



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 ایمنولوژی، 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

doi [10.22059/jvr.2021.311328.3102](https://doi.org/10.22059/jvr.2021.311328.3102) [20.1001.1.20082525.1401.77.1.3.8](https://doi.org/10.1001.1.20082525.1401.77.1.3.8)

چکیده

زمینه 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 سالیپنیت، 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.

روش کار: تعداد ۲۹۵ نمونه سوآب نابی 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 پلیمرز 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 پلیمرز

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

توانایی همولیز خون و همزمان نیز از کشت‌های خالص پرندگان درگیر پریتونیت و سالیپنیت حاد جداسازی گردید و در سال ۱۹۵۰ میلادی توسط Kjos-Hansen تحت عنوان "cloaca bacterium" معرفی شد (۱).

گالی‌باکتریوم آناتیس از اعضای خانواده پاستورلاسه می‌باشد که اغلب به عنوان بخشی از میکروفلور طبیعی دستگاه تنفس فوقانی و قسمت انتهایی دستگاه تولید مثل طیور شناخته می‌شود. این باکتری نخستین بار از کلواک مرغ و خروس‌های به ظاهر سالم و با

کلواک محتمل‌ترین راه گسترش عفونت باشد، اگرچه یک مورد انتقال از راه تخمدان در سطح ضعیف و متعاقب آن جداسازی گالی باکتریوم آناتیس از کیسه زرده مشاهده شده است که احتمال وجود انتقال عمودی را نیز یادآور می‌شود (۱).

گالی باکتریوم آناتیس نیز همانند سایر باکتری‌های خانواده پاستورلاسه دارای عوامل یا فاکتورهای حدت است، که اجزایی از ارگانسیم بوده که به آن توانایی ایجاد بیماری می‌دهند و قدرت بیماری‌زایی ارگانسیم 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 حدت باکتری شامل توکسین‌ها، آنزیم‌ها و مولکول‌های چسبنده هستند (۱).

از مهم‌ترین عوامل حدت گالی باکتریوم آناتیس می‌توان به GtxA، فیمبریه، وزیکول‌های سطح غشایی، کپسول، متالوپروتئازها، هم‌گلوتینین 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 ترشحي نوع 1 (T1SS) که مختص باکتری‌های گرم منفی است ترشح می‌گردند. پروتئین GtxA ترشح شده از گالی باکتریوم آناتیس دارای فعالیت همولیتیک علیه گلبول‌های قرمز طیف وسیعی از پرندگان و پستانداران و فعالیت لوکوتوکسیک علیه ماکروفاژهای لاین HD11 طیور هستند و موتانت‌های فاقد آن به شدت تخفیف حدت 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 گالی باکتریوم 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).

عبارت گالی باکتریوم 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).

گالی باکتریوم طیف میزبانی وسیعی در پرندگان اهلی و حیات وحش دارد این جنس شامل چهار گونه گالی باکتریوم آناتیس، گالی باکتریوم ملوپسی‌تاسی، گالی باکتریوم سالپنژی‌تیدیس، گالی باکتریوم تریهالوسی فرمنتانس و سه گونه ژنومی می‌باشد، ولی مهم‌ترین گونه این جنس آناتیس بوده که گالی باکتریوم آناتیس خود شامل دو بیووار قابل تفکیک از نظر فنوتیپی همولیتیک و غیر همولیتیک است، گالی باکتریوم آناتیس بیووار همولیتیک 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. گالی باکتریوم آناتیس گسترش جهانی داشته و گزارش‌های جداسازی آن در تمام پنج قاره اصلی وجود دارد (۱).

گالی باکتریوم آناتیس می‌تواند به صورت دائمی از نای و کلواک 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، پریکارڈیت، هپاتیت، اووفوریت، تحلیل فولیکول‌ها، انتريت، زخم‌های دستگاه تنفس فوقانی، سالپنژی‌ت و پریتونیت ایجاد می‌کند که باعث کاهش تولید تخم‌مرغ، کاهش رفاه زیستی پرندگان و در انتها افزایش مرگ و میر در گله‌های تولید کننده تخم‌مرغ می‌شود (۱).

گالی باکتریوم 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 گالی باکتریوم 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

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

علی‌رغم ضرر اقتصادی متعاقب درگیری با *گالی باکتریوم آنتیسی* 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 PCR و کشت باکتری می‌باشد.

