13(4) 97-102, Winter 2022

Journal of Animal Environment

(AEJ)

Journal homepage: http://www.aejournal.ir

Original Research Paper

Concurrent infection of *Avibacterium paragalinarum* and *Escherichia coli* in layers with Swollen Head Syndrom (SHS) in Isfahan province

Seyed Mohammad Javad Mirbagheri, Majid Gholami Ahangaran*

Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

Key Words

Avibacterium paragalinarum
SHS
layer

Abstract

Introduction: To investigating the role of *Avibacterium paragalinarum* (AP) in the development of Swollen head syndrome (SHS) in commercial and traditional layers in Isfahan province, 23 laying hen farms with signs of head swelling and mortality were sampled from the suborbital sinus. In addition, swabs were prepared from 20 traditional and commercial laying hen farms with respiratory symptoms and SHS.

Materials & Methods: Samples were cultured on specific media for isolation *Escherichia coli* (*E. coli*) and AP and approved by biochemical examination. After genome extraction, AP was detected with specific primers. Microbiological results showed that out of 23 samples, 14 samples (60.86%) were infected with AP and 21 samples (91.3%) were infected with *E. coli.*

Result: The results of direct detection of AP in suborbital sinus swabs that prepared from 23 dead laying hens with coryza symptoms showed the amplification of 500 bp fragment in 19 samples of suborbital sinus swabs (82.6%). Also, the rate of infection in live birds was less than the dead hens.

Conclusion: It seems that the sampling site can play role in the rate of infection and possibly the occurrence of false negatives. Therefore, due to the high frequency of AP infection in hens with SHS, it seems that a regular and public vaccination program should be applied to control *Avibacterium paragalinarum* in laying hens.

* Corresponding Author's email: mgholami6@gmail.com

Received: 22 October 2020; Reviewed: 22 December 2020; Revised: 24 January 2021; Accepted: 28 March 2021

(DOI): 10.22034/AEJ.2021.269542.2453

مقاله پژوهشی

عفونت هم‌زمان *اوی باکتریوم پاراگالیناروم* و *اشریشیاکلی* در موارد سندرم تورم سر در مرغ‌های تخم‌گذار در استان اصفهان

سیدمحمدجواد میرباقری، مجید غلامی‌آهنگران*

بخش علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

کلمات کلیدی

اوی باکتریوم پاراگالیناروم
سندرم تورم سر
مرغ تخم‌گذار

چکیده

مقدمه: به‌منظور بررسی نقش اوی باکتریوم پاراگالیناروم در ایجاد سندرم تورم سر و صورت در مرغ‌های تخم‌گذار صنعتی و سنتی در استان اصفهان، از ۲۳ فارم مرغ تخم‌گذار با علایم تورم سر و تلفات، از ناحیه سینوس زیر چشمی نمونه‌برداری شد. علاوه براین، از ۲۰ فارم مرغ تخم‌گذار صنعتی و سنتی با علایم تنفسی و تورم سر از شکاف کامی سواب تهیه شد.

مواد و روش‌ها: نمونه‌ها به‌منظور بررسی آلودگی با اشریشیاکلی و اوی باکتریوم پاراگالیناروم، بر روی محیط‌های اختصاصی کشت شد و با تست‌های بیوشیمیایی، اشریشیاکلی و اوی باکتریوم پاراگالیناروم جدا شد. پس از استخراج ژنوم، با پرایمرهای اختصاصی به ردیابی اوی باکتریوم پاراگالیناروم پرداخته شد.

نتایج: نتایج میکروبیولوژی نشان داد از ۲۳ نمونه ۱٤ نمونه (٦۰/۸٦ درصد) آلوده به اوی باکتریوم پاراگالیناروم و ۲۱ نمونه (۹۱/۳ درصد) آلوده به اشریشیاکلی بود. نتایج ردیابی مستقیم باکتری اوی باکتریوم پاراگالیناروم در سواب‌های سینوسی تهیه شده از ۲۳ مورد تلفات مربوط به‌علایم کوریزا نشان‌دهنده تکثیر قطعه ۵۰۰ جفت بازی در ۱۹ نمونه سواب سینوسی بوده است (۸۲/٦ درصد). این فراوانی در طیور سنتی ۹۲/۳ درصد (۱۲ نمونه از ۱۳ نمونه تجمعی) و در طیور صنعتی ۷۰ درصد (۷ نمونه از ۱۰ نمونه تجمعی) برآورد گردید. هم‌چنین میزان آلودگی در مرغان زنده به‌مراتب کم‌تر از تلفات ارزیابی شد.

