DOI: 10.22092/vj.2018.121238.1445
شماره ۱۲۲ بهار ۱۳۹۸
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

بررسی ادجوانت‌های مختلف بر روی کارایی واکسن غیرفعال اورنیتو باکتریوم رینو تراکیاله در جوجه‌های عاری ازپاتوژن بصورت آزمایشی

• **محمد جواد مهربانپور (نویسنده مسئول)**
استادیار بخش تحقیق و تولید واکسن‌های ویروسی طیور، شعبه شیراز موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران
• **علی شیرازی نژاد**
کارشناس بخش تحقیق و تولید واکسن های ویروسی طیور، شعبه شیراز موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران
• **سید محمد حسینی**
استادیار بخش بخش ایمنولوژی ، شعبه شیراز موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی ، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۷-۰۱-۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷-۰۵-۱۴
Email: m.mehrabanpour@rvsri.ir

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی اثر واکسن‌های ORT تجربی تهیه شده با ادجوانت‌های آلوم پتاسیم، روغن معدنی و ساپونین، جهت بررسی میزان آنتی‌بادی در سرم خون جوجه‌های SPF می‌اشد. واکسن‌های غیرفعال ORT با استفاده از از آلوم پتاسیم، ساپونین و روغن معدنی تهیه شد. به هر گروه ۱۵ تایی جوجه‌های SPF در سن سه هفتگی واکسن‌های تهیه شده با ادجوانت‌های مختلف تلقیح گردید. یگ گروه ۱۵ تایی از جوجه‌های SPF در سه هفتگی واکسن تهیه شده با روغن معدنی و واکسن یاداور در ۵ هفته بعد از واکسن اول را دریافت کردند. نمونه‌های خون از جوجه‌ها در مدت زمان آزمایش گرفته شد. میزان آنتی‌بادی IgG بر علیه ORT در جوجه‌های SPF با استفاده از آزمایش الیزا طراحی شده در آزمایشگاه اندازه‌گیری شد. در این مطالعه میزان آنتی‌بادی در سرم خون جوجه‌های واکسینه شده بطور معنی‌داری بالاتر از غیر واکسینه بود. در کل میزان آنتی‌بادی تولید شده با استفاده از روغن معدنی بطور معنی‌داری ایمنی بالاتری از واکسن‌های تهیه شده با استفاده از ادجوانت‌های دیگر بود. بر اساس نتایج، دو نوبت واکسیناسیون با فاصله پنج هفته ایمنی طولانی تر و موثرتری نسبت به یک بار واکسیناسیون ایجاد می‌کند. در کل واکسیناسیون در جوجه‌های SPF در سه هفتگی و واکسن یادآور در هشت هفتگی می‌تواند روش موثری بر علیه ORT باشد.

کلمات کلیدی: اورنیتوباکتریوم رینوتراکیال، واکسن غیرفعال، جوجه

● Veterinary Researches & Biological Products No 122 pp: 24-30

Effects of various adjuvants on efficacy of experimental inactivated oil *Ornithobacterium rhinotracheale* vaccine in SPF chickens

By: Mehrabanpour, M.J., (Corresponding Author) Assistant Professor, Department of Research and Production of Poultry Inactivated Viral Vaccine, Shiraz Branch of Razi Vaccine and Serum Research institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Shiraz, Iran. Shirazi, A., Department of Research and Production of Poultry Inactivated Viral Vaccine, Shiraz Branch of Razi Vaccine and Serum Research institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Shiraz, Iran. Hosseini, S.M.H., Assistant Professor, Department of Immunology, Shiraz Branch of Razi Vaccine and Serum Research institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Shiraz, Iran.

Received: 2018-04-09 Accepted: 2018-08-05

Email: m.mehrabanpour@rvsri.ir

The purpose of this study was the effect of vaccination with different adjuvant of inactivated ORT vaccines (potassium alum, mineral oil and Saponin) to measure the levels of antibodies against ORT in blood sera on SPF chickens. Inactivated ORT bacterin vaccines were prepared from ORT serotype A using potassium alum, mineral oil (MO) and Saponin. Fifteen SPF chickens per group were vaccinated at an age of 3 weeks with one of the three different inactivated vaccines. Similarly, 15 SPF chickens at an age of three week were vaccinated with inactivated vaccine in mineral oil. Booster vaccination with inactivated vaccine in mineral oil was performed five weeks after primary vaccination. Blood samples were collected from all the experimental birds during the experimental study. The presence of IgG antibodies against ORT antigens in SPF chickens were measured by using a modified ELISA, which were prepared in our laboratory. In this study, the levels of antibodies to ORT in blood sera of vaccinated chickens were significantly determined higher by ELISA than non-vaccinated chickens. These results show that the levels of antibodies of ORT vaccine with Montanide adjuvant were significantly greater than that of other vaccines when humoral responses of all vaccine were compared. According to the results, twice vaccination interval of 5 weeks could be effective for long lasting term than a single administration. In conclusion, vaccination of SPF chickens at 3 weeks of age with a booster dose at 8 weeks of age can be an effective method against ORT in chickens.

Key words: *Ornithobacterium rhinotracuim*, Inactivate vaccine, Chicken

مقدمه

بیماری‌هایی تنفسی در صنعت طیور دارای اهمیت ویژه‌ای می‌باشند، عوامل متعددی در ایجاد این بیماری‌های تنفسی در طیور نقش دارند. در این میان اورنیتوباکتریوزیس (ornithobacteriosis) یک بیماری تنفسی است که بیشتر در جوجه‌ها و بوقلمون‌ها ایجاد بیماری می‌نماید.

