"Research article" DOI: 10.30495/JVCP.2022.1951185.1351

Evaluation of antibody titers from vaccination against influenza virus subtype H_9N_2 in Japanese quails using dual Newcastle-Influenza vaccine

Mardani, G.[1], Rezaei M.[2*], Mahdavi S.[3]

1- D.V.M Graduate of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran.
2- Assistant Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran.
3- Assistant Professor, Department of Microbiology, Maraghe Branch, Islamic Azad University, Maraghe, Iran.
*Corresponding author's email: mehdi217mr@yahoo.com
(Received: 2022\7\21 Accepted: 2022\11\15)

Abstract

Avian Influenza (AI) is one of the most destructive viral diseases of poultry flocks, and vaccination can be one of the most important ways to control the disease. The aim of this research was to evaluate the antibody titer obtained from vaccination against H9N2 influenza virus in Japanese quails using Newcastle-influenza dual vaccine. For this purpose, 108 one-day-old Japanese quails were tested in 3 groups with 3 replicates. From day one to the end of the rearing period, the conditions were the same for all quails and the only difference was in the influenza disease vaccination program. The first group received killed ND/AI vaccine (CEVAC-NEW FLU H9 K) on day 7, the second group received the same type of vaccine on day 10 and the third group received no vaccination as the control group. The HI (Haemagglutination Inhibition) test was performed after two separate blood collection from the wing vein on days 25 and 35, following vaccination. Statistical analysis by Tukey's test showed that the mean titer of anti-influenza virus antibody in the serum of vaccinated birds was significantly different from the control group (p<0.05), so that in these groups, its amount was higher than its amount in the serum of birds of the control group. Also, the mean antibody titer in the serum of birds that received the vaccine at 7 days old was higher. Based on the findings of the present research and the low age of slaughter in broiler quail flocks, it seems necessary to carry out rapid vaccination against the influenza disease agent in the first week of rearing, to achieve the desired level of protective antibodies.

Conflict of interest: None declared.
Keywords: Antibody titer, Dual newcastle-influenza vaccine, Influenza virus, Japanese quail.

"مقاله پژوهشی"

DOI: 10.30495/JVCP.2022.1951185.1351

بررسی عیار پادتن حاصله از واکسیناسیون علیه ویروس آنفلوانزای تحت‌تیپ H9N2 در بلدرچین‌های ژاپنی با استفاده از واکسن دوگانه نیوکاسل- آنفلوانزا

گل‌آرا مردانی[۱]، مهدی رضائی[۲*]، سامان مهدوی[۳]

۱- دانش‌آموخته دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران.

۲-استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران.

۳- استادیار گروه میکروبیولوژی، واحد مراغه، دانشگاه آزاد اسلامی، مراغه، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات: mehdi217mr@yahoo.com

(دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۴/۳۰ پذیرش نهایی: ۱۴۰۱/۸/۲۴)

چکیده

آنفلوانزای پرندگان یکی از مخاطره‌انگیزترین بیماری‌های ویروسی برای گله‌های طیور است که واکسیناسیون می‌تواند به عنوان یکی از مهم‌ترین راه‌کارهای کنترل بیماری باشد. هدف از انجام مطالعه حاضر، بررسی عیار پادتن حاصله از واکسیناسیون علیه ویروس آنفلوانزای تحت‌تیپ H_9N_2 در بلدرچین‌های ژاپنی با استفاده از واکسن دوگانه نیوکاسل- آنفلوانزا بود. بدین منظور، تعداد ۱۰۸ قطعه بلدرچین ژاپنی یک‌روزه در ۳ گروه با ۳ تکرار مورد آزمایش قرار گرفتند. از روز اول تا انتهای دوره، شرایط پرورشی برای تمامی بلدرچین‌ها یکسان و تفاوت تنها در برنامه واکسیناسیون بود. واکسیناسیون در گروه اول به صورت دریافت واکسن دوگانه نیوکاسل- آنفلوانزا (CEVAC-NEW FLU H_9 K) در ۷ روزگی، در گروه دوم به صورت دریافت واکسن از همان نوع در ۱۰ روزگی و در گروه سوم (شاهد) بدون دریافت واکسن بود. آزمون HI (Haemagglutination Inhibition test) پس از ۲ نوبت خونگیری از ورید بالی در روزهای ۲۵ و ۳۵، متعاقب واکسیناسیون به‌عمل آمد. تحلیل آماری توسط آزمون توکی نشان داد که میانگین عیار پادتن ضد ویروس آنفلوانزا در سرم پرندگان گروه‌های واکسینه‌شده، اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد داشت ($p<۰/۰۵$)، به‌طوری‌که در این گروه‌ها، مقدارش بالاتر از میزان آن در سرم پرندگان گروه شاهد بود. همچنین میانگین عیار پادتن مذکور در سرم پرندگانی که واکسن را در ۷ روزگی دریافت کرده‌بودند، بیشتر بود. با استناد به یافته‌های تحقیق حاضر و نیز پایین بودن سن کشتار در گله‌های بلدرچین گوشتی، انجام واکسیناسیون سریع علیه عامل بیماری آنفلوانزا در هفته اول پرورش، برای دست‌یابی به عیار پادتن محافظت‌کننده، ضروری به‌نظر می‌رسد.

