

تشخیص فاکتورهای حدت مایکوپلازما گالی سپتیکوم (MG)، جدا شده از جوجه‌های مبتلا به کمپلکس بیماری‌های تنفسی، با استفاده از تکنیک Real-time PCR High-Resolution Melting Curve

آرش رمضانپور شاهی^{۱*}؛ عبدالکریم زمانی مقدم^۲؛ محمدرضا محزونیه^۳

۱. دانشجوی دکترای تخصصی بهداشت و بیماری‌های پرندگان، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.
۲. گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.
۳. گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.

پذیرش: ۳۱ خردادماه ۱۴۰۳

دریافت: ۸ اردیبهشت‌ماه ۱۴۰۳

چکیده

مایکوپلازما گالی سپتیکوم (*Mycoplasma gallisepticum*) یک پاتوژن باکتریایی است که باعث بیماری مزمن تنفسی (Chronic Respiratory Disease) در طیور می‌شود. CRD نه تنها میزان بهره‌وری در مزارع مرغداری را کاهش می‌دهد؛ بلکه منجر به زیان اقتصادی قابل توجهی در صنعت طیور می‌شود. هدف از این مطالعه شناسایی فاکتورهای حدت مایکوپلازما گالی سپتیکوم جدا شده از جوجه‌های مبتلا به بیماری‌های تنفسی با استفاده از تکنیک Real-time PCR High-Resolution Melting curve (HRM) بود. به‌طور کلی ۵۰ مزرعه مرغ گوشتی در این مطالعه وارد شدند. از هر مزرعه ۲۰ نمونه جمع‌آوری شد. استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA CTB i-genomic انجام شد. از ۵۰ مزرعه‌ای که نمونه‌ها جمع‌آوری شد، چهار مزرعه با استفاده از روش Real-time PCR به‌عنوان مایکوپلازما مثبت شناسایی شدند. منحنی ذوب با وضوح بالا Real-time PCR انجام شد و داده‌های به‌دست‌آمده با استفاده از سیستم PCR max تجزیه و تحلیل شدند. نتایج PCR نشان داد که ژن‌های *crmA*، *pvpA* و *gapA* در این نمونه‌ها وجود داشتند، نتایج ترسیم درخت فیلوژنتیک با نمونه‌های مشابه در مطالعات قبلی مقایسه شد. تجزیه و تحلیل HRM تنوع مولکولی بین نمونه‌های جدا شده را نشان می‌دهد. نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از HRM Real-time PCR روشی قابل اعتماد برای شناسایی و بررسی وجود فاکتورهای حدت مرتبط با پاتوژن مایکوپلازما است.

واژه‌های کلیدی: مایکوپلازما گالی سپتیکوم، بیماری مزمن تنفسی، طیور، ژن حدت، HRM Real-time PCR

مقدمه

مزمن تنفسی (CRD) در جوجه‌ها می‌شود (۱۹). عفونت با مایکوپلازما گالی سپتیکوم می‌تواند منجر به کاهش تولید تخم در مزارع پرورش‌دهندگان شود، همچنین بر شکل‌گیری لایه‌های پوسته اثر سوء داشته، منجر به کاهش وزن و عدم رسیدن به وزن ایده‌آل در طیور و متعاقب آن ضرر اقتصادی می‌شود (۲۹، ۱۳). این باکتری هم به‌صورت افقی و هم عمودی از طریق جوجه و تخم آلوده از مزارع پرورش‌دهنده منتقل شود (۲۰). پروتئین چسبندگی فرضی (*pvpA*) یکی از فاکتورهای حدت مرتبط با مایکوپلازما گالی سپتیکوم است. *pvpA*، یک پروتئین وابسته به شرایط است که در زمان عفونت افزایش بیان

صنعت طیور نقش مهمی در عرضه جهانی غذا ایفا می‌کند. با این حال، با چالش‌های مهمی از جمله عفونت‌های باکتریایی مواجه است. یکی از مهم‌ترین عفونت‌های باکتریایی مؤثر بر این صنعت، مایکوپلازما گالی سپتیکوم است (۲۰). مایکوپلازما گالی سپتیکوم متعلق به کلاس *Mollicutes* است و دارای ویژگی‌های منحصربه‌فردی مانند اندازه کوچک، مشکل در کشت آزمایشگاهی و عدم وجود دیواره سلولی کامل است (۲۷). تظاهرات بالینی ناشی از مایکوپلازما گالی سپتیکوم متفاوت است، اما در درجه اول باعث ایجاد سینوزیت در بوقلمون‌ها و بیماری



استفاده از PCR-HRM روشی سریع، قابل اعتماد و کارآمد برای تشخیص و تجزیه و تحلیل حضور این عوامل حدت در سویه‌های مایکوپلازما جدا شده از دستگاه تنفسی جوجه‌ها را فراهم کرد.

مواد و روش کار

در این مطالعه مقطعی که بین سال‌های ۱۴۰۱ تا ۱۴۰۲ انجام شد، در مجموع ۱۰۰۰ نمونه از ۵۰ مزرعه مرغ گوشتی واقع در استان‌های اصفهان و چهارمحال بختیاری جمع‌آوری شد. انتخاب مزارع بر اساس وجود علائم بیماری حاد تنفسی و میزان مرگ و میر روزانه بیش از ۱٪ بود. نمونه برداری با جمع‌آوری نمونه سواب از مجاری تنفسی پرندگان مبتلا با استفاده از سواب استریل انجام شد.

