

تشخیص و تفریق اولیه تعدادی از جدایه‌های مایکوپلازما سینوویه ایران به روش PCR بر اساس تکثیر بخشی از ناحیه انتهایی 5 ژن *VihA*

سید علی غفوری^{۱*} محمد حسن بزرگمهری فرد^۲ وحید کریمی^۲ محمد حسین ناظم شیرازی^۱ امیر نورمحمدی^۳ حسین حسینی^۴

(۱) بخش سلولی مولکولی مرکز تشخیص و کنترل دارو و فرآورده‌های بیولوژیک سازمان دامپزشکی، تهران، تهران - ایران.

(۲) گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه، تهران، تهران - ایران.

(۳) دانشکده دامپزشکی دانشگاه ملیورن، ملیورن - استرالیا.

(۴) دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد تهران، تهران - ایران.

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

چکیده

مایکوپلازما سینوویه بعنوان یک عامل بیماری‌زای دخیل در عوارض تنفسی و لنگش، خسارات اقتصادی قابل توجهی را متوجه صنعت طیور در ایران می‌سازد. لذا تشخیص سریع و قطعی 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 در ایران بویژه سویه‌های فیلد و واکنس به روش مولکولی بود. از ۱۱ مرغداری در مناطق مختلف کشور هرکدام تعداد ۲۰ نمونه خون جهت آزمایش تست سریع آگلوتیناسیون و الایزا، ۱۰ نمونه سوآب نای و شکاف کامی و بافت بمنظور کشت و نیز ۹ نمونه سوآب جهت آزمایش PCR اخذ گردید. بمنظور تشخیص این میکروارگانیزم به روش مولکولی، علاوه بر پرایمرهای *16srRNA*، برای اولین بار در کشور از جفت پرایمر مربوط به انتهای آمینی ژن *VihA* استفاده گردید. نتایج حاصله از روش PCR با استفاده از جفت پرایمر اخیر نشان داد که علاوه بر امکان شناسایی گونه مایکوپلازما سینوویه در مورد نمونه‌های مورد آزمایش، اندازه محصول PCR بدست آمده در سویه‌های مختلف شامل جدایه‌های بدست آمده، سویه استاندارد و سویه واکنس بین ۳۵۰ تا ۴۰۰ جفت باز متفاوت بود. مقایسه نتایج این روش با روشهای سرولوژی و جداسازی و نیز روش PCR معمول با استفاده از پرایمرهای مربوط به ژن *16srRNA* از یکسو و نیز اختلاف اندازه در باندهای ایجاد شده در سویه‌های مختلف از سوی دیگر دلالت بر آن دارد که روش PCR با استفاده از پرایمرهای مربوط به ژن *VihA* می‌تواند در مورد نمونه‌های بالینی بعنوان یک روش با حساسیت و ویژگی بالا جهت تشخیص گونه مایکوپلازما سینوویه و نیز تفریق اولیه سویه‌ها اعم از واکنس یا سویه فیلد مطرح باشد.

واژه‌های کلیدی: مایکوپلازما سینوویه، جداسازی، تفریق، *PCR*، *VihA*.

استفاده می‌شود. معمولاً این تست‌ها بر اساس تکثیر بخشی از ژن *16srRNA* صورت گرفته (۱۰، ۱۷) و برخی بصورت کیت‌های تجارتي در دسترس می‌باشند. ماهیت پایدار و ثابت این ژن در یک گونه توانایی این آزمون را در حد تشخیص گونه مایکوپلازما سینوویه محدود ساخته و اجازه تفریق سویه‌ای را نمی‌دهد (۳، ۱۲).

