DOI: 10.22092/vj.2019.124112.1521
شماره ۱۲۴ پاییز ۱۳۹۸
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

مطالعه اختلافات سرولوژیکی جدایه‌های اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال

• **عباس نوری (نویسنده مسئول)**
استادیار پژوهشی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج
• **منصور بنانی**
دانشیار پژوهشی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج
• **سید غلامرضا میرزایی**
کارشناس ارشد موسسه تحقیقات واکسن وسرم سازی رازی، کرج
تاریخ دریافت: ۱۳۹۷-۰۸-۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷-۱۰-۲۴
Email: a.nouri@rvsri.ac.ir

چکیده

مطالعه حاضر برای بررسی تنوع آنتی‌ژنیک پنج جدایه‌ی ۶۵،۶۳،۷۱،۳۲،۷ اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال (*Ornithobacterium rhinotracheale, ORT*) از برخی استان‌های کشور انجام گرفت. تعداد ۴۸ پرنده از جوجه‌های SPF ۱۴ روزه به‌طور تصادفی به ۶ گروه جداگانه تقسیم‌شده و با دسترسی آزاد به غذا و آب در قفس‌های جداگانه نگهداری شدند. جداگانه به هر گروه، از هریک از آنتی‌ژن‌های غیرفعال شده با فرمالین حاوی تعداد (CFU ^ ۱۰ ×۱) باکتری به همراه یاور ناقص فروند، دو مرتبه بافاصله سه هفته تزریق گردیدند. گروه ششم تنها بافر سالین فسفات در هر مرحله دریافت نمودند. دو هفته بعد، خون‌گیری از تمام پرنده‌ها جهت تهیه نمونه‌های سرمی صورت گرفت. ارزیابی پاسخ ایمنی هومورال و تشخیص تفاوت‌های آنتی‌ژن در بین جدایه‌ها با استفاده از آزمایش الیزا تجاری و آزمون (AGP, Agar gel precipitation)، انجام شد. نتایج الیزا تفاوت در تولید آنتی‌بادی با بالاترین سطح سرمی برای جدایه‌های ۷ و ۳۲ (p<۰/۰۵) و کمترین تیتر برای جدایه ۶۳ را نشان داد. آزمون AGP نشان داد حداقل یک آنتی‌ژن مشترک بین بیشتر جدایه‌ها (به‌جز جدایه ۷۱) وجود دارد. بعلاوه در AGP واکنشی مشابه بین این آنتی‌ژن‌ها با سرم حاصل از پرنده SPF ایمن شده با واکسن (ORT,serotype A) مشاهده شد. این تحقیق نشان داد که جدایه‌های مزبور ازلحاظ سرولوژیکی دارای هویت یکسان (به جز ۷۱) و وابسته به سروتیپ A اورنیتوباکتریوم رینوتراکئاله بوده و بین جدایه‌ها ممکن است اختلافی در القای پاسخ ایمنی دیده شود. نتایج این مطالعه می‌تواند در انتخاب بهتر سوش کاندیدای واکسن ORT بومی استفاده شود.

کلمات کلیدی: اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال، الیزا، تست رسوبی در ژلوز آگار، سروتیپ، جوجه عاری از اجرام خاص

Veterinary Researches & Biological Products No 123 pp: 30-37

Study of Serological Differences of *Ornithobacterium Rhinotracheale* Isolates

By: Nouri, A., (Corresponding Author) Department of Avian Diseases, Research & Diagnosis, Razi Vaccine & Serum Research, Institute, ministry of jahad-e-agriculture, research and education deputy, Karaj, Iran. Banani, M., Department of Avian Diseases, Research & Diagnosis, Razi Vaccine & Serum Research, Institute, ministry of jahad-e-agriculture, research and education deputy, Karaj, Iran. and Mirzaei, S. GH., Department of Avian Diseases, Research & Diagnosis, Razi Vaccine & Serum Research, Institute, ministry of jahad-e-agriculture, research and education deputy, Karaj, Iran.

Received: 2018-11-13 Accepted: 2019-01-14

Email: a.nouri@rvsri.ac.ir

The present study was conducted to evaluate the antigenic diversity of five ORT (*Ornithobacterium rhinotracheale*) isolates (7,32,71,63,65) from a few provinces. 48 birds from 14-day-old SPF chicken were randomly divided into 6 separate groups and were kept in separate cages with free access to food and water. Each of the groups were inoculated with formalin inactivated antigens of each isolates containing a 1 × 10 8 CFU, per dose of bacteria along with incomplete fraud's adjuvant twice within three weeks. The sixth group was injected with saline phosphate buffer. Two weeks post inoculation, all birds were bleeded for the preparation of serum samples. Evaluation of induced humoral immune response and differentiation of antigen diversity among isolates were done using commercial ORT ELISA kit and Agar Gel Precipitation (AGP) tests. Differences in titer were observed by ELISA with the highest serum level for isolates 7 and 32 ($P<0.05$) and the lowest titer for the 63 isolate. AGP test showed one common antigen between most isolates (except for isolate 71). In addition, a similar reaction was detected by all the antigens against the serum of SPF chickens previously immunized with a commercial ORT (serotype A) vaccine. Overall this study showed the most isolates were serologically identical (except 71) and associated to the serotype A of ORT in addition to possible variable induction of the immune response by isolates in chickens. The results of this study could help researcher in choosing an ORT candidate for producing a more effective local vaccine.

