

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

• محمدمجید ابراهیمی (نویسنده مسئول)

موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات ترویج و آموزش کشاورزی، کرج، ایران.

• شهلا شاهسوندی

موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی 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 سرم‌سازی 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. به دلیل خسارات اقتصادی ناشی از ILT در پولات‌های 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 پولات 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. به منظور انجام آزمایش‌های الیزا و خنثی‌سازی ویروس، پیش از انجام واکسیناسیون (روز صفر) و در فواصل زمانی ۳، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۶ هفته پس از آن، به طور 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 تولیدی موسسه رازی عملکرد یکسانی از نظر تیتراکتی‌بادی و شاخص خنثی‌سازی ویروس در هر دو سویه مورد مطالعه داشت ($p > 0.05$). روند افزایش تیتراکتی‌بادی علیه ILT و شاخص خنثی‌سازی ویروس نشان داد که با گذشت سه هفته از زمان واکسیناسیون، پولات‌های هر دو سویه آستانه مورد نیاز برای ایجاد ایمنی محافظت‌کننده را کسب نمودند. همچنین، واکسن ILT رازی به ترتیب 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 رازی تیتراکتی‌بادی 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 عفونی، واکسن، تیتراکتی‌بادی، کارایی، 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. Shamsavandi, 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 efficacy. 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

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 تک‌گیر این بیماری در پرندگان زینتی و مسابقه‌ای و همچنین عفونت‌هایی طبیعی با علائم مشابه بیماری ILT در بوقلمون نیز گزارش شده است (۲۰). علی‌رغم حساسیت قرقاول‌ها، سایر پرندگان مانند کبوتر، اردک، گنجشک، کلاغ و مرغ نروزی نسبت به آلودگی با این ویروس مقاومت نشان می‌دهند. به‌طور معمول، ۶ تا ۱۲ روز پس از در معرض قرارگرفتن پرنده با ویروس ILT، علائم 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

مقدمه

لارنگوتراکیت عفونی (Infectious laryngotracheitis; 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 ۱۹۳۶ میلادی، 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 خطی دو رشته‌ای تشکیل شده است. پنج گلیکوپروتئینی پوششی ویروس ILT، با وزن‌های مولکولی ۲۰۵، ۱۶۰، ۱۱۵، ۹۰، و ۶۰ کیلو دالتون، به‌عنوان ایمونوژن‌های اصلی

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. برای ارزیابی کیفیت عملیات ضدعفونی از سطوح مختلف سالن سوآب تهیه شد. تمامی مراحل پرورش در سیستم قفس و به‌صورت نیمه اتوماتیک 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 رازی 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.

نمونه‌گیری خون

پیش از انجام واکسیناسیون (روز صفر)، و در فواصل زمانی 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 یک پرنده) و نمونه‌گیری خون از سیاهرگ بال انجام شد. روش نمونه‌گیری برای هر دو سالن مشابه بود. پس از جداسازی سرم از نمونه‌های خون، تیت با روش الیزا 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 تیت آنتی‌بادی علیه ILT با روش الیزا

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

و با اندازه پلاک‌های ایجاد شده بر روی کشت سلول به دو گروه حد و خفیف طبقه‌بندی می‌شود. شکل حد بیماری علائمی 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 پنبه‌ری خون‌آلود در نای و ایجاد غشای کاذب در فضای درونی نای 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 واگیری این شکل بیماری 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 سینوس‌های بینی 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 ۱/۱ تا ۲ درصد است. شایان ذکر است که آلودگی‌های ثانویه بر حدت بیماری می‌افزایند (۹).

ویروس ILT به‌طور طبیعی 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 بیماری 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 تأیید 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 سری 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 پولات‌های تخم‌گذار استفاده می‌شود. 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 موسسه تحقیقات 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 پولات از هر یک از سویه‌های

آزمایش، حذف شدند.

آنالیز آماری

داده های حاصل از آزمایش های الایزا و خنثی سازی ویروس با روش t-test مقایسه آماری شدند. برای ارزیابی هم پایگی واریانس بین گروه ها، از آزمون Levene's استفاده شد. برای آنالیز داده های کارآبی واکسن در آزمایش چالش با ویروس vILT که توزیع باننومال داشتند، از روش رگرسیون لجستیک و رویه ی GENMOD نرم افزار آماری SAS ۹/۴ استفاده شد. سطح احتمال $p < 0.05$ برای بیان اختلاف های معنی دار مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج

تیتراژ آنتی بادی علیه ویروس ILT (آزمایش الایزا)

