DOI: 10.22092/VJ.2022.359688.2002
شماره ۱۳۹ تابستان ۱۴۰۲
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

ارزیابی پاسخ‌های ایمنی به واکسن آنفلوانزای پرندگان (تحت تیپ H9N2) پرتوتابی شده با گاما با تجویز به روش‌های تزریقی و داخل بینی در جوجه‌های نژاد تخمگذار

• **فرحناز معتمدی-سده (نویسنده مسئول)**
پژوهشکده کشاورزي هسته‌اي، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌اي، کرج، ایران
• **سارا میرزائی**
پژوهشکده کشاورزي، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران
• **ایرج خلیلی**
مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۲۲-۰۵-۱۴۰۱ تاریخ پذیرش: ۱۱-۰۷-۱۴۰۱
تاریخ بازنگری: ۳۰-۰۶-۱۴۰۱ تاریخ پذیرش: ۱-۰۴-۱۴۰۱
Email: fmotamedi@aeoi.org.ir

چکیده

تحت تیپ H۹N۲ ویروس آنفلوانزای پرندگان شایع‌ترین سویه ویروس در خاورمیانه با بیماری‌زایی کم است. هدف این مطالعه بررسی پاسخ‌های ایمنی همورال و سلولی جوجه‌های نژاد تخمگذار تجاری ایمن‌شده با واکسن H۹N۲ غیرفعال شده به وسیله پرتو گاما بود. برای این منظور، ۱۲۰ قطعه جوجه یک‌روزه به چهار گروه با ۳ تکرار و ۱۰ قطعه جوجه در هر تکرار تقسیم‌بندی شدند. واکسیناسیون جوجه‌ها با واکسن‌های مورد مطالعه در دو نوبت ۱۱ روزگی و ۲۵ روزگی انجام شد. گروه‌های اول و دوم، واکسن‌های پرتوتابی شده را به ترتیب به روش‌های داخل بینی و تزریقی و گروه سوم واکسن غیرفعال فرمالینه تزریقی دریافت کردند. گروه چهارم به عنوان شاهد بدون واکسن در نظر گرفته شد. میزان پادتن سرمی و میزان تکثیر لنفوسیت‌های طحال و سطح بیان اینترلوکین‌های ۲، ۶ و ۱۰ و اینترفرون گاما در این سلول‌ها بررسی شد. نتایج نشان داد که در گروه ایمن شده با واکسن پرتوتابی از راه داخل بینی عیار پادتن ضدویروس در ۲۵ روزگی، به طور معنی‌داری بالاتر از دیگر گروه‌ها بود. همچنین، شاخص تحریک لنفوسیت‌های طحال در روزهای ۳۹ و ۸۵ پرورش و بیان ژن سایتوکاین‌ها به ویژه اینترفرون گاما در ۳۹ و ۵۵ روزگی در این گروه به طور معنی‌داری بالاتر از گروه دریافت‌کننده واکسن روغنی فرمالینه بود. نتایج این مطالعه بیانگر آن است که استفاده از واکسن آنفلوانزای پرندگان H9N2 غیرفعال شده با پرتو گاما با القای پاسخ‌های پادتنی و ایمنی سلولی بالاتر از واکسن‌های غیرفعال فرمالینه در جوجه‌های نژاد تخمگذار، پتانسیل خوبی برای جایگزینی واکسن‌های مرسوم دارد.

کلمات کلیدی: ویروس آنفلوانزای پرندگان، تحت تیپ H9N2، پرتوتابی گاما، یاور روغنی، لمفوسیت‌های طحال

Veterinary Researches & Biological Products No 139 pp: 83-91

Evaluation of Immune Responses to Gamma- Irradiated (Subtype H9N2) Avian Influenza Vaccine Administered By Injection and Intranasal Routes in Layer Chickens

By:Motamedi-Sadeh, F., (Corresponding Author) Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, Karaj, Alborz, Iran. Mirzaie, S., Department of Agriculture, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran. and Khalili, I., Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Alborz, Iran.

Email: fmotamedi@aeoi.org.ir

Received:2022-08-13 **Accepted: 2022-10-03**

Revised: 2022-09-21 **Published: 2023-07-22**

H9N2 subtype of avian influenza virus (AIV) is the most common strain of low pathogenic AIV in the Middle East. The aim of this study was to investigate the humoral and cellular immune responses of commercial layer chickens immunized with gamma-inactivated H9N2 AIV. For this purpose, 120 one-day-old chickens of layer breed were divided into four groups including 3 replicates and 10 birds per replicate. Vaccination of chickens was done on days 11 and 25 of age. The first and second groups received the irradiated vaccine (IV) by intranasal and subcutaneous injection methods respectively, the third group was injected with formalin-inactivated vaccine and the fourth group was not vaccinated as the control. Anti-H9N2 serum antibodies, proliferation rate of splenocytes and the expression levels of interleukins 2, 6 and 10 and interferon gamma in these cells were investigated. The results indicated that in the groups immunized with intranasal IV the level of HI titers at 25 days of age was significantly higher than those in other groups. Additionally, stimulation index of splenocytes in 39 and 85 days of age and the level of gene expression of all the measured cytokines, especially interferon gamma in splenocytes at 39 and 55 days of age was significantly higher compared to formalin-inactivated vaccine. Based on the findings of the present study, the use of H9N2 AIV vaccine inactivated by gamma irradiation could be considered as a good candidate in layer chickens because it could induce antibody responses and cellular immunity at the levels higher than the formalin-inactivated vaccine.

