Archive of SID

FMD virus type Asia-1 irradiated vaccine and evaluation of immune response on guinea-pig model

Farahnaz Motamedi-Sedeh *
Associate professor of Virology, Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, Tehran, Iran, fmotamedi@nrcam.org
Homayoon Mahravani
Associate professor of Microbiology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran, mahravani2010@gmail.com
Mojgan Javadi
M.Sc. student of Microbiology, Islamic Azad University, Karaj Branch, Iran, mojganjavadi@ymail.com
Naser Harzandi
Assistant professor of Microbiology, Islamic Azad University, Karaj Branch, Iran, nasharzan@yahoo.com
Sayed Kamalodin Shafaei
Nuclear Agriculture Research Center, Institute of Nuclear Science and Technology, Iran, kshafaie@nrcam.org

Abstract

Introduction: Foot and Mouth Disease (FMD) is the most contagious disease in cloven-hoofed animals which causes a lot of economical losses. FMD virus belongs to Picornaviridae family and Aphthovirus genus. The aim of the study is evaluation of humoral and cellular immune responses triggered by a Gamma-irradiated FMD vaccine in the guinea-pig model.

Materials and Methods: FMD virus type Asia-1 was multiplied on BHK_{21} cell line and irradiated by gamma ray in different doses. According to dose/survival curve, D_{10} value and optimum dose of virus inactivation were calculated 7.69 and 50 kGy, respectively. Antigenic characteristic of irradiated and un-irradiated virus samples were evaluated by complement fixation test (CF test) and safety test was done by four blind passages cell culture on $IBRS_2$ cell line. The inactivated virus sample was formulated as Radio- vaccine and immune responses were evaluated in three groups of ginea-pigs; the first group Radio-vaccine, the second group conventional vaccine and the last one was negative control.

Results: The results of neutralizing antibody titration for two vaccinated groups were significant ($P<0.05$), but between Radio-vaccine and conventional vaccine was no significant. The increase in splenocyte multiplication for two vaccinated groups by MTT test was significant ($P<0.05$).

Discussion and conclusion: The Gamma irradiated inactivated FMD type Asia-1 vaccine is a good candidate for immunization of guinea-pig without the problems such as residue, virus escape and etc. And it can use for vaccination of cattle in the future.

Key words: FMD virus, Gamma irradiation, Vaccine, Immune Response

* Corresponding author
Received: February 13, 2016 / **Accepted:** March 8, 2017

www.SID.ir

Archive of SID

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال ششم، شماره ۲۳، پاییز ۱۳۹۶، صفحه ۶۶- ۵۷
تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۲۴ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۲/۱۸

واکسن پرتوتابی‌شده بیماری ویروسی تب برفکی تایپ آسیا-۱ و ارزیابی پاسخ ایمنی در خوکچه هندی

فرحناز معتمدی سده *: دانشیار ویروس شناسی، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، ایران، fmotamedi@nrcam.org
همایون مهروانی: دانشیار میکروبیولوژی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، ایران، mahravani2010@gmail.com
مژگان جوادی: دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، ایران، mojganjavadi@ymail.com
ناصر هرزندی: استادیار میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، ایران، nasharzan@yahoo.com
سید کمال‌الدین شفائی: پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، ایران، kshafaie@nrcam.org

چکیده

مقدمه: بیماری تب برفکی یکی از بیماری‌های حاد ویروسی است که موجب بیماری گونه‌های مختلف حیوانات زوج‌سم و وحوش می‌شود. ویروس عامل بیماری به خانواده پیکورناویریده و جنس *آفتوویروس* تعلق دارد. هدف پژوهش حاضر، ساخت رادیوواکسن بیماری تب برفکی تایپ آسیا-۱ با استفاده از پرتوی گاما و ارزیابی پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی در خوکچه‌های هندی واکسینه‌شده است.

مواد و روش‌ها: ابتدا ویروس تب برفکی تایپ آسیا-۱ تکثیر و در دوزهای مختلف پرتوی گاما پرتوتابی شد. سپس با منحنی دوز/پایندگی، فاکتور ارزش D_{10} و دوز مطلوب غیرفعال‌سازی ویروس به‌ترتیب ۷/۶۹ و ۵۰ کیلوگری محاسبه شدند. ویژگی‌های آنتی‌ژنیک ویروس پرتوتابی‌شده و شاهد به روش ثبوت کمپلمان مقایسه و بی‌ضرری واکسن با استفاده از چهار پاساژ کور متوالی تأیید شد. در مراحل بعد، ویروس غیرفعال‌شده با ادجوانت هیدروکسیدآلومینیوم فرموله و به‌عنوان رادیوواکسن استفاده شد. پاسخ‌های ایمنی در سه گروه خوکچه هندی واکسینه‌شده با رادیوواکسن، واکسن رایج و بافر فسفات (شاهد) بررسی شدند.

نتایج: نتایج نشان دادند تیتر آنتی‌بادی خنثی‌کننده در گروه‌های رادیوواکسن و واکسن رایج نسبت به گروه شاهد افزایش معناداری ($P<0.05$) داشته و میزان تولید آنتی‌بادی در دو گروه رادیوواکسن و واکسن رایج نسبت به یکدیگر اختلاف معناداری نداشته است ($P>0.05$). بررسی تکثیر لنفوسیت‌های طحال با آزمون MTT نشان داد که افزایش تکثیر لنفوسیت‌های T در گروه‌های رادیوواکسن و واکسن رایج مشابه و این افزایش نسبت به گروه شاهد معنادار است ($P<0.05$).

بحث و نتیجه‌گیری: رادیوواکسن تهیه‌شده در پژوهش حاضر، پاسخ ایمنی هومورال و سلولی مناسبی در خوکچه هندی ایجاد کرد و در پژوهش‌های آتی برای واکسیناسیون گوساله، میزبان اصلی این بیماری، استفاده‌شدنی است.

