✓ پژوهش و سازندگی، شماره ۴۵، زمستان ۱۳۷۸

ارزیابی پادگن‌های تهیه شده به روش‌های مختلف در سنجش میزان پادتن حاصله پس از واکسیناسیون بر علیه بیماری پاستورلوز

● سعید عطائی کچوئی، ● ایرج اعرابی، ● عباس ستوده‌نیا، ● غلامرضا معتمدی و ● علی‌اکبر ناصری‌راد، اعضا هیأت علمی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی

تاریخ دریافت: اردیبهشت ماه ۱۳۷۸

چکیده

با استفاده از روش‌های مختلف چهار نوع پادگن خام از هر یک از سروتیپ‌های *Pasteurella multocida* که به ترتیب عامل بیماریهای سپتی‌سمی هموراژیک گاو و گاومیش و وبای مرغان هستند، تهیه شد. تعداد پنج سر خرگوش با واکسن فرمله پاستورلوز گاوی و پنج قطعه جوجه با واکسن فرمله پاستورلوز طیور به دفعات یک تا پنج بار به طور هفتگی واکسینه شد و به فاصله‌های زمانی متفاوت خونگیری و سرم‌های آنها به منظور انجام آزمایش در یخچال منهای هجده نگهداری شد. از پادگن‌های به دست آمده جهت حساس کردن گلبول‌های قرمز گوسفندی و به کارگیری آن در آزمایش هماگلوتیناسیون غیر مستقیم استفاده شد. نتایج نشان داد در پی واکسیناسیون، تیترهای متفاوتی از پادتن در مقابل انواع پادگن‌های به کار رفته در آزمایش وجود دارد که گلبول‌های قرمز حساس شده با پادگن سونیکه بالاترین تیتر پادتن را نشان داد. گلبول‌های قرمز حساس شده با پادگن جدا شده به وسیله تیوسیانیدپتاسیم تیترهائی مشابه پادگن سونیکه نشان داد گلبول‌های قرمز حساس شده با پادگن کپسولی تیتر پائین‌تری را نسبت به پادگن جدا شده به وسیله تیوسیانیدپتاسیم نشان داد. گلبول‌های قرمز حساس شده با پادگن جدا شده به وسیله حرارت پائین‌ترین تیتر را در مقایسه با سایر پادگن‌ها نشان داد.

✓ Pajouhesh & Sazandegi, No 45 PP: 89-91

Preparation of crude & capsular antigens of *Pasteurella multocida* & evaluation of vaccination to increasing their seral antibodies

By: Ataei S.; Aarabi I.; Sotoodehnia A.; Motamedi Gh. & Nasserirad A.; Razi Institute Karadj - Iran

Pasteurella multocida serotypes B: 6 and A:1, the causative agents of hemorrhagic septicemia (H.S.) and fowl cholera (F. C.) were used and compared for crude antigen preparations. Four methods of extraction including sonication, potassium thiocyanate (KSCN) extraction, capsular and heat - extract were applied and the antigens were used in indirect hemagglutination (I.H.A.) test. Five rabbits were vaccinated with H.S. vaccine (1-5 times weekly) and five chickens with F.C. vaccine (1-5 times weekly). sera from these animals were tested for antibody detection against any of the four antigens by I.H.A. test. Results indicated that the higher titers were due to sonicated and KSCN - extract in I.H.A. test while capsular and heat - extract titers were lower respectively.

