله های درپوش دار(یونیورسال) حاوی محیط PPLO براث انتقال یافت ودر دمای ٤ درجه سانتی گراد در کمتر از ٢٤ ساعت به آزمایشگاه ارسال شد.

جداسازی و شناسایی میکروارگانیسم. نمونه‌هایی که در محیط PPLO براث به آزمایشگاه ارسال شد ابتدا برای یک دوره‌ی کوتاه ٦ ساعته در دمای ٣٧ درجه انکوباسیون گردید. تمامی محیط‌های PPLO براث حاوی نمونه، توسط فیلترهای مخصوص سرسرنگی PVDF (Poly Vinylidene Fluride) که دارای روزنه‌هایی با قطر ۰/٤٥ میکرومتراند، فیلتراسیون شد. با استفاده از سرنگ‌های استریل، ۲ میلی‌لیتر از محلول براث غنی شده برداشته شد و با کمک فیلتر، با فشار کم و به آرامی محلول وارد محیط کشت دوم که PPLO براث با pH 7.6-8 بود، اضافه گردید. سپس این محیط در انکوباتور Co_2 دار قرار گرفت و ۷-۱۰ روز تحت نظر قرار گرفت. با مشاهده تغییر رنگ، نمونه به محیط PPLO آگار انتقال یافت علاوه بر آن پاساژ مجدد در محیط PPLO براث انجام شد. آگاری که تحت کشت قرار گرفت به انکوباتور Co_2 دار در دمای ۳۷ سانتی گراد منتقل شد و

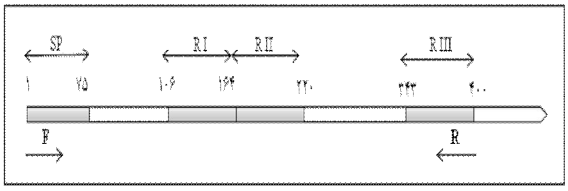
Archive of SID
www.SID.ir

پس از مدت ۷۲ ساعت محیط‌های کشت PPLO جامد با میکروسکوپ نوری و با بزرگنمایی ٤٠x از نظر رشد و تشکیل پرگنه‌های مخصوص تحت بررسی قرار گرفتند. با مشاهده‌ی پرگنه شبیه به تخم‌مرغ نیمرو، آلودگی به جنس مایکوپلاسما تأیید گردید. سپس آزمایش مولکولی به روش PCR جهت تایید انجام شد. ابتدا با آغازگر جنس مایکوپلاسما و سپس نمونه های مثبت مورد آزمایش PCR توسط آغازگر های اختصاصی ژن vlhA، قرار گرفت.

استخراج و تهیه DNA. ۰/۵ میلی لیتر از نمونه های مستقیم به تیوپ های ۱/۵ میلی لیتری، جهت استخراج DNA انتقال یافت، سپس با استفاده از روش فنل استخراج DNA انجام شد کلروفرم (روش فنل کلروفرم دارای عملکرد بالا در استخراج DNA می باشد و از مواد شیمیایی مانند فنل،کلروفرم، استات سدیم، الکل مطلق استفاده می شود).

آزمایش PCR بر اساس تکثیر بخشی از ژن 16S rRNA جهت تشخیص جنس مایکوپلاسما. در مورد تشخیص جنس مایکوپلاسما از پرایمرهای MYF با توالی F: 5′-GCTGCGGTGAATACGTTCT-3′ و MYR با توالی R: 5′-TCCCCACGTTCTCGTAGGG-3′ که محصول PCR، ۱٦۳ جفت بازی است تولید می کند، استفاده گردید(۱۱). آزمایش توسط ترموسایکلر peQSTAR 2X Gradient و در یک حجم PCR ۲۵ میکرولیتری شامل: ۰/۵ میکرولیتر dNTP، ۰/۵ واحد آنزیم DNA Polymerase Taq، ۲/۵ میکرولیتر از بافر واکنش۱۰X، ۰,۱ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای جلودار و برگشتی، ٤ میکرو لیتر Mgcl2، ۲ میکرولیتر DNA و نهایتاً ۱۵,۳ میکرولیتر آب صورت گرفت. برنامه واکنش شامل مرحله اول در دمای ۹٤ در جه سانتی گراد برای ۷ دقیقه و ۵ ثانیه، ۳۰ سیکل شامل دمای ۹۵ درجه سانتی گراد(۳۰ ثانیه)، ٥٦ درجه سانتی گراد(۳۰ ثانیه)، ۷۲ درجه سانتی گراد(۱ دقیقه) و مرحله گسترش نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه بود.

