DOI: http://dx.doi.org/10.22034/vj.2017.109219

نشریه دامپزشکی

در

پژوهش و سازندگی شماره ۱۱۵ تابستان ۱۳۹۶

DOI: 10.22034/vj.2017.109219

شناسایی مولکولی *اورنیتوباکتریوم راینوتراکئال* در پرندگان حیات وحش استان خوزستان

• **منصور میاحی**

گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

• **داریوش غریبی**

گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

• **رحیم قدیمی پور (نویسنده مسئول)**

گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز ، ایران و بخش تحقیق و توسعه، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه اهواز، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

• **فروغ طلازاده**

گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: فروردین ۹۵ تاریخ پذیرش: تیرماه ۹۵

Email: R.ghadimipour@rvsri.ac.ir

چکیده

اورنیتوباکتریوم راینوترکئال (ORT) به‌عنوان یکی از ارگانیسم‌های دخیل در بیماری‌های تنفسی گونه‌های مختلف پرندگان شناخته شده‌است. تاکنون گزارش‌های متعددی مبنی بر جداسازی این باکتری از گله‌های صنعتی پرورش طیور در ایران ارائه شده‌است. پژوهش حاضر با هدف شناسایی مولکولی و تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی باکتری ORT در پرندگان حیات وحش استان خوزستان طراحی گردید. بدین‌منظور بعد از جمع‌آوری تعداد ۲۳ نمونه سواب نایی، با استفاده از روش‌های مبتنی بر کشت، چهار (۱۷/۳ درصد) جدایه مظنون به باکتری ORT از این نمونه‌ها جداسازی گردید که با به‌کارگیری پرایمرهای اختصاصی، سه (۱۳ درصد) جدایه تایید مولکولی شدند. تمام سویه‌های جداشده در این مطالعه از راسته شاهین سانان (۲۱/۴ درصد) بودند که نشان‌دهنده میزان بالای آلودگی این پرندگان نسبت به دیگر طیور تحت بررسی می‌باشد ($p < ۰/۰۵$). بر اساس نتایج آزمایش تعیین الگوی مقاومت دارویی جدایه‌ها به روش انتشار دیسک، همه جدایه‌ها (۱۰۰ درصد) نسبت به انروفلوکساسین، پنی‌سیلین، استرپتومایسین، سفالکسین، لینکواسپکتین، تایلوزین، فلورفنیکل، فلومیکوئین و تتراسایکلین حساس بوده و بیشترین مقاومت دارویی (۶۶/۶ درصد) نیز مقابل فسفومایسین، سولتریم، نالیدیکسیک اسید و جنتامایسین مشاهده گردید. در مقایسه با مطالعات انجام‌یافته بر روی سویه‌های جداشده از طیور صنعتی به‌خصوص ماکیان، سویه‌های شناسایی شده در پرندگان حیات وحش نسبت به اغلب عوامل ضدمیکروبی حساسیت نشان دادند.

کلمات کلیدی: *اورنیتوباکتریوم راینوترکئال*، پرندگان حیات وحش، خوزستان، ایران

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 115 pp: 18-26

Molecular identification of ***Ornithobacterium rhinotracheale*** in wildlife birds of Khouzestan province

By: Mayahi, M., Clinical Sciences Department, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. Gharibi, D., Pathobiology Department, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. Ghadimipour, R., Pathobiology Department, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran, Department of Research and Development, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Ahvaz, Iran. and Talazadeh, F., Clinical Sciences Department, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

Received: 2016-04-17 Accepted: 2016-07-17
Email: R.ghadimipour@rvsri.ac.ir

Ornithobacterium rhinotracheale (ORT) is known as one of the involved organisms in respiratory diseases of different species of birds. So far, numerous reports have been presented about the isolation of the bacterium from commercial poultry flocks in Iran. This study was designed for molecular identification and evaluation of antimicrobial susceptibility of ORT bacterium in wildlife birds in Khouzestan province. After collection of 23 tracheal swab samples, four (17.3%) strains of ORT bacterium were isolated based on cultural methods; then three (13%) isolates were confirmed by application of specific primers. All strains isolated in this research were from Falconiformes (21.4%), which indicates the high rate of ORT isolation than that of other understudy birds ($P<0.05$). According to the results of determination of drug-resistance patterns of the isolates by disk diffusion method, all isolates (100%) were found sensitive to enrofloxacin, penicillin, streptomycin, cephalexin, lincospectin, tylosin, flumequine, florfenicol and tetracycline and 66.6% of them were resistant to fosfomycin, sultrim, nalidixic acid and gentamicin. In comparison with studies on strains isolated from commercial flocks especially poultry, strains detected in wild birds were sensitive to most antimicrobial agents.

Key words: *Ornithobacterium rhinotracheale*, Wildlife birds, Khouzestan, Iran

مقدمه

بیماری تنفسی ناشی از باکتری *اورنیتوباکتریوم راینوتراکئال* (ORT) عفونتی باکتریایی است که اخیرا شناسایی‌شده و به فهرست دیگر عفونت‌های باکتریایی تنفسی طیور افزوده شده‌است. *اورنیتوباکتریوم راینوتراکئال* باکتری میله‌ای گرم منفی، بسیار پلئومورف و غیرمتحرک است که رشد آن بسیار کند بوده و سریعا به‌وسیله باکتری‌های سریع‌الرشد پوشیده می‌شود (۲۰). باکتری ORT به‌عنوان پاتوژن تنفسی اولیه یا ثانویه طیور مطرح می‌باشد که به تنهایی و یا به همراه سایر پاتوژن‌های تنفسی طیور از قبیل *بوردتلا آویوم*، *رایمرلا آناتی‌پستیفر* و ویروس بیماری نیوکاسل (NDV) سبب بروز علائم تنفسی، کاهش رشد، کاهش تولید تخم، افزایش میزان تلفات (۱۱-۲ درصد) و افزایش حذف کشتارگاهی به‌خصوص در ماکیان و بوقلمون می‌شود (۲۵، ۳۳). علائم بالینی مشهود این بیماری در ماکیان جوان شامل سرفه، ترشحات بینی، ورم صورت و آرتریت و در بوقلمون‌ها شامل ادم ریه‌ها، سینوزیت، پریکاردیت، بزرگ شدن کبد و تورم کیسه‌های هوایی است (۱۴). شدت علائم بالینی، طول دوره بیماری و میزان تلفات ناشی از آن، علاوه بر حضور عفونت‌های همزمان ناشی از سایر پاتوژن‌ها، به عوامل غیرعفونی نظیر شرایط آب و هوایی و یا مسائل سوء مدیریتی مانند تراکم بالا و بهداشت ضعیف گله نیز بستگی داشته و بسیار متغیر می‌باشد (۱).

