

مقایسه ژنوتیپی جدایه‌های اورنیتوباکتریوم رینوتراکتال جدا شده از ماکیان صنعتی ایران

سید مصطفی پیغمبری^{۱*}، منصور بنانی^۲، محمد یوسفی^۳، کیوان تدین^۴ و محسن بشاشتی^۴

^۱ استاد گروه بیماری‌های طیور، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

^۲ دانشیار گروه تحقیقات و تشخیص بیماری‌های طیور، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

^۳ دانشجوی دکتری تخصصی بیماری‌های طیور، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

^۴ استادیار گروه تحقیقات و تشخیص بیماری‌های طیور، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

پذیرش: ۱۴۰۱/۱/۱۵

دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۳۰

چکیده

اورنیتوباکتریوم رینوتراکتال (ORT)، باکتری نوظهور بیماری‌زای تنفسی است که خسارات اقتصادی مهمی را در صنعت طیور ایجاد می‌کند. مطالعات قبلی در ایران شباهت‌های مولکولی و ژنتیکی بالایی را بین جدایه‌های ORT طی سال‌های ۱۹۹۹-۲۰۰۹، براساس SDS-PAGE، ERIC-PCR و تعیین توالی ژن 16S rRNA نشان داد. هدف از مطالعه حاضر تعیین ژنوتیپ جدایه‌های ORT به دست آمده از ماکیان صنعتی با استفاده از روش‌های تکثیر تصادفی پلی‌مورفیسم DNA (RAPD) و تعیین تیپ توالی‌یابی چندجایگاهی (MLST) بود. در این مطالعه، از ۳۰ باکتری ORT جدا شده از ماکیان صنعت طیور ایران در سال‌های ۱۳۷۹ تا ۱۳۹۵ تأیید شده به روش بیوشیمیایی و مولکولی استفاده شد. آزمایش RAPD با استفاده از پرایمر OPG11 بر روی تمام نمونه‌های ORT مورد مطالعه انجام شد. با توجه به نتایج آزمون RAPD از بین ۳۰ جدایه ORT تنها ۵ جدایه برای آزمون MLST انتخاب شدند که برای انجام آن، هفت جفت پرایمر برای تکثیر و توالی‌یابی ژن‌های خانه‌دار *pmi* و *pgi mdh gdhA fumC aroE adk* طراحی گردید. در آزمون RAPD با استفاده از پرایمر OPG11، تعداد ۹ ژنوتیپ متفاوت مشاهده شد. توالی DNA ال‌های این هفت لوکوس، در خصوص هر ۵ سویه ORT، با توالی آل‌های موجود در بانک اطلاعاتی MLST مقایسه شدند. چهار ORT از پنج جدایه مورد مطالعه متعلق به تیپ سکاسی ۹ (ST9) بودند و یک سویه هم تیپ سکاسی جدیدی بود. بر اساس یافته‌های این مطالعه، یک تیپ سکاسی جدید از ORT های طیور صنعتی در ایران گزارش گردید که پیش از این از سایر نقاط جهان گزارش نشده است. مطالعات بعدی جهت بررسی تعداد بیش‌تری از جدایه‌های ORT، می‌تواند در تشخیص تیپ‌های مختلف سکاسی و تیپ سکاسی غالب در کشور کمک‌کننده باشد.

کلمات کلیدی: اورنیتوباکتریوم رینوتراکتال، ژنوتایپینگ، طیور، RAPD-PCR، MLST

مقدمه

اورنیتوباکتریوم رینوتراکتال (ORT) یک عامل بیماری‌زای نوظهور در طیور است که سبب بیماری اورنیتوباکتریوز می‌شود. این بیماری باعث عوارض تنفسی، عصبی، کاهش تولید تخم‌مرغ، کاهش رشد و تلفات می‌گردد. شدت علائم

* نویسنده مسئول: سید مصطفی پیغمبری، استاد گروه بیماری‌های طیور، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

E-mail: mpeigham@ut.ac.ir



© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

بالینی، طول بیماری و تلفات به شدت متغیر بوده و تحت تأثیر عوامل محیطی مانند مدیریت، تهویه، تراکم، شرایط بستر و بهداشت قرار دارد (Gornatti-Churria et al, 2019; Barbosa et al, 2020; Hafez and Chin, 2020). این باکتری یک باکتری گرم منفی، غیرمتحرک، به شدت چند شکل، میله‌ای شکل و غیر اسپورزا است. پرگنه این باکتری بسیار کوچک، غیر همولیتیک، گرد، خاکستری تا سفید-خاکستری، گاهی اوقات قرمز به صورت محدب است. تا کنون با استفاده از روش‌های مختلف، ۱۸ سروتیپ ORT شناسایی شده است. سروتیپ A شایعترین سروتیپ در میان جدایه‌های ماکیان (۹۷ درصد) و بوقلمون (۶۱ درصد) به شمار می‌آید (Barbosa et al, 2020; Hafez and Chin, 2020).

اولین گزارش عفونت ORT در مرغ‌داری‌های ایران، در سال ۱۳۷۹ و از یک گله جوجه گوشتی و یک گله پولت تخم‌گذار با علایم تنفسی بوده است (Banani et al, 2000). بیماری اورنیتوباکتریوز در نژادهای مختلف ماکیان ایران شامل مادر گوشتی، جوجه گوشتی، تخم‌گذار تجاری و مرغ بومی و در گله‌هایی با تلفات بالا گزارش شده است (Banani et al, 2009). در سال ۲۰۰۶، Allymehr با استفاده از یک کیت تجاری الیزا شیوع سرمی ORT را به ترتیب در ۵۰ و ۴۲ گله گوشتی و مادر گوشتی مورد ارزیابی قرار داد و گله‌های مثبت از لحاظ سرولوژی را به ترتیب ۸۲ و ۹۲/۸ درصد نشان داد. در تحقیقی دیگر نیز شیوع سرمی و آلودگی گله‌های گوشتی در جنوب شرق ایران را به ORT به میزان ۳۱/۹ درصد گزارش شد (Ghanbarpour and Salehi 2009). Mayahi و همکاران در سال ۲۰۱۶ نیز ORT را از ۱۰/۹۵ درصد از سوآب‌های اخذ شده از گله‌های گوشتی در خوزستان جدا نمودند. همچنین Mirzaei و همکاران در سال ۲۰۱۱، آلودگی ORT را در بوقلمون تجاری، کبوتر و بلدرچین ایران به ترتیب ۲۰، ۵۰ و ۳۵ درصد گزارش نمودند.

تشخیص اورنیتوباکتریوز بر اساس نشانه‌های بالینی و یافته‌های کالبدگشایی دشوار است. شباهت علایم 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 بیماری اورنیتوباکتریوز به سادگی و سرعت امکان‌پذیر نباشد. از آن جا که به دلیل عدم رشد مناسب باکتری در برخی محیط‌ها و همین‌طور واکنش‌های متغیر سویه‌های مختلف این باکتری، تشخیص قطعی تنها بر اساس خصوصیات میکروبیولوژی و بیوشیمیایی متداول، امکان‌پذیر نیست (Barbosa et al, 2020). بنابراین در تشخیص قطعی باکتری ORT از برخی کیت‌های تجاری ویژه خواص بیوشیمیایی، آنتی‌سرم‌های اختصاصی و اخیراً از پرایمرهای اختصاصی برای PCR استفاده می‌شود (Barbosa et al, 2020). تشخیص قطعی می‌بایست بر اساس جداسازی و شناسایی ORT و یا جستجوی آنتی‌بادی استوار باشد (Barbosa et al, 2020). از آن جا که جداسازی و شناسایی باکتری به راحتی ممکن نیست و ORT جزء باکتری‌های سخت رشد محسوب می‌شود، استفاده از روش PCR و qPCR راهی جایگزین و دارای حساسیت بالا جهت شناسایی و ردیابی ORT می‌باشد (Hassanzadeh et al, 2010; Ghodsian et al, 2013; Ha et al, 2016). برای طبقه‌بندی ژنتیکی جدایه‌های ORT به غیر از ریوتایپینگ از طریق تعیین توالی ژن *16S rRNA*، روش‌های انگشت‌نگاری مولکولی مبتنی بر توالی‌های تکرار شونده نظیر تکثیر تصادفی پلی‌مورفیسم DNA (RAPD)، واکنش PCR مبتنی بر توالی‌های تکرار شونده (rep-PCR)، پلی‌مورفیسم طول قطعات حاصل از تکثیر (AFLP)، تایپینگ توالی‌یابی چندجایگاهی (MLST) و توالی‌یابی کامل ژنومی به کار رفته است (Hafez and Chin 2020; Nisar et al, 2020; Smith et al, 2020; Alispahic et al, 2021). این تکنیک‌ها برای تعیین میزان شباهت و یا هتروژنیسیته جدایه‌ها از هم مورد استفاده قرار گرفته‌اند و از لحاظ قدرت تمایز دارای تفاوت‌هایی باهم می‌باشند. تایپینگ سویه‌های باکتری‌ها در تشخیص، درمان و بررسی‌های اپیدمیولوژیک عفونت‌های باکتری از اهمیت

