ارزیابی ایمنی زایی سروتیپ های بومی *کلی باسیل* جدا شده از طیور درایران

دکتر تقی زهرایی صالحی[1]* دکتر ذوالفقار رجبی[2] دکتر مهرداد مدیر صانعی[3] دکتر سعید بکائی[4]

دریافت مقاله: ۲۲ مهر ماه ۱۳۸۰
پذیرش نهایی: ۲۴ اسفند ماه ۱۳۸۲

هدف: ارزیابی ایمنی زایی واکسنهای غیر فعال تهیه شده از چندین سروتیپ *کلی باسیل* جداشده از طیور درایران.

طرح: میدانی و آزمایشگاهی.

حیوانات: سیصد و شصت قطعه جوجه خروس گوشتی از نژاد آرین.

روش: دراین مطالعه از سروتیپ های بومی غالب و حاد (شامل سروتیپ های $O_{119}: B_{14}$ و $O_{124}: K_{82}$، $O_2: K_1$، $O_{128}: K_{67}$، $O_{78}: K_{80}$) *اشریشیا کلی* که در مرحله اول تحقیق جدا شده بودند، به سه روش حرارت دادن، استفاده از فرمالین و اولتراسونیکاسیون، سه نوع واکسن منووالان و یک نوع واکسن پلی والان تهیه گردید. همچنین به این واکسنها $ALK(SO4)_2.12H_2O$ و KOH به عنوان ماده کمکی اضافه شد. جهت ارزیابی ایمنی زایی واکسنها، تعداد ۳۶۰ قطعه جوجه خروس گوشتی یکروزه از نژاد آرین انتخاب و به صورت کاملاً تصادفی به چهار گروه درمانی و یک گروه شاهد تقسیم شدند. به چهار گروه آزمایشی، درسه مقطع سنی دوهفتگی (به روش زیر جلدی)، سه و چهار هفتگی (به روش عضلانی) به میزان ۰/۵ میلی لیتر یکی از چهار نوع واکسن تهیه شده تزریق گردید. در سن ۳۸ روزگی قبل از چالش، به منظور انجام آزمایشهای سرم شناسی از ورید بالی تعدادی از جوجه های هر پنج گروه خونگیری شد و سپس به میزان ۰/۵ میلی لیتر (واجد $۱/۵ \times ۱۰^۹$ جرم) از سویه های حاد $O_{128}:K_{67}$، $O_{78}:K_{80}$ و $O_2:K_1$ به گروههای مربوطه تزریق شد. در طی دوره مطالعه میزان غذای مصرفی، وزن جوجه ها و همین طور تعداد تلفات نیز ثبت گردید.

تجزیه تحلیل آماری: آنالیز واریانس و آزمون شف.

نتایج: بعداز چالش بیش از ۹۵ درصد جوجه های متعلق به گروه شاهد دراثر تزریق سروتیپ حاد مبتلا به کلی باسیلوز شده و بیش از ۷۰ در صد آنها در اثر این بیماری تلف شدند درحالی که میزان تلفات در گروههای واکسینه شده حدود ۳/۷ درصد بود. در گروههای واکسینه شده حدود ۹۷ درصد جوجه ها به رشد طبیعی خود ادامه دادند و بعد از چالش نیز مشکل خاصی در آنها دیده نشد.

نتیجه گیری: بر اساس نتایج به دست آمده در این تحقیق هر چهار نوع واکسن تهیه شده از سروتیپ های بومی ایمنی زا هستند و محافظت خوبی در برابر سویه حاد ایجاد می کنند. ولی ایمنی متقاطع بین سروتیپ های غیر مشابه کم است. همچنین مشخص شد که واکسیناسیون با واکسن های *کلی باسیل* تهیه شده در این تحقیق تأثیر زیان آوری بر روند رشد جوجه ها و کیفیت گوشت آنها ندارد به طوری که هیچ ضایعه ای در محل تزریق مشاهده نشد. لذا برای پیشگیری و کنترل بهتر کلی باسیلوز علاوه برتوجه به روشهای مدیریتی و کنترل بیماریهای تنفسی، از روش واکسیناسیون نیز می توان در طیور استفاده نمود. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، (۱۳۸۳)، دوره ۵۹، شماره ۲، ۱۹۵-۱۸۹.

واژه های کلیدی: کلی باسیلوز، طیور، واکسن، *اشریشیا کلی*.

۱) گروه آموزشی میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
۲) گروه آموزشی علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
۳) گروه آموزشی بهداشت و تغذیه دام و طیور دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
۴) گروه آموزشی بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
*) نویسنده مسؤول tzahraei2000@yahoo.com

Evaluation of the immunogenecity of endemic *Escherichia coli* serotypes isolated from poultry in Iran

Zahraei Salehi,T.,[1] Rajabi,Z.,[2] Modire Sanei, M.,[3] Bokaie, S.[4]

[1]Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran - Iran. [2]Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran - Iran. [3]Department of Animal and Poultry Health and Nutrition, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran - Iran. [4]Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.

Objective: Evaluation of the efficacy of inactivated monovalent and polyvalent vaccines prepared from *E. coli* serotypes in poultry in Iran.

Design: Randomized completely Design.

Animals: Three hundred sixty Arian broiler chicks.

Procedure: In this study monovalent vaccines $O78:K80$ and polyvalent vaccine were prepared, using native and virulent *E.coli* serotypes of $O78:K80$, $O128:K67$, $O2:K1$, $O124:K82$, $O119:B14$ and appropriate adjuvant ALK $(SO4)2.12H2O$ and KOH. Three hundred sixty day old broiler chicks were randomly divided into four treatment and one control groups. Birds in each group were injected with 0.5 ml (1.5×10^9) of one of four prepared vaccines by subcutaneous administration in second week and intramuscular administration in third and fourth weeks of age. Before challenge serum antibody titers were measured by the tube and slide agglutination test. Ten days after the last vaccination chicks were challenged with virulent strain of $O78:K80$, $O2:K1$ and $O128:K67$ *E. coli* serotypes.

Statistical analysis: Analysis of variance and Scheffe's test.

Results: More than 95 percent of chickens in control group showed colibacillosis and 70% of them were died after challenge with $O78:K80$, while in vaccinated groups just 3.7 % mortality was observed. Live and dead challenged chicks of control group had typical lesions of colibacillosis. No adverse effects were noted on growth rate that were vaccinated with monovalent vaccines.

