Assiut Vet. Med. J. Vol. 59 No. 138 July 2013

USING POLYMERASE CHAIN REACTION IN DIRECT DETECTION OF *MYCOPLASAMA GALLISEPTICUM* AND *MYCOPLASMA SYNOVIAE* INFECTIONS IN BROILER BREEDER FLOCKS IN HAMA PROVINCE IN SYRIA

H. ALREFAIE* and S. IBRAHIM**

* PhD student, Faculty of Vet Medicine, Albaath Univ, Hama, Syria.
**Assistant professor of Microbiology Department, Faculty of Vet Medicine, Albaath Univ, Hama, Syria.
Email: hamid77ali@hotmail.com and hamid77ali@yahoo.com

ABSTACT

Received at: 27/5/2013

Accepted: 25/6/2013

Mycoplasama gallisepticum (MG) and *Mycoplasma Synoviae* (MS) are important avian pathogens which cause respiratory diseases resulting in large economic losses in Syria and world-wide poultry industry. The objective of this study is using multiplex polymerase chain reaction for direct detection of these agents from respiratory infections in broiler breeder flocks at Hama Province in Syria. For this purpose, 203 tracheal swabs were collected from birds which belonging to 29 flocks suffered from respiratory symptoms during the continued period between May 2011 and May 2012. The results revealed that 27 flocks (93%) were infected by these species (16 mixed infections and 11 single infections). The number of infected flocks with MG was 25 flocks and MG prevalence in these flocks was 86%. While the number of infected flocks with MS was 18 flocks and MS prevalence in these flocks was 72%. Regardless of the flocks which belonging to them the studied samples, the results showed that 128(63%) birds were infected with MG and MS (66 mixed infections and 64 single infections);119 birds were infected with MG , MG prevalence in the studied birds was 59% and 75 birds were infected with MS, MS prevalence in the studied birds was 37%.

***Key words**: multiplex polymerase chain reaction, direct detection, Mycoplasma gallisepticum, Mycoplasma synoviae, broiler breeder flocks.*

استخدام تفاعل البلمرة المتسلسل في الكشف المباشر عن إصابات المايكوبلازما الانتانية الدجاجية والمايكوبلازما الزليلية عند قطعان أمات دجاج اللحم في محافظة حماة في سورية.

حميد الرفاعي ، سامر إبراهيم

تعتبر المايكوبلازما الانتانية الدجاجية والمايكوبلازما الزليلية ممرضات طيرية هامة تسبب أمراضاً تنفسيةً عند قطعان الدواجن، وينتج عنها خسائر اقتصادية كبيرة في صناعة الدواجن في سورية ومعظم أنحاء العالم. لذا فقد هدفت هذه الدراسة إلى استخدام تفاعل البلمرة المتسلسل المتعدد في الكشف المباشر عن الإصابة التنفسية المسببة بهذه الأنواع عند قطعان أمهات دجاج اللحم في محافظة حماة من سورية. لهذا الغرض تم جمع ٢٠٣ مسحة رغامية من طيور تنتمي لـ٢٩ قطيعاً تعاني من أعراض تنفسية وذلك خلال الفترة الممتدة بين أيار ٢٠١١ وأيار ٢٠١٢. أظهرت نتائج هذه الدراسة أن ٢٧ قطيعاً (٩٣%) كان مصاباً بهذين النوعين من المايكوبلازما (١٦ إصابة مختلطة، ١١ إصابة مفردة). وبلغ عدد القطعان المصابة بالمايكوبلازما الانتانية الدجاجية ٢٥ قطيعاً وبلغ معدل انتشار الإصابة عند هذه القطعان بهذا النوع ٨٦%، بينما بلغ عدد القطعان المصابة بالمايكوبلازما الزليلية ١٨ قطيعاً ومعدل انتشار الإصابة ٦٢%. وبغض النظر عن القطعان التي تنتمي إليها العينات المدروسة فقد أظهرت نتائج هذه الدراسة بأن ١٢٨ طيراً (٦٣%) كان مصاباً بكلا النوعين (٦٦ إصابة مختلطة و ٦٤ إصابة مفردة)، وبلغ عدد الطيور المصابة بالمايكوبلازما الانتانية الدجاجية ١١٩ طيراً وبلغ انتشار المايكوبلازما الانتانية الدجاجية بين الطيور المدروسة (٥٩%) كما أظهرت النتائج أن ٧٥ طيراً مصاباً بالمايكوبلازما الزليلية، وانتشار المايكوبلازما الزليلية بين طيور الدراسة (٣٧%).

الكلمات المفتاحية: تفاعل البلمرة المتسلسل المتعدد، الكشف المباشر، المايكوبلازما الانتانية الدجاجية، المايكوبلازما الزليلية، قطعان دجاج التربية (أمهات دجاج اللحم).

