مجله علوم و فنون هسته‌ای، دوره ۴۴، شماره ۳، جلد ۱۰۵، پاییز ۱۴۰۲

Journal of Nuclear Science and Technology
Vol. 44 (4), Serial Number 105, 2023

ارزیابی اثر حفاظتی واکسن بیماری تب‌برفکی سروتایپ A-Iran-۰۵ غیرفعال شده به روش بیم الکترون در مدل خوکچه‌هندی

فرحناز معتمدی سده*، مهدی بهگر، سید مرتضی موسوی

پژوهشکده‌ی کشاورزی هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی، صندوق پستی: ۱۴۹۸-۳۱۴۸۵، کرج - ایران

*Email: fmotamedi@aeoi.org.ir

مقاله‌ی پژوهشی

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۱۲/۴ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۳/۲۴

چکیده

ویروس بیماری تب‌برفکی باعث زیان‌های اقتصادی زیادی در دام‌ها می‌شود. در این تحقیق از ویروس تب‌برفکی سروتایپ A-Iran-۰۵ استفاده شد. پس از تکثیر ویروس در سلول کلیه بچه هامستر پرتوتابی با دزهای مختلف بیم الکترون (۱۰، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰، ۴۵ و ۵۰ کیلوگری) انجام و با استفاده از نرم‌افزار Origin منحنی دز/ پاسخ ترسیم گردید. با استفاده از این منحنی و نتایج آزمون بی‌ضرری و آزمون ثبوت کمپلمان جهت تأیید غیرفعال‌سازی کامل ویروس و بررسی خواص آنتی‌ژنیک ویروس ارزش $D_{۱۰}$ و دز مطلوب غیرفعال‌سازی ویروس به ترتیب ۸٫۳۳ و ۵۵ کیلوگری تعیین شد. سپس واکسن پرتوتابی شده و واکسن غیرفعال شده با اتیلن‌ایمین با استفاده از ژل آلومینیم هیدروکسید و ساپونین فرمولاسیون شده و جهت تزریق به خوکچه‌هندی استفاده شدند. تیترآنتی‌بادی خنثی‌کننده و میزان تکثیر لنفوسیت‌های طحال نشان داد که پاسخ‌های ایمنی همورال و سلولی در گروه‌های حیوانی واکسینه شده با هر دو واکسن نسبت به کنترل منفی افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد ($P<۰٫۰۵$). هم‌چنین دز حفاظتی واکسن پرتوتابی شده و واکسن مرسوم در آزمون چلنج به ترتیب ۶٫۲۸ و ۶٫۱۳ به‌دست آمدند که اثر حفاظتی این واکسن‌ها در مدل خوکچه‌هندی را نشان می‌دهند.

کلیدواژه‌ها: پرتوتابی، الکترون، ویروس تب‌برفکی، پاسخ ایمنی، تیترآنتی‌بادی

Evaluation of the protective effect of inactivated foot and mouth disease subtype A-IRAN-05 using anelectron beam in a guinea pig model

F. Motamedi Sedeh*, M. Behgar, S.M. Moosavi

Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, AEOI, P.O.Box: 31485-1498, Karaj - Iran

Research Article

Received 23.2.2022, Accepted 14.6.2022

Abstract

Foot and Mouth Disease Virus (FMDV) can cause a lot of economic losses in livestock. In this research FMDV subtype A-IRAN-05 was used. FMDV was multiplied on BHK21 cells and irradiated by electron beam (10, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 kGy), then the dose/response curve was drawn by Origin software. D_{10} value and optimum dose for virus inactivation according to the dose/ response curve and the results of the safety test and Complement Fixation test for the evaluation of antigenic characteristics were obtained at 8.33 and 55 kGy, respectively. Then irradiated vaccine and conventional vaccine were formulated with Aluminum Hydroxide gel and Saponin and used for injection on the guinea pig. The neutralizing antibody titration and splenic lymphocyte proliferation assay were shown a significant increase in humeral and cellular immunity induction in the irradiated vaccine and conventional vaccine to the negative control group ($P<0.05$). Also, the protective doses of irradiated and conventional vaccines were obtained at 6.28 and 6.13, respectively. It indicated the protective effect of both of the vaccines on a guinea pig.

Keywords: Irradiation, Electron, Foot, and mouth disease virus, Immune response, Antibody titration

۱. مقدمه

بیماری تب‌برفکی یکی از بیماری‌های حاد ویروسی است که موجب بیماری گونه‌های مختلف حیوانات زوج سم و وحوش می‌شود. در بین نشخوارکنندگان اهلی در درجه اول گاو و سپس گوسفند و بز نسبت به این بیماری حساس می‌باشند. این بیماری در اکثر نقاط دنیا و حداقل در ۷۰ گونه از حیوانات وحشی گزارش شده است؛ هم‌چنین سرعت انتشار سریع بیماری منجر به خسارات زیادی در شیر و گوشت و سایر محصولات دامی می‌شود. این بیماری در اغلب مناطق تولیدکننده دام در آفریقا، آسیا، اروپا و آمریکای جنوبی وجود دارد. تب و ضعف عمومی، ظهور تاول در اطراف دهان، روی پاها و غدد پستانی حیوانات از علائم بارز این بیماری محسوب می‌شود. ویروس عامل بیماری تب‌برفکی از خانواده پیکورناویریده می‌باشد. این خانواده ویروسی دارای ۵ جنس آفتوویروس، انترویروس، کاردیوویروس رینوویروس و هپارناویروس می‌باشد. این خانواده ویروسی دارای کسپید ۲۰ وجهی و ژنوم RNA تک‌رشته‌ای خطی، مثبت با اندازه kbp ۸٫۵-۷٫۵ می‌باشد. عامل بیماری تب برفکی جزء جنس آفتوویروس‌ها بوده و دارای ۷ تیپ ویروسی است که عبارتند از: Asia1, C, O, A و سه تیپ آفریقای جنوبی به نام‌های SAT۱، SAT۲، SAT۳ هر کدام از این تیپ‌ها دارای زیرتیپ‌هایی نیز می‌باشند [۱، ۲]. پرتوهای یون‌ساز گاما و ایکس که برای غیرفعال‌سازی میکروارگانیسم‌ها استفاده می‌شوند، پرتوهای الکترومغناطیسی با طول موج کوتاه هستند که قدرت نفوذ بالا دارند. مطالعاتی در مورد باکتری‌ها و ویروس‌های دامی نشان داده که عفونت‌زایی ویروس‌ها می‌تواند توسط پرتوتابی از بین رفته در حالی‌که آنتی‌ژنسیتی آن‌ها دست نخورده باقی بماند. غیرفعال‌سازی با مواد شیمیایی مثل فرمالین و آزیریدین‌ها می‌تواند منجر به تغییر در ساختار پروتیینی ویروس و در نهایت خواص آنتی‌ژنیک ویروس گردد، در حالی‌که پرتوتابی سوسپانسیون ویروسی در حالت منجمد با پرتوهای یون‌ساز بدون اثر بر ساختار پروتیینی ویروس می‌تواند منجر به تخریب ژنوم شود [۳-۵]. واکسن‌های زنده تخفیف حدت یافته اغلب پاسخ‌های ایمنی قوی ایجاد می‌کنند ولی از نظر سلامت و خطر بازگشت بیماری‌زایی ویروس مشکلاتی دارند. واکسن‌های کشته شده یا غیرفعال شده با مواد شیمیایی مثل فرمالین و ... خطر سلامتی کم‌تری دارند ولی ایمنی‌زایی آن‌ها نیز کم‌تر می‌باشد که ناشی از آسیب اپی‌توپ‌های آنتی‌ژنیک می‌باشد [۶]. پرتوتابی گاما سال‌های زیادی است که برای غیرفعال‌سازی میکروارگانیسم‌ها جهت مقاصد متنوعی استفاده می‌شود، که شامل محصولات پزشکی و بیولوژیکی، فرآورده‌های غذای و فاضلاب شهری و ... می‌باشد. غیرفعال‌سازی ویروس‌های انسانی در فاضلاب‌های شهری توسط چندین محقق بررسی شده است. در مطالعه‌ای نشان داده شد که فاضلاب روی ویروس تب‌برفکی اثر حفاظتی در مقابل پرتو دارد در حالی‌که در مورد ویروس بیماری وزیکولار خوک (SVD) این اثر را ندارد. ویروس تب‌برفکی در مغز استخوان، غدد لنفاوی و خون حیوانات عفونی شده در دز ۲ مگاراد (۲۰ کیلوگری) غیرفعال گردیده است [۷-۱۱]. واکسنی که امروزه برای تب‌برفکی مورد استفاده قرار می‌گیرد، یک واکسن کشته شده و غیر فعال است که با ادجوانت‌های مناسب فرموله شده است. این واکسن به دلایلی مانند نیمه‌عمر کوتاه، نیاز به زنجیر سرد، احتمال ایجاد باقی‌مانده‌های توکسیک و آلرژیک در واکسن و احتمال فرار ذرات ویروسی زنده به‌تنهایی نمی‌تواند در کنترل بیماری مؤثر باشد. لذا هدف از این تحقیق، ساخت واکسن پرتوتابی شده بیماری تب‌برفکی به روش بیم الکترون جهت کنترل سروتایپ A-IRAN-۰۵ این ویروس که در کشور شیوع دارد، بررسی پاسخ‌های ایمنی همورال و ایمنی سلولی ایجاد شده در حیوانات و ارزیابی دز حفاظتی ۵۰ درصد در خوکچه‌های هندی واکسینه‌شده پس از آزمون چلنج می‌باشد که در نهایت ارزیابی اثر حفاظتی این واکسن در مدل خوکچه‌هندی را نشان می‌دهد.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲ تکثیر ویروس تب‌برفکی سروتایپ A-IRAN-۰۵ و تعیین تیتر ویروس

