Archive of SID.ir

مقاله کامل

دوره بیستم ـ شماره ۲ ـ تابستان ۱۴۰۳

DOI: 10.22055/IVJ.2024.420074.2642

ردیابی میزان آنتی‌بادی و بررسی شیوع سرمی علیه *اورنیتوباکتریوم رایتوتراکئال* در سرم بوقلمون‌های کشتار شده در استان خوزستان با استفاده از الایزای خانگی

صدیقه یوسفی‌نژاد[۱]، محمد خسروی[۲*]، داریوش غریبی[۳]، منصور میاحی[۴] و مسعودرضا صیفی‌آبادشاپوری[۵]

[۱] دانش آموخته دکتری تخصصی باکتری‌شناسی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

[۲] دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

[۳] دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

[۴] استاد گروه بهداشت دام، طیور و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

[۵] استاد گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۷/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۳

چکیده

اورنیتوباکتریوم رایتوتراکئال (*Ornithobacterium rhinotracheal:* ORT) یک پاتوژن میله‌ای گرم منفی است که جزء عوامل ایجاد کننده بیماری‌های تنفسی در پرندگان محسوب می‌شود. عفونت همزمان با سایر پاتوژن‌ها، می‌تواند سبب اختلال در سلامت گونه‌های پرندگان شده و همچنین منجر به زیان‌های مالی در صنعت طیور گردد. روش‌های سرولوژی از جمله روش‌های بسیار مهم در تشخیص سریع عفونت، پایش گله و همچنین کنترل و پیش‌گیری از عفونت می‌باشند. نظر به عدم وجود اطلاعات در خصوص میزان آنتی‌بادی و اختلاف عیار آنتی‌بادی در پرندگان سالم و بیمار، هدف این مطالعه طراحی یک آزمون الایزای کمی جهت ارزیابی شیوع *اورنیتوباکتریوم رایتوتراکئال*، ردیابی میزان آنتی‌بادی اختصاصی بر علیه آن در سرم جمع‌آوری شده از بوقلمون است. جهت انجام این مطالعه، پس از ایمن‌سازی سه قطعه بوقلمون و به دست آوردن سرم هایپرایمن، خالص‌سازی آنتی‌بادی با روش‌های کروماتوگرافی تعویض یونی و افینیتی کروماتوگرافی انجام شد. آنتی‌بادی‌های اختصاصی جداسازی شده در الایزای خانگی به عنوان نمونه استاندارد، جهت تعیین میزان آنتی‌بادی اختصاصی علیه *اورنیتوباکتریوم رایتوتراکئال* به کار گرفته شد. در این بررسی، تعداد ۲۴۴ نمونه سرم از بوقلمون‌های کشتار شده در کشتارگاه طیور استان خوزستان جمع‌آوری گردید که وجود معنی‌دار آنتی‌بادی علیه *اورنیتوباکتریوم رایتوتراکئال* در ۱۴۱ نمونه مثبت (۵۷/۷۸ درصد) توسط الایزا تشخیص داده شد. میانگین غلظت آنتی‌بادی در نمونه‌های مثبت ۱۲۴/۱۲۸ ± ۴۶۷/۷۲ و در نمونه‌های منفی ۳۷/۲۶۴±۲۶۲/۹۷ میکروگرم در هر میلی‌لیتر از سرم بود. نتایج این مطالعه شیوع عفونت‌های *اورنیتوباکتریوم رایتوتراکئال* در استان خوزستان را نشان داد. بنابراین به دلیل عدم وجود واکسن مطمئن علیه *اورنیتوباکتریوم رایتوتراکئال*، مدیریت بهداشتی مناسب برای کنترل بیماری مورد نیاز است.

کلمات کلیدی: *اورنیتوباکتریوم رایتوتراکئال*، بوقلمون، آنتی‌بادی، الایزا

مقدمه

بیماری‌های تنفسی جدی‌ترین مشکلات پیش‌روی تولید طیور در سراسر جهان در نظر گرفته می‌شوند (Awad et al, 2022). چندین پاتوژن باکتریایی به عنوان عوامل احتمالی عفونت‌های دستگاه تنفسی به تنهایی یا در ترکیب

* نویسنده مسئول: محمد خسروی، دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

E-mail: m.khosravi@scu.ac.ir

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

با سایر میکروارگانیسم‌ها قلمداد می‌شوند. *اورنیتوباکتریوم رایتوتراکئال* (*Ornithobacterium rhinotracheal:* ORT) یک باکتری گرم منفی، چند شکلی، غیرمتحرک و غیرهاگ‌زا است که برای اولین بار در طیور اهلی شده که به وسیله پرندگان وحشی مبتلا شده بودند، شناسایی شد. اولین گزارش از این بیماری یک سندرم بیماری جدید در بوقلمون‌ها در اوایل دهه ۱۹۹۰ در آلمان بود (Hinz et al, 1994) و باکتری عامل این بیماری برای اولین بار در سال ۱۹۹۴ نام‌گذاری شد (Vandamme et al, 1994).

جنس *Ornithobacterium* عضوی از خانواده *Weeksellaceae* است که در این خانواده علاوه بر جنس *اورنیتوباکتریوم*، دو جنس *Riemerella* (*R. anatipestifer*) و *Coenonia* (*C. anatine*) نیز وجود دارند که از مهم‌ترین پاتوژن‌های پرندگان به خصوص در غاز و اردک اهلی می‌باشند (Hafez and Chin, 2020).

اورنیتوباکتریوم رایتوتراکئال یکی از مهم‌ترین پاتوژن‌های تنفسی باکتریایی است که عمدتاً صنعت بوقلمون با آن مواجه است. در سال ۲۰۲۰، *اورنیتوباکتریوم رایتوتراکئال* در فهرست مهم‌ترین مسائل بهداشتی در صنعت بوقلمون آمریکا در رتبه چهارم قرار گرفت و در چندین سال گذشته به طور مداوم بین شماره ۳ و شماره ۴ در نوسان بوده است (Clark and Ahlmeyer, 2018). به غیر از طیور تجاری، عفونت با *اورنیتوباکتریوم رایتوتراکئال* در گونه‌های مختلف پرندگان نیز گزارش شده است. در این زمینه، پرندگان وحشی به عنوان منبع بالقوه عفونت برای گله‌های طیور تجاری در نظر گرفته می‌شوند (Hashish et al, 2022). عفونت *اورنیتوباکتریوم رایتوتراکئال* می‌تواند به صورت افقی و عمودی منتقل شود. انتقال افقی عفونت از طریق آب آشامیدنی و آئروسل‌ها و از طریق تماس مستقیم و غیرمستقیم صورت می‌گیرد. *اورنیتوباکتریوم رایتوتراکئال* در دماهای پایین بقای زیادی دارد و ممکن است عفونت حاصل از این باکتری در زمستان شیوع بیش‌تری داشته باشد. انتقال عمودی از مادر به جنین نیز به اثبات رسیده است، زیرا برخی از محققان *اورنیتوباکتریوم رایتوتراکئال* را هر چند با تعداد کم از اندام‌های تولیدمثلی و جنین‌های تلف شده جدا کرده‌اند (Churria et al, 2012).

