

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, kshafaei@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 BHK₂₁ cell line and irradiated by gamma ray in different doses. According to dose/survival curve, D₁₀ 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 IBRS₂ cell line. The inactivated virus sample was formulated as Radio- vaccine and immune responses were evaluated in three groups of guinea-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

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 پرتوتابی شده بیماری ویروسی تب برفکی تایپ آسیا-۱ و ارزیابی پاسخ ایمنی در خوکچه هندی

فرحناز معتمدی سده*: دانشیار ویروس‌شناسی، 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 واکسینه شده است.

مواد و روش‌ها: ابتدا ویروس تب برفکی تایپ آسیا-۱ تکثیر و در دوزهای مختلف پرتوی گاما پرتوتابی شد. سپس با منحنی دوز/پابندگی، فاکتور ارزش D_{10} و دوز مطلوب غیرفعال‌سازی ویروس به ترتیب ۷/۶۹ و ۵۰ کیلوگری محاسبه شدند. ویژگی‌های آنتی‌ژنیک ویروس پرتوتابی شده 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 هیدروکسید آلومینیوم فرموله و به عنوان رادیوواکسن استفاده شد. پاسخ‌های ایمنی در سه گروه خوکچه هندی واکسینه شده با رادیوواکسن، واکسن رایج و بافر فسفات (شاهد) بررسی شدند.

نتایج: نتایج نشان دادند تیتراژ 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 ($P < 0.05$) است.

بحث و نتیجه‌گیری: رادیوواکسن تهیه شده 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

* نویسنده مسئول مکاتبات

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 می‌شود (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، هیپارناوویروس و پارچوویروس دارد. این خانواده ویروسی، کسپید بیست‌وجهی و ژنوم RNA تک‌رشته‌ای خطی، مثبت با اندازه ۷/۵ تا ۸/۵ کیلوگفت باز^۱ 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 آنتی‌ژنیتی آنها بدون تغییر می‌ماند (۳ و ۴). فرسکورا و همکاران در سال ۱۹۷۳ مشاهده کردند که ویروس FMD type C لیوفلیزه که با پرتوی گاما غیرفعال شده، ویژگی آنتی‌ژنیتی 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 ایمنولوژیک 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 اتیلن‌ایمین همراه با ادجوانت هیدروکسید آلومینیوم است؛ این واکسن معایبی از جمله نیمه‌عمر کوتاه، باقیمانده‌های توکسیک و آلرژیک در واکسن، احتمال فرار ذره‌های ویروسی از تیمار با مواد شیمیایی و طولانی بودن 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 از جمله 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 مواد شیمیایی، 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.

مواد و روش‌ها

ویروس: در پژوهش حاضر، از ویروس تب برفکی تایپ آسیا-۱^۱ استفاده شد که مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی از ایران جداسازی کرده است. پس از تکثیر ویروس در کشت سلولی رده پایدار IBRS₂ 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^۲ 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 ام‌دی‌اس 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/پابندگی با نرم‌افزار Origin 6.1 رسم شد. با رابطه بهترین خطی که بر این نمودار منطبق می‌شود، فاکتور ارزش^۶ D₁₀ (دوزی از پرتوی گاما بر

حسب کیلوگری که جمعیت ویروسی را یک سیکل لگاریتمی کاهش می‌دهد) محاسبه و سپس دوز مطلوب غیرفعال‌سازی کامل ویروس با در نظر گرفتن تیتراژ اولیه آن محاسبه شد (۱-۱۳).

