DOI:10.22092/VJ.2022.356669.1911
شماره ۱۳۶ پاییز ۱۴۰۱
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

بررسی فنوتیپی و ژنوتیپی جدایه‌های اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال نمونه‌های طیور صنعتی ایران، ارسالی به موسسه رازی

• **رحیم قدیمی‌پور**
بخش تحقیق و توسعه، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزي، مرند، ایران
• **ناصر قدسیان (نویسنده مسئول)**
بخش کنترل کیفی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزي، کرج، ایران
• **وحید کریمی**
گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
• **منصور بنانی**
بخش تحقیق و تشخیص بیماری‌های طیور، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزي، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰-۰۸-۲۲ تاریخ پذیرش:۱۴۰۰-۱۰-۲۲
Email: ghodsian2001@gmail.com

چکیده

مطالعه حاضر با هدف بررسی فنوتیپی و ژنوتیپی جدایه‌های اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال (ORT) نمونه‌های حاصل از ماکیان صنعتی مناطق مختلف ایران با بکارگیری روش باکتریایی مرسوم و نیز آزمون واکنش زنجیره‌اي پلیمراز (PCR) طراحی گردید. به همین منظور، ۲۵ نمونه باکتری از بانک میکروبی بخش تحقیق و تشخیص بیماری‌های طیور موسسه رازی انتخاب شدند. این نمونه‌ها با کشت در محیط‌های رایج باکتریایی و نیز استفاده از آزمایش‌های بیوشیمیایی به‌عنوان جدایه‌های ORT تعیین هویت فنوتیپی شده و در استفاده از آزمون PCR نیز باند اختصاصی ۷۸۴ جفت‌بازی (bp) را نشان‌داده و تایید مولکولی شدند. بر اساس نتایج آزمایش تعیین الگوی هماگلوتیناسیون جدایه‌ها به روش آزمون هماگلوتیناسیون سریع (RHAT)، از ۱۶ جدایه تحت بررسی، چهار جدایه (۲۵/۰۰ ٪) با خون رت، یک جدایه (۶/۲۵ ٪) با خون همستر، یک جدایه (۶/۲۵ ٪) با خون خوکچه و یک جدایه (۶/۲۵ ٪) نیز با خون انسان آگلوتیناسیون ایجاد نمودند، ولی هیچ‌یک از آن‌ها قادر به هماگلوتینه کردن گلبول‌های قرمز موش، خرگوش، گوسفند، بز و مرغ نبودند. بر طبق داده‌های انگشت‌نگاری مولکولی جدایه‌ها با تکنیک تکثیر مناطق بین‌ژنی تکراری حفاظت‌شده انتروباکتریایی (ERIC-PCR)، همه جدایه‌ها (۱۰۰ ٪)، بدون تاثیرپذیری از نوع و نژاد پرنده و نیز سال و منطقه جداسازی، حاوی ۱۹ باند ۱۲۰ تا ۲۵۰۰ جفت‌بازی بوده و در یک الگوی ژنتیکی (A) قرار گرفتند. بر اساس یافته‌های این مطالعه، تمام جدایه‌های ORT ماکیان صنعتی مناطق مختلف ایران از نظر پروفایل مولکولی بسیار شبیه به هم بوده، به ژنوتیپ واحدی وابستگی داشته و مشابهت بالایی با ژنوتیپ A مورد اشاره در تحقیقات سایر دانشمندان دارند.

کلمات کلیدی: اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال، ماکیان صنعتی، هماگلوتیناسیون، ERIC-PCR، ایران

● Veterinary Researches & Biological Products No 136 pp: 29-38

Pheno- and genotypic investigation of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolates of commercial poultry samples sent to Razi institute, Iran

By: Ghadimipour, R., Department of Research and Development, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Marand, Iran. Ghodsian, N., (Corresponding Author) Department of Quality Control, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Karimi, V., Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran. and Banani, M., Department of Avian Diseases, Research and Diagnosis, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Received: 2021-11-13 Accepted: 2022-01-12

Email: ghodsian2001@gmail.com

The aim of the present study was the pheno- and genotypic investigation of *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) isolates of commercial poultry in different areas of Iran based on conventional bacterial method and polymerase chain reaction (PCR) technique. For this purpose, 25 bacterial samples were selected from the microbial bank of the Avian Diseases Research and Diagnosis Department of Razi Institute. The cultural and biochemical investigations were identified all of the samples as ORT isolates. The isolates were also confirmed by PCR based on a 784-bp amplified fragment related to the estimated length. According to the results of determination of the haemagglutination pattern of the isolates by rapid haemagglutination test (RHAT), four (25.00%), one (6.25%), one (6.25%) and one (6.25%) of 16 studied isolates showed hemagglutination activity with rat, hamster, guinea pig and human red blood cells (RBCs), respectively, but none of them could react with mice, rabbits, sheep, goats and chickens RBCs. Based on the fingerprinting of the isolates by enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR, all isolates (100%), without being affected by the type and breed of bird as well as the year and geographical area of separation, showed approximately 19 bands between 120 and 2500 bp and were typed into one genetic pattern (A). Our findings show that all of ORT isolates from commercial poultry in different areas of Iran are very similar in molecular profile, depend on a specific genotype, and are highly similar to genotype A mentioned in research by other scientists.

Key words: *Ornithobacterium rhinotracheale*, Commercial poultry, Hemagglutination, ERIC PCR, Iran

مقدمه

اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال (ORT) باکتری میله‌ای، گرم منفی و دارای چندشکلی زیاد است که باعث کاهش تولید تخم، کاهش رشد، بروز نشانه‌های تنفسی و افزایش میزان مرگ و میر در گله‌های ماکیان و بوقلمون می‌گردد (۱۵، ۲۰، ۲۵). این ارگانیسم به‌عنوان یکی از عوامل مهم بیماری‌زای صنعت طیور شناخته شده‌است که در سال‌های اخیر در ایالات متحده آمریکا، فرانسه، مکزیک، هلند، آلمان، بلژیک، اسپانیا، برزیل، آفریقای جنوبی، تایوان، مجارستان، کره جنوبی، انگلستان، ترکیه و بسیاری دیگر از کشورها گزارش شده‌است (۵، ۱۴، ۲۲، ۲۳). عفونت با ORT تاکنون در گونه‌های مختلف پرندگان اهلی و وحشی از قبیل بوقلمون، مرغ، اردک، غاز، شترمرغ، مرغ دریایی، بلدرچین، کبک، کبوتر، قرقاول، مرغ شاخدار و زاغ شناسایی شده‌است (۷، ۲۵). در ایران، برای نخستین بار بنانی و همکاران (۱۳۷۹) عفونت با این باکتری را در یک گله گوشتی و یک گله تخم‌گذار ماکیان دارای نشانه‌های تنفسی شناسایی و گزارش کردند (۸).