کلیدواژه‌ها: ویروس آنفلوانزا، بلدرچین ژاپنی، واکسن دوگانهٔ نیوکاسل- آنفلوانزا، عیار پادتن.

مقدمه

آنفلوانزای پرندگان یکی از مهم‌ترین بیماری‌های زئونوز در صنعت طیور است که از نظر اقتصادی و بهداشت عمومی دارای اهمیت می‌باشد. ویروس‌های آنفلوانزا در خانواده اورتومیکسوویریده قرار گرفته و بر اساس مشخصات پادگنی به تیپ‌های A، B و C طبقه‌بندی می‌شوند. ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان در تیپ A قراردارند. ژنوم ویروس‌های آنفلوانزا، RNA چندقطعه‌ای با مفهوم (Sense) منفی می‌باشد. ویروس‌های آنفلوانزای تیپ A براساس واکنش‌های سرمی و توالی ژنومی مربوط به گلیکوپروتئین‌های سطحی هماگلوتینین و نورآمینیداز به تحت تیپ‌های HA و NA تقسیم می‌شوند که گلیکوپروتئین‌های مذکور نقش مهمی در بیماری‌زایی و ایجاد ایمنی اختصاصی در میزبان را دارند. تاکنون ۱۸ تحت‌تیپ هماگلوتینین (H_1-H_{18}) و ۱۱ تحت‌تیپ نورآمینیداز (N_1-N_{11}) شناسایی شده‌است. به استثنای $H_{17}N_{10}$ و $H_{18}N_{11}$ که اخیراً از خفاش جدا شده، سایر تحت تیپ‌ها در پرندگان در حال گردش می‌باشند (Alexander *et al*., 2008; Knipe *et al*., 2013; Swayne *et al*., 2013). تحت‌تیپ H_9N_2 شایع‌ترین ویروس آنفلوانزا با بیماری‌زایی کم در بین طیور در سراسر دنیا می‌باشد. ویروس‌های آنفلوانزای H_9N_2 علاوه بر مشکلات اساسی در صنعت طیور، همچنین به‌دلیل انتقال برخی از دودمان‌های آن به انسان، به عنوان یک نگرانی بهداشت عمومی از جنبه بیماری‌های مشترک بین پرندگان و انسان، مهم تلقی می‌شوند (Igbal *et al*., 2009; Azizpour *et al*., 2012; Khan *et al*., 2015). سازمان بهداشت جهانی دام (World Organization for Animal Health)، ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان را براساس شدت بیماری‌زایی در طیور به ۲ پاتوتیپ، شامل ویروس‌های با بیماری‌زایی پایین (Low Pathogenicity Avian Influenza; LPAI) و ویروس‌های با بیماری‌زایی بالا (High Pathogenicity Avian Influenza; HPAI) که تحت عنوان آنفلوانزای فوق حاد بیان می‌شود، تقسیم بندی کرده‌است. ویروس‌های با حدت کم می‌توانند پیش‌ساز بالقوهٔ ویروس‌های شدیداً بیماری‌زا باشند، بطوری‌که برخی از آن‌ها فقط به یک جهش جزئی نیاز دارند تا به ویروس مهاجم تبدیل شوند. تا به حال ویروس آنفلوانزای پرندگان از ۹۰ گونه پرندهٔ متعلق به ۱۳ راسته مختلف جدا شده‌است (Alexander, 2008; Swayne *et al*., 2013; OIE, 2015). اولین گام در ایجاد عفونت توسط ویروس آنفلوانزا، اتصال این ویروس با گیرنده‌های موجود در سطح سلول میزبان (سلول‌های اپیتلیال دستگاه تنفس و گوارش پرندگان) می‌باشد (Burgos and Burgos, 2007; Knipe *et al*., 2013; Abolnik *et al*., 2014) و تغییرات ژنتیکی ویروس آنفلوانزای تیپ A به علت وقوع تنوع پادگنی در گلیکوپروتئین‌های هماگلوتینین و نورآمینیداز باعث ایجاد تغییرات به شکل شیفت و دریفت پادگنی می‌شود که در همه‌گیری آن نقش دارند (Alexander, 2008; Swayne *et al*., 2013).

صنعت پرورش طیور در ایران از نظر اقتصادی، اجتماعی و امنیت غذایی دارای اهمیت ویژه‌ای است. با توجه به شرایط جغرافیایی و طبیعت مناسب، در سال‌های اخیر پرورش طیور صنعتی و بومی در اکثر مناطق کشور گسترش یافته است و در حال حاضر،

ایران بزرگ‌ترین تولیدکننده در مورد طیور صنعتی، در خاورمیانه می‌باشد (Shariatmadari, 2000).

