

ردیابی مولکولی اورنیتوباکتریوم رینوتراکتال (ORT) و ویروس نیوکاسل در شترمرغ‌های استان اصفهان

عباس علی شعبانی^۱، مجید غلامی آهنگران^{۲*}، حسن ممتاز^۳

۱- دانش‌آموخته دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۲- دانشیار بخش بیماری‌های طیور، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۳- استاد بخش میکروبی‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات: mgolamia1388@yahoo.com

(دریافت مقاله: ۹۶/۲/۳ پذیرش نهایی: ۹۶/۵/۴)

چکیده

با هدف شناسایی باکتری اورنیتوباکتریوم رینوتراکتال (ORT) و ویروس نیوکاسل در تلفات حاد شترمرغ، ۴۰ نمونه نای از ۲۲ گله شترمرغ واجد تلفات از نقاط مختلف استان اصفهان با ثبت تاریخچه جمع‌آوری شد. پس از استخراج RNA و DNA از بافت با کیت ترانس‌کریپتاز معکوس cDNA تهیه شد. DNA استخراج‌شده با پرایمرهای اختصاصی جهت تکثیر ژن 16srRNA باکتری ORT مورد ارزیابی قرار گرفت و cDNA تهیه‌شده با پرایمرهای اختصاصی ژن M نیوکاسل تکثیر شد. ژن 16srRNA در کنترل مثبت به‌خوبی تکثیر شد و قطعه ۷۸۴ جفت بازی به‌دست آمد اما در هیچ‌کدام از نمونه‌های اخذشده، قطعه مورد نظر تکثیر نشد. علاوه بر آن، در ۲۴ نمونه از ۴۰ نمونه جمع‌آوری شده (۶۰ درصد)، قطعه ۱۰۹۷ جفت بازی ژن M ویروس نیوکاسل تکثیر شد. از مجموع ۲۲ گله مورد بررسی با مرگ حاد، ۱۵ گله یا به‌عبارتی ۶۸/۱۸ درصد گله‌ها آلوده به ویروس نیوکاسل بودند. با توجه به نتایج این مطالعه می‌توان بیان داشت که در حال حاضر آلودگی با ORT در گله‌های شترمرغ در استان اصفهان منتفی است، اما ویروس نیوکاسل سهم بالایی در ایجاد تلفات حاد در گله‌های شترمرغ دارد.

کلیدواژه‌ها: اورنیتوباکتریوم رینوتراکتال، ویروس نیوکاسل، PCR، شترمرغ، اصفهان.

مقدمه

اورنیتوباکتریوم رینوتراکتال (ORT) یک باکتری گرم منفی، پلئومورف و غیرمتحرک است که همراه با بروز علائم تنفسی، کاهش رشد، کاهش تولید تخم و افزایش مرگ‌ومیر و حذف کشتارگاهی از بوقلمون و ماکیان جدا شده است (Van Empel and Hafez, 1999). این باکتری اولین بار توسط وندام و همکاران در سال ۱۹۹۴، اورنیتوباکتریوم رینوتراکتال نامیده شد (Vandamme et al., 1994). عامل بیماری از طریق افقی و عمودی و به شکل مستقیم و غیرمستقیم گسترش می‌یابد (Chin et al., 2013).

عفونت‌های ناشی از باکتری اورنیتوباکتریوم باعث بروز علائم تنفسی ملایم در بوقلمون و سایر پرندگان می‌گردد. نشانه‌های بالینی این بیماری شامل سینوزیت، ذات‌الریه چرکی، آماس نای، عفونت‌های کیسه‌های هوایی و پریکاردیت می‌باشد. این باکتری می‌تواند سبب مرگ ناگهانی پرندگان جوان در خلال عفونت مغز و جمجمه گردد (Van Empel and Hafez, 1999).

حضور اورنیتوباکتریوم رینوتراکتال در مرغ و بوقلمون با روش‌های مختلف سرولوژی و مولکولی در ایران و سایر کشورهای تولیدکننده طیور گزارش شده است. با توجه به علائم تنفسی و حرکتی در گله‌های شترمرغ در استان اصفهان شناسایی این عامل در گله‌های شتر مرغ ضروری به نظر می‌رسد، تا ضمن اتخاذ استراتژی پیشگیرانه در گله‌های شترمرغ در جهت کنترل این بیماری و جلوگیری از انتشار این باکتری به گله‌های مرغ و بوقلمون اقدامات بهداشتی و مدیریتی مناسب اخذ شود.