عوامل مختلف مانند توالی پرایمر و نقطه ذوب آن، خلوص DNA و غلظت آن و دستگاه PCR و مواد مصرفی قرار می‌گیرد. به علاوه، تکرارپذیری این روش چالشی را در مقایسه الگوهای بانندی در بین آزمایشگاه‌های مختلف ایجاد می‌کند. در مقابل MLST، روشی آسان، کارآمد و بسیار تکرارپذیر می‌باشد و به راحتی اجازه مقایسه اطلاعات توالی باکتری همراه با اطلاعات زمینه‌ای از سویه باکتری و آزمایشگاه‌های مختلف در سراسر جهان را می‌دهد (Thieme et al, 2016a). البته هزینه بالا و نیاز این تکنیک به تجهیزاتی که در همه آزمایشگاه‌های تحقیقاتی به راحتی فراهم نمی‌شود از محدودیت‌های MLST است.

با توجه به این که بررسی‌های پیشین در ایران شباهت‌های مولکولی و ژنتیکی بالایی را بین جدایه‌های ORT طی سال‌های ۱۹۹۹-۲۰۰۹، بر اساس SDS-PAGE، ERIC-PCR و تعیین توالی ژن 16S rRNA نشان داده بود در مطالعه حاضر تعیین ژنوتیپ جدایه‌های ORT به دست آمده از ماکیان صنعتی با استفاده از RAPD-DNA و MLST انجام شد تا شاید بتوان جدایه‌های ORT را بهتر از همدیگر تمایز داد.

مواد و روش کار

در این مطالعه از ۳۰ باکتری ORT بانک ذخیره باکتری بخش بیماری‌های باکتریایی طیور مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی استفاده شد. این باکتری‌ها در سال‌های مختلف (۱۳۷۹-۱۳۹۵) از مزارع صنعتی (گوشتی، تخم‌گذار و مادر گوشتی) مناطق مختلف کشور جدا شده بودند. مشخصات گله‌ها و تاریخ و استان جداسازی باکتری‌های مورد مطالعه در Table 1 آورده شده است.

بالایی برخوردار است. محدودیت‌های تعیین سروتیپ جدایه‌های ORT به دلیل عدم دسترسی به ۱۸ آنتی‌سرم و وجود واکنش متقاطع بین سروتیپ‌ها در آزمایشات سرولوژی، وابستگی نتایج به مشاهدات آزمایش‌گر و محافظت متقاطع در مقابل تعدادی از سروتیپ‌های هترولوگ، موجب شده که روش‌های سرولوژی رسوب بر روی ژل آگار (AGP) و الیزا برای تعیین سروتیپ جدایه‌ها ناکارآمد و شک برانگیز جلوه نماید، لذا به دلیل وجود چنین محدودیت‌هایی، روش‌های انگشت‌نگاری مولکولی قادر هستند این محدودیت‌ها را جبران کنند و تمایز و تفاوت بیشتری بین جدایه‌ها را فراهم کنند (Thieme et al, 2016a; Barbosa et al, 2020). بررسی تنوع ژنتیکی می‌تواند بیان‌گر تنوع فنوتیپی در باکتری، تفاوت پاتوژنیسیته در میان جدایه‌های ORT، گستردگی جغرافیایی، اختصاصیت میزبانی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی و حدت باشد (Thieme et al, 2016a). در پژوهش‌های قبلی در ایران بر روی جدایه‌های ORT، هتروژنیسیته محدودی در بین این باکتری مشاهده شد. در مطالعه‌ای، با استفاده از بررسی مولکولی و تعیین توالی ژن *16S rRNA*، مشابهت فراوان بیش از ۹۸ درصد بین چهار جدایه ORT و ۹ باکتری استخراج‌شده از بانک ژنی مشاهده گردید (Hassanzadeh et al, 2010). در مطالعه‌ای دیگر از ایران بر روی پرندگان به غیر از ماکیان صنعتی، با استفاده از توالی‌یابی قسمتی از ژن *16S rRNA*، مشابهت ۱۰۰ درصد جدایه‌های ORT ایرانی با ۱۴ جدایه موجود در بانک ژن گزارش شد (Mirzaie et al, 2011). در این مطالعه، برای مقایسه ژنتیکی جدایه‌های مختلف ORT در ایران، از دو روش RAPD و MLST استفاده شد. علی‌رغم این که، روش RAPD، روشی ارزان، سریع و حساس است، اما تحت تأثیر

Table 1. Details of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolates

No.	Isolate no.	Host	Isolation year	Province
1	ORT-2	Broiler breeder	2008	Gilan
2	ORT-7	Broiler breeder	2008	Gilan
3	ORT-10	Broiler breeder	2008	Gilan
4	ORT-29	Native breeder	2000	Alborz
5	ORT-30	Broiler	2001	Alborz
6	ORT-32	Broiler	2000	Ghazvin
7	ORT-36	Broiler	2000	Alborz
8	ORT-40	Layer pullet	2000	Alborz
9	ORT-41	Broiler	2000	Ghazvin
10	ORT-42	Broiler	2000	Alborz
11	ORT-48	Broiler	2000	Alborz
12	ORT-50	Broiler	2000	Alborz
13	ORT-53	Layer	2011	Golestan
14	ORT-55	Layer	2011	Khorasan Razavi
15	ORT-60	Layer	2011	Golestan
16	ORT-63	Layer	2011	Golestan
17	ORT-68	Layer	2015	Alborz
18	ORT-69	Broiler	2015	Gilan
19	ORT-70	Broiler	2015	Gilan
20	ORT-71	Broiler breeder	2015	Mazandarn
21	ORT-72	Layer	2015	Alborz
22	ORT-73	Broiler	2016	Alborz
23	ORT-74	Broiler	2016	Alborz
24	ORT-75	Broiler	2016	Alborz
25	ORT-78	Broiler	2016	Alborz
26	ORT-79	Layer	2016	Alborz
27	ORT-80	Broiler	2016	Alborz
28	ORT-81	Broiler	2016	Alborz
29	ORT-82	Broiler	2016	Alborz
30	ORT-86	Layer	2016	Alborz

نسبت‌های ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۳۰ با استفاده از دستگاه Thermo Fischer Scientific, Waltham,) ناندراپ (Massachusetts, US) مورد ارزیابی قرار گرفت. پرایمرهای مورد استفاده 5'-OR16S-F1: 5'-OR16- و GAGAATTAATTTACGGATTAAG-3' R1: 5'-TTCGCTTGGTCTCCGAAGAT-3' بودند که یک قطعه ۷۸۴ جفت بازی را در ژن *16S rRNA* شناسایی و تکثیر می‌کند (Umali et al, 2018). پرایمرها توسط شرکت سیناکلون (تهران، ایران) سنتز شدند. ژن *16S rRNA* در حجم ۲۵ میکرولیتری دارای *IX PCR Buffer* ۲ mM $MgCl_2$ ، ۴۰۰ μM dNTP، ۰/۴ μM از هر پرایمر، ۱/۲۵ یونیت *Taq DNA Polymerase* (سیناکلون، تهران، ایران) و ۲ μl DNA (50 ng/ml) باکتری در ترموسایکلر (Eppendorf, Hamburg, Germany) تکثیر

پس از خارج کردن باکتری‌های ORT از فریزر $70^{\circ}C$ ، جدایه‌ها در آگار خوندار به صورت هوازی کشت و در انکوباتور $37^{\circ}C$ و CO_2 ۵ درصد قرار داده شدند. بعد از ۲۴ الی ۴۸ ساعت که رشد باکتری‌ها به حداکثر خود رسید یک پرگنه را برداشت کرده و رنگ‌آمیزی گرم انجام شد (Banani et al, 2001). عدم رشد باکتری ORT بر روی آگار مکانکی، روشی برای تأیید تشخیص کشت ORT محسوب می‌شود. برای تأیید بیوشیمیایی باکتری از آزمایش‌های بررسی عدم حضور آنزیم کاتالاز، معرف اکسیداز، اوره‌آز و تأیید گرم منفی بودن باکتری با استفاده از هیدروکسید پتاسیم استفاده شد. برای استخراج DNA از کیت تجاری شرکت Roche High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche,) (Germany) استفاده شد. برای تعیین خلوص DNA

با توجه به نتایج آزمون RAPD و محدودیت‌های مالی در این پروژه از بین ۳۰ جدایه ORT تنها ۵ جدایه (شماره-های ۷، ۳۲، ۶۸، ۷۱ و ۸۲) برای آزمون MLST انتخاب شدند که سه جدایه از این باکتری متعلق به الگوی بانندی ژنوتیپ‌های شایع و دو جدایه با الگوی بانندی متفاوت بر اساس نتایج RAPD بودند. مراحل روش کار MLST به اختصار در Table 2 نشان داده شده است.

