

ارزیابی دفع سوش واکسینال RB51 بروسلا آبورتوس با دز کامل ، از راه شیر و اثرات این واکسن در گاوهای شیری

مسلم شمس فرد^۱ ، کامران افشارپاد^۲ ، حسین نوروزی^۳ ، علی کاظمی^{۴*} ، مجید قلیزاده^۵

چکیده

این مطالعه به منظور ارزیابی واکسن سویه RB51 بروسلا آبورتوس در ایمن سازی گاوهای بالغ علیه بروسلوز و دفع سوش واکسینال، واکسن RB51 از شیر تعداد ۴۳ رأس دام، که در آن گله سابقه بیماری بروسلوز داشته ، انجام گرفته است . از مجموع ۴۳ رأس دام، تعداد ۱۱ رأس آبستن و بقیه شیری بوده اند. تمامی گاوها در آزمایش سرولوژی و کشت نمونه شیر قبل از واکسیناسیون به جز ۳ رأس دام واکنش منفی داشتند . که آن سه رأس دام مثبت بوده و به کشتارگاه اعزام شدند . از واکسن سویه RB51 به میزان جرم یا واحد تشکیل پرگنه (cfu) $10^9 \times 10^3 - 10^4$ به صورت زیر جلدی به هر گاو تزریق شد . حیوانات واکسینه شده از نظر بالینی تحت نظر قرار گرفته و هیچ گونه آثار سوء ناشی از واکسیناسیون مشاهده نگردید . مصرف آب و غذا طبیعی بوده و در میزان تولید شیر گاوهای شیری تغییری ایجاد نشد . گاوهای آبستن وضعیتی طبیعی داشته و هیچ گونه سقط جنین یا زایمان زودرس اتفاق نیفتاد. آزمایش های کشت نمونه شیر و میکروبیولوژی از نظر دفع سوش واکسینال به طور هفتگی و به مدت ۸ هفته انجام پذیرفته و تماماً نتیجه منفی نشان دادند. نتیجتاً با توجه به عدم بروز آثار بالینی ناشی از تزریق واکسن، فقدان تولید آنتی بادی مداخله کننده در آزمایش های سرولوژی و نتیجه کشت باکتریولوژی شیر از نظر دفع سویه RB51 ، میزان دز فوق الذکر در گاوهای آبستن و شیری بی ضرر بوده و این گروه از حیوانات را می توان با اطمینان خاطر واکسینه نمود.

واژگان کلیدی: واکسن RB51 ، گاو، بروسلوز، دفع باکتری

مقدمه

بروسلوز یک بیماری مسری در حیوانات و انسان بوده که به وسیله سقط جنین، اورکیت ، جفت ماندگی و اختلالات باروری در میزبان های اصلی نمایان می گردد. عامل بیماری باکتری بروسلا میباشد که مشتمل بر شش گونه بروسلا آبورتوس ، بروسلا ملیتنسیس، بروسلا سوئیس، بروسلا نئوتومه، بروسلا اویس

- ۱- دانش آموخته دکترای دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج
 - ۲- کارشناس سازمان دامپزشکی کل کشور
 - ۳- گروه قارچ شناسی دانشگاه علوم پزشکی ایران
 - ۴- دانشجوی دکترای تخصصی فارما کولوژی دانشکده علوم دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران
 - ۵- دانشجوی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، عضو باشگاه پژوهشگران جوان
- *- نویسنده مسئول Dr_ali_kazemi@yahoo.com

بروسلوز می‌گردد و تداخل با آزمایش‌های تشخیصی ندارد. آزمایشات سرمی معمول برای تشخیص بروسلوز عبارتند از ۱-آزمایشات صفحه‌ای با آنتی ژن‌های اسیدی که شامل آزمایش صفحه‌ای رزبنگال (RBPT) و آزمایش آگلوتیناسیون صفحه‌ای (BPAT) می‌باشد. ۲- آزمایش آگلوتیناسیون سریع با آنتی ژن معمولی ۳- آزمایش رایت ۴- آزمایش مرکاپتواتانل ۵- آزمایش تثبیت عناصر مکمل ۶- آزمایش کومبس ۷- آزمایش ایمونوفلورسانس ۸-آزمایش الایزا ۹- آزمایش حلقه‌ای شیر ۱۰-آزمایش آلرژیک (۱۰، ۱۱، ۱۲ و ۱۴)

