ارزیابی فارمی دو واکسن کشته دوگانه نیوکاسل + گامبورو در جوجه تخمگذار تجاری

پیام حقیقی خوشخو[1*]، حسین حسینی[2]، گیتا اکبری آزاد[1]، سعید معصومیان[3]

۱- استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج - ایران.
۲- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج- ایران.
۳- دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج-ایران.
*نویسنده مسؤول: pkhoshkho@kiau.ac.ir

دریافت مقاله: ۲ آذر ۸۸ پذیرش نهایی: ۸ اردیبهشت ۸۹

چکیده

این مطالعه فارمی که به منظور ارزیابی توانمندی دو نوع واکسن کشته دوگانه در القاء پاسخ ایمنی هومورال علیه بیماریهای نیوکاسل وگامبورو انجام گرفته بود، منجر به یافته جالبی مبنی بر نقش ایمنی سلولی در محافظت علیه بیماری گامبورو گردید. چهل وشش هزار جوجهٔ یکروزه نیمچه تخمگذار تجاری نژادهای لاین (سویه (W360) به طور تصادفی در دوگروه ۱۶۰۰۰ قطعه ای (دریافت کننده واکسن غیرفعال A، گروه شاهد) و ۳۰۰۰۰ قطعه ای (دریافت کننده واکسن غیرفعال B، گروه آزمایش) تقسیم شدند. به استثنای تفاوت در نوع واکسن دوگانه نیوکاسل وگامبورو، بقیه شرایط از جمله برنامه واکسیناسیون، شرایط پرورش و تغذیه در هر دوگروه یکسان بود. واکسن دوگانه غیر فعال ND+IBD در هر دوگروه زیر جلد گردن در ۸ روزگی تزریق شد. درسن ۵، ۳۶ (۴ هفته پس از تزریق واکسن کشته)، ۵۰ روزگی (۶ هفته پس از تزریق واکسن کشته) و ۶۴ روزگی (۸ هفته پس از تزریق واکسن کشته)، ۲۰ نمونه خون در هر نوبت از هر سالن اخذ و به روش HI و ELISA بترتیب جهت اندازه‌گیری تیتر آنتی بادی علیه نیوکاسل وگامبورو بررسی شدند. مقایسه آماری نتایج نشان داد که میانگین تیتر و ضریب پراکندگی آنتی بادی علیه نیوکاسل وگامبورو در دو گروه فاقد اختلاف معنی داری می‌باشد ($p<0/05$). با اینحال علیرغم حضور سطح بالای آنتی بادی در هر دوگروه، بیماری گامبورو با تلفات بالا در گروه A (گروه شاهد) در هفته پنجم وششم پرورش شد. به نظر می رسد به منظور ارزیابی میزان محافظت در بیماری‌هایی مانند گامبورو که ایمنی سلولی نقش مهمی دارد، اتکاء صرف به پاسخ سرولوژی (به علت اندازه‌گیری ساده وارزان) کافی نیست و به تنهایی نمی تواند پیش بینی کامل و دقیقی از میزان محافظت کنندگی در گله‌ها ارائه دهد. پژوهشنامه دامپزشکی، ۱۳۸۹، دوره ۶، شماره ۱، ۶۷-۶۳

واژه‌های کلیدی: واکسن کشته، ایمنی هومورال، الایزا، بیماری نیوکاسل، بیماری گامبورو.

Field evaluation of two killed bivalent vaccines Newcastle and Gumboro diseases in commercial layer chickens

Haghighi khoshkhoo, P.[1*], Hosseini, H.[2], Akbari azad, G.[1], Masoumian, S.[3]

[1]*Assistant Professor of Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj-Iran*

[2]*Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj-Iran.*

[3]*Graduated from Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj-Iran*

Abstract:

