

## تأثیر فرمولاسیون (قطر ذرات) واکسن غیرفعال دوگانه (AI+ND) بر پایداری و ایمنی زایی آن در جوجه‌های SPF و گوشتی

محمد عباس‌نیا<sup>۱\*</sup>، علی شیرازی‌نژاد<sup>۲</sup>، نادر قلعه‌گلاب‌بهبهان<sup>۳</sup>، منصور میاحی<sup>۴</sup> و سیدسبحان عمادی‌جمالی<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup> دانش‌آموخته بیماری‌های طیور، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

<sup>۲</sup> دانش‌آموخته میکروبی‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

<sup>۳</sup> استادیار گروه بیماری‌های طیور مؤسسه تحقیقات سرم و واکسن‌سازی رازی، شعبه شیراز، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران

<sup>۴</sup> استاد گروه بهداشت دام، طیور و آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۱۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۶/۶

### چکیده

روغن‌های معدنی متداول‌ترین اجزای هستند که در ساخت واکسن‌های بر پایه امولسیون آب در روغن برای ایجاد پاسخ مناسب و طولانی آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن واکسن در پرندگان استفاده می‌شوند. خصوصیات ساختاری واکسن از قبیل اندازه ذرات و فرمولاسیون آن بر پایداری و ایمنی زایی نیازمند بررسی و اطلاعات بیشتری است تا تولیدکنندگان واکسن بتوانند محصولات خود را طبق شیوه‌های کارآمدتری تولید کنند. در این مطالعه، تأثیر قطر ذرات واکسن امولسیون آب در روغن بر دو عامل پایداری و ایمنی زایی، مورد بررسی قرار گرفت. امولسیون‌های مختلفی از واکسن بر اساس زمان‌های مختلف هموژنیزاسیون توسط آنتی‌ژن‌های ویروس آنفلوانزا H9N2 و ویروس نیوکاسل V4 تکثیر شده در تخم‌مرغ جنین‌دار ۹ روزه و اجزای مختلف ساخته شد. سه واکسن فرموله شده (واکسن‌های A، B و C به ترتیب ۳، ۶ و ۱۲ دقیقه هموژن کردن) به همراه دو نمونه خارجی (واکسن‌های D و E به ترتیب واکسن‌های دوگانه کشته آنفلوانزا-نیوکاسل شرکت ایزو و سوا) متداول در بازار در جوجه‌های عاری از بیماری خاص (SPF) و جوجه گوشتی از جهت میزان و مدت تولید آنتی‌بادی، مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان دوز تزریقی واکسن‌ها، ۰/۲ میلی‌لیتر در نظر گرفته شد. در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ بعد از واکسیناسیون، میزان عیار آنتی‌بادی توسط مهار هم‌آگلوتیناسیون (HI) سنجش شد میزان آنتی‌بادی ضد ویروس نیوکاسل در جوجه‌های SPF، در واکسن‌های B و C در روزهای ۷ و ۲۱ بعد از واکسیناسیون از سایر گروه‌ها به صورت معنی‌داری بیشتر بود. اما تفاوت معنی‌داری بین سایر گروه‌ها مشاهده نشد. میزان آنتی‌بادی ضد ویروس نیوکاسل در جوجه‌های گوشتی در گروه‌های B و C در روز ۷ و ۲۱ و در گروه E در روز ۲۱ به صورت معنی‌داری بیشتر از سایر گروه‌ها بود. میزان آنتی‌بادی سرم علیه ویروس آنفلوانزا جوجه‌های SPF در گروه C، نسبت به سایر گروه‌ها به طور معنی‌داری، بیشتر بود. میزان تیتر آنتی‌بادی (آنفلوانزا) در روزهای ۷ و ۱۴ بعد از واکسیناسیون، به جز گروه D، در سایر گروه‌ها تفاوت معنی‌داری نداشت. میزان ایمنی زایی واکسن در زمان‌های بیشتر هموژنیزاسیون، بالاتر بود. بر اساس داده‌های حاصل، افزایش زمان هموژنیزاسیون، ذرات امولسیون با قطر کوچک‌تری تولید می‌کند که در تولید سریع‌تر آنتی‌بادی، مؤثر است. قطر کوچک‌تر ذرات واکسن باعث پاسخ سریع و مناسب سیستم ایمنی می‌شود که میزان ایمنی زایی در جوجه‌های SPF و گوشتی را افزایش می‌دهد.

**کلمات کلیدی:** قطر ذرات، اجزای، آب در روغن، ایمنی زایی، واکسن غیرفعال

### مقدمه

در ایران به خصوص در سال‌های اخیر بیماری آنفلوانزا عفونت‌های دستگاه تنفسی و کاهش تولید تخم‌مرغ در ناشی از H9N2، به عنوان عامل اولیه یا ثانویه در ایجاد پرنده‌گان مطرح است. عامل این بیماری سبب توقف

\* نویسنده مسئول: محمد عباس‌نیا، متخصص بیماری‌های طیور، گروه بیماری‌های طیور مؤسسه تحقیقات سرم و واکسن‌سازی رازی، شعبه شیراز، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران

E-mail: Abasnia2011@gmail.com



© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

ایجاد می‌کنند (Zhao et al, 2020). انتخاب وپروس برای ساخت واکسن باید به شکلی باشد که بتواند به خوبی در تخم مرغ جنین‌دار رشد کرده و آنتی‌ژن کافی تولید کند. این نوع واکسن را به وسیله تزریق داخل عضلانی یا زیر جلدی به کار می‌برند. استفاده از این واکسن به خصوص در گله‌هایی که عوارض تنفسی داشته‌اند، مؤثر است و خسارات حاصل از آن را کم کرده و ایمنی یکتواخت‌تری در گله فراهم می‌کند (Alexander, 2003). بر اساس مطالعات گذشته، قطر ذرات واکسن با اندازه ۱۰۰-۲۰۰ نانومتر، به طور مؤثری توسط سلول‌های دندریتیک جذب شده و سیستم ایمنی را تحریک می‌کند (Ott et al, 1995). بر اساس نتایج بررسی Iyer و همکاران (۲۰۱۵) روی فرمولاسیون و قطر ذرات اجوانت امولسیون روغن در آب، هرچه قطر ذرات کوچک‌تر (۸۰ نانومتر) باشد، میزان ایمنی‌زایی آن بیشتر است. تاکنون بررسی دقیقی بر روی فرمولاسیون و قطر ذرات اجوانت امولسیون آب در روغن که پایه تولید واکسن‌های غیرفعال پرندگان در مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه شیراز به شمار می‌رود، صورت نگرفته است. این مطالعه به منظور تأثیر قطر ذرات و زمان مناسب هم‌وزن‌نیزاسیون بر افزایش ایمنی واکسن غیرفعال دوگانه *آنفلوانزا H9N2* و نیوکاسل انجام گرفت.