آزمایش vlhA PCR جهت تشخیص مایکوپلاسما سینوویه. به منظور تکثیر بخش محافظت شده انتهای ٥′ ژن vlhA، از پرایمرهای MSCons-F با توالی F: 5′-TACTATTAGCAGCTAGTGC-3′ و MSCons-R با توالی R: 5′- AGTAACCGATCCGCTTAAT-3′ که محصول PCR، 400–350 جفت بازی است(نگاره ۲) تولید می‌کند، استفاده گردید(۹).



نگاره ۲: نمایی از محل قرار گیری پرایمرهای F و R بر روی توالی ژن vlhA

آزمایش PCR در یک حجم ۲۵ میکرولیتری شامل ۳ میلی مول dNTP، ۱ واحد آنزیم DNA Polymerase Taq، ۲/۵ میکرولیتر بافر واکنش(۱۰X)، ۰,۳ میکرو لیتر از هر کدام از پرایمرهای جلودار و برگشتی، ٤ میکرو لیتر Mgcl2 به همراه ۱,۷ میکرو لیتر DNA و ۱۵,۲ میکرو لیتر آب صورت گرفت. برنامه واکنش شامل مرحله اول در دمای ۹٤ در جه سانتی گراد برای ۲ دقیقه، ۳۵ سیکل شامل دمای ۹٦ درجه سانتی گراد(۱۵ ثانیه)، ٥٤ درجه سانتی گراد(۱۵ ثانیه)، ۷۲ درجه سانتی گراد(۲۰ ثانیه) و در آخر مرحله گسترش نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه بود. محصول PCR به دست آمده روی ژل آگاروز 1 درصد و بافر TAE 10x و با استفاده از سایبر سیف(۰/۲ میکروگرم در میلی لیتر) در جریان ۱۰۰ ولت و به مدت ۱ ساعت و در مقایسه با مارکر ۱۰۰ قرائت گردید.

در این تحقیق علاوه بر پرایمرهای فوق از پرایمرهای طراحی شده توسط Bencina با توالی F_1:5′-ATTAGCAGCTAGTGCAGTGGCC-3′ و R_1:5′-GAGCGCTAGTTTTTGTTTTTGG-3′(۵) و همچنین

Archive of SID

www.SID.ir

پرایمرهای طراحی شده توسط May با توالی F:5́-CTA TTA GCA GCT AGT GCA GT-3́ و R:5́-CGT AAT ACT AGA CGA CCA AT-3́ (۱٤) استفاده گردید.

نتایج

در این مطالعه جهت جداسازی عامل بیماریزای مایکوپلاسما سینوویه، از دو روش کشت (در محیط مایع و روی آگار) و PCR(جنس مایکوپلاسما و ژن vlhA مایکوپلاسما سینوویه)به صورت موازی برای تشخیص موارد مثبت استفاده شد. از مجموعه ٤۳ نمونه که نخست در محیط PPLO براث و سپس در محیط PPLO آگار جهت رشد و تشکیل پرگنه، کشت داده شدند؛ تعداد ۲۸(٦٥٪) نمونه در کشت مثبت تشخیص داده شدند و بقیه نمونه ها منفی گزارش شدند(جدول ۱). منظور از کشت مثبت مشاهده‌ی پرگنه‌هایی به شکل تخم مرغ نیمرو شده، بر روی محیط کشت است که با میکروسکوپ نوری روی محیط کشت قابل مشاهده هستند. تمامی نمونه ها با کمک روش PCR برای جنس مایکوپلاسما، توسط پرایمرهای اختصاصی جنس مایکوپلاسما طراحی شده توسط Kojima(۱۹۹۷) با محصول PCR دارای باند ۱٦۳ جفت باز(نگاره ۳)، مورد بررسی قرار گرفتند. در آزمون PCR جنس مایکوپلاسما از ٤۳ نمونه مورد مطالعه، ۳۳(۷٦٪) نمونه مثبت و ۱۰(۲٤٪) نمونه منفی مشاهده شد. اجرای روش PCR برای ژن vlhA مایکوپلاسما سینوویه، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن vlhA مایکوپلاسما سینوویه، طراحی شده توسط Jeffery (۲۰۰۷) با محصول PCR دارای باند 350-400 جفت باز (نگاره ٤)، انجام گرفت. از مجموع ٤۳ نمونه، ۲٤(٥٥٪) نمونه در آزمون PCR ژن vlhA مایکوپلاسما سینوویه مثبت و ۱۹(٤٥٪) نمونه نیز منفی گزارش شدند. در نتایج به دست آمده بر اساس آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای طراحی شده توسط Bencina و May، مشاهده شد که تمام نمونه‌ها منفی بودند.