اورنیتوباکتریوم رینوتراکیال (*Ornithobacterium rhinotracheal*) از یک طرف به علت تلفات و از طرف دیگر به علت ایجاد کاهش رشد و تولید می‌تواند خسارات قابل توجهی به صنعت مرغداری وارد نماید. اولین مورد گزارش در خصوص این بیماری در مرغداری‌های ایران در سال ۱۳۷۹ توسط بنانی و همکاران ارائه گردید و متعاقب آن بیماری از گونه‌های مختلف پرندگان پرورشی تجاری، مرغ‌های مادر گوشتی و گوشتی تخمگذار، مرغ‌های بومی و بوقلمون‌ها در استان‌های مختلف کشور گزارش گردیده است (۱۴،۷،۱۱،۱). بسیاری از موارد گزارش شده از عفونت ORT، همراه با سایر عوامل بیماری‌زای دیگر از جمله اشرشیا کلی، ویروس نیوکاسل، ویروس برونشیت، آنفلوانزا و مایکوپلاسما بوده است. اورنیتوباکتریوسیس در بیشتر موارد بعنوان یک پاتوژن ثانویه مطرح گردیده است و عوامل استرس‌زا و توام شدن با عوامل عفونت‌زای دیگر می‌تواند باعث بروز بیماری گردد (۱۲،۶).

اورنیتوباکتریوم رینوتراکیال می‌تواند از مزرعه‌ای به مزرعه دیگر انتقال یابد، همچنین این بیماری می‌تواند در مرغداری اندمیک شده و مجدداً ایجاد بیماری نماید. از آنجا که بیشتر جدایه‌های این باکتری در برابر آنتی بیوتیک‌های رایج در صنعت مرغداری مقاوم می‌باشند لذا به نظر می‌رسد که واکسیناسیون بهترین راه جهت کنترل ویا پیشگیری از این بیماری مطرح می‌باشد. (۱۷،۱۶) تاکنون واکسن‌های غیرفعال، زنده، تحت واحد و نوترکیب متعددی جهت کنترل این بیماری ساخته شده‌اند (۲۰).

امروزه واکسن‌های کشته ORT جهت کنترل واگیری‌ها طیور در جوجه‌ها و بوقلمون‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. گزارشات متعددی در خصوص ادجوانت مورد استفاده در واکسن‌های کشته گزارش گردیده است.

مطالعات متعددی در زمینه استفاده از ادجوانت‌های مختلف در تهیه واکسن ORT صورت گرفته است (۱۳).
هدف از مطالعه حاضر تهیه واکسن اورنیتوباکتریوم با استفاده از ادجوانت‌های متفاوت (روغن معدنی ، ساپونین و آلوم) و بیشترین ایمنی‌زائی و حفاظت ایجاد شده توسط واکسن ORT با سه نوع ادجوانت‌های ذکر شده در جوجه‌های (Specific pathogenic free) بصورت آزمایشی می‌باشد.

مواد و روش کار

تهیه واکسن ORT

به منظور تهیه واکسن ابتدا سروتیپ A باکتری اورنیتوباکتریوم رینوتراکیال که از بخش تحقیق و کنترل بیماری‌های طیور موسسه رازی حصارک تهیه شده بود در محیط BHI به همراه پنج درصد سرم جنین گوساله تلقیح گردید و پس از تکثیر باکتری مذکور با کمک فرمالین به میزان ۰/۵٪ ـ ۰/۳٪ حجمی غیرفعال‌سازی صورت گرفت.
با استفاده از باکتری غیرفعال شده به میزان نهایی $۱/۱\times۱۰^{۹}$ در هر سی‌سی و با استفاده از روغن معدنی مونتاناید (ISA۷۰) تهیه شده از شرکت Sepic فرانسه پس از فرمولاسیون و هموژنیزاسیون بر اساس روش استاندارد واکسن تهیه گردید. با استفاده از آلوم وساپونین نیز با روش مشابه، دو واکسن دیگر نیز تهیه شد.

آزمایشات کنترل کیفیت واکسن‌ها

کلیه آزمایشات میکروبیولوژی از جمله آزمایش عاری بودن از میکوپلاسما، غیرهوازی بودن (anaerobic) Micotic microloans, به جهت اطمینان از عدم آلودگی براساس دستورالعمل استاندارد انجام گردید. آزمایشات دو فاز شدن نیز براساس روش استاندارد نیز صورت گرفت. ویسکوزیته واکسن‌ها نیز با استفاده از دستگاه ویسکومتر اندازه‌گیری شد، pH کلیه واکسن‌ها نیز توسط دستگاه pH متر ارزیابی گردید.

جوجه‌های SPF

تعداد ۶۰ قطعه جوجه SPF درسن سه هفتگی به طور تصادفی به چهار گروه ۱۵ تایی تقسیم شدند. شرایط نگهداری جوجه‌ها از لحاظ دما، رطوبت و غذا یکسان در نظر گرفته شد.
کلیه جوجه‌های SPF گروه یک مقدار ۰/۳ سی‌سی واکسن تهیه شده با ادجوانت روغن مونتاناید ISA۷۰ در ناحیه پشت گردن و بصورت زیر پوستی دریافت کردند. به جوجه‌های گروه دو نیز مقدار ۰/۳ سی‌سی واکسن تهیه شده با آلوم پتاسیم بطریق مشابه گروه ۱ تلقیح گرید.
جوجه‌های گروه ۳ با دز مشابه گروه‌های قبلی از واکسن ORT تهیه شده با ساپونین و با روش قبلی دریافت کردند . گروه ۴ بعنوان کنترل در نظر گرفته شده و تنها بافر فسفات سیلین (PBS) به آن‌ها تلقیح گردید .

