مقایسه‌ی اثربخشی پروتکل‌های مختلف واکسیناسیون ترکیبی علیه بیماری‌های نیوکاسل، آنفلوانزای H۹ و گامبورو (IBD) در جوجه‌های گوشتی: ارزیابی سرولوژیک، هیستوپاتولوژیک و مولکولی

آرش قلیانچی‌لنگرودی*[۱]، حسین حسینی[۲]، زهرا ضیافتی‌کافی [۳]، فهیمه جمیری[۴]، علیرضا بخشی [۴]، سید علیرضا رضائی [۵]، آمیتیس صدیقی [۶]، مهتاب حیدرپور [۶]، سید مانی مهرنیا [۶]

۱- استاد، گروه میکروبیولوژی و ایمنی شناسی ،دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران ،تهران ، ایران

۲- دانشیار، گروه علوم بالینی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد کرج، البرز، ایران

۳- استادیار، گروه میکروبیولوژی و ایمنی شناسی ،دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران ،تهران ، ایران

۴- دانشجوی دکترای تخصصی ویروس‌شناسی، گروه میکروبیولوژی و ایمنی شناسی ،دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران ،تهران ، ایران

۵- دکترای عمومی دامپزشکی، گروه میکروبیولوژی و ایمنی شناسی ،دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران ،تهران ، ایران

۶- دانشجوی دکترای عمومی دامپزشکی، گروه میکروبیولوژی و ایمنی شناسی ،دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران ،تهران ، ایران

* **نویسنده مسئول:** دکتر آرش قلیانچی‌لنگرودی، تخصص و مدرک تحصیلی: دکتری تخصصی بهداشت و بیماری‌های طیور-

آدرس: تهران، خیابان آزادی، خیابان دکتر قریب، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دپارتمان میکروبیولوژی و ایمنی‌شناسی–
تلفن تماس: ۰۲۱۶۱۱۱۷۱۵۴ – فکس: ..... –

ایمیل: arashghalyanchi@gmail.com

چکیده

بیماری‌های نیوکاسل (ND)، آنفلوانزا (سویه‌ی H۹N۲) و بورس عفونی (IBD) از مهم‌ترین عوامل ویروسی تهدید کننده‌ی صنعت طیور هستند. هدف این مطالعه، مقایسه‌ی اثربخشی پروتکل‌های مختلف واکسیناسیون شامل واکسن‌های کشته‌ی ترکیبی و واکسن زنده‌ی اینترمدیت گامبورو در القای ایمنی و حفاظت در برابر ویروس بسیار حاد گامبورو (vvIBD) بود. در این مطالعه‌ی تجربی، ۱۸۰ قطعه جوجه‌ی گوشتی نژاد راس به شش گروه ۳۰تایی تقسیم شدند. گروه‌ها شامل ترکیبات مختلفی از واکسن‌های کشته‌ی سه‌گانه‌ی گالیمون (محصول شرکت بوهرینگر اینگلهایم یا تولید ایران) همراه یا بدون واکسن زنده‌ی اینترمدیت IBD بودند. واکسیناسیون در روزهای هشت (واکسن کشته) و ۱۷ و ۲۴ (واکسن زنده) انجام شد. در روز ۳۵، به‌جز گروه کنترل منفی، سایر

گروه‌ها با ویروس vvIBD چالش شدند. سپس بار ویروسی (Real-time RT-PCR)، آسیب بافتی بورس (هیستوپاتولوژی) و تیتر آنتی‌بادی‌ها توسط ELISA و HI بررسی شد. گروه دریافت‌کننده‌ی واکسن کشته گالیمون + واکسن زنده‌ی اینترمدیت (گروه سه)، تیتر آنتی‌بادی IBD بالا (میانگین۴۱۵۳= ELISA)، کمترین بار ویروسی (C_t =۴۴/۰۶) و کمترین آسیب بافتی (میانگین نمره = ۰/۲۰ ± ۰/۴۵) را نشان داد. گروه یک (فقط واکسن کشته گالیمون) نیز با بیش‌ترین میانگین تیتر آنتی‌بادی IBD (ELISA= ۴۵۷۷) ایمنی مناسبی نشان داد. واکسن‌های تولید ایران عملکرد ضعیف‌تری داشتند که ممکن است بازتابی از تفاوت در جرم آنتی‌ژنی یا فرمولاسیون این واکسن‌ها باشد. استفاده‌ی ترکیبی از واکسن کشته‌ی گالیمون با واکسن زنده‌ی اینترمدیت، پاسخ ایمنی و حفاظت مؤثرتری علیه vvIBD ایجاد می‌کند. یافته‌های حاضر لزوم بررسی بیش‌تر کیفیت آنتی‌ژنی و فرمولاسیون واکسن‌های داخلی و نیز به‌کارگیری پروتکل‌های ترکیبی را برای بهبود کنترل بیماری IBD در گله‌ها برجسته می‌سازد.

کلمات کلیدی: بیماری بورس عفونی، واکسن کشته، واکسن زنده، هیستوپاتولوژی، Real-time RT-PCR

مقدمه

بیماری گامبورو (Infectious Bursal Disease)، که به عنوان بیماری ویروسی بورس عفونی یا بیماری جمپسون- اسپیلزی (Gumboro disease) نیز شناخته می‌شود، یکی از مهم‌ترین بیماری‌های ویروسی در صنعت طیور جهان است که توسط ویروس بیماری بورس عفونی (IBDV) ایجاد می‌شود. این ویروس متعلق به خانواده‌ی Birnaviridae و جنس Avibirnavirus است و به طور ویژه بر سلول‌های لنفوبلاستی B در بورس فابریسیوس (Bursa of Fabricius) حمله می‌کند و باعث تخریب شدید این عضو لنفوئیدی اولیه در جوجه‌های جوان می‌شود (۱, ۲). این تخریب منجر به سرکوب سیستم ایمنی و افزایش حساسیت نسبت به سایر عفونت‌های ثانویه، کاهش رشد، افت تولید و افزایش تلفات در گله‌های طیور می‌گردد. به دلیل این اثرات منفی، IBD خسارات اقتصادی قابل‌توجهی را به صنعت طیور وارد می‌کند (۳). ویروس IBD از نظر ژنتیکی و آنتی‌ژنیکی دارای تنوع قابل توجهی است. سویه‌های وحشی (wild-type) این ویروس به دو گروه اصلی تقسیم می‌شوند؛ سویه‌های با شدت متوسط یا اینترمدیت (intermediate) و سویه‌های بسیار حاد vvIBD (very virulent). سویه‌های vvIBD از اواسط دهه‌ی ۱۹۸۰ در اروپا ظهور کردند و به سرعت به سایر نقاط جهان از جمله آسیا، آفریقا و آمریکای جنوبی گسترش یافتند (۴). این سویه‌ها به دلیل توانایی بالا در ایجاد بیماری شدید حتی در گله‌های واکسینه شده، چالش بزرگی برای کنترل بیماری محسوب می‌شوند. سویه‌های جدیدتر نیز با قابلیت فرار از پاسخ ایمنی القایی توسط واکسن‌های سنتی، ظهور پیدا کرده‌اند که به آن‌ها سویه‌های "گریز از ایمنی" (Immune escaping variants) می‌گویند (۵). در ایران نیز شواهد متعددی از گردش سویه‌های vvIBD و وجود تنوع ژنتیکی قابل‌توجه در جمعیت ویروسی گزارش شده‌است. (۶, ۷) کنترل بیماری IBD عمدتاً متکی به برنامه‌های واکسیناسیون است. واکسن‌ها به دو دسته اصلی تقسیم می‌شوند؛ واکسن‌های زنده و واکسن‌های کشته (غیرفعال). واکسن‌های زنده شامل سویه‌های اینترمدیت (intermediate)، اینترمدیت پلاس (intermediate plus) و سویه‌های ملایم (mild) هستند که اغلب به‌همراه آب آشامیدنی یا قطره‌چشمی مصرف می‌شوند. این واکسن‌ها با القای پاسخ ایمنی سلولی و هومورال در بورس، حافظه‌ی ایمنی ایجاد می‌کنند، اما خطر بازگشت حدت (reversion to virulence) و انتقال به گله‌های مجاور را دارند. در مقابل، واکسن‌های کشته ایمن‌تر بوده و خطری برای انتقال ویروس ندارند، اما به تنهایی القای پاسخ ایمنی قوی را تضمین نکرده و معمولاً پس از واکسیناسیون با واکسن زنده به عنوان واکسن بوستر یا تقویت‌کننده (Booster) مورد استفاده قرار می‌گیرند (۸, ۹). در سال‌های اخیر، استفاده از واکسن‌های ترکیبی (multivalent) که به‌طور همزمان علیه چندین عامل بیماری‌زا ایمنی ایجاد می‌کنند، رواج یافته است. این واکسن‌ها علاوه بر کاهش استرس ناشی از تزریق‌های متعدد، هزینه‌های کارگری و خطر عفونت را کاهش می‌دهند. یکی از این واکسن‌های ترکیبی، واکسن سه‌گانه‌ی کشته‌ی گالیمون H9+ND+IBD (Boehringer Ingelheim) بوده که حاوی آنتی‌ژن‌های ویروس آنفلوانزای بروز شده H9N2 ، ویروس بیماری نیوکاسل (NDV) و ویروس بیماری گامبورو (IBDV) است. سویه‌ی IBD استفاده شده در این واکسن، سویه‌ی VNJO نام دارد که از نوع اینترمدیت طراحی شده و به‌عنوان یک آنتی‌ژن قوی برای القای پاسخ ایمنی در برابر سویه‌های حاد وحشی شناخته می‌شود. با این حال، اثربخشی این واکسن در شرایط پرورشی ایران، که با فشار بالای ویروسی و گردش سویه‌های بسیار حاد IBD مواجه است، نیاز به ارزیابی دقیق دارد. مطالعات متعددی در سراسر جهان اثربخشی واکسن‌های ترکیبی را ارزیابی کرده‌اند. در یافته‌های مطالعه‌ی **Isihak** و همکاران، واکسن کمپلکس ایمنی و واکسن زنده‌ی گامبورو در جوجه‌های گوشتی از نظر اثربخشی ایمنی‌زایی و آسیب بافتی بورس فابریسیوس با یک‌دیگر مقایسه شدند. نتایج این مطالعه با مشاهدات ما هم‌راستا بوده و نشان‌داد که واکسن کمپلکس ایمنی، پاسخ ایمنی قوی‌تری

