مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره پنجم، شماره بیستم - پائیز ۱۳۹۴

Research Article
مقاله تحقیقی

تعیین هویت مولکولی ایزوله های اورنیتو باکتریوم جدا شده از مرغداری های استان مرکزی

پریسا ایزدخواه[۱] ، سید داوود حسینی*[۲]،احمدعلی پوربابایی[۳]

۱ .کارشناس ارشد میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی قم، قم، ایران.
۲. استادیار، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه اراک، اراک، ایران.
۳ .استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی قم، قم، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: اورنیتو باکتریوزیس یک بیماری عفونی در گونه های پرندگان است که تقریبا در تمام کشورها در سراسر جهان گزارش شده است. اولین ایزوله های ثبت شده ORT از بوقلمون در آلمان در سال ۱۹۸۱ بود.ORT هم چنین از مرغ، مرغ شاخدار، غازها، مرغابی ها، بلدرچین، کبوتر، قرقاول، کبک، شترمرغ، مرغ ماهی خوار، کلاغ ها و بوقلمون جدا شده است. در ایران عفونت ORT برای اولین بار توسط بنانی و همکارانش گزارش شد. هدف اصلی این مطالعه شناسایی اورنیتو باکتریوم های جدا شده در استان مرکزی با استفاده از تجزیه و تحلیل مولکولی است.

مواد و روش ها: ۱۵ ایزوله که با روش های بیوشیمیایی توسط موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی از مرداد ۹۰ تا پایان سال ۹۱ واز بین نمونه هایی که به صورت تصادفی از ۲۰ مرغداری مناطق مختلف استان مرکزی و از ۲۳۱ قطعه طیور جمع آوری شده بود مورد آزمایش قرار گرفت. ایزوله ها در محیط آگار خون دار حاوی ۵µg/ml جنتامایسین کشت و به مدت ۴۸ ساعت در ۳۷°c انکوبه شد. سپس همه نمونه ها با استفاده از پرایمرPCR، ۱۶S rRNA و در نهایت توالی یابی شدند.

یافته ها: نتایج آزمون PCRو مشاهده باند ۷۸۴ bp بر روی ژل آگارز وجود جنس باکتری اورنیتو باکتریوم را از ۱۵ نمونه تایید کرد. هم چنین مقایسه توالی های به دست آمده از ایزوله های جدا شده با توالی های موجود در GenBankنشان داد که ۹۸ -۱۰۰ درصد شباهت با سویه های اورنیتو باکتریوم رینوتراکئال وجود دارد که مبین وجود این گونه ی باکتری در مرغداری های استان مرکزی است.

نتیجه گیری: باکتری اورنیتو باکتریوم رینوتراکئال می تواند گونه غالب باکتری اورنیتو باکتریوم در مرغداری های استان مرکزی باشد.

کلمات کلیدی: ORT ، مرغ،PCR ، بیماری تنفسی، ۱۶S rRNA

مقدمه

بیماری های تنفسی در صنعت طیور از اهمیت بسیار زیادی برخوردار می باشند و عوامل بسیاری در ایجاد بیماری های تنفسی دخالت دارند که هر یک از آن ها به صورت اولیه و یا ثانویه می توانند ضررهای اقتصادی فراوانی را در صنعت پرورش طیور ایجاد نمایند. این بیماری ها از یک طرف به علت تلفات و از طرف دیگر به دلیل ایجاد اختلال در متابولیسم حیوان و بنابراین کاهش رشد و تولید خسارات اقتصادی قابل توجهی را به صنعت مرغداری وارد می نمایند. گذشته از این سهم به سزایی از داروهای مصرفی در این صنعت به منظور پیش گیری و یا رفع مشکلات تنفسی گله مورد استفاده قرار می گیرد. عوارض تنفسی اغلب در نتیجه مجموعه ای از عوامل عفونی از قبیل ویروس ها، باکتری ها و قارچ ها ایجاد می گردد (۱،۲).

