

بررسی ایمنی زایی واکسن روغنی تب برفکی فرموله شده با ادجوان‌های روغنی در مقایسه با ادجوان ژل آلومینیوم هیدروکساید در بز

سید محمود عظیمی دزفولی^{۱*}، مسعود مقدم پور^۲

۱-دانشیار بخش تحقیق و تولید واکسن های تب برفکی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم رازی، سازمان تحقیقات کشاورزی،

آموزش و ترویج (AREEO)، کرج، ایران

۲-استاد یار بخش تحقیق و تولید واکسن های ویروسی طیور، موسسه تحقیقات واکسن و سرم رازی، سازمان تحقیقات کشاورزی،

آموزش و ترویج (AREEO)، کرج، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۳/۳۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۸/۲۹

چکیده

در مناطقی که بیماری تب برفکی اندمیک می باشد، همانند ایران، موثرترین راه کنترل پیشگیری از بیماری واکسیناسیون است. در حال حاضر واکسن تب برفکی در دو طیف پایه آبی و روغنی بصورت تجاری تولید شده و در اختیار دامداران قرار دارد. در مطالعه حاضر میزان پاسخ ایمنی همورال و مدت دوام آن متعاقب تجویز واکسن مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق واکسن های آزمایشی با ادجوان روغنی B62 و واکسن دارای ادجوان ISA61 و واکسن دارای ژل آلومینیوم هیدروکساید در دام هدف (بز) مورد مقایسه قرار گرفت. واکسیناسیون گروه ها در دو نوبت و با فاصله ۲۸ روز انجام شد. نمونه گیری از دام های تحت آزمایش در روز های صفر، ۲۸، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰، ۱۸۰، ۲۱۰ انجام شد. بررسی ایمنی همورال دام ها با استفاده از روش خنثی سازی سرم انجام شد. به جهت تعیین اختلاف معنی دار در نتایج گروهها از روش های آماری استفاده شد. عیار آنتی بادی حاصل از واکسن های دارای ادجوان های روغنی B62 و ISA61 و ژل آلومینیوم هیدروکساید تا روز ۶۰ افزایش یکسانی را نشان دادند ولی از روز ۶۰ عیار سرمی گروه دریافت کننده ژل آلومینیوم هیدروکساید کاهش یافت ولی دو گروه های که ادجوان B62 و ISA61 دریافت کرده بودند تا روز ۲۱۰ عیار بالایی نشان دادند. بررسی های آماری نتایج عیار سرمی در آزمایش خنثی سازی سرم (SN) اختلاف معنی دار را بین گروه واکسن های دارای ادجوان های روغنی B62 و ISA61 با سایر گروه ها از روز ۶۰ تا پایان تحقیق را نشان داد و میانگین عیار خنثی سازی حدود ۲/۶ گزارش شد.

کلمات کلیدی: تب برفکی، ژل آلومینیوم هیدروکساید، ادجوان روغنی، واکسن روغنی

*نویسنده مسئول: سید محمود عظیمی دزفولی

آدرس: بخش تحقیق و تولید واکسن های تب برفکی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم رازی، سازمان تحقیقات کشاورزی، آموزش و ترویج (AREEO)،

کرج، ایران.

پست الکترونیک: m.azimi@rvsri.ac.ir

مقدمه

تب برفکی (FMD) یک بیماری بسیار عفونی دام و از نظر اقتصادی برای دامدار و صنعت دامداری ویرانگر است. عامل این بیماری ویروسی از خانواده پیکورناویریده بوده و یک بیماری واگیردار در حیوانات زوج سم ایجاد میکند که خسارات آن در تامین بهداشت، رفاه و تولید فرآورده های دامی قابل توجه و بسیار سنگین میباشد. مهمترین و اصلی ترین راه ورود ویروس به بدن از طریق دستگاه تنفسی است (Ahmadzadeh, H.1390; Alexandersen, S, et al. 2003; Alexandersen, S. Mowat, N. 2005; Aftosa, F. (2007; Bachrach, H. L. 1968; Brown, F. 2003 واکسن تب برفکی با پایه روغنی و آبی رایج ترین نوع واکسن های مورد استفاده در بین دامداران می باشند. این دو دسته از ادجوان ها هر کدام دارای مزایا و معایبی هستند. از ویژگی های بسیار مهم و مورد انتظار ادجوان ها افزایش طول دوره ایمنی و افزایش قدرت پاسخ ایمنی محافظت کننده می باشد. (Moghadam Pour, M. 1385) (Moghadam Pour, M. et al 1384) تحقیقات انجام شده حاکی از آن است که واکسن های دارای ادجوان روغنی دارای مزایایی مانند بالا بودن طول دوره ایمنی و کاهش دفعات واکسیناسیون نسبت به نوع آبی می باشند. طبق مطالعات انجام شده ادجوان روغنی علاوه بر افزایش طول دوره ایمنی، قادر به تحریک ایمنی همورال به شکل مطلوب می باشند (Barnett, P.V. et al 2002; Bartels, T. et al 1994; Blancou, J. 2003 هدف از این تحقیق ارزیابی پاسخ ایمنی همورال و بررسی طول دوره ایمنی، متعاقب تجویز واکسن های تهیه شده از ادجوان روغنی B۶۲ و ISA61 در مقایسه با واکسن پایه آبی می باشد.

