جداسازی و شناسایی *پاستورلا مولتوسیدا* در گله های مرغ مادر

دکتر غلامعلی کلیدری[1] دکتر محمد حسن بزرگمهری فرد[2]* دکتر عبدالمحمدحسنی طباطبایی[3]

دریافت مقاله: ۱۰ اردیبهشت ماه ۱۳۸۱
پذیرش نهایی: ۴ آبان ماه ۱۳۸۲

هدف: بررسی وضعیت آلودگی گله های مرغ مادر به *پاستورلا مولتوسیدا* .

طرح: مشاهده ای- توصیفی.

حیوانات: یازده گله مرغ مادر.

روش: تعداد هزار و سیصد و هفتاد نمونه سواب حلقی از یازده گله مرغ مادر، سه گله سالم، سه گله بهبود یافته، سه گله مبتلا به شکل مزمن و دو گله آلوده در استانهای تهران، خراسان ومازندران تهیه شد. نمونه ها به وسیله محیط انتقال به آزمایشگاه حمل و سپس از نظر وجود باکتری *پاستورلا مولتوسیدا* آزمایشهای مختلف کشت باکتریایی انجام و موارد مثبت *پاستورلا مولتوسیدا* با آزمایشات مختلف جهت تشخیص تفریقی تأیید گردیدند.

نتایج: در بررسی انجام شده، از کشت سوآب حلقی گله های به ظاهر سالم، گله های دارای سابقه بیماری (شفا یافته)، گله های مبتلا به فرم مزمن هیچ مورد *پاستورلا مولتوسیدا* جدا نشد. در گله های مبتلا به فرم حاد هم از سواب حلقی و هم از لاشه *پاستورلا مولتوسیدا* جدا گردید.

نتیجه گیری: این بررسی نشان می دهد که گله های به ظاهر سالم و گله های شفا یافته از بیماری به طور معمول حامل *پاستورلا مولتوسیدا* نیستند و آلودگی می تواند از طرق مختلف از جمله پرنده آلوده، آب ودان آلوده، جوندگان و ... وارد گله شده وموجب آلودگی و بیماری گردد. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، (۱۳۸۳)، دوره ۵۹، شماره ۱، ۶۵-۶۳

واژه های کلیدی: پاستورلوز، مرغ مادر، *پاستورلا مولتوسیدا*.

پاستورلوز یا وبای ماکیان یک بیماری باکتریایی است که در گونه های مختلف پرندگان از جمله ماکیان دیده می شود (۱،۲،۱۰). بیماری در اثر باکتری *پاستورلا مولتوسیدا* ایجاد می شود که باکتری گرم منفی،کوکوباسیل بوده و دارای سروتیپ های مختلفی از نظر حدت و خصوصیات آنتی ژنتیکی می باشد و در شرایط گرم، مرطوب مدتها در محیط زنده باقی می ماند (۸،۱۱).

علت اصلی شیوع یا وقوع بیماری در یک گله نامشخص بوده ولی عامل می تواند ازطرق مختلف مثل پرندگان بیمار، حاملین جاندار، وسایل و تجهیزات، آب و غذای آلوده انتقال و انتشار یابد (۸،۹،۱۰). یکی از جنبه های مختلف بیماری که مدتهاست مورد بحث و بررسی می باشد، راههای انتقال بیماری، مخازن آلودگی و علل وقوع بیماری در گله است. در این ارتباط سؤالی که مطرح می باشد این است که آیا مرغان به ظاهر سالم حامل باکتری *پاستورلا مولتوسیدا* بوده و تحت شرایط خاصی باکتری بیماریزا گشته و باعث شیوع بیماری در گله می شود، یا آلودگی در گله وجود نداشته و عامل از طرق مختلف وارد شده و موجب بیماری می گردد. لذا با هدف بررسی وضعیت آلودگی گله های مرغ مادر به *پاستورلا مولتوسیدا* سؤالات زیر پیگیری گردید.۱-آیا گله های به ظاهر سالم حامل *پاستورلا مولتوسیدا* هستند؟ ۲- آیا گله های شفا یافته از بیماری حامل باقی می مانند؟ ۳-آیا گله های مبتلا به فرم مزمن بیماری حامل *پاستورلا مولتوسیدا* هستند؟

برای بررسی مو ضوع از گله های به ظاهر سالم، گله های شفا یافته و گله های بیمار به روش سواب حلقی نمونه گیری به عمل آمد. نمونه ها از نظر وجود *پاستورلا مولتوسیدا* مورد بررسی و مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش کار

در این بررسی از یازده گله مرغ مادر در استانهای خراسان، تهران و مازندران به روش سواب حلقی نمونه گیری به عمل آمد. گله های مورد بررسی به چهار گروه تقسیم شدند:

الف) گله های به ظاهر سالم و بدون سابقه بیماری، ب)گله های شفا

۱) گروه آموزشی علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد -ایران.
۲) گروه آموزشی علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران -ایران.
۳) گروه آموزشی پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران -ایران.
*) نویسنده مسؤول mhbfard@ut.ac.ir

Isolation and identification of *Pasteurella multocida* in breeder stocks

Kalidari, GH. A.,[1] Bozorgmehrifard, M.H.,[2] Tabatabaei,A.M.[1]

[1] *Department of Clinical Sciences Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University, Mashhad-Iran.* [2] *Department of Clinical Sciences Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran -Iran.* [3] *Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran -Iran*

Objective: To determine the rate of infection in breeder stocks.

Design:

Animals: A total of 11 breeder stocks.

Procedure: Pharyngeal swab samples from 11 farms, 3 flocks of healthy birds, 3 recovered flocks, 3 flocks with chronic disease and 2 infected flocks, were taken. The samples were transferred to the laboratory in transport media.and tested on culture media. The positive cases were identified and the *p. multocida* was confirmed by differential tests.

Results: *Pasteurella multocida* was not isolated from either healthy or recovered birds. The organism was neither isolated from the pharyngeal swab samples of chronic form. In flocks, which showed acute form, *p.multocida* was isolated from both the pharyngeal swabs or carcasses.

Clinical implication: The results in this survey indicate that the healthy birds are not carrier of *p. multocida* and the diseases spread by infected birds, rodents,water and feed. ***J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran. 59, 1: 63-65, 2004.***

Key words: Pasteurellosis, breeder stock, *Pasteurella multocida*.

Corresponding author email:mhbfard@ut.ac.ir

یافته از بیماری، ج)گله های مبتلا به شکل مزمن بیماری، د) گله های مبتلا به شکل حاد بیماری.

در این بررسی با سطح اطمینان۹۵ درصد و با فرض اینکه حداقل دو درصد جمعیت گله آلوده باشند از هر گله تعداد ۱۵۰ نمونه و در مجموع تعداد ۱۳۷۰ نمونه سواب حلقی تهیه شد (۳،۴). انتخاب گله ها براساس اطلاعات به دست آمده از ادارات دامپزشکی و دامپزشکان شاغل در بخش خصوصی انجام گرفت. قبل از نمونه گیری، اطلاعات هر گله شامل، سن، ظرفیت، سابقه بیماری، سابقه واکسیناسیون و... در فرمها ی مخصوصی ثبت می گردید. نمونه گیری با استفاده از سواب های پنبه ای استریل از ناحیه حلق و شکاف شوان انجام گرفت (۴). سپس نمونه ها با استفاده ازلوله های در پوش دارحاوی محیط انتقال (محیط پایه استوارت+کلیندا ماسین + جنتامایسین + تلوریت پتاسیم + آمفوتریسین B) به آزمایشگاه حمل گردید (۱،۶).

روشهای آزمایشگاهی: محیط های انتقال پس از حمل به آزمایشگاه به مدت ۲۴-۱۸ساعت در انکوباتور قرار داده می شد. سپس نمونه ها را روی محیط اگار خوندار کشت داده و پس از ۲۴ ساعت پر گنه ها مورد بررسی قرار می گرفت. از پر گنه های مشکوک به پاستورلا، ضمن تهیه گسترش و رنگ آمیزی و مطالعه میکروسکوپی، همزمان روی محیط های آگار خوندارو مکانکی تجدید کشت می گردید. پس از ۲۴ ساعت محیط های کشت بررسی بر روی پر گنه ها تست های اکسیداز و کاتالاز انجام می گرفت و پس از تأیید پاستورلا، برای تفریق *پاستورلا مولتوسیدا* از سایر گونه های پاستورلا از محیط های تفریقی مثل آگار خوندار، مکانکی، اوره، اندول، حرکت، گلوکز، لاکتوز، ساکارز ومالتوز استفاده می شد (۱،۴،۷،۱۰).

برای تأیید نهایی و بررسی بیماریزایی موارد مختلف جدا شده نمونه ها را در محیط آبگوشت مغذی کشت داده و پس از ۲۴ ساعت ۰/۱ میلی لیتر از محیط آبگوشت حاوی باکتری با استفاده از سرنگ انسولین از طریق پرده صفاق به موش سوری تزریق می گشت. وضعیت موشها را طی ۴۸-۲۴ ساعت کنترل نموده و در صورت تلف شدن هر موش آنرا کالبدگشایی کرده و نمونه گیری به عمل می آمد. نمونه های برداشت شده از طریق گسترش مستقیم و کشت روی محیط های آگار خوندار و مکانکی مورد بررسی مجدد قرار می گرفت.

