DOI:10.22092/VJ.2022.356341.1905
شماره ۳۷ زمستان ۱۴۰۱
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

تولید آزمایشگاهی و ارزیابی کیفی واکسن سه‌گانه غیرفعال روغنی علیه بیماری‌های نیوکاسل، برونشیت عفونی و سندرم افت تولید تخم‌مرغ

• **بهرام حایریان‌اردکانی**
بخش تحقیق و تشخیص بیماری‌های طیور، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
• **منصور بنانی**
بخش تحقیق و تشخیص بیماری‌های طیور، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
• **ناصر قدسیان**
بخش کنترل کیفی واکسن‌های ویروسی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
• **محمد عبدالشاه**
بخش تحقیق و تشخیص بیماری‌های طیور، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
• **محسن بشاشتی(نویسنده مسئول)**
بخش تحقیق و تشخیص بیماری‌های طیور، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

تاریخ دریافت: ۲۵-۰۷-۱۴۰۰ تاریخ پذیرش:۱۹-۱۱-۱۴۰۰
Email: m.bashashati@rvsri.ac.ir

چکیده

اگرچه واکسن‌های بیماری نیوکاسل (ND) و برونشیت عفونی (IB) درحال‌حاضر در کشور در دو شکل زنده و غیرفعال درحال‌تولید می‌باشند، اما تاکنون واکسنی علیه سندرم افت تولید تخم‌مرغ (EDS) تولید نشده است. در این مطالعه تولید آزمایشگاهی واکسن سه ظرفیتی ND + IB + EDS با هدف کاهش وابستگی به واردات و بومی‌ساختن تکنولوژی تولید این واکسن در داخل کشور انجام گرفت. سه بذر به کار رفته شامل سویه‌های V4، M41 و AV-127 به‌ترتیب از ویروس‌های ND، IB و EDS به لحاظ پاک‌بودن از باکتری، قارچ، مایکوپلاسما و سایر ویروس‌های ناخواسته با استفاده از آزمایشات میکروبیولوژی و PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند. سه آنتی‌ژن به‌دست‌آمده در دو فرمولاسیون مختلف به‌صورت امولسیون آب در روغن تهیه شد. در ارزیابی کیفی، آزمایش‌های سترونی، پایداری و بی‌ضرری این امولسیون‌ها انجام گرفت. بعلاوه، ایمنی‌زایی دو واکسن در مقایسه با یک واکسن سه‌گانه مشابه وارداتی از طریق واکسیناسیون به گروه‌های ۲۰ قطعه‌ای پولت‌های ۴ هفته با منشاء تخم‌مرغ عاری از پاتوژن خاص مورد بررسی قرار گرفت. سپس با استفاده از روش‌های سرولوژی ممانعت از هماگلوتیناسیون و الایزا، آنتی‌بادی اختصاصی علیه سه ویروس در سرم این پرندگان ارزیابی گردید. هر دو امولسیون تولیدشده در این مطالعه، ایمنی‌زایی مطلوب و مشابه با واکسن مشابه سه ظرفیتی وارداتی را داشتند. این مطالعه نشان داد که واکسن‌های سه‌گانه (ND + IB + EDS) آزمایشگاهی تهیه شده، پتانسیل تولید به‌صورت نیمه صنعتی را دارند. بنابراین، این واکسن‌ها می‌توانند توانایی تولید واکسن در کشور را تقویت کنند و وابستگی کشور به واردات واکسن‌های مشابه را کاهش دهند.

کلمات کلیدی: بیماری نیوکاسل، برونشیت عفونی، سندرم افت تولید تخم‌مرغ، واکسن سه‌گانه، تولید آزمایشگاهی

Veterinary Researches & Biological Products No 137 pp: 2-15

Laboratory-scale production and quality control of trivalent inactivated oil-emulsion vaccine against Newcastle disease, infectious bronchitis and egg drop syndrome

By: Haerian Ardakani.B., Department of Avian Disease Research and Diagnostics, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Banani, M., Department of Avian Disease Research and Diagnostics, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Ghodsian, N., Department of Viral Vaccine Quality Control, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Abdoshah, M., Department of Avian Disease Research and Diagnostics, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. and Bashashati, M., (Corresponding Author) Department of Avian Disease Research and Diagnostics, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Received: 2021-10-17 **Accepted:2022-02-08**

Email: m.bashashati@rvsri.ac.ir

Although Newcastle disease (ND) and infectious bronchitis (IB) vaccines are currently being produced in Iran in the forms of live and inactivated, egg drop syndrome (EDS) vaccine has not been produced in Iran so far. In this study, the laboratory-scale production of ND + IB + EDS multivalent vaccine was performed to reduce dependency on imports and localize production of this vaccine. Three vaccine seeds of V4 (ND virus), M41 (IB virus) and AV-127 (EDS virus) strains were evaluated for freedom from bacteria, fungi, mycoplasma, and unwanted viruses using microbiological methods and PCR. Two different inactivated vaccines, contained mineral oil adjuvant, were produced, and formulated as water-in-oil emulsions. Tests for sterility, stability and safety of these emulsions were performed for quality control. In addition, the immunogenicity of two vaccines were evaluated and compared with a similar imported trivalent ND + IB + EDS vaccine through vaccination of 20 four-week-old specific pathogen free chickens. Then serum antibodies specific to three viruses were detected using hemagglutination inhibition and ELISA tests. Both experimental vaccines showed desirable and similar immunogenicity compared to the imported trivalent vaccine. This study showed that the laboratory-scale production of trivalent vaccines (ND + IB + EDS) has potential to produce industrially. Thus, these vaccines can strengthen vaccine manufacturing capabilities and reduce dependence on imports of similar vaccines.

Key words: *Newcastle disease, infectious bronchitis, egg drop syndrome, trivalent vaccine, laboratory-scale production*

مقدمه

ایمنی‌زایی از طریق واکسیناسیون روشی معمول در کاهش ریسک و بیماری‌زایی عوامل مختلف میکروبی در گله‌های طیور می‌باشد. واکسیناسیون شیوه‌ای از تجویز واکسن‌های زنده و یا کشته است که سبب کاهش تظاهرات بالینی بیماری می‌شود و ایمنی را نیز به حداکثر میزان خود برای مواجه با عوامل بیماری‌زا می‌رساند. واکسیناسیون در طیور در ممانعت و کاهش مشکلات ناشی از سویه فیلد یک بیماری از اهمیت به‌سزایی برخوردار است. واکسن‌های زنده به‌طور گسترده در سراسر جهان بدلیل کاربرد گروهی (استفاده به‌صورت آشامیدنی و یا اسپری) و اقتصادی‌بودن مورد استفاده قرار می‌گیرند و ایمنی ناشی از آن‌ها به‌طور معمول بسیار کوتاه است. برخی از آن‌ها ممکن است سبب ایجاد شکل ملایم بیماری به منظور حفاظت دربرابر عامل بیماری‌زای کشنده شوند. در مقابل، واکسن‌های غیرفعال، عموماً از کل پیکره باکتری و یا ویروس همراه با ادجوانت استفاده می‌کنند و به‌صورت تزریق زیرجلدی و داخل عضلانی مصرف می‌شوند. این واکسن‌ها غالباً در مرغان اجداد، مادر و تخمگذار تجاری برای تحریک ایمنی بادوام و یا برانگیختن سطوح بالای آنتی‌بادی برای حفاظت از پرندگان در مواجهه با چالش‌های تهاجمی بیماری اندمیک طراحی می‌شوند. از سوی دیگر، در واکسیناسیون گله‌های مولد طیور، ایمن‌کردن حداکثری و یکنواخت جهت افزایش ایمنی مادری قابل انتقال ازطریق تخم‌مرغ به نتاج مورد نظر می‌باشد (۸).

عفونت‌های ویروسی مانند بیماری نیوکاسل (ND)، برونشیت عفونی (IB) طیور و سندرم افت تولید تخم‌مرغ (EDS) از مهم‌ترین عواملی

هستند که در میزان کاهش تولید گوشت و تخم‌مرغ نقش دارند و موجب تلفات یا افت تولید در گله‌های اجداد، مادر و تخم‌گذار می‌شوند. ND یک بیماری بسیار مسری و کشنده در پرندگان است که توسط ویروس بیماری نیوکاسل (NDV) و یا اورتوآوولاویروس پرندگان[1] ایجاد می‌شود. این ویروس در جنس اورتوآوولاویروس از خانوادهٔ پارامیکسوویریده قرار دارد. علی‌رغم این‌که ویروس فقط یک سروتیپ دارد، حدت سویه‌های ویروس بسیار متفاوت است و طیف متنوعی از علائم بالینی را ایجاد می‌کند. علائم بالینی می‌تواند از تلفات ۱۰۰٪ در میان مرغان واکسینه نشده تا افت تولید تخم‌مرغ در میان گله‌های تخم‌گذار به‌ظاهر سالم و واکسینه‌شده متفاوت باشد (۲۴). ویروس ND برای اولین‌بار در ایران در سال ۱۹۵۴در استان آذربایجان شرقی (تبریز) جداسازی گردید و متعاقب آن ویروس به تمام استان‌های کشور گسترش پیدا کرد (۲۳). اگرچه، واکسیناسیون زنده با استفاده از طیف مختلفی از سویه‌های لنتوژن و شکل بدون علامت گوارشی و کشته به‌تنهایی قادر به پیشگیری کامل طیور از آلوده شدن به سویه‌های حاد نیست، اما می‌تواند با کاهش میزان عفونت و متعاقب آن دفع ویروس نقش بسزایی را در کنترل بیماری ایفا کند (۲۴).

IB یک بیماری حاد و بسیار واگیردار می‌باشد که توسط ویروس برونشیت عفونی (IBV) ایجاد می‌گردد. این ویروس در جنس گاماکروناویروس از خانواده کروناویریده طبقه‌بندی می‌گردد. پرندگان مبتلا به IBV علائم بالینی مانند عطسه، صداهای تنفسی، سرفه و کاهش مصرف غذا را نشان می‌دهند. واگیری و تلفات IB سبب ضررهای سنگین اقتصادی در صنعت طیور می‌گردد. مرغان آلوده به IBV کاهش تولید تخم‌مرغ و کیفیت آن را به‌صورت تخم‌مرغ‌های با پوسته نازک، شکننده، بدشکل و محتویات آبکی نشان می‌دهند (۱۷). از زمانی‌که IBV برای اولین‌بار توصیف شد، سروتیپ‌های متعدد علاوه‌بر ماساچوست شناسایی شد. اولین جداسازی IBV در ایران در سال ۱۹۹۴ از گله‌های طیور گزارش شد (۱). درحال حاضر، استراتژی واکسیناسیون برمبنای واکسن‌های زنده از ژنوتیپ‌های GI-1 و GI-13 و نیز واکسن کشته تهیه شده از GI-1 در فارم‌های طیور برای کنترل IB انجام می‌گیرد. هرچند گزارشات متعددی مبنی بر موارد مشکوک به IB در کل کشور بدلیل ناکارآمدی ایمنی حاصله وجود دارد (۱۳).

