مجله تحقیقات دامپزشکی
دوره ۷۷، شماره ۱، ۱۴۰۱، ۲۷-۱۹
مقاله پژوهشی

جداسازی و شناسایی مولکولی جدایه‌های *گالی‌باکتریوم آناتیس* در مزارع پرورش مرغان تخم‌گذار

مرتضی حدادیان[۱]، سعیدعطائی کچویی[۲]، محمدرضا محزونیه[۳]، رامک یحیی‌رعیت[۴]، وحید کریمی[۵]

[۱] دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
[۲] گروه تحقیق و تشخیص بیماری‌های طیور موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
[۳] گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
[۴] گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
[۵] گروه بیماری‌های طیور، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۳۰ آذر ماه ۱۴۰۰، **تاریخ پذیرش:** ۸ اسفند ماه ۱۴۰۰

10.22059/jvr.2021.311328.3102 20.1001.1.20082525.1401.77.1.3.8

چکیده

زمینهٔ مطالعه: *گالی‌باکتریوم آناتیس* گونه‌ای نوظهور از خانواده پاستورلاسه است. این پاتوژن فرصت‌طلب به عنوان بخشی از فلور طبیعی دستگاه تنفس فوقانی و قسمت‌های انتهایی دستگاه تولید مثل طیور در صورت فراهم شدن شرایط مناسب سبب ایجاد عوارض مختلفی از جمله سالپنژیت، پریتونیت و کاهش تولید تخم‌مرغ تا حدود ۱۰ درصد به همراه مرگ و میر در گله‌های مرغ تخم‌گذار می‌شود. با توجه به این‌که افزایش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در مورد این باکتری در مطالعات قبلی به اثبات رسیده، عدم توجه به آلودگی با گالی‌باکتریوم در گله‌های مرغ تخم‌گذار هزینه‌های بالایی به مزارع پرورش مرغ تخم‌گذار تحمیل می‌کند. از سوی دیگر با توجه به عدم ایجاد علائم اختصاصی در درگیری‌های ایجاد شده با این باکتری، تا به امروز توجه لازم برای انجام مطالعه جامعی در مورد وضعیت این بیماری در ایران وجود نداشته است.

هدف: بررسی میزان آلودگی به *گالی‌باکتریوم آناتیس* در گله‌های مرغ تخم‌گذار صنعتی در برخی از استان‌های ایران به عنوان نمونه‌ای برای آغاز فرآیند تعیین میزان شیوع گالی‌باکتریوم در کشور.

روش‌کار: تعداد ۲۹۵ نمونه سوآب نایی از ۱۰ گله مرغ تخم‌گذار اخذ گردید که پس از طی مراحل جداسازی و کشت باکتری و خالص‌سازی آن، بررسی پرگنه‌های نهایی با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مطابق دستور العمل‌های استاندارد انجام شد.

نتایج: ۴۳/۷۲ درصد از نمونه‌ها در مجموع مثبت تشخیص داده شدند.

نتیجه‌گیری نهایی: مطالعه حاضر نشان داد که گله‌های تخم‌گذار در ایران آلوده به *گالی‌باکتریوم آناتیس* بوده و لازم است فرآیند ردیابی، پیشگیری و درمان عوامل کاهش تولید طیور تخم‌گذار و اقدامات لازم جهت کنترل این باکتری انجام پذیرد.

کلمات کلیدی: *گالی‌باکتریوم آناتیس*، خانواده پاستورلاسه، مرغان تخم‌گذار، افت تولید تخم‌مرغ، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است.

نویسنده مسئول: وحید کریمی، گروه بیماری‌های طیور، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
پست الکترونیکی: karimiv336@gmail.com

مقدمه

گالی‌باکتریوم آناتیس از اعضای خانواده پاستورلاسه می‌باشد که اغلب به عنوان بخشی از میکروفلور طبیعی دستگاه تنفس فوقانی و قسمت انتهایی دستگاه تولید مثلی طیور شناخته می‌شود. این باکتری نخستین بار از کلوآک مرغ و خروس‌های به ظاهر سالم و با توانایی همولیز خون و همزمان نیز از کشت‌های خالص پرندگان درگیر پریتونیت و سالپنژیت حاد جداسازی گردید و در سال ۱۹۵۰ میلادی توسط Kjos-Hansen تحت عنوان "cloaca bacterium" معرفی شد (۱).

عبارت گالی‌باکتریوم اولین بار توسط Bisgaard در سال ۱۹۸۲ برای نامگذاری آن استفاده شد. همچنین قبل از شناسایی به عنوان یک جنس مستقل در سال ۲۰۰۳ میلادی، این باکتری تحت نام‌های اکتینوباسیلوس سالپنژیتیدیس، باکتری‌های شبه پاستورلا همولیتیکای طیور یا پاستورلا آناتیس در درگیری‌های مشابه گزارش شده است (۲).

گالی‌باکتریوم طیف میزبانی وسیعی در پرندگان اهلی و حیات وحش دارد این جنس شامل چهار *گونه گالی‌باکتریوم آناتیس*، *گالی‌باکتریوم ملوپسیتاسی*، *گالی‌باکتریوم سالپنژیتیدیس*، *گالی‌باکتریوم تریهالوسی فرمنتانس* و سه گونه ژنومی می‌باشد، ولی مهم‌ترین گونه این جنس آناتیس بوده که *گالی‌باکتریوم آناتیس* خود شامل دو بیووار قابل تفکیک از نظر فنوتیپی همولیتیکا و غیر همولیتیکا است، *گالی‌باکتریوم آناتیس بیووار همولیتیکا* و گونه‌های ژنومی ۱ و ۲ توانایی ایجاد همولیز بتا با قطر ۱ تا ۲ میلی‌متر دور کلنی‌ها در آگار حاوی خون گاو، اسب، خوک، گوسفند، خرگوش یا مرغ را دارند. این باکتری‌ها، گرم منفی، کپسول‌دار، اکسیداز و کاتالاز مثبت می‌باشند. *گالی‌باکتریوم آناتیس* گسترش جهانی داشته و گزارش‌های جداسازی آن در تمام پنج قاره اصلی وجود دارد (۱).

