مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۸۹، دوره ۶۵، شماره ۴، ۲۹۹-۲۹۵

ارزیابی کیفی آزمایشگاهی واکسن‌های امولسیون روغنی تحت تیپ H_9N_2 آنفلوانزای پرندگان

ذوالفقار رجبی[1*] حسین طایفی نصرآبادی[2] امیربابک سیوفی خوجین[3]

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

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

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

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

چکیده

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

واژه‌های کلیدی: واکسن‌های آنفلوانزا، واکسن‌های امولسیون روغنی، ارزیابی درآزمایشگاه.

مقدمه

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

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

تکامل سروتیپ H_9N_2(۱۱)، ارتباط ژنتیکی با تحت تیپ H_5N_1 ویروس آنفلوانزای پرندگان(۵)، که می‌تواند طیور و انسان را آلوده کند و همچنین جداسازی ویروس‌های H_9N_2 از انسان(۷،۱۴)، بر اهمیت کنترل ویروس‌های H_9N_2 در طیور تأکید می‌کنند.

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

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

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

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۳۳۹۲۳۴۲-۰۴۱۱ نمابر: ۳۳۵۷۸۳۴-۰۴۱۱ Email: rajabi@tabrizu.ac.ir

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

مواد و روش کار

واکسن‌ها: سه واکسن روغنی تجاری تحت تیپ H_9N_2 آنفلوانزای پرندگان با نام‌های A، B، و C در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت، در هر سه واکسن امولسیون آب در روغن بود.

استخراج توده‌ی آنتی ژن موجود در واکسن‌ها به روش partition: Aqueous: به‌منظور جداسازی و اندازه‌گیری فاز آبی واکسن‌های روغنی مورد مطالعه، ۵ میلی لیتر از هر واکسن با سه میلی لیتر الکل ۱-هگزانول مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه با دور g۱۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شد. با توجه به نسبت فاز آبی و فاز روغنی واکسن‌های مورد مطالعه برای استخراج توده‌ی آنتی ژن از واکسن‌های بدون دستکاری، ۱۲ دوز از هر واکسن به لوله‌های سانتریفوژ حاوی مقدارهای مناسب فسفات-بافر سالین (PBS) (به ترتیب حاوی ۱/۳۳ میلی لیتر، ۲/۶۳ میلی لیتر و ۳ میلی لیتر) اضافه گردید، سپس در داخل حمام یخ قرار داده شدند تا دمای آنها به صفر درجه‌ی سانتیگراد برسد(نسبت حجم PBS و حجم فاز آبی در هر سه واکسن یکسان بود). محتویات هر لوله توسط هموژنایزر (IKA ULTRA-TURRAX® T 18 basic) به مدت ۵۰ ثانیه با دور ۲۰۰۰۰ در دقیقه در دمای یخچال مخلوط شد، سپس مخلوط حاصل به مدت ۱۵ دقیقه با دور g۱۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتیگراد به منظور جداسازی قسمت PBS از واکسن روغنی سانتریفوژ گردید. فعالیت هماگلوتیناسیون قسمت PBS استخراج شده از هر واکسن مشخص و عیار آن تعیین شد. استخراج توده‌ی آنتی ژن ۲ روز قبل از واکسیناسیون انجام گرفت.

روش ارزیابی فعالیت هماگلوتیناسیون: برای هر نمونه ابتدا ۲۵ میکرولیتر PBS به هر گوده در یک میکروپلیت ۹۶ گوده‌ای تا گوده‌ی ۱۲ ریخته شد، سپس ۲۵ میکرولیتر از PBS استخراج شده از یک واکسن به گوده‌ی اول اضافه شد و بعد از مخلوط کردن ۲۵ میکرولیتر از مخلوط برداشته شد و به گوده‌ی دوم اضافه شد، رقیق سازی تا گوده‌ی ۱۲ ادامه یافت. بعد از رقیق سازی ۲۵ میکرولیتر از گلبول‌های قرمز خون جوجه با رقت ۱ درصد به هر گوده اضافه شد و بعد از ۳۰ تا ۴۰ دقیقه گرماگذاری در دمای آزمایشگاه عیار هماگلوتیناسیون یاداشت شد. لازم به ذکر است این آزمایش در کنار شاهد گلبول قرمز و شاهد آنتی ژن استاندارد H_9N_2 انجام گرفت.

