✓ پژوهش و سازندگی، شماره ۵۲، پاییز ۱۳۸۰

بررسی تولید آزمایشی واکسن گندیدگی سم گوسفند (Foot-rot) در ایران

● محمود اردهالی ● محسن شوشتری ● رضا پیله‌چیان لنگرودی ● عبدالوهاب فرزان و ● غلامرضا مؤذنی جولا، اعضاء هیات علمی مؤسسه تحقیقاتی رازی
● فریدون امینی، عضو هیات علمی مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور
● محمد خداشناس، عضو هیأت علمی مؤسسه تحقیقات رازی ● محمد منصوربخت، کارشناس مؤسسه تحقیقاتی رازی

تاریخ دریافت: آذر ماه ۱۳۷۹ تاریخ پذیرش: خرداد ماه ۱۳۸۰

چکیده

گندیدگی سم یکی از بیماری‌های شایع در گوسفندداری‌ها می‌باشد. عامل بیماری *Dichelobacter nodosus* است ولی *Fusobacterium necroforum* و *Spirocheta penoreta* و *Corynebacterium pyogenes* نیز از ضایعات سم دامهای مبتلا جداگردیده است. گندیدگی سم در بعضی گوسفندداری‌های ایران وجود دارد. این بیماری مخصوصاً در گوسفندداری‌های نواحی شمال ایران مشاهده شده و عامل بیماری از دامهای مبتلا جداگردیده است. برای مبارزه با این بیماری پژوهشهایی در زمینه تولید واکسن آزمایشی در بخش تحقیق و تولید واکسن‌های بیهوازی موسسه رازی انجام گردیده است. در تهیه این واکسن از پنج سوش *D. nodosus* استفاده شده است. محیط غذایی برای تهیه واکسن آزمایشی حاوی تریپتیکاز پپتون، لاب - لمکو، عصاره مخمر، ال - آرژنین و گلوکز می‌باشد. واکسن حاوی یاور هیدروکسید آلومینیوم است. آزمایشهای کنترل کیفی واکسن در روی تعداد زیادی گوسفند انجام شده است که نتایج حاصله رضایت بخش بوده است.

کلمات کلیدی: گندیدگی سم - واکسن

✓ Pajouhesh & Sazandegi, No 52
PP:61-63

Study for experimental production of foot rot vaccine in Iran

By: M. Ardehali, Mossawi, M. Pilehchian langroudi R. Farzan A. Moazeni G. Khoda shenas M. Mansoorbakht M. Razi research institute. Amini F. Animal sciences research institute.

Foot rot is one of the contagious diseases of sheep and goats. The causal agent is *Dichelobacter nodosus*. The subject of this study was to prepare a multivalent *Dichelobacter nodosus* vaccine against foot rot in Iran. The experimental prepared vaccine consisted of tripticase peptone, protease peptone, Lab - lemco, yeast extract, L. argenine and glucose. the quality control of the vaccine was tested in sheep for safety and efficiency. The results of quality control of experimental vaccine was quite satisfactory in injected animals. The method of preparation and quality control of vaccine is described in this paper.

Key words: Footrot - Vaccine

مقدمه

گندیدگی سم از کشورهایی مانند استرالیا، نیوزیلند، انگلستان و آمریکا که دارای گوسفندداری‌های وسیع هستند به عنوان یکی از بیماری‌های شایع گزارش شده است (۳، ۷). گندیدگی سم در گوسفندداری‌های ایران مخصوصا در نواحی شمالی که نزولات آسمانی زیاد می‌باشد و همچنین سایر نقاط گزارش گردیده است (۲،۱).

عامل بیماری باکتری به نام *D. nodosus* است که یک باسیل بیهوازی سخت رشد و بدون هاگ می‌باشد و اولین بار توسط Beveridge در استرالیا تشخیص داده شد (۳). این باکتری از نمونه‌های مرضی گوسفندهای مبتلا در موسسه رازی جداگردیده است. پژوهشگران استرالیایی، نیوزیلندی و انگلیسی تحقیقاتی در مورد تولید واکسن برضد گندیدگی سم گوسفند انجام داده‌اند (۴، ۵، ۶، ۸، ۹، ۱۰). در حال حاضر تعدادی واکسنهای تجارتی برای پیش‌گیری این بیماری وجود دارد.

