

مطالعه فنوتیپی و ژنوتیپی جدایه‌های اورنیتوباکتریوم رینوتراکتال در ماکیان صنعتی استان آذربایجان شرقی، ایران

مهدی ازدیادی^۱، محمد کریم خسروپناه^{۲*}، منصور بنانی^۳، رحیم قدیمی پور^۴، کامبیز داوری^۵

۱- دانشجوی دکتری تخصصی بیوشیمی، گروه زیست شناسی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران

۲- استادیار گروه زیست شناسی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران

۳- استادیار بخش تحقیق و توسعه، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مرند، ایران

۴- دانشیار بخش تحقیقات بیماری‌های طیور، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۵- استادیار گروه زیست شناسی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۶/۱۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۲/۱۱

چکیده

اورنیتوباکتریوم رینوتراکتال (ORT) ارگانسیم مرتبط با بیماری‌های تنفسی، کاهش تولید تخم، کاهش رشد و مرگ و میر در مرغ‌ها و بوقلمون‌ها است. هدف پژوهش حاضر جداسازی، شناسایی، تعیین الگوی مقاومت دارویی و انگشت‌نگاری مولکولی این باکتری در گله‌های ماکیان صنعتی استان آذربایجان شرقی - شمال غرب ایران - با استفاده از روش مرسوم باکتریایی و نیز تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) بود. بدین منظور تعداد ۴۰۰ نمونه سواب نای از ۳۳ گله مرغ گوشتی در حال کشتار و هفت گله مرغ تخمگذار جمع‌آوری گردید. بر اساس نتایج این مطالعه، از ۳۳۰ نمونه حاصل از گله‌های مرغ گوشتی، ۱۴ جدایه (۴/۲ درصد) از سواب‌های نای پنج گله (۱۵/۱ درصد) به عنوان اورنیتوباکتریوم رینوتراکتال شناسایی شدند. همچنین یافته‌های پژوهش جاری مشخص نمود که هیچکدام از گله‌های مرغ تخمگذار تحت بررسی آلوده به این ارگانسیم نبودند. بر اساس نتایج آزمایش تعیین الگوی مقاومت دارویی جدایه‌ها به روش انتشار دیسک، بالاترین حساسیت دارویی به ترتیب نسبت به پنی‌سیلین (۸۵/۷ درصد)، تتراسایکلین (۷۱/۴ درصد) و داکسی‌سایکلین (۵۷/۱ درصد) بوده و بیشترین مقاومت دارویی نیز مقابل اریترومايسين (۷۱/۴ درصد) و نئومايسين (۵۰/۰ درصد) مشاهده گردید. بر طبق داده‌های انگشت‌نگاری جدایه‌ها با تکنیک تکثیر مناطق بین‌ژنی تکراری حفاظت‌شده انتروباکتریایی (ERIC-PCR)، این جدایه‌ها در دو الگوی ژنتیکی E1 و E2 تیپ‌بندی شدند که اغلب جدایه‌ها (n=۱۳، ۹۲/۸ درصد) در الگوی E1 قرار داشتند. تمام سویه‌های ORT جدا شده در این مطالعه از گله‌های مرغ گوشتی بودند که نشان‌دهنده میزان بالای آلودگی این پرندگان نسبت به ماکیان تخمگذار صنعتی تحت بررسی در استان آذربایجان شرقی است (P < ۰/۰۵). همچنین نتایج ما نشان می‌دهد که اغلب جدایه‌های ORT حاصل از ماکیان صنعتی مناطق شمال غرب ایران از نظر ژنتیکی بسیار شبیه به هم بوده و به یک پروفایل ژنتیکی خاص وابسته می‌باشند.

کلمات کلیدی: اورنیتوباکتریوم رینوتراکتال، ماکیان صنعتی، تایپینگ، PCR، آذربایجان شرقی، ایران.

* نویسنده مسئول: محمد کریم خسروپناه

آدرس: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج، سنندج-ایران.

پست الکترونیک: khosropanah.mk@iausdj.ac.ir

مقدمه

اورنیتوباکتریوم رینوتراکتال (ORT) باکتری میله‌ای گرم منفی، دارای چندشکلی زیاد و غیرمتحرک است که موجب خسارت‌های قابل توجه اقتصادی در صنعت طیور می‌گردد (۲۴). مرور مطالعات انجام‌یافته حاکی از جداسازی این ارگانیزم از گونه‌های مختلف پرندگان در سراسر جهان است (۷ و ۳۰). این باکتری می‌تواند موجب بیماری بسیار مسری در ماکیان گردد که طول دوره بیماری، شدت علائم بالینی و میزان تلفات ناشی از آن بسیار متغیر می‌باشد (۱۰ و ۳۰). از سوی دیگر، شدت بیماری با حضور عفونت‌های هم‌زمان و نیز عوامل مدیریتی مانند تراکم بالا و بهداشت پایین گله ارتباط مستقیمی دارد (۱۳ و ۲۶). علائم بالینی مشهود درگیری تنفسی با این باکتری در ماکیان شامل آبریزش بینی، سرفه، ورم مفاصل و ورم صورت و در بوقلمون‌ها شامل تورم کیسه‌های هوایی و ادم ریه‌ها، بزرگی کبد، پریکاردیت و سینوزیت است (۲۶). در طیور متاثر از باکتری ORT، به‌خصوص در گله‌های ماکیان و بوقلمون، بروز علائم تنفسی، کاهش رشد، کاهش تولید تخم، افزایش میزان تلفات (تا ۱۰ درصد) و افزایش حذف کشتارگاهی مشاهده می‌شود که در صورت همراه شدن با سایر عوامل بیماری‌زای تنفسی طیور از قبیل اشریشیا کلای، بوردتلا آویوم، ریمرلا آناتی-پستیفیر و ویروس بیماری نیوکاسل، میزان خسارت‌های اقتصادی ناشی از این بیماری به طور چشمگیری افزایش می‌یابد (۲۲ و ۳۰).

تاکنون گزارش‌های مختلفی مبنی بر شناسایی و انگشت‌نگاری این باکتری در طیور صنعتی و نیز سایر پرندگان اهلی و وحشی از کشورهای مختلف دنیا ارائه شده است (۱۵، ۱۷، ۲۶ و ۲۹). به طور کلی اغلب گله‌های ماکیان در اروپا، آفریقا، آمریکای شمالی و

جنوبی و برخی از کشورهای آسیایی با این ارگانیزم مواجه شده‌اند (۱۸ و ۲۷).

در ایران اولین بار محققین موسسه رازی در سال ۱۳۷۹ عفونت با باکتری ORT را از یک گله جوجه گوشتی و یک گله نیمچه تخمگذار دارای علائم تنفسی گزارش کردند (۹). به دنبال آن، مطالعات متعددی در خصوص شناسایی این بیماری در نژادهای مختلف ماکیان ایران شامل مادر گوشتی، مادر تخمگذار، جوجه گوشتی، تخمگذار تجاری و مرغ بومی (۹) و نیز شناسایی باکتری مسبب آن در مزارع صنعتی نگهداری و پرورش بلدرچین و بوقلمون و همچنین کبوترهای اهلی در نواحی مختلف کشور با بهره‌گیری از روش‌های رایج باکتری‌شناسی، سرولوژی و مولکولی انجام گردید (۱ و ۹). با وجود این مطالعات، تاکنون گزارش مدونی مبنی بر شناسایی این باکتری با استفاده از روش مرسوم کشت باکتریایی و نیز تکنیک مولکولی در طیور صنعتی مناطق شمال غرب ایران ارائه نگردیده است.

