



## Original Research Paper

# Concurrent infection of *Avibacterium paragalinarum* and *Escherichia coli* in layers with Swollen Head Syndrome (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 investigate the role of *Avibacterium paragalinarum* (AP) in the development of Swollen head syndrome (SHS) in commercial and traditional laying hen farms with signs of head swelling and mortality in Isfahan province, 45 laying hen farms with signs of head swelling and mortality were sampled from the suborbital sinus. In addition, swabs were prepared from traditional and commercial laying hen farms with respiratory symptoms and SHS.

**Materials & Methods:** Samples were cultured on specific media for isolation of *Escherichia coli* (*E. coli*) and AP and approved by biochemical examination. After genome extra AP was detected with specific primers. Microbiological results showed that 41 of 36 samples (20: 8%) were infected with AP and 43 samples (30: 5%) were infected with *E. coli*.

**Result:** The results of direct detection of AP in suborbital sinus swabs that prepared from 45 farms showed that 41 (91%) of 45 farms were infected with AP. The results of direct detection of *E. coli* in suborbital sinus swabs that prepared from 45 farms showed that 43 (95%) of 45 farms were infected with *E. coli*. The results of direct detection of SHS in suborbital sinus swabs that prepared from 45 farms showed that 41 (91%) of 45 farms were infected with SHS. The results of direct detection of SHS in suborbital sinus swabs that prepared from 45 farms showed that 41 (91%) of 45 farms were infected with SHS. The results of direct detection of SHS in suborbital sinus swabs that prepared from 45 farms showed that 41 (91%) of 45 farms were infected with SHS. The results of direct detection of SHS in suborbital sinus swabs that prepared from 45 farms showed that 41 (91%) of 45 farms were infected with SHS.

**Conclusion:** It seems that the sampling site can play a role in the rate of infection and 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: [mgholami8@gmail.com](mailto:mgholami8@gmail.com)

## 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 علائم تورم سر و تلفات، از ناحیه سینوس زیر چشمی نمونه‌برداری شد. علاوه بر این، از ۲۰ فارم مرغ تخم‌گذار صنعتی و سنتی با علائم 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 ۱۴ نمونه (۶۰/۸۶ 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 به علائم کوریزا نشان‌دهنده تکثیر قطعه ۵۰۰ جفت بازی در ۱۹ نمونه سواب سینوسی بوده است (۸۲/۶ درصد). این فراوانی در طیور سنتی ۹۲/۳ درصد (۱۲ نمونه از ۱۳ نمونه جمع) و در طیور صنعتی ۷۰ درصد (۷ نمونه از ۱۰ نمونه جمع) برآورد گردید. هم‌چنین میزان آلودگی در مرغان زنده به مراتب 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 به فراوانی 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.

## مقدمه

می باشد که شامل آلودگی با ویروس لارنگوتراکئیت، پاستورلوز، استرس سرمایی و بستر مرطوب می باشند که گاهی این عوامل زمینه را برای ایجاد بیماری فراهم می کنند (۸). نشانه های اصلی بیماری شامل تورم سینوس ها و مجاری تنفس و ورم ملتحمه چشم، آماس، تورم صورت است (۹). با انجام واکسیناسیون به موقع با واکنش غیرفعال شده می توان از واگیری و ایجاد خسارت و حتی کاهش تولید طیور تخم گذار در بیماری کوریزای عفونی جلوگیری کرد. خوشبختانه واکنش کوریزای عفونی در نزدیک شروع تولید در گله های تخم گذار به شکل تزریقی استفاده می شود و محافظت قابل قبولی ایجاد می کند (۴). با این حال، در فارم های با وضعیت بهداشتی نامناسب و هم چنین در طیور تخم گذار خانگی به کرات این بیماری مشاهده گردیده است (۹). از آن جایی که طیور خانگی می توانند در بقای باکتری در محیط نقش داشته باشند و به عنوان مخزن باکتری شناخته می شوند لازم است شناسایی این باکتری در موارد مشکوک اثبات شود سپس برنامه های واکسیناسیون مناسب علیه آن ها جهت کنترل این بیماری انجام شود. علاوه بر آن با توجه به شواهد بالینی مبنی بر فراوانی موارد سندرم تورم سر در فارم های تخم گذار و از طرفی نقش عوامل مختلف ویروسی و باکتریایی در رخداد این سندرم، به نقش کوریزای عفونی در ایجاد این سندرم کم تر توجه شده و مطالعه ای در خصوص 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 نمونه گیری از سینوس زیر چشمی پرندگان تلفات شده با علائم تورم سر و صورت و نیز با نمونه گیری از شکاف کامی پرندگان زنده با علائم تورم سر و صورت به شناسایی این عامل پرداخته شد.

