✓ پژوهش و سازندگی، شماره ۴۷، تابستان ۱۳۷۹

مطالعه تاثیر تجویز ماده محرک ایمنی (کوئل آ) روی برخی پارامترهای دفاع ایمنی غیراختصاصی ماهی کپور در عفونت تجربی با *Aeromonas hydrophila*

● مصطفی اخلاقی، دکترای تخصصی بیماریهای ماهی، استادیار گروه آموزشی بهداشت و بیماریهای آبزیان دانشگاه شیراز

تاریخ دریافت: دیماه ۱۳۷۸

چکیده

در این تحقیق بررسی تغییرات لیزوزیم سرم، پروتئین تام سرم و هماتوکریت خون در ماهی کپور معمولی متعاقب عفونت تجربی با باکتری *Aeromonas hydrophila* و نیز تأثیر ماده کوئل آ (محرک ایمنی) روی پارامترهای فوق انجام گرفت، تعداد ۱۰۰ قطعه ماهی کپور معمولی به چهار گروه تقسیم شدند، گروه اول شامل ماهیان کنترل، گروه دوم ماهیانی که ماده کوئل آ دریافت کردند، گروه سوم ماهیانی که در آنها ایجاد عفونت تجربی گردید وگروه چهارم ماهیانی که پس از دریافت کوئل آ در آنها ایجاد آلودگی تجربی صورت گرفت. در آزمایشات مربوط به تعیین فعالیت لیزوزیم سرم، مشخص شد که میزان فعالیت لیزوزیم در ماهیان آلوده به باکتری افزایش معنی‌داری ($P<0/05$) نسبت به ماهیان کنترل داشت و نیز میزان فعالیت لیزوزیم در ماهیانی که علاوه بر دریافت کوئل آ، در آنها ایجاد عفونت تجربی صورت گرفته بود، نسبت به ماهیانی که فقط آلوده به باکتری بودند، افزایش معنی‌داری ($P<0/05$) داشت. در آزمایشات مربوط به تعیین میزان پروتئین تام سرم در چهار گروه ماهیان، مشخص گردید که سطح پروتئین تام سرم ماهیانی که کوئل آ دریافت کرده بودند افزایش معنی‌داری ($P<0/05$) نسبت به ماهیان کنترل داشت و همچنین سطح پروتئین تام سرم ماهیانی که آلودگی تجربی داشتند، نسبت به ماهیان کنترل، دارای کاهش معنی‌داری بود ($P<0/05$). در آزمایشات مربوط به تعین هماتوکریت خون در چهار گروه ماهیان مشخص شدکه درصد هماتوکریت خون ماهیانی که آلودگی تجربی داشتند، کاهش معنی‌داری ($P<0/05$) نسبت به ماهیان کنترل داشت و نیز درصد هماتوکریت خون ماهیانی که علاوه بر دریافت کوئل آ، در آنها ایجاد عفونت تجربی گردیده بود، افزایش معنی‌داری ($P<0/001$) نسبت به ماهیانی که فقط آلودگی تجربی داشتند مشاهده شد. نتایج به دست آمده از این تحقیق نشانگر تحریک سیستم دفاع غیراختصاصی در مقابل عفونت ناشی از *Aeromonas hydrophila* و نیز نقش کوئل آ به عنوان محرک ایمنی در افزایش آن می‌باشد.

کلمات کلیدی: ایمنی غیراختصاصی، ماهی کپور، کوئل آ، آئروموناس هیدروفیلا

✓ Pajouhesh & Sazandegi, No 47 PP: 108-111

Effect of Quil-A as an immunostimulant on some non-specific immune response parameters of common carp in experimental infection with *A. hydrophila*.

By: Akhlaghi M.; DVM, Ph.D. Fish Health Unit, School of Vet. Med., Shiraz Univ.

E. mail: akhlaghi@hafez.shiraz.ac.ir

In the prsent study, changes in serum lysozyme, serum total protein and haematocrit values were investigated in common carp infected with *Aeromonas hydrophila*, and also role of the quil- A (as an immunostimulant) on some blood parameters. One hundred fish divided in four groups: 1- non - infected control fish 2- fish that received quil - A 3- fish with experimental infection 4- fish that after receiving quil - A infected experimentally. The present investigation demonstrated that infected fish had lysozyme levels significantly higher ($P<0.05$) than non - infected control fish. Similarily the group that received quil - A and then infection, had lysozyme levels significantly higher ($P<0.05$) than non - infected control fish conversely in infected fish, the levels of total serum protein were significantly lower ($P<0.05$) than non - infected control fish. The haematocrit values in blood samples from infected fish were significantly lower ($P<0.05$) compared to the values in non - infected control fish. Conversely in group that received quil - A and then infection, haematocrit values were significantly higher ($P<0.001$) than infected fish. The present results demonstrated that some non - specific immune factors during the infection change which might helps the process of the disesase. Quil - A as an immuno-stimulant elevates the non - specific defence mechanisms and other immunostimulant as such may be used as prevention.