ابتدا رده سلولی پایدار کلیه بچه هامستر BHK۲۱ به صورت تک‌لایه در فلاسک استریل سایز ۲۵ سانتی‌متر مربع مخصوص کشت سلول همراه با محیط کشت DMEM و ۵ درصد سرم جنین گوساله استریل در دمای ۳۷ °C کشت داده شد. پس از ۴۸ ساعت محیط کشت از فلاسک خارج گردیده و دو میلی‌لیتر محیط کشت جدید به‌علاوه یک میلی‌لیتر ویروس تب‌برفکی سروتایپ A-IRAN-۰۵ اضافه گردید و مجدداً در دمای ۳۷ °C کشت داده شد پس از ۴۸ ساعت علایم تخریب سلولی (CPE[1]) ظاهر شده و سوسپانسیون حاوی ویروس جمع‌آوری و به فریزر منتقل گردید. به این ترتیب حجمی حدود ۱۰۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون ویروس تهیه شده و پس از سه بار انجماد و یخ گشایی نمودن جهت جداسازی ذرات سلولی از سوسپانسیون ویروسی با دور پایین (۳۰۰۰ دور در دقیقه) سانتریفوژ شد و سوپ رویی آن جداسازی و پس از تقسیم در ویال‌های ۲ تا ۵ میلی‌لیتری به عنوان استوک ویروسی به فریزر ۷۰- °C منتقل شدند. دو نمونه از این استوک ویروسی جهت تعیین تیتر ویروس به روش کشت بافت ۵۰ درصد ($TCID_{50}$) مورد استفاده قرار گرفتند و تیتر ویروس با استفاده از فرمول رید و مونچ[2] محاسبه گردید [۱۲-۱۴].

1. Cytopathic Effect
2. Reed & Meunch

۲.۲ پرتوتابی ویروس تب‌برفکی سروتایپ A-IRAN-۰۵ با استفاده از بیم الکترون

برای پرتوتابی الکترون در این پروژه از سیستم پرتودهنده الکترون ساخت شرکت IBA مدل Rodotron TT۲۰۰ با انرژی ۱۰ مگاالکترون ولت (۱۰-MeV) و جریان ۲ میلی آمپر استفاده شد. ویال‌های حاوی ویروس فوق را که در فریزر ۷۰°C- نگه‌داری شدند به همراه یخ خشک در سیستم پرتودهنده الکترون قرار داده شدند و در دزهای ۱۰، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰، ۴۵ و ۵۰ کیلوگری پرتوتابی شدند. البته با توجه به دزیمتری که توسط یک نمونه ویال حاوی آب انجام گردید، با توجه به پارامترهای سیستم پرتوتابی الکترون از جمله تنظیم ولتاژ و آمپر و ...، مسئول سیستم پرتودهنده ناچاراً دزهای درخواستی ۱۰، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰، ۴۵ و ۵۰ کیلوگری را به طور دقیق به مقادیر ۱۰/۷، ۲۱/۴، ۲۷/۱، ۳۲/۱، ۳۷/۸، ۴۲/۸، ۴۸/۵ و ۵۳/۵ کیلوگری اصلاح نمودند. لذا برای محاسبه فاکتور D_{10}. Value و دز مطلوب غیرفعال‌سازی دزهای جذبی واقعی در محاسبات وارد شدند. همزمان با پرتوتابی این نمونه‌ها، سه ویال ویروسی به عنوان شاهد فقط جهت بررسی اثر تغییرات دما بر تیتر ویروسی در دمای آزمایشگاه هسته‌ای قرار داده شدند. تمام دزهای پرتوتابی سه بار تکرار گردید. سپس تیتر نمونه‌های ویروس پرتوتابی شده با دزهای مختلف پرتو الکترون هر یک به طور جداگانه به روش $TCID_{50}$. طبق فرمول رید و مونچ [۱۳] و روش لی [۱۴] تعیین شدند [۱۳، ۱۴].

۳.۲ محاسبه ارزش D_{10}. Value و تعیین دز مطلوب الکترون جهت غیرفعال‌سازی ویروس

با استفاده از نرم‌افزار Origin Pro ۶.۱ و با استفاده از میانگین تیتر ویروس‌های پرتوتابی شده در دزهای مختلف پرتو الکترون منحنی دز/ پایندگی به صورت نیمه لگاریتمی ترسیم گردید. در این منحنی تیتر ویروس‌های پرتوتابی شده در محور عمودی و به صورت لگاریتمی و دز پرتوتابی شده در محور افقی به صورت حسابی آورده شد. ارزش D_{10}. Value دزی از پرتو یون‌ساز (گاما یا الکترون) که بتواند جمعیت ویروسی را یک سیکل لگاریتمی کاهش دهد. پس از ترسیم منحنی دز/ پایندگی معادله بهترین خطی را که بتواند بر منحنی ترسیم گردد را به‌دست آورده و با استفاده از معادله آن خط (Y=A+BX) دز پرتو الکترون که سه سیکل لگاریتمی جمعیت ویروسی را کاهش دهد را به‌دست آورده و یک سوم آن دز برحسب کیلوگری به عنوان D_{10}. Value در نظر گرفته شد. سپس با در نظر گرفتن میانگین تیتر اولیه نمونه‌های ویروسی پرتوتابی نشده و فاکتور D_{10}. Value دز مطلوب غیرفعال‌سازی محاسبه شد.

۴.۲ تأیید ویروس غیرفعال شده با استفاده از آزمون بی‌ضرری (Safety Test) و بررسی خواص آنتی‌ژنیک آن

پس از تعیین دز مطلوب پرتو الکترون جهت غیرفعال‌سازی کامل ویروس نمونه‌های ویروسی در ویال‌های جداگانه با دزهای ۴۵، ۵۰، ۵۵ و ۶۰ کیلوگری پرتوتابی شده (از هر دز پرتوتابی دو ویال) و به منظور بررسی خواص عفونت‌زایی در کشت سلولی تک لایه رده سلولی پایدار کلیه بچه هامستر[1] کشت داده و پس از ۴۸ ساعت در صورت عدم مشاهده اثرات تخریب سلولی (CPE) از سوسپانسیون آن‌ها تا چهار پاساژ متوالی روی سلول‌های BHK_{21} کشت داده شد و هر پاساژ ۴۸ ساعت از نظر علایم تخریب سلولی بررسی شد. جهت بررسی خواص آنتی‌ژنیک ویروس پرتوتابی شده نسبت به ویروس شاهد از آزمون ثبوت کمپلمان استفاده گردید. در این آزمون به‌طور خلاصه از سیستم همولیتیک که شامل گلبول قرمز گوسفند شسته شده و آنتی‌بادی ضد آن است و آنتی‌بادی ضدویروس تب‌برفکی تایپ A و سریال رقت آنتی ژن ویروسی پرتوتابی شده و نشده استفاده شد [۱۵-۱۷].

۵.۲ آماده‌سازی واکسن مرسوم غیرفعال شده تب‌برفکی سروتایپ A-IRAN-۰۵

جهت تهیه واکسن مرسوم که توسط مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی تولید می‌شود ویروس تب‌برفکی سروتایپ A-IRAN-۰۵ با تیتر حدود 10^{6} $TCID_{50}$. جهت غیرفعال‌سازی با ۴/۲ mM اتیلن ایمین در دمای ۳۰°C به مدت ۲۴-۴۸ ساعت به طور جداگانه تیمار گردیدند. سپس جهت توقف واکنش غیرفعال‌سازی به میزان ۴/۲ mM سدیم تیوسولفات اضافه شد. این روش در حال حاضر جهت تهیه واکسن مرسوم در مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی استفاده می‌شود و به‌نام واکسن کشته تب برفکی نامیده می‌شود [۱۸].

