DOI: 10.22092/VJ.2022.358989.1986
شماره ۱۳۹ تابستان ۱۴۰۲
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

ارزیابی اثر استفاده از حلال اختصاصی بر کارآیی و اثربخشی واکسن آبله طیور

• **علیرضا یوسفی (نویسنده مسئول)**
موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
• **محمد عبدالشاه**
موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
• **محمدمجید ابراهیمی**
موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱-۰۳-۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱-۰۴-۲۱
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱-۰۴-۲۰ تاریخ انتشار: ۱۴۰۲-۰۴-۱
Email: ar.yousefi@rvsri.ac.ir

چکیده

ارائه‌ی یک حلال استاندارد به همراه واکسن لیوفیلیزه آبله طیور، نه تنها به سهولت آماده‌سازی واکسن جهت تلقیح در پرده بال ودقت بالاتر واکسیناسیون کمک می‌کند، بلکه می‌تواند موجب بهبود اثربخشی واکسن شود. هدف پژوهش حاضر، مطالعه نقش یک حلال استاندارد برای آماده‌سازی واکسن آبله طیور و بررسی اثر آن بر پایداری ویروس در واکسنِ آماده‌ی مصرف، کارآیی و همچنین اثربخشی واکسن در شرایط مزرعه بود. در این پژوهش، حلال رنگی اختصاصی تهیه شده برای واکسن آبله‌ی طیورِ رازی به همراه دیگر حلال‌های مرسوم طی آزمایش‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفتند. در آزمایش نخست، پایداری تیتر واکسن در زمان‌های صفر، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از آماده‌سازی در حلال‌های مختلف شامل حلال اختصاصی، آب مقطر حاوی ۲۰٪ (V/V) گلیسیرین و Phosphate-buffered saline(PBS) مطالعه شد. در آزمایش دوم، واکسن آماده شده با حلال اختصاصی، آب مقطر حاوی ۲۰٪ گلیسیرین و یک حلال وارداتی (حاوی آب قابل تزریق) تحت سنجش کارآیی به دنبال چالش با ویروس حاد آبله طیور قرار گرفت. در آزمایش سوم، اثربخشی واکسن آماده‌سازی شده با حلال اختصاصی نسبت به واکسن آماده‌سازی شده با آب مقطر حاوی ۲۰٪ گلیسیرین طی آزمایش مزرعه‌ای مقایسه شد. نتایج آزمایش نخست نشان داد استفاده از حلال اختصاصی و آب مقطر حاوی ۲۰٪ گلیسیرین نسبت به PBS میتواند به پایداری تیتر واکسن طی زمان‌های پس از آماده‌سازی کمک کند (P<۰/۰۵). در آزمایش دوم، تفاوتی بین حلال‌های مختلف از نظر take واکسن و کارآیی واکسن در پیشگیری از بروز بیماری پس از چالش با ویروس حاد تحت شرایط کنترل‌شده‌ی آزمایشگاهی دیده نشد (P>۰/۰۵)؛ اما تمامی گروه‌ها نسبت به گروه‌های کنترل مثبت (تلقیح حلال اختصاصی بدون واکسن) و منفی (عدم تلقیح حلال و واکسن)، پاسخ به واکسن و محافظت بالاتری داشتند (P<۰/۰۵). در نتایج آزمایش مزرعه‌ای، take واکسن در حلال اختصاصی ۱۱٪ بالاتر از آب مقطر حاوی ۲۰٪ گلیسرین بود(P<۰/۰۵). در کل، یافته‌های این پژوهش نشان دادند در صورت استفاده از حلال اختصاصی نه‌تنها کارآیی حداکثری واکسن حفظ می‌شود، بلکه از نظر سهولت کاربرد و بهبود اثربخشی واکسن نسبت به حلال‌های مرسوم دارای مزیت است.

کلمات کلیدی: اثربخشی، آبله طیور، حلال، کارآیی، واکسن

Veterinary Researches & Biological Products No 139 pp: 11-21

Evaluation of the effect of applying a specific diluent on efficacy and effectiveness of Fowl Pox vaccine

By: Yousefi, A.R., (Corresponding Author) Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Abdoshah, M., Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. and Ebrahimi, M.M., Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Email: ar.yousefi@rvsri.ac.ir

Received: 2022-06-14 **Accepted: 2022-07-12**

Revised: 2022-07-11 **Published: 2023-07-22**

Providing a standard diluent for preparing the lyophilized Fowl Pox vaccine not only facilitates the preparation of the vaccine for inoculation and improves the accuracy of vaccination but can also affect the effectiveness of the vaccine. The aim of the present study was to investigate the role of a standard diluent in the preparation of the Fowl Pox vaccine and its effect on virus stability in the ready-to-use vaccine, vaccine efficacy, and effectiveness in field conditions. In this study, a colored diluent specifically prepared for the Razi poultry Fowl pox vaccine was evaluated and compared with conventional diluents recommended by vaccine producers. In the first experiment, the vaccine titer stability was investigated at 0, 12, and 24 hours after vaccine preparation by different diluents including specific diluent, distilled water containing 20% (V/V) of glycerin and PBS (Phosphate-buffered saline), as the positive control. In the second experiment, the efficacy of the vaccine prepared with a specific diluent, distilled water containing 20% (V/V) of glycerin, an imported diluent (containing water for injection), was evaluated following a challenge with the virulent Fowl Pox virus. In the third experiment, the effectiveness of the vaccine prepared with specific diluent or distilled water containing 20% (V/V) of glycerin was studied. The results of the first experiment showed that the use of a specific diluent or distilled water containing 20% glycerin could help to maintain vaccine titer during the post-preparation period compared to PBS ($P < 0.05$). The results of the second experiment revealed that under the controlled laboratory conditions, there was no difference between the experimental diluents in terms of vaccinal take and vaccine efficacy in preventing post-challenge acute disease ($P > 0.05$); however, all the vaccinated groups had higher vaccinal take and protection compared to the positive (inoculation of specific diluents without vaccine) and negative (inoculation of no vaccine and diluent) control groups ($P < 0.05$). In the field trial experiment, the vaccinal take associated with the specific diluent group was 11% higher than the positive control group ($P < 0.05$). In general, the findings of this study showed that the application of a specific diluent for preparing the Fowl Pox vaccine, not only maintains its maximum efficacy but also it has advantages over conventional diluents in terms of applying easiness and improving the vaccine effectiveness.

Key words: Diluent, Effectiveness, Efficacy, Fowl Pox, Vaccine.

