DOI: 10.22092/vj.2019.123311.1497
شماره ۱۲۷ تابستان ۱۳۹۹
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده های بیولوژیک

تاثیر عصاره هگزانی میوه‌های زیتون و انجیر بر ایمنی‌زایی ویروس غیرفعال شده آنفلوانزای پرندگان تحت تیپ H9N2

• عدنان مرادپور
دانش آموخته رشته دکترای عمومی دامپزشکی از دانشکده دامپزشکی دانشگاه تبریز،تبریز، ایران
• ذوالفقار رجبی (نویسنده مسئول)
دانشیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.
• غلامرضا دهقان
استاد، گروه بیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
• مهدی وصفی مرندی
استاد، گروه بیماری های طیور، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران،ایران
تاریخ دریافت: ۲۶-۰۶-۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: ۱۹-۰۳-۱۳۹۸
Email: rajabi@tabrizu.ac.ir

چکیده

آنفلوانزای پرندگان یك بیماری بسیار واگیر ویروسی است. در حال حاضر تحت تیپ H9N2 عامل بیماری در ایران بومی است و خسارت زیادی به صنعت طیور وارد می‌کند. لذا کنترل این بیماری از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. واکسیناسیون یکی از این راه‌کارهای کنترلی می‌باشد. روغن‌هایی که در واکسن‌های تجاری بعنوان ادجوانت استفاده می‌شوند روغن‌های معدنی هستند. از مهم‌ترین معایب این روغن‌ها، متابولیسم پایین و باقیمانده در بافت، ایجاد واکنش‌های شدید بافتی، و همچنین سرطان‌زایی آنها است. لذا محققان در تلاش هستند در واکسن‌ها بجای روغن‌های معدنی از روغن‌های گیاهی بعنوان ادجوانت استفاده کنند. در مطالعه حاضر، خاصیت ادجوانتی عصاره‌ی هگزانی میوه‌های انجیر و زیتون بطور جداگانه به همراه ویروس غیرفعال آنفلوانزا تحت تیپ H9N2 در بدن ۵۰ قطعه جوجه گوشتی تجاری در مقایسه با واکسن تجاری بررسی شد. برای ارزیابی از روش پاسخ آنامنستیک استفاده شد. نتایج نشان داد مخلوط‌ها نمی‌توانند مانع از عفونت و پاسخ آنامنستیک در پرندگان شوند. درحالی که واکسن تجاری پاسخ آنامنستیک را مهار کرد و ایمنی مناسب‌تری را ایجاد نمود. با توجه به نتایج به نظر می‌رسد که حتی نتوان بصورت جداگانه از عصاره‌های هگزانی حاصل از میوه های انجیر و زیتون به عنوان ادجوانت در تهیه واکسن آنفلوانزای طیور استفاده کرد.

کلمات کلیدی: آنفلوانزا، انجیر، زیتون، ادجوانت، واکسن

Veterinary Researches & Biological Products No 127 pp: 13-20

The effect of hexane extract of Fig and olive fruits on the Immunogenicity of the inactivated Avian Influenza virus subtype H9N2

By: Moradpoor, A., DVM degree from faculty of veterinary medicine, university of Tabriz, Tabriz, Iran, Rajabi, Z., (Corresponding Author) Associate professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran, Dehghan, Gh., Professor, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran and Vasfi Marandi, M., Professor, Department of Avian Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

Email: rajabi@tabrizu.ac.ir

Received: 2018-09-17 Accepted: 2019-06-09

Avian influenza is a contagious viral disease. The H9N2 subtype of the agent is endemic in Iran and causes a lot of losses in poultry industry at the moment. Therefore, the control of the disease is particularly important. Vaccination is one of the control measures. Oils that are used as adjuvant in commercial vaccines are mineral oils. The most disadvantages of these oils include; low metabolism and residuals in tissues, severe tissue reactions, and carcinogenesis. So, researchers are trying to use vegetable oils as adjuvants in vaccines instead of mineral oils. In the present study, the adjuvant property of hexane extract of fig and olive fruits were evaluated. For this reason, the effect of mixture of inactivated avian influenza subtype H9N2 and fig or olive extract was separately examined in 50 commercial broiler chickens in comparison with a commercial vaccine. The anamnestic response method was used for evaluation. Results indicated that the mixtures could not inhibit infection and anamnestic response in the chickens, while the commercial vaccine inhibited anamnestic response and induced better immunity. According to the results, it seems that we cannot even use the hexane extract of fig and olive separately, as an adjuvant in preparation of avian influenza vaccine.

Key words: Influenza, Fig, Olive, Adjuvant, Vaccine

مقدمه

آنفلوانزای پرندگان یکی از بیماری‌های ویروسی مهم در صنعت طیور می‌باشد و شیوع جهانی دارد. تحت تیپ H9N2 ویروس آنفلوانزای پرندگان که ویروسی با بیماریزایی ملایم است که طی سال‌های ۱۹۹۹-۱۹۹۴ در دنیا منتشر شد (۱۹). در ایران برای اولین بار توسط دکتر وصفی مرندی و دکتر بزرگمهری فر جداسازی شد (۲۱). تکامل سروتیپ H9N2 و ارتباط ژنتیکی با تحت تیپ H5N1، و همچنین جداسازی ویروس‌های H9N2 از انسان (۱۲)، بر اهمیت کنترل ویروس‌های H9N2 در طیور تاکید می‌کنند.

