تحقیقات تولیدات دامی

سال نهم/شماره چهارم/زمستان ۱۳۹۹ (۳۱-۲۳)

Animal Production Research

دانشگاه گیلان

مقاله پژوهشی

همبستگی تنش با پاسخ‌های فاز حاد و ایمنی هومورال در جوجه‌های گوشتی

آرش جانمحمدی[۱]، نریمان شیخی[۲]، هادی حق بین نظرپاک[۳]، غلامرضا نیکبخت بروجنی[۴*]

۱- دانشجوی مقطع دکتری بیماری های طیور، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- استادیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳- استادیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد گرمسار، دانشگاه آزاد اسلامی، گرمسار، ایران

۴- استاد، گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

(تاریخ دریافت: ۹۸/۰۹/۱۱ - تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۱/۲۶)

چکیده

درک پیوستگی ایمنی ذاتی و اکتسابی و تناسب پاسخ‌های التهابی و تحریک ایمنی به بهبود روش ایمن‌سازی کمک خواهد نمود. هدف از این مطالعه، بررسی همبستگی پاسخ التهابی با پاسخ ایمنی اختصاصی در جوجه‌های گوشتی بود.۶۰ قطعه جوجه گوشتی سویه راس ۳۰۸ در دو گروه آزمایش (واکسینه) و شاهد و هر گروه با سه تکرار (هر تکرار با ۱۰ قطعه جوجه) مورد بررسی قرار گرفتند. به گروه آزمایش، واکسن نیوکاسل در روزهای ۸ و ۲۰ دوره پرورشی از راه داخل عضلانی تزریق شد و به گروه شاهد، بافر فسفات تزریق شد. در روزهای ۷، ۱۰، ۱۹ و ۲۲، پنج نمونه خون از هر گروه اخذ شد. به منظور بررسی تنش، نسبت هتروفیل به لمفوسیت، مقادیر پلاسمایی سرم آمیلوئید آ و آلفا-۱ اسید گلیکوپروتئین و همچنین جهت ارزیابی کمّی پاسخ ایمنی اکتسابی، پاسخ پادتنی به واکسن نیوکاسل بررسی شد. شاخص تنش و پروتئین‌های فاز حاد پس از واکسیناسیون افزایش معنی‌داری داشتند (P<۰/۰۵). مقایسه گروه واکسن با گروه شاهد نیز حاکی از افزایش ۱/۵ برابری شاخص تنش (۶۸٪ به ۹۷٪) و افزایش معنی‌دار سرم آمیلوئید آ در روز ۲۲ (۰/۰۸۶ به ۰/۰۹۶ گرم در لیتر) و آلفا-۱ اسید گلیکوپروتئین در روز ۱۰ (۳۰۰/۶۳ به ۶۰۰/۱۲ میلی-گرم در لیتر) بود (P<۰/۰۵). تغییرات میزان سرم آمیلوئید آ با آلفا-۱ اسید گلیکوپروتئین و شاخص تنش نسبت عکس داشت (r= -۰/۲۲۹، P=۰/۰۸۱). تغییرات شاخص تنش ارتباط مستقیم و معنی‌داری با تغییرات آلفا-۱ اسید گلیکو پروتئین (r=-۰/۴۱۱، P<۰/۰۰۱) و همچنین عیار پادتن (r=-۰/۳۱۳، P<۰/۰۰۱) داشت. تنش با پاسخ ایمنی اکتسابی همبستگی معنی‌داری دارد و نشانگر مناسبی برای ارزیابی ایمنی‌زایی و اثربخشی واکسیناسیون است.

