✓ پژوهش و سازندگی، شماره ۴۵، زمستان ۱۳۷۸

بررسی سطح ایمنی (پادتن HI) حاصل از روشهای مختلف واکسیناسیون طیور گوشتی با واکسنهای B1 و لاسوتای ساخت مؤسسه رازی به روش میکرو HI و CHALLENGE

● اسدالله توسلی ● مسعود مقدم‌پور، اعضای هیأت علی مؤسسه تحقیقاتی واکسن و سرمسازی رازی

تاریخ دریافت: آذر ماه ۱۳۷۸

چکیده

از آزمایش میکرو HI (Micro Haemagglutination inhibition) و چالنج برای تعیین سطح پادتن ۲۰ هزار قطعه جوجه گوشتی که از منابع مختلف با پادتن‌های مادری مختلف تهیه شده و با روشهای مختلف واکسینه گردیده بودند استفاده گردید که نتایج بسیار خوب و درخشانی را در برداشت، که خلاصه این نتایج به شرح زیر می‌باشد:

۱- در مناطق سالم توصیه می‌شود طیور گوشتی را در سن ۸روزگی با واکسن B1 به روش قطره چشمی و مجدداً در سنهای ۲۵ و ۱۶ روزگی با واکسن لاسوتای مؤسسه رازی در دو نوبت به ترتیب به صورت قطره چشمی و آب آشامیدنی واکسینه نمایند تا نتیجه بهتر و مطلوبتری حاصل شود (جمعاً سه نوبت) ۲۰- در مناطق آلوده به ویروس حاد نیوکاسل توصیه شده طیور گوشتی را یکبار در سن ۸ روزگی با وکسن B1 به صورت قطره چشمی و مجدداً برای بار دوم در سنهای ۱۶ روزگی با واکسن لاسوتای مؤسسه رازی و واکسن نیوکاسل روغنی همزمان و جداگانه به ترتیب به صورت قطره چشمی و تزریق زیر جلدی واکسینه نمائید تا نتیجه مطمئن‌تری حاصل شود. در آزمایش چالنج گروههای ۱، ۴ و ۵ واکسینه صددرصد و گروههای ۲ و ۳ واکسینه به ترتیب ۲۰ و ۲۲ درصد در مقابل سویه حاد ویروس نیوکاسل مقاومت کردند ولی گروه شاهد غیرواکسینه همگی در مقابل سویه حاد ویروس نیوکاسل تلف شدند.

✓ Pajouhesh & Sazandegi, No 45 PP: 108-110

Evaluation of HI antibody titer of broiler chickens vaccinated by B1 & Lasota vaccines of Razi Institute with Micro HI and Challange tests

By: Tavassoli, A.; Moghadampour, M.; Poultry Research and Vaccines Production Department of Razi Institute.

The broiler chicks, in contaminated and low contaminated area, have been vaccinated with B1 newcastle vaccine by eye drop at 8 days of age and received a booster vaccine at 16 and 25 days of age by eye drop and in drinking water with lasota vaccine respectively. The level of antibody was evaluated by micro HI test with 4 unit of haemagglutination at 4 weeks post third vaccination. The results showed a mean Hi titer of 10^7 log2. In the high contaminated area. The best result of vaccination was achieved by vaccinating chicks at 8 days of age using B1 vaccine by eye drop and revaccinated at 16 days of age using lasota vaccine by eye drop and inactivated oil adjuvant vaccine injected in the subcutis tissue simultaneously. All of vaccinated and unvaccinated control groups were challenged intramascularly with 0.2 ml of 10^6 ELd50 (Embryo lethal dose 50%) of ND virulent virus.

مقدمه

بیماری نیوکاسل یکی از خطرناکترین بیماریهای ویروسی طیور بوده و بسیار مسری می‌باشد و کمتر نقطه‌ای را در جهان می‌توان یافت که این بیماری در آنجا گزارش نشده باشد. ضایعات و خسارات ناشی از این بیماریی در دنیا تقریباً به اندازه بقیه بیماریهای ویروسی طیور است.

