نشریه دامپزشکی
(پژوهش و سازندگی)
شماره ۸۸، پاییز ۱۳۸۹

تشخیص سرولوژیکی و میکروبیولوژیکی مایکوپلاسماها از ماکیان صنعتی در کشتارگاه‌های طیور استان تهران

• **مجید ولدان**
عضو هیأت علمی سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (نویسنده مسئول)
• **سیدعلی پوربخش**
عضو هیأت علمی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی
• **محمدرضا قلعه نوئی، • غلامرضا شکری • احمدرضا احمدی و • محمد قدیری ابیانه**
اعضای هیأت علمی سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
• **فرهاد خامنه**
کارشناس شبکه دامپزشکی استان تهران
تاریخ دریافت: تیر ماه ۱۳۸۸ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۸۹
تلفن تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۲۳۱۰۸۵۵۴
Email: valadan@yahoo.com

چکیده

مایکوپلاسموز یک بیماری عفونی با گستره وسیع می‌باشد، که صنعت طیور را در سطح جهان تحت تاثیر قرار داده است. در زمینه تشخیص بیماری؛ علیرغم اینکه ارزیابی‌های سرمی تحت تاثیر عوامل مختلفی چون مصرف آنتی‌بیوتیک‌های مختلف و برنامه واکسیناسیون قرار می‌گیرند؛ انجام آزمایشات سرولوژیک اساس برنامه‌های کنترلی را تشکیل می‌دهند.در این تحقیق پس از نمونه‌برداری از طیور کشتار شده در کشتارگاه‌های استان تهران، با استفاده از آزمایشات سرولوژیک آگلوتیناسیون سریع سرم[1] و الایزا[2] و کشت در محیط‌های آب‌گوشت و آگار اختصاصی مایکوپلاسما، نسبت به جداسازی و شناسایی مایکوپلاسماهای بیماری‌زا اقدام گردید. از مجموع ۴۵۳۰ نمونه سوآب حلقی و خون اخذ شده از طیور مربوط به ۲۲۶ سالن؛ در آزمایش RSA با آنتی‌ژن (MG) *Mycoplasma gallisepticum*؛ ۱۱/۲۷ درصد نمونه‌ها مثبت بودند. این میزان در مورد *M.synoviae* ۴ (Ms)؛ ۳۸/۱۹ درصد بود. در آزمایش ELISA که بر روی نمونه‌های مثبت RSA انجام شد؛ به ترتیب ۶۶/۸۶ درصد و ۷۰/۸۳ درصد نمونه‌ها MG و MS مثبت بودند. نتایج حاصله نشان دهنده بالا بودن تعداد موارد مثبت کاذب در آزمایش RSA یا پایین بودن ویژگی آن است. در مقایسه شیوع MG و MS در فصول مختلف؛ بیشترین شیوع با اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۰۱) با سایر فصول؛ مربوط به فصل زمستان بود.از کشت نمونه‌های دریافتی از ۲۲۶ سالن تحت آزمایش؛ در ۸۲ مورد مایکوپلاسما جدا گردید؛ که از این تعداد ۳۶ مورد مایکوپلاسماهای غیر از MG و MS ، ۱۲ مورد Mg، ۲۹ مورد Ms و ۵ مورد همزمان MG و MS جداسازی شد.

کلمات کلیدی : *Mycoplasam synoviae* ، *Mycoplasma gallisepticum* ، کشتارگاه، جداسازی، طیور

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 88 pp: 19-26

Serolagic and microbiologic identification of avian mycoplasmas from slaughtered poultry in Tehran.

By: Valadan M. Members of Scientific Board of Agricultural Research, Education and Extention Organization (Corresponding Author; Tel: +989123108554), Pourbakhsh S.A. Members of Scientific Board of Razi Research Institute, Ghalehnoie M.R. Shokri Gh. Ahmadi A.R. and Ghadiri Abianeh M. Member of Scientific Board of Agricultural Research Education and Extention Organization, Khameneh F. Expert of Veterinary Organization, Tehran Branch.

In this research sampling of poultry slaughterhouses in Tehran province was done. The samples were investigated by serological tests : Rapid Serum Agglutination (RSA) , ELISA and Broth & agar specific culture of Mycoplasma. The main test for isolation and determination in this survey was RSA. In this investigation 4530 pharyngeal swab and blood sample from 226 poultryhouse were taken, in RSA method with MG antigen 11.27% were positive and false positive. This evaluation for MS was 38.19%. After this step the ELISA test was done on the positive and false positive RSA results, and 66.86% of Mg and 70.13% of Ms were positive. The results indicated that in RSA method, false positive was high and specificity was low. Comparison between prevalence of MG and MS in different seasons revealed in winter there are the most prevalence (P<0.001). Out of 226 poultry house covered in the study, in 82 cases, Mycoplasma was isolated from, which 36 cases was non MG and MS Mycoplasma, 12 cases was MG, 29 cases was MS, and 5 cases was simultaneously MG and MS.

Key words: *Mycoplasma gallisepticum; Mycoplasma synovie*; Avian, Slaughterhouse; Isolation; Identification, Serologic.