مقدمه

اکنون در ایران مانند بیشتر کشورها به منظور پیشگیری از بیماریهای سپتی سمی هموراژیک گاو و گاومیش و وبای مرغان از واکسیناسیون با واکسن فرمله حاوی ژل آلوم استفاده می‌شود (۳ و ۱۴) واکسن‌های نامبرده معمولا از کشت *Pasteurella multocida* بر روی فرمانتور تهیه می‌شود که در مورد واکسن پاستورلوزگاوی از سروتیپ 6B و در مورد پاستورلوز مرغی از سروتیپ A:1 این باکتری استفاده می‌شود (۱). در هر دو مورد واکسن حاوی تمامی اجزاء پیکره باکتری Whole cell می‌باشد و بدین ترتیب سیستم ایمنی بدن میزبان در پاسخ به انواع مختلف مواد تشکیل دهنده باکتری (که همان پادگن‌های مختلف هستند) انواع متعددی پادتن تولید می‌کند (۷). روشن است که تعدادی از این پادتن‌های تولید شده نسبت به سایرین نقش مهمتری در حفاظت میزبان در مقابل تهاجم باکتری دارد (۹). نهایتاً شناسایی این پادتن‌ها و طراحی نوعی آزمایش به منظور اندازه‌گیری میزان آنها، روش با ارزشی برای ارزیابی وضعیت مقاومت حیوان در مقابل تهاجم و بیماری‌زائی باکتری خواهد بود.

روشهای آزمایشگاهی متعددی در شناسائی و اندازه‌گیر پادتن‌های سرمی وجود دارد که از میان آنها آزمایش هماگلوتیناسیون غیر مستقیم IHAT به لحاظ سادگی و عدم نیاز به وسایل و لوازم گران قیمت می‌تواند کاربرد ویژه‌ای داشته باشد. هر چند برخی محققین معتقدند این روش بیشتر برای تایپینگ کپسولی پاستورلاها مناسب است (۵ و ۱۷) ولی هنوز کاربرد فراوانی در شناسائی وضعیت ایمنی‌حیوانات مورد مطالعه دارد (۱۳).

همچنین شناسائی پادگن‌هائی که واکسن قادر به افزایش پادتن بر علیه آنها باشد مقدمه‌ایی است برکاربرد آنها در تست .I.H.A

مواد و روشها

الف - تهیه سرم‌های خرگوشی و مرغی واکسینه

به منظور واکسیناسیون حیوانات مورد آزمایش، واکسن‌های پاستورلوز گاوی و پاستورلوز طیور با استفاده از فرمانتور در بخش هوازی مؤسسه رازی تهیه و استفاده گردید.

از خرگوش به عنوان حیوان مدل برای واکسیناسیون با واکسن پاستورلوز گاوی استفاده شد. واکسن مورد نظر از کشت ۱۴ ساعته *Pasteurella multocida* type B:6 بر روی محیط Tryptose phosphate broth (TPB) تهیه شد سپس فرمالدئید به میزان ۳ در هزار و ژل آلوم (آلومینیوم هیدروکسید) به عنوان یاور به ان اضافه گردید.

تعداد ۵ سر خرگوش به ترتیب زیر واکسینه شدند. به خرگوش شماره یک فقط یکبار واکسن به روش زیر جلدی به میزان ۱ میلی لیتر تزریق شد و پس از یک هفته، خونگیری از قلب انجام شد. خرگوش شماره ۲، دو تزریق به فاصله یک هفته دریافت کرد و دو هفته پس از اولین تزریق خونگیری شد. به همین ترتیب خرگوشهای شماره ۳، ۴ و ۵ به ترتیب ۳، ۴ و ۵ تزریق به طور هفتگی

دریافت کردند و یک هفته پس از آخرین واکسیناسیون خونگیری شدند.

تهیه سرم‌های واکسینه بر روی جوجه‌ها نیز به همین روش انجام شد. برای تهیه واکسن پاستورلوز طیور از روش مشابه با تهیه واکسن پاستورلوز گاوی استفاده شد بااین تفاوت که‌از *P. multocida* type A:1 استفاده گردید. از خون‌های گرفته شده سرم جدا شده و تا زمان انجام آزمایش‌ها در ۱۸- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

ب - تهیه پادگن

۱-کشت تیپ‌های مورد نظر: سروتیپهای مورد نظر از باکتری *P. multocida* که لیوفیلیزه بود ابتدا روی محیط TPB کشت داده شد و مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری گردید. از این کشت مایع بر روی محیط مغذی در بووات دور و کشت داده شد و مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد جهت رشد کامل قرار داده شد.

