

ارزیابی امکان بازگشت حدت و بی‌ضرری بذر واکسن زنده تخفیف حدت یافته آبله ماکیان موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی

• ناصر قدسیان

بخش کنترل کیفی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

• بهمن خالصی (نویسنده مسئول)

بخش تحقیق و تولید واکسن‌های ویروسی طیور موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

• منجمه معتمد

بخش تحقیق و تولید واکسن‌های ویروسی طیور موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

• محمدمجید بلراهمی

بخش تحقیق و تولید واکسن‌های ویروسی طیور موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

• محمد عبدالشاه

بخش تشخیص بیماری‌های ویروسی طیور موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

• زهره مجاهدی

بخش کنترل کیفی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

• نادیه شیری

بخش کنترل کیفی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران



تاریخ دریافت: ۱۴۰۰-۰۷-۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰-۰۹-۳۰
Email: khalesi20022002@yahoo.com

چکیده

واکسیناسیون از ابزارهای مهم کنترلی در برابر بسیاری از بیماری‌ها در صنعت طیور می‌باشد. امروزه انواعی از واکسن‌ها از جمله زنده تخفیف حدت یافته، کشته و نوترکیب و.. بر علیه عوامل پاتوژن طیور تولید می‌شود. علی‌رغم معرفی واکسن‌های نسل جدید هنوز واکسن‌های کلاسیک از جمله زنده تخفیف حدت یافته جایگاه و اهمیت خود را حفظ نموده و به طور وسیعی استفاده می‌شوند. واکسن‌های حاوی ویروس تخفیف حدت یافته از ویروس‌های جهش یافته‌ای تهیه می‌شوند که خاصیت آنتی‌ژنی آن‌ها به ویروس نوع وحشی شبیه بوده اما قادر نیستند که تمام مراحل بیماری‌زایی را در میزبان ایجاد نمایند از جمله مشکلات و مضرات این گونه واکسن‌ها خطر بازگشت حدت در واکسن طی تکثیر ویروس در میزبان می‌باشد که احتمال وقوع آن از نظر تئوری وجود دارد. در این مطالعه آزمایش بازگشت حدت بر روی بذر واکسن آبله ماکیان تولیدی موسسه رازی انجام گرفت. جهت انجام آزمایش پس از آماده‌سازی بذر واکسن در بخش تحقیق و تولید واکسن‌های طیور، حداقل ۵ پاساژ متوالی ویروس در جوجه‌های SPF انجام شد و در ادامه آن آزمایش بی‌ضرری واکسن صورت پذیرفت. نتایج آزمایش‌ها حاکی از عدم بازگشت حدت ویروس آبله ماکیان تولیدی موسسه رازی بوده است.

کلمات کلیدی: بازگشت حدت، جوجه SPF، بذر کاری واکسن، آبله ماکیان، بی‌ضرری

- Veterinary Researches & Biological Products No 136 pp: 12-17

Evaluation of the possibility of Reversion of virulence and Safety tests of Razi Institute 's live attenuated Fowl Pox vaccine

By: Ghodsian, N., Department of Quality control, Razi Vaccine and Serum Research institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Khalesi, B., (Corresponding Author) Department of Research and Production of Poultry Viral Vaccine, Razi Vaccine and Serum Research institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Motamed, N., Department of Research and Production of Poultry Viral Vaccine, Razi Vaccine and Serum Research institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Ebrahimi, M.M., Department of Research and Production of Poultry Viral Vaccine, Razi Vaccine and Serum Research institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Abdoshah, M., Department of Poultry Disease Diagnosis, Razi Vaccine and Serum Research institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Mojahedi, Z., Department of Avian Diseases Research and Diagnostic, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. and Shiri, N., Department of Research and Production of Poultry Viral Vaccine, Razi Vaccine and Serum Research institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Email: khalesi20022002@yahoo.com

Received: 2021-10-13 Accepted: 2021-12-21

Vaccination is an important tool in controlling many diseases in the poultry industry. Today, a variety of vaccines, including live attenuated, killed and recombinant, etc. are produced against poultry pathogens. Despite the introduction of new generation vaccines, classical vaccines, including live attenuated vaccines, still retain their status and importance and are widely used. Vaccines containing the attenuated virus are prepared from mutant viruses whose antigenic properties are similar to those of the wild-type virus but are not able to cause all stages of pathogenicity in the host, including the problems and harms of such vaccines. The reversion to virulence in the vaccine may probably occur during viral replication in host. In this study, a reversion to virulence and safety tests was performed on Fowlpox vaccine seeds produced by Razi Institute. In order to perform the test vaccine seeds provided by the research and production of poultry vaccines, at least 5 consecutive passages of the virus were performed in SPF chickens and then the safety test of the vaccine was performed. The results of the tests showed that the vaccine virus produced by Razi Institute comply with BP and OIE specifications.

