

طراحی و ساخت آزمایشگاهی واکسن غیر فعال سه گانه بیماری نیوکاسل، آنفلوآنزای پرندگان تحت تیپ H9N2 و بیماری بارس عفونی

• محمد مجید ابراهیمی (نویسنده مسئول)

موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات ترویج و آموزش کشاورزی، کرج، ایران.

• ناصر قدسیان

موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات ترویج و آموزش کشاورزی، کرج، ایران.

• شهلا شاهسوندی

موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات ترویج و آموزش کشاورزی، کرج، ایران.

• علی آملی

موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات ترویج و آموزش کشاورزی، کرج، ایران.

• سیدرضا ابراهیمی

موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات ترویج و آموزش کشاورزی، کرج، ایران.



تاریخ دریافت: ۱۴۰۰-۰۳-۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰-۰۶-۰۱

Email: mm.ebrahimi@rvsri.ac.ir

چکیده

بیماری‌های ویروسی نیوکاسل (ND)، آنفلوآنزای پرندگان (AI) و بیماری بارس عفونی (IBD) باعث خسارات شدیدی به صنعت مرغداری می‌شوند. برای پیش‌گیری یا کنترل انتشار بیماری‌های طیور اغلب از واکسیناسیون استفاده می‌شود. واکسن‌های غیرفعال برای ایجاد یکنواختی عیار آنتی‌بادی، افزایش سطح آنتی‌بادی و ماندگاری مصرف می‌شوند. در این تحقیق واکسن غیرفعال سه‌گانه ND، AI و IBD طراحی و در مقیاس آزمایشگاهی ساخته شد. سپس پتانسیل ایمنی‌زایی آن در جوجه‌های SPF ارزیابی گردید. برای تولید واکسن سه‌گانه، ابتدا بذره‌های استاندارد ND V4، AI H9N2 و IBD 07IR در تخم‌مرغ جنین‌دار بصورت جداگانه تکثیر شدند. پس از عیارسنجی، سوسپانسیون‌های ویروسی غیرفعال شدند. مقادیر مختلفی از هر ویروس بعنوان یک دز در نظر گرفته شده و پس از انجام آزمایش‌های استاندارد کنترلی به عنوان یک واکسن معرفی شد. واکسن تهیه شده در کنار واکسن مشابه وارداتی به گروه‌های مختلف جوجه SPF تزریق شده و آزمایش‌های ممانعت از هم‌اگلوتیناسیون (HI)، خنثی‌سازی ویروس (VN) و الیزا (ELISA) روی نمونه‌های سرم انجام شد. عیار HI برای ND برابر ۷/۶ و برای AI برابر ۶/۷، در آزمایش VN، مقدار شاخص VN برای IBD برابر ۳/۵ محاسبه شد. در آزمایش الیزا عیار آنتی‌بادی علیه ویروس ND 8481، برای AI 7569 و برای IBD 3108 محاسبه شد. این داده‌ها با نتایج واکسن وارداتی اختلاف معنی‌دار نداشت. یافته‌ها نشان داد واکسن غیرفعال سه‌گانه تولید شده ایمنی مناسبی در جوجه‌های SPF ایجاد کرده و هیچ‌گونه عوارض ناخواسته نداشت.

کلمات کلیدی: تولید آزمایشگاهی، ارزیابی، واکسن سه‌گانه غیرفعال، طیور

- Veterinary Researches & Biological Products No 135 pp: 13-21

Development and laboratory scale production of inactivated triple ND+AI (H9N2)+IBD vaccine

By: Ebrahimi, M.M., (Corresponding Author) Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran. Ghodsian, N., Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran. Shamsavandi, Sh., Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran. Ameghi, A., Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran. and Ebrahimi, S.R., Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran.

Email: mm.ebrahimi@rsvri.ac.ir

Received: 2021-06-01 Accepted: 2021-08-23

Newcastle disease (ND), avian influenza (AI) and infectious bursal disease (IBD) cause severe damage to the poultry industry. Vaccination is often used to prevent or control the spread of poultry diseases. Inactivated vaccines are used to produce the uniform antibody titer, the increase antibody levels and its shelf life. In this study, the ND, AI and IBD triple inactivated vaccine was designed and prepared in laboratory scale. Then its immunization potential was evaluated in SPF chickens. To produce the triple vaccine, the ND V4, avian AI H9N2 and IBD 071R standard strains were separately propagated in embryonated eggs. The viral suspensions were inactivated after virus titration. Different amounts of each virus were considered as a dose and introduced as a vaccine after standard control tests. The prepared vaccine was injected along with an imported vaccine to different groups of SPF chickens and HI, VN and ELISA tests were performed on serum samples. The HI titer was 7.6 for ND and 6.7 for AI. In the VN test, the neutralization index for IBD was 3.5. In the ELISA test, the antibody titer against ND was 8481, for AI 7569 and for IBD 3108. These data did not differ significantly from the results of the imported vaccine. The results showed that the developed triple inactivated vaccine provided good immunity and also had no side effects for SPF chickens.

Key words: laboratory production, evaluation, inactivated triple vaccine, poultry

این بیماری اورتوآوولایروس نوع یک پرندگان (*Avian orthoavulavirus-1*)، جنس اورتوآوولایروس (*Orthoavulavirus*) است که در زیرخانواده آوولایرینه (*Avulavirinae*) و خانواده پارامیکزوویریده (*Paramixoviridae*) قرار می‌گیرد. جدایه‌های ویروس ND بر اساس نشانه‌ها و حدت متفاوت در ۵ پاتوتیپ تقسیم‌بندی می‌شوند شامل ولوژنیک (احشایی و یا عصبی)، مزوژنیک، لنتوژنیک، و بدون علائم روده‌ای. مرگ و میر در جوجه‌ها فوق‌العاده بالا بوده و گاه به صد در صد می‌رسد. در مرغ‌های تخم‌گذار ND باعث کاهش تولید و قطع تدریجی تخم‌گذاری می‌شود (۲۰).

