گزارش نهایی پژوهش

بررسی ایمنی زایی واکسنهای کشته آنفلوانزای طیور مورد مصرف در گله H5 های پولت تخمگذار تجاری استان تهران در نیمه اول سال ۱۳۹۹

مجریان طرح :

دکتر وحید کریمی

ومرحوم دکتر مهدی وصفی مرندی

گروه بهداشت و بیماریهای پرندگان

دانشکده دامپزشکی تهران

عنوان پژوهش:

بررسی ایمنی زایی واکسنهای کشته H5 آنفلوانزای طیورمورد مصرف در گله های پولت تخمگذار تجاری استان تهران در نیمه اول سال ۱۳۹۹

مقدمه :

آنفلوآنزای طیور (AI) یکی از مهمترین بیماریها و مشکلات صنعت پرورش طیور در ایران در سالهای اخیر بوده و در بیشتر کشورها علاوه بر اینکه خسارات سنگین اقتصادی که به صنعت طیور کشور از طریق هزینه های ریشه کنی و پیشگیری، و غیره تحمیل می کند، می تواند به انسان نیز منتقل شده و بیماری جدی و مرگ باری را ایجاد نماید.ویروس آنفلوانزا به واسطه پروتئین های داخلی M1 و NA به ۵ جنس شاملA, B, C, Thogotovirus, Isavirusتقسیم می شوند. ویروس های آنفلوانزای پرندگان (AIV) جنس آنفلوانزایA، بعنوان تنها ویروس آلوده کننده پرندگان شناخته می شوند. ویروس های جنس (تیپ) A آنفلوانزا را، براساس خصوصیات آنتی ژنی گلیکوپروتئین های سطحی هماگلوتینین (HA) و نورامینیداز (NA) به ۱۶ تحت تیپ HA (H1-H16) و ۹ تحت تیپ NA (N1-N9) طبقه بندی می کنند.

هر ویروس، دارای یک آنتی ژن HA و NA در هر یک از تحت تیپ های ترکیبی می باشد کلیه تحت تیپ های آنفلوانزای A در اغلب ترکیبات ممکن، از گونه های مختلف پرندگان بخصوص پرندگان آبزی جدا شده است. بر اساس ویژگی بیماریزایی یا پاتوتیپ، ویروس آنفلوانزای طیور به دو گروه شامل آنفلونزای طیور با حدّت بالا[1] (HPAI) و آنفلوانزای طیور با حدّت پایین[2] (LPAI) تقسیم بندی می گردند. پاتوتیپ HPAIبیماری شدید با تلفات بالا و پاتوتیپ LPAI، عفونت بدون علامت و یا بیماری ملایم در طیور ایجاد می کند. تاکنون، تنها تحت تیپ های H5 و H7 آنفلوانزای بعنوان سویه های با حدّت بالا (HPAI) در پرندگان شناسایی شده اند و این تحت تیپ ها در گونه های حساس، بیماری بسیار حاد همراه با تلفات بالا ایجاد می کنند. تمام ویروس های H5 وH7 بسیار بیماریزا نیستند و ممکن است پاتوتیپ آنها از نوعLPAI باشد.

وضعیت بیماری در جهان :

تاکنون سه همه گیری جهانی انسانی از ویروس آنفلوآنزای تیپ A ثبت گزارش شده است، این همه گیری ها در سالهای ۱۹۱۸، ۱۹۵۷ و ۱۹۶۸ رخ داده اند و مجموعاً باعث تلفات انسانی حدود ۶۰ -۴۰ میلیون نفر در سراسر جهان شده اند. تاریخچه ویروس های آنفلوآنزای پرندگان را می توان به چهار دوره تقسیم نمود:

۱- گزارش های اولیه از آنفلوانزای طیور با حدّت بالا (HPAI)
۲- شناسایی ویروس های آنفلوانزاهای کم حدّت (LPAI) در پرندگان اهلی
۳- جداسازی ویروس های آنفلوانزا از پرندگان وحشی بظاهر سالم (مخزن)
۴- گسترش آنفلوانزا با حدّت بالا بخصوص تحت تیپ H5N1 یا H5NX از سال ۱۹۹۸ تاکنون

[1] HPAI- Highly Pathogenic Avian Influenza
[2] LPAI - Low Pathogenic Avian Influenza

ویروس های آنفلوانزای طیور با حدّت بالایی که امروزه در آسیا بصورت همه گیر در آمده اند، نتاج ویروس هایی محسوب می شوند که در سال ۱۹۹۶ (۱۳۷۵ هجری شمسی) از غازهای بیمار در استان گوانگ دونگ چین جدا شدند (A/Goose/Guangdong/1/96). واگیری H5N1 در هنگ کنگ (۱۹۹۷) اولین مورد شناخته شده ای بود که یک ویروس اختصاصی پرندگان، در انسان بیماری جدی و مرگبار ایجاد کرد (مرگ ۶ انسان مورد تایید قرار گرفت). با وجود همه اقدامات پیش گیرانه، همه گیری فعلی H5N1 که از سال ۲۰۰۳ (۱۳۸۲ شمسی) آغاز شده است از نظر میزان و گستردگی جغرافیایی بی نظیر بوده است. این ویروس در حال حاضر در سه قاره اروپا، آفریقا و آسیا وجود داشته و علاوه بر خسارات سنگین اقتصادی که به صنعت طیور این کشورها تحمیل نموده توانسته به انسان نیز منتقل شده و باعث مرگ و میر مبتلایان (تلفات بیش از ۶۰٪در افراد مبتلا) شود.

وضعیت بیماری در ایران :

در بررسی هایی که در ایران انجام گرفته است، از زمان همه گیری آنفلوانزا در سال ۱۳۷۷، تحت تیپ H9N2 بعنوان تحت تیپ غالب در ایران محسوب می شود با این وجود گزارشهایی از جداسازی H5N1 در استان های مختلف ایران وجود دارد، این جدایه ها از اردک ها و مرغان بومی جدا شده اند. در سال ۱۹۹۷ درگیری آنفلوانزای فوق حاد پرندگان سویه H5N1 در هنگ کنگ به OIE گزارش گردیده است .از آن زمان به بعد ویروس آنفلوانزا به کشورهای دیگر جنوب شرقی آسیا، افریقا و اروپا گسترش پیدا کرده است.

در ایران اولین موردگزارش وقوع بیماری ناشی از ویروس آنفلوانزای فوق حاد پرندگان در تلفات قوهای مهاجر در مرداب انزلی در بهمن ماه سال ۱۳۸۴ گزارش گردید که پس از نمونه برداری و انجام آزمایشات، درگیری با ویروس تحت تیپ H5N1 ناشی از مهاجرت پرندگان مهاجر از مناطق آلوده در جنوب شرقی آسیا تائید گردید. اولین مورد درگیری در طیور اهلی مربوط به گزارش وقوع تلفات در پرندگان بومی در روستای انزها در شهرستان فیروزکوه استان تهران در اسفندماه ۱۳۸۴ بوده است و اقدامات لازم در جهت مهار بیماری از طریق اعمال ضوابط قرنطینه ای در حمل و نقل ، بیماری یابی و حذف پرندگان حساس در روستای مذکور انجام گردید.با وجود اقدامات فوری انجام شده ، در اواسط فروردین ماه ۱۳۸۵ اولین گزارش وقوع بیماری در طیور صنعتی در یک مزرعه تخمگذار تجاری در شهرستان نظرآباد گزارش گردیدکه با دخالت گروههای ضربت و اقدامات قرنطینه ای و بهداشتی و معدوم سازی سعی در کنترل و پیشگیری بیماری به عمل آمد، لیکن به دلیل ماهیت مسری بودن بیماری و عدم شناخت کافی و آمادگی لازم در پیشگیری از بیماری، این بیماری به سرعت در استان تهران و نهایتا در کل کشور گسترش پیدا کرده و موجب بروز خسارات سنگین اقتصادی به صنعت طیور گردید .با توجه به اتخاذ سیاست حذف و معدوم سازی (Stamping Out) در برنامه کلان مبارزه با بیماری توسط تصمیم گیران کشور ، متاسفانه به دلیل ساختار ناکامل صنعت طیور کشور ، ضعف برنامه ای و لجستیکی در سازمانهای مسئول مبارزه با بیماری ، عدم کفایت اعتبارات مورد نیاز ، خلاء قوانین و مقررات موثر، عدم آشنایی و عدم همکاری صاحبان مزارع پرورشی و سایر موارد با ۵ اپیدمی در سالهای ۸۵، ۸۶، ۸۹، ۹۵ و ۹۶ با تحت تیپهای H5N1 و H5N8 در مزارع پرورشی (عمدتا طیور تخمگذار)مواجه گردید که منجر به بروز تلفات سنگین و خسارات اقتصادی ناشی از حذف و معدوم سازی گله های آلوده، کاهش تولید تخم مرغ و افزایش قیمت تخم مرغ، رکود و بیکاری فعالان بخش طیور، صرف اعتبارات ملی جهت

پشتیبانی، تجهیز سازمانهای عملیاتی و پرداخت غرامت به زیان دیدگان و جبران کمبود تخم مرغ و همچنین مشکلات بهداشتی برای جمعیت در معرض خطر گردید.

نخستین مورد حضور تحت تیپ H5N8 در ایران در سال ۱۳۹۵ از یک مزرعه پرورش تخمگذار در منطقه امیرآباد شهرستان ملارد در استان تهران گزارش گردید و به دنبال آن ویروس در بیشتر استانهای کشور مورد شناسایی قرار گرفت. در بررسیهای اولیه انجام شده قرابت ژنتیکی نزدیکی بین این ویروس و ویروس های منطقه مغولستان و روسیه گزارش شده است. علیرغم تمام اقدامات انجام شده در جهت ریشه کنی بیماری متاسفانه اقدامات بطور کامل موثر واقع نگردیدند و مجددا در سال ۹۶ همه گیری جدیدی با همان تحت تیپ ولی با گستردگی بیشتر در بیش از بیست استان کشور به وقوع پیوست و صنعت طیور کشور را به شدت تحت تاثیر قرار داد. با توجه به داده های حاصل از پایش فعّال و غیرفعّال انجام گرفته در بازه زمانی شهریور ماه ۱۳۹۵ تا مهرسال ۱۳۹۶ بیش از ۷۰۰ کانون بیماری در کشور (عمدتا در طیور تخمگذار)، روستاها و حیات وحش گزارش گردیدند.

استراتژی های مقابله با بیماری آنفلوانزای فوق حاد پرندگان

مطابق با دستورالعملها و توصیه های سازمانهای بین المللی مسئول مبارزه با بیماری مانند OIE و WHO برحسب شرایط اقلیمی ، امکانات و توان اقتصادی و لجستیکی، وضعیت بخشهای مختلف صنعت طیور و همچنین وضعیت اقتصادی و اجتماعی کشورهای درگیر ، استراتژی های مقابله با بیماری به شرح ذیل تقسیم بندی شده اند:

۱- برنامه حذف و معدوم سازی (Stamping Out) بدون استفاده از واکسن

در این برنامه با توجه به شرایط جغرافیایی و توان اقتصادی کشور و نیز امکانات و پرسنل دستگاه های مسئول کنترل و مبارزه با بیماری، به منظور جلوگیری از انتشار و بومی شدن ویروس عامل بیماری با اجرای برنامه های مراقبت و نظارت قوی، رعایت ضوابط و مقررات قرنطینه ای حمل و نقل طیور و فرآورده های آن در داخل و یا به خارج از کشور و امکان استقرار برنامه هشدار سریع در زمان وقوع بیماری نسبت به شناسایی سریع کانون ها و جمع آوری و دفن بهداشتی تلفات و باقیمانده گله با روشهای بهداشتی در محل اقدام نموده و سریعا نسبت به تعیین شعاع مناطق آلوده (Infection Zone) ، منطقه حفاظتی (Protection Zone)ومنطقه تحت مراقبت (Buffer Zone) در اطراف کانون بیماری اقدام می نمایند. این شعاع ها بسته به شرایط و وضعیت جغرافیایی از ۳ تا ۱۰ کیلومتر متغیر میباشند. در این برنامه استفاده از واکسن ممنوع بوده و روشهای تشخیصی بر مبنای عدم حضور آنتی بادی به غیر از درگیری طبیعی در سرم پرندگان می باشد. به منظور کاهش حداکثری احتمال گردش ویروس ، بیشتر کشورها اقدام به تخلیه جمعیت طیور حساس (Depopulation) در شعاع حفاظتی با پرداخت غرامت به صاحبان گله های حذف شده می نمایند. عمده کشورهای اروپایی ، امریکای شمالی و بعضی از کشورهای آسیایی (مانند ژاپن) از این سیاست پیروی می کنند.

