

ارزیابی تجربی واکسن کشته سالمونلا تیفی موریوم در خرگوش

دکتر تقی زهرا یی صالحی^۱

مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۶، شماره ۲، ۸۹-۸۷، ۱۳۸۰

تعلیق‌ها یک میلی‌لیتر از محلول ۱۰ درصد آلومینیوم پتاسیم سولفات و ۵/۵ میلی‌لیتر از محلول ۷/۴ هیدرواکسید پتاسیم به‌عنوان ماده کمکی ایمنی (آدجوان) اضافه گردید. قبل از تزریق از این تعلیق‌ها کشت داده شد تا از عدم آلودگی آنها اطمینان حاصل شود (۱۲ و ۸).

ب - حیوان آزمایشگاهی : در این تحقیق از خرگوش‌های نر چهار تا شش ماهه قراردادی برای ارزیابی واکسن استفاده گردید. بدین ترتیب که ۱۵ سر خرگوش در سه گروه F، H (گروه آزمایش) و C (گروه شاهد) به‌طور مجزا قرار گرفتند. قبل از واکسیناسیون بر روی مدفوع و سرم تمامی خرگوش‌ها دو بار آزمایش‌های میکروبی و سرمی (آزمایش‌های آگلوتیناسیون و رسوبی) انجام گرفت. به خرگوش‌های گروه‌های مورد آزمایش F و H به ترتیب از تعلیق‌های فرمالینه و حرارت‌دیده به میزان ۵/۵ میلی‌لیتر از طریق زیرجلدی (یکبار) و داخل عضلانی (دو بار) به فاصله ۸ روز تزریق شد. از خرگوش‌ها در ۷ و ۲۵ روز بعد از واکسیناسیون و ۹ روز بعد از مواجهه خونگیری به‌عمل آمد.

ج - روش مواجهه : گروه‌های مورد آزمایش و شاهد ۱۸ روز پس از آخرین تزریق از راه عضلانی با ۵/۵ میلی‌لیتر از سوش حاد سالمونلا تیفی موریوم مواجهه شدند و متعاقب آن به مدت یک هفته تحت‌نظر قرار گرفتند و تعداد تلفات ثبت شد. در زمان تزریق سوش حاد و در ساعات ۲، ۸ و ۲۴ بعد از آن درجه حرارت مقعدی گروه‌های مورد آزمایش و شاهد اخذ گردید. در کالبدگشایی نمونه‌های کبد، قلب، ریه، طحال، روده و کیسه صفرا در محیط‌های آزمایشگاهی کشت داده شد (۹).

نتایج

در کشت مدفوع و آزمایش‌های سرولوژی که قبل از واکسیناسیون بر روی تمامی خرگوش‌ها انجام گرفت هیچ‌گونه نشانه‌ای دال بر آلودگی آنها به سالمونلا وجود نداشت. هشت روز بعد از اولین واکسیناسیون در خرگوش‌های گروه F (واکسینه شده با تعلیق فرمالینه) در آزمایش آگلوتیناسیون H عیار آگلوتینین H به ۱:۸۰ افزایش یافت در صورتی‌که در گروه H (واکسینه شده با تعلیق حرارت دیده) واکسن مثبتی مشاهده نگردید. بیست و پنج روز بعد از شروع واکسیناسیون آگلوتینین H در تمامی خرگوش‌های واکسینه مثبت و عیار آن به بیش از ۱:۳۲۰ رسید. متعاقب مواجهه گروه‌های مورد آزمایش و شاهد با سویه حاد سالمونلا تیفی موریوم نشانه‌هایی همانند اسهال مخاطی و خونی، ضعف و گوشه‌گیری مشاهده شد. اندازه‌گیری درجه حرارت مقعدی خرگوش‌های مورد آزمایش و شاهد قبل و ۲، ۸ و ۲۴ ساعت بعد از مواجهه نشان داد که بعد از تزریق سویه حاد در تمامی خرگوش‌ها درجه حرارت بدن بین ۲-۱ درجه افزایش می‌یابد. در اثر تزریق سویه حاد چهار سر از پنج سر خرگوش شاهد در ساعات ۱۸، ۴۸، ۹۶ و ۱۲۰ بعد از مواجهه تلف شدند. در کالبدگشایی در کبد، طحال و ریه خرگوش‌های تلف‌شده پرخونی مشاهده گردید. در روده علاوه بر پرخونی خونریزی نیز دیده می‌شد. همچنین از کشت نمونه‌های کبد، خون قلب، کلبه‌ها، طحال و روده این خرگوش‌ها سویه تزریق شده جدا گردید. خرگوش‌های واکسینه و خرگوش شاهد زنده مانده در آزمایش ویدال O و H عیار بالایی از آگلوتینین‌ها را نشان دادند (جدول ۱) محاسبه آماری مربع کای اختلاف معنی‌داری را بین گروه‌های مورد آزمایش (H و F) و شاهد (C) نشان داد ($P < 0/001$).