Key words: Non-specific immunity, Common carp, Quil-A, *Aeromons hydrophila*.

مقدمه

پیشگیری از بیماریها یکی از ارکان ضروری در پرورش متراکم ماهیان محسوب می‌شود. امروزه تمایل زیادی به کم کردن و یا حذف آنتی‌بیوتیک‌ها به دلیل هزینه زیاد، ایجاد مقاومت، پائین‌آوردن کیفیت گوشت واثرات نامطلوب در بدن مصرف کننده ایجاد شده است. بالا بردن مقاومت از طریق تأثیر در سیستم ایمنی بدن ماهی با استفاده از ایمنواستیمولانت، آدجوانت و حاملین واکسن مورد توجه پرورش دهندگان ماهی قرار گرفته است (۲) که از آن جمله می‌توان استفاده از گلوکان و کوئل آ را نام برد که در تحریک ایمنی اختصاصی و به خصوص ایمنی غیر اختصاصی بدن ماهی نقش دارند (۵). به همین دلیل این مواد می‌توانند نقش اساسی را در پیشگیری از بیماریها داشته باشند خصوصاً به این دلیل که ماهیان نسبت به پستانداران وابستگی بیشتری به دفاع ایمنی غیر اختصاصی دارند (۴). یکی از بیماریهای مهم در پرورش ماهیان گرمابی، عفونت‌های ناشی از

Aeromonas hydrophila می‌باشد (۷) که به صورت سپتی‌سمی هموراژیک توأم با خونریزی‌ها، زخمهای پوستی و عضلانی، آب آوردگی و ورم شکم (۳) می‌باشد. *Aeromonas hydrophila* از زخمها و بافت کلیه در ماهیان کپور پرورش بیمار استان فارس جداگردیده و نقش برخی عوامل استرس‌زا در ظهور عفونت‌های ناشی از آن مورد مطالعه قرار گرفته است (۱).

هدف از این تحقیق، بررسی تغییرات برخی از پارامترهای دفاع ایمنی غیر اختصاصی و خون‌شناسی مانند فعالیت لیزوزیم سرم، پروتئین تام سرم و هماتوکریت خون در ماهی کپور معمولی به دنبال عفونت تجربی ناشی از باکتری *Aeromonas hydrophila* بیماریزا و نیز تأثیر ماده محرک ایمنی (کوئل‌آ) در پارامترهای فوق بود تا زمینه‌های لازم برای ارائه راه‌حل‌های پیشگیری از سپتی‌سمی ناشی از *Aeromonas hydrophila* و سایر عفونت‌های مشابه باکتریایی فراهم آید.

