Journal of Microbial World
Volume 16, No. 4, March 2024

Original Article

Inspection of the antibody titer against *Mannheimia haemolytica* with different doses of immunogen in sheep for the first time in Iran

Hajar Molaee[1], Yahya Tahamtan[2], Atefeh Shirazi Zadeh[3]

[1] Ph.D, Department of Nanobiotechnology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Shiraz Branch, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Shiraz, Iran. [2] Associate Professor, Department of Microbiology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Shiraz Branch, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Shiraz, Iran. [3]Expert, Department of Molecular Biology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Shiraz Branch, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Shiraz, Iran.

Abstract

Background & Objectives: *Mannheimia haemolytica* is one of the main bacterial species involved in lung diseases in ruminants. This bacterium is a part of normal flora in upper respiratory tract of these animals. *M. haemolytica* is an opportunistic microorganism, gaining access to the lungs when host defenses are compromised by stress or infection with respiratory viruses or mycoplasma. Antibiotics are candidates for treatment of Mannheimiosis but the universal growth of antibiotic resistance reduces their effectiveness. Therefore, vaccines are used broadly to control this disease while the low durability of existing vaccines makes to need vaccine progress. The objective of this study was to prepare inactivated immunogen of *M. haemolytica* and to define the suitable dose for immunization of sheep.

Material & methods: The polymerase chain reaction technique was used for identification of *M. haemolytica*. Formalin-inactivated immunogen adjuvanted with aluminum hydroxide and injected subcutaneously to sheep in different doses of 0.5, 1, 1.5 and 2 ml.

Results: Elisa results advocates long-term humoral immunity in studied animals and 1 ml seems to be sufficient dose for immunization of sheep.

Conclusion: Due to the lack of inactivated *M. haemolytica* vaccine in Iran, the results of this research are important in controlling *M. haemolytica* infection and provide useful information for making a suitable vaccine to prevent pneumonic pasteurellosis in Iran.

Keywords: *Mannheimia haemolytica*, Inactivated immunogen, Sheep, Elisa.

Received: 3 October 2023 Revised: 6 December 2023 Accepted: 28 January 2024

Correspondence to: Yahya Tahamtan
Tel: +98 7136240333
E-mail: yahyatahamtan@yahoo.com
Journal of Microbial World 2024, 16 (4): 253 - 262

Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.

مجله دنیای میکروب‌ها
سال شانزدهم شماره چهارم (پیاپی ۵۷) زمستان ۱۴۰۲
صفحات ۲۶۲ –۲۵۳

Original Article

بررسی عیار آنتی‌بادی ناشی از تزریق دزهای مختلف ایمونوژن *منهمیا هملیتیکا* در گوسفند برای اولین بار در ایران

هاجر مولائی[۱]، یحیی تهمتن[۲*]، عاطفه شیرازی زاده[۳]

[۱]دکتری، گروه نانوبیوتکنولوژی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه شیراز، سازمان تحقیق، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران.
[۲]دانشیار، گروه میکروبیولوژی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه شیراز، سازمان تحقیق، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران.
[۳]کارشناس، گروه بیولوژی مولکولی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه شیراز، سازمان تحقیق، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: باکتری *منهیمیا هملیتیکا* یکی از اصلی‌ترین گونه‌های باکتریایی مرتبط با بیماری‌های ریوی در نشخوارگنندگان می‌باشد و به صورت طبیعی در بخش فوقانی سیستم تنفسی حیوان وجود دارد. این باکتری یک گونه‌ی فرصت طلب است و زمانی که دفاع میزبان در اثر استرس و عفونت با ویروس‌های تنفسی یا مایکوپلاسما به خطر می‌افتد به ریه‌ها دسترسی پیدا می‌کند. آنتی‌بیوتیک‌ها یکی از روش‌های درمان هستند، اما افزایش جهانی مقاومت آنتی‌بیوتیکی اثربخشی آن‌ها را کاهش می‌دهد. بنابراین استفاده از واکسن برای کنترل بیماری به صورت گسترده‌ای انجام می‌شود اگرچه دوام واکسن‌های موجود بالا نیست و نیاز به بهبود کارایی آن‌ها مورد نیاز است. هدف از این مطالعه، تهیه ایمونوژن غیرفعال *منهمیا هملیتیکا* و تعیین دز مناسب جهت ایمنی‌زایی گوسفندان می‌باشد.

مواد و روش‌ها: روش مولکولی جهت تعیین هویت جدایه‌ها استفاده شد. سپس ایمونوژن غیرفعال به‌همراه ادجوانت آلوم در دزهای مختلف ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌لیتر به گوسفندان تزریق شد.

یافته‌ها: نتایج الایزا نشان دهنده ترشح آنتی‌بادی‌ها و ایجاد ایمنی هومورال به‌صورت طولانی مدت در گوسفندان بود. دز مناسب ۱ میلی‌لیتر به‌دست آمد.

نتیجه‌گیری: با توجه به عدم وجود واکسن غیرفعال *M. haemolytica* در ایران، نتایج این تحقیق در کنترل عفونت آن حائز اهمیت بوده و اطلاعات مفیدی را برای ساخت واکسن در ایران ارائه می‌دهد.

کلمات کلیدی: *منهمیا هملیتیکا*، ایمونوژن غیر فعال، گوسفند، الایزا.

دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۷/۱۱ ویرایش مقاله: ۱۴۰۲/۹/۱۵ پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۱۱/۸

مقدمه

منهمیا هملیتیکا (سابقاً *پاستورلا هملیتیکا*) یک کوکوباسیل گرم منفی، غیرمتحرک و بتاهمولیتیک متعلق به خانواده پاستورلاسه است که یک گروه بزرگ و متنوع از گاماپروتئوباکترهای گرم منفی را در برمی گیرد. خانواده Pasteurellaceae دارای پلئومورفیسم بوده و اشکال برآمده و رشته‌ای شکل نیز در آن‌ها دیده می‌شود. اما عمدتا باسیل‌های کوتاه یا کوکوباسیل با اندازه (۰/۲×۱×۲ میکرومتر)، گرم منفی،

*) آدرس برای مکاتبه: گروه میکروبیولوژی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، شیراز.
تلفن: ۰۷۱۳۶۲۴۰۳۳۳ پست الکترونیک: yahyatahamtan@yahoo.com

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/) در فصلنامه دنیای میکروب‌ها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.

فاقد هاگ، غیر متحرک، بی‌هوازی اختیاری، اکسیداز مثبت بوده و قادرند نیترات را به نیتریت احیاء کرده و نیز سبب تخمیر کربوهیدرات‌ها شوند و به سختی بر روی محیط‌های غنی رشد می‌کنند، کاتالاز، اکسیداز و آلکالین فسفاتاز مثبت هستند و با رنگ آمیزی گیمسا به شکل دو قطبی دیده می‌شوند (۱).

پاستورولوز دراصل به بیماری‌های تنفسی گاو، گوسفند، بز و خوک گفته می‌شود که توسط *منهمیا هموليتيكا* یا *پاستورلا مالتوسیدا* ایجاد می‌شود. این دو باکتری ممکن است به صورت مشترک یا هرکدام به تنهایی بیماری پاستورولوز را سبب شوند. معمولا *منهمیا هموليتيكا* را عامل بیماری در گوسفند و بز و *پاستورلا مالتوسیدا* را عامل بیماری در گاو قلمداد می‌کنند (۲). پاستورلوز ایجاد شده بوسیله *منهمیا هموليتيكا* معمول‌ترین فرم نمونیای حاد در گوسفند است که به آن منهمیوز نیز گفته می‌شود. در ابتدا بیماری به‌صورت تکی اتفاق می‌افتد اما در اثر استرس، دستکاری و حمل و نقل، شیوع به‌صورت گسترده رخ می‌دهد.

مطالعات مختلف نشان داده‌اند که *منهمیا هموليتيكا* سروتیپ ۱ و ۲ و ٦ مهم‌ترین و رایج‌ترین عامل ایجاد پاستورلوزیس و تب در دام می‌باشند (۳). در گاوها سروتایپ ۱، ۲ و٦ عموما از حلق حیوانات سالم بازیابی می‌شوند و سروتیپ‌های ۲ و ٦ از گاوهایی که در اثر BRD مرده‌اند به‌دست می‌آید. در گوسفندان اهلی اکثرا سروتیپ ۲ دیده می‌شود، در حالی که سروتیپ A1 عامل اصلی نمونیا در گاوها می‌باشد (٤و٥).

با وجودی که *منهمیا هموليتيكا* اغلب به‌عنوان یک عضو طبیعی میکروبیوتای دستگاه تنفسی فوقانی وجود دارد، اما عفونت با آن ممکن است به طور مستقیم یا غیر مستقیم به دلیل عوارض آلودگی و مرگ و میر حیوان خسارات اقتصادی فراوانی را به صنعت دام و دامداران تحمیل کند (٦). *منهمیا هموليتيكا* عامل سندرم‌های متعددی است که انواع مختلفی از میزبانان را تحت تأثیر قرار می‌دهد. سندروم مهم پاستورلوز در حیوانات اهلی و وحشی به‌صورت بیماری دستگاه تنفسی فوقانی به شکل رینیت (سوزش و التهاب مخاط بینی و ترشحات بینی) و بیماری دستگاه تنفسی تحتانی به شکل نمونیا می‌باشد.

نکته قابل توجه این است که بسیاری از گونه‌های *منهمیا هموليتيكا* به‌صورت پاتوژن فرصت‌طلب باعث ایجاد عفونت‌های حاد و مزمن می‌شوند. استرس ناشی از شرایط نامناسب محیطی، حمل و نقل و عفونت‌های باکتریایی یا ویروسی از عوامل مستعد کننده بیماری تنفسی بر اثر *منهمیا هموليتيكا* در نشخوارکننده گان می‌باشند (۷). پیشگیری یک روش مناسب و مؤثر برای جلوگیری از عفونت‌های پاستورلوزی است و در دام‌هایی چون بز و گوسفند اهمیت بسیاری دارد و از خسارات اقتصادی به دامداری‌ها می‌کاهد. آنتی‌بیوتیک درمانی، یک روش مفید برای کنترل عفونت می‌باشد، ولی مقاومت‌های میکروبی باعث شده که استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها چندان موفقیت آمیز نباشد (۸). مطالعات نشان دهنده مقاومت باکتری *منهمیا هموليتيكا* به آنتی‌بیوتیک‌هائی مانند بتالاکتام‌ها، تتراسایکلین، استرپتومایسین، سولفونامیدها، ماکرولیدها و سولفامتازین می‌باشد (۹و۱۰).

بنابراین واکسیناسیون با ایجاد پاسخ‌های ایمنی و حفظ سلول‌های حافظه ایمونولوژیک، موثرترین استراتژی در پیشگیری از بیماری‌های عفونی است (۱۱). بروز بیماری‌های نوظهور و مقاومت‌های دارویی، تقاضا برای روش‌ها و فن آوری‌های جدید را افزایش داده است. به طور کلی اکثر واکسن‌های باکتریایی مورد استفاده علیه *منهمیا هموليتيكا* حدود ۵۰ درصد ایمنی در برابر آلودگی با باکتری ایجاد می‌کنند (۱۲)، در نتیجه تلاش‌های بیشتری برای گسترش و پیدایش واکسن‌های مناسب لازم است.

