بررسی تغییرات تیتر آنتی‌بادی علیه بیماری نیوکاسل و آنفلوانزا در زرده تخم‌مرغ در دوره انکوباسیون و تأثیر آن بر تکثیر داخل تخم‌مرغی ویروس‌ها

لیلا علیزاده ارسی*[۱]، عارف هوشیاری[۱]، علی آمقی رودسری[۱]، ابوالفضل غنی ئی[۲]، بهبود جعفری[۳]، ابوالفضل جعفری ثالث[۴]

۱- بخش تحقیق و توسعه، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی(AREEO)، کرج، ایران
۲- گروه بیماریهای طیور، دانشکده ی دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۳- گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اهر، اهر، ایران
۴- گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کازرون،کازرون، ایران

دریافت مقاله: ۵ دی ۱۳۹۶، بازنگری: ۲ بهمن ۱۳۹۶، پذیرش نهایی: ۶ اسفند ۱۳۹۶

چکیده

آنتی‌بادی‌های مادری از طریق زرده تخم‌مرغ جذب شده و وارد گردش خون جوجه می‌شوند. ایمنی پاسیو کسب شده از آنتی‌بادی مادری در جوجه می‌تواند اثرات عوامل عفونی را کاهش داده یا از بروز بیماری‌های بالینی جلوگیری کند. بیماری نیوکاسل و آنفلوانزا از بیماری‌های بسیار مهم و واگیر در پرندگان هستند که خسارات اقتصادی زیادی به صنعت طیور وارد می‌کنند. تست ممانعت از هماگلوتیناسیون یکی از تست‌های رایج و عمومی برای تشخیص تیتر آنتی‌بادی علیه ویروس نیوکاسل و آنفلوانزا در پرندگان است. در بررسی حاضر در سه مرحله مقادیر تیتر آنتی‌بادی علیه بیماری نیوکاسل و آنفلوانزا در سرم مرغ مادر، زرده تخم‌مرغ و جوجه یک روزه به روش تست ممانعت از هماگلوتیناسیون اندازه‌گیری گردید. در این بررسی در سه دوره متوالی تیتر آنتی‌بادی نیوکاسل و آنفلوانزا در سرم مرغ مادر اندازه‌گیری و با مقادیر آن در زرده تخم‌مرغ حاصل از همان گله مقایسه گردید. مقادیر تیتر این آنتی‌بادی‌ها در زرده تخم‌مرغ در دوره انکوباسیون در روزهای اول، سوم، ششم، نهم، چهاردهم و هیجدهم اندازه‌گیری شد. همچنین این مقادیر با تیتر آنتی‌بادی در سرم جوجه یک روزه همان گروه تخم‌مرغ‌ها مقایسه گردید. در قسمتی از بررسی با تزریق ویروس‌های نیوکاسل و آنفلوانزا در حفره آلانتوئیک تخم‌مرغ جنین‌دار مقادیر تست EID_{50} در تخم‌مرغ‌های دارای آنتی‌بادی نیوکاسل و آنفلوانزا با مقادیر آن در تخم‌مرغ‌های فاقد آنتی‌بادی‌های مذکور (SPF) مقایسه گردید. بررسی آماری نتایج نشان داد که مقادیر آنتی‌بادی نیوکاسل و آنفلوانزا در سرم خون مادر تفاوت معنی‌داری با مقادیر این آنتی‌بادی در زرده تخم‌مرغ این گله ندارد ($P>0.05$). نتایج اندازه‌گیری مقادیر آنتی‌بادی نیوکاسل و آنفلوانزا در دوره انکوباسیون نشان داد که مقدار این آنتی‌بادی در مدت انکوباسیون در روزهای مختلف و همچنین بین مقادیر آنها در زرده و سرم جوجه یک روزه تفاوت معنی‌داری وجود ندارد ($P>0.05$). بنابراین می‌توان با اندازه‌گیری آنتی‌بادی در زرده تخم‌مرغ، تیتر آنتی‌بادی را در سرم گله مادر و سرم جوجه حاصل از این تخم‌مرغ‌ها تخمین زد. نتایج تست EID_{50} نشان داد که EID_{50} ویروس نیوکاسل، حاصل از تزریق آن به تخم‌مرغ SPF نسبت به تزریق آن به تخم‌مرغ دارای آنتی‌بادی بالاتر بوده ($P<0.05$) ولی در مورد ویروس آنفلوانزا تفاوت معنی‌داری بین مقادیر EID_{50} در تخم‌مرغ SPF و تخم‌مرغ دارای آنتی‌بادی وجود ندارد ($P>0.05$). لذا در مورد نیوکاسل جهت انجام تست مذکور بهتر است از تخم‌مرغ SPF استفاده گردد.

واژگان کلیدی: *آنتی‌بادی، زرده تخم، ویروس آنفلوانزای پرندگان، ویروس نیوکاس*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: leilaalizadeharsi@gmail.com

مقدمه

ویروس آنفلوانزا جزء خانواده ارتومیکسوویریده و جنس ویروس آنفلوانزا می‌باشد. ویروس به تیپ‌های A، B و C بر مبنای آنتی‌ژن‌های داخلی نوکلئوپروتئین و پروتئین ماتریکس تقسیم می‌شود (۱). ویروس‌های آنفلوانزای تیپ A بر مبنای ۱۸ پروتئین سطحی هماگلوتینین (H) و ۱۱ نورآمینیداز (N) به تحت تیپ‌هایی تقسیم می‌شوند (۲). با توجه به بیماری‌زایی، این ویروس‌ها را به دو گروه با بیماری‌زایی بالا (HPAI) و بیماری‌زایی کم (LPAI) تقسیم‌بندی می‌کنند (۳). ویروس‌های H7 و H5 عوامل اصلی ویروس‌های HPAI محسوب می‌شوند(۴). ویروس H9N2 که یکی از تحت تیپ‌های شایع طبقه LPAI محسوب می‌شود، در بسیاری از مناطق دنیا از جمله در آسیا و خاورمیانه گزارش شده است (۵). ویروس آنفلوانزای تحت تیپ H9N2 یکی از تحت تیپ‌های ویروس آنفلوانزا است که در ایران بومی می‌باشد و مسبب خسارات زیادی در صنعت طیور کشور می‌باشد. این تحت تیپ قابلیت انتقال به انسان را نیز دارد و به عنوان یک پاتوژن زئونوز محسوب می‌شود (۶). ویروس H9N2 جز ویروس‌هایی با بیماری‌زایی پائین محسوب می‌شود که منجر به بیماری‌های تنفسی، کاهش تولید تخم‌مرغ، اسهال و سندرم‌های کلیوی می‌شوند. البته بیماری‌زایی این ویروس‌ها متأثر از عوامل دیگری مانند سن، گونه، شرایط محیطی و مدیریتی و سایر عفونت‌های همزمان نیز می‌باشد (۷). ویروس H9N2 پتانسیل بازآرایی با سایر تحت تیپ‌های ویروس آنفلوانزا را دارد (۱۰، ۸). لذا یکی از ویروس‌هایی محسوب می‌شود که توان ایجاد پاندمی را به صورت بالقوه دارا می‌باشد. واکسیناسیون استراتژی مؤثر و اقتصادی جهت کنترل و پیشگیری از ویروس‌های آنفلوانزا محسوب می‌شود (۱۱).

