

# ارزیابی کیفی آزمایشگاهی واکسن‌های امولسیون روغنی تحت تیپ $H_9N_2$ آنفلوانزای پرندگان

ذوالفقار رجبی<sup>\*۱</sup> حسین طایفی نصرآبادی<sup>۲</sup> امیر بابک سیوفی خوجین<sup>۳</sup>

(۱) گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تبریز، تبریز - ایران.

(۲) گروه علوم پایه دانشکده دامپزشکی دانشگاه تبریز، تبریز - ایران.

(۳) گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تبریز، تبریز - ایران.

(دریافت مقاله: ۲۰ مرداد ماه ۱۳۸۸، پذیرش نهایی: ۱۲ اردیبهشت ماه ۱۳۸۹)

## چکیده

در سال‌های اخیر استفاده از واکسیناسیون برای کنترل ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان بخصوص ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان با بیماری‌زایی ملایم در حال افزایش است، لذا ارزیابی کیفی آنها با توجه به خصوصیات ویروس عامل بیماری از اهمیت زیادی برخوردار است. در این مطالعه جهت ارزیابی کیفی واکسن‌های روغنی تحت گروه  $H_9N_2$  آنفلوانزا در آزمایشگاه، توده‌ی آنتی ژن از سه واکسن تجاری قابل دسترس آنفلوانزا، توسط روش **Aqueous partition** استخراج و باز یافت شد، سپس مقدار پروتئین تام استخراج شده و فعالیت هماگلوتیناسیون باز یافت شده از هر واکسن تعیین و با میزان ایمنی‌زایی آنها در جوجه‌ها مقایسه شد. نتایج نشان داد فعالیت هماگلوتیناسیون باز یافته و غلظت پروتئین ویروسی استخراج شده از واکسن‌ها با دزهای مساوی متفاوت است. همچنین پاسخ سیستم ایمنی جوجه‌ها به واکسن‌های مورد مطالعه همانند نتایج قبل متفاوت و هماهنگ با آنها است که از نظر آنالیز آماری نیز اختلاف معنی‌داری بین آنها وجود دارد. با توجه به نتایج به نظر می‌رسد دلیل عمده‌ی کیفیت پایین دو واکسن از سه واکسن مورد مطالعه غلظت پایین پروتئین‌های ویروسی در آنها است.

واژه‌های کلیدی: واکسن‌های آنفلوانزا، واکسن‌های امولسیون روغنی، ارزیابی در آزمایشگاه.

همچنین جداسازی ویروس‌های  $H_9N_2$  از انسان (۷، ۱۴)، بر اهمیت کنترل ویروس‌های  $H_9N_2$  در طیور تأکید می‌کنند.

برای کنترل بیماری آنفلوانزا واکسن‌های متعددی ساخته شده است از جمله، واکسن‌های هومولوگ غیر فعال، واکسن‌های هترولوگ غیر فعال و واکسن‌های نوترکیب. واکسن‌های هترولوگ غیر فعال چندین سال در مینه‌سوتا، آمریکا و در ایتالیا استفاده شده است؛ در مورد واکسن‌های نوترکیب نیز مصرف یک نوع آن در مکزیک مجاز شده است (۲).

استفاده از واکسن‌های امولسینه‌ی روغنی غیر فعال به منظور پیشگیری و کنترل بیماری‌های طیور بعد از مطالعه‌ی هدایت شده بین سال‌های ۱۹۶۹ و ۱۹۷۸ به سرعت افزایش یافت. این واکسن‌ها با تحریک سیستم ایمنی هومورال موجب حفاظت میزبان در مقابل چلنج با ویروس‌های حاد مثل بیماری نیوکاسل ویسروتروپیک ولوژنیک و آنفلوانزای پرندگان با بیماری‌زایی بالا (HPAI) می‌شود (۲۱). واکسیناسیون طیور با واکسن‌های روغنی غیر فعال برای کنترل ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان بخصوص ویروس‌های بیماری‌زایی ملایم در سال‌های اخیر در حال افزایش است و در کشورهای مختلف از جمله مکزیک، پاکستان و هنگ کنگ استفاده شده است (۲، ۱۹). در ایران نیز بدنبال شیوع بیماری آنفلوانزا تحت تیپ  $H_9N_2$  از سال ۱۳۷۸ واکسن‌های روغنی غیر فعال (هومولوگ) استفاده می‌شود.