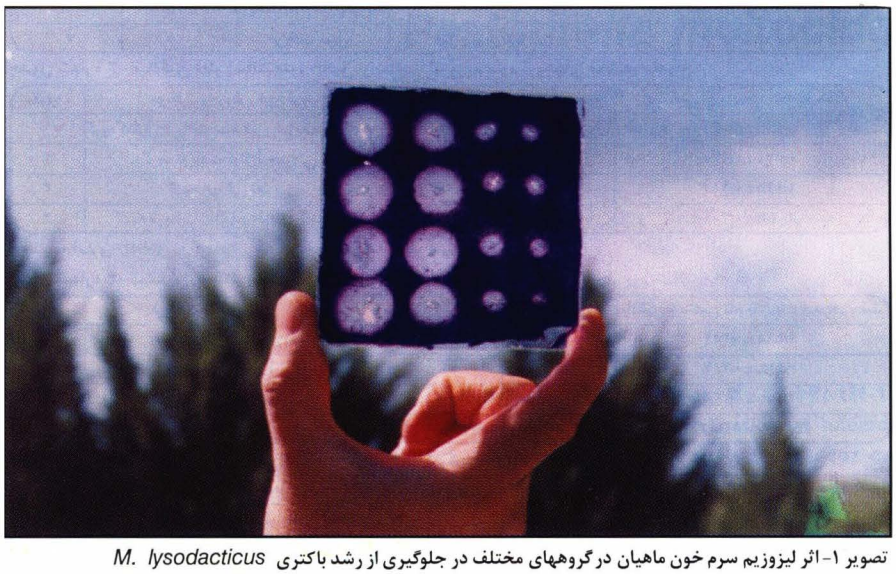
روش کار

تعداد ۱۰۰ قطعه ماهی کپور معمولی با وزن متوسط ۷۵ گرم از استخرهای تکثیر و پرورش کپور ماهیان مرودشت تهیه و توسط کیسه‌های پلاستیکی دو جداره حاوی اکسیژن به بخش آبزیان دانشکده انتقال یافت و در آکواریوم‌هایی که از قبل آبگیری شده بوده و هوادهی می‌شدند قرار گرفتند. به منظور سازگاری با محیط جدید، ماهیان به مدت ۳ هفته قبل از شروع تحقیقات در این آکواریوم‌ها ماندند. در این مدت از لحاظ سلامتی زیرنظر قرار گرفته و نمونه‌های لام مرطوب از پوست و آبشش‌های آنها جهت وجود احتمالی انگل‌های خارجی تهیه شد که سلامت کامل آنها مورد تأیید قرار گرفت. ماهیان روزانه تغذیه و دمای آب به صورت ثابت ۲۳ درجه سانتیگراد تنظیم شد. درصد تعویضی آب ۱۰٪ با فاصله ۲ روز یکبار بود.

ماهیان به چهار گروه ۲۵ قطعه‌ای به ترتیب گروه اول: گروه کنترل، گروه دوم: گروه کوئل‌آ به صورت خوراکی، گروه سوم: تحت آلودگی با باکتری *Aeromonas hydrophila* و گروه چهارم: پس از دریافت کوئل‌آ توسط باکتری *Aeromonas hydrophila* آلوده شدند (جدول شماره ۱).

ماهیان توسط پودر میخک به میزان ۳g/۱۰l بیهوش می‌شدند و تمام آزمایشها در شرایط بیهوشی ماهیان انجام گرفت. در گروههای ۲ و ۴ ماهیان، کوئل‌آ (Superfos biosectora/s, Denmark) به صورت خوراکی داده شد. کوئل‌آ که یک ساپونین و از فرآورده‌های گیاهی است به عنوان افزایش دهنده پاسخ دفاع غیر اختصاصی ماهی شناخته شده است. کوئل‌آ به میزان ۰/۵mg/ml حل شده و به هر ماهی ۰/۲ml با لوله نرم پلاستیکی نازک متصل به سرنگ انسولین پلاستیکی خورانیده شد.

ماهیان در گروه ۳ و گروه ۴ به مدت یک هفته پس از خورانیدن کوئل‌آ در معرض آلودگی با باکتری *Aeromonas hydrophila* به صورت غوطه‌ورسازی به مدت ۱۵ دقیقه با مقدار 10^7 باکتری در هر میلی‌لیتر مایع غوطه‌ورسازی قرار گرفتند (روش به کار برده شده اخلاقی ۱۳۷۷). ماهیان در شرایط درجه حرارت ثابت (۲۵ درجه سانتیگراد) و هوادهی مناسب قرار گرفتند. پس از سه روز از ایجاد عفونت تجربی و ایجاد علائمی نظیر خونریزی موضعی در پایه باله‌ها و مخرج از ورید دمی ماهیان در معرض عفونت قرار گرفته و همچنین ماهیان گروههای ۱ و ۳ که در معرض عفونت قرار نگرفته بودند خونگیری به عمل آمد و مقداری از نمونه‌های خون در درون لوله‌های حاوی هپارین جهت تعیین هماتوکریت و بقیه آن در لوله‌ها جمع‌آوری و در یخچال نگهداری شد تا سرم آن جداگردد و سرم جدا شده در ۲۰- درجه سانتیگراد تا زمان آزمایش تعیین فعالیت لیزوزیم نگهداری گردید.



تصویر ۱- اثر لیزوزیم سرم خون ماهیان در گروههای مختلف در جلوگیری از رشد باکتری *M. lysodacticus*
ستون ۱: با سرم ماهیان گروه کنترل، ستون ۲: سرم ماهیانی که فقط کوئل‌آ دریافت کرده‌اند. ستون ۳: سرم ماهیانی که در آنها عفونت تجربی ایجاد شده است. ستون ۴: سرم ماهیانی که علاوه بر دریافت کوئل‌آ در آنها ایجاد عفونت تجربی شده است.

