DOI: 10.22092/VJ.2021.353376.1813
شماره ۱۳۴ بهار ۱۴۰۱
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

تولید آزمایشگاهی کاندیدای واکسن غیرفعال طاعون نشخوارکنندگان کوچک (PPR) و ارزیابی ایمنی‌زایی آن در گوسفند و بز

• **مرتضی اکبریان**
بخش پاتوبیولوژی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی ، تهران، ایران
• **هادی کیوانفر (نویسنده مسئول)**
بخش پاتوبیولوژی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی ، تهران، ایران
• **محسن لطفی**
موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
• **سید محمود عظیمی دزفولی**
موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزي، کرج، ایران
• **حمید رضا ورشویی**
موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزي، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹-۱۱-۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰-۰۱-۱۵
Email: hkeyvanfar2013@gmail.com

چکیده

بیماري طاعون نشخوارکنندگان کوچك (PPR) يك بيماري ويروسي مسري و حاد با واگیری و انتشار سریع در گوسفند و بز است که جهت پیشگیری از شیوع و کنترل این بیماری، واکسیناسیون دام‌ها بهترین راه حل می‌باشد. هدف این پژوهش، ارزیابی پاسخ ایمنی حاصل از واکسیناسیون با شش فرمولاسیون تهیه شده از واکسن غیرفعال PPR در بز و گوسفند، در قالب طرح کامل تصادفی با آرایش فاکتوریل ۲×۳ بود. ویروس تخفیف حدت یافته PPR در یک سلول لنفوئیدی سوسپانسیون دستکاری شده با قدرت پاساژ بسیار زیاد، تکثیر و سپس با استفاده از دو غیرفعال کننده (۴ mM بایناری اتیلن ایمین [BEI] و یا ۳٪ پراکسید هیدروژن [H_2O_2]) غیرفعال و سپس هر یک از ویروس‌های غیر فعال شده با استفاده از سه یاور مختلف (هیدرواکسید آلومینیوم، فسفات آلومینیوم و مخلوط ۵۰٪ هر یک از این دو ادجوآنت) فرمولاسیون شد. ارزیابی ایمنی‌زایی و بی‌ضرری واکسن‌های تهیه شده، به ترتیب با استفاده از دو دز ۰/۱ ml و ۱ (ده برابر دز) بر روی ۳۸ راس گوسفند و ۲۸ راس بز مورد مطالعه قرار گرفت. هر یک از دزهای مورد آزمایش، طی دو نوبت، در روزهای صفر و ۲۱ آزمایش به صورت زیرجلدی تزریق و سپس تیتر سرمی آنتی‌بادی علیه ویروس PPR در روزهای صفر، ۱۴، ۲۱، ۳۵، ۴۲ و ۶۰ پس از واکسیناسیون اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد میانگین تیتر آنتی‌بادی علیه ویروس PPR تا روز ۲۱ و ۶۰ پس از واکسیناسیون تحت تاثیر نوع غیرفعال‌کننده و همچنین ادجوانت قرار نگرفت (P>۰/۰۵). همچنین، بین غیرفعال‌کننده‌ها و ادجوانت‌های مختلف برهمکنش معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵). با این حال، ایجاد تیتر آنتی‌بادی مناسب در گروه‌های مختلف نشان از ایمنی‌زایی مناسب واکسن‌های فرموله شده داشت، هر چند باید کارآیی آن با استفاده از آزمایش چالش مورد ارزیابی بیشتر قرار گیرد. همچنین، بدلیل عدم خاصیت سرطان زایی، ارزان بودن و سازگاری با محیط زیست، H2O2 کاندیدای استفاده به عنوان غیرفعال کننده در ساخت واکسن غیرفعال PPR می‌باشد.

کلمات کلیدی: ویروس طاعون نشخوارکنندگان کوچک، غیرفعال‌کننده، واکسن کشته طاعون نشخوارکنندگان کوچک، ادجوآنت، گوسفند و بز

● Veterinary Researches & Biological Products No 134 pp: 48-57

Experimental production and immunogenicity evaluation of an inactivated Peste des Petits Ruminunts candidate vaccine in sheep and goat

By: Akbarian, M., Department of Pathobiology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. Keyvanfar, H., (Corresponding Author) Department of Pathobiology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. Lotfi, M., Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Education and Extension Research Organization(AREEO), Karaj, Iran. Azimi Dezfouli, S. M., Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Education and Extension Research Organization(AREEO), Karaj, Iran. and Varshoiee, H. R., Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Education and Extension Research Organization(AREEO), Karaj, Iran.

Received: 2021-01-30 Accepted: 2021-04-04

Email: hkeyvanfar2013@gmail.com

Peste des Petits Ruminunts (PPR) is an acute and contagious viral disease with rapid infection and transmission in sheep and goats. Vaccination of livestock is the best solution to prevent the spread and control of the disease. The aim of this study was to evaluate the immune response derived from vaccination with six formulations of inactivated PPR vaccine in goats and sheep using a completely randomized design with 2 × 2 factorial arrangement. The attenuated PPR virus was amplified in a highly manipulated suspension lymphoid cell having a high passage potential, and then inactivated using two inactivators (4 mM bromoethylene imine [BEI] or 3% hydrogen peroxide [H_2O_2]). Thereafter each inactivated virus was formulated using three different helpers (aluminum hydroxide, aluminum phosphate, and a 50% mixture of each of these two adjuvants). Iimmunogenicity and safety of the formulated candidate vaccines were evaluated by respective two doses of 0.1 and 1 (10-fold doses) ml of the vaccines administrated into 38 sheep and 28 goats. Each dose was subcutaneously administrated on 0 and 21 days of the experiment and post vaccination sera antibody titer against PPR virus was measured on days 0, 14, 21, 35, 42 and 60. The results showed that the mean antibody titer against PPR virus was not influenced neither by inactivator nor adjuvant up to 21- and 60-days post vaccination ($P> 0.05$). Also, no significant interaction was observed between different inactivators and adjuvants ($P> 0.05$). The appropriate antibody titers observed in different experimental groups indicated a good immunization of the formulated vaccines; however, their efficacy remained to be investigated using challenge test. Also, due to the lack of carcinogenicity, cheapness and environmental compatibility reported for H2O2, it is nominated as an inactivator in production inactivated PPR vaccine.