بررسی ایمنی‌زایی واکسن اورنیتو باکتریوم تهیه شده با روغن مونتاناید

به منظور بررسی ایمنی‌زایی واکسن اورنیتوباکتریوم با استفاده از روغن مونتاناید ISA۷۰ در جوجه‌های SPF دو نوبت واکسیناسیون صورت گرفت. بدین منظور واکسن ORT با دوز ۰/۳ سی سی به ۱۵ جوجه در سن سه هفتگی در ناحیه پشت گردن بصورت زیر پوستی تلقیح گردید و خونگیری از سیاهرگ زیر بال از یک هفته بعد از واکسینا سیون بطور مرتب هر هفته جهت جداسازی سرم و بررسی تیتر آنتی‌بادی انجام می‌گرفت. در هفته هشتم یک مرحله دیگر واکسن یادآور به جوجه‌ها تزریق گردید و مجدداً تا پایان هفته بیست ودوم خونگیری انجام شد. جوجه‌ها هر روز از لحاظ مرگ و میر و همچنین هر گونه واکنش در محل تزریق مورد بررسی قرار گرفت. یک گروه ۱۵ تایی به عنوان کنترل در نظر گرفته شد که با روش مشابه PBS به میزان ۰/۳ سی‌سی در سه هفتگی ویادآور در پنج هفتگی به جوجه‌ها تزریق گردید.
سرم جوجه‌های SPF ایمن‌سازی شده (واکسینه شده) با واکسن ORT و همچنین سرم جوجه‌های SPF گروه کنترل، توسط کیت الیزا طراحی شده به منظور بررسی پاسخ ایمنی هومورال جوجه‌ها به واکسن، مورد بررسی قرار گرفتند.

نمونه‌گیری

از کلیه جوجه‌ها هرهفته خونگیری بعمل آمد وسرم آن‌ها جدا گردید.
لازم به ذکر است که قبل از تلقیح واکسن نیز از تمامی جوجه‌ها خونگیری انجام گردید بررسی سرولوژی با استفاده از تست الیزا (Elisa) نیز انجام گرفت.

آزمایش الیزا

آزمون الیزای غیرمستقیم جهت ارزیابی ایمونوگلوبولین‌های G علیه آنتی‌ژن‌های باکتری اورنیتوباکتریوم در سرم کلیه جوجه‌های واکسینه شده با واکسن‌های تجربی کشته اورنیتوباکتریوم رینوتراکیال همراه با ادجوانت‌های مختلف و غیر واکسینه انجام گردید.
به منظور استانداردسازی آزمون الیزا در آزمایشگاه ابتدا سروتیپ A اورنیتوباکتریوم رینوتراکیال در داخل محیط BHI به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد $CO_{۲}$ دار به میزان ۱۰٪ کشت داده شد.
میکروارگانیسم مورد نظر به مدت ۳۰ دقیقه با دور g۲۵۰۰ سانتریفیوژ گردید و با استفاده از بافر فسفات سیلین PBS سه بار شسته شد. سپس رسوب بدست آمده با فرمالین غیرفعال گردید. تست الیزا به روش شطرنجی با استفاده از مقادیر متفاوت آنتی‌ژن برای کت کردن پلیت الیزا (شامل دو میلیون، چهار میلیون و هشت میلیون باکتری بازاء هر چاهک) و همچنین رقت‌های مختلف سرم مثبت و منفی (شامل ۱/۲۵، ۱/۵۰ و ۱/۱۰۰) و در نهایت رقت مختلف آنتی‌بادی کنژوگه (شامل ۱/۲۰۰۰، ۱/۴۰۰۰و ۱/۸۰۰۰) استاندارد گردید که در نهایت تست الیزای محلی با پارامترهای دو میلیون باکتری در هر چاهک، رقت سرم ۱/۵۰ و رقت کنژوگه ۱/۴۰۰۰ و زمان ایجاد رنگ ۱۵ دقیقه استاندارد شد و برای ارزیابی آنتی‌بادی علیه اورنیتوباکتریوم رینوتراکیال در سرم جوجه‌های گروه‌های واکسینه و کنترل از تست استاندارد شده استفاده گردید. بطور خلاصه هر چاهک از پلیت ۹۶ چاهکی (Nunc) توسط ۲×۱۰^{۶} باکتری اورنیتوباکتریوم ریتوتراکیال غیرفعال شده در یک صد میکرولیتر بافرکربنات بی‌کربنات (pH=۹/۶) و انکوباسیون در چهار درجه سانتی‌گراد برای یک شب کت شدند. سپس چاهک‌های پلیت کت شده توسط ۳۰۰ میکرولیتر بافر فسفات سالین حاوی ۰/۰۵ درصد توین ۲۰ (Tween ۲۰) شسته شدند، به هر

