Bi-quarterly Journal of
Animal health and infectious diseases
Volume 1, Number 1
Journal homepage: https://jahid.lu.ac.ir/

Isolation and identification of some respiratory pathogens in perished kids in Avingen Agro Ind. Development Co.

Shahriyar Mehrabi [1], Shahin Nejat [2], Mohammad Noori [3], Hassan Momtaz [4]

1. DVSc Graduate of Large Animal Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
2. Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Sharekord branch, Shahrekord, Iran
3. Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
4. Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

ABSTRACT

Background and Aim: Pneumonia is one of the most important diseases that causes a drop in production. Bacterial infectious agents are one of the most important causes of this complication.

Materials and Methods: The present study was conducted in order to isolate and identify some respiratory pathogens in dead goats. For this purpose, with numerous referrals to the company during the winter and spring (breeding season), sterile swabs were sampled from the nasal discharge of suspected pneumonia (according to the veterinarian) Alpine and Senn race for bacteriological and virological examination. Two methods of culture and RT-PCR assay were performed.

Results: Among bacteria isolated by culture method, the prevalence of *Escherichiacoli* was 21.15%, *Staphylococcusepidermidis* 15.58%, *Klebsiellapneumoniae* 12.19%, *Actinomycespyogenes* 7.31%, *Pasteurellamultocida* 6.9%, *Staphylococcusaureus* 4.87%, and *Pseudomonasaeruginosa* 2.43% Was.Also, the prevalence of parainfluenza type 3 and respiratory syncytial virus was reported 43% and 28%, respectively, using molecular methods. In the present study, the most bacteria isolated from pneumonia cases was *E. coli*.

Conclusion:. It seems that due to the higher abundance of this bacterium and its presence, especially in the samples, it has a higher contribution in causing pneumonia. Although other bacteria that are not very important in causing pneumonia were isolated in relatively significant numbers in culture cases, but the specific organisms causing pneumonia such as *P. haemolytica* were not isolated from any case, *P. multocida* was isolated in 5 cases. This bacterium plays a role in causing septicemia in lambs, goats and calves. Today, the role of viral factors in causing pneumonia in livestock is much more important than before. In this study, these factors were diagnosed with a relatively high prevalence.

Keywords: Pneumonia,Kids, Avingen Agro Ind. Development Co.,Para-Influenza type 3, Respiratory Syncytial Virus

Received:04.**11.2023** **Accept: 31.01.2024** **Online Publish:04.02.2024**

Corresponding Information:

Shahriyar Mehrabi, DVSc Graduate of Large Animal Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

Email: shahriyar.mehrabi@gmail.com

Copyright © 2023, This is an original open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribution of the material just in noncommercial usage with proper citation.

دو فصلنامه
بهداشت و بیماری های عفونی دام
سال ۱ ، شماره ۱
صفحه مجله: https://jahid.lu.ac.ir/

جدا سازی و شناسایی برخی پاتوژن های تنفسی باکتریایی در بزغاله های تلف شده در ایران

شهریار مهرابی[۱] ، شاهین نجات[۲] ، محمد نوری[۳] ، حسن ممتاز [۴]

۱. دانشجو کتری تخصصی بیماری‌های داخلی دام‌های بزرگ، دانشکده دامپزشک، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
۲. گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران
۳. گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
۴. گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

چکیده

زمینه و هدف: پنومونی، یکی از مهم ترین بیماری هایی است که موجب اُفت تولید می‌شود. اجرام عفونی باکتریایی از مهم ترین عوامل ایجاد کنندهٔ این عارضه اند. در این پژوهش بیشترین باکتری جدا شده از موارد پنومونی، *اشریشیا کلی* بود.

مواد و روش ها: پژوهش حاضر به منظور جداسازی و شناسایی برخی پاتوژن های تنفسی در بزغاله های تلف شده انجام شد. به این منظور با مراجعات متعدد به این شرکت در طول فصل زمستان و بهار (فصل زایش)، از هر بزغاله به طور هم زمان دو نمونه سواب جهت انجام مطالعات باکتری شناسی و ویروس شناسی گرفته شد. نژاد های مورد مطالعه (آلپاین و سانن) بودند. روش به‌کار رفته جهت عوامل باکتری کشت و روش بررسی عوامل ویروسی RT-PCR بود.

یافته ها: از بین باکتری های جدا شده به روش کشت، میزان شیوع *اشریشیا کولای* ۵۱/۲۱ درصد، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* ۱۵/۵۸ درصد، *کلبسیلا پنومونیه* ۱۲/۱۹ درصد، *اکتینومایسس پیوژنز* ۷/۳۱ درصد، *پاستورلا مولتوسیدا* ۶/۰۹ درصد، *استافیلوکوکوس اورئوس* ۴/۸۷ درصد و *سودوموناس آئروژینوزا* ۲/۴۳ درصد بود. همچنین شیوع ویروس های پارآنفلوانزای تیپ ۳ و سنسیشیال تنفسی با استفاده از روش مولکولی به ترتیب ۴۳ درصد و ۲۸ درصد بود.

نتیجه گیری: به نظر می‌رسد به دلیل فراوانی بیشتر این باکتری و وجود آن به ویژه در نمونه ها، سهم بالاتری هم در ایجاد پنومونی داشته باشد. هر چند سایر باکتری هایی که اهمیت چندان زیادی در ایجاد پنومونی ندارند به تعداد نسبتاً قابل توجه در موارد کشت جدا شدند، ولی اجرام اختصاصی ایجادکنندهٔ پنومونی مانند *پاستورلا هموليتيكا* از هیچ موردی جدا نشد در ۵ مورد *پاستورلا مولتوسیدا* جدا شد. این باکتری بیشتر در ایجاد سپتی سمی در بره، بزغاله و گوساله نقش دارد. امروزه نقش عوامل ویروسی در ایجاد پنومونی در دام ها بسیار بیشتر از قبل، مطرح است. در این مطالعه نیز با شیوع نسبتاً فراوان این عوامل تشخیص داده شدند.

