



JOURNAL OF VETERINARY CLINICAL RESEARCH

## بررسی شیوع سرمی آلودگی به مایکوپلازما گالی سپتیکوم در مزارع تخمگذار تجاری استانهای البرز و قزوین با روش آگلوتیناسیون سریع بر روی لام

پیام حقیقی خوشخو<sup>۱</sup>، گیتا اکبری آزاد<sup>۱\*</sup>، مسعود روحی<sup>۲</sup>، پدram سمیع یوسفی<sup>۲</sup>

۱- گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج.

۲- دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج.

\* نویسنده مسئول: akbari@kiaou.ac.ir

سال اول، شماره سوم، تابستان ۱۳۸۹

صفحات ۱۸۷-۱۸۱

### چکیده

مایکوپلازما گالی سپتیکوم یکی از بیماری های مهم در کاهش تولید در مزارع تخمگذار تجاری است و هزینه های کنترلی آن قابل توجه می باشد. این مطالعه به منظور تعیین شیوع سرمی آلودگی با مایکوپلازما گالی سپتیکوم در تعدادی از مزارع تخمگذار تجاری استانهای البرز و قزوین صورت پذیرفت. برای این منظور از ۲۱ مزرعه استان البرز ۱۰۵۰ و از ۲۰ مزرعه استان قزوین ۱۰۰۰ نمونه سرم طی فصول زمستان و بهار اخذ شد و با استفاده از آنتی ژن رنگی مایکوپلازما گالی سپتیکوم، (Intervet Co. Holland® Noblis MG) آزمون آگلوتیناسیون سرم روی صفحه انجام شد. موارد سرمی مثبت در این آزمون به نسبت ۱ به ۸ رقیق و مجدداً آزمایش شدند و مزارعی که بیش از ۱۰٪ نمونه های سرمی رقیق شده آنها مثبت گردیدند، از نظر سرمی آلوده به مایکوپلازما گالی سپتیکوم قلمداد شدند. نتایج نشان داد که در استان البرز یک مزرعه از ۲۱ مزرعه (۸/۴٪) مورد مطالعه مثبت و ۲۰ مزرعه (۲/۹۵٪) منفی بود و از نظر سرمی نیز از ۱۰۵۰ نمونه مورد بررسی، ۵۱ نمونه (۸۶/۴٪) مثبت، ۹۹۱ نمونه (۳۸/۹۴٪) منفی و ۸ نمونه (۷۶/۰٪) مشکوک بود. در استان قزوین از ۲۰ مزرعه مورد مطالعه، ۳ مزرعه (۱۵٪) مثبت و ۱۷ مزرعه (۸۵٪) منفی بود و از نظر سرمی از مجموع ۱۰۰۰ نمونه سرمی اخذ شده از این استان، ۷۴ نمونه (۴/۷٪) مثبت، ۴۶ نمونه (۶/۴٪) مشکوک و ۸۸۰ نمونه (۸۸٪) منفی بود. افزایش رعایت اصول امنیت زیستی توانایی کنترل شیوع این بیماری را در سطح مزارع تخمگذار تجاری دارد. با توجه به شیوع سرمی پایین این بیماری در سطح مزارع تخمگذار تجاری مورد مطالعه، بنظر می رسد صدور مجوز مصرف واکسن زنده مایکوپلازما گالی سپتیکوم در سطح مزارع تخمگذار تجاری به مطالعات بیشتری نیاز دارد.