تست PCR مایکوپلازما سینوویه بر اساس ژن کدکننده پروتئین هم‌آگلوتینین (*VihA*) توسط برخی محققین طراحی گردیده است (۲، ۴، ۱۱، ۱۲، ۱۳). انتهای 5' ژن *VihA* بصورت یک کپی منفرد بوده و توالی آن در بین سویه‌های مایکوپلازما سینوویه متفاوت است (۱۸). این قطعه از ژن شامل بخش‌های تکراری کدکننده پلی‌پتیدی‌های غنی از پرولین بنام RI و RII بوده و نیز شامل ناحیه‌ای بنام RIII است که بسیار پلی‌مورفیک می‌باشد. این ویژگی‌ها این قطعه از ژن *VihA* 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 مایکوپلازما سینوویه جدا شده از تعدادی از مزارع پرورش طیور به روش PCR با استفاده از پرایمرهای مربوط به ژن *VihA* و مقایسه آن با نتایج آزمایشات سرولوژی، جداسازی و نیز مقایسه آن با روش

مقدمه

مایکوپلازما سینوویه 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 روش‌های 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 و نیز به دلیل ویژگی پایین، روش کاملی جهت تشخیص قطعی آلودگی با مایکوپلازما سینوویه و تصمیم‌گیری قطعی در مورد گله مربوطه نباشد (۴، ۱۵).

همچنین کشت مایکوپلازماها 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 مایکوپلازماهای بیماری‌زای طیور



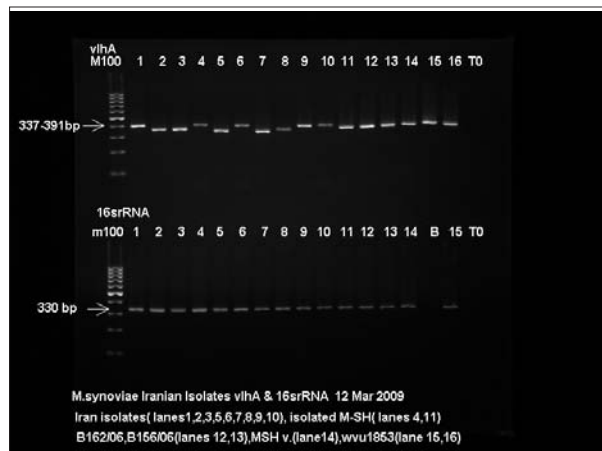
جدول ۱ - اجزاء محیط Frey جهت کشت مایکوپلازما سینوویه.

Mycoplasma borth base (BBL)	22.5 g
Glucose	3 g
Swine serum	120 ml
Nicotinamide adenine 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 ₂ O	1000 ml
Adjust pH to 7.8 with 209 % NaOH and filler sterilize	

جداسازی و شناسایی میکروارگانیزم. نمونه‌های غوطه‌ور 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 سوپ از لوله خارج و حذف گردید. سپس محیط‌های مایع حاوی نمونه در انکوباتور ۳۷ درجه 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 مایکوپلازما سینوویه مورد آزمایش PCR قرار می‌گرفتند. در صورت مثبت شدن نمونه‌ها در PCR، نمونه کشت مایع به محیط آگار Frey (۲ درصد آگار) تلقیح شده و در صورت مشاهده کلونی مایکوپلازما مجدداً از یک کلونی برداشت و به محیط مایع تلقیح می‌گردید و این کار مجدداً تکرار می‌شد (۲ بار) تا کلونی تک مایکوپلازما سینوویه تهیه گردد. به منظور حذف عوامل باکتریایی غیرمایکوپلازمایی در تمام مراحل انتقال و پاساژ در محیط‌های 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،۲) 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 16srRNA PCR جهت تشخیص مایکوپلازما سینوویه. در مورد قطعه مورد نظر روی ژن 16srRNA از پرایمرهای MS-F با توالی 3'-TGACTAGTTGATGGAAACCA-5' و MS-R با توالی 3'-CCTTCCTCCCAATTACTCG-5' 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



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

معمول (بر اساس 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 تجارتي و ۲ گله گوشتی که در آزمایش سرولوژی (تست سریع آگلوساسیون و الایزا) مثبت گردیدند نمونه برداری و از نظر آلودگی با مایکوپلازما 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 آگلوتیناسیون 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 سوپ با میله آلومینیومی بانوک پلی استراز نای 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 سوپ 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) غوطه‌ور و در دمای معمولی به آزمایشگاه منتقل گردیدند.