انجام واکسیناسیون موفق، باعث کاهش اثرات منفی بیماری‌ها، کم کردن بار آلودگی، انتشار و دفع ویروس‌ها و همچنین کاهش علائم بالینی، تلفات و افت تولید در دام و طیور می‌شود. همچنین از نظر بهداشت عمومی، کاهش بار آلودگی ویروسی، می‌تواند باعث کاهش خطر آلودگی افراد در تماس مستقیم با پرندگان شود. بر این اساس، گزارش شده که در گله‌هایی که برنامه واکسیناسیون به خوبی در آن‌ها اعمال شود، آنفلوانزای پرندگان با احتمال کمتری ایجاد می‌گردد و در صورت وقوع آلودگی، بار ویروسی کمتری وجود خواهد داشت که این موضوع سبب کاهش خطر انتشار آلودگی به گله‌های دیگر می‌شود (Nili and Asasi 2002; Breytenbach, 2005). لذا تجویز به موقع و مناسب واکسن برای کنترل، پیشگیری و یا جلوگیری از انتشار شکل حاد بیماری آنفلوانزای پرندگان به‌کار می‌رود. تعیین و تفسیر عیار یا سطح پادتن در سرم پرنده نیز نشان‌دهنده موفقیت و یا شکست واکسیناسیون می‌باشد و به عنوان یک فاکتور اساسی در مدیریت سیستم و بررسی تاثیر واکسن در گله مطرح است که برای دست‌یابی به عیار محافظت کننده پادتن در سرم طیور، ضروری می‌باشد (Myers *et al*., 2003; Breytenbach, 2005). در این خصوص نیلی و اساسی اثرات محافظتی واکسن سویه H_9N_2 در جوجه‌های گوشتی چالش‌یافته با ویروس آنفلوانزای جداشده از گله‌های درگیر بیماری را در مرحلهٔ اوج مرگ‌ومیر، مورد مطالعه قرار داده و گزارش کردند که جوجه‌های واکسینه‌شده در قیاس با جوجه‌های واکسینه‌نشده، بدون تلفات بوده و کاهش مصرف دان کمتری را داشته‌اند (Nili and Asasi 2002).

طالبی و همکاران در سال ۲۰۱۷ و نیز مرادی و همکاران در سال ۲۰۲۱، القا سیستم ایمنی هومورال علیه سوسپانسیون گلبول‌های قرمز گوسفند (sheep red blood cells) تزریق‌شده به عضله سینه بلدرچین‌ها و ردیابی عیار پادتن تولیدی به روش هماگلوتیناسیون میکروتیتر را نشان دادند (Moradi *et al*., 2021; Talebi *et al*., 2017). ولی تنوع بالای آنتی‌ژن‌های سطحی ویروس‌های آنفلوانزای تیپ A که منجر به ایجاد تنوع و تغییرات متعدد در تحت‌تیپ‌های ویروس آنفلوانزا می‌شود، محدودیت‌های شدیدی در استفاده از آزمون‌های ایمونولوژیکی و سرولوژیکی جهت ردیابی پادتن و تشخیص عفونت ایجاد می‌کند. به منظور ردیابی عیار پادتن‌های ساخته‌شده توسط واکسن و یا تشخیص عفونت، تکنیک‌های سرولوژیک مختلفی وجود دارد که یکی از این تکنیک‌ها، آزمون HI (Haemagglutination Inhibition test) می‌باشد که علاوه بر توانایی تشخیص آلودگی به تحت‌تیپی خاص و شناخته‌شده از ویروس آنفلوانزا، می‌تواند برای ردیابی عیار پادتن حاصله از واکسن مصرفی علیه تحت‌تیپ خاصی از ویروس مذکور نیز بکار رود (Myers *et al*., 2003; Pearson, 2003; Alexander, 2008; Swayne *et al*., 2013). البته گزارش شده که سطح عیار پاسخ پادتنی نسبت به گونه پرنده می‌تواند متغیر باشد، به طوری‌که بیشترین پاسخ پادتن در ماکیان نژاد لگهورن، قرقاول، بوقلمون، بلدرچین و اردک دیده می‌شود. OIE عیار پادتن ۴ در آزمون HI را به‌عنوان آستانه ایجاد محافظت در مقابل آنفلوانزای پرندگان تعیین نموده‌است (OIE, 2015). سوارز و همکاران نشان دادندکه

پاسخ‌های آنتی‌بادی در مواجهه با ویروس‌های آنفلوانزا در بلدرچین نسبت به جوجه‌ها، قرقاول و بوقلمون کمتر بوده ولی نسبت به اردک بیشتر می‌باشد. علت این موضوع می‌تواند به دلیل سرعت رسوب پادتن‌ها در سرم، فعالیت کمپلمان و یا فرآیند شناسایی و مبارزه با ویروس در بدن میزبان باشد (Suarez *et al.*, 2000).