Key words: Avian influenza virus, H9N2 subtype, Gamma irradiation, Oil adjuvant, Splenocytes

مقدمه

بیماری آنفلوانزا یکی از بیماری‌های عفونی مهم در صنعت طیور کشور است که در سطح جهانی نیز تهدیدی برای این صنعت به حساب می‌آید (۲۱). ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان از نظر ژنومی دارای RNA تک‌رشته‌ای چند قسمتی با سنس منفی هستند و به تیپ A خانواده اورتومیکسوویریده تعلق دارند. مخزن اصلی ویروس‌های آنفلوانزا پرندگان آبزی وحشی هستند که در گسترش ویروس و همه‌گیری‌های ناشی از آن نقش دارند. به طور کلی، تحت تیپ‌های ویروس‌های آنفلوانزا بر اساس واکنش‌های سرمی و یا آنالیز توالی ژن‌های مربوط به دو نوع گلیکوپروتئین سطحی موسوم به هماگلوتینین (HA) و نورآمینیداز (NA) شناسایی و دسته‌بندی می‌شوند؛ به طوری که تا به امروز ۱۶ نوع HA و ۹ نوع NA برای ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان شناسایی شده است. بیشتر ترکیب‌های حاصل از انواع HA و NA شامل ویروس‌های با بیماری‌زایی زیاد و ویروس‌های با بیماری‌زایی کم در طیور اهلی و پرندگان وحشی گزارش شده است. این دو نوع پروتئین سطحی نقش اساسی در بیماری‌زایی، خاصیت پادگنی و طیف میزبانی دارند (۲۴). تحت تیپ H۹N۲ ویروس آنفلوانزای پرندگان شایع‌ترین سویه ویروس آنفلوانزا با بیماری‌زایی کم است که در بسیاری از کشورهای در حال توسعه به ویژه در آسیا و خاورمیانه از جمله ایران بومی شده و در گله‌های طیور تجاری در چرخش است (۷). تحت تیپ H۹N۲ ویروس آنفلوانزا در مناطق مختلف دنیا علاوه بر ماکیان از گونه‌های دیگری از پرندگان اهلی نظیر بوقلمون، بلدرچین، اردک و غاز نیز جدا شده است (۶). راه انتقال ویروس H۹N۲ در میان پرندگان گله غالباً به صورت دهانی- مدفوعی است. همه‌گیری‌های بیماری آنفلوانزای پرندگان در اثر ویروس‌های با بیماری‌زایی کم همچون H۹N۲ به ویژه وقتی عوامل بیماری‌زای ثانویه باکتریایی و یا ویروسی با آن همراه می‌شوند موجب خسارت‌های اقتصادی قابل توجهی به دلیل ایجاد تلفات ناشی از بیماری تنفسی شدید و افت تولید تخم می‌شود (۱۵). با وجودی که

تحت تیپ‌های با بیماری‌زایی کم ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان معمولاً بین گونه‌های میزبان خود انتقال می‌یابند، ولی گزارش‌هایی از شباهت ویژگی‌های پذیرنده این تحت تیپ با ویروس‌های آنفلوانزای انسانی و ایجاد عفونت در انسان نیز وجود دارد که ممکن است نگرانی‌هایی را از نظر بهداشت عمومی برانگیزد (۲۴). با این حال، شواهد این عفونت‌ها در انسان غالباً به صورت مثبت شدن آزمون سرمی گزارش شده که حاکی از عفونت تحت بالینی و یا بروز بیماری خفیف است (۴).

واکسیناسیون گله‌های طیور علیه ویروس آنفلوانزا تحت تیپ H۹N۲ به طور معمول در کشور با استفاده از واکسن‌های غیرفعال روغنی انجام می‌شود (۹). واکسن‌های آنفلوانزای پرندگان به جز موارد محدود نوترکیب، عمدتاً از نوع غیرفعال (به اصطلاح کشته) هستند، زیرا واکسن‌های زنده برای این بیماری به دلیل ویژگی ویروس آنفلوانزا در بازآرایی ژنوم و افزایش حدت آن ممکن است بیماری‌زا و خطرآفرین باشند. به طور کلی، غیرفعال‌سازی میکروارگانیزم‌ها در واکسن‌های غیرفعال با استفاده از مواد شیمیایی نظیر فرمالدئید، بتا پروپیولاکتون، پریودات سدیم و آزیریدین‌ها و یا روش‌های فیزیکی همچون حرارت‌دهی، پاستوریزاسیون، پرتوتابی با نور فرابنفش و یا پرتو گاما امکان‌پذیر است (۲۲). غیرفعال‌سازی میکروارگانیزم‌ها به کمک مواد شیمیایی به ویژه فرمالین و بتا پروپیولاکتون ممکن است با تغییر پادگن‌های سطحی ناشی از ایجاد پیوندهای متقاطع در ساختار پروتئین‌ها، سبب از بین رفتن و یا کاهش اپی‌توپ‌های پادگنی مورد نیاز برای تحریک دستگاه ایمنی شود، در حالی که طی غیرفعال‌سازی میکروارگانیزم‌ها با روش‌های فیزیکی، ساختار پروتئین‌ها کمتر دستخوش تغییر می‌شود (۲).

پرتوتابی با پرتو گاما، به عنوان یکی از قدرتمندترین ابزارهای استریل کردن وسایل پزشکی، برای ایمن‌سازی بسیاری از محصولات زیستی شامل بافت‌های پیوندی انسان، داروها و غذا نیز به کار می‌رود. به علاوه، از پرتو گاما برای غیرفعال‌سازی عوامل بیماریزای بسیار خطرناک مثل ویروس ابولا نیز استفاده شده است (۲). پرتوتابی گاما به عنوان یکی از روش‌های فیزیکی غیرفعال‌سازی میکروارگانیزم‌ها قدرت نفوذ خوبی داشته و در صورت استفاده با دوز مناسب، ضمن تخریب اسیدهای نوکلئیک و از بین بردن قدرت تکثیر میکروارگانیزم‌ها، در مقایسه با مواد شیمیایی آسیب ساختاری کمتری در پروتئین‌های پادگنی به وجود می‌آورد. به طور کلی، پرتوتابی روش قابل اعتمادی برای غیرفعال‌سازی ویروس‌ها است، زیرا کمترین تغییرات مولکولی را در پروتئین‌ها و ساختار ویروس ایجاد می‌کند. از بین رفتن توان عفونت‌زایی ویروس آنفلوانزا ضمن حفظ یکپارچگی ویریون و عدم دناتوره شدن پروتئین که موجب حفظ توانایی ویروس در القای پاسخ‌های سلول T و تحریک پاسخ‌های پادتنی مناسب ضدویروس می‌شود با استفاده از پرتوتابی ویروس با پرتو گاما گزارش شده است (۳). علاوه بر اثر تخریبی مستقیم پرتو بر ژنوم ویروس، تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن نیز به عنوان سازوکار دیگری در غیرفعال‌سازی میکروارگانیزم‌ها توسط پرتوتابی گاما ذکر شده است (۱۱). از مزایای دیگر واکسن‌های پرتوتابی شده، عدم ایجاد باقیمانده در بدن دام است، در حالی که در استفاده از واکسن‌هاي غیرفعال با مواد شیمیایي از جمله فرمالین یا آزیریدین‌ها، این واکسن‌ها ممکن است حاوی باقیمانده‌هایي باشند که برای مصرف‌کنندگان محصولات دامی باعث مسمومیت‌زایی یا واکنش‌هاي آلرژیك شوند (۱۲).

