جداسازی، ردیابی و تعیین هویت مولکولی در سطح گونه‌ی مایکوپلاسماها در کبوتران شمال شرق ایران

صفیه قهستانی*[1]، جمشید رزم‌یار[2]، غلامعلی کلیدری[3]، محمدرضا باسامی[2]

[1]دانشجوی سال ششم دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

[2]استادیار، [3]دانشیار گروه علوم درمانگاهی بهداشت و پیشگیری بیماریهای دامی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

(sa.ghahestani@gmail.com)

طیور غیر صنعتی (شامل: طیور زینتی، کبوتران و ....) اخیرا جایگاه ویژه‌ای را در جوامع رو به توسعه از جمله ایران از نظر اقتصادی، اشتغالزایی و سرگرمی و حتی به عنوان مدل آزمایشگاهی پیدا کرده‌اند. از این‌رو زمینه بررسی عوامل تاثیرگذار بر سلامت این پرندگان دارای اهمیت زیادی است. کبوتران از جمله پرندگان وحشی و اهلی شده‌ای هستند که از دیرباز توسط انسان شناخته و مورد استفاده در ارسال پیام و مسابقات قرار گرفته اند. امکان دسترسی این پرندگان به سالن‌های پرورش و انبارهای دان طیور صنعتی و انتقال بیماری‌ها به فارم‌های صنعتی طیور شناخت عوامل پاتوژن این دسته از پرندگان را واجد اهمیت می سازد.از تعداد 16 کبوترخانه ارجاعی با 870 کبوتر، بطور متوسط از 3 تا 5 کبوتر جهت نمونه برداری استفاده شد که نهایتا هر نمونه(تجمعی) مشخصه یک کبوترخانه در نظر گرفته شد، همچنین از لاشه‌های ارجاعی با علایم درمانگاهی تنفسی یا درگیری دستگاه تنفس فوقانی و کیسه های هوایی ارجاعی به کلینیک تخصصی طیور دانشکده دامپزشکی فردوسی مشهد، سواپ ازشکاف سقفی دهانی و سطح نایی و کیسه‌های هوایی بسته به مورد اخذ گردید. نمونه ها در دو تکرار به‌روش استاندارد سازمان بهداشت جهانی دام *OIE* در محیط مایع *PPLO Broth* کشت و موارد مثبت بروی محیط جامد *PPLO Agar* کشت مجدد داده شده (نمونه‌های منفی در اولین تلاش، مجددا در مخیط مایع پاساژ داده شدند.) و از کلنی‌های حاصله استخراج ژنوم به روش جوشاندن انجام گردید. با استفاده از *PCR* اختصاصی جنس با محصول 1013 جفت باز از ژن *16S rDNA* تعیین هویت در سطح جنس و سپس آنالیز سکانس محصولات واکنش با مقایسه سکانس های ثبت شده در بانک ژن سطح گونه انجام گرفت.از 5 کبوتر خانه از مجموع 16 کبوترخانه مایکوپلاسما جدا و نتیجه تعیین توالی نوکلئوتیدی و مقایسه سکانس‌های ثبت شده بانک ژن، مشابهت بالا با گونه‌های *Mycoplasma cloumborale* (در 4 مورد) و *Mycoplasma gallinaceum* (در یک مورد) بود .

کلمه های کلیدی: مایکوپلاسما، کبوتر، *PCR*

مقدمه:

