

ارزشیابی واکسن Reduced dose-S.19 در گاوهای بالغ

تحقیق:

دکتر اسماعیل ذوقی عضو هیات علمی مؤسسه رازی دکتر عبدالله عبادی عضو هیات علمی مؤسسه رازی

با همکاری

دکتر علیرضا صفاریان، دکتر مهدی خلیج، دکتر محمدحسن روستائی، دکتر علیمحمد بهروزخواه،
دکتر پرویز اهورائی، دکتر نسرین مظفری، دکتر محمدرضا غلامی، دکتر مرتضی مهین پور.

خلاصه

بمنظور تعیین دوز مناسب واکسن S.19 در گاوهای بالغ، اثر دوزهای مختلف واکسن بر روی تعداد ۲۵ رأس گاو آبستن غیرواکسینه و حساس به بروسلاز از نژاد هولشتاین مورد بررسی قرار گرفت. این گاوها به دو گروه ۱۰ رأسی و یک گروه ۵ رأسی تقسیم شدند. ده رأس گاوهای گروه اول با دوز 3×10^8 جرم باکتری سویه واکسن S.19، ده رأس گروه دوم با دوز 1×10^9 جرم باکتری و ۵ رأس گروه سوم با دوز 10×10^9 جرم باکتری بطریق زیرجلدی واکسینه شدند. از یک هفته پس از واکسیناسیون، هر هفته خونگیری بعمل آمده و پاسخ های سرولوژیک مورد ارزیابی قرار گرفت. بررسیهای میکروشناسی جفت و ترشحات رحمی بعد از زایش، و هم چنین کشت آغوز و شیر انجام پذیرفت. شش ماه بعد از واکسیناسیون، از هر گروه ۲ رأس همراه با ۲ رأس کنترل بوسیله سویه حاد 544 بروسلا آبورتوس به دوز 7×10^7 جرم باکتری بطریق تزریق زیرجلدی آلوده شدند. بررسیهای سرولوژی هر هفته ادامه یافته و کشت شیر هرروزه صورت گرفت. طی ۷ تا ۸ هفته بعد از آلودگی با سویه حاد، گاوها و گروه کنترل کشتار شده، از تمام غدد لنفاوی و اعضای داخلی آنها کشت میکروبی بعمل آمد. در تفسیر نهائی نتایج، دوز 3×10^8 واکسن S.19 به دلیل دو امتیاز اصلی کاهش تیتراژ سرمی ناشی از واکسن در مدت حداکثر ۴ ماه و مقاومت ۱۰۰٪ در مقابل سویه حاد 544، در مقایسه با ۲ گروه دیگر و هم چنین آلودگی گروه کنترل، جهت استفاده در گاوهای بالغ مناسب تشخیص داده شده و توصیه میگردد.

واکسیناسیون گاوهای بالغ با واکسن S.19 از نیمه دوم دهه ۱۹۷۰ مورد توجه قرار گرفت. برای اولین بار Nicoletti در سال ۱۹۷۶ بیش از ۱۰۰۰ رأس گاو شیری را در ۷ یا ۸ ماهگی آبستنی با دوز استاندارد واکسن S.19 بطور زیرجلدی واکسینه نمود. (۱۱) میزان سقط جنین در این گله کاهش یافته، لیکن واکنش های سرولوژی با دوام باقی ماند. بعداً Nicoletti و همکاران دوز واکسن را به میزان $1/20$ (بهرمینای جرم متوسط ۵۰-۱۲۰ میلیارادی دوز کامل واکسن) کاهش داده و خاطرنشان ساختند که مدت واکنش سرولوژی را میتوان با کاهش دوز واکسن کوتاه نموده، ضمن آنکه ایمنیت مشابه دوز کامل واکسن قابل حصول است (۱۲، ۱۳).

در سال ۱۹۸۰، Alton و همکاران با کاهش دوز واکسن به میزان $1/20$ و $1/400$ (بهرمینای جرم ۱۱۲ میلیارادی دوز کامل واکسن مصرفی)، گاوهای آبستن را واکسینه نموده و نتیجه گرفتند که گاوهای آبستن را میتوان با کاهش دوز واکسن به میزان تقریباً 3×10^8 جرم زنده باکتری بدون دخالت ناروا در آزمایش های سرولوژی با نتیجه نامطلوب از نظر آلودگی با سویه ۱۹ (S.19) مایه کوبی نمود (۲) در همان سال ۱۹۸۰، پلاکت و همکاران تعدادی تلیسه را، که در سن گوسالگی واکسینه شده بودند، با دوز یادآور واکسن S.19 Reduced به میزان $2/8 \times 10^8$ مایه کوبی نموده و اثر مطلوب ایمنی حاصله را گزارش کردند (۱۵). سال ۱۹۸۱، آلتون و همکاران با میزان $2/8 \times 10^8$ جرم باکتری S.19 تعدادی تلیسه را واکسینه نموده و مقاومت قابل توجهی را در مقابل عفونت سویه حاد 544 بروسلا آبورتوس با جرم 2×10^7 باکتری بدست آوردند (۳). در ۱۹۸۳، بار دیگر آلتون و همکاران از دوز 3×10^8 جهت گاوهای بالغ استفاده نموده و نتیجه بسیار خوبی را گزارش کردند (۴).