پس از جمع‌آوری نمونه، استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA CTB i-genomic (اینترون، کره جنوبی) طبق دستورالعمل سازنده انجام شد. نمونه‌های سواب در ۱ میلی‌لیتر بافر سالین فسفات (PBS) گرداب شدند. پس از آن، ۲۰۰ میکرولیتر محلول PBS حاوی DNA با ۲۰۰ میکرولیتر بافر لیز و ۱۰ میکرولیتر پروتئیناز K مخلوط شد و سپس در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. سپس ۲۵۰ میکرولیتر اتانول و ۲۵۰ میکرولیتر بایندینگ بافر به محلول اضافه شد و سپس بر روی ستون‌ها قرار گرفت و با بافرهای شوینده شسته شد. در نهایت محلول حاوی DNA به دست آمده در بافر احیا حل شد و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد (۱۴).

در این مطالعه پس از استخراج DNA، با استفاده از روش Real-time PCR، تأیید حضور مایکوپلازما گالی سبتیکوم در بین نمونه‌ها با استفاده از پرایمرهای اختصاصی که در جدول ۱ ارائه شده است، انجام شد. برای هر واکنش PCR، حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر بود که از اجزای زیر تشکیل شده است: آب Nuclease-free (۱/۲ میکرولیتر)، پرایمر فوروارد (۰/۴ میکرولیتر)، پرایمر ریورس (۰/۴ میکرولیتر)، مسترمیکس (۵ میکرولیتر)، DNA ژنومی استخراج شده (۳ میکرولیتر). برای اطمینان از صحت و دقت نتایج هم نمونه کنترل مثبت و هم منفی در واکنش‌های PCR در نظر گرفته شدند.

این پروتئین مشهود است. این پروتئین نقش مهمی در ابتلای دستگاه تنفسی مرغ به عفونت باکتریایی و فرار از سیستم ایمنی میزبان را ایفا می‌کند (۲۲، ۲۳). فاکتورهای دیگر حدت مایکوپلازما گالی سبتیکوم شامل مولکول‌های چسبنده سلولی gapA و crmA هستند که اتصال اولیه باکتری به سلول‌های تنفسی میزبان را تسهیل می‌کنند و به گسترش عفونت کمک می‌کنند (۱۵، ۶). با توجه به تأثیر قابل توجه بیماری مایکوپلازما گالی سبتیکوم و نیاز به تشخیص سریع و به موقع برای جلوگیری از مرگ و میر، افزایش بهره‌وری و کاهش ضررهای اقتصادی، روش‌های مختلفی برای شناسایی مایکوپلازما گالی سبتیکوم گزارش شده است.

هرچند روش‌های سرولوژیکی برای شناسایی مایکوپلازما گالی سبتیکوم مفید بوده است، اما حساسیت و ویژگی آن‌ها به دلیل احتمال واکنش‌های کاذب محدود است. کشت باکتری به دلیل ماهیت زمان‌بر، رشد آهسته باکتری‌ها و همچنین احتمال آلودگی با باکتری‌های محیطی روش بهینه‌ای نیست (۱۵، ۶). روش‌های مولکولی، مبتنی بر تشخیص ژن‌های خاص، ویژگی، حساسیت، سرعت و قابلیت تکرارپذیری بالایی را ارائه می‌دهند و آن‌ها را به ابزارهای ارزشمندی در تشخیص مایکوپلازما گالی سبتیکوم تبدیل می‌کنند (۹).

یک تکنیک عملی که برای تشخیص پاتوژن‌های مختلف با استفاده از ویژگی‌های حرارتی محصولات نهایی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (Amplicones) استفاده می‌شود، Real-time PCR High Resolution Melt است (۳). PCR-HRM یک روش سریع، ساده و مقرون به صرفه است که با استفاده از آن می‌توان انواع مختلف توالی رشته‌های DNA را براساس دمای ذوب آنها شناسایی کرد (۱۱، ۲۸).

بر اساس پیشینه فوق، هدف از مطالعه حاضر شناسایی فاکتورهای حدت مایکوپلازما گالی سبتیکوم جدا شده از دستگاه تنفسی جوجه‌ها با استفاده از-PCR HRM بود. با استفاده از این روش، این مطالعه باهدف شناسایی نشانگرهای ژنتیکی خاص مرتبط با حدت مایکوپلازما گالی سبتیکوم، مانند پروتئین چسبندگی احتمالی pvpA، مولکول‌های چسبندگی سلولی gapA و crmA احتمال وجود سایر عوامل مرتبط انجام شد.

جدول ۱- پرایمرهای اختصاصی شناسایی مایکوپلازما گالی سبتیکوم

نام پرایمر	توالی	ژن هدف	اندازه باند	منبع
MGmgc2-543 F MGmgc2-543 R	5'- AAGCGATTGAGCCAACTG-3' 5'-TAAACCCTGGTCGCATTC-3'	mgc2	۵۴۳ bp	(۲۵)

در این مطالعه، شناسایی ژنهای حدت مایکوپلازما گالی سبتیکوم شامل gapA، pvpA و crmA با استفاده از PCR انجام شد. پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه بر اساس تحقیقات قبلی (۳۱،۲۵) انتخاب شده و در جدول

۲ ارائه شده است. برای اطمینان از صحت و دقت نتایج هم نمونه کنترل مثبت و هم منفی در واکنشهای PCR در نظر گرفته شدند.