۱) گروه آموزشی میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

در این تحقیق برای بررسی ایمنی‌زایی سروتیپ سالمونلا تیفی موریوم ابتدا خواص بیوشیمیایی و سرولوژیکی این سروتیپ را با آزمایش‌های بیوشیمیایی و سرولوژی مختلف تعیین نموده و سپس در محیط ژلوز برین هارت کشت داده شد و بعد از ۲۴ ساعت با استفاده از سرم فیزیولوژی تعلیق پادگنی مناسب تهیه گردید. با به‌کارگیری حرارت و فرمالین تعلیق‌های غیرفعال تهیه و به آنها ماده کمکی (آدجوان) اضافه گردید. پانزده سر خرگوش را به سه گروه H، F، H (گروه‌های آزمایش) و C (گروه شاهد) تقسیم کرده و به آنها واکسن‌های کشته شده تزریق گردید. در جریان واکسیناسیون روند تکوین ایمنی بدن با آزمایش‌های سرمی دنبال گردید و ۱۸ روز بعد از آخرین واکسیناسیون گروه‌های آزمایش و شاهد با سویه حاد سالمونلا تیفی موریوم مواجهه داده شدند. متعاقب تزریق باکتری زنده چهار سر از خرگوش‌های شاهد تلف گردیدند ولی هیچ‌گونه تلفاتی در گروه‌های واکسینه شده مشاهده نشد. واژه‌های کلیدی : واکسن، سالمونلا تیفی موریوم، سالمونلوز، آگلوتیناسیون.

سالمونلوز یکی از مهمترین بیماری‌های مشترک انسان و دام می‌باشد که در سرتاسر جهان گسترش دارد. در جنس سالمونلا بیش از ۲۴۵۰ سروتیپ وجود دارد که بسیاری از این سروتیپ‌ها بالقوه برای انسان و حیوانات بیمارنا هستند. در بین این سروتیپ‌ها، سالمونلا انتریکا تحت‌گونه انتریکا سرووار تیفی موریوم به دلیل گسترش جغرافیایی و طیف وسیع میزبانی از اهمیت خاصی برخوردار است (۱ و ۱۰).

برای پیشگیری از سالمونلوز از روش‌های مختلفی استفاده شده و می‌شود که یکی از مهمترین آنها واکسیناسیون می‌باشد که در این زمینه واکسن‌های مختلفی از سروتیپ‌های سالمونلا تهیه و در انسان و حیوانات به کار رفته است که از آن جمله می‌توان به واکسن‌های تخفیف حدت یافته ty21a، حساس به حرارت (ts) و واکسن‌های کشته فرمالینه، حرارت‌دیده سالمونلا تیفی، پاراتیفی A و پاراتیفی B (T.A.B)، دابلین، آبور توس اویس و تیفی موریوم اشاره نمود. در گاو واکسیناسیون با باکترین فرمالینه سالمونلا دابلین چند هفته قبل از زایمان منجر به محافظت غیرفعال گوساله‌ها می‌گردد (۱۰، ۷، ۳). در انگلستان از واکسن فرم‌های که حاوی سالمونلا تیفی موریوم، دابلین و کلی‌باسیل بوده استفاده شده است. تاج‌بخش و همکاران از سالمونلا آبور توس اویس جدا شده از مناطق مختلف واکسن‌های کشته تهیه نمودند که اساس تحقیقات در این زمینه می‌باشد (۱۳ و ۱۲).