واژه‌های کلیدی: آلفا ۱ اسیدگلیکوپروتئین، تنش، جوجه گوشتی، سرم آمیلوئید آ، واکسن

* نویسندهٔ مسئول: nikbakht@ut.ac.ir

doi: 10.22124/ar.2021.4657

مقدمه

ایمنی ذاتی در ابتدای برخورد با عامل بیماری‌زا و در طی واکنش آماسی یا التهاب نقشی تعیین‌کننده برای شدت و جهت‌دهی پاسخ‌های اکتسابی به سمت واکنش سلولی یا هومورال و یا حتی ازدیاد حساسیت دارد (Hoebe *et al.*, 2004). واکنش‌های التهابی متعاقب آسیب‌های بافتی و یا برخورد با عوامل عفونی در قالب مجموعه‌ای از رویدادهای فیزیولوژیک شکل می‌گیرند که حاصل آنها، از بین بردن عامل عفونی، جلوگیری از آسیب بافتی بیشتر و بازیابی هومئوستازی میزبان است. پاسخ فاز حاد (Acute phase response)، به عنوان بخشی از ایمنی ذاتی، شامل مجموعه واکنش‌هایی است که در طی زمانی اندک پس از آسیب بافتی رخ می‌دهند (Najafi *et al.*, 2015; Packialakshmi *et al.*, 2016). پاسخ فاز حاد به وسیله یاخته‌های نگهبان مستقر در بافت مثل ماکروفاژهای بافتی، یاخته‌های شجری و ماست‌سل‌ها آغاز می‌شود. این یاخته‌ها نقشی کلیدی در روند تحریک پاسخ ایمنی اختصاصی و به ویژه تولید پادتن‌های اختصاصی دارند. شاخص‌های اصلی التهاب، سایتوکاین‌ها و پاسخ فاز حاد پروتئین‌های فاز حاد (Acute APP-Phase Proteins) هستند. یافته‌های حاصل از ارزیابی پاسخ فاز حاد در شرایط سلامت و بیماری دارای کاربردی بالینی به منظور تشخیص زودهنگام بیماری است و همچنین می‌تواند ابزار مناسبی برای پیگیری روند درمان و بهبودی باشد (Marques *et al.*, 2017). در طراحی و تولید واکسن‌ها نیز ارزیابی پاسخ فاز حاد می‌تواند به انتخاب سویه‌های کم خطر و موثر در تحریک ایمنی اکتسابی کمک کند. مطالعات مربوط به واکنش پروتئین‌های فاز حاد در زمان واکسیناسیون در برخی گونه‌ها مانند اسب، گاو و گوسفند اشاره به اهمیت ارزیابی این پروتئین‌ها در برنامه‌های توسعه واکسن دارند (Andersen *et al.*, 2012; Arthington *et al.*, 2013; El *et al.*, 2005).

سایتوکاین‌های التهابی در طیور باعث افزایش ساخت و ترشح پروتئین‌های فاز حاد در هپاتوسیت‌ها می‌شوند. در طی ساعات ابتدایی پاسخ فاز حاد، پروتئین‌های فاز حاد ترشح شده به وسیله هپاتوسیت‌ها در پلاسما قابل اندازه‌گیری خواهند بود (O'Reilly and Eckersall, 2014). همانند پستانداران، دو دسته پروتئین فاز حاد در طیور شناخته شده‌اند: گروهی که در طی التهاب افزایش می‌یابند پروتئین فاز حاد مثبت و گروهی که کاهش می‌یابند پروتئین فاز حاد منفی نامیده می‌شوند. آلبومین پروتئین فاز حاد منفی است که غلظت پلاسمایی آن در طیور در شرایط التهابی تا ٪۷۵-۵۰ غلظت طبیعی کاهش می‌یابد. بر اساس مطالعات صورت گرفته، سرم آمیلوئید آ[1] (SAA) و آلفا ۱-اسید گلیکوپروتئین[2] (AGP) مهمترین پروتئین‌های فاز حاد مثبت (Major APP) در طیور هستند (O'Reilly and Eckersall, 2014). اندازه‌گیری پروتئین‌های فاز حاد در طیور طی چند ساله گذشته بیشتر به منظور تعیین آثار تغذیه، دما، رطوبت بستر و تراکم بر این پروتئین‌ها صورت گرفته است (Najafi *et al.*, 2015). مطالعات جدیدتر نیز حاکی از اهمیت پاسخ فاز حاد در مواجهه با لیپوپلی‌ساکارید باکتریایی و سموم فلزی است (Horvatić *et al.*, 2019; Jarosz, *et al.*, 2019). تاکنون ارزیابی پاسخ فاز حاد در برابر واکسن تنها در طیور تخم‌گذار گزارش شده است (Kaab *et al.*, 2018).