برای تعیین فعالیت لیزوزیم سرمها از روش موینر و همکاران (۱۹۹۳) استفاده گردید (۹) که به طور مختصر شرح داده می‌شود. پس از تهیه آگاروز یک درصد و استریل نمودن آن در اتوکلاو، محیط مزبور به مدت ۱/۵ ساعت در حمام ۵۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد تا محیط هم دما شود. سپس میزان ۵۰ mg/ml باکتری *Micrococcus lysodacticus* به آگار اضافه گردید. پس از مخلوط نمودن باکتری با محیط، آگار را روی اسلاید شیشه‌ای ۱۰×۱۰ سانتیمتر ریخته و اجازه داده شد تا آگار بسته شود. ارتفاع آگار سه میلیمتر بود که توسط پانچ شانزده حفره به فواصل معین در چهار ردیف چهارتایی روی اسلاید به وجود آمد و توسط میکروپیپت ده میکرولیتر از نمونه‌های سرم در هر حفره طوری ریخته شد که نمونه‌های سرم چهار گروه ماهیان مورد آزمایش، به ترتیب در چهار ردیف قرار گیرد. اسلاید به مدت ۲۰ ساعت در گرمخانه ۲۵ درجه سانتیگراد قرار گرفت و پس از آن به مدت ۵ دقیقه با آب شسته و در کاغذ صافی قرار گرفت و پس از آن در هوای آزاد قرار گرفت تا خشک شود. برای رنگ‌آمیزی، اسلاید مزبور به مدت یک دقیقه در متیل ویولت ۱/۲۵ درصد قرار گرفت و پس از هر شستشو با آب مقطر، به مدت ۱۵ ثانیه در محلول لوگول قرار داده شد و سپس با اتانول رنگ‌بری شد تا منطقه روشن ظاهر شود. در نهایت قطر مناطق روشن در هر ردیف اندازه‌گیری و نتایج به دست آمده با هم مقایسه شدند. این آزمایش ۴ بار تکرار گردید.

برای تعیین میزان پروتئین تام سرم از روش بیوره استفاده شد و پروتئین تام سرم کلیه ماهیان در چهار گروه محاسبه شد. برای تعیین هماتوکریت خون ماهیان از روش میکروهماتوکریت با استفاده از لولهٔ موئین و پر کردن دو سوم آن با خون و سانتریفوژ به مدت ۲ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ انجام شد و توسط گونیای مخصوص قرائت شد و هماتوکریت به صورت درصد گلبولهای قرمز در حجم نهایی خون ماهیان بیان شد.

نتایج

نتایج حاصله از ایجاد عفونت تجربی در گروههای مختلف ماهیان در جدول شماره ۲ نشان داده شده‌است.

نشانه‌های اولیه بیماری سپتی‌سمی ناشی از *Aeromonas hydrophila* از روز سوم پس از ایجاد عفونت به صورت تغییر رفتار در تعدادی از ماهیان گروههای ۳ و ۴ مشاهده شد و علائم بالینی به صورت خونریزی موضعی در پایه باله‌ها و مخرج، بزرگ شدن شکم و بیرون زدن چشمها بعد از روز چهارم در بعضی ماهیان مشاهده گردید.

نتایج فعالیت لیزوزیم در چهار گروه ماهیان تحت آزمایش به صورت میانگین قطر منطقه روشن اطراف هر حفره که درون آن سرم ریخته شده بود و مانع از رشد باکتری *Micrococcus lysodacticus* شده‌اند و در رنگ‌آمیزی رنگ آبی را به خود نگرفته‌اند (تصویر ۱).

گروه آلودگی تجربی سطح لیزوزیم سرم اختلاف فاحشی نسبت به سایر گروهها را نشان می‌دهد. در جدول ۳ میانگین قطر منطقه روشن اطراف هر حفره (سانتیمتر) نشان داده شده است.