مواد و روش کار

آنتی ژن

جهت تولید آنتی ژن از کشت مونولایر سلول BHK استفاده شد. مراحل کار بطور خلاصه به این صورت بود که ابتدا چهار عدد فلاسک ۱۷۵ cm2 سلول مونولایر BHK تهیه شد. هر یک از فلاسک ها با 100 ml محیط کشت RPMI1640، 5% FBS، 100 mg/ml پنی سیلین و استرپتومایسین کشت شده و بمدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. پس از این مدت کلیه فلاسک ها به بیش از ۹۰٪ رشد رسیدند. هر یک از فلاسک ها با 100/1 MOI از ویروس O2016 با عیار ۶/۸۰ TCID50/ml تلقیح شدند. پس از ۱۸ ساعت تمامی فلاسک ها تخریب سلولی (CPE) را نشان دادند. سوسپانسیون ویروسی حاصل در حجم ۴۰۰ میلی لیتر جمع آوری شده و توسط سانتریفوژ (۳۰۰۰ rpm/دقیقه/ ۴۰ درجه سانتیگراد) شفاف سازی شد. غیر فعال سازی ویروس با اتیلن آمین (binary ethylenimine) با غلظت ۴/۲ میلی مول در مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۲۶ درجه سانتی گراد انجام شد. باقی مانده اتیلن آمین مصرف نشده در سوسپانسیون ویروسی توسط تیوسولفات سدیم با غلظت ۵ میلی مول خنثی شد (Bahnmann HG. 1973).

ادجوان ها

در این تحقیق دو نوع ادجوان روغنی در کنار ادجوان ژل آلومینیوم هیدروکساید با یکدیگر مقایسه شده اند. ادجوان های روغنی شامل ادجوان ISA61 تولید شده توسط شرکت Seppic فرانسه و ادجوان تولید داخل با نام B۶۲ بود. ادجوان های داخلی از سازمان دامپزشکی پروانه تولید اخذ کرده است (Moghadam Pour, M. 1385 - Moghadam Pour, M. et al 1384). ادجوان آبی یا آلومینیوم هیدروکساید در موسسه رازی تولید



دام ها انجام شد. لازم به ذکر است که بز ها در ۴ گروه (A,B,C,D) دسته بندی شدند. در هر گروه سه راس دام در نظر گرفته شده و در برنامه واکسیناسیون دو نوبت تلقیح با فاصله ۲۸ روز انجام گردید (جدول ۲).

جدول ۲- گروه های دام تحت آزمایش

گروه ها	A	B	C	D
نوع ادجوان واکسن	B۶۲	ISA 61	Alum	Ag

برنامه نمونه گیری

اخذ نمونه از گروه های تحت آزمایش توسط لوله های خلاء دار و تحت شرایط کنترل شده در ۸ مرحله در روز های اول و روزهای ۲۸، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰، ۱۸۰ و ۲۱۰ انجام گردید. نمونه های بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شده و در شرایط استریل سرم آنها جدا گردیده و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد تا انجام آزمایش خنثی سازی ویروس نگهداری گردیدند.

آزمایش خنثی سازی ویروس (Seroneutralization test):

آزمایش خنثی سازی ویروس جهت تعیین عیار آنتی بادی خنثی کننده ویروس تب برفکی در سرم دام ها انجام گردید. بطور خلاصه مراحل کار در این آزمون به شرح ذیل صورت گرفت. ابتدا جهت غیرفعال کردن عوامل مداخله گر در تست، سرمها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۶ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. سپس با استفاده از محیط کشت RPMI از سرم ها رقت های سریالی تهیه گردید. به دو گوده از پلیت ۹۶ خانه، ۵۰ میکرولیتر سرم مجهول (دو گوده برای هر رقت سرم) اضافه گردید. در ادامه ۵۰ میکرولیتر ویروس O2016 با عیار 2×10^3 (TCID₅₀/ml) به هر گوده اضافه گردید. پلیت ها بمدت ۶۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. سپس ۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون

شده و در تهیه واکسن پایه آبی تب برفکی بصورت تجاری استفاده می گردد. در این مطالعه یک گروه از دام ها بعنوان گروه کنترل منفی، آنتی ژن ویروس تب برفکی را بدون افزودن ادجوان دریافت کردند. واکسن پایه آبی (ژل آلومینیوم هیدروکساید):

از ویروس غیر فعال شده و ژل آلومینیوم هیدروکساید و ساپونین (۰/۴ گرم در لیتر) برای تهیه واکسن پایه آبی استفاده شد. در فرمولاسیون واکسن پایه آبی از ۳۰٪ ژل آلومینیوم هیدروکساید و ۷۰٪ آنتی ژن استفاده شد و غلظت نهایی ژل آلومینیوم هیدروکساید ۶۵/۱ (w/v)٪ تنظیم گردید.