واکسیناسیون به عنوان ابزار تکمیلی برای کنترل آنفلوانزای طیور در برخی کشورها مورد استفاده قرار می‌گیرد. یک بار واکسیناسیون با واکسن‌های کشته در پرندگان با طول عمر کم ممکن است ایمنی موثری را ایجاد کند (Alexander., 2008; Swayne *et al.*, 2013). با توجه به این‌که در دوره پرورش طیور صنعتی، استفاده از واکسن‌های آنفلوانزا و نیوکاسل برای پیشگیری از هر دو بیماری استفاده می‌شود و امروزه استفاده از واکسن‌های کشتهٔ تک‌گانه تحت‌تیپ H_9N_2 آنفلوانزا و یا دوگانه نیوکاسل- آنفلوانزا، در برنامه واکسیناسیون، مد نظر قرار می‌گیرد، لذا جهت کاهش استرس و اجتناب از دو بار تزریق، در تحقیق حاضر از یک بار تزریق واکسن دوگانه کشتهٔ نیوکاسل-آنفلوانزا (CEVAC-NEW FLU H9 K) استفاده گردید (Zhao *et al.*, 2017). در واقع در مطالعه حاضر، برای اولین بار در ایران، عیار پادتن‌های حاصله از تجویز واکسن دوگانه کشتهٔ نیوکاسل-آنفلوانزا در بلدرچین‌های ژاپنی مورد بررسی قرار گرفت تا نتایج به‌دست آمده، به‌عنوان الگویی جهت بررسی سطح پادتن‌های تولیدی حاصله از واکسن آنفلوانزا (تحت‌تیپ H_9) و ارزیابی برنامه واکسیناسیون در گله‌های بلدرچین ژاپنی مورد استفاده قرارگیرد.

مواد و روش‌ها

مطالعه کاربردی- مداخله‌ای حاضر، در ۳ ماهه دوم سال ۱۴۰۰، در سالن مرغداری درمانگاه دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه انجام شد که در طی آن، ابتدا تعداد ۱۰۸ قطعه بلدرچین ژاپنی یک‌روزه از یک گله مادر تهیه و به سالن مرغداری دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه انتقال یافته و در سه گروه ۳۶ تایی (با سه تکرار ۱۲ تایی) تقسیم‌بندی شدند. از روز اول تا انتهای دوره، شرایط پرورش برای تمامی بلدرچین‌ها یکسان و تنها تفاوت گروه‌ها با یکدیگر در برنامه واکسیناسیون علیه ویروس بیماری آنفلوانزا بود. واکسیناسیون در گروه اول به صورت دریافت واکسن دوگانه نیوکاسل-آنفلوانزا (CEVAC-NEW FLU H9 K) در ۷ روزگی، در گروه دوم به صورت دریافت واکسن دوگانه نیوکاسل-آنفلوانزا (CEVAC-NEW FLU H9 K) در ۱۰ روزگی و در گروه سوم (شاهد)، بدون دریافت واکسن بود. به منظور سنجش عیار پادتن‌های اختصاصی (تحت‌تیپ H9N2 ویروس آنفلوانزا)، آزمون HI (Haemagglutination Inhibition test) پس از دو نوبت خونگیری از ورید بالی در روزهای ۲۵ و ۳۵، متعاقب واکسیناسیون انجام گردید. برای انجام آزمون HI ابتدا در تمام ۱۲ حفره یک ردیف افقی پلیت، مقدار ۲۵ میکرولیتر PBS ریخته شد. سپس به اولین حفره ردیف فوق، ۲۵ میکرولیتر از سرم مورد آزمایش اضافه شده و با کشیدن و تخلیه کردن محتویات حفره، سرم و PBS با یکدیگر مخلوط گردید. در ادامه ۲۵ میکرولیتر از محلول حفره اول به حفره دوم منتقل شده و تا آخرین حفره این عمل تکرار شد. در نهایت ۲۵ میکرولیتر از محلول حفره آخر دور ریخته شد. در

مرحله بعد ۲۵ میکرولیتر محلول حاوی آنتی ژن ۴ واحدی آنفلوانزا به تمامی حفرات اضافه گردید و پس از قراردادن درپوش پلیت به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگه داشته شد. پس از این مرحله مقدار ۲۵ میکرولیتر سوسپانسیون یک درصد گلبول قرمز آماده‌شده به تمامی حفرات اضافه شد و پس از ۳۰ دقیقه گذاشتن پلیت در دمای اتاق، نتیجه آزمایش قرائت گردید (Mahdavi *et al.*, 2017).

لازم به ذکر است که هیچ نوع علایم بیماری و چالش مخاطره‌آمیز، از ابتدا تا انتهای دوره پرورش در گروه‌های مورد مطالعه، مشاهده نشد.

-**تحلیل آماری داده‌ها:** نتایج به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۵ و آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تکمیلی توکی بی (Tukey B) در سطح ۹۵٪ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت ($p<۰/۰۵$).