چاهک ۱۰۰ میکرولیترآلبومین سرم گاو یک درصد اضافه و پلیت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای یک ساعت انکوبه شد. مجدداً چاهک‌های پلیت چهار بار توسط بافسفات سالین حاوی توین ۲۰، شستشو داد شد و به هر چاهک یک صد میکرولیتر سرم ۱/۵۰ رقیق شده جوجه‌های واکسینه شده با هر کدام از واکسن‌های تهیه شده و همچنین جوجه‌های گروه کنترل ریخته شد و پلیت مجددا برای یک ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. بعد از شستشوی مجدد چاهک‌ها با بافرفسفات سالین حاوی توین ۲۰، ۱۰۰میکرولیتر آنتی ایمونوگلوبولین جوجه کنژوگه با پراکسید جوجه در رقت ۱/۴۰۰۰ به هر چاهک اضافه و پلیت برای یک ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. پس از اتمام زمان انکوباسیون و شستشو پلیت با بافر فسفات سیلین حاوی توین ۲۰ برای چهار مرتبه به هرچاهک مقدار۱۰۰ میکرولیتر ماده رنگ‌زا (هیدورژن پراکسید و اورتوفنیلین دی آمین (OPD)) ریخته شد و پلیت بمدت ۱۰ دقیقه در محیطی تاریک در دمای اتاق انکوبه گردید. در نهایت به هر چاهک مقدار ۱۰۰میکرولیتر اسیدسولفوریک ۱۲/۵ درصد اضافه شد و OD چاهک‌ها توسط دستگاه خوانش ا لیزا در ۴۵۰ نانومتر خوانده شد.

نتایج

کشت باکتری

کشت باکتری اورنیتوباکتریوم رینوتراکیال در محیط برین هارت اینفیوژن براث پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در شرایط میکروائروبیک (۵-۱۰ درصد دی اکسید کربن) دارای ۴۵۰ -۶۰۰ میلیون باکتری در میلی‌لیتر بود.

نتایج غیرفعال بودن کشت اورنیتوباکتریوم رینوتراکیال نشان داد که هیچ گونه رشدی روی محیط مورد استفاده (آگار خوندار) مشاهده نگردید و با توجه به مشاهده باکتری‌های گرم منفی چند شکلی در رنگ‌آمیزی گرم از اسمیر تهیه شده از کشت غیرفعال شده باکتری اورنیتوباکتریوم رینوتراکیال مشخص شد که کشت خالص می‌باشد.

بی‌ضرری واکسن‌ها

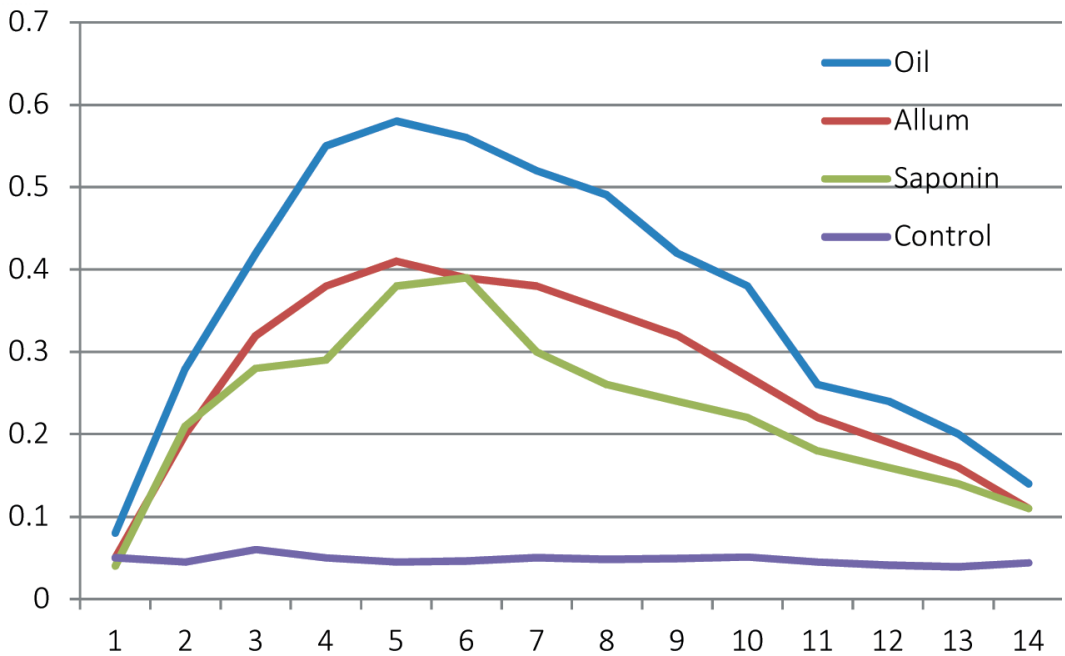
پس از تزریق واکسن‌های تجربی تهیه شده به جوجه‌ها به صورت زیرجلدی به منظور ایمن‌سازی، در هر سه نوع واکسن هیچ‌گونه واکنش خاصی در محل تزریق و یا واکنش سیستمی پس از ۳ هفته مشاهده نگردید. در مورد واکسن با ادجوانت روغنی در برخی از جوجه‌ها در هنگام لمس محل تزریق برآمدگی و سفتی حس می‌گردید که این حالت ظرف یک هفته برطرف گردید.

ارزیابی فیزیکو شیمیایی واکسن‌ها

نتایج فیزیکو شیمیایی هر سه واکسن نشان داد که هیچ‌گونه تفاوتی بین آن‌ها وجود ندارد. میزان ویسکوزیته، تست دوفازی شدن آن‌ها در حد استاندارد بود.