علاوه بر علایم تنفسی، یافته‌های بالینی عمدتاً با افزایش مرگ و میر، توقف رشد، هزینه‌های بالاتر دارو، کاهش تولید تخم‌مرغ، کاهش کیفیت پوسته تخم‌مرغ و کاهش قابلیت جوجه‌ریزی همراه است. شدت علایم بالینی، طول مدت بیماری و مرگ و میر با شیوع تأیید شده *اورنیتوباکتریوم رایتوتراکئال* بسیار متغیر است و تحت تأثیر عوامل محیطی بسیاری مانند مدیریت ضعیف، تهویه ناکافی، ازدحام بیش از حد، شرایط بستر نامناسب، بهداشت نامناسب، نوع عفونت ثانویه، سطح بالای آمونیاک، بیماری‌های مرتبط قرار دارد (Van Empel and Hafez, 1999). علایم بالینی و ضایعات پس از مرگ مرتبط با عفونت *اورنیتوباکتریوم رایتوتراکئال* شامل تراکئیت، پریکاردیت، سینوزیت، پنومونی اگزوداتیو و ترشحات کف‌آلود ماست مانند در کیسه‌های هوایی می‌باشد (Banani et al, 2001). تصاویر بالینی اورنیتوباکتریوز در بوقلمون‌ها و جوجه‌ها پاتوگنومیک نیست و *اورنیتوباکتریوم رایتوتراکئال* مشابه بسیاری از بیماری‌های تنفسی دیگر ناشی از پاتوژن‌های باکتریایی یا ویروسی است. بنابراین تکیه بر علایم بالینی و ضایعات پس از مرگ ارزش تشخیصی کمی دارد و برای تشخیص قطعی نیاز به آزمایش‌های تأییدی است (Alispahic et al, 2021; Ellakany et al, 2019).

روش‌های سرولوژیکی برای پایش گله از جمله مهم‌ترین ابزار در تشخیص عفونت‌های باکتریایی هستند. تا به حال ۱۸ سروتیپ مختلف (A-R) در *اورنیتوباکتریوم رایتوتراکئال* به وسیله روش‌های سرولوژیکی به خصوص الایزا شناسایی شده است. برخی از تفاوت‌های جغرافیایی در سروتیپ‌های موجود در سراسر جهان وجود دارد. بیش‌تر ایزوله‌ها در ایالات متحده و اروپا متعلق به سروتیپ A هستند، در حالی که سروتیپ C فقط در جوجه‌ها و بوقلمون‌های آفریقای جنوبی و ایالات متحده یافت شده است و سروتیپ‌های B، D و E بعد از سروتیپ A در اروپا

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

غالب هستند. همچنین سروتیپ A شایع‌ترین سروتیپ در بین سویه‌های جدا شده از مرغ‌ها و سروتیپ‌های A، B، D و E در بوقلمون‌ها است (Xue et al, 2022; Churria et al, 2012). گزارش‌هایی از عفونت ORT در کشورهای مختلف مانند ایالات متحده، آلمان، آفریقای جنوبی، ژاپن، ترکیه و ایران وجود دارد (Van Empel and Hafez, 1999). گسترش سریع بیماری‌های مرتبط با *اورنیتوباکتریوم رایتوتراکئال* و افزایش گزارش آن در مطالعات اپیدمیولوژیک، تفاوت‌های درون گونه‌ای و ویژگی‌های خاص جدایه‌ها را بر اساس منطقه جغرافیایی و منبع نشان داد (Alispahic et al, 2021; Barbosa et al, 2019).

علی‌رغم اهمیت اقتصادی این پاتوژن در صنعت بوقلمون، تا کنون مطالعات همه‌گیری‌شناسی در مورد *اورنیتوباکتریوم رایتوتراکئال* در بوقلمون‌های استان خوزستان گزارش نشده است. با توجه به افزایش عیار آنتی‌بادی متعاقب عفونت با ORT، به کارگیری آزمون الیزا می‌تواند سبب بهبود نظارت بر وضعیت سیستم ایمنی و شناسایی سرولوژیک *اورنیتوباکتریوم رایتوتراکئال* در پرندگان بیمار شود. هدف از این مطالعه، طراحی یک آزمون الایزا جهت بررسی کمی میزان آنتی‌بادی در پرندگان سالم و دارای علایم بیماری تنفسی و همچنین ارزیابی شیوع سرمی این بیماری در بوقلمون‌های کشتار شده در کشتارگاه طیور خوزستان (جنوب غربی ایران) می‌باشد.

مواد و روش کار

در زمستان و بهار ۱۴۰۰ تا ۱۴۰۲ تعداد ۲۴۴ نمونه خون بدون ماده ضد انعقاد از بوقلمون‌های کشتار شده با و بدون علایم تنفسی از کشتارگاه‌های استان خوزستان (جنوب غربی ایران) جمع‌آوری گردید. نمونه‌های خون در لوله‌های آزمایشگاهی به صورت استریل و در کنار یخ به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز منتقل شدند. جداسازی سرم از نمونه‌های خون در کم‌تر از ۲۴ ساعت انجام شد و جهت بررسی‌های سرولوژیکی در منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. همزمان با نمونه‌گیری از خون بوقلمون، نمونه‌برداری جهت جداسازی جدایه‌های *اورنیتوباکتریوم رایتوتراکئال* نیز انجام شد.

