JVM Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره چهاردهم، شماره اول، ۱۳۹۷، پیاپی ۳۶: ۲۶-۱۵

خصوصیات پاسخ‌های ایمنی القاء شده ناشی از واکسن زنده تخفیف حدت یافته آبله بزی سویه گرگان بر علیه بیماری لمپی اسکین در گاو

رضا نوریان [۱]، ناهیده افضل آهنگران [۲*]، حمید رضا ورشوی [۳]، عباس آزادمهر [۴]

۱- دانشجوی دکتری تخصصی ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۲- استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۳- استادیار دپارتمان واکسن‌های ویروسی دام، موسسه تحقیقاتی واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۴- دانشیار گروه ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۴/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۶/۸/۱۰

چکیده

ویروس‌های بیماری لمپی اسکین، آبله بزی وآبله گوسفندی از اعضاء جنس کاپری‌پاکس ویروس و از خانواده پاکس ویریده هستند. این ویروس‌ها قرابت ژنتیکی بسیار زیادی دارند. بنابراین استفاده از واکسن‌های حاوی سوش‌های کاپری‌پاکس ویروس مشتق شده از بز و گوسفند برای کنترل بیماری لمپی اسکین می‌تواند مفید باشد. هدف از این مطالعه ارزیابی خصوصیات پاسخ‌های ایمنی القاء شده ناشی از واکسن آبله بزی بر علیه بیماری لمپی اسکین در گاو می‌باشد. گوساله‌ها از زمان تزریق واکسن تا ۵ هفته بعد از آن از نظر ظهور تب و علایم بالینی بطور روزانه مورد معاینه قرار گرفتند. پاسخ‌های ایمنی هومورال توسط تست خنثی‌سازی سرم و پاسخ‌های ایمنی سلولی توسط تست‌های MTT، Real-time PCR و ELISA مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که در گوساله‌های واکسینه شده، تب و تورم موضعی در محل تزریق در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد. در ارزیابی پاسخ ایمنی هومورال افزایش معنی‌داری در میزان تیتر آنتی‌بادی اختصاصی در گروه واکسینه در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد، بطوریکه این میزان در روز ۳۵ بعد از واکسیناسیون دارای اختلاف معنی‌داری نسبت به سایر روزها بود ($P<۰/۰۵$). در ارزیابی پاسخ ایمنی سلولی، افزایش معنی‌داری در بیان ژن IFN-γ در روز ۷ و ژن IL-4 در روز ۲۱ بعد از واکسیناسیون در مقایسه با روز صفر و گروه کنترل مشاهده شد ($P<۰/۰۵$) و این در حالی بود که بیشترین میزان تولید سایتوکاین در مایع‌رویی کشت سلول برای IFN-γ و IL-4 در روز ۲۱ بعد از واکسیناسیون مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). همچنین شاخص تکثیر لنفوسیتی در گوساله‌های واکسینه، در روزهای ۷، ۲۱ و ۳۵ در مقایسه با روز صفر و گروه کنترل افزایش معنی‌داری را نشان داد ($P<۰/۰۵$). بر اساس نتایج این مطالعه واکسن آبله بزی سوش گرگان با القاء پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی قادر به تولید مقادیر مناسبی از آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده و همچنین با افزایش قدرت تکثیر لنفوسیتی و بیان و تولید سایتوکاین‌ها از ایمنی‌زایی مناسبی جهت استفاده در واکسیناسیون در برابر LSD برخوردار است.

کلمات کلیدی: واکسن آبله بزی، ایمنی سلولی، ایمنی هومورال، Real-time PCR، ELISA، MTT

* نویسنده مسئول: ناهیده افضل آهنگران

آدرس: گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. تلفن: ۰۴۴-۳۱۹۴۶۵۲

پست الکترونیک n. afzalahangaran@urmia. ac. ir

مقدمه

بیماری لمپی اسکین ((Lumpy Skin Disease (LSD نوعی بیماری حاد تا مزمن، بسیار عفونی و بیماری عمومی پوستی در گاوها می‌باشد که از نقطه نظر سازمان جهانی بهداشت دام (OIE) در لیست A بیماری‌های اخطار کردنی قرار دارد. ویروس‌های عامل بیماری لمپی اسکین، آبله گوسفندی و آبله بزی متعلق به جنس کاپری‌پاکس ویروس از خانواده پاکس ویریده می‌باشند(۱۶). تمامی سویه‌های کاپری‌پاکس ویروس با منشاء گاوی، گوسفندی و بزی در یک سایت عمده نوترالیزاسیون مشترک هستند. بنابراین دامهائی که از عفونت با یک سویه بهبود می‌یابند و یا با یک سویه واکسینه می‌شوند احتمالا در مقابل عفونت سایر سویه‌ها نسبتاً مقاومند (۱۶). برهمین اساس، در بسیاری از کشورها، از واکسن‌های حاوی سویه‌های کاپری‌پاکس ویروس با منشاء گوسفندی و بزی برعلیه بیماری لمپی اسکین در همه‌گیری‌ها استفاده گردیده است (۲۰ و ۱۱). این واکسن‌ها عمدتاً زنده تخفیف حدت یافته بوده و شامل واکسن ویروس LSD سویه Neethling، واکسن آبله بزی و گوسفندی سویه کنیایی، واکسن آبله گوسفندی سویه یوگسلاوی، واکسن آبله گوسفندی سویه رومانی می‌باشند. این بیماری برای اولین بار در سال ۲۰۱۴ از مرزهای غربی و شمال غربی کشور وارد ایران شد و باعث خسارات جبران ناپذیری به صنعت دامپروری کشور گردید. بدین ترتیب واکسیناسیون اضطراری جمعیت دامی کشور با واکسن‌های آبله بزی و گوسفندی جهت کنترل بیماری LSD در دستور کار سازمان دامپزشکی کشور قرار گرفت. از آنجائیکه واکسیناسیون، بعنوان مناسب‌ترین و سریعترین راه برای کنترل و پیشگیری از بیماری در نظر گرفته شده است ولی در بسیاری از مطالعات نشان داده شده است که استفاده از واکسن‌های نامناسب که سطح ایمنی محافظت کننده‌ای را در بدن گاو ایجاد نمی‌نمایند باعث شکست واکسیناسیون و گسترش بیماری در زمان شیوع شده‌اند. بدین منظور از آنجائیکه این بیماری به تازه‌گی وارد کشور شده است و احتمال شیوع مجدد آن نیز می‌رود، با برنامه ریزی با بخش آبله موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی، ارزیابی پاسخ‌های ایمنی القاء شده ناشی از واکسن آبله بزی سویه گرگان در گاو بصورت تجربی به مرحله اجرا در آمد.