۲- جداسازی جرم: سطح بوواتهای کشت شده با سرم فیزیولوژی استریل به ازای هر بورات ۱۰ میلی‌لیتر شسته شد و سوسپانسیون سلولی حاصل جمع‌آوری و در ظروف استریل تا انجام آزمایشها در دمای ۴+ درجه سانتیگراد نگهداری گردید.

پ - جداسازی پادگن‌ها

۱- پادگن کپسولی: سوسپانسیون سلولی به دست آمده مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری ۵۶ درجه سانتیگراد نگهداری و سپس در دمای ۴+ درجه سانتیگراد با دور ۱۰۰۰۰rpm به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد. به مایع سطحی به عوان پادگن کپسولی به میزان یک در هزار سدیم آزاید اضافه و تا انجام آزمایشهای در ۴+ درجه سانتیگراد نگهداری گردید.

۲- پادگن جدا شده به وسیله تیوسیانید پتاسیم: سوسپانسیون سلولی به دست آمده از کشت ۲ بار با بافر PBS, pH=۷/۲ استریل به وسیله سانتریفوژ (rpm ۱۰۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴+ درجه سانتیگراد) شسته شد. به رسوب حاصل از آخرین شستشو به میزان ۵ میلی لیتر PBS به ازای جرم حاصل از هر بووات اضافه گردید و سپس به میزان هم حجم آن PBS، دو مولار تیوسیانید پتاسیم افزوده شد. (pH=۷) و مخلوط حاصل مدت ۲ ساعت در دمای ۴+ درجه سانتیگراد نگهداری شد. پس از آن سانتریفوژ شد که مایع سطحی جدا و یک شب با M ۰/۱۵ و PBS دیالیز گردید. میزان یک هزارم سدیم آزاید به آن اضافه شد و تا انجام آزمایش در دمای ۴+ درجه سانتیگراد در ظروف سربسته نگهداری شد.

۳- پادگن جدا شده به وسیله سونیکاتور: سوسپانسیون سلولی به دست آمده از کشت مدت ۳۰ دقیقه سونیکه شد (Sonicor up - 420 A - Output 70%) سپس سوسپانسیون حاصل سانتریفوژ شد و به مایع سطحی به عنوان پادگن سونیکه به میزان یک درهزارم سدیم آزاید اضافه و در دمای ۴+ درجه سانتیگراد نگهداری شد.

۴- پادگن جدا شده به وسیله حرارت: سوسپانسیون سلولی به دست آمده از کشت به مدت یک ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد نگهداری شد و سپس مخلوط حاصل با دور ۱۰۰۰۰rpm به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴+ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شد به مایع سطحی سدیم آزاید افزوده و در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد.

ت - تهیه گلبول قرمز گوسفندی حساس شده

۱- تهیه گلبول قرمز گوسفندی: از گوسفندان به ظاهر سالم خونگیری به عمل آمد و در محلول آلسیور Alsever نگهداری شد. مخلوط مذکور ۳ مرتبه با PBS ۰/۱۵ M(pH=۷/۲) به وسیله سانتریفوژ (rpm ۱۷۰۰ به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد) شسته شد. سپس از سلولهای به دست آمده سوسپانسیون ده درصد تهیه شد و به نسبت یک در هزار سدیم آزاید افزوده و در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد.

۲- فیکس کردن گلبولهای قرمز: در مواردی که نیاز به فیکس کردن گلبولهای قرمز بود به روش Bing با گلوتارآلدئید فیکس شد. ابتدا محلول گلوتارآلدئید ٪۲۵ (Merck) با PBS به نسبت حجمی یک درصد رقیق شد. به سوسپانسیون گلبولهای قرمز ٪۱۰ میزان هم حجم محلول گلوتارآلدئید ٪۱ افزوده شد و مخلوط حاصل مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار داده شد، سپس ۳ مرتبه به وسیله سانتریفوژ با PBS شسته و از رسوب نهایی سوسپانسیون ٪۱۰ در PBS تهیه گردید. در نهایت به میزان یک در هزارم سدیم آزاید به آن افزوده و در دمای ۴+ درجه سانتیگراد نگهداری شد. در مواردی که RBC با پادگن‌های پروتئینی حساس می‌شد قبل از حساس سازی لازم بود با اسید تانیک به نسبت یک در ۲۰۰۰۰ مخلوط شده و مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گذاشته شد. سپس مخلوط حاصل ۳ مرتبه با PBS بوسیله سانتریفوژ (۱۷۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه) شسته و از رسوب حاصل سوسپانسیون ٪۱۰ تهیه شد.

