DOI: 10.22092/vj.2019.124139.1525 شماره ۱۲۵ زمستان ۱۳۹۸

تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

ارزیابی ایمنی‌زایی واکسن لارنگوتراکئیت عفونی در پولت سویه‌های بونز سفید و های‌لاین W36

• **محمدمجید ابراهیمی (نویسنده مسئول)**
موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات ترویج و آموزش کشاورزی، کرج، ایران.
• **شهلا شاهسوندی**
موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات ترویج و آموزش کشاورزی، کرج، ایران.
• **رسول مشهدی**
شرکت سیمرغ واحد اصفهان، کیلومتر ۱۶ جاده زیار، روستای دشتی، اصفهان، ایران
• **علیرضا یوسفی**
موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات ترویج و آموزش کشاورزی، کرج، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷-۰۸-۲۶ تاریخ پذیرش : ۱۳۹۷-۱۰-۳۰

Email: mm.ebrahimi@rvsri.ac.ir

چکیده

لارنگوتراکئیت عفونی *(Infectious laryngotrachitis; ILT)* از بیماری‌های ویروسی مجاری تنفسی ماکیان با انتشار جهانی است که نهفته بودن عامل آن، حامل بودن برخی طیور مبتلا و دفع طولانی مدت ویروس، کنترل آن را با دشواری‌هایی مواجه کرده است. به‌دلیل خسارات اقتصادی ناشی از ILT در پولت‌های تخم‌گذار، برای پیشگیری از شیوع آن در مناطقی که بیماری بومی است از واکسن تخفیف حدت یافته استفاده می‌شود. هدف پژوهش کنونی، مقایسه ایمنی‌زایی واکسن ILT تولیدی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی علیه این بیماری در سویه‌ها تخم‌گذار بونز سفید و های‌لاین W36 بود. تعداد هفتاد هزار قطعه پولت تخم‌گذار از هر سویه در دو فارم تجاری مجزا با واکسن ILT موسسه رازی و به روش قطره چشمی در سن هشت هفتگی واکسینه شدند. به‌منظور انجام آزمایش‌های الایزا و خنثی‌سازی ویروس، پیش از انجام واکسیناسیون (روز صفر) و در فواصل زمانی ۳، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۶ هفته پس از آن، به‌طور تصادفی از ۲۰ پرنده در هر گروه نمونه خون گرفته شد. افزون بر این، سه هفته پس از واکسیناسیون، چالش با سویه‌ی حاد ویروس لارنگوتراکئیت عفونی (vILT) بر روی ۲۰ قطعه جوجه از هر سویه انجام شد. نتایج نشان داد واکسن ILT تولیدي موسسه رازی عملکرد یکسانی از نظر تیتر آنتی‌بادی و شاخص خنثی‌سازی ویروس در هر دو سویه مورد مطالعه داشت ($p>0/05$). روند افزایش تیتر آنتی‌بادی علیه ILT و شاخص خنثی‌سازی ویروس نشان داد که با گذشت سه هفته از زمان واکسیناسیون، پولت‌های هر دو سویه آستانه مورد نیاز برای ایجاد ایمنی محافظت‌کننده را کسب نمودند. همچنین، واکسن ILT رازی به‌ترتیب موجب حفاظت ۱۰۰ و ۹۵ درصدی در سویه‌های بونز سفید و های‌لاین W36 طی آزمون چالش با ویروس vILT شد. در مجموع، نتایج این مطالعه نشان داد ایمن‌سازی با واکسن ILT موسسه رازي تیتر آنتی‌بادی سرمی مناسبی را در سویه‌های بونز سفید و های‌لاین W36 ایجاد می‌کند که به مصونیت در برابر ویروس vILT منجر می‌شود. هر چند بین سویه‌های بونز سفید و های‌لاین W36 از نظر فراسنجه‌های ایمنی مورد مطالعه تفاوتی وجود نداشت.

کلمات کلیدی: لارنگوتراکئیت عفوني، واکسن، تیتر آنتی‌بادی، کارآیی، موسسه رازی

Veterinary Researches & Biological Products No 125 pp: 20-28

Evaluation of immunization with infectious laryngotracheitis vaccine in White Bovans and HyLine W36 pullets

By: Ebrahimi. M.M., (Corresponding Author) Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Shahsavandi, S., Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Mashhadi, R., Simorgh Industrial farms, Isfahan Branch, Ziar road, Dashti village, Isfahan, Iran. and Yousefi, A.R., Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Received: 2018-11-17 Accepted: 2019-01-20

Email: mm.ebrahimi@rvsri.ac.ir

Infectious laryngotracheitis (ILT) is an acute viral respiratory tract of chickens with worldwide outbreak, and its virus latency, presence of carrier chickens, and long-term virus separation have been increased the difficulty of ILT control. Because of considerable economic losses associated with ILT, vaccination of susceptible pullets with attenuated viruses is recommended in endemic areas. The aim of the present study was to compare the immunization of ILT vaccine produced by Razi Vaccine and Serum Research Institute in White Bovans and HyLine W36 pullets. Seventy thousand pullets of each laying line were allotted into two different farms and were vaccinated with Razi ILT vaccine through eye drop method at eight week of age. In order to determine sera antibody titers against ILT virus by ELISA and serum virus neutralization tests, blood samples were randomly collected from 20 chickens per group before (d=0), and at 3, 6, 8, 10, 12, and 16 weeks post-vaccination. In addition, three weeks following vaccination, 20 birds per group were challenged with a nasal drop of virulent infectious laryngotracheitis (vILT) virus strain to evaluate vaccine effecacy. Results showed that Razi ILT vaccine caused a similar performance regarding serological ELISA antibody titers against ILT and the virus neutralization index in the both strains ($P > 0.05$). Trends in ELISA antibody tiers against ILT and the virus neutralization index revealed that these incidies reached to the protective immunity threshold three weeks post-vaccination. Moreover, Razi ILT vaccine was effectively protected 100% and 95% of White Bovans and HyLine W36 pullets against a vILT challenge, respectively. In conclusion, vaccination of White Bovans and HyLine W36 pullets with Razi ILT vaccine produced sufficient sera titers against ILT, resulted in effective immune protection against vILT virus. However, there was no difference between White Bovans and HyLine W36 pullets regarding the evaluated immune insides following vaccination.