مقدمه

آبله طیور بیماری ویروسی است که عامل آن یک DNA ویروس از جنس *Avipoxvirus*، زیر خانواده *Chordopoxvirinae* از خانواده *Poxviridae* است (۲۰). این بیماری با وجود گسترش آهسته، انتشار جهانی دارد و ضایعات پیش‌رونده، زخم‌های پوستی و جراحاتی در بخش‌های فوقانی دستگاه گوارش و تنفس ایجاد می‌کند. حالت خشک یا پوستی این بیماری نسبت به حالت مرطوب آن، معمولاً مرگ‌ومیر کمتری دارد و احتمال بهبود پرندگان درگیر با آن بیشتر است. زخم‌های پیش‌رونده‌ای که بینی، حلق و نای را در حالت مرطوب یا دیفتریک بیماری درگیر می‌کند، می‌تواند منجر به دردناک شدن تنفس و مرگ در اثر خفگی شود (۲۰). با

توجه به اینکه آبله‌ی طیور منجر به کاهش تولید تخم‌مرغ و کاهش نرخ رشد پرندگان جوان و افزایش تلفات می‌شود، از نظر اقتصادی اهمیت فراوانی دارد. ارزیابی‌های بافت‌شناسی زخم‌های پوستی یا دیفتریک در پرندگان مبتلا نشان‌دهنده‌ی هایپرپلازی اپیتلیومی همراه با گنجیدگی‌های درون‌سیتوپلاسمی سلول‌های تحت تاثیر قرار گرفته است. در اسمیرهای حاصل از چرک‌ها، ممکن است بخش‌هایی از زخم‌های ایجاد شده وجود داشته و با روش Gimenez قابل شناسایی باشد (۱۸). ارزیابی زخم‌ها با میکروسکوپ الکترونی، ذرات ویروسی با مشخصات ریخت‌شناسی ویروس آبله را نمایان می‌سازد (۱۸). لازم است فرم دیفتریک بیماری که با درگیری نای همراه است از لارنگوتراکئیت عفونی که توسط یک هرپس ویروس و با حضور گنجیدگی‌های درون‌هسته‌ای بروز می‌کند، تشخیص تفریقی داده شود (۱۵). اگر چه هم ایمنی با واسطه‌ی سلولی و هم ایمنی هومورال نقش مهمی در پاسخ به عفونت‌های ویروس آبله دارند، نظر به دشورای ارزیابی ارزیابی ایمنی با واسطه‌ی سلولی، آزمون‌های سرولوژی مانند خنثی‌سازی ویروس (VN)، آگار ژل ایمیونودیفیوژن(AGID)، هماگلوتیناسیون غیرفعال (Passive haemagglutination) و آزمون با آنتی‌بادی فلورسنت (Fluorescent antibody tests) و همچنین روش الایزا برای ارزیابی پاسخ ایمنی استفاده می‌شود (۲).

بیماری آبله طیور اغلب در مرغان مادر و تخمگذار بروز می‌کند و برای پیشگیری از بروز و یا کنترل آن، واکسیناسیون با واکسن زنده‌ی آبله‌ی طیور، اصلی‌ترین راه است (۱۵). نتایج مطالعات مختلف نشان از موفقیت این واکسن در جلوگیری از بروز بیماری و ایجاد ایمنی علیه آبله طیور دارد (۲، ۱۹). بر اساس دستورالعمل شرکت‌های تولیدکننده واکسن آبله‌ی طیور، ویال‌های واکسن لیوفیلیزه باید با حلال معرفی‌شده توسط سازنده، آماده‌سازی و مصرف شود. از آن جا که ترکیب حلال‌ها می‌تواند متنوع باشد، باید برای آماده‌سازی هر واکسن، حلال اختصاصی ساخته‌شده یا معرفی شده توسط سازنده استفاده شود (۲۴). با وجود این که در بروشور ارائه شده همراه با برخی از واکسن‌های آبله طیور توصیه به آماده‌سازی واکسن لیوفیلیزه با آب مقطر یا سرم فیزیولوژی حاوی ۲۰٪ گلیسیرین شده است، عدم ارائه یک حلال استاندارد همراه با واکسن منجر به استفاده‌ی سلیقه‌ای از حلال‌های مختلف در شرایط مزرعه می‌شود و ممکن است کارآیی واکسن را به شدت تحت تاثیر قرار دهد. در این راستا، نشان داده شده است که ویژگی های مختلف حلال از جمله ترکیب، pH، خاصیت بافری، دما و شیوه صحیح نگهداری آن که باید بین ۲ تا ۸ درجه سلسیوس باشد، می‌تواند بر کارآیی و اثربخشی واکسن، به‌خصوص واکسن‌های زنده، اثر گذار باشد (۸، ۲۴). با توجه به موارد بیان شده، هدف از مطالعه حاضر ارزیابی اثر استفاده از حلال اختصاصی توسعه یافته توسط موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی بر کارآیی و اثر بخشی واکسن آبله طیور بود.

مواد و روش‌ها

حلال‌های مورد استفاده

در این آزمایش از یک حلال جدید توسعه یافته توسط موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی حاوی نسبت‌های مشخصی از نمک‌های بافری (پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات، سدیم هیدروکساید، سدیم کلراید، پتاسیم کلراید، دی‌سدیم هیدروژن فسفات؛ شرکت مرک) رنگ برلیانت بلو (شرکت سیگما) و گلیسیرین (شرکت مرک)، به‌عنوان حلال استاندارد برای آماده‌سازی واکسن آبله استفاده شد. دیگر حلال‌ها شامل آب مقطر، آب مقطر حاوی ۲۰٪ (V/V) گلیسیرین، PBS (Phosphate-buffered saline) و یا حلال واکسن آبله طیور وارداتی (حاوی آب قابل تزریق) بودند که بسته به نوع آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند. هدف از بکارگیری رنگ در حلال توسعه‌یافته، علامت‌گذاری محل تلقیح به‌خاطر مشخص شدن دریافت واکسن در زمان مایه‌کوبی بود. برای این منظور، غلظت‌های مختلف از رنگ در حلال استفاده و کمترین غلظتی که اثر آن تا ۲۴ ساعت

شکل ۱- بررسی اثر غلظت‌های مختلف رنگ در حلال پس از تلقیح حلال در پرده بال جوجه‌هایSPF.

پس از تلقیح در پرده بال باقی بماند، در عین حال اثر منفی بر ویروس واکسینال نداشته باشد، انتخاب شد (شکل ۱).