Keywords: Peste des Petits Ruminunts, inactivator, PPR killed vaccine, adjuvant, sheep and goat

مقدمه

بیماری طاعون نشخوارکنندگان کوچک (Peste des petits ruminants: PPR) یک بیماری ویروسی شدید و حاد با واگیری و انتشار سریع است که عمدتاً نشخوارکنندگان کوچک مثل گوسفند و بز را مبتلا می‌کند و با علائمی مانند تب ناگهانی، بی‌حالی و افسردگی شدید، ترشحات چشم و بینی، زخم دهان، تنگی نفس، اسهال بدبو و سرفه بروز می‌کند و در نهایت دام مبتلا به شدت لاغر شده و تلف می‌گردد (۲). سازمان بهداشت جهانی دام و سازمان خوارو بار و کشاورزی ملل متحد این بیماری را جزء گروه بیماری‌های بسیار مهم از نظر اقتصادی قرار داده اند (۲۰). متعاقب موفقیت در ریشه‌کنی بیماری طاعون گاوی، سازمان بهداشت جهانی دام (OIE) و سازمان خواربار و کشاورزی ملل متحد (FAO) در یک برنامه چهار مرحله‌ای، درصدد کنترل و ریشه‌کنی جهانی این بیماری هستند. این مراحل شامل ۱) عدم استفاده از واکسن و ارزیابی میزان شیوع در کشورهای آلوده به این بیماری؛ ۲) کنترل بیماري توام با فرآهم‌آوری امکانات آزمایشگاهی پیشرفته‌تر و آموزش کارکنان در سطح بالاتر به همراه استفاده از واکسن تخفیف حدت یافته PPR ۳) ریشه کني بیماري که طی آن کشورهای شرکت‌کننده به دلیل از بین رفتن مناطق اپیدمیک، معدوم‌سازي انجام داده یا در اواخر این مرحله به منظور مبارزه با بیماری از واکسن کشته یا تحت واحد PPR استفاده می‌شود و ۴) مرحله بعد از ریشه‌کنی بیماری که طی آن از تمام اقدامات کنترلی و پایشی برای پیشگیری از بیماری استفاده شود و در اوایل این مرحله فقط در مناطق محدودی واکسیناسیون با واکسن غیرفعال یا تحت واحد انجام گیرد.

در حال حاضر کشور ایران در مرحله دوم مبارزه با این بیماری قرار دارد و از واکسن زنده تخفیف حدت‌یافته استفاده می نماید. طبق برنامه مشترک OIE و FAO با موافقت ۳۳ کشور درگیر با این بیماری، کشورهایی مانند ایران که در مرحله دو برنامه هستند، به شرط کنترل بیماری می‌توانند از

سال ۲۰۲۰ وارد مرحله سوم گردند. بر این اساس، از سال ۲۰۲۰ استفاده از واکسن تخفیف حدت یافته PPR متوقف گردیده و در کانون های باقی مانده درگیر و مناطق پر ریسک از واکسن غیرفعال یا تحت واحد، برای ایمن سازی گله های حساس استفاده خواهد شد.

برای غیرفعال کردن ویروس‌ها، از غیرفعال‌کننده‌های مختلفی می‌توان استفاده کرد. در سال۱۹۸۰ استفاده از آزیریدین‌ها (استیل اتیلن آمین) براي اولين بار جهت غير فعال سازي ويروس ها توسط Uecker and Raettig انجام گرديد. سپس Hurst اولين واكسن ويروسي غير فعال شده با استيل اتيلن آمين را توليد نمود و استفاده از املاح آزيريدين براي غير فعال سازي ويروسهايي مانند ويروس بيماري تب برفكي، در سال ۱۹۷۷ و ۱۹۸۸ و همچنين ويروس نيوكاسل، در سال ۱۹۸۸ توسط دانشمندان بررسي گرديد (۲۵). در سال ۱۹۵۹ استفاده از استيل اتيلن آمين در غير فعال سازي ويروسها در آمريكا به عنوان پتنت ثبت گرديد. اولين گزارش از غير فعال سازي ويروس تب برفكي در ۱۹۵۹ توسط Crick and Brown منتشر شد(۱۷). در سال ۱۹۸۰ ، ويروس تب برفكي كه با استفاده از استيل اتيلن آمين غير فعال شده بود براي توليد واكسن بكار گرفته شد(۶). استفاده از مشتقات آزيريدين ها با تأثير بر روي اسيدهاي نوكلئوئيك و عدم آزردگي آنتي ژنهاي سطحي ويروسها علاوه بر اطمينان يافتن از غيرفعال شدگي كامل، انتظار مي رود كه ايمني حاصل در مقايسه با فرمالدئيد بيشتر باشد. افزون بر این، پراکسید هیدروژن یکی از مشهورترین مواد اکسید کننده می باشد که دارای خواص ضدمیکروبی و ضدعفونی کننده می باشد. به دلیل اثرگذاری آن بر روی طیف وسیعی از باکتری ها، ویروس ها و اسپورهای باکتریایی می توان از آن برای استریل کردن سطوح مختلف و ابزارهای جراحی استفاده نمود. همچنین FDA محلول پراکسیدهیدروژن ۳۰٪ را به دلیل تجزیه آن به اکسیژن و آب، به عنوان یک ماده شیمیایی بی خطر و سازگار با محیط زیست معرفی نموده است. این موضوع بدان معنی است که پراکسید هیدروژن برای تصفیه، نیازی به پردازش‌های پیچیده ندارد (۱۹).

از طرفی، استفاده از ادجوانت‌های مختلف بسته به نوع آنتی‌ژن ایمنی‌زایی واکسن ساخته شده را تحت تاثیر قرار می‌دهد. آلوم ادجوانتی است كه اولين بار در سال ۱۹۲۶ در مدل هاي حيواني مورد استفاده قرار گرفت و نزديک به يک قرن است كه براي واكسن هاي انساني استفاده می شود (۱۰). در حالی که در علم ايمنی‌شناسی، عبارت آلوم براي بيان همه ادجوانت‌هاي داراي آلومينيوم استفاده می شود (۱۰). چندين فرمولاسيون آلوم براي تحقيقات در دسترس است. هيدروكسيد آلومينيوم ادجوانتی است كه به خوبی می‌تواند بر ايمنی‌زايی آنتی‌ژن‌ها اثربخش باشد. اين تركيب كه با نام تجاري Alhydrogel شناخته می‌شود، داراي كريستال‌هاي هيدروكسيد آلومينيوم بوده و براي توليد و استفاده در واكسن‌هاي انسانی مورد تأييد سازمان غذا و دارو قرار گرفته است (۱۱). با توجه به موارد بيان شده، هدف از اين پژوهش در درجه نخست مقايسه ايمنی زايی اين واكسن با فرمولاسيون های مختلف(غيرفعال‌كننده‌ها و ادجوانت‌های متفاوت) در حيوان هدف می باشد.

