

جستجوی مولکولی *Ornithobacterium rhinotracheale*

در موارد عفونت های تنفسی ماکیان گوشتی شهرکرد

• عبدالکریم زمانی مقدم

دانشیار گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد

• حسین طهماسبی (نویسنده مسئول)

دانشجوی دانشکده دامپزشکی و عضو پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه شهرکرد

• سید حسین هاشمی باباحیدری و • مهرداد خسروی فارسانی

دانشجویان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد

• عبدالله کیانی سلمی

کارشناس گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد

تاریخ دریافت: دی ماه ۱۳۹۰ تاریخ پذیرش: فروردین ماه ۱۳۹۱

تلفن تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۳۷۳۲۵۰۷۱

Email: H.Tahmasby@yahoo.com

چکیده

بیماری های تنفسی به صورت مداوم زیان های اقتصادی سنگینی را در صنعت طیور در سراسر جهان ایجاد می کنند. *Ornithobacterium rhinotracheale* به عنوان یک عامل موثر احتمالی در ایجاد کمپلکس های بیماری های تنفسی قلمداد شده است. اگرچه تایید شده است که *O. rhinotracheale* به ضدعفونی کننده های شیمیایی مختلف بسیار حساس است، با این حال اخیراً عفونت با *O. rhinotracheale* اندمیک شده است و به همان میزانی که مزارع پرورش دهنده ی طیور با سنین مختلف را می تواند آلوده کند هر مکان جداسازی و فروش دام جدید حتی در جایگاه های تمیز و ضدعفونی شده خصوصاً در مناطق با تولید متراکم طیور را می تواند آلوده نماید. با توجه به اهمیت آنچه ذکر گردید، مطالعه ی حاضر جهت ردیابی *O. rhinotracheale* در جوجه های گوشتی مبتلا به عفونت تنفسی در شهرکرد انجام شد. مجموعاً ۹۳ نمونه سوآب نای از موارد عفونت تنفسی از ۳۱ گله جوجه ی گوشتی اخذ گردید. نمونه ها روی محیط کشت آگار خوندار حاوی جنتاماایسین و ۵ درصد خون دفیبریینه گوسفند کشت داده و در انکوباتور با ۷/۵-۵ درصد CO₂ در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت نگه داری شدند. کلنی های مشکوک جهت جستجوی *O. rhinotracheale* با استفاده از آزمون واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR) مورد ارزیابی قرار گرفتند. میزان آلودگی گله های گوشتی مبتلا به عفونت های تنفسی به *O. rhinotracheale* ۱۹/۳۵ درصد (۱۸ تا از ۹۳ نمونه) بود. مطالعه ی حاضر نشان می دهد که *O. rhinotracheale* می تواند نقش قابل توجهی در زیان های اقتصادی ناشی از بیماری های تنفسی در صنعت طیور این منطقه ایفا کند.

کلمات کلیدی: *O. rhinotracheale*، جوجه ی گوشتی، PCR

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 96 pp: 41-44

Molecular detection of *Ornithobacterium rhinotracheale* in broiler chickens with respiratory infection in Shahrekord

By: A. Zamani Moghaddam: Associate Professor, Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran, H. Tahmasby: Student, Faculty of Veterinary Medicine and Member of Research Institute of Biotechnology, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran, (Corresponding Author; Tel: +989137325071), S.H. Hashemi Babaheidari and M. Khosravi Farsani: Student, Faculty of Veterinary Medicine, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran, A. Kiani Salmi: Lab Technician, Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