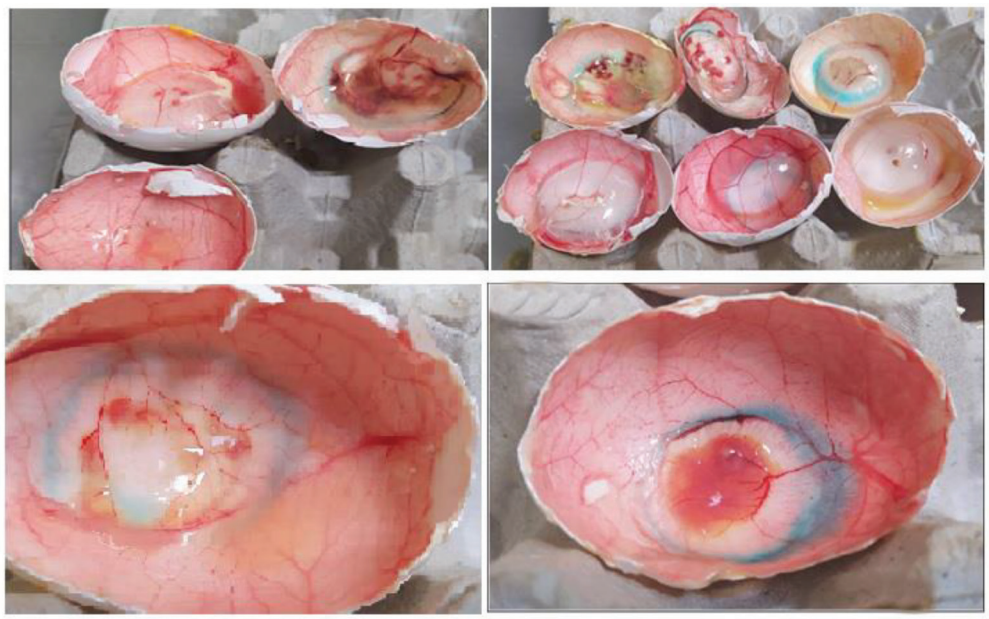
آزمایش اول: اثرحلال‌های مختلف بر پایداری تیتر واکسن آماده مصرف

به منظور ارزیابی واکنش متقابل حلال با ویروس و زنده‌مانی ویروس واکسینال در آن، واکسن آبله‌ی طیور موسسه رازی در حلال اختصاصی واکسن رازی، آب مقطر حاوی ۲۰٪ (V/V) گلیسیرین و PBS (گروه شاهد) مورد آزمایش قرار گرفت. طبق دستورالعمل OIE، برای تیتراسیون واکسن باید آن را در PBS حل نمود (۱۵)، لذا این گروه در آزمایش اول به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. واکسن آماده مصرف در هریک از حلال‌های فوق در سه مرحله شامل: الف) بلافاصله پس از آماده‌سازی، ب) با گذشت ۱۲ ساعت از نگهداری در دمای چهار درجه سلسیوس و ج) ۲۴ ساعت پس از نگهداری در دمای چهار درجه سلسیوس، تیتراسیون شد. برای این منظور، واکسن آبله طیور موسسه رازی (مخلوط سه ویال از یک شماره بچ) با کمک حلال‌های مورد آزمایش در رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-6} آماده‌سازی شدند. سپس هر رقت از واکسن مربوط به هر گروه آزمایشی بر روی پرده کوریوآلانتوییک پنج تخم‌مرغ SPF (Specific pathogen free) جنین‌دار ۱۱روزه تلقیح شد. تخم‌مرغ‌های تلقیح شده، روزانه برای ارزیابی تلفات جنینی نوربینی شدند. تلفات ۲۴ ساعت نخست به عنوان تلفات مکانیکی در نظر گرفته شد. طی دوره هفت روزه‌ی آزمایش، تخم‌مرغ‌های دارای جنین‌های تلف‌شده در یخچال قرار گرفتند. در انتهای روز هفتم پس از تلقیح، تمامی تخم‌مرغ‌های باقی‌مانده حاوی جنین زنده نیز به یخچال منتقل شدند. پس از ۲۴ ساعت، با باز نمودن تخم‌مرغ‌ها، اثر ویروس بر ضخامت پرده و یا ایجاد پوک مورد بررسی (شکل ۲)، و تیتر واکسن بر اساس فرمول کربر محاسبه شد (۱۵).

آزمایش دوم: ارزیابی کارآیی (Efficacy) واکسن آماده‌سازی شده با حلال‌های مختلف

تعداد ۸۰ قطعه جوجه SPF یک روزه به طور تصادفی به پنج گروه (۱۶ پرنده در هر گروه) تقسیم شدند. در گروه‌های ۱ تا ۳، واکسن آبله موسسه رازی در سن ۷ هفتگی با حلال‌های مختلف شامل ۱) آب مقطر حاوی ۲۰٪ (V/V) گلیسیرین؛ ۲) حلال اختصاصی واکسن رازی و ۳) حلال واکسن آبله طیور وارداتی (حاوی آب قابل تزریق)، آماده و به هر پرنده یک دز واکسن در پرده بال تلقیح شد. به گروه چهارم، حلال اختصاصی واکسن آبله رازی (بدون واکسن) تلقیح و چالش با ویروس حاد صورت گرفت. بر روی پرندگان گروه پنجم تلقیح واکسن و چالش صورت نگرفت. در روزهای ۷ تا ۱۰ پس از واکسیناسیون، take واکسن (شامل برجستگی یا ندول در محل تلقیح) ارزیابی شد (۱۵). حلال وارداتی استفاده شده در این آزمایش فاقد خصوصیات بافری، رنگ و یا گلیسرین بود و مشخصات فیزیکوشیمیایی آن شبیه به آب قابل تزریق (حلال غیراختصاصی) بود. از این رو، حلال وارادتی به عنوان یک حلال عمومی و غیراختصاصی، اما استاندارد در این آزمایش مورد مطالعه قرار گرفت.

برای ارزیابی مصونیت ایجاد شده حاصل از تلقیح واکسن حل شده در حلال‌های مختلف، سه هفته پس از آن، پرندگان گروه‌های پنج گانه با ویروس حاد آبله‌ی طیور به میزان $EID_{50}/bird\ 10^3 \leq$ ((۲۵،۳)) به کمک روش ایجاد خراش در تاج چالش شدند. سپس پرندگان به مدت ۲۱ روز



شکل ۲- نتایج ایجاد پوک متعاقب تزریق واکسن آبله طیور آماده‌سازی شده با حلال‌های مختلف مورد آزمایش در تخم‌مرغ‌های جنین‌دار SPF.

از نظر بروز علائم بالینی جلدی و دیفتریک تحت نظر قرار گرفتند. طبق دستورالعمل OIE در مورد واکسن آبله طیور، به دنبال چالش ویروس حاد باید حداقل ۹۰٪ از پرندگان واکسینه شده سالم و بدون ایجاد علائم باشند، در حالی‌که حداقل ۹۰٪ از پرندگان گروه کنترل زخم‌هایی مرتبط با آبله را نشان دهند (۱۵).

