



آثار فردی و ترکیبی پروتئین جیره و نانو یاور (نانو ادجوانت) بر عملکرد، تیترا علیه ویروس نیوکاسل و شمار گلبولهای سفید خون جوجههای گوشتی

فاطمه عزیزعلی آبادی^۱، حسن درمانی کوهی^۲، مهرداد محمدی^۳ و محمد حسن نظران^۴

۱ و ۳- دانش آموخته کارشناسی ارشد و دانشیار، دانشگاه گیلان

۲- دانشیار، دانشگاه گیلان (نویسنده مسؤول: darmani_22000@yahoo.com)

۴- صاحب فناوری کلیتینگ و نانو کلیتینگ (شرکت دانش بنیان صدور احراز شرق، ایران- تهران)

تاریخ پذیرش: ۹۵/۳/۲۲

تاریخ دریافت: ۹۴/۹/۲۸

چکیده

به منظور بررسی تاثیر پروتئین جیره و نانو یاور بر عملکرد، تیترا واکسن نیوکاسل و پارامترهای خونی جوجههای گوشتی، آزمایشی به مدت ۴۲ روز با استفاده از ۲۴۰ قطعه جوجهی گوشتی یک روزه سویه راس ۳۰۸، در قالب آزمون فاکتوریل ۳×۲ با سه سطح پروتئین (پایین، متوسط و بالا) و دو سطح نانو یاور (حاوی نانو یاور و فاقد نانو یاور) در یک طرح کاملاً تصادفی با ۶ تیمار و ۴ تکرار و ۱۰ قطعه جوجه در هر تکرار انجام گرفت. نتایج نشان داد که از میان اثرات اصلی و متقابل سطح پروتئین جیره و نانو یاور، تنها اثر اصلی سطح پروتئین جیره بر میانگین افزایش وزن در کل دوره معنی دار بود. در رابطه با تیترا آنتی بادی ضد ویروس نیوکاسل تنها اثر اصلی نانو یاور در روز ۲۸ معنی دار شد. اثر اصلی نانو یاور بر تعداد گلبولهای سفید معنی دار بود، در حالی که درصد هتروفیل، لنفوسیت و نسبت هتروفیل به لنفوسیت (H/L) تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت. در کل نتایج پژوهش حاضر نشان داد که استفاده از سطوح بالای پروتئین جیره سبب بهبود عملکرد رشد در جوجههای گوشتی شد. به علاوه، استفاده از نانو یاور باعث افزایش تیترا آنتی بادی علیه ویروس نیوکاسل و افزایش تعداد گلبولهای سفید و به دنبال آن تقویت سیستم ایمنی پرنده شد.

واژههای کلیدی: پاسخ ایمنی، پروتئین، عملکرد، نانو یاور، جوجههای گوشتی

مقدمه

افزایش گلبولهای سفید، نشان دهنده تحریک سیستم ایمنی میزبان است. عفونتها، تنش و التهاب سبب افزایش تعداد نوتروفیلها (هتروفیل) می شود. افزایش ائوزینوفیلها می تواند نشانه ای از واکنشهای آلرژیک، عفونتهای انگلی و یا بیماریهای خود ایمنی باشد (۳۶). وجود برخی عفونتهای ویروسی نیز می تواند سبب افزایش تعداد لنفوسیتها و منوسیتها شود (۳۶). واکسیناسیون بهترین روش برای جلوگیری از خسارات ناشی از بیماریهای عفونی در انسان و حیوانات است. واکسنهای رایج عمده شامل عوامل بیماری زای زنده ضعیف شده و توکسینهای باکتریایی غیرفعال شده هستند (۱۱). هدف واکسیناسیون ایجاد پاسخ ایمنی قوی برای ایجاد حفاظت طولانی مدت علیه عفونت است. برای رسیدن به این هدف، برخلاف واکسنهای زنده ضعیف شده، عموماً ارگانیزمهای کامل کشته شده یا واکسنهای تخفیف حدت یافته برای تاثیر گذار بودن، نیاز به افزودن یاور (ادجوانت) دارند (۲). یاورها ترکیبات شیمیایی یا زیستی هستند که سبب افزایش عملکرد سیستم ایمنی می شوند (۹). انواع یاورهای رایج شامل نمکهای آلومینیوم، امولسیونهای روغنی، لیپوزومها، ریز ذرات، انواع ترکیبات مشتق شده از باکتریها و سیتوکینها هستند (۱۱). نانو یاور بن زرا یک ترکیب آلی سنتزی است که به دلیل ساختار ویژه، قابلیت اختلاط و مصرف با انواع واکسنهای مختلف را دارد و به سادگی به چهار صورت خوراکی، اسپری، چشمی و تزریقی به همراه واکسن قابل استفاده است. این نانو یاور کاملاً در آب محلول بوده و به شکل مایع عرضه می شود. بر اساس ادعای