روش‌های مولکولی از قبیل آنالیز پلاسمید (۱۶)، تکثیر مناطق بین‌ژنی تکراری حفاظت‌شده انتروباکتریایی از طریق (Enterobacterial Repetitive PCR, ERIC-PCR, Intergenic Consensus Based PCR, Multilocus) (۲۵)، تعیین توالی در چند ناحیه ژنی (Sequence Typing, MLST) (۲۷)، پلی‌مورفیسم قطعات تکثیرشده تصادفی (Random DNA Amplified Polymorphic DNA, RAPD-PCR) (۲۴)، ریبوتایپینگ (۱۶)، آنالیز تنوع طولی قطعات حاصل از تکثیر Amplified Fragment Length (Polymorphism, AFLP) (۷) و تعیین توالی DNA (۲) از تکنیک‌های سریع بررسی سویه‌ها و گونه‌های باکتریایی هستند که در کنار شناسایی، مطالعه فنوتیپی و دسته‌بندی سروتیپی، برای تکمیل انگشت‌نگاری جدایه‌های ORT استفاده می‌شوند. این تکنیک‌ها،

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها

تعداد ۴۰۰ نمونه سواب نایی بطور تصادفی از ۳۳ گله مرغ گوشتی در حال کشتار و هفت گله مرغ تخمگذار به‌ظاهر سالم و یا دارای نشانه‌های تنفسی در مناطق مختلف استان آذربایجان شرقی واقع در شمال غرب ایران در طی فصول بهار و تابستان سال ۱۳۹۸ جمع‌آوری شد (جدول ۱). از آنجا که باکتری ORT به دمای محیط حساس می‌باشد، لذا تمام نمونه‌های اخذ شده در محیط انتقالی کری بلر (Cary Blair)، شرایط سرد و در حداقل زمان به آزمایشگاه میکروبی‌شناسی بخش پژوهش‌های دامپزشکی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شمال غرب کشور منتقل گردیدند.

روش‌های سریع، حساس و اختصاصی هستند که برای بررسی، تایپینگ و مقایسه تفاوت‌های گونه‌های باکتریایی مختلف به کار می‌روند (۱۵). مرور مطالعات انجام‌یافته بر روی باکتری ORT در ایران حاکی از آن است که در خصوص انگشت‌نگاری سویه‌های این باکتری با روش‌های مختلف مولکولی از جمله -ERIC PCR پژوهشی انجام نیافته است. از اینرو، مطالعه حاضر، با هدف جداسازی، شناسایی، تعیین الگوی مقاومت دارویی و انگشت‌نگاری مولکولی باکتری ORT با روش ERIC-PCR در گله‌های ماکیان صنعتی استان آذربایجان شرقی واقع در شمال غرب ایران، با استفاده از روش مرسوم بیوشیمیایی و نیز تکنیک واکنش زنجیرهای پلیمرز (PCR)، طراحی گردید.

جدول ۱- نتایج جداسازی و شناسایی اورنیتوباکتریوم رینوتراکتال (ORT) از مجموع ۴۰۰ نمونه سواب نایی حاصل از ۴۰ گله ماکیان صنعتی استان آذربایجان شرقی در فصل‌های بهار و تابستان سال ۱۳۹۸ با بهره‌گیری از تکنیک واکنش زنجیرهای پلیمرز (PCR)

منطقه (شهر)	شماره گله	تعداد مرغان گله	سن (روز)	وضعیت	تعداد نمونه	موارد مثبت (تعداد/درصد)
دارای علائم تنفسی						
سالم						
گله‌های مرغ گوشتی	هشترود	۱	۱۳۰۰۰	۴۸	■	۱۰
		۲	۱۶۰۰۰	۵۱	■	۱۰
	مرند	۳	۲۰۰۰۰	۵۲	■	۱۰
		۴	۱۵۰۰۰	۵۰	□	۱۰
	تبریز	۵	۳۰۰۰۰	۵۲	■	۱۰
شبیستر		۶	۲۵۰۰۰	۴۸	□	۱۰
		۷	۱۰۰۰۰	۴۸	■	۱۰
		۸	۲۰۰۰۰	۵۰	□	۱۰
		۹	۱۵۰۰۰	۵۰	■	۱۰
		۱۰	۱۰۰۰۰	۴۵	□	۱۰
		۱۱	۱۰۰۰۰	۴۸	■	۱۰
		۱۲	۲۰۰۰۰	۴۸	□	۱۰
		۱۳	۲۰۰۰۰	۵۰	■	۱۰
		۱۴	۲۰۰۰۰	۵۰	□	۱۰
		۱۵	۱۵۰۰۰	۵۰	■	۱۰
بستان آباد		۱۶	۱۰۰۰۰	۴۵	□	۱۰
		۱۷	۱۷۰۰۰	۵۰	■	۱۰
		۱۸	۱۰۰۰۰	۵۰	□	۱۰
		۱۹	۱۵۰۰۰	۴۸	■	۱۰
		۲۰	۳۰۰۰۰	۵۰	□	۱۰
	اهر	۲۱	۲۲۰۰۰	۵۰	■	۱۰
		۲۲	۱۵۰۰۰	۴۲	□	۱۰

۰	۱۰	□	■	۴۵	۱۰۰۰۰	۲۳	هریس
۰	۱۰	□	■	۵۰	۲۰۰۰۰	۲۴	صوفیان
۲	۱۰	□	■	۵۰	۱۵۰۰۰	۲۵	
۰	۱۰	□	■	۴۷	۱۵۰۰۰	۲۶	شرفخانه
۰	۱۰	□	■	۴۸	۲۰۰۰۰	۲۷	خسروشهر
۴	۱۰	■	□	۵۰	۱۲۰۰۰	۲۸	
۰	۱۰	□	■	۵۰	۲۵۰۰۰	۲۹	ملکان
۳	۱۰	□	■	۵۰	۱۸۰۰۰	۳۰	عجب شیر
۰	۱۰	■	□	۵۰	۱۰۰۰۰	۳۱	تسوج
۰	۱۰	□	■	۴۸	۱۳۰۰۰	۳۲	خواجه
۰	۱۰	■	□	۵۰	۲۰۰۰۰	۳۳	تیکمه داش
۱۴	۳۳۰						مجموع
(٪ ۴/۲)							
گله‌های مرغ تخمگذار							
۰	۱۰	□	■	۲۵۲	۱۰۰۰۰	۳۴	تبریز
۰	۱۰	■	□	۳۰۱	۱۵۰۰۰	۳۵	
۰	۱۰	■	□	۴۲۰	۱۲۰۰۰	۳۶	
۰	۱۰	□	■	۲۲۴	۲۵۰۰۰	۳۷	
۰	۱۰	□	■	۳۰۸	۳۰۰۰۰	۳۸	
۰	۱۰	■	□	۳۷۱	۱۵۰۰۰	۳۹	
۰	۱۰	■	□	۴۹۰	۲۵۰۰۰	۴۰	
۰/۰	۷۰						مجموع
(٪ ۰/۰)							
۱۴	۴۰۰						جمع کل
(٪ ۳/۵)							

کاتالاز، اکسیداز، تولید اندول، تولید اوره آز، تحرک، احیای نیترات و رشد بر روی آگار مک کانکی و محیط سه‌قندی آهن‌دار (TSI) استفاده شد. به منظور ارزیابی قدرت تخمیر کربوهیدرات‌ها به وسیله هر کدام از جدایه‌های مشکوک و تولید اسید از آنها، محیط‌های قندی شامل سوربیتول، گلوکز، آرابینوز، سوکروز، مالتوز و لاکتوز مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۲) (۱۴). جدایه‌های مشکوک به ORT برای ادامه بررسی‌ها در محیط نگه‌دارنده (Skim Milk) و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره‌سازی شدند (تمام محیط‌ها ساخت شرکت مرک، آلمان).

