DOI: 10.22092/vj.2024.364736.2120 No 145 Winter 2025

Veterinary Research & Biological Products

Original Article

Serological and molecular investigation of Avibacterium Paragallinarum in Broiler Chickens at Slaughter Age in Karaj county

• **Nouri, Abbas***

Section of Research and Diagnosis of Bacterial Diseases of Poultry, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and extension Organization (AREEO), Ministry of Agriculture Jihadm, Karaj.

• **Mirzaei, Sayed gholamreza**

Department of Research and Diagnosis of Poultry Diseases, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Ministry of Agriculture Jihad, Karaj.

• **Bahrami, Mohamad**

undergraduate student of veterinary School of Islamic Azad University, Garmsar branch.

Received: 2024-01-21 **Accepted: 2024-06-07**
Revised: 2024-06-02 **Published: 2024-12-21**

*Email: a.nouri@rvsri.ac.ir

Abstract

Avian Infectious Coryza (IC) is an acute respiratory disease in chickens caused by *Avibacterium Paragallinarum* (AP) which, results in a notable reduction in egg production in layers and performance in broiler chickens. IC exacerbates the severity of the condition when it occurs concurrently with other bacterial or viral pathogens. There is a scarcity of data on the prevalence of IC in broiler flocks in Karaj district. This study was initiallyconducted to determine the role of IC in broiler chickens through the use of Agar Gel Precipitation (AGP), Serum Plate Agglutination (SPA), and species-specific PCR of HPG-2. A total of 30 thirty broiler flocks were sampled for blood and swabbing from choanal cleft (7-5 samples from each herd) between February and May 2022, at an avian slaughterhouse. The AGP test yielded no serological results, whereas the SPA test indicated a positive reaction in two flocks. Molecular detection via by PCR demonstrated the presence ofIC infection in 16 farms, representing a prevalence of 53%. The findings of this indicate that broiler chickens are significantly exposed to IC,which poses a considerable threat to the viability of nearby commercial layer farms. It is therefore imperative that greater attention be paid to IC infection in epidemiological studies and that effective solutions be provided to deal with it in the country.

Key words: *Infectious Coryza; Avibacterium paragallinarum; Broiler Chicken; Karaj.*

CC BY

DOI: 10.22092/vj.2024.364736.2120
شماره ۱۴۵ زمستان ۱۴۰۳
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

مقاله کامل

ردیابی مولکولی و سرولوژی باکتری *Avibacterium Paragallinarum* عامل کریزای عفونی در گله‌های در سن کشتار گوشتی شهرستان کرج

• **عباس نوری***
بخش تحقیق و تشخیص بیماری‌های باکتریایی طیور، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، وزارت جهاد کشاورزی، کرج.
• **سید غلامرضا میرزایی**
مدیریت تحقیق و تشخیص بیماری‌های ویروسی، باکتریایی، انگلی و قارچی طیور و زنبور عسل و کرم ابریشم، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، وزارت جهاد کشاورزی، کرج.
• **محمد بهرامی**
دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار.

تاریخ دریافت: ۰۱-۱۱-۱۴۰۲ تاریخ پذیرش: ۱۸-۰۳-۱۴۰۳
تاریخ بازنگری: ۱۳-۰۳-۱۴۰۳ تاریخ انتشار: ۰۱-۱۰-۱۴۰۳
* Email: a.nouri@rvsri.ac.ir

چکیده

کوریزای عفونی پرندگان یک بیماری حاد تنفسی در مرغ است که توسط *Avibacterium Paragallinarum*, (AP) ایجاد می‌شود که علاوه بر تشدید شدت بیماری در عفونت همزمان با سایر باکتری‌ها یا ویروس‌ها، سبب کاهش قابل توجهی در تولید تخم مرغ و راندمان تولیدی در گله‌های تخمگذار و جوجه‌های گوشتی می‌شود. اطلاعات کمی در مورد بروز بیماری کوریزای عفونی در گله‌های گوشتی در شهرستان کرج وجود دارد. در این مطالعه با هدف ردیابی عامل این بیماری اقدام به نمونه‌گیری از ۳۰ گله گوشتی قبل کشتار به صورت سواب از شکاف کام و خون (۵- ۷ نمونه از هر گله) از بهمن ماه سال ۱۴۰۰ تا پایان اردیبهشت ماه سال ۱۴۰۱ شد. آزمون‌های آگار رسوبی ژل و آگلوتیناسیون سرم بر روی پلیت و واکنش زنجیره ای پلیمراز اختصاصی بر روی نمونه‌ها انجام شد. در نتایج انجام آزمون آگار رسوبی ژل مورد مثبت دیده نشد و اما با آزمون آگلوتیناسیون سرم بر روی پلیت در دو گله واکنش سرمی مثبت مشاهده شد. در ردیابی ژنومی با PCR، ۵۳ درصد (۱۶ گله) موارد مثبت آلودگی به عامل کوریزای عفونی تشخیص داده شد. این مطالعه نشان داد گله‌های گوشتی به میزان بالایی در معرض آلودگی کوریزای عفونی هستند و می‌توانند تهدیدی برای مزارعه تخمگذار بشمار آیند. لذا توجه بیشتر به این بیماری در مطالعات اپیدمیولوژی و ارائه راه‌حل‌های موثر برای مقابله با آن در کشور امری ضروری است.

