بررسی زمان مناسب واکسیناسیون جوجه های گوشتی با واکسن پرتوتابی شده آنفلوانزای مرغی ساب تایپ H9N2

فرحناز معتمدی سده*[۱]، ایرج خلیلی[۲]، پروین شورنگ[۱]، مهدی بهگر[۱]، آرش اربابی[۳]

۱. پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای، پژوهشکده کشاورزی هسته ای، گروه دامپزشکی و علوم دامی
۲. موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی
۳. دانشگاه علوم پزشکی تهران

نویسنده مسئول: فرحناز معتمدی-سده، **farah.motamedi@gmail.com[1]; fmotamedi@aeoi.org.ir;**

چکیده:

ویروس آنفلوانزا طیور تحت تیپ H9 از ویروس های آنفلوانزای طیور با حدت کم می باشد. **هدف** از این تحقیق مقایسه پاسخ های ایمنی در جوجه های گوشتی واکسینه شده با واکسن پرتوتابی شده و واکسن فرمالینه انفولانزای مرغی ساب تایپ H9N2 به همراه ادجوانت روغنی و قند تری هالوز در دو سن متفاوت می باشد. **روش کار:** پس از تکثیر ویروس آنفلوانزا مرغی در تخم مرغ هایSPF توسط پرتو گاما با دز kGy ۳۰ غیرفعال سازی گردید. ۳۶ راس جوجه گوشتی یک روزه به ۱۲ گروه تقسیم شده: ۵ گروه در سن ۱ و ۱۵ روزگی و به ۵ گروه دیگر در سن ۱۱ و ۲۵ روزگی واکسینه شدند. ارزیابی ایمنی همورال و سلولی انجام شد. **نتایج:** بیشترین میانگین تیتر آنتی بادی در گروه های واکسن پرتوتابی شده با قند تری هالوز و بعد از آن با واکسن پرتوتابی شده همراه با ادجوانت روغنی بود. افزایش معنی داری از نظر تیتر آنتی بادی و شاخص تحریکی تکثیر لنفوسیت های طحال در تمام گروه های واکسینه شده نسبت به گروه کنترل منفی وجود داشت. سن واکسیناسیون ۱۱ و ۲۵ روزگی از سن واکسیناسیون ۱ و ۱۵ روزگی مناسبتر برای القائ پاسخ های ایمنی بدست آمد.

کلید واژه ها: ویروس آنفولانزا مرغی، پرتوتابی گاما، واکسن، غیرفعال سازی، قند تری هالوز، سن واکسیناسیون

Evaluation of the best time for vaccination of broiler chicken by Gamma Irradiated Avian Influenza subtype H9N2 vaccine

Abstract:

Avian Influenza virus was divided in two groups; highly photogenic and low pathogenic, H9 is a low pathogenic virus. The aim of this research is to comparison of immune responses of vaccinated broiler chicken by irradiated vaccine and formalin vaccine against avian influenza accompany with oil adjuvant and trehalose disaccharide in two different times. **Methods:** Avian Influenza virus subtype H9N2 was multiplied on SPF eggs and inactivated by 30 kGy of gamma radiation. Thirty-six eggs (one day old) were divided in 12 groups; 5 groups were vaccinated in 1 and 15 days and other 5 groups were vaccinated in 11 and 25 days by irradiated and formalin vaccines intradermal and as a drop on nose. Evaluation of humoral and cellular immunity were carried out by antibody titration in sera samples and spleen lymphocyte proliferation assay, respectively. **Results:** The most of antibody titration was in irradiated vaccine with trehalose group and then irradiated vaccine with oil adjuvant. The significant increasing of antibody titration and stimulation index of spleen lymphocytes was observed in all vaccinated chickens against negative control group. The best time of vaccination to induce immune responses was 11 and 25 days.

Key words: Avian Influenza Virus, Gamma Irradiation, Vaccine, Inactivation, Threhalose disaccharide, vaccination age.