نتیجه‌گیری و بحث: به‌نظر می‌رسد محل نمونه‌گیری می‌تواند در میزان آلودگی و احتمالاً بروز موارد منفی کاذب نقش داشته باشد. لذا با توجه به‌فراوانی آلودگی به اوی باکتریوم پاراگالیناروم در موارد سندرم تورم سر در مرغان تخم‌گذار به‌نظر می‌رسد باید برنامه واکسیناسیون همگانی و منظم برای کنترل اوی باکتریوم پاراگالیناروم در مرغان تخم‌گذار اعمال شود.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: mgholami6@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱ آبان ۱۳۹۹؛ تاریخ داوری: ۲ دی ۱۳۹۹؛ تاریخ اصلاح: ۵ بهمن ۱۳۹۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۰ اسفند ۱۳۹۹
(DOI): 10.22034/AEJ.2021.269542.2453

مقدمه

سندرم تورم سر یک بیماری تنفسی است که عمدتاً قسمت‌های فوقانی دستگاه تنفس مبتلا می‌شود و با تورم سینوس‌های اطراف چشم و زیر چشم مشخص می‌شود. در اکثر طیور مبتلا، علائم تنفسی به شکل عطسه و آبریزش از چشم و بینی دیده می‌شود و سپس علایم التهاب در نواحی اطراف چشم گسترش پیدا می‌کند و تمام صورت را فرا می‌گیرد. در این حالت ممکن است التهاب و تورم پلک نیز منجر به‌چسبندگی پلک‌ها شود (۱). سندرم تورم سر یک بیماری چندعاملی است که به‌نظر می‌رسد ویروس‌ها در ایجاد آن نقش اولیه داشته باشند اما اتیولوژی اولیه آن نامشخص است. عوامل عفونی و محیطی در ایجاد و تشدید آن موثر است. در این سندرم عوامل مختلف عفونی نقش دارند که در بیش‌تر مواقع به‌شکل اولیه اشریشیاکلی جداسازی شده است (۲). قبلاً سندرم تورم سر به‌صورت یک التهاب اگزوداتیو نواحی زیرپوستی سر و صورت در پاسخ به‌باکتری اشریشیاکلی تعریف شده‌است (۳). علاوه‌براین، پنومو‌ویروس، ویروس عامل بیماری نیوکاسل، مایکوپلاسماها، کروناویروس عامل بیماری برونشیت عفونی، عفونت‌های آدنوویروسی و حتی *اوی باکتریوم پاراگالیناروم* در این سندرم نقش دارند. هم‌چنین فاکتورهای محیطی مانند تراکم بالا، میزان بالای آمونیاک و تهویه ضعیف تشدیدکننده این وضعیت هستند (۱). بیماری کوریزای عفونی یک بیماری واگیردار در صنعت پرورش طیور مخصوصا در گله‌های تخم‌گذار تجاری است که توسط *اوی باکتریوم پاراگالیناروم* ایجاد می‌شود. عامل این بیماری معمولاً بافت پوششی دستگاه تنفس فوقانی را مبتلا کرده و عوارضی مانند تورم سر و صورت، عطسه، سرفه، آبریزش از چشم و بینی، تورم سینوس‌ها و التهاب پلک‌ها را نشان می‌دهد (۴). عامل بیماری باکتری از خانوده باکتری‌های گرم‌منفی است که در مقابل دما و مواد ضدعفونی کننده بسیار حساس است اما در فارم‌های چند سنی و فارم‌هایی که از نظر بهداشتی و مدیریتی ضعیف باشند به‌عنوان یک مشکل اساسی شناخته می‌شود که رهایی از آن دشوار است (۵). عامل بیماری واگیری بالایی دارد (تا ۱۰۰ درصد) و بسیار سریع (در عرض ۲ تا ۳ روز) ایجاد علایم تنفسی می‌کند اما تلفات کمی دارد و در شرایط عادی تا ۱۰ درصد تلفات نشان می‌دهد (۱). مشکل اصلی در فارم های آلوده به *اوی باکتریوم پاراگالیناروم*، کاهش تولید (۵ تا ۱۰٪)، و عقب‌افتادگی از رشد است به‌طوری‌که ممکن است در فارم های مبتلا به‌کوریزای عفونی سایر اجرام بیماری‌زا نیز دیده شود و تلفات افزایش یابد (۶). مرغ‌های مسن نسبت به این بیماری حساس‌ترند، ولی بیماری در کبوتر، گنجشک، اردک، کلاغ، بوقلمون، خرگوش و خوکچه و موش دیده شده است (۷). عواملی موجب شدید و طولانی‌شدن بیماری می‌باشد که شامل آلودگی باویروس لارنگوتراکئیت، پاستورلوز، استرس سرمایی و بستر مرطوب می‌باشند که گاهی این عوامل زمینه را برای ایجاد بیماری فراهم می‌کنند (۸). نشانه‌های اصلی بیماری شامل تورم سینوس‌ها و مجاری تنفس و ورم ملتحمه چشم، آماس، تورم صورت است (۹). با انجام واکسیناسیون به‌موقع با واکسن غیرفعال شده می‌توان از واگیری و ایجاد خسارت و حتی کاهش تولید طیور تخم‌گذار در بیماری کوریزای عفونی جلوگیری کرد. خوشبختانه واکسن کویزای عفونی در نزدیک شروع تولید در گله های تخم‌گذار به‌شکل تزریقی استفاده می شود و محافظت قابل قبولی ایجاد می‌کند (۴). با این حال، در فارم‌های با وضعیت بهداشتی نامناسب و هم‌چنین در طیور تخم‌گذار خانگی به‌کرات این بیماری مشاهده گردیده است (۹). از آن‌جایی‌که طیور خانگی می‌توانند در بقای باکتری در محیط نقش داشته باشند و به‌عنوان مخزن باکتری شناخته می‌شوند لازم است شناسایی این باکتری در موارد مشکوک اثبات شود سپس برنامه‌های واکسیناسیون مناسب علیه آن‌ها جهت کنترل این بیماری انجام شود. علاوه برآن با توجه به‌شواهد بالینی مبنی بر فراوانی موارد سندرم تورم سر در فارم‌های تخم‌گذار و از طرفی نقش عوامل مختلف ویروسی و باکتریایی در رخداد این سندرم، به‌نقش کوریزای عفونی در ایجاد این سندرم کم‌تر توجه شده و مطالعه‌ای درخصوص سهم میزان آلودگی این عامل در رخداد تورم سر و صورت تاکنون در استان اصفهان انجام نشده است. در همین راستا در مطالعه اخیر با نمونه‌گیری از سینوس زیر چشمی پرندگان تلفات شده با علایم تورم سر و صورت و نیز با نمونه‌گیری از شکاف کامی پرندگان زنده با علایم تورم سر و صورت به شناسایی این عامل پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری: در فاصله زمانی بهار ۱۳۹۸ تا بهار ۱۳۹۹ به‌مدت یک‌سال به‌طور تصادفی از فارم‌های صنعتی و سنتی طیور تخم‌گذار در استان اصفهان با علایم تورم سر و صورت نمونه‌گیری شد. در این مدت، از ۲۳ فارم با تلفات (۱۰ فارم صنعتی و ۱۳ مرغداری سنتی) و ۲۰ فارم بدون تلفات و صرفاً مبتلا به تورم سر (۱۰ فارم صنعتی و ۱۰ مرغداری سنتی) نمونه‌گیری شد (جدول ۲). پرندگان نمونه‌گیری شده همگی علایم بارز تورم سر و صورت به‌همراه تورم سینوس چشمی، تورم ملتحمه و بعضاً چسبندگی پلک‌ها به هم‌دیگر، ترشحات کف‌آلود در چشم، آبریزش از چشم و بینی به‌همراه علایم تنفسی را نشان می‌دادند. در موارد تلفات صرفاً تهیه سواب از ترشحات تجمع یافته در سینوس‌های هر پرنده بود که از هر فارم ۵ نمونه اخذ شده و همگی به‌شکل تجمع یافته (پول) مورد آزمایش و بررسی قرار