باکتری ORT اولین بار در سال ۱۹۸۱ میلادی از موارد بالینی بیماری تنفسی در بوقلمون‌های گوشتی و مادر گوشتی در کشور آلمان جداسازی و شناسایی شد (۴). در سال ۱۹۹۱ نیز این باکتری از مرغ‌های گوشتی دارای علائم تنفسی خفیف در آفریقای جنوبی جدا گردید (۳۴). بااین‌همه در طی این سال‌ها این ارگانیسم به عنوان یک باکتری شبه پاستورلا شناخته می‌شد، تا اینکه اولین بار در سال ۱۹۹۴ به پیشنهاد واندامه و همکاران تحت عنوان *اورنیتوباکتریوم راینوتراکئال* نام‌گذاری و توصیف گردید (۳۱). پس از آن توجه پژوهشگران به این باکتری جلب شد و گزارش‌هایی مبنی بر جداسازی آن از طیور صنعتی و نیز سایر پرندگان اهلی و وحشی از کشورهای مختلف دنیا ارائه شد (۱۴، ۳۳). بر اساس مستندات موجود، این باکتری تاکنون از غاز، اردک، بوقلمون، کبوتر، کبک، کبک اوراسیایی، شترمرغ، قرقاول، بلدرچین، مرغ شاخدار، مرغ نوروزی، کلاغ سیاه و ماکیان در سراسر جهان جداسازی و شناسایی شده است (۵، ۸، ۱۹، ۲۱، ۲۶، ۲۸). به طور کلی اغلب گله‌های ماکیان در اروپا، آفریقا، آمریکای شمالی و جنوبی و برخی از کشورهای آسیایی با این باکتری مواجه شده‌اند (۶).

اولین گزارش عفونت با باکتری ORT در مرغداری‌های ایران، در سال ۱۳۷۹ و از یک گله جوجه گوشتی و یک گله پولت تخمگذار با علائم تنفسی بوده‌است (۴). متعاقبا باکتری در بوقلمون (۶) و سایر نژادهای ماکیان هم گزارش شد (۷). به‌دنبال آن، پژوهش‌های متعددی در ارتباط با شناسایی این بیماری در نژادهای مختلف ماکیان ایران شامل مادر گوشتی، جوجه گوشتی، تخمگذار تجاری و مرغ بومی صورت گرفت (۱۰) و نیز

جداسازی و شناسایی ارگانیسم از گله‌های صنعتی پرورش بوقلمون و بلدرچین و نیز کبوترهای اهلی در مناطق مختلف کشور با استفاده از روش‌های باکتریولوژی، سرولوژی و مولکولی انجام شد (۲۳). با وجود انجام مطالعات متعدد جهت جداسازی باکتری ORT از طیور صنعتی بویژه ماکیان در کشور، گزارشی مبنی بر شناسایی این ارگانیسم در پرندگان حیات وحش ایران و نیز بررسی مقاومت دارویی و وضعیت حاملین باکتری در بین گونه‌های مختلف این پرندگان ارائه نگردیده است. از این‌رو، پژوهش حاضر با هدف جداسازی، شناسایی و تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی باکتری ORT از پرندگان حیات وحش استان خوزستان، در جنوب غرب ایران طراحی گردید.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها

تعداد ۲۳ نمونه سواب نایی از گونه‌های مختلف پرندگان به ظاهر سالم و بدون علائم تنفسی حیات وحش استان خوزستان که طی فصول تابستان و پاییز سال ۱۳۹۴ توسط محیط‌بانان از مناطق مختلف این استان به سازمان حفاظت محیط زیست ارجاع می‌گردید، جمع‌آوری شد (جدول ۱). با توجه به حساس بودن ارگانیسم، تمام نمونه‌ها در حداقل‌زمان ممکن و در محیط انتقالی کری- بلایر و شرایط سرد به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز منتقل گردیدند.

کشت باکتریایی و آزمون‌های بیوشیمیایی

نمونه‌ها بر روی محیط آگار خون‌دار گوسفندی (۵ درصد) حاوی ۵/۲ میکروگرم در میلی‌لیتر جنتامایسین کشت‌شده و به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در اتمسفر حاوی ۷/۵ درصد دی‌اکسید کربن گرم‌خانه‌گذاری شدند؛ سپس پرگنه‌های مشکوک به باکتری ORT (پرگنه‌های ریز، خاکستری و غیرهمولیتیک) انتخاب و برای آزمایش‌های بعدی خالص‌سازی گردیدند (۱۴). اجرام مشکوک خالص‌سازی شده برای مشاهده شکل و اندازه باکتری، توسط رنگ‌آمیزی گرم و برای تشخیص بیولوژیکی ارگانیسم، توسط آزمون‌های بیوشیمیایی از قبیل کاتالاز، اکسیداز، تولید اندول، تحرک، احیای نیترات، تولید آنزیم اوره‌آز و رشد بر روی آگار مک‌کانکی و محیط سه قندی آهن‌دار (TSI) موردبررسی قرار گرفتند. برای تعیین قدرت تولید اسید از کربوهیدرات‌ها طی فرایند تخمیر توسط جدایه‌ها، محیط‌های قندی مختلف ازجمله سوکروز، آرابینوز، سوربیتول، لاکتوز، گلوکز و مالتوز موردارزیابی قرارگرفتند (تمامی محیط‌ها ساخت شرکت مرک آلمان) (۱۴، ۳۲). جدایه‌های مظنون به باکتری ORT جهت ادامه مطالعه به‌صورت تعلیق در محیط نگه‌دارنده در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره گردیدند.