This field trial was done to evaluate the efficacy of two killed bivalent vaccines to create the antibody titer against ND and IBD. Forty six thousand one-day-old Hy-line (W36) pullet chicks were randomly divided into two groups. Group1 as a test group (with population of 16000 pullets) and Group 2 as a control group (with population of 30000 pullets) received vaccine A and B respectively at 8 days of age via subcutaneous rout injection. Another vaccine programs, diet and rearing situations were almost the same for two groups. At 5, 36, 50 and 64 days of age, 20 blood samples were taken from each group and antibody titers were assessed by ELISA and HH methods against IBD and ND respectively. Statistic analysis of data by t-test method showed that antibody mean titer and coefficient of variation (CV) against ND and IBD were not different among groups 1 and 2 significantly ($p>0.05$). In spite of high titers of AB against IBD, group 1 (control) showed IBD diseases with high mortality rate and typical clinical signs at 5th and 6th weeks of rearing period. It seems that in some diseases such as IBD which cell mediated immunity (CMI) is very important, evaluation of vaccines based on serological tests is not reliable and CMI must be evaluated too. *Vet. Res. Bull. 6,1: 63-67, 2010.*

Key Words: Killed vaccine, Humoral immunity, ELISA, Newcastle disease, Gumboro disease

مقدمه

بیماری نیوکاسل (Newcastle disease, ND) و بیماری بورس عفونی (Infectious bursal disease, IBD) یا گامبورو از بیماریهای عفونی مهم صنعت طیور می باشند که علیه آنها هر دو نوع واکسن زنده و کشته برای ایجاد ایمنی در گله‌های ماکیان بصورت تجارتی در دسترس است. واکسنهای کشته یا غیرفعال

نیوکاسل و گامبورو به علت القاء مقادیر بالا، یکنواخت و طولانی مدت ایمنی هومورال بطور گسترده‌ای در صنعت طیور بکار می‌روند(۱،۶). گرچه در این تحقیق به منظور ارزیابی دونوع واکسن دوگانه از آزمایشات سرولوژیک HI و الیزا استفاده شده است، اما نتایج این مطالعه بخوبی محدودیت‌های این نوع ارزیابی را نشان می‌دهد. در بیماری‌هایی چون گامبورو، ایمنی سلولی نقش مهمی دارد و نقش آن از طریق لنفوسیت‌های T کمک کننده و T سیتوتوکسیک کاملا به اثبات رسیده است. لذا درارزیابی کارایی واکسن گامبورو، ایمنی سلولی القا شده توسط واکسن نیز باید سنجیده شود. از طرف دیگر تیتر بالای آنتی بادی در آزمایش الیزا و HI انعکاس دقیقی از آنتی بادی‌های محافظت کننده (VN antibody) نیست لیکن بعلت دسترسی راحت، ارزان بودن و استفاده فراوان از آنها در تفسیر کارایی واکسن، در این تحقیق نیز از همین تکنیک‌ها استفاده شده است.

مواد و روش کار

مشخصات مزرعه و گله: به منظور ارزیابی توانمندی این دو نوع واکسن یک مزرعه صنعتی پرورش پولت تخمگذار تجاری با شرایط استاندارد پرورشی در استان تهران، شهرستان شهریار در نظر گرفته شد. چهل و شش هزار جوجهٔ یکروزه نژادهای لاین W36 به صورت تصادفی در دو گروه (سالن) تقسیم شدند. گروه اول با جمعیت ۱۶۰۰۰ قطعه، در سالن شماره یک و گروه دوم با جمعیت ۳۰۰۰۰ قطعه در سالن شماره دو قرار گرفتند. تمامی شرایط پرورشی، تغذیه‌ای، نوری، تراکم و بهداشتی بطور یکسان برای هر دو سالن یکسان بکار گرفته شد.

واکسنهای کشته دوگانه: واکسن A (واکسن آزمایش) حاوی ویروسهای غیر فعال نیوکاسل سویهٔ لاسوتا و گامبورو سویهٔ W2512 و واکسن B (واکسن کنترل) حاوی ویروسهای غیر فعال نیوکاسل سویهٔ لاسوتا و گامبورو سویهٔ GP بود که هر کدام در بطری پلاستیکی ۵۰۰ میلی لیتری حاوی ۱۰۰۰ دوز واکسن بسته بندی و عرضه شده است. یک دز واکسن A در سالن یک و یک دز واکسن B در سالن دو بصورت زیر جلدی (زیر پوست گردن) و در سن ۸ روزگی به هر جوجه تزریق شدند.

