

شناسایی اورنیتوباکتریوم رینو تراکتال به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

منصور بنانی*^۱ سید علی پوربخش^۱ مه زادارمی^۱ فرزانه غلامین^۲ مسعود فاتح منش^۲

۱) آزمایشگاه رفرانس اورنیتوباکتریوم رینو تراکتال، مؤسسه تحقیقات واکنش و سرمسازای 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 رینو تراکتال (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 بکار آید، حائز اهمیت می‌باشد. هدف از این مطالعه شناسایی ORT به روش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)، در مقایسه با روش کشت بود. به منظور راه اندازی این PCR از پرایمرهای OR16S-F1 و OR16S-R1، باکتری‌های شناخته شده ORT و ۷ گونه باکتری دیگر، نظیر هموفیلوس پاراگالیناروم و پاستور لاملوتوسید، 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 تجمع شده بدست آمده از نای و سینوس زیر چشمی ۳۰ گله جوجه‌گوشتی کشتار شده 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 هموزنیزه نای و ۸ نمونه سواب سینوس زیر چشمی و در تمامی ۱۷ نمونه باکتری‌های جدا شده 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 تکثیر شده 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 بدست آمده؛ 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 حد اکثر رساندن تشخیص عفونت، با روش کشت توأم باشد.

واژه‌های کلیدی: تشخیص، اورنیتوباکتریوم رینو تراکتال، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، جوجه‌گوشتی.

جهانی آن در طیور تجاری و سایر پرندگان به اثبات رسید (۱، ۸، ۹، ۲۱).

اولین گزارش عفونت ORT در مرغداریهای ایران، در سال ۱۳۷۹ و از یک گله جوجه‌گوشتی 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 جدا شده 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 مرغداریه‌ها 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

مقدمه

اصطلاح کلی پاستورلوز طیور شامل عفونتهای ناشی از پاستور لاه‌ها و شبه پاستور لاه‌های 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 تراکتیت، 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 واکنسناسیون علیه آن هم مورد توجه 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 پاستور لاه 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



۱۳۲۰۰rpm یا ۱۶۱۰۰rcf سانتریفیوژ گردید. برای لیز باکتری ها به هم حجم ۱۰۰ میکرولیتر از رسوب بدست آمده از سانتریفیوژ، بافر لیز کننده اضافه شد و نمونه به مدت ۴ ساعت در دمای ۵۶ درجه سانتیگراد قرار گرفت. بافر لیز کننده شامل EDTA (Merck mM) ۱۰۰، NaCl (۵۰mM)، Tris-HCl (آلمان) (Merck) ۵۰mM، پروتئیناز K (Fermentas، لیتوانی) (۲mg/ml) و سدیم دودسیل سولفات (SDS) (Gibco BRL، انگلستان) ۱درصد 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 سانتریفیوژ گردید. فاز مایع رویی جدا گردید و هم حجم آن فنل - کلروفرم افزوده شد و به همان روش مرحله قبل سانتریفیوژ شد. سپس مایع رویی برداشت گردید و هم حجم آن کلروفرم اضافه شد و پس از ۵ دقیقه سانتریفیوژ در همان دور، مایع رویی به تیوب جدید منتقل شد. در انتها برای آبیگری 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 سانتریفیوژ در ۱۳۲۰۰rpm و تخلیه مایع رویی، به رسوب حاصل اتانل ۷۰در صد اضافه گردید و مجدد سانتریفیوژ شد. DNA حاصل خشک گردید و در ۵۰ میکرو لیتر آب مقطر دوبار تقطیر حل شد و تا زمان آزمایش PCR در ۴درجه سانتیگراد ذخیره شد.