جدول ۲- نتایج آزمایشات سرولوژی روی گله‌های مورد مطالعه

	تعداد گله 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 (16srRNA)	۱۱	۰	۳۱	۲	۱۱	۳۳
PCR (<i>vlhA</i>)	۱۱	۰	۲۹	۴	۱۱	۳۳

مایکوپلازما سینیویه مثبت تشخیص داده شده و نهایتاً هر گله ۱ جدا به به شکل کلونی خالص تهیه شد (جدول ۱).

نکته دیگر این که 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 ۴۲ درصد از نمونه‌های مثبت در محیط حاوی سرم خوک در محیط دارای سرم اسب نیز تغییر رنگ داد ولی پاساژهای متوالی روی محیط آگار و برات حاوی سرم اسب تا مرحله تهیه پرگنه خالص بجز ۱ مورد با موفقیت همراه نبود. از نمونه‌های مفصل نیز با کتری 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 *16srRNA* مربوطه تأیید گردیدند و روی ژل آگاروز ۲ درصد باندی باندازه ۳۳۰ جفت باز تشکیل دادند (تصویر ۲). 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 مایکوپلازما سینیویه مثبت تشخیص داده شدند (جدول ۱). همچنین باندهای حاصل از نمونه‌های مأخوذه از محیط کشت بدلیل تکثیر با کتری 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 *VlhA*، تمامی نمونه‌ها مورد آزمایش قرار گرفتند که نتایج بتایج مربوط به PCR معمول (بر اساس تکثیر بخشی از *16srRNA*) همخوانی داشت. اندازه باند مورد مثبت روی ژل آگاروز با یکدیگر و نیز با سویه واکسن و سویه‌های B162/06 و B156/07 و نیز سویه استاندارد WVU1853 تقریباً بین ۳۵۰ تا ۴۰۰ جفت باز متفاوت بود (تصویر ۱).

DNA و نهایتاً آب عاری از DNA تا حجم ۵۰ میکرولیتر صورت گرفت. برنامه واکنش شامل مرحله اول در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد برای ۵ دقیقه، ۳۶ سیکل شامل دمای ۹۴ درجه 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 مایکوپلازما سینیویه و مایکوپلازما گالی سپتیکوم. با توجه به امکان رشد مایکوپلازما 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 مایکوپلازما گالی سپتیکوم بنام MG1273f با توالی 5-GTTGCAAATCCCTAAGGTGG-3 و MG1427r با توالی 5-TTAGCAACACGGTTTTAGAT-3 مورد آزمایش قرار گرفتند (۳).