مواد و روش کار

جمعیت مورد مطالعه

از یک واحد گاوداری شیری و پس از معاینات بالینی توسط کلینیسین‌های با تجربه و اطمینان از سلامتی گوساله‌ها، تعداد ۱۵ رأس از گوساله‌های نژاد هلشتاین نر با سن تقریبی ۴-۶ ماهه بصورت تصادفی انتخاب گردیدند. کلیه گوساله‌ها در طول مدت آزمایش در شرایط یکسان نگهداری شده و بصورت روزانه از نظر عوارض جانبی واکسن، مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نوع واکسن

در این مطالعه از واکسن زنده تخفیف حدت یافته آبله بزی سویه گرگان ساخت موسسه تحقیقاتی واکسن و سرم رازی استفاده گردید. این واکسن لیوفیلیزه بوده و هر دز آن شامل $10^{3.2}$ $TCID_{50}/ml$ ویروس می‌باشد. طبق دستورالعمل شرکت سازنده دز ۱۰ برابر واکسن برای اجرای برنامه واکسیناسیون درگاو تهیه گردید.

برنامه واکسیناسیون

به ۱۲ رأس گوساله بعنوان گروه تیمار واکسن آبله بزی و به ۳ رأس گوساله بعنوان گروه کنترل، سرم فیزیولوژی تزریق گردید. به هر گوساله مقدار ۵ میلی لیتر از دز ۱۰ برابر واکسن از طریق زیر جلدی در ناحیه گردن تزریق گردید. کلیه گوساله‌ها از زمان تزریق

واکسن تا ۵ هفته بعد از واکسیناسیون، بصورت روزانه از نظر ظهور تب، عوارض جانبی شامل ترشحات مخاطی (چشمی و آبریزش از بینی)، تورم غددلنفاوی موضعی و تورم موضعی محل تزریق مورد معاینه قرار گرفته و کلیه مشاهدات ثبت و ضبط گردید.

آماده‌سازی ویروس

ویروس آبله بزی سویه بومی گرگان از بخش آبله موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی تهیه و کلیه مراحل کشت، خالص‌سازی، غیر فعال‌سازی و تیتر ویروس بر اساس دستورالعمل‌های استاندارد موجود انجام گرفت (۲۱ و ۱۶، ۱۸). تیتر ویروس بر مبنای log 10 $TCID_{50}$/ml بر اساس روش Reed & munch محاسبه گردید (۱۷).

ارزیابی پاسخ آنتی‌بادی اختصاصی

تست خنثی‌سازی سرم همواره بعنوان یک تست اختصاصی و استاندارد جهت تعیین میزان آنتی‌بادی اختصاصی بر علیه کاپری‌پاکس ویروس‌ها ثابت شده است (۱۱). در این مطالعه در روزهای صفر (قبل از واکسیناسیون)، ۷، ۲۱ و ۳۵ بعد از واکسیناسیون سرم‌های خون کلیه گوساله‌ها جمع آوری و میزان خنثی‌کنندگی سرم بر اساس دستورالعمل‌های بخش آبله موسسه رازی مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۶ و ۱۵).

جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی

از کلیه گوساله‌های گروه تیمار و کنترل در روزهای صفر، ۷، ۲۱ و ۳۵ بعد از واکسیناسیون از محل ورید وداجی خونگیری بعمل آمد. سلول‌های (Peripheral Blood Mononuclear Cells) PBMCs ظرف مدت حداکثر ۴ ساعت پس از خونگیری توسط محلول فایکول و بر اساس شیب گرادیانت غلظتی از خون تام جدا گردیدند (۱۴ و ۶). تعداد و درصد زنده بودن سلول‌ها بوسیله رنگ آمیزی با رنگ تریپان بلو محاسبه (درصد زنده بودن بیش از ۹۵٪) و تعداد سلول‌ها بر مبنای 2×10^{6} cell/ml تنظیم گردید. از این سلول‌ها برای تست‌های تکثیر لنفوسیتی و سنجش سایتوکاین‌ها به روش الایزا و Real-time PCR استفاده گردید.

استخراج و جداسازی mRNA و ساخت cDNA

بمنظور استخراج mRNA از سلول‌های PBMCs از کیت اختصاصی Oligotex Direct mRNA mini kit (Qiagen) استفاده گردید. بدین منظور پس از جداسازی سلول‌های PBMCs از گوساله‌های واکسینه، بر اساس دستور العمل شرکت سازنده کیت استخراج، mRNAها از سلول‌ها جدا گردیدند. در مرحله بعدی جهت ساخت رشته اولیه cDNA از آغاز گر شش نوکلئوتیدی تصادفی و از کیت Super Script III First-strand cDNA synthesis kit (Fermentas, USA) استفاده گردید. کلیه مراحل انجام آزمون و برنامه سیکل حرارتی جهت ساخت cDNA بر اساس دستورالعمل کیت شرکت سازنده و با استفاده از ترموسایکلر ABI مدل (Applied Biosystems, veriti CA, USA) انجام پذیرفت.

ارزیابی بیان سایتوکاین‌ها به روش Real-time PCR

برای اندازه گیری سطح بیان IL-4 و IFN-γ از روش Real-time PCR با استفاده از دستگاه Light Cycler 96 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) و کیت SYBR Green I (Roche Diagnostics, Germany) استفاده گردید. مخلوط واکنش در حجم نهایی ۲۰µl و در light cycler 8-tube strips clear تهیه گردید. طراحی پرایمرها بر اساس اطلاعات ژن‌های IL-4 و IFN-γ) گاوی در بانک اطلاعات ژنی NCBI و توسط شرکت Bioneer (Bioneer Corporation, Republic of Korea) ساخته شد. توالی پرایمرها مورد استفاده در جدول-۱ گزارش شده است. ضمن اینکه از GAPDH به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده گردید.

