

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

پیام حقیقی خوشخو<sup>۱\*</sup>، حسین حسینی<sup>۲</sup>، گیتا اکبری آزاد<sup>۱</sup>، سعید معصومیان<sup>۳</sup>

۱- استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج- ایران،

۲- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج- ایران.

۳- دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج- ایران.

\* نویسنده مسؤول: [pkhoshkho@kiau.ac.ir](mailto:pkhoshkho@kiau.ac.ir)

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

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

Haghighi khoshkhoo, P.<sup>1\*</sup>, Hosseini, H.<sup>2</sup>, Akbari azad, G.<sup>1</sup>, Masoumian, S.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Assistant Professor of Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj-Iran.

<sup>2</sup>Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj-Iran.

<sup>3</sup>Graduated from Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj-Iran

#### Abstract:

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

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

### چکیده

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

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

### مقدمه

بیماری نیوکاسل (Newcastle disease, ND) و بیماری بورس عفونی (Infectious bursal disease, IBD) یا گامبورو از

بیماریهای عفونی مهم صنعت طیور می باشند که علیه آنها هر دو نوع واکسن زنده و کشته برای ایجاد ایمنی در گله های ماکیان بصورت تجارتي در دسترس است. واکسنهای کشته یا غیرفعال



جدول ۱- برنامه و روش واکسیناسیون در دو گروه مورد آزمایش

روز	نوع واکسن	نحوه تجویز	گروه ۱ (تیمار)	گروه ۲ (کنترل)
۱	برونشیت (H120)	قطره چشمی	✓	✓
۸	نیوکاسل (B1)	قطره چشمی	✓	✓
۸	واکسن A دوگانه نیوکاسل- گامبورو	تزریقی	✓	-
۸	واکسن B دوگانه نیوکاسل- گامبورو	تزریقی	-	✓
۱۶	گامبورو (D78)	قطره چشمی	✓	✓
۱۸	نیوکاسل (LaSota)	آشامیدنی	✓	✓
۲۴	گامبورو (D78)	آشامیدنی	✓	✓
۲۶	برونشیت (H120)	آشامیدنی	✓	✓
۲۸	نیوکاسل (LaSota)	آشامیدنی	✓	✓
۳۱	گامبورو (D78)	آشامیدنی	✓	✓

نیوکاسل و گامبورو به علت القاء مقادیر بالا، یکنواخت و طولانی مدت ایمنی هومورال بطور گسترده‌ای در صنعت طیور بکار می‌روند (۶۰). گرچه در این تحقیق به منظور ارزیابی دو نوع واکسن دوگانه از آزمایشات سرولوژی یک HI و الیزا استفاده شده است، اما نتایج این مطالعه بخوبی محدودیت‌های این نوع ارزیابی را نشان می‌دهد. در بیماری‌هایی چون گامبورو، ایمنی سلولی نقش مهمی دارد و نقش آن از طریق لئوسیت‌های T کمک کننده و T سیتوتوکسیک کاملاً به اثبات رسیده است. لذا در ارزیابی کارایی واکسن گامبورو، ایمنی سلولی القاشده توسط واکسن نیز باید سنجیده شود. از طرف دیگر تیتربالای آنتی بادی در آزمایش الیزا و HI انعکاس دقیقی از آنتی بادی‌های محافظت کننده (VN antibody) نیست لیکن بعلت دسترسی راحت، ارزان بودن و استفاده فراوان از آنها در تفسیر کارایی واکسن، در این تحقیق نیز از همین تکنیک‌ها استفاده شده است.

### مواد و روش کار

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

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

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

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

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

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

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

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



جدول ۳- میانگین تیترو ضریب پراکندگی آنتی بادی علیه نیوکاسل در دو گروه مورد آزمایش به روش HI

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

NS\* = غیر معنی دار.

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

هفته	واکسن تیمار	واکسن کنترل	p-value
۱	۲/۴۸	۱/۶	*.۰۰۰۵=S
۲	۰/۳۸	۰/۳۹	۰/۸۶=NS**
۳	۰/۳۶	۱/۲۴	۰/۰۰۵=S
۴	۰/۸۲	۱/۳۱	۰/۰۰۵=S
۵	۰/۹۱	۸/۳۲	۰/۰۰۵=S
۶	۰/۴۲	۵/۴۸	۰/۰۰۵=S
۷	۰/۱	۱/۸۱	۰/۰۰۵=S
۸	۰/۳۱	۰/۲۲	۰/۰۸=NS
۹	۰/۴۵	۰/۴۲	۰/۶۱=NS
۱۰	۰/۳۵	۰/۲۱	۰/۰۰۹=NS

S\* = معنی دار، NS\*\* = غیر معنی دار

## بحث

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

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

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

NS\* = غیر معنی دار.

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

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

## نتایج

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



دامپزشکی دانشگاه تهران به سرانجام رسیده است. بدینوسیله از مساعدت این مرکز تشکر و قدردانی می‌شود.