تشخیص مولکولی به روش PCR

استخراج DNA

برای استخراج DNA از جدایه‌های مظنون، از روش جوشاندن استفاده گردید. برای این کار، ابتدا چند پرگنه خالص باکتری از روی محیط آگار خون‌دار برداشته شده و در ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل گردید. مخلوط حاصل توسط دستگاه Thermo Block (کیاژن، ایران) به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد جوشانده شد. تعلیق به‌دست آمده به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. در نهایت ۱۰۰ میکرولیتر از مایع رویی در میکروتیوب‌های استریل برای انجام PCR در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

آزمایش PCR

در این مطالعه یک جفت پرایمر اختصاصی باکتری ORT به نام‌های OR16S-F1 و OR16S-R1 مورد استفاده قرار گرفت که برای تکثیر یک قطعه ۷۸۴ جفت بازی (bp) بر روی ژن 16S rRNA ارگانیسم توسط وان امپل و حافظ (۱۹۹۹) طراحی و تهیه شده بودند (۳۳). ردیف‌های بازی این پرایمرها به شرح زیر بود:

OR16S-F1 5'- GAGAATTAATTTACGGATTAAG-3'

OR16S-R1 5'-TTCGCTTGGTCTCCGAAGAT-3'

برای انجام PCR از میکروتیوب‌های ۰/۲ میلی‌لیتری استریل و فاقد DNAase و دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf، آلمان) استفاده شد. واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس آماده ۲x (مسترمیکس آمپلیکون آلمان، حاوی MgCl۲، PCR buffer، dNTPs و Taq DNA Polymerase)، ۴/۵ میکرولیتر آب DEPC، ۱/۵ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها (۱۰ پیکومول، سیناژن، ایران) و پنج میکرولیتر از DNA استخراج‌شده، انجام‌گردید. برنامه دمایی PCR شامل مرحله واسرشته‌سازی اولیه به مدت هفت دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، سپس ۳۰ سیکل متوالی شامل مرحله واسرشته‌سازی به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، مرحله اتصال به مدت یک دقیقه در دمای ۵۳ درجه سانتی‌گراد و مرحله تکثیر به مدت دو دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد، و در انتها یک مرحله تکثیر نهایی به مدت هفت دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. پس از طی‌شدن مراحل دمایی و تکثیر احتمالی ژن هدف، در نهایت ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR در کنار نردبان ژنی ۱۰۰ جفت بازی (سیناژن، ایران)، سویه تاییدشده باکتری ORT سروتیپ A به عنوان شاهد مثبت و آب DEPC به‌عنوان شاهد منفی در ژل آگارز یک درصد حاوی ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر رنگ ایمن (سیناژن، ایران) در ولتاژ ۹۰ ولت به مدت یک ساعت الکتروفورز شد و در دستگاه ژل داک (UVitec، انگلستان) باندهای تشکیل‌شده مشاهده گردید. در صورت مشاهده باند ۷۸۴ جفت بازی، جدایه مورد نظر باکتری ORT در نظر گرفته شد.

آزمایش سنجش حساسیت ضدمیکروبی

برای سنجش حساسیت ضدمیکروبی جدایه‌ها از روش انتشار دیسک استفاده‌شده و بر طبق دستورالعمل موسسه استانداردهای آزمایشگاهی و کلینیکی اقدام گردید (۱۵). در این روش ابتدا پرگنه‌های رشدیافته در محیط آگار خون‌دار به لوله‌های حاوی محیط تریپتیک سوی براث (TSB) منتقل گردید. محیط‌ها به مدت چهار تا شش ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند تا غلظت میکروبی معادل کدورت استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند بدست‌آید. با سواب استریل از تعلیق داخل لوله‌ها برداشته‌شده و در محیط آگار مولر- هینتون حاوی پنج درصد خون گوسفندی کشت سفره‌ای داده شد؛ سپس دیسک‌های حاوی ۱۵ آنتی‌بیوتیک مختلف (پادتن طب، ایران) بر روی این محیط‌ها قرارگرفتند.

پس از ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، برای اندازه‌گیری هاله ممانعت از رشد و تفسیر نتایج بدست آمده نیز بر اساس دستورالعمل مرجع اقدام شده و جدایه‌ها به‌صورت مقاوم (R)، با حساسیت متوسط (I) و حساس (S) توصیف گردیدند (جدول ۳).

تجزیه و تحلیل آماری

نتایج حاصل از آزمایش‌ها بوسیله نسخه ۱۹ نرم افزار SPSS و استفاده از آمار توصیفی و آزمون‌های دقیق فیشر و مربع کای آنالیز شده و $p < ۰/۰۵$ مبنای اختلاف معنی‌دار درنظر گرفته‌شد.

