دانشگاه زنجان

باسمه تعالی

شماره : ۱۶۸۵۳
تاریخ ۹۰/۴/۲۹

صورتجلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد

با تأییدات خداوند متعال و با استعانت از حضرت ولی عصر (عج) جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد آقای/خانم **رباب حسینی کرندق** رشته **علوم دامی** گرایش **مدیریت دامپروری** تحت عنوان **ارزیابی ایمنی سرمی ایجاد شده متعاقب واکسیناسیون علیه لارنگوتراکئیت عفونی در پولت های نژاد بوونز و های لاین w36 با آزمایش های سرولوژی** در تاریخ **۹۰/۴/۲۸** با حضور هیأت محترم داوران در دانشگاه زنجان برگزار گردید و نظر هیأت داوران بشرح زیر می باشد :

☐ قبول (با درجه : عالی امتیاز : ۱۸/۵) دفاع مجدد ☐ مردود ☐

۱- عالی (۲۰-۱۸)

۲- بسیار خوب (۱۷/۹۹-۱۶)

۳- خوب (۱۵/۹۹-۱۴)

۴- قابل قبول (۱۳/۹۹-۱۲)

عضو هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	رتبه علمی	امضاء
۱- استاد راهنما	دکتر مراد پاشا اسکندری نسب	دانشیار	
۲- استاد راهنما	دکتر محمد مجید ابراهیمی	استادیار	
۳- استاد ممتحن	دکتر محمد طاهر هرکی نژاد	استادیار	
۴- استاد ممتحن	دکتر حمید رضا طاهری	استادیار	
۵- نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر مجید شاهمرادی	استادیار	

دکتر علی شمس

معاون آموزشی و تحصیلات تکمیلی دانشکده کشاورزی

دکتر محمدحسین شهیر

مدیر تحصیلات تکمیلی دانشگاه

دانشگاه زنجان
دانشکده کشاورزی
گروه علوم دامی

پایان‌نامه جهت دریافت درجه کارشناسی‌ارشد (M. Sc.)
در رشته مدیریت دامپروری

ارزیابی ایمنی سرمی ایجاد شده متعاقب واکسیناسیون علیه لارنگوتراکئیت عفونی درپولت های نژاد بوونز و های لاین W36 با آزمایش های سرولوژی

تحقیق و نگارش
رباب حسینی

استاد راهنما
دکتر مراد پاشا اسکندری نسب
دکتر محمد مجید ابراهیمی

تیر ماه ۱۳۹۰

سپاس بیکران به درگاه لایزال الهی که مهربانترین یاور است.

اکنون که با عنایات الهی پایان نامه خود را به اتمام رساندم بر خود لازم می دانم از اساتید راهنمای محترم جناب آقای دکتر **محمدمجیدابراهیمی** و جناب آقای دکتر **مرادپاشا اسکندری نسب** که با صبر و حوصله در تمام مراحل این پایان نامه همراه و پشتیبان اینجانب بودند تشکر و قدردانی نمایم .

از اساتید محترم جناب آقای دکتر محمد طاهر هرکی نژاد و جنا ب آقای دکتر حمید رضا طاهری که به عنوان اساتید داور زحمت بازخوانی این پایان نامه را برعهده داشتند قدردانی نمایم و از نماینده تحصیلات تکمیلی جناب آقای دکتر مجید شاهمرادی سپاسگزارم .

در پایان

از جناب **آقای مهندس محمدصابرصبا** هم دوره ای گرامی به خاطر کمک های بی دریغ شان در طی انجام آزمایشات و کلیه مراحل اجرای طرح بسیار متشکرم.

تقدیم به پدر عزیزم

که تکیه گاه و پناهگاهم از تمام دردهای زمانه است و هر چه دارم در سایه تلاش های بی منت اوست، کسی که سپید موی گشت تا من سپید روی گردم .

تقدیم به مادر عزیزم

که گوهر بی همتا در دریای بی دریغ فداکاریهاست و وجودش برایم همه عشق است کسی که دامان پرمهرش پناهگاه دوران کودکیم و قلب پاکش منبع دعای خیر در زندگیم است.