مقدار پروتئین ویروس و به خصوص غلظت و فعالیت پروتئین هماگلوتینین در واکسن‌های روغنی آنفلوانزا نقش مهمی در میزان

## مقدمه

آنفلوانزا یک بیماری بسیار واگیر ویروسی است که در پرندگان، انسان و سایر پستانداران مشاهده می‌شود. عامل بیماری متعلق به خانواده ارتومیکسوریدهاست که اولین بار در سال ۱۹۳۳ جدا و شناسایی شد (۴، ۷). ویروس تیپ A آنفلوانزا از پرندگان اهلی و وحشی در سراسر دنیا جدا شده است. شدت بیماری در پرندگان دامنه وسیعی دارد و بیماری تحت بالینی تا بیماری تنفسی شدید، کاهش یا توقف تولید تخم مرغ و مرگ مشاهده می‌شود (۳). از طرف دیگر از سال ۱۹۹۷ سه نوع تحت تیپ ویروس آنفلوانزای پرندگان ( $H_5N_1$ ،  $H_7N_7$ ،  $H_9N_2$ ) به طور مستقیم از پرندگان به انسان انتقال یافته است (۶، ۱۳).

تحت تیپ  $H_9N_2$  آنفلوانزای پرندگان که ویروس با بیماری‌زایی ملایم است طی سال‌های ۱۹۹۹-۱۹۹۴ در دنیا منتشر شد (۱). در ایران اولین بار در سال ۱۳۷۷ هجری شمسی از منطقه تهران و قزوین و در سال دوم از کلیه استان‌های کشور بجز گیلان، مازندران، گلستان و اردبیل گزارش گردید. با توجه به بررسی‌های صورت گرفته بیماری آنفلوانزای تحت تیپ  $H_9N_2$  در ایران موجب کاهش تولید در گله‌های تخمگذار تجارتي و مادر از ۳۰ درصد تا توقف تخمگذاری و همچنین تلفات به میزان ۸ درصد در گله‌های تخمگذار و ۳۷ درصد در گله‌های نیمچه گشته شده است.

تکامل سروتیپ  $H_9N_2$  (۱۱)، ارتباط ژنتیکی با تحت تیپ  $H_5N_1$  ویروس آنفلوانزای پرندگان (۵)، که می‌تواند طیور و انسان را آلوده کند و



گرفت.

**تعیین مقدار پروتئین تام (پروتئین‌های ویروس) استخراج شده:** غلظت پروتئین PBS استخراج شده از واکسن‌ها توسط روش Lowry و همکاران در سال ۱۹۵۱ و با استفاده از سرم کریستالین گاو تعیین گردید (۱۲). ابتدا کربنات سدیم ۲ درصد با سود ۱/۱ نرمال مخلوط و به نام محلول A نام‌گذاری شد. در مرحله بعد سولفات مس ۵/۵ درصد با سدیم پنتاسیم تارتارات ۱ درصد مخلوط و محلول B تهیه شد. ۵۰ میلی لیتر محلول A با ۱ میلی لیتر محلول B مخلوط و محلول C تهیه شد. برای اندازه‌گیری پروتئین تام ۰/۲ میلی لیتر از PBS استخراج شده از هر واکسن با ۱ میلی لیتر از محلول C مخلوط، بعد از ۱۰ دقیقه گرماگذاری در دمای آزمایشگاه ۱/۱ میلی لیتر از معرف فولین سیوکالتوا نرمال به آن اضافه و کاملاً مخلوط شد و پس از ۳۰ دقیقه، جذب آن در طول موج ۵۵۰ نانومتر به دست آمد. لازم به ذکر است نمودار استاندارد در غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تهیه شد.