EDS یک بیماری است که اویداکت مرغان تخم‌گذار را تحت‌تأثیر قرار می‌دهد و برای نخستین‌بار احتمالاً از طریق واکسن آلوده به ماکیان منتقل شده است (۱۱). عامل این بیماری در جنس آتادناویروس و خانواده آدنوویریده قرار می‌گیرد و گونه آن با نام آتادناویروس اردک A و یا ویروس EDS (EDSV) شناخته می‌شود. از نظر سرولوژی، این ویروس به سایر جنس‌های خانواده آدنوویریده ارتباطی نداشته و تنها یك سروتیپ از آن شناخته شده است، اگرچه اختلافات ژنوتیپی با کمك روش اندونوکلئاز محدودکننده مشاهده شده است. خصوصیت این بیماری با تولید تخم‌مرغ‌هایی با پوسته نازک و بدون پوسته توسط مرغ‌هایی که ظاهری سالم دارند و کاهش تولید ۴۰-۱۰٪ با مدت زمان ۱۰-۴ هفته توصیف می‌شود. در مواردی که بیماری در یک واحد پرورش طیور ایجاد شود، علائم بیماری بیشتر به صورت عدم رسیدن به اهداف پیش‌بینی شده تولید بروز می‌کند و تغییرات پوسته کمتر ظاهر می‌شود (۱۱). اولین گزارش از آلودگی به EDSV در سال ۱۹۹۰ بااستفاده از آزمایش ممانعت از هماگلوتیناسیون (HI) در گله‌های مادر گوشتی ایران اثبات گردید. اگرچه در این گزارش جداسازی ویروس انجام نشد، اما به‌دلیل عدم واکسیناسیون گله‌های مورد مطالعه، توانستند با استفاده از آزمایش HI تشخیص قطعی عفونت با EDSV را نشان دهند (۲). یکی از روش‌های کنترل این بیماری، استفاده از واکسیناسیون با ادجوانت روغنی است و این واکسن حفاظت خوبی را در برابر EDS ایجاد می‌کند (۱۱).

واکسن‌های زنده و غیرفعال ND و واکسن های زنده IB سال‌های متمادی است که به‌صورت صنعتی در ایران به‌صورت مونووالان و دی‌والان درحال تولید می‌باشند. بااین‌حال تاکنون واکسن تجاری حاوی آنتی‌ژن غیرفعال EDS تولید نشده است و صرفاً نیازهای کشور از طریق واردات واکسن‌های غیرفعال تأمین شده است. ایجاد ایمنی‌زایی گله‌های طیور اجداد، مادر و تخم‌گذار در برابر این بیماری‌ها، با کمک واکسیناسیون از اهمیت زیادی جهت جلوگیری از کاهش تولید ناشی از بیماری برخوردار است. از طرفی نیاز به واکسیناسیون گله‌های اجداد، مادر و مرغان تخم‌گذار تجاری با استفاده از واکسن غیرفعال روغنی سه‌گانه (ND + IB + EDS) و از طرف دیگر جلوگیری از خروج ارز بدلیل واردات این واکسن، ضرورت ساخت این واکسن را با هدف رفع نیاز کشور، بومی‌شدن تکنولوژی تولید و دست‌یابی به دانش‌فنی این واکسن را نشان می‌دهد. بنابراین، در این مطالعه تهیه و ارزیابی آزمایشگاهی واکسن غیرفعال سه‌گانه (ND + IB + EDS) انجام شد و تیتر آنتی‌بادی سرمی پولت‌های با منشاء عاری از پاتوژن خاص (SPF) واکسینه شده توسط این واکسن علیه ND، IB و EDS با واکسن مشابه تولید خارج مورد مقایسه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه آنتی‌ژن

سه ویروس مورداستفاده در این مطالعه از سویه‌های استاندارد بین‌المللی می‌باشند و از بانک ذخایر ویروسی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی تهیه شده است. از آنجایی‌که EDSV تنها در کشت‌های سلولی و تخم‌های جنین‌دار اردک و غاز با تیتر بسیار بالایی رشد می‌کند، برای آداپتاسیون این ویروس و افزایش تیتر آن در تخم‌مرغ SPF جنین‌دار (Venkey's، مهاراشترا، هند)، هفت پاساژ متوالی انجام شد. بذرکاری ویروس بیماری نیوکاسل (NDV) سویه V۴ و ویروس برونشیت عفونی (IBV) سویه M41 به میزان ۱۰۰ µL و EDSV سویه AV-127 به میزان ۲۰۰ µL در حفره آلانتوئیك تخم‌مرغ‌های SPF جنین‌دار ۱۰ روزه تلقیح و سپس تخم‌مرغ‌های تلقیح‌شده در گرمخانه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای مدت معین نگهداری شدند. پس از نگهداری تخم‌مرغ‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک شب، مایع آمنیوآلانتوئیك آن‌ها برداشت‌شده و در ظروف استریل جمع‌آوری شدند.

بررسی بذرهای ویروسی از لحاظ آلودگی

بذرهای NDV و IB از لحاظ آلودگی به مایکوپلاسما، ویروس آنفلوانزای پرندگان (AIV) تحت‌تیپ H9N2، ویروس بیماری بورس عفونی (IBDV)، ویروس کم‌خونی عفونی ماکیان (CIAV)، متانوموویروس پرندگان (AMPV) و اورتورئوویروس پرندگان (ARV) توسط PCR مورد بررسی

قرار گرفت. بذر EDSV علاوه بر موارد بالا از لحاظ آلودگی به NDV و IBV نیز بررسی شد (۵, ۶, ۱۰, ۱۵, ۱۸-۲۰, ۲۵).

عیارسنجی ویروس

برای اندازه‌گیری EID50 هر سه ویروس، رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-10} از مایع آلانتوئیک حاوی ویروس، در فسفات بافر سالین (PBS) استریل تهیه و مقدار ۱۰۰ µL از هر یک از این رقت‌ها به پنج تخم‌مرغ SPF جنین‌دار ۱۰ روزه تلقیح شد. پس از پنج روز نگهداری در گرمخانه در دمای ۳۷درجه سانتی‌گراد و کندلینگ روزانه، تخم‌مرغ‌ها به سردخانه با دمای ۴درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. عیارسنجی NDV و EDSV توسط آزمایش هماگلوتیناسیون (HA) و روش اسپیرمن-کربر انجام گرفت. برای تعیین میزان عیار IBV رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-7} از ویروس تهیه گردید و از هر رقت مقدار ۱۰۰ µL به پنج عدد تخم‌مرغ SPF جنین‌دار ۱۰ روزه تلقیح شد. پس از مدت هفت روز نگهداری در گرمخانه با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد عیار ویروس براساس علائم و جراحات اختصاصی IBV از قبیل کوتولگی، کاهش رشد، پیچ‌خوردگی در مقایسه با جنین‌های شاهد و یا مرگ جنین‌ها بررسی و توسط فرمول اسپیرمن-کربر محاسبه شد.
برای NDV و EDSV دوز عفونی ویروس براساس HA نیز محاسبه شد. به هر یک از خانه‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای U شکل ۲۵ µL بافر PBS اضافه شد. مقدار ۲۵ µL از مایع آمنیوآلانتوئیک در گودۀ اول هر ردیف ریخته تا گودۀ یازدهم به‌صورت سریالی رقت‌های لگاریتمی تهیه شد. ستون آخر به عنوان کنترل گلبول قرمز درنظر گرفته شد. مقدار µL ۲۵ از سوسپانسیون گلبول قرمز ۱٪ در تمام چاهک‌ها اضافه و مخلوط شد. پس از ۴۰ دقیقه قرارگرفتن در دمای آزمایشگاه، آخرین چاهکی که هماگلوتیناسیون کامل را نشان داد حاوی یک واحد هماگلوتینین و چاهک‌های ماقبل آن به‌ترتیب حاوی دو، چهار و هشت واحد هماگلوتینین بود.

غیرفعال‌سازی ویروس

برای غیرفعال‌سازی مایع آمنیوآلانتوئیک حاویNDV، IBV و EDSV از فرمالین ۰/۱٪ استفاده گردید. فرمالین به مایع آمنیوآلانتوئیک حاوی هر ویروس فعال، به‌طورجداگانه اضافه شد. برای غیرفعال‌سازی EDSV به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و متعاقب آن در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. برای دو ویروس دیگر پس از اضافه‌کردن فرمالین به‌مدت یک شب در گرمخانه با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. به‌عنوان مثال، در خصوص بذر EDSV، ۸۰۰ µL فرمالین ۱۰٪ به ۸۰ mL سوسپانسیون ویروس افزوده شد که درنهایت غلظت نهایی ۰/۱٪ بدست آمد.

کنترل غیرفعال‌سازی ویروس

برای اطمینان از غیرفعال‌شدن ویروس از نمونه آنتی‌ژن غیرفعال‌شده، در حفره آلانتوئیک ۱۰ تخم‌مرغ SPF جنین‌دار ۱۰ روزه مقدار µL ۲۰۰ در هر تخم‌مرغ تلقیح گردید. پس از گذشت پنج روز نگهداری در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، مایع آلانتوئیک آنها استخراج و با آزمایش آگلوتیناسیون سریع برای NDV و EDSV و مشاهده وضعیت سلامتی جنین‌ها در IBV در سه پاساژ مکرر مورد بررسی قرار گرفتند.