## مواد و روش ها

**نمونه گیری:** در فاصله زمانی بهار ۱۳۹۸ تا بهار ۱۳۹۹ به مدت یک سال به طور تصادفی از فارم های صنعتی و سنتی طیور تخم گذار در استان اصفهان با علائم تورم سر و صورت نمونه گیری 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) نمونه گیری شد (جدول ۲). پرندگان نمونه گیری شده همگی علائم بارز تورم سر و صورت به همراه تورم سینوس چشمی، تورم ملتحمه و بعضاً چسبندگی پلک ها به هم دیگر، ترشحات کف آلود در چشم، آبریزش از چشم و بینی به همراه علائم تنفسی را نشان می دادند. در موارد تلفات صرفاً تهیه سواب از ترشحات تجمع یافته در سینوس های هر پرنده بود که از هر فارم ۵ نمونه اخذ شده و همگی به شکل تجمع یافته (پول) مورد آزمایش و بررسی قرار

سندرم تورم سر یک بیماری تنفسی است که عمدتاً قسمت های فوقانی دستگاه تنفس مبتلای می شود و با تورم سینوس های اطراف چشم و زیر چشم مشخص می شود. در اکثر طیور مبتلا، علائم تنفسی به شکل عطسه و آبریزش از چشم و بینی دیده می شود و سپس علائم التهاب در نواحی اطراف چشم گسترش پیدا می کند و تمام صورت را فرا می گیرد. در این حالت ممکن است التهاب و تورم پلک نیز منجر به چسبندگی پلک ها شود (۱). سندرم تورم سر یک بیماری چند عاملی است که به نظر می رسد ویروس ها 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 بیش تر مواقع به شکل اولیه اشریشیاکلی جداسازی شده است (۲). قبلاً سندرم تورم سر به صورت یک التهاب آگزوداتیونوآحی زیر پوستی سرو صورت در پاسخ به باکتری اشریشیاکلی تعریف شده است (۳). علاوه بر این، پنومو ویروس، ویروس عامل بیماری نیوکاسل، مایکوپلاسماها، کرونا ویروس عامل بیماری برونشیت عفونی، عفونت های آدنو ویروسی و حتی *اوی باکتریوم پاراگالیناروم* در این سندرم نقش دارند. هم چنین فاکتورهای محیطی مانند تراکم بالا، میزان بالای آمونیاک و تهویه ضعیف تشدید کننده این وضعیت هستند (۱). بیماری کوریزای عفونی یک بیماری واگیردار در صنعت پرورش طیور مخصوصاً در گله های تخم گذار تجاری است که توسط *اوی باکتریوم پاراگالیناروم* ایجاد می شود. 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 سینوس ها و التهاب پلک ها را نشان می دهد (۴). عامل بیماری باکتری از خانواده باکتری های گرم منفی است که در مقابل دما و مواد ضد عفونی کننده بسیار حساس است اما در فارم های چند سنی و فارم هایی که از نظر بهداشتی و مدیریتی ضعیف باشند به عنوان یک مشکل اساسی شناخته می شود که راهی از آن دشوار است (۵). عامل بیماری واگیری بالایی دارد (تا ۱۰۰ درصد) و بسیار سریع (در عرض ۲ تا ۳ روز) ایجاد علائم تنفسی می کند اما تلفات کمی دارد و در شرایط عادی تا ۱۰ درصد تلفات نشان می دهد (۱). مشکل اصلی در فارم های آلوده به *اوی باکتریوم پاراگالیناروم*، کاهش تولید (۵ تا ۱۰٪)، و عقب افتادگی از رشد است به طوری که ممکن است در فارم های مبتلا به کوریزای عفونی سایر اجرام بیماری زا نیز دیده شود و تلفات افزایش یابد (۶). مرغ های مسن نسبت به این بیماری حساس ترند، ولی بیماری در کبوتر، گنجشک، اردک، کلاغ، بوقلمون، خرگوش و خوکچه و موش دیده شده است (۷). عواملی موجب شدید و طولانی شدن بیماری