ایجاد کرده و در عین حال آسیب کمتری به بافت بورس وارد می‌کند. از این‌رو، این نوع واکسن می‌تواند در شرایطی مشابه با وضعیت اپیدمیولوژیک منطقه‌ی مورد مطالعه‌ی ما، انتخابی مناسب‌تر جهت پیشگیری از بیماری بورس عفونی باشد (۱۰). با این‌حال، تفاوت در سویه‌های ویروسی محلی، برنامه‌های مدیریتی و کیفیت واکسن‌های تولید ایران، لزوم انجام مطالعات میدانی و تجربی در هر منطقه را ضروری می‌سازد. در ایران، با وجود استفاده‌ی گسترده از واکسن‌های تولید داخلی و وارداتی، گزارش‌های بالینی از شیوع IBD به‌ویژه در گله‌های جوجه‌های گوشتی ادامه دارد. این امر احتمالاً می‌تواند به دلیل تنوع ژنتیکی بالای ویروس، عدم تطابق آنتی‌ژنی بین سویه‌های واکسن و سویه‌های وحشی و یا سطح کیفیت برخی از واکسن‌های تولید ایران باشد(۱۱). بنابراین، مقایسه‌ی مستقیم اثربخشی واکسن‌های تولید ایران با واکسن‌های استاندارد بین‌المللی در شرایط کنترل‌شده‌ی آزمایشگاهی، می‌تواند اطلاعات ارزشمندی جهت بهینه‌سازی برنامه‌های واکسیناسیون ارائه دهد. هدف از این مطالعه، ارزیابی و مقایسه‌ی اثربخشی پروتکل‌های مختلف واکسیناسیون شامل تلقیح واکسن‌های کشته‌ی دوگانه و سه‌گانه (تولید داخلی و وارداتی) به همراه واکسن زنده‌ی اینترمدیت گامبورو در القای پاسخ ایمنی و حفاظت در برابر چالش با یک سویه‌ی بومی بسیار حاد ویروس گامبورو (vvIBD) در جوجه‌های گوشتی است. این ارزیابی بر اساس معیارهای چندگانه شامل پاسخ سرولوژیک (تیتر آنتی‌بادی)، میزان بار ویروسی با استفاده از Real-time RT-PCR ، و ارزیابی کمی و کیفی ضایعات بافتی بورس فابریسیوس (هیستوپاتولوژی) انجام می‌شود. نتایج این مطالعه می‌تواند به ارائه‌ی راهکارهای علمی برای بهبود کنترل بیماری IBD در شرایط ایران و انتخاب بهینه واکسن‌های ترکیبی کمک کند.

مواد و روش‌ها:

طرح کلی مطالعه و گروه‌بندی جوجه‌ها

این مطالعه به‌صورت تجربی و با طرح کاملاً تصادفی انجام گردیده‌است. در مجموع، ۱۸۰ قطعه جوجه‌ی گوشتی سویه‌ی راس (Ross 308) با سلامت تأییدشده از نظر بالینی و سرولوژیک (دارای آنتی‌بادی مادری) علیه ویروس‌های نیوکاسل، آنفلوانزای H۹ و بیماری بورس عفونی در یک مرکز پرورش تحقیقاتی مورد استفاده قرارگرفت. جوجه‌ها به‌صورت تصادفی به شش گروه ۳۰تایی تقسیم شدند:

شماره گروه	پروتکل واکسیناسیون
۱	واکسیناسیون با واکسن کشته‌ی سه‌گانه۹ (Gallimune H۹+ND+IBD (Updated strain) تولید شرکت Boehringer Ingelheim (BI) در سن هشت روزگی.
۲	واکسیناسیون با واکسن کشته دوگانه (H۹+ND) تولید ایران در سن هشت روزگی، واکسن زنده اینترمدیت گامبورو (IBD) در سن ۱۷ و ۲۴روزگی.
۳	واکسیناسیون با واکسن کشته سه‌گانه (H۹+ND+IBD Gallimune) تولید شرکت Boehringer Ingelheim (BI) در سن هشت روزگی، واکسن زنده اینترمدیت گامبورو در سن ۱۷ و ۲۴روزگی.
۴	واکسیناسیون با واکسن کشته سه‌گانه (H۹+ND+IBD) تولید ایران در سن هشت روزگی، واکسن زنده اینترمدیت گامبورو در سن ۱۷ و ۲۴ روزگی.
۵	بدون دریافت هرگونه واکسن و بدون چالش با ویروس.
۶	بدون واکسیناسیون، چالش با سویه‌ی حاد ویروس گامبورو (vvIBD) در سن ۳۵روزگی.

تمامی جوجه‌ها در شرایط استاندارد (دمای مناسب، تهویه‌ی مناسب، تغذیه و آب یکسان و بدون استرس محیطی) تا پایان آزمایش پرورش داده‌شدند.

پروتکل واکسیناسیون

واکسیناسیون با واکسن کشته: واکسن‌های کشته (کشته سه‌گانه یا دوگانه) به‌صورت زیرجلدی در ناحیه‌ی پشت گردن جوجه‌ها در سن هشت روزگی تلقیح شدند. دُز تلقیح بر اساس دستورالعمل سازنده (۰/۲۵ میلی‌لیتر برای هر قطعه جوجه) انجام‌گرفت.
واکسیناسیون با واکسن زنده: واکسن زنده‌ی اینترمدیت IBD به‌صورت مصرف از طریق آب آشامیدنی در دو نوبت، یعنی در سن ۱۷ و ۲۴ روزگی، مورد استفاده قرار گرفت. قبل از مصرف واکسن، آب آشامیدنی به مدت دو ساعت قطع شد و واکسن با آب بدون کلر و حاوی جایگزین‌کننده‌ی الکترولیت مخلوط و در مدت دو ساعت توسط جوجه‌ها مصرف شد.

چالش با ویروس حاد گامبورو (vvIBD)

در سن ۳۵روزگی، گروه‌های یک تا چهار و گروه شش (کنترل مثبت) با یک سویه‌ی بومی و حاد ویروس گامبورو (vvIBD) که پیش‌تر از یک گله جوجه‌ی گوشتی مبتلا به تلفات بالا و علائم تیپیک گامبورو در ایران جداسازی شده بود، چالش شد. سال جداسازی این ویروس مربوط به سال‌های اخیر گردش سویه‌های (vvIBDV) در کشور بوده و شناسایی اولیه آن براساس علائم بالینی، ضایعات کالبدگشایی (آتروفی شدید بورس و خونریزی‌های عضلانی) و آسیب‌های هیستوپاتولوژیک شدید بورس فابریسیوس انجام شد. به‌منظور تایید مولکولی، RNA ویروسی استخراج و ناحیه‌ی Hypervariable ژن VP2 با RT-PCR تکثیر و تعیین توالی گردید. تحلیل فیلوژنتیک توالی VP2 نشان‌داد که این ایزوله در دسته‌ی سویه‌های بسیار حاد (vvIBDV) قرار می‌گیرد. چالش به‌صورت قطره‌چشمی و تلقیح داخل بینی (هر چشم و بینی با ۵۰ میکرولیتر) با حجم کلی ۱۰۰ میکرولیتر و با تیتر 10^4 EID_{50} انجام شد. گروه پنج (کنترل منفی) تنها با بافر PBS با روش ذکر شده تلقیح گردیده و با ویروس چالش نگردید. پس از چالش، تمامی جوجه‌ها بصورت روزانه از نظر علائم بالینی شامل کاهش مصرف خوراک و آب، اسهال و افت فعالیت، بررسی شدند.