مقدمه

مایکوپلاسموز یک بیماری عفونی با گستره وسیع می‌باشد که صنعت طیور را در سطح جهان تحت تاثیر قرار داده است. این بیماری عامل مهم خسارت اقتصادی وسیع به واسطه ایجاد بیماری‌های دستگاه تنفس؛ ناهنجاری‌های حرکتی؛ کاهش در رشد و تولید تخم‌مرغ و نیز تنزل راندمان در هچ می‌باشد؛ که توسط گونه‌های متعدد پاتوژن ایجاد می‌شود. عفونت مزمن دستگاه تنفس[۳]؛ بارزترین عارضه ناشی از *M.gallisepticum* می‌باشد؛ که با نام‌های مترادفAir Sac Disease (بیماری کیسه‌های هوائی) و Air Sacculitis (التهاب کیسه‌های هوائی) نیز شناخته می‌شود. عفونت ناشی از *M.synoviae* با اسامی مترادف همچون Infectious synovitis (التهاب عفونی سینوس‌ها)، Synovitis(التهاب عفونی سینوس‌ها)، Silent air sac (کیسه هوائی خاموش) هم شناخته می‌شود. در حالت عادی مایکوپلاسموز با توان واگیری بالا و میزان مرگ و میر پایین نمود پیدا می‌کند؛ اما در مواقعی که گله با سایر عوامل باکتریائی یا ویروسی مواجه شود؛ شدت و حدت بیماری و میزان تلفات آن افزایش می‌یابد(۱۳).

در زمینه تشخیص بیماری؛ علیرغم اینکه ارزیابی‌های سرمی تحت تاثیر عوامل مختلفی چون مصرف آنتی‌بیوتیک‌های مختلف و برنامه واکسیناسیون قرار می‌گیرند؛ انجام آزمایشات سرولوژیک اساس برنامه‌های کنترلی را تشکیل می‌دهند (۲۱). جهت غربال‌گری[۴] گله های طیور، اغلب از آزمایش RSA و یا آگلوتیناسیون سرم روی پلیت[۵] استفاده می‌شود. آزمایش‌های مزبور سریع، کم هزینه و بسیار حساس هستند؛ ولی بزرگترین ایراد آنها ویژگی پایین (واکنش های مثبت کاذب) می‌باشد. لذا برای تایید نمونه‌های مثبت، انجام آزمایش ELISA، ممانعت از هماگلوتیناسیون[۶] یا سایر آزمایشات سرولوژیک قابل قبول؛ یا کشت عامل بیماری ضروری است (۴، ۲۱).

تحقیقات انجام شده درخصوص تعیین حساسیت Mg وMs به آنتی بیوتیک‌های مختلف نظیر تتراسایکلین‌ها و تیامولین (۲۷)، تایلوزین (۱۷)، انروفلوکساسین (۱۱، ۲۶)، دیفلوکساسین (۳۰) و نیز اسپیرومایسین، اسپکتینومایسین، لینکومایسین و جنتامایسین (۲) نشان دهنده حساسیت این عوامل بیماری‌زا نسبت به اغلب آنتی‌بیوتیک‌ها است؛ ولی اختلافات فاحش در خصوصیات بیماری‌زایی[۷]، عفونت‌زایی[۸] و نوع آنتی‌ژن‌های سطحی این عوامل، بخصوص در MG ، "جداسازی و شناسایی عامل" و تعیین حساسیت آن نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج در ایران را اجتناب‌ناپذیر می‌سازد (۲۱).

این تحقیق با هدف شناسایی عوامل مایکوپلاسموز در جوجه‌های گوشتی که جهت کشتار به کشتارگاه‌های صنعتی استان تهران حمل می‌شدند؛ انجام شد.

مایکوپلاسموز در طیور برای نخستین بار در ایران در سال ۱۹۵۵ توسط سهراب و بهارصفت شناسایی شد (۲۵). وجود بیماری در نژادهای خارجی نیز در سال ۱۹۵۷ توسط ایشان گزارش شد (۲). در سال ۱۹۵۹ Junghe و سهراب در گله‌های طیور اطراف تهران و شمال و جنوب کشور، آلودگی وسیع مایکوپلاسمایی را با استفاده از آزمایش‌های سرولوژیک تائید نمودند (۱۸).

Sikder در سال ۲۰۰۵ (۲۴)؛ Sarkar در سال ۲۰۰۵ (۲۳) و Hossain در سال۲۰۰۷ (۱۶)؛ از RSA یا SPA در بررسی سرواپیدمیولوژیک مایکوپلاسموز استفاده نمودند. Hanif در سال۲۰۰۷ (۱۵)؛ Turkyilmaz در سال ۲۰۰۷ (۲۹) و Ahmad در سال۲۰۰۸ (۱۰) کارایی این روش را با برخی روش‌های سرولوژیک دیگر؛ کشت و

روش‌های ملکولی مقایسه نمودند. بررسی‌های مختلف نشان می‌دهد که RSA آزمایشی سریع، کم هزینه و حساس است؛ ولی بزرگترین اشکال آن ویژگی پایین می‌باشد. لذا برای تایید نمونه‌های مثبت، انجام آزمایش HI، ELISA یا سایر آزمایشات سرولوژیک قابل قبول؛ یا کشت عامل بیماری ضروری است.