۲- برنامه حذف و معدوم سازی همرا ه با بکارگیری واکسیناسیون

در این برنامه با توجه به شرایط جغرافیایی و وضعیت اقتصادی کشور درگیر و عدم امکان کنترل ورود ویروس به داخل کشور علاوه بر اجرای برنامه مراقبت و بیماری یابی و حذف و معدوم سازی گله های درگیر ، به منظور جلوگیری از انتشار ویروس از واکسن های موثر در شعاع محدود اطراف کانون بیماری برای یک مقطع زمانی محدود استفاده می گردد، که به این نوع از واکسیناسیون ، واکسیناسیون حلقوی (Ring Vaccination)می گویند.در این برنامه فقط طیور حساس و سالم محدوده کانون بیماری واکسینه شده و پس از اجرای برنامه مراقبت و نظارت شدید به منظور ردیابی ویروس اقدام به حذف گله های واکسینه می نمایند. روشهای تشخیصی برای یافتن ردپای ویروس احتمالی بر مبنای وجود آنتی بادی ناشی از واکسیناسیون می باشد، لذا با ابداع روش جدید آگلوتیناسیون بر اساس آنتی ژن NA[1] که اختصارا NI[2] نامیده شده است به منظور تفریق بین گله های آلوده به ویروس از گله های واکسینه تحت عنوان (DIVA)[3] تنظیم شده است. کشور ایتالیا در درگیری سال ۱۹۹۹ از این برنامه پیروی نموده است.

۳- برنامه واکسیناسیون هدفمند (Targeted Vaccination)

در شرایط تهدید مداوم ورود ویروس از مرزهای کشور و عدم کفایت منابع انسانی و مالی در جهت اجرای برنامه حذف و معدوم سازی گسترده کانونهای بیماری برای جلوگیری از بومی شدن ویروس استفاده از واکسن های موثر در جمعیت حساس و استراتژیک ۰مانند طیور تخمگذار و مولّد)در مناطق پرخطر توصیه میگردد. در این برنامه در صورت وقوع بیماری سریعا نسبت به شناسایی کانون اهتمام و اقدامات فوری در جهت حذف گله آلوده به طریقه بهداشتی اعمال میگردد، و به منظور پایش رفتار ویروس اجرای برنامه های مراقبت (نظارت) از اجزای مهم این برنامه می باشند. مهمترین نکته در خصوص این برنامه تعیین استراتژی خروج از واکسیناسیون میباشد، به این معنا که برنامه واکسیناسیون در یک محدوده زمانی مشخص (برای مثال ۳ سال) تعیین میگردد و در این مدت کلیه اقدامات لازم در خصوص اصلاح ساختار پرورش طیور ، افزایش امنیت زیستی واحدها ،تقویت ساختارهای تشخیصی و مراقبتی، تقویت توان پرسنلی و مالی سازمان های مسئول ،اصلاح مقررات و ضوابط قرنطینه ای و حمل و نقل و آموزش بهره برداران به عمل می آید.

۴- برنامه واکسیناسیون جمعی (Mass Vaccination)

در کشورهایی که به دلایل مختلف قادر به حذف و ریشه کنی بیماری با روشهای قبلی نشده اند و بیماری به صورت بومی (اندمیک) در آمده است ناگزیر به استفاده از واکسن برای کلیه جمعیت های طیور و به صورت مدوام می باشد. در این برنامه عموما با استفاده از واکسن های کشته، کلیه واحدهای پرورشی گوشتی ،تخمگذار پولت و مولّد و در بعضی از موارد حتی طیور بومی و روستایی بصورت مستمر تحت پوشش قرار می گیرند. مخاطرات موجود در این

---

[1] NA- Neuraminidase
[2] NI- Neuraminidase Inhibition
[3] DIVA: Differentiate Infected from Vaccinated Animals

روش علاوه بر عفونت خاموش (Silent Infection)در گله های واکسینه که ممکن است توسط سیستم مراقبت و تشخیص معمول قابل تشخیص نباشند، میتوان به تغییرات آنتی ژنیکی و جهشهای ژنی ناشی از فشار ایمنی (Immune Pressure) به دلیل واکسیناسیون های مکرر در ساختار ویروس اشاره نمود که پس از مدتی ویروس های در گردش از نظر آنتی ژنیکی با واکسن های مورد استفاده تطابق نداشته و عملا تاثیر واکسیناسیون به میزان زیادی کاهش می یابد، لذا اعمال ضوابط بهداشتی و اجرای برنامه های مدوّن و جامع مراقبت و نظارت برای ردیابی ویروسهای احتمالی و تغییرات آنها بسیار ضروری به نظر میرسد. از کشورهایی که این برنامه را اجرا میکنند میتوان به کشورهای چین، مصر، اندونزی و پاکستان اشاره نمود.

واکسن های آنفلوانزای فوق حاد پرندگان :

از واکسن به عنوان یکی از ابزارهای مبارزه با بیماری از سال ۱۹۹۵ در ۵ همه گیری اتفاق افتاده استفاده شده است. بیش از ۱۱۳ میلیارد دز واکسن از سال ۲۰۰۲ الی ۲۰۱۰ از نوع واکسنهای کشته روغنی غیرفعال از ویروس کامل به میزان ۹۵٪ و واکسنهای نوترکیب به میزان ۵٪ استفاده شده است. از این میزان واکسن ۹۹ درصد در چهار کشوری که بیماری به صورت اندمیک درآمده، مصرف شده است که عبارتند از : چین (شامل هنگ کنگ) ۹۱ درصد، مصر ۴,۷ درصد، اندونزی ۲,۳ درصد و ویتنام ۱/۴ درصد، که در همه این کشورها برنامه واکسیناسیون بصورت سراسری و برای تمامی جمعیت های طیور بکار رفته است. مابقی ۱۰ کشوری که حدود ۱ درصد واکسن مصرفی را داشته اند عمدتا کشورهایی هستند که بر اساس ارزیابی خطر و بصورت متمرکز از واکسن استفاده کرده اند. عمده ناکامی های واکسن مربوط به مشکلات اجرایی برنامه واکسیناسیون از قبیل مدیریت غلط و عدم اختصاص به میزان کافی واکسن برای جمعیت در معرض خطر می باشد، که منجر به فقدان ایمنی جمعی می شود ولی برای سایر موارد عدم موفقیت واکسیناسیون مربوط به تغییرات آنتی ژنیکی ویروس های در حال گردش (دریفت)[1] است که با آنتی ژن واکسن متفاوت می شود.

واکسیناسیون پرندگان حیات وحش از نظر عملی امکان پذیر نمی باشد اما بطور طبیعی آلودگی این پرندگان به ویروس های آنفلوانزا با حدّت کم میتواند ایمنی متقاطع بر علیه ویروسهای حاد مانند H5N1 ایجاد کند. عملی ترین روش جهت کنترل و پیشگیری بیماری در حیات وحش، کنترل کامل بیماری در جمعیت طیور اهلی از طریق واکسیناسیون به منظور کاهش میزان ویروس در حال گردش و نهایتا ریشه کنی بیماری می باشد.

یک استراتژی مبارزه با بیماری برای دستیابی به موفقیت بر چهار عامل ب شرح ذیل استوار می باشد :

۱- آموزش بهره برداران ، پرسنل دستگاه های مسئول و متولیان دولتی کنترل بیماری که می بایستی منجر به تغییر رفتار و عملکرد در مناطق پرخطر شود و از انتشار ویروس جلوگیری نماید.
۲- استفاده از روشهای تشخیص سریع و دقیق و همچنین بکارگیری برنامه های مراقبت و نظارت به منظور شناسایی گله های آلوده

[1] drift

۳- برقراری سیستم امنیت زیستی قوی از طریق اعمال ضوابط قرنطینه ای در گله های آلوده ، کنترل حمل و نقل در منطقه درگیری و بکارگیری برنامه های شستشو و ضدعفونی مزرعه های پرورشی به منظور محدود کردن انتشار ویروس

۴- حذف منابع آلودگی از طریق معدوم کردن و دفن طیور در کانون های آلوده

۵- استفاده از برنامه واکسیناسیون در جهت مدیریت صحیح بیماری و حفظ امنیت غذایی تا زمانی که بتوان برنامه ریشه کنی را اجرا نمود.

یک واکسن موثر و مناسب آنفلوانزا می بایستی واجد خصوصیاتی به شرح ذیل باشد:

۱- قادر به ایجاد محافظت در برابر مواجهه با ویروس در حال گردش باشد

۲- قادر به ایجاد محافظت برای مدت زمان طولانی باشد.(حداقل یک دوره زمانی ۱۲-۶ ماهه)

۳- قادر به ایجاد یک محافظت تجدیدپذیر از طریق یک روش مشخص واکسیناسیون از قبیل تزریق زیرجلدی ،تزریق بالی ، اسپری درشت یا ریز ، قطره چشمی ، تزریق داخل تخم مرغ و ... باشد.

۴- قادر به ایجاد محافظت با حداقل تعداد واکسیناسیون باشد (دو نوبت ایده ال است)، ولی در بعضی از گونه ها مانند بوقلمون و طیور تخمگذار ممکن است سه نوبت یا بیشتر مورد نیاز باشد.

۵- امکان استفاده در گونه های مختلف پرندگان داشته باشد.

به منظور استمرار موفقیت برنامه واکسیناسیون، ویروس در حال گردش باید بصورت مستمر و مداوم از نظر تغییرات آنتی ژنیکی مورد پایش قرار گیرد و در صورت شناسایی سویه های جدید ، واکسن می بایستی در مقابل این سویه ها مورد آزمایش قرار گیرد. به طور کلی واکسن ها باید هر ۲ تا ۳ سال از نظر ایجاد محافظت در برابر ویروسهای در حال گردش مجددا ارزیابی شوند.

علاوه بر ویژگیهای فوق بطور کلی واکسن های آنفلوانزا باید ارزان ، قابل استفاده در گونه های مختلف پرندگان، قادر به ایجاد ایمنی با یک دز واکسن، دارای قابلیت تفریق بین طیور واکسینه و طیور آلوده ، کاربرد سریع و آسان ، قابلیت غلبه بر ایمنی مادری و از نظر آنتی ژنیکی قرابت بالایی با ویروس در حال گردش داشته باشد.

انواع واکسنهای رایج آنفلوانزا :

۱- واکسنهای کشته غیرفعال شده که از پیکره کامل ویروس همراه با مواد یاور (ادجوانت) تشکیل شده است و به روشهای تزریق زیرجلدی، عضلانی و داخل تخم مرغ در طیور تخمگذار ، گوشتی ، بوقلمون ، اردک ، غاز ، پرندگان باغ وحش و غیره استفاده میشوند. بذر این واکسنها میتواند از تحت تیپهای با حدّت کم H5و H7 و یا تحت تیپ های با حدّت بالا (HPAI) و همچنین سویه های ژنتیک معکوس ساخته شده باشد.

۲- واکسنهای زنده که از سویه های با حدّت کم (LPAI) موجود در حیات وحش بدست آمده که در ماکیان به صورت تزریق داخل عضلانی یا اسپری قابل استفاده است که تاکنون مجوز تولید تجاری و استفاده در صنعت داده نشده است. همچنین واکسن تخفیف حدّت یافته از سویه های با حدّت کم که شامل سویه های موتانت حساس به حرارت یا جایگرینی ژن HA در ویروس نیوکاسل می باشد ولیکن به صورت آزمایشی بوده و اجازه مصرف ندارند.

۳- واکسنهای نوترکیب با استفاده از وکتور زنده که عمدتا ویروس هایی از قبیل آدنوویروس ها، نیوکاسل، آبله، لارنگوتراکئیت، هرپس ویروس بوقلمون و یا باکتری هایی مانند سالمونلا تیفی موریوم هستند و در این وکتورها قسمتی از ژنوم ویروس آنفلوانزا (عمدتا H5) قرار داده شده و میتواند به صورت تزریق داخل عضلانی، زیرجلدی و یا داخل بینی، قطره چشمی، تزریق بالی و یا خوراکی در ماکیان استفاده شود. به واکسن های نوترکیب با ویروس نیوکاسل در کشورهای مصر و چین اجازه مصرف داده شده است.

۴- واکسن های تولید شده به صورت In vitro که با استفاده از کشت سلولی باکلوویروس حشرات نسبت به تولید هماگلوتینین ویروس آنفلونزا اقدام می شود و میتواند در ماکیان به صورت تزریق زیرجلدی استفاده شود.

۵- واکسنهای DNA که به عنوان واکسنهای جایگزین و نسل آینده در حال مطالعه و تحقیق بوده و تاکنون به صورت تجاری وارد بازار نشده است.

تأثیرگذاری واکسن :

محافظت در مزرعه تنها زمانی قابل دسترسی است که طیور در معرض خطر قادر به بالا بردن پاسخ ایمنی موثر باشند و پرندگان به صورت انفرادی واکسن را در دز صحیح ، تعداد مناسب دفعات واکسیناسیون و با روش درست واکسیناسیون دریافت نموده باشند.