گالی‌باکتریوم آناتیس می‌تواند به صورت دائمی از نای و کلوآک پرندگان سالم جداسازی شود. این موضوع ثابت می‌کند این باکتری بخشی از میکروفلور این نواحی است. از طرفی این باکتری در حالت پاتوژن ضایعات پاتولوژیکی از جمله سپتی‌سمی، پریکاردیت، هپاتیت، اووفوریت، تحلیل فولیکول‌ها، انتریت، زخم‌های دستگاه تنفس فوقانی، سالپنژیت و پریتونیت ایجاد می‌کند که باعث کاهش تولید تخم‌مرغ، کاهش رفاه زیستی پرنده و در انتها افزایش مرگ و میر در گله‌های تولید کننده تخم‌مرغ می‌شود (۱).

گالی‌باکتریوم آناتیس به‌طور معمول از طیور اهلی جداسازی می‌شود اما موارد متعددی از جداسازی در طیف وسیعی از پرندگان اهلی و غیر اهلی شامل بوقلمون، غاز، اردک، بلدرچین، قرقاول و پرندگان خانگی و پرندگان وحشی گزارش شده است. این باکتری از سالپنژیت اردک، سپتی‌سمی و سالپنژیت غاز، سپتی‌سمی و پنومونی کبوتر، سپتی‌سمی بوقلمون، پنومونی قرقاول، سپتی‌سمی طوطی استرالیایی و طوطی طوقدار جداسازی شده است. آلودگی انسانی با *گالی‌باکتریوم آناتیس* در موارد بسیار نادر در افراد دچار بیماری‌های تضعیف کننده ایمنی گزارش شده است. راه انتشار طبیعی همچنان مورد بحث است ولی بیشترین پذیرش روی انتقال افقی باکتری به عنوان راه اصلی وجود دارد و به نظر می‌رسد عفونت بالارونده از طریق کلوآک محتمل‌ترین راه گسترش عفونت باشد، اگرچه یک مورد انتقال از راه تخمدان در سطح ضعیف و متعاقب آن جداسازی *گالی‌باکتریوم آناتیس* از کیسه زرده مشاهده شده است که احتمال وجود انتقال عمودی را نیز یادآور می‌شود (۱).

گالی‌باکتریوم آناتیس نیز همانند سایر باکتری‌های خانواده پاستورلاسه دارای عوامل یا فاکتورهای حدّت است، که اجزایی از ارگانیسم بوده که به آن توانایی ایجاد بیماری می‌دهند و قدرت بیماریزایی ارگانیسم را تعیین می‌کنند. این عوامل در بسیاری از جنبه‌های درگیری میزبان _ پاتوژن مثل قدرت کلونیزاسیون، استفاده از مواد مغذی ضروری، گریز از ایمنی و سرکوب ایمنی دخیل هستند و نقش بازی می‌کنند. فاکتورهای حدّت باکتری شامل توکسین‌ها، آنزیم‌ها و مولکول‌های چسبنده هستند (۱).

از مهم‌ترین عوامل حدّت *گالی‌باکتریوم آناتیس* می‌توان به GtxA، فیمبریه، وزیکول‌های سطح غشایی، کپسول، متالوپروتئازها، هماگلوتینین و تشکیل بیوفیلم اشاره کرد.

GtxA نوعی از RTX توکسین‌ها می‌باشد. RTX توکسین‌ها به وسیله بسیاری از باکتری‌های خانواده پاستورلاسه ترشح می‌شوند و عامل ایجاد خواص همولیتیک و لوکوتوکسیک این باکتری‌ها هستند. این توکسین‌ها از طریق سیستم ترشحی نوع 1(T1SS) که مختص باکتری‌های گرم منفی است ترشح می‌گردند. پروتئین GtxA ترشح شده از *گالی‌باکتریوم آناتیس* دارای فعالیت همولیتیک علیه گلبول‌های قرمز طیف وسیعی از پرندگان و پستانداران و فعالیت لکوتوکسیک علیه ماکروفاژهای لاین HD11 طیور هستند و موتانت‌های فاقد آن به شدت تخفیف حدّت پیدا می‌کنند (۱).

از مهم‌ترین جنبه‌های کلونیزاسیون باکتری توانایی چسبیدن و حمله به بافت‌های میزبان است. اخیراً چندین خوشه فیمبریایی شبیه کلاس F-17 در ژنوم سه سویه مختلف *گالی‌باکتریوم آناتیس* دیده شده‌اند. فیمبریه‌های کلاس F-17 گروهی از فیمبریه‌ها هستند که با رسپتورهای حاوی N-acetyl-D-glucosamine (Glc-NAc) سلول‌های میزبان باند می‌شوند و بنابراین در چسبندگی باکتری به سطوح موکوسی بافت‌های میزبان نقش دارند (۱).

وزیکول‌های سطح غشایی (OMV) ساختارهای کروی با غشاء دو لایه هستند که در نتیجه دارای پروتئین‌های غشاء خارجی و LPS هستند و به عنوان وسیله انتقال لیپیدها، پروتئین‌ها، اجزای DNA و توکسین‌ها به غشاء سلولی استفاده می‌شوند تا با شرایط بدن میزبان مقابله کنند (۲).

نقش کپسول در افزایش مقاومت سرمی، چسبندگی سلولی، فعل و انفعلات بین سلولی و فرار از ایمنی میزبان به اثبات رسیده است، در مطالعات دیده شده که موتانت‌های فاقد کپسول باکتری حدّت بیشتری نسبت به انواع وحشی نشان می‌دهند، به نظر می‌رسد فقدان کپسول موجب در معرض قرار گرفتن آنتی‌ژن‌هایی می‌شود که در حالت طبیعی به واسطه وجود کپسول از دسترس ایمنی میزبان خارج می‌شوند و در نتیجه فقدان کپسول به افزایش پاسخ ایمنی منجر می‌شود (۱).

متالوپروتئازها یکی از انواع پروتئازها هستند که در توانایی کلونیزه شدن، فراهم آوری احتیاجات زیستی باکتری‌ها، فرار از ایمنی میزبان و تسهیل نفوذ باکتری به گردش خون میزبان و انتشار به سایر ارگان‌ها نقش دارند. همچنین با اثر روی ایمونوگلوبولین‌ها و پروتئین‌های سیستم ایمنی میزبان و اجزای سرمی آن پاسخ ایمنی میزبان را تعدیل می‌کنند (۱). *گالی‌باکتریوم آناتیس* متالوپروتئازهایی را ترشح می‌کند که IgG طیور را غیر فعال می‌کنند. پس در فرار از ایمنی میزبان نقش مهمی دارند (۲).