نیوکاسل یکی از مهم‌ترین بیماری‌های صنعت طیور محسوب می‌شود. عامل آن تیپ ۱ پارامیکسوویروس پرندگان می‌باشد و بالغ بر ۲۰۰ گونه پرنده را آلوده می‌کند (۱۲). ویروس‌های نیوکاسل را بر اساس بیماری‌زایی شان در ماکیان به سه گروه ولوژنیک، مزوژنیک و لنتوژنیک تقسیم‌بندی می‌کنند (۱۳). عفونت ویروس نیوکاسل از فرم فوق العاده کشنده تا حالت بدون علائم متغیر می‌باشد (۱۲). از استراتژی‌های مختلف برای کاهش انتشار ویروس و کنترل خسارت‌های اقتصادی آن استفاده شده است. واکسیناسیون به عنوان تنها گزینه ایمن در کنترل بیماری ذکر شده است (۱۴). البته بدیهی است که هیچ برنامه واکسیناسیونی نمی‌تواند جایگزین برنامه امنیت زیستی و رعایت اصول بهداشتی در سطح مزارع قلمداد شود. در ایران از واکسن‌های زنده و کشته برای کنترل بیماری نیوکاسل استفاده می‌شود. بهترین روش تشخیص بیماری، جداسازی و شناسایی عامل می‌باشد. تست‌های سرمی ابزارهای مفیدی در تشخیص عفونت می‌باشند. از این تست‌ها در سطح وسیعی برای تشخیص عفونت در گله‌های طیور استفاده می‌شود. تست مهار هماگلوتیناسیون (HI) رایج‌ترین تستی است که از آن برای ردیابی پاسخ‌های ایمنی در پرنده‌های آلوده استفاده می‌شود (۱۲). ایمنی مادری در طیور از طریق تخم‌مرغ به جوجه منتقل می‌شود و ایمونوگلوبولین‌های ناشی از بیماری یا واکسیناسیون در زرده جمع می‌شوند که آنتی‌بادی‌های موجود، جوجه را تا مدتی بعد از تولد محافظت می‌کند که این مدت بستگی به عیار آنتی‌بادی مورد نظر دارد. با تعیین مقادیر آنتی‌بادی‌های زرده‌ی تخم‌مرغ می‌توان مراحل بیماری در گله‌ها را بررسی و ارزیابی نمود. از این رو مطالعات و بررسی‌های فراوانی جهت جایگزینی استفاده از تست‌های زرده بجای سرم انجام یافته است (۱۵،۱۶). امروزه با توجه به اهمیت

واکسیناسیون گله‌ها خصوصا در یک‌روزگی در واحدهای جوجه‌کشی، چنانچه این تکنیک و فرمول‌ها و تفاوت‌های مقادیر آنتی‌بادی در سرم و زرده‌ی تخم‌مرغ به‌دست بیاید می‌توان با کمترین هزینه نسبت به تعیین زمان واکسیناسیون و انجام اقدامات پیشگیرانه قبل از درآمدن جوجه اقدام نمود. ایمنی مادری باید بتواند جوجه را قبل از دریافت اولین واکسن محافظت نماید، آنتی‌بادی در جوجه یکروزه ارتباط مستقیم با سطح آنتی‌بادی مادر دارد (۱۷). لذا تخمین آنتی‌بادی موجود در جوجه‌ی یک‌روزه می‌تواند ارزیابی میزان حفاظتی علیه بیماری خاصی را راحت‌تر کند، بدین صورت که با رسیدن به الگوی تغییرات و ارتباط سطح آنتی‌بادی مادر، زرده‌ی تخم‌مرغ و جوجه و همچنین احتمال تغییرات در طول دوره‌ی انکوباسیون می‌توان پیش‌بینی دوره حفاظت و همچنین اولین زمان واکسن را مشخص نمود. از طرفی استفاده از تخم‌مرغ برای تکثیر ویروس و با هدف تشخیص و جداسازی ویروس‌ها و همچنین تکثیر و بررسی جهت تولید انواع واکسن‌های زنده و غیرفعال، اهمیت ارزیابی آنتی‌بادی‌های زرده‌ی تخم‌مرغ را بیشتر می‌کند.