آزمایش سوم: ارزیابی اثربخشی (Effectiveness) واکسن رازی حل شده با حلال‌های مختلف در شرایط مزرعه

آزمایش مزرعه‌ای با همکاری شرکت گرگان شهر و در فارم پرورش پولت‌تخمگذار این شرکت واقع در استان گلستان، شهر گرگان انجام شد. برای ارزیابی مزرعه‌ای، واکسن آبله طیور رازی در سن ۷۵ روزگی با حلال اختصاصی واکسن رازی در سالن یک حاوی ۲۱۳۵۲ قطعه نیمچه تخمگذار نژاد هایلاین، و با آب مقطر حاوی ۲۰٪ گلیسیرین در سالن دو حاوی ۲۴۲۲۵ قطعه نیمچه تخمگذار به عنوان گروه شاهد آماده‌سازی و تلقیح شد. هفت روز پس از واکسیناسیون، take واکسن به طور تصادفی بر روی ۲۰۰ پرنده از هر گروه مورد ارزیابی قرار گرفت.

آنالیز آماری

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS 9.4 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. داده‌های مربوط به تیتر واکسن با استفاده از آنالیز واریانس دوطرفه و رویه‌ی GLM واکاوی آماری شدند. داده‌های مربوط به چالش و take واکسن که به صورت باینومیال بودند، با استفاده از رگرسیون لجستیک و رویه‌ی GENMOD واکاوی آماری شدند. مقایسه بین گروه‌های آزمایشی با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای توکی انجام، و سطح احتمال $P<0/05$ برای بیان اختلاف‌های معنی‌دار استفاده شد. نتایج داده‌های باینومیال به صورت درصدی و نتایج داده‌های کمیِ پیوسته به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین (SEM) ارائه شده‌اند.

نتایج

نتایج آزمایش اول: اثر حلال‌های مختلف بر پایداری تیتر واکسن آماده مصرف

تصویر ارزیابی تشکیل پوک بر روی پرده کوریوآلانتوئیک در شکل (۲) نشان داده شده است. برای مقایسه، نمونه‌های مربوط به گروه‌های شاهد و حلال اختصاصی رازی در کنار یکدیگر قرار داده شده است. بر اساس نتایج، استفاده از ترکیبات رنگی، گلیسیرین و یا نمک‌های بافری تاثیری در تشکیل پوک نداشت.

نتایج ارزیابی اثر حلال‌های مختلف بر پایداری تیتر واکسن آبله طیور رازی در جدول (۱) گزارش داده شده است. گروه شاهد نسبت به دو گروه دیگر حاوی گلیسیرین در زمان صفر تیتر بالاتری داشت ($P<0/05$). از طرفی، یافته‌ها نشان داد که با گذشت زمان از نقطه صفر به ساعت ۱۲ و ۲۴، روند کاهش تیتر در گروه کنترل مثبت (PBS فاقد گلیسیرین) از شدت بیشتری برخوردار بود ($P<0/05$).

نتایج آزمایش دوم

ارزیابی take واکسن

ارزیابی محل تلقیح واکسن رقیق شده با حلال‌های مختلف نشان داد که استفاده از حلال اختصاصی واکسن رازی همانند حلال خارجی و گروه شاهد بر پاسخ جلدی واکسن از نظر درصد take واکسن اثر معنی‌داری نداشت و همه‌ی پرندگان تلقیح شده با حلال حاوی واکسن (۱۰۰٪)، ندول‌های مربوطه را در پرده بال داشتند؛ این درحالی بود که گروه‌های شاهد علائمی در محل تلقیح نداشتند ($P<0/05$). نتایج مربوط به آزمایش ارزیابی take واکسن در شکل‌های ۳ و ۴ نشان داده شده است.

جدول ۱- ارزیابی تیتر واکسن (EID50/dose) پس از آماده‌سازی با حلال‌های مختلف در زمان‌های پس ازآماده‌سازی.

گروه‌های آزمایشی	زمان ارزیابی			میانگین افت تیتر طی ۲۴ ساعت
	بلافاصله پس از آماده‌سازی واکسن با حلال	۱۲ ساعت پس از آماده‌سازی واکسن با حلال	۲۴ ساعت پس از آماده‌سازی واکسن با حلال	
PBS (شاهد مثبت)	$10^{3/5\,a}$	$10^{1/5}$	$10^{0/5\,b}$	$10^{3\,a}$
آب مقطر حاوی ۲۰٪ گلیسیرین	$10^{2/1\,b}$	$10^{1/9}$	$10^{1/7\,a}$	$10^{0/4\,b}$
حلال اختصاصی واکسن رازی	$10^{2/5\,b}$	$10^{2/3}$	$10^{2/3\,a}$	$10^{0/2\,b}$
خطای استاندارد میانگین	$10^{0/3}$	$10^{0/25}$	$10^{0/2}$	$10^{0/2}$

توجه: برای تیتراسیون در هر زمان، از ۶ رقت و در هر رقت از ۵ تکرار استفاده شد.

PBS: Phosphate-buffered saline

a،b: در هر ستون میانگین‌های با حروف معنی‌داری متفاوت دارای اختلاف معنی‌دار هستند ($P>0/05$).

نتایج بررسی کارآیی واکسن آماده‌سازی شده با حلال‌های آزمایشی به دنبال چالش با ویروس حاد

نتایج مربوط به چالش با ویروس حاد در شکل‌های ۵ و ۶ نشان داده شده است. بر اساس یافته‌ها، پرندگان گروه شاهد منفی (بدون واکسیناسیون و چالش) و گروه‌های دریافت‌کننده واکسن، پس از چالش فاقد علائم بروز آبله در محل تخریش بودند؛ درحالی‌که تمامی پرندگان گروه کنترل مثبت علائم بروز آبله طیور را نشان دادند ($P<0/05$).

نتایج آزمایش سوم: ارزیابی اثربخشی حلال اختصاصی در سطح مزرعه

نتایج استفاده از حلال اختصاصی در مقایسه با حلال‌های مرسوم نشان داد که ۹۴٪ از پرندگان تلقیح شده با واکسن آبله طیور رازی آماده‌سازی‌شده در حلال اختصاصی، take مشخص داشتند (شکل ۷) که به‌طور معنی‌داری از گروه شاهد (۸۳٪) بیشتر بود.