برنامه سیکل دمایی مورد استفاده در Real-time PCR شامل مراحل پیش‌دمایی در ۵۰°C بمدت ۵ دقیقه و ۹۵°C بمدت ۱۰ دقیقه و به دنبال آن ۴۰ سیکل که به ترتیب شامل مرحله دناتوره شدن در ۹۵°C به مدت ۱۵ ثانیه، مرحله اتصال در ۵۶°C بمدت ۲۰ ثانیه و مرحله گسترش در ۷۲°C بمدت ۳۰ ثانیه بود (۲۲ و ۵) میزان بیان ژن‌های مورد نظر با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ اندازه گیری شد.

ارزیابی تکثیر لنفوسیتی به روش MTT

تست‌های تکثیر لنفوسیتی همواره بعنوان یک تست کلیدی برای ارزیابی میزان توان سلولی پاسخ‌های ایمنی مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این مطالعه از تست MTT (Cell Proliferation Kit, Roche, Germany) جهت اندازه گیری میزان تکثیر لنفوسیتی استفاده گردید. بطور خلاصه، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از PBMCs شمارش شده با غلظت 2×10^5 cell/well به درون گودهای میکروپلیت کشت سلول ریخته و سپس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از ویروس غیر غعال شده با احتساب MOI=۰/۱ بر اساس اپتیمم ظرفیت تحریک ویروس (داده‌ها نشان داده نشده است) بر روی سلول‌ها اضافه گردید. سلول‌های تحریک شده در دمای ۳۷ °C و اتمسفر حاوی ۵٪Co2 بمدت ۹۶ ساعت انکوبه شدند (۱۸ و ۱۴). بعد از زمان انکوباسیون، جهت جداسازی مایع رویی از سلول‌ها، میکروپلیت‌ها سانتریفیوژ گردیده و مایع رویی کشت سلول جهت بررسی میزان غلظت سایتوکاین‌ها برداشته و تا زمان انجام آزمایش در دمای ۸۰°C- در فریزر نگهداری شد. بر روی سلول‌های موجود در کف پلیت، بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده کیت، تست تکثیر لنفوسیتی انجام پذیرفت. میزان رنگ نمونه‌ها با دستگاه الایزا ریدر (Bio-Tek ELx808) با طول موج ۵۵۰ نانومتر و طول موج رفرانس ۶۹۰ نانومتر قرائت گردید. جذب نمونه‌ها بر اساس فرمول شاخص تحریک محاسبه و گزارش گردید (۶).

ارزیابی غلظت سایتوکاین‌ها به روش ELISA

امروزه در بسیاری از پژوهش‌ها از تجزیه و تحلیل عملکرد لنفوسیت‌های تولید شده ناشی از تحریک مجدد سلول‌های PBMCs با سویه کشته شده ویروس و بررسی نوع و میزان سایتوکاین‌های تولید شده، به عنوان الگویی برای تشریح مکانیسم اصلی تحریک سیستم ایمنی توسط واکسن، استفاده می‌شود. بدین منظور در این مطالعه پس از تحریک مجدد سلول‌های PBMCs، به بررسی سایتوکاین‌های IL-4 و IFN-γ که نقش کلیدی در پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی بعهده دارند پرداخته شد. مایع‌رویی کشت سلولی در زمان‌های متوالی بعد از واکسیناسیون جمع آوری و برای تعیین میزان غلظت سایتوکاین‌ها از کیت‌های الایزای IL-4 و IFN-γ (USCN Life Science Inc. USA)) بر مبنای تکنیک الایزای ساندویچ، استفاده گردید. در این روش کلیه مراحل آماده‌سازی نمونه، تهیه محلول‌ها، تهیه غلظت‌های مختلف کنترل‌های مثبت و انجام آزمون بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده کیت انجام و در پایان جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه الایزا ریدر و در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت گردید. جهت تحلیل داده‌ها و رسم منحنی کالیبراسیون از نرم افزار Ridawin (r-biopharm, Germany) استفاده گردید. کمترین حد تشخیص برای کیت IFN-γ، ۱۲/۸ pg/ml و برای IL-4، ۶/۲ pg/ml بود.

تحلیل آماری

داده‌ها در نمودارها بر اساس میانگین ± انحراف معیار نمایش داده شده است. برای مقایسه بین گروه‌ها از آزمون‌های آماری واریانس one-way ANOVA استفاده و اختلاف بیش از ۹۵٪ دامنه اطمینان با مقدار

P<۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد. برای آنالیز داده‌ها از نرم افزار SPSS ویراست ۱۸ استفاده شد.

نتایج

بررسی عوارض جانبی واکسن

دمای بدن کلیه گوساله‌ها در طول مدت مطالعه توسط ترمومتر از ناحیه رکتوم بصورت روزانه مورد ارزیابی قرار گرفت و دمای بالاتر از ۴۰°C بعنوان دمای تب در نظر گرفته شد. با توجه به نتایج نشان داده شده در نمودار -۱ افزایش دمای بدن گوساله‌ها از ۲۴ ساعت اول بعد از واکسیناسیون آغاز و در مدت روز ۳ به بالاترین میزان خود رسید و در روزهای بعد بتدریج کاهش یافت بطوریکه از روز هفتم به بعد به حد طبیعی خود (۳۹/۵- ۳۸/۵) رسیده بود. قطر تورم موضعی در محل تلقیح در پاسخ به آنتی ژن‌های واکسن، در گوساله‌های واکسینه شده در مقایسه با گروه کنترل دارای افزایش معنی‌داری بود.

بررسی تیتر سرمی آنتی‌بادی اختصاصی تولید شده ناشی از واکسیناسیون

بعد از واکسیناسیون بدلیل تلقیح ویروس به بدن دام، تیتر سرمی آنتی‌بادی بتدریج شروع به افزایش نمود. بطوریکه اولین تیتر آنتی‌بادی در روز ۷ شناسایی و در روز ۳۵ به اپتیمم مقدار خود رسید. نتایج نشان داد که تیتر سرمی آنتی‌بادی در روزهای ۷، ۲۱ و ۳۵ بعد از واکسیناسیون در مقایسه با روز صفر و گروه کنترل بتدریج دارای افزایش معنی‌داری بوده است (P<۰/۰۵)(نمودار-۲).