شرکت تولیدکننده، این نانو یاور ضمن کاهش چشمگیر تلفات جوجههای گوشتی باعث افزایش تولید گوشت و وزن لاشه می شود. به عبارت دیگر پس از مصرف به همراه واکسن با توجه به ساختار جدید و تکنولوژی کلیتینگ مورد استفاده در این نانو یاور، به علت ارتقای عملکرد سیستم ایمنی (هومورال و سلولی) و بهبود متابولیسم، وزن گوشت استحصالی افزایش می یابد (۷). هزینه خوراک یک بخش مهم از هزینههای پرورش جوجههای گوشتی است. در میان ترکیبات جیره ای، هزینه پروتئین ۱۵٪ از کل هزینهها در بر می گیرد (۶). به دلیل هزینههای مرتبط با افزایش سطح پروتئین در جیره ها که سبب ایجاد تاثیرات بر هزینهها به علاوه بر بازده تولید گوشت جوجه گوشتی می شود سطوح پروتئین خام جیره بسیار مهم است (۸). کمبود پروتئین و اسیدهای آمینه در طیور باعث کاهش مصرف خوراک، رشد، تولید و اندازه تخم مرغ گردیده و در مواردی که کمبود پروتئین شدید باشد، کاهش وزن و تحلیل دستگاه تولید مثل نیز مشاهده می شود (۲۳). بعضی از مواد مغذی به طور مستقیم از طریق تغییر در اعمال سلولهای ایمنی بر سیستم ایمنی موثرند و بعضی نیز به طور غیرمستقیم از طریق مسیرهای هورمونی یا عصبی بر سیستم ایمنی اثر گذار هستند (۲۱). مهم ترین مواد مغذی که به طور غیر مستقیم بر سیستم ایمنی تاثیر می گذارند انرژی و پروتئین می باشند (۱۸). با توجه به اهمیت ارتباط بین تغذیه و سیستم ایمنی در طیور، در این پژوهش آثار ترکیبی پروتئین جیره و نانو یاور بن زرا بر عملکرد، تیترا ویروس نیوکاسل و پارامترهای خونی جوجههای گوشتی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش از تعداد ۲۴۰ قطعه جوجه گوشتی یک روزه سویه راس ۳۰۸ (مخلوط نر و ماده) با میانگین وزن یک‌روزگی ۳۵/۱۴ گرم در یک آزمایش فاکتوریل ۳×۲ در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۶ تیمار، ۴ تکرار و ۱۰ قطعه جوجه در هر تکرار استفاده شد (پژوهش حاضر در سالن مرغ داری دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان واقع در شهر رشت از تاریخ ۹۳/۵/۲۸ لغایت ۹۳/۷/۹ انجام شد). فاکتورهای مورد بررسی شامل سه سطح پروتئین (پایین، متوسط و بالا)، پائین (۲۱، ۱۹ و ۱۷ درصد)، متوسط (۲۲، ۲۱ و ۱۹ درصد)، بالا (۲۴، ۲۳ و ۲۱ درصد) و دو سطح نانویاور (حاوی نانویاور و فاقد آن، چهار سی سی به ازای ۱۲۰ قطعه جوجه) بودند. جیره‌های آزمایشی مورد استفاده و ترکیب شیمیایی آن‌ها به ترتیب در جدول (۱) نشان داده شده است. مصرف خوراک، افزایش وزن و ضریب تبدیل خوراک در پایان دوره پرورش اندازه‌گیری شد. در ۴۲ روزگی از هر قفس ۲ پرنده (یک نر و یک ماده) که وزن آن‌ها به میانگین آن قفس نزدیک بود انتخاب و پس از ثبت وزن، کشتار و پرکنی شدند. واکسیناسیون مطابق توصیه دامپزشکی منطقه (جدول ۲) انجام شد و بررسی میزان آنتی‌بادی تولید شده در پاسخ به واکسن نیوکاسل در روزهای ۲۸ و ۴۲ با استفاده از روش مهار هم‌آگلوتیناسیون (HI)^۱ انجام شد. برای این منظور سرم‌ها از حالت فریز خارج و در دمای محیط قرار داده شد تا ذوب شوند. برای غیر فعال کردن سیستم کمپلمان، سرم‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس به مدت ۲ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ سانتریفوژ شدند. به همه چاهک‌های میکرو پلیت ۹۶ خانه‌ای مقدار ۲۵ میکرولیتر سرم فیزیولوژی اضافه شد. چاهک‌های اول به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شدند و مقدار ۲۵ میکرولیتر از نمونه سرم خون به چاهک‌های دوم اضافه شد و پس از ۳ بار پر و خالی کردن با سمپلر، ۲۵ میکرولیتر از محلول به دست آمده به چاهک بعدی منتقل شد و این کار تا آخرین چاهک ادامه یافت و ۲۵ میکرولیتر آنتی ژن رقیق شده به همه چاهک‌های میکرو پلیت اضافه شد. سپس ۳۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه قرار داده شد و ۲۵ میکرولیتر RBC^۲ (گلبول قرمز جوجه) ۱ درصد به همه چاهک‌ها اضافه و میکروپلیت به صورت ۸ لاتین تکان داده

شد و ۴۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. آخرین خانه ای که در آن رسوب تشکیل شد به عنوان تیترا آنتی‌بادی علیه نیوکاسل در نظر گرفته شد و به صورت $\log_2$ یادداشت شد. شمارش تعداد گلبول‌های سفید با استفاده از محلول رقیق‌کننده نات-هریک (Natt-Herrick) و لام نتوبار، توسط میکروسکوپ نوری انجام گرفت. روش Natt & Herrick از جمله روش‌های شمارش مستقیم گلبول‌های سفید است. میزان گلبول‌های سفید را می‌توان با استفاده از فرمول زیر محاسبه کرد:

$$۲۲۰ \times \text{تعداد گلبول‌های سفید شمارش شده} = \text{تعداد کلی}$$

گلبول سفید (TWBC)