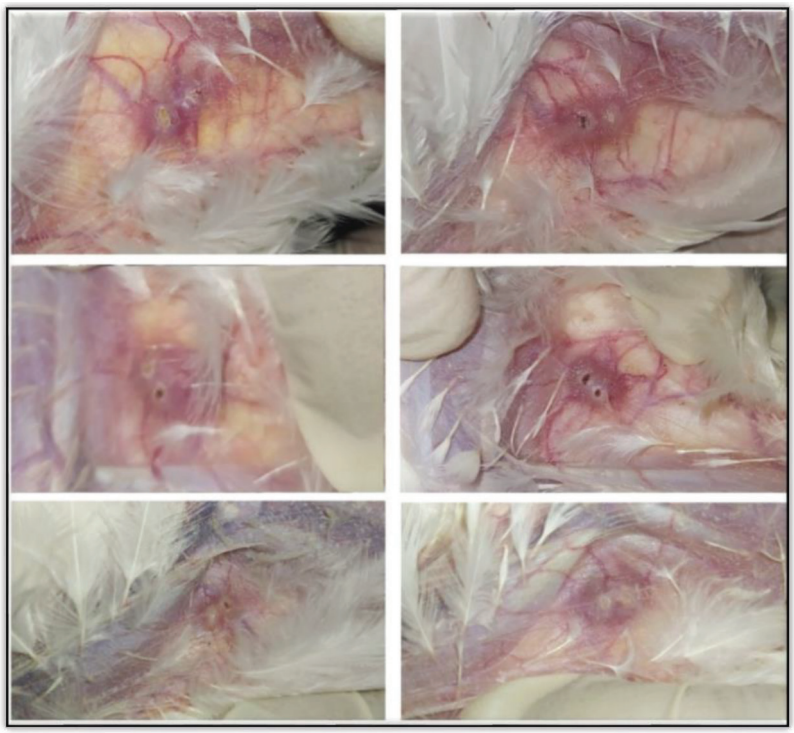
بحث

اثرگذاری واکسن و موفقیت واکسیناسیون به عوامل مختلفی از جمله استفاده از حلال مناسب بستگی دارد. عوامل مختلفی مانند ترکیبات، pH، خاصیت بافری و دمای حلال کارآیی واکسن رقیق‌شده، به خصوص واکسن‌های زنده، را به شدت تحت تاثیر قرار می‌دهد (۲، ۴، ۶، ۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۷). حلال واکسن باید شرایطی پایدار داشته باشد و بدون هر گونه ترکیب فعالی که به کارایی واکسن آسیب بزند، ارائه شود (۸، ۲۴).

پایداری یک واکسن آماده مصرف کاملاً به عواملی مانند pH حلال، غلظت یون‌های حلال، اسمولاریته و ترکیبات آن بستگی دارد (۵). از این رو در مطالعه حاضر، اثر استفاده از یک حلال اختصاصی بر کارآیی و اثربخشی واکسن آبله طیور مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج آزمایش نخست نشان داد که استفاده از حلال اختصاصی واکسن آبله طیور رازی موجب پایداری بالاتر تیتر واکسن طی زمان‌های بعد از آماده‌سازی آن می‌شود. اگر چه پایین‌تر بودن تیتر اولیه در استفاده از حلال استاندارد و گروه دارای گلیسیرین ممکن است مربوط به نقش گلیسیرین در ممانعت از عرضه آنی و همه‌جانبه‌ی ویروس به پرده کوریوآلانتوییک باشد که این موضوع، اثرات اجوانت‌گونه گلیسیرین در عرضه آهسته و تدریجی ویروس به میزبان را نشان می‌دهد. با این وجود، گفتنی است که بر اساس استانداردهای بین‌المللی، تیتراسیون واکسن آبله باید با کمک PBS در تخم‌مرغ‌های جنین‌دار انجام شود (۱۵) و استفاده از عوامل دیگری در حلال مورد استفاده برای تیتراسیون ممکن است نتیجه را تحت تاثیر قرار دهد.

نتایج آزمایش دوم تفاوتی بین استفاده از حلال‌های مرسوم، حلال وارداتی (به عنوان یک حلال عمومی) و حلال‌های اختصاصی دارای خاصیت بافری در کارآیی واکسن و چالش در برابر ویروس حاد را نشان نداد. شایان توجه است که در شرایط آزمایش کنترل شده، تعداد پرندگان محدود بوده و واکسیناسیون گروه‌های مختلف با سرعت انجام می‌گیرد. به علاوه، واکسن بلافاصله بعد از آماده‌سازی مصرف می‌شود و در اختیار

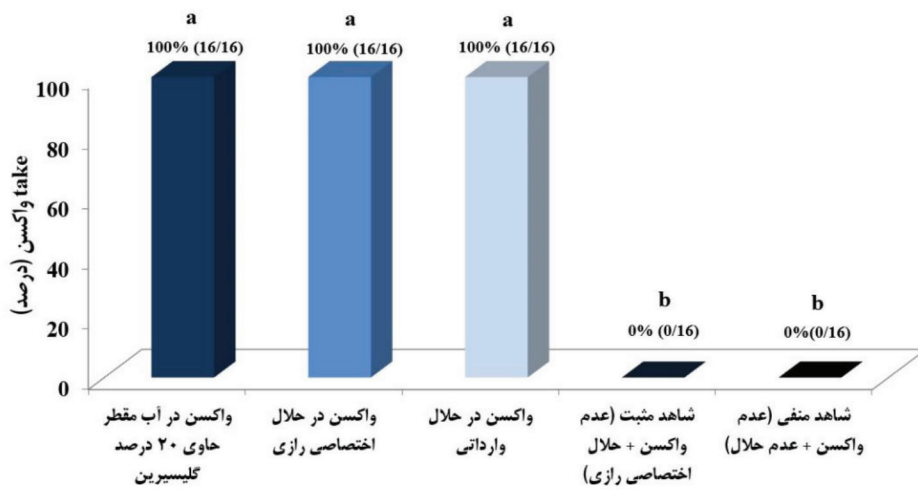


شکل ۳- ارزیابی take واکسن در محل تلقیح واکسن آبله رقیق شده با حلال‌های مختلف در روز هفتم پس از واکسیناسیون.

سیستم ایمنی پرندگان گروه‌های مختلف قرار می‌گیرد؛ لذا طبیعی است که در این شرایط، تاثیر حلال اختصاصی و حلال‌های توصیه شده توسط سازنده‌های واکسن از نظر اثر بر کارآیی واکسن و ایجاد محافظت در همه گروه‌های دریافت‌کننده واکسن، تفاوت چندانی نداشته باشد. از طرفی کارآیی و ایجاد محافظت صددرصدی واکسن آبله طیور رازی با حلال‌های مختلف در این آزمایش همراستا با یافته‌های دیگر پژوهش‌ها بود که نشان داد واکسن آبله رازی در ایجاد مصونیت علیه ویروس حاد آبله کارآیی بالایی دارد (۲، ۳، ۱۹).