اطلاعات توصیفی مربوط به میانگین کل تیتراژ آنتی بادی حاصل از واکسیناسیون با واکسن ILT تولید شده در موسسه رازی در سویه های لاین W36 و بونز سفید در جدول (۱) نشان داده شده است. بر اساس یافته ها، میانگین تیتراژ آنتی بادی در سویه های لاین و بونز به ترتیب برابر با $1820/20$ و $1910/71$ با میانگین خطای استاندارد $43/215$ و $41/061$ بود. بین گروه های آزمایشی از نظر میانگین تیتراژ کل دوره تفاوتی مشاهده نشد ($p > 0.05$). روند تغییرات تیتراژ آنتی بادی علیه این بیماری پس از واکسیناسیون با واکسن ILT موسسه رازی در شکل (۱) گزارش شده است. به طور کلی، نتایج آزمایش الایزا بر روی سرم های اخذ شده نشان داد که واکسن ILT در هر دو سویه بونز سفید و های لاین سویه W36 کارایی یکسانی داشت و از این نظر بین این دو سویه تفاوتی وجود نداشت ($p > 0.05$). شایان ذکر است که در هفته سوم پس از واکسیناسیون، در نتیجه ی آزمایش الایزا بین دو سویه مورد آزمایش اختلاف معنی داری وجود داشت ($p < 0.05$) که در هفته های پی آیند برطرف شد. روند تیتراژی تا هفته هشتم پس از واکسیناسیون در هر دو سویه به صورت خطی بود، اما پس از آن تیتراژ حاصل شده روندی به نسبت ثابت را در طول آزمایش داشتند. بررسی روند افزایش تیتراژ آنتی بادی حاصل از واکسیناسیون پوله های تخم گذار با واکسن ILT موسسه رازی نشان داد که طی هشت هفته نخست پس از واکسیناسیون، تیتراژ آنتی بادی با ضریب تابعیت خطی 251 افزایش می یابد.

آزمایش خنثی سازی ویروس

برای انجام آزمایش خنثی سازی ویروس، ابتدا رقت های سری از ویروس بر مبنای \log_{10} (۱۰-۱ تا ۱۰-۶) تهیه شد. بدین ترتیب که شش لوله در نظر گرفته شده و روی آن ها برچسب نشان دهنده رقت چسبانده شد. در تمامی لوله ها مقدار $1/8$ میلی لیتر محلول PBS ریخته شد و در ادامه به لوله نخست $0/2$ میلی لیتر محلول حاوی ویروس ILT اضافه شد (رقت 10^{-1}). پس از مخلوط سازی محتویات لوله ها، $0/2$ میلی لیتر از رقت 10^{-1} به لوله دوم منتقل شد. عمل تهیه رقت تا لوله ششم ادامه یافت. برای حذف اثرات نامطلوب پروتئین های کمپلمان موجود در سرم بر ویروس، ابتدا سرم ها به مدت نیم ساعت در بن ماری 56 درجه سانتی گراد گرم خانه گذاری و سپس بلافاصله نمونه ها بر روی یخ گذاشته شد. به هر رقت ویروس، حجم مساوی از غلظت ثابت سرم اضافه شده و به طور کامل مخلوط شد. سپس لوله ها در دمای 25 درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت برای خنثی شدن ویروس قرار داده شدند. برای هر رقت، شش تخم مرغ جنین دار یازده روزه در نظر گرفته شده و $0/2$ میلی لیتر از مخلوط سرم-ویروس بر روی پرده کوریوآلنتوییک جنین تخم مرغ ها تلقیح شد. پس از بستن محل تلقیح با پارافین مذاب، تخم مرغ ها به مدت ۷ روز در دمای 37 درجه سانتی گراد قرار داده شدند. برای تایید درستی آزمایش، کنترل های مثبت و منفی نیز در نظر گرفته شدند. بروز جراحات و مرگ جنین ها بررسی شده و نقطه پایانی به عنوان بیشترین رقتی از ویروس که هیچ پوکی روی پرده کوریوآلنتوییک ایجاد نکرده بود، ثبت شد. عیار آنتی بادی سرمی به روش Spearman-Kärber محاسبه شد.

ارزیابی کارآبی واکسن

سه هفته پس از واکسیناسیون و به منظور انجام چالش، به طور تصادفی به ۲۰ پرندۀ از هر گروه مقدار $EID_{50} < 10^3$ از ویروس vILT به صورت قطره داخل بینی تلقیح شد. شایان ذکر است که برای انجام آزمایش کارایی واکسن، پرندگان انتخاب شده به محیطی استاندارد و مجزا از سالن های پرورشی انتقال یافتند. پس از تلقیح ویروس vILT پرندگان به مدت سه هفته نگهداری و روزانه از نظر تلفات و نشانه های بیماری ILT بازرسی شدند. بنابراین، برای ارزیابی های سرمی از پوله های هر فارم در محل فارم خون گیری شد، اما پوله های تحت چالش در مکان جدا از فارم و کاملاً در شرایط کنترل شده تحت چالش قرار گرفتند و پس از انجام

جدول ۱- اطلاعات توصیفی میانگین کل و واریانس تیتراژ آنتی بادی علیه بیماری لارنگو تراکتیت عفونی (ILT) پس از واکسیناسیون با واکسن موسسه رازی در

سویه های پوله های لاین 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

vILT علائم بالینی بیماری 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 مرغ تخم‌گذار 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، کارایی واکسن ILT ساخت موسسه رازی در پولت‌های سویه بونز سفید و های‌لین سویه W36 از نظر تیترا آنتی‌بادی سرمی علیه ILT، آزمایش خنثی‌سازی ویروس و همچنین میزان محافظت طی آزمایش چالش با ویروس حاد مورد آزمون قرار گرفت.