بیماری IBD از بیماری‌های حاد ویروسی بسیار مسری جوجه‌های جوان است که بافت لنفاوی و بخصوص بورس فابرسیوس پرنده را بعنوان نخستین هدف مورد تهاجم قرار می‌دهد و باعث تضعیف سیستم ایمنی پرنده می‌شود. عامل IBD سروتیپ یک آوی بیروویروس

مقدمه

از مهم‌ترین عوامل تهدیدکننده صنعت پرورش طیور، عوامل عفونی ویروسی می‌باشند که به علت همه‌گیری و سرعت انتشار بالا و غیرقابل درمان بودن، از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. این بیماری‌ها خسارت‌های اقتصادی هنگفتی شامل افزایش تلفات، بالا رفتن هزینه‌های درمان، افزایش موارد حذف کشتارگاهی، و در موارد شدید حذف گله می‌شوند. از جمله این بیماری‌ها، نیوکاسل (*Newcastle Disease; ND*)، آنفلوآنزای پرندگان (*Avian Influenza; AI*) تحت تیپ H9N2 و بیماری بورس عفونی (*Infectious Bursal Disease; IBD*) است که گستردگی جهانی دارند.

ND یک عفونت واگیردار ویروسی است که باعث بیماری در ماکیان و سایر پرندگان می‌شود. در سال‌های اخیر همواره به عنوان مهم‌ترین عامل تهدیدکننده طیور صنعتی و سنتی مطرح بوده است (۱۲). عامل

اخیر، بهبودهایی روی ادجوانتها انجام شده است تا پاسخهای آنتی‌بادی بالاتری تولید کنند (۱۵).

در این تحقیق تلاش شد که واکسن غیرفعال سه گانه AI، ND و IBD طراحی شده و به‌طور آزمایشگاهی تولید شود. همچنین بستر مناسب برای تولید در مقیاس نیمه صنعتی و صنعتی واکسن طراحی شده ایجاد شده و امکان تولید واکسن‌های چند ظرفیتی غیرفعال فراهم گردد.

مواد و روش‌ها

تهیه آنتی‌ژن

از تخم‌مرغ جنین‌دار پاک برای تکثیر ویروس‌ها استفاده شد. در روز ۹-۱۱ انکوباسیون، بذر ویروس‌های AI تحت تیپ ND، H9N2 سویه V4، IBD سویه IBD07IR (موسسه رازی) بصورت جداگانه، به میزان ۰/۱ ml به داخل حفره آلانتوئیک تخم‌مرغ‌ها تلقیح شد. محل تلقیح مسدود شده و تخم‌مرغ‌ها به انکوباتور ۳۷ سانتی‌گراد منتقل گردید. پس از طی مدت معین انکوباسیون، تخم‌مرغ‌ها به مدت یک شب در سردخانه ۴ سانتی‌گراد قرار داده شدند. مایع آمنیوآلانتوئیک و در مورد IBD جنین آن‌ها نیز جمع‌آوری شد.

روش آزمایش عیارسنجی ویروس

رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-6} برای ویروس‌های ND و AI و تا 10^{-7} برای ویروس IBD، در فسفات بافر سالین (PBS) تهیه شد. مقدار ۰/۱ ml از هر رقت به ۶ عدد تخم‌مرغ SPF جنین‌دار ۱۰ روزه تلقیح گردید. پس از ۵ روز انکوباسیون در ۳۷ سانتی‌گراد، عیار ویروس با روش استاندارد اسپیرمن-کرب (Spearman-Karber) تعیین شد.

غیرفعال‌سازی آنتی‌ژن

برای غیرفعال‌سازی مایع آمنیوآلانتوئیک حاوی ویروس‌های فعال ND و AI، از فرمالین ۰/۱٪ و برای ویروس IBD اتیلن ایمین ۲/۵ mM استفاده شد. ظروف حاوی آنتی‌ژن به مدت ۱۶ ساعت در گرم‌خانه ۳۷ سانتی‌گراد قرار گرفت. برای اطمینان از غیرفعال شدن ویروس‌ها، ۰/۲ ml از سوسپانسیون هر نمونه بصورت جداگانه به حفره آلانتوئیک ۱۰ عدد تخم‌مرغ SPF جنین‌دار ۱۰ روزه تلقیح شده و در انکوباتور ۳۷ سانتی‌گراد قرار داده شد. برای هر ویروس سه تخم‌مرغ به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. از تلفات ۲۴ ساعت اول صرف‌نظر شده و بقیه تا ۷ روز نگهداری شدند. عدم حضور ویروس زنده در تخم‌مرغ‌هایی که با آنتی‌ژن‌های غیرفعال شده ND و AI تلقیح شده بودند، با آزمایش آگلوتیناسیون سریع و تخم‌مرغ‌هایی که با ویروس غیرفعال IBD تلقیح شده بودن با بررسی جنین ارزیابی شد. در پاساژهای دوم و سوم مایع آلانتوئیک تخم‌مرغ‌های زنده با هم، و تخم‌مرغ‌های جنین مرده با هم جمع‌آوری شده و بصورت مجزا پاساژ داده شده و همانند پاساژ اول مورد بررسی قرار گرفتند.

فرمولاسیون واکسن

مقادیر فاز آبی (شامل آنتی‌ژن‌های غیرفعال AI و ND و IBD) و فاز روغنی (مونتانا‌ید ISA-70) به نسبت ۳۰ به ۷۰ مشخص شده و درصد آنتی‌ژن‌ها استفاده محاسبه شد. مقدار مناسب روغن مونتانا‌ید در ظرف

(Avibirna virus) از خانواده بیرناویریده (Birnaviridae) است. این بیماری بسته به سن درگیری گله به دو شکل بالینی و تحت بالینی ظاهر می‌شود. در شکل تحت بالینی بیماری که در جوجه‌های زیر ۳ هفته بروز می‌کند و علامت بیماری دیده نمی‌شود ولی جوجه‌ها دچار سرکوب شدید و دائمی سیستم ایمنی ناشی از تخریب بورس فابریوس می‌شوند. شکل تحت بالینی، رخداد غالب IBD بویژه در مزارع مرغ گوشتی است و از اهمیت اقتصادی بیشتری برخوردار می‌باشد. شکل بالینی این بیماری معمولاً در سن ۳-۶ هفته و به‌صورت ناگهانی آغاز شده و میزان تلفات گله به سرعت افزایش می‌یابد (۷).

