نشریه دامپزشکی
در
پژوهش و سازندگی شماره ۱۱۳ زمستان ۱۳۹۵

شناسائی ملکولی و حساسیت آنتی بیوتیکی *اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال* در گله‌های گوشتی کشتاری استان گلستان

• **یداله اسدپور (نویسنده مسئول)**
بخش تحقیقات دامپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گیلان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران
• **احمدعلی فیوضی یوسفی**
بخش تحقیقات دامپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی ، گرگان، ایران
منصور بنانی
بخش تحقیق و تشخیص بیماریهای طیور، مؤسسه تحقیقات واکسن و سر م سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی ، کرج، ایران

تاریخ دریافت: آبان ۹۴ تاریخ پذیرش: دی ۹۴
Email: yasadpour@yahoo.com

چکیده

اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال **(ORT) یک باکتری گرم منفی بوده که باعث ایجاد اختلالات تنفسی، کاهش رشد و افزایش تلفات در مرغداری‌های تجاری می‌گردد. هدف از مطالعه حاضر جداسازی، تشخیص مولکولی *اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال* به روش واکنش زنجیره پلی مراز و تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی بود. در این مطالعه از تعداد ۵۰ گله گوشتی در سن کشتار از ۹ کشتارگاه تعداد ۵۱۳ نمونه (نای، ریه، سینوس زیرچشمی) جمع آوری شد. با استفاده از پرایمر اختصاصی در واکنش زنجیره پلی مراز، قطعه ۷۸۴ جفت باز که بر روی ژن 16S rRNA قرار دارد در تعداد ۲۹ گله (۵۸ درصد) تکثیر و باند مشاهده شد. حساسیت باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج با استفاده از روش انتشار از دیسک مورد سنجش قرارگرفت. تمامی جدایه‌ها (۱۰۰درصد) به آنتی‌بیوتیک‌های فلورفنیکل، تیامولین، پنی‌سیلین، آموکسی‌سیلین، آمپی‌سیلین، تایلوزین حساس و به آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین، استرپتومایسین، سولفامتوکسازول‌تری-متوپریم، جنتامایسین، باسیتراسین، نئومایسین و کلیستین مقاوم بودند. نتایج نشان داد که میزان آلودگی عفونت ORT در گله‌های گوشتی استان گلستان بالا می‌باشد.**

کلمات کلیدی: *اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال*، PCR ، مقاومت آنتی بیوتیکی، گلستان

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 113 pp: 31-37

Molecular detection and antibiotic susceptibility of *Ornithobacterium rhinotracheale* in slaughtered broiler flocks of Golestan province

By: Asadpour, Y., (Corresponding Author)Veterinary Research Department, Gilan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Rasht, Iran. Fiuzi yousefi, A. A., Golestan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Gorgan, Iran. and banani. M., Department of Research and Diagnosis of Poultry Disease Razi Vaccine and Serum Research Institute , AREEO, karaj, Iran.

Received: October 2015 Accepted: December 2015

Email: yasadpour@yahoo.com

Ornitobacterium rhinotracheale (ORT) is a gram-negative bacterium which causes respiratory disease and reduced flock performance in commercial poultry farms. The aim of the present study was molecular detection and determination of antibiotic susceptibility of ORT in broiler flocks of Golestan province. In this study, 513 samples were taken from trachea, lung and infraorbital sinuses of 50 broiler flocks from 9 poultry abattoirs of Golestan province. Out of 29 flocks(58%) were detected against to *Ornitobacterium rhinotracheale* infection with using specific primers of ORT in PCR method was amplified A 784 bp fragment of the 16SrRNA gene. Antimicrobial susceptibility test using standard disk diffusion technique was performed with 16 antibiotics. All isolates were susceptible (100%) to: Florfenicol, Tiamulin, Tylosin, Penicillin, Amoxicillin, Ampicillin. Also100% of the isolates were resistant to: Erythromycine, Streptomycin, Gentamycin, Colistin, Neomycin, Sulfamethoxazole + Trimetoprim, Bacitracin. The results showed that prevalence rate of ORT infection was high in Golestan province.