کلیدواژه ها: پنومونی، کشت و صنعت آوین ژن، بزغاله، RT-PCR، ویروس پارآنفلوانزای تیپ ۳، ویروس سنسیشیال تنفسی گاوان

دریافت: ۱۴۰۲/۰۸/۱۳ **پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۱۱** **انتشار آنلاین:۱۴۰۲/۱۱/۱۵**

اطلاعات نویسنده مسئول: شهریار مهرابی ،

Email: shahriyar.mehrabi@gmail.com

حق چاپ © ۲۰۲۳، این یک مقاله با دسترسی آزاد اصلی است که تحت شرایط Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License توزیع شده است که اجازه کپی و توزیع مجدد مطالب را فقط در استفاده غیرتجاری با استناد مناسب می دهد.

مقدمه

نشخوار کنندگان کوچک، به ویژه گوسفند و بز در اقتصاد شیر و تولید پشم نقش بسزایی دارند، همچنین به علت طبیعتی که دارند، به سرعت تکثیر و رشد سریع می یابند؛ بنابراین حفظ سلامت این دام ها معمولاً چالش مهمی است (۱). بیماری تنفسی مسئلهٔ دنباله داری برای احیای نشخوارکنندگان کوچک بوده است (۲). بسته به این نگرانی، مدیریت و کنترل بیماری های تنفسی در نشخوارکنندگان کوچک اهمیت زیادی برای جلوگیری از خسارات اقتصادی بزرگ ناشی از کاهش بهره وری، کاهش تعداد بره زایی و بزغاله زایی و تلفات بالا نشان می‌دهد (۳).

منهیمیا هموليتيكا و *بیبرستینیا ترهالوسی* از علل اصلی پاستورلوز در گوسفندان و بز ها هستند. در طبقه بندی قدیمی *منهیمیا هموليتيكا* به دو بیوتیپ A و T تقسیم می شد که بر اساس اختلافات آنتی ژنیک در پلی ساکارید کپسولی آن ها بود. سروتیپ های بیوتیپ A در حال‌حاضر با نام *منهیمیا هموليتيكا* طبقه بندی می شوند، به جز سروتیپ A11 که گونهٔ جداگانه ای به نام *منهیمیا گلوکوزیدا* است. بیشترین تظاهر *منهیمیا هموليتيكا* در گوسفند پاستورلوزیس پنومونیک است که در تمام سنین اتفاق می افتد(۴).

این بیماری در ایران بیشتر در مازندان، آذربایجان غربی، گیلان و خوزستان شایع است(۵). باکتری فلور طبیعی ناحیهٔ دهانی–حلقی پستانداران است. این باکتری عامل ضرر های اقتصادی در صنعت پرورش گاو گوشتی و بره است. بیشتر عفونت ها در اثرِ حملهٔ باکتری به‌دلیل و استرس است، ولی انتقال از منابع خارجی نیز ممکن است به وسیله تماس مستقیم یا ریز قطره ها اتفاق بیفتد. استرس های مختلف از قبیل حمل و نقل، عفونت ویروسی، هوای بد، تغذیهٔ بد و تجمع زیاد دام، منجر به رشد و تکثیر باکتری در مخاط دهانی–حلقی می شود و متعاقب آن باکتری به قسمت های پایینی دستگاه تنفس نفوذ می کند. این باکتری بیشتر مختص نشخوار کنندگان است که اغلب گونه های شناخته شدهٔ آن از گاو، گوسفند و بز منشأ می گیرد. این باکتری از عوامل مهم پنومونی در نشخوارکنندگان اهلی، تورم پستان و سپتی‌سمی در گوسفند است(۵).

شکل ریوی بیماری بیشتر در گوسفند و بز عوارض پنومونی ایجاد کرده و عامل *منهیمیا هموليتيكا* یا *پاستورلا هموليتيكا* است که اغلب به‌صورت غیر بیماری زا در ناحیهٔ حلق گوسفند و بز وجود دارد، اما در اثر استرس های گوناگون همچون تغییرات آب و هوایی، مدیریت استرس زا، حمل و نقل، حمام دادن و پشم چینی باعث بیماری می شود(۴). یکی از اساسی ترین راهبرد ها برای مبارزه با بیماری های تنفسی، تشخیص دقیق و شناسایی عوامل ایجاد کننده آن است. با این حال، علل نامشخص است. این بیماری به پاتوژن های باکتریایی متعددی از جمله گونه های گرم مثبت یا گرم منفی نسبت داده شده است (۶). هدف این مطالعه جداسازی و شناسایی برخی پاتوژن های تنفسی باکتریایی در بزغاله های تلف شده در شرکت توسعه کشت و صنعت آوین ژن ایران بوده است.