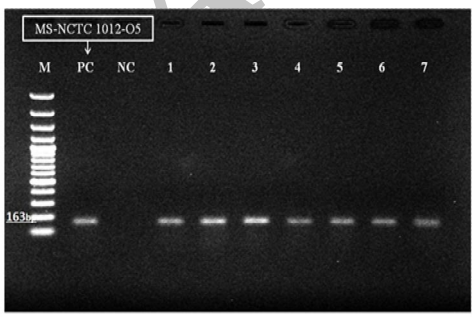
جدول ۱: نتایج کشت، PCR جنس مایکوپلاسما و PCR ژن vlhA مایکوپلاسما سینوویه

نمونه‌ها	VlhA PCR		PCR جنس مایکوپلاسما		کشت	
	−	+	−	+	−	+
٤۳	۱۹(٤٥٪)	۲٤(٥٥٪)	۱۰(۲٤٪)	۳۳(۷٦٪)	۱٥(۳٥٪)	۲۸(٦٥٪)

۲٤ نمونه در آزمون PCR جنس و VlhA PCR مثبت گزارش گردید و به عنوان مایکوپلاسما سینوویه مورد تأئید قرار گرفتند؛ ۱۰ نمونه از ٤۳ نمونه، در دو آزمون منفی و فاقد مایکوپلاسما سینوویه بودند؛ ۹ نمونه علیرغم اینکه در آزمون PCR جنس مثبت بودند در آزمون VlhA PCR منفی تشخیص داده شدند(جدول ۲).

جدول ۲: فراوانی نمونه ها براساس نتایج PCR جنس مایکوپلاسما و PCR ژن vlhA

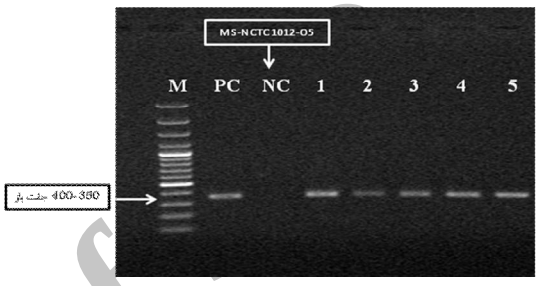
تعداد نمونه	PCR جنس	VlhA PCR
۲٤	+	+
۱۰	−	−
۹	+	−
۰	−	+
٤۳	٤۳	٤۳



نگاره ۳: تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR با استفاده از آغازگر اختصاصی جنس مایکوپلاسما.

Archive of SID
www.SID.ir

باندهای ۱۶۳ جفت بازی در نمونه‌های جنس مثبت مشاهده می‌شود. مارکر(Marker : M): 100 جفت باز؛ کنترل مثبت(PC) : باند نمونه استاندارد MS-NCTC 10124-05 در ناحیه ۱۶۳ جفت بازی؛ کنترل منفی(NC) : محیط کشت بدون تلقیح باکتری؛ باندهای ۱ تا ۷ : نمونه های مورد آزمایش در این مطالعه.



نگاره ٤ـ تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR با استفاده از آغازگر اختصاصی ژن vlhA مایکوپلاسما سینوویه(MSconsR-MSconsF).

