نشریه تازه ها در میکروب‌شناسی دامپزشکی
وبگاه: nfvm.uoz.ac.ir
دو فصلنامه - شاپا چاپی: ۲۶۴۵-۴۴۹۱ شاپا الکترونیکی: ۲۶۷۶-۵۰۰۴

دوره ۷، شماره ۲، پائیز و زمستان ۱۴۰۳، صفحات ۷۲- ۸۱

تعیین هویت مولکولی ماکرورابدوس اورنیتوگاستر (*Macrorhabdus ornithogaster*) در پرندگان زینتی

فاطمه حامیان[۱]، نریمان شیخی[*۲]، غلامرضا نیکبخت بروجنی[۳]، سعید چرخکار[۲]

۱- دانشجوی دکتری تخصصی بهداشت و بیماری‌های طیور و پرندگان زینتی، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۲- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۳- گروه میکروبیولوژی و ایمنی‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

دریافت مقاله: ۰۴ آذر ۱۴۰۲، بازنگری: ۱۳ آذر ۱۴۰۳، پذیرش نهایی: ۱۵ آذر ۱۴۰۳

10.22034/nfvm.2025.426402.1215

چکیده

ماکرورابدوزیس یا مگاباکتریوزیس، سندرم تحلیل برندهٔ پرندگان است که قارچ *Macrorhabdus ornithogaster* آن را ایجاد می‌کند. هدف از این پژوهش، تشخیص مولکولی قارچ *ماکرورابدوس اورنیتوگاستر* با روش PCR، از مدفوع پرندگان با علائم بالینی و آنالیز فیلوژنی بین جدایه‌های جمع‌آوری شده بود. در این پژوهش ۵۴ نمونه مثبت از بین ۳۰۰ پرندهٔ مشکوک مراجعه‌کننده به‌روش اسمیر مرطوب شناسایی شد. سپس از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) برای تشخیص نهایی استفاده شد. نمونه‌های مثبت با استفاده از آغازگرهای عمومی (Panfungal) با روش PCR بررسی شدند. برای آنالیز فیلوژنی ۱۵ نمونه تعیین توالی شدند، توالی‌های به‌دست‌آمده با توالی‌های ثبت‌شده در بانک جهانی ژن مقایسه و درصد شباهت و هم‌پوشانی بین توالی‌ها بررسی شد. از تعداد ۳۰۰ نمونه مدفوع با تکنیک اسمیر مرطوب بررسی شده ۵۴ نمونه مثبت بودند. از این تعداد ۳۳ نمونه با روش PCR مثبت شدند. بر اساس توالی‌یابی، *ماکرورابدوس اورنیتوگاستر* تنها در دو نمونهٔ کوتوله برزیلی (lovebird) تشخیص داده شد. آنالیز فیلوژنی نمونه‌های مثبت در این مطالعه نشان داد که موارد مثبت جداشده از باجی‌ها و فنچ‌ها، دارای تشابه (۸۶/۷۶ -۱۰۰ درصد) با توالی‌های ثبت شده در (NCBI) بودند. همچنین، نتایج نشان داد که تکنیک PCR به‌علت دقت، حساسیت و سرعت در روند تشخیص می‌تواند مؤثر باشد.

واژگان کلیدی: *Macrorhabdus ornithogaster*، *پرندگان زینتی*، *فیلوژنیک*

[*] پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: n_sheikhi@srbiau.ac.ir

مقدمه

مگاباکتریوز بیماری گوارشی کشنده‌ای با گسترش جهانی است. این پاتوژن گونه‌های مختلف پرندگان از جمله مرغ عشق (Budgerigars)، قناری، شترمرغ، فنچ، بوقلمون را درگیر می‌کند (۱، ۲). این بیماری را میکروارگانیسم *Macrorhabdus ornithogaster* که یک مخمر آسکومیست است در پروونتریکولوس (proventriculus) در نزیکی تقاطع پروونتیکولار- بطنی (proventicular–ventricular junction) پرندگان کلونیزه ایجاد می‌کند (۵-۳). علائم بیماری شامل کاهش وزن مزمن، دیسفاژی، استفراغ، اسهال و مرگ است. ماکروابدوزیس به‌طور وسیع در بسیاری از گونه‌ها شامل طوطی‌سانان، کبوترسانان، طیور و سایرگونه‌ها شناخته شده است (۶، ۷).

این بیماری در بسیاری از موارد بدون علامت پاتوگونومیک خاصی بوده و در بیشتر موارد تنها علامت مشترک در گونه‌ها لاغری و کاهش اشتها است (۸، ۹). علائم کالبدشکافی معمولاً در بین چینه‌دان و پیش‌معده به‌صورت التهاب لنفوسیتی مشاهده شده است (۴، ۹). امروزه رایج‌ترین روش مورد استفاده برای تشخیص این قارچ، استفاده از لام خیس بدون رنگ‌آمیزی با بزرگ‌نمایی ۴۰ است. با تجزیه و تحلیل DNA ریبوزمی (rDNA)، به‌ویژه 18 S rDNA و ناحیهٔ دامنهٔ 26 S rDNA، این ارگانیسم به‌عنوان یک مخمر آسکومیست شناسایی شده است. تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی رونویسی ITS نیز در مطالعات انجام شده در ایران و آلمان گزارش شده است (۱۰، ۱۱).