از آنجا که واکسن‌های غیرفعال آنفلوانزای پرندگان موجود اثر محافظت‌کنندگی کاملی ندارند، مطالعه در زمینه تولید واکسن‌های غیرفعال مؤثرتر و یا اثربخشی بیشتر واکسن‌های موجود همواره مورد توجه پژوهشگران بوده است (۵، ۱۹). نشان داده شده است که ویروس آنفلوانزای غیرفعال شده با پرتو فرابنفش نیز همچون ویروس غیرفعال شده با فرمالین صرفاً پاسخ های پادتنی را تحریک می‌کنند و موجب القای پاسخ لمفوسیت‌های T نمی‌شوند (۲). از این رو، در راستای تولید واکسن مؤثرتر آنفلوانزا، مطالعاتی در خصوص ایمنی‌زایی و اثربخشی ویروس آنفلوانزای پرندگان تحت تیپ H۹N۲ که با پرتو گاما غیرفعال شده است روی حیوانات آزمایشگاهی و جوجه‌های گوشتی صورت گرفته است (۱۲، ۲۳). هدف این مطالعه در تکمیل مطالعات پیشین صورت گرفته، بررسی پاسخ‌های ایمنی همورال و سلولی جوجه‌های نژاد تخمگذار تجاری ایمن شده با واکسن پرتوتابی شده H۹N۲ به دو روش داخل بینی و تزریقی بود.

مواد و روش‌ها

طرح آزمایش

یکصد و بیست قطعه جوجه یک‌روزه نژاد تخمگذار تجاری سویه لگهورن از یک جوجه‌کشی تجاری واقع در استان البرز خریداری شد. جوجه‌ها به صورت تصادفی به چهار گروه ۳۰ قطعه‌ای شامل ۳ تکرار و ۱۰ قطعه جوجه در هر تکرار تقسیم‌بندی شدند. جیره بر اساس نیازهای غذایی نژاد جوجه تنظیم شد و در طی پرورش جوجه‌ها دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. واکسیناسیون جوجه‌ها با واکسن‌های مورد مطالعه در دو نوبت ۱۱ روزگی (اولیه) و ۲۵ روزگی (یادآور) انجام شد. به این ترتیب که گروه‌های اول و دوم، واکسن پرتوتابی شده همراه با قند تری هالوز را به ترتیب از راه داخل بینی (به صورت قطره بینی) و تزریق زیرجلدی در ناحیه گردن (واکسن پرتوتابی شده با یاور روغن مونتاناید ISA۷۰) دریافت کردند. به گروه سوم، واکسن غیرفعال فرمالینه (واکسن مرسوم) همراه با یاور روغن مونتاناید ISA۷۰ به صورت زیرجلدی تزریق شد. پرندگان گروه چهارم نیز به عنوان شاهد واکسنی دریافت نکردند و تنها بافر فسفات سالین استریل با حجم مساوی با واکسن به صورت قطره بینی به آنها داده شد.

واکسن‌های آنفلوانزای مورد استفاده

در این مطالعه واکسن‌های غیرفعال آنفلوانزا تهیه شده در پژوهشکده کشاورزي هسته‌اي، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای ایران، مورد استفاده قرار گرفتند. بذر واکسن از سویه *A/Chicken/IRN/Qazvin/2001 (H9N2)* گرفته شده از مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی بوده است و غیرفعال‌سازی آن پس از تعیین عیار ویروس به روش ۵۰٪ مقدار عفونت‌زایی جنین ماکیان(EID۵۰) ، به وسیله پرتو گاما تولید شده توسط سیستم چشمه کبالت ۶۰ (MDS Nordion، کانادا) موجود در پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای با دوز ۳۰ کیلو گری (به طوری که ضمن از بین رفتن توانایی تکثیر ویروس در تخم‌مرغ جنین‌دار عاری از جرم خاص، عیار پادگن HA نیز دچار کاهش نشود) صورت گرفته

است (۱۲، ۲۳). به واکسن پرتوتابی شده‌ای که در این مطالعه تجویز شد، ۲۰٪ ترهالوز (دی‌ساکارید حاوی گلوکز) به عنوان محافظت کننده پادگن ویروس در طی پرتوتابی و در دمای نگهداری ۷۰- درجه سانتی‌گراد اضافه شده بود. در تهیه واکسن غیرفعال فرمالینه مطابق با روش توصیه شده مؤسسه رازی، از فرمالین با غلظت ۰/۱٪ برای غیرفعال‌سازی ویروس استفاده شده بود. به علاوه، روغن مونتاناید ISA۷۰ نیز در فرمولاسیون واکسن‌های تجویز شده به صورت تزریقی فرمالینه و یا پرتوتابی شده به عنوان یاور به کار رفته بود. مقدار پادگن در هر میلی‌لیتر واکسن، ۸/۵ ۱۰ EID۵۰ بود و در هر دوز واکسن ۱۰۰ میکرولیتر تلقیح شد (۱۲، ۲۳).