Keywords: Ornithobacterium rhinotracheale, AGP, ELISA, serotyping, SPF chicken

مقدمه

عفونت به اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال (*Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT)) در پرندگان موجب بروز بیماري مسري با نشانی‌های اختلالات تنفسي و مرگ‌ومیر و کاهش رشد می‌شود. اهمیت اقتصادی این بیماری در گله‌های طیور در ارتباط با افزایش تلفات و کاهش تولید تخم‌مرغ و رشد می‌باشد (۱۰). اولین گزارش عفونت ORT در مرغداری‌های ایران، توسط بنانی و همکاران در سال ۱۳۷۹ از يك گله جوجه گوشتي و يك گله پولت تخم‌گذار دارای علائم تنفسي انجام‌شده است (۶). متعاقباً باکتري از بوقلمون (۱۵) و سایر نژادهاي ماکیان نیز توسط دیگر محققان گزارش شد (۷, ۱۰). مطالعات دیگر ردیابی سرمی بیماري اورنیتوباکتریوز در نژادهاي مختلف ماکیان ایران شامل مادر گوشتي، جوجه گوشتي، تخم‌گذار تجاري و مرغ بومي و در گله‌های با تلفات بالا نشان دادند که درصد شیوع بسیار بالای از آلودگی در گله‌های طیور کشور وجود دارد (۱, ۳, ۱۲) و در سال‌های اخیر باکتری ORT علاوه بر ماکیان از بلدرچین و کبوتر اهلی در ایران نیز مورد جداسازی و تعیین هویت قرارگرفته است (۱۷). اخیرا بنانی (۵) مروری کلی بر عفونت اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال در صنعت طیور ایران نموده است.

گونه باکتری اورنیتوباکتریوز باکتریوم رینوتراکئال ازنظر سرولوژی شامل چندین سروتیپ است. تاکنون ۱۸ سروتیپ از این باکتری مورد شناسایی قرارگرفته است. این سروتیپ‌ها به ترتیب با حروف A تا R نام‌گذاری و شناخته می‌شود. بیش از ۹۷ درصد جدایه‌های به‌دست‌آمده از گونه‌های مختلف پرندگان محدود به سروتیپ‌های A, B, D, E بوده است. در این بین بیشتر باکتری‌های جدا شده ازماکیان مربوط به سروتیپ A و جدایه‌های بوقلمون با تنوع بیشتر از نوع سروتیپ‌های A ،B و D مورد شناسایی قرارگرفته‌اند (۱۰). تعیین سروتیپ یا شناسایی سرمی این باکتری با آزمون آگار رسوبی ژله (Agar Gel Precipitation(AGP)) و یا ELISA و بر اساس آنتی‌ژن مقاوم به حرارت و یا پروتیناز K صورت گرفته است (۹, ۱۰, ۲۰, ۲۱).

در طیور صنعتی استفاده از واکسن در استراتژي مبارزه با بیماري تنفسي و کاهش زیان‌های اقتصادي ناشي از آن حائز اهمیت می‌باشد. واکسن تجاری موجود در بازار جهانی علیه بیماری اورنیتوباکتریوز معمولاً از

سروتیپ غالب شایع در ماکیان (سروتیپ A) تهیه می‌شود. بوقلمون بعلت احتمال آلودگی به بیش از یک سروتیپ واکسناسیون با واکسن‌های چند ظرفیتی انجام می‌گردد. استفاده از واکسن سویه‌های بومی در بوقلمون با موفقیت مصرف گرفته است (۸).

با توجه به ناکافی بودن اطلاعات و شناخت مولکولی در زمینه تعیین آنتی‌ژنسیته و نیز تعیین سروتیپ باکتری ORT بر اساس آزمایشات مولکولی، بررسی و مقایسه واکنش‌های سرمی جدایه‌های بومی ایران ضروری بنظر می‌رسد. هدف از این پژوهش بررسی تنوع سرولوژیک در پنج جدایه بومی باکتری اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال و مقایسه با سویه سروتیپ A واکسن تجاری و نیز ارزیابی توانایی تحریک پاسخ ایمنی آن‌ها، با بکارگیری دو آزمون AGP و یک نوع بسته تجاری ELISA (Biochik) مورد تحقیق قرارگرفته است. نتایج این مطالعه می‌تواند در انتخاب بهتر سوش کاندیدای بومی واکسن ORT مورد پیشنهاد و استفاده قرار گیرد.

روش کار

باکتری‌ها

در این مطالعه تعداد پنج جدایه با شماره ۷، ۳۲، ۶۳، ۶۵، و ۷۱ باکتری اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال موجود در بانک ذخیره بخش بیماری‌های باکتریایی طیور موسسه رازی که قبلاً مورد شناسایی باکتریولوژیک و بیوشیمیایی قرارگرفته بودند استفاده شد.

تهیه آنتی‌ژن تزریقی

تکثیر باکتری‌ها

برای این منظور نمونه ویال‌های ذخیره شده باکتری‌های مورد نظر از دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد خارج نموده و سپس کشت‌های ۲۴ ساعته جدایه‌های مورد نظر اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال در محیط جامد ژلوز خون گوسفند (Blood agar) به روش خطی در شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO2 تهیه و انکوبه گردید. در روز بعد پس از اطمینان از خالص بودن کشت، شمارش تعداد باکتری در واحد حجم محیط، کشت مجددی در محیط مایع Brain Heart Infusion (BHI) با مدت ۲۴ ساعته تهیه شد. عیار سنجی تعداد باکتری در مقدار $۱۰^{۸} \times ۱$ باکتري در هر میلی‌لیتر (CFU)، با انجام روش خوانش جذب نور (OD) محیط با دستگاه اسپکترو فتومتری در طول موج ۶۰۰ نانومتر و نیز شمارش کلنی بر روی محیط جامد انجام شد (در جذب نوری (OD) ۳۹۹/ حدود $۱۰^{۹} \times ۱$باکتری است).