Key words: Reversion of virulence, SPF chickens, vaccine working seed, fowl pox, safety

تفاوت در شرایط آب و هوایی، مدیریت، رعایت پروتکل‌های بهداشتی و نحوه صحیح واکسیناسیون می‌تواند متغیر باشد (۶ و ۹). یکی از راه‌های مهم کنترل بیماری واکسیناسیون با واکسن‌های زنده تخفیف حدت یافته در کشت سلول یا تخم‌مرغ جنین‌دار است. موسسه رازی بیش از ۵۰ سال است که واکسن آبله ماکیان را تولید می‌کند. واکسن‌های حاوی ویروس تخفیف حدت یافته از ویروس‌های جهش‌یافته‌ای تهیه می‌شوند که خاصیت آنتی‌ژنی آن‌ها به ویروس نوع وحشی شبیه بوده اما قادر نیستند که تمام مراحل بیماری‌زایی را در میزبان ایجاد نمایند. این ویروس‌های

مقدمه

بیماری آبله ماکیان یک بیماری ویروسی در جوجه و بوقلمون‌هاست و با دو فرم جلدی و دیفتریک با تلفات بالای ۵۰٪ می‌باشد. بیماری توسط یک DNA ویروس گونه *fowl pox* از جنس *Avipoxvirus* و خانواده Poxviridae با وزن مولکولی ۲۸۸ kb ایجاد می‌شود (۱۶). بیماری گسترده‌گی جهانی داشته و سبب خسارات اقتصادی ناشی از افت تولید تخم‌مرغ و گوشت می‌شود، وقوع بیماری در مناطق مختلف به دلیل

ویال بذر کاری (Working Seed) واکسن آبله ماکیان طبق پروتکل استاندارد بخش تولید واکسن‌های طیور با ۲ ml بافر فسفات سالین (phosphate buffer solution) آماده شد. سپس از آن رقت‌های سریالی ۱ به ۱۰ تا رقت ۱۰^{-۷} تهیه و از رقت ۱۰^{-۲} الی رقت ۱۰^{-۷} از هر رقت به ۵ تخم‌مرغ SPF جنین دار با سن ۹-۱۱ روزه به روش تزریق بر روی پرده کوریوآلانتوئیک تلقیح گردید. پس از ۹۶ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷^o سانتی‌گراد میزان تیترو ویروس براساس حداقل ۵۰٪ تلفات در تخم‌مرغ جنین‌دار قرائت شد که معادل ۱۰^{-۷} ml/EID50 بود.