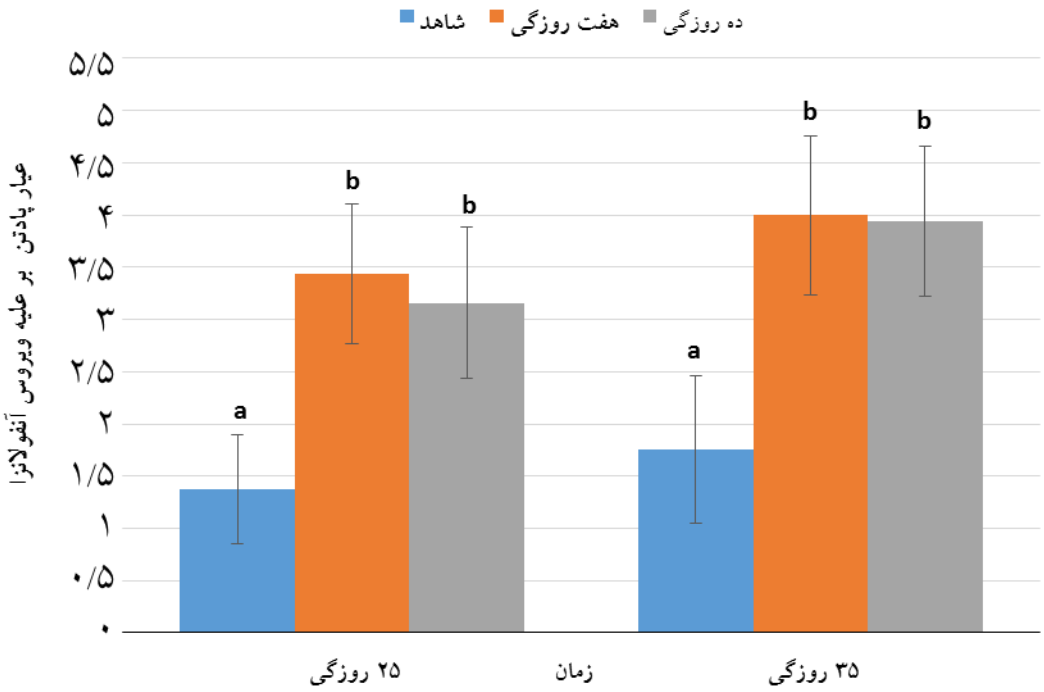
یافته‌ها

نتایج ارائه‌شده در جدول ۱ نشان داد که عیار پادتن ضد ویروس آنفلوانزا در تمام گروه‌های مورد آزمایش، در روز ۳۵، بیشتر از روز ۲۵ نمونه‌گیری بود. همچنین افزایش عیار پادتن ضد ویروس آنفلوانزا در تیمارهای مورد آزمایش، در روزهای ۲۵ و ۳۵ دوره پرورشی تفاوت معنی‌داری نسبت به گروه شاهد نشان داد ($p<۰/۰۵$). عیار پادتن ضد ویروس آنفلوانزا در بلدرچین‌های ژاپنی که در روز هفتم دوره پرورشی واکسن آنفلوانزا دریافت کرده‌بودند نسبت به بلدرچین‌هایی که در روز دهم دوره پرورشی واکسن دریافت کرده‌بودند، در روزهای ۲۵ و ۳۵ بیشتر بود، ولی از این نظر، تفاوت آماری معنی‌داری بین بلدرچین‌های دو گروه مذکور، مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$).

جدول۱- مقایسه میانگین ± انحراف معیار عیار پادتن علیه ویروس آنفلوانزا در جوجه بلدرچین‌های ۲۵ و ۳۵ روزه

گروه مورد مطالعه	عیار پادتن	
	۲۵ روزگی	۳۵ روزگی
شاهد	۱/۰±۳۷/۵۱^{a}	۱/۰±۷۵/۷۰^{a}
گروه اول	۳/۰±۴۳/۶۶^{b}	۴/۰±۰۰/۷۶^{b}
گروه دوم	۳/۰±۱۵/۷۲^{b}	۳/۰±۹۳/۷۱^{b}

ab: حروف نامشابه در هر ستون، نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در بین گروه‌های مورد مطالعه می‌باشد ($p<۰/۰۵$).



نمودار ۱- مقایسه میانگین ± انحراف معیار عیار پادتن علیه ویروس آنفلوانزا در جوجه بلدرچین‌های ۲۵ و ۳۵ روزه.
ab: حروف نامشابه نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در بین گروه‌های مورد مطالعه می‌باشد ($p<۰/۰۵$).