باندهای ۳۵۰– ٤۰۰ جفت بازی در نمونه‌های vlhA مثبت مشاهده شد. مارکر(Marker: M): 100 جفت بازی؛ کنترل مثبت(PC): باند نمونه استاندارد MS-NCTC 1012-05 در ناحیه ۳۵۰ –٤۰۰ جفت بازی؛ کنترل منفی(NC): محیط کشت بدون تلقیح باکتری؛ باندهای ۱ تا ۵: نمونه‌های مورد آزمایش در این مطالعه.

بحث

در این مطالعه ضمن جداسازی و شناسایی جدایه های مایکوپلاسما سینوویه با استفاده از روش کشت و آزمون PCR جنس و آزمون PCR بر اساس ژن vlhA، از موارد مشکوک به آلودگی در مرغداری های صنعتی استان های تهران و قزوین، مرکزی نسبت به تشخیص و ردیابی مایکوپلاسما سینوویه اقدام گردید و نشان داده شد که مرغداری های مذکور آلوده به مایکوپلاسما سینوویه می‌باشند. همچنین نشان داده شد که ژن vlhA به علت وجود نواحی RI، RII و RIII، جهت تشخیص و ردیابی مایکوپلاسما سینوویه دارای اهمیت می باشند و در تشخیص و تفریق جدایه های مایکوپلاسما سینوویه می تواند با حساسیت بالا مورد استفاده قرار گیرد.

تحقیقات زیادی درباره تشخیص مایکوپلاسما سینوویه صورت گرفته و روش های مختلفی نیز ارائه شده است. تشخیص سرمی با روش‌های معمول(HI, ELISA, RSA) اگر چه بسیار سودمند و راهگشا است اما ممکن است با واکنش های مثبت کاذب همراه باشد. همچنین در محیط کشت مایکوپلاسماها سخت رشد بوده و نیازمند به شرایط ویژه‌ای به منظور کشت می‌باشند و باید نیازمندی هر گونه به دقت بررسی و شرایط کشت آن فراهم باشد. در حضور عفونت‌های هم زمان وتوأم با سایر عوامل باکتریای امکان رشد موفق مایکوپلاسما در محیط کشت کاهش می‌یابد. همچنین روش کشت زمانبر بوده و روش وقت گیری می‌باشد(۱۷و ۳). لذا ضرورت استفاده از روش‌های دقیقتر در سال‌های أخیر مطرح شده است که یکی از آنها واکنش زنجیره‌ای پلی مراز(PCR) می‌باشد. از مزایای روش PCR سهولت در نمونه برداری می باشد، بدین ترتیب که بر خلاف نمونه های لازم برای کشت و جداسازی، در آزمایش PCR حتی از یک سواپ نای و بدون نیاز به محیط انتقال نیز می تواند به عنوان نمونه استفاده کرد(۱۲).

روش PCR توسط محققین زیادی در نقاط مختلف جهان انجام پذیرفته است و جهت تشخیص جنس مایکوپلاسما پرایمرهای مختلفی با هدف تکثیر بخش هایی از ژن S ۱٦ rRNA، طراحی گردیده است.(۱۲).

مایکوپلاسماها سال‌ها در ایران با روش‌های سرولوژی و کشت مورد شناسائی قرار گرفته‌اند، همچنین بررسی مولکولی مایکوپلاسما با روش‌های مختلف توسط محققین ایرانی صورت گرفته است و نیز تحقیقاتی بر پایه ژن S ۱٦ rRNA برای شناسایی مایکوپلاسما سینوویه انجام داده‌اند