تهیه آنتی‌ژن تزریقی

با استفاده از روش‌های توصیه شده (۹, ۲۰) و البته با کمی تغییر (شامل استفاده از ادجووانت فروند ناقص بجای یاور روغنی) آنتی‌ژن باکتری‌ها شد. برای این منظور ابتدا نمونه سوسپانسیون باکتری‌ها با افزودن فرمالین در غلظت نهایی ۰۵/. درصد به محیط کشت و انکوباسیون به مدت یک شب (Overnight)، غیرفعال شده و پس از کنترل و اطمینان از عدم رشد مجدد باکتری غیرفعال شده، با یاور ناقص فروند (موسسه رازی) مخلوط هموژن مربوطه از هر آنتی‌ژن تهیه و آماده تزریق شدند.

تهیه سرم هیپر ایمیون

برای تهیه سرم هیپرایمیون، تعداد ۴۸ قطعه جوجه یک‌روزه عاری از پاتوژن‌های ویژه (SPF) در یک فضای مشترک و با در اختیار داشتن آب و غذای آزاد نگهداری گردیده و سپس آن‌ها را در سن ۱۴ روزگی به شش گروه شامل ۸ قطعه به‌طور تصادفی، گروه‌بندی شدند. تمام این گروه‌ها در سیستم قفس به‌طور مجزا و در شرایط یکسان نگهداری و دان و آب به‌صورت آزاد در اختیار آن‌ها قرار داده شد. ایمن‌سازی پنج گروه اول پرنده‌ها با استفاده از آنتی‌ژن‌های هموژن شده با یاور ناقص فروند از طریق تزریق به عضلات سینه‌ای به میزان ۵/. میلی لیترصورت گرفت. برنامه تلقیح در دو مرحله و با فاصله ۳ هفته اجرا گردید. به گروه آخر (ششم) به‌عنوان شاهد بافر سالین فسفات با همان حجم ۵/. میلی‌لیتر در عضله فوق تزریق شد. دو هفته پس از تزریق مرحله دوم، از طریق ورید بال اقدام به خون‌گیری و تهیه سرم شد. نمونه سرم‌ها پس از تهیه، در فریزر دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا انجام آزمایش‌های سرمی نگهداری شدند.

آزمایش‌های سرمی

بررسی تغییرات سرمی در پرنده‌های تحت آزمایش این گروه‌ها با استفاده از یک بسته تجاری الیزا (Biochik) انجام گرفت و ارزیابی تفاوت سرولوژیک جدایه‌های مورد بررسی به روش آزمایش آگار رسوبی ژل (Agar Gel Precipitation, AGP) به‌صورت متقاطع و نیز در مجاورت آنتی سرم تهیه شده از مرغان SPF ایمن شده با واکسن تجاری اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال (به‌عنوان آنتی سرم سروتیپ A)، انجام پذیرفت.

الیزا

با استفاده از کیت الیزای تجاری معتبر موجود در بازار مطابق با دستورالعمل مربوطه با دقت و در سه تکرار اقدام به تعیین میزان پاسخ ایمنی یا عیار تولید آنتی‌بادی در سرم علیه آنتی‌ژن‌های باکتریایی تزریق شده به گروه‌های جوجه تیمار و شاهد انجام گردید. میزان تعیین تیتر آنتی‌بادی بر اساس معیار مشخص شده کیت و با استفاده از فرمول:

$$\frac{mean\ of\ Test\ Sample - Mean\ of\ negative\ control}{mean\ of\ Positive\ control - Mean\ of\ negative\ control} = S/P$$

نسبت دانسیته نوری نمونه بر کنترل مثبت به دست آورده و سپس با استفاده از معادله ارائه شده در اطلاعات کیت مقدار تیتر واقعی پاسخ تولید آنتی‌بادی محاسبه شد.

$$\text{Log10 Titre} = 1.75(\log10\ S/P) + 3.156$$

مطابق اطلاعات کیت تشخیص اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال شرکت سازنده تفسیر نمونه‌های سرم با نسبت S/P مساوی و یا بیش از یک به‌عنوان مثبت تلقی شده و تیتر بالاتر از ۱۴۳۲ به‌عنوان موارد مثبت و کمتر از ۱۴۳۱ به‌عنوان نمونه منفی در نظر گرفته شد. در مطالعه آماری نتایج ابتدا با بررسی وجود اختلاف آماری در میانگین تیتر گروه‌های تحت آزمایش با انجام تحلیل آنالیز واریانس یک‌طرفه One way-analysis of Variance (ANOVA) در سطح معناداری ($p \leq ۰/۰۵$) و سپس با استفاده از آزمون آماری توکی (Tukey' s test)، مقایسه اختلاف بین هر جفت داده‌های گروه‌های سرمی با استفاده از نرم‌افزار SPSS ورژن ۲۲

صورت گرفت.