سنجش بیان سایتوکاین‌های (IL-4,IFN-)در شرایط in vivo

پس از واکسیناسیون گوساله‌ها و بمنظور ارزیابی بیان ژن‌های سایتوکاینی در شرایط in vivo، از کلیه گوساله‌ها در زمان‌های مورد مطالعه بعد از واکسیناسیون خونگیری بعمل آمد. سلول‌های PBMCs از خون تام جدا و بیان ژن‌های (IL-4, IFN-توسط Real-time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. باوجودیکه میزان بیان سایتوکاین‌ها در خون تام نسبتاً پایین بود ولی این میزان بعد از واکسیناسیون نسبت به گروه کنترل و روز صفر دارای افزایش بود. بیان (IFN-از ساعات اولیه بعد از تلقیح شروع و در روز ۷ بعد از واکسیناسیون دارای بالاترین میزان بوده و پس از آن تا پایان مطالعه بتدریج کاهش یافته است و این اختلاف افزایش، بین روز ۷ و روزهای صفر و ۲۱، ۳۵ از نظر آماری نیز معنی‌دار می‌باشد (P<۰/۰۵). در مقابل، در خصوص IL-4، میزان بیان ژن از روز ۷ بعد از واکسیناسیون دارای یک افزایش تدریجی بوده و در روز ۲۱ و ۳۵ به بالاترین میزان بیان خود رسیده است و این اختلاف بین روز ۲۱ و روزهای صفر و ۷ از نظر آماری معنی‌دار می‌باشد (P<۰/۰۵)(نمودار-۳).

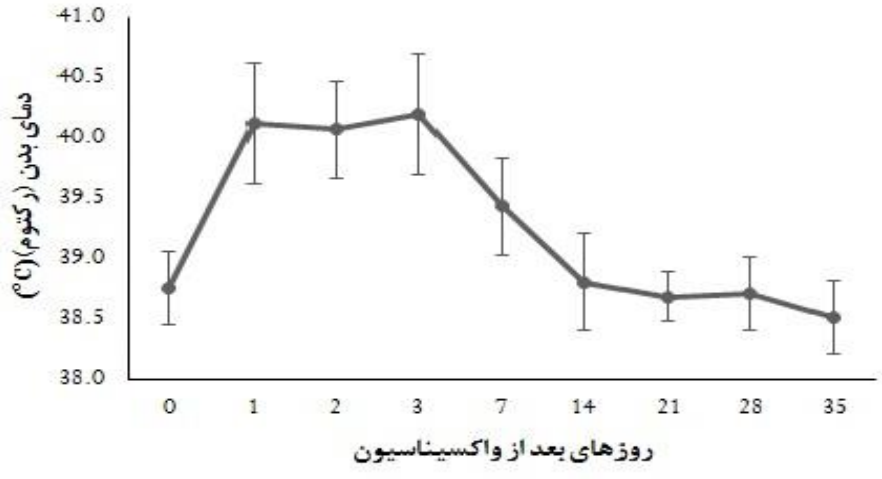
ارزیابی ایمنی با واسطه سلولی در شرایط in vitro سنجش تکثیر لنفوسیتی

بررسی پاسخ‌های ایمنی که متعاقب تحریک مجدد لنفوسیت‌ها با ویروس و در شرایط آزمایشگاهی صورت می‌پذیرد، برای پی بردن به میزان تکثیر اختصاصی لنفوسیت‌ها در شرایط in vivo و در پاسخ به آنتی ژن‌های واکسن، ضروری است (۱۰ و ۲) و همچنین از این طریق می‌توان به فنوتیپ تکثیر سلولی و نوع پاسخ ایمنی بدن در مواجهه با ویروس نیز پی برد (۱۸ و ۹). در این مطالعه، سلول‌های PBMCs گوساله‌های واکسینه شده از خون تام جدا و در شرایط آزمایشگاهی مجدداً با ویروس کشته شده آبله بزی مجاورت داده شد. نتایج نشان داد که شاخص تحریک (Stimulation Index (SI)) لنفوسیت‌ها در پاسخ به

ویروس، در هر یک از گوساله‌ها و در هفته‌های متوالی بسیار متغیر می‌باشد، و این در حالی بود که PBMCs گوساله‌های واکسینه در مقایسه با گروه کنترل دارای شاخص تکثیر بالاتری بودند. SI گوساله‌های واکسینه از روز ۷ بعد از واکسیناسیون شروع به افزایش نموده و در روز ۲۱ به اپتیمم مقدار خود رسیده است و پس از آن بتدریج کاهش یافته است. بطوریکه این میزان افزایش در روزهای ۷، ۲۱ و ۳۵ بعد از واکسیناسیون، در مقایسه با روز صفر و گروه کنترل دارای اختلاف معنی‌داری نیز می‌باشد (P<۰/۰۵) (نمودار-۴). همچنین در مقایسه نتایج بین روزهای متوالی مشخص شد که میانگین SI در روز ۲۱ نسبت به روز صفر و ۳۵ دارای افزایش معنی‌داری می‌باشد (P<۰/۰۵) ولی نسبت به روز ۷ باوجودیکه دارای افزایش بود ولی از نظر آماری معنی‌دار نبود.