Table 2. Different steps of MLST

No.	Steps of MLST
1	DNA extraction of 5 ORT isolates
2	Amplification of 7 target genes by using specific primers
3	Purification of amplified bands
4	Sequencing of amplified bands of 7 genes
5	Comparison of sequenced amplified bands of 7 genes with those of other ORT isolates and identification of allele of each gene
6	Evaluation of final MLST result and determination of sequence type (ST) of each isolate based on sequence of 7 genes

بر اساس مطالعه Thieme و همکاران در ۲۰۱۶، مجموعه‌ای از هفت ژن خانه‌دار (Table 3) برای انجام MLST برای جدایه‌های باکتری ORT انتخاب شدند (Thieme et al, 2016a). این ژن‌ها بر اساس مطالعات قبلی که شامل آنالیز MLEE روی باکتری ORT و آنالیز MLST روی باکتری پاستورلا مولتوسیدا بود مورد انتخاب قرار گرفتند. سه ژن *adh*، *mdh*، *pgi* در هر دو مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند، در حالی که دو ژن *aroE* و *fumC* از آنالیز MLEE و دو ژن *gdhA* و *pmi* از آنالیز MLST باکتری پاستورلا مولتوسیدا انتخاب شدند. مشخصات پرایمرهای طراحی شده برای تکثیر و توالی‌یابی هفت ژن خانه‌دار ORT بر اساس سکانس ژنومی سویه DSM15997 در Table 4 نمایش داده شده است.

گردید. واکنش PCR از یک واسرشت اولیه در دمای ۹۴°C به مدت ۲ دقیقه، ۳۵ سیکل متوالی ۹۴°C برای ۱ دقیقه، ۵۴°C برای ۳۰ ثانیه و ۷۲°C برای ۱ دقیقه تشکیل شده بود و نهایتاً توسط یک بسط نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه خاتمه پیدا کرد. سپس محصول PCR با استفاده از SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Waltham,) در ژل آگارز ۱ درصد مورد بررسی قرار گرفت.

Leroy-Setrin و همکاران در ۱۹۹۸ و Özbeý و همکاران در ۲۰۰۵ استفاده از پرایمر OPG11 را برای تمایز بین جدایه‌های ORT حتی تمایز بین جدایه‌های داخل یک سروتیپ توصیه کردند. بنابراین در این مطالعه، برای انجام آزمایش RAPD از این پرایمر با توالی 5'-TGCCCGTCGT-3' این آزمایش بر روی ۳۰ جدایه ORT صورت گرفت. واکنش RAPD در حجم ۲۵ میکرولیتری دارای ۱X PCR Buffer، ۳ mM MgCl₂، ۴۰۰ μM مخلوط dNTP، ۰/۸ μM پرایمر، ۱/۲۵ یونیت Taq DNA Polymerase (سیناکلون، تهران، ایران) و ۱ μl DNA (50 ng/ml) باکتری در ترموسایکلر (Eppendorf, Hamburg, Germany) تکثیر گردید. پروفایل حرارتی در ترموسایکلر به صورت یک مرحله واسرشت اولیه در دمای ۹۴°C به مدت ۲ دقیقه و ۳۵ سیکل ۹۴°C، ۴۱°C و ۷۲°C هر مرحله به مدت ۱ دقیقه و یک مرحله نهایی بسط در دمای ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه بود. سپس محصولات PCR در ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شدند. واکنش RAPD سه مرتبه برای بررسی تکرارپذیری انجام گرفت. دندروگرام (نمودار درختی) با استفاده از تجزیه و تحلیل UPGMA و ماتریکس فاصله ژنتیکی و بر اساس اطلاعات به دست آمده از آزمون انگشت نگاری RAPD-PCR و الگوهای باندهای ایجاد شده توسط جدایه‌ها، ترسیم شد.

Table 3. Selection of 7 housekeeping genes for MLST analysis (Thieme et al., 2016) (15)

No.	Gene	Produced protein	Fragment size (bp) in MLST ^a	MLEE analysis of ORT ^b	<i>P. multocida</i> MLST ^c
1	<i>adk</i>	Adenylate kinase	393	X	X
2	<i>mdh</i>	Malate dehydrogenase (NAD)	519	X	X
3	<i>pgi</i>	Glucose-6-phosphate isomerase	492	X	X
4	<i>aroE</i>	shikimate dehydrogenase	489	X	-
5	<i>fumC</i>	Fumarase, class II	489	X	-
6	<i>gdhA</i>	Glutamate dehydrogenase/ Leucine dehydrogenase	480	-	X
7	<i>pmi</i>	Phosphomannose isomerase	489	-	X

^aThieme et al. (2016a); ^bAmonsin et al. (1997); ^cSubaaharan et al. (2010).

Table 4. Specific primers designed for MLST analysis

Gene	Sequences of designed primers	Product size (bp)
<i>adk</i>	F: 5'-GGCAGTGGAAAAGGAACTCA-3' R: 5'-TCTAAACTTCCTTCGCCGTTT-3'	503
<i>aroE</i>	F: 5'-GGACTCATCGGCAGAAACAT-3' R: 5'-TGATGTTGGCATCTTGTGCT-3'	643
<i>fumC</i>	F: 5'-CACGCCACAAGGTTATGATG-3' R: 5'-TAAACGCACGGCTTCTTCTT-3'	616
<i>gdhA</i>	F: 5'-TCTGGTAGAGCACCAAACCA-3' R: 5'-GCTTGTTTTGCAACCACTCA-3'	601
<i>mdh</i>	F: 5'-CGCGAAGAATTAATCGGAAC-3' R: 5'-CTCTTACTTGCGCAACAGCA-3'	640
<i>pgi</i>	F: 5'-AAAGCGACATTGCCAAACAT-3' R: 5'-TTTCGAGTTCGCTCTCACT-3'	639
<i>pmi</i>	F: 5'-TGATGTGCAAGGCAATGTTT-3' R: 5'-CTGTGTCGAGCGAAATGCTA-3'	647

دقیقه/۷۲°C) انجام گرفت. سپس افزوده سازی ژن های هفت گانه با یک بسط نهایی (۵ دقیقه/۷۲°C) خاتمه یافت. پس از بررسی تکثیر ژن ها بر روی ژل آگارز ۱ درصد و خالص سازی DNA از روی ژل، به منظور توالی یابی به شرکت ماکروژن (سنول، کره جنوبی) ارسال شد. کیفیت توالی خام کروماتوگرام ها توسط نرم افزار Chromas lite ورژن ۲/۱ مورد ارزیابی قرار گرفتند تا توالی دقیق نوکلئوتیدها در هر جایگاه ژنی و سویه مشخص گردد.

واکنش PCR برای هفت ژن خانه دار با یک دستورالعمل یکسان در ۵۰ میکرولیتر حجم واکنشی شامل 1x PCR Buffer، ۲ mM MgCl₂، ۴۰۰ μM dNTP مخلوط، ۰/۸ از هر پرایمر، ۱/۲۵ یونیت *Taq DNA Polymerase* (سیناکلون، تهران، ایران) و ۲ μl DNA (50 ng/ml) انجام شد. الگوی حرارتی به صورت یک مرحله واسرشت اولیه (۲ دقیقه/۹۴°C)، ۳۵ سیکل متوالی واسرشت (۱۵ ثانیه/۹۴°C)، اتصال پرایمر (۳۰ ثانیه/۵۲°C) و گسترش (۱

نشان دادند. در حضور دیسک اکسیداز با تغییر رنگ دیسک به رنگ آبی تیره اکسیداز مثبت بودن آن تأیید شد. به دلیل عدم ایجاد حباب‌های ریز در حضور آب اکسیژنه، کاتالاز منفی بودن آن تأیید شد. تمام باکتری‌های ORT کشت داده شده از نظر تست اوره‌آز مثبت بودند و از نظر رشد بر روی محیط آگار مک‌کانکی منفی بودند. در آزمایش هیدروکسید پتاسیم، با توجه به انهدام دیواره سلولی باکتری و مشاهده شدن حالت چسبندگی قطره مخلوط هیدروکسید پتاسیم و باکتری، گرم منفی بودن باکتری نیز تأیید شد.