کشت باکتریایی و آزمایش‌های بیوشیمیایی

نمونه‌ها بر روی محیط آگار خون‌دار گوسفندی (پنج درصد) حاوی ۵/۲ میکروگرم جنتامایسین در هر میلی‌لیتر کشت شده و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد که حاوی ۷/۵ درصد دی‌اکسید کربن بود به مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند؛ به دنبال آن پرگنه‌های مشکوک به باکتری ORT (با ظاهری خاکستری رنگ، ریز و غیرهمولیتیک) برای آزمایش‌های بعدی انتخاب و خالص‌سازی شدند (۱۴). برای مشاهده شکل و اندازه باکتری‌های خالص‌سازی شده، از تکنیک رنگ‌آمیزی گرم و برای شناسایی بیولوژیکی اجرام، از آزمایش‌های بیوشیمیایی مانند

جدول ۲- نتایج آزمایش تعیین الگوی مقاومت دارویی ۱۴ جدایه اورنیتوباکتریوم رینوتراکتال (ORT) حاصل از کله‌های ماکیان صنعتی استان آذربایجان شرقی در فصل‌های بهار و تابستان سال ۱۳۹۸

عامل ضد میکروبی	حساس	حساسیت متوسط	تعداد (درصد)
اریترومایسین (15µg)	۱ (۷/۱)	۳ (۲۱/۴)	۱۰ (۷۱/۴)
نالدیکسیک اسید (30µg)	۲ (۱۴/۲)	۸ (۵۷/۱)	۴ (۲۸/۵)
جتنامایسین (10µg)	۱ (۷/۱)	۷ (۵۰/۰)	۶ (۴۲/۸)
نومایسین (30µg)	۷ (۵۰/۰)	۰ (۰/۰)	۷ (۵۰/۰)
پنی‌سیلین (10U)	۱۲ (۸۵/۷)	۲ (۱۴/۲)	۰ (۰/۰)
استرپتومایسین (10µg)	۷ (۵۰/۰)	۴ (۲۸/۵)	۳ (۲۱/۴)
داکسی‌سایکلین (30µg)	۸ (۵۷/۱)	۲ (۱۴/۲)	۴ (۲۸/۵)
تری‌متوپریم سولفامتو‌کسازول (1.25/23.75µg)	۱ (۷/۱)	۹ (۶۴/۲)	۴ (۲۸/۵)
تتراسایکلین (30µg)	۱۰ (۷۱/۴)	۳ (۲۱/۴)	۱ (۷/۱)
کلوگرامسین (1µg)	۶ (۴۲/۸)	۲ (۱۴/۲)	۶ (۴۲/۸)

گرفتند (۳۰). توالی نوکلئوتیدی این آغازگرها به

ترتیب زیر بود:

توالی آغازگر رفت:

5- GAGAATTAATTTACGGATTAAG-3

توالی آغازگر برگشت:

5-TTCGCTTGGTCTCCGAAGAT-3

برای انجام PCR از دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf, آلمان) استفاده شد. واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس آماده 2x (مستمیکس سیناکلون، ایران، حاوی PCR buffer، dNTPs، MgCl₂ و Taq DNA Polymerase)، ۵/۵ میکرولیتر آب DEPC، دو میکرولیتر از هر کدام از آغازگرها (۱۰ پیکومول، سیناکلون، ایران) و پنج میکرولیتر از DNA استخراج شده، انجام گردید. برنامه دمایی PCR شامل مرحله واسرشت اولیه به مدت پنج دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، سپس چرخه‌های متوالی شامل مرحله واسرشت به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، مرحله اتصال به مدت یک دقیقه در دمای ۵۳ درجه سانتی‌گراد و مرحله طولیل‌سازی به مدت دو دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد، به تعداد ۳۰ چرخه و در انتها یک مرحله طولیل‌سازی نهایی به

تشخیص مولکولی

استخراج DNA

جهت استخراج DNA نمونه‌های مشکوک، از روش جوشاندن استفاده شد. بدین منظور، ابتدا چند پرگنه خالص از محیط آگار خون‌دار انتخاب شده و در ۳۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل گردیدند. مخلوط بدست آمده بوسیله دستگاه ترموبلاک (کیازن، ایران) به مدت پنج دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد جوشانده شد. تعلیق به دست آمده به مدت ۱۵ دقیقه در سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. در نهایت ۱۵۰ میکرولیتر از مایع رویی در میکروتیوب‌های استریل برای انجام PCR در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

آزمایش PCR

در این مطالعه یک جفت آغازگر اختصاصی باکتری ORT که برای تکثیر یک قطعه ۷۸۴ جفت بازی (bp) بر روی ژن *16S rRNA* این باکتری توسط وان‌امپل و حافظ (۱۹۹۹) طراحی شده بودند، مورد استفاده قرار

محیطها به انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد منتقل شده و به مدت هشت ساعت در این دما گرمخانه گذاری شدند تا غلظت میکروبی آنها معادل کدورت استاندارد ۰/۵ مک فارلند شود. با سواب استریل از سوسپانسیون داخل لوله ها اخذ شده و در محیط کشت آگار مولر هینتون که به آن پنج درصد خون گوسفندی اضافه شده بود، کشت سفره ای داده شد؛ سپس دیسک های حاوی ۱۰ آنتی بیوتیک مختلف (پادتن طب، ایران) بر روی این محیطها قرار گرفتند. پس از ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، برای اندازه گیری قطر هاله ممانعت از رشد و تفسیر نتایج بدست آمده، جدایه های مورد مطالعه به سه گروه حساس (S)، با حساسیت متوسط (I) و مقاوم (R) دسته بندی شدند (جدول ۳).

انگشت نگاری سویه ها به روش ERIC-PCR

برای تایید جدایه های تایید شده به روش ERIC-PCR از یک تک آغازگر که توسط تاجیل و همکاران (۲۰۰۷) استفاده شده بود، بهره برداری شد (۲۵). توالی نوکلئوتیدی این آغازگر به ترتیب زیر بود:

ERIC 1R 5-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3

درجه سانتی گراد، سپس چرخه های متوالی شامل مرحله واسرشت به مدت ۴۵ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، مرحله اتصال به مدت سه دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و مرحله طویل سازی به مدت چهار دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد، به تعداد ۳۵ چرخه و در انتها یک مرحله طویل سازی نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد بود. پس از طی شدن مراحل دمایی و تکثیر احتمالی ژن های هدف، در نهایت هشت میکرولیتر از محصول PCR در کنار

مدت پنج دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد بود. پس از طی شدن مراحل دمایی و تکثیر احتمالی ژن هدف، در نهایت هشت میکرولیتر از محصول PCR در کنار نردبان ژنی ۱۰۰ جفت بازی (سیناکلون، ایران) و سویه تایید شده باکتری ORT به عنوان شاهد مثبت (تهیه شده از کلکسیون کشت میکروبی آزمایشگاه باکتری شناسی بخش تحقیقات بیماری های طیور موسسه تحقیقات واکنس و سرم سازی رازی، کرج، ایران) و آب DEPC به عنوان شاهد منفی در ژل آگارز یک درصد حاوی ۰/۵ میکروگرم رنگ ایمن در هر میلی لیتر (سیناکلون، ایران) در ولتاژ ۸۵ ولت به مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز شد و در دستگاه ژل داک (Kodak، ایالات متحده آمریکا) باندهای تشکیل شده مشاهده گردید. در صورت مشاهده باند ۷۸۴ جفت بازی، جدایه مورد نظر باکتری ORT در نظر گرفته شد.

آزمایش تعیین الگوی مقاومت دارویی

برای تعیین الگوی مقاومت دارویی جدایه ها از روش انتشار دیسک استفاده شد (۲۸). در این روش ابتدا پرگنه های رشد یافته در محیط آگار خون دار به لوله های حاوی محیط تریپتیکاز سویا برات (TSB) منتقل شدند.

