جداسازی، شناسایی و تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال از گله‌های مرغ گوشتی شهرستان بابل

مهدی برین [۱]، سید علی پوربخش [۲*]، منصور بنانی [۲]، پیمان حجتی [۳]، مه زاد ارمی [۲]

۱ـ دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار، گرمسار ـ ایران.
۲ـ مؤسسه واکسن و سرم سازی رازی، آزمایشگاه رفرانس ORT، کرج ـ ایران.
۳ـ دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار، گرمسار ـ ایران.
*نویسنده مسئول: A.Pourbakhsh@rvsri.ir

اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال (ORT) باکتری نوظهوری است که به همراه بروز علائم تنفسی، کاهش رشد، کاهش تولید تخم، افزایش مرگ و میر و افزایش حذف کشتارگاهی از ماکیان و بوقلمون جدا شده است. هدف از این مطالعه، جداسازی، شناسایی و تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی ORT از گله های گوشتی شهرستان بابل بود. پس از بررسی لاشه‌های ارجاع شده به درمانگاه، از لاشه‌های ۳۸ گله گوشتی مشکوک به بیماری های تنفسی با استفاده از سواب نمونه برداری از نای صورت گرفت. سپس سواب ها به محیط BHI منتقل شده و در آزمایشگاه بر روی آگار جنتامایسین دار حاوی ۵درصد خون گوسفندی کشت خطی انجام شد. از ۳۸ گله گوشتی نمونه برداری شده، فقط از یک گله ۴۲ روزه ORT جداسازی و شناسایی گردید. در آنتی بیوگرام مقاومت نسبت به نالیدیکسیک اسید، استرپتومایسین، سولتریم، جنتامایسین، تتراسایکلین، کلیستین، فلومکوئین و فورازولیدون مشاهده گردید. این مطالعه اولین گزارش از جداسازی ORT از مرغداری های گوشتی شهرستان بابل می باشد. آنتی بیوگرام انجام شده نیز مقاومت اکتسابی ORT را نسبت به برخی آنتی بیوتیک های متداول مصرفی نشان داد. توصیه می‌شود قبل از درمان گله های مبتلا، آزمون آنتی بیوگرام انجام شود. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار، ۱۳۸۷، دوره ۴، شماره ۴، ۱۶۹-۱۶۵.

واژه‌های کلیدی: اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال، جداسازی، شناسایی، تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی، بابل.

Isolation, identification and in vitro antibiotic sensitivity of Ornithobacterium rhinotracheale from Babol commercial broiler flocks

Barin, M.[1], Pourbakhsh, S.A.[2]*, Banani, M.[2], Hojati, P.[3], Erami, M.[2]

[1] *Graduated of Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Garmsar Brach, Garmsar - Iran.*

[2] *ORT Reference Laboratory, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran.*

[3] *Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Garmsar Brach, Garmsar - Iran.*

Abstarct

Ornithobacterium rhinotracheale (ORT) is a new-emerging bacterium. This bacterium has been isolated from turkey and chickens with respiratory signs, growth reduction and increasing in mortality. The purpose of this study was to isolate and identify ORT from Babol commercial flocks, and drug sensivity of the isolates. After examination of carcasses in clinic, tracheal swab samples collected from suspected cases with symptoms of ornithobacteriosis. Then the swabs transferred to the BHI medium and in the laboratory, linear culture on 5% sheep blood agar containing gentamycin was carried out.

ORT was isolated and identified from a 42 days old broiler flock out of 38 flocks. Antibiogram test showed that the isolate was resistant to nalidixic Acid, streptomycin, sultrim, Gentamycin, tetracycline, colistin, flumequine and furazolidone. This study for the first time proved presence of ORT in chicken flocks around Babol. Antibiogram's result showed acquired resistance of ORT against some current antibiotics. It is better to use antibiogram test before any drug treatment. ***Vet.J.of Islamic.Azad.Univ., Garmsar Branch. 4,4:165-169,2008.***

Keywords: Ornithobacterium rhinotracheale, Isolation, Identification, Drug Sensitivity, Babol

