بررسی تجربی ایمنی‌زایی چند نوع واکسن کشته آنفلوانزای طیور تحت تیپ H9N2 در جوجه‌های گوشتی

دکتر عبدالکریم زمانی مقدم[1] دکتر محمد حسن بزرگمهری فرد[2] دکتر مهدی وصفی مرندی[2] دکتر عبدالمحمد حسنی طباطبائی[1]

مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۶، شماره ۳، ۱۰۷-۱۰۳، (۱۳۸۰)

آنفلوانزای طیور بیماری ویروسی است که در سراسر دنیا انتشار داشته و توسط ویروسهای آنفلوانزای تیپ A از خانواده ارتومیکسوویریده ایجاد می‌گردد. در خرداد سال ۱۳۷۷ بیماری آنفلوانزای تحت تیپ H9N2 در گله‌های طیور ایران باعث ایجاد علایم بالینی و مرگ و میر بالایی گردید. پس از این زمان واکسیناسیون طیور به عنوان یکی از روشهای کنترل بیماری در نظر گرفته شد. در این تحقیق میزان تیتر سرمی HI چند نوع واکسن کشته آنفلوانزای طیور تحت تیپ H9N2 با یکدیگر مقایسه گردیده و پس از تلقیح گروه‌های مختلف با ویروس مزرعه علایم و دفع یا حضور ویروس در ارگانهای مختلف مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور ۲۱ گروه متشکل از ۳۰ قطعه جوجه نژاد آرین تهیه شد. در هر گروه از طیور، یک نوع واکسن متعلق به شرکت لوهمن ۱ (Lohmman)، ایواز (Ivaz)، واکسن ساخت مؤسسه واکسن و سرم سازی رازی (RI) و واکسن ساخت دانشکده دامپزشکی تهران (FVM) در سنین ۱، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ روزگی در زیر جلد ناحیه گردن تزریق گردید. در ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ هفته پس از واکسیناسیون نمونه‌های سرمی جهت تعیین حضور آنتی‌بادی علیه آنفلوانزای طیور تحت تیپ H9N2 مورد آزمایش HI قرار گرفت. گروه‌هایی که با واکسنهای داخلی آنفلونزای طیور (RI و FVM) واکسینه شده بودند نسبت به گروه‌هایی که واکسنهای خارجی آنفلوانزای طیور (Ivaz و Lohmman) دریافت نموده بودند سطح آنتی‌بادی بالاتری را نشان دادند ($P<0/0001$). در سن ۴۰ روزگی گروه‌های مختلف واکسینه شده با ویروس مزرعه تحت تیپ H9N2 سویه ZMT101 تلقیح شده و دو هفته پس از آن کلیه پرندگان کشتار و از مدفوع، نای، ریه، و کلیه به طور استریل نمونه‌برداری و جهت کشت ویروسی به آزمایشگاه ارسال گردید. در تمامی گروههای واکسینه شده با واکسن کشته آنفلوانزای طیور تحت تیپ H9N2 دفع ویروسی کاهش یافته بود. در این بین واکسنهای ساخت داخل در مقایسه با واکسنهای ساخت خارج موجب کاهش دفع بیشتر ویروس شده بودند ($P<0/001$).

واژه‌های کلیدی: آنفلوانزای طیور، واکسن کشته، جوجه‌های گوشتی، تیتر سرمی.

آنفلوانزای طیور بیماری ویروسی است که در پرندگان اهلی و وحشی ایجاد عفونت نموده و در سراسر دنیا از این پرندگان جدا شده است. این بیماری به صورت تحت بالینی یا عفونت خفیف دستگاه فوقانی تنفس و یا کاهش مختصر در تولید تخم مرغ تا بیماری حاد و کشنده و کاهش تولید تخم مرغ تا حد صفر می‌تواند متفاوت باشد. این بیماری از نظر اقتصادی بسیار با اهمیت بوده و علاوه بر خسارات مستقیم ناشی از خود بیماری، کنترل، پیشگیری و ریشه کنی آن بسیار پر هزینه است. (۷، ۶، ۵، ۴) در اکثر موارد تلفات و خسارات ناشی از یک واگیری آنفلوانزا قابل پیشگویی نمی‌باشد زیرا عوامل متعددی همچون اختلاف در خواص بیولوژیک ویروس، عفونتهای همزمان، استرسهای محیطی، سن و جنس پرنده نتیجه عفونت را تحت تاثیر قرار می‌دهند. در نتیجه در یک واگیری بیماری آنفلوانزا میزان واگیری و مرگ و میر از مقدار ناچیز تا نزدیک به ۱۰۰ درصد ممکن است متغیر باشد. ویروسهای آنفلوانزا قابلیت تغییرات ژنتیکی بسیار زیادی دارند که این امر اهمیت این بیماری را دو چندان می‌نماید (۱۲، ۱۱، ۱۰، ۹، ۸، ۷، ۶، ۵، ۴).

گزارشات اخیر نشان می‌دهد که عفونتهای آنفلوانزای طیور ناشی از تحت سروتیپ H9N2 و H9N3 با پاتوتیپ nHPAI در سرتاسر جهان افزایش یافته است (۱۴).