در حال حاضر در ایران سالانه در حدود ششصد میلیون جوجه گوشتی و در برنامه پنج ساله دوم در حدود هشتصد میلیون قطعه جوجه‌گوشتی تولید خواهد شد و این میزان تولید جوجه‌گوشتی نقش اساسی در تأمین مواد پروتئینی مورد نیاز جامعه دارد لذا حفظ و حراست طیور گوشتی بامصرف ۱/۵ تا ۲ میلیارد دز واکسنهای مختلف نیوکاسل با یک برنامه واکسیناسیون صحیح و اصولی که بتواند از واکسیناسیونهای پی درپی و سلیقه‌ای جلوگیری نماید و نیاز به تخم مرغ SPF را به حداقل برساند. امری ضروری و اجتناب ناپذیر است. در حال حاضر برای واکسیناسیون طیور گوشتی از روشهای مختلف واکسیناسیونی استفاده می‌شود که میزان مصرف بی‌رویه واکسنهای طیور را در برداشته است. بنابراین با اجرای این طرح و واکسیناسیون ۲۰ هزار قطعه جوجه‌گوشتی آزمایشی و خونگیری از ۱۰ درصد آنها و انجام آزمایش HI و Challenge موفق شدیم واکسیناسیون دقیق‌تری متناسب با شرایط مرغداریهای کشور را ارائه دهیم که مسلماً نتیجه کاربرد این برنامه در جلوگیری از خسارات جبران ناپذیر این بیماری بسیار مؤثر خواهد بود.

مواد و روشها

تهیه واکسن B1 و لاسوتا

برای تهیه واکسنهای B1 و لاسوتای نیوکاسل در مؤسسه رازی از دو سویه واکسن لانتوژن B1 و لاسوتا استفاده می‌شود برای تهیه هر شماره واکسن چه B1 و چه لاسوتا تعداد حداقل سه هزار تخم مرغ SPF از راه حفره آلانتو - آمینوتیک تزریق شده و پس از ۷۲ ساعت مایعات آلانتو - آمینوتیک را

جدول شماره ۱- نتایج آزمایش میکرو HI ۲۰ هزار قطعه جوجه گوشتی که با واکسنهای B1 و لاسوتای مؤسسه رازی در سنهای ۸، ۱۶ و ۲۵ روزگی واکسینه شده‌اند چهار هفته پس از آخرین واکسیناسیون

تعداد جوجه‌های واکسینه	تعداد گروهها	پادتن مادری بر حسب لوک ۲	اولین واکسیناسیون در سن ۸ روزگی	دومین واکسیناسیون در سن ۱۶ روزگی	سومین واکسیناسیون در سن ۲۵ روزگی	منطقه واکسیناسیون	نتیجه میکروHI چهارهفته پس از آخرین واکسیناسیون
(۲۰۰۰۰) قطعه	۱ (۴۰۰۰) قطعه	۳	واکسن B1 قطره چشمی(۱)	واکسن‌لاسوتا قطره‌چشمی واکسن + روغنی زیرجلدی (۲)	-	ورامین منطقه فوق‌العاده آلوده	۷/۵
	۲ (۴۰۰۰) قطعه	۳	واکسن B1 قطره چشمی	واکسن لاسوتا آب آشامیدنی(۳)	-	اشتهارد منطقه نسبتاً آلوده	۵/۵
	۳ (۴۰۰۰) قطعه	۳	واکسن لاسوتا قطره چشمی	واکسن لاسوتا آب آشامیدنی	-	شهریار منطقه آلوده	۶/۵
	۴ (۴۰۰۰) قطعه	۳	واکسن B1 قطره چشمی	واکسن لاسوتاقطره چشمی واکسن+روغنی زیرجلدی	-	کردان منطقه سالم	۷/۶
	۵ (۴۰۰۰) قطعه	۳	واکسن B1 قطره چشمی	واکسن لاسوتا قطره چشمی	واکسن لاسوتا آب آشامیدنی	شهریار منطقه آلوده	۷

۱- قطره چشمی: Eyedrop

۲- زیرجلدی: Subcutaneous

۳- آب آشامیدنی: Drinking water

جدول شماره ۲- نتایج آزمایش چالنج جوجه‌های واکسینه و غیرواکسینه با سویه حاد نیوکاسل چهار هفته پس از آخرین واکسیناسیون