Archive of SID

www.SID.ir

(۱۷و ٦، ۳). آنها در نتایج خود بیان کرده اند که آزمون PCR به عنوان یک روش مؤثر و با صرفه جویی بالا در وقت می تواند جایگزین مناسبی برای روش کشت باشد و آزمایش های PCR نسبت به روش کشت خیلی معتبرتر، سریعتر و حساستر است(۱۷و ٦، ۳). البته بر اساس نتایج برخی مطالعات اختلاف ژنوتیپی ناشی از حذف، اضافه و یا جایگزینی نوکلئوتیدی در ژن 16S rRNA در جدایه ها و سویه های مختلف مایکوپلاسما سینوویه مشاهده شده است(٤). همچنین بر اساس برخی مطالعات و طبق داده های بانک ژن، بین گونه های مایکوپلاسما به ویژه مایکوپلاسما سینوویه در این ناحیه از ژنوم تشابه توالی نوکلئوتیدی و در نتیجه واکنش متقاطع در PCR وجود دارد (۱۹). چنین امری ضرورت امکان استفاده از نواحی دیگری از ژنوم این باکتری را جهت تشخیص مولکولی مایکوپلاسما سینوویه برجسته تر می سازد . در این مطالعه جهت آزمون PCR رایج جهت تعیین جنس مایکوپلاسما(بر اساس تکثیر بخشی از ژن ١٦ S rRNA از پرایمرهایی استفاده شد که محصول ١٦٣ جفت بازی ایجاد نمودند و در ادامه نمونه های مثبت در PCR، مورد آزمون vlhA جهت تشخیص مایکوپلاسما سینوویه قرار گرفتند.

آزمون‌های زیادی بر اساس PCR جهت تشخیص مایکوپلاسما سینوویه گزارش شده است. تعدادی از محققین قطعات ژنی غیر از ناحیه ژنی 16S rRNA را جهت بررسی و تفریق میان باکتری ها به کار برده اند و بدین ترتیب آزمون PCR مایکوپلاسما سینوویه مبتنی بر ژن کد کننده پروتئین هماگلوتینین(VlhA) را طراحی کردند (۹و ۸، ۷، ۵). یکی از علل عمده استقبال محققین از ژن vlhA (بر خلاف ژن) ١٦ S rRNA، وجود پلی مورفیسم آن در جدایه های مختلف و در نتیجه فراهم ساختن امکان شناسایی و تفریق جدایه ها می باشد. این مطالعات، تفاوت هایی در حد یک تا چند نوکلئوتید دارند (١٦و ۸).

با توجه به این موضوع که توالی انتهای ´٥ ژن vlhA، در بین جدایه های مایکوپلاسما سینوویه متفاوت است (١٦) و این قطعه از ژن شامل بخش های تکراری کد کننده پلی پپتیدهای غنی از پرولین بنام RI و RII بوده و نیز ناحیه ای بسیار پلی مورفیک به نام RIII می باشد(نگاره ۱). این ویژگی‌ها این قطعه از ژن vlhA را جهت شناسایی جدایه‌های مختلف، منحصر به فرد جلوه می‌دهد(۹و ۸، ۷، ۵).

Noormohammad و همکاران در سال ۲۰۰۰ با انجام آزمایشاتی بر روی پروتئین VlhA، به نتایج قابل توجهی در مورد ژن vlhA دست یافتند. آنها بیان کردند که محصول ژن یک لیپوپروتئین سطحی با یک قلمرو ایمنی بر پایه نواحی ثابت و متغیر می‌باشد و همچنین در بررسی های خود بیان کردند که پروتئین MSPB به عنوان یک پروتئین سطحی غشا با خاصیت فوق العاده آنتی ژنی، می باشد (۱۸و ١٦، ١٥). Bencina و همکاران در سال ۲۰۰۱، تنوع هماگلوتینین در مایکوپلاسما سینوویه و همچنین تنوع سایز در N-terminal(MSPB) را اثبات کرد و در نتایج خود اظهار داشت که طول MSPB به علت وقوع حذف یا اضافه در ناحیه کد کننده PRR، در میان جدایه های مایکوپلاسما سینوویه متفاوت است (٥). در سال ٢٠٠٤ Hong و همکاران، و اثبات کردند که آزمایش PCR (به کار برده شده برای ردیابی vlhA مایکوپلاسما سینوویه)، در جهت تشخیص و تیپ بندی سویه های مختلف مایکوپلاسما سینوویه، ابزار مفیدی می‌باشد(۸). Jeffery و همکاران در سال ۲۰۰۷، طی نتایج خود اظهار داشتند که استفاده از PCR بر پایه ژن vlhA، بیشترین جهش‌ها را در میان جدایه های مایکوپلاسما سینوویه مشخص می‌کند(۹). Mardassi و همکاران در سال ۲۰۰٥ با تأکید بر روی ژن vlhA، برای تشخیص مایکوپلاسما سینوویه، به این نتایج دست یافتند که این روش به حد کافی حساس و اختصاصی است و می توان برای تفریق سویه ها از آن استفاده کرد(۱۳). Hammond و همکاران در سال ۲۰۰۹، بر این موضوع تأکید کردند که DNA

