ردیابی مولکولی *اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال* (ORT) و ویروس بیماری نیوکاسل در شترمرغ‌های استان اصفهان

عباس‌علی 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 میکروب‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.
*نویسنده مسئول مکاتبات: mgolamia1388@yahoo.com
(دریافت مقاله: ۹۶/۲/۳ پذیرش نهایی: ۹۶/۵/٤)

چکیده

با هدف شناسایی باکتری *اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال* (ORT) و ویروس بیماری نیوکاسل در تلفات حاد شترمرغ، ٤٠ 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 نای 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 ۷۸٤ جفت بازی به‌دست آمد، اما در هیچ‌کدام از نمونه‌های اخذشده، قطعه مورد نظر تکثیر نشد. علاوه بر آن، در ۲٤ نمونه از ٤٠ نمونه جمع‌آوری شده (٦٠ درصد)، قطعه ۱۰۹۷ جفت بازی ژن M ویروس نیوکاسل تکثیر شد. از مجموع ۲۲ گله مورد بررسی با مرگ حاد، ۱۵ گله یا به‌عبارتی ٦۸/۱۸ 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 رینوتراکئال*، ویروس نیوکاسل، PCR، شترمرغ، اصفهان.**

مقدمه

اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال(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 ۱۹۹٤، *اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال* نامیده شد (Vandamme *et al*., 1994). عامل بیماری از طریق افقی و عمودی و به‌شکل 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 رینوتراکئال* در مرغ و بوقلمون با روش‌های مختلف سرولوژی و مولکولی در ایران و سایر کشورهای تولیدکننده طیور گزارش شده است. با توجه به علایم تنفسی و حرکتی در گله‌های شترمرغ در استان اصفهان شناسایی این عامل در گله‌های شتر مرغ ضروری به‌نظر 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 سروار 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 کاملا سلیقه‌ای اجرا و اعمال می‌گردد. اگرچه بیماری‌زایی نیوکاسل به‌شکل 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 ۲۰۱٤ تا زمستان ۲۰۱۵ جمعاً ٤۰ نمونه نای از ۲۲ گله شترمرغ واجد تلفات که عمدتاً مرگ حاد را به‌دنبال زمین‌گیری نشان، می‌دادند از نقاط مختلف استان اصفهان با ثبت تاریخچه جمع‌آوری شد. نمونه‌ها از شترمرغ‌های زیر یک ماه تا شترمرغ‌های ۱٤ ماهه جمع‌آوری گردید و از هر گله یک تا سه نمونه نای بسته به‌میزان 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 (High Pure Viral Nucleic Acid Kit, Roche).

– **ساخت cDNA (ترانس‌کریپتاز 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 Gradiant Eppendorf, Germany) در دو سیکل دمایی ٤۲ درجه سانتی‌گراد، ٦۰ دقیقه و ۹٤ درجه سانتی‌گراد، ۵ دقیقه انکوبه شد.

– **تکثیر ژن 16srRNA *اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال*:** پرایمرها بر اساس ژن 16S ribosomal RNA باکتری ORT و مطابق توالی منتشرشده به‌صورت OR16S-F1:5'-GAGAATTAATTTACGGATTAAG-3' و OR16S-R1:5'-TTCGCTTGGTCTCCGAAGAT-3' سنتز شد (Van Empel and Hafez, 1999). جهت انجام آزمایش PCR و تکثیر ژن مورد نظر با طول قطعه حدود ۷۸٤ جفت بازی از دستگاه ترموسایکلر (Mastercycler Gradiant Eppendorf, Germany) با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱ میکروگرم نمونه DNA و ۱ میکرولیتر از هر پرایمر، ۲ میکرولیتر منیزیوم 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 ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و ٤۵ سیکل تکراری شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹٤ درجه سلسیوس در ۳۰ ثانیه هم‌سرشت‌سازی در دمای ۵۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۱ دقیقه و گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه و گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۷ دقیقه انجام شد. در این بررسی از واکسن Nobilis OR inac (واکسن کشته *ارنیتوباکتریوم رینوتراکئال* سروتیپ A، Intervet، هلند) به‌عنوان کنترل مثبت و از آب دو بار تقطیر استریل به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

– **تکثیر ژن M ویروس نیوکاسل:** به‌منظور 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 ۲۵ میکرولیتر تهیه شد که شامل ۲ میکرولیتر Pcr Buffer 10× ، ۰/۸ میکرولیتر

Mgcl2 50mM، ۰/٤ میکرولیتر dNTP Mix 10mM، ۱٦/۸ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۱ میکرولیتر از هر یک از زوج پرایمرهای F و R، ۳ میکرولیتر از cDNA و ۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase می‌باشد.