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

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

روش ارزیابی مهار هماگلوتیناسیون: برای هر نمونه‌ی سرمی ابتدا ۲۵ میکرولیتر PBS در هر گوده تا گوده‌ی دوازدهم در یک میکروپلیت ۹۶ گوده‌ای ریخته شد سپس ۲۵ میکرولیتر از نمونه‌ی سرمی مورد نظر به گوده‌ی اول اضافه گردید، بعد از مخلوط کردن سرم با PBS در گوده‌ی مذکور ۲۵ میکرو لیتر از برداشته شد و به گوده‌ی دوم اضافه و کاملاً با PBS موجود در گوده‌ی دوم مخلوط شد، سپس ۲۵ میکرولیتر از آن اخذ و به گوده‌ی سوم اضافه شد، رقیق سازی به ترتیبی که گفته شد تا گوده‌ی ۱۲ ادامه یافت، از گوده‌ی دوازده ۲۵ میکرولیتر برداشته و بیرون ریخته شد. بعد از رقیق سازی سرم، به هر گوده ۲۵ میکرو لیتر از آنتی ژن H_9N_2 (چهار واحد) اضافه گردید. بعد از ۳۰ دقیقه گرماگذاری در دمای آزمایشگاه به هر گوده ۲۵ میکرولیتر از گلبول‌های قرمز خون جوجه با رقت ۱ درصد ریخته شد. بعد از ۳۰ تا ۴۰ دقیقه گرماگذاری در دمای آزمایشگاه عیار مهار هماگلوتیناسیون سرم یاداشت شد.

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

جدول ۱- ارتباط بین عیارهای هماگلوتیناسیون بازیافته، پروتئین تام استخراج شده، و عیارهای مهار هماگلوتیناسیون سرم. a واکسن‌های روغنی تحت تیپ H_9N_2 آنفلوانزای پرندگان. b فسفات بافر سالین (PBS) به‌عنوان کنترل منفی واکسن‌ها. c عیار هماگلوتیناسیون باز یافته. d پروتئین تام استخراج شده از واکسن. e میانگین عیار مهار هماگلوتیناسیون بر اساس ۲۵ قطعه جوجه در هرگروه که بین آنها از نظر آماری اختلاف معنی‌داری وجود دارد (p=.۰۰۰).

واکسن‌ها[a]	عیارهای هماگلوتیناسیون[c]	پروتئین تام[d] (میکروگرم در میلی لیتر)	میانگین عیار مهار هماگلوتیناسیون سرم[e]
A	۲	۴/۸	۵/۰۸
B	۰	۲	۲/۷۶
C	۳	۷	۶/۲۴
[b]D	-	-	./۶

انجام گرفت.

نتایج

فاز آبی واکسن‌ها: حجم فاز آبی واکسن A، B و C به ترتیب ۱/۲ میلی لیتر در ۵ میلی لیتر، ۱/۶ میلی لیتر در ۵ میلی لیتر، و ۲/۲ میلی لیتر در ۵ میلی لیتر واکسن بود. در هر سه واکسن فاز آبی کمتر از فاز روغنی بود.

عیارهای هماگلوتیناسیون باز یافته: نتایج نشان داد عیار فعالیت هماگلوتیناسون باز یافته در سه واکسن یکسان نیست و عیارهای هماگلوتیناسیون باز یافته از واکسن‌ها به‌وسیله تکنیک partition aqueous به ترتیب ۰ (واکسن B)، ۲ (واکسن A) و ۳ (واکسن C) است (جدول ۱).