بیماری آنفلوانزای طیور از خرداد ۱۳۷۷ ابتدا در استانهای تهران و قزوین شیوع و سپس در اکثر نقاط کشور شایع گردید. ویروسهای آنفلوانزای طیور جدا شده از مرغداریهای ایران تاکنون متعلق به تحت تیپ H9N2 و پاتوتیپ nHPAI بوده‌اند (۱۴). از راههای مبارزه با بیماری، جلوگیری از ورود ویروس به مزرعه، جداسازی پرندگان حساس از آلوده، عدم تماس پرندگان حساس با پرندگان بهبود یافته، ایمن نمودن طیور توسط واکسیناسیون و استفاده از درمانهای حمایتی است (۴). واکسیناسیون یکی از مهمترین راههای ایمن نمودن طیور جهت مقابله با بیماری آنفلوانزا می‌باشد. واکسنها و روشهای واکسیناسیون مختلفی تاکنون ارایه گردیده است، از آن جمله می‌توان استفاده از واکسن غیر فعال شده روغنی، واکسنهای نوترکیبی، واکسن حاوی HA خالص تهیه شده توسط مهندسی ژنتیک و تلقیح DNA به طور مستقیم در جوجه‌ها را نام برد (۱۳، ۱۱، ۶، ۴، ۳، ۲) از آنجایی‌که پرندگان به عفونت با ویروسهای آنفلوانزا متعلق به هر ۱۵ تحت تیپ HA حساس می‌باشند، تنها با مشخص شدن تحت تیپ یک منطقه می‌توان واکسیناسیون علیه آن تحت تیپ را توصیه نمود (۹). اخیراً واکسنهای غیرفعال شده ویروس آنفلوانزا در گونه‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفته است که در کاهش علایم بالینی و مرگ و میر و همچنین کاهش دفع ویروسی مؤثر بوده‌اند. واکسنهای غیرفعال شده آنفلوانزا در بسیاری از کشورها ساخته شده است و در این بین واکسن غیر فعال شده آنفلوانزای تحت تیپ H9N2 توسط کشورهای آلمان، ایتالیا و دو نمونه نیز در داخل کشور ساخته شده است این واکسنها در شرایط مختلف در مرغداریهای صنعتی کشور جهت ایمن نمودن طیور در مقابل عفونت ویروس آنفلوانزای تحت تیپ H9N2 استفاده شده است ولی میزان تیتر آنتی‌بادی HI پس از واکسیناسیون در جوجه‌های گوشتی تا این زمان مطالعه نشده بود.

مواد و روش کار

در یک سالن پرورش طیور گوشتی تعداد ۲۱ پن مساوی به ابعاد ۲×۲ متر تهیه و پس از آماده سازی تعداد ۳۵ قطعه جوجه نژاد آرین تهیه شده از یک مزرعه مادر عاری از بیماری آنفلوانزا و نیز غیر واکسینه بر علیه بیماری آنفلونزا (مجموعاً ۷۳۵ قطعه) قرار داده شد. واکسیناسیون بر علیه بیماری گامبورو و نیوکاسل به روش معمول و بومی منطقه انجام شد و در سنین ۱، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ روزگی از واکسنهای زیر به میزان یک دوز در ناحیه زیر جلد گردن به هر گروه تزریق گردید (هر گروه یک واکسن را در یک نوبت در یک روز خاص دریافت نمود).

مشخصات واکسنهای آنفلوانزای مورد استفاده

واکسن داخلی شماره ۱: واکسن روغنی با مقدار $10^{7/4}$ ELD50 آنتی‌ژن ویروس آنفلوانزای H9N2 سویه ZMT/101 در هر دوز واکسن. یاور به کار رفته در واکسن: ISA - 70SEPPIC FRANCE. هر دوز = ۰/۵ میلی لیتر.

واکسن داخلی شماره ۲: واکسن روغنی با مقدار $10^{8/6}$ ELD50 آنتی‌ژن ویروس آنفلوانزای H9N2 سویه IRAN/259 در هر دوز واکسن. یاور به کار رفته در واکسن: ISA - 70SEPPIC FRANCE. ۲۵۰ میلی لیتر = ۵۰۰ دوز.

واکسن خارجی شماره ۱:

Inactivated oily emulsion avian influenza vaccine H9N2 (A. I. V. H9N2). 500 ml = 100 doses. Antigen content min. $10^{6.5}$ EID50. Dose: 0.5 ml. Lohmann animal health Gmbh 8 co. KG. Expiry date: 03.2001. Batch N: 9028700.

۱) گروه آموزشی علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان - ایران.
۲) گروه آموزشی علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

واکسن خارجی شماره ۲:

Fluva H9، Inactivated oily emulsion avian influenza vaccine H9N2. Composition per dose (0.25 ml): Avian influenza virus type A, subtype H9N2, with titre after inactivation not below to 640 HAU.،250 ml = 1000 doses. ،Batch N: 984365 ،Exp Date: 18.02.2001. ،Isbi Merial Italia spa Italy.

خونگیری از پرندگان: ابتدا یکبار در مرحله ورود به سالن از تعداد ۲۰ قطعه جوجه یکروزه (۳ درصد) خونگیری به عمل آمد. سرم این نمونه‌ها جدا شده و تحت آزمایش HI آنفلوانزا جهت اطمینان از منفی بودن و همچنین جهت اندازه‌گیری تیتر نیوکاسل جهت راهنمایی واکسیناسیون قرار گرفت. سپس با فواصل یک هفته از زمان واکسیناسیون هر گروه خونگیری انجام شد. خونگیریهای انجام شده توسط سرنگ انسولین برای هفته اول و سرنگ ۲ سی سی از هفته دوم از ناحیه ورید بالی انجام پذیرفت.