Conclusion: The results of this study revealed that inactivated monovalent and polyvalent vaccines prepared from endemic *E. coli* serotypes are immunogenic and protective in broiler chicks against virulent *E. coli*. No cross protection was shown among heterologous serotypes. The vaccines do not have any effects on growth rate or carcasse quality in vaccinated chicks. Thus we suggest using the endemic *E. coli* vaccine to protect broiler chicks against colibacillosis. ***J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran. 59, 2: 189-195, 2004.***

Key words: Colibacillosis, Poultry, Vaccine, *Escherichia coli*.

Corresponding author email:tzahraei2000@yahoo.com

کلی باسیلوز یکی از مهمترین بیماریهای باکتریایی است که صنعت طیور درتمام دنیا درگیر آن می باشد. کلی باسیلوز طیور به دنبال عدم رعایت اصول بهداشتی و استانداردهای مدیریتی و برخورد جوجه ها با بیماریهای تنفسی اتفاق می افتد، ولی روش مناسب و کاملی برای کنترل بیماریهای تنفسی وجود ندارد. کنترل کلی باسیلوز معمولاً از طریق تجویز آنتی بیوتیک ها صورت می گیرد که علاوه بر تحمیل هزینه های سنگین به تولید کنندگان، باعث افزایش مقاومت میکروبی نیز می گردد، لذا پیشگیری از کلی باسیلوز با واکسیناسیون مورد توجه محققین بوده است که دراین مورد در طیور واکسن های مختلفی تهیه و مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفته است. Deb و Harry درسال ۱۹۷۶ تأثیر پنج نوع واکسن کشته تهیه شده از سروتیپ $O_{78}:K_{80}$ رادر جوجه های گوشتی مورد مطالعه قرار دادند و نتیجه گرفتند واکسن کشته محتوی ماده کمکی نسبت به واکسن های کشته که فاقد ماده کمکی هستند موثرتر می باشد. Melamed و همکاران در سال ۱۹۹۱ واکسن غیر فعال سونیکه شده را با واکسن های حرارت دیده، فرمالینه و اشعه دیده مقایسه نمودند. دراین تحقیق علاوه بر سروتیپ $O_{78}:K_{80}$ از سروتیپ $O_2:K_1$ نیز استفاده شده بود. نامبردگان در نهایت نتیجه گیری نمودند که واکسن سونیکه تهیه شده از سروتیپ $O_2:K_1$ علیه سروتیپ های همولوگ و هترولوک به مدت ۱۵ روز ایمنی خوبی ایجاد می کند (۱۰). Kwaga و همکاران درسال ۱۹۹۴ با جهش ژنی گروه سرمی O_2 واکسن تخفیف حدت یافته را تهیه کردند و در چهار هفتگی از راه دهان در بوقلمون استفاده نمودند و نشان دادند که این واکسن در مواجهه داخل نایی با سروتیپ وحشی محافظت خوبی ایجاد می کند (۹). پیغمبری و همکاران در سال ۱۳۷۷ با موتاسیون مضاعف دو سویه بیماریزای *کلی باسیل* آنها را تخفیف حدت دادند و نتیجه گرفتند که جهشهای مضاعف باعث کاهش حدت باکتری و عدم بازگشت آن به حالت اولیه می شود که ممکن است به عنوان واکسن تخفیف حدت یافته در پیشگیری از کلی باسیلوز طیور مفید باشد (۱۱). به طور کلی واکسن های مختلفی از باکتری *کلی باسیل* تهیه شده که آنها را می توان در سه گروه واکسن های کشته، واکسن های زنده تخفیف حدت یافته و واکسن های تحت واحدی تقسیم نمود که هر کدام مزایا و معایب خاص خود را دارا می باشند (۳). ولی باید توجه داشت که در هر منطقه و کشوری سروتیپ و یا سروتیپ های بیماریزای *کلی باسیل* می توانند متفاوت باشند. از این رو بهتر است که در هر منطقه ابتدا سروتیپ یا سروتیپ های غالب بیماریزا مشخص گردد.

بر اساس مطالعات انجام شده درایران توسط بزرگمهری در سال ۱۳۵۷ و زهرایی در سال ۱۳۸۰ چند سروتیپ بیماریزا از جمله سروتیپ های $O_{78}:K_{80}$، $O_{128}:K_{67}$، $O_2:K_1$ و $O_{124}:K_{82}$ از طیور مبتلا به کلی باسیلوز جدا شده است که در آخرین مطالعه نیز سروتیپ $O_{78}:K_{80}$ سروتیپ غالب بوده است (۱،۲). از اینرو در این مطالعه ایمنی زایی چندین سروتیپ *کلی باسیل* جدا شده از طیور در ایران بویژه سروتیپ $O_{78}:K_{80}$ در جوجه های گوشتی مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش کار

سروتیپ های مورد استفاده: برای تهیه واکسن و همچنین مواجهه از پنج سروتیپ *اشریشیا کلی* ($O_{78}:K_{80}$، $O_{128}:K_{67}$، $O_2:K_1$، $O_{124}:K_{82}$، $O_{119}:B_{14}$) که در مرحله اول این طرح توسط زهرایی از طیور مبتلا به کلی باسیلوز جدا شده بود و در گنجینه میکروبی گروه میکروب شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران نگهداری می گردید استفاده شد (۲).

تهیه سوسپانسیون از سروتیپ های مورد نظر: سروتیپ های مورد استفاده ازنظر خشن یا صاف بودن مورد آزمایش قرار گرفتند و سویه های صاف سروتیپ ها انتخاب شدند. این سروتیپ ها با آنتی سرم اختصاصی (Mast Group Ltd., Merseyside,UK) به صورت متقاطع به روش آگلوتیناسیون سریع روی لام آزمایش شدند تا از خالص بودن سروتیپ ها اطمینان حاصل شود. سروتیپ های مورد استفاده در این تحقیق به پنج جوجه ۲۴ روزه تزریق شدند تا اگر احیاناً تغییراتی در اثر پاساژ در محیط های کشت در آنها ایجاد شده باشد به حالت قبلی و وحشی درآیند که برای این کار تزریق به صورت عضلانی صورت گرفت و همان سروتیپ ها (با آزمایش آگلوتیناسیون تأیید شد) ازخون قلب جوجه ها جدا شدند و مورد استفاده قرار گرفتند. هرکدام از سروتیپ ها جداگانه درمحیط ژلوز برین هارت کشت داده شدند، بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، محیط های کشت مربوط به هر سروتیپ با سرم فیزیولوژی استریل شستشو داده شد و درداخل شیشه الکل استریل ریخته شد. سپس جهت تهیه تعلیق و استاندارد کردن (تقریباً ۳×۱۰^{۹} جرم در هر میلی لیتر) سوسپانسیون متعلق به هر سروتیپ از روش معیار نفلومتری مک فارلند استفاده شد (۵).