مقدمه

اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال باکتری نوظهوری است که به همراه بروز علائم تنفسی، کاهش رشد، کاهش تولید تخم، افزایش مرگ و میر و افزایش حذف کشتارگاهی از ماکیان و بوقلمون جدا شده است. توصیف و نام گذاری این باکتری اولین بار در سال ۱۹۹۴ ابتدا به پیشنهاد ون بیک و همکاران و سپس وندام و همکاران صورت گرفته است. سپس این باکتری مورد توجه محققین واقع شد و گسترش جهانی آن در طیور تجارتی و سایر پرندگان اثبات

Rhotest

گردید(۹،۱۳، ۴،۶). علائم بیماری اورنیتوباکتریوز شامل تورم کیسه‌های هوایی و پنومونی و سایر نشانه‌های تنفسی اختصاصی نبوده و برای تشخیص قطعی بیماری جداسازی و شناسایی عامل بیماری ضروری است(۸،۱۱،۱۲،۱۴).

در ایران بنانی و همکاران در سال ۱۳۷۹ برای اولین بار در طیور صنعتی کشور باکتری ORT را از یک گله جوجه گوشتی و یک گله پولت تخم گذار در بخش تشخیص بیماری‌های طیور موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی جداسازی و شناسایی نمودند(۱). به دنبال آن باکتری از سایر نژادهای ماکیان نیز جداسازی و شناسایی گردید(۲،۴). ORT می‌تواند به صورت پاتوژن اولیه عمل نماید و برای بیماری زایی نیازی به همراهی سایر پاتوژن‌ها ندارد. با وجود این به نظر می‌رسد که سایر عوامل عفونی و غیرعفونی موجود در مرغداری‌ها به عنوان شروع کننده یا تشدید کننده اورنیتوباکتریوز مطرح می‌باشند(۶،۱۰،۱۴). همزمانی عفونت ORT با عفونت ناشی از سایر عوامل بیماری زا در ایران هم گزارش شده است(۲، ۳،۴). شیوع بالای عفونت‌های همزمان و شباهت علایم بالینی و کالبدگشایی ناشی از اورنیتوباکتریوز با بسیاری از بیماری‌های دیگر و از طرفی مشکل بودن جداسازی و شناسایی قطعی باکتری ORT، تشخیص این بیماری را مشکل کرده است.

با توجه به نوظهور بودن این باکتری در ایران و نقش آن در ایجاد خسارات اقتصادی در سطح مرغداری‌های صنعتی، هدف از اجرای این تحقیق جداسازی و شناسایی این پاتوژن تنفسی برای اولین بار از گله‌های جوجه گوشتی شهرستان بابل، و در صورت جداسازی، تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی آن به منظور به کارگیری درمان مناسب و مبارزه با گسترش آن در سطح مرغداری‌های صنعتی شهرستان بابل بوده است.

مواد و روش کار

پس از بررسی لاشه‌های ارجاع شده از مرغداری‌های گوشتی شهرستان بابل به کلینیک و تکمیل پرسش نامه شامل سن گله، داروهای مصرفی، علایم بالینی و کالبدگشایی، از موارد مشکوک به بیماری‌های تنفسی در شرایط استریل نمونه برداری از نای صورت می‌گرفت. نمونه‌ها بر اساس روشهای استاندارد، کشت داده شدند(۸،۱۴). به این صورت که پس از دسترسی به نای، با قیچی در ناحیه بالا تر از محل دو شاخه شدن نای برش عرضی داده می‌شد تا جهت کمتر شدن احتمال آلودگی ثانویه از قسمت میانی نای (و بالاتر از محل دو شاخه شدن) برای نمونه برداری استفاده شود. در مرحله بعدی در قسمت میانی نای با قیچی استریل برش طولی داده می‌شد تا سطح مخاطی نای در دسترس باشد. بعد از آن سواب استریل در سطح مخاطی چرخانده می‌شد تا کل سطح سواب با سطوح مخاطی نای تماس پیدا کند. سپس سواب آغشته به ترشحات به لوله حاوی محیط BHI منتقل می‌گردید. قابل ذکر است که سواب‌های تهیه شده از هر گله در یک لوله حاوی محیط BHI قرار داده می‌شدند.