Key words: *Ornitobacterium rhinotracheale,* PCR, Antibiotic resistance ,Golestan

مقدمه

استان گلستان با داشتن ۷۴۳ واحد مرغ گوشتی به ظرفیت حدود ۱۸ میلیون قطعه جوجه‌ریزی در هر دوره، تولید ۱۱۴ هزار تن گوشت مرغ و دارای آب و هوایی مناسب به عنوان یکی از قطب‌های پرورش جوجه گوشتی کشور بشمار می‌آید (۱۰). رشد سریع این صنعت با مشکلات خاص خود از جمله بیماری‌های طیور همراه بوده و از عفونت‌هایی که درکمپلکس‌های تنفسی نقش بسیار مهمی ایفا می‌نماید، عفونت *اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال* می‌باشد. سرعت گسترش این عامل عفونی در صنعت طیور و خسارت‌های اقتصادی ناشی از آن در ماکیان تجاری شامل: افزایش میزان تلفات، بالارفتن هزینه‌های درمان، افزایش موارد حذف کشتارگاهی لاشه، کاهش میزان تولید تخم‌مرغ، کاهش کیفیت پوسته تخم‌مرغ و کاهش رشد می‌باشد. تورم‌کیسه‌های هوایی و پنومونی یک‌طرفه و یا دوطرفه شایع‌ترین علائم کالبدگشایی اورنیتوباکتریوز است ولی سایر علائم بیماری مثل تراکئیت، سینوزیت، پریکاردیت و حتی‌آرتریت و مننژیت نیز گزارش شده است (۶ و۲۱). اولین جداسازی و شناسائی *اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال* در طیور صنعتی توسط بنانی و همکاران (۲۰۰۰) از یک گله گوشتی و یک گله نیمچه تخم‌گذار بوده است (۴). شیوع ORT در کشور در مطالعات مختلفی که صورت گرفته متفاوت بوده است. قائم مقامی و همکاران (۲۰۰۷) در استان مرکزی (۹) ، حقیقی خوشخو و همکاران (۲۰۰۸) در استان تهران (۱۱) ، کلیدری و همکاران (۲۰۰۸) در مشهد (۱۳) ، نیک پیران و همکاران (۲۰۱۱) در استان اردبیل (۱۴) ، میزان آلودگی در گله های گوشتی به ORT را بترتیب ۹/۸، ۵۰ ، ۹۷/۶۳ و۷۲/۲ درصد گزارش کرده اند. در استان گیلان آلودگی گله مرغ مادر به اورنیتوباکتریوم۱۰۰ درصد بوده همچنین آلودگی در گله‌های گوشتی ۳۰/۴۴ درصد بود (۲). بعد از واکسیناسیون گله‌های مادر، آلودگی در گله‌های گوشتی ۱۷/۲ درصد گزارش گردید (۳). با توجه به گزارشات چند ساله اخیر درکشور مبنی بر شیوع عفونت *اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال* و عدم اطلاع از وضعیت آن درگله‌های طیورگوشتی استان گلستان، ضرورت تحقیق حاضر مبنی بر جداسازی و تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌هایORT احساس گردید و با توجه به شباهت کلینیکی و کالبدگشائی این عفونت با سایر بیماریهای طیور، تایید تشخیص جدایه‌ها باروش PCR انجام شد.

مواد و روش کار

الف - نمونه‌برداری

با هماهنگی اداره کل دامپزشکی استان و مسئولین فنی ۹ واحد کشتارگاهی از ۵۰ گله گوشتی با تاریخچه علائم تنفسی در طول دوره پرورش و در سنین ۸-۶ هفتگی تعداد ۵۳۱ نمونه شامل نای، ریه و سر (سینوس زیر چشمی) بطور تصادفی جمع‌آوری شد. نمونه‌ها تا زمان ارسال به موسسه

تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری و سپس در کنار یخ انتقال داده شدند.

