

خبرنامه شماره ۳۱

TRANSMUNE® IBD



TRANSMUNE[®]
IBD

Together, beyond animal health

اختصاصی بیماری گامبورو



ردیف	عنوان	صفحه
۱	کلیات	
۶	اولین گزارش از شناسایی ویروس محلی گامبورو در ایران با استفاده از روشهای مولکولی س.ع. قریشی، ت. حاجیان، د. مرشدی، م.ح. بزرگمهری فرد	۱
۷	شناسایی مولکولی ویروس بیماری گامبورو در گله‌های گوشتی با علائم کلینیکی حاد در استان گیلان ی. اسدپور، ا. رحیم آبادی، ع.ا. شوشتری	۲
۸	تعیین هویت مولکولی ویروس‌های بیماری بورس عفونی J. Razmyar and S.M. Peighambari	۳
۱۹	بررسی اثرات ایمنوساپرسیو واکسن ایمونوکمپلکس بیماری بورس عفونی در جوجه‌های گوشتی A.Sadrzadeh, S.M.Peighambari and B. Shoadoost	۴
۲۶	تعیین هویت مولکولی ویروس‌های بیماری بورس عفونی جدا شده از ایران S.D. Hosseini, A.R. Omar and I. Aini	۵
۲۸	تعیین هویت سه جدایه ویروس بیماری بورس عفونی جدا شده از مرغان تخم‌گذار در ایران M.A. Bahmaninejad, M. Hair-Bejo, A.R. Omar, I. Aini and R. Toroghi	۶
۲۸	ارزیابی روش‌های مختلف استفاده از واکسن کمپلکس ایمنی بیماری بورس عفونی بر عملکرد آن در جوجه‌های گوشتی ا. صدرزاده، س.م. پیغمبری و ج. اشرفی هلان	۷
۲۹	تشخیص سریع جدایه‌های فوق حاد ویروس بیماری بورس عفونی با استفاده از RT/PCR بر روی ژن VP1 و بررسی خصوصیات مولکولی ژن VP1 در تعدادی از ویروس‌های جدا شده ا. غنی‌ئی و س.م. پیغمبری	۸
۳۰	مطالعه پاتوژنیسیته و پروفایل آنزیم محدود کننده جدایه اخیر ویروس بورس عفونی از ایران A.H. Shoshtari, S.A. Pourbakhsh, H.A. Dadras, M.A. Bahmaninejad and R. Toroghi	۹
۳۱	مطالعه تجربی پاتوژنز یک جدایه بسیار حاد ویروس بیماری بورس عفونی در مراحل اولیه ایجاد عفونت به روش ایمونوهیستوشیمی ز.م. سیاوش حقیقی، ع. توسلی، ع.ا. شوشتری، م.ع. بهمنی نژاد و س.ح. مرجانمهر	۱۰

اطلاعات علمی

CEVAC Transmune®

- ۳۲ دلائل افزایش تمایل به استفاده از واکسن‌های ایمونوکمپلکس گامبورو در پیشگیری از بیماری بارس عفونی (گامبورو)
Y. Gardin, V. Palya and R. Soares ۱۱
- ۳۸ مطالعه پاتولوژیکی و ایمونولوژی تلقیح داخل تخم مرغی واکسن‌های کمپلکس بیماری بارس عفونی
M. Kelemen, K. Forgach, J. Ivan, V. Palya, T. Suveges, B. Toth and J. Meszaros ۱۲
- ۵۴ ترمیم عملکردی بارس فابرسیوس پس از واکسیناسیون به شیوه تلقیح داخل تخم علیه بیماری بارس عفونی
J. Van, N. Nagy, A. Magyar, I. Kacs Kovics and J. Meszaros ۱۳
- ۷۰ کنترل بیماری گامبورو با استفاده از واکسن ایمونوکمپلکس
V. Palya, K. Forgach, T. Suveges, M. Kelemen, J. Meszaros and J. Benyeda ۱۴
- ۸۱ استفاده از واکسن HVT و واکسن ایمونوکمپلکس بیماری گامبورو جهت محافظت در برابر چالش با ویروس حاد بیماری مارک (RB1B) پس از واکسیناسیون به روش تلقیح داخل تخم مرغی در تخم مرغ های SPF
N. Dren csava, J. Ivan, Z. Vargna, Cs. Szamado, E. Lorinczy, K. Fargach, V. Palya, J. Meszaros, R.F. Silva, A.A.H.M. Ter Huurne and A. Levy ۱۵
- ۸۴ تکثیر تاخیری ویروس واکسن در جوجه‌های واکسینه با واکسن ایمونوکمپلکس بیماری بارس عفونی به صورت زیرجلدی: تعیین میزان ویروس واکسن با روش Real Time PCR
J. Ivan, M. Velhner, K. Ursu, P. German, T. Mato, C. Nick Dren and J. Meszaros ۱۶
- ۱۰۱ نتایج استفاده از واکسن ایمونوکمپلکس گامبورو "ترنسمیون" در مقابله با این بیماری در کشور تونس
M. Bouzonaia, E. Allagui, O. Abbes, A. Ghram and D. Fedida ۱۷
- ۱۰۶ کاهش ضایعات کشتارگاهی متعاقب واکسیناسیون در جوجه کشی
M.T. Paniago and V.M.T. and Turblin ۱۸
- ۱۰۹ بررسی آزمایشگاهی کارایی واکسن ترنسمیون در تزریق زیرجلدی به پرندهگان گوشتی
J. Herczeg, M. Nagy, L. Makranszki, K. Kustos, J. defoucauld, J. Thevenon and B. Alva ۱۹
- ۱۲۱ پایش دریافت واکسن ایمونوکمپلکس گامبورو با روش تلقیح داخل تخم مرغی در جوجه-کشی و مقایسه آن با روش‌های رایج واکسیناسیون علیه بیماری گامبورو
C. Jacquinet, Y. Gardin ۲۰
- ۱۳۰ ارزیابی پاسخ سرولوژی واکسن ایمونوکمپلکس (CEVAC Transmune®) تزریقی به صورت زیرجلدی در یک مطالعه فارمی با مقیاس بزرگ
S. Magallon, J.L. Balaguer, M. Arbe, C. Gonzalez, A. Martino and B. Alva ۲۱

اطلاعات علمی

CEVAC Transmune®

- ۱۳۴ ارزیابی پاسخ سرولوژی واکسن ایمونوکمپلکس (CEVAC Transmune®) تلقیحی به داخل تخم مرغ در یک مطالعه فارمی با مقیاس بزرگ
S. Magallon, J.L. Balaguer, M. Arbe, C. Gonzalez, A. Martino and B. Alva ۲۲
- ۱۴۰ ارزیابی بیولوژیکی دریافت واکسن و شاخص‌های پرورشی در جوجه‌های گوشتی واکسینه شده با واکسن ایمونوکمپلکس و واکسن‌های نو ترکیب بیماری بارس عفونی
L. Sesti, C. Kneipp, Y. Gardin and B. Alva ۲۳

کلیات

بیماری بورس عفونی، یک بیماری ویروسی حاد و بسیار واگیردار برای جوجه‌های جوان بوده و به صورت اولیه اندام لنفوئیدی به ویژه بورس فابرسیوس را هدف قرار می‌دهد. اولین همه‌گیری این بیماری در منطقه‌ای با نام گامبورو (Gumboro) به ثبت رسیده است و از این رو این بیماری گامبورو نیز نامیده می‌شود.

ویروس عامل بیماری بورس عفونی (گامبورو) از خانواده بیروناوریده^۱ (ویروس‌های RNA دو رشته‌ای و دارای ۲ قسمت) و جنس آوی بیروناویروس^۲ می‌باشد. ویروس‌های این جنس بدون پوشش بوده و دارای ۵ پروتئین ویروسی می‌باشند که از این میان پروتئین VP2 ایمونوژن‌ترین پروتئین سطحی ویروسی است و تولید آنتی‌بادی نوترالیزان و محافظت‌کننده را القا می‌کند. این ویروس بسیار در محیط پایدار است و می‌تواند حتی پس از پاکسازی و ضدعفونی در سالن‌های مرغداری زنده باقی بماند.

برای طبقه بندی ویروس‌های گامبورو از روش‌های معمول سروتایپینگ و روش‌های ژنتیک مولکولی استفاده شده است. ویروس بیماری بورس عفونی دارای دو سروتایپ می‌باشد. سروتایپ‌های ۱ و ۲ ویروس گامبورو تنها ۳۰ درصد ارتباط آنتی‌ژنیکی دارند. همچنین ویروس واریانت از سروتایپ ۱ نیز گزارش شده است. این ویروس‌های واریانت از نظر آنتی‌ژنیکی با جدایه‌های استاندارد کلاسیک متفاوت هستند. از دیدگاه دیگر، با استفاده از روش‌های مولکولی نیز ویروس بیماری گامبورو به سویه‌های: کلاسیک بیماری‌زا، کلاسیک آدابته به محیط کشت سلولی، کلاسیک تخفیف حدت یافته، کلاسیک واریانت و ویروس فوق حادثه از سروتایپ ۱ و همچنین ویروس سروتایپ ۲ غیر بیماری‌زا تقسیم می‌شوند.

سروتایپ ۱ ویروس گامبورو گسترش جهانی داشته و در اکثر مناطق پرورش طیور حضور دارد. در سال ۱۹۸۱، آقاخان و همکاران سویه کلاسیک ویروس گامبورو را برای اولین در ایران توصیف و گزارش نمودند. ماکیان و بوقلمون میزبانان طبیعی ویروس هستند. بیشترین حساسیت به بیماری بالینی در سن ۳ تا ۶ هفته‌گی می‌باشد. ماکیان حساس زیر ۳ هفته، علائم بالینی را بروز نمی‌دهند ولی درگیر بیماری تحت بالینی می‌شوند که از نظر اقتصادی بسیار پر اهمیت است. بیماری تحت بالینی موجب تضعیف ایمنی شدید در ماکیان می‌شود.

¹ Birnaviridae

² Avibirnavirus

³ Very Virulent

اطلاعات علمی

CEVAC Transmune®

مطالعات متعدد در ارتباط با پاتوژنز بیماری گامبورو انجام شده است. ۴ ساعت پس از عفونت، ویروس وارد ماکروفاژها و سلول‌های لنفوئیدی سکوم می‌شود. ۵ ساعت پس از عفونت ویروس به کبد می‌رسد و پس از آن وارد جریان خون شده و خود را به بورس می‌رساند. عفونت بورس همزمان با ویرمی ثانویه رخ می‌دهد. در فاز حاد درگیری گامبورو ماکروفاژهای طحال، T-سل‌های بورس و NKها، فعال می‌شوند و همزمان B-سل‌های بورس تخلیه شده و کاهش پیدا می‌کنند.

پس از مهاجرت اجداد B-سل‌های نابالغ در روز ۱۵ تا ۱۷ جنین، هیپرکانورسیون^۴ زنی به‌عنوان اصلی‌ترین عامل تنوع Ig در ماکیان شروع به فعالیت می‌نماید. فعال شدن این قسمت زنی منجر به تولید B-سل‌های بالغ به‌عنوان جزئی فعال از سیستم ایمنی همورال می‌شود. B-سل‌هایی که دارای ر سپتورهای ایمنوگلوبین متنوع هستند بورس را ترک کرده و در زمان هیچ به اندام‌های لنفاوی ثانویه مهاجرت می‌کنند؛ با این حال فرآیند هیپرکانورسیون زنی تا زمان بلوغ جنسی در بورس ادامه پیدا می‌کند. ویروس بیماری بورس عفونی با هدف قرار دادن لنفوبلاست‌ها و B-سل‌های تولیدکننده آنتی‌بادی موجب مختل شدن فرآیند هیپرکانورسیون زنی و نهایتاً القا ضعف ایمنی می‌گردد. ضایعات هموراژیک بورس ناشی از تشکیل کمپلکس‌های ایمنی و رخداد واکنش آرتوس^۵ (نکروز، همورژ و تعداد زیادی از لکوسیت‌های چند هسته‌ای) می‌باشند. واکنش آرتوس نوعی آسیب ایمنولوژیک موضعی ایجاد شده توسط کمپلکس آنتی‌ژن-آنتی‌بادی-کمپلمان است که به‌عنوان یک فاکتور کموتاکتیک عمل کرده و موجب ارتشاح لکوسیت‌ها و خون‌ریزی می‌شود. در مطالعه دیگری ارتشاح مست سل‌های ترشح‌کننده هیستامین را در بورس پرندگان آلوده به‌عنوان عامل اصلی ایجاد ضایعات بورسی مطرح کردند. در این مطالعه توانستند با استفاده از کنتوتیفن مانع دگرانوله شدن مست سل‌های مستقر شده در بورس پرنده‌های SPF متعاقب درگیری با بیماری گامبورو شده و نهایتاً ضایعات ماکروسکوپی و میکروسکوپی بورس و تلفات ناشی از بیماری کاهش چشم‌گیری داشت. در مطالعه دیگری ضایعات گواگلوپاتی^۶ را به‌عنوان یک از عوامل مشاهده ضایعات هموراژیک در بورس گزارش نمودند.

بیماری گامبورو بسیار واگیردار و به‌گرمای و ضد عفونی‌کننده‌ها مقاوم بوده و می‌تواند پس از تخلیه پرنده‌های آلوده از مرغداری بین ۵۴ تا ۱۲۲ روز در محیط زنده بماند. دوره انکوباسیون این بیماری کوتاه است و علائم بالینی بیماری ظرف ۲ تا ۳ روز بعد از مواجهه ایجاد می‌شود. یکی از علائم اولیه عفونت گامبور تمایل پرنده به نوک زدن به ناحیه ونت^۷ خودش می‌باشد. علائم بالینی شامل اسهال سفید و آبکی، بی‌اشتهائی، دپر سیون، پره‌های ژولیده، لرزش و زمین‌گیری است.

⁴ Gene Hyperconversion

⁵ Arthus reaction

⁶ Coagulopathy

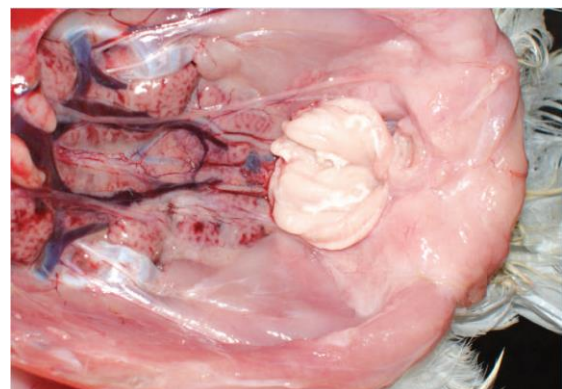
⁷ Vent

اطلاعات علمی

CEVAC Transmune®

در یک گله کاملاً حساس ابتلا به ۱۰۰ درصد می‌رسد و در صورتیکه ویروس بسیار پرحدت بیماری گامبورو با شد، تلفات به ۲۰ تا ۳۰ درصد می‌رسد. تلفات از سه روز بعد از بیماری شروع شده، اوج گرفته و ظرف ۵ تا ۷ روز فروکش می‌کند.

علائم کالبدگشایی شامل خون‌ریزی بر روی ران و عضلات پکتورال، دهیدراتا سیون شدید می‌باشد. ۳ روز بعد عفونت، به دلیل پرخونی و ادم، سایز و وزن بورس افزایش پیدا می‌کند. در این زمان یک ترانسودای زرد ژلاتینی سطح سروزی بورس را پوشانده است. در روز ۴ بعد از عفونت، سایز بورس دو برابر شده و سپس رو به کاهش می‌گذارد. در روز ۵ بورس به سایز عادی باز می‌گردد ولی روند آتروفی ادامه پیدا می‌کند و از روز ۸ به بعد سایز بورس به یک سوم سایز اولیه کاهش پیدا می‌کند (تصویر ۱). طحال هم ممکن است کمی بزرگ شده و به صورت سطحی حاوی کانون‌های خاکستری رنگ باشد. گاهی خون‌ریزی در مخاط محل اتصال پیش معده و سنگدان هم مشاهده می‌شود.



تصویر ۱: علائم بالینی و کالبدگشایی بیماری گامبورو

پازانی، ج. ۱۳۸۹، اطلس رنگی بیماری‌های طیور، انتشارات قله، صفحات ۸۴-۸۲

اطلاعات علمی

CEVAC Transmune®

ویروس بسیار پرحدت گامبورو (vIBDV) می تواند موجب کاهش شدید وزن تیموس شده و ضایعات شدیدتری به لوزه سکومی، تیموس، طحال و مغز استخوان وارد کند؛ با این حال ضایعات بور سی آن مشابه ویروس های معمولی گامبورو می باشد.

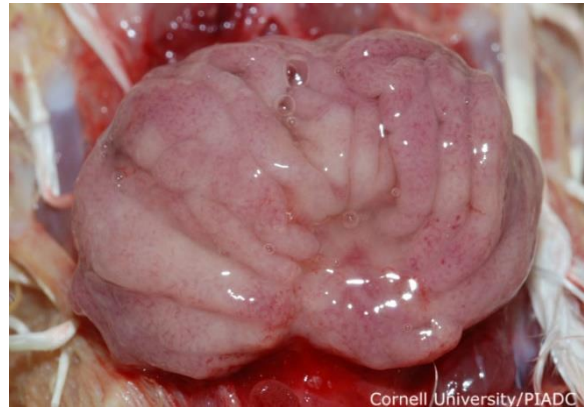
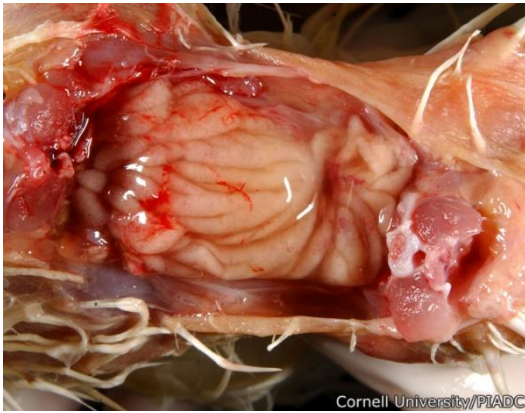
عموماً ویروس های سروتیپ ۱ بیماری زا بوده و ویروس های سروتیپ ۲ برای ماکیان و بوقلمون بیماری زا نیستند. مواجهه با ویروس فیلدی و واکسیناسیون با واکسن زنده یا کشته می تواند موجب تحریک سیستم ایمنی و تولید فعال آنتی بادی شود. واکسن های کشته و زنده تولید شده با سویه واریانت می توانند بر علیه سویه های واریانت و استاندارد گامبورو ایمنی ایجاد نماید. همچنین آنتی بادی منتقل شده از زرده به جنین نیز می تواند از جوجه در برابر عفونت زودهنگام و اثرات ایمنوساپرسیو ویروس محافظت نماید.

به صورت عملی، تشخیص بیماری گامبورو بر پایه مشاهده علائم بالینی و متعاقب آن تست های مولکولی (از جمله RealTimePCR، RT-PCR و ...) و همچنین بر پایه سرولوژی انجام می شود. الیذا متداول ترین روش سرولوژی برای سنجش آنتی بادی علیه گامبورو در گله های طیور می باشد.

از آنجائیکه شروع بیماری گامبورو ناگهانی بوده و گاهی خون در مدفوع ممکن است دیده شود، بایستی از بیماری کوکسیدیوز تفریق شود. در بیماری کوکسیدیوز خون ریزی در عضلات و بزرگ شدن بورس را نداریم. بسیاری از پرنده های تلف شده در اثر گامبورو علائم نفروز حاد را نشان می دهند. در این موارد هم درگیری بورس فابرسیوس می تواند در تفریق این بیماری از سایر عوامل ایجاد کننده نفروز از قبیل محرومیت از آب، درگیری با سویه های نفروپاتوژنیک بیماری برونشیت عفونی و ... بسیار کمک کننده باشد. در ارتباط با آتروفی بورس، بایستی بیماری گامبورو از بیماری مارک با استفاده از مشاهده هیستوپاتولوژی تفریق شود. عفونت های ادنوبروسی هم می توانند باعث آتروفی بورس شوند. تفریق را می توان با مشاهده گنجیدگی های درون هسته ای در بررسی هیستوپاتولوژی انجام داد. بورس ادماتوز و دارای خون ریزی در بیماری نیوکاسل ویسروتروپیک ولوژنیک دیده می شود (تصویر ۲). این بیماری بایستی با روش های مولکولی از بیماری گامبورو تفریق داده شود. همچنین آنفلوآنزای فوق حاد می تواند باعث ادم و پتشی های چندکانونی در بورس فابرسیوس شود.

اطلاعات علمی

CEVAC Transmune®



تصویر ۲: خون‌ریزی و ادم در بورس فابرسیوس متعاقب درگیری با سویه ویسروتروپیک ولوژنیک بیماری نیوکاسل^۹

واکسیناسیون اصلی‌ترین راه کنترل بیماری بورس عفونی در جوجه‌ها می‌باشد. به ویژه واکسیناسیون گله مادر نقش به‌سزایی در انتقال ایمنی به جوجه‌ها دارد. واکسن کشته به همراه ادجوان روغنی برای واکسیناسیون بوستر و ایجاد ایمنی طولانی مدت در گله‌های مولد عموماً استفاده می‌شوند. به صورت معمول آنتی‌بادی مادری جوجه‌ها تا ۳ هفته‌گی محافظت می‌کند. اصلی‌ترین مشکل در واکسیناسیون جوجه‌ها با واکسن زنده تخفیف حدت یافته، ایمنی مادری می‌باشد. از این‌رو مانیتورینگ میزان آنتی‌بادی مادری، نقش به‌سزایی در تعیین زمان واکسیناسیون دارد. نکته ظریفی که وجود دارد عدم یکنواختی تمامی جوجه‌های موجود در سالن از نظر تیتراژ آنتی‌بادی مادری است. از طرفی دیگر، حدت ویروس واکسن مورد استفاده نیز اهمیت دارد. واکسن‌های در دسترس شامل: ملایم^{۱۱}، ملایم اینتر مدیت^{۱۲}، اینتر مدیت^{۱۳}، اینتر مدیت پلاس^{۱۴} و هات^{۱۵} می‌باشند. واکسن زنده نو ترکیب با HVT^{۱۶} نیز تولید تجاری شده است. همچنین واکسن شامل سویه اینترمدیت پلاس پوشیده شده با آنتی‌بادی همولوگ به صورت تزریقی در حضور آنتی‌بادی مادری در یک روزگی استفاده می‌شود. نهایتاً آخرین دستاورد واکسیناسیون ماکیان، واکسیناسیون به صورت InOVO می‌باشد. واکسن‌های زنده گامبورو به صورت کمپلکس با آنتی‌بادی برای این روش واکسیناسیون استفاده می‌شود.

^۹ Cornell University online atlas

^۱ Viscerotropic Velogenic Newcastle Disease

^۱ Mild 1

^۱ Mild Intermediate 2

^۱ Intermediate 3

^۱ Intermediate Plus 4

^۱ Hot 5

^۱ Herpes virus of Turkey 6

اولین گزارش از شناسایی ویروس محلی گامبورو در ایران با استفاده از روشهای

مولکولی^{۱۷}

قریشی سید علی^۱، حاجیان ترانه^۱، مرشدی دینا^۱، بزرگمهری فرد محمد حسن^۲
۱ مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی؛ ۲ دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران

در این مطالعه با استفاده از روشهای مولکولی اقدام به تعیین خصوصیات ژنتیکی ویروس محلی گامبورو گردید. نمونههای بورس فابرسیوس از طیور مشکوک به بیماری گامبورو که علائم کالبدگشائی بیماری را نشان می‌دادند انتخاب و جدا گردید. در ابتدا آزمایش RT-PCR با استفاده از ویروس واکسن گامبورو بهینه سازی گردید. در این آزمایش پس از استخراج RNA ویروس، با استفاده از پرایمر اختصاصی ابتدا ساخت cDNA و سپس واکنش PCR انجام گرفت. شرایط آزمایش به گونه‌ای انتخاب شد تا قطعه ای از ژن VP2 ویروس به طول ۷۴۳ جفت باز تکثیر گردد. در مورد نمونه‌های جمع آوری شده از طیور مشکوک به بیماری نیز پس از تهیه هموژن از بافت بورس فابرسیوس، آزمایش RT-PCR به عمل آمد و محصول PCR در وکتور pTZ57R کلون و سپس ردیف نوکلئوتیدی آن تعیین گردید. سکانس نوکلئوتیدی نشان داد که نتایج PCR کاملاً اختصاصی و مربوط به ویروس گامبورو می‌باشد. ضمناً بررسی این نتایج مشخص نمود که سکانس ویروس شبیه سکانس منتشر شده از ویروس خیلی حاد گامبورو (Very Virulent IBDV) می‌باشد. مقایسه سکانس اسید آمینه ویروس فیلد با ویروس‌های خیلی حاد گزارش شده از سایر نقاط دنیا نشان داد که ویروس محلی گامبورو در ایران نیز مشابه ویروس‌های خیلی حاد است که تاکنون از سایر کشورهایی چون انگلستان، آلمان، چین، ژاپن گزارش شده است. این اولین گزارش از شناسایی ویروس محلی گامبورو در ایران و تعیین و انتشار قسمتی از سکانس ژن VP2 آن می‌باشد. مطالعه برای تعیین سکانس تمام ژنوم ویروس در مرکز ملی تحقیقات ژنتیک و تکنولوژی زیستی در دست انجام می‌باشد.

^{۱۷} سومین سمینار بهداشت و بیماری‌های طیور، شیراز، ۱۳۸۱



شناسائی مولکولی ویروس بیماری گامبورو در گله‌های گوشتی با علائم کلینیکی حاد در

استان گیلان^{۱۸}

اسدپور یداله^۱، رحیم آبادی ابراهیم^۱، شوستری عبدالحمید^۲
۱ بخش دامپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی گیلان، رشت، ایران؛ ۲ بخش تحقیق و تشخیص بیماری های
طیور، موسسه واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران

بیماری بورس عفونی یا گامبورو یک بیماری حاد و فوق العاده مسری است و ویروس آن پاتوژن مهم تضعیف کننده سیستم ایمنی جوجه‌های گوشتی و تخم‌گذار در سراسر دنیا است. هدف از این مطالعه بررسی مولکولی سویه‌های درگیر در موارد کلینیکی بیماری گامبورو در طیور گوشتی استان گیلان بوده است. بر اساس علائم کلینیکی و یافته‌های کالبدگشائی تعداد چهار گله (۱۰ درصد) از ۴۰ گله‌ی تحت بررسی مشکوک به بیماری تشخیص داده شد. در نمونه‌های بورس فابر سیوس هر چهار گله پس از استخراج RNA و انجام آزمایش RT-PCR، یک باند ۶۴۳ جفت باز در ناحیه بسیار متغیر ژن VP2 تکثیر شد. برای تایید بیشتر RT-PCR هر چهار گله، آزمایش PCR آشیانه‌ای انجام شد که با استفاده از پرایمر اختصاصی یک باند ۵۵۲ جفت باز تکثیر و مشاهده شد. برای شناخت حدت ویروس، آزمایش هضم آنزیمی با دو آنزیم Sacl و BspMI صورت گرفت و نتایج هضم مثبت گردید. بر اساس نتایج به دست آمده هر چهار گله مبتلا به ویروس فوق حاد بیماری گامبورو vWIBD تشخیص داده شد. نتیجه اینکه در چندسال اخیر علی رغم کاهش موارد حاد کلینیکی بیماری گامبورو، سویه فوق حاد در گله‌های گوشتی استان گیلان در حال چرخش بوده و مطالعه بعدی شناسائی تحت کلینیکی بیماری گامبورو در سنین پائین توصیه می‌شود.

^{۱۸} مجله تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک (پژوهش و سازندگی)، ۱۳۹۶، دوره ۳۰، شماره ۳، صفحات ۶۳-۷۰.



تعیین هویت مولکولی ویروس‌های بیماری بورس عفونی^۱

J. Razmyar and S.M. Peighambari

Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, P.O.Box 14155-6453, Tehran, Iran

این مطالعه برای تعیین هویت ۹ جدایه ویروس بیماری بورس عفونی جدا شده از ایران طراحی شد. به منظور تکثیر یک قطعه ۷۴۳ جفت بازی از قسمت بسیار متغییر ژن VP2 ویروس‌های جدا شده از روش RT-PCR استفاده شد. محصول حاصل از RT-PCR پس از تعیین توالی با سایر توالی‌های ثبت شده از ایران و سایر نقاط دنیا مقایسه شد و ارتباط فیلوژنتیکی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. سه ایزوله ارتباط نزدیکی با سویه‌های تخفیف حدت یافته سویه کلاسیک ویروس بیماری بورس عفونی نشان دادند. ۶ جدایه با سویه‌های بسیار پرحدت ویروس بیماری بورس عفونی (vIBDV) آسیایی و اروپایی مشابهت داشتند. در ۵ سویه بسیار پرحدت جداسازی شده از ایران، ۴ تغییر نوکلئیدی-802A، 934A، 940A و 1366A- مشاهده شد. در سه جدایه ویروس بسیار پرحدت بیماری بورس عفونی جدا شده از ایران، توالی‌های اسیدهای آمینه ۱۰۰ در صد با سویه‌های vIBDV اروپایی (UK661)، آسیایی (GZ96، HK46) و سویه‌های جدا شده از ایران (SDH1، IR01) مشابهت نشان داد. در جدایه‌های vIBDV چند جایگزینی منحصر به فرد در اسیدهای آمینه 231S-L، 231S-P و 233N-K مشاهده شد. در بررسی‌های فیلوژنتیکی جدایه‌های vIBDV ایران قرابت زیادی با سویه‌های vIBDV اروپایی و آسیایی دارند. مطالعات بیشتری برای ارزیابی میزان توزیع، تنوع و ارتباط فیلوژنتیکی سویه‌های مختلف ویروس بیماری بورس عفونی جدا شده از ایران با سایر قسمت‌های دنیا بایستی انجام شود.

¹ Avian Diseases, 52 (4):665-669.

تعیین هویت مولکولی ویروس‌های بیماری بارس عفونی^۲

J. Razmyar and S.M. Peighambari

Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, P.O.Box
14155-6453, Tehran, Iran

چکیده

این مطالعه برای تعیین هویت ۹ جدایه ویروس بیماری بارس عفونی جدا شده از ایران طراحی شد. به منظور تکثیر یک قطعه ۷۴۳ جفت بازی از قسمت بسیار متغییر ژن VP2 ویروس‌های جدا شده از روش RT-PCR استفاده شد. محصول حاصل از RT-PCR پس از تعیین توالی با سایر توالی‌های ثبت شده از ایران و سایر نقاط دنیا مقایسه شد و ارتباط فیلوژنتیکی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. سه ایزوله ارتباط نزدیکی با سویه‌های تخفیف حدت یافته سویه کلاسیک ویروس بیماری بارس عفونی نشان دادند. ۶ جدایه با سویه‌های بسیار پرحدت ویروس بیماری بارس عفونی (vIBDV) آسیایی و اروپایی مشابهت داشتند. در ۵ سویه بسیار پرحدت جداسازی شده از ایران، ۴ تغییر نوکلئیدی-802A، 934A، 940A و 1366A- مشاهده شد. در سه جدایه ویروس بسیار پرحدت بیماری بارس عفونی جدا شده از ایران، توالی‌های اسیدهای آمینه ۱۰۰ در صد با سویه‌های vIBDV اروپایی (UK661)، آسیایی (GZ96، HK46) و سویه‌های جدا شده از ایران (SDH1، IR01) مشابهت نشان داد. در جدایه‌های vIBDV چند جایگزینی منحصر به فرد در اسیدهای آمینه 231S-L، 231S-P و 233N-K مشاهده شد. در بررسی‌های فیلوژنتیکی جدایه‌های vIBDV ایران قرابت زیادی با سویه‌های vIBDV اروپایی و آسیایی دارند. مطالعات بیشتری برای ارزیابی میزان توزیع، تنوع و ارتباط فیلوژنتیکی سویه‌های مختلف ویروس بیماری بارس عفونی جدا شده از ایران با سایر قسمت‌های دنیا بایستی انجام شود.

مقدمه

بیماری بارس عفونی، بسیاری واگیردار جوجه‌های جوان می‌باشد. ماکیان در سن ۳ تا ۶ هفتگی، بیشترین حساسیت را به بیماری بالینی دارند. بافت‌های لنفوئیدی، به ویژه بارس فابریسیوس اهداف اولیه ویروس بیماری بارس عفونی می‌باشند. عفونت تحت بالینی در جوجه‌های زیر ۲ هفته اتفاق می‌افتد و معمولاً به ایجاد ایمنوساپرنش منتج می‌گردد.

² Avian Diseases, 52 (4):665-669.

ویروس بیماری بورس عفونی از خانواده بیرناورویده می‌باشد. ژنوم ویروس از قطعات RNA دو رشته‌ای تشکیل شده است که پروتئین‌های متعددی از جمله VP1، VP2، VP3، VP4 و VP5 را کد می‌کنند. پروتئین VP2 به‌عنوان ایمونژنیک‌ترین پروتئین ویروس شناخته می‌شود که حداقل شامل دو سایت نوترالیزه کننده می‌باشد. همچنین این پروتئین سایت‌هایی دارد که برای تعیین حدت ویروس از آن‌ها استفاده می‌شود. دو سروتیپ مجزا از ویروس بیماری بورس عفونی شناسایی شده‌اند، سروتیپ یک و سروتیپ دو. سروتیپ یک، پاتوژنیک‌تر بوده و در ماکیان بیماری بورس عفونی را ایجاد می‌نماید اما سروتیپ دو نه می‌تواند مسبب بیماری باشد و نه می‌تواند بر علیه سویه‌های پاتوژن سروتیپ یک محافظت ایجاد کند. ویروس بیماری بورس عفونی دارای توزیع جهانی در جمعیت طیور می‌باشد. بیماری بورس عفونی بسیار از نظر اقتصادی برای صنعت طیور مهم می‌باشد زیرا می‌تواند موجب افزایش حساسیت به بیماری‌ها و متاثر نمودن ایمنی ایجاد شده از واکسیناسیون شود. ویروس بسیار پرحدت بیماری بورس عفونی (vvIBDV) ابتدا در اواخر دهه ۱۹۸۰ در اروپا گزارش شد و سپس در سراسر دنیا به غیر از آمریکای شمالی و استرالیا گسترش پیدا کرد. vvIBDVها از نظر آنتی‌ژنیکی بسیار به سویه‌های کلاسیک نزدیک می‌باشند اما حدت آن‌ها به میزان قابل توجهی بیشتر است و می‌توانند موجب الفا تلفات بالا در گله‌های آلوده شوند.

ویروس بیماری بورس عفونی برای اولین بار در سال ۱۹۸۱ در ایران جدا سازی شد. حضور vvIBDVها در ایران با دو گزارش اخیر تأیید شده است. در یک مطالعه جامع، از ۴۹ گله گوشتی و تخمگذار مشکوک به بیماری بورس عفونی از نقاط مختلف ایران در سال‌های ۲۰۰۵ تا ۲۰۰۶ نمونه برداری انجام شد. از هر گله ۵ نمونه بورس اخذ و با هم مخلوط شدند. از RT-PCR برای تکثیر یک قطعه ۷۴۳ جفت بازی از ژن VP2 جدایه‌های فیلدی استفاده شد. قطعات VP2 تکثیر شده با استفاده از آنزیم محدود کننده تعیین هویت شده و ۳۷ نمونه مثبت پیدا شد؛ ۳۴ نمونه از آن‌ها الگویی مطابق vvIBDV نشان دادند و سه نمونه الگویی مشابه سویه‌های کلاسیک ویروس بیماری بورس عفونی را نشان دادند. به‌منظور مطالعات تکمیلی بر روی جدایه‌های فیلدی ایران، ۶ جدایه با الگوی vvIBDV و ۳ جدایه با الگوی ویروس کلاسیک بیماری بورس عفونی انتخاب شدند. این نمونه‌ها بر اساس ضایعات ماکروسکوپیکی بورس، تظاهرات بالینی بیماری گامبورو در فارم و منطقه جغرافیایی انتخاب شدند. در مطالعه حاضر، هدف تعیین هویت قطعه ۷۴۳ جفت بازی ژن VP2 تکثیر شده توسط RT-PCR و سپس تعیین توالی شده در ۹ جدایه فیلدی ویروس‌های بیماری بورس عفونی و مقایسه آن‌ها با سایر ویروس‌های گامبورو جدا شده از ایران و سراسر دنیا و ارزیابی ارتباط فیلوژنتیکی آن‌ها می‌باشد.

مواد و روش کار

ویروس‌ها، در این مطالعه از ۹ جدایه ویروس بیماری بورس عفونی جدا شده از فارم‌های طیور در مناطق مختلف ایران در طی سال‌های ۲۰۰۵ و ۲۰۰۶ استفاده شد. پیش از این مطالعه، بر اساس پروفایل آنزیم محدود کننده در محصول ۷۴۳ جفت بازی تکثیر شده توسط RT-PCR (مربوط به قسمت بسیار متغییر ژن VP2) در ۳۷ نمونه جدا شده از قسمت‌های مختلف کشور، الگوی کلاسیک و vvIBDV مشاهده شد. اطلاعات مربوط به این ۹ جدایه مورد استفاده در مطالعه حاضر، در جدول یک آمده است.

جدول ۱: ۹ جدایه فیلدی ویروس بیماری بورس عفونی مورد استفاده در مطالعه حاضر

Isolate designation	Flock type ^A	Age(wk)	% Mortality ^B	Bursal appearances ^A	Year of isolation	Geographic origin	GenBank accession no.	Restriction enzyme pattern
JRMP13IR	Broiler	4	5	Hemorrhagic	2005	Tehran (North-Central)	DQ779963	Very virulent
JRMP14IR	Broiler	4	10	Hemorrhagic	2005	Amol (North)	DQ899750	Very virulent
JRMP16IR	Broiler	6	1	Edematous	2006	Tehran	DQ899751	Classical
JRMP24IR	Broiler	4	30	Hemorrhagic	2005	Tehran	DQ785171	Very virulent
JRMP25IR	Pullet	5	35	Hemorrhagic	2005	Tehran	DQ785172	Very virulent
JRMP29IR	Broiler	4	15	Hemorrhagic	2006	Tabriz (West)	DQ899752	Classical
JRMP30IR	Pullet	5	25	Hemorrhagic	2005	Tehran	DQ785173	Very virulent
JRMP39IR	Broiler	5	3	Edematous	2005	Tehran	DQ899753	Classical
JRMP42IR	Pullet	5	40	Hemorrhagic	2006	Mashhad (East)	DQ899754	Very virulent

A تمامی گله با یک دُز واکسن اینترمدیت واکسینه شده‌اند به غیر از گله جدایه شماره ۱۶ که دو دُز واکسن دریافت کرده بود.

B تمامی گله‌ها به جز گله‌های شماره ۱۶ و ۳۹ علائم کلینیکی و کالبدگشایی درگیری با گامبورو را نشان دادند.

RT-PCR، برای استخراج RNA از نمونه‌های بورس هموژن شده در بافر TNE، برابر توصیه شرکت سازنده، از کیت تجاری RNX Plus استفاده شد. به منظور تولید cdNA از کیت Fermentas استفاده شد. از دستورالعمل توصیه شده توسط شرکت سازنده با کمی تغییرات استفاده شد. به صورت خلاصه، ۵ میکرولیتر RNA استخراج شده، ۲،۵ میکرولیتر از پرایمر ریورس، آب DEPC برای ۳ دقیقه جوشانده شد و سپس بلافاصله بر روی یخ خنک شد. ۴ میکرولیتر از بافر ریورترانس کرایپتاز ۵ ایکس، ۲ میکرولیتر مخلوط dNTP ۱۰ میلی مولار، ۱ میکرو لیتر آنزیم ریورس ترانس کریپتاز MMLV، ۰،۵ میکرولیتر RNasin و ۲،۵ میکرولیتر از آب DEPC به مخلوط پیشین اضافه شده و برای یک ساعت در دمای ۴۲ سانتیگراد و ۸۰ درجه سانتیگراد برای ۵ دقیقه انکوبه شدند، سپس بر روی یخ خنک شده و در دمای ۲۰ - سانتیگراد نگهداری شد. جهت تکثیر یک بخش ۷۴۳ جفت بازی از قسمت بسیار متغییر VP2، از پرایمرهای J1 و J2 استفاده کردیم. پرایمرها و سایر مواد مورد استفاده در واکنش PCR از شرکت سیناژن تهیه شد. فرآیند تکثیر در محلول ۵۰ میکرولیتری حاوی ۵ میکرولیتر بافر PCR ۱- ایکس، ۱ میکرولیتر از dNTP ۱۰ میکرومولار، ۱،۵ میکرولیتر از هر پرایمر، ۰،۲۵ میکرولیتر از DNA پلیمرز Taq، ۱،۵ میکرولیتر از MgCl₂ ۵۰ میکرومولار، ۱۴،۵ میکرولیتر از آب دیونیزه و ۲۵ میکرولیتر از محلول cdNA انجام شد. برنامه ترموسایکلر به شرح ذیل بود: دمای ۹۵ درجه سانتیگراد برای ۳ دقیقه و به دنبال آن ۳۷ سیکل شامل ۹۴ درجه سانتیگراد برای ۲۰ ثانیه، ۵۵ درجه سانتیگراد برای ۲۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتیگراد برای ۴۰ ثانیه و مرحله اکستنشن نهایی در ۷۲ درجه سانتیگراد برای ۵ دقیقه. در تمامی PCR ها از نمونه کنترل منفی استفاده شد (در مخلوط PCR به جای نمونه از آب دیونیزه استفاده شد). محصول PCR، با استفاده الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد شناسایی شد.

توالی‌یابی و آنالیز فیلوژنتیکی. ۹ محصول PCR که دارای الگوی کلاسیک و بسیار پرحدت در آزمون آنزیم‌های محدود کننده بودند، با استفاده از کیت Roche خالص سازی شدند و برای تعیین توالی دو طرفه با استفاده از پرایمرهای PCR به کمپانی

اطلاعات علمی

CEVAC Transmune®

یوروفین آلمان ارسال شد. با استفاده از الگوریتم کلاسترالاین، اطلاعات توالی نوکلئوتیدی و پیش بینی توالی اسیدهای آمینه تراز شدند. آنالیز فیلوژنتیکی بر اساس توالی‌های نوکلئوتیدی با استفاده از نرم افزار CLC Free Workbench Package انجام شد. سکانس‌های به دست آمده با شماره دسترسی مشخص در بانک ژنی ثبت شدند.

نتایج و بحث

ویروس بیماری بورس عفونی اولین بار در ایران، در سال ۱۹۸۱ از یک فارم گوشتی با تلفات محدود جداسازی شد. بعدتر، همین محققین ویروس بیماری بورس عفونی را از یک فارم پولت با ۷۵ درصد تلفات و یک فارم گوشتی با ۲۵ درصد تلفات جداسازی نمودند. گزارشات اخیر، حاکی از حضور vvIBDV در ایران هستند. در بانک ژنی توالی‌های vvIBDV دیگری هم وجود دارند که تاکنون گزارش آن‌ها منتشر نشده است.

قسمت بسیار متغیر از ژن VP2، جذابترین قسمت این ژن برای بسیاری از محققین می‌باشد. پروتئین VP2، شامل اپی‌توپ‌های خنثی کننده اختصاصی سروتیپ و اپی‌توپ‌های اختصاصی پاتوتیپ می‌باشد. سکانس‌های قسمت بسیار متغیر ژن VP2 بسیاری از ویروس‌های بیماری بورس عفونی به منظور آنالیز فیلوژنتیکی استفاده می‌شوند زیرا بخش اعظمی از تغییرات در اسیدهای آمینه ما بین سویه‌های مختلف در این قسمت روی می‌دهند.

این مطالعه نشان داد که در سطح نوکلئوتیدی، از بین ۹ توالی جدایه‌های ایران، فقط دو توالی ۱۰۰ درصد شناسایی شدند و میزان تغییرات بین صفر درصد (مابین دو جدایه بسیار پرحدت بیماری بورس عفونی ۱۳ و ۲۴) تا ۵,۵۲ درصد (مابین سویه کلاسیک IBDV، ایزوله ۱۶ و vvIBDV، ایزوله ۴۲) بود. تغییر در ۱۹ نوکلئوتید تمامی جدایه‌های vvIBDV ایران (794G, 826T, به جز UPM94, 829T, به جز جدایه شماره ۴۲, 832C, 856C, 865A, 896A, 904T, 988T, 1010A, 1026G, 1093G, 1114A, 1144C, 1213T, 1228C, 1282C, 1369A و 1399C به جز جدایه شماره ۴۲) و برخی جدایه‌های اروپائی و آسیایی ثبت شده در بانک ژن معمول می‌باشد. چهار تغییر نوکلئوتیدی 940A, 934A, 802A و 1366A در تمامی جدایه‌های ویروس بسیار پرحدت بیماری بورس عفونی جدا شده از ایران به جز جدایه شماره ۴۲ حضور دارد. به غیر از این تغییرات، تغییرات دیگری در برخی جدایه‌ها یافت شدند که منحصر به فرد بودند. به عنوان مثال، تغییر نوکلئوتیدی در جایگاه 889C منحصر به سویه‌های ادابته شده به کشت سلول می‌باشد که فقط در جدایه شماره ۱۶ مشاهده شد. یافته‌های ما نشان می‌دهد که سه ویروس گامبورو تیپ کلاسیک جدا شده از ایران، با سویه کلاسیک ۵۲/۷۰ اروپایی قرابت چندانی ندارد و میزان تغییرات مابین ۳,۲۶ درصد و ۴,۰۳ درصد بود. اما همین جدایه‌ها قرابت زیادی با سویه ادابته شده به کشت سلولی داشتند، میزان تغییرات بین ۰,۴۲ درصد تا ۰,۷۱ درصد بود. تفاوت این سه جدایه، با سویه واکسن A، که پر مصرف‌ترین واکسن در صنعت طیور ایران می‌باشد، مابین ۰,۴۷ درصد تا ۱,۲۴ درصد بود. مطالعات پیشین در کشورهای آسیائی، تغییرات نوکلئوتیدی همانند آنچه در ارتباط با جدایه‌های بسیار پرحدت ویروس بیماری بورس عفونی ایران مشاهده شد را گزارش نمودند. کائو و همکاران همین تغییرات را در جایگاه ۸۰۲ سه جدایه و در جایگاه ۹۳۴ یک جدایه چینی گزارش

اطلاعات علمی

CEVAC Transmune®

نمودند. همچنین جایگزینی در نوکلئوتیدهای جایگاه شماره 802A، 934A و 940A در بین جدایه‌های بنگلادشی گزارش شد.

پیش بینی سکانس اسیدهای آمینه (از شماره ۲۱۱ تا ۳۴۰) با سکانس‌های ویروس‌های بورس عفونی منتشر شده از ایران مقایسه شد (جدول ۲). ایزوله‌های ایرانی که با الگوی سویه‌های کلاسیک همخوانی داشتند، در حدود ۴۱,۷ درصد با جدایه کلاسیک اروپائی ۵۲/۷۰ تغییرات داشت. جدایه شماره ۱۶، ارتباط نزدیکی با سویه ادابته شده به کشت سلولی CU-1 و سویه واکسن A با تغییر در دو اسید آمینه، داشت. با این حال، میزان واگرایی آن نسبت به سویه ادابته شده به کشت سلولی P2 در حدود ۲,۱۸ درصد یعنی سه اسید آمینه بود. ایزوله شماره ۲۹ نسبت به سویه CU-1 و سویه واکسن A در سه اسید آمینه و از سویه P2 در چهار اسید آمینه متفاوت بود. جدایه شماره ۳۹، در مقایسه با سویه CU-1 و نسبت به سویه واکسن A چهار اسید آمینه متفاوت و در مقایسه با سویه P2 سه اسید آمینه تفاوت داشت.

جدول ۲: مقایسه تغییرات اسیدهای آمینه در جایگاه‌های متفاوت مابین جدایه‌های فیلدی و سایر سویه‌های منتر شده ویروس بیماری بورس عفونی A.

Strain/isolate	Amino acid substitutions at positions																	
	222	231	233	242	249	253	254	255	256	270	279	284	290	294	297	299	300	330
F52/70	P	S	N	I	Q	Q	G	L	V	A	D	A	M	L	P	N	E	S
STC	.	.	.	V	T
CU-1	.	.	.	V	.	H	.	.	.	T	N	T	.	.	S	.	.	K
P2	.	.	.	V	R	H	.	I	.	.	N	T	R
Vaccine A	.	.	.	V	.	H	N	T	L	R
JRMP16IR	.	.	.	V	.	H	.	.	.	T	N	T	R
JRMP29IR	.	.	.	V	.	N	.	.	.	T	N	T	R
JRMP39IR	.	.	.	V	.	.	.	I	.	T	N	T	R
Variant E	T	.	.	.	K	.	S	.	.	.	N
UK661	A	I	I	.	S	.	.
HK46	A	I	I	.	S	.	.
GZ96	A	I	I	.	S	.	.
UPM94	A	S	.	I	E	.	.	.	I	.	S	.	.
IR01	A	I	I	.	S	.	.
SDH1	A	I	I	.	S	.	.
BD 3/99	A	I	I	.	S	A	.
JRMP13IR	A	I	I	.	S	.	.
JRMP14IR	A	I	I	.	S	.	.
JRMP24IR	A	I	I	.	S	.	.
JRMP25IR	A	L	I	I	.	S	.	.
JRMP30IR	A	P	I	I	.	S	.	.
JRMP42IR	A	.	K	I	I	.	S	.	.

A سکانس‌های اسیدهای آمینه ایزوله‌های فیلدی IBDV و سویه‌های IBDV منتشر شده با سکانس‌های سویه F52/70 مقایسه شده‌اند. نقاط اسیدهای آمینه مشابه سکانس سویه F52/70 را نشان می‌دهند.

در مطالعات پیشین گزارش شده است که تغییراتی در اسیدهای آمینه از قبیل تغییر در 284A-T و 279D-N، 253Q-H به دنبال ادابتاسیون به محیط کشت سلولی و متعاقب تخفیف حدت سویه‌های ویروس بیماری بورس عفونی ایجاد می‌شوند. در مطالعه حاضر به صورت کاملاً تعجب برانگیزی، سه ویروس بیماری بورس عفونی کلاسیک سه الگوی مختلف تغییرات را در

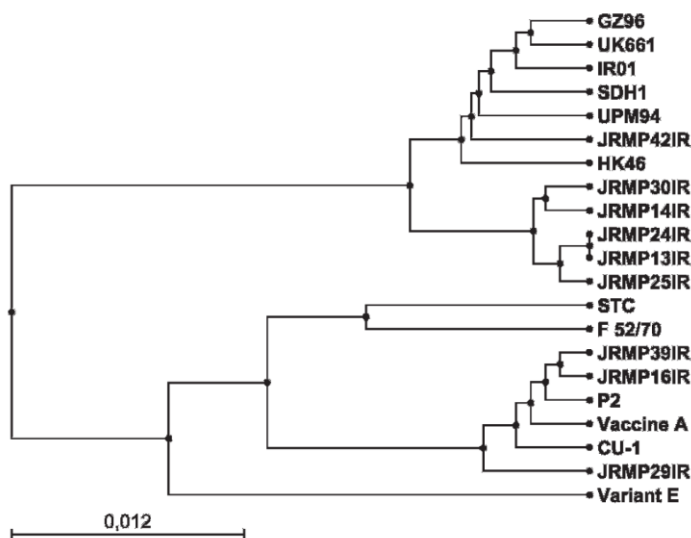
اطلاعات علمی

CEVAC Transmune®

جایگاه ۲۵۳ نشان دادند (جدول ۲). جدایه‌های شماره ۱۶ و ۲۹ در جایگاه‌های 253Q-H و 253Q-N به ترتیب دارای تغییرات بوده‌اند. هیچ جایگزینی در جایگاه ۲۵۳ جدایه شماره ۳۹ مشاهده نشد و این جدایه سکازسی مشابه سکان سویه F52/70 را نشان داد. با این حال، این جدایه جایگزینی در جایگاه 255L-I را نشان داد که این تغییر در سویه‌های کلاسیک آدابته شده به محیط کشت سلول P2 مشاهده شده است. تمامی هر سه جدایه کلاسیک ویروس بیماری بورس عفونی ایران تغییرات اسیدهای آمینه در جایگاه‌های 270A-T، 279D-N و 284A-T را نشان دادند. جایگزینی در جایگاه 330S-R که در سویه‌های واکسینال یافت می‌شود نیز در سه جدایه تیپ کلاسیک مطالعه حاضر مشاهده شد. مشاهده توالی‌های بسیار نزدیک به سویه‌های تخفیف حدت یافته و آدابته شده به کشت سلول در مطالعه حاضر ممکن است شاخصی از پایداری معکوس سویه‌های واکسینال و بازگشت احتمالی این سویه‌ها به حدت باشد، با این حال این تئوری نیازمند مطالعات تکمیلی می‌باشد. اخیراً وی و همکاران بازآرایی ژنتیکی طبیعی را در ویروس بیماری بورس عفونی گزارش نمودند؛ در این بازآرایی بخش A از سویه تخفیف حدت یافته و بخش B از سویه بسیار پرحدت بیماری بورس عفونی آمده بود. این ویروس بازآرایی شده و ویروس کلاسیک پرحدت بیماری بورس عفونی هر دو در جوجه‌های SPF حدت یکسانی را نشان دادند. به منظور تشخیص دقیق ویروس بورس عفونی تیپ کلاسیک جدا شده در مطالعه حاضر، آنالیزهای بیشتری بر روی قسمت‌های دیگر بخش A و B نیاز است.

سه ویروس تیپ کلاسیک بیماری بورس عفونی جدا شده در مطالعه حاضر، یک تغییر اختصاصی در 270T که در سویه‌های کلاسیک (سویه کلاسیک آمریکائی STC، سویه تخفیف حدت یافته آلمانی CU-1، سویه کلاسیک استرالیایی 002-73 و سویه واکسن بریتانیایی PBG98) مشاهده می‌شود را نشان دادند. هیچ یک از جدایه‌های فیلدی ایران جایگزینی در جایگاه‌های 249Q-K و 254G-S که اختصاصی سویه‌های واریانت است را نشان ندادند.

تمامی جدایه‌های wIBDV ایران (جدایه‌های شماره ۱۳، ۱۴، ۲۴، ۲۵، ۳۰ و ۴۲) چهار تغییر در اسیدهای آمینه جایگاه‌های



299N- و 294L-I، 256V-I، 222P-A S که در تمامی wIBDV ها به صورت محافظت شده وجود دارد را نشان دادند (جدول ۲؛ ۳، ۴، ۶، ۱۲ و ۲۸).

نمودار ۱. درخت فیلوژنتیکی سکانس‌های نوکلئوتیدی قطعه ۷۴۳ جفت بازی ژن VP2 ویروس‌های بیماری بورس عفونی ایران و سایر سویه IBDV منتشر شده

تغییر در جایگاه 299N-S نیز در سویه استرالیایی 002-73 و سروتیپ ۲، OH گزارش شده است. همین محققین تغییری در جایگاه 256V-A در تمامی هر سویه استرالیایی تحت مطالعه را گزارش نمودند. همچنین تغییراتی در سویه‌های واریانت ایالات متحده مشاهده نشد. جدایه vWIBDV افریقای غربی با شماره 88180 در جایگاه 222Q، 294L و 299N تغییر را نشان داد. در تمامی سه جدایه بنگلادشی و تمامی جدایه‌های vWIBDV نیجریه، جایگزینی E-A را در جایگاه ۳۰۰ نشان دادند. با این حال همچنین تغییراتی در جدایه‌های فیلدی vWIBDV ایران مشاهده نشد. توالی اسید آمینه سه جدایه فیلدی وروس بورس عفونی ایران (جدایه‌های ۱۳، ۱۴ و ۲۴) به صورت ۱۰۰ درصدی تغییرات UK661، HK46، GZ96 را نشان دادند. همچنین دو جدایه سابقا گزارش شده از ایران (SDH1 و IR01) نیز در این جایگاه‌ها تغییر نشان دادند. با این حال برخی جایگزینی‌های دیگر شامل 231S-L، 231S-P و 233N-K در بین جدایه‌های فیلدی vWIBDV ایران با شماره‌های ۲۵، ۳۰ و ۴۲ به ترتیب مشاهده شد. تا به امروز، این تغییرات توسط محققین دیگر گزارش نشده اند. دلیل این تفاوت‌ها و اهمیت آن‌ها برای ما شفاف نیست. مطالعات تکمیلی به منظور ردیابی نقش این تغییرات در حدت جدایه‌ها بایستی انجام شود.

توالی هپتاپتید غنی از سرین "SWSASGS" بعد از دومین منطقه هیدروفیلیک، هم در بین جدایه‌های vWIBDV ایران به صورت محافظت شده، حضور دارد. این مهم در جدایه‌های کلاسیک ایران مشاهده نشد (جدول ۲). مشابه سویه‌های P2 و واکسن A، جدایه‌های شماره ۱۶، ۲۹ و ۳۹ تغییرات در قسمت 330S-R را نشان دادند. پیش از این نقش توالی حفاظت شده "SWSASGS" در حدت ویروس بیماری بورس عفونی گزارش شده بود؛ با این حال، این توالی در ویروس‌های تخفیف حدت یافته دیده شده بود. تمامی سویه‌های vWIBDV، پرحدت کلاسیک و واریانت، دارای ۴ اسید آمینه سرین در این جایگاه هستند.