جدول ۲- پرایمرهای مربوط به شناسایی فاکتورهای حدت crmA، pvpA، gapA در واکنش PCR

نام پرایمر	توالی	ژن هدف
MGcrmA-349 F MGcrmA-349 R	5'- GCAATTATGATCATCTTAGGA-3' 5'- TAGAGAAGGGAGGTTATTTT-3'	crmA
MGpvpA-245 F MGpvpA-245 R	5'- CAAGGTCCACGACCAATGAA-3' 5'- CTTGTGGGCTGTTAGGTCTG-3'	pvpA
MGgapA-332 F MGgapA-332 R	5'- TTCTAGCGCTTTAGCCCTAAACCC-3' 5'- CTTGTGGAACAGCAACGTATTTCGC-3'	gapA

برای تعیین توالی محصولات PCR به دست آمده در مرحله قبل، از پرایمرهای اختصاصی استفاده شد. توالیهای به دست آمده با استفاده از سایت مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) GenBank و نرم افزار BioEdit با توالیهای ثبت شده مشابه مقایسه شدند. در ادامه درخت فیلوژنتیک با استفاده از مدل-Neighbour Jining و نرم افزار مگا ایکس ساخته و مورد ارزیابی قرار گرفت (۳۳،۲۱). این تجزیه و تحلیل برای ارزیابی روابط ژنتیکی و ارتباط تکاملی در میان سویه های مایکوپلازما گالی سبتیکوم شناسایی شده و همچنین بر اساس توالیهای ژن حدت آنها، امکان پذیر بود.

تجزیه و تحلیل HRM با استفاده از ترموسایکلر PCR Max(UK) انجام شد و داده های منحنی ذوب با استفاده از نرم افزار PCRmax مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. بدین ترتیب نواحی نرمال ۸۴/۶۱، ۸۴/۸۱ و ۹۰/۵۵، ۹۰/۷۵ با حد اطمینان ۹۰ درصد، توسط دستگاه شناسایی شد.

تمام تجزیه و تحلیل های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۹ انجام شد. مقادیر با P value کمتر از

۰/۰۵ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد. ($P < 0/05$)

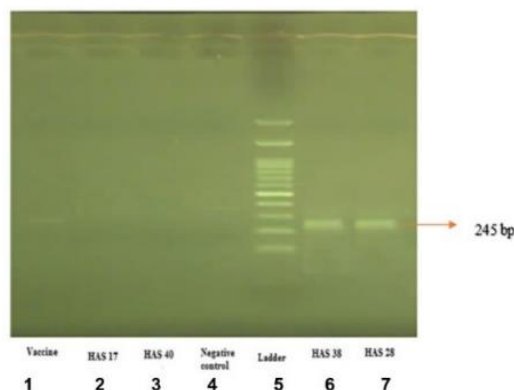
نتایج

از تعداد ۵۰ مزرعه ای که نمونه ها جمع آوری شدند و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای مایکوپلازما گالی سبتیکوم غربالگری شده بود، در مجموع نمونه چهار مزرعه (۸ درصد) برای حضور باکتری مثبت شناسایی شد. این نمونه های مثبت به عنوان HAS ۲۸،۱۷، ۳۸ و ۴۰ برچسب گذاری شدند. جست و جوی بیشتر برای یافتن ژنهای حدت خاص، از جمله gapA، pvpA و crmA، در بین این چهار نمونه مثبت انجام شد. نتایج این تجزیه و تحلیل در شکل ها نشان داده شده است که حضور یا عدم حضور هر ژن هدف را در نمونه های مربوطه نشان می دهد.

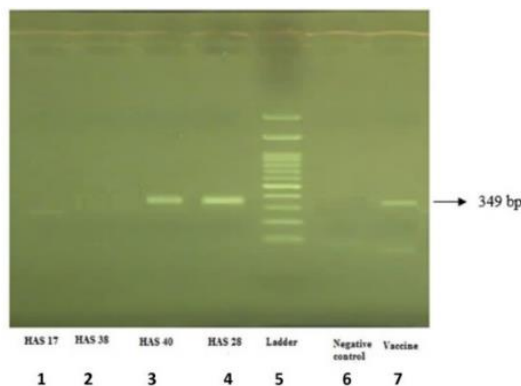
شکل ۱ حضور ژن pvpA را در بین چهار نمونه نشان می دهد. در این شکل واکنش TS-11 موسسه تحقیقات واکنش و سرم سازی رازی به عنوان کنترل مثبت و آب Nuclease-Free، به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. بر اساس این شکل، ژن pvpA در نمونه های

همانطور که در شکل ۳ نشان داده شده است، وجود ژن gapA در بین HAS 28 ، HAS 17 و واکسن مثبت گزارش شده است.

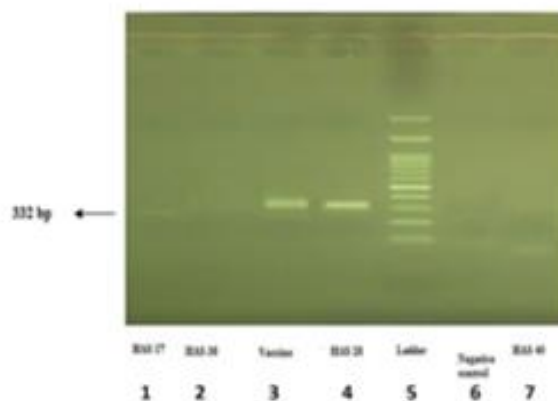
HAS 28 ، HAS 38 و واکسن مثبت بود. شکل ۲ حضور ژن crmA را نشان می‌دهد. بر اساس این عدد، ژن crmA در نمونه‌های HAS 28 ، HAS 40 و واکسن مثبت بود.