واکسنهای پایه روغنی

در مطالعه حاضر از ادجوان های روغنی ISA61 و B ۶۲ برای تولید واکسن روغنی استفاده شد. در فرمولاسیون های نهایی واکسن های روغنی تولید شده، نسبت فاز آبی (آنتی ژن) به فاز روغنی (ادجوان) ۵۰٪ (w/w) بوده است.

جدول ۱- فرمولاسیون واکسن ها

حجم نهایی (گرم)	مقدار ادجوان گرم و درصد	مقدار آنتی ژن گرم و درصد	نسبت W/O	نوع ادجوان
۱۰۰	۵۵	۴۵	۴۵/۵۵	B۶۲
۱۰۰	۵۵	۴۵	۴۵/۵۵	ISA61
۱۰۰	۳۰	۷۰	۳۰/۷۰	Alum
۱۰۰	صفر	۱۰۰	-	Ag

گروه بندی دام ها

در این مطالعه از بز نر بعنوان دام هدف جهت ارزیابی و مقایسه قدرت ایمنی زایی واکسن های تجربی استفاده شد. دام های تحت آزمایش در محدود سنی ۶ الی ۱۲ ماه بودند. برای حصول اطمینان از عدم مواجهه قبلی دام های تحت آزمایش با ویروس تب برفکی یا واکسن تب برفکی قبل از شروع آزمایش، آزمون SN بر روی سرم



میانگین تغییرات عیار آنتی بادی در دام های تحت آزمایش در روز های مختلف در نمودار شماره ۱ و در شکل عددی در جدول ۳ نمایش داده شده است.

۱- گروه A و B: عیار سرمی آنتی بادی این دو گروه از روز اول شروع آزمایش تا آخر دوره تقریباً همسان بوده و فقط در گروه B در روز ۱۸۰ به ۲/۱۷ در برابر ۲/۵ کاهش نشان داد ولی در نمونه ۲۱۰ روزگی با گروه A مطابق شد. با توجه به روند ثابت آنتی بادی احتمالاً در صورت ادامه نمونه گیری میزان آنتی بادی تا مدت ها افت نمی کرد ولی بخاطر محدودیت امکانات تحقیق متوقف گردید. عیار سرمی این دو گروه در ماه اول به نتیجه بالای ۲/۰ رسید و پس از دریافت نوبت دوم واکسن در ماه دوم به عیار ۲/۵ افزایش یافت.

۲- گروه C: افزایش عیار سرمی گروه C تا روز ۶۰ پس از واکسیناسیون با شیب ملایم تری نسبت به دو گروه قبل افزایشی بوده است. همانطور که در نمودار مشخص است در روز ۲۸ مقدار عیار سرمی کمتر از ۱/۵ بوده و در اثر واکسن نوبت دوم به عیار ۲/۵ افزایش پیدا کرد. عیار آنتی بادی این گروه بعد از ۶۰ روزگی دچار افت شده و در روز ۱۵۰ کاهش یافته و تا پایان دوره تحقیق بدون کاهش در همین سطح ادامه داشته است. مجموعاً عیار سرمی این گروه از دو گروه B & A ضعیف تر بوده ولی از دو گروه D & E عملکرد بهتری داشته است.

۳- گروه D: این گروه بعنوان کنترل مثبت به منظور بررسی افزایش عیار آنتی بادی مختص آنتی ژن تب برفکی در نظر گرفته شده بود. همانطور که مشخص است عیار ایمنی در این گروه پس از واکسن نوبت اول به متوسط ۰/۷ افزایش یافته و پس از نوبت دوم واکسیناسیون به ۰/۹ صعود کرد ولی پس از آن سیر نزولی داشته است.

سلولی IBR-S2 با غلظت ۱/۶×۱۰۶ در هر میلی لیتر اضافه گردید و در انکوباتور دارای گاز CO2 قرار داده شدند و پس از ۷۲ ساعت از نظر وجود آثار CPE توسط میکروسکوپ بررسی گردیدند. بطور کلی رقتی از سرم که بتواند در نیمی از گوده ها مانع ایجاد CPE شود بعنوان عیار آنتی بادی خنثی کننده در نظر گرفته می شود و جهت تعیین میزان دقیق عیار آنتی بادی از روش Reed and Muench استفاده گردید (Li, G. et al 2001).