در این مطالعه، آنالیز فیلوژنتیکی بر اساس توالی نوکلئوتیدی، جدایه‌ها را به دو گروه تیپ کلاسیک و ویروس بیماری بورس عفونی و vWIBDV را به دو گروه تقسیم نمود. در ویروس‌های تیپ کلاسیک، جدایه‌های شماره ۱۶ و ۳۹ یک شاخه جداگانه را تشکیل دادند و ارتباط نزدیکی با سویه P2 و سپس واکسن A و سویه CU-1 به ترتیب نشان دادند (نمودار ۱). هر دو این جدایه‌ها از گله‌ای با تلفات معمول و از یک بورس ادماتوز جدا شدند. در این گله‌ها، علائم کلینیکی و یا نرخ تلفاتی که مشخصه vWIBDV باشد، مشاهده نشد (جدول ۱). ایزوله شماره ۲۹، در یک شاخه جداگانه از درخت فیلوژنتیکی قرار گرفته است. در این شاخه ویروس جدا شده از گله دارای خون‌ریزی در بورس و دارای تلفات ناشی از بیماری بورس عفونی نیز قرار گرفته است (جدول ۱). اگرچه تلفات بالا این گله می‌تواند ناشی از دخالت سایر عوامل عفونی و یا به دلیل سایر عوامل باشد، اما احتمال این هم وجود دارد که جدایه ۲۹ دارای بازآرایی ژنتیکی باشد به گونه‌ای که قطعه A این ویروس می‌تواند از یک ویروس ادابته شده به کشت سلولی گرفته شده باشد. مطالعات بیشتر بر روی سایر نواحی قطعه A و B می‌تواند جوانب این امر را روشن‌تر نماید. تمامی گله‌هایی که جدایه‌های آن‌ها الگوی vWIBDV را نشان دادند، دارای تلفاتی با دامنه ۵ تا ۴۰ درصد بودند. در کالبدگشائی پرندگان تلف شده، بورس هموراژیک مشاهده شد. همان‌طور که در ارتباط با تمامی ویروس‌های vWIBDV از سایر کشورها گزارش شده است، سویه‌های بسیار پرحدت ویروس بیماری بورس عفونی ایران ارتباط نزدیکی با ویروس‌های vWIBDV اروپا و آسیا نشان دادند. vWIBDV‌های ایرانی به دو دسته گروه بندی شدند. یک دسته شامل ۵ جدایه (۱۳، ۱۴، ۲۴، ۲۵ و

۳۰)، تشابه زیادی با سویه BD3/99 بنگلادش نشان دادند و دسته دیگر شامل جدایه فیلدی ۴۲ بود که تشابه زیادی را با vvIBDVهای اروپائی و آسیائی از قبیل UK661, GZ96, HK46 و UPM94 و دو جدایه vvIBDV از ایران داشت. اگرچه منبع و طریقه ورود vvIBDV به ایران برای ما مشخص نیست، اما نتایج تحقیق حاضر نشانگر گسترش سریع ویروس بسیار پرحدت بورس عفونی از سایر نقاط دنیا به صنعت طیور ایران می‌باشد. مطالعات جامع بیشتر، اطلاعات دقیق‌تری را در ارتباط با توزیع، تنوع و ارتباط فیلوژنتیکی ویروس‌های IBD جدا شده از ایران و سایر نقاط جهان فراهم خواهد آورد.

منابع:

- Aghakhan, S. M., S. R. Fereidoni, N. Abshar, C. Marunesi, and Z. Sami. Characterization of a highly virulent infectious bursal disease virus. Arch. Razi Inst. 46/47:55–63. 1996.
- Bayliss, C. D., U. Spies, K. Shaw, R. W. Peters, A. Papageorgiou, H. Müller, and M. E. Boursnell. A comparison of the sequences of segment A of four infectious bursal disease virus strains and identification of a variable region in VP2. J. Gen. Virol. 71:1303–1312. 1990.
- Brown, M. D., P. Green, and M. A. Skinner. VP2 sequences of recent European “very virulent” isolates of infectious bursal disease virus are closely related to each other but are distinct from those of “classical” strains. J. Gen. Virol. 75:675–680. 1994.
- Cao, Y. C., W. S. Yeung, M. Law, Y. Z. Bi, F. C. Leung, and B. L. Lim. Molecular characterization of seven Chinese isolates of infectious bursal disease virus: classical, very virulent and variant strains. Avian Dis. 42:340–351. 1998.
- Chettle, N., J. C. Stuart, and P. J. Wyeth. Outbreak of infectious bursal disease in East Anglia. Vet. Rec. 125:271–272. 1989.
- Eterradossi, N., C. Arnauld, F. Tekaiia, D. Toquin, H. Le coq, G. Rivallan, M. Guittet, J. Domenech, T. P. van den Berg, and M. A. Skinner. Antigenic and genetic relationships between European very virulent infectious bursal disease viruses and an early West African isolate. Avian Pathol. 28:36–46. 1999.
- Eterradossi, N., C. Arnauld, D. Toquin, and G. Rivallan. Critical amino acid changes in VP2 variable domain are associated with typical and atypical antigenicity in very virulent infectious bursal disease viruses. Arch. Virol. 143:1627–1636. 1998.
- Fahey, K. J., P. McWaters, M. A. Brown, K. Erny, V. J. Murphy, and D. R. Hewish. Virus-neutralizing and passively protective monoclonal antibodies to infectious bursal disease virus of chickens. Avian Dis. 35:365–373. 1991.
- Heine, H. G., M. Haritou, P. Failla, K. Fahey, and A. Azad. Sequence analysis and expression of the host-protective immunogen VP2 of a variant strain of infectious bursal disease virus which can circumvent vaccination with standard type I strains. J. Gen. Virol. 2:1835–1843. 1991.

Hosseini, S. D., A. R. Omar, and I. Aini. Molecular characterization of an infectious bursal disease virus isolate from Iran. *Acta Virol.* 48:79–83. 2004.

Islam, M. R., K. Zierenberg, N. Eterradossi, D. Toquin, G. Rivallan, and H. Müller. Molecular and antigenic characterization of Bangladeshi isolates of infectious bursal disease virus demonstrate their similarities with recent European, Asian and African very virulent strains. *J. Vet. Med. Ser. B* 48:211–221. 2001.

Kataria, R. S., A. K. Tiwari, G. Butchaiah, and J. M. Kataria. Sequence analysis of the VP2 gene hypervariable region of infectious bursal disease viruses from India. *Avian Pathol.* 30:501–507. 2001.

Kibenge, F. S., P. K. McKenna, and J. K. Dybing. Genome cloning and analysis of the large RNA segment (segment A) of a naturally avirulent serotype 2 infectious bursal disease virus. *Virology* 184:437–440. 1991.

Lukert, P. D., and Y. M. Saif. Infectious bursal disease. In: *Diseases of poultry*, 11th ed. Y. M. Saif, H. J. Barnes, J. R. Glisson, A. M. Fadly, L. R. McDougald, and D. E. Swayne, eds. Iowa State University Press, Ames, IA. pp. 407–465. 2003.

Müller, H., M. R. Islam, and R. Raue. Research on infectious bursal disease—the past, the present and the future. *Vet. Microbiol.* 97:153–165. 2003.

Mundt, E. Tissue culture infectivity of different strains of infectious bursal disease virus is determined by distinct amino acids in VP2. *J. Gen. Virol.* 80:2067–2076. 1999.

Mundt, E., and H. Müller. Complete nucleotide sequences of 59- and 39-noncoding regions of both genome segments of different strains of infectious bursal disease virus. *Virology* 209:10–18. 1995.

Razmyar, J., and S. M. Peighambari. Rapid differentiation between very virulent and classical infectious bursal disease viruses isolated in Iran by RT-PCR/REA. *J. Vet. Res.* In press.

Sapats, S. I., and J. Ignjatovic. Antigenic and sequence heterogeneity of infectious bursal disease virus strains isolated in Australia. *Arch. Virol.* 145:773–785. 2000.

Sapats, S. I., and J. Ignjatovic. Restriction fragment length polymorphism analysis of the VP2 gene of Australian strains of infectious bursal disease virus. *Avian Pathol.* 31:559–566. 2002.

Shamsara, M., S. A. Ghorashi, and G. Ahmadian. Cloning and nucleotide analysis of the VP2 gene of a very virulent infectious bursal disease virus isolate from Iran. *Acta Virol.* 50:229–234. 2006.

Sharma, J. M., I. J. Kim, S. Rautenschlein, and H. Y. Yeh. Infectious bursal disease virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression. *Dev. Comp. Immunol.* 24:223–235. 2000.

Van den Berg, T. P. Acute infectious bursal disease in poultry: a review. *Avian Pathol.* 29:175–194. 2000.

Van den Berg, T. P., M. Gonze, and G. Meulemans. Acute infectious bursal disease in poultry: isolation and characterization of a highly virulent strain. *Avian Pathol.* 20:133–143. 1991.

Van Loon, A. A., N. de Haas, I. Zeyda, and E. Mundt. Alteration of amino acids in VP2 of very virulent infectious bursal disease virus results in tissue culture adaptation and attenuation in chickens. *J. Gen. Virol.* 83:121–129. 2002.

Wei, Y., J. Li, J. Zheng, H. Xu, L. Li, and L. Yu. Genetic reassortment of infectious bursal disease virus in nature. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 350:277–287. 2006.

Yamaguchi, T., M. Ogawa, Y. Inoshima, M. Miyoshi, H. Fukushi, and K. Hirai. Identification of sequence changes responsible for the attenuation of highly virulent infectious bursal disease virus. *Virology* 223:219–223. 1996.

Zierenberg, K., H. Nijper, T. P. van den Berg, C. D. Ezeokoli, M. Vob, and H. Müller. The VP2 variable region of African and German isolates of infectious bursal disease virus: comparison with very virulent, classical virulent and attenuated tissue culture adapted strains. *Arch. Virol.* 145:113–125. 2000.



بررسی اثرات ایمونوساپرسیو واکسن ایمونوکمپلکس بیماری بورس عفونی در جوجه‌های

گوشتی^{۲۱}

A. Sadrzadeh, S.M. Peighambari and B. Shoadoost

Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, P.O.Box: 14155-6453, Iran

این مطالعه با هدف بررسی اثرات ایمونوساپرسیو واکسن ایمونوکمپلکس بیماری بورس عفونی مورد استفاده با روش تلقیح داخل تخم‌مرغی و تزریق به جوجه یک روزه طراحی شده است. ۳۰۰ تخم‌مرغ نطفه‌دار از یک گله مرغ مادر با سن ۳۰ هفته در یک جوجه‌کشی انکوبه شدند. در روز ۱۸ جوجه‌کشی، واکسن ایمونوکمپلکس گامبورو به ۱۲۰ تخم‌مرغ نطفه‌دار تلقیح شد. در سن یک روزگی ۶۰ جوجه واکسن ایمونوکمپلکس را به صورت تزریق زیر جلدی دریافت نمودند. تمامی ۳۰۰ جوجه یک روزه هیچ شده، به ۵ گروه تقسیم شده و در یک ساختمان ایزوله و در اتاق‌های مختلف تحت شرایط مشخص نگهداری شدند. گروه‌هایی که واکسن بیماری بورس عفونی را دریافت نموده بودند با استفاده از برنامه واکسیناسیون به شرح ذیل علیه بیماری نیوکاسل ایمن‌سازی شدند: واکسن انتروتروپیک آپاتوژنیک (یک روزگی) یا واکسن B1 (در ۷ روزگی) و واکسن لاسوتا (۱۸ روزگی). یک گروه، فقط واکسن B1 و لاسوتا را دریافت کرد و یک گروه به عنوان کنترل هیچ واکسنی دریافت نکرد. در روز ۳۱، پرنده‌های همه گروه‌ها با سویه حاد ویروس نیوکاسل (Hertz33) چالش داده شدند. پیش و پس از چالش، پرنده‌ها با فواصل منظم هفتگی خون‌گیری شدند. در سن ۴۵ روزگی تمامی پرنده‌ها یوتانایز شده و کالبدگشایی شدند. میانگین هندسی تیترا HI نیوکاسل پرنده‌های هر ۵ گروه از یک تا هفت روزگی تفاوت معناداری نداشتند. میانگین تیترا دو گروه واکسینه شده با روش تلقیح داخل تخم‌مرغی در روزهای ۱۴، ۲۱، ۳۸ و ۴۵ به میزان معناداری متفاوت بود. تیترا میانگین پرنده‌هایی که B1 و لاسوتا دریافت کرده بودند، پیش و پس از دریافت واکسن ایمونوکمپلکس در فواصل یک هفته تا انتهای زمان مطالعه تفاوت معناداری باهم نداشتند. میزان تلفات در گروه غیر واکسینه به میزان معناداری بالاتر بود. از نظر میزان تلفات، تفاوت معناداری بین گروه‌های دریافت کننده واکسن ایمونوکمپلکس وجود نداشت. پرنده‌های گروه ۴، با اینکه فقط با واکسن نیوکاسل ایمن‌سازی شدند، تلفات کمتری نسبت به گروه‌هایی که واکسن ایمونوکمپلکس گامبورو را پیش از واکسن نیوکاسل دریافت کرده بودند، داشتند؛ با این حال میزان تفاوت معنادار نبود. این مطالعه نشان می‌دهد که واکسیناسیون با روش تلقیح داخل تخم‌مرغی با استفاده از واکسن ایمونوکمپلکس بیماری بورس عفونی هیچ اثر تضعیف‌کنندگی ایمنی در جوجه‌های گوشتی ندارد.

² Indian Vet. J., 2007, 84: 6-9.¹

بررسی اثرات ایمنوساپرسیو واکسن ایمنوکمپلکس بیماری بارس عفونی در جوجه‌های گوشتی^۲

A. Sadrzadeh, S.M. Peighambari and B. Shoadoost

*Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran,
P.O.Box: 14155-6453, Iran*

چکیده

این مطالعه با هدف بررسی اثرات ایمنوساپرسیو واکسن ایمنوکمپلکس بیماری بارس عفونی مورد استفاده با روش تلقیح داخل تخم‌مرغی و تزریق به جوجه یک روزه طراحی شده است. ۳۰۰ تخم‌مرغ نطفه‌دار از یک گله مرغ مادر با سن ۳۰ هفته در یک جوجه‌کشی انکوبه شدند. در روز ۱۸ جوجه‌کشی، واکسن ایمنوکمپلکس گامبورو به ۱۲۰ تخم‌مرغ نطفه‌دار تلقیح شد. در سن یک روزگی ۶۰ جوجه واکسن ایمنوکمپلکس را به صورت تزریق زیر جلدی دریافت نمودند. تمامی ۳۰۰ جوجه یک روزه هچ شده، به ۵ گروه تقسیم شده و در یک ساختمان ایزوله و در اتاق‌های مختلف تحت شرایط مشخص نگهداری شدند. گروه‌هایی که واکسن بیماری بارس عفونی را دریافت نموده بودند با استفاده از برنامه واکسیناسیون به شرح ذیل علیه بیماری نیوکاسل ایمن‌سازی شدند: واکسن انتروتروپیک آپاتوژنیک (یک روزگی) یا واکسن B1 (در ۷ روزگی) و واکسن لاسوتا (۱۸ روزگی). یک گروه، فقط واکسن B1 و لاسوتا را دریافت کرد و یک گروه به عنوان کنترل هیچ واکسنی دریافت نکرد. در روز ۳۱، پرنده‌های همه گروه‌ها با سویه حاد ویروس نیوکاسل (Hertz33) چالش داده شدند. پیش و پس از چالش، پرنده‌ها با فواصل منظم هفتگی خون‌گیری شدند. در سن ۴۵ روزگی تمامی پرنده‌ها یوتانایز شده و کالبدگشایی شدند. میانگین هندسی تیترا HI نیوکاسل پرنده‌های هر ۵ گروه از یک تا هفت روزگی تفاوت معناداری نداشتند. میانگین تیترا دو گروه واکسینه شده با روش تلقیح داخل تخم‌مرغی در روزهای ۱۴، ۲۱، ۳۸ و ۴۵ به میزان معناداری متفاوت بود. تیترا میانگین پرنده‌هایی که B1 و لاسوتا دریافت کرده بودند، پیش و پس از دریافت واکسن ایمنوکمپلکس در فواصل یک هفته تا انتهای زمان مطالعه تفاوت معناداری باهم نداشتند. میزان تلفات در گروه غیر واکسینه به میزان معناداری بالاتر بود. از نظر میزان تلفات، تفاوت معناداری بین گروه‌های دریافت کننده واکسن ایمنوکمپلکس وجود نداشت. پرنده‌های گروه ۴، با اینکه فقط با واکسن نیوکاسل ایمن‌سازی شدند، تلفات کمتری نسبت به گروه‌هایی که واکسن ایمنوکمپلکس گامبورو را پیش از واکسن نیوکاسل دریافت کرده بودند، داشتند؛ با این حال میزان تفاوت معنادار نبود. این مطالعه نشان می‌دهد که واکسیناسیون با روش تلقیح داخل تخم‌مرغی با استفاده از واکسن ایمنوکمپلکس بیماری بارس عفونی هیچ اثر تضعیف‌کنندگی ایمنی در جوجه‌های گوشتی ندارد.

² Indian Vet. J., 2007, 84: 6-9²

بیماری بارس عفونی یک بیماری بسیار واگیردار در پرند‌های جوان می‌باشد. از سن ۳ تا ۶ هفتگی، ماکیان بیشترین حساسیت را به عفونت بالینی نشان می‌دهند. هدف اولیه ویروس بیماری بارس عفونی، بافت‌های لنفوئید و علی‌الخصوص بارس فابرسایوس می‌باشد. بیماری تحت بالینی عموماً در پرند‌های با سن کمتر از دو هفته ایجاد می‌شود که می‌تواند منجر به ایمنوساپرنش شود. از آنجائیکه عفونت زودهنگام با بیماری بارس عفونی منجر به کاهش پاسخ به واکسیناسیون و افزایش حساسیت جوجه‌های جوان به سایر عوامل عفونی می‌شود، واکسیناسیون هر چه سریعتر بسیار مطلوب خواهد بود. واکسن‌های اینترمدیت پلاس برای کنترل سویه‌های بسیار حاد ویروس بیماری بارس عفونی طراحی شده‌اند. این واکسن همراه با آنتی‌بادی همولوگ (واکسن ایمنوکمپلکس) به صورت موفقیت آمیزی در جنین ۱۸ روزه از طریق تلقیح داخل تخم‌مرغی یا در جوجه یک روزه از طریق تزریق زیر جلدی استفاده شده است. با اینحال، این سویه‌های حاد واکسن ممکن است بتوانند اثرات ایمنوساپرسیو در پرند‌ها ایجاد نمایند.

مواد و روش کار

واکسن و ویروس‌های چالش داده شده: در این مطالعه ما از واکسن ایمنوکمپلکس (Transmune, CEVA, France) و سه واکسن زنده نیوکاسل شامل سویه انتروترپیک آپاتوژن، (Vitapest, CEVA, France) Phy. LMV.42، B1 و لاسوتا (واکسن و سرم‌سازی رازی، ایران) استفاده نمودیم. سویه حاد ویروس بیماری نیوکاسل، HERTZ33، برای چالش استفاده شد.

طراحی مطالعه: ۳۰۰ تخم‌مرغ جنین‌دار از یک گله مرغ مادر ۳۰ هفته (راس ۳۰۸) که دارای سطح بالایی از ایمنی بر علیه بیماری بارس عفونی بودند، انتخاب و در یک جوجه‌کشی مدرن انکوبه شدند. در روز ۱۸ جنینی، ۱۲۰ تخم‌مرغ جنین‌دار واکسن ایمنوکمپلکس را از طریق تلقیح داخل تخم‌مرغ دریافت نمودند. از دستگاه[®] Ovoidject جهت تلقیح داخل تخم‌مرغی استفاده شد. پس از هج، درصد جوجه‌درآوری در گروه واکسینه و غیر واکسینه ثبت شد. تمامی ۳۰۰ قطعه جوجه به دانشکده دامپزشکی منتقل شدند و پس از وزن‌کشی به ۵ گروه (هر گروه شامل ۶۰ قطعه پرند) تقسیم شده و در اتاق‌های جداگانه تحت شرایط مشخص نگهداری شدند. در طول مدت مطالعه، آب و دان به صورت آزاد در اختیار پرند‌ها قرار داشت و آن‌ها به صورت مستمر از نظر وجود تلفات و تظاهرات بیماری بررسی می‌شدند. گروه‌های ۱ و ۲ شامل پرند‌هایی بود که در روز ۱۸ جنینی واکسن ایمنوکمپلکس را با روش تلقیح داخل تخم‌مرغ دریافت کرده بودند. جوجه‌های گروه ۳، واکسن ایمنوکمپلکس را به صورت تزریق زیر جلدی در یک روزگی دریافت کرده بودند. پرند‌های گروه ۱، سویه انتروترپیک آپاتوژن بیماری نیوکاسل را در یک روزگی به صورت قطره چشمی و پرند‌های گروه‌های ۲، ۳ و ۴ سویه B1 در ۷ روزگی به صورت قطره چشمی و لاسوتا را به صورت آشامیدنی در ۱۸ روزگی دریافت کردند. پرند‌های گروه ۵ هیچ واکسنی را دریافت نکردند و به عنوان گروه کنترل تلقی شدند. در سن ۳۱ روزگی، از هر گروه ۵۰ پرند به صورت تصادفی انتخاب شده و با سویه حاد ویروس نیوکاسل HERTZ33 چالش داده شدند. هر پرند یک دُز ویروس 10^5 ELD₅₀ از طریق عضلانی دریافت نمودند. تمامی پرند‌های همه

گروه‌ها برای مدت ۱۴ روز پس از چالش، تحت مراقبت شدید قرار گرفتند و از نظر حضور علائم بالینی (به ویژه تظاهرات عصبی)، تلفات و حضور ضایعات تیپیک نیوکاسل در پرنده‌های تلف شده مانیتورینگ انجام شد. در روز ۱۴ پس از چالش (سن ۴۵ روزگی)، تمامی پرنده‌ها یوتانایز شده و از نظر حضور ضایعات بالینی بررسی شدند. در روزهای ۱، ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ (پیش از چالش)، ۳۸ و ۴۵ (پس از چالش) از هر گروه ۲۰ پرنده وزن کشی و خون‌گیری شدند. نمونه‌های سرمی برای تست HI نیوکاسل استفاده شدند.

آنالیز آماری: متوسط وزن‌گیری و تیترا آنتی‌بادی در آزمون HI در بین ۵ گروه حاضر در این مطالعه با روش آنالیز یک طرفه واریانس و تست تکمیلی Tukey ($P \leq 0.05$) توسط نرم افزار SPSS مقایسه شد. برای تعیین تفاوت تلفات بین هر دو گروه، از آزمون مربع کای استفاده شد.

نتایج و بحث

این مطالعه نشان داد که استفاده از واکسن ایمنوکمپلکس بیماری بورس عفونی به صورت تلقیح داخل تخم‌مرغی و یا تزریق زیر جلدی در یک روزگی هیچ اثر ایمنوساپرسیو معناداری در جوجه‌های گوشتی ندارد. پیش از چالش، تفاوت معناداری در بین گروه‌هایی که واکسن گامبورو و نیوکاسل را دریافت نموده بودند با گروهی که فقط واکسن نیوکاسل را دریافت نموده بود، وجود نداشت (جدول ۱). پس از چالش، میانگین تیترا در تمامی گروه‌های واکسینه بالا رفت. میانگین هندسی تیترا HI نیوکاسل در هر ۵ گروه تفاوت معناداری در روزهای ۱ و ۷ نشان نداد. در سن ۱۴ روزگی، میانگین تیترا گروه یک به میزان معناداری بیشتر از سایر گروه‌ها بود. در روزهای ۲۱ و ۲۸، میانگین تیترا در پرنده‌های واکسینه نشده به میزان معناداری کمتر از گروه‌های یک تا چهار بود. گروه‌های یک و دو که واکسن ایمنوکمپلکس را از طریق تلقیح داخل تخم‌مرغ دریافت نموده بودند در روزهای ۱۴، ۲۱، ۳۸ و ۴۱ تفاوت معناداری داشتند. تیترا میانگین گروه یک که واکسن سویه انتروپیک آپاتوزن و وروس نیوکاسل را دریافت نموده بودند، به میزان معناداری کمتر از گروه‌های ۲ و ۴ بود. این تفاوت می‌تواند ناشی از کارایی کمتر یک دُز واکسن نیوکاسل با سویه انتروپیک آپاتوزن باشد. تیترا میانگین پرنده‌ها در گروه‌های ۲، ۳ و ۴ در فواصل یک هفتگی تا انتهای آزمایش به صورت معناداری باهم متفاوت نبود. تمامی پرنده‌های گروه کنترل (گروه ۵) تا روز ۱۴ پس از چالش تلف شدند.

میزان تلفات در گروه کنترل به صورت معنی‌داری بالا بود که نشانگر ارزش واکسیناسیون در مقابله با سویه حاد بیماری نیوکاسل بود (جدول ۲). سیف و همکاران در سال ۲۰۰۳ هم تلفات بالا در پرنده‌های ایمن نشده و چالش داده شده با سویه‌های حاد بیماری نیوکاسل گزارش نمودند. هیچ تفاوت معنی‌داری در میزان تلفات گروه‌های واکسینه شده با واکسن ایمنوکمپلکس مشاهده نشد. پرنده‌های گروه ۴ که فقط واکسن نیوکاسل دریافت نموده بودند تلفات مقداری کمتر در مقایسه با گروه‌هایی واکسن گامبورو را پیش از نیوکاسل دریافت نموده بودند داشتند اما با این حالت تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود. تفاوت معناداری از لحاظ وزن‌گیری در بین پرندگان گروه‌های مختلف تا پایان مطالعه مشاهده نشد.

اطلاعات علمی

CEVAC Transmune®

جوجه‌هایی که در سنین اولیه درگیر بیماری بارس عفونی می‌شوند، نسبت به گستره وسیعی از عفونت‌های باکتریایی، پروتوزوایی و ویروسی حساس‌تر می‌شوند. همان‌گونه که پیش از این گزارش شده است، ضعف ایمنی ناشی از بیماری بارس عفونی بر ایمنی‌زایی واکسن‌ها اثرات منفی دارد. میزان پاسخ ایمنی به واکسن نیوکاسل همواره به‌عنوان شاخصی برای سنجش میزان قدرت ساپرس ایمنی واکسن‌های گامبوروا استفاده شده است. سویه مورد استفاده در واکسن گامبوروا نقش مهمی در قابلیت ایمنو ساپرس سبب بودن آن دارد. دیده شده که سویه‌های کم حدت بیماری بارس عفونی نقش ایمنو ساپرس سبب کمتری دارند؛ این در حالیست که سویه باحدت بیشتر قابلیت القای ضعف ایمنی را دارند. مطالعات محققین نشان می‌دهد که استفاده از اینترمدیت می‌تواند آتروفی خفیف به همراه ضایعات ماکرو سکوپیک محدودی در بارس ایجاد کند اما منجر به ایجاد ضعف ایمنی نمی‌شود. آن‌ها نتیجه گرفتند که ضایعات شدید بارس (از جمله آتروفی شدید بارس به همراه ضایعات ماکرو سکوپیک زیاد) برای القای ضعف ایمنی ضروری و لازم است.

پیش از این محققین مختلف تیتراژ پائین‌تر ناشی از واکسیناسیون نیوکاسل متعاقب واکسیناسیون علیه گامبوروا را گزارش نموده‌اند که با نتایج مطالعه حاضر قابل مقایسه نیست. به غیر از یک گروه، مطالعه حاضر تفاوت معناداری در تیتراژ HI نیوکاسل در بین گروه‌های واکسینه شده و واکسینه نشده بر علیه گامبوروا مشاهده نشد. گروهی که فقط یک واکسن انتروتروپ آپاتوزن را دریافت کرده بود، در مقایسه با گروهی که واکسن‌های B1 و لاسوتا را دریافت کرده بودند به میزان معنی‌داری تیتراژ پائین‌تری داشت. با اینحال این تفاوت ارتباطی با اثرات واکسن بیماری بارس عفونی نداشت.

جدول ۱: تیتراژ HI میانگین در گروه تیمار و شاهد

گروه	سن (روز)					
	۱	۷	۱۴	۲۱	۲۸	۳۸
۱	۶,۷۵	۴,۶	۴,۹	۴,۶	۳,۹	۵
۲	۶,۷۵	۵,۲	۴	۳,۸	۴,۲	۷,۹
۳	۶,۱۵	۵,۳	۴,۱	۳,۸	۴,۲	۶,۹
۴	۶,۱۵	۵,۲۵	۴	۳,۹	۳,۹	۶,۹
۵	۶,۱۵	۵,۱	۳,۷	۲,۵	۱,۴	-

برنامه واکسیناسیون هر گروه ۶۰ قطعه‌ای به شرح ذیل است: گروه ۱= واکسن ایمنوکمپلکس به صورت تلقیح داخل تخم مرغی + سویه انتروتروپیک آپاتوزن نیوکاسل؛ گروه ۲= واکسن ایمنوکمپلکس به صورت تلقیح داخل تخم مرغی + B1 + لاسوتا؛ گروه ۳= واکسن ایمنوکمپلکس به صورت تزریق زیر جلدی + B1 + لاسوتا؛ گروه ۴= B1 + لاسوتا؛ گروه ۵= بدون واکسیناسیون

جدول ۲: میزان تلفات گروه‌های تیمار و شاهد

گروه	روز بعد از چالش					
	۱	۳	۶	۹	۱۲	۱۴
۱	۰	۱	۶	۶	۶	۶
۲	۰	۰	۸	۸	۸	۸
۳	۰	۱	۷	۷	۷	۷
۴	۰	۰	۴	۴	۴	۴
۵	۰	۲۳	۴۸	۴۸	۴۹	۵۰

منابع

- Allan, W.H., Faragher, J.T. and Cullen, G.A. (1972) Immuno-suppression by the infectious bursal agent in chickens Immunized against New castle disease. *Vet Rec* 90:511-512.
- Corley, M. and Giambone, J. J. (2002) Immunosuppression in Specific-Pathogen-free broilers administered infectious bursal disease virus vaccines by in ovo route. *Avian Dis* 46:810-815.
- Corley, M., Giambone, J.J. and Dormitorio, T.V. (2001) Detection of infectious bursal disease vaccine viruses in lymphoid tissues after in ovo vaccination of specific- pathogen- free embryos. *Avian Dis* 45:897-905.
- Corley, M., Giambone, J.J. and Dormitorio, T.V. (2002) Evaluation of the immune response and detection of infectious bursal disease viruses by reverse transcriptase – polymerase chain reaction and Enzyme- Linked Immunosorbent Assay after in ovo vaccination of commercial broilers. *Avian Dis* 46:803-809.
- Giambone, J.J. and Clay, R.P. (1986) Evaluation of the immunogenicity, stability, pathogenicity, and immunodepressive potential of four commercial live infectious bursal disease vaccines. *Poult Sci* 65:1287-1290.
- Kelemen, M., Forgach, K., Ivan, J., Palya, V., Soveges, T., Toth, B. and Meszaros, J. (2000) Pathological and immunological study of an in ovo complex vaccine against infectious bursal disease. *Acta Vet Hung* 48:443-454.
- Mazariegos, L.A., Lukert, P.D. and Brown, J. (1990) Pathogenicity and immunosuppressive properties of infectious bursal disease “intermediate” strains. *Avian Dis* 34:203-208.
- Muskett, J.C. and Hopkins, I.G. (1979) Comparison of two infectious bursal disease vaccine strains: Efficacy and potential hazards in susceptible and maternally immune birds. *Vet Rec* 104:332-334.
- Saif, Y.M. (1991) Immunosuppression induced by infectious bursal disease virus. *Vet Immunol Immunopathol* 30:45-50

Lukert, P.D. and Saif, Y.M. (2003) Infectious bursal disease, in: Diseases of poultry, 11th Edition (Y. M. Saif, H. J. Barnes, J. R. Glisson, A. M. Fadly, L.R. MC Dougald and D. E. Swayne eds), pp: 161-179, Iowa: Iowa State Press.

Sharma, J.M., Dohms, J.E. and Metz, A.L. (1989) Comparative pathogenesis of serotype 1 and variant serotype 1 isolates of infectious bursal disease virus and the effect of those viruses on humoral and cellular immune competence of specific pathogen free chickens. Avian Dis 33:112-124.

Sharma, J.M., Karaca, K. and Pertile, T. (1994) Virus-induced immunosuppression in chickens. Poul Sci 73:1082-1086

Sharma, J.M., Kim, I.J., Rautenschlein, S. and Yeh, H.Y. (2000) Infectious bursal disease virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression. Dev Comp Immunol 24:223-235.

تعیین هویت مولکولی ویروس‌های بیماری بارس عفونی جدا شده از ایران^{۲۳}

S.D. Hosseini¹, A.R. Omar², I. Aini²

1 Research Center of Animal Science and Natural Resources, Arak, Iran. 2 University of Putra, Malaysia

با استفاده از روش RT-PCR بخش A ژنوم ویروس بیماری بارس عفونی تکثیر و تعیین توالی شد و سپس سکانس‌های حاصله با سکانس‌های ۲۶ ایزوله ویروس بیماری بارس عفونی جدا شده از سراسر دنیا مقایسه شدند. جدایه‌های ایرانی ۲۸ تفاوت اسید آمینه‌ای منحصر به فرد را نشان دادند. به‌علاوه ۹ تفاوت معمول در اسیدهای آمینه نیز شناسایی شد که به شرح ذیل می‌باشند: ۳ تفاوت در VP2 (222 Ala, 256 Ile and 294 Ile)، ۳ تفاوت در VP4 (685 Asn/Ser, 715 Ser and 751 Asp)، ۲ تفاوت در VP3 (990 Val and 1005 Ala) و ۱ تفاوت در VP5 (49 Arg). آنالیز فیلوژنتیکی نشان داد که جدایه‌های ایرانی قرابت نزدیکی به جدایه‌های بسیار پر حدت ویروس بیماری بارس عفونی جدا شده از سایر کشورهای آسیایی دارند. با این حال، این ویروس‌ها می‌توانند منشا مشترکی با تمامی ویروس‌های پرحدت جدا شده از سراسر دنیا نیز داشته باشند.

² Acta Virologica, 2004, 48: 79-83

تعیین هویت سه جدایه ویروس بیماری بارس عفونی جدا شده از مرغان تخم‌گذار در

ایران^۲

M.A. Bahmaninejad¹, M. Hair-Bejo², A.R. Omar², I. Aini², R. Toroghi³

1 Department of Poultry Disease Research and Diagnosis, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Tehran, Iran. 2 University of Putra, Malasia. 3 Department of Veterinary Research and Biotechnology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, P.O. Box 91735-14, Mashhad, Iran.

سه ویروس بیماری بارس عفونی از موارد شیوع این بیماری در گله‌های تخم‌گذار واکسن خورده و واکسن نخورده جدا سازی شد. به منظور جدا سازی و تعیین هویت ویروس‌های بیماری بارس عفونی از روش‌های آگار ژل پر سیپیتا سیون (AGP)، رنگ آمیزی ایمنو پراکسیداز، بررسی توسط میکروسکوپ الکترونی (TEM)، تلقیح داخل تخم‌مرغ جنین‌دار و کشت بر روی سلول‌های فیروبلاست جنینی استفاده شد. با استفاده از روش‌های RT-PCR و به دنبال آن RFLP و نهایتاً بررسی‌های فیلوژنتیکی، ویروس‌های جداسازی شده جز ویروس‌های بسیار پرحدت بیماری بارس عفونی (vVLBDV) تشخیص داده شدند. این ویروس‌ها شباهت نوکلئوتیدی ۹۶٫۳٪ تا ۹۹٫۸٪ با سایر سویه‌های vVIBDV داشتند. از این مطالعه نتیجه‌گیری شد که جدایه‌های بسیار پرحدت ویروس بیماری بارس عفونی جدا شده از ایران در سروتیپ یک با منشأ اروپا، ژاپن و چین حضور دارند.

² Acta Virologica, 2008, 52: 167-174.



ارزیابی روش های مختلف استفاده از واکسن کمپلکس ایمنی بیماری بورس عفونی بر

عملکرد آن در جوجه های گوشتی^{۲۵}

صدرزاده اوستا^۱، پیغمبری سید مصطفی^۲، اشرفی هلان جواد^۱

۱ گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار، گرمسار، ایران؛ ۲ گروه علوم درمانگاهی،

دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

روش ترجیحی برای بهره مندی از مزایای واکسن های کمپلکس ایمنی، تزریق به داخل تخم مرغ جنین دار است که مستلزم در اختیار داشتن دستگاه های بسیار پیشرفته تزریق می باشد و امکان استفاده از آنها هنوز بطور گسترده فراهم نیست. در این مطالعه عملکرد یک واکسن کمپلکس ایمنی برای بیماری بورس عفونی به دنبال استفاده با روش تزریق داخل تخم مرغی در روز ۱۸ جنینی و تزریق زیرجلدی در روز تفریح با بررسی چهار شاخص: میانگین وزن پایانی، پاسخ پادتن، نسبت وزن بورس به وزن بدن و نمره جراحات میکروسکوپی بورس فابرسیوس مقایسه شده است. روش استفاده از واکسن در القاء پاسخ پادتن در نوبت های متوالی عیارسنجی الایزا به جز در ۱۸ و ۲۵ روزگی تفاوت آماری معنی داری را بین دو گروه موجب نگردید. ویروس واکسن در نمونه های ۳۲ روزگی و پس از آن، در گروه های واکسینه بدون در نظر گرفتن روش استفاده، در مقایسه با گروه کنترل موجب کاهش معنی دار ($P \leq 0.05$) در نسبت وزن بورس فابرسیوس به وزن بدن شد، اما تفاوت این نسبت بین دو گروه واکسینه در تمامی نوبت های نمونه گیری معنی دار نبود. بررسی آسیب شناسی ریزیبینی نمونه های فرآوری شده بورس فابرسیوس در اکثر نوبت های نمونه گیری تفاوت معنی داری ($P \leq 0.05$) را در نمره جراحات ریزیبینی بین گروه های واکسینه با گروه کنترل نشان داد. اما این تفاوت در دو گروه واکسینه، به جز در نمونه های ۸ روزگی معنی دار نبود ($P > 0.05$). مقادیر وزن به دست آمده در پایان مطالعه بین دو گروه واکسینه و نیز بین آن ها با گروه کنترل تفاوت آماری معنی داری نشان داد ($P \leq 0.05$). از این مطالعه می توان نتیجه گرفت که واکسیناسیون به روش تزریق زیرجلدی در روز تفریح می تواند با حفظ عملکرد واکسن کمپلکس ایمنی، به عنوان جایگزینی برای روش تلقیح داخل جنینی آن باشد.

^{۲۵} مجله میکروبیولوژی دامپزشکی، ۱۳۹۳، دوره ۱۰، شماره ۱، صفحات ۲۶-۱۷.



تشخیص سریع جدایه های فوق حاد ویروس بیماری بوریس عفونی با استفاده از RT/PCR

بر روی ژن VP1 و بررسی خصوصیات مولکولی ژن VP1 در تعدادی از ویروس های جدا شده^{۲۶}

ابوالفضل غنی ئی، سید مصطفی پیغمبری

گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران-ایران

بیماری بوریس عفونی واگیری بالایی داشته و در ماکیان جوان تلفات و سرکوب ایمنی ایجاد می کند. جدایه های فیلدی بیماریزای سروتیپ ۱ را می توان به کلاسیک حاد، واریانت آنتی ژنیک و خیلی حاد تقسیم بندی نمود. توسعه روشی ساده، سریع و دقیق برای تعیین هویت آنتی ژنیک ویروس های بوریس عفونی از اهمیت ویژه ای در صنعت طیور برخوردار می باشد. یک تست RT-PCR برای تکثیر قطعه ای از ژن VP1 (۷۱۵ جفت باز) از جدایه های ایرانی ویروس در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفته است. تعداد ۲۰ نمونه از مجموع ۲۶ نمونه ای که در این مطالعه روی آن ها کار شد، در این تست مثبت بودند. تعیین هویت مولکولی شش جدایه با استفاده از قطعه تکثیری VP1 و VP2 (مطالعه قبلی) متفاوت بود. این تناقض در نتایج را می توان با پدیده بازآرایی مرتبط دانست. تعداد سه جدایه ویروس بیماری بوریس عفونی توالی یابی شد و با توالی های منت شر شده از ژن VP1 سویه های مختلف ویروس بوریس عفونی در بانک ژن مقایسه شدند. توالی نوکلئوتیدی و اسید آمینه ای سویه های ایرانی شباهت زیادی با یک سویه اروپایی (Holland)، سویه های جنوب شرق آسیا، و یک سویه ترکیه ای (OA/G1) داشتند. تعداد ۲۳ اختلاف نوکلئوتیدی بین سویه های فوق حاد (بجز IL و PT) و سویه های دیگر مشاهده شد. در سطح اسید آمینه ای تعداد این اختلافات دو عدد بود. تفاوت های اسید آمینه ای بین سویه های فوق حاد و سایر سویه ها را می توان بعنوان مارکرهای بالقوه حدت لحاظ نمود. در رسم درخت ژنی سه سویه ایرانی در کنار سویه های فوق حاد قرار گرفتند. این تست RT-PCR را می توان به طور موثری برای شناسایی سویه های فوق حاد ویروس بیماری بوریس عفونی به کار برد.

^{۲۶} پایان نامه جهت اخذ دکترای تخصصی بهداشت و بیماری های طیور، ۱۳۹۰



مطالعه پاتوژنیسیته و پروفایل آنزیم محدود کننده جدایه اخیر ویروس بارس عفونی از

ایران^{۲۷}

A.H. Shoshtari¹, S.A. Pournakhsh¹, H.A. Dadras², M.A. Bahmaninejad¹ and R. Toroghi¹
1 Department of Avian Medicine, Razi Vaccine and Serum Research Institute, PO.Box: 11365-1558; 2
Faculty of Veterinary Medicine, University of Shiraz

پاتوژنیسیته جدایه اخیر ویروس بیماری بارس عفونی، IR499، جدا شده از یک گله واکسینه نشده با ۱۷,۵ درصد تلفات در پرنده‌های SPF، جنین ماکیان و جوجه‌های گوشتی بررسی شد. همچنین تعیین هویت مولکولی این ویروس با استفاده از الگوی آنزیم محدود کننده نیز تحت مطالعه قرار گرفت. تلفات ایجاد شده توسط این ویروس در جوجه‌های SPF و جوجه‌های گوشتی به ترتیب ۸۵ درصد و ۲۲ درصد بود. شاخص وزن بارس در ۴ و ۹ روز بعد از تلقیح، برای پرنده‌های SPF به ترتیب ۴,۷ و ۱,۲ و برای جوجه‌های گوشتی حساس ۱,۷ و ۰,۷ بود. ضایعات کالبدگشایی شامل خون‌ریزی متوسط تا شدید بارس بود. محصول ۶۴۳ جفت بازی RT-PCR تکثیر شده و سپس از nested PCR برای تکثیر محصول ۵۵۲ جفت بازی استفاده شد. محصول ۵۵۲ جفت بازی با آنزیم‌های محدود کننده *SspI*، *StuI*، *HhaI* و *SacI* هضم شدند. الگوی هضمی به صورت *SspI* و *StuI* مثبت و *HhaI* و *SacI* منفی بود. نتایج حاصل تست پاتوژنیسیته و الگوس هضم آنزیمی در روش RFLP همگی نشانگر این موضوع هستند که ویروس IR499 یک ویروس بسیار پرحدت بیماری بارس عفونی می‌باشد.

² Arch. Razi Ins. 2004, 58: 9-18 ⁷

مطالعه تجربی پاتوژنز یک جدایه بسیار حاد ویروس بیماری بورس عفونی در مراحل

اولیه ایجاد عفونت به روش ایمونوهیستوشیمی^{۲۸}

سیاوش حقیقی زهرامینو^۱، توسلی عباس^۱، شوشتری عبدالحمید^۲، بهمنی نژاد محمدعلی^۲، مرجانمهر

سیدحسین^۱

۱ بخش پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران؛ ۲ بخش بیماری‌های طیور، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران

در این مطالعه جدایه IR499 از ویروس بیماری بورس عفونی، به منظور بررسی دقیق‌تر روند بیماری‌زایی و تعیین خصوصیات ویروس از لحاظ حدت، در مراحل اولیه بعد از عفونت، به روش ایمونوهیستوشیمی و با نشان دادن روند ظهور و بروز آنتی ژن ویروسی، در بافت‌های بدن جوجه‌های SPF مورد ارزیابی تجربی قرار گرفت. بدین منظور تعداد ۱۵ قطعه جوجه چهار هفته، با ویروس بسیار حاد IR499 به میزان 10^3 EID₅₀ در ۱۰۰ میکرولیتر، به روش چشمی / بینی تلقیح شدند. تعداد ۵ قطعه جوجه نیز به عنوان گروه کنترل با مقدار مساوی PBS، تلقیح شدند. پس از خونگیری، در ساعات ۳، ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ بعد از تلقیح ویروس از ارگان‌های بورس، لوزه‌های سکومی، کبد، طحال، تیموس و عضله ران، نمونه برداری به منظور رنگ آمیزی ایمونوپراکسیداز صورت گرفت. در این مطالعه آنتی ژن ویروس اولین بار ۳ ساعت بعد از تلقیح ویروس در سلول‌های منفی لوزه-های سکومی (ارگان مطلوب ویروس برای تکثیر اولیه) و سلول‌های کوپفر کبد پدیدار گردید. سیگنال‌های مثبت حاکی از وجود ویروس در بورس، اولین بار ۶ ساعت بعد از تلقیح مشاهده شد که بیانگر وقوع ویرمی اولیه است. پس از ویرمی ثانویه، ویروس برای اولین بار، ۱۲ ساعت بعد از تلقیح در طحال و تیموس دیده شد. این یافته‌ها در مراحل ابتدایی عفونت ویروس IR499، این سویه را به‌عنوان یک سویه بسیار حاد ویروس گامبورو با روند بیماری‌زایی گسترده و سریع در سطح *in vivo* تایید نمود.

² Iranian Journal of Veterinary Research, 2007, 10(2): 125-131.



دلایل افزایش تمایل استفاده از واکسن های ایمنو کمپلکس گامبورو در پیشگیری از

بیماری بورس عفونی (گامبورو)

Gardin.Y et al 2008 WPDC

چکیده:

مشکلات عدیده ای که سد راه موفقیت در ایمن سازی جوجه ها علیه بیماری گامبورو می باشد، شامل:

- تفاوت در میزان ایمنی مادری انتقال یافته به هر جوجه و نامشخص بودن میزان آنتی بادی مادری در سن واکسیناسیون موجب می شود که دریافت واقعی واکسن توسط یکایک پرندگان امکان پذیر نباشد. تعیین زمان مناسب واکسیناسیون علیه گامبورو، نیازمند بررسی دقیق سرمی به روش الایزا می باشد که عموماً کمتر مورد توجه قرار می گیرد.
- روش مصرف واکسن به صورت آشامیدنی نیز به خودی خود پرمخاطره بوده و موفقیت آن به عوامل متعددی همچون: کیفیت آب مصرفی، خنثی سازی مناسب کلر آب، توزیع یکنواخت محلول واکسن در سالن و دریافت دُز کامل واکسن توسط هر پرنده بستگی دارد. در نتیجه کیفیت نامطلوب واکسیناسیون در روش آشامیدنی دور از انتظار نیست.

در برخی شرکت های بزرگ تولیدکننده طیور، میزان شکست واکسیناسیون به روش آشامیدنی بر اساس مشکلات عنوان شده در بالا، به ۵۰-۳۰ درصد گله می رسد. ساخت و توسعه واکسن گامبورو و ایمنو کمپلکس ترنس میون با هدف مقابله با چنین مشکلاتی صورت گرفته است:

- این واکسن با استفاده از دستگاه های اتوماتیک در جوجه کشی تزریق می شود و امکان بررسی دریافت دُز کامل واکسن به سادگی وجود دارد. از ویژگی های دیگر این روش می توان به سرعت بالای واکسیناسیون و کاهش استرس اشاره نمود. واکسن ترنس میون را می توان به روش زیرجلدی در پرندگان تازه هچ شده یا به روش تلقیح داخل تخم مرغی به جنین ۱۸ روزه تزریق نمود.

اطلاعات علمی

CEVAC Transmune®

- فرمول به کار گرفته شده در کمپلکس ایمنی، ویروس واکسن را در مقابل ایمنی مادری محافظت کرده و در نتیجه ویروس واکسن در حضور ایمنی مادری خنثی نمی‌شود و دریافت واکسن در یکایک پرندگان به شکل کامل صورت می‌گیرد.
- به طور کلی واکسن ترنسمیون ترکیبی معین و متناسب از ویروس کلاسیک اینترمدیت پلاس تخفیف حدت یافته از سویه Winterfield 2512 و آنتی سرم هیپرایمیون علیه آن می‌باشد. این دو بخش واکسن به ترتیب در تخم مرغ های SPF و جوجه‌های SPF تهیه می‌شوند. محصول نهایی این ترکیب به شکل واکسن زنده لیوفیلیزه در می‌آید.

پس از تزریق به پرنده، این کمپلکس ایمنی توسط سلول‌های دندرتیک فولیکولی طحال به دام افتاده و ویروس واکسن به آرامی از این مکان آزاد می‌گردد. در نتیجه با افزایش سن پرنده، زمانی فرا می‌رسد که سطح ایمنی مادری تا حد معینی افت کرده و ویروس آزاد شده توانایی دستیابی به بورس فابرسیوس و کلونیزه شدن در آن را پیدا خواهد کرد، در آن زمان بلافاصله تکثیر یافته و ایمنی فعال را ایجاد می‌کند. این واکسن از لحاظ اثربخشی و بی‌خطری در سطح گسترده‌ای در کشورهای مختلف مورد بررسی قرار گرفته است. برای مثال، بررسی‌های وسیعی در برزیل نشان دهنده بهبود وضعیت فاکتورهای عملکردی گله با استفاده از واکسن ترنسمیون در مقایسه با روش آشامیدنی بوده‌اند. افزون بر این، بررسی‌های سرولوژیک در سن کشتار نشان دهنده دریافت کامل و یکنواخت واکسن ترنسمیون در مقایسه با دریافت ناقص و غیریکنواخت واکسن در روش آشامیدنی می‌باشد.

دلایل افزایش تمایل استفاده از واکسن های ایمونوکمپلکس گامبورو در پیشگیری از بیماری بورس عفونی (گامبورو)^{۲۹}

Y. Gardin¹, V.Paly², and R.Soaes¹

1 Ceva Sante Animale, Liborne, France ; 2 Ceva Phylaxia, Budapest, Hungary

مقدمه

ضرورت و اهمیت واکسیناسیون صحیح به منظور پیشگیری از ابتلا به بیماری گامبورو بر کسی پوشیده نیست. برای تقریباً نیم قرن است که استفاده موفقیت آمیز از واکسن های گامبورو در شرایط فارمی با مشکلاتی مواجه بوده است و شکست واکسیناسیون در موارد زیادی رؤیت شده و بیماری همچنان به صورت بالینی و یا تحت بالینی بروز می کند. عمده دلایلی که سبب شکست واکسیناسیون می گردند، عبارتند از:

(۱) وجود مقادیر متغیری از آنتی بادی های مادری (MDA) در زمان واکسیناسیون گله

(۲) مشکلات توزیع نامناسب واکسن به پرندگان در تمامی روش های واکسیناسیون گروهی و غیر انفرادی

حضور مقادیر متوسط یا کم آنتی بادی مادری در خون می تواند به شدت با واکسن های زنده تخفیف حدت یافته گامبورو در تداخل بوده و بطور کامل دریافت واکسن توسط پرنده را مهار کند. این رویداد بالاخص در مورد واکسن های اینترمدیت بیشتر صدق می کند؛ چرا که این نوع واکسن ها حساسیت بسیار بالایی به ایمنی مادری داشته و در حضور ایمنی مادری به ندرت قابلیت تکثیر دارند و همچنین از پرندگان واکسینه به شکل ضعیفی به سایر پرندگان انتقال می یابند. مطلوب ترین راه حل چنین مشکلی، بررسی سرولوژیکی آنتی بادی مادری در جوجه های یک روزه با هدف تعیین مناسب ترین زمان واکسیناسیون می باشد، اما این راه حل نیز هم زمان بر و هم هزینه بر بوده و در عمل به ندرت به درستی صورت می پذیرد. علی رغم تلاش های فراوان برای آموزش مرغداران و تکنیسین های فارم ها جهت اجرای کامل و صحیح واکسیناسیون علیه بیماری گامبورو، همچنان خطاهای فراوانی رخ می دهد. به طوریکه با استفاده از ابزارهای تشخیصی آزمایشگاهی، مشخص شده است که دریافت واکسن به روش آشامیدنی در ۵۰-۳۰ درصد جمعیت گله رخ نمی هد.

به دلیل وجود چنین مشکلاتی، واکسیناسیون در جوجه کشی توسط دستگاه های اتوماتیک با استفاده از واکسنی که تداخلی با ایمنی مادری ندارد، به عنوان ایده آل ترین روش واکسیناسیون علیه گامبورو محسوب می گردد. واکسن های نسل جدید

² 57th WPDC/XXXIII ANECA

³ Maternally derived antibodies

ایمونوکمپلکس و نو ترکیب گامبورو، امکان واکسیناسیون در جوجه کشی را فراهم آورده‌اند. در این مقاله تجربیات نویسندگان در ارتباط با واکسن نوع ایمونوکمپلکس (ترنسمیون) بیان می‌گردد.

واکسن گامبورو نوع کمپلکس ایمنی (ایمونوکمپلکس)

این واکسن چیست؟ این واکسن به عنوان واکسن کمپلکس آنتی ژن و آنتی بادی شناخته شده و همچنین از آن به عنوان واکسن کمپلکس ایمنی (ایمونوکمپلکس) یاد می‌شود. این نوع واکسن‌ها از ویروس تخفیف حدت یافته گامبورو (مشابه با ویروس واکسن‌های زنده) و سرم حاوی آنتی‌بادی‌های اختصاصی همولوگ آن تشکیل شده‌اند. بخش آنتی‌ژن (ویروس تخفیف حدت یافته) این واکسن با استفاده از تخم مرغ‌های جنین‌دار SPF و بخش آنتی‌بادی این واکسن با استفاده از جوجه‌های SPF تولید می‌گردد. سپس این دو بخش با یک نسبت معین با یکدیگر مخلوط می‌شوند. در واکسن ترنسمیون سویه ویروس گامبورو، Winterfield 2512 بوده و محصول نهایی به شکل لیوفیلیزه می‌باشد.

از آنجایی که آنتی‌بادی سبب مهار تکثیر ویروس در داخل تخم مرغ‌های جنین‌دار یا کشت بافتی می‌گردد، برای این محصول امکان تیتراسیون با روش‌های رایج وجود ندارد. از این رو آزمون بررسی اثربخشی واکسن، بر اساس سیستم ثبت اتحادیه اروپا، در جوجه‌های یک روزه نگهداری شده در ایزولاتورهای جداگانه صورت می‌گیرد. دریافت واکسن و تکثیر آن، بواسطه بررسی پاسخ آنتی بادی فعال در بدن پرنده قابل شناسایی می‌باشد. روش‌های دیگر معمول برای ارزیابی کارایی واکسن، واکسیناسیون جوجه‌های گوشتی تجاری و بررسی حضور و تکثیر ویروس در بورس می‌باشد.

مکانیسم کارکرد این کمپلکس چگونه است؟

بعد از تزریق داخل تخم مرغ یا تزریق زیرجلدی، کمپلکس آنتی‌ژن و آنتی‌بادی توسط سلول‌های دندریتیک طحال بدام می‌افتند. با افزایش سن پرنده و همزمان با کاهش آنتی‌بادی مادری، آنتی‌بادی متصل به ویروس واکسن نیز کاتابولیزه شده و ویروس واکسن به صورت مداوم و با تیتراژ معین وارد جریان خون می‌گردد. هنگامی که تیتراژ مادری به اندازه کافی کاهش یافت، ویروس واکسن می‌تواند به بورس رسیده و بلافاصله تکثیر یابد. در شرایط تحقیقاتی، هیبریداسیون ایمنی داخل بافتی جهت نشان دادن چنین پروسه‌ای استفاده می‌گردد.

بنابراین زمان آزادسازی و تکثیر به میزان آنتی‌بادی مادری در یک روزگی بستگی دارد، اگر آنتی‌بادی مادری کم باشد تکثیر زودتر رخ می‌دهد. در پرنده‌گان SPF تکثیر ۸ الی ۹ روز پس از واکسیناسیون آغاز می‌گردد. در حالی که در جوجه‌های گوشتی تکثیر حوالی سنین ۳ الی ۴ هفتگی صورت می‌گیرد. در واقع بر اساس سطح ایمنی مادری، کمپلکس باز شده و دریافت واقعی واکسن اتفاق می‌افتد.

این واکسن در طیور گوشتی تجاری با مقادیر متغیر ایمنی مادری مورد بررسی قرار گرفته و عدم خنثی‌سازی در حضور آنتی‌بادی مادری و قابلیت تکثیر ویروس به اثبات رسیده است.