ویروس عامل بیماری نیوکاسل از خانواده Paramyxoviridae است. ۹ سرووار از پارامیکسوویروس در پرندگان شناسایی شده است که در بین آن‌ها ویروس بیماری نیوکاسل (APMV-1) در پرندگان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Miller and Koch, 2013). این بیماری هم‌زمان با ورود طیور به ایران وارد شده است و به شکل بومی در ایران وجود دارد. این بیماری به فرم‌های عصبی، گوارشی و تنفسی در مزارع پرورشی طیور مشاهده می‌گردد که گاهاً با انجام واکسیناسیون‌های گسترده با واکسن‌های زنده و کشته، شواهدی از بیماری مشاهده می‌شود. اگرچه این بیماری در مزارع پرورشی ماکیان، بوقلمون و سایر گونه‌های صنعتی طیور با استفاده از واکسن‌های زنده و کشته تا حدودی کنترل می‌گردد اما در گله‌های شترمرغ برنامه منظم و مدونی برای واکسیناسیون علیه این بیماری وجود ندارد و برنامه واکسیناسیون در این گونه به شکل کاملاً سلیقه‌ای اجرا و اعمال می‌گردد. اگرچه بیماری‌زایی نیوکاسل به شکل آزمایشگاهی و مولکولی برای گله‌های شترمرغ ثابت شده است (Ghalianchi-Langeroudi et al., 2011)، اما تاکنون نقش این عامل بیماری در ایجاد تلفات حاد در مزارع پرورشی شترمرغ به‌خوبی مشخص نشده است. لذا، در این مطالعه به بررسی نقش عامل بیماری نیوکاسل در زمین‌گیری و مرگ‌ومیر حاد و ناگهانی شترمرغ‌ها در استان اصفهان مورد بررسی قرار می‌گیرد.

مواد و روش‌ها**- نمونه گیری**

از زمستان ۲۰۱۴ تا زمستان ۲۰۱۵ جمعاً ۴۰ نمونه نای از ۲۲ گله شترمرغ واجد تلفات که عمدتاً مرگ حاد را به دنبال زمین‌گیری نشان، می‌دادند از نقاط مختلف استان اصفهان با ثبت تاریخچه جمع‌آوری شد. نمونه‌ها از شترمرغ‌های زیر یک ماه تا شترمرغ‌های ۱۴ ماهه جمع‌آوری گردید و از هر گله یک تا سه نمونه نای بسته به میزان تلفات نمونه‌گیری شد. نمونه‌های نای پس از جمع‌آوری در کنار یخ منتقل شد و تا زمان انجام آزمایش در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

- استخراج DNA از نمونه‌های بافتی

استخراج DNA با استفاده از کیت ساخت شرکت سینا ژن ایران (DNP™ Kit) طبق دستورالعمل کیت انجام شد.

- استخراج RNA

RNA ویروس نیوکاسل از بافت نای با استفاده از کیت تخلیص RNA مطابق دستورالعمل کیت استخراج شد (Roche, High Pure Viral Nucleic Acid Kit).

- ساخت cDNA (ترانس کریپتاز معکوس)

جهت ساخت cDNA از نمونه‌های RNA استخراج شده، از کیت Accu Power RT Pre Mix شرکت BIONEER استفاده شد و مراحل طبق دستورالعمل کیت انجام گردید. ۱۵ میکرولیتر DEPC-Water، ۱ میکرولیتر Random Hexamer و ۳ میکرولیتر از RNA مربوطه به هر نمونه در دستگاه ترموسایکلر (Mastercycler Gradient Eppendorf, Germany) در دو سیکل دمایی ۴۲ درجه سانتی‌گراد، ۶۰ دقیقه و ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۵ دقیقه انکوبه شد.