سنجش غلظت سایتوکاین‌های IL-4 و IFN-γدر مایع رویی کشت سلول‌های PBMCs

مایع‌رویی کشت سلول‌های PBMCs تحریک شده با ویروس کشته شده آبله بزی، بمنظور وجود و میزان غلظت سایتوکاین‌های IL-4 و IFN-γبوسیله کیت‌های الایزا، مورد سنجش قرار گرفت. میزان این سایتوکاین‌ها در هر یک از گوساله‌ها و در روزهای متوالی مقادیر متفاوتی را از خود نشان داد و این میزان در گروه تیمار در مقایسه با روز صفر و گروه کنترل دارای افزایش معنی‌داری بود. میانگین غلظت سایتوکاین‌های IL-4 و IFN-)دارای دامنه بسیار متفاوتی می‌باشد، بطوریکه سطح تولید IFN-)و IL-4 از روز ۷ بعد از واکسیناسیون شروع به افزایش نموده و پس از رسیدن به حداکثر میزان خود در روز ۲۱، در روزهای بعدی با شیب ملایم کاهش پیدا کرده است. درخصوص IFN-)این افزایش دارای یک اختلاف معنی‌داری بین روز صفر و روزهای ۷، ۲۱ و ۳۵ بعد ازواکسیناسیون می‌باشد(P<۰/۰۵). در حالیکه در خصوص IL-4 این اختلاف فقط بین روز صفر و روز ۲۱ معنی‌دار می‌باشد (P<۰/۰۰۱)، و برای سایر روزها (۷ و ۳۵) با وجودیکه نسبت به روز صفر دارای سطح بالاتری می‌باشند ولی این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نبود (نمودار-۶).

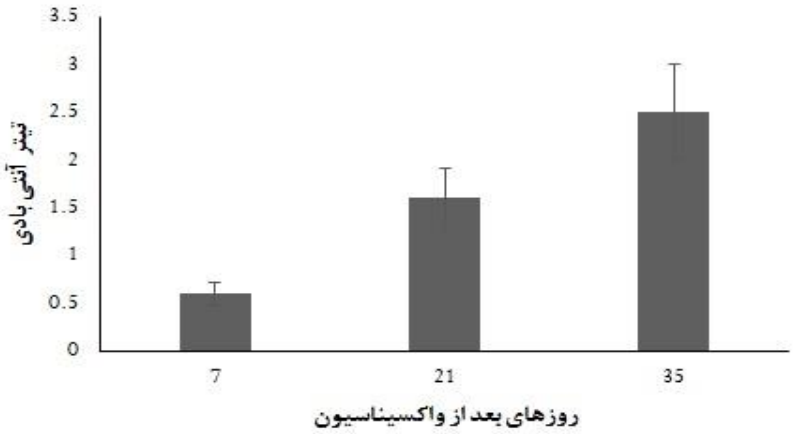


نمودار شماره-۱: دمای بدن (از ناحیه رکتوم) گوساله‌های واکسینه شده با ویروس زنده تخفیف حدت یافته آبله بزی سویه گرگان در روزهای بعد از واکسیناسیون

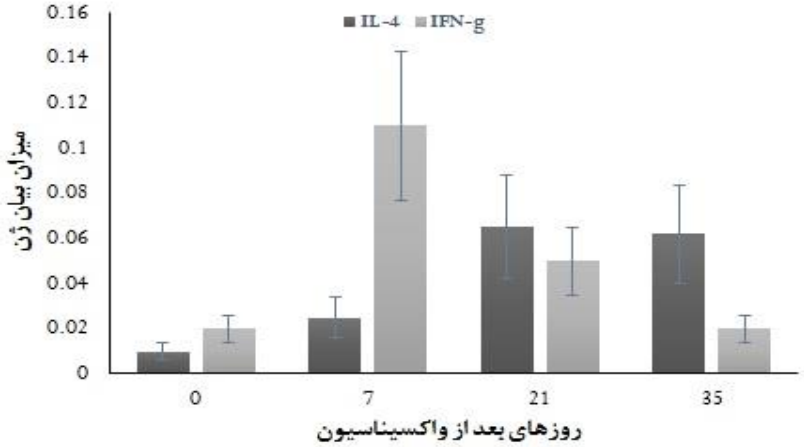
جدول شماره-۱: توالی پرایمرهای IL-4 و))-IFNگاوی و ژن کنترل

شماره در بانک ژن	سکانس پرایمر	ژن
M77120	AGC TGA TCC CAG TGC TGG TC-3' Forward: 5'-ACC Reverse: 5'-TGC TAC AGG CAG CTC CAT GCA-3'	IL-4

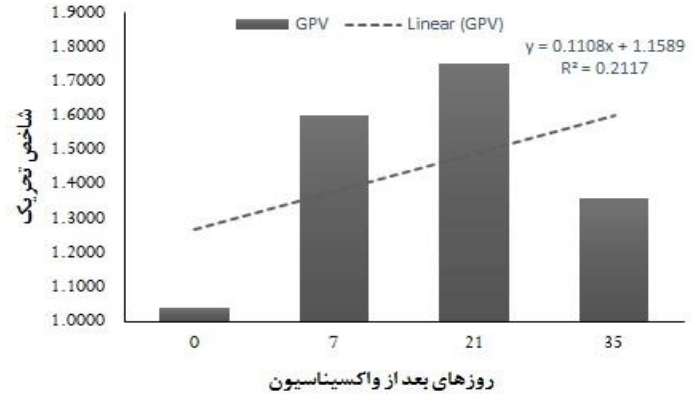
IFN-γ	Forward:5'-CTC CGG CCT AAC TCT CTC CT-3' Reverse: 5'-AGG CCC ACC CTT AGC TAC AT-3'	M29867
GAPDH	Forward:5'-GGC GTG AAC CAC GAG AAG TAT AA-3' Reverse: 5'-CCC TCC ACG ATG CCA AAG T-3'	U22385



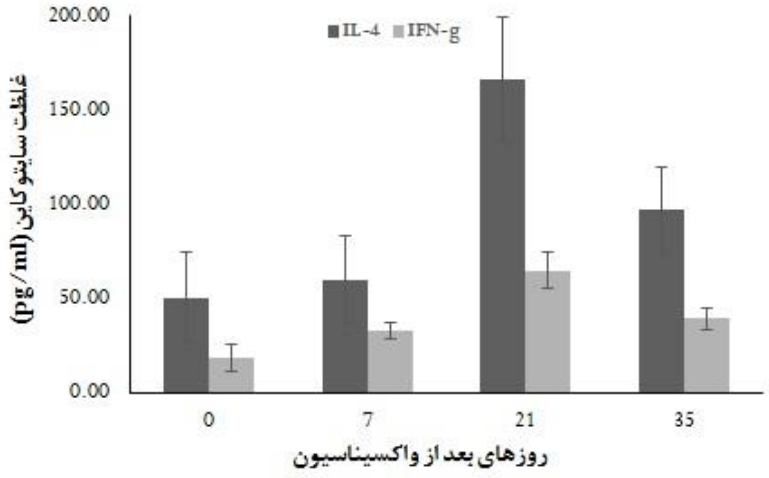
نمودار شماره-۲: تیتر آنتی‌بادی گوساله‌های واکسینه شده با ویروس زنده تخفیف حدت یافته آبله بزی سویه گرگان در روزهای بعد از واکسیناسیون