نتایج آزمون PCR برای تأیید تشخیص ORT

تعداد ۳۰ جدایه ORT پس از تأیید فنوتیپی و شناسایی بیوشیمیایی، برای شناسایی قطعی با کمک پرایمرهای اختصاصی ORT در آزمون PCR نیز مورد آزمایش قرار گرفتند. در آزمایش PCR تمامی آن‌ها قطعه ۷۸۴ جفت بازی از ژن *16S rRNA* را تولید کردند و هویت سویه‌های مورد مطالعه را به عنوان ORT مورد تأیید قرار دادند (Figure 1).

قطعات ژنتیکی هدف با اندازه ۳۹۳، ۴۹۰، ۴۸۹، ۴۸۰، ۵۱۹، ۴۹۲ و ۴۸۹ زوج باز به ترتیب از ژن‌های *aroE* *adk* *pmi* *mdh* *gdhA* *fumC* از سایت https://pubmlst.org/bigsdbs/db=pubmlst_orhinotrach_eale_seqdef دانلود و سپس توسط برنامه MEGAX قطعات یکسان از لحاظ طولی برای لکوس‌های تعیین توالی شده در پنج سویه مورد مطالعه مکان‌یابی و پردازش شدند. با ارایه قطعات ژنی هر سویه به همین وب‌سایت آل هر ژن شناسایی و تعیین و تیپ سکansı (ST) هر سویه نیز شناسایی گردید.

نتایج

کشت و شناسایی باکتری

تمامی ۳۰ جدایه بر اساس روش‌های استاندارد باکتریولوژی و بیوشیمیایی احیا و تأیید شدند. پس از رنگ‌آمیزی گرم، باکتری‌های باسیل کوتاه، بلند، کوکسی، دیپلوکوک، دمبلی، چماقی و رشته‌ای مشاهده شد که به شدت پلئومورف بودن (داشتن اشکال متنوع) باکتری را

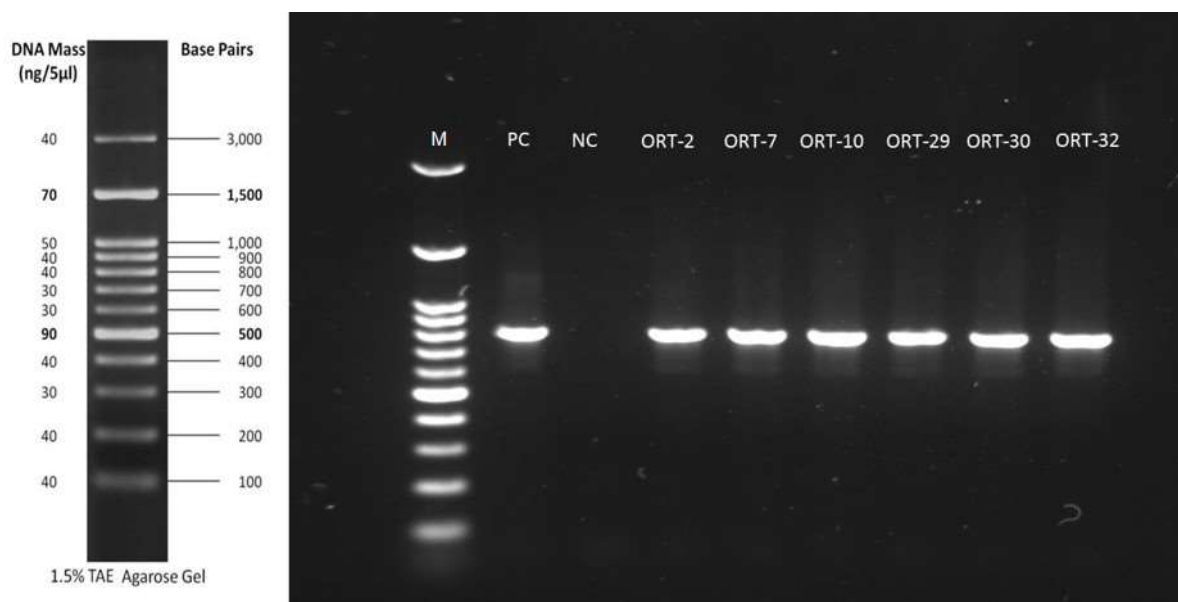


Figure 1. Electrophoresis of PCR-amplified *16S rRNA* gene of *Ornithobacterium rhinotracheale* field isolates on 1% agarose gel. Amplified 784 bp bands of six field isolates 2, 7, 10, 29, 30 and 32 are shown. Lanes M, PC, and NC indicate 100 bp plus ladder, positive control, and negative control (dH₂O instead of DNA), respectively.

آن‌ها یعنی ۸ از ۱۲ (۶۶/۶۶ درصد) در سال‌های ۱۳۹۵-۱۳۹۰ جدا شده بودند، ولی ۴ جدایه دیگر (۳۳/۳۳ درصد) متعلق به سال‌های ۱۳۸۷-۱۳۷۹ بود. از کل جدایه‌های بین سال‌های ۱۳۹۵-۱۳۹۰، یعنی ۱۸ جدایه، ۱۰ جدایه به ژنوتیپ غالب (۵۵/۵۵ درصد) تعلق داشتند. در صورتی که از کل جدایه‌های قدیمی‌تر که بین سال‌های ۱۳۸۷-۱۳۷۹ جدا شده‌اند، یعنی ۱۲ جدایه، ۸ جدایه به ژنوتیپ غالب (۶۶/۶۶ درصد) تعلق داشتند. دندروگرام (نمودار درختی) با استفاده از تجزیه و تحلیل UPGMA و ماتریکس فاصله ژنتیکی و بر اساس اطلاعات به دست آمده از آزمون انگشت نگاری RAPD-PCR با پرایمر OPG11 و الگوهای باندهای ایجاد شده در ۳۰ جدایه به کار رفته در این آزمون در Figure 3 نشان داده شده است.

نتایج بررسی تمایز ژنتیکی جدایه‌ها براساس روش RAPD

بر اساس باندهایی که هر کدام از ۳۰ جدایه ORT در آزمایش RAPD-PCR با کمک پرایمر OPG11 نشان دادند ۹ الگو یا ژنوتیپ متفاوت ایجاد گردید (Table 5 و Figure 2). در مجموع ۲۰ نوع باند در تمام نمونه‌های مورد مطالعه مشاهده شد که کوچک‌ترین و بزرگ‌ترین به ترتیب ۳۰۰ و ۳۰۰۰ جفت باز بود. تعداد ۱۸ مورد از جدایه‌ها (۶۰ درصد) به یک الگو تعلق داشتند و ۱۲ جدایه دیگر (۴۰ درصد) در هشت ژنوتیپ یا الگوی متفاوت توزیع شدند. از مجموع ۱۸ جدایه ژنوتیپ غالب، تعداد ۸ جدایه (۴۴/۴ درصد) در سال‌های ۱۳۸۷-۱۳۷۹ و ۱۰ جدایه (۵۵/۵۵ درصد) در سال‌های ۱۳۹۵-۱۳۹۰ جداسازی شده بودند. از مجموع ۱۲ جدایه متعلق به هشت ژنوتیپ مختلف، اکثریت

Table 5. Patterns observed in RAPD analysis

No.	Pattern	No. (%)	Isolates numbers	Fragments' sizes (bp)
1	A	18 (60)	2, 7, 10, 30, 32, 36, 41, 48, 53, 55, 60, 63, 69, 70, 72, 73, 74, 78	500, 600, 1100, 1300, 1400, 1500, 1800, 1900, 2800
2	B	2 (6.66)	42, 50	600, 700, 1100, 1400, 1500, 1800, 1900, 2800
3	C	2 (6.66)	71, 40	600, 1100, 1400, 1500, 1800, 1900, 2800
4	D	1 (3.33)	75	600, 700, 900, 1100, 1400, 1500, 1700, 1900, 2800
5	E	1 (3.33)	29	300, 600, 800, 1100, 1300, 1400, 1500, 1800, 1900, 2800
6	F	1 (3.33)	82	600, 900, 1400, 1500, 1900, 2100
7	G	1 (3.33)	79	1100, 1500, 1700, 1800, 1900, 2200, 2900, 3000
8	H	1 (3.33)	68	1300, 1700, 1900, 2700, 3000
9	I	3 (10)	80, 81, 86	1000, 1500, 1900, 3000