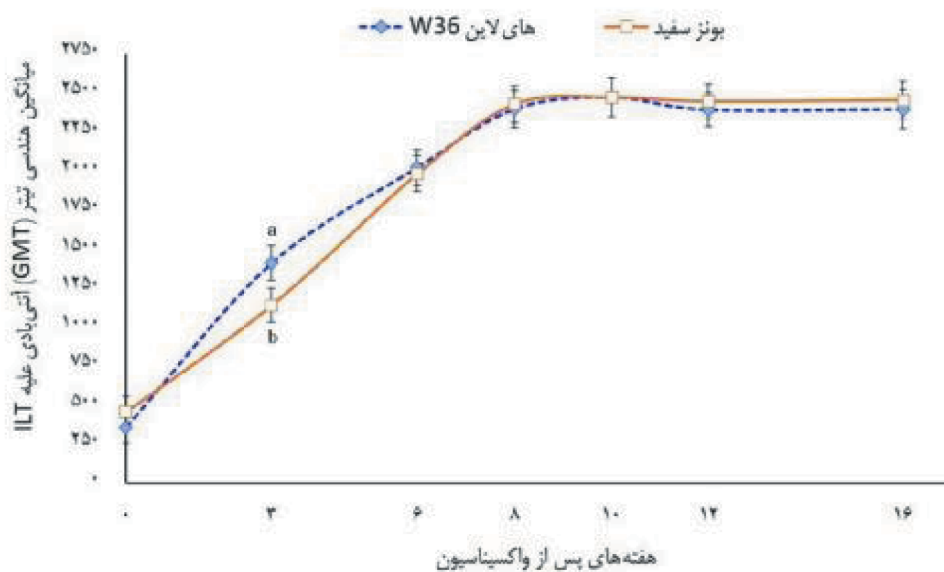
پدازش نتایج آزمایش‌های الایزا و خنثی‌سازی ویروس با استفاده از آزمون‌های آماری نشان داد که هر دو سویه تخم‌گذار نسبت به ایمن‌سازی علیه بیماری ILT طیور پاسخ حفاظتی مناسبی القا شده است. با تلقیح ویروس زنده تخفیف حدت یافته ILT به سینوس‌های زیر چشمی، داخل بینی، فولیکول‌های پر و چشم، و نیز از طریق آب آشامیدنی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

آزمایش خنثی‌سازی ویروس

نتیجه آزمایش خنثی‌سازی ویروس ILT در دو سویه تخم‌گذار بونز سفید و های‌لین سویه W36 در شکل (۲) گزارش شده است. میانگین کلی شاخص خنثی‌سازی ویروس در پولت‌های سویه بونز و های‌لین 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 تیترا آنتی‌بادی طی هفته‌های مختلف گزارش شد، شاخص خنثی‌سازی ویروس در شش هفته نخست پس از واکسیناسیون افزایشی بود و پس از آن روند به نسبت 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 کارایی

نتایج مربوط به آزمایش کارایی واکسن ILT موسسه رازی در دو سویه پولت تخم‌گذار های‌لین 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 های‌لین و ۹۵ درصد در سویه بونز). تنها در یک مورد از ۴۰ مورد پرنده تحت چالش با ویروس



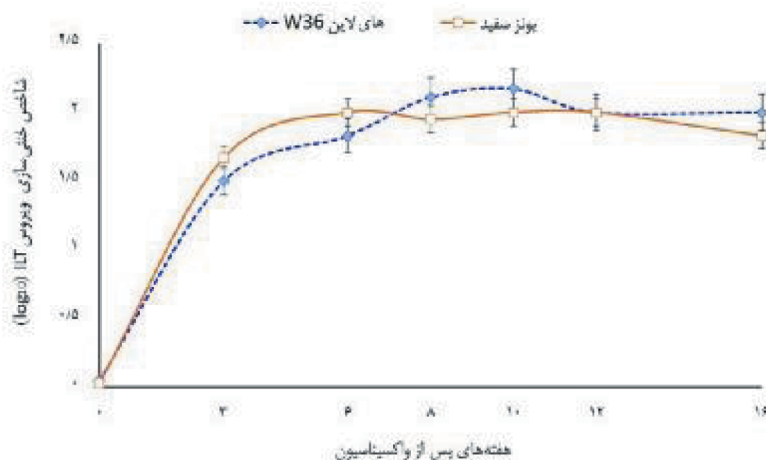
شکل ۱- نتایج ارزیابی عیار آنتی‌بادی علیه ویروس لارنگوتراکیت عفونی (ILT) در سویه‌های پولت های‌لین سویه W36 و بونز سفید طی هفته‌های مختلف نسبت به زمان واکسیناسیون (n=۲۰). حروف انگلیسی متفاوت (a, b) در هفته سوم نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($p > 0.05$).