ب- کشت میکروبی

نمونه‌ها در محیط آگار حاوی ۵ درصد خون گوسفند و مقدار ۵ میکروگرم به ازاء هر میلی لیتر جنتامایسین کشت داده شد و ۴۸-۲۴ ساعت در انکوباتور CO_2 نگهداری گردید. برای تهیه کشت یکنواخت از پرگنه‌های مشکوک به اورنیتوباکتریوم که ریز - شبنمی شکل بودند به صورت خطی در محیط آگار خوندار حاوی جنتامایسین کشت داده شد. با توجه به اینکه جهت تشخیص قطعی، نمونه ها باید PCR می‌شدند تنها دو خصوصیت مهم بیوشیمیایی اکسیداز و کاتالاز مورد بررسی قرار گرفت. پرگنه‌های اکسیداز مثبت و کاتالاز منفی در لوله حاوی آبگوشت مغز و قلب براث (BHI) جهت انجام آزمایش PCR در انکوباتور نگهداری شدند.

ج- حساسیت آنتی بیوتیکی

برای تعیین حساسیت باکتری به صورت کیفی از روش استاندارد کربی-بوئر با ۱۶ دیسک تجاری (شرکت پادتن طب، ایران) استفاده شد. بر اساس تشکیل قطر هاله روشن در اطراف دیسک، توسط خط‌کش بر حسب میلی‌متر اندازه گیری شده و سپس تفسیر قطر هاله روشن با کمک جدول استاندارد بصورت حساس (S)، نیمه حساس (IM) و مقاوم (R) انجام شد.

د- روش ملکولی

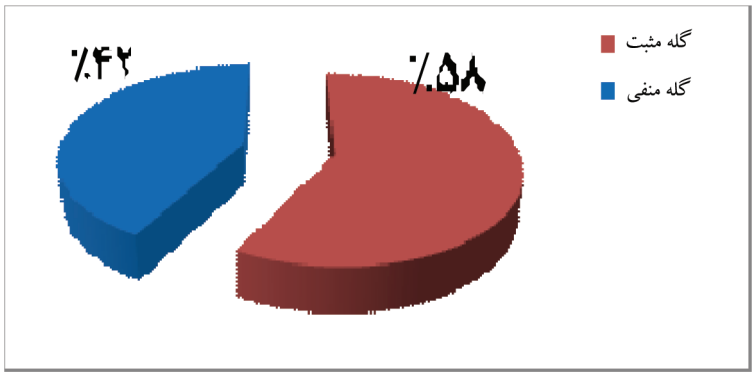
۰/۵ سی سی از لوله‌های حاوی پرگنه و BHI بعد از قرار دادن در شیکر به میکروتیوب ۱/۵ میکرولیتر منتقل شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۱۳۰۰۰ سانتریفوژ گردید، سپس محلول رویی تخلیه و رسوب باقیمانده با ۱۰۰ میکرولیتر (هم حجم رسوب) بافر لیز کننده:

(Proteinase K 200µg/ ml, EDTA 1m M, SDS1% 10mM) Tris (pH=8)

بخوبی مخلوط و ۴ ساعت در بن ماری ۵۶ درجه سانتی گراد قرار داده شد. هم حجم آن محلول فنل اشباع اضافه و با ورتکس کاملاً مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۱۳۰۰۰ سانتریفوژ، فنل از فاز آبی جدا گردید. محلول فنل و کلروفرم با حجم مساوی، به مایع رویی اضافه گردید و پس از مخلوط کردن و تکان دادن، نمونه در دور ۱۳۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد و فاز رویی به میکروتیوب جدید منتقل و هم حجم با فاز رویی، کلروفرم اضافه شد و با ورتکس کاملاً مخلوط گردید و سپس نمونه به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۳۰۰۰ سانتریفوژ گردید. مقدار ۰/۱ حجم، استات سدیم ۳ مولار به فاز رویی اضافه شد و پس از مخلوط کردن به میزان دو برابر حجم نمونه به آن اتانول مطلق اضافه گردید و به مدت ۲۰ دقیقه نمونه در سرمای ۲۰- درجه سانتی گراد قرار داده شد. پس از زمان انکوباسیون در سرما، نمونه به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۱۳۰۰۰ سانتریفوژ گردید تا DNA غیر محلول رسوب نماید. سپس محلول قبلی کاملاً تخلیه گردید. در مرحله رسوب داده شده، با الکل اتانول ۷۰ درجه شستشو گردید، DNA بعدی این مرحله با اضافه نمودن ۲۰۰ میکرولیتر الکل ۷۰ درجه به رسوب، سر و ته کردن لوله و سپس سانتریفوژ به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۳۰۰۰ انجام مقدار ۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه نموده و تا زمان DNA شد. به با استفاده از پرایمرهای PCR.آزمایش در داخل یخچال نگهداری گردید اختصاصی طراحی شده (۲۱) در حجم ۲۵ میکرولیتر(۲/۵ میکرولیتر بافر PCR ۱۰X، ۲ میلی مول ۱/۵MgCl ، میکرو لیتر ۰/۵DNTP ۱۰mM، ۰/۵ پلی مراز، ۱+۱ پیکومول از هر کدام از پرایمرها، ۴ Taq میکرو لیتر آنزیم PCR الگو و۱۴ میکرولیتر آب مقطر استریل) و با مراحل DNA میکرولیتر بصورت واسرشت ابتدایی ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه، ۴۰ سیکل اصلی با واسرشت ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال ۵۳ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، ساخت ۷۲ درجه به مدت ۲ دقیقه و بسط انتهایی ۷۲ درجه به مدت ۷ دقیقه با استفاده از پرایمرهای اختصاصی 'OR16S-F 1(5-GAG AAT TAA TTT ACG GAT TAAG-3 و 'OR16 S-R1 (5- TTC GCT TGG TCT CCGAAGAT - 3 انجام شد.