واژه های کلیدی: مایکوپلازما گالی سپتیکوم، شیوع سرمی، تخمگذار، البرز، قزوین، ایران



JOURNAL OF VETERINARY CLINICAL RESEARCH

J.Vet.Clin.Res.1(3)181-187,2010

## Seroprevalence of *Mycoplasma gallisepticum* infection in commercial layer farms in Alborz and Qazvin provinces

Haghighi Khoshkhoo, P.<sup>1</sup>, Akbari-Azad, G.<sup>1\*</sup>, Roohi, M.<sup>2</sup>, Sami-Yousefi, P.<sup>2</sup>

*1- Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Karaj Branch, Iran.*

*2- Graduated from Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Karaj Branch, Iran.*

*\*Corresponding author: akbari@kiaui.ac.ir*

*Mycoplasma gallisepticum* is associated with significant economic losses in domestic poultry, caused suboptimal egg production in layers. This survey was carried out to determine the seroprevalence of *Mycoplasma gallisepticum* infection in commercial layer farms in Alborz and Qazvin provinces for primary evaluation of usage of live Mg vaccine in commercial layer flocks. A total of 2050 serum samples were collected from 41 commercial layer flocks (50 samples from each farm) mostly over 40-week-old. Sera were tested by Serum Plate Agglutination (SPA) method using commercial Mg antigen (Noblis MG<sup>®</sup>, Intervet Co, Holland). Positive reactions retested by SPA on 1:8 dilution and the farms with more than 10% positive reactions were considered positive serologically. The result showed that in the Alborz province, only one out of 21 (4.8%) farms were positive and the rest (95.2%) were negative; also, 51 out of 1050 (4.86%) sera were positive, 991 out of 1050 (94.38%) were negative and 8 out of 1050 (0.76%) were doubtful. In Qazvin province, 3 out of 20 (15%) farms were positive and 17 out of 20 (85%) were negative; also, 74 out of 1000 (7.4%) sera were positive, 46 out of 1000 (4.6%) were doubtful and 880 out of 1000 (88%) were negative. As seroprevalence of Mg infection in these two provinces which are very important areas in poultry production in Iran were low, so it seems that using live vaccine against Mg needs more studies. However, molecular identification should be used for completing this finding and biosecurity notices are very important for controlling of Mg.

**Key words:** *Mycoplasma Gallisepticum*, Seroprevalence, Alborz, Qazvin, Iran.

## مقدمه

آزمایش سرولوژیک MG به روش آگلوتیناسیون سرم روی صفحه (SPA) Serum Plate Agglutination Test, در سن یک روزگی و سابقه واکسیناسیون گله مورد مطالعه و گله مادر آن با واکسن MG نیز اخذ شد.

آزمایش آگلوتیناسیون سرم روی صفحه: به منظور شناسایی آنتی بادی MG در سرم های اخذ شده، از آنتی ژن آبی رنگ مایکوپلازما گالی سبتیکوم (MG Noblis®Antigen)، ساخت شرکت اینترت هلند استفاده شد که سوسپانسیونی از اجرام کشته شده MG سویه S6 ادلر (Strain S6 Adler) با رنگ کریستال ویوله است. ۲۵ میکرولیتر از سرم و آنتی ژن در دمای اتاق روی صفحه شیشه ای مخلوط و بعد از گذشت ۲ دقیقه از نظر وجود یا عدم وجود آگلوتیناسیون در مقایسه با کنترل منفی قرائت شد. نمونه های مثبت بعد از رقیق سازی به نسبت ۸: ۱ با PBS مجدد آزمایش شده و در صورت آگلوتیناسیون یا عدم آگلوتیناسیون، به ترتیب مثبت یا مشکوک قلمداد شدند. مزارعی که ۱۰٪ نمونه های سرمی رقیق شده آن در آزمایش مجدد SPA مثبت بود، طبق دستورالعمل سازمان دامپزشکی کشور مثبت در نظر گرفته شدند.

## نتایج

نتایج نشان داد که از نظر آلودگی مزارع تخمگذار با مایکوپلازما گالی سبتیکوم در استان البرز یک مزرعه از ۲۱ مزرعه (۴/۸٪) مورد مطالعه مثبت و ۲۰ مزرعه (۹۵/۲٪) منفی بود و از نظر سرمی از ۱۰۵۰ نمونه مورد بررسی، ۵۱ نمونه (۴/۸۶٪) مثبت، ۹۹۱ نمونه (۹۴/۳۸٪) منفی و ۸ نمونه (۰/۷۶٪) مشکوک بود. در استان قزوین نیز از ۲۰ مزرعه مورد مطالعه، ۳ مزرعه (۱۵٪) مثبت و ۱۷ مزرعه (۸۵٪) منفی بودند و از نظر سرمی از مجموع ۱۰۰۰ نمونه اخذ شده، ۷۴ نمونه (۷/۴٪) مثبت، ۸۸۰ نمونه (۸۸٪) منفی و ۴۶ نمونه (۴/۶٪) مشکوک بودند. به علت کم بودن مزارع مثبت (یک مورد) امکان انجام تجزیه و تحلیل