هدف از این تحقیق تمرکز بر تولید ایمونوژنی است که بتواند چشم انداز نوینی را برای مقابله و مبارزه با بیماری‌های تنفسی در گوسفند ایجاد کند. در ادامه‌ی جداسازی، خالص سازی و تعیین تیپ کپسولی جدایه‌ها در تحقیق قبل (۱۳)، این پژوهش با هدف تهیه ایمونوژن غیر فعال و در نهایت ارزیابی دُز مناسب برای ایمنی‌زایی در گوسفندان انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش، باکتری *منهمیا هموليتيكا* جدا شده از گوسفند

توسط مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شیراز (RVSRI)، به‌عنوان سویه اصلی مورد استفاده قرار گرفت. این پژوهش به صورت تجربی (Experimental) انجام شد و جامعه آماری مورد پژوهش جهت تعیین دز مناسب ایمونوژن، گوسفندهای نژاد کبوده‌ی شیراز بود. حیوانات انتخاب شده به‌عنوان جامعه آماری سابقه عفونت با *منهمیا همولیتیکا* و یا واکسیناسیون در برابر این باکتری را نداشتند.

تمام جدایه‌های *منهمیا همولیتیکای* ذخیره شده در فریز، مجددا ذوب شده و با رعایت شرایط اسپتیک به‌صورت جداگانه بر روی محیط Blood Agar (شرکت Merck، آلمان) حاوی ۷٪ خون گوسفند کشت خطی داده شد. محیط‌های کشت داده شده به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفتند. پس از طی دوره گرمخانه‌گذاری نمونه‌ها از نظر کلنی‌های مشکوک به *منهمیا همولیتیکا* بررسی شدند.

در ادامه برای تایید نهایی *منهمیا همولیتیکا*، از روش مولکولی PCR استفاده شد که روشی بسیار دقیق، سریع و اختصاصی، برای تأیید وجود ژن‌های باکتری است. آزمون PCR توسط دستگاه ترموسایکلر مدل (Eppendorf, Mastercycler Gradient، آلمان) صورت پذیرفت. در این پژوهش از پرایمرهای الیگونوکلئوتیدی Rpt2 برای شناسایی همین ژن در جدایه‌های *منهمیا همولیتیکا* استفاده شد. در فرایند واکنش PCR، استخراج DNA با استفاده از کیت (شرکت سیناژن- ایران) انجام گرفت. حجم مخلوط واکنش در هر میکروتیوب ۲۵ میکرولیتر درنظر گرفته شد (جدول ۱).

جدول ۱: محتویات هر ویال مخلوط واکنش PCR.

	PCR Ingredients	Microliter
1	PCR buffer 10X	2.5
2	$MgCL_2$	1
3	dNTP	0.5
4	Forward Primer	1
5	Reverse Primer	1
6	Taq polymerase	0.25
7	Deionized water (double distilled water)	16.75
8	(DNA) Test sample	2

توالی پرایمر مورد استفاده جهت شناسایی باکتری *منهمیا همولیتیکا* در جدول ۲ نشان داده شده است (١٤).

جدول ۲: توالی اسید نوکلئیک پرایمرها.

Target gene	Primer	Sequence (5'→3')	Amplicon size (bp)
Rpt2	F	GTTTGTAAGATATCCCATTT	1022
	R	CGTTTTCCACTTGCGTGA	

شرایط PCR به صورت یک مرحله Denaturation ابتدایی ابتدایی (۳ دقیقه در ۹۵ °C) که توسط ۳۵ سیکل (۱ دقیقه در ۹۵ °C)، (۱ دقیقه در ٤٨ °C) و (۳۰ ثانیه در ۷۲°C) ادامه یافت. در مرحله Extension نهایی دمای ۷۲ °C به مدت ۵ دقیقه یافت. در مرحله Extension نهایی دمای ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه استفاده شد. در نهایت به‌منظور جداسازی و تشخیص قطعات DNA، الکتروفورز بر روی ژل آگارز روش مناسبی می‌باشد. پس از تایید نهایی باکتری‌ها با استفاده از روش مولکولی، چند کلنی تک از محیط بلاد آگار به ۵ میلی‌لیتر محیط (Brain Heart Infusion Broth (BHI (شرکت Merck) انتقال داده شد و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در انکوباتور شیکردار گرمخانه‌گذاری گردید. بعد از گذشت ٢٤ ساعت گرماخانه‌گذاری، غلظت سوسپانسیون باکتری با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر جذب اتمی مدل (Pharmacia biotech, Sweden) مشخص گردید (۱۳).

برای مشخص نمودن نمونه‌ی مناسب از میان جدایه‌های *منهمیا همولیتیکای* ذخیره شده در بانک باکتری آزمایشگاه موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه شیراز، هر کدام از جدایه‌ها در محیط BHI کشت داده شد و همه‌ی آن‌ها در رقت یکسان ۳×۱۰^{۹} CFU/ml که با استفاده از روش کدورت سنجی در اسپکتروفتومتری به‌دست آمد، به میزان ۵۰۰ میکرولیتر به دو سر موش بصورت داخل صفاقی (i.p) تزریق شد. از میان نمونه‌ها، تعدادی جدایه جهت انجام آزمون‌های بعدی انتخاب گردید. در این پژوهش از موش‌های Balb/C استفاده گردید. جنسیت همه موش‌ها ماده و وزن ۱۸-۲۲ گرم بود.