واژه‌های کلیدی: ویروس تب برفکی، پرتوتابی گاما، واکسن، پاسخ ایمنی

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

Copyright©2017, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

بیماری تب برفکی یکی از بیماری‌های حاد ویروسی است که موجب بیماری گونه‌های مختلف حیوانات زوج‌سم و وحوش می‌شود. در بین نشخوارکنندگان اهلی، نخست گاو و سپس گوسفند و بز به این بیماری حساس هستند. این بیماری در بیشتر بخش‌های دنیا و حداقل در ۷۰ گونه از حیوانات وحشی گزارش شده است و سرعت انتشار سریع آن موجب خسارت‌های بسیاری به شیر، گوشت و سایر محصولات دامی می شود (۱). این ویروس هفت سروتایپ دارد که سه سروتایپ آن (A، O و Asia 1) در ایران رایج و از خانواده پیکورناویریده هستند و شش جنس *آفتوویروس*، *اینتروویروس*، *کاردیوویروس*، *رینوویروس*، *هپاتاویروس* و *پارچوویروس* دارد. این خانواده ویروسی، کسپید بیست‌وجهی و ژنوم RNA تک‌رشته‌ای خطی، مثبت با اندازه ۷/۵ تا ۸/۵ کیلوجفت باز[1] دارد (۲). پرتوهای یون‌ساز گاما و ایکس که برای غیرفعال‌سازی ریزموجودات استفاده می‌شوند، پرتوهای الکترومغناطیسی با طول موج کوتاه و قدرت نفوذ زیاد هستند. مطالعات درباره ویروس‌ها نشان داده‌اند که عفونت‌زایی ویروس‌ها با پرتوتابی از بین می‌رود ولی آنتی‌ژنسیتی آنها بدون تغییر می‌ماند (۳ و ۴). فرسکورا و همکاران در سال ۱۹۷۳ مشاهده کردند که ویروس FMD type C لیوفیلیزه که با پرتوی گاما غیرفعال‌شده، ویژگی آنتی‌ژنسیتی خود را طبق آزمون ثبوت کمپلمان کاملاً حفظ کرده است (۵). مورتون و همکاران در سال ۱۹۷۰، واکسن غیرفعال بیماری انسفالیت اسبی ونزولایی (VEE) را به روش پرتوتابی گاما با دوزهای ۸ تا ۱۰ میلیون راد تهیه کردند که ویژگی ایمونولوژیک زیادی برای موش‌ها و خوکچه‌های هندی نشان داد. همچنین خوکچه‌های هندی در آزمون چلنج زنده ماندند و میزان آنتی‌بادی خنثی‌کننده در خوکچه‌های هندی و خرگوش افزایش داشت. این یافته‌ها نشان دادند که پرتوهای یون‌ساز در تهیه واکسن غیرفعال VEE بسیار مؤثر هستند (۶). واکسنی که امروزه برای تب برفکی استفاده می‌شود، واکسن غیرفعال‌شده با اتیلن ایمین همراه با ادجوانت هیدروکسیدآلومینیوم است؛ این واکسن معایبی ازجمله نیمه‌عمر کوتاه، باقیماندهای توکسیک و آلرژیک در واکسن، احتمال فرار ذره های ویروسی از تیمار با مواد شیمیایی و طولانی‌بودن زمان غیرفعال‌سازی ویروس دارد. بنابراین هدف پژوهش حاضر، ساخت رادیوواکسن بیماری تب برفکی تایپ آسیا-۱ با استفاده از پرتوی گاما و واکسیناسیون خوکچه‌های هندی و در نهایت، ارزیابی پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی ایجادشده در خوکچه‌های هندی واکسینه‌شده است (۷ و ۸). با توجه به خسارت‌های اقتصادی زیاد بیماری تب برفکی به صنعت دامداری در کشور و سایر کشورهای منطقه ازجمله کاهش شیر، گوشت و پشم حیوانات آلوده، روند تقاضا برای واکسن ایمن و مؤثر این بیماری رو به افزایش است. با توجه به کاهش مدت زمان غیرفعال‌سازی ویروس به چند دقیقه در فرایند تولید واکسن پرتوتابی، توانایی سیستم تولید واکسن افزایش می‌یابد. همچنین، با در نظر گرفتن قدرت نفوذ بسیار زیاد پرتوی گاما که فقط دیوار سربی قادر به ممانعت از نفوذ آن است، هیچ ذره ویروسی زنده در واکسن باقی نمی‌ماند؛ این در حالی است که در روش غیرفعال‌سازی ویروس با موادشیمیایی، احتمال فرار ذره‌های ویروسی از تیمار با ماده شیمیایی وجود دارد. بنابراین، امید است که روش پرتوتابی در آینده برای تولید صنعتی این واکسن استفاده شود.

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش‌ها

ویروس: در پژوهش حاضر، از ویروس تب برفکی تایپ آسیا-۱[۲] استفاده شد که مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی از ایران جداسازی کرده است. پس از تکثیر ویروس در کشت سلولی رده پایدار $IBRS_2$ و جمع‌آوری آن، سانتریفوژ با دور کم برای جداسازی ذره‌های سلولی پاره‌شده از سوسپانسیون ویروسی انجام و سپس، تیتراسیون ویروس به روش دوز عفونت‌زایی کشت بافتی ۵۰ درصد[۳] انجام شد. استوک ویروسی تهیه‌شده در ویال‌های استریل به حجم ۵ میلی‌لیتر تقسیم و در فریزر منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۹ و ۱۰).