#### مواد و روش کار

از جدایه‌های مورد استفاده در مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه شیراز جهت تولید واکسن غیرفعال دوگانه وپروس نیوکاسل *V4* و *آنفلوانزا H9N2* در این مطالعه استفاده شد. دو میلی‌لیتر مایع آلائتوییک حاوی هر وپروس (هر کدام به صورت مجزا) با یک میلی‌لیتر آنتی-بیوتیک حاوی پنی‌سیلین-استرپتومایسین (۳۰۰۰ واحد پنی‌سیلین + ۳۰۰۰ میلی‌گرم استرپتومایسین در یک میلی-لیتر) مخلوط گردید و پس از آماده‌سازی، هر کدام از وپروس‌ها با تیتراژ ۱۱ واحد هم‌اگلوتیناسیون به صورت مجزا در تخم مرغ جنین‌دار ۹ روزه تلقیح شد و پس از نگهداری

حرکت مژه‌ای و تخریب بافت پوششی مخاط تنفسی می‌شود (Abbasnia et al, 2020). این عامل بیماری‌زا همراه با سایر عوامل پاتوژن نظیر باکتری‌های *اشریشیا کلای*، *مایکوپلاسما* فرصت ایجاد کمپلکس‌های تنفسی را فراهم نموده و در نتیجه منجر به افزایش سطح تلفات در گله‌های گوشتی می‌شود (Jackwood and Wit, 2020). علی‌رغم بیماری‌زایی پایین وپروس *آنفلوانزا H9N2* شیوع آن در خاورمیانه، منجر به خسارات اقتصادی زیادی به صنعت طیور شده است که خسارت حاصله را می‌توان به عفونت‌های ثانویه متعاقب ابتلا به آن، نسبت داد (Peacock et al, 2019). در بسیاری از کشورها از جمله ایران، که وپروس *آنفلوانزا H9N2* به صورت اندمیک درآمده است، از واکسیناسیون به عنوان ابزاری جهت کاهش خسارات ناشی از بیماری استفاده می‌شود (Chio et al, 2008) اما علی‌رغم واکسیناسیون گسترده، تداوم تلفات به دنبال ابتلا به این بیماری گزارش شده است (Hassan et al, 2017).

بیماری نیوکاسل یکی از مهم‌ترین بیماری‌های وپروسی پرندگان در سراسر دنیا می‌باشد. عامل این بیماری در بین گونه‌های مختلف پرندگان اهلی، وحشی، آبی و مهاجر در دنیا ایجاد بیماری می‌نماید (Mayahi et al, 2015). ژنوم وپروس به صورت خطی پوشش‌دار و از RNA تک رشته-ای با سنس منفی تشکیل شده است (Shengqing et al, 2002). واکسیناسیون مؤثر یکی از مؤثرترین روش پیش-گیری از این بیماری و ابزاری قدرتمند برای کمک به رشد اقتصادی به شمار می‌رود (Teresa et al, 2021; Fenner, 1993). واکسن‌ها عمدتاً به صورت پاتوژن ضعیف شده و یا غیرفعال هستند (Vogel, 2009). واکسن‌های غیرفعال و کشته از کشت وپروس در جنین تخم مرغ و یا کشت غیرفعال بافت تهیه می‌شوند؛ سپس با موادی مثل فرمالدئید و یا بتا پروپیولاکتون غیرفعال می‌شوند و برای طولانی کردن اثر ایمنی‌بخشی همراه با مواد دیرجذب مثل هیدروکسید آلومینیوم و یا روغن‌های معدنی به کار می‌روند. استفاده از آجوانت‌ها با خاصیت ایمنی‌زایی که دارند، میزان مصرف واکسن را کاهش داده و محافظت ایمنی بهتری

فرمولاسیون رایج در شعبه شیراز، واکسن روغنی با نسبت ۳۰:۷۰ آنتی‌ژن به روغن مونتانااید به سه روش توسط دستگاه هموژنایزر ساخته شد و دو واکسن نمونه خارجی نیز برای ارزیابی مقایسه‌ای انتخاب گردید (Table 1). در واکسن A سه دقیقه هموژنیزاسیون به صورتی که با توالی یک دقیقه هموژن و سپس ۳۰ ثانیه استراحت صورت گرفت. هموژنیزاسیون واکسن‌های B و C نیز به ترتیب با ۶ دقیقه هموژن کردن (با توالی ۲ دقیقه هموژن کردن و ۳۰ ثانیه استراحت) و ۱۲ دقیقه هموژن کردن (با توالی ۴ دقیقه هموژن کردن و ۳۰ ثانیه استراحت) صورت گرفت. در هر دز واکسن میزان  $EID_{50}$   $10^{8.6}$  و  $10^{7.8}$  و  $V4$  و  $V4$  و  $10^{7.8}$  و  $V4$  و  $10^{7.8}$  و  $V4$  وجود دارد.