- تکثیر ژن 16S rRNA/اورنیوباکتریوم رینوتراکئال

پرایمرها بر اساس ژن 16S ribosomal RNA باکتری OR16S و مطابق توالی منتشرشده به صورت OR16S-3' F1:5'-GAGAATTAATTTACGGATTAAG- و OR16S-R1:5'-TTCGCTTGGTCTCCGAAGAT- جهت سنتز شد (Van Empel and Hafez, 1999). جهت انجام آزمایش PCR و تکثیر ژن مورد نظر با طول قطعه حدود ۷۸۴ جفت بازی از دستگاه ترموسایکلر (Mastercycler Gradient Eppendorf, Germany) با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱ میکروگرم نمونه DNA و ۱ میکرولیتر از هر پرایمر، ۲ میکرولیتر منیزیم کلراید و ۲۰۰ میکرولیتر از dNTP و ۲/۵ میکرولیتر از بافر 10x و ۱ میکرولیتر از آنزیم Taq پلی‌مراز بود (Fermentas, Germany). واکنش PCR در شرایط دمایی زیر انجام شد.

برنامه حرارتی مورد استفاده شامل یک سیکل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و ۴۵ سیکل تکراری شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد در ۳۰ ثانیه همسرشت‌سازی در دمای ۵۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه و گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه انجام شد. این بررسی از واکنش Nobilis OR inac (واکسن کشته ارنیوباکتریوم رینوتراکئال سروتیپ A، Intervet، هلند) به عنوان کنترل مثبت و از آب دو بار تقطیر استریل به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

- تکثیر ژن M ویروس نیوکاسل

به منظور تکثیر ژن M ویروس نیوکاسل از پرایمر منتشرشده استفاده شد (Wehmann et al., 1997). جزئیات پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ آمده است. برای انجام آزمون PCR، محلول واکنش در حجم

برنامه حرارتی برای تکثیر ژن M عبارت بود از یک سیکل ۹۵ درجه ۴ دقیقه، ۳۵ سیکل تکراری ۹۴ درجه ۶۰ ثانیه، ۵۸ درجه ۶۰ ثانیه، ۷۲ درجه ۸۰ ثانیه و یک سیکل انتهایی ۷۲ درجه ۱۰ دقیقه. در این واکنش از واکسن زنده لاسوتا (موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی، ایران) به منظور کنترل مثبت و از آب دوبار تقطیر استریل به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

۲۵ میکرولیتر تهیه شد که شامل ۲ میکرولیتر Pcr Buffer 10x، ۰/۸ میکرولیتر 50mM Mgcl2، ۰/۴ میکرولیتر 10mM dNTP Mix، ۱۶/۸ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۱ میکرولیتر از هر یک از زوج پرایمرهای R و F، ۳ میکرولیتر از cDNA و ۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase می‌باشد.

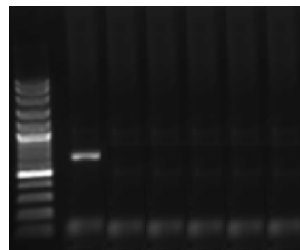
جدول ۱- مشخصات پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن M نیوکاسل

نام پرایمر	طول محصول	توالی
ND (M)-F	1097	5`_TCT AGG ACA ATT GGG CTG TAC TTT GAT T_3`
ND (M)-R	1097	3`_AGA GAC GCA GCT TAT TTC TTA AAA GGA TTG_5`

یافته‌ها

- آلودگی با اورنیتوباکتریوم رینوتراکنال

اگرچه ژن 16srRNA در کنترل مثبت به خوبی تکثیر شد و قطعه ۷۸۴ جفت بازی به دست آمد (شکل ۱) اما در هیچکدام از نمونه‌های اخذشده قطعه مورد نظر تکثیر نشد.

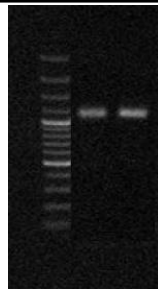


شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR (ستون ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی سیناژن، ستون ۲: قطعه ۷۸۴ جفت بازی ژن 16srRNA کنترل مثبت، ستون ۳: کنترل منفی، ستون ۴ تا ۷: نمونه‌های منفی).

- آلودگی با نیوکاسل

آلوده به ویروس نیوکاسل می‌باشد. از مجموع ۲۲ گله مورد بررسی با مرگ حاد، ۱۵ گله یا به عبارتی ۶۸/۱۸ درصد گله‌ها آلوده به ویروس نیوکاسل بودند.