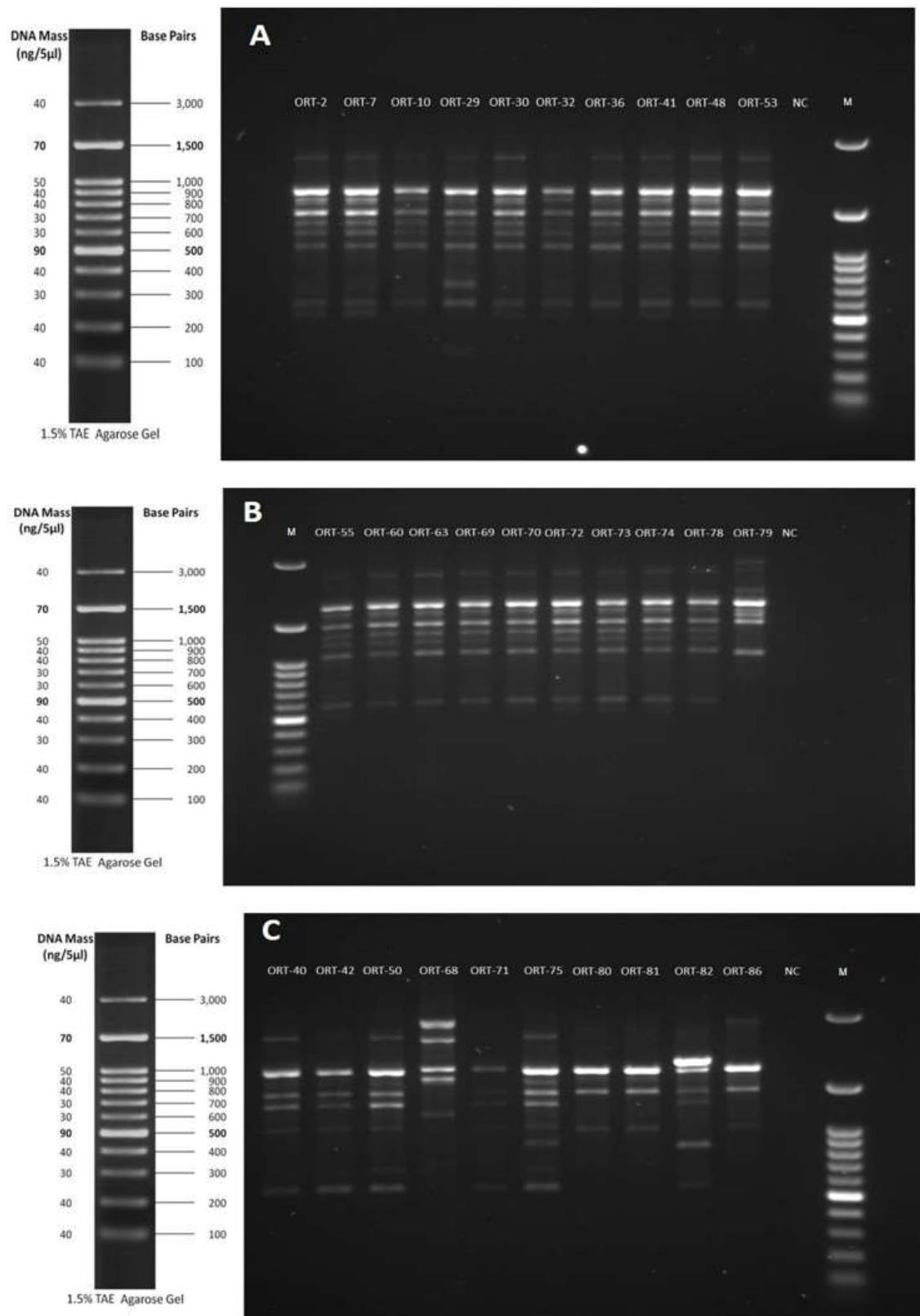


Figure 2. DNA fingerprinting patterns of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolates by RAPD-PCR using OPG11 primer in A, B and C figures. Lanes M and NC indicate 100 bp plus ladder and negative control (dH₂O instead of DNA). Other lanes show the RAPD patterns.

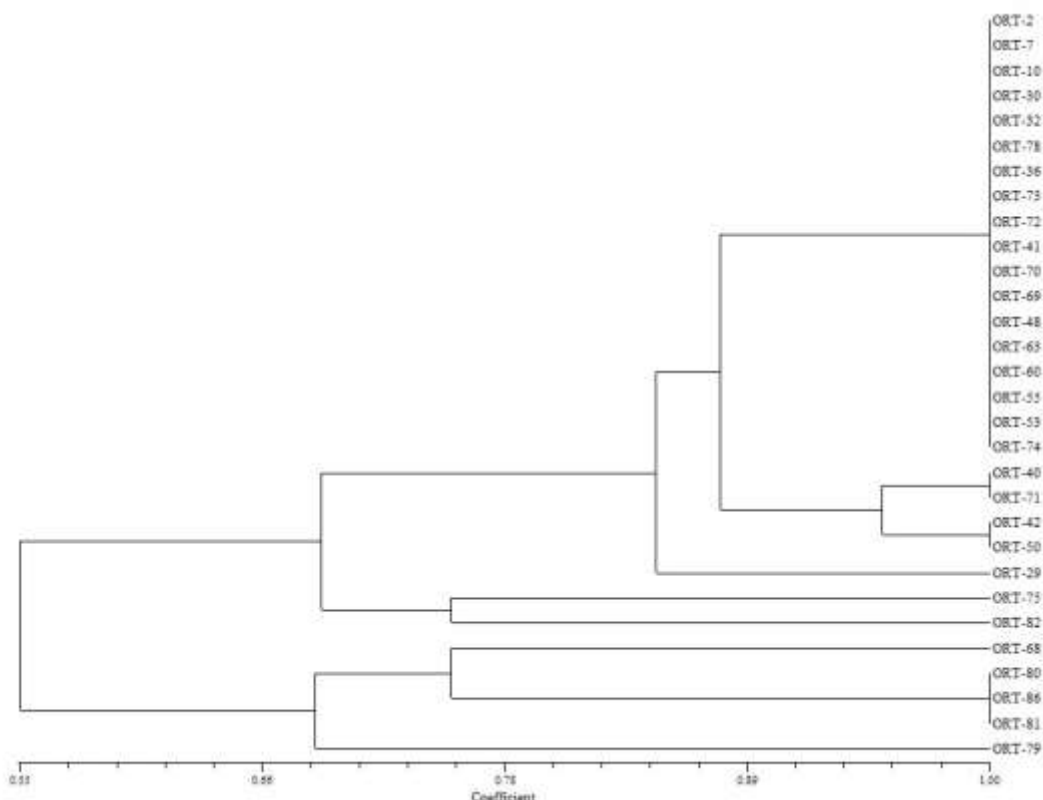


Figure 3. Dendrogram grouping the 30 *Ornithobacterium rhinotracheale* isolates based on RAPD-PCR with the OPG11 primer using the unweighted pair group method with the arithmetic average method (UPGMA).

نتایج MLST

که در مقایسه با اطلاعات سایر سویه‌های ORT از دنیا به دست آمده است، نشان داده شده است. تعداد چهار جدایه از پنج جدایه دارای یک پروفایل یکسان تیپ سکansı (ST9) بودند. تیپ سکansı سویه ORT-68 به دلیل جدید بودن چهار آلل از لکوس‌های *adk*، *aroE*، *fumC* و *mdh* در دنیا جدید محسوب می‌شود.

در آزمایش MLST تمام هفت جایگاه ژنی در پنج سویه مورد مطالعه با استفاده از یک پروتکل یکسان PCR افزوده-سازی شدند. با مراجعه به وبسایت بانک اطلاعاتی MLST ORT آلل مرتبط با هر ژن در سویه‌های تحت بررسی مشخص گردید. در Table 6 پروفایل آلل‌های هفت لکوس ژن‌های خانه‌دار متعلق به پنج جدایه ORT از ایران

Table 6. Allel profile of 7 housekeeping gene loci belonging to 5 ORT isolates

Isolate #	<i>adk</i>	<i>aroE</i>	<i>fumC</i>	<i>gdhA</i>	<i>mdh</i>	<i>pgi</i>	<i>pml</i>	ST
7	1	5	1	1	1	1	1	9
32	1	5	1	1	1	1	1	9
68	New	New	New	8	New	ND	25	New
71	1	5	1	1	1	1	1	9
82	1	5	1	1	1	1	1	9

ND: Sequencing not done.