واکنش PCR با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل مسترمیکس آماده (BIONEER، کره جنوبی، حاوی ۴۰ میلی مولار از PCR buffer، ۱/۵ میلی مولار از MgCl₂، ۲۵۰ میکرومولار از dNTPs و یک واحد از Top DNA Polymerase)، ۱۲/۵ میکرولیتر آب DEPC، ۲/۵ میکرولیتر از آغازگر (۱۰ پیکومول، تکاپوزیست، ایران) و پنج میکرولیتر از DNA استخراج شده، انجام گردید. برنامه دمایی PCR شامل مرحله واسرشت اولیه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۴

مربع کای و فیشر تجزیه و تحلیل شده و $P < 0/05$ مبنای اختلاف معنی دار در نظر گرفته شد.

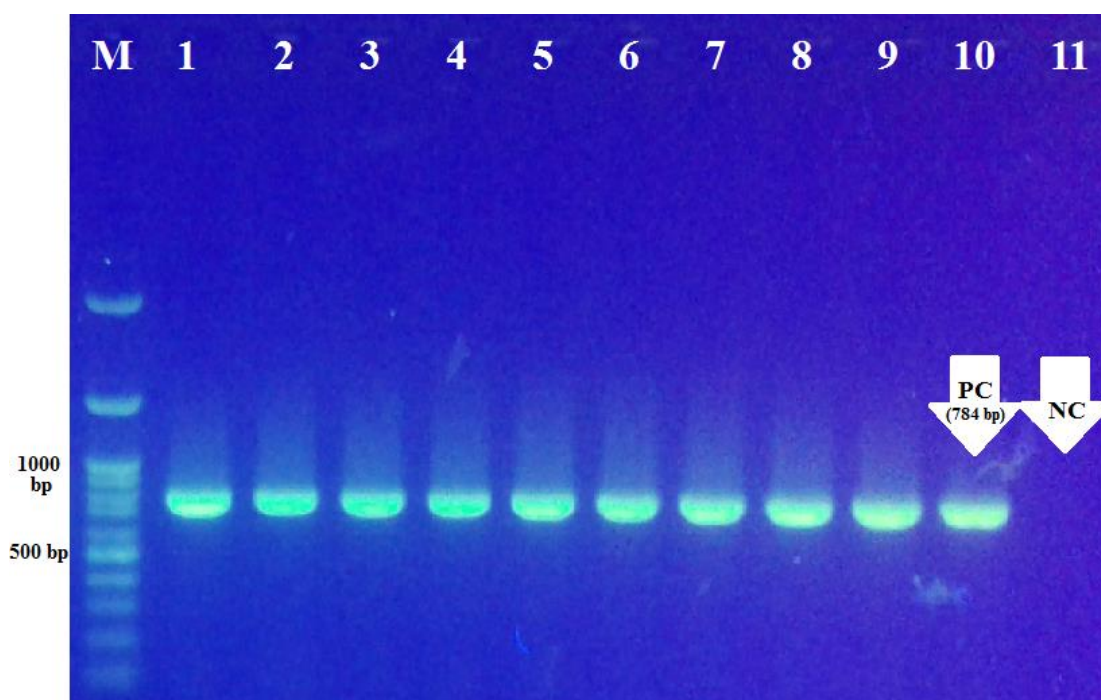
نتایج

در بررسی حاضر، از مجموع ۳۳۰ نمونه حاصل از گله‌های مرغ گوشتی، ۱۴ جدایه (۴/۲ درصد) از سواب‌های نای پنج گله (۱۵/۱ درصد) در کشت‌های باکتریایی و آزمون‌های بیوشیمیایی به عنوان اورنیتوباکتریوم رینوتراکتال شناسایی شدند که در استفاده از روش PCR نیز باند اختصاصی ۷۸۴ جفت بازی را نشان داده و تایید هویت شدند (جدول ۱، شکل ۱).

نردبان ژنی ۱۰۰۰ جفت بازی (سیناکلون، ایران) و سویه تایید شده باکتری ORT به عنوان شاهد مثبت و آب DEPC به عنوان شاهد منفی در ژل آگارز دو درصد حاوی ۰/۵ میکرو گرم رنگ ایمن در هر میلی لیتر (سیناکلون، ایران) در ولتاژ ۷۵ ولت به مدت ۱۲۰ دقیقه الکتروفورز شد و در دستگاه ژل داگ (Kodak)، ایالات متحده آمریکا) باندهای تشکیل شده مشاهده گردید.

آنالیز آماری

یافته‌های حاصل از آزمون‌ها توسط ویرایش ۱۷ نرم افزار SPSS و بهره‌گیری از آمار توصیفی و آزمون‌های دقیق



شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز یک درصد، رنگ آمیزی شده با رنگ ایمن. چاهک M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، چاهک‌های ۱-۹: جدایه‌های اورنیتوباکتریوم رینوتراکتال (ORT) (قطعه ۷۸۴ جفت بازی ژن 16SrRNA این ارگانسیم)، چاهک ۱۰: شاهد مثبت (باکتری ORT تایید شده با کمک آزمایش‌های بیوشیمیایی و آنتی سرم اختصاصی سروتیب A)، چاهک ۱۱: شاهد منفی (آب DEPC).

پایه آزمایش‌های بیوشیمیایی انجام یافته، اجرام جداسازی شده از نظر ژلاتیناز، اوره‌آز، کاتالاز و اندول منفی ولی از نظر آزمون اکسیداز مثبت بودند. این جدایه‌ها تمام قندهای مورد آزمایش به غیر از سوربیتول

این جدایه‌ها در محیط آگار خون‌دار دارای پرگنه‌های خاکستری متمایل به سفید و نوک سنجاقی بوده و فاقد قدرت همولیز بودند ولی در محیط‌های آگار TSI و آگار مک کانکی قادر به رشد نبودند. بر

سولفاتمتوکسازول (۶۴/۲ درصد) و نالیدیکسیک اسید (۵۷/۱ درصد) حساسیت متوسطی نشان دادند (جدول ۲). انگشت‌نگاری ۱۴ جدایه ERIC-PCR، این جدایه‌ها را در دو الگوی ژنتیکی E1 و E2 تقسیم‌بندی نمود که اکثر جدایه‌ها (n=۱۳، ۹۲/۸ درصد) در الگوی E1 قرار داشته و حاوی هفت باند ۳۴۰ تا ۲۴۰۰ جفت بازی بودند، در حالی که فقط یک جدایه (۷/۱ درصد) (ORT14/98R) از خسروشهر متعلق به الگوی ژنتیکی E2 بوده و دو باند ۷۰۰ و ۲۰۵۰ جفت بازی را نشان داد (جدول ۳).