فرمولاسیون واکسن سه‌گانه و اختلاط نهایی

مقدار هر یک از آنتی‌ژن‌های NDV سویه V4، IBV سویه M41و EDSV سویه AV-127 به‌طورجداگانه برای فرمولاسیون واکسن، تعیین شد و اختلاط نهایی صورت گرفت. محصول نهایی (امولسیون واکسن) در ظروف مناسب تقسیم و تا زمان مشخص‌شدن نتایج آزمایش‌های کنترلی سترونی و بی‌ضرری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. در این تحقیق واکسن تهیه شده با دو فرمول مختلف تهیه شد: الف) واکسن شماره ۱: NDV با دوز ۴۵۰ واحد HA (HAU) به‌میزان µL ۴۴، IBV با دوز $10^{7/7}$ به‌میزان µL ۶۰ و EDSV با دوز ۲۰۰۰ HAU به‌میزان µL ۴۹ و PBS ۹/۷ µL با حجم mL ۰/۵ در هر دوز واکسن مورد محاسبه قرار گرفت. این امولسیون دارای µL ۱۶۲/۷ فاز آبی (۳۲/۵ ٪) و µL ۳۳۷/۵ فاز روغنی (۶۷/۵ ٪) بود. ب) واکسن شماره ۲: NDV با دوز ۴۵۰ HAU به‌میزان µL ۴۴، IBV با دوز $10^{7/7}$ به‌میزان µL ۶۰ و EDSV با دوز ۲۵۰۰ HAU به‌میزان µL ۶۱ و PBS ۹/۷ µL با حجم mL ۰/۵ در هر دوز واکسن مورد محاسبه قرار گرفت. این امولسیون دارای µL ۱۶۵ فاز آبی (۳۳٪) و µL ۳۳۵ فاز روغنی (۶۷) بود. فاز روغنی (روغن مونتانایدISA-70) و فاز آبی (آنتی‌ژن‌های ND + IB + EDS) این دو واکسن، با استفاده از دستگاه هموژنایزر DIAX 900 (Heidolph، شواباخ، آلمان) هموژن و به‌صورت امولسیون درآمد. صحت خصوصیات فیزیکی امولسیون با روش آزمایش قطره مورد تأیید قرار گرفت. در این آزمایش یک قطره از امولسیون به فاصله چند ثانیه در داخل پلیت دارای آب ریخته شد. درصورتی‌که قطره دوم امولسیون در مایع پخش نشود، هموژناسیون بدرستی انجام شده است.

آزمایش سترونی (Sterility test)

به منظور اطمینان از عدم آلودگی به باکتری، قارچ و مایکوپلاسما، بذرهای ویروسی و امولسیون واکسن در محیط‌های کشت باکتری (محیط آگار خون)، قارچ (محیط سابورو دکستروز آگار) و مایکوپلاسما (براث PPLO) کشت داده شد. محیط‌ها از نظر احتمال آلودگی به باکتری و قارچ به‌مدت ۱۴ روز و به مایکوپلاسما به‌مدت ۲۸ روز مورد بررسی قرار گرفت.

آزمایش پایداری (Stability test)

مقدار ۱۰ mL از نمونه واکسن در سه لوله مخصوص مندرج ریخته شد و لوله‌ها پس از درج مشخصات واکسن بر روی آن‌ها به‌مدت ۳۰ روز در سه دمای متفاوت، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، دمای محیط (دمای ۲۵-۲۲ درجه سانتی‌گراد) و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

ارزیابی بی‌ضرری (Safety test)

برای انجام آزمایش بی‌ضرری واکسن، ۳۰ قطعه پولت سه هفته با منشاء SPF به سه گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند. گروه نخست به میزان ۱ mL (دو دز) از واکسن الف، گروه دوم به میزان ۱ mL (دو دز) از واکسن ب و گروه سوم به عنوان شاهد ۱ mL سرم فیزیولوژی به‌صورت زیرپوستی در پشت گردن دریافت کردند. پرنده‌ها به‌مدت سه هفته تحت مراقبت قرار

گرفتند و از نظر علائم بالینی عمومی و ضایعات موضعی کنترل شدند.

ارزیابی ایمنی‌زایی واکسن و مقایسه آن با واکسن وارداتی مشابه

برای انجام این آزمایش چهار گروه ۲۰ قطعه‌ای پولت با منشاء SPF با سن چهار هفته به‌صورت تصادفی تقسیم و هر گروه در چندین قفس جداگانه قرار گرفتند. پس از اطمینان از منفی‌بودن تیتر آنتی‌بادی سرمی آن‌ها از لحاظ سه آنتی‌ژن واکسن، واکسن‌های الف و ب در گروه اول و دوم، واکسن وارداتی در گروه سوم به میزان ۵۰۰ µL برای هر پرنده به‌صورت زیرپوستی در ناحیه گردن تزریق شدند. یک گروه هم به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد که مایه‌کوبی آن‌ها به‌میزان ۵۰۰ µL PBS استریل به‌صورت زیرپوستی انجام گردید. پس از چهار هفته، پرنده‌ها از طریق ورید بالی خونگیری شدند و سرم خون آن‌ها جدا و مورد آزمایش HI برای تعیین عیار آنتی‌بادی ND و EDS و آزمایش الایزا جهت تعیین عیار آنتی‌بادی IB قرار گرفتند.

آزمایش ممانعت از هماگلوتیناسیون (HI)

آزمایش HI برای ارزیابی عیار آنتی‌بادی‌ها علیه ND و EDS انجام شد. به هر یک از چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای U شکل مقدار ۲۵ µL بافر PBS اضافه شد. مقدار ۲۵ µL از سرم موردنظر در گودهٔ اول هر ردیف ریخته و تا گودهٔ یازدهم به‌صورت سریالی رقت‌های لگاریتمی تهیه شد. ستون آخر به عنوان کنترل گلبول قرمز درنظر گرفته شد. سپس مقدار ۲۵ µL از آنتی‌ژن (چهار واحد HA از آنتی ژن EDS و هشت واحد HA از آنتی ژن ND) به ۱۱ گوده اضافه شد و به‌آرامی تکان داده شد. پس از پایان زمان ۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای آزمایشگاه، مقدار µL ۲۵ گلبول قرمز ۱٪ به تمام چاهک‌ها اضافه و به‌مدت ۴۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. نتایج براساس آخرین رقتی که آگلوتیناسیون گلبول قرمز مشاهده نشد بررسی گردید.

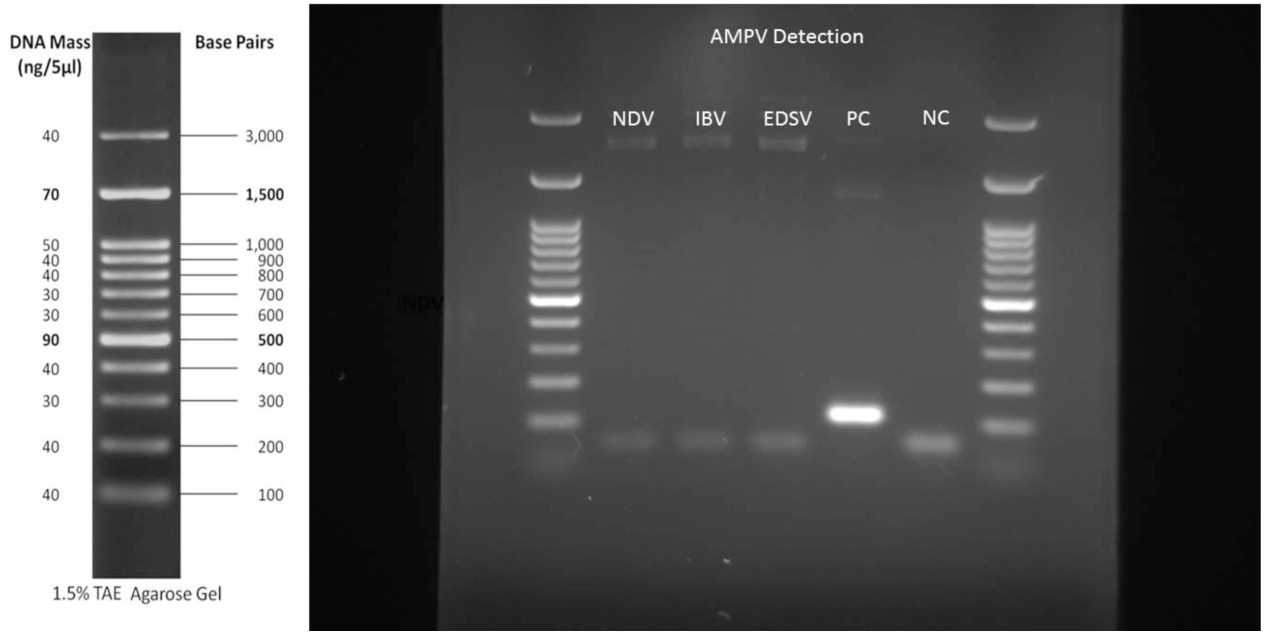
آزمایش الایزا (ELISA)

آزمایش الایزا برای ارزیابی عیار آنتی‌بادی IB بااستفاده از کیت تجاری (IDEXX، وستبروک، مین، آمریکا) انجام شد. مقدار ۱۰۰ µL از کنترل‌های منفی و مثبت رقیق نشده و نمونه سرمی ۵۰۰ برابر رقیق شده در چاهک‌ها ریخته شد. پس از قراردادن سرپوش روی میکروپلیت، به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. چاهک‌ها توسط ۳۵۰ µL آب دیونیزه پنج بار شست‌وشو شدند. پس از اضافه‌کردن ۱۰۰ µL کونژوگه پراکسیداز هورس‌رادیش آنتی‌چیکن در هر گوده، میکروپلیت‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه شدند و مجدداً گوده‌ها پنج بار شست‌وشو شدند. به هریک از چاهک‌ها ۱۰۰ µL سوبسترای TMB اضافه شد و میکروپلیت برای مدت ۱۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه گردید. پس از آن با اضافه‌کردن ۱۰۰ µL محلول توقف، واکنش متوقف گردید. مقدار جذب با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (BioTek ELx800، وینوسکی، ورمانت، آمریکا) در ۶۵۰ nm اندازه‌گیری شد و سپس با استفاده از برنامه شرکت سازنده کیت میزان آنتی‌بادی در هر نمونه ثبت شد.