دز چالنج ($LogEID_{50}$)	تعداد گروهها	تعداد طیور واکسینه‌در هر گروه	تعداد طیور شاهدیاکنترل	نتیجه میکروHIچهارهفته‌پس‌از واکسیناسیون	تعداد طیور زنده ده‌روز پس از چالنج	تعدادطیورمرده‌ده‌روزپس‌از چالنج
۶	۱	۲۵	-	۷/۵	۲۵	۰
۶	۲	۲۵	-	۵/۵	۲۰	۵
۶	۳	۲۵	-	۶/۵	۲۲	۳
۶	۴	۲۵	-	۷/۶	۲۵	۰
۶	۵	۲۵	-	۷	۲۵	۰
۶	۶	-	۲۵	۰	۰	۲۵

* تمام طیور واکسینه و کنترل‌ها با مقدار ۰/۲ml از محلول ویروس حاد نیوکاسل با تیتر $10^{6}ELD_{50}$ چالنج گردیدند.

برداشت کرده و پس از کشت و اطمینان از عدم آلودگی باکتریایی، قارچها و میکوپلاسماها، مایع برداشتی را تیتراژ و تیتر $10^{9/5}EID_{50}$ در میلی‌لیتر حاصل را تعدیل تیتر می‌نمائیم سپس از نظر بی‌ضرری و مؤثر بودن و همچنین فعال بودن، واکسنهای حاصل را در روی تخم‌مرغهای SPF ده روزه و جوجه‌های SPF ۱۰-۷ روزه کنترل می‌نمائیم و پس از آنکه از فعال بودن و مؤثر بودن و بی ضرری آن اطمینان حاصل شد واکسن را در فلاکنهای ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ دزی لیوفیلیزه نموده و تا زمان مصرف در ۲+ تا ۸+ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌کنیم. تیتر واکسنهای نیوکاسل B1 و لاسوتای مؤسسه رازی در موقع مصرف $10^{6/5-7}EID_{50}$ برای هر سر جوجه می‌باشد.

روشهای واکسیناسیون

در این طرح روشهای قطره چکانی و آب آشامیدنی بیشتر مورد توجه بوده است بنابراین طیور به دو روش قطره چشمی و آب آشامیدنی واکسینه می‌شوند.

روش قطره چکانی

در این روش قطره چکانی در داخل چشم انجام می‌شود برای این منظور هر ۱۰۰۰ دز واکسن را در ۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر خنک حل نموده یک قطره در روی کره چشم هر جوجه می‌ریزند. از مزایای این روش این است که اولاً هر جوجه یک دز کامل ویروس واکسن را دریافت می‌کند. ثانیاً ویروس واکسن به خوبی در داخل مجرای اشکی و کامی نفوذ نموده و به عنوان سدی محافظ، سلولها دستگاه تنفس را در مقابل ویروس بیماری‌زا حفظ می‌کند.

روش آب آشامیدنی

این روش از ۲ تا ۳ هفتگی به بعد در مناطقی که احتمال بروز بیماریهای تنفسی وجود دارد استفاده می‌شود. قبل از مصرف واکسن، طیور را ۲ تا ۳ ساعت تشنه نگاهداشته و سپس هر ۱۰۰۰ دز واکسن را بر حسب سن گله در ۱۰ تا ۴۰ لیتر آب آشامیدنی خنک بدون مواد گندزدا حل نموده و در اختیار طیور قرار می‌دهند. به آب آشامیدنی به نسبت ۲ تا ۲/۵ در هزار شیر بدون چربی اضافه می‌کنند.

واکسیناسیون طیور گوشتی

بیست هزار قطعه جوجه گوشتی از نژادها و منابع مختلف با پادتن‌های مادری مختلف مورد آزمایش قرار گرفتند. این جوجه‌ها قبلاً به ۵ گروه ۴۰۰۰ قطعه‌ای تقسیم گردیده بودند.

قبل از واکسیناسیون و در روز چهارم از ۵۰ قطعه جوجه هر گروه خونگیری و تیتر پادتن مادری نیوکاسل در آنها مورد ارزیابی قرار گرفت که متوسط تیتر در این جوجه‌ها $\frac{1}{8}$ بر مبنای آزمایش میکرو HI با ۴ واحد هماگلوتیناسیون به‌دست آمده است.