تریس قرار گرفت و در دمای ۵۶ درجه به مدت 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). به این 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 پلیمرز (۱/۲۵ واحد لیتر) (فرمنتاز)، DNA تهیه‌شده (یک میکرو لیتر) بود. پرایمرهای اختصاصی اوی باکتریوم پاراگالیناروم مطابق توالی منتشر شده توسط Chen و همکاران (۵) سنتز شد که در جدول ۱ آمده است. این پرایمر قادر است محصول ۵۰۰ جفت بازی را از ژن هم‌گلوپتینین اوی باکتریوم پاراگالیناروم تکثیر نماید. تکثیر ژن‌های هدف در دستگاه ترموسایکلر (اپندورف-آلمان) با برنامه حرارتی دنا تورا سیون اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و ۳۵ سیکل‌های حرارتی شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و مرحله گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت 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 ۱ درصد آگارز واجد اتیدیوم بروماید در ولتاژ ثابت ۸۰ ولت به مدت ۳۰ دقیقه الکتروفورز و ژل حاصله با دستگاه تصویر بردار ژل قرائت شد. در این مطالعه از واکنش غیرفعال کوری‌زای عفونی (هیپرا، اسپانیا) به عنوان کنترل مثبت و از آب دوبار تقطیر استریل و نیز کشت خالص اشریشیاکلی و آسپرژیلوس فلاووس به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت ردیابی اوی باکتریوم

#### پاراگالیناروم (۵)

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

گرفتند. از پرندگان زنده مبتلا نیز سواب‌ها از شکاف کام و ترشحات بینی تهیه شد و نمونه‌های هر فارم به شکل 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 به شکل خطی بر

روی آگار خون‌دار کشت داده شد و از استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان دهنده نیکوتین‌آمین استفاده شد. پلیت‌ها در جاری‌هوازی به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. کلنی‌های رشد یافته ریز شبنمی از نظر رنگ آمیزی گرم زیر میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت و تست‌های بیوشیمیایی تکمیلی شامل تست کاتالاز، تخمیر قندها (گلوکز، گالاکتوز و ترهالوز)، احیای نیترا، تولید اندول و اوره‌آز انجام شد. اوی باکتریوم پاراگالیناروم برخلاف سایر گونه‌های اوی باکتریوم قادر به تولید 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 نیترا مثبت و از نظر اوره‌آز و تولید اندول منفی است (۱).

#### جداسازی اشریشیاکلی: نمونه‌ها پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در

محیط پیش‌مغذی، به محیط بلادآگار و مک‌کانگی منتقل شدند و با حضور پرگنه‌های لاکتوز مثبت مشکوک به اشریشیاکلی به محیط Eosin methylene blue (EMB) منتقل شدند. وجود پرگنه‌های با جلازی فلزی حضور باکتری اشریشیاکلی را در نمونه‌ها تقویت کرد لذا برای اطمینان بیشتر تست IMViC بر روی پرگنه‌های خالص شده انجام شد. الگوی تولید ایندول، احیای متیل رد، Voges-Proskauer (VP) و احیای سیترا به صورت 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 به پردازش نمونه‌ها اقدام شد و ژنوم باکتری استخراج گردید. به این منظور سواب‌های تهیه‌شده در ۱ میلی‌لیتر سالین بافر فسفات‌ه (PBS) قرار گرفت و حدود یک ساعت بعد در دور ۲۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس مایع رویی به لوله جدید منتقل شد و برای ۱۵ دقیقه در ۱۳،۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) سانتریفوژ شد. مایع رویی خارج شد و رسوب ته‌لوله در منهای ۲۰ درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام PCR ذخیره شد. برای استخراج ژنوم رسوب حاصله در ۲۰ میکرو لیتر 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

## نتایج

بیوشیمیایی ۲۱ مورد باکتری /اشریشیا کلی از ۲۳ مورد نمونه‌های پول شده از سواب‌های گرفته شده از سینوس پرندگان تلف شده (۹۱/۳۰٪)، جدا شد. آلودگی به /اشریشیا کلی براساس رشد پرگنه‌های صورتی‌رنگ (لاکتوز مثبت) بر روی محیط مک کانکی و پرگنه‌های با جلا سبز فلزی بر روی EMB به‌انضمام تست مثبت تولید ایندول و احیای متیل رد و عدم احیای VP و سیترات (به‌صورت مثبت، مثبت، منفی، منفی) مشخص شد. از ۱۰ نمونه پول شده از طیور سنتی زنده‌ای که از شکاف کامی و ترشحات بینی نمونه کشت میکروبی تهیه شد فقط ۶ مورد آلودگی به /اشریشیا کلی را نشان دادند (۶۰٪) درحالی‌که از طیور صنعتی باکتری /اشریشیا کلی از شکاف کامی جدا نشد. بررسی عفونت هم‌زمان /اشریشیا کلی و اوی باکتریوم پاراگالیناروم در تلفات نشان می‌دهد در ۱۸ نمونه آلودگی هم‌زمان /اشریشیا کلی و اوی باکتریوم پاراگالیناروم (۷۸/۲۶ درصد) رخ داده است درحالی‌که فقط در ۳ نمونه /اشریشیا کلی 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).