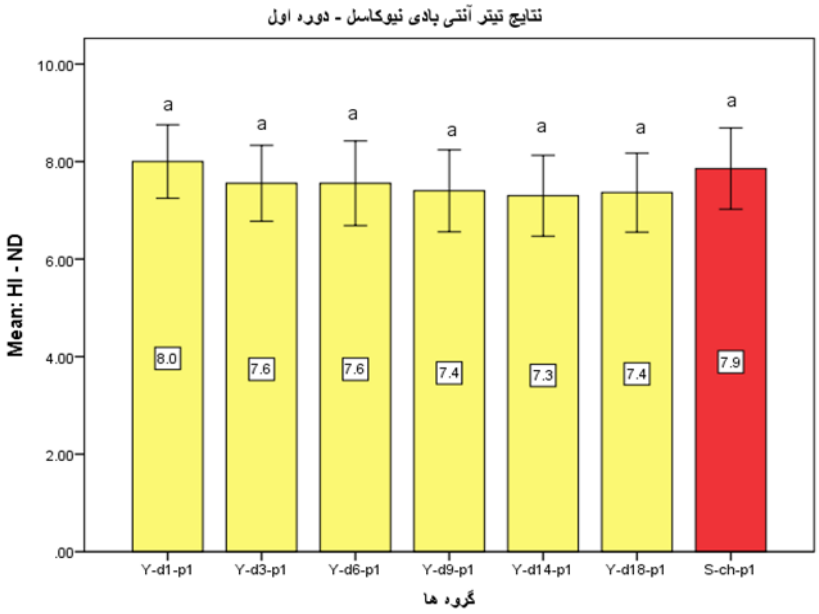
مواد و روش‌ها

در این بررسی تعداد ۳۰۰ عدد تخم‌مرغ بهداشتی گله مادر تخم‌گذار نژاد لاین واقع در شهرستان ملکان مرغداری فتحی تهیه گردید و تعداد ۳۰۰ تخم‌مرغ SPF وارداتی از شرکت VENKYS کشور هند تهیه گردید. بعد از تهیه تخم‌مرغ‌ها از گله مادر، قبل از شروع انکوباسیون تعداد ۲۰ عدد تخم‌مرغ از هر گروه جهت انجام تست به‌صورت تصادفی برداشته شد و بعد از جداسازی زرده تیتر HI آنتی‌بادی نیوکاسل و آنفلوانزا اندازه‌گیری شد. تخم‌مرغ‌ها در دستگاه جوجه‌کشی در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و رطوبت ۶۵ درصد با چرخش اتوماتیک هر سه ساعت یک بار انکوبه گردیدند. در طول دوره انکوباسیون در روزهای سوم، ششم، نهم، چهاردهم و هیجدهم تعداد ۲۰ عدد تخم‌مرغ برای روزهای ذکر شده از دستگاه جوجه‌کشی برداشت شد و به سردخانه منتقل گردید. بعد از ۲۴ ساعت تخم‌مرغ‌ها به آزمایشگاه منتقل و زرده آنها جدا گردید. برای انجام تست HI ابتدا در داخل یک ظرف ناودانی مقداری محلول PBS ریخته سپس با استفاده از سرسمپلر هشت کاناله در داخل گوده‌های ستون افقی میکروپلیت V شکل از شماره ۱ تا شماره ۱۲ مقدار ۵۰ میکرولیتر از محلول ریخته و از نمونه سرم‌ها ۵۰ میکرولیتر در گوده‌های ستون اول ریخته و به صورت سریال رقت‌سازی انجام گردید، تا گوده‌ی شماره ۱۲، ۵۰ میکرولیتر بیرون ریخته شد، با استفاده از شیکر لوله‌ای، آنتی‌ژن واحددار را شیک کرده سپس آنتی‌ژن شیک شده را در داخل یک ظرف ناودانی دیگر ریخته به مقدار ۵۰ میکرولیتر از آنتی‌ژن واحددار نیوکاسل یا آنفلوانزای تهیه شده به گوده‌های شماره‌ی ۱ تا ۱۲ اضافه کرده و درپوش میکروپلیت گذاشته شد و به مدت یک دقیقه بر روی شیکر مکانیکی قرار داده یا به آرامی میکروپلیت را به طور دورانی در دو جهت تکان داده و پس از آن به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد قرار داده، بعد از ۳۰ دقیقه به تمامی گوده‌ها ۵۰ میکرولیتر گلبول قرمز شسته شده ۱ درصد اضافه گردید. میکروپلیت به مدت ۱۵ ثانیه بر روی شیکر مکانیکی نهاده یا به آرامی میکروپلیت را به طور دورانی در دو جهت تکان داده و بعد از آن به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد گذاشته شد و پس از گذشت زمان فوق گودی که ریزش داشت قرائت گردید. برای آنالیز آماری از نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ استفاده گردید. داده‌های به دست آمده توسط تست‌های ANOVA وTukey

مـورد تحلیـل و تجزیـه آمـاری قـرار گرفتنـد. نتـایج به‌صـورت میـانگین و انحـراف معیـار (Mean ± SD) نشـان داده شـد، در تمـام مـوارد $p<0/05$ معنـی‌دار تلقی گردید.