دبیری در سال ۱۳۶۶ از ۹ نمونه از مجموع ۳۰۰ نمونه نای طیور مشکوک به عفونت مایکوپلاسمایی در اطراف شیراز، *M.gallisepticum* جدا نمود. تایید تشخیص باکتری با کمک آزمایش‌های بیوشیمیایی و سرولوژیک صورت گرفت (۶). عابدیان جلودار در سال ۱۳۷۱ موفق به جداسازی مایکوپلاسما از ۱۶۳ نمونه نای از مجموع ۴۶۶ نمونه مثبت از نظر سرولوژیک شد (۸). صادقی در سال ۱۳۷۵ در بررسی ۲۰۰ نمونه دستگاه تنفس طیور اطراف اهواز؛ ۷ نمونه مایکوپلاسما جدا کرد؛ که یک نمونه با استفاده از آزمایش‌های بیوشیمیایی و سرولوژیکی MG تشخیص داده شد؛ ولی سروتیپ ۶ نمونه دیگر به دلیل عدم دسترسی به آنتی‌سرم‌های لازم مشخص نشد (۷). بابایی آلوکنده در سال ۱۳۷۶ از ۴۲۵ نمونه طیور مشکوک به عفونت های مایکوپلاسمایی، ۱۰۰ نمونه مایکوپلاسما جداسازی کرد. پس از تهیه آنتی سرم MG در جوجه های ۴ روزه، ۵۶ مورد از مایکوپلاسماهای جدا شده با آن واکنش نشان دادند (۱). قلعه گلاب بهبهان در سال ۱۳۸۵ با دریافت ۱۱۵ نمونه سوآب نای و کیسه‌های هوایی از گله‌های دارای علائم مایکوپلاسموز در استان فارس؛ ۱۰۰ نمونه از آنها را کشت و سپس تحت آزمایشات PCR و RFLP ؛ و ۱۵ نمونه دیگر را مستقیماً تحت آزمایشات PCR و RFLP قرار داد. از ۱۰۰ نمونه گروه اول؛ در PCR ؛ ۴۷ نمونه مایکوپلاسما تشخیص داده شد که از این میزان؛ ۴۶ نمونه MG و ۱ نمونه MS تشخیص داده شد. از ۱۵ نمونه دوم نیز در PCR ؛ ۱۲ نمونه مایکوپلاسما تشخیص داده شد که از این میزان؛ ۹ نمونه MG و ۳ نمونه MS تشخیص داده شد (۹). Tiong در سال ۱۹۷۹ با هدف جداسازی و شناسایی مایکوپلاسما؛ اقدام به نمونه‌گیری از ۲۴۰ گله دارای علائم CRD نمود. وی توانست از ۱۰۵ گله از گله‌های مذکور؛ مایکوپلاسما (۱۱۰ جدایه) جدا نماید. از این تعداد جدایه؛ ۹ جدایه Mg ؛ ۴۸ جدایه *M.avian* serogroup D ؛ ۴۵ جدایه *M.gallinarum* ؛ ۱ جدایه *M.iners* و ۷ جدایه Unclassified تشخیص داده شد. جداسازی و شناسایی از طریق کشت؛ آزمایشات بیوشیمیایی و سرولوژیک (disc growth inhibition and agar gel diffusion tests) انجام شد (۲۸). Gharaibeh در سال ۲۰۰۸؛ ۷۶ گله از انواع مختلف گوشتی؛ تخمگذار و مادر که دارای علائم تنفسی بودند را تحت بررسی قرار داد. وی آلودگی به *M.gallisepticum* در گله‌های تحت بررسی را با استفاده از ELISA و جداسازی از طریق کشت؛ به ترتیب ۷۳/۵ درصد و ۳۱/۶ درصد گزارش نمود. جدایه‌های ناشی از کشت؛ متعاقباً تحت آزمون PCR قرار گرفته و در اثر این اقدام پنج الگوی ژنی متفاوت با سویه واکسینال مورد استفاده در واکسن *M.gallisepticum* مورد استفاده در اردن پیدا شد (۱۴).

تعیین حساسیت عوامل شناسایی شده ناشی از این تحقیق نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج در ایران و تجمیع نتایج به دست آمده با ماحصل تحقیقات مشابه و سپس کاربرد نتایج حاصله در مرغداری‌ها (بالاخص گله‌های مرغ اجداد و مادر، با توجه به انتقال عمودی عفونت از مادر به نتاج) در کنار سایر اقدامات کنترلی می‌تواند موجب ایجاد زنجیره تولید عاری از مایکوپلاسما شده و از زیان‌های اقتصادی بسیار جلوگیری نماید.

مواد و روش کار

طی هماهنگی به عمل آمده با اداره کل دامپزشکی استان تهران؛ با توجه به اینکه قسمت اعظم طیور کشتار شده در هفده کشتارگاه صنعتی استان تهران، از استان‌های همجوار (قزوین؛ سمنان؛ قم؛ مرکزی؛ مازندران؛ گلستان؛ اصفهان و همدان) حمل می‌شدند، لذا با در نظر گرفتن موقعیت جغرافیایی شهرستان‌های استان تهران؛ فعالیت؛ ظرفیت و فاصله کشتارگاه‌های در حال فعالیت، هشت کشتارگاه به شرح جدول یک برای نمونه‌گیری انتخاب شدند :

جدول ۱- کشتارگاه‌های طیور مورد مراجعه برای نمونه‌گیری

ردیف	نام کشتارگاه	با اطلاع	ظرفیت (قطعه در ساعت)
۱	ایران تیهو	جاده ورامین ، فیروزآباد ، بعد ازپادگان توحید جنب خط لوله گاز	۳۰۰۰
۲	زیتون کار	جاده مردآباد کرج ، پشت بیمارستان شریعتی	۲۰۰۰
۳	ایران بورچین	کیلومتر دو جاده ساوه ، جاده واوان ، روبروی مافین آباد	۲۰۰۰
۴	سپید پر	ساوجبلاغ ، روستای قلعه چندار	۳۰۰۰
۵	رضا کوشانفر	شهرک قدس ، بعد از قبرستان	۲۰۰۰
۶	پرناز طیور	جاده ورامین ، باقرآباد ، روستای صالح آباد	۲۰۰۰
۷	پرنده پرواز	کمربندی شهریار ؛ ده بهاء	۴۰۰۰
۸	وران رودهن	رودهن ؛ قریه گل آهک	۲۰۰۰