آزمایش رسوبی در ژل (AGP, Agar Gel Precipitation)

ابتدا با روش جوشاندن اقدام به تهیه آنتی‌ژن هر یک از جدایه باکتری‌ها مطابق با روش توصیه شده توسط چین و چارلتون گردید (۱۳). برای این منظور با تهیه سوسپانسیون باکتری و انجام سه مرتبه شستشوی آن با محلول فسفات بافر (PH=۷/۲) و سپس با تنظیم میزان تیتر آنتی‌ژن باکتری‌ها در حدود ۲۰ برابر غلظت جذب نوری ۵/. تا ۶/.، در طول موج ۶۶۰ نانومتر، نمونه‌ها در آب جوش به مدت یک ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شدند. در نهایت با انجام سانتریفوژ (۸- ۶ هزار دور به مدت ۷ دقیقه) و حذف ذرات درشت و عبور دادن از فیلتر ۲۲/. میکرون، عصاره به‌دست‌آمده به‌عنوان عصاره آنتی‌ژن اختصاصی باکتری (Boiled Extract Antigen) تهیه گردید.

آزمایش AGP، در ژل نوبل-آگار (special agar-noble, Difco) یک درصد تهیه شده با محلول ۱/. مولار PBS حاوی ۸/. درصد نمک (NaCl) و ۱./ درصد مرتیولات آماده شده در پلیت مناسب انجام گرفت. اندازه و ابعاد حفرات پلیت ژل مطابق ابزار استاندارد موجود در آزمایشگاه، در ژل ایجاد شده و در هر حفره ایجاد شده تا حجم ۳۰ میکرو لیتر (در دو مرحله ۱۵ میکرو لیتری در مدت یک تا دو ساعت)، از عصاره آنتی‌ژن باکتری‌ها در گودی مرکزی و نمونه‌های سرم تهیه شده در حفره‌های اطراف ریخته شد. یک حفره برای کنترل منفی و یک حفره برای آنتی سرم واکسن اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال در هر آزمایش لحاظ می‌شد. پس از انکوباسیون ۴۸ تا ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد خوانش‌ها ازنظر تشکیل باندهای رسوبی حاصل از کمپلکس آنتی‌ژن-آنتی‌بادی در تابش مایل نور (چراغ مطالعه با لامپ هالوژنه) مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج

در بررسی توصیفی داده‌های تیتر سرمی مشخص گردید که بالاترین میانگین تیتر به ترتیب مربوط به گروه پرنده‌های تلقیح شده با جدایه شماره ۷ و ۳۲ می‌باشد و کمترین میانگین تیتر مربوط به گروه ۶۳ بود (جدول ۱).

مقایسه میان گروهی داده‌ها با انجام آزمون توکی مشخص نشان داده شد، میانگین تیتر گروه ۷ و ۳۲ از نظر آماری بیشتر از گروه ۶۳ و گروه کنترل ۱ و دارای اختلاف آماری معنی‌داری بود (جدول ۲).

همچنین علی‌رغم وجود موارد مثبت و منفی تیتر سرم، در گروه تزریق‌شده آنتی‌ژن ۶۳، اختلاف آماری معنی‌داری بین این گروه و گروه کنترل وجود ندارد. اما بین گروه کنترل با سایر گروه‌ها اختلاف آماری معنی‌دار وجود داشت. مقایسه این نتایج در مورد دیگر گروه‌ها همچنین نشان داد که بین گروه ۷ و ۳۲ و ۶۵ و ۷۱ اختلاف آماری از نظر میزان تحریک پاسخ ایمنی دیده نمی‌شود.

مشاهده نتایج انجام آزمایش رسوبی ژل برای تفریق سرولوژیک باکتری‌های اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال نشان داد که اکثریت عصاره‌های آنتی‌ژنی تهیه شده با روش جوشاندن (Boiled extract Antigen)، دارای واکنش رسوبی با آنتی‌سرم‌های همولوگ (خودی) و نیز عصاره دیگر باکتری‌ها به‌جز آنتی‌ژن جدایه شماره ۷۱ بودند. جدایه اخیر تنها با آنتی سرم همولوگ توانست واکنش مثبت (به‌طور ضعیف) نشان دهد.

در بررسی باندهای رسوبی زیر تابش مایل نور، مشخص گردید باندهای ایجاد شده به‌صورت منفرد بوده و از نظر وضوح دارای درجات مختلفی در بین جدایه‌ها می‌باشند. میزان وضوح این باندها احتمالاً می‌تواند در ارتباط با میزان متفاوت تیتر سرم ناشی از عدم یکنواختی توزیع آنتی‌ژنی در دوزهای دریافتی و یا نوعی اختلاف فردی در هر یک از پرنده‌ها باشد. این حالت را در پاسخ‌های سرمی گله‌های طیور و در انجام تیتراسیون با آزمون الیزا قابل مشاهده است. همچنین مشاهده شد که حداکثر تا سه هفته سرم‌های فراهم شده مناسب انجام این آزمایش بوده و نیز تکرار ذوب-فریز سرم‌ها بشدت بر نتایج آزمایش AGP تاثیر گذار است.

جدول ۱- اطلاعات توصیفی داده‌های تیتر سرمی آزمایش الیزا علیه باکتری‌های اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال

Groups	Std. Error	Std. Dev	Mean	N	Confidence Interval for Mean 95%	
					Upper Bound	Lower Bound
۱	۸	۶۵۴,۶	۵۳۹,۰۶	۱۹۰,۵۸	۲۰۳,۹	۱۱۰۵,۲
۷	۸	۱۰۳۹۷,۶	۳۶۴۹,۲۹	۱۲۹۰,۲۱	۷۳۴۶,۷	۱۳۴۴۸,۵
۳۲	۸	۹۳۰۰,۷	۴۶۸۰,۱۸	۱۶۵۴,۶۹	۵۳۸۸,۰	۱۳۲۱۳,۵
۶۳	۸	۲۴۲۷,۲	۱۶۴۲,۹۱	۵۸۰,۸۵	۱۰۵۳,۷	۳۸۰۰,۷
۶۵	۸	۶۷۱۳,۳	۵۳۴۱,۶۵	۱۸۸۸,۵۶	۲۲۴۷,۶	۱۱۱۷۹,۰
۷۱	۸	۶۹۶۷,۵	۳۷۹۰,۱۰	۱۳۴۰,۰۰	۳۷۹۸,۹	۱۰۱۳۶,۱