کلمات کلیدی: کوریزای عفونی؛ آوی باکتریوم پاراگالینارم؛ جوجه‌های گوشتی؛ کرج

مقدمه

کریزای عفونی بیماری حاد تنفسی در طیور می باشد که توسط باکتری (AP)، *Avibacterium Paragallinarum* از خانواده پاستورلاسه (Pasteurellacea) و عضو جنس اوی باکتریوم (*Avibacterium*) ایجاد می‌شود. عفونت به این باکتری به تنهایی می‌تواند سبب کاهش رشد در جوجه‌های در حال رشد و کاهش بارز ۱۰ درصد تا ۴۰ درصد و گاهی تا ۷۵ درصد در تولید تخم مرغ در طول سه هفته در گله‌های تخمگذار شود. بر اساس گزارش‌های موجود، این بیماری در کنار دیگر دیگر عوامل بیماری‌زا و وجود استرس، میزان جوجه‌های وارد را بعلت تورم کیسه‌های هوایی تا ۶۹/۸ درصد و میزان تلفات را ۲۰-۵ درصد افزایش می‌دهد.

گزارش شده این بیماری در گله‌های گوشتی در توامان با استرس و دیگر عوامل بیماری‌زا توانسته است تا ۹۶/۸ درصد سبب افزایش جوجه‌های وازد بعلت تورم کیسه‌های هوایی و نیز افزایش تلفات بین ۵ تا ۲۰ درصد شود. این باکتری گرم منفي، متغیرالشکل، غیر متحرك و به اندازه ۳-۱ میکرون است. اغلب سویه‌های باکتری به فاکتور V به میزان مختلف جهت رشد نیاز دارند. اگرچه جدایه‌های در افریقای جنوبی دیده شده است که بدون نیاز به NAD قادر به رشد در محیط‌های آزمایشگاهی هستند. Page در سال ۱۹۶۲ با استفاده از آزمایش آگلوتیناسیون بر روی پلیت باکتری A P را در سه سروتیپ یا گروه آنتی‌ژنی B, A و C طبقه‌بندی نمود (۲۲). در این آزمایش از آنتی سرم جوجه به همراه سلول‌های کامل باکتری استفاده شده بود. Kumes با بکار گیری آزمایش مهار هماگلوتیناسیون (Haemagglutination Inhibition, HI) به شناسایی جدایه‌های مختلف پرداخت (۱۶) او در این آزمایش از گلبول‌های قرمز جوجه‌ی تثبیت شده با فرمالین استفاده کرد و در مقایسه با آزمایش آگلوتیناسیون جدایه‌های نامشخص کمتری در میان جدایه‌ها مشاهده نمود. در این روش او سروتیپ‌های سه گانه باکتری را در نه سرووار شامل ۱-A, ۲-A, ۳-A, ۴-A, ۱·B, ۱-C, ۲-C, ۳-C, ۴-C مورد شناسایی قرار داد. در ایران گزارشی کاملی از تعیین سروارهای شایع عامل کریزای عفونی وجود ندارد(۵). ولی بنابر آخرین گزارش‌های موجود احتمال وجود پراکندگی سروتیپ‌های مختلف در کشور پیش‌بینی شده است (۱۹-۲۱, ۲۴). انجام مطالعاتی جامع در خصوص اپیدمیولوژی مولکولی و سرولوژی کریزای عفونی در کشور و میزان پوشش ایمنی واکسن‌های تجاری در حال مصرف کنونی صورت نگرفته است. در مطالعه حاضر بعنوان یک تحقیق اولیه، با در نظر داشتن عدم وجود برنامه واکسیناسیون بر علیه کریزای عفونی در گله‌ها گوشتی و امکان آلودگی آنها به باکتری AP، اقدام به انجام بررسی از نظر آلودگی به باکتری *Avibacterium Paragallinarum* در زمان کشتار به روش سرولوژی و مولکولی شد.

روش کار

نمونه‌گیری

نمونه‌گیری‌ها در بین بهمن ماه سال ۱۴۰۰ تا اواخر اردیبهشت ماه سال ۱۴۰۱ با مراجعه به یک کشتارگاه ماکیان در شهرستان کرج و از ۳۰ گله در زمان کشتار صورت گرفت. نمونه‌ها شامل سواب شکاف کامی به همراه تهیه نمونه‌های خونی برای تهیه سرم در آزمایشگاه بود.