نمونه برداری و آزمایشات

۱. نمونه برداری خون و ارزیابی سرولوژیک

نمونه‌ی خون از ۱۰ قطعه جوجه از هر گروه در سن ۳۵روزگی (قبل از چالش) از طریق ورید بال جمع‌آوری شد. سرم جداسازی و به‌منظور تعیین تیتر آنتی‌بادی علیه ویروس‌های زیر مورد استفاده قرارگرفت:

آنفلوانزای H۹N۲: با استفاده از روش مهار هماگلوتیناسیون (HI) با استفاده از آنتی‌ژن استاندارد H۹N۲ و گلبول قرمز مرغ.

نیوکاسل (ND): با روش HI با استفاده از آنتی‌ژن استاندارد ویروس سویه‌ی لاسوتا.

بیماری بورس عفونی (IBD): با روش الایزا (ELISA) تجاری (کیت Biocheck، هلند) بر اساس دستورالعمل سازنده. نتایج به‌صورت میانگین تیتر گزارش شد.

۲. نمونه برداری بافتی و ارزیابی هیستوپاتولوژیک

در روز پنجم پس از چالش (سن ۴۰ روزگی)، پنج قطعه جوجه از هر گروه (به‌جز گروه شش که به‌دلیل عدم واکسیناسیون زودتر تلف شدند) به‌صورت اتانازی (Euthanasia) کشته شدند. انتخاب پرندگان برای نمونه‌گیری به‌صورت تصادفی از هرگروه انجام شد. از

پرندگان یکسان برای آزمون‌های سرولوژیک و بافتی استفاده شد. به دلیل وقوع تلفات زودرس و اتولیز سریع لاشه‌ها، در همه موارد امکان تهیه نمونه مناسب از بورس فابریسیوس برای بررسی هیستوپاتولوژیک در گروه کنترل مثبت وجود نداشت. در مواردی که امکان‌پذیر بود، نمونه‌ها بلافاصله پس از مرگ جمع‌آوری شدند؛ با این حال، این محدودیت می‌تواند بر مقایسه‌ی مستقیم یافته‌های بافت‌شناسی بین گروه‌ها تأثیر گذاشته باشد. سپس نمونه‌های بافتی از بورس فابریسیوس (Bursa of Fabricius) اخذ گردید. نمونه‌ها فورا در محلول فرمالین بافر ۱۰٪ تثبیت شدند. پس از تثبیت، نمونه‌ها به روش استاندارد (دفورماسیون، شیب‌دهی، تعبیه در واکسن، برش میکروتوم و رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) آماده‌سازی شدند. بررسی میکروسکوپی بافت بورس توسط دو پاتولوژیست با دانش کافی از ضایعات IBD و به‌صورت کور انجام شد. ضایعات هیستوپاتولوژیک بر اساس سیستم نمره‌دهی استاندارد (HLS- Histological Lesion Score) از صفر تا چهار ارزیابی شد:

Score	ضایعات هیستوپاتولوژیک
۰	نرمال، بدون ضایعه
۱	کاهش تعداد لنفوسیت‌ها به صورت خفیف در فولیکول‌ها
۲	کاهش تعداد لنفوسیت‌ها به صورت متوسط
۳	کاهش شدید لنفوسیت‌ها و آتروفی فولیکولی
۴	آتروفی کامل فولیکولی و فیبروز

همچنین، وزن نسبی بورس (نسبت وزن بورس به وزن بدن × ۱۰۰۰) در تمام گروه‌ها قبل از چالش (سن ۳۵روزگی) اندازه‌گیری شد تا از سلامت اولیه بورس اطمینان حاصل شود.

۳. آزمایش مولکولی (Real-time RT-PCR)

از تمام نمونه‌های بورس فابریسیوس (پنج عدد از هر گروه در سن ۴۰ روزگی)، نمونه‌های تازه برای استخراج RNA جمع‌آوری شد. RNA با استفاده از کیت تجاری (RNeasy Mini Kit (Qiagen)) از بافت بورس استخراج شد. سنتز cDNA با استفاده از آنزیم رونوشت بردار معکوس (Reverse Transcriptase) و پرایمرهای اختصاصی براساس ژن VP۲ انجام شد.

سپس، Real-time RT-PCR با استفاده از پرایمرها و پروب‌های اختصاصی برای ژن VP۲ ویروس IBD انجام شد. تکثیر و اندازه‌گیری سیگنال فلورسنت به‌صورت Real-time در دستگاه ترموسایکلر انجام شد. نتایج به صورت میانگین حد آستانه Cycle threshold (Ct) برای هر گروه گزارش شد. آستانه‌ی چرخه‌ی بالاتر نشان‌دهنده‌ی بار ویروسی پایین‌تر و حفاظت بهتر است. واکنش Real-time RT-PCR تا ۴۵ چرخه انجام شد و بر اساس دستورالعمل کیت، مقادیر Ct بالاتر از ۴۰ به‌عنوان نتیجه‌ی منفی یا زیر حد تشخیص قابل اعتماد(Low viral load) در نظر گرفته شدند.

تحلیل آماری

داده‌های حاصل از تیترهای سرولوژیک (HI) و (ELISA)، مقادیر آستانه‌ی چرخه‌ی Real-time RT-PCR و نمرات هیستوپاتولوژیک با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه‌ی ۲۶ تجزیه و تحلیل شدند. نرمال بودن داده‌ها با آزمون شاپیرو-ویلک (Shapiro–

WilkTest) ارزیابی شد. همگنی واریانس‌ها نیز با آزمون Levene ارزیابی گردید. برای متغیرهایی که توزیع نرمال و واریانس‌های همگن داشتند، از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) استفاده شد و مقایسه‌های دو به دو بین گروه‌ها با آزمون تعقیبی Tukey's HSD انجام گرفت. در مواردی که توزیع داده‌ها نرمال بود اما فرض همگنی واریانس‌ها برقرار نبود، از Welch ANOVA استفاده شد و مقایسه‌های چندگانه با آزمون تعقیبی Games–Howell انجام گردید. برای داده‌هایی که از توزیع نرمال تبعیت نمی‌کردند، از آزمون غیرپارامتری Kruskal–Wallis استفاده شد و در صورت مشاهده اختلاف معنی‌دار، مقایسه‌های دو به دو با آزمون Mann–Whitney U همراه با تصحیح Bonferroni انجام شد. نمرات هیستوپاتولوژیک به دلیل ماهیت رتبه‌ای داده‌ها، صرفاً با آزمون‌های غیرپارامتری تحلیل شدند. سطح معنی‌داری آماری در تمامی آزمون‌ها $p < ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد. خطای نمودارها (Error barها) نشان‌دهنده‌ی انحراف معیار (SD) داده‌ها هستند.

رعایت اصول اخلاقی در پژوهش

این مطالعه با رعایت کامل اصول اخلاقی در استفاده از حیوانات آزمایشگاهی و با تأیید کمیته اخلاق دانشگاه تهران انجام شد. تمامی مراحل نمونه‌برداری، واکسیناسیون و چالش تحت شرایط استریل و با حداقل استرس ممکن برای جوجه‌ها انجام شد. در صورت بروز علائم شدید بالینی، جوجه‌ها به سرعت آسان‌کشی شدند.

مقایسه موردنظر در طراحی مطالعه

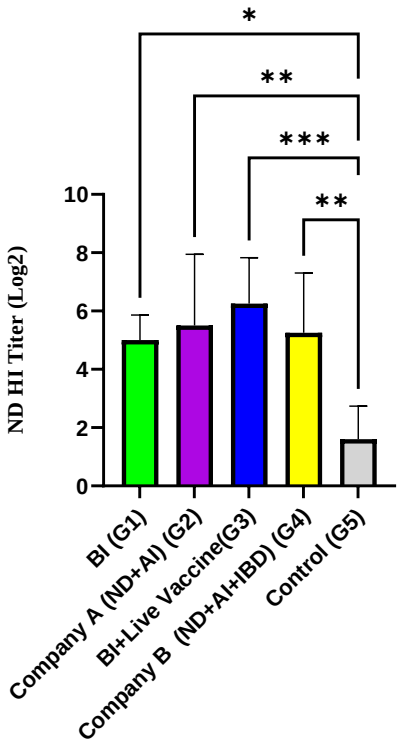
به‌منظور تفسیر هدفمند نتایج، مقایسه بین گروه‌ها براساس سه پرسش اصلی طراحی شد. نخست، مقایسه‌ی گروه یک و گروه سه برای ارزیابی اثر افزودن واکسن زنده IBD به پروتکل حاوی واکسن کشته‌ی سه‌گانه‌ی گالیمون انجام شد تا مشخص‌گردد آیا ترکیب واکسن زنده و کشته موجب تقویت پاسخ ایمنی و حفاظت می‌شود یا خیر. دوم، مقایسه‌ی گروه دو و چهار با هدف بررسی اثر حضور آنتی‌ژن IBD در واکسن کشته‌ی تولید داخل (در شرایطی که هر دو گروه واکسن زنده IBD نیز دریافت کرده بودند) صورت گرفت. این مقایسه، نقش جزء کشته‌ی IBD در ایجاد ایمنی مکمل را ارزیابی می‌کند. سوم، مقایسه‌ی گروه سه و چهار برای مقایسه‌ی عملکرد دو واکسن کشته‌ی متفاوت (Gallimune BI در مقابل واکسن تولید داخل) در یک پروتکل واکسیناسیون مشابه شامل واکسن زنده‌ی IBD طراحی شد. این مقایسه، امکان ارزیابی تفاوت‌های احتمالی در کیفیت آنتی‌ژنی، سویه‌ی واکسن و فرمولاسیون بین دو محصول را فراهم می‌کند. این چارچوب مقایسه‌ای، امکان تفسیر دقیق‌تر تفاوت‌ها در پاسخ‌های سرولوژیک، میزان تکثیر ویروس پس از چالش و شدت ضایعات بافتی را فراهم ساخت.