[1] farah.motamedi@gmail.com; fmotamedi@aeoi.org.ir

مقدمه:

آنفلوانزای پرندگان یکی از بیماری های عفونی شناخته شده گونه های مختلف پرندگان است که در اثر عفونت ناشی از برخی از سویه های تیپ A ایجاد می شود. این ویروس ها براساس بیماریزایی در پرندگان به دو گروه با بیماریزایی بالا و بیماریزایی پائین طبقه بندی می شوند[۱، ۴ و ۱۰]. تحت تیپ H9 از ویروس های آنفلوانزای طیور با حدت کم می باشد. در اواخر سالهای دهه ۱۹۹۰ گزارشات متعددی از وقوع آنفلوانزا با این تحت تیپ از نقاط مختلف دنیا گزارش شده است [۶، ۷ و ۱۱]. نشانه های بیماری با این ویروس ها بسته به نوع ویروس، گونه، سن، عفونت های همزمان، محیط و حالت ایمنی میزبان متفاوت بوده و از حالت بدون علامت بالینی، سندرم های ملایم و گذرا تا درگیری و تلفات تا ۱۰۰٪ را شامل می شود. (۱۰). آنفلوانزای پرندگان از مهمترین و خطرناک ترین بیماری های ویروسی است که از سراسر نقاط دنیا گزارش شده است. این ویروس ها می توانند با شکستن سد بین گونه ای و انتقال به پستاندارانی مثل خوک، اسب و انسان باعث انتقال بیماری شوند [۱۶]. استفاده از پرتوهای یونساز جهت غیرفعال شدن ویروس آنفلوانزا بعنوان کاندید و اکسن پیشنهاد شده بود. پرتودهی تحت شرایط مطلوب و استاندارد هیچگونه اکتیویته ای را بوجود نمی آورد. تاثیر کشندگی پرتو گاما به میزان آسیب به ساختار مولکولی اسید نوکلئیک ویروسی وابسته است. این آسیب که ویریون غیر عفونت زا یا کشته شده را ایجاد می کند بطور مستقیم متناسب است با اندازه ژنوم و دز پرتودهی. پرتوهای یونساز دارای انرژی بالا و قدرت نفوذ زیاد و اثر کشندگی شدید می‌باشند و در مقایسه با فرمالین یا بتا پروپیولاکتون اثر مخرب کمتری بر روی ساختمان آنتی ژنیک و یکپارچگی بیولوژیک پروتئین ها دارند [۵، ۱۳ و ۱۴]. واکسن های آنفلوانزای غیرفعال موجود پاسخ های آنتی بادی خاص گونه را القا نموده بنابراین محافظت موثری در مقابل گونه های فراگیر و در حال توسعه فصلی ایجاد می کنند [۱۷ و ۱۸]. استفاده از این ویروس پرتوتابی شده بعنوان واکسن قادر است محافظت متقاطع در مقابل گونه های ویروسی فصلی و فراگیر را القا نماید، نشان داده شده است که یک دز منفرد از ویروس آنفلوانزای A اشعه دیده بدون ادجوانت از طریق تلقیح داخل بینی قادر است محافظت خوبی در مقابل تحت تیپ های هترولوگ و همولوگ ایجاد نماید [۹ و ۱۸]. بعلاوه از آنجایی که اثر مخرب پرتو گاما وابسته به دز است، وسعت تخریب ساختمانی به درجه حرارت پرتو بستگی داشته و پایداری پروتئین وقتی که نمونه های ویروسی روی یخ خشک اشعه می بینند بیشتر است [۱۲ و ۱۴]. هدف از این تحقیق مقایسه پاسخ های ایمنی در جوجه های گوشتی واکسینه شده با واکسن پرتوتابی شده و واکسن فرمالینه انفلوانزای مرغی ساب تایپ H9N2 به همراه ادجوانت روغنی مونتاناید ISA70 و قند تری هالوز در دو سن متفاوت و دو دوز واکسیناسیون می باشد. که در نهایت منجر به پیشنهاد سن مناسب جوجه های گوشتی برای واکسیناسیون علیه بیماری انفولانزا می گردد.