نویسنده مسئول:
اراک، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه منطقه مرکزی
ایمیل: hosseinida@yahoo.com
تاریخ دریافت : ۱۳۹۳/۰۳/۲۲
تاریخ پذیرش :۱۳۹۴/۰۲/۲۱

اورنیتو باکتریوم رینوتراکئال یک باکتری گرم منفی، غیر متحرک، میله ای شکل، با رشد کند می باشد که در فوق خانواده v باکتری های rRNA جای گرفته است. این باکتری می تواند در گونه های مختلف از پرندگان مثل مرغ، بوقلمون، مرغ نوروزی، شترمرغ، کبک، قرقاول، بلدرچین، اردک، غاز و کبوتر ایجاد بیماری کند. تا قبل از ۱۹۹۴ مواردی از جداسازی باکتری با نام های متنوع، از جمله باکتری شبه پاستورلا وجود داشته است تا این که اولین بار به پیشنهاد Vandamme و همکاران در سال ۱۹۹۴ توصیف و اورنیتو باکتریوم رینوتراکئال نام گذاری گردید. پس از آن توجه محققان به آن جلب شد و گسترش جهانی آن در طیور تجاری و سایر پرندگان به اثبات رسید (۱، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۴).

اولین گزارش عفونت *ORT* در مرغداری های ایران در سال ۱۳۷۹ و از یک گله جوجه گوشتی و یک گله پولت تخم گذار با علائم تنفسی بوده است. متقابلا باکتری از بوقلمون و سایر نژاد های ماکیان هم گزارش شده است. بیماری اورنیتو باکتریوز در نژاد های مختلف ماکیان ایران شامل مادر گوشتی، جوجه گوشتی، تخم گذار تجاری و مرغ بومی و در گله های با تلفات بالا گزارش شده است (۳).

علائم بالینی و شدت عفونت به شدت تحت تاثیر عوامل محیطی مثل مدیریت ضعیف، تراکم بالا، بهداشت پایین، حدت سویه های پاتوژن و عوامل میزبانی مثل سیستم ایمنی و بیماری های همزمان است. عوامل عفونی دیگر دستگاه تنفسی مثل اشرشیا کلی و بوردتلا آویوم و ویروس نیوکاسل نیز اثر تحریک کنندگی روی عفونت *ORT* دارند (۵).

بروز این آلودگی در گله باعث بروز بیماری تنفسی با علائم و جراحات در قسمت های تحتانی دستگاه تنفس یعنی ریه و کیسه های هوایی و در مفاصل به خصوص مفاصل پا دارد (۴).

علائم بالینی این بیماری در جوجه ها شامل سرفه، ترشحات بینی، آرتریت و در بوقلمون شامل پنومونی ، سینوزیت، پریکاردیت، بزرگ شدن کبد و تورم کیسه های هوایی است که به دنبال آن کاهش رشد، کاهش وزن گیری، کاهش میزان تولید تخم مرغ، کاهش کیفیت پوسته تخم مرغ، کاهش جوجه آوری و افزایش مرگ و میر مشاهده می شود (۱و۶).

بر اساس خصوصیات آنتی ژنی و با استفاده از آزمایش های رسوب در ژل آگار و الایزا ۱۸ سروتیپ از باکتری *ORT* از A تا R شناسایی شده اند که در این بین سروتیپ Aشایع ترین آن ها در بوقلمون ها می باشد (۴).

تاکنون هیچ ساختار یا خواص ویژه مثل پیلی، فیمبریا، پلاسمید یا فعالیت سمی خاصی در این سروتیپ ها دیده نشده است (۱۸).

مطالعه بنانی و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان داد که اگر چه PCR می تواند یک روش سریع و مطمئن برای شناسایی *ORT* در نمونه های مشکوک به *ORT* باشد اما بهتر است که به منظور به حداکثر رساندن اطمینان تشخیص با روش کشت توام باشد (۲).

در این مطالعه سعی گردید که با استفاده از روش PCR نتایج به دست آمده از آزمایشات بیوشیمیایی بررسی شود و هم چنین ایزوله های جدا شده در سطح استان مرکزی تعیین هویت مولکولی گردند.