نتایج:

ارزیابی سرولوژیک پاسخ ایمنی علیه NDV

نتایج حاصل از آزمون‌های سرولوژیک در سن ۳۵روزگی (قبل از چالش) نشان‌دهنده‌ی تفاوتی معنی‌دار در القای پاسخ ایمنی بین گروه‌های مختلف واکسینه بود (شکل ۱). در ارزیابی تیتر آنتی‌بادی علیه ویروس بیماری نیوکاسل (NDV) به روش مهار هماگلوتیناسیون (HI)، گروه سه (تلقیح با واکسن کشته سه‌گانه گالیمون H۹+ND+IBD شرکت بوهرینگر (BI) به‌همراه واکسن زنده‌ی اینترمدیت IBD) با میانگین تیتر ۱/۵۸۱ ± ۶/۲۵۰ بالاترین سطح پاسخ ایمنی را نشان داد. گروه یک (فقط تلقیح با واکسن

کشته سه‌گانه گالیمون (H9+ND+IBD)) نیز با میانگین تیتر ۰/۸۶۶۰ ± ۵/۰۰۰ عملکرد بسیار خوبی داشت و انحراف معیار پایین‌تر آن، بیانگر یکنواختی و ثبات بالای پاسخ ایمنی در سطح گله است. در مقابل، گروه‌های دو (تلقیح با واکسن دوگانه تولید ایران + واکسن زنده IBD) و گروه چهار (واکسن سه‌گانه تولید ایران + واکسن زنده IBD) هر دو با میانگین تیتر ۵/۵۰۰ (۲/۴۴۹ ± ۵/۵۰۰) و ۵/۲۵۰ (۲/۰۵۳ ± ۵/۲۵۰) پاسخ ایمنی متوسطی را ایجاد کردند که پایین‌تر از گروه سه بود. میزان تیتر همه گروه‌ها نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بود ($p<0.005$). گروه کنترل (گروه پنج) کمترین تیتر را با میانگین ۱/۱۴۰ ± ۱/۶۰۰ نشان داد که تأییدکننده عدم القای پاسخ ایمنی در غیاب واکسیناسیون است.



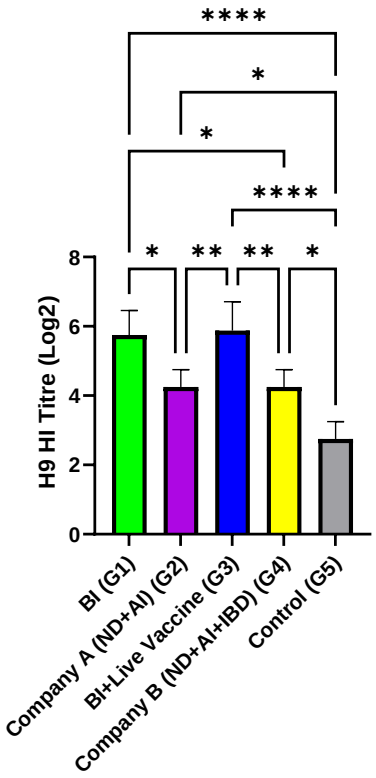
	BI (G1)	Company A (ND+AI) (G2)	BI+Live Vaccine(G3)	Company B (ND+AI+IBD) (G4)	Control (G5)
Mean	5.000	5.500	6.250	5.250	1.600
Std. Deviation	0.8660	2.449	1.581	2.053	1.140
Std. Error of Mean	0.2887	0.8660	0.5590	0.7258	0.5099

شکل ۱. میانگین تیتر آنتی‌بادی علیه ویروس بیماری نیوکاسل در گروه‌های مورد مطالعه در ۳۵روزگی به روش HI

پاسخ سرولوژی علیه ویروس آنفلوانزا H۹N۲

در مورد پاسخ ایمنی علیه ویروس آنفلوانزای H۹N۲، الگوی مشابهی مشاهده‌شد (شکل۲). گروه سه با میانگین تیتر ۵/۸۷۵ ± ۰/۸۳۴۵ و گروه یک با میانگین ۵/۷۵۰ ± ۰/۷۰۷۱ به‌ترتیب دارای بالاترین و دومین رتبه میانگین تیتر بودند. این نتایج نشان می‌دهد که واکسن کشته سه‌گانه گالیمون ((H9+ND+IBD (BI) به دلیل بروز شدن سویه‌ی واکسینال H۹N۲ به‌کار رفته در آن، به طور قابل توجهی قادر به القای پاسخ ایمنی قوی علیه آنتی ژن H۹ می‌باشد. گروه‌های دو و چهار نیز پاسخ ایمنی قابل قبولی

با میانگین تیتر ۰/۵۰۰۰ ± ۴/۲۵۰ ایجاد کردند، اما به طور معنی‌داری ضعیف‌تر از گروه‌های حاوی واکسن گالیمون بودند (۰/۰۵ >p).



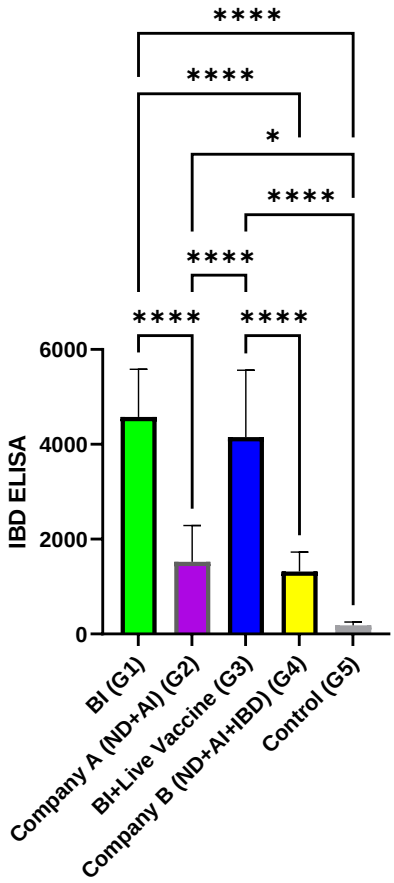
	BI (G1)	Company A (ND+AI) (G2)	BI+Live Vaccine (G3)	Company B (ND+AI+IBD) (G4)	Control (G5)
Mean	5.750	4.250	5.875	4.250	2.750
Std. Deviation	0.7071	0.5000	0.8345	0.5000	0.5000
Std. Error of Mean	0.2500	0.2500	0.2950	0.2500	0.2500
Coefficient of variation	12.30%	11.76%	14.20%	11.76%	18.18%

شکل ۲. میانگین تیتر آنتی‌بادی علیه ساب تایپ H۹ ویروس آنفلوانزا در گروه‌های مورد مطالعه در سن ۳۵روزگی به روش HI

پاسخ سرولوژی علیه ویروس بیماری گامبورو

مهمترین تفاوت در پاسخ ایمنی علیه ویروس بیماری بورس عفونی (IBDV) مشاهده گردید (شکل ۳). در ابتدای دوره‌ی پرورش، وجود آنتی‌بادی مادری علیه IBDV به‌صورت کیفی تایید شد، اما اندازه‌گیری کمی تیتر MDA انجام نشد. بنابراین، این امکان تداخل آنتی‌بادی‌های مادری با پاسخ به واکسن زنده IBDV را نمی‌توان به‌طور کامل رد کرد. این موضوع به‌عنوان یکی از محدودیت‌های مطالعه در تفسیر پاسخ ایمنی در نظر گرفته می‌شود. نتایج آزمون الایزا (ELISA) نشان داد که گروه یک (فقط تلقیح با واکسن کشته گالیمون) با میانگین تیتر ۱۰۰۷ ± ۴۵۷۷ و گروه سه (تلقیح با واکسن کشته‌ی گالیمون + واکسن زنده‌ی اینترمدیت IBD) با میانگین (۱۴۱۱ ± ۴۱۵۳) به‌طور معنی‌داری تیترهای آنتی‌بادی بالاتری نسبت به سایر گروه‌ها داشتند (p <۰.۰۰۱). در مقابل، گروه ۴ (واکسن سه‌گانه تولید ایران + واکسن زنده) و گروه ۲ (واکسن دوگانه‌ی تولید ایران + واکسن زنده) به ترتیب با میانگین تیتر

۴۰۸/۸ ± ۱۳۱۸ و ۷۶۵/۰ ± ۱۵۲۰، پاسخ ایمنی بسیار ضعیف‌تری را نشان دادند. این نتایج حاکی از آن است که تفاوت‌های مشاهده‌شده در پاسخ ایمنی و حفاظت، ممکن است به ویژگی‌های آنتی‌ژنی یا نحوه‌ی فرمولاسیون سویه‌ی VNJO به‌کار رفته در واکسن Gallimune H۹ +ND+IBD(BI) مرتبط باشد.



