آنالیز فیلوژنیک تعدادی از جدایه‌های *اورنیتوباکتریوم رینوتراکیال* از مرغداری‌های صنعتی استان البرز

ناصر قدسیان[۱]، وحید کریمی[۲]، منصور بنانی[۳]، محمدحسن بزرگمهری‌فرد[۴]، تقی زهرایی‌صالحی[۵] و سیدعلی پوربخش[۳]

تاریخ دریافت: ۹۰/۴/۱ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱/۱۵

خلاصه

اورنیتوباکتریوم رینوتراکیال به عنوان یک عامل بیماری‌زای باکتریایی در گله‌های ماکیان و بوقلمون شناخته شده است. هدف از این مطالعه تعیین توالی نوکلئوتیدی تعدادی از جدایه‌های این باکتری مرغداری‌های صنعتی استان البرز و بررسی مشابهت (هم‌طرازی) میان آنها و همچنین مقایسه آنها با جدایه‌های کشورهای مختلف و بررسی فیلوژنیکی آنها بوده است. در این مطالعه تعداد ۱۰ نمونه که به روش کشت از مرغداری‌های صنعتی استان البرز جداسازی شده بودند، جهت بررسی مولکولی انتخاب شدند. پس از استخراج DNA به روش فنل- کلروفرم، ابتدا با کمک پرایمرهای اختصاصی، شناسایی قطعی باکتری انجام شد و سپس با کمک پرایمرهای اختصاصی ژن کامل 16S rRNA، هر جدایه با حدود ۱۴۵۰ جفت باز، تکثیر و تخلیص شده و توالی نوکلئوتیدی آنها مشخص گردید. هم‌ردیف کردن و مقایسه توالی‌های نوکلئوتیدی در برنامه Bioedit نشان دهنده تشابه ۱۰۰ درصد ده جدایه این باکتری از مناطق مختلف استان البرز از لحاظ توالی ژن 16S rRNA با یکدیگر و تشابه زیاد (۹۸/۶ تا ۱۰۰ درصد) آنها با ۶۳ جدایه از سایر کشورهای جهان بود.

آنالیز فیلوژنیک در نرم‌افزار MEGA نشان می‌دهد که جدایه‌های استان البرز و اخذ شده از بانک ژن، در سه شاخه متفاوت قرار گرفته و تمامی ده جدایه البرز در یک شاخه واقع شده‌اند. بیشترین قرابت جدایه‌های استان البرز با جدایه‌های کشورهای آمریکا، روسیه و تایوان دیده شد. به طور کلی نتایج این بررسی نشان داد که جدایه‌های استان البرز از نظر ساختار مولکولی نزدیک به هم بوده و هومولوژی بین آنها وجود دارد.

کلمات کلیدی: *اورنیتو باکتریوم رینوتراکیال*، فیلوژنیک، البرز ایران

مقدمه

اورنیتوباکتریوم رینوتراکیال (ORT)[۱] باکتری گرم منفی، پلئومورف و غیرمتحرکی است که به همراه بروز علائم تنفسی، کاهش رشد، کاهش تولید تخم، افزایش مرگ و میر و حذف کشتارگاهی از بوقلمون و ماکیان جدا شده است (۲۳ و ۱۲). از سال ۱۹۹۴ و پس از نامگذاری باکتری، توجه محققین به آن جلب شد و گسترش جهانی آن در طیور صنعتی کشورهای مختلف و سایر پرندگان هم به اثبات رسید. اهمیت اقتصادی بیماری به حدی است که واکسیناسیون آن هم مورد توجه قرار گرفته است (۱۲، ۲۰، ۲۲ و ۲۳).

اولین گزارش عفونت ORT در مرغداری‌های ایران، در سال ۱۳۷۹ و از یک گله جوجه گوشتی و یک گله پولت

[۱] مربی بخش کنترل کیفی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، حصارک کرج
[۲] استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران E-mail: vkarimi@ut.ac.ir (نویسنده مسئول)
[۳] دانشیار بخش تشخیص بیماری‌های طیور، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، حصارک کرج
[۴] استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران
[۵] استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

1- *Ornithobacterium rhinotracheale*

تخمگذار با علائم تنفسی بوده است (۱). متعاقباً باکتری از بوقلمون (۹) و سایر نژادهای ماکیان هم گزارش شد (۲، ۳ و ۸). 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 به سادگی و به سرعت امکان‌پذیر نباشد. گسترش عفونت ORT در نژادهای گوناگون پرندگان صنعتی مناطق مختلف ایران با استفاده از روش‌های باکتریولوژی، سرولوژی و PCR گزارش شده است (۳، ۴، ۵، ۷ و ۱۴). عفونت ORT در برخی گونه‌های غیر از ماکیان هم گزارش شده است (۹، ۱۸ و ۱۹). برای طبقه‌بندی ژنتیکی جدایه‌های ORT به غیر از ریبوتایپینگ از طریق تعیین توالی ژن 16S rRNA ، روش‌های دیگری نظیر Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) ، rep-PCR و Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) به کار رفته است (۶، ۱۳ و ۱۷).