آزمایش‌های سرمی

آماده‌سازی آنتی‌ژن باکتری: برای انجام این آزمون مراحل آماده‌سازی آنتی‌ژن مورد نیاز از باکتری موجود در بخش که قبلا از طریق آزمایش‌های مولکولی و تعیین توالی بخشی از پروتئین هماگلوتینین آن (شماره دسترسی، KY۶۱۴۵۳۰) و آزمایش‌های بیوشیمیایی و باکتریولوژی به عنوان سرو گروه یا سروتیپ A مورد شناسایی قرار گرفته است استفاده گردید(۲۰).

بطور خلاصه تکثیر باکتری در محیط آگار کلمبیا (Columbia Agar) همراه با هفت درصد خون اسب و انکوباسیون ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و غلظت ۵- ۱۰ درصد گاز CO۲ انجام گرفته است، پرگنه‌های رشد یافته را در محلول بافری PBS (PH =۷,۲) جمع‌آوری و سه مرتبه با انجام سانتریفوژ (۸۰۰۰ نیروی گرانش به مدت ۱۰ دقیقه) اقدام به شستشو آن شد. در انتها غلظت نهایی سوسپانسیون باکتری بدست آمده را برابر مقیاس شماره ۱۰ لوله مک فارلن تنظیم شد. این آنتی‌ژن سه مرتبه در دمای ۲۰- و ۳۷ درجه فریز و ذوب گردید و روز بعد پس از نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد یخچال مورد استفاده قرار گرفت. آنتی‌ژن تهیه شده به روش فوق به مدت یک هفته در دمای ۴ درجه قابل نگهداری و استفاده بود.

تهیه سرم از جوجه‌های ایمن شده: به منظور آماده‌سازی سرم مثبت، به ۷ قطعه جوجه SPF با سن ۱۴ هفته، در دو مرحله واکسیناسیون با دوز ۰/۵ میلی‌لیتر از طریق داخل عضله (مطابق روش توصیه‌شده سازنده واکسن) با فاصله چهار هفته انجام گرفت. سه هفته پس از آخرین تزریق با انجام خون‌گیری از ورید بال اقدام به تهیه سرم مربوطه شد.

آزمایش آگلوتیناسیون سرم بر روی پلیت (Serum plate agglutination, SPA): مطابق روش‌های توصیه شده (۴, ۲۰) در آزمایش اگلوتیناسیون، بر روی لام مقدار ۲۰ میکرولیتر از آنتی‌ژن را با ۴۰ میکرولیتر نمونه سرم‌های تهیه شده از گله‌های جوجه گوشتی مخلوط نموده و نتیجه آزمایش با مشاهده بروز آگلوتیناسیون در کنار سرم کنترل منفی و مثبت، حداکثر پس از ۳ دقیقه مورد قرائت قرار می‌گرفتند.

آزمایش گار رسوبی ژل (Agar Gel Precipitation, AGP): ابتدا مقدار آنتی‌ژن تهیه شده را به میزان ۱۰ برابر غلظت استفاده شده در آزمایش SPA مطابق روش توصیف شده، تنظیم شد(۴). این آزمایش در ژل نوبل-آگار (Special Agar-Noble, Difco) یک درصد تهیه شده با محلول ۰/۱ مولار PBS حاوی هشت درصد نمک (NaCl) و ۰/۱ درصد مرتیولات (Difco) انجام گرفت. با استفاده از ابزار مخصوص و استاندارد، حفرات لازم در ابعاد توصیه شده در ژل تازه تهیه شده ایجاد نموده و سپس تا حجم ۳۰ میکرولیتر، از آنتی‌ژن تهیه شده در گودی مرکزی و نمونه‌های سرم تست و کنترل‌های مثبت و منفی در حفره‌های اطراف مربوطه ریخته شد. در نهایت پس از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد (با تامین رطوبت نسبی لازم) پس از ۷۲ ساعت از نظر تشکیل باندهای رسوبی حاصل از کمپلکس آنتی‌ژن-آنتی‌بادی، در تابش مایل نور (چراغ مطالعه با لامپ هالوژنه) مورد بررسی قرار گرفتند(۲۰).

آزمایش ردیابی به روش PCR

جهت انجام ردیابی ژنومی باکتری Avibacterium Paragallinarum از پرایمر اختصاصی موسوم به HPG۲ معرفی شده توسط Chen و همکاران در سال ۱۹۹۶ استفاده شد(۶, ۱۸). سنتز پرایمر های مورد نیاز با سفارش به شرکت سیناژن (سیناکلون) انجام شد. توالی نوکلوتیدی و اندازه محصول مورد انتظار آن در واکنش PCR در جدول ۱ نشان داده شده است.