دوزیمتری و پرتوتابی: سیستم پرتودهنده گامای استفاده‌شده در پژوهش حاضر به پژوهشکده کاربرد پرتوها و شرکت ام دی اس نوردین[۴] کشور کانادا مربوط است، نرخ دوز این سیستم و اکتیویته آن به ترتیب ثانیه/گری ۴/۸ و ۲۰۴۶۹ کوری است. دوزیمتری با روش فریک[۵] طبق استاندارد دوزیمتری فریک شماره E 1026–04e انجام شد. ویال‌های حاوی ۵ میلی‌لیتر ویروس منجمد به همراه یخ خشک با دوزهای ۱۰، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۴۰، ۳۵، ۴۵ و ۵۰ کیلوگری پرتوی گاما پرتوتابی شدند و سه تکرار برای هر دوز پرتوتابی انجام شد (۱۰-۱۳).

تیتراسیون ویروس‌های پرتوتابی‌شده و محاسبه دوز غیرفعال‌سازی: پس از پرتوتابی نمونه‌های ویروسی با دوزهای مختلف پرتوی گاما، تیتراسیون ویروسی به همان روش دوز عفونت‌زایی کشت بافتی ۵۰ درصد انجام و منحنی دوز/پایندگی با نرم‌افزار Origin6.1 رسم شد. با رابطه بهترین خطی که بر این نمودار منطبق می‌شود، فاکتور ارزش[۶] D_{10} (دوزی از پرتوی گاما بر حسب کیلوگری که جمعیت ویروسی را یک سیکل لگاریتمی کاهش می دهد) محاسبه و سپس دوز مطلوب غیرفعال‌سازی کامل ویروس با در نظر گرفتن تیتر اولیه آن محاسبه شد (۱-۱۳).

آزمون بی‌ضرری و بررسی ویژگی‌های آنتی‌ژنیک ویروس پرتوتابی‌شده: برای تأیید غیرفعال‌سازی کامل ویروس پرتوتابی شده با دوز مطلوب و انجام آزمون بی‌ضرری واکسن غیرفعال‌شده، نمونه‌های ویروسی پرتوتابی شده در سه دوز ۴۰، ۴۵ و ۵۰ کیلوگری و هر کدام دو تکرار در کشت سلولی تک‌لایه رده سلولی پایدار کلیه بچه هامستر[۷] کشت داده شدند. پس از ۴۸ ساعت، در صورت مشاهده نشدن آثار تخریب سلولی (CPE)، از سوسپانسیون آنها تا چهار پاساژ متوالی روی سلول‌های BHK_{21} کشت داده و هر پاساژ، ۴۸ ساعت از نظر نشانه های تخریب سلولی بررسی شد. برای بررسی ویژگی‌های آنتی‌ژنیک ویروس پرتوتابی‌شده نسبت به ویروس شاهد از آزمون ثبوت کمپلمان استفاده شد. در این آزمون، از سیستم همولیتیک که شامل گلبول قرمز گوسفند شسته‌شده و آنتی‌بادی ضد آن است و آنتی‌بادی ضدویروس تب برفکی تایپ آسیا-۱ و سریال رقت آنتی‌ژن ویروسی پرتوتابی‌شده و نشده استفاده شد (۱۳ و ۱۴).

فرمولاسیون واکسن: پس از تأیید غیرفعال‌سازی کامل ویروس توسط پرتوی گاما و حفظ ویژگی آنتی‌ژنیک ویروس پرتوتابی‌شده، ۵۰ میلی‌لیتر ویروس غیرفعال‌شده به روش پرتوتابی و روش رایج غیرفعال‌سازی (اتیلن ایمین) با تیتر مشخص ($10^{8/5}$ دوز عفونت‌زایی کشت بافتی ۵۰ درصد در میلی‌لیتر[۸]) همراه با ادجوانت ژل هیدروکسیدآلومینیوم[۹]، بافر فسفات دی‌هیدروژن‌پتاسیم و فسفات‌هیدروژن‌سدیم و ساپونین

www.SID.ir

Archive of SID

فرموله و اسیدیته بین ۷ تا ۸ با استفاده از گلیکوکول (گلیسین+سود) تنظیم شد.

واکسیناسیون حیوانات: در پژوهش حاضر از الگوی حیوانی خوکچه هندی استفاده شد. تعداد ۹ عدد خوکچه هندی ماده با وزن تقریبی ۲۰ گرم انتخاب و در سه گروه تقسیم شدند و به ترتیب به گروه اول ۲۰۰ میکرولیتر واکسن رایج تولیدشده در مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، به گروه دوم ۲۰۰ میکرولیتر رادیوواکسن تولیدشده در پژوهش حاضر و به گروه سوم بافر فسفات (شاهد) به روش زیرپوستی تزریق شد. دوز یادآور واکسن، ۲۱ روز پس از نخستین تزریق واکسن انجام و ۱۰ تا ۱۴ روز پس از دوز دوم، خون‌گیری از قلب حیوانات و جداسازی سرم خون انجام و طحال خوکچه‌های هندی جداسازی شد.

آزمون MTT: برای بررسی میزان تکثیر لنفوسیت‌های T در طحال حیوانات واکسینه‌شده، ابتدا طحال جداسازی‌شده همراه با بافر فسفات استریل و روی یخ به آزمایشگاه منتقل و پس از جداسازی لنفوسیت‌های طحال، شمارش آنها و تعیین درصد سلول‌های زنده با لام نئوبار انجام شد. کشت لنفوسیت‌های طحال با استفاده از محیط‌کشت RPMI1640 بدون فنل‌رد و همراه با ۱۰ درصد سرم جنین گوساله در میکروپلیت ۹۶ خانه انجام و برای هر نمونه ۹ خانه کشت داده شد؛ به شکلی که ۳ خانه با افزودن فیتوهماگلوتینین (عامل محرک رشد سلول) شاهد مثبت، ۳ خانه با افزودن آنتی‌ژن ویروسی به‌عنوان آزمون اصلی نمونه و ۳ خانه شاهد منفی انتخاب شد. پس از ۴۸ ساعت، معرف نمک تترازولیوم طبق دستورعمل کیت تجاری[10] افزوده شد و پس از ۴ ساعت، بلورهای فورمازان تشکیل شدند؛ در چاهک‌هایی که رشد لنفوسیت‌ها بیشتر بود، بلورهای بیشتری مشاهده شدند. سپس حلال کیت، شامل SDS ۱۰ درصد در کلریدریک‌اسید ۰/۰۱ مولار اضافه و یک شب در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری و در انتها، جذب نوری هر خانه با دستگاه الایزاریدر در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده شد. ضریب شاخص تحریکی تکثیر لنفوسیت‌های طحال با تقسیم‌کردن میانگین جذب نوری خانه های آزمون اصلی نمونه به میانگین جذب نوری خانه‌های شاهد منفی محاسبه و در سه گروه واکسن پرتوتابی شده، واکسن رایج و گروه شاهد با یکدیگر مقایسه شد (۱۵ و ۱۶).

