محافظت کنندگی واکسن کریزای عفونی در مقابل یک جدایه‌ی بومی *اوی‌باکتریوم پاراگالیناروم* ایران

عباس نوری[۱*]، منصور بنانی[۲] و رضا طرقی[۳]

تاریخ دریافت: ۹۶/۲/۴ تاریخ پذیرش: ۹۶/۹/۲۶

چکیده

کریزای عفونی بیماری حاد تنفسی در ماکیان است که توسط باکتری *اوی‌باکتریوم پاراگالیناروم* ایجاد می‌شود. در این مطالعه محافظت کنندگی یک واکسن روغنی تجاری کشته کریزای عفونی در مقابل عفونت با یک جدایه بومی باکتری *اوی‌باکتریوم پاراگالیناروم* سروگروه (سروتیپ) A ایران، در قالب یک مطالعه واکسیناسیون- چالش مورد بررسی قرار گرفت. تعداد ۳۶ قطعه نیمچه‌ی SPF با سن ۱۴ هفته به سه گروه تقسیم شدند. گروه اول با واکسن کشته تجاری کریزای عفونی (سه ظرفیتی) در دو مرحله با فاصله دو هفته واکسینه شدند. دو هفته بعد میزان ۱×۱۰^{۸} باکتری از طریق سینوس زیر چشمی به این گروه و گروه دوم (غیر واکسینه) تلقیح گردید. گروه سوم سرم فیزیولوژی استریل دریافت کردند. سه نمونه سرمی در روزهای ۲، ۴، ۶، ۸ پس از چالش از پرنده‌های هر گروه اخذ گردید. گروه اول علایم بسیار خفیف تنها به صورت تورم محل تزریق در روز دوم آزمایش مشاهده شد که در روزهای بعد تدریجاً محو گردید . در گروه دوم بروز ترشحات بینی، تورم سینوس همراه با صدای تنفسی از روز دوم شروع شده و تا پایان دوره‌ی آزمایش (روز ۸) ادامه داشت. ضمن عدم مشاهده تغییرات سرمی و علایم درمانگاهی در گروه کنترل، واکنش مثبت سرمی در گروه اول با آزمایش SPA و AGP با استفاده از آنتی‌ژن تهیه شده از کشت ۲۴ ساعته این جدایه دیده شد. در گروه دوم اولین واکنش سرمی از روز ۶ تنها در آزمایش SPA مشاهده شد. در نتیجه، این جدایه بومی با سویه‌های موجود در واکسن تجاری ارتباط آنتی‌ژنی داشته و استفاده از واکسن توان پیش‌گیری از بروز عمده علائم بالینی در پرنده‌های آلوده را دارد. اگرچه مطالعه‌ی بیش‌تری برای تعیین واریته سرمی این جدایه و تأیید نهایی کارایی واکسن‌های مصرفی کریزای عفونی مورد نیاز است.

کلمات کلیدی: کریزای عفونی، *اوی‌باکتریوم پاراگالیناروم*، ایران

مقدمه

کریزای عفونی بیماری حاد تنفسی در طیور است که توسط باکتری از خانواده‌ی پاستورلاسه (Pastourellacea) در جنس *اوی‌باکتریوم* (*Avibacterium*) به نام *اوی-باکتریوم پاراگالیناروم* (*Avibacterium paragallinarum*) ایجاد می‌شود قبلاً، این باکتری به نام *هموفیلوس پاراگالیناروم* شناخته می‌شد. عفونت با این باکتری به تنهایی می‌تواند سبب کاهش رشد در جوجه‌های در حال رشد و کاهش بارز تولید تخم مرغ ۱۰ تا ۴۰ درصد و گاهی تا ۷۵ درصد در طول سه هفته در گله‌های تخم‌گذار شود. در گزارشی از چین در جوجه‌های گوشتی، عامل این بیماری توانسته در همراهی با استرس و دیگر عوامل بیماری‌زا، سبب افزایش جوجه‌های وازد به علت تورم کیسه‌های هوایی تا ۶۹/۸ درصد و افزایش تلفات بین ۵ تا ۲۰ درصد شود (Blackall 2008b, Blackall 2013). همچنین شواهدی وجود دارد که *اوی‌باکتریوم پاراگالیناروم* می‌تواند سبب افزایش بیماری‌زایی و تلفات در عفونت

[۱*] استادیار پژوهشی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج

E-mail: a.nouri@rvsri.ac.ir (نویسنده‌ی مسئول)