این واکسن در فارم چگونه کار می‌کند؟

این واکسن در مطالعات فارمی متعدد در شرایط گوناگون چالشی همانند مطالعات گسترده در کشورهای درگیر با ویروس فوق حاد گامبورو (vVIBD) بررسی شده است. در تمامی شرایط اثربخشی عالی بوده و بی‌خطری آن به اثبات رسیده است. در مطالعات متعدد فارمی در برزیل مشخص گردید که میزان موارد درگیری به گامبورو در گله‌های واکسینه شده با واکسن ایمونوکمپلکس فقط رقمی در حدود ۰/۲٪ بوده است و عملکرد این گله‌ها نسبت به گروه دریافت کننده واکسن به روش آشامیدنی دارای بهبود در عملکرد بوده است.

نتایج مانیتورینگ دریافت واکسن توسط پرندگان با استفاده از تجهیزات آزمایشگاهی (هیستولوژی، سرولوژی، RT-PCR، RFLP، توالی‌یابی) یکنواختی بسیار خوبی در بین پرندگان دریافت کننده این واکسن را نشان می‌دهد. تقریباً در تمامی گله‌ها، تکثیر ویروس در سنین ۲۸-۲۱ روزگی مشاهده شد، در حالی‌که در گروه آشامیدنی نتایج بسیار متغیر بوده و در بسیاری موارد نشان‌دهنده شکست واکسیناسیون بوده است.

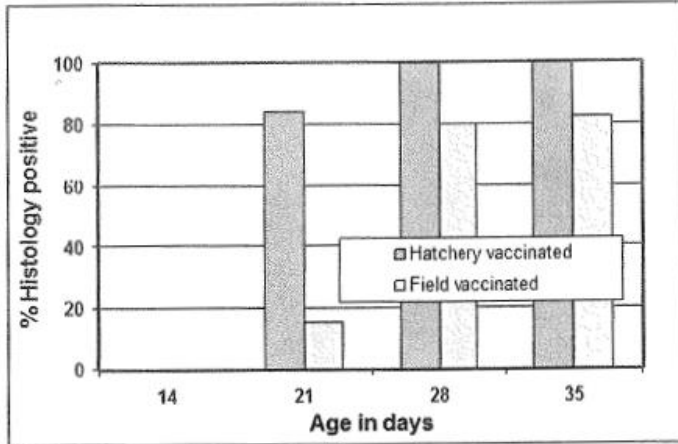
علل تمایل به استفاده از واکسن‌های کمپلکس ایمنی

عمده مزیت استفاده از واکسن‌های کمپلکس ایمنی، توانایی واکسیناسیون در حضور ایمنی مادری با استفاده از دستگاه‌های تزریق اتوماتیک داخل تخم‌مرغی یا زیرجلدی می‌باشد. در واقع واکسن با هر میزان ایمنی مادری سازگاری داشته و عدم یکنواختی در میزان آنتی‌بادی مادری تأثیری در عملکرد آن ندارد و به هنگام استفاده از این واکسن تیترگیری با الیزا برای تعیین سن واکسیناسیون لزومی ندارد. کنترل و اثبات یکنواختی دریافت واکسن در سطح گله، به راحتی با استفاده از تیتر سرولوژی در سن کشتار قابل انجام است.

پیامدهای کاربردی این روش واکسیناسیون، شامل سهولت در روش واکسیناسیون و عملکرد بهتر آن برای تولیدکننده می‌باشد که تنها با یک بار تزریق واکسن زنده گامبورو و بدون نیاز به تکرار آن واکسن به طور کامل توسط یکایک پرندگان دریافت می‌شود.

بررسی‌های وسیع واکسن ایمونوکمپلکس گامبورو در فارم نشان می‌دهد که واکسن از لحاظ سیستماتیک به‌خوبی در تمامی گله‌ها عمل می‌کند (نمودار شماره ۱). در حالی‌که نتایج کاملاً بر عکس در استفاده از روش آشامیدنی در فارم دیده می‌شود. تست‌های آزمایشگاهی و فارمی نشان می‌دهند که این واکسن توانایی ایجاد محافظت علیه تمامی اشکال بیماری گامبورو همچون اشکال حاد کلاسیک، تحت بالینی و همچنین بسیار حاد را دارد.

مزیت دیگر این واکسن امکان بررسی تکثیر ویروس واکسن و القا پاسخ ایمنی با استفاده از روش (هیستولوژی و سرولوژی) و نیز به روش (RT-PCR به همراه RFLP یا توالی‌یابی) می‌باشد. انتخاب یک روش ساده برای مانیتورینگ دریافت واکسن موجب اجرایی شدن آن در تمام کشورهای جهان می‌گردد.



نمودار شماره ۱: خلاصه‌ای از مطالعات هیستولوژیکی گله‌های واکسینه به روش تلقیح داخل تخم‌مرغی (در ۱۹ گله) با واکسن ایمونوکمپلکس در مقایسه با گله‌های واکسینه شده در فارم (به روش آشامیدنی در سن ۱۷ روزگی) با استفاده از واکسن اینترمدیت پلاس کلاسیک (در ۲۰ گله). حضور ضایعات در بورس نشان دهنده تکثیر ویروس واکسن می‌باشد که در ادامه توسط RT-PCR و توالی‌یابی قطعی می‌گردد. از هر گله به صورت هفتگی ۵ بورس فابرسیوس جمع آوری شد، در صورتیکه حضور علائم و ضایعات تیپیک حاصل از تکثیر ویروس گامبورو در یکی از این ۵ بورس مشاهده شود، گله از لحاظ هیستولوژی مثبت محسوب می‌شود.

منابع:

Balaguer J.L., Romeo F., Ccpero R., Lara C, Martino A., Rubio J.M., Gardin Y., Warm S., Paiya V., Comte S. Empleo de una nueva vacuna de tipo complejo inmune (rente a la enfermedad de Gumboro: resultados de campo. In proceedings XLIV Symposium científico de Avicultura AECA-WPSA, Valencia, Spain. October 24-26, 2007.

Gardin Y., Paiya V., Sesti L., Alva B., Warin S, Comte S. Hallazgos recientes de la enfermedad de Gumboro: los lotes mal vacunados no están protegidos! (Latest findings on Gumboro disease: not vaccinated flocks are not protected). In proceedings XX Congreso Latinoamericano de avicultura (XX Latin American Poultry Congress), Porto Alegre, Brazil. September 25-28, 2007.

مطالعه پاتولوژیکی و ایمونولوژی تلقیح داخل تخم مرغی واکسن‌های کمپلکس

بیماری بورس عفونی^۳

Kelmen M. et al. 2000

نتایج استفاده از واکسن Cevac® Transmune در پرندگان SPF

میزان جوجه‌درآوری در پرندگان SPF: گروه واکسینه ۹۷/۷٪؛ گروه کنترل ۹۰٪. افزایش اسکور هیستوپاتولوژی بورس پرندگان SPF گذرا (فقط در هفته ۲) بوده است، و علائم بهبودی در هفته‌های بعد مشاهده شد.

واکسن محافظت قوی بر علیه چالش با vvIBD در هفته‌های ۴ تا ۶ ایجاد نموده است. یک مطالعه دیگر پاسخ واضح آنتی بادی (VN) و محافظت کامل را در زمان چالش با vvIBD در سنین ۳ تا ۵ هفتگی را نشان داده است.

نتایج استفاده از واکسن Cevac® Transmune در پرندگان گوشتی

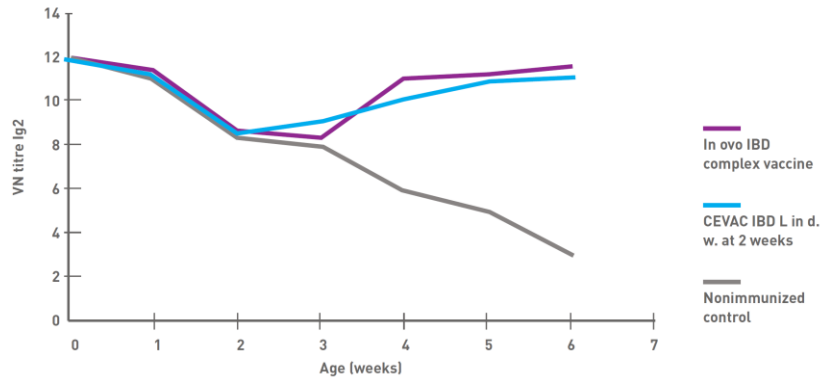
در شرایط فارمی، پاسخ آنتی‌بادی در پرندگان گوشتی واکسینه با روش تلقیح داخل تخم مرغی واکسن Cevac® Transmune از نظر زمان شروع پاسخ ایمنی (شروع پاسخ ایمنی در حداقل زمان ممکن) و میزان پاسخ ایمنی (میزان هر چه بیشتر پاسخ آنتی‌بادی) تقریباً مشابه پرندگان هابی بود که در شرایط آزمایشگاهی واکسن Cevac® IBD L را به صورت خوراکی در سن دو هفتگی دریافت نموده بودند.

³ Acta Veterinaria Hungarica 48(4): pp. 443-454 (2000)

اطلاعات علمی

CEVAC Transmune®

نتایج آزمایشات سرولوژی پرنده‌های گوشتی



محافظت بر علیه چالش ایجاد شده با wIBD در سنین ۵ و ۶ هفتگی در پرنده‌هایی که واکسن Cevac® Transmune را دریافت نموده بودند، بهتر از پرنده‌هایی بود که واکسن Cevac® IBD L را دریافت نمودند. هر دو گروه واکنشینه نتایج محافظتی بهتری نسبت به گروه کنترل داشتند (اطلاعات نمایش داده نشده است).

تلقیح داخل تخم‌مرغی واکسن Cevac® Transmune برای عملکرد سیستم ایمنی پرنده کاملاً بی‌مخاطره می‌باشد و این موضوع با واکنش‌های ND در زمان هج با بر علیه بیماری نیوکاسل، بررسی پروفایل این بیماری و همچنین چالش با ND در سن ۲۱ و ۳۳ روزگی بررسی شد.

چالش با نیوکاسل: سویه vvNDV هر تس ۳۳/۵۶ برای چالش پرنده‌ها در سن ۲۱ روزگی با دُز LD50 106 برای هر پرنده، ۰/۵ میلی‌لیتر، با روش تلقیح داخل عضلانی استفاده شد.

نتایج اولیه

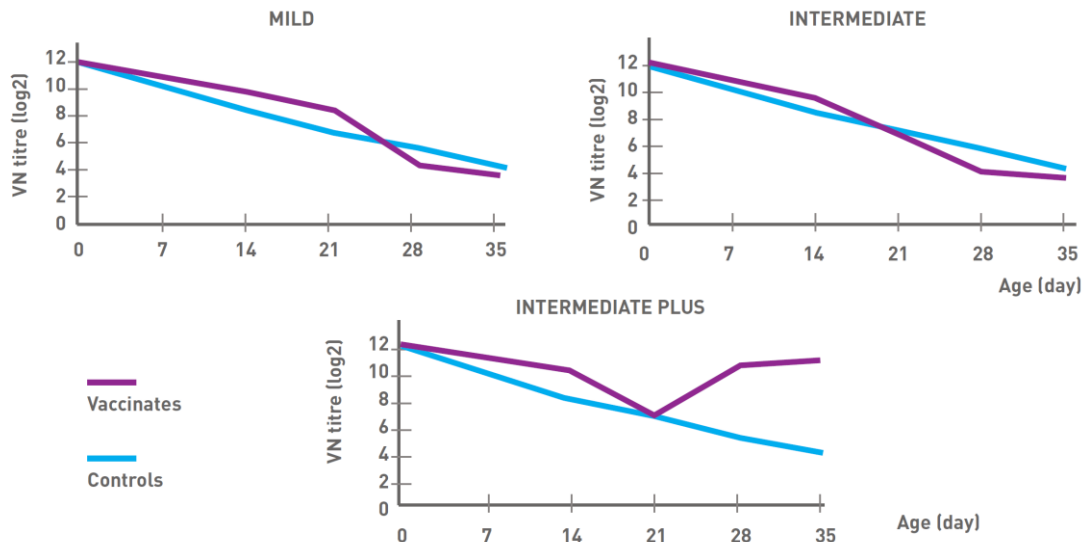
نتایج بی‌خطری و کارایی واکسن پس از تلقیح سویه مختلف IBDV (خود ویروس به تنهایی، بدون استفاده از آنتی‌سرم) به روش تلقیح داخل تخم‌مرغی در پرنده‌های گوشتی

سویه اینترمدیت پلاس Winterfield 2512	سویه اینترمدیت LIBDV	سویه ملایم G-87	
بله	خیر	خیر	اسکور هیستوپاتولوژی بورس (سن ۴-۵ هفتگی)
بله	خیر	خیر	آتروفی بورس (شاخص BB در سن ۳-۵ هفتگی)
بله	خیر	خیر	پاسخ آنتی بادی (سن ۴-۵ هفتگی)
بله	خیر	خیر	محافظت بر علیه چالش با wIBD (سن ۲-۵ هفتگی)
بله	بله	به	محافظت بر علیه چالش با ND در سن ۲۱ روزگی؛ پس از واکنش‌های ND در روز اول و IBD بصورت تلقیح داخل تخم‌مرغی

اطلاعات علمی

CEVAC Transmune®

پاسخ‌های ایمنی گوشتی‌های واکسینه شده بر علیه IBD با حدت‌های متفاوت به روش تلقیح داخل تخم‌مرغی



سویه Winterfield 2512 تنها سویه‌ای بود که در حضور آنتی‌بادی مادری توانست پاسخ قوی آنتی‌بادی را القا کند و بر علیه چالش محافظت ایجاد نماید. فرمولاسیون ترکیب واکسن کمپلکس ایمنی به‌نظر می‌رسد اثر بخشی بهتری نسبت زمان استفاده از سویه Winterfield 2512 به‌صورت تلقیح داخل مرغی داشت.

نتایج استفاده از واکسن Cevac® Transmune در پرند‌های SPF

جوجه‌درآوری در پرند‌های SPF: گروه واکسینه ۹۷/۷٪؛ گروه کنترل ۹۰٪. افزایش اسکور هیستوپاتولوژی بورس پرند‌های SPF گذرا (فقط در هفته ۲) بوده است، و علائم بهبودی در هفته‌های بعد مشاهده شد.

واکسن محافظت قویی بر علیه چالش با vvIBD در هفته‌های ۴ تا ۶ ایجاد نموده است. یک مطالعه دیگر پاسخ واضح آنتی‌بادی (VN) و محافظت کامل را در زمان چالش با vvIBD در سنین ۳ تا ۵ هفتگی را نشان داده است.

نتایج استفاده از واکسن Cevac® Transmune در پرند‌های گوشتی

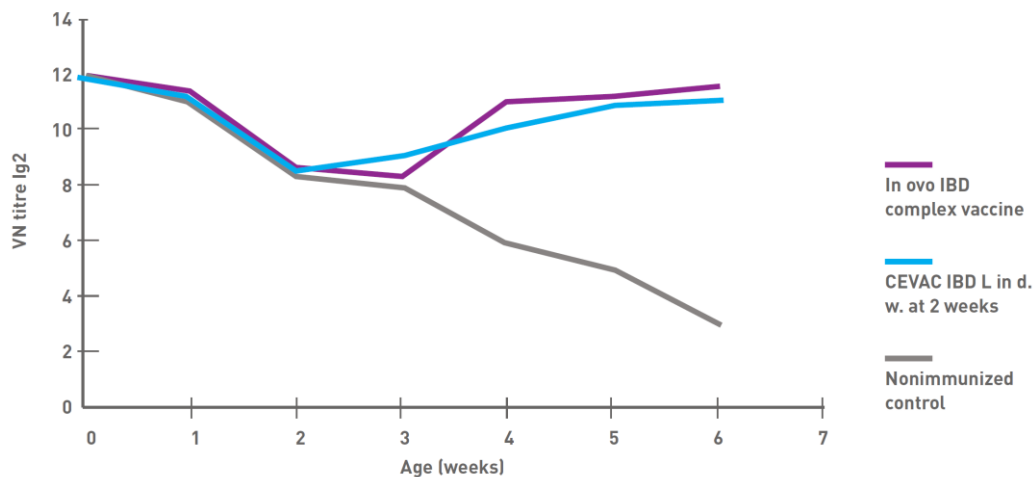
در شرایط فارمی، پاسخ آنتی‌بادی در پرند‌های گوشتی واکسینه با روش تلقیح داخل تخم‌مرغی واکسن Cevac® Transmune از نظر زمان شروع پاسخ ایمنی (شروع پاسخ ایمنی در حداقل زمان ممکن) و میزان پاسخ ایمنی (میزان هر چه بیشتر پاسخ

اطلاعات علمی

CEVAC Transmune®

آنتی‌بادی تقریباً مشابه پرنده‌هایی بود که در شرایط آزمایشگاهی واکسن Cevac® IBD L را به صورت خوراکی در سن دو هفتهگی دریافت نموده بودند.

نتایج آزمایشات سرولوژی پرنده‌های گوشتی



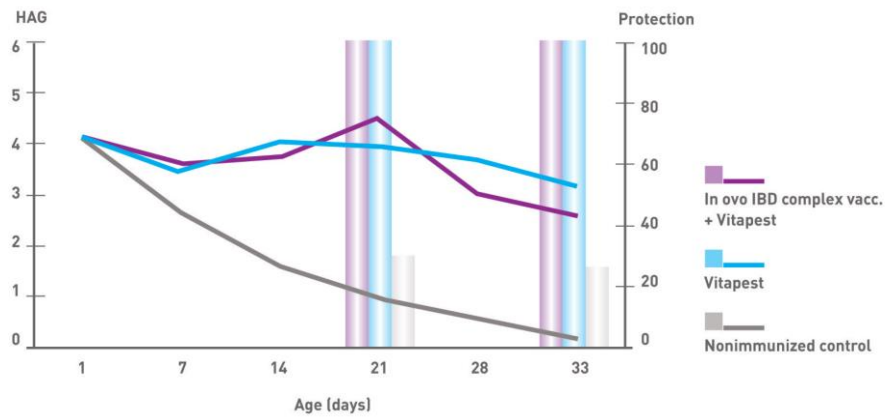
محافظت بر علیه چالش ایجاد شده با wIBD در سنین ۵ و ۶ هفتهگی در پرنده‌هایی که واکسن Cevac® Transmune را دریافت نموده بودند، بهتر از پرنده‌هایی بود که واکسن Cevac® IBD L را دریافت نمودند. هر دو گروه واکسینه نتایج محافظتی بهتری نسبت به گروه کنترل داشتند (اطلاعات نمایش داده نشده است).

تلقیح داخل تخم‌مرغی واکسن Cevac® Transmune برای عملکرد سیستم ایمنی پرنده کاملاً بی‌مخاطره می‌باشد و این موضوع با واکسیناسیون در زمان هچ با بر علیه بیماری نیوکاسل، بررسی پروفایل این بیماری و همچنین چالش با ND در سن ۲۱ و ۳۳ روزگی بررسی شد.

اطلاعات علمی

CEVAC Transmune®

اثر واکسیناسیون IBD به روش تلقیح داخل تخم مرغی و نتایج ایمن سازی با Vitapest در یک روزگی



چالش: در سن ۲۱ تا ۳۳

روزگی

دُز: 10^{60} LD₅₀ سویه Herts 33/56 بصورت تزریق داخل عضلانی

نتیجه گیری

نهایتاً تصمیم بر این شد که واکسن Cevac® Transmune به صورت یک واکسن ایمونوکمپلکس فرموله شده و با مخلوط سازی سرم هیپرایمن با IBDV سویه Winterfield 2512 تهیه گردد. بنابراین، به نظر می رسد که این بهترین ترکیبی است که هم بی خطر بوده و هم ایمنی قوی بر علیه بیماری بورس عفونی حتی در حضور آنتی بادی مادری در زمان هچ ایجاد می نماید.

مطالعه پاتولوژیکی و ایمونولوژی تلقیح داخل تخم مرغی واکسن‌های کمپلکس بیماری بورس

عفونی ۳۲

Maria Kelemen¹, Katalin Forgach¹, Judit Ivan², V. Palya¹, T. Suveges¹, B. Toth¹ and J. Meszaros²

1-CEVA-PHYLAXIA Veterinary Biologicals Co. Ltd., H-1107 Budapest, Szallas u. 5, Hungry; 2-Veterinary Medical Research Institute of the Hungarian Academy of Sciences, H-1581 Budapest, P.O. Box 18, Hungary

چکیده

با ظهور سویه بسیار پرحدت بیماری بورس عفونی (IBD) در اواخر سال‌های ۱۹۸۰، ضرورت بهبود دستورالعمل‌های ایمن‌سازی کارآمدتر را ایجاد نموده است. به منظور تسهیل این فرآیند، ایمونوژنیسیته و اثرات ایمنوساپرسیو سویه‌های با حدت ملایم (G-87)، با حدت اینترمدیت (LIBD) و باحدت اینترمدیت پلاس (IBDV 2512) با روش تلقیح داخل تخم‌مرغ جنین‌دار ۱۸ روزه SPF و گوشتی تجاری آزمایش شد. تفاوت قابل توجهی میان نرخ هیچ و وزن جوجه‌ها در زمان هیچ بین گروه‌های ایمن شده و کنترل وجود نداشت. هر چه سویه واکسینال مورد استفاده پر حدت‌تر، به همان نسبت آسیب به لنفوسیت‌های بورس فابرسیوس شدیدتر بود. در جوجه‌های SPF تیترا مانعت از هم‌آگلوتیناسیون (HI) القایی توسط واکسن بیماری نیوکاسل مورد استفاده در یک روزگی با افزایش حدت ویروس واکسینال IBD کاهش پیدا کرده است، این در حالیست که این اثرات در جوجه‌های گوشتی تجاری مشاهده نشد. علی‌رغم کاهش در تیترا HI، سطح محافظت (Protection) کاهش پیدا نکرده بود و اینگونه می‌توان گفت که در گروهی که سویه Hot را دریافت کرده اند، محافظت ایجاد شده بود. جوجه‌های SPF ایمن شده از طریق تلقیح داخل تخم مرغی واکسن کمپلکس تولید شده با سویه IBDV 2512 و آنتی بادی علیه IBD، میزان محافظت بر علیه بیماری نیوکاسل را همانند گروه گوشتی تجاری نشان دادند. در جنین‌های گوشتی که توسط تلقیح داخل تخم مرغ ایمن شده بودند، فقط سویه IBDV 2512 توانست تولید آنتی‌بادی را القا کند و این جوجه‌ها در هفته سوم بر علیه بیماری بورس عفونی محافظت شدند. واکسن‌های کمپلکس تلقیح شده در تخم‌مرغ، در فارم و هچری عملکرد موفقی داشته‌اند.

³ Acta Veterinaria Hungarica 48(4): pp. 443-454 (2000)

سویه بسیار پرحدت بیماری بورس عفونی (IBDV) که در اواخر سال‌های ۱۹۸۰ ظهور پیدا کرده است، موجب توسعه واکسن‌های کارآمدتر شد. تلاش‌ها در این زمینه دو هدف داشته‌اند: ابتدا، هدف گذاری ایجاد ایمنی در حداقل زمان ممکن بود زیرا فارم‌ها با ویروس بسیار پرحدت IBD آلوده بوده و این بیماری در سنین پائین‌تر ایجاد درگیری می‌نمود؛ دوم، توجه‌ها به استفاده از ویروس‌های واکسینال با حدت بالاتر معطوف شده بود تا بدین‌وسیله ایمن سازی کارآمدتری ایجاد گردد. با این حال، در زمان عدم حضور آنتی‌بادی مکفی، ویروس واکسینال پرحدت می‌تواند شدیداً به بورس فابرسیوس آسیب بزند. به‌منظور کاهش اثر ویروس بر بورس، زمان بهینه ایمن سازی می‌بایست بر اساس میزان اولیه آنتی‌بادی مادری محاسبه شود. از آنجائیکه سطوح آنتی‌بادی مادری در یک گله بسیار متفاوت است، سویه‌های واکسینال با حدت بالاتر (مثل سویه واکسن اینترمدیت پلاس) می‌توانند در جوجه‌هایی که دارای سطوح آنتی‌بادی مادری پائین‌تری هستند، ایجاد تضعیف ایمنی نمایند.

با استفاده از واکسینا سیون به صورت تلقیح داخل تخم مرغ جنین‌دار ۱۸ روزه ایمنی زودهنگام ایجاد می‌شود، از طرفی دیگر اثرات جانبی استفاده از ویروس بسیار ایمونوژن سویه اینترمدیت پلاس به واسطه همراهی آن با آنتی‌بادی‌های همولوگ اضافه شده به واکسن، پیش‌گیری می‌شود. بنابراین، تلقیح داخل تخم مرغ واکسن‌های کمپلکس نویدبخش راه حلی ایده آل هستند. استفاده از این روش ایمن سازی در حال گسترش می‌باشد. بنابراین، در این مقاله گستره وسیعی از مطالعات پاتولوژیکال و ایمونولوژیکال با استفاده از سویه‌های در دسترس واکسینال ترتیب داده شده است تا از این طریق یک سویه مناسب برای ایمن‌سازی بواسطه تلقیح داخل تخم مرغی انتخاب شود.

مواد و روش کار

پرنده‌ها، در برخی از آزمایشات از پرنده‌های SPF (SPAFAS) استفاده شده است. پرنده‌های گوشتی معمولی از آمیخته‌های راس (He-Ross)، جوجه کشی هریناد، مجارستان) یا کاب (Gallus Ltd.)، جوجه کشی دو سر، مجارستان) بودند. گله مادر جوجه‌های گوشتی بر علیه بیماری برونشیت عفونی، بیماری بورس عفونی و بیماری نیوکاسل ابتدا با واکسن زنده و پیش از تولید توسط واکسن کشته ایمن‌سازی شده بودند.

سویه ویروسی، ایمن‌سازی، جنین‌های ۱۸ روزه با استفاده از واکسن‌های زنده بیماری بورس عفونی با سویه‌های CEVA-Phylaxia Co Ltd: G-87 (سویه ملایم، CEVAC BURSA L)، LIBD (سویه اینترمدیت، CEVAC GUMBO L)، IBDV 2512 (سویه اینترمدیت پلاس، CEVAC IBD L) به ترتیب با دُزهای $10^{2.7-3}$ EID₅₀، $10^{3-3.3}$ TCID₅₀، $10^{1.8-2.3}$ EID₅₀ واکسینه شدند. تلقیح با استفاده سر سوزن با طول ۱،۲۵ اینچ و با گیج ۲۲ انجام شد. پرنده‌های ۱۴ روزه پس از دو ساعت محرومیت از آب، دُز 10^2 EID₅₀ واکسن CEVAC IBD L (اینترمدیت پلاس) را بصورت آشامیدنی دریافت نمودند. در این مطالعه برای هر پرنده ۱۰ میلی‌لیتر آب در نظر گرفته شد.

یک دُز واکسن کمپلکس (CEVAC TRANSMUNE IBD)، حاوی 10^2 EID₅₀ ویروس IBDV 2512 و ۲۰ واحد سرم ایمن تولید شده در پرنده‌های SPF بود. دُز سرم ایمن بر اساس روش حداد و همکاران در سال ۱۹۹۷ مشخص شد. در آزمایشگاه،

اطلاعات علمی

CEVAC Transmune®

واکسن به جنین‌های ۱۸ روزه با روش بالا تلقیح شد، این در حالیست که در طول کارآزمایی‌های بالینی تلقیح در جوجه‌کشی با استفاده از دستگاه تلقیح داخل تخم‌مرغ (Embrex) با دُز ۰/۰۵ میلی‌لیتر صورت گرفت.

در آزمایشگاه، جوجه‌های یک روزه با استفاده از ویروس آپاتوژن $10^{6.3}$ EID₅₀ (Vitapest, CEVA-Phylaxia Co. Ltd.) با روش داخل ملتحمه چشم (قطره چشمی) با حجم ۰.۳×۲ میلی‌لیتر بر علیه بیماری نیوکاسل ایمن شدند. در جوجه‌کشی واکسن یا به صورت آئروسول با دُز $10^{7.3}$ EID₅₀/m³ و با زمان مواجهه ۱۵ دقیقه استفاده شد و یا بصورت اسپری با دُز $10^{8.3}$ EID₅₀ برای ۱۰۰ جوجه با استفاده از سیستم واکسیناسیون بسته (تونل واکسینیشن) واکسینه شدند.

تشخیص درجه آسیب جنین، میزان هج و وزن جوجه در زمان هج برای جنین‌هایی که تلقیح داخل تخم‌مرغی دریافت نمودند در یک زمان مشخص برای همه مطالعات، نسبت بورس به وزن بدن، شاخص بورس به وزن بدن و اسکوربندی هیستولوژیک میزان آسیب به بورس مورد بررسی قرار گرفت.

تست کارایی. در زمان هج و روزهای ۷، ۱۴، ۲۱، ۲۸ و ۳۵ سرم‌های انفرادی از گروه جنین‌های ایمن شده و جنین‌های واکسینه نشده گروه کنترل جمع آوری و محتوای آنتی‌بادی بر علیه بیماری بیماراس عفونی با استفاده از روش خنثی‌سازی ویروس (VN) با دُز 200 TICD₅₀ ویروس بررسی شد.

چالش با استفاده از ویروس بسیار پرحدت بیماری بورس عفونی (vv IBDV) سویه MOH 94/9، جدا شده از یک همه‌گیری در مجارستان، با روش تلقیح ۰/۵ میلی‌لیتر به ازای هر پرنده با دُز 100 LD₅₀ ویروس به صورت خوراکی انجام شد. پرنده‌های تحت چالش برای ۷ روز مشاهده شدند. متوسط وزن‌گیری روزانه در طول زمان چالش با استفاده از تفاوت وزن بدن روز اول و ۷ روز بعد از چالش محاسبه شد.

مطالعه اثرات ایمونوساپرسیو. گروهی که تلقیح داخل تخم‌مرغ دریافت کرده بودند و گروه کنترل با روشی که در بالا شرح داده شد، بر علیه بیماری نیوکاسل ایمن شدند؛ سپس در ۲۱ روزگی میزان آنتی‌بادی بر علیه نیوکاسل در گروه‌ها محاسبه و چالش با ویروس پر حدت نیوکاسل انجام شد. میزان آنتی‌بادی بر علیه نیوکاسل با استفاده از تست ممانعت از هم‌آگلوتیناسیون با ۸ واحد هم‌آگلوتیناسیون ویروس انجام شد.

پرنده‌ها با میزان 10⁶ LD₅₀ ویروس حاد نیوکاسل سویه Hert 33/56 با تزریق ۰/۵ میلی‌لیتر به صورت داخل عضلانی چالش داده شدند. مدت مشاهده پرنده‌ها ۱۴ روز بود. پرنده‌هایی که از چالش زنده ماندند بودند و علائم بیماری نیوکاسل را نشان ندادند، ایمن تلقی شدند.

اثر سویه‌های واکسینال IBD یاد شده در بالا، ابتدا در پرنده‌های SPF و سپس جوجه‌های گوشتی بررسی شد. بر اساس نتایج که به دست آمد، مناسب‌ترین سویه برای تولید واکسن کمپلکس انتخاب شد. پرنده‌های SPF به دفعات با سویه‌های منتخب واکسینه شدند تا تیتراهای بالای آنتی‌بادی را به دست آورند. واکسن کمپلکس با اضافه کردن این آنتی‌بادی‌های تولید شده،

آماده شد و اثرات پاتولوژیکال و ایمونولوژیکال آنها در جنین‌های SPF و گوشتی ۱۸ روزه در شرایط فیلدی مورد مطالعه قرار گرفت.

نتایج و بحث

نرخ هیچ جنین‌های تخم‌مرغ‌های واکسینه نشده SPF و گوشتی، تخم‌مرغ‌هایی که تلقیح PBS و یا سویه واکسن IBD با حدت‌های متفاوت را دریافت نمودند، به استثناء گروهی که با سویه اینترمدیت و ویروس بیماری بورس عفونی LIBD (به ترتیب ۷۰ و ۸۰/۶ درصد) تفاوت واضحی در نرخ هیچ نداشتند. هیچ تفاوت معناداری هم حتی در وزن یک روزگی وجود نداشت. در جوجه‌های گوشتی، بیشترین تظاهرات ناشی از تفاوت حدت سه سویه واکسینال، غیر یکنواختی شاخص بورس به وزن بدن و اسکوربندی هیستولوژی بود (جدول ۱). این مهم نمایانگر این حقیقت است که ویروس IBDV 2517 موجب ایجاد ضایعه برگشت ناپذیر شدید به بورس فابرسیوس پرنده‌ها شد (جدول ۲). علی‌رغم این حقیقت، زمانی که پس از چالش در هفته‌های ۲ تا ۵، اسکور بافت شناسی بورس فابر سیوس پرنده‌هایی که از جنین‌های ایمن شده با تلقیح داخل تخم‌مرغ سویه‌های مختلف IBDV، با گروه کنترل (گروه ایمن نشده ولی تحت چالش قرار گرفته) مقایسه شدند، این یافته به دست آمد که هرچه سویه مورد استفاده برای تلقیح داخل تخم‌مرغی پرحدت‌تر باشد، به همان نسبت اسکور ناشی از چالش با ویروس پر حدت IBD کمتر متاثر خواهد شد. بر همین اساس، گروه ایمن شده با سویه IBDV 2512 مطلوب‌ترین نتایج را داشت (جدول ۳). از طرفی دیگر، متعاقب چالش با ویروس IBD، گروهی که با تلقیح داخل تخم‌مرغ سویه IBDV 2512 ایمن شده بودند، متوسط وزن‌گیری روزانه معنادار بیشتری در سنین ۳، ۴ یا ۵ هفتگی داشتند، این تغییر معنادار به ویژه از هفته چهارم در گروه ایمن نشده تحت چالش، بیشتر مشهود بود (نمودار ۱).

در مقایسه برخی شاخص‌ها در جوجه‌های گوشتی گروه‌های واکسینه با سه سویه به صورت تلقیح داخل تخم‌مرغ مشاهده شد که شاخص وزن بورس به بدن کاهش پیدا کرده در حالی که اسکورهای بافت شناسی با افزایش حدت ویروس‌های واکسن، افزایش پیدا کرده بود (این مهم بیشتر در سویه اینترمدیت پلاس مشاهده شد). در همین زمان، گوشتی‌هایی که دارای آنتی‌بادی مادری بودند، تنها در گروه واکسینه شده با سویه IBDV 2512 از هفته چهارم زندگی به بعد آنتی‌بادی فعال تولید نمودند (نمودار ۲).

با توجه به این یافته‌ها، مطالعه میزان آسب بورس متعاقب ایمن سازی به‌واسطه تلقیح داخل تخم‌مرغ که می‌تواند با ضعف ایمنی همراه باشد، از اهمیت بسزایی برخوردار بود. با توجه به سایر مطالعات مرتبط، دو گروه پرنده‌های SPF و گوشتی هیچ شده از جنین‌های ایمن شده به‌واسطه تلقیح داخل تخم‌مرغ با سویه IBDV 2512 که در یک روزگی با واکسن نیوکاسل واکسینه شده بودند، تیترا HI هفته سوم در پرنده‌های SPF بشدت و در جوجه‌های گوشتی کمی کاهش پیدا کرده بود. علی‌رغم این حقیقت، در مطالعات متعددی میزان محافظت فوق‌العاده بالا (۱۰۰ درصد) بود. فقط پرنده‌هایی که با سویه IBDV 2512 واکسینه شده بودند، دارای سطح محافظت کمتر بودند: ۸۱/۸٪ در جوجه‌های SPF و ۹۵/۵٪ در جوجه‌های گوشتی، که با کارایی مورد نیاز ما مطابقت دارد.

جدول ۱: ارزیابی ایمنیت پس از ایمن سازی از راه تلقیح داخل تخم مرغ

Criteria	Chicken groups	Controls	PBS	G-87	LIBD	IBDV 2512
Hatching rate (in % of fertile eggs)	SPF	*96.4	*91.4	84.0	70.0	89.0
	Broiler	*90.3	*78.6	78.0	80.6	89.0
B:B index at 35 days old	Broiler	1	-	1.1	1.0	0.26
Histological score of the bursa of Fabricius at 35 days old	Broiler	0	-	0	0	10.8
Challenge, resistance to ND (in %) at 21 days old	SPF	0-10%	-	100	100	81.8
	Broiler	-	-	100	95	95.5

*mean value of 3 groups

جدول ۲: برخی ویژگی های جنین های گوشتی ایمن شده با سویه مختلف IBDV با روش تلقیح داخل تخم مرغ

Age (weeks)	B:B index			Histological score			IBD antibodies, VN log ₂		
	G-87	LIBD	IBDV 2512	G-87	LIBD	IBDV 2512	G-87	LIBD	IBDV 2512
1	0.94	0.86	0.86	0	0	0.7	10.2	10.2	10.3
2	0.90	1.32	0.95	0	0	3.6	9.6	9.6	8.6
3	0.88	1.08	0.59	0	8	8.0	8.2	6.6	5.9
4	0.92	0.76	0.27	0	6.4	19.0	4.4	4.4	8.8
5	1.14	1.07	0.26	0	0	10.8	4.0	3.6	8.9

از آنجائی که سطوح آنتی بادی مادری به میزان زیادی در یک گله متفاوت است، این مهم می تواند در مواقع استفاده از واکسن با حدت بالا مخاطراتی را ایجاد نماید. بنابراین، واکسن کمپلکس از ترکیب سویه اینترمدیت پلاس IBDV و آنتی بادی اختصاصی تولید شده بر علیه آن ساخته شده است.

جدول ۳: امتیازبندی ضایعات هیستولوژیک گوشتی های واکسینه شده علیه بیماری بورس عفونی به روش تلقیح داخل تخم-

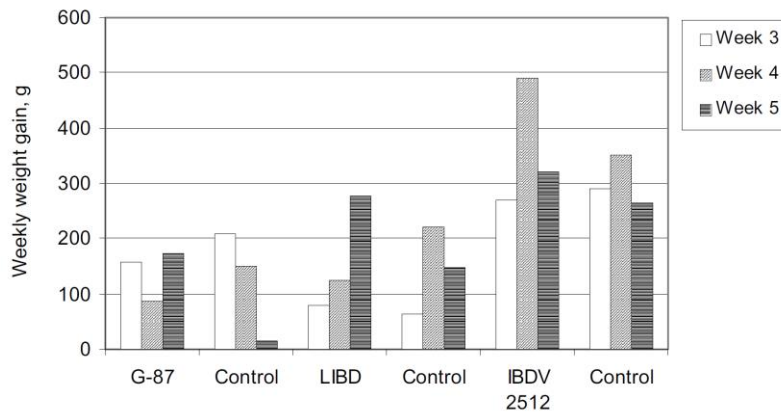
مرغ

Age (weeks)	Strain											
	G-87				LIBD				IBDV 2512			
	i.	n.i.	i.+ch.	n.i.+ch.	i.	n.i.	i.+ch.	n.i.+ch.	i.	n.i.	i.+ch.	n.i.+ch.
0	0	0	-	-	0	0	-	-	0	0	-	-
1	0	0	-	-	0	0	-	-	0.7	0	-	-
2	0	0	12.1	13.5	0	0	12.8	16.0	3.6	0	18.6	18.6
3	0	0	19.8	20.2	8.0	0	9.3	13.0	8.0	0	11.0	22.0
4	0	0	22.8	21.3	6.4	0	18.7	21.0	19.0	0	10.8	22.4
5	0	0	22.2	22.6	0	0	15.2	22.6	10.8	0	9.7	26.1

i.: immunized at 18 days of incubation; n.i.: non-immunized; i.+ch.: immunized and challenged; n.i.+ch.: non-immunized and challenged

اطلاعات علمی

CEVAC Transmune®



نمودار ۱: وزن گیری گوشتی‌های واکسینه شده به روش تلقیح داخل تخم مرغ با سویه های مختلف واکسن بیماری بورس عفونی و گوشتی‌های گروه کنترل در هفته بعد از چالش (سن ۳ تا ۵ هفتگی)

تفاوت متمایزی بین گروه جنین‌های SPF ایمن شده به روش تلقیح داخل تخم‌مرغ با واکسن کمپلکس و گروه‌های کنترل از نظر نرخ هج (به ترتیب ۹۷/۷ و ۹۰ درصد) مشاهده نشد. تفاوت در متوسط وزن بدن فقط یک گرم بود، آن هم با انحراف معیار خیلی پائین (۳/۴-۹۱/۳۲) برای هر دو شاخص.

اسکور پائین ضایعات هیستولوژیک بورس فابرسیوس در هفته‌های پس از ایمن‌سازی و چالش با ویروس حاد نشان می‌دهد که تنها استفاده از واکسن کمپلکس می‌تواند منجر به ضایعات هیستولوژی مشخص شود و ضایعات در هفته‌های بعدی خیلی ملایم‌تر خواهد بود. پس از چالش در هفته‌های ۴ و ۶ در مقایسه زمان پیش از چالش، اسکور به شدت افزایش پیدا کرده بود (نمودار ۳).

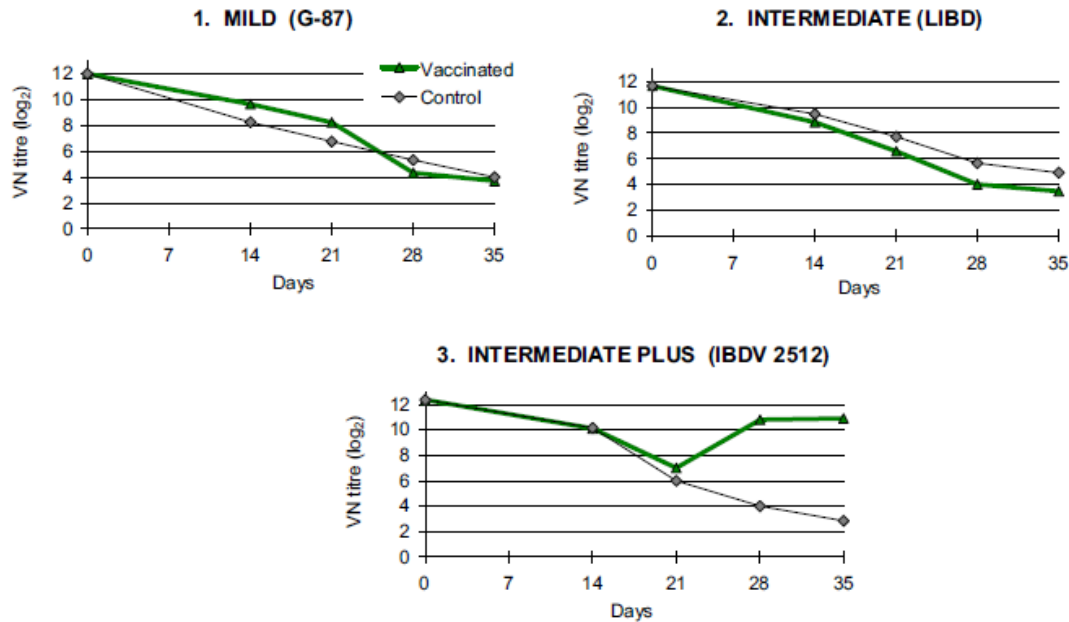
در مطالعات مرتبط با پخش شدن ویروس واکسن در داخل یک گله، پرنده‌های SPF مخلوط شده با پرنده‌های SPF یک روزه واکسینه شده به روش تلقیح داخل تخم‌مرغی در سن ۲ هفتگی دارای تیتراژ ایمنی بودند که این مهم نشانگر قابلیت گسترش ویروس حاضر در واکسن کمپلکس می‌باشد. در سن ۷ روزگی، جوجه‌های هج شده از جنین‌های SPF ایمن شده به روش تلقیح داخل تخم‌مرغ با دُزهای متفاوت ویروس ($10^{1.8-2.3}$) میزان ۶ تا ۳۰ درصد مثبت بودن سرمی را بر اساس دُز ویروس در تست VN نشان دادند، اما در ۱۴ روزگی تمامی سرم‌ها نتایج مثبت داشتند و تیتراژ آنتی‌بادی وابستگی به دُز ویروس نداشت (۱:۶۴۰-۱:۸۷۰).

در هفته‌های پس از ایمن‌سازی به‌وسیله تلقیح داخل تخم‌مرغی واکسن کمپلکس در هچری مستقر در فارم، پس از کاهش سطوح آنتی‌بادی مادری، میزان تیتراژ VN علیه بیماری بورس عفونی جوجه‌های گوشتی در هفته سوم به عددی بیش از ۹ در \log_2 رسید. میزان ایمنیت به دست آمده با ایمنیت ناشی از استفاده واکسن سویه اینترمدیت پلاس (CEVAC IBD-L) در هفته دوم از طریق آب آشامیدنی برابری می‌نمود. پس از ایجاد چالش با سویه بسیار پرحدت ویروس بیماری بورس عفونی برای گروه واکسینه شده به روش تلقیح داخل تخم‌مرغی و روش آب آشامیدنی، بیشترین رکورد وزن‌گیری مربوط به گروه واکسینه

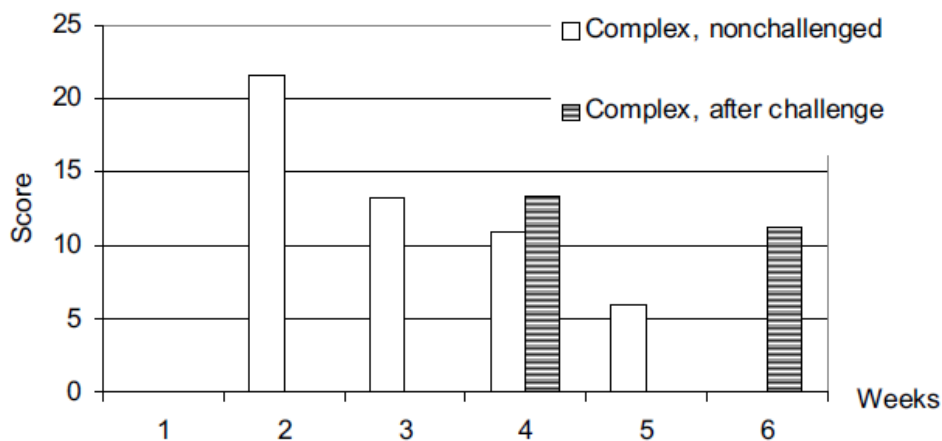
اطلاعات علمی

CEVAC Transmune®

شده با روش تلقیح داخل تخم مرغ بود. میزان وزن گیری در گروه ایمن شده در هفته دوم با روش آب آشامیدنی، کمی پائین تر بود و این شاخص برای گروه واکسینه نشده (کنترل) بسیار پائین تر بود (نمودار ۴).



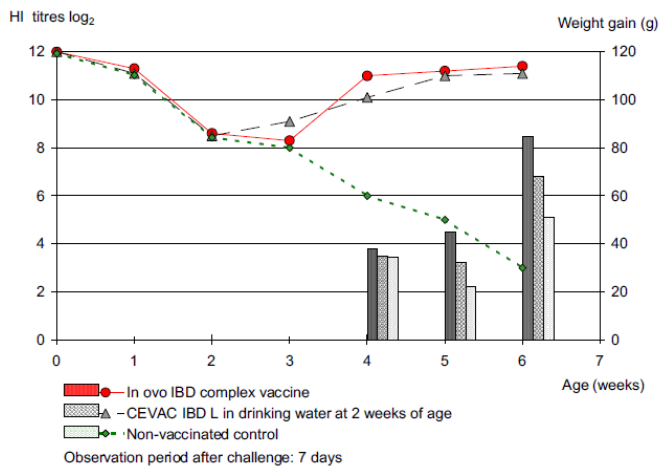
نمودار ۲: پاسخ ایمنی جنین‌های گوشتی واکسینه با روش تلقیح داخل تخم مرغ با سویه‌های دارای حدت مختلف ویروسی



نمودار ۳: اسکور بندی هفتگی ضایعات بورس فابرسیوس گروه‌های چالش شده و چالش نشده هیچ شده از جنین‌های SPF ایمن شده با واکسن کمپلکس IBD با روش تلقیح درون تخم مرغ

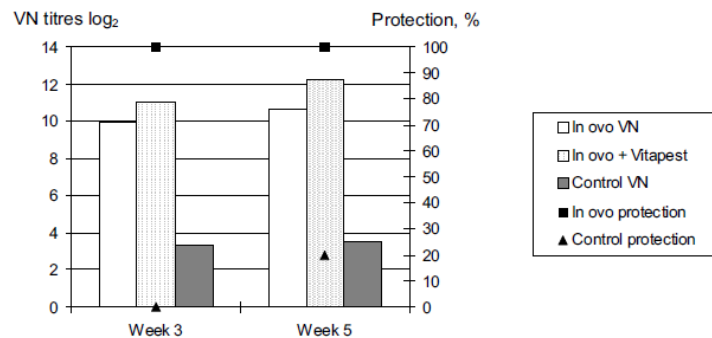
اطلاعات علمی

CEVAC Transmune®



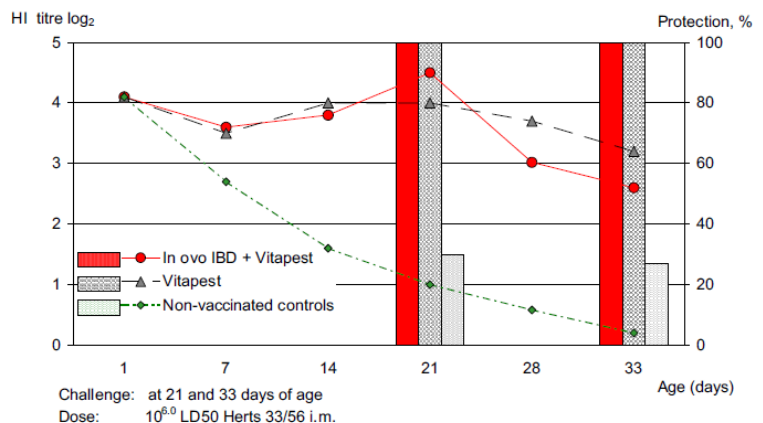
نمودار ۴: کارآزمایی بالینی-تغییرات تیتر VN پس از واکسیناسیون و متوسط وزن گیری روزانه بعد از ایجاد چالش در هفته های ۴، ۵ و ۶

پس از اینکه جوجه ها از جنین های SPF ایمن شده با واکسن کمپلکس به صورت تلقیح داخل تخم مرغ با واکسن Vitapest در یک روزگی واکسینه شدند، تیتر VN آنتی بادی بر علیه IBD در برخی موارد حتی از گروه واکسینه شده توسط واکسن IBD Complex هم بالاتر بود و در هفته های ۳ و ۵ سطح محافظت بر علیه IBD، ۱۰۰ درصد بود (نمودار ۵).



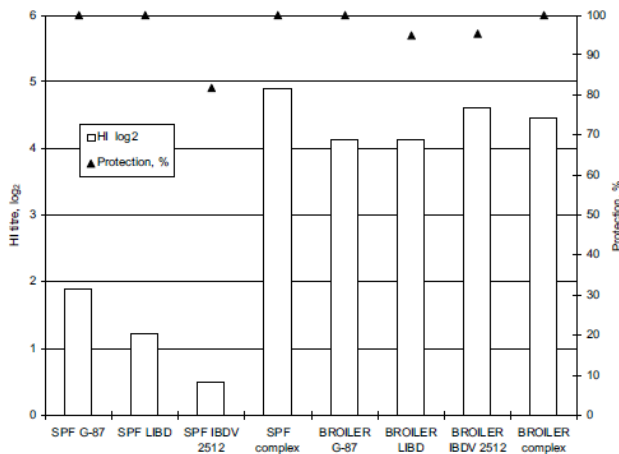
نمودار ۵: محافظت و تیتر VN بیماری بارس عفونی در پرنده های SPF گروه کنترل و پرنده های ایمن شده با واکسن IBD Complex به روش تلقیح داخل تخم مرغی و واکسینه توسط Vitapest در یک روزگی

در جوجه های گوشتی ایمن شده به روش تلقیح داخل تخم مرغی در هفته های ۳ و ۵ پس از ایمن سازی با واکسن Vitapest استفاده شده در یک روزگی، تیتر HI آنها مشابه تیتر گله های واکسینه نشده بر علیه IBD بود و گروه ایمن شده دارای محافظت ۱۰۰ درصدی بر علیه بیماری نیوکاسل در هفته های ۳ و ۵ بود (نمودار ۶).



نمودار ۶: اثرات واکسیناسیون به روش تلقیح داخل تخم مرغی بیماری بارس عفونی بر واکنش ایمنی به واکسیناسیون با Vitapest در یک روزگی: محافظت و تیتر HI

تیتیر HI بیماری نیوکاسل در پرنده‌های SPF و گروه گوشتی‌های با سن سه هفته که با روش تلقیح داخل تخم‌مرغ با هر سه سویه واکسن و واکسن کمپلکس ایمن شده بودند و واکسن Vitapest را در یک روزگی دریافت کرده بودند، یافت شد. این مهم به وضوح نشانگر این موضوع است که آنتی بادی مادری بر علیه IBD یا آنتی بادی اکتسابی بواسطه واکسن کمپلکس، به میزان زیادی اثرات ایمنوساپر سیو واکسن را که با شاخص تیتیر ناهماهنگ HI نشان داده می‌شود، را کاهش دادند. اگرچه به میزان کمتری، این موضوع خود را به صورت سطوح مختلف محافظت نشان می‌دهد (نمودار ۷).



نمودار ۷: تیتیر میانگین و محافظت کننده بر علیه بیماری نیوکاسل در سن ۲۱ روزگی در گروه‌های مختلف ایمن شده با روش تلقیح داخل تخم‌مرغ با سویه‌های مختلف IBD و واکسینه شده با واکسن Vitapest در یک روزگی

نتیجه گیری

مطالعه مقایسه‌ای بر روی سویه‌های مختلف ویروس واکسن IBD مورد استفاده در واکسن کمپلکس هم در پرنده‌های SPF و هم در گوشتی‌های دارای آنتی بادی مادری نشان می‌دهد که آسیب ایجاد شده در بورس فابرسیوس ارتباط مستقیمی با حدت سویه ویروس دارد. آسیب در SPF ها به مراتب نسبت به جنین‌های گوشتی شدید بود، و مطلوب‌ترین نتایج پس از استفاده از واکسن‌های کمپلکس به دست آمد. این ضایعات هیستولوژیک متمایز، در ماهیت موقتی هستند (بورس آسیب دیده به صورت نرمال باز خواهد گشت)؛ با این حال در گوشتی‌ها و پس از استفاده از واکسن کمپلکس ترمیم بافتی نسبت واکسیناسیون جنین‌های SPF به مراتب سریعتر است. این نرخ ترمیم بورس نیز توسط ایوان و همکاران در سال ۲۰۰۰ مستند شده است؛ این تحقیق نشان می‌دهد که پرنده‌های SPF واکسینه شده با روش تلقیح داخل تخم‌مرغی، تخلیه لنفوسیت‌های B بورس فابرسیوس از ۷ روز پس از هچ شروع می‌شود؛ این در حالی است که در جوجه‌های گوشتی این واقعه دیرتر یعنی از سن ۳۵ روزگی به بعد اتفاق می‌افتد. ترمیم بورس در جوجه‌های SPF ۳ تا ۴ روز و در گوشتی‌ها ۱۱ روز طول می‌کشد؛ پس از گذشت این زمان، جمعیت لنفوسیت‌های B در بورس فابرسیوس تجدید می‌شود. کیم و همکاران در سال ۱۹۹۹ دریافتند که سرعت ترمیم بورس به حدت ویروس واکسن بستگی دارد و پس از ترمیم تولید آنتی بادی بر علیه بیماری نیوکاسل آغاز خواهد شد. اگر چه نقش آنتی بادی مادری و نقش آنتی بادی مورد استفاده در واکسن کمپلکس در محافظت بر علیه اثرات ایمنوساپر سیو ناشی از واکسن بخوبی مطالعه نشده است، ویروس واکسن پس از ۵ روز بعد از تلقیح به صورت آزاد یافت خواهد شد. آنتی بادی

موجود در کمپلکس ایمنی، ویروس را خنثی نمی‌کند و فقط حدت آن را کاهش می‌دهد. در نتیجه پس از استفاده از واکسن، کاهش لنفوسیت‌های B با شدت کمتری بروز می‌کند.

سه هفته پس از واکسیناسیون Vitapest برای جوجه‌های SPFی که با روش تلقیح داخل تخم‌مرغی بر علیه بیماری بورس عفونی واکسینه شدند، با نسبت عکس حدت ویروس واکسینال IBD، تیتراژ HI نیوکاسل قابل شناسایی کاهش می‌یابد. همچنین این اثرات در واکسیناسیون با روش تلقیح داخل تخم‌مرغی جنین‌های گوشتی مشاهده نشد. به‌عنوان مهمترین یافته ۳ هفته پس از واکسیناسیون در یک روزگی با Vitapest می‌توان بیان نمود که پرندگی‌های هج شده از گروه واکسینه شده با روش تلقیح داخل تخم‌مرغی با واکسن کمپلکس، تیتراژ HI حتی در گروه SPF هم کاهش پیدا نکرد. این حتی به‌خوبی نشان داده شده است که کاهش در تیتراژ HI مورد اشاره فوق با کاهش کفایت ایمنی در ایجاد محافظت بر علیه بیماری نیوکاسل همراه نبوده است. این یافته با نتایج محققین دیگر در ارتباط اثرات انحصاری IBDV بر سیستم ایمنی همورال همخوانی دارد. تاکنون مکانسیم مهار عملکرد لنفوسیت‌های T به خوبی در دسترس نیست؛ با این حال در مطالعات حاضر، ایمنی سلولی یا به میزان جزئی کاهش پیدا کرد و یا اصلاً متاثر نشد. ژانویه در سال ۱۹۷۹ هم نتایج مشابهی را گزارش نموده است.

