جداسازی و شناسایی پاستورلاهای دستگاه تنفس فوقانی گوساله‌های سالم و مبتلا به بیماری تنفسی

دکترغلامرضا محمدی[1]* دکتر کیارش قزوینی[2] دکتر هادی عباس پناه[3]

دریافت مقاله: ۱۰ آبان ماه ۱۳۸۳
پذیرش نهایی: ۴ تیرماه ۱۳۸۴

هدف: مقایسه پاستورلاهای جداشده از کشت ناحیه بینی- حلقی گوساله‌های سالم با گوساله‌های بیمار (پنومونی گوساله‌های گاوهای شیری).

طرح: مطالعه‌شاهد - مورد.

حیوانات: ۶۰ راس گوساله هلشتاین بین سنین دوهفته تا شش ماه انتخاب شده از گاوداریهای شیری اطراف مشهد.

روش: هرگوساله بیمار پس از نشان دادن علائم پنومونی مورد معاینه قرار می‌گرفت. پس از انجام معاینات بالینی، یافته‌های درمانگاهی در فرم ثبت مشاهدات درمانگاهی برای هرگوساله جداگانه ثبت‌گردید. در ادامه سواپ از ناحیه بینی- حلقی گرفته شد. همچنین یک گوساله سالم (کنترل) برای هرگوساله بیمار ازگوساله‌های همان فارم انتخاب و وارد مطالعه شد.

تجزیه و تحلیل آماری: با آزمون t مستقل، من - ویتنی و مربع کای.

نتایج: پارامترهای درمانگاهی شامل بر تعداد ضربان قلب در دقیقه، تعداد تنفس در دقیقه، درجه حرارت اخذشده از رکتوم وشاخص بیماری اختلاف آماری معنی داری بین گوساله‌های سالم باگوساله‌های مبتلا به پنومونی نشان دادند ($p<0/05$). تفاوت بین اجرام بیماریزای جداشده با بهره‌گیری از جدول توافقی مربع کای مورد ارزیابی قرار گرفت. جداسازی پاستورلا مولتی سیدا از ناحیه بینی -حلقی درگوساله‌های بیمارنسبت به گوساله‌های سالم بیشتر بود($p<0/05$). منهیمیا همولیتیکا از گوساله‌های بیمار بیشتر جداسازی شد ولی اختلاف دوگروه از نظرآماری معنی‌دار نبود($p>0/05$).

نتیجه‌گیری: جداسازی پاستورلا مولتی‌سیدا ازناحیه بینی -حلقی درگوساله‌های بیمارنسبت به‌گوساله‌های سالم بیشتر مشاهده‌شد ولی جداسازی منهیمیا همولیتیکا با بیماری تنفسی ارتباط محکمی را نشان نداد. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ۱۳۸۵، دوره ۶۱، شماره ۲، ۱۵۳-۱۴۷.

واژه‌های کلیدی: گوساله، بیماری پنومونی گوساله‌های گاوهای شیری، پاستورلا مولتی‌سیدا، منهیمیا همولیتیکا.

یکی از عوامل مهم بروز بیماری و مرگ و میر در صنعت گاوداری بیماریهای دستگاه تنفس گاومی‌باشد بیماری تنفسی مرکب گاو (B.R.D Complex) به صورت سندرم‌های بالینی مختلفی تظاهر می‌یابد. متداول‌ترین سندرم در بیماری تنفسی مرکب گاوهای گوشتی، تحت عنوان بیماری تنفسی غیرقابل تفکیک (Undifferentiated Respiratory Disease) پنومونی پاستورلزی می‌باشد که به‌عنوان تب حمل و نقل (Shipping Fever) شناخته می‌شود. در مقابل، در گاوهای شیری متداول‌ترین سندرم بالینی پنومونی آنزئوتیک (*Enzootic Calf Pneumonia*) می‌باشد که به‌عنوان پنومونی گوساله‌های

۱) گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد- ایران.
۲) گروه میکروبیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد- ایران.
۳) دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد- ایران.
*) نویسنده مسؤول: *gmohamad@ferdowsi.um.ac.ir*

Isolation and Identification of *Pasteurella Spp.* in the Upper respiratory Tract of Healthy and Unhealthy Holstein (dairy calf pneumonia) Calves

Mohammadi, GH.R.[1], Ghazvini, K.[2], Abbaspanah, H.[3]

[1]Department of Clinical Sciences, School of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad-Iran. [2]Department of microbiology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad-Iran. [3]Gradueted from the School of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad-Iran.

Objective: To compare *Pasteurella Spp.* isolates of the nasopharyngeal cultures in healthy and unhealthy Holstein (dairy calf pneumonia) calves.

Design: Case control study.

Animals: Sixty Holstein calves from two weeks up to six-month-old in dairy farms of Mashhad Suburb were selected.

Procedure: In the affected calves, the clinical findings were recorded and nasopharyngeal swabs were also taken. Apparently healthy calves were chosen from the same farm as control.

Statistical analysis: t-test, Mann-Whitney and Chi-square.

Results: Clinical findings including respiratory rate, heart rate, rectal temperature, and illness index scores were significantly different between healthy and unhealthy calves ($P<0.05$). Differences between the isolation rates of various pathogens from healthy and unhealthy calves were evaluated by contingency table Chi-square analysis. *Pasteurella multicida* was isolated more frequently from nasopharynx in affected group than in control one ($P<0.05$). *Mannheimia hemolytica* was isolated more frequently in affected ones than controls. However, its difference was not significant ($P>0.05$).