آزمایش ممانعت از هماگلوتیناسیون (HI): ابتدا به ازای هر سرم مورد آزمایش در هر ۱۲ گوده میکروپلیت مخصوص آزمایش HI، ۲۵ میکرولیتر محلول PBS ریخته شد. بر روی هر میکروپلیت ۸ ردیف دوازده‌تایی وجود دارد که با حروف A تا H مشخص گردیده است. بنابراین به وسیله هر میکروپلیت ۸ سرم را می‌توان آزمایش نمود. سرمهای از قبل تهیه شده در گوده‌های اول میکروپلیت به میزان ۲۵ میکرولیتر قرار داده شد. سپس از هر سرم ۱۰ رقت متوالی در حجم ۲۵ میکرولیتر تهیه گردید. حال به تمام رقتها مقدار ۲۵ میکرولیتر آنتی‌ژن دارای ۴ واحد هماگلوتنین اضافه شده و پس از نیم ساعت (زمان لازم جهت خنثی سازی ویروس) به کلیه گوده‌ها ۲۵ میکرولیتر گلبول قرمز مرغ ۱ درصد اضافه گردید. پس از گذشت ۴۵-۳۰ دقیقه نتیجه آزمایش قرائت شد. آخرین رقتی که در آن رسوب کامل گلبول قرمز انجام شده بود به عنوان عیار پادتن سرم در نظر گرفته شد. گوده‌های ستون ۱۱ و ۱۲ به ترتیب کنترل بدون آنتی‌ژن و کنترل بدون آنتی سرم در نظر گرفته شد.

کشت ویروسی نمونه‌ها: در سن ۴۰ روزگی در منطقه‌ای کاملاً ایزوله شده تعداد ۸ قطعه از هر گروه به داخل قفس منتقل و به میزان $10^{6/2}$ ELD50 ویروس آنفلوانزای H9N2 در هر ۱۰۰ میلی لیتر از راههای داخل چشمی، داخل سینوسی، داخل نایی و داخل وریدی تلقیح شدند. سپس تا سن ۵۵ روزگی علایم بالینی، میزان مصرف دان و وزن‌کشی انجام در این سن کلیه طیور کشتار و به روش استریل نمونه‌های کشت ویروسی به آزمایشگاه ارسال گردید. جهت کشت ویروسی نمونه‌های ارسالی به آزمایشگاه تا زمان آزمایش نمونه‌ها در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شده و سپس بلافاصله مورد آزمایش قرار گرفتند.

الف) آماده سازی نمونه‌ها: نمونه‌های مورد آزمایش در شرایط کاملاً استریل با قیچی کاملاً خرد شده و توسط هاون چینی کاملاً هموژن گردیدند. در مورد نای با اسکالپل قسمت مخاط نای کاملاً تخریش شده و قسمت غضروفی جدا شد. نمونه‌های تهیه شده با دور پایین سانتریفوژ شده و مایع رویی با آنتی بیوتیک با غلظت ۴× به فرمول زیر مخلوط و به مدت یک‌ساعت نگهداری شدند. فرمول آنتی بیوتیک مورد استفاده با غلظت ۱×: Streptomycine = 10 mg/ml ، Penicilline = 10000 IU/ml , Tylosin = 300 µg/ml , در مرحله بعد نمونه‌ها به طور استریل در سرنگ انسولین کشیده شد و از هر نمونه در تعداد ۵ تخم مرغ جنین‌دار ۱۰-۹ روزه به مقدار ۲۰۰µl تزریق گردید. جهت این عمل ابتدا تخم مرغهای جنین‌دار ۱۰-۹ روزه نوربینی شده و محدوده کیسه هوایی و سمت قرار گرفتن جنین علامتگذاری شد. قسمت کیسه هوایی کاملاً توسط الکل طبی ضد عفونی شده و در حدود چند میلیمتر بالاتر از کیسه هوایی سمت مخالف قرار گرفتن جنین به کمک سوزن مخصوص، پوسته تخم مرغ سوراخ گردید. سپس توسط سرنگ انسولین مقدار ۲۰۰µl در داخل حفره آلانتوئیک تزریق شد. در این مرحله سوراخ ایجاد شده توسط پارافین جامد ذوب شده مسدود گردید. لازم به یاد آوری است که کلیه مراحل فوق به صورت کاملاً استریل انجام شد. تخم‌مرغهای تلقیح شده به داخل دستگاه جوجه کشی منتقل شده و تخم‌مرغهای تلف شده و زنده تا پنج روز پس از تلقیح جمع آوری و در یخچال خنک گردیدند. سپس در شرایط استریل از مایع آلانتوئیک تخم‌مرغها برداشت شده و آزمایش HA صورت پذیرفت. در صورت مثبت بودن نمونه مورد نظر، توسط آنتی سرم اختصاصی نیوکاسل و آنفلوانزا آزمایش HI انجام می‌شد. موارد مشکوک مجدداً پاساژ داده شده و مراحل فوق را طی می‌نمود (۱۵ و ۱۲).

نتایج آزمایشات سرمی: در تحقیق انجام شده ۴ نوع واکسن با نامهای A,B,C,D که واکسن A و D ساخت داخل کشور و واکسنهای B و C ساخت خارج از کشور به ترتیب متعلق به شرکتهای LOHMANN و IVAZ در سن ۱، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ روزگی در گروههایی از طیور تلقیح گشتند. یک گروه از جوجه‌ها هیچ‌گونه واکسنی دریافت ننموده و به عنوان معیاری جهت مواجه احتمالی گله با ویروس مزرعه و از طرفی به عنوان گروه کنترل جهت ارزیابی واکسنهای استفاده شده در نظر گرفته شدند.