میزان پروتئین تام سرم چهار گروه در ماهیان مورد آزمایش در جدول شماره ۴ آورده شده است. پروتئین تام سرم ماهیانی که کوئل‌آ دریافت کرده‌اند نسبت به ماهیان کنترل دارای افزایش معنی‌داری ($P<0/05$) را

کشت خالص بیست و چهار ساعته بویون این سویه به مقدار ۱/۵ میلی‌لیتر از رقت یک صدم از راه زیرجلدی گاو سالم را مبتلا کرده و حیوان در عرض ۴۸-۳۶ ساعت با علائم بالینی مشخص بیماری تلف می‌شود (عکس ۱). تاکنون دو سروتیپ آسیائی و آفریقائی این بیماری در جهان تشخیص داده شده است. روش‌های سروتایپینگ متداول عبارتند از:

- تایپینگ کپسولی با استفاده از آزمایش هماگلوتیناسیون غیر مستقیم (IHA)
- counter immunoelectrophoresis (CIEP)

- تایپینگ سوماتیک به وسیله آزمایش آگلوتیناسیون
- آگارژل ایمونودیفوژن AGID (۵، ۶ و ۷)

از نظر کپسولی سویه‌های آسیائی تیپ B و سویه‌های آفریقائی تیپ E هستند. با روش آگلوتیناسیون یا سوماتیک همه سویه‌ها تیپ ۶ طبقه‌بندی می‌شوند در حالیکه همین سویه‌ها با روش AGID تحت عنوان تیپ ۲ نامگذاری می‌گردند.

بطور کلی سه نوع واکسن جهت پیشگیری این بیماری در جهان متداول است:

الف - باکترین‌ها (Bacterins)

ب- واکسن کشته ترسیبی با آلوم؛
(APV) Alum precipitated vaccine

ج- واکسن کشته روغنی؛
(OAV) Oil adjuvant vaccine

باکترین‌ها باکتری کشته یا غیر فعال بدون یاور (Adjuvant) هستند که با تزریق مکرر آنها در دام ایمنی کافی حاصل می‌شود. غلظت زیاد باکتری در این گونه واکسنها از خطرات استفاده از باکترین است که می‌تواند باعث عکس‌العمل شوکی در حیوان شود. در مورد استفاده از واکسن APV عکس‌العمل شوکی کمتر و تقریباً در مورد OAV بدون شوک می‌باشد.

در این مقاله واکسن APV با سویه بومی 6:B در فرمانتور تهیه گردیده و نتایج آن به روش استاندارد O.I.E سال ۱۹۹۶ ارزیابی شده است.

روش کار

الف - مراحل تهیه واکسن در فرمانتور چهارصد لیتری

۱- ترکیبات محیط کشت باکتری

1- * Triptose phosphate broth (Merck) 29.5 g/lit
2- Yeast extract (oxoid) 14.3 g/lit
3- Antifoam, silicon (fluka) 1 g/lit
4- Distilled water
pH, 7.00; strile, 121°c, 5 min. 1000 ml

۲- تزریق بذر جوان و خالص ۶ ساعته *Pasteurella multocida* سروتیپ 6:B به محیط کشت در فرمانتور در شرایط ۳۷ درجه سانتیگراد (نسبت حجم بذر به حجم محیط کشت ۲ درصد). با استفاده از همزن در ۱۰۰ دور در دقیقه کشت ادامه می‌یابد.

۳- تعیین دوره رشد باکتری از طریق کنترل pH و مصرف سود (NaOH)

۴- تزریق هوای استریل به منظور تسریع در رشد باکتری به میزان ۹۰lpm

۵- پایان دوره کشت و افزودن فرمالدئید ۳۷ درصد به میزان ۳ در هزار در حالیکه شرایط همگی رعایت می‌گردد، به منظور غیرفعال کردن باکتری (Inactivation).

۶- تعیین تعداد باکتری در یک میلی‌لیتر واکسن

۷- تعیین جرم خشک واکسن در واحد حجم

۸- افزودن ژل آلومینیوم هیدراکسید به نسبت ۱۰ درصد حجمی از ژل ۱/۵ درصد به واکسن و یکنواخت کردن آن به وسیله همزن حدود ۲ ساعت.

۹- نگهداری واکسن در یخچال ۴ درجه سانتیگراد در تانکرهای ذخیره دویست لیتری تا هنگام تقسیم در شیشه و مصرف.

* فرمول محیط تریپتوزفسفات برات بر حسب گرم در لیتر: تریپتوز ۲۰ گرم، گلوکز ۲ گرم، کلرور سدیم ۵ گرم و فسفات دی سدیک ۲/۵ گرم.

ب - آزمایش‌های کنترلی واکسن

آزمایش‌های استریلیتی، بی‌ضرری و مؤثر بودن واکسن HS طبق استانداردهای O.I.E سال ۱۹۹۶ عمل گردید. آزمایش استریلیتی به منظور کنترل آلودگی واکسن با استفاده از محیط کشت متداول آزمایشگاهی انجام گردید. آزمایش بی‌ضرری بر روی موش سوری انجام شد. به ۵ سرموش به وزن ۲۲-۲۰ گرم به هر کدام مقدار ۰/۲ میلی‌لیتر واکسن از راه داخل عضلانی تزریق و به مدت ۵ روز تحت آزمایش نگهداری شد.