گروه اول

تعداد این گروه که در حدود ۴۰۰۰ قطعه می‌باشد در دو نوبت در سنهای ۸ روزگی و ۱۶ روزگی به ترتیب با واکسنهای B1 از راه چشم و واکسن لاسوتا مؤسسه رازی به صورت قطره چشمی و یک واکسن روغنی نیوکاسل تزریقی بطور همزمان واکسینه و در منطقه آلوده ورامین که گزارش بیماری مرتباً داده شده است نگهداری شدند.

گروه دوم

که تعداد آنها در حدود ۴۰۰۰ قطعه بوده و در سنهای ۸ روزگی و ۱۶ روزگی در دو نوبت به ترتیب با واکسنهای B1 و لاسوتای مؤسسه رازی از راه چشم و آب آشامیدنی واکسینه شدند (منطقه اشتهارد).

گروه سوم

که تعداد آنها در حدود ۴۰۰۰ قطعه بود در سنهای ۸ روزگی و ۱۶ روزگی در دو نوبت با واکسن لاسوتای مؤسسه رازی به ترتیب از راه چشم و آب آشامیدنی واکسینه شدند (منطقه شهریار).

گروه چهارم

که تعداد آنها در حدود ۴۰۰۰ قطعه بود و در دو نوبت در سنهای ۸ روزگی و ۱۶ روزگی به ترتیب با

واکسنهای B1 از راه چشم و واکسن لاسوتای مؤسسه رازی و یک واکسن روغنی نیوکاسل به طور همزمان از راه چشم و تزریقی در منطقه تقریباً پاک و عاری از گزارش بیماری نیوکاسل برای مدت ۶ ماه (کردان) واکسینه و در مجاورت سایر گله‌ها پرورش داده شدند.

گروه پنجم

که تعداد آنها در حدود ۴۰۰۰ قطعه بود در سه نوبت به ترتیب در سنهای ۸ روزگی باواکسن B1 از راه چشم و واکسنهای لاسوتای مؤسسه رازی در دو نوبت در سنهای ۱۶ روزگی و ۲۵ روزگی به ترتیب از راه قطره چشمی و آب آشامیدنی واکسینه شدند (منطقه شهریار).

یادآور می‌شود از ده درصد پنج گروه واکسینه چهار هفته پس از آخرین واکسیناسیون جهت آزمایش میکرو HI خونگیری به عمل آید.

آزمایش میکرو HI

بعضی از میکسوویروسها مانند ویروس اوریون و پارامیکسوویروسها مانند ویروس نیوکاسل به علت دارا بودن پادگن هماگلوتینین آنتی‌ژن قادرند گلبولهای قرمز مرغ، کبی و بعضی از پستانداران را جمع نموده و هماگلوتینه نمایند. در صورتیکه این ویروسها در مجاورت سرم ضد خود قرار گیرد خنثی شده و این خاصیت را از دست می‌دهند و دیگر قادر به جمع نمودن گلبولهای قرمز نخواهند بود. تست HI بر این مبنا استوار بوده و دقیقاً از این خاصیت ویروسی استفاده می‌شود. در تست HI ضمناً باید از سرم مثبت شاهد استفاده نمود. از ۱۰ درصد هر گروه فوق‌الذکر خون‌گیری به عمل آمده و آزمایش میکرو HI انجام گردیده است (جمعاً در حدود ۲۰۰۰ قطعه جوجه خونگیری شده‌اند).

آزمایش چالنج

تعدا ۲۵ قطعه جوجه از دو گروه واکسینه را با ۲۵ قطعه جوجه غیر واکسینه شاهد را مورد آزمایش چالنج قرار دادیم که نتایج آزمایش میکرو HI جوجه‌های واکسینه و چالنج جوجه‌های واکسینه و شاهد در تابلوهای شماره ۱ و ۲ به ترتیب مندرج است.

مشاهدات و نتایج

گروه اول

در این گروه تیتر میکرو HI در ۸۰ درصد گله برابر با $\frac{1}{128}$ و در ۲۰ درصد بقیه گله برابر با $\frac{1}{256}$ بوده است.

گروه دوم

در گروه دوم ۸۵ درصد گله واکسینه تیتر میکرو HI معادل $\frac{1}{64}$ و ۱۵ درصد گله تیتری برابر با $\frac{1}{128}$ نشان داده است.

گروه سوم

در این گروه تیتر میکرو HI در ۷۰ درصد گله برابر با $\frac{1}{64}$ و در ۳۰ درصد گله تیتری معادل با $\frac{1}{128}$ مشخص گردیده است.