گالی‌باکتریوم آناتیس می‌تواند به سطوح خنثی متصل شود که مرحله اول تشکیل بیوفیلم است. تشکیل بیوفیلم با تسهیل در انتقال ژن و فعال شدن ژن‌های مربوط به حدّت باکتری به بقاء باکتری در شرایط سخت محیط زیستی کمک می‌کند، که به ایجاد شکل مزمن بیماری می‌انجامد. همچنین با ایجاد مقاومت دارویی از طریق نفوذ ناپذیری آنتی بیوتیک در ماتریکس پلیمری، درمان را سخت و طولانی مدت می‌کند (۱).

برخی از سویه‌های *گالی‌باکتریوم آناتیس* قادرند گلبول‌های قرمز پرندگان را آگلوتینه کنند که به واسطه بروز هماگلوتینین در آن‌ها است که می‌تواند با رسپتورهای سطحی گلبول‌های قرمز باند شود. علاوه بر هماگلوتینین سطحی در برخی سویه‌های گالی‌باکتریوم هماگلوتینین از طریق OMVها نیز ترشح می‌شود (۱).

با وجود تلاش‌های انجام شده برای ساخت واکسن، همچنان آنتی بیوتیک درمانی مهم‌ترین روش مهار بیماری ناشی از *گالی‌باکتریوم آناتیس* است، با این وجود، ثابت شده است که *گالی‌باکتریوم آناتیس* به سرعت در برابر داروها مقاوم می‌شود. علاوه بر این، رعایت شرایط امنیت زیستی و بهداشت عمومی می‌تواند به روشی مشابه کنترل سایر بیماری‌های مسری در مرغداری‌ها، در این مورد نیز کارساز باشد (۲).

بروز مقاومت‌های آنتی بیوتیکی در باکتری‌های خانواده پاستورلاسه از جمله *گالی‌باکتریوم آناتیس* مشاهده شده است. اگرچه عفونت‌های گالی‌باکتریوم اغلب درمان‌پذیر به نظر می‌رسند، شکست درمان آنتی یوتیکی در موارد درگیری با گالی‌باکتریوم مشکل رایجی است. مقاومت سویه‌های جداشده گالی‌باکتریوم از طیور به نووبیوسین، تایلوزین، کلیندامایسین، اسپکتینومایسین، تتراسیکلین و پنی‌سیلین گزارش شده است (۲).

علی‌رغم ضرر اقتصادی متعاقب درگیری با *گالی‌باکتریوم آناتیس* در گله‌های ماکیان تخم‌گذار در نقاط مختلف دنیا تحقیقات بسیار اندکی در خصوص وضعیت آلودگی گله‌های تخم‌گذار کشور تا به امروز انجام شده است لذا هدف از مطالعه حاضر بررسی و جداسازی این باکتری در گله‌های تخم‌گذار کشور با استفاده از روش PCRو کشت باکتری می‌باشد.

مواد و روش کار

جمع‌آوری نمونه‌ها: در مطالعه حاضر به منظور بررسی وجود آلودگی با باکتری *گالی‌باکتریوم آناتیس* در گله‌های مرغ تخم‌گذار تحت آزمایش به روش ردیابی DNA باکتری با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز معمول (PCR) ابتدا لازم بود نمونه‌گیری از گله‌ها صورت گیرد. بنابراین پس از اخذ اجازه ورود به مرغداری‌های هدف نمونه‌گیری انجام شد. هدف اولیه نمونه‌گیری از مرغداری‌های استان تهران بود که به علت مشکلات و همزمانی با شیوع آنفلونزای فوق حاد و عدم اجازه ورود به بسیاری از مرغداری‌ها در نهایت نمونه‌گیری از پنج استان انجام شد. در مرحله اول پس از هماهنگی‌های معمول و رعایت اصول نمونه‌برداری استریل بر پایه نمونه‌گیری تصادفی خوشه‌ای از روش نمونه‌برداری با سوآب از نای پرندگان موجود در سالن‌های تولید استفاده شد. پس از اخذ نمونه‌ها در محل مرغداری سوآب‌ها به صورت تکی در لوله‌های استریل حاوی ۲ سی سی محیط BHI قرار داده شد و در کوتاه‌ترین زمان ممکن به آزمایشگاه انتقال داده شدند. در آزمایشگاه ابتدا لوله‌های حاوی نمونه و محیط را ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری کرده و پس از آن نمونه‌ها بر روی پلیت‌های محیط آگار خوندار (Blood Agar) حاوی خون سیتراته ۵ درصد گوسفند کشت خطی داده شدند و مجدد به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. در مرحله بعد کلنی‌ها بر اساس ویژگی‌های فنوتیپی شناسایی اولیه شدند و کلنی‌های مشکوک به گالی‌باکتریوم مجدداً در محیط آگار خوندار کشت خطی داده شدند تا تک کلنی به دست آید.

کلنی‌های جداسازی شده در این مرحله تا زمان انجام آزمایش‌های مولکولی و بیوشیمیایی به محیط برین-هارت بافر حاوی حدود ۵۰۰ میکرولیتر BHI و محلول گلیسیرین ۶۰ درصد استریل شده به میزان هم حجم انتقال داده و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. محلول گلیسیرین به جهت محافظت از جداره باکتری و پیشگیری از تخریب آن مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این مرحله کلنی‌های بتا-همولیز با قطر ۲-۱ میلی‌متر خاکستری، صاف، نیمه شفاف، گرد با حاشیه مشخص جداسازی شدند. سپس جهت شناسایی نهایی بر روی نمونه‌ها آزمایش PCR انجام شد.

برای بررسی خصوصیات بیوشیمیایی نمونه‌های مثبت قطعی پس از PCR از بین نمونه‌های سالن‌های مثبت شده ۵ نمونه به صورت تصادفی از هر سالن انتخاب شد و آزمایش‌های رنگ‌آمیزی گرم، کشت روی محیط آگار مک‌کانکی، اکسیداز، کاتالاز، اوره‌آز، نیترات، ایندول روی آن‌ها انجام شد.