گرفتند. از پرندگان زنده مبتلا نیز سواب‌ها از شکاف کام و ترشحات بینی تهیه شد و نمونه‌های هر فارم به‌شکل پول مورد ارزیابی قرار گرفت. سواب‌ها جهت کشت میکروبی در پپتون واتر نگه‌داری شد و برای ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد و سری دیگر جهت استخراج ژنوم مورد استفاده قرار گرفت.

جداسازی اوی *باکتریوم پاراگالیناروم*: سواب‌ها به‌شکل خطی بر روی آگار خون‌دار کشت داده‌شد و از *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌عنوان دهنده نیکوتین‌آمید آدنین استفاده شد. پلیت‌ها در جار بی‌هوازی به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. کلنی‌های رشد یافته ریز شبنمی از نظر رنگ‌آمیزی گرم زیر میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت و تست‌های بیوشیمیایی تکمیلی شامل تست کاتالاز، تخمیر قندها (گلوکز، گالاکتوز و ترهالوز)، احیای نیترات، تولیداندول و اوره‌آز انجام شد. *اوی باکتریوم پاراگالیناروم* برخلاف سایر گونه‌های *اوی باکتریوم* قادر به‌تولید کاتالاز نیست و نمی‌تواند قندهای گالاکتوز و ترهالوز را تخمیر کند. علاوه بر آن، از نظر تخمیر گلوکز مثبت است اما تولید گاز نمی‌کند. این باکتری از نظر احیای نیترات مثبت و ازنظر اوره آز و تولید اندول منفی است (۱).

جداسازی *اشریشیاکلی*: نمونه‌ها پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در محیط پیش‌مغذی، به‌محیط بلادآگار و مک‌کانگی منتقل شدند و با حضور پرگنه‌های لاکتوز مثبت مشکوک به *اشریشیاکلی* به‌محیط Eosin methylene blue (EMB) منتقل شدند. وجود پرگنه‌های با جلای فلزی حضور باکتری *اشریشیاکلی* را در نمونه‌ها تقویت کرد لذا برای اطمینان بیش‌تر تست IMViC برروی پرگنه‌های خالص شده انجام شد. الگوی تولید ایندول، احیای متیل رد، Voges-Proskauer (VP) و احیای سیترات به‌صورت مثبت، مثبت، منفی، منفی نشان‌دهنده حضور باکتری *اشریشیاکلی* در نمونه‌های مشکوک بود (۱۰).