INTRODUCTION
المقدمــة

يعتبر داء المايكوبلازما مرضاً تنفسياً معدياً يصيب الدجاج وطيور الرومي وتسببه العديد من أنواع المايكوبلازما الممرضة ومن أهمها المايكوبلازما الانتانية الدجاجية والمايكوبلازما الزلالية (OIE, 2008). تسبب المايكوبلازما الانتانية الدجاجية المرض التنفسي المزمن chronic respiratory disease (CRD)عند الدواجن الأهلية وبشكل خاص في الظروف الإدارية السيئة مثل التعرض للإجهاد أو وجود ممرضات تنفسية أخرى (Bradbury, 2001). يتصف المرض بالزكام والتهاب الملتحمة، عطاس والتهاب الجيوب وبشكل خاص عند طيور الرومي. يمكن أن يسبب المرض خسائر كبيرة في الإنتاج وتدني في جودة لحم الطيور المصابة وانخفاض في إنتاج البيض (Kleven, 2003; Ley, 2003; OIE, 2008). تحدث معظم إصابات المايكوبلازما الزلالية على شكل إصابة تنفسية علوية تحت سريرية وقد تسبب آفات في الأكياس الهوائية عندما تتعقد الإصابة مع مرض النيوكاسل Newcastle disease (ND) ، أوالتهاب القصبات المعدي infectious bronchitis (IB) أو كليهما معاً، ويمكن أن تسبب المايكوبلازما الزلالية المرض التنفسي والتهاب الأغشية الزلالية عند قطعان الدجاج التجارية أو يمكنها أن تسبب عدوى كامنة (Kleven, 2003; Ley, 2003; OIE, 2008). توجد طرق مختلفة لتشخيص داء المايكوبلازما مثل الاختبارات المصلية التي تكشف عن الأضداد النوعية للمفطورات المسببة للمرض ولكن يوجد بعض المساوئ والعيوب للطرق المصلية من أهمها النتائج الايجابية الكاذبة والتفاعلات التصالبية بين الأنواع المختلفة للمفطورات (Yamamoto, 1991; Yoder, 1991; Kempf, 1998). ويتم تأكيد نتائج الاختبارات المصلية من خلال عزل العامل المسبب على الأوساط الزرعية وتعتبر تقنيات الزرع والعزل مجهدة، ومكلفة وتتطلب ظروف تعقيم عالية (Fan *et al.*, 1995; Kempf, 1998). مؤخراً، استبدلت هذه التقنيات بتقنية اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل polymerase chain reaction (PCR) لتشخيص داء المايكوبلازما حيث يمكن إجراء اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل على العينات السريرية بدون الحاجة لعزل العامل المسبب ونظراً لما تتميز به هذه التقانة من حساسية عالية وسرعة في الانجاز كل ذلك جعلها أكثر استعمالاً للكشف ومراقبة إصابة المايكوبلازما الانتانية الدجاجية والمايكوبلازما الزلالية (Garcia *et al.*, 2005; Gharaibeh and Al Roussan, 2008). ويمكن من خلال هذه التقانة الكشف عن الحمض النووي لأكثر من نوع من أنواع المايكوبلازما بواسطة اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل المتعدد وتشخيص إصابات المايكوبلازما عند قطعان الدجاج التجاري (Wang *et al.*, 1997; Buim *et al.*, 2009). ونظراً لانتشار إصابات المايكوبلازما بين قطعان الدجاج في سورية وما تسببه من خسائر اقتصادية وصعوبة التشخيص الحقلي المعتمد على الأعراض السريرية نظراً لتشابهها مع أعراض أمراض أخرى وأهمية التشخيص المبكر لداء المايكوبلازما فقد هدفت هذه الدراسة إلى الكشف عن إصابات المايكوبلازما الانتانية الدجاجية والمايكوبلازما الزلالية عند قطعان أمات دجاج اللحم في محافظة حماة في سورية من العينات مباشرة باستعمال مشرعات نوعية للمايكوبلازما الانتانية الدجاجية والمايكوبلازما الزلالية.

MATERIALS and METHODS
المواد والطرائق

أجريت هذه الدراسة في الفترة الممتدة بين مايو ٢٠١١ ومايو ٢٠١٢ على ٢٩ قطيع أمهات دجاج لحم كانت تعاني من أعراض تنفسية من مناطق مختلفة من محافظة حماة في سورية.

جمع العينات sampling:

جمعت ٢٠٣ عينة من جميع قطعان الدراسة بواقع ٧ عينات من كل قطيع حيث تم أخذ العينات على شكل مسحات رغامية من خلال فتح الرغامى وحك أو فرك الماسحة القطنية المعقمة بالغشاء المخاطي لجدار الرغامي للحصول على إفرازات مخاطية أو خلايا ظهارية تحتوي على العامل المسبب بحسب (Buim *et al.*, 2009) وضعت كل عينة في أنبوب يحوي على٣ مل من الدارئة الفوسفاتية المعقمة ذات أس هيدروجيني ٧.٢ PBS (pH 7.2) وفقاً لـ (Gharaibeh and Al Roussan, 2008) ووضعت العينات في حافظة ثلجية ونقلت إلى مخبر الأحياء الدقيقة في كلية الطب البيطري.