شدت علائم و میزان مرگ و میر ناشی از این ارگانیسم می‌تواند تحت تأثیر حدت و میزان بیماری‌زایی آن و همچنین عوامل محیطی و مدیریتی متعددی مانند تهویه نامناسب، تراکم بالا و بهداشت پایین گله، آمونیاک، دما و رطوبت بالای محیط و نیز عفونت‌های هم‌زمان حاصل از سایر عوامل بیماری‌زای تنفسی از قبیل بوردتلا آویوم، ویروس بیماری نیوکاسل، کلامیدوفیلا پسیتاسی، ویروس آنفلوانزای طیور، ویروس برونشیت عفونی، مایکوپلاسما سینویه و اشرشیا کلای باشد (۱۲، ۲۲، ۲۵).

تاکنون محققین متعددی گسترش جهانی ORT را مورد مطالعه قرارداده و با بهره‌گیری از تکنیک‌های مختلف تایپینگ سعی در توصیف و طبقه‌بندی سویه‌های این باکتری نموده‌اند (۲۵). دسته‌بندی سرولوژیکی سویه‌های ORT با استفاده از روش رسوب در ژل آگارز (Agar Gel Precipitation Test, AGPT) بسیار کاربردی و رایج می‌باشد (۲۴). تابه‌حال ۱۸ سروتیپ مختلف این ارگانیسم (A-R) شناسایی شده‌اند که ۹۵ ٪ سویه‌های مرغی و بیش از ۵۰ ٪ از جدایه‌های بوقلمون آن متعلق به سروتیپ A می‌باشند (۱۸، ۲۴). با این‌همه، به‌دلیل در دسترس نبودن آنتی‌سرم‌های اختصاصی

و نیز بروز واکنش‌های متقاطع بین سروتیپ‌های مختلف ORT، تکنیک رسوب در ژل آگارز در شناسایی زیرگروه‌های جدایه‌های مزرعه‌ای این باکتری ضعیف و ناکارآمد به نظر می‌رسد (۲۴).

تکنیک سرولوژیکی هماگلوتیناسیون (Hemagglutination, HA) نیز یکی از روش‌های پرکاربرد به‌منظور شناسایی و عیارسنجی میکروب‌هاست. این روش اگرچه حساسیت نسبتاً کمتری دارد، با این‌همه برای تشخیص سریع میکروب‌ها، بدون استفاده از تجهیزات تخصصی، می‌توان از آن بهره‌برد. در طی واکنش هماگلوتیناسیون، گلیکوپروتئین هماگلوتینین روی سطح میکروب با گلبول‌های قرمز خون وارد واکنش شده و منجر به جمع‌شدن سلوهای قرمز خون و تشکیل شبکه می‌گردد. در غیاب میکروب و یا گلیکوپروتئین، گویچه‌های قرمز خون در ته ظرف رسوب‌کرده و نقطه قرمز رنگی را تشکیل می‌دهند (۱۵). این تکنیک عمدتا در مورد بعضی ویروس‌ها از جمله ویروس آنفلوانزا و ویروس بیماری نیوکاسل استفاده می‌شود. با این‌همه، نتایج مطالعات اندکی که از این روش برای بررسی توانایی هماگلوتیناسیون، عیارسنجی و مشخص نمودن بخشی از ویژگی‌های فنوتیپی سویه‌های ORT جداسازی‌شده از گونه‌های مختلف پرندگان اهلی و وحشی استفاده نموده‌اند، حکایت از ارتباط حدت سویه‌های مختلف ORT با هماگلوتینه نمودن گلبول‌های قرمز خون توسط آن‌ها، اختصاصی بودن توانایی هماگلوتیناسیون گلبول‌های قرمز یک میزبان خاص توسط سویه‌های ORT جداسازی‌شده از گونه‌های معینی از پرندگان اهلی و وحشی، و نیز ارتباط مستقیم بین توانایی برخی از جدایه‌های ORT برای آگلوتینه کردن گلبول‌های قرمز و اندازه پرگنه آن‌ها دارد (۱۷، ۲۳).

بهره‌گیری از روش‌های مرسوم فنوتیپی و نیز نشانگرهای نوین ژنوتیپی نیز برای انگشت‌نگاری اپیدمیولوژیک جدایه‌های ORT مورد استفاده بوده و توسعه یافته‌است. تکنیک‌های مختلف انگشت‌نگاری مبتنی بر قطعات ژنی مانند تکثیر مناطق بین‌ژنی تکراری حفاظت‌شده انتروباکتریایی از طریق PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Based PCR, ERIC-PCR) (۲۱)، پلی‌مورفیسم قطعات تکثیرشده تصادفی (DNA (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD-PCR (۲۰) و پلی‌مورفیسم طولی قطعات تکثیرشده Amplified Fragment Length Polymorphism, (AFLP) (۷) روش‌های سریعی هستند که برای تمایز جدایه‌های ORT در سطح سویه و یا بر روی گونه و زیرگونه‌ها استفاده می‌شوند (۲۱). این تکنیک‌ها، روش‌های حساس و اختصاصی هستند که در چندین مطالعه برای بررسی، تایپینگ و مقایسه تفاوت‌های گونه‌ای جدایه‌های باکتریایی مطرح در حوزه دامپزشکی با موفقیت از آن‌ها استفاده شده‌است (۱۴).

مرور مستندات مربوط به باکتری ORT در ایران حاکی از آن است که در خصوص تایپینگ سویه‌های این ارگانیسم با روش‌های مختلف مولکولی، کار پژوهشی چندانی انجام نیافته‌است. بدین جهت، پژوهش جاری با هدف بررسی و شناسایی فنوتیپی، تایید ژنوتیپی، تعیین الگوی هماگلوتیناسیون و نیز انگشت‌نگاری مولکولی این باکتری با روش ERIC-PCR در نمونه‌های حاصل از ماکیان صنعتی مناطق مختلف جغرافیایی کشور ارسالی به موسسه رازی طراحی شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌ها

تعداد ۲۵ نمونه باکتری که در طی سال‌های ۱۳۸۸-۱۳۷۷ از گله‌های ماکیان صنعتی مناطق جغرافیایی و استان‌های مختلف کشور جمع‌آوری شده و در بانک میکروبی بخش تحقیق و تشخیص بیماری‌های طیور موسسه رازی (موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج، ایران) نگه‌داری می‌شدند، انتخاب گردیدند. این نمونه‌ها با توجه به شواهد بالینی میزبان‌ها و نتایج کشت‌های اولیه میکروبی به عنوان جدایه‌های مظنون به ORT شناسایی شده، و همزمان با ثبت اطلاعات مربوط به گله‌ها شامل استان و شهرستان محل نگهداری، نوع و نژاد، سن، تعداد کل پرندگان، تعداد تلفات، عوامل بیماری‌زای هم‌زمان جداسازی‌شده و نیز علائم بالینی مشاهده‌شده در فرم‌های مخصوص، در محیط ذخیره‌سازی Skim Milk و در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شده بودند.