نتایج

در بررسی حاضر، از مجموع ۲۳ نمونه جمع‌آوری‌شده، تعداد چهار (۱۷/۳ درصد) جدایه مظنون به باکتری ORT در کشت‌های باکتریایی و آزمون‌های بیوشیمیایی جداسازی شدند. از جدایه‌های فوق، تعداد سه (۱۳ درصد) جدایه در آزمایش مولکولی باند اختصاصی ۷۸۴ جفت بازی را نشان داده و تایید مولکولی شدند (جدول ۲، شکل ۱). این جدایه‌ها بر روی محیط آگار خون‌دار دارای پرگنه‌های نوک سنجاقی به رنگ خاکستری متمایل به سفید و فاقد همولیز بوده ولی در محیط آگار مک‌کانکی و آگار TSI رشد نکردند. بر اساس آزمون‌های بیوشیمیایی نیز ارگانیسم‌های جداسازی شده از نظر کاتالاز، اندول، اوره‌آز و ژلاتیناز منفی ولی از نظر اکسیداز مثبت بودند. این جدایه‌ها به غیر از سوربیتول بقیه قندهای موردآزمایش را تخمیر نمودند. تمام سویه‌های جداشده در این مطالعه از راسته شاهین سانان (۲۱/۴ درصد) بوده و شامل یک جدایه از عقاب خال‌دار بزرگ (عقاب تالابی)، یک جدایه از سارگپه پابلند و یک جدایه از کورکور سیاه بود که نشان‌دهنده میزان بالای آلودگی این پرندگان نسبت به دیگر طیور تحت‌بررسی می‌باشد ($p < ۰/۰۵$) (جدول ۱). نتایج حاصل از آزمایش سنجش حساسیت ضدمیکروبی حاکی از حساسیت همه جدایه‌ها (۱۰۰ درصد) نسبت به اغلب عوامل ضدمیکروبی تحت‌مطالعه بوده و بیشترین مقاومت دارویی (۶۶/۶ درصد) نیز مقابل فسفومایسین، سولتریم، نالیدیکسیک اسید و جنتامایسین مشاهده گردید (جدول ۳).

جدول ۱- مشخصات پرندگان حیات وحش مورد مطالعه در طول فصل‌های تابستان و پاییز سال ۱۳۹۴ در استان خوزستان و درصد موارد مثبت از نظر جداسازی قطعی ارگانیسم *اورنیتوباکتریوم راینوتراکئال* (ORT) از هر کدام از گونه‌ها

گونه پرنده	نام علمی	تیره	راسته	تعداد پرنده مورد مطالعه	روش نمونه‌برداری	موارد مثبت (عدد)	موارد مثبت (%)
سارگپه پابلند	*Buteo rufinus*	عقابیان	شاهین سانان	۴	سواب نایی	۱	۲۵
پری شاهرخ	*Oriolus oriolus*	پری شاهرخان	گنجشک سانان	۲	سواب نایی	۰	۰
کورکور سیاه	*Milvus migrans*	قوشیان	شاهین سانان	۴	سواب نایی	۱	۲۵
جغد	*Otus jolandae*	جغد	جغد سانان	۲	سواب نایی	۰	۰
سنقر گندم زار	*Circus pygargus*	عقابیان	شاهین سانان	۱	سواب نایی	۰	۰
عقاب دشتی	*Aquila rapax*	عقابیان	پرندگان اکسیپیتریفورم	۳	سواب نایی	۰	۰
عقاب تالابی (عقاب خال دار بزرگ)	*Aquila clanga*	عقابیان	شاهین سانان	۲	سواب نایی	۱	۵۰
شاه بوف	*Bubo Bubo*	جغد	جغد سانان	۱	سواب نایی	۰	۰
دلیجه	*Falco tinnunculus*	شاهینیان	شاهین سانان	۳	سواب نایی	۰	۰
شب کور	*Corynorhinus townsendii*	خفاش	خفاش سانان	۱	سواب نایی	۰	۰

جدول ۲- نتایج جداسازی و شناسایی ارگانیسم *اورنیتوباکتریوم راینوتراکئال* (ORT) از مجموع ۲۳ نمونه سوآب نایی اخذشده از پرندگان حیات وحش استان خوزستان با استفاده از آزمایش‌های مرسوم بیوشیمیایی و نیز تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

ارگانیسم	آزمایش‌های بیوشیمیایی		تکنیک PCR		تعداد و درصد موارد مثبت قطعی
	مثبت	منفی	مثبت	منفی	
اورنیتوباکتریوم راینوتراکئال (ORT)	۴	۱۹	۳	۲۰	۳ (۱۳٪)

جدول ۳- نتایج آزمایش سنجش حساسیت ضدمیکروبی ۳ جدایه *اورنیتوباکتریوم راینوتراکئال* (ORT) جداشده از پرندگان حیات وحش استان خوزستان در طول فصل‌های تابستان و پاییز سال ۱۳۹۴

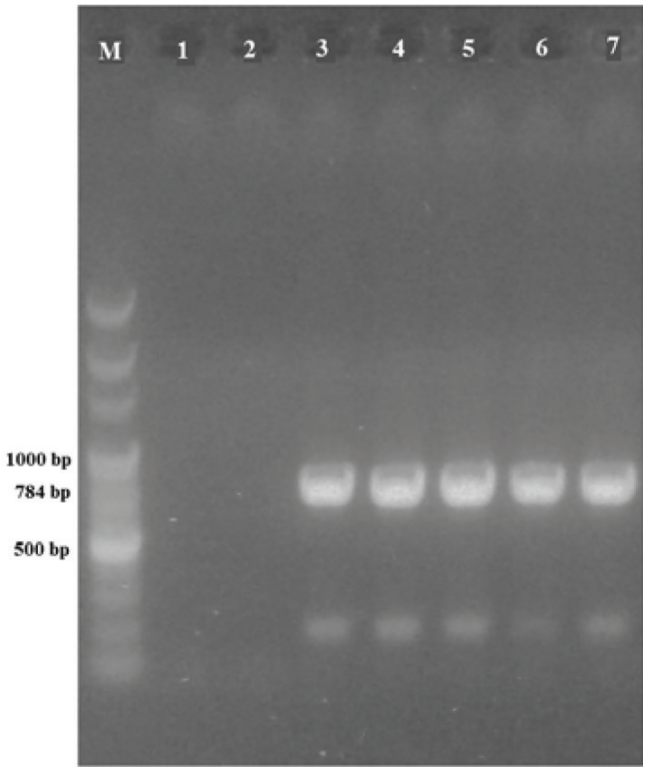
عامل ضدمیکروبی	تعداد و درصد جدایه‌ها		
	حساس	حساسیت متوسط	مقاوم
انروفلوکساسین (NFX)	۳ (٪۱۰۰)	۰ (٪۰/۰)	۰ (٪۰/۰)
نالیدیکسیک اسید (NA)	۱ (٪۳۳/۳)	۰ (٪۰/۰)	۲ (٪۶۶/۶)
جنتامایسین (GM)	۱ (٪۳۳/۳)	۰ (٪۰/۰)	۲ (٪۶۶/۶)
نئومایسین (N)	۲ (٪۶۶/۶)	۰ (٪۰/۰)	۱ (٪۳۳/۳)
پنی‌سیلین (P)	۳ (٪۱۰۰)	۰ (٪۰/۰)	۰ (٪۰/۰)
استرپتومایسین (S)	۳ (٪۱۰۰)	۰ (٪۰/۰)	۰ (٪۰/۰)
سفالکسین (CN)	۳ (٪۱۰۰)	۰ (٪۰/۰)	۰ (٪۰/۰)
لینکواسپکتین (LS)	۳ (٪۱۰۰)	۰ (٪۰/۰)	۰ (٪۰/۰)
سولتریم (SLT)	۱ (٪۳۳/۳)	۰ (٪۰/۰)	۲ (٪۶۶/۶)
فلورفنیکل (FF)	۳ (٪۱۰۰)	۰ (٪۰/۰)	۰ (٪۰/۰)
تایلوزین (TY)	۳ (٪۱۰۰)	۰ (٪۰/۰)	۰ (٪۰/۰)
فسفومایسین (FO)	۱ (٪۳۳/۳)	۰ (٪۰/۰)	۲ (٪۶۶/۶)
فلومایکوئین (FM)	۳ (٪۱۰۰)	۰ (٪۰/۰)	۰ (٪۰/۰)
تتراسایکلین (TE)	۳ (٪۱۰۰)	۰ (٪۰/۰)	۰ (٪۰/۰)
کلوگزاسیلین (CX)	۱ (٪۳۳/۳)	۲ (٪۶۶/۶)	۰ (٪۰/۰)