۳- حساس کردن گلبولها با پادگن‌ها: مطابق روش ۱۹۸۲ Sawada سوسپانسیون ٪۱۰ RBC با حجم معادلش از پادگن‌های تهیه شده مخلوط شده و مخلوط حاصل مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری شد. سپس مخلوط سه مرتبه با PBS به وسیله سانتریفوژ شسته شد و گلبولهای قرمز حاصل در PBS حاوی ۰/۲۵ درصد سوم آلبومین گاوی (BSA-PBS) حل شد تا سوسپانسیون ٪۱ حاصل گردد.

ث - انجام تست IHA

تست به روش میکروتیتراسیون در پلیت U شکل انجام شد. رقت‌های تصاعدی از سرم‌های مورد آزمایش در BSA-PBS تهیه شد و به هر گروه ۰/۲۵ میلی لیتر گلبولهای حساس شده در پلیت‌ها اضافه شد. پلیت‌ها پس از تکان دادن به مدت ۲-۱ ساعت در دمای آزمایشگاه (۲۰ درجه سانتیگراد) به صورت ساکن باقی ماند. برای خواندن تیتر IHA بالاترین رقت از سرم که واکنش مثبت هماگلوتیناسیون (پهن شدن رسوب) نشان دهد در مقایسه با واکنش منفی هماگلوتیناسیون (رسوب نقطه‌ایی) تیتر IHA خوانده شد. تست‌های کنترل که همراه سایر تست‌ها انجام می‌شد عبارت بود از گلبولهای قرمز حساس نشده با سرم تست شده و همچنین گلبولهای قرمز حساس شده با رقیق کننده BSA-PBS در مواردی که پادتن‌های هتروفیل در سرم‌ها وجود داشت به وسیله گلبولهای قرمز حساس نشده در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲ ساعت جذب و مجدداً تست انجام می‌شد.

جدول شماره ۱- نتایج آزمایش هموگلوتیناسیون غیرمستقیم بر روی سرم جوجه‌های واکسینه، برای حساس کردن گلبول قرمز از پادگن‌های متفاوتی استفاده شده است.

شماره سرم	تیتر I.H.A. در مقابل پادگن *Pasteurella multocida* sere type A:1			
	پادگن کپسولی	پادگن جدا شده به وسیله تیوسیانید پتاسیم	پادگن جدا شده به وسیله سونیکاتور	پادگن جدا شده به وسیله حرارت
C1جوجه‌واکسینه‌هفته‌اول‌پس‌از یک تزریق	۲	۰	۰	۰
C2جوجه واکسینه هفته دوم پس از دو تزریق	۸	۴	۴	۲
C3جوجه‌واکسینه هفته سوم پس‌از سه تزریق	۳۲	۳۲	۶۴	۸
C4جوجه‌واکسینه‌هفته‌چهارم‌پس‌ازچهارتزریق	انجام‌نشد	انجام نشد	انجام‌نشد	انجام‌نشد
C5جوجه واکسینه‌هفته‌پنجم پس‌ازپنج تزریق	۲۵۶	۱۰۲۴	۱۰۲۴	۶۴
جوجه غیر واکسینه (شاهد)	۰	۰	۰	۰

جدول شماره ۲- نتایج آزمایش هموگلوتیناسیون غیرمستقیم بر روی سرم خرگوش‌های واکسینه، برای حساس کردن گلبولهای قرمز از پادگن‌های متفاوتی استفاده شده است.