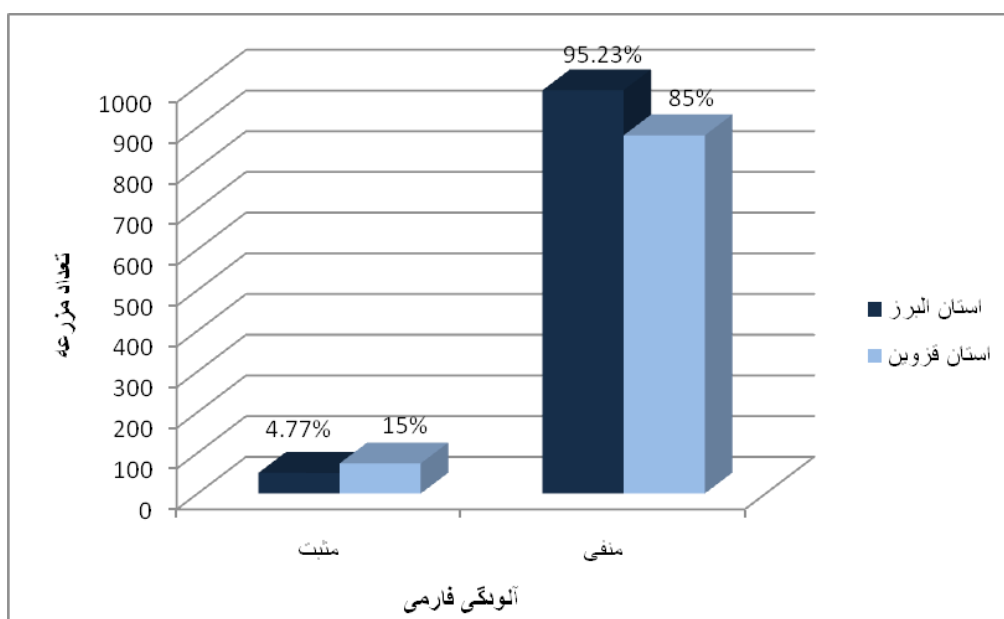
مایکوپلازماها پروکاریوت هایی فاقد دیواره سلولی اند که با انتقال افقی و عمودی و ایجاد وضعیت حامل در مبتلایان مشکلات مختلفی از جمله بیماری مزمن تنفسی مرغ (Chronic Respiratory Diseases, CRD) در ماکیان اهلی ایجاد می کنند که باعث خسارات اقتصادی بدلیل افزایش تلفات، هزینه بر بودن درمان دارویی، کاهش کیفیت لاشه جوجه های گوشتی، کاهش تولید تخم مرغ و کاهش جوجه درآوری می شود (۷ و ۱۱). امروزه از راههای کنترل و پیشگیری این بیماری رعایت اصول امنیت زیستی در مزارع و واکسیناسیون با واکسن زنده است که برای روشن تر شدن ضرورت استفاده از واکسن زنده آن، بایستی وضعیت آلودگی به این پاتوژن در مزارع مربوطه مشخص شود. هدف از این مطالعه تعیین شیوع سرمی آلودگی با مایکوپلازما گالی سبتیکوم (*Mycoplasma galisepticum*, MG) در تعدادی از مزارع تخمگذار تجاری استانهای البرز و قزوین بود تا مقدمه ای برای شروع مطالعات کامل تر و ارائه راهکارهای کنترلی علیه این بیماری باشد.

