JVM Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکروبیولوژی دامپزشکی/ دوره شانزدهم، شماره اول، ۱۳۹۹، پیاپی ۴۰: ۱۰۵-۹۱

مقاله پژوهشی

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

مهدی ازدیادی[۱]، محمدکریم خسروپناه*[۲]، منصور بنانی[۳]، رحیم قدیمی‌پور[٤]، کامبیز داوری[٥]

۱- دانشجوی دکترای 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

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

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

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۲/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۶/۱۱

چکیده

اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال (ORT) ارگانیسم 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 پلیمراز (PCR) بود. بدین منظور تعداد ۴۰۰ نمونه سواب نایی 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 رینوتراکئال* شناسایی شدند. همچنین یافته‌های پژوهش جاری مشخص نمود که هیچکدام از گله‌های مرغ تخمگذار تحت‌بررسی آلوده به این ارگانیسم 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 اریترومایسین (۷۱/۴ درصد) و نئومایسین (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 رینوتراکئال*، 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 رینوتراکئال (ORT) باکتری میله‌ای گرم منفی، دارای چندشکلی زیاد و غیرمتحرک است که موجب خسارت‌های قابل‌توجه اقتصادی در صنعت طیور می‌گردد (۲۴). مرور مطالعات انجام‌یافته حاکی از جداسازی این ارگانیسم 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*-پستیفر 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 ارگانیسم 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). به‌دنبال 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 PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Based PCR, ERIC-PCR) (۲۵)، تعیین توالی در چند ناحیه ژنی (Multilocus Sequence Typing, MLST) (۲۷)، پلی‌مورفیسم قطعات تکثیرشده تصادفی DNA (Random 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،

روش‌های سریع، حساس و اختصاصی هستند که برای بررسی، تایپینگ و مقایسه تفاوت‌های گونه‌های باکتریایی مختلف به‌کار 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 نیافته‌است. 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 پلیمراز (PCR)، طراحی گردید.

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 میکروب‌شناسی بخش پژوهش‌های دامپزشکی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شمال غرب کشور منتقل گردیدند.

جدول ۱- نتایج جداسازی و شناسایی *اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال* (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 پلیمراز (PCR)

منطقه (شهر)	شماره گله	تعداد مرغان گله	سن (روز)	وضعیت		تعداد نمونه	موارد مثبت (تعداد/درصد)
				سالم	دارای علائم تنفسی		
گله‌های مرغ گوشتی							
هشترود	۱	۱۳۰۰۰	۴۸	■	□	۱۰	۰
	۲	۱۶۰۰۰	۵۱	■	□	۱۰	۰
مرند	۳	۲۰۰۰۰	۵۲	■	□	۱۰	۰
	۴	۱۵۰۰۰	۵۰	□	■	۱۰	۰
تبریز	۵	۳۰۰۰۰	۵۲	■	□	۱۰	۱
	۶	۲۵۰۰۰	۴۸	□	■	۱۰	۴
	۷	۱۰۰۰۰	۴۸	■	□	۱۰	۰
	۸	۲۰۰۰۰	۵۰	■	□	۱۰	۰
شبستر	۹	۱۵۰۰۰	۵۰	■	□	۱۰	۰
	۱۰	۱۰۰۰۰	۴۵	□	■	۱۰	۰
	۱۱	۱۰۰۰۰	۴۸	■	□	۱۰	۰
مراغه	۱۲	۲۰۰۰۰	۴۸	■	□	۱۰	۰
ایلخچی	۱۳	۲۰۰۰۰	۵۰	□	■	۱۰	۰
سراب	۱۴	۲۰۰۰۰	۵۰	□	■	۱۰	۰
	۱۵	۱۵۰۰۰	۵۰	■	□	۱۰	۰
	۱۶	۱۰۰۰۰	۴۵	■	□	۱۰	۰
بستان آباد	۱۷	۱۷۰۰۰	۵۰	■	□	۱۰	۰
	۱۸	۱۰۰۰۰	۵۰	■	□	۱۰	۰
	۱۹	۱۵۰۰۰	۴۸	■	□	۱۰	۰
	۲۰	۳۰۰۰۰	۵۰	□	■	۱۰	۰
اهر	۲۱	۲۲۰۰۰	۵۰	■	□	۱۰	۰
	۲۲	۱۵۰۰۰	۴۲	■	□	۱۰	۰