جدول ۲- نتایج مقایسه میان گروهی داده‌های سرمی تیتر حاصل از آزمایش الیزا اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال با آزمون آماری توکی

Multiple Comparisons (Dependent Variable :Tukey HSD)						
(I) groupe	(J) groupe	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	Confidence Interval for Mean 95%	
					Upper Bound	Lower Bound
۱,۰۰	۷,۰۰	-۹۷۴۳,۰۶۳۳۱*	۱۸۳۸,۳۵۸۴۰	۰۰۰.	-۱۵۲۳۱,۰۲۰۶	-۴۲۵۵,۱۰۶۰
	۳۲,۰۰	-۸۶۴۶,۱۶۵۴۹*	۱۸۳۸,۳۵۸۴۰	۰۰۰.	-۱۴۱۳۴,۱۲۲۸	-۳۱۵۸,۲۰۸۲
	۶۳,۰۰	-۱۷۷۲,۶۱۷۵۵	۱۸۳۸,۳۵۸۴۰	۹۲۷.	-۷۲۶۰,۵۷۴۸	۳۷۱۵,۳۳۹۷
	۶۵,۰۰	-۶۰۵۸,۷۴۵۳۰*	۱۸۳۸,۳۵۸۴۰	۰۲۳.	-۱۱۵۴۶,۷۰۲۶	-۵۷۰,۷۸۸۰
	۷۱,۰۰	-۶۳۱۲,۹۴۷۶۲*	۱۸۳۸,۳۵۸۴۰	۰۱۶.	-۱۱۸۰۰,۹۰۴۹	-۸۲۴,۹۹۰۴
۷,۰۰	۱,۰۰	۹۷۴۳,۰۶۳۳۱*	۱۸۳۸,۳۵۸۴۰	۰۰۰.	۴۲۵۵,۱۰۶۰	۱۵۲۳۱,۰۲۰۶
	۳۲,۰۰	۱۰۹۶,۸۹۷۸۱	۱۸۳۸,۳۵۸۴۰	۹۹۱.	-۴۳۹۱,۰۵۹۴	۶۵۸۴,۸۵۵۱
	۶۳,۰۰	۷۹۷۰,۴۴۵۷۶*	۱۸۳۸,۳۵۸۴۰	۰۰۱.	۲۴۸۲,۴۸۸۵	۱۳۴۵۸,۴۰۳۰
	۶۵,۰۰	۳۶۸۴,۳۱۸۰۰	۱۸۳۸,۳۵۸۴۰	۳۵۷.	-۱۸۰۳,۶۳۹۳	۹۱۷۲,۲۷۵۳
	۷۱,۰۰	۳۴۳۰,۱۱۵۶۸	۱۸۳۸,۳۵۸۴۰	۴۳۷.	-۲۰۵۷,۸۴۱۶	۸۹۱۸,۰۷۲۹
۳۲,۰۰	۱,۰۰	۸۶۴۶,۱۶۵۴۹*	۱۸۳۸,۳۵۸۴۰	۰۰۰.	۳۱۵۸,۲۰۸۲	۱۴۱۳۴,۱۲۲۸
	۷,۰۰	-۱۰۹۶,۸۹۷۸۱	۱۸۳۸,۳۵۸۴۰	۹۹۱.	-۶۵۸۴,۸۵۵۱	۴۳۹۱,۰۵۹۴
	۶۳,۰۰	۶۸۷۳,۵۴۷۹۴*	۱۸۳۸,۳۵۸۴۰	۰۰۷.	۱۳۸۵,۵۹۰۷	۱۲۳۶۱,۵۰۵۲
	۶۵,۰۰	۲۵۸۷,۴۲۰۱۹	۱۸۳۸,۳۵۸۴۰	۷۲۲.	-۲۹۰۰,۵۳۷۱	۸۰۷۵,۳۷۷۴
	۷۱,۰۰	۲۳۳۳,۲۱۷۸۷	۱۸۳۸,۳۵۸۴۰	۸۰۰.	-۳۱۵۴,۷۳۹۴	۷۸۲۱,۱۷۵۱
۶۳,۰۰	۱,۰۰	۱۷۷۲,۶۱۷۵۵	۱۸۳۸,۳۵۸۴۰	۹۲۷.	-۳۷۱۵,۳۳۹۷	۷۲۶۰,۵۷۴۸
	۷,۰۰	-۷۹۷۰,۴۴۵۷۶*	۱۸۳۸,۳۵۸۴۰	۰۰۱.	-۱۳۴۵۸,۴۰۳۰	-۲۴۸۲,۴۸۸۵
	۳۲,۰۰	-۶۸۷۳,۵۴۷۹۴*	۱۸۳۸,۳۵۸۴۰	۰۰۷.	-۱۲۳۶۱,۵۰۵۲	-۱۳۸۵,۵۹۰۷
	۶۵,۰۰	-۴۲۸۶,۱۲۷۷۵	۱۸۳۸,۳۵۸۴۰	۲۰۵.	-۹۷۷۴,۰۸۵۰	۱۲۰۱,۸۲۹۵
	۷۱,۰۰	-۴۵۴۰,۳۳۰۰۷	۱۸۳۸,۳۵۸۴۰	۱۵۷.	-۱۰۰۲۸,۲۸۷۳	۹۴۷,۶۲۷۲
۶۵,۰۰	۱,۰۰	۶۰۵۸,۷۴۵۳۰*	۱۸۳۸,۳۵۸۴۰	۰۲۳.	۵۷۰,۷۸۸۰	۱۱۵۴۶,۷۰۲۶
	۷,۰۰	-۳۶۸۴,۳۱۸۰۰	۱۸۳۸,۳۵۸۴۰	۳۵۷.	-۹۱۷۲,۲۷۵۳	۱۸۰۳,۶۳۹۳
	۳۲,۰۰	-۲۵۸۷,۴۲۰۱۹	۱۸۳۸,۳۵۸۴۰	۷۲۲.	-۸۰۷۵,۳۷۷۴	۲۹۰۰,۵۳۷۱
	۶۳,۰۰	۴۲۸۶,۱۲۷۷۵	۱۸۳۸,۳۵۸۴۰	۲۰۵.	-۱۲۰۱,۸۲۹۵	۹۷۷۴,۰۸۵۰
	۷۱,۰۰	-۲۵۴,۲۰۲۳۲	۱۸۳۸,۳۵۸۴۰	۱,۰۰۰	-۵۷۴۲,۱۵۹۶	۵۲۳۳,۷۵۴۹