۶.۲ فرمولاسیون واکسن پرتوتابی شده و واکسن مرسوم

پس از تأیید غیرفعال‌سازی کامل ویروس توسط بیم الکترون و حفظ خاصیت آنتی‌ژنیک ویروس پرتوتابی شده، حجم ۵۰ میلی‌لیتر ویروس غیرفعال شده به روش پرتوتابی و حجم ۵۰ میلی‌لیتر ویروس غیرفعال‌سازی شده به روش مرسوم (با استفاده از اتیلن ایمین)، با تیتر مشخص ($10^{8/5}$ دز عفونت‌زایی کشت بافتی ۵۰ درصد در میلی‌لیتر[2]) همراه با ادجوانت ژل هیدروکسید آلومینیم[3] (که pH آن بین ۷-۸ با استفاده از گلیکوکول (گلیسین + سود) تنظیم شده بود)، بافر فسفات دی هیدروژن پتاسیم و فسفات هیدروژن سدیم و ساپونین فرموله شد، که به ترتیب واکسن پرتوتابی شده و واکسن مرسوم نامیده شدند [۱۸].

1. BHK21
2. TCID50/mL
3. Al (OH)3

۷.۲ واکسیناسیون حیوانات و ارزیابی پاسخ‌های ایمنی واکسن پرتوتابی شده ویروس تب‌برفکی سروتایپ A-Iran-۰۵ در مدل خوکچه‌هندی و مقایسه آن با واکسن مرسوم

در این تحقیق از مدل حیوانی خوکچه‌هندی و طرح آزمایش تصادفی استفاده شد. به منظور تعیین دز مناسب واکسن پرتوتابی شده جهت ایمن‌سازی خوکچه‌هندی ابتدا یک پیش‌تست در چهار گروه سه‌تایی خوکچه‌هندی انجام شد. به ترتیب که مقادیر متفاوت واکسن پرتوتابی شده به حجم‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میکرولیتر به صورت زیرپوستی در ناحیه زیر بغل تزریق نموده و ۲۱ روز بعد مجدد همین مقادیر واکسن به عنوان دز یادآور تزریق شد. دو هفته پس از دز یادآور خون‌گیری انجام شد و سرم خون خوکچه‌ها برای ارزیابی تیتر آنتی‌بادی خنثی‌کننده استفاده شدند. با توجه به نتایج این پیش‌تست دز واکسن مناسب مورد استفاده جهت ایمن‌سازی خوکچه‌هندی ۲۰۰ میکرولیتر انتخاب گردید. به منظور مقایسه ایمنی‌زایی واکسن پرتوتابی شده با روش بیم الکترون و واکسن مرسوم، تعداد ۱۸ عدد خوکچه‌هندی ماده به وزن ۵۰±۳۰۰ گرم انتخاب و در سه گروه تقسیم شدند که به ترتیب به گروه اول واکسن مرسوم تولید شده در مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، گروه دوم واکسن پرتوتابی شده به روش بیم الکترون و تولید شده در این تحقیق و به گروه سوم بافر فسفات (شاهد) به روش زیرپوستی در ناحیه زیر بغل و به حجم ۲۰۰ میکرولیتر تزریق شد. دز یادآور واکسن ۲۱ روز بعد از اولین تزریق واکسن انجام شد و ۱۲-۱۴ روز بعد از دز دوم واکسن خون‌گیری از قلب حیوانات و جداسازی سرم خون جهت بررسی تیترآنتی‌بادی خنثی‌کننده انجام شد. هم‌چنین طحال خوکچه‌های هندی جهت بررسی میزان تکثیر لنفوسیت‌های طحال به روش آزمون MTT جداسازی شد.

۱.۷.۲ آزمون MTT

به منظور بررسی میزان تکثیر لنفوسیت‌های طحال حیوانات واکسینه ابتدا طحال جداسازی شده و همراه با بافر فسفات استریل و روی یخ به آزمایشگاه منتقل گردید. پس از جداسازی لنفوسیت‌های طحال شمارش آن‌ها و تعیین درصد سلول‌های زنده با استفاده از لام نئوبار انجام شد. کشت لنفوسیت‌های طحال با استفاده از محیط کشت RPMI۱۶۴۰ بدون فنل رد همراه با ۱۰ درصد سرم جنین گوساله در میکروپلیت ۹۶ خانه انجام و برای هر نمونه ۹ خانه کشت داده شد، به‌طوری که ۳ خانه با افزودن فیتوهماگلوتینین (عامل محرک رشد سلول) کنترل مثبت، ۳ خانه با افزودن آنتی‌ژن ویروسی پرتوتابی شده به عنوان آزمون اصلی و ۳ خانه کنترل منفی انتخاب شدند. پس از ۴۸ ساعت معرف نمک تترازولیوم طبق دستورالعمل کیت تجاری[1] افزوده، و بعد از ۴ ساعت بلورهای فورمازان تشکیل می‌گردد در چاهک‌های که رشد لنفوسیت‌ها بیش‌تر باشد بلورهای بیش‌تری مشاهده می‌شود. سپس حلال کیت که شامل SDS ۱۰٪ در اسید کلریدریک M ۰/۰۱ بود اضافه شد و یک شب در ۳۷ °C قرار داده شد و در انتها توسط دستگاه الایزا ریدر با طول موج ۵۴۰ نانومتر جذب نوری در هر خانه قرائت شد. ضریب شاخص تحریکی تکثیر لنفوسیت‌های طحال با استفاده از تقسیم میانگین جذب نوری خانه‌های آزمون اصلی نمونه به میانگین جذب نوری خانه‌های کنترل منفی محاسبه شده و در سه گروه واکسن پرتوتابی شده، واکسن رایج و گروه شاهد با هم مقایسه شدند [۱۹، ۲۰]. هر چه مقدار ضریب شاخص تحریکی بالاتر باشد نشان‌دهنده میزان تکثیر لنفوسیت‌های طحال بیش‌تر و به عبارتی پاسخ ایمنی سلولی بیش‌تر در آن گروه می‌باشد.

۲.۷.۲ تیترآنتی‌بادی خنثی‌کننده

جهت تیتراسیون آنتی‌بادی خنثی‌کننده در سرم حیوانات واکسینه شده از آزمون خنثی‌سازی سرم استفاده شد. به این ترتیب که ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های ۱:۸، ۱:۱۶، ۱:۳۲، ۱:۶۴ و ۱:۱۲۸ از سرم تهیه و با ۱۰۰ میکرولیتر ویروس تب‌برفکی با تیتر ۱۰۰ دز عفونت‌زایی کشت بافتی ۵۰ درصد مخلوط شده، بعد از یک ساعت مخلوط فوق به چاهک‌های حاوی کشت سلول کلیه خوک ($IBRS_2$) منتقل و پس از ۴۸ ساعت با توجه به ظهور و عدم ظهور اثرات تخریب سلولی تیترآنتی‌بادی محاسبه گردید. در هر چاهک که ویروس توسط سرم حیوان خنثی شده، علایم تخریب سلولی دیده نشد، به این معنی که سرم حیوان دارای آنتی‌سرم ضدویروس مذکور بوده و در هر چاهک که علایم تخریب سلولی دیده شد به این مفهوم بود که سرم حیوان فاقد آنتی‌سرم ضدویروس فوق بوده لذا ویروس خنثی نگردید و باعث بروز علایم تخریب سلولی شده است. در نهایت بالاترین رقتی از سرم که بتواند علایم تخریب سلولی را در ۵۰٪ سلول‌های تک‌لایه‌ای نشان دهد به عنوان تیتر سرم در نظر گرفته شد و لگاریتم مبنای ده عکس ضریب آن رقت به عنوان تیتر آنتی‌سرم ضدویروس گزارش شد [۲۱].