پس از تعیین سویه‌ی مناسب *منهمیا همولیتیکا* بر اساس نتایج

آزمایش‌ها، این جدایه مجددا در محیط BHI کشت داده شد و جهت غیر فعال‌سازی باکتری، فرمالین با غلظت مناسب به سوسپانسیون باکتری با غلظت انتخاب شده اضافه و در انکوباتور شیکردار و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری گردید.

در ادامه جهت اطمینان از استریل بودن نمونه‌ی ایمونوژن غیر فعال‌شده با فرمالین، بعد از گرمخانه‌گذاری مناسب، از نمونه در محیط‌های Nutrient Agar، Blood Agar و BHI کشت و در ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری گردید. این محیط‌ها به مدت ۲٤ و ٤۸ ساعت از نظر وضعیت رشد یا عدم رشد باکتری‌ها مورد بررسی قرار گرفت (۱۵). برای تهیه ایمونوژن غیر فعال، ژل آلوم تهیه و به باکتری غیر فعال شده اضافه گردید. سوسپانسیون حاوی باکتری کشته شده و ادجوانت جهت تلقیح آماده شد.

تعداد ۵۰ گوسفند به دو گروه اصلی تست و کنترل تقسیم گردیدند. ٤۰ گوسفند در گروه‌های تست و هر گروه تست شامل ۱۰ راس گوسفند و گروه کنترل نیز شامل ۱۰ راس گوسفند بود. تزریق ایمونوژن‌ها در دو نوبت (دوز اول و دوز بوستر) با فواصل دو هفته‌ای و بصورت زیر جلدی، انجام شد. گروه تست در واقع شامل ایمونوژن غیرفعال شده با فرمالین به همراه ادجوانت آلوم می‌باشند و گروه کنترل شامل تمام محتویات گروه تست به غیر از آنتی‌ژن بود. ایمونوژن تهیه شده در دزهای مختلف به گوسفند تزریق شد (جدول ۳) و آزمون الایزا برای تعیین میزان تیتر آنتی‌بادی اختصاصی علیه باکتری بر روی سرم‌های جداسازی شده از گوسفندان انجام گرفت.

در ادامه از تمام گوسفندان ایمن شده و گروه کنترل در فواصل زمانی مشخص توسط لوله‌های ونوجکت حاوی ژل فعال کننده لخته خون‌گیری شد. سپس سرم‌ها جدا شده و در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس جهت انجام آزمون الایزا نگهداری شد.

از میکروپلیت‌های ۹٦ خانه از جنس پلی‌استیرن (شرکت SPL، کره) برای پوشش‌دهی (کوت کردن) آنتی‌ژن‌ها استفاده شد. مقدار مناسب باکتری *منهمیا هموليتيكا* در بافر کوت‌کننده کربنات – بی کربنات حل گردید و ۱۰۰ میکرولیتر از آن درون هر چاهک ریخته شد و به مدت ۲٤ ساعت در دمای ٤ درجه سلسیوس قرار گرفت. سپس با محلول PBS/Tween 20 (0.05%) شستشو انجام شد. در مرحله بعد در هر چاهک ۱۰۰µl از محلول ٪ ۱ سرم آلبومین گاوی (Bovine serum albumin=BSA) به منظور بلاکینگ اضافه و به مدت یک ساعت در انکوباتور ۳۷ °C قرار گرفت. پس از شستشو ۱۰۰ میکرولیتر سرم رقیق شده درون هر چاهک ریخته و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ °C گرمخانه‌گذاری شد. در ادامه، ۱۰۰ میکرولیتر محلول کونژوگه گوسفندی (۱/٤۰۰۰) به هر چاهک اضافه گردید و به‌مدت یک ساعت در انکوباتور ۳۷ °C قرار گرفت. پس از اتمام دوره انکوباسیون به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از سوبسترای TMB اضافه و به مدت ۱۲ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی گرمخانه‌گذاری شد. در نهایت ۱۰۰ میکرولیتر اسید سولفوریک ۱۲/۵ ٪ به‌منظور توقف واکنش به تمام چاهک‌ها اضافه گردید. در نهایت، دانسیته نوری به‌دست‌آمده توسط دستگاه خوانشگر الایزا (ELISA reader) (BioTek Instruments، آمریکا)، در طول موج ٤۵۰ نانومتر خوانده شد (۱۳).

جدول ۳: مشخصات گروه‌های تست و کنترل مورد آزمون.

روش تزریق	دز تزریقی (میلی لیتر)	مشخصات	نام گروه
(s.c)	۵/۰	ایمونوژن غیرفعال + ادجوانت ژل آلومینیوم هیدروکسید	۱
(s.c)	۱	ایمونوژن غیرفعال + ادجوانت ژل آلومینیوم هیدروکسید	۲
(s.c)	۵/۱	ایمونوژن غیرفعال + ادجوانت ژل آلومینیوم هیدروکسید	۳
(s.c)	۲	ایمونوژن غیرفعال + ادجوانت ژل آلومینیوم هیدروکسید	٤
(s.c)	۱	محتویات گروه تست بجز آنتی ژن	کنترل

نرم‌افزار SPSS و آزمون آنالیز واریانس ANOVA نسخه شانزدهم برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها استفاده شد. از روش آماری آنالیز واریانس با تکرار (Repeated ANOVA) برای ارزیابی تأثیر زمان در تیتر آنتی‌بادی و روش One way