نتایج پاسخ ایمنی جوجه‌های ایمن‌سازی شده

نتایج پاسخ ایمنی جوجه‌های ایمن‌سازی شده با باکترین اورنیتوباکتریوم رینوتراکیال در ادجوانت‌های مختلف نشان می‌دهد که سرم جوجه‌های ایمن‌سازی شده با باکترین اورنیتوباکتریوم رینوتراکیال همراه با ادجوانت



نمودار۱- تیتر انتی بادی بر علیه اورنیتوباکتریوم رینوتراکیال **ایجاد شده توسط واکسن های تجربی تهیه شده با ادجوانتهای متفاوت با الیزا در جوجه های SPF**

روغن مونتاناید (امولسیون آب در روغن) عیار آنتی‌بادی بیشتری در مقایسه با دو گروه دیگر، گروه دریافت کننده باکترین اورنیتوباکتریوم رینوتراکیال بهمراه ساپونین و گروه دریافت کننده باکترین اورنیتوباکتریوم رینوتراکیال همراه با آلوم را نشان می‌دهد. در نمودار ۱ هر سه گروه دریافت کننده آنتی‌ژن بهمراه ادجوانت افزایش عیار آنتی‌بادی علیه اورنیتوباکتریوم رینوتراکیال را نشان می‌دهند، اگر چه این افزایش در گروه دریافت کننده ادجوانت روغن معدنی بیشتر می‌باشد. آنتی‌بادی‌های علیه اورنیتوباکتریوم رینوتراکیال یک هفته پس از تلقیح آنتی‌ژن قابل ردیابی بوده و تا هفته چهارم پس از ایمن‌سازی دارای سیر صعودی می‌باشد. (نمودار ۱).

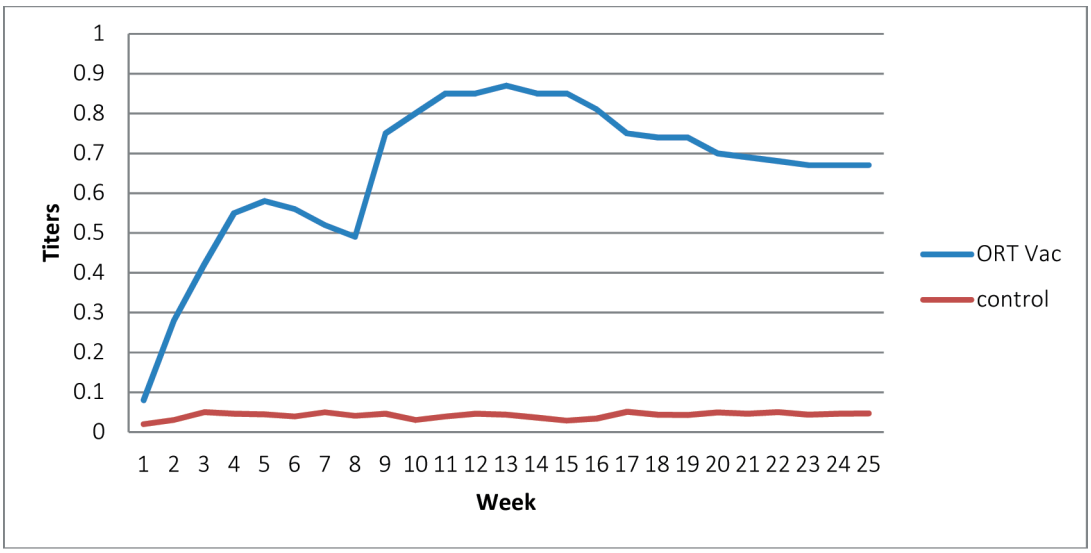
نتایج بدست آمده از تست الیزا سرم جوجه‌ها نشان می‌دهد که بعد از تزریق مجدد واکسن در سن پنج هفته بعد از واکسن اول تیتر آنتی‌بادی بر علیه اورنتوباکتریوم شروع به افزایش می‌نماید که در سه هفته بعد از واکسن دوم تیتر ایجاد شده به حد اکثر می‌رسد.(نمودار ۲)

نتایج بدست آمده با استفاده از روش آماری آنوا (ANOVA) و دانکن (DUNCAN) مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد که بین سرم جوجه‌های کنترل منفی و کنترل مثبت از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($p < ۰/۰۵$).

بحث

از زمان شناسایی و تعیین هویت باکتری اورنیتوباکتریوم رینوتراکیال و همچنین شناسایی دامنه گسترش این باکتری در مرغداری‌های صنعتی و گسترش جهانی آن و خسارات اقتصادی ناشی از این عفونت، تلاش‌های گسترده‌ای جهت طراحی و تهیه واکسن موثر برای پیشگیری از این بیماری صورت گرفته و در نتیجه مقآبله با آن شروع و در نتیجه تنوعی از واکسن‌های کشته و زنده بطور همزمان طراحی و مورد بررسی قرار گرفته‌اند که در نهایت با نتایج رضایت بخش به دست آمده از این مطالعات سرانجام واکسن‌های تجاری بجهت استفاده در ماکیان ارائه گردیده است (۲،۵). هنگام بکارگیری واکسن کشته ضروری است تا برای القاء پاسخ ایمنی کارآمد مورد نیاز برای مقآبله با عفونت از تقویت کننده پاسخ ایمنی تحت عنوان یاور یا ادجوانت به همراه واکسن استفاده گردد. از یاورهای متعددی از جمله ساپونین، هیدروکسید آلومینیوم و روغن معدنی جهت تهیه واکسن کشته استفاده گردیده است. در مطالعات انجام شده توسط ون امپل و بوش ۱۹۹۸ و ارگانیس و همکاران ۲۰۱۰ از این ادجوانت‌ها برای تقویت پاسخ ایمنی استفاده شده است. (۲۱،۹)