مواد و روش کار

الف - تهیه تعلیق‌های پادگنی (واکسن) : برای تهیه تعلیق‌های پادگنی از سالمونلا تیفی موریوم و ارزیابی ایمنی‌زایی آنها به‌عنوان واکسن، ابتدا خواص بیوشیمیایی و ساختار پادگنی آن را با انجام آزمایشات بیوشیمیایی نظیر تخمیر قندها، تولید H_2S ، اوره‌آز و IMViC و آزمایشات سرولوژی تعیین پادگن‌های پیکری و تازگی مشخص نموده و سپس در روی آگار برین هارت کشت داده شد. بعد از ۲۴ ساعت با سرم فیزیولوژی تعلیق پادگنی با غلظت 1×10^8 C.F.U./ml تهیه و سپس با حرارت (۷۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه) و فرمالین (در غلظت نهایی ۰/۱ درصد) غیرفعال گردید (۱۲ و ۹). به هر صد میلی‌لیتر از این



جدول ۱ - عیار آگلوتینین‌ها در گروه‌های واکسینه و شاهد قبل و بعد از واکسیناسیون و مواجهه

گروه	عیار آگلوتینین H				عیار آگلوتینین O			
	قبل از واکسیناسیون	۷ روز بعد از واکسیناسیون	۲۵ روز بعد از واکسیناسیون	۸ روز پس از مواجهه	قبل از واکسیناسیون	۷ روز بعد از واکسیناسیون	۲۵ روز بعد از واکسیناسیون	۸ روز پس از مواجهه
F	منفی	منفی	$\frac{1}{80}$	بیش از $\frac{1}{1280}$	منفی	منفی	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{160}$
H	منفی	منفی	منفی	بیش از $\frac{1}{1280}$	منفی	منفی	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{160}$
C	منفی	منفی	منفی	خرگوش زنده مانده: $\frac{1}{320}$	منفی	منفی	منفی	$\frac{1}{320}$

۵ روز بعد از مواجهه تلف گردیدند و دارای اسهال و اختلالات شدید گوارشی بودند. این مسئله از یکطرف معرف تحریک ایمنی همورال و از طرف دیگر معرف تحریک نسبی ایمنی مخاطی روده در اثر تزریق واکنش‌های مورد استفاده در مطالعه می‌باشد. در آزمایش آگلوتیناسیون O و H نیز عیار آگلوتینین‌ها در گروه‌های F و H شدیداً افزایش یافت که خود تأییدی بر تحریک ایمنی همورال در خرگوش‌های واکسینه است.

افزایش درجه حرارت بدن که هم در خرگوش‌های مورد آزمایش و هم در خرگوش‌های شاهد دیده می‌شود باعث آزاد شدن آندوتوکسین از باکتری است که با تحریک هیپوتالاموس باعث تولید انترلوکین یک و در نهایت تب می‌شود. در بعضی از خرگوش‌های شاهد بعد از مدتی باعث اسهال موکوسی و خونی درجه حرارت بدن کاهش و حتی به ۳۶ درجه سانتیگراد رسید.

هفت روز پس از تزریق واکنش فرمالینه عیار آگلوتینین H در حد تشخیصی (۱:۸۰) بود که نشانگر تثبیت یادگنهای تازه در اثر فرمالین می‌باشد. عیار آگلوتینین H، ۲۵ روز پس از شروع واکنش‌های فرمالینه در هر گروه بالاتر از آگلوتینین O بود. در این تحقیق تفاوتی بین واکنش‌های فرمالینه و حرارت دیده مشاهده نشد هر چند که از نظر تحریک پاسخ ایمنی همورال و بویژه تولید آگلوتینین H واکنش فرمالینه مناسبتر است. با توجه به موارد ذکر شده می‌توان از نتایج این مطالعه تجربی در جهت ارزیابی واکنش‌های مشابه از این نوع در پیشگیری از سالمونلوز در گاو و گوسفند استفاده نمود که خود نیاز به مطالعه جداگانه‌ای دارد.

