مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۸۸، دوره ۶۴، شماره ۱، ۴۵-۴۱

شناسایی اورنیتوباکتریوم رینو تراکئال به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

منصور بنانی[۱]* سید علی پور بخش[۱] مه زاد ارمی[۱] فرزان غلامین[۲] مسعود فاتح منش[۲]

۱) آزمایشگاه رفرانس اورنیتو باکتریوم رینوتراکئال، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرمسازی رازی، حصارک کرج - ایران.
۲) دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج - ایران.

(دریافت مقاله: ۲ اردیبهشت ماه ۱۳۸۷ ، پذیرش نهایی: ۱۴ اسفند ماه ۱۳۸۷)

چکیده

اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال (ORT) به صورت یک عامل بیماریزای باکتریایی نوظهور در گله‌های ماکیان و بوقلمون شناخته شده است. تشخیص عفونت ORT با برخی مشکلات در کشت و شناسایی قطعی باکتری با کمک خواص بیوشیمیایی آن مواجه بوده است. دسترسی به یک روش شناسایی قطعی و قابل اتکا که بتواند در پژوهشهای آزمایشگاهی متداول بکارآید، حائز اهمیت می‌باشد. هدف از این مطالعه شناسایی ORT به روش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، در مقایسه با روش کشت بود. به منظور راه اندازی این PCR از پرایمرهای OR16S-F1 و OR16S-R1، باکتریهای شناخته‌شده ORT و ۷ گونه باکتری دیگر، نظیر هموفیلوس پاراگالیناروم و پاستورلا مولتوسیدا، به ترتیب به عنوان کنترلهای مثبت و منفی استفاده شد. روش استخراج فنل و کلروفرم برای تهیه DNA از نمونه‌ها به کار رفت. ۶۰ نمونه تجمیع شده بدست‌آمده از نای و سینوس زیر چشمی ۳۰ گله جوجه‌گوشتی کشتارشده در یکی از کشتارگاههای منطقه قزوین، از نظر آلودگی به ORT با هر دو روش کشت و PCR بررسی شدند. یک باند ۷۸۴ جفت بازی در ۵ نمونه کنترل مثبت ORT، ۱۹ مورد از ۶۰ نمونه اولیه، شامل ۱۱ نمونه هموژنیزه نای و ۸ نمونه سواب سینوس زیر چشمی و در تمامی ۱۷ نمونه باکتریهای جداشده و مشکوک به ORT دیده شد؛ ولی در ۷ مورد باکتری کنترل منفی مشاهده نگردید. در یک مورد از ۴۱ نمونه اولیه منفی شده در PCR، باکتری ORT با کمک کشت جداسازی گردید و این باکتری تکثیرشده در آزمایش مجدد PCR مورد شناسایی قرار گرفت. پانزده مورد از ۳۰ گله (۵۰ درصد) در آزمایش PCR مثبت تشخیص داده شدند و تنها یک مورد از آنها در کشت باکتریایی منفی شد. بر اساس نتایج بدست‌آمده؛ PCR بکار رفته در این مطالعه می‌تواند برای شناسایی مطمئن و سریع ORT در نمونه‌های مشکوک به عفونت ORT استفاده شود، اما بهتر است که به منظور به حداکثر رساندن تشخیص عفونت، با روش کشت توام باشد.

واژه‌های کلیدی: تشخیص، اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، جوجه گوشتی.

مقدمه

اصطلاح کلی پاستورلوز طیور شامل عفونتهای ناشی از پاستورلاها و شبه پاستورلاهای مختلف است که مهمترین آنها بیماری وبای طیور ناشی از *Pasteurella multocida* و اورنیتوباکتریوز ناشی از *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) و چند بیماری کم اهمیت دیگر می‌باشد(۱۲). تورم کیسه‌های هوایی و پنومونی شایعترین علائم کالبد گشایی اورنیتوباکتریوز است ولی سایر علائم آن شامل تراکئیت، سینوزیت، پریکاردیت و حتی آرتریت و مننژیت می‌باشد(۸،۹،۲۱). علائم بالینی و کالبدگشایی ارزش اندکی در تشخیص بیماری و عامل آن دارد(۶،۱۱). اهمیت بیماری به حدی است که واکسناسیون علیه آن هم موردتوجه قرار گرفته است(۱۰،۲۰،۲۱).