مزایا و عدم مزایای استفاده از واکسن :

الف- مزایا :

۱- باعث افزایش مقاومت پرنده نسبت به آلودگی با ویروس شده و علاوه بر محافظت پرنده در مقابل بیماری مانع از گسترش ویروس در جمعیت موجود در محل پرورش می شود.

۲- باعث کاهش مرگ و میر و همچنین تخفیف علائم و تظاهرات بالینی ناشی از بیماری می شود.

۳- میزان تولید و تکثیر ویروس را در دستگاه تنفسی و گوارشی کاهش داده و در نتیجه رهاسازی ویروس از پرندگان بیمار به میزان زیادی کاهش می یابد.

۴- باعث کاهش میزان ویروس در گردش و همچنین تعداد مزرعه های آلوده شده و در نتیجه از وسعت و بزرگی همه گیری در یک منطقه کاسته می شود.

ب- عدم مزایا :

۱- با توجه به بروز پاسخ ایمنی ناشی از استفاده از واکسن ، روش های تشخیصی در زمان وقوع همه گیری با مشکل مواجه می شود و با روش های معمول امکان شناسایی کانون های آلوده وجود ندارد و لذا باید با روش های جدید مانند (DIVA) که قادر به تفریق تیتر ایمنی ناشی از واکسن از تیتر ایمنی ناشی از مواجهه با ویروس در حال گردش باشد ، جایگزین گردد.

۲- به دلیل تاثیرات واکسن در صورت وقوع بیماری در گله واکسینه ، از نظر علائم بیماری گله آلوده کمتر قابل تشخیص بوده و لذا با عفونتهای خاموش (Silent Infections) و بدون علامت ، شناسایی کانون های بیماری مشکل خواهد شد.

۳- با توجه به ذهنیت بهره برداران از عملکرد واکسن توجه به سایر فاکتورهای موثر در پیشگیری از بیماری مانند رعایت امنیت زیستی و مقررات قرنطینه ای کمتر شده و احتمال ورود ویروس به مزرعه بیشتر خواهد شد.

۴- افزایش هزینه های بهداشتی برای تولیدکنندگان و کاهش میل و رغبت به تخصیص بودجه برای خرید واکسن و هزینه های واکسیناسیون توسط بهره برداران

۵- استفاده از واکسن یکی از عوامل منفی در درجه بندی کشورها از نقطه نظر وضعیت آنفلوانزا بوده و بویژه تاثیر مهمی در صادرات محصولات طیور برای کشورهای صادرکننده خواهد داشت.
۶- تغییرات آنتی ژنیکی ناشی از فشار ایمنی در ویروس به علت واکسیناسیون های مکرر منجر به بروز تغییرات و موتاسیونهای نقطه ای و ظهور سویه های جدید ویروس میشود.

وضعیت تحت تیپ H5N8 در جهان

منشاء ویروس تحت تیپ H5N8 به احتمال خیلی زیاد از کشور چین می باشد و یافته های حاصل از یک برنامه مراقبت در سالهای ۲۰۱۰-۲۰۰۹ حاکی از جداسازی ویروس در اردک های به ظاهر سالم در بازارچه های پرندگان زنده در چین می باشد. مطالعات پاتوژنیسیته نشان داده اند که ویروس برای مرغان ، بسیار حاد ولی برای اردک ها از حدّت ملایم تا متوسط برخوردار می باشد. تحقیقات فیلوژنیک بیان میکند که این ویروس حاصل نوترکیبی های متعدد می باشد. ژنوم ویروس تحت تیپ H5N8 شامل قطعاتی است که از سایر ویروسهای آنفلوانزا منتقل شده است . قسمت اصلی این ویروس متشکل از تحت تیپ H5N1 آسیایی است که از سال ۱۹۹۷ در چین در حال گردش بوده و از سال ۲۰۰۴ به طور وسیعی در جنوب شرقی آسیا ، خاورمیانه و قسمتهایی از اروپا منتشر شده است.

از ژانویه ۲۰۱۴ تحت تیپ H5N8 عمدتا در اردک ها در کره جنوبی به سرعت منتشر شده است. آنالیز سکانس ژنتیکی نشان داده است که جدایه های حاصل از اردک های پرورشی در مزرعه آلوده در کره جنوبی و تلفات اردک های وحشی (بایکال) در اطراف این مزرعه شباهت زیادی با جدایه های قدیمی تر چینی دارد. در اواسط آوریل ۲۰۱۴ ویروس H5N8 در یک مزرعه پرورشی در ژاپن مشاهده گردید و پس از بررسی های اپیدمیولوژیک احتمال انتقال توسط پرندگان وحشی مهاجر از کره جنوبی مطرح گردید. در نوامبر ۲۰۱۴ آلمان وقوع بیماری ناشی از H5N8 را دریک مزرعه پرورش بوقلمون گزارش نمود آزمایشات ژنیکی نشان داد که این ویروس شباهت خیلی زیادی با ویروس های جداشده قبلی در کره جنوبی ، ژاپن و چین دارد.

وضعیت تحت تیپ H5N8 در ایران

اولین گزارش از حضور تحت تیپ H5N8 در ایران در سال ۱۳۹۵ (۲۰۱۶) از یک مزرعه پرورش مرغ تخمگذار در منطقه امیرآباد شهرستان ملارد در استان تهران گزارش گردید که بدنبال آن ویروس در بیشتر استانهای کشور مورد شناسایی قرار گرفت . در بررسی های انجام شده اولیه قرابت ژنتیکی زیادی بین این ویروس و جدایه های منطقه مغولستان و روسیه گزارش شده است.

علیرغم تمام اقدامات انجام شده در جهت ریشه کنی بیماری متاسفانه این اقدامات بطور کامل موثر واقع نگردید و مجددا در سال ۱۳۹۶ همه گیری جدیدی با همان تحت تیپ ولی با وسعت بیشتر در بیش از بیست استان کشور بوقوع پیوست و صنعت طیور کشور به ویژه تولید تخم مرغ را به شدت تحت تاثیر قرار داد. با توجه به داده های حاصل از پایش فعال و غیرفعال انجام گرفته در بازه زمانی شهریور ۹۵ تا مهر ۹۶ بیش از ۷۰۰ کانون بیماری در کشور و عمدتا در مزارع تخمگذار ، روستاها و حیات وحش گزارش و تایید شده است.

تغییر استراتژی مبارزه با بیماری در ایران

در سال ۱۳۹۶ علی رغم وجود اقدامات سنگین حذف و معدوم سازی کانون های بیماری در سراسر کشور، به دلایل ذیل عامل بیماری به حیات خود ادامه داده و تنها کاهش جمعیت طیور حساس و فرارسیدن فصول گرم احتمالا باعث توقف روند بیماری گردیدند :

۱- وجود مخازن طبیعی حفظ و انتشار عامل بیماری درحیات وحش، طیور بومی و فعالیت بازارچه های عرضه پرندگان زنده و همچنین قرارگرفتن کشور در مسیر مهاجرت پرندگان مهاجر و تهدید مداوم ورود ویروس به جمعیت حساس
۲- موثر واقع نشدن اقدامات قرنطینه ای در کنترل جابجایی طیور و فرآورده های آن از مناطق آلوده به سایر نقاط کشور
۳- عدم کفایت منابع مالی و اعتبارات مورد نیاز جهت اجرای برنامه معدوم سازی و پرداخت غرامت به صاحبان مزارع خسارت دیده و در نتیجه کاهش اعتماد بهره برداران به سیستم مبارزه با بیماری و عدم گزارش وقوع بیماری
۴- عادی انگاری بیماری در نزد مسئولین ذیربط و کاهش حساسیت نسبت به وقوع بیماری و در نتیجه عدم همراهی کامل با سازمان دامپزشکی در مبارزه با بیماری مانند سالهای ابتدایی ورود بیماری

با توجه به دلایل پیش بیان شده و بر اساس تحلیل داده ها تا قبل از شروع فصل پاییز ۱۳۹۶ بیش از ۱۹۸۴ کانون فعال بیماری وجود داشته، و وضعیت متراکم مزارع مرغ تخمگذار در ۹ استان کشور که حالت انفجاری میتوانستند پیدا کنند و نیز وجود مناطقی تحت عنوان زیستگاه های پرندگان وحش در داخل کشور که نقطه اتصال و ارتباط با مسیرهای مهاجرت پرندگان مهاجر هستند و با تاکید بر این نکته که واکسیناسیون به تنهایی عامل ریشه کنی بیماری قلمداد نمی شود، سازمان دامپزشکی کشور در سال ۱۳۹۷ تصمیم به تغییر استراتژی مبارزه با بیماری در قالب سیاست حذف و معدوم سازی به همراه بکارگیری واکسیناسیون هدفمند گرفته و واکسیناسیون هدفمند را که صرفا در گروه های مشخص از جمعیت حساس و در مناطق پرخطر را در بر می گرفت را در دستور کار قرار داده و ابلاغ نمود.

هدف از واکسیناسیون در کشور

اساس علمی استفاده از واکسن ، افزایش ایمنی طیور است که در نتیجه آن چنانچه مواجهه با ویروس صورت گیرد، آلودگی منجر به بیماری نخواهد شد و در صورت بروز بیماری نیز، علائم بالینی خفیف بوده و تلفات و انتشار ویروس بسیار پایین خواهد بود و احتمال بروز بیماری در جمعیت انسانی هم بسیار پایین خواهد بود.

بنابراین مهمترین اهداف واکسیناسیون عبارتند از :

۱- جلوگیری از همه گیر شدن جهانی بیماری و رعایت توصیه های مجامع ذیصلاح بین المللی
۲- محافظت از بهداشت عمومی با کاهش سرعت گردش و انتشار بیماری
۳- حفظ صنعت طیور کشور
۴- حفظ سودآوری صنعت طیور کشور
۵- تسهیل در تجارت منطقه ای و بین المللی
۶- فراهم کردن امنیت و ایمنی مواد غذایی کشور که عدم رعایت آن می تواند تهدید علیه کشور تلقی گردد.

جمعیت هدف :

مزارع مرغ تخمگذار ، مزارع مرغ مادر گوشتی ، مزارع مرغ مادر تخمگذار ، مزارع مرغ اجداد و پرندگان در معرض انقراض

مناطق هدف :

استانهای تهران، البرز، قزوین ، قم ، مرکزی ، اصفهان، گلستان، گیلان ، مازندران و آذربایجان شرقی .

بسته به شرایط بیماری استان های خراسان رضوی و فارس که از بعد تراکم و شرایط اکوسیستمی با بقیه استانها متفاوت می باشند نیز ممکن است پوشش داده شوند.

واکسیناسیون صرفا به عنوان یک ابزار موازی با سایر اجزاء برنامه کنترل بیماری و با سیاست گذاری سازمان دامپزشکی کشور و هماهنگی تشکل ها و با کمک عملیاتی سازمان نظام دامپزشکی کشور انجام می گردد.

پرندگان هدف :

در این مرحله فقط طیور تخمگذار و طیور مولد در مناطق مشخصی از کشور که به تایید ستاد مقابله با بیماری آنفلوانزای سازمان دامپزشکی کشور رسیده باشند ، واکسینه می شوند. البته با اجرای برنامه تحلیل خطر که نشان دهنده سطح رعایت امنیت زیستی در بین مرغداران، شرایط منطقه واکسیناسیون و سطح گستردگی آلودگی می باشد، قبل از واکسیناسیون ضروری بوده و در انجام واکسیناسیون شرایط امنیت زیستی در واحدها ، تعهد مدیریت بر رعایت ضوابط بهداشتی و قرنطینه ای در نظر گرفته خواهند شد.

نوع واکسن :

در حال حاضر واکسنهای مختلفی علیه H5 در دنیا تولید و در تعدادی از کشورها مصرف گردیده است که از آن جمله می توان به موارد ذیل اشاره نمود:

۱- واکسن مونووالان H5
۲- واکسنهای دوگانه H7+H5و H5 + H9
۳- واکسنهای زنده نوترکیب (از این نوع واکسنها واکسن Fowl pox H5 معروف هستند)

در این عملیات واکسیناسیون از واکسنهای موثر علیه تیپ هماگلوتینه ویروس در حال گردش در کشور استفاده می گردد. بر همین اساس و با توجه به بررسی های صورت گرفته و تحت تیپ ویروس در حال گردش در کشور از واکسن های ذیل استفاده خواهد شد که انتخاب یکی از واکسن ها با توجه به بررسی وضعیت منطقه ی دارای سابقه بیماری، شرایط استقرار واحدهای مرغداری و با لحاظ هزینه واکسیناسیون و کارایی واکسن ، مشخص خواهد شد:

۱- واکسن غیرفعال مونووالان H5N2 دارای تاییدیه مصرف در کشورهای بولیوی، کلمبیا، السالوادور، مصر، اندونزی، اردن و ....
۲- واکسن غیرفعال مونووالان H5N9 دارای تاییدیه مصرف در کشورهای ایتالیا، مکزیک و ایالات متحده امریکا
۳- واکسن دوگانه غیرفعال H5N2 + H9N2
۴- واکسن H5+ND Lasota دارای تاییدیه مصرف در کشورهای بولیوی، کلمبیا، مصر، اردن، کره جنوبی، چین و ....