منابع

۱. زهرابی‌صالحی، ت. (۱۳۷۸): سالمونلا. انتشارات دانشگاه تهران، شماره ۲۴۲۹، صفحه: ۲۱۴-۲۱۲.
2. Baron, E.J. and Finegold, S.M. (1990): Baily and Scott's Diagnostic Microbiology. 8th. ed. pp: 93, 363-385.
3. Bradford, P.S., Reina-Guerra, M., Hoiseith, S.K., Stocker, B.A.D., Habasha, F., Johnson, E. and Merritt, F. (1984): Aromatic-dependen S. typhimurium as modified live vaccines for calves. Am. J. Vet. Res. 45: 1, 59-66.
4. Chaturvedi, G.C. and Kaura, Y.K. (1994): Immune response of rabbits immunized with outer membrane proteins (porins) of Salmonella dublin 51. Indian Journal of Animal Sciences. 64: 12, 1308-1315.
5. Collins, F. and Carter, P. (1972): Comparative immunogenicity of heat-killed and living oral Salmonella vaccines. Infection & Immunity. 6: 451-458.
6. Deb, J.R. and Harry, E.G. (1974): Laboratory trials with inactivated vaccines against Escherichia Coli (O78 K8) infection in fowls. Research in Vet. Science 20, 131-138.

بحث

مطالعات متعددی در مورد استفاده از واکنش‌های غیرفعال سالمونلاها در انسان و حیوانات انجام شده است. میزان محافظت بستگی به روش واکنش‌های و نحوه تهیه واکنش دارد. Chaturvedi و همکاران در سال ۱۹۹۴ از پروتئین‌های پرده بیرونی (پورین) سالمونلا دابلین برای بررسی ایمنی‌زایی آنها در خرگوش استفاده کرده است. Kostromitinov و همکاران در سال ۱۹۸۹ واکنش کشته و جذب‌شده روی آلم سالمونلاتیفی موریوم، انتریتیدیس و کلراسوسیس را به صورت داخل عضلانی به موش، خرگوش و کبوتر تزریق نمودند و ایمنی‌زایی این واکنش پلی‌والان غیرفعال را مورد ارزیابی قرار دادند. Collins در سال ۱۹۷۲ ایمنی‌زایی واکنش‌های کشته‌شده به وسیله حرارت و زنده سالمونلاها را در موش مورد ارزیابی قرار داده و معتقد است که واکنش زنده ایمنی مناسبتری بر علیه عفونت ایجاد می‌کند.

Ruger در سال ۱۹۸۱ پنج نوع واکنش غیرفعال را با استفاده از فرمالین و هیدرواکسید آلومینیوم از سالمونلا تیفی موریوم واریته کپنهاگن (*S. typhimurium* Var. Copenhagen) تهیه نموده و ایمنی‌زایی این واکنش‌های کشته آدجوان دار در پنج گروه کبوتر مورد ارزیابی قرار داده و نتیجه‌گیری کرده که هیچ کدام از واکنش‌های آزمایش شده محافظت کافی ایجاد نمی‌کنند. تاج‌بخش و همکاران در سال ۱۹۷۴ واکنش کشته شده توسط فرمالین سالمونلا آبور توس اویس را در یک گروه ۱۱ رأسی از گوسفندان آزمایش کرده و اثر آن را با گروه ۱۱ رأسی شاهد مورد مقایسه قرار دادند که در گروه واکنش مانع از سقط جنین گردید. تاج‌بخش و Touway در تحقیق دیگری که به ۲۲ رأس میش سالمونلا آبور توس اویس کشته شده توسط حرارت و فرمالین تزریق نمودند که واکنش حرارت‌دیده نسبت به واکنش فرمالینه نتیجه بهتری داشت. در تحقیق حاضر نیز ایمنی‌زایی تجربی واکنش کشته جذب شده بر روی هیدرواکسید آلومینیوم و هیدرواکسید پتاسیم سولفات سویه بومی سالمونلا تیفی موریوم مورد بررسی قرار گرفت. راه معمول ورود سالمونلاها به بدن راه گوارشی است و واکنش تزریقی می‌بایستی ایمنی مخاطی روده را تحریک نماید تا از سیطره و نفوذ باکتری جلوگیری کند. در بیمارزایی سالمونلاها عوامل مختلفی از جمله وضعیت ایمنی بدن، تعداد باکتری وارد شده به بدن، حدت سویه و ... دخالت دارند که هر یک از آنها می‌توانند در کفایت واکنش مؤثر باشند. واکنش‌های کشته تزریقی هر چند ممکن است ایمنی مخاطی را در روده کمتر تحریک نمایند ولی با تحریک ایمنی همورال از بروز باکتری می‌و سپتی‌سمی که اغلب کشنده است جلوگیری می‌کند. در تحقیق حاضر ایمنی‌زایی واکنش کشته جذب شده بر روی هیدرواکسید آلومینیوم و هیدرواکسید پتاسیم سولفات سویه بومی سالمونلاتیفی موریوم مورد ارزیابی قرار گرفت و مشخص گردید که تحریک ایمنی خوبی در خرگوش‌های واکنش‌های ایجاد می‌کند، به طوری که در اثر مواجهه گروه‌های واکنش و شاهد با سویه حاد سالمونلا تیفی موریوم هیچ‌گونه تلفات یا عارضه‌ای در خرگوش‌های واکنش مشاهده نگردید ولی چهار سر از پنج سر خرگوش غیرواکنش (شاهد) در عرض