نتایج آزمایش مزرعه‌ای در خصوص آماده‌سازی واکسن آبله طیور رازی با حلال اختصاصی و حلال‌های مرسومی که توسط واکسن‌سازهای مختلف توصیه می‌شود، نشان داد که اثربخشی واکسن در زمان استفاده از حلال اختصاصی واکسن رازی به‌طور معنی‌داری نسبت به استفاده از آب مقطر حاوی ۲۰٪ گلیسرین (به‌عنوان کنترل مثبت) افزایش یافت. شایان توجه است که در شرایط مزرعه و به ویژه مزارع با ظرفیت بالا که از شروع واکسیناسیون تا پایان آن زمان زیادی طول می‌کشد و گروه‌های واکسیناتور به دلیل صرفه‌جویی در زمان، حجم بالایی از واکسن را در یک نوبت آماده می‌کنند، استفاده از حلالی که پایداری بیشتری برای ویروس آماده تلقیح را فراهم سازد، اثربخشی بالاتری را به همراه خواهد داشت. با مقایسه نتایج مربوط به آزمایش دوم مبنی بر take صد درصدی واکسن، با آزمایش سوم که در آن گروه شاهد مثبت take واکسن کمتری نسبت به گروه تلقیح شده با حلال اختصاصی داشت (۸۳٪ در برابر ۹۴٪)، می‌توان نتیجه گرفت بخشی از آنچه موجب کاهش take واکسن در سطح مزرعه می‌شود، کاهش دقت در واکسیناسیون نسبت به حالت کنترل شده آزمایشگاهی است. از این رو، هر عاملی مانند رنگی بودن یا قدرت بافری حلال، بهبود شرایط نگهداری واکسن پس از آماده مصرف شدن و انجام دقیق‌تر واکسیناسیون، می‌تواند به بهبود اثربخشی واکسن در سطح مزرعه کمک نماید.

نظر به اینکه حلال اختصاصی واکسن آبله طیور رازی مورد استفاده در این آزمایش از چندین مزیت نسبت به حلال‌های مرسوم برخوردار است، اثربخشی بالاتر آن در آزمایش مزرعه‌های قابل توجیه است. نخستین مزیت مربوط به اختصاصی بودن حلال توسعه‌یافته برای واکسن آبله طیور است. اگرچه به طور معمول نسبت ۲۰٪ گلیسیرین در حلال برای آماده‌سازی واکسن آبله طیور توصیه می‌شود، تاکنون مطالعه‌ای منتشر نشده است که بهترین درصد گلیسیرین را مشخص کرده و اثر آن بر ویروس واکسینال را بررسی نماید. نظر به اینکه برای توسعه حلال اختصاصی آبله طیور مورد آزمایش، این فرآیند قبلاً طی شده است، نخستین مزیت را می‌توان تعیین درصد گلیسیرین که منجر به بالاترین کارآیی واکسن آبله طیور رازی شود، در نظر گرفت. دومین مزیتی که حلال اختصاصی مورد آزمایش نسبت به حلال‌های مرسوم دارد، استریل بودن حلال تهیه شده است. در سطح مزرعه اغلب توصیه می‌شود از آب مقطر و یا سرم فیزیولوژی استریل همراه با گلیسیرین استفاده شود، اما استریل نمودن و یا استریل نگه داشتن ترکیب آب‌مقطر و گلیسیرین در شرایط مزرعه‌ای دشوار است و ممکن است اثربخشی واکسن را کاهش دهد یا منجر به ایجاد عفونت در محل تلقیح شود. سومین مزیت یک حلال اختصاصی نسبت به حلال‌های مرسوم، داشتن خصوصیات فیزیکوشیمیایی ثابت و مشخص است که موجب بروز بیشترین کارآیی واکسن مدنظر می‌شود. با توجه به اینکه خصوصیات فیزیکوشیمیایی حلال مانند اسمولاریته، قدرت یونی، pH و تغییرات آن به‌شدت بر زنده‌مانی ویروس واکسینال و اثربخشی واکسن اثرگذار است (۲، ۴، ۶، ۷، ۱۱، ۱۳، ۱۷)، بدیهی است که استفاده از حلال دارای خصوصیات فیزیکوشیمیایی استاندارد بتواند اثر



شکل ۴- مقایسه نتایج پرندگان دارای take واکسن آبله آماده‌سازی شده با حلال‌های مختلف.

توجه: ستون‌های دارای حروف انگلیسی متفاوت (a,b) در سطح P<۰/۰۵ با یکدیگر اختلاف معنی‌دار دارند. حلال واراتی فاقد خصوصیات بافری، رنگ و یا گلیسیرین بود و ویژگی‌های مشابه آب قابل تزریق (حلال غیر اختصاصی) داشت.

بخشی بالاتری را به دنبال داشته باشد. در نهایت می‌توان به رنگی بودن حلال اختصاصی رازی به عنوان یکی از مزایای آن در مقایسه با حلال‌های مرسوم اشاره کرد. همانطور که پیشتر بیان شد، در شرایط مزرعه‌ای و در فارم‌های بزرگ، به دلیل اهمیت سرعت واکسیناسیون، ممکن است فرآیند واکسیناسیون به درستی انجام نشود. این موضوع زمانی که ترکیب واکسن و حلال بی‌رنگ باشد، بیشتر مشخص خواهد شد. رنگی بودن حلال به واکسیناتور کمک می‌کند که در صورت عدم برداشت واکسن توسط سوزن دوشاخه و واکسینه نشدن پرنده در پی تلقیح به پرده بال، این پرندگان شناسایی و همان لحظه مجدداً واکسینه نماید.

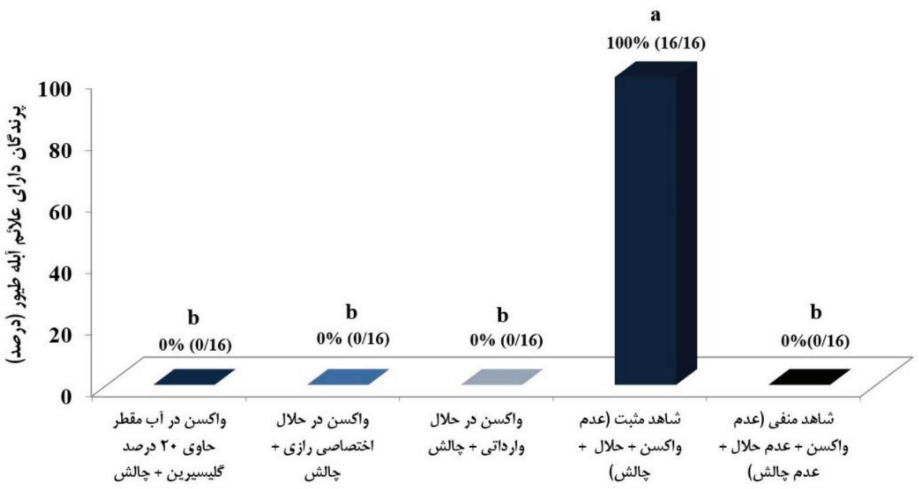
اهمیت استفاده از حلال‌های استاندارد و اختصاصی تاکنون در مطالعات مختلفی مورد تاکید قرار گرفته است. در این راستا، خلیل و همکاران (۱۰) در پژوهشی بر روی حلال‌های مختلف واکسن نیوکاسل لاسوتا مصرف شده به روش آب آشامیدنی نشان دادند که استفاده از آب شیر، آب چاه و آب بطری بر پاسخ ایمنی حاصل از واکسیناسیون به شدت اثرگذار است و بیان کردند آب با کل مواد جامد حل‌شده و کدورت (Turbidity) کمتر، پاسخ‌های ایمنی بهتری را به دنبال خواهد داشت. با توجه به این که آب‌های موجود در هر منطقه به شدت از نظر ترکیبات و کیفیت متفاوت هستند (۹)، آب مورد استفاده برای حل کردن واکسن بر پاسخ ایمنی اثرگذار خواهد بود (۱۰). این تفاوت‌ها ناشی از خصوصیات کیفی آب مانند کدورت، هدایت الکتریکی و کل مواد جامد آب می‌باشد؛ به طوری که ون‌دیرسلوس (۲۲) نشان داد که کدورت آب می‌تواند کارآیی یک واکسن، دارو و یا دیگر ترکیبات اضافه شده به آب را کاهش دهد. در پژوهشی دیگر، نشان داده شد که آب حاوی کلر با دامنه‌ی بالاتر از ۱/۰۸ – ۰/۵۲ میلی‌گرم/لیتر موجب غیرفعال شدن ویروس آنفلوانزا H5N1 می‌شود (۱۶).