تزریق بر روی پرده کوریوآلانتوئیک

تخم‌مرغ‌های جنین‌دار ۱۱-۱۰ روزه نورینی شده سپس تخم‌مرغ تقریباً در میانه محور طولی، جایی که ساختمان مویرگی به خوبی رشد کرده، علامت‌گذاری می‌شود. تخم‌مرغ‌ها به صورت افقی بر روی شانه تخم‌مرغ قرار داده می‌شوند. سپس قسمت کیسه هوایی و قسمت شرح داده شده در بالا، ضدعفونی می‌شوند. در ادامه در مرکز تخم‌مرغ سوراخی در پوسته به وسیله دریل مخصوص (دریل دندانپزشکی) ایجاد می‌شود. باید مراقب بود که غشای چسبیده به پوسته (غشای خارجی Eggshell Membrane): سوراخ نشود. در این مرحله تخم‌مرغ‌ها به یک اتاق تاریک منتقل شده تا با کمک نورینی افتادن پرده کوریوآلانتوئیک (غشای داخلی: Chorioallantoic membrane (CAM) بدقت دنبال شود. موارد کمی عبارتند از: سرنگ ۱ میلی‌لیتری توبرکولین که حاوی PBS استریل است با سرسوزن گیج ۲۵ با طول ۱۶ میلی‌متر (۵/۸ اینچ)، و یک لوله لاستیکی که به یک منبع خلاء متصل است. با قرار دادن نوک سرسوزن در مجاورت سوراخ جانبی تخم‌مرغ درست در زیر پوسته تخم‌مرغ و با زاویه بسیار مایل، غشای خارجی سوراخ می‌شود. باید مراقب بود که غشای داخلی سوراخ نشود. بیرون کشیدن هوای موجود در کیسه هوایی (به کمک خلاء) باعث افتادن غشای داخلی می‌شود. بنا بر این یک کیسه هوایی کاذب در قسمت میانی تخم‌مرغ (بر روی غشای داخلی) شکل می‌گیرد. قرار دادن یک قطره بسیار کوچک از PBS بر روی سوراخ ایجاد شده در قسمت میانی تخم‌مرغ گاهی به پروسه افتادن پرده داخلی کمک می‌کند. پس از افتادن پرده داخلی، سوراخ موجود در کیسه هوایی را مسدود کرده و همچنان تخم‌مرغ‌ها به صورت افقی نگهداری می‌شوند. با استفاده از یک سرنگ که به آن سوزن گیج ۲۵ با طول ۱۶ میلی‌متر متصل شده، ۰/۱-۰/۳ میلی‌لیتر از ماده مورد نظر به هر تخم‌مرغ تلقیح می‌شود. سوزن به صورت مایل وارد شده و فقط پس از عبور از غشای خارجی، مقادیر مورد نظر تزریق می‌شوند (شکل ۲-).

در خاتمه سوراخ تخم‌مرغ مسدود شده و تخم‌مرغ‌ها به آرامی حرکت داده می‌شوند تا مواد تزریق شده به صورت یکنواخت بر روی غشای داخلی پخش شوند. سپس تخم‌مرغ‌ها به انکوباتور بازگردانده می‌شوند. تخم‌مرغ‌ها می‌بایست در تمام دوره انکوباسیون به صورت افقی در انکوباتور نگهداری شوند تا مانع برگشت کیسه هوایی کاذب ایجاد شده گردد. زیرا این مسئله می‌تواند باعث افزایش مرگ و میر غیراختصاصی شود. تخم‌مرغ‌های تلقیح شده به این روش معمولاً ۷-۵ روز نگهداری می‌شوند.

تخفیف حدت‌یافته اثری مشابه عفونت طبیعی بر سیستم ایمنی دارند و در میزبان تکثیر و تولید آنتی‌بادی را به مدت طولانی‌تری تحریک کرده و باعث ایجاد ایمنی سلولی مطلوب و تولید آنتی‌بادی می‌شوند (۱۳). این ویروس‌ها به روش انتخاب طبیعی گونه‌های تضعیف شده یا از کشت متوالی ویروس در میزبان‌ها و محیط‌های کشت مختلف به دست می‌آیند و اساس ژنتیکی تهیه اغلب این واکسن‌های ویروسی زنده شناخته شده نیست بنابراین علی‌رغم تمامی مزایای ذکر شده در بالا دارای معایبی نیز می‌باشند که یکی از آن‌ها خطر بازگشت حدت در واکسن طی، تکثیر ویروسی در میزبان می‌باشد که احتمال وقوع آن از نظر تئوری وجود دارد بنابراین بر اساس الزامات بسیاری از مراجع تولیدکنندگان این گونه واکسن‌ها موظفند که در کنار تمامی تست‌های کنترلی به جهت اثبات عدم بازگشت حدت ویروس واکسن و ایمن بودن واکسن برای میزبان آزمایش بازگشت حدت را انجام داده و نتایج آن را در سوابق و فایل‌های ثبتی محصولشان گزارش نمایند. هدف از این مطالعه بررسی امکان بازگشت حدت ویروس تخفیف حدت‌یافته واکسن آبله ماکیان و همچنین بی‌ضرری آن در جوجه‌های SPF طبق پروتکل سازمان جهانی بهداشت دام و فارماکوپه ۲۰۱۶ بریتانیا بود (۴ و ۱۱).