۸.۲ آماده‌سازی ویروس سازگار با خوکچه‌هندی جهت آزمون چلنج

جهت انجام آزمون مواجهه با ویرس زنده در خوکچه‌هندی لازم است ویروس تکثیر یافته در کشت سلول را با کف پای خوکچه‌هندی سازگار نمود. برای این منظور ابتدا از

1. Cell Proliferation Kit 1 (MTT)- Roche

سوسپانسیون ویروس تب‌برفکی تایپ A-IRAN-۰۵ با تیتر مشخص (10^6 $TCID_{50}$ /mL) جهت تزریق به کف هر دو پای خوکچه‌هندی اول به صورت داخل جلدی و به حجم ۰/۲-۰/۳ میلی‌لیتر در دو یا سه نقطه استفاده شد. بعد از سه روز کف پای محل تزریق در خوکچه اول قرمز و متورم شده بود، پس از بیهوشی خوکچه با کلروفرم، پوسته‌های کف پای قرمز شده را جداسازی نموده و در یک لوله فالکون استریل حاوی ۲ میلی‌لیتر محیط کشت سلول استریل (DMEM) که روی یخ قرار داده و در آزمایشگاه پوسته‌های کف پای خوکچه به همراه محیط کشت آن به یک هاون چینی استریل منتقل شده و کاملاً ساییده شد، سانتریفوژ با دور پایین انجام شد و مایع رویی از فیلتر ۰/۴۵ میکرون عبور داده و به یک لوله استریل منتقل گردید. این مایع آماده تزریق به کف پای خوکچه دوم می‌باشد که مطابق روش پاساژ اول، تزریق به کف هر دو پای خوکچه دوم نیز انجام شد. این روش تا هفت پاساژ متوالی بر روی خوکچه‌هندی انجام شد ولی از پاساژ سوم فقط به کف یک پای حیوان تزریق انجام شد. در پاساژ چهارم در کف پای تزریق شده تاول مشاهده شد ولی در کف پای تزریق نشده مشاهده نگردید. پوسته‌ها و مایعات تاول جمع‌آوری و مجدد آماده‌سازی شده و به کف پای خوکچه پنجم تزریق شد پس از ۵ روز کف هر دو پای خوکچه پنجم تاول مشاهده شد و به همین ترتیب تا پاساژ هفتم ادامه یافت و کف هر دو پا و دو دست خوکچه‌های ششم و هفتم تاول مشاهده شد. ترشحات تاول‌ها و پوسته‌های آن‌ها جمع‌آوری شده و پس از آماده‌سازی و فیلتر طبق روش بالا، سوسپانسیون ویروسی آماده شده بر روی خوکچه‌هندی تیتر گردید. پس از سازگار نمودن ویروس تب‌برفکی با کف پای خوکچه‌هندی، رقت‌های ۱/۲، ۱/۴، ۱/۸، ۱/۱۶، ۱/۳۲، ۱/۶۴ و ۱/۱۲۸ از این ویروس تهیه شده و هر رقت به یک گروه دوتایی خوکچه‌هندی جهت تعیین تیتر دز عفونی ۵۰ درصد (ID_{50}) تزریق گردید. خوکچه‌های تزریق شده به مدت یک هفته از نظر ظهور علایم بیماری تب‌برفکی (تاول در کف هر دو پا و دست و زبان) مورد بررسی قرار گرفتند. با توجه به تعداد خوکچه‌های که علایم بیماری را نشان دادند و با استفاده از فرمول رید و مونچ دز عفونی ۵۰ درصد محاسبه شد [۱۵، ۲۱].

۹.۲ واکسیناسیون و مواجهه حیوانات واکسینه شده با ویروس زنده در مدل خوکچه‌هندی واکسینه شده

در آزمون مواجهه ابتدا دوازده گروه خوکچه‌های هندی هر گروه حاوی پنج خوکچه‌هندی (به وزن تقریبی ۳۰۰-۳۵۰ گرم) انتخاب گردید. گروه اول تا پنجم با رقت‌های ۱، ۱/۲، ۱/۴، ۱/۸ و ۱/۱۶ واکسن پرتوتابی شده، گروه‌های ششم تا دهم با رقت‌های ۱، ۱/۲، ۱/۴، ۱/۸ و ۱/۱۶ واکسن مرسوم در دو دز به فاصله ۲۱ روز تلقیح شدند. گروه‌های یازده و دوازده به عنوان کنترل منفی بدون تزریق واکسن آماده گردید. ده روز پس از تزریق دز دوم واکسن کف پای تمام خوکچه‌های هندی با ۰/۲ میلی‌لیتر ویروس سازگار شده با کف پای خوکچه‌هندی با دز عفونی ۵۰ درصد مشخص و با تیتر ۱۰۰ ID_{50} به صورت داخل جلدی تزریق شدند [۱۵]. سپس علایم ظهور تاول در کف دو پا و دست‌ها تا یک هفته بررسی گردید. با توجه به تعداد حیواناتی که تاول در هر دو پا و یا دست‌های آن‌ها ظاهر شده و با استفاده از روش رید و مونچ [۱۳] دز حفاظتی ۵۰ درصد محاسبه گردید [۱۳، ۱۵].

۱۰.۲ مطالعات آماری

مقایسه میانگین‌ها برای نتایج تیترآنتی‌بادی خنثی‌کننده و ضریب شاخص تحریکی رشد لنفوسیت‌های طحال به روش آنالیز واریانس یک طرفه[1] با استفاده از نرم‌افزار اس‌پی‌اس‌اس-۱۶[2] تجزیه و تحلیل شدند [۲۲].

۳. نتایج

۱.۳ نتایج تیتراسیون ویروس‌های پرتوتابی شده و شاهد و تعیین ارزش D_{10} و دز پرتو الکترون

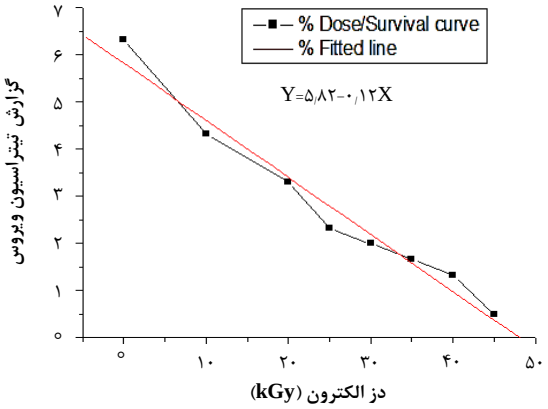
تیتر ویروس تب‌برفکی تایپ A-IRAN-۰۵ پرتوتابی شده و نشده به روش دز عفونت‌زایی کشت بافتی ۵۰ درصد و با استفاده از فرمول رید و مونچ محاسبه شده و در جدول ۱ مشاهده می‌شود. هم‌چنین با توجه به تیتر ویروس در دزهای مختلف پرتوتابی نمودار دز/ پایندگی با استفاده از نرم‌افزار Origin ۶.۱ رسم گردیده و معادله بهترین خط عبوری از منحنی به‌دست آمد که در شکل ۱ ملاحظه می‌شود. با کمک معادله خط، ارزش D_{10} و دز مطلوب غیرفعال‌سازی کامل ویروس به ترتیب ۸/۳۳ و ۵۲/۶۵ کیلوگری محاسبه شد. در جدول ۲ نتایج بررسی علایم تخریب سلولی در چهار پاساژ متوالی از نمونه‌های پرتوتابی شده در دزهای ۴۰، ۴۵ و ۵۰ کیلوگری مشاهده می‌شود با توجه به این نتایج دز مطلوب بیم الکترون جهت غیرفعال‌سازی ویروس تب‌برفکی تایپ A-IRAN-۰۵ با تیتر 10^6 در میلی‌لیتر که در هر چهار پاساژ متوالی هیچ علایم تخریب سلولی ایجاد نکند، پنجاه و پنج کیلوگری تعیین شد.

1. Anowa One-Way (LSD Method)
2. SPSS16

جدول ۱. تیتر نمونه‌های ویروس پرتوتابی شده با پرتو الکترون با دزهای ۰، ۱۰، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰ و ۵۰ کیلوگری

دز پرتوتابی الکترون	۰	۱۰ (۱۰/۷)	۲۰ (۲۱/۴)	۲۵ (۲۷/۱)	۳۰ (۳۲/۱)	۳۵ (۳۷/۸)	۴۰ (۴۲/۸)	۴۵ (۴۸/۵)	۵۰ (۵۳/۵)
تیتر ویروسی*	$10^{6/32}$	$10^{4/32}$	$10^{3/32}$	$10^{2/32}$	10^{2}	$10^{1/66}$	$10^{1/33}$	$10^{0/5}$	$10^{0/5}$

* (دز عفونت‌زایی ۵۰ درصد کشت بافتی در واحد میلی‌لیتر)



شکل ۱. منحنی دز/ پایندگی و معادله بهترین خطی عبوری از منحنی (برای نمونه‌های پرتوتابی شده با پرتو الکترون).