Conclusion: Results indicate that *Pasteurella multicida* was isolated more frequently from nasopharynx in affected calves than in control group. However isolation of *Mannheimia hemolytica* was not strongly associated with respiratory disease. ***J.Fac.Vet.Med. Univ. Tehran. 61,2:147-153,2006.***

Keyword: *calf, dairy calf pneumonia, pasteurella multicida, Mannheimia hemolytica.*

Corresponding author's email: gmohamad@ferdowsi.um.ac.ir

گاوهای شیری (Dairy Calf Pneumonia) شناخته می‌شود(۵). هر چند از نظر اتیولوژیک تب حمل و نقل به عنوان یک بیماری چند عاملی است که در رخداد آن میکروارگانیسمهای مختلف، استرس‌های مدیریتی و عوامل محیطی مطرح می‌باشند اما بر نقش اولیه سروتیپ های یک یا شش (ST1 یا **ST6**) منهیمیا همولیتیکا (Mannheimia hemolytica) به عنوان عامل باکتریایی ایجادکننده سندرم درمانگاهی و ضایعات پلوروپنومونی فیبرینونکروتیک نیز تاکید می‌گردد(۱۷،۲۱). با وجود پیشرفت‌های اخیر در درک پنومونی حمل و نقل، هنوز این بیماری به عنوان یک معضل در صنعت پرورش گاو گوشتی مطرح است. خسارات اقتصادی حاصل از بیماری تنها در ایالت متحده آمریکا بالغ بر ۳ میلیارد دلار سالانه تخمین زده شده که شامل: هزینه‌های درمانی، پیشگیری، کاهش ضریب تبدیل غذایی، رشد و مرگ و میر می‌باشند(۱۳). میزان ابتلا به بیماری را ۶۹-۰ درصد و میزان مرگ و میر را ۱۵-۰ درصد گزارش کرده‌اند. از این رو اهمیت بیماری پنومونی حاصل از حمل و نقل به عنوان یک معضل صنعت پرورش گاو گوشتی بیش از دیگر بیماریهای این صنعت می‌باشد. پنومونی آنزئوتیک گوساله‌ها مشابه تب حمل و نقل یک ماهیت اتیولوژیک چند عاملی دارد. معتقدند استرس، جایگاه، تهویه، نقصان ایمنی حاصل از عدم دریافت آغوز، عوامل ویروسی و مایکوپلاسمایی در شروع این بیماری مرکب نقش مهمی ایفاء می‌نمایند(۲۱). نشان داده شده که پاستورلا مولتی سیدا غالب‌ترین باکتری جدا شده از جراحات ریه در گوساله‌های مبتلا به پنومونی آنزئوتیک می‌باشد. در ضمن، گوساله‌های با تیتر بالای آنتی بادی بر علیه منهیمیا همولیتیکا در اولین ماه زندگی از شانس کمتری در ابتلا به پنومونی برخوردار بوده و ضریب رشد بهتری داشته‌اند. ۳۰-۲۴ درصد مرگ و میر گله‌های شیری در اثر ابتلا به این بیماری گزارش شده است. همچنین علت اصلی کاهش وزن و ضبط لاشه‌ها در گوساله‌های شیری و گوشتی ابتلا به بیماری تنفسی است(۱۴). در ضمن مطالعات نشان داده است که سن اولین زایمان در گوساله‌های شیری مبتلا به بیماری ۶ ماه افزایش می‌یابد، که این مهم خود منجر به کاهش ظرفیت گوساله زایی می‌شود. لذا پنومونی آنزئوتیک می‌تواند اثرات عمیقی بر تمامی ظرفیت‌های اقتصادی یک گاوداری شیری اعم از پرورش گوساله و تولید شیر داشته باشد(۱۹، ۵).

از آنجا که جایگاه فلور مهاجم به دستگاه تنفس پایینی در وقوع بیماری تنفسی ناحیه بینی -حلقی (Naso -Pharynx) می‌باشد با توجه به نقش پاستورلاها در تکوین بیماری در این پژوهش اقدام به شناسایی و مقایسه پاستورلاهای جدا شده از کشت ناحیه بینی - حلقی گوساله‌های سالم با گوساله‌های مبتلا به پنومونی گوساله‌های گاوهای شیری شده است.

مواد وروش کار

این مطالعه بر روی گوساله‌های سن دوهفته تا ۶ ماهه در تعدادی از گاوداریهای شیری اطراف مشهد بشرح ذیل انجام گرفت. بیماران با توجه به علائم بالینی (بی حال بودن دام، کشیدگی سر و گردن و ترشحات سروزی بینی) شناسایی شدند. البته در شناسایی دام‌های بیمار از بین علائم بالینی بر بی حالی دامها بیشتر تاکید شده است. سپس گوساله مشکوک با حداقل استرس مقید شده و معاینه بالینی انجام شد(۱۲، ۲). گوساله‌های بیمار خصوصیات زیر را داشتند (۲۴، ۸):

الف) علائم بالینی مبنی بر درگیری ریوی

ب) نداشتن علائم بالینی مبنی بر درگیری سایر دستگاههای بدن

در معاینه بالینی موارد ذیل بر اساس جدول۱ مورد توجه قرار گرفت:

۱- اخذ درجه حرارت بدن

۲- تعداد ضربان قلب

۳- تعداد تنفس که با قرار دادن گوشی بر روی نای و قفسه سینه شمارش شد.