Ornithobacterium rhinotracheale (ORT) باکتری گرم منفی، پلئومورف و غیر متحرکی است که به همراه بروز علائم تنفسی، کاهش رشد، کاهش تولید تخم و افزایش مرگ و میر و حذف کشتارگاهی از بوقلمون و ماکیان جدا شده است. تا قبل از ۱۹۹۴ مواردی از جداسازی باکتری با نامهای متنوع، از جمله باکتری شبه پاستورلا وجود داشته است تا اینکه اولین بار به پیشنهاد Vandamme و همکاران در سال ۱۹۹۴ توصیف و *O. rhinotracheale* نامگذاری گردید(۱۹). پس از آن توجه محققان به آن جلب شد و گسترش جهانی آن در طیور تجارتی و سایر پرندگان به اثبات رسید(۱،۸،۹،۲۱).

اولین گزارش عفونت ORT در مرغداریهای ایران، در سال ۱۳۷۹ و از یک گله جوجه گوشتی و یک گله پولت تخمگذار با علائم تنفسی بوده است (۲). متعاقباً باکتری از بوقلمون (۴) و سایر نژادهای ماکیان هم گزارش شد(۶). بیماری اورنیتوباکتریوز در نژادهای مختلف ماکیان ایران شامل مادر گوشتی، جوجه گوشتی، تخمگذار تجاری و مرغ بومی و در گله‌های با تلفات بالا گزارش شده است(۶). ایجاد آلودگی تجربی با تعدادی از باکتریهای جداشده از ایران در جوجه‌های عاری از پاتوژنهای اختصاصی (SPF)(۶) مشابه برخی گزارش‌های دیگر (۱۷،۲۴)، نشان داد که این باکتری می‌تواند به صورت پاتوژن اولیه عمل نماید و برای ایجاد بیماری نیازی به همراهی با سایر پاتوژن‌ها ندارد. با وجود این بنظر می‌رسد که عوامل عفونی و غیر عفونی موجود در مرغداریها به عنوان آغازگر یا تشدید کننده اورنیتوباکتریوز مطرح می‌باشند(۱،۲۱،۲۴). همزمانی عفونت ORT با سایر عوامل بیماریزای طیور در ایران هم گزارش شده است(۵،۶). شباهت علائم بیماری با بسیاری از بیماریهای طیور و شیوع بالای عفونتهای توأم، از یک طرف و مشکل بودن جداسازی و شناسایی قطعی باکتری ORT از طرف دیگر موجب شده است که تشخیص این بیماری نوظهور به سادگی و سرعت امکان پذیر نباشد. از آنجا که به دلیل عدم رشد مناسب باکتری در برخی محیط‌ها و همینطور واکنش‌های متغیر سویه‌های مختلف این باکتری، تشخیص قطعی تنها براساس

*) نویسنده مسؤول: تلفن: ۴۶-۴۵۷۰۰۳۸-۰۲۶۱ نمابر: ۴۵۵۲۱۹۴-۰۲۶۱ Email: m.banani@rvsri.ir

خصوصیات بیوشیمیایی متداول، امکان پذیر نیست. بنابر این در تشخیص قطعی باکتری ORT از برخی کیت‌های ویژه خواص بیوشیمیایی تجاری(۱۱)، آنتی سرم‌های اختصاصی(۳،۱۱) و اخیراً از پرایمرهای اختصاصی (۱۱،۱۴،۲۱) استفاده می‌شود. با توجه به اهمیت و گسترش روز افزون این بیماری در صنعت طیور کشور، تشخیص سریع و قطعی بیماری و عامل آن اجتناب ناپذیر شده است. هدف از مطالعه حاضر راه‌اندازی آزمایش PCR به منظور تشخیص قطعی باکتری جداشده مشکوک به ORT و همینطور تشخیص سریع و مستقیم نمونه‌های بافتی یا سواب اخذ شده از طیور بود.