در این بررسی از طیور واکسینه با فواصل یک هفته خونگیری به عمل آمده و مورد آزمایش HI قرار گرفت. از گروه شاهد نیز از سن یکروزگی تا ۶۳ روزگی به فواصل یک هفته خونگیری به عمل آمده و مورد آزمایش HI قرار گرفت که در کلیه موارد هیچ‌گونه تیتری مشاهده نگردید. نمودارهای زیر خلاصه نتایج به دست آمده از این آزمایشات و مقایسه تیتر سرمی HI واکسنهای مختلف را در زمانهای متفاوت پس از واکسیناسیون را نشان می‌دهد.

نتایج کشت ویروسی

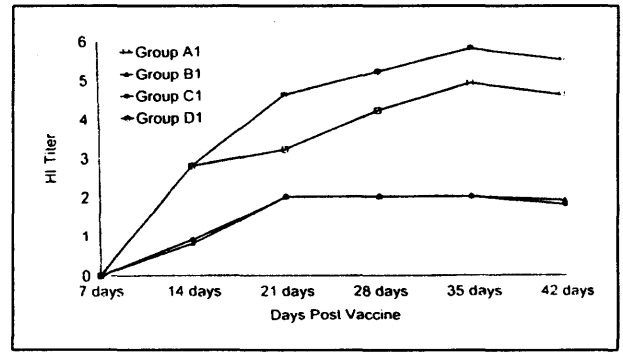
الف) کشت ویروسی از نای: تعداد ۸ نمونه از هر یک از ۲۱ گروه موجود مورد آزمایش قرار گرفت. از گروههای مختلف واکسینه شده ۱-۴ مورد مثبت مشاهده گردید. خلاصه نتایج در نمودار ۱ مشاهده می‌گردد. با آنالیزهای آماری انجام شده، اختلاف بین گروههای مختلف و گروههای کنترل معنی‌دار می‌باشد. $P = ۰/۰۰۰۱۹۲۹۳$ ، $df = ۵$، $X^۲ = ۲۴/۲۷$

ب) نتایج کشت ویروسی از مدفوع: تعداد ۸ نمونه از هر یک از ۲۱ گروه موجود مورد آزمایش قرار گرفت. از گروههای مختلف واکسینه شده ۱-۵ مورد مثبت مشاهده گردید. خلاصه نتایج در نمودار ۲ مشاهده می‌گردد. با آنالیزهای آماری انجام شده، اختلاف بین گروههای کنترل معنی‌دار می‌باشد. $P = ۰/۰۰۰۰۱۱۴۹$ ، $df = ۵$، $X^۲ = ۳۰/۵۵$

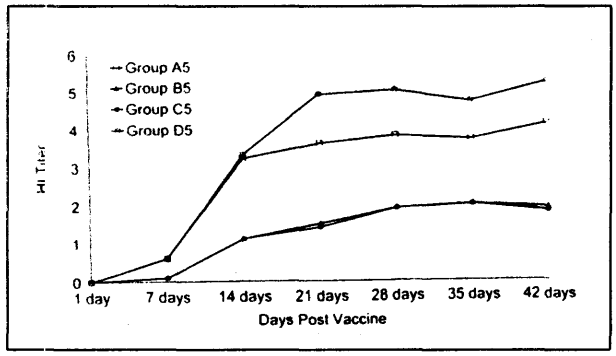
ج) کشت ویروسی از ریه: در این آزمایش ریه‌های پرنده‌های هر گروه با یکدیگر مخلوط شده و یک نمونه واحد برای هر گروه ایجاد گردید. سپس از هر نمونه ایجاد شده کشت ویروسی به عمل آمد. در این آزمایش علاوه بر جداسازی ویروس از گروه کنترل مثبت از گروههای A20, B1, B5, C1, C5, C10, D15 نیز ویروس جدا شد. از ۱۳ گروه دیگر و گروه کنترل منفی ویروسی جدا نشد.

د) کشت ویروسی از کلیه: در این آزمایش کلیه‌های پرنده‌های هر گروه با یکدیگر مخلوط شده و یک نمونه واحد برای هر گروه ایجاد گردید. سپس از هر نمونه ایجاد شده کشت ویروسی به عمل آمد. در این آزمایش علاوه بر جداسازی ویروس از گروه کنترل مثبت از گروه C1 نیز ویروس جدا شد. از ۱۹ گروه دیگر و گروه کنترل منفی ویروسی جدا نشد.

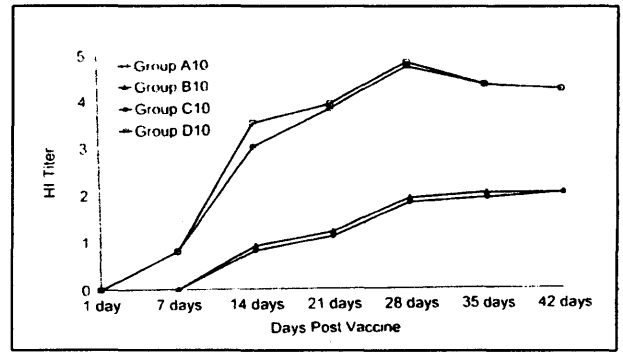
تاثیر واکسیناسیون بر تلفات، علایم بالینی و FCR در طیور گوشتی: کلیه گروههای واکسینه و شاهد از نظر تلفات و FCR مورد بررسی قرار گرفتند که از نظر آماری اختلافی مشاهده نشد. گروههای مختلفی که با ویروس زنده مزرعه تحت آلودگی تجربی قرار گرفتند نیز از نظر علایم بالینی، کالبدگشایی و FCR مورد بررسی واقع شدند. اصولا علایم بالینی مشاهده شده در گروههای مختلف و حتی گروه کنترل تنها در ۴۸ ساعت پس از تلقیح ویروس به صورت رال تنفسی قابل مشاهده بود. از روز سوم تلقیح بتدریج علایم کاهش یافته تا اینکه از روز چهارم علایم محسوس نبود. با مقایسه افزایش وزن، میزان مصرف دان و FCR گروههای مختلف پس از آلودگی تجربی با ویروس مزرعه مشخص شد گروه کنترل که هیچ‌گونه