[۲] دانشیار پژوهشی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج

[۳] دانشیار پژوهشی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد

جوجه‌های گوشتی به ویروس H9N2 (Kishida et al. 2004) و دیگر عوامل بیماری‌زای طیور گردد (Blackall 2013). کریزای عفونی در تمام دنیا شایع بوده و در گله-های ماکیان ایران به ویژه در گله‌های تخم‌گذار و مادر نیز به شکل درمانگاهی دیده می‌شود. در ایران قبلاً جداسازی و تشخیص باکتری از نمونه‌های ماکیان تخم‌گذار تجاری دارای علایم بیماری در گله، توسط محققین گزارش شده است (Askari badouei 2014, Banani 2007, Bororgmeri fard 1980). در این مطالعات ضمن جداسازی مبتنی بر شکل کلنی و نیازمندی رشد باکتری به پرگنه پرستار گزارش حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها نیز صورت گرفته است. اولین روش طبقه‌بندی سرولوژیک توسط Page در سال ۱۹۶۲ توصیف شد. با انجام آزمایش آگلوتیناسیون سرمی بر روی لام و یا آزمایش HI باکتری-های *اوی‌باکتریو پاراگالینارم* از نظر سرولوژیکی به سه گروه سروتیپ A, B و C تقسیم می‌شوند (Page 1962). از لحاظ مصونیت ایمنی ما بین این سه گروه باکتری‌ها ایمنی متقاطع در پرنده‌های ایمن شده مشاهده نمی‌شود و به همین منظور در تهیه‌ی واکسن (کشته) در برخی از کشورها بسته به تنوع شیوه نوع سروتیپ، از واکسن دو ظرفیتی و یا سه ظرفیتی شامل گروه باکتری‌های A، B و C مصرف می‌گردید. اما با مشاهده روزافزون جدایه‌های غیرقابل طبقه‌بندی با این شیوه، Kume در سال ۱۹۸۳ با معرفی آزمایش جایگزین پیچیده‌ای از HI، با استفاده از آنتی‌ژن تهیه شده با پتاسیوم تیوسیانید و انتی‌سرم تهیه شده در خرگوش و نیز گویچه‌های قرمز تثبیت شده با محلول گلوتارالدیید توانست جدایه‌های بیش‌تری از باکتری *اوی-باکتریوم پاراگالینارم* را طبقه‌بندی نماید (Kume et al. 1983). در روش اخیر جدایه‌های باکتری *اوی‌باکتریوم پاراگالینارم* در سه گروه سرمی مطابق با سروتیپ‌های طبقه‌بندی شده Page شامل ۹ سروار مشخص، طبقه‌بندی جدیدی پیدا نمودند. از لحاظ ایمنی‌زایی، حفاظت کامل ایمنی در تزریق پرنده‌ها با باکترین این باکتری‌ها در مقابله با سروارهای همولوگ حاصل می‌شود. از سوی دیگر گزارش‌های متعددی از کشورها از مشاهده وقوع بیماری در گله‌های واکسینه شده وجود دارد. در این موارد اختلاف یا عدم هم‌پوشانی ایمنی سویه‌های در گردش وحشی باکتری و سروار سویه‌های موجود در واکسن-های تجاری را به عنوان علت اساسی مطرح شده است. (Chukiatsiri 2010, Morales-Erasto et al. 2014, Zhang et al. 2003). لذا، بیش از پیش توجهات به سوی استفاده از سویه‌های واکسینال تهیه شده از جدایه‌های بومی در کنار سویه‌های استاندارد جلب گردیده است (Jacobs et al. 2003). در گله‌های تخم‌گذار و مادر کشور ما چند دهه است که از واکسن‌های وارداتی برای مقابله با بیماری کریزای عفونی استفاده می‌شود و تا کنون گزارشی در خصوص کارآمدی واکسن‌های مصرفی موجود در بازار و جدایه‌های بومی در گردش منتشر نشده است. در حالی که به صورت غیر رسمی مواردی از ابتلا گله‌های طیور واکسینه شده کشور به بیماری کریزا عفونی صورت گرفته است. ضرورتاً اطمینان از عملکرد مناسب واکسن مورد مصرف در کشور از اقلامات مهم در امر پیش‌گیری از خسارات بیماری کریزای عفونی محسوب می‌شود. در این مطالعه سعی بر این شده است تا کارآمدی یک واکسن تجاری در حال مصرف کشور، در مقابل عفونت تجربی حاصل از یک جدایه‌ی بومی با کمک مشاهده علایم درمانگاهی و تغییرات سرمی بررسی شود.

مواد و روش کار

باکتری *اوی‌باکتریوم پاراگالینارم* (RT-83)، در این تحقیق، از یک گله تخم‌گذار آلوده در استان خراسان رضوی جداسازی شده بود. تعیین هویت مولکولی و برخی ویژگی‌های بیوشیمایی و رشد این باکتری قبلاً انجام گرفته و جزو سروگروه A از جنس *Avibacterum paragallinarum* شناسایی شده بود (Nouri et al. 2014). برای رشد و تکثیر این باکتری از کشت هم‌زمان باکتری *S.epidermicus* به عنوان پرگنه پرستار بر روی

محیط آگار خونی (گوسفند) و نیز محیط آگار شکلات تهیه شده از خون اسب مطابق روش توصیه شد استفاده شد (Blackall 2008b, Blackall 1989). این محیط شامل ژلوز آگار خون کلمبیا به همراه ۷ درصد خون لیز شده اسب (تهیه شده در دمای $56^{\circ}c$ در مدت ۴۰ دقیقه) بود. سوسپانسیون باکتری مورد نیاز جهت آلوده‌سازی و ایجاد بیماری تجربی در پرنده‌های تحت آزمایش، در محیط بافری ۰/۱ مولار محلول PBS با غلظت 1×10^{8} تعداد باکتری تهیه شد. برای این منظور در تعیین دقیق تعداد باکتری در واحد حجم از دستگاه اسپکتوفتومتری (ultraspec 2000 شرکت pharmacia biotech، امریکا) در طول موج ۶۵۰nm و میزان جذب نوری ۰/۳۷۵ و روش معمول شمارش پرگنه بر روی محیط جامد (CFU) استفاده گردید. در انتها دوز نهایی تلقیح باکتری به منظور آلوده‌سازی، در حجم ۰/۲ ml تنظیم گردید.

واکسن به کار رفته در این تحقیق، واکسن وارداتی مورد مصرف در مرغداری‌های کشور بود. این واکسن از نوع سه ظرفیتی و متشکل از سه سویه متعلق به سرو گروه‌های C, B, A بود. هر دوز واکسن با حجم ۰/۵ ml و از طریق داخل عضلانی تزریق شد.

