AF 145

واکسن پاستورلوز طیور

مقایسه دو روش تهیه واکسن در فرمانتور و در محیط جامد و ارزیابی ایمنی آنها در جوجه

● عباس ستوده‌نیا، ● ایرج اعرابی، ● سعید عطائی کچوئی، ● علی‌اکبر ناصری‌راد، اعضاء هیأت علمی مؤسسه تحقیقاتی رازی
● جلال شلمـاشی ● عباس ایوبیان، اعضاء هیأت علمی سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران

مقدمه

پاستورلوز طیور بیماری عفونی و مسری طیور اهلی و وحشی است که در بعضی از کشورهای پیشرفته و در حال توسعه به شکل بومی به عنوان خطری جدی در صنعت پرورش طیور مطرح می‌باشد (۱ و ۴). پاستورلوز در طیور به خصوص در مرغ و بوقلمون توسط سروتیپ‌های *Pasteurella multocida* گروه A ایجاد می‌شود که با نشانی‌های سپتی سمی و پنومونی فیبرینی یا التهاب چرکی فیبرینی مزمن بافت‌های مختلف مشخص می‌گردد.

در ایران در سالهای گذشته شیوع این بیماری به دفعات در استانهای گیلان و مازندران در بین مرغ و خروس، اردک، بوقلمون و غاز دیده شده‌است (۳). در دهه اخیر این بیماری به خصوص از طریق واکسیناسیون با واکسن مؤثر مؤسسه رازی تحت کنترل درآمده است و در حال حاضر حدود ۵ میلیون دز واکسن در سال در کانونهای آلوده مصرف می‌شود. استفاده از واکسن از متداول‌ترین شیوه‌های پیشگیری در جهان است و تولیدکنندگان آن از تکنیک فرمانتور برای تهیه این واکسن استفاده می‌نمایند. کاربرد فرمانتور در تهیه واکسن به دلیل رعایت کنترل کیفی مناسب و امکان افزایش کمیت واکسن کاملاً شناخته شده و مورد توجه می‌باشد. اغلب از واکسن‌های به اصطلاح کشته یا باکترین پاستورلوز طیور با استفاده از سویه‌های مناسب بیماریزا به منظور پیشگیری استفاده می‌شود و در بعضی کشورها مانند امریکا واکسن زنده نیز مصرف می‌شود که با وجود مؤثر بودن به دلیل احتمال بازگشت سویه واکسن به سویه حاد طرفداران زیادی ندارد.

مکانیسم ایمنی پاستورلا هنوز به خوبی روشن نیست لیکن به نظر می‌رسد پادگن‌های سوماتیک به خصوص لیپوپلی ساکارید (LPS) نقش مهمی در ایجاد ایمنی داشته باشد. در مورد عوامل حدت عامل بیماری پاستورلوز طیور در حال حاضر اطلاعات کمی موجود است که علت آن مربوط به طبیعت پیچیده بیماری‌زائی باکتری است که دارای سوش‌های با حدت کم و گاه با حدت زیاد می‌باشد.

مواد و روش‌کار

الف - تهیه واکسن پاستورلوز طیور در فرمانتور

در سالهای ۱۳۷۱ الی ۱۳۷۳ به منظور تهیه واکسن پاستورلوز مجموعه فرمانتور با ظرفیت تولیدی ۴۰۰ لیتر با همکاری سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی کشور ساخته و در بخش تحقیق و تولید واکسنهای هوازی مؤسسه رازی راه‌اندازی گردید.

از محیط کشت Triptose phosphate broth (T.P.B.) که حاوی ترکیبات مناسب برای کشت پاستورلا است جهت تولید این واکسن بکار برده شد.

مراحل تهیه واکسن در فرمانتور

۱- تهیه بذر از سوش لیوفیلیزه *P. multocida* سروتیپ A_1 (کشت مایع حدود ۲۲ ساعت و به حجم حدود ۶ لیتر).

۲- استریل کردن محیط کشت (T.P.B.) در فرمانتور به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۲۱ درجه سانتیگراد

۳- افزودن بذر خالص باکتری به ۳۵۰ لیتر محیط کشت استریل در فرمانتور تحت شرایط ۳۷ درجه با استفاده از همزن و هوای استریل و ضد کف در pH=۷ تغییرات pH ناشی از رشد باکتری با محلول سود ۲۰ درصد تصحیح گردید.