اخذ نمونه از کشتارگاه‌ها، پس از تهیه مواد و وسایل لازم، عملاً از ابتدای مهرماه سال ۱۳۸۲ آغاز و تا پایان آذرماه سال ۱۳۸۳ به طول انجامید و هر هفته به یک کشتارگاه مراجعه شد. در هر بار مراجعه، به ازای هر سالن هر مرغداری که طیور از آن به کشتارگاه حمل شده بودند، در صورتی که ظرفیت سالن ۱۰۰۰۰ قطعه یا کمتر بود، ۲۰ قطعه و در صورتی که ظرفیت سالن بیش از ۱۰۰۰۰ قطعه بود، به ازای هر ۵۰۰ قطعه، یک قطعه طیور بیشتر؛ به طور کاملاً تصادفی انتخاب و از هر یک، نمونه خون جهت انجام آزمایشات سرولوژیک و نمونه سوآب از مخاطات نای و شکاف کامی جهت کشت میکروبی اخذ شد. نمونه‌های خون و سوآب در لوله‌های دربسته به آزمایشگاه منتقل شدند.

آزمایش‌های سرولوژی

نمونه‌های خون پس از انتقال به آزمایشگاه، دکوله شده و برای مدت یک ساعت در گرم‌خانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا سرم آنها جدا شود. سپس بلافاصله با مخلوط نمودن ۲۰ ماکرولیتر از هر یک از سرم‌های جدا شده با نسبت مساوی با آنتی‌ژن لاتکس MGو MS ؛ آزمایش RSA روی لام انجام شد. جهت تایید پاسخ‌های مثبت آزمایش مجدد با رقت‌های ۱/۴ و ۱/۸ سرم نیز انجام شد. با توجه به اینکه بزرگترین ایراد آزمایش RSA ، ویژگی پایین آن یعنی وجود پاسخ‌های مثبت کاذب است، برای تایید نمونه‌های مثبت، آزمایش ELISA انجام شد. کیت مورد استفاده برای ELISA کیت شرکت KPL آمریکا بود. برای انجام این آزمون در مرحله نخست از سرم‌های تحت آزمایش و نیز سرم کنترل رقت ۱/۵۰ تهیه و سپس ۵۰ میکرولیتر از هر یک از سرم‌های رقیق شده با ۵۰ میکرولیتر بافر رقیق‌کننده در پلیت اصلی مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه آنکوبه گردید. در مرحله دوم؛ سه بار شستشو با محلول شستشو x۲۰؛ هر بار به مدت ۳ دقیقه انجام و سپس پلیت خشک گردید. در مرحله سوم رقت ۱/۱۰۰ ترکیب "Anti IgG + پراکسیداز" به تمام گودهها اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه آنکوبه گردید. در مرحله چهارم؛ سه بار شستشو با محلول شستشو x ۲۰؛ هر بار به مدت ۳ دقیقه انجام و سپس پلیت خشک گردید. در مرحله پنجم سوبسترا ABTS بدون آنکه رقیق شود به تمام گودهها اضافه و پلیت برای مدت ۱۵ دقیقه در جای تاریک قرار گرفت. در مرحله بعد ۱۰۰ میکرولیتر از متوقف کننده x ۵ رقیق شده به تمام گودهها اضافه شد تا واکنش قطع شود. در نهایت نتایج با دستگاه Eliza reader مارک Awernes آمریکا مدل stat fax (در طول موج ۴۰۵ میکرولیتر) قرائت شد. سرم‌های موجود سپس در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. کلاً طی ۴۲ بار مراجعه به کشتارگاه‌ها، تعداد ۴۵۳۰ نمونه خون و به همان میزان نمونه سوآب اخذ شد.

کشت میکروبی

برای انتقال سوآب‌ها؛ از محیط آبگوشت PPLO (با ترکیب ۲۲/۵گرم PPLO broth، ۱۰ گرم عصاره مخمر، ۳ میلی لیتر استات تالیوم ده درصد، ۰/۱ گرم NAD دو درصد، ۲/۵ میلی لیتر فنل رد یک درصد، ۱/۲ میلی لیتر پنی سیلین G، ۳ گرم گلوکز؛ ۰/۱ گرم هیدروکلراید سیستئین و سرم اسب یا خوک که مطابق با روش استاندارد (۱۹) تهیه شده و pH آن در ۷/۸ تنظیم شده بود) استفاده شد. محیط آبگوشت PPLO پس از ساخت، در طول نمونه‌گیری تا زمان انتقال به آزمایشگاه میکروب‌شناسی بخش تحقیق و تشخیص بیماری‌های طیور موسسه؛ در شیشه‌های دربسته و در دمای یخچال نگهداری شد. هر شیشه حاوی آبگوشت PPLO برای انتقال ۱۰ عدد سوآب استفاده شد.