جدول ۲. تعیین دز مطلوب غیرفعال‌سازی بر اساس بررسی علایم سایتوپاتیک در نمونه‌های ویروسی پرتوتابی شده با الکترون

نمونه ویروس پرتوتابی شده	علایم سایتوپاتیک در پاساژ اول	علایم سایتوپاتیک در پاساژ دوم	علایم سایتوپاتیک در پاساژ سوم	علایم سایتوپاتیک در پاساژ چهارم
۴۵ kGy - نمونه ۱	-	+	+	+
۴۵ kGy – نمونه ۲	-	+	+	+
۵۰ kGy - نمونه ۱	-	+	+	+
۵۰ kGy – نمونه ۲	-	+	+	+
۵۵ kGy- نمونه ۱	-	-	-	-
۵۵kGy – نمونه ۲	-	-	-	-
۶۰ kGy - نمونه ۱	-	-	-	-
۶۰ kGy – نمونه ۲	-	-	-	-

۲.۳ نتیجه آزمون بی‌ضرری ویروس غیرفعال شده با بیم الکترون

پس از محاسبه دز مطلوب الکترون جهت غیرفعال‌سازی ویروس هشت نمونه ویروسی در سه دز ۴۵، ۵۰، ۵۵ و ۶۰ کیلوگری پرتوتابی شده و علایم سایتوپاتیک حاصل از کشت این نمونه‌های ویروسی پرتوتابی شده در رده سلولی BHK_{21} پس از ۴۸ ساعت بررسی گردید. پاساژ نمونه‌ها تا چهار مرحله پی در پی ادامه یافت و با توجه به نتایج جدول زیر دز مطلوب الکترون جهت غیرفعال‌سازی ویروس تب‌برفکی تایپ A-IRAN-۰۵ با تیتر 10^{6} $TCID_{50}$/mL میزان ۵۵ کیلوگری تعیین شد.

۳.۳ نتایج آزمون ثبوت کمپلمان به منظور بررسی خواص آنتی‌ژنیستی ویروس پرتوتابی شده با پرتو الکترون

با توجه به نتایج جدول زیر تغییرات خواص آنتی‌ژنی در نمونه‌های پرتوتابی شده نسبت به نمونه شاهد (صفر کیلوگری) مشاهده نشده است.

۴.۳ نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج به‌دست آمده می توان از روش پرتوتابی الکترون به منظور غیرفعال‌سازی ویروس تب‌برفکی تایپ A-IRAN-۰۵ با حفظ خواص آنتی‌ژنیک به منظور تولید واکسن پرتوتابی شده این بیماری استفاده نمود.

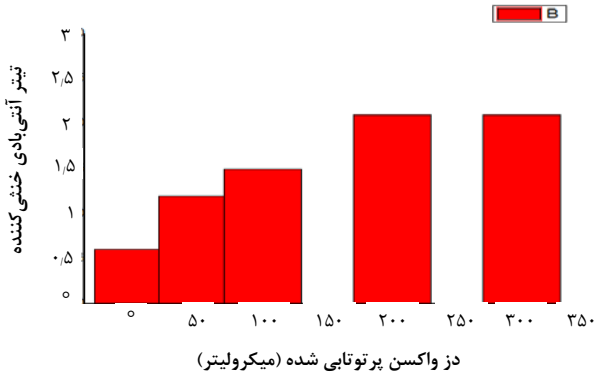
۵.۳ نتایج پاسخ‌های ایمنی و آزمون چلنج

نتایج پیش‌آزمون واکسن پرتوتابی شده با بیم الکترون در پنج گروه خوکچه‌هندی در شکل ۲ مشاهده می‌شود که با توجه به این شکل دز مناسب واکسن پرتوتابی شده جهت ایمنی‌زایی خوکچه‌هندی ۲۰۰ میکرولیتر انتخاب گردید. در این تحقیق جهت تعیین تیترآنتی‌بادی خنثی‌کننده در سرم خون حیوانات واکسینه شده و شاهد از روش آزمون خنثی‌سازی سرم استفاده گردید که نتایج آن در جدول ۳ مشاهده می‌شود. با توجه به نتایج تیترآنتی‌بادی می‌توان گفت که ایمنی هومورال در گروه خوکچه‌های هندی واکسینه شده با واکسن پرتوتابی با بیم الکترون نسبت به واکسن مرسوم اختلاف معنی‌داری ندارد ($P>0/05$).

هم‌چنین به منظور بررسی پاسخ ایمنی سلولی حیوانات واکسینه در این تحقیق میزان پاسخ‌دهی لنفوسیت‌های طحال نسبت به آنتی‌ژن تغلیظ شده ویروس تب‌برفکی تایپ O و میزان تکثیر این سلول‌ها در مجاورت با آنتی‌ژن به روش MTT اندازه‌گیری شد که نتایج آن در جدول ۳ نشان می‌دهد که در گروه خوکچه‌های هندی واکسینه شده با واکسن پرتوتابی با بیم الکترون نسبت به واکسن مرسوم اختلاف معنی‌داری وجود ندارد ($P>0/05$).

با توجه به تعداد خوکچه‌های هندی که با ویروس سازگار شده با کف پا تزریق شده بودند و پس از چند روز تاول در کف پای آن‌ها دیده شد و با استفاده از روش رید و مونچ دز عفونی

۵۰ درصد ($ID_{۵۰}$[1]) محاسبه شد که ۲۹۷/mL به دست آمد. در آزمون چلنج جهت مواجهه خوکچه‌های هندی واکسینه شده از این ویروس سازگار با کف پای حیوان با دز عفونی ۱۰۰ استفاده شد. پس از مواجهه خوکچه‌هندی‌های واکسینه شده با ویروس زنده سازگار شده با کف پای خوکچه‌هندی ظهور علایم بالینی بیماری به مدت یک هفته بررسی شده و با در نظر گرفتن تعداد خوکچه‌های که تاول در کف هر دو پاهای آن‌ها مشاهده گردید و با استفاده از روش رید ومونچ دز حفاظتی ۵۰ درصد[2] ($PD_{۵۰}$) محاسبه گردید که نتایج آن در جدول ۴ مشاهده می‌شود.



شکل ۲. نتایج تیتر آنتی‌بادی خنثی‌کننده در پیش‌آزمون واکسن پرتوتابی شده با بیم الکترون در خوکچه‌هندی.

جدول ۳. نتایج آزمون ثبوت کمپلمان نمونه‌های پرتوتابی شده با بیم الکترون

دز پرتوتابی	رقت‌های ویروس تب‌برفکی ساب تایپ A-Iran-۰۵			
	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
۵۵	۴	۴	Tr	۰

Tr: Trace

جدول ۴. نتایج پاسخ‌های ایمنی (تیترآنتی‌بادی خنثی‌کننده و میزان تکثیر لنفوسیت‌های طحال برحسب ضریب شاخص تحریکی) در حیوانات واکسینه شده

ردیف	نوع واکسن	تیترآنتی‌بادی خنثی‌کننده	ضریب شاخص تحریکی لنفوسیت‌های طحال	دز حفاظتی ۵۰ درصد $PD_{۵۰}$
۱	واکسن مرسوم	۲٫۱±۰٫۰	۱٫۲۲±۰٫۰۹۵	۶٫۱۳
۲	واکسن پرتوتابی شده	۲٫۱±۰٫۰	۱٫۲۶±۰٫۰۸	۶٫۲۸
۳	شاهد	۰٫۹ ≥	۰٫۹۸±۰٫۰۵	-

1. Infectious Dose 50 Percent (ID50)
2. Protective Dose 50 Percent (PD50)

۴. بحث و نتیجه‌گیری

هدف اصلی واکسن‌های دامی پیشگیری و کنترل بیماری‌های دامی می‌باشد. بیماری تب‌برفکی یک بیماری به‌شدت مسری در حیوانات زوج سم است که خسارات اقتصادی زیادی ایجاد می‌کند. این ویروس دارای ۷ سروتایپ بوده، سه سروتایپ آن در ایران رایج می‌باشند که شامل: O, A, Asia۱ می‌باشند؛ هر کدام از سروتایپ‌های A, O دارای چندین ساب تایپ می‌باشند. واکسنی که امروزه برای تب‌برفکی مورد استفاده قرار می‌گیرد، یک واکسن کشته شده و غیرفعال شده با مواد شیمیایی مثل اتیلن ایمین است که با ادجوانت‌های مناسب فرموله شده است. این واکسن دارای معایبی از جمله نیمه‌عمر کوتاه، باقی‌مانده‌های توکسیک و آلرژیک شیمیایی در واکسن، احتمال فرار ذرات ویروسی از تیمار با مواد شیمیایی و طولانی بودن زمان غیرفعال‌سازی و احتمال ایجاد تغییرات در ساختار پروتیینی ویروس می‌باشد. فواید استفاده از پرتوهای یون‌ساز به‌جای مواد شیمیایی جهت ساخت واکسن‌های غیرفعال عبارتند از: باقی‌مانده‌های توکسیک و آلرژیک در محصول نهایی (واکسن) به جا نمی‌ماند. هنگام استفاده از این پرتوها چون قدرت نفوذ آن‌ها بسیار زیاد است امکان فرار ذرات ویروسی وجود ندارد و خطر ابتلا به بیماری پس از واکسیناسیون از بین می‌رود. پرتوتابی در دمای پایین صورت می‌گیرد و مدت زمان پرتوتابی مطابق استانداردهای موجود فقط چند دقیقه است به همین دلیل امکان تغییر پروتیین‌های آنتی‌ژنتیک ویروس در روش پرتوتابی وجود ندارد [۱۸، ۲۳].