۴- توقف رشد باکتری پس از ۱۴ ساعت کشت با افزودن فرمالدئید ۳ در هزار.

۵- کنترل خلوص واکسن در فرمانتور و انتقال آن به تانکرهای تقسیم و افزودن یاور ژل آلومینیوم هیدرو-کسید به میزان ۱۰٪ حجم واکسن از محلول ۱/۵٪.

ب - تهیه واکسن پاستورلوز طیور بر روی محیط جامد در بوات دو رو (روش سنتی)

ترکیبات محیط جامد مصرفی: عصاره گوشت اسب یا گاو، پپتون، نمک طعام، عصاره مخمر، ترپیتوز، گلوکز، کراتینین، آگارآگار و آب مقطر.

مراحل تهیه واکسن به روش سنتی

۱- تهیه بذر از سوش لیوفیلیزه A_1 (کشت مایع حدود ۲۲ ساعته).

۲- کاشت بذر خالص بر روی محیط جامد در بوات دو رو (حدود ۳۰۰ عدد در هر هفته).

۳- رشد باکتری در ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت.

۴- شستشوی سطح کشت باکتری بوات‌ها و جمع‌آوری آن با آب مقطر استریل.

۵- فرمله کردن سوسپانسیون غلیظ باکتری، کشت واکسن، تیتراژ واکسن.

۶- آماده‌سازی واکسن از قرار ۴ میلیارد جرم در میلی‌لیتر و افزودن ژل آلومینیوم هیدروکسید به میزان ۱۰ درصد از محلول ۱/۵ درصد به عنوان یاور.

آزمایش‌های خلوص، بی‌ضرری و میزان تأثیر واکسن‌های آزمایشی به روش‌های فرمانتور و سنتی

آزمایش خلوص یا (sterility) هر یک از واکسن‌ها بر روی محیط‌های ژلوز خون، تیوگلیکولات، سابورو و ترپیتوز فسفات کشت انجام شد.

آزمایش بی ضرری یا (safety) هر یک از واکسنهای آزمایشی بر روی ۴ قطعه جوجه و ۴ سرخرگوش به میزان یک و دو دز واکسن تبزریق زیرجلدی(خرگوش)وداخل‌عضلانی(جوجه)انجام گرفت.

آزمایش تأثیر واکسنها (Potency)

واکسن تهیه شده با فرمانتور

دو گروه ۱۰ قطعه‌ای جوجه حساس ۸ هفته در شرایط مساوی انتخاب گردید. گروه اول با یک دز یک میلی‌لیتری حاوی ۴ میلیارد جرم باکتری در داخل

جدول شماره ۱- آزمایش تأثیر واکسن پاستورلوز طیور به روش فرمانتور

گروه جوجه‌آزمایشی	تعداد جوجه	سن جوجه	مقدار تزریق واکسن	راه تزریق واکسن	فاصله‌واکسیناسیون چالش	سوش حاد چالش	مقدار تزریق‌سوش حاد	تعداد تلفات / تعداد کل	درصد ایمنی
واکسینه	۱۰ قطعه	۸ هفته	یک میلی‌لیتر	داخل عضلانی	۳ هفته	سروتیپ A_1 *P. multocida* از رقت 10^{-7} کشت ۶ ساعته	یک میلی‌لیترمعادل ۱۰۰ کلنی	۲/۱۰	۸۰
شاهد غیرواکسینه	۱۰ قطعه	۸ هفته	-	-	-	۰	۰	۱۰/۱۰	صفر

چکیده
در این مقاله واکسن پاستورلوز طیور به دو روش کشت در محیط مایع فرمانتور و محیط جامد آگار در بوات دو رو (روش سنتی) تهیه گردید و ایمنی آنها بر روی جوجه ارزیابی و مقایسه شد. هر یک از واکسنهای آزمایشی به یک گروه ۱۰ قطعه‌ای جوجه دو ماهه تزریق شد و سه هفته بعد هر یک از گروه‌های واکسینه، به همراه یک گروه ۱۰ قطعه‌ای جوجه دو ماهه غیر واکسینه به عنوان شاهد با حدود صد کلنی سوش حاد *Pasteurella multocida* سروتیپ A_1 چالش شدند. ۸۰ درصد گروه واکسینه با واکسن فرمانتور در برابر سوش حاد مقاومت کرد در صورتی که صددرصد گروه شاهد آن از پاستورلوز تلف شد. واکسن تهیه شده به روش سنتی ۷۰ درصد جوجه‌ها را در برابر سوش حاد ایمن نمود در حالی که صددرصد گروه شاهد غیر واکسینه از بیماری تلف گردید. ایمنی ایجاد شده در گروه واکسینه با واکسن فرمانتور اندکی بیش از گروه واکسینه با واکسن سنتی پاستورلوز بود.