شمارش افتراقی گلبول‌های سفید به طریق تهیه گسترش خونی و رنگ‌آمیزی گیمسا و شمارش زیر میکروسکوپ انجام شد. به این ترتیب که قطره خون (بوسیله لوله هماتوکریت ساده) در یک سانتی‌متری انتهای لام قرار داده شد. لبه لام دیگر با زاویه ۴۵-۳۰ درجه بر روی قطره خون قرار گرفت. لحظه‌ای بعد خون سراسر روی لبه لام دوم (فصل مشترک دو لام) انتشار می‌یافت. بعد از خشک شدن گسترش خونی در هوای آزمایشگاه، خون خشک شده روی لام توسط ریختن الکل متانول ثابت شد. بعد از خشک کردن مجدد لام برای رنگ‌آمیزی آماده شد. رنگ گیمسا به نسبت یک به ده رقیق (یک سی سی رنگ + نه سی سی آب) و سپس لام داخل آن قرار گرفت. بعد از اینکه لام به رنگ آبی متمایل به بنفش در آمد، سلول‌ها زیر میکروسکوپ شمارش شد. محصول نانویاور بن‌زا، طراحی و تولید شرکت دانش بنیان صدور احراز شرق (تهران، ایران) می‌باشد که جهت انجام این طرح یک بسته ۶ تایی از این محصول از واحد تحقیقات و توسعه این شرکت تحویل گرفته شد. نانویاور به تمام واکسن‌هایی که در کل دوره استفاده شده بودند (جدول ۲)، به جز آخرین نوبت، اضافه شد (بنا به دستورالعمل شرکت سازنده). به‌منظور بررسی اثرات سطوح مختلف پروتئین جیره و نانو یاور بر عملکرد (مصرف خوراک روزانه، افزایش وزن و ضریب تبدیل خوراک) و تیترا ویروس نیوکاسل و پارامترهای خونی جوجه‌های گوشتی، از طرح کاملاً تصادفی در قالب آزمون فاکتوریل ۳×۲ استفاده شد. داده‌ها با استفاده از رویه GLM نرم‌افزار SAS آنالیز و تفاوت بین آن‌ها با آزمون دانکن در سطح ۵ درصد تست شد.

جدول ۱- اجزاء و ترکیب شیمیایی جیره‌های آزمایشی طی دوره آغازین، رشد و پایانی

Table 1. Ingredients and chemical composition of the experimental diets during starter, grower and finisher periods

پایانی			رشد			آغازین			مواد خوراکی (%)
۲۱CP=	۱۹CP=	۱۷CP=	۲۳CP=	۲۱CP=	۱۹CP=	۲۴CP=	۲۲CP=	۲۰CP=	
۵۴/۰۷	۶۰/۷۶	۶۷/۴۴	۴۸/۲۰	۵۴/۹۱	۶۱/۵۸	۴۲/۲۶	۵۰/۲۷	۵۸/۵۳	دانه ذرت
۳۶/۷۰	۳۰/۸۰	۲۴/۹۹	۴۲/۲۶	۳۶/۳۷	۳۰/۵۴	۴۵/۸۲	۳۹/۹۵	۳۲/۲۳	کنجاله سویا
۵/۸۳	۴/۸۸	۳/۹۲	۵/۹۹	۵/۰۴	۴/۰۷	۵/۹۸	۴/۸۱	۳/۴۴	روغن سویا
۱/۵۰	۱/۴۴	۱/۳۸	۱/۵۹	۱/۵۳	۱/۴۷	۱/۲۶	۱/۲۷	۱/۲۷	پودر آهک
۰/۷۴	۰/۹۲	۱/۰۹	۰/۷۳	۰/۹۱	۱/۰۸	۱/۹۵	۲/۰۱	۲/۰۸	دی کلسیم فسفات
۰/۲۷	۰/۳۷	۰/۲۶	۰/۲۷	۰/۳۷	۰/۲۶	۰/۲۷	۰/۲۷	۰/۲۷	نمک
۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	مکمل ویتامینه ^۲
۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	مکمل معدنی ^۳
۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۱۵	جوش شیرین
۰/۰۲	۰/۰۳	۰/۰۴	۰/۰۳	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۱۱	۰/۱۱	۰/۱۱	ترئونین
۰/۳۹	۰/۲۵	۰/۳۰	۰/۱۵	۰/۱۳	۰/۱۱	۰/۴۲	۰/۳۸	۰/۱۵	متیونین
۰/۰۹	۰/۱۳	۰/۱۶	۰/۱۱	۰/۱۵	۰/۱۸	۰/۲۸	۰/۲۹	۰/۳۳	لیزین
۳۲۰۰	۳۲۰۰	۳۲۰۰	۳۱۵۰	۳۱۵۰	۳۱۵۰	۳۰۲۵	۳۰۲۵	۳۰۲۵	ترکیب شیمیایی (%)
۰/۸۵	۰/۸۵	۰/۸۵	۰/۹۰	۰/۹۰	۰/۹۰	۱/۰۵	۱/۰۵	۱/۰۵	انرژی قابل متابولیسم (kcal/kg)
۰/۴۲	۰/۴۲	۰/۴۲	۰/۴۵	۰/۴۵	۰/۴۵	۰/۵۰	۰/۵۰	۰/۵۰	کلسیم
۰/۱۶	۰/۱۶	۰/۱۶	۰/۱۶	۰/۱۶	۰/۱۶	۰/۱۶	۰/۱۶	۰/۱۶	فسفر قابل دسترس
۰/۱۶	۰/۱۶	۰/۱۶	۰/۱۶	۰/۱۶	۰/۱۶	۰/۱۶	۰/۱۶	۰/۱۶	سدیم
۰/۴۵	۰/۳۶	۰/۴۱	۰/۴۹	۰/۴۵	۰/۴۰	۰/۵۵	۰/۵۱	۰/۴۶	کلر
۰/۹۵	۰/۷۶	۰/۶۵	۱/۰۴	۰/۹۵	۰/۸۵	۱/۱۶	۱/۰۷	۰/۹۷	متیونین
۱/۲۰	۰/۹۷	۰/۸۶	۱/۳۵	۱/۲۴	۱/۱۲	۱/۵۶	۱/۴۳	۱/۳۰	متیونین+سیستین
									لیزین