تیتر آنتی‌بادی خنثی‌کننده: از آزمون خنثی‌سازی سرم برای تیتراسیون آنتی‌بادی خنثی‌کننده در سرم حیوانات واکسینه‌شده استفاده شد؛ ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های ۱:۸، ۱:۱۶، ۱:۳۲، ۱:۶۴ و ۱:۱۲۸ سرم تهیه و با ۱۰۰ میکرولیتر ویروس تب برفکی با تیتر ۱۰۰ دوز عفونت‌زایی کشت بافتی ۵۰ درصد مخلوط شد، پس از یک ساعت مخلوط یادشده به چاهک‌های حاوی کشت سلول BHK_{21} منتقل و پس از ۴۸ ساعت، تیتر آنتی‌بادی با توجه به آشکارشدن یا نشدن آثار تخریب سلولی[11] محاسبه شد. در هر چاهکی که سرم حیوان، ویروس را خنثی کرده است، نشانه‌های تخریب سلولی دیده نشد به این معنا که سرم حیوان، آنتی‌سرم ضدویروس را داشته است و در هر چاهکی که نشانه‌های تخریب سلولی دیده شد یعنی سرم حیوان، آنتی‌سرم ضدویروس را نداشته، ویروس خنثی شده است و نشانه‌های تخریب سلولی بروز کرده‌اند. در نهایت، بیشترین رقت سرم که نشانه‌های تخریب سلولی را در ۵۰ درصد سلول‌های تک‌لایه‌ای نشان می‌دهد، تیتر سرم در نظر گرفته و لگاریتم مبنای ده عکس ضریب آن رقت، تیتر آنتی سرم ضدویروس گزارش شد (۱۷).

www.SID.ir

Archive of SID

اندازه‌گیری میزان سایتوکاین‌ها: در پژوهش حاضر، سایتوکاین‌های اینترفرون گاما[۱۲] که بیشتر لنفوسیت‌های T کمک‌کننده کلاس یک[۱۳] آنها را تولید می‌کنند و اینترلوکین ۴[۱۴] که به‌طور عمده لنفوسیت‌های T کمک‌کننده کلاس دو[۱۵] آنها را تولید می‌کنند با کیت‌های تجاری الایزا ساخت شرکت ای بیوساینس[۱۶] اندازه‌گیری شدند.

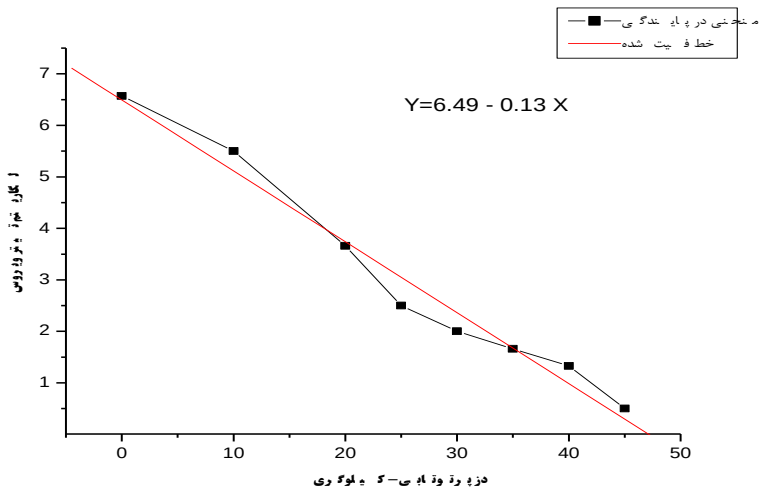
مطالعات آماری: مقایسه میانگین‌ها برای نتایج تیتر آنتی‌بادی خنثی‌کننده، ضریب شاخص تحریکی رشد لنفوسیت‌های طحال، مقادیراینترفرون گاما و اینترلوکین ۴ به روش آنالیز واریانس یک‌طرفه[۱۷] با نرم‌افزار اس‌پی‌اس‌اس-۱۶[۱۸] تجزیه و تحلیل شدند (۱۸).

نتایج

تیتر ویروس تب برفکی تایپ آسیا-۱ پرتوتابی‌شده و نشده به روش دوز عفونت‌زایی کشت بافتی ۵۰ درصد و با رابطه رید و مونچ[۱۹] محاسبه شد (جدول ۱). با توجه به تیتر ویروس در دوزهای مختلف پرتوتابی، نمودار دوز/پایندگی با نرم‌افزار Origin 6.1 رسم و رابطه بهترین خط عبوری از منحنی یافت شد (شکل ۱). با معادله خط، فاکتور ارزش D_{10} و دوز مطلوب غیرفعال سازی کامل ویروس به ترتیب ۷/۶۹ و ۵۰/۵۲ کیلوگری محاسبه شدند. در جدول ۲، نتایج بررسی نشانه‌های تخریب سلولی در چهار پاساژ متوالی از نمونه‌های پرتوتابی‌شده در دوزهای ۴۰، ۴۵ و ۵۰ کیلوگری مشاهده می‌شوند؛ با توجه به این نتایج، دوز مطلوب گاما برای غیرفعال‌سازی ویروس تب برفکی تایپ آسیا-۱ با تیتر $10^{6/5}$ در میلی‌لیتر که در هر چهار پاساژ متوالی نشانه تخریب سلولی ایجاد نکند، ۵۰ کیلوگری تعیین شد.

