نشریه میکروبیولوژی دامپزشکی
دوره هجدهم، شماره دوم، پاییز و زمستان ۱۴۰۱،
پیاپی ۴۵ : ۱۰۱-۸۸

JVM Journal of Veterinary Microbiology

مقاله ترویجی

جداسازی، شناسایی مولکولی، ردیابی ژن *magA* و ارزیابی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های *کلبسیلا* در تلفات جنینی شترمرغ در اصفهان

مجید غلامی آهنگران [1*]، امیرحسین آقاخانی لنبانی[2]، راضیه فرهنگ اصفهانی[2]، آسیه احمدی دستگردی[3]

۱- دانشیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۲- دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۳- استادیار، گروه صنایع غذایی، واحد اردستان، دانشگاه آزاد اسلامی، اردستان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۱/۲۲

چکیده

تلفات جنینی در شترمرغ می تواند باعث کاهش سودآوری صنعت پرورش شترمرغ شود. عوامل زیادی در کاهش جوجه درآوری نقش دارند. در این میان عوامل عفونی از اهمیت ویژه ای برخوردارند. در بین عوامل عفونی نقش *کلبسیلا* در تلفات جنینی و به ویژه در شترمرغ کمتر مورد بررسی قرار گرفته است. لذا در مطالعه اخیر ۲۰۰ نمونه سواب از جنین های تلف شده شترمرغ جمع آوری شد و با روش‌های میکروبیولوژی و بیوشیمیایی به شناسایی موارد آلوده به *کلبسیلا* پرداخته شد. سپس با روش PCR با پرایمرهای اختصاصی به شناسایی و تعیین گونه *کلبسیلا* و ژن حدت *magA* پرداخته شد. نتایج نشان داد از مجموع ۲۰۰ نمونه سوآب جمع آوری شده ۶۰ مورد آلوده به عوامل عفونی باکتری های گرم منفی (۳۰٪) بودند و از مجموع موارد آلوده به باکتری های گرم منفی ۲۰ مورد آلوده به *کلبسیلا* تشخیص داده شد (۳۳٪). از مجموع موارد آلوده به *کلبسیلا* ۱۵ مورد گونه *نومونیا* (۷۵٪) و ۵ مورد گونه *اکسی توکا* (۲۵٪) شناسایی شد. هیچ کدام از سویه های *کلبسیلا* حامل ژن *magA* نبودند. در این مطالعه سویه های کلبسیلا بیشترین حساسیت را نسبت به ایمیپنم (۱۰۰٪) و بیشترین مقاومت را نسبت به انروفلوکساسین (۷۰٪) نشان دادند. بطور کلی، با توجه به آلودگی جنین های تلف شده به *کلبسیلا* به نظر می رسد این باکتری سهم ۱۰ درصدی در تلفات جنینی شترمرغ داشته باشد لذا جلوگیری از آلودگی های سطحی و رعایت اصول ضدعفونی در جوجه کشی شترمرغ در کاهش تلفات جنینی ناشی از آلودگی های سطحی و از جمله *کلبسیلا* نقش عمده ای دارد.

کلمات کلیدی: تلفات جنینی، شترمرغ، *کلبسیلا*، PCR

*نویسنده مسئول: مجید غلامی آهنگران

آدرس: دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه ازاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

پست الکترونیک: mgholami6@gmail.com

مقدمه

پرورش شترمرغ در ایران در دهه اخیر رشد قابل توجهی داشته و گوشت شترمرغ بدلیل مزایای عمده تغذیه ای و از جمله کلسترول و چربی پایین از محبوبیت مطلوبی برخوردار شده است. در عرصه پرورش شترمرغ، افزایش بهره وری اقتصادی و تولید می تواند باعث رشد اقتصادی بیشتر در این صنعت شود (۲). در این راستا افزایش باروری، افزایش قابلیت تفریخ، کاهش تلفات جنینی و کاهش تلفات اولیه از عوامل بسیار مهم تاثیر گذار در افزایش بهره وری اقتصادی است. عفونت کیسه زرده از عوامل معمول تلفات جنینی و تلفات اولیه در پرندگان (و از جمله شترمرغ) است. کیسه زرده به طور معمول در بدو خروج جوجه از تخم بداخل شکم کشیده می شود و به مرور زمان جذب می شود به طوریکه پس از روزهای ابتدایی، ممکن است فقط پایک محل اتصال کیسه زرده به روده مشاهده شود (۱۴). عوامل مختلف تغذیه ای، مدیریتی، ژنتیکی و غیره ممکن است باعث باقی ماندن کیسه زرده و مستعد شدن آن به عفونت گردد. چربی بالای زرده، کیسه زرده را به محیط کشت مطلوب برای رشد انواع عوامل بیماریزا تبدیل کرده است. عوامل عفونی مدفوعی و محیطی از طریق منافذ روی سطح پوسته تخم به داخل تخم پرندگان نفوذ می کنند و در صورتیکه منجر به مرگ جنین نشوند می توانند باعث عفونت کیسه زرده شوند (۱ و ۲۲). عوامل مختلف میکروبی در تلفات جنینی و عفونت کیسه زرده دخیل هستند که از جمله می توان به *اشریشیاکلی*، *سالمونلا*، *استافیلوکوکوس*، *استرپتوکوکوس*، *پروتئوس*، *انتروباکتر*، *سودوموناس*، عوامل *کلستردیایی*، *باسیلوس*، *انتروکوکوس* و *کلبسیلا* اشاره نمود (۲۹). *کلبسیلا* به عنوان یک باکتری گرم منفی میله ای شکل از خانواده *انتروباکتریاسه* می باشد (۳) که می تواند از طریق محیطی باعث آلودگی پوسته یا تجهیزات جوجه کشی گردد و منجر به تلفات جنینی شود.

کلبسیلا عموماً به عنوان یک باکتری فرصت طلب شناخته می شود (۴). امروزه بیماریزایی این باکتری اثبات شده و به عنوان یک باکتری بیماریزای مستقل نیز شناخته می شود. عفونت های کلبسیلایی عمدتاً در اثر آلودگی های محیطی بوجود می آیند. این باکتری جزء فلور دستگاه گوارش است و در محیط های پر تراکم و شلوغ یکی از مهم ترین عفونت ها می باشد. معمولاً عفونت های باکتریایی بیمارستانی به کلبسیلا نسبت داده می شود (۳). این باکتری می تواند باعث عفونت زخم، مننژیت، سپتی سمی و عفونت های ادراری گردد. یکی از معضلات عمده در درمان عفونت های کلبسیلایی مقاومت باکتریایی است که گاهی اوقات از طریق ژنوم این باکتری، به سایر باکتری های بیماریزا خصوصاً خانواده *انتروباکتریاسه* منتقل می شود (۲۰ و ۲۸). لذا اهمیت این آلودگی هم از بعد درمان عفونت های کلبسیلایی است و هم اینکه می تواند سایر باکتری های مهم بیماریزای انسان را نیز مقاوم به آنتی بیوتیک سازد.