مواد و روش کار

نمونه برداری: در این مطالعه ۱۵ ایزوله *ORT* موجود در موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه منطقه مرکزی- اراک که از مرداد ۹۰ تا پایان سال ۹۱ به طور تصادفی از ۲۰ مرغداری مناطق مختلف استان و از ۲۳۱ قطعه طیور بیمار یا تلف شده جمع آوری شده بود برای آزمایش در اختیار ما قرار گرفت. بر اساس روش استاندارد این سویه ها کشت داده شد. بدین منظور از محیط کشت آگار خون دار حاوی ۵ درصد خون گوسفندی و ۵ میکروگرم در هر میلی لیتر جنتامایسین استفاده شد. محیط های کشت شده در انکوباتور دارای ۷/۵ درصد CO_2 به مدت ۴۸ ساعت و مطابق روش های ارائه شده آنکوبه شدند(۱۳ ، ۱۶). باکتری خالص شده را به ۵ میلی لیتر محیط کشت براث عصاره مغز و قلب (BHI) منتقل و پس از ۲۴ ساعت نگه داری در ۳۷ درجه سانتی گراد برای استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفت.

استخراج DNA:DNA باکتری ها پس از ۲۴ ساعت کشت در محیط براث BHIبه روش فنل و کلروفرم استخراج شد. روش استخراج به اختصار شامل مراحل لیز سلولی، ترسیب پروتئین و تخلیص DNA و به شرح ذیل بود که ابتدا یک میلی لیتر از هر نمونه و به مدت ۵ دقیقه در rpm ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شد. برای لیز باکتری هم حجم نمونه بافر لیز کننده سلول(۱۰mM Tris-HCl،PH=۸ ۱mM EDTA، PH=۸ و ۰/۱٪ SDS) اضافه و نمونه ها برای مدت ۲۰ تا ۳۰ ثانیه ورتکس شدند. در مرحله بعد پروتئیناز K (۲۰ mg/ml) به میزان ۲/۵ میکرولیتر و لیزوزیم (۱۰ mg/ml) به میزان ۳۰ میکرولیتر اضافه و به

مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. به منظور رسوب کردن پروتئین به میزان ۴۵۰ میکرولیتر فنل و ۴۵۰ میکرولیتر کلروفرم را به میکروتیوپ ها اضافه و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ گردید. مایع رویی را جدا و داخل یک تیوپ جدید منتقل و به هم حجم نمونه ایزوپروپانول (الکل ۱۰۰٪) سرد اضافه وسپس به مدت ۱۰ دقیقه در rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ گردید. پس از دور ریختن مایع رویی برای شستشوی DNA الکل ۷۵٪ اضافه , سپس به مدت ۵ دقیقه در rpm ۱۴۰۰۰ سانتریفوژ شد. مایع رویی را خارج کرده و DNA حاصل خشک و سپس در بافر Elution Buffer حل و تا زمان آزمایش PCR در ۴ درجه سانتی گراد نگه داری شد.

بررسی کیفی DNA ژنومیک: به منظور بررسی کیفیت DNA ژنومیک استخراج شده خلوص نمونه حاصل با دستگاه نانو دراپ سنجیده شد.

پرایمرها: در این مطالعه یک جفت پرایمر اختصاصی رفرانس *ORT* به نام های OR16S-F1 و OR16S-R1 با توالی ذیل مورد استفاده قرار گرفت.

OR16s-F1:

5′-GAGAATTAATTTACGGATTAAG

OR16s-R1:

5′-TTCGCTTGGTCTCCGAAGAT

آماده کردن مخلوط اصلی(Master Mix): در هر بار آزمایش PCR با احتساب تمام نمونه های مورد آزمایش مخلوط اصلی محاسبه و تهیه می گردد. در این مطالعه حجم هر نمونه واکنش PCR، ۲۵ میکرو لیتر در نظر گرفته شد و حجم هر کدام از اجزا مخلوط برای هر نمونه شامل بافر PCR ۲/۵ میکرو لیتر، کلرید منیزیم ۱/۵ میکرو لیتر، مخلوط داکسی نوکلئوزید تری فسفات ۰/۸ میکرو لیتر، هر کدام از پرایمرها ۲ میکرو لیتر، آنزیم Taq polymerase ۰/۴ میکرو لیتر، DNA الگو ۲ میکرو لیتر و آب مقطر استریل ۱۵/۸ میکرو لیتر بود.