PCR در حال حاضر، تشخیص مگاباکتریوز با تکنیک مولکولی (PCR) برروی ضایعات بافتی و نمونه مدفوع انجام می‌شود (۱۲). با این حال، قطعی‌ترین روش تشخیص بر اساس آزمایش PCR بر اساس قطعهٔ پرایمر مد نظر است. از آنجایی‌که *ماکروابدوس اورنیتوگاستر* فقط در پرندگان محدودی بررسی شده است (۱۳)، این مطالعه با هدف، ردیابی مولکولی و آنالیز فیلوژنی *ماکروابدوس اورنیتوگاستر*های جداشده در پرندگان زینتی (برای اولین بار در ایران)، و بررسی شباهت‌های ژنتیکی بین توالی ثبت شده در بانک جهانی ژن انجام شده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری: در این پژوهش از تعداد ۳۰۰ پرندهٔ مشکوک (علائم بالینی شامل: لاغری، تهوع، اسهال و کاهش تحرک) ارجاع داده‌شده به کلینیک‌های دامپزشکی تهران، باغ پرندگان لویزان، کلینیک دامپزشکی پاستور، کلینیک دامپزشکی آوین و کلینیک دامپزشکی سیمرغ بعد از انجام اسمیر مرطوب، ۵۴ نمونه آلوده به *ماکروابدوس اورنیتوگاستر*های بودند که در مرحلهٔ بعد برای تأیید نهایی از تست PCR استفاده شد.

بررسی میکروسکوپی: در مرحلهٔ اول مدفوع خیس بدون رنگ‌آمیزی و با استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۱۰-۴۰ بررسی شد. گفتنی است که هرچقدر قطر اسمیر نازک‌تر باشد، بهتر می‌توان میکروارگانیسم را تشخیص داد. سپس مدفوع پرندگان با علائم بالینی این بیماری به مقدار ۵۰۰ میلی‌گرم در میکروتیوب ذخیره و فریز شدند.

تشخیص مولکولی:

استخراج DNA: به‌منظور تأیید مولکولی قارچ *ماکروابدوس اورنیتوگاستر* ابتدا با استفاده از کیت استخراج DNA (ایران، تکاپوزیست، DynaBio Blood/Tissue DNA Extraction mini kit) از نمونه‌ها استخراج DNA انجام شد. روش استخراج ستونی بر اساس دستورکار شرکت سازنده انجام شد.

PCR: در این پژوهش به‌منظور انجام PCR از پرایمرهای عبدی و همکاران (۲۰۱۹) با آغازگرهای رفت: TCCGTAGGTGAACCTGCGG و برگشت: TCCTCCGCTTATTGATATGC استفاده شد (۱۰). مخلوط واکنش افزوده‌سازی در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۱۰ پیکومول از هرکدام از

پرایمرها، ۱/۵ میلی‌مولار MgCl2 و یک واحد آنزیم تک‌پلیمراز (Fermentas، آلمان) انجام شد. چرخه‌های حرارتی شامل یک مرحلهٔ واسرشتگی اولیهٔ ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت دو دقیقه، ۳۵ چرخهٔ سه‌مرحله‌ای، شامل مرحلهٔ واسرشته‌سازی ۹۲ درجه به‌مدت ۴۵ ثانیه، مرحلهٔ اتصال ۵۵ درجه به‌مدت ۴۵ ثانیه، مرحلهٔ گسترش ۷۲ درجه به‌مدت ۶۰ ثانیه و در انتها یک مرحلهٔ گسترش انتهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه بود.

تعیین توالی سنگر: نمونه‌هایی که در واکنش PCR باند مناسب و واضح تشکیل داده بودند و فاقد باند غیر اختصاصی یا اسمیر بودند، انتخاب شدند. مقدار ۳۰µl از محصول PCR نمونه‌های تأیید شده همراه با آغازگر رفت و آغازگر برگشت، برای تعیین توالی ژن به روش سنگر، به شرکت پیشگام (تهران، ایران) ارسال شدند.

آنالیز فیلوژنی: نتایج نمونه‌هایی که با موفقیت تعیین توالی شده بودند، با نرم‌افزار Bioedite و روش Clatal W بررسی و تجزیه و تحلیل شدند. پس از ویرایش و اصلاح، توالی‌های به دست‌آمده با سایر توالی‌هایی که قبلاً از نقاط مختلف جهان در بانک ژن (GeneBank) ثبت شده بودند در بانک ژن مطابقت داده شدند و میزان مشابهت و درصد هم‌پوشانی بین توالی‌های به دست‌آمده بررسی شد. به‌منظور آنالیز فیلوژنی و رسم درختچهٔ فیلوژنی از نرم‌افزار Mega 5 و الگوریتم Neighbor joining با Bootstrap معادل ۱۰۰۰ بار تکرار انجام شد.