برنامه حرارتی برای تکثیر ژن M عبارت بود از یک سیکل ۹۵ درجه ٤ دقیقه، ۳۵ سیکل تکراری ۹٤ درجه ٦۰ ثانیه، ۵۸ درجه ٦۰ 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) به‌منظور کنترل مثبت و از آب دوبار تقطیر استریل به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد.

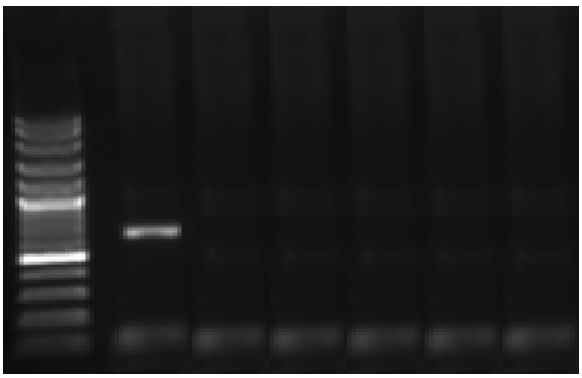
جدول ۱- مشخصات پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن M نیوکاسل

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`

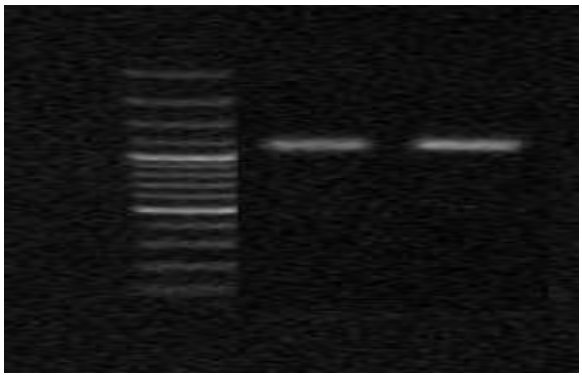
- **آنالیز محصولPCR**: محصول هر دو واکنش PCR (نیوکاسل و ORT) بر روی ژل ۱ درصدآگارز با ولتاژ ۸۰ ولت برای مدت ۳۰ دقیقه الکترفورز گردید، سپس ژل مورد نظر با اتیدیم بروماید رنگ‌آمیزی و با دستگاهUV doc مشاهده شد.

یافته‌ها

- **آلودگی با *اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال***: اگرچه ژن 16srRNA در کنترل مثبت به‌خوبی تکثیر شد و قطعه ۷۸٤ جفت بازی به‌دست آمد (شکل ۱) اما در هیچکدام از نمونه‌های اخذشده قطعه مورد نظر تکثیر نشد.



شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR (ستون ۱: مارکر۱۰۰ جفت بازی سیناژن، ستون ۲: قطعه ۷۹٤ جفت بازی ژن 16srRNA کنترل مثبت، ستون ۳: کنترل منفی، ستون ٤ تا ۷: نمونه‌های منفی).



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).

- آلودگی با نیوکاسل

در ۲٤ نمونه از ٤۰ نمونه جمع‌آوری‌شده، قطعه ۱۰۹۷ جفت بازی ژن M ویروس نیوکاسل تکثیر شد (شکل ۲). به‌عبارتی، ٦۰ درصد نمونه‌های اخذشده آلوده به ویروس نیوکاسل می‌باشد. از مجموع ۲۲ گله مورد بررسی با مرگ حاد، ۱۵ گله یا به عبارتی ٦۸/۱۸ درصد گله‌ها آلوده به ویروس نیوکاسل بودند.