آزمایش مؤثر بودن واکسن HS بنابر استاندارد O.I.E به سه روش پیشنهاد شده است.

روش اول واکسیناسیون گاو، سپس چالنج گاو با سویه حاد است. شکل دیگر این روش تزریق سرم حاوی پادتن گاو واکسینه به موش است که به دنبال آن آزمایش چالنج بر روی موش انجام می‌گیرد.
(Passive mouse protection test). این روش به دلیل مشکل تهیه و نگهداری و ارزش اقتصادی گاو معمولاً متداول نیست.

روش دوم واکسیناسیون خرگوش، سپس چالنج خرگوش با سویه حاد است. یا اینکه سرم خرگوش واکسینه حاوی پادتن به موش تزریق شده و همانند روش بالا (Passive mouse protection test) انجام شو.

روش سوم که هم دقیقتر و هم عملی‌تر است آزمایش Potency مستقیماً بر روی موش است.

در این مقاله واکسن HS آزمایشی به روش سوم بر روی موش انجام شد. برای این منظور تعداد ۱۰۰ سرموش سوری از یک نژاد بوزن ۲۲-۲۰ گرم انتخاب شد. به ۵۰ سر آنها واکسن آزمایشی به میزان ۰/۲ میلی‌لیتر در داخل عضله پا تزریق گردید. دو هفته بعد از این گروه واکسینه مجدداً با همان واکسن و به همان میزان واکسینه شدند و یک هفته بعد از تزریق دوم گروه ۵۰ تائی موش واکسینه باگروه ۵۰ تائی کنترل غیر واکسینه همگی با سوش حاد 6:B چالنج شدند، بدین ترتیب که از سوش حاد کشت ۶/۵ ساعته بر روی بویون تهیه شد سپس از این کشت خالص رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-10} در فیزیولوژی آماده شد و ۰/۱ میلی‌لیتر از هر رقت به ۵ سر موش واکسینه و ۵ سر موش غیرواکسینه تزریق گردید.

گروههای ۵ تائی به طور مجزا در جایگاه به مدت پنج روز نگهداری شدند و هر روز صبح و بعدازظهر آمار تلفات ثبت گردید. مرگ و میر از روز دوم شروع و تا روز چهارم ادامه داشت. در پایان آزمایش میزان LD_{50} برای هر یک از گروههای واکسینه و کنترل جداگانه محاسبه و مقایسه گردید.

نتایج

دیاگرام (۱) منحنی جمعیت باکتری پاستورلا در شرایط کشت فرمانتور را نشان می‌دهد. به طوریکه در این دیاگرام ملاحظه می‌گردد به تدریج از ساعت سوم رشد، جمعیت افزایش یافته که حداکثر سرعت بین ساعت ۵ تا ۷ می‌باشد. در ساعت ۹ رشد جمعیت باکتری به حداکثر خود می‌رسد و در این مقطع کشت باکتری با اضافه کردن فرمالدئید متوقف می‌گردد.

دیاگرام (۲) ارتباط تعداد باکتری را با O.D در طول موج ۵۴۰ نانومتر در زمان کشت نشان می‌دهد. با استفاده از دیاگرام ۲ در هر شرایط از دوره کشت با نمونه گیری از واکسن به راحتی می‌توان به کمک اندازه‌گیری O.D آن، تعداد جرم زنده را محاسبه نمود.

همزمان با کاهش pH در اثر رشد تدریجی باکتری، بطور اتوماتیک سود ۲۰ درصد به محیط کشت باکتری در فرمانتور اضافه می‌گردد تا pH مناسب در ۷ برقرار بماند. این تغییرات در دیاگرام ۳ خلاصه شده است. در هفتمین ساعت از کشت؛ حداکثر تغییرات pH و بالاترین میزان مصرف سود مشاهده می‌شود.

دوره کشت این باکتری در فرمانتور حدود ۹ ساعت است سپس باکتری در مجاورت فرمول در حدود ۵ ساعت غیرفعال می‌گردد. تعداد باکتری در واکسن بین ۴/۵ تا ۵ میلیارد در میلی‌لیتر است. جرم خشک واکسن معادل ۰/۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به دست آمده است.