آزمون بی‌ضرری و بررسی ویژگی‌های آنتی‌ژنیک ویروس پرتوتابی‌شده: برای تأیید غیرفعال‌سازی کامل ویروس پرتوتابی‌شده با دوز مطلوب و انجام آزمون بی‌ضرری واکسن غیرفعال‌شده، نمونه‌های ویروسی پرتوتابی‌شده در سه دوز ۴۰، ۴۵ و ۵۰ کیلوگری و هر کدام دو تکرار در کشت سلولی تک‌لایه رده سلولی پایدار کلیه بچه‌ها^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 BHK₂₁ کشت داده و هر پاساژ، ۴۸ ساعت از نظر نشانه‌های 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 ضد ویروس 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 (اتیلن‌ایمین) با تیتراژ مشخص (۱۰^{۸/۵} دوز عفونت‌زایی کشت بافتی ۵۰ درصد در میلی‌لیتر^۸) همراه با ادجوانت ژل هیدروکسید آلومینیوم^۹، بافر فسفات دی‌هیدروژن پتاسیم و فسفات هیدروژن سدیم و ساپونین

بیشتری مشاهده شدند. سپس حلال کیت، شامل SDS ۱۰ درصد در کلریدریک اسید ۰/۰۱ مولار اضافه و یک شب در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری و در انتها، جذب نوری هر خانه با دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده شد. ضریب شاخص تحریکی تکثیر لئوسیت‌های طحال با تقسیم کردن میانگین جذب نوری خانه‌های 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).

تیتراژ آنتی‌بادی خنثی‌کننده: از آزمون خنثی‌سازی سرم برای تیتراژ آنتی‌بادی خنثی‌کننده در سرم حیوانات واکسینه‌شده استفاده شد؛ ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های ۱:۸، ۱:۱۶، ۱:۳۲، ۱:۶۴، ۱:۱۲۸ سرم تهیه و با ۱۰۰ میکرولیتر ویروس تب برفکی با تیتراژ ۱۰۰ دوز عفونت‌زایی کشت بافتی ۵۰ درصد مخلوط شد، پس از یک ساعت مخلوط یادشده به چاهک‌های حاوی کشت سلول BHK₂₁ منتقل و پس از ۴۸ ساعت، تیتراژ آنتی‌بادی با توجه به آشکار شدن یا نشدن آثار تخریب سلولی^{۱۱} 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 ضد ویروس را داشته است و در هر چاهکی که نشانه‌های تخریب سلولی دیده شد یعنی سرم حیوان، آنتی‌سرم ضد ویروس 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، تیتراژ سرم در نظر گرفته و لگاریتم منبای ده عکس ضریب آن رقت، تیتراژ آنتی‌سرم ضد ویروس گزارش شد (۱۷).

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

واکسیناسیون حیوانات: در پژوهش حاضر از الگوی حیوانی خو کچه هندی استفاده شد. تعداد ۹ عدد خو کچه 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 سرم‌سازی 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 خو کچه‌های هندی جداسازی شد.

آزمون MTT: برای بررسی میزان تکثیر لئوسیت‌های T در طحال حیوانات واکسینه‌شده، ابتدا طحال جداسازی شده همراه با بافر فسفات استریل و روی یخ به آزمایشگاه منتقل و پس از جداسازی لئوسیت‌های طحال، شمارش آنها و تعیین درصد سلول‌های زنده با لام نئوبار انجام شد. کشت لئوسیت‌های طحال با استفاده از محیط کشت 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 فیتوهم‌گلوتینین (عامل محرک رشد سلول) شاهد مثبت، ۳ خانه با افزودن آنتی‌ژن ویروسی به عنوان آزمون اصلی نمونه و ۳ خانه شاهد منفی انتخاب شد. پس از ۴۸ ساعت، معرف نمک تترازولیوم طبق دستور عمل کیت تجاری^{۱۱} افزوده شد و پس از ۴ ساعت، بلورهای فورمازان تشکیل شدند؛ در چاهک‌هایی که رشد لئوسیت‌ها بیشتر بود، بلورهای

اندازه گیری میزان سایتوکاین ها: در پژوهش حاضر، سایتوکاین های اینترفرون گاما^{۱۲} که بیشتر لنفوسیت های T کمک کننده کلاس یک^{۱۳} آنها را تولید می کنند و اینترلوکین^{۱۴} که به طور عمده لنفوسیت های T کمک کننده کلاس دو^{۱۵} آنها را تولید می کنند با کیت های تجاری الیزا ساخت شرکت ای بیوساینس^{۱۶} اندازه گیری شدند.