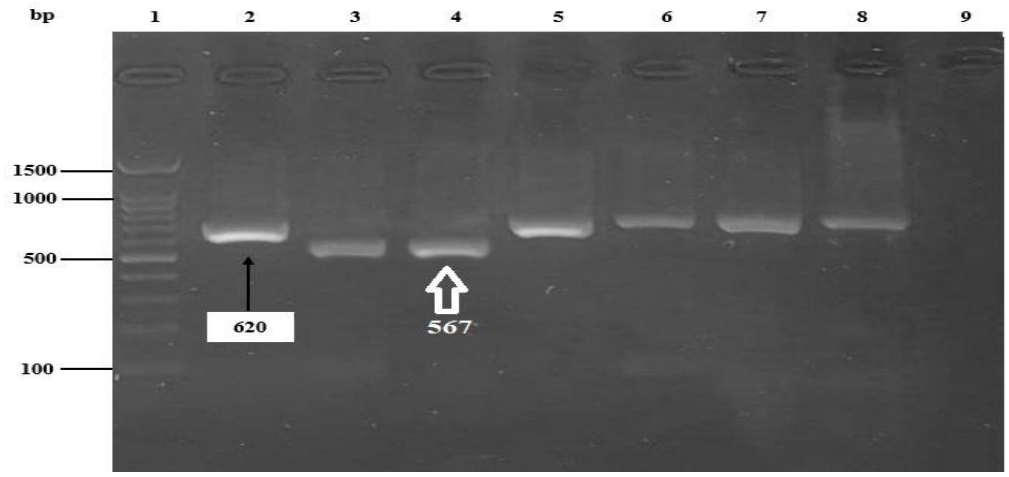
نتایج

اسمیر مرطوب: از بین ۳۰۰ نمونهٔ اولیه، تعداد ۵۴ نمونه مدفوع با اسمیر مرطوب شامل: ۲۳ قناری، ۱۵ عروس هلندی، ۵ لاوبرد، ۴ سهره، ۲ باجی، ۱ توکان، ۱ مرغ عشق انگلیسی، ۱ طوطی خاکستری آفریقایی، ۱ بلبل خرما و ۱ عدد فنچ آلوده به *ماکروابدوس اورنیتوگاستر* تشخیص داده شدند (جدول ۱).

PCR: با روش PCR از تعداد ۵۴ نمونه اسمیر مرطوب تعداد ۳۳ نمونه در افزوده سازی با پرایمرهای عبدی و همکاران (۲۰۱۹) باندهایی با وزن‌های مختلف بین ۵۶۷ تا ۶۲۰ در الکتروفورز نشان دادند (نگاره ۱). نتایج مثبت بر اساس (جدول ۱) آورده شده است.

جدول ۱- میزان آلودگی نمونه‌ها به *ماکروابدوس اورنیتوگاستر* با روش اسمیر مرطوب و PCR

روش تشخیص / گونهٔ پرنده	اسمیر مرطوب	نتایج PCR
قناری	۲۳	۱۲
عروس هلندی	۱۵	۱۰
لاوبرد	۵	۴
سهره	۴	۲
باجی‌ها	۲	۲
توکان	۱	۱
مرغ عشق انگلیسی	۱	۱
طوطی خاکستری	۱	-
بلبل خرما	۱	-
فنچ	۱	۱
جمع کل	۵۴	۳۳



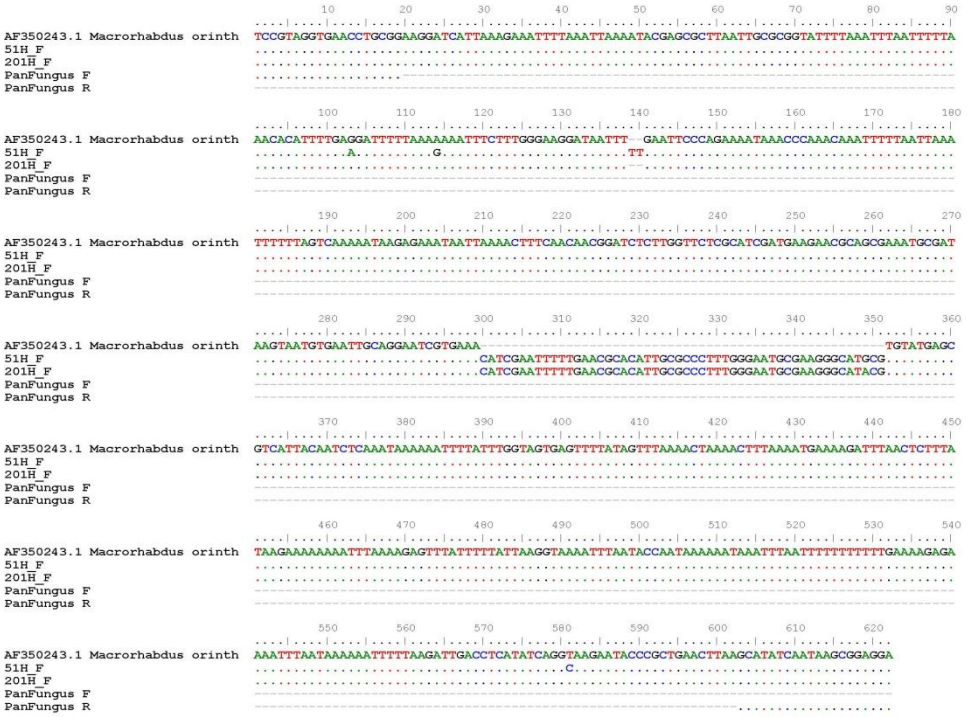
نگاره ۱- ژل الکتروفورز محصول PCR نمونه‌های آلوده به *ماکروورابدوس اورنیتوگاستر*