تخم مرغ‌ها در دمای ۳۶/۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت، از دستگاه انکوباتور خارج و پس از سرد کردن، مایع آلانتوئیک آن‌ها برداشت شد. جهت تأیید حضور ویروس آنفلوانزا و نیوکاسل از روش آگلوتیناسیون سریع استفاده شد. آنتی‌ژن‌ها توسط فرمالین ۳۷ درصد با میزان ۰/۲ درصد و در گرمخانه ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت، غیرفعال شد. جهت اطمینان از غیرفعال شدن ویروس، سه پاساژ متوالی در تخم مرغ جنین‌دار ۹ روزه انجام شد و پس از تأیید نهایی غیرفعال شدن ویروس، برای ساخت واکسن استفاده شد. تیتراژ مایع استحصال شده برای ساخت واکسن قبل از فرمولاسیون سنجش و ۱۱ واحد هماگلوتینین برای ویروس نیوکاسل و آنفلوانزا ثبت گردید. بر اساس

Table 1: Experimental formulated vaccines

Vaccine <sup>1</sup>	Homogenization time
A	3 minute with 12000 RPM/min speed
B	6 minute with 12000 RPM/min speed
C	12 minute with 12000 RPM/min speed
D	Killed bivalent Newcastle-Influenza vaccine (Izovac ND-FLU) <sup>®</sup>
E	Killed bivalent Newcastle-Influenza vaccine (CEVAC <sup>®</sup> NEW FLU H9 K) <sup>®</sup>

<sup>1</sup>- Vaccine name and group is same

سن ۹ روزگی پرورش و به ۶ گروه مجزا و هر گروه ۱۰ جوجه، تقسیم شدند. واکسیناسیون به صورت متداول پرورش در مزرعه، در سن ۹ روزگی صورت گرفت. به جوجه‌های گروه شاهد (F) در این آزمون نیز، PBS استریل به روش زیر پوستی تزریق گردید. تست‌های کنترل کیفی واکسن از قبیل تست پایداری، ویسکوزیته واکسن و استریلیتی طبق پروتکل‌های رایج شعبه رازی شیراز، انجام شد. تست پایداری با قرار دادن فالکون حاوی ۱۵ میلی‌لیتر واکسن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ماه انجام می‌شود و حفظ ساختار واکسن و عدم دو فازی شدن و جدا نشدن فاز آبی از روغن شرط تأیید صحت پایداری واکسن خواهد بود. تست استریلیتی واکسن با فیلتراسیون واکسن از فیلترهای سلولزی

### طرح آزمایش

واکسن‌های انتخاب شده جهت ارزیابی در جوجه SPF و گوشتی تجاری سویه راس در دو فاز مجزا انجام گردید. در فاز اول مطالعه، ۱۰۰ عدد تخم مرغ SPF در انکوباتور قرار داده شد و جوجه‌های تفریخ شده از تخم به سالن‌های پرورش منتقل گردید. جوجه‌ها تا سن ۹ روزگی پرورش یافته و به طور کاملاً تصادفی به ۶ گروه مجزا و هر گروه ۱۰ جوجه، تقسیم‌بندی شده و هر گروه، واکسن مربوط به خود را به میزان ۰/۲ میلی‌لیتر دریافت نمود. به جوجه‌های گروه شاهد (F)، PBS استریل به روش زیر پوستی تزریق گردید. جهت انجام مرحله دوم، تعداد ۶۰ قطعه جوجه یک روزه گوشتی (مخلوط از هر دو جنس) از سویه راس خریداری و به مؤسسه رازی شعبه شیراز منتقل گردید و تا

## نتایج

## آزمون پایداری، استریلیتی و ویسکوزیته

واکسن از نظر پایداری بررسی و پس از مطلوب بودن نتایج، برای کارآزمایی بالینی استفاده شد. تست استریلیتی واکسن‌های تهیه شده نیز در محیط آگار خونی، براس و سابورو دکستروز آگار بررسی شد و در تمام محیط کشت‌ها در زمان‌های ذکر شده، هیچ‌گونه ارگانسمی رشد نکرد. میزان ویسکوزیته واکسن‌های A، B و C به ترتیب ۲۳/۵، ۲۳/۴ و ۲۳/۲ بود و در واکسن D و E نیز ۳۲/۲ و ۳۲/۳ ثبت شد. در Figure 1-5، سنجش قطر و پراکندگی ذرات واکسن در هر ۵ گروه واکسن توسط دستگاه DLS ارایه شده است. میزان قطر ذرات با افزایش زمان هموژنیزاسیون کاهش می‌یابد به طوری که در واکسن B و C، که زمان هموژن کردن به ترتیب ۲ و ۳ برابر واکسن A است، قطر ذرات به طور میانگین کم‌تر از ۱۰۰ نانومتر است در حالی که در واکسن A و واکسن‌های خارجی (گروه D و E) ذرات واکسن به طور میانگین بالای ۱۰۰ نانومتر بوده و گاهی قطر ذرات تا ۵۰۰ نانومتر نیز می‌رسد.

و کشت در محیط آگار خونی (۷۲ ساعت)، براس (۱۴ روز) و سابورو دکستروز آگار، رشد باکتری و قارچ‌ها ارزیابی می‌گردد. سنجش قطر و پراکندگی ذرات واکسن در هر ۵ گروه واکسن توسط دستگاه آنالیزور اندازه نانوذرات (NANOTRAC WAVE II، ساخت کشور ایالات متحده آمریکا) DLS اندازه‌گیری شد (Figure 1-5). میزان ویسکوزیته توسط دستگاه Brook Field DV-II+por ساخت کشور ایالات متحده آمریکا و بر اساس پروتکل شرکت سازنده انجام شد.

در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ بعد از واکسیناسیون، تعداد ۵ قطعه جوجه از هر گروه آزمایشی، از ورید بال خون‌گیری شدند. به منظور حذف تأثیر جنس بر پاسخ ایمنی (Leitner et al, 1989)، در هر مرحله از نمونه‌گیری تعداد مساوی از هر دو جنس (بر اساس خصوصیات ظاهری) انتخاب شدند. سرم‌های حاصله با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس سرم‌های شفاف و عاری از هرگونه گلبول قرمز در درون میکروتیوب تا زمان انجام آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند.