جدول۱- تیتر نمونه‌های ویروس پرتوتابی‌شده با پرتو گاما با دوزهای صفر، ۱۰، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰ و ۵۰ کیلوگری

دوز پرتوتابی (کیلوگری)	۰	۱۰	۲۰	۲۵	۳۰	۳۵	۴۰	۴۵	۵۰
تیتر ویروسی دوز عفونت‌زایی کشت بافتی ۵۰ درصد/mL	$10^{6/5}$	$10^{5/5}$	$10^{3/66}$	$10^{3/5}$	10^{2}	$10^{1/66}$	$10^{1/33}$	$10^{0/5}$	$10^{0/5}$



شکل۱- منحنی دوز/پایندگی و رابطه بهترین خط عبوری از منحنی برای نمونه‌های ویروس تب برفکی تایپ آسیا-۱ پرتوتابی‌شده

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- نتایج آزمون بی‌ضرری در نمونه‌های ویروسی پرتوتابی‌شده تا چهار پاساژ متوالی

نمونه ویروس پرتوتابی‌شده	نشانه‌های سایتوپاتیک در پاساژهای متوالی			
	پاساژ اول	پاساژ دوم	پاساژ سوم	پاساژ چهارم
۴۰ kGy–نمونه ۱	+	+	+	+
۴۰ kGy–نمونه ۲	+	+	+	+
۴۵ kGy–نمونه ۱	–	+	+	+
۴۵ kGy–نمونه ۲	–	+	+	+
۵۰ kGy–نمونه ۱	–	–	–	–
۵۰ kGy–نمونه ۲	–	–	–	–

اتصال اختصاصی بین آنتی‌سرم اختصاصی ضدویروس تب برفکی تایپ آسیا-۱ و نمونه‌های ویروسی پرتوتابی‌شده با دوزهای مختلف پرتو گاما از صفر تا ۵۰ کیلوگری به روش ثبوت کمپلمان ارزیابی شد؛ این آزمون مشخص کرد که ویژگی آنتی‌ژنیک نمونه‌های ویروسی پس از پرتوتابی تغییر نکرده است. لوپ G-H قرارگرفته در پپتید VP1 کپسید ویروس تب برفکی، جایگاه اختصاصی اتصال آنتی‌بادی خنثی‌کننده به ویروس و گفتنی است که این لوپ در ویروس پرتوتابی‌شده در پژوهش حاضر بدون تغییر مانده است. نتایج آزمون ثبوت کمپلمان در جدول ۳ مشخص می کنند که ویژگی آنتی‌ژنیک ویروس پس از پرتوتابی تا دوز ۵۰ کیلوگری پرتوی گاما در دو رقت اولیه نسبت به نمونه پرتوتابی‌نشده بدون تغییر باقی می‌ماند و باعث القای پاسخ ایمنی مناسب در حیوان می‌شود.

جدول ۳- نتایج آزمون ثبوت کمپلمان نمونه‌های پرتوتابی‌شده با پرتو گاما

دوز پرتوتابی (کیلوگری)	رقت ویروس تب برفکی تایپ آسیا-۱ با تیتر 10^6 در هر میلی‌لیتر از دوز عفونت‌زایی کشت بافتی ۵۰ درصد			
	۱	۱/۲	۱/۴	۱/۸
۰	۴+	۴+	۰,۵+	۰
۱۰	۴+	۴+	۰,۵+	۰
۲۰	۴+	۴+	۰,۵+	۰
۳۰	۴+	۴+	Tr	۰
۴۰	۴+	۴+	Tr	۰
۴۵	۴+	۴+	Tr	۰
۵۰	۴+	۴+	Tr	۰

پس از تزریق واکسن فرموله‌شده به خوکچه های هندی، تیتر آنتی‌بادی خنثی‌کننده، میزان تکثیر لنفوسیت‌های T طحال و میزان اینترفرون گاما و اینترلوکین ۴ در هر سه گروه تعیین شد (جدول ۴). تیتر آنتی‌بادی خنثی‌کننده و میزان تکثیر لنفوسیت‌های طحال در گروه‌های واکسن مرسوم و رادیوواکسن افزایش معناداری ($P<0.05$) نسبت به گروه شاهد نشان دادند، هرچند اختلاف معناداری بین دو گروه واکسینه‌شده وجود نداشت ($P>0.05$). افزایش غلظت اینترفرون گاما در هر دو گروه واکسینه‌شده نسبت به گروه شاهد معنادار و این افزایش در گروه رادیوواکسن نسبت به واکسن مرسوم معنادار ($P<0.05$) بود. افزایش غلظت اینترلوکین ۴ در هر دو گروه واکسینه‌شده نسبت به گروه شاهد معنادار نیست ($P>0.05$).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۴- نتایج تیتر آنتی‌بادی خنثی‌کننده، میزان تکثیر لنفوسیت‌های T طحال، میزان اینترفرون گاما و اینترلوکین ۴