مواد و روش ها:

آماده سازی واکسن پرتوتابی شده آنفلوانزا مرغی ساب تایپ H9N2 : ویروس آنفلوانزا مرغی ساب تایپ A/Chicken/IRN/Ghazvin/2001/H9N2 در تخم مرغ های SPF تکثیر داده شد و پس از جمع آوری مایع آلانتوئیک تخم مرغ ها و تعیین تیتر آنتی ژن هماگلوتینین ویروسی در آن به عنوان استوک ویروسی در ویال های ۵ میلی لیتر تقسیم شده و در فریزر $-۷۰^{o}C$ نگهداری شدند. سپس به همراه یخ های خشک به پژوهشکده کاربرد پرتوها (تهران) انتقال داده شده و همراه با قالب های یخ مصنوعی در سیستم پرتودهنده گاما قرارگرفتند. سیستم پرتودهنده گاما مورد استفاده در این تحقیق مربوط به پژوهشکده کاربرد پرتوها شرکت MDS Nordion از کشور کانادا با چشمه کبالت 60 می باشد، نرخ دوز این سیستم و اکتیویته آن به ترتیب GyS ۸/۴ و ۲۰۴۶۹ Ci می باشد. دزیمتریک با روش فریک طبق استاندارد زیر انجام گردید.

Standard Practice for Using the Fricke Reference-Standard Dosimetry System, E 1026 – 04

دوز مطلوب برای غیر فعال سازی کامل این ویروس، حدود kGy ۳۰ محاسبه و به روش آزمون بی ضرری در تخم مرغ تایید شد.

آماده سازی واکسن فرمالینه آنفلوانزا مرغی ساب تایپ H9N2 : واکسن فرمالین طبق پروتکل موسسه واکسن و سرم سازی رازی تهیه گردید. فرمالین با غلظت ۰.۱٪ در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت ویروس را غیرفعال نموده و بعنوان واکسن مورد استفاده قرار گرفت.

انتخاب گروه های واکسن: پس از آماده سازی واکسن ها تعداد ۳۶ راس جوجه گوشتی یک روزه نژاد راس (Ross) خریداری و به پژوهشکده کشاورزی هسته ای منتقل گردیدند. سپس این جوجه ها در ۱۲ گروه سه تایی تقسیم شدند. یک گروه به عنوان نمونه های قبل از ایمن سازی انتخاب شدند یعنی در همان روز اول از طریق سر بریدن نمونه های خون انها جمع آوری و سرم جهت تعیین تیتر انتی بادی جداسازی شد. یک گروه هم به عنوان کنترل منفی بوده یعنی فقط به آنها بافر فسفات استریل تزریق شده و نمونه های سرم خون آنها جهت آزمون ممانعت از هماگلوتیناسیون برای تعیین تیتر آنتی بادی جمع آوری شد. پنج گروه از جوجه های در سن ۱ و ۱۵ روزگی واکسیناسیون شدند و پنج گروه دیگر در سن ۱۱ و ۲۵ روزگی واکسیناسیون گردیدند. واکسن ها شامل: ۱- واکسن فرمالینه به صورت یک قطره (۱۰۰ میکرولیتر) داخل بینی ۲- واکسن فرمالینه همراه با ادجوانت روغن مونتانایدISA70 به صورت تزریق زیر جلدی در ناحیه گردن (۱۰۰ میکرولیتر) ۳– واکسن پرتوتابی شده همراه با ادجوانت روغن مونتانایدISA70 به صورت تزریق زیر جلدی در ناحیه گردن (۱۰۰ میکرولیتر) ۴- واکسن پرتوتابی شده همراه با قند تری هالوز ۲۰٪ به صورت تزریق زیر جلدی در ناحیه گردن (۱۰۰ میکرولیتر) ۵- واکسن پرتوتابی شده همراه با قند تری هالوز ۲۰٪ به صورت یک قطره (۱۰۰ میکرولیتر) داخل بینی

خونگیری از جوجه ها دو هفته بعد از آخرین زمان واکسیناسیون انجام شد.