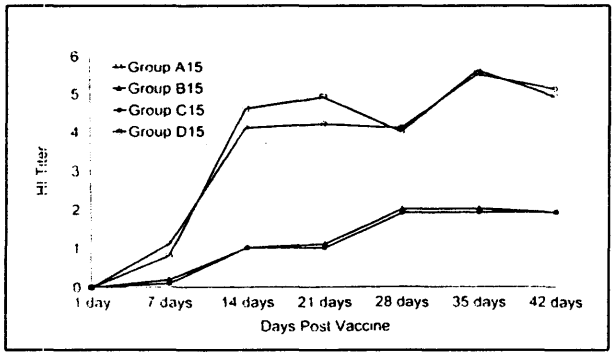
نمودار۱- تیتر سرمی HI در گروههای واکسینه شده در یکروزگی.



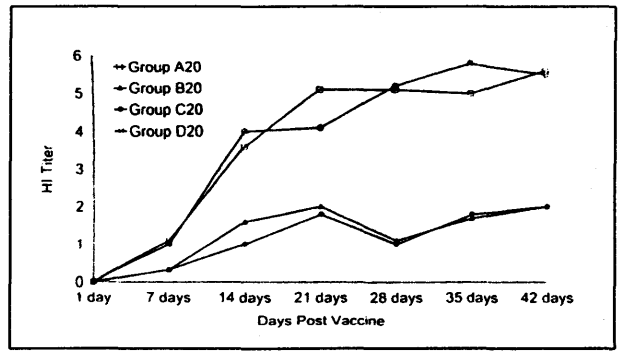
نمودار ۲- تیتر سرمی HI در گروههای واکسینه شده در ۵ روزگی.



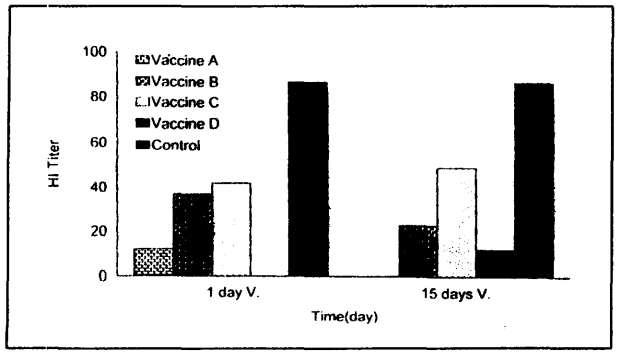
نمودار۳- تیتر سرمی HI در گروههای واکسینه شده در ۱۰ روزگی.



نمودار۴- تیتر سرمی HI در گروههای واکسینه شده در ۱۵ روزگی.



نمودار۵- تیتر سرمی HI در گروههای واکسینه شده در ۲۰ روزگی.



نمودار۶- نتایج دفع ویروس از نای در گروههای واکسینه شده در یکروزگی و ۱۵ روزگی.

واکسنی دریافت ننموده است دارای کاهش وزن و افزایش ضریب تبدیل غذایی معنی‌داری در مقایسه با سایر گروهها می‌باشد.

بحث

در تحقیق انجام شده ۴ نوع واکسن با نامهای A,B,C,D که واکسن A و D ساخت داخل کشور و واکسنهای B و C ساخت خارج از کشور به ترتیب متعلق به شرکتهای LOHMANN و IVAZ در سن ۱، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ روزگی در گروههایی از طیور تلقیح گشتند. یک گروه از جوجه‌ها هیچ‌گونه واکسنی دریافت ننموده و به عنوان معیاری جهت مواجه احتمالی گله با ویروس مزرعه و از طرفی به عنوان گروه کنترل جهت ارزیابی واکسنهای استفاده شده در نظر گرفته شدند. نتایج حاصل در گروههای مختلف و مقایسه آماری آنها حاکی از تأثیر بسیار بیشتر واکسنهای ساخت داخل کشور در مقایسه با واکسنهای ساخت خارج از کشور می‌باشد. در این بین اختلاف چندانی بین دو واکسن ساخت خارج از کشور (بین B و C) و دو واکسن ساخت داخل کشور (بین A و D) مشاهده نگردید ($P<0/0001$).

در اکثر موارد تیتر آنتی‌بادی HI از هفته دوم پس از واکسیناسیون شروع به افزایش کرده و تا ۴۲ روز پس از واکسیناسیون تا حداکثر ۵/۸-۴/۲ log2 در مورد واکسنهای داخلی و ۲/۱۳-۱/۸ log2 در مورد واکسنهای خارجی رسیده است. علت اختلاف زیاد بین متوسط تیتر HI حاصل از واکسنهای داخلی و خارجی می‌تواند تحریک بهتر سیستم ایمنی توسط واکسنهای داخلی و تعداد موارد منفی (صفر) کمتر نمونه‌ها در واکسنهای داخلی در مقایسه با واکسنهای خارجی باشد. لازم به ذکر است که اختلاف بین واکسنها می‌تواند ناشی از مقدار آنتی‌ژن موجود در هر دوز واکسن، نوع ادجوان استفاده شده و احتمالاً تفاوت در سویه‌های ویروس مورد استفاده در واکسن باشد (ممکن است بعضی از اپیتوپهای ویروس استفاده شده در واکسنهای خارجی با ویروس استفاده شده در واکسنهای داخلی متفاوت باشد). نتایج به دست آمده در این تحقیق با گزارشات موجود در سایر کشورها که عموماً در زمینه طیور تخمگذار انجام پذیرفته است تا حدی