در ایران از سال ۱۳۷۸ بدنبال شیوع بیماری آنفلوانزا از واکسن‌های روغنی استفاده می‌شود. کارایی واکسن به متغیرهای بسیاری همچون نوع و میزان آنتی‌ژن موجود در واکسن و حضور ادجوانت‌ها جهت بهبود ایمنی‌زایی، بستگی دارد. ادجوانت‌ها بیش از ۷۰ سال است که به منظور افزایش پاسخ ایمنی در برابر آنتی‌ژن‌ها استفاده می‌شود. رامون برای اولین بار اثبات کرد که با افزودن خرده‌نان، آگار، نشاسته‌ی کاساو (Tapioca)، روغن نشاسته (Starch oil)، لسیتین، یا ساپونین به واکسن می‌توان سطح آنتی‌توکسین دیفتری یا کزاز را افزایش داد (۱). روغن‌هایی که در واکسن‌های تجاری به عنوان ادجوانت یا ماده یاور استفاده می‌شوند، اغلب روغن‌های معدنی هستند. این نوع ادجوانت‌ها، با رهاسازی تدریجی آنتی‌ژن، در تقویت واکسن عمل می‌کنند و نقشی در ایمنی‌زایی ندارند. از معایب این نوع ادجوانت‌ها باقی‌ماندن آنها در محل تلقیح واکسن و ایجاد واکنش‌های شدید بافتی است. علاوه بر این، این مواد ممکن است سرطان‌زا نیز باشند (۱۷). لذا محققان تلاش می‌کنند تا روغن‌های گیاهی، با قابلیت سوخت و ساز بالا را جایگزین روغن‌های معدنی در واکسن‌ها بکنند. از جمله از روغن‌های گیاهی می‌توان به روغن انجیر و زیتون اشاره کرد. این میوه‌ها حاوی اسیدهای چرب غیر اشباع و تری آسیل گلیسرول هستند. قبلا در مطالعه‌ای مشخص شد وقتی عصاره‌های هگزانی انجیر و زیتون با هم مخلوط می‌شوند باعث افزایش

ایمنی‌زایی آنتی‌ژن غیر فعال تحت تیپ H9N2 نمی‌شود (۱۱) که شاید بدلیل وجود ترکیبات مهارکننده در یکی از این میوه‌ها باشد. لذا در این مطالعه تاثیر جداگانه‌ی عصاره‌های هگزانی میوه‌ی انجیر و زیتون بعنوان ادجوانت، بر ایمنی زایی ویروس غیر فعال آنفلوانزای پرندگان تحت تیپ H9N2 مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه‌ی عصاره‌ی هگزانی انجیر خشک

جهت تهیه‌ی عصاره‌ی هگزانی انجیر، حدود ۶۰۰ گرم انجیر شیرازی خشک تهیه و به وسیله‌ی یك دستگاه آسیاب برقی، آسیاب شد. سپس انجیرهای خرد شده، در یک ارلن ریخته شد و به میزان ۱/۵ برابر حجم انجیرها (۱ cm بیشتر از سطح انجیر)، حلال هگزان (شرکت مرک، آلمان) به آن اضافه شد(عمل خیساندن) و پس از گذشت یک روز، از کاغذ صافی عبور داده شد. عمل خیساندن و صاف کردن محلول سه بار تکرار گردید. محلول صاف شده توسط دستگاه سوکسله تغلیظ و سپس در مجاورت هوای آزاد قرار داده شد تا حلال به طور کامل از آن جدا شود (۶).

تهیه‌ی عصاره‌ی هگزانی زیتون خشک

برای این منظور ابتدا هسته‌ی زیتون‌ها جدا شد، سپس آنها در دمای اتاق و دور از نور آفتاب به مدت یک هفته در مجاورت هوا قرار داده شدند. پس از خشک شدن به وسیله‌ی یك آسیاب برقی خرد، و داخل یک بشر ریخته شدند. سپس به اندازه ۱/۵ برابر حجم زیتون‌ها (۱ cm بیشتر از سطح زیتون) حلال هگزان (شرکت مرک، آلمان) اضافه گردید. پس از گذشت یک روز، محلول رویی از کاغذ صافی عبور داده شد. عمل خیساندن و صاف کردن محلول سه بار تکرار گردید. محلول صاف شده توسط سوکسله تغلیظ شد. عصاره تغلیظ شده در مجاورت هوای آزاد قرار داده شد تا حلال به طور کامل از آن جدا شد (۶).

بررسی آلودگی میکروبی عصاره‌های انجیر و زیتون

از هر کدام از عصاره‌های انجیر و زیتون در محیط برین هارت آگار (Brain Heart Agar) (شرکت مرک، آلمان) کشت داده شد تا از عدم آلودگی میکروبی اطمینان حاصل شود.

تکثیر ویروس

برای تکثیر ویروس، ۱۰ عدد تخم‌مرغ جنین‌دار ۱۰ روزه از موسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه‌ی مرند تهیه شد. به منظور تأیید زنده بودن جنین‌ها، تعیین محدوده‌ی اتاقک هوایی و محل تلقیح وی‌روس، تخم مرغ‌ها کندل شدند. سپس محدوده‌ی تعیین شده ضدعفونی و محل تلقیح ویروس با سوزن استریل سوراخ شد. سپس به وسیله‌ی سرنگ انسولین۲۴ با زاویه ی ۴۵ تا ۶۰ درجه، به میزان ۰/۱ mL ویروس (A/Chicken/Iran/ZMT-101(101)/98(H9N2) داخل کیسه‌ی آلانتوئیك تلقیح شد.