آزمون ممانعت از هماگلوتیناسیون برای تعیین تیتر آنتی بادی: آنتی ژن هماگلوتینین که یکی از آنتی ژن های سطحی ویروس آنفولانزا می باشد با اتصال به گلبول های قرمز جوجه باعث واکنش آگلوتیناسیون شده که اساس آزمون هماگلوتیناسیون برای تعیین تیتر آنتی بادی ضد آنتی ژن هماگلوتینین می باشد. این آزمون در میکروپلیت ۹۶ خانه استریل انجام می شود. به تمامی خانه های ستون انتخاب شده از میکروپلیت ۹۶ خانه ای U شکل ۲۵ میکرولیتر سرم فیزیولوژی استریل ریخته شد. ۲۵ میکرولیتر از سرم مورد نظر در خانه اول ستون ریخته و سرم مورد نظر تا انتهای ستون مربوطه رقیق سازی شد. ۲۵ میکرولیتر آنتی ژن ۴ واحد هماگلوتینین به تمامی خانه های ستون مورد نظر اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار گرفت. سپس ۲۵ میکرولیتر خون سه بار شسته شده با رقت ۱٪ ، در تمامی خانه های ستون مورد نظر ریخته شد و مجددا ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار گرفت. بالا ترین رقت از سرم، که به طور کامل از آگلوتیناسیون گلبول قرمز جلوگیری کند عیار HI سرم را نشان می دهد.

بررسی میزان تکثیر لنفوسیت های طحال به روش آزمون MTT: پس از استخراج لنفوسیت ها در روز اول و بررسی درصد زنده مانی سلول ها، سلول ها ی هر نمونه در ۹ چاهک یک میکروپلیت ۹۶ خانه ای استریل کشت داده شد و به سه چاهک کنترل مثبت ۵ میکرولیتر فیتو هماگلوتینین (PHA-Gibco-Cat No: 10576-015) استریل افزوده شد. به سه چاهک کنترل منفی: ۵ میکرولیتر محیط کشت RPMI-1640 بدون اندیکاتور افزوده شد و به سه چاهک تست : 0.25 میلی گرم آنتی ژن ویروس آنفولانزای مرغی ساب تایپ H9N2 پرتوتابی شده تهیه شده اضافه گردید. سپس به سلول ها فرصت داده می شود تا در گرمخانه ^{o}C ۳۷ رشد نمایند. برای انجام این آزمون از کیت Cell Proliferation Kit 1 (MTT) - Roche (Cat No: 11-465-007-001) استفاده شد. پس از ۴۸ ساعت مقدار ۲۵ میکرولیتر از محلول MTT آماده شده به هر ۹ چاهک اضافه شد و به مدت ۴ ساعت در ^{o}C۳۷ انکوبه گردید

محلول MTT به غلظت 5mg/ml در بافر فسفات شامل ترکیب زیر می باشد:

3-[4, 5- dimethylthiazol-2-yl] - 2, 5- diphenyltetrazolium bromide

تشکیل بلورهای فورمازون بنفش رنگ با میکروسکوپ، ۴ ساعت پس از افزودن معرف MTT بررسی شد.

محلول رویی سلول ها به آرامی جمع آوری، میزان ۱۰۰ میکرولیتر حلال کیت که شامل SDS 10%در 0/01 M HCl اضافه گردید و پس از یک شب در گرمخانه 37°C کریستال ها در آن حل شد. و جذب نوری چاهک ها با دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۴۵۰ نانومتر

خوانده شد. سپس شاخص تحریکی (SI) حاصل تقسیم میانگین جذب نوری چاهک های تست به میانگین جذب نوری چاهک های کنترل منفی محاسبه شد.

تحلیل آماری: مقایسه میانگین تیتر آنتی بادی و شاخص تحریکی تکثیر لنفوسیت های طحال با استفاده از نرم افزار SPSS به روش آنالیز واریانس یک طرفه (آزمون دانکن) در بین گروه های جوجه های واکسینه شده در دو سن مختلف مورد مطالعه قرار گرفت.