طرز تهیه و مقدار ماده کمکی اضافه شده به واکسن ها: برای آدجوان از دو ماده دی هیدروکسید سولفات پتاسیم- آلومینیوم ۱۰ درصد و هیدروکسید پتاسیم ۷/۴ درصد استفاده شد. دراولین واکسیناسیون از محلول پتاسیم آلومینیوم ۱۰ درصد به هر چهار نوع واکسن تهیه شده به نسبت یکی میلی لیتر به صد میلی لیتر و از محلول هیدروکسید پتاسیم ۷/۴ درصد به نسبت نیم میلی لیتر به صد میلی لیتر واکسن اضافه شد (۶). ولی برای واکسیناسیون های بعدی میزان ماده کمکی اضافه شده به واکسن ها دو برابر گردید.

طرز تهیه واکسن ها:

الف - واکسن منووالان فرمالینه: برای تهیه واکسن، حجم مشخصی از سوسپانسیون سروتیپ $O_{78}:K_{80}$/*اشریشیا کلی* را برداشته و فرمالین تجارتی (۴۰ درصد) به میزان ۰/۳ درصد به آن اضافه شد ، سپس به آن ماده کمکی اضافه گردید (۶،۱۰).

ب - واکسن پلی والان فرمالینه: به حجم مساوی از تعلیق سوسپانسیون هر سروتیپ (شامل سروتیپ های $O_{78}:K_{80}$، $O_{128}:K_{67}$، $O_2:K_1$، $O_{124}:K_{82}$، $O_{119}:B_{14}$) داخل ظرف مناسب استریل ریخته و به میزان ۰/۳ درصد فرمالین تجارتی به آن اضافه شد. سپس ماده کمکی به آن اضافه گردید (۶،۱۰).

ج - واکسن منووالان حرارت دیده: از سوسپانسیون تهیه شده از سروتیپ

$O_{78}:K_{80}$ به حجم مورد نظر داخل ظرف مناسب استریل ریخته و در بن ماری با حرارت ۷۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد، سپس به آن ماده کمکی به میزان ذکر شده در بالا اضافه گردید (۶).

د - واکسن منووالان اولتراسونیکه: برای تهیه واکسن با این روش ازسوسپانسیون سروتیپ $O_{78}:K_{80}$، ۲۰ میلی لیتر داخل لوله مخصوص دستگاه اولتراسونیکاتور(Soniprep, Sanyo Electrical Instruments) ریخته، بعد لوله را داخل بشری که با خرده های یخ پرشده بود گذاشته و با دامنه ۱۶ میکرون به مدت ۳۰ دقیقه متناوب سوسپانسیون تحت تأثیر امواج ماورای صوت قرار گرفت (۱۰).

از واکسن های تهیه شده روی محیط مک کانکی و ژلوز خون کشت داده شد تا از کشته شدن باکتری ها و استریل بودن واکسن ها اطمینان حاصل شود سپس واکسن ها روی شیکر داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۵-۴ ساعت گذاشته شد تا ماده کمکی به پادگن های موجود در تعلیق بهتر و بیشتر متصل و جذب شود.

آزمایش برروی جوجه ها: برای انجام این مطالعه تعداد ۳۶۰ قطعه جوجه خروس یکروزه از نژاد آرین به طور کاملاً تصادفی به پنج گروه مساوی تقسیم گردیدند به طوری که هر گروه مشتمل بر سه زیر گروه (تکرار) و هر تکرار شامل ۲۴ قطعه جوجه بود. هریک از جوجه ها درروز اول با نصب شماره بال برروی آنها مشخص گردیدند. برای نگهداری جوجه ها از روز اول تا پایان سن ۲۱ روزگی از قفسهای مخصوص نگهداری جوجه موسوم به باتری (Battry) و از سن ۴۹-۲۲ روزگی از قفسهای مخصوص پرورش نیمچه استفاده شد. تمام جوجه ها در فاصله سنین ۲۱ -۰ و ۴۹-۲۲ روزگی به ترتیب با جیره های غذایی آغازی و پایانی که دارای مواد اولیه و ترکیب شیمیایی یکسان و فاقد هر گونه آنتی بیوتیک محرک رشد و داروی ضدکوکسیدی بودند، تغذیه گردیدند. طول مدت آزمایش ۵۱ روز بود و درطی این مدت جوجه ها با واکسن های معمول مورد استفاده در مرغداریها و با توجه به منطقه پرورش واکسینه می شدند. از میان پنج گروه، یک گروه (گروه اول) به عنوان شاهد در نظر گرفته شد و هیچ واکسنی علیه بیماری کلی باسیلوز به جوجه های این گروه تجویز نگردید. برای واکسیناسیون جوجه های چهارگروه دیگر علیه بیماری کلی باسیلوز به ترتیب از واکسن های زیر استفاده گردید:

گروه دوم: واکسن حرارت دیده سروتیپ $O_{78}:K_{80}$، **گروه سوم**: واکسن فرمالینه سروتیپ $O_{78}:K_{80}$، **گروه چهارم**: واکسن اولتراسونیکه سروتیپ $O_{78}:K_{80}$، **گروه پنجم**: واکسن فرمالینه پلی والان حاوی پنج سروتیپ $O_{78}:K_{80}$، $O_{128}:K_{67}$، $O_2:K_1$، $O_{124}:K_{82}$ و $O_{119}:B_{14}$.

واکسیناسیون علیه کلی باسیلوز در گروههای واکسینه شده در سه مقطع سنی، دو هفتگی (به صورت زیر جلدی)، سه و چهار هفتگی (به صورت عضلانی) انجام گردید. مقدار واکسن تزریق شده درهریک از سه مرحله، معادل ۰/۵ میلی لیتر (واجد $۱۰^۹ \times ۱/۵$ جرم) بود.

روش تهیه پادگنO: سروتیپ های $O_{78}:K_{80}$، $O_{128}:K_{67}$، $O_2:K_1$، $O_{124}:K_{82}$ و $O_{119}:B_{14}$ از نوع صاف باکتری *اشریشیاکلی* هریک به طور جداگانه در داخل محیط آبگوشت مغذی کشت و به مدت ۲۱ ساعت داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شدند، سپس محیط دارای باکتری به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ سانتریفوژ گردید و پس از جدا نمودن مایع موجود در قسمت سطحی، باکتری رسوب یافته با سرم فیزیولوژی استریل به صورت محلول درآمد. درمرحله بعد با اضافه نمودن سرم فیزیولوژی استریل، سوسپانسیون باکتری (هر سروتیپ به طور جداگانه) با کمک لوله های مک فارلند استاندارد گردید و سپس به مدت یکساعت در بن ماری ۱۰۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد (۶).