فاکتورهای حدت مختلفی در سویه های کلبسیلا شناسایی شده است که از جمله می توان به کپسول، عوامل اتصال باکتری و فعالیت ضد فاگوسیتوزی اشاره کرد. ژن *magA* (Mucoviscosity associated gene A)، یک رن کروموزومی است که مارکر اختصاصی سروتیپ K1 شناخته می شود (۲۵ و ۳۱). این ژن یک آنزیم پلیمراز را کد می کند که در سنتز کپسول نقش دارد و باکتری را در مقابل فاگوسیتوز محافظت می کند (۲۱). ژن *magA* در ایجاد فنوتیپ هیپرموکوویسکوزیتی و عفونت های کلبسیلایی از

جمله سپتی سمی، مننژیت و آبسه کبدی نقش مهمی دارد (۳۲).

با توجه به اینکه شواهد علمی از دخالت کلبسیلا در مرگ و میر جنینی در پرندگان وجود دارد (۸ و ۱۶) در مطالعه اخیر به بررسی نقش *کلبسیلا* در مرگ و میر جنینی شترمرغ پرداخته شده است. اگرچه در خصوص آلودگی میکروبی در تلفات جنینی طیور تخمگذار مطالعات فراوانی انجام شده است اما مطالعات معدودی در خصوص ارزیابی نقش کلبسیلا در تلفات جنینی شترمرغ و ارزیابی حدت و مقاومت آنتی بیوتیکی وجود دارد که در این مطالعه به طور همزمان با روش کشت باکتری شناسی و مولکولی PCR به این موضوع پرداخته می شود.

مواد و روش کار

نمونه گیری

این مطالعه از بهار ۱۳۹۹به مدت ۳ ماه و مجموعا ۵۰ نمونه تخم شترمرغ تفریخ نشده از سطح ۲۰ فارم پرورش شترمرغ در اصفهان (هر فارم ۱۰ نمونه) جمع آوری شد. تخم شترمرغ ها، بلافاصله بعد از انتقال به آزمایشگاه شکسته شد و در کنار شعله نمونه برداری شد.

شناسایی باکتری های گرم مثبت ، گرم منفی و قارچ ها

به منظور جداسازی باکتری از کیسه زرده، قلب و کبد، از بافت های مورد نظر با سواب استریل نمونه برداری شد و در لوله های حاوی محیط پیش مغذی پپتون واتر در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. سپس توسط سوآب استریل از این محیط برداشت کرده و بر روی محیط کشت مک کانگی کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد برای مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. پرگنه های لاکتوز مثبت مشکوک، با بررسی اندازه، شکل و نوع پرگنه ها، از نظر مورفولوژی باکتری نیز با رنگ آمیزی گرم و مشاهده در زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت و تایید شد. برای خالص سازی بر روی محیط مک کانگی کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد برای مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد.

به منظور تایید موارد مشکوک، تست های بیوشیمیایی کاتالاز، اکسیداز و تست حرکت بر روی پرگنه های خالص سازی شده انجام شد. معمولاً *کلبسیلا* کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی و بدون حرکت می باشد. علاوه بر آن از پرگنه های مشکوک بروی محیط TSIکشت می دهیم. کلبسیلا به علت تخمیر گلوکز و لاکتوز به رنگ زرد (بالا)- زرد (پایین) در می آید. برای تعیین تست اوره از پرگنه ها به محیط اوره براث تلقیح شد که کلبسیلا بدلیل تخمیر اوره باعث تغییر رنگ بنفش می شود. همچنین تست IMViC را نیز برای شناسایی کلبسیلا انجام داده که کلبسیلا ایندول منفی، MR منفی ، VPمثبت و تست احیای سیترات در مورد آن مثبت برای مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. برای شناسایی قارچ های فرصت طلب با سواب استریل از محتویات تخم شترمرغ های هچ نشده بر روی محیط PDA به صورت سطحی کشت داده شد و انکوبه شد.

شناسایی کلبسیلا

به منظور جداسازی کلبسیلا از کیسه زرده، قلب و کبد، از بافت های مورد نظر با سواب استریل نمونه برداری شد و در لوله های حاوی محیط پپتون واتر در دمای ۳۷درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. سپس توسط سوآب استریل از این محیط برداشت کرده و بر روی محیط کشت مک کانگی کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد برای مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. پرگنه های لاکتوز مثبت مشکوک، با بررسی اندازه، شکل و نوع پرگنه ها، از نظر مورفولوژی باکتری نیز با رنگ آمیزی گرم و مشاهده در زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت و تایید شد. برای خالص سازی بر روی محیط مک کانگی کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد برای مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد.

به منظور تایید موارد مشکوک، تست های بیوشیمیایی کاتالاز، اکسیداز و تست حرکت بر روی پرگنه های خالص سازی شده انجام شد. معمولاً *کلبسیلا* کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی و بدون حرکت می باشد. علاوه بر آن از پرگنه های مشکوک بروی محیط TSIکشت می دهیم. کلبسیلا به علت تخمیر گلوکز و لاکتوز به رنگ زرد (بالا)- زرد (پایین) در می آید. برای تعیین تست اوره از پرگنه ها به محیط اوره براث تلقیح شد که کلبسیلا بدلیل تخمیر اوره باعث تغییر رنگ بنفش می شود. همچنین تست IMViC را نیز برای شناسایی کلبسیلا انجام داده که کلبسیلا ایندول منفی، MR منفی ، VPمثبت و تست احیای سیترات در مورد آن مثبت

است. از نوترین براث برای آماده سازی جهت استخراج DNA استفاده شد.