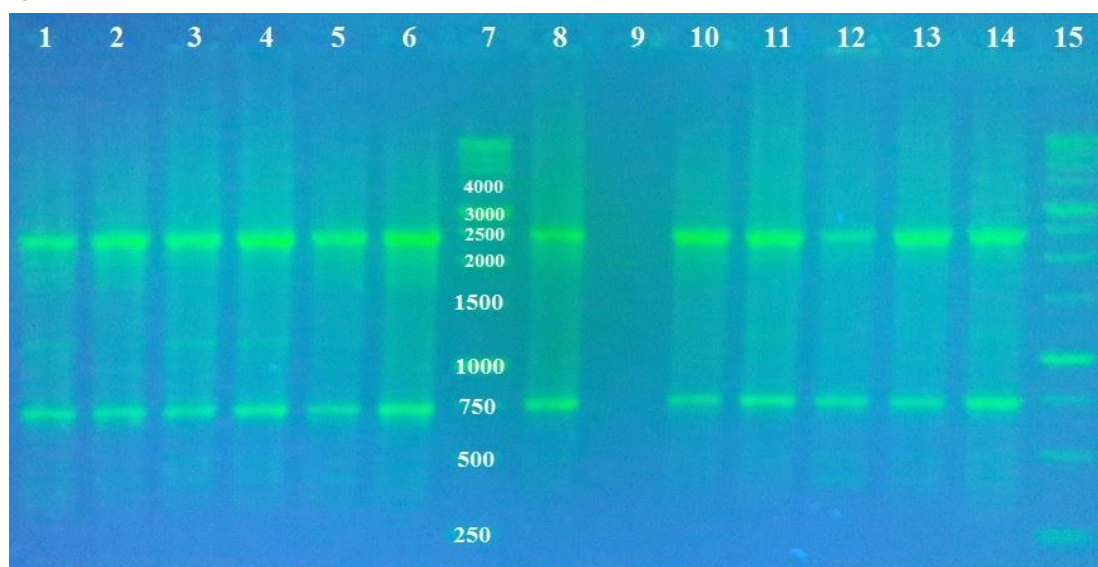
را تخمیر کردند. همچنین یافته‌های این مطالعه مشخص نمود که از مجموع ۷۰ نمونه سواب نایی حاصل از گله‌های مرغ تخمگذار تحت بررسی هیچکدام آلوده به باکتری ORT نیستند. نتایج حاصل از آزمایش تعیین الگوی مقاومت دارویی جدایه‌ها حاکی از حساسیت بالای آن‌ها به ترتیب نسبت به پنی‌سیلین (۸۵/۷ درصد)، تتراسایکلین (۷۱/۴ درصد) و داکسی‌سایکلین (۵۷/۱ درصد) و مقاومت بالای آن‌ها نسبت به اریترومايسين (۷۱/۴ درصد) و نئومايسين (۵۰/۰ درصد) است. همچنین اغلب جدایه‌ها نسبت به تری‌متوپریم

جدول ۳- نتایج انگشت‌نگاری ۱۴ جدایه اورنیتوباکتریوم رینوتراکنال (ORT) حاصل از گله‌های ماکیان صنعتی استان آذربایجان شرقی با بهره‌گیری از روش تایپینگ ERIC-PCR

منشاء جغرافیایی/میزبان	الگوهای حاصل از انگشت‌نگاری با روش ERIC-PCR	تعداد جدایه‌ها	فراوانی جدایه‌ها (درصد)	اندازه تقریبی باندها (bp)	ژنوتیپ پیشنهادی
تبریز/مرغ گوشتی	E1	۵	۱۳ (۹۲/۸)	۳۴۰-۴۳۰-۵۰۰-۷۰۰-۱۱۰۰-۱۳۵۰-۲۴۰۰	I
		۲			
		۳			
		۳			
خسروشهر/مرغ گوشتی	E2	۱	۱ (۷/۱)	۷۰۰-۲۰۵۰	II

از آن‌ها در ژنوم باکتری باشد. صحنه‌گذاری نتایج آزمایش با سه تکرار مورد تایید قرار گرفت (شکل ۲).

بارزترین باندهای الگوی E1 شامل ۷۰۰ و ۲۴۰۰ جفت باز بودند که علت آن می‌تواند وجود بیش از چند کپی



شکل ۲- الگوهای ژنتیکی ERIC-PCR جدایه‌های اورنیتوباکتریوم رینوتراکنال بر روی ژل آگارز دو درصد، رنگ‌آمیزی شده با رنگ ایمن. چاهک‌های ۷ و ۱۵: مارکر ۱۰۰۰ جفت بازی، چاهک‌های ۶-۱ و ۱۴-۸: جدایه‌های ORT تحت مطالعه، جدایه چاهک ۹ (ORT14/98R) الگوی ژنتیکی متفاوتی را نسبت به بقیه جدایه‌ها نشان داد است.

در پژوهش جاری، جدایه‌های ORT بدست آمده به ترتیب مربوط به نمونه‌های حاصل از گله‌های مرغ گوشتی شهرهای تبریز (پنج جدایه، ۳۵/۷ درصد)، خسروشهر (چهار جدایه، ۲۸/۵ درصد)، عجب شیر (سه جدایه، ۲۱/۴ درصد) و صوفیان (دو جدایه، ۱۴/۲ درصد) بودند. تمام سویه‌های ORT جداشده در این مطالعه از گله‌های مرغ گوشتی بودند که نشان‌دهنده میزان بالای آلودگی این پرندگان نسبت به ماکیان تخمگذار صنعتی تحت بررسی در استان آذربایجان شرقی است ($P < 0/05$). همچنین با اینکه انگشت-نگاری جدایه‌های تحت مطالعه با روش ERIC-PCR، آن‌ها را در دو پروفایل متفاوت (E1 و E2) متمایز نمود ولی اغلب جدایه‌های ORT حاصل از ماکیان صنعتی مناطق شمال غرب ایران از نظر ژنتیکی بسیار شبیه به هم بوده و به یک الگوی ژنتیکی خاص وابسته می‌باشند.

بحث

نشانه‌های تنفسی حاصل از عفونت اورنیتوباکتریایی با برخی دیگر از عفونت‌های تنفسی طیور مشابه است. علائم بالینی حاصل از درگیری با این ارگانیزم نیز مخصوص این بیماری نبوده و از این رو تشخیص عفونت با ORT باید بر اساس جداسازی و شناسایی عامل آن باشد (۱، ۱۷). جداسازی باکتری ORT از گونه‌های مختلف پرندگان اهلی و وحشی موضوع مطالعات متعدد در بسیاری از کشورها بوده و مقادیر گزارش شده در این مطالعات بسته به منطقه و نیز گونه پرنده تحت بررسی متغیر بوده و با نتایج پژوهش جاری متفاوت هستند.

در بررسی حاضر، از نمونه‌های حاصل از گله‌های مرغ گوشتی، ۱۴ جدایه (۴/۲ درصد) ORT به دست آمد در حالی که هیچکدام از نمونه‌های اخذشده از گله‌های مرغ تخمگذار آلوده به این باکتری نبودند. یافته‌های این

پژوهش نشان می‌دهد اگرچه ارگانیزم در گله‌های مرغ گوشتی نسبت به مرغ تخمگذار شیوع بالایی دارد، با این همه میزان جداسازی آن از ماکیان گوشتی و به‌ویژه تخمگذار صنعتی استان آذربایجان شرقی پایین است. در ایران، حسن‌زاده و همکاران (۲۰۱۰) ۰/۶ درصد از سواب‌های نایی و یک درصد از نمونه‌های نای و بافت ریه مرغ گوشتی مناطق مرکزی، غربی و شمالی کشور (۱۳) و اسدپور و همکاران (۲۰۱۱) نیز ۱/۰۳ درصد از نمونه‌های سواب نایی جوجه‌های گوشتی استان گیلان را آلوده به ارگانیزم ORT اعلام نمودند (۳). در مقایسه با نتایج این محققین، یافته‌های پژوهش حاضر حاکی از شیوع نسبتاً بالای باکتری ORT در گله‌های مرغ گوشتی استان آذربایجان شرقی است. این در حالی است که دوستی و همکاران (۲۰۱۱) ۱۹/۹۳ درصد از نمونه‌های نای و ریه‌های بوقلمون گوشتی استان اصفهان (۹)، میاحی و همکاران (۲۰۱۶) ۸/۵۷ درصد از نمونه‌های سواب نایی گله‌های مرغ گوشتی استان خوزستان (۱۷)، میرزایی و همکاران (۲۰۱۱) به ترتیب ۱/۶ درصد، ۱/۲ درصد و ۴/۸ درصد از نمونه‌های سواب نایی بوقلمون، بلدرچین و کبوتر اهلی نواحی مختلف کشور (۱۸) و عالی مهر (۲۰۰۶) نیز ۸۲ درصد از نمونه‌های سرمی گله‌های طیور گوشتی استان آذربایجان غربی را از نظر باکتری ORT مثبت گزارش کردند (۱).