فرآوری نمونه‌ها جهت ردیابی مولکولی: جهت انجام PCR مطابق روش ارائه شده توسط Chen و همکاران (۱۱) هرچه سریع‌تر نسبت به‌پردازش نمونه ها اقدام شد و ژنوم باکتری استخراج گردید. به‌این منظور سواب‌های تهیه‌شده در ۱ میلی‌لیتر سالین بافر فسفاته (PBS) قرار گرفت و حدود یک ساعت بعد در دور ۲۰۰۰ دوردردقیقه (rpm) به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس مایع رویی به‌لوله جدید منتقل شد و برای ۱۵ دقیقه در ۱۳،۰۰۰ دوردردقیقه (rpm) سانتریفیوژ شد. مایع رویی خارج شد و رسوب ته‌لوله در منهای ۲۰ درجه سانتی‌گراد تازمان انجام PCR ذخیره شد. برای استخراج ژنوم رسوب حاصله در ۲۰ میکرولیتر بافر لیزکننده حاوی ۰/۵ درصد Nonidet P-40 (آمپلیکون، آلمان)، ۰/۵ درصد محلول توئین ۲۰ (آمپلیکون، آلمان)، ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر پروتئین‌کیناز K (فرمنتاز، ایران) و محلول ۰/۱ مولار تریس قرار گرفت و در دمای ۵۶ درجه به‌مدت یک ساعت انکوبه شد. سپس نمونه‌ها در دمای ۹۸ درجه سانتی‌گراد برای ۱۰ دقیقه نگه‌داری شدند تا پروتئین‌کیناز غیرفعال گردد. نمونه‌ها بلافاصله بر روی یخ منتقل شدند و تا ۱۰ دقیقه در این حالت باقی ماند تا سریعاً سرد شود (۱۱).

آزمون PCR برای شناسایی *اوی باکتریوم پاراگالیناروم*: برای انجام آزمون PCR جهت تأیید تشخیص موارد کوریزای عفونی ناشی از *اوی باکتریوم پاراگالیناروم*، مطابق روش Chen و همکاران اقدام شد (۱۱، ۵). به‌این منظور PCR با حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر تنظیم گردید که شامل: بافر PCR (۵ میکرو لیتر)، (۵۰۰ میکرومول کلرید پتاسیم و ۲۰۰ میکرومول تریس هیدروکلراید)، داکسی نوکلئوتید تری فسفات‌ها (۰/۲ میلی‌مول)، کلرید منیزیم (۲ میلی‌مول)، هر یک از پرایمرها (۰/۴ میکرومول)، آنزیم *Taq* پلیمراز (۱/۲۵ واحد لیتر) (فرمنتاز)، DNA تهیه‌شده (یک میکرولیتر) بود. پرایمرهای اختصاصی *اوی باکتریوم پاراگالیناروم* مطابق توالی منتشرشده توسط Chen و همکاران (۵) سنتز شد که در جدول ۱ آمده است. این پرایمر قادر است محصول ۵۰۰ جفت بازی را از ژن هماگلوتینین *اوی باکتریوم پاراگالیناروم* تکثیر نماید. تکثیر ژن‌های هدف در دستگاه ترموسایکلر (اپندورف- آلمان) با برنامه حرارتی دناتوراسیون اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه و ۳۵ سیکل‌های حرارتی شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۵ ثانیه و مرحله گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه صورت گرفت. در این بررسی از نشانگر ۱۰۰ جفت بازی جهت مشخص نمودن اندازه باندها استفاده شد. در هر مرحله ۲۰ میکرومول از محصول PCR روی ژل ۱درصد آگارز واجد اتیدیوم بروماید در ولتاژ ثابت ۸۰ ولت به‌مدت ۳۰ دقیقه الکتروفورز و ژل حاصله با دستگاه تصویربردار ژل قرائت شد. در این مطالعه از واکسن غیرفعال کوریزای عفونی (هیپرا، اسپانیا) به‌عنوان کنترل مثبت و از آب دوبار تقطیر استریل و نیز کشت خالص *اشریشیاکلی* و *آسپرژیلوس فلاووس* به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد.

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت ردیابی *اوی باکتریوم پاراگالیناروم* (۵)

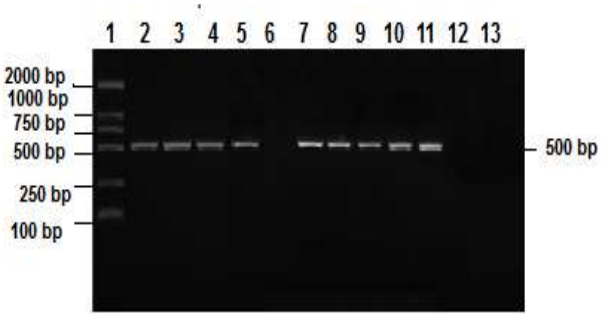
نام پرایمر	توالی پرایمر	اندازه محصول PCR (جفت بازی)
N1	5'-TGA GGG TAG TCT TGC ACG CGA AT-3'	۵۰۰
R1	5'-CAA GGT ATC GAT CGT CTC TCT ACT-3'	