در ۲۴ نمونه از ۴۰ نمونه جمع‌آوری شده، قطعه ۱۰۹۷ جفت بازی ژن M ویروس نیوکاسل تکثیر شد (شکل ۲). به عبارتی، ۶۰ درصد نمونه‌های اخذشده



شکل ۲- الکتروفورز محصول PCR (ستون ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی سیناژن، ستون ۲: قطعه ۱۰۹۷ جفت بازی ژن M ویروس نیوکاسل در کنترل مثبت، ستون ۳: قطعه ۱۰۹۷ جفت بازی ژن M ویروس نیوکاسل در نمونه مثبت).

بحث و نتیجه گیری

بسیار زیادی در زمینه شناسایی ORT در گلهای طیور در ایران انجام شده است، اما در اکثر موارد با هدف شناخت اپیدمی این بیماری در گلهای ماکیان و بوقلمون در استانهای مختلف کشور بوده است. در شناخت وضعیت آلودگی با ORT در سایر گونههای پرندگان مطالعات اندکی صورت گرفته و اکثر این مطالعات مربوط به خارج از کشور بوده است. در ایران تنها یک گزارش وجود دارد که به بررسی آلودگی با ORT در کبوتران تلف شده و کبک و بلدرچینهای بدون تاریخچه و کشتار شده می‌پردازد (Mirzaei et al., 2011).

در مطالعات خارج از کشور، ORT در برخی گونههای دیگر به جز ماکیان و بوقلمون مورد بررسی قرار گرفته است. در یک مطالعه در ترکیه به توصیف عفونت تجربی ORT در بلدرچین پرداختند و نشان دادند که عفونت ORT در بلدرچین همانند ماکیان باعث جراحات تنفسی می‌گردد (Eroksuz et al., 2006). علاوه بر آن، گزارشی مبنی بر آلودگی یک کبک مبتلا به اوتیت با علائم عصبی به باکتری ORT در اسپانیا وجود دارد (Moreno et al., 2009). قبل از آن در اسپانیا، آلودگی ORT در یک قرقاول با علائم تنفسی تشریح شده بود (Pages et al., 1995). در پرندگان

بیماری اورنیتوباکتریوم یک بیماری باکتریایی است که در ایجاد ضایعات تنفسی و اندامهای حرکتی در اکثر گونههای پرندگان نقش عمده‌ای دارد (Van Empel and Hafez, 1999). اگرچه این بیماری عمدتاً در بوقلمون‌ها و ماکیان مورد بررسی قرار گرفته است، اما شواهد بالینی و گزارشات پراکنده‌ای از رخداد این بیماری در برخی گونههای دیگر پرندگان نیز وجود دارد (Chin et al., 2013). در خصوص بیماری‌زایی این باکتری در پرندگان شک و شبهات زیادی وجود دارد برخی محققین از این عامل به عنوان یک عامل ثانویه نام برده‌اند، اما مطالعات اخیر نشان می‌دهد که ORT می‌تواند به عنوان یک عامل اولیه بیماری‌زا مطرح باشد (Van Empel and Hafez, 1999). علائم این بیماری در پرندگان بسیار متنوع است. در اغلب موارد عفونت ORT به صورت پنومونی یک‌طرفی یا دوطرفی همراه با آگزودای فیبرینی و تراکئیت حقیف تا شدید، التهاب فیبرینی-چرکی کیسه‌های هوایی، تورم کبد و طحال، استحاله عضله قلب و عفونت مفاصل و مهره‌ها جلب نظر می‌کند (Chin et al., 2013).

آلودگی با ORT از اکثر کشورهای دارای صنعت طیور در ماکیان و بوقلمون گزارش شده است. مطالعات

است، نقش ندارد. به هر حال با توجه به باقی ماندن باکتری برای مدت یک الی دو هفته در نای و سپس پاک شدن از سیستم تنفسی، برای ارزیابی امکان آلودگی و یا حساسیت شترمرغ به این عامل مطالعات جامع تری مورد نیاز است.

بیماری نیوکاسل در شترمرغ اولین بار در دهه ۱۹۵۰ در شترمرغ‌های باغ وحش شناسایی شد که با علائم عصبی و افسردگی مشخص شد (Alexander, 2000). اولین مورد بیماری نیوکاسل در شترمرغ‌های صنعتی به گزارشی از اسرائیل برمی‌گردد که در این واگیری ۱۳ مورد از ۴۶ شترمرغ با سن ۵ تا ۹ ماه (۲۸ درصد) به دنبال بروز علائم عصبی تلف شدند (Samberg et al., 1989). بعد از آن در گزارش دیگری به توصیف علائم عصبی در شترمرغ‌های مبتلا به نیوکاسل پرداخته شد (Huchzermeyer and Gerdes, 1993). در مطالعه دیگری در زیمباوه وضعیت سرمی ۹ مزرعه پرورشی شترمرغ بررسی شد که در آن زمان ۲۳ درصد شترمرغ‌ها واجد تیترا سرمی علیه ویروس نیوکاسل بودند و میزان شیوع سرمی در این مزارع پرورشی از ۵۰ تا ۶۰ درصد متغیر بود (Cadman et al., 1997).