بحث و نتیجه‌گیری

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 و برخی محققین از این عامل به‌عنوان 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). علایم این بیماری در پرندگان بسیار متنوع است. در اغلب موارد عفونت ORT به صورت پنومونی یک‌طرفی یا دوطرفی همراه با اگزودای فیبرینی و تراکئیت حفیف 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 بسیار زیادی در زمینه شناسایی ORT در گله‌های طیور در ایران انجام شده است، اما در اکثر موارد با هدف شناخت اپیدمی این بیماری در گله‌های 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 تلف‌شده و کبک و بلدرچین‌های بدون تاریخچه و کشتارشده 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 علایم عصبی به باکتری ORT در اسپانیا وجود دارد (Moreno *et al*., 2009). قبل از آن در اسپانیا، آلودگی ORT در یک قرقاول با علایم تنفسی تشریح شده بود (Pages *et al*., 1995). در پرندگان آزادزی تنها یک مورد واگیری ORT در جوجه شاهین‌های با علایم 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 کشتارشده 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)، به‌نظر 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 است، نقش ندارد. به‌هرحال با توجه به باقی‌ماندن 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 جامع‌تری مورد نیاز است.

بیماری نیوکاسل در شترمرغ اولین بار در دهه ۱۹۵۰ در شترمرغ‌های باغ وحش شناسایی شد که با علایم عصبی و افسردگی مشخص شد (Alexander, 2000). اولین مورد بیماری نیوکاسل در شترمرغ‌های صنعتی به گزارشی از اسراییل برمی‌گردد که در این واگیری ۱۳ مورد از ٤٦ شترمرغ با سن ۵ تا ۹ ماه (۲۸ درصد) به‌دنبال بروز علایم عصبی تلف شدند (Samberg *et al*., 1989). بعد از آن در گزارش دیگری به توصیف علایم 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 تیتر سرمی علیه ویروس نیوکاسل بودند و میزان شیوع سرمی در این مزارع پرورشی از ۵۰ تا ٦۰ 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 جداشده از مزارع پرورشی شترمرغ در سال‌های ۲۰۱۰-۲۰۰۸ 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 جداشده از گله‌های شترمرغ پرداخته و از نظر مولکولی نیز بیماری‌زایی بالای این ویروس مسجل شده است (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 ٦٠ درصدی نیوکاسل در مطالعه اخیر نشان داده است این ویروس سهم بالایی در ایجاد تلفات در گله‌های شترمرغ دارد. به‌هرحال با توجه به وجود علایم عصبی در برخی موارد و عدم ردیابی ویروس نیوکاسل در این نمونه‌ها، باید به آلودگی با سایر عوامل ایجادکننده علایم عصبی مانند ویروس برنا و آنسفالیت توجه داشت که تاکنون در ایران مورد بررسی قرار نگرفته است.

اگرچه مشاهده علایم 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 علایم عصبی یک علامت ثابت در این بیماری نیست و در برخی از شترمرغ‌های مسن هیچ‌گونه علایم بالینی خاص مشاهده نشده است. لذا، به‌نظر می‌رسد شترمرغ‌های مسن نسبت به بروز علایم 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 نمونه‌گیری‌شده نشان می‌دهد که عدم انجام واکسیناسیون تا سن یک ماهگی می‌تواند منجر به بروز بیماری شود. به‌طوری‌که 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، به‌نظر 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 به‌مرحله 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.

تضاد منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافعی ندارند.

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). Immuno-histochemical, pathological, enzyme linked immunosorbent assay and polymerase chain reaction analysis of experimental Ornithobacterium rhinotracheale infection in quails (Coturnix coturnix japonica). Revue de Médicinae Véterinaria, 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 *Ornithbacterium rhinotracheale* and Newcastle disease virus in ostriches of 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
(Received: 2017/4/23 Accepted: 2017/7/26)

Abstract
With the purpose of identifying *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) and Newcastle disease virus in acute death of ostriches, 40 tracheal samples from 22 ostrich farms with acute mortality were collected from all over the Isfahan province with the history recorded. After RNA and DNA extraction from tracheal tissue, the cDNA was prepared using reverse transcriptase kit. The extracted DNA was evaluated for amplification of 16srRNA gene of ORT using specific primers and cDNA was amplified by Newcastle disease specific primers based on M gene. The 16srRNA gene was amplified in positive control and a 784 bp fragment was reached but it was not amplified in any of the collected samples. Furthermore, in 24 of the 40 collected samples (60%) a 1097 bp fragment of the M gene of Newcastle disease virus was amplified. From a total of 22 evaluated flocks with acute mortality, 22 flocks (68.18%) were infected with Newcastle disease virus. By considering the results of this study, currently there is no infection with ORT in ostrich flocks of Isfahan province, but Newcastle disease virus has the main role in acute deaths in ostrich farms.
Conflict of interest: None declared.

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