به‌منظور حل‌شدن مشکلات فوق، نیاز به تولید واکسن‌های نسل جدید مانند واکسن‌های پپتیدی، DNA واکسن‌ها و واکسن‌های پرتوتابی شده احساس می‌شود [۱۷، ۲۴]. به منظور مقایسه دستورالعمل‌های بین‌المللی برای غیرفعال‌سازی ویروس‌های موجود در نمونه‌های بیولوژیکی سه مدل ویروسی متفاوت در سرم گاوی با استفاده از دو روش غیرفعال‌سازی توسط پروس و همکارانش مورد مطالعه قرار گرفتند. این نمونه‌ها یا با دو غلظت متفاوت اتیلن ایمین (۵ و ۱۰ میلی‌مولار) در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۷۲ ساعت و یا با پرتوتابی بیم الکترون به صورت منجمد و مایع در دزهای متفاوت ۱۱ و ۴۶ کیلوگری تیمار شدند. اتیلن ایمین یک عامل آلکیله‌کننده[3] با گروه‌های سولفیدریل و آمینی می‌باشد و به عنوان عاملی برای غیرفعال‌سازی ویروس‌ها به‌کار می‌رود. اثر این ماده روی پروتیین‌ها نسبت به فرمالدئید و گلوتارآلدئید کم‌تر می‌باشد [۲۵]. غیرفعال‌سازی شیمیایی باعث منحنی‌های غیرخطی به

3. Alkylating

فرم نیمه‌لگاریتمی برای تیتر ویروسی در مقابل زمان غیرفعال‌سازی می‌شود که نشان‌دهنده سینتیک کاهش تیتر ویروسی به طور خطی فقط وابسته به غلظت یک ماده واکنش‌گر نیست[1]. به طوری که زمان لازم برای غیرفعال‌سازی هفت $\log_{10}$ پارووویروس خوکی (PPV) با هر دو غلظت اتیلن ایمین حدود ۲۴ ساعت بوده، برای پنج $\log_{10}$ ویروس اسهال ویروسی گاوی (BVDV) با هر دو غلظت اتیلن ایمین دو ساعت و برای شش $\log_{10}$ اینتروویروس خوکی (PEV) سه ساعت تعیین شد. غیرفعال‌سازی با پرتوتابی الکترون منجر به منحنی‌های تقریباً خطی نیمه‌لگاریتمی برای تیتر ویروس به دز پرتوتابی می‌شد و نشان‌دهنده غیرفعال‌سازی با سینتیک خطی فقط وابسته به غلظت یک ماده واکنش‌گر می‌باشد. نرخ غیرفعال‌سازی در حالت مایع تقریباً دو برابر سریع‌تر از نرخ غیرفعال‌سازی در حالت جامد است. ارزش‌های دزهای لازم برای کاهش عفونت‌زایی ویروسی به میزان $1\log_{10}$ برای غیرفعال‌سازی PPV به ترتیب ۱۱٫۸ و ۷٫۷ کیلوگری برای نمونه‌های منجمد و مایع تعیین شد. در حالی‌که برای BVDV ۴٫۹ و ۲٫۵ کیلوگری و برای PEV ۶٫۴ و ۴٫۴ کیلوگری به ترتیب در حالت منجمد و مایع محاسبه شد. در این مطالعه D_{10} value برای نمونه‌های پرتوتابی شده در حالت مایع بین ۵۱٪ و ۶۹٪ ارزش D_{10} برای همان نمونه در حالت منجمد تعیین گردید. از آن‌جایی‌که تشکیل رادیکال‌های آزاد در حالت مایع بیش‌تر از حالت منجمد می‌باشد، لذا برای غیرفعال‌سازی همان مقدار ویروس در حالت منجمد دز بالاتر لازم است. هم‌چنین در این تحقیق دز پرتوتابی الکترون برای غیرفعال‌سازی PPV (برای کاهش عفونت‌زایی به میزان چهار $\log_{10}$) در حالت مایع ۳۵ کیلوگری و در حالت منجمد ۵۵ کیلوگری تعیین شد [۲۵].

واکسیناسیون یکی از مهم‌ترین استراتژی‌ها برای کنترل و پیشگیری بیماری‌های ویروسی می‌باشد. پرتوتابی با پرتوهای یون‌ساز یک روش بسیار کارآمد برای غیرفعال‌سازی ویروس‌ها با حداقل تغییرات مولکولی در پروتیین‌ها و ساختار ویروس‌ها می‌باشد. اثر واقعی پرتوهای یون‌ساز مثل گاما و الکترون در ارتباط با آسیب به ساختار مولکولی اسیدنوکلئیک ویروسی می‌باشد. معتمدی و همکارانش (۲۰۰۱۷) در تحقیقی بر روی ویروس سندروم لکه سفید میگو با استفاده از روش پرتوتابی الکترون توانستند یک شبه واکسن علیه این بیماری تولید نمایند. آن‌ها ویروس سندروم لکه سفید را از میگوهای آلوده به ویروس که با روش Nested-PCR تأیید شده بودند جداسازی نموده (WSSV/IRN/۱/۲۰۱۰) و در همولنف خرچنگ دراز آب شیرین تکثیر نمودند. پس از تهیه استوک ویروسی از همولنف خرچنگ‌های عفونی شده با ویروس و تعیین تیتر ویروس به روش کربر که حدود $10^{5/4}$ LD_{50}/mL به‌دست آمد، نمونه‌های ویروسی با دزهای مختلف الکترون توسط بیم الکترون با قدرت ۱۰ مگا الکترون ولت و جریان ۲ میلی آمپر پرتوتابی شدند. ارزش D_{10} و دز مطلوب غیرفعال‌سازی ویروس با پرتو الکترون به ترتیب ۱٫۸۵ و ۳ کیلوگری به‌دست آمد. ویروس سندروم لکه سفید پرتوتابی شده با بیم الکترون (EBI-WSSV) به عنوان رادیوواکسن برای ایمن‌سازی میگو وانامی به صورت تزریق داخل عضلانی و غوطه‌وری در آب مورد استفاده قرار گرفت. ایمیونوژن پربیوتیک هم به عنوان افزودنی به رژیم غذایی میگوها برای بهبود پاسخ ایمنی استفاده شد. دز حفاظتی ۵۰ درصد برای گروه‌های میگو واکسینه شده با EBI-WSSV و EBI-WSSV به‌علاوه ایمیونوژن پربیوتیک، به ترتیب ۵٫۶۲ و ۶٫۰۲ به‌دست آمد. درصد بقا نسبی (RPS) برای گروه‌های EBI-WSSV، EBI-WSSV به‌علاوه ایمیونوژن پربیوتیک و ایمیونوژن پربیوتیک به تنهایی که به روش غوطه‌وری واکسینه شده بودند به ترتیب ۷۵٪، ۹۱٪ و ۲۵٪، و برای همین گروه‌ها که به روش تزریقی ایمن‌سازی شده بودند به ترتیب ۷۳٪، ۸۲٪ و ۱۸٫۵٪ محاسبه شد. تفاوت معنی‌داری در مرگ و میر تجمعی بین دو گروه واکسینه شده EBI-WSSV، EBI-WSSV به‌علاوه ایمیونوژن پربیوتیک مشاهده نشد ($P>0.05$) در حالی‌که بین این دو گروه با گروه شاهد تفاوت معنی‌دار مشاهده گردید ($P<0.05$) [۲۶].

لمباردو و اسمولکو در سال ۱۹۹۰ بر روی تولید رادیوواکسن و مواد بیولوژیکی با استفاده از پرتو گاما صاتع شده از چشمه کبالت ۶۰ مطالعه نمودند. آن‌ها توانستند با استفاده از پرتوهای الکترومغناطیس، واکسن غیرفعال بیماری تب‌برفکی با کیفیت آنتی‌ژنیک خوب و هزینه پایین تولید نمایند. در این تحقیق فن‌آوری پرتوتابی در مراحل اصلی تهیه یک واکسن ضد ویروسی به‌کار رفت. نتایج نشان داد که منحنی‌های غیرفعال‌سازی نه تنها به دز پرتو، نوع پرتو، نرخ پرتو، دما در طی فرایند پرتوتابی، ترکیبات شیمیایی و خواص مرفولوژیک ویروس وابسته می‌باشد [۲۷]. اسمولکو و لمباردو در سال ۲۰۰۵ نیز پرتوتابی گاما را برای غیرفعال‌سازی نسبی یا کامل ویروس‌های تب‌برفکی، هرپس سیمپلکس ویروس و RLV[2] استفاده نمودند. آن‌ها نشان دادند که منحنی غیرفعال‌سازی نه تنها به ویروس بلکه به سایر فاکتورهای خارجی مثل دز و نوع پرتو و دمای پرتوتابی و طبیعت مواد ویروسی در طی فرایند پرتوتابی بستگی دارد.