7. Gilman, R.H., Hornick, R.B., Woodward, W.E., Dupont, H.L., Snyder, M.J., Levine, M.M. and Libonati, J.P. (1977): Evaluation of UDP-Glucose -4- Epimeraseless mutant of *S. typhi* as a live oral vaccine. *The J. of Infec. Dis.* 136: 6, 717-722.
8. Kostromitinov, N.A., Domsikii, I.A. and Boyarintsev, L.E. (1989): Polyvalent, inactivated, aluminium hydroxid vaccine against salmonellosis in farm animals. *Byulleten' - Vsesoyuznogo - Ordena - Lenina - Nauchno - Issledovalel' Skogo, Intilula, Vet.* 71: 66-72, Abs.
9. Onyekaba, C. (1985): *Salmonella ochiogu*: Experimental infection of laboratory rabbits (*orytolagus cuniculus*). *Laboratory Animals.* 19: 32-34.
10. Popoff, M.J. (1996): Supplement 1997 (No. 41) to the Kauffmann-White scheme. *Res. in Microbiology.* 149: 601-604.
11. Ruger, R. and Raddei, J. (1981): Comparison of the efficacy of five different inactivated vaccines against Salmonellosis of pigeon. 88: 511-514.
12. Tadjebakhche, H., Nadalian, M. and Hosseinioun, M. (1974): Infection experimentale par *Salmonella abortus ovis de brebis* vacciness et nonvacciness. *Res. Med. Vet.* 125(3): 387-395.
13. Tadjebakhche, H. and Touway, G. (1979): Evaluation des anticorps chez des brebis immunises contre *Salmonella abortus ovis* par different vaccine tues. *Rev. Med. Vet.* 130(2): 1632-1638.

Experimental evaluation of salmonella typhimurium killed vaccines

Zahraei Salehi, T.¹

¹Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran - Iran.

Salmonella infections in human and animals is one of the most important disease around the world. In the genus of *Salmonella*, *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Typhimurium has special situation, because of it's broad host range and wide geographical distribution. In present study all attempt was done to develop a potent effective vaccine against Salmonellosis. So the immunogenicity effects of heated (70C, 30 min) and formalized (0.1%) vaccine of *S. typhimurium* were evaluated in rabbits. Two groups of rabbits (groups F&H) were vaccinated with inactivated vaccines several times via s.c and im. In the different period steps between of vaccination times, the immune response were assayed by agglutination (Widal test) test. The results indicated that the inactivated vaccines induced a highly level of antibodies and also protective.

Key words : Vaccine, *Salmonella typhimurium*, Salmonellosis, Agglutination.