مواد و روش کار

نمونه برداری: پنج نمونه باکتری ORT سروتیپ A شناسایی شده در مطالعه قبلی(۳) به عنوان نمونه باکتری کنترل مثبت وسایر باکتریهای پاتوژن طیور شامل سالمونلا انتریتیدیس، اشریشیا کلی سروتیپ O2، هموفیلوس پاراگالیناروم سروتیپهای A و C، پاستورلا مولتوسیدا سروتیپ A1، مایکوپلاسما گالی سپتیکوم (MG) و مایکوپلاسما سینوویه (MS) تهیه شده در تحقیقات گذشته(۷) به عنوان باکتری کنترل منفی و همینطور آب مقطر به عنوان شاهد منفی، برای راه‌اندازی آزمایش PCR در نظر گرفته شدند. در یکی از کشتارگاه‌های ناحیه قزوین از تعداد ۳۰ گله جوجه گوشتی در سن کشتار و از هر گله ده نمونه سواب نای و ده نمونه سواب سینوس زیر چشمی، اخذ و نمونه‌های هر ارگان جداگانه تجمیع گردید. پس از اخذ سواب، نمونه نای هر گله با دستگاه آسیاب کننده بافت صلایه گردید و سپس با افزودن بافر نمکی فسفاته (PBS) به نسبت ۱۰ در صد به صورت سوسپانسیون هموژنیزه در آمد. نمونه‌ها بر اساس روشهای استاندارد(۲،۳،۸،۱۱)، کشت داده شدند. بدین منظور از محیط کشت آگار خوندار حاوی ۵ درصد خون گوسفند و ۵/۲ میکروگرم در هر میلی لیتر جنتامایسین استفاده شد. محیط های کشت شده، در انکوباتور دارای ۷/۵ در صد دی اکسید کربن و به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند. براساس برخی خواص بیوشیمیایی نظیر اکسیداز، کاتالاز، شکل و رنگ پرگنه و رنگ آمیزی گرم، نمونه باکتری مشکوک به ORT جدا سازی و با برداشت پرگنه تک، خالص سازی شد. باکتری خالص شده به ۵ میلی لیتر براث عصاره مغز و قلب - BHI (Infusion Heart Brain شرکت Biolife ایتالیا) منتقل و پس از ۲۴ ساعت نگهداری در ۳۷ درجه سانتیگراد برای استخراج DNA استفاده شد.

استخراج DNA: DNA تمام باکتریهای کنترل منفی و مثبت پس از ۲۴ ساعت کشت در محیط مایع استاندارد هر باکتری(۷،۱۲) و همینطور باکتریهای مشکوک به ORT رشد کرده در محیط BHI با روش فنل و کلروفرم استخراج شدند. علاوه بر اینها عملیات استخراج با همان روش بر روی نمونه‌های نای صلایه شده و هموژنیزه شده و سواپ اولیه در محیط BHI هم انجام شد. روش استخراج DNA به اختصار شامل مراحل لیزسلولی، ترسیب پروتئین و تخلیص DNA و به شرح ذیل بود که ابتدا یک میلی لیتر از نمونه در دستگاه Eppendorf 5415D(آلمان)، به مدت ۱۵ دقیقه با قدرت ۱۳۲۰۰rpm یا ۱۶۱۰۰rcf سانتریفوژ گردید. برای لیز باکتری‌ها به هم حجم ۱۰۰ میکرولیتر از رسوب بدست آمده از سانتریفوژ، بافر لیزکننده اضافه شد و نمونه به مدت ۴ ساعت در دمای ۵۶ درجه سانتیگراد قرار گرفت. بافر لیزکننده شامل Tris-HCl(Merck آلمان) ۵۰mM، NaCl (Merck mM) ۱۰۰، EDTA (Merck) ۵۰mM، پروتئیناز K(Fermentas، لیتوانی) (۲mg/ml) و سدیم دودسیل سولفات (SDS)(Gibco BRL، انگلستان) ۱ درصد بود. پس از این مرحله، به منظور ترسیب پروتئین و پپتید، هم حجم نمونه، فنل تهیه شده با کمک Tris HCl و با pH معادل ۷/۸، اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۲۰۰rpm سانتریفوژ گردید. فاز مایع رویی جدا گردید و هم حجم آن فنل - کلروفرم افزوده شد و به همان روش مرحله قبل سانتریفوژ شد. سپس مایع رویی برداشت گردید و هم حجم آن کلروفرم اضافه شد و پس از ۵ دقیقه سانتریفوژ در همان دور، مایع رویی به تیوب جدید منتقل شد. در انتها برای آبگیری و ایجاد رسوب DNA، ده در صد حجم مایع رویی برداشت شده، استات سدیم ۳ مولار (ترسیب پروتئینهای باقیمانده) و سپس دو برابر حجم محلول موجود، اتانل مطلق سرد افزوده گردید و ۲۰ دقیقه در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. پس از ۱۵ دقیقه سانتریفوژ در ۱۳۲۰۰rpm و تخلیه مایع رویی، به رسوب حاصل اتانل ۷۰ درصد اضافه گردید و مجدد سانتریفوژ شد. DNA حاصل خشک گردید و در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر حل شد و تا زمان آزمایش PCR در ۴ درجه سانتیگراد ذخیره شد.