آزمایش سرولوژی: قبل از مواجه کردن جوجه ها با باکتری *اشریشیاکلی* از هر گروه ۹ قطعه جوجه به صورت تصادفی انتخاب و از ورید بالی برای آزمایش سرولوژی خونگیری شد. آزمایش به دو روش انجام شد (۶،۱۰):

الف - آزمایش آگلوتیناسیون سریع، **ب**- آزمایش آگلوتیناسیون کند درداخل لوله.

چالش جوجه ها با سویه حاد: درسن ۳۸ روزگی تعلیق استاندارد(۳×۱۰^۹ باکتری درهر میلی لیتر) *اشریشیاکلی* درمحیط آبگوشت مغذی تهیه و به میزان ۰/۵ میلی لیتر به عضله سمت چپ سینه تزریق شد. به تمام گروهها از جمله گروه شاهد، به استثنا دو تکرار گروه پنجم (واکسینه با واکسن پلی والان) سروتیپ زنده $O_{78}:K_{80}$ تزریق شد. به جوجه های تکرار اول گروه پنجم سروتیپ $O_2:K_1$، و به تکرار دوم آن سروتیپ $O_{128}:K_{67}$ تزریق شد. بعد از چالش در صورتی که جوجه ای تلف می شد وزن آن یاد داشت، سپس برای کالبدگشایی و نمونه برداری جهت کشت به آزمایشگاه میکروب شناسی منتقل می گردید. با توجه به محل تزریق واکسن تمام ضایعات و علائم ثبت و جهت کشت از کبد و خون قلب، نمونه برداری شد. برای کشت مستقیم از محیط های آب پپتونه (مرک) و مک کانکی (مرک) و برای شناسایی باکتری از محیط TSI (مرک) و آنتی سرم اختصاصی هر سروتیپ مربوط به شرکت Mast استفاده شد. درنهایت در ۵۱ روزگی ۸ قطعه جوجه از گروههای واکسینه شده و شاهد انتخاب تا از نظر کمیت و کیفیت ظاهری و گوشت مورد بررسی و مقایسه قرار گیرند. از جوجه ها در ۴۹ روزگی جهت آزمایش سرولوژی خونگیری شد. نتایج با روش آنالیز واریانس یکطرفه و روش تکمیلی Scheffe مورد ارزیابی قرار گرفت.

توزین جوجه ها: جوجه ها در گروههای آزمایش و شاهد در ۱۴ روزگی (قبل از واکسیناسیون)، ۲۱ روزگی، ۴۲ روزگی و ۴۹ روزگی وزن کشی شدند.

میزان غذای مصرفی جوجه ها: میزان غذای مصرفی جوجه های گروههای آزمایشی و شاهد در طی مطالعه توزین و محاسبه گردید. همچنین ضریب تبدیل غذایی در گروههای مختلف طبق روش متداول محاسبه شد.

نتایج

تلفات: جدول ۱ میزان تلفات جوجه های مورد مطالعه را برحسب گروه و سن نشان می دهد. میانگین درصد تلفات در گروههای مختلف از ۱۴ روزگی

جدول ۱- میانگین درصد تلفات گروههای تحت آزمایش و شاهد برحسب گروه و سن.

سن (روز) / گروه	۱۴-۲۱	۱۴-۳۸	۱۴-۴۳	۱۴-۴۹
شاهد (غیرواکسینه)	۱/۴	۱/۴	۵۷/۱a	۶۳/۷a
واکسن حرارت دیده $O_{78}:K_{80}$	* .	* .	۲/۸b	۲/۸b
واکسن فرمالینه $O_{78}:K_{80}$	۱/۴	۲/۸	۴/۲b	۴/۲b
واکسن سونیکه $O_{78}:K_{80}$	* .	* .	۱/۴b	۱/۴b
واکسن پلی والان فرمالینه	* .	* .	۶/۹۳b	۶/۹۳b
P Value	۰/۵۸	۰/۱۷	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱

هر گروه مشتمل بر سه زیر گروه (تکرار) و هر تکرار شامل ۲۴ قطعه جوجه بود. واکسیناسیون علیه کلی باسیلوز در گروههای واکسینه شده در سه مقطع سنی، دو (به صورت زیر جلدی)، سه و چهار هفتگی (به صورت عضلانی) انجام گردید.

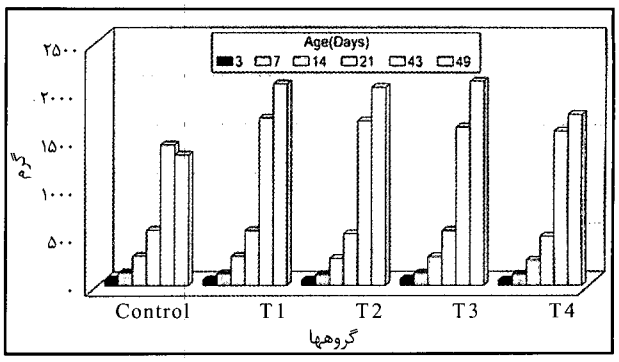
*) نشان دهنده عدم وجود تلفات است. -) در هر ستون اعدادی که با حروف غیرمشترک نشان داده شده اند، دارای اختلاف آماری معنی دار می باشند.

(شروع واکسیناسیون) تا ۲۱ روزگی شامل ۱/۴ درصد در گروه شاهد و ۱/۴ درصد در گروه واکسینه شده با واکسن فرمالینه بود. درسه گروه دیگر تلفاتی مشاهده نگردید. از نظر آماری اختلاف معنی داری بین میزان تلفات درگروههای مختلف در این مرحله وجود نداشت ($P = ۰/۵۸$). تا پایان ۳۸ روزگی، میزان تلفات در دو گروه شاهد و واکسینه شده با واکسن فرمالینه به ترتیب ۱/۴ درصد و ۲/۸ درصد بود درحالی که درسایر گروهها آزمایشی، تلفاتی دیده نشد. در این مرحله نیز که قبل از چالش با سویه حاد می باشد اختلاف بین میزان تلفات در گروههای مختلف معنی دار نبود ($P= ۰/۱۷$). تا سن ۴۳ روزگی و همچنین در پایان آزمایش (سن ۴۹ روزگی) بیشترین و کمترین میزان تلفات به ترتیب به گروه شاهد و گروه واکسینه شده با واکسن اولتراسونیکه اختصاص داشت. بین میزان تلفات (پس از چالش) در گروه شاهد با سایر گروهها اختلاف بسیار معنی داری مشاهده گردید ($P= ۰/۰۰۰۱$).