بحث

Ghodsian و همکاران (۲۰۱۳) با استفاده از روش‌های ERIC-PCR و تعیین توالی ژن *16S rRNA*، شباهت زیادی بین ۲۵ جدایه از مناطق مختلف ایران و در سال‌های مختلف مشاهده نمودند (Ghodsian et al, 2013). Pena-Vargas و همکاران (۲۰۱۶)، در مکزیک با استفاده از روش ERIC-PCR پروفایل ژنتیکی مشابه در بین ۲۳ جدایه از فیلد را مشاهده کردند، اما در برخی مطالعات دیگر تفاوت و تنوع ژنتیکی در بین جدایه‌ها مشاهده نشد (Amonsin et al, 1997; Szabo et al, 2017). در بین جدایه‌های ORT در مقایسه توالی ژن *16S rRNA* این باکتری در مطالعات انجام شده در ایران و خارج نیز مشاهده شده است (Chou et al, 2009; Hassanzadeh et al, 2010; Mirzaie et al, 2011; Ghodsian et al, 2013; Szabo et al, 2017; Veiga et al, 2019). چنین یافته‌هایی نشان‌گر نزدیکی تمامی جدایه‌های دنیا از لحاظ بررسی این ژن است. ولی از آن جا که این ژن در ناحیه نسبتاً محافظت شده ژنوم باکتری واقع شده است، از قابلیت تمایز ژنتیکی محدودی برخوردار است. با وجود این، Tsai و همکاران در سال ۲۰۰۶ از تایوان با همین روش شباهت بسیار بالای نوکلئوتیدی بین ۲۳ جدایه مورد مطالعه نشان دادند. مطالعات انجام شده در ایران نیز نشان داد که این جدایه‌ها از یک گروه کلون محدود و نزدیک به هم منشاء گرفته‌اند، لذا می‌توان نتیجه گرفت که استراتژی واکسیناسیون به منظور کنترل بیماری در صنعت طیور کشور به احتمال زیاد موفقیت‌آمیز خواهد بود.

Leroy-Setrin و همکاران، در سال ۱۹۹۸ در فرانسه با روش RAPD به مقایسه ۲۳ جدایه ORT از بوقلمون و ماکیان با استفاده از ۴۰ پرایمر مختلف پرداختند و بهترین قدرت تمایز را با استفاده از پرایمر OPG11 و OPG19 مشاهده کردند. آن‌ها بین میزبان و الگوی انگشت‌نگاری ارتباطی پیدا نکردند. در ترکیه، Özbey و همکاران (۲۰۰۵) با استفاده از پرایمر OPG11 تنوع ژنتیکی زیادی بین شش جدایه مشاهده نمودند، به طوری که هر کدام الگوی

در این مطالعه با استفاده از دو روش RAPD با کمک پرایمر OPG11 و MLST، تمایز مولکولی بین ۳۰ جدایه ORT انجام گرفت. مشاهده تمایز مولکولی بین جدایه‌ها در مطالعات همه‌گیری شناسی و تهیه واکسن اتوزن ضروری می‌باشد (Thieme et al, 2016a). مشابهت مولکولی جدایه‌های ORT در مطالعات قبلی با روش‌های توالی‌یابی ژن *16S rRNA*، ERIC-PCR و SDS-PAGE با یافته‌های برخی پژوهشگران منطبق بود و مشابهت بسیار زیادی بین سویه‌های این باکتری مشاهده شده است. این مشابهت بین جدایه‌های ORT مورد مطالعه در ایران به طبیعت باکتری برمی‌گردد که به نظر می‌رسد تمامی جدایه‌های ORT جدا شده از اقصی نقاط دنیا، از تعداد کمی کلون‌های نزدیک به هم مشتق شده‌اند. علاوه بر این، جدایه‌های تحت مطالعه ایران همگی از یک میزبان یعنی ماکیان صنعت طیور کشور جدا شده‌اند و چنین شباهتی احتمالاً قابل پیش‌بینی بوده است. عدم تمایز بین جدایه‌ها در سه روش قبلی باعث شد که در مطالعه حاضر از دو روش دیگر شامل RAPD و MLST استفاده شود و خوشبختانه تنوع ژنتیکی بین جدایه‌ها در این دو روش به خوبی مشاهده گردید.

Banani و همکاران در سال ۲۰۰۱، در بررسی ۵۹ جدایه از جوجه‌های گوشتی و تخم‌گذار تجاری از ایران با کمک روش SDS-PAGE شباهت زیادی بین پروفایل پروتئینی جدایه‌ها مشاهده کردند (Banani et al, 2001). در ترکیه Özbey و همکاران (۲۰۰۴) با استفاده از روش SDS-PAGE، الگوی پروتئینی مشابه یافته Banani و همکاران (Banani et al, 2001)، مشاهده نمودند اما Erganis و همکاران (۲۰۱۳) از ترکیه در آزمایش SDS-PAGE بین جدایه‌های ماکیان و بوقلمون، ۱۹ الگو یا خوشه مختلف را گزارش نمودند و بین جدایه‌های ماکیان و بوقلمون تفاوت مشاهده کردند.

آن‌ها ۷ ژن خانه‌دار را بر اساس مطالعات قبلی یعنی آزمایش MLEE بر روی جدایه‌های ORT (Amonsin et al, 1997) و آزمایش MLST بر روی باکتری نزدیک به ORT یعنی پاستورلا مولتوسیدا (Subaaharan et al, 2010) را برای این کار انتخاب کردند. نتیجه کار آن‌ها ۱۴ تیپ توالی متفاوت در بین ۸۷ جدایه تحت مطالعه بود. شایع‌ترین تیپ توالی، ST1 بود که ۴۰ جدایه از بوقلمون و ماکیان از ۴ قاره و سه کشور مختلف اروپایی از این تیپ بودند. تیپ سکansı ST1 به همراه ST9 (که تنها در یک ال با هم متفاوت هستند)، در مجموع سه چهارم (۷۷ درصد) جدایه‌های تحت مطالعه را شامل می‌شدند که متعلق به سروتیپ‌های A، E و I بودند (Thieme et al, 2016a). این سروتیپ‌ها اغلب در آزمایش AGP، واکنش متقاطع را نشان داده‌اند (Numee et al, 2012). در تحقیق Thieme و همکاران، تیپ‌های سکansı نظیر ST1، ST3، ST6، ST9 و ST11 که دو جدایه ORT یا بیش‌تر از آن را دارا بودند، به بیش از یک سروتیپ تعلق داشتند که نشان‌گر عدم ارتباط سروتیپ و تیپ سکansı است (Thieme et al, 2016a). بین تیپ سکansı و منشاء جغرافیایی جدایه‌ها و سال جداسازی ارتباطی مشاهده نشد. در مطالعه Thieme و همکاران، تعداد ۸۴ (۹۶/۶ درصد) جدایه، از بوقلمون و ماکیان جداسازی شده بودند و بین این دو میزبان و تیپ سکansı ارتباط یا اختصاصیت میزبانی دیده نشد. به طور کلی تنوع ژنتیکی پایین در بین سویه‌های جداسازی شده از بوقلمون و ماکیان بدون تأثیر منشاء جغرافیایی با هر کدام از این دو میزبان، احتمالاً مؤید این است که ORT اخیراً به طور اهلی منتقل شده و در سراسر دنیا گسترش یافته است (Thieme et al, 2016a). Thieme و همکاران (۲۰۱۶b) در تحقیق بعدی خود، این بار ۱۱ جدایه از کبوتر و ۱۰ جدایه از پرندگان شکاری را با روش MLST بررسی کردند. آن‌ها سپس نتایج حاصل را با نتایج قبلی جدایه‌های بوقلمون و ماکیان و همچنین سویه‌هایی از قرقاول، مرغ شاخدار و کلاغ سیاه مقایسه نمودند. جدایه‌های کبوتر با یکدیگر شباهت زیاد داشتند و ارتباط نزدیکی را نشان دادند و از