شکل ۱- وجود ژن pvpA در بین نمونه‌های مثبت؛ ستون ۱: کنترل مثبت واکسن (TS-11)، ستون ۲: HAS 17، ستون ۳: HAS 40، ستون ۴: کنترل منفی (آب Nuclease-free)، ستون ۵: نشانگر DNA، ستون ۶: HAS 38، ستون ۷: HAS 28

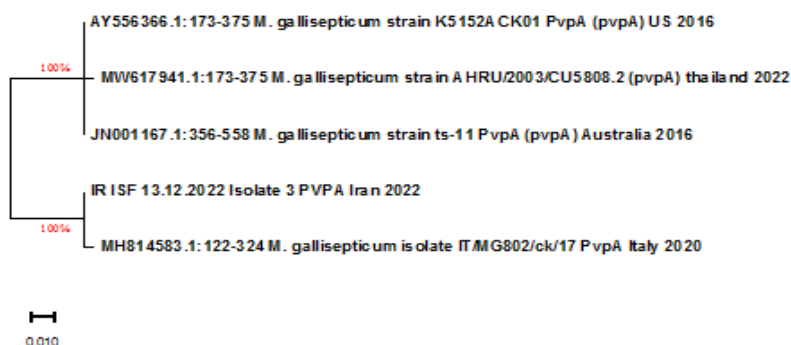


شکل ۲- وجود ژن crmA در بین نمونه‌های مثبت؛ ستون ۱: HAS 17، ستون ۲: HAS 38، ستون ۳: HAS 40، ستون ۴: HAS 28، ستون ۵: نشانگر DNA، ستون ۶: کنترل منفی (آب Nuclease-free)، ستون ۷: کنترل مثبت (واکسن TS-11)



شکل ۳- وجود ژن gapA در میان سویه‌های مثبت؛ ستون ۱: HAS 17، ستون ۲: HAS 38، ستون ۳: کنترل مثبت واکسن (TS-11)، ستون ۴: HAS 28، ستون ۵: نشانگر DNA، ستون ۶: کنترل منفی (بدون هسته آب)، ستون ۷: HAS 40

بر اساس تجزیه و تحلیل مشابه ترین توالی نوکلئوتیدی ژن pvpA با استفاده از مدل Neighbour-Joining ساخته شد. درخت فیلوژنی در مورد روابط تکاملی و خوشه بندی ژنتیکی سویه های مایکوپلازما گالی سبتیکوم مورد مطالعه دیدگاه هایی را ارائه می دهد (شکل ۴).



شکل ۴- درخت فیلوژنتیک بر اساس توالی های ژن pvpA سویه های جدا شده از مزارع مورد مطالعه در ایران و سویه های منتشر شده در GenBank

بیشتر روابط ژنتیکی، مقایسه توالی های نوکلئوتیدی ژن gapA انجام شد. یک درخت فیلوژنتیک جداگانه بر اساس تجزیه و تحلیل توالی ژن gapA در شکل ۵ ارائه شده است. تصاویر ارائه شده تغییرات و شباهت های ژنتیکی در میان سویه ها را ارائه می دهند، و خوشه ها و روابط متمایز در جمعیت مایکوپلازما گالی سبتیکوم را برجسته می کنند.



شکل ۵- درخت فیلوژنتیک بر اساس توالی های ژن gapA سویه های جدا شده از مزارع مورد مطالعه در ایران و سویه های منتشر شده در GenBank

نمونه‌های بالینی آمریکایی و نمونه‌ای جدا شده از یک فنچ خانگی در سال ۲۰۱۴ مشاهده شد. این یافته‌ها تنوع ژنتیکی در جمعیت مایکوپلازما گالی سبتیکوم و متمایز بودن سویه واکسن را برجسته می‌کند. برای درک جامع‌تر، شکل ۶ درخت فیلوژنتیک مقایسه توالی نوکلئوتیدی ژن *crmA* را نشان می‌دهد. این تصاویر تغییرات ژنتیکی و ارتباط میان سویه‌ها را ارائه می‌دهد، و بر الگوهای خوشه‌بندی متمایز و شاخه‌های متفاوت در جمعیت مایکوپلازما گالی سبتیکوم تأکید می‌کنند.