در برابر وجود گرامیشان زانوی ادب به زمین می نهم و با دلی مالامال از عشق و محبت بر دستانشان بوسه می زنم . آرزومندم انوار روح افزای پرمهرشان همواره بر وجودم بتابد و اندیشه های والاشان روشنگر ادامه مسیر زندگیم باشد.

و تقدیم به

خواهرانم آرزو (همسرش احمد) و زهرا و برادرانم علی(همسرش سمیرا) ، رضا و امیر حسین که وجودشان گرمابخش زندگیم است.

چکیده

بیماری لارنگوتراکئیت عفونی از بیماری‌های ویروسی مجاری تنفسی ماکیان با انتشار جهانی است. تشخیص زود هنگام آن با استفاده از جداسازی و تعیین عامل بیماری، و پایش‌های سرمی برای پیشگیری و کنترل بیماری ضروری است. نهفته بودن عامل بیماری، حامل بودن برخی طیور مبتلا و دفع طولانی مدت ویروس کنترل بیماری لارنگوتراکئیت عفونی را با دشواری‌هایی مواجه کرده است. به دلیل خسارات اقتصادی ناشی از این بیماری، از واکسن تخفیف حدت یافته برای پیشگیری از شیوع آن در پولت‌های تخمگذار در مناطقی که بیماری بومی است استفاده می‌شود. برای بررسی وضعیت ایمنی علیه این بیماری در نژادهای مختلف دو سالن پولت تخمگذار نژادهای بونز سفید و های‌لاین سویه **W36** با ظرفیت ۷۵۰۰۰ در نظر گرفته شد. تمامی پرندگان واکسن لارنگوتراکئیت عفونی تولیدی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی را به روش قطره چشمی دریافت کردند. قبل از انجام واکسیناسیون، از بیست قطعه جوجه نمونه خون گرفته شد. نمونه‌گیری در فاصله‌های زمانی ۳، ۸ ،۱۳و ۱۶ هفته پس از واکسیناسیون تکرار شد. سطح آنتی‌بادی سرمی با آزمایش‌های الایزا و خنثی سازی ویروس اندازه‌گیری شد. نتایج آزمایش‌های الایزا و خنثی‌سازی ویروس نشان داد که ایمن‌سازی واکسن لارنگوتراکئیت عفونی تولیدی موسسه رازی در هر دو نژاد پولت تخمگذار بونز سفید و های‌لاین سویه **W36** کارایی یکسانی داشته و اختلاف معنی داری (**$P \leq 0.05$**) بین این دو نژاد وجود ندارد.

کلید واژه: لارنگوتراکئیت عفونی، واکسن تخفیف حدت یافته، الایزا، خنثی‌سازی ویروس

فهرست

(مطالب ، جداول، نمودارها و شکلها وضمائم)

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فصل اول- مقدمه	۱
فصل دوم- کلیات و مروری بر منابع	۵
۲- لارنگوتراکئیت عفونی طیور	٦
۲-۱- تاریخچه بیماری لارنگوتراکئیت عفونی طیور	٦
۲-۲- طبقه‌بندی	٦
۲-۳- خواص بیولوژیک	۷
۲-۳-۱- ریخت‌شناسی	۷
۲-۳-۲- ساختار شیمیایی و ژنوم	۸
۲-۳-۳- تکثیر ویروس	۸
۲-۳-٤- حساسیت نسبت به عوامل فیزیکی و شیمیایی	۹
۲-٤- آسیب‌شناسی ویروس لارنگوتراکئیت عفونی	۱۱
۲-٤-۱- میزبان	۱۱
۲-٤-۲- انتقال	۱۱
۲-٤-۳- بیماری‌زایی	۱۲
۲-٤-٤- نهفتگی ویروس لارنگوتراکئیت عفونی	۱٦
۲-۵- تشخیص	۱۷
۲-۵-۱- جداسازی ویروس	۱۷