به منظور انجام چالش، تعداد ۳۶ قطعه نیمچه‌ی ماکیان به طور تصادفی از میان هر دوجنس نر و ماده در سن ۱۴ هفتگی از یک گله‌ی SPF موجود در مؤسسه‌ی رازی تهیه و به سه گروه مجزا در فضایی جداگانه تقسیم شدند. پرنده‌ها در شرایط قفس نگهداری و آب و دان به صورت آزاد در اختیار آن‌ها قرار داده شد و سیستم آب‌خوری قفس‌ها از نوع ناودانی انتخاب شد. به پرنده‌های گروه اول در روز دوم نگهداری یک واکسن کشته روغنی کریزای عفونی موجود در بازار، مطابق روش توصیه شده شرکت سازنده (نام محفوظ)، در دو مرحله با فاصله دو هفته از طریق داخل عضلانی تزریق گردید. دو هفته پس از آخرین واکسیناسیون، هم‌زمان در گروه فوق و گروه دوم که واکسن دریافت نکرده بودند با سوسپانسیون تازه تهیه شده از کشت ۲۴ ساعته باکتری *اوی‌باکتریوم پاراگالینارم*، (تقریبا 1×10^{8} تعداد باکتری در هر میلی‌لیتر (CFU) در حجم ۰/۲ ml از طریق داخل سینوس زیر چشمی، مورد چالش قرار گرفتند. پرنده‌های گروه سوم به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شدند و با ۰/۲ ml بافر فسفاته مورد تلقیح قرار گرفتند. در مدت مطالعه کلیه‌ی گروه‌ها هر روز از نظر بروز علایم درمانگاهی و هر گونه تغییرات در مصرف آب و دان تحت نظر بودند. در روزهای ۲، ۴، ۶ و ۸ پس از چالش، تعداد ۳ پرنده از هر گروه به طور اتفاقی جدا نموده و نمونه‌گیری خون از طریق ورید بال جهت تهیه سرم انجام گردید.

در این مطالعه از آزمایش‌های سرمی عنوان شده در منابع برای پایش تغییرات سرمی استفاده شد (Blackall 1989). این آزمایش‌ها در بر گیرنده‌ی آزمایش‌های آگلوتیناسیون سرم بر روی لام (SPA) و آگار ژل پرسیپیتاسیون (AGP) بود. برای تهیه‌ی آنتی‌ژن مورد لزوم این آزمایشات به مقدار مورد نیاز، کشت ۲۴ ساعته از باکتری *اوی‌باکتریوم پاراگالینارم* در محیط کشت ژلوز خون اسب تهیه شده و پرگنه‌های موجود را در محلول بافری PBS، (PH=7.2) جمع‌آوری نموده و با سه مرتبه انجام سانتریفوژ (۸۰۰۰ نیروی گرانش –G به مدت ۱۰ دقیقه) اقدام به شستشوی آن‌ها شد. در انتها غلظت نهایی سوسپانسیون باکتری برابر مقیاس شماره‌ی ۱۰ لوله‌ی مک فارلن آماده گردید. این آنتی‌ژن به مدت یک هفته در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد قابل نگهداری بود. برای انجام آزمایش اگلوتیناسیون بر روی لام مقدار ۲۰µl از آنتی‌ژن تهیه شده فوق را با ۴۰µl سرم تهیه شده از سه گروه پرنده‌های تحت آزمایش در روزهای مختلف، مخلوط نموده و نتیجه مثبت آزمایش با مشاهده بروز آگلوتیناسیون پس از حد اکثر ۳ دقیقه مورد خوانش قرار گرفتند.

برای انجام آزمایش AGP، مقدار آنتی‌ژن مورد استفاده تا ۱۰ برابر غلظت مورد آزمایش SPA در نظر گرفته شد. این آزمایش، در ژل نوبل–آگار ۱/۵ درصد تهیه شده با محلول ۰/۱ مولار PBS حاوی ۰/۸ درصد NaCl انجام

گرفت. با استفاده از ابزار سوراخ کننده‌ی استاندارد از قبل تهیه شده، حفره‌های لازم در ژل ایجاد شده و در هر حفره تا حجم ۳۰µl ، آنتی‌ژن در گودی مرکزی و نمونه‌های سرم در حفره‌های اطراف ریخته شد. در نهایت با انکوباسیون در دمای اتاق پس از ۷۲ ساعت تشکیل باند-های رسوبی حاصل از کمپلکس آنتی‌ژن – آنتی‌بادی مورد خوانش قرار گرفتند.

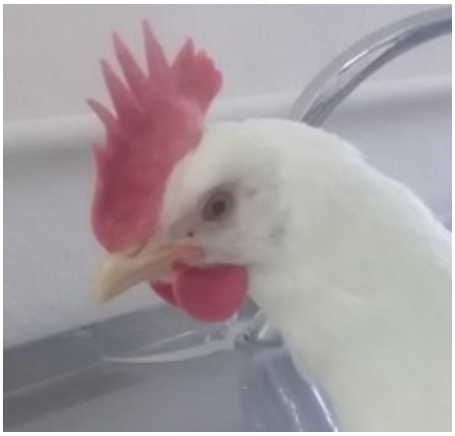
نتایج

در گروه پرنده‌های شاهد، طی مشاهدات دوره‌ی آزمایش، هیچ‌گونه علایم درمانگاهی و یا کاهش مصرف آب و یا دان دیده نشد. در گروه اول یعنی پرنده‌های ایمن شده با واکسن کریزای عفونی (روغنی کشته) پس از آلوده‌سازی و مواجهه با باکتری، در ۳ قطعه پرنده (۲۵ درصد) از آنان علایم درمانگاهی شامل تورم خفیف یک-طرفه صورت به ویژه در اطراف محل تلقیح دیده شد (عکس ۱). این علایم از روز دوم شروع شده و در پایان روز چهارم این علایم برطرف گردید. در گروه دوم شامل پرنده‌های (غیرایمن) آلوده شده با باکتری، علایم شدید بیماری کریزای عفونی در کلیه‌ی پرنده‌ها به وضوح دیده شد. این علایم شامل آب ریزش بینی، تورم یک-طرفه صورت که در روزهای بعد دو طرف صورت را درگیر می‌کرد، بسته شدن نسبی چشم ناشی از تورم بافت ملتحمه و در مواردی تکان سر و عطسه بود. نشانه‌های درمانگاهی در گروه دوم، از روز دوم شروع شده و از روز پنجم پس از تلقیح تا پایان دوره (روز ۸ پس از تلقیح) اگر چه با شدت کم‌تر در تمام پرنده‌ها دیده می‌شد. کاهش مصرف دان در این گروه نسبت به دو گروه دیگر به واسطه‌ی کم اشتهایی در روزهای ۳-۲ پس از تلقیح بسیار قابل توجه بود (عکس ۲).