در ایران، هم‌زمان با ورود شترمرغ در نیمه دوم دهه ۱۹۹۰ شواهد بالینی از این بیماری مشخص شد و بررسی شاخص‌های ICPI و MDT ویروس جدا شده از مزارع پرورشی شترمرغ در سال‌های ۲۰۰۸-۲۰۱۰ حاکی از بیماری‌زایی بالای این ویروس بوده است (Ghiamirad et al., 2010). علاوه بر آن، در مطالعه دیگری به توالی ناحیه تقسیم ژن F ویروس نیوکاسل جدا شده از گله‌های شترمرغ پرداخته و از نظر مولکولی نیز بیماری‌زایی بالای این ویروس مسجل شده است

آزادزی تنها یک مورد واگیری ORT در جوجه شاهین‌های با علائم التهاب کیسه هوایی گزارش شده است (Hafez and Michael, 2010).

در مورد بررسی آلودگی به ORT در شترمرغ مطالعه مستندی صورت نگرفته است. قبلاً حساسیت شترمرغ‌ها در برنامه نظارت بر سلامت حیوانات در جنوب آفریقا بیان شده است (Anonymous, 2000) به گونه‌ای که در اکثر گزارشات مروری به این گزارش استناد نموده‌اند و شترمرغ را به عنوان یک پرنده مستعد به عفونت ORT بیان کرده‌اند، اما این گزارش جنبه علمی کافی ندارد و بدون مولف و بی‌نام منتشر شده است. اما، لی و همکاران در سال ۲۰۰۰ به بررسی وضعیت آلودگی سرمی در شترمرغ‌های کشتار شده در ایالات اوهایو و ایندیانا در آمریکا پرداختند و با تهیه ۱۶۳ نمونه سرمی و بررسی آلودگی با تست آگلوتیناسیون بر روی پلیت، گزارش کردند که هیچ مورد مثبت از آلودگی با ORT وجود نداشته است (Ley et al., 2000). طبق اطلاعات موجود، تاکنون گزارش دیگری از وجود یا عدم وجود آلودگی ORT در شترمرغ منتشر نشده است.

در مطالعه اخیر مبنای شناسایی آلودگی به ORT ردیابی ژن 16SrRNA در نای بوده است. با توجه به مطالعات مشابه در ماکیان (Van Empel and Hafez, 1999)، به نظر می‌رسد بهترین مکان انتخابی برای کلونیزه شدن ORT ارگان‌های تنفسی به‌ویژه نای و ریه باشد. لذا در مطالعه حاضر برای بالا بردن درصد اطمینان در شناسایی موارد مثبت، تمامی نمونه‌های نای به شکل مجزا مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد ORT در شکل‌گیری تلفات حاد شترمرغ در آن برهه از زمان که نمونه‌گیری انجام شده

بروز بیماری شود. به طوری که در مطالعه اخیر ۱۰۰ درصد شترمرغ‌هایی که تا سن یک ماهگی واکسن را دریافت نکرده‌اند، در این سن درگیر بیماری نیوکاسل شده‌اند و حتی در مواردی در سن کمتر از یک ماهگی نیز ویروس نیوکاسل ردیابی شده است. قبلاً نیز بیان شده که بیماری نیوکاسل می‌تواند در مزارع پرورشی غیرواکسینه باعث ۸۰ درصد تلفات شود (Shanawany, 1999).

بررسی مزارع پرورشی نشان می‌دهد درصد ابتلا به نیوکاسل در مزارع پرورشی واکسینه نیز قابل توجه است. عدم وجود یک اصول مشخص در روش، زمان و حتی دوز مصرف واکسن نیوکاسل در شترمرغ گاهاً موجب شکست واکسیناسیون شده است. لذا، به نظر می‌رسد با توجه به شیوع بالای نیوکاسل در مزارع پرورشی شترمرغ و از طرفی تأیید بیماری‌زایی بالای این ویروس در مطالعات قبلی، لازم است رهیافت‌های مناسب واکسیناسیون علیه این بیماری طراحی و به مرحله اجرا گذاشته شود.