اولین بررسی تفاوت ژن 16S rRNA جدایه‌های ORT توسط Amonsin و همکاران (۱۹۹۷) انجام گردید. آنها در بررسی توالی کامل ژن 16S rRNA ۸ جدایه ORT از کشورها و پرندگان مختلف، تشابه بالای ۹۹ درصد را دریافتند. آنها جدایه‌ها را به دو شاخه اصلی و یکی از شاخه‌ها را شامل ۲ زیر شاخه اصلی طبقه‌بندی نموده و تفاوت جدایه‌ها را به طور میانگین در حد ۱/۶۵±۳/۷۵ درصد ارزیابی کردند. آنها روش ریبوتایپینگ ژن کامل 16S rRNA را قابل استفاده برای تفریق ژنتیکی جدایه‌های ORT اعلام نمودند (۶). پرایمرهای به کار رفته برای تعیین توالی ژن 16S rRNA در مطالعه حاضر از همین تحقیق Amonsin و همکاران اخذ شده است و توالی‌های ثبت شده ژن کامل 16S rRNA در بانک ژن مربوط به تحقیق آنها است.

علی‌رغم گزارشاتی در خصوص جداسازی باکتری ORT، شناسایی آن با کمک PCR و ردیابی آنتی‌بادی ضد آن در مرغداری‌های ایران (۳، ۴، ۵، ۷، ۱۴ و ۱۶)، در خصوص بررسی مولکولی جدایه‌ها، به منظور تعیین سویه‌های غالب و جستجوی شباهت‌ها و تفاوت‌های مولکولی بین جدایه‌ها مطالعات محدودی انجام شده است. بنانی و همکاران با استفاده از روش SDS-PAGE و بر اساس الگوی الکتروفورزی پروتئین‌ها، مشابهت فراوان جدایه‌های تحت بررسی را نشان دادند و سروتیپ همه آنها را سروتیپ A اعلام نمودند (۸). سایر محققین هم به نتایج مشابه‌ای رسیده بودند (۲۲). حسن‌زاده و همکاران توالی ژنتیکی ۴ جدایه ORT از جوجه‌های گوشتی را بررسی نمودند. آنها در مطالعه خود توالی قسمتی از ژن 16S rRNA را مدنظر داشتند (۱۶). در این مطالعه، بررسی مولکولی باکتری‌های ORT جدا شده از ماکیان صنعتی استان البرز، مورد توجه قرار گرفته است. در مطالعه حاضر با کمک پرایمرهای اختصاصی ژن کامل 16S rRNA (۶)، توالی نوکلئوتیدی به دست آمده از جدایه‌های نژادهای مختلف ماکیان از اطراف شهرستان کرج (استان البرز) با یکدیگر و با توالی جدایه‌های سایر نقاط جهان و از گونه‌های مختلف پرنده مقایسه و بررسی شده‌اند.

مواد و روش کار

تعداد ۱۰ نمونه باکتری ORT از دستگاه تنفس ده گله ماکیان صنعتی (شامل ۶ گله جوجه گوشتی، ۳ گله مرغ تخمگذار و یک گله مرغ مادر) مشکوک به بیماری اورنیتوباکتریوز، در مناطق مختلف استان البرز، به روش کشت، جداسازی شده و با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و پرایمرهای اختصاصی ORT مورد تایید قرار گرفته بودند. جزئیات روش کشت و تأیید تشخیص ORT با کمک آزمایش PCR قبلاً ارائه شده است (۲، ۳، ۴ و ۱۵). این ده جدایه شناسایی شده و ذخیره شده ORT، جهت بررسی مولکولی انتخاب شدند.

DNA هر یک از جدایه‌های خالص و تکثیر شده، به روش فنل- کلروفورم استخراج شد. روش استخراج

DNA بـه اختـصار شـامل مراحـل لیـز سـلولی، ترسـیب پروتئین و تخلیص DNA بود (۴).

پرایمـر مـورد اسـتفاده بـرای تکثیـر ژن 16S rRNA، توسط Amonsin و همکاران (۱۹۹۷) (۶) طراحی شـده و تـــوالی پرایمرهـــای جلـــودار (Forward) و برگـــشتی (Reverse) آن به صورت زیر بود:

ORS1 –5´AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3´
ORS2 – 5´GGTTACCTTGTTACGACTT-3´

در هر بار آزمایش PCR، با احتساب تمام نمونـه‌هـای مورد آزمایش و همین طور کنترل‌های مثبت و منفـی و بـا یک نمونه بیـشتر، مخلـوط اصـلی PCR محاسـبه و تهیـه می‌گردید. در این مطالعه حجم هر نمونـه واکـنش PCR، ۵۰ میکرولیتر در نظر گرفته شد و حجم هر کدام از اجزای مخلوط بـرای هـر نمونـه شـامل بـافر PCR (Cinnagen، ایران) (x ۱۰)۵ میکرولیتر، کلرید منیـزیم (Cinnagen) ۲۵ میلی مـولار (۳ میکرولیتـر)، مخلـوط داکـسی نوکلئوزیـد تری‌فسفات (Cinnagen) ۱۰ میلی مـولار (۱ میکرولیتـر)، هر کـدام از پرایمرهـا (MWG، آلمـان) ۲ میکرولیتـر (۲۰ پیکومول)، آنزیم DNA Taq polymerase (Cinnagen) ۱ میکرولیتر (۲/۵ واحـد بـین‌المللـی)، DNA ۸ میکرولیتـر (۱۲/۶ نـانوگرم در میکرولیتـر) و آب مقطـر اسـتریل ۲۸ میکرولیتر بود.