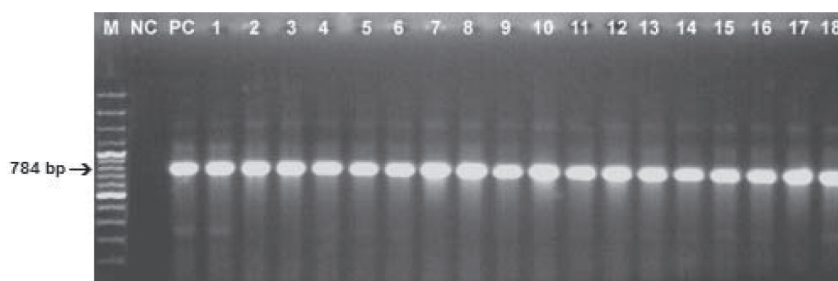
Respiratory disease conditions are continuing to cause heavy economic losses in the poultry industry worldwide. *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) has been incriminated as a possible additional causative agent in respiratory disease complex. Although, ORT has been proved to be highly sensitive to different chemical disinfectants, currently, ORT infection appears to have become endemic and can affect every new restocking even in previously cleaned and disinfected houses especially in areas with intensive poultry production as well as in multiple age farms. Considering the importance of what mentioned, present study was conducted to detection of *Ornithobacterium rhinotracheale* in broiler chickens with respiratory infection from Shahrekord, Iran. Altogether 93 tracheal swab samples collected from 31 broiler chicken flocks with respiratory diseases in Shahrekord, Iran. The samples were plated onto Blood agar containing Gentamicin and 5% defibrinated sheep blood and incubated under 5-7.5% CO₂ at 37°C for 48 hours. Suspected colonies were evaluated for detecting ORT by polymerase chain reaction (PCR) method. The rate for respiratory infections with ORT was 19.14% (18 out of 93). Present study suggests ORT can play a significant role in economic losses caused by respiratory diseases in the poultry industry of the region.

Key words: *Ornithobacterium rhinotracheale*, broiler chicken, PCR

مقدمه

Ornithobacterium rhinotracheale باکتری گرم منفی، پلی مورف، میله ای شکل و بدون هاگ است که رشد آن خیلی کند بوده و سریعاً به وسیله باکتری های سریع رشد پوشیده می شود، کشت این باکتری مشکل و از نظر خصوصیات بیوشیمیایی نیز ناپایدار است. انتقال (*O. rhinotracheale*) (ORT) از طریق افقی بوسیله چالش ریز قطرات و به شکل مستقیم و غیر مستقیم رخ می دهد (۸، ۱۲). علاوه بر آن انتقال عمودی نیز امکان پذیر می باشد (۱۲)، گرچه انتقال عمودی به صورت انتقال از طریق تخمدان و یا از طریق کلواک هنوز اثبات نشده است (۸). در مرغان مادر، بیماری در دوره تخم گذاری پرندگان را مبتلا می نماید که ابتدا در اوج تولید و یا قبل از وارد شدن گله به زمان تولید می باشد. از آن جایی که تشخیص قطعی این عفونت بر اساس علائم کلینیکی و یافته های کالبدگشایی مشکل بوده (۵، ۷، ۱۱)، از واکنش زنجیره ای پلی مراز می توان برای اثبات باکتری در جهت تشخیص قطعی عفونت استفاده نمود (۷). تاکنون مطالعه ای در مورد وضعیت آلودگی به *O. rhinotracheale* در منطقه ی شهرکرد انجام نشده است لذا بررسی حاضر با هدف ردیابی این باکتری در گله های گوشتی مبتلا به عفونت های تنفسی در منطقه شهرکرد به انجام رسید. در این مطالعه که در پاییز سال ۱۳۹۰ صورت گرفت ۹۳ سوآب نای از موارد عفونت تنفسی از ۳۱ گله جوجه ی گوشتی مراجعه شده به کلینیک دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد اخذ گردید و روی محیط کشت آگار