محصول PCR با استفاده از ژل ۱/۵ درصدی آگارز ظاهرسازی شد، چاهک ۱؛ DNA Ladder ۱۰۰ جفت بازی. چاهک‌های؛ ۲ کنترل مثبت، چاهک ۹؛ کنترل منفی، چاهک‌های ۳ و ۴ (نمونه‌های مثبت با طول قطعه ۵۶۷ جفت بازی) چاهک‌های؛ ۵، ۶، ۷ و ۸ (نمونه‌های مثبت با طول ۶۲۰ جفت بازی)

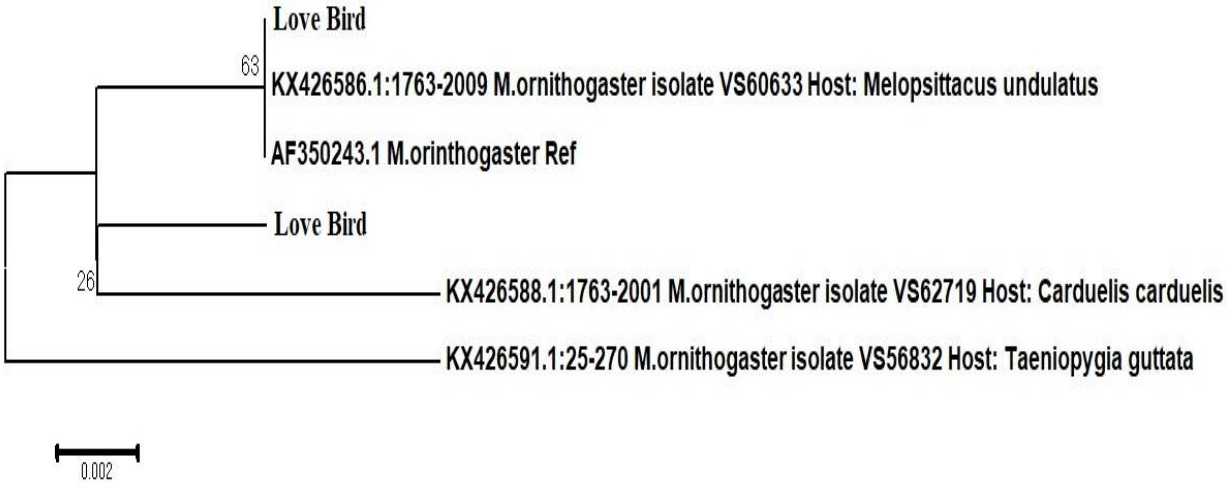
نمونه‌هایی که با موفقیت تعیین توالی شده بودند، با نرم‌افزار بایوادیت بررسی و تجزیه و تحلیل شدند. پس از ویرایش و اصلاح، توالی‌های به دست‌آمده در بانک ژن مطابقت داده شدند و با توالی‌های دیگری که قبلاً از نقاط مختلف جهان در بانک ژن ثبت شده بودند، مقایسه شدند و میزان مشابهت و درصد هم‌پوشانی بین توالی‌های به دست‌آمده بررسی شد (جدول). منهای مواردی که در تعیین توالی *Cladosporium herbarum, Mucor circinelloides, Penicillium polonicum, Naganishia albida* و *Alternaria tenuissima* تشخیص داده شدند تنها در دو نمونه با افزوده‌های ۶۲۰ جفت باز، گونهٔ قارچ *ماکروورابدوس اورنیتوگاستر* تشخیص داده شد که هر دو کد مربوط به کوتولهٔ برزیلی (lovebird) است. نگاره ۲؛ همترازی توالی‌های به دست آمده را نشان می‌دهد. جدول ۲ درصد تشابه توالی‌های این مطالعه با توالی‌های ثبت شده در بانک جهانی ژن را نشان می‌دهد.

جدول ۲- درصد تشابه توالی‌های این مطالعه با توالی ثبت‌شده در بانک جهانی ژن

شمارهٔ نمونه	جداسازی	درصد شباهت
۵۱	*Macrorhabdus orinthogaster*	۹۹/۸۳ – ۹۹/۶۶
۲۰۱		
۳۰۱	*Cladosporium herbarum*	۱۰۰ - ۹۹/۲۳
۳۰۹		
۱۴		
۳۷		
۵۳	*Mucor circinelloides*	۹۸/۶۴ – ۹۷/۸۷
۳۰۸		
۳۰۵		
۳۰۴		
۳۰۲	*Penicillium polonicum*	۹۰/۲۴- ۸۸/۹۲
۲۰۷	*Naganishia albida*	۸۶/۹۲ – ۸۶/۷۶
۵۲	*Alternaria tenuissima*	۹۹/۶۳ – ۹۹/۴۴
۲۰۸	نتایج توالی قابل‌تحلیل نبود	
۳۱۰		



نگاره ۲- هم‌ترازی توالی‌های مثبت *ماکرورابدوس* این مطالعه با ژن مرجع AF350243 در بانک جهانی ژن



نگاره ۳- بررسی و آنالیز فیلوژنی با روش Neighbor-joining و تعداد تکرار ۱۰۰۰ برای دو نمونه مثبت با توالی‌های مرجع بانک ژن انجام شد.