برای استخراج آنتی‌ژن، جدایه‌های *اورنیتوباکتریوم رایتوتراکئال* ذخیره شده در بخش آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشگاه شهید چمران اهواز که قبلا طبق روش‌های باکتریولوژیکی و بیوشیمیایی مورد شناسایی قرار گرفته بودند، استفاده شد. جدایه‌ها را از دمای منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد خارج نموده و سپس بر روی محیط کشت آگار خون‌دار حاوی ۵ درصد خون اسب به مدت ۲۴–۴۸ ساعت و شرایط میکروائروفیل کشت و گرم‌خانه‌گذاری شدند و پس از اطمینان از خالص بودن، با استفاده از PBS استریل سوسپانسیون‌هایی از آن‌ها تهیه شد. با استفاده از روش استاندارد مک فارلند، تعداد باکتری در هر میلی‌لیتر بر روی ۱۲×۱۰^{۸} (McFarland) تنظیم گردید.

با استفاده از روش‌های توصیه شده قبلی آنتی‌ژن *اورنیتوباکتریوم رایتوتراکئال* تهیه شد. جهت غیرفعال سازی باکتری‌ها تیمار باکتری‌ها با فرمالدئید ۱ درصد به مدت ۲۴ ساعت انجام شد. سوسپانسیون باکتری‌ها در دمای منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد چندین بار فریز و دفریز شدند که با مشاهده عدم رشد باکتری‌ها پس از ۲۴–۴۸ ساعت از غیر فعال‌سازی آن‌ها اطمینان حاصل شد. سپس سوسپانسیون‌های تهیه شده با ادجوانت کامل فروند و یا در تزریق‌های یادآور با ناقص فروند مخلوط شده و برای تزریق آماده شدند.

از جدایه‌های *اورنیتوباکتریوم رایتوتراکئال* در غلظتی برابر با ۱۲×۱۰^{۸}، و در حجم ۰/۵ میلی‌لیتر با ۰/۵ میلی‌لیتر ادجوانت کامل فروند مخلوط شد. ایمن‌سازی سه قطعه بوقلمون با تزریق آنتی‌ژن، در عضلات سینه و ران انجام شد. تزریق‌های یادآور در حجم ۰/۵ میلی‌لیتر و با چهار تکرار انجام شد. بدین منظور، تزریق ۰/۵ میلی‌لیتر از باکتری‌های غیرفعال شده با مقدار مساوی از ادجوانت ناقص فروند با فاصله ۱۰ روز انجام شد. پس از کسب اطمینان از ایجاد عیار مناسب آنتی‌بادی با روش الایزای

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

غیرمستقیم، خون‌گیری از ورید بال بوقلمون انجام شد و سرم هایپرایمن ایجاد شده جداسازی گردید. سرم‌های هیپر ایمن از بوقلمون‌های تیمار شده برداشت و در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Hurn and Chanter, 1980).

مراحل تخلیص آنتی‌بادی با استفاده از سولفات آمونیوم

در این روش به ازای ۱۰ میلی‌لیتر سرم به دست آمده، به صورت قطره قطره پنج میلی‌لیتر محلول آمونیوم سولفات اشباع اضافه شد، این کار به صورتی انجام شد که بشر حاوی سرم بر روی یخ و شیکر ۹۰ دور در ۳۰ دقیقه در حال مخلوط شدن بود. پس از مخلوط شدن کامل سرم و سولفات آمونیوم اشباع، محلول در دور ۴۰۰۰ و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی جداسازی شد و به رسوب حاصل، پنج میلی‌لیتر سولفات آمونیوم ۴۰ درصد اضافه شد و مجدداً سانتریفوژ گردید. سپس رسوب ایجاد شده، در بافر فسفات (Phosphate Buffer (PB ۰/۰۲ مولار با pH ۷/۲ مخلوط شد. جهت جداسازی نمک، رسوب حاصل از سولفات آمونیوم در برابر بافر فسفات دیالیز شد (Burns, 2005).

کروماتوگرافی تعویض یونی

در این روش پس از خیساندن پودر DEAE-Cellulose در محلول PB ۰/۰۲ مولار به مدت ۲۴ ساعت، پودر حاصل را در ستون قرار داده و سپس به ترتیب با استفاده از بافر فسفات حاوی KCL یک مولار و بافر فسفات ۰/۰۲ مولار با pH = ۷/۲ شست و شو گردید. محلول جمع‌آوری شده از کیسه دیالیز به ستون منتقل شد و ستون به مدت ۲ ساعت بسته شد. ستون با استفاده از بافر فسفات ۰/۰۲ مولار با pH = ۷/۲ شست و شو داده شد. آنتی‌بادی‌های IgY به ستون متصل نمی‌شوند و فراکسیون‌های آن در میکروتیوب‌های دو میلی‌لیتری جمع‌آوری شد. IgYهای جمع‌آوری شده از ستون پس از بررسی میزان و درصد خلوص و عملکرد جهت انجام سایر مراحل کار در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Khosravi et al, 2021).

افینیتی کروماتوگرافی

خالص‌سازی آنتی‌بادی‌های اختصاصی *اورنیتوباکتریوم راینوتراکتال* با استفاده از کروماتوگرافی میل ترکیبی انجام شد. به طور خلاصه، باکتری‌های *اورنیتوباکتریوم راینوتراکتال* با استفاده از فریز و دفریز شدن متوالی تخریب شدند، چهار میلی‌گرم از آنتی‌ژن‌های آماده شده به ازای هر میلی‌لیتر از سفارز 4B (product number 4B200, Sigma-Aldrich) فعال شده با سیانوژن بروماید مخلوط شد و به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شد، سپس سانتریفوژ در دور ۳۰۰۰ به مدت پنج دقیقه انجام شد و مایع رویی خارج و جهت مسدود نمودن گروه‌های فعال به رسوب بافر گلیسین یک مولار (pH = ۷/۲) اضافه گردید و شش ساعت شیکر شده و مجددا سانتریفوژ انجام شد و پس از شست و شو با بافر PBS مایع رویی را دور ریخته و به رسوب، حدود ۱۰ میلی‌گرم از IgY حاصل از دیالیز اضافه گردید و پس از ۲ ساعت در دور ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد و مایع رویی به عنوان آنتی‌بادی‌های غیراختصاصی حذف شد و مراحل شست و شو تا حذف کلیه آنتی‌بادی‌های آزاد ادامه یافت. استخراج IgY اختصاصی ORT متصل به سفارز ۴B با قرار دادن سفارز در ستون و آزاد نمودن آنتی‌بادی‌های متصل شده به وسیله بافر گلایسین (pH = ۲/۵) و خنثی‌سازی سریع با استفاده از بافر تریس (pH = ۹/۵) انجام شد (Khosravi et al, 2021).