Archive of SID

www.SID.ir

استخراج شده از کشت ها و همینطور نمونه‌های مستقیم سواپ ها، بطور موفقیت آمیز با کمک پرایمرهای vlhAF-vlhAR2در آزمون PCRافزایش می یابند و می توان در تشخیص و طبقه بندی مایکوپلاسما سینوویه از آن استفاده کرد (۷). در کشور ما نیز بررسی مولکولی مایکوپلاسما سینوویه بر اساس ژن vlhA به طور محدود توسط محققین انجام شده است(۲و ۱).

در این مطالعه از پرایمر های طراحی شده توسط Bencina، May و Jeffery استفاده گردید از آنجا ئیکه پرایمر R1 *بکار گرفته شده توسط* Bencina در ناحیه متغیر ژن vlhA قرار می گیرد، قادر به تشخیص جدایه ها نبود؛ با انجام آزمایشات و بررسی‌هایی که در راستای این تحقیق صورت گرفت، مشاهده شد که در آزمون PCR صورت گرفته بر اساس پرایمرهای طراحی شده توسط Bencina(F1 و R1) فقط سویه واکسن(MS-H)، دارای باند بود و در مورد محصولات PCR جدایه های ایرانی، باندی مشاهده نشد و جالب اینکه در PCR با استفاده از پرایمر F1(طراحی شده توسط Bencina) و پرایمر MSCons-R (طراحی شده توسط Jeffery)، در ناحیه ۳۰۰ جفت بازی باند مشاهده شد که نشان دهنده کاربردی بودن پرایمر F1 بود و بدین ترتیب این نتایج حاصل گردید که علت نا موفق بودن PCR با استفاده از پرایمرهای طراحی شده توسط Bencina، پرایمر R1 است و بیانگر این موضوع بود که پرایمر R1، توانایی شناسایی ناحیه متغیر ژن vlhA جدایه‌های ایرانی را ندارد، پرایمر R1 به کار گرفته شده توسط Bencina، به دلیل قرار گرفتن در ناحیه بسیار متغیر ژن vlhA(ناحیه متغیر : نوکلئوتید ۴۲۱-۱۰۲۴)، قادر به تشخیص جدایه ها نبوده و باعث ایجاد نتایج منفی کاذب می گردد و در نتیجه پرایمرهای طراحی شده توسط Bencina، برای جدایه های ایرانی کاربردی نمی باشد. در ضمن در آزمون هایی که بر اساس پرایمرهای طراحی شده توسط May(در محدوده نوکلئوتیدی ۲۵-۲۵۰۰) انجام گرفت، اینگونه برآورد شد که به علت طولانی بودن نواحی مورد شناسایی پرایمرها و در بر گرفتن نواحی متغیر ژن vlhA(۱٤)، در رابطه با جدایه‌های ایرانی نتیجه ای حاصل نشد.

با توجه به اینکه پرایمرهای مورد استفاده توسط Hong (نوکلئوتید ۱-۳٤۷)، PCR بر اساس ناحیه PRR و خارج از ناحیه RIII توصیف شده است برای تشخیص و ردیابی محدوده مورد نظر در این مطالعه کاربردی نبود. این در حالیست که پرایمر معکوس استفاده شده توسط Hammond (نوکلئوتید ۱-٤۲۱) و پرایمرهای طراحی شده توسط Jeffery (نوکلئوتید ۱-٤۰۰) با در بر داشتن ناحیه RIII در ناحیه محافظت شده ژن vlhA، مستقر می‌شوند و با توجه به اینکه فاقد نقایص فوق می‌باشند، می‌توانند با وجود حساسیت کافی در ردیابی جدایه‌ها، دارای کارآیی لازم می باشند(۹و ۸، ۷، ۲). در ضمن پرایمرهای طراحی شده توسط Slavac (در محدوده نوکلئوتیدی ۱-۲۳۱۰) با در نظر گرفتن این موضوع که در ناحیه متغیر ژن قرار می‌گیرند، قادر به شناسایی توالی DNA جدایه های ایران در این ناحیه نمی باشند(۱۸). در این تحقیق از پرایمرهای طراحی شده توسط Jeffery استفاده گردید و در نتیجه مشاهده شد که با استفاده از این پرایمرها تمام نمونه های مثبت در این تحقیق، محصول PCR ۴۰۰-۳۵۰ جفت بازی را تشکیل دادند.