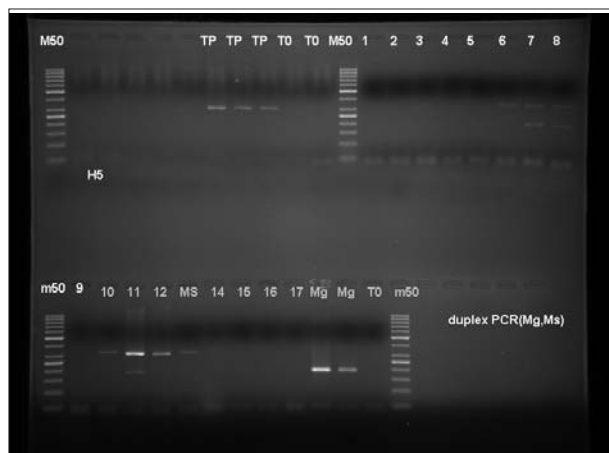
آزمایش *vlhA* PCR جهت تشخیص مایکوپلازما سینیویه. در مورد تکثیر بخشی از ناحیه انتهایی 5' ژن *VlhA* محققین مختلف از پرایمرهای متفاوتی استفاده نموده‌اند (۱۳، ۱۱، ۱۲، ۳، ۲). با توجه به مقایسه اولیه کارآیی این پرایمرها و نظریه حساسیت و ویژگی جفت پرایمر مورد استفاده توسط Hammond و همکاران در سال ۲۰۰۹ بنام *vlhAF* با توالی C-3-ATTAGCAGCTAGTGCAGTGGC و *vlhAR2* با توالی 3-5-AGT AAC CGA TCC GCT TAA TG در این مطالعه از آنها استفاده شد. ویژگی این پرایمرها در حد تشخیص اختصاصی مایکوپلازما سینیویه و عدم تشکیل باند در مورد ۲۲ گونه مایکوپلازمایی دیگر بوده و حساسیت آن در حد 1 cfu/100 ul و در رقت 10^{-۳} امی باشد (۱۲). آزمایش PCR در یک حجم ۵۰ میکرولیتر شامل ۰/۲ میلی مول dNTP، ۰/۵ میلی مول از هر پرایمر، ۵ میکرولیتر با فرواکشن، ۲/۵ میلی مول Mgcl2 و 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 اتیدیم بروماید (۰/۲ میکروگرم در میلی لیتر) در جریان ۱۰۰ v و به مدت ۱ ساعت و در مقایسه با مارکر 100 قرائت گردیدند.

نتیجه

از تعداد ۲۲۰ نمونه سرم آزمایش شده، ۱۸۲ نمونه (۸۳ درصد) در تست سریع آگلوتیناسیون با رقت ۱/۸ و ۱۸۷ نمونه (۸۵ درصد) 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 (۷۲ درصد) مربوط به ۹ گله دچار تغییر رنگ شدند که تمام این نمونه‌ها در آزمایش PCR از نظر

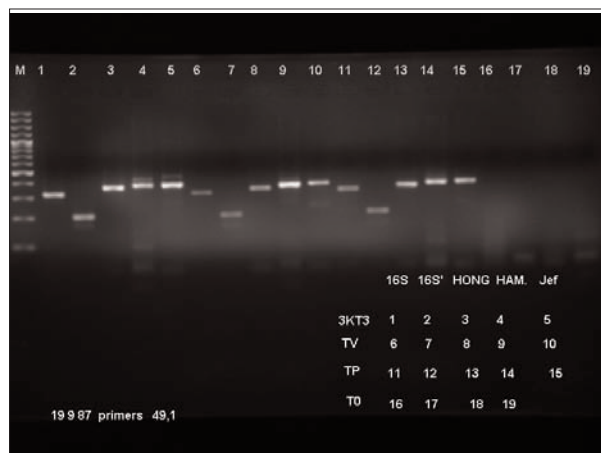




تصویر ۳- آزمایش Duplex PCR با استفاده از پرایمرهای *16srRNA* جهت تشخیص همزمان مایکوپلازما گالی سپتیکوم و مایکوپلازما سینوویه. نمونه‌های ۷، ۸ و ۱۱ مربوط به یک گله تخمگذار به هردو گونه مایکوپلازمایی آلوده بوده (باند ۲۰۹ و ۳۳۰ جفت بازی) و نمونه ۶، ۱۰ و ۱۲ فقط به مایکوپلازما سینوویه آلوده هستند.