بیماری AI یکی از بیماری‌های واگیردار تنفسی ویروسی پرندگان است که دارای قدرت انتشار سریع می‌باشد. عامل آن، ویروسی متعلق به خانواده اورتومیکسوویریده (Orthomyxoviridae) می‌باشد و همه انواع آن در طیور، متعلق به تیپ A است. ویروس AI که در ایران بصورت اندمیک وجود دارد متعلق به تحت تیپ H9N2 بوده که قدرت بیماری‌زایی خیلی حاد ندارد ولی در صورت همزمانی با سایر عوامل بیماری‌زا، تلفات بالایی ایجاد می‌کند. ویروس AI از انواع ماکیان و سایر پرندگان جدا شده است پرندگان آبی‌بازو بعنوان مخزن این بیماری در طبیعت معرفی شده‌اند. عوارض درمانگاهی حاصل از ابتلا به AI به سویه ویروس، گونه و سن پرندگی مبتلا و وضعیت ایمنی آنها، و عوامل فیزیکی شیمیایی مانند گرد و غبار، آمونیاک بستگی دارد. علائم بیماری ممکن است در دستگاه تنفس، گوارش، تناسلی یا عصبی مشاهده گردد. در برخی موارد دوره بیماری خیلی سریع بوده و پرندگی بدون نشان دادن عارضه مشخص تلف می‌شوند (۲۲).

برای جلوگیری و کنترل موثر از شیوع بیماری‌های طیور استراتژی‌های مختلفی به کار برده شده و برنامه‌های کنترل این بیماری‌ها اغلب شامل استفاده از واکسیناسیون است. در واقع واکسن‌ها، جزئی مهم در پیشگیری و کنترل بیماری‌های طیور در سراسر جهان هستند. استفاده از آنها برای جلوگیری و یا به حداقل رساندن ظهور بیماری بالینی در سطح مزرعه و در نتیجه افزایش تولید است. برنامه‌های واکسیناسیون به طور گسترده‌ای متفاوت هستند و به چندین عامل بستگی دارند. به عنوان مثال نوع تولید، سطح امنیت زیستی، الگوی محلی بیماری، وضعیت ایمنی مادری، واکسن‌های در دسترس، هزینه‌ها و تلفات احتمالی می‌توانند در نوع و روش واکسیناسیون تاثیر داشته باشند (۱۴).

واکسن غیرفعال علیه بیماری‌های AI، ND و IBD بصورت مونووالن و یا بصورت پلی‌والن همراه با سایر واکسن‌ها تولید و استفاده می‌شود (۴، ۱۴). واکسن‌های ویروسی غیرفعال چند گانه به دلیل صرفه‌جویی در وقت و نیروی کار و کاهش استرس ناشی از دستکاری دستی در هنگام ایمن‌سازی به طور گسترده‌ای در مرغداری‌ها استفاده می‌شود (۱۵). این واکسن‌ها باعث یکنواختی عیار آنتی‌بادی در گله می‌شوند. در صورت مصرف به عنوان یادآور، سبب افزایش سطح آنتی‌بادی و ماندگاری آن می‌شود در نتیجه مقدار مناسب آنتی‌بادی از مادر به جنین منتقل خواهد شد. به طور کلی واکسن‌های ویروسی غیرفعال در مقایسه با سایر انواع واکسن‌ها پایدارتر هستند و در مقایسه با واکسن‌های زنده خطر بازگشت به حدت را ندارند. غیرفعال‌سازی ویروس اغلب بوسیله مواد شیمیایی انجام می‌شود. واکسن‌های غیرفعال معمولاً بصورت چندتایی برای پیشگیری از چند بیماری ساخته می‌شوند. در طی سال‌های

انجام خنثی‌سازی قرار داده شدند. به ازای هر رقت، حداقل ۵ تخم‌مرغ در نظر گرفته شد. مخلوط سرم ویروس در حفره آلانتوئیک تخم‌مرغها تلقیح گردید. محل تلقیح بسته شده و در ۳۷ سانتی‌گراد به مدت ۷ روز انکوبه شدند. نقطه پایانی به عنوان بیشترین رقتی از ویروس که هیچ ضایعه‌ای در جنین‌ها ایجاد نکند ثبت شده و شاخص خنثی‌سازی (NI) محاسبه گردید.

آزمایش HI

آزمایش HI برای ارزیابی آنتی‌بادی‌های ND و AI به روش میکرو انجام شد. ۲۵ μ l سرم فیزیولوژی یا PBS در تمامی گوده‌های یک ردیف ۱۲ تایی میکروپلیت V شکل ریخته شد. ۲۵ μ l سرم پرند در گوده اول و رقت‌سازی آن تا آخرین گوده انجام شد. ۲۵ μ l آنتی‌ژن تهیه شده به تمامی گوده‌ها اضافه گردید. میکروپلیت به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۵ سانتی‌گراد قرار داده شد. ۲۵ μ l گلوبول قرمز جوجه شسته شده ۱٪ به تمام گوده‌ها اضافه گردید و میکروپلیت به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۵ سانتی‌گراد قرار داده شد. نتایج بر اساس آخرین رقت که گلوبول قرمز در آن آگلوتینه نشده است بررسی شد.