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل های نتایج عیار آنتی بادی توسط نرم افزار SPSS نسخه ۲۴ انجام گردید.

نتایج

بررسی میکروسکوپی

مشاهده آثار مرگ سلولی (CPE) در گوده های کشت سلول با استفاده از میکروسکوپ اینورت نشان دهنده عدم وجود یا پائین بودن عیار آنتی بادی خنثی کننده ویروس تب برفکی تلقی گردید. این موارد بعنوان سرم منفی بودن دام در نظر گرفته شد. گوده هایی که سلول بصورت تک لایه پس از ۷۲ مشاهده گردید و آثار مرگ سلولی را نشان ندادند، بعنوان مورد سرم مثبت در نظر گرفته شدند. در نهایت عیار دقیق آنتی بادی خنثی کننده توسط فرمول Reed and Muench محاسبه گردید (شکل ۱).

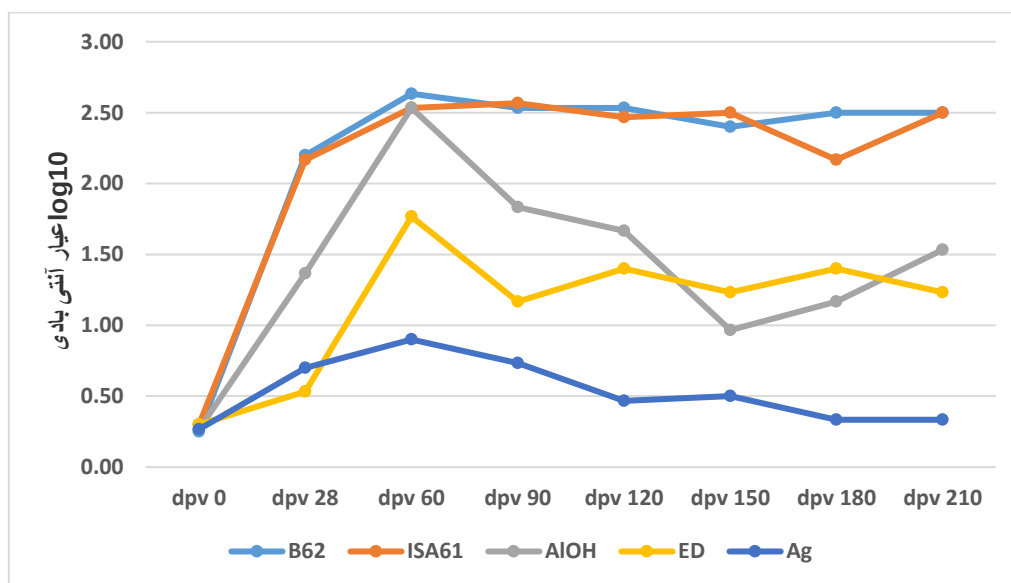
شکل ۱- تصویر سلول BA اولیه (سمت راست) و سلول با آثار مرگ سلولی (سمت چپ) با بزرگ نمای ۵ برابر



بررسی مقادیر عددی عیار آنتی بادی گروه ها

جدول ۳- عیار آنتی بادی در آزمون SN (log10) در گروه های تحت آزمایش

گروه ها	ادجوانها	شماره دام	روز خونگیری							
			۱ - واکسن اول	۲۸ واکسن دوم	۶۰	۹۰	۱۲۰	۱۵۰	۱۸۰	۲۱۰
A	B۶۲	۱	۰/۲	۲/۱	۲/۵	۲/۷	۲/۷	۲/۴	۲/۴	۲/۵
		۲	۰/۲۵	۲/۳	۲/۶	۲/۶	۲/۵	۲/۷	۲/۸	۲/۶
		۳	۰/۳	۲/۲	۲/۸	۲/۳	۲/۴	۲/۱	۲/۳	۲/۴
B	ISA61	۴	۰/۳	۲/۴	۲/۹	۲/۳	۲/۶	۲/۵	۲/۴	۲/۲
		۵	۰/۳	۲/۰	۲/۶	۲/۸	۲/۳	۲/۷	۲	۲/۸
		۶	۰/۳	۲/۱	۲/۱	۲/۶	۲/۵	۲/۳	۲/۱	۲/۵
C	Alum	۷	۰/۲	۱/۳	۲/۷	۲	۱/۹	۱	۱/۳	۱/۵
		۸	۰/۳	۱/۴	۲/۶	۱/۷	۱/۵	۰/۸	۱	۱/۷
		۹	۰/۳	۱/۴	۲/۳	۱/۸	۱/۶	۱/۱	۱/۲	۱/۴
D	FMDV Ag	۱۳	۰/۳	۰/۸	۰/۸	۰/۸	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۴
		۱۴	۰/۳	۰/۷	۱	۰/۸	۰/۶	۰/۳	۰/۳	۰/۳
		۱۵	۰/۲	۰/۶	۰/۹	۰/۶	۰/۳	۰/۷	۰/۲	۰/۳