Key words: Efficacy, Infectious laryngotracheitis, Razi Institute, Antibody Titer, Vaccine

مقدمه

لارنگوتراکئیت عفونی (Infectious laryngotrachitis; ILT) از بیماری ویروسی مجاری تنفسی ماکیان با انتشار جهانی است. تظاهرات بالینی این بیماری شامل تنگی نفس، سرفه، تنفس با دهان باز و دفع ترشحات خونی از دستگاه تنفس است که با بروز تلفات و کاهش تولید تخم‌مرغ گله‌های مبتلا همراه است. نخستین بار در سال ۱۹۲۵ میلادی بیماری ILT توصیف و گزارش شد (۱۷). سپس در سال ۱۹۳۶میلادی، عامل بیماری که از خانواده هرپس ویریده (Herpesviridae)، زیرخانواده آلفا هرپس ویرینه (Alphaherpesvirinae) و گونه گالید هرپس ویروس ۱ (Gallid herpes virus 1) است، شناسایی و طبقه‌بندی شد (۱۴). مشابه با سایر هرپس ویروس‌ها، ژنوم این ویروس نیز از DNA خطي دو رشته‌ای تشکیل شده است. پنج گلیکوپروتئینی پوششی ویروس ILT، با وزن‌های مولکولی ۲۰۵، ۱۶۰، ۱۱۵، ۹۰، و ۶۰ کیلو دالتون، به‌عنوان ایمنوژن‌های اصلی تحریک‌کننده‌ی پاسخ‌های ایمنی سلولی و هومورال معرفی شده‌اند (۸).

اگر چه طیور اهلی در تمام سنین مستعد آلودگی با ویروس ILT هستند، اما جوجه‌های با سن بیش از سه هفته حساسیت بیش‌تری نسبت به آن دارند (۶). افزون بر طیور اهلی، موارد تك‌گیر این بیماری در پرندگان زینتی و مسابقه‌ای و همچنین عفونت‌هایی طبیعی با علایم مشابه بیماری ILT در بوقلمون نیز گزارش شده است (۲۰). علی‌رغم حساسیت قرقاول‌ها، سایر پرندگان مانند کبوتر، اردك، گنجشك، کلاغ و مرغ نوروزی نسبت به آلودگی با این ویروس مقاومت نشان می‌دهند. به‌طور معمول، ۶ تا ۱۲ روز پس از در معرض قرارگرفتن پرنده با ویروس ILT، علایم بالینی بیماری که شامل کاهش مصرف آب و غذا، تنگی نفس، تنفس با دهان باز، التهاب سینوس‌های بینی و زیر چشمی و دفع ترشحات خونی همراه با سرفه، افسردگی و تورم ملتحمه است، پدیدار می‌شود. ضایعات این بیماری در مزارع پرورش مرغان مادر و تخم‌گذار مشهودتر است (۱۹). حدت سویه‌های ویروس ایجادکننده‌ی بیماری بر اساس برآورد تلفات در تخم مرغ‌های جنین‌دار

و یا اندازه پلاک‌های ایجاد شده بر روی کشت سلول به دو گروه حاد و خفیف طبقه‌بندی می‌شود. شکل حاد بیماری علایمی مانند بلع هوا، تنفس سخت، ایجاد موکوس و خلط‌های خونی، ظهور جراحات بر روی زبان و حلق و سوراخ‌های دهان و بینی، لکه‌های خونی در سقف دهان، ترشحات پنیری خون‌آلود در ناي و ایجاد غشای کاذب در فضای درونی ناي داشته و تلفات بالایی را به بار می‌آورد. با انسداد کامل فضای درونی نای توسط غشای کاذب، تنفس مرغ با کشیدگی گردن به‌طرف بالا و بروز صدا، که از مشخصات بیماری ILT است، همراه می‌شود. میزان واگیري این شکل بیماري ۹۰ تا ۱۰۰ درصد، و مرگ‌ومیر حاصل از آن ۵ تا ۷۰ درصد است (۹). شکل خفیف یا ملایم بیماری ILT با علایم التهاب موکوسی نای، التهاب سینوس‌هاي بيني و زیر چشمی، تورم ملتحمه، کاهش تولید تخم‌مرغ و کاهش وزن همراه است (۱۹). میزان واگیری این شکل از بیماری در گله پنج درصد و میزان مرگ و میر حاصل از آن ۰/۱ تا ۲ درصد است. شایان ذکر است که آلودگی‌های ثانویه بر حدت بیماری می‌افزایند (۹).

ویروس ILT به‌طور طبیعي و با تماس مستقیم از طریق بخش فوقانی دستگاه تنفس و ملتحمه چشم، بین پرندگان آلوده و پرندگان حساس منتشر می‌شود. انتقال مکانیکی ویروس توسط گرد و غبار، وسایل و تجهیزات آلوده مرغداری و باد صورت می‌گیرد (۹). برخی از پرندگان بهبود یافته از بیماري و یا پرندگان واکسینه شده، به حامل‌های ویروس تبدیل شده و آن را به مدت طولانی دفع می‌کنند (۵، ۱۲، ۲۱). در پرنده‌ی آلوده، ویروس در اپی‌تلیوم نای و حنجره تکثیر شده و به خارج از بدن منتشر می‌شود. تاکنون انتقال عمودی (از مادر به جنین) این ویروس تایید نشده است (۹). مشابه با سایر هرپس ویروس‌ها، ویروس ILT نیز آلودگی نهفته ایجاد می‌کند. گانگلیون‌های تری‌ژمینال محل اصلی نهفته شدن این ویروس هستند (۲۵).