بررسی و تعیین هویت فنوتیپی

به منظور حصول اطمینان از رشد مجدد نمونه‌ها و نیز شناسایی فنوتیپی آن‌ها، نمونه‌ها ابتدا بر روی محیط آگار خون‌دار (حاوی پنج درصد خون گوسفند) (مرک، آلمان) دارای ۵/۲ mL/µg جنتامایسین کشت‌شده و در گرم‌خانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد که حاوی ۷/۵ ٪ دی‌اکسید کربن بود به‌مدت ۴۸ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند؛ به‌دنبال آن پرگنه‌های کوچک، غیرهمولیتیک و خاکستری رنگ مظنون به باکتری ORT برای مراحل بعدی انتخاب و خالص‌سازی شدند (۱۳). به‌منظور مشاهده و بررسی اندازه و شکل باکتری‌های خالص‌سازی شده، از تکنیک رنگ‌آمیزی گرم و به‌منظور مطالعه بیولوژیکی آن‌ها، از آزمون‌های بیوشیمیایی شامل تولید اوره‌آز، اکسیداز، احیای نیترات، کاتالاز، رشد بر روی آگار مک‌کانکی، تحرک، تولید اندول و رشد در محیط سه‌قندی آهن‌دار (TSI) (مرک، آلمان) استفاده شد (۱۳). جدایه‌هایی که از منظر آزمون‌های بیوشیمیایی و کشت‌های باکتریایی به‌عنوان ORT تعیین هویت فنوتیپی شدند، برای تایید مولکولی و ادامه مطالعات در محیط ذخیره‌سازی Skim Milk (مرک، آلمان) و در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

تایید ژنوتیپی

استخراج DNA

در بررسی جاری جهت استخراج DNA جدایه‌ها از روش جوشاندن (Boiling) استفاده شد. بدین ترتیب که ابتدا چند پرگنه خالص از محیط کشت آگار خون‌دار انتخاب شده و در ۴۰۰ میکرولیتر بافر سالین فسفات (PBS) استریل حل گردید. مخلوط حاصله به‌مدت پنج دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد جوشانده شد. تعلیق به‌دست آمده به‌مدت ۱۰ دقیقه در سرعت ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. نهایتا، ۲۰۰ میکرولیتر از محلول رویی در میکروتیوب‌های استریل به‌منظور انجام ORT در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره‌سازی شد.

آزمون PCR

در این مطالعه جهت تایید مولکولی جدایه‌های ORT، بر اساس روش وان امپل و حافظ (۱۹۹۹) یک قطعه ژنی ۷۸۴ جفت بازی (bp) مربوط به

ژن *16S rRNA* با بهره‌گیری از یک جفت پرایمر اختصاصی مورد تکثیر قرارگرفت (۲۵). توالی نوکلئوتیدی این پرایمرها به ترتیب زیر بود:

توالی پرایمر جلودار:

5-GAGAATTAATTTACGGATTAAG-3

توالی پرایمر برگشتی:

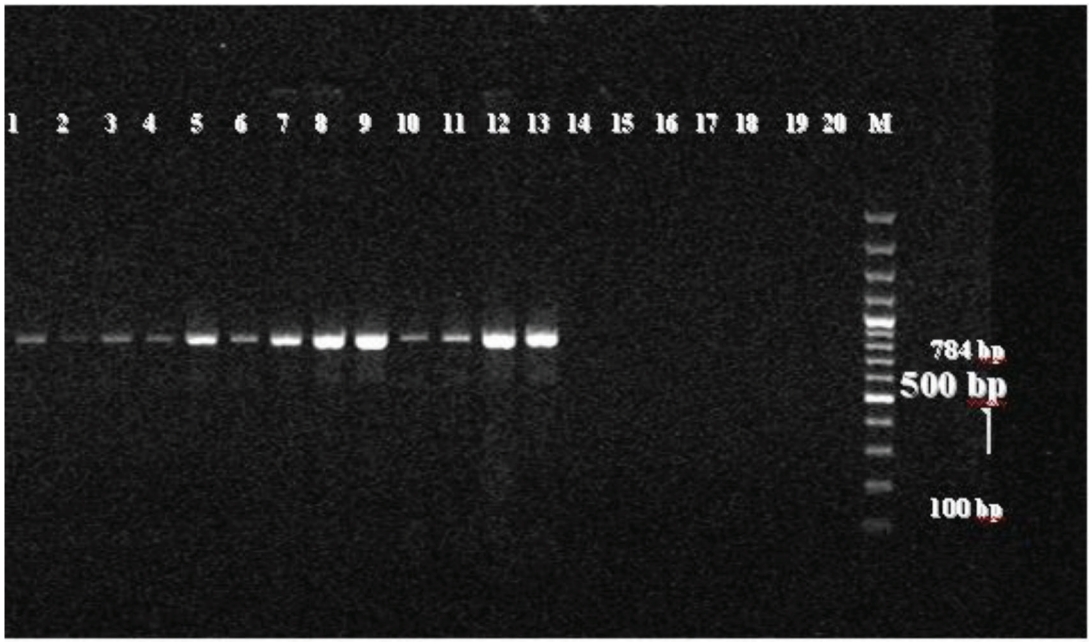
5-TTCGCTTGGTCTCCGAAGAT-3

آزمون PCR با حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس X۲ آماده (سیناکلون، ایران، دارای $MgCl_2$، dNTPs، *Taq* DNA Polymerase و PCR buffer)، پنج میکرولیتر DNA استخراج‌شده، دو میکرولیتر از هر یک از پرایمرها (۱۰ pM، سیناکلون، ایران) و ۵/۵ میکرولیتر آب DEPC انجام‌شد. برنامه دمایی این آزمون شامل مرحله واسرشت اولیه (Initial Denaturation)، پنج دقیقه، ۹۵ درجه سانتی‌گراد، سپس مراحل واسرشت (Denaturation)، ۳۰ ثانیه، ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال (Annealing)، یک دقیقه، ۵۳ درجه سانتی‌گراد و طویل‌سازی (Extension)، دو دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد، به تعداد ۳۵ چرخه و در پایان برنامه، مرحله طویل‌سازی نهایی (Final Extension)، پنج دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. پس از انجام واکنش PCR و تکثیر احتمالی ژن هدف، هفت میکرولیتر از محصول تکثیر در کنار مارکر ۱۰۰ bp (سیناکلون، ایران) و جدایه‌های ORT تاییدشده (با کمک آزمایش‌های بیوشیمیایی و آنتی‌سرم اختصاصی سروتیپ A) به‌عنوان کنترل مثبت (تهیه‌شده از بانک میکروبی بخش تحقیق و تشخیص بیماری‌های طیور موسسه رازی، کرج، ایران) و آب DEPC و چند نمونه باکتری به‌عنوان کنترل منفی در ژل آگارز یک درصد حاوی رنگ ایمن (سیناکلون، ایران) در ولتاژ ۸۰ ولت به مدت یک ساعت الکتروفورز شده و بعد از بررسی باندهای تشکیل‌شده، در صورت رویت قطعه ژنی ۷۸۴ bp، جدایه مدنظر از نظر مولکولی تایید شده و به عنوان ORT در نظر گرفته‌شد (شکل ۱).

