JVM Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکروبیولوژی دامپزشکی/ دوره دهم، شماره اول، ۱۳۹۳، پیاپی ۲۸: ۴۴-۳۷

# بررسی تاثیر دما، زمان، لرزش و غلظت‌های مختلف فرمالین بر پروسه غیرفعال‌سازی سویه واکسینال ویروس آنفلوانزا (H9N2)

**رحیم قدیمی‌پور [۱و۳]*، ایرج خلیلی [۱]، علی آمقی [۱]، محمد مجید ابراهیمی [۲]، مسعود قربانپور [۳]، سعید صدیق اعتقاد [۱]، بهراد زندیه [۴]**

*۱- بخش تحقیق و توسعه، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه شمالغرب کشور، مرند، ایران*

*۲- بخش تحقیق و تولید واکسن‌های طیور، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران*

*۳- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران*

*۴- کارشناس بخش بهداشت و مدیریت بیماریهای طیور، اداره کل دامپزشکی استان آذربایجان شرقی، تبریز، ایران*

تاریخ دریافت: ۲۶ فروردین ۱۳۹۲ تاریخ پذیرش: ۱۰ دی ۱۳۹۲

**چکیده**

*به منظور تهیه واکسن‌های غیرفعال، عوامل پاتوژن باید بوسیله مواد شیمیایی مختلف غیرفعال گردند. امروزه بیشتر واکسن‌های ویروسی غیرفعال در کشور ما بوسیله تاثیر فرمالین بر ویروس تهیه می‌شوند. با توجه به اهمیت عواملی مانند غلظت فرمالین، مدت زمان غیرفعال‌سازی، دمای انکوباسیون و شرایط لرزش در پروسه غیرفعال‌سازی ویروس آنفلوانزا و نیز برای ارتقاء کیفی واکسن نهایی، بهینه کردن شرایط موثر بر غیرفعال‌سازی ضروری به نظر می رسد. بدین منظور بعد از تهیه و تیترسنجی ویروس سویه واکسینال آنفلوانزا (H9N2)، آنرا با استفاده از غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۰۷۵، ۰/۱، ۰/۱۲۵، ۰/۱۵ و ۰/۲ درصد فرمالین در دماهای ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۳۷ و ۳۹ درجه سانتیگراد و زمان های ۱۲، ۱۶ و ۲۱ ساعت و نیز شرایط لرزش و عدم لرزش در طول پروسه، بصورت خوشه ای تقسیم نمودیم. چهار گروه شاهد جهت کنترل متغیرهای مختلف در نظر گرفته شدند. بعد از انجام آزمایشات، نمونه‌های اخذ شده از همه گروه ها توسط تست غیرفعال‌شدگی (IT) و تست هماگلوتیناسیون (HA) ارزیابی گردیدند. کلیه آزمایشات فوق در سه دوره تکرار شدند. بر اساس نتایج اخذ شده، غلظت ۰/۰۵ درصد فرمالین در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد و زمان انکوباسیون ۱۲ ساعت ویروس را بصورت بهینه غیرفعال نمود. همچنین عملیات لرزاندن تاثیر معنی داری بر روند غیرفعال‌سازی نداشته است. بر اساس یافته‌های این تحقیق، عملیات غیرفعال‌سازی در شرایط مختلف تحت آزمایش تاثیر معنی داری بر تیتر HA ویروس، بلافاصله بعد از غیرفعال‌سازی، نداشته است. لذا در روند تولید واکسن غیرفعال آنفلوانزا، استفاده از شرایط بهینه فوق جهت غیرفعال‌سازی پیشنهاد می‌گردد.*

***کلمات کلیدی:*** *غیرفعال‌سازی، آنفلوانزای H9N2 طیور، فرمالین، واکسن آنفلوانزا*

* نویسنده مسئول: رحیم قدیمی‌پور

آدرس: بخش تحقیق و توسعه، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه شمالغرب کشور، مرند، ایران. تلفن: ۸۲-۰۴۹۱۲۴۵۳۲۸۰