بحث

شباهت علائم بالینی عفونت اورنیتوباکتریایی با بسیاری از عفونت‌های تنفسی باکتریایی و ویروسی طیور از یک سو و دشوار بودن جداسازی و شناسایی قطعی عامل آن از سوی دیگر، موجب شده است که تشخیص این بیماری به سادگی امکان‌پذیر نباشد. از این‌رو، در سال‌های اخیر برای جداسازی باکتری ORT از گونه‌های مختلف پرندگان اهلی و وحشی، از کیت‌های ویژه بیوشیمیایی (۲۰)، آنتی‌سرم‌های اختصاصی (۵، ۲۰) و نیز پرایمرهای اختصاصی(۱۰، ۳۳) استفاده شده و مقادیر گزارش شده در این مطالعات بسته به منطقه و نیز گونه پرنده موردمطالعه متغیر می‌باشد. در پژوهش حاضر، از ۲۳ نمونه سواب نایی جمع‌آوری‌شده از گونه‌های مختلف پرندگان حیات وحش سه جدایه ORT جداسازی شد که در شناسایی آن‌ها هم از روش‌های مرسوم کشت و هم از تکنیک‌های مولکولی استفاده گردید. یافته‌های این پژوهش نشان‌دهنده میزان قابل‌توجهی از آلودگی راسته شاهین سانان (۲۱/۴ درصد) به باکتری ORT می‌باشد.

نتایج حاصل از بررسی‌های انجام‌یافته در سایر کشورها، که مربوط به گونه‌های مختلف پرندگان وحشی و نیز طیور صنعتی می‌باشند، متغیر بوده و در برخی موارد با نتایج بررسی حاضر مطابقت داشته ولی در بعضی دیگر مغایرت دارد. چارلتون و همکاران (۱۹۹۳) گزارش کردند که ۴۵ جدایه باکتری ORT شامل ۳۰ جدایه از بوقلمون‌ها، ۱۱ جدایه از مرغ‌ها و یک جدایه از هر کدام از کبک، کبک اوراسیایی، قرقاول و کبوترهای موردآزمایش جدا نموده‌اند (۱۲). واندامه و همکاران (۱۹۹۴) نیز اعلام کردند که ۲۱ جدایه از این باکتری را در کشورهای مختلف اروپایی و نیز آفریقای جنوبی مورد آزمایش قرار داده‌اند که شامل ۱۰ جدایه از بوقلمون‌ها، هفت جدایه از جوجه‌های گوشتی، سه جدایه از کلاغ‌های سیاه و یک جدایه از کبک‌های پرورشی بوده‌است (۳۱). همچنین دوریه‌سه و همکاران (۱۹۹۵) ۱۴ جدایه باکتری ORT را از هشت مرغ، چهار بوقلمون، یک مرغ شاخدار و یک کبک در کشور بلژیک جدا نمودند (۱۶). وان امپل و همکاران (۱۹۹۷) نیز گزارش کردند که موفق به جداسازی ۴۴۳ جدایه از این باکتری شده‌اند که همه آن‌ها، به‌غیر از سه نمونه جداشده از اردک، مرغ شاخدار و کبک، مربوط به مرغ یا بوقلمون‌های موردمطالعه بوده‌اند (۳۲). ارگانیش و همکاران (۲۰۰۲) و تورک ییلماز (۲۰۰۵) میزان جداسازی ارگانیسم از نمونه‌های سواب نایی گله‌های مرغ گوشتی در مناطق مختلف کشور ترکیه را به ترتیب ۰/۴ و ۱/۲ درصد گزارش کردند (۱۸، ۲۹). همچنین تی‌سای و هووانگ (۲۰۰۶) به ترتیب ۸/۳ و نه درصد از سواب‌های نایی حاصل از ۳۳۷ مرغ گوشتی و ۱۳۳ کبوتر از مناطق مختلف کشور تایوان را آلوده به باکتری ORT اعلام کردند (۲۸). نتایج حاصل از این مطالعات با نتایج پژوهش حاضر متفاوت بوده و میزان جداسازی ارگانیسم از پرندگان حیات وحش استان خوزستان به مراتب بالا می‌باشد. این در حالیست که چانسیری پورن‌چایی و همکاران (۲۰۰۷) شیوع سرمی این ارگانیسم در گله‌های طیور گوشتی مورد مطالعه در کشور تایلند را ۶۳ درصد گزارش کردند (۱۱). روسان و همکاران (۲۰۱۱) نیز سواب‌های نایی گله‌های مرغ گوشتی در مناطق شمالی و جنوبی کشور اردن را به روش PCR مورد آزمایش قرار داده و ۲۱ درصد این نمونه‌ها را آلوده به باکتری ORT اعلام نمودند (۲۴).