Crude Protein = پروتئین خام

- ۱- در دوره آغازین تیمارها شامل: (۱) تیمار بدون بن زا + پروتئین ۲۲٪ (توصیه شده در کاتالوگ سویه راس)، (۲) تیمار بدون بن زا + پروتئین ۲۰٪، (۳) تیمار بدون بن زا + پروتئین ۲۴٪، (۴) تیمار حاوی بن زا + پروتئین ۲۲٪، (۵) تیمار حاوی بن زا + پروتئین ۲۰٪، (۶) تیمار حاوی بن زا + پروتئین ۲۴٪
- ۲- در دوره رشد تیمارها شامل: (۱) تیمار بدون بن زا + پروتئین ۲۱٪ (توصیه شده در کاتالوگ سویه راس)، (۲) تیمار بدون بن زا + پروتئین ۱۹٪، (۳) تیمار بدون بن زا + پروتئین ۲۳٪، (۴) تیمار حاوی بن زا + پروتئین ۲۱٪، (۵) تیمار حاوی بن زا + پروتئین ۱۹٪، (۶) تیمار حاوی بن زا + پروتئین ۲۳٪
- ۳- در دوره پایانی تیمارها شامل: (۱) تیمار بدون بن زا + پروتئین ۱۹٪ (توصیه شده در کاتالوگ سویه راس)، (۲) تیمار بدون بن زا + پروتئین ۱۷٪، (۳) تیمار بدون بن زا + پروتئین ۲۱٪، (۴) تیمار حاوی بن زا + پروتئین ۱۹٪، (۵) تیمار حاوی بن زا + پروتئین ۱۷٪، (۶) تیمار حاوی بن زا + پروتئین ۲۱٪

جدول ۲- برنامه واکسیناسیون استفاده شده در دوره پرورش

Table 2. Vaccination program used during the rearing period

بیماری	واکسن	روش	سن (روز)
برونشیت	H120	اسپری	۰
نیوکاسل	B1	قطره چشمی	۵
گامپورو	Intermediate strain	قطره چشمی	۱۰
برونشیت	H120	آشامیدنی	۱۲
نیوکاسل	لاسوتا	آشامیدنی	۱۵
گامپورو	Intermediate strain	آشامیدنی	۱۹
نیوکاسل	لاسوتا	آشامیدنی	۲۹

*: به تمامی واکسن‌ها به استثنای واکسن نیوکاسل ۲۹ روزگی نانو ادجوانت اضافه شد.

نتایج و بحث

و بافت جیره اشاره کرد (۸). در مطالعه‌ای به‌منظور بررسی اثرات سطوح مختلف چربی (۳، ۷ و ۱۱ درصد) و پروتئین (۱۸، ۲۳ و ۲۸ درصد) بر عملکرد جوجه‌های گوشتی در طول هفت روز اول پس از هچ، گزارش کردند که با افزایش سطوح پروتئین و چربی جیره، مصرف خوراک و وزن بدن کاهش یافت، افزایش سطح پروتئین جیره دفع اسید اوریک را در پرنده افزایش می‌یابد. از آنجایی که دفع اسید اوریک نیازمند صرف انرژی است، بنابراین پرنده سعی می‌کند تا با افزایش مصرف خوراک انرژی مورد نیاز را تامین کند (۲۴). با توجه به اینکه، ضریب تبدیل خوراک به عامل‌های مصرف خوراک و افزایش وزن بستگی دارد، بنابراین عوامل تاثیرگذار بر این دو عامل، بر ضریب تبدیل هم موثرند. تراکم مواد مغذی جیره بر

نتایج مربوط به میانگین افزایش وزن، مصرف خوراک روزانه و ضریب تبدیل در کل دوره در جدول (۳) نشان داده شده است. از میان اثرات اصلی و متقابل سطح پروتئین جیره و نانویاور، تنها اثر اصلی سطح پروتئین جیره بر میانگین افزایش وزن در کل دوره معنی‌دار بود ($P < 0.01$)، به‌طوری‌که جوجه‌های دریافت‌کننده جیره‌های با سطح پروتئین بیشتر افزایش وزن بیشتری داشتند. عوامل متعددی می‌توانند بر میزان مصرف خوراک پرنده تاثیرگذار باشد که از آن جمله می‌توان به عوامل فیزیولوژیک، عوامل تغذیه‌ای، سلامت و میزان تولید پرنده اشاره کرد. از جمله عوامل تغذیه‌ای موثر بر مصرف خوراک می‌توان به محتوای انرژی و پروتئین، رنگ، بو