بررسی میزان آنتی‌بادی با استفاده از پروتئین سنجی به روش برادفورد انجام شد. برای انجام پروتئین سنجی از پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای استفاده شد. ۲۰ میکرولیتر از نمونه ۱۰ میکرولیتر از محلول برادفورد و ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر در هر یک از گودها اضافه شد. نمونه‌های استاندارد به وسیله آلبومین سرم گاوی تهیه شدند. به منظور شناسایی دقیق سطح آنتی‌بادی هر نمونه، جذب نوری نمونه‌ها با

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

استفاده از اسپکتروفوتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر قرائت شد.

الکتروفورز بر روی ژل پلی آکریل آمید حاوی سدیم دودسیل سولفات

جهت اطمینان از تخلیص آنتی‌بادی‌های IgY نمونه سرم هایپر ایمن بوقلمون از آزمون Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) استفاده شد. SDS-PAGE با ژل جداکننده ۹ درصد و ژل انباشته ۴ درصد انجام شد. نمونه‌ها در چاهک‌ها اضافه شدند، جریان روی ولتاژ ۸۵ جهت ژل بالا و ولتاژ ۱۰۰ جهت حرکت نمونه‌ها در ژل پایین تنظیم شد. ژل در ظرف حاوی محلول رنگی کوماسی آبی بر روی شیکر به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد و سپس محلول را خالی کرده و محلول رنگ بر حاوی ۵۰ درصد متانول و ۱۰ درصد اسید استیک به آن اضافه گردید و تا هنگامی که ژل کاملا بی رنگ شد رنگ بری ادامه داشت (Hurn and Chanter, 1980).

الایزا غیرمستقیم با استفاده از اصلاح روشی که قبلاً توسط Hafez و Sting (۱۹۹۹) شرح داده شد، انجام شد. آنتی‌ژن‌های ORT که پس از فریز و دفریز شدن متوالی به دست آمده بودند به عنوان آنتی‌ژن کامل با غلظت ۱۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر با بافر کربنات–بی کربنات (pH = ۹/۵) رقیق و ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک پلیت اضافه شد. در ادامه پلیت‌ها جهت پوشیده شدن در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. پلیت سه بار با PBS حاوی توین ۰/۰۵درصد شسته شد و به هر چاهک ۲۵۰ میکرولیتر شیر فاقد چربی (Skim Milk) چهار درصد اضافه گردید و به مدت یک ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. سپس پلیت مجددا سه بار به صورت فوق شسته شد. به هر چاهک نمونه سرم رقیق شده با بافر PBS با رقت ۱/۴۰ اضافه گردید و پلیت به مدت یک ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. پس از شست و شوی مجدد پلیت، ۱۰۰ میکرولیتر از رقت ۱/۴۰۰۰ آنتی‌بادی نشان‌دار شده با پراکسیداز ضد مرغ به هر چاهک اضافه شد و به مدت یک ساعت انکوبه گردید و دوباره شسته شد. ۵۰ میکرولیتر سوبسترای کروموژن به هر چاهک اضافه شد و پس از انکوبه شدن پلیت به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق، با اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر محلول توقف کننده واکنش متوقف گردید. مقادیر جذب به روش فتومتری ELISA reader (Medispec ESR 200) در طول موج ۴۵۰ نانومتر ارزیابی شد. آزمون الایزای غیرمستقیم به صورت فوق برای نمونه آنتی‌بادی‌های خالص‌سازی شده با روش کروماتوگرافی میل ترکیبی به عنوان نمونه استاندارد در بوقلمون‌های ایمن شده نیز انجام شد.

نتایج

آنتی‌بادی اختصاصی علیه *اورنیتوباکتریوم رینوتراکئال* از حیوانات واکسینه شده پس از چهار دوره ایمن‌سازی به دست آمد. تجزیه و تحلیل SDS-PAGE و برادفورد خالص‌سازی آنتی‌بادی‌های حاصل از کروماتوگرافی تعویض یونی و افینیتی کروماتوگرافی را نشان دادند (Figure 1). چگالی نوری حاصل از الایزا غیر مستقیم در سرم بوقلمون‌های هایپرایمن قبل از ایمن‌سازی و بعد از ایمن‌سازی به ترتیب ۰/۲۵۷±۰/۰۶۴ و ۰/۸۳۳ ±۰/۲۱۵ بود (Figure 2).

میزان غلظت آنتی‌بادی موجود در هر نمونه نیز در آزمون الایزا غیرمستقیم بر اساس منحنی استاندارد محاسبه شده برای آنتی‌بادی‌های خالص‌سازی شده از افینیتی کروماتوگرافی به دست آمد. حد تشخیص نمونه‌های مثبت از منفی بر اساس میزان میانگین و انحراف معیار غلظت آنتی‌بادی در ۱۰ نمونه سرم مستخرج از بوقلمون‌های منفی در کشت باکتری بر اساس نمودار استاندارد محاسبه شد (Figure 3) (Ozbey et al, 2004). بر اساس نتایج به دست آمده از ۲۴۴ نمونه سرم جمع‌آوری شده از بوقلمون‌های کشتار شده، تعداد نمونه مثبت و منفی در آزمون الایزا به ترتیب ۵۷/۷۸ درصد و ۴۲/۲۱ درصد محاسبه شد. نتایج آزمون الیزا در Figure 4 نشان داده شده است.

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

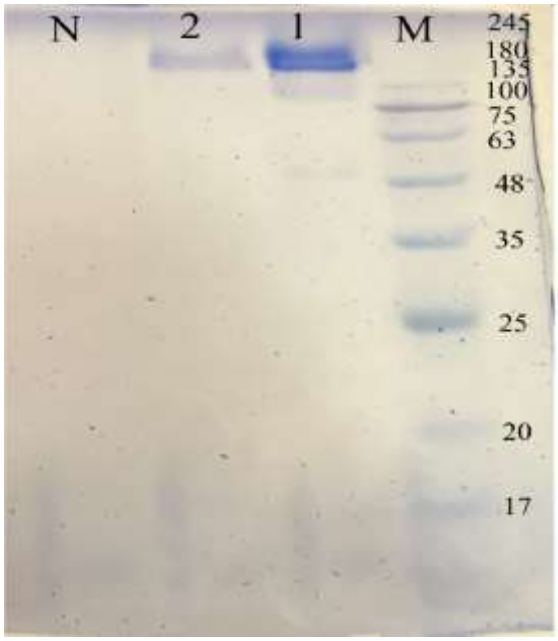

Figure 1: Electrophoresis on SDS polyacrylamide gel to determine the purity of antibodies against ORT isolated from hyperimmune turkey serum. N: negative control, M: size marker protein, 1,2: turkey antibodies purified using ion exchange chromatography and affinity chromatography, respectively.