شکل ۶- درخت فیلوژنتیک بر اساس توالی‌های ژن *crmA* سویه‌های مزرعه در ایران و سویه‌های منتشر شده در GenBank

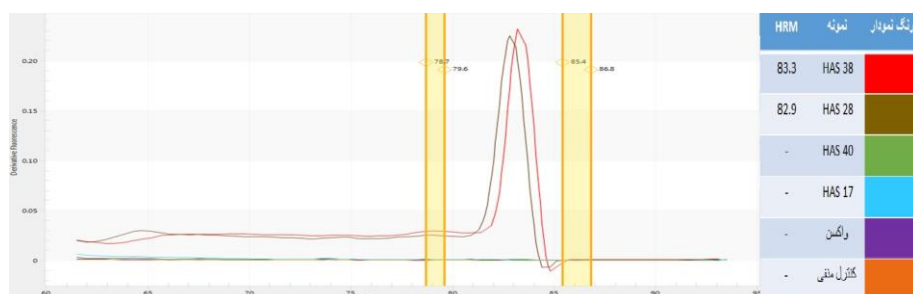
برخی تفاوت‌های ژنتیکی یا ویژگی‌های منحصربه‌فرد در نمونه شماره ۴۰ در مقایسه با نمونه‌های واکسن سویه F99 و F است. این مشاهدات در درخت فیلوژنتیک که روابط و الگوهای خوشه‌بندی را بر اساس توالی‌های ژنتیکی نشان می‌دهد، به تصویر کشیده شده‌اند. قرار دادن نمونه‌ها در شاخه‌های متمایز، تنوع ژنتیکی و تفاوت‌های بالقوه بین سویه‌های مورد تجزیه و تحلیل را برجسته می‌کند. تجزیه و تحلیل HRM برای ژن‌های *gapA*، *pvpA*، *crmA* در بین چهار نمونه، کنترل مثبت (واکسن) و کنترل منفی (آب) در شکل‌های زیر نشان داده شده است.

با تجزیه و تحلیل توالی‌های نوکلئوتیدی و ساخت یک درخت فیلوژنتیک برای ژن *gapA*، می‌توان چندین نتیجه را مشاهده کرد. در مرحله اول، توالی واکسن ۱۰۰٪ شباهت با واکسن تجاری مایکوپلازما گالی سبتیکوم مریال را نشان داد و در یک شاخه با هم قرار گرفتند. این نشان‌دهنده سطح بالایی از شباهت بین واکسن و سویه تجاری است. در مقابل، توالی‌های به دست آمده از سایر نمونه‌های بالینی تفاوت‌هایی با توالی واکسن نشان دادند و شاخه‌ای جداگانه در درخت فیلوژنتیک تشکیل دادند. بیشترین تفاوت با سویه F در استرالیا و به دنبال آن

بر اساس تجزیه و تحلیل نتایج، چندین یافته قابل مشاهده است. توالی واکسن مورد استفاده در این مطالعه بیشترین شباهت را به واکسن تجاری مریال نشان می‌دهد و در همان شاخه قرار می‌گیرد. علاوه بر این، نمونه شماره ۲۸ و نمونه گزارش شده از کره جنوبی در سال ۲۰۱۹ شباهت بالایی را نشان می‌دهد و همچنین در همان شاخه قرار می‌گیرد که نشان‌دهنده یک رابطه ژنتیکی نزدیک است. البته قابل ذکر است که نمونه شماره ۴۰ اگرچه شباهت‌هایی با نمونه‌های واکسن سویه F99 و F دارد؛ اما در شاخه‌ای جداگانه قرار داده شده است. این نشان‌دهنده

در نمونه HAS 28-38 و وجود داشت و ژن crmA
در نمونه HAS 28-40 و واکسن مشاهده شد.

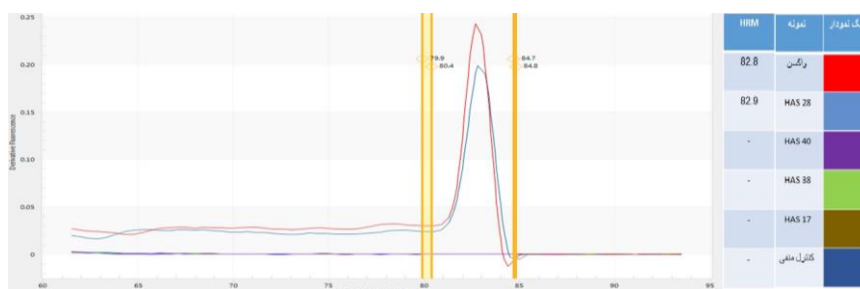
بر اساس نتایج به دست آمده از نمودارها ژن gapA در
نمونه HAS 28 و واکسن وجود داشت، همچنین ژن



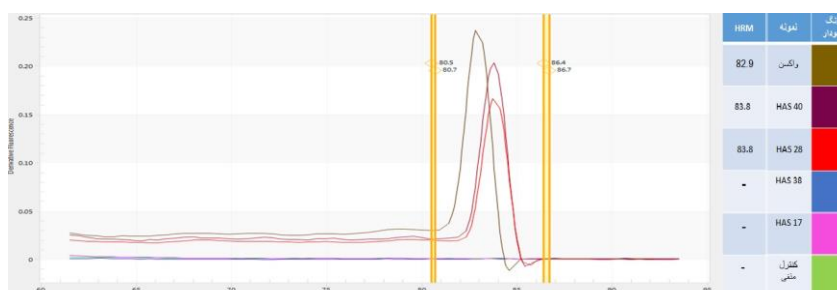
شکل ۷- تجزیه و تحلیل منحنی HRM محصولات PCR ژن pvpa از سویه‌های میکوپلازما کالی‌سپتیکوم

HAS 28 به ترتیب ۸۲/۸ و ۸۲/۹ بوده است. شکل ۹
نمودارهای تکثیر منحنی HRM از ژن crmA نشان
می‌دهد که HRM واکسن و نمونه‌های HAS و HAS 40
28، ۸۳/۸ و ۸۲/۸ بوده است.