## مواد و روش کار

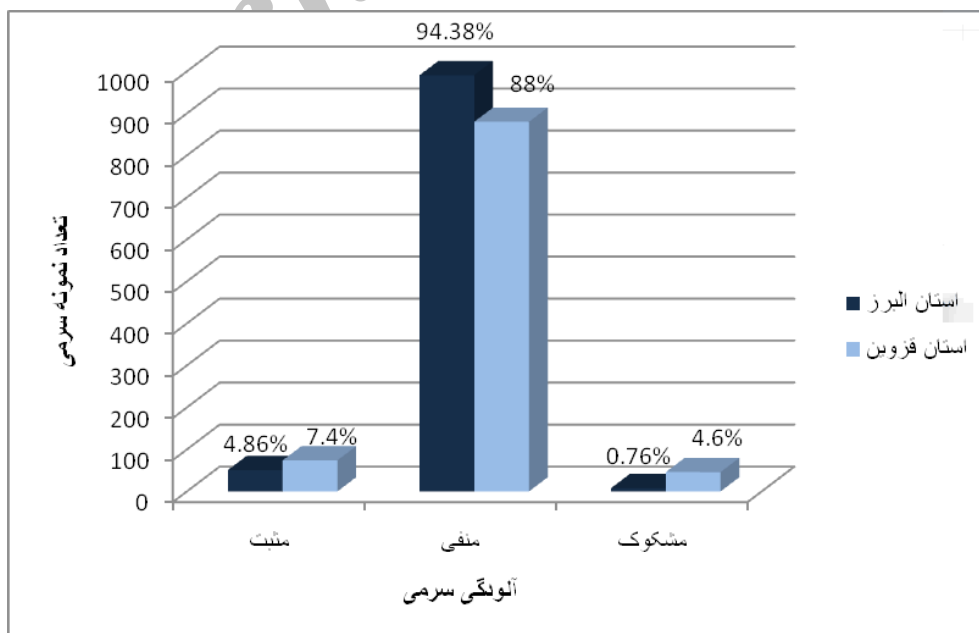
زمان و مکان انجام مطالعه: نمونه های سرمی از دی ماه ۱۳۸۸ تا خرداد ماه ۱۳۸۹ به مدت ۶ ماه از مزارع تخمگذار تجاری با بیش از ۴۰ هفته سن اخذ شد. از ۲۱ مزرعه استان البرز ۱۰۵۰ نمونه خون از مناطق مختلف شامل: کرج، هشتگرد، کردان، نظرآباد و اشتهارد و از ۲۰ مزرعه استان قزوین ۱۰۰۰ نمونه خون از مناطق آبیک، میرپنجی، ناصرآباد، اسلام آباد و دوده جمع آوری شد. خونگیری از ورید بال اخذ و سرم های جدا شده در عرض کمتر از ۲۴ ساعت در آزمایشگاه مرکزی بیمارستان شماره یک دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج آزمایش شدند. همزمان با خونگیری اطلاعاتی مبنی بر سن گله، سویه تجاری پرندگان، ظرفیت مرغداری، آنتی بیوتیک مصرفی در سه ماه اخیر، درصد تولید، نتیجه

گله پرورش تک سنی و ۷ گله پرورش چند سنی داشتند و ۲۰ مزرعه مورد مطالعه استان قزوین، ظرفیتهای ۱۵ هزار تا یک میلیون قطعه و سن ۴۰ تا ۱۰۹ هفته از دو نژاد LSL (۹ گله)، Hy-line (۱۰ گله) و Bovans (یک گله) بودند که ۱۱ گله پرورش تک سنی و ۹ گله پرورشی چند سنی داشتند.