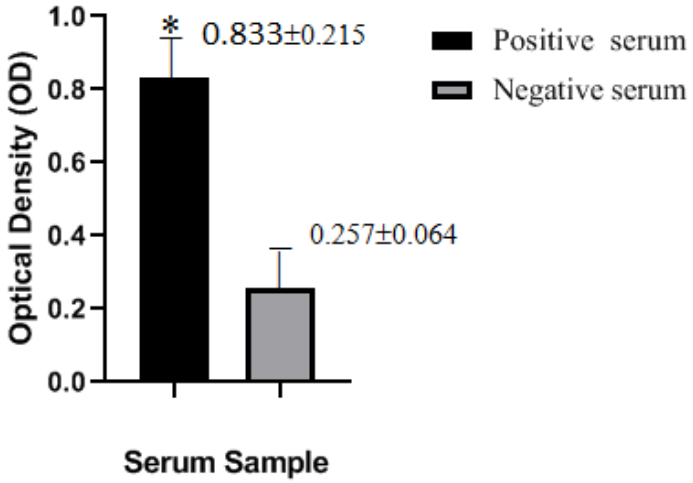

Figure 2: The optical density obtained by ELISA for detection of reactive antibodies in turkey serum samples (n=3) before (Negative) and after (Positive) immunization by ORT bacteria. The significant difference between of the groups showed by star symbol.

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

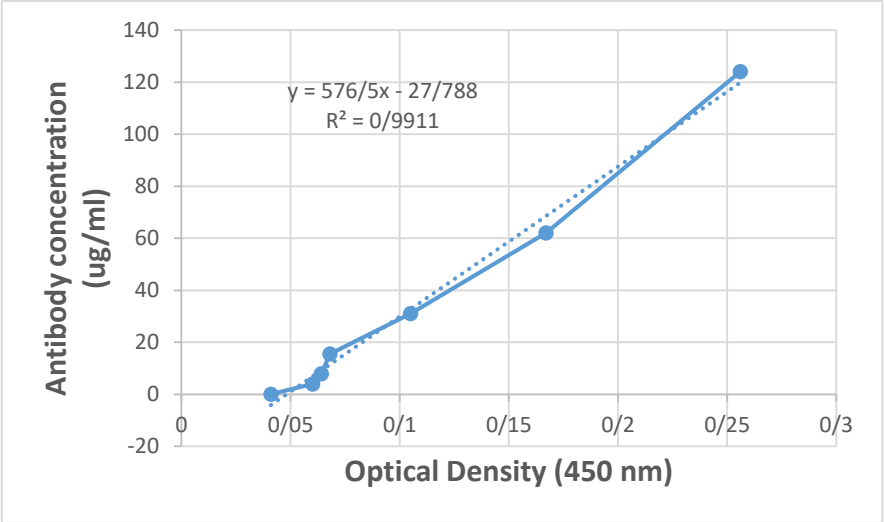

Figure 3: The obtained standard curve based on affinity purified antibodies for detection of the antibody concentration in turkey serum samples.

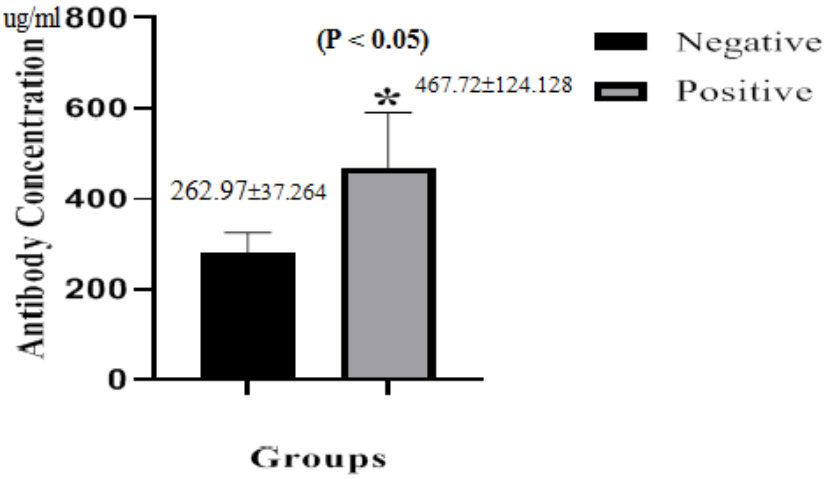

Figure 4: The average concentration of specific antibody (ug/ml) against *Ornithobacterium rhinotracheal* in positive (n=182) and negative (n=62) serum samples. The significant difference between of the groups showed by star symbol.

بحث

با توجه به افزایش بیماری‌های تنفسی و خسارات اقتصادی ناشی از کاهش رشد و تولید و تلفات بالا در صنعت طیور به خصوص در مرغ و بوقلمون به نظر می‌رسد که جهت تعیین عوامل ایجاد کننده این بیماری‌ها و عوامل مستعد کننده همراه بایستی مطالعات بیش‌تری در این زمینه صورت گیرد. در کشورهای مختلف تحقیقات زیادی جهت بررسی شیوع آلودگی به *اورنیتوباکتریوم رایتوتراکئال* در مرغ و بوقلمون انجام شده است و به دلیل این که علایم بالینی و یافته‌های کالبدگشایی *اورنیتوباکتریوم رایتوتراکئال* به اندازه کافی برای تشخیص اختصاصی نیست، بنابراین، مطالعات سرولوژی از عمده‌ترین روش‌های مورد استفاده در تحقیقات بوده است.