پست الکترونیک: ghadimipoorrahim@yahoo.com

**مقدمه**

بیماری‌های ویروسی به عنوان مهم‌ترین علل خسارات اقتصادی در صنعت پرورش طیور به شمار می‌روند. بیماری آنفلوانزای طیور (AI) که از سال ۱۹۹۵ گله‌های گوشتی و تخمگذار صنعتی را در بسیاری از کشورها از جمله مکزیک، پاکستان، چین و ایتالیا درگیر نمود، یکی از این بیماری‌ها است (۱۳). این بیماری توسط جنس A خانواده ارتومیکسوویریده ایجاد شده و ارگان‌های مختلف انواع طیور را درگیر می سازد. ویروس های خانواده ارتومیکسوویریده ویروس‌هایی با RNA غلاف دار هستند که دارای دو آنتی ژن سطحی H و N می‌باشند. آنتی ژن H دارای فعالیت هماگلوتینینی بوده و در چسبندگی ویروس روی سلول میزبان نقش دارد. همچنین آنتی ژن N مسئول آزاد کردن ویروس از سلول های آلوده بوده و دارای فعالیت نورآمینیدازی می‌باشد. این ویروس ها براساس نوع هر کدام از آنتی ژن های H و N به تحت تیپ های متعددی طبقه بندی می شوند. همچنین بر اساس بیماریزایی، و صرف نظر از تحت تیپ‌هایشان، این ویروس ها به دو گروه کم حدت (LP) و شدیداً بیماری زا (HP) طبقه بندی می‌شوند. از خصوصیات مهم ویروس آنفلوانزای طیور، قدرت جهش از شکل LP به HP می‌باشد. جهش ویروس اساساً به علت تغییرات جزئی آنتی ژنتیکی (Drift) در سکانس آمینواسیدهای ناحیه هماگلوتینین و یا در اثر تغییرات شدید آنتی ژنتیکی (Shift) اتفاق می‌افتد که باعث بروز پدیده نوترتیبی و ساخت یک تحت تیپ جدید میشود (۱۴).

در ایران، عربستان سعودی، پاکستان و امارات از سال ۱۹۹۷، تحت تیپ H9N2 که باعث تلفات در جوجه‌های گوشتی و نیز کاهش تولید تخم‌مرغ در گله‌های تخمگذار بوده، مشاهده گردید. به نظر می‌رسد که این میزان تلفات و کاهش تولید در این کشورها تنها مربوط به ویروس آنفلوانزای جدا شده نبوده و ویروس های تنفسی و عوامل دیگری مانند عوامل سرکوب ایمنی، استرس های محیطی و باکتریهای ثانوی نیز در ایجاد آن دخالت فراوان داشته‌اند. عفونت آنفلوانزا در ماکیان اغلب باعث خسارات اقتصادی و طیفی از علائم بالینی از بیماری تنفسی ملایم و کاهش تولید تخم‌مرغ تا بیماری حاد سیستمیک می گردد (۱و ۱۹).

در بین روش های پیشگیری از آنفلوانزای طیور، استفاده از واکسن‌های غیرفعال به‌عنوان یکی‌از ابزارهای پر ارزش مطرح است. تا کنون دو نوع واکسن برای آنفلوانزا مورد تایید قرار گرفته است که هر دو مورد در تخم‌مرغ‌های جنین‌دار تولید می‌شود: واکسن آنفلوانزای زنده تخفیف حدت یافته و واکسن آنفلوانزای غیرفعال (۱۷و ۱۸). تولید واکسن آنفلوانزای غیرفعال H9N2 در سال ۱۹۸۸ در ایران آغاز گردید و امروزه این واکسن یکی از بهترین واکسن‌های غیرفعال آنفلوانزا از نظر کمی و کیفی بوده و پاسخ مناسب ایمونولوژیک در میزبانان ایجاد می کند (۱۲ و ۱۷).