مواد و روش کار

طراحی آزمایش

مطابق پروتکل فارماکوپه بریتانیا و توصیه سازمان جهانی بهداشت دام (۴ و ۱۱) جهت تست بی‌ضرری و بازگشت حدت حداقل ۵ پاساژ متوالی در حیوان هدف یعنی جوجه نیاز است لذا حداقل ۱۰۰ قطعه جوجه SPF در سن هشت هفتگی (حداقل سن توصیه شده برای واکسیناسیون آبله ماکیان) برای انجام این تست در داخل ایزولاتور فشار مثبت و دسترسی آزاد به آب و خوراک در نظر گرفته شد (شکل-۱). برای هر پاساژ دو گروه ۱۰ قطعه‌ای کنترل و تست در نظر گرفته شد. ۵۰ قطعه جوجه هم جهت انجام آزمایش بی‌ضرری در ادامه پاساژ ویروس در جوجه‌ها مد نظر قرار گرفت.

ویروس واکسن

در این تحقیق ویروس واکسینال مورد مصرف حداقل پاساژ بین بذر مادر (Master seed) و بچ تولیدی را دارا بود. برای این منظور یک



شکل ۱- نگهداری جوجه‌ها در ایزولاتور.

نتایج

در هر مرحله تلقیح واکسن آبله در گروه واکسن بروز برآمدگی Take که تاییدکننده تلقیح واکسن است بررسی و مشاهده شد (شکل ۳). در مورد ارزیابی امکان بازگشت یا افزایش حدت ویروس واکسن آبله در هیچ یک از پاساژهای متوالی در جوجه‌های دریافت‌کننده واکسن علائم بالینی غیر طبیعی یا تلفات مشاهده نگردید.

بازیابی ویروس آبله ماکیان در هر نوبت پاساژ با مشاهده ایجاد پوک بر روی پرده کوریوآلانتوئیک تخم‌مرغ جنین‌دار ۱۱ روزه عاری از عوامل پاتوژن خاص تایید و سوسپانسیون حاوی ویروس برای تلقیح مرحله بعد استفاده گردید (شکل ۴).

آزمایش بی‌ضرری واکسن که با حداقل ۱۰ برابر دوز احتمالی واکسن صورت پذیرفت با مشاهده جوجه‌های تحت آزمایش تا ۲۱ روز پس از تلقیح ویروس تایید گردید. همچنین گروه‌هایی که برای ارزیابی بی‌ضرری ویروس پس از پاساژ در جوجه با ویروس پاساژ اول و پنجم تزریق شدند هم در بروز علائم پس از ۱۴ روز مشاهده تفاوتی با هم نداشتند.

بحث

واکسن‌های آبله ماکیان با منشا تخم‌مرغ جنین‌دار یا کشت سلولی ساخت شرکت‌های مختلف تولیدکننده واکسن در کشور موجود است. واکسن



شکل ۳ - برآمدگی حاصل از تزریق ویروس واکسینال آبله (Take)



شکل ۴ - بازیافت مجدد ویروس پس از پاساژ بر روی حیوان (Recovery)

پاساژ ویروس در جوجه

در پاساژ اول به ۱۰ قطعه جوجه SPF با سن ۸ هفته معادل یک دز از ویروس آبله به روش تزریق در پرده بال با سوزن دو شاخ تلقیح گردید. (مطابق پروتکل موجود در کاتالوگ واکسن) همزمان ۱۰ جوجه هم سن هم به عنوان کنترل با حلال واکسن تلقیح شدند.

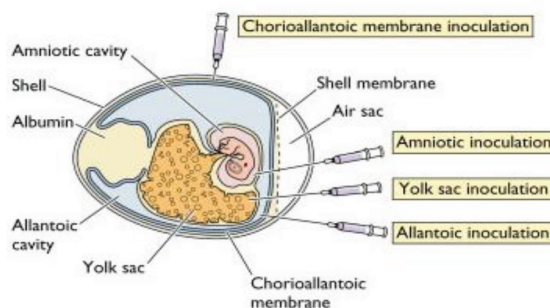
یک هفته پس از تزریق، پس از آسان‌کشی، محل Take واکسن را برداشته نمونه‌ها پولد شدند و با هوموژنایزر یکنواخت گردید. سپس به آن آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین، استرپتومایسین) و ضد قارچ اضافه و سوسپانسیون حاصل به دو بخش تقسیم شد سپس بخش اول برای اطمینان از بازیافت و حضور ویروس در ضایعه‌ها به روی پرده کوریوآلانتوئیک تخم‌مرغ جنین‌دار ۱۱ روزه تزریق شدند.