درخت فیلوژنیک حاصل با استفاده از روش Neighbor-Joining و بر اساس ۱۰۰۰ تکرار Bootstrap برای ارزیابی میزان اطمینان به گره‌ها ترسیم شد. این درخت روابط تکاملی دو نمونه مثبت مورد مطالعه را با توالی‌های مرجع موجود در بانک ژن بررسی می‌کند. درخت شامل دو خوشه اصلی است. نمونه KX426586.1 که از میزبان مرغ عشق جداسازی شده است، در یک خوشه با توالی مرجع AF350243.1 مربوط به

ماکروورابدوس اورنیتوگاستر قرار دارد. این گره دارای مقدار Bootstrap برابر با ۶۳ است که سطح اعتماد متوسطی را به این شاخه نشان می‌دهد.

در خوشه دوم، دو نمونه KX426588.1 و KX426591.1 که به‌ترتیب از میزبان‌های *Carduelis carduelis* و *Taeniopygia guttata* جداسازی شده‌اند، قرار گرفته‌اند. این دو نمونه فاصله ژنتیکی کمی با یکدیگر داشته و با توالی‌های مرجع مورد مطالعه قرابت دارند. با این حال، مقدار Bootstrap این گره (۲۶) نشان‌دهنده سطح اعتماد پایین به این شاخه‌بندی است که ممکن است ناشی از تنوع ژنتیکی پایین یا محدودیت داده‌ها باشد. فاصله‌های کوتاه شاخه‌ها در مقیاس ۰/۰۰۲نیز نشان‌دهنده شباهت ژنتیکی بالا میان این توالی‌ها است. این یافته‌ها نشان می‌دهد که نمونه‌های مورد مطالعه با گونه *ماکروورابدوس اورنیتوگاستر* مرتبط بوده، اما ممکن است تفاوت‌هایی در سطح میزبان یا تغییرات تکاملی داشته باشند که نیازمند بررسی‌های بیشتر است.

بحث و نتیجه‌گیری

مخمر *ماکروورابدوس اورنیتوگاستر* عامل بیماری‌زای فرصت‌طلب گوارشی در پرندگان زینتی و دیگر پرندگان است که گسترش جهانی دارد. این مخمر معمولاً شکل مزمنی از بیماری به نام مگاباکتریوز یا ماکروورابدوس را در پرندگان وحشی و خانگی ایجاد می‌کند. این بیماری در بسیاری از موارد بدون‌علامت پاتوژنومیک (Pathogenomic) خاصی بوده و در بیشتر موارد تنها علامت مشترک درگونه‌ها لاغری و کاهش اشتها است (۵، ۱۴). انتقال این بیماری از طریق مدفوع آلوده به این انگل رخ می‌دهد. در مطالعه‌ای Borrelli و همکاران (۲۰۱۵)، توانستند با استفاده از روش مینی‌فلتک (mini-Foltac)، *ماکروورابدوس اورنیتوگاستر* را تشخیص دهند و درنهایت به این نتیجه رسیدند که مینی‌فلتک روشی معتبر، حساس و کم‌هزینه است (۲). در مطالعهٔ دیگری که Ozmen و همکاران انجام دادند، عفونت‌های همزمان *ماکروورابدوس اورنیتوگاستر* و *آیمریا دانسینگی* را در باجی‌ها از نظر آسیب‌های پاتولوژی در اندام‌های مختلف بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که *ماکروورابدوس اورنیتوگاستر* در پیش‌معده، معده و روده کلونیزه می‌شود (۹).

در مطالعه‌ای Razmyar و همکاران (۲۰۱۷)، در یک گلهٔ پرورشی قناری، در شهر مشهد، عفونت در اثر *ماکروورابدوس اورنیتوگاستر* را گزارش دادند. تعداد بسیار زیادی از *ماکروورابدوس اورنیتوگاستر* در گسترش مدفوع و گسترش مستقیم از خراشیدن مخاط پیش‌معده در بررسی میکروسکوپ نوری مشاهده شدند که نتایج نهایی بر اساس مشاهدات آسیب‌شناسی روش PCR نشان داد که *ماکروورابدوس اورنیتوگاستر* به‌عنوان التهاب پیش‌معدهٔ مزمن است (۱۵) همچنین در مطالعهٔ دیگری Kheirandish و همکاران (۲۰۱۱)، از مجموع ۵۰۰ باجی تعداد ۱۰ نمونه با کالبدشکافی مبتلا به بیماری مزمن تحلیل برنده گزارش دادند، همچنین در این مطالعه لام‌های بافتی برای آزمایش‌های پاتولوژی از قسمت پیش‌معده، سنگ‌دان و ایسموس (محل بین پیش‌معده و سنگ‌دان) گرفته و بررسی شده‌اند. این مطالعه نشان داده است که بیشترین آسیب‌ها ابتدا در قسمت ایسموس (محل بین پیش‌معده و سنگ‌دان) و به‌مراتب در قسمت پیش‌معده و سنگ‌دان که شامل آتروفی ماهیچه‌ای، ضخیم شدن دیوارهٔ بین پیش‌معده و سنگ‌دان، خون‌ریزی و نازک شدن لایهٔ کوئیلین مشاهده شد (۱۶).