نتایج: به منظور بررسی زمان مناسب واکسیناسیون جوجه های گوشتی با واکسن پرتوتابی شده و واکسن فرمالینه آنفولانزا مرغی ساب تایپ H9N2 در دو سن مختلف ۱ و ۱۵ روز در مقایسه با سن ۱۱ و ۲۵ روز تیتر انتی بادی در سرم خون جوجه ها و میزان تکثیر لنفوسیت های طحال این جوجه ها با هم مقایسه گردید که نتایج انها در جدول شماره ۱ مشاهده می شود. طبق نتایج جدول تیتر آنتی بادی در جوجه ها قبل از ایمن سازی یعنی در یک روزگی صفر بوده است که نشان می دهد جوجه ها ایمنی مادرزادی نداشته اند. در گروه های که در سن ۱ و ۱۵ روزگی واکسیناسیون شده اند بیشترین میانگین تیتر آنتی بادی در گروه واکسن پرتوتابی شده به همراه قند تری هالوز بوده که بصورت استنشاقی (قطره داخل بینی) تلقیح شده است و بعد از آن واکسن پرتوتابی شده همراه با ادجوانت روغنی ISA70 می باشند. در گروه های که در سن ۱۱ و ۲۵ روزگی واکسیناسیون شده اند بیشترین میانگین تیتر آنتی بادی در گروه های واکسن پرتوتابی شده به همراه قند تری هالوز بوده و بعد از آن واکسن پرتوتابی شده همراه با ادجوانت روغنی ISA70 می باشد. همچنین افزایش معنی داری از نظر تیتر آنتی بادی و شاخص تحریکی تکثیر لنفوسیت های طحال در تمام گروه های واکسینه شده نسبت به گروه کنترل منفی وجود دارد ($P<0.05$). با توجه به نتایج تیتر آنتی بادی و تکثیر لنفوسیت های طحال در سن ۱۱ و ۲۵ روزگی افزایش بهتری قابل مشاهده می باشد لذا سن واکسیناسیون ۱۱ و ۲۵ روزگی از سن واکسیناسیون ۱ و ۱۵ روزگی مناسبتر برای القائ پاسخ های ایمنی می باشد.

جدول ۱: نتایج تیتر آنتی بادی و شاخص تحریکی تکثیر لنفوسیت های طحال در تمام گروه های واکسینه شده

ردیف	نوع واکسن	روش تلقیح	سن واکسیناسیون (روز)	سن نمونه گیری (روز)	میانگین تیتر انتی بادی ±انحراف معیار	میانگین شاخص تحریکی SI ±انحراف معیار
۱	قبل از ایمن سازی	-	-	۱	۰	۰.۹۸
۲	واکسن فرمالینه	استنشاقی	۱ و ۱۵	۲۹	۴.۲۵± ۰.۵	۱.۰۴± ۰.۲۲
۳	واکسن فرمالینه+ISA70	تزریقی	۱ و ۱۵	۲۹	۴.۶۶± ۰.۵۷	۱.۰۷± ۰.۲۸
۴	واکسن پرتوتابی+ISA70	تزریقی	۱ و ۱۵	۲۹	۴.۵± ۰.۵۷	۱.۱۴± ۰.۴۱
۵	واکسن پرتوتابی+تری هالوز	استنشاقی	۱ و ۱۵	۲۹	۴.۷۵± ۰.۵	۱.۲۱± ۰.۳۸
۶	واکسن پرتوتابی+تری هالوز	تزریقی	۱ و ۱۵	۲۹	±۴.۵ ۰.۵۷	۱.۱۴± ۰.۵۲
۷	واکسن فرمالینه	استنشاقی	۱۱ و ۲۵	۳۹	۴± ۱	۱.۰۸± ۰.۲۵
۸	واکسن فرمالینه+ISA70	تزریقی	۱۱ و ۲۵	۳۹	۵± ۰	۱.۱۳± ۰.۳۳
۹	واکسن پرتوتابی+ISA70	تزریقی	۱۱ و ۲۵	۳۹	۵.۳۳± ۰.۵۷	۱.۱۸± ۰.۴۶
۱۰	واکسن پرتوتابی+تری هالوز	استنشاقی	۱۱ و ۲۵	۳۹	۵± ۰	۱.۳۸± ۰.۵۸
۱۱	واکسن پرتوتابی+تری هالوز	تزریقی	۱۱ و ۲۵	۳۹	۴.۶۶± ۰.۵۷	۱.۲۳± ۰.۱۳
۱۲	کنترل منفی (PBS)	-	۱ و ۱۵	۲۹	۰	۱.۰۱