گزارشاتی که در این مقاله منتشر شده‌اند، نتایج مطالعات پیشین در ارتباط با اثرات حدت بیشتر ویروس با پاسخ ایمنی شدیدتر و اثرات ایمنوساپرسیو را تصدیق می‌کند. از سه سویه مقایسه شده، سویه اینترمدیت پلاس IBDV 2512 که به‌صورت تلقیح داخلی تخم‌مرغی مورد استفاده قرار گرفته بود، توانست پس از افول آنتی‌بادی مادری، تولید آنتی‌بادی فعال را القا نماید. سایر محققین همچنین دریافتند که واکسن کمپلکس تهیه شده از این سویه، اگر به‌صورت تلقیح داخل تخم‌مرغی و یا تلقیح زیرجلدی در یک روزگی استفاده شود، کارایی بیشتری در مقایسه با استفاده از طریق آب آشامیدنی دارد. بر اساس مطالعات ما، اثرات ایمنوساپرسیو موقتی ایجاد شده توسط سویه IBDV 2512 به میزان قابل توجهی با استفاده از آنتی‌بادی همولوگ اضافه شده به این سویه کاهش پیدا کرده است. در حقیقت ضایعات بافت شناسی قابل شناسایی در بورس فابریسیوس برای مدت خیلی محدودی پس از استفاده از واکسن کمپلکس حضور دارد.

منابع

Craft, D.W., Brown, J. and Lukert, P. D. (1990): Effects of standard and variant strains of infectious bursal disease virus on infections of chickens. *Am. J. Vet. Res.* 51, 1192-1197.

Giambrone, J. J. (1979): Effects of early IBDV infection on immunity to Newcastle disease in adult chicken. *Poultry Sci.* 59, 794-798.

Haddad, E. E., Whitfill, C. E., Avakian, A. P., Riks, C. A., Andrews, P. D., Thoma, J. A. and Wakkenell, P. S. (1997): Efficacy of a novel IBDV immune complex vaccine in broiler chickens. *Avian Dis.* 41, 882-889.

Ivan, J., Nagy, N., Kacsokovics, I. and Meszaros, J. (2000): Functional restoration of the bursa of Fabricius following infectious bursal disease vaccination. *Vet. Immunol. Immunopathol.* (submitted).

- Jeurissen, S. H. M., Janse, E. M., Lehrbach, P. R., Haddad, E. E., Avakian, A. and Whitfill, C. E. (1998): The working mechanism of an immune complex vaccine that protect chickens against infectious bursal disease. *Immunology* 95, 494-500.
- Johnston, P. A., Ziu, H., O'Connell, T., Phelps, P., Bland, M., Tyczkowski, J., Kemper, A., Harding, T., Avakian, A., Haddad, E., Whitfill, C., Gildersleeve, R. and Ricks, C. A. (1997): Applications in *in ova* technology. *Poultry Sci.* 76, 165-178.
- Kim, I. J., Gagic, M. and Sharma, J. M. (1999): Recovery of antibody-producing ability and lymphocyte repopulation of bursal follicles in chickens exposed to infectious bursal disease virus. *Avian Dis.* 43, 401-413.
- Lutticken, D. (1997): Viral diseases of the immune system and strategies to control infectious bursal disease by vaccination. *Acta Vet. Hung.* 45, 933-938.
- Meszáros, J., Szemerédi, M. and Tamási, G. (1992): Immunization of day-old chickens against Newcastle disease. *Acta Vet. Hung.* 40, 121-127.
- Muskett, J. C., Hopkins, I. G., Edwards, K. R. and Thornton, D. H. (1979): Comparison of two vaccine strains: efficacy and potential hazards in susceptible and maternally immune birds. *Vet. Rec.* 104, 332-334.
- Nakamura, T., Otaki, Y. and Nunuya, T. (1992): Immunosuppressive effect of a highly virulent infectious bursal virus isolated in Japan. *Avian Dis.* 36, 891-896.
- Sharma, J. M., Kim, I. J., Rautenschein, S. and Yeh, H. Y. (2000): Infectious bursal disease of chickens: pathogenesis and immunosuppression. *Dev. Comp. Immunol.* 24, 223-235.
- Sharma, J. M. and Lee, L. F. (1983): Effect of infectious bursal disease on natural killer cell activity and mitogenic response of chicken lymphoid cells and the role of adherent cells in cellular immune suppression. *Infect. Immun.* 42, 747-754.
- Suveges, T. (1998): Observations on the histopathology of alterations developed in the bursa of susceptible chickens due to virulent infectious bursitis virus (in Hungarian, with English abstract). *Magy. Allatorv. Lapja* 120, 73-79.
- Van den Berg, T. P., Gonze, M. and Meulemans, G. (1991): Acute infectious bursal disease in poultry; isolation and characterization of highly virulent strains. *Avian Pathol.* 20, 133-143.
- Whitfill, C. E., Haddad, E. E., Ricks, C. A., Skeeles, J. K., Newberry, L. A., Beasley, J. N., Andrews, P. D., Thoma, J. A. and Wakenell, P. S. (1995): Determination of optimum formulation of a novel infectious bursal disease virus (IBDV) vaccine constructed by mixing bursal antibody with IBDV. *Avian Dis.* 39, 687-699.

۱۳

ترمیم عملکردی بورس فابرسیوس پس از واکسیناسیون به شیوه تلقیح داخل تخم

علیه بیماری بورس عفونی

Ivan J. 2001. Veterinary Immunology and Immunopathology

پرندگان

تخم مرغ‌های نطفه‌دار SPF و گوشتی تجاری Ross 308.

واکسیناسیون

جنین‌ها در سن ۱۸ روزگی با استفاده از واکسن Cevac Transmune® با روش تلقیح داخل تخم مرغ به صورت دستی، واکسینه شدند.

طراحی گروه‌ها:

- گروه ۱: نمونه‌های کنترل SPF واکسینه نشده
- گروه ۲: تخم مرغ‌های SPF واکسینه شده
- گروه ۳: تخم مرغ‌های تجاری واکسینه شده

طراحی نمونه‌برداری: ۳ تا ۵ قطعه جوجه در فواصل زمانی منظم نمونه‌برداری شدند: بورس فابرسیوس نمونه‌های اخذ شده با روش‌های ایمنو‌هیستوشیمی و آنالیز Northern Blot بررسی شدند.

نشانه‌های لنفوسیت‌های B سالم از نظر کارکردی

- بیان ژن لکتین chB1: نشان‌دهنده لنفوسیت‌های B فعال بورس
- بیان کربوهیدرات ساختاری LewisX (LeX) در سطح سلول: نشان‌دهنده آن دسته از لنفوسیت‌های B بورس می‌باشد که هیپرکانورسیون ژنی دارند.

اطلاعات علمی

CEVAC Transmune®

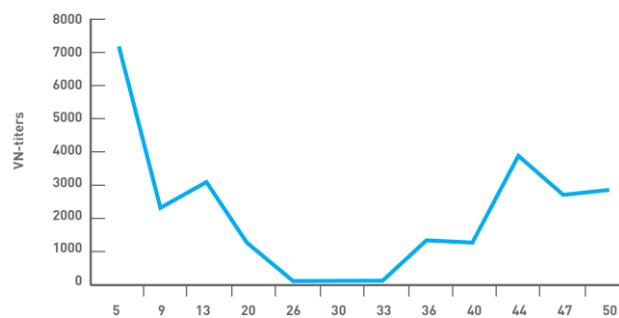
نتایج

گوشتی‌های تجاری واکسینه	SPFهای واکسینه شده	SPFهای واکسینه نشده	
کاهش بیان بین D33 تا D27؛ ریژنراسیون توسط D47	کاهش بیان بین D6 تا D27؛ ریژنراسیون توسط D35	شناسایی مداوم از ED18 تا D40	ChB1
کاهش بیان در D37؛ بازیابی در D50	کاهش بیان D7 و D37؛ بازیابی در D41	در ED16 کم؛ بین ED20 و D1 پیک گرفته؛ کاهش مداوم: متوسط در D7، کم در D37، یافت نشده در D50	LeX

توضیح: D=روز؛ ED=روز جنینی

نکته: هیچ گروه مرغ گوشتی تجاری غیرواکسینه در این مطالعه وجود ندارد. برخی از تفاوت‌های مشاهده شده ممکن است بخاطر زمینه ژنتیکی متفاوت بین مرغ‌های SPF (لگهورن) و مرغ‌های گوشتی Ross 308 باشد.

دریافت واکسن در مرغ‌های گوشتی تجاری توسط آزمون خنثی سازی ویروس، اثبات گردید.



تیتراژ آنتی بادی مادری (MDA) نسبتاً بالا بود: ۷۳۰۰ در سن ۵ روزگی. این مسئله توجه کننده شروع تغییرات بورس از ۳۳ روزگی به بعد می‌باشد.

نتیجه‌گیری

شواهد دریافت واکسن Cevac Transmune® توسط تغییرات بورس تأیید شد. با این حال، این تغییرات در پرنده‌های گوشتی تجاری در مقایسه با پرنده‌های SPF بسیار ملایم‌تر، با تأخیر و ناپایدارتر بود. علائم ترمیم کامل ساختاری و کارکردی بورس در کمتر از دو هفته اثبات شد.

ترمیم کارکردی بورس فابرسیوس پس از واکسیناسیون به شیوه تلقیح داخل تخم علیه بیماری بورس عفونی^۳

J. Van¹, N. Nagy², A. Magyar², I. Kacs Kovics³, J. Meszaros¹

1 Veterinary Medical Research Institute, Hungarian Academy of Science, P.O. Box 18, Budapest H-1581, Hungary; *2* Department of Human Morphology and Developmental Biology, Faculty of Medicine, Semmelweis University, P.O. Box 95, Budapest H-1094, Hungary; *3* Department of Physiology and Biochemistry, Faculty of Veterinary Science, Szent Istvan University, P.O. Box 2, Budapest H-1400, Hungary

چکیده

نقش اولیه بورس فابرسیوس در طیور، فراهم آوردن یک محیط ضروری برای لنفوسیت‌های B جهت متنوع ساختن ژن‌های مسئول تولید ایمونوگلوبین از طریق هیپرکانورسین ژنی، می‌باشد. واکسیناسیون بیماری بورس عفونی (IBD) با استفاده از سویه‌های واکسن با حدت نسبتاً بالا می‌تواند فولیکول‌های بورسی را موقتاً تخلیه کرده و توسعه عادی لنفوسیت‌های B را با اختلال مواجه کند که معمولاً متعاقب با تکثیر و بازسازی بافت‌شناسی B-Cell می‌باشد. برای یافتن شواهدی که نشان دهد ترمیم کارکردی بورس فابرسیوس در کنار رژراسیون بافتی رخ می‌دهد، ما بیان ژن chB1 را آنالیز کردیم که نشان داد لنفوسیت‌های B بورسی فعال هستند و همچنین بیان کربوهیدرات ساختاری Lewis^x در سطح سلول هم بررسی شد. این کربوهیدرات نشان‌دهنده آن‌دسته از لنفوسیت‌های B بورسی بود که هیپرکانورسین ژنی داشتند. واکسیناسیون به شیوه تلقیح داخل تخم‌مرغی با یک واکسن کمپلکس ایمنی[®] Cevac Transmune موجب تخریب گذرا بورس در هر دو گروه پرنده‌های گوشتی تحت حفاظت آنتی‌بادی مادری و پرنده‌های SPF شد. تفاوت در این گروه‌ها شامل زمان آغاز تخریب و شدت و مدت اثرات تخریبی بود. پس از مرحله تخلیه، علائم رژراسیون بافت همراه با بیان chB1 و Lewis^x ظاهر گردید که نشان می‌دهد لنفوسیت‌های B از لحاظ کارکردی فعال بودند. در نتیجه، بورس فابرسیوس دوباره توانست به صورت یک اندام لنفوئید اولیه مؤثر عمل نماید و محیط مناسب برای رشد و توسعه لنفوسیت‌های B را فراهم آورد.

مقدمه

³ Veterinary Immunology and³Immunophatology; 79 (2001) 235-248.

سه مکانیسم سوماتیک برای متنوع ساختن ژرم لاین ژن‌های ایمونوگلوبین مرغ وجود دارد: هیپرکانورسیون ژن، اتصال انعطاف پذیر J-V و جهش‌های نقطه‌ای سوماتیک. هیپرکانورسیون ژن که مولد اصلی تنوع Ig در پرنده‌ها می‌باشد، حدوداً در سن ۱۷- ۱۵ روزگی پس از انکوباسیون آغاز می‌شود؛ این واقعه پس از مهاجرت اجداد B سل‌های نابالغ به بورس فابرسیوس رخ می‌دهد. بورس فابرسیوس یک محیط ضروری برای انتخاب و تکثیر B سل‌های دارای بازآرایی در ژن تولیدکننده ایمونوگلوبین را فراهم می‌آورد. در طی فرآیند هیپرکانورسیون ژن، بلوک‌هایی از توالی DNA از مناطق شبه V به مناطق متغیر نوترکیب ژن‌های ایمونوگلوبین انتقال می‌یابند که نتیجه آن، تولید B سل‌های بالغی است که برای تشکیل یک سیستم ایمنی هومورال کارآمد در پرنده بالغ، مناسب می‌باشند. در زمان خروج جوجه از تخم مرغ، این B سل‌ها به همراه گیرنده‌های ایمونوگلوبینی متنوع شروع به ترک بورس و تجمع در اندام‌های لنفوئیدی ثانویه می‌نمایند، با این حال، فرآیند هیپرکانورسیون تا زمان بلوغ جنسی ادامه پیدا می‌کند. آسیب یا فقدان این فرآیند تبدیلی، باعث سرکوب ایمنی در اثر کاهش تنوع گیرنده‌های Ig و نبود کلون‌های پاسخ دهنده B سل‌ها در بافت‌های لنفوئید پیرامونی می‌گردد.

ویروس بیماری بورس عفونی (IBDV) یک پاتوژن به‌خوبی شناخته شده است که می‌تواند در فاز حاد بیماری سبب آسیب به بورس گردد. شدت آسیب‌های بورسی می‌تواند بسته به بیماری‌زایی سویه‌های ویروس از ناپایدار تا برگشت‌ناپذیر متغیر باشد. در مواردی که آسیب برگشت‌پذیر است، بازسازی بافتی بورس فابرسیوس به اثبات رسیده و ترمیم جزئی یا کامل کارکرد ایمنی هومورال نیز نشان داده شده است. با این وجود، هیچگونه شواهد مستقیمی در مورد ترمیم کارکردی فعالیت B سل‌های بورس پس از بازسازی بافتی وجود ندارد. هدف ما ساخت مدلی درباره آسیب برگشت‌پذیر بورس با استفاده از یک واکسن IBDV و بررسی یکپارچگی کارکرد آن دسته از لنفوسیت‌های B می‌باشد که پس از بازسازی بورس فابرسیوس تکثیر می‌شوند. ما از دو نشانگر متفاوت استفاده کردیم که پیش از این مشخص شده بود در لنفوسیت‌های B سالم و فعال بورس فابرسیوس، بیان می‌شوند.

ژن لکتین chB1 به‌صورت انتخابی در B سل‌های بورس و در لاین B سل‌های نابالغ DT40 رونویسی می‌شود، که هردوی آن‌ها دارای توانایی متنوع‌سازی گیرنده‌های Ig خود از طریق هیپرکانورسیون ژن می‌باشند. رونوشت‌های chB1 در سایر بافت‌های بالغ، در طحال جنینی و در لاین T سل، لاین ماکروفاژ یا سایر لاین‌های B سل‌ها قابل تشخیص نبودند. اتصال متقابل مولکول‌های لکتین chB1 مانع پرولیفراسیون شده و باعث آپوپتوز B سل‌های بورس و لاین سلولی DT40 می‌گردند. نقش واقعی مولکول chB1 در رشد و توسعه B سل‌ها واضح نیست اما الگوی انتخابی بیان‌شان می‌دهد که رونویسی chB1 می‌تواند نشانگر ساده‌ای باشد که وضعیت کارکردی آن دسته از B سل‌های بورس را که تحت هیپرکانورسیون ژن می‌باشند را بیان می‌کند. اگر سطوح بیان در نمونه‌های بورسی بازسازی شده از لحاظ بافتی و نمونه‌های شاهد مشابه باشند، فعالیت مشابه B سل‌ها پس از ترمیم را می‌توان انتظار داشت. ما همچنین الگوی بیان کربوهیدرات ساختاری Lewis^x (Le^x) را نیز آنالیز کردیم که نشان‌دهنده لنفوسیت‌های B می‌باشد که تحت هیپرکانورسیون ژن قرار دارند. هم‌بستگی بین فنوتیپ گلیکوزیلاسیون^۳ و وضعیت هیپرکانورسیون ژن، زیاد است اما مطلق نمی‌باشد؛ زیرا تقریباً ۸۰٪ B سل‌های Le^x مثبت، توالی تبدیل ژنی شده را نشان دادند. نقش واقعی مولکول Le^x نیز مشخص نیست و احتمالاً این نشانگر در فرآیند هیپرکانورسیون ژن، به‌طور مستقیم تحت تأثیر نمی‌باشند.

³ Gene hyperconversion 4
³ Cross-linkage 5
³ Selective pattern of expression
³ glycosylation 7

اطلاعات علمی

CEVAC Transmune®

در این مطالعه، ما به این پرسش پرداختیم که آیا بورس فابرسیوس می‌تواند به صورت یک اندام لنفونیدی اولیه مؤثر پس از بازسازی بافتی، عمل کند یا خیر. ما همچنین این مسئله را نیز بررسی کردیم که آیا هیچ‌گونه اختلافی در فرآیند ترمیم بین پرنده‌های SPF و پرنده‌های گوشتی تحت حفاظت مادری وجود دارد یا خیر. ما در اینجا آنالیز رونویسی ژن *chB1* و الگوی بیان کربوهیدرات ساختاری Lewis^x را در پرنده‌های واکسینه شده با واکسن کمپلکس ایمنی IBDV (که قبلاً عامل آسیب بوری ناپایدار شناخته می‌شد) یا غیرواکسینه گزارش می‌نماییم.

مواد و روش‌ها

حیوانات آزمایشگاهی

تخم مرغ‌های عاری از عوامل بیماری‌زای خاص (SPF؛ سانرایز، مزارع سانرایز، ایالات متحده آمریکا) و تخم‌مرغ گوشتی (ROSS-308) مورد استفاده قرار گرفتند. تخم مرغ‌های گوشتی از مرغ‌های مادر گوشتی واکسینه شده در مقابل IBDV تهیه شدند. جوجه‌ها پس از هج در محفظه‌های جداگانه قرار داده شده و طبق مقررات محلی رفاه حیوانات، نگهداری شدند. طبق طرح آزمایش ۳ الی ۵ جنین یا جوجه در هر روز به روش انسانی کشته شدند. آب و غذا به صورت آزاد در اختیار جوجه‌ها قرار داده شد.

واکسن IBDV و پروتکل واکسیناسیون

جنین‌ها به صورت دستی و به شیوه تلقیح داخل تخم‌مرغ در روز هجدهم آنکوباسیون مطابق با یک پروتکل استاندارد، واکسینه شدند. به طور خلاصه، یک حفره کوچک در انتهای پهن تخم‌مرغ ایجاد شد و با استفاده از سوزن ۳ سانتی‌متری گیج ۱۸ به زیر غشا اتاقک هوایی جنین تلقیح انجام شد. یک واکسن کمپلکس ایمنی (واکسن IBD ترانس‌میون سوا، CEVA-شرکت فیلاکسیا، بوداپست) مورد استفاده قرار گرفت که حاوی یک سویه ویروس بیماری بوریس عفونی با حدت نسبتاً بالا (IBDV 2512) و سرم هیپرایمن ضد IBDV (BDA) بود. یک دُز از واکسن حاوی ویروس $10^{2.0} \text{EID}_{50}$ (متوسط دُز عفونی جنین) بود.

سه گروه جوجه در آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند. در گروه ۱، جوجه‌های SPF واکسینه نشده به عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفتند. سه تا پنج جنین و یا جوجه در روزهای ۱۵، ۱۷، ۱۸ و ۱۹ جنینی و سپس در روزهای ۱، ۴، ۷، ۱۶، ۲۹، ۳۶ و ۴۰ پس از هج، به صورت انسانی کشته شدند. در گروه ۲، به جنین‌های SPF واکسن کمپلکس ایمنی IBDV (IBDV-BDA) به شیوه تلقیح داخل تخم‌مرغی، تزریق شد و روزانه ۳ الی ۵ جوجه در طول ۱ هفته پس از هج و پس از آن، در روزهای ۱۶، ۲۱، ۲۴، ۲۷، ۳۰، ۳۵، ۳۷، ۴۱ و ۴۴، به صورت انسانی کشته شدند. گروه ۳، جنین‌های مرغ گوشتی تحت تزریق واکسن IBDV-BDA در داخل تخم قرار گرفتند و ۳ الی ۵ جوجه در روزهای ۵، ۹، ۱۳، ۲۰، ۲۶، ۳۰، ۳۳، ۳۶، ۴۰، ۴۴، ۴۷ و ۵۰ پس از هج، به صورت انسانی کشته شدند. در هر مورد، بورس فابرسیوس در نیتروژن مایع منجمد گردید و برای ایمنوهیستوشیمی و آنالیز Northern blot، در دمای -70°C نگهداری شد. از نمونه‌های خون، سرم جدا شد و تا زمان آزمایش در دمای -20°C نگهداری شد.

آماده سازی کاوشگر *chB1* با برچسب DIG

³ Mean embryo infective dose⁸

از بورس فابریوس یک جنین SPF ۱۷ روزه (ED17) برای جداسازی RNA با استفاده از معرف (BRL-Gibco) TRIZOL، شرکت Life technologies، گیترزبورگ، MD) استفاده و طبق پروتکل ارائه شده توسط کارخانه سازنده، آماده‌سازی cDNA انجام شد. پس از سنتز cDNA با استفاده از پرایمرهای ترانسکریپتاز معکوس (BRL-Gibco) Superscript II، شرکت Life technologies، گیترزبورگ، MD) و اولیگو-dT، یک قطعه ۸۷۶bp از ژن chB1 با استفاده از پرایمرهای اولیگو B1: 5'-ACGCGCAACCCCGTAAT-3' (موقعیت ۱۸۱۳-۱۳۷۷) و اولیگو B2: 5'-GGCAGGTGGGAGGCAGA-3' (موقعیت ۵۰۱-۵۱۸) تکثیر شد؛ این پرایمرها براساس داده‌های توالی منتشر شده ژن chB1 انتخاب شدند (بانک ژن، شماره دسترسی U22014). PCR بشرح زیر انجام گرفت: ذوب اولیه در ۹۴°C بمدت ۲ دقیقه، پس از آن ۳۵ چرخه از برنامه ۳۰ ثانیه ای در ۹۴°C، ۳۰ ثانیه در دمای ۶۰°C و بمدت ۱ دقیقه در ۷۲°C. آخرین مرحله طولیل شدن در ۷۲°C بمدت ۴ دقیقه، واکنش PCR را تکمیل نمود. براساس اندازه مورد انتظار قطعات DNA، محصول به‌دست آمده توسط ستون سوپلکو (SUPELCO، بالفونته، PA، ایالات متحده آمریکا) تصفیه شد و توسط یک وکتور pGEM-T کلون شده و توسط سیستم توالی چرخه DNA® (شرکت پرومگا، مادیسون، WI)، در آزمایشگاه ما توالی یابی شد.

۲۰۰ نانوگرم از قطعه chB1 تکثیر شده برای سنتز یک پروب اختصاصی chB1 با برچسب DIG در یک واکنش خطی PCR فقط با استفاده از پرایمر B1، به‌کار گرفته شدند. این واکنش حاوی ۲۰۰ μM از هر یک از dATP، dCTP، dGTP و dTTP از ۷۰ μM از FIG-11-dUTP (شرکت ماشین آلات بوهرینگر، آلمان) برای ساخت یک واکنشگر حساس با نسبت ۱:۲ DIG-11-dUTP:dTTP بود. شرایط PCR خطی عبارت بود از: ۹۴°C بمدت ۲ دقیقه؛ ۹۴°C بمدت ۲۰ ثانیه، ۵۵°C بمدت ۳۰ ثانیه، ۷۲°C بمدت ۹۰ ثانیه، ۲۵ چرخه: ۷۲°C بمدت ۴ دقیقه.

جداسازی کل RNA و هیبریداسیون Northern blot

RNA از نمونه‌های بورس با استفاده از معرف (BRL-Gibco) TRIZOL، شرکت Life technologies، گیترزبورگ، MD) طبق پروتکل ارائه شده توسط کارخانه سازنده، جدا گردید. ۱۰ میکروگرم از نمونه‌های RNA از طریق یک ژل آگار دنا توره شده ۱٪/۲ حاوی ۰/۳۵ مولار فرمالدئید و بافر ۰/۰۲ مولار بافر ۱۰ × MOPS الکتروفورز شد و به یک غشاء نایلونی Hybond-N+ (پلاستیک بین المللی آمرشام، بریتانیا) انتقال داده شد. تک تک نمونه‌های RNA موجود در گروه ۱ در معرض الکتروفورز قرار داده شدند. در گروه‌های ۲ و ۳، RNAهای نمونه‌هایی که در همان روز از بورس جمع‌آوری شده بودند، با هم مخلوط شدند. ۱۰ میکروگرم از RNA الکتروفورز شد.

۱ ساعت پس از پیش-هیبریداسیون، لکه‌ها^۹ در مخلوط هیبریداسیون (فرمامید ۵۰٪، SSPE ۵ × pH برابر ۷/۴، Denhardt ۵ × ۱۰۰ μg/ml اسپرم ماهی سالمون، ۰/۱٪ SDS w/v) حاوی کاوشگر برچسب زده شده-DIG در دمای ۴۲°C در طول شب، انکوبه شدند. غشاهای حاوی نمونه‌ها ۳ مرتبه و هر بار ۲۰ دقیقه در SSC دو ایکس، بافر SDS ۰/۱٪ در دمای اتاق، برای مدت ۲۰ دقیقه در ۴۲°C و برای مدت ۲۰ دقیقه در SCC ۰/۵ ایکس، بافر SDS یک دهم درصد در ۶۰°C شسته شدند. کاوشگر chB1 با استفاده از کیت تشخیص اسید نوکلئیک DIG (شرکت ماشین آلات بوهرینگر GmbH، آلمان) شناسایی شد.

تست خنثی سازی ویروس

اطلاعات علمی

CEVAC Transmune®

تست خنثی سازی ویروس (VN) با استفاده از روش آنتی-بادی-متغیر-ویروس-ثابت تَلْبِق پروتکل استاندارد، انجام گرفت. به طور خلاصه، ۵۰ میکرولیتر سرم از یک مجموعه دوبار رقیق شده با TCID₅₀ ۲۰۰ از ویروس در ۵۰ میکرولیتر محیط کشت در دمای ۳۷°C به مدت ۱ ساعت، انکوبه شد. پس از انکوباسیون، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلول فیروبلاست اولیه جنین مرغ (CEF) تنظیم شده با $10^5 \times 2/5$ سلول در هر میلی لیتر اضافه گردید و به مدت ۵ روز کشت داده شد. اثر سیتوپاتیک بر سلول های CEF به صورت روزانه ثبت شد. تیتراهای آنتی بادی علیه IBDV به صورت متقابل با آخرین ترقیق سرم که ویروس را به طور کامل خنثی نموده است، بیان شدند. میانگین هندسی تیتراهای آنتی بادی از ۳ تا ۵ نمونه سرم جوجه، محاسبه شدند.

ایمنوهِیستوشیمی

قطعات کرایوستات با ضخامت ۱۰ میکرومتر در استون قرار داده شده و در مجاورت هوا خشک شدند. قطعات کرایوستات توسط تکنیک های استاندارد ایمنوهِیستوشیمی رنگ آمیزی شدند. قطعات، پس از آبدهی مجدد در نمک بافر شده با فسفات دولیکو^۴ (PBS)، با آنتی بادی های مونوکلونال (mAb) علیه Bu-1b (mAb 11G2)؛ مخصوص سلول B و آنتی بادی مونوکلونال علیه Lewis^x (mAb DU-HL60-3)؛ شرکت مواد شیمیایی سیگما، سنت لوئیس، MO، ایالات متحده آمریکا) انکوبه شدند. آنتی بادی ثانویه یک IgG بیوتیلیت اسب بر علیه موش (آزمایشگاه های وکتور، بولینگام، کانادا) بود و از آنجا به بعد، کمپلکس آویدین-بیوتین- پروکسیداز (آکیت الیت ABC، آزمایشگاه های وکتور، بولینگام، کانادا) مورد استفاده قرار گرفت. مکان های چسبیده آنتی بادی های اولیه با استفاده از ۴-کلروفتول مشخص شدند.

نتایج

جداسازی یک قطعه chB1

بر اساس توالی منتشر شده از ژن chB1 (گوئیتسوکا و همکاران، ۱۹۹۷) دو پرایمر اختصاصی chB1 طراحی شده و یک قطعه chB1 با طول ۸۷۶pb با موفقیت کلون شد. نتایج مطالعه ما توسط آنالیز توالی، تأیید شد که نشان داد که DNA تکثیر شده با توالی chB1 یکسان می باشد (بانک ژن، شماره دسترسی U22014).

بیان پیوسته chB1 و کاهش تدریجی بیان Le^x در پرنده های SPF واکسینه نشده (گروه ۱)

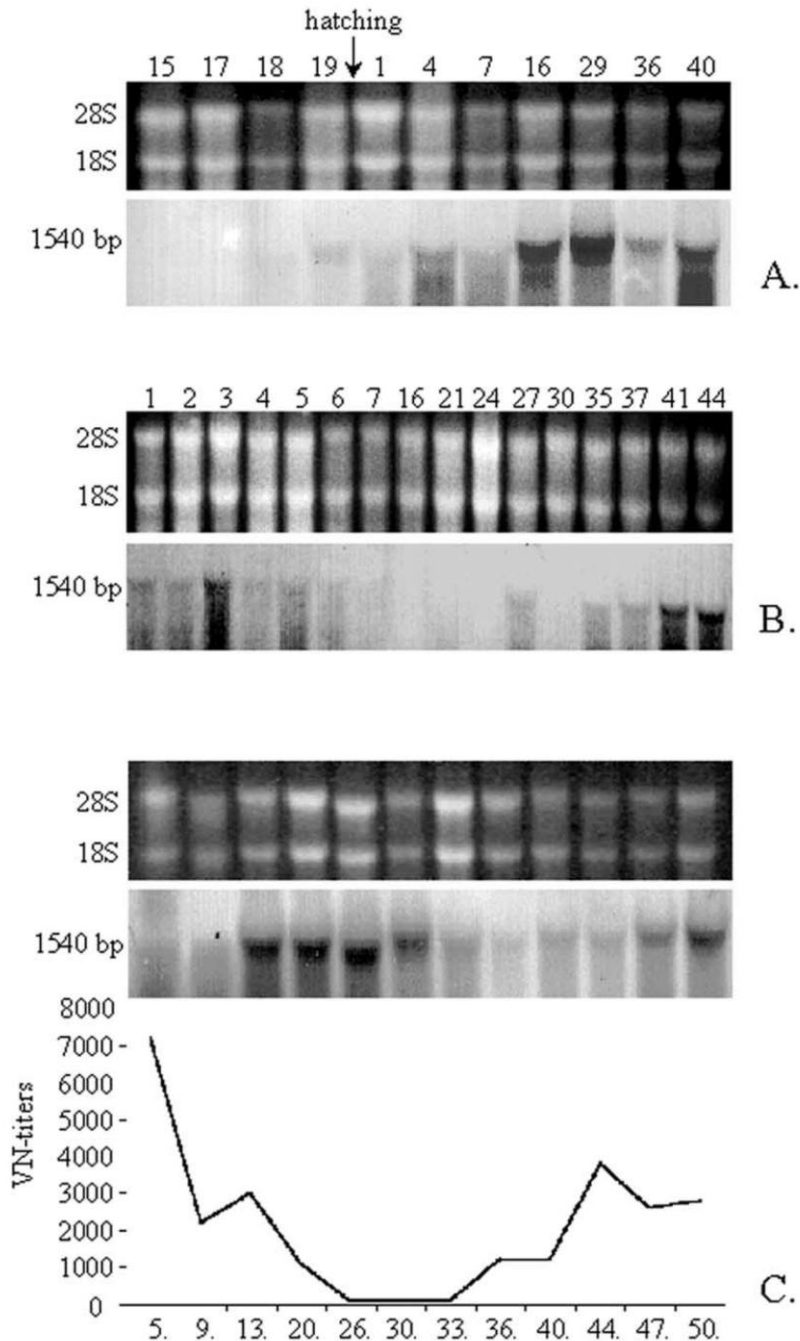
رونوشت های chB1 با طول ۱۵۴۰ bp توسط هیبریداسیون Northern blot در نمونه های بورس از روزهای ۱۸-۱۹ جنینی تا روز ۴۰ پس از هچ، شناسایی شدند (شکل ۱A). مطالعات ایمنوهِیستوشیمی با استفاده از mAb اختصاصی Le^x، تنها چند فولیکول با B سل های Le^x مثبت را در روز ۱۶ جنینی شناسایی کردند در حالی که مثبت بودن شدید Le^x در روز ۲۰ دوران جنینی و پس از هچ در هریک از فولیکول های بورس شناسایی شد. بیان Le^x سطح اپی توپ ها به تدریج پس از هچ، کاهش یافت: رنگ متوسطی در اغلب فولیکول های پرنده های هفت روزه مشاهده گردید، در مقاطع تهیه شده در روز ۳۷، تنها تعداد اندکی از فولیکول ها با حاوی B سل های Le^x مثبت بودند؛ فولیکول های Le^x مثبت تقریباً در روز ۵۰ غیرقابل تشخیص بودند (شکل a- ۲f).

⁴ Constant-virus-varying-antibody procedure

⁴ Dulbecco

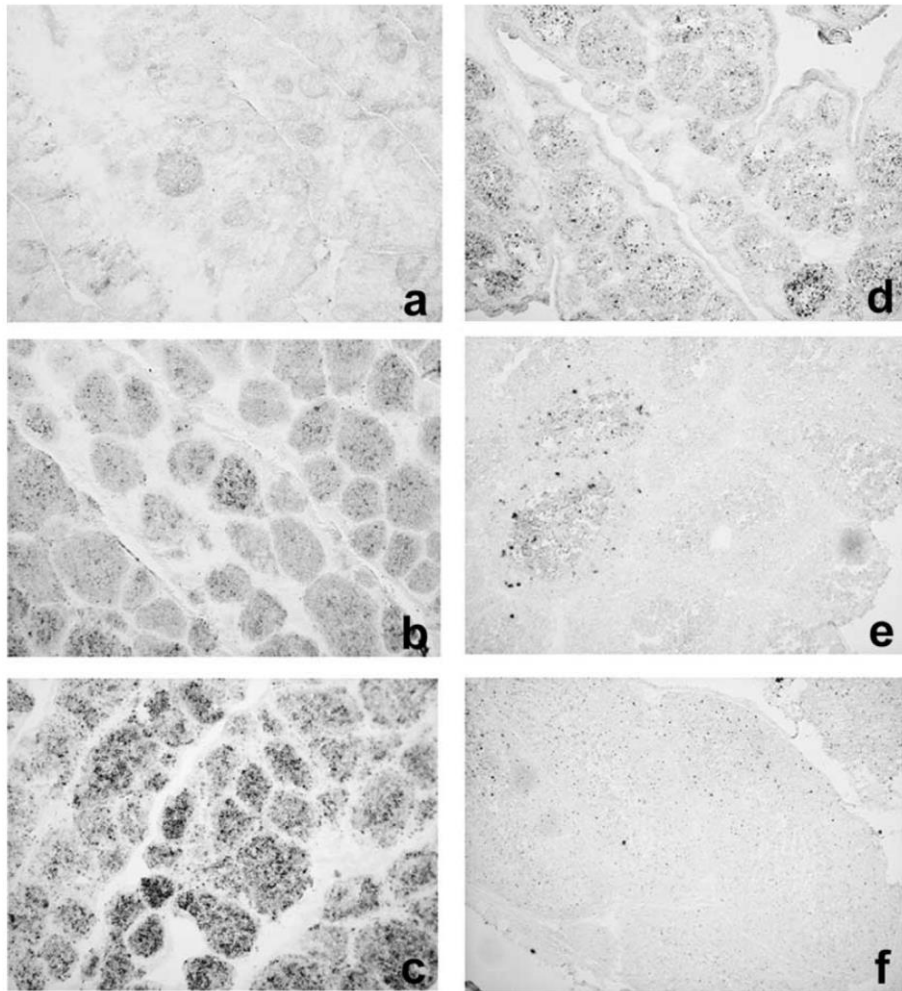
⁴ Biotinylated horse anti mouse IgG

⁴ Avidin-biotin-peroxidase



تصویر ۱. شناسایی mRNA ژن ChB1 با استفاده از روش Northern blot Hybridisation از نمونه‌های بروس گروه کنترل (A) و از RNA پرنده‌های SPF تلقیح شده با روش داخل تخم مرغی (B) و گروه پرنده‌های گوشتی (C). نمونه‌های RNA تکی یا مخلوط RNA در هر لاین ۱- میکرو گرم، در پانل بالایی لود شده و با استفاده از کاوشگرهای DIG-labelled chB1 هیبرید شدند. میانگین تیتراژ ژئومتریک خنثی کننده ویروس در گروه پرنده‌های گوشتی از ۳ تا ۵ پرنده اندازه‌گیری شد. (C). روزهای نمونه‌گیری در قسمت بالایی (A) و (B)، یا در قسمت پائین (C) درج شده‌اند.

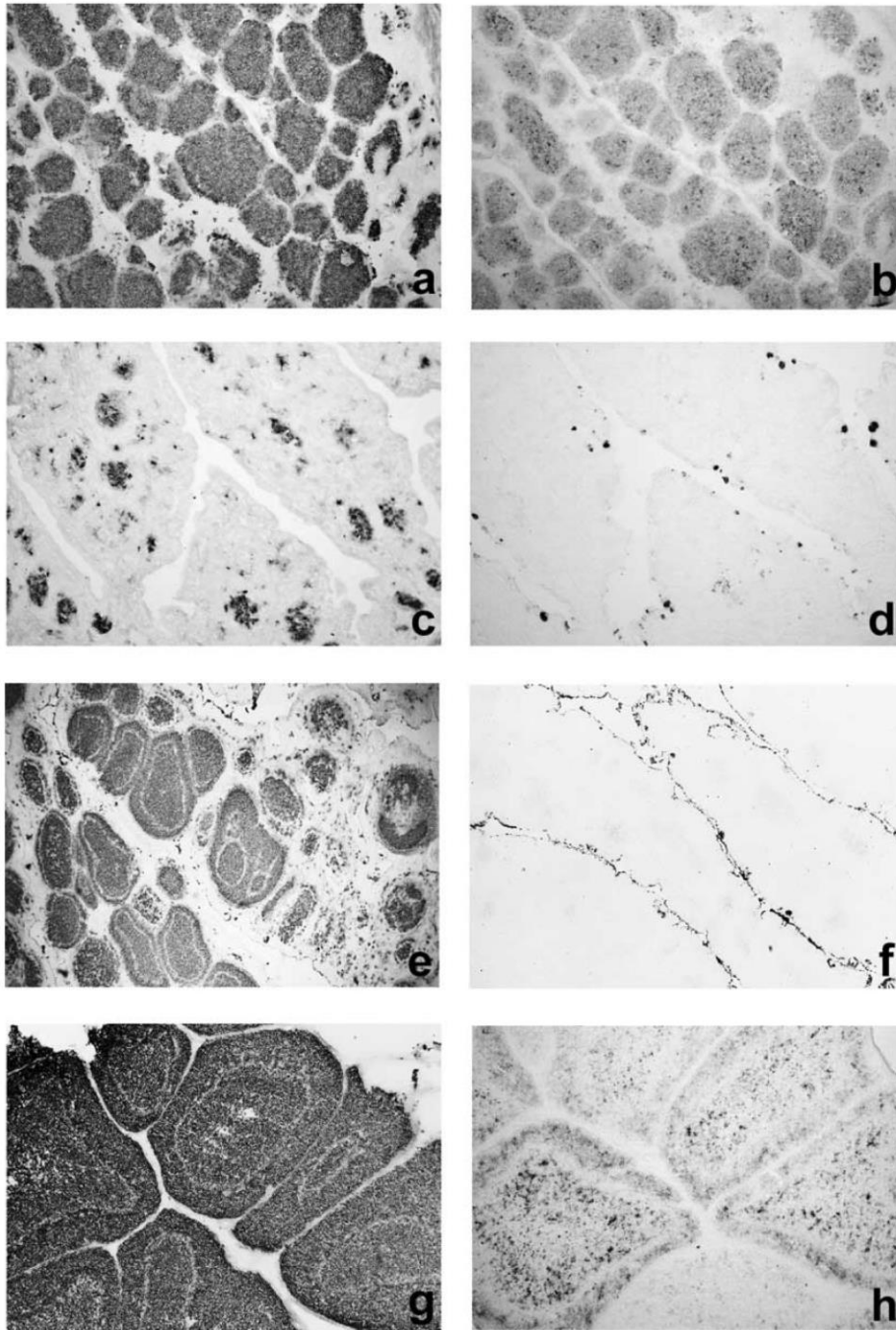
تصویر ۲. بیان آنتی ژن Lewis^x بر لنفوسیت‌های B فولیکولار پرنده‌های گروه کنترل ۱۶ روزه جنینی (a)، ۲۰ روزه جنینی (b)، یک روزه (c)، ۷ روزه (d)، ۳۷ روزه (e) و ۵۰ روزه (f). بیان Lewis^x در روز ۱۶ جنینی (a) غیر قابل شناسایی بود. بیان این ژن در میان روزهای ۲۰ جنینی تا سن یک روزگی به بیشترین سطح خود می‌رسد و سپس ما بین ۷ روزگی (d) تا ۳۷ روزگی (e) به تدریج کاهش پیدا می‌کند. بیان Lewis^x در روز ۵۰ جنینی (f) غیر قابل شناسایی بود. بزرگنمایی: ۶۵۰×.



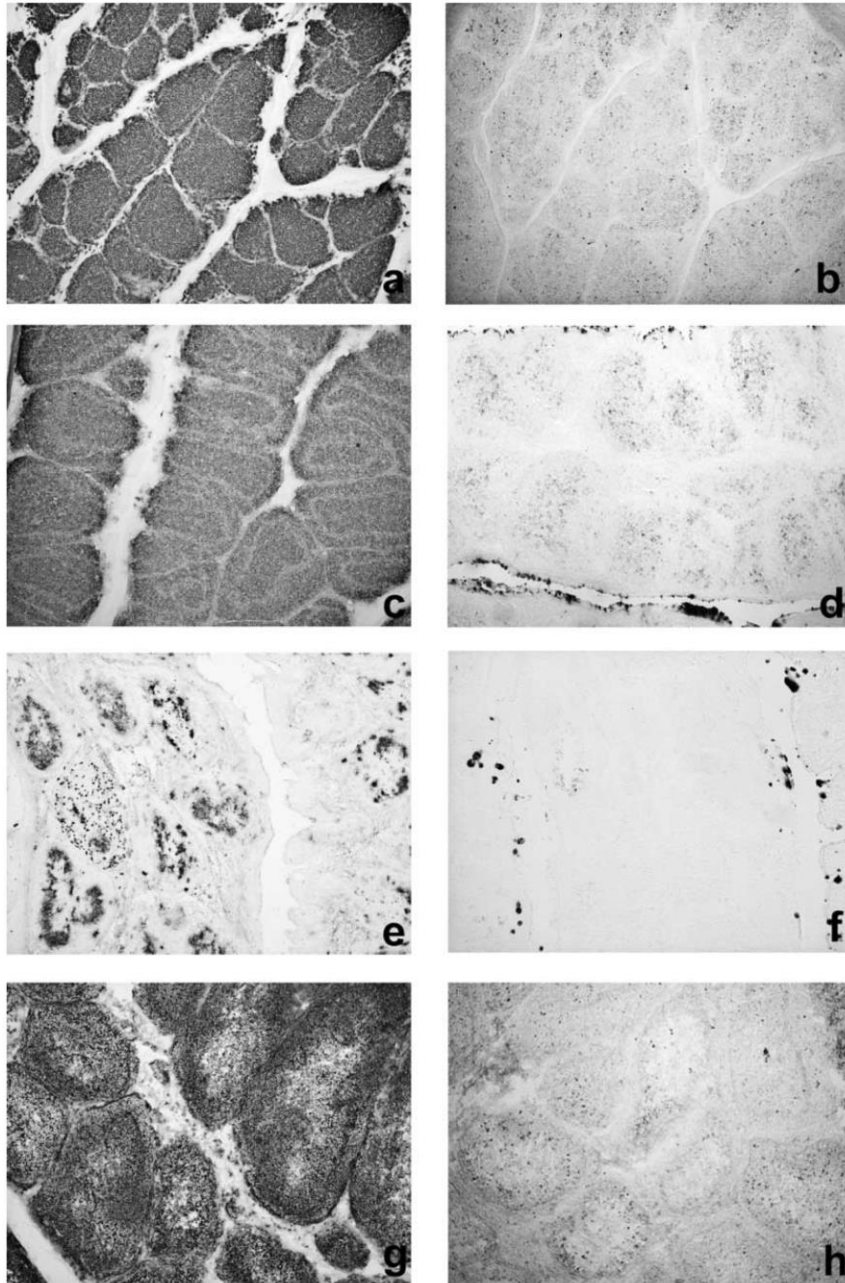
تقلیل B سل بورسی و کاهش موقتی بیان *chB1* و *Le^x* در پرنده‌های واکسینه شده به روش تلقیح داخل تخم‌مرغی

پرنده‌های SPF واکسینه شده به روش تلقیح داخل تخم‌مرغ (گروه ۲)

یک الگوی بیان مشابه *chB1* توسط هیبریداسیون Northern blot از روز ۱ تا روز ۶-۵ پس از هچ همانند گروه شاهد واکسینه نشده، شناسایی شد. از روز ۶ بیان ژن *chB1* به سختی تشخیص داده شد. بیان این ژن بین روزهای ۲۷ و ۳۵ دوباره قابل تشخیص شد. البته میزان بیان انفرادی بوده و از پرنده‌ای به پرنده دیگر متفاوت بود (شکل ۱B).



تصویر ۳. مقاطع سریالی از نمونه‌های بورس پرنده‌های SPF واکسینه شده با روش تلقیح داخل تخم مرغی با استفاده از رنگ آمیزی Bu-1b (a, c, e, g) و آنتی‌بادی مونوکلونال اختصاصی Lewis^x (b, d, f, h) بیان هر دو آنتی‌ژن مشابه گروه کنترل بود. در سن ۷ روزگی (c و d) فولیکول‌های بورسی از B سل‌ها تخلیه شدند و بیان Lewis^x شناسائی نشد. در سن ۳۷ روزگی مقاطع بورس (e و f) رژنراسیون فولیکول را نشان داد اما با این حال بیان Lewis^x شناسائی نشد. بیان ژن در زمان ترمیم کامل بورس به حداکثر خود رسید (روز ۴۱: g و h). بزرگنمایی: ۶۵ ایکس.



تصویر ۴. مقاطع سریالی از نمونه‌های بورس پرنده‌های گوشتی واکسینه شده با روش تلقیح داخل تخم مرغی با استفاده از رنگ آمیزی Bu-1b (a, c, e, g) و آنتی‌بادی مونوکلونال اختصاصی Lewis^x (b, d, f, h) رنگ آمیزی شدند. بیان Bu-1b و Lewis^x مشابه گروه کنترل در سن یک روزگی (a و b) و سن هفت روزگی (c و d) بود. تخلیه B سل‌ها و بیان غیر قابل ردیابی Lewis^x (روز ۳۷: e و f) با رژراسیون فولیکول‌های بورس همراه بود؛ در این فرآیند لنفوسیت‌های B سطوح متوسطی از آنتی‌ژن Lewis^x را بیان کردند (روز ۵۰: g و h). بزرگنمایی: ۶۰ ایکس.

مطالعات ایمنوهیستوشیمی با استفاده از mAb لنفوسیت B و Bu-Ib، زمان بندی الگوی بیان chB1 را تأیید می نمایند (تصویر 3a, c, e و g). فولیکول های سالم را می توان در بورس فابریسیوس جوجه های یک روزه تشخیص داد و این مقاطع از نظر رنگ آمیزی مشابه رنگ آمیزی جوجه های شاهد بودند. تا روز هفتم، سلول های Bu-Ib مثبت از فولیکول ها تخلیه شدند، با این وجود، در روز ۳۷، بورس از نظر بافتی ترمیم شده و حاوی فولیکول های متعدد سالم از لحاظ ساختاری بود. در روز ۴۱، بازسازی بیشتری نشان داده شد.

در مقاطع بورس جوجه های یک روزه، رنگ آمیزی قوی Le^x در هر فولیکول همانند گروه شاهد، تشخیص داده شد. هیچ گونه B سل Le^x مثبتی در هفته اول مشاهده نگردید و تقریباً رنگ آمیزی غیر قابل تشخیص در هر فولیکول در روز ۳۷ و همین طور رنگ آمیزی قوی در روز ۴۱ نیز مشاهده نگردید (تصویر 3b, d, f و h).

مرغ های گوشتی واکسینه شده با روش تلقیح داخل تخم مرغ (گروه ۳)

الگوی رونوشت مشابهی از chB1 توسط هیبریداسیون Northern blot از روز ۵ تا روز ۳۰ پس از آنکه همانند گروه شاهد واکسینه نشده، مشاهده گردید. کاهش جزئی برای یک دوره ۱۱ روزه بین روزهای ۳۳ تا ۴۴ تشخیص داده شد که در روز ۴۷ به سطح عادی خود برگشت (تصویر 1c).

مطالعات ایمنوهیستوشیمی با استفاده از آنتی بادی مونوکلونال Bu-Ib با زمان بندی الگوی بیان chB1 هم بستگی نشان دادند (تصویر 4a, c, e و g). فولیکول های عادی و سالم در بورس فابریسیوس جوجه های یک روزه، ۷ روزه و همچنین ۳۰ روزه شناسایی شدند (داده ها در اینجا ارائه نشده اند). تا روز ۳۷، اغلب سلول های Bu-Ib مثبت در فولیکول ها کاهش یافته و تنها سلول های Bu-Ib مثبت اندکی شناسایی شدند. با این وجود، مقاطع بورسی تهیه شده از روز ۵۰، فولیکول های بورسی کاملاً رزنده که سرشار از سلول های Bu-Ib بودند را نشان داد که این مهم نمایانگر ساختار مشابه با بورس های گروه شاهد می باشد.

رنگ آمیزی متوسط Le^x در بورس جوجه های ۱ و ۷ روزه شناسایی شد. مقطع بورس از روز ۳۷ حاوی هیچگونه B سل Le^x مثبت نبود اما در روز ۵۰ مجدداً رنگ آمیزی متوسط قابل مشاهده بود (تصاویر 4b, d, f و h).

در روز ۵، میانگین هندسی تیتر (GMT) آنتی بادی مادری قابل شناسایی با تست خنثی سازی ویروس (VN) ۷۳۰۰ بود که این عدد در روز ۲۶ به ۱۰۰ کاهش یافت (تصویر 1c). با این وجود، ۱ هفته بعد (در روز ۳۳)، آنتی بادی اختصاصی IBDV ناشی از واکسیناسیون با روش تلقیح داخل تخم مرغی ظاهر گردید و GMT تا ۴۰۰۰ افزایش یافت.

بحث

IBDV یک ویروس لنفوتروپیک است که می تواند باعث سرکوب ایمنی هومورال و تا حد کمتری سلولی در جوجه هایی که پیش از سن ۳ هفتگی آلوده شده اند، بشود. گزارشاتی وجود دارد که نشان می دهند طول مدت سرکوب ایمنی و ترمیم پاسخ ایمنی هومورال ظاهراً با بازسازی بافتی بورس فابریسیوس هم بستگی دارد. ادواردز و همکاران (۱۹۸۲) رابطه بین آسیب بورسی و سرکوب پاسخ ایمنی هومورال ایجاد شده توسط ویروس بیماری بورس هم بستگی دارد. اسپنر و همکاران (۱۹۹۹) در مورد SPF مورد مطالعه قرار دادند و اظهار داشتند که سلامت کامل جوجه ها از نظر سیستم ایمنی بعید بوده بجز در مواردی که ۵۰ درصد بورس به صورت کامل ترمیم و بازسازی شود. کیم و همکاران (۱۹۹۹) در مورد جوجه های SPF نشان دادند که پاسخ های

آنتی بادی به ویروس بیماری نیوکاسل (NDV) تنها در ۶ هفته اول ابتلا به IBDV متاثر می‌شود و بازیابی مورفولوژی بورس همزمان با سطوح عادی آنتی‌بادی رخ می‌دهد. از طرف دیگر، گیامبرون (۱۹۷۹) کاهش پاسخ‌های ایمنی به NDV را در مرغ‌های بالغ ۴۲ هفته‌ای که در اوایل زندگی خود بیمار و دچار آسیب بورسی برگشت‌ناپذیر شده بودند را گزارش نمود. این یافته‌ها نشان می‌دهند که بازسازی بافتی بورس برای شروع یک پاسخ آنتی‌بادی نرمال، ضروری می‌باشد. در این مطالعه، ما آسیب بورسی ناپایدار را با استفاده از یک واکسن کمپلکس ایمنی علیه IBDV ایجاد نموده و به دنبال شواهدی بودیم که اثبات نماید علاوه بر ترمیم بافتی، بازسازی کارکردی لنفوسیت‌های B بورسی نیز رخ می‌دهد.

در پرندگان شاهد، ما بیان دائم chB1 را از روزهای ۱۹-۱۸ دوره آزمایش، مشاهده نمودیم (تصویر 1A)، حتی در یک مرغ ۴/۵ ماه (داده‌ها در اینجا ارائه نشده‌اند) ادامه داشت. نقش فیزیولوژیکی واقعی مولکول chB1 در افتراق B سل احتمالی است، هرچند الگوی بیان این ژن (با در نظر گرفتن زمان‌بندی و توسعه بافت) با فرآیند هیپرکانورسیون ژن، کاملاً هم‌بستگی دارد. رابطه کارکردی بین این دو رویداد تاکنون به اثبات نرسیده است، با این حال، بیان دائمی ژن chB1 نشان‌دهنده لنفوسیت‌های B بورسی سالم و فعال پیش و پس از هج می‌باشد.

به منظور تعیین ویژگی‌های بیشتر وضعیت کارکردی سلول‌های B بورسی، ما نشانگر سطح سلول Lewis^x را مورد مطالعه قرار دادیم، این نشانگر نشان‌دهنده آندسته از لنفوسیت‌های B می‌باشد که برای آغاز هیپرکانورسیون Ig ایجاد شده‌اند. نتایج ایمنوهیستوشیمیایی ما در کنترل نمونه‌های بورسی شاهد با استفاده از mAb اختصاصی Le^x با نتایج به‌دست آمده توسط مستلر و همکاران (۱۹۹۵b) مطابقت دارد. این محققین نشان داده‌اند که بیان Le^x در روزهای ۱۷-۱۵ دوره جنینی در بورس آغاز می‌شود و حدوداً در زمان هج به بالاترین شدت خود می‌رسد و سپس مجدداً در سطح پایینی تنظیم می‌گردد. آن‌ها دریافتند که ظاهر شدن اپی‌توپ Le^x بر روی سطح B سل نشان‌دهنده B سل‌هایی می‌باشد که هیپرکانورسیون ژن را در جایگاه Igl بازآرایی شده، اعمال می‌نمایند. علاوه بر این، تغییر وضعیت از بیان بالای Le^x به سطح متوسط، می‌تواند نشان‌دهنده یک جمعیت بالغ‌تر از سلول B باشد که می‌توانند به اطراف جابجا شوند. این محققان سلول‌های Le^x مثبت را حتی در ۱۰ هفتهگی با استفاده از فلوسیتومتری نشان داده‌اند. ما با استفاده از ایمنوهیستوشیمی بیان ضعیف Le^x را از بورس مرغ ۷ هفته تشخیص دادیم، که احتمالاً ناشی از حساسیت کم روشی است که استفاده نمودیم.