نتایج

بررسی نتایج مربوط به‌جداسازی *اوی باکتریوم پاراگالیناروم* از سواب‌های سینوسی نشان داد از ۲۳ مورد کشت تهیه‌شده در ۱۴ مورد باکتری *اوی باکتریوم پاراگالیناروم* از لحاظ کشت میکروبی و تست‌های بیوشیمیایی مثبت ارزیابی گردید (۶۰/۸ درصد) که همگی در PCR مثبت‌ارزیابی‌شدند(جدول ۲). نتایج ردیابی مستقیم باکتری *اوی باکتریوم پاراگالیناروم* در سواب‌های سینوسی تهیه شده از ۲۳ مورد تلفات مربوط به علایم کوریزا نشان‌دهنده تکثیر قطعه ۵۰۰ جفت بازی در ۱۹ نمونه سواب سینوسی بوده است(۶/۰درصد).این فراوانی درطیور سنتی ۹۲/۳ درصد(۱۲ نمونه از ۱۳ نمونه تجمعی) ودرطیور صنعتی ۷۰ درصد (۷ نمونه از ۱۰ نمونه تجمعی) برآورد گردید. در پرندگان زنده با علایم کوریزا، قطعه ۵۰۰ جفت بازی در ۴ نمونه از ۱۰ نمونه تهیه شده از شکاف کام و ترشحات بینی طیور سنتی (۴۰ درصد) و ۲ نمونه از ۱۰ نمونه تهیه‌شده از شکاف‌کامی طیور صنعتی (۲۰ درصد) تکثیر شد (شکل ۱). در نمونه‌های گرفته شده از شکاف کام و ترشحات بینی پرندگان زنده در طیور سنتی فقط در ۳ نمونه (۳۰ درصد) *اوی‌باکتریوم پاراگالیناروم* همراه‌با *اشریشیاکلی* شناسایی شد. در تحقیق حاضر با استفاده از روش‌های میکروبیولوژی و بیوشیمیایی ۲۱ مورد باکتری *اشریشیا کلی* از ۲۳ مورد نمونه‌های پول شده از سواب‌های گرفته شده از سینوس پرندگان تلف‌شده (۹۱/۳۰٪)، جدا شد. آلودگی به *اشریشیاکلی* براساس رشدپرگنه‌های صورتی‌رنگ(لاکتوز مثبت) بر روی محیط مک کانکی و پرگنه‌های با جلا سبز فلزی بر روی EMB به‌انضمام تست مثبت تولید ایندول و احیای‌متیل رد و عدم احیای VP و سیترات (به‌صورت مثبت، مثبت، منفی، منفی) مشخص شد. از ۱۰ نمونه پول‌شده از طیور سنتی زنده‌ای که از شکاف کامی و ترشحات بینی نمونه کشت میکروبی تهیه شد فقط ۶ مورد آلودگی به *اشریشیاکلی* را نشان دادند (۶۰٪) درحالی‌که از طیور صنعتی باکتری *اشریشیاکلی* از شکاف کامی جدا نشد.بررسی عفونت هم‌زمان *اشریشیاکلی* و *اوی‌باکتریوم پاراگالیناروم* در تلفات نشان می‌دهد در ۱۸ نمونه آلودگی هم‌زمان *اشریشیاکلی* و *اوی باکتریوم پاراگالیناروم* (۷۸/۲۶ درصد) رخ داده است درحالی‌که فقط در ۳ نمونه *اشریشیاکلی* مثبت شده و *اوی باکتریوم* منفی (۱۳/۰۴ درصد) و در یک نمونه فقط *اوی باکتریوم* مثبت و *اشریشیا کلی* منفی (۴/۳۴ درصد) شده است. در این مطالعه فقط یک نمونه از نظر این دو باکتری منفی بود (۴/۳۴ درصد).

جدول ۲: فراوانی و میزان درصد آلودگی به *اوی باکتریوم پاراگالیناروم* در آزمون‌های کشت، PCR و PCR مستقیم از بافت

منشاء نمونه	نوع طیور (تعداد نمونه‌های تجمعی جمع‌آوری شده)	فراوانی در کشت (درصد)	فراوانی در PCRروی کشت خالص (درصد)	فراوانی در PCR مستقیم از بافت (درصد)
تلفات(سینوس‌زیر چشمی)	صنعتی (۱۰)	۵ (۵۰)	۶ (۵۰)	۷ (۷۰)
	سنتی (۱۳)	۹ (۶۹/۲)	۹ (۶۹/۲)	۱۲ (۹۲/۳)
زنده (شکاف کامی)	صنعتی (۱۰)	۲ (۲۰)	۲ (۲۰)	۲ (۲۰)
	سنتی (۱۰)	۳ (۳۰)	۳ (۳۰)	۴ (۴۰)



شکل ۱: ژل الکتروفورز مربوط به‌تکثیر قطعه ۵۰۰ جفت بازی *اوی باکتریوم پاراگالیناروم* (ستون ۱ مارکر، ستون ۲ تا ۴ نمونه مثبت از سواب شکاف کامی، ستون ۵ کنترل مثبت، ستون ۶ کنترل منفی آب دوبار تقطیر استریل، ستون ۷ تا ۱۱ نمونه‌های مثبت از سینوس زیرچشمی تلفات، ستون ۱۲ کنترل منفی *اشریشیاکلی* و ستون ۱۳ کنترل منفی *آسپرژیلوس فلاووس*)

بحث

نتایج مربوط به‌جداسازی و ردیابی *اوی باکتریوم پاراگالیناروم* از مرغ‌های تخم‌گذار تلف شده با علایم تورم سر و صورت نشان می‌دهد موارد ردیابی *اوی باکتریوم پاراگالیناروم* در تست مولکولی PCR به مراتب بیش‌تر از جداسازی باکتری باکشت مستقیم از ضایعات موجود در ناحیه سر و صورت است. به‌طوری‌که در این مطالعه، در ۵۰ و ۹۲/۳ درصد موارد نمونه‌گیری شده از مرغ‌های تخم‌گذار تلف شده با علایم تورم سر و صورت در فارم‌های پرورشی صنعتی و سنتی، ژنوم *اوی باکتریوم پاراگالیناروم* ردیابی شد حال آن‌که میزان جداسازی باکتری با کشت مستقیم از ضایعات به‌ترتیب ۵۰و ۶۹/۲ درصد بوده