منحنی‌های HRM ژن pvpa در شکل ۷ نشان
می‌دهد که HRM نمونه HAS 38 و HAS 28 به ترتیب
۸۳/۳ و ۸۲/۹ بوده است. نتایج تجزیه و تحلیل HRM ژن
gapA در شکل ۸ نشان داده شده است. بر اساس شکل
۸ منحنی‌های HRM، نشان می‌دهد که HRM واکسن و



شکل ۸- تجزیه و تحلیل منحنی HRM محصولات PCR ژن gapA از سویه‌های میکوپلازما کالی‌سپتیکوم



شکل ۹- تجزیه و تحلیل منحنی HRM محصولات PCR ژن crmA از سویه‌های میکوپلازما کالی‌سپتیکوم

مزارع پرورش به خطر انداخته و موجب ضرر اقتصادی
برای مرغداری‌ها می‌شود (۲۷). آلودگی با این باکتری
ممکن است سبب کاهش وزن طیور، کاهش تولید تخم
مرغ و در نهایت افزایش مرگ و میر در مزارع شود به

بحث

عفونت طیور با پاتوژن میکوپلازما منجر به بیماری
مزمن تنفسی (CRD) می‌شود که سلامت طیور را در



طوری که سالانه بیش از ۷۸۰ میلیون دلار به صنعت خسارت وارد می‌کند (۱۸،۵). شناسایی سریع سویه‌های مایکوپلازما می‌تواند در کنترل و درمان بیماری موثر باشد. روش‌های مولکولی از جمله PCR HRM روشی قابل اعتماد برای تشخیص و شناسایی سویه‌های مایکوپلازما است (۲۶). با توجه به اهمیت سویه‌های مایکوپلازما در صنعت طیور، ما تشخیص فاکتورهای حدت مایکوپلازما گالی سبتیکوم جدا شده از جوجه‌های مبتلا به کمپلکس بیماری‌های تنفسی توسط HRM Real-time PCR را به عنوان هدف در این مطالعه انتخاب کردیم. بر اساس مطالعات انجام شده، مشخص شد که روش‌های مولکولی (PCR) از ویژگی ارزش تشخیصی بالاتری نسبت به روش‌های سنتی مانند کشت باکتریایی برخوردار هستند (۸). در این مطالعه از بین ۵۰ مزرعه مورد مطالعه، نمونه ۴ مزرعه (۸ درصد) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی به عنوان مایکوپلازما گالی سبتیکوم مثبت شناسایی شدند. وجود ژن‌های فاکتور حدت gapA، pvpA و crmA در بین این ۴ نمونه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج PCR نشان داد که ژن‌های crmA، pvpA و gapA در بین آن‌ها وجود دارد. شیوع مایکوپلازما در مطالعات چینگ و همکاران (۳۲) و چندهار و همکاران (۲)، به ترتیب ۲/۷ درصد و ۱۳/۳۳ درصد بود که با مطالعه حاضر همخوانی دارد. اگرچه، شیوع مایکوپلازما در مطالعات ابتها و همکاران (۲۷)، میشل و همکاران (۸)، جعفر و همکاران (۲۴)، به ترتیب ۸۵/۹ درصد، ۶۳/۵ درصد و ۷۸/۴ درصد بود که بیشتر از مطالعه حاضر بود. تفاوت در شیوع مایکوپلازما را می‌توان به این دلیل توضیح داد که مرحله آلودگی حاد یا مزمن دارد، جمعیت نمونه‌ها و روش نمونه‌برداری و همچنین سن طیور در مطالعات متفاوت بود. همچنین این مطالعه بر اساس ترسیم درخت فیلوژنتیک مشخص کرد که توالی ژن pvpA شباهت بالایی با نمونه گزارش شده از ایتالیا در سال ۲۰۲۰ دارد، در حالی که ژن gapA هیچ شباهتی با نمونه‌های جدا شده در هیچ نقطه‌ای ندارد. همچنین در مورد ژن crmA مشخص شد که توالی ژن جدا شده در مطالعه حاضر شباهت بالایی با نمونه گزارش شده از کره جنوبی در سال ۲۰۱۹ دارد و در یک شاخه قرار می‌گیرند. در مطالعات نورمحمدی و همکاران

(۳۵) و هاشمی و همکاران (۳۱) از تکنیک آنالیز ذوب با وضوح بالا (HRM) برای تعیین ژنتیکی مایکوپلازما استفاده شد، بنابراین در این مطالعه از تکنیک HRM برای تشخیص ژن‌های حدت crmA، pvpA، gapA استفاده شد. یکی از ویژگی‌های قابل توجه عفونت‌های مایکوپلازما توانایی آن‌ها برای تداوم علی‌رغم پاسخ ایمنی میزبان است (۳۵،۳۴،۱۰). pvpA ژن بیان کننده پروتئین سطحی غشایی یکپارچه با انتهای C آزاد است که در معرض تغییرات خود به خودی فاز با فرکانس بالا قرار می‌گیرد و موجب تنوع اندازه در بین سویه‌ها می‌شود (۱۶،۱۲). تصور می‌شود که این پروتئین نقش مهمی در ایجاد تنوع آنتی ژنی ایفا می‌کند، که امکان فرار ایمنی را در طول عفونت مزمن با این پاتوژن فراهم می‌کند (۱۷،۱) که تنوع نه تنها در بین سویه‌ها، بلکه در کلون‌های یک سویه نیز می‌تواند رخ دهد تنوع مداوم در بیان چنین آنتی ژن‌های سطحی نیز در داخل بدن رخ می‌دهد (۳۴)، و ممکن است عامل اصلی در ایجاد بیماری بالینی و پاسخ‌های سرولوژیکی باشد (۴). نتایج تحقیقات قبلی نشان می‌دهد که وجود ژن‌های اختصاصی gapA و crmA برای اتصال سلولی مایکوپلازما گالی سبتیکوم به سلول میزبان و بیماری‌زایی آن ضروری است (۷). به نظر می‌رسد که بقای ژن‌ها و تغییرات فنوتیپی گسترده در پروتئین‌های اتصال به سلول میزبان در میان مایکوپلازما گالی سبتیکوم سبب عفونت‌زایی گسترده این پاتوژن در میزبان‌ها شده است (۳۱،۳۰).