بحث و نتیجه‌گیری

پرورش بلدرچین در دنیا به دلیل اهمیت تغذیه‌ای گوشت و تخم آن در حال گسترش می باشد. از طرف دیگر رعایت اصول امنیت زیستی و قرنطینه دقیق همراه با واکسیناسیون به‌عنوان فاکتور اساسی در پیشگیری از شیوع بیماری آنفلوانزا می‌باشد. استفاده صحیح از واکسن آنفلوانزا و نیز انتخاب نوع و زمان واکسیناسیون بر اساس تحت‌تیپ‌ها و نیز ویروس‌های وحشی در حال گردش در منطقه علاوه بر کاهش تعداد پرندگان دفع‌کننده ویروس، می‌تواند تیتر ویروسی چالشی دفع‌شده را کاهش دهد. مطالعات تجربی نشان می‌دهد که واکسن‌های آنفلوانزای پرندگان قادر به القای پادتن و ایجاد محافظت علیه تلفات، ابتلا و کاهش تولید تخم هستند (Alexander, 2008; Swayne *et al.*, 2013). تحقیق حاضر، اولین بار در ایران، به منظور بررسی عیار پادتن حاصله از واکسن آنفلوانزا در بلدرچین‌های ژاپنی انجام شده که در طی آن واکسن مربوط به تحت‌تیپ H_9 K (CEVAC-NEW FLU H9 K) ساخت شرکت سواک فرانسه مورد استفاده قرار گرفت و یافته‌های مربوطه نشان داد که عیار پادتن ضد ویروس آنفلوانزا در تمام گروه‌های مورد آزمایش، در روز ۳۵، بیشتر از روز ۲۵ نمونه‌گیری بود. که نشان می دهد واکسن کشته

آنفلوانزا احتیاج به زمان بیشتری برای القاء سیستم ایمنی و ردیابی پادتن در سرم پرنده است. همچنین افزایش عیار پادتن ضد ویروس آنفلوانزا در تیمارهای مورد آزمایش، در روزهای ۲۵ و ۳۵ دوره پرورشی، تفاوت آماری معنی‌داری نسبت به گروه شاهد نشان داد ($p<۰/۰۵$). بنابراین تحریک سیستم ایمنی و تولید آنتی‌بادی ضد ویروس واکسن آنفلوانزا در گروه های اول و دوم واکسینال صورت گرفته است که نشان از موفقیت واکسیناسیون می‌باشد. از طرف دیگر مشخص گردید که عیار پادتن ضد ویروس آنفلوانزا در سرم بلدرچین‌های ژاپنی که در روز ۷ دوره پرورشی، واکسن آنفلوانزا دریافت کردند نسبت به بلدرچین‌هایی که در روز ۱۰ دوره پرورشی واکسن مذکور را دریافت کرده بودند، هم در نمونه‌گیری روز ۲۵ و هم در نمونه‌گیری روز ۳۵، بیشتر بود ولی در این بین، تفاوت آماری معنی‌داری مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$). بنابراین به‌علت کوتاه بودن دوره پرورش بلدرچین‌های گوشتی از یک روزگی تا زمان کشتار، تجویز واکسن در روزهای اول برای دست‌یابی به عیار پادتن مناسب و نیز عملکرد محافظتی آن بر اساس تحت‌تیپ معین ویروس، ضروری می‌باشد، چرا که تحریک سیستم ایمنی توسط واکسن‌های کشته و عیار قابل تفسیر در سرم پرنده به مدت زمان بیشتری نیاز دارد. البته سطح عیار پاسخ پادتن نسبت به گونه پرنده متغیرمی‌باشد. تکرار دز واکسن در فاصله زمانی مناسب، تفاوت در میزان غلظت آنتی‌ژن‌های موجود در ترکیب واکسن‌ها و حدت آنها می‌تواند دلیل افزایش عیار پادتن سرمی تولیدشده در پرندگان باشد.

وانگ و همکاران ایمنیت واکسن تجاری غیرفعال‌شده تحت تیپ H_9 ویروس آنفلوانزای پرندگان که برای طیور ساخته شده است را برای پیشگیری و کنترل عفونت آنفولانزای پرندگان در میان پرندگان وحشی صیدشده در باغ وحش شانگهای مورد مطالعه قرار دادند که نتایج حاصله از آزمون HI، عیار پادتن بالاتر از استانداردهای ملی چین (log2,GB/T18936-۵ 2003) را نشان داد. لذا نامبردگان نتیجه گرفتند که واکسن غیرفعال تجاری دوگانه نیوکاسل-آنفلوانزا (ND/AI H9) که در حال حاضر در باغ وحش شانگهای استفاده می‌شود، می‌تواند پاسخ‌های ایمنی بالا و طولانی مدت را در پرندگان واکسینه شده ایجاد کند (Wang *et al*., 2021). بنابراین، آنتی‌ژن‌های استفاده‌شده در واکسن بر اساس حدت سویه‌های وحشی در حال گردش در منطقه می‌تواند در عیار پادتن تولیدی تاثیرگذار باشد. مهربان‌پور در سال ۲۰۱۹، با ارزیابی و مقایسه ایمنی‌زایی واکسن دوگانه نیوکاسل-آنفلوانزای موسسه رازی در جوجه‌های SPF (specific-pathogen-free) ماکیان و بررسی عیار سرمی پادتن ساخته‌شده علیه ویروس آنفلوانزا با استفاده از آزمون HI، مشاهده کرد که ۱۵ هفته پس از تجویز واکسن مذکور، سطح بالاتری از پادتن، درمقایسه با عملکرد واکسن مشابه وارداتی ایجاد می‌شود (Mehrabanpour *et al*., 2019). بنابراین هنگام استفاده از واکسن دوگانه غیرفعال نیوکاسل -آنفلوانزا و رسیدن به عیار بالاتری از پادتن در سرم پرنده مدت زمان بیشتری نیاز می‌باشد که در مطالعه حاضر نیز این موضوع مشاهده گردید.

