

تشخیص و ردیابی مایکوپلازما سینوویه از مرغداری‌های صنعتی با

استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بر اساس ژن vIhA

معصومه مقامی^۱، سیدعلی پوربخش^{۲*}، علیرضا همایونی‌مهر^۳، حمیدرضا مهاجرانی^۴، عباس اشتری^۵، محمدعلی بیات‌زاده^۶

چکیده

مایکوپلازما سینوویه مهمترین عامل بیماریزا در ماکیان است و همه ساله خسارات اقتصادی قابل توجهی را متوجه صنعت طیور در ایران می‌سازد. مایکوپلازما سینوویه قادر به بیان لیپوپروتئین هم‌گلوتینین متغیر (VihA) Variable lipoprotein hemagglutinin A می‌باشد که نقش مهمی در ایجاد بیماری ایفا می‌کند. هدف اصلی این مطالعه تشخیص و شناسایی جدایه‌های مایکوپلازما سینوویه بر اساس ژن vIhA بود. از گله‌های طیور صنعتی سه استان (تهران، مرکزی و قزوین) که دارای علائم مشکوک به آلودگی بودند، توسط سوآپ‌های کتانی و از شکاف حلقی کامی، نای و کیسه‌های هوایی نسبت به نمونه‌گیری اقدام شد. در این مطالعه ضمن جداسازی و شناسایی مایکوپلازما با استفاده از روش کشت و آزمون PCR جنس مایکوپلازما، نسبت به آزمون PCR برای ناحیه محافظت شده ژن vIhA مایکوپلازما سینوویه نیز مبادرت گردید و بدین ترتیب علاوه بر پرایمرهای اختصاصی جنس مایکوپلازما از جفت پرایمر مربوط به ناحیه محافظت شده انتهای آمینی ژن vIhA استفاده گردید. در نتایج مشاهده شد که محصول PCR تولیدی برای پرایمرهای اختصاصی ژن vIhA در نمونه‌های مثبت مایکوپلازما سینوویه، ۳۵۰-۴۰۰ جفت بازی برای هر جدایه بر روی ژل الکتروفورز تشکیل داده شد و از بین ۴۳ نمونه مورد مطالعه، در روش کشت، ۲۸ (۶۵٪) نمونه مثبت مشاهده گردید و در آزمون PCR جنس مایکوپلازما، ۳۳ (۷۶٪) نمونه و همچنین ۲۴ (۵۵٪) نمونه در آزمون PCR ژن vIhA مایکوپلازما سینوویه، مثبت گزارش شدند. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که آزمون PCR در ناحیه^۵ ژن vIhA مایکوپلازما سینوویه جهت شناسایی جدایه‌ها کاربردی بوده و همچنین به علت دربرداشتن نواحی RI، RII و ناحیه پلی مورفیک RIII، با کارایی و حساسیت بالا، می‌تواند جهت تشخیص و ردیابی گونه مایکوپلازما سینوویه مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: مایکوپلازما سینوویه، لیپوپروتئین هم‌گلوتینین متغیر، ژن vIhA، PCR، تشخیص، ردیابی.

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

مقدمه

مایکوپلازما سینوویه یکی از عوامل مهم بیماریزای ماکیان و بوقلمون در سرتاسر جهان است (۱۰) که با آستوآرتریت، سینوویت و جراحات مفصلی همراه است و همه ساله خسارت اقتصادی زیادی به صنعت طیور وارد می‌نماید (۱۴ و ۱۰). مایکوپلازما سینوویه دارای لیپوپروتئین متغیر هم‌گلوتینین (VihA) است که توسط ژن vIhA به صورت یک پروتئین منفرد بیان می‌شود، ژن vIhA لیپوپروتئینی سطحی با نواحی متغیر و ثابت، تولید می‌کند (۱۶). پروتئین VihA 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. نظاهر این لیپوپروتئین‌ها ممکن است با هماهنگی هم صورت بگیرد (۱۶ و 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 مورفیک در میان سوش‌های مایکوپلازما سینوویه (RIII، نوکلئوتید ۳۴۳-۴۰۰) و یک ناحیه متغیر (نوکلئوتید ۴۲۱-۱۰۲۴) که به علت نوترکیبی مکرراً تغییر می‌کند (۵). طول MSPB به علت وقوع Insertion یا Deletion در ناحیه کد کننده PRR، در میان سویه‌های مایکوپلازما سینوویه متفاوت است. علاوه بر این، جمعیت‌های کلونی مایکوپلازما 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