استخلاص مرصاف الدنا DNA extraction:

استخلص مرصاف الدنا وفقاً للطريقة الموصوفة من قبل (Liu *et al.*, 2001)
بشكل مختصر، بعد عصر الماسحة على جدار الأنبوب تم أخذ ١ مل من العينة طردت مركزياً على سرعة 13,000g لمدة ١٠ دقائق. بعد ذلك غسلت الخلايا المترسبة مرتين بـ ١مل من محلول الدارئة الفوسفاتية (pH 7.2) (PBS) وتم تحضير معلق بإضافة ٥٠ميكرولتر من الماء المقطر المعقم إلى الراسب. سخن المعلق الخلوي في حمام مائي على درجة ١٠٠مْ لمدة ١٠ دقائق، بعد ذلك وضعت العينات بسرعة في المجمد لمدة ١٠ دقائق. طرد المعلق مركزياً بالمثقلة بسرعة ١٣٠٠٠g لمدة ١٠ دقائق. جمع السائل الطافي المحتوي على الحمض النووي وخزن بدرجة -٢٠مْ لحين الاستعمال.

إجراء تفاعل البلمرة المتسلسل المتعدد Multiplex PCR:

تم استخدام مشرعات نوعية للمايكوبلازما الانتانية الدجاجية والزلالية من إنتاج شركة(Eurofins MWG Operon,Germany ويوضح الجدول رقم (١) تسلسل هذه المشرعات

الجدول ١: تسلسل المشرعات المستعملة في تفاعل البوليميريز المتسلسل المتعدد وحجم المنتجات.

Primersa	Sequence	Product	Reference
MG-f	GAGCTAATCTGTAAAGTTGGTC	185 pb	Lauerman, 1998
MG-r	GCTTCCTTGCGGTTAGCAAC		
MS-f	GAGAAGCAAAATAGTGATATCA	207 pb	Lauerman, 1998
MS-r	CAGTCGTCTCCGAAGTTAACAA		

f = forward, r = reverse.

كما استعملت عتيدة خاصة بتفاعل البولميريز من إنتاج شركة كياجن PCR core kit(QIAGEN, Germany) أجري الاختبار وفقاً لـ (OIE,2008) حيث حضر مزيج التفاعل بحجم ٥٠ ميكرولتر في مكان نظيف ومعزول وباستعمال ماصات ورؤس ماصات معقمة كما يلي:

10 × PCR Buffer	5.00 µl	دارئة الاختبار
dNTP(l0 mM)	1.00 µl	مزيج القواعد الآزوتية
MGF (20 pmole/µl)	0.50 µl	المشرع الصاعد للمايكوبلازما الانتانية الدجاجية
MGR (20 pmole/µl)	0.50 µl	المشرع الهابط للمايكوبلازما الانتانية الدجاجية
MS F (20 pmole/µl)	0.50 µl	المشرع الصاعد للمايكوبلازما الزلالية
MS R (20 pmole/µl)	0.50 µl	المشرع الهابط للمايكوبلازما الزلالية
Taq (5 U/µl)	0.25 µl	انزيم البلمرة لحمض دنا
$MgCl_2$	2.00 µl	كلوريد المغنزيزم
H2O Ultra-pure	3٤.75 µl	ماء نقي معقم وخالي من الدنا
Template DNA	5.00 µl	مرصاف الدنا

وتم استخدام شاهد سلبي وشاهد ايجابي مع كل مجموعة مختبرة بعد ذلك تم وضع الأنابيب في المدور الحراري Termocycler (TechNE TC- 512) وتم تشغيل الجهاز بعد إعداد البرنامج الخاص بتضخيم المايكوبلازما الانتانية الدجاجية والزلالية وفقاً لـ (OIE, 2008).

الجدول رقم ٢: برنامج المدور الحراري للكشف عن المايكوبلازما الانتانية الدجاجية والمايكوبلازما الزلالية

المرحلة	درجة الحرارة	المدة	عدد الدورات
Initial Denaturation	94م	2 دقيقة	1
Denaturation	94م	30 ثانية	40 دورة
Annealing	55 م	30 ثانية	
Extension	72 م	1 دقيقة	
Final-Extension	72 م	1 دقائق	1 دورة

تم الكشف عن نواتج تفاعل البلمرة المتسلسل بالرحلان الكهربائي في هلامة الأغاروز ٢% (Peq gold universal No. 2) والمضاف له صبغة الإثيديوم بروميد بتركيز ١ ميكروغرام/مل في دارئة TBE(Tris borate EDTA) من شركة تاكارا. بعد الرحلان لمدة ساعة وجهد كهربائي ثابت ١٠٠ فولت، نقلت هلامة الأجاروز الى نظام التظهير بالأشعة فوق البنفسجية (UVipro Platinum) المزود بكاميرة فيديو ومرشحة خاصة بالأشعة فوق البنفسجية وموصلة بجهاز كمبيوتر وطابعة حرارية. وفحصت الصور من اجل وجود أنطقة دنا (DNA Band) ذات حجم ٢٠٧ قاعدة آزوتية للمايكوبلازما الزلالية و١٨٥ قاعدة أزوتية للمايكوبلازما الانتانية الدجاجية وذلك مقارنةً مع معلم الوزن الجزيئي (100 bp DNA Ladder, PeqLab).