به نظر می‌رسد مشکلات تنفسی در کبوتران بسیار معمول بوده و به دشواری قابل تشخیص، پیشگیری و درمان هستند.اگر چه صاحبان کبوتر در تشخیص بیماری‌هایی مانند "one eyed cold"، "سرماخوردگی"، "چشم درد"، " Big eye یا چشم بزرگ"، ""coryza، " و "دیفتری"، در کبوتران با سردرگمی قابل توجهی در مورد اتیولوژی شان روبرو می‌شوند اما به هر حال، این پرندگان می‌توانند با بیماری‌های مختلف با علائم تنفسی درگیر شوند که این برخی از آنها عبارتند از ornithosis (عفونت کلامیدیوفیلا پسیتاسی)، آبله کبوتر، عفونت اشریشیا کولی، آسپرژیلوزیس (آسپرژیلوس فومیگاتوس) و کمبود ویتامین A می‌باشند (1) همچنین هرپس ویروس کبوتر (PHV I) وسویه‌های لنتوژنیک ویروس بیماری نیوکاسل نیز می‌توانند علائم تنفسی ایجاد کنند، اما نقش مایکوپلاسماها در ایجاد سندروم‌های تنفسی کبوتر هنوز مورد بحث است. اگر چه mycoplasmosis به عنوان یک نماد بالینی توسط بسیاری از پرورش دهندگان کبوتر و برخی از دامپزشکان در نظر گرفته شده اما اساسا مستندات کمی برای این دیدگاه وجود دارد. تا کنون سه گونه مایکوپلاسما به نام‌های *Mycoplasma columborale* ، *Mycoplasma columbinum* و *Mycoplasma columbinasale* و *عفونت تجربی با Mycoplasma gallisepticum* . 2 گونه مایکوپلاسما با نام‌های *M. columbinum* و *M. columborale* در کبوتر شناخته شده تر می‌باشند .مایکوپلاسما کولومبینوم arginine-positive بوده و مایکوپلاسما کولومبوراله تخمیرکننده گلوکوز می‌باشد.این 2 گونه بر اساس شاخص‌های بیولوژیکی و سرولوژیک قابل تمایز می‌باشند. به عنوان مثال گونه‌های یاد شده از نای و حفره دهانی حلقی کبوتران بیمار و سالم جداسازی و گزارش شده است. با این حال در مطالعه‌ای دیگر *M. columborale* به عنوان عامل اصلی سندروم بیماری تنفسی در جوجه کبوترها عنوان شده است که نتایج مشابهی بر صحت این یافته در مطالعات دیگر دلالت دارد. به هر جهت برخی از گونه‌های مایکوپلاسماها به عنوان ارگانیسم‌هایی همزیست با بدن انسان و حیوان مطرح بوده که می‌توانند در شرایطی همچون ضعف سیستم ایمنی میزبان، آلودگی‌های میکس تنفسی و ... به عنوان یک ژاتوژن عمل کرده و سلامت رابه مخاطره می‌اندازد(4). *هدف از مطالعه حاضر، جداسازی و تعیین هویت مولکولی در سطح گونه مایکوپلاسماهای کبوتران در شمال شرق ایران با استفاده از ژن 16S rDNA و تعیین سکانس و ردیابی فیلوژنتیک جدایه‌ها برای اولین بار در ایران بود .*

مواد و روش کار:

نمونه برداری

از تعداد 16 کبوترخانه ارجاعی با 870 کبوتر، بطور متوسط از 3 تا 5 کبوتر جهت نمونه برداری استفاده و نهایتا هر نمونه تجمعی(pooled sample) مشخصه یک کبوترخانه در نظر گرفته شد که شامل نمونه‌های حاصل از لاشه‌های ارجاعی با علایم درمانگاهی تنفسی یا درگیری دستگاه تنفس فوقانی و کیسه‌های هوایی ارجاعی به کلینیک تخصصی طیور دانشکده دامپزشکی فردوسی مشهد بود و سواب ازشکاف سقفی دهانی و سطح نایی و کیسه‌های هوایی بسته به مورد اخذ (نمونه تجمعی) گردیده بود. در آزمایشگاه، به لوله حاوی سوآب‌های مربوط به هر گله 2 سی‌سی سرم فیزیولوژی استریل افزوده، بوسیله شیکر به-مدت 20 ثانیه همزده و با سرنگ استریل برداشت می‌گردید .