یافته‌های حاصل از مطالعات انجام‌یافته در مناطق مختلف ایران، که تقریبا تمام آن‌ها بر روی طیور صنعتی صورت پذیرفته، نیز بسته به منطقه جغرافیایی متغیر می‌باشند. بنانی و همکاران (۲۰۰۱) نمونه‌های نایی لاشه گله‌های مرغ گوشتی، مرغ مادر گوشتی و مرغ تخمگذار دارای اختلالات تنفسی را با استفاده از دو روش کشت باکتریایی و آزمایش PCR بررسی کرده و میزان آلودگی آن‌ها به باکتری ORT را ۵۹ درصد گزارش کردند (۵). عالی‌مهر (۲۰۰۶) نیز شیوع سرمی این ارگانیسم در گله‌های طیور گوشتی استان آذربایجان غربی را ۸۲ درصد گزارش کرد (۲). در حالیکه جمشیدیان و میاحی (۱۳۸۷) ۸/۶۶ درصد از سواب‌های نایی اخذ شده از مرغ‌های گوشتی در حال کشتار استان خوزستان را آلوده به این ارگانیسم گزارش کردند (۲۲). حسن زاده و همکاران (۲۰۱۰) نیز با استفاده از دو روش کشت باکتریایی و مولکولی، باکتری را از ۰/۶ درصد از نمونه‌های سواب نایی و یک درصد از نمونه‌های بافت ریه و نای جوجه‌های گوشتی در حال کشتار و یا تلف شده در مناطق شمالی، مرکزی و غربی کشور جدا نمودند (۲۱). اسدپور و همکاران (۲۰۱۱) نیز ارگانیسم را از ۱/۰۳



شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز یک درصد، رنگ‌آمیزی شده با رنگ ایمن. چاهک M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، چاهک ۱: آب DEPC (شاهد منفی)، چاهک ۲: نمونه منفی، چاهک‌های ۵-۳: جدایه‌های *اورنیتوباکتریوم راینوتراکئال* (ORT) (قطعه ۷۸۴ جفت بازی ژن 16SrRNA در باکتری‌های ORT مورد مطالعه)، چاهک‌های ۶ و ۷: شاهدهای مثبت (باکتری‌های ORT تاییدشده با کمک آزمایش‌های بیوشیمیایی و آنتی‌سرم اختصاصی سروتیپ A).

درصد نمونه‌های سواب نایی حاصل از جوجه‌های گوشتی در حال کشتار در استان گیلان گزارش کردند (۳). همچنین میرزایی و همکاران (۲۰۱۱) با روش‌های مرسوم و مولکولی باکتری را از چهار (۱/۶ درصد) نمونه سواب نایی بوقلمون، سه (۱/۲ درصد) نمونه بلدرچین، ۲۳ (۹/۲ درصد) نمونه کبوتر اهلی و ۱۹ (۷/۶ درصد) نمونه کبک که مربوط به مناطق مختلف کشور بودند، جداسازی کردند (۲۳). به طور طبیعی باکتری ORT را فقط می‌توان در مراحل اولیه عفونت جداسازی نمود و تلاش‌ها برای شناسایی آن در مراحل پیشرفته کاری بیهوده است. در نمونه‌های آلوده، این ارگانیسم به سادگی توسط سایر باکتری‌های سریع‌الرشد مانند *اشرشیا کولی*، گونه‌های پروتئوس و گونه‌های سودوموناس پوشیده شده و از این‌رو بررسی‌های معمول به دشواری به جداسازی و شناسایی منجر می‌شود (۵).

در ارتباط با نتایج حاصل از آزمایش سنجش حساسیت ضدمیکروبی، همه باکتری‌های جدا شده (۱۰۰ درصد) نسبت به انروفلوکساسین، پنی‌سیلین، استرپتومایسین، سفالکسین، لینکواسپکتین، تایلوزین، فلورفنیکل، فلومیکوئین و تتراسایکلین حساس بودند. بر اساس نظریه وان امپل و حافظ (۱۹۹۹) حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های مختلف باکتری ORT بسیار متغیر بوده و ظاهرا بستگی به سویه باکتری و طیف آنتی‌بیوتیک‌های مورداستفاده در منطقه جداسازی دارد (۳۳). وان بیک (۱۹۹۴) گزارش کرد که اغلب سویه‌های موردمطالعه ارگانیسم در کشورهای آلمان و هلند نسبت به انروفلوکسازین مقاومت نشان دادند (۳۰). مطالعات انجام‌یافته توسط وان امپل و حافظ (۱۹۹۹) در کشور آلمان یافته‌های وان بیک را تایید کرده و نشان داد که ۱۰۰-۹۰ درصد سویه‌های جدا شده نسبت به انروفلوکسازین، نئومایسین و جنتامایسین مقاوم بوده و تمامی سویه‌ها نسبت به تتراسایکلین، کلرامفنیکل و آموکسی‌سیلین حساس بودند (۳۳). دوریه‌سه و همکاران (۲۰۰۱) همه سویه‌های جدا شده از جوجه‌های گوشتی در کشور بلژیک را مقاوم به لینکومایسین، سفتیوفور و آمپی‌سیلین و کمتر از ۱۰ درصد آن‌ها را حساس به فلومیکوئین و تایلوزین معرفی کردند (۱۷). سوریانو و همکاران (۲۰۰۳) نیز حساسیت جدایه‌های مکزیکی این باکتری را نسبت به انروفلوکسازین، آموکسی‌سیلین و اکسی‌تتراسایکلین متغیر عنوان کردند (۲۷). تی‌سای و هووانگ (۲۰۰۶) اذعان نمودند که در مقاومت جدایه‌های مرغی و کبوتری باکتری به اریترومایسین، جنتامایسین، تتراسایکلین و کلیندامایسین تفاوت معنی‌داری وجود دارد (۲۸). همچنین چرنیشو و همکاران (۲۰۱۱) همه سویه‌های جداشده از مرغ و بوقلمون در کشور روسیه را مقاوم به آمیکاسین، پنی‌سیلین، جنتامایسین و انروفلوکسازین گزارش کردند (۱۳).