مواد و روش کار

جمع‌آوری نمونه‌ها: در مطالعه حاضر به منظور بررسی وجود آلودگی با باکتری *گالی باکتریوم آنتیسی* در گله‌های مرغ تخم‌گذار تحت آزمایش به روش ردیابی DNA باکتری با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز 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 آنفلوئزای 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 *گالی باکتریوم* مجدداً در محیط آگار خوندار کشت خطی داده شدند تا تک کلنی به دست آید.

نقش کپسول در افزایش مقاومت سرمی، چسبندگی سلولی، فعل و انفعالات بین سلولی و فرار از ایمنی میزبان به اثبات رسیده است، در مطالعات دیده شده که موتانت‌های فاقد کپسول باکتری حدت 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، فراهم‌آوری 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). *گالی باکتریوم آنتیسی* متالوپروتئازهایی را ترشح می‌کند که IgG طیور را غیر فعال می‌کنند. پس در فرار از ایمنی میزبان نقش مهمی دارند (۲).

گالی باکتریوم آنتیسی 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 حدت باکتری به بقا 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 *گالی باکتریوم آنتیسی* 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 *گالی باکتریوم* 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 *گالی باکتریوم آنتیسی* است، با این وجود، ثابت شده است که *گالی باکتریوم آنتیسی* 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).

مراحل جداسازی را طبق پروتکل جداسازی کیت استخراج DNA ساخت شرکت MBST انجام داده و نمونه هموزن 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 (12656-12) *G. anatis* biovar haemolytica اهدایی پروفسور Bojesen شاغل در بخش میکروبیولوژی دامپزشکی دانشگاه کپنهاگ دانمارک و برای کنترل منفی از آب مقطر استریل استفاده شد.

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 گلیسرین ۶۰ درصد استریل شده به میزان هم حجم انتقال داده و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. محلول گلیسرین 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

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

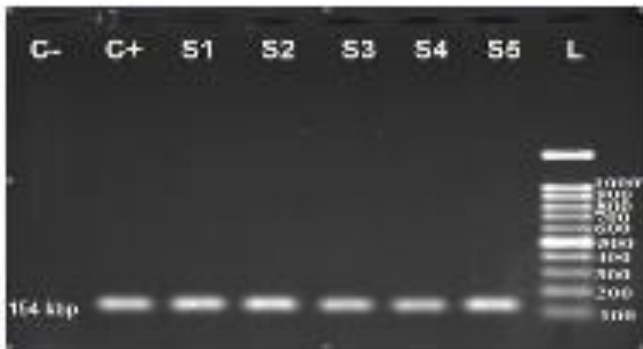
مشخصات پرایمر	طول باند
Primer Forward 5-ACC GGT TGA AAG CTT GCT TT-3	۱۵۴
Primer Reverse 5-GTT CAT CCC TTG GCA AGT GG-3	

جدول ۲. نتایج جداسازی و شناسایی مولکولی جدایه‌های گالی باکتریوم 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	هایلین	۱۱۹	دماوند	تهران	۵۵	۳۰	۲۳	۷۶/۶۶	۲۱	۷۰
B	هایلین	۶۲	آبیک	قزوین	۸۲	۳۰	۲۲	۷۳/۳۳	۱۵	۵۰
C	هایلین	۳۴	آبیک	قزوین	۹۰	۳۰	۲۲	۷۳/۳۳	۱۵	۵۰
D	هایلین	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	هایلین	۵۲	سمنان	سمنان	۸۴	۳۰	۱۱	۳۳/۶۶	۵	۱۶/۶۶
H	هایلین	۵۴	سمنان	سمنان	۸۵	۳۰	۶	۲۰	۰	۰
I	هایلین	۴۸	آبیک	قزوین	۷۳	۳۰	۹	۳۰	۶	۲۰
J	هایلین	۵۱	شهرکرد	چهار محال و بختیاری	۶۵	۲۵	۲۵	۱۰۰	۲۰	۸۰
جمع					۲۹۵	۱۷۳	۵۸/۶۵	۱۲۹	۴۳/۷۲	



تصویر ۱. کشت خالص شده گالی باکتریوم آناتیس بیووار همولیتیکا: کلونی های کوچک، صاف، خاکستری، نیمه شفاف با همولیز بتا به شعاع ۲-۳ میلی متر در اطراف کلونی پس از ۲۴ ساعت کشت در محیط آگار خوندار.