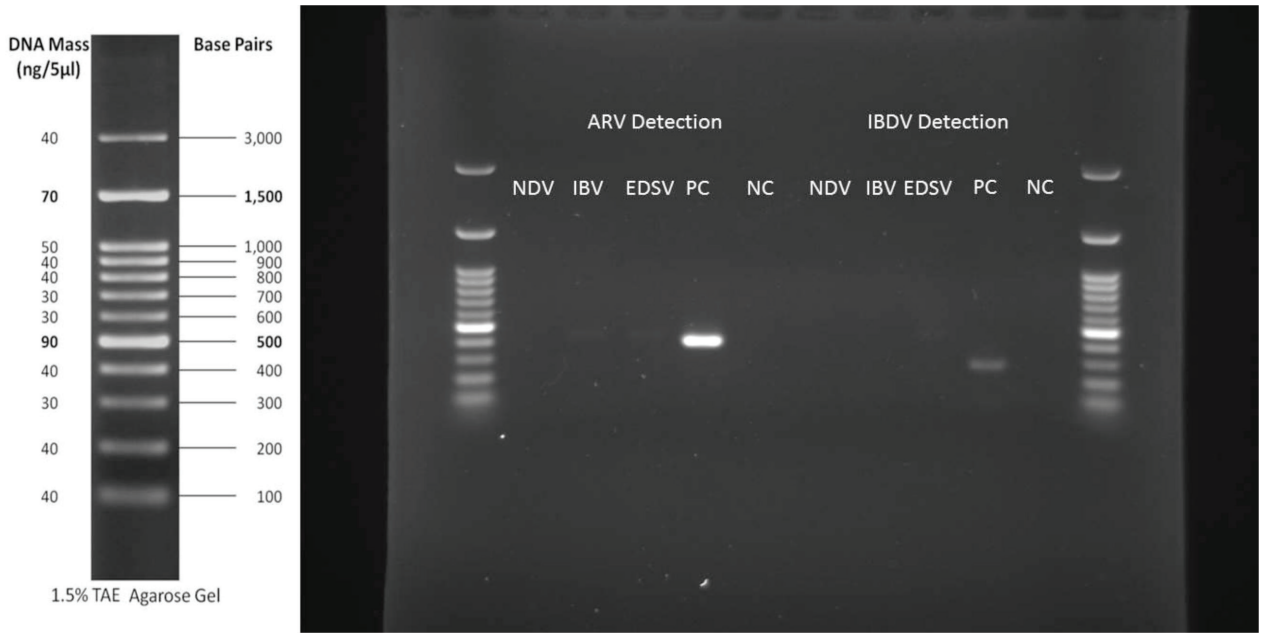
ارزیابی آماری

تجزیه و تحلیل آماری نمونه‌ها با استفاده از آنالیز واریانس توسط

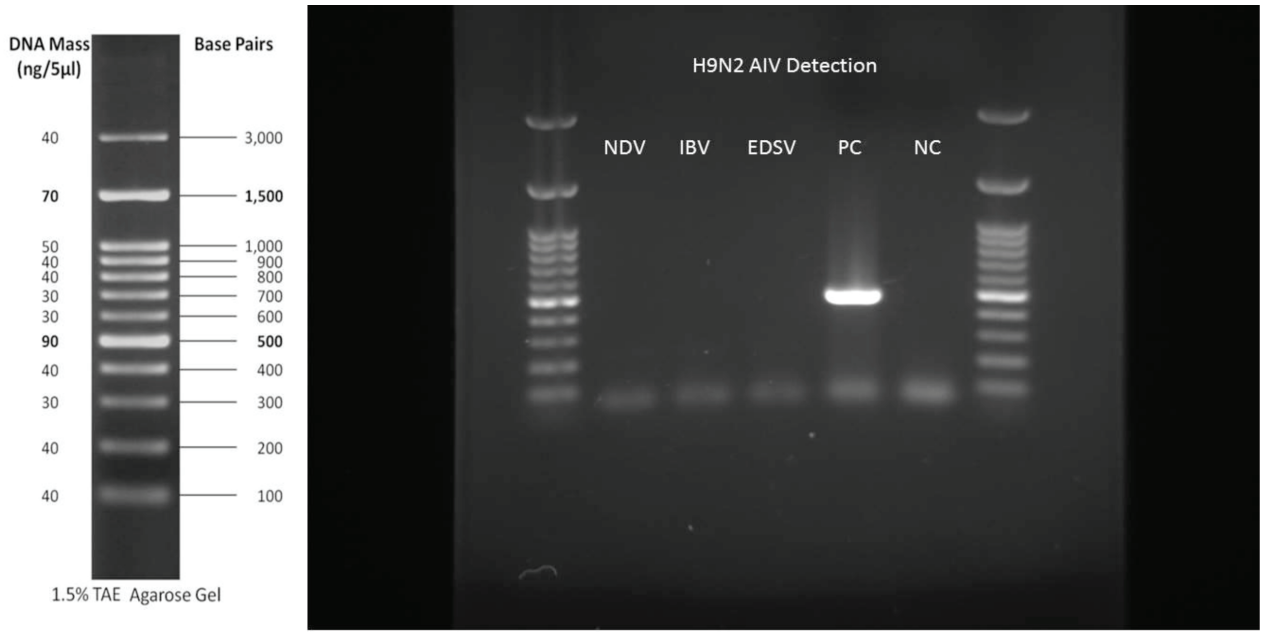
شکل ۱- نتایج PCR به منظور تأیید عدم وجود مایکوپلاسما.



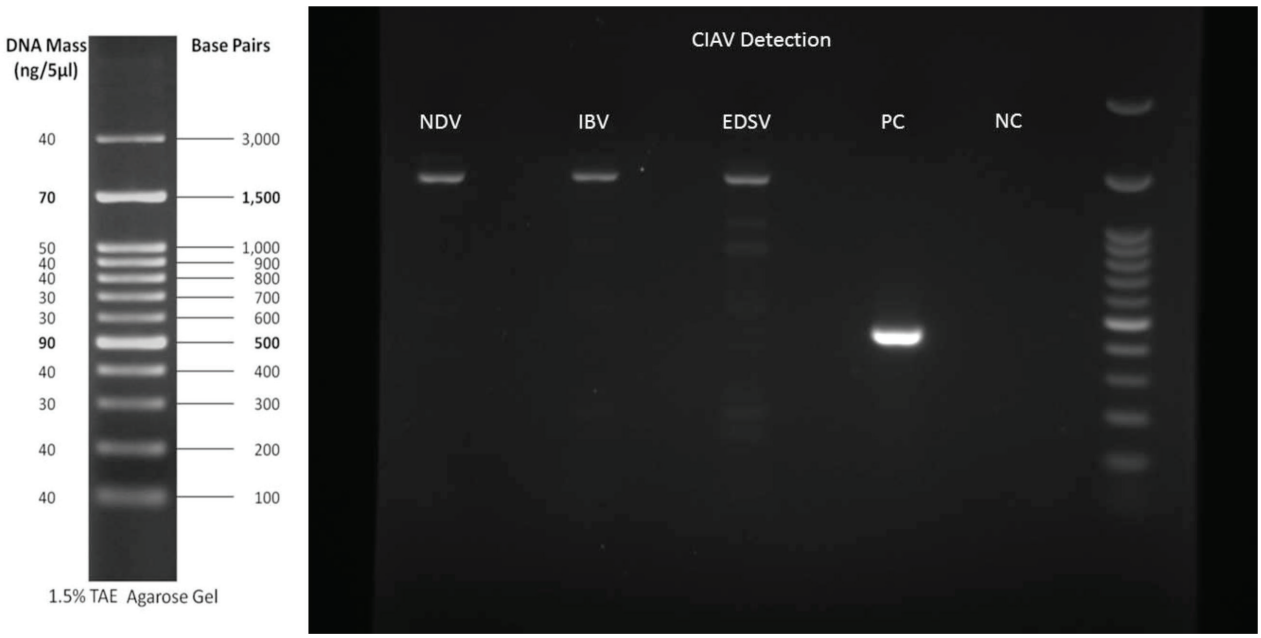
شکل ۲- نتایج PCR به منظور تأیید عدم وجود AMPV.



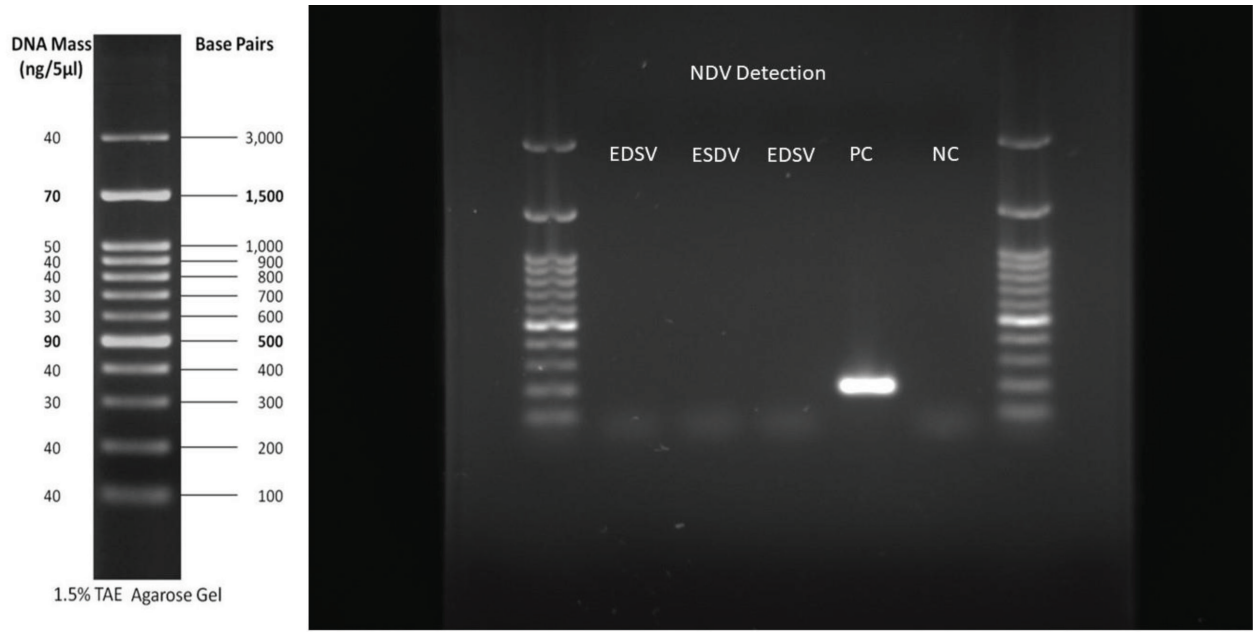
شکل ۳- نتایج PCR به منظور تأیید عدم وجود ARV و IBDV.