مخلوط PCR به منظور واسرشت اولیـه و تفکیـک دو رشـته DNA بـه مـدت ۲ دقیقـه در دمـای ۹۵ درجـه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس سیکل‌هـای متـوالی شـامل مرحله واسرشت (Denaturation) ۳۰ ثانیـه در ۹۴ درجـه سانتی‌گـراد، مرحلـه اتـصال (Annealing) یـک دقیقـه در دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد و مرحله سـاخت (Extention) ۹۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد، به تعداد ۳۵ سیکل و در انتها یک مرحله ساخت پایانی به مـدت ۷ دقیقـه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد همگی در دستگاه ترموسـایکلر (Eppendorf، آلمان) تنظیم شده بود.

محصولات PCR به نسبت ۵ به یک بـا بـافر Loading (Fermentas ، لیتوانی) مخلوط و به گوده‌های تعبیه شـده در ژل آگارز ۱/۵ درصد و حاوی اتیـدیوم‌بروماید منتقـل شدند. مارکر ۵۰۰ جفت بازی (Fermentas) هم در گوده مشخصی ریخته شد. در این مطالعه ژل با ولتاژ ۱۰۰ ولت الکتروفورز گردیـد و پـس از آن ژل بـه دسـتگاه تـرانس ایلومینـاتور منتقـل و بـا اشـعه UV بررسـی گردیـد و در خاتمه با استفاده از دوربین و چـاپگر متـصل بـه دسـتگاه، عکس‌برداری از ژل انجام شد (شکل ۱).

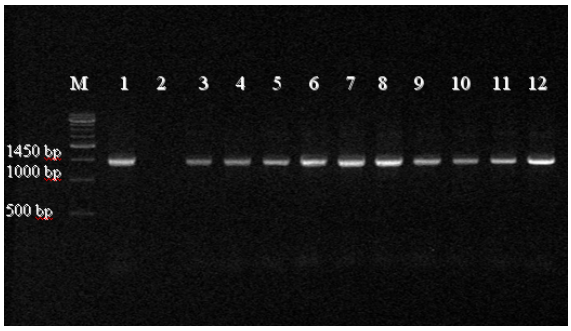
پس از اطمینان از تکثیر محصول PCR و تشکیل بانـد، عمل خـالص‌سـازی DNA بـا اسـتفاده از کیـت تجـاری شرکت Roche آلمان انجام شـد. پـس از خـالص‌سـازی، محصول به دست آمـده توسـط شـرکت MWG Biotech تعیین توالی نوکلئوتیدی گردید. تعیین توالی دوطرفـه بـا پرایمرهای جلودار و برگشتی و مونتاژ و ویرایش توالی‌هـا با کمک بسته نرم‌افزاری DNASTAR(DNASTAR, Inc., Madison, USA) انجام و سکانس‌ها در Gen Bank ثبـت گردیدنـد. سـپس تـوالی نوکلئوتیـدی ژن 16S rRNA جدایه‌های ORT سایر کشورها از بانک ژن استخراج شـد. همردیـــف کـــردن تـــوالی نوکلئوتیـــدی (Multiple Alignment) جدایه‌های مورد مطالعه در استان البرز و ۶۳ جدایه اخذ شده از بانک ژن بـا نـرم‌افـزار Bioedit انجـام گردیـد و درخـت فیلـوژنیکی آنهـا بـا اسـتفاده از روش Maximum Likelihood (ML)، قابل دسترس در نرم‌افزار MEGA4 و براساس boot strap ۱۰۰۰ رسم گردید.