واکنشهای تولید شده کشت *D. nodosus* می‌باشد که با یاور آلومینیوم هیدروکسید و یا یاور روغنی‌تر سبب گردیده‌اند که به اعتقاد سازندگان دارای توان ایمنی‌زایی قوی می‌باشد.

برای پیش‌گیری گندیدگی سم گوسفند در ایران، پژوهشهایی در تهیه یک واکسن آزمایشی در بخش تحقیق و تولید واکسنهای بیهوازی در موسسه رازی انجام گردیده است.

واکسن تهیه شده در تعدادی گوسفند از نظر بی‌ضرری و کارآیی آزمایش گردیده که نتایج حاصله کاملاً رضایت‌بخش بوده است.

مواد و روشها

برای تهیه واکسن از پنج سوش *D. nodosus* به شماره مجموعه ۱۱۲۵ و ۱۱۲۶ و ۱۱۳۰ و ۱۱۳۲ و ۱۱۳۳ استفاده گردیده است.

منشأ سوش‌های *D. nodosus* که در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفتند به شرح زیر می‌باشد:

C.N. ۱۱۲۵ ارسالی از اسپانیا
C.N. ۱۱۲۶ ارسالی از اسپانیا
C.N. ۱۱۳۰ جدا شده از نمونه مرضی از شمال ایران.
C.N. ۱۱۳۲ جدا شده از نمونه مرضی از شمال ایران.
C.N. ۱۱۳۳ جدا شده از نمونه مرضی کردان (اطراف حصارک)

محیط کشت باکتری

۱- تریپتیکاز پپتون	۲ درصد
۲- پروتئوز پپتون	۱ درصد
۳- لاب لمکو	۰/۰۵ درصد
۴- عصاره مخمر	۰/۰۲۵ درصد
۵- ال آرژنین	۰/۵ درصد
۶- گلوکز	۱ درصد
pH = ۷/۴	

مواد فوق‌الذکر برای هر سوش باکتری در پنج شیشه دو لیتری در حجم یک و نیم لیتر تهیه گردیده و شیشه‌های محتوی محیط غذایی کشت در حرارت ۱۱۰ درجه سانتیگراد برای مدت ۲۰ دقیقه استریل گردیده‌اند.

بذر

بذر واکسن از آمپول خشک شده هر سوش باکتری در یک لوله از محیط کشت فوق‌الذکر کشت گردیده است. از هر لوله کشت باکتری به یک فلاسک ۵۰۰ سانتیمتر مکعب که حاوی ۳۰۰ سانتیمتر مکعب محیط کشت فوق‌الذکر بوده منتقل و برای مدت ۲۴ ساعت در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه قرار گرفتند.

تهیه واکسن

در شرایط استریل از بذر هر فلاسک به نسبت ده درصد به محیط کشت شیشه حاوی یک و نیم لیتر اضافه و برای مدت ۲۴ ساعت در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد هر سوش باکتری به حداکثر رشد خود رسیده است. خلوص هر شیشه کشت باکتری با تهیه گسترش میکروسکوپی و همچنین کشت در ژلوز، بویون معمولی و سابورو کنترل گردیده است. سپس با اضافه نمودن فرم آلدئید به مقدار ۶ در هزار تبدیل به آناکولتور شده و pH=۷ تنظیم گردیده است. شیشه‌های محتوی واکسن پس از یک هفته انکوباسیون در گرمخانه ۳۷ درجه سانتیگراد به سردخانه منتقل گردیده‌اند.

پنج سوش مختلف واکسن به نسبت‌های مساوی و حجم کلی ۱/۵ لیتر مخلوط و سپس به نسبت ۱۰ درصد هیدروکسید آلومینیوم ۱/۵ میلی‌گرم فرم آلدئید در سانتیمتر مکعب بوده است.