این آزمایش با استفاده از بسته‌های ازپیش آماده (PCR Master Mix ، شرکت Roche) در حجم واکنش ۲۵ میکرولیتر مطابق دستورالعمل شرکت مربوطه و ۱۵ تا ۱۵۰ نانوگرم از ماده ژنتیکی استخراج شده از سواب‌های نمونه‌گیری با روش فنل - کلروفرم اجرا و انجام شد. برنامه سیکل دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر (Mastercycler, Eppendor) بصورت یک مرحله پیش گرمایش ۹۵ درجه سانتی‌گراد در برای مدت ۵ دقیقه آغاز شده و سپس ۳۰ چرخه دمایی ۹۴ درجه درمدت ۳۰ ثانیه و ۵۸ درجه در مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه در مدت ۴۵ ثانیه انجام گرفت. در آخر، یک چرخه پایانی دمایی ۷۲ درجه بمدت ۵ دقیقه تعریف و اجرا گردید. محصول نهایی PCR را پس از انجام الکتروفورز در ژل آگارز ۱ درصد بمدت ۲۵ تا ۳۰ دقیقه و برای مشاهده و بررسی به دستگاه ترانس ایلومیناتور انتقال داده شد. در این آزمایش از DNA باکتری اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال (ORT) به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

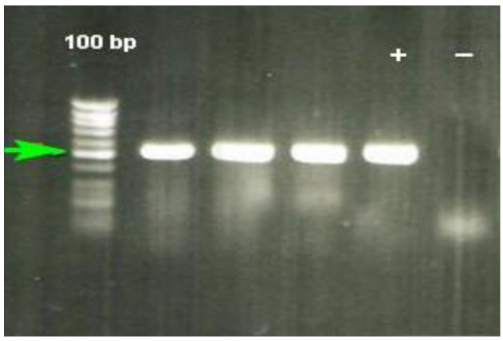
شکل ۱- آزمایش آگلوتیناسیون سرم بر روی پلیت : واکنش مثبت(چپ) سرم مربوط به گله گوشتی در مقابل آنتی ژن تهیه شده از باکتری *Avibacterium Paragallinarum* و واکنش سرم منفی (راست).

نتایج

نتایج آزمایش‌های سرمی AGP و SPA بر روی تعداد ۲۳۰ نمونه سرم تهیه شده از ۳۰ گله طیور گوشتی در سن کشتار(۵۵-۴۵ روزه)، ضمن مشاهده واکنش مثبت سرم در دو گله با آزمایش SPA (شکل ۱)، در تمام موارد نتایج انجام تست AGP منفی بود. در بررسی مولکولی بر روی نمونه‌های سواب، از مجموع سواب‌های تهیه شده از ۳۰ گله گوشتی، در تعداد ۱۶ مورد (معادل ۵۳ درصد) نتایج آزمایش همراه با تولید باند مورد انتظار با اندازه تقریبی ۵۰۰ جفت باز در پروفایل الکتروفورز محصول PCR بود و نمونه های کنترل منفی (ORT) استفاده شده در واکنش ها منفی شدند.(شکل ۲)

بحث

ابتلا به بیماری کریزای عفونی در گله‌های طیور با میزان تلفات کم همراه است و درگیری در هر سنی ممکن است مشاهده شود ولی علائم بیماری با افزایش سن پرنده بیشتر و شدیدتر می‌شود. اقدامات پیشگیری و کنترل بیماری با درمان دارو و استفاده از واکسن قابل انجام است ولی حذف بیماری از گله مبتلا به دلایل مقاومت‌های دارویی و در مواردی عدم همخوانی واکسن با سویه‌های درگردش بعنوانی بخشی از مشکلات مبارزه علیه این بیماری محسوب می‌شود. اعمال و رعایت اقدامات سخت‌گیرانه امنیت زیستی و رعایت فاصله مزارعه مرغان تخمگذار و



شکل ۲- نمایه ای از نتایج الکتروفورز محصول PCR ردیابی ژنومی باکتری *Avibacterium Paragallinarum* در نمونه های سواب شکاف کام گله های گوشتی قبل از کشتار (سمت چپ ردیف ، به ترتیب دو باند مربوط به کنترل مثبت (+)و در انتها کنترل منفی (-) و شاخص ۱۰۰ جفت باز می باشند و اندازه باند محصول در حدود ۵۰۰ جفت باز است.

جدول ۱- توالی و محصول نهایی پرایمرهای شناسایی باکتری *Avibacterium Paragallinarum*.

Primer	Sequence	Fragment length
F۱ ۵′TGAGGGTAGTCTTGCACGCGAAT۳-′ N ۱ ۵′CAAGGTATCGATCGTCTCTCTACT۳-′		۵۰۰bp

مادر از گله‌های طیور گوشتی و مرغان روستایی بعنوان مخازن کریزای عفونی(بعلت عدم دریافت واکسن علیه این بیماری) اقدامی بسیار با اهمیت قلمداد می‌گردد(۵, ۲۱).