علائم بالینی: درگروه شاهد (غیرواکسینه)، ۹۵ درصد جوجه ها بعد از چالش به کلی باسیلوز مبتلا و تعداد زیادی از آنها تلف شدند (قریب ۷۰ درصد تا ۵۱ روزگی) (جدول ۱). اکثر جوجه ها بدون حرکت در گوشه قفس با چشمان بسته و حالت کز کرده ایستاده بودند. سایر نشانه های بالینی شامل بی اشتهایی، پرهای ژولیده و اسهال موکوئیدی سبز رنگ بود. نشانه های نفس نفس زدن و لنگش در برخی از جوجه ها مشاهده گردید. در تعدادی از جوجه های مبتلا به لنگش، مفصل خرگوشی متورم بود. جوجه های زنده مانده درمقایسه با گروههای واکسینه شده جثه کوچکتر و وزن کمتری داشتند. بعد از چالش همه گروهها به استثنا دو زیر گروه واکسینه شده با واکسن پلی والان به مدت ۱۲ ساعت کسل بودند و بعد از طی این مدت اکثر گروههای واکسینه شده، شروع به مصرف آب و غذا کردند. جوجه های بیمار متعلق به گروه واکسینه شده باواکسن پلی والان همچنان کسل و مبتلا به اسهال موکوئیدی بودند. این نشانه ها بیشتر در جوجه هایی که سروتیپ $O_2:K_1$ به آنها تلقیح شده بود مشاهده گردید. بعد از چالش درگروه واکسینه شده با واکسن پلی والان ۷۰ درصد جوجه های مبتلا به کلی باسیلوز شدند. جوجه های مبتلا متعلق به زیر گروههایی بودند که سروتیپ زنده $O_{78}:K_{80}$ و $O_2:K_1$ به آنها تلقیح شده بود. درکشت باکتریایی ازخون قلب و کبد، سروتیپ تزریق شده *کلی باسیل* جداشد. ابتلا به کلی باسیلوز در جوجه های زیر گروهی که سروتیپ $O_{128}:K_{67}$ به آنها تزریق شده بود در مقایسه با دو زیر گروه دیگر کمتر بود.

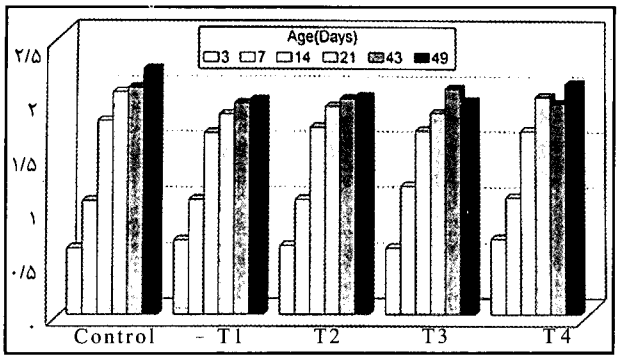
علائم کالبدگشایی: در کالبد گشایی، در جوجه هایی که بعد از مدت کوتاهی پس از چالش تلف شده بودند، درمحل تزریق تورم و مقداری فیبرین زرد رنگ وجود داشت. عضلات، کبد، طحال، عروق زیر جلدی و عروق سطوح بافتهای سروزی و چربی و کلیه ها کاملاً پرخون بودند. درجوجه هایی که دراوایل چالش تلف شده بودند، نشانه های سپتی سمی مشاهده گردید. شدت ضایعات در گروه واکسینه شده با واکسن پلی والان، ملایمتر از گروه شاهد بود. جوجه هایی که چند روز پس از چالش تلف شدند، نشانه های مشخص کلی باسیلوز، شامل پری کاردیت، پری هپاتیت، تورم کیسه های هوایی، تورم صفاق همراه با مواد کازئوز را نشان دادند. پوست لاشه ها به سختی جدا می شد و در محل تزریق باکتری زنده، لایه های فیبرینی زردرنگ بین عضلات وجود داشت. مفاصل خرگوشی متورم و حاوی لایه های فیبرینی بودند که با نمونه برداری و کشت از آنها سروتیپ $O_{78}:K_{80}$ (سروتیپ تزریق شده) *کلی باسیل* جدا شد.

اثر واکسن بر کیفیت لاشه در گروههای مختلف واکسینه: با بررسی ظاهری محلهای تزریق واکسن قبل و بعد از چالش جوجه ها با باکتری زنده هیچ گونه آثار جراحت یا آثار غیر عادی برروی لاشه مشاهده نشد. حتی درجوجه هایی که قبل از چالش تلف شده بودند، علاوه بر اینکه از کشت اندامهای آنها هیچ گونه باکتریی جدا نشد، عضله محل تزریق واکسن نیز کاملاً طبیعی بود. همچنین در محل تزریق واکسن کلی باسیلوز به روش



نمودار ۱- میانگین وزن جوجه های گوشتی نژاد آرین برحسب سن و گروه تحت آزمایش قبل و بعد از واکسیناسیون و مواجهه با سویه حاد.

T1) گروه واکسینه شده با واکسن حرارت دیده ،T2) گروه واکسینه شده با واکسن فرمالینه،T3) گروه واکسینه شده با واکسن سونیکه،T4) گروه واکسینه شده با واکسن پلی والان فرمالینه.



نمودار ۲- ضریب تبدیل غذایی جوجه های گوشتی نژاد آرین برحسب سن و گروه تحت آزمایش قبل و بعد از به کاربردن واکسیناسیون علیه کلی باسیلوز.

T1) گروه واکسینه شده با واکسن حرارت دیده ،T2) گروه واکسینه شده با واکسن فرمالینه،T3) گروه واکسینه شده با واکسن سونیکه،T4) گروه واکسینه شده با واکسن پلی والان فرمالینه.

زیر جلدی (مرحله اول واکسیناسیون) نیز نشانه های غیر طبیعی مشاهده نگردید.