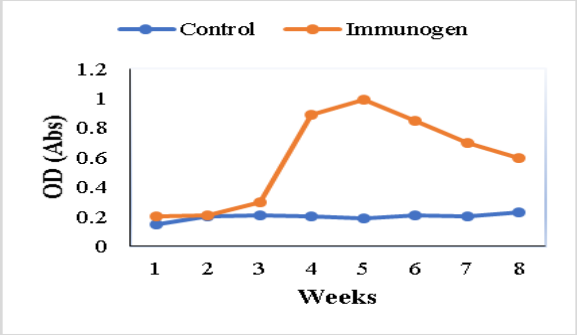
ANOVA برای مقایسه میانگین متغیرها بین گروه‌های مختلف استفاده گردید. نتایج سنجش‌ها با درصد خطای ۰/۵٪ با آزمون t مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

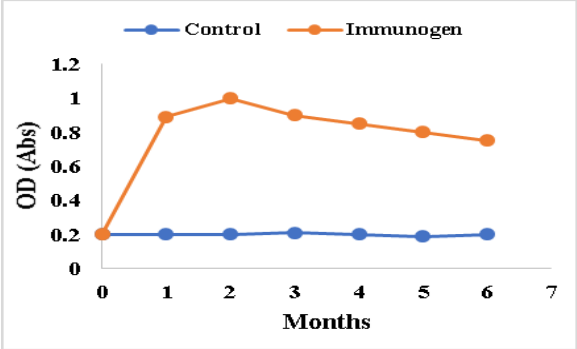
یافته‌ها

کلنی‌های منهمیا هموليتيكا دارای حاشیه گرد و سطح محدب است و به‌صورت کلنی‌های نسبتا ریز سفید یا کرمی با همولیز ضعیف بر روی محیط بلاد آگار دیده شد. پس از رنگ‌آمیزی گرم، باکتری‌ها زیر میکروسکوپ به‌صورت کوکوباسیل‌های کوتاه و گرم منفی دیده شدند. جهت تعیین هویت باکتری به روش آزمون مولکولی Single step PCR حضور ژن *Rpt2* در باکتری *منهمیا هموليتيكا* تأیید شد. محصول PCR بر روی ژل الکتروفورز آنالیز و باند حاصل با اندازه ۱۰۲۲ جفت باز به‌دست آمد.

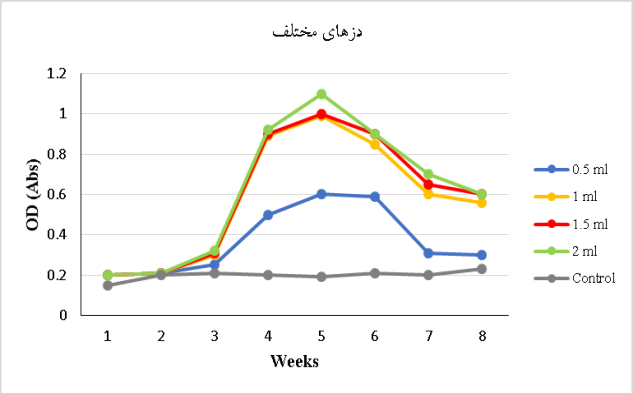
در ادامه تیتر آنتی‌بادی اختصاصی علیه باکتری *منهمیا هموليتيكا* در گوسفندان دریافت کننده ایمونوژن استاندارد یعنی آنتی‌ژن *منهمیا هموليتيكای* غیرفعال شده و ادجوانت آلوم (ژل آلومینیوم هیدروکسید) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج در نمودار ۱ نشان داده شده است، نمودار سمت راست تغییرات تیتر آنتی‌بادی را در ۸ هفته اول و نمودار سمت چپ تغییرات را در بازه زمانی ٦ ماه نشان می‌دهد. با توجه به نمودار تیتر آنتی‌بادی از هفته سوم شروع به افزایش کرده و در هفته ٤، ٥ پس از تزریق دز یادآور، به بیشترین مقدار خود رسیده و سپس در پایان هفته ششم شروع به کاهش کرد. این کاهش تیتر تا ماه دوم و سوم به‌تدریج ادامه داشت و در ماه ششم به حداقل میزان خود رسید. گروه دریافت کننده ایمونوژن با اختلاف آماری معنی‌داری تیتر ایمنی بالاتری نسبت به گروه کنترل نشان داد ($p<$۰/۰۵).

در ادامه برای انتخاب دز مناسب ایمونوژن *منهمیا هموليتيكا*، دزهای ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌لیتر به گوسفند تزریق شد. نتایج مربوط به میزان تیتر آنتی‌بادی گوسفندان ایمن شده با دزهای فوق در نمودار ۲ آورده شده است. دزهای بالای ۱ میلی‌لیتر نتایجی مشابه ۱ میلی‌لیتر داشت و اختلاف آماری معنی‌داری به‌دست نیامد ($p>$۰/۰۵) بنابراین از نظر اقتصادی هم مقرون





نمودار ۱: تیتر آنتی‌بادی اختصاصی ایمونوژن همراه با هیدروکسید آلومینیوم در گوسفندان.



نمودار ۲: تیتر آنتی‌بادی اختصاصی مربوط به گروه‌های دریافت کننده دزهای مختلف ایمونوژن.

به صرفه است که از دز ۱ میلی‌لیتر برای هر گوسفند استفاده شود. دز ۰/۵ میلی‌لیتر نیز تیتر کمتری نسبت به سایر دزها داشت. در این رابطه بین دز ۰/۵ میلی‌لیتر و سایر دزها تفاوت آماری معنی‌داری حاصل شد ($p<$۰/۰۵) (نمودار ۲).