در مجموع ۱۲۰ نمونه از ۳۸ گله جوجه گوشتی (ماکیان) جمع آوری گردید که تعداد نمونه‌های هر گله بین ۲ تا ۵ عدد بوده است. (کم بودن تعداد نمونه‌های هر گله به این دلیل بود که لاشه‌های ارجاعی از هر گله به کلینیک حداکثر ۶ مورد بود و در بین این لاشه‌ها تنها از موارد مشکوک نمونه برداری صورت می‌گرفت). همچنین گله‌هایی که از آن‌ها نمونه برداری صورت گرفته است در محدوده سنی ۳ تا ۷ هفته بودند.

نمونه‌های اخذ شده در کنار یخ و در مدت کمتر از ۴۸ ساعت به آزمایشگاه باکتریولوژی بخش بیماری‌های طیور مؤسسه رازی منتقل می‌شدند. در آزمایشگاه، توسط آنس استریل بر روی محیط انتخابی آگار جنتامایسین دار حاوی ۵درصد خون گوسفندی کشت خطی صورت می‌گرفت. هدف از این گونه کشت دادن، به دست آوردن پرگنه‌های تکی بود. سپس محیط های کشت به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد حاوی ۱۰-۷/۵ درصد CO_2 قرار داده می‌شدند. جهت خالص سازی و یک دست نمودن پرگنه‌ها، پرگنه‌های مشکوک براساس مورفولوژی در محیط دیگر آگار خون دار حاوی جنتامایسین کشت داده شدند تا به راحتی آزمون‌های شناسایی را بتوان روی آن‌ها انجام داد.

آزمون‌های شناسایی به کار رفته در این تحقیق، KOH ۳درصد، مشاهده ریخت شناسی (مورفولوژی) باکتری در زیر میکروسکوپ نوری، اکسیداز و کاتالاز بودند. لازم به ذکر است که در صورت مثبت بودن تست KOH۳درصد، باکتری گرم منفی و در صورت منفی بودن تست، باکتری گرم مثبت می‌باشد. همچنین با توجه به عدم رشد پرگنه‌های ORT بر روی محیط مک کانکی، از این محیط برای تایید تشخیص استفاده شد.

پس از جداسازی و شناسایی ORT، آزمون آنتی بیوگرام انجام شد که در آن از ۳۰ دیسک آنتی بیوتیکی ساخت شرکت پادتن طب استفاده شده که در قسمت نتایج معرفی می‌شوند.

تصویر شماره۱: باکتری ORT جداشده در محیط کشت بلادآگار.

نتایج

از ۳۸ گله گوشتی مورد آزمایش در شهرستان بابل که دچار اختلالات تنفسی بودند تنها از یک گله ۴۲ روزه که نژاد آن راس ۳۰۸ بود، ORT جداسازی و شناسایی گردید. در تنها مورد مثبت، ORT به خوبی بر روی آگار خون دار حاوی جنتامایسین رشد کرد. در حالی که مطابق انتظار رشدی در محیط مک کانکی صورت نگرفت. پرگنه‌های ORT پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، به صورت پرگنه‌های ریز سرسنجاقی مشاهده شدند که اتصالی به محیط کشت نداشتند به طوری که توسط آنس بر روی محیط کشت به حرکت درمی‌آمدند.

آزمون KOH ۳درصد در مورد ORT جدا شده مثبت بود. در بررسی با میکروسکوپ نوری نیز باکتری به شدت پلئومورف (چند تصویر) بود. همچنین اکسیداز آن مثبت و کاتالاز آن منفی بود.

در جدول شماره۱ آنتی بیوتیک‌هایی که ORT جداشده در این تحقیق نسبت به آن‌ها حساسیت، حساسیت نسبی و مقاومت نشان داده است، به طور جداگانه آورده شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

این مطالعه اولین گزارش از جداسازی ORT در سطح مرغداری‌های گوشتی شهرستان بابل می‌باشد. بنابراین حضور عفونت ناشی از ORT در مرغداری‌های گوشتی شهرستان بابل اثبات می‌گردد و باید این باکتری را به فهرست عوامل بیماری زای تنفسی در طیور صنعتی شهرستان بابل اضافه نمود.