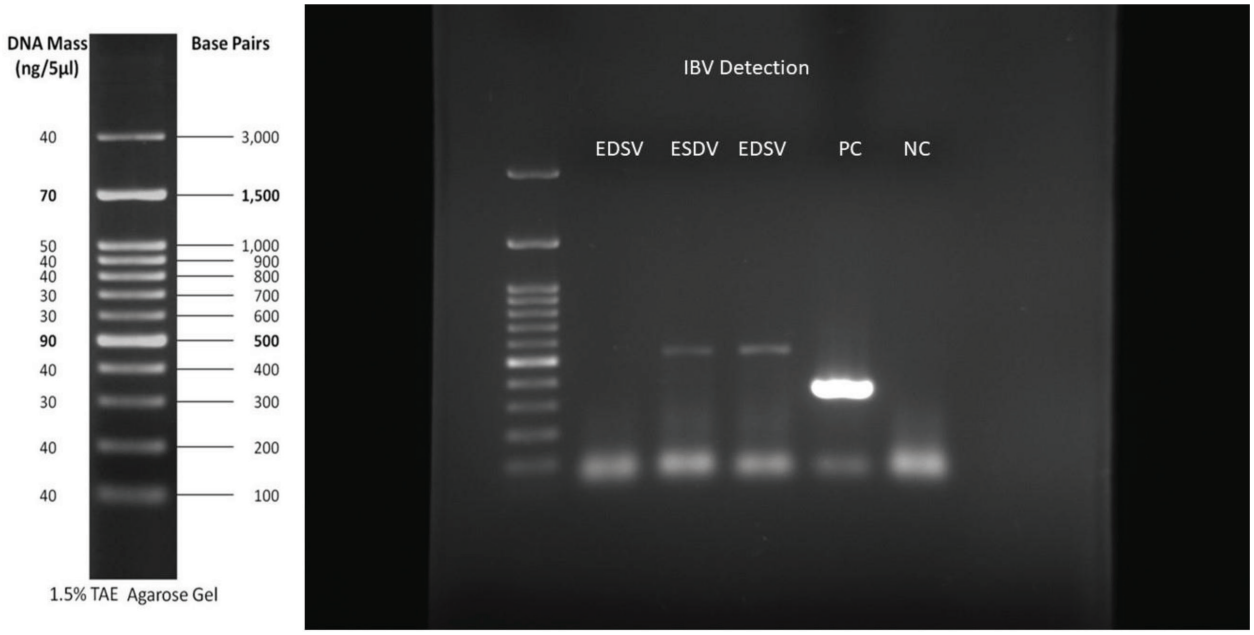
شکل ۴- نتایج PCR به منظور تأیید عدم وجود AIV تحت‌تیپ H9N2.



شکل ۵- نتایج PCR به منظور تأیید عدم وجود CIAV.



شکل ۶- نتایج PCR به منظور تأیید عدم وجود NDV.

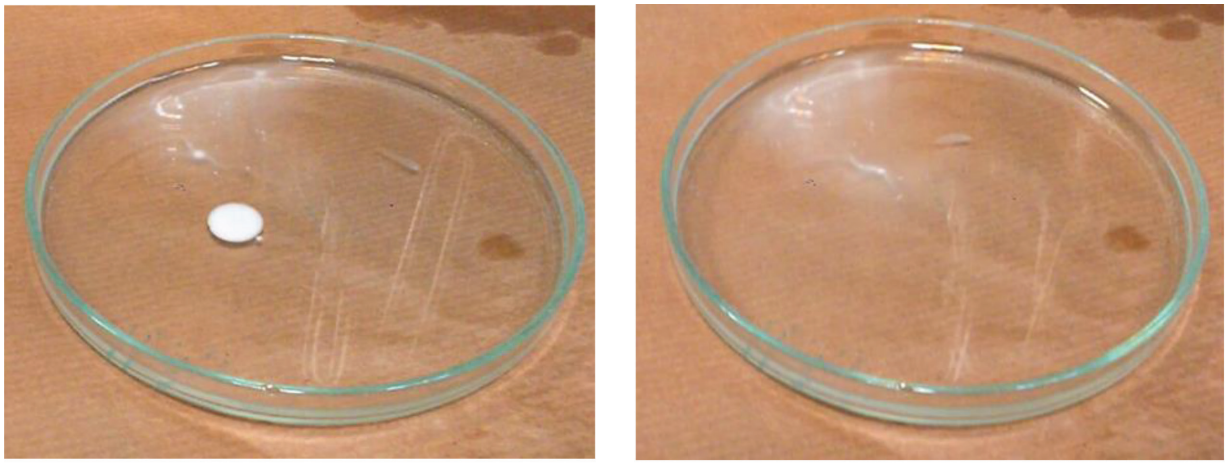


شکل ۷- نتایج PCR به منظور تأیید عدم وجود IBV.

نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۶ مورد ارزیابی قرار گرفت. اختلاف آماری در سطح P<۰/۰۵ معنی‌دار قلمداد شد.

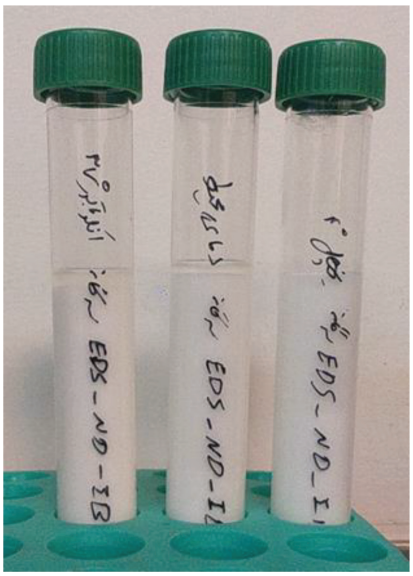
نتایج

نتایج بدست‌آمده از عیارسنجی IBV،NDV و EDSV به‌ترتیب $10^{9/5}$، $10^{7/7}$ و $10^{4/75}$ EID50 به‌ازای هر میلی‌لیتر مورد محاسبه قرار گرفت. عیار NDV و EDSV بااستفاده از آزمایش HA ده در مبنای لگاریتم ۲ بود. در ارزیابی غیرفعال‌سازی آنتی‌ژن‌های NDV و EDSV مورد استفاده در واکسن، نتایج بدست‌آمده از آزمایش HA در پایان سه مرتبه پاساژ در تخم‌مرغ‌های جنین‌دار SPF عدم رشد ویروس در مایع آلانتوئیک را نشان داد. نتایج بدست‌آمده از کنترل غیرفعال‌سازی IBV توسط بررسی جنین داخل تخم‌مرغ‌های SPF، عدم مشاهده علائم در جنین‌ها را نشان داد که



(الف) (ب)

شکل ۸- الف: پخش شدن قطره اول واکسن به‌محض اضافه‌شدن در آب ب: حل‌نشدن و شناورماندن قطره دوم واکسن اضافه‌شده در آب.



شکل ۹) آزمایش پایداری امولسیون واکسن. مقایسه عدم تفکیک دو فاز روغنی و آبی در شرایط دمایی مختلف (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، دمای ۲۵-۲۲ درجه سانتی‌گرادو دمای ۴ درجه سانتی‌گراد).

تأییدی بر غیرفعال‌بودن ویروس است. در آزمایش سترونی، تا پایان دوره آزمایش، آلودگی در محیط‌های کشت باکتریایی، مایکوپلاسمایی و قارچی مشاهده نشد و واکسن تهیه‌شده عاری از آلودگی میکروبی بود.

آنتی‌ژن NDV، IBV و EDSV با استفاده از PCR از لحاظ آلودگی به مایکوپلاسما، AIV، IBDV، CIAV، AMPV و ARV مورد ارزیابی قرار گرفت که در تمام موارد بذر واکسن‌ها عاری از عوامل ویروسی و مایکوپلاسمایی بود (شکل ۷-۱). بذر EDSV علاوه بر موارد بالا، از لحاظ IBV و NDV نیز منفی بود (شکل ۷-۶).

به‌منظور تأیید هموژن بودن واکسن، خصوصیات فیزیکی امولسیون با روش آزمایش قطره مورد بررسی قرار گرفت. با ریختن اولین قطره از واکسن برروی سطح آب، قطره پخش شد اما در آزمایشات بعدی قطرات امولسیون در آب باقی ماندند (شکل ۸).

در آزمایش پایداری امولسیون با گذشت یک‌ماه و عدم تفکیک دو فاز روغنی و آبی، پایداری امولسیون تهیه‌شده واکسن مورد تأیید قرار گرفت (شکل ۹).

آزمون بی‌ضرری در مورد واکسن سه‌گانه آزمایشگاهی در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت. در پایان سه هفته تمام جوجه‌های مایه‌کوبی‌شده، هیچ‌گونه عوارض موضعی (آماس، تورم و یا خونریزی در محل تزریق) و یا عمومی نسبت به واکسن نشان ندادند و تمام پرندگان تزریق‌شده سالم بودند. سرم خون پولت‌های چهار هفته تحت آزمایش، قبل از واکسیناسیون از لحاظ وجود آنتی‌بادی علیه NDV، IBV و EDSV مورد بررسی قرار گرفت و هیچ‌گونه تیتری علیه این بیماری‌ها مشاهده نشد.

بررسی ایمنی هومورال در این تحقیق بااستفاده از آزمایشات HI و الایزا انجام شد. نتایج بدست‌آمده از آزمایش سرم خون پولت‌های واکسینه‌شده در جدول ۱ و شکل ۱۲-۱۰ نشان داده شده است. عیار آنتی‌بادی سرمی علیه NDV در پایان هفته چهار پس از واکسیناسیون با واکسن‌های الف، ب و واکسن مشابه خارجی به‌ترتیب برابر ۹/۶۵، ۹/۷۰ و ۷/۵۰ بود. عیار آنتی‌بادی ۸/۸۰، ۸/۳۵ و ۹/۱۰ علیه EDSV در سه واکسن الف، ب و واکسن مشابه خارجی مشاهده شد. عیار آنتی‌بادی علیه NDV و EDSV واکسن‌های تولیدی در این تحقیق و واکسن تجاری دیگر که براساس آزمایش HI تعیین شده بود، هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. دررابطه با آنتی‌بادی هومورال علیه IBV، عیار ۵۷۶۵، ۵۸۱۴ و ۴۳۶۳ به‌ترتیب در واکسن‌های الف، ب و واکسن مشابه وارداتی بااستفاده از الایزا اندازه‌گیری شد. تفاوت در میزان تیتر آنتی‌بادی علیه EDSV معنی‌دار نبود.