جدول ۱: علایم بیماری کریزای عفونی در عفونت تجربی در سه گروه پرنده تحت آزمایش

بروز علایم / گروه	بیماری در روز دوم پس از تلقیح	بیماری در روز ۴ پس از تلقیح	بیماری در روز ۶پس از تلقیح	بیماری در روز ۸ پس از تلقیح	مجموع موارد (٪)
گروه اول (واکسینه)	-++	-+	---	---	۳ (٪۲۵)
گروه دوم (غیرواکسینه)	+++	+++	+++	+++	۱۲(٪۱۰۰)
گروه شاهد	---	---	---	---	۰

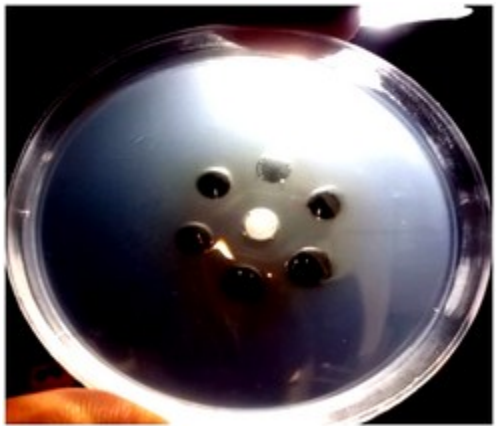
+ پرنده با علایم درمانگاهی _ پرنده به ظاهر سالم



عکس ۱: تورم صورت در اطراف محل تلقیح ماکیان SPF گروه اول (واکسینه شده) دو روز پس از تزریق با $۱۰^{۸}$ ۱ باکتری *اوی‌باکتریوم پاراگالینارم* **جداشده از ایران (RT-83) به داخل سینوس زیر چشمی**

عکس ۲: تورم صورت در اطراف محل تلقیح ماکیان SPF گروه دوم دو روز پس از تزریق با $۱۰^{۸}$ ۱ باکتری *اوی-باکتریوم پاراگالینارم* **جداشده از ایران (RT-83) به داخل سینوس زیر چشمی**

تغییرات سرمی در گروه پرنده‌های تحت مطالعه با استفاده از دو روش آزمایش SPA و AGP قابل مشاهده بود. این تغییرات به ترتیب به صورت بروز پدیده‌ی آگلوتیناسیون بارز سرمی و تشکیل یک یا دو باند رسوبی (عکس ۳) در دو گروه تحت آزمایش، به جز گروه شاهد بود (جدول ۲). نتایج آزمایش‌ها در پرنده‌های گروه شاهد در تمام روزهای دوره منفی بود و در گروه پرنده‌های واکسینه شده و مورد چالش قرار گرفته کاملاً واکنش‌های سرمی مورد نظر مشاهده شد.



عکس ۳: آزمون AGP: تشکیل یک یا دو باند رسوبی کمپلکس ایمنی در ژل آگار مربوط به آنتی‌ژن سویه‌ی بومی ایران (در حفره‌ی مرکزی) و نمونه‌ی سرمی گروه پرنده‌های ایمن شده با واکسن در حفره‌های اطراف

جدول ۲: نتایج آزمایش‌های سرمی AGP و SPA

روزهای پس از آلوده‌سازی	SPA			AGP		
	گروه اول	گروه دوم	گروه شاهد	گروه اول	گروه دوم	گروه شاهد
۲	+++	−−·	−−·	+++	−−·	−−·
۴	+++	−−·	−−·	+++	−−·	−−·
۶	+++	−++	−−·	+++	−−·	−−·
۸	+++	+++	−−·	+++	−−·	−−·

+ : نشان دهنده‌ی نتیجه‌ی مثبت آزمایش سرم در هر پرنده.

− : نشان دهنده‌ی نتیجه‌ی منفی آزمایش سرمی در هر پرنده.

پایش تغییرات سرمی در گروه پرنده‌های تحت مطالعه با استفاده دو روش آزمایش SPA و AGP نشان از بروز تغییرات سرمی به ترتیب زیر در گروه‌های آزمایشی بود. واکنش مثبت در گروه اول یا واکسینه مورد چالش قرار گرفته به صورت بروز پدیده آگلوتیناسیون بارز سرمی و تشکیل یک یا دو باند رسوبی در آزمایش‌های فوق در روزهای نمونه‌گیری بود. این نتایج به خوبی نوعی قرابت آنتی‌ژنیکی بین واکسن و باکتری چالش را نشان داد. در گروه پرنده‌های دوم (حساس و غیرواکسینه) مورد چالش قرار گرفته از روز ۶ پس از تلقیح واکنش سرمی تنها در آزمایش SPA دیده شد (جدول ۲). واکنش سرمی آزمایش‌های فوق در گروه شاهد در تمام روزهای دوره‌ی آزمایش کاملاً منفی بود.

بحث

موضوع ایجاد مصونیت در مقابل عوامل عفونی در پرندگان و یافتن عوامل تشدید و یا تقویت کننده‌ی آن از جمله مسائل پیش روی در بحث پیش‌گیری و کنترل بیماری‌ها است. بیماری کریزای عفونی به عنوان یکی از بیماری‌های مهم تنفسی در ماکیان است که بیش‌تر عوارض آن در پرنده‌های بالغ دیده می‌شود.