در ایران مطالعات محدودی در خصوص این بیماری در سال‌های اخیر صورت گرفته است که مشتمل بر تشخیص و شناسایی عامل بیماری از گله‌های طیور صنعتی و بومی بوده است(۱, ۳, ۱۹-۲۱). لذا اطلاعاتی بویژه از میزان واقعی وضعیت عفونت به AP در گله‌های مختلف و عملکرد واکسن‌های مصرفی مربوطه بسیار اندک است(۲۰). این مطالعه با هدف بررسی برآورد اولیه و امکان سنجی ردیابی درگیری گله‌های گوشتی شهرستان کرج با استفاده از آزمایش مولکولی PCR رایج و آزمون‌های سرولوژی انجام گرفت. در این تحقیق از دو آزمون AGP و SPA به دلایل قابل دسترس بودن آنها و نیز تنها ابزار کمک‌کننده، در خصوص کسب اطلاعاتی هرچند محدود از آلودگی قبلی در گله‌های گوشتی علی رغم حساسیت و ویژگی پایین آنها استفاده شد. مطالعات قبلی نشان داده است آزمون‌های SPA و AGP در تشخیص واکنش‌های سرمی علیه عامل این بیماری از حدودا دو هفته بعد از عفونت طبیعی و یا واکسیناسیون تا ۱۱ هفته بعد می‌تواند مفید باشد(۴). واکنش غیر اختصاصی آنتی‌ژن کامل سروتیپ A در آزمون SPA با سایر سروتیپ‌های باکتری *Avibacterium Paragallinarum* قبلا مورد مشاهده قرار گرفته بود(۴). دراین مطالعه از آنتی‌ژن جدایه‌ای که از قبل بعنوان سروتیپ A (بر اساس توالی‌یابی نوکلوتیدی بخش از پروتئین هماگلوتینین) مورد شناسایی قرار گرفته بود استفاده شد تا در آلودگی‌های ناشی از سروتیپ‌های مختلف نیز مورد شناسایی قرار گیرند. مطالعات در زمینه استفاده از تست‌های سرولوژیک دیگر در تشخیص این بیماری بسیار محدود می‌باشد. در یک آزمایش بلوک- الیزا مشخص گردید است استفاده از آنتی‌بادی منوکلونال اختصاصی سروتیپ برای عفونت *Avibacterium Paragallinarum* ضمن اختصاصی سروتیپ بودن آن، از میزان حساسیت کمی برخوردار است و همچنین این تست در شناسایی سروتیپ‌های مختلف دارای عملکرد متفاوتی است بطوریکه در شناسایی سروتیپ A تا ۹۶٪ و در مورد سروتیپ C تا ۴۰ ٪ و در شناسایی آلودگی‌های تجربی تا ۹۰ ٪ موفقیت داشته است (۱۷). در تشخیص عفونت‌ها به AP آزمایش مهار هماگلوتینین (HI) در مقایسه با آزمایش‌های AGP و SPA با فاصله زمانی دیرتری از وقوع آلودگی به پاسخ می‌رسد (۱۲)، لذا در پرنده‌های کم سن استفاده از این آزمایش ممکن است با نتایج مبهمی همراه شود.

در این مطالعه مشاهده نتایج منفی در نمونه سرم‌ها در آزمایش با AGP در مقایسه با SPA که حداقل در دو مورد از گله‌ها نتایج مثبت داشته است می‌تواند حاکی از حساسیت بسیار پایین آن باشد. مشاهده دو مورد مثبت سرمی در SPA می‌تواند نشان‌دهنده وجود سابقه درگیری این گله‌ها به بیماری حداقل بین دو تا سه هفته آخر دوره پرورشی آنها بوده است. این یافته می‌تواند بعنوان اولین دلیل اهمیت توجه به گله‌های گوشتی بعنوان مخزن بالقوه بیماری، در کنترل و پیشگیری کریزای عفونی در کشور باشد.

روش مولکولی PCR معرفی شده توسط Chen و همکاران در تشخیص AP بعنوان یکی از روش‌های تشخیص معتبر کریزای عفونی همچنان مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۱, ۲۵, ۲۸). گزارشاتی از استفاده از این آزمون در تشخیص و شناسایی AP توسط برخی از محققان کشور نیز وجود دارد (۱, ۱۹, ۲۱, ۲۴). با بررسی‌های صورت گرفته توسط محققان مشخص شده است پرایمر های این PCR در تشخیص جدایه‌های غیر معمول اخیر که غیر وابسته به NAD می‌باشند، نیز قابل استفاده می‌باشد(۷).

شناسایی مولکولی این باکتری بر روی نمونه‌های سواب تهیه شده از شکاف کامی (Choanal cleft) جوجه‌های گوشتی نشان داد که بیش از ۵۳ ٪ از نمونه‌ای تهیه شده از ۳۰ گله گوشتی (۱۶ مورد مثبت) در معرض آلودگی به باکتری عامل کریزای عفونی قرار داشته‌اند. انتخاب فصول سرد سال که همزمانی مشخصی با افزایش مشاهده موارد این بیماری محسوب می‌شود احتمالا در مشاهده میزان بالای آلودگی در این یافته تاثیرگذار بوده باشد. از سوی دیگر بنابر گزارش Chen در سال ۱۹۹۸، مبنی بر امکان ردیابی آلودگی به AP در نمونه‌های سواب تا مدت ۱۸ روز پس از آلودگی، می‌تواند احتمال داد بروز آلودگی در گله‌های مطالعه شده حاضر(با سن ۵۵ - ۴۵ روزگی) در پایان هفته چهارم و یا پنجم رخ داده باشد. در این موارد احتمالا وجود باقیمانده ایمنی مادر در نحوه بروز علائم بیماری گله‌های گوشتی حاصل از مادران واکسینه شده تاثیرگذار بوده باشد که نیازمند مطالعه دقیقتری در این زمینه می‌باشد.