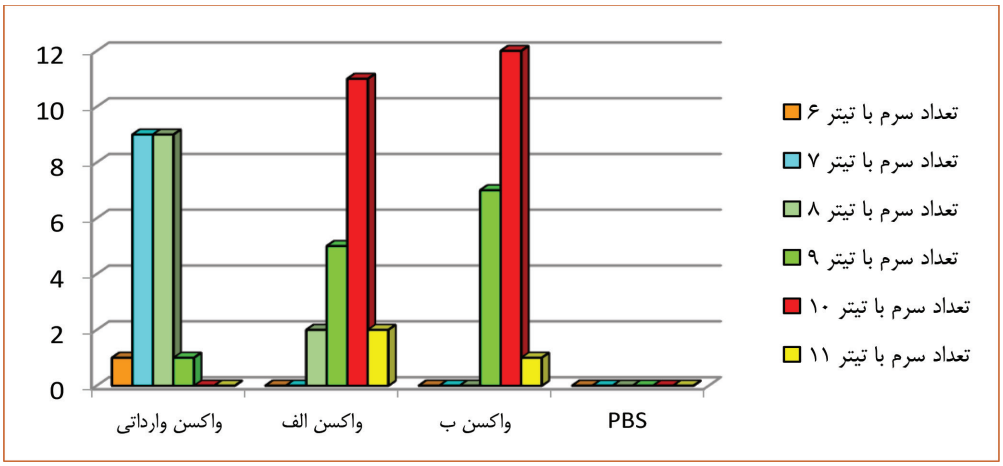
بحث

بیماری‌های عفونی به‌عنوان بزرگترین تهدید در صنعت طیور محسوب می‌شوند و مسئول بیشترین خسارات اقتصادی به تولیدکنندگان است. این خسارات ناشی از تلفات بالا، کاهش رشد، کاهش تولید تخم‌مرغ، باروری کم، جوجه‌درآوری ضعیف و کاهش کیفیت محصول همراه با هزینه درمانی می‌باشد. واکسیناسیون یکی از رهیافت‌های اصلی در کنترل بیماری‌های عفونی طیور می‌باشد که یک سری از اهداف را دنبال می‌کند. این اهداف شامل ممانعت از واگیری و تلفات، جلوگیری از تضعیف ایمنی (بیماری بورس عفونی)، پیشگیری از اثرات مرتبط با عفونت (سندرم افت تولید تخم‌مرغ) و در بیماری‌های که سنین پایین را درگیر می‌کند، ایجاد سطوح بالای آنتی‌بادی‌های مادری می‌باشد. به‌طورکلی، بار بیماری در یک فارم و یا در یک منطقه بر اثر واکسیناسیون منظم، کاهش می‌یابد که نتیجه آن افزایش بهره‌وری می‌باشد (۳). واکسن‌های طیور برای ایمن‌کردن پرندگان در چند فرم غیرفعال (کشته)، زنده و زنده نوترکیب استفاده می‌شوند. روش تجویز واکسن متنوع و شامل تزریق، تلقیح داخل تخم‌مرغ، آب آشامیدنی، اسپری، پرده بال و قطره چشمی می‌باشد. انتخاب نحوه تجویز بستگی به فاکتورهای مختلف همانند نوع پرنده (گوشتی یا تخم‌گذار)، سن (یک روزه یا بالاتر)، نوع بیماری برای واکسیناسیون (بیماری مارک و یا ND)، نوع واکسن (به‌طور مثال برای واکسن آبله منشاء واکسن می‌تواند کشت بافت، جنین مرغ و یا نوترکیب باشد) و نیروی کار مورد نیاز در تجویز واکسن (دردسترس بودن و هزینه آن) دارد. از اواخر سال ۱۹۶۰ واکسن‌های روغنی طیور به‌خاطر اثر بخشی بالا و دوام ایمنیت مناسب در مبارزه با بیماری‌های طیور از اهمیت ویژه‌ای در تولید برخوردار شدند. ماهیت غیرعفونی آن، سطح بالای پاسخ ایمنی، ایجاد ایمنی بادوام و توانایی آن‌ها در ترکیب آنتی‌ژن‌های دوگانه و چندگانه در یك دوز از مزایای این نوع فرآورده‌های بیولوژیك به‌شمار می‌رود. از طرفی احتمال روبروشدن با بیماری‌های خطرناك گوناگون از جمله NDV و AIV در فارم‌های طیور در طول دوران پرورش

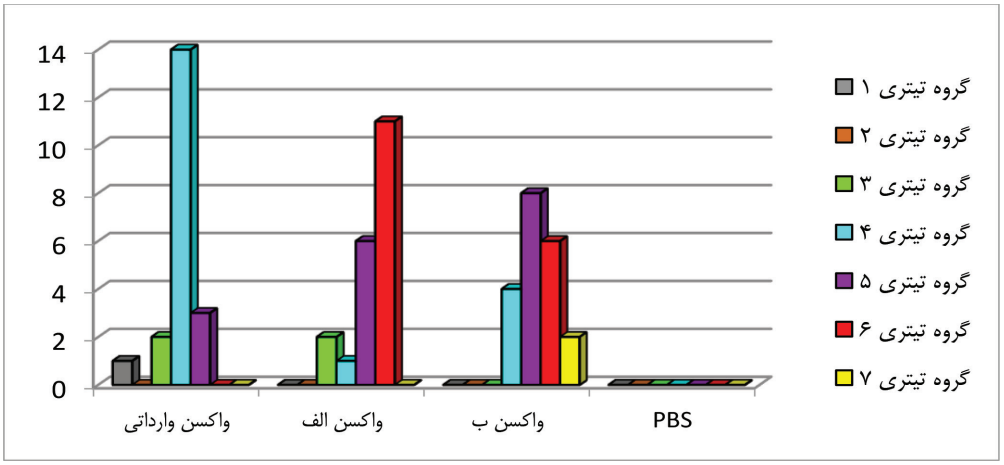
جدول ۱- مقایسه میانگین و ضریب تغییرات (CV) عیار آنتی‌بادی علیه IBV، NDV و EDSV پولت‌های واکسینه‌شده با واکسن‌های مختلف.

ویروس	آزمایش	میانگین عیار واکسن الف[1]	CV (٪)	میانگین عیار واکسن ب[1]	CV (٪)	میانگین عیار واکسن وارداتی[1]	CV (٪)
NDV	HI	۹/۶۵	۸/۴۲	۹/۷	۵/۸۸	۷/۵	۹/۱۷
IBV	الایزا	۵۷۶۵	۱۵	۵۸۱۴	۱۴	۴۳۶۳	۱۸
EDSV	HI	۸/۸	۷	۸/۳۵	۵/۸۵	۹/۱	۷/۸۹

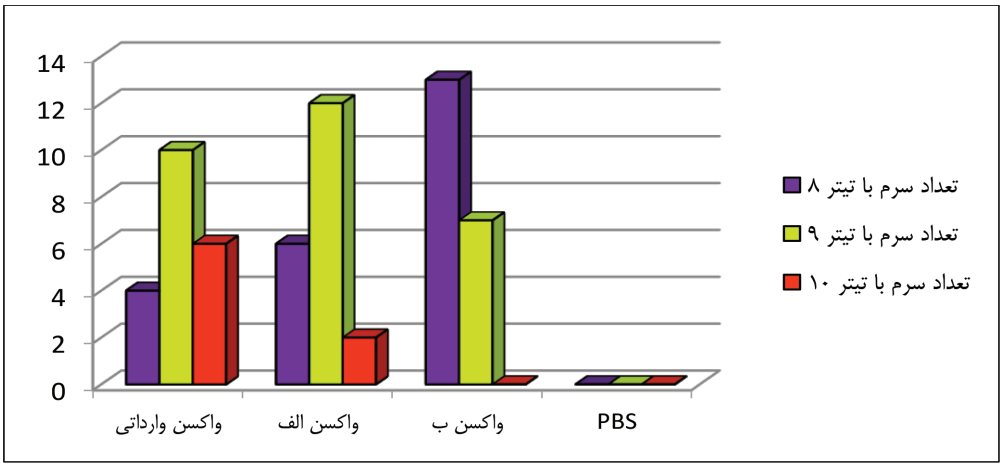
[1]غیرمعنی‌دار در سطح احتمال ۵ ٪ (P> ۰/۰۵).



شکل ۱۰- مقایسه عیار آنتی‌بادی علیه NDV در سرم پولت‌های واکسینه‌شده با واکسن‌های الف، ب و وارداتی.



شکل ۱۱- مقایسه عیار آنتی‌بادی علیه IBV در سرم پولت‌های واکسینه‌شده با واکسن‌های الف، ب و وارداتی.



شکل ۱۲- مقایسه عیار آنتی‌بادی علیه EDSV در سرم پولت‌های واکسینه‌شده با واکسن‌های الف، ب و وارداتی.

بالا است. برای پیشگیری از ابتلا به این بیماری‌ها از واکسن‌های تک‌گانه در نوبت‌های متعدد استفاده می‌شود. این شیوه واکسیناسیون برای صاحبان مرغداری از نقطه نظر اقتصادی بخاطر استرس ناشی از مایه‌کوبی و احتمال تلفات گله، صرف وقت زیاد، هزینه خرید واکسن و عوامل زیان‌آور دیگر قابل‌قبول نیست. از این‌رو خوشبختانه تولید موفقیت‌آمیز واکسن‌های دوگانه و چندگانه روغنی، گامی جدی برای مرتفع ساختن این مشکل از نقطه‌نظر اقتصادی برای صاحبان مرغداری و صرفه‌جویی در مصرف یاور گران وارداتی برای موسسات متولی ساخت واکسن به‌شمار می‌آید (۷, ۱۴). باوجود این‌که واکسن سه‌گانه روغنی طیور (ND + IB + EDS) اغلب در مرغان اجداد، مادر و تخمگذار مورد مصرف قرار می‌گیرد، تاکنون این واکسن در ایران تولید نشده و تمام نیاز کشور از طریق منابع خارجی تأمین شده است. لذا در این مطالعه دو نوع واکسن سه‌گانه ND + IB + EDS با دو فرمول مختلف طراحی گردید و با یک واکسن مشابه وارداتی از لحاظ ایمنی‌زایی مورد مقایسه قرار گرفت.