نمودار ۱- مقایسه میانگین عیار آنتی بادی توسط واکسن های تهیه شده از ادجوان های مختلف در روزهای پس از واکسیناسیون در دام های تحت آزمایش

تا ۶۰ روز پس از واکسیناسیون افزایشی بوده و در گروه های A, B و C حدود ۲/۵ را نشان داد مگر گروه D که میانگین عیار کمتر از یک بود. نتایج سرمی گروه های A, B تقریباً از ۹۰ تا ۲۱۰ روزگی بصورت ثابت در حدود ۲/۵ ماند ولی در گروه های C و D نتایج نزولی شد و

تجزیه و تحلیل آماری

طبق نتایج آزمون ANOVA یک طرفه، اختلاف معنی داری در میانگین عیار ایمنی زایی گروه A, B و گروه کنترل D در روز اول واکسیناسیون مشاهده نشد ($P < 0.05$). میانگین عیار آنتی بادی تمام گروه ها از اول



در روز ۲۱۰ میانگین نتایج گروه C ۱/۵۳ رسیده و در گروه D ۰/۳۳ کاهش یافت ($P < ۰/۰۵$). اختلاف میانگین عیار آنتی بادی گروه های مختلف در ۱۲۰ روز پس از واکسیناسیون کاملاً معنی دار بود میانگین عیار آنتی بادی گروه های A, B بصورت معناداری بیشتر از همه ی گروه های دیگر بود اما اختلاف میانگین عیار آنتی بادی نتایج گروه های A, B معنادار نبود. میانگین عیار آنتی بادی گروه C بصورت معناداری نسبت به گروه های A, B کمتر و از D بیشتر بود ($P < ۰/۰۵$) (نمودار ۱).

بحث

بیماری تب برفکی یکی از بیماریهای مهم واگیردار حیوانات زوج سم میباشد که جهت کنترل آن از واکسیناسیون استفاده می شود. بنابراین تهیه واکسنهای کارآمد دارای اهمیت ویژه ایی است

(Bittle, J. L. et al 1982; DiMarchi, R. G. et al 1986; Li, G. et al 2001) در سال های اخیر انواع مختلفی از ادجوان ها برای تقویت پاسخ ایمنی به واکسن های تب برفکی اضافه شده و مورد مطالعه قرار گرفته است. این ادجوان ها شامل روغن های معدنی، ساپونین ها (Quil-A)، لیگاندهای گیرنده Toll مانند (TLR)، سایتوکاین ها، لیپوزوم ها و غیره می باشد. مطالعات زیادی در حوزه ادجوان های روغنی و استفاده آنها در واکسن تب برفکی صورت گرفته است. اثربخشی یک ادجوان روغنی به جمع شدن در محل تزریق، ناقل مناسب برای انتقال آنتی ژن در سراسر سیستم لنفاوی و انتشار آهسته آنتی ژن با تحریک سلول های تولید کننده آنتی بادی نسبت داده می شود. Yimei Cao و همکارانش پیرامون پیشرفت های اخیر ادجوان های واکسن ویروس تب برفکی تحقیقاتی فراوانی انجام دادند (Cao Y. 2014). در سال ۲۰۱۳ Getu Ayele و همکارانش طی آزمایشی تولید آنتی بادی توسط واکسن

ها با ادجوان های مختلف را مورد ارزیابی قرار دادند. در این آزمایش از ادجوان های مختلف از قبیل ژل هیدروکسید آلومینیم و واکسن روغنی سه ظرفیتی شامل تایپ های SAT2, O, A در گاوها استفاده شد (Ayele G. et al 2023, 2022). گروه هایی که دارای ادجوان روغنی بودند نتایج بسیار بهتری نسبت به سایر گروهها داشتند. واکسن های آبی حاوی Al(OH)₃/saponin برای استفاده در خوک ها ایده آل نیستند، زیرا کارایی محافظتی آنها در این گونه کم است (Alexandersen, S. Mowat, N. 2005). در حال حاضر، واکسن های امولسیون دوگانه روغنی برای پیشگیری از بیماری تب برفکی ترجیح داده می شوند، زیرا می توانند برای محافظت از همه گونه های حساس دامی استفاده شوند و برای واکسیناسیون اضطراری ایده آل هستند. Montanide ISA-201 و ISA-206، یک ادجوان مبتنی بر روغن معدنی است که توسط شرکت Seppic فرانسه عرضه می شود (Amanda, L. et al 2005). در سال ۱۳۸۳ شوشتری و همکاران طی مطالعه ای دو نوع واکسن تب برفکی تهیه کردند که تنها تفاوت بین آنها ادجوان موجود در آنها بود به طوری که در یک نوع واکسن تب برفکی ادجوان ژل آلومینیم هیدروکساید + ساپونین و در دیگری ادجوان روغنی مورد استفاده قرار گرفت. آنها به این نتیجه رسیدند که واکسن تب برفکی با ادجوان روغنی می تواند به عنوان یک واکسن مطلوب با طول دوره آنتی بادی بیشتر از واکسن تب برفکی با ادجوان ژل آلومینیم هیدروکساید مورد استفاده قرار گیرد. شوشتری گزارش کرده است که واکسن حاوی یاور روغنی هم از نظر عیار آنتی بادی نهایی و هم از نظر دوام عیار ایمنی بالاترین میزان را دارا بوده و هم به دلیل خصوصیات فیزیکی و تولید آن آسانتر از واکسن آبی می باشد. در سال ۲۰۱۴