هریس	۲۳	۱۰۰۰۰	٤٥	■	□	۱۰	۰
صوفیان	۲٤	۲۰۰۰۰	٥۰	■	□	۱۰	۰
	۲٥	۱٥۰۰۰	٥۰	■	□	۱۰	۲
شرفخانه	۲٦	۱٥۰۰۰	٤۷	■	□	۱۰	۰
خسروشهر	۲۷	۲۰۰۰۰	٤۸	■	□	۱۰	۰
	۲۸	۱۲۰۰۰	٥۰	□	■	۱۰	٤
ملکان	۲۹	۲٥۰۰۰	٥۰	■	□	۱۰	۰
عجب شیر	۳۰	۱۸۰۰۰	٥۰	■	□	۱۰	۳
تسوج	۳۱	۱۰۰۰۰	٥۰	□	■	۱۰	۰
خواجه	۳۲	۱۳۰۰۰	٤۸	■	□	۱۰	۰
تیکمه داش	۳۳	۲۰۰۰۰	٥۰	□	■	۱۰	۰
مجموع						۳۳۰	۱٤ (٪ ٤/۲)
گله‌های مرغ تخمگذار							
تبریز	۳٤	۱۰۰۰۰	۲٥۲	■	□	۱۰	۰
	۳٥	۱٥۰۰۰	۳۰۱	□	■	۱۰	۰
	۳٦	۱۲۰۰۰	٤۲۰	□	■	۱۰	۰
	۳۷	۲٥۰۰۰	۲۲٤	■	□	۱۰	۰
	۳۸	۳۰۰۰۰	۳۰۸	■	□	۱۰	۰
	۳۹	۱٥۰۰۰	۳۷۱	□	■	۱۰	۰
	٤۰	۲٥۰۰۰	٤۹۰	□	■	۱۰	۰
مجموع						۷۰	۰/۰ (٪ ۰/۰)
جمع کل						٤۰۰	۱٤ (٪ ۳/٥)

کشت باکتریایی و آزمایش‌های بیوشیمیایی

نمونه‌ها بر روی محیط آگار خون‌دار گوسفندی (پنج درصد) حاوی ۵/۲ میکروگرم جنتامایسین در هر میلی‌لیتر کشت‌شده و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد که حاوی ۷/۵ درصد دی‌اکسید کربن بود به مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند؛ به‌دنبال 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 کاتالاز، اکسیداز، تولید اندول، تولید اوره‌آز، تحرک، احیای نیترات و رشد بر روی آگار مک‌کانکی و محیط سه‌قندی آهن‌دار (TSI) استفاده شد. به‌منظور 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 قرارگرفتند (جدول ۲) (۱۴). جدایه‌های مشکوک به ORT برای ادامه بررسی‌ها در محیط نگه‌دارنده (Skim Milk) و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره‌سازی شدند (تمام محیط ها ساخت شرکت مرک، آلمان).

جدول ۲- نتایج آزمایش تعیین الگوی مقاومت دارویی ۱٤ جدایه *اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال* (ORT) حاصل از گله‌های ماکیان صنعتی استان آذربایجان شرقی در فصل‌های بهار و تابستان سال ۱۳۹۸

عامل ضدمیکروبی	تعداد (درصد)		
	حساس	حساسیت متوسط	مقاوم
اریترومایسین (15µg)	۱ (۷/۱)	۳ (۲۱/۴)	۱۰ (۷۱/۴)
نالیدیکسیک اسید (30µg)	۲ (۱۴/۲)	۸ (۵۷/۱)	۴ (۲۸/۵)
جنتامایسین (10µg)	۱ (۷/۱)	۷ (۵۰/۰)	۶ (۴۲/۸)
نئومایسین (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)
کلوگزاسیلین (1µg)	۶ (۴۲/۸)	۲ (۱۴/۲)	۶ (۴۲/۸)

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 بدست‌آمده بوسیله دستگاه ترموبلاک (کیاژن، ایران) به مدت پنج دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد جوشانده شد. تعلیق به‌دست 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 وان امپل و حافظ (۱۹۹۹) طراحی شده بودند، مورد استفاده قرار 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 (مسترمیکس سیناکلون، ایران، حاوی PCR buffer، $MgCl_2$، dNTPs 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 استخراج‌شده، 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 طویل‌سازی به مدت دو دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد، به تعداد ۳۰ چرخه و در انتها یک مرحله طویل‌سازی نهایی به