۴- وضعیت عمومی دام: هوشیار بودن یا بی حال بودن دام به همراه شدت بی حالی.

۵- علائم ضعف: آیا بیماری موجب تغییر مشخص در راه رفتن دام شده یا نه ؟ اصولا آیا دام علائم ضعف دارد یا نه؟

۶- پوست: آیا طبیعی و براق است یا ژولیده و خشن؟

۷- تیز یا خوابیده بودن وضعیت گوش‌ها

۸- چشم‌ها: طبیعی و روشن یا دارای ترشحات التهابی است.

۹- بینی: آیا ترشحات وجود دارد یا نه و ماهیت ترشحات چیست و آیا دام قادر به تمیز کردن پوزه هست یا نه ؟ لازم به ذکر است که حضور ترشحات بینی درجات مختلف التهاب مجرای تنفسی را بیان می‌نمود.

۱۰- نوع، ریتم و عمق تنفس، حضور تنگی نفس (دیسپنه) مشخص می‌شد. به علت اینکه بیشتر ضایعات در مراحل اولیه برونکوپنومونی در بخش قدامی -شکمی ریه پدید می‌آید لذا در کبدی شدن در این محل افزایش صداهای تنفسی سمع می‌شود.

۱۱- سرفه: موکوس اضافی، محصولات التهابی با مواد خارجی را از سمت ریه‌ها به طرف حنجره می‌راند و معمولا حضور بیماری ریوی را بیان می‌کند از این رو سرفه و شدت آن مشخص می‌شد.

۱۲- پاسخ و عکس العمل‌های دام به مشاهده گر مورد ارزیابی قرار گرفت.

اطلاعات اخذ شده در پرسش نامه ثبت شد. با توجه به شدت بروز نشانه‌های بالینی، وضعیت عمومی و ابتلای دام به بیماری درجه بندی می‌شد و این درجات شامل چهار سطح بودند که شرح آن در جدول (۱) آمده است.

گروه گوساله‌های بیمار از ۳۰ راس گوساله تشکیل شده بود. در ضمن همزمان گوساله‌های سالم از هر واحد به صورت جفت (Pair) با بیماران انتخاب می‌شدند و پس از معاینه بالینی اطلاعات آنها نیز بطور جداگانه در فرمهای مربوط ثبت می‌گردید. گروه گوساله‌های سالم نیز از ۳۰ راس گوساله تشکیل شد.

آنگاه به منظور ارزیابی فلور پاستورلایی دستگاه تنفس فوقانی به کمک سواپ‌های استریل با طول ۳۰ سانتیمتر همراه با لوله محافظ استریل اقدام به نمونه گیری از ناحیه بینی - حلقی می‌شد (۴،۱۰،۲۳). برای این منظور ابتدا

جدول۱- درجه بندی شاخص بیماری.

درجه	ملاک‌های درجه بندی
۱: طبیعی	هوشیار و با برگرداندن سر به مشاهده گر پاسخ می‌دهد. چشم‌ها و پوشش بدن براق و هیچ نشانه‌ای از بیماری مشهود نمی‌باشد.
۲: ابتلای ملایم	هوشیاری و براقیت کمتری در قیاس با گوساله‌های سالم دارد، ممکن است سرفه‌های متناوب با سایر علائم بیماری مثل ترشحات بینی و چشمی وجود داشته باشد بعلاوه اشتهای دام ممکن است کاهش یافته باشد. معمولاً علائم ضعف واضح نیست.
۳: ابتلای نسبتاً شدید	به کندی به مشاهده گر پاسخ می‌دهد، گوش‌ها خوابیده، براقیت پوشش بدن را از دست داده است. علائم بیماری مثل سرفه، ترشحات بینی و چشمی مشهود است و علائم ضعف بطور مختصر ممکن است آشکار باشد.
۴: ابتلای شدید	از دادن پاسخ به مشاهده گر ناتوان است. بی اشتها، همراه با علائم ضعف مثل پایین بودن سر و تغییر در راه رفتن.

گوساله مقید می‌گردید. سپس منخرین حیوان با تامپون پاک و ضد عفونی شده و به داخل منخرین گوساله جهت ایجاد بی حسی درمحل ورود لوله محافظ، لیدوکائین اسپری می‌شد سپس از درون لوله‌های محافظ سواب استریل در حدود ۲۰ سانتیمتر وارد حفره بینی می‌شد تا به هنگام عبور سواب استریل در طول حفره بینی با ترشحات بینی آلوده نشود. در این محل سواب از لوله محافظ خارج گشته و پس از چند بار حرکت به جلو و عقب با مخاط ناحیه بینی - حلقی دوباره به داخل لوله محافظ کشیده شده و همراه لوله محافظ از منخرین خارج می‌شدند. نمونه‌ها تا زمان کشت که حداکثر ۴ ساعت از محل نمونه گیری تا آزمایشگاه میکروبیولوژی طول می‌کشید در دمای حدود ۴ درجه سانتیگراد نگهداری می‌شدند(۲۲).