در این مطالعه نیز به بررسی کارایی این ادجوانت‌ها برای تقویت پاسخ ایمنی به واکسن کشته اورنیتوباکتریوم رینوتراکیال تجربی در جوجه‌های SPF اقدام گردید. واکسن تجربی تهیه شده با روغن معدنی مونتاناید در هفته‌های اندازه گیری شده نسبت به دو واکسن تجربی دیگر مقدار آنتی‌بادی بیشتری القاء نموده است. هر سه نوع واکسن کشته تجربی تهیه شده با بکارگیری سه ادجوانت متفاوت در جوجه‌های SPF واکسینه شده پاسخ ایمنی هومورال را القاء نمودند. اگر چه مقدار آنتی‌بادی القاء شده توسط این واکسن‌های تجربی در جوجه متفاوت بود، لیکن با توجه به اینکه مقدار آنتی‌ژن یکسان برای هر دز از این واکسن‌های تجربی در نظر گرفته شد، می‌توان نتیجه گرفت که تفاوت در مقدار پاسخ ایمنی هومورال القاءشده در نتیجه تفاوت در ادجوانت استفاده شده می‌باشد.



نمودار۲- تیترآنتی بادی علیه اورنیتوباکتریوم رینوتراکیال **ایجاد شده با دوبار واکسیناسیون توسط واکسن تجربی تهیه شده با ادجوانت روغن معدنی مونتاناید با الیزا در جوجه های SPF**

در مطالعات انجام شده توسط محققین دیگر از جمله ون امپل و بوش ۱۹۹۸، ون وین ۲۰۰۴، مورتی و همکاران ۲۰۰۷، ارگانیس و همکاران ۲۰۱۰ بر استفاده از ادجوانت با باکترین اورنیتوباکتریوم رینوتراکیال برای دست‌یابی به پاسخ ایمنی مناسب در جوجه‌های ایمن‌سازی شده تاکید شده، زیرا در مطالعات آنان نیز باکترین بدون ادجوانت پاسخ ایمنی ضعیف القاء کرده است (۲۲،۲۰،۱۳،۸). در مطالعه حاضر در تمام گروه‌های آزمایشی قبل از واکسیناسیون با بکارگیری تست الیزا، آنتی‌بادی علیه اورنیتوباکتریوم رینوتراکیال منفی بود. گروه‌های واکسینه شده نسبت به گروه کنترل در هفته‌های پس از واکسیناسیون دارای تیتر آنتی‌بادی علیه اورنیتوباکتریوم رینوتراکیال بودند که این افزایش آنتی‌بادی نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بود ($p < ۰/۰۵$). یافته‌های این تحقیق بخوبی با یافته‌های دیگر محققین هم‌خوانی دارد، بطوری که ون امپل و بوش ۱۹۹۸ اعلام نمودند که واکسیناسیون مرغ‌های مادر با باکترین اورنیتوباکتریوم رینوتراکیال در روغن معدنی باعث ایجاد پاسخ ایمنی قوی و با دوام در آن‌ها می‌گردد که می‌تواند به جوجه‌ها به صورت عمودی منتقل شده و آن‌ها را در هفته‌های اول زندگی در برابر عفونت اورنیتوباکتریوم رینوتراکیال محافظت نماید (۲۲).

ادجوانت روغن معدنی پاسخ ایمنی هومورال قوی‌تری نسبت به سایر ادجوانت‌های معمول مورد استفاده در صنعت مرغداری ایجاد می‌کند. ادجوانت روغن معدنی تنها ادجوانتی است که در جوجه‌های یک روزه پاسخ ایمنی هومورال مناسبی ایجاد می‌کند اگر چه آنتی‌بادی مادری می‌تواند حضور داشته باشد (۹،۲۲).

نمودار یک پاسخ ایمنی جوجه‌های ایمن‌سازی شده با باکترین اورنیتوباکتریوم رینوتراکیال با هر کدام از این ادجوانت‌ها را نشان می‌دهد. همانطور که در نمودار مشاهده می‌گردد، ادجوانت ساپونین کمترین پاسخ ایمنی و ادجوانت روغن معدنی بیشترین پاسخ ایمنی با مقدار ثابت از آنتی‌ژن را در جوجه ایجاد کرده است.

این یافته با یافته‌های سایر محققین که در زمینه استفاده از ادجوانت تحقیق نموده‌اند (ون امپل و بوش ۱۹۹۸ و ارگانس و همکاران ۲۰۱۰، مورتی و همکاران۲۰۰۷) همخوانی دارد. کارآمدی ادجوانت روغن معدنی در تولید واکسن‌های دام و طیور به خوبی شناخته شده است و از این ادجوانت در تولید واکسن‌های نیوکاسل و آنفلوانزای غیرفعال طیور استفاده می‌گردد (۲۲،۱۳،۸). اگر چه ادجوانت هیدروکسید آلومینیوم ادجوانتی است که برای استفاده در واکسن‌های انسانی توصیه گردیده و لذا بی‌خطرترین ادجوانت محسوب می‌شود، اما مطالعه مورتی و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان داد که پاسخ ایمنی قوی ایجاد نمی‌نماید. ساپونین اگر چه ادجوانتی ارزان و استفاده از آن آسان می‌باشد اما در این مطالعه نشان داده شد که نسبت به دو ادجوانت دیگر پائین‌ترین سطح پاسخ ایمنی را القاء می‌نماید. با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان نتیجه‌گیری کرد که با توجه به القاء پاسخ ایمنی هومورال قوی‌تر در جوجه‌ها ایمن‌سازی شده با باکترین اورنیتوباکتریوم رینوتراکیال بهمراه روغن معدنی این ادجوانت کاندیدای مناسبی برای استفاده در تولید این واکسن می‌باشد.