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

میانگین عیار مهار هماگلوتیناسیون سرم: حداقل و حداکثر میانگین عیارهای مهار هماگلوتیناسیون سرم جوجه‌های واکسینه شده به ترتیب ۲/۷۶ و ۶/۲۴ بود که پتانسیل و میزان ایمنی‌زایی واکسن‌ها را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد پاسخ سیستم ایمنی به واکسن C بیشتر از واکسن A و واکسن B است (جدول ۱). از نظر آماری اختلاف معنی‌داری بین پاسخ سیستم ایمنی جوجه‌های واکسینه با واکسن‌های A، B، C با هم و با جوجه‌های غیرواکسینه (p=/۰۰۰) وجود داشت.

بحث

ایمنی‌زایی و درجه‌ی ایمنی‌زایی واکسن‌های روغنی آنفلوانزای پرندگان در گونه‌های مختلف به اثبات رسیده است (۴،۱۰،۱۹)، بنابراین واکسیناسیون با واکسن‌های روغنی ابزاری مناسب برای کنترل ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان است (۲).

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

به‌طور کلی میزان ایمنی‌زایی واکسن‌ها از جمله واکسن‌های کشته تحت تأثیر عوامل مختلفی است از جمله توده آنتی ژن، فرمولاسیون واکسن، نوع روغن مورد استفاده در واکسن به‌عنوان ادجوان، دز واکسن، گونه پرنده واکسینه و سن واکسیناسیون (۱۰،۱۶،۲۳). استون و همکاران نشان دادند وجود دو فاز آبی و روغنی در واکسن در مقایسه با وقتی که فقط فاز روغنی است، عیار مهار هماگلوتیناسیون ۴-۲ برابر بیشتر است (۱۸) و در صورت ثابت ماندن تعادل هیدروفیل - لیپوفیل (HLB) نسبت فاز آبی و روغنی واکسن در پاسخ سرولوژی تأثیری ندارد، در عین حال فاز روغنی علاوه بر افزایش تأثیر واکسن، باعث کاهش ویسکوزیتی و افزایش ثبات واکسن‌های امولسیون آب در روغن (W/O) می‌شود (۱۷).

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

علاوه‌بر آنتی ژن هماگلوتینین، آنتی ژن نورآمینیداز و همچنین پروتئین‌های داخلی و بخصوص نوکلئوپروتئین‌های ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان نیز موجب ترشح آنتی بادی‌های می‌شود که عیار تکثیر ویروس‌های آنفلوانزا را از طریق به تأخیر انداختن زمان آلودگی کاهش می‌دهند (۲۰).

از آن جا که واکسن‌های روغنی آنفلوانزا از ویروس کامل تهیه می‌شود هر چقدر میزان پروتئین ویروسی در واکسن بیشتر باشد غلظت آنتی ژن هماگلوتینین و سایر آنتی ژن‌ها نیز بیشتر خواهد بود لذا با استخراج و اندازه‌گیری غلظت پروتئین ویروسی می‌توان اطلاعاتی در ارتباط با کیفیت واکسن به‌دست آورد. معمولاً واکسن‌ها قبل از ورود به بازار و حتی

درزمان استفاده در مرغداری ها از لحاظ ایمنی زایی و میزان کیفیت ارزیابی می شوند که غالباً در بدن جوجه براساس میزان تولید آنتی بادی علیه آنتی ژن هماگلوتینین و میزان حفاظت از بدن در مقابل چالش با ویروس و میزان دفع ویروس انجام می گیرد که مستلزم صرف وقت و هزینه ی زیاد است. استون نشان داد با استفاده از روش Aqueous partition امکان استخراج پروتئین های ویروسی از واکسن های روغنی نیوکاسل وجود دارد(۱۵).