در مطالعه حاضر ۵۷/۷۸ درصد از نمونه‌ها از نظر وجود آنتی‌بادی بر علیه *اورنیتوباکتریوم رایتوتراکئال* مثبت بودند و ۴۲/۲۱ درصد از نمونه‌ها نیز از نظر وجود آنتی‌بادی بر علیه این باکتری منفی تشخیص داده شدند. یافته‌های حاصل از مطالعه Nik Piran و همکاران (۱۳۹۰) در استان اردبیل نشان داد که ۷۲/۲ درصد از نمونه‌ها به

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

اورنیتوباکتریوم رایتوتراکئال آلوده بودند و ۲۷/۸ درصد از نمونه‌ها مشکوک گزارش شدند، در این مطالعه هیچ مورد منفی قطعی مشاهده نشد. همچنین Haghigi Khoshkho و همکاران (۲۰۰۸) گزارش دادند که با توجه به نتایج آزمون الایزا میزان آلودگی به *اورنیتوباکتریوم رایتوتراکئال* در استان تهران ۴۴/۵ درصد است.

Ghanbarpour و Salehi (۲۰۰۹) در مطالعه خود در جنوب شرق ایران نشان دادند که از ۴۲۰ نمونه سرمی که توسط الایزا مورد بررسی قرار گرفته بود، ۱۳۴ (۳۱/۰۹ درصد) سرم از ۱۷ گله (۸۱ درصد) از نظر آنتی‌بادی ORT مثبت گزارش دادند.

در سایر کشورها، تحقیقات متعددی در مورد میزان مثبت آنتی‌بادی *اورنیتوباکتریوم رایتوتراکئال* در مرغ و بوقلمون گزارش شده است اما میزان غلظت آنتی‌بادی *اورنیتوباکتریوم رایتوتراکئال* در این مطالعات مورد بررسی قرار نگرفته است.

در مطالعه حاضر میزان چگالی نوری نمونه‌های سرم بوقلمون‌های هایپرایمن بعد از ایمن‌سازی ۳/۲ برابر بیش‌تر از نمونه زمان صفر (قبل از ایمن‌سازی) بود: همچنین میزان آنتی‌بادی موجود در نمونه‌های سرم مثبت ۶/۸ برابر نمونه-های سرم منفی بوقلمون‌های کشتار شده بود. در مطالعه‌ی در شرق ترکیه از ۳۲۴ نمونه سرم گله‌های جوجه گوشتی ۳۳ نمونه (۱۰/۲ درصد) از نظر میزان آلودگی به *اورنیتوباکتریوم رایتوتراکئال* به وسیله آزمون الایزای خانگی مثبت گزارش شد (Ozbey et al, 2004). در مطالعه دیگری با استفاده از یک الایزای خانگی طراحی شده در مطالعه خود در استان شارکیا مصر گزارش دادند که ۸۰ درصد از نمونه‌های سرمی از نظر *اورنیتوباکتریوم رایتوتراکئال* مثبت بودند، گزارشات آن‌ها نشان داد که میزان میانگین چگالی نوری نمونه‌های سرم مثبت و منفی به ترتیب ۰/۸۳۷ و ۰/۱۴۷ می‌باشد که با مطالعه حاضر مطابقت داشت. نتایج این تحقیقات نشان داد که میزان شیوع *اورنیتوباکتریوم رایتوتراکئال* در این کشورها بسیار بالاست و آزمایش الایزا یک روش مناسب جهت پایش آنتی‌بادی‌های *اورنیتوباکتریوم رایتوتراکئال* می‌باشد (Eid et al, 2021).

Van Empel و همکاران (۱۹۹۷) در مطالعه خود گزارش دادند که تیتر آنتی‌بادی در ۱ تا ۴ هفته پس از آلودگی به حداکثر میزان خود می‌رسد اما بعد از این مدت به سرعت کاهش می‌یابد بنابراین نتایج آن‌ها نشان داد که اخذ نمونه‌های سرم جهت غربالگری گله باید در سنین مختلف انجام شود تا بتوان به طور دقیق میزان بروز عفونت را تشخیص داد.

در مطالعه Xue و همکاران (۲۰۲۰) میزان شیوع آلودگی سرمی به ORT در میان گله‌های مرغ ۱۵ استان چین ۴۴/۰۶ درصد بود، آن‌ها نشان دادند که در جوجه‌های جوان، میزان مثبت سرمی کم‌تر از جوجه‌های مسن‌تر بود و با افزایش سن، میزان مثبت سرم افزایش یافت. جوجه‌های مسن نه تنها نرخ مثبت بالاتری داشتند بلکه سطح آنتی‌بادی آن‌ها نیز بالا بود، بنابراین این داده‌ها نشان داد که عفونت‌های *اورنیتوباکتریوم رایتوتراکئال* در چین نیز رایج است.

مطالعات انجام شده در کره جنوبی نشان داد که شیوع سرمی آنتی‌بادی‌های *اورنیتوباکتریوم رایتوتراکئال* در جوجه‌های تخم‌گذار ۹۸/۹۱ درصد است که این بررسی نیز شیوع بالای *اورنیتوباکتریوم رایتوتراکئال* در جوجه‌های تخم‌گذار در استان گیونگی، کره جنوبی را نشان داد (Jung, 2020).

در مطالعه سرمی Baksi و Chauhan (۲۰۱۷) در کشور هند به وسیله آزمون الایزا نشان داده شد که ۷۴/۳۷ درصد از نمونه‌ها برای آنتی‌بادی‌های *اورنیتوباکتریوم رایتوتراکئال* مثبت و ۲۵/۶۳ درصد نیز منفی بودند، آن‌ها نشان دادند که میزان شیوع سرمی این بیماری در شهرهای مختلف هند و در فصول مختلف سال متفاوت است و در فصل باران‌های موسمی میزان عفونت بیش‌تر از زمستان است، آن‌ها همچنین نمونه‌ها را بر اساس گروه‌های مختلف سنی پرندگان تقسیم‌بندی کردند و نشان دادند که با افزایش سن میزان آنتی‌بادی علیه *اورنیتوباکتریوم رایتوتراکئال* نیز افزایش می‌یابد.