برنامه واکسیناسیون :

در گله های تخمگذار تجاری معمولا اولین نوبت واکسیناسیون در سن ۷ تا ۱۴ روزگی بوده و علیرغم اینکه بهترین زمان تزریق مجدد در حدود سنین ۵ تا ۶ هفتگی است ولی با توجه به حساسیت بالا و وارد آمدن یک مرحله استرس اضافی به گله های پولت ، توصیه میگردد نوبت دوم واکسیناسیون در پای قفس و در سنین ۷۵ تا ۹۰ روزگی و قبل از انتقال به قفس انجام گیرد.هدف از واکسیناسیون در گله های تخمگذار دستیابی به تیتر ۷ HI می باشد تا ایمنی لازم را در پرنده ایجاد کند .

در گله های مرغ مادر و اجداد با توجه به اینکه هدف از واکسیناسیون علاوه بر ایجاد ایمنی در گله های مادر ، انتقال آنتی بادی به نتاج می باشد لذا تیتر ۸ تا ۹ HI مورد انتظار است تا بخشی از آن (در حدود ۷۰ درصد) به عنوان ایمنی مادری به جوجه های تولیدی منتقل تا در هفته های اول زندگی خود در برابر بیماری ایمن باشند. به همین منظور در گله های مادر و اجداد سه نوبت واکسیناسیون توصیه میگردد که در سنین ۷ تا ۹ روزگی ، ۸ تا ۱۰ هفتگی و ۱۶ تا ۱۸ هفتگی و قبل از شروع تولید انجام گیرد.

واکسن مورد استفاده در واکسیناسیون هدفمند کشور دارای هماگلوتینین همولوگ با سویه ویروس در گردش و نورآمینیداز هترولوگ با ویروس در حال گردش خواهد بود که همین موضوع تشخیص تفکیک آن را از ویروس فیلد یا مزرعه در صورت بروز بیماری فراهم خواهد نمود.

نحوه برخورد با گله های واکسینه درگیر بیماری :

در صورت مثبت شدن نتایج آزمایشگاهی مبنی بر وجود عامل بیماری در گله واکسینه ، گله مزبور بر اساس دستورالعمل سازمان دامپزشکی کشور معدوم می گردد.

پیشینه تحقیق :

با توجه به تصویب و ابلاغ مصوبه واکسیناسیون الزامی هدفمند توسط سازمان دامپزشکی کشور از اواخر سال ۱۳۹۷ ، فرآیند واردات واکسن های موثر و مورد تایید OIEآغاز گردید و پس از توزیع در استانهای هدف ، عملیات واکسیناسیون در گله های پولت و تخمگذار با نظارت ادارات دامپزشکی استانها آغاز گردید. با عنایت به اینکه تا پیش از این تاریخ سابقه ای از واکسیناسیون بر علیه تحت تیپ های حاد آنفلوانزا (HPAI H5 ,H7) در کشور وجود نداشته ، لذا سوابقی از بررسی عملکرد واکسن های مذکور در کشور وجود ندارد. اما در سایر کشورها تحقیقات قابل توجه ای در این خصوص انجام شده است که می توان به مطالعه Bauma و همکاران در سال ۲۰۰۹ در گله های تخمگذار در اندونزی، Kauda و همکاران در سال ۲۰۰۸ در مزارع مرغ گوشتی در مصر و همچنین Ellis و همکاران در سال ۲۰۰۲ در گله های گوشتی در هنگ کنگ اشاره نمود.

با توجه به فقدان سابقه واکسیناسیون بر علیه سویه های حاد بیماری آنفلوانزا در کشور و اجرای برنامه واکسیناسیون برای اولین بار ، سازمان دامپزشکی کشور الزام به بررسی میدانی عملکرد واکسنهای مصرفی نموده و این مهم با هماهنگی اداره کل دامپزشکی استان تهران و دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران (گروه بهداشت و بیماریهای طیور) در قالب پروژه تحقیقاتی فوق الذکر مصوب و جهت اجرا ابلاغ گردید.

متغیرهای پژوهش :

۱- ایمنی زایی و فقدان ایمنی زایی واکسن
۲- میزان محافظت بالینی و آزمایشگاهی گله های واکسینه
۳- میزان عیار آنتی بادی محافظت کننده در گله های واکسینه

روش انجام پژوهش :

۱- انتخاب گله های پولت تخمگذار :

با توجه به میزان واردات و مصرف واکسن های مورد نظر تعداد ۷ مزرعه پرورش پولت تخمگذار در مناطق غرب (شهرستانهای شهریار و ملارد) ، شرق (شهرستان پاکدشت) ، جنوب (شهرستان ورامین) و جنوب غرب (شهرستان اسلامشهر) استان تهران به تعداد مجموعا ۴۰ سالن با جمعیت حدودا ۹۱۰ هزار قطعه پولت تخمگذار تجاری جهت بررسی و نمونه برداری انتخاب گردیدند. نحوه انتخاب به صورت تصادفی و بر حسب زمان تخصیص سهمیه واکسن توسط اداره کل دامپزشکی استان بوده است.
کلیه واحدهای منتخب از شرایط بهداشتی مناسب برخوردار بوده و رعایت اصول بهداشتی آماده سازی سالن ها و همچنین ضوابط قرنطینه ای در ورود افراد و وسایل به شکل مطلوب رعایت شده است.

جوجه های مزرعه های مذکور عمدتا از واحدهای مرغ مادر تخمگذار مرغک (آبیک) و مرغ مادر ملکان (تبریز) از جوجه کشی های مرغک و ساکت (تهران) تهیه شده اند.

علاوه بر واکسن آنفلوانزای فوق حاد (H5) گله های نذکور طبق برنامه واکسیناسیون مخصوص خود بر علیه بیماریهای نیوکاسل ، آنفلوانزای تحت تیپ H9 ، گامبورو ، برونشیت عفونی در دفعات متعدد و به اشکال مختلف واکسینه شده اند.

از مزرعه های مذکور تنها یک مزرعه از پولتهای پرورش داده جهت استفاده در مزرعه تخمگذار خود استفاده نموده و مابقی پس از پرورش به واحدهای مختلف تخمگذار واقع در داخل و یا خارج استان منتقل شده اند.

۲- واکسنهای مصرف شده :

- واکسن A : واکسن غیرفعال شامل تحت واحد هماگلوتینین (H) ویروس آنفلوانزای H5N1 به همراه سویه لاسوتای غیرفعال ویروس نیوکاسل
- واکسن B : واکسن غیرفعال تحت تیپ H5N3
- واکسن C : واکسن غیرفعال H5 بازآرایی شده با استفاده از تکنیک ژنتیک معکوس

برای هر واکسن حداقل دو مزرعه جهت بررسی و نمونه برداری در نظر گرفته شده است. کلیه مراحل اخذ ، نگهداری و حمل و استفاده واکسن توسط گروه های مایه کوبی دارای مجوز از دامپزشکی استان با رعایت ضوابط بهداشتی و قرنطینه ای و همچنین با اطلاع قبلی مدیریت مزرعه و فراهم نمودن مقدمات امر واکسیناسیون و تحت نظارت کارشناسان دامپزشکی استان و در حضور پژوهشگر انجام شده است. رعایت زنجیره سرد در تمامی مراحل نگهداری و انتقال به مزرعه (در دمای ۸-۲ درجه سانتیگراد) توسط گروه مایه کوبی انجام شده است.

۳- واکسیناسیون :

پس از آماده سازی سالن از طریق ایجاد حائل برای جداسازی جوجه های واکسینه از غیرواکسینه و فراهم نمودن تاریکی به منظور کاهش استرس در گله ، توسط کارگران و تکنسین های ماهر گروههای مایه کوبی دارای مجوز از دامپزشکی استان عملیات واکسیناسیون با مقید نمودن انفرادی جوجه ها و تزریق ۰/۵ سی سی از واکسن در ناحیه پشت گردن به صورت زیرجلدی با استفاده از سرنگ خودکار انجام شده و جوجه های واکسن خورده در جایگاه مخصوص رها می شدند. سعی گردیده گله های کوچک در یک شب و گله های بزرگ در کوتاه ترین زمان ممکن تحت پوشش عملیات واکسیناسیون قرار گیرند. برابر دستورالعمل ابلاغی از اداره کل دامپزشکی استان کلیه واحدهای پرورش پولت ملزم به واکسیناسیون طی دو نوبت هستند که نوبت اول در سن ۳۰ روزگی و نوبت دوم به فاصله ۴ تا ۶ هفته بعد صورت گیرد.

۴- نمونه برداری :

الف – نمونه برداری سرمی :

مطابق با طراحی انجام شده در مطالعه به منظور بررسی سرولوژیکی عملکرد واکسن ها طی سه نوبت به شرح ذیل اقدام به نمونه برداری خون از ورید بالی به میزان ۱ سی سی با استفاده از سرنگ استریل یکبار مصرف به تعداد ۲۰ عدد از هر سالن گردید :

- برداشت نمونه خون از جوجه ها قبل از واکسیناسیون به منظور بررسی وضعیت آنتی بادی بر علیه آنتی ژن H5 پیش از استفاده از واکسن (همزمان با نظارت بر انجام واکسیناسیون توسط گروه های مایه کوب)
- برداشت نمونه خون ۳ تا ۵ هفته پس از انجام واکسیناسیون نوبت اول
- برداشت نمونه خون ۳ تا ۵ هفته پس از انجام واکسیناسیون نوبت دوم

انتخاب گروه شاهد :

به منظور بررسی علائم کلینیکی و یا پاراکلینیکی وقوع بیماری احتمالی در گله های تحت مطالعه اقدام به تعیین تعداد ۲۰ قطعه جوجه از هر سالن به عنوان قراول یا شاهد (Sentinel) نموده که غیرواکسینه باقی مانده و با علامت گذاری به صورت لکه رنگی در پشت پرنده و همچنین نصب حلقه پلاستیکی در پای پرنده و در جایگاه جداگانه در سالن ها مشخص گردیده و در طی دو نوبت نمونه برداری پس از واکسیناسیون از پرندگان شاهد نیز نمونه سرمی اخذ گردید.

کلیه نمونه های اخذ شده پس از کدگذاری در دمای اتاق نگهداری شده تا مراحل جداسازی سرم از خون انجام شود و سپس در شرایط مناسب نمونه ها به آزمایشگاه گروه بهداشت و بیماریهای طیور دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران منتقل گردیدند و پس از جداسازی سرم ها در میکروتیوپ مخصوص جهت انجام آزمایشات سرمی در فریزر ۲۰- درجه نگهداری شدند.

تعداد کل نمونه های سرمی اخذ شده :

- نوبت اول قبل از واکسیناسیون به تعداد ۸۰۰ عدد نمونه
- نوبت دوم پس از واکسن اول به تعداد ۱۶۰۰ عدد نمونه
- نوبت سوم پس از واکسن دوم به تعداد ۱۶۰۰ عدد نمونه

در مجموع تعداد ۴۰۰۰ عدد سرم اخذ گردید.

ب- **نمونه برداری سواب:**

به منظور بررسی ابتلای احتمالی مزرعه های تحت مطالعه با ویروسهای آنفلوانزای فوق حاد (HPAI) در حال گردش، اقدام به برداشت نمونه های سواب نای و سواب کلواک همزمان با نمونه برداری سرمی از گرو ه های شاهد (سنتینل) به شرح ذیل گردید :

- برداشت تعداد ۲۰ عدد سواب نای و ۲۰ عدد سواب کلواک قبل از واکسیناسیون
- برداشت تعداد ۱۰ عدد سواب نای و ۱۰ عدد سواب کلواک پس از واکسن اول
- برداشت تعداد ۱۰ عدد سواب نای و ۱۰ عدد سواب کلواک پس از واکسن دوم

نمونه های سواب جمع آوری شده پس از کدگذاری در شرایط مناسب به آزمایشگاه گروه بیماریهای طیور دانشکده دامپزشکی تهران منتقل و در فریزر ۲۰- درجه نگهداری شدند.

تعداد کلّ نمونه های سواب نای و کلواک :

- نوبت اول قبل از واکسیناسیون ۸۰۰ عدد سواب نای و ۸۰۰ عدد سواب کلواک
- نوبت دوم پس از واکسن اول ۴۰۰ عدد سواب نای و ۴۰۰ عدد سواب کلواک
- نوبت سوم پس از واکسن دوم ۴۰۰ عدد سواب نای و ۴۰۰ عدد سواب کلواک

نظارت پس از واکسیناسیون :

به منظور ردیابی ابتلای احتمالی با ویروسهای در حال گردش در مزرعه های تحت مطالعه ، بررسی وضعیت بالینی گله های واکسینه در زمان نمونه برداری با بازدید و معاینه گله از نظر وضعیت سلامتی و یا علائم بیماری احتمالی (بویژه در گروه شاهد) توسط پژوهشگر انجام گرفته است. همچنین پیگیری وضعیت سلامتی گله ها از طریق دامپزشکان، مدیران مزرعه و کارشناسان دامپزشکی استان بصورت مستمر انجام گردید.