در این مطالعه آزمایش‌های رایت و رزبنگال و ۲ مرکاپتواتانول قبل از واکسیناسیون در دامهای مورد مطالعه انجام شد. از لحاظ ایمنیت زایی واکسن RB51 مطالعات زیادی در داخل و خارج کشور انجام شده است. در کشور آمریکا این واکسن از سال ۱۹۹۶ مجوز مصرف گرفته است. در ایران نیز کارایی واکسن از لحاظ ایمنی زایی توسط ذوقی و همکاران بررسی شده است (۳، ۲) و در این تحقیق فقط دفع سوش واکسینال RB51 از راه شیر و اثرات آن در گاوهای شیری مدنظر بوده است. مبنای این تحقیق مطالعاتی است که توسط ذوقی و همکاران انجام شده و ایمن بودن واکسن را تایید کرده اند (۲، ۳، ۴) اما طبق اظهارات عده ای از کلینیسین‌ها مصرف دز کامل واکسن RB51 خطر سقط جنین برای دام را به دنبال دارد که این امر با مطالعات ذوقی متناقض است. همچنین در ایران مطالعه مدونی مبنی بر ارزیابی دفع سوش واکسینال RB51 از راه شیر و پیامد های آن در گاوهای شیری انجام نشده است که این مطالعه به بررسی این عوامل و صحت و سقم آنها می‌پردازد.

اهداف کلی در این مطالعه: ۱- ارزیابی دفع سوش واکسینال RB51 از راه شیر در گله‌های دامی و مشاهده خطرات و اثرات جانبی احتمالی ۲- کاهش میزان بروسلوز در دام و در پی آن کاهش میزان تب مالت در انسان.

و بروسلا کنیس میباشد. اکثر موارد راه اصلی دفع بروسلا آبورتوس تماس حیوانات سالم با مایعات رحمی و جفت حیوان آلوده است و شیر راه دوم دفع بروسلا است. دوره کمون بیماری در حیوانات غیر واکسینه کمتر از دوماه می‌باشد (۱، ۲ و ۳)

بروسلا آبورتوس مسئول بیماری اپیدمیک در گاو بوده که گاهی هم به دیگر حیوانات اهلی و همچنین نشخوارکنندگان وحشی انتقال می‌یابد. هفت بیوتیپ از بروسلا آبورتوس شناخته شده که بیوتیپ Tulya بروسلا آبورتوس بومی ایران است. این باکتری در محیط کشت غالباً به صورت کوکوباسیل یا میله ای دیده می‌شود. گونه بروسلا آبورتوس هوازی، غیر متحرک، کاتالازواوره آز و اکسیداز مثبت است. باکتری بروسلا در حرارت ۶۰ درجه سانتی‌گراد طی ۱۰ دقیقه و در فنل ۱٪ طی ۱۵ دقیقه از بین می‌رود. لیپو پلی ساکارید باکتری، آنتی ژن اصلی در آزمایشات سروآگلوتیناسیون مستقیم، آزمایشات ثبوت عناصر مکمل، کومبس و... می‌باشد. بدین منظور در خلال سالهای اخیر ایمن سازی گاوهای بالغ و آبستن علیه بروسلوز مورد توجه خاصی بوده است که در بحث ایمن سازی گاوهای بالغ واکسن S19 بروسلا آبورتوس در حد وسیعی جهت محافظت گاوها در مقابل بیماری استفاده می‌شده است. ۴ و ۵ و ۶

واکسن S19: با دوز تزریقی $10 \times 10^8 - 3 (c.f.u)$ یا واحد تشکیل پرگنه و دوز چشمی $10 \times 10^9 - 4$ جهت گاوهای بالغ ایمنی زا شناخته شده است (۸ و ۹ و ۱۳). اما به دلیل حدت بالای آن و گزارشاتی از سقط جنین و ایجاد تداخل در آزمایش‌های تشخیصی ناشی از تحریک ایمنی هومورال، کاربرد آن محدود گشت. ۱۲

واکسن RB51: این واکسن از پاساژ پنجاه و یکم کلونی خشن موتان بروسلا آبورتوس سوش ۲۳۰۸ تهیه گردیده که فاقد زنجیره O پروز آمین پلی ساکاریدی است لذا موجب تحریک ایمنی هومورال نمی‌گردد و از طریق ایمنی سلولی موجب مقاومت دامها در برابر

مواد و روش کار

بررسی می شد. اگر پرگنه ای جدامی شد مثبت و در غیر این صورت منفی تلقی می گردید. در جداسازی بروسلا برای تفریق سوش واکسن از سوش بیماریزا آنتی بیوگرام با دیسک پنی سیلین انجام می شد. اگر سوش مقاوم به پنی سیلین بود سوش بیماریزا است و در غیر آن سوش واکسن می باشد.