در مطالعات انجام یافته در سایر کشورها نیز تی‌سای و هووانگ (۲۰۰۶) ۸/۳ درصد از سواب‌های نایی مرغ گوشتی کشور تایوان (۲۸)، چانسیری پورن‌چایی و همکاران (۲۰۰۷) ۶۳ درصد از نمونه‌های سرمی گله‌های طیور گوشتی کشور تایلند (۶)، کانال و همکاران (۲۰۰۳) ۶۳/۸۳ درصد از نمونه‌های سرمی گله‌های مرغ گوشتی کشور برزیل (۵)، روسان و

همکاران (۲۰۱۱) ۲۱ درصد از سواب‌های نایب گله‌های مرغ گوشتی کشور اردن (۲۰) و ساکای و همکاران (۲۰۰۰) به ترتیب ۱۳/۵ درصد، ۱۳/۹ درصد و ۱۲/۷ درصد از نمونه‌های سرمی گله‌های مرغ گوشتی، مادر گوشتی و مادر تخم‌گذار کشور ژاپن را آلوده به ORT گزارش کردند (۲۱). باکتری ORT فقط در مراحل اولیه عفونت قابل جداسازی بوده و شناسایی آن در مراحل پیشرفته بیماری کاری دشوار به نظر می‌رسد (۱۹). در نمونه‌های آلوده، این جرم توسط سایر ارگانیسیم‌های سریع‌الرشد از قبیل گونه‌های سودوموناس، گونه‌های پروتئوس و اشریشیا کلای پوشیده شده و در بررسی‌های معمول به دشواری قابل جداسازی و شناسایی می‌باشد (۲۴).

در هر مطالعه‌ای که برای شناسایی سویه‌های باکتری ORT در یک منطقه انجام می‌شود، مقاومت دارویی چندگانه از مسائل مهم دامپزشکی است که باید مورد توجه قرار گیرد. دامنه مقاومت سویه‌های باکتری ORT به عوامل مختلف ضد میکروبی بسیار متغیر بوده و به طیف آنتی‌بیوتیک‌های مورد مصرف در منطقه جداسازی و سویه باکتری وابسته می‌باشد (۳۰). الگوی مقاومت دارویی جدایه‌های ORT مطالعه حاضر حاکی از حساسیت بالای آن‌ها نسبت به پنی‌سیلین، تتراسایکلین و داکسی‌سایکلین و مقاومت آن‌ها نسبت به اریترومايسين و نئومايسين بود. وان‌امپل و حافظ (۱۹۹۹) گزارش کردند که ۹۰ تا ۱۰۰ درصد سویه‌های آلمانی ارگانیسیم نسبت به نئومايسين، جنتامایسین و انروفلوکسازین مقاوم بوده و تمامی آن‌ها نسبت به تتراسایکلین، آموکسی‌سیلین و کلرامفنیکل حساس بودند (۳۰). فیتزجرالد و همکاران (۱۹۹۸) نیز با بررسی تاثیر آنتی‌بیوتیک‌های مختلف بر روی ۲۵ جدایه ORT به روش ریزرقت‌سازی براث، حداقل غلظت

ممانعت‌کنندگی (MIC) فسفومايسين بر روی ۱۵ جدایه تحت آزمایش را $\geq 128 \mu\text{g/mL}$ گزارش کردند (۱۲). همچنین سوریانو و همکاران (۲۰۰۳) حساسیت جدایه‌های مکزیکی این باکتری نسبت به اکسی‌تتراسایکلین، آموکسی‌سیلین و انروفلوکسازین را متغیر عنوان نمودند (۲۳). تی‌سای و هووانگ (۲۰۰۷) نیز شاهد تفاوت معنی‌داری در مقاومت سویه‌های کبوتری و مرغی باکتری ORT به تتراسایکلین، جنتامایسین، اریترومايسين و کلیندامایسین بودند (۲۸). دوریه‌سه و همکاران (۲۰۰۱) نیز کمتر از ۱۰ درصد سویه‌های حاصل از جوجه‌های گوشتی کشور بلژیک را حساس به تایلوزین و فلومیکوئین معرفی کرده و همه آن‌ها را مقاوم به آمپی‌سیلین، سفتیوفور و لینکومايسين گزارش کردند (۸). به نظر می‌رسد بسته به منطقه جداسازی سویه‌های ORT، این ارگانیسیم‌ها الگوی حساسیت بسیار متغیری را نسبت به عوامل ضد میکروبی از خود به نمایش می‌گذارند (۲۸).

در ایران، میاحی و همکاران (۲۰۱۶) تمام سویه‌های حاصل از گله‌های مرغ گوشتی استان خوزستان را حساس به تتراسایکلین، فلورفنیکل و سفالکسین و ۸۹ درصد آن‌ها را مقاوم به فسفومايسين، سولتریم و جنتامایسین شناسایی کردند (۱۷). از سوی دیگر، اسدپور و همکاران (۲۰۱۱) همه جدایه‌های این ارگانیسیم را نسبت به تتراسایکلین، سیپروفلوکسازین، فلومیکوئین، انروفلوکسازین و فورازولیدون مقاوم و نسبت به سفتریاکسون و تیامولین حساس معرفی کردند (۳). همچنین میرزایی و همکاران (۲۰۱۱) دریافتند که دانوفلوکسازین و کلرامفنیکل فعالیت ضد میکروبی خوبی را نسبت به همه جدایه‌های باکتری ORT نشان دادند (۱۸). مقایسه الگوی مقاومت دارویی جدایه‌های پژوهش حاضر با نتایج مطالعات پیشین حاکی از

ORT را در کشور پرو و با روش تکثیر توالی‌های تکرارشونده ژنومی از طریق PCR (Repetitive Extragenic Palindromic Based PCR, rep-PCR) بررسی کرده و گزارش نمودند که همه سویه‌ها مشابه هم بوده و در الگوی ژنوتیپی A جای دارند. این محققین ژنوتیپ A را شایع‌ترین ژنوتیپ بر اساس روش ERIC معرفی کردند که در میان گونه‌های مختلف پرندگان در اقصی نقاط دنیا جریان دارد (۱۵).

همچنین تاچیل و همکاران (۲۰۰۷) جدایه‌های مزرعه‌ای و مرجع ORT را با روش‌های ERIC و RAPD (با استفاده از آغازگر M13) انگشت‌نگاری کرده و آن‌ها را به ترتیب در شش و ۱۰ پروفایل ژنتیکی مختلف تقسیم‌بندی نمودند. این محققین تکنیک M13 را در تمایز ژنتیکی سویه‌های ORT موفق‌تر از روش ERIC معرفی کردند (۲۵). در مطالعه دیگری، ارگانیش و همکاران (۲۰۱۳) جدایه‌های ORT حاصل از ماکیان و بوقلمون را در کشور ترکیه و با روش‌های الکتروفورز ژل پلی‌آکریل‌آمید (Sodium Dodecyl Sulfate) Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE و RAPD (با استفاده از آغازگر OPG11) بررسی کرده و آن‌ها را به ترتیب در ۱۹ پروفایل پروتئینی و هشت پروفایل ژنتیکی دسته‌بندی نمودند (۱۱). در پژوهشی همسو، زابو و همکاران (۲۰۱۷) ۳۷ جدایه ORT حاصل از گونه‌های مختلف پرندگان را در کشور مجارستان و با روش‌های ERIC و RAPD (با استفاده از آغازگرهای OPG11، OPH19 و M13) آزمایش کرده و دریافتند که تکنیک‌های ERIC و RAPD (با استفاده از آغازگر M13) به ترتیب جدایه‌ها را در ۱۳ و ۱۰ الگوی متفاوت تقسیم‌بندی نمودند، در حالی که آغازگرهای OPG11 و OPH19 برای تمایز این جدایه‌ها روش‌های مناسبی نبودند. این محققین

مقاومت آن‌ها نسبت به برخی از عوامل ضد میکروبی مهم می‌باشد که می‌تواند به دلیل استفاده بی‌رویه از عوامل ضد میکروبی مختلف برای درمان عفونت‌های ثانویه در گله‌های صنعتی پرورش طیور باشد.