در کشور مطالعات بسیار معدود در مورد بیماری کریزای عفونی بویژه با استفاده از PCR انجام گرفته است. عسکری بادویی و همکاران در سال ۲۰۱۴ در مطالعه‌ای با بررسی ۳۵ مورد نمونه سواب مربوط به مرغان گوشتی موارد مثبتی از آلودگی را گزارش نکردند (۱). احتمالا تفاوت نتایج این مطالعه با بررسی حاضر در ارتباط با محل نمونه‌گیری و یا شیوه استخراج DNA باکتری با استفاده از کیت تجاری بجای استفاده از روش فنل- کلرفرم و یا فصل نمونه‌گیری بوده باشد. باتوجه به وجود حساسیت سنی در بروز علائم مشخصه بیماری در پرنده‌های درگیر، ممکن است بسته به حدت باکتری عامل بیماری، این علائم بطور مشخص قابل توجه نباشد ولی تکثیر و بقای حداقلی عامل بیماری در اندام‌های تنفسی می‌تواند بویژه در مورد سویه‌های کم حدت‌تر، آلودگی طولانی بلند مدت گردیده و منجر به نتایج مثبت در آزمایش‌های حساسی همچون واکنش PCR گردد. گزارش‌هایی از بروز عوارض و خسارات ناشی از کریزای عفونی در گله‌های گوشتی وجود دارد (۲, ۵, ۸-۱۱). بررسی این گزارشات بخوبی نشان می‌دهد در کشورهای متعددی بیماری کریزای عفونی در گله‌های گوشتی یکی از بیماری‌های نسبتا شایع و از عامل مهم بروز خسارات اقتصادی می‌باشد. خسارات اقتصادی فوق بویژه زمانی که با دیگر عوامل درگیرکننده سیستم تنفس ماکیان مانند ویروس برونشیت عفونی (۸, ۲۳, ۲۹)، ویروس بیماری نیوکاسل (۲۳, ۲۹) مایکوپلاسما گالیسپتیکوم (۱۴, ۲۶) و عفونت‌های سالمونلوز در گله‌های گوشتی همراه باشد، نمود بیشتری می‌یابد.(۵)

بررسی‌های صورت گرفته در برخی نقاط جهان نشان داده است درگیری مرغان در مناطق روستایی و در مراکز پرورش طیور نیمه صنعتی آن مناطق به کریزای عفونی از مهمترین چالش‌های پیش رو بوده و از عوامل مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک در پرورشگاه‌های مرغ برای مهار بیماری می‌باشد.

خاتون و همکاران در سال ۲۰۱۶ در مطالعه‌ای محدود در بنگلادش جداسازی و شناسایی AP را با نرخ شیوع ۱۰ ٪ در جوجه‌های گوشتی

گزارش کرده‌اند (۱۳). کولسنیکوف در اوکراین در مطالعه‌ای با انجام تست PCR بر روی نمونه‌های بالینی مربوط به سال‌های ۲۰۱۵ – ۲۰۱۸ مربوط به گروه‌های مختلف طیور صنعتی (گله‌های تخمگذار، گوشتی و مادران گوشتی) نشان داد بین ۲۰ تا ۱۰۰ درصد نمونه‌های مرتبط با ۸ مزرعه از ۱۸ مزرعه تحت مطالعه آن کشور دارای آلودگی به AP بوده‌اند(۱۵). بین سال‌های ۲۰۱۹ تا ۲۰۲۰ گیو و همکاران، ۴۰ جدایه باکتری بعنوان AP از گله‌های گوشتی بیمار چین مورد شناسایی قرار داده و در آزمایش HI مشخص کردند، تعداد ۱۱ ، ۱۰ و ۱۹ جدایه به ترتیب مربوط به سروتیپ‌های A ، B و C بودند (۱۱). در بررسی جامع وجود عوامل ویروسی و باکتریایی و انگل‌های روده‌ای در مزارع پرورش طیور با مقیاس کوچک دچار بیماری در ناحیه‌ای از کشور ویتنام با تست PCR مشخص شد از مجموع وجود ۸۰ ٪ آلودگی به حداقل یک عامل بیماریزای مطالعه شده، و شناسایی آلودگی به AP تا۶۲/۳ ٪ ، MG تا ۲۶/۲ ٪ ، IBD تا ۲۴/۶ ٪ و در مورد IB تا ۲۱/۳ ٪ و به باکتری ایشرشیا کولی تا ۱۴/۸ ٪ و ORT تا ۱۳/۱ ٪ و ویروس‌های HPAI تا ۴/۹ ٪ و در حدود ۶۷/۲ ٪ از کل پرنده‌های تحت مطالعه حامل انواع کرم‌های انگل روده‌ای بوده‌اند(۲۷). بنظر می‌رسد میزان شیوع بیماری کریزای عفونی در مناطق استوایی و نیمه استوانی در پرنده‌های بومی آزادزی شایع‌تر باشد(۵). همچنین نسبت به اصلاح برداشت پیش‌تر مبنی بر عدم درگیری و یا کم اهمیت بودن کریزای عفونی در گله‌های گوشتی کشور اقدام نموده و توجه خاصی را در ارزیابی تلفات بیماری‌ها در این نوع گله‌ها در نظر داشت. استفاده از پروتکل‌های بهداشتی سخت‌گیرانه‌تر و انتخاب ضدعفونی‌کننده‌ها بر مبنای داده‌های علمی و در نهایت استفاده از واکسن‌های واجد کفایت ایمنی‌زایی در برابر سویه‌های محلی به نظر می‌رسد از مهم‌ترین راهکارهای مطرح در مقابله با عفونت کریزای عفونی باشد.