با توجه به اظهارات چین و چارلتون اولین مکان برای جداسازی ORT، دستگاه تنفسی می‌باشد(۸). نای، ریه‌ها و کیسه‌های هوایی بهترین مکان‌ها جهت جداسازی این

جدول شماره۱: نتیجه آزمون آنتی بیوگرام.

حساس	حساسیت نسبی	مقاوم
آمپی سیلین آموکسی سیلین اریترومایسین اکسی تتراسایکلین ایمپنم تایلوزین تیامولین تیکارسیلین دای فلوکساسین سفالکسین فلورفنیکل کلرامفنیکل کلرتتراسایکلین کلیندامایسین لینکومایسین نورفلوکساسین	انروفلوکساسین پی سیلین داکسی سایکلین سیپروفلوکساسین نئومایسین	استرپتومایسین تتراسایکلین جنتامایسین سولتریم فلومکوئین فورازولیدون کلیستین نالیدیکسیک اسید

میکروارگانیسم می‌باشند(۹،۱۴، ۲). البته مواردی از جداسازی ORT از سینوس زیرچشمی و حتی مفاصل، قلب، مغز و کبد گزارش شده است. همچنین در موارد مزمن، ORT از مهره‌های سینه‌ای و غلاف رباطات هم جدا شده است(۶،۸). محل نمونه گیری و جداسازی ORT در این تحقیق نای بوده است. نمونه‌های این تحقیق در آگار خون دار حاوی جنتامایسین کشت داده شدند که تنها در یک مورد ORT جداسازی و شناسایی گردید. همچنین یادآوری می‌شود که محیط کشت به کار رفته جهت تأیید تشخیص ORT در این تحقیق آگار مک کانکی بود که مطابق تحقیقات انجام شده قبلی هیچ رشدی بر روی آن مشاهده نشد. ضمناً ORT جدا شده در این تحقیق در آزمون‌های شناسایی به کار رفته نیز مطابق تحقیقات انجام شده قبلی، گرم منفی، به شدت پلئومورف، اکسیداز مثبت و کاتالاز منفی بود(۱،۶،۱۴).

در تحقیقی دیگر که همزمان با این پایان نامه در استان قزوین و بر روی ۳۰ گله جوجه گوشتی در سن کشتار صورت گرفته است(۵)، از ۱۴ گله ORT جداشده است. از نتایج این دو تحقیق می توان این گونه استنباط کرد که ممکن است رطوبت بالای هوا و کمتر بودن دمای هوای شهرستان بابل (واقع در استان مازندران) نسبت به استان قزوین یکی از دلایل احتمالی اختلاف میزان آلودگی مزارع با ORT در این دو منطقه باشد. معمولاً ORT تنها در مراحل اولیه عفونت قابل جداسازی است و دوره عفونت هم معمولاً کوتاه است که این مسئله می تواند یکی از دلایل عدم موفقیت در جداسازی موارد بیشتری از ORT در این تحقیق باشد. زیرا تمام موارد مراجعه به کلینیک به علت درگیری تازه گله به بیماری تنفسی نبوده است بلکه در بعضی موارد مرغدارها به علت عدم نتیجه گیری از درمان‌هایی که انجام داده اند و به منظور درمان مناسب تر گله به کلینیک مراجعه می‌کردند. همچنین در بعضی از موارد در روزهای قبل از مراجعه به کلینیک و نمونه بر داری از لاشه‌ها، آنتی بیوتیک‌هایی مثل اکسی تتراسایکلین، فلورفنیکل و کلرامفنیکل تجویز شده بود که در آنتی بیوگرام انجام شده در این تحقیق از

RICEST

موثرترین داروهای شناخته شده به حساب می‌آیند و همین مسئله ممکن است یکی از علل کم بودن موارد جداسازی ORT در این تحقیق باشد.