Dong Li، و همکارانش کارایی واکسن FMD خوک ای مولسیون شده را با روغن کمکی ISA 201 VG یا ISA 206 VG مقایسه کردند. Min Eun Park و همکارانش پیرامون تقویت پاسخ‌های ایمنی واکسن بیماری تب برفکی با استفاده از ترکیب‌های کمکی جدید روغن/ژل در خوک‌ها و بزها تحقیقاتی را به ثمر رساندند (گزارش منتشر نشده Park ME, 2014). در سال ۲۰۱۳، Pervaiz Dar و همکارانش به این نتیجه رسیدند که ادجوان واکسن ISATM 201 در سال ۲۰۱۴ باعث بهبود پاسخ‌های ایمنی و محافظت در گاو می‌شود (Dar P. , et al 2013). هدف این تحقیق، بررسی قدرت ایمنی زایی و طول دوره ایمنی واکسن روغنی تب برفکی حاوی ادجوان‌های تولید داخل B ۶۲ در مقایسه با ادجوان خارجی بود. در این پژوهش عملکرد واکسن‌های دارای ادجوان تولید داخل در مقابل واکسن روغنی دارای ادجوان ISA61 و واکسن آبی حاوی ژل آلومینیوم هیدروکساید در بز بررسی گردید. عیار‌های آنتی بادی بر علیه تب برفکی گروه‌های تحت آزمایش در روز اول قبل از واکسیناسیون اول بسیار پایین و بر اساس نتایج بدست آمده از نمونه‌های روز ۲۸ و ۶۰ پس از واکسیناسیون، میانگین عیار آنتی بادی گروه‌های A و B و C (واکسن‌های حاوی ادجوان B ۶۲، ISA61 و آلومینیوم هیدروکساید) بصورت معناداری بیشتر از گروه D (گروه کنترل) بود ($P < 0.05$) و ضمناً میانگین عیار آنتی بادی این سه گروه در این دو مرحله اختلاف معناداری با یکدیگر نداشتند ($P < 0.05$). از روز ۶۰ الی ۹۰ پس از واکسیناسیون عیار آنتی بادی گروه C سقوط کرده ولی میانگین عیار آنتی بادی گروه‌های A و B بصورت معناداری بیشتر از همه‌ی ادجوان‌های مذکور بود ($P < 0.05$) اما بین گروه‌های A و B اختلاف معنادار وجود نداشت ($P < 0.05$). بر اساس

نتایج عیار سرمی روز ۱۲۰، ۱۵۰، ۱۸۰ و ۲۱۰ پس از واکسیناسیون، میانگین عیار آنتی بادی گروه A و B بصورت معناداری بیشتر از همه‌ی گروه‌های ادجوان‌های مذکور بوده هیچگونه کاهش تا پایان دوره تحقیق (۷ ماهه) نشان ندادند ($P < 0.05$) ولی میانگین عیار سرمی گروه C پس از کاهش در ۹۰ روز پس از تلقیح، کاهش دیگری نداشتند و بصورت معناداری نسبت به نتایج گروه کنترل (آنتی ژن) بیشتر بودند ($P < 0.05$). ۶ ماه پس از واکسیناسیون دوم عیار سرمی دو گروه A و B حدود ۲/۵ بوده و نتیجه گروه C حدود ۱/۵ را نشان داد. عیار سرمی گروه کنترل کمتر از ۰/۵ بود. نتایج گروه کنترل مشخص کرد که هیچگونه بیماری در طول تحقیق در گروه‌ها اتفاق نیفتاده و تنها متغیر ادجوان‌های واکسن‌های مصرف شده بوده است.