(۲۸) نیز گزارش کردند که تاثیر سطوح مختلف پروتئین جیره بر تیترا واکسن نیوکاسل معنی دار نشد. کربلایی بابایی و همکاران (۱۷) گزارش کردند که در مرغ‌های مادر گوشتی تغذیه شده با جیره شاهد و کم پروتئین، پاسخ HI علیه واکسن نیوکاسل و آنفلوانزا تفاوت معنی داری بین گروه‌های آزمایشی نشان‌داد. ویلگاس و همکاران (۳۴) طی مطالعه‌ای در مورد میزان پاسخ آنتی‌بادی علیه واکسن نیوکاسل در مرغ‌های تخم‌گذار تجاری با سطوح مختلف پروتئین در جیره غذایی نشان دادند که میزان پروتئین جیره تاثیری بر پاسخ آنتی‌بادی علیه واکسن نیوکاسل ندارد. گزارش شده است که اثر اصلی پروتئین بر ویروس نیوکاسل و تیترا آنتی‌بادی علیه SRBC (گلوبول قرمز گوسفندی) معنی دار نبود (۱). هوشمند و همکاران (۱۴) نیز گزارش کردند که سطوح مختلف پروتئین جیره تاثیر معنی داری بر تیترا واکسن نیوکاسل (۲۱ و ۴۲ روزگی) نداشت. کمبود متیونین باعث کاهش فعالیت لنفوسیت‌ها و تحلیل بورس و همچنین افزایش حساسیت به بیماری نیوکاسل و کوکسیدیوز شد (۱۰). نتایج مطالعه مهدوی و همکاران (۲۲) نشان داد که تزریق واکسن HIV بدون یاور باعث عدم تحریک یا تحریک بسیار ضعیف سیستم ایمنی در موش‌ها می‌شود، این مطلب بیانگر نقش مهم ادجوانت‌ها (یاور) در افزایش کارایی واکسن است. نتایج به دست آمده از تزریق واکسن هیپاتیت بدون ادجوانت بیانگر این موضوع است که واکسن مذکور ذاتا ضعیف است، این نتیجه موید مشاهدات قبلی در خصوص ضعف ایمنی‌زایی واکسن در غیاب ادجوانت‌های مناسب است (۵). در مطالعه سلیمانی و همکاران (۳۲) استفاده از یاور MX سبب القای ایمنی هومورال و افزایش عیارآنتی بادی علیه ویروس آنفلوانزا شد. صادقی و همکاران (۳۰) گزارش کردند که یاور مولکولی هموکینین-۱ سبب افزایش پاسخ ایمنی علیه ویروس آنفلوانزا شده و همچنین فعالیت لنفوسیت‌های B و T را افزایش می‌دهد، این یاور تنظیم‌کننده پاسخ ایمنی بوده و با تحریک تولیدآنتی بادی در تغییر مسیر ایمنی به سمت پاسخ‌های اینترفرون-۱ موثر بود.

ضریب تبدیل خوراک تاثیر دارد به طوری که افزایش تراکم پروتئین جیره سبب بهبود ضریب تبدیل می‌شود (۳۳). بنابر گزارش جهانیان (۱۵) افزایش وزن روزانه پرندگان به طور معنی داری تحت تاثیر سطح پروتئین جیره قرار گرفت. تغذیه جوجه‌های گوشتی با جیره حاوی سطوح متعادل پروتئین نسبت به جیره کم پروتئین سبب بهبود معنی دار افزایش وزن در دوره آغازین و کل دوره شد (۲۶). روی و همکاران (۲۹) گزارش کردند که افزایش وزن زنده در تیمار حاوی ۱۹ درصد پروتئین و تیمار حاوی ۲۰ درصد پروتئین به طور معنی داری بالاتر از تیمار حاوی ۱۸ درصد پروتئین بود. در بررسی انجام شده توسط هوشمند و همکاران (۱۴) نیز جوجه‌های تغذیه شده با سطح پروتئین توصیه شده NRC (۲۳) افزایش وزن بیشتری در مقایسه با جوجه‌های تغذیه شده با جیره‌های با پروتئین پایین نشان دادند نتایج حاصل از اثرات اصلی و متقابل استفاده از نانویاور و سطوح مختلف پروتئین جیره بر عیار پادتن علیه ویروس واکسن نیوکاسل در روزهای ۲۸ و ۴۲ در جدول (۴) نشان داده شد. بر اساس نتایج به دست آمده اثر اصلی نانویاور بر عیار پادتن علیه ویروس واکسن نیوکاسل در روز ۲۸ معنی دار بود ($P < 0.05$). به طوری که تیترا آنتی بادی ضد ویروس نیوکاسل در جوجه‌های دریافت کننده نانویاور در مقایسه با سایر جوجه‌ها بالاتر بود ($P < 0.05$). اثر اصلی نانویاور و سطوح مختلف پروتئین جیره بر تیترا آنتی‌بادی ضد ویروس نیوکاسل در روز ۴۲ و اثر متقابل نانویاور و سطوح مختلف پروتئین جیره بر تیترا آنتی‌بادی ضد ویروس نیوکاسل در روز ۲۸ و ۴۲ معنی دار نشد ($P > 0.05$). همچنین اثر اصلی پروتئین جیره بر تیترا آنتی‌بادی ضد ویروس نیوکاسل در روز ۲۸ معنی دار نشد ($P > 0.05$). علی‌رغم پیشرفت‌های حاصل در تشخیص و واکسیناسیون علیه بیماری نیوکاسل در طیور، این بیماری همچنان گله‌های طیور را به طور منفی تحت تاثیر قرار می‌دهد (۴). علاوه بر انتخاب ژنتیکی بعضی از عوامل غیرژنتیکی مانند غلظت اسید آمینه در جیره غذایی می‌توانند ظهور ژن‌های مسئول پاسخ ایمنی را از طریق ایجاد تغییر در سطح بلوغ سیستم ایمنی و همچنین میزان آنتی‌بادی تولید شده در برابر عفونت‌ها تغییر دهد (۱۹). رستم‌خانی و همکاران

جدول ۳- تاثیر سطوح مختلف نانویاور و پروتئین جیره بر عملکرد جوجه‌های گوشتی در کل دوره (۴۲ روزگی)

Table 3. Effect of different dietary nano adjuvant and protein levels on performance of broiler chicks in the whole rearing period (day 42)

اثرات اصلی ^۱	افزایش وزن (گرم)	مصرف خوراک (گرم)	ضریب تبدیل خوراک
نانویاور	۲۲۹۰/۴	۴۱۰۷/۱	۱/۸۷
بدون نانویاور	۲۲۴۰/۸	۴۰۴۷/۶	۱/۸۴
حاوی نانویاور	۱۹/۱۱۵	۳۴/۰۱۱	۰/۰۱۷
SEM			
سطح پروتئین جیره			
پائین (۲۱، ۱۹ و ۱۷ درصد) ^۲	۲۱۸۵/۸ ^۰	۴۱۰۰/۵	۱/۸۹
متوسط (۲۲، ۲۱ و ۱۹ درصد)	۲۱۹۹/۹ ^۰	۴۱۱۷/۷	۱/۸۵
بالا (۲۴، ۲۳ و ۲۱ درصد)	۲۳۷۰/۶ ^a	۴۱۲۵/۷	۱/۸۰
SEM	۱۹/۲۱۳	۳۴/۱۴۲	۰/۰۱۶
اثر متقابل	NS*	NS	NS

۱- برای هر عامل، حروف متفاوت در هر ستون بیانگر وجود تفاوت معنی دار می باشد ($P < 0.05$).