گروه چهارم

تیتر میکرو HI در ۸۵ درصد گله برابر با $\frac{1}{128}$ و در ۱۵ درصد بقیه گله برابر با $\frac{1}{256}$ بوده است.

گروه پنجم

تیتر میکرو HI در ۷۵ درصد گله معادل با $\frac{1}{128}$ و در ۲۵ درصد بقیه گله برابر با $\frac{1}{256}$ بوده است.

بحث

به نظر می‌رسد در مناطقی که آلودگی نیوکاسل شدید نیست در صورتی که طیور گوشتی ایران در سن ۸ روزگی با واکسن B1 با روش قطره چشمی و در سن ۱۶ روزگی با واکسن لاسوتا (دومین واکسیناسیون) به صورت قطره چشمی و در سن ۲۵ روزگی مجدداً با واکسن لاسوتا (سومین واکسیناسیون) در آب آشامیدنی واکسینه شوند تیتر میکرو HI برابر با 10^{7}Log_2 خواهد بود که نتیجه مطلوبتری حاصل می‌شود.

با توجه به اینکه جوجه‌های گروه یک مشابه گروه ۴ واکسینه شده بودند و در مجاورت فارم‌های آلوده پرورش داده شده‌اند و هیچگونه آثار و تلفات بیماری نیوکاسل در آنها مشاهده نشده است توصیه می‌شود.

در مناطق آلوده به ویروس نیوکاسل و در مرغداریهای آلوده و متراکم واکسن B1 مؤسسه رازی را در سن ۸ روزگی به صورت قطره چشمی و واکسن لاسوتا را در سن ۱۶ روزگی به صورت قطره چشمی به طور همزمان با واکسن نیوکاسل روغنی تزریقی مصرف نمود تا با تیتر میکرو HI برابر با $10^{7/6}\text{Log}_2$ نتیجه مطمئن‌تری حاصل شود. قابل ذکر است که واکسیناسیون با روش فوق‌الذکر توانسته است در مناطق نسبتاً آلوده و مناطق کاملاً آلوده جایگزین روشهای یک قطره چشمی (B1) و دو آب آشامیدنی (لاسوتا) سابق که در اکثر طیور گوشتی متداول و معمول بوده گردد و نتایج مطمئن‌تری را داشته باشد.

سپاسگزاری

مجری طرح از آقایان دکتر دلیمی معاون پژوهشی وقت مؤسسه رازی و همچنین از آقایان، مهندس یداله کمالی‌دهقان، ابراهیم بربند، محمدعلی خانی، پرویز گیتی گرد، محمدعلی افخمی و سیدرضا حسینی کارشناسان بخش تحقیق و تولید واکسنهای طیور بخاطر زحمات و همکاریهای ارزشمندشان تشکر و قدردانی می‌نماید.

منابع مورد استفاده

1- Alexander D.J. et al., 1985. Antigenic & biological characterisation of avian paramyxovirus type 1 isolates from pigeons. An inlernational collaborative study. Avian pathol, 14: 365.346.

2- Beard, C.W., Hopkins, S.R. and Hamand, J., 1975. Preparation of newcastle disease virus. Antigen for haemagglutination - inhibition test avian dis, 19: 692-699.

3- Redcly, G.S. and Srinivasan, V.A., 1991. Immunogenicity of tissus culture newcastle disease vaccine. Indiam vet. J, 68: 708-712.

4- Hofstad, M.S., 1956. Amer. J. Vet. Res. 17: 738. Methods for examining poultry biologics. The national academy of sciences - Washington D.C. USA.

5- Phillips J.M., 1973. Vaccination against newcastle disease: Assessement of haemagglutination - inhibition titers obtaine from fiedlsamples. Vet. Res. 93: 577-587.

6- L.D. Keck, J.K. Skeeles, and R.W. Mcnew, 1993. Antibody detection in match chicken sera and egg-yolk samples by commercial enzyme linked immunosurbent assay kits for newcastle disease virus, infectious bronchitis virus and avian reovirus. Avian disease, 3: 825-828.

7- W.H.Allan and R.C. Cough, A standard haemagglutination - Inhibition test for newcastle disease.
1) A comparison of macro and micro methods. Veter Roco, Agusl 10. 74.