کشت باکتریایی

سپس مایع فوق الذکر با فیلتر 0/45 میکرون استریل داخل لوله حاوی 5 سی سی محیط مایع *pplo* دارای فاکتور *NAD* و *Cystein* بمیزان استاندارد ، تلقیح می‌شد. محیط های مایع در داخل انکوباتور 37 درجه سلسیوس بمدت 10-17 روز گرم خانه گذاری شده، در صورت تغییر رنگ یا کدورت درطی بیست و چهار ساعت اول، ناشی از آلودگی باکتریایی قلمداد شده و حذف می شد. در غیر اینصورت با مقایسه با نمونه‌های کنترل منفی در صورت تغییر رنگ به‌سمت زرد (ناشی از تغییر اسیدیته) جهت کشت در محیط جامد با سرنگ استریل از محیط کشت مایع تغییر رنگ داده 1 سی سی با استفاده از فیلتر استریل 0.45 میکرونی به محیط کشت جامد انتقال داده می‌شد و مجددا همزمان جهت پاساژ دوم به محیط مایع جدید منتقل می‌شد. پس از قرار دادن محیط‌های کشت جامد در انکوباتور 37 به مدت 7 تا 10 روز در صورت مشاهده پرگنه زیر لوپ یا میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی40 تصویر برداری ماکرو ومیکروسکوپی انجام گردید (شکل 1) .

استخراج DNA و PCR

برای استخراج DNA از پرگنه‌های سطح پلیت، کلنی باکتری را زیر میکروسکوپ مشخص و با آنس استریل آن را برداشته و در سرم فیزیولوژی حل گردید. استخراج به روش حرارتی Boiling Method انجام پذیرفت و PCR به منظور ردیابی DNA مایکوپلاسما به کمک پرایمرهای اختصاصی جنس (جدول 1) بر اساس ژن 16S rDNA انجام گردید(5).

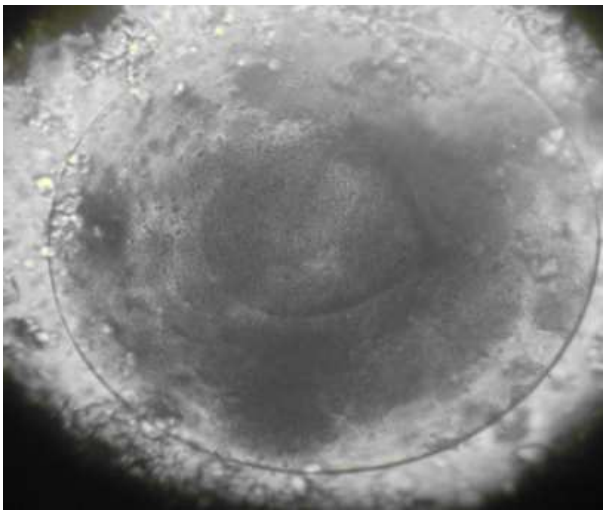
جدول1. سکانس پرایمرهای مورد استفاده جهت شناسایی جنس مایکوپلاسما

گونه مایکوپلاسما	سکانس پرایمر	منبع
GPF	5’-GCT-GGC-TGT-GTG-CCT-3’	(5)
MGSO	5’ -TGC-ACC-ATC-TGT-CAC-TCT-GTT-AAC-CTC-3’	