۲- برای هر یک از سطوح پروتئین، اعداد داخل پرانتز به ترتیب محتوای پروتئینی جیره مربوطه در مراحل آغازین، رشد و پائینی می‌باشند.

* None significant

جدول ۴- تاثیر سطوح مختلف نانویاور و پروتئین جیره بر عیار پادتن علیه ویروس بیماری نیوکاسل در روزهای ۲۸ و ۴۲
Table 4. Effect of different dietary nano adjuvant and protein levels on antibody against Newcastle disease virus on days 28 and 42

اثرات اصلی ^۱	۲۸ روزگی	۴۲ روزگی
نانویاور	۵/۰۰ ^b	۴/۱۲
بدون نانویاور	۵/۳۴ ^a	۴/۱۲
حاوی نانویاور	۰/۰۱	۰/۰۵
SEM		
سطح پروتئین جیره		
پائین (۲۱، ۱۹ و ۱۷ درصد) ^۲	۵/۱۰	۴/۰۹
متوسط (۲۱، ۲۱ و ۱۹ درصد)	۵/۲۱	۴/۱۲
بالا (۲۳، ۲۳ و ۲۱ درصد)	۵/۵۶	۴/۱۵
SEM	۰/۰۱	۰/۰۶
اثر متقابل	NS	NS

۱- برای هر عامل، حروف متفاوت در هر ستون بیانگر وجود تفاوت معنی دار می باشد ($P < 0.05$).

۲- برای هر یک از سطوح پروتئین، اعداد داخل پرانتز به ترتیب محتوای پروتئینی جیره مربوطه در مراحل آغازین، رشد و پایانی می باشد.
* None significant

در پژوهش صورت گرفته روی کپور ماهیان مشاهده شد که در گروه دریافت کننده نانوکیتوزان به عنوان یاور، افزایش معنی داری در تعداد گلبول های سفید خون وجود داشت (۱۳). گزارشات در رابطه با اثر محتوای پروتئینی جیره روی تعداد گلبول های سفید خون ضد و نقیض است. گزارش شده است که سطوح مختلف لیزین و پروتئین جیره بر تعداد گلبول های سفید اثر معنی داری ندارد (۳، ۱۰). مکمل کردن جیره های غذایی با سطوح افزایشی آرژنین، تاثیری بر جمعیت هتروفیل های خون نداشت (۱۶). سیلوا و همکاران (۳۱) بیان کردند که کاهش یا افزایش سطح پروتئین جیره به مقدار ۱۰ درصد تاثیر معنی داری بر تعداد گلبول های سفید، لنفوسیت ها و پاسخ ایمنی جوجه گوشتی ندارد. گلیک و همکاران (۱۲) نشان دادند که کاهش پروتئین خام جیره تعداد لنفوسیت ها را در تیموس کاهش می دهد. کمبود لیزین سنتز پروتئین هایی مانند سیتوکین و فراوانی لنفوسیت ها را محدود کرده و پاسخ های ایمنی را کاهش می دهد، در نتیجه بیماری ها و تلفات در اثر عفونت های مختلف افزایش می یابد (۲۰). پایین و همکاران (۲۵) نیز گزارش کردند که کاهش پروتئین جیره تعداد لنفوسیت ها را در گردش خون کاهش داد.

علی رغم بهبود در افزایش وزن جوجه ها در پاسخ به محتوای پروتئین جیره، این اثر روی تیتراژ آنتی بادی علیه ویروس نیوکاسل و تعداد گلبول های سفید معنی دار نشد. استفاده از نانویاور، بدون اثرگذاری روی عملکردهای رشدی جوجه ها، باعث افزایش تیتراژ آنتی بادی علیه ویروس نیوکاسل و افزایش تعداد گلبول های سفید و به دنبال آن تقویت سیستم ایمنی در پرنده ها شد.