غیرفعال‌سازی ویروس

برای غیرفعال کردن ویروس، از فرمالین استفاده شد. مایع آلانتوئیك حاوی ویروس زنده با فرمالین ۳۷٪ (شرکت مرك) به نسبت ۰/۱٪ غیر فعال شد. برای این کار ۵۰ mL از مایع آلانتوئیك حاوی ویروس زنده داخل یك ارلن ریخته و سپس ۵۰ µL فرمالین ۳۷٪ به آن اضافه شد. مخلوط حاصل به وسیله‌ی یك همزن مگنت دار به مدت ۴ ساعت در دمای آزمایشگاه به هم زده شد. قبل و بعد از غیر فعال کردن ویروس، آزمایش HA از مایع آلانتوئیك صورت گرفت. به منظور نگهداری، از ماده‌ی نگهدارنده‌ی تیمروسال به مقدار ۰/۰۱. درصد استفاده شد (۱۶)؛ سپس آنتی‌ژن غیر فعال به فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شد.

جهت تأیید غیرفعال‌شدن ویروس، از این مایع بدست آمده به تخم مرغ‌های جنین‌دار تلقیح شد. که برای این منظور به میزان ۰/۱ mL از ویروس غیرفعال شده به شش عدد تخم‌مرغ جنین‌دار نه روزه تلقیح شد؛ سپس به مدت شش روز داخل دستگاه جوجه‌کشی (با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۶۰٪) قرار داده شدند. هر روز تخم‌مرغ‌ها کندل شدند؛ بعد از گذشت شش روز، تخم‌مرغ‌ها به یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند تا مرگ جنینی رخ دهد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت مایع آلانتوئیك استحصال شد و آزمایش HA (Hemagglutination Assay) بر روی آن انجام گرفت. همزمان با این کار، ۰/۱ mL از ویروس غیرفعال نشده(قبل از افزودن فرمالین) در یك تخم‌مرغ جنین‌دار نه روزه به عنوان شاهد تلقیح شد و در دستگاه جوجه‌کشی قرار گرفت.

آزمایش HA: تیتر ویروس آنفلوانزای پرندگان تحت تیپ H9N2 در مایع آمنیوآلانتوئیک طبق روش توصیه شده انجام گرفت (۲۰).

آزمایش HI (Hemagglutination Inhibition): تعیین تیتر آنتی‌بادی نمونه‌های سرم علیه تحت تیپ H9N2 طبق روش توصیه شده انجام شد (۲۰).

تعیین EID50 (Egg Infection Dose 50): میزان EID50 ویروس با روش اسپیرمن-کاربر محاسبه شد (۱۴):

مخلوط کردن عصاره‌ها با ویروس غیرفعال

برای تهیه‌ی مخلوط‌ها، عصاره و ویروس غیر فعال هرکدام ۵۰٪ از کل مخلوط را تشکیل دادند. با توجه به اینکه برخی از ادجوانت‌ها با فرمول؛ ۸۹٪ ماده ی اصلی(عصاره)، ۱۰٪ ۸۰®Span و ۱٪ ۸۰®Tween تهیه می‌شوند، در این مطالعه نیز بر اساس همین فرمول مخلوط‌ها تهیه شدند. عمل مخلوط کردن با دستگاه هموژنایزر(IKA ULTRA-TURRAX® T 18 basic) استریل صورت گرفت.

مخلوط کردن عصاره‌ی هگزانی انجیر با ویروس غیر فعال

برای تهیه‌ی این مخلوط به میزان ۲/۷۵ میلی‌لیتر از عصاره‌ی هگزانی انجیر با ۲۷۵ µL Span®80 (شرکت مرک، آلمان) در یك لوله‌ی استریل ریخته، و مخلوط شدند (فاز روغنی). همچنین در یك لوله‌ی استریل دیگر به میزان ۲/۷۵ mL از ویروس غیرفعال با ۲۷/۵ µL Tween®80 (شرکت مرک، آلمان) ریخته و مخلوط شدند(فاز آبی). جهت تهیه امولسیون، فاز روغنی در کنار حمام یخ به وسیله‌ی هموژنایزر(IKA ULTRA-TURRAX® T 18 basic) با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ ثانیه بهم زده شد و سپس فاز آبی به آرامی به فاز روغنی اضافه گردید؛ که در طول این زمان سرعت هموژنایزر به ۷۰۰۰ دور در دقیقه رسانده شد. پس از اضافه

کردن کامل فاز آبی، سرعت به ۹۰۰۰ دور در دقیقه افزایش داده شد و در مدت ۳۰ ثانیه کل مخلوط هموژنیزه گردید. بطور کلی مدت زمان تهیه امولسیون دو دقیقه طول کشید.

مخلوط کردن عصاره‌ی هگزانی زیتون با ویروس غیرفعال

برای تهیه‌ی این مخلوط به میزان ۲/۷۵ میلی لیتر از عصاره‌ی هگزانی زیتون با ۲۷۵ µL Span®80 (شرکت مرک، آلمان) در یك لوله‌ی استریل ریخته، و مخلوط شدند (فاز روغنی). همچنین در یك لوله‌ی استریل دیگر به میزان ۲/۷۵ mL از ویروس غیر فعال با ۲۷/۵ µL Tween®80 (شرکت مرک، آلمان)، ریخته و مخلوط شد(فاز آبی). جهت تهیه امولسیون همانند روش تهیه امولسیون عصاره‌ی انجیر و ویروس غیر فعال، عمل شد.