نتایج

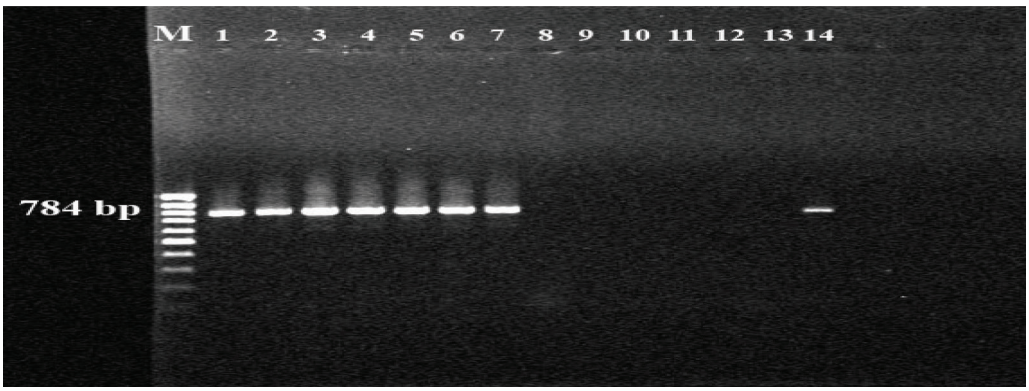
به نمودار، جدول و شکل مراجعه شود.



نمودار ۱- میزان درصدآلودگی گله‌های گوشتی به عفونت اورنیتوباکتریوم در استان گلستان

جدول ۱ - حساسیت آنتی بیوتیکی ۱۰ جدایه *اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال* از گله‌های گوشتی کشتاری استان گلستان

ردیف	آنتی بیوتیک (غلظت دیسک به میکروگرم)	تعداد جدایه های حساس (درصد)	تعداد جدایه های نیمه حساس (درصد)	تعداد جدایه های مقاوم (درصد)
۱	فلورفنیکل(۳۰)	۱۰ (٪۱۰۰)	-	-
۲	تیامولین (۳۰)	۱۰ (٪۱۰۰)	-	-
۳	پنی سیلین (۱۰)	۱۰ (٪۱۰۰)	-	-
۴	آموکسی سیلین(۲۵)	۱۰ (٪۱۰۰)	-	-
۵	آمپی سیلین (۱۰)	۱۰ (٪۱۰۰)	-	-
۶	تایلوزین(۱۰)	۱۰ (٪۱۰۰)	-	-
۷	لینکواسپکتین (۱۵/۲۰۰)	۸ (٪۸۰)	۲ (٪۲۰)	-
۸	فلومکوئین(۳۰)	-	۲ (٪۲۰)	۸ (٪۸۰)
۹	اوفلوکساسین(۵)	۳ (٪۳۰)	۲ (٪۲۰)	۵ (٪۵۰)
۱۰	اریترومایسین (۱۵)	-	-	۱۰ (٪۱۰۰)
۱۱	استرپتومایسین (۱۰)	-	-	۱۰ (٪۱۰۰)
۱۲	باسیتراسین(۱۰)	-	-	۱۰ (٪۱۰۰)
۱۳	سولفامتوکسازول+ تری متوپریم(۲۳/۷۵)	-	-	۱۰ (٪۱۰۰)
۱۴	نئومایسین (۳۰)	-	-	۱۰ (٪۱۰۰)
۱۵	کلیستین (۱۰)	-	-	۱۰ (٪۱۰۰)
۱۶	جنتامایسین (۱۰)	-	-	۱۰ (٪۱۰۰)