محتویات شیشه‌های آبگوشت PPLO حاوی سوآب، پس از انتقال به آزمایشگاه مخلوط شده و سپس در شرایط استریل ۲ میلی‌لیتر آن از فیلتر ۰/۴۵ میکرون عبور داده شد و یک میلی‌لیتر آن به محیط تازه آبگوشت مایکوپلاسما که مطابق با استاندارد مذکور ساخته شد(۱۹) اضافه گردید و برای مدت ۴۸ ساعت در گرم‌خانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. تغییر رنگ محلول از قرمز به زرد (به دلیل اسیدی شدن ناشی از رشد مایکوپلاسما و تخمیر گلوکز)، نشان دهنده رشد میکروب بود. به دلیل حساسیت مایکوپلاسما در محیط اسیدی ناشی از رشد لگاریتمی؛ بلافاصله با شروع تغییر رنگ؛ نسبت به پاساژ دوم اقدام شد و در صورت عدم تغییر رنگ؛ پس از ۵ روز، نسبت به پاساژ دوم و نگهداری هر دو پاساژ در گرم‌خانه اقدام گردید. محلول‌های تغییر رنگ یافته از فیلتر ۴۵ درصد میکرون عبور داده شدند و در محلول براث و نیز آگار PPLO کشت مجدد شده و برای مدت پنج تا ده روز در آنکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در طول مدت مذکور کلنی‌های رشد یافته بازبینی شده و محیط‌های واجد کلنی‌های مایکوپلاسما در یخچال نگهداری و جهت تایید نهایی، آزمایش آگلوتیناسیون سریع سرم با استفاده از سرم استاندارد شرکت SPAFAS آمریکا روی آنها انجام شد.

نتایج

نتایج حاصل از آزمایش‌های سرولوژی

نتایج حاصل از انجام آزمایشات سرولوژیک بر روی نمونه‌های سرم در جدول ۲ و مقایسه نتایج حاصل از دو آزمایش RSA و ELISA در فصول مختلف در جدول ۳ درج شده است:

از مجموع ۲۲۶ سالن تحت آزمایش؛ به ترتیب ۴۲ (۱۸/۵۸ درصد) و ۹۸ (۴۳/۳۶ درصد) سالن دارای حداقل یک سرم مثبت قطعی MG و MS بوده‌اند.

نتایج حاصل از کشت میکروبی

از کشت نمونه‌های دریافتی از ۲۲۶ سالن تحت آزمایش؛ در ۸۲ مورد مایکوپلاسما جدا گردید که از این تعداد، ۳۶ مورد مایکوپلاسماهای غیر از MG و MS ، ۱۲ مورد MG، ۲۹ مورد MS و ۵ مورد همزمان MG و MS جدا سازی و شناسایی شد. نتایج حاصل از کشت نمونه‌های دریافتی به تفکیک فصل؛ در جدول چهار درج شده است:

در جدول پنج نتایج حاصل از آزمایش‌های سرولوژیک با نتایج حاصل از کشت مقایسه شده‌اند:

بحث

در تحقیق حاضر از مجموع ۴۴۹۷ نمونه سرم (نمونه‌های دارای حداقل سرم مورد نیاز از مجموع ۴۵۳۰ نمونه خون) که تحت آزمایش RSA با

جدول ۲- نتایج حاصل از انجام آزمایشات سرولوژیک RSA و ELISA بر روی نمونه‌های سرم

ردیف	نام کشتارگاه	MG	MS
تعداد کل نمونه		۴۵۳۰	۳۴۸۰*
تعداد نمونه‌های فاقد حداقل سرم مورد نیاز		۳۳	۶
تعداد نمونه‌های تحت آزمایش		۴۴۹۷	۳۴۷۴
RSA	مثبت (تعداد)	۵۰۷	۱۳۲۷
	مثبت (درصد)	۱۱/۲۷ درصد	۳۸/۱۹ درصد
	منفی (تعداد)	۳۹۹۰	۲۱۴۷
	منفی (درصد)	۸۸/۷۳ درصد	۶۱/۸۱ درصد
ELISA	مثبت (تعداد)	۳۳۹	۹۴۰
	مثبت (درصد)	۶۶/۸۶	۷۰/۸۳
	منفی (تعداد)	۹۹	۲۴۶
	منفی (درصد)	۱۹/۵۲	۱۸/۵۳
	مشکوک(تعداد)	۶۹	۱۴۱
	مشکوک(درصد)	۱۳/۶۲	۱۰/۶۴

*** با توجه به در دسترس نبودن پادگن لاتکس MS در شروع مراحل اجرایی تحقیق؛ صرفاً ۳۴۸۰ نمونه تحت آزمایش RSA با پادگن لاتکسMS قرار گرفتند.**

جدول ۳- مقایسه نتایج حاصل از دو آزمایش سرولوژیک RSA و ELISA بر روی نمونه‌های سرم در فصول مختلف

	بهار		تابستان		پاییز		زمستان		کل	
	MG	MS	MG	MS	MG	MS	MG	MS	MG	MS
تعداد نمونه‌های مثبت در آزمایش RSA	۵۵	۱۷۷	۱۲۱	۵۵	۲۸۳	۱۷۷	۷۴۶	۲۲۰	۱۳۲۷	۵۰۷
تعداد نمونه‌های مثبت تایید شده در آزمایش ELISA	۴۱	۱۲۵	۹۹	۴۱	۱۹۹	۹۷	۵۱۷	۱۶۰	۹۴۰	۳۳۹
درصد نمونه‌های مثبت تایید شده در آزمایش ELISA	٪۷۴/۵	٪۷۰/۶	٪۸۱/۸	٪۷۴/۵	٪۷۰/۳	٪۵۴/۸	٪۶۹/۳	٪۷۲/۷	٪۷۰/۸	٪۶۶/۸
درصد از کل موارد مثبت تایید شده	٪۱۲/۱	٪۱۳/۳	٪۱۰/۵	٪۱۲/۱	٪۲۱/۲	٪۲۸/۶	٪۵۵	٪۴۷/۲	٪۱۰۰	٪۱۰۰