ارزیابی پاسخ پادتنی

در سنین یک، ۲۵، ۳۹، ۵۵ و ۸۵ روزگی از شش قطعه جوجه از هر گروه خون‌گیری شد و نمونه‌های سرم خون از نظر وجود پادتن ضد ویروس آنفلوانزای پرندگان با روش ممانعت از هماگلوتیناسیون (HI) بررسی شدند (۲۵).

سنجش میزان تکثیر لمفوسیت‌های طحال

برای سنجش پاسخ لمفوسیت‌های طحال پرنده‌های ایمن شده، سه پرنده از هر گروه در روزهای ۲۵، ۳۹، ۵۵ و ۸۵ پرورش کشتار شده و طحال آنها در شرایط بهداشتی از پرنده‌ها خارج و در پلیت‌های استریل قرار داده شد. تعلیق سلول‌های طحال در محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ حاوی ۱۰٪ سرم گوساله تهیه شد. سلول‌های طحال پس از جداسازی از نظر زنده بودن با رنگ‌آمیزی با تریپان بلو بررسی شده و سلول‌های زنده به کمک لام هماسیتومتر شمارش شدند و درصد زنده‌مانی لمفوسیت‌های طحال در هر نمونه محاسبه گردید. لمفوسیت‌های طحال در میکروپلیت ۹۶ خانه با تعداد ۱۰۵ سلول در هر چاهک توزیع شده و در شرایط دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و حضور ۵٪ دی اکسید کربن گرمخانه‌گذاری شدند. برای تحریک لمفوسیت‌ها، محلول حاوی ویروس آنفلوانزای غیرفعال شده به وسیله پرتو گاما (با مقدار EID۵۰ معادل ۱۰۸ در میلی‌لیتر) با حجم ۳ میکرولیتر به چاهک‌ها با سه تکرار اضافه شد (۲۳). پس از ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری، میزان تکثیر لمفوسیت‌های طحال با استفاده از کیت بروموددئوکسی‌یوریدین (Roche، آلمان) مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده بررسی و میزان جذب نوری به وسیله الایزا ریدر در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد. در نهایت، شاخص تحریک (SI) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (۱۲).

SI =میانگین جذب نوری نمونه‌های تحریک نشده/ میانگین جذب نوری نمونه‌های تحریک شده

سنجش میزان بیان ژن سایتوکاین‌ها در لمفوسیت‌های طحال

در این مطالعه، میزان بیان اینترلوکین‌های ۲، ۶ و ۱۰ و اینترفرون گاما در لمفوسیت‌های طحال مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور، به پلت سلول‌های رسوب یافته پس از سانتریفیوژ محیط کشت، محلول ترایزول اضافه شد و RNA سلولی با استفاده از کیت RNA mini (Bio & Sell، آلمان) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. غلظت RNA استخراج شده به وسیله نانو دراپ اندازه‌گیری شد (Smart، کانادا). سنتز cDNA به وسیله کیت Easy cDNA طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد (Parstous، ایران). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز کمّی در زمان واقعی (real time qPCR)، با استفاده از مخلوط آماده واکنش،

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده برای سنجش بیان ژن سایتوکاین‌های ماکیان.

نام	ژن هدف	توالی (از چپ به راست، '۵ به '۳)	منبع
AvIL۲- Fw	اینترلوکین ۲	CGGGATCCATGATGTGCAAAGTACTG	(۱)
AvIL۲- Rv		CGGTCGACTTATTTTTGCAGATATCT	
AvIL۶- Fw	اینترلوکین ۶	GCGAGAACAGCATGGAGATG	(۱۳)
AvIL۶- Rv		GTAGGTCTGAAAGGCGAACAG	
AvIL۱۰- Fw	اینترلوکین ۱۰	CGGGAGCTGAGGGTGAA	(۱۰)
AvIL۱۰- Rv		GTGAAGAAGCGGTGACAGC	
AvIFN-g Fw	اینترفرون گاما	CAAGTCAAAGCCGCACATC	(۱)
AvIFN-g Rv		CGCTGGATTCTCAAGTCGTT	
AvGAPDH Fw	GAPDH (ژن خانه‌بان)	ATACACAGAGGACCAGGTTG	(۱۴)
AvGAPDH Rv		AAACTCATTGTCATACCAGG	

IQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad، ایالات متحده) و در دستگاه Rotor-Gen Q (Qiagen، آلمان) انجام شد. توالی آغازگرهای اختصاصی برای سایتوکاین‌های ماکیان و اندازه قطعه تکثیر شده در جدول یک آورده شده است. شرایط دمایی و زمانی جهت واکنش به صورت زیر بود؛ واسرشت اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه و سپس ۴۰ چرخه به ترتیب شامل واسرشت در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۹ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه و گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه و به دنبال آن گسترش نهایی در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه. ژن GAPDH به عنوان ژن خانه‌بان در مقایسه نتایج استفاده شد. در نهایت، تغییرات mRNA مربوط به هر سایتوکاین با محاسبه مقادیر $2^{-\Delta\Delta Ct}$ به دست آمد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

مقایسه میانگین داده‌ها در گروه‌های مختلف با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه به کمک نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ در سطح معنی‌دار $P<0/05$ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند (۲۳).

نتایج

پاسخ پادتنی

عیار پادتن مادری ضد H9N2 در جوجه‌های یک‌روزه یافت نشد. نتایج عیار پادتن در جوجه‌های نژاد تخمگذار پس از واکسیناسیون در جدول دو نشان داده شده است. پاسخ پادتنی تمامی پرندگان ایمن شده با واکسن در مقایسه با شاهد بدون واکسن به طور معنی‌داری بالاتر بود($P<0/05$). در ۲۵ روزگی (دو هفته پس از نوبت اول)، جوجه‌های دریافت‌کننده واکسن پرتوتابی شده همراه با قند تری هالوز از راه داخل بینی دارای بیشترین عیار پادتن نسبت به سایر گروه‌ها بودند ($P<0/05$). در دیگر روزهای نمونه‌گیری نیز میزان پادتن سرمی ضد H9N2 در دو گروه ایمن شده با واکسن پرتوتابی بالاتر از گروه دریافت‌کننده واکسن روغنی فرمالینه بود هر چند این تفاوت معنی‌دار نشد($P>0/05$). همچنین، مشاهده شد که عیار پادتن در گروه‌های واکسینه‌شده با واکسن پرتوتابی شده و واکسن فرمالینه بعد از ۸۵ روز به آهستگی شروع به کاهش می‌کند.