ادامه جدول ۲

	۱,۰۰	۶۳۱۲,۹۴۷۶۲*	۱۸۳۸,۳۵۸۴۰	۰۱۶.	۸۲۴,۹۹۰۴	۱۱۸۰۰,۹۰۴۹
	۷,۰۰	-۳۴۳۰,۱۱۵۶۸	۱۸۳۸,۳۵۸۴۰	۴۳۷.	-۸۹۱۸,۰۷۲۹	۲۰۵۷,۸۴۱۶
۷۱,۰۰	۳۲,۰۰	-۲۳۳۳,۲۱۷۸۷	۱۸۳۸,۳۵۸۴۰	۸۰۰.	-۷۸۲۱,۱۷۵۱	۳۱۵۴,۷۳۹۴
	۶۳,۰۰	۴۵۴۰,۳۳۰۰۷	۱۸۳۸,۳۵۸۴۰	۱۵۷.	-۹۴۷,۶۲۷۲	۱۰۰۲۸,۲۸۷۳
	۶۵,۰۰	۲۵۴,۲۰۲۳۲	۱۸۳۸,۳۵۸۴۰	۱,۰۰۰	-۵۲۳۳,۷۵۴۹	۵۷۴۲,۱۵۹۶

*= نشاندهنده وجود اختلاف در سطح (P≤۰,۰۵)

بحث

کوشش‌های فراوانی جهت تعیین ارتباط ویژگی سروتیپ باکتری اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال با ویژگی‌های ترکیبات ساختمانی و ژنوتیپی آن انجام گرفته است. برآیند کلی این نوع بررسی‌ها منجر به روشن شدن وجود برخی اختلافات ژنومی در این باکتری گردیده است که ارتباط کمی با سروتایپینگ باکتری تاکنون داشته‌اند. از جمله این بررسی‌ها، مقایسه الگوی پروتئین تام و الگوی پروتئین‌های خارجی غشایی در سویه‌های مختلف باکتری در مطالعات آمونسین و همکاران (۲) ون امپل و حافظ (۲۱) بود آن‌ها نشان دادند ضریب شباهت Similarity coefficient (SC) بیش از ۸۴ درصد در بین ۵۵ جدایه بدون توجه به سروتیپ و یا محل جداسازی آن‌ها وجود دارد. در مطالعه ون امپل و حافظ بر روی ژنوم جدایه‌های اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال بر اساس آزمون‌های RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (۱۴) و نیز مطالعه دیگر ون امپل (۱۹) در سال ۱۹۹۸ با استفاده از تکنیک AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) بر روی ژنوم این باکتری نشان دادند که اختلافات ژنی بین جدایه‌های مختلف و احتمالاً وجود ژنوتیپ‌ها و تحت گونه‌های مختلف وجود دارد. ولی تاکنون ارتباطی بین تفاوت‌های ژنومی یافت شده در سویه‌های باکتری مطالعه شده کاملاً منطبق با ارتباط سرولوژیک آن‌ها نبوده است.

کماکان آزمون‌های سرمی در تشخیص و شناسایی جدایه‌ها و سویه‌های مختلف باکتری اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال به‌رغم پیشرفت‌های صورت گرفته در روش‌های مولکولی مرتبط با این باکتری (۱۳, ۱۶)، تنها راه تعیین سروتیپ‌های مختلف می‌باشند. تابه‌حال امکان تفریق و شناسایی ۱۸ گونه سروتیپ (از حرف A تا R) در آزمایش‌های AGP و ELISA با بکارگیری سرم منو والان علیه جدایه‌های مختلف باکتری اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال و تهیه آنتی‌ژن مقاوم به حرارت (احتمالاً ترکیبات پلی ساکاریدی دیواره سلولی)، امکان‌پذیر شده است.

در سال ۱۹۹۸ آزمایش اگلوتیناسیون سریع سرم بر روی لام توسط بک و همکاران (۴) برای تشخیص آلودگی سروتیپ باکتری از طریق سرم در طیور معرفی گردید. ولی در سال بعد کارآمدی این آزمون با مشاهده ون امپل و حافظ (۲۱) از بروز اتواگلوتیناسیون مکرر در این آزمایش با مشکل مواجه گردیده است.