تصویر ۲. نتایج مثبت نمونه های مشکوک به گالی باکتریوم آناتیس جداسازی شده از گله های تخم گذار 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 Lölig در سال ۱۹۷۶ طی مطالعه ای با وارد کردن 10^2 cfu گالی باکتریوم به چینه دان جوجه های SPF یک روزه و جوجه های ۶ هفته به طور جداگانه و بررسی میزان ماندگاری باکتری در ۸ هفته دریافتند، باکتری پس از مدت کوتاهی از روده ها و در موارد کمتر از سایر ارگان های داخلی پرندگان مورد مطالعه قابل جداسازی است این مطالعه نشان می دهد گالی باکتریوم می تواند به صورت عفونتی طولانی مدت یا دائمی درآید (۳).

شیوع گالی باکتریوم در گله های مرغ تخم گذار صنعتی به وسیله Mushin و همکاران در سال ۱۹۸۰ گزارش شده است. آن ها از ۳۲۲ نمونه جمع آوری شده از ۲۳ گله متفاوت مرغان تخم گذار به ظاهر سالم و بدون علامت، ۹۷ درصد نمونه ها را آلوده با گالی باکتریوم تشخیص دادند (۴). این مطالعه در تطابق با مطالعات قبلی Bisgaard در سال ۱۹۷۷ بود که گالی باکتریوم را به عنوان

در مطالعه حاضر با استفاده از توالی نوکلئوتیدی ژن 16S rRNA در باکتری گالی باکتریوم آناتیس با شماره دسترسی AF228011.1، توسط برنامه تحت شبکه primer3 یک زوج پرایمر طراحی شد. سپس با استفاده از نرم افزار BLAST از اختصاصی بودن پرایمرها برای ردیابی توالی های 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 تخم گذار مورد بررسی قرار گرفت و پس از مراحل کشت و جداسازی کلنی های مشکوک کوچک، صاف، خاکستری، نیمه شفاف با همولیز به شعاع بین ۲ الی ۳ میلی متر 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 جمع آوری و ذخیره سازی شدند. پس از انجام PCR از مجموع ۲۹۵ نمونه سوآب نای اخذ شده، ۴۳/۷۲ درصد نمونه ها مثبت بودند. نمونه نتایج PCR در تصویر ۲ نشان داده شده است. میزان شیوع گالی باکتریوم آناتیس به تفکیک گله و شهر نیز در جدول ۲ نشان داده شده است. تمام ۴۵ نمونه انتخاب شده برای بررسی بیوشیمیایی کلونی های بتا-همولیز، گرم منفی، اکسیداز مثبت، کاتالاز مثبت، اوره آز منفی، ایندول منفی، مک کانکی منفی بودند.

بحث

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

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

براساس مطالعات اخیر Paudel و همکاران در سال ۲۰۱۴ گالی باکتریوم 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 در سال ۲۰۱۴ طی یک مطالعه تجربی دریافتند در جوجه خروس‌هایی که از راه تلقیح داخل بینی با گالی باکتریوم 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 گالی باکتریوم 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 گالی باکتریوم 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 گالی باکتریوم 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 گالی باکتریوم، ۱۲۲ ایزوله را با استفاده از دو پرایمر 16S rRNA (1133fgal) 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 گالی باکتریوم به عنوان مرجع و کنترل مثبت، ۱۷ نمونه از باکتری‌های مختلف خانواده پاستورلاسه به جز

گالی باکتریوم و ۵ نمونه از خانواده‌های فلاوو باکتریاسه و انتروباکتریاسه برای تشخیص تفریقی بودند که تمام نمونه‌های گالی باکتریوم باندهای قابل انتظار حاصل تکثیر ژنی را روی ژل الکتروفورز نهایی نشان دادند در حالی که در ۲۲ نمونه دیگر هیچ باندهای دیده نشد. این نتایج کفایت روش PCR برای شناسایی و تفکیک گالی باکتریوم 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 گالی باکتریوم 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* گالی باکتریوم 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 گالی باکتریوم آناتیس و پاستورلا مولتوسیدا در نمونه‌های مرغ تخم‌گذار و مادر ارجاعی به آزمایشگاه تحقیق و تشخیص بیماری‌های طیور می‌سی‌سی‌پی دریافتند که میزان جداسازی گالی باکتریوم آناتیس در طی یک دوره ۵ ساله رو به افزایش بوده است (۱۱).