در آزمایشگاه میکروبیولوژی اقدام به کشت درمحیط‌های انتخابی گردید. محیط‌های انتخابی محیط کشت آگار خون دار تهیه شده با خون گوساله و محیط کشت مک کانکی بودند. محیطهای کشت و معرفهای آزمایش براساس دستورالعملهای ذکرشده درمنابع تهیه شدند(۲۶،۲۳،۲۲،۱۰،۹،۷،۴).

سواپ‌های گرفته شده از ناحیه بینی - حلقی بر روی محیط‌های آگارخون دار و مک کانکی بطور مستقیم کشت داده می‌شدند. پس از کشت، محیط‌های آگار خون دار در جار محتوی شمع روشن قرار داده می‌شد. با گذاشتن شمع روشن، ۵ تا ۱۰ درصد Co2 جهت تسریع در رشد ارگانیسم‌ها تأمین می‌گردید. سپس جارهای حاوی محیط‌های کشت آگار خون دار به انکوباتور ۳۷°C درجه بمدت ۴۸ ساعت منتقل می‌شدند. محیط مک کانکی نیز در شرایط هوازی در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد بمدت ۴۸ ساعت گذاشته می‌شد.

در صورت مشاهده رشد در محیط، کلنی‌های باکتریایی بر اساس روش‌های شناسایی سریع ذکر شده در منابع به کمک رنگ آمیزی‌های اختصاصی و خواص بیوشیمیایی شناسایی می‌شدند(جدول ۲).

نتایج حاصل از اندازه گیری شاخص‌های بالینی و کشت میکروبی ۶۰ راس گوساله هلشتاین در دو گروه بیمار و سالم با استفاده از نرم افزار آماری SPSS با کمک آزمون t مستقل و آزمون کای مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

جدول۲- اساس تشخیص تفریقی آزمایشگاهی منهیمیا(پاستورلا) همولیتیکا از پاستورلا مولتی سیدا(برگرفته از منبع ۲۳).

باکتری	همولیز	مک کانکی	اندول	اوره	اورنی تین	گلوکز	لاکتوز	ساکاروز	مالتوز	مانیتول
مولتی سیدا	-	-	+	-	(+)	+	(-)	+	(-)	(+)
همو- لیتیکا	+	(+)	-	-	(-)	+	(+)	+	+	+

(+) دراکثر سویه‌ها مثبت (-) دراکثر سویه‌ها منفی.

نتایج

در این پژوهش میانگین ±خطای معیار نتایج پارامترهای مورد ارزیابی گوساله‌های گروههای آزمایش و کنترل در جدولهای ۳ و ۴ ارائه شده‌اند. نتایج حاصل از بررسی آماری بشرح زیر می‌باشند.

- **جنس وسن:** BG توجه به قرار دادن شرط جفت بودن در انتخاب دامهای وارد شده از هر واحد گاوداری در این پژوهش تعداد ۲۱ راس (۷۰ درصد) ازگوساله‌ها در هر یک از گروهها نر و ۹ راس (۳۰درصد) ماده بودند. دامهای دو گروه با هم از نظر جنسیت یکسان بودند.

سن گوساله‌های گروه کنترل ۲۹/۱±۵۹/۸۶روز و سن گوساله‌های گروه بیمار ۲۷/۴۱±۵۸/۸۷روز بود، در آزمون t مستقل دو گروه اختلاف معنی دار نداشتند (P>۰/۰۵). نتایج حاصل از اندازه گیری پارامترهای درمانگاهی در جدول ۳ ارائه شده است.

- **ارزیابی بالینی وشاخص بیماری:** درجه حرارت گروه کنترل ۰/۳۱ ±۳۸/۶۷ و گروه بیمار ۰/۵۹ ±۴۰/۰۷ درجه سانتیگراد در روز نمونه گیری بود، در آزمون t مستقل دو گروه اختلاف معنی دار داشتند (P<۰/۰۵). همچنین تعداد ضربان قلب و تعداد تنفس به ترتیب در گروه بیمار تعداد ضربان قلب ۲۲/۸۵ ±۱۱۰ و تعداد تنفس ۱۵/۲۵ ±۶۶ و در گروه کنترل بترتیب ۱۲/۱۲±۶۶ و ۸/۳۸ ±۳۲ در دقیقه بود و دو گروه اختلاف معنی داری داشتند (P<۰/۰۵). شاخص بیماری در گروه بیمار ۰/۶۱±۲/۸ بود و در آزمون من ویتنی اختلاف بسیار معنی داری با گروه کنترل داشت. (P<۰/۰۰۱)نتایج حاصل از اندازه گیری پارامترهای درمانگاهی در جدول (۳) ارائه شده است.

-**میکروب شناختی:** نتایج کشت سواب گرفته شده از ناحیه نازوفارنکس در جدول (۴) ارائه شده است. اجرام جدا شده از دستگاه تنفس بالایی در دامهای تحت مطالعه (گروه بیمار وگروه کنترل) بجز در چندمورد کاملاً یکسان بودند. گونه اشریشیاکلی که ازنمونه‌های گرفته شده از ناحیه نازوفارنکس گروه کنترل وگونه پروتئوس که از ناحیه نازوفارنکس گروه بیمار جدا شدند دیگر ارگانیسم‌های جدا شده کاملاً گونه‌های مشابه یکدیگر

جدول۳ - نتایج معاینات بالینی گوساله‌ها در روز نمونه گیری (±خطای استاندارد از میانگین).