واکسن‌های کشته خصوصاً نوع تخلیص‌شده و یا نوع ساب‌یونیت نوترکیب در مقایسه با واکسن‌های زنده درحال تکثیر، فاقد ایمنی‌زایی هستند و بنابراین بیشتر با ادجوانت‌های تقویت‌کننده سیستم ایمنی فرموله می‌شوند. درحالی‌که آنتی‌ژن‌های غیرفعال شناسایی‌شده توسط سلول‌های T و یا B اختصاصیت پاسخ ایمنی را تعیین می‌کنند، نوع ادجوانت به‌طورعمده مشخص‌کننده سایر ویژگی‌های پاسخ ایمنی شامل شروع، میزان، مدت زمان شروع و دوام ایمنی، کیفیت، پاسخ ایمنی سلولار و یا همورال و سطوح واکنش لوکال یا سیستمیک می‌باشد. در اکثر واکسن‌های طیور، امولسیون آب در روغن (W/O) برای افزایش کارایی و مدت زمان ایمنی استفاده می‌شود. مکانیسم فعالیت این تقویت‌کننده‌های ایمنی هنوز به‌طور دقیق شناخته نشده است، گرچه به‌طور کلی اعتقاد بر این است که امولسیون‌های W/O آنتی‌ژن را در محل تزریق نگه می‌دارد. پاسخ ایمنی این نوع از واکسن‌ها به گیرنده‌های شبه Toll-2 (TLR-2) در واکسن‌های برپایه روغن معدنی (فرمولاسیون نوع W/O) وابسته است (۲۲). در این مطالعه از ادجوانت روغنی مونتانايد برای فرمولاسیون واکسن استفاده شد که به‌نظرمی‌رسد باتوجه به قدرت بالای آن در افزایش سطح ایمنی و همچنین دردسترس بودن آن بدلیل ساخت واکسن‌های تک‌گانه و دوگانه در کشور بهترین انتخاب باشد.

پاتوژن‌های مختلف نیاز به نوع متمایزی از پاسخ ایمنی میزبانی دارد. هنگام طراحی یک واکسن نوع پاسخ ایمنی اکتسابی مورد نیاز ترجیحاً می‌بایست شناخته شود. سیستم ایمنی اکتسابی می‌تواند در دو دسته عمده تقسیم‌بندی شود: ایمنی همورال و یا برپایه آنتی‌بادی و ایمنی سلولار و یا برپایه سلولی. اگرچه ترکیبی از هر دو نوع ایمنی مورد ترجیح است، اما برای بعضی از میکروارگانیسم‌ها ایمنی وابسته به آنتی‌بادی کافی است درحالی‌که برای سایر پاتوژن‌ها ایمنی وابسته به سلول ضروری است. واکسن‌های کشته بیشتر در واکسینه‌کردن پرندگان مادر و تخم‌گذار قبل از دوره تخم‌گذاری استفاده می‌شوند. این واکسن‌ها ممکن است برای تقویت ایمنی که توسط واکسن‌های زنده فراهم شده است به‌کاررروند. واکسن‌های غیرفعال همچنین برای فراهم‌کردن ایمنی همیشگی بدون آماده‌سازی قبلی همانند واکسن علیه EDS مورد مصرف قرار می‌گیرد. استفاده از واکسن‌های کشته در مادرها برای انتقال ایمنی به نتاج صورت می‌گیرد. واکسن‌های غیرفعال خصوصاً آن‌هایی که به‌صورت ادجوانت‌های W/O فرموله می‌شوند، سطوح بالایی از IgY سرمی را القا می‌کنند که می‌توانند برای بیش از یکسال باقی بمانند (۲۱). باکزندال و همکاران در سال ۱۹۸۰، آزمایش مجزایی را به منظور بررسی اثرات محافظت‌کنندگی واکسن EDS طراحی و اجرا کردند. در این آزمایشات هر دوز واکسن EDS حاوی ۴۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ HAU بود که پرنده‌های مورد آزمایش یک بار واکسینه شدند. در هیچکدام از گروه‌های تحت آزمایش گله‌های واکسینه علائم EDS و کاهش تولید تخم‌مرغ را نشان نداند. نتایج مطالعات ایشان نشان داد که با حداقل دوز ۴۰۰ HAU در واکسن EDS می‌توان در قبال بیماری EDS محافظت قابل قبولی ایجاد نمود. آن‌ها حداقل عیار آنتی‌بادی HI محافظت‌کننده را نامشخص عنوان کردند و در مواردی هم در پرندگان واکسینه‌شده هیچگونه عیار آنتی‌بادی HI مشاهده نکردند، درصورتی‌که محافظت کامل دربرابر علائم بیماری مشاهده کردند (۴). کوك در سال ۱۹۸۳ نشان داد که در مواردی که عیار آنتی‌بادی HI پایین است، ممکن است دفع ویروس و عفونت ایجاد شود و در این حالت ممکن است عیار آنتی‌بادی خنثی‌سازی سرم (SN) بالا باشد. اگرچه واکسن‌های EDS القا کننده عیار آنتی‌بادی هومورال بالا می‌باشند، درصورتی‌که پرندگان دوز بسیار پایینی از واکسن را دریافت کنند، دفع ویروس با امکان انتشار عفونت ممکن است اتفاق بیفتد که از منظر اپیزوتیولوژی حائز اهمیت است (۹). در مطالعه حاضر واکسن‌های تولید شده در دو دوز متفاوت ۲۰۰۰ و ۲۵۰۰ HAU مورد ارزیابی قرار گرفتند که نتیجه استفاده از واکسن الف میانگین عیار سرمی HI ۸/۸ را نشان داد.

از آنجا که واکسن EDS یك واکسن غیرفعال و تزریق آن در گله‌ها به‌صورت مونووالان معمولاً مشکل‌ساز و استرس‌زا است، اغلب جهت صرفه‌جویی در وقت، هزینه و کاهش استرس این واکسن را به صورت سه یا چهار ظرفیتی با آنتی‌ژن‌های غیرفعال ND، IB و IBD مصرف می‌کنند. هولمز و همکاران در سال ۱۹۸۹ مطالعاتی را برروی واکسن سه‌گانه آزمایشگاهی NDV سویه آلستر، IBV سویه M41 و EDSV سویه AV-127 انجام دادند. آنتی‌ژن‌های موجود در این واکسن با روش شیمیایی غیرفعال شدند و در ساخت آن از یك نوع روغن معدنی به‌صورت W/O استفاده کردند. نتیجه واکسیناسیون با ردیابی آنتی‌بادی‌ها توسط آزمایش HI مورد بررسی قرار گرفت که تمام پرنده‌ها به هر سه آنتی‌ژن موجود در واکسن واکنش مثبت نشان دادند، درحالی‌که در گروه کنترل افزایش آنتی‌بادی مشاهده نشد. این مسئله بیانگر سازگاری آنتی‌ژن‌های موجود در واکسن چندگانه می‌باشد و در عمل هم در طول سالیان مصرف این سه آنتی‌ژن در قالب یك واکسن در مرغداری‌ها نتایج رضایت بخشی داشته است. قدرت حفاظت‌کنندگی این واکسن سه‌گانه تا ۴۴ هفته باقی‌مانده که برای یك دوره تخمگذاری طبیعی به نظر کافی می‌رسد (۱۶). در مطالعه حاضر از جوجه‌های واکسینه شده با واکسن‌های تولید شده و واکسن خارجی و همچنین گروه شاهد تا چهار هفته پس از مصرف واکسن خونگیری به عمل آمد که عیار HI پرندگان در حدقابل قبولی پایدار ماند.

طی مطالعه‌ای که در هندوستان توسط گارگ و همکاران در سال ۱۹۹۴ انجام شد، مقایسه‌ای بین دو نوع واکسن EDS ساخته‌شده با دو نوع

ادجوانت متفاوت ژل هیدروکسیدآلومینیوم و روغن پارافین صورت گرفت. پس از غیرفعال‌سازی EDSV با فرمالین ۰/۵٪ در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با PBS رقیق شد و سپس در دو گروه یکی با ژل هیدروکسیدآلومینیوم و دیگری با امولسیون روغن پارافین (۸۵ ٪ روغن پارافین + ۱۵٪ لانولین) مخلوط شد. واکسن‌ها در دوزهای مختلف با حجم ۰/۵ mL به هفت گروه پنج‌تایی از جوجه‌های SPF که دارای سن پنج هفته بودند از طریق داخل عضلانی تزریق شدند. پس از ۲۸ روز از تمام پرنده‌ها خونگیری به عمل آمد و عیار آنتی‌بادی سرم‌های آن‌ها با آزمایش HI تعیین گردید. محل تزریق واکسن نیز از نظر تورم تا چند روز تحت مشاهده و معاینه قرار گرفت. طبق مشاهدات انجام شده شش روز پس از واکسیناسیون در محل تزریق واکسن حاوی ژل هیدروکسیدآلومینیوم تورمی وجود نداشت و یا خیلی کم بود، درحالی‌که در گروه دیگر تا ۱۲-۱۰ روز در محل تزریق واکسن، مقداری تورم و التهاب وجود داشت. اگرچه عیارآنتی‌بادی تولیدشده توسط هر دو گروه یکسان بود، اما این محققین پیشنهاد کردند که به‌علت سهولت تزریق، التهاب زودگذر، عدم حذف لاشه و احتمالاً قیمت ارزانتر ژل هیدروکسیدآلومینیوم بهتراست که از این یاور ایمنی جهت فرآوری واکسن EDS استفاده شود (۱۲).

واکسن‌های کشته عموماً شامل دو بخش جداگانه شامل فاز آبی و فاز روغنی (ادجوانت) هستند. فاز آبی شامل آنتی‌ژن و ادجوانت افزایش‌دهنده پاسخ پرنده به آنتی‌ژن است. نسبت آنتی‌ژن به ادجوانت براساس واکسن‌های مختلف متفاوت است. این نسبت توسط فاکتورهای مختلف از جمله ماهیت ادجوانت، آنتی‌ژن، ویسکوزیتی، پاسخ ایمنی و واکنش‌پذیری بافتی تعیین می‌شود. روغن معدنی عمده‌ترین ادجوانت مورد مصرف است که در این مطالعه از این روغن معدنی به نسبت ۶۷/۵ ٪ استفاده شد (۸).