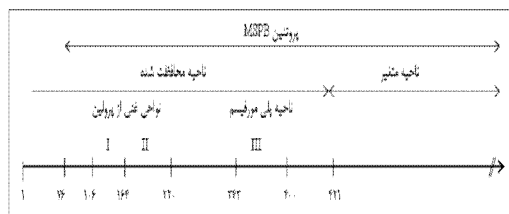
۲. آزمایشگاه رفرنس مایکوپلازما، مؤسسه تحقیقات واکنس و سرم‌سازی رازی، کرج، ایران.

a.pourbakhsh@rvsri.ir

۳. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اراک، اراک، ایران

۴. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات مرکزی- اراک، اراک، ایران

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.



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

مواد و روش کار

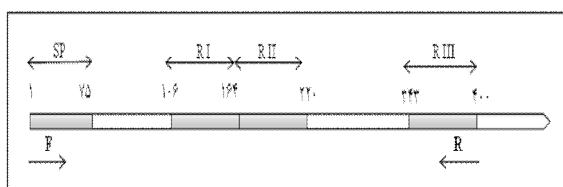
نمونه برداری. از گله های طیور صنعتی سه استان (تهران، مرکزی و قزوین)، که دارای علائم مشکوک به آلودگی بودند با در نظر گرفتن این که خود و گله های مادر، واکسن MS را دریافت نکرده باشند، نمونه گیری به عمل آمد. نمونه ها توسط سوآپ های کتانی و از شکاف حلقی کامی، نای و کیسه های هوایی تهیه گردید. سوآپ ها به لوله های درپوش دار (یونیورسال) حاوی محیط PPLO برات انتقال یافت و در دمای ۴ درجه سانتی گراد در کمتر از ۲۴ ساعت به آزمایشگاه ارسال شد.

جداسازی و شناسایی میکروارگانیسم. نمونه‌هایی که در محیط PPLO برات به آزمایشگاه ارسال شد ابتدا برای یک دوره‌ی کوتاه ۶ ساعته در دمای ۳۷ درجه انکوباسیون گردید. تمامی محیط‌های PPLO برات حاوی نمونه، توسط فیلترهای مخصوص سرسرنگی (Poly Vinylidene PVDF (Fluride) که دارای روزنه‌هایی با قطر ۰/۴۵ میکرومتراند، فیلتراسیون شد. با استفاده از سرنگ‌های استریل، ۲ میلی‌لیتر از محلول برات غنی شده برداشته شد و با کمک فیلتر، با فشار کم و به آرامی محلول وارد محیط کشت دوم که PPLO برات با pH 7.6-8 بود، اضافه گردید. سپس این محیط در انکوباتور CO₂ 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 برات انجام شد. آگاری که تحت کشت قرار گرفت به انکوباتور CO₂ دار در دمای ۳۷ سانتی گراد منتقل شد و

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 مایکوپلاسمای سینوویه برای ردیابی همه گیری این میکروارگانیسم مفید می باشد و در کشورهایی که گله مایکان با سویه MS-H، واکسینه می شوند دارای اهمیت می باشد (۹). جهت تشخیص جنس مایکوپلاسمای پرایمرهای مختلفی با هدف تکثیر بخش هایی از ژن 16S rRNA، طراحی گردیده است (۱۲). تعدادی از محققین جهت بررسی و تفریق مایکوپلاسمای سینوویه، آزمون PCR مبتنی بر ژن کد کننده پروتئین هم‌گلوپتینین (*VlhA*) را طراحی کردند (۵، ۷، ۸ و ۹). از آنجایی که انتهای ۵' ژن *vlhA* به صورت یک کپی منفرد بوده و توالی آن در بین جدایه‌های مایکوپلاسمای 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 (۵، ۷، ۸ و ۹).