عضله سینه واکسینه شد و در مورد گروه دوم به عنوان شاهد غیر واکسینه هیچگونه تزریقی صورت نگرفت. سه هفته پس از تزریق واکسن، هر دو گروه واکسینه و شاهد با سوش حاد *P. multocida* سروتیپ A_1 از رقت 10^{-7} کشت ۶ ساعته آن چالش شدند. بدین ترتیب هر یک از جوجه‌های هر دو گروه به میزان یک میلی‌لیتر معادل ۱۰۰ کلنی پاستورلای حاد دریافت کردند (جدول شماره ۱)، نتایج عملکرد واکسن در این آزمایش در قسمت نتایج مقاله توضیح داده شده‌است.

واکسن تهیه شده بر روی محیط جامد

ابتدا دو گروه ۱۰ قطعه‌ای جوجه حساس ۸ هفته در شرایط برابر انتخاب و نگهداری گردید. به گروه اول یک دز یک میلی‌لیتری حاوی ۴ میلیارد جرم باکتری در داخل عضله سینه تزریق شد و گروه شاهد غیر واکسینه بدون تزریق باقی ماند. سه هفته بعد از تزریق واکسن هر دو گروه باسوش حاد *P. multocida* سروتیپ A_1 چالش شدند. از رقت 10^{-7} کشت ۶ ساعته یک میلی‌لیتر معادل ۱۰۰ کلنی به هر جوجه تزریق گردید (جدول شماره ۲). نتایج این آزمایش در بخش نتایج مقاله شرح داده شده‌است.

نتایج

در آزمایش خلوص واکسنهای آزمایشی هیچگونه آلودگی مشاهده نشد. در آزمایش بی‌ضرری حیوانات تزریق شده با واکسنهای مورد آزمایش همگی سالم ماندند و هیچگونه واکنش التهابی غیر طبیعی در ناحیه تزریق دیده‌نشد. حیوانات پس از دو هفته از آزمایش خارج شدند.

در آزمایش تأثیر واکسن تهیه شده با فرمانتور کلیه جوجه‌های شاهد غیر واکسینه در عرض ۳ روز پس از تزریق سویه حاد پاستورلا با نشانی‌های پاستورلوز حاد تلف شدند که در کالبدگشائی از کشت خون قلب هر یک از آنها باکتری *P. multocida* خالص جداگردید. در گروه واکسینه با همین واکسن ۸ قطعه از جوجه‌ها تا پایان سه هفته بدون عوارض بیماری زنده ماندند در حالیکه ۲ قطعه دیگر در فاصله ۲ تا ۵ روز پس از چالش تلف شدند و از کشت خون آنها باکتری *P. multocida* جدا شد. درصد ایمنی گروه واکسینه ۸۰ درصد و درصد تلفات گروه شاهد ۱۰۰ درصد بود.

در آزمایش تأثیر واکسن تهیه شده بر روی محیط جامد هر ۱۰ قطعه جوجه شاهد غیر واکسینه در عرض ۴ روز پس از چالش با عوارض حاد پاستورلوز تلف شدند و در کالبدگشائی از کشت خون همه آنها سوش حاد جدا گردید. ۷ قطعه از گروه واکسینه پس از چالش تا پایان آزمایش سه هفته‌ای بدون عوارض بیماری زنده ماندند. از این گروه نیز ۳ قطعه جوجه به فاصله ۳ روز پس از چالش تلف شد که در کشت خون آنها باکتری *P. multocida* به دست آمد. درصد ایمنی گروه واکسینه ۷۰ درصد و تلفات گروه شاهد ۱۰۰ درصد بود.