به منظور تشخیص قطعی *کلبسیلا* در نمونه‌های کشت شده و نیز تعیین گونه این باکتری از آزمایش PCR با استفاده از زوج پرایمرهای منتشر شده استفاده شد. پرایمر های مذکور در شرکت تکاپوزیست سنتز و تهیه شدند و توالی آن ها در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱) توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت ردیابی جنس *کلبسیلا* (۸) و گونه های *نومونیا* و *اکسی توکا* (۱۰)

هدف شناسایی	نام پرایمر	توالی پرایمر	ژن	اندازه محصول PCR
کلبسیلا	Kleb-F	CGC GTA CTA TAC GCC ATG AAC GTA	*gyr A*	٤٤١v
	Kleb-R	ACC GTT GAT CAC TTC GGT CAG G		
نوموز یا	KP-F	CAA CGG TGT GGT TAC TGA CG	*rpoB*	۱۰۸
	KP-R	TCT ACG AAG TGG CCG TTT TC		
اکسی توکا	KO-F	GAT ACG GAG TAT GCC TTT ACG GTG	*PehX*	۳٤۳
	KO-R	TAG CCT TTA TCA AGC GGA TAC TGG		

برای این منظور، باکتری های خالص شده در محیط نوترینت براث در دمای ۳۷ درجه به مدت یک روز انکوبه شد و DNA ژنومی باکتریهای رشد یافته با استفاده از روش Boiling استخراج و در دمای ۲۰- درجه قرار گرفت. آزمایش PCR جهت تأیید جنس کلبسیلا با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام شد که شامل PCR buffer (۲۰ میکرو لیتر) که شامل (۵۰۰ میکرومول KCL و ۲۰۰ میکرومول Tris HCL)، dNTPs (۱/۲۵ میکرو لیتر) (۱۰میلی مول) ، MgCl 2 (۱/۵ میکرو لیتر) (۵۰ میلی مول)، هر یک از پرایمرها (۱ میکرو لیتر)، Taq DNA polymerase(۰/۲ میکرو لیتر) (Fermentase) ، DNA استخراج شده (۵ میکرو لیتر) بود. توالی پرایمر های مورد استفاده در جدول ۱ آمده است. تکثیر ژن های هدف در دستگاه ترموسایکلر (اپندورف - آلمان) با برنامه ی سیکل های حرارتی شامل مرحله شروع در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه، ۳۵ سیکل شامل ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه، ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه ، ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه و مرحله ی بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه صورت می گیرد. دراین بررسی از نشان گر 100bp جهت مشخص نمودن اندازه ی باند ها استفاده شد.

در هر مرحله ۲۰ میکرومول از محصول PCR روی ژل ۱/۵ درصد آگارز واجد اتیدیوم بروماید در ولتاژ ثابت

۸۰ ولت الکتروفورز و ژل حاصله با دستگاه تصویربردار ژل (Uvitech.U.K) قرائت شد.

در این بررسی سویه رفرنس *کلبسیلا نومونیا* (ATCC 700603, PTCC 1792) و کلبسیلا اکسی توکا (ATCC 8724, PTCC 1402) به عنوان کنترل مثبت (تهیه شده از سازمان پژوهش های علمی صنعتی ایران) و آب دوبار تقطیر استریل به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

شناسایی ژن حدت فعالیت ضد فاگوسیتی (*magA*)

به منظور ردیابی ژن *magA*، واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل PCR buffer (۵ میکرو لیتر)، dNTPs (۰/۵ میکرو لیتر) (۱۰میلی مول)، هر یک از پرایمرها (۱/۵ میکرو لیتر) (۱۰ پیکومول)، Taq DNA polymerase(۰/۵ میکرو لیتر) (۲/۵ واحد) (Fermentase) ، DNA استخراج شده (۲ میکرو لیتر) (۲ میکروگرم) بود.

توالی پرایمر های مورد استفاده در جدول ۲ آمده است. تکثیر ژن های هدف در دستگاه ترموسایکلر (اپندورف – آلمان) با برنامه ی حرارتی شامل مرحله شروع در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل شامل ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه، ۴۵ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه ، ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷۵ ثانیه و مرحله ی گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصول PCR بر روی ژل ۱٪ الکتروفورز و نتایج ثبت شد.

جدول ۲) توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت ردیابی ژن *magA*

ژن	توالی پرایمر	اندازه محصول PCR	منبع
magA	F: 5′ GGT GCT CTT TAC ATC ATT GC 3′ R: 5′ GCA ATG GCC ATT TGC GTT AG 3’	۱۲۸۰	۲۶

ارزیابی مقاومت آنتی بیوتیکی

برای تعیین حساسیت باکتری جدا شده نسبت به داروهای آنتی باکتریال، از روش انتشار دیسکی ساده به روش استاندارد کربی بوئر بر روی محیط مولر هینتون آگار انجام شد. آنتی بیوتیک های موردبررسی شامل انروفلوکساسین(۵ میکروگرم بر دیسک)، سولفامتازول + تری متوپریم، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم بر دیسک)، سفوتاکسیم(۳۰ میکروگرم بر دیسک)، استرپتومایسین(۱۰ میکروگرم بر دیسک)، ایمیپنم (۱۰ میکروگرم بر دیسک)، کلرامفنیکل (۳۰ میکروگرم بر دیسک)، کلستین (۱۰ میکروگرم بر دیسک) است. در نهایت میزان مقاومت و حساسیت هر جدایه با مقایسه با استاندارد جهانی CLSI قرائت شد.

نتایج

در تحقیق حاضر با استفاده از روش‌های میکروبیولوژی و بیوشیمیایی از کیسه زرده، کبد و قلب ۲۰۰ تخم شترمرغ حاوی جنین تلف شده کشت تهیه شد که از مجموع ۲۰۰ نمونه کشت داده شده در ۸۸ مورد (۴۴٪) آلودگی با باکتری گرم منفی، گرم مثبت و یا قارچ مشاهده شد. از مجموع ۸۸ مورد عفونی، ۱۵ مورد باکتری گرم مثبت (۱۷/۰۴ درصد)، ۶۰ مورد باکتری

گرم منفی (۶۸/۱۸) و ۱۳ مورد قارچ (۱۴/۷۷درصد) جدا شد.

از مجموع باکتری های گرم منفی در محیط های کشت و تست های بیوشیمیایی ۲۰ مورد آلوده به *کلبسیلا* یافت شد. شناسایی موارد مثبت بر اساس تست های میکروبی و بیوشیمیایی صورت گرفت. باکتری ها شناسایی شده به عنوان *کلبسیلا* در زیر میکروسکوپ به صورت باسیل های گرم منفی و در محیط مک کانگی ارغوانی بودند (لاکتوز مثبت) و به دلیل داشتن کپسول، موکوییدی دیده شدند.