مواد و روش‌ها

طرح آزمایشی

به منظور ارزیابی بی‌ضرری و ایمنی‌زایی حاصل از واکسیناسیون با واکسن غیرفعال PPR در حیوانات هدف، تعداد ۶۶ راس بز و گوسفند به‌طور تصادفی در شش گروه آزمایشی در قالب طرح کامل تصادفی با آرایش فاکتوریل ۲×۳ (شش گروه تیماری) تقسیم شدند. تیمارهای آزمایشی فرمولاسیون‌های مختلف واکسن غیرفعال PPR بودند که با غیرفعال‌سازی بذر واکسینال PPR (شرکت سیراد فرانسه) تکثیر یافته بر روی بستر سلول لنفوئیدی F۹ با استفاده از دو غیرفعال کننده (mM ۴ بایناری اتیلن ایمین [BEI] و یا ۳٪ پراکسید هیدروژن [H_2O_2]) و سپس فرمولاسیون با سه یاور مختلف (هیدرواکسید آلومینیوم، فسفات آلومینیوم و مخلوط ۵۰٪ هر یک از این دو این ادجوآنت)، تهیه شدند. ارزیابی ایمنی‌زایی و بی‌ضرری واکسن‌های تهیه شده، به ترتیب با استفاده از دو دز ۰/۱ ml و ۱ (ده برابر دز) بر روی ۳۸ راس گوسفند و ۲۸ راس بز مورد مطالعه قرار گرفت. هر یک از دزهای مورد آزمایش، طی دو نوبت، در روزهای صفر و ۲۱ آزمایش به‌صورت زیرجلدی تزریق و سپس تیتر سرمی آنتی‌بادی علیه ویروس PPR در روزهای صفر، ۱۴، ۲۱، ۳۵، ۴۲ و ۶۰ پس از واکسیناسیون اندازه‌گیری شد. فرمولاسیون‌های و تعداد حیوانات در گروه‌های مختلف شامل ۱) غیرفعال‌کننده BEI + هیدرواکسید آلومینیوم (شش راس گوسفند و چهار راس بز)، ۲) BEI +فسفات آلومینیوم (شش راس گوسفند و سه راس بز)، ۳) BEI + مخلوط ۵۰٪ از هیدرواکسید آلومینیوم و فسفات آلومینیوم (شش راس گوسفند و سه راس بز)، ۴) H۲O۲ + هیدرواکسید آلومینیوم (شش راس گوسفند و شش راس بز)، ۵) H۲O۲ + فسفات آلومینیوم (شش راس گوسفند و شش راس بز) و ۶) H۲O۲ + مخلوط ۵۰٪ از هیدرواکسید آلومینیوم و فسفات آلومینیوم (شش راس گوسفند و شش راس بز) بود. همچنین دو راس گوسفند به عنوان شاهد منفی (عدم تزریق واکسن) در نظر گرفته شد (جدول ۱).

تکثیر ویروس PPR

از سوبسترای سلول لنفوئیدی (سلول F۹ با منشاء عقده‌های لنفاوی گاو موجود در موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، جهت تکثیر ویروس PPR استفاده شده است (۱۸). در همین راستا سلول‌ها در ظروف سل اسپین تکثیر و در حجم ۵۰۰ ml تکثیر داده شد. برای تهیه غلظت نهایی (۱۰۵ ml × ۲ سلول)، سلول چندین نوبت مرتبه در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰٪ سرم گوساله پاساژ داده شد و در هر نوبت ابعاد فلاسک از ۲۵ به ۷۵ و از ۷۵ به ۱۷۵ cm^2 افزایش داده شد. به منظور کشت اولیه ویروس طاعون نشخوارکنندگان کوچک (PPRV) بر روی سلول لنفوئیدی، از بذر واکسینال ویروس تخفیف حدت‌یافته PPR استفاده شد. نمونه ویروسی با تیتر مشخص (10^6 ml/CCID۵۰) از فریز خارج و پس از محاسبه حجم مورد نیاز، ویروس با MOI ۰/۰۳، به سلول‌های کشت داده شده تلقیح گردید. سپس ظروف سل‌اسپین در انکوباتور با ۵٪ CO_2 و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سرعت چرخش دوران دستگاه روی ۷۰ rpm تنظیم شد. پس از ۴۸ ساعت به طور روزانه از سلول‌ها نمونه‌گیری شد و درصد سلول‌های زنده محاسبه و روند

تخریب سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفت. زمانی که درصد سلول‌های زنده به حدود ۱۵٪ رسید، محتویات ظروف فریز گردید. ظروف حاوی ویروس‌های فوق از فریز خارج و پس از ذوب و سانتریفیوژ در ۶۰۰ g (حدود ۲۵۰۰ rpm) به مدت ۲۰ تا ۳۰ min، مایع رویی حاوی ویروس تا زمان ادامه آزمایش، فریز شد (۸).

غیرفعال‌سازی ویروس و فرمولاسیون واکسن

جزییات روش غیرفعال‌سازی ویروس توسط اکبریان و همکاران (۳) گزارش شده است. به‌طور خلاصه، ویروس PPR (10^{6} ml/CCID50) با دو ماده باینایری اتیلن ایمین mM (BEI) ۴ و غلظت ۳٪ پراکسید هیدروژن (H_2O_2) غیرفعال گردید. سپس کینتیک تغییرات تیتر ویروس PPR بعد از غیرفعال‌سازی آن توسط BEI و H_2O_2 (۲۴) با نمونه‌گیری طی فواصل زمانی ۳۰ min و تیتراسیون ویروس انجام شد. به منظور خنثی‌سازی باینایری اتیلن ایمین در نمونه‌ها و در بالک واکسن، از تیوسولفات سدیم (Sigma-Aldrich, U.S.A) به نسبت ۲٪ v/v استفاده گردید. همچنین، غلظت ۳٪ H_2O_2 به منظور غیرفعال سازی ویروس PPR در دمای آزمایشگاه استفاده گردید (۱). برای خنثی سازی باقی‌مانده‌های H_2O_2 از آنزیم کاتالاز (MP Biomedical. U.S.A.) به میزان ۱۲/۵ U/ml به مدت ۱۰ min در دمای آزمایشگاه استفاده گردید. تیتر هر نمونه به روش میکروتیتراسیون مورد ارزیابی قرار گرفت. برای هر غیرفعال‌کننده، فرآیند با سه تکرار انجام و میانگین آن مورد استفاده قرار گرفت. به منظور فرمولاسیون واکسن، ۳۰۰ ml از ویرس غیرفعال شده توسط هر یک از غیرفعال‌کننده‌ها به سه بخش مجزا تقسیم شد. سپس هر یک از نمونه‌ها با یکی از ادجوانت‌های هیدرواکسید آلومینیوم، فسفات آلومینیوم و مخلوط ۵۰٪ از هر یک از ادجوآنت‌ها فرموله گردید. هر یک از واکسن‌های فرموله شده تا زمان ارزیابی‌های بعدی در دمای ۳ تا ۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۲۰).