**مطالعه میزان ایمنی زایی واکسن:** صد قطعه جوجه گوشتی یک روزه از یک کارخانه جوجه‌کشی تجاری خریداری و به روش استاندارد پرورش داده شدند. قبل از واکسیناسیون، جوجه‌ها به شکل تصادفی به چهار (گروه I، II، III و IV) تقسیم و در داخل قفس‌های جداگانه در یک اتاق ایزوله قرار داده شدند (۲۵ قطعه جوجه در هر گروه). گروه I، گروه II، و گروه III به ترتیب با واکسن A، واکسن B و واکسن C در زیر پوست ناحیه‌ی پشت گردن در سن ۱۱ روزگی واکسینه شدند. گروه IV به عنوان گروه کنترل بافر PBS (۳/۳ میلی لیتر در هر دوز) دریافت کرد. نمونه‌های خون ۵ هفته بعد از واکسیناسیون، از ورید بالی به منظور بررسی عیار سرمی مهار هم‌گلو تیناسیون (HI) و ویروس تحت تیپ H9N2 آنفلوآنزای پرندگان اخذ شد. عیارهای مهار هم‌گلو تیناسیون به صورت عیارهای میانگین مهار هم‌گلو تیناسیون بیان شدند.

**روش ارزیابی مهار هم‌گلو تیناسیون:** برای هر نمونه‌ی سرمی ابتدا ۲۵ میکرولیتر PBS در هر گوده تا گوده‌ی دوازدهم در یک میکروپلیت ۹۶ گوده‌ای ریخته شد سپس ۲۵ میکرولیتر از نمونه‌ی سرمی مورد نظر به گوده‌ی اول اضافه گردید، بعد از مخلوط کردن سرم با PBS در گوده‌ی مذکور ۲۵ میکرولیتر از برداشته شد و به گوده‌ی دوم اضافه و کاملاً با PBS موجود در گوده‌ی دوم مخلوط شد، سپس ۲۵ میکرولیتر از آن اخذ و به گوده‌ی سوم اضافه شد، رقیق‌سازی به ترتیبی که گفته شد تا گوده‌ی ۱۲ ادامه یافت، از گوده‌ی دوازدهم ۲۵ میکرولیتر برداشته و بیرون ریخته شد. بعد از رقیق‌سازی سرم، به هر گوده ۲۵ میکرولیتر از آنتی ژن H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> (چهار واحد) اضافه گردید. بعد از ۳۰ دقیقه گرماگذاری در دمای آزمایشگاه به هر گوده ۲۵ میکرولیتر از گلبول‌های قرمز خون جوجه با رقت ۱ درصد ریخته شد. بعد از ۳۰ تا ۴۰ دقیقه گرماگذاری در دمای آزمایشگاه عیار مهار هم‌گلو تیناسیون سرم یادداشت شد.

**روش آنالیز داده‌ها:** به روش Kruskal-Wallis Test (Npar tests)

ایمنی زایی و کیفیت واکسن دارد (۴، ۲۱، ۲۳). با باز یافت و استخراج توده‌ی آنتی ژن واکسن روغنی آنفلوآنزای پرندگان و تعیین عیار هم‌گلو تینین باز یافته و پروتئین تام (پروتئین‌های ویروس)، امکان پیشگویی کیفیت و میزان محافظت و ایمنی زایی واکسن وجود دارد. در این مطالعه توده‌ی آنتی ژن و مقدار پروتئین تام از سه واکسن روغنی آنفلوآنزای پرندگان استخراج شد و جهت ارزیابی کیفی، فعالیت هم‌گلو تیناسیون باز یافته و مقدار پروتئین تام استخراج شده تعیین و با میزان پاسخ‌های سرولوژیک جوجه‌ها به همان واکسن‌ها مورد مقایسه قرار گرفت.