روش‌های مختلفی جهت غیرفعال سازی ویروس جهت تولید واکسن غیرفعال مورد استفاده قرار می‌گیرد که به‌طورکلی می‌توان آن‌ها را به دو دسته کلی شیمیایی و حرارتی تقسیم کرد. از آنجا که غیرفعال‌بودن و بیماری‌زا نبودن آنتی‌ژن موجود در واکسن شرط اصلی و ضروری واکسن‌های غیرفعال می‌باشد، برای ساخت واکسن‌ها معمولاً از روش شیمیایی جهت غیرفعال‌سازی آنتی‌ژن استفاده می‌شود. در روش حرارتی این احتمال وجود دارد که حرارت به‌اندازه کافی و یکنواخت به تمام مناطق سوسپانسیون حاوی ویروس نرسد، بخصوص در مواقعی که حجم سوسپانسیون حاوی ویروس در مقیاس تولید انبوه جهت تولید واکسن تجاری باشد. مواد شیمیایی که اغلب جهت غیرفعال کردن ویروس در ساخت واکسن استفاده می‌شود شامل فرمالین و بتاپروپیولاکتون است. بتاپروپیولاکتون به‌عنوان یك ماده آلکیل کننده این مزیت را دارد که پس از تزریق بطور کامل هیدرولیز شده و کاملاً غیر سمی می‌گردد. این ماده در ساخت واکسن‌های انسانی کاربرد دارد، اما به‌علت قیمت بالای آن در دامپزشکی اغلب از فرمالین جهت غیرفعال‌سازی آنتی‌ژن‌ها برای ساخت واکسن استفاده می‌شود (۸). فرمالدهید با غلظت نهایی ۰/۱٪ به‌طورکامل هر سه ویروس را در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک شب غیرفعال کرد. فقدان فعالیت HA و عدم مشاهده علائم جنینی در مایع آلانتوئیک پس از تزریق ویروس غیرفعال به تخم‌مرغ SPF نشان داد که فرمالین یک کشنده مؤثر ویروسی است. غلظت بالای فرمالین احتمالاً آنتی‌ژنیسیتی ویروس را کاهش می‌دهد، درحالی‌که غلظت پایین ممکن است نیاز به انکوباسیون طولانی‌تر مخلوط ویروس و فرمالین را داشته باشد.

برپایه نتایج این مطالعه، واکسن سه‌گانه تولیدی ND + IB + EDS در این تحقیق از لحاظ ایمونوژنیک و ایمن‌بودن مشابه واکسن وارداتی می‌باشد. هیچ تفاوت قابل‌توجهی در عیار آنتی‌بادی هر سه واکسن مشاهده نشد. بنابراین امید است این تحقیق بستر مناسبی را برای تولید نیمه صنعتی و صنعتی این واکسن سه‌گانه فراهم کند. بعلاوه نتایج این مطالعه می‌تواند در جهت تحقیق و توسعه و افزایش سبد تولیدات واکسن در کشور خصوصاً سایر واکسن‌های پلی‌والان مورد استفاده قرار گیرد و کشور را از واردات این نوع واکسن‌ها بی‌نیاز کند.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی به شماره ۹۷۰۳۲۳-۹۷۰۰۵-۰۱۷-۱۸-۱۸-۲ انجام شده است. نویسندگان از زحمات پرسنل تشخیص و تحقیق بیماری‌های طیور که صمیمانه ما را در این تحقیق یاری رساندند، کمال تشکر را دارند.

منابع مورد استفاده

1- Aghakhan, S. M., N. Abshar, S. Fereidouni, C. Marunesi and M. Khodashenas. 1994. Studies on Avian Viral Infections in Iran. *Archives of Razi Institute* 44.45: 1-10.

2- Aghakhan, S. M. and M. Khodashenas. 1990. Studies on Egg Drop Syndrome in Iran. *Archives of Razi Institute* 41: 80-86.

3- Aini, I. 1990. Control of poultry diseases in Asia by vaccination. *World's Poultry Science Journal* 46: 125-132.

4- Baxendale, W., D. Lutticken, R. Hein and I. McPherson. 1980. The results of field trials conducted with an inactivated vaccine against the egg drop syndrome 76 (EDS 76). *Avian Pathology* 9: 77-91.

5- Bayon-Auboyer, M. H., V. Jestin, D. Toquin, M. Cherbonnel and N. Eterradossi. 1999. Comparison of F-, G- and N-based RT-PCR protocols with conventional virological procedures for the detection and typing of turkey rhinotracheitis virus. *Archives of Virology* 144: 1091-1109.

6- Bruhn, S., L. Bruckner and H. P. Ottiger. 2005. Application of RT-PCR for the detection of avian reovirus contamination in avian viral vaccines. *Journal of Virological Methods* 123: 179-186.

7- Cavanagh, D. 2003. Severe acute respiratory syndrome vaccine development: experiences of vaccination against avian infectious bronchitis coronavirus. *Avian Pathology* 32: 567-582.

8- Collett, S. R., J. A. Smith, M. Boulianne, R. L. Owen, E. Gingerich, R. S. Singer, T. J. Johnson, C. L. Hofacre, R. D. Berghaus and B. Stewart-Brown. 2020. Principles of Disease Prevention, Diagnosis, and Control. pp. 1-78. In: D.E. Swayne, M. Boulianne,

C.M. Logue, L.R. McDougald, V. Nair, D.L. Suarez, S. Wit, T. Grimes, D. Johnson, M. Kromm, T.Y. Prajitno, I. Rubinoff and G. Zavala (eds.) Diseases of Poultry. eds. John Wiley & Sons. Hoboken, NJ.

9- Cook, J. K. 1983. Egg drop syndrome 1976 (EDS-76) virus infection in inadequately vaccinated chickens. *Avian Pathology* 12: 9-16.

10- Creelan, J. L., D. A. Graham and S. J. McCullough. 2002. Detection and differentiation of pathogenicity of avian paramyxovirus serotype 1 from field cases using one-step reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Avian Pathology* 31: 493-499.

11- Fitzgerald, S. D., S. Rautenschlein, H. M. Mahsoub, F. W. Pierson, W. M. Reed and S. W. Jack. 2020. Adenovirus Infections. pp. 321-363. In: D.E. Swayne, M. Boulianne, C.M. Logue, L.R. McDougald, V. Nair, D.L. Suarez, S. Wit, T. Grimes, D. Johnson, M. Kromm, T.Y. Prajitno, I. Rubinoff and G. Zavala (eds.) Diseases of Poultry. eds. John Wiley & Sons. Hoboken, NJ.

12- Garg, S. P. and R. P. Garg. 1994. Studies on egg drop syndrome–76 vaccines immunization with killed adjuvanted vaccines. *Indian Veterinary Journal* 71: 325-328.

13- Ghorbiani, M., Z. Boroomand, M. Mayahi and M. R. Seyfi Abad Shapouri. 2020. Molecular identification of infectious bronchitis virus isolated from respiratory diseases in some Iranian broiler flocks. *Molecular Biology Reports* 47: 7161-7168.

14- Gough, R. E., W. H. Allan and D. Nedelciu. 1977. Immune response to monovalent and bivalent Newcastle disease and infectious bronchitis inactivated vaccines. Avian Pathology 6: 131-142.

15- Hermann, J., D. Koski, S. Taylor and D. Gatewood. 2012. Evaluation of the analytical sensitivity of a polymerase chain reaction assay for the detection of chicken infectious anemia virus in avian vaccines. *Biologicals* 40: 266-269.

16- Holmes, H. C., K. J. Webb and P. G. Box. 1989. Vaccine for the control of egg drop syndrome '76. *Veterinary Records* 124: 309-310.

17- Jackwood, M. W. and S. de Wit. 2020. Infectious Bronchitis. pp. 167-188. In: D.E. Swayne, M. Boulianne, C.M. Logue, L.R. McDougald, V. Nair, D.L. Suarez, S. Wit, T. Grimes, D. Johnson, M. Kromm, T.Y. Prajitno, I. Rubinoff and G. Zavala (eds.) Diseases of Poultry. eds. John Wiley & Sons. Hoboken, NJ.

18- Lee, M. S., P. C. Chang, J. H. Shien, M. C. Cheng and H. K. Shieh. 2001. Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR. *Journal of Virological Methods* 97: 13-22.

19- Loa, C. C., T. L. Lin, C. C. Wu, T. A. Bryan, T. A. Hooper and D. L. Schrader. 2006. Differential detection of turkey coronavirus, infectious bronchitis virus, and bovine coronavirus by a multiplex polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods* 131: 86-91.

20- Ottiger, H. P. 2010. Development, standardization and assessment of PCR systems for purity testing of avian viral vaccines. *Biologicals* 38: 381-388.

21- Phillips, J. M. 1973. Vaccination against Newcastle disease: An assessment of haemagglutination inhibition titres obtained from field samples. *Veterinary Records* 93: 577-583.

22- Schijns, V. E. J. C., S. van de Zande, B. Lupiani and S. M. Reddy. 2014. Chapter 20 - Practical Aspects of Poultry Vaccination. pp 345-362. In: Schat KA., Kaspers B., Kaiser P, editors. Avian Immunology (Second Edition). Academic Press. Boston.

23- Sohrab, V. 1974. Newcastle disease in Iran. *Bulletin de L'Office International des Epizooties* 81: 899-903.

24- Suarez, D. L., P. J. Miller, G. Koch, E. Mundt and S. Rautenschlein. 2020. Newcastle Disease, Other Avian Paramyxoviruses, and Avian Metapneumovirus Infections. pp. 109-166. In: D.E. Swayne, M. Boulianne, C.M. Logue, L.R. McDougald, V. Nair, D.L. Suarez, S. Wit, T. Grimes, D. Johnson, M. Kromm, T.Y. Prajitno, I. Rubinoff and G. Zavala (eds.) Diseases of Poultry. eds. John Wiley & Sons. Hoboken, NJ.

25- Zhi, Y., A. Mayhew, N. Seng and G. B. Takle. 2010. Validation of a PCR method for the detection of mycoplasmas according to European Pharmacopoeia section 2.6.7. *Biologicals* 38: 232-237.