داده های مربوط به بررسی گلبول های سفید خون و نسبت هتروفیل به لنفوسیت در جدول (۵) آورده شده است. بر اساس نتایج حاصل اثرات اصلی نانویاور بر تعداد گلبول های سفید معنی دار بود ($P < 0.05$). به طوری که در جوجه های دریافت کننده نانویاور در مقایسه با گروه فاقد نانویاور تعداد گلبول های سفید بیشتر بود ($P < 0.05$). در مورد سطوح پروتئین جیره تفاوت معنی داری بین تیمارها وجود نداشت ($P > 0.05$). هیچ کدام از اثرات اصلی و متقابل نانویاور و پروتئین جیره بر درصد هتروفیل، درصد لنفوسیت و نسبت هتروفیل به لنفوسیت معنی دار نبود ($P > 0.05$). تیمار حاوی نانویاور + پروتئین بالا بیشترین تعداد گلبول سفید و درصد لنفوسیت را داشت و کمترین تعداد گلبول های سفید و درصد لنفوسیت در تیمار بدون ادجوانت + پروتئین پایین مشاهده شد. لنفوسیت ها تنها سلول هایی در بدن هستند که قادر به شناسایی و تفکیک شاخص های آنتی ژنیک مختلف می باشند و با گیرنده های خاصی که بر سطح خود دارند، به طور اختصاصی عمل می کنند. هتروفیل ها تمایل به بیگانه خواری داشته و اولین مرحله از پاسخ های التهابی را شروع می کنند و در دفاع بدن علیه بیماری های عفونی نقش مهمی دارند. گزارش شده است که تعداد هتروفیل ها و لنفوسیت ها بیشتر در شرایطی مانند تنش، بیماری و برخی داروها تغییر می کنند (۲۷). نتایج مطالعه فخارزاده و همکاران (۹) نشان داد که همزمان با حفظ سطح پادتن تولید شده در بدن، شاخص های ایمنی سلولی در پی استفاده از نانویاور Hep-c به میزان قابل چشمگیری افزایش می یابد. این نانویاور موجب افزایش سیتوکین آنتی ویرال اینترفرون گاما تا ۴۰۰ درصد و نیز افزایش تکثیر گلبول های سفید پس از مواجهه با آنتی ژن ویروس هپاتیت ب می شود.

منابع

- Abbasi, M., M. Mahdavi and M.H. Nazaran. 2014. The new nano-complex, Hep-c, improves the immunogenicity of the hepatitis B vaccine. Vaccine, 31: 2591-2597.
- Aguilar, J.C and E.G. Rodriguez. 2007. Vaccine adjuvants revisited. Vaccine, 19: 3752-3762.
- Alam, M.S., N. Ahmed, M.A. Miah and R. Islam. 2004. Effect of supplemented dietary protein on certain haematological values and meat yield characteristics of broiler birds. Bangladesh Veterinary Medicine, 2: 121-123.
- Alexander, D.J., E.W. Aldous and C.M. Fuller. 2012. The long view. A scientific review of 40 years of Newcastle disease research Avian Pathology, 41: 329-335.

5. Alvarez-Obregon, J.C., S. Duenas-Carrera, C. Valenzuela and J.M. Grillo. 2001. A truncated HCV core protein elicits a potent immune response with a strong participation of cellular immunity components in mice. *Vaccine*, 19: 3940-3946.
6. Banerjee, G.C. 1992. *Poultry* (3th edition). Oxford and IBI publishing co. New Delhi, pp: 168-172.
7. Bonza Instruction Manual. 2016. Available at: <http://www.bonza.ir/> (In Persian).
8. Eits, R.M., R.P. Kwakkel, M.W.A. Verstegen and L.A. Den Hartog. 2005. Dietary balance protein in broiler chickens. A flexible and practical tool to predict does-response curves. *Poultry Science*, 46: 300-309.
9. Fakhrazadeh, S., S. Kalanaky, M. Hafizi, M.M. Goya, Z. Masoumi, S. Namaki, N. Shakeri, M. Abbasi, M. Mahdavi and M.H. Nazaran. 2013. The new nano-complex, Hep-c, improves the immunogenicity of the hepatitis B. *Vaccine*, 31: 2591-2597.
10. Fakhraee, G., H. Lotfolahian, M. Shivazad and M. Chamani. 2011. Different levels of lysine in the diet of broiler breeder hens Arian on the immune system and blood serum biochemical traits. *Veterinary Journal*, 90: 48-57 (In Persian).
11. Foumani, M.G., L. Asadpour, A.R. Azizi Saraji, A. Sharifat Salmani and M.R. Aghasadeghi. 2012. Adjuvants and their mechanisms of action. *Ardabil University of Medical Science*, 3: 276-291.
12. Glick, B., E.J. Day and D. Thompson. 1981. Calorie-protein deficiencies and immune response of the chicken. L. humoral immunity. *Poultry Science*, 60: 2494-2500.
13. Hajipour, A., M. Alishahi, M. Mesbah and M. Ghorbanpour. 2014. The effect of nano-chitosan adjuvant on the immunogenicity of the bacterium *Aeromonas hydrophila* common carp, Professional doctoral thesis, Faculty of Veterinary Medicine, University of Chamran, Ahvaz, Iran. 86 pp (In Persian).
14. Houshmand, M., K. Azhar, I. Zulkifli, M.H. Bejo and A. Kamyab. 2012. Effect of prebiotic, protein and stocking density on performance, immunity and stress indicators of broilers. *Poultry Science*, 91: 393-401.
15. Jahanian, R. 2010. Threonine needs of growing chicks for performance and optimum immunological functions in response to dietary crude protein. 2nd International Veterinary Congress, 200 pp, Tehran, Iran.
16. Jahanian, R. 2009. Effect of dietary arginine on different subsets of blood serum proteins and immune responses in broilers. The 4th Iranian Congress of Animal Sciences, pp: 1042-1045, Tehran University (In Persian).
17. Karbalaee Babae, H., A.K. Zamanimoghadam and F. Khajali. 2012. The effect of low protein diets supplemented with amino acids on performance, hatchability and immune response of broiler breeder hens in the second production cycle. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 4: 109-114 (In Persian).
18. Klasing, K.C. 1988. Influence of acute starvation or acute excess intake on immune competence of broiler chicks. *Poultry Science*, 67: 628-636.
19. Klasing, K.C. 2007. Nutrition and immune system Gordon memorial lecture. *British Poultry Science*, 48: 525-537.
20. Konashi, S., K. Takahashi and Y. Akiba. 2000. Effects of dietary essential amino acid deficiencies on immunological variables in broiler chickens. *British Journal of Nutrition*, 83: 449-459.
21. Lochmiller, R.L. and C. Deerenberg. 2000. Trade-offs in evolutionary immunology: Just what is the cost of immunity? *Oikos*, 88: 87-98.
22. Mahdavi, M., M. Ebtekar, K. Azadmanesh, F. Mahboudi, H.R. Khoramkhorshid, F. Rahbarizadeh, E. Nezhadmoghadam and Z. Mohamadhasan. 2009. Immunological assessment of HIV-1-P24-Nef peptide vaccine with adjuvant mono phosphorylation lipid A in mice, BALB/C. *Modares Journal of Medical Sciences: Pathology*, 13: 79-86 (In Persian).
23. National Research Council. 1994. *National Requirements of Poultry*, 9th rev. ed. National Academy Press, Washington DC, 176 pp.
24. Noy, Y. and D. Sklan. 2002. Nutrient use in chicks during the first week post-hatch. *Poultry Science*, 81: 76-100.
25. Payne, C.J., T.R. Scott, J.W. Dick and B. Glick. 1990. Immunity to *pasteurella multocida* in protein deficient chickens. *Poultry Science*, 69: 2134-2142.
26. Rezaei, M., H. Nassiri Moghadam, J. Pour Reza and H. Kermanshahi. 2004. The effect of dietary protein and lysine levels on broiler performance, carcass characteristics and nitrogen excretion. *Poultry Science*, 3: 148-152.
27. Riddell, C. 1999. *Avian histopathology*. Published by the American Association of Avian Pathologists, 650 pp.
28. Rostamkhani, A.R., N. Ila, F. Foroudi and A. Afsar. 2012. Effect of diets containing adequate amounts of essential amino acids reduced crude protein on immune function of broiler chicks. *Journal of Animal Science and research*, 11: 11-21 (In Persian).
29. Roy, S.C., M.S. Alam, M.A. Ali, S.D. Chowdhury and C. Goswami. 2010. Different levels of protein on the performance of synthetic broiler. *Veterinary Medicine*, 8: 117-122.
30. Sadeghi, K., S. Shahsavandi, M. Ebrahimi, H. Mahravani and H. Fazel. 2015. Hemokinin-1 molecular adjuvant: An approach to enhance the efficacy of influenza vaccine. *Journal of Arak University of Medical Sciences*, 11: 62-69 (In Persian).
31. Silva, V.K., J. Della Torre da Silva, K.A.A. Torres, D.E. de Faria Filho, F. Hirota Hada and V.M. Barbosa de Moraes. 2009. Humoral immune response of broiler fed diets containing yeast extract and probiotics in pre-starter phase and rose at different temperature. *Poultry Science*, 18: 530-540.
32. Soleimani, S., S. Shahsavandi, A. Madadgar, H. Mehrani and M. Lotfi. 2015. Introduction and evaluation to enhance immune response against influenza virus MX biological helper. *Medical Journal*, 3: 192-201 (In Persian).
33. Sterling, K.G., G.M. Pesti and R.I. Bakalli. 2003. Performance of broiler chicks fed various levels of dietary lysine and crude protein. *Poultry Science*, 82: 1939-1947.
34. Villegas, P., G.M. Pesti and D. Pesti. 1983. Antibody response against Newcastle disease in commercial broilers fed different dietary protein levels. *Poultry Science*, 62: 277-281.
35. Wang, W. and M. Singh. 2011. Selection of adjuvants for enhanced vaccine potency. *Vaccine*, 21: 33-78.
36. Zamiri, M.J. 2007. *Animal Physiology Fourth Edition*. Published by HaghShenas Publisher 397 pp (In Persian).