RESULTS
النتائــج

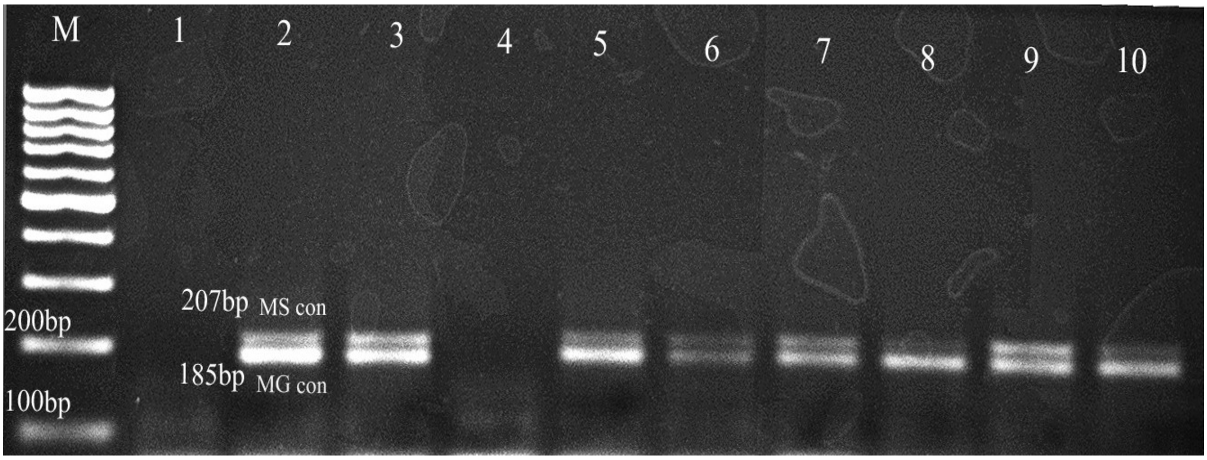
أظهرت نتائج اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل المتعدد المستخدم في هذه الدراسة في الكشف عن المايكوبلازما الانتانية الدجاجية والمايكوبلازما الزلالية عند أمات دجاج اللحم في محافظة حماة أن ١٢٨ عينةً (٦٣%) من أصل ٢٠٣ عينات أخذت من طيور تعاني من أعراض تنفسية حددت على أنها مصابة بهذين النوعين من المايكوبلازما (بعضها إصابة بنوع واحد والبعض بالنوعين معاً)، حيث أظهرت نتائج الاختبار أن عدد العينات التي تم تحديد المايكوبلازما الانتانية الدجاجية بشكل مفرد بلغ ٥٣ عينة (٢٦%) بينما بلغ عدد العينات المحددة فيها المايكوبلازما الزلالية بشكل مفرد ٩ عينات (٤%)، وعدد العينات المحدد فيها العدوى المختلطة بالمايكوبلازما الزلالية والمايكوبلازما الانتانية الدجاجية معاً بلغ ٦٦ عينة (٣٣%)، وكان مجموع الطيور المصابة بالمايكوبلازما الانتانية الدجاجية ١١٩ طيراً (عدوى مفردة وعدوى مختلطة) وبلغ انتشار الإصابة بين الطيور المدروسة ٥٩% وعدد الطيور المصابة بالمايكوبلازما الزلالية ٧٥ طيراً (إصابة مفردة ومختلطة) وبلغ انتشار الإصابة بالمايكوبلازما عند طيور الدراسة ٣٧%. في حين أظهرت النتائج أن عدد القطعان المصابة بهذين النوعين من المايكوبلازما بلغ ٢٧ قطيعاً (٩٣%) (إصابة مفردة ومختلطة) من أصل ٢٩ قطيعاً جمعت منها العينات، حيث كان ٢٥ قطيعاً مصاباً بالمايكوبلازما الانتانية الدجاجية وبلغ معدل انتشار الإصابة بالمايكوبلازما الانتانية الدجاجية ٨٦% و كما أظهرت النتائج أن عدد القطعان المصابة بالمايكوبلازما الزلالية ١٨ قطيعاً وانتشارها بين القطعان بلغ ٦٢%. والجدول رقم (٣) و(٤) يوضح النتائج بالتفصيل وتوضح الصورة رقم (١)،(٢)،(٣) نتائج الاختبار للكشف عن المايكوبلازما الانتانية الدجاجية والمايكوبلازما الزلالية.

الجدول رقم ٣ : نتائج اختبار PCR لانتشار المايكوبلازما الانتانية الدجاجية والمايكوبلازما الزلالية في العينات المأخوذة من أمات دجاج اللحم في محافظة حماة خلال الفترة الممتدة بين مايو ٢٠١١ ومايو ٢٠١٢.