گروه واکسن	تکثیر لنفوسیت‌ها (SI)	میانگین SI ±انحراف معیار	غلظت IFN-γ (pg/ml)	میانگین غلظت IFN-γ ± انحراف معیار	غلظت IL4	میانگین غلظت IL4 ± انحراف معیار	تیتر آنتی‌بادی
شاهد	۰/۶۷	۰/۶۹ ± ۰/۰۱۸	۹۸/۵۳	۸۴/۶۸±۱۲/۹۶	۶۶۵/۵۲	۸۵۷/۸۴ ±۲۲۰/۲۲۰	۰/۶ >
شاهد	۰/۷۰		۸۲/۶۹		۱۰۹۸/۰۵		۰/۶ >
شاهد	۰/۷۰۴		۷۲/۸۴		۸۰۹/۹۶		۰/۶ >
واکسن مرسوم	۱/۱۵	۱/۱ ±۰/۱۴۹	۳۳۲/۹۵	۳۱۵/۲۵±۴۸/۴۱	۸۰۹/۹۶	۲۳۵۱/۸۴ ±۱۶۹۷/۵۷	۲/۱ <
واکسن مرسوم	۱/۲۰		۲۶۰/۴۸		۴۱۷۰/۹۷		۲/۱ <
واکسن مرسوم	۰/۹۲		۳۵۲/۳۳		۲۰۷۴/۶۰		۲/۱ <
رادیوواکسن	۱/۳	۱/۵۶ ±۰/۲۸۰	۵۰۱/۸۰	۳۹۵/۰۸±۱۲۸/۶۵	۱۰۳۵/۴۱	۱۴۳۶/۷۳ ±۶۴۱/۶۳	۲/۱ <
رادیوواکسن	۱/۲۷		۲۵۲/۰۰		۲۱۷۶/۷۵		۲/۱<
رادیوواکسن	۰/۹۰		۳۲۳/۴۵		۱۰۹۸/۰۵		۲/۱ <

بحث و نتیجه‌گیری

والی و کاری، پژوهشگران فرانسوی، در سال ۱۹۲۷ نخستین تلاش برای استفاده از واکسن حفاظتی تب برفکی را انجام دادند (۱۹). باهنمان در سال ۱۹۷۳ در مرکز FMD آمریکا از آزیریدین‌ها مانند اتیلن ایمین برای واکسن تب برفکی استفاده کرد (۱۹). پرتوهای یون‌ساز گاما و ایکس که برای غیرفعال‌سازی ریزموجودات استفاده می‌شوند، پرتوهای الکترومغناطیسی با طول موج کوتاه و قدرت نفوذ زیاد هستند. مطالعات درباره باکتری‌ها و ویروس‌های دامی نشان داده‌اند که پرتوتابی، عفونت‌زایی ویروس‌ها را از بین می‌برد و آنتی‌ژنسیتی آنها بدون تغییر می‌ماند و تیمارهای شیمیایی روی ویژگی‌های آنتی‌ژنیک اثر می‌کنند مگر اینکه این مواد شیمیایی از محیط واکسن حذف یا خنثی شوند (۹، ۱۲، ۱۴ و ۲۰). در پژوهش حاضر، از عامل غیرفعال‌کننده پرتوی یون‌ساز گاما استفاده شد. مزیت‌های استفاده از پرتوی گاما به جای مواد شیمیایی عبارتند از: باقیمانده‌های توکسیک و آلرژیک مواد شیمیایی استفاده‌شده برای غیرفعال‌سازی ویروس در محصول نهایی واکسن پرتوتابی‌شده وجود ندارند؛ به دلیل قدرت نفوذ بسیار زیاد پرتو گاما که تنها دیوار سربی مانع نفوذ آن می‌شود، امکان فرار ذره‌های ویروسی از تیمار با پرتو وجود ندارد و خطر ابتلا به بیماری پس از واکسیناسیون از بین می‌رود ولی در واکسن های غیرفعال به روش شیمیایی امکان فرار ذره‌های ویروسی زنده از تیمار با ماده شیمیایی وجود دارد؛ پرتودهی در دمای کم انجام می‌شود و مدت زمان پرتودهی مطابق استانداردهای موجود فقط چند دقیقه است و بنابراین امکان تغییر پروتئین‌های آنتی‌ژنیک ویروس در روش پرتوتابی وجود ندارد و با کم‌شدن زمان پرتوتابی توان سیستم تولید واکسن در واحد زمان افزایش می‌یابد (۳، ۴، ۵ و ۲۱).