گروه	سن	درجه حرارت	ضربان قلب	تعداد تنفس	شاخص بیماری
گروه کنترل	۵۹/۸۶±۲۹/۱	۳۸/۶۷± ۰/۳۱	۶۶± ۱۲/۱۲	۳۲± ۸/۳۸	۱
گروه بیمار	۵۸/۸۷±۲۷/۴۱	۴۰/۰۷± ۰/۵۹	۱۱۰± ۲۲/۸۵	۶۶± ۱۵/۲۵	۲/۸±۰/۶۱

بودند، ولی نسبت درصد فلور جدا شده از دو گروه بایکدیگر متفاوت بود. پاستورلا مولتی سیدا فلور غالب در هر دو گروه می‌باشد، در گروه بیمار از ۲۳ مورد برابر با ۷۷ درصد موارد واز گروه کنترل از ۱۴ مورد برابر ۴۷ درصد موارد پاستورلا مولتی سیدا جدا گردید، اختلاف دو گروه از نظر فراوانی پاستورلا مولتی سیدا در آزمون مربع کای معنی دار می‌باشد(P=۰/۰۳۳).

منهیمیا (پاستورلا) همولیتیکا جدا شده از ناحیه بینی - حلقی ۱۰ گوساله گروه بیمار برابر با ۳۳ درصد موارد واز گروه گوساله‌های سالم از ۷ مورد برابر با ۲۳ درصد موارد جدا شدند، در آزمون مربع کای فراوانی منهیمیا (پاستورلا) همولیتیکا در دو گروه اختلاف معنی‌داری نداشت(P=۰/۵۶۷). همچنین نتایج کشت نشان می‌دهد که تنها محیط کشت ۱۰ مورد برابر با ۳۳ درصد موارد از گروه بیمار علاوه بر پاستورلاها ارگانیسم‌های دیگری نیز درمحیط کشت شناسایی شدندکه این نسبت در گروه کنترل در کشت ۱۸ مورد برابر با ۶۰ درصد موارد ارگانیسم‌های دیگر بجز پاستورلاها را نیز شامل می‌گردید. در تجزیه و تحلیل آماری نتایج بدست آمده در آزمون مربع کای اختلاف معنی دار بو(P=۰/۰۳۸). نتایج جدول (۴) نشانگر افزایش تعداد کلنی‌های شناسایی شده منهیمیا (پاستورلا) همولیتیکا و پاستورلا مولتی سیدا درمحیط کشت سوب‌های نازوفارنکس گرفته شده ازموارد گروه بیمار نسبت به گروه کنترل می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

پیش از تفسیر یافته‌های باکتری شناختی حاصل از این پژوهش لازم است اساس معیارهای انتخاب دامهای دو گروه یعنی گروه بیمارو گروه کنترل (سالم) موردبحث و بررسی قرار گیرد. در این پژوهش با انتخاب گوساله‌های بصورت جفت از هر گاوداری تلاش گردید اثر فاکتورهای مخدوشگرو تورش ساز (Bias) تا حد امکان کاهش یابد. لذا یکسان بودن ترکیب دوگروه از نظر فاکتور جنس گوساله‌ها و نداشتن اختلاف معنی دار آماری از نظر سن گوساله‌های قرار گرفته در هر دوگروه (P>۰/۰۵) به این مهم توجه شده است.

دامهای دو گروه در این مطالعه پیش از نمونه گیری از ناحیه بینی -حلقی آنها با اندازه‌گیری متغیرهای درجه حرارت رکتوم، تعداد تنفس، تعداد ضربان قلب و نیز شاخص بیماری مورد ارزیابی قرار می‌گرفتند. معیارهای ذکر شده از نتایج محققین دیگر در شناسایی دامهای بیمار از دامهای سالم بدست آمده و در این پژوهش بکار گرفته شده است. آلن وهمکاران درسال ۱۹۸۳، گیبس و همکاران درسال ۱۹۸۳ در مطالعات خود نشان دادند که پیشرفت

جدول۴- نتایج کشت باکتری شناختی سواب نازوفارنکس در گروه کنترل و بیمار.

ارگانیسم‌های جدا شده	گروه بیمار	گروه کنترل
P.multocida	۲۳(۷۷)	۱۴(۴۷)
M.hemolytica	۱۰(۳۳)	۷(۲۳)
Bacillus spp.	۵(۱۷)	۷(۲۳)
E coli	۰(۰)	۱(۳)
Staph Spp.	۱(۳)	۲(۷)
Streptococcus spp.	۱(۳)	۴(۱۳)
Pseudomonas aurogenosa	۱(۳)	۲(۷)
Proteus spp.	۱(۳)	۰(۰)
Mixed flora	۱۰(۳۳)	۱۸(۶۰)

( ): نسبت درصد اجرام جدا شده.