شکل ۱- الکترفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ ٪، رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید M - مارکر با وزن ملکولی ۱۰۰ جفت باز، ۷-۱ نمونه‌های مثبت، ۱۲-۸ نمونه های منفی، ۱۳- کنترل منفی (آب مقطر)
۱۴- کنترل مثبت

بحث

اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال یکی از عوامل باکتریایی بوده که در سال‌های اخیر در خیلی از کشورهای دنیا شناسایی شده و در کمپلکس‌های تنفسی طیور باید مورد توجه قرارگیرد، با توجه به سرعت گسترش بیماری در کشور و علاقمندی به شناخت بیشتر آن، مطالعه فوق صورت گرفت. نظر به نتایج حاصل ازکشت میکروبی و PCR در مطالعه حاضر، آلودگی به *اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال* در ۲۹ گله گوشتی (نمودار ۱) تایید شد که حاکی از بالا بودن میزان عفونت در استان گلستان می‌باشد. در مطالعه اسدپور و همکاران (۲۰۰۸) به روش PCR، ۲۲۰ سواب نای از ۲۲ گله مرغ مادر اخذ گردیدکه ۳/۱۸ درصد نمونه‌ها مثبت ارزیابی شدند (۱). در پژوهشی حسن‌زاده و همکاران (۲۰۱۰) بر روی گله‌های گوشتی که در مناطق غرب، شمال و مرکزی کشور انجام شده از مجموع ۱۵۰ نمونه بافت ریه فقط ۲ درصد آن‌ها از نظر ORT مثبت شناسائی شدند و از ۱۵۰ نمونه نای، مورد مثبتی یافت نشد (۱۲) ، در صورتی‌که در تحقیق حاضر عامل عفونت بیشتر از نمونه‌های نای جدا گردید، و به عبارتی نای شرایط محیطی مستعدتری نسبت به ریه‌ها و سینوس‌ها برای حضور عامل بیماری را دارا بوده است.

بر اساس مطالعاتی که توسط Seyyal و Turan (۲۰۰۱)، Turkyilmaz (۲۰۰۴) در مناطق مختلف کشور ترکیه صورت گرفت، میزان موارد مثبت سرمی به ترتیب ۶۵درصد (۱۷) و۶۶/۳ درصد (۱۹) گزارش شده است. Ozbey و همکاران (۲۰۰۴) در شرق ترکیه، تعداد ۲۵۰ نمونه نای و ریه از ۱۰ گله گوشتی تجاری که دارای علائم تنفسی بودند از کشتارگاه جمع‌آوری نمودند و توانستند عامل بیماری را از نای ۵ جوجه (۱/۵ درصد) و هم از نای و ریه تنها یک جوجه (۰/۴ درصد) درآزمایش باکتریولوژی جدا نمایند (۱۵). Roussan و همکاران (۲۰۱۰) بر روی ۱۰۰گله گوشتی در مناطق شمال و جنوب کشور اردن میزان آلودگی به ORT را ۲۶ درصد گزارش و با آزمایش PCR تایید نمودند(۱۶). Uriate و همکاران (۲۰۱۰) در ۲۱ شهر آرژانتین ، ۶۲/۶ درصد نمونه‌های سرمی از نظر ORT مثبت بودند که نشان‌دهنده میزان بالای آلودگی به ORT در این کشور می‌باشد (۲۰).