تشخیص زود هنگام بیماری ILT با استفاده از جداسازی و تشخیص عامل بیماری، و کنترل و پیشگیری از آن با استفاده از پایش‌های سرمی امری ضروری است (۴). طبیعت نهفتگی عامل بیماری ILT، حامل بودن برخی طیور مبتلا و دفع طولانی مدت ویروس، مبارزه با این بیماری را دشوار نموده است. بنابراین، تجویز واکسن در بیشتر موارد راهکار مناسبی برای جلوگیری از بروز بیماری است. واکسن‌های زنده تخفیف حدت یافته ILT از تلقیح ویروس به تخم‌مرغ جنین‌دار و یا کشت سلولی تهیه می‌شوند (۱۲). با توجه به بومی بودن بیماری ILT در بعضی از مناطق ایران، به‌طور معمول برای پیشگیری از شیوع آن از واکسن تخفیف حدت یافته در پولت‌های تخم‌گذار استفاده مي‌شود. در این راستا، یکی از واکسن‌هایی که به‌طور رایج در گله‌های تخم‌گذار برای مقابله با شیوع این بیماری مورد استفاده قرار می‌گیرد، واکسن ILT تولیدی موسسه‌تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی است. نظر به اینکه، روند بروز پاسخ‌های ایمنی و ایجاد مصونیت پس از واکسیناسیون از اهمیت شایانی برخوردار است و همچنین عملکرد یک واکسن می‌تواند در سویه‌های مختلف، متفاوت باشد، این پژوهش با هدف مقایسه ایمنی‌زایی و ارزیابی روند پاسخ‌های ایمنی واکسن ILT تولید شده در موسسه رازی در سویه‌های بونز سفید و های‌لاین سویه W36 انجام شد.

مواد و روش‌ها

پرندگان و شرایط پرورش

برای انجام این مطالعه، هفتاد هزار قطعه پولت از هر یک از سویه‌های تخم‌گذار بونز سفید و های‌لاین W36 انتخاب و به دو فارم تجاری با شرایط مشابه اختصاص یافت. پیش از جوجه‌ریزی عملیات پاک‌سازی و ضدعفونی جایگاه طیور انجام شد. براي ارزیابی کیفیت عملیات ضدعفونی از سطوح مختلف سالن سوآب تهیه شد. تمامی مراحل پرورش در سیستم قفس و به‌صورت نیمه اتوماتیك صورت پذیرفت. پیش از آغاز دوره تخم‌گذاری، پرندگان به سالن‌های جدید انتقال یافتند.

برنامه‌ی واکسیناسیون

برای ایمن‌سازی گله‌های تخم‌گذار مورد آزمایش، واکسن ILT تولید شده در موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازي تهیه شد. این واکسن محتوی ویروس تخفیف حدت یافته کشت داده شده در تخم‌مرغ SPF جنین‌دار است. طبق دستورالعمل، واکسن لیوفیلیزه ILT به‌طور کامل در سرم فیزیولوژی حل و سپس پرنده‌های هر دو گروه آزمایشی، بر اساس نظر دامپزشک مسئول فارم‌ها، در سن هشت هفتگی واکسینه شدند. برای حصول اطمینان از واکسیناسیون انفرادی، تجویز واکسن با روش قطره چشمی انجام شد. سایر واکسن‌های مورد استفاده در این گله‌ها طبق برنامه استاندارد پرورشی مرغ‌های تخم‌گذار و با نظر دستور دامپزشک فارم‌های مورد مطالعه مصرف شد.

نمونه‌گیري خون

پیش از انجام واکسیناسیون (روز صفر)، و در فواصل زماني ۳، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۶ هفته پس از آن، به‌طور تصادفی ۲۰ قطعه جوجه هر سویه از قفس‌های مختلف انتخاب (از هر قفس يك پرنده) و نمونه‌گیری خون از سیاهرگ بال انجام شد. روش نمونه‌گیری برای هر دو سالن مشابه بود. پس از جداسازی سرم از نمونه‌های خون، تیتر با روش الایزا و آزمایش خنثی‌سازی ویروس ILT آنتی‌بادی علیه ارزیابی شد. تعداد نمونه‌های اخذ شده از هر سالن بر اساس فرمول

$$N= (z^2 \times p \times q)/d^2$$

و با فرض شیوع ۵٪ بیماری (p) و ضریب اطمینان ۹۰٪ و حاشیه خطای ۱۰٪ (d)، تعداد ۱۸ نمونه برآورد شد که برای اطمینان بیشتر تعداد ۲۰ نمونه خون از هر نژاد اخذ شد.

اندازه‌گیری تیتر آنتی‌بادی علیه ILT با روش الایزا

براي اندازه‌گیری تیتر آنتی‌بادی علیه بیماری ILT، از کیت الایزای تجاری IDEXX طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. به‌طور خلاصه، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سرم‌هاي مورد آزمایش (رقت ۱:۱۰۰) به‌ترتیب در دو چاهك متوالی ستون‌های ۱ تا ۱۲ ریخته شده و يك ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از سه بار شست‌وشو، آنتی‌بادی کونژوگه (goat anti-chicken IgG-HRP) به هر چاهك افزوده شد و پلیت‌ها به‌مدت يك ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. در ادامه چاهك‌ها شسته شده و پس از افزودن سوبسترای ABTS به هر چاهك، به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه گرم‌خانه‌گذاری صورت پذیرفت. در پایان با افزودن بافر متوقف کننده به هر چاهك، جذب نوری در طول موج ۴۰۵ نانومتر با دستگاه خوانش‌گر الایزا ثبت شد.

آزمایش خنثي‌سازي ویروس

برای انجام آزمایش خنثی‌سازی ویروس، ابتدا رقت‌های سری از ویروس بر مبنای log 10 (۱-۱۰ تا ۶-۱۰) تهیه شد. بدین ترتیب که شش لوله در نظر گرفته شده و روی آن‌ها برچسب نشان‌دهنده رقت چسبانده شد. در تمامی لوله‌ها مقدار ۱/۸ میلی‌لیتر محلول PBS ریخته شد و در ادامه به لوله نخست ۰/۲ میلی‌لیتر محلول حاوی ویروس ILT اضافه شد (رقت 10^{-1}). پس از مخلوط‌سازی محتویات لوله‌ها، ۰/۲ میلی‌لیتر از رقت 10^{-1} به لوله دوم منتقل شد. عمل تهیه رقت تا لوله ششم ادامه یافت. برای حذف اثرات نامطلوبِ پروتئین‌های کمپلمان موجود در سرم بر ویروس، ابتدا سرم‌ها به‌مدتِ نیم ساعت در بن‌ماری ۵۶ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری و سپس بلافاصله نمونه‌ها بر روی یخ گذاشته شد. به هر رقت ویروس، حجم مساوی از غلظت ثابت سرم اضافه شده و به‌طور کامل مخلوط شد. سپس لوله‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یك ساعت برای خنثی شدن ویروس قرار داده شدند. براي هر رقت، شش تخم‌مرغ جنین‌دار یازده روزه در نظر گرفته شده و ۰/۲ میلي‌لیتر از مخلوط سرم-ویروس بر روی پرده کوریوآلانتوییك جنین تخم‌مرغ‌ها تلقیح شد. پس از بستن محل تلقیح با پارافین مذاب، تخم‌مرغ‌ها به مدت ۷ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. براي تایید درستی آزمایش، کنترل‌های مثبت و منفی نیز در نظر گرفته شدند. بروز جراحات و مرگ جنین‌ها بررسی شده و نقطه پایانی به عنوان بیشترین رقتي از ویروس که هیچ پوکی روی پرده کوریوآلانتوییك ایجاد نکرده بود، ثبت شد. عیار آنتی‌بادی سرمی به روش Spearman-Karber محاسبه شد.