آزمایش سرولوژی: درآزمایش آگلوتیناسیون سریع، سرم های گروه های واکسینه شده (قبل و بعد از چالش) به طور یکسان و درمدت کمتر از یک دقیقه در مجاورت پادگن O *کلی باسیل* آگلوتینه شدند، درحالی که نمونه های سرم خون مربوط به گروه غیر واکسینه (قبل از چالش) دراین مدت آگلوتینه نشدند و آزمایش منفی بود ولی بعد از چالش مثبت شد. در آزمایش آگلوتیناسیون در داخل لوله، سرم گروه های واکسینه شده (قبل از چالش) با رقت ۱:۴۰ درمجاورت پادگنO آگلوتینه شدند. آزمایش آگلوتیناسیون درلوله در مورد سرمهای گروه شاهد منفی بود.

میانگین وزن بدن: در ۱۴ روزگی و ۲۱ روزگی بیشترین وزن جوجه ها متعلق به گروه شاهد و کمترین آن متعلق به گروه واکسینه شده با واکسن پلی والان بود. از نظر آماری اختلاف معنی داری بین میزان وزن جوجه ها در گروه شاهد با گروههای واکسینه شده با واکسن های منووالان وجود نداشت. در۴۳ روزگی، بیشترین وزن متعلق به گروه واکسینه شده با واکسن حرارت دیده و کمترین آن متعلق به گروه شاهد (واکسینه نشده) بود. از نظر آماری اختلاف معنی داری بین گروههای واکسینه شده و گروه شاهد مشاهده نگردید (P=۰/۷۸).

در۴۹ روزگی، بیشترین میانگین وزن جوجه ها به گروه واکسینه شده با واکسن سونیکه و کمترین میانگین وزن بدن به گروه شاهد اختصاص داشت. از نظر آماری اختلاف میانگین وزن بین گروه شاهد و گروههای واکسینه شده به استثنای گروه واکسینه شده با واکسن پلی والان معنی دار بود (P=۰/۰۰۶)، درحالی که اختلاف بین گروههای واکسینه معنی دار نبود (نمودار۱).

میزان غذای مصرفی و ضریب تبدیل غذایی: تا سن ۲۱روزگی بیشترین و کمترین مقدار غذای مصرفی به ترتیب به گروه شاهد (واکسینه نشده) و گروه واکسینه شده با واکسن پلی والان اختصاص داشت واختلاف بین این دوگروه، معنی دار بود (P=۰/۰۲). درحالی که بین میزان مصرف غذا در این دو گروه با سایر گروههای آزمایشی و همچنین بین سه گروه دیگر با هم تفاوت معنی داری مشاهده گردید(P=۰/۰۵). بیشترین و کمترین میانگین غذای مصرفی تا سن ۴۳ روزگی (پنج روز پس از مواجهه با سویه حاد) به ترتیب مربوط به دو گروه واکسینه شده با واکسن سونیکه و شاهد (واکسینه نشده) بود و اختلاف بین گروههای مختلف بسیار معنی دار بود (P=۰/۰۰۳). به طوری که بین میزان مصرف غذا در گروه شاهد با سه گروه واکسینه شده با واکسن های حرارت دیده، فرمالینه و سونیکه تفاوت بسیار معنی داری مشاهده گردید ولی بین گروه شاهد و گروه واکسینه شده با واکسن پلی والان، اختلاف معنی داری وجود نداشت. در سن ۴۹ روزگی، بیشترین مقدار غذای مصرفی به گروه واکسینه شده با واکسن فرمالینه و کمترین میزان مصرف غذا به گروه واکسینه شده با واکسن پلی والان اختصاص داشت. اختلاف بین مقدار غذای خورده شده به وسیله جوجه های گروه شاهد با گروههای واکسینه شده، بسیار معنی دار بود (P=۰/۰۰۱). درحالی که بین گروههای واکسینه شده با یکدیگر، تفاوت معنی داری مشاهده نگردید. در۲۱ روزگی کمترین ضریب تبدیل غذایی (بهترین بازده غذا) و بیشترین ضریب تبدیل غذایی (ضعیف ترین بازده غذا) به ترتیب به گروه واکسینه شده با واکسن حرارت دیده و گروه شاهد (واکسینه نشده) اختصاص داشت. ازنظر آماری بین گروههای مختلف واکسینه شده و گروه شاهد (واکسینه نشده) اختلاف معنی دار نبود(P=۰/۳۱). در۴۳روزگی کمترین و بیشترین ضریب تبدیل غذایی به ترتیب مربوط به گروه واکسینه شده با واکسن حرارت دیده و گروه شاهد (واکسینه نشده) بود. ازنظر آماری اختلاف بین ضریب تبدیل غذایی گروههای واکسینه شده وگروه شاهد معنی دار نبود (P=۰/۸۸). در ۴۹ روزگی کمترین و بیشترین ضریب تبدیل غذایی به ترتیب مربوط به گروه واکسینه شده با واکسن سونیکه و گروه شاهد (واکسینه نشده) بود، درحالی که بین گروههای واکسینه و گروه شاهد اختلاف معنی دار نبود (P=۰/۵۲) (نمودار ۲).

بحث

برای پیشگیری از کلی باسیلوز در طیور و همچنین دامها واکسن های مختلفی تهیه شده است که از آن جمله می توان به واکسن سه گانه حاوی سویه K_{99} *کلی باسیل*، *روتاویروس* و *کرونا ویروس* اشاره نمود که در حال حاضر از خارج وارد و در برخی از گاوداریهای کشور مصرف می شود. در طیور

نیز واکسن های مختلفی تهیه و مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفته است ولی آنچه که اکثر محققان بر آن تأکید دارند این است که سویه و سروتیپ های *کلی باسیل* ممکن است از گله ای به گله دیگر و از منطقه ای به منطقه دیگر متفاوت باشند و ساختار پادگنی سروتیپ نیز نمی تواند معرف همه خواص بیماریزایی آن باشد. بدین دلایل است که استفاده از سویه بومی جهت تهیه واکسن ارزشمندتر از سویه های غیر بومی است. در همین راستا در این تحقیق ابتدا سروتیپ های بومی *کلی باسیل* در اطراف تهران جدا گردید و سپس از سروتیپ های شایع، واکسن به روشهای مختلفی تهیه و مورد استفاده قرار گرفت.