حساسیت آنتی بیوتیکی عفونت *اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال* به منطقه جداسازی باکتری بستگی دارد (۲۱). در این تحقیق که با استفاده از ۱۶ دیسک تجاری آنتی بیوتیک بر روی ۱۰ جدایه انجام شد(جدول ۱) با مطالعات محققین دیگر، شباهت‌ها و تفاوت‌هایی داشت. در بسیاری از مطالعات، حساسیت جدایه‌های باکتری از گله‌های گوشتی و هم از جدایه‌های گله‌های مرغ مادر و تخم‌گذار بررسی شده و تفکیک خاصی بر روی حساسیت جدایه‌های گله‌ها در برابرآنتی بیوتیک‌ها صورت نگرفته است. ۱۰۰ درصد جدایه‌های این تحقیق در برابر ترکیبات خانواده آمینوپنی سیلین‌ها حساسیت نشان دادندکه با مطالعه اسدپور و همکاران (۲۰۱۱a و ۲۰۱۱b) (۲،۳) و مطالعه بنانی و همکاران (۲۰۰۴) (۵) مغایرت داشت. ۴۵ جدایه از ۴۵ گله گوشتی در بلژیک نیز ۱۰۰ درصد به آمپی‌سیلین مقاوم بودند، اما در برخی از مطالعات نیز پنی‌سیلین و آمپی سیلین در غلظت‌های بالا برای بیشتر جدایه‌ها ممانعت‌کننده‌های خوبی بودند هر چند که مواردی نیز در هلند مشاهده گردید که تزریق تتراسیکلین و پنی سیلین‌های سنتتیک (معمولاً دو بار) جهت درمان مفید و موثر بوده و در بعضی موارد نیز منجر به شکست شده است (۸). در مطالعه حاضر به دلیل ممنوعیت استفاده از کلرآمفنیکل، از فلورفنیکل در آنتی بیوگرام استفاده شد که ۱۰۰ درصد جدایه‌ها نسبت به این آنتی بیوتیک، حساسیت نشان دادند. ۸۰ درصد جدایه‌های تحقیق حاضر در برابر لینکواسپکتین حساس بوده است اما در مطالعه اسدپور و همکاران (a ۲۰۱۱) این دارو بیشتر حساس متوسط بوده ولی در برابر لینکومایسین مقاوم بود (۲). از خانواده کینولون‌ها فلوموکوئین و افلوکسازین در تحقیق حاضر استفاده شد که با توجه به مصرف داروهای خانواده کینولون‌ها در مرغداری‌ها در چند ساله اخیر مقاومت جدایه‌ها مشاهده شده و نمی‌توان از این داروها در درمان استفاده نمود.

مقاومت جدایه‌های این تحقیق در برابر آنتی بیوتیک‌های خانواده آمینوگلیکوزیدها، پلی‌پپتیدها و سولفانامیدها با مطالعات دیگران در کشورهای مختلف شباهت داشت. مقاومت به نئومایسین و اریترومایسین در ۱۰ جدایه این تحقیق، با جدایه‌های بنانی و همکاران (۵) و سه جدایه ترکیه (۱۹) شباهت داشت. در پژوهشی که توسط Seyyal و Turan (۲۰۰۱) در ترکیه بر روی حساسیت آنتی بیوتیکی ۱۱جدایه ORT بدست آمده از گله‌های گوشتی صورت گرفت، تمامی جدایه‌ها به نئومایسین و جنتامایسین مقاومت کامل از خود نشان دادند (۱۷). Erganis و همکاران (۲۰۰۲) نیز حساسیت جدایه‌های بوقلمون را مورد بررسی قرار دادند ولی این جدایه‌ها نسبت به اریترومایسین حساس بودند. جدایه‌ها در برابر آنتی بیوتیک‌های خانواده کینولون‌ها حساسیت یکسانی نداشتند. مقاومت باکتری در برابر افلوکسازین و فلومکوئین از آنتی بیوتیک‌های خانواده کینولون‌ها نیز مشاهده گردید (۸). اورنیتوباکتریوم بسادگی قادر است در برابر آنتی بیوتیک‌هایی نظیر داکسی سیکلین، انروفلوکسازین، فلومکوئین، لینکومایسین، تری متوپریم+ سولفانامید و تایلوزین مقاومت ایجاد نماید آزمایش حساسیت آنتی بیوتیکی ۴۵ جدایه از ۴۵ فارم گله گوشتی مختلف بلژیک که دارای علائم تنفسی بودند، مورد بررسی قرار گرفت که به ترتیب ۱۰۰، ۱۰۰، ۹۸، ۹۸، ۱۰۰، ۹۶، ۹۴، ۸۹ و ۸۰ درصد از جدایه‌ها به آمپی سیلین، سفتیوفور، تایلوزین، اسپیرامایسین، لینکومایسین، تیل مایکوزین، فلومکوئین، انروفلوکسازین و داکسی سایکلین مقاوم بودند (۷). تایلوزین در جدایه‌های بدست آمده از مکزیک و نیز در این پژوهش جزء آنتی بیوتیک‌های حساس و موثر بود اما در جدایه‌های گله‌های گوشتی کشور بلژیک مقاومت به آن مشاهده شد. در تشخیص *اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال* می‌توان بصورت مستقیم از واکنش زنجیره پلی مراز استفاده نمود با استفاده از ترکیب آغازگر های OR 16S-F1 و OR 16S –R1، قطعه ۷۸۴ جفت باز که بر روی ژن 16S rRNA قرار دارد تکثیر می‌یابد (شکل ۱) ، هرچند باکتری‌هایی که با اورنیتوباکتریوم ارتباط نزدیکی دارند ممکن است، اشتباه شوند (۱۸).