نمودار شماره-۳: میزان بیان mRNA سایتوکاین‌های))-IFNو IL-4 در سلول‌های PBMCs گوساله‌های واکسینه شده با ویروس زنده تخفیف حدت یافته آبله بزی سویه گرگان در روزهای بعد از واکسیناسیون در شرایط in vivo



نمودار شماره-۴: شاخص تحریک سلول‌های PBMCs گوساله‌های واکسینه شده، در پاسخ به ویروس کشته شده آبله بزی سویه گرگان در روزهای بعد از واکسیناسیون



نمودار شماره-۵: میزان تولید سایتوکاین‌های (IFN-)و IL-4 در مایع رویی کشت سلول‌های PBMCs گوساله‌های واکسینه شده در پاسخ به ویروس کشته شده آبله بزی سویه گرگان در روزهای بعد از واکسیناسیون در شرایط in vitro

بحث

امروزه واکسیناسیون بعنوان کاربردی‌ترین و موثرترین ابزار برای کنترل و پیشگیری از بیماری‌های ویروسی دامی بویژه بیماری لمپی اسکین در نظر گرفته شده است. اما از آنجائیکه در ارتباط با دینامیک سیستم ایمنی، نحوه پاسخ سایتوکاینی و چگونگی عملکرد اینگونه واکسن‌ها در ایجاد یک ایمنی محافظت کننده در مقابل LSD اطلاعات کاملی در دسترس نیست، لذا هدف از این مطالعه، بررسی پاسخ‌های ایمنی القاء شده ناشی از واکسن آبله بزی که طیف وسیعی از جمعیت دامی کشور بوسیله آن در مقابل LSD واکسینه شده‌اند، پرداخته شد. بدینمظور ایمونوژنیسیته، عوارض جانبی، تیتر آنتی‌بادی اختصاصی، تکثیر لنفوسیتی و میزان بیان و تولید سایتوکاین‌های (IFN-)و IL-4 در پاسخ به آنتی ژن‌های واکسن مورد بررسی قرار گرفت.

در گوساله‌های واکسینه شده واکنش‌های موضعی خفیفی به شکل قرمزی و تورم خفیف در محل تزریق و در تعدادی از آن‌ها علایم بالینی نظیر آبریزش از بینی مشاهده شد (۱۵ و ۳، ۷). در اکثریت گوساله‌ها تورم موضعی ناشی از پاسخ ایمنی سلولی بعد از واکسیناسیون نیز مشاهده شد که خود دلیل بر ایمونوژنیسیته بالای ویروس می‌باشد. در مواردی که واکنش موضعی در محل تزریق واکسن مشاهده نشود دلالت بر تضعیف بیش از حد ویروس در طی مراحل آماده‌سازی واکسن می‌باشد بنابراین چنین ویروسی نه تنها قادر به تحریک پاسخ ایمنی سلولی و هومورال نخواهد بود بلکه در نهایت منجر به شکست واکسیناسیون نیز خواهد شد (۱۱). با وجودیکه تولید آنتی‌بادی بعنوان یکی از مهمترین فاکتورها در پاسخ‌های ایمنی محافظت کننده در برابر بیماریهای ناشی از کاپری‌پاکس ویروس‌ها مطرح می‌باشد، در مقابل پاسخ‌های ایمنی سلولی و تولید سایتوکاین‌ها نیز در ایمنی محافظت کننده نقش بسزایی دارند (۱۹ و ۱۲). بدینمنظور میزان تولید آنتی‌بادی‌های اختصاصی القاء شده ناشی از آنتی ژن‌های واکسن به کمک تست خنثی‌سازی سرم اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که سیستم ایمنی گوساله‌های گروه تیمار به واکسن پاسخ داده و این میزان از روز ۷ بعد از واکسیناسیون آغاز شده و تا روز ۳۵ نیز ادامه داشته است. این یافته‌ها با نتایج بدست آمده از سایر مطالعات که در آن‌ها عنوان شده است در گاوهای واکسینه با واکسن‌های کاپری‌پاکس ویروس تولید آنتی‌بادی از روزهای اولیه بعد از واکسیناسیون