بنانی و همکاران (۲۰۰۴) گزارش کردند که اغلب جدایه‌های مرغی این ارگانیسم در ایران نسبت به کلرامفنیکل حساس بوده ولی نسبت به اریترومایسین و تتراسایکلین درجات مختلفی از مقاومت را نشان می‌دهند (۹). همچنین جمشیدیان و میاحی (۱۳۸۷) دریافتند که همه جدایه‌های موردمطالعه باکتری نسبت به جنتامایسین و تری‌متوپریم-سولفامتوکسازول مقاوم بوده ولی نسبت به آمپی‌سیلین و کلرامفنیکل حساسیت نشان دادند (۲۲). اسدپور و همکاران (۲۰۱۱) نیز همه جدایه‌های این ارگانیسم را نسبت به انروفلوکسازین، تتراسایکلین، سیپروفلوکسازین، فلومیکوئین و فورازولیدون مقاوم و نسبت به سفتریاکسون و تیامولین حساس معرفی کردند (۳). میرزایی و همکاران (۲۰۱۱) دریافتند که دانوفلوکسازین و کلرامفنیکل فعالیت ضدمیکروبی خوبی را نسبت به همه جدایه‌های باکتری ORT نشان دادند (۲۳). به نظر می‌رسد بسته به منطقه جداسازی ارگانیسم، حساسیت سویه‌ها نسبت به عوامل ضدمیکروبی مختلف متغیر است. مقایسه الگوی مقاومت دارویی جدایه‌های پژوهش حاضر با نتایج مطالعات پیشین بیانگر حساسیت بالای این جدایه‌ها نسبت به اغلب عوامل ضدمیکروبی از جمله نئومایسین، استرپتومایسین و کلوگزاسیلین می‌باشد؛ درحالیکه سویه‌های جداشده از گله‌های صنعتی پرورش طیور، به دلیل استفاده بی‌رویه از عوامل ضدمیکروبی مختلف برای درمان عفونت‌های ثانویه، نسبت به اغلب این عوامل مقاومت نشان داده‌اند.

نتایج مطالعه جاری نشان می‌دهد که باکتری ORT در میان راسته شاهین سانان از پرندگان وحشی مناطق جنوب غربی کشور شیوع قابل توجهی داشته و همه جدایه‌های این باکتری نسبت به اغلب عوامل ضدمیکروبی موردبررسی حساس می‌باشند. بطورکلی الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های مختلف باکتری ORT بسیار متغیر بوده و بستگی به منطقه جداسازی، سویه باکتری و طیف آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در منطقه جداسازی دارد. نتایج حاصل از این مطالعه در تبیین وضعیت حاملین باکتری در بین گونه‌های مختلف پرندگان وحشی در منطقه مفید می‌باشد. همچنین مقایسه الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های به‌دست آمده از این پژوهش با الگوی سویه‌های حاصل از مطالعات پیشین، اطلاعات جدیدی را درباره افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های حاصل از گله‌های صنعتی پرورش طیور در اختیار قرار می‌دهد.

منابع مورد استفاده

1- Abdul-Aziz, T.A. (1997) *Ornithobacterium rhinotracheale* developing into a serious infection. *World Poultry Misset*. 13:47-48.

2- Allymehr, M. (2006) Seroprevalence of *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in broiler and broiler breeder chickens in West Azerbaijan Province. Iran. *J. Vet. Med*. 53:40-42.

3- Asadpour, Y., Banani, M. and Pourbakhsh, S.A. (2011) Isolation, identification and antibiotic sensitivity determination of *Ornithobacterium rhinotracheal*e in slaughtering broiler chicken flocks of Guilan province. Iran. *J. Vet. Res.* 12(4):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 & Sazandegi*. 46:106-109. (In Persian)

5- Banani, M., Pourbakhsh, S.A. and Khaki, P. (2001a) Characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolates from commercial chickens. *Arc. Razi Inst*. 52:27-34.

6- Banani, M., Pourbakhsh, S.A. and Deihim, A.H. (2001b) Antibiotic sensitivity of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolate associated with respiratory disease. *Arc. Razi Inst.* 58:111-117.

7- Banani, M., Pourbakhsh, S. A., Moazeni-Jula, G., Momayez, R., Ezzi, A. (2002) Natural infection with *Ornithobacterium rhinotracheale* in commercial poultry and experimental infection in specific

pathogen-free chickens. *Pajouhesh & Sazandegi.* 55: 28-37. (In Persian)

8- Banani, M., Pourbakhsh, S.A., Khaki, P. and Nikookhesal-Gilvayi, H. (2003) Serotyping and drug sensitivity of Salmonellae isolates from commercial chickens and domestic pigeons submitted to Razi institute. *Pajouhesh & Sazandegi.* 59:91-99. (In Persian)

9- Banani, M., Pourbakhsh, S.A., Khaki, P. and Moazeni-Jula, G.R. (2004) Isolation and identification of bacterial agents in commercial chickens suffered from swollen head andface. Iran. *J. Vet. Res.* 9:49-61.