متفاوتی را نشان دادند. Chou و همکاران (۲۰۰۹) تعداد ۹۳ جدایه ORT از ماکیان، بلدرچین، بوقلمون، کبوتر و باز شاخدار کشور تایوان را در فاصله زمانی ۲۰۰۴-۲۰۰۶ با کمک روش RAPD و پرایمر OPG11 بررسی و مقایسه کردند که بر اساس نتایج به دست آمده، جدایه‌ها در دو گروه عمده از هم تفکیک شدند. گروه اول شامل ۴ خوشه و شامل جدایه‌های ماکیان و بلدرچین بود و گروه دوم شامل ۳ خوشه دیگر و حاوی جدایه‌های با منشاء کبوتر و یک جدایه باز شاخدار بود. جدایه‌های بوقلمون در هر دو گروه عمده، پراکنده بودند (Chou et al, 2009). آن‌ها نتیجه‌گیری کردند که احتمالاً بوقلمون‌ها نقش واسط را در انتقال ORT از پرندگان وحشی به پرندگان اهلی و پرورشی نظیر ماکیان ایفا می‌کنند (Chou et al, 2009). Erganis و همکاران، در سال ۲۰۱۳ در ترکیه با استفاده از پرایمر OPG11 نسبت به تعیین هویت مولکولی ۳۰ جدایه از بوقلمون و ماکیان مزارع آن کشور اقدام نمودند. تنوع ژنتیکی زیادی بین جدایه‌ها دیده شد و برخلاف یافته‌های Chou و همکاران (۲۰۰۹)، بین الگوی باندها در جدایه‌های بوقلمون و ماکیان تفاوت آشکاری مشاهده گردید. Szabo و همکاران، (۲۰۱۷)، ۳۷ جدایه ORT از مناطق مختلف مجارستان (بین سال‌های ۱۹۹۷ تا ۲۰۱۵) را با دو روش ERIC-PCR و RAPD بررسی و مقایسه کردند. تعداد ۳۱ جدایه از ۳۷ جدایه متعلق به سروتیپ A بودند. بیش‌تر جدایه‌ها از بوقلمون و پرندگان شکاری متعلق به سروتیپ A بودند. تعداد ۴ جدایه سروتیپ D و یک جدایه سروتیپ B و یک جدایه با ۵ آنتی‌سرم A-E تعیین تیپ نشد. در روش ERIC-PCR ۱۳ الگو شناسایی شد، اما در روش RAPD، پرایمر OPG11 را برای تمایز جدایه‌ها مناسب ندیدند و روش ERIC-PCR را بهترین روش برای تمایز و تفکیک جدایه معرفی کردند (Szabo et al, 2017).

کاربرد روش MLST در خصوص باکتری ORT اولین بار توسط Thieme و همکاران گزارش شد. آن‌ها ۸۷ جدایه ORT از کشورها، میزبان‌ها، سروتیپ‌ها و سال‌های مختلف را با روش MLST بررسی نمودند (Thieme et al, 2016a).

جدید (ST32، ST33، ST34 و ST35) در بین آن‌ها وجود داشت. تیپ سکانشی یک (ST1)، در بین جدایه‌های هر دو ایالت تیپ غالب بود که با مطالعات قبلی (Thieme et al, 2016a) همخوانی داشت (Nisar et al, 2020). در مطالعه حاضر در بین سویه‌های مورد مطالعه، جدایه -ORT-68 متمایز بود. این جدایه در آزمایش با پرایمر OPG11 نیز تفاوت آشکاری در باندهای ایجاد شده با بقیه جدایه‌ها نشان داد این جدایه همچنین در آزمایش MLST نه تنها جدایه‌ای با تیپ سکانشی متفاوت بود، بلکه از نظر تیپ نیز تیپ جدیدی با توجه به گزارشات مختلف از نقاط مختلف دنیا محسوب می‌شود. بدیهی است تحقیقات بیشتر در خصوص جدایه -ORT-68 مورد نیاز است تا آگاهی ما را در مورد ویژگی‌های بیولوژیکی آن به ویژه اهمیت آن ویژگی‌ها در بیماری‌زایی باکتری افزایش دهند.

در مجموع می‌توان گفت روش‌های ژنتیکی و فنوتیپی رایج برای تمایز ژنوتیپی باکتری ممکن است به اندازه کافی قدرت لازم را نداشته باشند لذا باید از تکنیک‌های با قدرت تمایز بیشتر مانند PFGE و یا MLST استفاده نمود. بر اساس یافته‌های این مطالعه، در آزمون RAPD با استفاده از پرایمر OPG11، تعداد ۹ ژنوتیپ متفاوت مشاهده شد. انجام تکنیک MLST بر روی پنج سویه -ORT- جدا شده از طیور صنعتی نیز منجر به شناسایی یک تیپ سکانشی جدید گردید که پیش از این از سایر نقاط جهان گزارش نشده است. بررسی تعداد بیشتر از جدایه‌های -ORT- در تشخیص تیپ‌های مختلف سکانشی و تیپ سکانشی غالب در کشور را کمک کننده است.

سوی دیگر با سایر جدایه‌های غیرکبوتری متمایز بوده و در یک شاخه جداگانه‌ای قرار گرفتند. جدایه‌های پرندگان شکاری تنوع ژنتیکی بیشتری را در مقایسه با هم نشان دادند و در دو شاخه از پرندگان پرورشی (بوقلمون و ماکیان) قرار گرفتند. جدایه‌های کبوتری ۷ تا ۱۰ آلل در هر لوکوس و ده تیپ توالی نوکلئوتیدی را تشکیل دادند، در صورتی که جدایه‌های پرندگان وحشی ۵ تا ۷ آلل در هر لوکوس و تعداد ۷ توالی نوکلئوتیدی را تشکیل دادند (Thieme et al, 2016b). تعداد چهار جدایه آزمایش شده در مطالعه حاضر (شامل سویه‌های -ORT-7، -ORT-32، -ORT-71 و -ORT-82) که همگی متعلق به تیپ سکانشی ۹ (ST9) بودند، همانند سایر جدایه‌های واقع در تیپ سکانشی (ST9) در تحقیق Thieme و همکاران، در خوشه B و تحت خوشه Ba قرار گرفتند (Thieme et al, 2016b). خوشه B که خود حاوی دو تحت خوشه Ba و Bb بود و اکثریت جدایه‌ها (اغلب از ماکیان) و همچنین هفت -ORT- جدا شده از پرندگان شکاری در این خوشه قرار گرفتند (شش جدایه از شاهین‌ها تحت خوشه مجزای Bb را شکل دادند و یک جدایه از کرکس بوقلمونی در تحت خوشه Ba واقع شد که اغلب جدایه‌های بوقلمون و ماکیان و یک جدایه کلاغ سیاه در آن قرار گرفتند). خوشه C، که به صورت مشخص از دو خوشه دیگر، متفاوت می‌باشد، جدایه‌های کبوتر را شامل شد (Thieme et al, 2016b). در سال ۲۰۲۰، Nisar و همکاران تعداد ۶۰ جدایه -ORT- را از دو ایالت کالیفرنیا و مینه‌سوتا با MLST مقایسه کردند. به طور کلی، هشت تیپ سکانشی مختلف شناسایی شد که چهار تیپ سکانشی

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت آموزش و تحقیقات سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی و وزارت جهاد کشاورزی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی و معاونت پژوهشی دانشگاه تهران تشکر و قدردانی می‌شود.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض منافع گزارش نشده است.

منابع مالی

هزینه‌های این مطالعه از محل اعتبارات طرح‌های شماره ۹۴۰۰۱-۹۴۵۲-۱۸-۱۸-۱۲ موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی و شماره ۳۳-۶-۷۵۰۸۰۰۷ شورای پژوهشی دانشگاه تهران تأمین و پرداخت شده است.