آزمایش ELISA

مقدار ۱۰۰ μ l از هر یک از کنترل‌های منفی و مثبت رقیق نشده در گوده‌های تکراری میکروپلیت توزیع شد. ۱۰۰ μ l نمونه سرم رقیق شده ۱:۵۰۰ در هر گوده توزیع شد. صفحه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه شد. ۳ بار گوده‌ها با آب دیونیزه شسته شدند. سپس ۱۰۰ μ l کونژوگه به هر گوده اضافه شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه شد و گوده‌ها مجدداً شستشو شد. ۱۰۰ μ l سوبسترای TMB در هر گوده ریخته شده و صفحه برای مدت ۱۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار گرفت. ۱۰۰ μ l محلول توقف (stop solution) به هر یک از گوده‌ها اضافه شد. مقدار جذب با استفاده از دستگاه الیزا ریدر در ۶۵۰ nm اندازه‌گیری شده و آنتی‌لگاریتم عیار (Log₁₀) با نرم‌افزار IDEXX محاسبه و به عنوان مقدار آنتی‌بادی در هر نمونه ثبت شد.

ارزیابی آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از آزمون t و پیرسون Chi-square با استفاده از نرم‌افزار SPSS با در نظر گرفتن $P \leq 0.05$ به عنوان سطح اختلاف معنی‌دار انجام شد.

نتایج

ویروس‌ها در تخم‌مرغ جنین‌دار بخوبی تکثیر پیدا کردند و نتیجه تیتراسیون برای ویروس ND برابر با $10^{1.77}$ EID50/ml، برای ویروس AI برابر با $10^{1.73}$ EID50/ml و برای ویروس IBD برابر با $10^{7.83}$ محاسبه شد.

در ارزیابی غیرفعال‌سازی، در پایان سه مرتبه پاساژ تخم‌مرغ‌های SPF علائم و ردپای نشان‌دهنده وجود ویروس‌ها مشاهده نگردید. در آزمایش سترونی، تا پایان دوره آزمایش، هیچ‌گونه آلودگی در محیط‌های کشت مشاهده نشد و واکسن تهیه شده عاری از آلودگی باکتریایی و قارچی بود. آزمون بی‌ضرری در مورد واکسن آزمایش انجام گردید. در پایان ۱۴ روز

استریل ریخته شده و در فاز آبی افزوده شد. فرایند تشکیل امولسیون روغنی با استفاده از هوموژنایزر انجام شده و ۰/۵ ml به عنوان یک دز در نظر گرفته شد.

آزمایش سترونی (Sterility)

مقدار ۱۰۰ ml از نمونه‌های واکسن فیلتر شده و غشای فیلتر سه مرتبه شستشو داده شد. غشای فیلتر در محیط‌های باکتریولوژی کشت داده شده و در دو دمای ۳۵ سانتی‌گراد و ۲۵ سانتی‌گراد انکوبه شدند. محیط‌های کشت از نظر احتمال وجود باکتری‌های هوازی، بی‌هوازی و قارچ‌ها تا ۱۴ روز بررسی شدند.

ارزیابی واکسن روی جوجه‌های SPF

تعداد شصت جوجه سه هفته‌ای SPF بطور تصادفی در سه گروه (۲۰ n=) تقسیم شدند. گروه ۱: پرندگان یک دز واکسن تولید شده را به صورت زیرجلدی دریافت کردند. گروه ۲: پرندگان یک دز واکسن مشابه وارداتی را به صورت زیرجلدی دریافت کردند. گروه ۳: به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. نمونه خون تا هفته ۴ پس از واکسیناسیون از جوجه‌ها گرفته شد. میزان عیار آنتی‌بادی اختصاصی در نمونه‌های سرم با آزمایش HI برای ND و AI و آزمایش خنثی‌سازی ویروس (VN) برای IBD و آزمایش ELISA با کیت تجاری IDEXX برای هر سه ویروس انجام شد. موارد اخلاقی نگهداری جوجه‌ها در دوره آزمایش شامل دریافت کافی و مناسب آب و غذا، عدم ایجاد تنش به هنگام خون‌گیری و واکسیناسیون طبق دستورالعمل استاندارد به طور کامل رعایت شد.

آزمایش بی‌ضرری (Safety)

مقدار ۱ ml واکسن به زیر پوست در ناحیه پشت گردن ۱۰ قطعه جوجه‌های سه هفته‌ای SPF تزریق شد. ۱۰ قطعه جوجه بدون تزریق به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. جوجه‌ها به مدت سه هفته روزانه برای مشاهده وضعیت سلامتی، بازرسی شدند.

ارزیابی واکسن روی جوجه‌های ناشی از مادران واکسینه

دو گروه بیست تایی پولد با منشا تخم‌مرغ SPF بیست هفته‌ای انتخاب شدند. پرندگان گروه ۱ واکسن را به صورت زیرجلدی دریافت کردند. گروه ۲ به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. شش هفته پس از واکسیناسیون، تخم‌مرغ آن‌ها جمع‌آوری شده و در دستگاه جوجه‌کشی قرار داده شد تا هیچ شوند. سه هفته پس از هچ، از جوجه‌های هر دو گروه خون‌گیری شده و آزمایش HI برای AI و ND و VN برای IBD روی سرم آن‌ها انجام شد.