ارزیابي کارآیی واکسن

سه هفته پس از واکسیناسیون و به منظور انجام چالش، به‌طور تصادفی به ۲۰ پرنده از هر گروه مقدار 10^{3} EID_{50} < از ویروس vILT به‌صورت قطره داخل بینی تلقیح شد. شایان ذکر است که برای انجام انجام آزمایش کارایی واکسن، پرندگان انتخاب شده به محیطی استاندارد و مجزا از سالن‌های پرورشی انتقال یافتند. پس از تلقیح ویروس vILT پرندگان به مدت سه هفته نگهداری و روزانه از نظر تلفات و نشانه‌های بیماری ILT بازرسی شدند. بنابراین، برای ارزیابی‌های سرمی از پولت‌های هر فارم در محل فارمِ خون‌گیری شد، اما پولت‌های تحت چالش در مکان جدا از فارم و کاملاً در شرایط کنترل شده تحت چالش قرار گرفتند و پس از انجام آزمایش، حذف شدند.

آنالیز آماري

داده های حاصل از آزمایش هاي الایزا و خنثی سازي ویروس با روش t-test مقایسه آماری شدند. براي ارزیابی هم پایگي واریانس بین گروه ها، از آزمون Levene's استفاده شد. برای آنالیز داده‌های کارآیی واکسن در آزمایش چالش با ویروس vILT که توزیع باینومیال داشتند، از روش رگرسیون لجستیک و رویه‌ی GENMOD نرم‌افزار آماری SAS ۹/۴ استفاده شد. سطح احتمال $p<۰/۰۵$ برای بیان اختلاف‌های معنی‌دار مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج

تیتر آنتی‌بادی علیه ویروس ILT (آزمایش الایزا)

اطلاعات توصیفی مربوط به میانگین کل تیتر آنتی‌بادی حاصل از واکسیناسیون با واکسن ILT تولید شده در موسسه رازی در سویه های‌لاین W36 و بونز سفید در جدول (۱) نشان داده شده است. بر اساس یافته‌ها، میانگین تیتر آنتی‌بادی در سویه های‌لاین و بونز به ترتیب برابر با ۱۸۲۰/۲۰ و ۱۹۱۰/۷۱ با میانگین خطای استاندارد ۴۳/۲۱۵ و ۴۱/۰۶۱ بود. بین گروه‌های آزمایشی از نظر میانگین تیتر کل دوره تفاوتی مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$). روند تغییرات تیتر آنتی‌بادی علیه این بیماری پس از واکسیناسیون با واکسن ILT موسسه رازی در شکل (۱) گزارش شده است. به‌طور کلی، نتایج آزمایش الایزا بر روي سرم‌هاي اخذ شده نشان داد که واکسن ILT در هر دو سویه بونز سفید و های‌لاین سویه W36 کارایی یکسانی داشت و از این نظر بین این دو سویه تفاوتی وجود نداشت ($p>۰/۰۵$). شایان ذکر است که در هفته سوم پس از واکسیناسیون، در نتیجه‌ی آزمایش الایزا بین دو سویه مورد آزمایش اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($p<۰/۰۵$) که در هفته‌های پی‌آیند برطرف شد. روند تیترگیری تا هفته هشتم پس از واکسیناسیون در هر دو سویه به صورت خطی بود، اما پس از آن تیترهای حاصل شده روندی به‌نسبت ثابت را در طول آزمایش داشتند. بررسی روند افزایش تیتر آنتی‌بادی حاصل از واکسیناسیون پولت‌های تخم‌گذار با واکسن ILT موسسه رازی نشان داد که طی هشت هفته نخست پس از واکسیناسیون، تیتر آنتی‌بادی با ضریب تابعیت خطی ۲۵۱ افزایش می‌یابد.

جدول ۱- اطلاعات توصیفی میانگین کل و واریانس تیتر آنتی‌بادی علیه بیماری لارنگوتراکئیت عفونی (ILT) پس از واکسیناسیون با واکسن موسسه رازی در سویه‌های پولت های‌لاین سویه W36 و بونز سفید

سویه	تعداد	میانگین	انحراف معیار	میانگین خطای استاندارد
های لاین سویه W36	۲۰	۱۸۲۰/۲۰۰	۱۳۶/۶۵۸	۴۳/۲۱۵
بونز سفید	۲۰	۱۹۱۰/۷۱۴	۱۲۹/۸۴۷	۴۱/۰۶۱

آزمایش خنثي‌سازي ویروس

نتیجه آزمایش خنثي‌سازي ویروس ILT در دو سویه تخم‌گذار بونز سفید و هاي‌لاین سویه W36 در شکل (۲) گزارش شده است. میانگین کلی شاخص خنثی‌سازی ویروس در پولت‌های سویه بونز و هایلاین واکسینه شده با واکسن ILT موسسه رازی تفاوت معنی‌داری نداشت ($p>0/05$). با این حال، تفاوت‌های جزئی با روند سینوسی بین هفته‌های ۶ تا ۱۰ پس از واکسیناسیون بین گروه‌های آزمایشی مشاهده شد. مشابه با روندی که در میانگین تیتر آنتی‌بادی طی هفته‌های مختلف گزارش شد، شاخص خنثی‌سازی ویروس در شش هفته نخست پس از واکسیناسیون افزایشی بود و پس از آن روند به‌نسبت ثابتی را طی کرد. طی سه هفته نخست پس از واکسیناسیون، شاخص خنثی‌سازی ویروس با روندی خطی و با ضریب تابعیت ۰/۵۴۷ افزایش یافت.