مطالعات آماری: مقایسه میانگین ها برای نتایج تیترا آنتی بادی خنثی کننده، ضریب شاخص تحریکی رشد لنفوسیت های طحال، مقادیر اینترفرون گاما و اینترلوکین ۴ به روش آنالیز واریانس یک طرفه^{۱۷} با نرم افزار اسپاس اس-۱۶^{۱۸} تجزیه و تحلیل شدند (۱۸).

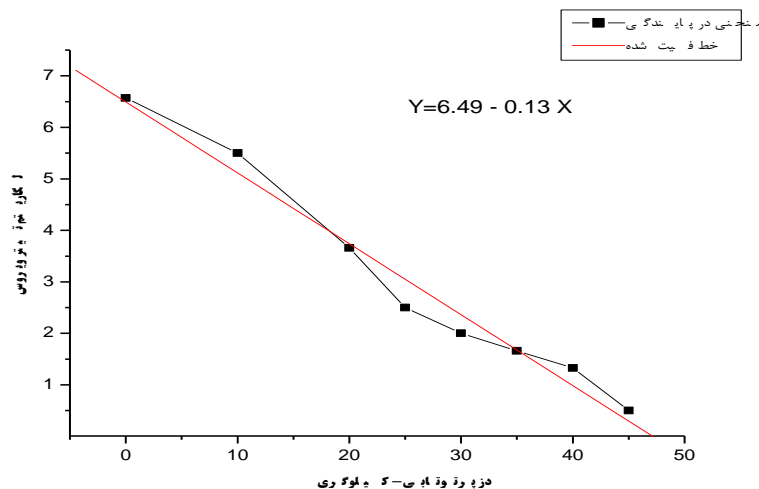
نتایج

تیترا ویروس تب برفکی تایپ آسیا-۱ پرتوتابی شده و

نشده به روش دوز عفونت زایی کشت بافتی ۵۰ درصد و با رابطه رید و مونچ^{۱۹} محاسبه شد (جدول ۱). با توجه به تیترا ویروس در دوزهای مختلف پرتوتابی، نمودار دوز/پایندگی با نرم افزار Origin 6.1 رسم و رابطه بهترین خط عبوری از منحنی یافت شد (شکل ۱). با معادله خط، فاکتور ارزش D₁₀ و دوز مطلوب غیرفعال سازی کامل ویروس به ترتیب ۷/۶۹ و ۵۰/۵۲ کیلوگری محاسبه شدند. در جدول ۲، نتایج بررسی نشانه های تخریب سلولی در چهار پاساژ متوالی از نمونه های پرتوتابی شده در دوزهای ۴۰، ۴۵ و ۵۰ کیلوگری مشاهده می شوند؛ با توجه به این نتایج، دوز مطلوب گاما برای غیرفعال سازی ویروس تب برفکی تایپ آسیا-۱ با تیترا ۱۰^{۶/۵} در میلی لیتر که در هر چهار پاساژ متوالی نشانه تخریب سلولی ایجاد نکند، ۵۰ کیلوگری تعیین شد.

جدول ۱- تیترا نمونه های ویروس پرتوتابی شده 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
تیترا ویروسی	۱۰ ^{۶/۵}	۱۰ ^{۵/۵}	۱۰ ^{۳/۶۶}	۱۰ ^{۳/۵}	۱۰ ^۲	۱۰ ^{۱/۶۶}	۱۰ ^{۱/۳۳}	۱۰ ^{۰/۵}	۱۰ ^{۰/۵}
دوز عفونت زایی کشت بافتی ۵۰ درصد/mL									



شکل ۱- منحنی دوز/پایندگی و رابطه بهترین خط عبوری از منحنی برای نمونه های ویروس تب برفکی تایپ آسیا-۱ پرتوتابی شده

جدول ۲- نتایج آزمون بی‌ضرری در نمونه‌های ویروسی

پرتوتابی شده تا چهار پاساژ متوالی

نمونه ویروس پرتوتابی شده	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	-	-	-	-