۲-۵-۲- هیستوپاتولوژی ۱۹
۲-۵-۲- آزمایش‌های سرولوژی ۱۹
۲-۵-۲-۱- آزمایش الایزا ۱۹
۲-۵-۲-۲- آزمایش خنثی سازی ویروس ۲۰
۲-۵-۳- آزمایش‌های مولکولی ۲۱
۲-٦- دستگاه تنفس و سیستم ایمنی پرندگان ۲۱
۲-٦-۱- پاسخ ایمنی پرندگان ۲۵
۲-۷- ایمن‌سازی برای کنترل و پیشگیری از بیماری لارنگوتراکئیت عفونی ۲۷
۲-۷-۱- انواع واکسن‌های لارنگوتراکئیت عفونی ۲۸
۲-۷-۲- روش‌های واکسیناسیون طیور ۲۹
۲-۷-۲-۱- روش قطره چشمی ۲۹
۲-۷-۲-۲- روش تزریقی ۳۰
۲-۷-۲-۳- روش آشامیدنی ۳۰
۲-۷-۲-٤- روش اسپری ۳۰
۲-۷-۲-۵- روش تلقیح در نسوج بال ۳۱
۲-۷-۲-٦- روش داخل جنینی ۳۱
۲-۷-۳- اصطلاحات مرتبط با ارزیابی واکسن در گله ۳۲
۲-۸- استفاده از آزمایش‌های سرولوژی برای ارزیابی واکسیناسیون ۳۲
۲-۹- دلایل شکست واکسیناسیون ۳۳
۲-۹-۱- عوامل مربوط به پرنده ۳۳

۲-۹-۲- عوامل مدیریتی ۳۶
۲-۹-۳- عوامل مربوط به واکسن ۳۷
۲-۱۰- مرغ تخمگذار های‌لاین سویه W-36 و نژاد بونز ۳۹
۲-۱۰-۱- مرغ تخمگذار نژاد های‌لاین سویه W-36 و نژاد بونز ۴۰
۲-۱۰-۲- مرغ تخمگذار نژاد بونز سفید ۴۱
فصل سوم- مواد و روش‌ها ۴۲
۳- ارزیابی واکسن لارنگوتراکئیت عفونی در پولت‌های تخمگذار ۴۳
۳-۱- انتخاب فارم و نژاد پولت‌ها ۴۳
۳-۲- واکسن لارنگوتراکئیت عفونی ۴۳
۳-۳- نمونه‌برداری ۴۷
۳-۳-۱- تعداد نمونه و زمان‌های نمونه‌گیری ۴۷
۳-۴- آزمایش‌های سرولوژی ۴۸
۳-۴-۱- آزمایش الایزا ۴۸
۳-۴-۱-۱- محلول‌های مورد نیاز ۴۸
۳-۴-۲- آزمایش خنثی سازی ویروس ۴۹
۳-۴-۲-۱- مواد و محلول‌های مورد نیاز ۵۱
۳-۵- ارزیابی آماری ۵۲
فصل چهارم- نتایج و بحث
میانگین وزنی ۵۳
آزمایش الایزا ۵۳

آزمایش خنثی سازی ویروس ٥٦
پیشنهادها ٦٦
فصل پنجم- منابع ٦٨

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول ۳-٤. محاسبه عیار آنتی‌بادی سرم به روش Spearman-Karber ٤٧

جدول ٤-۱. اطلاعات توصیفی میانگین و واریانس عیار واکسن لارنگوتراکئیت عفونی در نژاد پولت تخمگذار های‌لاین سویه W36 در هفته‌های مختلف پس از واکسیناسیون ٥١

جدول ٤-۲. اطلاعات توصیفی میانگین و واریانس عیار واکسن لارنگوتراکئیت عفونی در نژاد پولت تخمگذار بونز سفید در هفته‌های مختلف پس از واکسیناسیون ٥٢

جدول ٤-۳. اطلاعات توصیفی میانگین و واریانس عیار واکسن لارنگوتراکئیت در دو نژاد پولت تخمگذار های‌لاین سویه W36 و بونز سفید ٥٢

جدول شماره ٤-٤. نتایج آماری با آزمون t مربوط به آزمایش الایزا روی سرم دو نژاد پولت تخمگذار های‌لاین سویه W36 و بونز سفید به تفکیک زمان‌های خونگیری ٥٤

فهرست نمودارها و شکل‌ها

عنوان **صفحه**

تصویر ۲-۱. میکروگراف‌های الکترونی ویروس لارنگوتراکئیت عفونی ۷

تصویر ۲-۲. مراحل تکثیر ویروس لارنگوتراکئیت عفونی در سلول میزبان ۱۰

تصویر ۲-۳. علایم بالینی بیماری لارنگوتراکئیت عفونی: الف) تنفس با دهان باز، ب) التهاب سینوس‌های بینی و زیر چشمی، پ) دفع ترشحات خونی ۱۳