جدول ۴- نتایج حاصل از کشت نمونه‌های دریافتی به تفکیک چهار فصل سال

فصل	غیر از MG و MS	MG	MS	MG و MS	جمع کل
بهار	۲	۰	۱۱	۰	۱۳
تابستان	۰	۰	۸	۳	۱۱
پاییز	۲۵	۹	۹	۱	۴۴
زمستان	۹	۳	۱	۱	۱۴
جمع کل	۳۶	۱۲	۲۹	۵	۸۲
درصد	۴۳/۹۰	۱۴/۶۳	۳۵/۳۶	۶/۰۹	۱۰۰

جدول ۵- مقایسه نتایج حاصل از آزمایش‌های سرولوژی با نتایج حاصل از کشت

	MG		MS	
کشت / سرولوژی	مثبت	منفی	مثبت	منفی
مثبت (تعداد)	۴	۳۸	۱۸	۸۰
مثبت (درصد)	۱/۷۶	۱۶/۸۱	۷/۹۶	۳۵/۳۹
منفی (تعداد)	۱۳	۱۷۱	۱۶	۱۱۲
منفی (درصد)	۵/۷۵	۷۵/۶۸	۷/۰۷	۴۹/۵۵

آنتی‌ژن MG قرار گرفتند؛ ۵۰۷ نمونه (۱۱/۲۷ درصد) مثبت بودند. در تحقیقات Sarkar ؛ Sikder؛ Baua و Hossain این میزان بیش از این و به ترتیب ۵۸/۹۰ درصد؛ ۴۶/۸۸ درصد؛ (در دو منطقه؛ ۵۳ درصد و ۴۶درصد) و ۵۵/۱۳درصد گزارش شده است (۱۲، ۱۶، ۲۳، ۲۴) .
از ۵۰۷ نمونه مذکور در آزمایش ELISA؛ ۳۳۹ نمونه (۶۶/۸۶ درصد) مثبت؛ و الباقی منفی یا مشکوک تشخیص داده شدند. آمار مذکور بیان کننده بالا بودن تعداد موارد مثبت کاذب (۳۳/۱۴درصد) در آزمایش RSA و یا پایین بودن Specificity آن می باشد که با آنچه در منابع مذکور در مقدمه مقاله آمده مطابقت دارد.
در خصوص تشخیص سرولوژیک MS نیز از مجموع ۳۴۷۴ نمونه سرم که تحت آزمایش RSA با پادگن MS قرار گرفتند؛ ۱۳۲۷ نمونه (۳۸/۱۹درصد) مثبت بودند. از ۱۳۲۷ نمونه مذکور در آزمایش ELISA ؛ ۹۴۰ نمونه (۷۰/۸۳درصد) مثبت؛ و الباقی منفی یا مشکوک تشخیص داده شدند. درصد موارد مثبت کاذب در مورد MS " کمتر" از MG و برابر ۲۹/۱۷ درصد می باشد. در رابطه با MG ذکر این مهم ضروری است که روش‌های سرولوژیک از حساسیت بالایی برخوردار نبوده و این مهم مربوط به تفاوت معنی‌دار آنتی‌ژنیک بین سویه‌های MG می باشد. غشای پلاسمایی MG حدود ۲۰۰ پلی‌پپتید دارد که درتفاوت آنتی‌ژنیک سطحی، اتصال به سلول میزبان و انتقال مواد مغذی حائز اهمیت می‌باشند (۱۰، ۱۵، ۱۶، ۲۰، ۲۱، ۲۴، ۲۹).
با تکیه بر نتایج آزمایشات سرولوژیک (جدول سه) شیوع مایکوپلاسما (MG و MS) در فصل زمستان با اختلاف معنی‌داری (P <۰/۰۰۱) بیش از سایر فصول می‌باشد (بر اساس روش مربع کا). این یافته با نتایج حاصل از تحقیقات Sarkar ؛ Sikder و Hossain مطابقت دارد (۱۶، ۲۳، ۲۴).
Sarkar در بررسی سرمی شیوع Mg اقدام به اخذ ۳۸۲ نمونه خون از سرخرگ زیر بال؛ در دو فصل تابستان و زمستان نمود و سرم حاصل را تحت آزمایش RSA قرار داد. وی ۵۸/۹۰ درصد سرم‌ها را مثبت تشخیص داد. بر اساس تحقیق مذکور درصد آلودگی در فصل زمستان ۶۲/۴۴ درصد و درصد آلودگی در فصل تابستان ۵۳/۱۰ درصد گزارش شده است (۲۳). Sikder در بررسی میزان آلودگی به MG؛ ۳۶۴ نمونه سرمی را تحت آزمایش SPA قرار داد. وی درصد شیوع *M.gallispeticum* را ۴۶/۸۸ درصد و حداکثر میزان آن را در فصل زمستان (۶۱/۴۵ درصد) گزارش نمود (۲۴). Baua در بررسی سرواپیدمیولوژیک MG در دو منطقه Lohagara و Satkania-Upazilla در بنگلادش؛ اقدام به اخذ ۴۰۰ نمونه خون از گله های مرغ گوشتی و تخمگذار نمود. وی میزان آلودگی در گله های مرغ گوشتی و تخمگذار در منطقه نخست را به ترتیب ۵۳ درصد و ۷۳ درصد؛ و در منطقه دوم را به ترتیب ۴۶ درصد و ۶۰ درصد گزارش نمود (۱۲). Hossain ۵۷۵ نمونه سرم که در طول یک سال از ۱۱۵ گله دریافت نموده بود را تحت آزمایش SPA قرار داد و درصد آلودگی به MG را ۵۵/۱۳ درصد گزارش نمود. وی میزان آلودگی در زمستان را با اختلاف معنی‌دار بیشتر از تابستان و به ترتیب ۶۱/۴۸درصد و ۴۷/۷۴ درصد اعلام نمود (۱۶).
از کشت نمونه‌های دریافتی از ۲۲۶ سالن تحت آزمایش؛ در ۸۲ مورد (۳۶/۲۸درصد) مایکوپلاسما جدا گردید که از این تعداد، ۳۶ مورد (۴۳/۹۰درصد) مایکوپلاسماهای غیر از MG و MS ، ۱۲ مورد (۱۴/۶۳درصد) MG، ۲۹ مورد (۳۵/۳۶درصد) MS و ۵ مورد (۶/۰۹درصد) همزمان MG و MS جداسازی و شناسایی شد. نتایج موصوف با نتایج تحقیقات دبیری؛ صادقی؛ بابایی آلوکنده و Tiong مشابهت دارد (۱، ۶، ۷، ۲۸).
ناهمخوانی نتایج ناشی از آزمایشات سرولوژیک و کشت به شرح زیر :
MG : سرولوژی مثبت - کشت منفی : ۱۶/۸۱درصد
سرولوژی منفی - کشت مثبت : ۵/۷۵درصد
MS : سرولوژی مثبت - کشت منفی : ۳۵/۳۹درصد
سرولوژی منفی - کشت مثبت : ۷/۰۷درصد