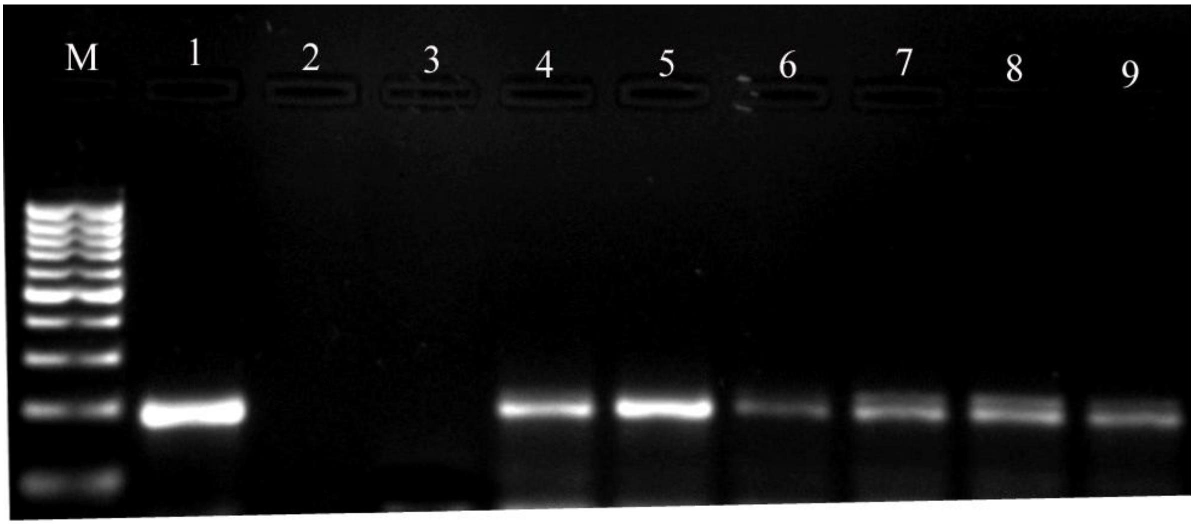
العامل الممرض	العينات الايجابية لاختبار الـPCR		العينات السلبية لاختبار الـPCR	
	العدد	النسبة المئوية	العدد	النسبة المئوية
مايكوبلازما انتانية دجاجية	53	26	150	74
مايكوبلازما زلالية	9	4.4	194	96
عدوى مختلطة	66	33	137	67
مجموع م.الانتانية الدجاجية	119	59	84	41
مجموع م. الزلالية	75	37	128	63

الجدول رقم ٤ : نتائج اختبار PCR لانتشار المايكوبلازما الانتانية الدجاجية والمايكوبلازما الزلالية في قطعان أمات دجاج اللحم في محافظة حماة خلال الفترة الممتدة بين مايو ٢٠١١ ومايو ٢٠١٢.

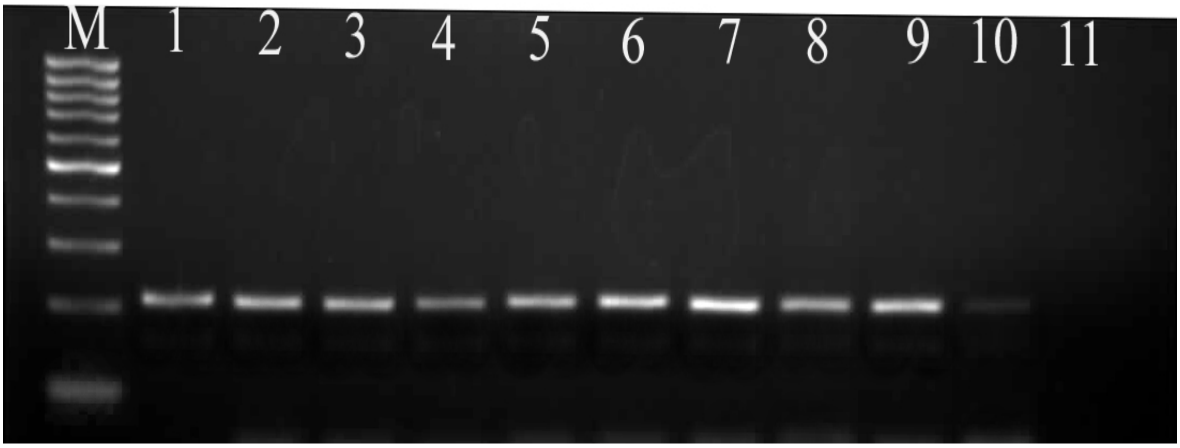
العامل الممرض	القطعان الايجابية لاختبار الـPCR		القطعان السلبية لاختبار الـPCR	
	العدد	النسبة المئوية	العدد	النسبة المئوية
مايكوبلازما انتانية دجاجية	9	31	20	69
مايكوبلازما زلالية	2	7	27	93
عدوى مختلطة	16	55	13	45
مجموع م. الانتانية الدجاجية	25	86	4	14
مجموع م. الزليلية	18	62	11	38



الصورة رقم ١: نتائج الفحص المباشر للمسحات الرغامية للطيور المشتبهة باستخدام اختبار الـPCR المتعدد، يشير العمود M إلى معلم الوزن الجزئي (100 bp DNA Ladder)، يشير العمود ١ إلى الشاهد السلبي، يشير العمود ٢ إلى الشاهد الإيجابي، يشير العمود ٣ والأعمدة ٥-١٠ إلى إصابة مختلطة بالمايكوبلازما الزلالية والمايكوبلازما الانتانية الدجاجية والعمود رقم ٤ نتيجة سلبية.