## مواد و روش کار

**واکسن‌ها:** سه واکسن روغنی تجاری تحت تیپ H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> آنفلوآنزای پرندگان با نام‌های A، B، و C در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت، در هر سه واکسن امولسیون آب در روغن بود.

**استخراج توده‌ی آنتی ژن موجود در واکسن‌ها به روش: partition aqueous:** به منظور جداسازی و اندازه‌گیری فاز آبی واکسن‌های روغنی مورد مطالعه، ۵ میلی لیتر از هر واکسن با سه میلی لیتر الکل ۱-هگزانول مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰g در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شد. با توجه به نسبت فاز آبی و فاز روغنی واکسن‌های مورد مطالعه برای استخراج توده‌ی آنتی ژن از واکسن‌های بدون دستکاری، ۱۲ دوز از هر واکسن به لوله‌های سانتریفوژ حاوی مقدارهای مناسب فسفات-بافر سالین (PBS) (به ترتیب حاوی ۱/۳۳ میلی لیتر، ۲/۶۳ میلی لیتر و ۳ میلی لیتر) اضافه گردید، سپس در داخل حمام یخ قرار داده شدند تا دمای آنها به صفر درجه‌ی سانتیگراد برسد (نسبت حجم PBS و حجم فاز آبی در هر سه واکسن یکسان بود). محتویات هر لوله توسط هموژنایزر (IKA ULTRA-TURRAX® T 18 basic) به مدت ۵۰ ثانیه با دور ۲۰۰۰۰ در دقیقه در دمای یخچال مخلوط شد، سپس مخلوط حاصل به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰g در دمای ۴ درجه سانتیگراد به منظور جداسازی قسمت PBS از واکسن روغنی سانتریفوژ گردید. فعالیت هم‌گلو تیناسیون قسمت PBS استخراج شده از هر واکسن مشخص و عیار آن تعیین شد. استخراج توده‌ی آنتی ژن ۲ روز قبل از واکسیناسیون انجام گرفت.

**روش ارزیابی فعالیت هم‌گلو تیناسیون:** برای هر نمونه ابتدا ۲۵ میکرولیتر PBS به هر گوده در یک میکروپلیت ۹۶ گوده‌ای تا گوده‌ی ۱۲ ریخته شد، سپس ۲۵ میکرولیتر از PBS استخراج شده از یک واکسن به گوده‌ی اول اضافه شد و بعد از مخلوط کردن ۲۵ میکرولیتر از مخلوط برداشته شد و به گوده‌ی دوم اضافه شد، رقیق‌سازی تا گوده‌ی ۱۲ ادامه یافت. بعد از رقیق‌سازی ۲۵ میکرولیتر از گلبول‌های قرمز خون جوجه با رقت ۱ درصد به هر گوده اضافه شد و بعد از ۳۰ تا ۴۰ دقیقه گرماگذاری در دمای آزمایشگاه عیار هم‌گلو تیناسیون یادداشت شد. لازم به ذکر است این آزمایش در کنار شاهد گلبول قرمز و شاهد آنتی ژن استاندارد H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> انجام



کنترل ناقص ویروس های آنفلوانزای با بیماریزایی ملایم و گردش ویروس ها در مرغداری ممکن است زمینه را برای تغییرات آنتی ژنیک فراهم کند و احتمالاً منجر به افزایش بیماریزایی آنها شود (۸). پیشگیری و کنترل ویروس های با بیماریزایی ملایم ممکن است ایجاد ویروس ها آنفلوانزای بسیار بیماریزا را مهار کند. اکثر واکسن های روغنی و تجاری آنفلوانزای پرندگان تنها از بروز علائم کلینیکی و بروز تلفات جلوگیری می کنند (۷) و از تکثیر ویروس های آنفلوانزای پرندگان و دفع آنها از بدن میزبان به طور کامل جلوگیری نمی کنند ولی باید تلاش شود از گسترش ویروس جلوگیری گردد.