نشانه‌های درمانگاهی، جراحات ماکروسکوپیک و یافته‌های باکتری شناختی بسیار مشابه موارد گزارش شده از رخداد طبیعی بیماری تب حمل ونقل بودند (۲۷، ۲۵، ۲۴، ۲۱، ۵، ۳، ۲). همچنین نتایج و ارتباط بین متغیرها در این تجربیات مشابه دو مطالعه جداگانه‌ای است که به توسط ریوجانسون درسال ۱۹۹۹ برای ایجاد تجربی بیماری با تیپ A1 منهیمیا همولیتیکا به تنهایی در یک مطالعه ودر مطالعه دیگربه همراه مایکوپلاسما بویس بوجود آورد(۱۵،۲۴). فرین وهمکاران درسال ۱۹۷۷ روش آماری مشابهی را برای سنجش میزان همبستگی تیتر آنتی بادیهای سرمی ترشحات بینی با میزان شدت ضایعات ریوی بکار گرفتند. نتایج مطالعه فرین از نظر همبستگی متغیرهای مورد ارزیابی ارتباط آماری معنی‌داری را نشان ندادند. اما بین میزان شدت آسیب ریوی و تیتر آنتی بادی سرم درگوساله‌های واکسینه شده تمایل مثبتی مشاهده گردید (۶،۱۶).

تعداد تنفس، درجه حرارت رکتوم و شاخص بیماری متغیرهای قوی وارزشمندی در پیشگویی میزان کبدی شدن ریه می‌باشند، در این بین تعداد تنفس شاخص مرکزی در جمع سیستمهای ارزیابی بالینی است که توسط محققین مختلف جهت ارزیابی گوساله‌های مبتلا به بیماری تنفسی پیشنهاد شده است(۲۴). همچنین ریوجانسون درسال ۲۰۰۱ بیان می‌کند که شاخص بیماری وتعداد تنفس، معیاری برای پیشگویی جداسازی باکتری می‌باشند. ولی جدا شدن باکتری در این رابطه می‌تواند اثرمخدوشگر باشد، زیرا کبدی شدن ریه و بروز نشانیهای درمانگاهی درپی عفونت باکتریایی قابل انتظار است. ریوجانسون دریافت که کبدی شدن ریه همواره با جداسازی منهیمیا همولیتیکا همراه نمی‌باشد و در ضمن با عفونت باکتریایی علاوه بر جراحات ماکروسکوپیک اثرات دیگری نیز پدید می‌آید برای مثال در اثر آزاد شدن اندوتوکسین یا پیروژن‌های داخلی می‌تواند موجب افزایش نشانه‌های بیماری تنفسی و بالینی در دامهای مبتلا به بیماری گردد. همچنین بیان می‌کند شاخص بالینی بیماری بطور معنی داری با کبدی شدن ریه (P=۰/۰۱) وجدا شدن باکتری (P<۰/۰۰۱) همبستگی دارد. اما با درجه حرارت رکتوم همبستگی معنی‌داری ندارد. درجه حرارت در سطوح ۱، ۲و۳ از (جدول۱:

درجه‌بندی شاخص بیماری) همبستگی خوبی با شدت جراحات ریوی و جدا شدن باکتری دارد، ولی در سطح ۴ افت درجه حرارت بسیار زیاد می‌باشد. تصور می‌شود به دلیل از دست دادن کنترلهای هموستاتیک درجه حرارت در بیماران مبتلا به فرم وخیم بیماری کاهش می‌یابد. درمقابل شدت جراحات ریوی (کبدی شدن ریه) و افزایش تعداد تنفس با افزایش شاخص بیماری همراه است. همچنین همبستگی بین جداسازی باکتری و شاخص بیماری از همبستگی شاخص بیماری با درجه حرارت رکتوم بهتر بود که این امر می‌تواند ناشی از آزاد شدن میانجیهای التهابی باشد که گرچه سبب تب نمی‌شوند ولی شرایط بالینی بیماری را وخیم‌تر می‌سازند (۲۴).

در این مطالعه نیز معیارهای عینی شامل تعداد تنفس، تعداد ضربان قلب و درجه حرارت در گروه بیماران افزایش یافته و با گروه کنترل (سالم) اختلاف آماری معنی‌داری داشت($P<۰/۰۵$). با توجه به کیفی بودن درجات شاخص بیماری که بصورت مرتبه‌ای درجه بندی می‌شود برای تجزیه و تحلیل آماری از روش غیر پارامتریک من ویتنی استفاده شد، گروه بیمار با گروه کنترل اختلاف معنی داری با یکدیگر داشتند($P<۰/۰۵$).

باکتریهای جدا شده از سوابهای گرفته شده از ناحیه بینی - حلقی گوساله‌های این پژوهش شامل ۷ گونه مختلف می‌باشند. یکسان بودن نسبی اجرام جدا شده از دو گروه را می‌توان به دلیل مشابهت محیط نگهداری گوساله‌ها دانست (جدول ۳).

در بین اجرام جدا شده منهیمیا (پاستورلا) همولیتیکا و پاستورلا مولتی سیدا به صورت همزیست (Commensal) در ناحیه بینی - حلقی نشخوارکنندگان حضور دارند و جزء فلور طبیعی دستگاه تنفس فوقانی گاو به شمار می‌آیند. جداسازی این ارگانیسمها از گروه کنترل و بیمار در این مطالعه نیز شاهدی بر این ادعا می‌باشند (۱،۲۶).

در مطالعات تجربی ثابت شده است که میکروارگانیسم‌ها علی رغم اینکه دائماً از محل استقرارشان در ناحیه بینی - حلقی بوسیله هوای جاری از راه نای به شش‌ها برده می‌شوند، اما در حالت سلامت با وجود این بمباران دائمی از سوی فلور مستقر در بینی و هوای آلوده شش‌ها به دلیل وجود مکانیسم‌های دفاعی پویا استریل باقی می‌مانند (۲۰).