الصورة رقم ٢: نتائج اختبار الـPCR المتعدد حيث يشير العمود M إلى معلم الوزن الجزئي(100 bp DNA Ladder)، يشير العمود ١ إلى الشاهد الإيجابي للـ MG(185bp) والعمود ٢ شاهد سلبي ، العمود ٣ نتيجة سلبية ، تشير الأعمدة ٤-٦ إصابة مفردة بـ MG وتشير الأعمدة ٧-٩ إلى إصابة مختلطة بـ MS,MG.



الصورة رقم ٣: نتائج اختبار الـPCR للمسحات الرغامية للطيور المشتبهة، يشير العمود M إلى معلم الوزن الجزئي (100 bp DNA Ladder)، العمود ١ يشير إلى الشاهد الايجابي وتشير الأعمدة ٢-١٠ إلى الإصابة بـ MS(207 bp) والعمود ١١ يشير إلى الشاهد السلبي.

DISCUSSION
المناقشة

تعتبر المايكوبلازما (المفطورات) وخصوصاً المايكوبلازما الانتانية الدجاجية والمايكوبلازما الزلالية ممرضات طيرية هامة تسبب أمراضاً تنفسيةً ومفصليةً عند قطعان الدجاج التجارية، وينتج عنها خسـائر اقتصاديـة كبيرة في صناعـة الدواجن في معظم أنحاء العالم (OIE, 2008; Buim *et al.*, 2009). عادة يتم تشخيص الإصابات التي تسببها المايكوبلازما الانتانية الدجاجية والمايكوبلازما الزلالية بطرق مختلفة منها الكشف عن الأضداد النوعية للمايكوبلازما المسببة للإصابة باستخدام الاختبارات المصلية مثل اختبار التراص السريع على الصفيحة واختبار منع التلازن الدموي واختبار الأليزا (Kempf, 1998; OIE, 2008)، يتم الرجوع إلى زرع وعزل المايكوبلازما واختبار PCR لتأكيد التشخيص المصلي (Kleven, 1997; OEI, 2008) ولكن زرع وعزل المايكوبلازما يستغرق وقتاً طويلاً، علاوة على أنه يكون غير مجدٍ أحياناً بسبب النمو الغزير للجراثيم االملوثة أو بسبب وجود عوامل تمنع نمو المايكوبلازما مثل المعالجة بالمضادات الحيوية (Kempf *et al.*, 1997; Salisch *et al.*, 1998; Mekkes and Feberwee, 2005)، كما أن الاختبارات المصلية يمكن أن تكون مرتبطة بإصابات متقدمة ويمكن حدوث تفاعلات تصالبية ولانوعيـة مع أنواع أخرى من المايكوبلازما غير الممرضة مما يؤدي إلى الحصول على نتائج ايجابية كاذبة لتشخيص الإصابـة (Kleven *et al.*, 1996; Kempf *et al.*, 1997). تتميز تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل PCR بحساسية عالية وسرعة في الانجاز كل ذلك جعلها أكثر استعمالاً للكشف ومراقبة إصابة المايكوبلازما الانتانية الدجاجية والمايكوبلازما الزلالية (Garcia *et al.*, 2005; Gharaibeh and Roussan, 2008). ويمكن من خلال هذه التقنية الكشف عن الحمض النووي لأكثر من نوع من أنواع المايكوبلازما بواسطة اختبار PCR المتعدد وتشخيص إصابات المايكوبلازما عند قطعان الدجاج التجاري (Wang *et al.*, 1997; Buim *et al.*, 2009). لذا فقد هفت هذه الدراسة إلى استخدام اختبار PCR في الكشف المباشر عن إصابات المايكوبلازما الانتانية الدجاجية والزلالية عند أمات دجاج اللحم في محافظة حماة من سورية لما تسببه من خسائر اقتصادية وخطورة انتقالها الى نسل هذه القطعان.

أشارت نتائج هذه الدراسة إلى انتشار مرتفع للمايكوبلازما (الانتانية الدجاجية والزلالية) في القطعان التى تم فحصها وبنسبة ٩٣%، مع سيادة المايكوبلازما الانتانية الدجاجية فقد بلغ انتشارها بين القطعان ٨٦% بينما بلغ انتشار المايكوبلازما الزلالية ٦٢% في قطعان أمات دجاج اللحم التي تعاني من مشاكل تنفسية. ووفقاً لنتائج هذه الدراسة على العينات، وبدون الاهتمام بالقطيع التي تنتمي إليها طيور الدراسة ، فإن وجود المايكوبلازما ، قد برهن أو أكد بحدوث عالٍ : ٦٣% ووفقاً لنتائج هذه الدراسة على القطعان وعلى طيور الدراسة فقد أشارت هذه النتائج إلى أن المايكوبلازما تنتشر بشكل واسع بين طيور وقطعان أمات دجاج اللحم التى تم فحصها. مما سبق يمكن تفسير الانتشار المرتفع لداء المايكوبلازما بين قطعان وطيور الدراسة إلى الانتقال الأفقي للمايكوبلازما الانتانية الدجاجية والمايكوبلازما الزلالية بين الطيور لنفس القطيع. وإذا أخذنا بعين الاعتبار خصائص الانتشار أو الانتقال العمودي للمرض والمصرح به سابقاً من قبل (Christensen *et al.,* 1994; Bradbury, 2001). فإن الانتشار المرتفع للمايكوبلازما في قطعان أمات دجاج اللحم يمكن أن يكون بسبب الطرح أو النشر المستمر للمسبب في مزارع الدواجن التجارية التي تتسلم الصيصان أو الكتاكيت، مما يؤدي إلى انتشار المرض وترتفع الخسائر الاقتصادية. إضافة إلى عوامل أخرى مساعدة ومهيئة للمرض والمتضمنة مقاومة المضادات الجرثومية من قبل العامل المسبب وآلية تملص المايكوبلازما من الجهاز المناعي للمضيف. حيث يمكن أن تبقى المايكوبلازما لفترات طويلة في الطيور المصابة، مما يؤدي إلى إصابة قطعان جديدة قادمة إلى المزارع (Buim *et al.,* 2009).