تخریب فیزیکی و شیمیایی واکسن به شدت تحت تاثیر pH هستند (۵). نشان داده شده است که در pH بین ۶ تا ۸ کمترین افت فعالیت ویروس‌های واکسینال مشاهده خواهد شد و دامنه‌های بالاتر از ۸ و کمتر از ۶، شدت افت فعالیت بیشتر است (۴، ۶، ۱۱، ۱۷). در خصوص واکسن‌های زنده تخفیف حدت‌یافته، وابسته به pH بودن برخی از فعالیت‌های آنزیمی نیز باید مد نظر قرار گیرد (۶)؛ برای نمونه در واکسن فلج اطفال خوراکی، فعالیت آنزیمی RNA پلیمراز ویروس می‌تواند در طول زمان منجر به از بین بردن RNA طی مدت زمان نگهداری شود. فعالیت این آنزیم در pH بین ۵ تا ۶ حداقل بوده و از این رو در این دامنه پایداری شیمیایی بیشتر خواهد شد (۱۴، ۲۱).

بر اساس تئوری Debye-Huckel در قدرت یونی پایین (کمتر از ۰/۱۵)،

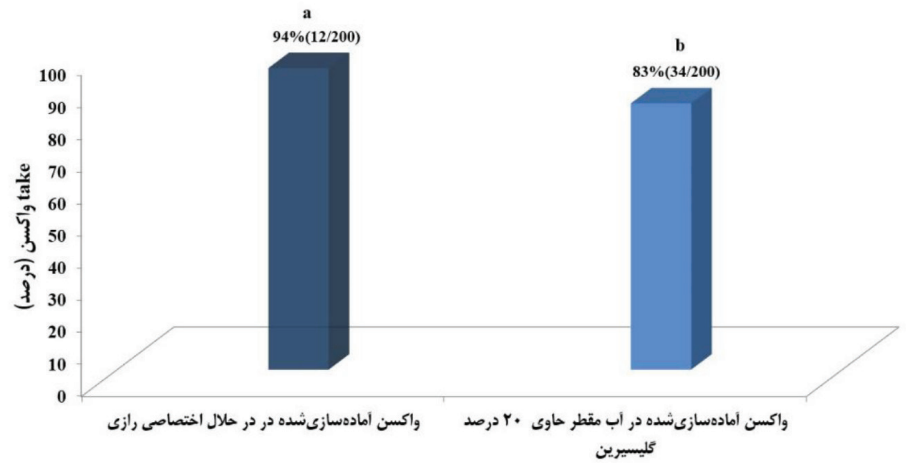
شکل ۵- ارزیابی نتایج چالش در گروه شاهد مثبت (تلقیح حلال) و دریافت‌کننده واکسن آبله طیور آماده شده در حلال‌های مختلف.

با افزایش جزئی در غلظت نمک محلول، حلالیت بیومولکول‌ها تمایل به افزایش خواهد داشت، اما در غلظت‌های بسیار بالا، حلالیت بیومولکول‌ها کاهش خواهد یافت (۱). اثر کاتوتروپیک برخی از آنیون‌ها و کاتیون‌ها نیز می‌تواند بر حلالیت بیومولکول‌ها اثرگذار باشد. به طور کلی، ماکرومولکول‌ها به دلیل اثری که قدرت یونی حلال می‌تواند بر تضعیف پایداری، برهمکنش‌های الکترواستاتیک، و تغییر برهمکنش‌های قطبی داشته باشند، بر آنتی‌ژنیسیتی واکسن اثرگذار خواهد بود. واکسن بیماری مارک، یک نمونه خوب از واکسن‌هایی است که ویروس آن به شدت تحت تاثیر اسمولاریته (به عنوان یک خصوصیت فیزیکوشیمیایی مهم حلال) قرار می‌گیرد (۷). در پژوهشی دیگر، اثر حلال‌های مختلف مورد استفاده برای اسپری واکسن نیوکاسل B1 شامل آب دیونیزه، ۲٪ شیرخشک، و ۲۰٪ گلیسرین بافری‌شده، بر پاسخ‌های ایمنی و محافظت در برابر ویروس حاد



شکل ۶- مقایسه درصد پرندگان دارای علائم بیماری آبله پس از دریافت واکسن آبله طیور موسسه رازی حل شده در حلال‌های مختلف.

توجه: ستون‌های دارای حروف انگلیسی متفاوت (a,b) با یکدیگر در سطح P<۰/۰۵ اختلاف معنی‌دار دارند. حلال واراتی فاقد خصوصیات بافری، رنگ و یا گلیسیرین بود و ویژگی‌های مشابه آب قابل تزریق (حلال غیر اختصاصی) داشت.



شکل ۷- مقایسه نتایج پرندگان دارای پاسخ جلدی (Take) به واکسن آبله طیور موسسه رازی حل شده در حلال‌های مختلف.

توجه: ستون‌های دارای حروف انگلیسی متفاوت (a,b) در سطح P<۰/۰۵ با یکدیگر اختلاف معنی‌دار دارند.

نیوکاسل توسط ویلیگاس و همکاران (۲۳) مورد آزمون قرار گرفت و نشان داده شد که تیتر آنتی‌بادی و درصد محافظت در برابر ویروس حاد در گروه آب دیونیزه و گروه حاوی ۲٪ شیرخشک بیشتر بود.