بحث: به منظور پیشگیری از گسترش عفونت ویروس H9N2 واکسن کشته تجاری تهیه شده از اولین ویروس جدا شده از مزارع طیور ایران از سال ۱۳۷۷ مورد استفاده قرار گرفت (۸، ۱۴). ویروس های H9N2 هنوز در جمعیت طیور اعم از گله های واکسینه و غیر واکسینه در حال چرخش می باشد. بسیاری از سویه های در حال گردش به آمانتادین مقاوم شده اند. افزایش شیوع آنتی بیوتیک ها و باقیمانده آنها در مواد غذایی مورد مصرف انسان و مقاومت داروئی، اهمیت وجود روش جایگزین برای کنترل بیماری ها را نشان می دهد و به خصوص زمانی که در بیماری ویروسی روش درمانی جایگزینی وجود نداشته باشد (۱۵). در این تحقیق با غیرفعال سازی ویروس آنفلوانزای طیور سروتیپ H9N2 به وسیله پرتو گاما به منظور تهیه واکسن کشته شده اقدام گردید. در این مطالعه پس از تکثیر ویروس در تخم مرغ جنین دار SPF و اطمینان از تکثیر ویروس، تیتر ویروس به روش دز عفونی کننده ۵۰٪ تخم مرغ ها (EID50) تعیین گردید. سپس نمونه های ویروس همراه با قالب های یخ مصنوعی در سیستم پرتودهنده گاما قرار داده شدند. دز مطلوب برای غیرفعال سازی کامل ویروس 30KGy بود. معتمدی و همکارانش در سال ۲۰۰۸ با تهیه واکسن غیرفعال ویروس تب برفکی تیپ A87/IRN توسط پرتوتابی گاما و بررسی پاسخ ایمنی آن توانستند ویروس تب برفکی را با دز ۴۴ کیلوگری پرتوتابی و غیرفعال سازی نموده و به عنوان رادیوواکسن با استفاده از ژل هیدروکسید آلومینیوم فرموله نمایند. سپس رادیوواکسن و واکسن های رایج به خوکچه های هندی تزریق شدند و نتایج آزمون خنثی سازی سرم برای واکسن رایج و رادیوواکسن بعد از ۸ ماه بدست آمد. آزمون کارایی واکسن غیرفعال انجام شد که ارزیابی دز حفاظتی ۵۰٪ (PD50) به ترتیب برای واکسن رایج و رادیوواکسن، ۷.۰۶ و ۵.۶ محاسبه گردید [۱۸]. رویا و همکارانش درسال ۲۰۱۰ مقایسه ای بین ویروس های آنفلوانزا تحت تیپ {A/PC{A/Port Chalmers/1/73(H3N2) که با اشعه گاما، فرمالین و اشعه ماورائ بنفش غیرفعال شده بودند و همچنین واکسن ساب ویریون ۳ ظرفیتی که اکنون به صورت تجاری در دسترس است انجام دادند تا قابلیت آنها برای القا ایمنی محافظت کننده همولوگ و هترولوگ مقایسه شود. نتایج نشان داد که برخلاف واکسیناسیون داخل بینی با ویروس غیرفعال شده با فرمالین، اشعه ماورا بنفش یا واکسن سه ظرفیتی آنفلوانزا، یک دز از ویروس آنفلوانزای A/PC که با اشعه گاما غیرفعال شده است ایمنی محافظت کننده متقاطع مربوط به پاسخ های سلول T ایجاد می نماید ولی آنتی بادی های خنثی کننده متقاطع تولید نمی کند. در نهایت لیوفیلیزه ویروس آنفلوانزای A/PC پرتوتابی شده با اشعه گاما بر توانایی القا ایمنی محافظت کننده متقاطع تاثیر نمی گذارد [۸]. صالحی و همکاران در سال ۱۳۹۴ توانستند ویروس آنفلوانزای طیور تیپ H9N2 را به روش پرتوتابی گاما با دز حدود ۳۰ کیلوگری غیرفعال نمایند و آن را در مدل موشی استفاده نمودند. با توجه به مقایسه میانگین های تیتر آنتی بادی های خنثی کننده مشخص گردید که افزایش معنی داری در تیتر آنتی بادی در گروه واکسن پرتوتابی شده و گروه واکسن فرمالینه و نسبت به شاهد داخلی می باشد. همچنین افزایش تیتر آنتی بادی در گروه واکسن پرتوتابی شده نسبت به گروه واکسن فرمالینه معنی دار نمی باشد. همچنین در بررسی تکثیر لنفوسیت های طحال نتیجه گرفتند که در گروه رادیوواکسن گاما افزایش معنی داری نسبت به گروه واکسن فرمالینه و شاهد ایجاد شده است ولی گروه فرمالینه با شاهد اختلاف معنی داری ندارد [۱۳]. الشریفی و همکاران در سال ۲۰۰۹ بیان کردند که پرتوتابی روش قابل اعتمادی در غیرفعال سازی ویروس ها است که بر روی ساختار و پروتئین ویروسی تاثیر دارد و همچنین برای فرمولاسیون واکسن های با ایمنی متقاطع انتظار پاسخ وجود دارد بنابراین تعداد واکسن هایی را که مورد نیاز است کاهش می دهد. آنها همچنین عنوان نمودند موشی که یکبار به وسیله آنفلوانزای A غیرفعال شده با پرتوتابی 10000Gy به صورت داخل بینی واکسینه شده در برابر چالش با ویروس های آنفلوانزای A همولوگ و هترولوگ شامل H5N1 ایمن شد [۱۲]. مولباچر و همکاران در سال ۱۹۸۸ بیان نمودند که واکسن آنفلوانزای غیرفعال شده به روش شیمیایی بر پاسخ آنتی بادی ایمنی زا یا محافظت کننده استوار است و به پاسخ سلول T سیتوتوکسیک که در بهبودی از عفونت اولیه نقش مهمی دارند تاثیری ندارد. ویروس آنفلوانزای A پرتوتابی شده با 12000Gy پاسخ سلول T را در موش برمی انگیزد و از آنها در برابر چالش کشنده با سویه هترولوگ ویروس محافظت می کند [۱۹]. عبدالحمید و همکاران در سال ۲۰۱۶ بر روی اثرات پاتوژنیک ویروس آنفلوانزای H9N2 در جوجه ها مطالعه کردند نتایج کاهش شدیدی در میانگین وزن بدن در گروه جوجه های عفونی در مقایسه با گروه کنترل را نشان داد که احتمالا به دلیل اثر ویروس بر روی تولید آنزیم های پانکراس برای هضم غذا است [۲۰]. در نهایت با توجه به نتایج این تحقیق و با در نظر گرفتن تیتر آنتی بادی و تکثیر