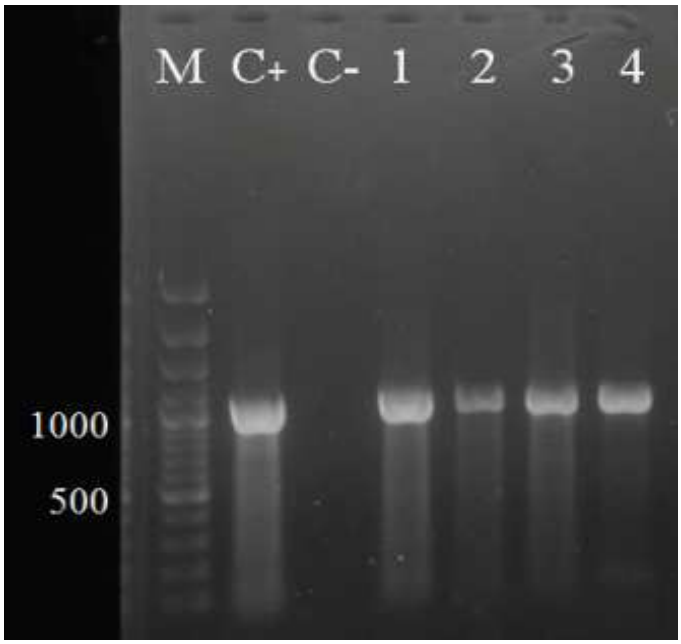
آزمایش PCR بوسیله دستگاه TC (England) 512 Temperature Cycling System انجام پذیرفت. مخلوط اصلی به منظور واکنش PCR حاوی 2 Mgcl2 mM، Tris-HCl pH 8.5، 0.2 Tween 20, (NH4)2S04 درصد، 0.4 mM DNA polymerase ,dNTPs Ampliqon Taq 0.2 units/µl و تثبیت کننده ((Ampliqon -Denmark، 2 میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها (10 (bioneer, South Korea)- (25،pmol/ µl ، نانوگرم از DNA الگو و آب دوبار تقطیر تا نهایتا حجم نهایی به 50 میکرولیتر برسد. تکثیر با استفاده از انکوباسیون اولیه به مدت 4 دقیقه در 94 ° C و 35 سیکل دناتوراسیون به مدت 30 ثانیه در 94 ° C، آنیلینگ به مدت 30 ثانیه در 56 ° C و سنتز به مدت 50 ثانیه در دمای 72 درجه سانتی گراد، و سپس گسترش نهایی به مدت 10 دقیقه در 72 درجه سانتی گراد انجام شد. محصول PCR با روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز 1.5٪ حاوی (0.5 µg/ml) اتیدیوم بروماید در ولتاژ 80 برای مدت 2 ساعت قرار داده شد(شکل 2) . محصولات واکنش جهت نعیین توالی با استفاده از پرایمرهای واکنش بصورت دو طرفه به شرکت bioneer کره جنوبی ارسال شد. نتایج سکانس نوکلئوتیدی با نرم‌افزار Choroma lite 2.31 تصحیح و با استفاده از برنامه Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) جهت تعیین میزان مشابهت با سایر سکانس‌های گزارش شده به بانک ژن National Center for Biotechnology Information مورد بررسی قرار گرفت. همچنین برازش نوکلئوتیدی alignment و رسم درخت فیلوژنی با استفاده از نرم‌افزار CLC Workbench ver. 5.5 انجام پذیرفت(شکل 3).

نتایج:

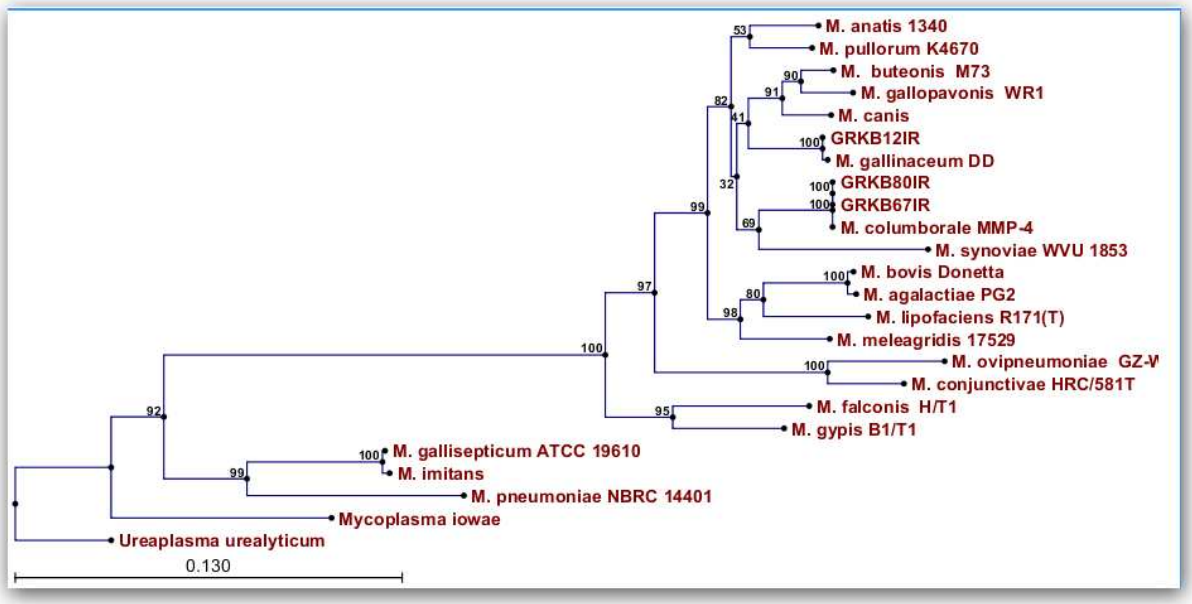
مجموعا از 5 کبوتر خانه از 16 کبوترخانه مورد مطالعه، مایکوپلاسما جداسازی گردید که نتایج کشت و PCR مستقیم نیز همخوانی داشت و تعیین توالی نوکلئوتیدی و مقایسه سکانس‌های ثبت شده در بانک ژن، مشابهت بالا با گونه‌های *Mycoplasma cloumborale* (در 4 مورد) و *Mycoplasma gallinaceum* (در یک مورد) را نشان داد (شکل 3) .



تصویر 1: پرگنه مایکوپلاسمای جداشده از کبوتر جدایه GHRKB12IR با بزرگ نمایی x400



تصویر2: الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره ای با استفاده از پرایمر های اختصاصی جنس برای ژن 16S rDNA : M:ladder 100 bp plus ,C+: Control +,C-: Control – , lane 1-4 GHRKB12IR, GHRKB66IR, GHRKB67R, GHRKB80IR



تصویر 3: درخت فیلوژنی یا تکاملی حاصل از آنالیز فیلوژنی ژن(اعداد بالای شاخه ها درصد اطمینان با آنالیز 1000 بار تکرار) حداکثر 100 درخت در هر تکرار می باشد،Neighbour joining method

بحث و نتیجه گیری:

در بین عوامل پاتوژن، مایکوپلاسماها به علت اینکه معمولا روند بیماری را تشدید کرده و یا آغازگر یک عفونت هستند، از اهمیت ویژه‌ای برخورداراند. در مطالعه‌ای که توسط Keymer و همکاران در سال 1984 انجام شده است M. *columbinum* و *M. columborale* به همراه *M. columbinasale* از سینوس و ناحیه حلق کبوترها جداشده است که برخی از این نمونه‌ها از کبوتران دارای علایم جدی تنفسی بوده‌اند. مشخص شده است که این گونه‌ها می‌تواند به عنوان عامل عفونت طبیعی تنفسی در کبوترها مطرح باشند(1). در نیجریه نیز Molokuwu و همکاران در سال1998، 2 گونه‌ی *M. columbinum* و *M. columborale* را در کبوتر با استفاده از تست‌های سرولوژی و بیوشیمیایی شناسایی و گزارش نمودند.(2) در مطالعه حاضر، 2 گونه مایکوپلاسما جدا و نتیجه تعیین توالی نوکلئوتیدی و مقایسه سکانس‌های ثبت شده بانک ژن، مشابهت بالا با گونه‌های *M cloumborale* (در 4 مورد) و *M. gallinaceum* (در یک مورد) را نشان داد (شکل 3). در طی مطالعه که به منظور شناسایی مایکوپلاسماهای پرندگان وحشی انجام شده است، بیش از 50 جدایه مایکوپلاسما از نای و حفره دهانی حلقی کبوتران جداسازی شده که همه آنهااز لحاظ خصوصیات سرولوژیک و بیوشیمیایی با مایکوپلاسماهای شناخته شده ماکیان از جمله *M.*