وعند مقارنة نتائج هذه الدراسة مع نتائج الدراسات المنشورة والتي أجريت على قطعان الدجاج التجارية نجد أن انتشار داء المفطورات في هذه الدراسة كان مرتفعاً فقد بلغ ٩٣% مع سيادة المايكوبلازما الانتانية الدجاجية حيث بلغ انتشارها عند قطعان الدراسة ٨٦% وقد كانت هذه النسبة أعلى مما توصل إليه (Buim *et al.,* 2009) فقد ذكروا بأن انتشار الإصابة بالمفطورة الزلالية والمايكوبلازما الانتانية الدجاجية في نتائج دراستهم بلغ ٧٢.٧٢% مع سيادة المايكوبلازما الزلالية (٦٠.٦%) وهذه النتيجة متقاربة مع انتشار المايكوبلازما الزلالية عند القطعان في هذه الدراسة حيث بلغ ٦٢%.

كما أظهرت نتائج هذه الدراسة بأن انتشار المايكوبلازما الانتانية الدجاجية عند القطعان التى تم فحصها بلغ ٨٦% هو أعلى مما توصل إليه (Kahya *et al.,* 2010) حيث ذكروا بأن انتشار المايكوبلازما الانتانية الدجاجية في نتائج دراستهم بلغ ٢٩% وقد يكون السبب في ذلك هو تطبيق طرق وقائية عند القطعان التى تم فحصها لديهم مثل استخدام التحصين والتشخيص المبكر للمرض والتخلص من القطعان المصابة بينما لم تطبق مثل هذه الإجراءات في قطعان هذه الدراسة وغالباً يتم تشخيص الإصابات عند قطعان دجاج التربية بشكل متأخروتقتصر الإجراءات المطبقة على المعالجة بالمضادات الحيوية.

وإذا قارنا انتشار الإصابة بالمايكوبلازما الزلالية والمايكوبلازما الانتانية الدجاجية بالنسبة لعينات الدراسة أو طيور الدراسة بغض النظر عن القطعان التي تنتمي إليها العينات فقد بلغ ٥٩% و ٣٧% على التوالي نجد أن هذه النتيجـة كانت قريبـة إلى حدٍ ما مع ما توصل إليه (Roussan *et al.,* 2011) في نتائج دراستهم لتحديد نسبة انتشار الإصابة بالمايكوبلازما الزلالية عند قطعان دجاج اللحم باستخدام PCR في الأردن فقد بلغت لديهم ٤٠%. وكان انتشار المايكوبلازما في نتيجة هذه الدراسة على مستوى العينات أعلى مما توصل إليه (Pourbakhsh *et al.,* 2010) في نتائج دراستهم التي أجروها في محافظة طهران في إيران لكشف الإصابة بالمايكوبلازما الزلالية في مزارع دجاج اللحم فقد بلغت نسبة الإصابة لديهم ٢٥.٧%. كما كان انتشار الإصابة بالمايكوبلازما الانتانية الدجاجية في هذه الدراسة أقل مما توصل إليه (Kahya *et al.,* 2010) في نتائج دراستهم التي أجروها في تركيا للكشف عن الإصابة بالمايكوبلازما الانتانية الدجاجية عند قطعان دجاج التربية باستخدام اختبار تفاعل البلمرة المتسلسل ذي الوقت الحقيقي Real-time PCR فقد بلغ لديهم ٦٨% (٥١ عينة ايجابية للاختبار من أصل ٧٥ عينة) وقد يكون السبب في ذلك أنهم استخدموا اختبار Real-time PCR وهو أكثر حساسية من اختبار الـPCR المستخدم في هذه الدراسة. أظهرت نتيجة هذه الدراسة بأن اختبار الـPCR سريع ومفيد للتشخيص المباشر للعينات الحقلية للقطعان المشتبة بأن لديها إصابة بالمايكوبلازما الانتانية الدجاجية والزلالية وننصح باستخدام هذه التقنية في الكشف المبكر عن إصابات المايكوبلازما عند قطعان دجاج التربية.

REFERENCES

Bradbury, J.M. (2001): Avian Mycoplasmosis. In: Poultry Diseases.5th ed. Jordan.D. and Raragher T. EDS. W.b. Sanders London, UK, 178-193.