آزمایش VN

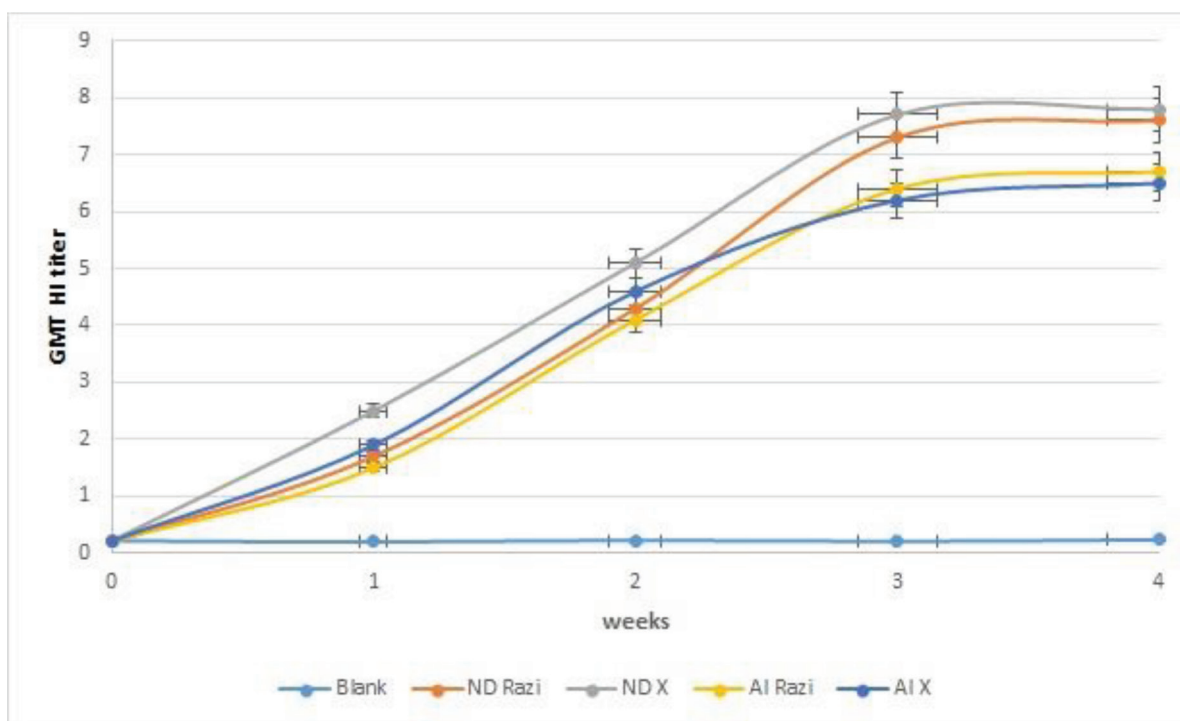
آزمایش VN به روش آلفا برای ارزیابی آنتی‌بادی IBD در تخم‌مرغ‌های SPF جنین‌دار ده روزه انجام شد. رقت‌های سریال بر مبنای 10^{-1} تا 10^{-7} و ویروس تهیه شده و به حجم‌های مساوی آن‌ها از غلظت ثابت سرم اضافه شد. مخلوط‌ها در ۲۵ سانتی‌گراد به مدت یک ساعت برای

آنتی‌بادی علیه ویروس IBD برای واکسن تهیه شده ۳۱۰۸ و برای واکسن مشابه وارداتی ۲۸۲۳ بدست آمد.

بحث

در چند دهه اخیر صنعت پرورش طیور رشد قابل ملاحظه‌ای داشته طوری که هم اکنون گوشت مرغ درصد بالایی از سرانه پروتئینی را شامل می‌شود. شیوع بالای بیماری طیور محدودیت‌های عمده‌ای در توسعه صنعت مرغداری ایجاد می‌کند. یک پرنده به دو طریق در برابر یک بیماری مقاومت می‌نماید یکی دریافت آنتی‌بادی از راه تخم‌مرغ یا ایمنی غیرفعال و دیگری تولید آنتی‌بادی متعاقب واکسیناسیون یا ایمنی فعال (۱۰). یکی از بهترین استراتژی‌ها برای پیشگیری از شیوع بیماری‌های عفونی طیور استفاده از واکسن‌های غیرفعال است که سبب بوجود آمدن سطوح بالا و طولانی مدت ایمنی می‌شود. دیگر مزایای واکسن غیرفعال شامل وارد شدن مقدار مشخص دز آنتی‌ژن مورد نظر به هر قطعه پرنده و اطمینان از واکسینه شدن تمام پرندگان گله، یک دست بودن عیار پادتن حاصله و تضعیف نکردن پادتن مادری، قابل مصرف در جوجه‌های یک روزه، منتقل نشدن میکروارگانیسم از گله‌ای به گله دیگر، آلوده نبودن با سایر میکروارگانیسم‌ها، سهولت نگهداری، داشتن حداقل استرس سیستمیک، امکان استفاده از واکسن‌های چندگانه و دفعات