آزمایش‌های کنترل کیفی واکسن

تعداد ۸ رأس گوسفند سالم انتخاب شده و دو دز به مقدار سه سانتیمتر مکعب واکسن به فاصله یک ماه به روش زیرجلدی در بالای کتف هر رأس گوسفند تزریق شد. از گوسفندها واکسینه و چهار راس گوسفند غیر واکسینه به عنوان شاهد دو هفته بعد از تزریق دوم تا مدت پنج ماه خونگیری به عمل آمد. سرم خون گوسفندهای تزریقی و شاهد تا مدت پنج ماه خونگیری به عمل آمد. سرم خون گوسفندهای تزریقی و کنترل آزمایش آگلوتیناسیون به عمل آمد (۱۱).

آزمایش‌های میدانی

به منظور آزمایش واکسن گندیدگی سم ۵۲۰ رأس گوسفند از نژادهای مختلف در مؤسسه تحقیقات دامپروری حیدرآباد به سه گروه تقسیم شده بودند.

۱-گروه اول به تعداد ۱۶۰ رأس گوسفند که واکسن یک بار به مقدار ۳ سانتیمتر مکعب زیر جلد پشت کتف تزریق گردید.

۲-گروه دوم تعداد ۱۸۵ رأس گوسفند که واکسن دوبار به فاصله دو هفته به مقدار ۳ سانتیمتر مکعب تزریق گردید.

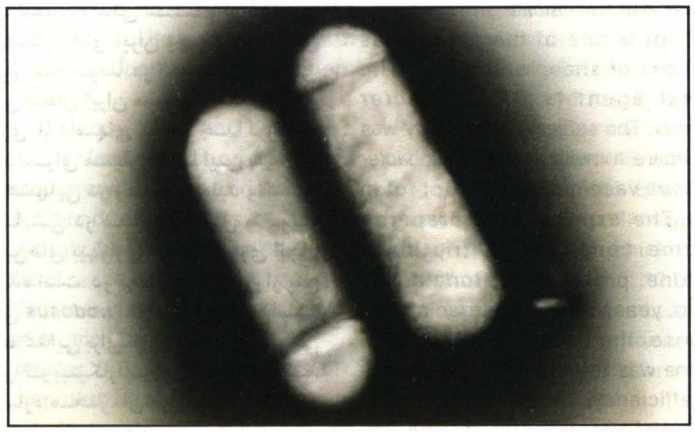
۳-گروه سوم به تعداد ۱۷۵ رأس گوسفند شاهد (کنترل) انتخاب شدند. تمام گوسفندهای واکسینه و غیرواکسینه تا مدت دو سال تحت آزمایش بودند.

بررسی میکروسکوپ الکترونی

نمونه‌های کشت شده محیط کشت *D. nodosus* فوق‌الذکر پس از ۱۶ ساعت برداشت گردید. یک قطره از آن بر روی گریدهای فوم واردار شده ۲۰۰ قرار گرفت.

شکل شماره ۱- تصویر الکترومیکروسکوپی *D. nodsus* عامل گندیدگی سم گوسفند در رنگ‌آمیزی منفی با بزرگنمایی ۲۷۰۰۰

شکل شماره ۲- تصویر الکترومیکروسکوپی *D. nodsus* عامل گندیدگی سم گوسفند در رنگ‌آمیزی منفی با بزرگنمایی ۳۶۰۰۰



پس از یک دقیقه مازاد آن به وسیله کاغذ صافی واتمن برداشت و سپس نمونه‌ها با فسفوتنگستات اسید ۳ درصد در pH=۷/۲ رنگ آمیزی شد. پس از خشک شدن با میکروسکوپ الکترونی فیلیپس ۴۰۰ در ۸۰ کیلوولت مورد بررسی قرار گرفت.

تصاویر الکترومیکرسکوپی به دست آمده مورفولوژی ساده *D. nodosus* را در رنگ‌آمیزی منفی نشان می‌دهد (شکل‌های ۱ و ۲).