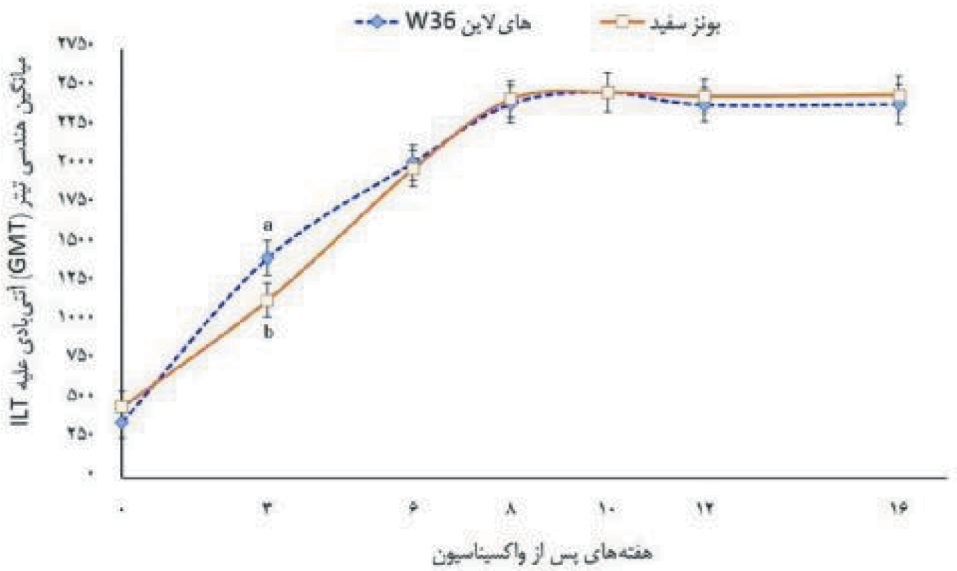
آزمایش کارآیی

نتایج مربوط به آزمایش کارآیی واکسن ILT موسسه رازی در دو سویه پولت تخم‌گذار های‌لاین و بونز در شکل (۳) نشان داده شده است. بین سویه‌های مورد آزمایش از نظر محافظت در برابر ویروس vILT تفاوتی وجود نداشت ($p>0/05$). یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که واکسیناسیون با واکسن ILT موسسه رازی باعث محافظت مناسب پرندگان مورد آزمایش شد (۱۰۰ درصد در سویه های‌لاین و ۹۵ درصد در سویه بونز). تنها در یک مورد از ۴۰ مورد پرنده تحت چالش با ویروس vILT علائم بالینی بیماري مشاهده شد که نشان از محافظت کلی بیش از ۹۷ درصدی گله‌های واکسینه شده داشت.

بحث

بیماری ILT از جمله مهم‌ترین بیماری‌های ویروسی دستگاه تنفسی ماکیان با انتشار جهانی است که خسارات زیادی را به واحدهای مرغ‌تخم‌گذار تحمیل می‌کند. واکسیناسیون علیه این بیماری در سویه‌های مختلف پولت می‌تواند تا حد زیادی مصونیت ایجاد نماید. با این حال، پاسخ به واکسیناسیون در سویه‌های مختلف می‌تواند متفاوت باشد. در این پژوهش، کارآیی واکسن ILT ساخت موسسه رازی در پولت‌های سویه بونز سفید و هلای‌لاین سویه W36 از نظر تیتر آنتی‌بادی سرمی علیه ILT، آزمایش خنثی‌سازی ویروس و همچنین میزان محافظت طی آزمایش چالش با ویروس حاد مورد آزمون قرار گرفت.

پردازش نتایج آزمایش‌های الایزا و خنثی‌سازی ویروس با استفاده از آزمون‌های آماری نشان داد که هر دو سویه تخم‌گذار نسبت به ایمن‌سازی علیه بیماری ILT طیور پاسخ حفاظتی مناسبی القا شده است. با تلقیح ویروس زنده تخفیف حدت یافته ILT به سینوس‌های زیر چشمی، داخل بینی، فولیکول‌های پر و چشم، و نیز از طریق آب آشامیدنی ایمنی اختصاصی در طیور ایجاد می‌شود. بر اساس یافته‌های Andreasen و همکاران (۱۹۸۹)، Fahey و York (۱۹۹۰) و García و همکاران (۲۰۱۳)، آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده ویروس ILT ۵ تا ۷ روز پس از واکسیناسیون قابل شناسایی بوده و طی ۲۱ روز به آستانه غلظت محافظت‌کنندگی



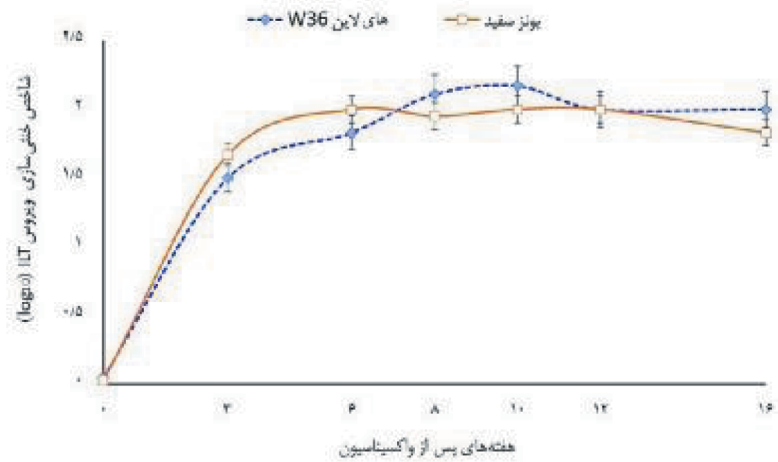
شکل ۱- نتایج ارزیابی عیار آنتی‌بادی علیه ویروس لارنگوتراکئیت عفونی (ILT) در سویه‌های پولت های‌لاین سویه W36 و بونز سفید طی هفته‌های مختلف نسبت به زمان واکسیناسیون (n=۲۰). حروف انگلیسی متفاوت (a، b) در هفته سوم نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($p>0/05$).