در یک مطالعهٔ موردی Babazadeh و همکاران (۲۰۱۵)، عفونت همزمان *ماکروورابدوس اورنیتوگاستر* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در قناری در ایران تأیید و گزارش شده است (۷). در مطالعهٔ Amir و Mekky (۲۰۲۰)، به اهمیت و حساسیت تکنیک PCR در تشخیص *ماکروورابدوس اورنیتوگاستر* تاکید شده است (۱). همچنین در مطالعه‌ای توسط Fillipich و همکاران (۱۹۹۸)، دو گروه از باجی‌ها به‌مدت چند سال به‌منظور بررسی شیوع *ماکروورابدوس اورنیتوگاستر* و عوامل مؤثر بر آن بررسی شدند، نتایج این مطالعه نشان داد که فاکتور سن بر میزان شیوع *ماکروورابدوس اورنیتوگاستر* هیچ

تأثیری نداشته، در صورتی که میزان شیوع با فاکتور جنسیت رابطهٔ مستقیمی داشته، به‌طوری که میزان شیوع در نرها بیشتر از ماده‌ها بود (۱۷).

در مطالعهٔ Sullivan و همکاران (۲۰۱۷)، در یک گلهٔ ۱۰۰ تایی باجی که آلوده به *ماکروراپدوس اورنیتوگاستر* بودند، در بررسی سوآپ‌های ناحیهٔ کلوآک با روش PCR نشان داده شد که این روش بسیار دقیق‌تر و کارآمدتر است (۱۴). در مطالعهٔ Phalen (۲۰۰۶)، بهترین و دقیق‌ترین روش برای تشخیص *ماکروراپدوس اورنیتوگاستر* تهیهٔ لام بافتی و تشخیص پاتولوژی آن از قسمت ایسموس (محل بین پیش‌معده و سنگ‌دان) و قسمت پیش‌معده و سنگ‌دان معرفی شده است و اعتقاد بر این بوده که این آزمایش نسبت به تهیهٔ لام از مدفوع حساس‌تر و بعد از آن PCR حساسیت بیشتر و دقیق‌تری دارد (۴). همچنین در مطالعهٔ Abdi-Hachesoo و همکاران (۲۰۱۹)، ژنوم *ماکروراپدوس اورنیتوگاستر* در یک گزارش موردی قناری که با میکروسکوپ نوری و رنگ‌آمیزی گرم قارچ را تشخیص داده بودند، با استفاده از پرایمر پنفنگال ژنوم *ماکروراپدوس اورنیتوگاستر* را ردیابی و تأیید کردند (۱۰).

در مطالعهٔ دیگری Paula و همکاران (۲۰۱۸)، شیوع *ماکروراپدوس اورنیتوگاستر* در بین عروس هلندی، مرغ عشق (Budgerigars) کوتولهٔ برزیلی (lovebird) به‌ترتیب ۷۳/۶۸ درصد (۱۴/۱۹)، ۴۰/۹۰ درصد (۹/۲۲) و ۵۰ درصد (۲/۴) در اوبرابا، ایالت Minas Gerais شده است (۱۸). دلایل تفاوت در نتایج می‌تواند به وضعیت عمومی پرنده، تفاوت در حجم نمونه، روش‌های مدیریتی، انتشار جغرافیایی *ماکروراپدوس اورنیتوگاستر* یا روش‌های آزمایشگاهی در تشخیص این مخمر باشد. همچنین دفع متناوب *ماکروراپدوس اورنیتوگاستر* در برخی از نمونه‌های پرندگان بیمار را نمی‌توان رد کرد، زیرا احتمال دارد منجر به حداقل رساندن شیوع این مخمر در جامعهٔ مورد مطالعه شود. بازرسی پس از مرگ از سیستم گوارش ممکن است موارد دیگری از عفونت *ماکروراپدوس اورنیتوگاستر* را در پرندگانی که سلول‌های مخمر را دفع نمی‌کنند نشان دهد (۱۸)، در مطالعهٔ ما هیچ پرنده‌ای تلف نشد و این مسئله در مطالعهٔ ما قابل بررسی نبود. در مطالعهٔ Powers و همکاران (۲۰۱۸)، از ۱۰۰۶ طوطی، ۱۷۷ مورد در بازرسی پس از مرگ و از نظر بافت‌شناسی آلوده به *ماکروراپدوس اورنیتوگاستر بودند* (۱۹).