مواد و روش کار

نمونه گیری

طی هماهنگی با مجتمع کشت و صنعت آوین ژن واقع در شهرستان فیروزکوه استان تهران از اواخر زمستان سال ۱۳۹۶ تا اواخر بهار سال ۱۳۹۷، دو نمونه سوآب از بزغاله های نژاد آلپاین و سانن مشکوک به پنومونی جهت انجام مطالعات باکتری شناسی و ویروس شناسی گرفته شد. گفتنی است که نمونهٔ سوآب برای مطالعهٔ باکتری شناسی از بافت ریهٔ دام تلف شده گرفته شده است. همچنین اطلاعات کامل از قبیل زمان شروع ابتلا به بیماری، علائم بالینی، دمای بدن دام های مذکور جمع آوری شد. نکتهٔ قابل توجه اینکه از نظر سنی حیوانات با توجه به هم زمان بودن فصل زایش در محدودهٔ سنی (۱تا۶۰ روزه) قرار داشتند. نمونه گیری از سن سه روز به بالا گرفته شد.روش بررسی جهت عوامل باکتری کشت و روش بررسی عوامل ویروسی RT-PCR بود.

شهرستان فیروزکوه از نظر ویژگی های آب و هوایی و اقلیمی، زمستان سرد و تابستان معتدل و خنک دارد. متوسط بارندگی سالانه سال ۱۳۹۰ در این شهرستان ۲۳۰ میلی متر بوده و حداکثر بارندگی ۲۴ ساعته ۴۰/۲ میلی متر و تعداد روز های یخبندان ۱۷۴ روز در سال است.

از هر بزغاله نمونهٔ سواب گرفته شد و هر نمونه شماره گذاری شد. مشخصاتی از قبیل زمان شروع ابتلا به بیماری، علائم بالینی، دمای بدن و سن دام های مذکور نیز در داخل ثبت شد. از نظر سن حیوانات با توجه به مزمان بودن فصل زایش در یک محدودی سنی (۱ تا ۶۰ روزه) قرار داشتند. نمونه گیری از سن سه روز به بالا انجام شد. سواب ها به لوله های حاوی ۱۰ میلی لیتر محیط کشت

تریپتیک سوی براث (TSB) منتقل شدند و در کار یخ در دمای ۴ درجه سانتی گراد به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد منتقل شدند.

کشت و جدا سازی باکتری

برای جدا سازی باکتری ها، ابتدا نمونه های کشت داده شده، در محیط TSB را به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شدند و پس از آن باکتری های رشد یافته در محیط TSB، را روی محیط آگار خون دار به صورت چهار خطی کشت داده شد و دوباره محیط های کشت داده شده، به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند. پس از ۲۴ ساعت باکتری های رشد یافته بر روی محیط آگار خون دار، با استفاده از رنگ آمیزی گرم ارزیابی شدند. در ارزیابی لام های رنگ آمیزی شده، گرم مثبت یا گرم منفی بودن باکتری ها، شکل باکتری و خالص یا ناخالص بودن کلنی های باکتری در محیط های کشت مربوطه بسیار اهمیت داشت(۱۱).

شناسایی باکتری های کوکوباسیل گرم منفی

پرگنه های مربوطه از محیط آگار خونی به محیط مک کانکی و ائوزین متلین بلو (EMB) انتقال داده شدند و سپس این محیط ها در انکوباتور قرار گرفتند. پس از ۲۴ ساعت پلیت های مربوطه ارزیابی شدند. اگر کوکوباسیل روی محیط مک کانکی رشد نمی کرد، می توان به حضور سه باکتری *پاستورلا مولتوسیدا*، *پاستورلا پنوموتروپیکا* و *پاستورلا اورهآ* مشکوک شد و اگر رشد می کرد احتمال وجود دو باکتری *منهمیا هموليتيكا* و *پاستورلا آئروژنز* بود. اما این نکته شایان ذکر است که با توجه به اینکه در هیچ کدام از محیط های آگار خونی همولیز وجود نداشت، پس *منهمیا هموليتيكا* در این مورد چندان مد نظر قرار نگرفت(۱۱). باکتری هایی که در محیط مک کانکی رشد و در محیط آگار خون دار بدون همولیز بودند وجود *پاستورلا آئروژنز* مشهود بود. جهت تفریق باکتری های پاستورلا از محیط اوره استفاده شد که تمام موارد، اوره منفی بودند. با توجه به اینکه تنها *پاستورلا مولتوسیدا* اوره آز منفی اند، اما *پاستورلا پنوموتروپیکا* و *پاستورلا اورهآ*، اوره آز مثبت هستند بنابراین باکتری های مربوطه *پاستورلا مولتوسیدا* تشخیص داده شدند

شناسایی باسیل های گرم منفی

به منظور شناسایی از دو روش کشت و کیت های تشخیص انتروباکتریاسه (ساخت شرکت ایران دارو) استفاده شد. در این پژوهش، سبز فلزی بودن یا نبودن پرگنه ها دال بر وجود یا نبود د *اشریشیا کولای* قرار نگرفت، بلکه برای تفریق ۲۴ باکتری خانواده انتروباکتریاسه از کیت مخصوص استفاده شد.

شناسایی انتروباکتریاسه با کیت

با توجه به تغییراتی که در کپسول ها رخ داد، نوع باکتری مشخص شد. اما در این مورد هم باز مشکلاتی بود؛ به عبارتی در برخی موارد نتایج کیت همه حاکی از وجود یک نوع باکتری خاص بود، در حالی‌که برخی مشخصات با باکتری مربوطه مطابق نبود؛ برای نمونه ۸ تست این کپسول کلبسیلا را به ما نشان می داد که گاهی دو تست مطابق با مشخصات کلبسیلا نبود. این اختلافات در سیترات و اوره بود که این اختلافات می توانست به دلایل مختلفی، از جمله قدیمی بودن محیط کشت و همچنین از بین رفتن برخی خصوصیات باکتری در فاز رکود باشد. برای حصول اطمینان در کنار کپسول های مشکوک کیت محیط های TSI، VP، اندول، اوره و سیمون سیترات استفاده شد که در این محیط ها تردید هایی که دربارهٔ بعضی خصوصیات باکتری در کیت بود، رفع شد.