در این مطالعه، شناسایی باکتری *کلبسیلا* بر اساس ظهور پرگنه های موکوییدی صورتی لاکتوز مثبت بر روی مک کانگی به انضمام تست های بیوشیمیایی IMViC انجام شد. باکتری های شناسایی شده در محیط TSI به صورت گلوکز مثبت و لاکتوز مثبت (زرد- زرد) به همراه تولید گاز و H2S منفی دیده شدند. در آزمون های بیوشیمیایی تست اوره آز مثبت (به کندی)، تولید ایندول منفی (و در مورد گونه اکسی توکا ایندول مثبت)، MRمنفی، VP مثبت و احیای سیترات مثبت دیده شد. علاوه بر این باکتری های شناسایی شده اکسیداز منفی و کاتالاز مثبت و در تست حرکت، بدون حرکت بودند.

نتایج آنتی بیوگرام سویه های کلبسیلا جدا شده نشان داد بیشترین حساسیت نسبت به آنتی بیوتیک های ایمیپنم، سفوتاکسیم و جنتامایسین به ترتیب ۱۰۰، ۷۵ و ۷۵ درصد وجود داشت حال آنکه سویه های کلبسیلا نسبت به آنتی بیوتیک انروفلوکساسین بیشترین مقاومت (۷۰ درصد) را نشان داد. مقاومت و حساسیت آنتی بیوتیکی نسبت به سایر آنتی بیوتیک های مورد مطالعه در جدول ۳ آمده است.

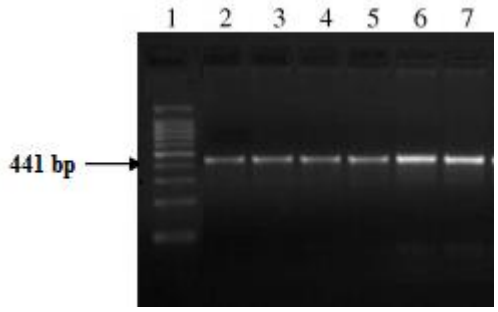
جدول ۳) مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های کلبسیلا جدا شده از تلفات جنینی شترمرغ

آنتی بیوتیک	مقاوم (٪)	نیمه حساس (٪)	حساس (٪)
انروفلوکساسین	۷۰	۱۵	۱۵
جنتامایسین	۱۵	۱۰	۷۵
کلرامفنیکل	۳۰	۲۰	۵۰
سفوتاکسیم	۱۰	۱۵	۷۵
کلستین	٤۵	۲۵	۳۰
سولفامتوکسازول + تری متوپریم	۳۵	۲۰	٤۵
ایمیپنم	۰	۰	۱۰۰
استرپتومایسین	۲۰	۳۰	۵۰

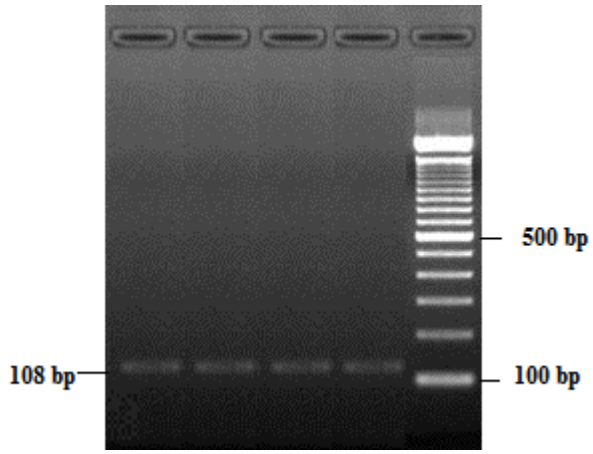
علاوه بر این، بدنبال روش های میکروبیولوژی، استخراج DNA و تکثیر ژنوم با استفاده از پرایمر اختصاصی *کلبسیلا* در هر ۴ مورد شناسایی شده به روش میکروبیولوژی، در تست مولکولی نیز تایید شد و قطعه ۴۴۱ جفت بازی همانند کنترل مثبت، مربوط به تکثیر ژن *gyr* A بدست آمد (شکل ۱).

از مجموع ۲۰ مورد *کلبسیلا* ردیابی شده، ۱۵ مورد بر اساس تکثیر ژن *rpo* B با طول قطعه ۱۰۸ جفت باز متعلق به گونه نومونیا شناسایی شد (شکل ۲) و ۵ گونه نیز با تکثیر قطعه ۳۴۳ جفت بازی ژن *peh X* متعلق به جنس *اکسی توکا* تشخیص داده می شود (شکل ۳).

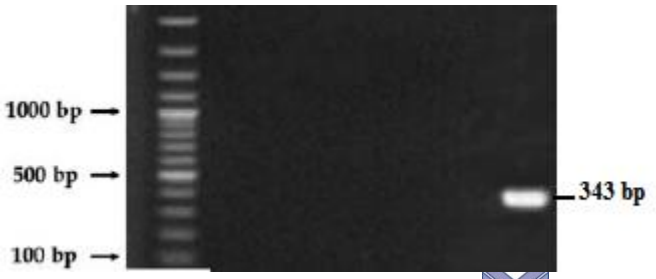
ردیابی ژن حدت *magA* در واکنش PCR نشان داد که هیچ یک از سویه های مورد بررسی واجد ژن حدت *magA* نبودند (شکل ۴).



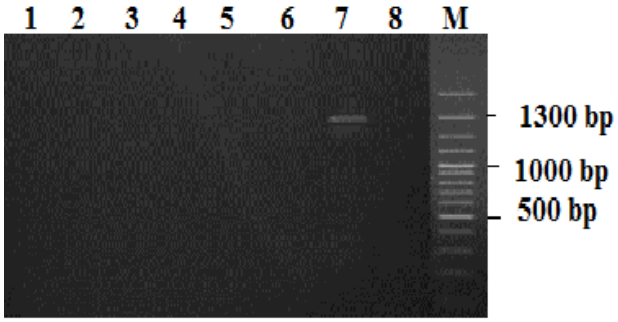
شکل ۱) ژل الکتروفورز مربوط به تکثیر قطعه ۴۴۱ جفت بازی ژن *gyr A کلبسیلا* (مربوط به ۲ کنترل مثبت (گونه های *نومونیا* و *اکسی توکا: ستون ۲ و ۳*) و ۴ نمونه مثبت *کلبسیلا: ستون ۴ تا ۷*)