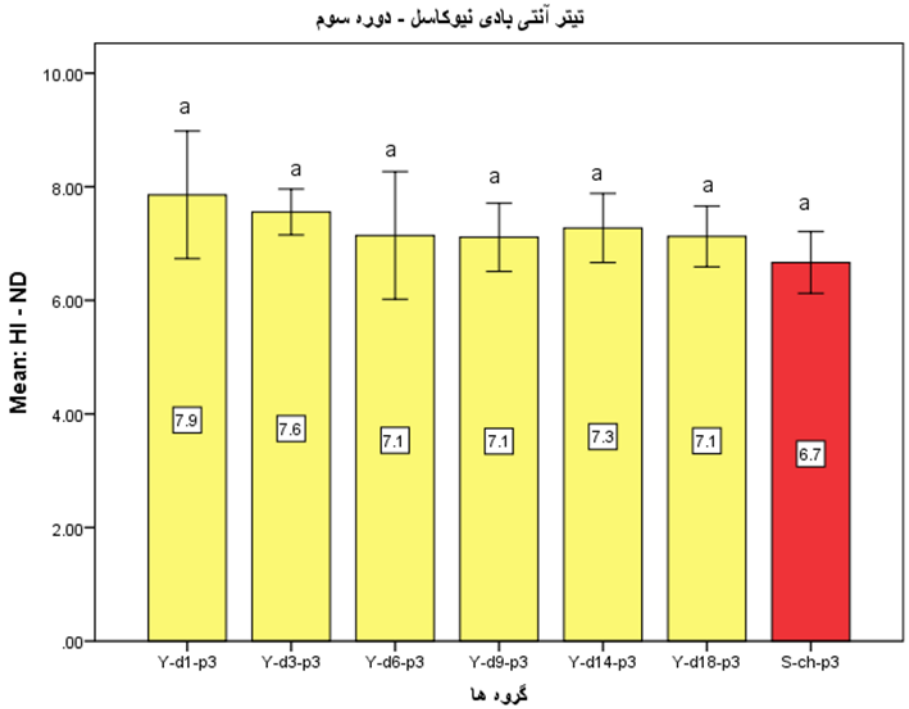
نتایج

انـدازه‌گیری مقـادیر تیتـر آنتی‌بـادی نیوکاسـل در سـه دوره متـوالی در زرده تخم‌مـرغ توسـط تسـت HI انجام گرفت کـه نتـایج سـه دوره در نمـودار ۱تـا ۳ آمـده اسـت. همین‌طـور انـدازه‌گیری مقـادیر تیتـر آنتی‌بـادی آنفلـوانزا در سـه دوره متـوالی در زرده تخم‌مـرغ توسـط تسـت HI انجـام گرفـت کـه نتـایج سـه دوره در نمـودار ۴ تا ۶ آمده اسـت. انـدازه‌گیری مقـادیر تیتـر آنتـی‌بـادی آنفلوانزا در سـه هفتـه متـوالی در سـرم خـون گلـه مـادر و زرده تخم‌مرغ‌های حاصـل از همـان گلـه توسـط تسـت HI انجام گرفـت کـه نتـایج سـه دوره در نمـودار ۷ آمـده اسـت. همچنـین انـدازه‌گیری مقـادیر تیتـر آنتـی‌بـادی نیوکاسل در سه هفتـه متـوالی در سـرم خـون گلـه مـادر و زرده تخم‌مرغ‌های حاصـل از همـان گلـه توسـط تسـت HI انجام گرفـت کـه نتـایج سـه دوره در نمـودار ۸ آمـده است.

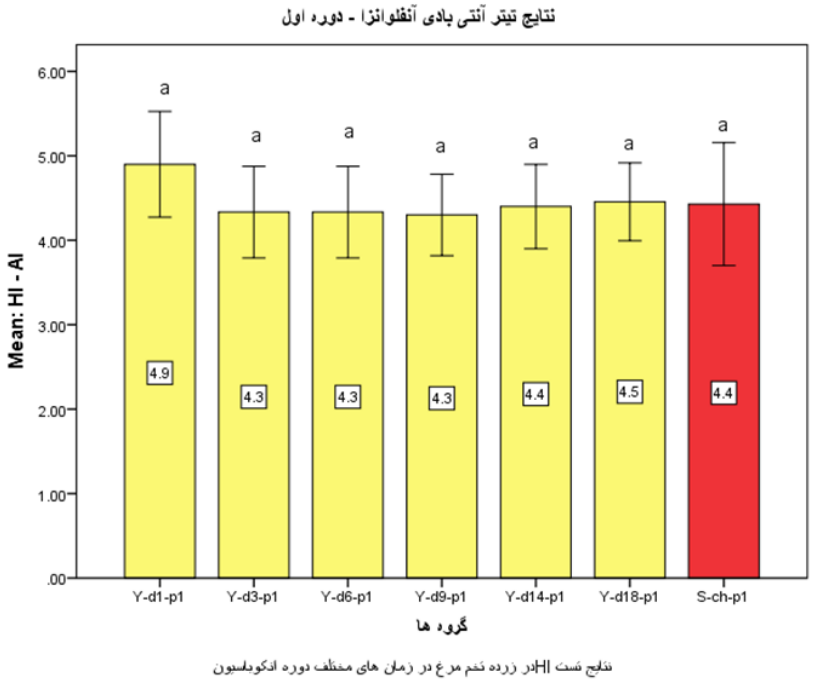


نمودار ۱- نتایج تیتر آنتی بادی نیوکاسل - دوره اول (از گله ۴۱ هفته)

مقایسـه مقـادیر تسـت EID_{50} بـرای ویـروس نیوکاسـل بـا اسـتفاده از تخم‌مـرغ SPF و Local نشـان داد کـه میـانگین آن در تخم‌مـرغ SPF ($Log_{10}10$) و میـانگین آن در تخم‌مـرغ Local ($Log_{10}2/9$) اسـت. مقایسـه مقـادیر تسـت EID_{50} بـرای ویـروس آنفلـوانزا بـا اسـتفاده از تخم‌مـرغ SPF و Local نشـان داد کـه میـانگین آن در تخم‌مـرغ SPF ($Log_{10}7/9$) و میـانگین آن در تخم‌مرغ Local ($Log_{10}5/9$) است.

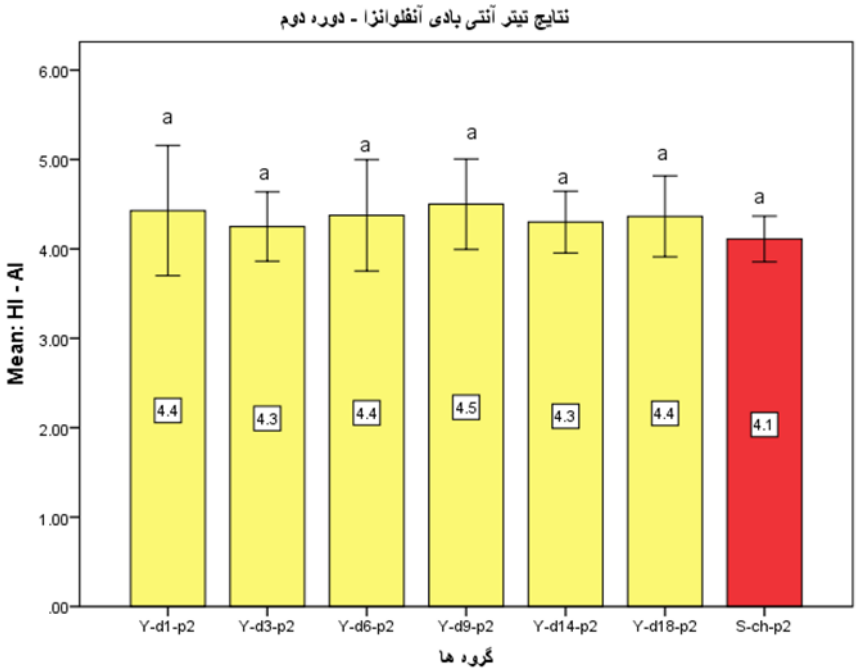


نمودار ۳- نتایج HI نتایج تیتر آنتی‌بادی نیوکاسل - دوره سوم (از گله ۴۷ هفته)