بر اساس مطالعه‌ی Sullivan و همکاران (۲۰۱۷)، PCR سوآپ‌های جمع‌آوری شده از کلوآک، احتمال بیشتری برای تشخیص *ماکروراپدوس اورنیتوگاستر* نسبت به FGS در طوطی‌ها داشته است. Poleschinski و همکاران (۲۰۱۹). عفونت *ماکروراپدوس اورنیتوگاستر* را ۵۳/۸۰ درصد با معاینهٔ میکروسکوپی و ۴۶/۲۰ درصد با آزمایش مدفوع به‌روش PCR گزارش کردند (۲۰) که با نتایج مطالعهٔ حاضر مطابقت دارد. در مطالعهٔ حاضر موارد مثبت با روش PCR (۳۳ نمونه مثبت) در حالی‌که در روش اسمیر مرطوب (۵۴ نمونه مثبت) تشخیص داده شد.

در مطالعهٔ Kojima و همکاران (۲۰۲۲)، در کشور ژاپن تنوع ژنتیکی کمی بین *ماکروراپدوس اورنیتوگاستر*های جدا شده از پرندگان خانگی گزارش شده است (۲۱). مطالعهٔ ما با این مطالعه همخوانی داشت و تفاوت بسیار کمی بین *ماکروراپدوس اورنیتوگاستر*های جدا شده وجود داشت. با این حال، در برخی تحقیق‌ها برای آنالیز فیلوژنی پیشنهاد شده از ناحیهٔ *۲۶R rDNA* استفاده شود. به‌طور خاص این ناحیه فاصلهٔ بین ژنی را تقویت می‌کند.

هرچند در این پژوهش تعداد کمی پرنده بررسی شدند، اما نتایج مهمی را نشان داد. در کل نتایج این تحقیق نشان داد که آلودگی به *ماکروراپدوس اورنیتوگاستر* در لاوبرد وجود دارد و نتایج تعیین توالی و آنالیز فیلوژنی این مسئله را تأیید کرده است. بررسی فیلوژنی موارد مثبت جدا شده از باجی‌ها و فنچ‌ها نشان داد که نمونه‌های *ماکروراپدوس اورنیتوگاستر* در این مطالعه دارای شباهت ۸۶/۷۶ درصد تا ۱۰۰ درصد با نمونه‌های ثبت شده در بانک جهانی ژن هستند. در سایر

نمونه‌ها، توالی به دست‌آمده با توالی *ماکرورابدوس اورنیتوگاستر* شباهتی نداشت. تفاوت در نتایج گسترش لام و PCR ممکن است به‌دلیل حضور آلودگی بالا با سایر قارچ‌ها باشد. به‌طور کلی آغازگرهای استفاده شده دیدی کلی از حضور انواع آلودگی‌های قارچی به دست می‌دهد و برای بررسی تطابق PCR با نتایج گسترش لام باید از آغازگرهای اختصاصی *ماکرورابدوس اورنیتوگاستر* استفاده شود. در نهایت نتایج این مطالعه نشان داد که در پرندگان ارجاع داده شده به کلینیک‌ها با علائمی نظیر افسردگی، کاهش وزن، لاغری، دفع غذای هضم نشده، ملنا، اسهال و استفراغ می‌تواند ناشی از آلودگی به *ماکرورابدوس اورنیتوگاستر* باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان مراتب قدارنی و تشکر خود را از دانشگاه آزاد اسلامی و همکاری تخصصی سرکار خانم دکتر شبنم هاشمی ادا می‌کنند. این مقاله بخشی از رسالهٔ دکتری تخصصی است.

References

1- Amer M, Mekky H. Avian gastric yeast (AGY) infection (macrorhabdiosis or megabacteriosis). *Bulg J Vet Med*. 2020; 23(4): 397-410.

2- Borrelli L, Dipineto L, Rinaldi L, Romano V, Noviello E, Menna LF, *et al*. New diagnostic insights for *Macrorhabdus ornithogaster* infection. *J Clin Microbiol*. 2015; 53(11): 3448-50.

3- Madani SA, Ghorbani A, Arabkhazaeli F. Successful treatment of macrorhabdosis in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*) using sodium benzoate. *J Mycol Res*. 2014; 1(1): 21-7. [In persian]

4- Phalen D. Implications of *Macrorhabdus* in clinical disorders. *Clin Avian Med*. 2006; 2: 705.

5- Baron HR, Stevenson BC, Phalen DN. Comparison of in-clinic diagnostic testing methods for *Macrorhabdus ornithogaster*. *J Avian Med Surg*. 2021; 35(1): 37-44.

6- Robino P, Ferrocino I, Rossi G, Dogliero A, Alessandria V, Grosso L, *et al*. Changes in gut bacterial communities in canaries infected by *Macrorhabdus ornithogaster*. *Avian Pathol*. 2019; 48(2): 111-20.

7- Babazadeh D, Ghavami S, Nikpiran H, Dorestan N. Acute megabacteriosis and *staphylococosis* of canary in Iran. *J World's Poult Res*. 2015; 5(1): 19-20. [In persian]

8- Tomaszewski EK, Logan KS, Snowden KF, Kurtzman CP, Phalen DN. Phylogenetic analysis identifies the 'megabacterium'of birds as a novel anamorphic ascomycetous yeast, *Macrorhabdus ornithogaster* gen. nov., sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2003; 53(4): 1201-5.