بحث

M. haemolytica و *P. multocida* علت اصلی بیماری‌های تنفسی در دام‌ها هستند که ٥/٦ درصد از کل بیماری‌های دامی

را در سراسر جهان تشکیل می‌دهند و خسارات اقتصادی قابل توجهی را به‌دنبال دارند (۱۶). تاکنون مطالعات علمی زیادی در خصوص جداسازی و شناسایی *M. haemolytica* در کشورهای مختلف انجام شده است (۷). *منهمیا هموليتيكا* از سواب بینی، ریه‌ها و لوزه‌های گوسفند سالم و نشخوارکنندگان با علائم ذات الریه جدا شده است (۱۷). مطالعات مختلفی شیوع *منهمیا هموليتيكا* و *پاستورلا مالتوسیدا* را در گوسفندان مناطق مختلف جهان از جمله ایران نشان داده است (۱۸و۱۹). شیوع بالای بیماری منهمیوز در حیوانات اهلی باعث افزایش تحقیقات، جهت ایمن‌سازی علیه این عفونت شده است. بنابراین، در ادامه کار قبلی گروه تحقیقاتی ما (۱۳) در زمینه جداسازی، شناسایی و خالص‌سازی جدایه‌های مختلف *منهمیا هموليتيكا* از سواب بینی و گلوی گوسفندان بیمار و تعیین تیپ کپسولی آن‌ها، در این مطالعه از میان جدایه‌های ذخیره شده، ایمونوژن مناسب جهت ایمنی‌زایی در گوسفندان تهیه شد. همچنین در ادامه دز مناسب ایمونوژن در تزریق به گوسفند مورد بررسی قرار گرفت.

بطور کلی واکسیناسیون اقدام پیشگیرانه ایمن و موثری می‌باشد که حتی در بین گروه‌های مختلف حیوانات نیز اهمیت بسیاری دارد. در چند سال اخیر پیشرفت‌های قابل توجهی در تحقیقات برای شناسایی واکسن‌های مدرن و مؤثر صورت گرفته است. جنبه‌های متعددی برای طراحی استراتژی‌های تولید یک واکسن وجود دارد. با این وجود، بررسی‌ها نشان می‌دهد واکسن علیه منهمیا تکامل یافته اما محدودیت‌هایی در کاربرد آن وجود دارد که باید برطرف شود. مطالعه ی بیماریزایی *منهمیا هموليتيكا* اطلاعات ارزشمندی را در مورد فرآیند بیماری‌زایی این میکروارگانیسم در میزبان‌های طبیعی آن مشخص کرده است. این تحقیقات منجر به توسعه واکسن‌های جدید شده، که تعدادی از آن‌ها در حال حاضر برای استفاده در حیوانات به صورت تجاری در دسترس هستند (۲۰و۲۱).

در سال ۱۹۷۵، تامسون و همکاران نشان دادند یک روز پس از حمل و نقل، حیواناتی که سالم ماندند دارای تعداد کمتری از *M. haemolytica* در حفره بینی و غلظت‌های بالاتر آنتی‌بادی نسبت به گاوهای بیمار بودند. بنابراین، واکسیناسیون با واکسن‌های موثر *M. haemolytica* قبل از حمل و نقل می‌تواند به طور بالقوه ذات‌الریه ناشی از تب حمل و نقل کاهش دهد (۲۲). در سال‌های ۱۹۸۰ مطالعه واکسن‌های *M. haemolytica* زنده گسترش یافت زیرا واکسن‌های موجود حفاظت مناسب در برابر بیماری را ایجاد نمی‌کرد و گاهی باعث افزایش شدت بیماری در حیوانات نیز می‌شدند. در تحقیقات Mantsumoto و همکاران که در سال ۱۹۸٤ انجام شد از *منهمیا هموليتيكای* استخراج شده با سالین ۲/۵ درصد و ادجوانت آلومینیوم هیدروکسید به‌عنوان واکسن زیر جلدی استفاده گردید. این واکسن مقاومت بیشتری نشان داد. اما چالش پس از واکسیناسیون زیر جلدی منجر به نتایج متناقض شد. زیرا استخراج باکتری با سالین گرم منجر به حذف کپسول و پروتین‌های سطحی متعددی شد (۲۳).

در مطالعه حاضر، پس از مشخص نمودن سویه‌ی مناسب *منهمیا هموليتيكا*، آنتی‌ژن غیر فعال با ادجوانت آلوم تهیه شد و در گوسفند به‌عنوان حیوان هدف مورد بررسی قرار گرفت. برای اولین بار در سال ۱۹۲٦ ادجوانت‌های آلومینیومی در یک واکسن به‌کار برده شد و سپس برای حدود یک قرن مورد استفاده قرار گرفته اند. این ادجوانت‌ها می‌توانند به طور موثر آنتی‌ژن ها را جذب کنند و پس از ورود به بدن در بدن انبار شوند. سپس به آرامی آنتی‌ژن ها را آزاد می کنند تا یک پاسخ ایمنی طولانی مدت ایجاد کنند. علاوه‌براین، ادجوانت‌ها می‌توانند آنتی‌ژن‌های آزاد را برای تجمع در ذرات القا کنند (۲٤) و در نتیجه جذب بهتر آنتی‌ژن‌ها توسط سلول‌های ارائه‌دهنده آنتی‌ژن (APC) را افزایش دهند. از طرف دیگر، یک واکسن خوب نه تنها ایمنی محافظتی طولانی مدت ایجاد می‌کند، بلکه ساخت آن ارزان است.