کریزای عفونی در ماکیان تجاری ایران اغلب با مشاهده علایم بیماری مورد تأیید قرار می‌گیرد. برای مقابله با بیماری اقدامات پیش‌گیری را با مصرف واکسن و موارد رخداد آن را با مصرف داروهای مختلف آنتی‌بیوتیک درمان می‌شود. در ایران در مقایسه با برخی کشورهای منطقه اطلاعات محدودی در خصوص مشخصات باکتری عامل بیماری کریزای عفونی، علی‌رغم استفاده چندین ساله از واکسن برای مقابله با این بیماری، در دسترس می‌باشد. Bororgmeri fard در سال ۱۹۸۵ اولین گزارش جداسازی و تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی *H. gallinarum* در ایران را ارائه کرد. Banani و همکاران در سال ۲۰۰۷ در بررسی عوامل باکتریایی مولد تورم سر و صورت، موفق به جداسازی دو جدایه از این باکتری شد. او ضمن تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها، با تلقیح به مرغان SPF اولین بیماری تجربی کریزای عفونی را مورد مطالعه قرار داد. همچنین Nouri و همکاران در سال ۲۰۱۴ با به کارگیری روش مولکولی PCR توانستند با استخراج ماده‌ی ژنتیکی این دو مورد جدایه‌ی باکتری ذخیره شده در محیط زرده‌ی تخم (علی‌رغم غیرفعال بودن)، به عنوان سروتیپ B آن‌ها را مورد شناسایی قرار دهند. مطالعه‌ی دیگری در خصوص شناسایی و تشخیص مولکولی بیماری کریزای عفونی در گله‌های تخم‌گذار و مادر ایران در سال‌های اخیر انجام شده است (Banani 2007, Askari badouei 2014). کند رشد بودن و حساسیت باکتری در مرحله‌ی جداسازی و همچنین نیازمندی ویژه‌ی آن به محیط کشت حاوی فاکتور V یا NAD از عوامل محدود کننده‌ی مطالعات بر روی عامل بیماری کریزای عفونی مطرح هستند (Banani 2007, Blackall 2013). اگر چه با به کارگیری محیط جامد توصیف شده در بعضی منابع به شکل مؤثری مشکل تکثیر خالص و نگهداری باکتری را برطرف می‌نماید (Blackall 1989, Blackall 2008a). در این محیط NAD مورد نیاز رشد باکتری از منبع گلبول‌های قرمز لیز شده اسب تا حدودی تأمین می‌گردد. جدایه‌ی مورد استفاده در این مطالعه قبلاً با آزمایش‌های شناسایی مولکولی PCR انجام گرفته و گروه سرمی آن با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و تعیین توالی بخش متغیر ژن پروتئین هماگلوتینین باکتری به عنوان گروه سرمی A مشخص و توالی مربوطه در بانک ژن با شماره‌ی دسترسی KY614530 قرار گرفته است. اطلاعاتی در خصوص میزان حدت سویه‌های شایع در کشور و نیز میزان تأثیرگزاری واکسن‌های مصرفی در دسترس نمی‌باشد. مطالعه‌ی حاضر برای اولین بار به منظور سنجش توانایی ایمنی‌بخشی واکسن کریزای عفونی در مقابل یک جدایه اخیر باکتری *اوی‌باکتریوم پاراگالینارم* بومی کشور در نیمچه‌های SPF مورد اجرا قرار گرفت.

اگر چه اطلاعاتی تا کنون در خصوص معیارهای استاندارد ارزیابی واکسن کریزای عفونی در شیوه‌نامه‌ی بین‌المللی OIE و یا فارماکوپه‌های انگلستان و اتحادیه اروپا موجود نمی‌باشد، در شیوه‌نامه‌های مربوط به اتحادیه‌های کشورهای آسیای جنوب شرقی (ASEAN)، دستورالعملی جهت ارزیابی واکسن کریزای عفونی وجود دارد. بر اساس این دستورالعمل، نمی‌بایست در حداقل ۷۰ درصد پرنده ایمن شده با واکسن، علایم بیماری پس از انجام چالش با باکتری استاندارد بروز نماید. در مطالعه‌ی حاضر بروز مختصر علایم بیماری شامل تورم زودگذر محل تلقیح باکتری در تعدادی از پرنده‌های ایمن شده مشاهده شد که همچنان در محدوده‌ی مورد قبول (۲۵ درصد) برای یک واکسن بود. بروز علایم جزیی (تورم محل ترزیق) ممکن است به به علت حدت جدایه و یا اختلاف احتمالی واریته سرمی این جدایه نسبت به سویه‌های واکسن مورد آزمایش باشد. به طور معمول شرکت‌های سازنده‌ی واکسن نوع واریته سرمی استفاده شده در واکسن را به دلایل اقتصادی هرگز بیان نمی‌دارند. لذا به نظر می‌رسد این واقعیت، یکی از علل‌های ایجاد کننده‌ی موانع در مدیریت اقدامات پیش‌گیرانه بیماری کریزای عفونی در خصوص انتخاب واکسن مناسب باشد. در سال‌های اولین تولید واکسن ضد کریزای عفونی، Clark و همکاران در سال ۱۹۶۱ از بروز علایم خفیف بیماری با میزان رخدادی کم‌تر و به دنبال آن سرعت بالای بهبودی را در گروه پرنده‌های واکسینه شده مشاهده و گزارش نموده‌اند (Clark 1961). همچنین Blackall مشاهده موارد کارایی کم واکسن را به نوع ادجووانت واکسن‌ها، محیط کشت (تخم مرغ) بذر و یا فرمالین استفاده شده در تهیه‌ی واکسن مربوط می‌داند (Blackall 1995). اما آنچه که هم اکنون بیش‌ترین مسئله اصلی صنعت طیور شده است مشاهده‌ی موارد ظهور واریته‌های سرمی جدید در مناطقی که قبلاً سابقه‌ی آلودگی را نداشته بودند (Cabrera et al. 2011, Falconi-Agapito et al. 2015, Morales-Erasto et al. 2011, Trujillo-Ruiz et al. 2016). از سوی دیگر بنا بر شواهد مشخص شده موجود، در مورد یکسان نبودن ایمنی محافظتی بین برخی واریته‌های سرمی گروه‌های سرمی، انتخاب واکسن متناسب با سویه‌های شایع در مناطق مختلف و یا استفاده از سویه‌های بومی در کنار سویه‌های استاندارد واکسن را منطقی‌تر می‌نماید (Blackall 2008b, Wambura 2010, Morales-Erasto et al. 2015, Blackall 2013).