هم‌نظور انجام پاساژ دوم تا پنجم تمام مراحل عنوان شده در پاساژ اول مجدداً صورت پذیرفت. بدین ترتیب که ۰/۲ ml از سوسپانسیون Take های برداشت شده و هوموژن شده به جوجه‌های مرحله قبل تلقیح شد. در هر بار پاساژ علائم بالینی و بروز ضایعه بررسی و ثبت شدند. مطابق فارماکوپه اگر در پاساژ پنجم هیچ علامتی دال بر بازگشت حدت و بیماری‌زا شدن بذر ویروس وجود نداشته باشد نیازی به ادامه پاساژ نیست.

بی‌ضرری واکسن

جهت ارزیابی بی‌ضرری، ویروس واکسن باید در کمترین سطح پاساژ مابین بذر مادر و بچ واکسن مورد استفاده قرار گیرد. بدین منظور به یک گروه ۱۰ تایی جوجه معادل ۱۰ برابر حداکثر دوز ممکن در تلقیح واکسن آبله تجویز و یک گروه ده‌تایی هم به عنوان شاهد تنها حلال به طور همزمان دریافت نمودند. جوجه‌ها تا ۱۴ روز حداقل از لحاظ علائم بالینی بررسی شدند. اگر جوجه‌ها علائم بالینی غیر طبیعی یا تلفات مرتبط با ویروس نداشته باشند بی‌ضرری واکسن در این مرحله تایید می‌گردد.

بعلاوه بر اساس الزامات فارماکوپه بریتانیا پس از آخرین پاساژ تست بی‌ضرری مجدد ویروس در سه گروه ۱۰ تایی دیگر صورت پذیرفت، بدین صورت که در گروه اول ویروس پاساژ اولیه و گروه دوم با ویروس حاصل از پاساژ پنجم و گروه سوم بعنوان شاهد همزمان تلقیح شدند و علائم بالینی و سایر پارامترها در هر سه گروه مورد بررسی قرار گرفت.



شکل ۲ - روش تزریق بر روی پرده کوریوآلانتوئیک.

در واکسن زنده سالمونلا گالیناروم شرکت CEVA را در پولت تخم‌گذار تجاری ارزیابی و پس از ۵ پاساژ متوالی در جوجه‌ها هیچ گونه علائم بالینی و کالبدگشایی بیانگر بازگشت حدت مشاهده نکردند. لذا عدم امکان بازگشت حدت سویه واکسن توسط ایشان گزارش گردید (۱۲).

در تحقیق آتکینسون و همکاران (۲۰۱۲) کارایی و بازگشت حدت واکسن آبله قناری زنده تخفیف حدت‌یافته در مرغ‌های حشره‌خوار بومی هاوایی ارزیابی شد. محققین نامبرده بازگشت حدت و تلفات در ۱۵ درصد پرندگان واکسینه و عدم حفاظت مناسب در برابر چالش با ویروس آبله قناری و ماکیان را گزارش نمودند (۲).

در گزارش منتشر شده سال ۲۰۲۰ که در خصوص بی‌ضرری و عدم بازگشت حدت واکسن نوترکیب آبله لارنگوتراکتیت و آنسفالومیلیت پرندگان انجام شد در جوجه‌های SPF توسط کمیته داروهای دامپزشکی اتحادیه اروپا پس از ۶ پاساژ متوالی عدم بازگشت حدت و عدم مشاهده علائم بالینی مطابق الزامات فارماکوپه اروپا تایید شده است (۳).

همان‌گونه که قبلاً عنوان شد بیشترین احتمال بازگشت حدت هنگامی رخ می‌دهد که پاساژ ویروس از حیوان به حیوان دیگر باشد چنانچه در مطالعات متعددی بازگشت حدت ویروس واکسن زنده تخفیف حدت‌یافته پس از چندین پاساژ در حیوان حساس از جمله واکسن دیستمپر در سگ و برونشیت عفونی گزارش شده است (۱ و ۸) به همین دلیل فارماکوپه‌ها نیز این روش را جهت اطمینان از عدم بازگشت حدت توصیه و از الزامات تایید واکسن‌های زنده تخفیف حدت‌یافته از جمله آبله ماکیان اعلام می‌نمایند. در پایان دوره ۱۴ روزه در آزمون بی‌ضرری و پس از پنج نوبت پاساژ متوالی در جوجه‌های SPF خوشبختانه تلفات و یا علائم کلینیکی دال بر حدت ویروس آبله طیور در هیچیک از گروه‌ها ملاحظه نشد. بنابراین مطابق فارماکوپه بریتانیا، آزمون عدم بازگشت حدت با استانداردهای واکسن از جمله فارماکوپه بریتانیا و OIE مطابقت دارد که می‌توان نتایج حاصل از این پروژه تحقیقاتی را که تاکنون بر روی این واکسن صورت نگرفته بود و مستندات آن وجود نداشت جهت ثبت در پرونده تولید واکسن و ارائه به مراجع مرتبط استفاده نمود.