نتیجه‌گیری کلی

در این مطالعه اثر استفاده از یک حلال اختصاصی بر پایداری تیتر واکسن آماده مصرف، کارآیی آن در شرایط آزمایشگاهی و اثربخشی واکسن آبله طیور در مقایسه با حلال‌های مختلف مورد مطالعه قرار گرفت. یافته‌های این پژوهش نشان داد که حلال اختصاصی دارای قدرت بافری و گلیسرین می‌تواند افت تیتر پس از آماده‌سازی واکسن را کاهش دهد. اگر چه در شرایط کنترل شده با تعداد محدود پرنده، کارآیی واکسن آبله آماده‌سازی شده در حلال اختصاصی و حلال‌های مرسوم و یا عمومی یکسان بود، اما در شرایط مزرعه، اثربخشی واکسن حل شده در حلال اختصاصی نسبت به حلال‌های مرسوم به‌طور قابل توجهی افزایش یافت. این یافته‌ها نشان از اهمیت و مزیت استفاده از حلال اختصاصی در زمان واکسیناسیون پرندگان با واکسن آبله طیور دارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی برای حمایت از انجام این پژوهش کمال تشکر و قدردانی را دارند (کد مصوب ۲-۱۸-۱۸-۱۳۸-۹۹۰۸۶۵). همچنین از جناب آقای دکتر امیرعلی امیری، آقای مهندس عباس معارف‌وند، آقای دکتر مسعود قادر، آقای دکتر محمدحسن ابراهیمی‌جم، مدیریت و پرسنل محترم شرکت گرگان شهر و سایر همکارانی که به نوعی در انجام این پژوهش نقش داشتند، سپاسگزاری می‌شود.

منابع مورد استفاده

1- Ahern, T. J. and M. C. Manning. 1992. Stability of protein pharmaceuticals (Part A. Chemical and physical pathways of protein degradation). New York, NY: Plenum Press p 1-29.

2- Alehegn, E., M. Chanie and D. Mengesha. 2014. A systematic review of serological and clinicopathological features and associated risk factors of avian pox. *British Journal of Poultry Sciences* 3: 78-87.

3- Alemian, A., B. Khalesi and M. M. Ebrahimi, Sh. 2021. Efficacy evaluation of Razi Institute Fowl pox vaccine in laying hen pullet (In Farsi). *Veterinary Research and Biological Products* 34: 6-14.

4- Black, F. L. 1959. Growth and stability of measles virus. *Virology* 7: 184-192.

5- Brandau, D. T., Jones, L. S., Wiethoff, C. M., Rexroad, J and C. R. Middaugh. 2003. Thermal stability of vaccines. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 92: 218-231.

6- Burke, C. J., Hsu, T and D. B. Volkin. 1999. Formulation, stability, and delivery of live attenuated vaccines for human use. Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 16: 1-83.

7- Colwell, W. M., Simmons, D. J., Harris, J. R., Fulp, T. G., Carrozza J. H and Maag T. A. 1975. Influence of some physical factors on survival of Marek's disease vaccine virus. *Avian diseases* 19: 781-790.

8- Committee for Veterinary Medicinal Products (CVMP). 2010. Guideline on requirements for the production and control of immunological veterinary medicinal products. European Medicines Agency. London, 1-13. Avalable online at: https://www.ema.europa.eu/en

9- Fairchild, B. and C. Ritz. 2012. Poultry drinking water primer. UGA Cooperative Extension Bulletin 1301.

10- Khalil, A. A. and A. I. Khalafalla. 2011. Analysis and effect of water sources used as diluents on Newcastle disease vaccine efficacy in chickens in the Sudan. *Tropical Animal Health and Production* 43: 295-297.

11- Lancz, G. and J. Sample. 1985. Thermal-pH inactivation of herpes simplex virus: Interdependence of the medium composition and the pH on the rate of virus inactivation. *Archives of Virology* 84: 141-146.

12- Li, S., Schöneich C and R. T. Borchardt. 1995. Chemical instability of protein pharmaceuticals: mechanisms of oxidation and strategies for stabilization. *Biotechnology and Bioengineering* 48: 490-500.

13- Middaugh, C. and D. Volkin. 1992. Protein solubility. Stability of protein pharmaceuticals, Part A: chemical and physical pathways of protein degradation, pharmaceutical biotechnology 2: 109-134.

14- Newman, J., S. Tirrell, C. Ullman, P. Piatti and F. Brown. 1995. Stabilising oral poliovaccine at high ambient temperatures. *Vaccine* 13: 1431-1435.

15- OIE (World Organisation for Animal Health) Terrestrial Manual. 2018. Chapter 3.3. 10, Fowlpox. p 906-914.

16- Rice, E. W., N. J. Adcock, M. Sivaganesan, J. D. Brown, D. E. Stallknecht and D. E. Swayne. 2007. Chlorine inactivation of highly pathogenic avian influenza virus (H5N1). *Emerging Infectious Diseases* 13: 1568-1570.

17- Salo, R. and D. Cliver. 1976. Effect of acid pH, salts, and temperature on the infectivity and physical integrity of enteroviruses. *Archives of Virology* 52: 269-282.

18- Sawale, G., Roshini, S., Bulbule, N., Chawak, M and G. Kinge. 2012. Pathology of fowl pox in chickens. *Indian Journal of Veterinary Pathology* 36: 110-111.

19- Tadesse, H., Belete, S and B. Deressa. 2018. Evaluation of the safety and efficacy of combined Newcastle disease, fowl pox

and fowl typhoid vaccine under laboratory condition. *Veterinary Medicine and Animal Health*: 60.

20- Tripathy, D. N., and W. M. Reed. 2020. "Pox." In Diseases of Poultry. 13th ed., edited by D. E. Swayne, 364–381. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons.

21- Vadas, E. B. 2000. Stability of pharmaceutical products, Remington: The science and practice of pharmacy 20th ed. Philadelphia: Mack Publishing Company, Lippincott Williams & Wilkins: 986-994.

22- Van Der Sluis, W. 2002. Water quality is important but often overestimated. *World Poultry* 18: 26-32.

23- Villegas, P. and S. Kleven. 1976. Aerosol vaccination against Newcastle Disease. II. Effect of vaccine diluents. *Avian diseases* 20: 260-267.

24- World Health Organization (WHO). 2015. Department of Immunization, Vaccines and Biologicals. WHO guidance note: vaccine diluents, revision 2015, the proper handling and use of vaccine diluents. Geneva: World Health Organization. p. 2015.

25- Winterfield, R. and S. Hitchner. 1965. The response of chickens to vaccination with different concentrations of pigeon pox and fowl pox viruses. *Avian Diseases* 9: 237-241.