می‌رسند. این آنتی‌بادی‌ها برای چند ماه، گاه تا یك سال در بدن پرنده باقی خواهند ماند. آنتی‌بادی‌های موجود در ترشحات نای پرنده آلوده با ویروس ILT، یك هفته پس از آلودگی قابل شناسایی‌اند و تا چهار هفته پس از آن به بیشینه مقدار خود می‌رسند. این یافته‌ها با نتایج حاصل از این پژوهش که نشان داد طی هفته‌های نخست پس از واکسیناسیون با واکسن ILT موسسه رازی تیتر سرمی و همچنین شاخص خنثی‌سازی ویروس به صورت خطی افزایش می‌یابد و سپس در سطح به‌نسبت ثابتی نوسان می‌یابد، همخوانی داشت. همچنین، بررسی ارتباط بین افزایش تیتر آنتی‌بادی حاصل از واکسیناسیون پولت‌های تخم‌گذار با واکسن ILT موسسه رازی نشان داد که طی هشت هفته نخست پس از واکسیناسیون، تیتر آنتی‌بادی با ضریب تابعیت خطی ۲۵۱ و شاخص خنثی‌سازی ویروس با ضریب تابعیت ۰/۵۵ افزایش می‌یابد. این امر روند بسیار مناسب ایمن‌سازی پرندگان مورد آزمایش پس از واکسیناسیون را نشان می‌دهد، به‌طوری‌که پس از گذشت حداقل سه هفته از زمان واکسیناسیون، واکسن ILT تولیدی موسسه رازی تیتر آنتی‌بادی و شاخص خنثی‌سازی را به آستانه حفاظت‌کنندگی علیه بیماری می‌رساند. این نتایج با یافته‌های حاصل از چالش پرندگان با ویروس vILT تنها سه هفته پس از واکسیناسیون و ثبت حفاظت کلی ۹۷ درصدی علیه ویروس آن مورد تائید قرار گرفت.

مشخص شده است که ایمني حاصل از واکسیناسیون علیه این بیماری در جوجه‌هاي کم سن به‌خصوص کمتر از دو هفته به خوبی جوجه‌هاي بالغ نیست. افزون بر این، واکنش به واکسیناسیون در جوجه‌هاي جوان‌تر بسیار بیش‌تر از بالغین است. زمان انجام واکسیناسیون و نوبت‌های آن به شرایط فارم، سوابق بیماری و نظر دامپزشک فارم بستگی دارد.

اغلب یک نوبت واکسیناسیون با روش قطره چشمی در سن حدود ۱۰-۸ هفتگي انجام می‌شود. درصورت کاهش عیار آنتی‌بادی طی هفته‌های بعد، واکسیناسیون را به همان روش یا روش‌های اسپری و یا آب آشامیدنی می‌توان تکرار کرد. از آنجایی که ممکن است پرندگان واکسینه شده علیه این بیماری به حامل‌های نهفته ویروس تبدیل شوند، Garcia و همکاران (۲۰۱۳)، و به ویژه کارشناسان OIE (۱۲) توصیه نموده‌اند که واکسیناسیون علیه ILT فقط در مناطق جغرافیایی که این بیماری بومی است انجام شود. با وجود اینکه آزمایش سرولوژی (Differentiating Infected from Vaccinated Animals; DIVA) برای افتراق حیوانات واکسینه از آلوده به‌عنوان یک روش سودمند برای کنترل ILT پیشنهاد شده است (۹)، اما این راهبرد کنترلی مرحله آزمایشگاهی را سپری می‌کند و هنوز میدانی نشده است. در سال‌های اخیر با هدف طراحی روشی کارآمد برای افتراق سویه واکسن با منشاء جنین جوجه از سویه‌های vILT، پژوهش‌هایی با بررسی پویایی رشد ویروس و ارزیابی رفتارهای آن در سلول بنیادی عصب و ریه جنین جوجه انجام شده است (۱۰، ۲۳). تنوع در پاسخ سلولی در عفونت‌های ILT ثابت می‌کند که این سلول‌ها می‌توانند به‌عنوان مدلی مناسب برای تشخیص تفریقی سویه‌های این ویروس معرفی شوند.

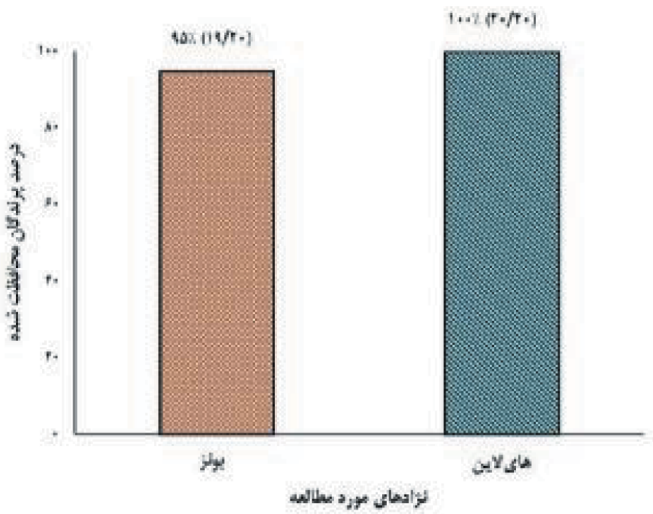
یك پولت یا مرغ‌تخم‌گذار فقط در صورتی می‌تواند در سطح پتانسیل ژنتیکی خود عمل کند که شریط محیطی بهینه فراهم باشد و بیماری‌های عفونی کم‌ترین تاثیر را بر روی گله داشته باشند. در همه‌گیری یك بیماری عفونی، موثرترین راه کنترل بیماری، تلاش هماهنگ برای تشخیص سریع بیماری، رعایت معیارهای زیست امنیتی برای جلوگیری از افزایش انتشار



شکل ۲- نتایج آزمایش خنثی‌سازی ویروس لارنگوتراکئیت عفونی (ILT) در دو سویه پولت تخم‌گذار های‌لاین سویه W36 و بونز سفید در هفته‌های مختلف پس از واکسیناسیون با واکسن موسسه رازی (n=۶).