نتایج

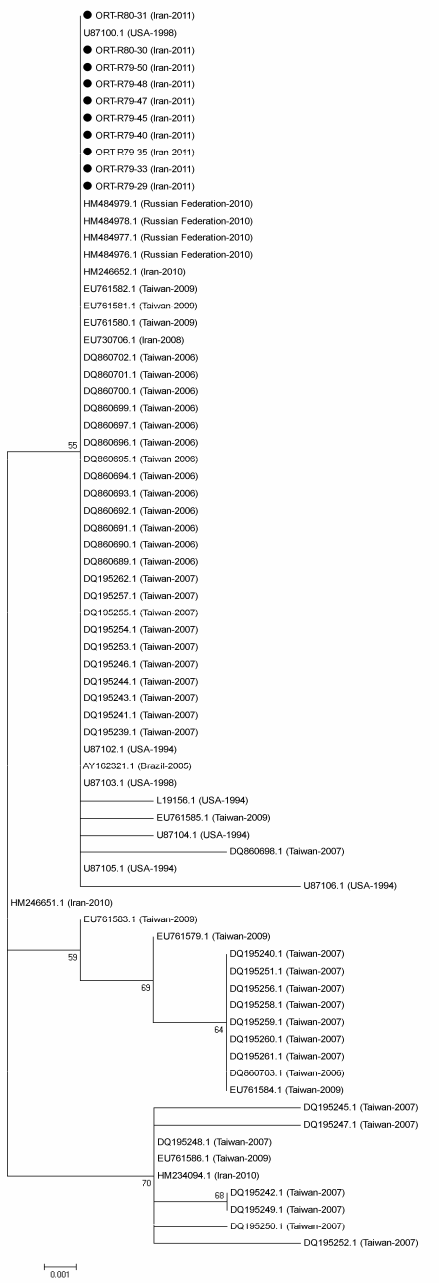
در کشت ده نمونه از دسـتگاه تـنفس ماکیـان صـنعتی ارسـالی از منـاطق مختلـف اسـتان البـرز، بـاکتری ORT جداسازی و شناسایی شده بود (۴). در آزمایش PCR بـا اسـتفاده از پرایمرهـای ژن کامـل 16S rRNA، قطعـه‌ای DNA با حدود ۱۴۵۰ جفت باز برای هـر نمونـه تـشکیل شد (شکل ۱). پس از خالص سازی و تعیین توالی DNA مـذکور و مونتـاژ و ویـرایش تـوالی‌هـا بـا کمـک بـسته نرم‌افـزاری DNASTAR(DNASTAR, Inc., Madison, USA) ، توالی نوکلئوتیدی ده جدایه استان البرز در بانـک

ژن بـا شـماره‌هـای دسترسـی JF501953، JF501954، JF501955، JF501956، JF501957، JF501958، JF501959، JF501960، JF501961 و شماره JF810496 ثبت گردید.

درخت فیلوژنیکی حاصل از همردیـف نمـودن تـوالی نوکلئوتیـدی (Multiple Alignment) جدایـه‌هـای مـورد مطالعه و ۶۳ جدایه اخذ شده از بانک ژن در شکل ۲ قابل مشاهده است. توالی نوکلئوتیـدی ژن 16S rRNA، در ده جدایه ORT از استان البرز و ۶۳ جدایه از سراسر دنیـا در سه شاخه یا دودمان مجزا قرار گرفتند (شکل ۲). مقایـسه توالی‌ها نشان داد که ده جدایـه البـرز بیـشترین مـشابهت (۱۰۰٪) را با یکدیگر نـشان مـی‌دهنـد و همگـی در یـک دودمان قرار دارند. از طرف دیگر مشابهت بـسیار بـالایی (۹۹/۷٪ تا ۱۰۰٪) بین این ده جدایه مشابه از استان البـرز، با ۳۷ جدایه بانـک ژن کـه همگـی در یـک شـاخه واقـع شده‌اند وجود دارد. این ۳۷ جدایه شامل، یـک جدایـه از بوقلمون از آمریکا (۶)، یک جدایه از کلاغ از آلمـان (۶)، یک جدایه از مرغ شاخدار از بلژیـک (۶)، یـک جدایـه از بوقلمـون از هلنـد (۹) (Amonsn 1997)، ۴ جدایـه از روسیه، دو جدایه از ماکیـان (۱۶) و کبـک (۱۸) از ایـران، ۲۶ جدایه از تـایوان (۲۱ و ۱۳) و یـک جدایـه از برزیـل (۱۰) هستند. در بین ۳۷ جدایه فوق‌الذکر، شباهت کامـل بین ده جدایه البرز (۱۰۰٪) با ۱۴ جدایـه مـشاهده گردیـد که شامل یک جدایه از بوقلمون از مینسوتای آمریکـا (۶)، ۳ جدایه ازماکیان تجاری و ۱ جدایه از بوقلمـون صـنعتی روسیه، یک جدایه از کبک (۱۸) و یک جدایه از جوجـه گوشتی ایران (۱۶) و ۴ جدایه بوقلمون و ۲ جدایه ماکیـان تایوان (۱۳) و یک جدایه از شترمرغ تایوان (۱۳) هـستند. دو جدایه دیگـر ایـران کـه بـا ۱۰ جدایـه مطالعـه حاضـر ۱۰۰ درصد مشابهت داشتند، یکی از کبک (۱۸) (Mirzaie 1997) و دیگری از جوجه گوشتی (۱۶) (Hassanzadeh 2010) جدا شده بودند. البتـه مقایـسه ده جدایـه مطالعـه حاضر با چهار جدایه قبلی ایـران (۱۶، ۱۸ و ۱۹) مقایـسه کاملی نیست، زیرا چهار توالی نوکلئوتیدی قبلـی از ایـران دارای حدود ۷۰۰ جفت باز بـوده و قـسمتی از تـوالی ژن است در حالی که توالی ده جدایه استان البرز، بـین ۱۰۹۱ تا ۱۳۸۷ جفت باز را شامل می‌شـوند و حـداقل تـوالی ۵ جدایه از آنها توالی ژن کامل محسوب مـی‌گردنـد. نکتـه قابل توجه دیگر اینکه در بین ۶۳ جدایه دیگر ORT ثبـت شده در بانک ژن تنها ۶ جدایه از نقاط مختلف دنیا دارای توالی ژن کامل 16SrRNA هستند و بـین ۱۳۷۹ تـا ۱۴۵۹ جفت باز را شامل می‌شوند بنابراین مقایسه این توالی‌ها با ده جدایه از ایران مقایسه قابل قبولی بوده و نشان می‌دهـد که تمام این توالی‌ها در یـک دودمـان و بـسیار شـبیه هـم (بالای ۹۹٪) می‌باشند. شماره ثبـت در بانـک ژن، تعـداد جفت باز، گونه پرنده و زمان و مکـان جداسـازی ایـن ۶ جدایه استاندارد با ژن کامل (۶) و میزان مشابهت آنهـا بـا ده جدایه البرز، به ترتیب عبارتنـد از: ۱- U87100 ، bp ۱۴۲۱ ، بوقلمـون، آمریکـا، ۱۹۹۷ بـا ۱۰۰٪ شـباهت بـا جدایه‌های البرز ۲- AY162321 ، bp ۱۴۵۷، زاغ rook ، آلمـان، ۱۹۸۳، بـا ۹۹/۷٪ شـباهت ۳- U87103 ، bp ۱۴۵۹ ، مـرغ شـاخدار، بلژیـک، ۱۹۹۲ بـا ۹۹/۷ درصـد شـباهت ۴- U87105 ، bp ۱۴۲۶ ، بوقلمـون هلنـد، ۹۹/۷٪ شباهت ۵- U87104، bp ۱۴۶۵، زاغ rook ، آلمـان، ۱۹۸۳ با ۹۹/۵ درصد شباهت و ۶- U87106، bp ۱۳۷۹، بوقلمون، ۱۹۹۳، فلسطین اشغالی، با ۹۹/۳ درصد شباهت.