برنامه واکسیناسیون: برنامه واکسیناسیون براساس شرایط منطقه و مزرعه، تاریخچه و همچنین ایمنی مادری منتقله به جوجه‌ها طراحی شد. برنامه واکسیناسیون و نوع واکسنها در هر دو گروه مورد آزمایش از هر نظر مشابه هم بود و فقط از نظر نوع

حدول ۱ـ برنامه و روش واکسیناسیون در دو گروه مورد آزمایش

روز	نوع واکسن	نحوه تجویز	گروه۱ (تیمار)	گروه۲ (کنترل)
۱	برونشیت (H120)	قطره چشمی	✓	✓
۸	نیوکاسل (B1)	قطره چشمی	✓	✓
۸	واکسن A دوگانه نیوکاسل ـ گامبورو	تزریقی	✓	–
۸	واکسن B دوگانه نیوکاسل ـ گامبورو	تزریقی	-	✓
۱۶	گامبورو (D78)	قطره چشمی	✓	✓
۱۸	نیوکاسل (LaSota)	آشامیدنی	✓	✓
۲۴	گامبورو (D78)	آشامیدنی	✓	✓
۲۶	برونشیت (H120)	آشامیدنی	✓	✓
۲۸	نیوکاسل (LaSota)	آشامیدنی	✓	✓
۳۱	گامبورو (D78)	آشامیدنی	✓	✓

واکسن کشتهٔ ND+IBD متفاوت بودند. برنامه کامل واکسیناسیون در جدول ۱ ارائه شده است. جهت تعیین زمان تجویز واکسن زنده گامبورو ابتدا در سن پنج روزگی خونگیری صورت گرفت و براساس فرمول Deventer که در زیر آورده شده است، زمان تقریبی واکسیناسیون تعیین شد (۴).

سن واکسیناسیون = {(لگاریتم ۲ تیتر درصد پرنده ـ لگاریتم ۲ تیتر رخنه) t × (نیمه عمر پادتن مادری} + (سن نمونه برداری + روز تصحیح در زمان نمونه برداری از صفر تا ۴)

که در این طرح: تیتر درصد پرنده: ۱۷۵، تیتر رخنه: ۱۲۵، t: ۵/۵ روز، سن نمونه گیری: ۵ روز، روز تصحیح: صفر بود. بنابراین سن واکسیناسیون طبق فرمول فوق = {۵/۵ × (۱۱/۱۸ - ۱۳/۸)} + ۵ + ۰ و برابر با سن ۱۶ روزگی بود.

سرولوژی: به منظور تعیین میزان آنتی بادی مادری منتقل شده به جوجه‌ها اولین خونگیری در سن ۵ روزگی صورت گرفت و سپس در ۳۶ روزگی (۴ هفته پس از تزریق واکسن کشته)، ۵۰ روزگی (۶ هفته پس از تزریق واکسن کشته) و ۶۴ روزگی (۸ هفته پس از تزریق واکسن کشته) خونگیری به عمل آمد. در هر نوبت خونگیری از هر سالن تعداد ۲۰ نمونه خون به آزمایشگاه ارسال شد. جهت اندازه گیری تیتر آنتی بادی علیه نیوکاسل از روش HI و برای اندازه گیری تیتر آنتی بادی علیه گامبورو از روش الیزا استفاده شد. از کیت گامبورو (BioChek, Netherland) برای آزمون الیزا بهره گرفته شد.