نتایج

در این تحقیق که در پی تزریق واکسن RB51 با دوز کامل در دامهای شیری و آبستن سوش واکسن از شیر جدا نگردید و در هیچ یک از حیوانات طی هفته ی اول پس از واکسیناسیون تب به ظهور نرسیده و در مصرف آب و غذا هیچ گونه تغییری ایجاد نشد. در محل تزریق واکسن آثاری از تورم یا آبه بروز نکرد و آثاری از آرتریت یا شوک آنافیلاکتیک نیز مشهود نبوده است. در میزان تولید شیر گاوهای شیری تغییری ایجاد نشد. تزریق واکسن با دوز کامل جهت دامهای آبستن بی ضرر شناخته شد و هیچ گونه سقطی در اثر واکسن در دامهای آبستن (۲-۶ ماهه) رخ نداد.

جدول شماره ۱ - تفسیر نتایج آزمایشات سرولوژیکی بروسلا در گاو

تفسیر نتایج	2ME	S.A.T	R.B.P.T
راکتور	وجود هر مقدار عیار پادتن	رقت ۱/۸۰ و بالاتر	مثبت
راکتور	رقت ۱/۴۰ و بالاتر	رقت ۱/۸۰ تا ۴۰ و ۱/۱	مثبت
مشکوک	رقت ۱/۴۰ پایین تر	رقت ۱/۲۰ تا ۱/۴	مثبت
منفی	رقت ۱/۲۰ و پایین تر	رقت ۱/۲۰ و پایین تر	مثبت

در طی آزمایشات سرمی و کشت شیر قبل از واکسیناسیون سه دام مثبت تلقی شد و به کشتارگاه اعزام شد در حیوانات واکسینه شده با RB51 ایمنی سلولی نقش اصلی را ایفا می کند. تزریق واکسن باعث تولید

در این تحقیق تعداد ۴۳ راس گاو از گله ای که سابقه بروسلاز داشت واقع در منطقه فشافویه در استان تهران مورد مطالعه قرار گرفتند که از این چهل و سه راس دام ۱۱ راس آبستن (۲-۶ ماهه) و بقیه دامها در سنین مختلف بودند. قبل از واکسیناسیون از تمامی ۴۳ راس دام نمونه خون گرفته شد و آزمایش های رزبنگال و سروآگلوتیناسیون لوله ای (رایت) با آنتی ژن استاندارد و آزمایش ۲ مرکاپتواتانول به عمل آمد. همچنین از تمامی گاوها قبل از واکسیناسیون از شیر کشت باکتریولوژی اخذ شد که طی آن سه دام مثبت تلقی شد و به کشتار اعزام شد. در واکسیناسیون از واکسن RB51 لیوفیلیزه طبق بروشور شرکت سازنده به میزان جرم ۱۰۹×۳۴-۱۰ (دز کامل) (c.f.u) در حجم ۲ میلی لیتر حلال به طور زیرجلدی به هر گاو تزریق شد. کشت باکتریولوژی از شیر به مدت ۸ هفته بعد از تزریق واکسن به فاصله یک هفته انجام شد.

عملیات آزمایشگاهی: شیر اخذ شده از هر دام جداگانه در ظروف استریل ریخته می شد سپس به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ سانتریفوژ شد. سپس با سوآپ استریل از قسمت خامه که روی ظرف قرار می گرفت و روی محیط کشت اختصاصی بروسلا آگار کشت داده می شد. همچنین از قسمت رسوب شیر که در ته ظرف قرار می گرفت نیز با سوآپ استریل در محیط جداگانه دیگر کشت به عمل آمد، طوری که برای هر نمونه شیر دو سری کشت از قسمت کرم و دو سری کشت از قسمت رسوب شیر تهیه شد.