آزمایش‌های کنترل کیفیت: آزمایش تعیین هویت با روش SN بدین صورت انجام گرفت که در واکسن کشته تهیه شده در حضور آنتی‌سرم هیچ آثار CPE روی سلول Vero مشاهده نگردید. در حالی‌که در چاهک‌های کنترل بخوبی آثار CPE مشاهده گردید. آزمایش‌های استریلیتی شامل آزمایشات بررسی آلودگی‌های مایکوپلاسمایی، قارچی و باکتریایی در تمامی مراحل انجام شد. همچنین، پس از تهیه فرمول‌های مختلف واکسن، آزمایش‌های کنترل کیفیت شامل استریلیتی، بی‌ضرری و آزمایش‌های فیزیکوشیمیایی انجام پذیرفت (۲۰). همچنین در آزمایش بی‌ضرری دمای رکتال گوسفندان و بزان تحت آزمایش در دوره پایش اخذ گردید. حیوانات مذکور علائم بالینی خاصی در طی دوره نداشتند.

واکسیناسیون و ارزیابی پاسخ‌های ایمنی

به منظور ارزیابی پاسخ‌های ایمنی، دو دز ۱ ml و ۰/۱ از هر یک از واکسن‌های فرموله شده به صورت زیرجلدی در روزهای صفر و ۲۱

جدول ۱- تیمارهای آزمایشی، گروه‌بندی حیوانات تحت آزمایش و دزهای تزریقی فرمول‌های مختلف تهیه شده از واکسن غیرفعال طاعون نشخوارکنندگان کوچک.

نام گروه	فرمولاسیون واکسن		نوع آزمایش	(ml) دز تزریق	روزهای تزریق	حیوان هدف تحت آزمایش
	غیرفعال‌کننده	ادجوانت				
۱	BEI	HA	ایمنی‌زایی	۰/۱	۰ و ۲۱	۳ راس گوسفند و ۲ راس بز
			بی‌ضرری	۱ (۱۰ برابر دز)	۰ و ۲۱	۳ راس گوسفند و ۲ راس بز
۲	BEI	PA	ایمنی‌زایی	۰/۱	۰ و ۲۱	۳ راس گوسفند و ۱ راس بز
			بی‌ضرری	۱ (۱۰ برابر دز)	۰ و ۲۱	۳ راس گوسفند و ۲ راس بز
۳	BEI	Mix	ایمنی‌زایی	۰/۱	۰ و ۲۱	۳ راس گوسفند و ۱ راس بز
			بی‌ضرری	۱ (۱۰ برابر دز)	۰ و ۲۱	۳ راس گوسفند و ۲ راس بز
۴	H_2O_2	HA	ایمنی‌زایی	۰/۱	۰ و ۲۱	۳ راس گوسفند و ۳ راس بز
			بی‌ضرری	۱ (۱۰ برابر دز)	۰ و ۲۱	۳ راس گوسفند و ۳ راس بز
۵	H_2O_2	PA	ایمنی‌زایی	۰/۱	۰ و ۲۱	۳ راس گوسفند و ۳ راس بز
			بی‌ضرری	۱ (۱۰ برابر دز)	۰ و ۲۱	۳ راس گوسفند و ۳ راس بز
۶	H_2O_2	Mix	ایمنی‌زایی	۰/۱	۰ و ۲۱	۳ راس گوسفند و ۳ راس بز
				۱ (۱۰ برابر دز)	۰ و ۲۱	۳ راس گوسفند و ۳ راس بز
شاهد منفی			۲ راس گوسفند			

آزمایش به حیوانات مورد آزمایش تزریق شد (۲۴). به حیوانات گروه شاهد، ml ۰/۱ سرم فیزیولوژی تزریق گردید. سپس برای ارزیابی تیتر آنتی‌بادی در روزهای ۰، ۱۴، ۲۱، ۳۵، ۴۲ و ۶۰ از همه‌ی دام‌ها خونگیری به عمل آمد. برای ارزیابی ایمنی‌زایی واکسن در دام‌ها، تیتر آنتی‌بادی علیه ویروس PPR به روش آزمایش خنثی‌سازی (Serum Neutralization: SN) اندازه‌گیری و با روش کربر محاسبه گردید. به طور خلاصه، سرم‌های تهیه شده از دام‌ها در بن‌ماری ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت نیم ساعت غیرفعال گردید. سپس با استفاده از محیط کشت DMEM از سرم‌ها رقت یک به دو تهیه گردید. سرم‌های غیرفعال شده به همراه ویروس PPR به سلول Vero منتقل می‌شوند. تشخیص آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده با نبود اثر سایتوپاتیک در سلول‌های Vero تعیین شد. بیشترین رقتی از سرم که از ایجاد اثر CPE جلوگیری نمود، به عنوان تیتر آنتی‌بادی خنثی کننده در نظر گرفته شد.

آنالیز آماری

نتایج با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS ۹,۴ با رویه MIXED به صورت داده‌های تکرار شده در زمان در قالب طرح بلوک کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل ۳×۲ مورد تجزیه واریانس دوطرفه قرار گرفت. پیش از آنالیز آماری، توزیع نرمال داده‌ها با استفاده از رویه UNIVARIATE و آزمون Shapiro-wilk بررسی شد. افزون بر اثرات اصلی (نوع غیرفعال‌کننده و نوع یاور)، برهمکنش بین اثر غیرفعال‌کننده و یاور نیز در مدل آماری مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. اثر گونه حیوانی و همچنین دوز تزریق به عنوان بلوک‌های تصادفی در مدل آماری قرار داده شد. مقایسات بین گروهی با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای توکی انجام شد و نتایج به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین (SEM) گزارش شد. ($P<۰/۰۵$) به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

نتایج

آزمایش‌های کنترل کیفی

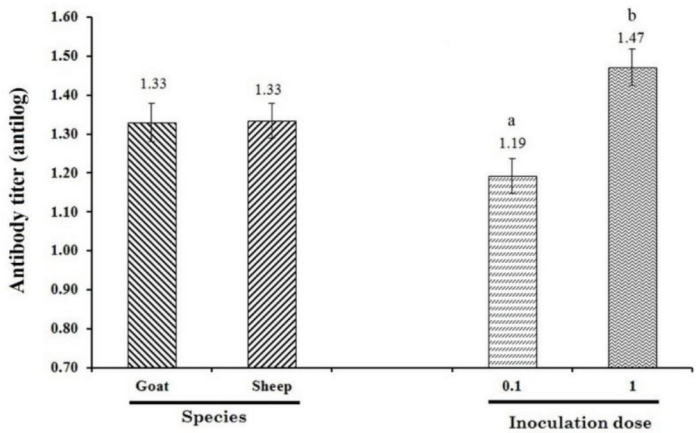
نتایج آزمایش‌های استریلیتی که در انتهای هر مرحله از فرآیند تولید و همچنین بر روی محصول نهایی انجام شد نشان از استریل بودن محصولات را داشت. همچنین در طول دوره انکوباسیون ۱۴ روزه، هیچ گونه کدورت ناشی از آلودگی در محیط‌های مایع تایو و TSB مشاهده نشد که نشان از عدم آلودگی این واکسن با عوامل میکروبی داشت. تزریق واکسن به میزان ده برابر دوز توصیه شده به عنوان آزمایش بی‌ضرری نیز نشان داد که محصولات تولیدی برای حیوانات هدف بی‌ضرر بودند، به طوری که با پایش دمای رکتال گوسفندان و بزان تحت آزمایش در یک دوره ۲۱ روزه بعد از تزریق واکسن‌های غیرفعال PPR، در دامنه طبیعی بود. همچنین طی دوره مطالعه، حیوانات تحت آزمایش علائم بالینی غیر طبیعی نداشتند.