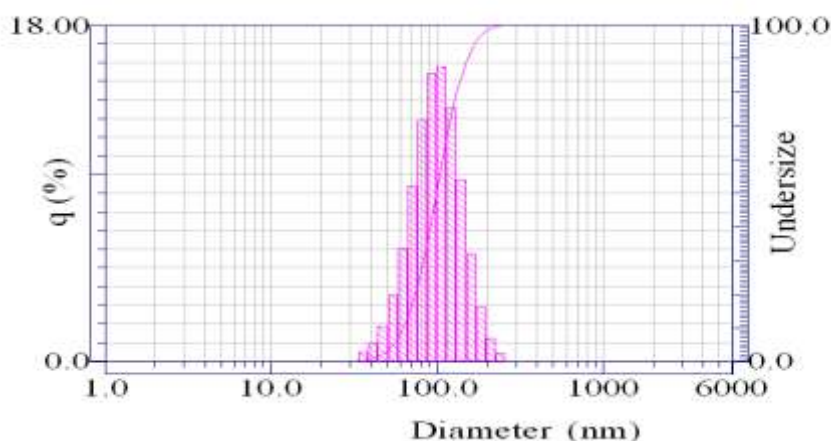


Figure 1: Analyzing Real Particle Size Distributions of vaccine A.

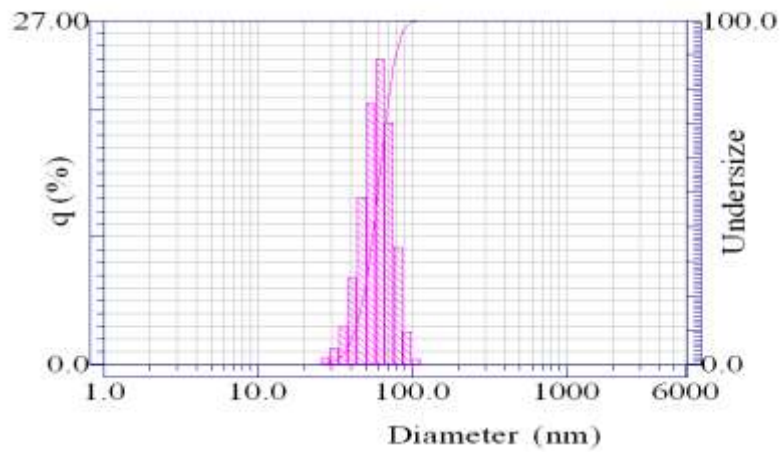


Figure 2: Analyzing Real Particle Size Distributions of vaccine B by DLS.

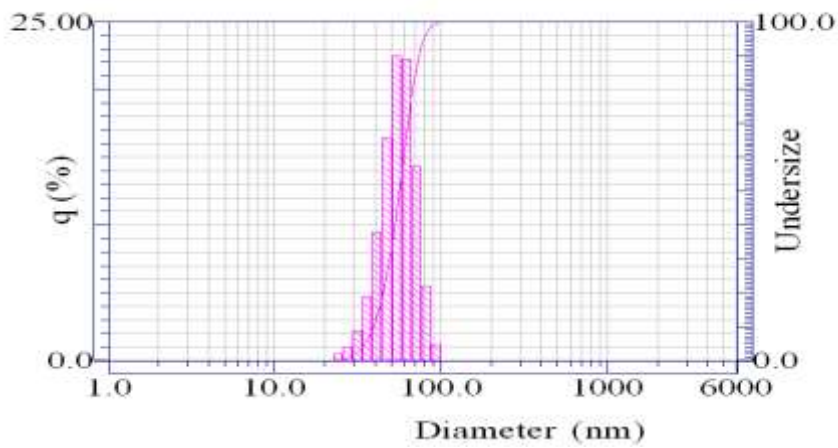


Figure 3: Analyzing Real Particle Size Distributions of vaccine C by DLS.

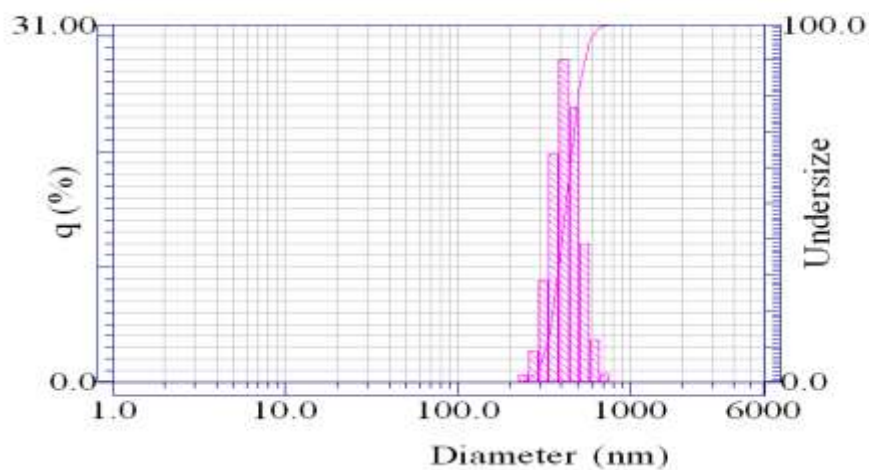


Figure 4: Analyzing Real Particle Size Distributions of vaccine D by DLS.

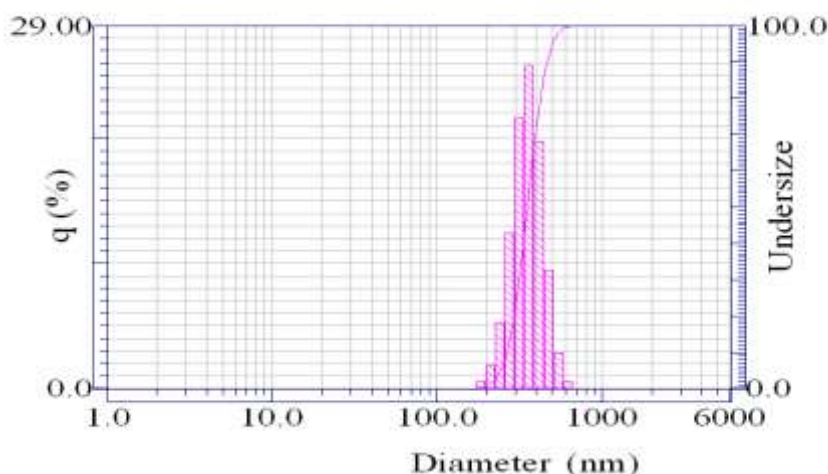


Figure 5: Analyzing Real Particle Size Distributions of vaccine E by DLS.