خوندار (مرک، ساخت آلمان) حاوی ۵ درصد خون گوسفند و جنتامایسین (۵ میکروگرم به ازای هر میلی لیتر، برای جلوگیری از رشد باکتری های سریع رشد) کشت داده و در انکوباتور با ۷/۵-۵ درصد CO₂ در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت نگه داری شدند. مشاهده پرگنه های ریز شبثی شکل، رنگ آمیزی گرم و مشاهده ی اشکال پلی مورف باکتری در زیر میکروسکوپ و دو خصوصیت مهم بیوشیمیایی، اکسیداز و کاتالاز مورد بررسی قرار گرفت (۶، ۷، ۹). نمونه های مشکوک به *O. rhinotracheale* تا زمان انجام PCR در محیط TSB (مرک، ساخت آلمان) به صورت گلیسرینه در دمای ۲۰- نگه داری گردیدند. کنترل مثبت از کلکسیون باکتری های گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز تهیه گردید. نمونه های مشکوک جهت جست و جوی *O. rhinotracheale* به وسیله ی PCR با استفاده از پرایمرهای توصیف شده توسط Hafez (۸) مورد آزمون قرار گرفتند. مواد PCR از شرکت سیناژن ساخت ایران تهیه شد و واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر (۲/۵ میکرولیتر بافر PCR ۱۰X، ۱/۵ میکرولیتر ۵۰ MgCl₂ میلی مولار، ۱ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی مولار، ۱/۵ واحد آنزیم Taq پلی مراز، ۱ میکرولیتر با غلظت ۱۰ میکرومولار از هر پرایمر، ۱ میکرولیتر DNA الگو) انجام گردید. برنامه های دمایی مطابق با برنامه حرارتی Hafez (۸) در دستگاه ترموسایکلر (Biorad، ساخت آمریکا) صورت پذیرفت. در پایان محصولات PCR روی ژل آگارز (ساخت سیناژن، ایران) ۱/۵ درصد الکتروفورز (ساخت پایاپژوهش پارس، ایران) گردید.



شکل ۱- تصویر الکتروفورز ژل آگارز برای *O. rhinotracheale*. مارکر ۱۰۰ جفت بازی، NC: کنترل منفی، PC: کنترل مثبت *O. rhinotracheale*، ۱ تا ۱۸: ایزوله های مثبت برای *O. rhinotracheale*.

طیور صنعتی به ویژه طیور گوشتی مطالعه ی حاضر صورت گرفت. امید است نتایج این مطالعه به منظور اتخاذ سیاست مناسب در برخورد با بیماری های تنفسی صنعت طیور کشور و از جمله منطقه ی شهرکرد و جلوگیری از وارد آمدن خسارت بیشتر مفید باشد. بدین وسیله از شورای محترم پژوهشی دانشگاه شهرکرد به خاطر تامین هزینه های مالی این طرح تحقیقاتی تشکر و قدردانی می گردد.

منابع مورد استفاده

- ۱- اسدپور، ی.، بزرگمهری فرد، م.ح.، پوربخش، س.ع.، بنانی، م.، چرخ کار، س. (۱۳۸۸) تشخیص *O. rhinotracheale* در گله های مرغ مادر گوشتی استان گیلان به روش PCR. مجله دامپزشکی ایران، ۵، ۴: ۵۹-۶۳
- ۲- بنانی، م.، پوربخش، س.ع.، ارمی، م.، غلامین، ف.، فاتح منش، م. (۱۳۸۸) شناسایی *O. rhinotracheale* به روش واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR). مجله تحقیقات دامپزشکی، ۶۴، ۱: ۴۱-۴۵
- ۳- جمشیدیان، م.، میاحی، م. (۱۳۸۷) جداسازی *O. rhinotracheale* (ORT) از ماکیان گوشتی شهرستان اهواز. مجله دامپزشکی ایران، ۴، ۴: ۲۹-۳۶
- ۴- قائم مقامی، س.ش.، وندیوسفی، ج.، نیرومند، ح.، منصفی، ع.ع.، احمدلو، س. (۱۳۸۶) بررسی شیوع *O. rhinotracheale* در گله های مرغ گوشتی مبتلا به عوارض تنفسی در استان مرکزی. مجله تحقیقات دامپزشکی، ۶۲، ۵: ۲۹۷-۳۰۰.

- 5- Abdul-Aziz, T.A. (1997) Ornithobacterium rhinotracheale developing into a serious infection. *World Poultry Misset*, 13(8):47-48
- 6- Canal, C.W., Leao, J.A., Rocha, S.L., Macagnan, M., Lima-Rosa, C.A., Oliviera, S.D., Back, A. (2005) Isolation and characterization of Ornithobacterium rhinotracheale from chickens in Brazil. *Research Veterinary Science*, 78(3):225-230 .
- 7- Chin, R.P., Van Empel, P.C.M., Hafez, H.M. (2003) *Ornithobacterium rhinotracheale* infection. In: Saif, Y.M., Calnek, B.W., Barnes, H.J., et al. Disease of poultry. Chapter (11th eds).