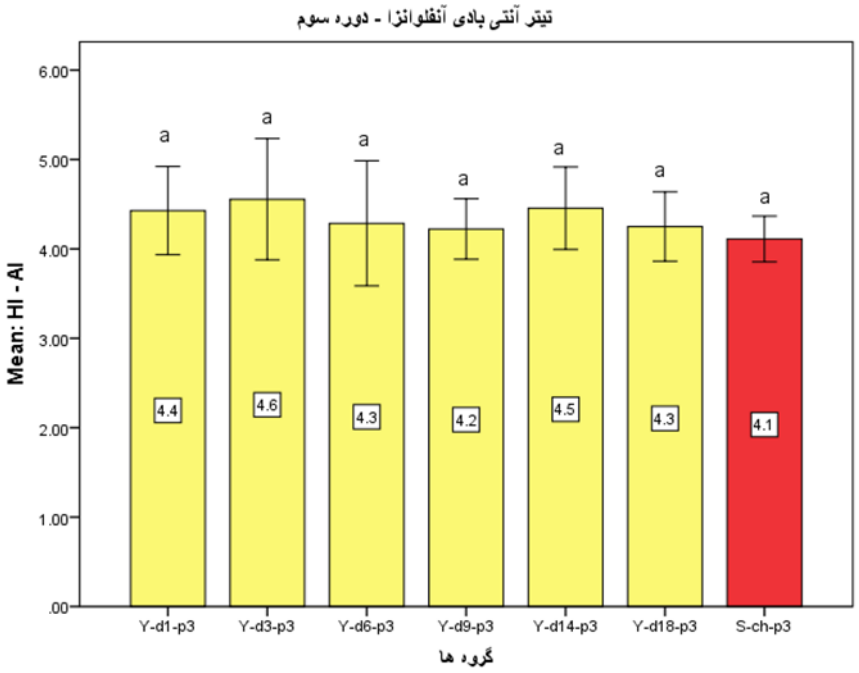


نتایج تست HIدر زرده تخم مرغ در زمان های مختلف دوره ادکوباسیون

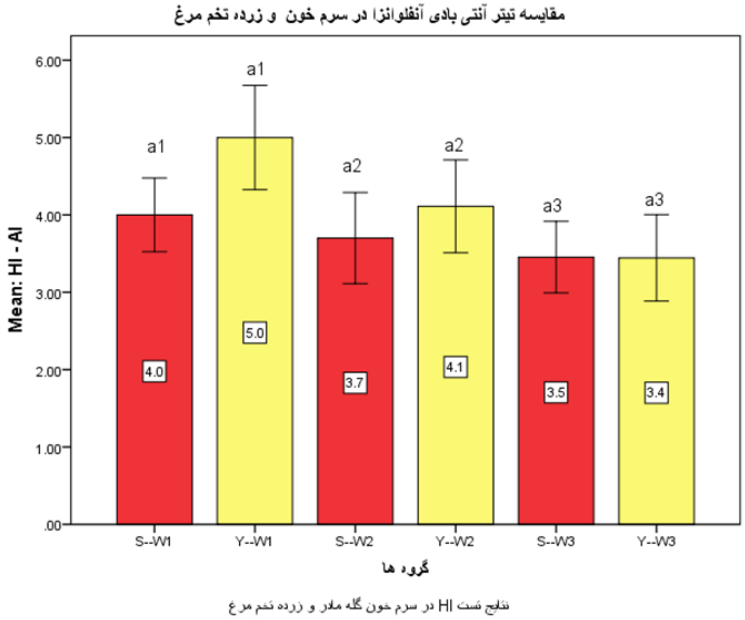
نمودار ۴- نتایج تیتر آنتی‌بادی آنفلوانزا - دوره اول (از گله ۴۱ هفته)



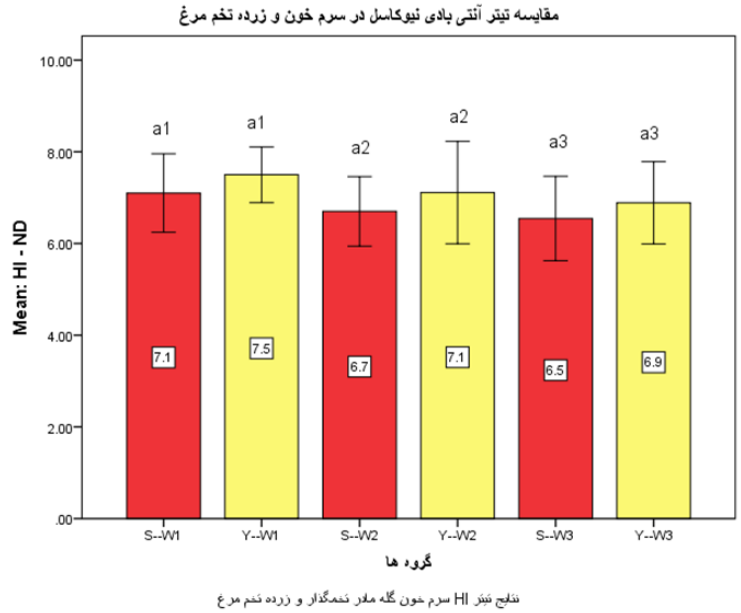
نمودار ۵- نتایج تیتر آنتی‌بادی آنفلوانزا - دوره دوم (از گله ۴۴ هفته)



نمودار ۶- نتایج تیتر آنتی‌بادی آنفلوانزا - دوره سوم (از گله ۴۷ هفته)



نمودار ۷- نتایج تیتر آنتی‌بادی آنفلوانزا در سرم خون و زرده تخم‌مرغ



نمودار ۸- نتایج تیتر آنتی‌بادی نیوکاسل در سرم خون و زرده تخم‌مرغ

بحث و نتیجه‌گیری

بررسی آماری میانگین تیتر آنتی‌بادی نیوکاسل در روزهای مختلف دوره انکوباسیون در سه دوره نشان داد که مقادیر این آنتی‌بادی در طول دوره انکوباسیون تغییرات معنی‌داری ندارند ($P<0.05$). نتایج بررسی در سه دوره ارزیابی روند مشابهی را نشان داد و همچنین مقایسه میانگین تیتر آنتی‌بادی نیوکاسل در زرده و سرم جوجه‌های حاصل نشان می‌دهد که بین مقادیر این آنتی‌بادی در زرده و سرم تفاوت معنی‌داری وجود ندارد ($P<0.05$). لذا با توجه به نتایج حاصل می‌توان با اندازه‌گیری مقادیر آنتی‌بادی نیوکاسل در زرده در طول دوره انکوباسیون مقادیر احتمالی آن را در جوجه‌های