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

با توجه به میزان آنتی‌بادی واکنش دهنده با *اورنیتوباکتریوم راینوتراکئال* در سرم بوقلمون‌های مورد آزمون، آزمون الایزا کنونی طراحی شده است؛ لذا کم‌ترین و بیش‌ترین میزان آنتی‌بادی اختصاصی قابل ردیابی متناسب با این میزان در سرم بوقلمون‌ها می‌باشد. قابل ذکر است کم‌ترین میزان آنتی‌بادی قابل ردیابی با استفاده از الایزای طراحی شده کم‌تر از یک میکروگرم در هر میلی‌لیتر از سرم می‌باشد، در صورتی که کم‌ترین میزان آنتی‌بادی موجود در سرم بوقلمون‌ها ۳۷/۲۶۴ ± ۲۶۲/۹۷ میکروگرم در هر میلی-لیتر می‌باشد. در اغلب مطالعات سرولوژی، جهت تعیین آنتی‌بادی علیه *اورنیتوباکتریوم راینوتراکئال* ازکیت‌های تجاری الایزا استفاده شده است. در مطالعات انجام شده در کشور ترکیه، نمونه سرم‌های جمع‌آوری شده با استفاده از کیت تجاری الایزا مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آن‌ها نشان داد که ۶۶/۳ درصد از نمونه‌های سرم مرغ و ۱۱/۱ درصد از نمونه‌های سرم بوقلمون برای *اورنیتوباکتریوم راینوتراکئال* مثبت بودند (Türkyilmaz and Kaya, 2005). در مطالعه دیگری نیز وجود آنتی‌بادی علیه *اورنیتوباکتریوم راینوتراکئال* را در جوجه‌های گوشتی در سنین مختلف را با استفاده از کیت‌های تجاری الایزا گزارش دادند که با نتایج الایزا طراحی شده در مطالعه حاضر مطابقت داشتند (De Boeck et al, 2015).

نتایج مطالعه حاضر وجود آنتی‌بادی بر علیه *اورنیتوباکتریوم راینوتراکئال* در سرم بوقلمون‌های استان خوزستان را نشان داد. که این نتایج با مطالعات صورت گرفته در سایر استان‌های ایران و کشورهای دیگر هم‌خوانی داشت. برخی اختلاف‌های مشاهده شده موجود نیز به دلیل تفاوت در زمان نمونه‌گیری، سنین مختلف پرندگان در انجام آزمایش و نمونه‌گیری در فصول مختلف سال و در نتیجه تغییر در میزان آنتی‌بادی‌های ایجاد شده بود. بنابراین درصد بالای غلظت آنتی‌بادی بر علیه این باکتری در سرم بوقلمون‌های مورد بررسی، نشان دهنده شیوع بالای *اورنیتوباکتریوم راینوتراکئال* در استان خوزستان است. این مسئله به دلیل خسارات اقتصادی فراوان ناشی از تلفات بالا، ایجاد عفونت‌های تنفسی همراه و کاهش رشد و تولید در صنعت طیور بسیار مهم است. پیشنهاد می‌گردد که جهت مدیریت و پیش‌گیری از خسارات اقتصادی در صنعت طیور ردیابی آنتی‌بادی واکنش دهنده با *اورنیتوباکتریوم راینوتراکئال* در گونه‌های مختلف پرندگان استان به خصوص طیور تخم‌گذار و گله‌های مادر با سنین مختلف انجام شود.

تشکر و قدردانی

از همکاری کارکنان محترم کشتارگاه دزفول جهت همکاری مؤثر در اخذ نمونه‌های مورد بررسی تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافعی ندارند.

منابع مالی

منابع مالی این پژوهش در قالب بودجه پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز تأمین شده است.

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

منابع

Alispahic, M., Endler, L., Hess, M., Hess, C., 2021. *Ornithobacterium rhinotracheale*: MALDI-TOF MS and whole genome sequencing confirm that serotypes K, L and M deviate from well-known reference strains and numerous field isolates. Microorganisms 9, 1006.

Awad, N. F., Hashem, Y. M., Elshater, N. S., Khalifa, E., Hamed, R. I., Nossieur, H. H., ... & Abd El-Hamid, M. I. (2022). Therapeutic potentials of aivlosin and/or zinc oxide nanoparticles against *Mycoplasma gallisepticum* and/or *Ornithobacterium rhinotracheale* with a special reference to the effect of zinc oxide nanoparticles on aivlosin tissue residues: An in vivo approach. *Poultry Science*, *101*(6), 101884.

Baksi, S., Rao, N., & Chauhan, P. (2017). Seroprevalence of *Ornithobacterium rhinotracheale* in broiler breeders in India. *PSM Veterinary Research*, *2*(2), 29-32.

Banani, M., Pourbakhsh, S. A., & Khaki, P. (2001). Characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolates from commercial chickens.

Barbosa, E. V., Cardoso, C. V., Silva, R. D. C. F., Cerqueira, A. D. M. F., Liberal, M. H. T., & Castro, H. C. (2019). *Ornithobacterium rhinotracheale*: An update review about an emerging poultry pathogen. *Veterinary sciences*, *7*(1), 3.

Burns, R. (Ed.). (2005). *Immunochemical protocols* (Vol. 295). Totowa, NJ: Humana Press.

Churria, C. D. G., Machuca, M. A., & Petruccelli, M. A. (2012). *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in poultry: an updated review. *International Journal of Molecular Zoology*, *2*.

Clark, S., & Ahlmeyer, V. (2018). Current health & industry issues facing the turkey industry: 2018. *United States Animal Health Association, Kansas City, MO*.

De Boeck, C., Kalmar, I., Dumont, A., & Vanrompay, D. (2015). Longitudinal monitoring for respiratory pathogens in broiler chickens reveals co-infection of *Chlamydia psittaci* and *Ornithobacterium rhinotracheale*. *Journal of Medical Microbiology*, *64*(5), 565-574.

Eid, A. A., Morsy, A. M., Adael, S. A., & Ismail, A. S. N. (2021). Comparative ELISA and SAT assays for the detection of *Ornithobacterium rhinotracheale* antibodies in broiler chickens at Sharkia Governorate. *Zagazig Veterinary Journal*, *49*(2), 171-180.

Ellakany, H. F., Elbestawy, A. R., Abd-Elhamid, H. S., Gado, A. R., Nassar, A. A., Abdel-Latif, M. A., ... & Alowaimer, A. N. (2019). Effect of experimental *Ornithobacterium rhinotracheale* infection along with live infectious bronchitis vaccination in broiler chickens. *Poultry science*, *98*(1), 105-111.