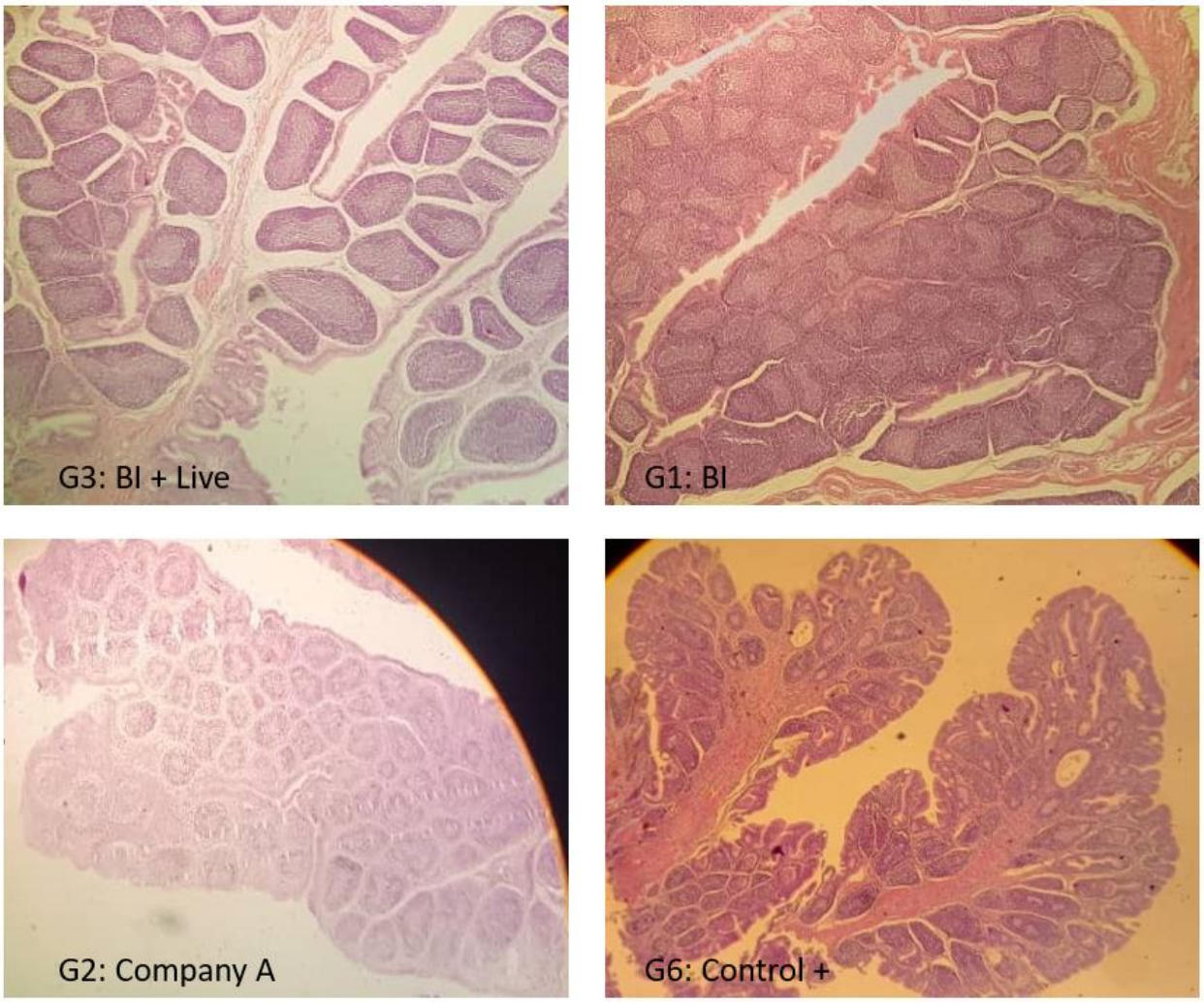
	BI (G1)	Company A (ND+AI) (G2)	BI+Live Vaccine (G3)	Company B (ND+AI+IBD) (G4)	Control (G5)
Mean	4577	1520	4153	1318	181.0
Std. Deviation	1007	765.0	1411	408.8	73.73
Std. Error of Mean	356.0	241.9	470.4	129.3	30.10

شکل ۳. میانگین تیتر آنتی‌بادی علیه ویروس بیماری بورس عفونی به روش الایزا با کیت تجاری Biocheck در سن ۳۵روزگی

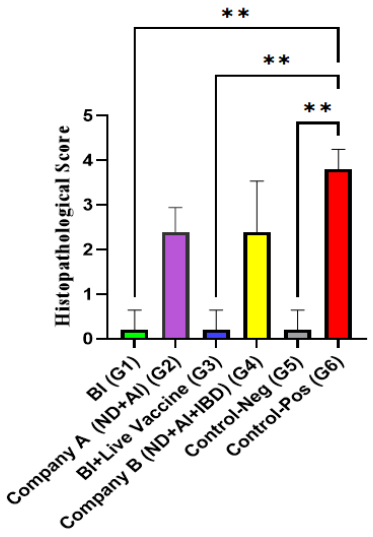
ارزیابی هیستوپاتولوژیک ضایعات بورس فابریسیوس

پنج روز پس از چالش با ویروس حاد گامبورو (vvIBD)، نمونه‌های بافتی بورس فابریسیوس از پنج قطعه جوجه از هر گروه جمع‌آوری و از نظر هیستوپاتولوژیک ارزیابی گردید (شکل ۴). گروه کنترل مثبت (گروه شش)، که واکسینه نشده‌بود، بیش‌ترین میزان آسیب بافتی را با میانگین نمره ۰/۴۵ ± ۳/۸۰ نشان‌داد که بیانگر تخریب شدید فولیکول‌های لنفاوی و کاهش تعداد لنفوسیت‌ها است. این نمره به‌طور معنی‌داری بالاتر از تمام گروه‌های واکسینه شده بود ($p < ۰/۰۱$).

در گروه‌های واکسینه، تفاوت قابل توجهی در شدت آسیب بافتی بورس مشاهده‌شد. گروه‌های یک (واکسینه شده با واکسن کشته‌ی گالیمون) و سه (واکسینه شده با واکسن کشته‌ی گالیمون به‌همراه واکسن زنده)، به‌همراه گروه کنترل منفی (گروه پنج)، کم‌ترین میزان آسیب بافتی را نشان دادند؛ به‌طوری که میانگین نمره‌ی آسیب بافتی در این گروه ها برابر با ۰/۴۵± ۰/۲۰ بود. این نمره بیانگر عدم وجود یا وجود ضایعات بسیار خفیف در بافت بورس است که نشان‌دهنده‌ی حفاظت بسیار مطلوب در برابر چالش با ویروس و نیز محافظت مؤثر بورس توسط تیتر بالای آنتی‌بادی هومورال علیه ویروس گامبورو می‌باشد. این مقادیر به‌طور معنی‌داری با نتایج گروه‌های دو، چهار و شش تفاوت داشتند ($p < ۰/۰۱$). در مقابل، گروه دو (تلقیح با واکسن دوگانه‌ی تولید ایران + واکسن زنده) و گروه چهار (تلقیح با واکسن سه گانه‌ی تولید ایران + واکسن زنده) به‌ترتیب با میانگین نمره‌ی ۰/۵۵ ± ۲/۴۰ و ۱/۱۴ ± ۲/۴۰، ضایعات بافتی متوسط تا شدیدی را نشان دادند که بیانگر عدم حفاظت کافی در برابر چالش است (شکل ۵). نتایج حاضر نشان می‌دهد که در شرایط این مطالعه، واکسن‌های تولید ایران سطح حفاظت بافتی پایین‌تری در برابر چالش vvIBD ایجاد کرده‌اند، اگرچه تعیین علت دقیق این تفاوت نیازمند بررسی‌های تکمیلی است.



شکل ۴. ارزیابی هیستوپاتولوژی ضایعات بورس فابریسیوس پنج روز پس از چالش با ویروس حاد گامبورو (vvIBD) درگروه‌های جوجه‌های واکسینه و کنترل مثبت.