با توجه به اهمیت واکسیناسیون و انتخاب واکسن‌های مناسب در طیور گوشتی لازم است پاسخ ایمنی ذاتی نیز بررسی شود. به ویژه، پیوستگی ایمنی ذاتی و اکتسابی و به عبارتی تناسب پاسخ‌های التهابی و تحریک ایمنی اختصاصی به بهبود روش‌ها و شرایط ایمن‌سازی کمک خواهد نمود. حال سوال اساسی این است که پاسخ التهابی تا چه اندازه بر چگونگی پاسخ اختصاصی اثر خواهد گذاشت. در تحقیق حاضر همبستگی تنش با التهاب و ایمنی اختصاصی در طیور گوشتی بررسی شده است. نسبت هتروفیل/لنفوسیت به عنوان شاخص تنش، مقادیر پروتئین‌های فاز حاد (سرم آمیلوئید آ و آلفا ۱- اسید گلیکوپروتئین) به عنوان شاخص التهاب و تولید پادتن به عنوان پاسخ ایمنی اختصاصی به واکسن نیوکاسل در نظر گرفته شدند. همچنین ارتباطات این شاخص‌ها در پاسخ به واکسن نیوکاسل مورد ارزیابی قرار می‌گیرند.

1. Serum Amyloid A
2. Alpha 1-Acid glycoprotein

مواد و روش‌ها

گروه‌های مطالعه: در این مطالعه، تعداد ۶۰ قطعه جوجه خروس گوشتی سویه تجاری Ross 308 از یک گله مادر تهیه و به صورت تصادفی در روز اول پرورش به دو گروه واکسینه (آزمایش) و شاهد تقسیم شدند. هر گروه شامل سه زیر گروه (تکرار) با ۱۰ قطعه جوجه گوشتی بود. گروه‌ها به طور کاملاً مجزا و در شرایط قرنطینه‌ای مناسب پرورش یافتند. شرایط تغذیه و پرورش بر اساس استانداردهای سویه Ross 308 بود (راهنمای پرورش سویه راس ۳۰۸) و تراکم برای تمام گروه‌ها یکسان و ۱۰ جوجه در هر متر مربع در نظر گرفته شد. تمام پرندگان دسترسی آزاد به دان پلت متوازن شده و آب تازه داشتند. نور، تهویه و دما به صورت یکسان و بر اساس راهنمای نژادی برای پن‌های مختلف تامین شد. قبل از انجام اولین مرحله واکسیناسیون و در هفته اول پرورش، زمان لازم برای تطبیق جوجه‌ها با محیط صرف شد.

در روزهای هشتم و بیستم پرورش، میزان ۰/۱ میلی‌لیتر بافر فسفات و واکسن غیرفعال روغنی نیوکاسل (شرکت Cevac، مجارستان) به ترتیب در عضله سینه گروه شاهد و آزمایش تزریق شد. واکسن قبل از انجام واکسیناسیون برای تزریق به پرنده به مدت دو ساعت در دمای محیط قرار داده شد. در روزهای ۷، ۱۰، ۱۹ (۲۴ ساعت قبل از واکسیناسیون) و ۲۲ (۴۸ ساعت بعد از واکسیناسیون)، نمونه خون کامل (با ماده ضدانعقاد EDTA) از پنج پرنده در هر تکرار اخذ شد. ابتدا از هر نمونه، گسترش خون به منظور شمارش هتروفیل به لنفوسیت تهیه شد و سپس با سانتریفیوژ ۳۰۰۰ دور در دقیقه پلاسما جدا شده و تا زمان آزمایش ذخیره شد. گسترش‌های بدست آمده بعد از تثبیت با رایت گیمسا (شرکت پارس پیوند، ایران) رنگ‌آمیزی شد. نسبت هتروفیل به لنفوسیت با کمک میکروسکوپ (نیکون، کشور ژاپن) و عدسی شیئی ۱۰۰ با شمارش حداقل ۱۰۰ لکوسیت تعیین شد.

غلظت پروتئین‌های فاز حاد (سرم آمیلوئیدوز A و آلفا – یک اسید گلیکو پروتئین) در پلاسمای خون با آزمون ساندویچ الیزا و بر اساس روش پیشنهادی شرکت تولید کننده کیت الیزای اختصاصی اندازه‌گیری شدند (Cloud-Clone Corp., Spain).

به منظور بررسی عیار پادتن ضد ویروس نیوکاسل و میزان برانگیختگی سیستم ایمنی همورال از روش الیزا استفاده شد. دستورالعمل الیزا کاملاً مشابه با روش شرح داده شده توسط Nikbakht *et al.* (2019) بود، با این تفاوت که در اینجا پوشش ابتدایی گوده‌ها با پادگن لاسوتا صورت گرفت (Nikbakht *et al.*, 2019).