شکل ۱: الکتروفورز محصول ۱۴۵۰ جفت بـازی بـر روی آگارز ۱/۵ در صد، رنگ‌آمیـزی شـده بـا اتیـدیوم‌بروماید. M: مـارکر ۵۰۰ جفـت بـازی، شـماره ۱: کنتـرل مثبـت، شماره ۲: کنترل منفی، شماره‌های ۱۲-۳: ده نمونـه جدایـه ORT مورد مطالعه



شکل ۲: درخت فیلوژنیک ۱۰ جدایه اورنیتوباکتریوم رینوتراکیال مورد مطالعه و ۶۳ توالی نوکلئوتیدی ORT به دست آمده از بانک ژن با استفاده از روش Maximum Likelihood (ML)، قابل دسترس در نرم‌افزار MEGA4 و براساس ۱۰۰۰ boot strap رسم گردید. نمونه‌هایی که باعنوان ORT● شروع شده از استان البرز و بقیه اخذ شده از بانک ژن است (عددی که روی هر Node وجود دارد بیانگر درصد آنالیز bootstrap در 1000 replicates است همچنین مقیاس یا bare بیانگر تمایز فاصله‌های تکاملی ناشی شده با استفاده از مدل Kimura 2 Parameter می‌باشد).

بحث

در این مطالعه بر اساس نتایج فیلوژنی، ORTهای جدا شده از استان البرز و اخذ شده از بانک ژن، در سه دودمان (شاخه) نزدیک به هم، قرار گرفته و تمامی ده جدایه البرز در یک شاخه واقع شده‌اند. تشابه صددرصد ده جدایه ORT از مناطق متفاوت استان البرز، از لحاظ توالی ژن 16S rRNA با یکدیگر و تشابه زیاد (۹۸/۶ تا ۱۰۰ درصد) آنها با ۶۳ جدایه از سراسر دنیا در مطالعه حاضر، مشاهده گردید. برای استفاده گسترده از واکسیناسیون و یا در صورت تمایل به تولید واکسن بومی، بررسی جدایه‌های مختلف کشور از لحاظ سروتیپ و ژنوتیپ ضروری به نظر می‌رسد. مطالعه حاضر به عنوان بخشی از بررسی ژنوتیپ‌های غالب در کشور با کمک روش تعیین توالی نوکلئوتیدی است.

اهمیت اقتصادی عفونت ORT با پیچیده‌تر کردن کمپلکس‌های تنفسی و ایجاد مقاومت اکتسابی سریع و رو به ازدیاد ORT نسبت به اغلب داروها، لزوم مبارزه اصولی و از جمله واکسیناسیون را مطرح نموده است (۳، ۱۱، ۱۲، ۲۰، ۲۲، ۲۳ و ۲۴).