همخوانی دارد (۶). در ارتباط با واکسنهای داخلی ملاحظه می‌گردد که ۸۰-۷۰ درصد پرندگان واکسینه بخوبی آنتی بادی بر علیه ویروس آنفلونزا را ایجاد نموده و در مواردی تا تیتر سرمی HI ۶ log2 نیز آن را افزایش داده‌اند. با بررسی هر هفته پس از واکسیناسیون در گروههای مختلف تأثیر مناسبتر واکسنهای داخلی در مقایسه با نوع خارجی آن تأیید می‌گردد. (P<۰/۰۰۰۱) اگر چنانچه تیتر HI قابل قبول جهت محافظت نسبی طیور گوشتی ۴ Log2 و بیشتر از آن فرض شود ملاحظه می‌گردد که در زمانی‌که در یکروزگی واکسن تلقیح گردد از حدود هفته سوم یعنی ۲۱ روزگی می‌توان به چنین تیتر سرمی دست یافت. در صورتی‌که در سن ۵ روزگی تلقیح گردد، ۲۱ روز پس از تلقیح واکسن یعنی در سن ۲۶ روزگی می‌توان به میزان تیتر سرمی حد انتظار رسید. با تلقیح واکسن در سن ۱۰ روزگی در حدود سن ۳۳ روزگی تیتر آنتی بادی HI از مرز متوسط ۴ log2 فراتر خواهد رفت. در تلقیح واکسن در سن ۱۵ روزگی افزایش تیتر با سرعت بیشتری ایجاد شده و در حدود دو هفته پس از واکسیناسیون به بیشتر از ۴ log2 خواهد رسید. اگر چه سرعت افزایش تیتر در این سن بیشتر می‌باشد ولی باید توجه داشت سنی که پرنده به حد ایمنی قابل قبول می‌رسد در این گروه حدود ۳۰ روزگی خواهد بود. اگرچه به نظر می‌رسد سن واکسیناسیون در ۲۰ روزگی نمی‌تواند به موقع ایمنی مورد نیاز پرندگان را فراهم آورد ولی جهت مقایسه واکسن و استفاده در شرایط واکسیناسیون تاخیری (اگر چنانچه به لحاظ شرایطی واکسیناسیون در قبل از این سن انجام نشده باشد) واکسن در سن ۲۰ روزگی نیز مورد آزمایش قرار گرفت. در ۱۴ روز پس از تلقیح واکسن در سن ۲۰ روزگی تیتر آنتی بادی به حد مورد انتظار یعنی بیشتر از ۴ log2 رسید که در این زمان سن پرندگان حدود ۳۴ روز می‌باشد. در صورتی‌که ایجاد ایمنی هر چه زودتر طیور مد نظر باشد به نظر می‌رسد تلقیح واکسن در سنین پایین با وجودی‌که باعث تولید آنتی‌بادی با تأخیر بیشتر می‌گردد در مجموع باعث حصول تیتر HI قابل قبول در سن کمتر خواهد شد. در این بین تلقیح واکسن در سن یکروزگی تیتر HI قابل قبولی را در سن ۲۱ روزگی ایجاد نموده است حال آنکه تلقیح واکسن در سنین ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ روزگی به ترتیب در سنین ۲۶، ۳۰، ۳۳، ۳۴ روزگی باعث ایجاد آنتی‌بادی مورد انتظار شده است.

همان‌گونه که ملاحظه می‌گردد بر خلاف انتظار واکسن در سن ۱۵ روزگی در مقایسه با سن ۱۰ روزگی حصول به ایمنی زودتری را باعث گردیده است که این امر باید مورد بررسی بیشتری قرار گیرد. با بررسی نتایج کشت ویروسی از مدفوع طیور در ۲ هفته پس از آلودگی تجربی با ویروس مزرعه سویه ZMT-101 مشخص شد که در طیور واکسینه نشده از قریب ۸۷ درصد موارد ویروس از مدفوع جدا شده است حال آنکه این رقم در مورد طیور واکسینه با واکسنهای داخلی به حداکثر ۱۳ درصد و در طیور واکسینه شده با واکسنهای خارجی به ۲۵ درصد تا ۶۳ درصد می‌رسد (P = ۰/۰۰۰۰۱۱۴۹). با توجه به نتایج به دست آمده ملاحظه می‌گردد که میزان دفع ویروس از گروههای واکسینه با واکسنهای داخلی در سن یکروزگی و ۱۵ روزگی تفاوتی وجود ندارد ولی در گروههای واکسینه با واکسنهای خارجی میزان دفع ویروس در گروه واکسینه شده در یکروزگی تقریباً دو برابر گروه واکسینه شده در ۱۵ روزگی است. البته تاثیر سن واکسیناسیون در جلوگیری از دفع ویروس نیاز به بررسیهای بیشتری دارد. به طور کلی این نتایج حاکی از کاهش معنی‌دار و قابل ملاحظه دفع ویروس از مدفوع در طیور واکسینه است. نکته قابل توجه تأثیرات واکسن خارجی در مقایسه با گروه کنترل می‌باشد. دفع ویروس در گروه کنترل در مقایسه با طیور واکسینه با واکسن داخلی حدود ۶ برابر و در مقایسه با طیور واکسینه با واکسنهای خارجی حدود ۲ برابر بوده است.