مطالعات در خارج از ایران بیشترین آلودگی جوجه‌های گوشتی را در سنین ۳ تا ۴ هفتگی اعلام کرده‌اند(۱۳،۱۴). در این تحقیق ORT از یک گله ۴۲ روزه جدا شده است. ضمن این که تحقیق صورت گرفته در استان قزوین نیز آلودگی ۴۶/۶ درصدی گله‌های گوشتی را در سن کشتار یعنی در هفته هشتم نشان می‌دهد. همچنین یافته قبلی در ایران نیز بیشترین میزان آلودگی در جوجه‌های گوشتی را هفته‌های ششم و هفتم نشان می‌دهد(۲) که نتیجه این ۳ تحقیق صورت گرفته در ایران به هم نزدیک و منطبق است.

یک دلیل احتمالی تفاوت سن اوج آلودگی ORT در گله‌های جوجه گوشتی ایران با کشورهای غربی، تغذیه متفاوت(۲) و تفاوت اوج سرعت رشد آن‌ها در ایران نسبت به آن کشورها می‌باشد.

براساس نتایج به دست آمده از تحقیقات قبلی، مقاومت آنتی بیوتیکی ORT نسبت به خیلی از آنتی بیوتیک‌ها از جمله آنتی بیوتیک‌های متداول مصرفی در صنعت مرغداری مشاهده شده است(۹،۱۰،۱۴). وان امپل و حافظ بر این عقیده هستند که حساسیت آنتی بیوتیکی ORT بسیار متغیر بوده و ظاهراً بستگی به منطقه جداسازی و سویه باکتری دارد(۱۴).

مطالعات انجام شده در آلمان نشان داد که ۹۰ تا ۱۰۰ درصد سویه‌های جداشده به انرو فلوکساسین، نئومایسین، جنتامایسین و تری متوپریم سولفانامید مقاوم بوده و تمامی سویه‌های مورد بررسی در برابر تتراسایکلین، کلرامفنیکل و آموکسی سیلین حساس بوده‌اند(۱۴).

در بررسی قبلی(۷) در سال ۱۳۸۳ نشان داده شد که تمامی سویه‌های جدا شده به تیامولین و اکثر آن‌ها به کلرامفنیکل و لینکواسپکتین حساس اند. همچنین تمامی موارد جدا شده در برابر کلیستین و نئومایسین مقاوم و اکثر آن‌ها به جنتامایسین، لینکومایسین، اریترومایسین، تتراسایکلین و انرو فلوکساسین مقاوم بوده اند(۹). یادآوری می‌شود که در تحقیق انجام شده در مطالعه حاضر نیز ORT جدا شده نسبت به تیامولین حساسیت نشان داده است.

در مطالعه حاضر ORT جدا شده نسبت به کلیستین و جنتامایسین کاملاً مقاوم بوده است. همچنین مقاومت نسبت به فورازولیدون نیز در مطالعه حاضر دیده شده است. در حالی که نسبت به دای فلوکساسین حساسیت دیده شده است. نکته قابل ذکر دیگر این است که ORT جدا شده در این تحقیق نسبت به اکسی تتراسایکلین و کلر تتراسایکلین حساسیت و نسبت به تتراسایکلین مقاومت نشان داده است. ضمن این که نسبت به داکسی سایکلین حساسیت نسبی دیده شده است. همچنین حساسیت نسبت به آموکسی سیلین و کلرامفنیکل در مطالعهٔ حاضر نیز دیده شده است.

با توجه به این که طی این تحقیق تنها از یک گله ORT جدا گردید، نتیجه آزمون آنتی بیوگرام انجام شده به طور قطعی بیانگر حساسیت‌ها یا مقاومت‌های آنتی بیوتیکی سویه یا سویه‌های موجود در منطقه نمی‌باشد. بنابراین برای این که بتوان با اطمینان بیشتری اطلاعات مربوط به آنتی بیوگرام آن را در اختیار دامپزشکان و مرغداران منطقه قرار داد باید نمونه‌های مثبت بیشتری از تمامی نقاط شهرستان به دست آورد. البته با توجه به مقاومت اکتسابی ORT نسبت به آنتی بیوتیک‌های رایج مصرفی، به دامپزشکان منطقه توصیه می‌شود که به اطلاعات این بررسی‌ها اکتفا نکنند و با انجام آزمون آنتی بیوگرام جهت انتخاب دارویی مناسب و کارآمد برای درمان و پیشگیری از عفونت ORT مبادرت ورزند.