به طور کلی میزان ایمنی زایی واکسن ها از جمله واکسن های کشته تحت تأثیر عوامل مختلفی است از جمله توده آنتی ژن، فرمولاسیون واکسن، نوع روغن مورد استفاده در واکسن به عنوان ادجوان، دوز واکسن، گونه پرند و اکسینه و سن واکسیناسیون (۲۳، ۱۶، ۱۰). استون و همکاران نشان دادند وجود دوز فازی و روغنی در واکسن در مقایسه با وقتی که فقط فاز روغنی است، عیار مهار هماگلوتیناسیون ۴-۲ برابر بیشتر است (۱۸) و در صورت ثابت ماندن تعادل هیدروفیل - لیوفیل (HLB) نسبت فاز آبی و روغنی واکسن در پاسخ سرولوژی تأثیری ندارد، در عین حال فاز روغنی علاوه بر افزایش تأثیر واکسن، باعث کاهش ویسکوزیته و افزایش ثبات واکسن های امولسیون آب در روغن (W/O) می شود (۱۷).

مطالعات متعددی در مورد ارتباط غلظت هماگلوتینین و به عبارت دیگر غلظت پروتئین ویروسی در واکسن های روغنی آنفلوانزا و ایجاد ایمنی انجام گرفته و مشخص شده است، ایجاد ایمنی توسط این واکسن ها بستگی به مقدار توده آنتی ژن و مقدار هماگلوتینین ویروس در واکسن دارد (۲۱، ۲۳). Garcia و همکاران نشان دادند برای پیشگیری از علائم بیماری نیاز به حداقل ۰/۴ میکروگرم هماگلوتینین در هر دوز واکسن است (۴). مطالعه دیگری نشان می دهد حداقل مقدار هماگلوتینین که باعث ایجاد ایمنی و عدم دفع ویروس و آلودگی می شود ۰/۵ میکروگرم می باشد (۲۱). بدیهی است علاوه بر غلظت آنتی ژن هماگلوتینین در واکسن از لحاظ ایمنی زایی نیز آنتی ژن باید سالم و میزان فعالیت هماگلوتیناسیون آن بالا باشد.

علاوه بر آنتی ژن هماگلوتینین، آنتی ژن نورآمینیداز و همچنین پروتئین های داخلی و بخصوص نوکلئوپروتئین های ویروس های آنفلوانزای پرندگان نیز موجب ترشح آنتی بادی های می شود که عیار تکثیر ویروس های آنفلوانزا را از طریق به تأخیر انداختن زمان آلودگی کاهش می دهند (۲۰).

از آن جا که واکسن های روغنی آنفلوانزا از ویروس کامل تهیه می شود هر چقدر میزان پروتئین ویروسی در واکسن بیشتر باشد غلظت آنتی ژن هماگلوتینین و سایر آنتی ژن ها نیز بیشتر خواهد بود لذا با استخراج و اندازه گیری غلظت پروتئین ویروسی می توان اطلاعاتی در ارتباط با کیفیت واکسن به دست آورد. معمولاً واکسن ها قبل از ورود به بازار و حتی

جدول ۱- ارتباط بین عیار های هماگلوتیناسیون باز یافته، پروتئین تام استخراج شده، و عیار های مهار هماگلوتیناسیون سرم. a واکسن های روغنی تحت تیپ H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> آنفلوانزای پرندگان. b فسفات بافر سالیین (PBS) به عنوان کنترل منفی واکسن ها. c عیار هماگلوتیناسیون باز یافته. d پروتئین تام استخراج شده از واکسن. e میانگین عیار مهار هماگلوتیناسیون بر اساس ۲۵ قطعه جوجه در هر گروه که بین آنها از نظر آماری اختلاف معنی داری وجود دارد (p=۰.۰۰۰).

واکسن ها <sup>a</sup>	عیار های هماگلوتیناسیون <sup>c</sup>	پروتئین تام <sup>d</sup> (میکرو گرم در میلی لیتر)	میانگین عیار مهار <sup>e</sup> هماگلوتیناسیون سرم
A	۲	۴/۸	۵/۰۸
B	۰	۲	۲/۷۶
C	۳	۷	۶/۲۴
<sup>b</sup> D	-	-	۰/۶

انجام گرفت.