مدت پنج دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. پس از طی‌شدن 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 تاییدشده باکتری ORT به‌عنوان شاهد مثبت (تهیه‌شده از کلکسیون کشت میکروبی آزمایشگاه باکتری‌شناسی بخش تحقیقات بیماری‌های طیور موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج، ایران) و آب DEPC به‌عنوان شاهد منفی در ژل آگارز یک درصد حاوی ۰/۵ میکروگرم رنگ ایمن در هر میلی‌لیتر (سیناکلون، ایران) در ولتاژ ۸۵ ولت به مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز شد و در دستگاه ژل داک (Kodak، ایالات متحده آمریکا) باندهای تشکیل‌شده مشاهده گردید. در صورت مشاهده باند ۷۸۴ جفت بازی، جدایه موردنظر باکتری ORT در نظر گرفته‌شد.

آزمایش تعیین الگوی مقاومت دارویی

برای تعیین الگوی مقاومت دارویی جدایه‌ها از روش انتشار دیسک استفاده‌شد (۲۸). در این روش ابتدا پرگنه‌های رشدیافته در محیط آگار خون‌دار به لوله‌های حاوی محیط تریپتیکاز سویا براث (TSB) منتقل شدند. محیط‌ها به انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد منتقل شده و به مدت هشت ساعت در این دما گرم‌خانه‌گذاری شدند تا غلظت میکروبی آن‌ها معادل کدورت استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند شود. با سواب استریل از سوسپانسیون داخل لوله‌ها اخذشده و در محیط کشت آگار مولر هینتون که به آن پنج درصد خون گوسفندی اضافه شده‌بود، کشت سفره‌ای داده شد؛ سپس دیسک‌های حاوی ۱۰ آنتی‌بیوتیک مختلف (پادتن طب، ایران) بر روی این محیط‌ها قرارگرفتند. پس از ۴۸ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، برای اندازه‌گیری قطر هاله ممانعت از رشد و تفسیر نتایج بدست‌آمده، جدایه‌های مورد مطالعه به سه گروه حساس (S)، با حساسیت متوسط (I) و مقاوم (R) دسته‌بندی شدند (جدول ۳).

انگشت‌نگاری سویه‌ها به روش ERIC-PCR

برای تایپینگ جدایه‌های تاییدشده به روش ERIC-PCR از یک تک آغازگر که توسط تاچیل و همکاران (۲۰۰۷) استفاده شده‌بود، بهره‌برداری شد (۲۵). توالی نوکلئوتیدی این آغازگر به ترتیب زیر بود:

ERIC 1R 5-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC-3

واکنش PCR با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل مسترمیکس آماده (BIONEER، کره جنوبی، حاوی ۴۰ میلی‌مولار از PCR buffer، ۱/۵ میلی‌مولار 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 استخراج‌شده، انجام‌گردید. برنامه دمایی PCR شامل مرحله واسرشت اولیه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، سپس چرخه‌های متوالی شامل مرحله واسرشت به مدت ۴۵ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، مرحله اتصال به مدت سه دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و مرحله طویل‌سازی به مدت چهار دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد، به تعداد ۳۵ چرخه و در انتها یک مرحله طویل‌سازی نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. پس از طی‌شدن مراحل دمایی و تکثیر احتمالی ژن‌های هدف، در نهایت هشت میکرولیتر از محصول PCR در کنار