آغاز خواهد شد مطابقت دارد (۱۳ و ۱). این نتایج دلالت بر ایمنی زایی واکسن و کارایی استفاده از آن در برابر بیماری می‌باشد. جهت ارزیابی پاسخ‌های ایمنی وابسته سلول، ابتداء میزان تکثیر لنفوسیتی که عمدتاً مربوط به نقش سلول‌های T-helper در پاسخ به آنتی ژن‌های واکسن می‌باشد مورد بررسی قرار گرفت (۴). میزان تکثیر سلول‌های PBMCs گوساله‌های واکسینه شده که در شرایط in vivo با سوش واکسن تحریک شده بودند در شرایط in vitro مجدداً با همان سوش واکسن تحریک گردیدند تا با بررسی میزان تکثیر و نوع سایتوکاین‌های تولیدی، بتوان تا حدودی به نحوه پاسخ سلولی بدن در مقابل ویروس پی‌برد. شاخص تحریک لنفوسیتی در گوساله‌های واکسینه شده، از روزهای اولیه بعد از واکسیناسیون آغاز و در هفته سوم به حداکثر میزان خود رسید، که نشان از اوج تحریک سلولی و شکل‌گیری نوع پاسخ ایمنی در هفته سوم بعد از واکسیناسیون خواهد داشت (۱۳ و ۸). از آنجائیکه سایتوکاین‌ها عموماً بصورت موضعی و در مقادیر بسیار جزئی تولید می‌شوند بنابراین شناسایی میزان ترشح و غلظت آنها بصورت سیستمیک در بدن بسیار مشکل می‌باشد از اینرو ابتداء میزان بیان ژن‌های سایتوکاینی ناشی از تحریک لنفوسیت‌ها، بصورت سیستمیک (in vivo) مورد بررسی قرار گرفت و سپس با تحریک آزمایشگاهی لنفوسیت‌ها با همان سوش واکسن (in vitro)، اینبار میزان تولید سایتوکاین‌ها مورد سنجش قرار گرفت، تا با تحلیل این نتایج بتوان به نمایی کلی از میزان بیان ژن‌های سایتوکاینی و همچنین میزان تولید آنها در پاسخ به واکسن دست یافت. چراکه در بسیاری از مطالعات ثابت شده است که میزان بیان ژن‌های سایتوکاینی همیشه با میزان تولید و ترشح آن‌ها ارتباط مستقیم نداشته و رونوشت ژن ممکن است تحت تأثیر عوامل مختلف درون سلولی به مرحله تولید نرسیده و سرکوب شود. لذا بررسی ارتباط بین میزان بیان و میزان تولید سایتوکاین‌ها از نظر علمی بسیار با اهمیت می‌باشد. لذا در این تحقیق بعد از واکسیناسیون میزان بیان سایتوکاین‌های IFN-γ و IL-4 ارزیابی شد. نتایج نشان داد بیان IFN-γ در روز ۷ بعد از واکسیناسیون دارای بالاترین میزان بوده و پس از آن تا پایان مطالعه بتدریج کاهش یافته است که خود نشان دهنده شروع تحریکات سلولی در روزهای اولیه بعد از واکسیناسیون و بیان سایتوکاین‌های التهابی بویژه IFN-γ می‌باشد. این نتایج با نتایج مشاهده شده در روزهای اولیه بعد از تلقیح ویروس و شروع علایم بالینی نظیر تب، التهاب و تورم در ناحیه تزریق مطابقت دارد. در مقابل، در خصوص IL-4، میزان بیان ژن در روز ۷ بعد از واکسیناسیون بسیار کم بوده ولی در روز ۲۱ و ۳۵ به بالاترین میزان بیان خود رسیده است. این نتایج نیز با نتایج تولید آنتی‌بادی که در روز ۳۵ دارای بالاترین میزان تولید بوده نیز ارتباط معنی‌داری دارد. در خصوص میزان تولید سایتوکاین‌های IFN-γ و IL-4 نیز مایع رویی کشت سلول مورد سنجش قرار گرفت و نتایج نشان داد که میزان تولید این سایتوکاین‌ها از روز ۷ بعد از واکسیناسیون آغاز و در روز ۲۱ به حداکثر مقدار خود رسیده است. این داده‌ها با نتایج تست تکثیر لنفوسیتی که در روز ۲۱ دارای بالاترین میزان تکثیر سلولی بودند نیز مطابقت دارد، که خود نشان از ارتباط افزایش میزان درصد لنفوسیت‌های T و B اجرایی در هفته سوم بعد از تحریک واکسن در بدن دام و متعاقباً در سلول‌های PBMCs جدا شده از همان دام‌ها دارد. با عبارت دیگر پس از واکسیناسیون و با افزایش میزان درصد لنفوسیت‌های اجرایی در پاسخ به واکسن، قابلیت تکثیر

سلولی و تولید سایتوکاین در آنها نیز افزایش یافته است.

جمع بندی

از نتایج فوق چنین بر می‌آید که واکسن آبله بزی با القاء پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی ناشی از تحریک سلول‌های Th1 و Th2، قادر به تولید مقادیر مناسبی از آنتی‌بادی و همچنین با افزایش قدرت تکثیر لنفوسیتی و تولید)-IFNو IL-4 در هفته‌های بعد از واکسیناسیون، از ایمنی‌زایی مناسبی جهت استفاده در واکسیناسیون اضطراری در برابرLSD برخوردار است و به راحتی می‌توان از آن بعنوان یک واکسن هترولوگ در پیشگیری و کنترل بیماری LSD استفاده نمود.

منابع

1. Barman, D., Chatterjee, A., Guha, C., Biswas, U., Sarkar, J., Roy, T. K., Roy, B., Baidya, S. (2010). Estimation of post-vaccination antibody titre against goat pox and determination of protective antibody titre. *Small Ruminant Research* **93**: 76-78.
2. Blanco, E., McCullough, K., Summerfield, A., Fiorini, J., Andreu, D., Chiva, C., Borras, E., Barnett, P., Sobrino, F. (2000). Interspecies major histocompatibility complex-restricted Th cell epitope on foot-and-mouth disease virus capsid protein VP4. *Journal of Virology* **74**: 4902-07.
3. Coetzer, J. A. W. (2004). Lumpy skin disease; Infectious Diseases of Livestock. *Oxford University Press*. pp: 1268-76.
4. Danilo, B., Sebastian, D. G., Juan, P., Juan, M. S., Nancy C., Alejandra, V. C., Mariano, P. F., (2015). Foot-and-mouth disease vaccination induces cross-reactive IFN-γ responses in cattle that are dependent on the integrity of the 140S particles. *Virology* **476***:* 11-18.
5. Dar, P. A., Hajam, I. A., Suryanarayana, V. S., Kishore, S., Kondabattula, G. (2015). Kinetics of cytokine expression in bovine PBMCs and whole blood after in vitro stimulation with foot-and-mouth disease virus (FMDV) antigen. *Cytokine* **72**: 58-62.
6. Delirezh, N., Norian, R., Azadmehr, A. (2016). Changes in some pro-and anti-inflammatory cytokines produced by bovine peripheral blood mononuclear cells following foot and mouth disease vaccination. *Archives of Razi Institute* **71**: 199-207.
7. Diallo, A., and Viljoen, G. J. (2007). Genus capripoxvirus. *In Poxviruses, Springer*. pp: 167-81.
8. Eble, P., Bouma, A., Weerdmeester, K., Stegeman, J., and Dekker, A. (2007). Serological and mucosal immune responses after vaccination and infection with FMDV in pigs. *Vaccine* **25**: 1043-54.
9. Eble, P. L., de Bruin, M. G., Bouma, A., van Hemert-Kluitenberg, F., Dekker, A. (2006). Comparison of immune responses after intra-typic heterologous and homologous vaccination against foot-and-mouth disease virus infection in pigs. *Vaccine* **24**: 1274-81.
10. Esther B., Mercedes G. B., Arantza S. P., Paula G., Eliandre D. O., Mari L. V., David A., Victoria L., Francisco S. (2001). Identification of T-cell epitopes in nonstructural proteins of foot-and-mouth disease virus. *Journal of Virology* **75**: 3164–74.
11. Gari, G., Abie, G., Gizaw, D., Wubete, A., Kidane, M., Asgedom, H., Bayissa, B., Ayelet, G., Oura, C. A., Roger, F., Tuppurainen, E. S. (2015). Evaluation of the safety, immunogenicity and efficacy of three capripoxvirus vaccine strains against lumpy skin disease virus. *Vaccine* **33**: 3256-61.
12. Heba, A. Khafagy, M. G. A., Abdelmoneim M. M., Mohamed A., Saad, A. A. (2016). Preparation and field evaluationof live attenuated sheep pox vaccine for protection of calves against lumpy skin disease. *Benha Veterinary Medical Journal* **31**: 1-7.
13. Mohamed, G., Abdelwahab, H. A. K., Abdelmoneim, M. M., Moustafa, Mohamed A., Saad, A. A. (2016). Evaluation of Humoral and Cell-mediated Immunity of Lumpy Skin Disease Vaccine Prepared from Local