بطور کلی، از آنجاییکه ناحیه ٥َ در ژن vlhA مایکوپلاسما سینوویه دارای یک کپی منفرد و ناحیه محافظت شده می باشد، قادر است در جمعیت های مایکوپلاسما سینوویه دچار تغییرات شود(۷، ۱٦) بنابراین آزمون صورت گرفته برای این ناحیه می تواند در جهت شناسایی جدایه ها، بسیار مهم و مفید باشد. همچنین محصولات PCR به علت دربرداشتن نواحی RI، RII و ناحیه پلی مورفیسم RIII در مقایسه با ژن 16S rRNA دارای ارزش بیشتری می‌باشد(۸و ۷).

نتایج به دست آمده بیانگر این موضوع است که آزمون PCR بر پایه ژن vlhA به عنوان روشی با حساسیت بالا و کارآیی مفید، می‌تواند برای تشخیص و جداسازی مایکوپلاسما

Archive of SID

www.SID.ir

سینوویه مطرح باشد و حاکی از اهمیت کاربرد این ژن در شناسایی جدایه های مایکوپلاسما سینوویه می باشد.

شیوع عفونت مایکوپلاسمایی و استفاده روز افزون از واکسن زنده در سراسر جهان و از طرف دیگر بروز عفونت، همگی ابداع و ارزیابی روش های جدید مولکولی برای تشخیص و تفریق سویه های مختلف مایکوپلاسما را ضروری و لازم نموده است؛ از اینرو با توجه به تنوع موجود در ژن vlhA، استفاده از این ژن به عنوان یک روش تفریقی مفید برای سویه های واکسینال و قیلدی پیشنهاد می شود و همچنین بررسی تفاوت های درون و بین گونه ای در میان جدایه های مایکوپلاسما سینوویه موجود در ایران و مقایسه نتایج حاصله با جدایه های سایر کشورها توصیه می شود.

تشکر و سپاسگزاری

هزینه‌های این مطالعه از محل اعتبارات طرح شماره ۸۷۰۸۰-۱۸-۱۸-۲ مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی تأمین و پرداخت شده است. بدین وسیله از معاونت آموزش و تحقیقات سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی وزارت جهاد کشاورزی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی تشکر و قدردانی می‌شود. همچنین از همکاری‌های صمیمانه سرکار خانم‌ها: سلیمه آهنگران، مهناز باباخانی و آقای دکتر علیرضا آبتین و تمامی کارکنان و همکاران آزمایشگاه رفرانس مایکوپلاسما مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج سپاسگزاری می‌گردد.

فهرست منابع

۱- انصاری، ح.، پوربخش, س.ا.، شیخی، ن.، بزرگمهری فرد، م،ح.، اشتری، ع.(۱۳۸۸). تشخیص گونه مایکوپلاسما سینوویه در نمونه های بالینی با استفاده از روش vlhA-PCR. مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز. دوره ۳. شماره ٤. ٦٧٣-٦٨١.

۲- غفوری، س.ع.، بزرگمهری فرد، م.ح.، کریمی، و.، ناظم شیرازی، م.ح.، نورمحمدی، ا.، حسینی، ح. (۱۳۹۰) . تشخیص و تفریق اولیه تعدادی از جدایه های مایکوپلاسما سینوویه ایران به روش PCR بر اساس تکثیر بخشی از ناحیه انتهایی ´۵ ژن vlhA . مجله دامپزشکی. ٦٦، (۲) :۱۱۷-۱۲۲.