آزمون الیزای تجاری معمولاً برای تشخص آلودگی گله‌ها و مانیتورینگ وضعیت ایمنی گله‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. (۹, ۱۰). یافته‌های حافظ و استینگ نشان داده است که استفاده از آزمون الیزای بر اساس آنتی‌ژن کامل سلول باکتری به دلیل بروز واکنش‌های متقاطع بین سروتیپ‌ها، از اطمینان لازم برای تعیین آلودگی سروتیپ خاص باکتری برخوردار نیست (۱۱).

با وجود اطلاعات محدود در خصوص میزان ایمنی یا مصونیت در برابر باکتری اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال، ایمنی هومورال ناشی از واکسن‌های غیرفعال (کشته) به‌صورت اختصاصی سروتیپ عمل می‌نماید. درحالی‌که واکسن زنده موجب پدید آمدن درجاتی از محافظت متقاطع (Cross protection) در پرنده‌های ایمن شده می‌شود (۱۸, ۲۱).

در مطالعه حاضر با تکیه بر یافته‌های فوق، با بکارگیری آزمون AGP اقدام به بررسی امکان وجود اختلاف آنتی‌ژنی میان پنج جدایه باکتری اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال گردید. نتایج این مطالعه نشان داد که این جدایه‌ها با توجه به داشتن واکنش مثبت سرمی با آنتی سرم همولوگ و هترولوگ متناظر خود اکثرا دارای ویژگی آنتی‌ژنی مشابه‌ای (به‌جز مورد شماره ۷۱) هستند و همچنین نظر به مشاهده نتایج مثبت آزمایش AGP بین سرم جوجه‌های SPF ایمن شده با تنها واکسن وارداتی موجود در بازار اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال (واکسن سروتیپ A)، می‌تواند نشان‌دهنده امکان یکسان بودن تایپ باکتری‌ها، به‌عنوان سروتیپ A باشد. با توجه به اینکه در دنیا به ترتیب ۹۷ و ۶۱ درصد جدایه‌های بدست آمده از ماکیان و بوقلمون مربوط به سروتیپ A هستند (۹)، تعلق این باکتری‌ها به این سروتیپ شاید دور از انتظار نباشد.

از ارزیابی میزان پاسخ ایمنی جوجه‌های ایمن شده با این آنتی‌ژن‌ها با انجام آزمایش الیزا، نشان داده شد میزان القاء و تحریک پاسخ‌های سیستم ایمنی در پرنده‌های با کمی اختلاف در بیشتر موارد یکسان می‌باشد. بطوری‌که بیشترین مقدار تولید آنتی‌بادی یا پاسخ ایمنی با تلقیح آنتی‌ژن‌های جدایه شماره ۷ و ۳۲ در پرنده‌ها مشاهده شد.

این تصور وجود دارد این میزان اختلاف هم می‌تواند بدلیل میزان دقت نسبی کاربرد روش‌های شمارش باکتری‌های پلی مورف، برای تهیه آنتی‌ژن و نیز توجه به این نکته که دو جدایه فوق به‌عنوان پروتو تایپ جدایه‌های

اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال بخش بیماری‌های باکتریایی طیور بیشترین تعداد پاساژ و بررسی و مطالعه بر روی آن‌ها صورت گرفته، می‌تواند بیشترین سازگاری رشد در شرایط آزمایشگاهی و یا تغییراتی در میزان بیان یا کیفیت آنتی‌ژنی‌های خاص ایمنی‌زا داشته باشند که سبب مشاهده این نوع اختلاف در پاسخ ایمنی شده باشد.

مشاهده کاهش عیار سرمی گروه جدایه ۶۳ می‌تواند به دلایل ایمنی‌زایی ناکافی ناشی از هموژناسیون ناقص آنتی‌ژن با یاور استفاده شده و یا از بین رفتن پیوند یاور-آنتی‌ژن ناشی از طولانی‌شدن زمان آماده‌سازی تا تزریق آنتی‌ژن به پرنده‌ها مربوط باشد. بطوری‌که تعدادی از پرندهای این گروه دارای تیتر مثبت (بیش از حداقل تیتر مثبت (۱۴۳۲) و برخی منفی بر اساس شاخص بسته تجاری الیزا بودند و این اختلاف در داده‌های آماری نیز بصورت افزایش پراکندگی تیتر تولید آنتی‌بادی این گروه بالاترین در مقایسه با دیگر گروه‌های آزمایشی قابل مشاهده بود (جدول ۱)).

به‌طور خلاصه نتیجه حاصل از انجام این تحقیق می‌تواند بیان‌کننده یکسان بودن ویژگی آنتی‌ژنی جدایه‌های ۷،۳۲،۶۳،۶۵ به‌عنوان سروتیپ A بود. مزیت نسبی در آنتی‌ژن غیرفعال جدایه‌های شماره ۷ و ۳۲ در تحریک پاسخ سیستم ایمنی (هومورال) در جوجه‌های SPF تلقیح شده مورد مشاهده قرار گرفت. لذا بکارگیری و یا استفاده از هریک از جدایه‌های شماره ۷ و یا ۳۲ می‌تواند هم از نظر داشتن ویژگی یکسان آنتی‌ژنی و نیز توانایی بالاتر تحریک پاسخ سیستم ایمنی پرنده مورد توجه و بررسی‌ها به‌عنوان کاندیدای تولید واکسن و یا غیره قرار گیرد.