گزارش شده است که واکسیناسیون در زمان هج توسط واکسن کمپلکس ایمنی IBDV، از جوجه‌های SPF در مقابل آسیب بورسی در ۶ الی ۸ روزگی محافظت می‌نماید اما باعث کوچک شدن بورس در سن ۲۱ روزگی می‌شود، هیچ‌گونه نتایجی برای دوره تداخل، ارائه نشده است. در آزمایشات ما، واکسیناسیون IBDV-BDA به شیوه تلقیح داخل تخم، فولیکول‌های بورسی را کاهش داده که ما به‌طور مستقیم توسط ایمنوهیستوشیمی با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال Bu-Ib اختصاصی B سل (تصاویر ۳ و ۴) و به‌طور مستقیم با استفاده از کاهش سطوح بیان ژن chB1 و رنگ‌آمیزی Le^x منفی (تصویر C, 1B و تصاویر ۳ و ۴) در هر دو گروه پرند SPF و پرند گوشتی شناسایی نمودیم. هرچند ما شاهد باقی ماندن سلول‌های Bu-Ib مثبت در طی فاز تخلیه^۴ گرون فولیکول‌ها بودیم، نتایج منفی رنگ‌آمیزی هم‌زمان Le^x نشان می‌دهند که این سلول‌ها در این زمان فعال نبوده و یا روش ما آنقدر حساس نیست که بتواند بیان Le^x را تشخیص دهد. اگرچه الگوی مشابهی از اثر ویروسی در دو گروه را مشاهده نمودیم، اما اختلاف‌های قابل توجهی در فرآیند بیماری‌زایی وجود داشت. در پرند‌های گوشتی تخلیه بورس با تاخیر صورت گرفت و هم با شدت کمتری همراه بود و هم زمان کمتری طول کشید (در حدود روز ۳۳ شروع شد، تنها یک کاهش اندک در بیان chB1 مشاهده شد و به مدت ۱۱ روز طول کشید، تصویر ۱C). در مقایسه با پرند‌های SPF (در هفته اول آغاز شد، ۳ تا ۴

⁴ Depletion file

هفته به طول انجامید و chB1 به طور کامل ناپدید بود، تصویر ۱B). گسترش کمتر آسیب در پرند‌های گوشتی با تاثیرات حفاظتی آنتی‌بادی‌های اختصاصی مادری قابل توجیه می‌باشند، هرچند اطلاعات اندکی در خصوص تاثیر آنتی‌بادی مادری و آنتی‌بادی موجود در واکسن کمپلکس ایمنی بر روی بیماری وجود دارد. احتمالاً این آنتی‌بادی‌ها اثر یکسانی بر ویروس داشته و به علت حضور مقادیر بالای آنتی‌بادی‌های اختصاصی IBDV در پرند‌های گوشتی، مانع تکثیر ویروس گردیده و در نتیجه از پرند‌ها برای یک مدت زمان طولانی‌تر محافظت می‌نمایند. آنتی‌بادی مادری که مدت زمان زیادی در بدن باقی می‌ماند می‌تواند تا اندازه‌ای ویروس واکسن را خنثی سازد و آسیب بورس را کاهش دهد، در نتیجه، زمان کمتری برای بازسازی نیاز است. در این آزمایش، ما توانستیم تیتراهای آنتی‌بادی مادری بالایی را در مرغ‌های گوشتی واکسینه شده به روش تلقیح داخل تخم‌مرغی در زمان پس از هج (تصویر ۱C)، تشخیص دهیم که به تدریج تا مقادیر تقریباً ۱۰۰ در سن ۴ هفتگی، کاهش یافت. با این وجود، ۱ هفته بعد، افزایش تیترا آنتی‌بادی مشاهده گردید که نشان می‌دهد واکسیناسیون علیه IBDV موفقیت آمیز بوده است. دینامیک-های تیتراهای آنتی‌بادی و اثرات ویروسی (که توسط الگوی بیان chB1 نشان داده می‌شوند، تصویر ۱C) به خوبی با یکدیگر هم‌بستگی داشتند، زیرا کاهش آنتی‌بادی مادری قبل از کاهش بیان chB1 تا حدود ۱ هفته رخ می‌دهد. ما همچنین دریافتیم که افزایش در تیتراهای آنتی‌بادی قبل از ظهور بیان chB1 تا حدوداً ۱۴ روزگی اتفاق می‌افتد. نتایج ما نشان می‌دهند که در زمان فقدان آنتی‌بادی اختصاصی مادری تقریباً ۵ روز (از روز ۲۶ تا ۳۱) برای تکثیر گسترده ویروس و تخریب سطحی بورس و کاهش بیان ژن chB1 کافی است. به طور موازی با تخریب بورسی، آنتی‌بادی‌های اختصاصی IBDV با محدود کردن تکثیر ویروس، می‌توانند امکان بازسازی بورس فابرسیوس را فراهم آورند. علائم بازسازی بافتی در هر دو گروه واکسینه شده مشاهده گردید. اغلب فولیکول‌ها سرشار از لنفوسیت‌های B، Bu-Ib مثبت بودند؛ این مهم نشان می‌دهد که احتمال تکثیر تدریجی لنفوسیت B وجود دارد. به طور هم‌زمان، بیان chB1 به مقادیری مشابه سطوح نمونه شاهد بازگشت، که نشان می‌دهد سلول‌های B تکثیر شده از لحاظ کارکرد سالم می‌باشند. ما همچنین رنگ‌آمیزی متوسط Le^x را در هر دو گروه مشاهده نمودیم که نشان می‌دهد بورس فابرسیوس می‌تواند محیط مناسبی برای رشد و توسعه B سل‌ها فراهم نماید. روش ایمنو‌هیستوشیمی برای تعیین نسبت سلول‌های B حاوی Le^x شدید یا متوسط در بورس بازسازی شده، مناسب نمی‌باشد. با این وجود، مثبت بودن Le^x نشان می‌دهد که لنفوسیت‌های B یا در فرآیند هیپرکانورسیون ژن هستند یا در یک وضعیت بالغ‌تر می‌باشند که این فرآیند در آن‌ها پیش از این به اتمام رسیده است.

بر اساس نتایج ما و متون منتشر شده، یک مدل برای سرکوب سیستم ایمنی و ترمیم پاسخ ایمنی متعاقب واکسیناسیون IBDV-BDA را ارائه نمودیم. از آنجایی که سلول هدف اصلی برای ویروس بیماری بورس عفونی لنفوسیت B می‌باشد، ویروس تکثیر یافته فولیکول‌های بورس را تخلیه کرده و از توسعه سیستم ایمنی جلوگیری می‌نمایند. از سایر اندام‌ها، طحال نیز تحت تاثیر قرار می‌گیرند، که خود نیز مکانی برای پاسخ ایمنی می‌باشند. لنفوسیت‌ها و B سل‌های تولید کننده آنتی‌بادی نیز می‌توانند هدفی برای ویروس بیماری بورس عفونی محسوب شوند، بنابراین این سلول‌ها در طحال و در سایر بافت‌های لنفوئیدی پیرامونی تا میزان مشخصی کاهش می‌یابند و این کاهش موجب پاسخ‌های سرکوب شده آنتی‌بادی نسبت به آنتی‌ژن‌های نیوکاسل یا BA می‌گردند. تجزیه B سل در اثر تکثیر ویروس احتمالاً یک فرآیند تصادفی می‌باشد و در نتیجه آن دسته از لنفوسیت‌هایی که به آنتی‌ژن‌های IBDV پاسخ می‌دهند نیز ممکن است تا یک سطح مشخصی تحت تاثیر قرار گیرند. با این وجود، B سل‌های باقیمانده، آنتی‌بادی اختصاصی IBDV کافی جهت ارائه یک پاسخ ایمنی مؤثر تولید می‌نمایند. پس از محدود شدن تکثیر ویروس، فرآیند ترمیم بافتی به بورس امکان ادامه عملکرد اصلی‌اش را داده و این اندام دوباره می‌تواند به‌عنوان یک اندام لنفوئیدی اولیه فعالیت به فعالیت خود ادامه دهد. طحال و اندام‌های لنفوئیدی پیرامونی نیز مجدداً به صورت کلون درآمده و می‌توانند به بازگشت پاسخ‌های هومورال نرمال کمک نمایند.

- Buerstedde, J.-M., Reynaud, C.-A., Humphries, E.H., Olson, W., Ewert, D.L., Weill, J.-C., 1990. Light chain gene conversion continues at high rate in an ALV-induced cell line. *EMBO* 9, 921-927.
- Burkhardt, E., Muller, H., 1987. Susceptibility of chicken blood lymphoblasts and monocytes to infectious bursal disease virus (IBDV). *Arch. Virol.* 94, 297-303.
- Edwards, K.R., Muskett, J.C., Thornton, D.H., 1982. Duration of immunosuppression caused by a vaccine strain of infectious bursal disease. *Res. Vet. Sci.* 32, 79-83.
- Giambrone, J.J., 1979. Effects of early infectious bursal disease virus infection on immunity to Newcastle disease in adult chickens. *Poult. Sci.* 58, 794-798.
- Goitsuka, R., Chen, C.H., Cooper, M.D., 1997. B-cells in the bursa of Fabricius express a novel C-type lectin gene. *J. Immunol.* 159, 3126-3132.
- Jackwood, D.J., Saif, Y.M., Moorhead, P.D., Dearth, R.N., 1982. Infectious bursal disease virus and *Alcaligenes faecalis* infections in turkeys. *Avian Dis.* 26, 365-374.
- Jeurissen, S.H.M., Janse, E.M., Lehrbach, P.R., Haddad, E.E., Avakian, A., Whitfill, C.E., 1998. The working mechanism of an immune complex vaccine that protects chickens against infectious bursal disease. *Immunology* 95, 494-500.
- Kibenge, F.S.B., Dhillon, A.S., Russel, R.G., 1988. Biochemistry and immunology of infectious bursal disease virus. *J. Gen. Virol.* 69, 1757-1775.
- Kim, I.J., Gagic, M., Sharma, J.M., 1999. Recovery of antibody-producing ability and lymphocyte repopulation of bursal follicles in chickens exposed to infectious bursal disease virus. *Avian Dis.* 43, 401-413.
- Lasher, H.N., Shane, S.M., 1994. Infectious bursal disease. *World's Poult. Sci. J.* 50, 133-166.
- Lukert, P.D., Saif, Y.M., 1997. Infectious bursal disease. In: Calnek, B.W., Barnes, H.J., Beard, C.W., Mcdouglad, L.R., Saif, Y.M. (Eds.), *Disease of Poultry*, 10th Edition. Iowa State University Press, Ames, IA, pp. 721-738.
- Masteller, E.L., Larsen, R.D., Carlson, L.M., Pickel, J.M., Nickoloff, B., Lowe, J., Thompson, C.B., Lee, K.P., 1995a. Chicken B cells undergo discrete developmental changes in surface carbohydrate structure that appear to play a role in directing lymphocyte migration during embryogenesis. *Development* 121, 1657-1667.
- Masteller, E.L., Lee, K.P., Carlson, L.M., Thompson, C.B., 1995b. Expression of sialyl Lewisx and Lewisx defines distinct stages of chicken B cell maturation. *J. Immunol.* 155, 5550-5556.
- Masteller, E.L., Pharr, G.T., Funk, P.E., Thompson, C.B., 1997. Avian B cell development. *Int. Rev. Immunol.* 15, 185-206.
- McCormack, W.T., Tjoelker, L.W., Carlson, L.M., Petryniak, B., Barth, C.F., Humphries, E.H., Thompson, C.B., 1989a. Chicken IgL gene rearrangement involves deletion of a circular episome and addition of single nonrandom nucleotides to both coding segments. *Cell* 56, 785-791.

- McCormack, W.T., Tjoelker, L.W., Barth, C.F., Carlson, L.M., Petryniak, B., Humphries, E.H., Thompson, C.B., 1989b. Selection for B cells with productive IgL gene rearrangements occurs in the bursa of Fabricius during chicken embryonic development. *Genes Develop.* 3, 838-847.
- McCormack, W.T., Tjoelker, L.W., Thompson, C.B., 1991. Avian B-cell development: generation of an immunoglobulin repertoire by gene conversion. *Annu. Rev. Immunol.* 9, 219-241.
- Olah, I., Glick, B., 1995. Dendritic cells in the bursal follicles and germinal centers of the chicken's caecal tonsil express vimentin but not desmin. *Anat. Rec.* 243, 384-389.
- Parvari, R., Ziv, E., Lantner, F., Heller, D., Schechter, I., 1990. Somatic diversification of chicken immunoglobulin light chains by point mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87, 3072-3076.
- Reynaud, C.-A., Anquez, V., Grimal, H., Weill, J.-C., 1987. A hyperconversion mechanism generates the chicken light chain preimmune repertoire. *Cell* 48, 379-388.
- Rodenberg, J., Sharma, J.M., Belzer, S.W., Nordgren, R.M., Naqi, S., 1994. Flow cytometric analysis of B cell and T cell subpopulations in specific-pathogen-free chickens infected with infectious bursal disease virus. *Avian Dis.* 38, 16-21.
- Sharma, J.M., Burmester, B.R., 1982. Resistance to Marek's Disease at hatching in chickens vaccinated as embryo with turkey herpes virus. *Avian Dis.* 26, 134-149.
- Sharma, J.M., Lee, L.F., 1983. Effect of infectious bursal disease on natural killer cell activity and mitogenic response of chicken lymphoid cells: role of adherent cells in cellular immune suppression. *Infect. Immunol.* 42, 747-754.
- Weill, J.-C., Reynaud, C.-A., 1987. The chicken B cell compartment. *Science* 238, 1094—1098.
- Whitfill, C.E., Haddad, E.E., Ricks, C.A., Skeeles, J.K., Newberry, L.A., Beasley, J.N., Andrews, P.D., Thoma, J.A., Wakenell, P.S., 1995. Determination of optimum formulation of a novel infectious bursal disease virus (IBDV) vaccine constructed by mixing bursal disease antibody with IBDV. *Avian Dis.* 39, 687-699.

۱۴

کنترل بیماری گامبورو با استفاده از واکسن ایمونو کمپلکس

Palya V. et al 2004 WPC

حیوانات مورد مطالعه

در این مطالعه ۴۰ هزار تخم مرغ گوشتی تجاری در سن ۱۸ روزگی جنینی و ۴۰ هزار قطعه جوجه گوشتی تجاری یک روزه مورد استفاده قرار گرفتند و هر دو گروه خود نیز به دو گروه دیگر تقسیم شدند.

واکسن مورد استفاده

واکسن مورد استفاده در این مطالعه واکسن Cevac Transmune® بوده که بر اساس نوع گروه به روش داخل تخم مرغی یا زیرجلدی تزریق شد.

نوع چالش

در این مطالعه یک سویه بسیار حاد گامبورو به نام MOH-94 جهت ایجاد چالش در گله استفاده شد. دُز عفونی آن 103 EID50 به روش داخل دهانی به هر پرنده خورانده شد. بررسی‌های پس از چالش همچون علائم بالینی و کالبدگشایی، اندازه‌گیری وزن بورس فابرسیوس، افزایش وزن بدن و اسکوربندی هیستوپاتولوژی بورس فابرسیوس مورد ارزیابی قرار گرفتند.

اطلاعات علمی

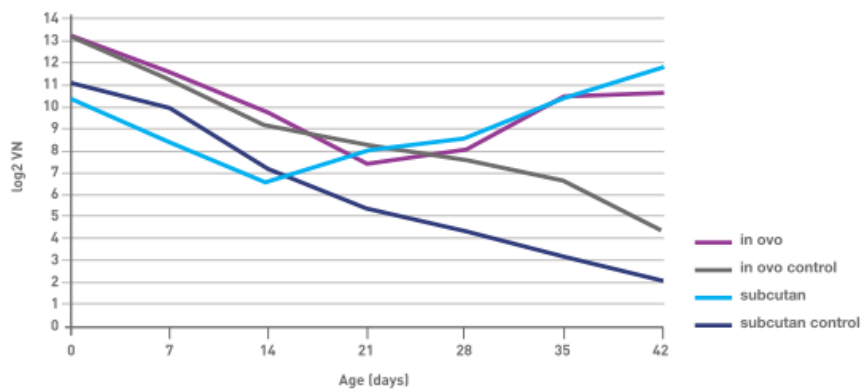
CEVAC Transmune®

جدول زیر کل طرح مورد مطالعه را خلاصه‌وار بیان می‌کند:

گروه	Cevac® Transmune	سرولوژی گامبورو (تست VN) (تعداد=۲۰)	کالبدگشایی و هیستوپاتولوژی بوس فابریسیوس (تعداد=۲۰)	چالش با ویروس گامبوروی فوق حاد (تعداد=۲۰)
تخم مرغ‌های جنین دار ۱۸ روزه	۰/۰۵ سی سی داخل تخم مرغی	به صورت هفتگی از روز ۰ تا ۴۲ روزگی	به صورت هفتگی از روز ۷ تا ۴۲ روزگی	به صورت هفتگی از روز ۱۴ تا ۴۲
	هیچ			
جوجه‌های یک روزه	۰/۱ سی سی زیرجلدی			
	هیچ			

نتایج سرولوژی

تصویر زیر نتایج سرولوژی به دست آمده در این مطالعه را نشان می‌دهد:



نتایج تیتراژ مادری در یک
روزگی (VN):

*داخل تخم مرغی:
 \log_2 (تقریباً) = ۱۳/۱۸
(۹۲۸۰)

*زیرجلدی: ۱۰/۳۹
 \log_2 (تقریباً) = ۱۳۴۲

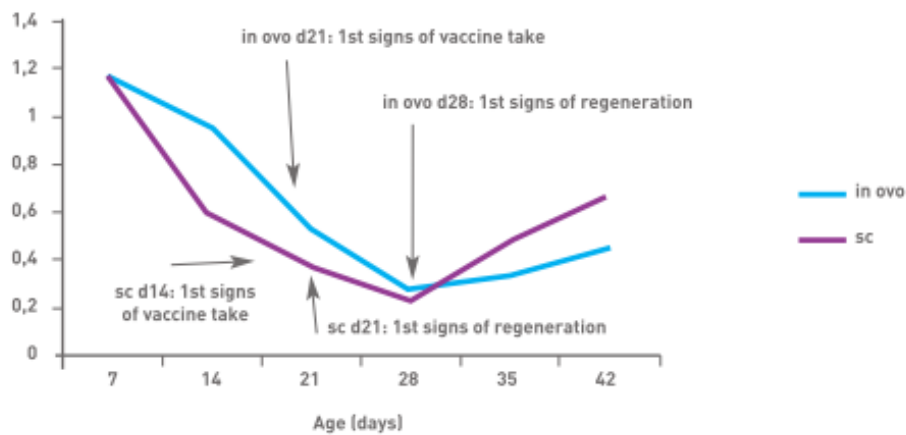
شروع پاسخ آنتی‌بادی، نشان دهنده دریافت واقعی واکسن در بدن می‌باشد. بر اساس روند متابولیزه شدن کمپلکس ایمنی واکسن در بدن، در صورت پایین بودن ایمنی مادری در سن یک‌روزگی، دریافت واقعی واکسن زودتر رخ می‌دهد، بنابراین همان‌طور که در این‌جا نیز قابل مشاهده است گروه تزریق زیرجلدی در مقایسه با گروه تزریق داخل تخم‌مرغی، پاسخ آنتی‌بادی زودتری را نشان می‌دهد (سن ۱۴ روزگی در مقابل سن ۲۱ روزگی).

نتایج قابلیت هج

- میزان جوجه‌درآوری در گروهی که واکسن ترنسمیون را با روش تلقیح داخل تخم‌مرغی دریافت کرده بودند برابر ۸۷/۱۱ بود.
- میزان جوجه‌درآوری در گروهی که واکسنی به روش تلقیح داخل تخم‌مرغی دریافت نکرده بودند برابر ۸۶/۶٪ بود.

نتایج دریافت واکسن

ایندکس وزن بورس به وزن بدن (B/B index) پس از واکسیناسیون در تصویر زیر نشان داده شده است:

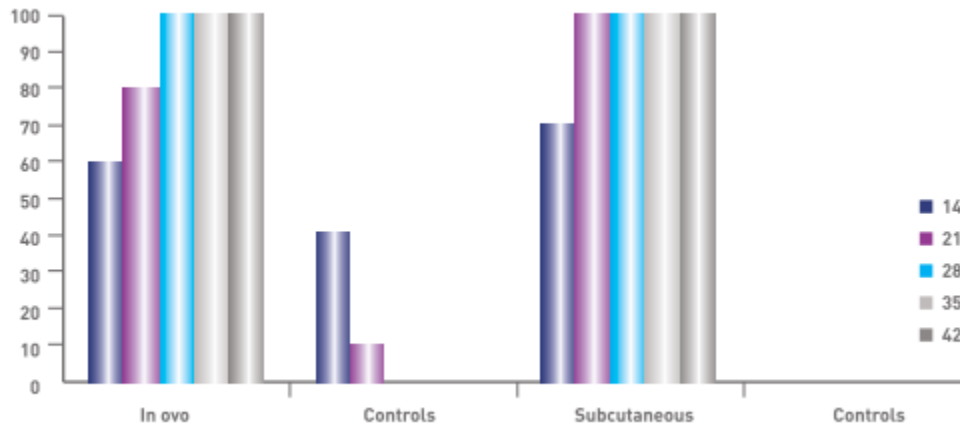


- به هنگام دریافت واکسن توسط پرنده یک آتروفی نسبی اما موقتی در بورس دیده می‌شود که به‌عنوان نشانه خوبی از دریافت واکسن محسوب می‌گردد. سپس علائم بازسازی مجدد بورس ظرف مدت یک هفته بعد از ورود ویروس به بورس فابرسیوس دیده می‌شود.

میزان محافظت کلینیکی پس از چالش با ویروس فوق حاد گامبرو

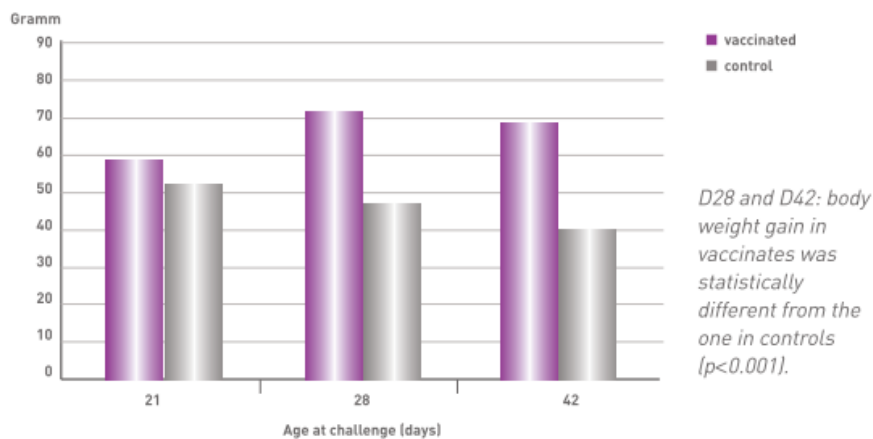
میزان محافظت پس از چالش با vvIBD (سن بر اساس روز)					
۴۲ روزگی	۳۵ روزگی	۲۸ روزگی	۲۱ روزگی	۱۴ روزگی	
٪ ۱۰۰	٪ ۱۰۰	٪ ۱۰۰	٪ ۸۰	٪ ۶۰	تلقیح داخل تخم مرغی
۰	۰	۰	٪ ۱۰	٪ ۴۰	کنترل
٪ ۱۰۰	٪ ۱۰۰	٪ ۱۰۰	٪ ۱۰۰	٪ ۷۰	زیرجلدی
۰	۰	۰	۰	۰	کنترل

نمودار میزان محافظت پس از چالش هفتگی با ویروس فوق حاد گامبورو (در دو گروه با میزان متفاوت آنتی‌بادی مادری)



محافظت کامل بلافاصله همزمان با تکثیر ویروس در بورس آغاز و متعاقب آن تولید آنتی‌بادی هم شروع می‌شود. شرایط چالش‌های تجربی همیشه بسیار شدیدتر و قوی‌تر از شرایط فارم می‌باشند. چرا که به هر پرندگی میزان مشخصی از دُز ویروس به صورت انفرادی تلقیح می‌شود.

در تصاویر زیر میزان محافظت در سنین اولیه نشان داده می‌شوند. در روز ۲۸ و ۴۲ میزان وزن‌گیری در گروه واکسینه به‌طور معناداری بیش از گروه کنترل می‌باشد.



نتیجه گیری

- واکسیناسیون با روش تلقیح داخل تخم مرغی واکسن Cevac Transmune® برای جنین کاملاً بی خطر بوده و میزان جوجه‌درآوری به میزان معناداری متاثر نخواهد شد.
- واکسن Cevac Transmune® توانایی ایجاد ایمنی هم در حضور آنتی‌بادی مادری بالا و هم در حضور آنتی‌بادی مادری پایین را دارد.
- هرچه میزان آنتی‌بادی مادری پایین‌تر باشد، زمان دریافت واقعی واکسن توسط بدن پرنده نیز زودتر رخ می‌دهد.
- دریافت واکسن با استفاده از بررسی هیستوپاتولوژی بورس قابل شناسایی بوده و بازسازی مجدد بورس در طول مدت یک هفته انجام می‌گیرد.
- بلافاصله پس از ورود ویروس به بورس فابرسیوس، محافظت کامل علیه درگیری با گامبورو فوق حاد تا سن کشتار جوجه گوشتی ایجاد می‌گردد.
- در این مطالعه چالش با ویروس گامبورو فوق حاد بسیار پرحدت انجام شده است؛ بطوریکه ایمنی مادری نیز در ۱۴ روزگی توانایی مهار آن را نداشته است و این در حالیست که پرنده در مرغداری خیلی به‌ندرت با این شرایط مواجه می‌گردد؛ با این وجود واکسن توانایی مهار بیماری را نشان می‌دهد.

کنترل بیماری گامبورو با استفاده از واکسن ایمونوکمپلکس^{۴۵}

V.Palya¹, K. Forgach¹, T. Suveges¹, M. Kelemen¹, J. Meszaros², J. Benyeda³

¹ CEVA-Phylaxia Veterinary Biologicals Co. Ltd., Budapest, Hungary; ² Veterinary Medical Research Institute of Hungarian Academy of Science, Budapest, Hungary; ³ Prophyl Ltd., Mohacs, Hungary

خلاصه:

ضرورت مقابله با ویروس فوق حاد بیماری گامبورو از یک طرف و حضور مقادیر بالای ایمنی مادری در جوجه‌ها و در نتیجه خطر خنثی‌سازی ویروس واکسن از طرف دیگر، اهمیت مبارزه با این بیماری را با استفاده از واکسن‌های توانا و کارآمد دو چندان می‌کند. در تلاش برای یافتن راهی برای حل این مشکل، واکسن جدیدی (Cevac Transmune IBD®) حاصل از ترکیب یک سویه واکسینال تخفیف حدت یافته اینترمدیت پلاس ویروس گامبورو به اضافه آنتی‌سرم اختصاصی، طراحی شده است. این واکسن در جوجه یک‌روزه به واسطه تلقیح زیر جلدی و نیز در تخم‌مرغ جنین‌دار ۱۸ روزه توسط روش تلقیح داخل تخم‌مرغی مورد آزمایش قرار گرفته است. میزان تأثیرگذاری واکسن در این مطالعه با استفاده از تست‌های سرولوژیکی، آزمون هیستوپاتولوژی بورس فابرسیوس و چالش در مقاطع زمانی مختلف پس از واکسیناسیون بررسی شد. پس از واکسیناسیون، همچنان کاهش ایمنی مادری گامبورو طی ۲ الی ۳ هفته دیده می‌شود و پیش از کاهش ایمنی مادری به مرز بحرانی، ایمنی فعال وارد عمل می‌گردد. با استفاده از تست‌های هیستوپاتولوژی، علائم دریافت واکسن در بورس در هر دو گروه تلقیح داخل تخم‌مرغی و تزریق زیرجلدی، از سن ۱۴ و ۲۱ روزگی به بعد قابل مشاهده بود. در مطالعه چالش با ویروس وحشی، مشخص شد که در هر دو گروه غیر واکسینه و واکسینه، جوجه‌ها در سن ۱۴ و ۲۱ روزگی همچنان تحت محافظت گسترده ایمنی مادری در برابر ابتلا به بیماری بالینی و کاهش وزن‌گیری قرار داشتند. با این وجود از لحاظ بررسی وضعیت هیستوپاتولوژی بورس، گروه واکسینه محافظت کاملی را علیه چالش نشان داده و گروه غیر واکسینه ضایعات بورس را به همراه داشته است. در ادامه آزمایش چالش در سن ۲۸ روزگی و بالاتر، گروه کنترل غیر واکسینه حساسیت ۱۰۰ درصدی به بیماری را نشان داد و در همین زمان گروه واکسینه محافظت بسیار خوبی داشت. این نتایج نشان داد که واکسن ایمونوکمپلکس یک ابزار بسیار قدرتمند برای واکسینه کردن جوجه‌های گوشتی علیه بیماری گامبورو می‌باشد که فقط با یک بار واکسیناسیون، مشکل ناسازگاری مقادیر متغیر آنتی بادی مادری با واکسن رفع شده و محافظت خوبی علیه بیماری گامبورو ایجاد می‌گردد.

⁴ WPC 2004 XXII World's Poultry Congress-Istanbul-Turkey

اطلاعات علمی

CEVAC Transmune®

مقدمه

بیماری گامبورو از سال‌های ۱۹۵۰، یک مشکل دائمی و مهم برای صنعت طیور تجاری محسوب می‌گردد. تنها راه محافظت پرندگان در برابر این بیماری، واکسیناسیون در زمان مناسب و دقیق می‌باشد. در پرندگان تجاری ایمنی مادری به صورت متغیر و اغلب بالا وجود دارد که در اکثر مواقع مانع تکثیر و ایمنی‌زایی واکسن‌های رایج گامبورو حتی پس از دو بار واکسیناسیون می‌گردد.

اخیراً واکسن ایمونوکمپلکس گامبورو حاصل از ترکیب ویروس واکسن با آنتی‌بادی‌های اختصاصی علیه آن پا به عرصه مبارزه با بیماری گامبورو نهاده است. این واکسن می‌تواند با روش تلقیح داخل تخم‌مرغی یا به صورت زیرجلدی استفاده شود. مزیت بزرگ این واکسن، توانایی منحصر به فرد آن در شروع تکثیر و القاء ایمنی فعال در بهترین زمان ممکن و به صورت انفرادی در یک‌پیک جوجه‌ها و در ارتباط مستقیم با میزان آنتی‌بادی مادری انتقال یافته به هر جوجه می‌باشد.

مواد و روش کار

واکسن مورد استفاده

واکسن Cevac Transmune IBD® یک واکسن ایمونوکمپلکس گامبورو بوده که ترکیبی از ویروس گامبورو کلاسیک تخفیف حدت یافته اینترمدیت پلاس (Winterfield 2512) و آنتی‌بادی اختصاصی علیه آن می‌باشد.

واکسیناسیون

- در این مطالعه از تخم‌مرغ‌های جنین‌دار ۱۸ روزه و جوجه‌های یک روزه دارای آنتی‌بادی مادری علیه گامبورو استفاده شد.
- مطالعه اول: دو گروه ۲۰ هزار قطعه‌ای جوجه گوشتی تجاری که یک گروه از آنها در سن ۱۸ روزگی جنینی واکسن ترنسمیون را با روش تلقیح داخل تخم‌مرغی دریافت کردند (۵/۰ سی سی) و گروه دیگر واکسن دریافت نکردند. پس از هج هر گروه در یک سالن مجزا پرورش یافتند.
 - مطالعه دوم: جوجه‌های گوشتی تجاری به ۲ گروه ۲۰ هزار قطعه‌ای تقسیم شدند. یک گروه واکسن دریافت نکردند و گروه دیگر واکسن ترنسمیون را به روش زیرجلدی (۱/۰ سی سی به ازای هر جوجه) دریافت کرد. پرندگان در سالن‌های مجزا پرورش داده شدند.

نمونه برداری

جهت تعیین میزان آنتی‌بادی مادری، در روز اول از پرندگان نمونه خون جمع‌آوری گردید. در روزهای ۷، ۱۴، ۲۱، ۳۵ و ۴۲ تعداد ۲۰ قطعه پرنده از هر ۴ گروه انتخاب و خون‌گیری شدند، سپس با روش انسانی کشته و وزن‌گیری شده و پس از کالبدگشایی بورس آن‌ها جدا گردید و وزن بورس به بدن (B/BW) محاسبه شد تا برای تعیین ایندکس بورس به بدن (BB Index) مورد استفاده قرار گیرد. بخشی از بورس نیز در فرمالین بافر نگهداری شد تا جهت آزمایشات هیستوپاتولوژی مورد

اطلاعات علمی

CEVAC Transmune®

استفاده قرار گیرد (رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ئوزین) تا از این ره گذر زمان شروع تکثیر واکسن در بورس، مورد بررسی قرار گیرد.

تست خنثی سازی ویروس (VN)

تیتراژ آنتی بادی تولیدی بر علیه ویروس گامبورو با تست خنثی سازی ویروس در کشت فیبروبلاست جنین ماکیان (CEF) اندازه گیری شد. برای این تست از ۳۰۰-۵۰۰ TCID₅₀ ویروس گامبورو سویه GP82 ادابته شده با کشت سلولی استفاده شد میزان ایندکس بورس به بدن با استفاده از روش فرمول لوسبو تعیین گردید.

چالش

پرندگان در روزهای ۱۴، ۲۱، ۲۸، ۳۵ و ۴۲ از تمامی گروهها (تعداد ۲۰ پرنده از هر گروه) به یک اتاق مجزا انتقال داده شدند و با میزان ۱۰۰۰ EID₅₀ ویروس فوق حاد گامبورو سویه MOM-94 چالش داده شدند. ۴ روز پس از چالش، ۲۰ پرنده تحت چالش از هر گروه کالبدگشایی شدند و بورس آنها برای مطالعه هیستوپاتولوژی جمع آوری گردید. در طول کالبدگشایی، بورس به طریق مشاهده ماکروسکوپی امتیازدهی شد. برای اسکوربندی بورسهای پرندگان از لحاظ حساسیت به چالش (ادم و خون-ریزی در بورس) و یا محافظت کامل مورد بررسی قرار گرفتند. در چالشهای روزهای ۲۱، ۲۸ و ۴۲ مطالعه اول ۲۰ پرنده به ازای هر گروه به صورت انفرادی وزن کشی شدند و ۱۰ روز بعد نیز وزن کشی صورت گرفت. ارزیابی میزان محافظت با استفاده از مطالعه پاتولوژی ماکروسکوپی و مطالعه هیستوپاتولوژی میکروسکوپی بورس، ۴ روز پس از چالش و میزان وزن گیری در طی ۱۰ روز پس از چالش صورت گرفت.

نتایج و بحث

پرندگان واکسینه شده با روش تلقیح داخل تخم مرغی با یک دُز Cevac Transmune IBD® به صورت طبیعی هیچ شدند. درصد هیچ در این پرندگان (۱/۸۷٪) تغییر معنی داری نسبت به گروه غیرواکسینه نداشت (۶/۸۶٪). تلفات پس از هیچ در گروه واکسینه، دیده نشد ولی در گروه غیر واکسینه یک مورد مرگ پس از هیچ دیده شد. از لحاظ میزان تلفات در طول دوره رشد نیز تفاوتی بین گروه واکسینه و غیرواکسینه در هر دو مطالعه دیده نشد (نتایج نشان داده نشد).

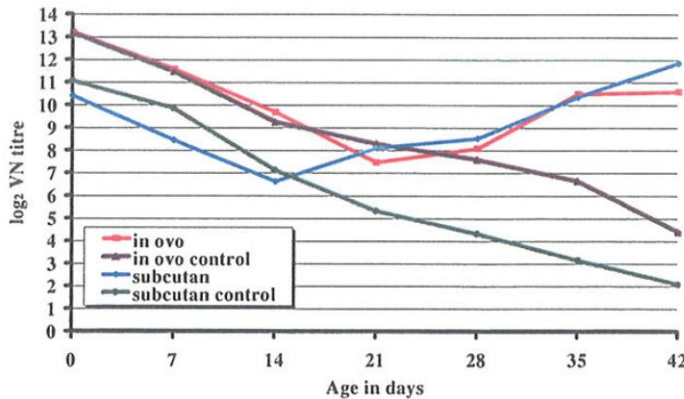
سرولوژی

در مطالعه اول و دوم به ترتیب جوجههای یک روزه دارای تیتراژ آنتی بادی مادری در حدود ۱۳/۱۸ و \log_2 ۱۰/۳۹ (با روش VN) بودند. کاهش ایمنی مادری جوجهها در طی هفتههای اول مشاهده شد که کمترین حد آن (\log_2 ۷/۴۵) در گروه تلقیح داخل تخم مرغی و \log_2 ۶/۶۲ در گروه تزریق زیر جلدی) بین هفتههای دوم و سوم ثبت گردید. پس از آن ایمنی همورال فعال حاصل از واکسیناسیون علیه بیماری گامبورو مشاهده شد. در گروههای واکسینه هر دو مطالعه پس از هفته سوم افزایش آنتی بادی در خون مشاهده شد، در حالی که در گروههای غیر واکسینه آنتی بادی مادری کاهش یافت (نمودار شماره ۱). پرندگان دارای میزان

اطلاعات علمی

CEVAC Transmune®

کمتر آنتی‌بادی مادری در هنگام هج (مطالعه ۲ تزریق به روش زیرجلدی) پاسخ ایمنی سریع‌تری را نسبت به پرندگان دارای آنتی‌بادی مادری بالا (پرندگان واکسینه شده با روش تلقیح داخل تخم‌مرغی در مطالعه اول) در برابر واکسیناسیون نشان دادند.



نمودار شماره ۱: پاسخ سرولوژیکی پرنده به مصرف واکسن Cevac Transmune IBD®

هیستولوژی و ایندکس وزن بورس به وزن بدن (BB Index)

در مطالعه اول، پرندگان واکسینه شده با واکسن Cevac Transmune IBD® با روش تلقیح داخل تخم‌مرغی، ۶۵٪ بورس‌ها در سن ۲۱ روزگی علائم دریافت واکسن را نشان دادند. در سن ۲۸ روزگی بازسازی بورس به‌طور کامل رخ داده بود و متوسط ایندکس بورس به بدن در ۱۴ روزگی در پرندگان واکسینه تفاوتی با پرندگان غیر واکسینه نداشت که نشان‌دهنده اثر مہاری تکثیر آنتی‌بادی مادری علیه ویروس واکسینال می‌باشد. با این وجود در سن ۳ هفتگی، میزان ایندکس بورس به بدن در پرندگان واکسینه کمتر از پرندگان غیر واکسینه بود که نشان‌دهنده تکثیر معنی‌دار واکسن در بورس می‌باشد. در سن ۲۸ روزگی میزان ایندکس وزن بورس به وزن بدن به کمترین میزان خود رسیده و آتروفی بورس در پرندگان واکسینه دیده می‌شد. از این سن به بعد هیستوپاتولوژی بورس فابرسیوس و نیز ایندکس وزن بورس به وزن بدن علائم بازسازی و بهبود را نشان می‌داد. این اطلاعات نشان دهنده تأثیر آنتی‌بادی مادری بر تأخیر تکثیر ویروس واکسن و نیز کاهش ضایعات بورس فابرسیوس بودند. در مطالعه دوم، پروسه تکاملی مشابه مطالعه اول در ضایعات بورس و آتروفی (ایندکس بورس به بدن) در پرندگان واکسینه دیده شد. تنها تفاوت معنی‌دار، شروع زود هنگام تکثیر ویروس بود که بر اساس ضایعات بورس و ایندکس وزن بورس به وزن بدن مشخص گردید. در سن ۱۴ روزگی ۷۰٪ بورس‌ها علائم دریافت واکسن را نشان دادند و در سن ۲۱ روزگی ۱۰۰٪ پرنده‌هایی که واکسن را دریافت کرده بودند، علائمی از بازسازی بورس‌ها را به دلیل شروع زود هنگام دریافت واکسیناسیون نشان دادند. بورس در گروه غیر واکسینه در هر دو مطالعه در کل دوره پرورش دست نخورده و سالم بود.

جدول شماره ۱: ایندکس بورس به بدن

روز	روزگی ۷	روزگی ۱۴	روزگی ۲۱	روزگی ۲۸	روزگی ۳۵	روزگی ۴۲
داخل تخم مرغی	۱/۱۶	۰/۹۵	۰/۵۲	۰/۲۸	۰/۳۴	۰/۴۵
زیرجلدی	۱/۱۷	۰/۶۱	۰/۳۸	۰/۲۴	۰/۴۸	۰/۶۷

اطلاعات علمی

CEVAC Transmune®

نتایج سرولوژیک و هیستولوژیک نشان‌دهنده عدم توانایی ایمنی مادری در غیر فعال کردن واکسن Cevac Transmune IBD® بود و افزایش ایمنی فعال در قالب افزایش آنتی‌بادی در خون از سن ۳-۴ هفته به بالا دیده می‌شود. این نتایج همچنان نشان‌دهنده کارایی کامل واکسن Cevac Transmune IBD® در حضور مقادیر بالایی از آنتی‌بادی مادر می‌باشد.

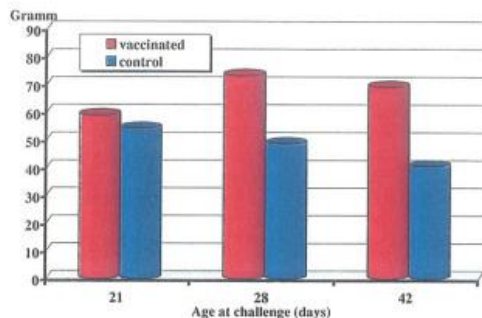
چالش:

پرنده‌گان هر گروه از دو مطالعه در سنین ۱۴، ۲۱، ۲۸، ۳۵ و ۴۲ چالش داده شدند. بر اساس علائم کلینیکی و آتروفی بورس هنگامی که چالش در ۱۴ روزگی صورت گرفت، ۶۰٪ پرنده‌گانی واکسن را به‌روش تلقیح داخل تخم‌مرغ دریافت کردند و ۷۰٪ پرنده‌گانی که واکسن را با روش تزریق زیرجلدی دریافت کردند بر علیه چالش محافظت شدند. در حالی که پرنده‌گان غیر واکسینه ۶۰٪ و ۱۰۰٪ حساسیت نسبت به ابتلا به بیماری گامبورو نشان دادند. در سن ۳ هفتگی، ۸۰٪ و ۱۰۰٪ به ترتیب در گروه‌های تلقیح داخل تخم‌مرغی و تزریق زیرجلدی علیه ابتلا به بیماری گامبورو محافظت شدند؛ در حالی که ۹۰٪ و ۱۰۰٪ پرنده‌گان غیر واکسینه در این گروه‌ها نسبت به گامبورو حساسیت نشان دادند. از ۴ هفتگی به بعد در هر دو مطالعه پرنده‌گان واکسینه کاملاً در برابر ابتلا به بیماری گامبورو ایمن بودند؛ در حالی که تمامی پرنده‌گان غیر واکسینه ۱۰۰٪ به درگیری با بیماری بورس عفونی حساس بودند (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۲: محافظت پس از چالش

سن در چالش	داخل تخم مرغی		زیرجلدی	
	واکسینه	غیر واکسینه	واکسینه	غیر واکسینه
۱۴ روزگی	۶۰	۴۰	۷۰	۰
۲۱ روزگی	۸۰	۱۰	۱۰۰	۰
۲۸ روزگی	۱۰۰	۰	۱۰۰	۰
۳۵ روزگی	۱۰۰	۰	۱۰۰	۰
۴۲ روزگی	۱۰۰	۰	۱۰۰	۰

وزن بدن در زمان چالش اندازه‌گیری شد و ۱۰ روز بعد نیز مجدداً وزن‌گیری انجام گرفت. چالش‌ها در سنین ۳، ۴ و ۶ هفتگی انجام شد. گله واکسینه چالش یافته در سن ۳ هفتگی دارای عملکرد وزنی قابل قبول بود و از لحاظ آماری با گروه غیر واکسینه تفاوتی نداشت. با این وجود چالش در سن ۴ و ۶ هفتگی به شدت وزن‌گیری را متأثر کرده و تفاوت‌ها در مقایسه با گروه غیر واکسینه معنی‌دار ($p < 0/001$) بودند (نمودار ۲).



نمودار ۲: افزایش وزن روزانه در گروه‌های واکسینه و غیر واکسینه پس از چالش (۱۰ روز پس از چالش)

بر اساس داده‌های مطالعه حاضر، پرنده‌های دارای ایمنی مادری که با واکسن Cevac Transmune IBD® واکسینه شدند، در سن ۳-۴ هفتگی محافظت کامل نشان دادند. پرندگان دارای تیترا آنتی بادی مادری بالاتر در زمان هیچ در مقایسه با جوجه‌های با ایمنی مادری پایین‌تر، پاسخ ایمنی فعال دیرتری خواهند داشت (نمودار شماره ۱). نتایج سرولوژی نشان می‌دهند که حتی با تیتراهای مادری بسیار بالا (Log₂ ۱۳۸۸) واکسن Cevac Transmune IBD® به خوبی عمل کرده و ایمنی‌زایی می‌کند. نتایج سرولوژی و پاتولوژیکی (هیستولوژی ایندکس وزن بورس به وزن بدن) نشان می‌دهند که واکسن Cevac Transmune IBD® پیش از کاهش ایمنی مادری به محدوده بحرانی (امکان ابتلا به بیماری بورس عفونی) قابلیت تکثیر داشته و ایمنی کامل ایجاد می‌کند. لذا استفاده از Cevac Transmune IBD® در جوجه‌کشی (چه به صورت تلقیح داخل تخم مرغی و چه به صورت تزریق زیرجلدی) به عنوان تنها واکسن علیه بیماری بورس عفونی احتمال ابتلا به این بیماری را کاهش داده (به دلیل کاهش زمان حساسیت پرندگان در ابتلا به بیماری بورس عفونی) و در مقایسه با واکسن‌های رایج فاصله زمانی بین کاهش ایمنی مادری و افزایش ایمنی فعال خود جوجه را به حداقل می‌رساند. همچنین استفاده از این واکسن سبب می‌شود دیگر احتیاجی به تعیین سن واکسیناسیون در فارم وجود نداشته باشد و امکان واکسیناسیون موفق در گله‌های غیر یکنواخت از لحاظ ایمنی مادری را به حداکثر می‌رساند.

منابع

BENJAMIN LUCIO AND STEPHEN B. HITCHNER (1979) Infectious bursal disease emulsified vaccine: Effect upon neutralizing-antibody levels in the dam. Avian Diseases 23: 466-478.

J.M. SHARMA (1985) Embryo vaccination with infectious bursa! disease virus alone or in combination with Marek's disease vaccine. Avian Diseases 29:1155-1169.

C.E. WHITFILL (1995) Determination of optimum formulation of a novel infectious bursal disease virus (IBDV) vaccine constructed by mixing bursal disease antibody with IBDV. Avian Diseases 39: 687-699 E.E. HADDAD (1997) Efficacy of a novel infectious bursal disease virus immune complex vaccine in broiler chicken. Avian Diseases 41: 882-889.

M.KELEMEN (2000) Pathological and immunological study of an in ovo complex vaccine against IBD. Acta Veterinaria Hungarica 48: 443-454.

۱۵

استفاده از واکسن HVT و واکسن ایمونوکمپلکس بیماری گامبورو جهت محافظت در

برابر چالش با ویروس حاد بیماری مارک (RB1B) پس از واکسیناسیون به روش تلقیح داخل تخم مرغی در تخم مرغ های SPF

Dren c.et al 2005 WVPA congress

پرندهگان مورد استفاده

در این مطالعه تخم مرغ های جنین دار ۱۸ روزه SPF مورد استفاده قرار گرفتند.

واکسیناسیون

- تعداد ۵۸ تخم مرغ به صورت تلقیح داخل تخم مرغی واکسن HVT وابسته به سلول را دریافت کردند.
- تعداد ۵۴ تخم مرغ واکسن HVT وابسته به سلول را در ترکیب با واکسن Cevac Transmune IBD® به صورت تلقیح داخل تخم مرغی دریافت کردند.
- تعداد ۴۶ تخم مرغ بدون واکسیناسیون به عنوان گروه کنترل معین شدند.

چالش

- ۶ روز پس از هیچ تمامی پرندگان با ۱۰۰ واحد PFU از ویروس بسیار حاد بیماری مارک سویه RB1B با روش داخل عضلانی چالش داده شدند، سپس پرندگان به مدت ۷۲ ساعت جهت شروع علائم بالینی و ضایعات ماکروسکوپیکی تحت نظر قرار گرفتند و میزان محافظت نسبی محاسبه گردید.
- HVT به تنهایی محافظت ۴۲ درصد نشان داد.
 - ترکیب HVT و Cevac Transmune IBD® محافظت ۷۰/۵ درصد را نشان دادند.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه حاکی از آن است که واکسن ترنسمیون با واکسن فریز شده HVT در برابر محافظت علیه بیماری مارک سازگاری کامل دارد.

استفاده از واکسن HVT و واکسن ایمونوکمپلکس بیماری گامبورو جهت محافظت در برابر چالش با ویروس حاد بیماری مارک (RB1B) پس از واکسیناسیون به روش تلقیح داخل تخم مرغی در تخم مرغ های SPF^۴

Dren csava N., J. Ivan, Zsuzsanna Vargna, Cs, Szamado, Rika, Erzsebet Lorinczy, Katalin Fargach, V. Palya, J. Meszaros R. F, Silva, A.A.H.M. Ter Huurne, A. Levy

چکیده

شواهد نشان می‌دهند که واکسیناسیون با روش تلقیح داخل تخم مرغی در سن ۱۸ روزگی جنینی با استفاده از واکسن هرپس ویروس بوقلمون (HVT) و واکسن Cevac Transmune IBD® به صورت تکی یا در کنار هم تأثیر منفی بر میزان جوجه‌درآوری تخم‌مرغ‌های SPF سویه لگهورن سفید ندارد. جوجه‌های هیچ شده از گروه‌های واکسن خورده (۵۸ قطعه جوجه HVT را به تنهایی و ۵۴ قطعه جوجه هر دو واکسن را دریافت نمودند) و واکسن نخورده (۴۶ جوجه) در ایزولاتورهای Horsfall-Baver مجزا قرار داده شدند. در سن ۵ روزگی (یک روز قبل از چالش با ویروس حاد مارک) ویروس واکسن HVT از نمونه خون جوجه‌های واکسینه توسط این واکسن (۴ نمونه از ۵ نمونه مثبت بودند) و یا جوجه‌های دریافت کننده ترکیب هر دو واکسن (۲ نمونه از ۵ نمونه مثبت بودند) با استفاده از روش استاندارد کشت در فیبروبلاست جنین جوجه قابل جداسازی بودند، ولی در گروه غیرواکسینه هیچ کدام از نمونه‌ها از لحاظ HVT مثبت نبودند. در روش آزمون ایمونوفلورسنس هیچکدام از آنتی‌ژن‌های اختصاصی ویروس HVT و ویروس بیماری بوریس عفونی با استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال مخصوص خود قابل شناسایی نبودند. پرندگان هر ۲ گروه در سن ۶ روزگی با ۱۰۰ واحد PFU از ویروس حاد مارک سویه RB1B به روش داخل عضلانی چالش داده شدند. ۴ روز پس از چالش، ویروس HVT از کشت فیبروبلاست جنین در گروه واکسینه توسط HVT (۳ نمونه از ۴ نمونه مثبت بودند) و گروه دریافت کننده هر دو واکسن (۱ نمونه از ۴ نمونه مثبت بود) جداسازی شد اما سویه چالش داده شده قابلیت ایجاد پلاک را نداشت. با استفاده از روش PCR اختصاصی برای HVT و MDV-1 بر روی نمونه‌های خون، تمام نمونه‌ها منفی بودند. با این وجود با استفاده از روش ایمونوفلورسنت بر روی مقاطع تهیه شده از بورس و طحال، ویروس‌ها قابل شناسایی بودند. از گروه کنترل ۱ قطعه جوجه در سن ۳ روزگی تلف شد (۱ قطعه پرنده از ۴۶ پرنده) و ۹۷٪ پرندگان در طی ۷۲ ساعت مطالعه تلف شده یا با علائم ماکروسکوپیک ابتلا به مارک حذف شدند. در یکی از ۲ قطعه پرنده زنده مانده در گروه کنترل هیچ علائمی از ابتلا به بیماری مارک دیده نشد. از ۴۸ قطعه پرنده واکسینه شده با واکسن HVT ۲۰ قطعه پرنده پس از چالش با سویه حاد مارک زنده ماندند. بنابراین ایندکس محافظت در این گروه ۴۲ درصد بود (Pharmeuropa vol 14, No 3 July)

⁴ 14th World Veterinary Poultry Congress; 2005; Istanbul-Turkey

اطلاعات علمی

CEVAC Transmune®

2002). در گروه دریافت کننده هر دو واکسن HVT و Cevac Transmune IBD® ، ۳۱ قطعه جوجه از ۴۴ قطعه جوجه زنده ماندند و ایندکس محافظت نسبی آن ۷۰٪ بود.

این مطالعه تحت حمایت Szechenyi; National R&D program (شماره قرارداد: ۴/۰۴۰/۲۰۰۱) و توسط گرانت گروه علوم ملی (OTKA) با شماره T29630 صورت پذیرفت.

۱۶

تکثیر تاخیری ویروس واکسن در جوجه‌های واکسینه با واکسن ایمونوکمپلکس

بیماری بورس عفونی به صورت زیر جلدی:
تعیین میزان ویروس واکسن با روش Real Time PCR

Ivan J. 2005. The Canadian Journal of Veterinary Research

هدف این مطالعه تعیین توزیع بافتی ویروس واکسینال بیماری بورس عفونی به دنبال واکسیناسیون جوجه‌های تجاری و SPF با واکسن Cevac Transmune IBD® است.

پرندگان

تعداد ۴۰ قطعه جوجه SPF و ۵۰ قطعه جوجه گوشتی تجاری نژاد کاب (از نتاج گله مادری که قبل از شروع تخم‌گذاری واکسن کشته چهارگانه IBD، ND، IB، EDS دریافت نموده‌اند).

واکسیناسیون

یک دُز واکسن Cevac Transmune IBD® با روش تزریق زیرجلدی زیر پوست گردن در ۲۱ قطعه جوجه SPF و ۲۴ قطعه جوجه گوشتی تجاری در یک‌روزگی استفاده شد. ۱۹ قطعه جوجه SPF و ۲۶ قطعه جوجه گوشتی تجاری باقی مانده به عنوان گروه شاهد غیر واکسینه نگهداری شدند.

نمونه گیری

نمونه‌های خونی، بورس، طحال، تیموس، سگال تانسیل، کبد و دوازدهه جمع‌آوری گردید. برنامه نمونه‌برداری به قرار ذیل بود: جوجه‌های SPF: از ۳ قطعه جوجه واکسینه و ۳ قطعه جوجه شاهد در روزهای ۱، ۳، ۶، ۱۰، ۱۴ و ۲۱ پس از واکسیناسیون نمونه اخذ گردید.

جوجه‌های گوشتی تجاری: از ۳ قطعه جوجه واکسینه و ۳ قطعه جوجه شاهد در روزهای ۷، ۱۰، ۱۴، ۱۷، ۲۱، ۲۸، ۳۴ و ۴۳ بعد از واکسیناسیون نمونه اخذ شد.

اطلاعات علمی

CEVAC Transmune®

روش‌های مختلفی از جمله الایزا (کیت Idexx)، RT-PCR، Nested PCR (برای تأیید نتایج RT-PCR) و ایمونوفلورسینس استفاده گردیدند.

نتایج

هیچ ویروس واکسنی در طحال، تیموس، سکال تانسیل، کبد یا دوازدهه طی تمام دوره پایش در جوجه‌های SPF و نیز جوجه‌های گوشتی تجاری یافت نگردید.

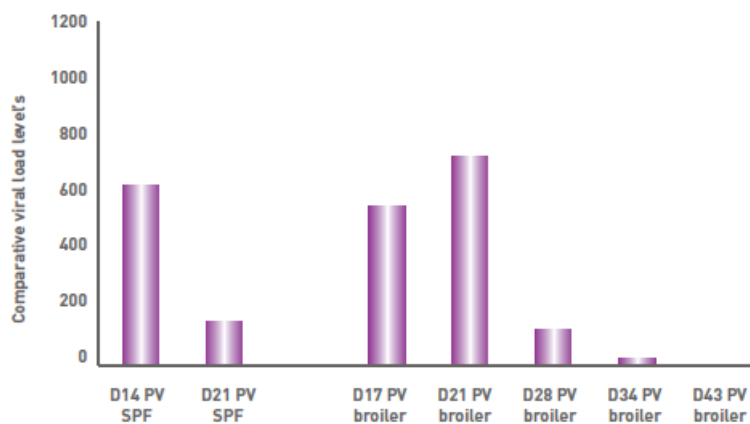
در بورس فابرسیوس، ویروس واکسن قابل شناسایی بود (میزان به درصد از تعداد ۳ بورس).