gallisepticum , M. iowa , M synoviae , M. melagridis متفاوت بوده اند. در بین گونه‌های جدا شده از کبوتران براساس شواهد و *M. columborale* *بعنوان* پاتوژن اولیه بوده و برخی دیگر تنها به عنوان فلور طبیعی در بدن این پرندگان وجود دارند(3) اگرچه که مایکوپلاسماها به عنوان پاتوژن‌هایی خطرناک در نظر نگه دارندگان این پرندگان و دامپزشکان به حساب می آیند ولی تا به امروز شواهد زیادی از قابلیت 100٪ این ارگانیسم‌ها در به خطر انداختن جان کبوترها وجود ندارد. از طرفی کبوترها ، به فارم‌های طیور صنعتی دسترسی داشته و نقش مهمی در انتقال سایر بیماری‌ها و احیانا در گیری مایکوپلاسمایی می‌توانند داشته باشند. جداسازی مایکوپلاسما گالیسینائوم که یک مایکوپلاسمای غیر بیماریزا در ماکیان می‌باشد می‌تواند قابلیت آلودگی فعال و یا انتقال دهندگی غیر فعال کبوتران را در انتقال مایکوپلاسماهای بیماریزا و غیر بیماریزا را نشان دهد. همچنین Molokwu و همکاران گزارش نموده اند که *M. columborale* را از ماکیان نیز جدا نموده‌اند(2) که نشان از اهمیت شناسایی مایکوپلاسماهای کبوتران و برنامه ریزی در جهت کنترل رفت و آمد آنها به فارم‌های صنعتی دارد. همچنین مطالعات نشان داده است که کبوتران می‌توانند بدون بروز علائم به *M. gallisepticum* آلوده شوند. به نظر می رسد مطالعه وسیعتری با همکاری مراکز تحقیقاتی سراسر کشور روی مایکوپلاسماهای کبوتران جهت برنامه ریزی از کاهش نقش آنها در خسارات احتمالی به صنعت طیور و ارزیابی میزان این خسارات احتمالی نیاز باشد.

References:

1. Keymer I.F, Leach R.H, Clarke R.A, Bardsley M.E, McIntyre R.R Isolation of mycoplasma spp. from racing pigeons (Columba livia).Avian Pathol. 1984 Jan;13(1):65-74.
2. MOLOKWU J.U., ADEGBOYE D.S. (1988). *Mycoplasma columborale* and *Mycoplasma columbinum*from pigeons: a first report of their isolation in Nigeria., 7 (3), 635-638
3. TAKAMASA SHIMIZU,' HENNING ERN0; AND HIROSHI NAGATOMO وIsolation and Characterization of Mycoplasma columbinum and Mycoplasma columborale, Two New Species from Pigeons و INTERNATIONAL JOURNAOLF SYSTEMATIC BACTERIOLOOGCtY.28,538-546
4. Withera K J. Avain mycoplasmosis(bacteriology).scool of veterinary science,the university of melborne,prince high way,wreire,3030,australia.
5. Lierz M. , Hagen N. ,. Harcourt-Brown N, Hernandez-Divers S. J. , Lüschow D. Hafez H. M. (2007). Prevalence of mycoplasmas in eggs from birds of prey using culture and a genus-specific mycoplasma polymerase chain reaction, Avian Pathology 36: 145_150