ایمنی‌زایی

با توجه به اینکه در این پژوهش دو نوبت واکسیناسیون با واکسن‌های فرموله شده انجام شد، ایمنی‌زایی در دو مقطع شامل ۲۱ روز نخست که تنها اثر واکسیناسیون اول را در بر داشت و همچنین ایمنی‌زایی تا روز ۶۰ که شامل هر دو نوبت واکسیناسیون بود مورد ارزیابی قرار گرفت. گفتنی است اثر کل دوره که طی هفته‌های مختلف خونگیری بررسی شده است، در نتایج ارائه شده تا روز ۶۰ پس از واکسیناسیون قرار می‌گیرد و نتایج ایمنی‌زایی تا روز ۲۱ شامل نتایج سه هفته نخست می‌باشد.

ایمنی‌زایی تا روز ۲۱ پس از واکسیناسیون

تاثیر گونه‌ی حیوانی و دوز تزریق واکسن بر تیتر آنتی‌بادی علیه ویروس PPR طی ۲۱ روز نخست پس از واکسیناسیون با واکسن‌های غیرفعال در شکل (۱) گزارش شده است. نتایج نشان داد از زمان شروع آزمایش تا



شکل ۱- مقایسه‌ی اثر گونه‌ی حیوانی و دوز تزریق بر ایمنی‌زایی واکسن غیرفعال طاعون نشخوارکنندگان کوچک طی ۲۱ روز نخست پس از واکسیناسیون

روز ۲۱ پس از آن، تیتر آنتی بادی علیه ویروس PPR تحت تاثیر گونه‌ی حیوانی قرار نگرفت (P<۰/۰۵)، با این وجود، تزریق با دز ml ۱ در برابر ml ۰/۱ منجر به افزایش تیتر آنتی‌بادی علیه ویروس PPR شد (P<۰/۰۵). تاثیر غیرفعال‌کننده‌ها و یاورهای مختلف بر ایمنی‌زایی واکسن کشته‌ی طاعون نشخوارکنندگان کوچک در بز و گوسفند طی ۲۱ روز نخست پس از واکسیناسیون در جدول (۲) گزارش شده است. بر اساس نتایج، تیتر آنتی‌بادی علیه ویروس PPR بین غیرفعال‌کننده‌های BEI و H_2O_2 و همچنین بین یاورهای مختلف از نظر آماری تفاوتی معنی‌داری طی ۲۱ روز نخست آزمایش وجود نداشت. همچنین برهمکنش بین غیرفعال‌کننده و یاور نیز بر تیتر آنتی‌بادی علیه ویروس PPR تاثیر معنی‌داری نداشت (جدول ۲).

ایمنی‌زایی تا روز ۶۰ پس از واکسیناسیون

تاثیر گونه‌ی حیوانی و دز تزریق واکسن غیرفعال PPR بر تیتر آنتی‌بادی علیه ویروس PPR طی ۶۰ روز نخست پس از تزریق واکسن در شکل (۲) آورده شده است. نتایج نشان داد که میانگین تیتر آنتی‌بادی در بزها نسبت به گوسفندان به طور معنی‌داری بالاتر بود. همچنین، با تزریق دوز ml ۱ در برابر ml ۰/۱ واکسن، میانگین تیتر آنتی‌بادی به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (شکل ۱).

اثر غیرفعال‌کننده‌ها و یاورهای مختلف بر میانگین تیتر آنتی‌بادی علیه ویروس PPR طی ۶۰ روز نخست آزمایش در پی تزریق واکسن غیرفعال PPR در جدول (۳) گزارش شده است. بر اساس نتایج، بین غیرفعال‌کننده‌های BEI و H_2O_2 و همچنین بین یاورهای مختلف از نظر آماری تفاوتی معنی‌داری طی ۶۰ روز نخست آزمایش وجود نداشت (P<۰/۰۵). روند افزایش تیتر آنتی-بادی با تزریق واکسن‌های مختلف فرموله شده در شکل (۳) گزارش شده است. روند نسبتاً مشابهی بین گروه‌های مختلف تیماری از نظر روند تغییرات و افزایش تیتر آنتی‌بادی علیه ویروس PPR مشاهده شد. بین گروه‌های تیماری از نظر میانگین

جدول ۲- تاثیر غیرفعال‌کننده و یاورهای مختلف بر ایمنی‌زایی واکسن کشته‌ی طاعون نشخوارکنندگان کوچک در بز و گوسفند طی ۲۱ روز نخست پس از واکسیناسیون.

Main effect	Item	SE	
Inactivant	BEI	۱،۳۶	۰،۰۵
	H۲O۲	۱،۳۰	۰،۰۴
Adjuvant	HA	۱،۳۷	۰،۰۶
	Mix	۱،۳۲	۰،۰۶
	PA	۱،۳۱	۰،۰۶
Inactivant×Adjuvant	BEI× HA	۱،۴۳	۰،۰۸
	BEI× Mix	۱،۳۸	۰،۰۹
	BEI× PA	۱،۲۸	۰،۰۹
	H۲O۲× HA	۱،۳۱	۰،۰۸
	H۲O۲× Mix	۱،۲۶	۰،۰۷
	H۲O۲× PA	۱،۳۳	۰،۰۷
P value	Inactivant	۰،۳۳	-
	Adjuvant	۰،۶۸	-
	Inactivant×Adjuvant	۰،۵۱	-

توجه: HA: Hydroxide aluminum; PA: Phosphate aluminum.