پرایمرها: در این مطالعه یک جفت پرایمر اختصاصی ORT به نام‌های OR16S- F1 و OR16S R1 به کار رفت که بر اساس سکانس ژن 16S rRNA طراحی و تهیه شده بودند. محققان مختلف در کارهای خود از آنها استفاده نموده و اختصاصی بودن آنها را تأئید کرده بودند(۱۱،۱۴،۲۱). ردیف بازهای آنها به شرح زیر بود:

OR16S- F1 5′- GAG AAT TAA TTT ACG GAT TAA G-3′

OR16S-R1 5′-TTC GCT TGG TCT CCG AAG AT -3′

آماده کردن مخلوط اصلی: در هر بار آزمایش PCR، با احتساب تمام نمونه‌های مورد آزمایش و همینطور کنترل‌های مثبت و منفی و با یک نمونه بیشتر، مخلوط اصلی محاسبه و تهیه می‌گردید. در این مطالعه حجم هر نمونه واکنش PCR، ۲۵ میکرولیتر در نظر گرفته شد و حجم هر کدام از اجزای مخلوط برای هر نمونه شامل بافر PCR (Cinnagen ، ایران) (۱۰x) ۲/۵ میکرولیتر، کلرید منیزیم (Cinnagen) ۲۵ میلی مولار (۱/۵ میکرولیتر)، مخلوط داکسی نوکلئوزید تری فسفات (Cinnagen) ۱۰ میلی مولار ۰/۵ میکرولیتر، هر کدام از پرایمرها (MWG، آلمان) ۱ میکرولیتر (۱۰ پیکومول)، آنزیم Taq polymerase (Cinnagen) ۰/۵ میکرولیتر (۱/۲۵ واحد بین‌المللی)، DNA ۴ میکرولیتر و آب مقطر استریل ۱۴ میکرولیتر بود.

۵- برنامه سیکل حرارتی در دستگاه ترموسایکلر: مخلوط PCR به منظور واسرشت اولیه و تفکیک دو رشته DNA به مدت ۷ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد قرار گرفت. سپس سیکل‌های متوالی شامل مرحله واسرشت (Denaturation) ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتیگراد، مرحله اتصال

(Annealing) یک دقیقه در دمای ۵۳ درجه سانتیگراد و مرحله ساخت (Extention) ۲ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد، به تعداد ۳۰ سیکل و در انتها یک مرحله ساخت پایانی به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد همگی در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf، آلمان) تنظیم شده بود.

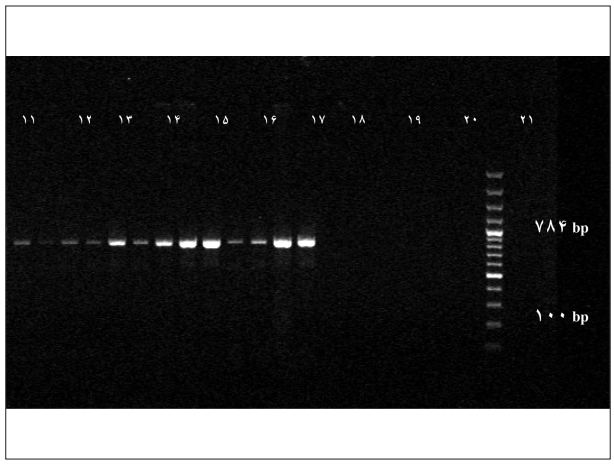
۶- **الکتروفورز محصول PCR**: محصولات PCR به نسبت ۵ به یک با بافر Loading (Fermentas، لیتوانی) مخلوط و به گوده‌های تعبیه شده در ژل آگارز یک درصد و حاوی اتیدیوم بروماید منتقل شدند. مارکر ۱۰۰ جفت بازی (Fermentas) هم در گوده مشخصی ریخته شد. در این مطالعه ژل با ولتاژ ۱۰۰ ولت الکتروفورز گردید و پس از آن ژل به دستگاه ترانس ایلومیناتور منتقل و با اشعه UV بررسی گردید و در خاتمه با استفاده از دوربین و چاپگر متصل به دستگاه، عکسبرداری از ژل انجام شد.

۷- **تعیین حساسیت PCR**: رقتهای ده برابر از کشت براث BHI از باکتری ORT تهیه گردید. همزمان یک میلی لیتر از هر رقت در محیط جامد ژلوز خوندار کشت داده شد و از معادل همان حجم استخراج DNA بعمل آمد و سپس آزمایش PCR در مورد رقت‌های مختلف انجام شد.