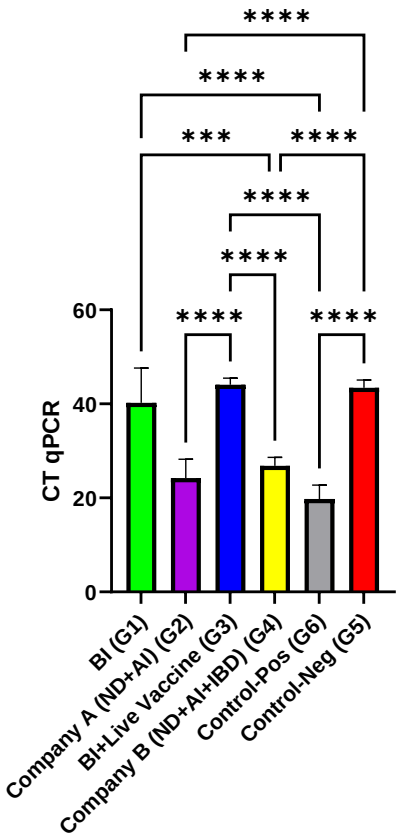
	BI (G1)	Company A (ND+AI) (G2)	BI+Live Vaccine (G3)	Company B (ND+AI+IBD) (G4)	Control-Neg (G5)	Control-Pos (G6)
Mean	0.2000	2.400	0.2000	2.400	0.2000	3.800
Std. Deviation	0.4472	0.5477	0.4472	1.140	0.4472	0.4472
Std. Error of Mean	0.2000	0.2449	0.2000	0.5099	0.2000	0.2000

شکل ۵. میانگین امتیاز ضایعات پاتولوژی بافت بورس فابریسیوس، پنج روز بعد از چالش با ویروس vvIBD در کلیه‌ی گروه‌های مورد مطالعه در جداول فوق نشان داده‌شده است.

ارزیابی مولکولی (Real-time RT-PCR)

برای تعیین بار ویروسی در بافت بورس فابریسیوس پس از چالش، از روش Real-time RT-PCR استفاده شد و نتایج بر اساس میانگین آستانه‌ی چرخه‌ی Cycle threshold (Ct) گزارش گردید (شکل ۶). تعداد کل چرخه‌ها در این آزمون ۴۵ سیکل در نظر گرفته شد. بر اساس دستورالعمل کیت مورد استفاده، مقادیر Ct بالاتر از ۴۰ به‌عنوان منفی یا خارج از محدوده‌ی تشخیص قابل اعتماد تفسیر شدند. در برخی نمونه‌ها که تکثیر اختصاصی ویروس مشاهده نشد، دستگاه مقادیر Ct را در چرخه‌های پایانی (نزدیک به ۴۵) ثبت نمود. این مقادیر از نظر بیولوژیک به‌عنوان عدم تکثیر قابل تشخیص ویروس در نظر گرفته شدند و نه بار ویروسی قابل اندازه‌گیری کمّی.گروه کنترل مثبت (گروه شش) کمترین میانگین آستانه‌ی چرخه‌ی (Ct) را با ۲/۹۱ ± ۱۹/۸۰ داشت که نشان‌دهنده بار ویروسی بسیار بالا و تکثیر فعال ویروس در بافت بورس است. در مقابل، گروه سه (تلقیح با واکسن کشته‌ی گالیمون + واکسن زنده) با میانگین آستانه‌ی چرخه‌ی (Ct) ۱/۴۰ ± ۴۴/۰۶ و گروه یک (فقط تلقیح با واکسن کشته‌ی گالیمون) با میانگین آستانه‌ی چرخه‌ی (Ct) ۷/۴۰ ± ۴۰/۲۳، بالاترین مقادیر آستانه‌ی چرخه‌ای (Ct) را نشان دادند که بیانگر کاهش شدید بار ویروسی و تقریباً عدم تکثیر ویروس می‌باشد. بنابراین گروه یک و سه از نظر ویروسی عملاً منفی یا دارای بار ویروسی ناچیز و غیرقابل اندازه‌گیری کمّی تلقی شدند. این مقادیر با گروه‌های دیگر به‌طور معنی‌داری متفاوت بود ($p < ۰/۰۰۰۱$).گروه دو و گروه چهار به ترتیب با میانگین آستانه‌ی چرخه‌ی (Ct) ۴/۰۰ ± ۲۴/۲۴ و ۱/۸۰ ± ۲۶/۸۳ ، بار ویروسی قابل‌توجهی را نشان دادند که بیانگر تکثیر فعال

ویروس در بافت بورس می‌باشد. این یافته‌ها با نتایج هیستوپاتولوژی و سرولوژی همخوانی کامل داشته است. این تفاوت‌ها ممکن است بازتابی از اختلاف در جرم آنتی‌ژنی، پایداری آنتی‌ژن یا کیفیت فرمولاسیون واکسن‌ها باشد. از آنجا که در این مطالعه اندازه‌گیری مستقیمی از جرم آنتی‌ژنی یا یکنواختی بچ‌های واکسن انجام نشده است، تفسیر نتایج به شاخص‌های غیرمستقیم ایمنی‌زایی و حفاظت محدود می‌گردد.



	BI (G1)	Company A (ND+AI) (G2)	BI+Live Vaccine (G3)	Company B (ND+AI+IBD) (G4)	Control-Pos (G6)	Control-Neg (G5)
Mean	40.23	24.24	44.06	26.83	19.80	43.44
Std. Deviation	7.404	4.002	1.404	1.796	2.907	1.656
Std. Error of Mean	3.311	1.790	0.6277	0.8031	1.300	0.7405

شکل ۶. ارزیابی میزان CT (بار ویروسی) ۵ روز بعد از چالش با ویروس vvIBD به روش PCR دربورس جوجه‌های گروه واکسینه و گروه‌های کنترل مثبت و منفی

تلفات و میانگین زمان مرگ

در ارزیابی نرخ بقا پس از چالش با ویروس vvI BD ، گروه ۶ (کنترل مثبت/چالش بدون واکسیناسیون) بالاترین میزان حساسیت را نشان داد؛ به‌طوری‌که تلفات در این گروه از روز ۲ پس از چالش آغاز گردید و تا روز ۵ به ۱۰۰ درصد رسید. میانگین زمان مرگ (Mean Time to Death) در این گروه ۳/۵ روز ثبت شد. پرندگان در این گروه پیش از مرگ علائم شدید بالینی شامل افسردگی

حاد، بی‌اشتهایی، اسهال سفید و لرزش را نشان دادند. به دلیل سرعت بالای تلفات و تخریب کامل بافت بورس در اثر ویروس بسیار حاد، امکان انجام ارزیابی‌های مقایسه‌ای هیستوپاتولوژیک و مولکولی در روز ۴۰ برای این گروه میسر نگردید. در مقابل، در سایر گروه‌های واکسینه شده با واکسن های وارداتی، نرخ بقا ۱۰۰ درصد بود و هیچ‌گونه تلفاتی تا پایان دوره‌ی مطالعه مشاهده نشد که نشان‌دهنده‌ی توانایی پروتکل‌های واکسیناسیون در جلوگیری از مرگ‌ومیر ناشی از سویه‌ی vvI BD است.

بحث و نتیجه‌گیری

یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که واکسن کشته‌ی سه‌گانه گالیمون (Boehringer Ingelheim)H۹+ND+IBD در شرایط این پژوهش، در مقایسه با واکسن‌های ترکیبی تولید ایران، پاسخ ایمنی هومورال بالاتر و سطح حفاظت موثرتری در برابر چالش با یک سویه بسیار حاد ویروس گامبورو (vvIBD) ایجاد کرده است. این تفاوت‌ها به‌طور هم‌زمان در ارزیابی‌های سرولوژیک، هیستوپاتولوژیک و مولکولی مشاهده شد. به‌طور مشخص، گروه‌های دریافت‌کننده واکسن Gallimune H۹+ND+IBD (BI)(گروه‌های یک و سه) بالاترین تیترهای آنتی‌بادی علیه IBD را نشان دادند و پس از چالش، با بار ویروسی بسیار پایین و نمرات هیستوپاتولوژیک نزدیک به حد طبیعی همراه بودند.

در مقابل، گروه دریافت‌کننده‌ی واکسن تولید ایران (گروه چهار)، علی‌رغم استفاده از آنتی‌ژن IBD در فرمولاسیون خود، پاسخ ایمنی متوسط‌تری القا کردند و پس از چالش، بار ویروسی قابل‌توجه و ضایعات بافتی شدیدی را تجربه کردند. این تفاوت در عملکرد واکسن‌ها ممکن است بازتابی از اختلاف در ویژگی‌های آنتی‌ژنی، جرم آنتی‌ژنی، یا فرمولاسیون واکسن‌های مورد استفاده باشد، هرچند در این مطالعه، اندازه‌گیری مستقیمی از این پارامترها انجام نشده‌است. واکسن گالیمون H۹+ND+IBD حاوی سویه‌ی VNJO از ویروس IBD است که به‌عنوان یک سویه‌ی با حدت متوسط (Intermediate) با ایمنی‌زایی مناسب شناخته شده و به‌طور گسترده در سراسر جهان به عنوان یک واکسن کشته‌ی مؤثر استفاده می‌شود. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که آنتی‌ژنیسیته و پایداری فرمولاسیون واکسن‌های کشته، نقشی تعیین‌کننده در ایجاد حفاظت طولانی مدت دارد (۱۲). در مقابل، عملکرد ضعیف‌تر واکسن‌های تولید ایران در این مطالعه ممکن است بازتابی از تفاوت در فرایندهای تولید، جرم آنتی‌ژنی یا فرمولاسیون آنتی‌ژنی باشد و تعیین علت دقیق این تفاوت‌ها مستلزم انجام بررسی‌های تکمیلی است. این یافته با گزارش‌های بالینی از شیوع IBD در گله‌های واکسینه شده با واکسن‌های داخلی در ایران همخوانی دارد و تأیید می‌کند که کیفیت واکسن یک عامل کلیدی در کنترل بیماری است (۱۱).