در این تحقیق ،آنتی‌ژن غیر فعال *M. haemolytica* که حاوی باکتری کامل و آلوم به‌عنوان کمکی است، تهیه شد و گوسفندان دو بار با ۱ میلی‌لیتر از ایمونوژن فوق به‌صورت زیر جلدی ایمن شدند. ایمونوژن فوق دارای تیتر آنتی‌بادی IgG بالاتر در مقایسه با گروه کنترل بود و تیتر آنتی‌بادی برای مدت طولانی

بالا باقی ماند. داده‌های پژوهش حاضر با سایر واکسن‌های کامل *M. haemolytica* مطابقت دارد (۱۵). همچنین در ادامه ایمونوژن مذکور در دزهای مختلف به صورت s.c به گوسفندان مختلف تزریق شد. نتایج نشان داد که دزهای تزریقی ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌لیتر از نظر آماری اختلاف معنی‌داری نداشتند بنابراین با تواجه به جنبه‌های اقتصادی و کاهش هزینه‌های مربوط به آن، دز ۱ میلی‌لیتر یک دز مناسب و کافی برای ایجاد ایمنی لازم در گوسفندان پیشنهاد می‌شود.

ایمونوژن تهیه شده در این پژوهش با تولید و ترشح آنتی‌بادی‌ها باعث ایجاد ایمنی هومورال شده و از عفونت جلوگیری می کند. پاسخ ایمنی هومورال عامل مهمی در مقاومت به عفونت *منهمیا هموليتيكا* است. ایمنی هومورال نوعی پاسخ وابسته به آنتی‌بادی در مقابل ورود ویروس‌ها یا باکتری‌ها به بدن می‌باشد. در واقع عوامل اجرایی ایمنی هومورال، آنتی‌بادی‌ها می‌باشند. سلامت واکسن مسأله بسیار مهم است و یک واکسن ابتدا باید ایمن باشد. در این تحقیق، سلامت ترکیبات مورد آزمایش با بررسی وضعیت حیوانات مشخص شد. نشانه‌های نامطلوبی مانند تغییرات دمای بدن و سایر علائم غیر طبیعی به‌ویژه در محل تزریق در طول مراحل آزمایش مشاهده نشد. وضعیت استریل بودن ایمونوژن نشان داد که ایمونوژن عاری از آلاینده‌های میکروبی زنده بود. همچنین تغییری در رفتار حیوان و یا واکنش موضعی و عمومی در هیچ گروه از گوسفندان دیده نشد. وضعیت کلی حیوانات ثابت بود و افزایش غیرطبیعی دمای بدن نیز در گروه‌های مورد آزمایش مشاهده نگردید.

در نهایت، نتایج تحقیق حاضر در کنترل عفونت *M. Haemolytica* مهم بوده و اطلاعات مفیدی را برای ساخت واکسن مناسب برای پیشگیری از پاستورلا و منهمیا در ایران فراهم می‌کند. همانطور که مشخص است واکسن غیر فعال *M. haemolytica* در ایران وجود ندارد بنابراین تهیه و بررسی این واکسن جذابیت بیشتری نسبت به سایر واکسن‌های پاستورلوز دارد در این پروژه برای اولین بار در ایران، تهیه آسان ایمونوژن موثر منهمیا در گوسفند گزارش شد.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، از میان باکتری‌های *منهمیا هموليتيكا* جدا شده از گوسفند، پس از انتخاب سویه‌ی مناسب و تهیه ایمونوژن اقدام به ایمن‌سازی گوسفندان گردید. نتایج الایزا نشان داد گوسفندان ایمن‌شده، میزان متفاوتی از آنتی‌بادی تولید می‌کنند. بر اساس این نتایج، باکتری غیر فعال شده با فرمالین به همراه ادجوانت آلوم، ایمونوژن قابل قبولی است. شایان ذکر است تزریق دز یادآور در تولید و ترشح آنتی‌بادی تأثیر به‌سزایی دارد و پس از تزریق دز بوستر به‌ویژه در گروه‌های تست، تیتر آنتی‌بادی افزایش قابل توجهی نشان داد. دز مناسب برای ایمن‌سازی گوسفندان ۱ میلی‌لیتر به ازای هر راس گوسفند به‌دست آمد.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان این مقاله پژوهشی کلیه نکات اخلاقی اعم از سرقت ادبی، عدم انتشار دوگانه و تحریف داده‌ها را رعایت کرده‌اند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی (RVSRI)، شیراز جهت فراهم نمودن امکانات آزمایشگاهی و حمایت‌شان و همچنین از جناب آقای مهندس صفر صادق‌زاده (بخش حیوانات آزمایشگاهی) جهت مساعدت فنی ایشان تشکر و قدردانی به‌عمل می‌آورند. این مطالعه توسط بنیاد ملی علوم ایران (INSF) و بخشی از آن توسط گرنت پژوهشی شماره ۹۹۰۱۳۵۴۵ حمایت شده است.

تعارض منافع

وجود ندارد.

References

1. Jesse F, Boorei M, Chung E, Wan-Nor F, Lila MM, Norsidin M, Isa K, Amira N, Maqbool A, and Odhah M. A review on the potential effects of *Mannheimia haemolytica* and its immunogens on the female reproductive physiology and performance of small ruminants. Journal of Animal Health and Production. 2020.

2. Zamri-Saad M, Azri A, Nurida A, and Sheikh-Omar A. Experimental respiratory infection of goats with *Mycoplasma arginini* and *Pasteurella haemolytica* A2. PERTANIKA. 1994. 17; 239-239.

3. Blackall P, Bojesen AM, Christensen H, and Bisgaard M. Reclassification of [Pasteurella] trehalosi as Bibersteinia trehalosi gen. nov., comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2007. 57(4); 666-674.