Hafez, H. M., & Sting, R. (1999). Investigations on different *Ornithobacterium rhinotracheale*" ORT" isolates. *Avian diseases*, 1-7.

Hafez, H. M., & Chin, P. R. (2020). *Ornithobacterium rhinotracheale* infection. *Diseases of Poultry, 14th ed.; Swayne, ED, Boulianne, M., Logue, CM, McDougald, LR, Nair, V., Suarez, DL, de Wit, S., Grimes, T., Johnson, D., Kromm, M., et al., Eds*, 853-889.

Haghigi Khoshkho, P., Akbari Azad, G. and Amiri, Sh. (2008). Investigation of the seroprevalence of *Ornithobacterium rhinotracheal* infection in broiler chickens of Tehran province. Proceedings of the 4th National Symposium on Poultry Health and Diseases, Shahrekord. Page 10(In Farsi)

Hashish, A., Sinha, A., Sato, Y., Macedo, N. R., & El-Gazzar, M. (2022). Development and validation of a new TaqMan real-time PCR for the detection of *Ornithobacterium rhinotracheale*. *Microorganisms*, *10*(2), 341.

Hinz, K. H., Blome, C., & Ryll, M. (1994). Acute exudative pneumonia and airsacculitis associated with *Ornithobacterium rhinotracheale* in turkeys. *Veterinary record*, *135*(10), 233-234.

Hurn, B. A., & Chanter, S. M. (1980). [5] Production of reagent antibodies. In *Methods in enzymology* (Vol. 70, pp. 104-142). Academic Press.

Ghanbarpour, R., & Salehi, M. (2009). Sero-prevalence and identification of *Ornithobacterium rhinotracheale* in broiler flocks in south-eastern Iran. *Tropical animal health and production*, *41*, 1679-1683.

Khosravi, M., Nouri, M., Mohammadi, A., Mosavari, N., & Constable, P. D. (2021). Preparation of immunomagnetic beads coupled with a rhodamine hydrazine immunosensor for the detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in bovine feces, milk, and colostrum. *Journal of Dairy Science*, *104*(6), 6944-6960.

Kwang Jung (2020) High seroprevalence of *Ornithobacterium rhinotracheale* in layer chickens in Gyeonggi province, South Korea Journal of Livestock Hygiene Society (KOJVS), 43(4), 257-259.

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

Nik Piran, Abbasi Bahner, Bijanzad, Peyman and Taqvi Melai. (2012). Serological investigation of *Ornithobacterium rhinotracheal* in beef herds of Ardabil province. Veterinary Clinical Pathology, 5(4 (20) Winter), 1363-1368. (In Farsi)

Ozbey, G., Ongor, H., Turgut-Balik, D., Celik, V., Kilic, A., & Muz, A. (2004). Investigations on *Ornithobacterium rhinotracheale* in broiler flocks in Elazig province located in the East of Turkey. *Veterinarni medicina*, *49*(8).

Türkyilmaz, S., & Kaya, O. (2005). Detection of antibodies produced against *Ornithobacterium rhinotracheale* and *Bordetella avium* by enzyme-linked immunosorbent assay in hens and turkeys in Aydın province, Turkey. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, *29*(3), 897-902.

Vandamme, P., Segers, P., Vancanneyt, M., Van Hove, K., Mutters, R., Hommez, J., ... & Mannheim, W. (1994). *Ornithobacterium rhinotracheale* gen. nov., sp. nov., isolated from the avian respiratory tract. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *44*(1), 24-37.

van Empel, P., van den Bosch, H., Loeffen, P., & Storm, P. (1997). Identification and serotyping of *Ornithobacterium rhinotracheale*. *Journal of clinical microbiology*, *35*(2), 418-421.

Van Empel, P. C. M., & Hafez, H. M. (1999). *Ornithobacterium rhinotracheale*: a review. *Avian pathology*, *28*(3), 217-227.

Xue, J., Lv, C., He, P., Xu, M., & Zhang, G. (2020). Research Note: Serological investigation of *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in China. *Poultry science*, *99*(10), 4814-4817.

Received: 09.10.2023
Accepted: 23.01.2024

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

Vol. 20, No. 2, Summer, 2024 **Original Article**
DOI: 10.22055/IVJ.2024.420074.2642

Tracking the antibody level against *Ornithobacterium rhinotracheal* in the serum of slaughtered turkeys in Khuzestan province using In-house ELISA

Sedigheh Yousefinejad[1], Mohammad Khosravi[2*], Darioush Gharibi[3], Mansoor Mayahi[4] and Masoud Reza Seyfi Abad Shapouri[5]

[1] PhD Graduated in Veterinary Bacteriology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[2] Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[3] Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[4] Professor, Department of Livestock, Poultry and Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[5] Professor of the Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Received: 09.10.2023 Accepted: 23.01.2024

Abstract

Ornithobacterium rhinotracheal (ORT) is a Gram-negative pathogen that is one of the causes of respiratory diseases in birds. Co-infection of *Ornithobacterium rhinotracheal* with other pathogens can cause serious health problems in bird species and also lead to financial losses in the poultry industry. Serological methods are among the most important techniques for rapid infection diagnosis, farm monitoring, infection control and prevention. The purpose of this study was to design an ELISA test to assess the prevalence of ORT and track the amount of ORT-specific antibody in serum collected from turkeys. After immunizing three pieces of turkey and obtaining the immunization serum, antibody purification was performed using ion exchange chromatography and affinity chromatography methods. The purified antibodies were then used in a homemade ELISA reaction as a standard sample to determine the quantity of specific antibodies against ORT. A total of 244 serum samples were collected from turkeys slaughtered in the poultry slaughterhouse of Khuzestan province. ELISA testing revealed the significant presence of antibodies against ORT in 141 (57.78%) of the samples. The average concentration of antibodies in positive samples was 467.72 ± 124.128 micrograms per milliliter of serum, while in negative samples it was 262.97 ± 37.263 micrograms per milliliter. This study revealed the prevalence of ORT infections in Khuzestan province. Therefore, due to the lack of a reliable vaccine against *O. rhinotracheal*, it is necessary to implement good disease management and biosecurity measures in order to effectively control the disease.

Key words: *Ornithobacterium rhinotracheal*, Turkey, Antibody, ELISA

[*] **Corresponding Author**: Mohammad Khosravi, Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
E-mail: m.khosravi@scu.ac.ir

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

Archive of SID.ir