## References

- Alexander, D. (2003) Newcastle disease, other avian paramyxoviruses, and pneumovirus infections. In: Saif Y.M., Barnes H.J., Glisson J.R., Fadly A.M., McDougald L.R., Swayne D., editors. *Diseases of Poultry*. Ames: Iowa State University Press, 63-99.
- Becht, H.H., Müller H.K. (1988) Comparative Studies on Structural and Antigenic Properties of Two Serotypes of Infectious Bursal Disease Virus. *Journal Genetic Virology*, **69**: 631-640.
- De Herdt, P., Jagt, E., Paul, G., Van Vollen, S., Renard, R., Destrooper, C., Van Den Bosch, G. (2005) Evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies against infectious bursal disease virus (IBDV) and the estimation of the optimal age for IBDV vaccination in broilers. *Avian Pathology J.*, **134**:501-504.
- De Wit, J.J. (2001) Gumboro Disease: Estimation of optimal time of vaccination by the Deventer formula. Proceedings of the 3rd meeting of working group 3 of COST action 839: passive protection and vaccination (current and future possibilities) in the presence of maternally derived antibody, Pulawy, 21-28.
- Ismail, N.M., Saif, Y. M. (1991) Differentiation between Antibodies to Serotype 1 and 2 IBDV in Chicken Sera. *Avian Disease*, **34**: 1002-1004.
- Lukert, P. D., Saif, Y. M. Infectious bursal disease. In: *Diseases of Poultry*, (2003) 11th ed. Y. M. Saif, H.J. Barnes, A.M. Fadly, J.R. Glisson, L.R. McDougald and D. E. Swayne, eds. Iowa State Press, Ames, IA. 161-179.
- Maas, R.A., Komen, M., Van Diepen, M., Oei, H.L., Claassen, I. J. T. M. (2003) Correlation of Haemagglutinin- Neuraminidase and Fusion protein content with protective antibody response after immunisation with inactivated Newcastle disease vaccines. *Vaccine*, **21**:3136 - 3141.
- Maas, R., Vanema, S., Kant, A., Dei, H., Claassen, I. (2004) Quantification of infectious bursal disease viral proteins 2 and 3 in inactivated vaccines as an

کمکی (T helper) و سلولهای T سیتوتوکسیک جهت ایجاد محافظت ضروری است (۱۰) و ایمنی سلولی قادر به ایجاد محافظت کامل حتی در غیاب آنتی بادی می‌باشد (۱۱). دوم ممکن است آنتی بادی‌های هومورال اندازه گیری شده در آزمایش الیزا از نوع خنثی کننده (VN) نباشند. از آنجا که آنتی ژن واکسنهای کشته تجاری مقادیر بسیار متفاوتی از آنتی بادی‌های خنثی کننده را القای کند، این احتمال وجود دارد که آنتی بادی‌های تولید شده توسط واکسن B خاصیت نوترولیزانی بیشتری نسبت به آنتی بادیهای تولید شده توسط واکسن A داشته است (۲). ولی آزمون الیزای بر خلاف آزمایش VN، قادر به تفکیک آنتی بادیهای تولید شده نیست (۳ و ۷). به نظر می‌رسد ارزیابی وضعیت محافظت گله در برابر بیماری گامبورو بر اساس سرولوژی کافی نباشد و لازم است میزان فعالیت ایمنی سلولی نیز اندازه گیری شود. در این آزمایش برای اطمینان از صحت نتایج سرولوژی، آزمایشات برای گامبورو دو بار انجام شد و البته نتایج یکسان در هر دو نوبت آزمایش بدست آمد.

از دیگر نتایج قابل انتظار این آزمایش، همطرازی تیتراژ آنتی بادی و ضریب یکنواختی آنتی بادی علیه بیماری نیوکاسل بود که به روش آماری تفاوت معنی داری نداشت ( $p \leq 0.05$ ). هم چنین در مقایسه آماری بین میانگین وزن هفتگی، درصد یکنواختی وزن، درصد ماندگاری و ضریب تبدیل غذایی هفتگی دو گروه کنترل و تیمار نیز اختلاف معنی داری مشاهده نشد ( $p \leq 0.05$ ).

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

## تشکر و قدردانی

این طرح تحقیقاتی با همکاری جهاد دانشگاهی دانشکده



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

- 9-Rautenschlein, S.H., Yeh, Y., Sharma, J. M. (2002) The role of T cells in protection by an inactivated infectious bursal disease virus vaccine. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **89**: 159-167.
- 10-Wyeth, P., Chettle, N. J., Mohepat, A. R. (1992) Use of an inactivated infectious bursal disease oil emulsion vaccine in commercial layer flocks. *Veterinary Record*, **130**:30-32.
- 11-Yeh, H., Rautenschlein, S., Sharma, M. (2002) Protective immunity against infectious bursal disease virus in chickens in the absence of virus-specific antibodies. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **89**: 149-158.