در این مطالعه، افزودن واکسن زنده‌ی اینترمدیت گامبورو به پروتکل واکسیناسیون، تأثیر معنی‌داری بر پاسخ ایمنی یا حفاظت در گروه سه نسبت به گروه یک نداشت. این نتیجه می‌تواند به دو دلیل اصلی نسبت داده‌شود: اول، واکسن کشته گالیمون به تنهایی قادر به القای پاسخ ایمنی بسیار قوی و محافظتی بوده، به‌طوری که اضافه کردن واکسن زنده تأثیر قابل توجهی بر آن نمی‌گذارد. دوم، زمان‌بندی و توالی واکسیناسیون (واکسن کشته در سن هشت‌روزگی و سپس واکسن زنده در ۱۷ و ۲۴روزگی) ممکن است بهینه نبوده باشد. مطالعات نشان داده‌اند که واکسن‌های زنده‌ی اینترمدیت باید پس از کاهش آنتی‌بادی مادری و قبل از رسیدن به سن حساسیت بالا به ویروس وحشی مصرف شوند، و مصرف آن‌ها طی مدت کوتاهی پس از واکسن کشته ممکن است موجب مهار اثر آن‌ها توسط آنتی‌بادی القاشده توسط واکسن کشته شود (۴). بر این اساس، در شرایط این مطالعه، استفاده از واکسن کشته با کیفیت مناسب به‌تنهایی توانسته سطح حفاظت قابل‌قبولی ایجاد کند، هرچند تعمیم این نتیجه به سایر شرایط نیازمند احتیاط است.

جوجه‌های گوشتی در مصر و خاورمیانه تقریباً همیشه از گله‌های مولد گوشتی به‌دست می‌آیند که علیه ویروس H۹N۲ واکسینه شده‌اند. بنابراین، اکثریت قریب به اتفاق جوجه‌های یک روزه‌ی گوشتی تولید شده در این منطقه دارای آنتی‌بادی مادری (MDA) علیه H۹N۲ هستند که استفاده از واکسن‌های غیرفعال H۹N۲ را با مشکل مواجه می‌کند. نتایج مطالعه‌ی **Elfeil** و همکاران نشان داد که واکسیناسیون در روز هفتم زندگی، بدون توجه به نوع واکسن، پاسخ ایمنی بالاتری نسبت به روز اول ایجاد می‌کند. این امر به تداخل ایمنی مادری با واکسن در روز اول و به‌ویژه تیتر بالای MDA نسبت داده‌شد. واکسن MEFLUVAC-H۹ND-۱۶ که دارای جرم آنتی‌ژنی بالاتری (۳۵۰ HAU) بود، نسبت به واکسن Gallimune۲۰۸ H۹ND (حدود ۲۰۰ HAU) در هر دو سن تزریق، پاسخ ایمنی بهتری ایجاد کرد. همچنین، تزریق واکسن MEFLUVAC-H۹ND-۱۶ در روز هفتم به طور معنی‌داری دفع ویروس را در روزهای سه و هفت پس از چالش کاهش داد، در حالی که واکسن Gallimune۲۰۸ H۹ND چنین اثری را کم‌تر نشان‌داد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که انتخاب زمان مناسب واکسیناسیون و استفاده از واکسن با جرم آنتی‌ژنی بالا می‌تواند در کنترل انتشار ویروس H۹N۲ نقش مهمی داشته‌باشد. همچنین، در شرایط مزرعه، پاسخ ایمنی به‌طور متوسط ۷ تا ۲۵ درصد کمتر از شرایط آزمایشگاهی بود که اهمیت ارزیابی واکسن‌ها در شرایط واقعی پرورش را برجسته می‌سازد. این نتایج نشان می‌دهد که انتخاب زمان مناسب واکسیناسیون و استفاده از واکسن‌های با جرم آنتی‌ژنی بالا می‌تواند در بهبود پاسخ ایمنی و کنترل ویروس H۹N۲ در جوجه‌های گوشتی مؤثر باشد (۱۳-۱۶).

در مطالعه‌ی انجام شده توسط **YOUNIS, Z. T** و **ISIHAK, F. A** در گروه واکسیناسیون Gallimune H۹+ND+IBD (BI)، مشاهده شد که این واکسن قادر به تحریک پاسخ آنتی‌بادی علیه ویروس نیوکاسل بود؛ اما نسبت به واکسن‌هایی مانند QVAC و Poul Shot در برخی مقاطع ضعیف‌تر عمل کرد. همچنین این واکسن در پاسخ به آنتی‌ژنH۹N۲ نیز عملکرد متوسطی داشته و یکنواختی پاسخ مطالعه شده در میان پرندگان کم‌تر بود (ضریب تغییرپذیری بالا)، برخلاف واکسن گروه ششم (Nobilis H۹N۲+ND P) که علاوه بر پاسخ قوی، یکنواختی بالایی را نشانداد. همچنین، عملکرد رشد جوجه‌ها تحت واکسیناسیون Gallimune H۹+ND+IBD (BI) قابل‌قبول بود، اما مزیت قابل‌توجهی نسبت به دیگر گروه‌ها ارائه نکرد (۱۷).

در مطالعه‌ای در پاکستان، اثربخشی واکسن‌های وارداتی و تولید داخل آنفلوانزای پرندگان در جوجه‌های گوشتی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان‌داد که واکسن های وارداتی مانند Gallimune H۹+ND+IBD (BI) و Flu-Vac H۷ توانستند پاسخ ایمنی قوی‌تری نسبت به واکسن‌های تولید پاکستان ایجاد کنند، به‌طوری که تیترهای HI در روز ۲۱ پس از واکسیناسیون به‌طور قابل توجهی بالاتر بود. میانگین تیتر آنتی‌بادی در روز ۲۱ پس از واکسیناسیون در گروه های مختلف بین ۲۹/۹ تا ۵۹/۷ متغیر بود، در حالی که گروه کنترل دارای تیتر بسیار ناچیزی بود که ناشی از ایمنی مادری تلقی شد. این یافته‌ها بر اهمیت انتخاب واکسن مناسب براساس ترکیب آنتی‌ژنی و قابلیت تحریک پاسخ ایمنی تأکید دارد (۱۸).

همچنین، این یافته‌ها اهمیت انتخاب صحیح پروتکل واکسیناسیون را در برابر فشار بالای بیماری در صنعت طیور ایران برجسته می‌سازد. استفاده از واکسن‌های کشته ترکیبی با کیفیت بالا، علاوه بر کاهش استرس ناشی از تزریق‌های متعدد، می‌تواند به‌طور قابل توجهی از انتشار ویروس در سطح مزرعه جلوگیری کند. کاهش بار ویروسی در بورس، نه تنها حفاظت فردی جوجه را تضمین می‌کند، بلکه خطر آلوده کردن گله‌های دیگر از طریق انتشار ترشحات را نیز کاهش می‌دهد. این امر برای مدیریت بیماری در سطح مزرعه و منطقه حیاتی است (۱۹, ۲۰).

در نهایت، این مطالعه تأکید می‌کند که کنترل IBD تنها با واکسیناسیون ممکن نیست و واکسیناسیون باید در رویکردی یکپارچه شامل بهداشت، امنیت زیستی و مدیریت استرس گنجانده شود. با این‌حال، انتخاب واکسنی با ویژگی‌های آنتی‌ژنی و فرمولاسیون مناسب، سنگ بنای اولیه‌ی این استراتژی است. نتایج این پژوهش پیشنهاد می‌کند که مراکز نظارتی و تولیدکنندگان واکسن در ایران باید بر کیفیت و اثربخشی محصولات خود تمرکز کرده و از استانداردهای بین‌المللی برای تضمین حفاظت واقعی در برابر بیماری‌های ویروسی مهم مانند IBD پیروی نمایند.

نتایج ترکیبی این مطالعه نشان می‌دهد که واکسن کشته سه‌گانه گالیمونIBD+ND+H۹ (Boehringer Ingelheim) در شرایط این پژوهش توانسته است پاسخ ایمنی هومورال مناسبی علیه H۹، IBD و ND القا کرده به‌طور معنی‌داری از واکسن‌های ترکیبی تولید ایران در القای پاسخ ایمنی سه‌گانه IBD، H۹، ND و سطح حفاظت مؤثری در برابر چالش با سویه‌ی بسیار حاد ویروس گامبورو (vvIBD)ایجاد کند. در این چارچوب، افزودن واکسن زنده اینترمدیت گامبورو به پروتکل واکسیناسیون منجر به بهبود معنی‌دار پاسخ ایمنی یا حفاظت نشد ($P>۰/۰۵$) که می‌تواند با قدرت ایمنی‌زایی بالای واکسن کشته‌ی مورد استفاده یا زمان‌بندی واکسیناسیون مرتبط باشد. در مقابل، واکسن‌های ترکیبی تولید ایران در این مطالعه سطح پایین‌تری از پاسخ ایمنی و حفاظت را نشان دادند؛ با این حال، تفسیر این تفاوت‌ها باید با احتیاط انجام شود، زیرا تعیین علت دقیق آن‌ها مستلزم انجام بررسی‌های تکمیلی از جمله اندازه‌گیری جرم آنتی‌ژنی، یکنواختی بچ‌ها و کیفیت فرمولاسیون واکسن‌ها است.