جدول ۳- نتایج آزمون ثبوت کمپلمان نمونه‌های پرتوتابی شده

با پرتو گاما

دوز پرتوتابی (کیلوگری)	رقت ویروس تب برفکی تایپ آسیا-۱ با تیتراژ ۱۰ ^۶ 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

اتصال اختصاصی بین آنتی‌سرم اختصاصی

ضد ویروس تب برفکی تایپ آسیا-۱ و نمونه‌های ویروسی پرتوتابی شده 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 قرار گرفته در پپتید VP1 کپسید ویروس تب برفکی، جایگاه اختصاصی اتصال آنتی‌بادی خنثی‌کننده به ویروس و گفتنی است که این لوپ در ویروس پرتوتابی شده در پژوهش حاضر بدون تغییر مانده است. نتایج آزمون ثبوت کمپلمان در جدول ۳ مشخص می‌کنند که ویژگی آنتی‌ژنیک ویروس پس از پرتوتابی تا دوز ۵۰ کیلوگری پرتوی گاما در دو رقت اولیه نسبت به نمونه پرتوتابی نشده بدون تغییر باقی می‌ماند و باعث القای پاسخ ایمنی مناسب در حیوان می‌شود.

پس از تزریق واکسن فرموله شده به خو کچه های هندی، تیتراژ آنتی‌بادی خنثی‌کننده، میزان تکثیر لنفوسیت‌های T طحال و میزان اینترفرون گاما و اینترفرون کین ۴ در هر سه گروه تعیین شد (جدول ۴). تیتراژ 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 واکسینه شده وجود نداشت ($P > 0.05$). افزایش غلظت اینترفرون گاما در هر دو گروه واکسینه شده نسبت به گروه شاهد معنادار و این افزایش در گروه رادیوواکسن نسبت به واکسن مرسوم معنادار ($P < 0.05$) بود. افزایش غلظت اینترفرون کین ۴ در هر دو گروه واکسینه شده نسبت به گروه شاهد معنادار نیست ($P > 0.05$).

جدول ۴- نتایج تیتراژ آنتی بادی خنثی کننده، میزان تکثیر لئوسیت های T طحال، میزان اینترفرون گاما و اینترلوکین ۴

گروه واکسن	تکثیر لئوسیت ها (SI)	میانگین SI ± انحراف معیار	غلظت IFN-γ (pg/ml)	میانگین غلظت IFN-γ ± انحراف معیار	غلظت IL4	میانگین غلظت IL4 ± انحراف معیار	تیتراژ آنتی بادی
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 <
راديو واکسن	۱/۳	۱/۵۶ ± ۰/۲۸۰	۵۰۱/۸۰	۳۹۵/۰۸ ± ۱۲۸/۶۵	۱۰۳۵/۴۱	۱۴۳۶/۷۳ ± ۶۴۱/۶۳	۲/۱ <
راديو واکسن	۱/۲۷		۲۵۲/۰۰		۲۱۷۶/۷۵		۲/۱ <
راديو واکسن	۰/۹۰		۳۲۳/۴۵		۱۰۹۸/۰۵		۲/۱ <

بحث و نتیجه گیری

استفاده شد. مزیت های استفاده از پرتوی گاما به جای مواد شیمیایی عبارتند از: باقیمانده های توکسیک و آلرژیک مواد شیمیایی استفاده شده برای غیرفعال سازی ویروس در محصول نهایی واکسن پرتوتابی شده وجود ندارند؛ به دلیل قدرت نفوذ بسیار زیاد پرتو گاما که تنها دیوار سربی مانع نفوذ آن می شود، امکان فرار ذره های ویروسی از تیمار با پرتو وجود ندارد و خطر ابتلا به بیماری پس از واکسیناسیون از بین می رود ولی در واکسن های غیرفعال به روش شیمیایی امکان فرار ذره های ویروسی زنده از تیمار با ماده شیمیایی وجود دارد؛ پرتو دهی در دمای کم انجام می شود و مدت زمان پرتو دهی مطابق استانداردهای موجود فقط چند دقیقه است و بنابراین امکان تغییر پروتئین های آنتی ژنتیک ویروس در روش پرتوتابی وجود ندارد و با کم شدن زمان پرتوتابی توان سیستم تولید واکسن در واحد زمان افزایش می یابد (۳، ۴، ۵ و ۲۱).