www.SID.ir

Archive of SID

لمبـاردو و اسـمولکو (۱۹۹۰) از پرتـوی گامـای تـابش‌شـده از چشـمه کبالـت ۶۰ بـرای غیرفعـال‌سـازی ویروس تب برفکی و تهیه واکسن با کیفیت آنتی‌ژنیک خوب برای آن استفاده کردند (۱۲). اسمولکو و لمباردو (۲۰۰۵) پرتوتابی گاما را بـرای غیرفعـال‌سـازی نسـبی یـا کامـل ویـروس‌هـای تـب برفکـی، هـرپس سـیمپلکس ویروس و RLV استفاده کردند و نشان دادند که منحنـی غیرفعال‌سـازی بـه ویـروس و سـایر پارامترهـای خـارجی ماننـد دوز، نـوع پرتـو، دمـای پرتوتـابی و طبیعـت مـواد ویروسی طی فرایند پرتوتابی بستگی دارد. نتیجه درخـور توجـه پـژوهش یادشـده، کـاربرد تئـوری هـدف بـرای غیرفعـال‌سـازی ویـروس تـب برفکـی بـود کـه بـه‌طـور موفقیت‌آمیـزی بـه آنتی‌ژن پرتوتـابی‌شـده غیرفعـال ایـن ویروس به‌صورت واکسن ضد بیماری تب برفکـی منجـر شد. همچنین، مقدار یک میلیون دوز این واکسن بـه‌طـور تجـاری تولیـد شـد و گوسـاله‌هـا را در برابـر بیمـاری محافظت کرد (۱۴). شریف و مـول بـاچر (۲۰۱۰) نشـان دادند که ویـروس آنفـولانزا A غیرفعـال‌شـده بـا پرتـوی گاما، نامزد واکسن پیشنهاد می‌شـود و متوجـه شـدند کـه تجویز داخل بینی ویروس Flu A/RR/8 پرتوتـابی گامـا شده به‌شکل تک دوز باعث القـای پاسـخ ایمنـی متقـاطع در عفونت‌های هتروساب تایپی ازجمله سویه آنفولانزای پرندگان H_5N_1 مـی‌شـود. بنـابراین، روش تهیـه ویـروس آنفولانزای پرتوتابی شده با پرتوی گاما، فناوری جدیدی برای تهیه واکسن آنفـولانزا بـا اثـر حفـاظتی متقـاطع شـد (۲۲). فورویـا و همکـاران در دانشـگاه ملـی اسـترالیا (۲۰۱۰)، اثر روش‌هـای غیرفعـال‌سـازی بـر پاسـخ ایمنـی متقاطعی را بررسی کردند که ویـروس‌هـای آنفـولانزا A کشـته‌شـده القـا مـی‌کننـد. آنهـا بـا بررسـی کـارایی ویروس‌های غیرفعال‌شده با اشعه ماورای بـنفش، فرمـالین و پرتوی گاما برای القای پاسخ ایمنـی در آزمـون چلـنج بر ضد ویروس هترولوگ و همولـوگ نشـان دادنـد کـه فعالیـت هماگلوتیناسـیون در ویـروس غیرفعـال‌شـده بـا پرتوی گاما و ویروس‌های غیرفعال‌شده با فرمالین و اشعه ماورای بنفش به‌ترتیب سه و ده برابر کاهش داشته اسـت. از این رو پرتوتـابی گامـا در مقایسـه بـا سـایر روش‌هـای غیرفعـال‌سـازی، کمتـرین اثـر تخریبـی را روی سـاختار پروتئینی ویروس دارد و ویروس غیرفعال‌شده بـا پرتـوی گاما برخلاف ویـروس غیرفعـال‌شـده بـا دو روش دیگـر باعـث القـای ایمنـی در ویـروس‌هـای هتروسـاب تایـپ می‌شود. همچنین، ویروس غیرفعال‌شـده بـا پرتـوی گامـا برخلاف ویروس‌هـای غیرفعـال‌شـده بـا فرمـالین و اشـعه ماورای بنفش باعث القای پاسخ ایمنی سلولی از نوع تـی سایتوتوکسـیک[۲۰] مـی‌شـود. واکسـن آنفـولانزای غیرفعـال‌شـده بـا پرتـوی گامـا، ایمونوژنیسـتی غـالبی در مقایسه با سـایر روش‌هـای رایـج غیرفعـال‌سـازی تجـاری دارد و باعث اثر حفاظتی بیشتری در مقابله با عفونت های هموتایپ و هتروتایپ این ویروس می‌شود که به کـاهش پاسخ التهابی ریه و میـزان ویـروس در ریـه میزبـان منجـر می‌شود (۲۳). معتمدی و همکاران (۱۳۸۵)، ویروس تب برفکـی (FMDV type A87/IRN) را بـا پرتـوی گامـا سـاطع از چشـمه کبالـت ۶۰ غیرفعـال کردنـد و پـس از فرمولاسـیون بـه‌عنـوان رادیوواکسـن بـرای ایجـاد ایمنـی هومورال در خوکچه هندی استفاده کردند (۹ و ۲۴).

با توجه به مزایایی که واکسن پرتوتابی‌شده نسبت بـه واکسن غیرفعال بـا مـواد شـیمیایی دارد و نیـز شـیوع سـه سویه ویروس تب برفکی در ایران (A05، O Panasia و Asia 1)، آماده‌سازی و آزمون واکسن پرتوتابی برای هر کـدام از سـویه‌هـا بـه‌طـور جداگانـه ضـروری بـود. در پروژه‌ای مشترک بین پژوهشگاه علوم و فنون هسـته‌ای و

www.SID.ir

Archive of SID

مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، واکسن پرتوتابی‌شده برای تایپ O Panasia ویروس تب برفکی بررسی و نتایج رضایت‌بخشی یافت شد (۲۵). نتایج پژوهش حاضر مشخص کردند که رادیوواکسن تهیه‌شده برای تایپ آسیا-۱ ویروس تب برفکی باعث ایجاد پاسخ ایمنی هومورال حفاظتی (تولید آنتی‌بادی با تیتر بیش از ۲/۱) و ایمنی سلولی (تکثیر بیشتر لنفوسیت‌های طحال و میزان اینترفرون گامای بیشتر) مناسب در خوکچه هندی می‌شود. از نظر تولید اینترفرون گاما نیز حیوانات واکسینه‌شده با رادیوواکسن، غلظت بیشتری را نشان دادند و بنابراین، تحریک لنفوسیت‌های T کمک‌کننده کلاس یک در رادیوواکسن بهتر از واکسن مرسوم انجام می‌شود. از آنجا که غلظت اینترلوکین ۴ در هر دو گروه واکسینه‌شده نسبت به شاهد معنادار نبود، هیچ‌یک از دو نوع واکسن، لنفوسیت‌های T کمک‌کننده کلاس دو را تحریک نمی‌کنند. پیشنهاد می‌شود بررسی‌های ایمونولوژیکی کامل‌تر ازجمله اندازه‌گیری میزان اینترلوکین ۲ و ۱۰ و اثر بر لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک در پژوهش‌های آتی انجام شوند و در نهایت، رادیوواکسن تولیدشده در میزبان اصلی، گوساله، آزمون شود.

References

(1) Alexandersen S., Zhang Z., Donaldson AI., Garland AJ. The pathogenesis and diagnosis of foot-and-mouth disease. *Journal of Comparative Pathology* 2003; 129(1): 1-36.