نتایج

واکسن آزمایشی گندیدگی سم با استفاده از سوشهای بومی و خارجی با موفقیت تولید گردیده است. تعداد جرم *D. nodosus* در واکسن حدود ۷×۱۰^{۸} بوده است. واکسن در روی تعدادی گوسفند از نظر بی‌ضرری و موثر بودن آزمایش شده است. واکنش عمومی و موضعی بعد از تزریق واکسن مشاهده نگردیده است. تیتر آگلوتیناسیون در جدول شماره یک خلاصه گردیده است.

همانطوری که جدول شماره ۱ نشان می‌دهد تیتر آگلوتیناسیون بعد از تزریق دوم حدود ۲۳۰-۶۴۰ واحد بوده و تا مدت چهار ماه بعد از خونگیری حدود ۱۶۰ واحد در سانتیمتر مکعب سرم گوسفندهای تزریقی می‌باشد که بعد از شش ماه به ۸۰-۴۰ واحد در سرم

جدول شماره ۱- نتایج بدست آمده از آزمایش آگلوتیناسیون در زمانهای متفاوت بعد از واکسیناسیون گوسفندها با واکسن Foot Rot

شماره گوسفندان	یک ماه بعد از تزریق دوم	دو ماه بعد از تزریق دوم	سه ماه بعد از تزریق دوم	چهار ماه بعد از تزریق دوم	پنج ماه بعد از تزریق دوم	شش ماه بعد از تزریق دوم
2997	1:640	1:320	1:160	1:160	1:160	1: 80
1340	1:640	1:320	1:320	1:160	1:80-1:160	1: 80
405	1:320	1:320	1:160	1:160	1:160	1: 80
*858	1:640	1:640	-	-	-	-
*1458	1:640	1:320	-	-	-	-
1244	1:640	1:640	1:160	1:160	1:160	1: 40
*1613	1:640	1:320	-	-	-	-
783	1:640	1:320	1:160	1:160(ضعیف)	1:160	1: 40
1000// شاهد	0	0	0	0	0	0
1767// شاهد	0	0	0	0	0	0
1743// شاهد	0	0	0	0	0	0
1761// شاهد	0	0	0	0	0	0

* در ماه سوم بعلت ابتلا به بیماری بون ادامه نمونه گیری از آنها متوقف و حذف گردیدند.

گوسفندها رسیده است.

در سرم گوسفندهای شاهد، هیچگونه تیتر آگلوتیناسیون مشاهده نشده است.

طبق گزارش همکار طرح از مؤسسه تحقیقات دامپروری حیدرآباد، واکسن آزمایشی گندیدگی سم در ۵۲۰ سرگوسفند از نژادهای مختلف مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج حاصله نشان می‌دهد که گروههای اول و دوم گوسفندهای واکسینه که تا مدت دو سال تحت آزمایش بوده‌اند بیماری گندیدگی سم مشاهده نگردید ولی در گروه سوم گوسفندهای غیر واکسینه چهار مورد گندیدگی سم مشاهده گردید.

بحث

Bacteroides nodosus یا *Dichelobacter* عامل گندیدگی سم گوسفند از نمونه‌های مرضی در بخش تحقیق و تولید واکسن‌های بیهوازی در موسسه رازی جدا گردیده است. به منظور پیش‌گیری بیماری در مناطق آلوده آزمایش برای کنترل کیفی واکسن تهیه شده آزمایشی به عمل آمد. واکسن تولید شده که از مواد شیمیایی صناعی می‌باشد حاوی $1/7\times10^8$ جرم باکتری در سانتیمتر مکعب بوده است (۱۰) آزمایش کنترل کیفی واکسن در روی گوسفندهای واکسینه و شاهد انجام گردید.

با تزریق دو دز واکسن تهیه شده به گوسفندهای تحت آزمایش تا مدت پنج ماه خونگیری به عمل آمد. سرم خون هر راس گوسفند تزریقی همزمان با گوسفندهای شاهد از نظر تیتر آگلوتیناسیون آزمایش به عمل آمد که نتایج حاصله در جدول شماره یک خلاصه گردیده است. همانطوری که جدول نشان می‌دهد دو هفته بعد از تزریق دوم تیتر آگلوتیناسیون $\frac{1}{640}$ واحد در سانتیمتر مکعب در سرم گوسفندهای واکسینه بوده و دو ماه بعد از تزریق دوم به $\frac{1}{320}$ واحد رسیده و پنج ماه بعد از تزریق دوم به $\frac{1}{160}$ واحد و در ماه ششم به $\frac{1}{40}$ واحد رسیده است. همزمان تیتر آگلوتیناسیون در گوسفندهای شاهد صفر بوده است.