منابع

۱- بنانی، م.، خاکی، پ.، گودرزی، ح.، وندیوسفی، ج.، پوربخش، س. ع. (۱۳۷۹) جداسازی و شناسایی اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال از یک گله گوشتی و یک گله پولت تخمگذار. نشریه پژوهش و سازندگی، شماره ۶، صفحات ۱۰۹-۱۰۶.

۲- بنانی، م.، پوربخش، س. ع.، موذنی جولا، غ.، ممیز، ر.، عزی، ع. (۱۳۸۱) آلودگی طبیعی ناشی از ORT در گله‌های طیور تجاری و عفونت تجربی آن در جوجه‌های عاری از پاتوژن‌های اختصاصی. نشریه پژوهش و سازندگی، شماره ۵، صفحات ۳۸-۲۸.

۳- بنانی، م.، ممیز، ر.، پوربخش، س. ع.، گودرزی، ح.، بهمنی نژاد، م. ع. (۱۳۸۱) جداسازی همزمان ORT و ویروس آنفلوانزای طیور تحت تیپ H9N2 از طیور صنعتی. مجله تحقیقات دامپزشکی ایران، دوره سوم، شماره ۲، صفحات ۱۹۵-۱۹۰.

۴- بنانی، م.، پوربخش، س. ع.، خاکی، پ.، موذنی جولا، غ. (۱۳۸۳) جداسازی و شناسایی عوامل باکتریایی از ماکیان تجاری

مبتلا به تورم سر و صورت. مجله تحقیقات دامپزشکی ایران، دوره پنجم، شماره ۱، صفحات ۶۱-۴۹.

۵- فاتح منش، م. (۱۳۸۶) جداسازی، شناسایی و تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال از گله‌های گوشتی قزوین. پایان نامه، شماره ۸۸۶، دانشکده دامپزشکی کرج.

6- AbdulAziz, T. A. (1997) Ornithobacterium rhinotracheale developing into a serious infection. World Poultry Misset, **13**(8): 47-78.

7- Banani, M., Pourbakhsh, S. A., and Deihim, A.H. (2004) Antibiotic sensitivity of isolates associated with respiratory diseases. Archives of Razi Institute, **58:** 111-117.

8- Chin, R.P., Charlton, B.R. (1998) Ornithobacteriosis. In: Swayne, D.E., et al (Eds), A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens, 4th Ed., PP: 89-91.

9- Chin, R.P., van Empel, P.C.M., Hafez, H. M. (2003) Ornithobacterium rhinotraceale infection. In: Saif, Y.M. et al (eds) Diseases of poultry, 11th Ed, Iowa State Press. PP: 683-690.

10- Devriese, L.A., Hommez, J., Vandamme, p., Kersters, K., Haesbrouck, F. (1995) In vitro antibiotic sensitivity of Ornithobacterium rhinotracheale strains from poultry and wild birds. The Veterinary Record, **137**: 435-436.

11- Hung, A. L., Alvarado, A. (1999) Characterization and serotyping of Ornithobacterium rhinotracheale isolates associated with respiratory disease in domestic poultry in Peru. Avian Diseases, **45**: 999-1005.

12- Koga, Y., Zavaleta, A. (2005) Intraspecies genetic variability of Ornithobacterium rhinotracheale in commercial birds in Peru. Avian Diseases, **49**: 108-111.

13- Naeem, K., Malik, A., Ullah, A. (2003) Seroprevalence of Ornithobacterium rhinotracheale in chickens in Pakistan. The Veterinary Record, PP:533-535.

14- Van Empel, P.C.M., Hafez, H.M. (1999) Ornithobacterium rhinotracheale : a review. Avian Pathology, **28**: 217-227.

RICEST