تعیین الگوی هماگلوتیناسیون

در مطالعه حاضر برای تعیین الگوی هماگلوتیناسیون جدایه‌ها از آزمون هماگلوتیناسیون سریع (Rapid Haemagglutination Test, RHAT) استفاده شد (۱۵). بدین منظور، ابتدا ۱۶ مورد از جدایه‌های تحت آزمایش در محیط آبگوشت عصاره مغز و قلب (BHI، بیولایف، ایتالیا) کشت شده و سپس با گلبول قرمز شسته‌شده ۱۰ ٪ تهیه‌شده از خون تازه موش، رت، خرگوش، همستر، خوکچه، گوسفند، بز، جوجه (بخش حیوانات آزمایشگاهی موسسه رازی، کرج، ایران) و نیز انسان مجاورت داده‌شدند. برای انجام این مرحله از آزمایش از سه روش مختلف به ترتیب زیر استفاده شده و نتایج حاصله ثبت گردید:

الف) یک قطره از جدایه کشت‌شده در محیط آبگوشت عصاره مغز و قلب با یک قطره از گلبول قرمز شسته‌شده حاصل از حیوانات مختلف و انسان در پلیت‌های مخصوص ۱۲ گوده‌ای مخلوط گردیده و به مدت ۲-۱



شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز یک درصد، رنگ‌آمیزی شده با رنگ ایمن. چاهک‌های ۵-۱: کنترل‌های مثبت (باکتری‌های ORT تاییدشده با کمک آزمایش‌های بیوشیمیایی و آنتی‌سرم اختصاصی سروتیپ A)، چاهک‌های ۱۳-۶: جدایه‌های اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال (ORT) تحت آزمایش (قطعه ۷۸۴ bp ژن *16SrRNA* این ارگانیسم)، چاهک‌های ۱۹-۱۴: نمونه‌های باکتری کنترل منفی به ترتیب شامل ساملونلا انتریتیدیس، اشرشیا کلای سروتیپ O2، پاستورلا مولتوسیدا سروتیپ A1، هموفیلوس پاراگالیناروم سروتیپ C، مایکوپلاسما گالی‌سپتیکوم و مایکوپلاسما سینویه، چاهک ۲۰: کنترل منفی (آب DEPC)، چاهک M: مارکر ۱۰۰ bp.

دقیقه تکان داده‌شد.

ب) ۱۰۰۰ میکرولیتر از جدایه کشت‌شده در محیط آبگوشت عصاره مغز و قلب به مدت ۱۰ دقیقه در سرعت ۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. به‌دنبال آن ۷۰۰ میکرولیتر از محلول رویی حذف شده و آزمایش با یک قطره از ۳۰۰ میکرولیتر باکتری کنسانتره‌شده تکرار شد.

ج) یک قطره از جدایه بر روی محیط آگار خون‌دار کشت چهار منطقه‌ای داده‌شد، سپس تک پرگنه باکتری مستقیما با آنس برداشته‌شده و پس از حل کردن آن در یک قطره PBS آزمایش بر روی آن انجام شد.

در انجام هر کدام از روش‌ها، از گلبول قرمز شسته‌شده ۱۰ ٪ هر کدام از میزبان‌ها و نیز محیط کشت آبگوشت عصاره مغز و قلب به‌عنوان شاهدهای منفی، و آنتی‌ژن حاوی سویه V4 ویروس بیماری نیوکاسل و نیز آنتی‌ژن حاوی سویه H9N2 ویروس آنفلوانزای طیور (تهیه‌شده از بانک میکروبی بخش تحقیق و تشخیص بیماری‌های طیور موسسه رازی، کرج، ایران) که قادر به آگلوتینه نمودن گلبول‌های قرمز پرندگان هستند،

جدول ۱- نتایج آزمون هماگلوتیناسیون ۱۶ جدایه اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال (ORT) تحت‌مطالعه با گلبول قرمز حاصل از حیوانات مختلف آزمایشگاهی و نیز انسان.

کد جدایه	منشاء گلبول قرمز								
	موش	رت	خرگوش	همستر	خوکچه	گوسفند	بز	جوجه	انسان
ORT-R80-31	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ORT-R80-34	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ORT-R79-44	-	+	-	-	+	-	-	D	-
ORT-R79-38	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ORT-R80-30	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ORT-R86-20	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ORT-R87-7	-	+	-	-	-	-	-	-	-
ORT-R87-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ORT-R87-10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ORT-R78-1	-	-	-	+	-	-	-	-	-
ORT-R79-47	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ORT-R79-35	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ORT-R79-41	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ORT-R79-33	-	-	D	D	-	-	D	D	+
ORT-R79-40	-	+	-	-	-	-	-	-	-
ORT-R79-50	-	+	-	-	-	-	-	-	-
ویروس آنفلوانزای طیور (AIV-H9N2)	+	D	+	+	+	+	+	+	+
ویروس بیماری نیوکاسل (NDV-V4)	D	D	+	+	+	+	+	+	+
محیط آبگوشت عصاره مغز و قلب (BHI)	-	-	-	-	-	-	-	-	-

D: Doubtful.

BHI: Brain Heart Infusion Broth.

به‌عنوان شاهدهای مثبت استفاده شد.