تصویر ۲-٤. علایم بالینی بیماری لارنگوتراکئیت عفونی: الف) تورم ملتحمه، ب) ترشحات چرکی چشم، پ) اکسودای کف آلوده در گوشه داخلی چشم ۱٤

تصویر ۲-۵. علایم کالبد گشایی بیماری لارنگوتراکئیت عفونی: الف) خونریزی در نای، ب) ترشحات پنیری در نای ۱۵

تصویر ۲-٦. جنین چهارد روزه: چپ) جنین و کوریوآلانتوییک سالم، راست) جنین آلوده شده با ویروس لارنگوتراکئیت عفونی و پدیدار شدن پوک‌ها بر روی کوریو آلانتوییک ۱۸

تصویر ٤-۱. نتایج ارزیابی عیار آنتی بادی علیه ویروس لارنگوتراکئیت عفونی در دو نژاد پولت تخمگذار های‌لاین سویه **W36** و بونز سفید با آزمایش الایزا ۵۱

تصویر ٤-۲. نتایج آزمایش خنثی‌سازی ویروس لارنگوتراکئیت عفونی در دو نژاد پولت تخمگذار های‌لاین سویه **W36** و بونز سفید ۵۳

فهرست ضمایم

عنوان **صفحه**

ضمیمه ۱- جدول رشد برای گرداوری اطلاعات پولت تخمگذار ٦٤

ضمیمه ۲- جدول تولید برای گرداوری اطلاعات پولت تخمگذار ٦٥

ضمیمه ۳- وضعیت واکسیناسیون پولت‌های تخمگذار نژادهای بونز سفید و های‌لاین سویه W36 ٦٦

فصل اول

مقدمه

با افزایش جمعیت جهان و تغییر شرایط اقتصادی و اجتماعی، تقاضا برای غـذا چنـد برابـر شـده اسـت. دراین میان نقش صنعت طیور در تامین پروتئین حیوانی مورد نیاز به دلیل پایین بودن نسـبی هزینـه‌هـای تولید، بالا بودن بازده غذایی، کوتاه بودن دوره پرورش در مقایسه با دیگر حیوانات اهلی تولید کننده غذا بیش از پیش آشکار می‌شود. صنعتی شدن پرورش طیور، افزایش تراکم نگه‌داری و استفاده از روش‌هـای مختلف برای بالا بردن میزان تولید فرآورده‌های طیور، سبب شده تا این پرندگان در معرض بیماری‌هـای مختلف واگیردار ویروسی و باکتریایی قرار گرفته و میزان حساسیت آن‌ها نسبت به این بیماری‌ها افزایش یابد. بسیاری از این بیماری‌ها درمان مطمئنی ندارند و یا در صـورت درمـان، هزینـه زیـادی بـه مرغـدار تحمیل شده و روند کنترل بیماری دشوار می‌شـود. بنـابراین بـه هنگـام خطـر ابـتلا گلـه‌هـای طیـور بـه بیماری‌های واگیردار، پیشگیری اهمیت بیش‌تری خواهد داشت. برای پیشگیری از بروز بیماری‌های طیور در گله رعایت بهداشت، رعایت اصول ضدعفونی، و اسـتفاده از واکسـن در زمـان‌هـای مناسـب توصـیه می‌شود. واکسیناسیون موجب فعال شدن سیستم ایمنی و در نتیجه افزایش توان پرنده در برابر بیماری‌هـا می‌شود.

واکسن‌های مورد استفاده در طیور شامل سه گروه واکسن‌های زنده[1]، واکسـن‌هـای زنـده تخفیـف حدت یافته[2]، و واکسن‌های غیرفعال[3] یا کشته[4] هستند. واکسن‌های زنـده و تخفیـف حـدت یافتـه دارای میکرو ارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که قدرت بیماری‌زایی آن‌ها به‌طور طبیعی یا با روش‌هـای مصـنوعی کاهش یافته است. در واکسن‌های کشته، عامل بیماری‌زا با

[1] Live
[2] Attenuated
[3] Inactivated
[4] Killed

استفاده از روش‌های فیزیکی (حرارت، اشعه ماوراء بنفش) و یا استفاده از عوامل شیمیایی (فرمالدیید، فنل، بتا-پروپیولاکتون[5]، اتیلن ایمین[6]) غیرفعال شده است. در بهترین شرایط، هیچ واکسنی ایمنی و حفاظت کامل ایجاد نمی‌کند. بنابراین یاور[7] ها مانند هیدروکسید آلومینیوم یا امولسیون‌های روغنی به محلول واکسن افزوده می‌شوند تا توان ایمنی‌زایی آن‌ها افزایش یابد.