آماري برای محاسبه ضریب همبستگی بین مزارع مثبت و متغیر های اخذ شده در زمینه موارد بهداشتی و پرورشی و سوابق واکسیناسیون این مزارع امکانپذیر نشد (نمودار های شماره ۱ و ۲). با اینحال، ۲۱ مزرعه مورد مطالعه استان البرز، با ظرفیتهای ۱۰ تا ۱۲۰ هزار قطعه و سن ۴۰ تا ۱۱۰ هفته از دو نژاد LSL (۱۰ گله) و Hy-line (۱۱ گله) بودند که ۱۴



نمودار شماره ۱- میزان آلودگی مزارع تخمگذار تجاری مورد مطالعه در استان البرز و قزوین به MG



نمودار شماره ۲- میزان آلودگی نمونه های سرمی اخذ شده از مزارع تخمگذار تجاری استان البرز و قزوین به MG

بحث

این مطالعه به منظور تعیین شیوع سرمی آلودگی با مایکوپلازما گالی سبتیکوم در تعدادی از مزارع تخمگذار تجاری استانهای البرز و قزوین با استفاده از آزمایش سرولوژی SPA به عنوان یک آزمون غربال گر (Screening Test) انجام شد. نتایج بدست آمده از آزمایش ۲۰۵۰ نمونه سرم اخذ شده از ۴۱ مزرعه تخمگذار تجاری بالای ۴۰ هفته در دو استان فوق نشان داد که شیوع سرمی آلودگی به مایکوپلازما گالی سبتیکوم در مزارع تخمگذار این استان ها بسیار پایین است و صرفاً ۴ مزرعه از ۴۱ مزرعه (%۹/۸) مثبت و ۳۷ مزرعه باقیمانده (%۹۰/۲) منفی بودند. از مجموع ۲۰۵۰ نمونه سرم اخذ شده نیز ۱۲۵ سرم (%۶/۱) مثبت، ۱۸۷۱ سرم (%۹۱/۳) منفی و ۵۴ سرم (%۲/۷) مشکوک هستند. طبق پرسشنامه های جمع آوری شده، مزارع تخمگذار در یک روزگی و مزارع مادر آنها در زمان تولید فاقد آنتی بادی علیه MG بر اساس آزمایش SPA بودند و این موضوع نشان می دهد که با رعایت اصول مدیریتی و قرنطینه ای صحیح و جوجه های عاری از MG می توان گله هایی عاری از MG پرورش داد. با اینحال انتقال افقی نقش بسزایی در شیوع این بیماری دارد گرچه عمده ترین راه انتقال عمودی است (۷ و ۹). در یک نمونه گیری تصادفی از جوجه های یک روزه از ۴۰ مزرعه در شهرستان شهرکرد، ۲۲/۵٪ آلودگی سرمی به MG گزارش شده است که نشان دهنده اهمیت انتقال عمودی است (۱). در مطالعه حاضر سن نمونه گیری ۴۰ هفته به بالا و فصل نمونه گیری زمستان و بهار در نظر گرفته شد. مطالعه دلورانی و همکاران روی گله های مرغ مادر شهرستان کرج نشان داد که ۵ مزرعه از ۸ مزرعه (%۶۲/۵) به روش SPA آلودگی سرمی به MG دارند و این آلودگی در سنین بالاتر گله بیشتر دیده می شود (۲). در مطالعه ای بر روی کارایی واکسن زنده مایکوپلازما گالی سبتیکوم سویه موتانت حساس به حرارت در گله های تخمگذار تجاری چند سنی نشان داد که استفاده از واکسن باعث کاهش تلفات و افزایش تولید تخم مرغ در مقایسه با