## نتایج

**فاز آبی و واکسن ها:** حجم فاز آبی واکسن A، B و C به ترتیب ۱/۲ میلی لیتر در ۵ میلی لیتر، ۱/۶ میلی لیتر در ۵ میلی لیتر، و ۲/۲ میلی لیتر در ۵ میلی لیتر واکسن بود. در هر سه واکسن فاز آبی کمتر از فاز روغنی بود. **عیار های هماگلوتیناسیون باز یافته:** نتایج نشان داد عیار فعالیت هماگلوتیناسیون باز یافته در سه واکسن یکسان نیست و عیار های هماگلوتیناسیون باز یافته از واکسن ها به وسیله تکنیک partition aqueous به ترتیب ۰ (واکسن B)، ۲ (واکسن A) و ۳ (واکسن C) است (جدول ۱).

**پروتئین تام استخراج شده:** نتایج نشان داد غلظت پروتئین تام استخراج شده در واکسن ها یکسان نیست و پروتئین های تام استخراج شده از واکسن های مورد مطالعه به ترتیب ۲ (واکسن B) ۴/۸ (واکسن A) و ۷ (واکسن C) میکروگرم در هر میلی لیتر است (جدول ۱).

**میانگین عیار مهار هماگلوتیناسیون سرم:** حداقل و حداکثر میانگین عیار های مهار هماگلوتیناسیون سرم جوجه های واکسینه شده به ترتیب ۲/۷۶ و ۶/۲۴ بود که پتانسیل و میزان ایمنی زایی واکسن ها را نشان می دهد. نتایج نشان داد پاسخ سیستم ایمنی به واکسن C بیشتر از واکسن A و واکسن B است (جدول ۱). از نظر آماری اختلاف معنی داری بین پاسخ سیستم ایمنی جوجه های واکسینه با واکسن های A، B، C با هم و با جوجه های غیر واکسینه (p=۰.۰۰۰) وجود داشت.

## بحث

ایمنی زایی و درجه ایمنی زایی واکسن های روغنی آنفلوانزای پرندگان در گونه های مختلف به اثبات رسیده است (۱۹، ۱۰، ۴). بنابراین واکسیناسیون با واکسن های روغنی ابزاری مناسب برای کنترل ویروس های آنفلوانزای پرندگان است (۲).



## References

- Alexander, D.J. (2000) A review of avian influenza in different bird species. *Vet. Microbiol.* 74: 3-13.
- Capua, I., Marangon, S. (2003) The use of vaccination as an option for the control of avian influenza. a review. *Avian Pathol.* 32: 335- 343.
- Garcia, A., Johnson, H., Srivastava, D. K., Jayawardene, D. A., Wehr, D. R., Webster, R. G. (1998) Efficacy of inactivated H<sub>5</sub>N<sub>2</sub> influenza vaccines against lethal A/Chicken/Queretaro/19/95 infection. *Avian Dis.* 42: 248-256.
- Gubareva, L. V., Webster, R. G., Hayden, F. G. (2002) Detection of influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors by an enzyme inhibition assay. *Anti. Virol. Res.* 53: 47-61.
- Guo, Y. J., Li, J. G., Cheng, X. W., Wang, M., Zhou, Y., Li, X. H., Cai, F., Miao, H. L., Zhang, H., Guo, F. (1999) Discovery of men infected by avian influenza A (H<sub>9</sub>N<sub>2</sub>) virus. *Chin. J. Exp. Clin. Virol.* 13: 105-108.
- Halvorson, D. A. (2003) Strengths and weaknesses of vaccines as a control tool. *Avian Dis.* 47: 223-227.
- Jacob, P. J., Butcher, D. G., Mather, B. F., Miles, D. R. (2000) *Avian Influenza in Poultry.* University of Florida. Gainesville, USA.
- Karunakaran, D., Newman, J. A., Halvorson, D. A., Abraham, A. (1987) Evaluation of inactivated influenza vaccines in market turkeys. *Avian Dis.* 31: 498-503.
- Li, C., Yu, K., Tian, G., Yu, D., Liu, L., Jing, B., Ping, J., Chen, H. (2005) Evolution of H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> influenza viruses from domestic poultry in Mainland China. *Virol.* 340: 70 - 83.
- Lowry, O. H., Rosebriugh, N. J., Farr, A. L. L., Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Maccauly, W. J., Baigent, J. S., Bethell, C. R. (2003) Anti influenza virus therapeutics: Potential use and their mode of action. *Avian Dis.* 47: 281-291.
- Peiris, M., Yuen, K. Y., Leung, C. W., Chan, K. H., Ip, P. L. S. R., Lai, W. M., Orr, W. K., Shortridge, K. F. (1999) Human infection with influenza H<sub>9</sub>N<sub>2</sub>.