Wang و همکاران در سال ۲۰۱۶ برای تعیین روش شناسایی گونه‌ای گالی باکتریوم به وسیله (qPCR) روی ژن (*gyrB*) مطالعه‌ای انجام دادند که طی آن ۲۲ نمونه از بیووارهای مختلف گالی باکتریوم آناتیس به عنوان مرجع و کنترل، ۹ نمونه از گونه گالی باکتریوم دیگر به جز گالی باکتریوم آناتیس و ۲۱ نمونه از سایر باکتری‌های مهم خانواده‌های پاستورلاسه، فلاوو باکتریاسه 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

Bojesen و همکاران در سال ۲۰۰۳ به بررسی درصد شیوع گالی باکتریوم *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 پرندۀ انتخاب و سوآب نایی و کلواک 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) گالی باکتریوم *آناتیس* بیووار همولایتیکا جداسازی شد و به صورت معنی‌داری درصد نمونه‌های مثبت در سوآب‌های اخذ شده از نای بالاتر از سوآب‌های کلواک 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 گالی باکتریوم 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 گالی باکتریوم *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 تعیین‌کننده‌ای در کاهش میزان موارد آلودگی دارد (لازم به یادآوری است که تعیین توالی

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 تورینگن آلمان به بررسی میزان آلودگی با گالی باکتریوم 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 پرندۀ آلوده تعداد ۹ پرندۀ (۴۷/۴ درصد) فقط درگیر با گونه گالی باکتریوم بودند و مابقی آن‌ها (۵۲/۶ درصد) علاوه بر گالی باکتریوم با انواع دیگری از باکتری‌ها نظیر *اشریشیا کلی*، *کلستریدیوم پرفرنجنس* و *مایکوپلاسما* و آدنوویروس‌ها آلوده بودند (۱۳).

اولین جداسازی و شناسایی گالی باکتریوم *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، کلواک و محوطه شکمی ماکیان تخم‌گذار دارای سالپنژیت ارجاعی به کشتارگاه صنعتی با استفاده از روش PCR و روش‌های فنوتیپی وجود گالی باکتریوم *آناتیس* را تأیید کردند (۱۴).

در ادامه Omidvar و همکاران در سال ۲۰۱۸ وجود گالی باکتریوم *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 گالی باکتریوم 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 گالی باکتریوم برای ژن 16S rRNA به طول ۱۵۴ bp برای شناسایی گالی باکتریوم *آناتیس* استفاده شد. نتایج حاکی از آن بود که از ۵۰ نمونه سوآب اخذ شده از کلواک و نای، ۹ نمونه (۱۸ درصد) آلوده به گالی باکتریوم *آناتیس* بود. نتایج تفکیکی مطالعه اخیر به این صورت بود که از ۲۰ نمونه اخذ شده از دو گله تخم‌گذار صنعتی ۷ نمونه (۳۵ درصد) از نمونه‌ها آلوده به باکتری بودند.

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.

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 گالی باکتریوم 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 گالی باکتریوم 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.

References

- 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](https://doi.org/10.1186/s13567-015-0206-z)
- 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](https://doi.org/10.4172/2157-7579.1000324)
- Matthes S, Löfliger 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](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1259695/)
- 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](https://doi.org/10.2307/1589775)
- 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](https://doi.org/10.1080/03079457708418238)
- 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](https://doi.org/10.1080/03079457.2014.967176)
- 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](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2177972/)
- 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](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.02.013)
- Zepeda A, Ramirez S, Vega V, Morales V, Talavera M, Salgado-Miranda C, Simon-Martinez 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](https://doi.org/10.1637/8375-060908-resnote.1)
- 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](https://doi.org/10.1637/9907-082511-reg.1)
- 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](https://doi.org/10.3382/ps.2013-03321)
- 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](https://doi.org/10.1080/03079457.2016.1184743)
- 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](https://doi.org/10.1186/s13620-018-0116-2)
- 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](https://doi.org/10.22092/ari.2017.109842)
- 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](https://doi.org/10.1128/JCM.41.11.5167-5172.2003)
- Sorour HK, Al Atfeehy NM, Shalaby AG. *Gallibacterium Anatis* Infection in Chickens and Ducks. *Assiut Vet Med J*. 2015; 61(147): 80-86.