مشخصات محیط کشت:

- پلی میکسین B سولفات ۶۰۰۰ واحد
- اکتیدین ۱۰۰ میلی گرم
- باسیتراسین ۲۵۰۰ واحد
- سیرکولین ۱۵۰۰ واحد و کریستال و بوله ۱/۴ میلی گرم
- پلیت ها در جایی که حاوی ۱۰٪ دی اکسید کربن بود قرار می گرفت و تا روز سوم در پلیت باز نمی شد و از روز سوم به بعد هر روز پلیت ها تا یک هفته

گردید (۸). پس با توجه به آلودگی در کشور واکسیناسیون، تست وکشتار ضروری به نظر می‌آید که تا چندی پیش واکسن S19 کاربرد وسیعی داشت اما به دلیل گزارش مواردی از سقط جنین و تداخل با آزمایش‌های تشخیصی کاربرد آن محدود گشت و واکسن RB51 تایید گشت. در تحقیقی که توسط ذوقی و همکاران در موسسه رازی روی موش سوری انجام شد حتی با دوز بالا نیز هیچ گونه آثار سوئی از واکسن مشاهده نشد (۲).

در تحقیقی که توسط افشارپاد و امیری (۱۳۸۴) مبنی بر بررسی واکسن RB51 در کنترل بروسلوز در گاوداری‌های بحرانی از لحاظ بروسلوز انجام گرفت سوش واکسن از ۲۰٪ شیر دام‌های سقط کرده جدا سازی شد و ۲٪ سقط گزارش شد که شاید دلیل آن این است که آن بررسی در شرایط بحرانی انجام گرفته بوده اما بررسی حاضر در شرایط عادی بوده است. در تحقیق دیگری که توسط امیری (۱۳۸۵) مبنی بر بررسی واکسن RB51 در ۶۰ راس گاو در سنین مختلف انجام گرفت سوش واکسن از شیر جدا نگردید اما یک مورد سقط رخ داده بود که به دلیل مدیریت ضعیف (تزریق اشتباه پروستاگلاندین) بود (۵) نه به دلیل واکسن که آن نتایج بررسی حاضر را تایید می‌کند در بررسی دیگری که توسط امیری و افشار پاد طی ۲ سال در پنج گاوداری مهم و مطرح از جمله تلیسه نمونه که دچار اپیدمی بروسلوز شده بودند انجام گرفت موارد سقط جنین در دام‌های آبستن (۵-۷ ماهه) ۳٪ گزارش شد (۵).

با توجه به نتایج و بررسی‌های عمل آمده سوش واکسن در شیردر شرایط عادی ترشح نمی‌شود و سقط جنین نیز حتی با دوز کامل رخ نمی‌دهد اما بهتر است که دز کامل در گوساله‌های ۳-۱۲ ماهه استفاده شود. موارد ذیل هم به منظور سهولت سریعتر در امر ریشه کتی بروسلوز در دام و بالتبع کاهش موارد تب مالت در انسان توصیه می‌گردد:

۱- توسعه مایه کوبی در کلیه جمعیت‌های حساس

آنتی بادی در مقابل زنجیره O لیپو پلی ساکاریدی سویه‌های صاف بروسلا نمی‌شود از این رو در تفسیر نتایج سرولوژی معمول دخالت نمی‌کند. اما باعث تولید آنتی بادی علیه پروتئین‌های غشائی سلول باکتری می‌شود که این آنتی بادی تنها از طریق الایزای نقطه‌ای تحت تاثیر اشعه گاما قابل اندازه‌گیری است. درکشت باکتریولوژیکی ۸ هفته نمونه گیری شیر هیچ‌گونه آثاری از دفع باکتری ناشی از سوش واکسن در شیر مشاهده نشد. همچنین در بررسی‌های باکتریولوژی نیز آثاری از انتشار باکتری از طریق شیر و ترشحات رحم حیوانات واکسینه به حیوانات غیر واکسینه مشاهده نشد.

جدول شماره ۲- نتایج حاصل از آزمایشات سرمی و کشت شیر بعد و قبل از واکسیناسیون

تعداد دام	نتایج آزمایش سرمی و کشت شیر قبل از واکسیناسیون	کشت باکتریولوژی از شیر بعد از واکسیناسیون
۳	مثبت	-
۴۰	منفی	منفی

بحث

بروسلوز گاوی در ایران شایع است و به دلیل وجود مخاطرات بیماری کنترل و ریشه کتی بیماری در رابطه با جوامع دامی و انسانی ضروری می‌باشد. در بررسی‌های اپیدمیولوژیک که توسط مرادی و همکاران در استان کردستان طی سالهای ۷۶ تا ۸۲ انجام شد میزان آلودگی به بروسلوز در گوسفندان ۱۱/۴٪ و در گاو ۶/۶٪ بود. در موارد انسانی کمترین درصد آلودگی از شهرستان بانه با میزان آلودگی ۴/۲٪ گزارش شد (۷). در مطالعه‌ای دیگر که توسط سارا شیخ و فجزبگی در سالهای ۸۱ و ۸۲ انجام گرفت میزان بروز آلودگی ۶۵ در ۱۰۰۰۰۰ گزارش شد (۷) و در بررسی اپیدمیولوژیک بیماری در نشخوار کنندگان کوچک که توسط باهنر (۱۳۸۶) انجام شد شیوع بیماری بین ۱٪ تا ۲۵٪ گزارش