شماره سرم	تیتر I.H.A. در مقابل پادگن *Pasteurella multocida* sere type B:6			
	پادگن کپسولی	پادگن جدا شده به وسیله تیوسیانید پتاسیم	پادگن جدا شده به وسیله سونیکاتور	پادگن جدا شده به وسیله حرارت
R1خرگوش‌واکسینه‌هفته ۱ پس‌از یک تزریق	۴	۰	۰	۲
R2خرگوش‌واکسینه‌هفته۲ پس از دو تزریق	۱۲۸	۲۵۶	۲۵۶	۱۶
R3خرگوش‌واکسینه‌هفته ۳ پس‌ازسه تزریق	۱۲۸	۱۲۸	۱۲۸	۳۲
R4خرگوش واکسینه‌هفته ۴ پس‌ازچهارتزریق	۱۲۸	۱۲۸	۲۵۶	۳۲
R5خرگوش واکسینه هفته ۵ پس‌ازپنج تزریق	۲۵۶	۱۰۲۴	۱۰۲۴	۶۴
خرگوش غیر واکسینه	۰	۰	۰	۰

نتایج

آزمایشهای مقدماتی نشان داد که پادگن‌های جدا شده به وسیله پتاسیم تیوسیانید و پادگن‌های سونیکه، بهتر جذب گلبولهای قرمز تانیکه می‌شوند در حالیکه در مورد پادگن‌های کپسولی و پادگن‌های جداشده به وسیله حرارت، گلبولهای قرمز تازه برای این کار مناسب‌تر بودند.

نتایج آزمایش‌های انجام شده بر روی سرم خرگوشهای واکسینه و خرگوش غیرواکسینه (شاهد) در جدول شماره ۲ نمایش داده شده است. همانگونه که در جدول مشاهده می‌شود در تمام موارد تکرار تزریق واکسن باعث افزایش تیتر پادتن شده است. مقایسه تیترها نشان می‌دهد که بالاترین تیترها مربوطه به پادگن سونیکه و پائین‌ترین آنها مربوط به پادگن جداشده به وسیله حرارت است و تیتر مربوط به پادگن جدا شده به وسیله پتاسیم تیوسیانید اختلاف کمی با تیتر مربوط به پادگن سونیکه دارد.

در تمامی آزمایشها، سرم خرگوش غیرواکسینه واکنش منفی داشت. همچنین به منظور کنترل سرم‌ها آزمایش باگلبولهای قرمز گوسفندی حساس نشده تکرار شدکه در تمام موارد واکنش منفی مشاهده شد.

نتایج آزمایش‌های انجام شده بر روی جوجه‌های واکسینه و غیرواکسینه (شاهد) در جدول شماره ۱ نمایش داده شده است. در این مورد نیز تکرار تزریق واکسن باعث افزایش تیتر پادتن شده است. همانطور که در جدول مشاهده می‌شود بالاترین تیترها مربوط به پادگن سونیکه و پائین‌ترین نیز مربوط به پادگن جدا شده به وسیله حرارت است و تیتر مربوط به پادگن جدا شده به وسیله پتاسیم تیوسیانید تقریباً در وضعیت مشابه سونیکه است.

در این مورد نیز سرم جوجه غیر واکسینه واکنش منفی داشت و آزمایش بر روی کلیه سرم‌ها باگلبول قرمز گوسفندی حساس نشده نیز تکرار شدکه در تمام موارد واکنش منفی بود.

آزمایش بر روی سرم‌های جوجه شماره C4 به دلیل تلف شدن انجام نشد.