تحلیل آماری: تمامی داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار نمایش داده شدند. برای تحلیل آماری و مقایسه گروه-های آزمایش و شاهد از آزمون Student's t-test استفاده شد. برای تحلیل همبستگی بین متغیرهای التهاب و پادتن، ضرایب همبستگی به روش پیرسون محاسبه و برای تعیین معنادار بودن ضریب همبستگی از آزمون تبدیل r-to-z فیشر استفاده شد.

در ابتدا مقادیر شاخص تنش و پروتئین‌های فاز حاد در زمان قبل از واکسیناسیون با بعد از واکسیناسیون مقایسه شدند. سپس در زمان‌های پس از واکسیناسیون هر مقدار در گروه آزمایش با گروه شاهد مقایسه شدند.

نتایج

نتایج نشان داد شاخص تنش پس از واکسیناسیون در گروه آزمایش، نسبت به زمان قبل از واکسیناسیون افزایش یافت (P<۰/۰۱). همچنین شاخص تنش در گروه آزمایش در روزهای ۱۰، ۱۹ و ۲۲ اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد واکسن داشت (P<۰/۰۵) (جدول ۱).

غلظت سرم آمیلوئید آ پس از واکسیناسیون نسبت به زمان قبل از واکسیناسیون افزایش یافت (P<۰/۰۵). افزایش این متغیر در گروه آزمایش نسبت به گروه شاهد پس از واکسیناسیون و فقط در روزهای ۲۲ معنی‌دار بود. در روزهای ۱۰ و ۱۹، افزایش غلظت سرم آمیلوئید آ در گروه آزمایش تفاوتی با گروه شاهد نداشت (P>۰/۰۵) (جدول ۱).

در گروه دریافت‌کننده واکسن پس از واکسیناسیون مرحله اول (روز ۱۰)، غلظت آلفا-۱ اسید گلیکوپروتئین نسبت به زمان پیش از واکسیناسیون افزایش یافت. افزایش مقادیر

آلفا-۱ اسید گلیکوپروتئین در بین گروه آزمایش و شاهد فقط در روز ۱۰ مشاهده شد ($P<۰/۰۵$) (جدول ۱).

نتایج آزمون الیزا برای تعیین مقادیر پادتن نیوکاسل نشان داد که میزان پادتن پس از واکسیناسیون افزایش یافته است ($P<۰/۰۵$). در مقایسه زمان‌های پس از واکسیناسیون در روزهای ۱۰، ۱۹ و ۲۲ نیز میزان پادتن در گروه آزمایش بیشتر از گروه شاهد بود ($P<۰/۰۵$) (جدول ۱).

همان‌گونه که در جدول ۲ نشان داده شده است، تغییرات میزان سرم آمیلوئید آ تناسب معکوس با آلفا-۱ اسید گلیکوپروتئین و شاخص تنش (هتروفیل/لمفوسیت) داشت. اما افزایش هر دو پروتئین فاز حاد با افزایش عیار پادتن همراه بود. هیچ یک از تغییرات مذکور بر اساس آزمون فیشر معنی‌دار نبودند. تغییرات نسبت هتروفیل به لنفوسیت ارتباط مستقیم و معنی‌داری با تغییرات آلفا-۱ اسید گلایکو پروتئین ($P<۰/۰۰۱$) و همچنین عیار پادتن ($P<۰/۰۰۱$) داشته است (جدول ۲).

بحث

پژوهش حاضر بر مبنای دانسته‌های بنیادین ایمنی‌شناسی از ارتباط و تقابل ایمنی ذاتی و اکتسابی طراحی شده است. اساساً ایمنی ذاتی در مواجهه با عوامل غیرخودی به دو صورت غیر فعال (سدهای فیزیکو شیمیایی) و فعال، در قالب پاسخ آماسی یا التهابی شکل می‌گیرد. در روند فعال، واکنش التهابی تسهیلاتی را برای افزایش تولید عوامل هومورال (سیتوکاین‌ها)، حضور یاخته‌های ایمنی و پاسخ ایمنی اکتسابی فراهم می‌کند. به عبارتی، آماس پل میان ایمنی ذاتی و اکتسابی است (Gruys *et al.*, 2005; Hosseini *et al.*, 2015). از این رو می‌توان تصور نمود که التهاب و پاسخ فاز حاد، شاخص‌های مناسبی برای تخمین کیفیت و کمیت پاسخ ایمنی اختصاصی باشند. برای آزمون این نظریه به متغیرهایی نیاز است که کمیت پاسخ التهابی را نشان دهند.