بطور خلاصه یافته این مطالعه بخوبی نشان داد که گله‌های گوشتی می‌تواند در معرض تهدید بیماری کریزای عفونی باشد و شاید مواردی از درگیری‌ها تنفسی در گله‌ها ی گوشتی کشور که با علائم بالینی تورم سر و مشکلات خفیف تنفسی بروز و ظهور می‌یابند می‌تواند ناشی از عملکرد زمینه‌ای باکتری *Avibacterium Paragallinarum* نیز باشد. لذا نظر به وجود درگیری‌های حاد کریزای عفونی در گله‌های گوشتی در برخی کشورها، اهمیت توجه به این گله‌ها در امر مبارزه با بیماری در کشور ما نیز مهم و ضروری می‌باشد. همچنین این نتایج می‌تواند نشان‌دهنده ضرورت پرداختن به این بیماری در مطالعات اپیدمیولوژی و شناسایی سویه‌های در گردش کشور و تهیه واکسن بومی در آینده باشد.

این مطالعه در غالب اجرای پروژه ۲-۱۸-۱۸-۹۵۰۷۷۳ مصوب سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج صورت گرفت.

منابع مورد استفاده

1 - Askari Badouei M, Sadrzadeh A, Azad N, Blackall P, Madadgar O, Charkhkar S. Isolation and molecular identification of avibacterium paragallinarum in suspected cases of infectious coryza. Turkish J Vet Anim Sci. 2013;38(1):46-49.

2 - Badr H, Roshdy H, Kilany WH, Elfeil WK, Sedik A, Hassan WM, et al. Isolation and Molecular Identification of Avibacterium Paragallinarum in Suspected Cases of Poultry. Journal of Advanced Veterinary Research. 2022;12(3):253-258.

3- Banani M, Pourbakhsh, S.A.,Khaki; P.,Goodarzi, H.,Moazeni-Jula, G., Ghodsian, N. Isolation, Identification And Antibiotic Sensitivity Of Haemophilus Paragallinarum Isolates From Commercial Layer Flocks Affected By Infectious Coryza. In Persian:. Pajouhesh and Sazandegi. 2007;73 128-135.

4 - Blackall PJ, R. Yamamoto. Infectius Coryza. In: Graham purchase.H. LHA, editor. A laboratory manual for the isolation and Identification of Avian Pathogens. third ed: Kendall / Hunt publishing Company; 1989. p. 27-31.

5 - Blackall PJ, Soriano-Vargas E. Infectious coryza and related bacterial infections. In: Swayne DE, Boulianne M, Logue CM, McDougald LR, Nair VL, Suarez DL, editors. Diseases of Poultry. 14 ed. NJ, USA: Hoboken; 2020. p. 890-906.

6 - Chen X, Miflin JK, Zhang P, Blackall PJ. Development and application of DNA probes and PCR tests for Haemophilus paragallinarum. Avian Dis. 1996;40(2):398-407.

7 - Chen X, Song C, Gong Y, Blackall PJ. Further studies on the use of a polymerase chain reaction test for the diagnosis of infectious coryza. Avian Pathol. 1998;27(6):618-624.

8 - Crispo M, Sentíes-Cué CG, Cooper GL, Mountainspring G, Corsiglia C, Bickford AA, et al. Otitis and meningoencephalitis associated with infectious coryza (Avibacterium paragallinarum) in commercial broiler chickens. J Vet Diagn Invest. 2018;30(5):784-788.

9 - Falconi-Agapito F, Saravia LE, Flores-Pérez A, Fernández-Díaz M. Naturally Occurring β-Nicotinamide Adenine Dinucleotide-Independent Avibacterium paragallinarum Isolate in Peru. Avian Dis. 2015;59(2):341-343.