آزمون های انجام شده :

۱- روش تشخیص ملکولی (PCR) :

واکنش زنجیره ای پلیمرازسیون (PCR) فقط اجزاء اولیهٔ این سیستم پیچیدهٔ همانند سازی را جهت تکثیر قطعات کوچک DNA در یک لولهٔ آزمایش به کار می برد. در یک سیستم بافری ساده ناحیهٔ خاصی از مولکول DNA بوسیلهٔ آنزیم DNA پلی مراز تکثیر می شود و دی اکسی نوکلوتیدها بعنوان بلوک های ساختمانی جهت رشتهٔ جدید استفاده می شوند. پرایمرهای اولیگونوکلئوتیدی اختصاصی که بر اساس قوانین جفت شدن بازها به DNA الگو متصل شده و ناحیهٔ مورد نظر از DNA الگو را جهت تکثیر مشخص می کنند. رشته های DNA الگو با استفاده از حرارت از هم جدا می شوند. در حقیقت، حرارت باعث می شود که پیوندهای هیدروژنی بین جفت بازهای رشته های DNA شکسته شوند. این فرایند واسرشته سازی (Denaturation) نامیده می شود. پرایمرهای نوکلوتیدی توالی های مکمل خود را بر روی DNA الگو پیدا خواهند کرد که این عمل، اتصال (Annealing) نامیده می شود و نهایتاً DNA پلیمراز، افزودن دی

اکسی نوکلئوتیدها را بر روی عامل OH– ۳ پرایمرها آغاز می نماید و مولکول های جدید از روی هر دو رشته ساخته می گردند. در مرحلهٔ حرارت دهی بعدی، رشته های تازه ساخته شده مجدداً از هم جدا می شوند و تمامی رشته های جدا شده (هم رشته های اولیه و هم رشته های تازه ساز) جایگاه های اتصال برای پرایمرها را فراهم می سازند و به عنوان الگو برای ساخت رشته های DNA بعدی عمل می کنند. در این مرحله اولین رشته های DNA با طول مشخص (در واقع محصول PCR) به دست خواهد آمد، زیرا اتصال پرایمر دوم بر روی رشتهٔ DNA ساخته شده در مرحلهٔ قبلی که در واقع با پرایمر اول شروع می شود باعث ایجاد محصول PCR با طول مشخص می گردد. سپس تعداد نسخه های توالی DNA هدف به صورت تصاعدی افزایش می یابند. در واقع تعداد رشته های توالی هدف در هر چرخه PCR دو برابر خواهند شد. یعنی در صورت کارایی ۱۰۰٪ از هر نسخه DNA موجود در ابتدای واکنش تنها پس از ۲۰ چرخه از PCR تعدادی بیش از ۱ میلیون نسخه محصول ساخته خواهد شد که این عدد پس از پایان چرخهٔ سی ام به بیش از یک میلیارد نسخه می رسد. البته کارایی واکنش هیچگاه ۱۰۰ ٪ نخواهد بود و معمولاً به تعداد چرخه های بیشتری (اغلب ۲۵ الی ۴۰ چرخه) نیاز می باشد که به مقدار DNA الگوی اولیه و هدف بستگی دارد. ولی حتی تعداد بسیار کمی از ملکولهای الگو در ابتدای PCR را می توان تا مقادیر بسیار زیاد، اغلب به میزان یک میکروگرم و حتی بیشتر تکثیر کرد.

نتیجه آزمایش مولکولی:

با توجه به ضرورت اطمینان از سلامت پرندگان در جمعیت تحت مطالعه در مرحله قبل از واکسیناسیون اقدام به انجام آزمایش ملکولی (PCR) بر روی نمونه های سواب نای و کلواک اخذ شده در آزمایشگاه تشخیص ملکولی دانشکده دامپزشکی تهران گردید و نتایج کلیه آزمایشات انجام شده از نظر ردیابی DNA ویروس تحت تیپ حاد H5 منفی بودند .در خصوص نمونه های سواب نای و کلواک برداشت شده پس از واکسیناسیون نیز با توجه به عدم مشاهده تیتر مثبت در سرمهای گروه شاهد (غیر واکسینه) و همچنین عدم مشاهده علائم بیماری ، آزمایش ملکولی بر روی نمونه های مذکور ضروری نبوده و انجام نگردید.

۲- آزمایشات سرولوژی

۲-۱ -آزمایش ممانعت از هماگلوتیناسیون یا HI – (Hemagglutination Inhibition test)

آزمون HI بر پایه ویژگی توانایی ویروس آنفلوانزا در جمع کردن یا هماگلوتیناسیون گلبولهای قرمز خون (HA) استوار است. حال چنانچه در سرم طیور در اثر مواجهه با این ویروس آنتی بادی یا سرم ضد (آنتی سرم) تشکیل شده باشد، در آزمایشگاه این آنتی سرم به ویروس آنفلوانزا متصل شده و از اتصال آن به گلبول های قرمز جلوگیری می کند و به عبارتی عمل ممانعت از هماگلوتیناسیون (HI) اتفاق می افتد.

در این آزمایش آنتی ژن را در مجاورت سرم های تهیه شده از طیور تحت مطالعه قرار داده و سپس گلبولهای قرمز خون مرغ به آن اضافه میشود چنانچه سرم حاوی انتی بادی های اختصاصی ویروس عامل بیماری و قابل اتصال به آنتی ژن باشد، آنتی ژن در اثر باند شدن با آنتی بادی، توانایی آگلوتینه کردن گلبولهای قرمز را از دست میدهد و بدین ترتیب واکنش مهار هماگلوتیناسیون (HI) رخ میدهد.

لوازم و مواد مورد نیاز :

۱- محلول PBS ۲- میکروپلیت ۹۶ گوده ای ۳- آنتی ژن آنفلوانزای H5 (در این مطالعه از پیکره کامل ویروس H5 در گردش به عنوان آنتی ژن استفاده شد) ۴- میکروپیپت ۸ کاناله و تک کاناله ۵ – گلبول قرمز شسته شده تازه مرغ (۱ درصد) ۶- سرم حاصل از نمونه های خون اخذ شده

روش کار :

- مقدار ۲۵ میکرولیتر (لاندا) محلول PBS به کلیه گوده های میکروپلیت ۹۶ خانه ای اضافه میشود
- مقدار ۲۵ لاندا از سرم نمونه را به گوده A1 اضافه کرده و پس از چندبار پر و خالی نمودن به میزان ۲۵ لاندا به گوده بعدی و همین کار را تا گوده ۱۰ ادامه پیدا میکند (رقتهای ۱/۲ ، ۱/۴ ، ۱/۸ و ... از سرم نمونه تهیه میشود و از گوده شماره ۱۰ مقدار ۲۵ لاندا دور ریخته میشود.
- در گوده شماره ۱۱ فقط آنتی ژن جهت شاهد مثبت ریخته میشود
- در گوده شماره ۱۲ فقط گلبول قرمز ریخته میشود بعنوان شاهد منفی
- به میزان ۲۵ لاندا از آنتی ژن ویروس آنفلوانزای H5 رقیق شده پس از عیارسنجی * به تمام گوده ها از A1 تا A11 اضافه میشود (گوده ۱۲ بعنوان شاهد منفی است) .
- بعد از اضافه کردن آنتی ژن ، پلیت را به مدت ۴۵-۳۰ دقیقه در حرارت اتاق نگهداری میشود تا فرایند باند شدن آنتی بادی و آنتی ژن اتفاق افتد.
- به کلیه گوده ها مقدار ۲۵ لاندا از گلبول قرمز شسته شده تازه (RBC) مرغی ۱ درصد اضافه کرده و سپس به مدت ۲۵-۲۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده می شود.

* تعیین قدرت آنتی ژنیسیته ویروس از طریق آزمون HA انجام میشود بدین شکل که پس از ریختن محلول PBS در گوده های میکروپلیت نسبت به افزودن مقدار ۲۵ لاندا از ویروس به گوده اول اقدام نموده و عمل رقیق سازی را تا گوده ۱۲ انجام داده و سپس به میزان ۲۵ لاندا از گلبول قرمز شسته شده تازه یک درصد به گوده ها اضافه میشود و پس از قراردادن در دمای اتاق به مدت ۴۵ دقیقه اقدام به خوانش نتیجه آزمون می شود و آخرین گوده ای که در آن هماگلوتیناسیون رخ داده بعنوان رقت عیار ویروس در نظر گرفته میشود و با توجه به نیاز به ۴ واحد HA از آنتی ژن بر اساس میزان عیار ویروس نسبت به رقیق سازی ویروس با استفاده از محلول PBS اقدام میشود.

تفسیر نتایج :

تیتر HI یعنی بالاترین رقت سرمی (آخرین گوده) که توان مهار کامل هماگلوتیناسیون در حضور آنتی ژن را داشته است و در آن اصطلاحا تکمه کامل مشابه گوده شاهد مثبت (شماره ۱۱) تشکیل شده باشد. برای کنترل صحت نتیجه پلیت را مایل نموده (زاویه ۴۵ درجه) و آخرین گوده ای که درآن جریان اشکی گلبول قرمز نظیر گوده شاهد باشد به عنوان تیتر سرم آزمایش شده تعیین می شود.

جهت کنترل صحت انجام آزمایش باید به ردیف ۱۱ و ۱۲ توجه کرد بطوریکه در ردیف ۱۱ عمودی حتما باید هماگلوتیناسیون و در ردیف ۱۲ عمودی حتما باید دکمه های کامل دیده شود.

نتایج آزمایش HI :

کلیه سرمهای اخذ شده از مزرعههای تحت مطالعه در آزمایشگاه به روش پیش گفته مورد آزمایش قرار گرفتند که نتایج بر اساس واکسن هایِ مصرفی به شرح ذیل می باشند :

الف – **واکسن A** :

عملکرد این واکسن در سه مزرعه به شرح ذیل مورد مطالعه قرار گرفت :

۱- **مزرعه یک :**

۱-۱- کلیه سرمهای تهیه شده در هفته هفتم (تعداد ۶۰ نمونه) قبل از واکسیناسیون تیتر HI صفر داشته اند.

۱-۲- کلیه سرمهای تهیه شده از گروه شاهد در هفته های یازدهم و شانزدهم (به تعداد ۱۲۰ نمونه) تیتر HI صفر داشته اند.

۱-۳- میانگین تیتر سرمی در آزمون HI بعد از واکسیناسیون اول (هفته یازدهم) بر روی نمونه های اخذ شده (۶۰ نمونه) از گروه واکسینه در سالن شماره یک ۲/۱۰ و سالن شماره دو ۳/۱۵ و سالن شماره سه ۲/۵۰ و میانگین کل گله ۲/۵۸ بوده است.

۱-۴- میانگین تیتر سرمی در آزمون HI بعد از واکسیناسیون دوم (هفته شانزدهم) بر روی نمونه های اخذ شده (۶۰ نمونه) از گروه واکسینه در سالن شماره یک ۵/۶۰ ،سالن شماره دو ۵/۱۵ و سالن شماره سه ۴/۹۰ و میانگین کل گله ۵/۲۰ بوده است.

جدول میانگین تیتر HI در گروه واکسینه **مزرعه یک**

شماره سالن	قبل از واکسیناسیون	بعد از واکسن اول	بعد از واکسن دوم
شماره ۱	صفر	۲/۱۰	۵/۶۰
شماره ۲	صفر	۳/۱۵	۵/۱۵
شماره ۳	صفر	۲/۵۰	۴/۹۰
کل مزرعه	صفر	۲/۵۸	۵/۲۰

۲- مزرعه شمار دو :

۲-۱- در کلیه نمونه های تهیه شده (۱۶۰ نمونه از ۸ سالن) در هفته چهارم قبل از واکسیناسیون تیتر HI صفر بوده است.

۲-۲- در کلیه سرمهای اخذ شده از گروه شاهد در هفته های هشتم و دوازدهم (به تعداد ۳۲۰ نمونه از ۸ سالن) تیتر HI صفر بوده است.

۲-۳- میانگین تیتر سرمی در آزمون HI بعد از واکسیناسیون نوبت اول (هفته هشتم) بر روی نمونه های اخذ شده (۱۶۰نمونه از ۸ سالن) از گروه واکسینه در کل گله ۲/۸۵ بوده است .

۲-۴- میانگین تیتر سرمی در آزمون HI بعد از واکسیناسیون نوبت دوم (هفته دوازدهم) بر روی نمونه های اخذ شده (۱۶۰نمونه از ۸ سالن) از گروه واکسینه در کل گله ۴/۹ بوده است .