مایکوپلازما گالی سبتیکوم (MG) باعث بیماری مزمن تنفسی (CRD) در طیور می‌شود که منجر به افزایش تلفات و ضررهای اقتصادی جبران‌ناپذیری می‌شود. نتایج این مطالعه نشان داده است که HRM Real-time PCR یک تکنیک سریع و قابل اعتماد برای شناسایی سویه‌های پاتوژن مایکوپلازما گالی سبتیکوم ارائه می‌کند و می‌تواند تنوع مولکولی را در بین سویه‌های جدا شده تعیین کند.

منابع

1. Ali B, Yosif E. Isolation and molecular characterization of Mycoplasma synoviae from infected chickens with respiratory signs. Iraqi Journal of Agricultural Sciences. 2020; 51 (5).

- of Genetic Engineering and Biotechnology. 2022;20(1):160.
10. Ferguson-Noel N, Laibinis VA, Farrar M. Influence of swab material on the detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* by real-time PCR. *Avian diseases*. 201;56 (2):310-314.
 11. Galluzzo P, Migliore S, Galuppo L, Condorelli L, Hussein HA, et al. First molecular survey to detect *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in poultry farms in a strategic production district of sicily (south-italy). *Animals*. 2022;12(8):962.
 12. Glew M, Browning GF, Markham PF, Walker ID. pMGA phenotypic variation in *Mycoplasma gallisepticum* occurs in vivo and is mediated by trinucleotide repeat length variation. *Infection and immunity*. 2000;68(10):6027-33.
 13. Gori A, Cerboneschi M, Tegli S. High-resolution melting analysis as a powerful tool to discriminate and genotype *Pseudomonas savastanoi* pathovars and strains. *PLoS One*. 2012;7(1):e30199.
 14. Hashemi S, Mahzounieh M, Sheikhi N, Ebrahimi A. Application of high-resolution melting-curve analysis on *pvpA* gene for detection and classification of *Mycoplasma gallisepticum* strains. *Microbial Pathogenesis*. 2018;124:365-71.
 15. Jafar N, Noomi B. Detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* by using of cultural and PCR technique. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*. 2019; 33(2): 469-473.
 16. Jiang H-X, Chen J-R, Yan H-L, Li X-N, Chen Z-L, et al. Molecular variability of DR-1 and DR-2 within the *pvpA* gene in *Mycoplasma*
 2. Athamna A, Rosengarten R, Levisohn S, Kahane I, Yogev D. Adherence of *Mycoplasma gallisepticum* involves variable surface membrane proteins. *Infection and immunity*. 1997;65(6):2468-71.
 3. Basit MSI, Mamun MA, Rahman MM, Noor M. Isolation and molecular detection of *Mycoplasma gallisepticum* in commercial layer chickens in Sylhet, Bangladesh. *World's Veterinary Journal*. 2021;11(4):614-20.
 4. Bester R, Jooste AE, Maree HJ, Burger JT. Real-time RT-PCR high-resolution melting curve analysis and multiplex RT-PCR to detect and differentiate grapevine leafroll-associated virus 3 variant groups I, II, III and VI. *Virology Journal*. 2012;9:1-12.
 5. Boguslavsky S, Menaker D, Lysnyansky I, Liu T, Levisohn S, et al. Molecular characterization of the *Mycoplasma gallisepticum* *pvpA* gene which encodes a putative variable cytoadhesin protein. *Infection and immunity*. 2000;68(7):3956-64.
 6. Chandhar P, Swamy M, Verma Y, Dubey A, Singh A. Prevalence and pathology of chronic respiratory disease in broilers. *Asian J Sci Technol*. 2018;9(10):8854-9.
 7. Ching G, Mahadevan J, Aini I, Sheikh O, Abdul R, et al. Prevalence of *Mycoplasma gallisepticum* in commercial chickens and free-flying birds. *J Agri Vet Sci*. 2016;9:89-95.
 8. Ehtisham-ul-Haque S, Kiran M, Waheed U, Younus M. Real-time loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene of. *Journal of Veterinary Research*. 2017;61(4):439-44.
 9. Fatideh FP, Esmaelizad M, Kargar M, Tebianian M, Kafilzadeh F. Designing of novel chimeric PvpA-pMGA protein of *Mycoplasma gallisepticum*, applicable for indirect ELISA. *Journal*