تحقیق حاضر نشان داد که در طیور گوشتی از شاخص تنش و مقادیر پلاسمایی سرم آمیلوئید آ و آلفا-۱ اسید گلیکوپروتئین می‌توان برای ارزیابی التهاب ناشی از واکسن استفاده کرد. افزایش معنی‌دار این شاخص‌ها نه تنها در تحقیق حاضر بلکه در طیور تخم‌گذار نیز در پاسخ به واکسن نیوکاسل نشان داده شده است (Kaab *et al.*, 2018).

ایجاد پاسخ فاز حاد متعاقب واکسیناسیون با واکسن‌های کشته روغنی، متفاوت از سویه‌های زنده واکسن است. گرچه در هر دو مورد سیستم ایمنی ذاتی تحریک می شود، اما در مورد واکسن کشته روغنی، راه تجویز واکسن و ایجاد آسیب بافتی ناشی از تزریق، احتمالاً منجر به ایجاد التهاب و پاسخ فاز حاد بیشتری می شود. با توجه به این‌که در این مطالعه واکسن کشته روغنی به شکل تزریقی مورد استفاده قرار گرفت، ایجاد تنش و پاسخ فاز حاد در مقایسه با جوجه‌های غیر واکسینه دور از ذهن نبود. افزایش معنی‌دار شاخص تنش در گروه آزمایش نسبت به گروه شاهد نشان‌دهنده آثار ماده کمک ایمنی و تا حدی عوامل وابسته به عوامل بیماری‌زا (الگوهای وابسته به عوامل بیماری‌زا) در ساختار ویروس است. این الگوها شامل اسید نوکلئیک ویروسی و برخی پروتئین‌های ساختاری است. با این توصیف، تغییرات میزان پادتن اختصاصی را می‌توان به میزان زیادی ناشی از ارتباط پاسخ التهابی با واکنش هومورال ایمنی اختصاصی دانست.

اندازه‌گیری نسبت هتروفیل به لنفوسیت به عنوان راهکاری جهت تشخیص تنش شناخته شده است (Post *et al.*, 2003; Puvadolpirod and Thaxton, 2000). نتایج این مطالعه نشان داد که پس از واکسیناسیون، نسبت هتروفیل به لنفوسیت در پرنده‌های آزمایش در مقایسه با قبل واکسیناسیون و همچنین گروه شاهد بالاتر بود. این شاخص می‌تواند نشانگر مناسبی برای تنش واکسیناسیون در طیور گوشتی باشد.

سرم آمیلوئید آ و آلفا-۱ اسید گلیکوپروتئین در طیور به ترتیب جزء گروه عمده و متوسط پروتئین‌های فاز حاد تقسیم‌بندی می‌شوند (O'Reilly and Eckersall, 2014; Kaab *et al.*, 2018). افزایش غلظت سرم آمیلوئید آ و آلفا-۱ اسید گلیکو پروتئین نیز موید یک پاسخ فاز حاد سریع است.

جدول ۱- مقادیر آزمون شاخص تنش، سطح پروتئین‌های فاز حاد و پادتن حاصل از واکسن نیوکاسل در زمان‌های قبل و بعد از واکسیناسیون (میانگین ± انحراف معیار)

Table 1. Stress index (H/L) values, levels of acute phase proteins and antibody in response to Newcastle vaccine at pre-vaccination and post-vaccination time (mean ± SD)

	Age (day)	Heterophil/lymphocyte (%)		Serum amyloid A(mg/L)		Alpha 1 acid glycoprotein (mg/L)		Antibody (Newcastle)	
		Vaccinated	Control	Vaccinated	Control	Vaccinated	Control	Vaccinated	Control
Pre- vaccination*	7	0.52 ± 0.12 Aa**	0.51 ± 0.09 Aa	0.065 ± 0.011 Aa	0.069 ± 0.008 Aa	359.03 ± 114.83 Aa	327.62 ± 116.70 Aa	0.76 ± 0.05 Aa	0.77 ± 0.07 Aa
Post -vaccination	10	0.97 ± 0.14 Ab	0.68 ± 0.07 Ba	0.081 ± 0.019 Ab	0.096 ± 0.002 Ab	600.12 ± 200.60 Ab	300.63 ± 200.83 Ba	0.92 ± 0.31 Ab	0.80 ± 0.10 Ba
	19	0.43 ± 0.01 Ac	0.36 ± 0.05 Ba	0.087 ± 0.021 Ab	0.071 ± 0.01 Ab	428.65 ± 116.02 Ab	392.46 ± 58.35 Aa	0.91 ± 0.06 Ab	0.72 ± 0.12 Ba
	22	0.73 ± 0.18 Ab	0.42 ± 0.03 Ba	0.096 ± 0.004 Ac	0.086 ± 0.024 Ab	315.30 ± 111.7 Ac	262.70 ± 136.5 Ac	0.93 ± 0.03 Ab	0.86 ± 0.05 Ba