ژاوو و همکاران در سال ۲۰۱۷ در کشور چین با تزریق واکسن دوگانه نیوکاسل-آنفلوانزا (H_9/NDV)

درجوجه‌های گوشتی و بررسی عیار پادتن حاصله از واکسن آنفلوانزا توسط آزمون HI، مشاهده کردند که واکسن کشته آنفلوانزا در جوجه‌های واکسینه، واکنش ایمنی هومورال و افزایش عیار پادتن را متعاقب واکسیناسیون به خوبی القاء کرده‌است (Zhao *et al.*, 2017). ین تحریک سیتم ایمنی هومورال توسط واکسن دو گانه نیوکاسل -آنفلوانزا با نتایج تحقیق حاضر، همخوانی دارد. امیدی‌زاده و همکاران در سال ۱۴۰۰ با بررسی اثر سطح کوآنزیم Q_{10} بر مقدار عیار پادتن حاصله از واکسن آنفلوانزا در بلدرچین‌های ژاپنی نر به کمک آزمون HI، مشاهده کردند که در گروه شاهد واکسینال (بدون دریافت کوآنزیم Q_{10}) هم، برانگیختگی پاسخ به واکسن و تولید پادتن در سرم بلدرچین‌ها ایجاد می‌گردد که این تحریک سیستم ایمنی در گروه‌های شاهد واکسینال در مطالعه فوق با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد (Omidi Zadeh *et al.*, 2021).

ترجینو و همکاران در سال ۲۰۱۰ در کشور مصر نشان دادند که استفاده از واکسن آنفلوانزای سویه H_5N_2، قادر به کاهش قابل توجه علائم بالینی در برابر چالش با ویروس آنفلوانزای سویه H_5N_1 در پرندگان مصر است و با وجود تفاوت آنتی‌ژنی و ژنتیکی میان سویه‌های واکسن و چالش، با آزمایش سرولوژیکی HI مشخص شد که پاسخ ایمنی حاصله از واکسن مذکور نیز رضایت بخش می‌باشد (Terregino *et al.*, 2010). بنابراین ارتباط بین عیار پادتن HI حاصله از واکسن و کاهش علایم بالینی همراه با کاهش دفع ویروس نشان می‌دهد که آزمون مربوطه می‌تواند در ارزیابی پادتن‌های حاصله از واکسن به‌کار برده شود که در مطالعه حاضر نیز از این آزمون برای ردیابی پادتن حاصل از واکسن استفاده شد.

با توجه به یافته‌های تحقیق حاضر، به نظر می‌رسد که محتوای واکسن دوگانه نیوکاسل- آنفلوانزای مورد استفاده که شامل ویروس کشته‌شده نیوکاسل(سویهٔ لاسوتا) و ویروس کشته‌شده آنفلوانزا (تحت‌تیپ H_9) شرکت سواک بود، تیتر مناسبی از پادتن اختصاصی ضد ویروس آنفلوانزا را در سرم بلدرچین‌های ژاپنی واکسینه‌شده، ایجاد کرد. با استناد به این نتایج و پایین‌بودن سن کشتار در گله‌های بلدرچین گوشتی، واکسیناسیون سریع علیه بیماری آنفلوانزای پرندگان در هفته اول پرورش برای دست‌یابی به عیارهای محافظت‌کننده، ضروری می‌باشد. این مطالعه به‌عنوان پیش‌زمینه و ارزیابی پایه در برنامه واکسیناسیون و سطح پادتن‌های تولیدی (H9 sub type) در گله‌های بلدرچین می‌باشد. همچنین پایش و ردیابی تحت‌تیپ‌های در حال چرخش در منطقه، جهت ایجاد محافظت کامل در برنامه‌های واکسیناسیون نیز باید مد نظر قرار بگیرد.

سپاسگزاری

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از پرسنل محترم سالن مرغداری درمانگاه دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند، صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافعی ندارند.