شکل ۲) ژل الکتروفورز مربوط به تکثیر قطعه ۱۰۸ جفت بازی ژن *rpoB کلبسیلا نومونیا* (از سمت مارکر اولین ستون مربوط به یک نمونه کنترل مثبت *کلبسیلا نومونیا* و سه ستون آخر مربوط به ۳ نمونه مثبت)



شکل ۳) ژل الکتروفورز مربوط به تکثیر قطعه ۳۴۳ جفت بازی ژن *pehX کلبسیلا اکسی توکا* (مربوط به یک نمونه مثبت *کلبسیلا اکسی توکا* و نمونه های منفی)



شکل ۳) ژل الکتروفورز مربوط به تکثیر قطعه ۱۲۸۰ جفت بازی ژن *magA* کلبسیلا (از چپ به راست: ستون ۱ تا ۶: نمونه های منفی، ستون ۷ : کنترل مثبت، ستون ۸: کنترل منفی، ستون M : مارکر)

بحث و نتیجه گیری

نتایج مطالعه اخیر نشان می دهد که از مجموع ۲۰۰ تخم شترمرغ مورد مطالعه، ۸۸ مورد آلوده به عوامل عفونی (۴۴٪) بود که از مجموع ۸۸ مورد، ۱۳ مورد قارچی، ۶۰ مورد باکتری گرم منفی و ۱۵ مورد باکتری گرم مثبت جداسازی شد. قبلاً Deeming (۱۹۹۵) نشان داد که ۲۲/۸ ٪ و ۳۶/۳٪ از تمامی تخم شترمرغ های بارور که هچ نمی شوند با باکتری و یا قارچ آلوده هستند (۱۲). همچنین Dzoma و Dorrestein (۲۰۰۱) گزارش کردند که ۴۲ درصد از جنین های شترمرغ تلف شده در پوسته، آلودگی باکتریایی داشتند که عمدتاً مربوط به *اشریشیاکلی* بوده است (۱۳). Button و همکاران (۱۹۹۴) گزارش کردند که ۳۹/۵ ٪ از ۱۱۴ تخم نطفه دار شترمرغ که تلفات جنینی زود هنگام یا در اواسط دوره را نشان می دادند عفونی بودند (۱۰). لذا براساس

مطالعه حاضر و سایر مطالعات مشابه به نظر می رسد که آلودگی میکروبی دلیل مهمی در تلفات جنینی شتر مرغ است که در این میان عوامل باکتریایی و قارچ ها مهمترین آلودگی میکروبی موثر در تلفات جنینی هستند.

در مطالعه اخیر به بررسی نقش *کلبسیلا* در تلفات جنینی شترمرغ پرداخته شده است. *کلبسیلا* یک باکتری گرم منفی است که می تواند در انسان باعث نومونیا، سپتی سمی عفونت ادراری، مننژیت، اسهال و عفونت بافت نرم گردد و در حیوانات بیماری های مختلفی مانند ورم پستان، التهاب رحم، پلی آرتریت، سپتی سمی، نومونیا و عفونت های ادراری ایجاد کند (۳ و ۸). در پرندگان این باکتری می تواند به عنوان یکی از عوامل ایجاد کننده تلفات جنینی و عفونت کیسه زرده مطرح باشد. عوامل زیادی از خانواده انتروباکتریاسه مانند *اشریشیاکلی*، گونه های *سالمونلا* و نیز عواملی مانند *استافیلوکوکوس*، گونه های *کلستریدیوم*، *سودوموناس*، *پروتئوس* و *آسپرژیلوس* می توانند در ایجاد تلفات جنینی نقش داشته باشند (۱۹) اما با توجه به اینکه در مطالعات قبلی، کمتر به نقش *کلبسیلا* در ایجاد تلفات جنینی پرداخته شده است در این مطالعه مورد توجه قرار گرفته است.

مطالعات زیادی به ارزیابی موارد آلودگی به *کلبسیلا* در پرندگان پرداخته اند اما معدود مطالعه ای به نقش *کلبسیلا* در موارد تلفات جنینی پرداخته است. رزمیار و زمانی در سال ۲۰۱۶ به بررسی علت تلفات در ۳ روز اول پرورش و نیز تلفات داخل تخم در یک سالن پرورش قناری پرداختند و با روش کشت مشخص نمودند که *کلبسیلا* یکی از عوامل عمده ایجاد کننده تلفات جنینی در این واگیری بوده است (۲۳). همچنین در یک گزارش از نیجریه از نمونه های کشت حاصل از ۶۰۰ مورد تلفات جنینی داخل تخم مرغ متعلق به دو هچری، ۱۳ سویه *کلبسیلا* جداسازی شده است (۲۱). اگرچه در خصوص بیمایزایی این باکتری در طیور اطلاعاتی وجود ندارد اما نتایج مطالعه اخیر و مطالعات قبلی نشان می دهد *کلبسیلا* می تواند به عنوان یکی از عوامل دخیل در تلفات جنینی پرندگان مطرح باشد و برای صنعت جوجه کشی شترمرغ به عنوان یک تهدید مطرح باشد.

ارزیابی جنین های تلف شده در داخل تخم نشان داد که جنین های تلف شده به اندازه کافی تکامل یافته بودند اما در اثر عفونت قادر به خروج از تخم نشدند و در داخل تخم تلف شدند. بررسی ظاهری و کالبدگشایی جنین های تلف شده نشان دهنده تورم و ادماتوز بودن کلی جنین ها مخصوصاً تورم ناحیه پشت گردن و پاها جلب توجه می کرد که در بعضی موارد با ترشحات غلیظ و بد بو همراه بود و در اکثر موارد قوام کیسه زرده تغییر یافته و با بوی مشمئز کننده همراه بود. پرخونی عروق کیسه زرده و پرخونی عمومی لاشه ها از دیگر یافته ها در جنین های آلوده به *کلبسیلا* بود. با این حال، این جنین ها اگر موفق به خروج از تخم هم می شدند در مراحل اولیه به دلیل سپتی سمی ناشی از عفونت کیسه زرده تلف می شدند. به طوری که قبلا نیز Hosseina و همکاران در سال ۲۰۰۸ توانستند *کلبسیلا* را از تلفات عفونت کیسه زرده در جوجه های گوشتی ماکیان جدا کنند. در آن بررسی ۱۲ ٪ باکتری های جدا شده مربوط به تلفات جنینی جوجه های گوشتی *کلبسیلا* بود (۱۸). همچنین بهاری و همکاران در سال ۲۰۰۶ با جداسازی *کلبسیلا* از تلفات عفونت کیسه زرده ۳ مرغداری جوجه گوشتی از مجموع ۱۰ مرغداری مورد بررسی در مشهد، فراوانی *کلبسیلا* در ایجاد تلفات جنینی را در مرغداری ها ۱۰ درصد بیان نمودند (۱). در

خصوص شترمرغ یک گزارش از جداسازی عوامل باکتریایی از تلفات جنینی وجود دارد که در این مطالعه بیشترین درصد آلودگی باکتریایی مربوط به سودوموناس (۲۳/۳ درصد) بوده و جنین ها آلودگی ۷/۵ درصدی را با کلبسیلا نیز نشان داده اند (۴).