جدول میانگین تیتر HI در گروه واکسینه **مزرعه دو**

شماره سالن	قبل از واکسیناسیون	بعد از واکسن اول	بعد از واکسن دوم
شماره ۱	صفر	۳/۲	۵/۲۵
شماره ۲	صفر	۳/۱۵	۵/۴
شماره ۳	صفر	۲/۷	۵/۰۵
شماره ۴	صفر	۲/۵	۴/۹
شماره ۵	صفر	۲/۸۵	۴/۸
شماره ۶	صفر	۲/۸	۴/۹
شماره ۷	صفر	۳/۱۵	۴/۸۵
شماره ۸	صفر	۲/۴۵	۴/۰۵
کل مزرعه	صفر	۲/۸۵	۴/۹

۳- مزرعه سه :

۳-۱- در کلیه نمونه های اخذ شده (۱۶۰ نمونه از ۸ سالن) در هفته چهارم قبل از واکسیناسیون تیتر HI صفر بوده است.

۳-۲- در کلیه سرمهای اخذ شده از گروه شاهد در هفته های هشتم و دوازدهم (به تعداد ۳۲۰ نمونه از ۸ سالن) تیتر HI صفر بوده است.

۳-۳- میانگین تیتر سرمی در آزمون HI بعد از واکسیناسیون نوبت اول (هفته هشتم) بر روی نمونه های اخذ شده (۱۶۰نمونه از ۸ سالن) از گروه واکسینه در کل گله ۲/۹۹ بوده است .

۳-۴- میانگین تیتر سرمی در آزمون HI بعد از واکسیناسیون نوبت دوم (هفته دوازدهم) بر روی نمونه های اخذ شده (۱۶۰نمونه از ۸ سالن) از گروه واکسینه در کل گله ۴/۸۳ بوده است .

جدول میانگین **تیتر HI** در گروه واکسینه **مزرعه سه**

شماره سالن	قبل از واکسیناسیون	بعد از واکسن اول	بعد از واکسن دوم
شماره ۱	صفر	۳/۰۵	۵/۳
شماره ۲	صفر	۳/۱۵	۵/۲
شماره ۳	صفر	۲/۷	۴/۵
شماره ۴	صفر	۲/۷۵	۴/۸۵
شماره ۵	صفر	۳/۲۵	۴/۷
شماره ۶	صفر	۳/۱	۴/۹
شماره ۷	صفر	۳/۲	۵
شماره ۸	صفر	۲/۷۵	۴/۲
کل مزرعه	صفر	۲/۹۹	۴/۸۳

ب- واکسن B :

عملکرد این واکسن در سه مزرعه به شرح ذیل مورد مطالعه قرار گرفت :

۱- مزرعه شماره یک :

۱-۱- در کلیه نمونه های اخذ شده (۴۰ نمونه از ۲ سالن) در هفته هفتم قبل از واکسیناسیون تیتر HI صفر بوده است.

۱-۲- در کلیه سرم های اخذ شده از گروه شاهد در هفته های یازدهم و شانزدهم (به تعداد ۱۲۰ نمونه از ۲ سالن) تیتر HI صفر بوده است.

۱-۳- میانگین تیتر سرمی در آزمون HI بعد از واکسیناسیون اول (هفته یازدهم) بر روی نمونه های اخذ شده (۴۰ نمونه از دو سالن) از گروه واکسینه در سالن شماره یک ۴/۸ ،سالن شماره دو ۴/۰۵ و میانگین کل گله ۴/۴۲بوده است.

۱-۴- میانگین تیتر سرمی در آزمون HI بعد از واکسیناسیون دوم (هفته شانزدهم) بر روی نمونه های اخذ شده (۴۰ نمونه از دو سالن) از گروه واکسینه در سالن شماره یک ۶/۵۵ ،سالن شماره دو ۵/۳ و میانگین کل گله ۵/۹۲بوده است.

جدول میانگین تیتر HI در گروه واکسینه **مزرعه یک**

شماره سالن	قبل از واکسیناسیون	بعد از واکسن اول	بعد از واکسن دوم
شماره ۱	صفر	۴/۸	۶/۵۵
شماره ۲	صفر	۴/۰۵	۵/۳
کل مزرعه	صفر	۴/۴۲	۵/۹

۲- مزرعه شماره دو :

۲-۱ - در کلیه نمونه های اخذ شده (۱۴۰ نمونه از ۷ سالن) در هفته ششم قبل از واکسیناسیون تیتر HI صفر بوده است.

۲-۱- در کلیه سرمهای اخذ شده از گروه شاهد در هفته های دهم و شانزدهم (به تعداد ۲۸۰ نمونه از ۷ سالن) تیتر HI صفر بوده است.

۲-۲- میانگین تیتر سرمی در آزمون HI بعد از واکسیناسیون نوبت اول (هفته دهم) بر روی نمونه های اخذ شده (۱۴۰نمونه از ۷ سالن) از گروه واکسینه در کل گله ۵/۴۲بوده است .

۲-۳- میانگین تیتر سرمی در آزمون HI بعد از واکسیناسیون نوبت دوم (هفته شانزدهم) بر روی نمونه های اخذ شده (۱۴۰نمونه از ۷ سالن) از گروه واکسینه در کل گله ۶/۴ بوده است .

جدول میانگین تیتر **HI** در گروه واکسینه **مزرعه دو**

شماره سالن	قبل از واکسیناسیون	بعد از واکسن اول	بعد از واکسن دوم
شماره ۱	صفر	۵/۹	۷/۳۵
شماره ۲	صفر	۵/۷۵	۶/۸
شماره ۳	صفر	۵/۱۵	۶/۴
شماره ۴	صفر	۴/۵۵	۶
شماره ۵	صفر	۵/۵	۵/۶
شماره ۶	صفر	۵/۸۵	۶/۷۵
شماره ۷	صفر	۵/۳	۶/۱۵
کل مزرعه	صفر	۵/۴۲	۶/۴۳

۳- مزرعه شماره ۳ :

۴-

۴-۱- در کلیه نمونه های اخذ شده (۸۰ نمونه از ۴ سالن) در هفته هشتم قبل از واکسیناسیون تیتر HI صفر بوده است.

۴-۲- در کلیه سرمهای اخذ شده از گروه شاهد در هفته های سیزدهم و هیجدهم (به تعداد ۱۶۰ نمونه از ۴ سالن) تیتر HI صفر بوده است.

۴-۳- میانگین تیتر سرمی در آزمون HI بعد از واکسیناسیون نوبت اول (هفته سیزدهم) بر روی نمونه های اخذ شده (۸۰نمونه از ۴ سالن) از گروه واکسینه در کل گله ۵/۱۸ بوده است .

۴-۴- میانگین تیتر سرمی در آزمون HI بعد از واکسیناسیون نوبت دوم (هفته هیجدهم) بر روی نمونه های اخذ شده (۸۰نمونه از ۴ سالن) از گروه واکسینه در کل گله ۶/۰۷بوده است .

جدول میانگین تیتر HI در گروه واکسینه **مزرعه سه**

شماره سالن	قبل از واکسیناسیون	بعد از واکسن اول	بعد از واکسن دوم
شماره ۱	صفر	۵/۳	۶/۱۵
شماره ۲	صفر	۴/۹	۶/۲
شماره ۳	صفر	۴/۹	۶/۰۵
شماره ۴	صفر	۵/۵۶	۵/۹
کل مزرعه	صفر	۵/۱۸	۶/۰۷

ج- واکسن C :

۱-۱- در کلیه نمونه های اخذ شده (۱۶۰ نمونه از ۸ سالن) در هفته پنجم قبل از واکسیناسیون تیتر HI صفر بوده است.

۱-۲- در کلیه سرمهای اخذ شده از گروه شاهد در هفته های هشتم و سیزدهم (به تعداد ۳۲۰ نمونه از ۸ سالن) تیتر HI صفر بوده است.

۱-۳- میانگین تیتر سرمی در آزمون HI بعد از واکسیناسیون نوبت اول (هفته هشتم) بر روی نمونه های اخذ شده (۱۶۰نمونه از ۸ سالن) از گروه واکسینه در کل گله ۴/۹۴ بوده است .

۱-۴- میانگین تیتر سرمی در آزمون HI بعد از واکسیناسیون نوبت دوم (هفته سیزدهم) بر روی نمونه های اخذ شده (۱۶۰نمونه از ۸ سالن) از گروه واکسینه در کل گله ۷/۰۴ بوده است .

جدول میانگین تیتر HI در گروه واکسینه مزرعه یک

شماره سالن	قبل از واکسیناسیون	بعد از واکسن اول	بعد از واکسن دوم
شماره ۱	صفر	۵/۴	۷/۱
شماره ۲	صفر	۴/۹۵	۷/۴
شماره ۳	صفر	۴/۸	۷/۰۵
شماره ۴	صفر	۵	۷/۰۵
شماره ۵	صفر	۵/۱	۷/۲۵
شماره ۶	صفر	۵/۱	۶/۹
شماره ۷	صفر	۵/۲۵	۷/۱۵
شماره ۸	صفر	۳/۹۵	۶/۴۵
کل مزرعه	صفر	۴/۹۴	۷/۰۴

۳-تعیین توان خنثی کنندگی آنتی بادیهای سرم

۳ -۱- آزمون تیتراسیون ویروس و تعیین EID50

- از آنتی ژن ویروس آنفلوانزا (H5) در تعدادی لوله استریل (۸ لوله) حاوی مقدار یک میلی لیتر محلول PBS ، رقتهای لگاریتمی (از ۱۰ به توان منفی یک تا ۱۰ به توان منفی ۸) تهیه میشود.
- از هر رقت به مقدار ۰/۱ میلی لیتر به ۴ عدد تخم مرغ جنین دار (۱۱-۹ روزه) به داخل کیسه آلانتوئیک تزریق میشود.
- بعد از گذشت ۴۸ الی ۷۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه ، تخم مرغها خارج شده و به مدت یک شب در دمای ۴ درجه یخچالی قرار داده میشود.
- از مایع آلانتوئیک تمام تخم مرغها بصورت استریل و در کنار شعله مقدار ۲۵ لاندا برداشت کرده و آزمایش HA انجام میشود
- تمام گوده هایی که هماگلوتیناسیون کامل را نشان دهد دلیل بر حضور و تکثیر ویروس می باشد و بر اساس نتایج آن عیار ویروس تعیین میشود.(روش Reed & Munech)

نتیجه آزمون HA برای شانه تخم مرغ (تزریق ویروس به تنهایی) جهت تعیین LD50 عدد ۷ بدست آمد.

۲-۳- آزمون تیتراسیون سرم به روش HI آلفا

در این آزمون برخلاف روش بتا (روش معمول HI) میزان ثابت سرم به رقتهای مختلف آنتی ژن ویروس اضافه میشود.

- ابتدا در تمام گوده های پلیت مقدار ۲۵ لاندا بافر PBS اضافه میشود
- در گوده اول در ردیف اول مقدار ۲۵ لاندا از آنتی ژن ویروس مورد سنجش عیار قرار گرفته (از طریق آزمون HA) اضافه میشود و سپس به میزان ۲۵ لاندا رقیق شده و تا ردیف ۱۲ به رقیق کردن ادامه داده میشود
- به تمام گوده ها از سرم مورد آزمایش به میزان ۲۵ لاندا اضافه میشود.
- گذشت ۱۵ دقیقه زمان جهت خنثی سازی ویروس در دمای اتاق
- میزان ۲۵ لاندا گلبول قرمز شسته شده ۱ درصد مرغی به تمام گوده ها اضافه میشود و به مدت ۳۰ تا ۴۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده میشود
- آخرین رقت که هماگلوتیناسیون کامل را نشان دهد ، عیار ویروس می باشد

قابل ذکر است که همزمان با آزمایش عیار سنجی سرم به روش آلفا ، آزمایش عیارسنجی ویروس هم انجام میشود.

نتیجه آزمایش HI به روش آلفا بر روی سرمهای تجمیع شده

سرم	HI α
سرم صفر (شاهد)	۸
سرم یک (واکسن A)	۵
سرم دو (واکسن B)	۳

به منظور انجام آزمون به روش آلفا و بتا اقدام به تجمیع (پول کردن) سرمهای جمع آوری شده از مزرعه های تحت مطالعه (به تعداد ۱۲ میکروتیوب) از هر کدام از گروههای شاهد ، گروه واکسن A و گروه واکسن B بصورت جداگانه نموده و جهت آزمایش آماده گردید.