1. Non-First Order

2. Rauscher Leukemia Virus

هم‌چنین به خواص مرفولوژیکی ویروس مثل ساختار مولکولی و ترکیبات شیمیایی آن نیز بستگی دارد. نتیجه خوب این تحقیق کاربرد تئوری هدف برای غیرفعال‌سازی ویروس تب‌برفکی که به‌طور موفقیت‌آمیزی منجربه آنتی‌ژن غیرفعال این ویروس به صورت واکسن ضدبیماری تب‌برفکی شد. هم‌چنین مقدار یک میلیون دز این واکسن به طور تجاری تولید شد و گوساله‌ها را در مقابل بیماری محافظت نمود [۱۷]. شریف و مول باچر در سال ۲۰۱۰ نشان دادند که ویروس آنفولانزا A غیرفعال شده توسط پرتو گاما می‌تواند به عنوان یک کاندید واکسن پیشنهاد گردد. آن‌ها متوجه شدند که تجویز داخل بینی ویروس Flu A/RR/۸ پرتوتابی گاما شده به‌صورت تک دز باعث القای پاسخ ایمنی متقاطع در عفونت‌های هتروساب تایپی از جمله سویه آنفولانزای پرندگان $H_۵N_۱$ می‌شود. بنابراین روش تهیه ویروس آنفولانزای پرتوتابی شده با پرتو گاما یک فن‌آوری جدیدی برای تهیه واکسن آنفولانزا با اثر حفاظتی متقاطع شد [۲۸]. فورویا و همکارانش در دانشگاه ملی استرالیا در سال ۲۰۱۰ اثر روش‌های غیرفعال‌سازی بر پاسخ ایمنی متقاطع القا شده توسط ویروس‌های آنفولانزا A کشته شده را بررسی نمودند. آن‌ها کارآیی ویروس‌های غیرفعال شده با اشعه ماوری بنفش، فرمالین و پرتو گاما را برای القا پاسخ ایمنی در آزمون چلنج بر ضد ویروس هترولوگ و همولوگ بررسی نمودند. آن‌ها نشان دادند که در ویروس غیرفعال شده با پرتو گاما فعالیت هماگلوتیناسیون سه برابر کاهش داشته در حالی‌که در ویروس‌های غیرفعال شده با فرمالین و UV ده برابر کاهش داشته است. لذا نتایج نشان می‌دهد که پرتوتابی گاما در مقابل با سایر روش‌های غیرفعال‌سازی اثر تخریبی حداقلی روی ساختار پروتیینی ویروس دارد و ویروس غیرفعال شده با پرتو گاما بر خلاف ویروس غیرفعال شده به دو روش دیگر باعث القای ایمنی در ویروس‌های هتروساب تایپ گردید. هم‌چنین ویروس غیرفعال شده با پرتو گاما باعث القای پاسخ ایمنی سلولی از نوع لنفوسیت‌های T کشنده سلولی[1] شده در حالی‌که ویروس‌های غیرفعال شده با فرمالین و UV این‌طور نمی‌باشند. به‌طور کلی مشخص شد که واکسن آنفولانزای غیرفعال شده با پرتو گاما دارای ایمونوژنسیتی غالبی در مقایسه با سایر روش‌های رایج غیرفعال‌سازی تجاری بوده و باعث اثر حفاظتی بیش‌تری در مقابله با عفونت‌های هموتایپ و هتروتایپ این ویروس شده و منجر به کاهش پاسخ التهابی ریه و میزان ویروس در ریه میزبان گردیده است [۲۹]. معتمدی و همکارانش نشان دادند که واکسن آنفولانزا طیور ساب تایپ H۹N۲ غیرفعال شده به روش پرتوتابی گاما می‌تواند باعث القای پاسخ ایمنی در جوجه‌های گوشتی شود. هم‌چنین آن‌ها دو روش تلقیح واکسن هم تزریقی به صورت زیر پوستی و هم استنشاقی به صورت قطره داخل بینی را در جوجه‌ها مورد بررسی قرار دادند و ویروس پرتوتابی شده همراه با قند تری هالوز و بدون تری هالوز را نیز مورد بررسی قرار دادند. نتایج آن‌ها نشان داد تیترآنتی‌بادی و غلظت اینترفرون گاما در گروه‌های جوجه که با واکسن پرتوتابی شده با قند تری هالوز واکسینه شده بودند هم به روش تزریقی و هم به روش استنشاقی افزایش معنی‌داری نسبت به گروه‌های واکسینه با واکسن فرمالینه و گروه کنترل منفی داشت [۳۰].

واکسن‌های غیرفعال شده معمولاً از طریق تیمار عوامل بیماری‌زا با مواد شیمیایی مثل فرمالدئید یا بتاپروپیولاکتون تولید می‌شوند. این یک فرایند زمان‌بر است، و فرایندهای پایین دستی گسترده‌ای اغلب نیاز دارد. علاوه بر این، استفاده از مواد شیمیایی اجزای آنتی‌ژنی ویروس‌ها یا باکتری‌ها را تغییر می‌دهد و در نتیجه ویژگی آنتی‌بادی کاهش می‌یابد و در نتیجه باعث کم شدن تحریک پاسخ ایمنی مؤثر می‌شود. جاسمین و همکارانش (۲۰۱۶) یک روش جایگزین برای غیرفعال‌سازی عوامل بیماری‌زا با پرتوهای یون‌ساز پیشنهاد نمودند که باعث آسیب خیلی سریع به اسید نوکلئیک شده و ساختارهای آنتی‌ژنیک را حفظ می‌کند. هرچند که تکنولوژی پرتوتابی (گاما و الکترون با انرژی بالا) که اخیراً استفاده می‌شوند نیاز به حفاظ‌های پیچیده و بزرگی برای حفاظت محیط از رادیواکتیویتی دارند ولی الکترون با انرژی پایین (LEEI) به عنوان یک روش جایگزین غیرفعال‌سازی عوامل بیماری‌زا در حالت مایع توسط آن‌ها معرفی شد که می‌تواند در آزمایشگاه‌های نرمال با سطح ایمنی زیستی بالا و حداقل حفاظ لازم مورد استفاده قرار گیرد. آن‌ها کارآیی این روش (LEEI) را در غیرفعال‌سازی ویروس‌های مختلف مثل ویروس آنفولانزا نوع A– ساب تایپ H۳N۸، ویروس سندرم تنفسی و تناسلی خوک (PRRSV)، هرپس ویروس تایپ-۱ اسبی (EHV-۱)، و باکتری‌ها و حفظ خواص آنتی‌ژنیسیتی آن‌ها نشان دادند. علاوه بر این، ویروس‌های آنفلوانزای A غیرفعال‌شده با LEEI، پاسخ‌های ایمنی محافظتی را در حیوانات ایجاد می‌کنند، که با سنجش خنثی‌سازی ویروس و تعیین بار ویروسی در هنگام آزمون چالش ارزیابی می‌شوند. این نتایج برای روش‌های جدید توسعه و تولید واکسن‌های غیرفعال با کارایی بهبود یافته، پیام‌هایی دارد [۳۱].

پرتوهای گاما و الکترون هر دو از پرتوهای یون‌ساز بوده‌اند و مکانیسم اثر آن‌ها مشابه و بر ژنوم ویروس‌ها می‌باشد. تفاوت

1. Cytotoxic T Cell

آن‌ها این است که برای تولید پرتو گاما نیاز به رادیوایزوتوپ‌های مثل کبالت-۶۰ یا سزیم-۱۳۷ می‌باشد که در سامانه‌های پرتودهنده با حفاظ‌های سربی مناسب قرار داده می‌شوند که البته تهیه این رادیوایزوتوپ‌ها مشکلات عدیده‌ای را به همراه دارد. ولی جهت تولید پرتوالکترون نیاز به مواد رادیوایزوتوپ نمی‌باشد و از روش‌های ماشین‌های بیم الکترون و الکتریسیته برای تولید پرتو الکترون استفاده می‌شود [۳۲].