والی و کاری، پژوهشگران فرانسوی، در سال ۱۹۲۷ نخستین تلاش برای استفاده از واکسن حفاظتی تب برفکی را انجام دادند (۱۹). باهمنان در سال ۱۹۷۳ در مرکز FMD آمریکا از آزیردین ها مانند اتیلن ایمین برای واکسن تب برفکی استفاده کرد (۱۹). پرتو های یون ساز گاما و ایکس که برای غیرفعال سازی ریز موجودات استفاده می شوند، پرتو های الکترومغناطیسی با طول موج کوتاه و قدرت نفوذ زیاد هستند. مطالعات درباره باکتری ها و ویروس های دامی نشان داده اند که پرتوتابی، عفونت زایی ویروس ها را از بین می برد و آنتی ژنسیتی آنها بدون تغییر می ماند و تیمار های شیمیایی روی ویژگی های آنتی ژنتیک اثر می کنند مگر اینکه این مواد شیمیایی از محیط واکسن حذف یا خنثی شوند (۹، ۱۲، ۱۴ و ۲۰). در پژوهش حاضر، از عامل غیرفعال کننده پرتوی یون ساز گاما

و پرتوی گاما برای القای پاسخ ایمنی در آزمون چلنج بر ضد ویروس هترولوگ و همولوگ نشان دادند که فعالیت هماگلو تیناسیون در ویروس غیرفعال شده با پرتوی گاما و ویروس‌های غیرفعال شده با فرمالین و اشعه ماورای بنفش به ترتیب سه و ده برابر کاهش داشته است. از این رو پرتوتابی گاما در مقایسه با سایر روش‌های غیرفعال‌سازی، کمترین اثر تخریبی را روی ساختار پروتئینی ویروس دارد و ویروس غیرفعال شده با پرتوی گاما برخلاف ویروس غیرفعال شده با دو روش دیگر باعث القای ایمنی در ویروس‌های هتروساب تایپ می‌شود. همچنین، ویروس غیرفعال شده با پرتوی گاما برخلاف ویروس‌های غیرفعال شده با فرمالین و اشعه ماورای بنفش باعث القای پاسخ ایمنی سلولی از نوع تی سایتوتوکسیک^{۲۰} می‌شود. واکسن آنفولانزای غیرفعال شده با پرتوی گاما، ایمونوژنیستی غالبی در مقایسه با سایر روش‌های رایج غیرفعال‌سازی تجاری دارد و باعث اثر حفاظتی بیشتری در مقابله با عفونت‌های هموتایپ و هتروتایپ این ویروس می‌شود که به کاهش پاسخ التهابی ریه و میزان ویروس در ریه میزبان منجر می‌شود (۲۳). معتمدی و همکاران (۱۳۸۵)، ویروس تب برفکی (FMDV type A87/IRN) را با پرتوی گاما ساطع از چشمه کبالت ۶۰ غیرفعال کردند و پس از فرمولاسیون به‌عنوان رادیوواکسن برای ایجاد ایمنی همومرال در خوکچه هندی استفاده کردند (۹ و ۲۴).