مخلوط PBS و ویروس غیرفعال

برای این منظور ۲/۵ mL ویروس غیر فعال با ۲/۵ mL محلول PBS استریل در داخل یک لوله آزمایش استریل ریخته و با حرکات دست مخلوط شد.

کشت میکروبی از مخلوط‌ها و امولسیون‌های تهیه شده

به منظور تعیین وجود و یا عدم وجود آلودگی، از مخلوط‌ها و امولسیون‌های تهیه شده، در محیط‌های کشت مغذی کشت داده شد. تمامی مخلوط‌ها و امولسیون‌های تهیه شده تا روز واکسیناسیون در داخل فالکون تیوب‌های استریل در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

آزمایش بیولوژیکی بر روی جوجه‌ها

۵۰ قطعه جوجه‌ی گوشتی یکروزه، سویه‌ی گوشتی کاب ۵۰۰ خریداری شد. جوجه‌ها به صورت کاملا تصادفی به پنج گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند؛ که گروه‌ها شامل:

گروه A: گروهی که مخلوط عصاره‌ی انجیر و ویروس غیرفعال را دریافت کردند.

گروه B: گروهی که مخلوط عصاره‌ی زیتون و ویروس غیر فعال را دریافت کردند.

گروه C: گروهی که مخلوط PBS و ویروس غیر فعال را دریافت کردند.

گروه D: گروهی که واکسن تجاری (ساخت موسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه مرند) را دریافت کردند.

گروه E: گروهی که هیچ ماده‌ای دریافت نکرد (گروه شاهد).

پرورش جوجه ها در داخل قفس با شرایط یکسان صورت گرفت و تغذیه نیز به صورت آزاد در اختیار پرنده‌ها قرار گرفت؛ نوردهی به صورت ۲۴ ساعته بود؛ و برنامه واکسیناسیون طبق جدول ۱ انجام شد.

واکسن تجاری، امولسیون‌ها و مخلوط‌های تهیه شده، در ۱۳ روزگی، از ناحیه پشتی گردن به صورت زیر جلدی تزریق شد. گروهA) mL ۰/۵ برای هر قطعه جوجه، گروهB) mL ۰/۵ برای هر قطعه جوجه، گروهC) mL ۰/۵ برای هر قطعه جوجه و گروهD) mL ۰/۲ برای هر قطعه جوجه. در تمام گروه‌ها (به غیر از گروه D) با هر بار تزریق mL ۰/۲۵ آنتی‌ژن غیر فعال (۷=HA) وارد بدن پرنده شد.

پس از واکسیناسیون، هر هفته از جوجه‌ها خون‌گیری شد و در هر بار خون‌گیری، آزمایش HI بر روی نمونه‌های سرمی بدست آمده انجام گرفت.

برای چالش جوجه ها با ویروس، مایع آلانتوئیك حاوی ویروس زنده (۸=HA) با محیط کشت BHB به میزان یک به ۱۰ رقیق شد و ۲۱ روز پس از واکسیناسیون از این مایع آلانتوئیك رقیق شده به میزان mL ۰/۱ به صورت قطره‌ی چشمی، به هر جوجه داده شد. سویه‌ی ویروس چالش داده شده با سویه‌ی به کار رفته در مخلوط‌ها و امولسیون‌ها یکسان بود.

برای ارزیابی چالش، دو هفته پس از چالش، از جوجه‌ها خون‌گیری به عمل آمد و نمونه‌های سرمی جدا و آزمایش HI بر روی نمونه‌ها صورت گرفت و پاسخ آنامنستیك نیز مورد بررسی قرار گرفت؛ به این معنی که در صورتی که دو هفته بعد از چالش، تیتر آنتی بادی علیه ویروس چهار برابر و یا بیشتر شود، نشان دهنده عدم خاصیت حفاظتی واکسن علیه عفونت می‌باشد (۱۶). میزان ابتلا، مرگ و میر و علایم بالینی جوجه‌ها

جدول ۱- برنامه‌ی واکسیناسیون جوجه‌های مورد مطالعه با واکسن‌های مرسوم

سن جوجه	نوع واکسن	راه تجویز
چهار روزگی	H120 برونشیت	آشامیدنی
هشت روزگی	(B1) نیوکاسل	آشامیدنی
۱۳ روزگی	آنفلوانزا	تزریق زیرجلدی
۱۸ روزگی	(La sota) نیوکاسل	آشامیدنی
۲۱ روزگی	H120 برونشیت	آشامیدنی

تا دو هفته پس از چالش به صورت روزانه ثبت شد. خوابیدن جوجه‌ها بر روی سینه و عدم تمایل به بلند شدن، علایم تنفسی مانند دیسترس تنفسی، عطسه، رال های تنفسی، ترشحات از چشم و بینی، پرهای ژولیده و التهاب ملتحمه چشم (کانجکتیویت) به عنوان علائم بالینی بیماری در نظر گرفته شدند.

نتایج

میانگین نتایج آزمایش مهار هماگلوتیناسیون در گروه‌های مختلف مورد مطالعه به روش آنالیز واریانس یکطرفه و روش تکمیلی دانکن مورد آنالیز و مقایسه قرار گرفت. برای این منظور از نرم‌افزار SPSS، ورژن ۲۲ استفاده شد.