در خصوص بررسی ژنتیکی ORTهای جدا شده از ماکیان صنعتی فقط یک گزارش از ایران وجود دارد. حسن‌زاده و همکاران (۱۶) ۴ باکتری ORT را از جوجه‌های گوشتی، جداسازی و شناسایی و با ۹ جدایه بانک ژن مقایسه کردند. آنها محل دقیق جداسازی را ذکر ننموده و از قسمتی از ژن 16S rRNA (حدود ۷۰۰ جفت باز) در جدایه‌های خود استفاده کرده و آن را با ژن کامل (حدود ۱۵۰۰ جفت باز) ۷ جدایه وتوالی ناکامل ژن دو جدایه دیگر از بانک ژن مقایسه نمودند. در مطالعه آنها مشابهت فراوان (بالای ۹۸ درصد) بین ۴ جدایه ایران و ۹ جدایه بانک ژن مشاهده شده است. دو گزارش دیگر از ایران در خصوص مطالعه ژنومی ORT با کمک روش تعیین توالی وجود دارد که هر دو مربوط به پرندگانی به غیر از ماکیان صنعتی هستند (۱۸ و ۱۹). میرزایی و

همکاران (۱۸) توالی نوکلئوتیدی ORT جدا شده از کبک مریض را در بانک ژن ثبت نموده‌اند. در مطالعه حاضر از بین ۱۴ جدایه موجود در بانک ژن که به طور صددرصد با ده جدایه البرز مشابهت نشان دادند دو جدایه از ایران هم دیده می‌شود که یکی از آنها یک جدایه حاصل ازمطالعه حسن‌زاده و همکاران با شماره قابل دسترس EU730706 (۱۶) و دیگری جدایه‌ای از کبک با شماره HM246652 (۱۸) است. هر دو این توالی‌ها قسمتی از ژن 16S rRNA به ترتیب با ۶۷۸ و ۷۱۸ جفت باز هستند.

میرزایی و همکاران در بررسی دیگری از ایران، به مطالعه مولکولی ORTهای جدا شده از بوقلمون، بلدرچین و کبوتر اقدام نموده‌اند (۱۹). آنها در مطالعه خود به مشابهت بالای توالی‌های ناکامل ژن 16S rRNA (بین ۹۸ تا۱۰۰٪) بین ۲ جدایه از کبوتر، یک جدایه از بلدرچین و یک جدایه از بوقلمون در مطالعه‌شان، با ۱۵ جدایه بانک ژن دست یافتند. مقایسه فیلوژنیکی توالی نوکلئوتیدی ۲ جدایه کبوتر از ایران (۱۹) با ده جدایه البرز مطالعه حاضر نشان می‌دهد که ده جدایه البرز و دو جدایه دیگر از ایران (از جوجه گوشتی و کبک) در یک شاخه قرار دارند ولی دو جدایه کبوتر از ایران (با شماره‌های HM246651 و HM2340941) در دو شاخه دیگر قرار می‌گیرند. چنین یافته‌ای با نتیجه مطالعات از تایوان (۲۱ و ۱۳) مطابقت دارد. در مطالعه آنها هم توالی جدایه‌های کبوتر و ماکیان در شاخه‌های مجزایی قرار گرفته‌اند (۲۱ و ۱۳).

Tsai و Huang در (۲۰۰۶) در ریبوتایپینگ ۱۶ جدایه ORT از ماکیان تایوان و ۷ جدایه از کبوترهای تایوان و مقایسه توالی ناکامل ژن 16S rRNA آنها با ۸ جدایه از بانک ژن، ۳۱ جدایه را در سه گروه یا شاخه دسته‌بندی نمودند. ۹ جدایه از ماکیان تایوان به اتفاق تمامی جدایه‌های رفرانس بانک ژن (از ماکیان، بوقلمون، زاغ و مرغ شاخدار) در یک شاخه، ۷ جدایه دیگر ماکیان تایوان در شاخه دوم و بالاخره تمامی جدایه‌های کبوتر تایوان در شاخه سوم دسته‌بندی می‌شدند. آنها مشابهت توالی ۳۱ جدایه تحت بررسی را به میزان ۹۸/۳ تا ۱۰۰ درصد اعلام نمودند که با یافته‌های مطالعه حاضر کاملاً منطبق است. آنها به ناکامل بودن توالی ژن 16S rRNA در بررسی‌شان اذعان نموده‌اند و برای افزایش دقت، بررسی توالی کامل ژن را، با پرایمرهای دیگری به غیر از پرایمرهای مورد استفاده ایشان، پیشنهاد دادند (۲۱).

Chou و همکاران (۲۰۰۹) در مطالعه دیگری، توالی ناکامل ژن 16S rRNA را در ۵۰ جدایه ORT از تایوان (شامل ۲۶ جدایه ماکیان، ۱۱ جدایه کبوتر، ۷ جدایه بوقلمون، ۳ جدایه بلدرچین، ۲ جدایه شترمرغ و یک جدایه از شاهین) با ۷ توالی کامل بانک ژن مقایسه نمودند (۱۳). در مطالعه آنها تمامی جدایه‌ها در سه شاخه ژنتیکی طبقه‌بندی شدند. شاخه اول شامل ۱۳ جدایه ماکیان، یک جدایه بوقلمون، یک جدایه بلدرچین و سه جدایه رفرانس (U87100 ، U87101 ، U87106)، شاخه دوم خود از ۴ زیر شاخه (A, B, C, D) تشکیل می‌شد، زیر شاخه A شامل ۷ جدایه ماکیان، ۲ جدایه شترمرغ، یک جدایه از شاهین و جدایه U87104 بود و زیر شاخه B شامل ۵ جدایه بوقلمون، ۲ جدایه بلدرچین، ۲ جدایه ماکیان و جدایه U87105 (جدایه رفرانسی که بیشترین شباهت– صد در صد– را با ده جدایه البرز نشان داده است) بودند. تمامی جدایه‌های کبوتر و یک جدایه ماکیان در زیر شاخه C و یک جدایه بوقلمون، یک جدایه ماکیان و دو جدایه رفرانس (U87102 و U87103) در زیر شاخه D قرار داشتند. بالاخره شاخه سوم فقط در بردارنده ۲ جدایه ماکیان بود. در مجموع شباهت جدایه‌ها بین ۹۷ تا ۱۰۰ در صد مشاهده شده است. این یافته‌ها با نتایج کار قبلی از تایوان و مطالعه حاضر از لحاظ مجزا بودن وضعیت ژنتیکی جدایه‌های کبوتر از جدایه‌های ماکیان و بلدرچین و در عین حال شباهت بالای تمامی جدایه‌ها تطابق دارد. در بررسی Chou و همکاران (۱۳) علاوه بر ریبوتایپینگ، دو روش دیگر RAPD و AFLP برای طبقه‌بندی ژنتیکی جدایه‌های ORT استفاده شده است و در هر دو روش ضمن تأیید یافته‌های ریبوتایپینگ، نشان داده شده است