استخراج DNA: برای استخراج DNA مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از سویه‌هایی که قبلاً در محیط BHI کشت داده شده بود، به میکروتیوب حاوی همین مقدار نرمال سالین استریل انتقال داده و در حرارت آب جوش به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد، بقیه مراحل جداسازی را طبق پروتکل جداسازی کیت استخراج DNA ساخت شرکت MBST انجام داده و نمونه هموژن نهایی را تا زمان انجام PCR در یخچال منفی ۶۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

روش PCR: محلول کار PCR شامل ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس، ۰/۵ میکرولیتر از هر تک جفت پرایمر، ۰/۵ میکرولیتر از نمونه آلوده و ۸/۵ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر عاری از آنزیم DNase و RNase بود که در مجموع حجم کل نمونه برابر با ۲۰ میکرولیتر شد. برنامه دمایی به این صورت تنظیم شد که ابتدا به مدت ۴ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد سپس ۳۵ سیکل متشکل از ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد و ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و در نهایت به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد جهت مرحله اکستنشن پایانی یا امتدادیابی انجام شد. محصولات PCR با استفاده از ژل آگاروز ۱ درصد و رنگ اتیدیوم بروماید با استفاده از دستگاه فرابنفش مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. برای کنترل مثبت از سویه *G. anatis* (12656-12) biovar haemolytica اهدایی پروفسور Bojesen شاغل در بخش میکروبیولوژی دامپزشکی دانشگاه کپنهاگ دانمارک و برای کنترل منفی از آب مقطر استریل استفاده شد.

جدول ۱. سکانس پرایمر ژن 16S rRNA مورد استفاده در روش PCR جهت شناسایی *گالی‌باکتریوم آناتیس* (In-house).

طول باند	مشخصات پرایمر
۱۵۴	Primer Forward 5-ACC GGT TGA AAG CTT GCT TT-3 Primer Reverse 5-GTT CAT CCC TTG GCA AGT GG-3

جدول ۲. نتایج جداسازی و شناسایی مولکولی جدایه‌های *گالی‌باکتریوم آناتیس* در مزارع پرورش مرغ تخم‌گذار.

مزرعه	نژاد	سن گله (هفته)	منطقه	استان	درصد تولید	تعداد نمونه	پرگنه مشکوک	درصد پرگنه مشکوک	تعداد PCR مثبت	درصد PCR مثبت
A	هایلاین	۱۱۹	دماوند	تهران	۵۵	۳۰	۲۳	۷۶/۶۶	۲۱	۷۰
B	هایلاین	۶۲	آبیک	قزوین	۸۲	۳۰	۲۲	۷۳/۳۳	۱۵	۵۰
C	هایلاین	۳۴	آبیک	قزوین	۹۰	۳۰	۲۲	۷۳/۳۳	۱۵	۵۰
D	هایلاین	۵۰	رباط‌کریم	تهران	۹۷	۳۰	۲۳	۷۶/۶۶	۲۰	۶۶/۶۶
E	نیک‌چیک	۵۰	رباط‌کریم	تهران	۹۸	۳۰	۲۲	۷۳/۳۳	۱۹	۶۳/۳۳
F	بونز	۴۰	گرگان	گلستان	۸۶	۳۰	۱۰	۳۳/۳۳	۸	۲۶/۶۶
G	هایلاین	۵۲	سمنان	سمنان	۸۴	۳۰	۱۱	۳۳/۶۶	۵	۱۶/۶۶
H	هایلاین	۵۴	سمنان	سمنان	۸۵	۳۰	۶	۲۰	۰	۰
I	هایلاین	۴۸	آبیک	قزوین	۷۳	۳۰	۹	۳۰	۶	۲۰
J	هایلاین	۵۱	شهرکرد	چهار محال و بختیاری	۶۵	۲۵	۲۵	۱۰۰	۲۰	۸۰
جمع						۲۹۵	۱۷۳	۵۸/۶۵	۱۲۹	۴۳/۷۲

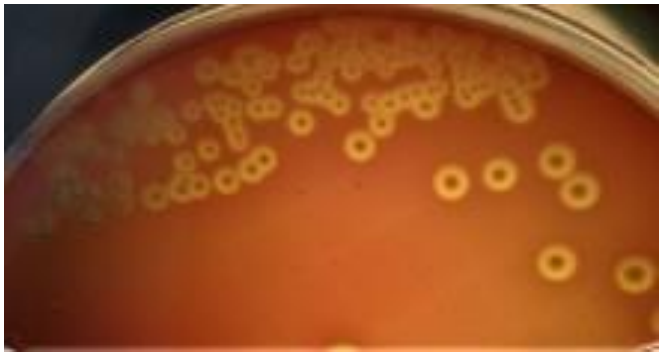
در مطالعه حاضر با استفاده از توالی نوکلئوتیدی ژن 16S rRNA در باکتری *گالی‌باکتریوم آناتیس* با شماره دسترسی AF228011.1، توسط برنامه تحت شبکه primer3 یک زوج پرایمر طراحی شد. سپس با استفاده از نرم‌افزار BLAST از اختصاصی بودن پرایمرها برای ردیابی توالی‌های نوکلئوتیدی مشابه ثبت شده در بانک ژن جهانی (Genbank) اطمینان حاصل شد و حساسیت و ویژگی پرایمرها با DNA استخراج شده از باکتری مزبور به عنوان کنترل مثبت مورد تأیید قرار گرفت. سپس توالی نوکلئوتیدی توسط شرکت سیناکلون ساخته شد. برای انجام کار نیز از مسترمیکس آماده مصرف ساخت شرکت سیناکلون استفاده شد. در نهایت اندازه باند محصول نهایی واکنش برابر با ۱۵۴ bp بود (جدول ۱).

نتایج

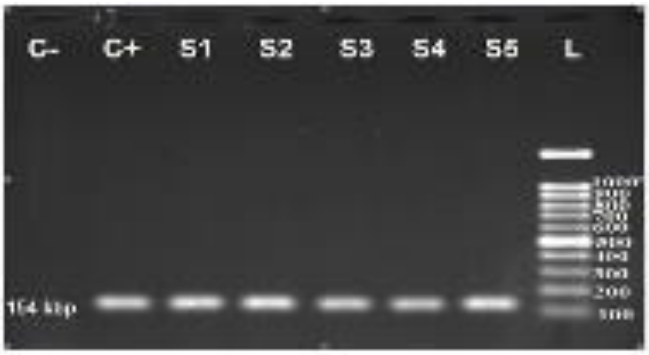
در مطالعه حاضر ۲۹۵ نمونه از ۱۰ گله مرغ تخم‌گذار مورد بررسی قرار گرفت و پس از مراحل کشت و جداسازی کلنی‌های مشکوک کوچک، صاف، خاکستری، نیمه‌شفاف با همولیز به شعاع بین ۲ الی ۳ میلی‌متر در اطراف کلنی پس از ۲۴ ساعت کشت در محیط بلاد آگار مشابه آنچه در تصویر ۱ نشان داده شده است، برای بررسی بیشتر و انجام PCR جمع‌آوری و ذخیره‌سازی شدند. پس از انجام PCR از مجموع ۲۹۵ نمونه سوآب نای اخذ شده، ۴۳/۷۲ درصد نمونه‌ها مثبت بودند. نمونه نتایج PCR در تصویر ۲ نشان داده شده است. میزان شیوع *گالی‌باکتریوم آناتیس* به تفکیک گله و شهر نیز در جدول ۲ نشان داده شده است. تمام ۴۵ نمونه انتخاب شده برای بررسی بیوشیمیایی کلونی‌های بتا-همولیز، گرم منفی، اکسیداز مثبت، کاتالاز مثبت، اوره‌آز منفی، ایندول منفی، مک‌کانکی منفی بودند.