10 - Gallardo RA, Da Silva AP, Egaña-Labrin S, Stoute S, Kern C, Zhou H, et al. Infectious Coryza: Persistence, Genotyping, and Vaccine Testing. Avian Dis. 2020;64(2):157-165.

11 - Guo M, Chen X, Zhang H, Liu D, Wu Y, Zhang X. Isolation, Serovar Identification, and Antimicrobial Susceptibility of Avibacteriumparagallinarum from Chickens in China from 2019 to 2020. Vet Sci. 2022;9(1).

12 - Iritani Y, G. sugimori,. K. katagiri. Serologic response to Haemophilus gallinarum in artificially infected and vaccinated chickens. Avian Dis. 1977;22:793-797.

13 - Khatun MM, Lijon MB, Islam MA, Sultana N. Detection of antibiotic resistant Avibacterium paragallinarum from broiler chickens in Bangladesh. J Adv Vet Anim Res. 2016;3(2):173-177.

14 - Kishida N, Sakoda Y, Eto M, Sunaga Y, Kida H. Co-infection of Staphylococcus aureus or Haemophilus paragallinarum exacerbates H9N2 influenza A virus infection in chickens. Arch Virol. 2004;149(11):2095-2104.

15 - Kolesnykov A, Stegniy B, Pinchuk N, Deryabin O. The spread of the causative agent of infectious rhinitis (avibacterium paragallinarum) in poultry farms of ukraine. . Scientific Horizons. 2019;9(89):81-87.

16 - Kume K, Sawata A, Nakai T, Matsumoto M. Serological classification of Haemophilus paragallinarum with a hemagglutinin system. J Clin Microbiol. 1983;17(6):958-964.

17 - Miao D, Zhang P, Gong Y, Yamaguchi T, Iritani Y, Blackall PJ. The development and application of a blocking ELISA kit for the diagnosis of infectious coryza. Avian Pathol. 2000;29(3):219-225.

18 - Miflin JK, Chen X, Bragg RR, Welgemoed JM, Greyling JM, Horner RF, et al. Confirmation that PCR can be used to identify NAD-dependent and NAD-independent Haemophilus paragallinarum isolates. Onderstepoort J Vet Res. 1999;66(1):55-57.

19 - Nouri A, Banani M, Goudrzi H, Pourbakhsh SA, Mirzaei SG. Retrospective detection of Avibacterium paragallinarum serovar B in egg yolk materials by PCR. Archives of Razi Institute. 2014;69(2):179-183.

20 - Nouri A, Banani M, Toroqi R. Immunogenicity of Infectious Coryza vaccine against a native isolate of Avibacterium paragallinarum from Iran. Iran Vet J. 2019;14(4):96-105.

21 - Nouri A, Bashashati M, Mirzaie SG, Shoshtari A, Banani M. Isolation, Identification and Antimicrobial Susceptibility of Avibacterium Paragallinarum from Backyard Chicken in Retail Markets of Karaj and Tehran, Iran. Archives of Razi Institute. 2021;76(4):923-929.

22 - page LA. Haemophilus infections in chickens. 1. Characteristics of 12 Haemophilus isolates recovered from diseased chickens. Am J Vet Res. 1962;23:85-95.

23 - Patel JG, Patel BJ, Patel SS, Raval SH, Parmar RS, Joshi DV, et al. Metagenomic of clinically diseased and healthy broiler affected with respiratory disease complex. Data Brief. 2018;19:82-85.

24 - Peighambari SM, Nouri A, Barzegari R, Ghorbani A. Isolation and Molecular Identification of Avibacterium paragallinarum Isolated from Commercial Layer and Backyard Chickens in Iran. Iran J Vet Med. 2022;16(3):239-248.

25 - Putra FN, Wahyuni A, Sutrisno B. Molecular detection and pyrG sequence analysis of Avibacterium paragallinarum using clinical samples of infraorbital exudates from layer chickens with infectious coryza symptoms in Indonesia. Vet World. 2023;16(8):1655-1660.

26 - Sandoval VE, Terzolo HR, Blackall PJ. Complicated infectious coryza outbreaks in Argentina. Avian Dis. 1994;38(3):672-678.

27 - Van NTB, Yen NTP, Nhung NT, Cuong NV, Kiet BT, Hoang NV, et al. Characterization of viral, bacterial, and parasitic causes of disease in small-scale chicken flocks in the Mekong Delta of Vietnam. Poult Sci. 2020;99(2):783-790.

28 - Xie H, Li H, Yu C, Miao Y, Wu Y, Jia R, et al. Avibacterium paragallinarum: an emerging birds pathogen in Qinling wildlife conservation center, China. Animal Diseases. 2023;3(1).

29 - Xie Z, Luo S, Xie L, Liu J, Pang Y, Deng X, et al. Simultaneous typing of nine avian respiratory pathogens using a novel GeXP analyzer-based multiplex PCR assay. J Virol Methods. 2014;207:188-195.