گله کنترل منفی می شود ولی این افزایش معنی دار نمی باشد (۰.۰۵ > P) (۳). Sarkar و همکاران در سال ۲۰۰۵ در مطالعه ای در بنگلادش بر روی آلودگی سرمی MG در مزارع مادر نشان دادند که شیوع سرمی در زمستان ۱۰-۵ درصد بیشتر از تابستان و در سن ۴۰-۲۰ هفته بیش تر از ۳۰-۵۵ هفتگی است (۱۷). شیوع بیشتر MG در فصل زمستان نسبت به تابستان را Mushi (۱۹۹۹) و همکاران، Ley، Pradhan و همکاران (۲۰۰۰)، Alam و همکاران (۲۰۰۳) و Talha (۲۰۰۳) نیز گزارش کرده اند (۵ و ۱۳ و ۱۶ و ۱۸). تست های سرولوژیکی برای شناسایی آنتی بادی علیه MG هر کدام مزایا و معایب خاص خود را دارند با اینحال سازمان جهانی بهداشت حیوانات (World Organization for Animal Health) در سال ۱۹۹۶ سه تست آگلوتیناسیون سرم روی صفحه، ممانعت از همآگلوتیناسیون و الیزا را برای بررسی آنتی بادی علیه MG در سرم ماکیان پیشنهاد داده است (۱۴). در این مطالعه از SPA استفاده شد که نسبت به دو تست دیگر حساسیت بالاتر و ویژگی پایین تری دارد و لذا موارد مثبت کاذب در این آزمایش در مقایسه با تست های HI و الیزا بیشتر است. این مطلب در تجربیات lin و kleven نیز آورده شده است (۱۲). Buxton معتقد است که تست SPA اگرچه دارای واکنش های مثبت کاذب است ولی به علت قابلیت انجام سریع و آسان و ارزان به عنوان یک آزمایش اولیه جهت ردیابی مایکوپلازما ها در طیور مطلوب می باشد و استفاده از آنرا توصیه کرده است (۸). در مطالعه مقایسه ای که توسط Osman روی ۲۷۹ نمونه انجام شد، نتیجه گرفت که در روش کشت ۱۹/۷٪ مثبت، در روش PCR ۴۷/۵٪ مثبت، در روش SPA ۵۴/۸٪ مثبت و در روش الیزا ۴۱/۹٪ مثبت بود که نشان دهنده بالا بودن مثبت کاذب آزمایش SPA بوده و باید با روش های مولکولی تأیید گردد (۱۵). شیوع سرمی MG در گله های جوجه گواشی و تخمگذار تجاری در چند منطقه بنگلادش با تست SPA بترتیب ۴۹/۵٪ و ۶۶/۵٪ و بطور متوسط ۵۸٪ در

۳- کاشانی، ن.، بررسی کارایی واکسن زنده مایکوپلاسما گالی سبتیکوم سویه موتانت حساس به حرارت در گله های تخم گذار تجاری چند سنی، پایان نامه دکتری دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، شماره پایان نامه ۹۷۳ ( ۸۹-۱۳۸۸).

4- Amin M.M, Sidique M.A.B., Rahman M.M(1992) .)

Investigation on chronic respiratory disease in chickens: part-II, BUA Research Progress. (6) 519-526.

5- Alam J., Koike I., Giasuddin M., Rahman M.,)2003 ( Seroprevalence of poultry diseases in native chickens in Bangladesh, 9th Bsver Annual Scientific Conference. Bsver Publication. (24) 26.

6- Barua S.R., Prodhan A.M., Islam S., Chawdhury S., 2006)) Study on Mycoplasma Gallisepticum in chicken. Bangl. Journal Veterinary Medicine. 4 (2) 141-142.

7-Bradbury J.M., Jordan F.T.W., (2003) Avian mycoplasmas in poultry disease. 5<sup>th</sup> ed. Bailliere Tindal, London, pp: 47-85.

8- Buxton F., (1981) Mycoplasma and Acoloplasma of bacteria. Animal Microbiology 267-282 (9) .

9- Hannan P.C.T., (2000) Guide lines and recommendations for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary mycoplasma species. Veterinary Research (31) 373-395.

10- Kapetanov M., Orlic D., Potkonjak D., Velnher M., (2010) Mycoplasma in poultry flocks in the year 2009 compare to the year 2000 and significance of the control measures in Serbia. Lucrari Scientific Medicine Veterinary (1) 249-253.

11- Ley D.H., (2008) Mycoplasma gallisepticum infection in diseases of poultry, Edited by Calnek B.w., Barnes H.J., Beard C.W., Mcdougald L.R., Saif Y.M., 12<sup>th</sup> ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, pp: 805-833.