است. در خصوص اختلاف در میزان شناسایی *اوی باکتریوم پاراگالیناروم* در روش‌های جداسازی و ردیابی، به‌نظر می‌رسد از آن‌جایی‌که این باکتری شدیداً حساس می‌باشد لذا در موارد کشت باکتریایی از تلفات ممکن است باکتری غیرفعال شده باشد و امکان رشد و تکثیر باکتری برروی محیط کشت فراهم نشود. از طرفی این باکتری برای رشد برروی محیط کشت بلاد نیاز به‌فاکتورهای مکمل مانند فاکتور V (NAD) به‌اندازه کافی دارد و از آن‌جایی‌که رشد بسیار آهسته دارد (حدود ۴۸ ساعت) لذا ممکن است در عفونت‌های مخلوط به‌راحتی با باکتری‌هایی که رشد سریع‌تری دارند پوشیده شود و از نظر پنهان بماند (۱۲). علاوه بر این، سویه‌های غیربیماری‌زا و فلور مانند *اوی باکتریوم اویوم* و *اوی باکتریوم وولانتینوم* نیز ممکن است در محیط رشد کنند که شناسایی گونه *پاراگالیناروم* را با مشکل مواجه می‌کند (۱۱). لذا با توجه به‌پیچیدگی‌های ذکر شده، ردیابی عامل کوریزای عفونی با روش‌های مولکولی توصیه می‌شود. در شناسایی عامل بیماری کوریزای عفونی، PCR روش بسیار حساس و دقیق توصیف شده است و حتی گزارشاتی وجود دارد که بیان می‌کند در مواردی که به‌دنبال مصرف آنتی‌بیوتیک و یا در فاز مزمن بیماری بار آلودگی کم می‌شود و در کشت میکروبی شناسایی نشده است، باروش PCR ردیابی شده است (۱۱، ۵). به‌طوری‌که در مطالعه Chen و همکاران، از مجموع ۸ نمونه مشکوک، ۴ مورد در ۳ روز پس از درمان با آنتی بیوتیک در روش PCR مورد شناسایی قرار گرفت اما هیچ موردی ۳ روز پس از درمان در محیط کشت رشد نکرد (۵). اختلاف بین میزان شناسایی در روش کشت و PCR را در مطالعه اخیر به‌حساسیت بیش‌تر تست PCR نسبت به‌کشت معمول اوی باکتریوم نسبت داد. در مطالعات قبلی نیز تاکید شده است که برای جلوگیری از موارد منفی کاذب بهتر است از روش PCR به‌جای کشت استفاده شود (۱۳). لذا در مطالعه حاضر از روش PCR با پرایمر HPG2 که براساس ژن هماگلوتینین *اوی باکتریوم پاراگالیناروم* می‌باشد و حساسیت و ویژگی مطلوبی دارد استفاده شد (۵). نتایج مطالعه حاضر نشان داد PCR مستقیم از سواب‌های سینوس زیرچشمی ۲۱ نمونه پول‌شده از مرغ‌های تخم‌گذار تلف شده از مجموع ۲۳ نمونه پول‌شده (۸۲/۶ درصد) از نظر ژن هماگلوتینین *اوی باکتریوم پاراگالیناروم* مثبت می‌باشد. هم‌چنین، ۳۰ درصد نمونه‌های پول‌شده از پرندگان زنده با علایم تورم سر و صورت مثبت ارزیابی شدند. درخصوص شناسایی کوریزای عفونی در مرغان تخم‌گذار در ایران مطالعات اندکی وجود دارد. اولین بار بزرگمهری‌فرد، این باکتری را از مرغ تخم‌گذار جدا نمود. سپس Banani و همکاران، در بررسی عوامل باکتریایی ایجاد کننده تورم سر و صورت در گله‌های تخم‌گذار دو مورد جداسازی *اوی باکتریوم پاراگالیناروم* را گزارش کردند (۹). در این مطالعه از ۸ گله مرغ مادر گوشتی، ۷ گله تخم‌گذار تجاری و ۱۴ گله گوشتی جمع‌آوری شده، در ۴ گله تخم‌گذار تجاری *اوی باکتریوم پاراگالیناروم* جداسازی گردید (۶). Askari Badouei و همکاران، به مقایسه روش کشت و PCR در شناسایی *اوی باکتریوم پاراگالیناروم* در ۱۴ فارم تخم‌گذار تجاری و مرغ گوشتی پرداختند. در این بررسی‌ها نیز هیچ مورد مثبتی در گله‌های گوشتی مشاهده نشد اما از ۱۴ نمونه مشکوک، ۴ مورد در کشت باکتریایی رشد کرد که تنها یک مورد در PCR تایید شد. علاوه برآن، با PCR مستقیم برروی ۱۴ نمونه مشکوک ۵ مورد مثبت ارزیابی شد. لذادراین مطالعه به‌خوبی نشان داده شد که PCR نسبت به‌کشت از حساسیت بیش‌تر برخوردار است (۱۴). با توجه به این‌که در مطالعات قبلی صرفاً به‌بررسی *اوی باکتریوم پاراگالیناروم* در تلفات پرداخته شده است اما در مطالعه حاضر علاوه بر بررسی آلودگی در تلفات، میزان آلودگی در پرندگان واجد علایم تورم سر و صورت نیز پرداخته شده است، میزان فراوانی به‌مراتب بیش‌تر گزارش گردیده است. مقایسه میزان آلودگی به *اوی باکتریوم پاراگالیناروم* در پرندگان زنده و تلفات نشان می‌دهد میزان آلودگی در پرندگان تلف‌شده به‌مراتب بیش‌تر از پرندگان سالم بوده است که علت آن را می‌توان به‌محل نمونه‌گیری نسبت داد. به‌طوری‌که قبلاً نیز نشان داده شده است که میزان آلودگی پرندگان در مواردی که از سینوس زیرچشمی نمونه‌گیری شده است به‌مراتب بیش‌تر از قسمت‌های دیگر دستگاه تنفس و از جمله سواب بینی بوده است (۸۳/۹ درصد در مقابل ۴۰/۹ درصد) (۱۵). علاوه بر محل نمونه‌گیری، درمان‌های دارویی و نیز شکل‌گیری ایمنی و مزمن‌شدن بیماری می‌تواند سبب کاهش تعداد باکتری و نهایتاً میزان ردیابی در روش PCR موثر باشد (۵، ۱۱). در مطالعه حاضر در ۷۸/۲ درصد موارد آلودگی توام *اوی باکتریوم پاراگالیناروم* با *اشریشیاکلی* در تلفات مشاهده شده است. اگرچه در تهیه سواب از شکاف کامی این آلودگی هم‌زمان در پرندگان زنده مشاهده نشده است اما به‌نظر می‌رسد علت تورم و التهاب عمده و نهایتاً انتشار باکتری *اشریشیا کلی* و رخداد مرگ می‌تواند هم‌زمانی آلودگی *اوی باکتریوم پاراگالیناروم* با *اشریشیا کلی* باشد. به‌طوری‌که در مطالعات قبلی نیز رخداد عفونت هم‌زمان *اوی باکتریوم پاراگالیناروم* با *اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال* (۱۶) و یا آلودگی مشترک *اوی باکتریوم پاراگالیناروم* با آدنوویروس (۱۷) و تشدید علایم تنفسی و حتی افزایش موارد مرگ و میر در عفونت طبیعی و چالش تجربی بررسی و بیان شده است. در مطالعه حاضر، اگرچه درصد بالایی از مرغان تخم‌گذار واجد علایم تورم سر و صورت از لحاظ *اوی باکتریوم پاراگالیناروم* مثبت شدند اما این درصد آلودگی در طیور سنتی بیش‌تر از طیور صنعتی در کشت و PCR برآورد گردیده است. به‌نظر می‌رسد عدم واکسیناسیون علیه کوریزای عفونی در گله‌های سنتی طیور می‌تواند یکی از دلایل