تایپینگ به روش ERIC-PCR

برای انگشت‌نگاری جدایه‌ها با تکنیک ERIC-PCR از روش توصیه‌شده توسط تاچیل و همکاران (۲۰۰۷) بهره‌برداری شد (۲۱). توالی نوکلئوتیدی تک پرایمر مورد استفاده در این روش به ترتیب زیر بود:

ERIC 1R 5-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC-3

آزمایش PCR با حجم ۲۰ میکرولیتر شامل مسترمیکس آماده (BIONEER، کره جنوبی، دارای یک واحد 250 µM *Top* DNA Polymerase، 5/1 mM MgCl2، dNTPs و 40 mM PCR buffer)، پنج میکرولیتر DNA استخراج‌شده، ۲/۵ میکرولیتر پرایمر (۱۰ pM، تکاپوزیست، ایران) و ۱۲/۵ میکرولیتر آب DEPC انجام‌گردید. برنامه دمایی آزمون PCR شامل مرحله واسرشت اولیه، ۱۰ دقیقه، ۹۴ درجه سانتی‌گراد، سپس مراحل واسرشت، ۴۵ ثانیه، ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال، سه دقیقه، ۴۰ درجه سانتی‌گراد و طویل‌سازی، چهار دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد، به تعداد ۳۵ چرخه و در پایان برنامه، مرحله طویل‌سازی نهایی، ۱۰ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. پس از انجام واکنش PCR و تکثیر احتمالی قطعات ژنی هدف، هفت میکرولیتر از محصول تکثیر در کنار مارکر ۱۰۰۰ bp (سیناکلون، ایران) و سویه تاییدشده ارگانیسم به‌عنوان کنترل مثبت و آب DEPC به‌عنوان کنترل منفی در ژل آگارز دو درصد (سیناکلون، ایران) در ولتاژ ۷۵ ولت به مدت ۱۳۰ دقیقه الکتروفورز شده و باندهای تشکیل‌شده تحت بررسی و کنکاش قرار گرفتند.

تجزیه و تحلیل آماري

نتایج آزمایش‌ها به‌وسیله نسخه ۱۷ نرم‌افزار SPSS و بهره‌گیری از آزمون‌های مربع کای و فیشر و آمار توصیفی آنالیز شده و $P<0/05$ مبنای اختلاف معني‌دار درنظر گرفته‌شد.

نتایج

شناسایی هویت فنوتیپی جدایه‌ها

در بررسی حاضر، همه ۲۵ نمونه انتخاب‌شده از بانک میکروبی در آزمون‌های بیوشیمیایی و کشت‌های باکتریایی به‌عنوان باکتری ORT شناسایی شدند. این جدایه‌ها در محیط آگار خون‌دار به‌خوبی رشد کرده و دارای پرگنه‌های نوک سنجاقی، خاکستری رنگ (متمایل به سفید) و فاقد قدرت همولیز بودند، درحالی‌که در محیط‌های آگار TSI و آگار مک‌کانکی قادر به رشد نبودند. بر اساس آزمون‌های بیوشیمیایی، اجرام خالص‌سازی شده از نظر ژلاتیناز، اوره‌آز، کاتالاز و اندول منفی ولی از نظر اکسیداز مثبت بودند.

تایید ژنوتیپی جدایه‌ها

در مطالعه مولکولی نیز همه ۲۵ نمونه انتخاب‌شده با بهره‌گیری از آزمون PCR قطعه ژنی اختصاصی ۷۸۴ bp را نشان داده و تایید مولکولی شدند (شکل ۱).

الگوی هماگلوتیناسیون جدایه‌ها

طبق نتایج آزمایش تعیین الگوی هماگلوتیناسیون جدایه‌ها، در استفاده از هر سه روش آزمون هماگلوتیناسیون سریع، از ۱۶ جدایه تحت بررسی، چهار جدایه (۲۵/۰۰ ٪) با خون رت، یک جدایه (۶/۲۵ ٪) با خون همستر، یک جدایه (۶/۲۵ ٪) با خون خوکچه و یک جدایه (۶/۲۵ ٪) نیز با خون انسان آگلوتیناسیون ایجاد نمودند، ولی هیچ‌یک از آن‌ها قادر به هماگلوتینه کردن گلبول‌های قرمز موش، خرگوش، گوسفند، بز و مرغ نبودند (جدول ۱). بررسی‌های ما نشان داد که در استفاده از هر سه روش، نتایج اخذشده تفاوت معنی‌داری نداشتند. همچنین یافته‌های این بخش از پژوهش حاضر مشخص نمود که نمونه‌هایی که به‌عنوان مثبت تلقی شدند آگلوتیناسیون سریع و واضحی را نشان دادند درحالی‌که در

جدول ۲- نتایج انگشت‌نگاری ۲۵ جدایه اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال (ORT) حاصل از گله‌هاي ماکیان صنعتي استان‌های مختلف کشور با بهره‌گیری از روش تایپینگ ERIC-PCR.

منشاء جغرافیایی	الگوهای حاصل از انگشت‌نگاری با روش ERIC-PCR	تعداد جدایه‌ها	درصد فراوانی جدایه‌ها	اندازه تقریبی باندها (bp)	ژنوتیپ پیشنهادی
البرز	A	۱۰	۴۰	۱۲۰۰-۱۵۰۰-۲۰۰۰-۲۳۰۰-۲۵۰۰ ۶۲۰-۶۸۰-۷۵۰-۸۵۰-۹۲۰-۹۸۰-۱۰۵۰ ۱۲۰-۱۸۰-۲۵۰-۳۲۰-۳۸۰-۴۸۰-۵۲۰	I
گیلان		۴	۱۶		
مازندران		۲	۸		
اصفهان		۱	۴		
قم		۱	۴		
مرکزی		۱	۴		
قزوین		۶	۲۴		

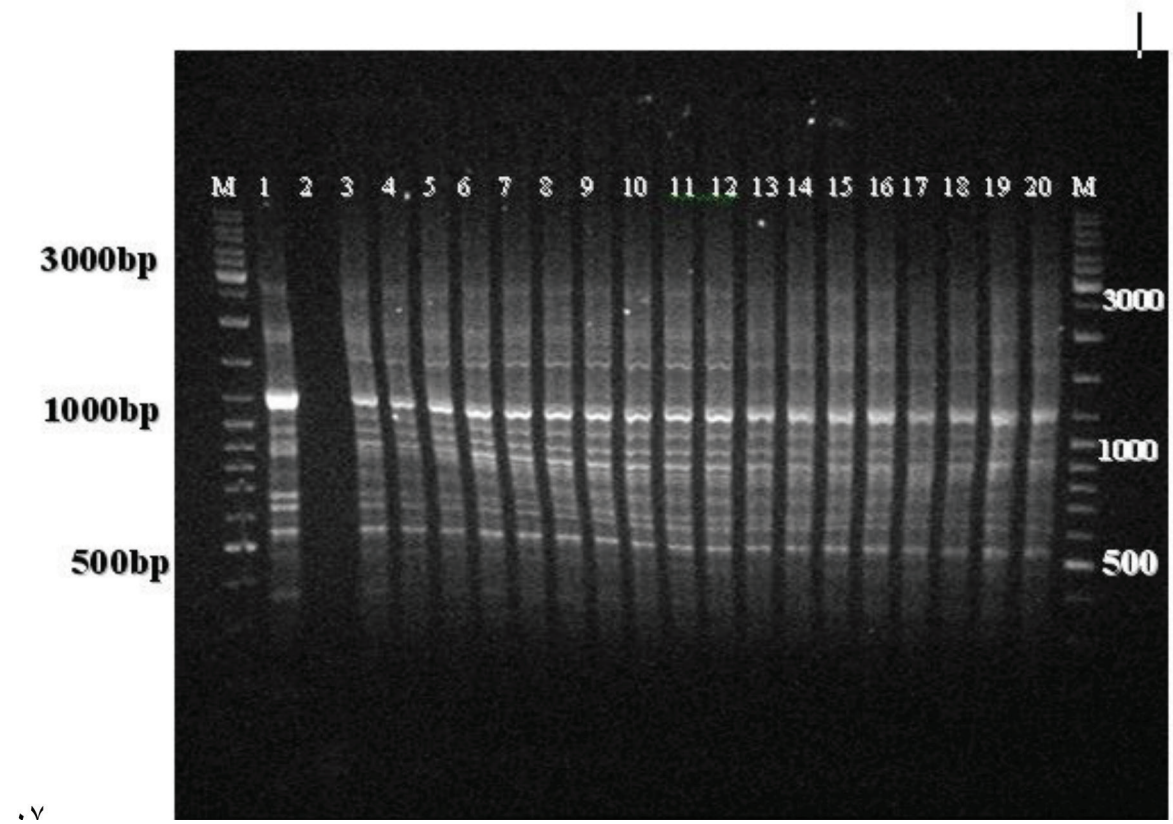
موارد مشکوک، آگلوتیناسیون غیرواضح بوده و پس از مدت زمان طولانی رویت می‌شد.