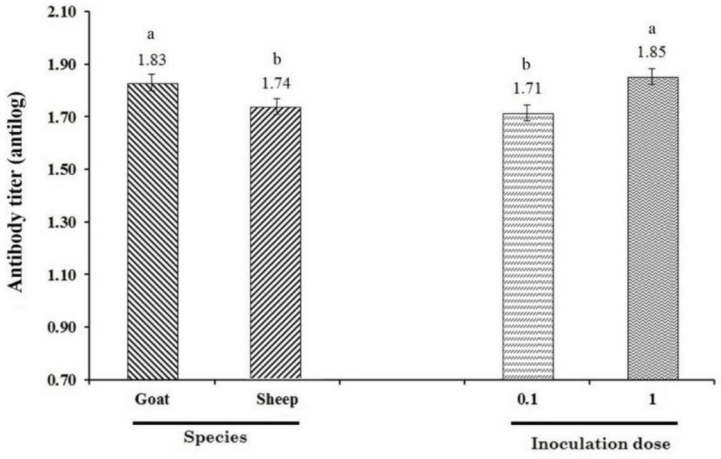
تیتر آنتی‌بادی در مقاطع زمانی مختلف پس از واکسیناسیون اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

بحث

در این مطالعه، از ویروس PPR (strain ۱/۷۵ Nigeria) برای تولید یک واکسن جدید تک‌گانه غیرفعال استفاده شد و ایمنی‌زایی آن در حیوان هدف (گوسفند و بز) مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین، اثر دز تزریق و گونه‌ی حیوانی نیز بر تیتر آنتی‌بادی علیه ویروس PPR مورد سنجش قرار گرفت. نتایج نشان داد که استفاده از دز یک میلی‌لیتر توانست تیتر بالاتری را طی مقاطع زمانی مختلف بدون اثر منفی بر حیوانات مورد ارزیابی ایجاد نماید. این موضوع نشان می‌دهد که واکسن‌های تهیه شده با هر دو غیرفعال‌کننده و ترکیب آن با ادجوانت‌های مختلف، بی‌ضرر بوده و می‌توان در صورت تایید سایر آزمایش‌های کنترل کیفیت، مورد استفاده قرار گیرد. با توجه به اینکه تزریق تیتر بالاتر ویروس (یک میلی‌لیتر)، سیستم ایمنی را بیشتر و سریعتر تحریک می‌کند، بالاتر بودن تیتر آنتی‌بادی علیه ویروس PPR که در حیوانات دریافت‌کننده ۱ ml از واکسن‌های تهیه شده مشاهده گردید، قابل پیش‌بینی و مورد انتظار بود. در این راستا، رونچی و همکاران (۲۴) نیز تزریق ۱ ml برمواتیلن ایمین توانست تیتر مناسبی را در استفاده از واکسن کشته طاعون نشخوارکنندگان کوچک در بز بدست آورند. افزون بر این، یافته‌های این پژوهش نشان داد که اگر چه از زمان شروع آزمایش تا روز ۲۱ پس از آن، تیتر آنتی‌بادی علیه ویروس PPR تحت تاثیر گونه‌ی حیوانی قرار نگرفت، اما بررسی نتایج تا روز ۶۰ مشخص نمود که میانگین تیتر آنتی‌بادی در بزها نسبت به گوسفندان به طور معنی‌داری بالاتر بود. لفور و همکاران (۱۵) بیان کردند که بز نسبت به گوسفند به بیماری PPR حساس‌تر می باشد، لذا در تزریق واکسن با یک تیتر برابر، تیتر ایمنی بالاتری رادر بزها نسبت به گوسفندان به دنبال خواهد داشت.

در این پژوهش، آنتی ژن تهیه شده از ویروس با غیرفعال‌کننده‌های BEI و H۲O۲ به طور موفقیت‌آمیزی غیرفعال گردید. BEI فقط بر روی اسید نوکلوئیک اثر کرده و تاثیری بر روی پروتئین‌های کپسید ندارد (۶). همچنین، BEI برای غیرفعال‌سازی سایر ویروس‌ها همانند هاری (۱۴)، تب برفکی (۹)، زبان آبی(۱۲)، پارووویروس خوکی(۲۳) و بیماری نیوکاسل پرندگان (۱۳) و اخیراً ویروس PPR (۲۴) مورد استفاده قرار گرفته است. در مقابل، از H_2O_2 برای غیرفعال‌سازی ویروس هاری (۲۲) استفاده شده است. برای اولین بار، در این مطالعه از H۲O۲ برای غیرفعال‌سازی ویروس PPR استفاده شد. واکسن کشته PPR با دو غیرفعال کننده BEI و H_2O_2 به ترتیب تیتر آنتی‌بادی در حد ۱/۱۷۸ (۲/۲۵ antilog) و ۱/۳۵۵ (۲/۵۵ antilog) ایجاد نمود؛ در حالی‌که سطح استاندارد حفاظت بر علیه ویروس PPR حداقل تیتر ۱/۱۰ می‌باشد (۲۰). این موضوع نشان از ایمنی‌زایی مناسب واکسن‌های فرموله‌شده دارد.

در بررسی میانگین تیتر آنتی‌بادی بین دو غیرفعال‌کننده BEI و H_2O_2 تا روز ۲۱ و ۶۰ روزگی پس از واکسیناسیون، اختلافی معناداری مشاهده نگردید. این موضوع نشان می‌دهد که استفاده از غیرفعال‌کننده H_2O_2 همانند BEI توان غیرفعال‌سازی ویروس PPR را دارا بوده و بر ایمنی‌زایی ویروس نیز تاثیر منفی ندارد. Novak و (۱۹) با مطالعه بر روی اثرات غیر فعال کننده‌های مختلف، هر دو غیرفعال‌کننده H_2O_2 و BEI را گزینه‌های بسیار خوبی برای فرآیند غیرفعال‌سازی اکثر ویروس‌ها معرفی نمودند. همچنین، رونچی و همکاران (۲۴) بر روی اثرات غیرفعال‌کنندگی BEI بر روی حیوان هدف (بز) تحقیقاتی را انجام داد و گزارش کردند که استفاده از این غیرفعال‌کننده موجب غیرفعال شدن موفقیت‌آمیز ویروس PPR شده است. در تحقیق دیگری عبدالغفار و همکاران (۱) بر روی ویروس هاری و اثر غیرفعال‌کنندگی H_2O_2 انجام دادند، مشخص شد که غلظت ۳٪ H_2O_2 با موفقیت این ویروس را غیرفعال نمود. پراکسید هیدروژن به عنوان یکی از مشهورترین عناصر اکسیدکننده، دارای خواص



شکل ۲- مقایسه‌ی اثر گونه‌ی حیوانی و دز تزریق بر ایمنی‌زایی واکسن غیرفعال طاعون نشخوارکنندگان کوچک طی ۶۰ روز نخست پس از واکسیناسیون.