شناسایی باسیل های گرم مثبت

این دسته از باکتری ها از روی محیط آگار خون دار و وجود یا نبود همولیز بررسی شدند، همچنین تست های دیگری که انجام شد شامل کاتالاز، اوره و رشد در آگار مغذی بودند.

شناسایی کوکسی های گرم مثبت

در رابطه با کوکسی های گرم مثبت تست هایی مانند همولیز، کاتالاز، Rapidtest coagulase و کوآگولاز لوله ای انجام شد. با توجه به همولیز مثبت یا منفی بودن باکتری و تست کاتالاز، *استرپتوکوکوس* از *استافیلوکوکوس* تفریق داده شد. مشخص کرد که باکتری مد نظر *استافیلوکوکوس* است. *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اپیدرمیدیس* و *ساپروفیتیکوس* سه *استافیلوکوکی* بودند که از هم تفریق داده شدند. جهت این امر تست Rapidtest coagulase انجام گرفت. باکتری کوآگولاز مثبت، *استافیلوکوکوس اورئوس* در نظر گرفته شد و باکتری های کوآگولاز منفی با تست کواگولاز لوله ای بررسی شدند. در نهایت باکتری هایی که با این تست کوآگولاز

منفی بودند، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* بودند. جهت تفریق *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* از تست آنتی بیوگرام و حساسیت به نئوبیوسین استفاده شد. باکتری هایی که به دیسک نئوبیوسین حساس بودند، *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* و باکتری هایی که حساس نبودند، به عنوان *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* در نظر گرفته شدند.

نمونه های ویروسی

جهت انجام مطالعات ویروس شناسی سوآپ ها در ظروف کریوویال (لوله‌های دَردار) با دو میلی لیتر از محیط نگهداری (سرم فیزیولوژی) قرار داده شدند و در دمای چهار درجه سانتی گراد به آزمایشگاه منتقل شدند و تا زمان انجام مراحل آزمایشات در دمای منفی ۷۰ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

استخراج RNA ژنومی

با توجه به اینکه ویروس های *PI3* و *BRSV* جزء ویروس های RNA دار هستند، جهت استخراج RNA از نمونه های ترشحات بینی مورد مطالعه از کیت استخراج RNA (RNX-PLUS) ساخت شرکت سیناژن ایران بر اساس پرتوکل شرکت سازنده استفاده شد.

ساخت cDNA

جهت ساخت cDNA از کیت RT PreMix (ساخت شرکت Bioneer، آلمان) طبق دستورالعمل کیت مربوطه استفاده شد. برای این منظور یک میکرولیتر از نمونه RNA به همراه یک میکرولیتر Random Hexamer (فرمنتاز، آلمان) و یک میکرولیتر آب مقطر حاوی DEPC به لوله های آماده کیت اضافه و با اعمال برنامه حرارتی ۱۵ درجه به مدت یک دقیقه، ۵۵ درجه به مدت صفر دقیقه و ۹۵ درجه به مدت پنج دقیقه در دستگاه ترموسایکلر رشته cDNA تهیه شد.

آزمایش PCR

جهت انجام آزمایش PCR از دستگاه Master Cycler Gradient (Eppendorf, Germany) استفاده شد. توالی پرایمر های استفاده شده در این پژوهش در جدول شماره ۱ آورده شد است. برای این منظور واکنش PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر واجد ۵ میکرولیتر بافر 10X PCR، ۰/۲ میلی‌مول MgCl2، ۲۰۰ میکرومول dNTP Mix، ۱ میکرولیتر از زوج پرایمرها (جدول ۱)، ۳ میکرولیتر نمونه cDNA و ۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase (سیناژن، ایران) تنظیم شد.

یک سیکل حرارتی اولیه ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه، ۳۵ سیکل حرارتی تکراری ۹۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه به مدت ۹۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه، برنامهٔ حرارتی مورد استفاده جهت تکثیر قطعهٔ ۱۹۹ جفت بازی مربوط به ویروس *PI3* و قطعهٔ ۲۴۵ جفت بازی مربوط به ویروس *BRSV* مد نظر بود

Virus	Gene	Primer	Product size (bp)	Temperature °C	Cycle time (s)
BPI3 (Bovin PI3)	*M*	Fw 5'AAAGGAGTAGTTC AGATTCTAGATG3'	199	A 94	30
		Rw 5'ATATAGAGCCAGTT GCGTT3'		B 55	30
BRSV (Bovine SRV)	*N*	Fw 5'FGTACCAATGTCAA CCAAATTCC3'	245	C 72	90
		Rw 5'RTTTGCACATCGTA ATTGGGTAT3'			

جدول ۱: لیست پرایمر ها مورد استفاده در پژوهش حاضر (۲۴)