روش‌های مولکولی از تکنیک‌های سریع، حساس و اختصاصی تعیین تیپ هستند که در کنار روش‌های سروتایپینگ، برای تکمیل انگشت‌نگاری و مقایسه تفاوت‌های سویه‌ای و گونه‌ای باکتری‌های مختلف از جمله ORT به کار می‌روند (۱۵). با استفاده از این روش‌ها می‌توان تفاوت منابع آلودگی را نیز تشخیص داد چرا که سویه‌های هر منطقه به یک الگوی ژنتیکی خاصی وابسته هستند (۱۵). این تکنیک‌ها قادرند بین سویه‌های یک سروتایپ ORT الگوهای متفاوت ژنتیکی را ایجاد نمایند که شباهت این الگوها وابستگی زیادی به موقعیت جغرافیایی جدایه‌های مورد مطالعه دارد که این امر می‌تواند سودمندی روش مولکولی ERIC-PCR را در مطالعات همه‌گیری شناسی ORT بیش از گذشته آشکار نماید (۲۵). تکنیک ERIC را می‌توان به عنوان روشی کارآمد و موثر و به‌عنوان جایگزینی برای شناسایی، ردیابی و بررسی تفاوت سویه‌های ORT استفاده نمود. در مطالعه جاری از این روش برای تعیین تیپ ژنتیکی ۱۴ جدایه ORT حاصل از گله‌های ماکیان صنعتی استان آذربایجان شرقی استفاده شده و این جدایه‌ها در دو الگوی ژنتیکی E1 و E2 دسته‌بندی شدند که اغلب جدایه‌ها در الگوی E1 قرار داشته و به یک پروفایل ژنتیکی وابسته بودند. آمونسن و همکاران (۱۹۹۷) سویه‌های ORT حاصل از گونه‌های مختلف پرندگان در کشورهای گوناگون را با روش ERIC بررسی کرده و آن‌ها را در هفت ژنوتیپ A تا G تقسیم‌بندی نمودند که فراوانی ژنوتیپ A بیش از سایرین بود (۲). کوگا و زوالتا (۲۰۰۵) نیز ۲۵ سویه

جدایه‌ها با روش ERIC-PCR، آن‌ها را در دو الگوی مولکولی متمایز نمود، با این‌همه اغلب جدایه‌ها به یک پروفایل ژنتیکی وابسته بودند. به نظر می‌رسد استفاده همزمان از روش مرسوم کشت باکتریایی و تکنیک‌های انگشت‌نگاری مولکولی، اطلاعات جامع و متقنی را درباره جداسازی، شناسایی و تیپ‌بندی ارگانسیم‌های جدا شده از پرندگان تحت مطالعه در یک منطقه بدست می‌دهد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان لازم می‌دانند از همکاری بی‌دریغ کارکنان بخش تحقیقات دامپزشکی معاونت پژوهشی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شمال غرب کشور تقدیر و تشکر نمایند.

منابع

1. Allymehr, M. (2006). Seroprevalence of *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in broiler and broiler breeder chickens in West Azerbaijan province, Iran. *Journal of Veterinary Medicine, A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine* **53**: 40-42.
2. Amonsin, A., Wellehan, J.F., Li, L.L., Vandamme, P., Lindemann, C., Edman, M., Robinson, R., Kapur, V. (1997). Molecular epidemiology of *Ornithobacterium rhinotracheale*. *Journal of Clinical Microbiology* **35**: 2894-2898.
3. Asadpour, Y., Banani, M., Pourbakhsh, S.A. (2011). Isolation, identification and antibiotic sensitivity determination of *Ornithobacterium rhinotracheale* in slaughtering broiler chicken flocks of Guilan province. *Iranian Journal of Veterinary Research* **12**: 345-349.
4. Banani, M., Pourbakhsh, S.A., Khaki, P. (2001). Characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolates from commercial chickens. *Archives of Razi Institute* **52**: 27-34.
5. Canal, C.W., Leão, J.A., Ferreira, D.J., Macagnan, M., Pippi Salle, C.T., Back, A. (2003). Prevalence of antibodies against *Ornithobacterium rhinotracheale* in broilers and breeders in southern Brazil. *Avian Diseases* **47**: 731-737.

گزارش کردند که تکنیک ERIC در بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های ORT و تقسیم‌بندی آن‌ها روش قدرتمندی به‌شمار می‌رود (۲۴).

در ایران تاکنون در خصوص تایپینگ سویه‌های باکتری ORT با روش‌های مختلف مولکولی از جمله ERIC-PCR پژوهشی انجام نیافته است. مطالعه حاضر، اولین گزارشی است که در آن سویه‌های ORT بدست آمده در مناطق شمال غرب کشور با این روش انگشت‌نگاری شده و پروفایل ژنتیکی آن‌ها مشخص گردید. در مطالعه مشابهی، بنانی و همکاران (۲۰۰۱) ۱۰۰ جدایه ORT حاصل از ماکیان صنعتی مناطق مختلف ایران را با روش سرولوژیک رسوب در ژل آگارز (Agar Gel SDS-Precipitation Test, AGPT) و تکنیک SDS-PAGE انگشت‌نگاری کرده و دریافتند که تمام سویه‌ها مربوط به سروتیپ A بوده و همگی آن‌ها در یک پروفایل پروتئینی قرار دارند (۴). نتایج ما نیز حاکی از تشابه ژنتیکی اغلب جدایه‌های ORT حاصل از ماکیان صنعتی منطقه شمال غرب کشور بود که از یکسو بیانگر ژنوتیپ واحد آن‌هاست و از سوی دیگر مشابهت بسیار بالای آن‌ها با ژنوتیپ A مورد اشاره در تحقیقات انجام یافته توسط آمونسن و همکاران (۱۹۹۷) و کوگا و زاولتا (۲۰۰۵) را نشان می‌دهد (۲ و ۱۵).

یافته‌های پژوهش حاضر نشان می‌دهد اگرچه باکتری ORT در گله‌های مرغ گوشتی تحت مطالعه نسبت به مرغان تخمگذار شیوع بالایی دارد، با این‌همه میزان جداسازی آن از ماکیان گوشتی و به‌ویژه تخمگذار صنعتی استان آذربایجان شرقی پایین است. همچنین نتایج این بررسی حاکی از حساسیت بالای جدایه‌های بدست آمده نسبت به پنی‌سیلین، تتراسایکلین و داکسی‌سایکلین و مقاومت آن‌ها نسبت به اریترومايسين و نئومايسين است. در مطالعه حاضر، انگشت‌نگاری