۳-۳- آزمون تعیین ضریب خنثی کنندگی سرم (SN) :

- در این آزمون ابتدا از ویروس مورد نظر (H5) رقتهای لگاریتمی تهیه گردید.(تعداد ۶ رقت ویروس)
- به منظور انجام آزمون LD50 ویروس نسبت به تهیه رقتهای ۳- تا ۸- ویروس H5 اقدام نموده و مشابه روش معمول به داخل تخم مرغ (بدون مخلوط کردن با سرم) تزریق میشود و بقیه مراحل مانند نمونه های سرم انجام میشود.
- قبل از رقت سازی ویروس ، آزمون HA ویروس جهت تعیین عیار آن انجام شد که نتیجه آن عدد ۷ بود
- تعداد ۱۸ لوله (برای هر ۳ گروه سرمی ۶ رقت) تهیه شده و از هر رقت ویروس تهیه شده مقدار ۰/۵ سی سی به هر لوله اضافه گردید.
- سرمها قبلا در بن ماری ۵۶ درجه به مدت ۴۵ دقیقه نگهداری شده و سپس در دور ۲۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژگردید

- مخلوط ویروس + سرم در لوله های متعدد تهیه شده به مدت ۴۵ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده میشود
- سپس از هر رقت ویروس (در مخلوط سرم + ویروس) به میزان ۰/۲ سی سی با سرنگ استریل در کنار شعله به ۴ عدد تخم مرغ جنین دار (۱۱-۹ روزه) از طریق کیسه آلانتوئیک پس از نشان دار و ضدعفونی کردن تخم مرغها تزریق میشود.(تخم مرغهای جنین دار قبلا در محل جوجه کشی از نظر شکل و اندازه و سن جنین سورت شده است و سپس در محل آزمایشگاه از نظر زنده بودن جنین به روش کندلینگ بررسی شده است)
- بعد از تزریق و نشانه گذاری ،شانه های تخم مرغ تزریق شده در انکوباتور ۳۷ درجه به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت نگهداری میشود.(در این فاصله زمانی تخم مرغها از نظر زنده ماندن و یا مرگ رخ داده بررسی میشوند)
- پس از گذشت زمان انکوباسیون ، شانه های تخم مرغ در داخل یخچال ۴ درجه به مدت یک شب نگهداری می شوند.
- پس از برداشت نمونه از مایع آلانتوئیک از تخم مرغهای خارج شده از یخچال ،مقدار ۲۵ لاندا از مایع آلانتوئیک در داخل گوده های پلیت ۹۶ خانه ای ریخته میشود.

آزمون HA بر روی نمونه های مایع آلانتوئیک جمع آوری شده :

- اضافه کردن ۲۵ لاندا از گلبول قرمز شسته شده تازه مرغی ۱ درصد به تمام گوده های پلیت و نگهداری در دمای اتاق به مدت ۴۵ دقیقه
- سپس نسبت به خوانش نتیجه هماگلوتیناسیون به روش معمول در گوده ها اقدام کرده و هر گوده ای که بصورت کامل هماگلوتیناسیون داشته باشد به عنوان تیتر خنثی کنندگی قلمداد میشود.(هر گوده تا ۸ رقت رقیق شده است)

نتایج آزمایش SN :

نتیجه هماگلوتیناسیون مشاهده شده بر اساس رقتهای تزریق شده و بر حسب واکسنهای مورد آزمایش به شرح جدول ذیل بدست آمده است :

سرم شماره دو		سرم شماره یک		LD50 ویروس	
نتیجه	رقت	نتیجه	رقت	نتیجه	رقت
+۳	-۱	+۴	-۱	+۱	-۳
+۲	-۲	+۳	-۲	+۲	-۴
+۱	-۳	+۱	-۳	+۴	-۵
۰	-۴	۰	-۴	+۴	-۶
۰	-۵	۰	-۵	+۳	-۷
۰	-۶	۰	-۶	+۴	-۸

تعیین جدول فاصله نسبی (Proportionate distance) PD50

با توجه به نتایج بدست آمده در آزمون HA بر روی نمونه های مایع آلانتوئیک جهت تعیین میزان LD50 نسبت به تنظیم جدول PD به روش Reed & munech برای هر یک از گروههای سرمی به شرح ذیل اقدام گردید :

لازم به ذکر است نتیجه هماگلوتیناسیون برای نمونه های آلانتوئیک سرم صفر (شاهد) تمام منفی بود و لذا جدولی تهیه نشده است.

۱- **سرم شماره یک :**

درصد پاسخ مثبت	نسبت پاسخ مثبت به کل	مقدار تجمعی پاسخ منفی -+	مقدار تجمعی پاسخ مثبت ++	پاسخ منفی -	پاسخ مثبت +	رقت
۱۰۰%	۸/۸	۰	۸	۰	۴	-۱
۸۰%	۴/۵	۱	۴	۱	۳	-۲
۲۰%	۱/۵	۴	۱	۳	۱	-۳
۰%	۰/۸	۸	۰	۴	۰	-۴

$$\text{Proportionate distance} = \frac{\text{بالای } 50\% - 50\%}{\text{بالای } 50\% - \text{پایین } 50\%}$$

$$= \frac{80-50}{80-20} = \frac{30}{60} = 0.5$$

$$T = 10^{2.5} \times 10 = 10^{3.5}$$

$$T = 10^{3.5}$$

شاخص خنثی کنندگی (Neutralization Index):

NI= لگاریتم تیتر مخلوط سرم و ویروس - لگاریتم تیتر ویروس کنترل

$$NI = 10^{7} - 10^{3.5} = 10^{3.5}$$

$$NI = 10^{3.5}$$

۲-**سرم شماره دو :**

درصد پاسخ مثبت	نسبت پاسخ مثبت به کل	مقدار تجمعی پاسخ منفی -+	مقدار تجمعی پاسخ مثبت ++	پاسخ منفی -	پاسخ مثبت +	رقت
۸۶%	۶/۷	۱	۶	۱	۳	-۱
۵۰%	۳/۶	۳	۳	۲	۲	-۲
۱۴%.	۱/۷	۶	۱	۳	۱	-۳
۰%	۰/۱۰	۱۰	۰	۴	۰	-۴

$T = 10^2 \times 10 = 10^3$

تیتر) $(T=10^3$

$NI=10^7 - 10^3 = 10^4$

$NI=10^4$

جدول نتیجه نهایی آزمایشات انجام شده (شماره ۱):

نوع سرم	تعداد نمونه	میانگین تیترHIβ بعد از واکسن اول	میانگین تیترHIβ بعد از واکسن دوم	نتیجه آزمون HIα سرمهای تجمیعی	شاخص NI آزمایش SN
واکسن A	۷۶۰	۲/۵۸ -۲/۹۹	۴/۸۳ – ۵/۲	۵	$10^{3.5}$
واکسن B	۵۲۰	۴/۴۲ – ۵/۴۲	۵/۹ – ۶/۴۳	۳	10^4
شاهد A	۱۱۴۰	۰	۰	۸	0
شاهد B	۷۸۰	۰	۰	۸	0

جدول نتیجه نهایی آزمایشات HI انجام شده (شماره ۲):

	واکسنA				واکسن B		
	تیتر	تعداد	درصد		تیتر	تعداد	درصد
نوبت اول	0	13	3/5%		0	2	0/8%
	1	35	9/3%		1	0	0/0%
	2	52	13/8%		2	8	3/1%
	3	100	26/6%		3	9	3/4%
	4	131	34/8%		4	30	11/5%
	5	39	10/4%		5	87	33/3%
	6	6	1/6%		6	121	46/4%
	7	0	0/0%		7	4	1/5%
	8	0	0/0%		8	0	0/0%
		376	100/0%			261	100/0%
نوبت دوم	0	0	0/0%		0	0	0/0%
	1	0	0/0%		1	0	0/0%
	2	9	2/4%		2	0	0/0%
	3	31	8/3%		3	6	2/3%
	4	67	17/9%		4	16	6/1%
	5	141	37/7%		5	36	13/7%
	6	78	20/9%		6	83	31/7%
	7	48	12/8%		7	104	39/7%
	8	0	0/0%		8	17	6/5%
		374	100/0%			262	100/0%

تحلیل نتایج :

- جدول فراوانی تیتر HI (شماره ۲) در خصوص سرمهای آزمایش شده نشان میدهد که بیشترین فراوانی در نوبت اول برای واکسن A در تیتر ۴ با ۳۴/۸٪ و برای واکسن B تیتر ۶ با ۴۶/۴٪ و در نوبت دوم واکسیناسیون برای واکسن A تیتر ۵ با ۳۷/۷٪و برای واکسن B تیتر ۷ با ۳۹/۷٪ می باشد. بنابرین در مقایسه عملکرد تولید آنتی بادی بین دو واکسن آزمایش شده می توان گفت واکسن B هم از لحاظ عدد لگاریتم تیتر در نوبت اول و دوم و هم از نظر میزان فراوانی ماکزیمم تیتر با واکسن A تفاوت قابل ملاحظه ای دارد.
- در میانگین تیتر سرمهای آزمایش شده در نوبت اول واکسیناسیون ، واکسن B با اختلاف حدود ۲ log بالاتر از واکسن A بوده و در نوبت دوم واکسیناسیون نیز واکسن B با اختلاف حدود ۱ log بالاتر از واکسن A عملکرد داشته است.
- بالاتری تیتر برای واکسن A در نوبت اول واکسیناسیون ۶ بوده ولی برای واکسن B بالاترین تیتر در نوبت اول عدد ۷ است. اما در نوبت دوم واکسیناسیون بالاترین تیتر برای واکسن A عدد ۷ و برای واکسن B بالاترین تیتر در نوبت دوم عدد ۸ است . بنابرین بالاترین تیتر پس از دو بار واکسیناسیون با مصرف واکسن B بدست آمده است.
- با توجه به نقطه نظر OIE در دستورالعمل تستهای تشخیصی ویرایش ۲۰۲۱ در فصل آنفلوانزا بند ۲-۳-۲ مبنی بر این که تیتر ۵ به بالا در آزمون HI قابلیت محافظت از مرگ و میر را در پرنده دارد لذا برای واکسن A در نوبت اول تنها ۱۲٪ از سرمها دارای تیتر بالای ۵ بوده اما این عدد برای واکسن B در نوبت اول ۸۱/۲٪ است و در نوبت دوم واکسیناسیون عملکرد واکسن A در این خصوص ۷۱/۴٪ از سرمها تیتر بالای ۵ داشته و برای واکسن B این عدد ۹۱/۶٪ بوده است. همچنین چنانچه تیتر HI بالاتر از ۷ باشد علاوه بر محافظت پرنده در مقابل مرگ و میر ، قادر به کاهش تکثیر و رهاسازی ویروس از پرنده میشود لذا تیتر بالای ۷ برای واکسن A در نوبت اول واکسیناسیون صفر بوده و هیچیک از سرمها این معیار نداشتند اما این عدد برای واکسن B در نوبت اول ۱/۵٪ بوده است. در نوبت دوم واکسیناسیون برای واکسنA این عدد تنها ۱۲/۸٪ بوده و در مقابل برای واکسن B ۴۶/۲٪ سرمها دارای تیتر بالاتر از ۷ می باشند.

بنابرین در خصوص عملکرد محافظت از مرگ ومیر واکسن B عملکرد قابل قبولی با یک نوبت واکسیناسیون داشته اما هر دو واکسن با دو نوبت واکسیناسیون از این نظر مطلوب هستند و در خصوص جلوگیری از تکثیر و رهاسازی ویروس هیچکدام از دو واکسن با یک دز قادر به این کار نیستند و پس از دو نوبت واکسیناسیون ، واکسن B عملکرد بهتری داشته است.

- در خصوص عملکرد خنثی کنندگی آنتی بادیهای حاصل از واکسنهای مصرفی با توجه به نتایج جدول شماره ۱ در آزمون خنثی کنندگی ویروس در پلیت به روش Hiα (Invitro) واکسن A توانسته است تا ۳ log (هزار برابر) از توان آنتی ژنیسیته ویروس کاهش دهد ولیکن واکسن B با ۵ log کاهش (۱۰۰هزار برابر) از توان آنتی ژنیسیته ویروس کاسته است. در آزمون خنثی کنندگی سرم به روش SN (Invivo) فقط ۰/۵ log تفاوت بین دو واکسن وجود دارد بطوریکه واکسن A با شاخص $NI10^{3.5}$ توانسته ۵۰٪ توان آنتی ژنیسیته ویروس را کاهش دهد و واکسن B با شاخص $NI\ 10^{4}$ توانسته بیش از ۵۷٪ از توان آنتی ژنیسیته ویروس را کاهش دهد.

با توجه به نتایج سرولوژیک (HI و SN) بر روی نمونه های اخذ شده از گروه شاهد که همگی صفر بوده و همچنین نتایج منفی آزمون ملکولی (PCR) و فقدان هر گونه علائم بیماری و یا مرگ و میر در پرندگان شاهد لذا هیچگونه ردپایی از ویروس فیلد در مزرعه های تحت مطالعه یافت نگردید.