الکتروفورز

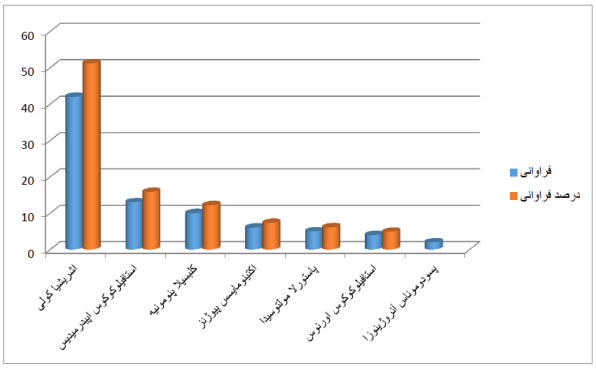
جهت ارزیابی محصول PCR از ژل ۱/۵ درصد آگاروز استفاده شد. جهت ساخت ژل آگاروز ۳ درصد از آگاروز با ۲۰ میلی لیتر از بافر TBE 1X مخلوط و به مدت ۳۰ ثانیه در مایکروویو قرار گرفت تا آگاروز حل شود. پس از سرد کردن و اضافه کردن رنگ ایتیدیوم برماید، محلول درون کست های حاوی شانه جهت ایجاد چاهک های مد نظر ریخته شد. سپس جهت ارزیابی محصول PCR، ۱۵ میکرولیتر از محصول PCR با ۳ میکرولیتر رنگ نشانگر (Loading buffer) مخلوط و در حضور مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA (فرمنتاز، آلمان) در چاهک های موجود در ژل ریخته شد. الکترفورز در ولتاژ ثابت ۹۰ ولت به مدت ۴۵ دقیقه انجام و در پایان ژل به دست آمده با دستگاه تصویربردار از ژل (با تابش نور UV) بررسی و نتیجهٔ به دست آمده روی کاغذ حرارتی ثبت شد.

نتایج

در مجموع نتایج باکتری شناسی به دست آمده از ۱۰۰ نمونه سواب مورد بررسی بدین صورت بوده که ۹۶ سواب (۹۶ درصد) از لحاظ باکتری شناسی مثبت بوده و ۴ سواب (۴ درصد) منفی بودند. از مجموع ۹۶ سوابی که از لحاظ باکتری شناسی مثبت بودند، از ۱۴ سواب (۱۴/۵۸ درصد) دو نوع باکتری مختلف و از ۸۲ سواب (۸۵/۴۲ درصد) فقط یک نوع باکتری جدا شد.

تعداد و درصد فراوانی مجموع باکتری های جدا شده از ۸۲ محیط کشت خالص شده به شرح زیر بود:

اشریشیا کولای ۵۱/۲۱ درصد (۴۲ نمونه)، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* ۱۵/۸۵ درصد (۱۳ نمونه)، *کلبسیلا پنومونیه* ۱۲/۱۹ درصد (۱۰ نمونه)، *اکتینومایسس پیوژنز* ۷/۳۱ درصد (۶ نمونه)، *پاستورلا مولتوسیدا* ۶/۰۹ درصد (۵ نمونه)، *استافیلوکوکوس اورئوس* ۴/۸۷ درصد (۴ نمونه) و *سودوموناس آئروژینوزا* ۲/۴۳ درصد (۲ نمونه) بود. (نمودار ۱).

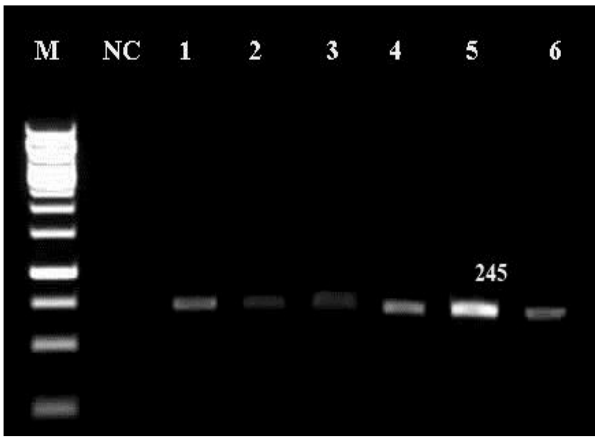


نمودار ۱: درصد فراوانی باکتری های جدا شده از ۸۲ نمونهٔ محیط کشت خالص

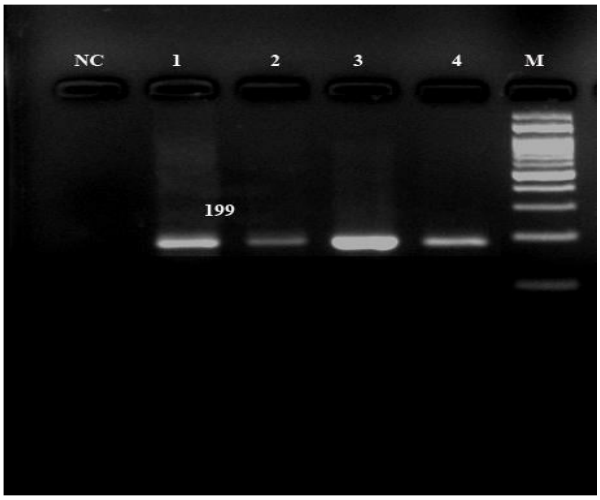
همچنین تعداد و درصد فراوانی مجموع باکتری های جداشده از ۱۴ محیط کشت مخلوط به شرح زیر بود: *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و کلبسیلا ۴۲/۸۵ درصد (۶ نمونه)، *سودوموناس آئروژینوزا* و *پاستورلا مولتوسیدا* ۲۸/۵۷ درصد (۴ نمونه)، کلبسیلا و *استافیلوکوکوس اورئوس* ۱۴/۲۸ درصد (۲ نمونه)، *اکتینومایسس پیوژنز* و *سودوموناس آئروژینوزا* ۱۴/۲۸ درصد (۲ نمونه) بود.

نتایج ویروس‌شناسی

نتایج به دست آمده از مجموع ۱۰۰ نمونه سواب بررسی شده بدین صورت بود، تعداد آلودگی با ویروس *PI3* ۴۸ مورد و آلودگی با ویروس *BRSV* ۲۸ مورد بود. شکل ۱ نتایج الکترفورز برای *BRSV* را نشان می دهد. نتایج الکترفورز برای *PI3* بر اساس شکل ۲ آورده شده است.