شده است (۲،۳،۱۰،۱۱،۱۲،۱۷). برخی از این مطالعات براساس تکثیر بخشی از ناحیه انتهایی و ۵ ژن *VlhA* بوده است که از نظر موقعیت و اندازه قطعه تکثیر یافته، تفاوتی 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 مایکوپلازما 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 مایکوپلازما 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 گرفتن در ناحیه بسیار متغیر ژن *VlhA*، 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 مایکوپلازما سینوویه کمک نماید. این در حالیست که پرایمر *vlhAR2* 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 مایکوپلازمای دیگر واکنش نداده و از طرفی حتی در برخی سویه‌ها تا



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

نتایج تشخیص همزمان مایکوپلازما سینوویه و گالی سپتیکوم با استفاده از روش PCR Duplex حاکی از عدم آلودگی نمونه‌های مربوط به ۱۰ گله و وجود آلودگی توأم با مایکوپلازما گالی سپتیکوم و مایکوپلازما سینوویه در ۳ نمونه (سواب مستقیم و نمونه اخذ شده از محیط کشت مایع تغییر رنگ یافته) از یک گله گوستی 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 با جداسازی عامل، امکان تشخیص آلودگی می‌باشد (۸). در هر صورت تکیه صرف بر نتایج سرولوژی جهت تشخیص قطعی وضعیت آلودگی گله با مایکوپلازما 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 این که احتمال آلودگی همزمان با دو یا چند گونه مایکوپلازما وجود داشته و از طرفی با توجه به این که محیط ویژه رشد مایکوپلازما سینوویه جهت رشد مایکوپلازماهای دیگر مثل مایکوپلازما گالی سپتیکوم نیز مناسب می‌باشد، به نظر می‌رسد انجام آزمایش PCR بتواند در شناسایی و تفریق گونه ای مایکوپلازما روی نمونه‌های مثبت مایکوپلازما سینوویه در کشت کمک نماید. به هر حال در صورت نیاز به مطالعات بعدی و نیز در برخی موارد مثل حضور سویه‌های آنتیبیک هنوز روش جداسازی عامل علی‌رغم وقت گیر و هزینه بردار بودن بعنوان یک روش ارزشمند مطرح می‌باشد (۷،۱۴).

آزمایش PCR جهت تشخیص مایکوپلازما سینوویه پیشتر گزارش



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., Dheilily 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

رقت^{۱۰} (نزدیک به اپیکوگرم) از نمونه DNA، قادر به تشخیص عامل بوده است در حالی که در چنین رقتی هیچ کلونی حتی در محیط کشت رشد نمی‌کند.

مقایسه باندهای به دست آمده از پرایمرهای *VlhA-F* و *VlhAR2* نشان می‌دهد که بین جدایه‌های مختلف ایران و نیز سویه واکسنی H-MS و سویه استاندارد از نظر اندازه اختلاف وجود دارد، بطوری که باند مربوط به سویه واکسن به طور قابل توجهی از باند مربوط به سویه استاندارد WVU1853 و نیز جدایه‌های دیگر متفاوت است، در حالی که 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 *VlhA* 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 *vlhA*، 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 و یا در مناطقی که احتمالاً سویه واکسنی بمرور زمان در زمره سویه‌های فیلدی قرار می‌گیرد 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 و قدردانی

بدین وسیله از آقایان دکتر David Ley، عباس برین، سیاوش نیازی، فضل الله الهام نیا، رامین اکبری، حسین مقصدلو و رضا حسن زاده و خانم‌ها دکتر Janet M. Bradburry، دکتر معصومه فرشچیان، مریم اخلاقی، سحرناز حاج آقا زاده، ندابنی صدر و آزاده احمدی بدلیل زحمات و همکاری‌های بیدریغ ایشان و نیز شرکت پارس فاطمه بدلیل تامین بخشی از مواد مورد نیاز در این مطالعه سپاسگزاری می‌گردد.



- 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., Bradbury, 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., Bradbury J. M. (2004) Avian Mycoplasmosis. In: Manual of standard for diagnostic tests and vaccines. (5th 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., Whithear Kevin, 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.



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*}, Bozorgmehrfard, M.H.², Karimi V.², Nazemshirazi, M.H.¹, Noormohammadi, A.³, Hosseini, H.⁴

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

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

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

⁴Department 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