- Isolation of *Ornithobacterium rhinotracheale* from turkeys in Quebec, Canada. *Avian Diseases* **43**: 622-626.
15. Koga, Y., Zavaleta, A.I. (2005). Intraspecies genetic variability of *Ornithobacterium rhinotracheale* in commercial birds in Peru. *Avian Diseases* **49**: 108-111.
 16. Leroy-Sétrin, S., Flaujac, G., Thénaïsy, K., Chalus-Dancla, E. (1998). Genetic diversity of *Ornithobacterium rhinotracheale* strains isolated from poultry in France. *Letters in Applied Microbiology* **26**: 189-193.
 17. Mayahi, M., Gharibi, D., Ghadimipour, R., Talazadeh, F. (2016). Isolation, identification and antimicrobial sensitivity of *Ornithobacterium rhinotracheale* in broilers chicken flocks of Khuzestan, Iran. *Veterinary Research Forum* **7**: 337-342.
 18. Mirzaie, S., Hassanzadeh, M., Bozorgmehrfard, M.H., Banani, M. (2011). Isolation and characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* in the commercial turkey, quail flocks and domestic pigeons by bacteriological and molecular methods. *Archives of Razi Institute* **66**: 121-127.
 19. Ozbey, G., Ongor, H., Balik, D.T., Celik, V., Kilic, A., Muz, A. (2004). Investigations on *Ornithobacterium rhinotracheale* in broiler flocks in Elazig province located in the East of Turkey. *Veterinárni medicína* **49**: 305-311.
 20. Roussan, D.A., Al-Rifai, R.H., Khawaldeh, G.Y., Totanji, W.S., Shaheen, I. (2011). *Ornithobacterium rhinotracheale* and *Mycoplasma synoviae* in broiler chickens in Jordan. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* **30**: 931-937.
 21. Sakai, E., Tokuyama, Y., Nonaka, F., Ohishi, S., Ishikawa, Y., Tanaka, M., Taneno, A. (2000). *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in Japan: Preliminary investigations. *The Veterinary Record* **146**: 502-503.
 22. Schuijffel, D.F., Van Empel, P.C., Pennings, A.M., Van Putten, J.P., Nuijten, P.J. (2005). Successful selection of cross-protective vaccine candidates for *Ornithobacterium rhinotracheale* infection. *Infection and Immunity* **73**: 6812-6821.
 6. Chansiripornchai, N., Wanasawaeng, W., Sasipreeyajan, J. (2007). Seroprevalence and identification of *Ornithobacterium rhinotracheale* from broiler and broiler breeder flocks in Thailand. *Avian Diseases* **51**: 777-780.
 7. Chou, C.H., Lin, S.Y., Chen, C.L., Tsai, H.J. (2009). Use of random amplified polymorphic DNA analysis and single-enzyme amplified fragment length polymorphism in molecular typing of *Ornithobacterium rhinotracheale* strains. *Avian Diseases* **53**: 108-114.
 8. Devriese, L.A., Hommez, J., Vandamme, P., Kesters, K. (1995). In vitro antibiotic sensitivity of *Ornithobacterium rhinotracheale* strains from poultry and wild birds. *The Veterinary Record* **137**: 435-436.
 9. Doosti, A., Sharifzadeh, A., Ghasemi, H., Vaez, J. (2011). Molecular identification of *Ornithobacterium rhinotracheale* in turkeys in Isfahan province of Iran. *African Journal of Biotechnology* **10**: 7911-7914.
 10. Erganis, O., Hadimli, H.H., Kav, K., Çorlu, M., Ozturk, D. (2002). A comparative study on detection of *Ornithobacterium rhinotracheale* antibodies in meat type turkeys by dot immuno binding assay, rapid agglutination test and serum agglutination test. *Avian Pathology* **31**: 201-204.
 11. Erganis, O., Hadimli, H.H., Kav, K., Sayin, Z. (2013). Phenotypic and molecular characterization of strains of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolated from poultry in Turkey. *African Journal of Microbiology Research* **7**: 82-88.
 12. Fitzgerald, S.L., Greyling, J.M., Bragg, R.R. (1998). Correlation between ability of *Ornithobacterium rhinotracheale* to agglutinate red blood cells and susceptibility to fosfomycin. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research* **65**: 317-320.
 13. Hassanzadeh, M., Karimi, V., Fallah, N., Ashrafi, I. (2010). Molecular characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolated from broiler chicken flocks of Iran. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* **34**: 373-378.
 14. Joubert, P., Higgins, R., Laperle, A., Mikaelian, I., Venne, D., Silim, A. (1999).

23. Soriano, V.E., Vera, N.A., Salado, C.R., Fernandez, R.P., Blackall, P.J. (2003). In vitro susceptibility of *Ornithobacterium rhinotracheale* to several antimicrobial drugs. *Avian Diseases* **47**: 476-480.
24. Szabó, R., Wehmann, E., Makrai, L., Nemes, C., Gyuris, E., Thuma, A., Magyar, T. (2017). Characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* field isolates from Hungary. *Avian Pathology* **46**: 506-514.
25. Thachil, A.J., Velayudhan, B.T., Lopes-Berkas, V.C., Halvorson, D.A., Nagaraja, K.V. (2007). Application of polymerase chain reaction fingerprinting to differentiate *Ornithobacterium rhinotracheale* isolates. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **19**: 417-420.
26. Thieme, S., Mühldorfer, K., Lüscho, D., Hafez, M.H., Woo, P.C.Y. (2016a). Molecular characterization of the recently emerged poultry pathogen *Ornithobacterium rhinotracheale* by multilocus sequence typing. *PLoS ONE* **11**: e0148158.
27. Thieme, S., Hafez, M.H., Gutzer, S., Warkentin, N., Lüscho, D., Mühldorfer, K. (2016b). Multilocus sequence typing of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolated from pigeons and birds of prey revealed new insights into its population structure. *Veterinary and Animal Science* **1**: 15-20.
28. Tsai, H.J., Huang, C.W. (2006). Phenotypic and molecular characterization of isolates of *Ornithobacterium rhinotracheale* from chickens and pigeons in Taiwan. *Avian Diseases* **50**: 502-507.
29. Turan, N., Ak, S. (2002). Investigation of the presence of *Ornithobacterium rhinotracheale* in chickens in Turkey and determination of the seroprevalence of the infection using the enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian Diseases* **46**: 442-446.
30. Van Empel, P., Hafez, M.H. (1999). *Ornithobacterium rhinotracheale*: a review. *Avian Pathology* **28**: 217-227.

Pheno- and genotypic study of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolates in commercial poultry flocks of East Azarbaijan province, Iran

Ezdiyadi, M.¹; Khosropanah, M.K.^{*2}; Banani, M.³; Ghadimipour, R.⁴; Davari, K.⁵

1. PhD Student of Biochemistry, Department of Biology, Islamic Azad University of Sanandaj, Sanandaj, Iran
2. Assistant Professor, Department of Biology, Islamic Azad University of Sanandaj, Sanandaj, Iran
3. Assistant Professor, Department of Research and Development, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Marand, Iran
4. Associate Professor, Department of Avian Diseases, Research and Diagnosis, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
5. Assistant Professor, Department of Biology, Islamic Azad University of Sanandaj, Sanandaj, Iran

Received: 01 March 2020

Accepted: 01 September 2020

Abstract

Ornithobacterium rhinotracheale (ORT) is an organism associated with respiratory disease, decreased egg production, growth retardation and mortality in chickens and turkeys. The aim of the present study was isolation, identification, determination of the drug resistance pattern and molecular fingerprinting of the bacterium in commercial poultry flocks based on conventional bacterial method and polymerase chain reaction (PCR) technique, in East Azarbaijan province, North-West of Iran. Totally, 400 tracheal swab samples were collected from 33 slaughtered broiler flocks and seven layer flocks. Based on the results of this study, 14 isolates (4.2%) from tracheal swabs of five flocks (15.1%) out of 330 samples of broiler flocks were identified as ORT. None of studied layer flocks was ORT positive. According to the results of determination of the drug resistance pattern of the isolates by disk diffusion method, the highest drug susceptibility was to penicillin (85.7%), tetracycline (71.4%) and doxycycline (57.1%), respectively, and the highest antimicrobial resistance was against erythromycin (71.4%) and neomycin (50.0%). Based on the fingerprinting of the isolates by enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR, the isolates were typed into two E1 and E2 genetic patterns, most of which (n=13, 92.8%) were in E1 pattern. All strains isolated in this research were from broiler chicken flocks, which indicates the high rate of ORT isolation than those of understudy commercial layers poultries in East Azarbaijan province ($P < 0.05$). Also, our findings show that most of ORT isolates from commercial poultry in North-west Iran are genetically similar and depend on a specific genetic profile.

Keywords: *Ornithobacterium rhinotracheale*, Commercial poultry, Typing, PCR, East Azarbaijan, Iran.

*Corresponding author: Mohamad Karim Khosropanah

Address: Department of Biology, Faculty of Science, Islamic Azad University of Sanandaj, Sanandaj, Iran.

Email: khosropanah.mk@iausdj.ac.ir