شکل ۱: محصول PCR، *BRSV*
ژل به دست آمده از الکترفورز محصول PCR مربوط به نمونه های آلوده به ویروس *BRSV*، ستون M مارکر ۱۰۰ جفت بازی ، ستون NC؛ نمونهٔ کنترل منفی، ستون های ۱ تا ٦ نمونه های مثبت (باند هدف ۲٤٥ جفت باز)



شکل ۲: محصول PCR، ویروس *PI3*
ستون M مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون NC کنترل منفی، ستون های ۱ تا ٤ نمونه های مثبت (باند هدف ۱۹۹ جفت باز)

بحث

نشخوارکنندگان کوچک اهلی به دلیل تولید گوشت، شیر، پشم و مو در زندگی روزمره و وضعیت اقتصادی جمعیت های انسانی، اهمیت زیادی دارند. به طور کلی در رابطه با یافته های بالینی و شیوع اختصاصی بیماری های تنفسی گوسفند و بز، اطلاعات ناچیزی در منابع جهانی وجود دارد.

امروزه پرورش بز در جهت تولید گوشت و محصولات لبنی به ویژه شیر به شکل صنعتی رواج یافته و نژاد های پر شیر، به ویژه از سایر کشور ها، همچون اسپانیا و فرانسه به ایران آورده شده و پرورش داده می‌شود. از آنجا که میزان قابل توجه تولید شیر به ازای مصرف خوراک کمتر، شیوع کمتر بیماری های به ویژه بیماری های متابولیک و نگهداری ساده تر در ارتباط با پروش این گونه وجود دارد، اقبال عمومی برای پرورش این حیوان توسعهٔ گسترده یافته است. بیماری های دستگاه تنفس یکی از دلایل اصلی مرگ بین گله های بز است. این مسئله پیامد شرایط آب و هوایی بد، حمل و نقل، ازدحام بیش از حد و سایر موارد است. بیشتر، حیوانات جوان تحت تأثیر قرار می‌گیرند.

در برخی پژوهش ها، اغلب بیماری های تنفسی در گوسفند و بز را ناشی از *کلبسیلا پنومونیه* دانسته‌اند(۷, ۸). همچنین منصور و همکاران (۲۰۱۴) جداسازی *کلبسیلا پنومونیه* را از گله های گوسفند و بز در منطقهٔ طائف به ترتیب ۲۴/۲ درصد و ۲۱/۲ درصد گزارش دادند(۹).رانیا و همکاران در مصر پژوهشی انجام دادند (۲۰۲۱)که از نمونه های سواب بینی و ریهٔ گوسفندان زنده و مرده مبتلا به علائم تنفسی در مزارعه استان شارکیا میزان شیوع *کلبسیلا پنومونیه* را ۱۰/۹ درصد نشان داده است(۱۰). داده های ما نشان داد که باکتری *اشریشیاکولای* از ۹۶ مورد (۵۱/۲۰ درصد) جدا شده است. که با نتایج حسین الرودان (۲۰۱۱) ۲۰/۷۸ درصد نزدیک است(۱۱). در بنگلادش میزان عفونت برونکوپنومونیک در بز مختلط ۲۰ درصد گزارش شده است(۱۲). همچنین در پژوهش دیگرِ رانیا و همکاران، میزان شیوع *اشریشیاکولای* ۲۱/۸ درصد گزارش شده است(۱۰).

در پژوهش حاضر میزان شیوع *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اپیدرمیدیس* به ترتیب (۴/۸۷ درصد) و (۱۵/۵۸ درصد) بوده است. در تحقیقِ فوأد و همکاران (۲۰۲۲) گونه استافیلوکوکوساز ۳۶ نمونه (۷/۹ درصد) جداسازی شده است(۱۳). این جداسازی بسیار کمتر از سایر مطالعاتی است که در دیگر نقاط جهان انجام شده است. المشاد و همکاران (۲۰۱۹) اشاره کرد که *استافیلوکوکوساورئوس* شایع ترین سویهٔ جدا شده از گوسفندان مبتلا پنومونی شدید بوده که میزان جداسازی ۳۸/۴ درصد به عنوان تنها علت و ۷/۶۹ درصد به عنوان عفونت مختلط در استان قالیوبیا مصر بوده است(۱۴). علاوه بر این، حسین و الرودان (۲۰۱۱) *استافیلوکوکوساورئوس* را با درصد ۱۶/۸۵ درصد در استان دیوانیه عراق گزارش دادند. رشید و همکاران (۲۰۱۳) جداسازی جنس *استافیلوکوکوس* را از پنومونی چرکی (۴۰ درصد) گزارش دادند.

در پژوهش حاضر*پاستورلا مولتوسیدا* پنجمین پاتوژن بود که از ۹۶ نمونه (۶/۰۹ درصد) جدا شد. میزان شیوع این باکتری در مطالعات متعددی با نتایج متفاوتی گزارش شده است. در ترکیه، منطقهٔ قونیه ۶۴ نمونه از ۱۱۴ نمونه (۵۶/۱۴ درصد) گزارش شده است(۱۵). در پژوهش دیگری در کشور عراق، منطقهٔ بغداد، شیوع کم (۴/۴۶ درصد) از دستگاه تنفسی گوسفندان گزارش شده است (۱۶).
طباطبایی و عبدالهی (۲۰۱۸) در شیراز با بررسی ۲۵۰۰ ریهٔ گوسفند و جدا کردن ۱۶۱ ریهٔ مبتلا به پنومونی عفونی، با استفاده از روش کشت و PCR، در ۳۸ مورد باکتری *منهمیا هملیتیکا* را جدا کردند(۱۷). آیدمی و همکاران (۲۰۱۷) با انجام پژوهشی بر روی بز ها در نیجریه، ارتباط مثبت معنی داری بین انگل های گوارشی و شیوع پنومونی را گزارش دادند(۱۸).