سپاسگزاری

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از تمامی همکاران دامپزشک و شترمرغ‌داران محترم استان اصفهان که در انجام این تحقیق ما را مساعدت کردند تشکر نمایند. ضمناً نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافی ندارند.

(Ghalyanchi-Langeroudi *et al.*, 2011). با توجه به بیماری‌زایی بالای این ویروس در گله‌های شترمرغ در ایران، در مطالعه حاضر به نقش این ویروس اندمیک به عنوان یک عامل ایجادکننده تلفات در گله‌های شترمرغ پرداخته شد. ردیابی ۶۰ درصدی نیوکاسل در مطالعه اخیر نشان داده است این ویروس سهم بالایی در ایجاد تلفات در گله‌های شترمرغ دارد. به‌هرحال با توجه به وجود علائم عصبی در برخی موارد و عدم ردیابی ویروس نیوکاسل در این نمونه‌ها، باید به آلودگی با سایر عوامل ایجادکننده علائم عصبی مانند ویروس برنا و آنسفالیت توجه داشت که تاکنون در ایران مورد بررسی قرار نگرفته است.

اگرچه مشاهده علائم عصبی به شکل گردن پیچی یک شاخص مهم در تشخیص بالینی بیماری نیوکاسل است، اما بررسی تاریخچه شترمرغ‌هایی که در PCR مثبت ارزیابی شدند، نشان می‌دهد وجود علائم عصبی یک علامت ثابت در این بیماری نیست و در برخی از شترمرغ‌های مسن هیچ‌گونه علائم بالینی خاص مشاهده نشده است. لذا، به نظر می‌رسد شترمرغ‌های مسن نسبت به بروز علائم بالینی نیوکاسل یک مقاومت سنی داشته باشند که برای اثبات این فرضیه مطالعات مجزای دیگری لازم است.

بررسی برنامه واکسیناسیون علیه این بیماری در مزارع پرورشی نمونه‌گیری شده نشان می‌دهد که عدم انجام واکسیناسیون تا سن یک ماهگی می‌تواند منجر به