فراوانی بالاتر آلودگی با *اوی باکتریوم پاراگالیناروم* در مرغ‌های تخم‌گذار سنتی باشد. از طرفی عدم وجود ایمنی کافی در این مرغ‌ها باعث تکثیر بیش‌تر جرم بیماری‌زا و افزایش بار میکروبی در ضایعات است که منجر به‌افزایش احتمال رشد و یا ردیابی این باکتری در سواب‌های تهیه شده از ضایعات می‌گردد. به‌هر حال، نتایج این مطالعه اگرچه به‌عنوان یک مطالعه اولیه نشان می‌دهد که *اوی باکتریوم پاراگالیناروم* در سندرم تورم سر و صورت در مرغ‌های تخم‌گذار سنتی و صنعتی نقش دارد اما عدم ردیابی *اوی باکتریوم پاراگالیناروم* در مابقی مرغان واجد علامت تورم سر نشان می‌دهد که به‌جز *اوی باکتریوم پاراگالیناروم* عوامل دیگری نیز در ایجاد این علایم در مرغان تخم‌گذار نقش دارد. قبلا نقش پنوموویروس پرندگان، عفونت‌های *اشریشیاکلی*، سالمونلا، پاستورلا و گونه‌های مایکوپلاسما به اثبات رسیده است که در این مطالعه مورد بررسی قرار نگرفته است. لذا به‌نظر می‌رسد علت تلفات می‌تواند پیچیدگی چند عامل مختلف عفونی باشد که بعضی از آن‌ها قادر به‌ایجاد سپتی‌سمی کشنده هستند و حتی منجر به تلفات پرندگان می‌گردند. به‌طور کلی، این مطالعه نشان می‌دهد کوریزای عفونی می‌تواند به‌عنوان یکی از عوامل دخیل در تورم سر و صورت در مرغان تخم‌گذار صنعتی و سنتی مطرح باشد و لازم است مطالعات تکمیلی درخصوص میزان شیوع و بیماری‌زایی *اوی باکتریوم پاراگالیناروم* به‌همراه سایر بیماری‌های تنفسی در فارم‌های تخم‌گذار صورت گیرد تا در صورت آلودگی و بیماری‌زایی این عامل برنامه واکسیناسیون به‌صورت همگانی و دقیق مخصوصاً در پرورش طیور تخم‌گذار صنعتی برای کنترل هر چه بیش‌تر و بهتر این بیماری انجام شود.