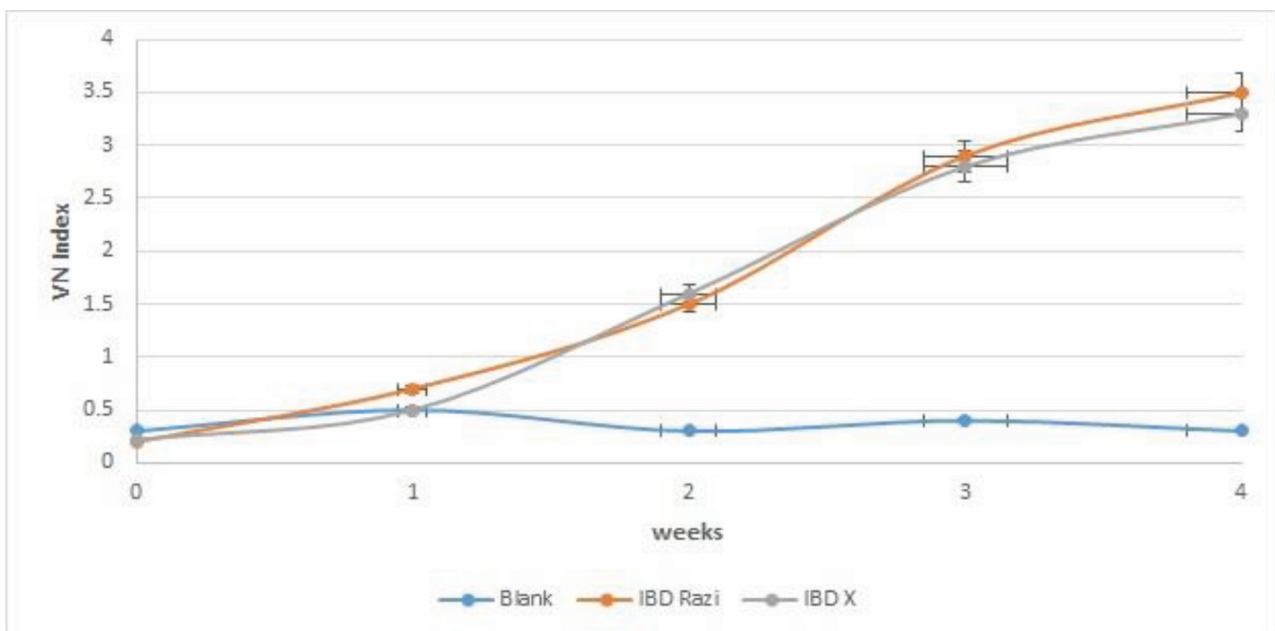
همه جوجه‌های تزریق شده سالم بوده و هیچ‌گونه عوارض موضعی (آماس، تورم و یا خونریزی در محل تزریق) و یا عمومی دیده نشد. توانایی واکسن سه‌گانه در القای پاسخ ایمنی هومورال در جوجه‌های SPF ارزیابی شد. عیار آنتی‌بادی علیه ویروس‌های ND و AI با آزمایش HI تا پایان دوره آزمایش روند افزایشی داشت (شکل ۱) و در هفته چهارم پس از واکسیناسیون برای ND برابر ۷/۶ و برای AI برابر ۶/۷ محاسبه شد. این عیار برای واکسن مشابه وارداتی به ترتیب ۷/۸ و ۶/۵ بدست آمد. تفاوت عیار آنتی‌بادی علیه ویروس‌های ND و AI بین واکسن تهیه شده و مشابه وارداتی معنی‌دار نبود. در آزمایش الیزا عیار آنتی‌بادی علیه ویروس ND 8481 و برای AI 7569 محاسبه شد. این عیار برای واکسن مشابه وارداتی به ترتیب ۸۶۸۷ و ۷۸۱۸ بدست آمد. عیار آنتی‌بادی علیه ویروس IBD با آزمایش‌های VN و الیزا ارزیابی شد. در آزمایش VN، سرم خون جوجه‌های واکسینه شده توانست ویروس IBD را خنثی کند. مقدار VN برای واکسن تهیه شده برابر ۳/۵ و برای واکسن وارداتی برابر ۳/۳ محاسبه شد (شکل ۲). مبنای مثبت بودن آزمایش، وجود علائم در جنین جوجه (احتقان جلدی، خونریزی‌های عضلانی، مفاصل انگشتان پا و سر) بود (شکل ۳). این تفاوت از نظر آماری این تفاوت معنی‌دار نبود. نتیجه آزمایش HI روی جوجه‌های سه هفته‌ای حاصل از مادر واکسینه برای ND ۳/۵، برای AI ۳/۱، نتیجه آزمایش VN برای IBD ۲/۷ و نتایج در گروه شاهد، منفی بود. در آزمایش الیزا عیار



شکل ۱- نتایج آزمایش HI سرم علیه بیماری نیوکاسل و آنفلوآنزای پرندگان تحت تیپ H9N2 با واکسن سه گانه طراحی شده (Razi) در جوجه‌های SPF در مقایسه با واکسن مشابه وارداتی (X).

پس از چهار هفته به بالاترین سطح رسید. اگر آنتی‌بادی محافظت کننده حاصل از واکسن IBD در جوجه و همچنین در جوجه‌های حاصل از مادران واکسینه ایجاد شده باشد نشان‌دهنده عملکرد خوب واکسن است (۷، ۸، ۱۸). مقدار NI برای واکسن سه گانه تهیه شده برابر ۳/۵ و برای جوجه‌های حاصل از مادر واکسینه برابر ۲/۷ محاسبه شد. در پایان دوره، عیار HI برای ND ۷/۶ و برای AI ۶/۷ بود. چنانچه نتیجه HI متعاقب مصرف واکسن در جوجه‌های SPF برای ND حداقل ۳ با ۸ واحد HA یا ۴ با ۴ واحد HA باشد از تلفات جلوگیری کرده و اگر برای AI حداقل ۵ باشد باعث کاهش شدینگ ویروس شده و نشان‌دهنده اثربخشی واکسن خواهد بود (۱، ۸، ۱۹، ۲۱). به نظر می‌رسد سطح بالای عیار آنتی‌بادی و دوام آن به دلیل کیفیت مناسب محتوای آنتی‌ژنی واکسن، جذب تدریجی و رهایش آهسته آن در ترکیب با امولسیون روغنی است. به طور کلی، ایمنی طبیعی به عنوان اولین سد دفاعی توانایی محدودی در مقابله با عوامل بیماری‌زای مختلف دارد. بسیاری عوامل مانند تغذیه، شرایط محیطی، تنش‌های گرما و سرما، سوخت و ساز بدن و سن بر روی آن اثر می‌گذارند. در بیش‌تر مواقع به لحاظ عدم رعایت برنامه‌های بهداشتی، با استفاده از واکسن یا دارو سلامت گله تامین می‌شود (۲). ایمنی اختصاصی مکانیسم دفاعی تکامل یافته‌ای است که پس از هر بار تماس با همان عامل بیماری‌زا بر قدرت دفاعی و شدت پاسخ‌گویی آن افزوده می‌شود. این نوع ایمنی به وسیله سلول‌های لنفوسیت و فرآورده‌های آن‌ها یعنی آنتی‌بادی‌ها ایجاد می‌شود که به‌طور اختصاصی ذره آلوده‌کننده را مورد هدف قرار داده و خنثی می‌کنند (۱۱).