با عنایت به این که در فارماکوپیای دامپزشکی استانداردی برای واکسن گندیدگی سم گوسفند وجود ندارد مرجع مقایسه از نظر تیترهای به دست آمده در دسترس نمی‌باشد.

در آزمایش‌های صحرایی در روی ۵۲۰ رأس گوسفند به عمل آمده نشان می‌دهد که در گوسفندهای واکسینه (۳۴۵ رأس) بعداز دو سال بیماری گندیدگی سم مشاهده نگردیده است در صورتی که در ۱۷۵ رأس گروه مشاهده چهار راس گوسفند به گندیدگی سم مبتلا شده‌اند.

در آزمایش‌هایی که توسط محققان دیگری به منظور بررسی ایمنی‌زایی واکسن گندیدگی سم انجام گردیده است ثابت شده واکسنی که از کشت فرمله همراه با هیدروکسید آلومینیوم در مناطق آلوده به بیماری گندیدگی سم تهیه شده است قدرت ایمنی‌زایی آن مورد تایید قرار گرفته است (۴، ۹، ۱۱).

منابع مورد استفاده

۱- امینی، فریدون، ۱۳۷۳. مقایسه اثرات درمانی تایلوزین و تتراسیکلین در بیماری گندیدگی سم. مجله پژوهش و سازندگی شماره ۲۳ سال ۶. ۷۵-۷۴.

۲- نعمت‌الهی، امین، محمدپناه، رضا، شمس‌آبادی، ناصر و کریمی، سعید، ۱۳۷۸. گزارش یک مورد گندیدگی سم گوسفند. مجموعه مقالات یازدهمین کنگره دامپزشکی ایران، صص ۱۸۹-۱۸۷.

3- Beveridtge W.I.B., 1941. Foot rot in sheep, a transmissible disease to in fection with *Fusiformis nodosus*, studies on its cause, epidemiology and control, Aust. CSIRO, Bull. 140-PP 1-53.

4- Egerton J.R. and Roberts P.S., 1971. Vaccination against ovine footrot. J. cemp. Path. Vol. 81, 179-185.

5- Elleman TC. and Stewart DJ., 1988. Efficacy against footrot of a *Bacteroides nodosus*. 265 (serogroup H) pilus vaccine expressed in *Pseudomonas aeruginosa* infectian and immunity, 56, 3, 595-600.

6- Hindmarsh, F. Fraser J. Scott, K. 1989 Efficacy of a multivalent *Bacteroides nodosus* vaccine against footrot in sheep in Britain, veterinary report 125, 128-130.

7- Liardet DM., C. Chetwin DH., MCNerney DM., Hindmarsh FH., 1989. Reduction of the prevalence of foorot on New Zealand farms by Vaccination New Zealand veterinary Journal. 37: 3, 129-130.

8- Stewart DJ., Clark BI., Emery DL., Peterscon JE., Fahey KJ., 1983. A *Bacteroides nodosus* immunogen, distinct from the pilus, which induces cross - protective immunity in sheep vaccinated against footrot Australian veterinary Journal, 60: 3, 83-85.

9- Stewart DJ., Vaugtan JA., Elleman TC., 1991. Cross protective immunity and the serologicael classification system for *Bacteroides nodosus*. Australian veterinary journal, 68: 2, 50-53.

10- Skerman T.M., 1975. Determination of some in vitro growth requirments of *Bacteroides nodosus*. J.G. Microbiology, 87, 107-119.

11- Smith AW., Gradin JL., Bulgin MS., Lincolen SD., 1990. Antigenic profiles of *Bacteroides nodosus* strains isolated from sheep given a polyvalent commercial footrot vaccine. Small ruminant research, 3: 5, 503-509.