عملکرد گله: به منظور ارزیابی عملکرد گله در دوره پرورش به

جدول ۲ ـ میانگین حسابی و هندسی تیتر و ضریب پراکندگی آنتی بادی علیه گامبورو در دو گروه مورد آزمایش به روش الایز

سن (روز)	واکسن کنترل			واکسن تیمار			p-value
	میانگین حسابی تیتر	میانگین هندسی تیتر	ضریب پراکندگی	میانگین حسابی تیتر	میانگین هندسی تیتر	ضریب پراکندگی	
۵	۳۷۸۸	۳۵۰۶	۳۹	۳۷۸۸	۳۵۰۶	۳۹	NS*
۳۶	۱۰۸۵۹	۱۰۶۵۴	۱۹	۱۰۹۲۸	۱۰۷۸۰	۱۶	NS
۵۰	۱۴۰۴۳	۱۳۶۲۲	۲۳	۱۵۱۹۷	۱۵۰۵۵	۱۴	NS
۶۴	۱۸۰۲۱	۱۷۳۰۷	۲۶	۱۸۴۴۳	۱۸۲۷۴	۱۳	NS

*NS = غیر معنی دار.

طور هفتگی تعداد ۱۰۰ قطعه جوجه از سالنهای یک و دو بطور تصادفی وزن کشی شدند. همچنین آمار تلفات و مصرف دان روزانه در هر سالن به طور مجزا ثبت و در آخر دورهٔ پرورش، راندمان دو گروه از نظر میانگین وزن، درصد یکنواختی، ضریب تبدیل غذایی (Food Conversion Rate, FCR)، و درصد ماندگاری محاسبه و با هم مقایسه شدند.

آنالیز آماری: کلیه داده‌ها به روش t-test در دو گروه مقایسه شدند. سطح معنی داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

مقایسه آماری به روش T-test بر روی ۱۴۰ تیتر آنتی بادی علیه گامبورو به روش ELISA در گروه‌های تیمار و کنترل نشان داد که میانگین تیترهای حسابی (Arithmetic Mean Titer, AMT) و هندسی (Geometric Mean Titer, GMT) و ضریب پراکندگی تیترها (Coefficient Variance Percent, CV %) در دو گروه تفاوت معنی داری ندارد ($p \leq ۰/۰۵$)(جدول ۲). همچنین مقایسه آماری به روش T-test بر روی ۱۴۰ تیتر آنتی بادی علیه نیوکاسل به روش HI در گروه‌های تیمار و کنترل نشان داد که میانگین تیتر HI و ضریب پراکندگی تیترها (CV%) در دو گروه فاقد اختلاف معنی داری می‌باشد ($p \leq ۰/۰۵$)(جدول ۳). جدول ۴ نشان می‌دهد که در هفته‌های ۱، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷ و ۱۰ پرورش، متوسط تلفات هفتگی در گروه کنترل بطور معنی داری بالاتر از گروه تیمار می‌باشد ($p < ۰/۰۵$). ولی در هفته‌های دیگر (۲، ۸، ۹) تفاوت معنی داری ندارد ($p \leq ۰/۰۵$). در دو گروه از لحاظ میانگین وزن، درصد یکنواختی، متوسط ضریب تبدیل غذایی در هفته‌های پرورش و متوسط درصد ماندگاری هفته‌های مختلف نیز اختلاف معنی داری وجود ندارد ($p \leq ۰/۰۵$)(داده‌ها نمایش داده نشده است).

جدول ۳ ـ میانگین تیتر و ضریب پراکندگی آنتی بادی علیه نیوکاسل در دو گروه مورد آزمایش به روش HI

سن (روز)	گروه کنترل		گروه تیمار		p-value
	میانگین تیتر	ضریب پراکندگی	میانگین تیتر	ضریب پراکندگی	
۵	۵/۹	۱۰/۸۴	۵/۹	۱۰/۸۴	NS*
۳۶	۶	۱۵/۳	۶/۷۵	۱۵/۸	NS
۵۰	۵/۸	۱۰/۶۲	۶	۹/۴	NS
۶۴	۶	۱۳/۲۵	۶/۷۵	۱۵/۶	NS

*NS = غیر معنی دار.