بحث

گالی‌باکتریوم آناتیس طیف میزبانی وسیعی در پرندگان اهلی و حیات وحش دارد. این باکتری می‌تواند به عنوان بخشی از میکروفلور طبیعی دستگاه تنفس فوقانی و قسمت‌های انتهایی دستگاه تولید مثل طیور در صورت فراهم شدن شرایط کاهنده سطح ایمنی میزبان، به تنهایی و یا همراه سایر باکتری‌ها تغییرات پاتولوژیک وسیعی به ویژه در دستگاه تولید مثلی طیور ایجاد کند (۲).



تصویر ۱. کشت خالص شده *گالی‌باکتریوم آناتیس* بیووار همولیتیکا: کلونی‌های کوچک، صاف، خاکستری، نیمه شفاف با همولیز بتا به شعاع ۳-۲ میلی‌متر در اطراف کلونی پس از ۲۴ ساعت کشت در محیط آگار خوندار.



تصویر ۲. نتایج مثبت نمونه‌های مشکوک به *گالی‌باکتریوم آناتیس* جداسازی شده از گله‌های تخم‌گذار بر روی ژل پس از انجام PCR و الکتروفورز.
L= Ladder, S1-S5=Samples, C-=Negative Control (sterile distilled water), C+= Positive Control: G. anatis biovar haemolytica (12656-12).

Matthes و Löliger در سال ۱۹۷۶ طی مطالعه‌ای با وارد کردن 10^2cfu گالی‌باکتریوم به چینه‌دان جوجه‌های SPF یک روزه و جوجه‌های ۶ هفته به طور جداگانه و بررسی میزان ماندگاری باکتری در ۸ هفته دریافتند، باکتری پس از مدت کوتاهی از روده‌ها و در موارد کمتر از سایر ارگان‌های داخلی پرندگان مورد مطالعه قابل جداسازی است این مطالعه نشان می‌دهد گالی‌باکتریوم می‌تواند به صورت عفونتی طولانی مدت یا دائمی درآید (۳).

شیوع گالی‌باکتریوم در گله‌های مرغ تخم‌گذار صنعتی به وسیله Mushin و همکاران در سال ۱۹۸۰ گزارش شده است. آن‌ها از ۳۲۲ نمونه جمع‌آوری شده از ۲۳ گله متفاوت مرغان تخم‌گذار به ظاهر سالم و بدون علامت، ۹۷ درصد نمونه‌ها را آلوده با گالی‌باکتریوم تشخیص دادند (۴). این مطالعه در تطابق با مطالعات قبلی Bisgaard در سال ۱۹۷۷ بود که گالی‌باکتریوم را به عنوان

یکی از باکتری‌های فلور طبیعی دستگاه تنفس فوقانی مرغان تخم‌گذار مطرح کرد (۵).

براساس مطالعات اخیر Paudel و همکاران درسال ۲۰۱۴ گالی‌باکتریوم پاتوژن فرصت‌طلبی است که در شرایط مناسب قادر است بیماری ایجاد کند و عوامل مستعد کننده از قبیل عفونت‌های همزمان با سایر میکروارگانیسم‌ها، تأثیرات هورمونی، سن، تغییرات فصلی، استرس، وضعیت‌های کاهنده ایمنی و استعداد ژنتیکی میزبان در تعیین نتیجه درگیری با باکتری مؤثرند (۶).

Paudel و همکاران درسال ۲۰۱۴ طی یک مطالعه تجربی دریافتند در جوجه خروس‌هایی که از راه تلقیح داخل بینی با *گالی‌باکتریوم آناتیس* آلوده شده بودند یک هفته بعد از درگیری از کشت بیضه و اپیدیدیم آن‌ها باکتری به صورت خالص قابل جداسازی است و در این مورد کاهش شدید تعداد و حرکت اسپرم‌ها و کاهش حرکات پیشرونده مؤثر در اسپرم‌ها و کاهش مقاومت غشایی آن‌ها از عوارض آلودگی با *گالی‌باکتریوم آناتیس* بود که به شدت باروری آن‌ها را کاهش می‌داد. همچنین جداسازی باکتری از خروس‌ها و نقش آن در کاهش کیفیت و کمیت اسپرم‌های فعال نشان داد خروس‌ها در انتقال باکتری در گله‌های مولد نقش مهمی دارند (۶).

امروزه روش PCR به علت توانایی شناسایی چندین نمونه به صورت همزمان، حساسیت بالا و عدم نیاز به کشت *گالی‌باکتریوم آناتیس* به عنوان روش قطعی و طلایی جایگزین روش‌های سنتی شناسایی فنوتیپی این باکتری شده است.

Shaw و همکاران در سال ۱۹۸۹ در مینه‌سوتای آمریکا طی بررسی ۵ گله ماکیان تخم‌گذار که با افزایش مرگ و میر ناگهانی مواجه شده بودند با استفاده از PCR وجود *گالی‌باکتریوم آناتیس* را در ۳ گله در کنار ویروس لارنگوتراکئیت تأیید کردند و مطرح کردند که این باکتری باعث افزایش خسارت ناشی از بیماری‌های ویروسی می‌شود (۷).

Bojesen و همکاران در سال ۲۰۰۷ برای تعیین میزان حساسیت و ویژگی PCR برای شناسایی گالی‌باکتریوم، ۱۲۲ ایزوله را با استفاده از دو پرایمر (1133fgal) 16S rRNA و 23S rRNA (114r) مورد ارزیابی قرار دادند که در این میان ۷۵ نمونه از ۱۸ گله مرغ تخم‌گذار از مناطق مختلف مکزیک، ۲۵ نمونه بیووارهای مختلف گالی‌باکتریوم به عنوان مرجع و کنترل مثبت، ۱۷ نمونه از باکتری‌های مختلف خانواده پاستورلاسه به جز گالی‌باکتریوم و ۵ نمونه از خانواده‌های فلاووباکتریاسه و انتروباکتریاسه برای تشخیص تفریقی بودند که تمام نمونه‌های گالی‌باکتریوم باندهای قابل انتظار حاصل تکثیر ژنی را روی ژل الکتروفورز نهایی نشان دادند در حالی که در ۲۲ نمونه دیگر هیچ باندی دیده نشد. این نتایج کفایت روش PCR برای شناسایی و تفکیک گالی‌باکتریوم از سایر باکتری‌ها را به خوبی نشان می‌دهد (۸).