لنفوسیت های طحال در سن ۱۱ و ۲۵ روزگی افزایش بهتری قابل مشاهده می باشد لذا سن واکسیناسیون ۱۱ و ۲۵ روزگی از سن واکسیناسیون ۱ و ۱۵ روزگی مناسبتر برای القائ پاسخ های ایمنی می باشد.

تشکر و قدردانی: بدینوسیله از جناب آقای دکتر ایرج خلیلی از همکاران موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج، جناب آقای دکتر کیان جوادی کوشش ریاست محترم آزمایشگاه پاتوبیولوژی و سیتو ژنتیک رازی کرج، سرکار خانم آوا اسدی کارشناس آزمایشگاه مولکولی دانشگاه آزاد کرج و تمام کسانی که به نحوی در اجرای این تحقیق همکاری نموده اند، صمیمانه تشکر و قدردانی می شود.

منابع:

۱- قلیان چی لنگرودی، آ.، کریمی، و.، هاشم زاده، م. (۲۰۱۲). شجره شناسی ویروس آنفلوانزای پرندگان H9N2 جدا شده از گله های گوشتی ایران براساس پلی مراز PB1.

۲- رحیمیان ع، شوشتری پور محمره ع، پوربخش ع، ممیز ر، رحیمی لرکی ا، مهربانپور م ج. بررسی سرولوژی و ملکولی آلودگی به ویروس آنفلوانزای طیوری H9N2 در کارکنان صنعت طیور. ۱۳۸۸. شماره۳: ۱۳۳-۱۴۰.