واکسیناسیون به طور معنی داری کم تر از سایر گروه ها بود ( $P < 0.05$ ). میزان تیتر پادتن ضد هر دو ویروس در روزهای بعد از واکسیناسیون به صورت معنی داری افزایش یافت (Table 2). بیشترین میزان افزایش تیتر پادتن نیوکاسل در گروه B و C مشاهده شد که به طور معنی داری از گروه A و D بیش تر بود ( $P < 0.05$ ). میزان تیتر پادتن ضد آنفلوانزا حاصل از گروه D در روز ۲۱ بعد از واکسیناسیون، بطور قابل توجهی کم تر از سایر گروه ها بود ( $P < 0.05$ ). میزان تیتر پادتن در گروه شاهد (F) در طول آزمایش ثابت و هیچ گونه افزایشی نداشت (Table 2).

عیار پادتن ممانعت کننده از هماگلوتیناسیون (HI) سرم خون سطح پادتن ممانعت کننده هماگلوتیناسیون در گروه های مختلف آزمایشی جوجه های SPF و گوشتی به ترتیب در Table 2 & 3 ذکر شده است. سطح پادتن سرم در جوجه های SPF گروه C در طول آزمایش روند صعودی داشت و در مقایسه با سایر گروه ها در روز ۲۱ بعد از واکسیناسیون به بالاترین میزان خود رسید ( $P < 0.05$ ). پادتن های سرم حاصل از واکسن های تزریقی در سنین ۱۴ و ۲۱ بعد از واکسیناسیون در گروه B و C، به طور معنی داری بیش تر از سایر گروه ها بود ( $P < 0.05$ ). عیار سرم خون جوجه های گروه E در روز ۱۴ و ۲۱ بعد از

Table 2: Mean±SD of AI and ND HI titers of SPF chickens on days post vaccination.

Groups	Days post vaccination					
	AI antibody titer			ND antibody titer		
	7	14	21	7	14	21
A	4.33±0.57 <sup>Aa</sup>	6±1.73 <sup>Ba</sup>	7.33±1.33 <sup>Ca</sup>	4.66±2.3 <sup>Aa</sup>	7±1 <sup>Ba</sup>	6±1 <sup>Ca</sup>
B	4.33±0.57 <sup>Aa</sup>	6.2±1.3 <sup>Ba</sup>	7.66±1.15 <sup>Ca</sup>	5.4±0.89 <sup>Ab</sup>	6±1.72 <sup>Ab</sup>	7±1 <sup>Bb</sup>
C	4.66±0.57 <sup>Aa</sup>	6.33±1.5 <sup>Ba</sup>	8.33±0.57 <sup>Cb</sup>	5.66±1.7 <sup>Ab</sup>	6.6±1.15 <sup>Bab</sup>	7.33±0.57 <sup>Bb</sup>
D	4±1 <sup>Aa</sup>	3±1 <sup>Bb</sup>	1.66±0.57 <sup>Cc</sup>	3±0.57 <sup>Ac</sup>	4.33±1.5 <sup>Bc</sup>	6±1 <sup>Ca</sup>
E	4±0.57 <sup>Aa</sup>	6±1.73 <sup>Ba</sup>	7.33±1.33 <sup>Ca</sup>	4±1 <sup>Aa</sup>	6±1 <sup>Bb</sup>	6.66±0.57 <sup>Bb</sup>
F	0	0	0	0	0	0

<sup>a-d</sup>: The values with different and dissimilar superscript letters in a column are significantly different ( $P < 0.05$ ).

A-C: Different superscript letter in a row indicates significant difference ( $P < 0.05$ ).

‡ Hemagglutination Inhibition



D، در روزهای مختلف به طور قابل توجهی کم تر از سایر گروه‌های واکسن بود. میزان تیتر آنتی بادی در گروه شاهد نیز روند ثابتی داشته و افزایشی نداشت (Table 3).

میزان آنتی بادی ضد ویروس نیوکاسل در جوجه‌های گوشتی در گروه‌های B و C در روز ۷ و ۲۱ و در گروه E در روز ۲۱ به صورت معنی داری بیش تر از سایر گروه‌ها بود ( $P < 0.05$ ). میزان تیتر آنتی بادی ضد آنفلونزا در گروه

**Table 3: Mean±SD of AI and ND HI titers of broiler chickens on days post vaccination**

Groups	Days post vaccination					
	AI antibody titer			ND antibody titer		
	7	14	21	7	14	21
A	3±1.58 <sup>Aa</sup>	4.4±1.14 <sup>Ba</sup>	6±0.83 <sup>Ca</sup>	3±2.3 <sup>Aa</sup>	5±1.22 <sup>Ba</sup>	5.4±0.89 <sup>Ca</sup>
B	3.6±1.34 <sup>Aa</sup>	4±0.7 <sup>Ba</sup>	6.6±1.3 <sup>Ca</sup>	4.2±0.35 <sup>Ab</sup>	5.4±1.14 <sup>Aa</sup>	6.6±0.54 <sup>Ba</sup>
C	3.6±1.14 <sup>Aa</sup>	4.6±0.89 <sup>Ba</sup>	6.4±0.7 <sup>Ca</sup>	4±0.7 <sup>Ab</sup>	5.4±0.55 <sup>Ba</sup>	6.8±0.83 <sup>Bb</sup>
D	2.8±1 <sup>Aa</sup>	2±1.23 <sup>Bb</sup>	1.6±0.89 <sup>Cb</sup>	3±1.58 <sup>Aa</sup>	4±1.58 <sup>Bb</sup>	5±2 <sup>Ca</sup>
E	3.4±1.14 <sup>Aa</sup>	4.2±1.1 <sup>Ba</sup>	6±1.23 <sup>Ca</sup>	3.2±1.3 <sup>Aa</sup>	4.8±0.84 <sup>Ba</sup>	6.2±0.84 <sup>Ba</sup>
F	1.7±0.22 <sup>Ab</sup>	1.7±0.22 <sup>Ac</sup>	1.7±0.22 <sup>Ac</sup>	1.7±0.22 <sup>Ac</sup>	1.4±0.21 <sup>Ac</sup>	1.7±0.18 <sup>Ac</sup>

a-d: The values with different superscript letters in a column are significantly different ( $P < 0.05$ ).

A-C: Different superscript letter in a row indicates significant difference ( $P < 0.05$ ).