واکسیناسیون کم می‌باشد (۱۴). در این تحقیق برای دستیابی به ایمنی یکنواخت و بادوام در سطح گله و کاهش دفعات تجویز، واکسن غیرفعال سه گانه AI، ND و IBD تولید شد. ارزیابی عیار آنتی‌بادی‌های اختصاصی در جوجه‌های SPF بیانگر پتانسیل این واکسن در تحریک و القا پاسخ‌های ایمنی و فرمولاسیون مناسب آن می‌باشد. واکسن‌های غیرفعال به طور معمول بیشتر در طیور مادر و اجداد و در مناطق با ریسک بالا بصورت چندتایی با سایر واکسن‌ها در طیور گوشتی مصرف می‌شوند (۴). به‌طور کلی وضعیت ایمنی و سن میزبان هدف، ماهیت ادجوان، کیفیت و کمیت محتوای آنتی‌ژن، و همسانی آنتی‌ژنی ویروس واکسن با ویروس‌های در گردش عوامل اثرگذار بر کارایی و توانمندی این واکسن‌ها هستند. در واکسن غیرفعال، از روغن‌های معدنی که متابولیزه نمی‌شوند برای تحریک سیستم ایمنی و افزایش القای ایمنی موثر علیه عامل بیماری‌زا، تسریع در برانگیخته شدن و دوام پاسخ ایمنی استفاده می‌شود. به نظر می‌رسد روغن مانند مخزنی عمل می‌کند که آنتی‌ژن محلول در آن به مدت طولانی و به تدریج آزاد شده، پاسخ ایمنی را به طور پیوسته یادآوری می‌کند. القا پاسخ التهابی موضعی در محل تزریق به فعال‌سازی سلول‌های عرضه کننده آنتی‌ژن، ازدیاد و تمایز سلول‌های اختصاصی آنتی‌ژن CD۴+ یا CD۸+ منجر شده و پاسخ هومورال اختصاصی آنتی‌ژن را بهبود می‌بخشد (۳، ۶). در این پژوهش از ادجوانت ISA-۷۰ برای فرمولاسیون واکسن سه گانه استفاده شد. سطوح آنتی‌بادی اختصاصی سرمی القا شده با واکسن سه گانه همراه با این ادجوان روغنی علیه ویروس‌های AI، ND و IBD در هفته دوم روند افزایشی داشت و



شکل ۲- نتایج آزمایش VN سرم علیه ویروس بیماری بارس عفونی با واکسن سه گانه طراحی شده (Razi) در جوجه‌های SPF در مقایسه با واکسن مشابه وارداتی (X).

تخم‌گذار علیه عفونت‌های تحت کلینیکی در روزهای اول زندگی کمک شایانی می‌کند (۱۱). تحقیقات اخیر نشان داده‌اند حتی در گله‌های مادری با تیتراژ ایمنی یکنواخت، جوجه‌های تولیدی آنها تیتراژ ایمنی متفاوتی دارند و ممکن است در بسیاری از جوجه‌ها تیتراژ ایمنی مادری کم بوده و یا وجود نداشته باشد. از مزایای واکسن‌های غیرفعال این است که با وجود عیار آنتی‌بادی مادری می‌توان از آنها برای ایمن‌سازی پرندگان استفاده کرد (۱۸). در گله‌هایی که تیتراژ آنتی‌بادی مادری یکنواخت نیست، برنامه واکسیناسیون یک روزگی با واکسن زنده ممکن است برای جوجه‌هایی

اغلب پنج روز پس از عرضه ویروس به لنفوسیت‌های B، آنتی‌بادی تولید خواهد شد. این وقفه زمانی به دلیل آماده شدن و تکثیر تعداد مورد نیاز از سلول‌های B می‌باشد. در صورتی که پرنده برای بار دوم با همین بیماری مواجه شود، پاسخ سریع‌تر و آنتی‌بادی بیشتری تولید خواهد شد. این روند اساس واکسیناسیون است که طی دوره پرورش مرغ‌های مادر و به منظور دستیابی به سطوح بالای آنتی‌بادی‌های فعال و یکنواخت و انتقال آنها به فرزندانشان انجام می‌شود. سطوح آنتی‌بادی‌های مادری اکتسابی بالا و هماهنگ در فرزندان، به حفاظت جوجه‌های گوشتی و



شکل ۳- جنین جوجه سیزده روزه. راست: جنین طبیعی، چپ: جنین آلوده شده با ویروس بیماری بوریس عفونی

- 3- Awate, S., L. A. B. Babiuk and G. Mutwiri. 2013. Mechanisms of action of adjuvants. *Frontiers in Immunology*, 4: 1-10.
- 4- Brun, A. 2016. Vaccines and vaccination for veterinary viral diseases: a general overview. *Vaccine Technologies for Veterinary Viral Diseases*, 1349: 1-24.
- 5- Dey, S., D. C. Pathak., N. Ramamurthy., H. K. Maity and M. M. Chellappa. 2019. Infectious bursal disease virus in chickens: prevalence, impact, and management strategies. *Veterinary Medicine: Research and Reports*, 10: 85-97.
- 6- Dupuis, L., S. Ascarateil., J. Aucouturier and V. Ganne. 2006. SEPPIC vaccine adjuvants for poultry. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1081: 202-205.
- 7- Eterradossi, N. and Y. M. Saif. 2020. Infectious Bursal Disease. pp: 257-283. In: D. Swayne (ed.), *Diseases of poultry*. John Wiley & Sons, Inc, New York.
- 8- Eterradossi, N. and Y. M. Saif. 2018. Infectious bursal disease (Gumboro disease). pp: 931-951. In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Office International des Epizooties, World Organization for Animal Health, Paris.
- 9- Hincke, M. T., M. Da Silva., N. Guyot., J. Gautron., M. D. McKee., R. Guabiraba-Brito and S. Réhault-Godbert. 2019. Dynamics of structural barriers and innate immune components during incubation of the avian egg: critical interplay between autonomous embryonic development and maternal anticipation. *Journal of Innate Immunity*, 11: 111-124.
- 10- James, N. 2017. *Fenner's Veterinary Virology*. N. J. Maclachlan and E. J. Dubovi, Elsevier Academic Press, London.
- 11- Jeurissen, S. H., A. G. Boonstra_Blom., S. O. Al_Garib., L. Hartog and G. Koch. 2000. Defence mechanisms against viral infection in poultry: a review. *Veterinary Quarterly*, 22: 204-208.
- 12- Kaffashi, A., M. Mahmoudzadeh and S. Ataei Kachooei. 2021. Development of TaqMan Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay for Detection of Chicken Anemia Virus in Newcastle Disease Vaccines Archives of Razi Institute 76: 421-427.
- 13- Kim, S. M., Y. I. Kim., S. J. Park., E. H. Kim., H. I. Kwon., Y. J. Si., I. W. Lee., M. S. Song and Y. K. Choi. 2017. Vaccine efficacy of inactivated, chimeric hemagglutinin H9/H5N2 avian influenza virus and its suitability for the marker vaccine strategy. *Journal of Virology*, 91: 1-17.
- 14- Marangon, S. and L. Busani. 2007. The use of vaccination in poultry production. *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties*, 26: 265-274.
- 15- Meeusen, E. N., J. Walker., A. Peters., P. P. Pastoret and G. Jungersen. 2007. Current status of veterinary vaccines. *Clinical Microbiology Reviews*, 20: 489-510.