منابع مورد استفاده

1. Apple M.J.G.1978.Reversion to Virulence of Attenuated Canine Distemper Virus In Vivo and In Vitro. *Journal of General Virology* 41(2):385-390.
2. Atkinson, C., K.C. Wiegand, D. Triglia, and S.I. Jarvi. 2012. Reversion to virulence and efficacy of an attenuated Canarypox vaccine in Hawai'i 'Amakihi (*Hemignathus virens*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 43(4):808-819.
3. European Medicine agency.2021. Vectormune FP ILT (fowlpox and avian infectious Laryngotracheitis vaccine (live, recombinant))https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/vectormune-fp-ilt-epar-medicine-overview_en.pdf. Accession date :26/11/2021.
4. European Pharmacopeia 9.0.2016. https://www.edqm.eu/sites/default/files/index_9th_edition_pheur.pdf. 1064.

"آبله ماکیان" شامل ویروس زنده آبله است که در صورت استفاده نادرست از آن می‌تواند بیماری جدی در گله ایجاد کند (۱۴). واکسن آبله ماکیان در گله‌های حساس طیور در مناطقی که بیماری بومی بوده یا در فصل قبلی در آن منطقه تشخیص داده شده است و نیز در گله‌های مادر و تخم‌گذار پیش از ورود به مرحله تخم‌گذاری، استفاده می‌شوند. در هنگام واکسیناسیون نتایج حاصل از گله‌هایی که اخیراً دچار عفونت طبیعی شده‌اند یا اخیراً واکسینه شده‌اند، ایمنی پاسیو دارند و از آنجا که ایمنی غیرفعال (به مدت ۲-۳ هفته ابتدای زندگی جوجه‌ها) ممکن است در تکثیر ویروس واکسن تداخل ایجاد کند، باید فقط پس از کاهش آنتی‌بادی مادری واکسینه شوند. در حال حاضر واکسن آبله ماکیان با استفاده از روش تلقیح در پرده بال تزریق می‌شود. واکسیناسیون آبله ماکیان معمولاً با استفاده از روش تلقیح در پرده بال در مرغ‌های ۴ هفته‌ای و بیشتر و در حدود ۱-۲ ماه قبل از شروع تولید تخم‌مرغ بر روی پولت‌ها اعمال می‌شود. همچنین برای واکسیناسیون مجدد گله‌هایی که برای دومین سال تولید تخم‌مرغ نگهداری می‌شوند استفاده می‌شود. اما واکسیناسیون علیه این بیماری در دوره تخم‌گذاری انجام می‌شود (۱۴). شیوع بیماری آبله ماکیان در سراسر جهان گزارش شده است، اما میزان بروز آن با توجه به مناطق جغرافیایی متفاوت است، واکسیناسیون پرندگان حساس قبل از وقوع بیماری بهترین راه برای ایمن‌سازی پرندگان در برابر آبله است. به هر حال در مرغداری‌های بزرگ که جوجه‌ها در سنین مختلف نگهداری می‌شوند و نیز در مناطق گرمسیری، جایی که بیماری ممکن است در تمام طول سال رخ دهد، واکسیناسیون ممکن است در هر زمان که لازم باشد بدون توجه به فصل انجام شود (۱۱).