حاصل تخمین زد و قبل از در آمدن جوجه از تخم‌مرغ در واحدهای جوجه‌کشی می‌توان با اندازه‌گیری آنتی‌بادی نیوکاسل ضمن تخمین مقادیر آن در سرم جوجه‌ها نسبت به برآورد وضعیت ایمنی جوجه‌ها و برنامه‌ریزی برای برنامه واکسیناسیون روزهای اول جوجه اقدام لازم را به عمل آورد. همچنین بررسی آماری میانگین تیتر آنتی‌بادی آنفلوانزا در روزهای مختلف دوره انکوباسیون در سه دوره نشان داد که مقادیر این آنتی‌بادی در طول دوره انکوباسیون تغییرات معنی‌داری ندارد ($P<0.05$) . نتایج بررسی در سه دوره ارزیابی روند مشابهی را نشان داد و همچنین مقایسه میانگین تیتر آنتی‌بادی آنفلوانزا در زرده و سرم جوجه‌های حاصل نشان می‌دهد که بین مقادیر این آنتی‌بادی در زرده و سرم تفاوت معنی‌داری وجود ندارد ($P<0.05$). لذا با توجه به نتایج حاصل می‌توان با اندازه‌گیری مقادیر آنتی‌بادی آنفلوانزا در زرده در طول دوره انکوباسیون مقادیر احتمالی آن را در جوجه‌های حاصل تخمین زد و قبل از در آمدن جوجه از تخم‌مرغ در واحدهای جوجه‌کشی می‌توان با اندازه‌گیری آنتی‌بادی آنفلوانزا ضمن تخمین مقادیر آن در سرم جوجه‌ها نسبت به برآورد وضعیت ایمنی جوجه‌ها و برنامه‌ریزی برای برنامه واکسیناسیون روزهای اول جوجه اقدام لازم را به عمل آورد. بررسی و مقایسه آماری میانگین تیتر آنتی‌بادی آنفلوانزا در سرم خون و زرده تخم‌مرغ در طول سه هفته متوالی نشان می‌دهد که مقادیر این آنتی‌بادی در سرم و زرده تخم‌مرغ تغییرات معنی‌داری ندارد ($P<0.05$). لذا با توجه به نتایج حاصل می‌توان با اندازه‌گیری مقادیر آنتی‌بادی آنفلوانزا در زرده، مقادیر احتمالی آن را در سرم خون گله مادر و یا بالعکس تخمین زد و با اندازه‌گیری آنتی‌بادی نیوکاسل در زرده می‌توان وضعیت ایمنی گله مادر را ارزیابی نمود. بررسی و مقایسه آماری میانگین مقدار EID_{50} ویروس نیوکاسل در تخم‌مرغ SPF به‌صورت معنی‌داری بیشتر از میانگین آن در تخم‌مرغ Local است ($P\geq0.05$). لذا با توجه به وجود آنتی‌بادی در تخم‌مرغ لوکال در ارزیابی تست EID_{50} ویروس نیوکاسل بهتر است از تخم‌مرغ SPF استفاده گردد. بررسی و مقایسه آماری میانگین مقدار EID_{50} ویروس آنفلوانزا در تخم‌مرغ SPF تفاوت معنی‌داری با میانگین آن در تخم‌مرغ Local ندارد ($P<0.05$). ایمنی مادری جوجه را در اوایل زندگی محافظت می‌نماید و مقادیر آنتی‌بادی زرده فاکتور مهم ایمنی جوجه یک روزه است. بنابراین با تعیین تیتر آنتی‌بادی مادری می‌توان زمان اولین واکسیناسیون جوجه را تخمین زد. خون‌گیری از پرندگان و جداسازی سرم آن برای مونیتورینگ انواع بیماری‌ها یک روش مرسوم می‌باشد ولی مطالعات زیادی انجام یافته که نشان می‌دهد ارتباط خوب و مستقیمی بین مقادیر آنتی‌بادی در سرم و زرده تخم‌مرغ مادر وجود دارد. بنابراین استفاده از تیتر آنتی‌بادی زرده به عنوان روش جایگزینی برای نمونه سرم مطرح گردیده است. جستجوی آنتی‌بادی‌های ویژه عوامل بیماری‌زای طیور در زرده و مقایسه آن با سرم خون توسط محققین مختلف انجام یافته است. برای این جستجو از آزمایشات متداول از جمله تست HI و الایزا برای انواع بیماری‌ها استفاده شده است (۱۸،

۱۵). در بررسی حاضر از روش HI برای تعیین مقادیر آنتی‌بادی نیوکاسل و آنفلوانزا استفاده شد که در حال حاضر در اکثر آزمایشگاه‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. بوداد و همکاران (۱۸) در سال ۲۰۱۲ در بررسی خود تحت عنوان استفاده از آنتی‌بادی زرده برای تخمین سن مناسب واکسیناسیون علیه بیماری بورس عفونی به این نتیجه رسید که تفاوت معنی‌داری در مقادیر تیتر آنتی‌بادی زرده و سرم وجود ندارد که در تحقیق حاضر نیز نتایج نشان داد در مورد آنتی‌بادی نیوکاسل و آنفلوانزا تفاوت معنی‌داری بین مقادیر آن در سطح سرم و زرده وجود ندارد که مطابق با یافته‌های محققین فوق می‌باشد.