strainin calves and Its Related to Maternal Immunity. *Journal of American Science* **21**:1-5.

14. Norian, R., Delirezh, N., and Azadmehr, A. (2015). Evaluation of proliferation and cytokines production by mitogen-stimulated bovine peripheral blood mononuclear cells. *Veterinary Research Forum* **6**: 265-71.
15. OIE (1992). Manual of recommended diagnostic techniques and requirements for biological products. *World Organization for Animal Health, Rue de Prony*. pp: 1-5.
16. OIE (2010). Lumpy skin diseas; Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. *World Organization for Animal Health, Paris*. pp: 1-13.
17. Reed, L. J., and Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal of Epidemiology* **27**: 493-97.
18. Ryan, J. E., Dhiman, N., Ovsyannikova, I. G., Vierkant, R. A., Pankratz, V. S., Poland, G. A. (2009). Response surface methodology to determine optimal cytokine responses in human peripheral blood mononuclear cells after smallpox vaccination. *Journal of Immunological Methods* **341**: 97-105.
19. Tilahun, Z., Berecha, B., Simenew, K., Reta, D. (2014). Towards Effective Vaccine Production: A Controlled Field Trial on the Immunological Response of Three Lumpy Skin Disease Vaccine Strains in Dairy Farms. *Academic Journal of Animal Diseases* **3**: 17-26.
20. Tuppurainen, E. S., Pearson, C. R., Bachanek-Bankowska, K., Knowles, N. J., Amareen, S., Frost, L., Henstock, M. R., Lamien, C. E., Diallo, A., Mertens, P. P. (2014). Characterization of sheep pox virus vaccine for cattle against lumpy skin disease virus. *Antiviral Research* **109**: 1-6.
21. Varshovi, H. R., Keyvanfar, H., Aghaiypour, K., Pourbakhsh, S. A., Shooshtari, A. H., Aghaebrahimian, M. (2009). Capripoxvirus identification by PCR based on P32 gene. *Archives of Razi Institute* **64**:19-25.
22. Zaros, L. G., Bricarello, P. A., Amarante, A. F. T., Coutinho, L. L. (2007). Quantification of bovine cytokine gene expression using real-time RT-PCR methodology. *Genetics and Molecular Biology* **30**: 575-79.

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 14, Issue1, 2018

Characteristic of Immune response induced by live attenuated Gorgan goat pox strain vaccine against lump skin disease in cattle

Norian, R.[1], Afzal AhangranN.[*2], Varshovi,H.R.[3], Azadmehr, A.[4]

1.Ph.D student of Immunology, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
2.Assistant professor, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
3. Assistant professor, Department of Animal Viral Vaccines, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
4.Associate professor, Department of Immunology, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

Received Date: 12 July2017 *Accepted Date: 1 November2017*

Abstract: *Lumpy skin disease virus (LSD), Goatpox virus and Sheeppox virus are members of genus Capripoxvirus of the Poxviridae, which have close genetic similarity. Therefore, the use of CaPV-vaccine strains derived from sheep and goat would be useful to protect cattle against LSD. The aim ofthis study was to evaluate the immune responses characteristics of available goat pox vaccine against LSD in cattle. All immunized calves were daily examined for any increase of rectal temperature and appearance of adverse reaction for 5 weeks following vaccination. Humoral immune responses were evaluated by serum neutralization test and cellular immune response were evaluated by MTT, Real-time PCR and ELISA tests. The results showed that theFever and localized swelling at the injection site were observed in vaccinated calves, in comparison to the control group. In assessing of humoral immune response, a significant increase in the neutralizing antibody titer was observed in the vaccinated group in comparison to control group, although this difference in days 35 was higher than the other days ($p<0.05$). In assessing the cellular immune response, a significant increase was shown for IFN-γ gene expression on day 7 and for IL-4 gene expression on day 21 post-vaccination in comparison to day 0 and control group ($P<0.05$), While the highest cytokine production in cell culture supernatant for IFN-γ and IL-4 was observed at day 21 post-vaccination ($P<0.05$). Also, the lymphocyte proliferation index in vaccinated calves showed a significant increase on day 7, 21, and 35 in comparison to day 0 and control group ($P<0.05$). According to the results of this study, the results of this study indicated, that goat pox-vaccine due to induction of high level of antibody titer, higher lymphocyte proliferation and IFN-γ and IL-4 production has a good immunogenic response, So It considered suitable vaccine to control of LSD.*

***Keywords: Goat Pox Vaccine, Cellular and Humoral Immunity*, Real-time PCR, ELISA, MTT**

**Corresponding author: Afzal-Ahangran, N.*
Address: Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.
Tel: +98443194652
Email: n.afzalahangaran@urmia.ac.ir