به منظور تهیه واکسن‌های غیرفعال، عوامل پاتوژن استحصال شده باید بوسیله مواد شیمیایی مختلف از قبیل بتا پروپیو لاکتون (BPL)، فرمالین و بیناری اتیلن ایمین (BEI) غیرفعال گردند. جهت تولید واکسن آنفلوانزای غیرفعال H9N2 در ایران از فرمالین بعنوان غیرفعال‌کننده استفاده می‌شود. به نظر می‌رسد فاکتورهای متعددی مانند غلظت فرمالین، مدت زمان غیرفعال‌سازی، دمای انکوباسیون و شرایط لرزش، پروسه غیرفعال‌سازی این ویروس را تحت تاثیر قرار می‌دهند. با توجه به امکان تاثیر شرایط فوق روی

غیرفعال‌سازی ویروس آنفلوانزا و با در نظر گرفتن قدرت این ویروس در ایجاد تغییرات ژنتیکی وسیع در خود و اهمیت این پدیده در فرایند تولید واکسن، بهینه سازی شرایط موثر بر غیرفعال‌سازی در پروسه تولید واکسن ضروری به نظر می رسد.

## مواد و روش کار

### ویروس

بذر مورد استفاده، ویروس آنفلوانزا سویه ($H_9N_2$) A/Chicken /Iran/۹۹ است که در حفره آلانتوئیک تخم‌مرغ‌های جنین دار ۱۱ روزه SPF تلقیح گردید. تخم‌مرغ‌ها بعد از تلقیح بمدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷/۵ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. سپس مایع آمنیوآلانتوئیک آنها جمع آوری گردید (۵).

### تیترسنجی ویروس

HA (Heamagglutination) ویروس استحصال شده، در پلیت های ۹۶ خانه V شکل با گلبول قرمز ۱ ٪ جوجه سنجیده شد و با تیتر نهایی ۲ Log ۱۰ = HA آماده شد (۱۴). همچنین $EID_{50}$ ( Egg Infective Dose 50) ویروس به روش Reed and Muench انجام شد و تیتر عفونت زایی آن ۱۰ Log ۹/۸ = $EID_{50}$ محاسبه گردید (۱۵).

### غیر فعال‌سازی ویروس

بعد از تهیه و تیتر سنجی، ویروس به ۱۸۴ ویال ۲۰۰ میلی لیتری تقسیم گردید. سپس آزمایشات غیرفعال‌سازی روی ویال ها به ترتیب زیر انجام پذیرفت:

محلول فرمالدهید ( Merck Formaldehyde 37.40%;) به ۱۸۰ ویال حاوی ویروس به نحوی اضافه گردید که غلظت نهایی آن به ترتیب در ۳۰ ویال ۰/۰۵ درصد، در ۳۰ ویال ۰/۰۷۵ درصد، در ۳۰ ویال ۰/۱ درصد (غلظت استاندارد)، در ۳۰ ویال ۰/۱۲۵ درصد، در ۳۰ ویال ۰/۱۵ درصد و در ۳۰ ویال ۰/۲ درصد شد. سپس ویال‌ها تکان داده شده و در دماهای ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۳۷ (دمای استاندارد) و ۳۹ درجه سانتیگراد و زمان های ۱۲، ۱۶ (زمان استاندارد) و ۲۱ ساعت تحت شرایط لرزش (دستگاه شیکر JSH – 20CH; Jahl) با دور چرخش ۷۲ دور در دقیقه (RPM) و بدون لرزش قرار گرفتند. در پایان مدت زمان آزمایش، نمونه برداری از ویا ل ها انجام شد.