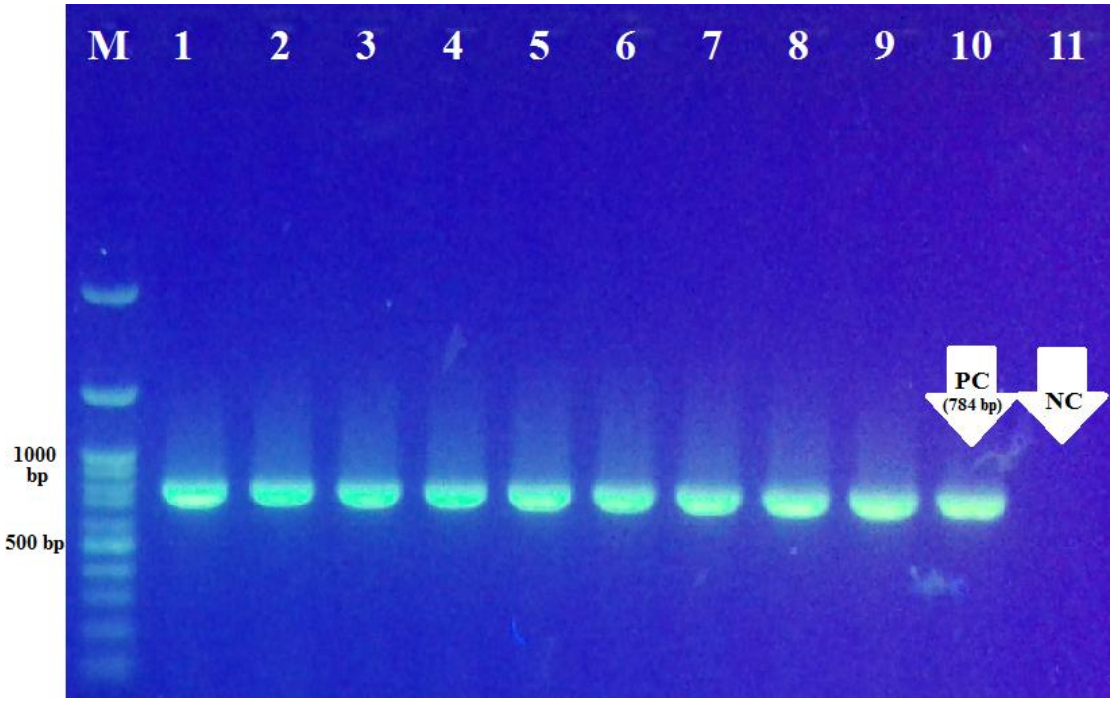
نردبان ژنی ۱۰۰۰ جفت یازی (سیناکلون، ایران) و سویه تاییدشده باکتری ORT به‌عنوان شاهد مثبت و آب DEPC به‌عنوان شاهد منفی در ژل آگارز دو درصد حاوی ۰/۵ میکروگرم رنگ ایمن در هر میلی‌لیتر (سیناکلون، ایران) در ولتاژ ۷۵ ولت به مدت ۱۲۰ دقیقه الکتروفورز شد و در دستگاه ژل داک (Kodak، ایالات متحده آمریکا) باندهای تشکیل‌شده مشاهده گردید.

آنالیز آماری

یافته‌های حاصل از آزمون‌ها توسط ویرایش ۱۷ نرم‌افزار SPSS و بهره‌گیری از آمار توصیفی و آزمون‌های دقیق مربع کای و فیشر تجزیه و تحلیل شده و $P < ۰/۰۵$ مبنای اختلاف معنی‌دار درنظر گرفته‌شد.

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 رینوتراکئال* 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).



شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز یک درصد، رنگ‌آمیزی شده با رنگ ایمن. چاهک M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، چاهک‌های ۹-۱: جدایه‌های *اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال* (ORT) (قطعه ۷۸٤ جفت بازی ژن 16SrRNA این ارگانیسم)، چاهک ۱۰: شاهد مثبت (باکتری ORT تاییدشده با کمک آزمایش‌های بیوشیمیایی و آنتی‌سرم اختصاصی سروتیپ A)، چاهک ۱۱: شاهد منفی (آب DEPC).