تولید اینترفرون گاما و تکثیر لمفوسیت‌های طحال

نتایج بررسی میزان تکثیر لمفوسیت‌های طحال نشان داد که شاخص تحریک این سلول‌ها در تمامی پرندگان ایمن شده در مقایسه با شاهد بدون واکسن به طور معنی‌داری بالاتر بود($P<0/05$) (جدول ۳). به علاوه، در روزهای ۳۹ و ۸۵ پرورش، گروه پرندگان دریافت‌کننده واکسن پرتوتابی شده از راه داخل بینی به طور معنی‌داری شاخص تحریک بالاتری در مقایسه با گروه دریافت‌کننده واکسن روغنی فرمالینه داشتند($P<0/05$). میزان تکثیر لمفوسیت‌های طحال در دو گروه دریافت کننده واکسن پرتوتابی تجویز شده از راه داخل بینی و تزریقی تفاوت معنی‌داری را با یکدیگر نشان ندادند.

بیان ژن سایتوکاین‌ها در لمفوسیت‌های طحال

نتایج تغییرات برابری میزان بیان اینترلوکین‌های ۲، ۶ و ۱۰ و اینترفرون گاما در لمفوسیت‌های طحال جوجه‌های نژاد تخمگذار نشان داد که به طور کلی در جوجه‌های ایمن شده با واکسن H9N2 پرتوتابی شده میزان بیان ژن اینترلوکین‌های ۲، ۶ و ۱۰ و اینترفرون گاما بالاتر از گروه ایمن شده با واکسن روغنی فرمالینه بود. همچنین، تجویز از راه داخل بینی سبب به دست آمدن بالاترین میزان بیان ژن سایتوکاین‌های مورد مطالعه شد. این تفاوت‌ها در میزان بیان ژن سایتوکاین‌های مورد بررسی در گروه‌های دریافت‌کننده واکسن پرتوتابی شده و گروه دریافت‌کننده واکسن روغنی فرمالینه، به ویژه در مورد اینترفرون گاما در ۳۹ و ۵۵ روزگی بسیار زیاد و قابل توجه بود (جدول ۴). در گروه شاهد مقادیر قابل اندازه‌گیری از سایتوکاین‌ها وجود نداشت.

بحث

تحت تیپ H9N2 ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان در دو دهه اخیر گسترش جهانی در طیور پیدا کرده است و تهدیدی برای صنعت طیور جهان و سلامت انسان، به دلیل پتانسیل ویروس در ایجاد همه‌گیری، به شمار می‌رود (۲۱). با وجود بهره‌گیری از واکسن غیرفعال موجود در

جدول ۲- عیار پادتن سرمی ضد H9N2 در جوجه‌های نژاد تخمگذار ایمن شده با واکسن‌های پرتوتابی شده و فرمالینه آنفلوانزا.

گروه‌های آزمایشی	میانگین عیار پادتن± انحراف معیار			
	۲۵ روزگی	۳۹ روزگی	۵۵ روزگی	۸۵ روزگی
واکسن پرتوتابی از راه داخل بینی	۲/۶۶±۰/۵۷	۵±۱	۴/۶۶±۰/۵۷	۴/۳۳±۰/۵۷
واکسن پرتوتابی از راه تزریقی	۱/۶۶±۰/۵۷	۴/۶۶±۰/۵۷	۴/۶۶±۰/۵۷	۴/۳۳±۰/۵۷
واکسن فرمالینه از راه تزریقی	۱/۳۳±۰/۵۷	۴/۵±۰/۵۷	۴/۳۳±۰/۵۷	۴±۱
شاهد (بدون واکسن)	-	-	-	-

صنعت طیور، ویروس H۹N۲ به طور کامل کنترل و یا ریشه‌کن نشده است و همچنان موجب آلودگی گله‌های گوشتی و تخمگذار می‌شود (۱۵). طبق مطالعات صورت گرفته، مشخص شده است که چنان‌چه برنامه‌های واکسیناسیون بر ضدسویه‌های با بیماری‌زایی کم آنفلوانزای پرندگان موجب به وجود آمدن ایمنی قوی در جمعیت پرندگان نشوند (به عنوان مثال به دلیل نامناسب بودن و یا ناکافی بودن واکسیناسیون)، احتمال پیدایش سویه‌های جهش‌یافته ویروس در مزرعه افزایش می‌یابد (۲۴). از این رو، پژوهش در زمینه تولید واکسن‌های غیرفعال مؤثرتر و با اثربخشی بیشتر در جهت تولید واکسن‌های با کفایت‌تری که هم پاسخ‌های ایمنی هومورال و هم ایمنی سلولی را القاء کنند حائز اهمیت است (۳).

بررسی عیار پادتن سرمی در پژوهش جوان و همکاران (۲۰۲۰) با استفاده از واکسن پرتوتابی شده H۹N۲ با برنامه واکسیناسیون مشابه مطالعه حاضر ولی در جوجه‌های گوشتی نشان داد که گروه‌های دریافت‌کننده واکسن از راه تزریقی و از راه داخل بینی به ترتیب دو هفته پس از واکسیناسیون اول و دوم (۲۵ و ۳۹ روزگی) دارای بالاترین عیار پادتنی بودند (۱۲). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میزان عیار پادتن ضدویروس در جوجه‌های نژاد تخمگذار ایمن‌شده با واکسن پرتوتابی در همه روزهای نمونه‌گیری بیشتر از گروه واکسن فرمالینه بود و البته روش تجویز داخل بینی این واکسن بالاترین عیار پادتن را نشان داد. تولید عیار بالاتر پادتن به وسیله واکسن پرتوتابی شده با یاور مونتانايد ISA۷۰ در مقایسه با واکسن فرمالینه دارای یاور یکسان در جوجه‌های گوشتی در مطالعه دیگری نیز گزارش شده است (۱۹).