که در مجموع جدایه‌های با منشاء ماکیان و بلدرچین از جدایه‌های با منشاء کبوتر و پرندگان وحشی به طور عمده در دو گروه مجزا تقسیم می‌شوند، هر چند در هر دو گروه جدایه‌هایی از گروه مقابل هم ممکن است دیده شود. جدایه‌های با منشاء بوقلمون که در هر دو گروه پراکنده هستند احتمالاً پل ارتباطی جدایه‌های پرندگان وحشی به پرندگان اهلی محسوب می‌شوند. مطالعات انجام شده قبلی (۱۳) و همین‌طور نتایج مطالعه حاضر احتمال اختصاصی بودن میزبان را در مورد جدایه‌های ORT تقویت می‌نماید.

Amonsin و همکاران (۶) با توجه به مشابهت ژنوتیپی جدایه‌های مختلف از نواحی جغرافیایی متعدد و زمان‌های متفاوت، در خصوص منشاء ORT در جمعیت‌های طیور اهلی، این فرضیه را اظهار نمودند که باکتری ORT اخیراً به گله‌های طیور اهلی از جمعیت‌های پرندگان وحشی وارد شده است. تفاوت اندک در جدایه‌های ORT به دست آمده از طیور اهلی نشان می‌دهد که این ارگانیسم تاریخچه تکاملی نسبتاً کوتاهی در این جمعیت داشته است. اگرچه تنها تعداد کمی از جدایه‌های پرندگان وحشی برای آنالیز در دسترس بودند، نتایج Amonsin و همکاران نشان داد که گوناگونی در میان جدایه‌های ORT به دست آمده از جمعیت‌های پرندگان وحشی بیشتر است که نشان می‌دهد، ارگانیسم تاریخچه تکاملی طولانی‌تری در جمعیت‌های پرندگان وحشی داشته است. این مسئله نیاز دارد که در آزمایشات بعدی با تعدادی زیادی جدایه از گونه‌های مختلف پرندگان آزمایش شود. در نهایت، نتایج تحقیق‌ها نشان داد که اکثریت جدایه‌های ORT به دست آمده از طیور اهلی از سرتاسر جهان ناشی ازگروه‌های کوچک از کلون‌های نزدیک به هم است. نکته مشترکی که از تحقیقات انجام شده در ساختار ژنومی ORT (۶ و ۱۰) حاصل می‌شود، این است که ماهیت کلونال و مشابه جمعیت باکتری، سودمند بودن واکسیناسیون را به عنوان یک راهکار استراتژیک در مقابله با بیماری اورنیتوباکتریوز مطرح می‌نماید. البته مسلم است که در بین کلون‌های نزدیک به هم، شناسایی کلون غالب و ساختار مولکولی جمعیت باکتری یک منطقه برای تهیه بهترین و مؤثرترین واکسن توصیه می‌گردد. به نظر می‌رسد تعمیم نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر به تمامی جدایه‌های ایران صحیح نبوده و بهتر است که در خصوص سایر مناطق کشور هم بررسی مشابه‌ای صورت گیرد و علاوه برآن از سایر روش‌های ژنتیکی برای جستجوی تفاوت جدایه‌ها نیز استفاده گردد.

منابع

۱- بنانی منصور، خاکی پژواک، گودرزی حسین، وندیوسفی جلیل و پوربخش سیدعلی (۱۳۷۹). جداسازی و شناسایی *Ornithobacterium rhinotracheale* از یک گله گوشتی و یک گله پولت تخمگذار. پژوهش و سازندگی، شماره ۶، صفحات ۱۰۹ - ۱۰۶.

۲- بنانی منصور، ممیز رضا، پوربخش سیدعلی، گودرزی حسین و بهمنی‌نژاد محمدعلی (۱۳۸۱). جداسازی همزمان *اورنیتوباکتریوم رینوتراکیال* و ویروس آنفلوانزای طیور تحت تیپ H9N2 از طیور صنعتی. مجله تحقیقات دامپزشکی ایران، دوره سوم، صفحات ۱۹۵-۱۹۰.