بحث

در آزمایش هماگلوتیناسیون غیر مستقیم واکنش بین پادگن و پادتن به صورت آگلوتیناسیون گلبولهای قرمز تظاهر می‌نماید. زیرا پادگن‌های مورد نظر بر روی سطح گلبول‌های قرمز پوشانده شده و پیوند پادگن با پادتن مربوطه که اغلب دو ظرفیتی است به شکلی باعث پیوند گلبولهای قرمز با یکدیگر و ایجاد شبکه‌ای از آنها می‌کنند. ویژگی این پیوند به حدی است که Carter با به کارگیری پادگن کپسولی *Pasteurella multocida* در این روش توانست تیپ‌های مختلف این باکتری را شناسایی کند (۱). سایر دانشمندان نیز پس از او با ایجاد اصلاحاتی در روش او گونه‌های مختلف پاستورلا را از لحاظ پادگن پلی‌ساکاریدی کپسول تایپینگ کردند (۱۷، ۱۱، ۴ و ۶). علاوه بر این در مطالعات اپیدمیولوژیک و ارزیابی واکسن‌ها نیز از این روش تشخیصی بهره‌گیری شده است (۱۰ و ۱۳) در این مطالعه با به‌کارگیری پادگن‌های خام و کپسولی استخراج شده از دو تیپ *P. multocida* در آزمایش I.H.A.، مقایسه‌ای بین سطح پادتن‌های تولید شده در پس واکسیناسیون انجام گرفت. پیکره باکتری از انواع مولکولهای ساختمانی کوچک و بزرگ تشکیل شده که واکسیناسیون باعث تولید پادتن بر علیه تعداد زیادی از آنها خواهد شد. بدون شک برخی از این پادتن‌ها نسبت به بقیه اهمیت بیشتری در حفاظت میزبان در مقابل تهاجم باکتری دارد و به میزان بیشتری تولید می‌شوند.

سایر موارد نشان می‌دهد که این امر در مورد هر دو گروه حیوانات اعم از خرگوش و جوجه مشابه است. پادگن سونیکه پادگن خامی است که حاوی تعداد بسیار زیادی از انواع مولکولهای ساختمانی باکتری است. پادگن سونیکه به دست آمده از سویه X73 همین باکتری حاوی ۷۴ نوع پادگن مجزاست (۲).

گلبولهای قرمز حساس شده با پادگن جدا شده به وسیله تیوسیانید پتاسیم تیترهایی مشابه تیترهای پادگن سونیکه نشان داد که این امر در مورد خرگوشها مشهودتر بود.

پادگن جدا شده به وسیله تیوسیانید پتاسیم نسبت به انتی‌ژن سونیکه از تنوع مولکولی کمتری برخوردار است (۱۶) و از میان آنها مولکولهای پروتئینی بیشتر جذب گلبولهای قرمز تانیکه می‌شود (۱۲).

گلبولهای قرمز حساس شده با پادگن کپسولی تیتر پائین‌تری را نسبت به پادگن جدا شده به وسیله تیوسیانید پتاسیم نشان داد که این اختلاف در مورد جوجه‌های تحت آزمایش مشهودتر بود. گلبولهای قرمز حساس شده با پادگن جدا شده به وسیله حرارت پائین‌ترین تیتر را در مقایسه با سایر پادگن‌ها نشان داد.

نتایج آزمایش‌های انجام شده بیانگر توانائی واکسیناسیون در افزایش تیتر پادتن‌های سرمی بر علیه پادگن جدا شده به وسیله سونیکاتور و پادگن جدا شده به وسیله تیوسیانیدپتاسیم در خور توجه بیشتری است و آن را به عنوان کاندیدای مطالعات بعدی جهت یافتن رابطه بین سطح پادتن‌های ضد آن و میزان مقاومت حیوان در برابر تهاجم باکتری معرفی می‌کند.

از آنجائیکه ایمنی در برابر *Pasteurella multocida* بیشتر به ایمنی هومورال نسبت داده شده است (۷) و بررسی‌های جدید وجود پادگن محافظت کننده از نوع پروتئین را محتمل می‌داند (۸ و ۱۵) لذا خالص کردن اجزاء تشکیل دهنده این پادگن خام و ارزیابی هر یک از آنها در آزمایش‌های سرولوژیکی و تهیه واکسن ساب یونیت (Subunit) می‌تواند موضوع مطالعات بعدی در این زمینه باشد.