لاوری و همکاران (۲۰۱۸) با بررسی تعدادی بز کوهی واقع در مناطق کوهستانی آلاسکا و منطقه Greater Yellowstone Area (GYA) باکتری های *منهمیا هملیتیکا* را در آلاسکا و *مایکوپلاسما اویس پنومونی* را در GYS به‌عنوان عامل ایجاد کنندهٔ پنومونی جدا و گزارش کردند(۱۹). بیسر و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند که *مایکوپلاسما اویس‌پنومونیه* می تواند باعث ایجاد پنومونی کشنده در گوسفند شود(۲۰).

آلودگی به *سودوموناس آئروژینوزا* در پژوهشِ حاضر آشکار بود میزان شیو ع (۲/۴۳ درصد) بود. این تا حدودی شبیه به گزارش ناهد و علام (۲۰۱۹) بود که *سودوموناس آئروژینوزا* را از گوسفند با ۱۰ درصد گزارش دادند. همچنین دپق و همکاران. (۲۰۱۹) دریافتند که *سودوموناس آئروژینوزا* از ۵/۸ درصد از گوسفند های آزمایش شدهٔ قبلی جدا شد و زاگوآ و همکارانش (۲۰۱۰) *سودوموناس آئروژینوزا* با نرخ پایین ۵/۸۵ درصد از سواب بینی و بافت ریه پنومونی جدا کردند(۲۱). عفونت ناشی از *سودوموناس آئروژینوزا* یکی از مسائل مهم در گوسفند و بز است و با نرخ مرگ و میر فراوان همراه است، در نتیجهٔ تشخیص زودهنگام و درمان های صحیح، بهترین راهبرد برای نجات جان حیوانات است (۲۲).در پژوهشِ دیگری در اسپانیا بر روی ۵۰ رأس بزغاله، ویروس سین‌سیشیال تنفسی گاوان از ۸ رأس از آن‌ها جدا شد. نکتهٔ قابل توجه اینکه از ۸ رأس، دو رأس عفونت

همزمان با *BRSV* و *منهمیا هموليتيكا* بیوتیپ A را داشتند (۷۹). Brako و همکاران (۱۹۸۴) با انجام بررسیِ سرمی برروی رأس گوسفند سالم در لوئیزیانا، در ۱۰۰ درصد آن‌ها آنتی‌بادی پارآنفلوانزای تیپ ۳ و در ۸۷/۵ درصد ویروس سین‌سیشیال تنفسی را جدا کردند (۲۶). در پژوهشی در آلمان نشان داده شد که ویروس‌های ایجادکننده BRDC یا کمپلکس بیماری‌های تنفسی گاوان، شامل پارآنفلوانزای تیپ ۳ گاوان، *BHV-1* و *BRSV* می‌توانند با نشخوارکنندگان کوچک به‌عنوان مخازن، حفظ و انتقال پیدا کنند (۵۶). Contreras-Lune و همکاران (۲۰۱۷) با مطالعه برروی ۲۹۳ رأس گوسفند در مکزیک، در ۵۳ درصد بالغان و در ۶۱ درصد بره‌ها، آنتی‌بادی ضد *BRSV* و در ۸۱/۴ درصد بالغان و ۸۴/۳ درصد بره‌ها، آنتی‌بادی علیه *PI3* را گزارش دادند (۳۵). عفونت‌های مختلط با علل باکتریایی و ویروسی مختلف در عفونت تنفسی رایج است و می‌توان آن را با این واقعیت توضیح داد که عفونت با یک عامل باکتریایی یا ویروسی می‌تواند احتمال ابتلا به عفونت دیگر را افزایش دهد (۲۳).

نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر بیشترین باکتری جدا شده از موارد پنومونی، *اشریشیاکلی* بود. به نظر می‌رسد به‌دلیل فراوانی بیشتر این باکتری و وجود آن، به‌ویژه در بستر، سهم بیشتری هم در ایجاد پنومونی داشته باشد. هرچند سایر باکتری‌هایی که اهمیت چندان زیادی در ایجاد پنومونی ندارند، به تعداد نسبتاً چشمگیری در موارد کشت جدا شدند، ولی اجرام اختصاصی ایجادکنندهٔ پنومونی همچون *پاستورلا هموليتيكا* از هیچ موردی جدا نشد در پنج مورد *پاستورلا مولتوسیدا* جدا شد. این باکتری بیشتر در ایجاد سپتی‌سمی در بره و بزغاله نقش دارد. ویروس‌ها نیز در ایجاد پنومونی و ایجاد شرایط مستعدکننده برای فعالیت باکتری‌ها و ایجاد پنومونی چرکی، چه در انسان و چه در حیوانات دارای نقش بسزایی هستند. با استفاده از روش مولکولی در ۴۸ مورد ویروس *PI3* و در ۲۸ مورد *BRSV* جدا شد. امروزه نقش عوامل ویروسی در ایجاد پنومونی در دام‌ها بسیار بیشتر از قبل، مطرح است. در این مطالعه نیز با شیوع نسبتاً گستردهٔ این عوامل از موارد درگیر جدا شدند. واضح است که رعایت موارد بهداشتی و مدیریت بهینه نقش بسیار مهمی در کنترل بیماری‌ها، به‌ویژه موارد پنومونی دارد.