هدف مطالعه حاضر تشخیص و ردیابی توالی نوکلئوتیدی ناحیه محافظت شده انتهای ۵' ژن *vlhA* در جدایه های مایکوپلاسمای سینوویه حاصل از موارد مشکوک به بیماری در مرغداری‌های

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



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

آزمایش PCR در یک حجم ۲۵ میکرولیتری شامل ۳ میلی مول dNTP، ۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase، ۲/۵ میکرولیتر بافر واکنش (۱۰X)، ۰٫۳ میکرو لیتر از هر کدام از پرایمرهای جلودار و برگشتی، ۴ 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 ۹۴ درجه سانتی گراد برای ۲ دقیقه، ۳۵ سیکل شامل دمای ۹۶ درجه سانتی گراد (۱۵ ثانیه)، ۵۴ 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 5'-F₁: ATTAGCAGCTAGTGCAGTGGCC-3' و 5'-R₁: GAGCGCTAGTTTTGTTTTTGG-3' و همچنین

پس از مدت ۷۲ ساعت محیط‌های کشت PPLO جامد با میکروسکوپ نوری و با بزرگنمایی ۴۰X از نظر رشد و تشکیل پرگنه‌های مخصوص تحت بررسی قرار گرفتند. با مشاهده‌ی پرگنه شبیه به تخم‌مرغ نیمرو، آلودگی به جنس مایکوپلازما تأیید گردید. سپس آزمایش مولکولی به روش PCR جهت تایید انجام شد. ابتدا با آغازگر جنس مایکوپلازما 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 مایکوپلازما. در مورد تشخیص جنس مایکوپلازما از پرایمرهای MYF با توالی 5'-F: GCTGCGGTGAATACGTTCT-3' و MYR با توالی 3'-R: TCCCCACGTTCTCGTAGGG-5' که محصول PCR، ۱۶۳ 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 Taq DNA Polymerase، ۲/۵ میکرولیتر از بافر واکنش ۱۰X، ۰٫۱ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای جلودار و برگشتی، ۴ میکرو لیتر MgCl₂، ۲ میکرولیتر DNA و نهایتاً ۱۵٫۳ میکرولیتر آب صورت گرفت. برنامه واکنش شامل مرحله اول در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد برای ۷ دقیقه و ۵ ثانیه، ۳۰ سیکل شامل دمای ۹۵ درجه سانتی گراد (۳۰ ثانیه)، ۵۶ 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.

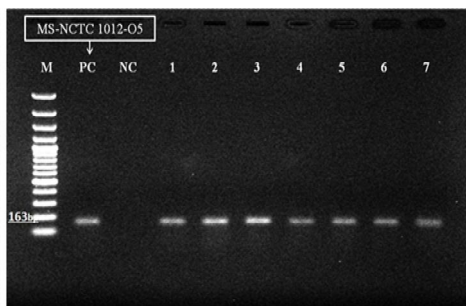
جدول ۱: نتایج کشت، PCR جنس مایکوپلازما و PCR ژن vIhA

کشت		PCR جنس مایکوپلازما		VlhA PCR		نمونه‌ها
+	-	+	-	+	-	
۲۸ (٪۶۵)	۱۵ (٪۳۵)	۳۳ (٪۷۶)	۱۰ (٪۲۴)	۲۴ (٪۵۵)	۱۹ (٪۴۵)	۴۳

۲۴ نمونه در آزمون PCR جنس و VlhA PCR مثبت گزارش گردید و به عنوان مایکوپلازما سینیویه مورد تأیید قرار گرفتند؛ ۱۰ نمونه از ۴۳ نمونه، در دو آزمون منفی و فاقد مایکوپلازما سینیویه بودند؛ ۹ نمونه علیرغم اینکه در آزمون PCR جنس مثبت بودند در آزمون VlhA PCR منفی تشخیص داده شدند (جدول ۲).

جدول ۲: فراوانی نمونه‌ها براساس نتایج PCR جنس مایکوپلازما و PCR ژن vIhA

VlhA PCR	PCR جنس	تعداد نمونه
+	+	۲۴
-	-	۱۰
-	+	۹
+	-	۰
۴۳	۴۳	۴۳



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

پرایمرهای طراحی شده توسط May با توالی 5'-CTA R:5'-CGT AAT و TTA GCA GCT AGT GCA GT-3' استفاده گردید. ACTAGA CGA CCA AT-3' (۱۴)