نتیجه گیری کلی

در این تحقیق مشخص شد عیار آنتی بادی در گروه دریافت کننده واکسن تهیه شده از ادجوان‌های روغنی B۶۲ و ISA61 نسبت به گروه‌های دیگر، بخصوص گروه دریافت کننده ادجوان آبی ژل آلومینیوم هیدروکساید و بدون ادجوان بیشتر است. نکته دیگر اینکه پاسخ ایمنی نسبت به هر دو ادجوان روغنی B۶۲ و ISA61 تقریباً یکسان است. لذا میتوان کارایی این دو ادجوان را در مطالعات بیشتر بررسی نموده و در صورت تایید نهایی در تولید واکسن تب برفکی پیشنهاد نمود.

تشکر و تقدیر

بدینوسیله از شرکت دانش بنیان زیست فناوریان پژوه البرز تولید کننده ادجوان (یاور) B ۶۲ و همکاری موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی در اجرای این پروژه کمال تشکر را دارد.

منابع



11. Bahnemann HG. (1973) The inactivation of foot and mouth disease virus by ethyleneimine and propyleneimine. *Zbl Vet Med*; B20:356-60.
12. Barnett, P.V. Cox, S.J. Aggarwal, N. Gerber, H. and McCullough, K.C. (2002) Further studies on the early protective responses of pigs following immunization with high potency foot and mouth disease vaccine. *Vaccine*, 20: 3197-3208.
13. Bartels, T. Schafer, H. Liebermann, H. Burger, R. Beyer, J. (1994) T-lymphocyte responses in guinea pigs vaccinated with foot and mouth disease virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 40: 213-223.
14. Bittle, J. L. Houghten, R. A., Alexander, H. Shinnick, T. M. Sutcliffe J. G. Lerner, R. A. Rowlands D. J., and Brown F. (1982) Protection against foot-and-mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence. *Nature* 298:30-33.
15. Blancou, J. (2003) History of the surveillance and control of transmissible animal diseases. *World Organisation for Animal Health Paris*, 362 pp Brooksby, J.B. 1982. foot and mouth disease virus. *Interviol*. 18, 1-23.
16. Brown, F. (2003) The history of research in foot-and-mouth disease. *Virus Research*, 91: 3-7.
17. Cao Y. (2014) Adjuvants for foot-and-mouth disease virus vaccines: recent progress, *Expert Rev Vaccines* . 13 (11):1377-85.
18. Cox, S.J. Aggarwal, N. Statham, R.J. Barnett, P.V. (2003) Longevity of antibody and cytokine responses following vaccination with high potency emergency FMD vaccines. *Vaccine* 21, 254:1336-1347.
1. Abol Abbas, L.K. Lichman, A. Puber, J. (2003) *Cellular and molecular immunology*. 5ed.
2. Aftosa, F. (2007) *Foot and Mouth Disease. The center for food security and public health*.
3. Ahmadzadeh, H. (1390) New type of foot and mouth disease. *Agriculture and food industry weekly*. sixth year Number 90 (In Persian)
4. Alexandersen, S. Mowat, N. (2005) Foot-and-mouth disease: Host range and pathogenesis. *Current Concepts In Endometriosis*, 288: 9-42.
5. Alexandersen, S. Zhang, Z. Donaldson, A.I. and Garland, A.J. (2003) The pathogenesis and diagnosis of foot and mouth disease. *J. Comp. Pathol*. 129: 1-36.
6. Allen, S. David, N. M. (2003) Coordinate Cytokine Gene Expression In Vivo following Induction of Tuberculous Pleurisy in Guinea Pigs. *American Society for Microbiology*, 71: 4271-4277.
7. Amanda, L. Barnarda, A.A. Sarah, C. Barnett, P. Birte, K. Summerfielda, A. Kenneth, C. (2005) Immune response characteristics following emergency vaccination of pigs against foot-and-mouth disease. *Vaccine*, 23, 287: 1037-1047.
8. Ayele G. et al (2023) Combined Adjuvant Formulations Enhanced an Immune Response of Trivalent Foot and Mouth Disease Vaccine in Cattle, *Vet Med (Auckl)*. ; 14: 47-62.
9. Ayele G. et al (2022) Evaluation of different adjuvant formulations of trivalent Foot and Mouth Disease vaccine in 2022 DOI:10.21203/rs.3.rs-1975001/v1
10. Bachrach, H. L. (1968) Foot-and-mouth disease. *Annu. Rev. Microbiol*, 22: 201-244.