در این مطالعه برای این که بررسی کیفی سه واکسن و امکان مقایسه ی آن ها با یکدیگر فراهم شود در استخراج آنتی ژن هماگلوتینین از هر واکسن ۱۲ دز و با توجه به فاز آبی هر واکسن (قسمت اعظم پروتئین ویروسی در این فاز قرار دارد) محلول PBS با نسبت برابر به هر کدام اضافه شد. نتایج مطالعات نشان می دهد اختلاف معنی داری بین میزان ایمنی زایی واکسن ها وجود دارد(p=/۰۰۰)، (جدول ۱) و به عبارت دیگر کیفیت واکسن ها با هم یکسان نیست و ایمنی زایی واکسن C بهتر از ایمنی زایی دو واکسن دیگر است. نتایج حاصل از استخراج پروتئین های ویروسی و فعالیت هماگلوتیناسیون بازیافته از واکسن ها نیز مطلب مورد اشاره را تأیید می کنند و نشان می دهد با استفاده از دو روش آزمایشگاهی مذکور ارزیابی کیفی واکسن روغنی آنفلوانزا و حتی تا حدودی بیان دلیل کیفیت پایین یا بالای آن و استاندارد بودن آن در مدت کوتاه و با هزینه ی حداقل و بدون استفاده از روش های معمول ارزیابی کیفی امکان پذیر است. البته جهت بهبود و استاندارد کردن این روش ها نیاز به مطالعه ی بیشتری است. با توجه به نتایج استخراج پروتئین و فعالیت هماگلوتیناسیون باز یافته از واکسن های مورد مطالعه به نظر می رسد علت اصلی کیفیت پایین واکسن های A و B، به خصوص واکسن B در مقایسه با واکسن C غلظت پایین پروتئین های ویروسی در این واکسن ها باشد.

تشکر و قدردانی

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

References

1. Alexander, D.J. (2000) A review of avian influenza in different bird species. Vet. Microbiol. 74: 3-13.
2. Capua, I., Marangon, S. (2003) The use of vaccination as an option for the control of avian influenza. a review. Avian Pathol. 32: 335- 343.
3. Garcia, A., Johnson, H., Srivastava, D. K., Jayawardene, D. A., Wehr, D. R., Webster, R. G. (1998) Efficacy of inactivated H_5N_2 influenza vaccines against lethal A/Chicken/Queretaro/19/95 infection. Avian Dis. 42: 248-256.
4. Gubareva, L. V., Webester, R. G., Hayden, F. G. (2002) Detection of influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors by an enzyme inhibition assay. Anti. Virol. Res. 53: 47-61.
5. Guo, Y. J., Li, J. G., Cheng, X. W., Wang, M., Zhou, Y., Li, X. H., Cai, F., Miao, H. L., Zhang, H., Guo, F. (1999) Discovery of men infected by avian influenza A (H_9N_2) virus. Chin. J. Exp. Clin. Virol. 13: 105-108.
6. Halvorson, D. A. (2003) Strengths and weaknesses of vaccines as a control tool. Avian Dis. 47: 223-227.
7. Jacob, P. J., Butcher, D. G., Mather, B. F., Miles, D. R. (2000) Avian Influenza in Poultry. University of Florida. Gainesville, USA.
8. Karunakaran, D., Newman, J. A., Halvorson, D. A., Abraham, A. (1987) Evaluation of inactivated influenza vaccines in market turkeys. Avian Dis. 31: 498-503.
9. Li, C., Yu, K., Tian, G., Yu, D., Liu, L., Jing, B., Ping, J., Chen, H. (2005) Evolution of H_9N_2 influenza viruses from domestic poultry in Mainland China. Virol. 340: 70 - 83.
10. Lowry, O. H., Rosebriugh, N. J., Farr, A. L. L., Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
11. Maccauly, W. J., Baigent, J. S., Bethell, C. R. (2003) Anti influenza virus therapeutics: Potential use and their mode of action. Avian Dis. 47: 281-291.
12. Peiris, M., Yuen, K. Y., Leung, C. W., Chan, K. H., Ip, P. L. S. R., Lai, W. M., Orr, W. K., Shortridge, K. F. (1999) Human infection with influenza H_9N_2.