جدول ۴ ـ درصد تلفات هفتگی نسبت به موجودی هفته قبل در دو گروه مورد آزمایش

هفته	واکسن کنترل	واکسن تیمار	p-value
۱	۱/۶	۲/۴۸	*۰/۰۰۵=S
۲	۰/۳۹	۰/۳۸	۰/۸۶=NS**
۳	۱/۲۴	۰/۳۶	۰/۰۰۵=S
۴	۱/۲۱	۰/۸۲	۰/۰۰۵=S
۵	۸/۳۲	۰/۹۱	۰/۰۰۵=S
۶	۵/۴۸	۰/۴۲	۰/۰۰۵=S
۷	۱/۸۱	۰/۱	۰/۰۰۵=S
۸	۰/۲۲	۰/۳۱	۰/۰۸=NS
۹	۰/۴۲	۰/۴۵	۰/۶۱=NS
۱۰	۰/۲۱	۰/۳۵	۰/۰۰۹=NS

*S=معنی دار، **NS= غیر معنی دار

بحث

در ارزیابی مقایسه‌ای دو نوع واکسن کشته نیوکاسل + گامبورو بصورت آزمایش فارمی در یک مزرعه پرورش نیمچه تخمگذار تجاری مشاهده شد که هر دو گروه در سن ۵-۶ هفتگی به بیماری گامبورو مبتلا شدند که در نتیجه منجر به افزایش تیتر آنتی بادی علیه بیماری گامبورو در آزمایش الیزا شد. اما یافته قابل تامل و بحث برانگیز این است که، اگرچه تیتر آنتی بادی و ضریب پراکندگی در هر دو گروه همطراز بود، گروه کنترل با وجود تیتر بالای آنتی بادی و ضریب پراکندگی پایین، به بیماری گامبورو مبتلا شد و شکل بالینی بیماری را بطور واضح با تلفات بالا نشان داد. در حالیکه بیماری گامبورو در گروه تیمار هیچ علامتی را نشان نداده و تلفاتی هم در پی نداشت. اینکه چرا بیماری گامبورو در گروه کنترل علیرغم تیتر بالای آنتی بادی بروز کرد، دو فرضیه را قوت بخشید: اول اینکه آنتی بادی محافظت کننده در بیماری گامبورو، فقط از نوع هومورال نیست و نقش ایمنی سلولی در محافظت علیه بیماری بسیار پررنگتر از آن است که پیش از این تصور می‌شد (۹، ۱۰). مطالعات متعددی نشان داده است که حضور سلولهای T

کمکی (T helper) و سلولهای T سیتوتوکسیک جهت ایجاد محافظت ضروری است (۱۰) و ایمنی سلولی قادر به ایجاد محافظت کامل حتی در غیاب آنتی بادی می باشد(۱۱). دوم ممکن است آنتی بادی های هومورال اندازه گیری شده در آزمایش الیزا از نوع خنثی کننده (VN) نباشند. از آنجا که آنتی ژن واکسنهای کشته تجاری مقادیر بسیار متفاوتی از آنتی بادی های خنثی کننده را القامی کند، این احتمال وجود دارد که آنتی بادی های تولید شده توسط واکسن B خاصیت نوترولیزانی بیشتری نسبت به آنتی بادیهای تولید شده توسط واکسن A داشته است (۲). ولی آزمون الیزای بر خلاف آزمایش VN، قادر به تفکیک آنتی بادیهای تولید شده نیست (۳و۷). به نظر می رسد ارزیابی وضعیت محافظت گله در برابر بیماری گامبورو بر اساس سرولوژی کافی نباشد و لازم است میزان فعالیت ایمنی سلولی نیز اندازه گیری شود. در این آزمایش برای اطمینان از صحت نتایج سرولوژی، آزمایشات برای گامبورو دو بار انجام شد و البته نتایج یکسان در هر دو نوبت آزمایش بدست آمد.

از دیگر نتایج قابل انتظار این آزمایش، همطرازی تیتر آنتی بادی و ضریب یکنواختی آنتی بادی علیه بیماری نیوکاسل بود که به روش آماری تفاوت معنی داری نداشت ($p \leq ۰/۰۵$). هم چنین در مقایسه آماری بین میانگین وزن هفتگی، درصد یکنواختی وزن، درصد ماندگاری و ضریب تبدیل غذایی هفتگی دو گروه کنترل و تیمار نیز اختلاف معنی داری مشاهده نشد ($p \leq ۰/۰۵$).