با نتایج تحقیقات عابدیان جلودار؛ Hanif؛ Turkyilmaz و Gharaibeh مشابهت دارد (۸، ۱۴، ۱۵، ۲۹).

بدون شک موارد "سرولوژی مثبت - کشت منفی"؛ ناشی از تاثیر دارو درمانی یا مقابله اثر بخش سیستم ایمنی بدن با عامل بوده و موارد"سرولوژی منفی - کشت مثبت" صرفاً نشان دهنده شروع بیماری و اخذ نمونه قبل از تحریک سیستم ایمنی است.

سپاسگزاری

این پروژه با حمایت مالی و تصویب موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی و همکاری مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان تهران و نیز اداره کل دامپزشکی استان تهران به اجرا درآمد؛ لذا ضمن تشکر از مسئولین ذیربط؛ مراتب قدردانی خود را از آقای دکتر روحانی کارگر موخر؛ ناظر محترم پروژه؛ دکتر افشین درداری؛ رییس وقت بخش تحقیقات دامپزشکی مرکز تحقیقات مذکور و سایر همکارانی که بدون همکاری آنها اجرای پروژه مورد نظر امکان پذیر نبود؛ اعلام نماید.

پاورقی‌ها

1- Rapid serum agglutination (RSA)
2- Enzym Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)
3- Chronic Respiratory Disease (CRD)
4- Screening
5- Serum plate agglutination (SPA)
6- Heamagglutination Inhibition (HI)
7- Pathogenicity
8- Infectivity

منابع مورد استفاده

۱- بابایی آلوکنده، ع. (۱۳۷۶) جداسازی و خالص‌سازی مایکوپلاسماهای جدا شده از طیور و لیوفیلیزه کردن آنها. پایان نامه دکترای عمومی. دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز.

۲- بلاها، ت. (۱۹۹۸) اپیدمیولوژی کاربردی دامپزشکی. ترجمه دلیمی اصل، ع.؛ معتمدی؛ غ. و موذنی جولا؛ غ.۱۳۷۸. انتشارات آییژ. تهران: ۲۶۳-۲۵۹.

۳- بهار صفت، م و جعفری؛ م. (۱۳۵۳) مایکوپلاسما و مایکوپلاسموز در انسان، دام و گیاه. انتشارات سازمان دامپزشکی کشور. تهران: ۲۳۵-۲۰۰.

۴- پورچیز، گ و همکاران. (۱۹۹۴) راهنمای تشخیص بیماری‌های باکتریایی طیور. چاپ سوم. ترجمه ع.ر. اکبری. (۱۳۷۵) انتشارات واحد آموزش و پژوهش معاونت کشاورزی سازمان اقتصادی کوثر. تهران: ۱۵۹-۱۴۵.

۵- حسنی طباطبایی؛ ع. و فیروزی؛ ر. (۱۳۸۰) بیماری‌های باکتریایی دام. تهران: نشر موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران.

۶- دبیری، ع. (۱۳۶۶) جداسازی مایکوپلاسما از عفونت‌های دستگاه تنفسی طیور. پایان نامه دکترای عمومی. دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز.

۷- صادقی، ع. (۱۳۷۵) جداسازی مایکوپلاسما از دستگاه تنفسی طیور صنعتی منطقه اهواز. پایان نامه دکترای عمومی. دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز.

۸- عابدیان جلودار، ع. (۱۳۷۱) بررسی آلودگی سالمونلایی و مایکوپلاسمایی در مرغداری‌های اطراف شیراز. پایان نامه دکترای عمومی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز.