در زمان استفاده در مرغداری‌ها از لحاظ ایمنی زایی و میزان کیفیت ارزیابی می‌شوند که غالباً در بدن جوجه بر اساس میزان تولید آنتی بادی علیه آنتی ژن هم‌گلو تینین و میزان حفاظت از بدن در مقابل چالش با ویروس و میزان دفع ویروس انجام می‌گیرد که مستلزم صرف وقت و هزینه‌ی زیاد است. استون نشان داد با استفاده از روش Aqueous partition امکان استخراج پروتئین‌های ویروسی از واکسن‌های روغنی نیوکاسل وجود دارد (۱۵).

در این مطالعه برای این که بررسی کیفی سه واکسن و امکان مقایسه‌ی آن‌ها با یکدیگر فراهم شود در استخراج آنتی ژن هم‌گلو تینین از هر واکسن ۱۲ دز و با توجه به فاز آبی هر واکسن (قسمت اعظم پروتئین ویروسی در این فاز قرار دارد) محلول PBS با نسبت برابر به هر کدام اضافه شد. نتایج مطالعات نشان می‌دهد اختلاف معنی داری بین میزان ایمنی زایی واکسن‌ها وجود دارد ( $p=0/000$ )، (جدول ۱) و به عبارت دیگر کیفیت واکسن‌ها با هم یکسان نیست و ایمنی زایی واکسن C بهتر از ایمنی زایی دو واکسن دیگر است. نتایج حاصل از استخراج پروتئین‌های ویروسی و فعالیت هم‌گلو تیناسیون باز یافته از واکسن‌ها نیز مطلب مورد اشاره را تأیید می‌کند و نشان می‌دهد با استفاده از دوروش آزمایشگاهی مذکور ارزیابی کیفی واکسن روغنی آنفلوانزا و حتی تا حدودی بیان دلیل کیفیت پایین یا بالای آن و استاندارد بودن آن در مدت کوتاه و با هزینه‌ی حداقل و بدون استفاده از روش‌های معمول ارزیابی کیفی امکان پذیر است. البته جهت بهبود و استاندارد کردن این روش‌ها نیاز به مطالعه‌ی بیشتری است. با توجه به نتایج استخراج پروتئین و فعالیت هم‌گلو تیناسیون باز یافته از واکسن‌های مورد مطالعه به نظر می‌رسد علت اصلی کیفیت پایین واکسن‌های A و B، به خصوص واکسن B در مقایسه با واکسن C غلظت پایین پروتئین‌های ویروسی در این واکسن‌ها باشد.

## تشکر و قدردانی

از آقای دکتر بیورانی به دلیل آنالیز آماری داده‌ها تشکر و قدردانی می‌شود. این مطالعه با حمایت مالی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه تبریز انجام گرفته است.