بررسی نتایج مربوط به جداسازی اوی باکتریوم پاراگالیناروم از سواب‌های سینوسی نشان داد از ۲۳ مورد کشت تهیه شده در ۱۴ مورد باکتری اوی باکتریوم پاراگالیناروم از لحاظ کشت میکروبی و تست‌های بیوشیمیایی مثبت ارزیابی گردید (۶۰/۸ درصد) که همگی در PCR مثبت ارزیابی شدند (جدول ۲). نتایج ردیابی مستقیم باکتری اوی باکتریوم پاراگالیناروم در سواب‌های سینوسی تهیه شده از ۲۳ مورد تلفات مربوط به علائم کوریزا نشان‌دهنده تکثیر قطعه ۵۰۰ جفت بازی در ۱۹ نمونه سواب سینوسی بوده است (۶۰/۸ درصد). این فراوانی در طیور سنتی ۹۲/۳ درصد (۱۲ نمونه از ۱۳ نمونه جمع) و در طیور صنعتی ۷۰ درصد (۷ نمونه از ۱۰ نمونه جمع) برآورد گردید. در پرندگان زنده با علائم کوریزا، قطعه ۵۰۰ جفت بازی در ۴ نمونه از ۱۰ نمونه تهیه شده از شکاف کامی و ترشحات بینی طیور سنتی (۴۰ درصد) و ۲ نمونه از ۱۰ نمونه تهیه شده از شکاف کامی طیور صنعتی (۲۰ درصد) تکثیر شد (شکل ۱). در نمونه‌های گرفته شده از شکاف کامی و ترشحات بینی پرندگان زنده در طیور سنتی فقط در ۳ نمونه (۳۰ درصد) اوی باکتریوم پاراگالیناروم همراه با /اشریشیا کلی شناسایی شد. در تحقیق حاضر با استفاده از روش‌های میکروبیولوژی و

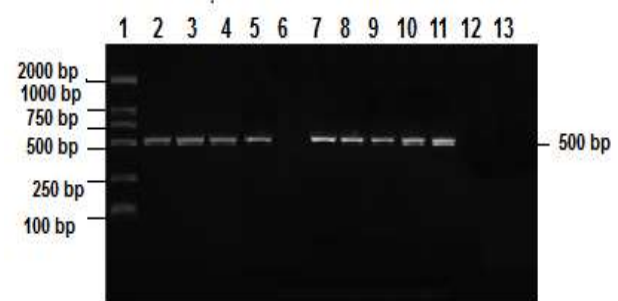
جدول ۲: فراوانی و میزان درصد آلودگی به اوی باکتریوم پاراگالیناروم در آزمون‌های کشت، PCR و PCR مستقیم از بافت

منشاء نمونه	نوع طیور (تعداد نمونه‌های جمع‌آوری شده)	فراوانی در کشت (درصد)	فراوانی در PCR روی کشت خالص (درصد)	فراوانی در PCR مستقیم از بافت (درصد)
تلفات (سینوس زیر 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)

## بحث

نتایج مربوط به جداسازی و ردیابی اوی باکتریوم پاراگالیناروم از مرغ‌های تخم‌گذار تلف شده با علائم 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 علائم 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 ۵۰ و ۶۹/۲ درصد بوده

۱۰۰



شکل ۱: ژل الکتروفورز مربوط به تکثیر 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 /اشریشیا کلی و ستون ۱۳ کنترل منفی آسپرژیلوس فلاووس)