نتایج

درکشت نمونه‌های سینوس و نای ۳۰ گله مورد آزمایش از ۱۴ گله باکتری مشکوک به ORT جداسازی و شناسایی شد. در ۵ مورد فقط از سینوس، ۶ مورد فقط از نای و در ۳ مورد از هر دو باکتری مشکوک به ORT جدا شد. یک قطعه ۷۸۴ جفت بازی در تمامی نمونه‌های کنترل مثبت ORT و تمامی ۱۷ نمونه باکتری مشکوک از ۱۴ گله مشاهده گردید (تصویر ۱). در آزمایش PCR نمونه‌های نای صلایه شده و سواب نای اولیه نشان داد که یک گله دیگر هم آلوده به ORT بوده که در کشت قابل جداسازی نبود. علاوه بر آن در ۲ مورد دیگر که در گله‌های آلوده فقط از یک ارگان باکتری جدا شده بود در آزمایش PCR در هر دو ارگان وجود ORT ردیابی شد. نمونه‌های ۱۵ گله (۵۰ درصد) که شامل ۴ مورد فقط سینوس، ۷ مورد فقط نای و ۴ مورد هر دو ارگان بودند، در آزمایش PCR مثبت شدند. در مجموع ۱۹ مورد از ۶۰ نمونه اولیه، شامل ۱۱ نمونه هموژنیزه نای و ۸ نمونه سواب سینوس زیر چشمی در آزمایش PCR مثبت شدند. در یک مورد از یک گله آلوده هم مشاهده گردید که با وجود جداسازی و شناسایی ORT از یک نمونه سواب سینوس، باکتری در PCR آن نمونه شناسایی نشد ولی در خصوص نمونه نای آن گله هر دو آزمایش مثبت بودند. به عبارت دیگر فقط در یک مورد از ۴۱ نمونه اولیه منفی شده در آزمایش PCR، باکتری ORT با کمک کشت جداسازی گردید و این باکتری تکثیر شده در آزمایش مجدد PCR مورد شناسایی قرار گرفت. در سایر موارد (۵۶ مورد از ۶۰ نمونه، ۹۳/۳ درصد) نتایج کشت و PCR نمونه‌های سینوس زیر چشمی و نای همخوانی داشتند.

قطعه ۷۸۴ جفت بازی در نمونه‌های باکتری کنترل منفی PCR و همینطور شاهد منفی آزمایش PCR (آب مقطر) مشاهده نشد (تصویر ۱). به منظور اثبات تکرارپذیری آزمایش PCR هر آزمایش سه بار در زمانهای متفاوت



تصویر ۱- تصویر قطعه ۷۸۴ جفت بازی ژن 16S rRNA در باکتریهای ORT مورد مطالعه به همراه. شاهدهای مثبت و منفی. چاهکهای ۱-۵: شاهدهای مثبت (باکتریهای ORT تأئید شده با کمک آنتی سرم اختصاصی سروتیپ A). چاهکهای ۶-۱۳: نمونه‌های باکتری مشکوک به ORT بر اساس برخی خواص بیوشیمیایی. چاهکهای ۱۴-۱۹: نمونه‌های باکتری شاهد منفی به ترتیب شامل؛ سالمونلا انتریتیدیس، اشریشیاکلی. سروتیپ O2، پاستورلا مولتوسیداسروتیپ A1، هموفیلوس پاراگالیناروم‌سروتیپ C، مایکوپلاسما. گالی سپتیکوم و مایکوپلاسما سینوویه. چاهک ۲۰: آب (شاهد منفی). چاهک ۲۱: مارکر.

تکرار شد. از طرف دیگر نتایج این بررسی نشان داد که PCR راه‌اندازی شده قادر به شناسایی ORT در نمونه‌ای با تعداد حدود ۲۰ سلول در هر میلی لیتر می‌باشد.

بحث

جداسازی و شناسایی باکتری ORT به سادگی امکان پذیر نبوده و ممکن است به علت رشد سریع تر سایر باکتریها کشت و جداسازی آن با مشکل مواجه گردد. از آنجا که باکتری خواص بیوشیمیایی متغیری را ممکن است نشان دهد و یا در برخی محیط های متداول رشد نکند (۸)، بنابراین تشخیص قطعی بر اساس خواص بیوشیمیایی ممکن است با اشتباه همراه باشد. استفاده از آنتی سرمهای اختصاصی در روشهای مختلف سرولوژیکی هم ممکن است زمان بر باشد و در صورت بکاربردن آنتی سرم مونووالان احتمال عدم شناسایی سایر سروتیپها وجود دارد. تشخیص تفریقی از سایر پاتوژن‌های طیور به ویژه هموفیلوس پاراگالیناروم و پاستورلا مولتوسیدا که هم از نظر خواص بیوشیمیایی و هم از نظر جراحاتی که در طیور ایجاد می‌کنند شبیه هم هستند به سادگی ممکن نیست؛ به ویژه آنکه احتمال آلودگی مخلوط این پاتوژنها هم وجود دارد. مشکل دیگر در تشخیص باکتری ORT شباهت و نزدیکی آن با برخی باکتریهای دیگر است که ممکن است پاتوژن اولیه طیور نباشند ولی از نمونه‌های طیور جدا شوند. Koga در سال ۲۰۰۵ و Zavaleta (۱۴) و Hafez در سال ۲۰۰۲ (۱۱) اختصاصی بودن پرایمرهای F1-OR16S و OR16s-R1 را به منظور تشخیص قطعی ORT تأئید نمودند. Van Empel و Hafez توانایی این پرایمرها را در تشخیص تفریقی ORT از سایر باکتری‌های مشابه و نزدیک به آن را تأکید کردند (۲۱).