- Lancet. 354: 916-917.
13. Stone, H. D. (1985) Determination of hemagglutination activity recovered from oil-emulsion Newcastle disease vaccines as a prediction of efficacy. *Avian Dis.* 29: 721-728.
  14. Stone, H. D. (1987) Efficacy of avian influenza oil-emulsion vaccines in chickens of various ages. *Avian Dis.* 31:483-490.
  15. Stone, H. D. (1988) Optimization of hydrophile-lipophile balance for improved efficacy of Newcastle disease and avian influenza oil-emulsion vaccines. *Avian Dis.* 32:68-73.
  16. Stone, H. D., Brugh, M., Beard, C. W. (1983) Influence of formulation on the efficacy of experimental oil-emulsion Newcastle disease vaccines. *Avian Dis.* 27:688-697.
  17. Swayne, D. E., Beck, J. R., Perdue, M. L., Beard, C.W. (2001) Efficacy of vaccines in chickens against highly pathogenic Hong Kong H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> avian Influenza. *Avian Dis.* 45: 355-365.
  18. Swayne, D. E., Halvorson, D. A. (2003) Influenza. In: *Diseases of Poultry*. (11<sup>th</sup> ed.). Saif, Y. M., Barnes, H. J., Glisson, J. R., Fadly, A. M., McDougald, L. R., Swayne, D. E. (eds.). Iowa State Press. Iowa, USA. p.135-160.
  19. Trani, L. D., Cordiol, P., Falcon, E., Lombardi, G., Moreno, A., Sala, G., Tollis, M. (2003) Standardization of an inactivated H<sub>7</sub>N<sub>1</sub> Avian Influenza vaccine and efficacy against A/ Chicken/ Italy/1347/99 high-pathogenicity virus infection. *Avian Dis.* 47: 1042-1046.
  20. Vasfi Marandi, M., Bozorgmehri Fard, M. H., Hashemzadeh, M. (2002) Efficacy of inactivated H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> Avian Influenza vaccine against non-highly pathogenic A/ Chicken/ Iran/ ZMT-173/ 1999 infection. *Arch. Raz. Inst.* 53: 23-31.
  21. Wood, J. M., Kawaoka, Y., Newberry, L. A., Bordwell, E., Webster, R. G. (1984) Standardization of inactivated H<sub>5</sub>N<sub>2</sub> influenza vaccines and efficacy against lethal A/ Chicken/ Pennsylvania/ 1370/ 83 infection. *Avian Dis.* 29: 867-872.



# IN VITRO QUALITY EVALUATION OF AVIAN INFLUENZA SUBTYPE H<sub>9</sub>N<sub>2</sub> OIL-EMULSION VACCINES

Rajabi, Z.<sup>1\*</sup>, Tayefi Nasrabadi, H.<sup>2</sup>, Syofi Khojin, A. B.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz-Iran.

<sup>2</sup>Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz-Iran.

<sup>3</sup>Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz-Iran.

(Received 10 August 2009 , Accepted 2 May 2010)

---

## Abstract:

The use of vaccines in poultry to control avian influenza viruses (AIVs), especially mildly pathogenic avian influenza viruses, has been increased in recent years; thus, regarding the characteristic of AIVs, it is important to evaluate the quality of vaccines with an appropriate and rapid method. The aim of the present study was to investigate the quality of three commercially available oil-emulsion AIVs (subgroup H<sub>9</sub>N<sub>2</sub>) vaccines via in-vitro assessment. Viral antigens of the vaccines were recovered by aqueous partition method and the amounts of extracted total protein and recovered hemagglutination (HA) activity were determined and compared with the immune system responses of chickens to the vaccines. It has been shown that the amount of recovered total protein and activity of the recovered HA were different among vaccines with the same dose. Meanwhile, chickens showed different immune system responses to the vaccines. We have shown poor quality for two vaccines and high quality for one which can be attributed to their viral protein density.

**Key words:** Influenza vaccines, oil-emulsion vaccines, in vitro evaluation.

\*Corresponding author's email: [rajabi@tabrizu.ac.ir](mailto:rajabi@tabrizu.ac.ir), Tel: 0411-3392342, Fax: 0411-3357834