با این حال علی رغم فلور طبیعی بودن منهیمیا (پاستورلا) همولیتیکا و پاستورلا مولتی سیدا، فقط پاستورلا مولتی سیدا به راحتی از سوابهای بینی گوساله‌های سالم جدا می‌شود و منهیمیا همولیتیکا بندرت و بصورت انفرادی از کشت بینی گوساله‌های سالم جدا می‌گردد (۶،۲۱).

در این مطالعه نیز باکتری غالب جدا شده در کشت ناحیه بینی - حلقی در گروه کنترل و بیمار پاستورلا مولتی سیدا است، پاستورلا مولتی سیدا بطور معمول متداول‌ترین عامل باکتریایی جدا شده از پنومونی گوساله‌های گاوهای شیری است. این امکان، احتمالاً بازتاب طبیعت فرصت طلب این ارگانیسم در تهاجم ثانویه می‌باشد که با تکثیر زیاد آن پیرو آسیب دیدن دستگاه تنفس بوسیله باکتریهای مهاجم اولیه فرصت طلب مانند منهیمیا همولیتیکا است(۱،۲۶). وجود یک ارتباط سینرژیسمی بین گونه‌های مایکوپلاسما و منهیمیا همولیتیکا گزارش شده است (۶،۱۵). همچنین تعدادی از محققین بر وجود این ارتباط سینرژیسمی بین پاستورلا مولتی سیدا و گونه‌های مایکوپلاسما اعتقاد دارند. بدون تردید وجود ارتباط سینرژیسمی بین گونه‌های مایکوپلاسما و پاستورلاها در یک بیماری چند عاملی همانند پنومونی گوساله‌های گاوداری شیری غیر منتظره نمی‌باشد(۵).

افزایش موارد جدا سازی منهیمیا همولیتیکا و افزایش معنی دار پاستورلا مولتی سیدا جدا شده از گروه بیمار نسبت به گروه کنترل را می‌توان به دلیل مهیا شدن شرایط کلونیزه شدن و تکثیر زیاد در ناحیه بینی - حلقی دانست($P<۰/۰۵$). تصور می‌شود منهیمیا همولیتیکا به داخل لوزه‌های ناحیه فارنکس رفته و تحت شرایط استرس‌زا از قبیل حمل و نقل، عفونت‌های ویروسی، تغییرات آب و هوای شدید، تغذیه بد و ازدحام می‌تواند به دفاع ایمنی و سطوح دفاع فیزیکی حیوانات آسیب وارد کند. در اثر التهاب موضعی افزایش نفوذ پذیری عروق، سیلان مایعات، موجب کاهش رقت موکوس فرش شده بر روی مخاط دستگاه تنفس و مستعد شدن شرایط کلونیزه شدن باکتری فراهم می‌شود. همچنین محققین توانسته‌اند ایجاد بیماری تجربی تنفسی با باکتری پاستورلا مولتی سیدا در گوساله نمایند. این محققین پس از ایجاد تجربی بیماری نتیجه گرفته‌اند که بیماری بالینی ایجاد شده از شدت و وسعت کمتری در مقایسه با منهیمیا همولیتیکا برخوردار می‌باشد. بیماری با تکثیر پاستورلا مولتی - سیدا بر روی مخاط ناحیه بینی - حلقی ایجاد می‌شود و پیرو آن شرایط ورود متناوب ارگانیسم به ناحیه تحتانی دستگاه تنفس مهیا می‌گردد. در رخداد طبیعی بیماری پنومونی آنزئوتیک گوساله عفونتهای ویروسی اولیه و مایکوپلاسما، حیوانات را به تهاجم ثانویه پاستورلا مولتی سیدا از راه وارد نمودن آسیب به عملکرد دفاع ماکروفاژهای آلوئولی و همچنین وارد ساختن آسیب به مکانیسم پاکسازی موکوسی - مژه‌ای در نای و برونش مستعد می‌کنند. همچنین نشان داده شده است گوساله‌هایی که دارای تیتر بالا بر علیه منهیمیا همولیتیکا در اولین ماه زندگی بوده‌اند از شانس کمتری در ابتلا به پنومونی برخوردار بوده و ضریب رشد بهتری داشتند. این مطالعات نشان می‌دهند که سابقه درمعرض قرار گرفتن قبلی گوساله در برابر عوامل بیماریزای اولیه چون منهیمیا همولیتیکا و مایکوپلاسماها در کلونیزه شدن و تکثیر بسیار زیاد پاستورلا مولتی سیدا موثر می‌باشد.

علاوه بر این وجود کشتهای ناخالص بیشتر در گروه کنترل نسبت به گروه بیمار نشانگر مستعد شدن شرایط تکثیر باکتری در ناحیه بینی - حلقی گروه بیمار می‌باشد($P<۰/۰۵$)(۶،۱۵).

تشکر وقدردانی

نگارندگان بر خود لازم می‌دانند از شورای محترم پژوهشی دانشکده ومعاونت محترم پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد به پاس تامین هزینه‌های لازم انجام این پژوهش تشکر وقدردانی نمایند.