Heller و همکاران در سال ۱۹۷۶ از دو سروتیپ $O_{78}:K_{80}$ و $O_2:K_1$ واکسن سونیکه تهیه و در گله مادر در سن شش ماهگی استفاده نمودند. جوجه های حاصل از این گله تا دو هفته پس از خروج از تخم علیه کلی باسیلوز ایمن بودند به طوری که بعد از رویارویی با سویه حاد همولوگ میزان مرگ و میر و بیماری در گروه شاهد و آزمایش به ترتیب ۱۰۰-۷۰درصد و ۱۶-۰ درصد بود. ولی جوجه ها در برابر سویه هترولوگ مصونیتی نداشتند (۷،۸). Deb و Harry در سال ۱۹۷۶ تأثیر پنج نوع واکسن غیرفعال شده با حرارت، فرمالین، الکل، استن و فرمالین دارای ماده کمکی آلم را که از سروتیپ $O_{78}:K_{80}$ تهیه کرده بودند در جوجه های گوشتی مورد بررسی و ارزیابی قرار دادند. نامبردگان نیم میلی لیتر از واکسن های فوق را از طریق زیر جلدی و داخل عضلانی در دو و سه هفتگی به جوجه ها تزریق و درشش و هشت هفتگی میزان ایمنی ایجاد شده را در گروههای تحت تجربه با چالش آنها با سروتیپ های زنده مشابه و غیرمشابه ($O_{18}:K_1$) به صورت زیر جلدی، داخل عضلانی، وریدی و داخل صفاقی با گروه شاهد مقایسه نمودند. نتایج به دست آمده نشان داد که همه واکسن ها مؤثر هستند ولی واکسن جذب شده با آلم تأثیر بیشتری تا حدود ۹۰ درصد دارد (۶). Melamed و همکاران در سال ۱۹۹۱ واکسن غیر فعال سونیکه شده را با چند نوع واکسن دیگر از جمله واکسن فرمالینه و حرارت دیده مورد مقایسه و ارزیابی قرار دادند و در نهایت نتیجه گرفتند که واکسن سونیکه در برابر سویه حاد محافظت مناسبی در گروههای واکسینه ایجاد می کند (۱۰). در تحقیق حاضر نیز از واکسن های تهیه شده ازسروتیپ غالب $O_{78}:K_{80}$ که در مرحله اول این پژوهش همانند Rende و همکاران از مرغهای مبتلا به کلی باسیلوز جدا شده بود با روش حرارت دادن، افزودن فرمالین و اولترا سونیکاسیون، مطابق تحقیقات فوق به میزان نیم میلی لیتر در ۱۴ روزگی (به صورت زیر جلدی) و ۲۱ و ۲۸ روزگی (به صورت داخل عضلانی) همراه با آدجوان آلم به جوجه های گوشتی تزریق شد. علاوه بر این برای بررسی ایمنی متقاطع بین سروتیپ هایی که فراوانی بیشتری در این مطالعه داشتند واکسن پلی والان فرمالینه ای نیز از سروتیپ های $O_{78}:K_{80}$، $O_2:K_1$، $O_{128}:K_{67}$، $O_{124}:K_{82}$، $O_{119}:B_{14}$ تهیه و مورد استفاده قرارگرفت. در مواجهه گروههای مورد آزمایش و شاهد با سویه حاد، نتایج به دست آمده خیره کننده بود به طوری که در گروه شاهد بیش از ۹۵ درصد مرغها مبتلا به کلی باسیلوز شدند و بیش از ۷۰ درصد آنها تلف گردیدند و اختلاف بین گروههای آزمایش و شاهد بسیار معنی دار ($P= ۰/۰۰۰۱$) بود. از بین واکسن های استفاده شده وا کسن سونیکه ایمنی بیشتری در مقایسه با سایر واکسن ها ایجاد نمود (جدول ۱) که نتایج به دست آمده با نتایج تحقیقات Melamed و همکاران، Deb و Harry مطابقت داشت.

Kwaga و همکاران در سال ۱۹۹۴ از موتان Car AB گروه سرمی O_2 به عنوان واکسن زنده تخفیف حدت یافته در چهار هفتگی و از راه دهان در بوقلمون استفاده نمودند و نشان دادند که درمواجهه داخل نایی با سویه وحشی محافظت خوبی ایجاد می کند (۹). در تحقیق حاضر نیز روش اسپری با توجه به سهولت انجام و سایر مزایای آن مورد نظر بود ولی با توجه به اینکه ممکن بود تمامی مرغها مورد آزمایش به طور یکسان با واکسن تماس پیدا نکنند از این روش استفاده نگردید ولی در کاربرد وسیع واکسن در گله بخصوص در سنین پایین این روش و روش خوراکی بایستی مورد توجه قرار گیرد. در اکثر تحقیقات انجام شده در دنیا ازآدجوان آلم در واکسن ها استفاده شده است که در این تحقیق نیز از این ماده کمکی استفاده گردید که در بازرسی محل تزریق ضایعه قابل ملاحظه ای مشاهده نشد. همچنین تزریق واکسن ها تأثیری بر میزان مصرف غذا و همین طور افزایش وزن مرغها در گروههای تحت آزمایش بویژه گروه واکسینه شده با واکسن سونیکه حتی پس از مواجهه با سویه حاد نداشتند (نمودارهای ۱ و۲).

در کالبدگشایی و کشت از جوجه هایی که درگروههای واکسینه شده، قبل از چالش تلف شده بودند، نشانه های ابتلا به کلی باسیلوز وجود نداشت. باتوجه به اینکه هر چهار نوع واکسن مورد استفاده از نوع کشته بودند و قبل از تزریق از استریل بودن واکسن ها اطمینان حاصل می گردید و از طرف دیگر تعداد تلفات هم زیاد نبود، لذا می توان گفت که علت مرگ مربوط به تزریق واکسن ها نبوده است. بین درصد تلفات از زمان چالش تا ۴۹ روزگی در گروه شاهد (غیر واکسینه) و گروه های واکسینه شده اختلاف بسیار معنی داری وجود داشت و دراین میان بیشترین تلفات مربوط به گروه شاهد و کمترین تلفات متعلق به گروه واکسینه شده با واکسن اولتراسونیکه بود. با توجه به اینکه همه جوجه های تلف شده پس از چالش از گروه شاهد یا گروهها ی واکسینه، مبتلا به کلی باسیلوز بودند (باتوجه به نشانه های بالینی، کالبدگشایی و کشت باکتریایی) و درکشت نیز همان سروتیپ های تلقیح شده جدا شدند، این مسئله نشان می دهد که مرگ و میر جوجه ها بعد از چالش به علت تلقیح سروتیپ های بیماریزا ($O_{78}:K_{80}$ و $O_2:K_1$) بوده است. از سوی دیگر آزمایش آگلوتیناسیون در گروه شاهد قبل ازچالش منفی بود، لذا تفاوت بالای تلفات در گروه شاهد و گروههای واکسینه ناشی از عدم وجود ایمنی در جوجه های غیر واکسینه (گروه شاهد) و وجود و بروز ایمنی در جوجه های واکسینه می باشد. درمورد گروههای واکسینه شده، اگرچه اختلاف بین درصد تلفات معنی دار نبود ولی گروه واکسینه شده با واکسن پلی والان نسبت به سایر گروههای واکسینه شده از درصد تلفات بالاتری برخوردار بود. این مطلب نشان می دهد که ایمنی زایی هر سروتیپ تا حدود