همچنین در برخی کشورها با هر چه بیش‌تر روشن شدن نقش واریته‌های سرمی مختلف این باکتری در بروز بیماری در گله‌های طیور واکسینه شده (Bragg 2004, Morales-Erasto et al. 2014, Morales-Erasto et al. 2015)، و از جمله گزارش‌های غیر رسمی در ایران، برخی محققان اصلاح روش‌های متداول ارزیابی عملکرد واکسن‌های کریزای عفونی را مورد توجه قرار داده و به پیچیدگی‌های آن پرداخته‌اند (Blackall 1995). Blackall در سال ۱۹۹۵ این پیچیدگی‌ها را در آزمایش تجربی بیماری کریزای عفونی ناشی از متعدد بودن علایم بیماری (عطسه، آبریزش بینی، سرفه، تورم صورت با شدت‌های مختلف که بستگی به ویژگی فردی پرنده دارند) و وجود حدت‌های متفاوت باکتری و نیز به روش یا مدل ایجاد عفونت در پرنده‌ها مربوط دانسته است. به اعتقاد این محققان در مدل‌های رایج واکسیناسیون / چالش راه آلوده-سازی پرنده تحت آزمایش (تزریق داخل سینوس زیر چشمی) متفاوت از آن چیزی است که در آلودگی‌های طبیعی رخ می‌دهد. لذا ممکن است ارزیابی میزان حدت جدایه‌ها و محافظت ایمنی واکسن‌ها از دقت لازم برخوردار نباشد. در این ارتباط Zhao و همکاران در سال ۲۰۱۰ استفاده از پرنده‌های در تماس (In-contact) را برای سنجش پاتوژنز باکتری و بررسی علایم بیماری تجربی پیشنهاد کرده است (Zhao et al. 2010).

نتایج آزمایش‌های سرمی در این مطالعه از نظر تشخیصی، ضمن نشان دادن وجود ارتباط آنتی‌ژنیکی بین واکسن و جدایه‌ی حاضر، حائز اطلاعاتی از زمان بروز واکنش‌های ایمنی در عفونت‌های تجربی بود. مشاهده‌ی

وجود آگلوتیناسیون در سرم پرنده‌های واکسینه شده همچنین تشکیل باند رسوبی به ترتیب در آزمایش‌های SPA و AGP، نشان دهنده‌ی عملکرد ایمنی‌زایی واکسن بود. در مطالعه‌ی حاضر به جز یک مورد که دو باند واضع در سرم مربوط به گروه دوم (غیر واکسینه) مشاهده گردید، در دیگر موارد تنها شامل یک باند قابل رویت بود. تعداد باندهای رسوبی قابل مشاهده آزمایش AGP در سرم پرنده‌های واکسینه توسط blackall از یک تا سه باند ذکر گردیده است (Blackall and Reid 1982, Blackall 1989, Iritani 1979). نتایج سایر تحقیقات نشان داده است که مشاهده‌ی واکنش مثبت در آزمون‌های سرمی SPA و AGP به ترتیب از ۷– ۱۴ روز و دو هفته پس از آلودگی گله‌ها و یا واکسیناسیون دیده می‌شود و این واکنش‌ها برای مدت ۱۱ هفته در مورد واکسیناسیون و برای مدت حداقل یک سال در عفونت‌های طبیعی تداوم می‌یابد (Blackall 1997). یافته‌های سرمی این مطالعه نیز با یافته‌های قبلی با اختلاف یک روز هم‌خوانی داشت. در گروه دوم پرنده‌ها به جهت کوتاه بودن زمان آلوده‌سازی و اخذ سرم (حداکثر ۸ روز) فرصت کافی برای بروز واکنش سرمی در آزمون AGP نداشتند. آزمون‌های سرمی SPA و AGP از نظر ویژگی قادر به تفریق عفونت گروه‌های سرمی مختلف باکتری عامل بیماری نیستند. بنابراین واکنش سرمی بر ضد هر یک گروه‌های سرمی سه گانه موجود در واکسن با این آزمایش‌ها می‌تواند قابل ردیابی باشد. شناسایی گروه‌های سرمی باکتری عامل کریزای عفونی با انجام آزمون سرمی HI بنا بر روش Page و با استفاده از آنتی‌سرم استاندارد، صورت می‌گیرد (Page 1962, Blackall 2013). آزمایش طلایی تعیین گروه سرمی مختلف با استفاده آزمایش HI با روش توصیه شده Kumeانجام می‌شود (Kume et al. 1983). آزمایش HI در فاصله‌ی زمانی دیرتری نسبت به آزمون‌های SPA و AGP قادر به شناسایی واکنش سرمی در پرنده‌های آلوده شده و یا واکسینه شده است (Iritani 1977) و ارتباط میزان تیتر این آزمون با حفاظت ایمنی در تیترهای بالاتر از ۵ دیده شده است (Blackall 2013, Morales-Erasto et al. 2015). لذا در این مطالعه با توجه به امکانات در دسترس و زمان کوتاه آزمایش از این آزمون استفاده نگردید. تعیین واریته‌ی سرمی این جدایه حاضر با دسترسی به آنتی‌سرم استاندارد در مطالعه‌ی آتی انجام خواهد شد.