بیک و همکاران (۱۵) در سال ۲۰۰۳ در تحقیقی که تحت عنوان، معتبرسازی تست آنتی‌بادی زرده برای تعیین تیتر آنفلوانزا در نژاد لگهورن سفید انجام دادند. تیتر آنتی‌بادی در زرده و سرم متعاقب واکسیناسیون را ارزیابی کردند و نشان دادند مقادیر آنتی‌بادی در سرم در واکسیناسیون با واکسن زنده آنفلوانزا زودتر مشخص می‌گردد. به این معنی که آنتی‌بادی در سرم زودتر از زرده قابل ردیابی است. اما در مواردی که بیماری تازه اتفاق افتاده باشد می‌تواند سطح آنتی‌بادی را در زرده کمتر نشان دهد. اما در بررسی ما با توجه به واکسیناسیون برنامه‌ریزی شده در گله مادر، امکان خطا کمتر وجود داشت. در تحقیق حاضر نیز اندازه‌گیری سطح آنتی‌بادی آنفلوانزا در سرم خون جوجه یک روزه، مرغ مادر و زرده انجام یافت که بیانگر عدم تفاوت سطح معنی‌دار در بین مقادیر آنتی‌بادی زرده و سرم خون آنها بود. و از طرفی به علت عدم تغییرات سطح آنتی‌بادی در طول انکوباسیون، نتایج تحقیق اخیر بیانگر این است که سطح آنتی‌بادی در زرده قبل از انکوباسیون و سطح آنتی‌بادی در جوجه یک روزه حاصل از همان تخم‌مرغ‌ها تفاوت معنی‌داری ندارد و با اطمینان می‌توان سطح آنتی‌بادی جوجه‌ها را با اندازه‌گیری سطح آنتی‌بادی زرده تخمین زد. سانگ ژون و همکاران (۱۹) در سال ۲۰۰۳ در تحقیقی که تحت عنوان روش غیر مستقیم برای تعیین تیتر آنتی‌بادی نیوکاسل در جوجه‌ها به‌وسیله تیتر کردن آنتی‌بادی‌ها در زرده تخم‌مرغ انجام دادند به این نتیجه رسیدند که همبستگی مثبت بین تیتر آنتی‌بادی نیوکاسل در زرده و سرم مرغ مادر و همچنین بین تیتر زرده و سرم جوجه یک روزه وجود دارد و بیان کردند می‌توان از تست HI زرده به عنوان روش جایگزین برای نمونه خون در مرغ مادر و جوجه یک‌روزه استفاده کرد که نتایج آن با یافته‌های تحقیق حاضر همخوانی دارد.

جیووانی توسی و همکاران (۲۰) در سال ۲۰۰۵ تیتر آنتی‌بادی *مایکوپلاسما* را در زرده و سرم مقایسه کردند و به این نتیجه رسیدند که بین مقادیر آنتی‌بادی موجود در زرده و سرم تفاوت معنی‌داری وجود ندارد و بیان کردند که ارزیابی تیتر آنتی‌بادی زرده یک رهیافت مناسب و عملی برای بررسی شیوع عفونت *مایکوپلاسما* در گله مادر است. که عدم معنی‌دار بودن نتایج حاصل در خصوص آنتی‌بادی نیوکاسل و آنفلوانزا در ارزیابی زرده و سرم مشابه محققین فوق می‌باشد.

دارل و همکارن (۲۱) در سال ۲۰۰۶ مقادیر آنتی‌بادی آنفلوانزای طیور را در زرده و سرم بررسی کردند. آنها در بررسی خود سطح آنتی‌بادی سرم و زرده را در هفته‌های مختلف متعاقب ایجاد عفونت با ویروس آنفلوانزای پرندگان سویه H_6N_2 اندازه‌گیری کردند و به این نتیجه رسیدند که آنتی‌بادی در سرم نسبت به زرده زودتر ظاهر شده و پیک آن در سرم بیشتر بوده و به مدت طولانی در مقادیر بالا حفظ می‌شود.

اما در تحقیق حاضر مشخص شد که آنتی‌بادی

آنفلوانزا در سرم مرغ مادر تخم‌گذار با مقادیر آن در زرده تفاوت معنی‌داری ندارد که احتمالاً دلیل آن این است که زمان نمونه برداری بعد از به اوج رسیدن پاسخ ایمنی به واکسناسیون بوده است و چنانچه قبل از این زمان نمونه‌برداری انجام می‌شد احتمالا مقادیر آنتی‌بادی در سرم مرغ مادر تخم‌گذار و زرده تخم‌مرغ معنی‌دار می‌شد. بنابراین زمان واکسیناسیون گله مادر و فاصله نمونه‌برداری از آن و همچنین نوع واکسن استفاده شده از جهت زنده یا غیر فعال بودن آن می‌تواند منجر به اختلاف در یافته‌های محققین مختلف شود. از این رو در تفسیر نتایج در نظر گرفتن برنامه واکسیناسیون می‌تواند نحوه نتیجه‌گیری را کاملاً تغییر دهد. با عنایت بر اینکه گله مادر مورد استفاده در این بررسی از واکسن دوگانه غیر فعال روغنی نیوکاسل و آنفلوانزای طیور حدود ۳۵ روز قبل از شروع نمونه برداری استفاده کرده بود لذا این فاصله زمانی باعث شد که تیتر این دو آنتی‌بادی در سرم و متعاقب آن در زرده به پیک برسد و این پیک به خاطر استفاده از واکسن روغنی برای مدتی در اوج حفظ شد و این می‌تواند دلیل اصلی عدم وجود اختلاف معنی‌دار در میانگین تیتر آنتی‌بادی در سرم و زرده در سه دوره متوالی باشد.

آنالیز نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که در مواقعی که دسترسی به گله مادر جهت گرفتن نمونه خون و سرم وجود ندارد، می‌توان جهت تعیین عیار آنتی‌بادی نیوکاسل و آنفلوانزا در گله بجای نمونه سرم از زرده تخم‌مرغ همان گله استفاده کرد و همچنین با اندازه‌گیری مقادیر آنتی‌بادی نیوکاسل در زرده دقیقاً می‌توان میزان این آنتی‌بادی را در سرم جوجه یک روزه حاصل از همان گله تخمین زد. در صنعت واکسن‌سازی و جداسازی ویروس‌ها جهت بررسی عفونت‌زایی ویروس نیوکاسل بهتر است از تخم‌مرغ SPF استفاده گردد.

References

1- Capua I, Alexander DJ. Ecology, Epidemiology and Human Health Implications of Avian Influenza Virus Infections, In: Capua, I. and Alexander, D.J. (Eds.). Avian Influenza and Newcastle Disease. 2009. P.5 (Winterer Ltd).

2- Tong S, Zhu X, Li Y, Shi M, Zhang J, Bourgeois M, and et al. New world bats harbor diverse influenza a viruses. PLoS Pathog. 2013; 9(10):e1003657.

3- Alexander DJ. A review of avian influenza in different bird species. Vet Microbiol. 2000; 74:3–13.

4- Iqbal M, Yaqub T, Mukhtar N, Shabbir MZ, McCauley JW. Infectivity and transmissibility of H9N2 avian influenza virus in chickens and wild terrestrial birds. Vet Res. 2013; 44:100.