سال ۲۰۰۶ گزارش شده است که خیلی بیشتر از شیوع آن در سال ۱۹۹۲ می باشد که توسط Amin و همکاران، ۱۳/۲۲٪ گزارش شده بود (۴۰۶). مطالعه مقایسه ای Kapetanov و همکاران روی میزان آلودگی گله های مختلف طیور با MG روی مزارع گوشتی و تخمگذار تجاری و پولت جایگزین به روش الیزا و HI در سال ۲۰۰۰ را نسبت به سال ۲۰۰۹ برتریب روی ۱۲۰۲ و ۲۳۶۰ نمونه سرم مقایسه کردند و نشان دادند که در سال ۲۰۰۰، ۸٪ گله های گوشتی و ۱۹٪ گله های تخمگذار تجاری و پولت جایگزین مثبت بودند در حالی که در سال ۲۰۰۹، ۱۴٪ گله های گوشتی و ۷/۹٪ گله های تخمگذار تجاری و پولت جایگزین مثبت بودند که نشان دهنده افزایش آلودگی در گله های گوشتی و کاهش آن در گله های پولت جایگزین و تخمگذار تجاری بود (۱۰). شیوع سرمی MG در مطالعه حاضر پایین بود. بی تردید رعایت اصول امنیت زیستی در کنترل این بیماری در مزارع طیور بسیار حائز اهمیت است با اینحال ضرورت استفاده از واکسن زنده MG در مزارع تخمگذار تجاری با توجه به اطلاعات بدست آمده، نیاز به بررسی بیشتری دارد. بر این اساس مطالعات تکمیلی با روش های ملکولی برای روشن تر شدن مشکل MG در سطح مزارع تخمگذار تجاری پیشنهاد می شود.

#### منابع

۱- اسدیان، ب.، بررسی تیتراژ سرمی مایکوپلاسما گالی سبتیکوم در جوجه های گوشتی یک روزه در شهرستان شهرکرد، پایان نامه دکتری دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد شهرکرد (۱۳۷۹).

۲- دلورانی، ا.، بررسی میزان آلودگی به مایکوپلاسما گالی سبتیکوم و مایکوپلاسما سینوویه در تعدادی از گله های مرغ مادر گوشتی شهرستان کرج، پایان نامه دکتری دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج (۱۳۷۶).

12- Lin, M.Y., Kleven, S.H., (1984), Evaluation of the micro agglutination test in the diagnosis of MG infection in chickens, *Avian Diseases*, 28:286-294.

13- Mushi E.Z., Binta M.G., Chabo R.G., Mathaio M., Ndebele R.T., (1999) Detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* antibodies in the sera of indigenous chickens by rapid plate agglutination test at Mnopane, Gaborone, Botswana, Onderstepoort. *Journal Veterinary research* (66) 333-334.

14- OIE (1996) *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccine*. World Organization for Animal Health, Paris, pp: 512-521.

15- Osman K.M., Aly M.M., Amin Z.M.S., (2009) *Mycoplasma gallisepticum*: an emerging challenging to the poultry industry in Egypt. *Rev. sci. tech. off. int. Epiz* 28(3) 1015-1023.

16- Pradhan M.A.M., Amin M.M., Taimur M.J.F., (2000) A seroprevalence study of avian *Mycoplasma* in Bangladesh, Paper Presented in 7<sup>th</sup> BSVER Publication, pp:19-23.

17- Sarkar S.K., Rahman M.B., Khan M.F.R., (2005) Seroprevalence of *Mycoplasma gallisepticum* infection of chickens in model breeder poultry farms of Bangladesh. *International Journal of Poultry Science* 4 (1) 32-35.

18- Talha A.F.S.M., (2003) Investigation on the prevalence of *Mycoplasma gallisepticum* in village chickens and possibility of establishing *Mycoplasma gallisepticum* free flocks and significance of *Mycoplasma gallisepticum* on different production parameters in layer chickens in Bangladesh. M.Sc. Thesis. Department of Veterinary Microbiology, The Royal Veterinary and Agricultural University, Denmark, and Department of Pathology, Bangladesh Agricultural University, Mymensingh.