منابع

- Abolnik, C. (2014). A current review of avian influenza in pigeons and doves (Columbidae). Veterinary Microbiology, 170(3-4): 181-196.
- Azizpour, A., Bokaei, S., Sheikhi, N. and Habibzadeh S. (2012). A serological study of antibodies to H9N2 Avain influenza virus in human population of ardabil area, iran. Journal of Comprative Pathobiology, 9(1-36): 619-628. [In Persian]
- Alexander, D.J. (2008). Poultry Diseases. 6th ed., USA: Philadelphia, Elsevier Health Sciences press, pp: 317-332.
- Breytenbach, J.H. (2005). Avian influenza control – the merits of vaccination. International Poultry Production, 13(4): 15-17.
- Burgos, S. and Burgos. S.A. (2007). Influenza A Viruses in Poultry: A Condensed Review. International Journal of Poultry, 6(10): 705-708.
- Iqbal, M., Yaqub, T., Reddy, K. and McCauley, J.W. (2009). Novel genotypes of H9N2 influenza a viruses, isolated from poultry in Pakistan containing NS genes similar to highly pathogenic H7N3 and H5N1 viruses. PloS one, 4(6): e5788.
- Khan, S.U., Anderson, B.D., Heil, G.L., Liang, S. and Gray, G.C. (2015). A systematic review and meta-analysis of the seroprevalence of influenza A (H9N2) infection among humans. Journal of Infectious Disease, 212(4): 562-569.
- Knipe, D.M. and Howley, P.M. (2013). Fields Virology. 6th ed., USA: Philadelfia, Lippincott Williams & Wilkins, pp: 1151-1185.
- Mahdavi, S., Hemmatzadeh, F., Ghiami Rad, M. and Momtaz, M. (2017). Experimental Methods in Virology. 1st ed., Maragheh, Iran: Islamic Azad University of Maragheh Publication, pp: 70-77. [In Persian]
- Mehrabanpour, M. (2019). Evaluation and comparison of the potential immunogenicity of two commercial inactivated bivalent Newcastle and avian Influenza vaccines in SPF chiken. Archives of Razi Institute, 74(3): 251-257.
- Moradi, K. and Shahbazi, H.R. (2021). The effect of different levels of dietary threonine on performance, carcass characteristics, immune system and blood factors of Japanese quail under heat stress. Veterinary Clinical Pathology, 14(56): 365-379. [In Persian]
- Myers, T.J. and Morgan, A.P. (2003). Policy and guidance for licensure of avian influenza vaccines in the United States. Avian Diseases, 47(special issue): 373-378.
- Nili, H. and Asasi, K. (2002). Natural cases and an experimental study of H9N2 avian influenza in commercial broiler chickens of Iran. Avian Pathology, 31(3): 247-252.
- OIE. (2015). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2016. 8th ed., Chapter 2.3.4. Avian Influenza (Infection with Avian Influenza Viruses). World Organization for Animal Health, Paris, France: Office International Des Epizooties, pp: 1594-1607.
- Omidi zadeh, M., Kheyri, F. and Faghani, F. (2021). The effect of levels of coenzyme Q10 on performance, carcass characteristic, some blood parameters, immune system, organoleptic properties of meat and gastrointestinal tract development of male Japanese quails (Coturnix japonica). Journal of Animal Production, 23(1): 143-153. [In Persian]
- Pearson, J.E. (2003). International standards for the control of avian influenza. Avian Disease, 47(3 Suppl): 972-975.
- Shariatmadari, F. (2000). Poultry production and the industry in Iran. World's Poultry Science Journal, 56(1): 55-65.
- Suarez, D. and Schultz-Cherry, S. (2000). Immunology of avian influenza virus: a review. Developmental Comparative Immunology, 24(2-3): 269-283.
- Swayne, D.E., Suarez, D.L. and Sims, D.L. (2013). Diseases of Poultry. 13th ed., USA: Iowa 50010, WILLY-BLACKWELL, pp: 181-218.

- Talebi, E., Abedi, A., Rahimi, E. and Khosravinezhad, M. (2017). The effect of nano-selenium particles and sodium selenite on humoral immunity indices of quails using foods contaminated with aflatoxin B1. Veterinary Clinical Pathology, 11(42): 159-173. [In Persian]
- Terregino, C., Toffan, A., Cilloni, F., Monne, I., Bertoli, E., Castellanos, L., *et al*. (2010). Evaluation of the protection induced by avian influenza vaccines containing a 1994 Mexican H5N2 LPAI seed strain against a 2008 Egyptian H5N1 HPAI virus belonging to clade 2.2.1 by means of serological and in vivo tests. Avian Pathology, 39(3): 215-222.
- Wang, Y., Chen, X. and Yuan, Y. (2021). Antibody Response of an H9 Subtype Avian Influenza Poultry Vaccine on Three Kinds of Wild Birds in Shanghai Zoo. Avian Disease, 65(1): 90-94.
- Zhao, J., Yang, H., Xu, H., Ma, Z. and Zhang, G. (2017). Efficacy of an inactivated bivalent vaccine against the prevalent strains of Newcastle disease and H9N2 avian Influenza. Virology Journal, 14(1): 56.