در این تحقیق تمامی باکتریهای مشکوک به ORT، در آزمایش PCR تأئید شدند و این امر نشان داد که در مطالعه حاضر، تشخیص اولیه بر اساس خصوصیات پرگنه‌ها و برخی خواص بیوشیمیایی باکتری دقیق بوده است و حتی در یک مورد که نتیجه آزمایش PCR بر روی نمونه اولیه منفی بود؛ با کمک جداسازی تک پرگنه مشکوک به ORT و سپس تکثیر آن و آزمایش مجدد PCR، مثبت بودن آن نمونه احراز شد. این مطالعه ضمن تأئید کارهای قبلی (۲،۳،۴،۵،۶،۷) دقت بالای این آزمایشگاه را در جدا سازی ORT نشان داد. با وجود این نمی توان به آزمایش باکتری شناسی بیش از حد تکیه نمود. آزمایش‌های باکتری شناسی و حتی سرولوژی در ردیابی آلودگی یک گله علاوه بر وقت گیر بودن از حساسیت کافی برخوردار نیستند و تکیه بر آزمایشهای باکتری شناسی یا سرولوژی در تشخیص عفونت ORT یگ گله ممکن است گمراه کننده باشد. مطالعات Van Empel و همکاران (۲۲) و همچنین Van Veen و همکاران (۲۳) مشخص نمود که بر اساس مطالعات ایمنو- هیستوشیمیایی تا ۷۰ در صد از اختلالات تنفسی در جوجه‌های گوشتی ناشی از ORT است؛ در حالی‌که با آزمایش‌های باکتری شناسی یا سرولوژی تنها ۳۰ درصد از موارد تحت مطالعه عفونت ORT را نشان دادند. در مطالعه حاضر PCR راه‌اندازی شده قادر به رد یابی تا ۲۰ سلول ORT در هر میلی لیتر نمونه‌های مستقیم سواپ و صلایه نای و سوسپانسیون باکتری مشکوک می‌باشد و احتمالاً با کمی تغییر میتوان حساسیت آن را باز هم افزایش داد و یا از آن برای ردیابی باکتری در تخم مرغ، مدفوع و گرد و خاک هم استفاده نمود. شناسایی عفونت ORT بوسیله PCR در مواردی که در کشت و جدا سازی منفی شده بود احتمالاً در تعدادی از موارد به علت رشد سریع باکتریهایی مثل پروتئوس بود که سراسر پلیت را در ۲۴ ساعت آلوده می‌کردند و پرگنه‌های ریز و با رشد آهسته ORT را می پوشاندند. در موارد دیگر احتمال عدم زنده ماندن باکتری یا عدم رشد باکتری در محیط کشت به هر دلیل می تواند عامل عدم جداسازی باکتری باشد. در ژلوز خوندار برای کنترل رشد سایر باکتریها از جنتامایسین و یا پلی میکسین B استفاده می‌شود ولی باید در نظر داشت که ۵ درصد سویه‌های ORT به جنتامایسین و ۱۰ درصد آنها به پلی میکسین B حساس هستند (۸) و این می تواند یکی از دلایل عدم رشد برخی از سویه‌های ORT باشد. در این مطالعه یک مورد از ۴۱ نمونه PCR منفی، در کشت مثبت شده بود. Malorny و همکاران در سال ۲۰۰۳ نتایج منفی کاذب PCR را در موارد کشت مثبت سالمونلا به ممانعت کننده‌های PCR منتسب می‌کنند (۱۵). بنظر می رسد که در هر حال آزمایش سریع و دقیق PCR ما را از روشهای متداول باکتریولوژی بی نیاز نمی کند و بهتر است برای افزایش حساسیت از هر دو آزمایش در ردیابی عفونت ORT استفاده شود. با توجه به نتایج بدست آمده، از PCR راه‌اندازی شده در این تحقیق بخوبی می توان در تشخیص قطعی باکتری مشکوک به ORT و تشخیص تفریقی آن با سایر باکتریهای نزدیک و مشابه آن و همچنین در تشخیص سریع در نمونه مستقیم صلایه نای یا سواپ استفاده نمود. از طرف دیگر با تغییرات لازم در آزمایش PCR می توان نسبت به افزایش حساسیت آن، تشخیص آلودگی در سایر نمونه‌ها نظیر مدفوع، تخم مرغ و گرد وخاک و همینطور بررسیهای اپیدمیولوژی اقدام نمود. این مطالعه اولین گزارش از جداسازی باکتری ORT در سن کشتار و از ناحیه قزوین می‌باشد. آلودگی بالای گله‌های گوشتی در سن کشتار (۵۰ درصد) یعنی در هفته هشتم با یافته قبلی در ایران (۶)، که بیشترین میزان آلودگی جوجه‌های گوشتی در هفته‌های ششم و هفتم دیده شده بود نزدیک و منطبق است. اما با مطالعات در خارج از ایران که بیشترین آلودگی در جوجه‌های گوشتی در سنین ۳ تا ۴ هفته اعلام شده است (۲۱)، انطباق ندارد. شاید یک دلیل آن تغذیه متفاوت جوجه‌های گوشتی و تفاوت اوج سرعت رشد آنها در ایران با کشورهای غربی باشد. با توجه به بروز بیماری در سن ۴ هفتگی در سایر کشورها و دوره نسبتاً کوتاه بیماری، که بین ۵ تا ۸ روز اعلام شده است (۲۱) و همینطور مقاومت طبیعی ناشی از سیستم ایمنی پس از بروز بیماری، عفونت ORT در سن کشتار در آن کشورها کمتر قابل انتظار است. این یافته ممکن است فرضیه دیگری را متبادر به ذهن نماید که گله‌های طیور گوشتی پس از دوره بیماری، آلوده باقی می‌مانند و قادر به اشاعه عفونت می‌باشد.