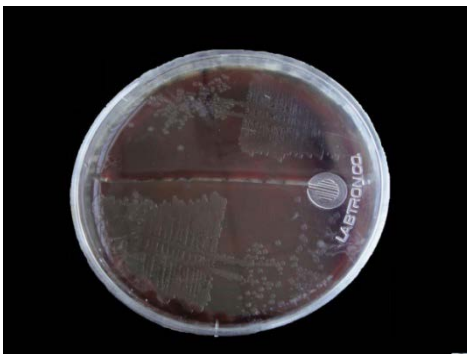
برنامه سیکل حرارتی دستگاه ترموسایکلر: مخلوط واکنش PCR به منظور واسرشت اولیه و تفکیک دو رشته DNA به مدت ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت. سپس سیکل های متوالی شامل مرحله واسرشت ۱ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد مرحله اتصال شامل ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه در ۵۲ درجه سانتی گراد و مرحله ساخت شامل ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی گراد به تعداد ۳۴ سیکل و در انتها یک مرحله ساخت پایانی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد همگی در دستگاه ترموسایکلر تنظیم شده بود.

الکتروفورز محصول PCR: محصول PCR به نسبت ۵ به ۱ با بافر Loading مخلوط و به گودی های تعبیه شده در ژل آگارز یک درصد و حاوی اتیدیوم بروماید منتقل شدند. مارکر ۱kb DNA Ladder هم در گوده مشخصی ریخته شد. در این آزمایش ژل با ولتاژ ۱۰۰ ولت الکتروفورز گردید و پس از آن ژل به دستگاه GELDOC انتقال و با اشعه UV بررسی گردید و در خاتمه با استفاده از دوربین متصل به دستگاه عکسبرداری از ژل انجام شد.

توالی یابی: محصول حاصل از PCR برای تعیین توالی به شرکت تکاپو زیست فرستاده شد و توالی این قطعات مشخص گردید.

یافته ها

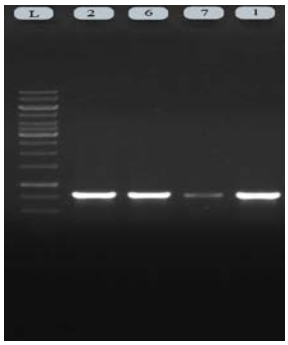
کشت تمام نمونه های مشکوک به ORT که آزمایش های بیوشیمیایی آنها در موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی انجام شده بود مثبت بود و پس از ۴۸ ساعت کلنی های ریز خاکستری تا خاکستری مایل به سفید، مدور و محدب روی محیط ایجاد کرد(تصویر ۱).



تصویر۱ - کشت *ORT* روی بلاد آگار

DNA استخراج شده در اندازه گیری با نانو دراپ نشان داد که از کیفیت خوبی برای انجام آزمایش های مولکولی برخوردار است. محصول PCR بدست آمده از ۱۵ نمونه مورد آزمایش , باندی

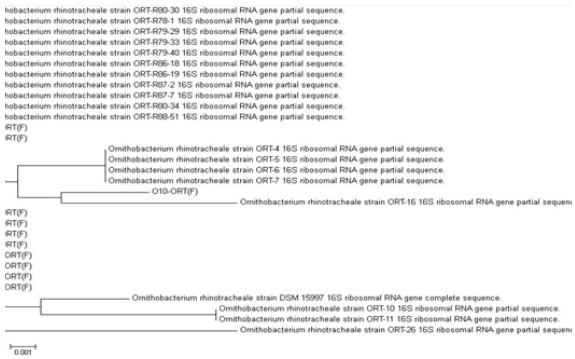
حدود bp ۷۸۴ را بر روی ژل ۱ درصد ایجاد کرد که نشان دهنده تکثیر ژن 16S rRNA در تمام نمونه ها است (تصویر۲).



تصویر ۲- تصویر قطعه ۷۸۴ جفت بازی ژن 16S rRNA: نمونه های ۲،۶،۷و۱ باکتری *ORT*. چاهک اول از سمت چپ 1Kb ladder.