Lancet. 354: 916-917.

13. Stone, H. D. (1985) Determination of hemagglutination activity recovered from oil-emulsion Newcastle disease vaccines as a prediction of efficacy. Avian Dis. 29: 721-728.
14. Stone, H. D. (1987) Efficacy of avian influenza oil-emulsion vaccines in chickens of various ages. Avian Dis. 31:483-490.
15. Stone, H. D. (1988) Optimization of hydrophile-lipophile balance for improved efficacy of Newcastle disease and avian influenza oil-emulsion vaccines. Avian Dis. 32:68-73.
16. Stone, H. D., Brugh, M., Beard, C. W. (1983) Influence of formulation on the efficacy of experimental oil-emulsion Newcastle disease vaccines. Avian Dis. 27:688-697.
17. Swayne, D. E., Beck, J. R., Perdue, M. L., Beard, C.W. (2001) Efficacy of vaccines in chickens against highly pathogenic Hong Kong H_5N_1 avian Influenza. Avian Dis. 45: 355-365.
18. Swayne, D. E., Halvorson, D. A. (2003) Influenza. In: Diseases of Poultry. (11thed.). Saif, Y. M., Barnes, H. J., Glisson, J. R., Fadly, A. M., McDougald, L. R., Swayne, D. E. (eds.). Iowa State Press. Iowa, USA. p.135-160.
19. Trani, L. D., Cordiol, P., Falcon, E., Lombardi, G., Moreno, A., Sala, G., Tollis, M. (2003) Standardization of an inactivated H_7N_1 Avian Influenza vaccine and efficacy against A/ Chicken/ Italy/1347/99 high-pathogenicity virus infection. Avian Dis. 47: 1042-1046.
20. Vasfi Marandi, M., Bozorgmehri Fard, M. H., Hashemzadeh, M. (2002) Efficacy of inactivated H_9N_2 Avian Influenza vaccine against non-highly pathogenic A/ Chicken/ Iran/ ZMT-173/ 1999 infection. Arch. Raz. Inst. 53: 23-31.
21. Wood, J. M., Kawaoka, Y., Newberry, L. A., Bordwell, E., Webster, R. G. (1984) Standardization of inactivated H_5N_2 influenza vaccines and efficacy against lethal A/ Chicken/ Pennsylvania/ 1370/ 83 infection. Avian Dis. 29: 867-872.

J.Vet.Res. 65,4:295-299,2010

IN VITRO QUALITY EVALUATION OF AVIAN INFLUENZA SUBTYPE H_9N_2 OIL-EMULSION VACCINES

Rajabi, Z.[1*], Tayefi Nasrabadi, H.[2], Syofi Khojin, A. B.[3]

[1]*Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz-Iran.*

[2]*Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz-Iran.*

[3]*Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz-Iran.*

(Received 10 August 2009 , Accepted 2 May 2010)

Abstract:

The use of vaccines in poultry to control avian influenza viruses (AIVs), especially mildly pathogenic avian influenza viruses, has been increased in recent years; thus, regarding the characteristic of AIVs, it is important to evaluate the quality of vaccines with an appropriate and rapid method. The aim of the present study was to investigate the quality of three commercially available oil-emulsion AIVs (subgroup H_9N_2) vaccines via in-vitro assessment. Viral antigens of the vaccines were recovered by aqueous partition method and the amounts of extracted total protein and recovered hemagglutination (HA) activity were determined and compared with the immune system responses of chickens to the vaccines. It has been shown that the amount of recovered total protein and activity of the recovered HA were different among vaccines with the same dose. Meanwhile, chickens showed different immune system responses to the vaccines. We have shown poor quality for two vaccines and high quality for one which can be attributed to their viral protein density.

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

***Corresponding author's email: rajabi@tabrizu.ac.ir, Tel: 0411-3392342, Fax: 0411-3357834**