گروه شاهد اول بدون افزودن فرمالین به مدت ۱۶ ساعت همراه با عمل لرزش در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. گروه شاهد دوم در همان شرایط و بدون عمل لرزش انکوبه گردید. گروه شاهد سوم با افزودن فرمالین ۰/۱ درصد به مدت ۱۶ ساعت و همراه با عمل لرزش در شرایط سردخانه (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفت. گروه شاهد چهارم در همان شرایط و بدون عمل لرزش در سردخانه قرار داده شد. در پایان مدت زمان آزمایش، نمونه برداری از گروه های شاهد نیز انجام پذیرفت. کلیه گروه‌ها در سه تکرار ارزیابی گردیدند.

### ارزیابی نمونه‌ها از نظر IT

از نمونه اخذ شده از هر ویال تحت آزمایش به حفره آلانتوئیک ۲۵ تخم‌مرغ جنین دار ۱۱ روزه SPF، هرکدام ۰/۲ سی سی تلقیح گردید. بعد از تلقیح، تخم‌مرغ‌ها برای مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷/۵ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. در هر ۲۴ ساعت تخم‌مرغ‌ها یکبار کندلینگ شدند. تخم‌مرغ‌های تلف شده در ۲۴ ساعت اول حذف گردیدند. بعد از ۷۲ ساعت،

تخم‌مرغ‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. سپس باز شده و مایع آمنیوآلانتوئیک تک تک آنها از نظر هماگلوتیناسیون ماکرو مورد بررسی قرار گرفت. سپس از مایع آمنیوآلانتوئیک هر یک از تخم‌مرغ‌ها مقداری جمع آوری شده و در پاساژ دوم، به حفره آلانتوئیک ۲۵ تخم‌مرغ دیگر تلقیح شد. از مایع آمنیو آلانتوئیک هر یک از تخم‌مرغ‌های پاساژ دوم نیز مقداری جمع آوری شده و در پاساژ سوم مورد استفاده قرار گرفت. در هر سه پاساژ، باید همه تخم‌مرغ‌ها از نظر هماگلوتیناسیون ماکرو منفی باشند (۵).

### ارزیابی نمونه‌ها از نظر HA

از نمونه اخذ شده از هر ویال تحت آزمایش، تست HA انجام شد. نتایج بدست آمده از تست‌های غیرفعال‌سازی و HA، مورد مقایسه قرار گرفته و شرایط متعادل غیرفعال‌سازی و نیز میزان اثرگذاری روش‌های مورد مطالعه بر غیرفعال‌سازی و تیتر ویروس مشخص گردید.

### نتایج

بر اساس نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر، در همه غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۰۷۵، ۰/۱، ۰/۱۲۵، ۰/۱۵ و ۰/۲ درصد فرمالین و در تمامی درجه حرارت های ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۳۷ و ۳۹ درجه سانتیگراد و زمان های انکوباسیون ۱۲، ۱۶ و ۲۱ ساعت تحت آزمایش، غیرفعال‌سازی ویروس با موفقیت انجام گردید و در پاساژهای اول تا سوم تست غیرفعال‌سازی، نتایج به دست آمده منفی بود مگر در غلظت ۰/۰۵ درصد فرمالین و در درجه حرارت های ۲۵ و ۳۰ درجه سانتیگراد و در تمام زمان های تحت آزمایش که ویروس غیرفعال‌نشده و تست غیرفعال‌سازی در پاساژ دوم مثبت ارزیابی گردید و در همین غلظت از فرمالین در درجه حرارت ۳۵ درجه سانتیگراد و در همه زمان های تحت آزمایش نیز ویروس غیرفعال‌نشده و تست غیرفعال‌سازی در پاساژ سوم مثبت گردید. بنابراین گروه آزمایشی شامل غلظت ۰/۰۵ درصد فرمالین، دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و زمان انکوباسیون ۱۲ ساعت، گروهی بود که در آن ویروس بطور بهینه غیرفعال شد.

بر اساس نتایج اخذ شده عملیات لرزش در هیچکدام از گروه های تحت آزمایش تاثیری بر روند غیرفعال‌سازی نداشته است. همچنین بر اساس یافته‌های این تحقیق، عملیات غیرفعال‌سازی در شرایط مختلف تحت آزمایش تاثیری بر تیتر HA ویروس، بلافاصله بعد از دوره غیرفعال‌سازی نداشته است.