مدت زمان پس از واکسیناسیون (ساعت، یا روز)												
۴۳	۳۴	۲۸	۲۱	۱۷	۱۴	۱۰	۷	۶	۳	۱	۵ ساعت	
NR	NR	NR	% ۱۰۰	NR	% ۱۰۰	% ۰	NR	% ۰	% ۰	% ۰	% ۰	SPF
% ۱۰۰	% ۱۰۰	% ۱۰۰	% ۵۰	% ۶۶	% ۰	NR	NR	NR	NR	NR	NR	گوشتی تجاری

NR: Not Required

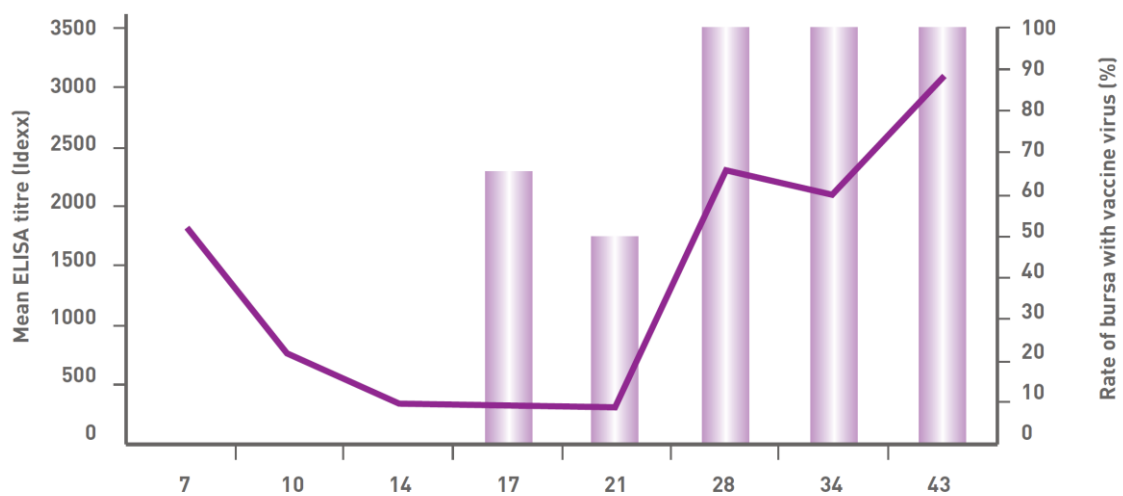
در جوجه‌های گوشتی تجاری، تهاجم ویروس واکسن به بورس در سن ۱۷-۲۸ روزگی رخ می‌دهد که معمولاً تحت شرایط فارمی مشاهده شده است. تمایل ویروس به تشکیل کلونی در بورس جوجه‌های SPF، غیرمعمول است؛ زیرا مطالعات دیگری شناسایی زودهنگام را مطرح نموده‌اند.

مقدار ویروس واکسن برای هر روز نمونه‌گیری مثبت مشخص گردید.



نمودار زیر شروع کلونیزه شدن ویروس واکسن در بورس و نیز پاسخ آنتی‌بادی در جوجه‌های گوشتی تجاری را نشان می‌دهد.

Cevac Transmune در جوجه‌های گوشتی: شروع تکثیر ویروس در بورس و تیتراژ



نتیجه گیری

مطابق انتظار بین هفته دوم و سوم، ویروس واکسن قادر به کلونیزه شدن در بورس فابرسیوس جوجه‌های گوشتی تجاری می‌باشد. در هیچ اندام یا بافت دیگری کلونی تشکیل نمی‌شود. بعد از یک پیک، از روز ۲۸ به بعد، مقدار ویروس واکسن در بورس کاهش می‌یابد. پاسخ ایمنی فعال چند روز پس از کلونیزه شدن ویروس واکسن در بورس با روش‌های شناسایی می‌شود.

تکثیر تاخیری ویروس واکسن در جوجه‌های واکسینه با واکسن ایمونوکمپلکس بیماری بارس عفونی به صورت

زیرجلدی: تعیین میزان ویروس واکسن با روش Real time PCR

Judit Ivan¹, Maja Velhner², Krisztina Ursu³, Peter German⁴, Tamas Mato⁵, Cesba Nick Dren¹, Janos Meszaros¹

1Veterinary Medical Research Institute, Hungarian Academy of Science, Budapest, P.O. Box 18, H-1581, Hungary; 2Scientific Veterinary Institute, Novi Sad, P.O. Box 15, 2100, Yugoslavia; 3Central Veterinary Institute, Budapest 146, P.O. Box 2, H-1581, Hungary; 4Veterinary Institute of Debrecen, P.O. Box 51, H-4002, Hungary; 5Ceva-Phylaxia Biologicals Company, P.O. Box 68, H-1475, Hungary

چکیده

توزیع ویروس واکسن ایمونوکمپلکس بیماری بارس عفونی در بافت برسی گردید و مقادیر ویروس در اندام‌ها به صورت کمی مقایسه شد. واکسن به صورت زیرجلدی به جوجه‌های گوشتی یک روزه SPF و دارای ایمنی مادری تزریق گردید. بافت‌های لنفاوی و غیرلنفاوی، در فواصل زمانی مختلفی طی آزمایش جهت بررسی RNA ویروس بیماری گامبور با استفاده از روش RT-PCR جمع‌آوری گردید. نمونه‌های مثبت بارس با استفاده از روش real time-PCR همراه با پروب TaqMan مورد بررسی بیشتر قرار گرفت. مقادیر بالای ویروس در مرحله اولین ظهور در بارس یعنی در حوالی روز ۱۴ پس از واکسیناسیون (PV) در جوجه‌های SPF و در روزهای ۱۷ و ۲۱ در گروه جوجه گوشتی با ایمنی مادری شناسایی شد. سپس ویروس به تدریج پاک گردید؛ می‌توان علت این امر را به احتمال زیاد، ایجاد پاسخ ایمنی فعال دانست که عمدتاً با سروکانورسیون مشخص می‌شود.

مقدمه

بیماری بارس عفونی بیماری رایج جوجه‌های گوشتی می‌باشد که به وسیله یک RNA ویروس دو رشته‌ای متعلق به خانواده بیرناویریده ایجاد می‌شود. ویروس حاد بیماری بارس عفونی می‌تواند منجر به سرکوب شدید ایمنی در جوجه‌های حساس شود؛ این امر به نوبه خود منجر به از دست رفتن پاسخ مناسب به واکسن‌های رایج مصرفی در طیور و آسیب پذیری به عوامل بیماری‌زای فرصت طلب موجود در محیط می‌گردد. از آنجاکه جوجه‌های تجاری معمولاً در شرایط فارمی به صورت زود هنگام به بیماری بارس عفونی آلوده می‌شوند، لذا کسب ایمنی مناسب در سریع‌ترین زمان ممکن ضروری به نظر می‌رسد.

واکسن ایمونوکمپلکس IBD (IBD-Icx) به منظور ایمنی‌زایی از طریق تلقیح داخل تخم مرغی تهیه شده است و شامل آنتی‌بادی اختصاصی ویروس بیماری بورس عفونی (IBDV) در ترکیب با سویه زنده تخفیف حدت یافته IBDV (-2512) (IBDV) با حدت اینترمدیت پلاس می‌باشد. این واکسن به سطوح بالای آنتی‌بادی مادری (Mab) - ساس نیست. همچنین اثرات مخرب احتمالی ویروس واکسن برای پرنده‌هایی که آنتی‌بادی مادری کمی دارند، به واسطه افزودن آنتی‌بادی همولوگ به ویروس واکسن پیش‌گیری شده است. اثربخشی این واکسن در زمان بروز چالش (با ویروس فیلد)، مشابه با تاثیر واکسن‌های رایج حاوی سویه ویروس مشابه بدون آنتی‌بادی می‌باشد. به‌رحال Chettle و Wyeth نشان داده‌اند زمانی که واکسن ایمونوکمپلکس استفاده می‌شود محافظت مناسبی برای جوجه‌های با ایمنی مادری حاصل می‌گردد. طی دوره درگیری بعد از واکسیناسیون با واکسن ایمونوکمپلکس در مقایسه با واکسن‌های رایج بدون آنتی‌بادی، پرنده‌ها وزن‌گیری بهتری داشتند. همچنین مشاهده شده است که اثرات سرکوب ایمنی در جوجه‌های SPF واکسینه شده با واکسن ایمونوکمپلکس (سویه بسیار ایمونولوژیک واکسن به‌علاوه آنتی‌بادی اختصاصی) در مقایسه گروه واکسینه شده با واکسن این سویه به‌تنهایی ملایم‌تر بوده است.

واکسیناسیون تخم‌مرغ جنین‌دار ۱۸ روزه با استفاده از روش *In ovo*، یک راه‌کار رایج برای استفاده از واکسن ایمونوکمپلکس می‌باشد که به‌صورت موفقیت‌آمیزی برای واکسیناسیون میلیون‌ها جوجه گوشتی تجاری در سراسر جهان استفاده شده است، بنابراین عمده اطلاعات در مورد واکسن ایمونوکمپلکس، با استفاده از روش *In ovo* حاصل گردیده است. در مجارستان به‌دلیل این‌که تعداد کمی از واحدهای جوجه‌کشی بزرگ دارای تجهیزات مناسب برای استفاده از واکسن با روش تلقیح داخل تخم‌مرغ می‌باشند، لذا در این کشور به‌صورت رایج از تزریق زیرجلدی در سن یک روزگی استفاده می‌شود. گزارش‌ها حاکی از آن است که استفاده از روش تزریق زیرجلدی در سن یک روزگی برای واکسن ایمونوکمپلکس در جوجه‌های SPF و جوجه‌های گوشتی بی‌خطر و مؤثر می‌باشد. به هر حال اطلاعات دقیقی در خصوص نحوه عملکرد ویروس گامبور و ترکیب شده با آنتی‌بادی به‌هنگام اپلیکاسیون با روش‌های مختلف وجود ندارد. هدف از این مطالعه تعیین پراکندگی RNA ویروس گامبور در بافت‌های جوجه‌های گوشتی و SPF با استفاده از روش RT-PCR و مقایسه میزان ویروس اندام‌های مثبت با استفاده از روش Real time-PCR به‌دنبال تزریق زیرجلدی واکسن ایمونوکمپلکس است.

مواد و روش کار

حیوانات

تخم‌مرغ‌های SPF (SPAFAS; Biovo, Mochacs, Hungary) و تخم‌مرغ‌های جوجه گوشتی (Cobb, Gallus, Devecser, Hungary) در انستیتو تحقیقات دامپزشکی بوداپست مجارستان داخل دستگاه‌های هچر استاندارد، هچ شدند. گله مادر گوشتی در مقابل ویروس بیماری گامبور IBDV با استفاده از واکسن کشته مولتی‌والان پیش از دوره تخم‌گذاری واکسینه شدند. بعد از تفریح، جوجه‌ها در ایزولاتور قرار داده شدند و بر اساس قوانین بین‌المللی حقوق حیوانات منعکس شده در قانون مجارستان نگهداری شدند. خوراک و آب به‌صورت آزاد در اختیار پرندگان قرار گرفت.

واکسن ایمونوکمپلکس گامبورو و دستورالعمل واکسیناسیون

واکسن ایمونوکمپلکس (واکسن Ceva Transmune IBD®). شرکت بیولوژیک سوا فیلاکسیا، بوداپست، مجارستان) شامل $10^{2.5}$ EID₅₀ در هر ۱ ml از ویروس زنده گامبورو سویه اینترمدیت پلاس (2512-IBDV) و ۲۰ واحد سرم هیپرایمیون علیه ویروس گامبورو مصرف گردید. ۴۰ قطعه جوجه SPF و ۵۰ قطعه جوجه گوشتی یک روزه استفاده شدند. از این جوجه‌ها، ۲۱ قطعه جوجه SPF و ۲۴ قطعه جوجه گوشتی در سن یک روزگی واکسن ایمونوکمپلکس را به روش تزریق زیرجلدی در پشت گردن دریافت نمودند. ۱۹ قطعه جوجه SPF و ۲۶ قطعه جوجه گوشتی باقیمانده به‌عنوان گروه شاهد واکسینه نشدند.

نمونه‌گیری و آماده‌سازی

۳ قطعه جوجه SPF از هر دو گروه واکسینه و شاهد در مدت ۵ ساعت و همچنین در روزهای ۱، ۳، ۶، ۱۰، ۱۴ و ۲۱ پس از واکسیناسیون نمونه‌برداری شدند. ۳ قطعه جوجه گوشتی نیز از هر دو گروه واکسینه و شاهد در روزهای ۷، ۱۰، ۱۴، ۱۷، ۲۱، ۲۸، ۳۴ و ۴۳ پس از واکسیناسیون برداشت شدند. جوجه‌ها وزن شدند، نمونه‌های خونی اخذ گردید و مورد کالبد گشایی قرار گرفتند.

بعد از کالبدگشایی قسمتی از بورس فابرسیوس، طحال، تیموس، سکال تانسیل، کبد و دوازدهه از هر جوجه برداشته شد و در نیتروژن مایع با دمای -8°C برای آنالیز بیشتر نگهداری شدند. جهت بررسی ایمونوفلورسنس، نمونه‌های بافتی فقط از جوجه‌های SPF اخذ گردید و در کاربوماتریکس (Thermo Shandon, Pittsburgh, Pennsylvania, USA) بلافاصله در نیتروژن مایع با دمای -8°C جهت بررسی بیشتر قرار داده شدند. نمونه‌های سرمی از نمونه‌های خونی جداسازی و در دمای -20°C برای آزمایشات تکمیلی نگهداری شدند.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ترانس کریپتاز معکوس (RT-PCR)

۵۰-۱۰۰ میلی‌گرم بافت برای جداسازی RNA با استفاده از معرف (TRIZOL Reagent; Gibco-BRL Life Technologies, Gaithersburg, Maryland, USA) پراسس شد. روش کار بر اساس پروتکل تهیه شده توسط شرکت سازنده صورت گرفت. RNA از هر نمونه در ۲۰ میکرولیتر آب استریل عاری از RNA حل گردید و با روش اسپکتروفوتومتری اندازه‌گیری و یا در دمای -8°C ذخیره شد یا بلافاصله برای RT-PCR استفاده گردید. رشته cDNA در ۲۵ میکرولیتر حجم نهایی در دمای 37°C به مدت یک ساعت با استفاده از ۲ میکروگرم از مجموع RNA، MMLV RT، پرایمرهای مخلوط-oligo dT و Pd(N) به نسبت ۴:۱ ساخته شد. بعد از واکنش RT، پرایمرهای اختصاصی برای تکثیر قطعه ژنومی ۲۰۲ جفت باز از ژن IBDV VP2، با استفاده از سکانس سویه 2512-IBDV به قرار زیر: (GenBank accession number AF457105): 5'-202R 3'-CCGGACGACACCCTGGAG-3' (جایگاه ۲۰۰-۱۸۲ نوکلئوتید) و 5'-202F 3'-AACTGGCCGGTAGGTTCTGG-3' (جایگاه ۳۸۴-۳۶۴ نوکلئوتید) طراحی شدند.

PCR بدین طریق انجام گرفت: ذوب اولیه در دمای 94°C برای ۳ دقیقه و به‌دنبال آن ۳۵ چرخه برنامه تکراری 30°C ثانیه در 94°C ، ۳۰ ثانیه در 58°C و ۴۰ ثانیه در 72°C صورت یافت. مرحله نهایی طویل شدن در دمای 72°C برای مدت ۱۰ دقیقه روند PCR را تکمیل کرد.

جوجه‌های SPF در سن ۳ هفتگی با ویروس حاد IBDV چالش داده شدند و بورس ۳ روز بعد از چالش برداشته شد. این نمونه‌ها به‌عنوان کنترل مثبت برای استخراج RNA و RT-PCR استفاده شدند. یک پلاسمید IBDV به‌وسیله کلون‌سازی قطعه ژنومی VP2 ویروس IBD داخل فازمید^۴ تهیه گردید و به‌عنوان کنترل مثبت PCR استفاده شد. محصولات PCR بعد از الکتروفورز در ژل ۲/۵٪ آگاروز مشاهده شدند.

Nested PCR

روش Nested PCR با طراحی پرایمر خارجی P1 و P2 و پرایمر داخلی P2.3 و P5.3 انجام گرفت. سکانس‌های پرایمری بدین صورت تنظیم شد: P1: 5'-TCACCGTCCTCAGCTTAC-3' ، P2: 5'-TCAGGATTTGGGATCAGC-3' ، P2.3: 5'-CCCAGAGTCTA CACCATA-3' ، P5.3: 5'-TCCTGTTGCCACTCTTTC-3' . پرایمرها، قسمت ۴۷۴ جفت بازی از ناحیه نوکلئوتید ۷۰۳ تا ۱۱۶۷ موجود در قسمت بسیار متغیر ژن VP2 را تکثیر می‌کنند. واکنش‌های PCR بر اساس روندهای توصیف شده توسط لیو و لین و همکاران به ترتیب برای هر دو ۲ سری پرایمر، انجام شد.

حساسیت PCR

حساسیت‌های ارزیابی RT-PCR و Nested PCR با استفاده از تکثیر سویه IBDV (LIBD) در فیروبلاست جنین جوجه تعیین گردید. آزمون سنجش پلاک با استفاده از ۱۰ رقت سریالی ویروس IBD برای تعیین تیر ویروس استفاده شد. استخراج RNA و RT-PCR یا Nested PCR از رقت‌های سریالی با استفاده از یک جفت پرایمر 202R/202F در مورد RT-PCR صورت گرفت و پرایمرهای خارجی P1/P2 و داخلی P2.3/P5.3 در مورد Nested PCR انجام شد. حساسیت بر اساس فاکتورهای رقتی سنجیده شد و به‌صورت واحدهای تشکیل‌دهنده پلاک (PFU) بیان گردید.

Real time PCR

تعیین تیر ویروس IBD بر اساس افزایش سیگنال فلورسنسی در PCR با استفاده از Real time PCR و پروب TaqMan مشخص گردید. پرایمرهای طراحی شده آن با سکانس سویه 2512-IBDV، قطعه ژنومی ۷۴ بازی ژن VP2 را تکثیر می‌کند: پروب VP2-TaqMan برای سکانس ۷۴ بازی طراحی شد و با رنگ نشانگر FAM در انتهای ۵' و رنگ خاموشگر TANRA در انتهای ۳' مشخص شد. 5'-(FAM)-TCTTTTCCCTGGATCCCTGGCTCA-(TAMRA)-3' . مخلوط PCR (با حجم کلی ۵۰ میکرولیتر) شامل بافر PCR، ۳ میلی مول MgCl₂، ۳۰۰ میکرومول از دئوکسی نوکلئوتید تری فسفات (dNTP)، ۴۵ پیکومول از هر پرایمر خاص ویروس IBD، ۵ واحد از پلیمراز Taq DNA، ۵/۱ مول از پروب TaqMan و ۱ میکرومول از cDNA می‌باشد. شرایط PCR به قرار ذیل بود:

داناتوره اولیه در ۹۵°C برای ۳ دقیقه که با ۴۵ چرخه برنامه تکراری: ۳۰ ثانیه در ۹۵°C، ۳۰ ثانیه در ۶۰°C و ۳۰ ثانیه طولیل شدن در ۷۲°C همراه شد.

پرایمر الیگونوکلئوتید برای 18SrRNA تکثیر محصول ۱۸۶ جفت بازی استفاده شد 5'-CGGCTACCACATCC 18S sense 3'-AAGGAA (جایگاه ۳۷۰-۳۸۹ نوکلئوتیدی). برای تعیین فراوانی نسبی 18SrRNA، پروب TaqMan استفاده شد. 5'-(FAM)-TGCTGGCACCAGACTTGCCCTC-(TAMRA)-3'

⁴ phagmid

مخلوط PCR (با حجم کلی ۵۰ میکرولیتر) شامل شامل بافر PCR، ۳ میلی مول $MgCl_2$ ، ۳۰۰ میکرومول از دئوکسی نوکلئوتید تری فسفات (dNTP)، ۳۰۰ نانومول از هر پرایمر خاص 18S، ۵ واحد از تگ DNA پلیمراز، ۵۰ نانومول از پروب 18S-TaqMan و ۱ میکرومول از الگوی cDNA می‌باشد. شرایط PCR بدین قرار صورت گرفت: ذوب اولیه در $95^{\circ}C$ برای ۳ دقیقه که با ۴۰ چرخه برنامه تکراری ۱۵ ثانیه در $95^{\circ}C$ و ۶۰ ثانیه در $62^{\circ}C$ همراه شد. ویروس IBD و تقویت کننده‌های 18S در لوله‌های مجزا قرار داشتند.

نمونه cDNA بوس از یک جوجه واکسینه با ویروس IBD به صورت رقت‌سازی سریالی یک دهم از 10^{-1} تا 10^{-5} برای 18SrRNA و از رقت‌سازی یک پنجم به صورت سریالی در ۴ مرحله (با استفاده از نمونه یک دهم رقیق شده) برای ویروس IBD ($10 \times$ ، $50 \times$ ، $250 \times$ و ...) تا حصول منحنی‌های کالیبره رقیق گردید.

ضریب ارتباط و کارایی PCR با استفاده از نرم افزار کامپیوتری (iCycler Software; Bio-Rad) جهت نشان دادن دقت و صحت اندازه‌گیری‌ها محاسبه شد. نتایج هر چرخه (C_T)، توسط نرم افزار کامپیوتری محاسبه گردید. هر چه مقدار اولیه DNA بالاتر، محصول تجمع یافته در فرآیند PCR زودتر شناسائی شد و مقدار شاخص C_T کمتر بود. استاندارد کردن اختلافات در مقدار RNA کل اضافه شده به هر واکنش، بر اساس روش C_T مقایسه ای (روش $\Delta\Delta C_T$) انجام شد. برای Real time PCR، هر نمونه ۳ مرتبه تکرار گردید. هر مطالعه شامل نمونه بوس کنترل منفی از گروه بدون دریافت واکسن، نمونه بوس کنترل مثبت از جوجه‌های واکسینه با ویروس حاد IBD، نمونه‌های آزمایش و رقت‌های سریالی بود.

ارزیابی ایمونوفلورسنس (IFA)

مقاطع بافتی به وسیله تکنیک ایمونوفلورسنس رنگ آمیزی شدند. به طور خلاصه مقاطع کریواستات با ضخامت ۵-۷ میکرومتر داخل پلی ال لیزین قرار داده شده و بررسی شدند. این مقاطع در هوا خشک شده و سپس در استون خالص برای ۱۰ دقیقه تثبیت شدند. بعد از آب‌گیری با محلول سالین بافر فسفات (PBSS) حاوی سرم اسب غیر فعال ۴٪ (جهت اشغال جایگاه‌های اتصال غیر اختصاصی $(PH=7.1)$)، مقاطع با رقت از پیش تعیین شده پلی کلونال آنتی‌بادی (آنتی ریبیت VP2 ویروس IBD ۱:۵۰) و آنتی‌بادی‌های مونوکلونال موش (۷۰ میکرولیتر/برش) برای یک ساعت در محفظه مرطوب دارای دمای $37^{\circ}C$ نگهداری شدند. برش‌ها ۳ مرتبه در بافر (PBSS + 0/05% TWEEN 20) شستشو داده شدند و متعاقباً IgG آنتی ریبیت خوک کونژوگه با ایزوتیو سیانات فلور سین و یا کونژوگه آنتی ریبیت با TC بطوریکه در بالا تو صیف شد در رقت تو صیه شده شرکت سازنده نگهداری شدند. در تکمیل روند، رنگ آمیزی کنتراست در اوانس بلو ۱٪/۰ صورت گرفت. بعد از شستشو در آب مقطر، برش‌ها خشک و بر روی لام فیکس شده و به وسیله میکروسکوپ اپی‌فلورسنس مشاهده شدند.

ELISA

تیتر آنتی‌بادی علیه ویروس IBD با استفاده از کیت الایزا IDEXX بر اساس پروتکل شرکت سازنده تعیین گردید. تیترها بر اساس دستورالعمل‌های شرکت سازنده محاسبه گردیدند و نمونه‌های سرمی با تیتر بیشتر از ۳۹۶ مثبت در نظر گرفته شد. نتایج به صورت میانگین هندسی تیتر آنتی‌بادی (GMT) از نمونه‌های سرمی ۳ جوجه بیان گردید.

نتایج

RT-PCR و Nested-PCR

محدوده تشخیص RT-PCR و Nested-PCR برای تشخیص ویروس IBD مشخص گردید. بعد از تکثیر ویروس بیماری بارس عفونی در RT-PCR، قطعه ژنومی ۲۰۲ جفت بازی در محلول رقیق کننده شامل ۱۰^۴ PFU ویروس مشاهده شد. Nested-PCR قطعه ژنومی محدود ۴۷۲ جفت بازی در رقیق کننده شامل ۱۰^۱ PFU ویروس IBD را نشان داد (اطلاعات موجود نیست).

نتایج جدا سازی RNA اختصاصی برای ژن VP2 ویروس IBD به وسیله RT-PCR در جدول I و II نشان داده شده است. در گروه SPF واکسینه با واکسن ایمونوکمپلکس گامبورو (جدول I) قطعه ژنومی ۲۰۲ جفت بازی در بارس در روز ۱۴ و روز ۲۱ پس از واکسیناسیون شناسایی شد. در گروه جوجه گوشتی واکسینه با واکسن ایمونوکمپلکس (جدول II) ۲ نمونه از ۳ نمونه بارس در روز ۱۷ پس از واکسیناسیون، یکی از ۲ نمونه در روز ۲۱ پس از واکسیناسیون و تمام نمونه‌های بارس که متعاقباً روزهای بعد تا پایان دوره آزمایش در روز ۴۳ بعد از واکسیناسیون نمونه گیری شدند، نسبت به ویروس IBD مثبت بودند. ویروس بیماری بارس عفونی در طحال، تیموس، سکال تانسیل، کبد یا دوازدهه در همه گروه‌های واکسینه شناسایی نشد. همچنین همه بافت‌ها در گروه‌های کنترل بدون دریافت واکسن به طور کامل در فواصل نمونه‌گیری منفی بودند (اطلاعات نشان داده نشده است). تمام نمونه‌های بارس و به صورت تصادفی برخی از نمونه‌های طحال، تیموس و سکال تانسیل مورد ارزیابی به وسیله RT-PCR در هر دو آزمایش قبلی، با روش Nested-PCR نیز ارزیابی شدند و تمامی نتایج منفی بودند. هر نمونه منفی به وسیله RT-PCR همچنین به وسیله Nested-PCR نیز اعلام گردید (اطلاعات نشان داده نشده است).

جدول ۱: شناسایی ویروس به وسیله RT-PCR و IFA در اندام‌های مختلف و پاسخ سرولوژی مشخص شده با روش ELISA در نمونه‌های سرمی جوجه‌های SPF واکسینه شده با واکسن ایمونوکمپلکس بیماری گامبورو

Hours and days PV	RT-PCR						IFA	ELISA
	BF	SP	TH	CT	L	D	BF	Serum
5h	0/1 ^a	0/2	0/3	nd	0/3	0/3	0/1	1.78 ^b
1	0/3	0/2	0/3	nd	0/3	0/3	0/1	2.88
3	0/3	0/3	0/3	nd	0/3	0/2	0/1	2.82
6	0/3	0/3	0/3	0/1	nd	nd	0/1	2.09
10	0/3	0/3	0/3	0/1	0/3	0/3	0/1	3.24
14	3/3	0/2	0/3	0/2	nd	nd	1/1	832.00
21	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/2	1/1	794.00

nd — Not determined; PV — post vaccination; BF — bursa of Fabricius; SP — spleen; TH — thymus; CT — cecal tonsils; L — liver; D — duodenum

^a Number positive/total tested

^b Results are expressed as geometric mean antibody titers (GMT) of 3 serum samples

اطلاعات علمی

CEVAC Transmune®

جدول ۲: شناسایی ویروس به وسیله RT-PCR در اندام‌های مختلف و پاسخ سرولوژی مشخص شده با روش ELISA در نمونه‌های سرمی جوجه‌های گوشتی دارای ایمنی مادری واکسینه شده با واکسن ایمونوکمپلکس بیماری گامپورو

Days PV	RT-PCR						ELISA
	BF	SP	TH	CT	L	D	Serum ^b
14	0/3 ^a	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	354.8 ^c
17	2/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	343.1
21	1/2	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	316.2
28	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	2290.9
34	3/3	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	2089.3
43	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	3090.3

PV — post vaccination; BF — bursa of Fabricius; SP — spleen; TH — thymus; CT — cecal tonsils; L — liver; D — duodenum

^a Number positive/total tested

^b ELISA results from day 7 and day 10 PV are indicated in the text

^c Results are expressed as geometric mean antibody titers (GMT) of 3 serum samples

آنالیز Real-time PCR نمونه‌های بورس فابرسیوس

برای آنالیز Real time نمونه‌های بافتی که از قبل با RT-PCR مثبت اعلام شده بود، مورد استفاده قرار گرفت. بنابراین نمونه‌های زیر استفاده شدند: نمونه‌های بورس فابرسیوس از گروه SPF واکسینه با واکسن ایمونوکمپلکس از روز ۴ و روز ۲۱ پس از واکسیناسیون و نمونه‌های بورس فابرسیوس از گروه گوشتی واکسینه با واکسن ایمونوکمپلکس از روزهای ۱۷، ۲۱، ۲۸، ۳۴ و ۴۳ پس از واکسیناسیون.

بورس جوجه‌های SPF چالش داده شده با ویروس حاد IBD، به‌عنوان گروه کنترل مثبت استفاده شد. نمونه‌های بورس فابرسیوس از روز ۲۲ گروه کنترل بدون دریافت واکسن و یک کنترل خارج از آزمایش به‌عنوان کنترل منفی استفاده شدند. منحنی‌های کالیبراسیون ایجاد شدند و تحت شرایط مورد استفاده در این آزمایش، خطی بودن منحنی‌ها با استفاده از پرایمر 18S و پرایمر اختصاصی IBD به ترتیب در ردیف‌های ۵ و ۴ به‌دست آمد.

همان‌طور که با مقادیر انحراف معیار نشان داده شده است (جدول IIIA و B)، تکرارپذیری مقادیر اندازه‌گیری شده رپلیکت‌ها کافی بودند. آنالیز رگرسیون مقادیر Ct توسط سری رقت‌ها، مقادیر ذیل را به‌دست آورد: برای 18SrRNA ضریب هم‌بستگی ۰/۹۹۹ و کارایی PCR ۹۲/۸٪ و برای ویروس IBD ضریب هم‌بستگی ۰/۹۹۲ و کارایی PCR ۱۰۰/۷٪ بود. شیب خط رگرسیون برای 18SrRNA و ویروس IBD به ترتیب ۳/۵۰۸ و ۳/۳۰۶ بود. به‌منظور کنترل تنوع در نمونه‌گیری و آماده‌سازی RNA، مقادیر Ct استانداردسازی شد. 18SrRNA یک تعدیل‌کننده مناسب برای این آزمایشات محسوب می‌شد، زیرا سطوح بیان آن طی دوره درگیری ثابت باقی می‌ماند. در جوجه‌های SPF، در روز ۱۴ و روز ۲۱ پس از واکسیناسیون به ترتیب ۱۰/۴ و ۱۰/۸ Ct و در جوجه‌های گوشتی طی دوره بین روز ۱۷ و روز ۴۳ پس از واکسیناسیون مقادیر Ct بین ۱۱/۹ - ۱۰/۵ بود. در هر روز نمونه‌گیری، ۳ نمونه بورس آماده‌سازی شد (به غیر از روز ۲۱ پس از واکسیناسیون در آزمایش جوجه گوشتی که ۲ نمونه بورس استفاده شد) و هر نمونه ۳ مرتبه برای آنالیز realtime PCR استفاده گردید. میانگین ارزیابی ۳ مرتبه و اختلاف بین مقادیر Ct (ΔCt) اختصاصی 18S و ویروس IBD برای هر نمونه تعیین گردید. به‌عنوان یک مرجع، نمونه بورس

اطلاعات علمی

CEVAC Transmune®

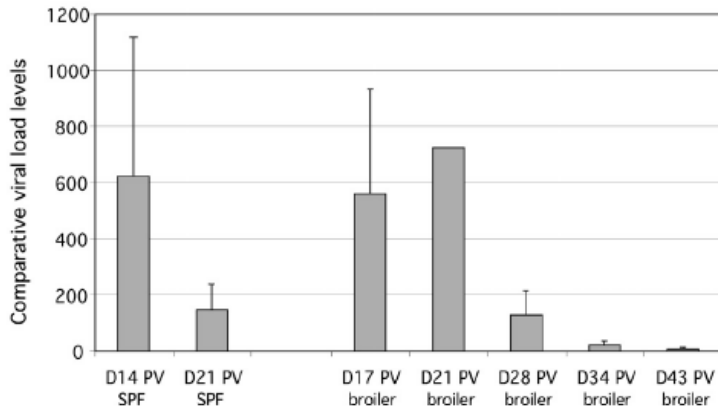
غیرواک سینه انتخاب شد و ΔC_T آن برای تعیین مقادیر $\Delta\Delta C_T$ و سطوح نسبی مقادیر ویروس ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) برای هر نمونه به کار برده شد. در نهایت نتایج به صورت N مرتبه افزایش در مقدار ویروس در مقایسه با سطح مرجع گروه کنترل بدون دریافت واکسن بیان گردید. در آزمایش جوجه گوشتی، یکی از ۳ نمونه بورس فابرسیوس در روز ۱۷ پس از واکسیناسیون و یکی از دو بورس در روز ۲۱ پس از واکسیناسیون منفی باقی ماند و مقادیر ΔC_T اختصاصی IBDV با ΔC_T گروه کنترل منفی غیرواکسینه مقایسه شد (به ترتیب ۲۰/۶۷، ۲۰/۶۰ و ۲۱/۲). این ۲ نمونه به وسیله RT-PCR نیز منفی بودند (جدول II) و آنها در محاسبات لحاظ نشدند؛ زیرا به دلیل عدم تکثیر ویروس، این نمونه‌ها به اندازه کافی برای مطالعه کمی مفید نبودند. در گروه جوجه SPF، تمام بورس فابرسیوس به وسیله ویروس واکسن ایمونوکمپلکس چالش داده شدند. در این گروه مقدار نسبی ویروس در نمونه‌های بورس بین روزهای ۱۴ و ۲۱ پس از واکسیناسیون از ۱۴۸ تا ۶۲۲ مرتبه (که این مقدار در گروه کنترل بدون دریافت واکسن به عنوان مقدار پایه بود) کاهش یافت (نمودار ۱). در آزمایش جوجه گوشتی بیشترین مقدار ویروس در روز ۱۷ و ۲۱ پس از واکسیناسیون تا روز ۲۸ و بعد آن تا روز ۳۴ و ۴۳ پس از واکسیناسیون کاهش یافت (نمودار ۱). بیشترین مقدار ویروس (۱/۱۴۲۶۳) مرتبه بالاتر از مقدار پایه) در نمونه بورس کنترل مثبت اندازه‌گیری شد (اطلاعات نشان داده نشده است).

جدول ۳: مقادیر آستانه چرخه C_T برای منحنی‌های استاندارد اندازه‌گیری تکثیر 18SrRNA (A) و ویروس بیماری گامبرو (B)

A					
Replicates of 18S rRNA standard curve	C_T values for cDNA dilutions				
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
1	13.5	17.1	20.6	24.1	27.7
2	13.6	17.0	20.7	24.4	27.0
3	13.6	17.3	20.9	24.6	27.8
Mean	13.57	17.13	20.73	24.37	27.50
s	0.06	0.15	0.15	0.25	0.44

B				
Replicates of IBDV standard curve	C_T values for cDNA dilutions			
	10X	50X	250X	1250X
1	24.4	26.7	29.6	30.8
2	24.4	26.7	29.4	31.2
3	23.9	27.0	29.5	31.2
Mean	24.23	26.80	29.50	31.07
s	0.29	0.17	0.10	0.23

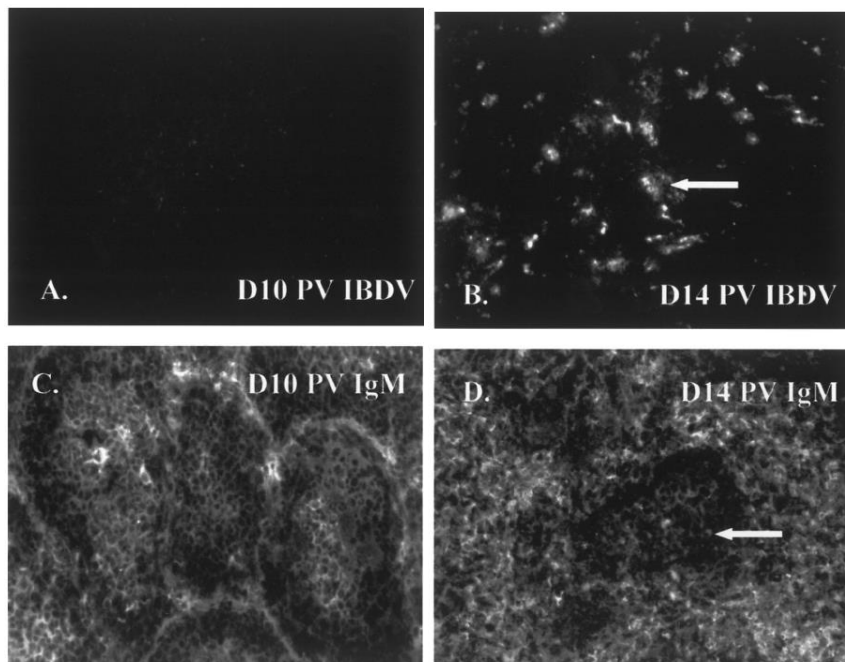
s — standard deviation



نمودار ۱: تعیین نسبی RNA ویروس بیماری گامبورو در بورس فابرسیوس جوجه‌های SPF و جوجه‌های گوشتی واکسینه با واکسن ایمونوکمپلکس IBD. نتایج به صورت N مرتبه افزایش در مقدار ویروس در مقایسه با سطح مرجع گروه کنترل بدون دریافت واکسن بیان گردید. میانگین مقادیر از ۲-۳ نمونه بورس در روزهای یکسان تعیین شد و ۳ مرتبه اندازه‌گیری گردید. انحراف معیار مشخص شد.

بررسی ایمونوفلورسنس

آنتی‌ژن‌های اختصاصی ویروس بیماری گامبورو، نشان‌دهنده تکثیر ویروس بیماری گامبورو در مقاطع بورس فابرسیوس جوجه‌های SPF واکسینه با واکسن ایمونوکمپلکس که در روز ۱۴ و ۲۱ پس از واکسیناسیون اخذ شدند، می‌باشند (جدول ۱ تصویر ۲B). در نمونه‌های بورس فابرسیوس در روزهای دیگر، نقاط خیلی کوچک مجزا و با اشکال قابل مشاهده وجود داشت که به‌عنوان واکنش زمینه‌ای غیراختصاصی محسوب گردید (تصویر ۲A). نمونه‌های بافتی طحال، تیموس و سکال تانسیل در هر زمان از آزمایش جمع آوری و نشان داده شد که نسبت به آنتی‌ژن ویروس بیماری گامبورو منفی می‌باشند (اطلاعات نشان داده نشده است). ساختار بورس فابرسیوس تا روز ۱۰ پس از واکسیناسیون دست نخورده باقی ماند تا به‌وسیله رنگ آمیزی ایمونوفلورسنس توسط آنتی بادی علیه IgM شناسایی صورت گیرد (تصویر ۲C). اما علائم تکثیر ویروس از قبیل تخلیه لنفوسیت‌ها، آتروفی فولیکول‌ها و نشانه‌های التهاب در بافت بین فولیکولی در روز ۱۴ پس از واکسیناسیون (تصویر ۲D) و پس از آن شناسایی شد.



تصویر ۲: بررسی ایمونوفلورسینس (IFA) برش‌های بورس فابرسیوس رنگ آمیزی شده با آنتی‌بادی‌های ویروس بیماری گامبورو (A,B) یا IgM (C,D) در جوجه‌های SPF واکسینه با واکسن ایمونوکمپلکس گامبورو. در روز ۱۰ بعد از واکسیناسیون آنتی‌ژن ویروس گامبورو قابل شناسایی نبود و بافت بورس ساختار فولیکولی طبیعی را نشان داد (C). تا روز ۱۴ پس از واکسیناسیون آنتی‌ژن‌های اختصاصی ویروس گامبورو، تکثیر ویروس گامبورو همراه با تخریب ساختار فولیکولی، تخلیه لنفو سیتی و علائم التهاب در بافت بین فولیکولی را مشخص نمود. پیکان‌ها آنتی‌ژن اختصاصی ویروس بیماری گامبورو (B) و تخلیه لنفوسیتی (D) را نشان می‌دهند. بزرگنمایی ۲۰۰X

بررسی ELISA

همان‌گونه که ذکر گردید، پاسخ ایمنی فعال به واکسیناسیون با واکسن ایمونوکمپلکس ویروس بیماری گامبورو با استفاده از روش الیزا در هر دو گروه اندازه‌گیری شد (جدول I و II). جوجه‌های SPF تا روز ۱۴ پس از واکسیناسیون (جدول I) افزایش تیتراژ را نشان دادند، در این زمان میانگین هندسی تیتراژ (GMT) ۸۳۲ بود و تا روز ۲۱ پس از واکسیناسیون در این سطح باقی ماند. نمونه‌های سرمی گروه جوجه‌های SPF واکسینه نشده، منفی بودند (اطلاعات نشان داده نشده است). آنتی‌بادی مادری با میانگین هندسی تیتراژ ۱۸۲۰ در روز ۷ پس از واکسیناسیون و میانگین ۷۵۹ در روز ۱۰ پس از واکسیناسیون در گروه جوجه‌های گوشتی اندازه‌گیری شد و این میزان تا روز ۱۴ پس از واکسیناسیون به ۳۵۵ رسید که این رقم نسبت به سطوح پایه ۳۹۶ تعیین شده توسط سازنده پائینتر است (جدول II). دو هفته بعد در روز ۲۸ پس از واکسیناسیون آنتی‌بادی‌های اختصاصی ویروس گامبورو ظاهر شد و تا روز ۴۳ پس از واکسیناسیون افزایش پیدا نمود و تا پایان آزمایش باقی ماند. در گروه جوجه گوشتی غیر واکسینه، در غیاب پاسخ آنتی‌بادی فعال، سطوح تیتراژ مادری تا روز ۱۴ به زیر تیتراژ پایه کاهش یافت (نتایج نشان داده نشده است).

بحث

در مقاله حاضر، توزیع بافتی ویروس واکسن ایمونوکمپلکس گامبورو مورد استفاده به صورت تزریق زیرجلدی و آنالیز کمی مقدار ویروس در اندام‌های آلوده به ویروس بیماری گامبورو، مطالعه شد. ویروس واکسن در بورس فابر سیوس جوجه‌های SPF از روز ۱۴ پس از واکسیناسیون تا انتهای آزمایش در روز ۲۱ پس از واکسیناسیون شناسایی شد. ظهور دیرهنگام ویروس بیماری گامبورو تا روز ۱۴ پس از واکسیناسیون در مقایسه با نتایج حاصل از آزمایشات واکسن ایمونوکمپلکس گامبورو به صورت تلقیح داخل تخم مرغی غیرمنتظره بود. Corley و همکاران پروتئین‌های ویروس واکسن ایمونوکمپلکس را در بورس فابر سیوس جوجه‌های SPF، ۶ روز پس از واکسیناسیون با روش تلقیح داخل تخم مرغی (PIOV) با آنتی‌ژن کیچر الایزا (ACCE) نشان دادند. Jeurissen و همکاران ویروس واکسن ایمونوکمپلکس در بورس فابر سیوس را از روز ۱۰ تا ۱۹ پس از تلقیح داخل تخم‌مرغی (زمانی که تنها تعداد کمی نقطه کوچک از ویروس دیده شد)، به وسیله ایمونوهیستوشیمی شناسایی نمودند. به علاوه در آزمایشات ما هیچ ویروسی در سایر بافت‌هایی که بررسی نمودیم یافت نشد، در حالی که آنتی‌ژن ویروس واکسن ایمونوکمپلکس در طحال و تیموس و سایر بافت‌ها یافت گردید.

از روش حساس‌تر Nested PCR برای تایید نتایج حاصل از بررسی ایمونوفلورسنس تمام نمونه‌های بورس فابر سیوس استفاده شد. نتایج حاصله با نتایج RT-PCR مطابقت داشت، برای مثال ویروس بیماری گامبورو فقط در روزهای ۱۴ و ۲۱ پس از واکسیناسیون در بورس فابر سیوس شناسایی شد (جدول ۱ تصویر ۲). نتایج حاصل از بررسی ایمونوفلورسنس، Nested PCR و RT-PCR در مورد بورس فابر سیوس مشابه نتایج مورد انتظار برای نمونه‌های طحال، تیموس و سگال تانسلیل بود؛ این نمونه‌ها به صورت تصادفی بررسی شدند و همگی منفی بودند. حساسیت ارزیابی‌های PCR مورد استفاده در این مطالعه، مشابه ارزیابی‌های چاپ شده Phong و همکاران و نیز Wu و همکاران بود. اختلاف بین نتایج در مقالات (شناسایی زودتر در بورس فابر سیوس و علائم مثبت در تیموس و طحال) و نتایج ما (شناسایی دیرتر و فقدان علائم در سایر بافت‌های لنفوئیدی) می‌تواند ناشی از اختلاف در روش و زمان واکسیناسیون باشد. Sharma اختلافاتی بین واکسیناسیون با روش تلقیح داخل تخم مرغی و واکسیناسیون با روش تزریق زیرجلدی در جوجه‌کشی پیدا نمود، برای مثال در روش تلقیح داخل تخم مرغی، توزیع بافتی وسیع‌تر بود و سطوح ویروس در بافت‌ها بیشتر بود. Komine و همکاران نشان دادند که اثر بخشی واکسن و شناسایی ویروس بعد از واکسیناسیون بستگی به روش واکسیناسیون دارد. بر اساس نتایج Jochemsen و Jeurissen در روش تلقیح داخل تخم مرغی، آنتی‌ژن از طریق دهان جنین وارد دستگاه گوارش و ریه‌ها می‌شود که این اتفاق در مورد روش تزریق زیرجلدی رخ نمی‌دهد. بنابراین می‌توان فرض نمود که اختلاف در الگوی تکثیر ویروس و اختلاف در پاسخ ایمنی بر علیه آنتی‌ژن یکسان، احتمالاً ناشی از تفاوت در نوع سلول‌ها، بافت‌های لنفوئیدی و یا مکانیسم‌های اثر باشد. همچنین باید به این نکته توجه شود که واکسن ایمونوکمپلکس شرکت‌های مختلف می‌تواند شامل مقادیر متفاوتی از آنتی‌بادی اختصاصی باشد (به دلیل محرمانه بودن ترکیب). Charan و Kumar نشان داده‌اند که ویروس‌های بیماری گامبورو پوششیده شده با مقادیر متفاوت آنتی‌بادی اختصاصی، درجات متفاوتی از تکثیر را نشان می‌دهند. متعاقباً، میزان آنتی‌بادی موجود در واکسن ایمونوکمپلکس می‌تواند زمان آغاز و شدت تکثیر ویروس واکسن را متاثر نماید.

در جوجه‌های گوشتی دارای ایمنی مادری ویروس بین روزهای ۱۷ و ۴۳ پس از واکسیناسیون تا انتهای دوره آزمایش شناسایی شد. وقتی نتایج این گروه با نتایج حاصل جوجه‌های SPF مقایسه می‌شود، ویروس در این گروه با چند روز تاخیر برای اولین بار شناسایی شد که احتمالاً ناشی از اثر مهاری آنتی‌بادی‌های مادری می‌باشد. کاهش آنتی‌بادی مادری با زمان اثرگذاری واکسن ایمونوکمپلکس در بورس ارتباط دارد. در این مطالعه کاهش تیتراژ ایزا تا روز ۱۴ پس از واکسیناسیون می‌تواند به شروع تکثیر ویروس در حوالی این زمان و اولین شناسایی در ۳ روز بعد آن (حوالی روز ۱۷) منجر گردد. Corley و همکاران

توزیع ویروس واکسن ایمونوکمپلکس گامبورو را در بافت‌ها در حضور سطوح بالای آنتی‌بادی مادری بررسی کردند و به وسیله روش Nested PCR ویروس را بلافاصله ۳ روز بعد از تلقیح داخل تخم مرغ واکسن شناسایی نمودند (متأسفانه مشخص نیست که آیا تیموس و طحال بررسی شده است یا خیر).

از طرف دیگر آنتی‌ژن کپچر الایزا قادر به نشان دادن آنتی‌ژن ویروس بیماری گامبورو در بافت‌های مورد ارزیابی نبود. این ویروس با روش nested PCR تا قبل از روز ۱۸ در بورس فابر سیوس قابل شناسایی نبود. سایر بافت‌های دیگر که به صورت تصادفی بررسی شدند نیز منفی بودند. با این حال پایداری ویروس واکسن در گروه جوجه گوشتی به طور غیر طبیعی طولانی بود. تنها یک مطالعه وجود دارد که مدت زمانی مشابه از پایداری واریانت، سویه تخفیف حدت نیافته ویروس بیماری گامبورو مورد استفاده در یک روزگی در جوجه‌های گوشتی دارای ایمنی مادری را گزارش نمود؛ در این مطالعه پس از ۶-۲ هفته ویروس با استفاده از روش RT-PCR شناسایی گردید. جوجه‌های SPF در سن ۲ هفته با سویه واریانت و یا سویه گامبورو جدا سازی شده از بورس تلقیح شدند. در این پرنده‌ها مشاهده گردید که ویروس بیماری گامبورو در بورس فابر سیوس برای حدود ۴ هفته باقی ماند.

میزان نسبی لود ویروسی در نمونه‌های بورس فابر سیوس جمع‌آوری شده در مقاطع زمانی مختلف پس از واکسیناسیون انجام شد. در مطالعات پیشین، از روش Realtime PCR برای اندازه‌گیری سطوح RNA ویروس بیماری گامبورو و یا شناسایی جهش‌ها در سویه‌های این ویروس استفاده گردید. در مطالعه حاضر از پروب اختصاصی سکانس TaqMan برای 18SrRNA و برای ویروس بیماری گامبورو در تیوب‌های مجزا استفاده شد. از 18SrRNA به دلیل فراوانی و پایداری آن در طی عفونت به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد. برای مثال، مقادیر میانگین Ct برای 18S در آزمایش جوجه گوشتی ۱۰/۹، ۱۱ و ۱۱/۱ به ترتیب در روزهای ۱۷، ۲۸ و ۳۴ پس از واکسیناسیون بود که این مهم نشان‌دهنده ثبات عفونت می‌باشد. به هر حال تعدادی از نمونه‌های انفرادی در مقادیر Ct نوسان نشان دادند (بیشترین اختلاف بین دو نمونه Ct ۲/۸ بود که نشان‌دهنده حدود ۷ مرتبه اختلاف در رقت بود) که این اختلاف می‌تواند ناشی از نمونه‌گیری و خالص‌سازی RNA باشد. جهت به حداقل رساندن این تغییرات، از اختلافات 18SrRNA برای اصلاح مقادیر Ct برای ویروس بیماری گامبورو استفاده شد. در هر دو آزمایش، بیشترین مقدار ویروس در نمونه‌های بورسی شناسایی شد که حضور ویروس با روش RT-PCR در اولین زمان ممکن تأیید شده بود. این زمان برای جوجه‌های SPF روز ۱۴ و برای گروه جوجه گوشتی بین روزهای ۱۷ تا ۲۱ پس از واکسیناسیون بود. (جدول ۱، نمودار ۱). این سطوح به تدریج طی دوره آزمایش کاهش پیدا کرد. از آنجائی که هر دو گروه به‌واسطه واکسیناسیون تغییر سریعی داشتند، این کاهش می‌تواند به‌وسیله پاسخ ایمنی فعال باشد که تکثیر ویروس را محدود کرده و سبب پاک شدن تدریجی ویروس از بورس می‌گردد. در گروه جوجه SPF سطح نسبی ویروس ظرف مدت یک هفته به یک چهارم کاهش می‌یابد. در گروه جوجه گوشتی سطوح ویروس ظرف مدت چهار هفته از رقمی در حدود ۶۰۰ به ۱۰ کاهش یافت (نمودار ۱). Moody و همکاران نشان دادند که ویروس‌های بیماری گامبورو ۴ روز پس از وقوع عفونت به‌صورت کامل از خون پاک شدند، با این حال ویروس برای مدت طولانی‌تری در بورس (اندام هدف برای تکثیر ویروس) پایدار می‌ماند. سطوح قابل شناسایی ویروس واکسن تا انتهای هر دو آزمایش در بورس اندازه‌گیری شد که این مهم نشانگر پایداری بیش از حد انتظار ویروس در این ارگان می‌باشد.

به‌عنوان نتیجه‌گیری، واکسیناسیون با روش تزریق زیرجلدی واکسن ایمونوکمپلکس منجر به تکثیر تاخیری ویروس واکسن در بورس در مقایسه با واکسیناسیون با روش تلقیح داخل تخم‌مرغی می‌شود؛ همچنین ویروس واکسن ایمونوکمپلکس در جوجه‌های گوشتی دارای ایمنی مادری پایداری بیشتری دارد. کاهش تدریجی سطوح RNA ویروس در اندام‌های مثبت هر دو گروه جوجه SPF و جوجه گوشتی در سراسر دوره آزمایش ثابت شد. Realtime PCR ابزاری دقیق و حساس برای مقایسه سطوح نسبی ویروس در بورس می‌باشد.

Kibenge FSB, Dhillon AS, Russel RG. Biochemistry and immunology of infectious bursal disease virus. J Gen Virol 1988;69: 1757-1775.

Sharma JM. Embryo vaccination of specific-pathogen-free chickens with infectious bursal disease virus: tissue distribution of the vaccine virus and protection of hatched chickens against disease. Avian Dis 1986; 30:776-780.

Whitfill CE, Haddad EE, Ricks CA, et al. Determination of optimum formulation of a novel infectious bursal disease virus (IBDV) vaccine constructed by mixing bursal disease antibody with IBDV. Avian Dis 1995; 39:687-699.

Jeurissen SHM, Janse EM, Lehrbach PR, Haddad EE, Avakian A, Whitfill CE. The working mechanism of an immune complex vaccine that protects chickens against infectious bursal disease. Immunol 1998; 95:494-500.

Haddad EE, Whitfill CE, Avakian AP, et al. Efficacy of a novel infectious bursal disease virus immune complex vaccine in broiler chickens. Avian Dis 1997; 41:882-889.

Chettle NJ, Wyeth PJ. Protection against challenge with very virulent infectious bursal disease vaccine using various vaccines and different regimes. Proceedings of International Symposium on Infectious Bursal Disease and Chicken Anaemia, Rauischholzhausen, Germany. 1994:280-285.

Kelemen M, Forgach K, Ivan J, et al. Pathological and immunological study of an *in ovo* complex vaccine against infectious bursal disease. Acta Vet Hung 2000; 48:443-454.

Ricks CA, Avakian A, Bryan T, et al. *In ovo* vaccination technology. Adv Vet Med 1999; 41:495-515.

Liu HJ, Giambrone JJ, Dormitorio T. Detection of genetic variations in serotype 1 isolates of infectious bursal disease virus using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. J Virol Meth 1994; 48:281-291.

Lin Z, Kato A, Otaki Y, Nakamura T, Sasmaz E, Ueda S. Sequence comparisons of highly virulent infectious bursal disease virus prevalent in Japan. Avian Dis 1993; 37:315-323.

Kibenge FS, Jackwood DJ, Mercado CC. Nucleotide sequence analysis of genome segment A of infectious bursal disease virus. J Gen Virol 1990; 71:569-577.

Skeeles JK, Lukert PD, Fletcher OJ, Leonard JD. Immunization studies with a cell-culture-adapted infectious bursal disease virus. Avian Dis 1979; 23:456-465.

Pivarcsi A, Bodai L, Rethi B, et al. Expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 in human keratinocytes. Int Immunol 2003; 15:721-730.

Allan GM, McNulty MS, Connor TJ, McCracken RM, McFerran JB. Rapid diagnosis of infectious bursal disease infection by immunofluorescence on clinical material. Avian Pathol 1984; 13:419-427.

Corley MM, Giambrone JJ, Dormitorio TV. Detection of infectious bursal disease vaccine viruses in lymphoid tissues after *in ovo* vaccination of specific-pathogen-free embryos. Avian Dis 2001; 45:897-905.

Phong SF, Hair-Bejo M, Omar AR, Aini I. Sequence analysis of Malaysian infectious bursal disease virus isolate and the use of reverse transcriptase nested polymerase chain reaction enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of VP2 hypervariable region. *Avian Dis* 2003; 47:154-162.

Wu CC, Lin TL, Zhang HG, Davis VS, Boyle JA. Molecular detection of infectious bursal disease virus by polymerase chain reaction. *Avian Dis* 1992; 36:221-226.

Sharma JM. Embryo vaccination of specific-pathogen-free chickens with infectious bursal disease virus: tissue distribution of the vaccine virus and protection of hatched chickens against disease. *Avian Dis* 1986; 30:776-780.

Komine K, Ohta H, Fujii H, Watanabe Y, Kamata S, Sugiyama M. Efficacy of subcutaneous application of live infectious bursal disease vaccine in young chickens with maternally derived antibody. *J Vet Med Sci* 1995; 57:647-653.

Jochemsen P, Jeurissen SHM. The localization and uptake of in ovo injected soluble and particulate substances in the chicken. *Poultry Sci* 2002; 81:1811-1817.

Kumar R, Charan S. Virus enhancement following infection with antibody-coated infectious bursal disease virus (IBDV) in chick-ens. *Ind J Exp Biol* 2001; 39:1314-1317.

Ivan J, Nagy N, Magyar A, Kacskovics I, Meszaros J. Functional restoration of the bursa of Fabricius following in ovo infectious bursal disease vaccination. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 79:235-248.

Corley MM, Giambrone JJ, Dormitorio TV. Evaluation of the immune response and detection of infectious bursal disease viruses by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay after in ovo vaccination of commercial broilers. *Avian Dis* 2002; 46:803-809.