References

1. Abdul-Aziz, T. A. (1997) *Ornithobacterium rhinotracheale* developing into a serious infection. world poultry Misset. 13: 47-48.
2. Banani, M., Khaki, P., Goodarzi, H., Vand-Yousefi, J., Pourbakhsh, S. A. (2000) Isolation and identification of *Ornithobacterium rhinotracheale* from a broiler and a pullet flock. Pajouhesh-va-Sazandegi. 46: 106-109.
3. Banani, M., Pourbakhsh, S. A., Khaki, P. (2001) Characterization of O. rhinotracheale from commercial chickens. Arch. Razi. 52: 27-36.
4. Banani, M., Pourbakhsh, S. A., Deihim, A.H. (2001) Antibiotic sensitivity of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolates assiciated with respiratory diseases. Arch. Razi Ins. 58: 111-117.
5. Banani, M., Momayez, R., Pourbakhsh, S.A., Goodarzi, H., Bahmani- Nejad, M. A. (2002) Simultaneous isolation of *Ornithobacterium rhinotracheale* and avian influenza virus subtype H9N2 from commercial poultry. Iranian J. Vet. Res. 3: 190-195.
6. 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-va-Sazandegi. 55: 28-37.

7. Banani, M., Pourbakhsh, S. A., Khaki, P., Moazeni-Jula, G. (2004) Isolation and identification of bacterial agents in commercial chickens suffered from swollen head and face. Iranian J. Vet. Res. 5: 49-61.
8. Chin, R. P., Charlton, B. R. (1998) Ornithobacteriosis. In: Swayne, D.E., et al (Eds), A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. 4th ed., Pennsylvania State, USA. pp. 89-91.
9. Chin, R. P., Droual, R. (1997) *Ornithobacterium rhinotracheale* infection. In: Diseases of poultry. Calnek, BW, et al (eds). 10th ed. Ames, Iowa state University press.USA. pp. 1012- 1015.
10. Chin, R. P., van Empel, P. C. M., Hafez, H. M. (2003) Ornithobacterium rhinotraceale infection. In: Saif, Y.M. et al (eds) diseases of poultry. 11th ed., Iowa State Press. USA. pp. 683-690.
11. Hafez, M. H. (2002) Diagnosis of *Ornithobacterium rhinotracheale*. Inter. J. Poultry Sci. 1: 114-118.
12. Jordan, F. T. W., Pattison, M. (1999) Poultry diseases, 4th ed. (reprinted), W.B. Saunders.
13. Joubert, P., Higgins, R., Laperle, A., Mikaelian, I., Venne, D., Silim, A. (1999) Isolation of *Ornithobacterium rhinotracheale* from turkeys in Quebec, Canada. Avian Dis. 43: 622-626.
14. Koga, Y., Zavaleta, A. (2005) Intraspecies genetic variability of *Ornithobacterium rhinotracheale* in commercial birds in Peru. Avian Dis. 49: 108- 111.
15. Malorny, B., Hoorfar, J., Hugas, M., Heuvelink, A., Fach, P., Ellerbyoek, L., Bunge, C., Dorn, C., Helmuth, R. (2003) Interlaboratory diagnostic accuracy of Salmonella specific PCR-based method. Inter. J. Food Microbiol. 89: 241-249.
16. Odor, E. M., Salem, M., Pope, C.R., Sample, B., Primm, M., Vance, K., Murphy, M. (1997) Isolation and identification of *Ornithobacterium rhinotracheale* from commercial broiler flocks on the Delmarva Peninsula. Avian Dis. 41: 257-260.
17. Sprenger, S.J., Back, A., Shaw, D.P., Nagaraja, K.V., Roepke, D. C., Halvorson, D.A. (1998) *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in turkeys: experimental reproduction of the disease. Avian Dis. 42: 154-161.
18. Travers, A.F. (1996) Concomitant *Ornithobacterium rhinotracheale* and Newcastle disease infection in broilers in South Africa. Avian Dis. 40: 488 - 490.
19. Vandamme, P., Segers, P., Vancaneyt, M., van Hover, K., Mutters, R., Hommez, J., Dewirst, F., Paster, B., Kersters, K., Falsen, E., Devrieze, L., Bisgaard, M., Hinz, K.H., Mannheim, W. (1994) Description of Ornithobacterium rhinotraceale gen. Nov. sp. nov. isolated from the avian respiratory tract. Inter. J. Systemic Bacteriol. 44: 24-37.