*Newcastle vaccine was administrated at days 8 and 20

** Different capital letters indicate a significant difference between the vaccinated and control groups at each time point. Different lower-case letters indicate a significant difference among time points.

جدول ۲- نتایج حاصل از محاسبه ضرایب همبستگی بین تنش، سطح پروتئین‌های فاز حاد و پاسخ پادتن به واکسن نیوکاسل

Table 2. Results obtained by calculating the correlation coefficients between stress (H/L), acute phase proteins (SAA and AGP), and antibody response to Newcastle vaccine

		Heterophil/lymphocyte	Serum amyloid A	Alpha 1 acid glycoprotein	Antibody (Newcastle)
H/L	r^a		-0.231	0.411**	0.313**
	P-value		0.078	0.001	0.001
SAA	*r*	-0.231		-0.229	0.035
	P-value	0.078		0.081	0.79
AGP	*r*	0.411**	-0.229		0.013
	P-value	0.001	0.081		0.922
Ab	*r*	0.313**	0.035	0.013	
	P-value	0.001	0.79	0.922	

[a] Correlation coefficient expressed by *r* value

** Correlation is highly significant (*P*<0.001)

غلظت سرم آمیلوئید آ ارتباط مستقیم با شدت و حدت عامل بیماری‌زا دارد و میزان افزایش آن نیز جهت تشخیص التهاب ارزشمند است (O'Reilly and Eckersall, 2014). از این رو افزایش غلظت آن در واکسیناسیون نیز می‌تواند به عنوان نشانه‌ای از تحریک سیستم ایمنی ذاتی متعاقب واکسیناسیون تلقی شود. در انسان، غلظت سرم آمیلوئید آ ظرف چند ساعت پس از واکنش التهابی به میزان ۱۰ تا ۱۰۰ برابر افزایش می‌یابد (Kushner and Rzewnicki, 1994).

مطالعه حاضر نشان داد که غلظت سرم آمیلوئید آ پس از هر واکسیناسیون افزایش یافته و این میزان در مرحله اول واکسیناسیون، ۱/۴۸ برابر و در مرحله دوم، ۱/۱۲ برابر میزان آن در قبل از واکسیناسیون بوده است. اندازه‌گیری این پروتئین فاز حاد به دلیل فقدان کیت اختصاصی برای طیور تا چندی پیش مورد توجه نبوده است، اما با توجه به تولید کیت‌های اختصاصی، تحقیقات ارزشمندی به وسیله محققین در این زمینه آغاز شده است (O'Reilly and Eckersall, 2014; Kaab *et al.*, 2018; Post *et al.*, 2003; Puvadolpirod and Thaxton, 2000).

تغییرات آلفا -۱ اسید گلیکوپروتئین در گروه آزمایش در مرحله اول واکسیناسیون مشهود بود، به‌طوری که غلظت آن به میزان ۱/۶۷ برابر افزایش یافت، ولی تغییرات معنی‌داری در مرحله دوم واکسیناسیون نداشت. در سایر مطالعات نیز تغییرات غلظت آلفا- ۱ اسید گلیکو پروتئین پس از واکسیناسیون گزارش شده است. این پروتئین در مرغ‌های تخم‌گذار لگهورن در پاسخ به ویروس آنفلونزا ظرف دو روز و در پاسخ به واکسن ویروس بیماری گامبورو پس از سه روز به بالاترین مقدار خود رسیده است (Inoue *et al.*, 1997; Sylte and Suarez, 2012).