نتیجه‌گیری

با توجه به میزان آلودگی بالای عفونت در گله‌های گوشتی استان ، تشخیص سریع عفونت با روش ملکولی و استفاده از آنتی بیوگرام قبل از درمان با آنتی بیوتیک‌های رایج و رعایت امنیت زیستی جهت اقدامات پیشگیرانه ضروری است.

تشکر و قدردانی

نویســـندگان مقاله برخود لازم می‌دانند تا از موسســـه تحقیقات واکسن و سرم‌ســـازی رازی جهت تخصیص اعتبارات مالی این پروژه با کد (۹۰۰۱۰-۱۸-۱۸-۰۲۱) و همچنین از همکاران محترم مرکز تحقیقات کشـــاورزی و منابع طبیعی استان گلستان و پرســـنل بخش تحقیق و تشخیص موسسه رازی تقدیر و تشکر به عمل آورند.

منابع مورد استفاده

1-Asadpour, Y., BozorgmeriFarad, M.N., Pourbakhsh,S.A., Banani, M. and Chakhkar, S. (2008). Isolation and Identification of *Ornithobactrium rhinotracheale* in Broiler Breeder Flocks of Guilan Province, North of Iran. *Pakistan Journal of Biological Sciences*.11 (11) , 1487-1491.

2- Asadpour, Y., BozorgmeriFarad, M.N., Pourbakhsh, S.A., Banani, M and Chakhkar, S. (2011a). Determination of antibiotic sensitivity *Ornithobactrium rhinotracheale* from Broiler Breeder Flocks of Guilan Province. *Iranian Journal of Biology*. 23(6) ,825-831.[In Farsi].

3-Asadpour, Y., Banani, M. and Pourbakhsh S.A. (2011b). Isolation,Identification and determination of *Ornithobactrium rhinotracheale* in slaughtering broiler chicken flocks of Guilan Province. *Iranian Journal of Veterinary Research*. 12(4) 37,345-349.

4- Banani, M., Khaki, P., Goodarzi, H., Vandyousefi, J. and Pourbakhsh, S. A. (2000). Isolation and identification of *Ornithobacterium rhinotracheale* from a broiler and a pullet flock. *Pajouhesh-va-Sazandegi.* 46, 106-109. [In Farsi].

5- Banani, M., Pourbakhsh, S.A. and Deihim A.H. (2004). Antibiotic sensivity of ORT isolates associated with respiratory Diseaes. *Archives of Razi Institute*. 58,111-117.

6- Chin, R.P., van Empel, P., and Hafez, H.M. (2008). *Ornithobacterium rhinotracheale* infection, In: Diseases of Poultry. 12th ed. Eds Y.M. Saif,H.J. Barns. A. M. Fadly, J.R. Glisson, L.R. McDougald. And D.E. Swayne, Iowa State University Press, Ames:765-774.