Main and Interaction Effects of Dietary Protein and Nano Adjuvant on Performance, Antibody Titres Against Newcastle Disease and White Blood Cells Counts of Broiler Chickens

Fatemeh Aziz Ali-Abadi¹, Hassan Darmani Kuhl², Mehrdad Mohammadi³ and Mohammad Hassan Nazaran⁴

1and 3- Graduated M.Sc. Student and Associate Professor, University of Guilan

2- Associate Professor, University of Guilan, (Corresponding author: darmani_22000@yahoo.com)

4- Sodour Ahrar shargh Company, Founder of Chelating and Nanochelating Technology and the Sole Producer of Designed Compounds Based on this Technology, Tehran

Received: December 19, 2015

Accepted: June 11, 2016

Abstract

The present study was conducted to investigate the effects of dietary protein density (low, medium and high) and nano adjuvant on performance, antibody titres against Newcastle disease and blood parameters of broiler chickens. Two hundred forty one-day old Ross 308 broiler chickens were allocated to six dietary treatments based on a completely randomized design in a factorial arrangement of 2×3 with two levels of nano adjuvant and three levels of protein. Feed intake (FI), body weight gain (BWG) and feed conversion ratio (FCR) were measured at the end of the experiment. On days 28 and 42, antibody titres against Newcastle disease virus were measured. Two birds per replicate were selected on day 42 and their blood samples were collected in order to determine white blood cell differential counts. The main effect of protein density on BWG was significant ($P<0.01$). For main and interaction effects of protein density and Nano adjuvant on antibody titres against Newcastle disease at day 28, only the main effect for nano adjuvant was significant ($P<0.05$). The main effect of nano adjuvant was also significant on white blood cells counts at day 42 ($P<0.05$). The percentages of heterophile (H) and lymphocyte (L) and the ratio of H/L did not affected by the factors ($P>0.05$). Despite of significant effect of protein density in the diets on body weight gain of the chicks, this effect on antibody titres against Newcastle disease and white blood cells counts was not significant. There was some advantage for nano adjuvant use on antibody titers against Newcastle disease and white blood cells counts of broiler chickens.

Keywords: Broiler, Nano adjuvant, Newcastle, Performance, Protein, White blood cells