نتایج

میزان EID50 ویروس H9N2

میزان EID50 ویروس برابر با $10^{6,16}$ در هر mL شد.

غیر فعال سازی ویروس

همه‌ی تخم مرغ‌های جنین داری که ویروس غیر فعال به آنها تلقیح شده بود، تا روز ششم زنده ماندند؛ آزمایش HA نیز بر روی هرکدام صورت گرفت که عدم حضور ویروس زنده را تأیید کرد.

بررسی آلودگی میکروبی عصاره‌ها

تمام عصاره‌های انجیر و زیتون که در محیط‌های مغذی کشت داده شده بودند؛ از لحاظ آلودگی میکروبی منفی بودند.

نتایج آزمایش HI

در جدول ۲ میانگین نتایج آزمایش HI روی نمونه‌های سرمی نشان داده شده است. میانگین عیار آنتی بادی گروه‌های مختلف درمانی و کنترل، دو هفته پس از واکسیناسیون به استثناء گروهی که واکسن تجاری دریافت کرده بود (D) صفر شد، که از آنالیز آماری بین گروه واکسینه با واکسن تجاری و سایر گروه‌ها اختلاف معنی‌دار شد (P=۰/۰۰۰). در ۳ هفته بعد از واکسیناسیون کمترین و بیشترین میانگین آزمایش HI به ترتیب به گروه شاهد (E) و گروه واکسینه با واکسن تجاری تعلق داشت، و از نظر آماری بین گروه D و سایر گروه‌ها، و بین گروه A و گروه D و E اختلاف معنی‌دار شد (P=۰/۰۰۰). در دو هفته بعد از چالش، کمترین میانگین آزمایش مهار هماگلوتیناسیون به گروه B و E و بیشترین آن به گروه D تعلق داشت و از نظر آماری بین گروه D و گروه‌های B، C و E اختلاف معنی‌دار شد (P=۰/۰۰۶).

علایم بالینی جوجه‌ها پس از چالش با ویروس

پس از چالش جوجه‌ها با ویروس زنده در سن ۳۴ روزگی، به مدت دو

جدول ۲- میانگین نتایج آزمایش مهار هماگلوتیناسیون (HI) ± خطای استاندارد، بر روی نمونه های سرمی جوجه-های مورد مطالعه

روزهای خون گیری گروه ها	۱۳ روزگی (روز واکسیناسیون)	۲۷ روزگی (دو هفته پس از واکسیناسیون)	۳۴ روزگی (سه هفته پس از واکسیناسیون و قبل از چالش)	۴۸ روزگی (دو هفته پس از چالش)
گروه A	۱/۵	a ۰	b ۰/۷ ± ۰/۰۸	ab ۶/۵ ± ۰/۱۷
گروه B	۱/۵	a ۰	ab ۰/۵ ± ۰/۱۱	a ۵/۹ ± ۰/۲۸
گروه C	۱/۵	a ۰	ab ۰/۴ ± ۰/۱۰	a ۶ ± ۰/۱۵
گروه D	۱/۵	b ۲/۸ ± ۰/۱۱	c ۳/۷ ± ۰/۳۷	b ۶/۸ ± ۰/۱۳
گروه E	۱/۵	a ۰	a ۰/۱ ± ۰/۰۷	a ۵/۹ ± ۰/۲۳

گروه A : گروهی که مخلوط عصاره‌ی انجیر و ویروس غیر فعال را دریافت کردند.

گروه B : گروهی که مخلوط عصاره‌ی زیتون و ویروس غیر فعال را دریافت کردند.

گروه C : گروهی که مخلوط PBS و ویروس غیر فعال را دریافت کردند.

گروه D : گروهی که واکسن تجاری (ساخت موسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه مرند) را دریافت کردند.

گروه E : گروهی که هیچ ماده‌ای دریافت نکرد (گروه شاهد).

اعدادی که در هر ستون با حروف غیر مشترک نشان داده شده‌اند، دارای اختلاف آماری معنی‌دار (P<۰/۰۵) می‌باشند.

هفته، هر روز علایم بالینی ثبت شد؛ علایم بالینی به صورت کاهش اشتها، ترشحات منخرینی، التهاب ملتحمه چشم، پرهای پف کرده، اسهال، تنفس دهانی، رال تنفسی و زمین‌گیری مشاهده شد. در همه‌ی گروه‌ها علایم بالینی از یك روز پس از چالش به تدریج شروع شد و در روزهای چهارم و پنجم به اوج خود رسید و پس از آن علایم کم کم رو به بهبودی یافت؛ تا اینکه در روز نهم به بعد علایم تقریباً به صورت کامل از بین رفت. با این تفاوت که شدت علایم ثبت شده در گروه‌های مختلف به صورت زیر بود:

گروه E > گروه C > گروه B > گروه A > گروه D

بحث

واکسن‌ها یک علاج کلی برای کنترل آنفلوانزای پرندگان نیستند، اما به عنوان یک ابزار برای استفاده در برنامه کنترلی وسیع مطرح هستند (۱۸). از آنجا که امکان دارد ریشه کنی آنفلوانزای طیور در ایران بسیار هزینه بر و ناموفق باشد، لذا واکسیناسیون علیه H9N2 می‌تواند به عنوان یک راه چاره و کنترل مطرح باشد (۳) و می‌توان انتظار داشت که انجام واکسیناسیون، دفع ویروس، انتقال آن و شدت نشانه‌های درمانگاهی را کاهش دهد (۱۵). از طرفی ادجوانت‌های مناسب برای یک واکسیناسیون کار آمد علیه آنفلوانزای پرندگان لازم و ضروری می‌باشد.