منابع

1. **Blackall, P.J. and Soriano, E.V., 2008**. Infectious coryza and related diseases. In Diseases of Poultry. Edited by Saif, Y.M., Barnes, H.J., Glisson, J.R., Fadly, A.M., McDougald, L.R. and Swayne, D.A., 12th Ed. Iowa State University Press. Ames, USA. 155-159.
2. **Georgiades, G., Iordanidis, P. and Koumbati, M., 2001**. Cases of swollen head syndrome in broiler chickens in Greece. Avian Diseases. 3(5): 745-750.
3. **Nakamura, K., Mase, M., Tanimura, N., Yamaguchi, S., Nakazawa, M. and Yuasa, N., 1997**. Swollen head syndrome in broiler chickens in Japan: its pathology, microbiology and biochemistry. Avian Pathology. 26(1): 139-154.
4. **Crispo, M., Sentíes-Cué, C.G., Cooper, G.L., Mountainspring, G., Corsiglia, C., Bickford, A.A. and Stoute, S.T., 2018**. Otitis and meningoencephalitis associated with infectious coryza (*Avibacterium paragallinarum*) in commercial broiler chickens. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 30(5): 784-788.
5. **Chen, X., Chen, Q., Zhang, P., Feng, W. and Blackall, P.J., 1998.** Evaluation of a PCR test for the detection of *Haemophilus paragallinarum* in China. Avian Pathology. 27(3): 296-300.
6. **Banani, M., Pourbakhsh, S.A., Khaki, P., Goodarzi, H., Moazeni-Jula, G. and Ghodsian, N., 2006**. Isolation, identification and antibiotic sensitivity of *Haemophilus paragallinarum* isolates from commercial layer flocks affected by infectious coryza. Pajouhesh and Sazandegi. 73: 128-135.
7. **Akhter, S., Ali, M., Das, P.M. and Hossain, M.M., 2013**. Isolation & identification of *Avibacterium paragallinarum* the causal agent of infectious coryza (IC) from layer chickens in Bangladesh. Journal of Bangladesh Agriculture University. 11(1): 87-96.
8. **Azad, N., Sadrzadeh, A. and Askari, M., 2014**. Isolation and molecular identification of *Avibacterium Paragaliinarum* in Suspected Cases of Infectious Coryza. Turkish Journal of Animal and Veterinary Science. 38: 46-49.
9. **Banani, M., Pourbakhsh S.A., Khaki P. and Moazzeni Jola, Gh., 2003.** Isolation and identification of bacterial agents from commercial poultry suffering from head and face swelling. Iranian Journal of Veterinary Research. 5(9): 49-61. (In Persian)
10. **Hitchins, A.D., Hartman P.A. and Todd, E.C.D., 1992.** Coliforms-*Escherichia coli* and its toxins. In Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Edited by Vanderzant, C. and Splittstoesser, D.F., 3rd Ed. American Public Health Association, Washington, USA. 325-369.
11. **Chen, X., Miflin, J.K., Zhang, P. and Blackall, P.J., 1996.** Development and application of DNA probes and PCR tests for *Haemophilus paragallinarum*. Avian Diseases. 40(2): 398-407.
12. **Dwivedi, S., Swamy, M. and Singh, A., 2018**. Detection of *Avibacterium paragallinarum* in Poultry Carcass. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 7(1): 1547-1554. 10.20546/ijcmas.2018.712.18.
13. **Wahyuni, A., Tabbu, C.R. and Artanto, S., 2017**. Isolation, identification,and serotyping Of *Abibacterium Paragallinarum* From quails In Indonesia With Typical Infection Coryza Disease Symptoms. Veterinary World. 11(4): 519-524.
14. **Askari Badouei, M., Sadrzadeh, A., Azad, N., Blackall, P., Madadgar, O. and Charkhkar, S., 2014**. Isolation and molecular identification of *Avibacterium paragallinarum* in suspected cases of infectious coryza. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences. 3(1): 46-49.
15. **Nabeel Mohammad, T.M. and Sreedevi, B., 2015**. Detection of *Avibacterium Paragallinarum* by Polymerase chainreaction form outbreaks of Infectious coryza of poultry in Andhrd Pradesh. Veterinary World. 8(1): 103-108.
16. **Morales-Erasto, V., Falconi-Agapito, F., Luna-Galaz, G.A., Saravia, L.E., Montalvan-Avalos, A., Soriano Vargas, E.E. and Fernandez-Diaz, M., 2016.** Coinfection of *Avibacterium paragallinarum* and *Ornithobacterium rhinotracheale* in chickens from Peru. Avian Diseases. 60(1): 75-78.
17. **Mei, C., Xian, H., Blackall, P.J., Hu, W., Zhang, X. and Wang, H., 2020.** Concurrent infection of *Avibacterium paragallinarum* and fowl adenovirus in layer chickens. Poultry Science. 99(12): 6525-6532.