نتایج

در این مطالعه جهت جداسازی عامل بیماریزای مایکوپلازما سینیویه، از دو روش کشت (در محیط مایع و روی آگار) و PCR (جنس مایکوپلازما و ژن vIhA مایکوپلازما سینیویه) به صورت موازی برای تشخیص موارد مثبت استفاده شد. از مجموعه ۴۳ نمونه که نخست در محیط PPLO براث و سپس در محیط PPLO آگار جهت رشد و تشکیل پرگنه، کشت داده شدند؛ تعداد ۲۸ (٪۶۵) نمونه در کشت مثبت تشخیص داده شدند و بقیه نمونه‌ها 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 نمونه‌ها با کمک روش PCR برای جنس مایکوپلازما، توسط پرایمرهای اختصاصی جنس مایکوپلازما طراحی شده توسط Kojima (۱۹۹۷) با محصول PCR دارای باند ۱۶۳ جفت باز (نگاره ۳)، مورد بررسی قرار گرفتند. در آزمون PCR جنس مایکوپلازما از ۴۳ نمونه مورد مطالعه، ۳۳ (٪۷۶) نمونه مثبت و ۱۰ (٪۲۴) نمونه منفی مشاهده شد. اجرای روش PCR برای ژن vIhA مایکوپلازما سینیویه، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن vIhA مایکوپلازما سینیویه، طراحی شده توسط Jeffery (۲۰۰۷) با محصول PCR دارای باند 350-400 جفت باز (نگاره ۴)، انجام گرفت. از مجموع ۴۳ نمونه، ۲۴ (٪۵۵) نمونه در آزمون PCR ژن vIhA مایکوپلازما سینیویه مثبت و ۱۹ (٪۴۵) 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.

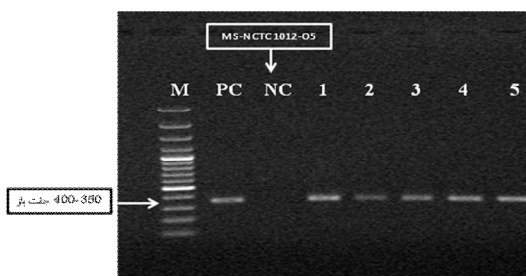
وجود نواحی RI، RII و RIII، جهت تشخیص و ردیابی مایکوپلازما سینوویه دارای اهمیت می‌باشند و در تشخیص و تفریق جدایه‌های مایکوپلازما سینوویه می‌تواند با حساسیت بالا مورد استفاده قرار گیرد.

تحقیقات زیادی درباره تشخیص مایکوپلازما سینوویه صورت گرفته و روش‌های مختلفی نیز ارائه شده است. تشخیص سری می با روش‌های معمول (ELISA, HI, RSA) اگر چه بسیار سودمند و راهگشا است اما ممکن است با واکنش‌های مثبت کاذب همراه باشد. همچنین در محیط کشت مایکوپلازماها 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 هم‌زمان و توأم با سایر عوامل باکتریایی امکان رشد موفق مایکوپلازما در محیط کشت کاهش می‌یابد. همچنین روش کشت زمانبر بوده و روش وقت‌گیری می‌باشد (۱۷ و ۳). لذا ضرورت استفاده از روش‌های دقیقتر در سال‌های اخیر مطرح شده است که یکی از آنها واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR) می‌باشد. از مزایای روش PCR سهولت در نمونه برداری می‌باشد، بدین ترتیب که بر خلاف نمونه‌های لازم برای کشت و جداسازی، در آزمایش PCR حتی از یک سوپ‌نای و بدون نیاز به محیط انتقال نیز می‌تواند به عنوان نمونه استفاده کرد (۱۲).

روش PCR توسط محققین زیادی در نقاط مختلف جهان انجام پذیرفته است و جهت تشخیص جنس مایکوپلازما پرایمرهای مختلفی با هدف تکثیر بخش‌هایی از ژن *vlhA* طراحی گردیده است (۱۲).

مایکوپلازماها سال‌ها در ایران با روش‌های سرولوژی و کشت مورد شناسائی قرار گرفته‌اند، همچنین بررسی مولکولی مایکوپلازما با روش‌های مختلف توسط محققین ایرانی صورت گرفته است و نیز تحقیقاتی بر پایه ژن *vlhA* برای شناسایی مایکوپلازما سینوویه انجام داده‌اند

باندهای ۱۶۳ جفت بازی در نمونه‌های جنس مثبت مشاهده می‌شود. مارکر (M: Marker): 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: نمونه‌های مورد آزمایش در این مطالعه.