انگشت‌نگاری جدایه‌ها به روش ERIC-PCR

بر اساس داده‌های انگشت‌نگاری جدایه‌ها با تکنیک ERIC-PCR، همه جدایه‌های تحت بررسی (۱۰۰ ٪)، بدون تاثیرپذیری از نوع و نژاد پرنده و نیز سال و منطقه جغرافیایی جداسازی، در یک الگوی ژنتیکی واحد (A) قرارگرفته و حاوی ۱۹ باند ۱۲۰ تا ۲۵۰۰ جفت‌بازی بودند که بارزترین باند مشاهده‌شده حدود ۱۲۰۰ جفت‌باز بود که علت آن می‌تواند وجود بیش از چند کپی از آن‌ها در ژنوم باکتری یا تفاوت بسیار جزئی آن‌ها در نوکلئوتیدها باشد (جدول ۲، شکل ۲). صحه‌گذاری نتایج آزمایش با سه تکرار مورد تایید قرارگرفت. طبق یافته‌های این مطالعه، تمام جدایه‌های ORT حاصل از ماکیان صنعتی مناطق مختلف جغرافیایی ایران از نظر پروفایل مولکولی بسیار شبیه به هم بوده و به یک ژنوتیپ واحد وابستگی دارند.

بحث

جداسازی و شناسایی باکتری ORT در گونه‌های مختلف پرندگان اهلی و وحشی به‌ویژه ماکیان موضوع بررسی‌های متعدد در بسیاری از کشورها بوده و مقادیر اظهارشده در این پژوهش‌ها بسته به منطقه تحت‌مطالعه، گونه پرنده و روش آزمایشگاهی مورد استفاده متغیر بوده و بعضا نتایج گزارش‌شده با همدیگر تفاوت چشمگیری دارند. به نظر می‌رسد در غربالگری نمونه‌های بیولوژیک با بهره‌گیری از روش سرولوژیک سنجش ایمنی متصل به آنزیم (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA)، مقادیر شناسایی و گزارش‌شده عفونت نسبت به روش مرسوم کشت باکتریایی بالاست. چنان‌چه، حسن‌زاده و همکاران (۲۰۱۰) ۰/۶ ٪ (۱۲)، اسدپور و همکاران (۲۰۱۱) ۱/۰۳ ٪ (۲)، دوستی و همکاران (۲۰۱۱) ۱۹/۹۳ ٪ (۸)، میاحی و همکاران (۲۰۱۶) ۸/۵۷ ٪ (۱۶) و ازدیادی و همکاران (۲۰۲۰) ۴/۲ ٪ از نمونه‌های سواب نایی مرغان گوشتی را در ایران (۱۰)، و تی‌سای و هووانگ (۲۰۰۶) ۸/۳ ٪ از این نمونه‌ها را در تایوان (۲۳) و روسان و همکاران (۲۰۱۱) نیز ۲۱ ٪ از آن‌ها را در اردن (۱۹) از نظر باکتری ORT مثبت گزارش کردند. این در حالیست که عالی-مهر (۲۰۰۶) ۸۲ ٪ از نمونه‌های سرمی مرغان گوشتی ایران (۱)، چانسیری پورن‌چایی و همکاران (۲۰۰۷) ۶۳ ٪ از این نمونه‌ها را در تایلند (۶) و کانال و همکاران (۲۰۰۳) نیز ۶۳/۸۳ ٪ از آن‌ها را در برزیل (۴) آلوده به ORT اعلام نمودند.



شکل ۲- الگوی ژنتیکی ERIC-PCR جدایه‌های اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال (ORT) بر روی ژل آگارز دو درصد، رنگ‌آمیزی شده با رنگ ایمن. چاهک‌های M: مارکر bp ۱۰۰۰، چاهک ۱: کنترل مثبت (باکتری ORT تاییدشده با کمک آزمایش‌های بیوشیمیایی و آنتی‌سرم اختصاصی سروتیپ A)، چاهک ۲: کنترل منفی (آب DEPC)، چاهک‌های ۲۰-۳: تعدادی از جدایه‌های ORT تحت‌مطالعه.