9- Ozmen O, Aydogan A, Haligur M, Adanir R, Kose O, Sahinduran S. The Pathology of *Macrorhabdus ornithogaster* and Eimeria dunsingi (Farr, 1960) Infections in Budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Israel J Vet Med*. 2013; 68(4).

10- Abdi-Hachesoo B, Sharifiyazdi H, Haddad-Marandi MR, Kalantari M. Phylogenetic evaluation of Macrorhabdus ornithogaster isolated from a case of canary (Serinus canaria). *Comp Clin Path*. 2019; 28: 275-8. [In persian]

11- Puestow R, Cramer K, Krautwald-Junghanns M-E, Schmidt V. Ribosomal DNA fragments analysis of avian pathogenic *Macrorhabdus ornithogaster*. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*. 201; 131(1): 58-64.

12- Sheykhi A, Sheikhi N, Charkhkar S, Brujeni GN. Detection and characterization of circovirus in canary flocks. *Avian Dis*. 2018; 62(2): 137-42. [In persian]

13- Brunthaler R, Teufelbauer N, Seaman B, Nedorost N, Bittermann K, Matt J, *et al*. Trichomonosis in Austrian Songbirds—Geographic distribution, pathological lesions and genetic characterization over nine years. *Animals*. 2022; 12(10): 1306.

14- Sullivan PJ, Ramsay EC, Greenacre CB, Cushing AC, Zhu X, Jones MP. Comparison of two methods for determining prevalence of *Macrorhabdus ornithogaster* in a flock of captive budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *J Avian Med Surg*. 2017; 31(2): 128-31.

15- Razmyar J, Movassaghi AR, Rezaee M. An outbreak of severe *Macrorhabdus ornithogaster* infection in common canaries (Serinus canarius

domesticus), Molecular and pathological assay. *Iran J Vet Sci Technol*. 2016; 8(1): 64-8. [In persian]

16- Kheirandish R, Salehi M. Megabacteriosis in budgerigars: diagnosis and treatment. *Comp Clin Path*. 2011; 20: 501-5. [In persian]

17- Filippich L, Hendrikz J. Prevalence of megabacteria in budgerigar colonies. *Aust Vet J*. 1998; 76(2): 92-5.

18- Paula Id, Linhares FP, Kanayama CY, Carvalho Sd, Bittar ER, Campos M, Bittar J. Megabacteria (*Macrorhabdus ornithogaster*) in psittacids kept in commercial establishments in the municipality of Uberaba-MG. *PUBVET*. 2018; 12(2): 1-4.

19- Powers LV, Mitchell MA, Garner MM. Macrorhabdus ornithogaster infection and spontaneous proventricular adenocarcinoma in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Vet Pathol*. 2019; 56(3): 486-93.

20- Poleschinski JM, Straub JU, Schmidt V. Comparison of two treatment modalities and PCR to assess treatment effectiveness in macrorhabdosis. Journal of avian medicine and surgery. 2019;33(3):245-50.

21- Kojima A, Osawa N, Oba M, Katayama Y, Omatsu T, Mizutani T. Validation of the usefulness of 26S rDNA D1/D2, internal transcribed spacer, and intergenic spacer 1 for molecular epidemiological analysis of *Macrorhabdus ornithogaster*. *J Vet Med Sci*. 2022; 84(2): 244-50.

New Findings in Veterinary Medicine
Homepage: nfvm.uoz.ac.ir
Semiannual - Print ISSN: 2645-4491 Online ISSN: 2676-5004

Volume 7, Issue 2, Autumn & Winter 2024, pages: 72-81

Molecular identification of *Macrorhabdus ornithogaster* in companion bird

Fateme Hamian[1], Nariman Sheikhi[2*], Gholamreza Nikbakht Brujeni[3], Saeid Charkhkar[2]

1- Ph.D. Student in Avian Hygiene and Medicine, Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2- Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
3- Department of Microbiology & Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.

Receive: November 24, 2023; Revise: December 3, 2024; Accept: December 5, 2024

10.22034/nfvm.2025.426402.1215

Summary

Macrorhabdosis, also known as Megabacteriosis, is a wasting disease in birds caused by the fungus *Macrorhabdus ornithogaster*. This study aimed to detect the fungus using PCR from the feces of birds showing clinical signs of infection, and to perform a phylogenetic analysis of the collected isolates. In this study, 54 positive samples were detected among the 300 suspicious birds referred to the wet smear method. Subsequently, the polymerase chain reaction (PCR) technique was employed for the final diagnosis. Positive samples were then subjected to PCR analysis using panfungal primers. For phylogenetic evaluation, 15 samples were sequenced, and the resulting sequences were compared with entries in the World GeneBank to assess their similarity and overlap. A total of 300 stool samples were subjected to analysis using the wet smear technique, of which 54 were found to be positive. Furthermore, 33 samples were identified as positive using the PCR method. Sequencing revealed the presence of *M. ornithogaster* in only two samples from lovebirds. Phylogenetic analysis showed an 86.76%-100% similarity between the isolates from budgerigars and finches and sequences recorded in the NCBI database. These findings highlight that PCR is an effective diagnostic tool for *M. ornithogaster* due to its speed, accuracy, and sensitivity.

Keywords: *Macrorhabdus ornithogaster, companion birds, phylogenies*