که تیتراژ ایمنی بالا دارند نامناسب باشد اما واکسیناسیون زود هنگام با واکسن غیرفعال، گله را از درگیری زود هنگام با ویروس وحشی نجات داده، مانع تکثیر و انتشار ویروس وحشی در گله شده و از انتقال آن به پرندگان دیگر جلوگیری می‌کند (۵، ۱۳، ۱۶، ۱۷، ۲۳). در این مطالعه، واکسن غیرفعال سه گانه تولید شده به جوجه‌های سه هفته تزریق شد و نتایج نشان‌دهنده یکنواختی مناسب میزان آنتی‌بادی‌های اختصاصی در پرندگان بود. افزون بر این، واکسیناسیون پولت‌های SPF سبب انتقال آنتی‌بادی از زرده تخم‌مرغ به نسل بعد شد. اما دریافت آنتی‌بادی‌های مادری اکتسابی برای حمایت پرند در تمام مدت زندگی اش کافی نیست و می‌بایست حفاظت علیه بیماری‌ها با اختیار داشتن واکسن مناسب و اجرای دقیق برنامه واکسیناسیون در پرندگان جوان القا شود (۱۴-۱۷). زمان واکسیناسیون گله با واکسن زنده، به میزان تیتراژ آنتی‌بادی مادری انتقال یافته به جوجه‌ها بستگی دارد. اگر میزان آنتی‌بادی مادری بالا باشد، سبب خنثی شدن اثر واکسن می‌شود، در صورتی که با وجود عیار آنتی‌بادی مادری و حتی در مواردی که تیتراژ ایمنی مادری گله یکنواخت نباشد و یا گله‌ها از چند واحد مرغ مادر تهیه شده باشند می‌توان از واکسن غیرفعال استفاده کرد (۱۸).

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش، واکسن غیرفعال سه گانه ND، AI و IBD مطابق با استانداردهای بین‌المللی تولید شده و اثربخشی آن در جوجه‌های SPF ارزیابی شد. نتایج آزمایش‌های سرولوژی نشان داد که این واکسن و واکسن وارداتی از نظر توانایی تولید آنتی‌بادی علیه هر سه ویروس در جوجه‌های واکسینه شده و جوجه‌های حاصل از مادر واکسینه عملکرد مشابه دارند. برآیند یافته‌ها بیان‌کننده این است که واکسن غیرفعال سه گانه گزینه مناسبی برای القای ایمنی با دوام علیه سه بیماری مهم طیور می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج با شماره ۹۷۰۴۳۷-۲۱-۱۸-۱۸-۲ انجام شده است. نویسندگان از مدیریت و پرسنل واکسن‌های ویروسی طیور و شعبه پیام مرنده موسسه رازی بابت همکاری در اجرای پروژه کمال تشکر را دارند.

منابع مورد استفاده

- 1- Afonso, C., P. J. Miller., C. H. Grund., G. Koch., B. Peeters., P. W. Selleck and G. B. Srinivas. 2018. Newcastle disease (infection with Newcastle disease virus). pp. 964-985, In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Office International des Epizooties, World Organization for Animal Health, Paris.
- 2- Alkie, T. N., A. Yitbarek., D. C. Hodgins., R. R. Kulkarni., K. Taha-Abdelaziz and S. Sharif. 2019. Development of innate immunity in chicken embryos and newly hatched chicks: A disease control perspective. *Avian Pathology*, 48: 288-310.

- 16- Mehrabanpour, M. 2019. Evaluation and Comparison of the Potential Immunogenicity of Two Commercial Inactivated Bivalent Newcastle and Avian Influenza Vaccines in SPF Chicken. *Archives of Razi Institute* 74: 251-257.
- 17- Müller, H., E. Mundt., N. Etteradossi and M. R. Islam. 2012. Current status of vaccines against infectious bursal disease. *Avian Pathology*, 41: 133-139.
- 18- Niewiesk, S. 2014. Maternal antibodies: clinical significance, mechanism of interference with immune responses, and possible vaccination strategies. *Frontiers in Immunology*, 5: 1-15.
- 19- Palya, V. 1991. Manual for the production of Marek's disease, Gumboro disease and inactivated Newcastle disease vaccines. Food & Agriculture Organization, Rome.
- 20- Patti J. M., P. Koch and G. Section. 2020. Newcastle Disease. pp: 112-128. In: D. Swayne (ed.), *Diseases of poultry*. John Wiley & Sons, Inc, New York.
- 21- Swane, D. and I. Brown. 2018. Avian influenza (infection with avian influenza virus). pp: 821-843. In: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Office International des Epizooties, World Organization for Animal Health. Paris.
- 22- Swayne, D., D. L. Suarez and L. D. Sims. 2020. Influenza. pp: 210-256. In: D. Swayne (ed.), *Diseases of Poultry*. John Wiley & Sons, Inc, New York.
- 23- Van Boven, M., A. Bouma., T. H. Fabri., E. Katsma., L. Har-tog and G. Koch. 2008. Herd immunity to Newcastle disease virus in poultry by vaccination. *Avian Pathology*, 37: 1-5.