در آزمایش استریلیتی واکسن خالص به طور کامل با فرمل غیر فعال شده بود.

در آزمایش بی‌ضرری گروه ۵ تائی موش تزریقی کاملاً سالم و بدون عوارض موضعی بودند.

در آزمایش مؤثر بودن بر روی موش، مقایسه LD_{50} گروه واکسینه با LD_{50} گروه کنترل (Reed and muench's method for estimation of LD_{50}) نشان داد که 10^5 واحد ایمنی، در گروه واکسینه وجود دارد. طبق دستورالعمل O.I.E سال ۱۹۹۶ با این روش بایستی گروه موش واکسینه حداقل 10^4 واحد ایمنی داشته باشد (۸).

از موشهای تلف شده در این آزمایش باکتری خالص پاستورلا از خون قلب جداگردید.

بحث

نتایج به دست آمده از تولید این واکسن در فرمانتور در ۲۵ تکرار و در حجم کاری ۳۵۰ لیتر واکسن مشابه بود. از ویژگیهای تولید این واکسن در فرمانتور علاوه بر تولید انبوه، ساخت واکسن استاندارد با شرایط کنترلی دقیق است. برآوردهای اقتصادی ما سیستم فرمانتور را مطمئن‌ترین و اقتصادی‌ترین وسیله تهیه این واکسن ارزیابی نموده است. دوره ایمنی واکسن سپتی‌سمی هموراژیک APV به دنبال یک دز تزریقی (۴-۳ میلی‌لیتر متناسب با وزن دام) در گوساله‌های جوان حساس چهار تا شش ماهه بین ۳ تا ۴ ماه است، بدین ترتیب حداقل دوبار واکسیناسیون در سال توصیه می‌گردد. به دنبال تزریق این واکسن گهگاه علائم شوک گزارش شده که مربوط به طبیعت واکسن است و در این موارد بایستی داروهای ضد شوک مصرف گردد.

واکسن HS امروزه در اکثر کشورهای مصرف کننده، به صورت APV به کار می‌رود. واکسن روغنی یا OAV نیز به علت ایجاد ایمنی طولانی‌تر و فقدان شوک پس از واکسیناسیون طرفدارانی دارد که در برخی از مناطق مانند مالزی، اندونزی، سریلانکا و مصر ساخته و مصرف می‌شود.

سپاسگزاری

بدینوسیله از آقایان دکتر چاندراسکاران سابرامانیام و دکتر مختار به خاطر انجام سروتیپینگ سویه 6:B در انستیتو تحقیقات دامپزشکی کشور مالزی تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع مورد استفاده

1- Bain R.V.S, DE Alwis M.C.L., Carter G.R. & gupta B.K. 1982.

2- Carter G.R. & DE Alwis M.C.L, 1989. Haemorrhagic septicaemia. In pasteurella and pasteurellosis. Adlam C & rutter J.M., eds. Academic press, London UK, 131-160.

3- DE Alwis M.C.L 1992. Haemorrhagic septicaemia - A general review. Br. Vet. J., 148, 99-112.

4- Kaveh, M., Sohrab, V. and Baharsefat, M. 1960. Bovine pasteurellosis in Iran. Arch. Inst, Razi, 12, 99-105.

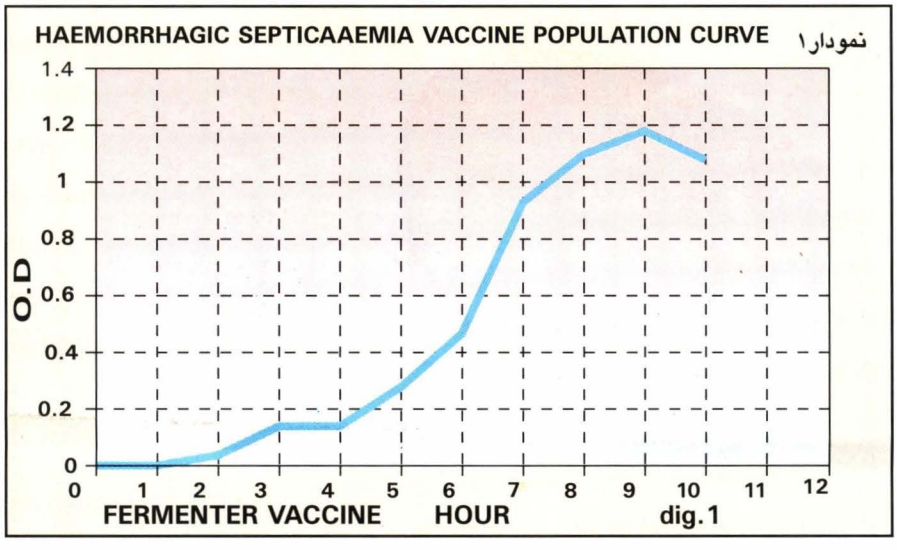
5- Heddleston K.L, Gala gher J.E & Rebers P.A. 1972. Fowl cholera: Gel diffusion precipitin test for serotyping *Pasteurella multocida* from avian species. Avian Dis., 16.925-936.