یکی از محدودیت‌های این مطالعه، عدم اندازه‌گیری کمی سطح آنتی‌بادی مادری (MDA) علیه بیماری گامبورو در آغاز دوره‌ی پرورش (روز اول یا روز هفتم) بود. با وجود آن‌که جوجه‌ها از گله‌های مادری واکسینه‌شده تهیه شده و وجود MDA به‌صورت کیفی تایید گردید، نبود داده‌های کمی می‌تواند تفسیر دقیق پاسخ ایمنی به واکسن زنده‌ی اینترمدیت و حتی واکسن کشته را تحت تاثیر قرار دهد، به‌ویژه از نظر تداخل ایمنی مادری با زمان‌بندی واکسیناسیون. از این‌رو، نتایج این مطالعه باید با درنظر گرفتن این محدودیت تفسیر شوند و انجام مطالعات آینده با اندازه‌گیری دقیق MDA در مراحل ابتدایی پرورش توصیه می‌شود.

تعارض منافع

نگارندگان این مقاله اعلام می دارند که در رابطه با نگارش و چاپ مقاله هیچ گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

منابع:

1. Franciosini MP, Davidson I. A walk through Gumboro disease. Poultry. 2022;1(4):229-42.

2.Eterradossi N, Saif YM. Infectious bursal disease. Diseases of poultry. 2013:219-46.

3.Jackwood DJ, Sommer-Wagner S. Genetic characteristics of infectious bursal disease viruses from four continents. Virology. 2007;365(2):369-75.

4.Van den Berg H, Faulks R, Granado HF, Hirschberg J, Olmedilla B, Sandmann G, *et al*. The potential for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2000;80(7):880-912.

5.Boudaoud A, Mamache B, Tombari W, Ghram A. Virus mutations and their impact on vaccination against infectious bursal disease. Rev Sci Tech. 2016;35(3):875-97.

6.Najafi H, Hosseini H, Kasaee M, Aghaiyan L, ZiafatiKafi Z, Hajizamani N, *et al*. Molecular characterization of a very virulent Infectious Bursal Disease Virus from Iran demonstrates its similarity with recent isolates from the Middle East. Iranian Journal of Virology. 2018;12(2):1-5.

7.Norouzian H, Farjanikish G, Hosseini H. Genetic and pathologic characteristics of infectious bursal disease viruses isolated from broiler chickens in Iran during 2014–2015. Acta Virol. 2017;61(2):191-6 [In Persian].
8.Alam J, Rahman M, Sil B, Khan M, Sarker M. Effect of maternally derived antibody on vaccination against infectious bursal disease with live vaccine in broiler. International Journal of Poultry Science. 2002;1(4):98-101.
9.De Wit J. Gumboro disease: estimation of optimal time of vaccination by the Deventer formula. Annual report and proceedings of COST Action. 2001;839:170-8.
10.Isihak FA, Ismail HK, Wahid AA. Comparison study between the efficacy of immune complex and conventionally live vaccine against Gumboro disease in broilers. 2021[In Persian].
11.Ebrahimi M, Yousefi A, Zaghari M, Bassami M. Comparison of the immunogenicity of four infectious bursal disease intermediate vaccines in commercial broiler flocks in Iran: A Field Trial Study. Archives of Razi Institute. 2020;75(2):205[In Persian].
12.Lasher H, Shane S. Infectious bursal disease. World's Poultry Science Journal. 1994;50(2):133-66.
13.Nagy A, Mettenleiter TC, Abdelwhab E. A brief summary of the epidemiology and genetic relatedness of avian influenza H9N2 virus in birds and mammals in the Middle East and North Africa. Epidemiology & Infection. 2017;145(16):3320-33.
14.Elfeil W, Abouelmaatti R, Diab M, Mandour M, Rady M. Experimental infection of chickens by avian influenza H9N2 virus: monitoring of tissue tropism and pathogenicity. J Egypt Vet Med Assoc. 2018;78(3):369-83.
15.Sultan HA, Talaat S, Elfeil WK, Selim K, Kutkat MA, Amer SA, *et al.* Protective efficacy of the Newcastle disease virus genotype VII-matched vaccine in commercial layers. Poult Sci. 2020;99(3):1275-86.
16.Kilany WH, Ali A, Bazid AH, El-Deeb AH, El-Abideen MA, Sayed ME, *et al.* A Dose-Response Study of Inactivated Low Pathogenic Avian Influenza H9N2 Virus in Specific-Pathogen-Free and Commercial Broiler Chickens. Avian Dis. 2016;60(1 Suppl):256-61.
17.Younis Z, Isihak F. Immunological assessment and homogeneity of commercial inactivated bivalent Newcastle and avian influenza H9N2 vaccines in broilers. Iraqi Journal of Veterinary Sciences. 2025;39(3):501-10.
18.Shaukat T, Muneer M, Ahmad M, Maqbool A, Shaukat T. Efficacy of avian influenza virus locally manufactured and imported vaccines. 2016.
19.Sun Y, Pu J, Fan L, Sun H, Wang J, Zhang Y, *et al*. Evaluation of the protective efficacy of a commercial vaccine against different antigenic groups of H9N2 influenza viruses in chickens. Veterinary microbiology. 2012;156(1-2):193-9.
20.Pan X, Su X, Ding P, Zhao J, Cui H, Yan D, *et al*. Maternal-derived antibodies hinder the antibody response to H9N2 AIV inactivated vaccine in the field. Animal Diseases. 2022;2(1):9.

Comparison of the Efficacy of Different Combined Vaccination Protocols Against Newcastle Disease, H9 Avian Influenza and Gumboro Disease (IBD) in Broiler Chickens: A Serological, Histopathological and Molecular Evaluation

Arash Ghalyanchi Langeroudi[*1]; Hossein Hosseini [2]; Zahra Ziafati Kafi [3]; Fahime Jamiri[4]; Alireza Bakhshi [4]; Seyed Alireza Rezaei [5]; Amitis Sadighi [6]; Mahtab Heydarpour [6]; Seyed Mani Mehrnia [6]

1. Professor, Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

2. Associate Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj, Iran

3. Assistant Professor, Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

4. Virology Ph.D student, Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

1. Doctor of Veterinary Medicine, Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

1. Doctor of Veterinary Medicine student, Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

* **Corresponding author**: Dr. Arash Ghalyanchi Langeroudi, specialized in DVSc. of Avian Health and Diseases - Address Tehran, Azadi St., Dr. Gharib St., Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Department of Microbiology and Immunology – Tel: 021-6117154– Fax:– Email: Arashghalyanchi@gmail.com

Abstract

Infectious Bursal Disease (IBD), Newcastle Disease (ND), and low-pathogenic Avian Influenza (H9) pose significant economic threats to the global poultry industry. Despite widespread vaccination efforts, outbreaks of highly virulent Infectious Bursal Disease Virus (vvIBDV) continue, leading to uncertainty about optimal vaccination strategies, especially regarding the synergistic effects of combined vaccines and the relative effectiveness of domestic versus international formulations. This study evaluated the humoral immune response and protective efficacy of different vaccination protocols, comparing international triple-inactivated vaccines (H9 + ND + IBD) with domestic formulations, administered with or without an additional live intermediate IBD vaccine. A total of 180 Ross-308 broiler chickens were divided into six experimental groups. Inactivated vaccines were administered on Day 8, followed by live intermediate Gumboro vaccination on Days 17 and 24 when applicable. All groups were challenged with vvIBDV on Day 35. Vaccine efficacy was assessed using ELISA and HI serology, viral load quantification in the bursa of Fabricius by RT-qPCR (C_t values), and histopathological evaluation of lymphoid depletion. The highest level

of protection was observed in broilers receiving the international inactivated vaccine combined with a live intermediate vaccine, characterized by a strong humoral response (ELISA titer = 4153) and markedly reduced viral replication (C_t = 44.06). Notably, although the international inactivated vaccine alone provided substantial protection (ELISA titer = 4577), adding a live vaccine did not yield a statistically significant improvement ($P > 0.05$), suggesting that high-potency inactivated antigens may independently provide effective protection. Conversely, domestic Iranian vaccine formulations induced significantly lower immunogenicity and higher bursal lesion scores, revealing a pronounced efficacy gap compared to international products. These findings indicate that although combined live-inactivated vaccination strategies provide broad protection, the overall success of vvIBDV control programs is largely determined by the antigenic mass and the quality of the inactivated vaccine formulation. Enhancing the potency and consistency of domestic vaccines is therefore essential to achieve effective and sustainable control of vvIBDV in endemic regions.

Keywords: Infectious Bursal Disease; Activated Vaccine; Inactivated Vaccine; Histopathology; Real-time RT-PCR