با توجه به ارتباط حدت باکتری‌های مختلف من‌جمله ORT با هماگلوتینه نمودن گلبول‌های قرمز شسته‌شده حیوانات آزمایشگاهی توسط آن‌ها، در پژوهش حاضر توانایی هماگلوتیناسیون سویه‌های ORT جداسازی‌شده از ماکیان صنعتی مناطق مختلف جغرافیایی ایران با گلبول‌های قرمز طیف وسیعی از حیوانات آزمایشگاهی و نیز انسان با سه روش آزمون هماگلوتیناسیون سریع مطالعه گردید. نتایج بررسی حاضر مشخص نمود که برخی از جدایه‌های هماگلوتینه کننده فقط با گلبول‌های قرمز یک میزبان واکنش نشان می‌دهند. همسو با این یافته‌ها، میرزایی و همکاران (۲۰۱۱) گزارش نمودند که از ۲۳ جدایه کبوتری ORT فقط سه جدایه (۱۳ ٪) با گلبول‌های قرمز کبوتر، یک جدایه (۴/۳۴ ٪) با گویچه‌های قرمز مرغ و پنج جدایه (۲۱/۷ ٪) نیز هم‌زمان با گلبول‌های قرمز هر دو حیوان واکنش نشان می‌دهند. این درحالی است که از چهار جدایه بوقلمونی تحت بررسی این محققین هیچ‌کدام قادر به هماگلوتینه نمودن گلبول‌های قرمز مرغ و یا بوقلمون نبودند (۱۷). فیتزجرالد و همکاران (۱۹۹۸) نیز اظهار داشتند که از ۲۵ جدایه مرغی ORT، ۱۵ جدایه (۶۰ ٪) قادر به آگلوتینه نمودن گلبول‌های قرمز خون مرغ هستند (۱۱). همچنین نتایج ما نشان داد در نمونه‌هایی که به‌عنوان مثبت تلقی شدند آگلوتیناسیون سریع و واضحی مشاهده گردید درحالی‌که در موارد مشکوک، آگلوتیناسیون غیرواضح بوده و پس از مدت زمان طولانی رویت شد. طبق اظهارات تی‌سای و هوانگ (۲۰۰۶) بین توانایی برخی از جدایه‌های ORT برای آگلوتینه کردن گلبول‌های قرمز و اندازه پرگنه آن‌ها ارتباط مستقیمی وجود دارد (۲۳)، ولی در مطالعه حاضر رابطه بین شکل‌شناسی پرگنه‌های این ارگانیسم، توانایی هماگلوتیناسیون و نیز حدت آن‌ها مشخص نگردید. روش مولکولی ERIC-PCR را می‌توان به عنوان تکنیکی توانمند و به‌عنوان جایگزینی برای بررسی و مطالعه تفاوت سویه‌های باکتری ORT به‌کار گرفت. در پژوهش جاری از این تکنیک برای تایپینگ مولکولی ۲۵ جدایه ORT جمع‌آوری‌شده از گله‌های ماکیان صنعتی استان‌ها و مناطق مختلف ایران استفاده شد که همگی این جدایه‌ها در یک الگوی ژنتیکی واحد (A) قرار گرفتند. روش‌های مولکولی از تکنیک‌های اختصاصی، سریع و حساس تایپینگ هستند که در کنار روش‌های سروتایپینگ، برای تکمیل انگشت‌نگاری و مقایسه تفاوت‌های سویه‌ای، گونه‌ای و زیرگونه‌ای باکتری‌های مختلف من‌جمله ORT به‌کار می‌روند (۱۴). این روش‌ها توانایی ایجاد الگوهای متفاوت ژنتیکی در بین سویه‌های یک سروتیپ خاص از باکتری ORT را دارا می‌باشند که شباهت این الگوها، به موقعیت جغرافیایی سویه‌های تحت بررسی وابسته بوده و این امر می‌تواند سودمندی این روش‌ها را در مطالعات همه‌گیری‌شناسی ORT نشان دهد (۲۱).

بررسی مطالعات انجام‌یافته در خصوص باکتری ORT در ایران حاکی از آن است که در خصوص تعیین تیپ سویه‌های این ارگانیسم با تکنیک‌های مختلف مولکولی کار پژوهشی چندانی انجام نیافته‌است. بنانی و همکاران (۲۰۰۱) ۱۰۰ جدایه ORT حاصل از مناطق مختلف کشور را با تکنیک الکتروفورز ژل پلی‌آکریل‌آمید (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) و روش رسوب در ژل آگارز (AGPT) انگشت‌نگاری کرده و گزارش نمودند که تمام سویه‌ها در یک پروفایل پروتئینی قرار داشته و همگی مربوط به سروتیپ A می‌باشند (۳). در مطالعه دیگری، ازدیادی و همکاران (۲۰۲۰) جدایه‌های ORT حاصل از مرغان گوشتی و تخمگذار استان آذربایجان شرقی را با تکنیک ERIC-PCR انگشت‌نگاری نموده و گزارش کردند که اکثر جدایه‌های (۹۲/۸ ٪) مناطق شمال غربی ایران از نظر مولکولی به یک پروفایل ژنتیکی وابستگی داشته و بسیار شبیه به‌هم می‌باشند (۱۰). در مطابقت کامل با یافته‌های ایشان، نتایج مطالعه حاضر نیز حکایت از تشابه مولکولی و ژنتیکی همه جدایه‌های ORT حاصل از ماکیان صنعتی مناطق و استان‌های مختلف کشور، بدون تاثیرپذیری از نوع و نژاد پرنده و سال و منطقه جغرافیایی جداسازی، دارد.

در کشور مجارستان، زابو و همکاران (۲۰۱۷) ۳۷ جدایه ORT جمع‌آوری شده از گونه‌های مختلف پرندگان را با تکنیک‌های RAPD-PCR (با استفاده از پرایمرهای OPH19، OPG11 و M13) و ERIC-PCR مطالعه‌کرده و گزارش نمودند که تکنیک‌های RAPD(با استفاده از پرایمر M13) و ERIC به ترتیب جدایه‌های مورد آزمایش را در ۱۰ و ۱۳ الگوی متفاوت ژنتیکی تقسیم‌بندی نمودند، این محققین اظهار داشتند که روش ERIC-PCR در مطالعه تنوع مولکولی جدایه‌های ORT و دسته‌بندی آن‌ها روشی توانمند و موثر به‌شمار می‌رود (۲۰).

در ترکیه نیز ارگانیش و همکاران (۲۰۱۳) سویه‌های ORT حاصل از ماکیان و بوقلمون را با روش‌های RAPD-PCR (با استفاده از پرایمر OPG11) و SDS-PAGE مطالعه کرده و آن‌ها را به ترتیب در هشت پروفایل ژنتیکی و ۱۹ پروفایل پروتئینی تقسیم‌بندی نمودند (۹). در پژوهشی همسو، تاچیل و همکاران (۲۰۰۷) سویه‌های مختلف باکتری ORT را با روش‌های RAPD-PCR(با استفاده از پرایمر M13) و ERIC-PCR تیپ‌بندی کرده و آن‌ها را به ترتیب در ۱۰ و شش الگوی ژنتیکی دسته‌بندی نمودند (۲۱). همچنین کوگا و زاوالتا (۲۰۰۵) ۲۵ جدایه این ارگانیسم را با تکنیک تکثیر توالی‌های تکرارشونده ژنومی از طریق PCR (Repetitive Extragenic Palindromic Based PCR, rep-PCR)) مطالعه نموده و عنوان کردند که تمامی جدایه‌ها مشابه هم بوده و در پروفایل ژنوتیپی A قرار دارند. ایشان بر اساس روش ERIC-PCR، ژنوتیپ A را شایع‌ترین ژنوتیپ در میان گونه‌های مختلف پرندگان در اقصی نقاط دنیا معرفی کردند (۱۴). همسو با یافته‌های ایشان، جمع‌بندی نتایج مطالعه حاضر و نیز بررسی‌های ازدیادی و همکاران (۱۰) نیز نشان می‌دهد که جدایه‌های ORT جمع‌آوری شده از ماکیان صنعتی مناطق مختلف ایران از نظر ژنتیکی مشابه هم بوده، ژنوتیپ واحدی داشته و با ژنوتیپ A مورد اشاره کوگا و زاوالتا (۱۴) همخوانی دارند.