پژوهندگان فرانسوی نیز بررسیهای متعددی انجام داده و استفاده از واکسن S.19 را بصورت قطره چشمی با دوز $4-10 \times 10^9$ در دو قطره و دو بار با فاصله ۶ ماه مورد تأیید قرار دادند. (۱۶، ۱۷، ۱۸)

سرانجام کمیته کارشناسان بروسلاز FAO/WHO ششمین گزارش خود در سال ۱۹۸۶ استفاده از دوز واکسن S.19 Reduced dose را به میزان $3-10 \times 10^8$ جرم باکتری در گاوهای بالغ تأیید و توصیه نمود. (۱۰)

در ۱۹۸۹، Nicoletti موفقیت حاصله در یک دهه استفاده از واکسن S.19 Reduced dose در گاوهای بالغ را برشمرده و کاربرد آن را در گلهها و نواحی آلوده با برنامه کنترل از طریق آزمایش / کشتار و واکسیناسیون گوسالهها مورد توصیه قرار داد. (۱۲)

Plommet نیز در سال ۱۹۹۱ روشهای مختلف استفاده از واکسن S.19 را در گوسالهها و گاوهای بالغ ارائه نموده و مصرف واکسن S.19 Reduced dose را به دوروش تزریقی با جرم $3-10 \times 10^8$ و قطره چشمی با دوز $4-10 \times 10^9$ جرم باکتری مورد تأیید قرار داده است. (۱۸)

در ارتباط با واردات گاوهای آبستن غیرواکسینه و حساس به بروسلاز، استفاده از واکسن S.19 dose

Reduced در ایران مورد توجه قرار گرفت. بدین منظور تعداد ۲۵ رأس گاو آبستن در اوایل اسفند ماه سال ۱۳۶۹ از طرف سازمان دامپزشکی کشور به مؤسسه رازی تحویل گردید و تحت بررسی قرار داده شد. در این بررسی، ضمن توجه به خصوصیات واکسن مورد استفاده از نظر: ۱- بی ضرری، ۲- قابلیت ایمنی زائی، ۳- تولید ایمنی برعلیه بروسلا آبروتوس و بروسلا ملی تنسیس، ۴- قابلیت دوام، ۵- روش عملی و مناسب استفاده از واکسن، ۶- اثرات اقتصادی- اجتماعی، و ۷- عدم مخاطره بهداشت عمومی (۹)، دو هدف اصلی شامل: الف- مدت زمان دوام تیتراژ آنتی بادی ناشی از واکسن، و ب- مقاومت در مقابل سویه حاد 544 بروسلا آبروتوس، مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش ها

۲۵ رأس گاو آبستن وارداتی نژاد هولشتاین در اوایل اسفند ماه ۱۳۶۹ مستقیماً از قرنطینه به مؤسسه رازی انتقال داده شد. در تاریخ ۱۳۶۹/۱۲/۹ از تمامی گاوها خونگیری بعمل آمده و نتیجه آزمایش های سرمی از نظر بروسلاز منفی به ثبت رسید. در تاریخ ۱۳۶۹/۱۲/۱۲ گاوها به دو گروه ۱۰ راسی (گروه های اول و دوم) و یک گروه ۵ راسی (گروه سوم) تقسیم شدند. واکسن لیوفیلیزه S.19 ساخت مؤسسه رازی با حلال سرم فیزیولوژی رقیق شده و مورد استفاده قرار گرفت. مقدار جرم واکسن براساس شمارش کلنی تعیین گردید. به ۱۰ رأس گاو گروه اول با سن آبستنی ۶ تا ۸/۵ ماه دوز واکسن بمقدار 3×10^8 جرم زنده باکتری در حجم ۲ میلی لیتر، به ۱۰ رأس گاو گروه دوم با سن آبستنی ۶ تا ۸ ماه دوز واکسن بمقدار 1×10^9 جرم زنده باکتری در حجم ۲ میلی لیتر، و به ۵ رأس گاو گروه سوم با سن آبستنی ۵/۵ تا ۸ ماه دوز واکسن بمقدار 1×10^9 جرم زنده باکتری در حجم ۲ میلی لیتر تزریق گردید. بفاصله یک هفته بعد از واکسیناسیون (از تاریخ ۱۳۶۹/۱۲/۱۹) بطور هفتگی از تمامی گاوها خونگیری شده و نمونه سرم آنها با آزمایش رزبنگال (R.B.P.T)، سروآگلوتیناسیون استاندارد یا رایت (S.S.A.T)، ۲- مرکاپتو اتانول (2-ME.T)، و ثبوت عناصر مکمل (C.F.T) برطبق روشهای استاندارد توصیه شده بوسیله کارشناسان FAO/WHO و دیگران (۱۰، ۶، ۵، ۱) مورد بررسی قرار گرفت. آنتی ژن های مصرفی ساخت مؤسسه رازی بوده و طبق روش استاندارد بین المللی توصیه شده بوسیله WHO تهیه گردید (۵، ۱). نتایج آزمایش های سرمی هفتگی به ثبت رسید.