در حال حاضر روغن‌هایی که در واکسن‌های تجاری بعنوان ادجوانت استفاده می‌شوند روغن‌های معدنی هستند و این روغن‌ها اغلب با رهاسازی تدریجی آنتی‌ژن واکسن عمل می‌کنند و نقشی در ایمنی‌زایی ندارند و در عین حال مضراتی مانند باقی‌ماندن در بافت‌ها که ممکن است باعث واکنش‌های شدید بافتی شود، امکان سرطان‌زایی و زمان بری طولانی جهت جذب (۴۲ روز) دارند (۱۷). لذا محققان در تلاش هستند روغن‌های گیاهی را که قابل سوخت و ساز بوده و مضرات فوق را ندارند جایگزین روغن‌های معدنی در واکسن‌ها نمایند. با در نظر گرفتن آنچه که گفته شد، در این مطالعه تاثیر جداگانه عصاره‌های انجیر و زیتون بر ایمنی‌زایی ویروس غیر فعال آنفلوانزای پرندگان تحت تیپ H9N2 مورد بررسی قرار گرفت.

استون در سال ۱۹۸۶ نشان داد که پاسخ آنامنستیک به عنوان شاخصی از عفونت می‌باشد بطوری‌که ممکن است در پرنده‌ای پاسخ آنامنستیک رخ بدهد ولی جداسازی ویروس از آن پرنده منفی باشد فلذا استفاده از روش پاسخ آنامنستیک حساس‌تر و قابل قبول‌تر از روش جداسازی ویروس خواهد بود. همچنین این دانشمند نشان داد که ممکن است واکسنی مانع از ابتلا و مرگ ومیر گردد ولی نتواند مانع پاسخ آنامنستیک شود و این یعنی عدم مقاومت پرنده در برابر عفونت و نیز نشان از دفع ویروس می‌باشد، بنابراین به نظر می‌رسد که پاسخ آنامنستیک در پی چالش پرنده با ویروس، یک پارامتر نهایی در سنجش کارایی واکسن باشد (۱۶). در سال ۱۹۹۶ گارسیا و همکاران (۵) در طی مطالعه‌ای نشان دادند که فقدان پاسخ آنامنستیک دال بر محدود شدن تکثیر ویروس در پرنده‌های چالش داده شده با ویروس می‌باشد و نشان می‌دهد که واکسن در کاهش دادن سطح ویروس موثر بوده است. همچنین این دانشمندان نشان دادند که مقدار دز آنتی‌ژنی که برای جلوگیری از نشانه‌های بیماری نیاز است، کمتر از آن مقدار دزی است که مانع پاسخ آنامنستیک می‌شود. با نظر به آنچه که گفته شد، در مطالعه حاضر جهت ارزیابی واکسن و امولسیون‌های تهیه شده، پاسخ آنامنستیک مورد ارزیابی قرار گرفت.

در این مطالعه، گروه A دارای میانگین تیتر HI ۷/. بود که این مقدار، دو هفته پس از چالش به ۶/۵ افزایش یافت (تقریباً نه برابر بیشتر) و این نشاندهنده‌ی پاسخ آنامنستیک بوده و افزایش بیش از چهار برابر، در تیتر آنتی‌بادی رخ داده است؛ که می‌توان نتیجه گرفت این ترکیب و فرمولاسیون، مانع از عفونت پرنده‌ها نشده است. در گروه‌های B و C هم میانگین تیتر آنتی‌بادی به ترتیب از ۵/. به ۵/۹ (تقریباً ۱۲ برابر بیشتر) و از ۴/. به شش (۱۵ برابر بیشتر) افزایش یافت که باز نشانگر عدم حفظ پرنده‌ها از عفونت می‌باشد. در این میان گروه شاهد که هیچ واکسنی دریافت نکرده بود، تیتر آنتی بادی آن از ۱/. به ۵/۹ (۵۹ برابر) افزایش یافت. در حالی‌که واکسن تجاری به طور مطلوبی توانست که مانع از پاسخ آنامنستیک گردد، به طوری که تیتر آنتی‌بادی از ۳/۷ به ۶/۸ (تقریباً ۱/۸ برابر) افزایش یافت. در این مطالعه مشخص شد مخلوط حاوی عصاره‌ی انجیر نسبت به مخلوط حاوی عصاره‌ی زیتون و مخلوط محتوی PBS، بهتر عمل کرده. با این وجود در مقایسه با واکسن تجاری تاثیر این عصاره‌ها بخصوص عصاره‌ی زیتون قابل چشم پوشی است.

مشخص شده است که ادجوانت‌های گیاهی موجب افزایش کارایی واکسن‌ها می‌شود (۱۳). فوشی‌کو آن و همکاران (۷) نشان دادند که عصاره گیاهان جنسنگ (Ginseng) و مریم گلی (Salviae) به عنوان ادجوانت‌های مخاطی علیه ویروس آنفلوانزا و نیز تعدیل‌کنندگان ایمنی در طی عفونت آنفلوانزا نقش دارند. استون طی تحقیقی نشان داد که روغن گیاهی بادام زمینی در فرمولاسیون واکسن آنفلوانزا موجب حفظ پرنده‌ها در برابر ابتلا و مرگ ومیر به هنگام چالش با ویروس آنفلوانزای پرندگان می‌شود؛ علاوه بر این، واکنش بافتی حاصل از تزریق واکسن‌های حاوی روغن گیاهی و حیوانی کمتر از واکسن‌های حاوی روغن معدنی بود (۱۷).