نتایج تعیین توالی این نمونه ها با توالی های موجود در NCBI توسط نرم افزار BioEdit مقایسه شد که شباهت ۹۸-۱۰۰ درصد را با سویه های اورنیتو باکتریوم رینوتراکئال نشان داد. سپس توالی های بدست آمده با توالی های موجود در Gen-Bank در نرم افزار MEGA ۵ قرار داده شد و درخت فیلوژنی آنها رسم شد (تصویر ۳).

نتایج PCR تعیین توالی شده و نتایج تعیین توالی همه سویه ها توسط نرم افزار BioEdit مقایسه شد. نتایج مقایسه توالی در هر ۱۵ نمونه مشابه گزارش شد.



تصویر ۳- درخت فیلوژنی سویه های *ORT*

بحث

نکته قابل توجه در مورد بیماری های تنفسی که در ارتباط با طیور می باشند این است که علائم کلینیکی اکثر بیماری ها شبیه به هم بوده و باعث ایجاد یک سری علائم مشترک می گردند اما عوامل ایجاد کننده بیماری از لحاظ جنس و گونه می توانند متفاوت باشند. مثلا در عفونت های تنفسی چند گانه در طیور چندین باکتری از جنس پاستورلا (پاستورلا آناتی پستی فر[۱] - پاستورلا مولتوسیدا[۲] - پاستورلا گالیناروم[۳] - پاستورلا همولیتیکا[۴])، بوردتلا (بوردتلا آویوم[۵]) و هموفیلوس (هموفیلوس پاراگالیناروم[۶]) دخالت دارند. اشرشیاکلی[۷] با عفونت تنفسی در مرغ ارتباط دارد (۱۵).

به طور معمول از علائم بالینی، کشت و تست های میکروبیولوژی برای تشخیص اولیه عامل بیماری و در ادامه جهت تایید تشخیص از روش های مولکولی استفاده می شود.

در مطالعه حاضر با استفاده از PCR و پرایمرهای ژن16S rRNA و مقایسه توالی های تکثیر شده با توالی های موجود در GenBank نشان داد که اولا تمام ایزوله های جدا شده در استان مرکزی دارای توالی اسید نوکلیئک مشابه هستند و با در صد بالایی(۱۰۰-۹۸) با گونه اورنیتو باکتریوم رینوتراکئال شباهت دارند که می توانند مبین گونه شایع اورنیتو باکتریوم در مرغداری های استان مرکزی باشد.

منصور بنانی و همکاران در تحقیقی شناسایی *ORT* به روش PCR را با روش کشت مقایسه کردند و بر اساس نتایج به دست آمده نشان دادند که PCR می تواند برای شناسایی مطمئن و سریع *ORT* در نمونه های مشکوک استفاده شود، اما بهتر است که به منظور به حداکثر رساندن اطمینان تشخیص با روش کشت توام باشد (۲).

در مطالعه Roussan و همکاران که یک مطالعه مقطعی از نوامبر ۲۰۰۲ تا جولای ۲۰۰۸ در گله های گوشتی در جنوب و شمال اردن برای تعیین شیوع *ORT* و مایکوپلاسما سینوویه بود نمونه ها از نای جوجه های گوشتی با علائم تنفسی جمع آوری شده بود و تست PCR روی آن ها انجام شد که در مجموع ۲۱٪ از گله های گوشتی برای *ORT* و ۲۵٪ برای مایکوپلاسما سینوویه مثبت بود. در مناطق جنوبی شیوع گله هایی با نمونه های مثبت از *ORT* ۱۶٪ و مایکوپلاسما سینوویه ۱۰٪ بود. در مناطق شمالی شیوع *ORT* ۲۶٪ و مایکوپلاسما سینوویه ۴۰٪ بود. از گله های مورد آزمایش ۷٪ به طور همزمان به *ORT* و مایکوپلاسما سینوویه آلوده بودند (۱۷).