ضدمیکروبی و ضد عفونی کنندگی می‌باشد و بر اساس اثرات وسیعی که در خصوص از بین بردن میزان بسیار وسیعی از باکتری‌ها، اسپور باکتری‌ها و ویروس‌ها دارد، از آن برای ضدعفونی نمودن سطوح و وسایل جراحی استفاده می‌شود (۴). یکی از ویژگی‌های مهم H۲O۲ زیست‌سازگار بودن آن نسبت به سایر ترکیبات مورد استفاده برای غیرفعال‌سازی است؛ به‌طوری که حتی محلول ۳۰ درصد H۲O۲ بر محیط زیست اثر سویی نداشته و در طبیعت به آب و اکسیژن تبدیل می‌شود. به علاوه، عوامل اکسیدکننده همانند H۲O۲ یکی از بخش‌های ضروری سیستم ایمنی ذاتی در پستانداران به‌شمار می‌آیند (۱۶). در گذشته گمان می‌شد H_2O_2 با اثر بر روی ساختار پروتئینی به مولکول‌های پایه آسیب وارد می‌نماید؛ از این رو در صنعت تولید واکسن‌های غیرفعال شده مورد استفاده قرار نمی‌گرفت (۷). اما، امروزه قضاوت بر روی اثر غیرفعال‌کنندگی H_2O_2 متفاوت است، به طوری که طیف وسیعی از DNA و RNA ویروس‌ها را غیرفعال می‌نماید، ولی در مقایسه با بتاپروپیولاکتون و فرمالین، آسیب بسیار پایینی را به آنتی‌ژن‌های سطحی وارد می‌نماید. همچنین، پراکسید هیدروژن باعث افزایش ترشح آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده و افزایش عملکرد سلول‌های لنفوسیت T می‌شود (۵).

نتایج پژوهش حاضر نشان داد نوع ادجوانت (هیدرواکسید آلومینیوم، فسفات آلومینیوم و مخلوط ۵۰٪ این دو ادجوانت) مورد استفاده در مقاطع زمانی ۲۱ و ۶۰ پس از واکسیناسیون بر میانگین تیتر آنتی‌بادی بر علیه ویروس PPR تاثیر معناداری نداشت. همچنین، برهمکنش مثبت و یا منفی بین اثر غیرفعال‌کننده‌ها و ادجوانت‌ها مشاهده نشد. این موضوع نشان می‌دهد که نه تنها بین خود ادجوانت‌های مختلف تفاوتی از تاثیر بر ایمنی‌زایی محصول فرموله شده با آن وجود ندارد، بلکه فرمولاسیون‌های مختلف حاصل از ترکیب غیرفعال‌کننده و ادجوانت‌های مختلف، بر تیتر آنتی‌بادی علیه ویروس PPR با یکدیگر نیز تفاوتی

جدول ۳- تاثیر غیرفعال‌کننده و یاورهای مختلف بر میانگین تیتر آنتی‌بادی حاصل از تزریق واکسن کشته‌ی طاعون نشخوارکنندگان کوچک در بز و گوسفند طی ۶۰ روز نخست پس از واکسیناسیون.

Main effect	Item	Antibody titer (log ۲)	SE
Inactivant	BEI	۱,۷۶	۰,۰۳
	H۲O۲	۱,۸۱	۰,۰۳
Adjuvant	HA	۱,۸۰	۰,۰۴
	Mix	۱,۷۸	۰,۰۴
	PA	۱,۷۷	۰,۰۴
Inactivant×Adjuvant	BEI× HA	۱,۸۰	۰,۰۵
	BEI× Mix	۱,۷۴	۰,۰۶
	BEI× PA	۱,۷۴	۰,۰۶
	H۲O۲× HA	۱,۸۱	۰,۰۵
	H۲O۲× Mix	۱,۸۲	۰,۰۴
	H۲O۲× PA	۱,۸۰	۰,۰۵
P value	Inactivant	۰,۲۴	-
	Adjuvant	۰,۸۰	-
	Inactivant×Adjuvant	۰,۷۸	-

توجه: حیوانات در روزهای صفر و ۲۱ آزمایش، با واکسن‌های فرموله شده مختلف واکسینه شده‌اند؛ HA= Hydroxide aluminum، PA= Phosphate aluminum.

ندارند. پارک و همکاران (۲۱) نیز به این نتیجه رسیدند که استفاده از ژل آلومینیوم هیدروکساید در مقابل ادجوآنت فسفات آلومینیوم در بز شیری می‌تواند منجر به افزایش پاسخ آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده شود که همین نتیجه مشابه در خوک نیز اخذ شده است؛ با این حال، در آزمایش حاضر، بین ادجوانت‌های مختلف تفاوت معنی‌داری از نظر افزایش تیتر آنتی‌بادی علیه ویروس PPR مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری کلی

با تمامی ارزیابی‌های صورت گرفته می‌توان به این نتیجه رسید که به دلیل یکسان بودن اثرات تیتر واکسن با استفاده از غیرفعال‌کننده‌های BEI و H۲O۲ و خاصیت سرطان زایی BEI و همچنین عدم ایجاد اثرات زیست محیطی توسط H۲O۲ و ارزان بودن آن، استفاده از پراکسید هیدروژن می‌تواند جایگزین مناسبی برای BEI در تهیه واکسن PPR باشد، هرچند برای تصمیم‌گیری قطعی به مطالعات بیشتری نیاز است.

منابع مورد استفاده

1- Abd-Elghaffar, A. A. 2015. Study of In vitro inactivation of rabies virus by hydrogen peroxide. MSthesis. Cairo University, Cairo

2- Abdollahpour, G., A. Raoofi, J. Najafi, F. Sasani and E. Sakhaie. 2006. Clinical and para-clinical findings of a recent outbreaks of peste des petits ruminants in Iran. *Journal of Veterinary Medicine,* Series B 53: 14-16.

3- Akbarian, M., H. Keyvanfar, M. Lotfi, S. Azimi Dezfuli and H. Varshovi. 2020. Preparation of an inactivated Peste des Petits Ruminants (PPR) vaccine and its comparative immunogenicity evaluation in animal model (In press). *Archives of Razi Institute*.