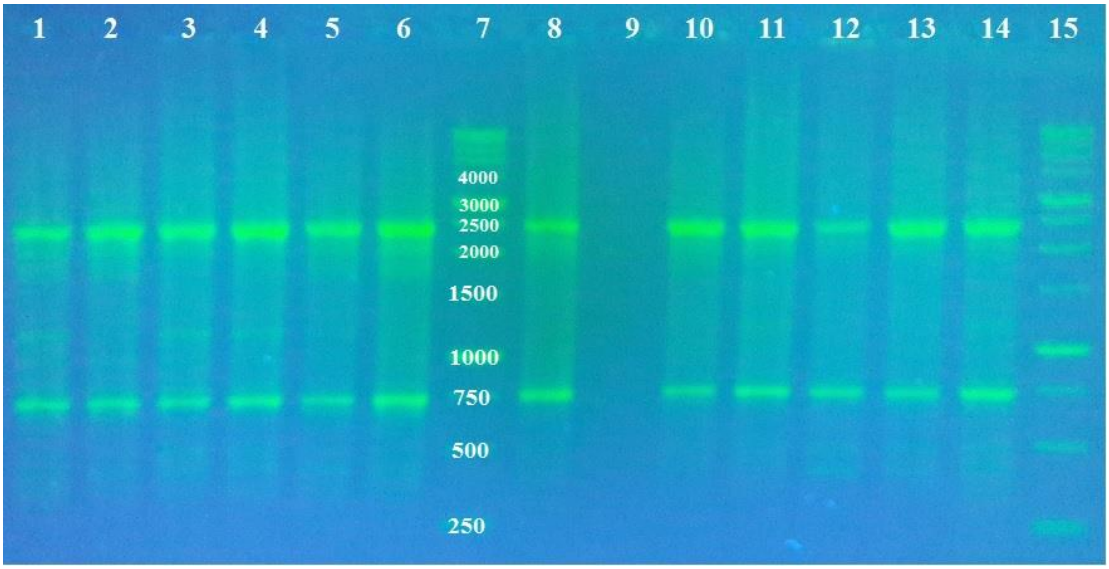
این جدایه‌ها در محیط آگار خون‌دار دارای پرگنه‌های خاکستری متمایل به سفید و نوک سنجاقی بوده و فاقد قدرت همولیز بودند ولی در محیط‌های آگار TSI و آگار مک‌کانکی قادر به رشد نبودند. بر پایه آزمایش‌های بیوشیمیایی انجام‌یافته، اجرام جداسازی شده از نظر ژلاتیناز، اوره‌آز، کاتالاز و اندول منفی ولی از نظر آزمون اکسیداز مثبت بودند. این جدایه‌ها تمام قندهای موردآزمایش به‌غیر از سوربیتول

را تخمیر کردند. همچنین یافته‌های این مطالعه مشخص نمود که از مجموع ۷۰ نمونه سواب نایی حاصل از گله‌های مرغ تخمگذار تحت‌بررسی 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 اریترومایسین (۷۱/۴ درصد) و نئومایسین (۵۰/۰ درصد) است. همچنین اغلب جدایه‌ها نسبت به تری‌متوپریم سولفامتوکسازول (۶۴/۲ درصد) و نالیدیکسیک اسید (۵۷/۱ درصد) حساسیت متوسطی نشان دادند (جدول ۲). انگشت‌نگاری ۱۴ جدایه ORT این مطالعه با روش 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 قرارداشته و حاوی هفت باند ۳۴۰ تا ۲۴۰۰ جفت بازی بودند، درحالی‌که فقط یک جدایه (۷/۱ درصد) (ORT14/98R) از خسروشهر متعلق به الگوی ژنتیکی E2 بوده و دو باند ۷۰۰ و ۲۰۵۰ جفت‌بازی را نشان داد (جدول ۳).

جدول ۳- نتایج انگشت‌نگاری ۱۴ جدایه *اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال* (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
صوفیان/مرغ گوشتی		۲			
عجب‌شیر/مرغ گوشتی		۳			
خسروشهر/مرغ گوشتی		۳			
خسروشهر/مرغ گوشتی	E2	۱	۱ (۷/۱)	۷۰۰-۲۰۵۰	II

بارزترین باندهای الگوی E1 شامل ۷۰۰ و ۲۴۰۰ جفت باز بودند که علت آن می‌تواند وجود بیش از چند کپی از آن‌ها در ژنوم باکتری باشد. صحه‌گذاری نتایج آزمایش با سه تکرار مورد تایید قرارگرفت (شکل ۲).



شکل ۲- الگوهای ژنتیکی ERIC-PCR جدایه‌های *اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال* بر روی ژل آگارز دو درصد، رنگ‌آمیزی شده با رنگ ایمن. چاهک‌های ۷ و ۱۵: مارکر ۱۰۰۰ جفت بازی، چاهک‌های ٦-۱ و ١٤-۸: جدایه‌های ORT تحت‌مطالعه، جدایه چاهک ۹ (ORT14/98R) الگوی ژنتیکی متفاوتی را نسبت به بقیه جدایه‌ها نشان داده‌است.