در مطالعه محمد حسن زاده و همکاران که هدف از این مطالعه

۱ *Pastorella anatipestifer*
۲ *Pastorella multocida*
۳ *Pastorella galinarum*
٤ *Pastorella haemolytica*
٥ *Bordetell avium*
٦ *Haemophilus paragalinarum*
۷ *E.coli*

جداسازی *ORT* از گله های گوشتی ایران بر اساس تست های بیوشیمیایی، PCR و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی بوده است در کل ۱۵۰ نمونه سوآپ از جوجه های گوشتی از کشتارگاه ها جمع آوری شد, علاوه بر این ۱۵۰ نمونه از ریه و ۱۵۰ نمونه از بافت نای جوجه های مرده با علائم تنفسی جمع آوری شد. برای آزمایش PCR از ایزوله های *ORT* ابتدا DNA آن ها استخراج شد. این باکتری از ۱ نمونه از ۱۵۰ نمونه برداشته شده توسط سوآپ جدا شد و ۳ باکتری از ۳۰۰ نمونه حاصل از بافت جدا شد. این ۴ باکتری تحت آزمایشات PCR قرار گرفتند و در نهایت با تجزیه و تحلیل ژن ۱۶S rRNA از باکتری های جداشده و مقایسه آن با توالی این ژن در GenBank شباهت ۹۸٪ تا ۱۰۰٪ مشاهده شد (۱۲).

در مطالعه عباس دوستی و همکاران شیوع *ORT* در بین بوقلمون ها در استان اصفهان بررسی شد. در این مطالعه DNA از ۳۷۵ نمونه سوآپ تهیه شده از نمونه های نای و ریه استخراج شد و توسط پرایمرهای اختصاصی ژن۱۶S rRNA با استفاده از تکنیک PCRتکثیر داده شد. DNA باکتری *ORT* در ۷۵ نمونه (۱۹/۹۳٪) از بوقلمون های گوشتی در استان اصفهان تشخیص داده شد. نتایج این مطالعه شیوع گسترده از *ORT* را در بوقلمون های گوشتی نشان داد و شیوع بالای این باکتری را در ایران تایید می کند (۹).

در مطالعه شریف زاده و همکاران شیوع *ORT* در گله های گوشتی جنوب غربی ایران بررسی شد. از ۲۳۰ سوآپ نای و نمونه های ریه گرفته شده باکتری *ORT* در ۶۳ نمونه از جوجه های گوشتی (۲۷/۳۹٪) تشخیص داده شد. نتایج این مطالعه شیوع گسترده *ORT* را در جوجه های گوشتی در جنوب غربی ایران نشان می دهد (۱۸).

نتیجه گیری

نتایج این پروژه نشان می دهد که باکتری اورنیتو باکتریوم رینوتراکئال می تواند گونه غالب باکتری اورنیتو باکتریوم در مرغداری های استان مرکزی باشد و لازم است جهت ساخت واکسن مورد توجه قرار گیرد.

سپاسگزاری

نویسندگان از کارکنان محترم موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه اراک و اداره کل دامپزشکی که در انجام این پروژه همکاری داشته اند تشکر و قدردانی می نمایند.

منابع:

۱- اسدپور ی، بزرگمهری فرد م ح، پوربخش س ع، بنانی م، چرخکار س. بررسی سرولوژی، جداسازی و حساسیت آنتی بیوتیکی اورنیتو باکتریوم رینوتراکئال در گله های مرغ مادر گوشتی استان گیلان. مجله دامپزشکی ایران ،۱۳۸۷؛ سال اول، شماره چهارم: ۲۱-۱۴.

۲- بنانی م، پوربخش ع، آرمی م، غلامین ف، فاتح منش م. شناسایی اورنیتو باکتریوم رینوتراکئال به روش واکنش زنجیره ای پلیمراز .(PCR) مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۸۸؛ سال دوم، شماره یک: ۴۱-۴۵.

۳- جمشیدیان م، میاحی م. جداسازی اورنیتو باکتریوم رینوتراکئال (ORT)از ماکیان گوشتی شهرستان اهواز. مجله دامپزشکی ایران، ۱۳۸۷؛ دوره ۴، شماره ۴: ۳۶-۲۹.

۴- حقیقی خوش خو پ، اکبری آزاد گ، مسعودیان ع، روایی پ، بررسی شیوع سرمی عفونت اورنیتو باکتریوم رینوتراکئال در تعدادی از مزارع پرورشی بوقلمون گوشتی ایران. مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی، ۱۳۸۹؛ شماره ۱۰.