3- Bayatzadeh, M.A., Pourbakhsh, S.A., Homayounimehr, A.R., Ashtari, A., Abtin, A.R. (2010): Application of culture and polymerase chain reaction (PCR) methods for isolation and identification of Mycoplasma synoviae on broiler chicken farms. Archives of Razi Institute. 66(2): 87-94.

4- Buim MR, Buzinhani M, Yamaguti M, Oliveira RC, Mettifogo E, Timenetsky J et al (2010): Interspecific variation in 16S rRNA geneof Mycoplasma synoviae determined by DNA sequencing. Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases. 33(1):15-23.

5- Bencina, D., Drobnic-Valic, M., Horvat, S., Narat, M., Kleven, S.H. & Dovc, P. (2001): Molecular basis of the length variation in the Nterminal part of Mycoplasma synoviae hemagglutinin. FEMS Microbiology Letters. 203:115-123.

6- Ghaleh Golab Behbehan, N., Asasi, K., Afsharifar, A., Pourbahksh, S.A. (2005): Isolation and detection of Mycoplasma gallisepticum by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. Iranian journal of veterinary research, University of Shiraz. 6(2):35-41.

7- Hammond, P.P. Ramirez,a.s. Morrow,c.j. bradbury,g.m.(2009):development and evaluation of improved diagnostic PCR of mycoplasma synoviae using primers located in the haemagglutinin encoding gene VlhA and its value for train typing. Veterinary microbiology. 136:61-68.

8- Hong, Y; Gracia, M; Leiting, V; Benecina, D; Zavala, L.D; Zavala,G; Kleven, S.H. (2004): Specifi Detection and Typing of mycoplasma synovia Strains in Poultry with PCR and DNA Analysis Targeting the Hemaggluitinin Encoding Gene vlhA. Avian Diseases. 48:606-616.

Archive of SID
www.SID.ir

9- 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. Microbiology. 153:2679-2688.

10- Kleven, S. H. (1997): Mycoplasma synoviae infection. In Diseases of Poultry, pp. 220–228. Edited by B. W. Calnek, H. J. Barnes, C. W. Beard, L. R. McDougald & Y. M. Saif. Ames, IA: Iowa State University Press.

11- Kojima, A., Takahashi, T., Kijima, M., Ogikubo, Y., Nishimura, M., Nishimura, S., Harasawa, R., Tamura, Y. (1997): Detection of Mycoplasma in avian live virus vaccines by polymerase chain reaction. Biologicals. 25(4): 365-371.

12- 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.

13- Mardassi, BB., Mohamed, R.B., 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. Journal of Clinical Microbiology. 43(2): 948-958.

14- May, M. and. Brown, D.R. (2011): Diversity of Expressed vlhA Adhesin Sequences and IntermediateHemagglutination Phenotypes in Mycoplasma synoviae. Journal of Bacteriology. Pp.2116–2121.

15- Noormohamadi, A.H., Markham, P.F., Kanci, A., Whither, K.G., Browing, G.F. (2000): A novel mechanism for control of antigenic variation in the hemagglutining gene family of Mycoplasma synoviae. Mol. microbial. 35: 911-923.

16- Noormohamadi, A.H; Hemmatzadeh, F; Whither, K.G. (2007): Safety and Efficacy of the Mycoplasma Synoviae MS-H Vaccine in Turkeys. Avian Disease Preprint; N/A-N/A.

17- Pourbakhsh, S.A., Shokri, G.R., 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 Institute. 65(2):75-81.

18- Slavec, B., Bercic, R.L., Cizelj, I., Narat, M., Zorman-Rojs, O., Dovc, P and Bencina, D. (2011): Variation of vlhA gene in Mycoplasma synoviae clones isolated from chickens. Avian Pathology. 40(5):481-489.

19- Takanashi-Omoe. H., Omoe, K., Matsushit, S., Kobayashi, H., Yamamoto, K. (2004): Polymerase chain reaction whit a primer pair in the 16S-23S rRNA spacer region for detection of Myccoplasma pulmonis in clinical isolates. Comp. Immunol. Microbiol. Infection Disease. 27:117-128.

Archive of SID

www.SID.ir