



واکسن پاستورلوز طیور

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

عباس ستوده‌نیا، ایرج اعرابی، سعید عطائی کچوئی، علی اکبر ناصری‌راد، اعضاء هیأت علمی مؤسسه تحقیقاتی رازی جلال شلماشی، عباس ابوبیان، اعضاء هیأت علمی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران

باکتری است که دارای سوش‌های با حدت کم و گاه با حدت زیاد می‌باشد.

باکتری است که دارای سوش‌های با حدت کم و گاه با حدت زیاد می‌باشد.

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 سیتی سمی و پنومونی فیبری 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 کانوهای آلوده مصرف می‌شود. استفاده از واکسن از متداول‌ترین شیوه‌های پیشگیری در جهان است و تولیدکنندگان آن از تکنیک فرماتتور برای تهیه این واکسن استفاده می‌نمایند. کاربرد فرماتتور 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 بیمارزا به منظور پیشگیری استفاده می‌شود و در بعضی کشورها مانند آمریکا واکسن زنده نیز مصرف می‌شود که با وجود مؤثر بودن به دلیل احتمال بازگشت سویه واکسن به سویه حاد طرفداران زیادی ندارد.

مکانیسم ایمنی پاستورلوز هنوز به خوبی روشن نیست لیکن به نظر می‌رسد پادگن‌های سوماتیک به خصوص لیپوپولی 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 بیماری‌زایی

مراحل تهیه واکسن به روش سنتی

- ۱- تهیه بذر از سوش لیوفیلیزه A₁ (کشت مایع حدود ۲۲ ساعت).
- ۲- کاشت بذر خالص بر روی محیط جامد در بوت دو رو (حدود ۳۰۰ عدد در هر هفته).
- ۳- رشد باکتری در ۲۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت.
- ۴- شستشوی سطح کشت باکتری بوت‌ها 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 فرماتتور و سنتی

آزمایش خلوص یا (sterility) هر یک از واکسن‌ها بر روی محیط‌های زلوز خون، تیوگلیکولات، ساپورو و تریپتوز فسفات کشت انجام شد. آزمایش بی‌ضرری یا (safety) هر یک از واکسن‌های آزمایشی بر روی ۴ قطعه جوجه و ۴ سرخرگوش به میزان یک و دو دز واکسن تیزریق زیرجلدی (خرگوش) و داخل عضلانی (جوجه) انجام گرفت.

آزمایش تأثیر واکسنها (Potency)

واکسن تهیه شده با فرماتتور

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

مواد و روش کار

الف - تهیه واکسن پاستورلوز طیور در فرماتتور
در سالهای ۱۳۷۱ الی ۱۳۷۳ به منظور تهیه واکسن پاستورلوز مجموعه فرماتتور با ظرفیت تولیدی ۴۰۰ لیتر با همکاری سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی کشور ساخته و در بخش تحقیق و تولید واکسن‌های هواری 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 فرماتتور

- ۱- تهیه بذر از سوش لیوفیلیزه *P. multocida* سروتیپ A₁ (کشت مایع حدود ۲۲ ساعت و به حجم حدود ۶ لیتر).
- ۲- استریل کردن محیط کشت (T.P.B.) در فرماتتور به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۲۱ درجه سانتیگراد
- ۳- افزودن بذر خالص باکتری به ۲۵۰ لیتر محیط کشت استریل در فرماتتور 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 فرماتتور 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 بوت دو رو (روش سنتی)
ترکیبات محیط جامد مصرفی: عصاره گوشت اسب

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

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 <i>P. multocida</i> از رقت ۱۰ ^{-۷} کشت ۶ ساعته	یک میلی‌لیتر معادل ۱۰۰ کلنی	۲/۱۰	۸۰
شاهد غیر واکسینه	۱۰ قطعه	۸ هفته	-	-	-	-	-	۱/۵	صفر

حکیده

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 ارز بانی 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 A₁ چالش شدند. ۸۰ درصد گروه واکسینه با واکسن فرمانتور در برابر سوش حاد مقاومت کرد در صورتی که صد درصد 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 صد درصد 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.

توجه به شرایط ارزی کشور هر بوات 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 باکتری به حد اکثر 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, I. 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.

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 کالبدگشایی 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 *P. multocida* A₁ تهیه می‌شود که چند سال قبل از منطقه آستارا استان گیلان جدا شده‌است. این سروتیپ تا حدودی در برابر دیگر سروتیپ‌ها ایجاد ایمنی می‌کند. شناسایی 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 سالیهاست که روش سنتی در دنیا به دلایل زیر کنار گذاشته شده‌است:

- یکنواخت نبودن شرایط کشت در تعداد زیادی بوات دو 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

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 A₁ از رقت ۱۰^{-۷} 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 با سوش حاد *P. multocida* سروتیپ A₁ چالش شدند. از رقت ۱۰^{-۷} 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 دیده نشد. 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 سوبه حاد پاستورلا با نشانی‌های پاستورلوز حاد تلف شدند که در کالبدگشایی از کشت خون قلب هر یک از آنها باکتری *P. multocida* خالص جدا گردید. 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

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 <i>P. multocida</i>	یک میلی‌لیتر معادل ۱۰۰ کلنی	۳/۱۰	۷۰
شاهد غیر واکسینه	۱۰ قطعه	۸ هفته	-	-	-	-	۰	۱۰/۱۰	صفر