پرایمرها: در این مطالعه یک جفت پرایمر اختصاصی ORT به نام های OR16S-R1 و OR16S-F1 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 تأیید کرده بودند (۱۱،۱۴،۲۱). ردیف بازهای آنها به شرح زیر بود:

OR16S-F1 5'-GAGAAT TAA TTTACG 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 نمونه های مورد آزمایش و همینطور کنترل های مثبت و منفی و با یک نمونه بیشتر، مخلوط اصلی محاسبه و تهیه می گردید. در این مطالعه حجم هر نمونه واکنش PCR، ۲۵ میکرو لیتر در نظر گرفته شد و حجم هر کدام از اجزای مخلوط برای هر نمونه شامل بافر PCR (Cinnagen، ایران) (۱۰x) ۲/۵ میکرو لیتر، کلرید منیزیم (Cinnagen) ۲۵ میلی مولار (۱/۵ میکرو لیتر)، مخلوط داکیسی نوکلئوزید تری فسفات (Cinnagen) ۱۰ میلی مولار ۰/۵ میکرو لیتر، هر کدام از پرایمرها (MWG، آلمان) ۱ میکرو لیتر (۱۰ پیکومول)، آنزیم (Cinnagen) Taq polymerase ۰/۵ میکرو لیتر (۱/۲۵ واحد بین المللی)، ۴DNA میکرو لیتر و آب مقطر استریل ۱۴ میکرو لیتر بود.

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

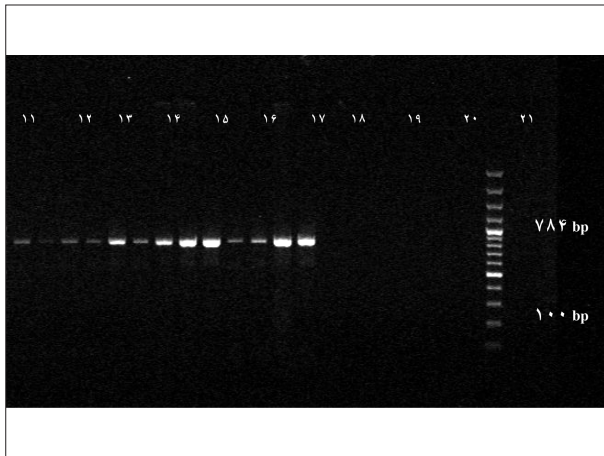
خصوصیات بیوشیمیایی متداول، امکان پذیر نیست. بنابر این در تشخیص قطعی باکتری ORT از برخی کیت های ویژه خواص بیوشیمیایی تجاری (۱۱)، آنتی سرم های اختصاصی (۳،۱۱) و اخیراً از پرایمرهای اختصاصی (۱۱،۱۴،۲۱) استفاده می شود. با توجه به اهمیت و گسترش روز افزون این بیماری در صنعت طیور کشور، تشخیص سریع و قطعی بیماری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

مواد و روش کار

نمونه برداری: پنج نمونه باکتری ORT سرو تیپ A شناسایی شده در مطالعه قبلی (۳) به عنوان نمونه باکتری کنترل مثبت و سایر باکتریهای پاتوژن طیور شامل سالمونلا انتریتیدیس، اشریشیا کلی سرو تیپ O2، هموفیلوس پاراگالیناروم سرو تیپهای A و C، پاستور لا مولتوسیداس سرو تیپ A1، مایکوپلازما گالی سپتی کوم (MG) و مایکوپلازما سینوویه (MS) تهیه شده در تحقیقات گذشته (۷) به عنوان باکتری کنترل منفی و همینطور آب مقطر به عنوان شاهد منفی، برای راه اندازی آزمایش PCR در نظر گرفته شدند. در یکی از کشتارگاه های 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 نمونه های 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 فسفات (PBS) به نسبت ۱۰ در صد به صورت سوسپانسیون هموژنیزه در آمد. نمونه ها بر اساس روشهای استاندارد (۲۰،۳،۸،۱۱)، کشت داده شدند. بدین منظور از محیط کشت آگار خوندار حاوی ۵ درصد خون گوسفند و ۵/۲ میکرو گرم 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. بر اساس 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 برات 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: 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 نمونه های نای صلایه شده و هموژنیزه شده و سواب اولیه در محیط BHI هم انجام شد. روش استخراج DNA به اختصار شامل مراحل لیز سلولی، 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





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

تکرار شد. از طرف دیگر نتایج این بررسی نشان داد که PCR راه اندازی شده قادر به شناسایی ORT در نمونه ای با تعداد حدود ۲۰ سلول در هر میلی لیتر می باشد.