Elankumaran S, Heckert RA, Moura L. Pathogenesis and tissue distribution of a variant strain of infectious bursal disease virus in commercial broiler chickens. *Avian Dis* 2002; 46:169-176.

Henderson KS, Jackwood DJ. Comparison of the dot blot hybridization assay with antigen detection assays for the diagnosis of infectious bursal disease virus infections. *Avian Dis* 1990;34: 744-748.

Abdel-Alim GA, Saif YM. Detection and persistence of infectious bursal disease virus in specific-pathogen-free and commercial broiler chickens. *Avian Dis* 2001; 45:646-654.

Moody A, Sellers S, Bumstead N. Measuring infectious bursal disease virus RNA in blood by multiplex real-time quantitative RT-PCR. *J Virol Meth* 2000; 85:55-64.

Jackwood DJ, Sommer SE. Identification of infectious bursal disease virus quasispecies in commercial vaccines and field isolates of this double-stranded RNA virus. *Virology* 2002; 304:105-113.

Jackwood DJ, Spalding BD, Sommer SE. Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction detection and analysis of nucleotide sequences coding for a neutralizing epitope on infectious bursal disease viruses. *Avian Dis* 2003; 47:738-744.

Rautenschlein S, Yeh H-Y, Njenga MK, Sharma JM. Role of intrabursal T cells in infectious bursal disease virus (IBDV) infection: T cells promote viral clearance but delay follicular recovery. *Arch Virol* 2002; 147:285-304.

Sharma JM, Kim I-J, Rautenschlein S, Yeh H-Y. Infectious bursal disease virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression. *Dev Comp Immunol* 2000; 24:223-235.

۱۷

نتایج استفاده از واکسن ایمونوکمپلکس گامبورو "ترنسمیون" در مقابله با این

بیماری در کشور تونس

Bouzonaia M. et al 2009 WVPA Congress

پرندهگان

در این مطالعه جوجه‌های گوشتی تجاری آمیخته هوبارد JV از گله مادر ۵۰ هفته مورد استفاده قرار گرفتند.

واکسن

واکسن Cevac Transmune IBD® در یک روزگی با روش تزریق زیرجلدی در هجری استفاده شد. این روش واکسیناسیون با روش واکسیناسیون آشامیدنی در فارم مقایسه شد. واکسیناسیون به روش آشامیدنی در فارم به ترتیب با واکسن‌های اینترمدیت و اینترمدیت پلاس در سن ۷ و ۱۴ روزگی انجام گرفت.

طرح مطالعه

عملکرد گله‌ها در طول ۳ دوره متوالی بررسی شد و در هر دوره ۴۱۰۰۰ قطعه پرنده مورد پایش قرار گرفتند. سالن‌هایی که واکسن Cevac Transmune IBD® و یا واکسن آشامیدنی دریافت کرده بودند، تنها ۴۰۰ متر از یکدیگر فاصله داشتند. مدیریت این مزارع از درگیری‌های متعدد گله با بیماری گامبورو در دوره‌های قبل شکایت داشت.

اطلاعات علمی

CEVAC Transmune®

نتایج دوره اول پرورش

تفاوت (۱)-(۲)	گروه کنترل	گروه ترانسمیون	
-	۲۲۰۰۰	۲۰۹۳۰	تعداد پرندگان (قطعه)
-	۲۱/۹۵	۲۱/۸۹	تراکم به متر مربع
-۱۵۱۴	۲۱۰۸	۵۹۴	تلفات
-%۰.۶	%۹/۵۸	%۲/۸۳	درصد تلفات
-	۱۹۸۹۲	۲۰۳۳۶	تعداد پرند کشتار شده
+۸۴۶	۳۷۸۹۴	۳۸۷۴۰	وزن کلی
+۲/۸۹	۳۷/۶۳	۴۰/۵۲	گوشت تولیدی به ازای هر متر مربع
-	۱/۹۰۵	۱/۹۰۵	میانگین وزن بدن در کشتار
-	۴۳	۴۳	میانگین سن کشتار
-	۴۴	۴۴	میانگین افزایش وزن روزانه
-۷۰۰	۷۵۱۵۰	۷۴۴۵۰	مصرف دان به کیلوگرم
-۰/۰۶	۱/۹۸	۱/۹۲	ضریب تبدیل غذایی
+۲۲	۲۰۲	۲۲۴	فاکتور تولید اروپایی

در اولین دوره بررسی، گروه کنترل مبتلا به همه‌گیری گامبورو شد که سبب افزایش ناگهانی تلفات روزانه در بین سنین ۲۸ تا ۳۲ روزگی گردید. گروه دریافت کننده واکسن Cevac Transmune IBD® نیز در کنار این فارم قرار داشت که کاملاً سالم تا انتهای دوره پرورش پیش رفت.

اطلاعات علمی

CEVAC Transmune®

نتایج دوره دوم

تفاوت (۱)-(۲)	گروه کنترل	گروه ترانسمیون	
-	۲۱۰۰۰	۲۱۰۰۰	تعداد پرندگان (قطعه)
-	۲۰/۸۵	۲۱/۹۶	تراکم به متر مربع
-۸۲۵	۱۹۱۴	۱۰۸۹	تلفات
-۳/۹۳	% ۹/۱۱	% ۵/۱۸	درصد تلفات
۸۲۵	۱۹۰۸۶	۱۹۹۱۱	تعداد پرنده کشتار شده
۱۰۸	۳۷۴۲۰	۳۷۵۲۸	وزن کلی
۲/۰۹	۳۷/۱۵	۳۹/۲۴	گوشت تولیدی به ازای هر متر مربع
-۷۶ گرم	۱/۹۶۰	۱/۸۸۴	میانگین وزن بدن در کشتار
-	۴۲	۴۲	میانگین سن کشتار
-	۴۷	۴۵	میانگین افزایش وزن روزانه
-۵۶۰	۷۰۹۹۰	۷۰۳۲۰	مصرف دان به کیلوگرم
-۲۳	۱/۸۹۷	۱/۸۷۴	ضریب تبدیل غذایی
۳	۲۲۷	۲۳۰	فاکتور تولید اروپایی

استرس سرمایی در هفته اول دلیل تلفات غیراختصاصی در گروه واکسینه شده با واکسن Cevac Transmune IBD® بود. گروه کنترل، درگیر بیماری گامبورو گردید که سبب افزایش ناگهانی تلفات بین سنین ۲۶ تا ۳۱ روزگی شد. گله‌ای که با واکسن Cevac Transmune IBD® تلقیح شده بود و در نزدیکی این فارم نگهداری می‌شد، به سلامت دوره را به انتها رساند.

در دوره اول و دوم، گله دریافت کننده واکسن Cevac Transmune IBD® و گروه کنترل در شرایط یکسان پرورش یافتند تا میزان تاثیرگذاری فاکتورهای سالن و فارم به حداقل برسند. برای اینکه نقش بیماری گامبورو در دوره‌هایی که گله درگیر گامبورو شده بود، همچنان در یک سالن تکرار نشود، بین دوره‌ها، سالن‌های گروه‌های مورد مطالعه تعویض شدند.

اطلاعات علمی

CEVAC Transmune®

نتایج دوره سوم

تفاوت (۱)-(۲)	گروه کنترل	گروه ترانسمیون	
-	۲۱۰۰۰	۲۱۰۰۰	تعداد پرندگان
-	۲۱/۹۶	۲۰/۸۵	تراکم به متر مربع
-۵	۶۶۰	۶۵۵	تلفات
-۰/۰۳	% ۳/۱۴	% ۳/۱۱	درصد تلفات
۵	۲۰۳۴۰	۲۰۳۴۵	تعداد پرنده کشتار شده
+۱۹۶۱ کیلوگرم	۳۵۱۵۹	۳۷۱۲۰	وزن کلی
+۰/۰۳	۳۶,۷۷۷	۳۶,۸۶۰	گوشت تولیدی به ازای هر متر مربع
۹۴ گرم	۱/۷۳۰	۱/۸۲۴	میانگین وزن بدن در کشتار
-	۳۹/۱۸	۳۹/۱۸	میانگین سن کشتار
+۳ گرم	۴۴	۴۷	میانگین افزایش وزن روزانه
+۴۳۰ کیلوگرم	۶۱/۹۰۰	۶۲/۳۳۰	مصرف دان به کیلوگرم
-۰/۰۸۱	۱/۷۶۰	۱/۶۷۹	ضریب تبدیل غذایی
+۲۶	۲۴۳	۲۶۹	فاکتور تولید اروپایی

نتیجه گیری

در طول این مطالعه یک چالش طبیعی با ویروس فوق حاد گامبورو (vVIBD) در فارم مشاهده شد. واکسن ترانسمیون توانایی مقابله با این چالش را داشت اما گروه کنترل با واکسن آشامیدنی، درگیر بیماری شد. در کل گله‌هایی که واکسن ترانسمیون را دریافت کردند، عملکرد بهتری را نسبت به سایر گله‌ها نشان دادند.

نتایج استفاده از واکسن ایمونوکمپلکس گامبورو Cevac Transmune IBD® در مقابله با این بیماری در کشور تونس

Bouzonaia, M.¹; Allagui, E.²; ABBES, O.³; Ghram, A.⁴ and Fedida, D.²

1 Veterinary School, Sidi Thabet 2020, Tunisia; 2 Ceva Animal Health, France; 3 Poulina holding, Tunisia; 4 Pasteur Institute, Tunisia

نویسنده در ابتدا نتایج گروه کنترل بیماری گامبورو با استفاده از واکسن ایمونوکمپلکس Cevac Transmune IBD® در کشور تونس را ارائه می‌دهد. هدف از این مطالعه، ارزیابی کارایی و بی‌خطر بودن واکسن Cevac Transmune IBD® با روش تزریق زیرجلدی داخل جوجه‌کشی و مقایسه آن با گروه واکسینه شده به روش آشامیدنی داخل فارم با استفاده از واکسن‌های اینترمدیت و اینترمدیت پلاس می‌باشد. داده‌های عملکردی گله در طول ۳ دوره هر کدام با حدود ۴۱۰۰۰ قطعه پرنده ارزیابی شده و ثبت گردیدند. در این مطالعه مشخص گردید که واکسن ایمونوکمپلکس Cevac Transmune IBD® سبب بهبود عملکرد گله‌ها می‌گردد. نتایج عملکردی گله گوشتی نیز در بیش از ۸ میلیون پرنده مورد مطالعه در این مقاله، ذکر شده است. تزریق واکسن در جوجه‌کشی می‌تواند سبب حذف و کاهش بسیاری از مخاطرات واکسیناسیون با روش آشامیدنی در فارم گردد. این مخاطرات شامل زمان مناسب واکسیناسیون، کیفیت و کمیت آب و تفاوت در مهارت کارگر فارم در اجرای واکسیناسیون می‌باشد. واکسن Cevac Transmune IBD® به‌عنوان یک واکسن جدید تمامی این مشکلات را حل کرده و ایمنی بهتر و کامل‌تری در برابر بیماری گامبورو ایجاد می‌کند.

اطلاعات علمی

CEVAC Transmune®



کاهش ضایعات کشتارگاهی متعاقب واکسیناسیون در جوجه کشی

Paniago M.T. and V.Turblin, 2009. WVPA Congress

در این مقاله میزان ضایعات کشتارگاهی در دو گروه گله‌هایی که واکسن Cevac Transmune IBD® را دریافت نمودند، در مقایسه گله‌هایی که واکسن را به شکل آشامیدنی دریافت کردند، مقایسه شده‌اند. این مطالعه بالینی مجموعاً ۹ میلیون جوجه را شامل می‌گردد.

کشور	تعداد پرنده‌های گوشتی	نوع واکسن گامبورو	ایندکس تولید	کل ضایعات کشتارگاهی	میزان کاهش در هنگام مصرف ترنسمیون
برزیل (بخش جنوبی)	۱۸۸۰۰۰	ترنسمیون	۳۳۵	۱/۴۵	-٪ ۶۵
	۳۸۸۰۰۰	۲ دُز واکسن اینترمدیت آشامیدنی	۳۲۰	۴/۱۸	
برزیل	۶۰۰۰۰۰	ترنسمیون	۳۰۴	۱/۷۳	-٪ ۴
	۳۸۸۰۰۰	۱ دُز واکسن اینترمدیت پلاس آشامیدنی	۳۰۰	۱/۸۰	
بریتانیا	۲۲ گله	ترنسمیون	بدون داده	۱/۹۵	-٪ ۴۷
	۳ گله	۱ دُز واکسن اینترمدیت پلاس آشامیدنی	بدون داده	۳/۶۵	
فرانسه	۴۰۰۰۰۰	ترنسمیون	۲۴۹	۰/۶۶	-٪ ۳۳
	۸۷۰۰۰۰	۲ دُز واکسن اینترمدیت آشامیدنی	۲۳۸	۰/۹۸	
آفریقای جنوبی	۶۳۰۰۰۰	ترنسمیون	۲۶۷	۱/۲۰	-٪ ۵۰
	۴۴۰۰۰۰۰	۱ دُز گامبورو اینترمدیت پلاس آشامیدنی	۲۶۴	۲۴۰	
تایلند	۲۱۶۰۰۰	ترنسمیون	۳۳۸	۳/۳۹	-۱۰٪
	۲۱۶۰۰۰	۱ دُز اینترمدیت پلاس آشامیدنی	۳۳۹	۳/۷۸	

نتیجه گیری

میزان کمتر ضایعات کشتارگاهی می تواند به دلایل زیر باشد:

- کنترل بهتر بیماری گامبورو بخصوص اشکال تحت بالینی آن که می تواند سبب عملکرد ضعیف تر گله شود و متعاقب آن عوامل ثانویه ای همچون کلی باسیلوز در گله افزایش یابد.
- بهبود یکپارچگی پوست بدن: در طول واکسیناسیون با روش آشامیدنی به دلیل تشنگی دادن به گله و تلاش و رقابت افراد گله جهت رسیدن به آب درهنگام شروع واکسیناسیون، خراش ها و ضایعاتی در پوست ایجاد می گردد. استفاده از روش واکسیناسیون در جوجه کشی سبب قطع بروز این وقایع شده و مطمئناً یکپارچگی پوست بدن بیشتر خواهد بود.

کاهش ضایعات کشتارگاهی طیور متعاقب واکسیناسیون در جوجه کشی

Paniago M.T¹ and Turblin V.¹

1 Ceva Animal Health Asia Pacific, Kuala Lumpur, Malaysia

به منظور ارزیابی اثر واکسیناسیون در جوجه‌کشی بر کاهش ضایعات کشتارگاهی طیور، مطالعات فارمی مقایسه‌ای متعدد (که مجموعاً شامل ۹ میلیون جوجه گوشتی می‌شد) در کشورهای مختلف انجام گرفت. جوجه‌ها علیه بیماری گامبورو به روش واکسیناسیون آشامیدنی در فارم و یا واکسن ایمونوکمپلکس® Cevac Transmune IBD (سوا-فرانسه) با روش تزریقی در جوجه‌کشی واکسینه شدند. ادامه برنامه واکسیناسیون و مدیریت گله در هر دو گروه یکسان بود. بدون شک، اقدامات مدیریتی در طول دوره نقش بسیار زیادی در کیفیت لاشه‌های کشتار شده دارد. سلولیت در بین پرنده‌های یک گله ناشی از عدم یکپارچگی و سالم بودن پوست بدن بوده و عواملی همچون تراکم گله، فضای دانخوری، برنامه نوری، دما و سایر موارد مستقیماً بر آن تأثیر دارد. در واقع، افزایش حرکات ناگهانی و هیجانی پرنده جهت دریافت غذا و آب سبب پدید آمدن خراش‌هایی بر روی پوست شده که این خراش‌ها سرآغاز وقوع سلولیت خواهند بود. واکسیناسیون در جوجه‌کشی مطمئناً سبب کاهش حرکات ناگهانی برای دریافت آب به هنگام واکسیناسیون با روش آشامیدنی شده و به این طریق سبب کاهش ضایعات کشتارگاهی خواهد شد. از سوی دیگر حتی اگر در گله‌های واکسینه شده به روش آشامیدنی درگیری‌های بالینی گامبورو گزارش نشود، موارد درگیری تحت بالینی همچنان به وقوع پیوسته و سبب افزایش ضایعات کشتارگاهی خواهد شد. پس از معرفی واکسن ایمونوکمپلکس گامبورو، شکل تحت بالینی بیماری گامبورو به میزان قابل توجهی کنترل گردید و این خود سبب کاهش ضایعات کشتارگاهی شد. در واقع، موارد ایجاد کننده ضایعات کشتارگاهی زیاد و چند فاکتوره می‌باشند، بنابراین کاهش آن از طریق بهبود مدیریت، ساده به نظر نمی‌رسد. با این وجود واکسیناسیون در جوجه‌کشی سبب کاهش قابل توجه این ضایعات شده و روش واکسیناسیون مطمئن‌تری محسوب می‌گردد.

بررسی آزمایشگاهی کارایی واکسن ترنسمیون در تزریق زیرجلدی به پرندگان

گوشتی

Herczeg J. et al., 2011 WVPA congress

پرندگان

در این مطالعه از ۱۵۰ قطعه جوجه گوشتی یک روزه استفاده شد. میانگین هندسی تیترا مادری (با روش خنثی‌سازی ویروس) بر علیه بیماری بورس عفونی (گامبورو) در زمان هج مورد ارزیابی قرار گرفت: تیترا میانگین ۸۲۰۰ (13 Log2) و محدوده آن از ۲۴۰۰ تا ۲۵۶۰۰ بود.

واکسن

در این مطالعه از یک بچ اختصاصی واکسن Cevac Transmune IBD® با حداقل اثربخشی (CID₅₀ ۰/۱) مورد استفاده قرار گرفت. واکسن در سن یک روزگی به مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر در هر پرنده تزریق گردید.

گروه‌های مورد مطالعه

گروه‌ها	توضیحات	درمان های مختلف
G1	۷۵ قطعه جوجه گوشتی	تزریق Cevac Transmune IBD® در یک روزگی
G2	۷۵ قطعه جوجه گوشتی	غیرواکسینه
G3	۲۰ قطعه جوجه SPF	غیرواکسینه

اطلاعات علمی

CEVAC Transmune®

شناسایی دریافت واکسن

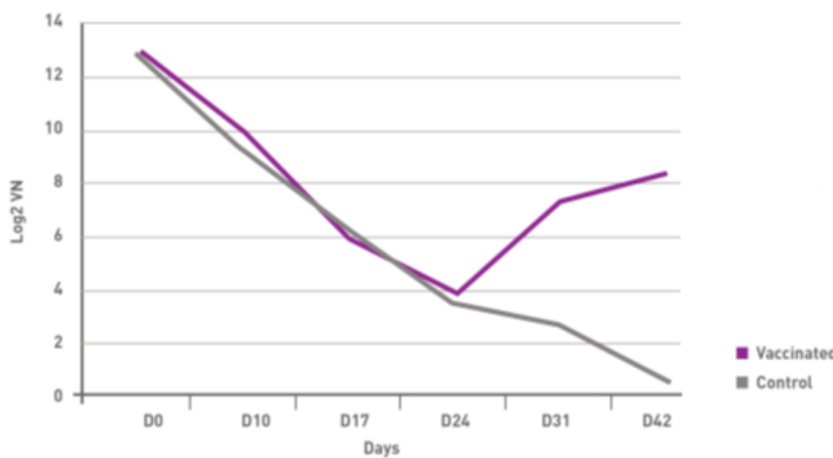
بر اساس کالبدگشایی و هیستوپاتولوژی در ۵ نمونه بورسی که به صورت منظم نمونه برداری شد، مشخص گردید که دریافت واکسن در روز ۱۹ آغاز و در روز ۲۴ کامل شد.

چالش

به منظور ایجاد چالش تجربی، از سویه بسیار حاد گامبورو MOH-94-3 استفاده شد. چالش به طریقه چشمی و دهانی با دُز EID₅₀ ۱۰۳/۵ و با حجم ۰/۲ میلی لیتر صورت گرفت. در این مطالعه ۲ چالش صورت گرفت که یکی در ۲۴ روزگی (در زمان تکمیل دریافت واکسن) و دیگری در ۳۱ روزگی. میزان محافظت بر اساس علائم کلینیکی (تلفات و وزن گیری)، کالبدگشایی و علائم هیستوپاتولوژیکی (با استفاده از سیستم امتیازبندی) ارزیابی شد.

نتایج

میزان محافظت پس از چالش اول (روز ۲۴)	محافظت پس از چالش دوم	
۱۰۰	۱۰۰	پرندگان واکسینه شده با ترنسمیون
۷۸	۳۰	پرندگان غیرواکسینه
۰	۰	پرندگان غیرواکسینه SPF



گروه ترنسمیون:

روز ۱۹: شروع دریافت واکسن
روز ۲۴: دریافت کامل واکسن (۱۰۰ درصد محافظت در برابر ۷۸ درصد محافظت در گروه کنترل)

اطلاعات علمی

CEVAC Transmune®

نتیجه گیری

در مطالعه حاضر دریافت واکسن در سن ۲۴ روزگی کامل شد؛ این در حالی است که شناسایی تولید آنتی‌بادی در این سن با روش الایزا امکان‌پذیر نیست. در این سن مقداری آنتی‌بادی مادری در بدن پرنده مانده، اما مقادیر آن در حد ایجاد محافظت علیه سویه بسیار حاد ویروس گامبورو نبود. زمانی که دریافت واکسن Cevac Transmune IBD® کامل شد (در این مطالعه ۲۴ روزگی)، محافظت کامل علیه سویه بسیار حاد بیماری گامبورو ایجاد گردید. در نتیجه، حتی اگر پاسخ آنتی‌بادی یک هفته دیرتر قابل شناسایی باشد، هیچ‌گونه خلأ ایمنی بین کاهش ایمنی مادری و دریافت واکسن دیده نمی‌شود.

بررسی آزمایشگاهی کارآیی واکسن Cevac Transmune IBD® در تزریق زیرجلدی به پرندگان گوشتی^{۴۸}

Jozef Herczeg¹, Miklos Nagy¹, Laszlo Makranszki¹, Karoly Kustos², Jean defoucauld¹, Jerome Thevenon¹, Branko Alva³

1-CEVA-Phylaxia, Budapest, Hungary; 2-Lab-NYUL consulting Ltd.; 3- CEVA-Libourne, France

مقدمه

Cevac Transmune IBD® یک واکسن تک دُز تزریقی به روش زیرجلدی در جوجه‌های گوشتی جهت پیشگیری از تلفات، علائم بالینی، کاهش وزن و کاهش ضایعات بورس فابرسیوس حاصل از اشکال فوق حاد و کلاسیک بیماری بورس عفونی (گامبورو) می‌باشد. شروع ایمنی علیه گامبورو در پرندگان، وابسته به کاهش ایمنی مادری می‌باشد. واکسن Cevac Transmune IBD® در جوجه‌های گوشتی به صورت مادام‌العمر علیه گامبورو ایمنی ایجاد می‌کند. مطالعات آزمایشگاهی اخیر واکسن، حداقل دُز موثر (CID₅₀ ۰/۱) را به صورت زیرجلدی مورد آزمایش قرار داده است و کلیات این مطالعه در این مقاله عنوان می‌گردد.

مواد و روش کار

۱۲۸ قطعه جوجه یک روزه گوشتی با منشا یک گله مادر به صورت زیرجلدی واکسن Cevac Transmune IBD® را با حداقل دُز موثره دریافت کردند (جدول شماره ۱). در تست VN میانگین هندسی تیترا میزان آنتی‌بادی مادری گله انتخاب شده ۸۲۰۰ (به صورت میانگین Log₂ ۱۳) بوده و محدوده کلی تیترا نسبتاً بالا بود (حداقل ۲۴۰۰ و حداکثر ۲۵۶۰۰).

جدول شماره ۱: گروه‌ها و درمان‌های مختلف

واکسیناسیون	گروه‌ها
۱ دوز واکسن (۰/۱ میلی لیتر)	گروه ۱ جوجه واکسینه گوشتی محل A
بدون واکسن	گروه ۲ جوجه‌های گوشتی کنترل محل B
بدون واکسن	گروه ۳ جوجه‌های کنترل SPF محل C

جهت جلوگیری از آلودگی متقاطع گروه‌های واکسینه شده و واکسینه نشده، تمامی گروه‌ها در محل‌های کاملاً جداگانه نگهداری (محل A و B) و بر روی بستر پرورش داده شدند. سیستم‌های پرورشی و مدیریتی بر اساس آخرین توصیه‌های کانالوگ‌های

⁴ 2011 WVPA Congress

اطلاعات علمی

CEVAC Transmune®

پرورشی صورت گرفت و دان به صورت آزاد در دسترس پرندگان بود. علاوه بر این دو گروه، ۲۰ قطعه پرنده SPF (۲×۱۰) در یک محل کاملاً مجزا تا زمان چالش جدا نگهداری شدند (محل C). میزان ایمنوژنیسیته و کارایی واکسن با در نظر گرفتن دستورالعمل دارویی اتحادیه اروپا شماره ۶/۲ به طریق دوبار چالش در حیوانات واکسینه شده با استفاده از سویه‌ی فوق حد گامبورو (سویه MOH-94-3) مورد ارزیابی قرار گرفت. ویروس چالشی به روش داخل دهانی یا قطره چشمی با EID₅₀ ۱۰^{۳/۵} به ازای هر پرنده در ۰/۲ میلی لیتر مصرف گردید. گروه‌ها و برنامه‌های مختلف درمانی در جدول شماره ۲ خلاصه شده‌اند.

جدول شماره ۲: روند چالش

چالش دوم	چالش اول	گروه‌ها
۲۷ قطعه جوجه واکسینه و غیر واکسینه گوشتی همچنین ۱۰ قطعه پرنده SPF در سن ۳۱ روزگی (۷ روز پس از چالش اول)	۲۷ قطعه جوجه واکسینه و ۲۷ قطعه جوجه گوشتی کنترل، همچنین ۱۰ قطعه پرنده SPF در سن ۲۴ روزگی به هنگام دریافت کامل واکسن (۵ روز پس از شناسایی اولین علائم دریافت واکسن)	گروه ۱ (واکسینه)
		گروه ۲ جوجه گوشتی کنترل
		گروه ۳ گروه کنترل SPF

استفاده از جوجه‌های SPF برای ارزیابی عملکرد واکسن‌های گامبورو در دستورالعمل دارویی اتحادیه اروپا ضروری است، اما استفاده از جوجه‌های گوشتی الزامی نمی‌باشد. در این مطالعه حتی از جوجه‌های گوشتی استفاده گردید چرا که ایمنی مادری بر روی شروع دریافت واکسن و پاسخ ایمنی واکسن‌ها تأثیرگذار هستند. گروه جوجه‌های SPF نیز با ویروس مشابه سایر گروه‌ها چالش داده شدند و از آن‌ها به عنوان مدل کنترل چالش جهت اعتبار بخشیدن به چالش گروه‌ها استفاده گردید.

آزمون

در این مطالعه تغییرات صورت گرفته در بورس فابرسیوس به دلیل تأثیرات دریافت واکسن به صورت مرتب با نمونه‌برداری از ۵ پرنده مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۳). در صورت مشاهده هرگونه علامت از تکثیر واکسن در بورس فابرسیوس، این علامت به عنوان دریافت واکسن محسوب می‌گردد. معیارهای دیگر شامل: ایندکس وزن بورس به وزن بدن، امتیازبندی هیستولوژیکی و پاتولوژیکی بورس بودند.

ارزیابی میزان محافظت بالینی واکسن، با استفاده از بررسی میزان تلفات و علائم بالینی القا شده توسط بیماری در طی چالش صورت گرفت. با وجود اینکه به دلیل ایمنی مادری ممکن است همیشه علائم بالینی بیماری پس از چالش دیده نشود، عواملی همچون امتیازبندی پاتولوژیکی بورس فابرسیوس، امتیازبندی هیستولوژیکی بورس و ایندکس وزن بورس به وزن بدن جهت ارزیابی میزان محافظت بررسی گردید. در صورتی که در سیستم امتیازدهی پاتولوژیکی و هیستولوژیکی جمع نمرات از ۷ تجاوز کند (جدول ۴) پرندگان ایمن نشده (محافظت نشده) محسوب می‌شوند. پاسخ سرولوژیکی و وزن‌گیری روزانه نیز ارزیابی شدند. نرخ وزن‌گیری فردی محاسبه شد. تمامی پرندگان قبل و بعد از چالش و در طول دوره آزمایش وزن‌گیری شدند. وزن‌گیری فردی

اطلاعات علمی

CEVAC Transmune®

در گله به صورت مداوم انجام و با نرم افزارهای آماری مورد بررسی قرار گرفت. روش آماری مورد استفاده آزمون Two-sided two-sampled T comparison بود. آستانه معناداری در این آزمون سطح ۵ درصد بوده و نرم افزار statgraphics centurion xv.v.15.214 مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج

پایش دریافت واکسن

جدول شماره ۳ نتایج پایش تغییرات بورس در طول مطالعه را با استفاده از تمامی پارامترهای مطالعه همچون امتیازبندی پاتولوژیکی و هیستولوژیکی بورس فابرسیوس و نیز ایندکس وزن بورس به وزن بدن نشان می دهد. اولین زمان علائم دریافت واکسن به روش هیستولوژی در ۲ پرنده روز ۱۹ بود. تکثیر سریع ویروس در پرندگان در روز ۲۱ مشاهده شد و نهایتاً در روز ۲۴ تمامی پرندها از لحاظ دریافت واکسن در بورس مثبت بودند. این زمان برای چالش اول انتخاب شده بود.

جدول شماره ۳: شناسایی اثرات ویروس واکسن در بورس فابرسیوس (پرندگان واکسن خورده و چالش نیافته)

کنترل		واکسن خورده			روزهای پس از واکسیناسیون
میانگین امتیاز هیستولوژیکی	میانگین امتیاز پاتولوژیکی	ایندکس وزن بورس به وزن بدن	میانگین امتیاز هیستولوژیکی	میانگین امتیاز پاتولوژیکی	
۰	۰	۱/۳۴	۰	۰/۴	روز ۱۷
۰	۰	۰/۹۳	۰/۶	۰/۴	روز ۱۱ (شناسایی دریافت واکسن)
۰	۰	۰/۷۷	۱/۴	۱/۴	روز ۲۱
۰	۰	۰/۴۸	۲	۱/۸	روز ۲۴ ۱۰۰ درصد دریافت واکسن

ارزیابی محافظت بالینی

چالش اول (روز ۲۴)

میزان کارایی واکسن با استفاده از پارامترهای عنوان شده در بالا در ۴ و ۱۰ روز پس از چالش مورد ارزیابی قرار گرفت. جدول شماره چهار داده های نمونه برداری از ۴ بورس را پس از چالش اول در گروه ها نشان می دهد. پنج پرنده از گروه های پرندگان واکسن خورده-چالش یافته و گروه پرندگان واکسن نخورده-چالش یافته انتخاب و نمونه برداری شدند.

اطلاعات علمی

CEVAC Transmune®

جدول شماره ۴: بررسی کارایی واکسن با استفاده از روش دریافت واکسن در بورس، ۴ روز پس از چالش اول

کنترل					واکسینه				
ایندکس وزن بورس به وزن بدن	امتیاز بندی پاتولوژیکی و هیستولوژیکی	امتیاز بندی هیستولوژیکی	امتیاز بندی پاتولوژیکی	شماره پرنده	ایندکس وزن بورس به وزن بدن	امتیاز بندی پاتولوژیکی و هیستولوژیکی	امتیاز بندی هیستولوژیکی	امتیاز بندی پاتولوژیکی	شماره پرنده
۰/۵۵	۶	۲	۴	۱	۰/۳۸	۳	۲	۱	۱
۱/۰۳	۶	۳	۳	۲	۰/۴۱	۳	۲	۱	۲
۰/۷۱	۶	۲	۴	۳	۰/۲۷	۴	۲	۲	۳
۰/۷۶	۵	۲	۳	۴	۰/۳۲	۳	۲	۱	۴
۰/۸۳	۶	۲	۴	۵	۰/۳۴	۴	۲	۲	۵
۰/۷۷	۵/۸	۲/۲	۳/۶	میانگین	۰/۳۳	۳/۴۰	۲	۱/۴۰	میانگین
محافظت شده ۱۰۰ درصد (۵/۵)					محافظت شده ۱۰۰ درصد (۵/۵)				

۴ روز پس از اولین چالش پرنده‌گان واکسن خورده بر اساس امتیاز بندی هیستولوژیکی و پاتولوژیکی کاملاً محافظت شده بودند. گروه کنترل میزان محافظت کمتری داشتند ولی در مجموع امتیاز بندی پاتولوژیکی و هیستولوژیکی (میانگین ۵/۸) به‌عنوان گروه غیرایمن (میانگین ۷) محسوب نگردید. جدول شماره ۵ نشان دهنده نتایج بررسی پارامترهای مورد مطالعه در ۲۷ قطعه پرنده در انتهای روز ۱۰ مشاهده پرنده‌گان می‌باشد.

جدول شماره ۵: مقایسه پارامترهای اولیه در انتهای دوره مشاهده (میانگین نتایج گروه)

گروه‌ها	امتیاز بندی پاتولوژیکی	امتیاز بندی هیستولوژیکی	امتیاز بندی پاتولوژیکی + هیستولوژیکی	ایندکس وزن بورس به وزن بدن	وزن گیری در روز به گرم	زنده مانده	درصد محافظت
واکسینه	۱/۴۴	۱/۶۷	۳/۱۱	۰/۲۱	۵۵/۷	۱۰۰ (۲۷/۲۷)	۱۰۰ (۲۷/۲۷)
کنترل	۲/۶۳	۲/۷۸	۵/۴۱	۰/۲۵	۵۴/۸۵	۱۰۰ (۲۷/۲۷)	۷۸ (۲۷/۲۱)
آنالیز آماری (p-value)	.	.	.	۰/۰۴۷۲	۰/۷۴۸	N/A	N/A
کنترل SPF (۱۰)	تلف شد	تلف شد	تلف شد	تلف شد	تلف شد	.	.

۱۰ روز پس از چالش، تمامی پرنده‌گان گوشتی تجاری زنده ماندند، اما تمامی پرنده‌گان SPF به دلیل ابتلا به بیماری گامبورو تلف شدند. تمامی پرنده‌گان واکسینه شده ۱۰۰ درصد محافظت را نشان دادند ولی ۲۲ درصد پرنده‌گان غیرواکسینه (کنترل) امتیاز بندی

اطلاعات علمی

CEVAC Transmune®

پاتولوژیکی و هیستولوژیکی بالای ۷ را نشان دادند که حاکی از عدم محافظت محسوب می‌شد. ۷۸ درصد پرندگان در گروه کنترل به دلیل وجود آنتی‌بادی مادری محافظت کامل علیه بیماری را نشان دادند که نتیجه نمره‌بندی پاتولوژیکی و هیستولوژیکی آن زیر ۷ بود.

چالش دوم:

کارایی واکسن در این آزمایش، ۴ و ۱۰ روز پس از چالش ارزیابی گردید. جدول شماره شش نشان‌دهنده امتیازبندی بورس‌های فابرسیوس جمع‌آوری شده ۴ روز پس از چالش دوم می‌باشد. از هر گروه واکسینه و غیر واکسینه ۵ نمونه جمع‌آوری گردید.

جدول شماره ۶: ارزیابی کارایی واکسن با استفاده از پایش تأثیر ویروس واکسن بر روی بورس فابرسیوس ۴ روز پس از چالش دوم

کنترل					واکسینه				
ایندهکس وزن بورس به بدن	مجموع امتیازبندی پاتولوژیکی و هیستولوژیکی	امتیازبندی هیستولوژیکی	امتیازبندی پاتولوژیکی	شماره	ایندهکس وزن بورس به بدن	مجموع امتیازبندی پاتولوژیکی و هیستولوژیکی	امتیازبندی هیستولوژیکی	امتیازبندی پاتولوژیکی	شماره
۱/۳۰	۸	۴	۴	۱	۰/۴۱	۲	۱	۱	۱
۰/۸۲	۶	۲	۴	۲	۰/۳۷	۲	۱	۱	۲
۱/۰۶	۷	۳	۴	۳	۰/۲۹	۲	۱	۱	۳
۱/۴۵	۹	۴	۵	۴	۰/۳۹	۴	۲	۲	۴
۰/۶۹	۷	۳	۴	۵	۰/۳۶	۲	۱	۱	۵
۱/۰۶	۷/۴۰	۳/۲۰	۴/۲۰	میانگین	۰/۳۷	۲/۴۰	۱/۲۰	۱/۲۰	میانگین
محافظت ۲۰ درصد					محافظت ۱۰۰ درصد				

۴ روز پس از چالش دوم پرندگان واکسن خورده بر اساس امتیازبندی هیستولوژیکی و پاتولوژیکی کاملاً محافظت شده محسوب شدند. ۸۰ درصد پرندگان گروه کنترل بر اساس ارزیابی‌های پاتولوژیکی و هیستولوژیکی محافظت نشده محسوب شدند چرا که مجموع امتیازبندی آن‌ها بالاتر از نمره ۷ (معیار کنترل داخلی) بود. ۲۰ درصد پرندگان نیز در گروه کنترل بر اساس امتیازبندی در دسته محافظت شده، قرار گرفتند و مجموع امتیازبندی آن‌ها زیر ۷ بود. جدول شماره ۷ نشان‌دهنده نتایج گروه‌ها ۱۰ روز پس از چالش می‌باشد. ۲۷ قطعه پرنده از دو گروه واکسینه و غیر واکسینه نمونه برداری شدند.

اطلاعات علمی

CEVAC Transmune®

جدول شماره ۷: مقایسه تفاوت های کلینیکی در پایان مطالعه

گروه ها	امتیاز بندی پاتولوژیکی	امتیاز بندی هیستولوژیکی	مجموع امتیاز بندی پاتولوژیکی و هیستولوژیکی	ایندکس وزن بورس به وزن بدن	افزایش روزانه وزن بدن به گرم	درصد نجات یافتگان	درصد محافظت
واکسینه	۱/۱۱	۱/۲۲	۲/۳۳	۰/۳۸	۶۷/۸۹	۱۰۰	۱۰۰
کنترل	۳/۳۷	۳/۳۳	۶/۷	۰/۳۴	۶۱/۱۷	۱۰۰	۲۹/۶
آنالیز آماری	۰	۰	۰	۰/۳۰۲	۰/۰۸۹	N/A	N/A
کنترل SPF	همگی تلف شدند	همگی تلف شدند	همگی تلف شدند	همگی تلف شدند	همگی تلف شدند	.	.

۱۰ روز پس از چالش تمامی پرندگان گوشتی نجات یافتند، ولی پرندگان SPF چالش داده شده با بیماری گامبورو تلف شدند. تمامی پرندگان واکسینه شده ۱۰۰ درصد محافظت را نشان دادند و ۷۰/۴ درصد پرندگان گروه کنترل امتیاز بندی ۷ را رد کردند که نشان دهنده عدم محافظت بود.

وزن گیری روزانه

روش آماری مورد استفاده در این مطالعه به منظور کاهش انحراف معیار به کار گرفته شد. همچون همیشه انحراف معیار بالا، سبب ماسکه شدن تفاوت بین گروه ها می شود.

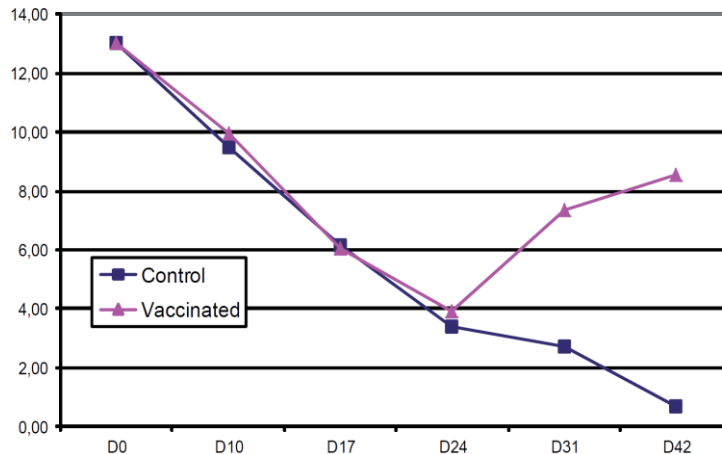
پس از اولین چالش تفاوتی از لحاظ میزان افزایش وزن گیری بین دو گروه واکسینه و کنترل مشاهده نشد ($P=0/53$). پس از دومین چالش وزن گیری گروه واکسینه به طور معنی داری از گروه کنترل بیشتر بود. گروه واکسینه در برابر کاهش وزن حاصل از چالش با ویروس گامبورو محافظت شده بود.

نتایج سرولوژی

جدول شماره ۸ و نمودار شماره ۱ تیتراژ سرولوژیک Log2 تست VN (خنثی سازی ویروس) را بر اساس روزهای نمونه برداری نشان می دهد.

جدول شماره ۸: نتایج سرولوژی (میانگین Log2 تست خنثی سازی ویروس و ضریب تغییرات آن)

Log2 تیتراژ تست خنثی سازی ویروس در روزهای مختلف نمونه برداری						گروه ها
روز ۰	روز ۱۰	روز ۱۷	روز ۲۴	روز ۳۱	روز ۴۲	
۱۳۰۰	۹/۴۷	۶/۱۷	۳/۳۸	۲/۷۳	۰/۷۰	کنترل
۱/۰۷	۱/۶۷	۱/۷۹	۲/۱۳	۲/۲۴	۱/۲۶	
۱۳	۹/۹۳	۶/۰۷	۴/۹۰	۷/۳۶	۸/۵۷	واکسینه
۱/۰۷	۰/۹۸	۱/۶۲	۱/۶	۱/۳۶	۱/۶۵	



نمودار شماره ۱: میانگین تیتراژ Log_2 تست خنثی سازی ویروس قبل و بعد از دریافت واکسن

بحث

پارامترهای اولیه مطالعه: محافظت بالینی

اولین چالش در روز دریافت ۱۰۰ درصدی واکسن صورت گرفت (تمامی پرندگان ویروس واکسن را دریافت کرده بودند)، اما میزان آنتی‌بادی مادری همچنان بالا بود، به همین دلیل گروه کنترل نیز در عمل محافظت شده بودند. یک هفته بعد میزان آنتی‌بادی مادری بسیار کاهش یافت و چالش دوم توانست تفاوت‌های بین گروه واکسینه و کنترل (غیرواکسینه) را مشخص کند.

چالش اول:

پرندگان در سن ۲۴ روزگی، زمانی که همگی پرندگان علائم دریافت ویروس واکسن را در بورس نشان دادند، چالش شدند. این سن ۵ روز پس از اولین علائم دریافت واکسن (سن ۱۹ روزگی) می‌باشد. دلیل استفاده از این زمان بندی برای چالش، بالا بودن تفاوت‌ها بین میزان ایمنی مادری بود.

چالش قابل قبول و معتبر بود؛ چرا که تمامی پرندگان در گروه کنترل SPF تلف شدند. ۴ روز پس از چالش، تمامی ۵ پرنده گوشتی تجاری مورد مطالعه واکسینه و غیر واکسینه (کنترل) محافظت شده بودند (چراکه میزان امتیازبندی پاتولوژیکی و هیستولوژیکی آن زیر ۷ بود). در گروه کنترل، ایمنی مادری به قدری بالا بود که بتواند جلوی بیماری را بگیرد. اما در گروه واکسینه در همین سن، ویروس واکسن توانست به صورت ۱۰۰ درصدی وارد بورس شده و محافظت ایجاد کند.

در پایان ۱۰ روز دوره آزمایش پرندگان، تمامی پرندگان واکسینه محافظت ۱۰۰ درصدی را نشان دادند و ۲۲ درصد پرندگان گوشتی تجاری گروه کنترل محافظت نشده محسوب شدند.

نتایج آماری:

پرندگان گوشتی تجاری واکسینه به طور معنی داری نمره بندی پاتولوژیکی و هیستولوژیکی پایین تری نسبت به گروه کنترل داشتند. شاخص ایندکس وزن بورس به وزن بدن در پرندگان واکسینه به طور معنی داری پایین بود.

چالش دوم:

چالش دوم ۷ روز پس از چالش اول و در سن ۳۱ روزگی صورت گرفت. چالش مورد قبول بود؛ چرا که تمامی پرندگان کنترل SPF تلف شدند. ۴ روز پس از چالش، تمامی پرندگان گروه واکسینه محافظت شده بودند، در حالی که ۸۰ درصد پرندگان در گروه کنترل پرندگان گوشتی تجاری محافظت نشده بودند. در پایان دوره ۱۰ روزه مشاهده و بررسی گروه‌ها، مشخص گردید که تمامی پرندگان گروه واکسینه محافظت شده و ۷۰/۴ درصد پرندگان گروه کنترل گوشتی تجاری محافظت نشده بودند.

نتایج آماری:

- گروه واکسینه از لحاظ آماری به طور قابل توجهی نمره بندی هیستولوژیکی و پاتولوژیکی پایین تری نسبت به گروه کنترل داشت.
- تفاوت معنی داری بین ایندکس وزن بورس به وزن بدن وجود نداشت.
- پس از دومین چالش، گروه واکسینه به طور معنی داری افزایش وزن روزانه بیشتری نسبت به گروه کنترل داشت.

سرولوژی:

سطح آنتی بادی اختصاصی بیماری بورس عفونی در پرندگان چالش نیافته واکسینه و کنترل اندازه گیری شد تا میزان تغییرات آنتی بادی مادری تا سن ۲۴ روزگی بررسی گردد. در سن ۲۴ روزگی افزایش ملایم میزان آنتی بادی در گروه واکسینه دیده شد. در نمونه برداری ۳۱ و ۴۲ روزگی این افزایش به صورت مداوم مشاهده شد. در جوجه های گوشتی تجاری گروه کنترل کاهش میزان آنتی بادی مادری به صورت خطی رخ داد، به طوری که تا ۴۲ روزگی به سطح غیر قابل تشخیص کاهش می یابد (نمودار ۱ را ملاحظه کنید).

نتیجه گیری

چالش ارائه شده در این مقاله، عملکرد واکسن را بسیار به دقت و با جزئیات و حتی دقیق تر از دستورالعمل های عنوان شده توسط سازمان دارویی اتحادیه اروپا بررسی و ارزیابی کرده است. این مطالعه نشان داد که واکسن Cevac Transmune IBD® حتی با کمترین میزان دُز اثر کننده (۰/۱ CID₅₀) همچنان محافظت کامل را علیه بیماری گامبورو ایجاد می کند. واکسن سبب مهار تلفات، پیش گیری از افت وزن گیری و بیماری بالینی می گردد و همچنین ضایعات حاد حاصل از ویروس فوق حاد بیماری گامبورو را نیز کاهش می دهد. این واکسن یک ایمنی یکنواختی را حتی در حضور سطوح مختلفی از ایمنی مادری در گله ایجاد می کند.

منابع

- 01/2008:0959 EUROPEAN PHARMACOPOEIA 6.1.
01/2008:0450 EUROPEAN PHARMACOPOEIA 6.1.
01/2008:1202 EUROPEAN PHARMACOPOEIA 6.1.
Diseases of Poultry, 11th edition by Y.M. Saif, Iowa State Press, 2003.

۲۰ پایش دریافت واکسن ایمونوکمپلکس گامبورو با روش تلقیح داخل تخم مرغ در جوجه کشی و مقایسه آن با روش های رایج واکسیناسیون علیه بیماری گامبورو

Jacquinet C. and Y. Gardin, 2011. JRA.

پرندهگان

گله های گوشتی تحت شرایط فارمی در فرانسه با استفاده از واکسن Cevac Transmune IBD® به صورت تلقیح داخل تخم مرغی در جوجه کشی و نیز با استفاده از برنامه رایج واکسیناسیون مورد پایش قرار گرفتند. پنج شرکت تولیدی جوجه گوشتی مجموعاً با ۱۱۴ مرغداری در این مطالعه مشارکت داشتند. این مطالعه شامل بیش از ۲/۳ میلیون جوجه گوشتی پرورش صنعتی و ۹۲۰۰۰ جوجه گوشتی پرورش آزاد می باشد.

محل واکسیناسیون	واکسن	تعداد مرغداری	برنامه
جوجه کشی با روش تلقیح داخل تخم مرغ	Cevac Transmune IBD®	۵۶	واکسن ایمونوکمپلکس
مرغداری، با روش آشامیدنی یک مرتبه در حدود ۱۸ روزگی*	واکسن اینترمدیت	۵۸	واکسیناسیون به روش آشامیدنی

* برای جوجه های گوشتی پرورش آزاد، دو واکسن اینترمدیت استفاده شد.

نمونه گیری

تعداد ۵ بورس فابرسیوس از هر فارم در سن حدود ۳۰ روزگی اخذ شد و دریافت واکسن در آن ها با چندین روش مورد ارزیابی قرار گرفت:

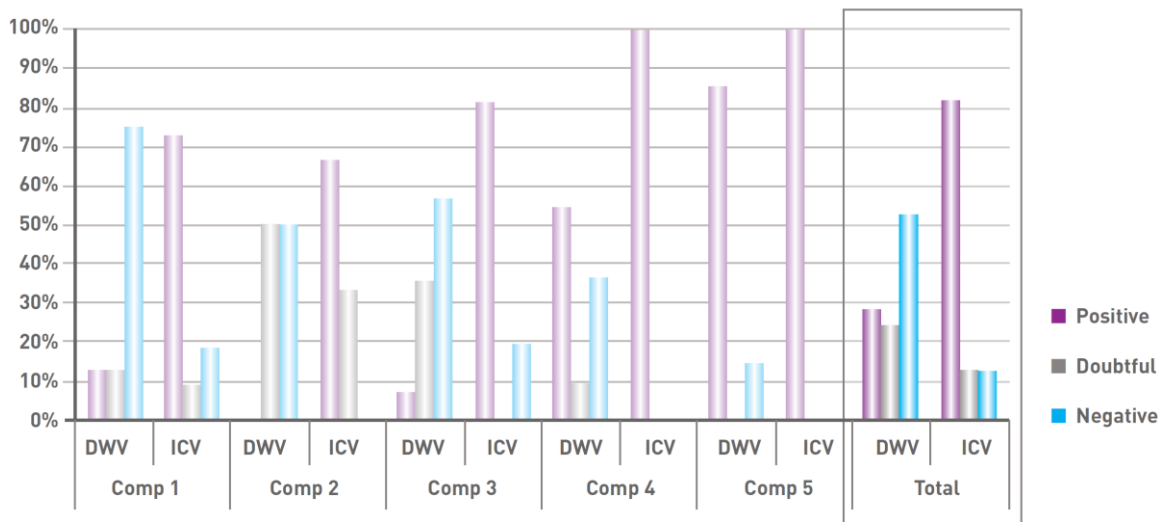
- بررسی هیستوپاتولوژی: جهت مشاهده شروع تکثیر ویروس واکسن.

اطلاعات علمی

CEVAC Transmune®

- RT-PCR و به‌ندبال آن RFLP: جهت تعیین تا نوع ویروس گامبورو موجود در بورس. در صورت لزوم، برای گله‌های واکسینه با واکسن Cevac Transmune IBD® (حاوی سویه Winterfield2512)، تعیین توالی هم انجام شد تا نوع سویه جداسازی شده، بیشتر بررسی شود.
- سرولوژی، استفاده از کیت الیزا Biocheck بیماری گامبورو.

نتایج: میزان نرخ دریافت واکسن در شرکت‌های مختلف (Comp)



منفی در دریافت واکسن	مثبت (یا مشکوک) در دریافت واکسن	
۹٪	۹۱٪	واکسیناسیون با واکسن ایمونوکمپلکس
۵۲٪	۴۸٪	واکسیناسیون با روش آشامیدنی

نتیجه گیری

میزان دریافت واکسن در گروه دریافت کننده واکسن ایمونوکمپلکس Cevac Transmune IBD® با روش تلقیح داخل تخم مرغی داخل جوجه کشی در مقایسه با روش معمول واکسیناسیون آب آشامیدنی در مرغداری بسیار بهتر بود. ۹۰٪ گله های واکسینه با واکسن Cevac Transmune IBD®، دریافت واکسن را به وضوح نشان می دادند. در کشور مذکور واکسیناسیون فارمی منجر به ایمن سازی ناقص در نیمی از موارد گردیده بود.

پایش دریافت واکسن ایمونوکمپلکس گامبورو با روش تلقیح داخل تخم مرغی در جوجه کشی و مقایسه آن با روش های رایج واکسیناسیون علیه بیماری گامبورو

Jacquinet, C.¹; Gardin, Y.¹

1 CEVA sante Animale, LA Ballastiere, BP 126, 33501 Libourne Cedex, France

چکیده

در سن ۳۰ روزگی، ابزار تشخیصی گوناگونی (هیستوپاتولوژی، PCR و سرولوژی) جهت بررسی دریافت واکسن ایمونوکمپلکس مورد استفاده داخل جوجه کشی در مقایسه با گله های واکسینه با واکسن های رایج گامبورو در مرغداری به کار گرفته شد. نتایج از ۵۶ گله واکسینه در جوجه کشی با واکسن ایمونوکمپلکس در مقایسه با ۵۸ گله واکسینه با واکسن رایج گامبورو به روش آشامیدنی جمع آوری گردید. دریافت واکسن در گروه اول تقریباً به ۱۰۰ درصد رسید که اثر بخشی بیشتر واکسیناسیون داخل جوجه کشی با استفاده از واکسن های ایمونوکمپلکس را نشان می دهد.

مقدمه

طی سالیان متمادی، در فرانسه واکسیناسیون جوجه های گوشتی بر علیه بیماری گامبورو به وسیله واکسن زنده تخفیف حدت یافته از طریق آب آشامیدنی انجام می گرفت. این واکسن ها عموماً اینترمدیت یا اینترمدیت پلاس می باشند که بر اساس توانایی آن ها در پیش گیری از ویروس های فارمی با حدت بالا یا ملایم و قابلیت آن ها در عبور از آنتی بادی های مادری (MPA) در جوجه های جوان دسته بندی می شوند. به طور معمول، تجویز و موفقیت واکسیناسیون توسط موارد ذیل می تواند به خطر افتد:

- تداخل واکسیناسیون با ایمنی غیرفعال و تغییر در آنتی بادی های مادری؛ بنابراین تعیین زمان مناسب واکسیناسیون الزامی است تا واکسن بتواند از سد ایمنی مادری عبور کرده و ایمنی فعال ایجاد نماید. تعیین زمان مناسب واکسیناسیون که به وسیله سنجش تیتراژ آنتی بادی مادری در جوجه های یک روزه محاسبه می شود، کاری هزینه بر و دشوار می باشد.
- مشکلات مربوط به تجویز واکسن از طریق آب آشامیدنی. عوامل متعددی می تواند به طور جزئی یا کامل ویروس واکسن حل شده در آب آشامیدنی را غیر فعال نماید: برای مثال وجود کلر یا یون های فلزی در آب. در نهایت بزرگترین مانع در موفقیت کامل واکسیناسیون آشامیدنی، عدم اطمینان از دریافت مقدار صحیح از محلول واکسن در دوره زمانی کوتاه (۲ ساعت) و پیش از افت فعالیت واکسن، توسط هر جوجه می باشد.

علی رغم تلاش کارشناسان فنی شرکت های تولیدی جوجه گوشتی و آموزش های نوین در مورد تکنیک های واکسیناسیون صحیح (ارزیابی، استفاده از رنگ آبی معرف، مواد خنثی کننده کلر و غیره) هنوز خطاهای واکسیناسیون به طور قابل توجهی رایج هستند.

اطلاعات علمی

CEVAC Transmune®

نسل جدیدی از واکسن‌های گامبورو به شرکت‌های تولیدی جوجه گوشتی این امکان را می‌دهد که با استفاده از واکسن زنده تخفیف حدت یافته ایمونوکمپلکس (Cevac Transmune IBD®) بر این مشکلات غلبه نمایند. این واکسن متشکل از ویروس واکسن و آنتی سرم اختصاصی است که به نسبت مشخصی با هم ترکیب شده‌اند. این سوسپانسیون کمپلکس آنتی‌ژن-آنتی‌بادی می‌بایست در جوجه‌کشی به صورت انفرادی از طریق تلقیح داخل تخم مرغی در روز ۱۸ جنینی و یا تزریق زیرجلدی در جوجه‌های یک‌روزه استفاده گردد. کمپلکس آنتی‌ژن-آنتی‌بادی به وسیله سیستم ایمنی پرنده از بین نمی‌رود و تا حدود زیادی پایدار باقی می‌ماند؛ چرا که توسط سلول‌های دندریتیک فولیکولی در طحال و سایر اندام‌های لنفاوی (مطالعات چاپ نشده شرکت Ceva) به دام می‌افتد. این آنتی‌ژن‌ها (ویروس‌های واکسینال) در اثر افول آنتی‌بادی‌های کمپلکس به صورت تدریجی آزاد می‌شوند. بلافاصله با کاهش آنتی‌بادی‌های مادری و رسیدن مقدار آن به سطح پایین یا متوسط، ویروس واکسن آزاد شده، دیگر خنثی نمی‌شود و می‌تواند خود را به بورس فابرسیوس رسانده و در آن جا تکثیر شده و منجر به القای ایمنی فعال گردد. زمان دریافت واکسن بستگی به سطوح آنتی‌بادی مادری جوجه دارد، لذا از جوجه‌های به جوجه دیگر متغیر است؛ اما با این حال برای هر جوجه در زمان مناسب رخ می‌دهد. معمولاً اگر پولت‌های گله مادری در مقابل بیماری گامبورو واکسینه شوند، این اثر بخشی تقریباً در سن ۳-۵ هفتگی رخ می‌دهد. ابزارهای تشخیصی نوین، امکان ردیابی دریافت واکسن حاصل از واکسن‌های رایج با روش آشامیدنی و یا ناشی از واکسن ایمونوکمپلکس در جوجه‌کشی را میسر می‌سازند. این ابزارهای تشخیصی امکان تأیید و مقایسه میزان محافظت واقعی گله‌های گوشتی را تحت شرایط فارمی فراهم می‌سازند.