## بحث

اما ذرات بزرگ تر، محتوای بیش تر آنتی ژنی را به سلول‌های عرضه کننده آنتی ژن ارایه می کنند (Shima et al, 2013). ذرات نانومتری (از ۱۰۰-۶۰۰ نانومتر) در مقایسه با ذرات میکرومتری سلول‌های دندریتیک بیش تری را فعال می کنند (توسط سنجش میزان بیان CD80) که در نتیجه، سلول‌های CD8+ اختصاصی آنتی ژن بیش تری ایجاد شده و میزان IgG2a بیشتری تولید می شود (Naomi et al, 2016). ذرات با قطر کم تر از ۱۰۰ نانومتر، مشابه مکانیسم مورد استفاده ویروس‌ها و از طریق سیستم منافذ کلاترین جذب می شوند که سلول‌های پاسخ ایمنی Th1<sup>۲</sup> قوی تری ایجاد می کند (Mottram et al, 2007). ذرات با قطر بزرگ تر از ۵۰۰ نانومتر به فاگوزوم‌ها تحویل داده شده و متعاقباً با اندوزوم-های اولیه متصل می شوند، در حالی که ذرات کوچک تر از ۲۰۰ نانومتر به اندوزوم‌های انتهایی متصل شده و با لیزوزوم امتزاج می یابند. سیستم سازگاری نسجی<sup>۳</sup> کلاس II با مشارکت دو مسیر، فرآیند عرضه آنتی ژن را انجام می دهد.

واکسیناسیون با آموزش سیستم ایمنی در شناخت و پاسخ مناسب به پاتوژن‌های بیماری‌زا عمل می کند (Rodrigues and Plotkin, 2020). متداول ترین امولسیون به عنوان اجوانت، امولسیون آب در روغن می باشد در جایی که آب به عنوان حل شونده در فاز روغنی امولسیون می شود و ریز قطرات مجزایی شکل می گیرد که توسط امولسیفایرها پایدار می شود. یکی از خصوصیات فیزیکی-شیمیایی واکسن، قطر ذرات واکسن است که در ایمنی‌زایی آن مؤثر است (Benne et al, 2016). Shima و همکاران (۲۰۱۳)، نشان دادند که ذرات (گاما-گلوتامیک اسید) با قطر ۴۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ نانومتر به طور قابل توجهی در تجویز زیر پوستی توسط سلول‌های دندریتیک جذب می شوند. ذرات با قطر ۴۰ نانومتر توسط سلول‌های دندریتیک دو برابر بیش تر از ذرات با قطر ۲۰۰ نانومتر جذب می شوند در حالی که محتوای آنتی ژنی ذرات ۲۰۰ نانومتری، حدود ۳ برابر بیش تر از ذرات ۴۰ نانومتری است. بنابراین، ذرات با قطر کوچک تر جذب مؤثرتری دارند

- 1- Cluster of differentiation 80
- 2- T helper 1
- 3- Major Histocompatibility Complex class II

ذرات امولسیون واکسن‌های مختلف در این بررسی، افزایش زمان هموژنیزاسیون تا زمان مشخصی می‌تواند اندازه ریز ذرات را کاهش دهد. میزان قطر ذرات امولسیون واکسن‌های خارجی حتی از واکسن A که کم‌ترین زمان هموژنیزاسیون را داشته است نیز بزرگ‌تر می‌باشد. نتایج تیتراژ ضعیف ضد آنفلوآنزا در واکسن D احتمالاً با کیفیت ضعیف آنتی‌ژن در مرحله فرآوری واکسن بوده است. با توجه به محدودیت فاز آبی در امولسیون کردن با اجزای روغنی، در صورت پایین بودن میزان HA آنتی‌ژن نیوکاسل از میزان حداقل لازم، در زمان فرمولاسیون باید حجم بیش‌تری از آن استفاده شود. افزایش حجم آنتی‌ژن نیوکاسل با توجه به محدودیت فاز آبی، استفاده کافی از آنتی‌ژن آنفلوآنزا را محدود می‌سازد که در نهایت تیتراژهای آنتی‌بادی حاصله در پرندگانه کاهش می‌یابد. نتایج این پژوهش نیز با یافته‌های Iyer و همکاران (۲۰۱۵) مطابق است و با کاهش قطر ریز ذرات واکسن به زیر ۱۰۰ نانومتر، جذب آن‌ها توسط سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن<sup>۱</sup> تسهیل می‌شود (Fenner, 1993). میزان تیتراژ ضد ویروس نیوکاسل و آنفلوآنزا حاصل از واکسیناسیون جوجه‌های SPF توسط واکسن‌های فرموله شده در مقایسه با دو واکسن خارجی، نشان‌دهنده کیفیت مطلوب واکسن‌های فرموله شده می‌باشد.

بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش، هموژنیزاسیون به مدت ۶ و ۱۲ دقیقه، بهترین تیتراژ پادتن را به همراه داشت و میزان یکنواختی و افزایش تیتراژ علیه ویروس نیوکاسل و آنفلوآنزا از سایر گروه‌ها بیش‌تر بود. با توجه به ارزیابی ایمنی‌زایی واکسن‌های ساخته شده در شعبه شیراز با نمونه‌های خارجی غالب در بازار، میزان تولید آنتی‌بادی واکسن‌های ساخته شده مطلوب و به طور قابل توجهی بهتر بود. بنابراین با پیش فرض استفاده از آنتی‌ژن با کیفیت و تیتراژ مناسب، فرمول زمانی ارائه شده برای ساخت واکسن برای افزایش کیفیت واکسن‌های تولیدی در کشور، مطلوب به نظر می‌رسد.