5- Alexander DJ. Summary of avian influenza activity in Europe, Asia, Africa, and Australasia 2002–2006. Avian Dis. 2007; 51:161–166.

6- Capua I, Alexander DJ. Human Health Implications of Avian Influenza Viruses and Paramyxoviruses. Eur J Clin Microbiol Infect. 2004; 23:1–6.

7- Zhang P, Tang Y, Liu X, Peng D, Liu W, Liu H, Lu S, Liu X. Characterization of H9N2 influenza viruses isolated from vaccinated flocks in an integrated broiler chicken operation in eastern China during a 5-year period (1998-2002). J Gen Virol. 2008; 89(Pt 12):3102-12.

8- Gao R, Cao B, Hu Y, Feng Z., Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus. N Engl J Med. 2003; 368(20):1888-97.

9- Ewert DL, Eidson CS, Dawe DL. Factors influencing the appearance of antibody intracheal washes and serum of young chickens after exposure to Newcastle disease virus. Infect Immun. 1977; 18:138-145.

10- Monne I, Yamage M, Dauphin G, Claes F, Ahmed G, Giasuddin M, et al. Reassortant avian influenza A (H5N1) viruses with H9N2-PB1 gene in poultry, Bangladesh. Emerg Infect Dis. 2013; 19(10):1630-4.

11- Shen H, Wu B, Li G, Chen F, Luo Q, Chen Y, Xie Q. H9N2 Subtype Avian Influenza Viruses in China: Current Advances and Future Perspectives. Br J Virol. 2014; 1(2):54-63.

12- Alexander DJ, Senne DA, Newcastle disease and other paramyxoviruses. In: L.D Zavala, ed. Isolation, identification and characterization of avian pathogens. Omnipress. 2008.

13- Beard CW. Serological procedures, In: Purchase, H.G.; Arp, L.H. Domermuth, C.H. and Pear-

son, J.E. (eds), A Labaratory Manual for the Isolation and Identification Avian Pathogens, 3rd ed 1989; p.192-200.

14- Orajaka LJE, Adene DF, Anene BM, Onuoha EA. Seroprevalence of Newcastle disease in local chickens from Southeast derived savannah zone of Nigeria. Revue Elevage Medicine Veterinaire pays Tropicaux. 1999; 52:185-188.

15- Beck JR, Swayne DE, Davison S, Casavant S, Gutierrez C. Validation of egg yolk antibody testing as a method to determine influenza status in white leghorn hens. Avian Dis. 2003; 47(3):1196-9.

16- Silva MS, Swayne DE. Serum and egg yolk antibody detection in chickens infected with low pathogenicity avian influenza virus. Avian Dis. 2012; 56(3), 601-604.

17- Allan WH, Lancaster JE, Toth B. Newcastlle disease vaccines their production and use. FAO. 1978.

18- Boudaoud A, Mamache B. Use of Egg Yolk Antibodies to Predict Optimal Age of Vaccination against Infectious Bursal Disease (IBD) in Broilers. International Journal of Poultry Science. 2012; 11(2):138-142.

19-Sang-Geon Y, Eva N, Peter JK. Indirect method for prediction of hemagglutination inhibition antibody titers to Newcastle disease virus in chickens by titration of antibodies in egg yolk. J Vet Diagn Invest. 2003; 15:184–187.

20- Giovanni T, Roberto L, Marco T, Roberto C. Evaluation of an egg yolk enzyme-linked immunosorbent assay antibody test and its use to assess the prevalence of Mycoplasma gallisepticum infection in laying hens in Italy Ital J Anim Sci. 2005;4:272-275.

21- Darrell WT, En-Min Z, Kyoung-Jin Y, Kenneth JK. Detection of antibodies in serum and egg yolk following infection of chickens with an H6N2 avian influenza virus. J Vet Diagn Invest. 2006; 18:437–442.

Evaluation of Antibody Titer Changes against Newcastle Disease and influenza (H9N2) In the Egg Yolk during Incubation Period and its Impact on The Replication of the Viruses

Leila Alizadeh-Arsi*[1], Aref Hoshyari[1], Ali Ameghi-Roodsary[1], Abolfazl Ghaniei[2], Behboud Jafari[3], Abolfazl Jafari-Sales[4]

1- Department of Research and Development, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj
2- Department of Poultry Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia
3- Department of Microbiology, Ahar branch, Islamic Azad University, Ahar
4- Department of Microbiology, Kazeroon branch, Islamic Azad University, Kazeroon

Receive: December 26, 2017; Revise: January 22, 2018; Accept: February 25, 2018

Summary

Maternal antibodies are transferred from hens to their offWinter through the egg yolk where the antibody is absorbed and enters the circulatory system. Passive immunity via maternal antibodies can lessen the effects of clinical diseases in chicks or prevent the incidence of them. Haemagglutination inhibition (HI) test is one of the popular assays for detection of Newcastle disease virus (NDV) and Avian influenza virus (AIV) infections. Newcastle disease and avian influenza disease are very important contagious infections which causes vast economic losses to poultry industry. In this study, antibody titres against NDV and AIV measured in serum of breeders, egg yolk, and day old chicks by HI method. NDV and AIV antibodies compared in serum of breeders and egg yolk of the flock. Level of antibodies in the first, third, 6^{th}, 9^{th}, 14^{th}, and 18^{th} days of incubation measured and compared. These values compared with antibody levels of day old chicks. In another experiment, NDV and AIV injected to eggs via allantoic cavity of eggs. EID50 test was used to compare the eggs with NDV and AIV antibodies and the eggs without antibodies (SPF eggs). There was no significant difference in NDV and AIV titres in serum of breeders and egg yolk samples ($P>0.05$). Also, antibody titres during incubation and serum of day old chicks showed no significant difference ($P>0.05$). Hence, evaluation of egg yolk antibodies is a valuable tool for estimation of antibody levels in serum of breeders and their chicks. Results of NDV EID50 test showed significant difference between eggs with NDV antibodies and SPF eggs ($P<0.05$). But, this comparison about AIV was non-significant ($P>0.05$). Hence, it is better to use SPF eggs for determination of EID50 of NDV.

Keywords: *Avian influenza virus, egg yolk antibody, Newcastle disease virus.*