منابع

1. Lacasta D, Ferrer L, Ramos J, González J, De las Heras M. Influence of climatic factors on the development of pneumonia in lambs. Small Ruminant Research. 2008;80(1-3):28-32.
2. Besser TE, Cassirer EF, Highland MA, Wolff P, Justice-Allen A, Mansfield K ,et al. Bighorn sheep pneumonia: Sorting out the cause of a polymicrobial. 2012.
3. Drew M, Edwards H, Fox K, Gillin C, Gonzales B, Jennings-Gaines J, et al. Bighorn sheep herd health monitoring recommendations. Western Association of Fish and Wildlife Agencies. https://www. wafwa. org …; 2014.
4. Radostits OM, Gay C, Hinchcliff KW, Constable PD. Veterinary Medicine E-Book: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats: Elsevier Health Sciences; 2006.
5. Danesh Lari S, Tahamtan Y, Hayati M, Kargar M. Rapid and simultaneous identity of virulence factors and capsular typing of Pasteurella multocida isolated from sheep and goats by Multiplex PCR. Journal of Microbial World. 2010;3(3):162-8.
6. Wood ME, Fox KA, Jennings-Gaines J, Killion HJ, Amundson S, Miller MW, et al. How respiratory pathogens contribute to lamb mortality in a poorly performing bighorn sheep (Ovis canadensis) herd. Journal of wildlife diseases. 2017;53(1):126-30.
7. Patel S, Chauhan H, Patel A, Shrimali M, Patel K, Prajapati B, et al. Isolation and identification of Klebsiella pneumoniae from sheep-case report. Int J Curr Microbiol App Sci. 2017;6(5):331-4.
8. Al-Agha AGM, Al-Khafaji NJM, Al-Azawi AKS. Isolation and identification of Klebsiella pneumoniae using API-20E analytical system and conventional PCR assay. Intl J Curr Microbiol App Sci. 2017;6(8):203-10.
9. Mansour AM, Zaki HM, Hassan NA, Al-Humiany AA. Molecular characterization and immunoprotective activity of capsular polysaccharide of Klebsiella Pneumoniae isolated from farm animals at Taif Governorate. American Journal of Infectious Diseases. 2014;10(1):7-20.
10. Rania H, Rehab EM, Amira EL, Noha M, Heba A. Mixed infection of Mycoplasma and bacteria in the respiratory tract of sheep with reference to thehistopathological picture in Sharkia Governorate. Egyptian Journal of Animal Health. 2021;1(1):7-22.
11. T Husseein M, Alrodhan M. Isolation and identification of some aerobic bacteria associated with respiratory infections of sheep in Al-Diwaniya Governorate. AL-Qadisiyah Journal of Veterinary Medicine Sciences. 2011;10(2):138-46.

12. Rashid M, Ferdoush M, Dipti M, Roy P, Rahman M, Hossain M, et al. Bacteriological and pathological investigation of goat lungs in Mymensingh and determination of antibiotic sensitivity. Bangladesh journal of veterinary medicine. 2013;11.(۲)
13. Fouad EA, Khalaf DD, Farahat E, Hakim AS. Identification of predominant pathogenic bacteria isolated from respiratory manifested small ruminants in western north Egypt with regard to their susceptibility to antibiotics. International Journal of Health Sciences. 2022(II):10818-28.
14. El-Mashad A-BI, Moustafa SA, Amin A, Samy EM. Pathological Studies on lung affections in sheep and goat at Kalubia Governorate. Benha Veterinary Medical Journal. 2020;38(1):17-23.
15. Oruc E. The pathologic and bacteriologic comparison of pneumonia in lambs. Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences. 2006;30(6):593-9.
16. Ahmed WA, Mohammed RJ, Khalaf IA. Molecular and phenotypical characterization of mannheimia haemolytica isolated from goats in Baghdad province. Advances in Microbiology. 2017;7(04):304.
17. Tabatabaei M, Abdollahi F. Isolation and identification of Mannheimia haemolytica by culture and polymerase chain reaction from sheep's pulmonary samples in Shiraz, Iran. Veterinary World. 2018;11(5):636.
18. Adeyemi MT, Morenikeji OA, Emikpe BO, Jarikre TA. Interactions between gastrointestinal parasitism and pneumonia in Nigerian goats. Journal of Parasitic Diseases. 2017;41:726-33.
19. Lowrey B, Butler CJ, Edwards WH, Wood ME, Dewey SR, Fralick GL, et al. A survey of bacterial respiratory pathogens in native and introduced mountain goats (Oreamnos americanus). Journal of Wildlife Diseases. 2018;54(4):852-8.
20. Besser TE, Highland MA, Baker K, Cassirer EF, Anderson NJ, Ramsey JM, et al. Causes of pneumonia epizootics among bighorn sheep, western United States, 2008–2010. Emerging Infectious Diseases. 2012;18(3):406.
21. Zaghawa A, Hassan H, El-Sify A. Clinical and Etiological study on respiratory affections of sheep. Minufiya veterinary journal. 2010;7(1):93-103.
22. Bangar Y, Pachpute S, Nimase R. The survival analysis of the potential risk factors affecting lamb mortality in deccani sheep. J Dairy Vet Anim Res. 2016;4(2):266-70.
23. MonaMA. Studies on respiratory affec-tions of sheep in Matrouh governorate, Egypt. European Biomedical Pharmaceutical Sci J. 2019;6(13):505-12.
24. Contreras-Luna MJ, Ramírez-Martínez LA, Sarmiento Silva RE, Cruz Lazo C, Pérez Torres A, Sánchez-Betancourt JI. Evidence of respiratory syncytial virus and parainfluenza-3 virus in Mexican sheep. Virusdisease. 2017 ;28(1):102-110