ذرات با قطر بزرگ‌تر از ۵۰۰ نانومتر در مقایسه با ذرات کوچک‌تر، بیش‌تر سلول‌های CD4+ T را تحریک می‌کنند (Brewer et al, 2004). تجمع نانوذرات درون لیزوزوم باعث القای بار اضافی بر لیزوزوم شده و تجزیه لیزوزومی را دچار اختلال می‌کند و این مسئله می‌تواند توجه‌کننده کاهش ظرفیت عرضه آنتی‌ژنی سیستم سازگاری نسجی کلاس II باشد (Seydoux et al, 2014). بر اساس فیزیولوژی سازوکار جذب واکسن‌های کشته روغنی نیوکاسل و آنفلوآنزا و هدف از کاربرد در پرندگان، تولید آنتی‌بادی کافی برای مقابله با بیماری است و تولید پادتن نیز از طریق فعال شدن ایمنی همورال و توسط لئوسیت‌های B صورت می‌گیرد. با وجود عرضه متقاطع، ذرات با قطر نانومتری، توسط سیستم سازگاری نسجی کلاس I عرضه شده و مسیر فاگوزوم-سیتوزول را القا می‌کنند، در حالی که ذرات با قطر میکرومتری از طریق مسیر واکتولی پردازش می‌شوند که نهایتاً سیستم سازگاری نسجی کلاس I کم‌تری را خواهیم داشت (Mant et al, 2014). بنابراین بر اساس مطالعات انجام شده، شواهد متقنی درباره تأثیر وابسته به قطر ذرات لیپوزومی و غیر لیپوزومی در پردازش و عرضه آنتی‌ژن اندوزومی وجود دارد. ذرات با قطر کم‌تر از ۱۰۰ نانومتر، پایداری بیش‌تری از خود نشان می‌دهند. امولسیون واکسن با ریز قطرات کم‌تر از ۸۰ میکرون قطر، پاسخ ایمنی و سلولی با شدت بیش‌تری تحریک می‌شود (Iyer et al, 2015). در این بررسی، میزان قطر ذرات امولسیون واکسن‌های خارجی (D و E) مشابه (بزرگ‌تر از ۵۰۰ نانومتر) و از واکسن‌های B و C بیشتر بود، در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ بعد از واکسیناسیون میزان تیتراژ پایین‌تری نشان دادند. افزایش اولیه تیتراژ پادتن علیه هر دو ویروس در واکسن‌های B و C، در روز ۷ بعد از واکسیناسیون، نشان‌دهنده آن است که با کاهش قطر ریز ذرات امولسیون واکسن، میزان افزایش تیتراژ پادتن نیز سرعت بیش‌تری خواهد داشت و با نتایج بررسی‌های گذشته، مطابق است. بر اساس آنالیز به دست آمده از سنجش قطر ریز



## تشکر و قدردانی

از کارشناسان بخش تولید واکسن‌های ویروسی به خصوص جناب آقای مهندس رحیمیان جهت ساخت و فرمولاسیون واکسن‌های مورد نظر، تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

## تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافع ندارند.

## منابع مالی

هزینه‌های این تحقیق توسط مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، شعبه شیراز تأمین گردیده است.

## منابع

- Abbasnia, M., Mosleh, N., Dadras, H., Rezaeianzadeh, G., & Boroomand, Z. (2020). Effect of different herbal preparations on experimental viral respiratory complex of broilers: clinical, pathological and ciliary activity aspects. *Journal of Herbed Pharmacology*, 9(3): 277-285.
- Alexander, D.J. (2003). Newcastle disease and other avian paramyxoviridae infections. In: Diseases of Poultry, ed. Saif Y.M., Barnes H.J., Glisson, J.R., Fadly A.M., McDougald L.R., & Swayne D.E. 11th ed., pp. 64-87. Iowa State University Press, Ames, IA.
- Benne, N., van Duijn, J., Kuiper, J., Jiskoot, W., & Slütter, B (2016). Orchestrating immune responses: How size, shape and rigidity affect the immunogenicity of particulate vaccines. *Journal of Controlled Release*. 234, p: 124-134.
- Brewer, M., Pollock, K.G., Tetley, L., & Russell, D.G. (2004). Vesicle size influences the trafficking, processing, and presentation of antigens in lipid vesicles, *Journal of Immunology*, 173, 6143-6150.
- Choi, J.G., Lee, Y.J., Kim, Y.J., Lee, E.K., Jeong, O.M., Sung, H.W., Kim, J.H., & Kwon J.H. (2008). An inactivated vaccine to control the current H9N2 low pathogenic avian influenza in Korea. *Journal of Veterinary Science*, 9: 67-74.
- Fenner, F. Smallpox: emergence, global spread, and eradication (1993). *History and Philosophy of the Life Sciences*. 15(3): 397-420; PMID: 7529932.
- Hassan, K.E., Ali A., Shany, S.A.S., & El-Kady, M.F. (2017). Experimental co-infection of infectious bronchitis and low pathogenic avian influenza H9N2 viruses in commercial broiler chickens. *Research in Veterinary Science*, 115:356-362.
- Iyer, V., Cayatte C., Guzman, B., Schneider-Ohrum, K., Matuszak, R., Snell, A., Manohar Rajani, G., McCarthy, M.P., & Muralidhara, B. (2015). Impact of formulation and particle size on stability and immunogenicity of oil-in-water emulsion adjuvants. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 11(7): 1853-1864.
- Jackwood, M., & Wit, S.D. (2020). Infectious Bronchitis. In: Disease of Poultry. Edited by Swayne D.E., Boulianne M., Logue C.M., McDougald L.R., Nair V., and Suarez D.L. Diseases of Poultry, 14th edition, PP: 167-181.
- Leitner, G., Dan Heller, E., & Friedman, A. (1989). Sex-related differences in immune response and survival rate of broiler chickens. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 21 (3-4): 249-260.
- Mant, A., Chinnery, F., Elliott, T., & Williams, A.P. (2012). The pathway of cross presentation is influenced by the particle size of phagocytosed antigen. *Immunology*, 136: 163-175.
- Mayahi, M., SefiAbad Shapouri, M.R., Jafary, R., & Khosravi Farsani, M. (2015). Isolation and molecular diagnostic of pigeon paramyxovirus-1 from suspected pigeons to Newcastle disease in Ahvaz, Iran. *Iranian Veterinary Journal*, 11(2):102-112.
- Mottram, P.L., Leong, D., Crimeen-Irwin, B., Gloster, S., Xiang, S.D., Meanger, J., Ghildyal, R., Vardaxis, N. & Plebanski, M. (2007). Type 1 and 2 immunity following vaccination is influenced by nanoparticle size: formulation of a model vaccine for respiratory syncytial virus. *Molecular Pharmacology*, 4: 73-84.