Buim, M.R.; Mettifogo, E.; Timenetsky, J.; Kleven, S.; Antonio, J. and Ferreira, P. (2009): Epidemiological survey on Mycoplasma gallisepticum and M. synoviae by multiplex PCR in commercial poultry. Pesq. Vet. Bras. 29(7): 552-556.

Christensen, NH.; Yavari, CA.; Mc Bain, AJ. and Bradbury, JM. (1994): Investigation into the survival of Mycoplasma gallisepticum, Mycoplasma synoviae and Mycoplasma iowae on materials founds in poultry house environment. Avian pathol., 23: 127-143.

Fan, H.H.; Kleven, S.H.; Jackwood, M.W.; Johansson, K.E.; Pettersson, B. and Levisohn, S. (1995): Specks identification of avian mycoplasmas by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism assay. Avian Dis., 39: 307–398.

Garcia, M.; Ikuta, N.; Levisohn, S. and Kleven, S.H. (2005): Evaluation and comparison of various PCR methods for detection of Mycoplasma gallisepticum infection in chickens. Avian. Dis., 49: 125-32.

Gharaibeh, S. and Roussan, D.Al (2008): The Use of Molecular Techniques in Isolation and Characterization of Mycoplasma gallisepticum from Commercial Chickens in Jordan. Int. J. Poult. Sci., 7: 28–35.

Kahya, S.A.; Temelli, S.b.; Eyigor, A.b. and Carli, T.K.a. (2010): Real-time PCR culture and serology for the diagnosis of Mycoplasma gallisepticum in chicken breeder flocks. VET MIC. 4758 1–6.

Kempf, I. (1998): DNA amplification methods for diagnosis and epidemiological investigations of avian mycoplasmosis. Avian Pathol., 27: 7–14.

Kempf, I.; Gesbert, F. and Guittet, M. (1997): Experimental infection of chickens with an atypical Mycoplasma gallisepticum strain: comparison of diagnostic methods. Res. Vet. Sci. 63, 211–213.

Kleven, S.H. (1997): Changing expectations in the control of Mycoplasma gallisepticum. Acta Vet. Hung. 45, 299–305.

Kleven, S.H. (2003): Mycoplasma synoviae infection. In Y.M. Saif (Ed.), Diseases of Poultry, 11th edn (pp. 756 _/766). Ames: Iowa State University Press.

Kleven, S.H.; Jordan, F.T.W. and Bradbury, J.M. (1996): Avian Mycoplasmosis (Mycoplasma gallisepticum). In: Reichard, R. (Ed.), Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. Office International Des Epizootics, Paris, France, pp. 512–521.

Ley, D.H. (2003): Mycoplasma gallisepticum Infection. In: Saif, Y.M., H.J. Barnes, J.R. Glisson, A.M. Fadly, L.R. McDougald and D.E. Swayne (Eds.). Diseases of Poult., 11th Edn. Iowa State Press, Ames, Iowa., pp:722-744.

Liu, T.; Garcia, M.; Levisohn, S.; Yogev, D. and Kleven, S. (2001): Molecular variability of the adhesion-encoding Gene pvpA among Mycoplasma gallisepticum strains and its application in diagnosis. J. Clin. Microbiol., 39: 1882-1888.

Mekkes, D.R. and Feberwee, A. (2005): Real-time polymerase chain reaction for the qualitative and quantitative detection of Mycoplasma gallisepticum. Avian Pathol. 34, 348–354.

OIE (2008): Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, sixth ed. International des Epizooties (World Organization for Animal Health), Paris, p.486 (ISBN92-9044-510-6).

Pourbakhsh, S.A.; Shokri1, G.R.; Banani1, M.; Elhamnia, F. and Ashtari1, A. (2010): Detection of Mycoplasma synoviae infection in broiler breeder farms of Tehran province using PCR and culture methods. Archives of Razi Institute, Vol. 65, No. 2, 75-81.

*Roussan, D.A.; Al-Rifai, R.H.; Khawaldeh, G.Y.; Totanji, W.S. and Shaheen, I(2011):*Ornithobacteriumrhinotracheale and Mycoplasma synoviae in broiler chickens in Jordan. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 30 (3); 931-937.

Salisch, H.; Hinz, K.H.; Graack, H.D. and Ryll, M. (1998): A comparison of a
commercial PCR-based test to culture methods for detection of Mycoplasma gallisepticum and Mycoplasma synoviae in concurrently infected chickens. Avian Pathol. 27, 142–147.

Wang, H.; Fadl, A.A. and Khan, M.I (1997): Multiplex PCR for avian pathogenic mycoplasmas. Mol. Cell. Probes, 11: 211–216.

Yamamoto, R. (1991): Mycoplasma meleagridis infection. In B.W. Calnek, C.W. Beard, H.J. Barnes, W.M. Reid & H.W. Yoder Jr (Eds). Diseases of Poultry, 9th edn. (pp. 212-223).

Yoder, H.W.Jr (1991): Mycoplasma gallisepticum infection. In B.W.
Calnek, C.W. Beard; H.J. Barnes, W.M. Reid and H.W. Yoder Jr (Eds): Diseases of Poultry, 9th edn. (pp. 198-212) Ames: Iowa State University Press.