منابع مورد استفاده

۱- ستوده‌نیا عباس، اعرابی ایرج، شلماشی جلال، عطائی کچوئی سعید، ناصری‌راد علی اکبر و ایوبیان عباس، واکسن پاستورلوز طیور، مقایسه دو روش تهیه واکسن در فرمانتور و در محیط جامد و ارزیابی ایمنی آنها در جوجه. پژوهش و سازندگی، سال ۹، جلد ۴ شماره ۳۳ زمستان ۱۳۷۵ صفحه ۱۰۳-۱۰۲.

2- Avakian, A.P. Dick, J.W. Derieua . T. and Henry. C.W. 1986. Camparison of various antigens and their ability to detect protective antibodies against *Pasteurella multocida* using ELISA Avian diseases 30, 3, 528-536.

3- Baharsefat m-Aarabi, I.Hedayati, M.Ardehali, M. Darakhchan, H. Mirkarimi, A. 1976. Immunisation active des bovins par le vaccin associe. Antisepticemie hemorragique (pasteurellose) et auticharbon symptomatique (qurtiers noirs) En Iran. Arch. Inst. Razi, 1976 28, 51-56.

4- Blackburn billie O. - Heddleston kenneth L. - Pfow claude J. 1974. *Pasteurella multocida* serotyping results. Avian diseases 19, 2, 353-356.

5- Carter, G.R., 1955. Studies on *P. multocida* I.A. Hemagglutination test for the identification of serological typs. A. J. Vet. Res Jul. 1955 481-484.

6- Carter, G.R., 1972. Simplified identification of somatic varieties of *P. multocida* causing fowl cholera. Avian diseases 16 1109-14.

7- Colins, Frankm. 1977. Mechanisms of acquired resistance to *P. multocida* infection: A Review. cornell vet. 67 103-38.

8- Confer, A.W., Nutt, S.H., Dabo S.M., Panciera R.J., Murphy G.L. 1996. Antibody responses of cattle to outer membrane proteins of *P. Multocida* A:3 A.J.V.R. Vol 57, No. 10.

9- Donachie W., 1992. Prevention of pasteurellosis Br. vet. J. 148, 93, 93-5.

10- Frank Glynn H. et. al. 1996. Respiratory tract disease and mucosal colonization by *P. haemolytica* in transported cattle. A.J.V.R. Vol 57, No. 9.

11- Heddleston K.L., 1972. Gallagher J.E. and rebers P.A. - Fowl cholera: Gel Diffusion precipitin test for serotyping *P. multocida* from avian species. avian diseases.

12- Sawada T., Rimler R.B., Rhoades K.R., 1982. Indirect hemagglutination test that uses glutaraldehyde - fixed sheep erythrocytes sensitized with extract antigens for detection of pasteurella autibody. Journal of clinical microbiology. 15, 5, 752, 756.

13- Sawada T., Rimler R.B. , Rghoades K.R., 1985. Hemorrhagic septicemia: Naturally acquired autibodies against *P. multocida* types B and E in calves in the united states. Am. J. vet. Res., Vol 46, No. 6 1242-50.

14- Sotoodehnia A., Aarabi I., Vand Yoosefi J., Tavasoli A., 1984. The efficacy of the autogenous fowl cholera killed aluminum hydroxide vaccine in ducks in Iran. Arch - Inst. Razi 34, 35- 71-74.

15- Sreevatsan S., Ames R.T., Werdin R.E., Yoo H.S., Maheswaran S.K., 1996. Evaluation of three experimental subunit vaccines against pneumonic pasteurellosis in cattle. Vaccine 14 - 2 147 - 154.

16- Yue, Shouny, Pakes S.P., Massey L., Stefanu C., 1987. Apotassium thiocyanate extract vaccine prepared from *P. multocida* A:3 protects rabbits against homologous challenge. infection and immunity 55, 2, 2967 - 2976.

17- Younan M., 1995. Characterisation of a new *P. haemolytica* serotype (A 17) Research in veterinary science 58, 98.