(2) Barteling SJ., Vreeswijk J. Development in foot-and-mouth disease vaccines. *Vaccine* 1992; 9(2): 75-88.

(3) Genoza W. Inactivation of viruses by ionizing radiation and by heat In: Aramorosch K., Oprowski H. editors. *Methods in virology*. New York: Academic Press Inc; 1968: 4.

(4) Jordan RT., Kempe LL. Inactivation of some animal viruses with gamma radiation from cobalt 60. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 1956; 91: 212-215.

(5) Frescura T., Vivoli P. Studies of the foot and mouth disease virus sub-types using antigens inactivated by gamma radiations. *Zoonoses and Public Health* 1973; 20: 822-825.

(6) Morton R., Tribble HR., Leonard G. Gamma-irradiated Venezuelan equine encephalitis vaccines. *Applied Microbiology* 1970; 19(5): 763-767.

(7) Rodriguez LL, Grubman MJ. Foot and mouth disease virus vaccines. *Vaccine*. 2009; 27: D90- D94.

(8) Motamedi Sedeh F., Khorasani A., Shafaee SK., Arbabi K. Immune response of foot and mouth disease virus type A87/IRN inactivated on guinea pig in Iran. *Iranian Journal of Science and Technology*, Transaction A. 2007; 31(A1): 35-41.

(9) Motamedi sedeh F., Khorasani A., Shafaee SK., Fatolai H., Arbabi K. Preparation of FMD type A87/IRN inactivated vaccine by gamma irradiation and Immune response on guinea-pig. *Indian Journal of Microbiology*. 2008; 48 (3): 326-330.

(10) Standard practice for using the Fricke Reference-Standard Dosimetry system. ASTM E1026- 04e1.

(11) Lombard M., Pastoret PP., Moulin AM. A brief history of vaccines and vaccination. *Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties* 2007; 26(1): 29-48.

(12) Lombardo JH, Smolko E. Biotechnological project with a gamma radiation source of 100,000 Ci. *Radiatio. Physics and Chemistry* 1990; 35(4-6): 585-589.

www.SID.ir

Archive of SID

(13) Stark LM, Lewis AL. Complement Fixation Test In: Specter S., Lancz G., editors. *Clinical Virology Manual*. New York: Published Elsevier; 1992: 203-208.

(14) Smolko EE, Lombardo JH. Virus inactivation studies using ion beams, electron and gamma irradiation. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research* 2005; B 236: 249-253.

(15) Grubman MJ., Lewis SA., Morgan DO. Protection of swine against foot-and-mouth disease with viral capsid proteins expressed in heterologous systems *Vaccine.1993;* 11(8): 825-829.

(16) Roosien J., Belsham GJ, Ryan MD., King AM., Vlak JM. Synthesis of foot-and-mouth disease virus capsid proteins in insect cells using baculovirus expression vectors. *Journal of General Virology*. 1990; 71(Pt 8): 1703-1711.

(17) Chinsangaram J., Beard C., Mason PW., Zellner MK, Ward G., Grubman MJ. Antibody response in mice inoculated with DNA expressing foot-and-mouth disease virus capsid proteins. *Journal of Virology* 1998; 72(5): 4454- 4457.

(18) Goris N., Maradei E., D'aloia R., Fondevila N., Mattion N., Perez A., et al. Foot-and-mouth disease vaccine potency testing in cattle using homologous and heterologous challenge strains: precision of the "Protection against Podal Generalisation" test. *Vaccine*. 2008; 26(27-28): 3432–3437.

(19) Sutmoller P., Barteling SJ. The history of foot and mouth disease vaccine development: a personal perspective In Dodet B., Vicari M. editors. *Foot and mouth disease control strategies*. Paris: Elsevier (Editions scientifiques et medicales SAS); 2003.

(20) Bahnemann HG. The inactivation of foot and mouth disease virus by ethyleneimine and propyleneimine. *Zentralbl. Veterinärmed* 1973; B(20): 356-360.

(21) Polley JR. The use of gamma radiation for the preparation of virus vaccines. *Canadian Journal of Microbiology* 1962; 8: 455-459.

(22) Alsharifi M., Mu¨ llbacher A. The c-irradiated influenza vaccine and the prospect of producing safe vaccines in general. *Immunology and Cell Biology* 2010; 88: 103–104.

(23) Furuya Y., Regner M., Lobigs M., Koskinen A., Mu¨ llbacher A., Alsharifi M. Effect of inactivation method on the crossprotective immunity induced by whole 'killed' influenza A viruses and commercial vaccine preparations. *Journal of General Virology* 2010; 91: 1450-1460.]

(24) Motamedi-Sedeh F., Khorasani A., Shafaei S. K., Salehizadeh M., Fatollahi H., Arbabi K., Majd F. Inactivation of Foot and Mouth Disease Virus by Gamma Irradiation in order to killed vaccine preparation. *Nuclear Science and Technology Journal* 1385; 37(2): 17-21.

(25) Motamedi-Sedeh F., Production of FMD type O vaccine by nuclear and molecular techniques in cattle-Phase1. *Final report of project*, Research and technical deputy of Atomic Energy Organization of Iran; 1394.

[1]- kbp
[2]- Asia-1
[3]- $TCID_{50}$
[4]- MDS Nordion
[5]- Fricke
[6]- D_{10} Value
[7]- BHK_{21}
[8]- $10^{8.5}$ $TCID_{50}$/ml
[9]- Al $(OH)_3$
[10]- Cell Proliferation Kit 1 (MTT)- Roche
[11]- CPE
[12]- IFN-γ
[13]- $T\text{-}helper_1$
[14]- IL4
[15]- $T\text{-}helper_2$
[16]- eBioscience
[17]- Anowa One-way (LSD method)
[18]- SPSS16
[19]- Reed and Mounch
[20]- T Cytotoxic Cells

www.SID.ir