پیشنهاد می‌گردد با توجه به امکان آلودگی بوقلمون به سروتیپ‌های مختلف باکتری اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال، در آینده ارزیابی مشابه‌ای در مورد دیگر جدایه‌های شاخص به‌ویژه در مورد جدایه‌های مربوط به این‌گونه انجام پذیرد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در قالب اجرای پروژه تحقیقاتی به شماره ۲-۱۸-۱۸-۹۴۵۲-۹۴۰۰۳ مورد حمایت موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی انجام گرفته است.

منابع مورد استفاده

1- Allymehr, M. 2006. Seroprevalence of *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in broiler and broiler breeder chickens in West Azerbaijan Province, Iran. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 53: 40-42.

2- Amonsin, A., J. F. Wellehan, L. L. Li, P. Vandamme, C. Lindeman, M. Edman, R. A. Robinson and V. Kapur. 1997. Molecular epidemiology of *Ornithobacterium rhinotracheale*. *Journal of clinical microbiology* 35: 2894-2898.

3- Asadpour, Y., M. H. Bozorgmehrifard, S. A. Pourbakhsh and M. B. a. S. Charkhkar. 2008. Isolation and Identification of *Ornithobacterium rhinotracheale* in Broiler Breeder Flocks of Guilan Province, North of Iran. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 11: 1487-1491.

4- Back, A., D. Halvorson, G. Rajashekara and K. V. Nagaraja. 1998. Development of a serum plate agglutination test to detect antibodies to *Ornithobacterium rhinotracheale*. *J Vet Diagn Invest* 10: 84-86.

5- Banani, M. 2016. Infection of *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) and its signs, importance and pathogenicity in the poultry industry of Iran: a review article. *Veterinary Journal (Pajouhesh Sazandegi)* 113: 2-16 (In Persian).

6- Banani, M., P. KHaki, H. Goodarzi, J. Vandyousefi and S. Pourbakhsh, A. 2000. Isolation and identification of *Ornithobacterium rhinotracheale* from a broiler and a pullet flock. *Pajouhsh & Sazandegi* 46: 106-109 (In Persian).

7- 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: 49-61. (In Persian).

8- Bock, R., P, M. Freidlin, A. Manoim, A. Inbar, P. Frommer, Vandamme and P. Wilding. 1997. *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) associated with a new turkey respiratory tract infectious agent in Israel. *Intl Congr World Vet Poult Assoc*: 11:120.

9- Chin, R. P. and B. R. Charlton. Section. 2008. Ornithobacteriosis, . 75-76. In: L. Dufour-Zavala ea, editor. A laboratory manual for the isolation, identification, and characterization of avian pathogens,. 5 ed. American Association of Avian Pathologists,. Madison,: Wisconsin,United States.

10- Chin, R. P., P. C. M. van Empel and H. M. Hafez. Section. 2013. *Ornithobacterium rhinotracheale infection*. In: D.E. JRG., Swayne LR., McDougald LK., Nolan DL., Nair SVL, editors. Diseases of Poultry,. 13 ed. Wiley-Blackwell. Ames.

11- Hafez, H. M. and R. Sting. 1999. Investigations on different *Ornithobacterium rhinotracheale* "ORT" isolates. *Avian diseases* 43: 1-7.

12- Keleidari, G. A., M. R. Basami, H. Kavoosi and F. Kordi. 2008. Seroprevalence of *Ornithobacterium rhinotracheale* in a selected number of broiler and a broiler breeder by the use of ELISA assay in Mashhad. In: Proceedings of the 4th National Symposium of Poultry Disease, Shahrekord: pp. 5–9.

13- Koga, Y. and A. I. Zavaleta. 2005. Intraspecies genetic variability of *Ornithobacterium rhinotracheale* in commercial birds in Peru. *Avian diseases* 49: 108-111.

14- Leroy-Setrin, S., G. Flaujac, K. Thenaisy and E. Chaslus-Dancla. 1998. Genetic diversity of *Ornithobacterium rhinotracheale* strains isolated from poultry in France. *Letters in applied microbiology* 26: 189-193.

15- M., B., S. A. Pourbakhsh and P. Khaki. 2001. Isolation and identification of *Ornithobacterum rhinotracheale* from turkey and its antibiotic sensitivity. Proceeding of 4th Congress of Microbiology Shahed University: Tehran, Iran. Pp: 180-181. (In Persian).

16- Mendoza-Espinoza, A., Y. Koga and A. I. Zavaleta. 2008. Amplified 16S ribosomal DNA restriction analysis for identification of Avibacterium paragallinarum. *Avian diseases* 52: 54-58.

17- Mirzaie, S., M. Hassanzdeh, M. H. Bozorgmehrifard and M. Banani. 2011. Isolation and characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* in the commercial turkey, quail flocks and domestic pigeons by bacteriological and molecular methods. . *Archives Razi Institute* 66: 121–127.

18- Schuijffel, D. F., P. C. van Empel, A. M. Pennings, J. P. van Putten and P. J. Nuijten. 2005. Successful selection of cross-protective vaccine candidates for *Ornithobacterium rhinotracheale* infection. *Infect Immun* 73: 6812-6821.

19- van Empel, P. 1998. *Ornithobacterium rhinotracheale.* PhDthesis. Utrecht, Universiteit

20- van Empel, P., H. van den Bosch, P. Loeffen and P. Storm. 1997. Identification and serotyping of *Ornithobacterium rhinotracheale*. *Journal of clinical microbiology* 35: 418-421.

21- van Empel, P. C. and H. M. Hafez. 1999. *Ornithobacterium rhinotracheale*: A review. *Avian pathology : journal of the WVPA* 28: 217-227.