3- Dong-Hun, L., Jae-Kenu, P., Yu-Na L. (2011). H9N2 avian influenza virus-like particle vaccine provides protective immunity and a strategy for the differentiation of infected from vaccinated animals. Vaccine, 29; 4003-4007.

4- Velden, M. V. W., Aichinger G., Pollabauer E. M. (2012). Cell culture (vero cell) derived whole-virus non-adjuvanted H5N1 influenza vaccine induces long-lasting cross-reactive memory immune response: Homologous or heterologous booster response following two dose or single dose priming. Vaccine, 30; 6127-6135.

5- Monne, I., Ormelli, S., Salviato, A. (2008). Development and validation of a one-step real-time PCR assay for simultaneous detection of subtype H5, H7, and H9 avian influenza viruses. Journal of clinical microbiology, 46; 1769-1773.

6- Khalil, A. A., Hussein, H. A., Tolba, S. K. (2015). Preparation and evaluation of H9N2 vaccine adjuvated with montanide ISA71 VG. Global veterinaria, 5; 670-674.

7- Pushko, P., Tretyakova, I., Hidajat, R. (2017). Virus-like particles displaying H5, H7, H9 hemagglutinins and N1 neuraminidase elicit protective immunity to heterologous avian influenza viruses in chickens. Virology, 501; 176-182.

8- Furuya, Y., Chan, J., Regner, M. (2010). Cytotoxic T cells are the predominant players providing cross-protective immunity induced by ϒ-irradiated influenza A viruses. Journal of virology, 84; 4212-4221.

9- 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, 1; 13-17.

10- Wei, H., Chang, W., Lin, Sh. (2011). Fabrication of influenza virus-like particles using M2 fusion proteins for imaging single viruses and designing vaccines. Vaccine, 29; 7163-7172.

11- Brito, L. A., Ohagan, D. T. (2014). Designing and building the next generation of improved vaccine adjuvants. Journal of controlled release, 190; 563-579.

12- Alsharifi, M., Furuya, Y., Bowden, T. R. (2009). Intranasal flu vaccine protective against seasonal and H5N1 avian influenza infections. Plos one, 4;.

13- Salehi, B., Motamedi-sadeh, F., Madadgar, O. (2018). Analysis of antigen conservation and inactivation of gamma-irradiated avian influenza virus subtype H9N2. Acta microbiological et immunologica hungarica, Doi: 10.1556/030.65.

14- Furuya, Y., Chan, J., Regner, M. (2010). Cytotoxic T cells are the predominant players providing cross-protective immunity induced by ϒ-irradiated influenza A viruses. Journal of virology, 9; 4212-4221.

15- Ebrahimi, S. M., Nili, H., Sohrabi, N. (2010). Histopathological evaluation of A/chicken/Iran/339/02 (h9N2), an Iranian field isolate of influenza virus on Japanese quail (coturnix coturnix Japonica). World applied sciences journal, 2; 226-229.

16- Shannon, C.D., josyane, L., Eve, V.S. (2017). The effect of gamma-irradiation conditions on the immunogenicity of whole-inactivated influenza A virus vaccine. Vaccine, 35; 1071-1079.
17- Nakayama, M., Itoh, Y., Shichnohe, Sh. (2017). Potential risk of repeated nasal vaccination that induces allergic reaction with mucosal IgE and airway eosinophilic infiltration in cynomolgus macaques infected with H5N1 highly pathogenic avian influenza virus. Vaccine, 35; 1008-1017.
18- MotamediSedeh F, Khorasani A, Shafaee K, Fatolahi H, Arbabi K. Preparation of FMD type A87/IRN Inactivated Vaccine by Gamma Irradiation and the Immune Response on Guinea pig. Indian J Microbio. 2008,48: 51-60.
19- Müllbacher A, Ada G L, Hla R T. Gamma-irradiated influenza A virus can prime for a cross-reactive and cross-protective immune response against influenza A viruses. Immunology and Cell Biology.1988, 66:153–157.
20- Abdelhamid H.S., Ellakany H.F., Hussien H.A., El-bestawy. Pathogenicity of an avian influenza H9N2 virus isolated from broiler chickens in Egypt. Alexandria journal of veterinary sciences. 2016.51(2):90-100.