مواد و روش کار

تکثیر ویروس واکسن در بورس نشانه دریافت واکسن زنده تخفیف حدت یافته می‌باشد. ابزارهای آزمایشگاهی موجود امکان ارزیابی موارد زیر را فراهم می‌سازد.

- شروع ضایعات در فولیکول‌های بورس: شناسایی با هیستوپاتولوژی
- حضور ویروس واکسن در بورس: شناسایی با RT-PCR
- ایجاد ایمنی فعال با تولید آنتی‌بادی‌های اختصاصی: شناسایی با سرولوژی

نمونه‌ها

- از ۵-۱۰ جوجه گوشتی در هر مرغداری نمونه‌گیری به قرار ذیل انجام شد:
- ۵ نمونه بورس در فرمالین برای بررسی هیستوپاتولوژی نگهداری شد.
- ۵ نمونه بورس در حالت فریز برای PCR نگهداری شد.
- ۵-۱۰ نمونه سرم برای بررسی سرولوژی اخذ گردید.

هیستوپاتولوژی

۵ نمونه بورس نگهداری شده در فرمالین، جهت بررسی هیستوپاتولوژی ارسال گردید. اندازه‌گیری ضایعات در هر بورس به صورت مجزا انجام شد.

اطلاعات علمی

CEVAC Transmune®

شناسایی ویروس

در ابتدا، حضور ویروس بیماری بارس عفونی در ۵ نمونه بارس با روش RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت. اگرچه عدم کارآمدی این روش نادر است ولی محتمل می‌باشد. نتایج منفی کاذب عموماً ناشی از شرایط نامناسب نگهداری و انتقال، حضور مواد مهارکننده (محتویات مجاری روده‌ای)، تکثیر بسیار زود هنگام ویروس (تقلیل میزان ویروس در زمان مخلوط‌سازی ۵ بارس) می‌توانند باشند. در قدم دوم، بررسی با آنزیم‌های محدود کننده با روش RFLP می‌باشد که راه‌کاری عملی برای تشخیص ویروس واکسن از ویروس فارم است. در مورد واکسن Cevac Transmune IBD®، روش RFLP قابلیت شناسایی متعارف حضور سویه واکسن Winterfield2512 را دارد. اخیراً توالی‌یابی ژنی قسمت بسیار متغیر VP2 ویروس گامبور (توالی نوکلئوتیدی ۱۱۲۸-۷۲۱) روشی دقیق برای شناسایی سویه ویروس گامبور شناخته شده است.

سرولوژی

نمونه‌های سرمی به‌وسیله کیت الایزای گامبور (کیت BioChek) مورد ارزیابی قرار گرفتند. این روش از نتایج مثبت کاذب جلوگیری می‌کند و نیز قادر به شناسایی سطوح پایین آنتی‌بادی به‌ویژه در زمان شروع ایمنی فعال می‌باشد. بالا رفتن تیتراژ بیش از ۵۰۰ دلالت بر شروع ایمنی فعال دارد.

سن نمونه‌گیری و تفسیر نتایج

جوجه‌ها در حدود ۳۰ روزگی نمونه‌گیری شدند (حداقل ۲۷ روز و حداکثر ۴۰ روز). از این‌رو در این سن، صرف نظر از نوع واکسن کلاسیک (واکسن اینترمدیت در ۱۸-۱۵ روزگی یا واکسن اینترمدیت پلاس در ۱۴-۱۲ روزگی تجویز شده است) و روش مورد استفاده، می‌بایست نشانه‌ای از دریافت واکسن را داشته باشد، زیرا فاصله زمانی نیز کافی است. انتظار می‌رود تکثیر ویروس واکسن حداکثر ۵ روز بعد از واکسیناسیون و شروع پاسخ آنتی‌بادی حداکثر ۱۵ روز بعد از واکسیناسیون صورت گیرد. در سن ۳۰ روزگی، بارس فابرسیوس باید مقداری ضایعه نشان دهد، سویه واکسن باید جداسازی شده و پاسخ آنتی‌بادی باید به‌خوبی تثبیت شود و یا اینکه پس از ۱۵ روز از زمان واکسیناسیون شروع گردد. در مورد واکسن ایمونوکمپلکس، به‌دلیل رهاسازی آنتی‌ژن واکسن که مختص به هر جوجه می‌باشد، بر اساس مرحله تکثیر ویروس ۳ حالت می‌تواند مشاهده شود:

- (۱) شروع تکثیر ویروس واکسن
- مثبت شدن RT-PCR ویروس Winterfield2512، مثبت شدن هیستوپاتولوژی و منفی شدن سرولوژی: تکثیر ویروس واکسن شروع شده است ولی هنوز آنتی‌بادی جداسازی نشده است.
- منفی شدن RT-PCR ویروس Winterfield2512، مثبت شدن هیستوپاتولوژی و منفی شدن سرولوژی: تکثیر ویروس واکسن شروع شده است که ضایعات دلالت بر آن دارد، اما هیچ ویروسی نمی‌تواند جداسازی یا شناسایی شود. (فرار از پرایمر؟ تقلیل ویروس در ۵ بارس؟) عفونت با ویروس وحشی نیز ممکن است محتمل باشد.
- (۲) تکثیر ویروس واکسینال به‌خوبی تثبیت می‌شود: مثبت شدن RT-PCR ویروس Winterfield2512 و مثبت شدن هیستوپاتولوژی و تغییر سرمی مشخص (تیتراژ < 500) حداقل در یک قطعه پرنده.

اطلاعات علمی

CEVAC Transmune®

- ۳) تکثیر پیشرفته ویروس واکسن، مثبت شدن RT-PCR (یا منفی شدن به دلایلی که هنوز به خوبی مشخص نیست)، مثبت شدن هیستوپاتولوژی، تغییر سرمی واضح و یکنواخت.
- ۴) عدم دریافت واکسن، تمامی معیارها منفی هستند.

به عنوان یک نتیجه؛ مرغداری‌های با تأیید دریافت واکسن، علامت مثبت و بدون علائم دریافت واکسن، علامت منفی دریافت کردند. در تعداد کمی از موارد، به دلیل آن که هیچ بررسی هیستوپاتولوژی صورت نگرفت یا نمونه‌گیری‌ها بسیار زود هنگام اخذ شده بود و یا نتایج قابل تفسیر نبودند، هیچ نتیجه‌ای نمی‌توانست قابل تفسیر باشد لذا این مرغداری‌ها علامت مشکوک دریافت کردند.

چهار شرکت جوجه گوشتی با پرورش صنعتی و یک شرکت جوجه گوشتی با پرورش آزاد در این مطالعه بررسی شدند. در هر شرکت، تعداد یکسانی مرغداری از واکسن‌های رایج (اینترمدیت یا اینترمدیت پلاس) توسط آب آشامیدنی و واکسن ایمونوکمپلکس در جوجه کشی استفاده نمودند که در مجموع این مطالعه ۱۱۴ مرغداری را شامل می‌شود.

نتایج و بحث:

شرکت شماره ۱:

- ۱۶ مرغداری با واکسیناسیون از طریق آب آشامیدنی: دریافت واکسن در دو مرغداری تأیید شد. (شماره ۱۴ و ۱۵). در ۱۲ مرغداری منفی و در ۲ مرغداری تفسیر مشکوک (شماره ۱۳ و ۱۶) اعلام گردید.
- مثبت شدن نتایج RT-PCR یا هیستوپاتولوژی در مرغداری‌های شماره ۳، ۷، ۸، ۱۰، ۱۱ و ۱۲ بدون هیچ تغییر سرمی می‌تواند گواه یک عفونت با ویروس فارمی (جداسازی سویه وحشی یا سویه واکسن مشابه D78) یا ویروس فیلدی باشد. RT-PCR نتوانست ویروس را در فارم‌های شماره ۳، ۱۰، ۱۱ و ۱۲ شناسایی کند. ویروس واکسن تجویز شده نتوانست ضایعات بورس ایجاد نماید، چرا که هیچ علامت مشخصی از دریافت واکسن وجود نداشت به طوری که از روزهای ۱۵-۱۰ پس از واکسیناسیون انتظار مواردی همچون ضایعات بورس در اکثر پرندگان و پاسخ آنتی‌بادی واضح مدنظر می‌باشد.
- ۱۱ مرغداری با واکسن ایمونوکمپلکس: در ۸ مرغداری دریافت واکسن تأیید گردید. در ۲ مرغداری منفی بود (شماره ۱ و ۷) و در مرغداری شماره ۵ مشکوک اعلام گردید.

شرکت شماره ۲:

- از مجموع ۱۰ مرغداری با واکسیناسیون از طریق آب آشامیدنی، هیچ نشانه‌ای از دریافت واکسن در هیچ مرغداری مشاهده نشد. در مقابل ۵ مرغداری (شماره ۲، ۳، ۵، ۷ و ۱۰) به طور واضح منفی بودند و برای سایر فارم‌ها هیچ تفسیری میسر نگردید.
- از مجموع ۱۲ مرغداری با واکسن ایمونوکمپلکس، دریافت واکسن در ۸ فارم تأیید شد و در فارم‌های شماره ۵، ۷، ۹ و ۱۰ هیچ تفسیری نمی‌توان داشت. هیچ فارمی منفی در نظر گرفته نشد.

اطلاعات علمی

CEVAC Transmune®

شرکت شماره ۳:

هیچ بررسی هیستوپاتولوژی صورت نگرفت.

- از مجموع ۱۴ مرغداری با واکسیناسیون از طریق آب آشامیدنی: دریافت واکسن فقط در مرغداری شماره ۹ تأیید شد. درحالی که در ۸ مرغداری (۲، ۶، ۷، ۸، ۱۰، ۱۱، ۱۳ و ۱۴) منفی بودند و برای سایر مرغداری‌ها تردید وجود داشت. در مرغداری‌های شماره ۱۰ و ۱۳ سویه V877 با PCR شناسایی شد و از آنجا که سویه واکسن تجویز شده نمی‌باشد، از این رو می‌توان آن را دلیلی برای عدم دریافت واکسن بیان نمود.

- ۱۶ مرغداری با واکسن ایمونوکمپلکس: دریافت واکسن در ۱۳ مرغداری تأیید شد و ۳ مرغداری منفی بود. (فارم‌های شماره ۷، ۸ و ۱۴)

شرکت شماره ۴:

بررسی هیستوپاتولوژی صورت نگرفت.

- ۱۱ مرغداری با واکسیناسیون از طریق آب آشامیدنی؛ پاسخ آنتی‌بادی در ۶ فارم تأیید شد (فارم ۳، ۴، ۵، ۶، ۷ و ۸). در ۴ مرغداری منفی شد (شماره ۲، ۹، ۱۰ و ۱۱) و در مرغداری شماره یک تردید وجود داشت. در مرغداری شماره ۹ درگیری به بیماری گامبرو ثبت شد که دلالت بر نقص واکسیناسیون دارد. در مرغداری شماره ۱۰ مخلوطی از ویروس‌ها (نه سویه واکسن) به وسیله PCR شناسایی شد که نشان دهنده عدم دریافت واکسن و عفونت بورس به وسیله سویه‌های فیلدی می‌باشد.

- ۳ مرغداری با واکسن ایمونوکمپلکس؛ دریافت واکسن در هر ۳ فارم تأیید شد. از آنجا که نمونه‌ها از حدود سن ۳۳ روزگی به بعد اخذ گردیده بود، پاسخ آنتی‌بادی مناسب و حضور ویروس در بورس می‌توانست مشاهده گردد.

شرکت شماره ۵ (جوجه‌های گوشتی با پرورش آزاد):

بررسی هیستوپاتولوژی در کنترل فارمی صورت نگرفت.

- ۷ مرغداری با واکسیناسیون از طریق آب آشامیدنی؛ دریافت واکسن در ۶ مرغداری تأیید شد و فقط در یک مرغداری منفی گردید (مرغداری شماره ۳). لازم به ذکر است که برنامه واکسیناسیون شامل تجویز ۲ واکسن اینترمدیت در سن ۲۴ و ۱۷ روزگی بود.

- ۱۴ مرغداری با واکسن ایمونوکمپلکس؛ دریافت واکسن در تمامی مرغداری‌ها تأیید شد. به‌طور کلی دریافت واکسن در ۵۸ مرغداری شاهد و ۵۶ مرغداری با واکسن ایمونوکمپلکس تأیید گردید.

نتایج در جدول شماره یک خلاصه شده است.

جدول ۱: خلاصه نتایج (در تعدادی مرغداری و درصد کلی)

شرکت	روش واکسیناسیون	مثبت	منفی	مشکوک
۱	آشامیدنی	۲	۱۲	۲
	ایمونوکمپلکس	۸	۲	۱
۲	آشامیدنی	۰	۵	۵
	ایمونوکمپلکس	۸	۰	۴
۳	آشامیدنی	۱	۸	۵
	ایمونوکمپلکس	۱۳	۳	۰
۴	آشامیدنی	۶	۴	۱
	ایمونوکمپلکس	۳	۰	۰
۵	آشامیدنی	۶	۱	۰
	ایمونوکمپلکس	۱۴	۰	۰
مجموع	آشامیدنی فارم ۵۸	۱۵	۳۰	۱۳
	ایمونوکمپلکس فارم ۵۶	۴۶	۵۲٪	۲۲٪
		۸۲٪	۹٪	۹٪

نتیجه گیری:

این مطالعه معضلات واقعی واکسیناسیون گامبورو را در مرغداری‌های گوشتی نشان داد و همچنین مشاهده شد که نیمی از موارد واکسیناسیون در مرغداری‌ها فاقد اثربخشی بودند. عدم دریافت واکسن نشان می‌دهد که چرا جدایه‌های فارمی غیر قابل انتظار (سویه‌های واکسن یا وحشی) در بورس شناسایی شده‌اند. این مهم ناشی از این حقیقت است که واکسن‌های نوع اینترمدیت مورد استفاده در مطالعه حاضر، حتی به تیترا پایین آنتی‌بادی مادری خیلی حساس بوده و قابلیت نفوذ محدودی به بورس داشتند.

به نظر می‌رسد تنها روشی که میزان دریافت واکسن را در مرغداری بهبود می‌بخشد، استفاده مناسب از ۲ واکسن می‌باشد (که بر اساس نتایج بهتر در شرکت شماره ۵ تأیید می‌شود)، در این روش تیترا عبور آنتی‌بادی مادری در گله گوشتی بهتر هدف قرار می‌گیرد. با این حال این روش در پرورش جوجه گوشتی به ندرت استفاده می‌-

شود و هنوز خطر ناشی از عدم اطمینان به واکسیناسیون فارمی مطرح است.

به‌طور عکس، تقریباً ۱۰۰٪ فارم‌هایی که با واکسن ایمونوکمپلکس در جوجه‌کشی واکسینه شدند، دریافت واکسن را نشان دادند چرا که این واکسن به تیترا آنتی‌بادی مادری حساس نیست و جوجه‌کشی نیز محیطی کنترل شده برای واکسیناسیون می‌باشد. بر خلاف واکسیناسیون گروهی با روش آب آشامیدنی، این واکسیناسیون به‌صورت انفرادی انجام می‌شود.

ابزارهای تشخیصی موجود (هیستوپاتولوژی، ویروس شناسی، سرولوژی) دارای اعتبار بالایی هستند و می‌توانند برای پیش دریافت واکسن با یک نوبت نمونه‌گیری در حدود سن ۳۰ روزگی استفاده گردند. علی‌رغم تعداد محدود پرندگان نمونه‌گیری شده از هر فارم (۵ پرنده)، نتایج حاصله در اکثر موارد قابل تفسیر است (۸۰٪ تا ۹۰٪ بر اساس نوع واکسیناسیون).

در این مطالعه با روش RT-PCR، در ۱۲٪ فارم (۷ فارم از ۵۶ فارم) نتایج منفی کاذب به‌دست آمد. می‌توان منفی کاذب را به نمونه‌گیری در ابتدای مرحله تکثیر نسبت داد. نهایتاً نمونه‌گیری بیشتر احتمالاً می‌تواند میزان نتایج مشکوک را کاهش دهد.

منابع

C.E. Whitfill et al: Determination of optimum formulation of a novel infectious bursal disease virus (IBDV) vaccine constructed by mixing bursal disease antibody with IBDV. Avian Diseases 39: 687-699, 1995. "

E.E. Haddad et al: Efficacy of a novel infectious bursal disease virus immune complex vaccine in broiler chicken. Avian Diseases 41: 882-889, 1997. M.Kelemen et ai: Pathological and immunological study of an in ovo complex vaccine againts IBD. Acta Veterinaria Hungarica 48: 443-454, 2000

ارزیابی پاسخ سرولوژی واکسن ایمونوکمپلکس (Cevac Transmune IBD®)

تزریقی به صورت زیرجلدی در یک مطالعه فارمی با مقیاس بزرگ

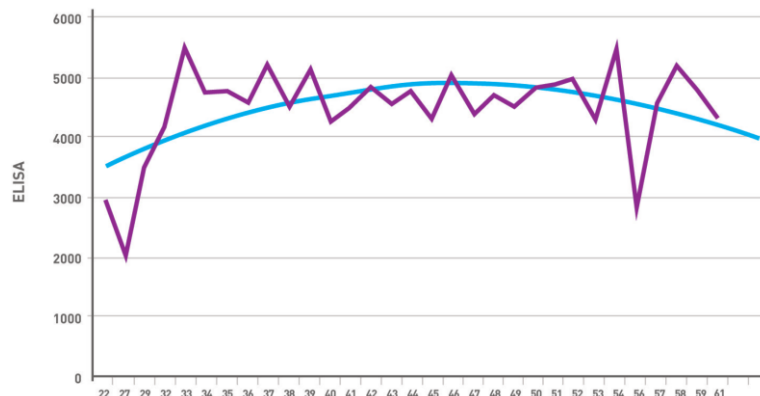
Magallon S. et al., 2011A. WVPA Congress

تحت شرایط فارمی، گله‌های گوشتی به منظور ارزیابی میزان پاسخ آنتی‌بادی و یک‌نواختی آن به دنبال واکسیناسیون با واکسن CEVAC Transmune® در کارخانه جوجه کشی به صورت تزریق زیرجلدی در کشور اسپانیا بررسی شدند.

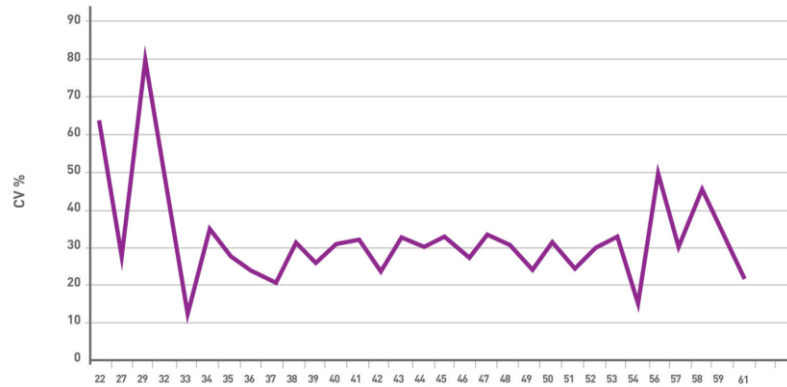
نمونه‌های خونی در زمان کشتار از ۱۵ پرند در هر گله جمع‌آوری شد و نیز میزان آنتی‌بادی IBD با روش الیزا مورد سنجش قرار گرفت.

متوسط سن کشتار	کیت الیزا	تعداد گله‌ها	
۴۳ روز	Idexx	۴۳۲	تزریق زیرجلدی (دستگاه Dovac)

میانگین تیتراژ الیزا-۴۳۲ گله



متوسط درصد CV نسبت به سن



نتیجه گیری

در این مطالعه فارمی در مقیاس بزرگ، به دنبال واکسیناسیون با واکسن Cevac Transmune IBD® در جوجه‌کشی پاسخ آنتی‌بادی قوی و مداومی دیده شد. علاوه بر تیتراژ آنتی‌بادی مثبت و معمولاً بالا، یک‌نواختی گله بهبود یافت، به‌طوری‌که ضریب تغییرات (CV) در اکثر گله‌ها به کمتر از ۶۰٪ کاهش پیدا کرد.

ارزیابی پاسخ سرولوژی واکسن ایمونوکمپلکس (Cevac Transmune IBD®) تزریقی به صورت زیرجلدی در یک مطالعه فارمی با مقیاس بزرگ

S. Magallon¹, J.L. Balaguer¹, M. Arbe¹, C. Gonzalez², A. Martino¹ and B. Alva²

1 Ceva Sante Animale, Libourne, France; 2 Ceva Salud Animal, Barcelona, Spain

مقدمه

بیماری بورس عفونی (IBD) یکی از بیماری‌های مهم در صنعت طیور است. چندین نوع واکسن مختلف در بازار موجود می‌باشد که به مقابله با این بیماری کمک می‌کنند. ارزیابی سطح آنتی‌بادی پرندگان بعد از واکسیناسیون به وسیله الایزا می‌تواند میزان محافظت و نیز اثر بخشی واکسیناسیون را منعکس نماید. Cevac Transmune IBD® یک واکسن ایمونوکمپلکس بیماری گامبورو می‌باشد که می‌تواند به صورت تزریق زیرجلدی در جوجه‌های یک‌روزه و یا تلقیح داخل تخم‌مرغی استفاده شود. این واکسن شامل ویروس گامبورو (سویه Winterfield 2512) می‌باشد که با آنتی‌بادی‌های اختصاصی تشکیل کمپلکس ایمنی می‌دهد؛ به طوری که این آنتی‌بادی‌ها از خنثی شدن ویروس توسط آنتی‌بادی‌های مادری محافظت می‌نمایند. وقتی آنتی‌بادی‌های مادری به سطوح پایین می‌رسند، ویروس در بورس فابرسیوس تکثیر شده و منجر به القا ایمنی فعال می‌گردد. ایمنی فعال القا شده را می‌توان با روش الایزا اندازه‌گیری نمود.

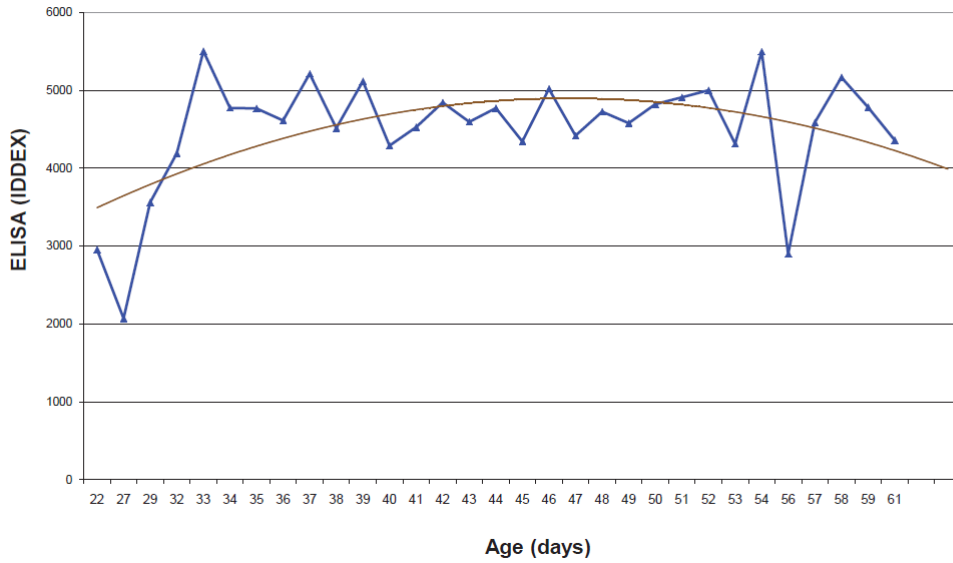
اهداف

هدف از مطالعه فارمی با مقیاس بزرگ ارزیابی اثربخشی یک واکسن ایمونوکمپلکس (Cevac Transmune IBD®) به وسیله اندازه‌گیری پاسخ سرولوژی بود. این واکسن در یک روزگی به صورت زیرجلدی توسط دستگاه‌های نیمه خودکار (Dovac single) تزریق شد.

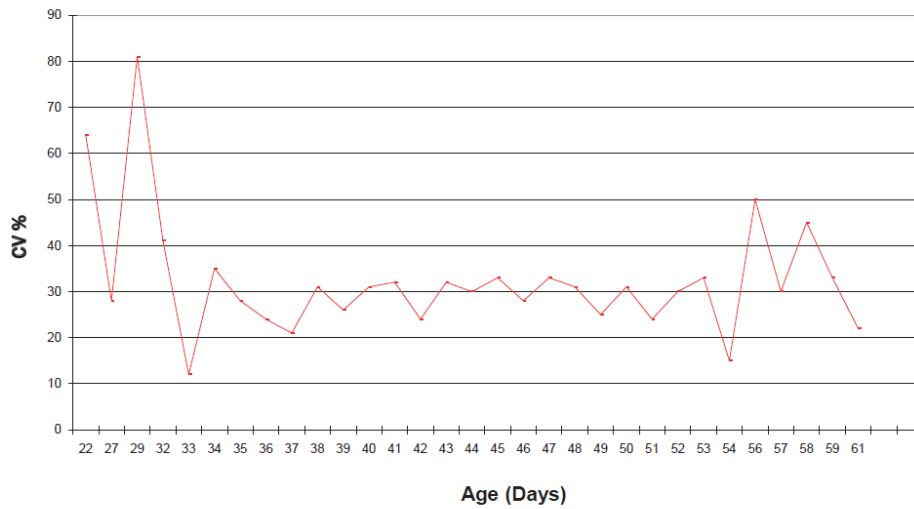
مواد و روش

از ۴۳۲ گله در سن کشتار نمونه خونی دریافت گردید. از هر گله ۱۵ نمونه خونی با استفاده از کیت الایزای Idexx مورد ارزیابی قرار گرفت. متوسط سن کشتار ۴۳ روزگی بود. تمامی گله‌ها به صورت تزریق زیرجلدی در جوجه کشی در زمان هیچ واکسینه شدند.

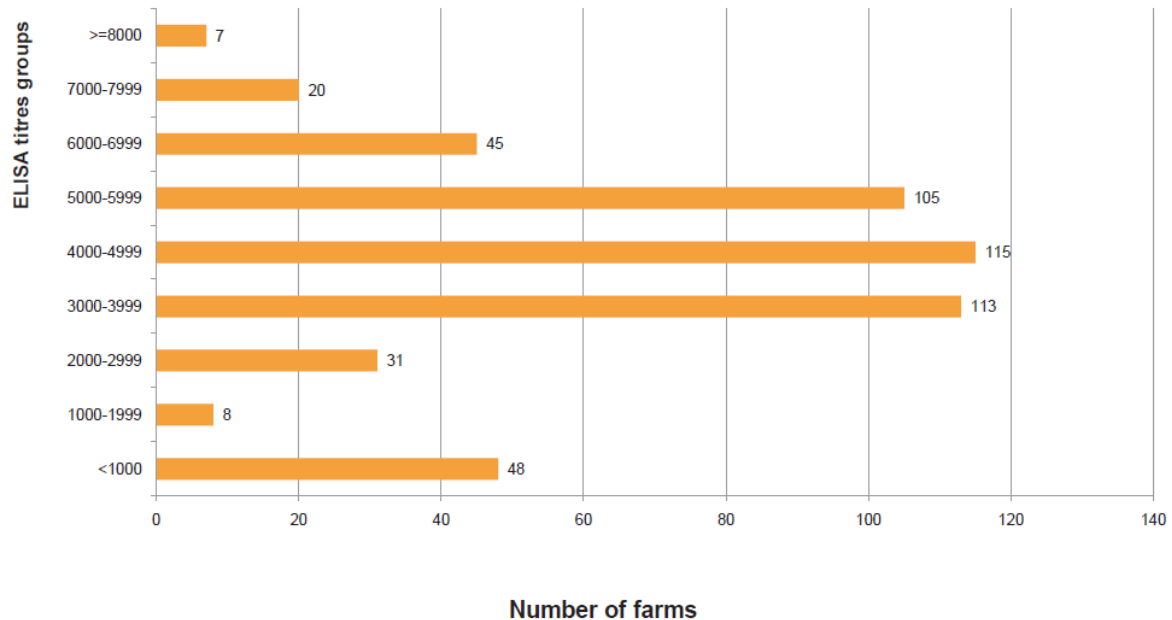
میانگین تیتراژ ایذا- ۴۳۲ گله



متوسط درصد CV مرتبط با سن



تعداد فارم‌های فرار گرفته در گروه تیتری



نتیجه گیری

در هر سنی که نمونه‌گیری انجام شد، تمامی سرم‌ها مثبت بودند. مقادیر حداکثری میانگین هندسی تیتر (GMT) در سن ۳۶ و ۴۶ روزگی حاصل گردید. ۷۶٪ گله‌ها تیتر الایزا بین ۳۰۰۰ و ۶۰۰۰ داشتند. ۹۵٪ گله‌ها ضریب تغییرات (CV) کمتر از ۶۰٪ داشتند. تمامی این اطلاعات پاسخ سرولوژی مناسب ناشی از استفاده واکسن ایمونوکمپلکس بیماری گامبورو (Cevac® Transmune IBD) به صورت تزریق زیرجلدی در جوجه‌کشی را در سن کشتار نشان می‌دهند.

منابع

C.E. Whitfili et al. Determination of optimum formulation of a novel infectious bursal disease virus (IBDV) vaccine constructed by mixing bursal disease antibody with IBDV. Avian Diseases 39: 687-699, 1995.

E.E. Haddad et al. Efficacy of a novel infectious bursal disease virus immune complex vaccine in broiler chicken. Avian Diseases 41: 882-889, 1997. M.Keiemen et al. Pathological and immunological study of an in ovo complex vaccine against IBD, Acta Veterinaria Hungarica 48: 443-454, 2000.



ارزیابی پاسخ سرولوژی واکسن ایمونوکمپلکس (Cevac Transmune IBD®)

تلقیحی به داخل تخم مرغ در یک مطالعه فارمی با مقیاس بزرگ

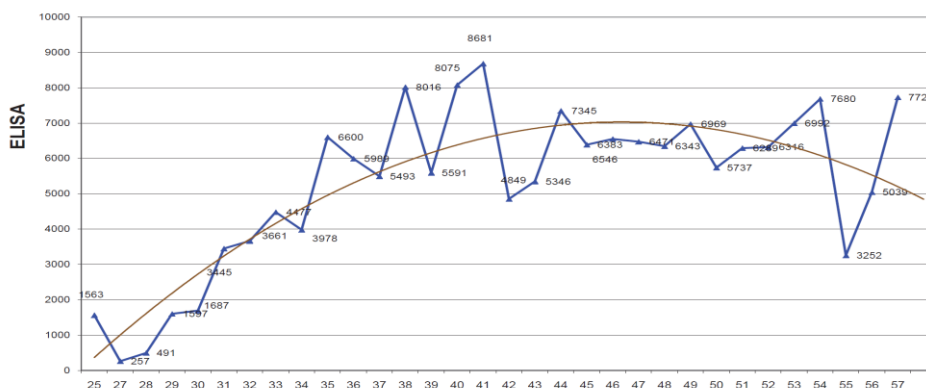
Magallon S. et al., 2011B. WVPA Congress

گله‌های گوشتی به منظور ارزیابی میزان پاسخ آنتی‌بادی و یک‌نواختی آن به دنبال واکسیناسیون با واکسن CEVAC Transmune® در کارخانه جوجه کشی به صورت تلقیح داخل تخم مرغی تحت شرایط فارمی در کشور اسپانیا بررسی شدند. نمونه‌های خونی در زمان کشتار از ۱۵ پرنده در هر گله جمع‌آوری شد و میزان آنتی‌بادی IBD با روش الایزا مورد سنجش قرار گرفت.

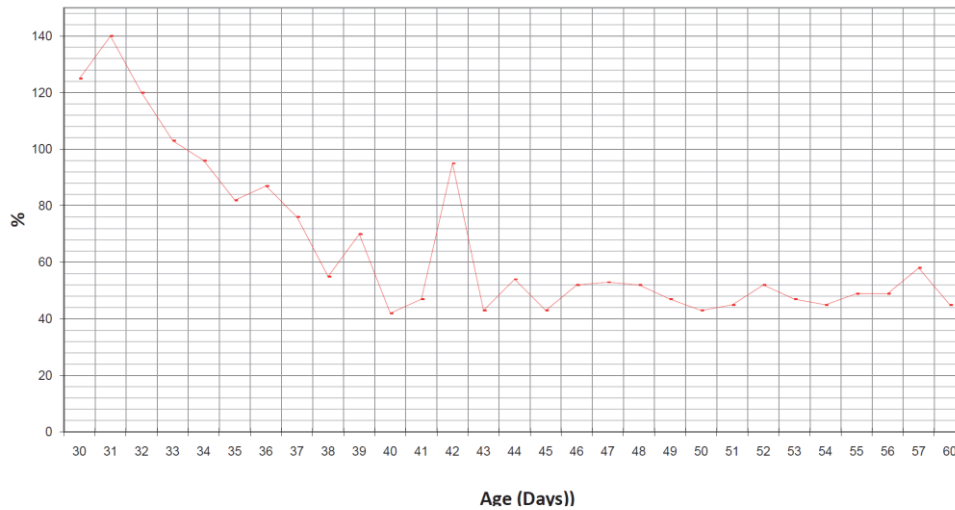
تعداد گله‌ها	کیت الایزا	متوسط سن کشتار
۶۱۲	Biocheck	۴۰ روز

تلقیح داخل تخم مرغ (دستگاه egginject)

میانگین تیتر الایزا-۶۱۲ گله



متوسط درصد CV نسبت به سن



نتیجه گیری

در این مطالعه فارمی در مقیاس بزرگ، به دنبال واکسیناسیون با واکسن Cevac Transmune IBD® در جوجه‌کشی پاسخ آنتی‌بادی قوی و مداومی دیده شد. علاوه بر تیتراژ آنتی‌بادی مثبت و معمولاً بالا، یک‌نواختی گله بهبود یافت، به‌طوری‌که ضریب تغییرات (CV) در اکثر گله‌ها به کمتر از ۶۰٪ کاهش پیدا کرد.

ارزیابی پاسخ سرولوژی واکسن ایمونوکمپلکس (Cevac Transmune IBD®) تلقیحی به داخل تخم مرغ در یک مطالعه فارمی با مقیاس بزرگ

S. Magallon¹, J.L. Balaguer¹, M. Arbe¹, C. Gonzalez², A. Martino¹ and B. Alva²

1 Ceva Sante Animale, Libourne, France; 2 Ceva Salud Animal, Barcelona, Spain

مقدمه

بیماری بورس عفونی (IBD) یکی از بیماری‌های مهم در صنعت طیور است. چندین نوع واکسن مختلف در بازار موجود می‌باشد که به مقابله با این بیماری کمک می‌کنند. ارزیابی سطح آنتی‌بادی پرندگان بعد از واکسیناسیون به وسیله الایزا می‌تواند میزان محافظت و نیز اثر بخشی واکسیناسیون را منعکس نماید. Cevac Transmune IBD® یک واکسن ایمونوکمپلکس بیماری گامبورو می‌باشد که می‌تواند به صورت تزریق زیرجلدی در جوجه‌های یک‌روزه و یا تلقیح داخل تخم مرغی استفاده شود. این واکسن شامل ویروس گامبورو (سویه Winterfield 2512) می‌باشد که با آنتی‌بادی‌های اختصاصی تشکیل کمپلکس ایمنی می‌دهد؛ به طوری که این آنتی‌بادی‌ها از خنثی شدن ویروس توسط آنتی‌بادی‌های مادری محافظت می‌نمایند. وقتی آنتی‌بادی‌های مادری به سطوح پایین می‌رسند، ویروس در بورس فابرسیوس تکثیر شده و منجر به القا ایمنی فعال می‌گردد. ایمنی فعال القا شده را می‌توان با روش الایزا اندازه‌گیری نمود.

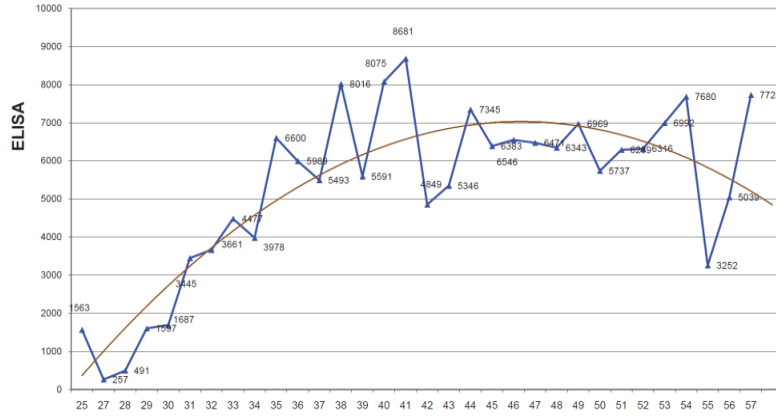
اهداف

هدف از مطالعه فارمی با مقیاس بزرگ ارزیابی اثربخشی یک واکسن ایمونوکمپلکس (Cevac Transmune IBD®) به وسیله اندازه‌گیری پاسخ سرولوژی بود. این واکسن به صورت داخل تخم مرغی توسط دستگاه‌های Egginject® تلقیح شد.

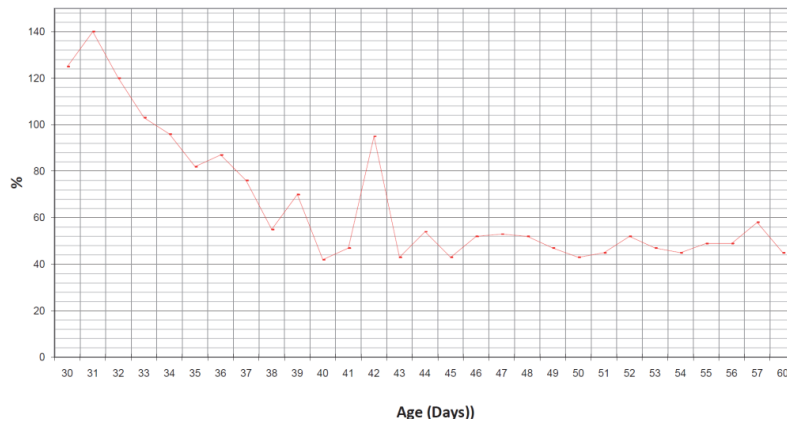
مواد و روش‌ها

در مجموع، از ۶۱۲ گله در سن کشتار نمونه خونی دریافت گردید. از هر گله ۱۵ نمونه خونی به وسیله روش الایزا با استفاده از کیت BioChek مورد ارزیابی قرار گرفت. متوسط سن کشتار ۴۰ روزگی بود. تمامی گله‌ها به صورت تلقیح داخل تخم مرغی توسط دستگاه Egginject® در جوجه کشی به هنگام ترانسفر از ستر به هچر واکسینه شدند.

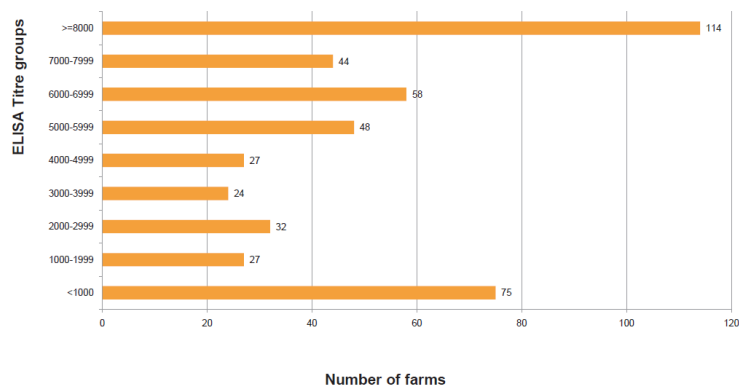
میانگین تیترا ایزا-۱۲-۶۱ گله



متوسط درصد CV نسبت به سن



تعداد فارم‌های قرار گرفته در گروه تیتری



نتیجه گیری

بعد از سن ۴۰ روزگی ۹۲٪ تا ۹۶٪ از سرم‌ها مثبت بودند. تیترهای بالای ۵۰۰، مثبت در نظر گرفته شدند. حدود ۵۶٪ گله‌ها تیتر بین ۴۰۰۰ تا ۸۹۹۹ داشتند. ۵۶٪ گله‌ها ضریب تغییرات (CV) کمتر از ۶۰٪ داشتند. تمامی این اطلاعات پاسخ سرولوژی مناسب ناشی از استفاده واکسن ایمونوکمپلکس بیماری گامبورو (Cevac Transmune IBD®) به صورت تلقیح داخل تخم-مرغی در جوجه‌کشی را در سن کشتار نشان می‌دهند.

۲۳

ارزیابی بیولوژیکی دریافت واکسن و شاخص‌های پرورشی در جوجه‌های گوشتی

واکسینه شده با واکسن ایمونوکمپلکس و واکسن‌های نو ترکیب بیماری بورس عفونی

Sestil, et al., 2011, AAAP

پرندگان

جوجه‌های گوشتی تجاری، در منطقه‌ای با شیوع متوسط فرم خیلی حاد بیماری گامبور در برزیل فارم‌های پرورشی اصول امنیت زیستی متوسط رو به پایینی را داشتند (اصول رایج در برزیل جنوبی). این مقاله خلاصه ۲ آزمایش شامل بیش از ۳۰۰۰۰۰ قطعه جوجه گوشتی می‌باشد.

واکسن‌ها

تمامی پرندگان با روش تزریق زیر جلدی در جوجه کشی با استفاده از واکسن‌های زیر، واکسینه شدند:

- Cevac Transmune IBD® (۱۰ گله).
- واکسن با پایه HVT حامل ژن VP2 از سویه کلاسیک Faragher ۵۲/۷۰ ویروس گامبور (۱۰ گله).

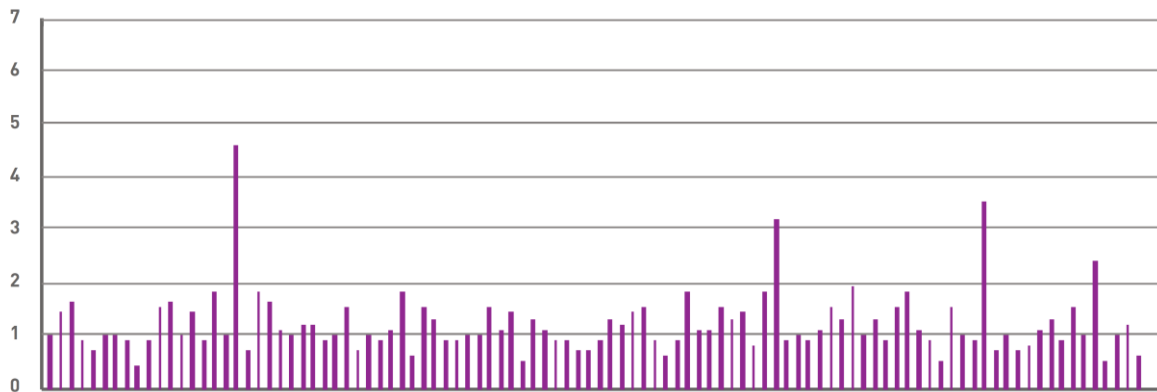
در سن ۴۲ روزگی، بورس‌های فابرسیوس جمع‌آوری و وزن شده و جهت بررسی هیستوپاتولوژی ارسال گردیدند. پاسخ آنتی‌بادی با استفاده از کیت الایزا گامبور کلاسیک Idexx ارزیابی شد.

وزن بورس

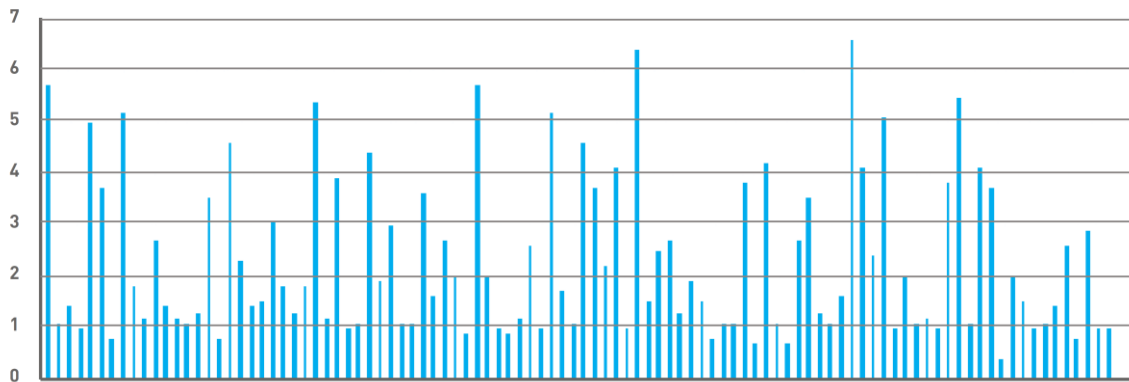
Vector HVT-VP2	Cevac Transmune IBD®	
۲,۳ گرم	۱,۳ گرم	متوسط وزن بورس در ۴۲ روزگی

ارقام به صورت معناداری اختلاف دارند (استفاده از تست Tukey, $P < 0.05$).

اوزان انفرادی بورس، گروه Cevac Transmune IBD®



اوزان انفرادی بورس، گروه Vector HVT-VP2



مطابق انتظار، میانگین وزن بورس در جوجه‌های واکسینه با واکسن Cevac Transmune IBD® کمتر بود، چرا که ویروس واکسن به‌منظور ایجاد پاسخ ایمنی می‌بایست در بورس کلونیزه شود که این امر در مورد واکسن حامل HVT-VP2 رخ نمی‌دهد. اوزان انفرادی، یکنواختی بیشتری در گروه واکسن Cevac Transmune IBD® را نشان می‌دهند، در مقابل جوجه‌های واکسینه با واکسن نوترکیب تفاوت‌های بیشتری در وزن بورس داشتند.

امتیاز هیستوپاتولوژی

Vector HVT-VP2	Cevac Transmune IBD®	متوسط امتیاز هیستوپاتولوژی بورس
۲,۴	۲,۹	

ارقام به‌صورت معناداری اختلاف دارند (استفاده از تست Tukey, $P < 0.05$).

اطلاعات علمی

CEVAC Transmune®

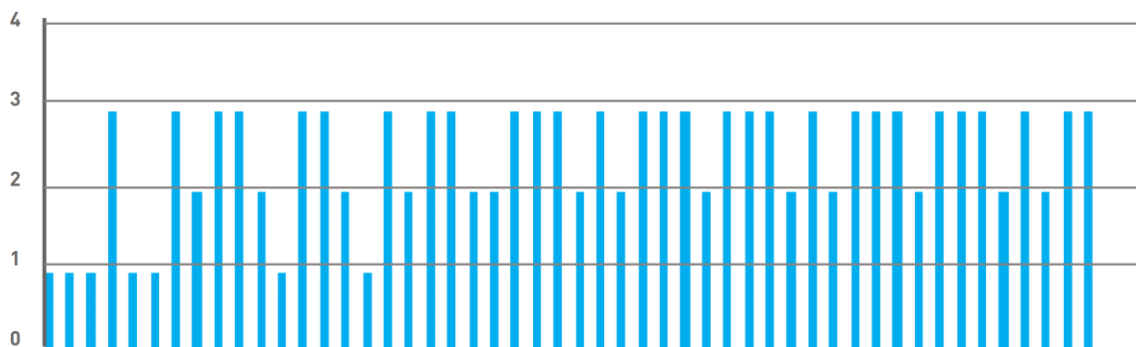
توجه: مقیاس امتیاز بندی به قرار ذیل است:

امتیاز	تخلیه لنفوسیتی
۱	۰-۲۵٪
۲	۲۶-۵۰٪
۳	۵۱-۸۰٪
۴	<۸۱٪

امتیاز انفرادی هیستوپاتولوژی بورس، گروه Cevac Transmune IBD®



امتیاز انفرادی هیستوپاتولوژی بورس، گروه Vector HVT-VP2



طبق معمول میانگین امتیاز بورس در جوجه‌های واکسینه با واکسن Cevac Transmune IBD® بیشتر بود؛ چرا که ویروس واکسن جهت ایجاد پاسخ ایمنی فعال بایستی در بورس کلونیزه شود. این درحالیست که واکسن نو ترکیب HVT-VP2 این قابلیت را ندارد.

اطلاعات علمی

CEVAC Transmune®

در ارتباط با امتیازبندی هیستوپاتولوژی بورس، نمودارهای انفرادی یک‌نواختی بیشتری را در گروه Cevac Transmune IBD® نشان دادند؛ در مقابل، امتیازها در گروه واکسن نوترکیب، تفاوت‌های زیادی داشت. با این حال تعداد قابل توجهی از امتیازهای گروه واکسن نوترکیب، مشابه گروه Cevac Transmune IBD® بود.

پاسخ آنتی‌بادی

Vector HVT-VP2	Cevac Transmune IBD®	
۱۶۹۸	۲۴۲۸	تیترا میانگین هندسی در الایزا
۵۲	۳۴	%CV

ارقام به‌صورت معناداری اختلاف دارند (استفاده از تست Tukey، $P < 0.05$).

عملکردها

Vector HVT-VP2	Cevac Transmune IBD®	
۴۲,۴	۴۲,۶	سن کشتار
۲,۵۷	۲,۵۹	میانگین وزن نهایی بدن Kg
۱,۷۲	۱,۷۴	ضریب تبدیل غذایی
۳,۱۴	۲,۵۶	تلفات
۶۰,۴	۶۱	افزایش وزن روزانه gr
۳۴۱	۳۴۰,۴	شاخص تولید

ارقام به‌صورت معناداری اختلاف دارند (استفاده از تست Tukey، $P < 0.05$).

نتیجه گیری

مقایسه واکسن نوترکیب HVT-VP2 در شرایط فارمی با واکسن Cevac Transmune IBD® در برزیل نشان داد:

- تداوم دریافت واکسن؛⁴ بر اساس تغییرات در بورس؛ عدم یکنواختی بورس در واکسن رقیب نشان از حفاظت ناپایدار در سطح این ارگان دارد.
- پاسخ آنتی بادی بیشتر و یکنواخت تر.
- عملکردهای تولیدی یکسان در مقایسه با واکسن رقیب.

این آزمایش فارمی در مقیاس بزرگ نشان می دهد که تغییرات بورس ناشی از دریافت واکسن Cevac Transmune IBD® مفید بوده و در عملکرد تولیدی گله‌ها تأثیر منفی ندارد. به عبارت دیگر، بورس سنگین تر یا بورس با تغییرات هیستوپاتولوژی ملایم تر در کشتارگاه به معنای این نیست که عملکرد بهتری خواهد داشت.

⁴ Vaccine take

ارزیابی بیولوژیکی دریافت واکسن و شاخص‌های پرورشی در جوجه‌های گوشتی واکسینه شده با واکسن ایمونوکمپلکس و واکسن نوترکیب بیماری بارس عفونی^۵

Luiz Sesti, Carlos Kneipp, Yannick Gardin, Branko Alva

Ceva Saude Animal Ltda./Rua Moanoel Joaquim Filho 303, Paulinia, Sp, Brazil

در این مطالعه، دو واکسنی که اخیراً برای کنترل بیماری گامبورو عرضه شده‌اند، واکسن ایمونوکمپلکس و واکسن نوترکیب، از لحاظ ویژگی‌های بیولوژیک دریافت واکسن و پارامترهای تولیدی جوجه‌های گوشتی واکسینه با هم مقایسه شدند. واکسن ایمونوکمپلکس متشکل از ویروس سویه واکسن گامبورو (Winterfield 2512) در ترکیب با آنتی بادی‌های اختصاصی بوده و واکسن نوترکیب متشکل از سویه HVT ویروس مارک بیان کننده ژن پروتئین VP2 از سویه کلاسیک ویروس گامبورو می‌باشد. دو آزمایش فارمی کنترل شده در فارم‌هایی با درگیری کم ویروس گامبورو صورت گرفت و مشخصات بیولوژیکی دریافت واکسن بین سنین ۴۲-۳۵ روزگی بررسی گردید (سرولوژی گامبورو، وزن بارس، تخلیه لنفوسیتی، کلونیزه شدن ویروس در بارس با روش‌های مولکولی). همچنین شاخص‌های پرورشی جوجه‌های گوشتی واکسینه با هر دو واکسن مقایسه شدند (میانگین وزن کشتار، ضریب تبدیل غذایی، تلفات کلی و افزایش وزن روزانه). هر دو واکسن از طریق تزریق زیر جلدی در یک روزگی استفاده شدند و در هر دو آزمایش مجموعاً ۳۱۶۰۸۰ جوجه گوشتی شرکت داشتند. پرنده‌گانی که واکسن ایمونوکمپلکس را دریافت نموده بودند، میزان دریافت واکسن یکنواخت‌تری نسبت به گروه واکسن نوترکیب داشتند. همچنین عملکرد جوجه‌های گوشتی گروه واکسن ایمونوکمپلکس کمی بهتر بود. وزن بارس، سرولوژی و نتایج آزمایشات مولکولی به خوبی نشانگر عدم کارایی واکسن نوترکیب در ایجاد محافظت کامل بر علیه ویروس وحشی موجود در محیط بود.

⁵ AVMA convention, 2011, America's Center

GARDIN Y. et al., 2008. Interest of using an antigen antibody complex IBD vaccine in the prevention of IBD. Proceedings of the 57th Western Poultry Disease Conference, April 9-12, Puerto Vallarta, Jalisco, Mexico.

KELEMEN M. et al., 2000. Pathological and immunological study of an in ovo complex vaccine against infectious bursal disease. Acta Vet. Hung. 48(4), 443-454.

IVAN J. et al., 2001. Functional restoration of the bursa of Fabricius following in ovo infectious bursal disease vaccination. Vet. Immunol. Immunopathol. 79; 235-248.

PALYA V. et al., 2004. Control of infectious bursal disease by an immune complex vaccine. Proceedings of the 22nd World's Poultry Congress, June 8-13, Istanbul, Turkey.

DREN C. et al., 2005. Protection of bivalent HVT and IBDV-immune complex vaccine against very virulent Marek's disease virus (RB1B) challenge after in ovo vaccination of SPF eggs. Proceedings of the XIVth Congress of the World Veterinary Poultry Association, August 22-26, Istanbul, Turkey.

IVAN J. et al., 2005. Delayed vaccine virus replication in chickens vaccinated subcutaneously with an immune complex infectious bursal disease vaccine: Quantification of vaccine virus by real-time polymerase chain reaction. Can. J. Vet. Res. 69; 135-142.

BOUZOUAIA M. et al., 2009. Results of IBD control using an antigen-antibody complex vaccine Cevac Transmune IBD in Tunisia. Proceedings of the XVth Congress of the World Veterinary Poultry Association, November 8-12, Marrakesh, Morocco.

PANIAGO M.T. and V. TURBLIN, 2009. Reduction of condemnation in processing plants through vaccination in the hatchery. Proceedings of the XVIth Congress of the World Veterinary Poultry Association, November 8-12, Marrakesh, Morocco.

HERCZEG J. et al., 2011. Laboratory efficacy testing of subcutaneously administered Cevac Transmune vaccine in broiler chickens. Proceedings of the XVIIth Congress of the World Veterinary Poultry Association, August 14-18, Cancun, Mexico.

JACQUINET C. and Y. GARDIN, 2011. Monitoring de la prise vaccinale d'un vaccin Gumboro de type immun complexe applique au couvoir. Interet et exemples de suivis en comparaison avec une methode de vaccination classique. Proceedings of the Neuviemes Journees de la Recherche Avicole, March 29-30, Tours, France.

MAGALLON S. et al., 2011a. Evaluation of serological response of an IBD immune-complex vaccine (Cevac Transmune®) applied subcutaneously on a large scale field study.

CEVAC Transmune®

Proceedings of the XVIIth Congress of the World Veterinary Poultry Association, August 14-18, Cancun, Mexico.

MAGALLON S. et al., 2011b. Evaluation of serological response of an IBD immune-complex vaccine (Cevac Transmune®) applied via in ovo on a large scale field study. Proceedings of the XVIIth Congress of the World Veterinary Poultry Association, August 14-18, Cancun, Mexico.

SESTI L. et al., 2011. Biological monitoring of vaccine take and productive parameters in broilers vaccinated with immune complex and recombinant vector vaccines against infectious bursal disease. Proceedings of the American Association of Avian Pathologists Meeting, July 16-19, St. Louis, MO, USA.

Investing today to produce for tomorrow?



شرکت سوا پارس

تلفکس:

۰۲۱ ۸۸۳۴۵۰۴۶

۰۲۱ ۸۸۸۴۶۶۷۶

www.savapars.com



Together, beyond animal health