نتیجه‌گیری کلی

بر اساس یافته‌های پژوهش حاضر، در ویژگی‌های فنوتیپی جدایه‌های ORT حاصل از ماکیان صنعتی مناطق مختلف ایران که در یک بازه زمانی نسبتا طولانی جمع‌آوری شده بودند، تفاوتی مشاهده نگردید. همچنین نتایج این بررسی مشخص نمود که اغلب جدایه‌های ORT تحت‌مطالعه قادر به هماگلوتینه نمودن گلبول‌های قرمز خون اکثر حیوانات آزمایشگاهی و نیز انسان نبوده و جدایه‌های هماگلوتینه کننده نیز فقط با گلبول‌های قرمز یک میزبان واکنش نشان می‌دهند. در مطالعه حاضر، انگشت‌نگاری جدایه‌ها با روش ERIC-PCR همه آن‌ها را در یک الگوی ژنتیکی واحد

قرار داد. به نظر می‌رسد تمام جدایه‌های ORT حاصل از ماکیان صنعتی مناطق مختلف ایران از نظر پروفایل مولکولی بسیار شبیه به هم بوده، به یک ژنوتیپ واحد وابستگی داشته و مشابهت بسیار بالایی با ژنوتیپ A مورد اشاره در تحقیقات انجام‌شده توسط سایر دانشمندان دارند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان لازم می‌دانند از همکاری صمیمانه پرسنل بخش تحقیق و تشخیص بیماری‌های طیور موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی تقدیر و تشکر نمایند.

منابع مورد استفاده

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.Asadpour, Y., M. Banani and S. A. Pourbakhsh. 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.

3.Banani, M., S. A. Pourbakhsh and P. Khaki. 2001. Characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolates from commercial chickens. *Archives of Razi Institute* 52: 27-34.

4.Canal, C. W., J. A. Leão, D. J. Ferreira, M. Macagnan, C. T. Pippi Salle and A. Back. 2003. Prevalence of antibodies against *Ornithobacterium rhinotracheale* in broilers and breeders in southern Brazil. *Avian Diseases* 47: 731-737.

5.Canal, C. W., J. A. Leao, S. L. Rocha, M. Macagnan, C. A. Lima-Rosa, S. D. Oliveira and A. Back. 2005. Isolation and characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* from chickens in Brazil. *Research in Veterinary Science* 78: 225-230.

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

7.Chou, C. H., S. Y. Lin, C. L. Chen and H. J. Tsai. 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.Doosti, A., A. Sharifzadeh, H. Ghasemi and J. Vaez. 2011. Molecular identification of *Ornithobacterium rhinotracheale* in turkeys in Isfahan province of Iran. *African Journal of Biotechnology* 10: 7911-7914.

9.Erganis, O., H. H. Hadimli, K. Kav and Z. Sayin. 2013. Phenotypic and molecular characterization of strains of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolated from poultry in Turkey. *African Journal of Microbiology Research* 7: 82-88.

10.Ezdiyadi, M., M. K. Khosropanah, M. Banani, R. Ghadimipour and K. Davari. 2020. Pheno- and genotypic study of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolates in commercial poultry flocks of East Azarbaijan province, Iran. *Journal of Veterinary Microbiology* 40: 91-105.

11.Fitzgerald, S. L., J. M. Greyling and R. R. Bragg. 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.

12.Hassanzadeh, M., V. Karimi, N. Fallah and I. Ashrafi. 2010. Molecular characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolated from broiler chicken flocks of Iran. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 34: 373-378.

13.Joubert, P., R. Higgins, A. Laperle, I. Mikaelian, D. Venne and A. Silim. 1999. Isolation of *Ornithobacterium rhinotracheale* from turkeys in Quebec, Canada. *Avian Diseases* 43: 622-626.

14.Koga, Y. and A. I. Zavaleta. 2005. Intraspecies genetic variability of *Ornithobacterium rhinotracheale* in commercial birds in Peru. *Avian Diseases* 49: 108-111.

15.Markey, B. K., F. C. Leonard, M. Archambault, A. Cullinane and D. Maguire. 2013. Clinical Veterinary Microbiology. pp. 404-405, 2nd Ed. The United Kingdom, The CV Mosby Company, London.

16.Mayahi, M., D. Gharibi, R. Ghadimipour and F. Talazadeh. 2016. Isolation, identification and antimicrobial sensitivity of *Ornithobacterium rhinotracheale* in broilers chicken flocks of Khuzestan, Iran. *Veterinary Research Forum* 7: 337-342.

17.Mirzaie, S., M. Hassanzdeh, M. H. Bozorgmehrifard and M. Banani. 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.

18.Numee, S., R. Hauck and H. M. Hafez. 2012. Detection and typing of *Ornithobacterium rhinotracheale* from German poultry flocks. *Avian Diseases* 56: 654-658.

19.Roussan, D. A., R. H. Al-Rifai, G. Y. Khawaldeh, W. S. Totanji and I. Shaheen. 2011. *Ornithobacterium rhinotracheale* and Mycoplasma synoviae in broiler chickens in Jordan. Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics) 30: 931-937.

20.Szabó, R., E. Wehmann, L. Makrai, C. Nemes, E. Gyuris, A. Thuma and T. Magyar. 2017. Characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* field isolates from Hungary. *Avian Pathology*

46: 506–514.
21.Thachil, A. J., B. T. Velayudhan, V. C. Lopes-Berkas, D. A. Halvorson and K. V. Nagaraja. 2007. Application of polymerase chain reaction fingerprinting to differentiate *Ornithobacterium rhinotracheale* isolates. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 19: 417-420.
22.Thieme, S., K. Mühldorfer, D. Lüschow, M. H. Hafez and P. C. Y. Woo. 2016. Molecular characterization of the recently emerged poultry pathogen *Ornithobacterium rhinotracheale* by multilocus sequence typing. *PLoS ONE* 11: e0148158.
23.Tsai, H. J. and C. W. Huang. 2006. Phenotypic and molecular characterization of isolates of *Ornithobacterium rhinotracheale* from chickens and pigeons in Taiwan. *Avian Diseases* 50: 502-507.
24.Van Empel, P., H. van den Bosch, P. Loeffen and P. Storm. 1997. Identification and serotyping of *Ornithobacterium rhinotracheale*. *Journal of Clinical Microbiology* 35: 418-421.
25.Van Empel, P. and M. H. Hafez. 1999. *Ornithobacterium rhinotracheale*: a review. *Avian Pathology* 28: 217-227.