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 بر آن، با PCR مستقیم بر روی ۱۴ نمونه مشکوک ۵ مورد مثبت ارزیابی شد. لذا در این مطالعه به خوبی نشان داده شد که PCR مثبت ارزیابی شد. لذا در این مطالعه به خوبی نشان داده شد که PCR نسبت به کشت از حساسیت بیش‌تر برخوردار است (۱۴). با توجه به این که در مطالعات قبلی صرفاً به بررسی *اوی باکتریوم پاراگالیناروم* در تلفات پرداخته شده است اما در مطالعه حاضر علاوه بر بررسی آلودگی در تلفات، میزان آلودگی در پرندگان واجد علائم تورم سر و صورت نیز پرداخته شده است، میزان فراوانی به مراتب بیش‌تر گزارش گردیده است. مقایسه میزان آلودگی به *اوی باکتریوم پاراگالیناروم* در پرندگان زنده و تلفات نشان می‌دهد میزان آلودگی در پرندگان تلف شده به مراتب بیش‌تر از پرندگان سالم بوده است که علت آن را می‌توان به محل نمونه‌گیری نسبت داد. به طوری که قبلاً نیز نشان داده شده است که میزان آلودگی پرندگان در مواردی که از سینوس زیرچشمی نمونه‌گیری شده است به مراتب 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 مزمن شدن 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 توأم *اوی باکتریوم پاراگالیناروم* با *اشریشیا کلی* در تلفات مشاهده شده است. اگرچه در تهیه سواب از شکاف کامی این آلودگی هم‌زمان در پرندگان زنده مشاهده نشده است اما به نظر 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. به طوری که در مطالعات قبلی نیز رخداد عفونت هم‌زمان *اوی باکتریوم پاراگالیناروم* با *اورنیتوباکتریوم رینوترانکال* (۱۶) و یا آلودگی مشترک *اوی باکتریوم پاراگالیناروم* با *آدنوویروس* (۱۷) و تشدید علائم 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 علائم 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. به نظر می‌رسد عدم واکنش‌های سینوس علیه کوریزای عفونی در گله‌های سنتی طیور می‌تواند یکی از دلایل

است. در خصوص اختلاف در میزان شناسایی *اوی باکتریوم پاراگالیناروم* در روش‌های جداسازی و ردیابی، به نظر می‌رسد از آنجایی که این باکتری شدیداً حساس می‌باشد لذا در موارد کشت باکتریایی از تلفات ممکن است باکتری غیرفعال شده باشد و امکان رشد و تکثیر باکتری بر روی محیط کشت فراهم نشود. از طرفی این باکتری برای رشد بر روی محیط کشت بلاذ نیاز به فاکتورهای مکمل مانند فاکتور V (NAD) به اندازه کافی دارد و از آنجایی که رشد بسیار آهسته دارد (حدود ۴۸ ساعت) لذا ممکن است در عفونت‌های مخلوط به راحتی 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 وولاتینوم* نیز ممکن است در محیط رشد کنند که شناسایی گونه *پاراگالیناروم* را با مشکل مواجه می‌کند (۱۱). لذا با توجه به پیچیدگی‌های 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 به دنبال مصرف آنتی‌بیوتیک و یا در فاز مزمن بیماری بار آلودگی کم می‌شود و در کشت میکروبی شناسایی نشده است، با روش PCR ردیابی شده است (۵، ۱۱). به طوری که در مطالعه Chen و همکاران، از مجموع ۸ نمونه مشکوک، ۴ مورد در ۳ روز پس از درمان با آنتی‌بیوتیک 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 به حساسیت بیش‌تر تست PCR نسبت به کشت معمول *اوی باکتریوم* نسبت داد. در مطالعات قبلی نیز تاکید شده است که برای جلوگیری از موارد منفی کاذب بهتر است از روش PCR به جای کشت استفاده شود (۱۳). لذا در مطالعه حاضر از روش PCR با پرایمر HPG2 که براساس ژن هم‌گلوپتینین *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 هم‌گلوپتینین *اوی باکتریوم پاراگالیناروم* مثبت می‌باشد. هم‌چنین، ۳۰ درصد نمونه‌های پول‌شده از پرندگان زنده با علائم تورم سر و صورت مثبت ارزیابی شدند. در خصوص 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 ایجادکننده 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



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 Paragallinarum* 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., 3<sup>rd</sup> Ed. American Public Health Association, Washington, USA. 325-369.
11. **Chen, X., Mifflin, 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 *Avibacterium 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 chain reaction form outbreaks of Infectious coryza of poultry in Andhr 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.

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 به افزایش 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 علائم در مرغان تخم‌گذار نقش دارد. قبلاً 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 به ایجاد 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 در خصوص 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., 12<sup>th</sup> 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., Senties-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.