۵- زمانی مقدم ع، طهماسبی ح، هاشمی باباحیدری س ح، خسروی فارسانی م، کیانی سلمی ع. جستجوی مولکولی Ornithobac-terium rhinotracheale در موارد عفونت های تنفسی ماکیان شهرکرد. نشریه دامپزشکی پژوهش و دامپزشکی، ۱۳۹۱؛ شماره ۹۶: ۴۱-۴۴.

۶- قائم مقامی ش، یوسفی ج، نیرومند ح، منصفی ع، احمدلو س. بررسی شیوع اورنیتو باکتریوم رینوتراکئال در گله های مرغ گوشتی مبتلا به عوارض تنفسی در استان مرکزی. مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۸۶؛ دوره ۶۲ ، شماره ۵: ۲۹۷-۳۰۰.

۷- نیک پیران ح، عباسی باهنر ش، بیژن زاد پ، تقوی ملایی م. بررسی سرولوژیکی عفونت اورنیتو باکتریوم رینوتراکئال در گله های گوشتی استان اردبیل. مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، ۱۳۹۰؛ دوره ۵، شماره ۴ ، ۱۳۶۳-۱۳۶۸.

8. De Haro-cruz MJ, Ixta-avila L, Guerra-infante FM. Adherence of five serovars of Ornithobacterium rhinotracheale to chicken tracheal epithelial cells. Br Poul sci, 2013; 54 (4): 425–429.

9. Doosti A, Sharifzadeh A, Ghasemi H, Vaez J. Molecular identification of Ornithobacterium rhinotracheale in turkeys in Isfahan province of Iran. Afr J Biotechnol, 2011; 10 (40): 7911-7914.

10. Erganis O, Hadimli HH, Kav K, Sayin Z. Phenotypic and molecular characterization of strains of Ornithobacterium rhinotracheale isolated from poultry in Turkey. Afr J Microbiol Res, 2013; 7 (2): 82-88.

11. Ghanbarpour R, Salehi M. Sero-prevalence and identification of Ornithobacterium rhinotracheale in broiler flocks in south-eastern Iran. Trop Anim Health Prod, 2009; 41: 1679–1683.

12. Hassanzadeh M, Karrimi V, Fallah N, Ashrafi I. Molecular characterization of Ornithobacterium rhinotracheale isolated from broiler chicken flocks in Iran.Turk J Vet Anim Sci, 2010; 34 (4): 373-387.

13. Louisa B, Tabatabai AC, Mandy K, Zimmerli B, Emilie S, Zehr ARE. Ornithobacterium rhinotracheale North American Field Isolates Express a Hemolysin-Like Protein. Avian Dis, 2010; 54: 994-1001.

14. Mirzaie S, Hassan zadeh M, Bozorgmehri Fard MH, Banani M. Isolation and characterization of Ornithobacterium rhinotracheale in the commercial turkey, quail flocks and domestic pigeons by

bacteriological and molecular methods. Arch Razi Inst, 2011; 66(2): 121-127.

15. Murthy K, Dorairajan N, Balasubramaniam GA, Dinakaran AM, Saravanabava K. Pathogenic bacteria related to respiratory diseases in poultry with reference to Ornithobacterium rhinotracheale isolated in India. Veterinarski Arch, 2008; 78(2): 131-140.

16. Rahimi M, Banani M. Isolation of Ornithobacterium rhinotracheale from the chickens of a broiler farm in Kermanshah province, west of Iran. Iran J Vet Res, 2007; 4(21): 355-359.

17. Roussan DA, Al-Rifai RH, Khawaldeh GY, Totanji WS, Shaheen I. Ornithobacterium rhinotracheale and Mycoplasma synoviae in broiler chickens in Jordan Rev sci tech, 2011; 30 (3): 931-937.

18. Sharifzadeh A, Doosti A, Ghasemi H. Prevalence of Ornithobacterium rhinotracheale at broiler chicken farms in south west Iran. Bulg J Vet Med, 2011; 14 (3): 179-183.