7- Devriese, L.A., De herdt, P. and Haesebrouck (2001). Antibiotic sensivity and resistance in *Ornithobacterium rhinotracheale* strain from Belgian broiler chickens. *Avian diseases.* 30,197-200.

8- Erganis,O., Hadimli, H.H., Kav, K., Carlu, M. and Ozturic, d.(2002). A comparative study on detection of *Ornithobacterium rhinotracheale* in meat-type turkeys by dot immunobiding assay, rapid agglutination test and serum agglutination test. *Avian Pathology.* 31, 201-204.

9- Ghaemmaghami, Sh., Vand Yosefi, J., Niroomand, H., Monsefi,A. and Ahmadloo,S.(2007). Survey of prevalence of *Ornithobacterium rhinotracheale* in broiler farms affected with respiratory disorders in Markazi Province. *Journal of Veterinary Research.* 62(5) , 297-300. [In Farsi]

10- Golestan Agricultural Statistics . (2013). Ministry of Jahad -E-Agriculture. IT Center. Vol 2, 98-106. [In Farsi]

11- Haghighi Khoshkhoo, P., Akbari Azad, G. and Amiri, S.H. (2008). Seroprevalence of *Ornithobacterium rhinotracheale* infection (ORT) within broiler chicken population in Tehran province. 4th national symposium of poultry disease in Shahrekord. PP: 10-13. [In Farsi]

12- Hassanzadeh, M., Karraimi, V., Fallah, N. and Ashrafi, I. (2010). Molecular characterization of *Ornithobactrium rhinotracheale* isolates from broiler chicken in Iran. *Turkey Journal of Veterinary Animal Science.* 43 (4) , 373-378.

13- Keleidari, Gh.A., Basami, M.R., Kavoosi, H. and Kordi, F. (2008). Seroprevalence of *Ornithobacterium rhinotracheale* in a selected number of broiler and a broiler breeder by the use of ELISA assay in Mashhad. 4th national symposium of poultry disease in Shahrekord. PP: 5-9. [In Farsi]

14- Nikpiran, H., Abbasi-Bahonar, Sh., Biijanzad, P., Taghavi molaei, M. (2011). Serological survey on *Ornithobacterium rhinotracheale* in broiler flocks of Ardabil Province. *Veterinary Journal, Tabriz Branch of Islamic Azad University*. 4(2), 1363-1368. [In Farsi]

15- Ozbey G., Ongor H., Balik D.T., CelikV., Kilic A. and Muz A. (2004). Investigation on *Ornithobacterium rhinotracheale* in broiler flocks in Elazig province located in the east of Turkey. *Veterinary Med-Czech.* 49 (8) ,305-311

16-Roussan, D.A., Al-Rafai,R.H., Khawaideh,G.Y., Totanji, W.S. and Shaheen, L. (2011). *Ornithobactrium rhinotracheale* and *Mycoplasma syniviae* in Broiler Chickens in Jourdan". *Rev.sci. tech. off. int. Epiz.* 30(3), 931-937.

17-Seyyal, A.k., and Turan, N. (2002). Antimicribial suceptibility of *Ornithobactrium rhinotracheale* isolates from broiler chicken in Turkey. *VETERINARSKI ARHIV*.71(3) ,121-127.

18- Soriano, V.E., Longinos, M.G., Navarrete, P.G. and Fernandez, R.P. (2002). Identification and characterization of isolates from Mexico. *Avian Diseases*. 46, 686-690.
19- Turkyilmaz, S. (2004). Isolation and serotyping of *Ornithobacterium rhinotracheale* from poultry. *Turkey Journal of Veterinary Animal Science*. 29, 1299-1304.
20- Uriate, J., et al. (2010). Stochastic estimation of seroprevalence against *Ornithobacterium rhinotracheale* and avian pneumovirus among chickens in Argentina. *International Journal of poultry sciences*. 9(4) , 352-356.
21- Van empel, P. and Hafez, M.H. (1999). *Ornithobacterium rhinotracheale* : A review. *Avian Pathology*. 28, 217-227.