10 - Banani, M., Pourbakhsh, S.A., Erami, M., Gholamin, F. and Fatehmanesh, M. (2009) Diagnosis of *Ornithobacterium rhinotracheale* using polymerase chain reaction (PCR). *J. Vet. Res.* 64(1):41-45. (In Persian)

11- Chansiripornchai, N., Wanasawaeng, W. and Sasipreeyajan, J. (2007) Seroprevalence and identification of *Ornithobacterium rhinotracheale* from broiler and broiler breeder flocks in Thailand. *Avian Dis*. 51:777-780.

12- Charlton, B.R., Channing-Santiago, S.E., Bickford, A.A., Cardona, C.J., Chin, R.P., Cooper, G.L., Droual, R., Jeffrey, J.S., Meteyer, C.U., Shivaprasad, H.L. and Walker, R.L. (1993) Preliminary characterization of a pleomorphic gram negative rod associated with avian respiratory disease. *J. Vet. Diag. Inv.* 5:47–51.

13- Chernyshev, A.V., Sprygin, A.V., Ruchnova, O.I., Mudrak, N.S., Pruntova, O.V. and Drygin, V.V. (2011) Characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* from commercial chicken and turkey flocks in Russia. In: American Association of Avian Pathologists (eds.), Proceedings of the 2011 Annual Meeting of the American Association of Avian Pathologists, 16-19 July, St. Louis, Missouri, United States, (http://www.aaap.info/assets/2011Program/aaap%202011%20abstracts.pdf)

14- Chin, R.P., Van Empel, P.C.M. and Hafez, H.M. (2008) Ornithobacterium rhinotracheale infection. In: Diseases of poultry, 11th edition (Saif, Y.M., Calnek, B.W., Barnes, H., Glisson, J.R . and McDougald, L.R.). Blackwell Publishing Ltd, Oxford, United Kingdom. pp: 683-688.

15- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2008) Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard, third ed. CLSI document M31-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

16- Devriese, L.A., Hommez, J., Vandamme, P. and Kesters, K. (1995) In vitro antibiotic sensitivity of *Ornithobacterium rhinotracheale* strains from poultry and wild birds. *Vet. Record.* 137:435-36.

17- Devriese, L.A., De Herdt, P. and Haesebrouck, F. (2001) Antibiotic sensitivity and resistance in *Ornithobacterium rhinotracheale* strains from Belgian broiler chickens. Avian Pathol. 30:197–200.

18- Erganis, O., Hadimli, H.H., Kav, K., Çorlu, M. and 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 Pathol*. 31:201-204.

19- Hafez, M.H. and Sting, R. (1999) Investigation on different *Ornithobacterium rhinotracheale* " ORT" isolates. Avian Dis. 43:1-7.

20- Hafez, H.M. (2002) Diagnosis of *Ornithobacterium rhinotracheale.* Int. J. Poultry Sci. 1:114-118.

21-Hassanzadeh, M., Karimi, V., Fallah, N. and Ashrafi, I. (2010) Molecular characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolated from broiler chicken flocks of Iran. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 34:1-6.

22- Jamshidian, M. and Mayahi, M. (2008) Isolation of *Ornithobacterium rhinotracheale* from broilers in Ahvaz. *Iran Vet. J.* 4(1): 29-36. (In Persian)

23- Mirzaie, S., Hassanzdeh, M., Bozorgmehrifard, M.H. and Banani, M. (2011) Isolation and characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* in the commercial turkey, quail flocks and domestic pigeons by bacteriological and molecular methods. *Arc. Razi Inst.* 66(2): 121-127.

24- Roussan, D.A., Al-Rifai, R.H., Khawaldeh, G.Y., Totanji, W.S. and Shaheen, I. (2011) *Ornithobacterium rhinotracheale* and *Mycoplasma synoviae* in broiler chickens in Jordan. Reviw of science technology in Office international des Epizooties (OIE). 30(3): 931-937

25- Schuijffel, D.F., Van Empel, P.C.M., Pennings, A.M.M.A., Van Putten, J.P.M. and Nuijten, P.J.M. (2005) Successful selection of cross-protective vaccine candidates for *Ornithobacterium rhinotracheale* infection. *Infec. Immun.* 73: 6812-6821.

26- Soriano, V.E., Longinos, M.G., Navarrete, P.G. and Fernandez, R.P. (2002) Identification and characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolates from Mexico. *Avian Dis.* 46: 686-690.

27- Soriano, V.E., Vera, N.A., Salado, C.R., Fernandez, R.P. and Blackall, P.J. (2003) In vitro susceptibility of *Ornithobacterium rhinotracheale* to several antimicrobial drugs. *Avian Dis.* 47:476-480.

28- Tsai, H.J. and Huang, C.W. (2006) Phenotypic and molecular characterization of isolates of *Ornithobacterium rhinotracheale* from chickens and pigeons in Taiwan. *Avian Dis.* 50:502-507.

29- Turkyilmaz, S. (2005) Isolation and serotyping of *Ornithobacterium rhinotracheale* from poultry. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*

29:1299-1304.
30- Van Beek, P. (1994), *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT), clinical aspects in broilers and turkeys. Annual meeting of the veterinary study group of the EU, Amsterdam, November, 1994.
31- Vandamme, P., Segers, P., Vancaneyl, M., VanHove, K., Mutters, R., Hommez, J., Dewirst, F., Paster, B., Kersters, K., Falsen, F., Devrieze, L., Bisgard, M., Hinz, K.H. and Mannheim, W. (1994) Description *of Ornithobacterium rhinotracheale* gen. nov. sp. nov. isolated from the avian respiratory tract. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 44:24-37.
32- Van Empel, P.C.M., Van Den Bosch, H., Loeffen, P. and Storm, P. (1997) Identification and serotyping of *Ornithobacterium rhinotracheale*. *J. Clinic. Microbiol*. 35: 418–421.
33- Van Empel, P. and Hafez M.H. (1999), *Ornithobacterium rhinotracheale*: a review. *Avian Pathol.* 28:217-227.
34- Van Veen, L. (2003) Do we know the real impact of *Ornithobacterium rhinotracheale* infections. *Poultry Inter.* 42,5.