Zepeda و همکاران در سال ۲۰۱۰ با تزریق باکتری داخل بینی ماکیان و روش‌های مولکولی تکمیلی و سپس تهیه لام پاتولوژی نشان دادند که *گالی‌باکتریوم آناتیس* توانایی ایجاد ضایعات میکروسکوپی در نای،کیسه‌های هوایی، ریه و کبد را دارا بوده و از این جهت به عنوان پاتوژن اولیه در ماکیان مطرح می‌باشد (۹).

Huangfu و همکاران در سال ۲۰۱۲ با روش qPCR روی ژن gtxA *گالی‌باکتریوم آناتیس* برای ردیابی باکتری، ۳۶/۵ درصد از ۱۸۱ نمونه بافتی مورد بررسی را آلوده تشخیص دادند. آن‌ها با بررسی بافت‌های متفاوت دریافتند بیشترین میزان باکتری از نای و تخمدان‌ها و حتی در جوجه‌های ۴ روزه قابل ردیابی است (۱۰).

Jones و همکاران در سال ۲۰۱۳ طی یک مطالعه گذشته‌نگر از نوامبر ۲۰۰۶ تا دسامبر ۲۰۱۱ روی میزان جداسازی *گالی‌باکتریوم آناتیس* و پاستورلا مولتوسیدا در نمونه‌های مرغ تخم‌گذار و مادر ارجاعی به آزمایشگاه تحقیق و تشخیص بیماری‌های طیور می‌سی‌سی‌پی دریافتند که میزان جداسازی *گالی‌باکتریوم آناتیس* در طی یک دوره ۵ ساله رو به افزایش بوده است (۱۱).

Wang و همکاران درسال ۲۰۱۶ برای تعیین روش شناسایی گونه‌ای گالی‌باکتریوم به وسیله (qPCR) روی ژن (gyrB) مطالعه‌ای انجام دادند که طی آن ۲۲ نمونه از بیووارهای مختلف *گالی‌باکتریوم آناتیس* به عنوان مرجع و کنترل، ۹ نمونه از ۶ گونه گالی‌باکتریوم دیگر به جز *گالی‌باکتریوم آناتیس* و ۲۱ نمونه از سایر باکتری‌های مهم خانواده‌های پاستورلاسه، فلاووباکتریاسه و انتروباکتریاسه مرتبط با طیور برای تشخیص تفریقی بهتر استفاده شدند. که آن‌ها توانستند با موفقیت تمام نمونه‌های مثبت را شناسایی کنند و ژن (gyrB) را که قبلاً توسط Bojesen و همکاران در ۲۰۰۷ شناسایی شده بود بین رقت‌های ۱۰ تا $۱۰^{۸}$ با

حساسیت ۹۷ درصد در مقابل ۷۸ درصد PCR عادی، شناسایی کنند (۱۲).

El-Adawy و همکاران در آلمان در سال ۲۰۱۷ با استفاده از روش PCR-RFLP روی ۱۲۰ نمونه بافتی به دست آمده از ماکیان دارای علائم تنفسی و کاهش تولید در ۱۸ منطقه جغرافیایی مختلف در ایالت تورینجیای آلمان به بررسی میزان آلودگی با گالی‌باکتریوم در ماکیان، بوقلمون و کبک پرداختند. این محققین از ارگان‌های مختلف دچار ضایعات پاتولوژیک از جمله کیسه‌های هوایی و نای جهت بررسی نمونه اخذ کردند و از ۱۹ پرنده آلوده تعداد ۹ پرنده (۴۷/۴ درصد) فقط درگیر با گونه گالی‌باکتریوم بودند و مابقی آن‌ها (۵۲/۶ درصد) علاوه بر گالی‌باکتریوم با انواع دیگری از باکتری‌ها نظیر *اشریشیاکلی*، *کلستریدیوم پرفرنجنس* و مایکوپلاسما و آدنوویروس‌ها آلوده بودند (۱۳).

اولین جداسازی و شناسایی *گالی‌باکتریوم آناتیس* در ایران توسط Ataei و همکاران در سال ۲۰۱۶ گزارش شد. آن‌ها از پرایمر طراحی شده توسط Bojesen و همکاران در ۲۰۰۷ استفاده کردند که برمبنای شناسایی قطعه (ITS) بین 16S rRNA و 23S rRNA طراحی شده است. این محققین با اخذ نمونه سوآب از تخمدان، اویداکت، کلوآک و محوطه شکمی ماکیان تخم‌گذار دارای سالپنژیت ارجاعی به کشتارگاه صنعتی با استفاده از روش PCR و روش‌های فنوتیپی وجود *گالی‌باکتریوم آناتیس* را تأیید کردند (۱۴).

در ادامه Omidvar و همکاران در سال ۲۰۱۸ وجود *گالی‌باکتریوم آناتیس* را در ۵ گله انتخابی (۲ گله تخم‌گذار صنعتی و ۳ گله مرغ بومی تخم‌گذار رنگی) در استان اصفهان به وسیله PCR مورد تأیید قرار دادند. در این مطالعه از جفت پرایمر طراحی شده توسط نرم افزار Blast در سایت NCBI به منظور جستجوی ژنومی جنس گالی‌باکتریوم در نمونه‌ها مطابق روشی که قبلاً توسط محقق دانمارکی Bojesen و همکارانش در سال ۲۰۰۷ انجام شده بود استفاده کردند، با این تفاوت که از جفت پرایمر مخصوص جنس گالی‌باکتریوم برای ژن 16S rRNA به طول ۱۵۴ bp برای شناسایی *گالی‌باکتریوم آناتیس* استفاده شد. نتایج حاکی از آن بود که از ۵۰ نمونه سوآب اخذ شده از کلوآک و نای، ۹ نمونه (۱۸ درصد) آلوده به *گالی‌باکتریوم آناتیس* بود. نتایج تفکیکی مطالعه اخیر به این صورت بود که از ۲۰ نمونه اخذ شده از دو گله تخم‌گذار صنعتی۷ نمونه (۳۵ درصد) از نمونه‌ها آلوده به باکتری بودند.