بیش از یک قرن است که موفق‌ترین واکسن‌های ویروسی از ویروس‌های تخفیف حدت‌یافته زنده استفاده می‌کنند. تخفیف حدت ویروس شامل تکثیر ویروس در شرایط خاص کنترل شده به طوری که برای میزبان اصلی آن ضمن ایمنوزن بودن بیماری‌زا نباشد. با وجود قدمت این روش و موفقیت چشم‌گیر آن در تولید بسیاری از واکسن‌هایی که به طور گسترده در انسان و سایر حیوانات استفاده می‌شود، اطلاعات کمی در مورد فرآیند بوجود آمدن و تکامل جهش‌های تضعیف‌کننده در دست است. علاوه بر این، اشکالاتی نیز به این روش وارد است چرا که نتیجه تلاش برای تخفیف حدت ویروس تا حد زیادی غیرقابل پیش‌بینی است، و یک ویروس ضعیف شده ممکن است به دلایل متعددی مجدداً حاد شده و در حیوان هدف بیماری‌زا شود (۷). اگرچه رویکردهای جدید تولید واکسن بسیار نویدبخش است، اما بسیاری از واکسن‌های حال حاضر مانند واکسن آبله ماکیان در مارکت هنوز با روش‌های کلاسیک تولید می‌شوند. واکسن آبله ماکیان بیش از نیم قرن است که برای جلوگیری از آبله در طیور تجاری در مناطقی که بیماری بومی است استفاده می‌شود. با این حال، در سال‌های اخیر، شیوع آبله در گله‌های واکسینه شده قبلی رخ داده است. یک توضیح ممکن برای این مشکل ظهور گونه‌های جدید ویروس آبله ماکیان (FPV) است. دومین فرضیه این است که FPV جدید به دلیل ورود ویروس رتیکولودندوتیلیوز مرغی (REV) در ژنوم آنها، افزایش حدت را نشان می‌دهد (۱۵) و فرضیه سوم بازگشت به حدت به دنبال تلقیح و پاساژ در پرندگان است.

اوکا موتو و همکاران (۲۰۱۰) امکان بازگشت حدت سویه استفاده شده

5. Gilhare, V.R, S.D. Hirpurkar, A. Kumar, S.K. Naik and T. Sahu. 2015. Pock forming ability of fowl pox virus isolated from layer chicken and its adaptation in chicken embryo fibroblast cell culture. *Veterinary World* 8(3):245-50.
6. Gholami-Ahangaran, M., N. Zia-Jahromi and A. Namjoo. 2014. Molecular detection of avian pox virus from nodular skin and mucosal fibrinonecrotic lesions of Iranian backyard poultry. *Tropical Animal Health and Production* 46(2): 349-353.
7. Hanly, K.A. 2011. The double-edged sword: How evolution can make or break a live-attenuated virus vaccine. *Evolution* 4(4):635-643
8. Hopkins S.R and H.W. Yoder. 1985. Reversion to Virulence of Chicken-Passaged Infectious Bronchitis Vaccine Virus. *Avian Diseases* 30(1):221-223.
9. Nayeri Fasaei, B., O. Madadgar, A. Ghalyanchi Langeroodi and M.M. Ghafari. 2014. Molecular detection and phylogenetic analysis of Avipoxvirus strains isolated from different bird species. *Iranian Journal of Veterinary Research* 15: 40-44.
10. Norouzian, H. and G.h. Farjanikish .2016. Pathological and molecular diagnosis of avian pox in backyard chickens in Khorram Abad. *Veterinary Researches & Biological Products*. 117: 2-10. [In Farsi]
11. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial. 2016. Fowl Pox (Chapter 3.3.10). <https://www.oie.int/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-manual-online-access/> accessed online at 30/03/2021
12. Okamoto, A.S., A. Menconi, Gonçalves G.A., T.S. Rocha, Andreatti F.R and E.N. Savano. 2010. Reversion to Virulence Evaluation of a 9R Vaccine Strain of Salmonella enterica Serovar Gallinarum in Commercial Brown Layers *Brazilian Journal of Poultry Science* 12(1):47-52.
13. Sharma, D. K. and S. N. Sharma. 1988. Comparative immunity of fowl pox virus vaccines. *Journal of Veterinary Medicine* 35:19-23.
14. Siccardi, F. J. 1975. The addition of fowlpox and pigeonpox vaccine to Marek's vaccine in broilers. *Avian Diseases* 19:362-365.
15. Singh, G.K, N.P. Singh and S.K.C. Garg. 1987. Studies on pathogenesis of fowlpox: Virological study. *Acta Virologica* 31: 417-423.
16. Tripathy, D.N. and C.H. Cunningham. 2008. Avian pox. pp. 524-534. In: Hofstad, M.S., H. J. Barnes, B. W. Calnek., Reid. W. M. and H. W. Yoder) eds.). Diseases of Poultry, 8th edition, Ames Iowa State University Press, USA.