نگاره ۴- تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR با استفاده از آغازگر اختصاصی ژن *vlhA* مایکوپلازما سینوویه (MSconsR-MSconsF).

باندهای ۳۵۰-۴۰۰ جفت بازی در نمونه‌های *vlhA* مثبت مشاهده شد. مارکر (M: Marker): 100 جفت بازی؛ کنترل مثبت (PC): باند نمونه استاندارد MS-NCTC 1012-05 در ناحیه ۳۵۰-۴۰۰ 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 جدایه‌های مایکوپلازما سینوویه با استفاده از روش کشت و آزمون PCR جنس و آزمون PCR بر اساس ژن *vlhA*، از موارد مشکوک به آلودگی در مرغداری‌های صنعتی استان‌های تهران و قزوین، مرکزی نسبت به تشخیص و ردیابی مایکوپلازما سینوویه اقدام گردید و نشان داده شد که مرغداری‌های مذکور آلوده به مایکوپلازما سینوویه می‌باشند. همچنین نشان داده شد که ژن *vlhA* به علت

با توجه به این موضوع که توالی انتهای ۵ ژن *vlhA* در بین جدایه های مایکوپلازما سینوویه متفاوت است (۱۶) 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 ویژگی ها این قطعه از ژن *vlhA* را جهت شناسایی جدایه های مختلف، منحصر به فرد جلوه می دهد (۵، ۷، ۸، ۹).

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 می باشد 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 (۱۵، ۱۶، ۱۸). Bencina و همکاران در سال ۲۰۰۱، تنوع همگلوپتینین در مایکوپلازما سینوویه و همچنین تنوع سائز در (MSPB)N-terminal 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 مایکوپلازما سینوویه متفاوت است (۵). در سال ۲۰۰۴ Hong و همکاران، و اثبات کردند که آزمایش PCR (به کار برده شده برای ردیابی *vlhA* مایکوپلازما سینوویه)، در جهت تشخیص و تیپ بندی سویه های مختلف مایکوپلازما سینوویه، ابزار مفیدی می باشد (۸). Jeffery و همکاران در سال ۲۰۰۷، طی نتایج خود اظهار داشتند که استفاده از PCR بر پایه ژن *vlhA*، بیشترین جهش ها را در میان جدایه های مایکوپلازما سینوویه مشخص می کند (۹). Mardassi و همکاران در سال ۲۰۰۵ با تأکید بر روی ژن *vlhA*، برای تشخیص مایکوپلازما 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

(۱۷ و ۶، 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 (۱۷ و ۶، 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 مایکوپلازما سینوویه مشاهده شده است (۴). همچنین بر اساس برخی مطالعات و طبق داده های بانک ژن، بین گونه های مایکوپلازما به ویژه مایکوپلازما 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 مایکوپلازما سینوویه برجسته تر می سازد. در این مطالعه جهت آزمون PCR رایج جهت تعیین جنس مایکوپلازما (بر اساس تکثیر بخشی از ژن 16S rRNA از پرایمرهایی استفاده شد که محصول ۱۶۳ جفت بازی ایجاد نمودند و در ادامه نمونه های مثبت در PCR، مورد آزمون *vlhA* جهت تشخیص مایکوپلازما سینوویه قرار گرفتند.

آزمون های زیادی بر اساس PCR جهت تشخیص مایکوپلازما 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 مایکوپلازما سینوویه مبتنی بر ژن کد کننده پروتئین همگلوپتینین (*VlhA*) را طراحی کردند (۵، ۷، ۸، ۹). یکی از علل عمده استقبال محققین از ژن *vlhA* (بر خلاف ژن 16S 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 (۱۶ و ۸).

نواحی مورد شناسایی پرایمرها و در بر گرفتن نواحی متغیر ژن vlhA (۱۴)، در رابطه با جدایه‌های ایرانی نتیجه ای حاصل نشد. با توجه به اینکه پرایمرهای مورد استفاده توسط Hong (نوکلوتید ۱-۳۴۷)، 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 (نوکلوتید ۱-۲۲۱) و پرایمرهای طراحی شده توسط Jeffery (نوکلوتید ۱-۴۰) 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 کارایی لازم می‌باشند (۷، ۸، ۹، ۲). در ضمن پرایمرهای طراحی شده توسط Slavac (در محدوده نوکلوتیدی ۱-۲۳۱) با در نظر گرفتن این موضوع که در ناحیه متغیر ژن قرار می‌گیرند، قادر به شناسایی توالی DNA جدایه های ایران در این ناحیه نمی‌باشند (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 ۳۵۰-۴۰۰ جفت بازی را تشکیل دادند.