زمانی‌که از نای طیور گروههای مختلف کشت ویروسی به عمل آمد مشخص گردید که در گروه کنترل از ۸۷ درصد موارد ویروس جدا گشته است در حالی‌که در طیور واکسینه با واکسنهای داخلی این رقم به حداکثر ۱۳ درصد رسیده است (P = ۰/۰۰۰۰۱۹۲۹۳). این یافته‌ها دلالت بر همخوانی نتایج کشت ویروسی از مدفوع و نای دارد. در طیور واکسینه شده با واکسنهای خارجی در ۵۰-۲۵ درصد موارد ویروس جدا شده است که اگر چه در مقایسه با واکسنهای داخلی دفع ویروس بسیار بیشتری را نشان می‌دهد ولی در مقایسه با گروه کنترل بیش از ۱/۲ کاهش را می‌توان ملاحظه نمود.

با کشت ویروسی ریه‌های پرندگان هر گروه مشخص گردید که تنها در ۳۵ درصد گروههای واکسینه ویروس جدا گردیده است که از این مقدار ۱۰ درصد متعلق به واکسنهای داخلی و ۲۵ درصد متعلق به گروه واکسنهای خارجی بوده است. در این بین ویروس از ریه‌های گروه کنترل نیز جدا گشته است. این یافته‌ها نیز حکایت از احتمال کاهش حضور ویروس در دستگاه تنفس طیور واکسینه دارد. کاهش دفع ویروس از طیور واکسینه در گزارشات متعددی نیز عنوان گشته است (۱۰ و ۵).

به منظور جستجوی حضور ویروس تحت تیپ H9N2 در کلیه، از کلیه‌های گروههای مختلف واکسینه شده و همچنین از طیور غیر واکسینه آلوده شده با ویروس مزرعه کشت ویروسی به عمل آمد، در این بررسی از کلیه‌های گروه غیر واکسینه و همچنین یک گروه از طیوری که در یکروزگی واکسن خارجی دریافت نموده بودند (گروه C) ویروس جدا گردید. از سایر موارد ویروسی جدا نشد. علت حضور ویروس در کلیه ممکن است به علت انتشار سیستمیک ویروس و استقرار آن در کلیه باشد. از طرفی یکی از روشهای تلقیح ویروس زنده به پرندگان روش IV بوده است که این خود می‌تواند علت حضور ویروس در کلیه‌ها باشد. با این وجود در اکثر موارد واکسینه (۹۵ درصد موارد) ویروسی از کلیه‌ها جدا نگردید. با توجه به نتایج کشت ویروس از مدفوع، نای، ریه و کلیه می‌توان دریافت که واکسیناسیون بر روی جلوگیری از دفع ویروس و یا حضور ویروس در این ارگانها نقش بسزایی اعمال نموده است. به عبارتی واکسیناسیون خصوصاً با واکسنهای داخلی توانسته است به طور معنی‌داری دفع یا حضور ویروس را در مدفوع (P = ۰/۰۰۰۰۱۱۴۹)، نای (P = ۰/۰۰۰۰۱۹۲۹)، ریه و کلیه کاهش دهد. این کاهش دفع ویروس می‌تواند به کاهش آلودگی منطقه و کاهش واگیری سایر گله‌های طیور کمک نماید. این کاهش دفع ویروس به دنبال واکسیناسیون با سایر مطالعات انجام گرفته در سایر کشورها همخوانی دارد. لازم به ذکر است که مقدار آنتی‌ژن موجود در واکسن که باعث کاهش یا قطع دفع ویروس می‌گردد بیشتر از مقداری است که از علایم بالینی و تلفات جلوگیری می‌نماید (۸). اگر چنانچه یکی از علل مهم واکسیناسیون جلوگیری و یا کاهش دفع ویروس می‌باشد لازم به نظر می‌رسد که بررسیهای دقیقتری در ارتباط با میزان آنتی‌ژن موجود در واکسن و مقدار دقیق آن جهت کاهش مناسب و یا قطع دفع ویروس صورت پذیرد. به عنوان مثال میزان آنتی‌ژن ۰/۴ میکروگرم در هر دوز واکسن مورد استفاده در مکزیک قادر به کاهش علایم بالینی و دفع ویروس با ویروس H5N2 گردیده است (۸).

اگر چنانچه واکسیناسیون بتواند تعداد پرندگان آلوده شده را کاهش دهد ممکن است امکان تغییرات آنتی‌ژنیکی در ویروس را نیز کاهش دهد. آقای انلی (Anelli) و همکارانش طی تحقیقی که در سال ۱۹۹۹ در خصوص واگیری پنسیلوانیا انجام دادند فرضیه‌های ذکر شده را مطرح نمودند (۱).

با توجه به نتایج به دست آمده به نظر می‌رسد جهت کنترل بیماری، کاهش خسارات ناشی از بیماری و ایجاد زمینه ریشه‌کنی بیماری انجام واکسیناسیون بر علیه آنفلوانزای طیور تحت تیپ H9N2 در کشور ما ضروری می‌باشد. در این بین استفاده از واکسنهای داخلی می‌تواند بسیار سودمندتر واقع گردد.

تشکر و قدردانی

مقاله مزبور در پوشش طرح تحقیقاتی مصوب شورای پژوهشی دانشگاه تهران به شماره ۲۱۸/۱/۳۸۷ صورت پذیرفته است که بدین وسیله مراتب تشکر و قدردانی خود را به حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه تهران تقدیم می‌داریم.