- data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25: 402-408.
25. Moghadam Pour, M. (1384) Comparison of two types of domestic and foreign oil adjuvant, 14th Iranian Veterinary Congress, 23rd of February 2006, Tehran, Razi Conference Center, Iran University of Medical Sciences(In Persian)
 26. Moghadam Pour, M. Ebrahimi, M. M. Mohammad Pour, N. (1385) Research on the production of adjuvant used in poultry vaccines, the first student conference on chemical applications in industry, November 9-11, 2007, Department of Chemistry, Isfahan University(In Persian)
 27. Park ME, Lee SY, Kim RH, Ko MK, Lee KN, Kim SM, Kim BK, Lee JS, Kim B, Park JH.(2014) Enhanced immune responses of foot-and-mouth disease vaccine using new oil/gel adjuvant mixtures in pigs and goats. *Vaccine.*, 8;32 (40):5221-7.
 28. Tizard, A. (1389) *Veterinary Immunology*. Translation: Shimi, A. The second edition of Nourbakhsh Tehran, Publishing House.
 19. Dar P. , Kalaivanan R., Sied N., Mamo B., Kishore S., Suryanarayana V.V.S., Kondabattula G,(2013) Montanide ISA™ 201 adjuvanted FMD vaccine induces improved immune responses and protection in cattle *Vaccine* ,18 ;31(33):3327-32.
 20. DiMarchi, R. G. Brooke, C. Gale, V. Cracknell, T. Doel, N. Mowat.(1986) Protection of cattle against foot-and-mouth disease by a synthetic peptide. *Science*, 232:639–641.
 21. Fenner, F. J. Gibbs, P. J. Murphy, Rott, F. A. R. Studdert, M. J. White, D. O. (1993) *Veterinary virology*, 403–430.
 22. Lei, C. Yang, J. Hu, J. Sun, X. (2021)On the Calculation of TCID50 for Quantitation of Virus Infectivity, *Virol Sin.* 2021 36(1): 141–144.
 23. Li, G. Li, Y. Yan, W. XU Q., WU Y., XIE Y., You U. and Zheng Z .(2001) CpG DNA enhances the immune responses elicited by the DNA vaccine against foot and mouth disease virus in guinea pigs. *Chinese Science Bulletin* 46:1376-1379.
 24. Livak, K.J. Schmittgen, T.D.(2001) Analysis of relative gene expression



Assay the antibody titer and duration of immunogenicity of foot-and-mouth oil vaccine containing domestic adjuvants compared to imported adjuvant and aluminum gel in livestock (goats)

Seied Mahmod Azimi - E-Zfoli¹, Masoud Moghaddam Pour², Majid Eslami^{2,3}, Habib Yaribeygi^{4*}

1. Associate Professor, FMD Vaccine Research and Production Department, Razi Vaccine and Serum Research Institute (Hesarek), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran;

2. Assistant Professor of Department of Research and Production Poultry Viral Vaccines, Razi Vaccine and Serum Research Institute (Hesarak), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran (m.moghaddam@rvsri.ac.ir)

Received: 19 November 2024 Accepted: 21 Jun 2025

Abstract

Foot and mouth disease is one of the infectious diseases in the livestock industry. In areas where FMD disease is endemic such as Iran the most effective way to control and prevent the disease is vaccination. At present, FMD vaccine is commercially produced in two types of Alum and oil-based. In the present study, the level of humoral immune response and its duration following the administration of a vaccine prepared with an domestic oil adjuvant compared to a vaccine with an imported adjuvant and a vaccine with aluminum gel in target animals (goats) were investigated. Vaccination of the groups was done on two occasions with an interval of 28 days. Sampling of the tested animals was done on days zero, 28, 60, 90, 120, 150, 180 and 210. The humoral immunity of animals was investigated using serum neutralization method. The titer of antibody obtained from vaccines with oil adjuvants B 62 (group A) and ISA61 (group B) and aluminum hydroxide gel (group C) showed the same increase until day 60, but from day 60 the serum titer of group C decrease. The group D during the research period could not have the good titer and quickly lost the low titer obtained on the 60th day. Statistical analysis of the results of serum titer in the serum neutralization test (SN) showed a significant difference between the group of vaccines with oil adjuvants B 62 and ISA61 and other groups from the 60th day to the end of the research. The neutralization rate of the above-mentioned two groups A&B were reported to be about 2.6.

The groups C and D performed very poorly in increasing the immunity level and also the length of the immunization period compared to the groups A and B. In total and considering the lack of decrease in the immunity level after 210 days (7 months). In the first group (A) was inoculated with domestic adjuvant, compared to other foot-and-mouth disease vaccines, they can be of great help to the livestock industry to deal with foot-and-mouth disease. In total, considering the increase in the appropriate immunity rate up to approximately 7 months in the first group (B 62) which had a domestically produced adjuvant, compared to other groups under test, this type of vaccine can be great help to control FMD in animal husbandry industry.

Keywords: FMD, aqueous aluminum hydroxide vaccine, oil adjuvant, oil vaccine

* Corresponding Author: Seied Mahmod Azimi

Address: Associate Professor, FMD Vaccine Research and Production Department, Razi Vaccine and Serum Research Institute (Hesarek), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Email: m.azimi@rvsri.ac.ir