20. Van Empel, P., Van den Bosch, H. (1998) Vaccination of chickens against *Ornithobacterium rhinotracheale* infection. Avian Dis. 42: 572-578.
21. Van Empel, P. C. M., Hafez, H. M. (1999) *Ornithobacterium rhinotracheale*: a review. Avian Pathol. 28: 217- 227.
22. Van Empel, P. C. M., Vrijenhoek, M., Goovaerts, D., Van den Bosch, H. (1999) Immuno-histochemical and serological investigation of experimental *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in chickens. Avian Pathol. 28: 187-193.
23. Van Veen, L., Gruys, E., Frik, K., Van Empel, P. C. M. T. (2000) Increased condemnation of broilers associated with *Ornithobacterium rhinotracheale*. Vet. Rec. 147: 422-423.
24. Van Veen, L., Van Empel, P., Fabri, T. (2000) *Ornithobacterium rhinotracheale*, a primary Pathogen in broilers. Avian Dis. 44: 896 -900.

J.Vet.Res. 64,1:41-45,2009

DIAGNOSIS OF *ORNITHOBACTERIUM RHINOTRACHEALE* USING POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

Banani, M.[1]*, Pourbakhsh, S.A.[1], Erami, M.[1], Gholamin, F.[2], Fatehmanesh, M.[2]

[1]*Reference Laboratory of Ornithobacterium rhinotracheale, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Hessarak, Karaj-Iran.*

[2]*Graguated from Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj - Iran.*

(Received 21 April 2008 , Accepted 4 March 2009)

Abstract:

Ornithobacterium rhinotracheale (ORT) has been identified as one of the emerging respiratory bacterial pathogens in turkey and chicken flocks. Diagnosis of ORT infection has been faced some difficulties in isolation and identification of the bacterium based on the biochemical properties. A reliable identification method that can be used in routine laboratory investigations is of importance. The Purpose of this study was diagnosis of ORT using polymerase chain reaction (PCR) in comparison with culture. The PCR was optimized using the primer combination OR16S-F1 and OR16S-R1, positive control of ORT bacteria, and 7 other bacteria such as Haemophilus paragallinarum and Pasteurella multocida as negative control. All samples were prepared for DNA extraction by use of phenol- chloroform method. Sixty pooled tracheal and infraorbital sinus samples from 30 broiler flocks slaughtered at an abattoir in Gazvin province were examined for presence of ORT using culture and PCR assay. A fragment of 784-bp was amplified in 5 positive known ORT samples, but not in other 7 bacteria as negative controls. 19 out of 60 primary samples including 11 homogenized tracheal samples and 8 infraorbital sinus swabs, and also all 17 suspected and purified colonies identified microbiologically as ORT were positive in PCR assay. One out of 41 negative primary samples in PCR test became positive through the culture. Then the propagated bacterium was confirmed in PCR. Fifteen out of 30 flocks (50%) were positive in PCR test and only one of them was negative in culture. Upon the results the PCR method of this study can be used as a reliable and rapid identification of ORT in samples suspected to ORT infection. However, it is better to use a combination of the PCR and culture in order to maximize the diagnosis of ORT infections.

Key words: diagnosis *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT), polymerase chain reaction (PCR), broiler.

***Corresponding author's email: m. banani@rvsri.ir, Tel: 0261-4570038-46, Fax: 0261-4552194**