4. Ferede Y, Mekuriaw S, Mazengia H, and Amane A. Serotyping and evaluation of the level of protective antibody titer in Northwest Ethiopian sheep before and after ovine pasteurollosis vaccination. Int J Pharm Med Bio Sc. 2013. 2(4).

5. Deressa A, Asfaw Y, Lubke B, Kyule M, Tefera G, and Zessin K. Molecular detection of *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica* in sheep respiratory infections in Ethiopia. The Journal of Applied Research in Veterinary Medicine. 2010. 8(2); 101.

6. Dassanayake RP, Shanthalingam S, Herndon CN, Lawrence PK, Cassirer EF, Potter KA, Foreyt WJ, Clinkenbeard KD, and Srikumaran S. *Mannheimia haemolytica* serotype A1 exhibits differential pathogenicity in two related species, Ovis canadensis and Ovis aries. Veterinary microbiology. 2009. 133(4); 366-371.

7. Legesse A, Abayneh T, Mamo G, Gelaye E, Tesfaw L, Yami M, and Belay A. Molecular characterization of *Mannheimia haemolytica* isolates associated with pneumonic cases of sheep in selected areas of Central Ethiopia. BMC microbiology. 2018. 18; 1-10.

8. Lamm CG, Love BC, Krehbiel CR, Johnson NJ, and Step DL. Comparison of antemortem antimicrobial treatment regimens to antimicrobial susceptibility patterns of postmortem lung isolates from feedlot cattle with bronchopneumonia. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 2012. 24(2); 277-282.

9. Anholt RM, Klima C, Allan N, Matheson-Bird H, Schatz C, Ajitkumar P, Otto SJ, Peters D, Schmid K, and Olson M. Antimicrobial susceptibility of bacteria that cause bovine respiratory disease complex in Alberta, Canada. Frontiers in Veterinary Science. 2017. 4; 207.

10. Sahay S, Natesan K, Prajapati A, Kalleshmurthy T, Shome BR, Rahman H, and Shome R. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* isolated from ovine respiratory infection: A study from Karnataka, Southern India. Veterinary World. 2020. 13(9); 1947.

11. Sarkander J, Hojyo S, and Tokoyoda K. Vaccination to gain humoral immune memory. Clinical & translational immunology. 2016. 5(12); e120.

12. Gupta A and Chaphalkar SR. Vaccine adjuvants: the current necessity of life. Shiraz E-Medical Journal. 2015. 16(7).

13. Molaee H, Tahamtan Y, Saeednezhad E, and Hayati M. Isolation of the various serotypes of *Mannheimia haemolytica* and preparation of the first vaccine candidate in Iran. Molecular Biology Reports. 2022. 49(11); 10367-10375.

14. Kumar J, Dixit SK, and Kumar R. Rapid detection of *Mannheimia haemolytica* in lung tissues of sheep and from bacterial culture. Veterinary World. 2015. 8(9); 1073.

15. Confer AW, Ayalew S, Panciera RJ, Montelongo M, and Wray JH. Recombinant *Mannheimia haemolytica* serotype 1 outer membrane protein PlpE enhances commercial M. haemolytica vaccine-induced resistance against serotype 6 challenge. Vaccine. 2006. 24(13); 2248-2255.

16. García-Alvarez A, Fernández-Garayzábal JF, Chaves F, Pinto C, and Cid D. Ovine *Mannheimia haemolytica* isolates from lungs with and without pneumonic lesions belong to similar genotypes. Veterinary microbiology. 2018. 219; 80-86.

17. Ackermann MR and Brogden KA. Response of the ruminant respiratory tract to *Mannheimia* (*Pasteurella*) *haemolytica*. Microbes and infection. 2000. 2(9); 1079-1088.

18. Abbasi K, Tahamtan Y, Moazamian E, and Hosseini MH. Formalin and ferric chloride inactivated *Pasteurella multocida* type a adjuvanted with bacterial DNA and alum as a new vaccine candidate in sheep pasteurellosis. Microbial Pathogenesis. 2023. 183; 106282.

19. Boumart Z, Bamouh Z, Semmate N, Tadlaoui KO, and El-Harrak M. Biological characterisation and pathogenicity of a *Pasteurella multocida* isolate from sheep in Morocco. J. Agric. Sci. Technol. A. 2021. 11; 53-64.

20. Wilson BA and Ho M. *Pasteurella multocida*: from zoonosis to cellular microbiology. Clinical microbiology reviews. 2013. 26(3); 631-655.

21. Kisiela DI, Aulik NA, Atapattu DN, and Czuprynski CJ. N-terminal region of *Mannheimia haemolytica* leukotoxin serves as a mitochondrial targeting signal in mammalian cells. Cellular microbiology. 2010. 12(7); 976-987.

22. Thomson R, Chander S, Savan M, and Fox M. Investigation of factors of probable significance in the pathogenesis of pneumonic pasteurellosis in cattle. Canadian Journal of Comparative Medicine. 1975. 39(2); 194.

23. Matsumoto M, Schmitz J, Syuto B, Watrous B, and Mattson D. Immunogenicity of a soluble antigen against *Pasteurella haemolytica*-associated pneumonia in calves. Veterinary research communications. 1984. 8; 117-130.

24. Zhao X, Yang F, Shen H, Liao Y, Zhu D, Wang M, Jia R, Chen S, Liu M, and Yang Q. Immunogenicity and protection of a *Pasteurella multocida* strain with a truncated lipopolysaccharide outer core in ducks. Veterinary Research. 2022. 53(1); 1-12.