منابع

- Alispahic, M., Endler, L., Hess, M., & Hess, C. (2021). *Ornithobacterium rhinotracheale*: MALDI-TOF MS and whole genome sequencing confirm that serotypes K, L and M deviate from well-known reference strains and numerous field isolates. *Microorganisms*, 9(5), 1006.
- 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(1), 40-42.
- Amonsin, A., Wellehan, J. F., Li, L. L., Vandamme, P., Lindeman, C., Edman, M., Robinson, R. A., & Kaper, V. (1997). Molecular epidemiology of *Ornithobacterium rhinotracheale*. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(11), 2894-2898.
- Banani, M., Khaki, P., Goodarzi, H., Vandyousefi, J., & Pournakhsh, S. A. (2000). Isolation and identification of *Ornithobacterium rhinotracheale* from a broiler and a pullet flock. *Pajouhesh & Sazandegi*, 13(1), 106-109. (In Persian)
- Banani, M., Pournakhsh, S. A., Erami, M., Gholamin, F., & Fatehmanesh, M. (2009). Diagnosis of *Ornithobacterium rhinotracheale* using polymerase chain reaction (PCR). *Journal of Veterinary Research*, 64(1), 41-45. (In Persian)
- Banani, M., Pournakhsh, S. A., & Khaki, P. (2001). Characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* from commercial chickens. *Archives of Razi Institute*, 52(1), 27-36.
- Barbosa, E. V., Cardoso, C. V., Silva, R. C. F., Cerqueira, A. M. F., Liberal, M. H. T., & Castro, H. C. (2020). *Ornithobacterium rhinotracheale*: An update review about an emerging poultry pathogen. *Veterinary Science*, 7(1), 3.
- Chou, C. H., Lin, S. Y., Chen, C. L., & Tsai, H. J. (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(1), 108-114.
- Erganis, O., Hadimli, H. H., Kav, K., & Sayin, Z. (2013). Phenotypic and molecular characterization of strains of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolated from poultry in Turkey. *African Journal of Microbiology Research*, 7(2), 82-88.
- Ghanbarpour, R., & Salehi, M. (2009). Seroprevalence and identification of *Ornithobacterium rhinotracheale* in broiler flocks in south-eastern Iran. *Tropical Animal Health and Production*, 41(8), 1679-1683.
- Ghodsian, N., Karimi, V., Banani, M., Bozorgmehri-Fard, M. H., Zahraei Salehi, T., & Pournakhsh, S. A. (2013). The phylogenetic analysis of some *Ornithobacterium rhinotracheale* isolates from Alborz province commercial chicken flocks of Iran. *Iranian Veterinary Journal*, 8(4), 68-75.
- Ha, H. J., Christensen, N., Humphrey, S., Haydon, T., Bernardi, G., & Rawdon, T. (2016). The First detection of *Ornithobacterium rhinotracheale* in New Zealand. *Avian Diseases*, 60(4), 856-859.
- Hafez, H. M., & Chin, R. P. (2020). *Ornithobacterium rhinotracheale* infection. In: Diseases of Poultry. Swayne, D.E. et al. (eds). (14th ed.) Wiley-Blackwell Publication. NJ, USA. p. 853-860.
- Hassanzadeh, M., Karimi, V., Fallah, N., & Ashrafi, I. (2010). Molecular characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolated from broiler chicken flocks of Iran. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 34(4), 373-378
- Leroy-Setrin, S., Flaujac, G., Thenaisy, K., & Chalus-Dancia, E. (1998). Genetic diversity of *Ornithobacterium rhinotracheale* strains isolated from poultry in France. *Applied Microbiology*, 26(3), 189-193.
- Mayahi, M., Gharibi, D., Ghadimipour, R., & Talazadeh, F. (2016). Isolation, identification and antimicrobial sensitivity of *Ornithobacterium rhinotracheale* in broilers chicken flocks of Khuzestan, Iran. *Veterinary Research Forum*, 7(4), 341-346.
- Mirzaie, S., Hassanzadeh, M., Bozorgmehri Fard, M. H., & Banani, M. (2011). Isolation and characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* in turkey, quail flocks and domestic pigeons by bacteriological and molecular methods. *Archives of Razi Institute*, 66(2), 121-127.

- Nisar, M., Thieme, S., Hafez, H. M., Sentfies-Cúe, G., Chin, R. P., Muhammad, S. P., Aboubakr, H., Goyal, S. M., & Nagaraja, K. V. (2020). Genetic diversity of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolated from chickens and turkeys in the United States. *Avian Diseases*, 64(3), 324-329.
- Numee, S., Hauck, R., & Hafez, H. M. (2012). Detection and typing of *Ornithobacterium rhinotracheale* from German poultry flocks. *Avian Diseases*, 56(4), 654-658.
- Özbey, G., Ertaş. H. B., & Muz. A. (2005). A random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Ornithobacterium rhinotracheale* strains isolated from chickens in Turkey. *Veterinary Medicine Czech*, 50(12), 526-530.
- Özbey, G., Öngör, H., Balik, D. T., Çelik, V., Kiliç, A., & Muz, A. (2004). Investigations on *Ornithobacterium rhinotracheale* in broiler flocks in Elazığ Province located in the East of Turkey. *Veterinary Medicine Czech*, 49(8), 305-311.
- Peña-Vargas, E. R., Vega-Sánchez, V., Morales-Erasto, V., Trujillo-Ruíz, H. H., Talavera-Rojas, M., & Soriano-Vargas, E. (2016). Serotyping, genotyping, and antimicrobial susceptibility of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolates from Mexico. *Avian Diseases*, 60(3), 669-672.
- Smith, E. A., Miller, E. A., Weber, B. P., Munoz Aguayo, J., Flores Figueroa, C., Huisinga, J., Nezworski, J., Kromm, M., Wileman, B., & Johnson, T. J. (2020). Genomic landscape of *Ornithobacterium rhinotracheale* in commercial turkey production in the United States. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(11): e02874-19.
- Subaaharan, S., Blackall, L. L., & Blackall. P. J. (2010). Development of a multi-locus sequence typing scheme for avian isolates of *Pasteurella multocida*. *Veterinary Microbiology*, 141(3-4), 354-361.
- Szabó, R., Wehmann, E., Makrai, L., Nemes, C., Gyuris, E., Thuma, A., & Magyar, T. (2017). Characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* field isolates from Hungary. *Avian Pathology*, 46(5), 506-514.
- Thieme, S., Mühldorfer, K., Gad, W., Lüscho, D. and Hafez, H. M. (2016a). Molecular characterization of the recently emerged poultry pathogen *Ornithobacterium rhinotracheale* by multilocus sequence typing. *PLoS ONE*, 11(9), e0163401.
- Thieme, S., Hafez, H. M., Gutzer, S., Warkentin, N., Lüscho, D., & Mühldorfer, K. (2016b). Multilocus sequence typing of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolated from pigeons and birds of prey revealed new insights into its population structure. *Veterinary and Animal Science*, 1, 15-20.
- Tsai, H., & Huang, C. (2006). Phenotypic and molecular characterization of isolates of *Ornithobacterium rhinotracheale* from chickens and pigeons in Taiwan. *Avian Diseases*, 50(4), 502-507.
- Umali, D. V., Shiota, K., Sasai, K., & Katoh, H. (2018). Characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* from commercial layer chickens in eastern Japan. *Poultry Science*, 97(1), 24-29.
- Veiga, I. M. B., Lüscho, D., Gutzer, S., Hafez, H. M., & Mühldorfer, K. (2019). Phylogenetic relationship of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolated from poultry and diverse avian hosts based on *16S rRNA* and *rpoB* gene analyses. *BMC Microbiology*, 19(1), 31.

Received: 20.01.2022

Accepted: 04.04.2022

Genotypic comparison of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolates from commercial chickens of Iran

Seyed Mostafa Peighambari^{1*}, Mansour Banani², Mohammad Yoosefi³, Keivan Tadayon² and Mohsen Bashashati⁴

¹ Professor, Department of Avian Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

² Associate Professor, Avian Diseases Research and Diagnosis Department, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

³ PhD Student of Avian Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

⁴ Assistant Professor, Avian Diseases Research and Diagnosis Department, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

Received: 20.01.2022

Accepted: 04.04.2022

Abstract

Ornithobacterium rhinotracheale (ORT) is a newly emerging respiratory bacterial pathogen that causes significant economic losses to the poultry industry. Previous studies in Iran have shown high molecular and genetic similarity among ORT isolates by SDS-PAGE, ERIC-PCR and *16SrRNA* gene sequencing during 1999-2009. The aim of this study was the genotyping of ORT isolates recovered from commercial chickens by using RAPD-PCR with OPG11 primer and multilocus sequence typing (MLST). In total, 30 ORT isolates recovered from commercial chickens of Iran during 2000-2017 and confirmed by bacteriological, biochemical and PCR tests were used in this study. All 30 ORT isolates were subjected to RAPD-PCR with OPG11 primer. For MLST, 5 isolates were selected based on their RAPD patterns. Seven primer pairs were synthesized for amplification and sequencing of seven housekeeping genes of *adk*, *aroE*, *fumC*, *gdhA*, *mdh*, *pgi* and *pml* in MLST assay. In RAPD-PCR with OPG11 primer, 9 different genotypes were found. The DNA sequences of the distinct alleles of these seven loci of 5 ORT strains were compared with other alleles deposited in GenBank. Four out of 5 strains belonged to sequence type 9 (ST9) and one strain was found to be a new ST. Based on the results of the present study, a new sequence type among ORT isolates of Iran was found that has not been previously reported from elsewhere in the world. Further studies on more ORT isolates may help in identification of different sequence types and dominant ST in the country.

Key words: Genotyping, MLST, *Ornithobacterium rhinotracheale*, Poultry, RAPD-PCR

* **Corresponding Author:** Seyed Mostafa Peighambari, Professor, Department of Avian Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
E-mail: mpeigham@ut.ac.ir



© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).