در مطالعات دیگری نیز توسط Bisschop و همکاران در خصوص استفاده از واکسن ORT در گله‌های مادر گوشتی انجام گرفته است که نشان دهنده کارآیی واکسن کشته در ایجاد ایمنی جوجه‌ها می‌باشد. (۴) در این تحقیقات از روغن معدنی مونتاناید جهت ادجوانت استفاده گردید که باعث می‌گردد تیتر بالاتر و طولانی‌تر را در بدن جوجه ایجاد نماید، این مسئله توسط دیگر محققان از جمله Murthy و همکاران نیز اثبات گردیده است(۱۳). آن‌ها از ژل هیدرو کسید آلمینیوم، آلوم پتاسیم و روغن معدنی جهت تهیه واکسن ORT استفاده کردند و نتیجه‌گیری نمودند که روغن‌های معدنی تیتر بالاتر و طولانی‌تری را ایجاد می‌نماید (۱۳).

در هند، Murthy و همکاران اثر چند واکسن غیرفعال ORT را بر پاسخ ایمنی و تغییرات پاتولوژیک پس از چالنج ORT در مرغ تخمگذار بررسی نمودند. انواع باکترین با دو روش غیر فعال‌سازی فرمالین و تیومرسال و سه ادجوانت مختلف شامل روغن‌های معدنی، آلوم پتاسیم و ژل هیدروکسید آلومینیوم تهیه شد. پس از دو نوبت تزریق واکسن به مرغ تخمگذار در ناحیه گردن، هیچ یک از واکسن‌ها واکنش موضعی یا عمومی نشان ندادند. ۷ روز پس از واکسیناسیون اول، پاسخ ایمنی تنها در مورد واکسن تهیه شده با ادجوانت روغن معدنی دیده شد و مشخص شد که تنها این نوع واکسن، ایمنی زودتری را در عرض یک هفته پس از واکسیناسیون ایجاد می‌کند. باکتری‌های با یا بدون ادجوانت در عرض ۱۴ تا ۲۱ روز پس از واکسن اول، واکنش ایمنی ایجاد می‌کنند، اما باکترین‌های همراه با ادجوانت روغن معدنی، تیتر بالاتر و طولانی‌تری را تولید می‌کنند(۱۳). آن محققین سه هفته پس از واکسن اول (زمان تزریق اولین واکسیناسیون در ۸ هفتگی) افزایش تیتر آنتی‌بادی و همچنین سه هفته پس از واکسن دوم (۱۱ هفتگی) افزایش تیتر آنتی‌بادی را مشاهده نمودند. آن‌ها اظهار داشتند که علیرغم اینکه سن واکسیناسیون بوقلمون‌های تجاری ۶ تا ۹ هفتگی است؛ می‌توان بر حسب ضرورت، این سن را به ۳ تا ۶ هفتگی کاهش داد.

Erganis و همکاران در طی تحقیقاتی مشاهده کردند که سه هفته بعد از واکسیناسیون با واکسن کشته اورنیتو باکتریوم تیتر انتی‌بادی به حداکثر می‌رسد آن‌ها همچنین دریافتند که سه هفته بعد از واکسن دوم نیز مجددا تیتر انتی‌بادی افزایش می‌یابد. این محققین گزارش کردند که هر دو باکترین ساخته شده با فرمالین وتیومرسال پاسخ سرولوژی و حفاظت مطلوبی را نشان می‌دهند و دو نوبت استفاده از واکسن غیرفعال همراه با ادجوانت روغن معدنی در مرغ تخمگذار تجاری منجر به تیتر ایمنی بالا و طولانی مدت خواهد شد و این به خاطر پاسخ ایمنی قوی بعد از واکسیناسیون اول و اثر تقویت کننده پس از واکسیناسیون دوم است. این محققین، نتیجه گرفتند که واکسیناسیون پولت‌های تخمگذار در ۸ هفتگی و تکرار آن در سن ۱۲ هفتگی (دوز یاد آور)، می‌تواند برای محافظت در برابر تغییرات پاتولوژیک، در اشکال تورم کیسه هوایی و پنومونی بر اثر عفونت‌های ORT یک روش موثر باشد. در این تحقیق تیتر قابل قبولی با استفده از دو نوبت واکسیناسیون جوجه‌ها بدست می‌آید که تیتر بالا به علت اثر تقویت‌کننده پس از واکسیناسیون دوم است (۸).

در این تحقیق نیز مشخص گردید که واکسن تهیه شده با روغن مونتاناید توانایی ایجاد ایمنی بالاتری نسبت به دو ادجوانت دیگر بکار رفته در این تحقیق دارد و از طرف دیگر دز یادآور در پنج هفته بعد از واکسن اول می‌تواند ایمنی با دوامی را در جوجه‌ها ایجاد کند و تیتر آنتی‌بادی بطور معناداری نسبت به جوجه‌های که یک بار واکسینه شدند بالاتر می‌باشد.