بحث

طبق استانداردهای موجود واکسن پاستورلوز طیور (B.P) ۸۰ درصد ایمنی در آزمایش چالش، درصد کاملاً قابل قبولی است که می‌توان از تأثیر واکسن سلولی پاستورلوز (Whole cell vaccine) انتظار داشت. در شرایط فعلی واکسن مؤسسه رازی با سروتیپ A_1 *P. multocida* تهیه می‌شود که چند سال قبل از منطقه آستارا استان گیلان جدا شده‌است. این سروتیپ تا حدودی در برابر دیگر سروتیپ‌ها ایجاد ایمنی می‌کند. ۲شناسائی سروتیپ‌های بیماری‌زا در ایران و استفاده از آنها در تهیه واکسن پلی‌والان اهمیت خاصی دارد که این مورد در موسسه رازی بررسی‌های تحقیقاتی در جریان می‌باشد. در بررسی دیگری در ایران طول دوران ایمنی واکسن پاستورلوز طیور در اردک مطالعه شده و حداقل تا ۶ ماه ایمنی گزارش گردیده‌است (۲).

در مورد تهیه واکسن پاستورلوز سالهاست که روش سنتی در دنیا به دلایل زیر کنار گذاشته شده‌است:

- یکنواخت‌نبودن‌شرایط کشت‌در تعدادزیادی‌بوات‌دو رو.
- خطر شکستگی بوات‌ها در اثر حمل و نقل و مراحل استریل کردن (سالانه حدود ۵۰۰ عدد از دور مصرف خارج می‌شود).
- خرید تعداد زیادی بوات از خارج در حال حاضر با توجه به شرایط ارزی کشور هربوات دو رو بیش از ۵ هزار تومان هزینه دارد.
- احتمال آلودگی در مراحل تهیه واکسن زیاد است.
- مقداری از مواد ناخواسته مانند آگار در واکسن باقی می‌ماند که قابل حذف شدن نیست. این مواد در سیستم ایمنی حیوان دخالت کرده و احتمال عوارض در محل تزریق را دارد.
- استاندارد نبودن تکنیک تهیه واکسن.

از ویژگی‌ها و مزایای استفاده از فرمانتور در تهیه این واکسن می‌توان موارد زیر را برشمرد:

- محیط واکسن یکجا و در حالتی یکنواخت استریل و کشت می‌گردد.
- بدلیل وجود کنترل دقیق pH، کف محیط، همزن، و درجه حرارت، رشد باکتری کامل می‌شود به همین دلیل رشد پاستورلا در این تجربه در فرمانتور در عرض ۱۴ ساعت کامل شد در حالی که در محیط جامد بین ۱۸ تا ۲۴ ساعت زمان لازم است تا باکتری‌به‌حداکثر رشد برسد.
- امکان تولید انبوه واکسن.
- محصول در شرایط استاندارد تهیه می‌گردد.

منابع مورد استفاده

1- Nakamine. M, et al. 1992. The first outbreak of fowl cholera in muscovy ducks in Japan. Journal of Veterinary Medical Science. 54 (6), 1225-7.

2- Sotoodehnia, A. Aarabi,ا. Vandyousefi, J. and Tavasoli, A. 1984. The efficacy of the autogenous fowl cholera killed aluminum vaccine in ducks in Iran. Arch. Inst. Razi, 34. 35, 71-74.

3- Tavasoli, A. Sotoodehnia, A. Aarabi, I. and Vandyousefi, J. 1984. A case report of fowl cholera disease in north of Iran. Arch. Inst. Razi. 34, 34, 35, 39-41.

4- Waltman, WD. Horne, AM. 1993. Characteristics of fowl cholera diagnosed in Georgia, 1989-91. Avian dis., 37(2): 616-21.

جدول شماره ۲- آزمایش تأثیر واکسن پاستورلوز طیور به روش سنتی

گروه جوجه‌آزمایشی	تعداد جوجه	سن جوجه	مقدار تزریق واکسن	راه تزریق واکسن	فاصله واکسیناسیون چالش	سوش حاد چالش	مقدار تزریق سوش حاد	تعداد تلفات / تعداد کل	درصد ایمنی
واکسینه	۱۰ قطعه	۸ هفته	یک میلی‌لیتر	داخل عضلانی	۳ هفته	سروتیپ A_1 *P. multocida* از رقت 10^{-7} کشت ۶ ساعته	یک میلی‌لیترمعادل ۱۰۰ کلنی	۳/۱۰	۷۰
شاهد غیرواکسینه	۱۰ قطعه	۸ هفته	-	-	-	۰	۰	۱۰/۱۰	صفر