به طور خلاصه این مطالعه نشان داد ارتباط آنتی‌ژنیکی بین این جدایه علی‌رغم نامشخص بودن واریته‌ی آن با واکسن تجاری موجود در بازار وجود دارد و استفاده از واکسن در پیش‌گیری از بروز علایم بیماری تجربی کوریزا در پرنده‌های آلوده به این جدایه مؤثر بوده است. اگر چه ممکن است واکسن تجاری در طولانی مدت یعنی چند ماه پس از واکسیناسیون در برابر همین جدایه‌ی محلی هم محافظت کافی نداشته باشد. به منظور کنترل بیماری کریزای عفونی در کشور پیشنهاد می‌گردد ضمن شناسایی گروه‌های سرمی شایع در کشور بررسی کارآمدی واکسن-های مصرفی و طراحی واکسن بومی مطالعات اساسی صورت گیرد.

تشکر و قدردانی

از کلیه‌ی همکاران گرامی خود در مدیریت بیماری‌های طیور به ویژه آقای سیدغلامرضا میرزایی که در به انجام رساندن این تحقیق همکاری صمیمانه‌ای داشتند سپاس‌گزارم. این مطالعه در قالب پروژه مصوب پژهشی به شماره ۹۲۱۰۵–۱۸–۱۸– ۲ در مؤسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی اجرا گردید.

منابع

Askari badouei, M.A.S.A.; Blackall, P.J.; Madadgar, O. and Charkhkar, S. (2014). Isolation and molecular identification of Avibacterium paragallinarum in suspected cases of infectious coryza. Turikish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 38: 46-49.

Banani, M.; Pourbakhsh, S.A.; Khaki, P.; Goodarzi, H.; Moazeni-Jula, G. and Ghodsian, N. (2007). Isolation; Identification And Antibiotic Sensitivity Of Haemophilus Paragallinarum Isolates From Commercial Layer Flocks Affected By Infectious Coryza. Pajouhesh and Sazandegi, 73: 128-135. (In Persian)

Blackall, P.J.; E.S.V. (2013). Infectious Coryza and Related Bacterial Infections. In: swayne; D. E. (ed.) Diseases of Poultry. 13th ed. Wiley-Blackwell.

Blackall, P.J. (2008a). Infectious Coryza. In: Dufour-Zavala L.; s.; D.E.; Glisson; J.R.; Pearson; J.E.; Reed; W.M.; Jackwood; M.W.; Woolcock; P.R. (ed.) A laboratory manoual for the isolation and identification of avian pathogens. 5th ed. American Association of Avian Pathologists. Pp: 22-26.

Blackall, P. J. (1995). Vaccines against infectious coryza, World's Poultry Science Journal, 51(1): 17-26.

Blackall, P.J.; Matsumoto, M. and Yamamoto, R. (1997). Infectious Coryza. In: Calnek; B. W.; Barnes;H. J.; Beard; C. W.; Mcdougald; L. R.; Saif; Y. M (ed.) Diseases of Poultry. 10 ed. Mosby-Wolfe, Pp: 179-190.

Blackall, P.J. and Reid, G.G. (1982). Further characterization of Haemophilus paragallinarum and Haemophilus avium. Veterinary Microbiology, 7(4): 359-367.

Blackall, P.J.; Richard Yamamoto (1989). Infectious Coryza. In: Graham purchase.H.; L. H. A. e. (ed.) A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. 3rd ed. kendall / Hunt publisheing company, Pp: 27-31.

Blackall, P.J. and Soriano, E.V. (2008). Infectious Coryza and Related Bacterial Infections. In: Saif; H. J. (ed.) Diseases of Poultry. 11 ed. Iowa State University press; Ames; Iowa, Pp: 789-803.

Bororgmeri fard, M.H. (1980). Determine the sensitivity of pathogenic bacteria in poultry to different antibiotics. Journal of Tehran Faculty of Veterinary Medicine, 35: 101-88. (In Persian)

Bragg, R.R. (2004). Evidence of possible evasion of protective immunity by NAD-independent isolates of Haemophilus paragallinarum in poultry. Onderstepoort Journal of Veterinary Research, 71(1): 53-58.

Cabrera, A.; Morales-Erasto, V.; Salgado-Miranda, C.; Blackall, P.J. and Soriano-Vargas, E. (2011). Hemagglutinin serotyping of Avibacterium paragallinarum isolates from Ecuador. Tropical Animal Health and Production. 43, 549-51.

Chukiatsiri, K.C.S.; Chansiripornchai, N. (2010). An outbreak of Avibacterium paragllainarum serovar B in a Thai Layer farm. Thai Journal of Veterinary Medicine, 40: 441-444.

Clark, D.S.; Godfrey, J.F. (1961). Studies of an inactivated vaccine for immunization of chickens against infectious Coryza. Avian Diseases, 5: 37-47.

Falconi-Agapito, F.; Saravia, L.E.; Flores-Perez, A. and Fernandez-Diaz, M. (2015). Naturally Occurring beta-Nicotinamide Adenine Dinucleotide-Independent Avibacterium paragallinarum Isolate in Peru. Avian Diseases, 59(2): 341-343.

Iritani, Y. (1979). Separation with trypsin of hemagglutinin of Haemophilus paragallinarum. Japanes Journal of Veterinary Science. 41: 69-71.