### بحث

عفونت‌زایی ویروس آنفلوانزای طیور بوسیله عوامل شیمیایی و فیزیکی مختلف از بین می‌رود. این ویروس دارای غشاء بوده و حلال‌های چربی مانند اتر و کلروفرم با حل کردن غشاء لیپیدی ویروس، آن را از بین می‌برند. خاصیت عفونت زایی این ویروس همچنین توسط عواملی مانند BPL، فرمالین، اسیدهای رقیق، اکسید کننده‌ها، سدیم داکسی کولات، هیدروکسیل آمین، سدیم دودسیل سولفات و یون‌های آمونیوم سریعا از بین می‌رود. فرمالین از عوامل شیمیایی است که بطور وسیع در تهیه واکسن‌های غیرفعال ویروسی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۳). بخش آلدهید این مولکول با عوامل شیمیایی آمینی، آمیدی، هیدروکسی و سولفیدریل پروتئین‌های سطحی ویروس واکنش داده و باعث بروز پدیده ای تحت عنوان اثر غشایی می‌شود

که طی این پدیده، پروتئین‌های سطحی ویروس قبل از اسید نوکلئیک ژنوم ویروسی تخریب می‌شوند (۸). Blackburn و Besselaar طی مطالعه ای از ۲۳ نوع آنتی بادی مونوکلونال برای مطالعه اثر BPL، فرمالین و BEI بر روی اپی توپ های گلیکو پروتئین‌های ویروس تب دره ریفت استفاده کرده و دریافتند که بعد از دوره غیرفعال‌سازی، BEI تاثیر جزئی بر روی این اپی توپها داشته و فرمالین نیز بطور جزئی شکل بعضی از اپی-توپ ها را تغییر داد. در حالی که این تغییرات در BPL بطور معنی داری بالا بود (۲). در مطالعه حاضر نیز با توجه به نتایج تست HA، غلظت‌های مختلف فرمالین تاثیر چندانی از نظر آنتی ژن H و تیتر ویروسی نداشتند.

Chatchai و همکاران (۲۰۰۷) با بررسی اثر فرمالین بر روی ویروس آنفلوانزای سویه H5N1 دریافتند که در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد اثر غیرفعال‌کنندگی فرمالین بیشتر از ۲۵ درجه سانتیگراد است، چرا که عوامل شیمیایی در دمای انکوباسیون بالاتر، سریعتر در ذرات ویروسی نفوذ می‌کنند (۳). Guobin و همکاران (۲۰۰۵) نیز جهت غیرفعال‌سازی همان سویه ویروسی از غلظت ۰/۲ درصد فرمالین در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت استفاده کردند (۷).

Muhmmad و همکاران (۲۰۰۱) با تاثیر غلظت‌های ۰/۰۶ و ۰/۱۲ درصد فرمالین بر روی ویروس آنفلوانزای سویه H7N3 در زمان های انکوباسیون ۶، ۱۲، ۱۸ و ۲۴ ساعت مشاهده نمودند که غلظت ۰/۰۶ درصد فرمالین در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد طی ۱۲ ساعت این ویروس را در مایع آمنیوآلانتوئیک غیرفعال می‌کند (۱۳). همچنین ابراهیمی و همکاران (۲۰۰۵) طی تحقیقی اثر دما، زمان و غلظت‌های مختلف فرمالین، BPL و BEI را در غیرفعال‌سازی ویروس بیماری نیوکاسل سویه لاسوتا و ویروس بیماری آنفلوانزا سویه H9N2 مورد بررسی قرار داده و گزارش کردند که غلظت ۰/۰۵ درصد فرمالین در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد طی ۱۶ ساعت می تواند ویروس آنفلوانزا را غیرفعال کند. درحالی که برای غیرفعال‌سازی ویروس نیوکاسل مورد مطالعه در شرایط مشابه غلظت ۰/۰۷۵ فرمالین مورد نیاز است (۴). این یافته‌ها با نتایج اخذ شده از مطالعه حاضر که نشان می‌دهد غلظت ۰/۰۵ درصد فرمالین در حرارت‌های ۲۵، ۳۰ و ۳۵ درجه سانتیگراد قادر به غیرفعال کردن ویروس آنفلوانزای سویه H9N2 در هیچکدام از زمان های تحت آزمایش نیست ولی در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد و زمان انکوباسیون ۱۲ ساعت، این ویروس را غیرفعال می‌نماید، منطبق می‌باشد.