بطور کلی، از آنجاییکه ناحیه ۵ در ژن vlhA مایکوپلازما سینوویه دارای یک کپی منفرد و ناحیه محافظت شده می باشد، قادر است در جمعیت های مایکوپلازما سینوویه دچار تغییرات شود (۷، ۱۶) 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 RII، RI و ناحیه پلی مورفسم RIII در مقایسه با ژن 16S rRNA دارای ارزش بیشتری می‌باشد (۷ و ۸).

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

استخراج شده از کشت ها و همینطور نمونه‌های مستقیم سواب ها، بطور موفقیت آمیز با کمک پرایمرهای vlhAR2-vlhAF در آزمون PCR افزایش می یابند و می توان در تشخیص و طبقه بندی مایکوپلازما سینوویه از آن استفاده کرد (۷). در کشور ما نیز بررسی مولکولی مایکوپلازما سینوویه بر اساس ژن vlhA به طور محدود توسط محققین انجام شده است (۱ و ۲).

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 بررسی هایی که در راستای این تحقیق صورت گرفت، مشاهده شد که در آزمون PCR صورت گرفته بر اساس پرایمرهای طراحی شده توسط Bencina (R1 و F1) فقط سوبه 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 ناموفق 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 : نوکلوتید ۱-۴۲۱-۱۰۲۴)، 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 نوکلوتیدی ۲۵-۲۵۰۰) انجام گرفت، اینگونه برآورد شد که به علت طولانی بودن

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 مایکوپلازما سینوویه ایران به روش PCR بر اساس تکثیر بخشی از ناحیه انتهایی ۵' ژن vlhA. مجله دامپزشکی. ۶۶، (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, Mettifofo E, Timenetsky J et al (2010): Interspecific variation in 16S rRNA gene of 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 Behbahan, N., Asasi, K., Afsharif, A., Pourbakhsh, 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): Specific Detection and Typing of mycoplasma synoviae Strains in Poultry with PCR and DNA Analysis Targeting the Hemagglutinin Encoding Gene vlhA. Avian Diseases. 48:606-616.

سینوویه مطرح باشد و حاکی از اهمیت کاربرد این ژن در شناسایی جدایه های مایکوپلازما سینوویه می باشد. شیوع عفونت مایکوپلازمایی 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 مایکوپلازما 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 مایکوپلازما سینوویه موجود در ایران و مقایسه نتایج حاصله با جدایه های سایر کشورها توصیه می شود.

تشکر و سپاسگزاری

هزینه های این مطالعه از محل اعتبارات طرح شماره ۸۷۰۸۰-۱۸-۱۸-۲ مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی 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 سرم سازی رازی تشکر و قدردانی می شود. همچنین از همکاری های صمیمانه سرکار خانم ها: سلیمه آهنگران، مهناز باباخانی و آقای دکتر علیرضا آبتین و تمامی کارکنان و همکاران آزمایشگاه رفرانس مایکوپلازما مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج سپاسگزاری می گردد.

فهرست منابع

- ۱- انصاری، ح.، پوربخش، س.ا.، شیخی، ن.، بزرگمهری فرد، م.ح.، اشتری، ع. (۱۳۸۸). تشخیص گونه مایکوپلازما سینوویه در نمونه های بالینی با استفاده از روش vlhA-PCR. مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز. دوره ۳، شماره ۴. ۶۷۳-۶۸۱.

- 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- Laueran, 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 Intermediate Hemagglutination Phenotypes in *Mycoplasma synoviae*. *Journal of Bacteriology*. Pp.2116-2121.
- 15- Noormohamadi, A.H., Markham, P.F., Kanci, A., Whither, K.G., Browning, G.F. (2000): A novel mechanism for control of antigenic variation in the hemagglutinating 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 with a primer pair in the 16S-23S rRNA spacer region for detection of *Mycoplasma pulmonis* in clinical isolates. *Comp. Immunol. Microbiol. Infection Disease*. 27:117-128.