تفاوت در ارزیابی توسط آزمایش های مختلف سرولوژی در مورد بیماری نیوکاسل نیز صادق می باشد. از آنجا که آنتی بادی محافظت کننده از نوع VN بوده و توسط گلیکوپروتئین F القاء می شود، اما روش متداول ارزیابی ایمنی و محافظت گله استفاده از آزمایش HI می باشد که آنتی بادی القاء شده توسط گلیکوپروتئین HN را اندازه گیری می کند. گرچه این دو پاسخ موازی هم هستند اما موفقیت اتکاء بر آزمایش ساده HI جهت ارزیابی محافظت تنها براساس خوش شانسی استوار است (۱). شاید بدلیل همین محدودیت ها (که در این آزمایش نیز بخوبی تایید شد) بر طبق فارماکوپه اروپا واکسنهای کشته باید در یک آزمایش واکسیناسیون - سرولوژی ارزیابی شوند و تیتر آنتی بادی خنثی کننده حاصل از آن با تیتر سرم مرجع مقایسه شود (۹).

تشکر و قدردانی

این طرح تحقیقاتی با همکاری جهاد دانشگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران به سرانجام رسیده است. بدینوسیله از مساعدت این مرکز تشکر و قدردانی می شود.

References

1- Alexander, D. (2003) Newcastle disease, other avian paramyxoviruses, and pneumovirus infections. In: Saif Y.M., Barnes H.J., Glisson J.R., Fadly A.M., McDougald L.R., Swayne D., editors. Diseases of Poultry. Ames: Iowa State University Press, 63-99.

2- Becht, H.H., Müller H.K. (1988) Comparative Studies on Structural and Antigenic Properties of Two Serotypes of Infectious Bursal Disease Virus. *Journal Genetic Virology*, **69** : 631-640.

3- De Herdt, P., Jagt, E., Paul, G., Van Volen, S., Renard, R., Destrooper, C., Van Den Bosch, G. (2005) Evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies against infectious bursal disease virus (IBDV) and the estimation of the optimal age for IBDV vaccination in broilers. *Avian Pathology J.*, **134**:501-504.

4- De Wit, J.J. (2001) Gumboro Disease: Estimation of optimal time of vaccination by the Deventer formula. Proceedings of the 3rd meeting of working group 3 of COST action 839: passive protection and vaccination (current and future possibilities) in the presence of maternally derived antibody, Pulawy, 21-28.

5- Ismail, N.M., Saif, Y. M. (1991) Differentiation between Antibodies to Serotype 1and 2 IBDV in Chicken Sera. *Avian Disease*, **34**: 1002-1004.

6- Lukert, P. D., Saif, Y. M. Infectious bursal disease. In: Diseases of Poultry, (2003)11th ed. Y. M. Saif, H.J.Barns, A.M. Fadly, J.R. Glisson, L.R. McDougald and D. E. Swayne, eds. Iowa State Press, Ames, IA. 161-179.

7- Maas, R.A., Komen, M., Van Diepen, M., Oei, H.L., Claassen, I. J. T. M. (2003) Correlation of Haemagglutinin- Neuraminidase and Fusion protein content with protective antibody response after immunisation with inactivated Newcastle disease vaccines. *Vaccine*, **21**:3136 - 3141.

8-Maas, R., Vanema, S., Kant, A., Dei, H., Claassen, I. (2004) Quantification of infectious bursal disease viral proteins 2 and 3 in inactivated vaccines as an

indicator of serological response and measure of potency. *Avian Pathology J.*, **33**:126-132.

9-Rautenschlein, S.H., Yeh, Y., Sharma, J. M. (2002) The role of T cells in protection by an inactivated infectious bursal disease virus vaccine. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **89**: 159-167.

10-Wyeth, P., Chettle, N. J., Mohepat, A. R. (1992) Use of an inactivated infectious bursal disease oil emulsion vaccine in commercial layer flocks. *Veterinary Record*, **130**:30-32.

11-Yeh, H., Rautenschlein, S., Sharma, M. (2002) Protective immunity against infectious bursal disease virus in chickens in the absence of virus-specific antibodies. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **89**: 149-158.