۳- بنانی منصور، پوربخش سیدعلی، مؤذنی‌جولا غلامرضا، ممیز رضا و عزی عباس (۱۳۸۱). آلودگی طبیعی ناشی از *Ornithobacterium rhinotracheale* در گله‌های طیور تجاری و عفونت تجربی آن در جوجه‌های عاری از پاتوژن‌های اختصاصی. پژوهش و سازندگی، شماره ۵، صفحات ۳۷- ۲۸.

۴- بنانی منصور، پوربخش سیدعلی، ارمی مه‌زاد، غلامین فرزان و فاتح‌منش مسعود (۱۳۸۸). شناسایی *اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال* به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR). مجله تحقیقات دامپزشکی، دانشگاه تهران، دوره ۶۴، شماره ۱، صفحات ۴۵- ۴۱.

۵- جمشیدیان محمود و میاحی منصور (۱۳۸۷). جداسازی *اورنیتو باکتریوم رینو تراکئال* (ORT) از ماکیان گوشتی شهرستان اهواز. مجله دامپزشکی ایران، دانشگاه شهید چمران اهواز، دوره ۴، شماره ۴، صفحات ۳۶-۲۹.

6- Amonsin A., Wellehan J.F.X., Ling-Ling Li L.L., Vandamme P., Lindeman C., Edman M. and et al. (1997). Molecular Epidemiology of Ornithobacterium rhinotracheale. Journal of Clinical Microbiology, 35(11): 2894-98.

7- Asadpour Y., Bozorgmehri Fard M.H., Pourbakhsh S.A., Banani M. and Charkhkar S. (2008). Isolation and identification of *Ornithobacterium rhinotracheale* in broiler breeder flocks of Guilan province, north of Iran. Pakistan Journal of Biological Science, 11: 1484-91.

8- Banani M., Pourbakhsh S.A. and Khaki P. (2001). Characterization of Ornithobacterium rhinotracheale from commercial chickens. Archives of Razi Institute, 52: 27-36.

9- Banani M., Pourbakhsh S.A. and Deihim A.H. (2004). Antibiotic sensitivity of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolates associated with respiratory disease. Archives of Razi Institute, 58: 111- 117.

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

11- Cauwerts K., De Herdt P., Haesebrouck F., Vervloesem J. and Ducatelle R. (2002). The effect of *Ornithobacterium rhinotracheale* vaccination of broiler breeder chickens on the performance of their progeny. Avian Pathology, 31: 619- 624.

12- Chin R.P., Van Empel P.C.M. and Hafez H.M. (2008). *Ornithobacterium rhinotracheale* infection. In: Diseases of Poultry, Saif Y. M. (ed.), Blackwell Publishing, pp: 765- 771.

13- Chou C.H., Lin S.Y., Chen C.L. and Tsai H.J. (2009). Use of random amplified polymorphic DNA analysis and single enzyme amplified fragment length polymorphism in molecular typing of *Ornithobacterium rhinotraceale* strains. Avian Diseases, 53(1): 108-14.

14- Ghanbarpour R. and Salehi M. (2009). Sero-prevalece and identification of O*rnithobacterium rhinotracheale* in broiler flocks in south-eastern Iran. Tropical Animal Health Production, 41: 1676-83.

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

16- Hassanzadeh M., Karimi V., Fallah N. and Ashrafi I. (2010). Molecular characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolated from broiler chicken flocks of Iran. Turkish Journal of Veterinary and Animal Science, 34: 1-6.

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

18- Mirzaie S., Hassanzadeh M., Bozorgmehri Fard M.H. and Banani M. (2010). Isolation and characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* from a diseased partridge by bacteriological and molecular methods, a clinical report. Unpublished data.

19- Mirzaie S., Hassanzadeh M., Bozorgmehri Fard M.H. and Banani M. (2011). Isolation and characterization of O*rnithobacterium rhinotracheale* in turkey, quail flocks and domestic pigeons by bacteriological and molecular methods. Archives of Razi Institute, 66(2): 121-127.

20- Murthy T.R.G.K., Dorairajan N., Balasubramaniam G.A., Dinakaran A.M. and Kalaimathi R. (2007). The effect of vaccination of pullets against *Ornithobacterium rhinotracheale infection*. Avian Pathology, 36(6): 481-485.

21- Tsai H.J. and Huang C.W. (2006). Phenotyping and molecular characterization of isolates of *Ornithobacterium rhinotracheale* infection from chickens and pigeons in Taiwan. Avian Diseases, 50: 502-507.

22- van Empel P.C.M. and van den Bosch H. (1998). Vaccination of chickens against *Ornithobacterium rhinotracheale* infection. Avian Diseases, 42: 572-578.

23- Van Empel PCM and Hafez HM (1999): O*rnithobacterium rhinotracheale :* a review. Avian Pathology, 28 : 217- 227.

24- Van Veen L., Van Empel P. and Fabri T. (2000). *Ornithobacterium rhinotracheale*, a primary Pathogen in broilers. Avian Discase, 44: 896 -900.