عامل بیماری‌زا و اجرای برنامه واکسیناسیون برای القا ایمنی اختصاصی است. در این میان، بررسی احتمال بروز هر نوع اختلال در پاسخ‌های ایمنی القا شده علیه عوامل بیماری‌زا بیش از پیش احساس می‌شود. عوامل تغذیه‌ای می‌توانند تظاهر ژن‌های مسئول پاسخ ایمنی را با ایجاد تغییر بر روی تکامل سیستم ایمنی و نیز مقدار آنتی‌بادی تولید شده علیه عامل بیماری‌زا، تغییر دهند. بنابراین، در اختیار قرار دادن سطوح مناسبی از پروتئین، اسیدهای آمینه‌ی موثر بر پاسخ‌های ایمنی مانند متیونین، آرژنین و تریپتوفان برای بیشینه‌سازی پاسخ ایمنی ضروری است، به‌طوری که کمبود این اسیدهای آمینه موجب کاهش فعالیت لنفوسیت‌ها، تحلیل غده بورس فابریسیوس و افزایش حساسیت به بیماری‌های عفونی می‌شود (۱۳). افزون بر این، کمبود ویتامین A سبب کاهش تولید لنفوسیت B، کراتینه شدن سلول‌های پایه‌ای بورس فابریسیوس و اختلال در عملکرد لنفوسیت‌های T می‌شود. نتیجه این کمبود کاهش مقاومت نسبت به عفونت‌ها و افزایش احتمال شیوع و گسترش بیماری است (۳). طبق بررسی Wintergerst و همکاران (۲۰۰۷) ویتامین B۶ در گسترش و حفظ بافت‌های لنفوییدی موثر است و کمبود آن سبب کاهش تولید IgG وIgM می‌شود. همچنین نشان داده شده است که تجویز ویتامین E و سلنیوم در زمان تزریق واکسن باعث بهبود عملکرد سیستم ایمنی می‌شود در حالی‌که جیره‌های حاوی مقادیر کم روی، سدیم و کلر پاسخ‌های ایمنی هومورال کاهش می‌دهد (۱۸).

افزون بر عوامل تغذیه‌ای، عوامل ژنتیکی نیز می‌توانند پاسخ ایمنی علیه عامل بیماری‌زا تعییر دهند. مقاومت ژنتیکی در برابر عوامل بیماری‌زا صفت پیچیده چند ژنی است که بر روی سیستم ایمنی و برهم‌کنش آن با عوامل فیزیولوژیك و محیطی اثر میگذارد. برای نمونه، ژن‌های SAL 1، NrampI (SIC11a1)، و IAP1 در مقاومت نسبت به بیماری سالمونلوزیس احشایی جوجه‌ها از راه افزایش فعالیت ماکروفاژها علیه باکتری سالمونلا نقش دارند. همچنین، توالی‌یابی ژنوم لگهورن‌های سفید و بررسی ارتباط آن با سویه‌های مختلف سالمونلا مشخص کرده است که این سویه نسبت به سویه‌های مختلف سالمونلا حساسیت‌های متفاوتی دارند (۲، ۱۵). ارتباط بین چندشکلی‌های موجود در توالی ژن کمپلکس سازگاری نسجی اصلی (Major histocompatibility complex; MHC) میزبان با بروز حساسیت و یا مقاومت نسبت به بیماری‌های عفونی نیز به تایید رسیده است. اهمیت عرضه آنتی‌ژن و اختصاصی بودن اتصال به پپتیدهای مولکول MHC در طیور توسط Jovanovic و همکاران (۲۰۰۹) بررسی شده است. این کمپلکس هم در مقاومت ذاتی نسبت به بیماری‌ها و هم در پاسخ به واکسیناسیون نقش مهمی دارد، به‌طوری که توانایی لنفوسیت‌های T در شناسایی پپتیدهای آنتی‌ژن بیگانه، وابسته به ارائه شدن آن‌ها توسط مولکول‌های MHC است. اگرچه نقش مولکول‌های MHC در ایجاد مقاومت ژنتیکی نسبت به برخی از بیماری‌های عفونی طیور مورد مطالعه قرار گرفته است (۱۶)، اما در مورد بیماری ILT اطلاعات چندانی در دسترس نیست و تنها نقش MHC میزبان در بروز مقاومت ژنتیکی علیه این بیماری گزارش شده است. نشان داده شده است که در نتیجه‌ی تنظیم بهتر زیر جمعیت‌های سلول‌های T، القای پاسخ‌های ایمنی سلولی در دو سویه لگهورن سفید می‌تواند متفاوت باشد



شکل ۳- درصد پولت‌های سویه بونز سفید و های‌لاین سویه W36 محافظت‌شده در برابر چالش با ویروس vILT سه هفته پس از واکسیناسیون با واکسن لارنگوتراکئیت عفونی موسسه رازی (n=۲۰)

(۱۱). این بدین معنی است که در کنار تفاوت‌های ژنتیکی در حساسیت ذاتی سویه‌های طیور نسبت به شماری از بیماری‌ها، اختلافاتی نیز در پاسخ به واکسن‌ها و در نتیجه کاهش یا افزایش اثر واکسن وجود دارد. آنتی‌بادی‌های مادری علیه ویروس ILT از طریق تخم مرغ به جوجه منتقل می‌شوند. این آنتی‌بادی‌ها توانایی محافظت در برابر این بیماری را ندارند، بنابراین واکسیناسیون روش مناسبی برای محافظت در برابر آن در جمعیت طیور حساس است (۹). در زمان شیوع این بیماری، واکسیناسیون انتشار ویروس را محدود کرده و سبب می‌شود دوره بیماری کاهش یابد. بر اساس مطالعه Fahey و York (۱۹۹۰)، حذف آلودگی ویروس ILT در نتیجه کسب ایمنی هومورال و یا ایمنی با واسطه سلولی، بیان‌گر ایجاد مقاومت ژنتیکی علیه این بیماری با مشارکت MHC جوجه است. بنابراین، سویه‌های بونز سفید و های‌لاین W36 نسبت به ابتلا به ILT مقاومت یکسانی دارند. از آنجایی که تاکنون تحقیقات کاملی در مورد مقاومت ژنتیکی لاین‌های مختلف طیور نسبت به بیماری ILT صورت نگرفته است، برای پیشگیری و کنترل موفقیت‌آمیز آن، باید افزون بر واکسیناسیون با رعایت معیارهای زیست-امنیتی، رعایت بهداشت تجهیزات و سالن‌های پرورش، از انتقال بیماری بین گله‌های مختلف جلوگیری کرد.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش نشان داد واکسیناسیون علیه بیماری ILT در سویه‌های تخم‌گذار بونز سفید و های لاین W36 با واکسن تخفیف حدت یافته موسسه رازی، تیتر آنتی‌بادی سرمی بهینه‌ای را ایجاد کرده و از پرندگان علیه این بیماری به‌خوبی محافظت می‌کند. اگر چه تفاوت‌های بسیار جزئی در روند ایمن‌سازی بین سویه‌های مورد مطالعه در پاسخ به واکسیناسیون مشاهده شد، اما میانگین کلی تیتر آنتی‌بادی و همچنین شاخص خنثی‌سازی ویروس بین سویه‌ها تفاوتی نداشت. از طرفی، روند تیترگیری و افزایش شاخص خنثی‌سازی ویروس طی هفته‌های نخست پس از واکسیناسیون نشان از کارآیی مناسب واکسن ILT موسسه رازی برای ایجاد ایمنی فعال علیه بیماری داشت، ادعایی که سه هفته پس از واکسیناسیون، با انجام آزمایش چالش پرنده‌های واکسینه شده با ویروس vILT به اثبات رسید. با این حال، باید آزمایش‌های بیشتری برای تعیین روند تغییرات ایمنی طی دوره پرورش و واکنش پس از واکسیناسیون صورت پذیرد.