منابع

- Alexander, D.J. (2000). Newcastle disease in ostriches (*Struthio camelus*)- a review. *Avian Pathology*, 29(2): 95-100.
- Anonymous. (1995). *Ornithobacterium rhinotrachele* in ostrich. *Khangela Quarterly Report on Aniaml Diseases Surveillance*, South Africa, pp: 11.
- Cadman, H.F., Kelly, P.J., de Angelis, N.D., Rohde, C., Collins, N. and Zulu, T. (1997). Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and haemagglutination inhibition test for the detection of antibodies against Newcastle disease virus in ostriches (*Struthio camelus*). *Avian Pathology*, 26(2): 357-363.
- Chin, R.P., van Empel, P.C.M. and Hafez, H.M. (2013) *Ornithobacterium rhinotracheale* Infection. In: *Disease of Poultry*. Swayne, D.E., Glisson, J.R., McDougald, R., Nolan, L.K, Suarez, D.L. and Nair, V.L. editors. 13th ed., USA: W.B. Publishing, Massachusetts, pp: 830-840.
- Eroksuz, H., Ozbey, G., Cevik, A., Gencer Tarakci, B. and Balik, D.T. (2006). Immunohistochemical, pathological, enzyme linked immunosorbent assay and polymerase chain reaction analysis of experimental *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in quails (*Coturnix coturnix japonica*). *Revue de Médecinae Vétérinaire*, 157(4): 197-202.
- Ghalyanchi-Langeroudi, A., Hosseini, H., Madadgar, O., Karimi, V., Shahraeini, A. and Ghafari, M.M. (2011). Sequence analysis of fusion gene of Newcastle disease viruses isolated from ostrich (*Struthio camelus*) in Iran, 2012. *Iranian Journal of Virology*, 5(3): 12-17.
- Ghiamirad, M., Pourbakhsh, A., Keyvanfar, H., Momayaz, R., Charkhkar, S. and Ashtari, A. (2010). Isolation and characterization of Newcastle disease virus from ostriches in Iran. *African Journal of Microbiology Research*, 4(23): 2492-2497.
- Hafez, M.H. and Michael L. (2010). *Ornithobacterium rhinotracheale* in Nestling Falcons. *Avian Diseases Digest*, 5(1): e51-e52.
- Huchzermeyer, F.W. and Gerdes, G.H. (1993). Newcastle disease virus isolated from ostriches in South Africa. *Journal of the South African Veterinary Association*, 46: 140.
- Ley, E.C., Morishita, T.Y., Harr, B.S., Mohan R. and Brisker T. (2000). Serologic survey of slaughter-age ostriches (*Struthio camelus*) for antibodies to selected avian pathogens. *Avian Diseases*, 44(4): 989-992.
- Miller, P.J. and Koch, G. (2013). Newcastle disease. In: *Disease of Poultry*. Swayne, D.E., Glisson, J.R., McDougald, R., Nolan, L.K., Suarez, D.L. and Nair, V.L. editors. 13th ed., USA: W.B. Publishing, Massachusetts, pp: 92-120.
- Mirzaei, S., Hassanzadeh, M., Bozorgmehrifard, M.H. and Banani, M. (2011). Isolation and characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* in the commercial turkey, quail flocks and domestic pigeons by bacteriological and molecular methods. *Archives of Razi Institute*, 66(2): 121-126.
- Moreno, B., Chacón, G., Villa, A., Fernández, A., Vela, A.I., Fernández-Garayzábal, J.F., Ferré, S. and Gracia E. (2009). Nervous signs associated with otitis and cranial osteomyelitis and with *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in red-legged partridges (*Alectoris rufa*). *Avian Pathology*, 38(5): 341-347.
- Pagés, A., Foix, A., March, R. and Artigas, C. (1995). Estudio bacteriológico de un agente asociado a problemas respiratorios en aves de producción: *Ornithobacterium rhinotracheale*. *Medicina Veterinaria*, 12: 585-588.
- Samberg, Y., Hadash, D.U., Perelman, B. and Meroz, M. (1989). Newcastle disease in ostriches (*Struthio camelus*): field case and experimental infection. *Avian Pathology*, 18(2): 221-226.
- Shanawany, M.M. (1999). Ostrich production systems. Parts 1-2. Food and Agriculture Organization, pp: 256.
- Vandamme, P., Segers, P., Vancanneyt, M., Van hofe, K., Mutters, R. and Hommez, J. (1994). *Ornithobacterium rhinotracheale* gen. nov. isolated from the avian respiratory tract. *International*

Journal of Systemic Bacteriology, 44: 24-37.

- Van Empel, P. and Hafez, H.M. (1999). *Ornithobacterium rhinotracheale*: a review. *Avian Pathology*, 28: 217-227.
- Wehmann, E., Herczeg, J., Ballagi-Pordány, A. and Lomniczi, B. (1997). Rapid identification of Newcastle disease virus vaccine strains LaSota and B-1 by restriction site analysis of their matrix gene. *Vaccine*, 15(12-13): 1430-1433.

Molecular detection of *Ornithobacterium rhinotracheale* and Newcastle virus in ostriches in Isfahan province

Shabani, A.A.¹, Gholami-Ahangaran, M.^{2*}, Momtaz, H.³

1- Graduate of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

2- Department of Poultry Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

3- Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

*Corresponding author's email: mgholamia1388@yahoo.com

Abstract

In this study for identification of *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) and Newcastle in acute death of ostriches, 40 tracheal samples from 22 ostrich farms were collected from all over the Isfahan province with history recording. After RNA and DNA extraction from tracheal tissue, the cDNA was prepared. Extracted DNA was evaluated for amplifying by ORT specific primer and cDNA was amplified by ND specific primer based on M gene. The result showed 16srRNA gene in positive control was amplified and a 1097 bp fragment was reached but in none of samples was not amplified. Furthermore, in 24 samples from 40 samples (60%) a 1097 bp fragment of ND M gene was amplified. Totally, 15 flocks from 22 flocks (68.18%) were infected to ND virus. By considering to this study, there is not infection to ORT in ostrich flocks in Isfahan province, presently. ND virus has the main role in acute death in ostrich farms.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: *Ornithobacterium rhinotracheale*, Newcastle virus, PCR, Ostrich, Isfahan.