نتایج

در این بررسی از تعداد ۱۳۷۰ نمونه سواب حلقی که از یازده گله مرغ مادر گرفته شد نتایج زیر به دست آمد.

از سه گله به ظاهر سالم (گروه الف) که جمعاً ۴۵۰ نمونه سواب حلقی

جدول ۱ - گله های سالم.

نام گله	نوع گله	سن به هفته	واکسیناسیون	تعداد نمونه	نتایج کشت سواب حلقی
الف - ۱	مادر گوشتی	۴۵	–	۱۵۰	منفی
الف - ۲	مادر گوشتی	۷۵	–	۱۵۰	منفی
الف - ۳	مادر گوشتی	۵۴	–	۱۵۰	منفی

جدول ۲ - گله های بهبود یافته.

نام گله	نوع گله	سن به هفته	واکسیناسیون	تعداد نمونه	نتایج کشت سواب حلقی
ب - ۱	مادر گوشتی	۳۷	–	۱۵۰	منفی
ب - ۲	مادر گوشتی	۶۱	+	۱۵۰	منفی
ب- ۳	مادر گوشتی	۵۴	+	۱۵۰	منفی

جدول ۳ - گله های مبتلا به فرم مزمن.

نام گله	نوع گله	سن به هفته	واکسیناسیون	تعداد نمونه	نتایج کشت سواب حلقی
ج - ۱	مادر بومی	۴۰	+	۱۵۰	منفی
ج - ۲	مادر گوشتی	۳۷	–	۱۵۰	منفی
ج - ۳	مادر گوشتی	۹۳	+	۱۵۰	منفی

جدول ۴ - گله های مبتلا به فرم حاد.

نام گله	نوع گله	سن به هفته	واکسیناسیون	تعداد نمونه	نتایج کشت سواب حلقی
د - ۱	مادر گوشتی	۶۲	–	۱۰	+
د - ۲	مادر گوشتی	۸۰	–	۱۰	+

گرفته شده بود هیچ مورد *پاستورلا مولتوسیدا* جدا نشد. در گروه ب (گله های شفا یافته از بیماری) از ۴۵۰ نمونه سواب حلقی هیچ مورد *پاستورلا مولتوسیدا* جدا نشد. در گروه ج (گله های مبتلا به شکل مزمن بیماری) از ۴۵۰ نمونه سواب حلقی هیچ مورد *پاستورلا مولتوسیدا* جدا نشد. در گروه د (گله های مبتلا به شکل حاد بیماری) هم از نمونه های سواب حلقی و هم از لاشه *پاستورلا مولتوسیدا* جدا شد. نتایج فوق در جداول ۳،۲،۱و۴ آمده است.

همزمان با بررسی فوق در هنگام بر خورد با موارد مشکوک به پاستولوز در طیور بومی شمال کشور از لاشه ها نمونه گیری به عمل آمد که ۴ مورد *پاستورلا مولتوسیدا* از مرغان بومی و اردکهای تلف شده جدا شد. موارد جدا شده از طیور صنعتی (۳مورد) و طیور بومی (۴مورد) از طریق داخل صفاقی به موش سوری تزریق شد که سه مورد کمتر از ۲۴ساعت و چهار مورد دیگر بین ۴۸-۲۴ ساعت باعث مرگ موشها گردید.

بحث

دراین بررسی از نمونه های سواب حلقی گله های سالم، گله های شفا یافته از بیماری و گله های مبتلا به شکل مزمن *پاستورلا مولتوسیدا* جدا نشد ولی از گله های بیمار باکتری جدا گردید. براساس نتایج این تحقیق جدا نشدن *پاستورلا مولتوسیدا* در گله های به ظاهر سالم نشان می دهد که گله های به ظاهر سالم به طور معمول حامل *پاستورلا مولتوسیدا* نبوده و آلودگی می تواند از طرق مختلف وارد گله شده و بیماری ایجاد نماید. این نتایج با نتایج به دست آمده توسط Curtis و همکاران در سال ۱۹۸۱ که مطالعه ای روی گله های ماکیان و بوقلمون انجام دادند و از ۴۳۶ نمونه سواب حلقی از ۶ گله ماکیان و ۱۷۵ نمونه سواب حلقی از ۵ گله بوقلمون هیچ مورد *پاستورلا مولتوسیدا* جدا ننمودند همخوانی دارد. این محققین چنین نتیجه گرفتند که گله های به ظاهر سالم به طور معمول حامل *پاستورلا مولتوسیدا* نیستند. جدا نشدن باکتری از گله های شفا یافته از بیماری و گله های مبتلا به فرم مزمن می تواند ناشی از درمانهای مکرر و مداوم گله ها به صورت گروهی یا انفرادی یا ناشی از روش کار و محیط های کشت مورد استفاده باشد. در این ارتباط Curtis در بررسی که در گله های ماکیان و بوقلمون انجام داد در روش کشت مستقیم هیچ مورد *پاستورلا مولتوسیدا* جدا نکرد ولی در روش استفاده از آبگوشت و محیط کشت Morris (۳) از ۴۰ نمونه سواب حلقی یک مورد *پاستورلا مولتوسیدا* جدا کرد. در تحقیقی که Curtis انجام داده، گله های موردبررسی در زمان نمونه گیری هیچ آنتی بیوتیکی در یافت نکرده بودند در حالی که گله های مورد بررسی در این تحقیق در روزهای قبل از نمونه گیری و حتی در زمان نمونه گیری، آنتی بیو تیک دریافت می کردند.