Iritani, Y.; Sugimori, G.; Katagiri, K. (1977). Serologic response to Haemophilus gallinarum in artificially infected and vaccinated chickens. Avian Diseases, 21(1): 1-8.

Jacobs, A.A.; van den Berg, K. and Malo, A. (2003). Efficacy of a new tetravalent coryza vaccine against emerging variant type B strains. Avian Pathology, 32(3): 265-269.

Kishida, N.; Sakoda, Y.; Eto, M.; Sunaga, Y. and Kida, H. (2004). Co-infection of Staphylococcus aureus or Haemophilus paragallinarum exacerbates H9N2 influenza A virus infection in chickens. Archives of Virology, 149: 2095-104.

Kume, K.; Sawata, A.; Nakai, T. and Matsumoto, M. (1983). Serological classification of Haemophilus paragallinarum with a hemagglutinin system. Journal of Clinical Microbiology, 17(6): 958-964.

Morales-Erasto, V.; Fernandez-Rosas, P.; Negrete-Abascal, E.; Salazar-Garcia, F.; Blackall, P.J. and Soriano-Vargas, E. (2014). Genotyping; pathogenicity; and immunogenicity of Avibacterium paragallinarum serovar B-1 isolates from the Americas. Avian Diseases. 58(2): 293-296.

Morales-Erasto, V.; Maruri-Esteban, E.; Trujillo-Ruiz, H.H.; Talavera-Rojas, M.; Blackall, P.J. and Soriano-Vargas, E. (2015). Protection Conferred by Infectious Coryza Vaccines Against Emergent Avibacterium paragallinarum Serovar C-1. Avian Diseases, 59(1): 162-164.

Morales-Erasto, V.; Garcia-Sanchez, A.; Salgado-Miranda, C.; Talavera-Rojas, M.; Robles-Gonzalez, F.; Blackall, P.J. and Soriano-Vargas, E. (2011). ERIC-PCR genotyping of emergent serovar C-1 isolates of Avibacterium paragallinarum from Mexico, Avian Disease, 55(4): 686-688.

Nouri, A.; Banani, M.; Goudrzi, H.; Pourbakhsh, S.A. and Mirzaei, S.G. (2014). Retrospective Detection of Avibacterium Paragallinarum Serovar B in Egg Yolk Materials by PCR. Archives of Razi Institute, 69(2): 179-183.

Page, L.A. (1962). Haemophilus infections in chickens. I. Characteristics of 12 Haemophilus isolates recovered from diseased chickens. American Journal of Veterinary Research, 23: 85-95.

Trujillo-Ruiz, H.H.; Shivaprasad, H.L.; Morales-Erasto, V.; Talavera-Rojas, M.; Salgado-Miranda, C.; Salazar-Garcia, F. et al. (2016). Virulence of Serovar C-1 Strains of Avibacterium paragallinarum. Avian Diseases, 60(4): 837-840.

Wambura, P.N. (2010). Preparation and use of autogenous vaccine from Avibacterium paragallinarum (strain Tan 1-05) in layer chickens. Tropical Animal Health and Production, 42(3): 483-486.

Zhang, P.J.; Miao, M.; Sun, H.; Gong, Y. and Blackall, P.J. (2003). Infectious coryza due to Haemophilus paragallinarum serovar B in China. Austrilan Veterinary Journal, 81(1-2): 96-7.

Zhao, Q.; Sun, Y.N.; Zhang, X.X.; Kong, Y.B.; Xie, Z.J.; Zhu, Y.L. et al. (2010). Evaluation of two experimental infection models for Avibacterium paragallinarum. Veterinary Microbioligy, 141(1-2): 68-72.

Immunogenicity of Infectious Coryza vaccine against a native isolate of *Avibacterium paragallinarum* from Iran

Nouri, A.[1]; Banani, M.[2] and Toroqi, R.[3]

Received: 24.04.2017 Accepted: 17.12.2017

Abstract

Infectious Coryza (IC) an acute respiratory disease of chicken that caused by *Avibacterium paragallinarum*(*Av.P*). Immunity offered by a commercial IC killed oil vaccine against a native field isolate of Av. P serogroup A of Iran was studied by designing a vaccination/challenge experiment. 36 SPF birds of 14 weeks old were randomly divided into three separate groups. One group was vaccinated by two doses within 2 weeks by a commercial vaccine. After two weeks of last vaccination, this group and the second one were challenged with 1×10 8 CFU/ml bacterial suspension prepared from fresh 24 hours cultured of *Av. p* through infraorbital sinus. The third group kept as the control only received phosphate buffer saline. Three birds from each group were bled for serum sample collection on days of 2, 4, 6 and 8 after challenge. On Clinical observation of the first group, mild swelling on inoculation site was developed on the second day of the experiment that gradually disappeared on days after. In the second group on post-infection day (PID) of 2, nasal discharge and facial swelling that extended to become bilateral beside tracheal rales were noticed in all bird throughout the experiments days. For all birds Sero-conversions monitored by serum plate agglutination (SPA) and agar gel precipitation (AGP) test using antigen prepared from 24 hours culture of bacterium. While birds of control remained negative, All bird of the first group shown positive serum reaction by SPA and AGP tests while in the second group, only SPA becomes positive after 6 PID. In conclusion, this native isolate has an antigenic relationship with vaccine contained strains and the commercial vaccine can prevent must clinical sign in infected birds. However, more studies needed to verify serovar identity of isolate and reach a conclusive outcomes about the efficacy of currently used vaccine in country.

Key world: Infectious Coryza, Avibacterium, Paragallinrum, Iran

1- Research Assistant Professor, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran
2- Research Associate Professor, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran
3- Research Associate Professor, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Mashhad, Iran
Corresponding Author: Nouri, A., E-mail: a.nouri@rvsri.ac.ir