King (۱۹۹۱) طی مطالعه ای اثر غلظت‌های مختلف فرمالین را بر روی عفونت زایی، HA، اسیدیته و همولیز سویه‌های مختلف ویروس بیماری نیوکاسل و سویه‌های مختلف ویروس بیماری آنفلوانزا در مایع آلانتوئیک تخم‌مرغ بررسی نموده و دریافت که غلظت‌های ۰/۰۴ درصد و بالاتر فرمالین، نمونه‌های ویروسی مورد مطالعه را غیرفعال کرد بدون اینکه بلافاصله بعد از غیرفعال‌سازی تاثیری بر اسیدیته و HA آنها داشته باشد (۱۱). همچنین Goldstein و Tauraso (۱۹۷۰) با بررسی اثر مرتیولات، اشعه UV و فرمالین بر روی سویه‌های مختلف ویروس آنفلوانزا گزارش نمودند که غیرفعال‌سازی توسط فرمالین در دمای ۳۴ درجه سانتیگراد و در زمان های انکوباسیون مختلف صورت می‌گیرد بدون اینکه تاثیری بر روی آنتی ژنیسیته و تیتر HA ویروس داشته باشد (۶). در مطالعه حاضر نیز غیرفعال‌سازی ویروس آنفلوانزای سویه H9N2 در درجه حرارت‌ها و زمان های مختلف، تاثیر معنی داری بر تیتر HA ویروس مورد مطالعه، بلافاصله بعد از اتمام

دوره غیرفعال‌سازی، نداشت و این با یافته‌های تحقیقات قبلی همخوانی دارد. همچنین نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر نشان می‌دهد که عملیات لرزش ویروس در هیچیک از گروه های تحت مطالعه تاثیری بر روند غیرفعال‌سازی نداشت.

نتایج بدست آمده بیانگر این است که در بین عوامل متعدد تاثیر گذار بر غیرفعال‌سازی ویروس آنفلوانزای سویه H9N2 بوسیله فرمالین، غلظت نقش اصلی را دارد چرا که در غلظت‌های ۰/۰۷۵ درصد و بالاتر فرمالین، حتی در کمترین دماها و زمان های تحت آزمایش نیز عملیات غیرفعال‌سازی با موفقیت انجام می‌شود. در غلظت ۰/۰۵ درصد که غیرفعال‌کننده با کمترین مقدار خود قادر به غیرفعال‌سازی ویروس بود نقش سایر عوامل تاثیرگذار یعنی دمای انکوباسیون و مدت زمان غیرفعال‌سازی بارزتر می‌شود. چنانچه در دماهای پایینتر (۲۵، ۳۰ و ۳۵ درجه سانتیگراد) و زمان‌های متفاوت، غیرفعال‌سازی بطور کامل صورت نمی‌گیرد و تست غیرفعال‌سازی در پاساژهای دوم و یا سوم مثبت می‌شود، ولی در دماهای بالاتر (۳۷ و ۳۹ درجه سانتیگراد) حتی در کمترین زمان، عمل غیرفعال‌سازی بطور کامل انجام می‌شود. عملیات لرزش نیز در هیچکدام از گروه‌های مورد آزمایش تاثیری بر نتیجه غیرفعال‌سازی نداشت و تنها فاکتوری است که باید از پروسه غیرفعال‌سازی حذف شود. بنابراین غلظت ۰/۰۵ درصد فرمالین در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد و زمان انکوباسیون ۱۲ ساعت و بدون لرزش، ویروس آنفلوانزای طیور سویه H9N2 را غیرفعال می‌نماید و فاکتورهای فوق به عنوان شرایط بهینه غیرفعال‌سازی، در روند تولید واکسن غیرفعال آنفلوانزای طیور سویه H9N2 پیشنهاد می‌گردد.

## تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت‌های مالی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی و سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی طی طرح تحقیقاتی شماره ۸۹۰۵۴-۱۸-۸۱-۲ انجام گرفته است. همچنین مولفین لازم می‌دانند از همکاری صمیمانه پرسنل بخش واکسن آنفلوانزای طیور تشکر و قدردانی نمایند.

## منابع

1. Alizadeh, E., Hosseini, S.M., Kheiri, M.T. (2009). Avian influenza (H9N2) among poultry workers in Iran. *Iranian Journal of Microbiology* **1**: 3-6.
2. Blackburn, N.K., Besselaar, T.G. (1991). A study of the effect of chemical inactivants on the epitopes of Rift Valley fever virus glycoproteins using monoclonal antibodies. *Journal of Virology Methods* **33**: 367-74.
3. Chatchai, S., Jiroj, S., Niwat, C. (2007). Inactivation of avian influenza virus H5N1 with binary ethylenimine solutions. Proceedings on the 8th Asian Pacific Poultry Conference, March 5-6, 2007. Swissotel Le Concorde Hotel, Bangkok, Thailand, 376-9.
4. Ebrahimi, M.M., Shahsavandi, S., Ebrahimi, S.R. (2005). Evaluation of some chemical agents for inactivation of Newcastle disease virus and avian influenza virus for use as vaccine and immunodiagnostic reagents. 14th World Veterinary Poultry Congress, August 22-26, 2005. Istanbul, Turkey, 286-9.
5. Food and Agriculture Organisation (FAO) (1989). *Animal production and health paper*, by Dr. V. Palya Phylaxia Vet. Biol. Com. Budapest, Hungary, 10-56.
6. Goldstein, M.A., Tauraso, N.M. (1970). Effect of formalin, β-propiolactone, merthiolate and ultraviolet light upon influenza virus infectivity, chicken cell agglutination, hemagglutination and