لیانجو و همکاران (۲۳) نشان دادند که عصاره‌های غیرسمی انجیر موجب ارتقای سیستم ایمنی در بدن موش‌ها می‌شود. جیونگ و همکاران در یک بررسی وجود فیتواسترول‌های موجود در انجیر خوراکی را نشان دادند (۸) و اوگستر و همکاران (۴) هم در سال ۱۹۹۷ کارایی ضدویروسی فیتواسترول‌ها را علیه ویروس‌هایی مثل HIV-1، سیتومگالوویروس انسانی و هرپس سیمپلکس ویروس نشان دادند. فیتواسترول‌ها بدلیل ویژگی غیرقطبی بودنشان، جزو محتویات عصاره‌ی هگزانی است. با وجود خاصیت روغنی عصاره هگزانی که یک خاصیت مطلوبی در تهیه ادجوانت به حساب می‌آید ولی احتمال داده می‌شود که اثر منفی فیتواسترول‌های موجود در عصاره هگزانی بر روی ویروس، مانع از ایجاد تیتر مطلوب در گروه‌های مورد مطالعه شده است.

ویزیولی و همکاران (۲۲) خاصیت ضد التهابی مربوط به پلی‌فنل‌های روغن زیتون را در از بین بردن رادیکال‌های آزاد نشان دادند و ازسوی دیگر آندری کوپولوس و همکاران (۲) خاصیت آنتی‌اکسیدانی را در ترکیبات پلی‌فنلی و غیر پلی‌فنلی زیتون نشان دادند. هیدروکسی تیروزول یکی از مهم ترین ترکیبات پلی‌فنلی موجود در زیتون می‌باشد و مقدار آن در زیتون، بیش از سایر ترکیبات پلی‌فنلی زیتون است (۹). یامادا و همکاران (۲۵) در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که هیدروکسی تیروزول می‌تواند بر روی پوشش ویروس H9N2 اثر گذاشته و باعث تخریب

ساختار و تغییر شکل این ویروس شده و موجب کاهش تیتر ویروس شود، بطوری‌که دیگر محل قرارگرفتن هماگلوتینین ویروس بر روی سطح ویروس منحصر نمی‌شود. اسید اولئیک (C18:1) یک اسید چرب غیر اشباع مهم در روغن زیتون می‌باشد (۱۰)، و از طرفی ویلش و همکاران (۲۴) در سال ۱۹۷۸ نشان دادند که اسید اولئیک موجود در شیر انسان اثر ضدویروسی علیه ویروس پوشش دار Semliki forest virus دارد. با توجه به تحقیقات صورت گرفته ترکیبات پلی‌فنلی و اسید اولئیک موجود در زیتون و انجیر از عواملی هستند که بر ویروس‌ها اثر منفی گذاشته‌اند؛ علاوه بر این‌ها، ترکیب فیسین موجود در انجیر که خاصیت پروتئولیتیکی دارد تأثیر منفی بیشتری بر ویروس گذاشته است. به عبارتی این چنین می‌توان گفت که شاید اثر منفی و نامطلوب ترکیبات آنتی‌اکسیدانی(مثل ترکیبات پلی فنلی) بر روی آنتی‌ژن‌های سطحی ویروس غیرفعال، بیش از اثر مثبت این ترکیبات بر روی سیستم ایمنی بدن بوده است و همچنین اسیدهای چرب موجود در این نوع عصاره با اثر منفی بر روی ویروس، مانع از ایجاد تیتر مطلوب در گروه‌های مورد آزمایش شده است.

نتیجه‌گیری کلی

در نهایت اینکه انجیر و زیتون، هرکدام تک تک به طریقی در سیستم ایمنی بدن نقش دارند، ولی نتایجی که از این مطالعه بدست آمد نشان داد که مخلوط هرکدام از این عصاره‌ها با ویروس غیرفعال H9N2، گرچه تا حدودی در پرنده، علیه ویروس آنفلوانزای H9N2 ایمنی ایجاد کردند، ولی مانع از عفونت و پاسخ آنامنستیک نشدند، در حالیکه واکسن تجاری بخوبی توانست مانع از پاسخ آنامنستیک شود.

تشکر و قدردانی

از معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگاه تبریز به خاطر تامین اعتبار تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع مورد استفاده

1. Aguilar, J. C., and E. G. Rodriguez. 2007. Vaccine adjuvants revisited. *Vaccine* 19: 3752-3762.

2. Andrikopoulos, N. K., A. C. Kaliora, A. N. Assimopoulou and V. P. Papageorgiou. 2002. Inhibitory activity of minor polyphenolic and nonpolyphenolic constituents of olive oil against in vitro low-density lipoprotein oxidation. *Journal of medicinal food* 1: 1-7.

3. Bozorgmehri Fard, M. H., and M. Hashemzadeh. 2002. Efficacy of Inactivated H9N2 Avian Influenza Vaccine against Non-highly Pathogenic A/Chicken/Iran/ZMT-173/1999 Infection. *Archives of Razi Institute* 1: 23-32.

4. Eugster, C., G. Rivara, A. Biglino, R. Cavallo, P. Gioannini, B. Forno, M. Macario and A.M. Pollono. 1997. Phytosterol compounds having antiviral efficacy. *Panminerva medica* 1: 12-20.