در خصوص منشا عفونت *کلبسیلا* در ایجاد تلفات جنینی و عفونت کیسه زرده به نظر می رسد آلودگی های مدفوعی و نفوذ باکتری به داخل تخم نقش داشته باشد. به طوریکه در یک مطالعه در نیجریه توانستند ۹۰ سویه *کلبسیلا* از ۱۵۰ نمونه مدفوع پرندگان خانگی جدا کنند (۱۳). علاوه بر آن در ایران، منصوری و فرهمند با تهیه سواب از محتویات جوجه های گوشتی در کرمان میزان فراوانی این باکتری را در مدفوع ۲۱/۲ درصد گزارش کردند (۱۱). لذا با وجود روزنه های زیاد در پوسته تخم، با عبور تخم از قسمت مشترک گوارشی- تناسلی و از طرفی تماس با سطوح بستر و لانه های تخمگذاری غیر بهداشتی، عوامل مختلف فرصت طلب می توانند به داخل تخم پرندگان نفوذ کرده و باعث تلفات جنینی و یا حتی مشکلات عفونی در جوجه های تفریخ شده شوند. بستر ماسه ای در پرورش شترمرغ و بعضاً عدم رعایت اصول ضدعفونی در افزایش رخداد تلفات جنینی بدلیل آلودگی های مدفوعی در شترمرغ از اهمیت بالایی برخوردار است.

اگر چه اهمیت بیماریزایی *کلبسیلا* در بیماری های طیور (به جز عفونت کیسه زرده و تلفات جنینی) به خوبی مطالعه نشده است اما Younis و همکاران در سال ۲۰۱۶ با تهیه ۲۰۰ کشت باکتریایی از ۵۰ مرغ بیمار گونه های *کلبسیلا* را از ریه، کبد، طحال و قلب جدا کردند. در این مطالعه از ۳۰ سویه جدا شده ۷۷ درصد متعلق به گونه *نومونیا* و ۲۶ درصد متعلق به گونه *اکسی توکا* و ۱۵٪ متعلق به گونه های دیگر بوده است (۲۴).

لذا به نظر می رسد گونه *نومونیا* گونه شایع تر *کلبسیلا* باشد به طوری که در مطالعه اخیر نیز فراوانی *نومونیا* در مقایسه با *اکسی توکا* حدوداً ۳ برابر بوده است.

در مطالعه اخیر تنها به بررسی *کلبسیلا* پرداخته شده است اما مرور مطالعات قبلی نشان می دهد که سایر باکتری های گرم مثبت و گرم منفی نیز در ایجاد تلفات جنینی نقش بسزایی دارند که شامل *سالمونلا*، *استافیلوکوکوس*، *استرپتوکوکوس* (۷)، *باسیلوس* (۲۳)، پروتئوس (۷ و ۲۳)، سیتروباکتر (۷)، آنتروباکتر، سودوموناس (۱۳)، کورینه باکتریوم (۷)، آئروموناس، اسینتوباکتر و یرسینیا (۱۹) می باشند. به هر حال، بنظر می رسد در نمونه های اخیر نیز امکان جداسازی سایر عوامل عفونی وجود دارد که بعضاً ممکن است دو یا چند عامل به صورت مشترک در تلفات جنینی نقش داشته باشند.

نتایج این تحقیق نشان داد سویه های جدا شده کلبسیلا از تخم های شترمرغ، بیشترین حساسیت را نسبت به آنتی بیوتیک های ایمیپنم، سفوتاکسیم و جنتامایسین به ترتیب ۱۰۰، ۷۵ و ۷۵ درصد نشان دادند. در مطالعات مختلف ایمیپنم را به عنوان موثرترین آنتی بیوتیک با بیشترین حساسیت معرفی کردند (۱۴) که نتایج مطالعه اخیر نیز کمترین مقاومت و بیشترین حساسیت سویه های کلبسیلا را نسبت به ایمیپنم نشان داده است.

با توجه به اینکه مقاومت چندگانه آنتی بیتویکی (MDR) به سویه هایی اطلاق می شود که به سه گروه آنتی بیوتیکی یا بیشتر مقاوم هستند (۱۵)، جدایه های مورد مطالعه به دو گروه MDR (۵۰ درصد) و غیر MDR (۵۰ درصد) تقسیم شدند. از کل نمونه های مقاوم به انروفلوکساسین ۶۶/۶۶ درصد در گروه مقاومت چندگانه آنتی بیتویکی قرار می گیرند. اگرچه ارتباط آماری بین مقاومت نسبت به انروفلوکساسین و

مقاومت چندگانه آنتی بیتویکی وجود ندارد اما به نظر می رسد مصرف گسترده انروفلوکساسین در فارم های پرورش شترمرغ به شکل منفرد و همراه با سایر آنتی بیوتیک ها می تواند دلیل مقاومت بالا نسبت به انروفلوکساسین و احیانا مقاومت های همزمان با سایر آنتی بیوتیک های پر کاربرد شود (۱۵).