antigenicity. *Application of Microbiology* **19**: 290-4.
7. Guobin, T., Suhua, Z., Yanbing, L., Zhigao, B., Peihong, L., Jinping, Z., Chengjun, L., Jianzhong, S., Kangzhen, Y., Hualan, C. (2005). Protective efficacy in chickens, geese and ducks of an H5N1- inactivated vaccine developed by reverse genetics. *Virology* **341**: 153-62.
8. Habib, M., Hussain, I., Fang, W.H., Rajput, Z.I., Yang, Z.Z., Irshad, H., (2006). Inactivation of infectious bursal disease virus by binary ethylenimine and formalin. *Journal of Zhejiang University Science B* **7**: 320-3.
9. Hulskotte, E.G.H., Dings, M.E.M., Norley, S.G., Osterhaus, A.D.M.E. (1997). Chemical inactivation of recombinant vaccinia viruses and the effects on antigenicity and immunogenicity of recombinant simian immunodeficiency virus envelope glycoproteins. *Vaccine* **15**: 1839-45.
10. Javier, M., Graham, C., Wood, D.J., Minor, P.D. (2003). Characterization of formaldehyde-inactivated poliovirus preparations made from live-attenuated strains. *Journal of General Virology* **84**: 1781-8.
11. King, D.J. (1991). Evaluation of different methods of inactivation of Newcastle disease virus and avian influenza virus in egg fluids and serum. *Avian Disease* **35**: 505-14.
12. Moghadam-Pour, M., Momayez, R., Akhavizadegan, M.A. (2006). The efficacy of inactivated oil emulsion H9N2 avian influenza vaccine. *Iranian Journal of Veterinary Research* **15**: 85-7.
13. Muhmmad, K., Das, P., Yaqoob, T., Riza, A., Manzoor, R. (2001). Effect of physico-chemical factors on survival of avian influenza virus (H7N3). *International Journal of Agriculture Biology* **4**: 416-8.
14. Office International des Epizooties (OIE) (2008). *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*. Chapter 2.3.4, Avian influenza, 465-81.
15. Reed, L.J., Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty percent endpoints. *American Journal of Hygiene* **27**: 493-7.
16. Rizwan, Q., Muhammad, N., Khushi, M. (1999). Effect of physico-chemical factors on survival of Newcastle disease virus. *International Journal of Agriculture Biology* **1**: 42-4.
17. Singh, N., Pandey, A., Mittal, S.K. (2011). Avian influenza pandemic preparedness: developing prepandemic and pandemic vaccines against a moving target. *Expert Reviews in Molecular Medicine* **12**: e14.
18. Takada, A., Matsushita, S., Ninomiya, A. (2003). Intranasal immunization with formalin-inactivated virus vaccine induces a broad spectrum of heterosubtypic immunity against influenza A virus infection in mice. *Vaccine* **21**: 3212-8.
19. Vasfi-Marandi, M., BozorgmehriFard, M.H. (2002). Isolation of H9N2 subtype of avian influenza viruses during an outbreak in chickens in Iran. *Iranian Biomedical Journal* **6**: 13-7.

*Journal of Veterinary Microbiology, Volume 10, Issue 1, 2014*

# Evaluating the Effects of Temperature, Time, Shaking and Different Concentrations of Formalin on the Vaccinal Subtypes of Influenza Virus (H9N2) Inactivation

***Ghadimipour, R.[1, 3]*, Khalili, I.[1], Ameghi, A.[1], Ebrahimi, M.M.[2], Ghorbanpour, M.[3], Sedigh-Eteghad, S.[1], Zandiyeh, B.[4]***

*1- Department of Research and Development, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Marand, Iran*
*2- Department of Poultry Research & Vaccines Production, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran*
*3- Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran Univercity, Ahvaz, Iran*
*4- Department of Health & Control of Poultry Disease, East Azarbaijan Provincial Veterinary Service, Tabriz, Iran*

*Received Date: 15 April 2013* *Accepted Date: 31 December 2013*

***Abstract:*** *Among the avian influenza virus (AIV) subtypes, H9N2 virus has the potential to cause an avian influenza (AI) pandemic and vaccination with inactivated vaccines to prevent or reduce losses due to infections is common. Formalin is one of the most important inactivators in AIV inactivated vaccine production process and incorrect inactivation may be due to secondary irreparable problems. So we evaluate these conditions to optimize inactivation factors such as temperature, time, shaking and formalin concentration. For the optimization of factors, we used different treatment concentrations (0.05, 0.075, 0.1, 0.125, 0.15, and 0.2%), time (12, 16 and 21 hour), temperatures (25, 30, 35, 37 and 39 °C) and shaking condition. The titer of inactivated viruses was evaluated with standard hemaglutination (HA) test and non infectivity of those was assessed with inactivation test (IT). The optimum condition that could inactivate the infectivity of AIV (H9N2) was 0.05% concentration in 12 h and 37 °C. The shaking did not have any significant effects on inactivation process. So the mentioned qualifications are the optimum condition for virus inactivation in the production of inactivated AI vaccine process.*

***Keywords:*** *Inactivation, Avian Influenza, Formalin, Influenza Vaccine.*

**Corresponding author: Ghadimipour, R.*
*Address: Department of Research and Development, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Marand, Iran.*
*Tel: 4912453280-82*
*Email: Ghadimipoorrahim@yahoo.com*