وضعیت تمامی گاوها از نظر سقط احتمالی و زایش مورد توجه بوده، که خوشبختانه در هیچیک از گروهها سقط جنین اتفاق نیفتاده و تماماً زایش طبیعی داشتند. پس از زایش، جفت، ترشحات مهبل و آغوز از نظر دفع احتمالی سویه واکسن مورد بررسی میکروشناسی قرار گرفتند. محیط های غذایی کشت اختصاصی بروسلا طبق روش های توصیه شده WHO و مراکز

بین المللی (۸، ۶، ۵، ۱) تهیه و بکار گرفته شد. این نتایج نیز به ثبت رسید.

۶ ماه پس از واکسیناسیون و در تاریخ ۱۳۷۰/۵/۱۵، دو گاو از گروه اول به شماره های ۴۲ و ۷۹۱، دو گاو از گروه دوم به شماره های ۵۰۴، همراه با دو گوساله نر به مشخصات گوساله سیاه و گوساله سفید بعنوان کنترل با سویه حاد 544 بروسلا آبروتوس بمقدار 7×10^7 جرم باکتری بطریق زیرجلدی آلوده شدند. برنامه خونگیری هفتگی ادامه یافته، از گروه کنترل نیز هر هفته خونگیری شده، نمونه های سرم مورد آزمایش قرار گرفته و نتایج به ثبت رسید. بفاصله ۷ تا ۸ هفته پس از آلودگی با سویه حاد 544، ۶ گاو اخیر و ۲ گوساله کنترل کشتار شده، تمامی غدد لنفاوی و اعضای داخلی آنها برداشت گردیده و از نظر باکتریولوژی کشت داده شد. برای هرگاو بیش از ۱۰۰ بوات محیط کشت در نظر گرفته شده، و نتایج آن نیز ثبت گردید.

نتیجه

سرولوژی بعد از واکسیناسیون

گروه اول ۱۰ رأس گاو با سن آبستنی ۶ تا ۸/۵ ماه- دوز واکسن 3×10^8 جرم زنده S.19. واکنش سرولوژی بعد از یک هفته با آزمایش رزبنگال شروع شده، بتدریج افزایش یافته و سپس کاهش یافت. بالاترین تیتراژ سرمی رایت در رقت $1/160$ ، ۲- مرکاپتو اتانول در رقت $1/80$ ، و ثبوت عناصر مکمل در رقت $1/20$ اتفاق افتاد. اولین موارد حذف آنتی بادی در ۲/۵ ماه پس از واکسیناسیون مشاهده گردید. حذف کامل تیتراژ آنتی بادی در سطح پائین تر از حد تشخیص آلودگی پس از ۴ ماه ایجاد شد. منحنی سرولوژی این گروه تقریباً مشابه شکل ۱ بوده است.

گروه دوم ۱۰ رأس گاو با سن آبستنی ۶ تا ۸ ماه- دوز واکسن 1×10^9 جرم زنده S.19. واکنش سرولوژی بعد از یک هفته با آزمایش رزبنگال شروع شده، تدریجاً افزایش یافته، سپس کاهش یافت. بالاترین تیتراژ سرمی رایت در رقت $1/320$ ، ۲- مرکاپتو اتانول در رقت $1/80$ ، و ثبوت عناصر مکمل در رقت $1/40$ اتفاق افتاد. اولین موارد حذف آنتی بادی در ۵ ماه پس از واکسیناسیون مشاهده گردید. حذف کامل تیتراژ آنتی بادی در سطح پائین تر از حد تشخیص آلودگی پس از ۶ ماه ایجاد شد. منحنی سرولوژی این گروه تقریباً مشابه شکل ۲ بوده است.