چنان‌که نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد ارتباط مثبتی بین میزان پادتن تولیدی و متغیرهای تنش و التهاب موجود است، اما با توجه به تحلیل آماری، فقط همبستگی شاخص تنش با تولید پادتن قابل توجه و معنی‌دار است. متغیرهای مذکور در پژوهش دیگری نیز بدون توجه به میزان همبستگی آنها با پاسخ ایمنی اکتسابی مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند (Kaab *et al.*, 2018). البته گزارش اخیر مربوط به طیور تخم‌گذار بوده و یافته‌ها بر واکنش‌ها و پاسخ التهابی ناشی از تجویز واکسن ترکیبی برونشیت و نیوکاسل به روش قطره چشمی متمرکز است. با این وجود، مقادیر گزارش شده با نتایج پژوهش حاضر همخوانی داشته و هر دو موید حساسیت و ویژگی بیشتر شاخص تنش برای ارزیابی واکنش به واکسن هستند (Cotter, 2015; Kaab *et al.*, 2018).

نتیجه‌گیری کلی

پژوهش حاضر مقادیر طبیعی و پایه پروتئین‌های فاز حاد و تغییرات آنها در پاسخ به واکسیناسیون را در طیور گوشتی ارائه کرده است. ارتباط شاخص تنش با پاسخ ایمنی اکتسابی می‌تواند نشانگری برای ایمنی‌زایی موثر تلقی شود. لازم به ذکر است که این یافته‌ها حاصل بررسی ابتدایی‌ترین واکنش‌های بدن به واکسن یا عوامل عفونی هستند. به همین دلیل از آنها می‌توان برای پایش پاسخ به واکسن،

درمان و شرایط گله بهره برد. از ارتباط تنش با پاسخ فاز حاد و مقایسه سویه‌های واکسن نیز استفاده کرد. و میزان تولید پادتن می‌توان برای طراحی واکسن‌های جدید

فهرست منابع

Andersen S. A., Petersen H. H., Ersboll A. K., Falk-Ronne J. and Jacobsen S. 2012. Vaccination elicits a prominent acute phase response in horses. Veterinary Journal, 191: 199-202.

Arthington J. D., Cooke R. F., Maddock T. D., Araujo D. B., Moriel P., DiLorenzo N. and Lamb G. C. 2013. Effects of vaccination on the acute-phase protein response and measures of performance in growing beef calves. Journal of Animal Science, 91: 1831-1837.

Cotter P. F. 2015. An examination of the utility of heterophil-lymphocyte ratios in assessing stress of caged hens. Poultry Science, 94: 512-517.

El Y. M., Mercier S., Breuille D., Denis P., Papet I., Mirand P. P. and Obled C. 2005. The inflammatory response to vaccination is altered in the elderly. Mechanisms of Ageing and Development, 126: 874-881.

Gruys E., Toussaint M. J., Upragarin N., Van E. A. Adewuyi A. A., Candiani D., Nguyen T. K. and Sabeckiene J. 2005. Acute phase reactants, challenge in the near future of animal production and veterinary medicine. Journal of Zheijang University Science B, 6: 941-947.

Hoebe K., Janssen E. and Beutler B. 2004. The interface between innate and adaptive immunity. Nature Immunology, 5: 971-974.

Hosseini A., Namazi F., Oryan A. and Nazifi S., 2015. Correlation between some hematological parameters, acute phase proteins and serum immunoglobulins in experimental caprine besnoitiosis. Journal of Parasitic Disease, 39: 155-161.

Horvatić A., Guillemin N., Kaab H., McKeegan D., O'Reilly E., Bain M. and Eckersall P. D. 2019. Quantitative proteomics using tandem mass tags in relation to the acute phase protein response in chicken challenged with Escherichia coli lipopolysaccharide endotoxin. Journal of Proteomics, 192: 64-77.

Inoue M., Satoh W. and Murakami H. 1997. Plasma alpha 1-acid glycoprotein in chickens infected with infectious bursal disease virus. Avian Disease, 41: 164-170.

Jarosz Ł., Marek A., Grądzki Z., Laskowska E. and Kwiecień M. 2019. Effect of zinc sulfate and zinc glycine chelate on concentrations of acute phase proteins in chicken serum and liver tissue. Biological Trace Element Research, 187: 258-272.

Kaab H., Bain M. M. and Eckersall P. D. 2018. Acute phase proteins and stress markers in the immediate response to a combined vaccination against Newcastle disease and infectious bronchitis viruses in specific pathogen free (SPF) layer chicks. Poultry Science, 97: 463-469.