واکسن‌های مرسوم آنفلوانزا محافظت اختصاصی سویه را برای میزبان فراهم می‌کنند، دلیل این مسئله توانایی این واکسن‌ها تنها در القای ایمنی هومورال و تولید پادتن بر ضدپروتئین‌های سطحی HA و NA است که اتفاقاً بسیار به تغییرات پادگنی ناشی از شیفت و دریفت پادگنی حساس هستند (۲۰). این تغییرات پادگنی موجب می‌شوند که حتی سطح محافظت ایجاد شده به وسیله واکسن‌های تحت واحد تولید شده بر اساس پادگن‌های شناخته شده A و NA محدود باشد. در مقابل، تحریک ایمنی سلولی به معنای ایجاد ایمنی متقاطع در برابر سویه‌های مختلف ویروس آنفلوانزا است که به وسیله واکسن پرتوتابی شده آنفلوانزا حاصل می‌شود، زیرا در پاسخ ایمنی سلولی بر ضدویروس آنفلوانزا، پروتئین‌های داخلی ویروس نظیر نوکلئوپروتئین که در انواع مختلف ویروس آنفلوانزای A مشترک و حفاظت شده هستند هدف سلول‌های T سیتوتوکسیک قرار می‌گیرند (۸). در یک مطالعه، الشریفی و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند که تجویز یک نوبت ویروس آنفلوانزای H۱N۱ از راه داخل بینی به موش‌های آزمایشگاهی آنها را از اثرات کشنده این تحت تیپ و حتی عفونت ناشی از دیگر تحت‌تیپ‌ها همچون H۵N۱ محافظت می‌کند (۲). در مطالعه حاضر با بررسی ایمنی سلولی در جوجه‌های نژاد تخمگذار از طریق اندازه‌گیری میزان تکثیر لمفوسیت‌های طحال مشخص شد که شاخص تحریک این سلول‌ها در جوجه‌های ایمن شده با واکسن پرتوتابی به طور کلی بالاتر از گروه واکسن فرمالینه و در گروه دریافت‌کننده واکسن از راه داخل بینی نیز بیشتر از گروه پرتوتابی تزریقی تا دو ماه بعد از آخرین واکسیناسیون بود. همچنین در این مطالعه مشاهده شد که میزان تکثیر لمفوسیت‌های طحال در گروه های واکسینه شده با واکسن پرتوتابی شده استنشاقی و تزریقی بعد از ۸۵ روز همچنان افزایش نشان می‌دهد در حالی که در پی تجویز واکسن فرمالینه، شاخص تحریک لمفوسیت‌های طحال دو ماه بعد از آخرین واکسیناسیون کاهش‌یافته بود. این یافته، تأییدکننده مطالعه جوان و همکاران (۲۰۲۰) بود که گزارش نمودند جوجه‌های گوشتی ایمن شده با واکسن پرتوتابی به همراه ترهالوز از راه داخل بینی در مقایسه با جوجه‌های دریافت‌کننده واکسن فرمالینه و جوجه‌های ایمن شده با واکسن پرتوتابی تزریقی بالاترین شاخص تحریک لمفوسیت‌های طحال را دو هفته پس از واکسیناسیون یادآور (۳۹ روزگی) نشان می‌دهند (۱۲).

سایتوکاین‌ها پروتئین‌های مهم در برقراری ارتباط میان سلول‌های ایمنی هستند. سطح سایتوکاین‌های محرک ایمنی در میزبان، بیانگر توانایی مقابله با عوامل بیماری‌زا به شمار می‌رود. در میان سایتوکاین‌های محرک ایمنی، اینترلوکین ۲ نقش حیاتی در فعال‌سازی سلول‌های T دارد. همچنین، ثابت شده است که این سایتوکاین، هتروفیل‌ها را نیز فعال می‌کند (۱۶). اینترفرون گاما نیز سایتوکاینی است که موجب القای پاسخ‌های مرتبط با سلول T helper۱ می‌شود (۱۷). عملکرد اینترلوکین ۱۰ در ماکیان به عنوان سایتوکاین ضدالتهابی، کاهش دادن اثرات اینترفرون

جدول ۳- میانگین شاخص تحریک لمفوسیت‌های طحال جوجه‌های نژاد تخمگذار ایمن شده با واکسن‌های پرتوتابی شده و فرمالینه آنفلوانزا.

گروه‌های آزمایشی	میانگین شاخص تحریک لمفوسیت‌های طحال± انحراف معیار			
	۲۵ روزگی	۳۹ روزگی	۵۵ روزگی	۸۵ روزگی
واکسن پرتوتابی از راه داخل بینی	۱/۱۴±۰/۱۰۴	۱/۳۲±۰/۰۴۵	۱/۲۵±۰/۰۷۹	۱/۳۲±۰/۰۴۵
واکسن پرتوتابی از راه تزریقی	۱/۰۹±۰/۰۵۵	۱/۲۶±۰/۰۲۶	۱/۲۲±۰/۱۸۰	۱/۲۴±۰/۱۳۹
واکسن فرمالینه از راه تزریقی	۱/۰۷±۰/۰۲۶	۱/۱۲±۰/۰۷۸	۱/۱۸±۰/۱۱۵	۱/۱۱±۰/۰۲
شاهد (بدون واکسن)	۰/۸±۰/۱۶۳	۰/۹۵±۰/۰۳	۰/۹۵±۰/۱۱۳	۰/۷۳±۰/۰۳۶