گروه سوم ۵ رأس گاو با سن آبستنی ۵/۵ تا ۸ ماه- دوز واکسن 1×10^9 جرم زنده S.19. واکنش سرولوژی بعد از یک هفته با آزمایش رزبنگال شروع شده، تدریجاً افزایش یافته، سپس کاهش یافت. بالاترین تیتراژ سرمی رایت در رقت $1/640$ ، ۲- مرکاپتو اتانول در رقت $1/320$ ، و ثبوت عناصر مکمل در رقت $1/80$ اتفاق افتاد. اولین موارد حذف آنتی بادی در ۵/۵ ماه پس از واکسیناسیون مشاهده گردید. حذف کامل

تیتراژ آنتی بادی در سطح پائین تر از حد تشخیص آلودگی پس از ۶/۵ ماه ایجاد شد. منحنی سرولوژی این گروه تقریباً مشابه شکل ۳ بوده است.

باکتری شناسی پس از واکسیناسیون

گروه اول (دوز واکسن 3×10^8 جرم زنده S.19)- سن آبستنی ۶ تا ۸/۵ ماه. زایش طبیعی؛ کشت جفت، ترشحات مهبل و آغوز منفی بوده است. آزمایش حلقه های شیر (رینگ تست) واکنش گذرا حدود یکماه و نیم داشته، کشت تمامی نمونه های شیر نتیجه منفی نشان داد.

گروه دوم (دوز واکسن 1×10^9 جرم زنده S.19)- سن آبستنی ۶ تا ۸ ماه. زایش طبیعی؛ کشت جفت، ترشحات مهبل و آغوز منفی بوده است. آزمایش حلقه های شیر واکنش بادوامتری (حدود ۲ ماه) نسبت به گروه اول داشته، کشت تمامی نمونه های شیر نتیجه منفی نشان داد.

گروه سوم (دوز واکسن 1×10^9 جرم زنده S.19)- سن آبستنی ۵/۵ تا ۸ ماه. زایش طبیعی؛ کشت جفت، ترشحات مهبل و آغوز منفی بوده است. آزمایش حلقه های شیر دوام بیشتری (حدود ۲/۵ ماه) نسبت به دو گروه دیگر داشته، کشت تمامی نمونه های شیر نتیجه منفی نشان داد.

سرولوژی بعد از Challenge با 7×10^7 جرم زنده سویه حاد 544 بروسلا آبروتوس

گروه اول به شماره های ۴۲ و ۷۹۱- دوز واکسن 3×10^8 جرم S.19. آزمایش رزبنگال بعد از یک هفته، تیتراژ رایت تا $1/80$ ، ۲- مرکاپتو اتانول تا $1/40$ ، و ثبوت عناصر مکمل تا $1/20$ واکنش نشان داده؛ و زمان کشتار در ۷ تا ۸ هفته بعد از آلودگی با سویه حاد پائین تر از سطح تشخیصی بوده است.

گروه دوم به شماره های ۳۳ و ۵۰۴- دوز واکسن 1×10^9 جرم S.19. آزمایش رزبنگال بعد از یک هفته، تیتراژ رایت تا $1/160$ ، ۲- مرکاپتو اتانول تا $1/40$ ، و ثبوت عناصر مکمل تا $1/20$ واکنش نشان داده؛ و زمان کشتار در ۷ تا ۸ هفته بعد از آلودگی با سویه حاد، شماره ۳۳ در حد پائین تر از سطح تشخیصی و شماره ۵۰۴ در حد مشکوک بوده است.

گروه سوم به شماره های ۴۱۸ و ۲۳۸- دوز واکسن 1×10^9 جرم S.19. آزمایش رزبنگال بعد از یک هفته، تیتراژ رایت تا $1/640$ ، ۲- مرکاپتو اتانول تا $1/80$ ، و ثبوت عناصر مکمل تا $1/80$ واکنش نشان داده؛ و زمان کشتار در ۷ تا ۸ هفته بعد از آلودگی با سویه حاد، هر دو گاو دارای تیتراژ سرمی در حد مشکوک بودند.

گروه کنترل با مشخصات گوساله سفید و گوساله سیاه- تیتراژ سرمی از هفته اول شروع شده، بتدریج افزایش یافته؛ و زمان کشتار در ۷ تا ۸ هفته بعد از آلودگی با سویه حاد بالاتر از حد تشخیصی بوده است.