با توجه به مزایایی که واکسن پرتوتابی شده نسبت به واکسن غیرفعال با مواد شیمیایی دارد و نیز شیوع سه سویه ویروس تب برفکی در ایران (A05، O Panasia و Asia 1)، آماده‌سازی و آزمون واکسن پرتوتابی برای هر کدام از سویه‌ها به‌طور جداگانه ضروری بود. در پروژه‌ای مشترک بین پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای و

لمباردو و اسمولکو (۱۹۹۰) از پرتوی گامای تابش شده از چشمه کبالت ۶۰ برای غیرفعال‌سازی ویروس تب برفکی و تهیه واکسن با کیفیت آنتی‌ژنیک خوب برای آن استفاده کردند (۱۲). اسمولکو و لمباردو (۲۰۰۵) پرتوتابی گاما را برای غیرفعال‌سازی نسبی یا کامل ویروس‌های تب برفکی، هرپس سیمپلکس ویروس و RLV استفاده کردند و نشان دادند که منحنی غیرفعال‌سازی به ویروس و سایر پارامترهای خارجی مانند دوز، نوع پرتو، دمای پرتوتابی و طبیعت مواد ویروسی طی فرایند پرتوتابی بستگی دارد. نتیجه درخور توجه پژوهش یادشده، کاربرد تئوری هدف برای غیرفعال‌سازی ویروس تب برفکی بود که به‌طور موفقیت‌آمیزی به آنتی‌ژن پرتوتابی شده غیرفعال این ویروس به‌صورت واکسن ضد بیماری تب برفکی منجر شد. همچنین، مقدار یک میلیون دوز این واکسن به‌طور تجاری تولید شد و گوساله‌ها را در برابر بیماری محافظت کرد (۱۴). شریف و مول باچر (۲۰۱۰) نشان دادند که ویروس آنفولانزا A غیرفعال شده با پرتوی گاما، نامزد واکسن پیشنهاد می‌شود و متوجه شدند که تجویز داخل بینی ویروس Flu A/RR/8 پرتوتابی گاما شده به‌شکل تک دوز باعث القای پاسخ ایمنی متقاطع در عفونت‌های هتروساب تایپی از جمله سویه آنفولانزای پرندگان H₅N₁ می‌شود. بنابراین، روش تهیه ویروس آنفولانزای پرتوتابی شده با پرتوی گاما، فناوری جدیدی برای تهیه واکسن آنفولانزا با اثر حفاظتی متقاطع شد (۲۲). فورویا و همکاران در دانشگاه ملی استرالیا (۲۰۱۰)، اثر روش‌های غیرفعال‌سازی بر پاسخ ایمنی متقاطع را بررسی کردند که ویروس‌های آنفولانزا A کشته شده القا می‌کنند. آنها با بررسی کارایی ویروس‌های غیرفعال شده با اشعه ماورای بنفش، فرمالین

- 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., Shafae 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., Shafae 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.
- مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، واکسن پرتوتابی شده برای تایپ O Panasia ویروس تب برفکی بررسی و نتایج رضایت‌بخشی یافت شد (۲۵). نتایج پژوهش حاضر مشخص کردند که رادیوواکسن تهیه شده برای تایپ آسیا-۱ ویروس تب برفکی باعث ایجاد پاسخ ایمنی هومورال حفاظتی (تولید آنتی‌بادی با تیتراژ 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 واکسینه شده 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 واکسینه شده نسبت به شاهد معنادار نبود، هیچ‌یک از دو نوع واکسن، لنفوسیت‌های T کمک‌کننده کلاس دو را تحریک نمی‌کنند. پیشنهاد می‌شود بررسی‌های ایمونولوژیکی کامل‌تر از جمله 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) Genozza W. Inactivation of viruses by ionizing radiation and by heat In:

- (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) Suttmoller 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- TCID₅₀

⁴- MDS Nordion

⁵- Fricke

⁶- D₁₀ Value

⁷- BHK₂₁

⁸- 10^{8.5} TCID₅₀/ml

⁹- Al (OH)₃

¹⁰- Cell Proliferation Kit 1 (MTT)- Roche

¹¹- CPE

¹²- IFN-γ

¹³- T-helper₁

¹⁴- IL4

¹⁵- T-helper₂

¹⁶- eBioscience

¹⁷- Anova One-way (LSD method)

¹⁸- SPSS16

¹⁹- Reed and Mouch

²⁰- T Cytotoxic Cells