واحد کرج شماره ۸۵۵

۷- شیمی، الف (۱۳۷۶): باکتری شناسی دامپزشکی و بیماریهای باکتریایی، مؤسسه نشر جهاد وابسته به جهاد دانشگاهی، ص ۳۱۱-۳۰۷

۸- قجر بیگلی. (۱۳۷۷): پایان نامه دکتری دامپزشکی بررسی میزان درصد به بیماری بروسلوز در جمعیت های دامی و انسانی منطقه شهری قزوین، دانشگاه آزاد اسلامی کرج. شماره ۲۳۷

9- Adone. Rosanna et al. March (2001). Clinical and diagnostic laboratory Immunology. No: 2, PP: 385-387

10- Davis D.S., Elzer P.H. (2002) Brucella vaccine in wildlife. Veterinary microbiology, Volume 90 PP: 533-544

11- Martins H., Bastuji B-G., Lima F., Flor F., Fonseca A., Boinas F. (2009) Eradication of bovine brucellosis in the Azores, Portugal _ Outcome of a 5-year programme (2002 - 2007) based on test and slaughter and RB51 vaccination. Preventive veterinary medicine, volume 90, PP: 80-89

12- Miranda K.L. (2009) Safety Brucella abortus vaccination of adult cows, Bacteriological evaluation of milk. Veterinary immunology and immunopathology, volume 128, PP: 317-318

13- Nicoletti p; (1997)- Adult Vaccination in bovine brucellosis: an International Symposium. Texas A&M University Press. College Station PP: 201-208.

14- Poester F.P., Goncalves V.S.P., Paixão T.A., Santos R.L., Olsen S.C., Schurig G.G., Lage A.A (2006) Efficacy of strain RB51 vaccine in heifers against experimental brucellosis. Vaccine. Volume 24 PP: 5327-5334

15- Samartino L.E., Fort M., Gregoret R., Schurig G.G. (2000) Use of Brucella abortus strain RB51 in pregnant cows after calf hood vaccination with strains 19 in Argentina. Preventive veterinary medicine, volume 45, PP: 193-199

دامی اعم از گوسفند، بز و گاو انجام گیرد.

۲- استفاده گسترده تر از واکسن RB51 با توجه به امکان تکرار مایه کوبی در دام بالغ وعدم تداخل در برنامه تست وکشتاراعمال گردد.

۳- آموزش دامداران وکارگران دامداری ها در استفاده از امکانات ضد عفونی ورعایت بهداشت در زمان زایمان گاوالزامی است .

منابع

۱- افشار یاد، ک. (۱۳۷۸): اپیدمیولوژی در دامپزشکی و تحقیقات، انتشارات مولف

۲- باهنرغ، اختیاریزاده ح، کوئی جهرمی اع، ربانی م. (۱۳۸۷) مقایسه واکسن S19 و RB51 در عملیات مبارزه با بروسلوز در گاوداری های استان تهران. پانزدهمین کنگره دامپزشکی

۳- ذوقی، الف و همکاران. (۱۳۷۹): ارزیابی سویه RB51 بروسلا آبورتوس در مدل آزمایشگاهی. فصلنامه جامعه دامپزشکی ایران سال دوم شماره چهارم .

۴- ذوقی، الف و همکاران. (۱۳۷۹): ایمن سازی گوساله ها با واکسن سویه RB51 بروسلا آبورتوس. فصلنامه جامعه دامپزشکی ایران. سال دوم شماره چهارم.

۵- ذوقی، الف و همکاران (۱۳۷۹): واکسیناسیون گاوهای بالغ و آبستن با واکسن سویه RB51 بروسلا آبورتوس، فصلنامه جامعه دامپزشکی ایران. سال دوم شماره چهارم.

۶- شمس فرد، م. (۱۳۸۶): پایان نامه دکترای عمومی دامپزشکی "ارزیابی دفع سوش واکسینال RB51 از شیرپس از تلقیح واکسن" دانشگاه آزاد اسلامی