6- Namioka S. & Murata M., 1961. Serological studies on *Pasteurella multocida*. 1:A simplified of capsular typing of the organism. Cornell Vet., 51, 498-507.

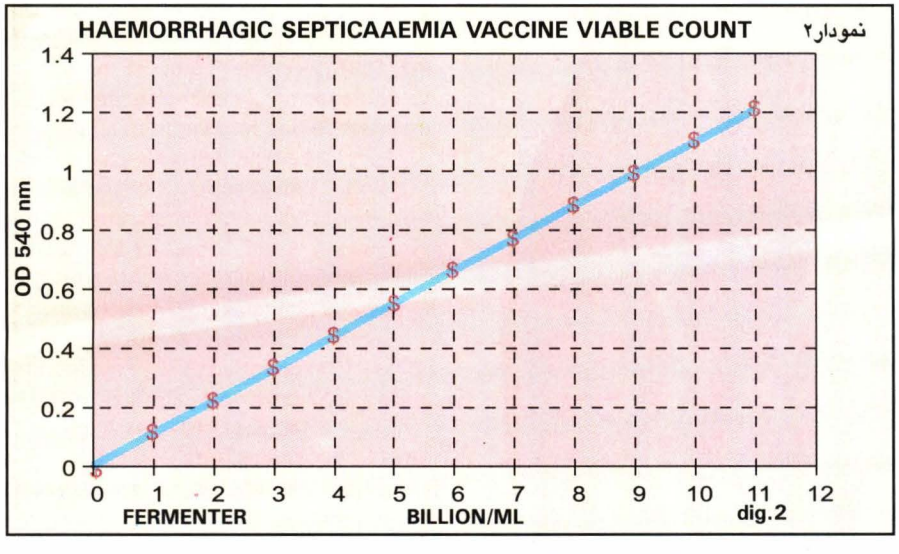
7- Carter G.R., 1955. A haemagglutination test for identification of serological types. Am. J. Vet. Res., 16, 481-484.

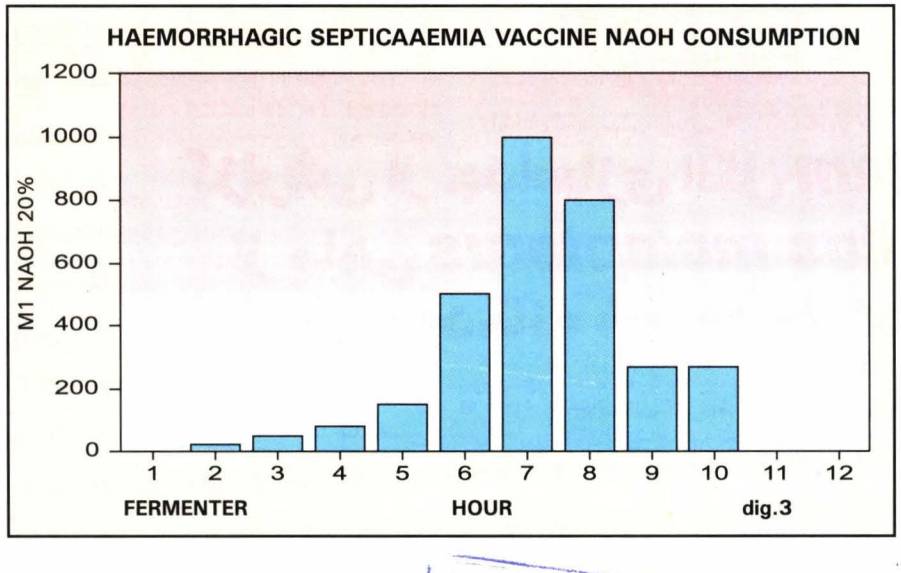
8- Manual of standards for diagnositic test and vaccine. O.I.E. 1996.

نمودار۱



نمودار۲





کتابخانه انستیتو رازی

ش۴۷/ت۷۹