Bojesen و همکاران در سال ۲۰۰۳ به بررسی درصد شیوع *گالی‌باکتریوم آناتیس* بیووار همولایتیکا در گله‌های مرغ با سطوح امنیت زیستی متفاوت شامل مرغ تخم‌گذار ارگانیک با تغذیه در فضای باز، مرغ تخم‌گذار صنعتی، مرغ مادر تخم‌گذار، مرغ مادر گوشتی و گله اجداد گوشتی در دانمارک پرداختند. آن‌ها از هر مزرعه ۳۰ پرنده انتخاب و سوآب نایی و کلوآک از هر یک اخذ کردند و تعیین کردند حتی اگر یک نمونه مثبت شد کل مزرعه را آلوده در نظر بگیرند. از کل ۲۷ مزرعه مورد مطالعه تمام پرندگان مزارع اجداد گوشتی منفی و فاقد آلودگی بودند در حالی که ۲۸ درصد پرندگان مرغ مادر گوشتی، ۴۰ درصد پرندگان مرغ مادر تخم‌گذار، ۶۷ درصد پرندگان گله‌های مرغ تخم‌گذار صنعتی و ۹۶ درصد پرندگان مزارع مرغ تخم‌گذار ارگانیک با تغذیه در فضای باز مثبت بودند. از ۹۵/۹ درصد پرندگان مزارع آلوده (با انحراف معیار ۷/۶ درصد) *گالی‌باکتریوم آناتیس* بیووار همولایتیکا جداسازی شد و به صورت معنی‌داری درصد نمونه‌های مثبت در سوآب‌های اخذ شده از نای بالاتر از سوآب‌های کلوآک بود. این مطالعه اهمیت رعایت سطوح بالاتر امنیت زیستی را در کاهش میزان آلودگی مزارع یادآور می‌شود (۱۵).

مطالعات Sorour و همکاران در سال ۲۰۱۵ در مصر با استفاده از PCR در اردک و ماکیان مبتلا به سندرم تنفسی نشان داد که گالی‌باکتریوم در ۲۴ درصد ماکیان و ۲۶ درصد اردک‌ها از ۵۰ نمونه اخذ شده وجود داشت. این مطالعه نیز نقش امنیت زیستی را مورد تأکید قرار داده است (۱۶).

مطالعات انجام شده دیگر بسیاری نیز نقش امنیت زیستی در میزان آلودگی گله‌ها به باکتری *گالی‌باکتریوم آناتیس* را مورد تأیید قرار می‌دهند. نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر با نتایج سایر محققین در این مورد همخوانی دارد که با افزایش سن گله‌ها به علت مواجهه بیشتر با عوامل عفونی و کاهش میزان مقاومت سیستم ایمنی پرندگان و لغزش‌های مدیریت بهداشتی در پرورش گله‌ها میزان آلودگی روند افزایشی دارد. هر چند به علت گوناگونی نژادهای پرورشی گله‌های تخم‌گذار و شرایط پرورشی متنوع، لازم است تحقیقات بیشتری روی نقش تفاوت‌های نژادی در مقاومت به عفونت انجام پذیرد که از هدف تعیین شده مطالعه حاضر فاصله دارد. همچنین می‌توان نتیجه گرفت که بالاتر بردن سطح مدیریت بهداشتی و امنیت زیستی گله‌ها نقش تعیین کننده‌ای در کاهش میزان موارد آلودگی دارد (لازم به یادآوری است که تعیین توالی

جدایه‌های به دست آمده که نتایج آن می‌تواند در ارتقاء مطالعات آتی کاملاً مؤثر باشد از اهداف بعدی محققین می‌باشد).

با توجه به نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر و آلودگی ۴۳/۷۲ نمونه‌ها به *گالی‌باکتریوم آناتیس* و با توجه به محدودیت‌های اخذ نمونه‌ها به دلیل شیوع اپیدمی آنفلونزای فوق حاد در سطح کشور در زمان نمونه‌برداری می‌توان نتیجه گرفت آلودگی با گالی‌باکتریوم قطعاً در سطح گسترده‌ای در ایران وجود دارد و برای تعیین میزان شیوع کلی و برآورد میزان خسارت‌های سالانه ناشی از عفونت با این باکتری لازم است مطالعات جامع‌تری انجام شود. در کل با توجه به اطلاعات موجود، نبود واکسن مؤثر به صورت صنعتی و مقاومت ذاتی این باکتری به آنتی بیوتیک‌ها تنها راه کاهش خسارات بیماری رعایت بیشتر موارد امنیت زیستی در گله‌های مولد تخم‌مرغ می‌باشد.