توجه به تاریخچه و سابقه گله ها نشان می دهد که بیماری هم در گله ها واکسینه و هم در گله های غیر واکسینه رخ داده است. از آنجا که واکسن مورد استفاده در این گله های واکسن منووالان کشته تهیه شده از سروتیپ A1 می باشد (۱۲،۱۳). یکی از علل عدم موفقیت در واکسیناسیون می تواند نا شی از وجود احتمالی سرو تیپ های دیگر *پاستورلا مولتوسیدا* در منطقه باشد. بررسی بیماریزایی موارد جدا شده از طریق ترزیق به موش سوری و کشتن موشها در زمانها ی مختلف نشان می دهد که سویه های جدا شده دارای حدت و بیماریزایی متفاوت بود و احتمال وجود سروتیپ های دیگر را قوت می بخشد. برای تکمیل بررسی فوق، وجود تحقیقات دیگر ی درخصوص جداسازی و شناسایی سروتیپ های *پاستورلا مولتوسیدا* در مناطقی که بیماری وجود دارد لازم به نظر می رسد.

References

1. Adlam, C. and Rutler. (1989): Pasteurlla and Pasteurellosis. Academic Press. London.PP: 5-35.
2. Carpenter, T.E., Hirsh, D.C. and Kasten, R.W. (1989): Pasteurella multocida recovered from live turkey. Avian Dis. 33: 12-17.
3. Curtis, P.E. (1981): Investigation to determine whether healthy chicken and turkey are oral carrier of *Pasteurella multocida*. Vet. Rec.108: 206-207.
4. Curtis, P.E. (1985): *Pasteurella multocida* in isolation identification of micro rganism of medical and veterinary importance. PP: 43-51.
5. Heddleston, K.L.,Goodson, T. and Leibuvitz. (1972): Serological and biochemical characteristics of *Pasteurella multocida* from free flying birds and poultry. Avian Dis. 15: 729-734.
6. Knight, D.P., Paine, J.E. and Speller, D.C.E. (1983): A elective medium for *Pasteurella multocida* and its use with animal and human specimen. J. Clin. Pathol. 30: 591-594.
7. OIE. office International Des Epizootics. (1992): Manual of standards for diagnosis tests and vaccines. P:593-599.
8. Richard, G.B. (1991): Epizootiology of avian cholera in wildfowl.J.Wildlife Dis. 27:367-394.
9. Rimler, R.B. and Roads, K.R. (1989): *Pasteurella multocida* in pasteurella and pasteurellosis. Academic Press London. PP: 35-75.
10. Rimler, R.B. and Glisson, J.R. (1997): Fowl cholera in Disease of poultry. PP: 143-160.
11. Roades, K.R. and Rimler, R.B. (1987): Capsular groups of *Pasteurlla multocida* isolated from avian hosts. Avian. Dis. 31: 895-898.
12. Sotodehnia, A., Aarabi, A.E. and Vand Yoosefi, J. (1984): The efficacy of the outogenous fowl cholera killed aluminum hydroid vaccine in duck in Iran. Arch. Razi. Inst. 34, 35: 71-75.
13. Tavassoli, A., Sotuodehnia, A. and Aarabi ,A.I. (1962): A case report of fowl cholera disease in north of Iran. Ach. Razi. Inst. 34, 35: 39-41.
14. Vasfi marandi, M. and Mittal, K.R. (1997): Roll of OMPH and OMPA specific monoclonal antibody from hibridoma tumors in protection of mice against *Pasteurella multocida*. Infection and Immunity. PP: 4502-4508.