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 یاد 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 بکار بردن آنتی سرم مونووالان احتمال عدم شناسایی سایر سروتیپها وجود دارد. تشخیص تفریقی از سایر پاتوژن های طیور به ویژه هموفیلوس پاراگالیناروم و پاستور لا مولتوسیدا که هم از نظر خواص بیوشیمیایی و هم از نظر جراحاتی که در طیور ایجاد می کنند 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 نمونه های 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 تأیید نمودند. Van Empel و Hafez توانایی این پرایمرها را در تشخیص تفریقی ORT از سایر باکتری های مشابه و نزدیک به آن را تأکید کردند (۲۱).

(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 گوده های تعبیه شده در ژل آگارز یک در صد 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: رفتهای ده برابر از کشت برات 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 رقت های مختلف انجام شد.

نتایج

در کشت نمونه های سینوس ونای 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 نمونه های کنترل مثبت ORT و تمامی ۱۷ نمونه باکتری مشکوک از ۱۴ گله مشاهده گردید (تصویر ۱). در آزمایش PCR نمونه های 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 گله های آلوده فقط از یک ارگان باکتری جدا شده بود در آزمایش PCR در هر دو ارگان وجود ORT ردیابی شد. نمونه های 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 نمونه های سینوس زیر چشمی و نای همخوانی داشتند.

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



سایر نمونه‌ها نظیر مدفوع، تخم مرغ و گرد و خاک و همینطور بررسیهای اپیدمیولوژی اقدام نمود. این مطالعه اولین گزارش از جداسازی باکتری ORT در سن کشتار و 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 هفته‌گی 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 associated 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

در این تحقیق تمامی باکتریهای مشکوک به ORT، در آزمایش PCR تأیید 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 تأیید کارهای قبلی (۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷)، دقت بالای این آزمایشگاه را در جداسازی ORT نشان داد. با وجود این نمی‌توان 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 درصد از اختلالات تنفسی در جوجه‌های گوشتی ناشی از ORT است؛ در حالی که با آزمایش‌های باکتری شناسی یا سرولوژی تنها ۲۰ درصد از موارد تحت مطالعه عفونت ORT را نشان دادند. در مطالعه حاضر PCR راه اندازی شده قادر به ردیابی ۲۰ سلول ORT در هر میلی لیتر نمونه‌های مستقیم سوپ 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 جداسازی 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 بارش آهسته ORT را می‌پوشاندند. در موارد دیگر احتمال عدم زنده ماندن باکتری یا عدم رشد باکتری در محیط کشت به هر دلیل می‌تواند 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 سوپ‌های ORT به جنتامایسین و ۱۰ درصد آنها به پلی میکسین B حساس هستند (۸) و این می‌تواند یکی از دلایل عدم رشد برخی از سوپ‌های 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 می‌رسد که در هر حال آزمایش سریع و دقیق مارا از روش‌های متداول باکتریولوژی بی‌نیاز نمی‌کند و بهتر است برای افزایش حساسیت از هردو آزمایش در ردیابی عفونت ORT استفاده شود. با توجه به نتایج بدست آمده، از PCR راه اندازی شده در این تحقیق بخوبی می‌توان 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 سوپ استفاده نمود. از طرف دیگر با تغییرات لازم در آزمایش PCR می‌توان نسبت به افزایش حساسیت آن، تشخیص آلودگی در



- 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. 4thed., 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). 10thed. Ames, Iowa state University press. USA. pp. 1012- 1015.
 10. Chin, R. P., van Empel, P. C. M., Hafez, H. M. (2003) *Ornithobacterium rhinotracheale* infection. In: Saif, Y.M. et al (eds) diseases of poultry. 11thed., 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, 4thed. (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., Mitters, R., Hommez, J., Dewirst, F., Paster, B., Kersters, K., Falsen, E., Devrieze, L., Bisgaard, M., Hinz, K.H., Mannheim, W. (1994) Description of *Ornithobacterium rhinotracheale* 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.



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

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

²Graduated 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