References

1. Ackermann M.R., Brogden K.A. (2000) Response of the ruminant respiratory tract to *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. Microb Infec. 2: 1079-1088.
2. Allen J.W., Bateman K.G., Viel L., et al. (1990) The microbial flora of the upper and lower respiratory tracts of feedlot calves with undifferentiated bovine respiratory disease. Bovine Pract. 26: 162-165.
3. Allen J.W., Viet L., Bateman K.G., et al. (1991) The microbial flora of the respiratory tract in feedlot calves. Associations between nasopharyngeal and bronchoalveolar lavage cultures. Can J Vet Res. 55: 341-346.
4. Allen J.W.,Viel L., Bateman K.G.,et al. (1992) Changes in the bacterial flora of the upper and lower respiratory tracts and bronchoalveolar lavage differential cell counts in feedlot calves treated for respiratory disease. Can J Vet Res.56: 177-183.
5. Ames T.R. (1997) Diary calf pneumonia. Vet Clin North Am, food animal practice. 13: 379-391.
6. Andrews, A., Blowey, R.W., Boyd, H. (2004)Bovine Medicine, Disease and Husbandry of Cattle. Second edition. Blackwell Scientific London. PP. 286-293 and 860-873
7. Barbour, E.K., Nabbut, N.H., Hamadeh, S.K., et al. (1997) Bacterial identity and characteristics in healthy and unhealthy respiratory tracts of sheep and calves. Vet Res Comm. 21: 421-430.
8. Becker, B.A., Nienaber, J.A., Deshazer, J.A., et al. (1985) Effect of transportation on cortisol concentrations and on the circadian rhythm of cortisol in gilts. Am J Vet Res. 46:1457-9.
9. Biberstein, E.l., Chung, Zeey. (1990) Review of Vet Microbiol. Black well Scientific Publications, London. PP. 146-227.
10. Carter, G.R., Cole, J.R. (1990) Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology. 5thed. Academic press, new York. PP. 129-139 and 346-366.
11. Dalgleish, R. (1990) Bovine pneumonic pasteurellosis. Pract.12: 223-226.
12. Friend, T.H. (1991) Symposium response of animals to stress, Behavioral aspects of stress. J Dairy Sci. 47: 292-303.
13. Gibbs, A. (2001) Practical approach to the control of pneumonia in housed calves. Pract. 23: 3, 323-329.
14. Griffin, D. (1997) Economic impact associated with respiratory disease in beef cattle. Vet Clin North Am food Anim Pract. 13: 367-377.
15. Houghton, S.B., Gourlay, R.N. (1983) Synergism between *Mycoplasma bovise* and *Pasteurella haemolytica* in calf pneumonia. Vete Rec. 113: 2, 41-42.
16. Howard, J.L., Smith, R.A. (2000) Current Veterinary therapy. food animal practice, 4rd ed. W. B. Saunders, Philadelphia. PP. 437-471
17. Jeyaseelan, S., Sreevatsan, S., Maheswaran, S.K. (2002) Role of *Mannheimia haemolytica* leukotoxin in the pathogenesis of bovine pneumonic pasteurellosis. Ann Health Res Rev. 3: 69-82.
18. Kelly, A.P., Janzen, E.D. (1986) A review of morbidity and mortality rates and disease occurrence in North American feedlot cattle. Can Vet J. 27: 496-500.
19. Lekeux, P.(1995) Bovine respiratory disease complex: an European perspective. Bovine Pract. 29: 71-75.
20. Lopez, A.(2001)Respiratory system, thoracic cavity and pleura. In Me Gavin MD, Carlton W.W, Zachary J.F, editor's, Thomson's special veterinary pathology 3rd ed, Moby year book., St. Louis. PP. 125-170.
21. Maheswaran, S.K., Thumbikat, P., Dileepan, T. (2002) Current knowledge on pathogenesis of lung injury caused by *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multicida* in the bovine. In proceedings. XX11 world buiatrics congress: 160-167.
22. Pringle, J.K., Viel, L., Shewen, P.E., et al. (1988) Bronchoalveolar lavage of cranial and caudal lung regions in selected normal calves, cellular, microbiological, immunoglobulin, serological and histological variables. Can J Vet Res. 52: 239-248.
23. Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B., et al.(1994)

Clin Vet Microbiol. Mosby-year book Europe limited. PP. 13-21, 497-627, 254-258.

24. Reeve-Johnson, L. (2001) Relationships between clinical and pathological signs of disease in calves with *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica type A1*. Vet Rec. 149: 18,549-552

25-Van donkersgoed, J., Rlbble bover, L.G., Townsend, H.G.G. (1993) Epidemiologic study of enzootic pneumonia in dairy calves in Saskatchewan. Can J Vet Res. 57: 247-254.

26-Vestweber, J., Jean, G.S. (1997)Bovine respiratory disease update. Vet Clin North Am food Anim Pract.13: 3, 367-429.

27.Virtala, M.K., Mechor, G.D., Grohn, Y.T., et al. (1996) Epidemiologic and pathologic characteristics of respiratory tract disease in dairy heifers during the first three months of life. J Am Vet Med Associ. 208: 12, 2035-2042.

28.Weekley, L.B., Veit, H.P., Eyre, P. (1998) Bovine pneumonic pasteurellosis. Part 1. Pathophysiology. Compedium, 17,7: 974-982.20,1: 533-545.