در این تحقیق مشخص شد که با افزایش دز پرتو الکترون، عفونت‌زایی نمونه‌های ویروسی به تدریج کاهش می‌یابد؛ دز مطلوب غیرفعال‌سازی ویروس تب‌برفکی سروتایپ A-IRAN-۰۵ ۵۵ کیلوگری تعیین شد. نتیجه آزمون بی‌ضرری غیرفعال‌سازی کامل ویروس را تأیید کرد و نتیجه آزمون ثبوت کمپلمان نشان داد که خواص آنتی‌ژنیک ویروس تب‌برفکی سروتایپ A-IRAN-۰۵ که با دز مطلوب غیرفعال شده بود نسبت به نمونه ویروسی شاهد تغییر معنی‌داری نداشتند بررسی پاسخ‌های ایمنی، مشخص نمود که در گروه‌های واکسن پرتوتابی شده و واکسن مرسوم نسبت به گروه شاهد ایمنی همورال افزایش یافته و تیتر آنتی‌بادی خنثی‌کننده آن‌ها حفاظتی است. بررسی ایمنی سلولی توسط آزمون تکثیر لنفوسیت‌های طحال نشان داد که در گروه‌های واکسن پرتوتابی شده و واکسن مرسوم از نظر ضریب شاخص تحریک لنفوسیت‌های طحال افزایش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد ایجاد شده است. هم‌چنین با توجه به نتایج آزمون مواجهه مشخص گردید که واکسن پرتوتابی شده تب‌برفکی سروتایپ A-IRAN-۰۵ می‌تواند اثر حفاظتی در مقابل ویروس زنده ایجاد نماید. در نهایت نتیجه‌گیری می‌شود که واکسن پرتوتابی شده تب‌برفکی به روش پرتوتابی الکترون می‌تواند کاندید مناسبی برای ایجاد ایمنی در حیوان و ایجاد اثر حفاظتی در مقابل ویروس زنده باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از همکاری پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای و مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی در حمایت از انجام این تحقیق تشکر می‌نمایند.

تأیید اخلاقی

کار با حیوانات آزمایشگاهی در این تحقیق طبق دستورالعمل بین‌المللی مورد تأیید دانشگاه تهران با کد EU Directive ۲۰۱۰/۶۳ انجام شده است.

مراجع

1. S. Alexandersen, et al., *The Pathogenesis and Diagnosis of Foot-and-Mouth Disease*, Comp. Path, **129**, 1-36 (2003).
2. M.J. Grubman, B. Baxt, *Foot-and-Mouth Disease*, Clini Microb Revie, **17**, 465-493 (2004).
3. W. Genoza, *Inactivation of viruses by ionizing radiation and by heat*, In K. aramorosch and H. Koprowski (ed.), Methods in virol. (Academic Press Inc., New York, 1968).
4. R.T. Jordan, L.L. Kempe, *Inactivation of some animal viruses with gamma radiation from cobalt 60*, Proc Soc Exp Biol Med, **91**, 212-215 (1956).
5. J.R. Polley, *The use of gamma radiation for the preparation of virus vaccines*, Can. J. Microbiol, **8**, 455-459 (1962).
6. S.B. Sohini, D.P. Suresh, *Ionizing Radiation Technologies for Vaccine Development A Mini Review*, Frontiers in Immunology, **13**, (2022). doi: 10.3389/fimmu.2022.845514.
7. H.S. Lemke, A.V. Sinskey, *Viruses and ionizing radiation in respect to waste water treatment*, Proceedings of the International Atomic Energy Association Symposium on Radiation for a Clean Environment. Int. Atomic Energy Assoc. (Vienna), **402**, 99-120 (1975).
8. J. Simon, G. Tamasi, *Data on the disinfection of liquid manure by gamma irradiation at Baja, Hungary*, Proceedings of the International Atomic Energy Association Symposium on Radiation for a Clean Environment.Int. Atomic Energy Assoc. (Vienna) STI PUB, **402**, 209- 216 (1975).
9. L.B. Sztanyik, et al, *Panel on the radiation treatment of wastes*, Proceedings of the International Atomic Energy Association Symposium on Radiation for a Clean Environment. Int. Atomic Energy Assoc. (Vienna) STI PUB, **402**, 645-656 (1975).
10. F.C. Thomas, et al, *Inactivation by Gamma Irradiation of Animal Viruses in Simulated Laboratory Effluent*, Appli. Enviro. Microbio. May, 1051-1056 (1982).
11. N.K. Blackburn, T.G. Besselaar, *A study of the effect of chemical inactivants on the epitopes of Rift Valley fever virus glycoproteins using monoclonal antibodies*, J. Virol. Methods, **33**, 367-374 (1991).
12. M. Lombard, P.P. Pastoret, A.M. Moulin, *A brief history of vaccines and vaccination*, Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz, **26,** 29-48 (2007).
13. L.J. Reed, H. Muench, *A Simple Method of Estimating Fifty Per Cent Endpoints*, Am. J. Epidemiol, **27**, 493-497 (1938).
14. C. Lei, et al., *On the Calculation of TCID50 for Quantitation of Virus Infectivity*, Virol. Sin, **36(1)**, 141-144 (2021).
15. Y. Jian-Zhong, et al., *Recombinant Bivalent Vaccine against Foot-and-Mouth Disease Virus Serotype O/A Infection in Guinea Pig*, Acta Biochimica et Biophysica Sinica, **36(9)**, 589–596 (2004).

16. L.M. Stark, A.L. Lewis, *Complement Fixation Test*, In: Specter S., Lancz G., editors. Clinical Virology Manual, (New York: Published Elsevier, 203-208, 1992).
17. E.E. Smolko, J.H. Lombardo, *Virus inactivation studies using ion beams, electron and gamma irradiation*, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research., B **236**, 249-253 (2005).
18. F. Motamedi Sedeh, et al., *Production of Foot and Mouth Disease Type O Vaccine by Nuclear and Molecular Methods*, Nuclear Science and Technology Research Institute, (1393) (In Persian).
19. M.J. Grubman, S.A. Lewis, D.O. Morgan, *Protection of swine against foot-and-mouth disease with viral capsid proteins expressed in heterologous systems*, Vaccine, **11(8)**, 825-829 (1993).
20. J. Roosien, et al., *Synthesis of foot-andmouth disease virus capsid proteins in insect cells using baculovirus expression vectors*, J. Gener.Virol, **71(8)**, 1703-1711 (1990).
21. J. Chinsangaram, et al., *Antibody response in mice inoculated with DNA expressing foot-and-mouth disease virus capsid proteins*, J. Virol, **72(5)**, 4454-4457 (1998).
22. N. Goris, 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, **26(27-28)**, 3432–3437 (2008).
23. F. Motamedi Sedeh, et al., *Production of Tetra-Valente Foot and Mouth Disease Vaccine by Nuclear Methods in Livestock (Cattle)*, Nuclear Science and Technology Research Institute, (1399) (In Persian).
24. F. Motamedi Sedeh, et al., *FMD virus type Asia-1 irradiated vaccine and evaluation of immune response on guinea-pig model*, Biol. J. Microoganism, **23**, 57-66 (2017).
25. T. Preuss, et al., *Comparison of two methods for inactivation of viruses in serum*, Clinical and Diagno Labor, Immunol, **4(5)**, 504-508 (1997).
26. F. Motamedi-Sedeh, et al., *Protection of Litopenaeus vannamei against white spot syndrome virus by electron-irradiated inactivated vaccine and prebiotic immunogen*, Radiation Physics and Chemistry, **130**, 421–425 (2017).
27. J.H. Lombardo, E.A. Smolko, *Biotechnology project with agamma radiation source of 100,000 Ci*, Radiat Phys Chem, **35 (4-6)**, 585-589 (1990).
28. M. Alsharifi, A. Mullbacher, *The c-irradiated influenza vaccine and the prospect of producing safe vaccines in general*, Immunol. Cell. Biol., **88**, 103–104 (2010).
29. Y. Furuya, et al., *Effect of inactivation method on the crossprotective immunity induced by whole 'killed' influenza A viruses and commercial vaccine preparations*, J. Gene. Virol, **91**, 1450–1460 (2010).
30. F. Motamedi Sedeh, et al., *Evaluation of Immune Responses and Histopathological Effects against Gamma Irradiated Avian Influenza (Sub type H9N2) Vaccine on Broiler*, Brazilian Archives of Biology and Technology, **63** (2020).
31. J. Fertey, et al., *Pathogens Inactivated by Low-Energy-Electron Irradiation Maintain Antigenic Properties and Induce Protective Immune Responses*, Viruses, **8(11)**, 319 (2016).
32. IAEA, *Database of Industrial Irradiation Facilities. E-Beam and X-ray (2022)*, https://nucleus.iaea.org/sites/diif/Pages/EBeam%20and%20XrayRT.aspx.

COPYRIGHTS
©2021 The author(s). This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY 4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, as long as the original authors and source are cited. No permission is required from the authors or the publishers.

استناد به این مقاله
فرحناز معتمدی سده، مهدی بهگر، سید مرتضی موسوی (۱۴۰۲)، ارزیابی اثر حفاظتی واکسن بیماری تب‌برفکی سروتایپ A-Iran-۰۵ غیرفعال شده به روش بیم الکترون در مدل خوکچه‌هندی، ۱۰۵، ۷۷-۸۷

DOI: 10.24200/nst.2022.1061.1717 **Url**: https://jonsat.nstri.ir/article_1435.html