ژن *magA* به عنوان یک ژن حدت با فعالیت ضد فاگوسیتوزی می تواند کلبسیلا را در مقابل فاگوسیتوز ماکروفاژها محافظت کند (۳۱). گزارشات مختلفی وجود دارد که به ارتباط بیان این ژن و بروز ضایعات سپتی سمی، مننژیت، اندوفتالمیت و آبسه کبدی پرداخته است (۲۳). گزارشات قبلی نشان داده است که *magA* در ۳۸/۲ درصد موارد باکتریمی ناشی از کلبسیلا نومونیا با توانایی ایجاد آبسه کبدی ردیابی شده است (۳۱). همچنین در ۵۰ درصد موارد آبسه کبدی با قدرت عفونت متاستاتیک ردیابی شده است (۲۳). نتایج مطالعه اخیر نشان داد که ژن *magA* در هیچ کدام از سویه های کلبسیلا نومونیا و اکسی توکا یافت نشده است. اگرچه گزارشاتی از ردیابی این ژن در نمونه های بالینی در ایران وجود دارد (۸ و ۳۲) اما در بسیاری از مطالعات انسانی، سویه های کلبسیلا جدا شده فاقد ژن *magA* بوده اند (۱۳، ۱۶ و ۲۱). با توجه به وجود مقاومت های چندگانه در برخی از سویه های کلبسیلا جدا شده در مطالعه حاضر، به نظر می رسد ارتباطی بین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و ردیابی ژن *magA* وجود ندارد و سویه های کلبسیلا جدا شده از تلفات جنینی شترمرغ با الگوهای متفاوت مقاومت آنتی بیوتیکی از نظر ژن حدت فعالیت ضد فاگوسیتوزی تفاوتی ندارند.

به طور کلی نتایج مطالعه اخیر نشان داد کلبسیلا می تواند یکی از عوامل دخیل در تلفات جنینی شترمرغ مطرح باشد و با توجه به اینکه احتمال انتقال این عامل از مدفوع به داخل تخم مرغ بیشتر است توصیه می شود با جمع آوری و ضدعفونی سریع تخم ها باعث کاهش میزان انتقال این عوامل به داخل تخم مرغ گردند.

منابع

۱. بهاری چهارده، پ.، جاجوندیان، ر.، راد، م. (۱۳۸۴). جدا سازی برخی از باکتری های ایجاد کننده عفونت کیسه زرده در تعدادی از مرغداری های اطراف شهرستان مشهد. *پاتوبیولوژی مقایسه ای*، شماره ۲ ، پیاپی۹، صفحات ۱۲۵-۱۳۰.

۲. شعبانی ع.ع.، غلامی آهنگران، م.، ممتاز ح. (۱۳۹۶). ردیابی مولکولی *اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال* (ORT) و ویروس بیماری نیوکاسل در شترمرغ‌های استان اصفهان. *آسیب‌شناسی درمانگاهی دامپزشکی*، سال ۱۱، شماره ۲، صفحات ۹۷-۱۰۵.

۳. کهن ورز بیجارپس، ز.، ذاکر بستان اباد، س.، تفویضی، ف. (۱۳۹۷). تشخیص مولکولی *کلبسیلا نومونیه* مقاوم به دارو طبق شناسایی ژن های PER، SHV و VEB در نمونه های جدا شده از بیماران شهر تهران. *مجله میکروب شناسی پزشکی ایران*، سال ۱۲، شماره ۵، ۳۶۴- ۳۷۲.

۴. رضایی فر، آ.، پیغمبری، س. م.، صدرزاده، ا.، زهرایی صالحی، ت.، عسگری بدوئی؛ م.، حاجی بابایی ، ع. (۱۳۸۸). بررسی وضعیت آلودگی باکتریایی تلفات جوجه کشی های شترمرغ. *نشریه میکروب شناسی دامپزشکی گرمسار*، سال ۵ ، شماره ۲ ، ۱۳۳-۱۲۹.

5. Agha-Seyed Hosseini, M., Firoozeh, F., Piroozmand, A., and Gilasi, H.R. (2016). Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains among clinical specimens in Kashan (2014-2015). *Feyz*, **20:**267-73.
6. Ajayi, A.O., and Egbebi, A.O. (2011). Antibiotic susceptibility of *Salmonella typhi* and *Klebsiella pneumoniae* from poultry and local birds in Ado-Ekiti, Ekiti-State, Nigeria. *Annals of Biological Research*, **2:** 431-437.
7. Amer, M.M., ELbayoumi, K.M., Amin Girh, M.S., Mekky, H.M., and Rabie, N.S. (2017). A study on bacterial contamination of dead in shell chicken embryos and culled one day old chicks. *International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research*, **7:** 5-11.
8. Amraie, H., Shakib, P., Rouhi, S., Bakhshandeh, N., & Zamanzad, B. (2014). Prevalence assessment of *magA* gene and antimicrobial susceptibility of Klebsiella pneumoniae isolated from clinical specimens in Shahrekord, Iran. *Iranian Journal of Microbiology*, **6:** 311.
9. Anderson, M.J., and Janoff, E.N. (1998). Klebsiella endocarditis: report of two cases and review. *Clinical Infectious Diseases*, **26:**468-474
10. Brisse, S., and Verhoef, J. (2001). Phylogenetic diversity of Klebsiella pneumoniae and Klebsiella oxytoca clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, gyrA and parC genes sequencing and automated ribotyping. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology*, **51:** 915-924.
11. Button, C., Moon, D., and Turner, D. (1994). Increasing the hatchability of ostrich eggs. *Australian Ostrich Assocciation Journal*, **27:**18-23.
12. Chander, Y., Ramakrishnan, M.A., Jindal, N., Hansen, K., and Goyal, S.M. (2011). Differentiation of Klebsiella pneumoniae and Klebsiella oxytoca by multiplex poly-merase chain reaction. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, **9:** 138-142.
13. Dalir, A., Razavi, S., Talebi, M., Masjedian Jazi, F., Zahedi Bialvaei, A., Mirshekar, M., and Lohrasbi, V. (2021). Antibiotic Susceptibility Pattern and Distribution of Virulence Factors Among Klebsiella pneumoniae Isolated from Healthy Volunteers. *Iranian Journal of Medical Microbiology*, **15:** 676-683.
14. Deeming, D.C. (1995). Possible effect of microbial infection on yolk utilization in ostrich chicks. *Veterinar Record*, **136:** 270-271.
15. Dzoma, B.M., and Dorrestein, G.M. (2001). Yolk sac retention in the ostrich (Struthio camelus): histopathologic, anatomic, and physiologic considerations. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, **15:** 81-89.
16. El Fertas-Aissani, R., Messai, Y., Alouache, S., & Bakour, R. (2013). Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of Klebsiella pneumoniae strains isolated from different clinical specimens. *Pathologie Biologie*, **61:**209-216.
17. Fatehi, T., Anvari, M., Ranji, N. (2017). Investigating antibiotic resistance and the frequency of SHV and TEM extended expecterum beta lactamase genes in *Klebsiella penumoniea* isolated from blood samples of neonates admitted to some health centers in rasht. *Iranian Journal of Medical Microbiology*, **11:** 57-63.
18. Gholami-Ahangaran, M., Moravvej, A.H., Safizadeh, Z., Sadeghi Nogoorani, V., Zokaei, M., Ghasemian, S.O. (2021). The evaluation of ESBL genes and

Klebsiella pneumoniae liver abscess. *Clinical Infectious Diseases*, **47:** 642-650.