گاما است و افزایش آن معمولاً در پی افزایش تولید اینترفرون گاما مشاهده می‌شود. بر اساس یافته‌های مطالعه حاضر، واکسیناسیون با واکسن پرتوتابی شده و به ویژه با تجویز واکسن پرتوتابی شده به همراه ترهالوز از راه داخل بینی سبب بیان بالاتر ژن‌های اینترلوکین ۲، ۶ و ۱۰ و اینترفرون گاما در سلول‌های طحال در مقایسه با واکسن فرمالینه شد. گزارش شده است که حضور ترهالوز در فرمولاسیون واکسن پرتوتابی شده با ایجاد اثر محافظتی برای پروتئین‌های ویروس در طی پرتوتابی و در زمان ماندگاری واکسن در فریزر و احتمالاً ایجاد غلظت بیشتر در محلول واکسن (و در نتیجه ماندگاری بهتر در حفره بینی پرنده) و افزایش تولید سایتوکاین‌ها و بالا بردن سطح اینترفرون گاما در تحریک بهتر دستگاه ایمنی نقش دارد (۱۲). در مطالعه فورویا و همکاران (۲۰۱۰) نشان داده شد که ایمن‌سازي با ویروس آنفلوانزاي پرتوتابی شده با پرتو گاما پاسخ‌هاي سلولي T سیتوتوکسیك را همانند زماني که این سلول‌ها با ویروس زنده مواجه شده‌اند القاء می‌کند که بیانگر محافظت بهتر در مقایسه با ایمن‌سازی با واکسن‌های فرمالینه است (۸).

با توجه به این که تولید واکسن‌های زنده تخفیف حدت‌یافته با وجود ایمنی‌بخشی بالاتر نسبت به انواع غیرفعال در مورد بیماری آنفلوانزا به دلیل مخاطرات ایمنی واکسن امکان‌پذیر نیست، بر اساس یافته‌های مطالعه حاضر بهره‌گیری از واکسن تهیه شده از ویروس غیرفعال شده با پرتو گاما با داشتن پتانسیل بالاتر برای القای پاسخ‌های پادتنی و به ویژه ایمنی سلولی که با ایجاد محافظت متقاطع در برابر سویه‌های مختلف ویروس آنفلوانزا نیز مرتبط است، می‌تواند جایگزین خوب و مؤثری برای واکسن‌های غیرفعال فرمالینه مرسوم باشند.

تعارض منافع

وجود تعارض منافع توسط نویسندگان گزارش نشده است.

منابع مورد استفاده

1- Adams, S. C., Z. Xing, J. Li and C. J. Cardona. 2009. Immune-related gene expression in response to H11N9 low pathogenic avian influenza virus infection in chicken and Pekin duck peripheral blood mononuclear cells. *Molecular immunology*, 46(8-9), 1744-1749. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2009.01.025.

2- Alsharifi, M., Y. Furuya, T. R. Bowden, M. Lobigs, A. Koskinen, M. Regner, L. Trinidad, D. B. Boyle and A. Müllbacher. 2009. Intranasal flu vaccine protective against seasonal and H5N1 avian influenza infections. *PloS one*, 4(4), e5336. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005336.

3- Alsharifi, M. and A. Müllbacher. 2010. The [gamma]-irradiated influenza vaccine and the prospect of producing safe vaccines

جدول ۴- تغییرات برابری میزان بیان سایتوکاین‌ها (اینترلوکین‌های ۲، ۶ و ۱۰ و اینترفرون گاما) در لنفوسیت‌های طحال جوجه‌های نژاد تخمگذار ایمن شده با واکسن‌های پرتوتابی شده و فرمالینه آنفلوانزا.

روزهای نمونه‌گیری برای بررسی میزان بیان سایتوکاین‌ها		گروه‌های آزمایشی			
		واکسن پرتوتابی داخل بینی	واکسن پرتوتابی تزریقی	واکسن فرمالینه تزریقی	شاهد (بدون واکسن)
۳۹	اینترلوکین ۲	۳۲/۱۳	۲۴/۹۳	۲۲/۲۳	-
	اینترلوکین ۶	۱۲/۴۶	۱۱/۱۹	۹/۸۸	-
	اینترلوکین ۱۰	۴/۱۱	۴/۰۴	۳/۳۵	-
	اینترفرون گاما	۷۴/۱۷	۶۸/۱۹	۱۱/۴۳	-
۵۵	اینترلوکین ۲	۳۱/۱۲	۲۵/۰۹	۲۱/۹۴	-
	اینترلوکین ۶	۱۱/۰۴	۱۰/۶۶	۹/۳۲	-
	اینترلوکین ۱۰	۴/۶۷	۳/۸۷	۳/۱۲	-
	اینترفرون گاما	۵۶/۱۱	۵۵/۹۸	۱۴/۱۵	-
۸۵	اینترلوکین ۲	۲۱/۵۶	۱۶/۱۳	۱۵/۹۳	-
	اینترلوکین ۶	۸/۷۹	۸/۳۵	۷/۶۶	-
	اینترلوکین ۱۰	۲/۱۵	۲/۰۱	۱/۴۵	-
	اینترفرون گاما	۱۵/۴۳	۱۴/۱	۸/۹۸	-

in general. *Immunology and cell biology*, 88(2), 103. https://doi.org/10.1038/icb.2009.81.

4- Azizpour, A., S. Bokaei, N. Sheikhi and S. Habibzadeh. 2012. A serological study of antibodies to h9n2 avain influenza virus in human population of Ardabil area, Iran. *Journal of Comparative Pathology*, 9, 619-628.

5- Cui, H., M. C. de Jong, N. Beerens, M. M. Van Oers, Q. Teng, L. Li, X. Li, Q. Liu and Z. Li. 2021. Vaccination with inactivated virus against low pathogenic avian influenza subtype H9N2 does not prevent virus transmission in chickens. *Journal of virus eradication*, 7(3). https://doi.org/10.1016/j.jve.2021.100055.

6- Ebrahimi, S. M., S. Ziapour, M. Tebianian, M. Dabaghian and M. Mohammadi. 2011. Study of infection with an Iranian field-isolated H9N2 avian influenza virus in vaccinated and unvaccinated Japanese quail. *Avian Diseases* 55(2): 195-200. https://doi.org/10.1637/9538-092110-Reg.1.