منابع مورد استفاده

1- Andreasen, J. R., J. R. Glisson, M. A. Goodwin, R. S. Resurreccion, P. Villegas and J. Brown. 1989. Studies of infectious laryngotracheitis vaccines: immunity in layers. *Avian Diseases*: 524-530.

2- Blackwell, J. M., T. Goswami, C. A. Evans, D. Sibthorpe, N. Papo, J. K. White, S. Searle, E. N. Miller, C. S. Peacock and H. Mohammed. 2001. SLC11A1 (formerly NRAMP1) and disease resistance: Microreview. *Cellular microbiology* 3: 773-784.

3- Cook, M. 1991. Nutrition and the immune response of the domestic fowl. *Critical Reviews in Poultry Biology* 3: 167-189.

4- Ebrahimi, M. M., S. A. Pourbakhsh, S. Shahsavandi, R. Momayez and M. R. Gholami. 2003. Isolation and Identification of Infectious Laryngotrachitis Virus from Commercial Flocks of Iran Using Various Techniques. *Archives of Razi Institute* 56: 11-22.

5- Ebrahimi, M. M., S. Shahsavandi and M. R. Gholami. 2001. Outbreak of infectious laryngotracheitis following vaccination in pullet flock. *Archives of Razi Institute*: 19-26.

6- Fahey, K., T. Bagust and J. York. 1983. Laryngotracheitis herpesvirus infection in the chicken: the role of humoral antibody in immunity to a graded challenge infection. *Avian Pathology* 12: 505-514.

7- Fahey, K. J. and J. J. York. 1990. The role of mucosal antibody in immunity to infectious laryngotracheitis virus in chickens. *Journal of General Virology* 71: 2401-2405.

8- Fuchs, W., J. Veits, D. Helferich, H. Granzow, J. P. Teifke and T. C. Mettenleiter. 2007. Molecular biology of avian infectious laryngotracheitis virus. *Veterinary Research* 38: 261-279.

9- García, M., S. Spatz and J. S. Guy. 2013. Infectious laryngotracheitis. *Diseases of Poultry*: 161-179.

10- Ghadiri, M. B., S. Shahsavandi, G. A. Moradli and Z. Jamshidi-Navroud. 2016. Interaction of embryonic chicken lung cell with dif-ferent strains of infectious laryngotracheitis virus in-fections. *Journal of Biology and Today's World* 5: 35-39.

11- Hunt, H. D., S. Jadhao and D. E. Swayne. 2010. Major histocompatibility complex and background genes in chickens influence susceptibility to high pathogenicity avian influenza virus. *Avian Diseases* 54: 572-575.

12- Jones, R. 2000. Avian infectious laryngotrachities. Office International des Epizooties World Organization for Animal Health: 456-464.

13- Klasing, K. 1998. Nutritional modulation of resistance to infectious diseases. *Poultry Science* 77: 1119-1125.

14- Kouwenhoven, B. 1993. Newcastle disease. Virus infections of birds St Louis: Elsevier Science: 341-361.

15- Lamont, S., M. Kaiser and W. Liu. 2002. Candidate genes for resistance to Salmonella enteritidis colonization in chickens as detected in a novel genetic cross. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 87: 423-428.

16- Loudovaris, T., B. Yoo and K. Fahey. 1991. Genetic resistance to infectious laryngotracheitis in inbred lines of White Leghorn chickens. *Avian Pathology* 20: 357-361.

17- May, H. G. and R. P. Tittsler. 1925. Tracheo-laryngitis in poultry. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 67: 229-231.

18- Park, S., S. Birkhold, L. Kubena, D. Nisbet and S. Ricke. 2004.

Review on the role of dietary zinc in poultry nutrition, immunity, and reproduction. *Biological Trace Element Research* 101: 147-163.

19- Pattison, M., P. McMullin and J. M. Bradbury. 2008. Poultry Diseases. Elsevier Health Sciences 6th edition.

20- Portz, C., N. Beltrao, T. Q. Furian, A. B. Júnior, M. Macagnan, J. Griebeler, C. A. V. L. Rosa, E. M. Colodel, D. Driemeier and A. Back. 2008. Natural infection of turkeys by infectious laryngotracheitis virus. *Veterinary Microbiology* 131: 57-64.

21- Rodríguez-Avila, A., I. Oldoni, S. Riblet and M. García. 2007. Replication and transmission of live attenuated infectious laryngotracheitis virus (ILTV) vaccines. *Avian Diseases* 51: 905-911.

22- S, J., M. Savic and D. Zivkovic. 2009. Genetic variation in disease resistance among farm animals. *Biotechnology in Animal Husbandry* 25: 339-347.

23- Shahsavandi, S., Z. Jamshidi-Navroud, M. Firouzi and M. M. Ebrahimi. 2017. Examining responses of chicken embryonic neural stem cell to infectious laryngotracheitis virus infections. *Comparative Clinical Pathology* 26: 493-498.

24- Wintergerst, E. S., S. Maggini and D. H. Hornig. 2007. Contribution of selected vitamins and trace elements to immune function. *Annals of Nutrition and Metabolism* 51: 301-323.

25- Yilmaz, F., N. Timurkaan and H. Bulut. 2004. Detection of infectious laryngotracheitis virus in trigeminal ganglia by avidin-biotin complex method in chickens. *Acta Veterinaria Hungarica* 52: 167-171.