۹- قلعه گلاب بهبهان؛ ن. (۱۳۸۵). جداسازی؛ تشخیص و تفریق مایکوپلاسما گالی‌سپتیکم و مایکوپلاسما سینوویه با استفاده از PCR و RFLP و انجام تست آنتی بیوگرام. پایان نامه دکتری تخصصی. دانشگاه شیراز.

10- Ahmad, A., Rabbani, M., Yagoob, T., Ahmad, A., Shabbir, M.Z. and Akhtar, F. (2008) Status of IgG antibodies against *Mycoplasma gallisepticum* in non vaccinated commercial poultry breeder flocks. *J.Anim.PL.Sci*.18-2,3:61-63.

11- Barbour, E., Hamadeh, S., Talhouk, R., Sakr, W. and Darwish, R. (1998) Evaluation of an enrofloxacin-treatement program against *Mycoplasma gallisepticum* in broilers. *Rev. Vet. Med.* 35-2: 91-99.

12- Barua, S.R., Prodhan, A.M., Islam, S. and Chowdhury, S. (2006) Study on Mycoplasma gallisepticum in chickens in selected areas of Bangladesh. Bangl. J. Vet. Med. 4-2: 141-142.

13- Bradbury, J.M. (2001) *Avian Mycoplasmosis,* In : Fand Jordan et al. Poultry Disease. 5th edi. Iowa. W.B.Saunders company. PP :178-193.

14- Gharaibeh, S. and Al Roussan, D. (2008) The use of molecular techniques in isolation and characterization of *Mycoplasma gallisepticum* from commercial chickens in jordan. *Int. J. of poultry sci.* 7-1:28-35.

15- Hanif, A., Najeeb, M.I. (2007) Comparison of conventional bacterial isolation, rapid slide agglutination and polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma gallisepticum* in breeder flocks.*Pak.J.Life Soc. Sci.* 5-1,2:1-5.

16- Hossain, K.M.M., Ali, M.Y. and Haque, M.I. (2007) Seroprevalence of Mycoplasma gallisepticum infection in chicken in the Greater rajshahi District of Bangladesh. Bangl. J. Vet. Med. 5-1,2: 9-14.

17- Jordan, F. and Horrocks, B. (1996) The minimum inhibitory concentration of tilmicosin and tylosin for *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma Synoviae* and comparison of their efficacy in the control of M.G. infection in broiler chickens. *Avi. Dis*.40-2: 326-334.

18- Jungherr, E. and Sohrab, V. (1959) Pilot serological survey of CRD among imported breeds of chicken in Iran. Ann. *Rep. Razi. Inst.* 1956-57. P: 21.

19- Kleven, S.H., Swayne, D.E., Glisson, J.R., Jackwood, M.W., Pearson, J.E. and Reed, W.M. (1998) *Mycoplasmosis*. In: A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. 4th edn. American Association of Avian Pathologists. PP: 74-80.

20- Kleven, S. H. (2003) *Mycoplasmosis*. In: Saif, Y. M., Barnes,

H. J., Glisson, J. R., Fadly, A. M., Mc Dougald, L. R. and Swayne, D. E. (eds). Diseases of Poultry. 11 th edn. Iowa State Press. Pp: 719-721.

21- Levisohn, S. and Kleven, S. (2000) Avian *Mycoplasmosis*: *Mycoplasma gallisepticum*. *Rev. Sci. Tech.* 19-2: 425-442.

22- Quinn, P. J., Carter, M. E., Markey, B. and Carter, G. R. (1994) *Clinical Veterinary Microbiology*. Mosby. Wolf. PP: 320-326.

23- Sarkar, S.K., Rahman, M.B., Rahman, M., Amin, K.M.R., Khan, M.F.R. and Rahman, M.M. (2005) Sero-prevalence of *Mycoplasma gallisepticum* infection of chikens in model breeder poultry farms of Bangladesh. *Int.J.of Poultry Sci.* 4-1 : 32-35.

24- Sikder, A.J., Islam, M.A., Rahman, M.M. and Rahman, M.B. (2005) Seroprevalence of Salmonella and *Mycoplasma gallisepticum* hnfection in the six model breeder poultry farms at Patuakhali district hn Bangladesh. *Int.J.of Poultry Sci.* 4-11: 905-910.

25- Sohrab, V. and Baharsefat, M. (1955) Mycoplasmosis in poultry in Iran. *Ann. Rep. Razi. Inst*. 1955-56. P : 24.

26- Stanley, W., Hofacre, C., Speksnijder, G., Kleven, S., and Aggrey, S. (1955) Monitoring *Mycoplasma gallisepticum* and Mycoplasma synoviae infection in breeder chicken after treatment with enrofloxacin .*J. Vid. Is*. 45-2: 534-539.

27- Stipkovits , L., Kempf, I. (1996) *Mycoplasmosis in Poultry. Rev. Sci. Tech*. 15-4: 1495-1525.

28- Tiong, S.K., Liow, T.M. and Tan, R.J. (1979) Isolation and identification of avian mycoplasmas in Singapore. Bri. *Poultry Sci.* 20-1: 1040-1049.

29- Turkyilmaz, S., Coven, F. and Eskiizmirliler, S. (2007) Detction of antibodiesproduced in quail (*Coturnix Coturnix Japonica*) against *Mycoplasma gallisepticum* with different serological tests. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 31-4: 267-270.

30- Vandenhoven, R., Kemef, I., Gesbert, F. and Guiter, M. (1998) Efficacy of difloxacin in growing broiler chickens for the control of infection due to pathogenic *Mycoplasma gallisepticum*. *Zent. Vet.* 45-5: 305-310.