در مطالعه ی حاضر میزان آلودگی به *O. rhinotracheale* در گله های گوشتی مبتلا به عفونت های تنفسی ۱۹/۳۵ درصد (۱۸ تا از ۹۳ نمونه یا ۶ گله از ۳۱ گله) بود (شکل ۱).

در مطالعات مختلفی که در کشور صورت گرفته شیوع *O. rhinotracheale* از میزان متفاوتی برخوردار بوده است. قائم مقامی و همکاران طی مطالعه ای در استان مرکزی در گله های گوشتی مبتلا به عوارض تنفسی، میزان شیوع *O. rhinotracheale* را ۹/۸ درصد تعیین گزارش کردند (۴). در مطالعه ای در شهرستان اهواز از نمونه های کشتارگاهی، نمونه های میدانی بدست آمده از مرغداری ها و از موارد ارجاعی به بخش طیور به ترتیب ۸/۶۶، ۱ و ۱۳/۷۹ درصد *O. rhinotracheale* جداسازی گردید (۳). در مطالعه ی بنانی و همکاران در کشتارگاه های قزوین به روش PCR، ۶۰ نمونه سواب نای از جوجه های گوشتی کشتار شده از ۳۰ گله اخذ گردید که ۶ نمونه (۱۰ درصد) مثبت بود (۲). در مطالعه ی اسدپور و همکاران در استان گیلان به روش PCR، ۲۲۰ سواب نای از ۲۲ گله مرغ مادر اخذ گردید که ۳/۱۸ درصد نمونه ها مثبت ارزیابی شدند (۱).

در سایر نقاط دنیا در مورد شیوع *O. rhinotracheale* نیز مطالعات مختلفی صورت گرفته است. Ozby (۲۰۰۵) در شرق ترکیه از ۲۵۰ نمونه شستشو نای ۱۰ گله تجاری توانست از نای ۵ جوجه (۱/۵ درصد) و هم از نای و شش یک جوجه (۰/۰۴ درصد) باکتری را جدا و بوسیله PCR آن را تایید نماید (۱۰). Canal و همکاران (۲۰۰۵) در برزیل، ۴ جدایه از سواب نای گله های گوشتی جدا نمودند و از نظر PCR تمام جدایه ها را تایید کردند (۶). Hung و Alvarado (۲۰۰۱) در کشور پرو نیز ۲۵ جدایه را از نظر PCR مورد تایید قرار دادند (۹).

در مطالعه ی حاضر در مقایسه با سایر مطالعاتی که اخیرا در کشور صورت گرفته است، آلودگی نسبتا بالا به *O. rhinotracheale* گزارش شده است و این مسئله می تواند نشان دهنده ی نقش بیشتر *O. rhinotracheale* در موارد عفونت های تنفسی این منطقه نسبت به مناطقی که توسط سایر محققین مورد بررسی قرار گرفته است باشد. با در نظر گرفتن توضیحات فوق می توان این نکته را بیان نمود که این عفونت به صورت یک خطر بالقوه اکثر مرغداری های ایران را تهدید می نماید. با توجه به اهمیت *O. rhinotracheale* و لزوم اطلاع از وضعیت آلودگی به آن به عنوان عامل مزمن کاهش راندمان تولید در

polymorphic DNA (RAPD) Analysis of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolated from chickens in Turkey. *Veterinary Medicine-Czech*, 50(12):526-530

11- Van empel, P. and Hafez, M.H. (1999) *Ornithobacterium rhinotracheale*: A review. *Avian Pathology*, 28:217-227 .

12- Van empel, P. (2002) *Ornithobacterium rhinotracheale*. In: Jordan, F., Pattison, M., Alexander, D. and Faragher, T. *Poultry Diseases*, 5th eds, T. WB Sanders, 138-145.

Ames. Iowa State University Press, 683-688.

8- Hafez, M.H. (2002) Diagnosis of *Ornithobacterium rhinotracheale*. *International Journal of Poultry Science*, 1(5):114-118 .

9- Hung, A.L. and Alvarado, A. (2001) Phenotypic and molecular characterization of isolates of *Ornithobacterium rhinotracheale* from Peru. *Avian Disease*, 45:999-1005

10- Ozbey, G., Eatas, H.B. and Muz, A. (2005) Random amplified