زیادی اختصاصی می باشد و ایمنی متقاطع ناچیز است. لذا می توان نتیجه گرفت که واکسن های منووالان درمقایسه با واکسن پلی والان از خاصیت ایمنی زایی بیشتری در برابر سویه مشابه برخوردار می باشند که این یافته با یافته های برخی از محققان از جمله Heller و همکاران مطابقت دارد (۷،۸). از سوی دیگر در بین واکسن های منووالان، واکسن اولتراسونیکه از ایمنی زایی بیشتری برخوردار بود (۹۸/۶ ـ ۹۴ درصد) که این یافته با نتایج به دست آمده توسط محققین دیگر از جمله Melamed، Deb و Heller مطابقت دارد (۶،۷،۸،۱۰).

پایین بودن عیار پادتن های آگلوتینان درگروههای واکسینه، علی رغم محافظت و ایمنی مناسب ایجاد شده در اثر واکسیناسیون در برابر سویه حاد (با توجه به درصد تلفات، ضایعات کالبدگشایی و میزان ابتلای پس از چالش) نشانه عدم وجود تطابق کامل بین عیار پادتن های آگلوتینان با میزان ایمنی زایی واکسن ها می باشد. در همین راستا و از طرف دیگر Deb و همکاران با استفاده از واکسن غیر فعال سروتیپ $O_2:K_1$ دارای ماده کمکی نشان دادند که علی رغم بالابودن عیار پادتن تولید شده درمقابل واکسن، ایمنی زایی واکسن پایین و درحدود ۴۴ درصد است. درمورد واکسن های سالمونلا نیز یافته های مشابهی به دست آمده است. لذا دراین ارتباط باید به نقش ایمنی سلولی توجه گردد. اگر چه گفته می شود ایمنی سلولی بیشتر به وسیله واکسنهای زنده تولید می شود ولی مطالعات نشان داده است که درصورت استفاده ازآد جوان مناسب برای تهیه واکسن کشته، تحریک ایمنی سلولی توسط این نوع واکسن ها نیز امکانپذیر است (۳،۶،۱۰).

در نهایت با توجه به حجم سرمایه گذاری عظیم کشور در صنعت مرغداری از یکطرف و از طرف دیگر استفاده از آنتی بیوتیک های مختلف برای پیشگیری و درمان کلی باسیلوز که در نگاه کلان هزینه بسیار زیادی را به مملکت و همین طور به مرغدار وارد می سازد پیشنهاد می شود با توجه به نتایج این تحقیق از واکسن تهیه شده از سروتیپ های بومی کشور بویژه ازسروتیپ $O_{78}:K_{80}$ که در این تحقیق و تحقیقات قبلی سروتیپ غالب بوده است استفاده گردد. هر چند که قطعاً برای استفاده وسیع آن به انجام آزمایشهای وسیعتر در سطح گله با در نظر داشتن دخالت عوامل متعدد و مختلف در ایجاد بیماری نیاز است. توان بالقوه انجام این کار و خدمت بزرگ در گروه میکروبیولوژی و بخش طیور دانشکده دامپزشکی و مؤسسه تحقیقاتی رازی وجود دارد و حمایت وکمکهای سازمان دامپزشکی می تواند آن را به صورت بالفعل درآورد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشکده دامپزشکی و دانشگاه تهران به خاطر تأمین اعتبار طرح تحقیقاتی شماره ۲۹۲/ ۲۱۵/۱ که این مقاله منتج از آن است تشکر و قدردانی می گردد.

References

۱. بزرگمهری فرد، م. و مدرس گیلانی، ش. (۱۳۵۷): بررسی کلی باسیلوز در مرغداریهای اطراف تهران . نامه دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۳۵، شماره ۱، صفحه : ۱۲۱ ـ ۱۰۹.

۲. زهرایی صالحی، ت. و یحیی رعیت، ر. (۱۳۸۰): سروتایپینگ *کلی باسیل های* جداشده از مرغداریهای اطراف تهران. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۶، شماره۴، صفحه: ۲۰ ـ ۱۷.

۳. زهرائی صالحی، ت. (۱۳۶۸): سالمونلا، انتشارات دانشگاه تهران، شماره ۲۴۲۹، صفحه: ۲۲۰ ـ ۲۱۳.

4. Baron, E.J., and Finegold, S.M. (1990): Bailery and Scott's Diagnostic Microbiology 8th ed. Mosby Company. PP: 370-382.

5. Calnek, B.W. (1997): Diseases of Poultry. 10th ed. PP: 131-141.

6. Deb, R. and Harry, E.G. (1976): Laboratory trials with inactivated vaccines against *Esherichia coli* (O78:K80) infection in fowls. Res. Vet. Sci. 20: 131-138.

7. Heller, E.D., Leitner, G., Drabkin, N. and Melamed, D. (1990): Passive Immunization of chicks against *Escherichia coli*. Avian. Pathol. 19:345-354.

8. Heller, E. D. (1975): The immune response of hens to multiple *E. coli* injection and transfer of immunoglobulins to the egg and hatched chick. Res. Vet. Sci. 18: 117-120.

9. Kwaga, J.K., Allan, B.J., Hurk, J.V., Seida, H. and Potter, A.A. (1994): A Car AB mutant of avian pathogenic *E.coli* serogroup O_2 is attenuated and effective as a live oral vaccine against colibacillosis in turkey. Infect. Immunol. 62: 3766-3772.

10. Melamed. D., Leitner. G. and Heller. D. (1991): A vaccine against avian colibacillosis based on ultrasonic inactivation of *E.coli*. Avian Disease. 35: 117-122.

11. Peighambari, S.M. and Gyles, C.L. (1998): Construction and characterization of avian *Eschereichia coli* cyacrp mutants. Avian Disease. 42:4. PP: 698-710.

12. Rende, Y., Xuon, G. and Tan, L. (1996): Isolation and identification of the pathogen in chickens infected with colibacillosis and preparation of a polyvalent inactivated vaccine. Chinese. J. Vet. Med. 22: 17-18.