Kushner I. and Rzewnicki D. L. 1994. The acute phase response: general aspects. Baillieres Clinical Rheumatology, 8: 513-530.

Marques A. T., Nordio L., Lecchi C., Grilli G., Giudice C. and Ceciliani F. 2017. Widespread extrahepatic expression of acute-phase proteins in healthy chicken (*Gallus gallus*) tissues. Veterinary Immunoogy and Immunopathology, 190: 10-17.

Najafi P., Zulkifli I., Soleimani A. F. and Kashiani P. 2015. The effect of different degrees of feed restriction on heat shock protein 70, acute phase proteins, and other blood parameters in female broiler breeders. Poultry Science, 94: 2322-2329.

Nikbakht B. G., Hassanzadeh M., Al-Karagoly H., Tolouei T. and Esmailnejad A. 2019. Evaluation of humoral immune responses to enterotropic lentogenic VG/GA vaccine of Newcastle disease in commercial turkey poults (*Meleagris gallopavo*). Acta Veterinaria Scandinavia, 61: 41-47.

O'Reilly E. and Eckersall D. 2014. Acute phase proteins: a review of their function, behaviour and measurement in chickens. World's Poultry Science Journal, 70: 27-43.

Packialakshmi B., Liyanage R., Lay J. O., Makkar S. K. and Rath N. C. 2016. Proteomic Changes in Chicken Plasma Induced by Salmonella typhimurium Lipopolysaccharides. Proteomics Insights, 7: 1-9.

Post J., Rebel J. M. and Huurne A. A. 2003. Physiological effects of elevated plasma corticosterone concentrations in broiler chickens. An alternative means by which to assess the physiological effects of stress. Poultry Science, 82: 1313-1318.

Puvadolpirod S. and Thaxton J. P. 2000. Model of physiological stress in chickens 1. Response parameters. Poultry Science, 79: 363-369.

Sylte M. J. and Suarez D. L. 2012. Vaccination and acute phase mediator production in chickens challenged with low pathogenic avian influenza virus; novel markers for vaccine efficacy? Vaccine, 30: 3097-3105.

Animal Production Research

Vol. 9, No. 4, 2020 (23-31)

University of Guilan

Research paper

Correlation between stress and acute phase and humoral immune responses in broiler chicken

A. Janmohammadi [1], N. Sheikhi[2], H. Haghbin Nazarpak[3], Gh. Nikbakht Brujeni[4*]

1. Ph.D Student of Poultry Disease, Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Assistant Professor, Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
3. Assistant Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Garmsar Branch, Islamic Azad University, Garmsar, Iran
4. Professor, Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

(Received: 02-12-2019 – Accepted: 15-02-2020)

Abstract

A better understanding of the relationship between innate and adaptive immunity, as well as inflammation and immune response, can help to improve immunization methods. This study aimed to evaluate the correlations between specific immunity and inflammation. A total of 60 Ross 308 broiler chicks were divided into two groups of an equal number of birds, 30 per treatment and 10 per replicate. One group, as vaccinated, was subjected to intramuscular injection of inactivated oil emulsion of Newcastle disease vaccine on days 8 and 20. The control group administered PBS by the same route on the same days. Blood samples were collected on days 7, 10, 19, and 22. The heterophil/lymphocyte ratio was used as a stress index, serum amyloid A (SAA), and alpha 1 acid glycoprotein (AGP) for acute phase response and the level of a specific antibody for quantification of adaptive immunity. Stress index, as well as acute phase proteins, increased after vaccination ($P<0.05$). In comparison between the control and vaccinated group, the stress index elevated in the vaccinated group to 1.5 fold (0.68% to 0.97%). Significant increase was observed for SAA (0.086 mg/L to 0.096 mg/L) at day 22 ($P< 0.001$) and AGP (300.63 mg/L to 600.12 mg/L) at day 10 ($P<0.05$). SAA adversely correlated with the amounts of AGP ($r = -0.229$, $P=0.081$). Stress index correlated with SAA ($r= 0.411$, $P<0.001$) and antibody levels ($r= 0.313$, $P<0.001$). Stress had a significant correlation with adaptive immunity and could be used for the evaluation and monitoring of vaccine efficacy.

Keywords: Alpha 1 acid glycoprotein, Stress, Broiler chicken, Serum Amyloid A, Vaccine

*Corresponding author: nikbakht@ut.ac.ir

doi: 10.22124/ar.2021.4657