اغلب یک نوبت واکسیناسیون با روش قطره چشمی در سن حدود ۸-۱۰ هفتگی انجام می‌شود. در صورت 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 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 منشأ 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.

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

می‌رسند. این آنتی‌بادی‌ها برای چند ماه، گاه تا یک سال در بدن پرنده باقی خواهند ماند. آنتی‌بادی‌های موجود در ترشحات نای پرنده آلوده با ویروس ILT، یک 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 تیتراژ 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 تیتراژ آنتی‌بادی حاصل از واکسیناسیون پولت‌های تخم‌گذار با واکسن ILT موسسه رازی نشان داد که طی هشت هفته نخست پس از واکسیناسیون، تیتراژ 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، به طوری که پس از گذشت حداقل سه هفته از زمان واکسیناسیون، واکسن ILT تولیدی موسسه رازی تیتراژ 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 تأیید قرار گرفت.

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

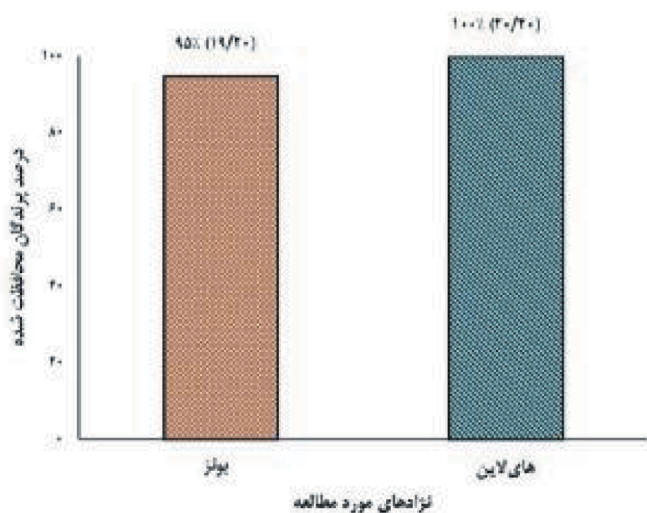


شکل ۲- نتایج آزمایش خنثی‌سازی ویروس لارنگوتراکتیت عفونی (ILT) در دو سویه پولت تخم‌گذار های‌لین سویه W36 و بونز سفید در هفته‌های مختلف پس از واکسیناسیون با واکسن موسسه رازی (n=۶).

صفت پیچیده چند ژنی است که بر روی سیستم ایمنی و برهم‌کنش آن با عوامل فیزیولوژیک و محیطی اثر می‌گذارد. برای نمونه، ژن‌های SAL 1، NrpmpI (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، به طوری 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

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 آمینه موثر بر پاسخ‌های ایمنی مانند متیونین، آرژنین و تریپتوفان برای پیشینه‌سازی پاسخ ایمنی ضروری است، به طوری 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 IgM و IgG 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 تغییر دهند. مقاومت ژنتیکی در برابر عوامل بیماری‌زا



شکل ۳- درصد پولت‌های سویه بوز سفید و های لاین سویه W36 محافظت شده در برابر چالش با ویروس vILT سه هفته پس از واکسیناسیون با واکسن لارنگوتراکیت عفونی موسسه رازی (n=۲۰)

- 4- Ebrahimi, M. M., S. A. Pourbakhsh, S. Shahsavandi, R. Momayez and M. R. Gholami. 2003. Isolation and Identification of Infectious Laryngotracheitis 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- Garcia, 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 different strains of infectious laryngotracheitis virus infections. *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 laryngotracheitis. 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.

(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 اپنی هومورال و یا اپنی 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 های‌لاین W36 با واکسن تخفیف حدت یافته موسسه رازی، تیتراژ 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 تیتراژ آنتی‌بادی و همچنین شاخص خنثی‌سازی ویروس بین سویه‌ها تفاوتی نداشت. از طرفی، روند تیتراژی و افزایش شاخص خنثی‌سازی ویروس طی هفته‌های نخست پس از واکسیناسیون نشان از کارایی 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- Andreassen, J. R., J. R. Glisson, M. A. Goodwin, R. S. Resurrection, 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.

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 (ILT) 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- Shamsavandi, 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.