- Newcastle disease virus. Vaccimonitor. 2023;32.
25. Michiels T, Welby S, Vanrobaeys M, Quinet C, Rouffaer L, et al. Prevalence of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in commercial poultry, racing pigeons and wild birds in Belgium. *Avian Pathology*. 2016;45(2):244-52.
 26. Mudahi-Orenstein S, Levisohn S, Geary SJ, Yogev D. Cytadherence-deficient mutants of *Mycoplasma gallisepticum* generated by transposon mutagenesis. *Infection and immunity*. 2003;71(7):3812-20.
 27. Nascimento ER, Yamamoto R, Herrick KR, Tait RC. Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Diseases*. 1991;62-9.
 28. Papazisi L, Frasca Jr S, Gladd M, Liao X, Yogev D, et al. GapA and CrmA coexpression is essential for *Mycoplasma gallisepticum* cytheadherence and virulence. *Infection and immunity*. 2002; 70(12): 6839-6845.
 29. Papazisi L, Troy K, Gorton T, Liao X, Geary S. Analysis of cytheadherence-deficient, GapA-negative *Mycoplasma gallisepticum* strain R. *Infection and immunity*. 2000; 68(12): 6643-9.
 30. Reed GH, Kent JO, Wittwer CT. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. 2007.
 31. Sulyok KM, Kreizinger Z, Bekö K, Forró B, Marton S, et al. Development of molecular methods for rapid differentiation of *Mycoplasma gallisepticum* vaccine strains from field isolates. *Journal of clinical microbiology*. 2019; 57(6): 10.1128/jcm. 01084-18.
 32. Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial *gallisepticum* isolates. *Avian diseases*. 2009;53(1):124.۸-
 17. Kirkpatrick NC, Blacker HP, Woods WG, Gasser RB, Noormohammadi AH. A polymerase chain reaction-coupled high-resolution melting curve analytical approach for the monitoring of monospecificity of avian *Eimeria* species. *Avian Pathology*. 2009;38(1):13-9.
 18. Kleven S. *Mycoplasmas* in the etiology of multifactorial respiratory disease. *Poultry science*. 1998;77(8):1146-9.
 19. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*. 2018;35(6):1547.
 20. Levisohn S, Kleven S. Avian mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*). *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*. 2000; 19(2): 425-42.
 21. Levisohn S, Rosengarten R, Yogev D. In vivo variation of *Mycoplasma gallisepticum* antigen expression in experimentally infected chickens. *Veterinary Microbiology*. 1995;45(2-3): 219-31.
 22. Liu T, Garcia M, Levisohn S, Yogev D, Kleven S. Molecular variability of the adhesin-encoding gene *pvpA* among *Mycoplasma gallisepticum* strains and its application in diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001;39(5):1882-8.
 23. Mahmoud EN, Hamad MA, Khudhur ZN. Detection of *Mycoplasma gallisepticum* in broiler chickens by PCR. *Open Veterinary Journal*. 2022;12(3):329-34-34.
 24. Mahmoud H, Elsayed MF, Soliman RA, El Safty M, Zaghloul MA. Assessment of mycoplasma vaccine efficacy in reducing infection with



- sequencing. *Cogent Biology*. 2018;4(1):1456738.
35. Yogev D, Menaker D, Strutzberg K, Levisohn S, Kirchhoff H, et al. A surface epitope undergoing high-frequency phase variation is shared by *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma bovis*. *Infection and immunity*. 1994; 62(11): 4962-8.
- DNA in humans and chimpanzees. *Molecular biology and evolution*. 1993;10(3):512-26.
33. Whithear K. Control of avian mycoplasmoses by vaccination. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*. 1996;15(4):1527-53.
34. Yasmin F, Ideris A, Omar AR, Bejo MH, Islam R, et al. Molecular characterization of field strains of *Mycoplasma gallisepticum* in Malaysia through pMGA and pVPA genes



Detection of virulence factors of *Mycoplasma gallisepticum* (MG), isolated from broilers with chronic respiratory disease, using Real-time PCR High-Resolution Melting Curve technique

Arash Ramezanpour Shahi^{1*}; Abdolkarim Zamani Moghadam²;
Mohammadreza Mahzounieh³

1. DVSc Student, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.
2. Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.
3. Department of Pathobiology Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.

Summary

Received: 27 April 2024 Accepted: 20 June 2024

Mycoplasma gallisepticum (MG) is a bacterial pathogen that causes chronic respiratory disease (CRD) in poultry. CRD not only reduces productivity in poultry farms but also leads to significant economic losses in the poultry industry. Molecular methods have emerged as a reliable tool for the diagnosis of this bacterial infection. The aim of this study was to identify virulence factors of *Mycoplasma gallisepticum* isolated from chickens with respiratory diseases using Real-time PCR High-Resolution Melting curve (HRM) technique. In general, 50 broiler farms were included in this study. 20 samples were collected from each farm. DNA extraction was performed using CTB i-genomic DNA extraction kit. From 50 farms where samples were collected, four farms were identified as *Mycoplasma* positive using Real-time PCR method. The melting curve was performed with high-resolution real-time PCR and the obtained data were analyzed using the PCR max system. PCR results showed that *pvpA*, *crmA* and *gapA* genes were present in these samples, the results of phylogenetic tree drawing were compared with similar samples in previous studies. HRM analysis reveals molecular diversity between isolates. The results of this study showed that the use of HRM Real-time PCR is a reliable method to identify and investigate the presence of virulence factors related to the *Mycoplasma* pathogen.

Keywords: *Mycoplasma gallisepticum*, Chronic respiratory disease, Poultry, Virulence gene, HRM Real-time PCR

*Corresponding author: Ramezanpour.dvm@gmail.com