- Naomi, B., Janine van, D., Johan, K., Wim, J. & Bram, (2016). S. Orchestrating immune responses: How size, shape and rigidity affect the immunogenicity of particulate vaccines. *Journal of Controlled Release*, 234:124-34. DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.05.033
- Ott, G., Barchfeld, G.L., Chernoff, D., Radhakrishnan, R., Van Hoogevest, P., & Van Nest, G. (1995). Design and evaluation of a safe and potent adjuvant for human vaccines. *Pharmaceutical Biotechnology*, 6, p: 277-96; PMID: 7551221; <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4615-1823-5-10>.
- Peacock, T.H.P., James, J., Sealy, J.E., & Iqbal, M. (2019). A global perspective on H9N2 avian influenza virus. *Viruses*, 11(7). Pii: E 620.doi:10.3390/v11070620.
- Rodrigues, C.M.C., & Plotkin, S.A. (2020). Impact of Vaccines; Health, Economic and Social Perspectives. *Front. Microbiology*, 11: 1526.
- Seydoux, E., Rothen-Rutishauser, B., Nita, I.M., Balog, S., Gazdhar, A., Stumbles, P.A., Petri-Fink, A., Blank, F., & von Garnier, C. (2014). Size-dependent accumulation of particles in lysosomes modulates dendritic cell function through impaired antigen degradation, *International Journal of Nanomedicine*, 9: 3885-3902.
- Shengqing, Y., Shinya, K., Otsuki, K., Ito, H., & Ito, T. (2002). Isolation of myxoviruses from migratory waterfowls in San-in district, western Japan in winters of 1997–2000. *Journal of Veterinary Medical Science*, 64: 1049-1052.
- Shima, F., Uto, T., Akagi, T., Baba, M., & Akashi, M. (2013). Size effect of amphiphilic poly ( $\gamma$ -glutamic acid) nanoparticles on cellular uptake and maturation of dendritic cells in vivo. *Acta Biomaterialia*, 9: 8894-8901.
- Silva, A.L., Rosalia, R.A., Varypataki, E., Sibuea, S., Ossendorp, F., & Jiskoot, W. (2015). Poly-(lactic-co- glycolic-acid)-based particulate vaccines: Particle uptake by dendritic cells is a key parameter for immune activation. *Vaccine*, 33, 847-854.
- Teresa, C., Giraldo, C., López-Abán J., Muro A., Patarroyo, M.A., & Román, R. M. (2021). Nanovaccines against Animal Pathogens: The Latest Findings. *Vaccines (Basel)* 9(9): 988. Doi: 10.3390/vaccines9090988.
- Vogel, F.R., Caillet, C., Kusters, I.C., & Haensler, J. (2009). Emulsion based adjuvants for influenza vaccines. *Expert Review of Vaccines*, 8(4): 483-92; PMID: 19348563; <http://dx.doi.org/10.1586/erv.09.5>.
- Zhao, L., Zhu, Z., Ma, L., & Li, Y. (2020). O/W Nanoemulsion as an Adjuvant for an Inactivated H3N2 Influenza Vaccine: Based on Particle Properties and Mode of Carrying. *International Journal of Nanomedicine*, 15: 2071-2083. Doi: 10.2147/IJN.S232677.
- Received: 28.08.2023  
Accepted: 31.01.2024

## Effect of Formulation (particle size) of inactivated AI+ND vaccine on Stability and Immunogenicity in SPF and Broiler Chickens

Mohammad Abbasnia<sup>1\*</sup>, Ali Shirazi Nezhad<sup>2</sup>, Nader Ghaleh golab behbahan<sup>3</sup>,  
Mansour Mayahi<sup>4</sup> and Seyed Sobhan Emadi Jamali<sup>1</sup>

<sup>1</sup> PhD Graduated of Avian Disease, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran

<sup>2</sup> PhD Graduated of microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran

<sup>3</sup> Assistant Professor, Department of Poultry Disease, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Shiraz Branch, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Shiraz, Iran

<sup>4</sup> Professor, Department of Livestock, Poultry and Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Received: 28.08.2023

Accepted: 31.01.2024

### Abstract

Mineral oils are the most common adjuvants that are used in the production of poultry killed vaccine based on water-in-oil emulsion (W/O) to create high and long term antibody responses to vaccine antigens. The vaccine structural specifications, including particle size and formulation on stability and immunogenicity, have needed more clarification for vaccine producers so that they can produce their products based on highly efficient methods. This study assessed the effect of particle size on the stability and immunogenicity of a W/O vaccine. Different W/O emulsions were formulated by three different homogenization times by means of inactivated Avian Influenza Virus subtype H9N2 (AI H9N2) and Newcastle Disease Virus (V4) antigens and Montanide™ ISA 70 adjuvant. The three killed AI+ND vaccines were formulated and 2 commercial vaccines were evaluated for magnitude and duration of specific antibody response in SPF and broiler chickens. The vaccine dose for each bird was considered 0/2 ml. On days 7, 14 and 21 post vaccination, antibody titers of serum were evaluated by Hemagglutination Inhibition (HI) test. The serum antibody titers (ND) of group B and C on days 7 and 21 were higher than the other groups ( $P < 0.05$ ), but the difference between the other groups was not significant on the same day. The serum antibody titers (ND) of broiler chickens in group B and C on day 7, 21 and also group E on day 21 were significantly higher than other groups. The serum antibody titers (AI) of SPF chickens on day 21, in group C, had significant difference with other groups. The antibody titers (AI) on days 7 and 14 showed no significant difference in all groups except group D. The immunogenicity of emulsions was higher in more homogenization time. In all, these results indicate that increases in homogenization time create a smaller size of droplets and are effective for the rapid onset of antibody production. The small size of droplets not only creates a fast and good response, but also promotes immunogenicity both in broilers and SPF chickens.

**Key words:** Particle size, Adjuvant, Water in oil, Immunogenicity, Inactivated vaccine

---

\* **Corresponding Author:** Mohammad Abbasnia, Ph.D. of Avian Disease, Department of Poultry Disease, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Shiraz Branch, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Shiraz, Iran  
E-mail: Abasnia2011@gmail.com



© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).