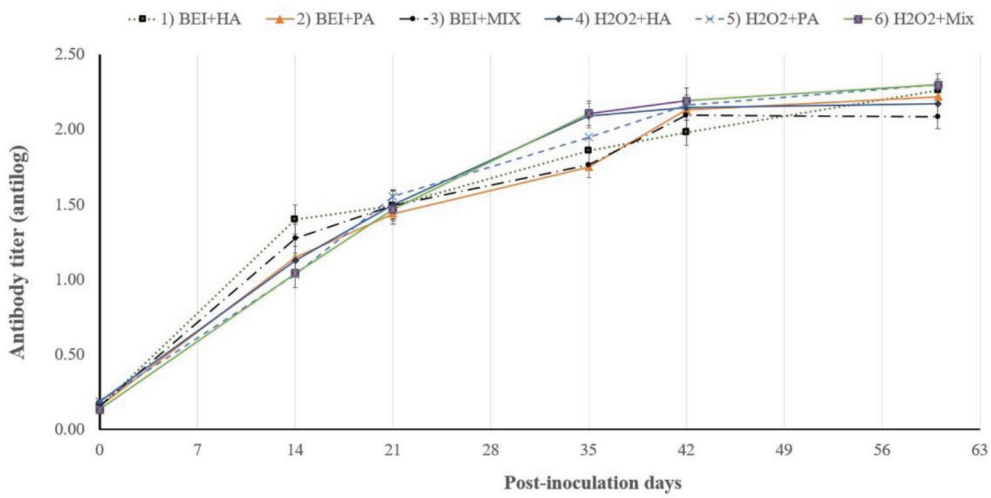
4- Altamimi, M. J., J. C. Greenwood, K. Wolff, M. E. Hogan, A. Lakhani, G. P. Martin and P. G. Royall. 2019. Anti-counterfeiting DNA molecular tagging of pharmaceutical excipients: An evaluation of lactose containing tablets. *International Journal of Pharmaceutics* 571: 118656.

5- Amanna, I. J., H.-P. Raué and M. K. Slifka. 2012. Development of a new hydrogen peroxide–based vaccine platform. *Nature Medicine* 18: 974-979.

6- Bahnemann, H. G. 1990. Inactivation of viral antigens for vaccine preparation with particular reference to the application of binary ethylenimine. *Vaccine* 8: 299-303.

7- Betts, D., C. Elliott and M. Sykes. 1974. Derivation of high field expansions for Ising model on the hydrogen peroxide lattice. *Journal of Physics* A: Mathematical, Nuclear and General 7: 1323.

8- Dheda, K., T. Gumbo, G. Maartens, K. E. Dooley, M. Murray, J. Furin, E. A. Nardell, R. M. Warren, A. Esmail and E. Nardell. 2019. The Lancet Respiratory Medicine Commission: 2019 update: epidemiology, pathogenesis, transmission, diagnosis, and management of multidrug-resistant and incurable tuberculosis. *The Lancet Respiratory Medicine* 7: 820-826.



شکل ۳- روند افزایش تیتر آنتی‌بادی در پی تزریق واکسن کشته‌ی طاعون نشخوارکنندگان کوچک غیرفعال شده با غیرفعال-کننده‌های مختلف (BEI و H۲O۲) و فرموله شده با یاورهای مختلف (HA، PA و یا MIX) در بز و گوسفند.

توجه: حیوانات در روزهای صفر و ۲۱ آزمایش، با واکسن‌های فرموله شده واکسینه شدند؛ Mix= مخلوط PA+HA.

9- Dilovski, M. and P. Tekerlekov. 1983. Comparative testing of the quality of foot-and-mouth disease vaccines prepared with different virus inactivators. *Veterinarno-Meditsinski Nauki* 20: 41-45.
10- Hew-Butler, T., M. H. Rosner, S. Fowkes-Godek, J. P. Dugas, M. D. Hoffman, D. P. Lewis, R. J. Maughan, K. C. Miller, S. J. Montain and N. J. Rehrer. 2015. Statement of the third international exercise-associated hyponatremia consensus development conference, Carlsbad, California, 2015. *Clinical Journal of Sport Medicine* 25: 303-320.
11- Jankovic, D., P. Caspar, M. Zweig, M. Garcia-Moll, S. D. Showalter, F. R. Vogel and A. Sher. 1997. Adsorption to aluminum hydroxide promotes the activity of IL-12 as an adjuvant for antibody as well as type 1 cytokine responses to HIV-1 gp120. *The Journal of Immunology* 159: 2409-2417.
12- Karickhoff, S. W., D. S. Brown and T. A. Scott. 1979. Sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments. *Water Research* 13: 241-248.
13- King, D. 1991. Evaluation of different methods of inactivation of Newcastle disease virus and avian influenza virus in egg fluids and serum. *Avian Diseases*: 505-514.
14- Larghi, O. P. and A. Nebel. 1980. Rabies virus inactivation by binary ethylenimine: new method for inactivated vaccine production. *Journal of Clinical Microbiology* 11: 120-122.
15- Lefèvre, P.-C. and A. Diallo. 1990. Peste des petits ruminants. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 9: 935-981.
16- Linley, E., S. P. Denyer, G. McDonnell, C. Simons and J.-Y. Maillard. 2012. Use of hydrogen peroxide as a biocide: new consideration of its mechanisms of biocidal action. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67: 1589-1596.
17- Lugo, A. E. and S. Brown. 1992. Tropical forests as sinks of atmospheric carbon. *Forest Ecology and Management* 54: 239-255.
18- Mofrad, S., M. Lotfi and M. Parsania. 2016. Comparison of vero and a new suspension cell line in propagation of peste des petits ruminants virus (PPRV). International conference on agriculture and animal science.
19- Novak, J. L., J. W. Pease and L. D. Sanders. 2015. Agricultural policy in the United States: evolution and economics. 1 ed. Routledge. Oklahoma, USA.
20- OIE. Section. 2017. Infection with Peste des Petits ruminants virus. Terrestrial Animal Health Code. OIE. Paris.
21- Park, M.-E., S.-Y. Lee, R.-H. Kim, M.-K. Ko, K.-N. Lee, S.-M. Kim, B.-K. Kim, J.-S. Lee, B. Kim and J.-H. Park. 2014. Enhanced immune responses of foot-and-mouth disease vaccine using new oil/gel adjuvant mixtures in pigs and goats. *Vaccine* 32: 5221-5227.
22- Ragab, S. M., S. K. Abd Elghaffar, T. H. El-Metwally, G. Badr, M. H. Mahmoud and H. M. Omar. 2015. Effect of a high fat, high sucrose diet on the promotion of non-alcoholic fatty liver disease in male rats: the ameliorative role of three natural compounds. *Lipids in Health and Disease* 14: 1-11.
23- Rivero, V., G. Gualandi, C. Buonavoglia and P. Mortarino. 1988. A study on the susceptibility of minipig kidney (MPK) and rabbit kidney (RK13) cell line cultures to the lapinized Chinese strain of hog cholera virus. *Microbiologica* 11: 371-378.
24- Ronchi, G. F., F. Monaco, M. Harrak, L. Chafiqa, S. Capista, G. Bortone, G. Orsini, C. Pinoni, M. Iorio and F. Iapaolo. 2016. Preliminary results on innocuity and immunogenicity of an inactivated vaccine against Peste des petits ruminants. *Veterinaria Italiana* 52: 101-109.
25- Soliman, E., S. Mahdy, W. Mossad, A. Hassanin and E. El-Sayed. 2013. Effect of different inactivators on the efficacy of Egyptian foot and mouth disease SAT2 vaccine. *Journal of Animal Science Advances* 3: 388-395.