بیماری لارنگوتراکئیت عفونی[8] از بیماری‌های ویروسی مجاری تنفسی ماکیان است. این بیماری انتشار جهانی داشته و در برخی از کشورها بومی[9] است. تشخیص زود هنگام آن با استفاده از جداسازی و تشخیص عامل بیماری، و کنترل و پیشگیری از آن با استفاده از پایش‌های سرمی ضروری است. با توجه به طبیعت نهفتگی[10] عامل بیماری لارنگوتراکئیت عفونی، حامل[11] بودن برخی طیور مبتلا و دفع طولانی مدت ویروس، مبارزه با این بیماری دشوار است. بنابراین تجویز واکسن در بیشتر موارد از بروز بیماری جلوگیری می‌کند.

از آنجایی که بیماری لارنگوتراکئیت عفونی در ایران بومی است و از واکسن تخفیف حدت یافته برای پیشگیری از شیوع آن در پولت[12]های تخمگذار استفاده می‌شود، انجام تحقیق

برای بررسی وضعیت ایمنی علیه این بیماری در نژادهای مختلف طیور با در نظر گرفتن عواملی که بر روی دریافت واکسن و ایجاد ایمنی موثرند، ضروری به‌نظر می‌رسد.

[5] Beta-propiolacton
[6] Ethylene imine
[7] Adjuvant
[8] Infectious laryngotrachitis
[9] Endemic
[10] Latency
[11] Carrier
[12] Pullet

اهداف این پژوهش عبارتند از:

۱ – بررسی وضعیت ایمنی پیامد واکسیناسیون علیه لارنگوتراکئیت عفونی در دو نژاد **BOVANS** و **Hy Line W36** با در نظر گرفتن شرایط یکسان زمان، دما، مکان، سن، و تغذیه.

۲ - تعیین نژاد مناسب طیور تخمگذار برای پرورش براساس مقاومت نژاد پولت به بیماری لارنگوتراکئیت عفونی در منطقه‌ای که این بیماری شایع است.

فصل دوم

کلیات و مروری بر منابع

۲- لارنگوتراکئیت عفونی طیور

۲-۱- تاریخچه بیماری لارنگوتراکئیت عفونی طیور

بیماری لارنگوتراکئیت عفونی با تنگی نفس، سرفه، تنفس با دهان باز، و دفع ترشحات[1] خونی از دستگاه تنفس مشخص شده و سبب بروز تلفات و کاهش تولید تخم مرغ در گله‌های مبتلا می‌شود. موارد تک‌گیر[2] این بیماری در پرندگان زینتی و مسابقه‌ای نیز گزارس شده است. بیماری لارنگوتراکئیت عفونی برای نخستین بار در سال ۱۹۲۵ میلادی توسط می[3] و تیتسلر[4] توصیف شد (May & Tittsler 1925). نخستین گزارش تکثیر ویروس لارنگوتراکئیت عفونی بر روی غشا کوریوآلانتوییک[5] جنین جوجه ده روزه در سال ۱۹۳۰ اعلام شد (Beach 1930). در سال ۱۹۳٦، ویروس عامل بیماری به عنوان هرپس ویروس در نظر گرفته شد (Cruickshank et al., 1963).

۲-۲- طبقه‌بندی

ویروس عامل بیماری لارنگوتراکئیت عفونی طیور، در خانواده *هرپس ویریده*[6] و زیر خانواده *آلفا هرپس ویرینه*[7] و گونه *گالید هرپس ویروس ۱*[8] طبقه بندی می‌شود (McGeoch et al., 2000).

[1] Exudate
[2] Sporadic
[3] May
[4] Thittsler
[5] Chorioallantoic membrane
[6] Herpesviridae
[7] Alphaherpesvirinae
[8] Gallid herpes virus 1