References

1. Anclli, J.F., Scott Hurd, H, Forsythe, k. and YTrock, S.C. (1999): Risk analysis of potential control options for the 1997 nonpathogenic avian influenza outbreak in Pennsylvania, no published.
2. Beard, C.W., Schnitzlein, W.M. and Tripathy, D.N. (1991): Protection of chicken against highly pathogenic avian influenza virus (H5N2) by recombinant fowlpox viruses, Avian Diseases., 35:356-359.
3. Crawford, J., Wilkinson, B., Vosnesnsky, A., Smith G., Garcia, M., Stone, H. and Perdue, M.L. (1999): Baculovirus- derived hemagglutinin vaccines protect against lethal influenza infection by avian H5 and H7 subtypes, Vaccine. 17(18): 2265-74.
4. Esterday, B.C., Hinshaw, V.S. and Halvorson, A. (1997): Influenza. Diseases of Poultry, 10th Edition (Ed B.W. Calnek), JAWA pp: 585-605., State University Press, Ames.
5. Fenner, F. Bachmman, P.A., Gibbs, E.P.j., Murphy, F.A., Studdert, M.j. and White, D.O. (1987): Veterinarty Virology Academic Press. Orlando. FL PP: 473-484.
6. Fynan, E.F., Webster, R.G., Fuller, D.H., Haynes, J.R., Santoro, J.R., Santoro, J.C. and Robinson, H.L. (1993): DNA vaccines: Protective immunization by parenteral, mucosal and gene-gun inoculations, Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 90(11): 478-11, 482.
7. Garcia, A., Johnson, H., Srivastava, D.K., Jayawardene, D.A., Wehr, D.R. and Webster, R.G. (1998): Efficacy of inactivated H5N2 influenza vaccines against lethal A/chicken/Queretaro/ 19/95 infection, Avian Diseases. 42:248-256.
8. Guan, Y., Shortridge,K.F., Krauss, S. and Webster, R.G. (1999): Molecular characterization of H9N2 influenza viruses: were they the donors of the internal genes of H_5N_1 virus in Hong Kong?, proc Natl. Acad. Sci. USA., 96 (16): 9363-7.
9. Halvorson, D.A., Karunakaran, D., Abraham,A.S., Newman, J.A., Sivanandan, V. and Poss, (1987): Efficacy of vaccine in the control of avian influenze. United States Animal Health Association Athens, GA.PP; 264-270.
10. Higers, L.A., Nicolas, I., Lejeune, G., Dewil, E. and Boon, B. (1998): Effect of various adjuvants on secondary immune response in chickens, Vet. Immunol Immunopathol., 66 (2): 159-171.
11. Johansson, B.E. (1999): Results in a balanced and broadened immune response superior to conventional vaccine, Vaccine., 17 (15-16): 2073-80.
12. Jordan, F.T.W. and Pattison, M. (1996): Orthomyxoviridae (Avian Influenza), 4th Ed.W.B. Saunders company limited, UK. PP: 156-165.
13. Kodihalli, S., Goto, H., Kobasa, D.L., Krauss, S., Kawaoka, Y. and Webster, R.G. (1999): DNA vaccine encoding hemagglutinin provides protective immunity against H5N1 influenza virus infection in mice, Journal of Virol., 73 (3): 2094-8.
14. Marandi, V.M., Bozorgmehri fard, M.H. (2000): Efficacy of inactivated H9N2 avian influenza vaccine against non highly pathogenic A/Chicken/ZMT-101/Iran infection. World Poultry Congress (Submitted).
15. Swayne, D.E., Senne, D.A. and Bread, C.W. (1998): Avian influenza. In: Swayna. D.E. Glisson, J.R. Jackwood, M.W. Pearson, J.E. and Reed, W.M.A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of avian Pathogens,. Fourth Edition, The American Association of Avian Pathologists. Ed Kendall-Hunt. Rose Printing. Florida. PP: 150-154.

Comparative experimental study of Immunogenesis of different inactivated H9N2 avian influenza vaccines in broiler chickens.

Zamani Moghadaam, A.K.[1], Bozorgmehri Fard, H.[2], Vasfi Marandi, M.[2], Tabatabaii, A.M.[2]

[1]*Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine,Shahid Bahonar Kerman University, Kerman – Iran.*

[2]*Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine,University of Tehran, Tehran – Iran.*

Avian influenza (AI) is a viral disease with worldwide distribution. It is caused by influenza A viruses of the family Orthomyxoviridae. In May 1998, clinical signs and high mortaity in broiler chickens in Iran were associated with H9N2 avian influenza subtype. Vaccination was adapted as an alternative method to control it in poultry industry. The aim of this study was to compare the Immunogenesis of different local and imported H9N2 avian influenza vaccines. Arian broiler chickens were divided randomly into 21 groups of 30 birds. Each group received standardized dose of Lohmman, Ivaz, and FVM vaccines in 1,5,10,15 and 20 days old by subcutaneously in the nape of the neck. Sera were collected from each chicken for antibody analysis 1,2,3,4 and 5 weeks post vaccination. The sera were tested for antibodies against avian influenza H9N2 subtype with hemagglutination inhibition (HI) tests. Antiboby levels in broiler chickens immunized with local H9n2 avian influevza vaccines were higher than those Immunized with imported H9N2 avian influenza vaccines ($P<0.0001$). The vaccinated chickens were challenged with local H9N2 influenza virus. To detect viral shedding feces, lungs and kidneys were tested. In all vaccinate groups, viral shedding was reduced. The local H9N2 avian influenza vaccines in broiler chickens induced a significantly immune response and less viral shedding in comparison with imported H9N2 avian influenza vaccine ($P<0.001$). On the basis of these results, it is suggested that vaccination of broiler chickens with inactivated local vaccine may be useful in control of AI in poultry industry in IRAN.

Key words: Avian Influenza, Inactivated vaccine, Broiler chicken, HI, Viral shedding.