26. Nahavandinejad, M., & Asadpour, L. (2017). Mucoviscosity determination and detection of *magA* and *rmpA* genes in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae in Northern Iran. *Crescent Journal of Medical and Biological Sciences*, **4:** 104-107.
27. Orajaka, L.J.E., and Mohan, K., (1985). Aerobic Bacterial Flora from Dead-in-Shell Chicken Embryos from Nigeria. *Avian Diseases*, **29:** 583-589.
28. Overdevest, I.T., Willemsen, I., and Rijnsburger, M. (2011). Extended-spectrum b-lactamase genes of *Escherichia coli* in chicken meat and humans, the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases*, **17:**1216–22.
29. Razmyar, J., and Zamani, A.H. (2016). An outbreak of yolk sac infection and dead-in-shell mortality in common canary (*Serinus canaria*) caused by *Klebsiella pneumonia*. *Iranian Journal of Veterinary Research-Shiraz University*, **17:** 141-143.
30. Younis, G., Awad, A., El-Gamal, A., and Hosni, R. (2016). Virulence properties and antimicrobial susceptibility profiles of Klebsiella species recovered from clinically diseased broiler chicken. *Advance in Animal and Veterinary Science*, **4:** 536-542.
31. Yu, W. L., Ko, W. C., Cheng, K. C., Lee, H. C., Ke, D. S., Lee, C. C., and Chuang, Y. C. (2006). Association between rmpA and *magA* genes and clinical syndromes caused by Klebsiella pneumoniae in Taiwan. *Clinical Infectious Diseases*, **42:**1351-1358.
32. Zamani, A., Mashouf, R. Y., Namvar, A. M. E., & Alikhani, M. Y. (2013). Detection of *magA* Gene in Klebsiella spp. Isolated from clinical samplesdetection of *magA*. *Iranian* antibiotic resistance rate in *Escherichia coli* strains isolated from turkey meat and intestinal contents in Isfahan, Iran. *Iranian Journal of Veterinary Research*, DOI**:** 10.22099/IJVR.2021.39493.5737.

19. Guo, Y., Zhou, H., Qin, L., Pang, Z., Qin, T., and Ren, H. (2016). Frequency, Antimicrobial Resistance and Genetic Diversity of *Klebsiella pneumoniae* in Food Samples. *PLoS ONE*, **11***: e0153561. doi:10.1371/journal. pone. 0153561*

20. Hiroi, M., Yamazaki, F., and Harada, T. (2012). Prevalence of extended-spectrum β-lactamaseproducing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in food-producing animals. *Journal of Veterinary Medicine Science*, **74:**189– 95.
21. Hossieni, S. E., Amini, A., Soltanmoradi, H., & Ebrahimzadeh Namvar, A. (2018). Frequency of fimH, *magA* and *rmpA* genes among Klebsiella pneumoniae isolates in hospitalized patients in Babol, Iran. *Avicenna Journal of Clinical Medicine*, **25:** 121-6.
22. Husseina, S.A., Hassanb, A.H., and Sulaimanc, R.R. (2008). Bacteriological and pathological study of yolk sac infection in broiler chicks in Sulaimani district. *Journal of Dohuk University*, **11:** 48-56.
23. Khan, K.A., Khan, S.A., Aslam, A., Rabbani, M., and Tipu, M.Y. (2004). Factors contributing to yolk retention in poultry: A review. *Pakistan Veterinary Journal*, **24:** 46-51.
24. Knöbl, T., Cappellete, C.P., and Vigilato, M.A.N. (2012). Enterobacteria isolation in ostrich eggs (Struthio Camelus). *Brazilian Journal of Poultry Science* **14:** 33-36.
25. Lee, S. S. J., Chen, Y. S., Tsai, H. C., Wann, S. R., Lin, H. H., Huang, C. K., & Liu, Y. C. (2008). Predictors of septic metastatic infection and mortality among patients with

Journal of Basic Medical Sciences, **16:** 173.

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 18, Issue 2,
Autumn & Winter 2023

Isolation, molecular identification, detection of *magA* gene and evaluation of antibiotic resistance of *Klebsiella strains* in fetal mortality of ostriches in Isfahan

Majid Gholami-Ahangaran[*1] , Amirhossein Aghakhani-lonbani[2] , Raziyeh Farhang Esfahani[2], Asiye Ahmadi-Dastgerdi[3]

1. Associate Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine,Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2. Graduated of Veterinary Medicine Faculty, Shahrekord Branch, Islamic Azad University,Shahrekord, Iran.
3. Assistance Professor, Department of Food Science and Technology, Ardestan Branch, Islamic Azad University, Ardestan, Iran.

Received: 15 January 2022 Accepted: 11 April 2023

Abstract

Embryonic mortality in ostriches can reduce the income of the ostrich production industry. Many factors play role in reduce hatching such as infectious agents. Among infectious agents, the role of Klebsiella in fetal losses, especially in ostriches, has been less studied. Therefore, in the recent research, 200 swab samples from dead ostrich embryos were collected and Klebsiella infection was identified with microbiological and biochemical methods. Then, Klebsiella species and virulence gene of magA were identified and determined by PCR method with specific primers. The results showed that out of 200 ostrich egg samples, 60 eggs infected with Gram-negative bacteria (30%) and 20 eggs were infected with Klebsiella (33%). Out of 20 Klebsiella strains, 15 and 5 strain identified as K. pneumonia (75%) and K. oxytoca (25%), respectively. None of the Klebsiella strains carried the magA gene. In this study, Klebsiella strains showed the highest sensitivity to imipenem (100%) and the highest resistance to enrofloxacin (70%). In general, Klebsiella spp seems to have 10% share in ostrich embryonic mortality, so preventing surface contamination and observing the principles of disinfection in ostrich hatchery play role in reducing embryonic mortality due to surface contamination.

Keywords: Embryonic mortality, Ostrich, Klebsiella, PCR.

** Corresponding author: Majid Gholami-Ahangaran,*
Address:;Department of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord,Iran.
Email: mgholami6@gmail.com