منابع مورد استفاده

1-Banani, M., p. Khaki, H. Goodarzi, J. Vandyousefi and S.A. Pourbakhsh. 2000. Isolation and identification of *Ornithobacterum rhinotracheale* from a broiler and a pullet flock. *Pajouhesh & Sazandegi* 46: 10

2- Banani, M., R. Momayez, S.A. Pourbakhsh, H.Goodarzi and M.A. Bahmani – Nejad. 2002. Simultaneous isolation of *Ornithobacterium rhinotracheale* and avian influenza virus subtype H9N2 from commercial poultry. *Iranian Journal of Veterinary Research.* 3(2):190 – 195.

3- Banani, M., S.A. Pourbakhsh. P. Khaki and G. Moazeni Jula. 2004. Isolation and identification of bacterial agents in commercial chickens suffered from swollen head and face. *Iranian Journal of Veterinary Research*. 5(1). No, 9: 49-61. (In Persian).

4- Bisschop, S.P., M. Van Vuuren. And B. Gummow. 2004. The use of a bacterin vaccine in broiler breeders for the control of *Ornithobacterium rhinotracheale* in commercial broilers. *Journal African veterinary Association*. 75: 125-128

5- Churria, C.D., G.B. Vigo, M.A. Machuca, V.F. Nievas and et al. 2013. Vaccines against *Ornithobacterium rhinotracheale*: A Review. *Journal of Veterinary Science & Medical Diagnosis*. 2:4

6- Chin, R.P., P.C.M. van Empel, and Hafez, H.M. 2013. *Ornithobacterium rhinotracheale* infection. In: Diseases of poultry. Swayne, D.E. et al. (eds). 13 th edition. Wiley- Blackwell press, AAAP. Pp: 1124- 1132

7- Doosti, A., A. Sharifzadeh. H. Ghasemi, J.Vaez. 2011. Molecular identification of *Ornithobacterium rhinotracheale* in turkeys in Isfahan province of Iran. *African Journal Biotechnology*.10 (40): 7911-7914.

8- Erganis, O., H.H. Hadimli. K. Kav. Z. Sayin and Z. Aras. 2010. Production and development of vaccines for *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in turkeys. *Eurasian Journal veterinary science.* 26: 101-107.

9- Erganiş, O., H.H. Hadimli. K. Kav and Z. Sayin. Z. Aras. 2011. Production and development of vaccines for *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in commercial broilers. *Eurasian Journal veterinary Science.* 27, 2: 99-105.

10- Ghanbarpour., R, and M. Salehi. 2009. Sero-prevalence and identification of *Ornithobacterium rhinotracheale* in broiler flocks in south-eastern Iran. *Tropical Animal Health Production.* 41,7:1549-61.

11- Ghodsian, N., V. Karimi. M. Banani. M.H. Bozorgmehri-Fard. T. Zahraei Salehi and S.A. Pourbakhsh. 2013. The phylogenetic analysis of some *Ornithobacterium rhinotracheale* isolates from Alborz province commercial chicken flocks of Iran. *Scientific- Research Iranian Veterinary Journal*. 18.4 (37): 68-75.

12- Gornatti, C.D, M. Machuca. G. Vigo and M. Petruccelli. 2012. *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in poultry: an updated review. *International Journal Molecular Zoology*. 2.23–38.

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

14- Rahimi, M., and M.M. Banani, MM. 2007. Isolation of *Ornithobacterium rhinotracheale* from the chickens of a broiler farm in Kermanshah province, west of Iran. *Iranian Journal of Veterinary Research*, University of Shiraz. 8(4). 21: 355-359.

15- Seifi, S. 2012. Seroprevalence and isolation of *Ornithobacterium rhinotracheale* in broiler flocks in Mazandaran province, north of Iran. *Bulgarian Journal Veterinary Medecine.* 15(3): 184-190.

16-Schuijfel, D. F., P.C.M. van Empel. A.M. Pennings. P.J.M. van Putten and M. Nuijten 2005. Successful Selection of Cross-Protective Vaccine Candidates for *Ornithobacterium rhinotracheale* Infection. *Infection and Immunity* 73(10): 6812–6821.

17- Thieme, S., M.Hafez .S. Gutzer.N. Warkentin. D. Lüschow. K. Mühldorfer. 2016. Multilocus sequence typing of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolated from pigeons and birds of prey revealed new insights into its population structure. *Veterinary animal science*.1, 2: 15-20

18- Van Veen, L., P. Van Empel and T. Fabri, T. 2000. *Ornithobacterium rhinotracheale*, a primary pathogen in broilers. *Avian Disease*. 44: 896 -900.

19- Van Veen, L., E. Gruys. K. Frik and P.C.M. Van Empel 2000. Increased condemnation of broilers associated with *Ornithobacterium rhinotracheale*. *Veterinary Records.* 147:422-423.

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

21- Van Empel, P.C.M. and H.M. Hafez. 1999. *Ornithobacterium rhinotracheale* : a review. *Avian Patholology.* 28: 217- 227.

22 - van Empel, P.C.M. and H.van den Bosch. 1998. Vaccination of chickens against *Ornithobacterium rhinotracheale* infection. *Avian Diseases*. 42: 572-57.