7- Fallah Mehrabadi, M. H., A. Shoushtari, F. Tehrani, N. Motamed, B. Haerian, A. Ghalyanchilangeroudi, S. A. Ghafouri and S. Amirhajloo. 2020. Serological and molecular survey of avian influenza H9N2 subtype in live birds markets-2016. *Journal of Veterinary Research* 75(4): 399-406. https://doi.org/10.22059/JVR.2019.278728.2921.

8- Furuya, Y., J. Chan, M. Regner, M. Lobigs, A. Koskinen, T. Kok, J. Manavis, P. Li, A. Müllbacher and M. Alsharifi. 2010. Cytotoxic T cells are the predominant players providing cross-protective immunity induced by γ-irradiated influenza A viruses. J*ournal of virology* 84(9): 4212-4221. https://doi.org/10.1128/JVI.02508-09.

9- Ghadimipour, R., I. Ghadimipour, A. Ameghi, S. Masoudi, S. Sedigh-Eteghad and M. M. Ebrahimi. 2014. Monitoring virus harvesting time in embryonated chicken eggs inoculated with avian influenza H9N2 vaccine strain. *Archives of Razi Institute* 69(1): 35–39. https://doi.org/10.7508/ARI.2014.01.005.

10- Hong, Y. H., H. S. Lillehoj, E. P. Lillehoj and S. H. Lee. 2006. Changes in immune-related gene expression and intestinal lymphocyte subpopulations following Eimeria maxima infection of chickens. *Veterinary immunology and immunopathology* 114(3-4): 259-272. https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.08.006.

11- Hume, A. J., J. Ames, L. J. Rennick, W. P. Duprex, A. Marzi, J. Tonkiss and E. Mühlberger. 2016. Inactivation of RNA viruses by gamma irradiation: a study on mitigating factors. *Viruses* 8(7): 204. https://doi.org/10.3390/v8070204.

12- Javan, S., F. Motamedi-Sedeh, M. Dezfoolian and V. Wijewardana. 2020. Evaluation of immune responses and histopathological effects against gamma irradiated avian influenza (Sub type H9N2) vaccine on broiler chicken. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 63. https://doi.org/10.1590/1678-4324-2020200094.

13- Jiang, H., H. Yang and D. R. Kapczynski. 2011. Chicken interferon alpha pretreatment reduces virus replication of pandemic H1N1 and H5N9 avian influenza viruses in lung cell cultures from different avian species. *Virology Journal* 8(1): 1-12. https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-447.

14- Jie, H., L. Lian, L. J. Qu, , J. X. Zheng, Z. C. Hou, G. Y. Xu, J. Z. Song and N. Yang. 2013. Differential expression of Toll-like receptor genes in lymphoid tissues between Marek's disease virus-infected and noninfected chickens. *Poultry science* 92(3): 645-654. https://doi.org/10.3382/ps.2012-02747.

15- Karimi, Sh., V. Karimi, A. Ghalyanchi Langeroudi, O. Madadgar, H. Najafi and H. Maghsoudlo. 2015. Molecular characterization and phylogenetic study based on matrix gene of avian influenza viruses (H9N2) in Iran during 1998-2008. *Journal of Veterinary Research* 70(2): 147-153. https://doi.org/10.22059/JVR.2015.53731.

16- Kogut, M. H., L. Rothwell and P. Kaiser. 2003. Priming by recombinant chicken interleukin-2 induces selective expression of IL-8 and IL-18 mRNA in chicken heterophils during receptor-mediated phagocytosis of opsonized and nonopsonized Salmonella enterica serovar enteritidis. *Molecular Immunology* 40(9): 603–610. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2003.08.002.

17- Mao, T. K., J. Van de Water and M. E. Gershwin. 2000. Effect of Spirulina on the secretion of cytokines from peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Medicinal Food* 3(3): 135–140. https://doi.org/10.1089/jmf.2000.3.135.

18- Monne, I., S. Ormelli, A. Salviato, C. De Battisti, F. Bettini, A. Salomoni, A. Drago, B. Zecchin, I. Capua and G. Cattoli. 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(5): 1769-1773. https://doi.org/10.1128/JCM.02204-07.

19- Motamedi sedeh, F., A. Saboorizadeh, I. Khalili, M. Sharbatdaran, V. Wijewardana, and A. Arbabi. 2022. Carboxymethyl chitosan bounded iron oxide nanoparticles and gamma□irradiated avian influenza subtype H9N2 vaccine to development of immunity on mouse and chicken. *Veterinary Medicine and Science* 8(2): 626-634. https://doi.org/10.1002/vms3.680.

20- Palese, P. 2006. Making better influenza virus vaccines?. *Emerging infectious diseases* 12(1). https://doi.org/61.10.3201/eid1201.051043.

21- Peacock, T. H. P., J. James, J. E. Sealy and M. Iqbal. 2019. A global perspective on H9N2 avian influenza virus. *Viruses* 11(7): 620. https://doi.org/10.3390/v11070620.

22- Raie Jadidi, B., H. Erfan-Niya and A. Ameghi. 2017. Opti-

mizing the process of inactivating influenza virus subtype H9N2 by formalin in the production of killed avian influenza vaccine. *Archives of Razi Institute* 72(1): 43-49. https://doi.org/10.22034/ARI.2016.107486.

23- Salehi, B., F. Motamedi-Sedeh, O. Madadgar, I. Khalili, A. Ghalyanchi Langroudi, H. Unger and V. Wijewardana. 2018. Analysis of antigen conservation and inactivation of gamma-irradiated avian influenza virus subtype H9N2. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 65(2): 163-171. https://doi.org/10.1556/030.65.2018.025.

24- Swayne, D. E., D. L. Suarez and L. D. Sims. 2013. Influenza. pp. 181-218 In: Diseases of Poultry (13th ed.). D. E. Swayne (ed.). Wiley-Blackwell publishing.

25- Webester, R. G., N. J. Cox and K. Sthor. 2002. WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance (1st ed.). Geneva, Switzerland.