سپاسگزاری

مطالعه حاضر براساس طرح مشترک مصوب دانشگاه تهران و موسسه واکسن و سرم سازی رازی انجام گرفته است. لذا نویسندگان برخود لازم می‌دانند از توجهات و مساعدت‌های معاونت پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، اداره کل دامپزشکی استان تهران، معاونت پژوهشی موسسه واکسن و سرم سازی رازی، گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران و سایر عزیزانی که ما را یاری کردند تشکر و قدردانی نمایند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Persson G, Bojesen AM. Bacterial determinants of importance in the virulence of *Gallibacterium anatis* in poultry. Vet Res. 2015; 46(1): 57. doi: 10.1186/s13567-015-0206-z
2. Varan Singh S, Singh BR, Sinha DK, Kumar V, Prasannavadhana A, Bhardwaj M, Dubey S. *Gallibacterium anatis*: An Emerging Pathogen of Poultry Birds and Domiciled Birds. J Vet Sci Technol. 2015; 7(3): 1-7. doi: 10.4172/2157-7579.1000324
3. Matthes S, Löliger HC. Beitrag zur Kinetik bakterieller Infektionen beim Huhn [Kinetics of bacterial infections in hens]. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 1976 Mar 1; 89(5): 98-102. German. PMID: 1259695
4. Mushin R, Weisman Y, Singer N. *Pasteurella haemolytica* Found in the Respiratory Tract of Fowl. Avian Dis. 1980; Avian Diseases. 24(1): 162-168. doi: 10.2307/1589775
5. Bisgaard M. Incidence of *Pasteurella haemolytica* in the respiratory tract of apparently healthy chickens and chickens with infectious bronchitis. characterisation of 213 strains. Avian Pathol. 1977; 6(4): 285-92. doi: 10.1080/03079457708418238
6. Paudel S, Liebhart D, Aurich C, Hess M, Hess C. Pathogenesis of *Gallibacterium anatis* in a natural infection model fulfils Koch's postulates: 2. Epididymitis and decreased semen quality are the predominant effects in specific pathogen free cockerels. Avian Pathol. 2014; 43(6): 529-34. doi: 10.1080/03079457.2014.967176
7. Shaw DP, Cook DB, Maheswaran SK, Lindeman CJ, Halvorson DA. *Pasteurella haemolytica* as a co-pathogen in pullets and laying hens. Avian Dis. 1990 Oct-Dec; 34(4): 1005-8. PMID: 2177972
8. Bojesen AM, Vazquez ME, Robles F, Gonzalez C, Soriano EV, Olsen JE, Christensen H. Specific identification of *Gallibacterium* by a PCR using primers targeting the 16S rRNA and 23S rRNA genes. Vet Microbiol. 2007; 123(1-3): 262-268. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.02.013
9. Zepeda A, Ramırez S,Vega V, Morales V, Talavera M, Salgado-Miranda C, Simon-Martınez J, Bojesen AM, Soriano-Vargas E. Hemagglutinating Activity of *Gallibacterium* Strains. Avian Dis. 2009; 53(1): 115-118. doi: 10.1637/8375-060908-resnote.1
10. Huangfu H, Zhao J, Yang X, Chen L, Chang H, Wang X, Li Q, Yao H, Wang C. Development and Preliminary Application of a Quantitative PCR Assay for Detecting gtxA-Containing *Gallibacterium* Species in Chickens. Avian Dis. 2012; 56(2): 315-320. doi: 10.1637/9907-082511-reg.1
11. Jones KH,Thornton JK, Zhang Y, Mauel MJ. A 5-year retrospective report of *Gallibacterium anatis* and pasteurella multocida isolates from chickens in Mississippi. Poult Sci. 2013; 92(12): 3166-3171.doi: 10.3382/ps.2013-03321
12. Wang C, Robles F, Ramirez S, Riber AB, Bojesen AM. Culture-independent identification and quantification of *Gallibacterium anatis* (*G. anatis*) by real-time quantitative PCR. Avian Pathol. 2016; 45(5): 538-544. doi: 10.1080/03079457.2016.1184743
13. El-Adawy H, Bocklisch H, Neubauer H, Hafez HM, Hotzel H. Identification, differentiation and antibiotic susceptibility of *Gallibacterium* isolates from diseased poultry. Ir Vet J. 2018; 71: 5. doi: 10.1186/s13620-018-0116-2
14. Ataei S, Bojesen AM, Amininajafi F, Ranjbar MM, Banani M, Afkhamnia M, Abtin A, Goodarzi H. First report of *Gallibacterium* isolation from layer chickens in Iran. Arch Razi Inst. 2017; 72(2): 125-130. doi: 10.22092/ari.2017.109842
15. Bojesen AM, Christensen H, Nielsen OL, Olsen JE, Bisgaard M. Detection of *Gallibacterium* spp. in Chickens by Fluorescent 16S rRNA In Situ Hybridization. J Clin Microbiol. 2003; 41(11): 5167-5172. doi: 10.1128/JCM.41.11.5167-5172.2003
16. Sorour HK, Al Atfeehy NM, Shalaby AG. *Gallibacterium Anatis* Infection in Chickens and Ducks. Assiut Vet Med J. 2015; 61(147): 80-86.

Journal of Veterinary Research
J Vet Res, Volume 77, Number 1, 2022
Original Article

Isolation and Molecular Identification of *Gallibacterium Anatis* Isolates in Layer Flocks

Morteza Hadadian[1], Saeed Ataei Kachooei[2], Mohammadreza Mahzounieh[3], Ramak Yahyaraeyat[4], Vahid Karimi[5]

[1] *Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*
[2] *Department of Avian Diseases, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran*
[3] *Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran*
[4] *Departement of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*
[5] *Department of Poultry Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*

10.22059/jvr.2021.311328.3102
Received: *21 December 2021*., ***Accepted:*** *27 February 2022*

Abstract

BACKGROUND: *Gallibacterium* anatis is a recently defined genus, which is a member of the *Pasteurellaceae* family. This advantageous pathogen is frequently found as part of the normal microflora of the upper respiratory tract and lower genital tract of the healthy poultry. Provided with appropriate conditions, it leads to various diseases, such as salpingitis, peritonitis, and loss of egg production with mortality in layer flocks. According to previous studies, multiple antibiotic resistance has been observed among *G. anatis* isolates, which can impose high costs on layer flocks. Due to the lack of the pathognomonic symptoms in the conflicts caused by this bacterium, not enough comprehensive research has been conducted to date on the condition of this disease in Iran.
OBJECTIVES: This study aimed to investigate the infection rates of this bacterium via PCR.
METHODS: 295 tracheal swabs were collected from 10-layer flocks. Subsequently, the suspected colonies were isolated and identified with morphological features, differential cultivation, and PCR.
RESULTS: 43.72 % of the samples were positive.
CONCLUSIONS: The results of this study indicated that laying farms in Iran were infected with Gallibacterium anatis; thus, certain measures should be taken to control the factors reducing the production of layer flocks.

Keywords: *Gallibacterium anatis*, *Pasteurellaceae* family, Egg production loss, PCR, Layer flocks

Copyright © 2020. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

Corresponding author's email: karimiv336@gmail.com Tel/Fax: 021-61117124/021-66933222

How to cite this article:

Hadadian M, Ataei Kachooei S, Mahzounieh M, Yahyaraeyat R, Karimi V. Isolation and Molecular Identification of *Gallibacterium Anatis* Isolates in Layer Flocks. J Vet Res, 2022; 77(1): 19-27. doi: 10.22059/jvr.2021.311328.3102

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Primer sequence of 16 S rRNA gene used in PCR method for identification of *Gallibacterium anatis.*
Table 2. Results of isolation and molecular identification of *Gallibacterium anatis* in layer flocks using culture and PCR.
Figure 1. Purified culture of *Gallibacterium anatis* biovar Hemolytica: small, smooth, gray, and translucent colonies with beta hemolysis around the colony after 24 hours of culture in blood agar.
Figure 2. Gel electrophoresis results of 16S rRNA gene of the suspected isolates from laying flocks. L= ladder, S1-S5= samples, C-= negative control (sterile distilled water), C+= positive control: *G. anatis* biovar haemolytica (12656-12).