در پژوهش جاری، جدایه‌های ORT بدست‌آمده 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 مرغان 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 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 شمال‌غرب 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 ارگانیسم نیز مخصوص این بیماری نبوده و از این‌رو 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 گزارش‌شده در این مطالعات بسته به منطقه و نیز گونه پرنده تحت‌بررسی 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 به‌دست آمد در حالی‌که هیچکدام از نمونه‌های اخذشده از گله‌های مرغ تخمگذار آلوده به این باکتری نبودند. یافته‌های این پژوهش نشان می‌دهد اگرچه ارگانیسم در گله‌های مرغ گوشتی نسبت به مرغان 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 مرغان 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 ارگانیسم ORT اعلام نمودند (۳). در مقایسه با نتایج این محققین، یافته‌های پژوهش حاضر حاکی از شیوع نسبتا بالای باکتری ORT در گله‌های مرغان گوشتی استان آذربایجان شرقی است. این در حالی‌است که دوستی و همکاران (۲۰۱۱) ۱۹/۹۳ درصد از نمونه‌های نای و ریه گله‌های 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 عالی‌مهر (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 مرغان 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 نایی 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 به‌نظر می‌رسد (۱۹). در نمونه‌های آلوده، این جرم توسط سایر ارگانیسم‌های 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 قرارگیرد. دامنه مقاومت سویه‌های باکتری ORT به عوامل مختلف ضدمیکروبی 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 اریترومایسین و نئومایسین بود. وان امپل و حافظ (۱۹۹۹) گزارش کردند که ۹۰ تا ۱۰۰ درصد سویه‌های آلمانی ارگانیسم نسبت به نئومایسین، 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 ریز رقت‌سازی براث، حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی (MIC) فسفومایسین بر روی ۱۵ جدایه تحت‌آزمایش را ۱۲۸ µg/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، اریترومایسین 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 لینکومایسین گزارش کردند (۸). به نظر می‌رسد بسته به منطقه جداسازی سویه‌های ORT، این ارگانیسم‌ها الگوی حساسیت بسیار متغیری را نسبت به عوامل ضدمیکروبی 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 فسفومایسین، سولتریم و جنتامایسین شناسایی کردند (۱۷). از سوی دیگر، اسدپور و همکاران (۲۰۱۱) همه جدایه‌های این ارگانیسم 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 ضدمیکروبی خوبی را نسبت به همه جدایه‌های باکتری ORT نشان دادند (۱۸). مقایسه الگوی مقاومت دارویی جدایه‌های پژوهش حاضر با نتایج مطالعات پیشین حاکی از

مقاومت آن‌ها نسبت به برخی از عوامل ضدمیکروبی مهم می‌باشد که می‌تواند به دلیل استفاده بی‌رویه از عوامل ضدمیکروبی 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 به‌کار 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 سروتیپ ORT الگوهای متفاوت ژنتیکی را ایجاد نمایند که شباهت این الگوها وابستگی زیادی به موقعیت جغرافیایی جدایه‌های موردمطالعه 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. آمونسین 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 زاوالتا (۲۰۰۵) نیز ۲۵ سویه 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 حالی‌که آغازگرهای OPG11 و OPH19 برای تمایز این جدایه‌ها روش‌های مناسبی نبودند. این محققین

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 بدست‌آمده 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 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 قراردارند (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 انجام‌یافته توسط آمونسین و همکاران (۱۹۹۷) و کوگا و زاوالتا (۲۰۰۵) را نشان می‌دهد (۲ و ۱۵).

یافته‌های پژوهش حاضر نشان می‌دهد اگرچه باکتری ORT در گله‌های مرغ گوشتی تحت‌مطالعه نسبت به مرغان تخمگذار شیوع بالایی دارد، بااین‌همه میزان جداسازی آن از ماکیان گوشتی و به‌ویژه تخمگذار صنعتی استان آذربایجان شرقی پایین است. همچنین نتایج این بررسی حاکی از حساسیت بالای جدایه‌های بدست‌آمده نسبت به پنی‌سیلین، تتراسایکلین و داکسی‌سایکلین و مقاومت آن‌ها نسبت به اریترومایسین و نئومایسین است. در مطالعه حاضر، انگشت‌نگاری 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 ارگانیسم‌های جداشده از پرندگان تحت‌مطالعه 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 شمال‌غرب 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.

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., Thénaisy, K., Chaslus-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., Hassanzdeh, M., Bozorgmehrifard, 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. *Veterinární 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., Lüschow, 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., Lüschow, 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.