5. Garcia, A., H. Johnson, D. K. Srivastava, D. A. Jayawardene, D. R. Wehr and R. G. Webster. 1998. Efficacy of inactivated H5N2 influenza vaccines against lethal A/Chicken/Queretaro/19/95 infection. *Avian diseases* 1: 248-256.

6. González-Trujano, M. E., L.Y. Hernández-Sánchez, V. Muñoz Ocotero, A. Dorazco-González, P.Guevara Fefer, and E. Aguirre-Hernández. 2017. Pharmacological evaluation of the anxiolytic-like effects of Lippia graveolens and bioactive compounds. *Pharmaceutical biology* 1: 1569-1576.

7. Quan, F. S., R. W. Compans, Y.K. Cho and S. M. Kang. 2007. Ginseng and Salviae herbs play a role as immune activators and modulate immune responses during influenza virus infection. *Vaccine* 2: 272-282.

8. Jeong, W. S. and P. A. Lachance. 2001. Phytosterols and fatty acids in fig (Ficus carica, var. Mission) fruit and tree components. *Journal of food science* 2: 278-281.

9. Kountouri, A. M., A. Mylona, A. C. Kaliora and N. K. Andrikopoulos. 2007. Bioavailability of the phenolic compounds of the fruits (drupes) of Olea europaea (olives): impact on plasma antioxidant status in humans. *Phytomedicine* 10: 659-667.

10. Menendez, J. A., L. Vellon, R. Colomer and R. Lupu. 2005. Oleic acid, the main monounsaturated fatty acid of olive oil, suppresses her-2/neu (erb b-2) expression and synergistically enhances the growth inhibitory effects of trastuzumab (herceptin™) in breast cancer cells with her-2/neu oncogene amplification. *Annals of oncology* 3: 359-371.

11. Najjari, A. H. A., Z. Rajabi, M. V. Marandi and G. Dehghan. 2015. The effect of the hexanic extracts of fig (Ficus carica) and olive (Olea europaea) fruit and nanoparticles of selenium on the immunogenicity of the inactivated avian influenza virus subtype H9N2. *Veterinary Research Forum* 3: 227-231.

12. Peiris, M., K. Y. Yuen, C. W. Leung, K. H. Chan, P. L. S. Ip, R. W. M. Lai, W. K. Orr and K. F. Shortridge. 1999. Human infection with influenza H9N2. *The Lancet* 9182: 916-917.

13. Sakure, S., V. D. Negi, S. K. Mitra, K. S. Nandakumar and D. Chakravortty. 2008. Vaccine with herbal adjuvant-A better cocktail to combat the infection. *Vaccine* 25: 3387-3388.

14. Ramakrishnan, M.A. 2016. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World Journal of Virology* 2: 85.

15.Spickler, A. R., D. W. Trampel, and J. A. Roth. 2008. The onset of virus shedding and clinical signs in chickens infected with high-pathogenicity and low-pathogenicity avian influenza viruses. *Avian Pathology* 6: 555-577.

16. Stone, H. D. 1987. Efficacy of avian influenza oil-emulsion vaccines in chickens of various ages. *Avian Diseases* 1: 483-490.

17. Stone, H. D. 1993. Efficacy of experimental animal and vegetable oil-emulsion vaccines for Newcastle disease and avian influenza. *Avian Diseases* 1: 399-405.

18. Swayne, D. E. and D. Kapczynski. 2008. Strategies and chal-

lenges for eliciting immunity against avian influenza virus in birds. *Immunological Reviews* 1: 314-331.

19. Swayne, D. E., D. L.Suarez and L. D. Sims. 2013. Influenza. pp. 180-206, In: D. E. Swayne, J. R. Glisson, L. R. McDougald, L. K. Nolan, D. L. Suarez, and V. L. Nair. (eds), Diseases of poultry (13th). John Wiley & Sons. Hoboken, New Jersey.

20. Swayne, D. E., D. A., Senne, D. L. Suarez. 2008. Avian Influenza. pp.128-134, In: L. Dufour-Zavala, D. E. Swayne, J. R. Glisson, J. E. Pearson, W. M. Reed, M. W. Jackwood, and P. R. Woolcock. (eds), A laboratory manual for the isolation, identification, and characterization of avian pathogens (5th). American Association of Avian Pathologists, Athens, GA.

21. Vasfi Marandi, M. and M. H. Bozorgmehri Fard. 2002. Isolation of H9N2 subtype of avian influenza viruses during an outbreak in chickens in Iran. *Iranian Biomedical Journal* 1: 13-17.

22. Visioli, F., G. Bellomo and C. Galli. 1998. Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1: 60-64.

23. Wang, L., W. Jiang, K. Ma, Z. Ling, and Y. Wang. 2003. Production and Research of Fig (Ficus carica L.) in China. *Acta Horticultura*e 1: 191-196.

24. Welsh, J. K., I. J. Skurrie and J. T. May. 1978. Use of Semliki forest virus to identify lipid-mediated antiviral activity and anti-alphavirus immunoglobulin A in human milk. *Infection and Immunity* 2: 395-401.

25. Yamada, K., H. Ogawa, A. Hara, Y. Yoshida, Y. Yonezawa, K. Karibe, V. B. Nghia, H. Yoshimura, Y. Yamamoto, M. Yamada and K. Nakamura. 2009. Mechanism of the antiviral effect of hydroxytyrosol on influenza virus appears to involve morphological change of the virus. *Antiviral Research* 1: 35-44.