توصیه ها :

- **مطالعه مستمر ارزیابی توان حفاظت کنندگی هر یک از واکسنهای مصرفی**
- **بررسی و مطالعه نوع و تعداد کانون ویروس (HPAI) در حال گردش در کشور**
- **مطالعه مستمر فیلوژنیک ویروسهای جداشده از رخدادهای قطعی بیماری در کشور**
- **تعیین حدود پایه (Basline) سرولوژیک ناشی از مصرف واکسنهای موجود**
- **تدوین برنامه ملی خروج از واکسیناسیون**

منابع :

تعداد صفحات	سال انتشار	نام ناشر	محل انتشار	تاریخ نگارش	نام مولف نام مترجم	عنوان کتاب /مقاله	ردیف
11	2008		Faculty of Veterinary Medicine, Department of Farm Animal Health, Marburglaan 2, 3584 CN Utrecht, the Netherland	2008	ouma (1)*, A. Teguh Muljono (2), A. Jatikusumah (2), A.J. Nell	Field trial for assessment of avian influenza vaccination effectiveness in Indonesia	١
11	2005		Hong Kong	2005	T.M. Ellis , L.D. Sims, H.K.H. Wong, L.A. Bissett, K.C	Evaluation of vaccination to support control of H5N1 avianinfluenza in Hong Kong	٢
8	2008		Department of Veterinary Hygiene† and Management‡, Faculty of Veterinary Medicine, Cairo University, Giza, Egypt	2008	H.A. Ka - Oud†, M.A. Zakia and Mervat M. Kamel‡	Evaluation of the Immune Response in AI Vaccinated Broiler Chickens: Effect of Biosecurity Faults on Immune Response	٣
8	2008		Key Laboratory of Zoonosis of Ministry of Agriculture, College of Veterinary Medicine	2008	Honglei SUN, Jinhua LIU	Assessment of vaccination strategies against highlypathogenic avian influenza in China	٤
21	2010		FAO, Viale delle Terme di Caracalla, 00153 Rome, Italy	2009	J. Hinrichs, J. Otte, J. Rushton	Technical, epidemiological and financial implications of large-scale national vaccination campaigns to control HPAI H5N1	٥
9	2013		United States Department of Agriculture, 934 College Station Road, Athens, GA 30605	2013	id E. Swayne,1 Erica Spackman,1 and Mary Pantin-Jackwood1	success Factors for Avian Influenza Vaccine Use in Poultryand Potential Impact at the Wild Bird–Agricultural Interface	٦
10	2017		Exotic and Emerging Avian Disease Research Unit, Southeast Poultry Research Laboratory, U.S. National Poultry Research Center, Agricultural Research Service, USDA, 934 College Station Road, Athens, GA 30605, United States	2017	Darrell R. Kapczynski ⇑ , Mary J. Pantin-Jackwood, Erica Spackman, Klaudia Chrzastek, David L. Suarez, David E. Swayne	Homologous and heterologous antigenic matched vaccines containing different H5 hemagglutinins provide variable protection of chickens from the 2014 U.S. H5N8 and H5N2 clade 2.3.4.4 highly pathogenic avian influenza viruses	٧

10	2010		Southeast Poultry Research Laboratory, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, 934 College Station Road, Athens, GA 30605, USA.	2010	Pfeiffer J[1], Suarez DL, Sarmento L, To TL, Nguyen T, Pantin-Jackwood MJ.	Efficacy of commercial vaccines in protecting chickens and ducks against H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses from Vietnam	8
8	2014		Department of Veterinary Hygiene and Environmental Pollution, Faculty of Veterinary Medicine, Cairo University, Egypt	2014	H.A. Kaoud a,*,1,2, H.A. Hussein b,1,3, A.R. El-Dahshan a,1,3, H.S. Kaliefa a,1,3, M.A. Rohaim b,1,	Co-circulation of avian influenza virusesin commercial farms, backyards and livemarket birds in Egypt	9
5	2010		*epartments of Surgery and Medicine,*1 *Division of Infectious Diseases,*2 *and Department of Pathology,*3 *University of Pittsburgh School of Medicine, and Division of Laboratory Animal Resources,*4 *University of Pittsburgh, Pittsburgh,*	2010	Julia Steitz,1 Robert A. Wagner,4 Tyler Bristol,1 Wentao Gao,3 Ruben O. Donis,5 and Andrea Gambotto	Assessment of Route of Administration and Dose Escalation for anAdenovirus-Based Influenza A Virus (H5N1) Vaccine in Chickens	10
26	2016		Department of Microbiology and Immunology, University of Rochester, Rochester, NY 14642, USA	2016	Marta Gíria a, LuísSantos a,b, JoãoLouro a,b, HelenaRebelodeAndrade	Reverse Genetics Approaches for the Development of Influenza Vaccines	11
45	2001		University of Texas at Austin	2001	Lippincott W, Wilkins	Orthomyxoviridae: The viruses and their replication	12
5	1997		Institut für Virologie, Justus-Liebig-Universität Giessen	1997	Rott R[1]	Influenza, a special form of zoonosis.	13
3	2005		Influenza Branch, Mailstop G-16, Division of Viral and Rickettsial Diseases (DVRD), National Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, 1600 Clifton Road, NE, Atlanta, GA 30333, USA. tft9@cdc.gov	2005	Tumpey TM[1], Basler CF, Aguilar PV, Zeng H, Solórzano A, Swayne DE, Cox NJ, Katz JM, Taubenberger JK, Palese P, García-Sastre A.	Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus	14
7	2010		College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, People's Republic of China.	2010	Wu ZQ[1], Ji J, Zuo KJ, Xie QM, Li HM, Liu J, Chen F, Xue CY, Ma JY, Bi YZ.	Cloning and phylogenetic analysis of hemagglutinin gene of H9N2 subtype avian influenza virus from different isolates in China during 2002 to 2009	15
11	1998		Queen Mary Hospital, The University of Hong Kong, Hong Kong SAR.	1998	Shortridge KF[1], Zhou NN, Guan Y, Gao P, Ito T, Kawaoka Y, Kodihalli S, Krauss S, Markwell D, Murti KG, Norwood M, Senne D, Sims L, Takada A, Webster RG.	Characterization of avian H5N1 influenza viruses from poultry in Hong Kong	16
3	1985			1985	A J Hay, A J Wolstenholme, J J Skehel, and M H Smith	The molecular basis of the specific anti-influenza action of amantadine.	17

34	1990			1990	Wilson I a, Cox NJ	Structural basis of immune recognition of influenza virus hemagglutinin.	18
12	2002		Southeast Poultry Research Laboratory, U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Athens, Georgia 306051	2002	Terrence M. Tumpey, David L. Suarez, Laura E. L. Perkins, Dennis A. Senne, Jae-gil Lee, Youn-Jeong Lee, In-Pil Mo, Haan-Woo Sung, David E. Swayne	haracterization of a Highly Pathogenic H5N1 Avian Influenza A Virus Isolated from Duck Meat	19
3	1998		Influenza Branch, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA 30333, USA.	1998	Subbarao K[1], Klimov A, Katz J, Regnery H, Lim W, Hall H, Perdue M, Swayne D, Bender C, Huang J, Hemphill M, Rowe T, Shaw M, Xu X, Fukuda K, Cox N	Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness	20
10	1998		Southeast Poultry Research Laboratory, USDA, ARS, Athens, Georgia 30605, USA	1998	Suarez DL[1], Perdue ML, Cox N, Rowe T, Bender C, Huang J, Swayne DE	Comparisons of highly virulent H5N1 influenza A viruses isolated from humans and chickens from Hong Kong	21
12	1996			1996	Dennis A. Senne, Benu Panigrahy, +5 authors Robert G Webster	Survey of the hemagglutinin (HA) cleavage site sequence of H5 and H7 avian influenza viruses: amino acid sequence at the HA cleavage site as a marker of pathogenicity potential	22
8	1994		Department of Virology and Molecular Biology, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tennessee 38101,1 and Department of Pathology, The Health Science Center, University of Tennessee, Memphis, Tennessee 381632	1994	TAISUKE HORIMOTO' AND YOSHIHIRO KAWAOKA1	Reverse Genetics Provides Direct Evidence for a Correlation of Hemagglutinin Cleavability and Virulence of an Avian Influenza A Virus	23
13	1997		Agriculture Research Service, United States Department of Agriculture, Athens, GA, USA.	1997	Perdue ML[1], García M, Senne D, Fraire M.	Virulence-associated sequence duplication at the hemagglutinin cleavage site of avian influenza viruses	24
10	2004		Division of Virology, Department of Infectious Diseases, St. Jude Children's Research Hospital, 332 N. Lauderdale St., Memphis, TN 38105-2794, USA.	2004	Hulse DJ[1], Webster RG, Russell RJ, Perez DR.	Molecular determinants within the surface proteins involved in the pathogenicity of H5N1 influenza viruses in chicken	25
10	2010		National Influenza Center and Department of Virology, Erasmus Medical Center, P.O. Box 2040, 3000 CA Rotterdam, The Netherlands	2010	Emmie de Wit,† Vincent J. Munster,† Debby van Riel, Walter E. P. Beyer, Guus F. Rimmelzwaan, Thijs Kuiken, Albert D. M. E. Osterhaus, and Ron A. M. Fouchier*	Molecular Determinants of Pathogenicity for Avian Influenza Viruses. Avian Influenza	26
10	2006		State Key Laboratory of Emerging Infectious Diseases, Department of Microbiology, The University of Hong Kong, Faculty of Medicine Building, 21 Sassoon Road, Pokfulam, Hong Kong SAR, China	2006	Smith GJ[1], Naipospos TS, Nguyen TD, de Jong MD, Vijaykrishna D, Usman TB, Hassan SS, Nguyen TV, Dao TV, Bui NA, Leung YH, Cheung CL, Rayner JM, Zhang JX, Zhang LJ, Poon LL, Li KS, Nguyen VC, Hien TT, Farrar J, Webster RG, Chen H, Peiris JS, Guan Y.	Evolution and adaptation of H5N1 influenza virus in avian and human hosts in Indonesia and Vietnam	27

9	2006		Department of Infectious Diseases, St. Jude Children's Research Hospital, and Department of Pathology, University of Tennessee, Memphis, TN 38105, USA.	2006	Salomon R[1], Franks J, Govorkova EA, Ilyushina NA, Yen HL, Hulse-Post DJ, Humberd J, Trichet M, Rehg JE, Webby RJ, Webster RG, Hoffmann E	The polymerase complex genes contribute to the high virulence of the human H5N1 influenza virus isolate A/Vietnam	28
6	2001		Laboratory of Viral Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Bethesda, Maryland, USA.	2001	Chen W[1], Calvo PA, Malide D, Gibbs J, Schubert U, Bacik I, Basta S, O'Neill R, Schickli J, Palese P, Henklein P, Bennink JR, Yewdell JW.	A Novel Influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death.	29
8	2005		Department of Microbiology, Mount Sinai School of Medicine, New York, New York, United States of America	2005	Zamarin D[1], García-Sastre A, Xiao X, Wang R, Palese P.	Influenza Virus PB1-F2 Protein Induces Cell Death through Mitochondrial ANT3 and VDAC1	30
17	1992		U.S. Department of Agriculture, Southeast Poultry Research Laboratory, Athens, GA 30605.	1992	Perdue ML	Naturally occurring NS gene variants in an avian influenza virus isolate. Virus	31
7	2008		Department of Veterinary Hygiene† and Management‡, Faculty of Veterinary Medicine, Cairo University, Giza, Egypt **Abstract:** This article was a trial to evaluate: The immune responses	2008	H.A. Ka - Oud†, M.A. Zakia and Mervat M. Kamel	Evaluation of the Immune Response in AI Vaccinated Broiler Chickens: Effect of Biosecurity Faults on ImmuneResponse	32
11	2008		Faculty of Veterinary Medicine, Department of Farm Animal Health, Marburglaan 2, 3584 CN Utrecht, the Netherlands	2008	A. Bouma (1)*, A. Teguh Muljono (2), A. Jatikusumah (2), A.J. Nell (3), S. Mudjiartiningsih (4), I. Dharmayanti (5), E. Sawitri Siregar (6), I. Claassen (7), G. Koch (8) & J.A. Stegeman	Field trial for assessment of avian influenza vaccination effectiveness in Indonesia	33
5	2014		Key Laboratory of Zoonosis of Ministry of Agriculture, College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China	2014	Honglei SUN, Jinhua LIU	Assessment of vaccination strategies against highly pathogenic avian influenza in China	34

- **Isolation ,Identification,and Characterization of Avian Pathogens**
- **دستورالعمل تستهای تشخیصی ویرایش ۲۰۲۱ در فصل آنفلوانزا بند ۲-۳-۲**
- **برنامه ملی کنترل آنفلوانزای فوق حاد پرندگان – سازمان دامپزشکی کشور**
- **بخشنامه شماره ۹۷/۴۲/۲۰۱۵۹ - ۹۷/۳/۲۷ سازمان دامپزشکی کشور**
- **بخشنامه شماره ۹۷/۴۲/۴۶۳۷۹ - ۹۹/۹/۲ سازمان دامپزشکی کشور**

با تقدیم احترام

دکتر وحید کریمی

گروه بهداشت و بیماریهای طیور

دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران