

کمیت، کیفیت، اثربخشی و طول دوره ایمنی واکسن‌های تب برفکی در گاو شیری



تنظیم کننده:

واحد تحقیق، توسعه و نوآوری

هلدینگ صنایع لبنی تامین

اردیبهشت ۱۴۰۴

## خصوصیات ویروس تب برفکی

بی شک در طول تاریخ بروز بیماری‌های دامی، تب برفکی یکی از شاخص‌ترین و مهم‌ترین بیماری ویروسی دامی است که توان بالقوه زیادی برای ایجاد خسارات شدید اقتصادی در حیوانات زوج سم دارد. ویروس تب برفکی قابلیت فراوانی برای تغییرات ژنتیکی و آنتی ژنتیکی از خود نشان می‌دهد و تاکنون هفت سروتیپ مجزا از این ویروس شناسایی شده که شامل A, O, C, Asia1, SAT1, SAT2, SAT3 می‌باشند. عفونت با یک سروتیپ نمی‌تواند دام حساس را در برابر عفونت‌های بعدی با سایر سروتیپ‌ها محافظت نماید. به علاوه در یک سروتیپ دامنه وسیعی از سویه‌ها وجود دارد که ممکن است اثر مناسب واکسن‌ها را به مخاطره بیندازد (Alexandersen and Mowat, 2005; Knowles and Samuel, 2003; Longjam et al., 2011). سروتیپ‌ها و سویه‌های در ایران شامل A, O, Asia1, AOIR و Opan می‌باشد (زیبایی و همکاران، ۱۳۸۶).

از علائم بارز این بیماری تب و ضعف عمومی، تاول و وزیکول روی زبان، لثه‌ها و محوطه دهانی، نوک پستان‌ها و نیز زخم و تاول در تاج سم و بین دو سم می‌باشد. میزان مرگ میر بجز در حیوانات جوان بسیار کم است اما بیماری به سرعت گسترش و انتشار می‌یابد (Doel, 2003). علی‌رغم توصیف بیماری تب برفکی در سال ۱۵۱۴ میلادی نقطه آغازین دانش کنونی درباره آن، تحقیقات لوفلر و فروش (۱۸۹۸) است که برای نخستین بار عامل بیماری را شناسایی کردند. عامل مولد بیماری تب برفکی یک آفتو ویروس از خانواده پیکورناویریده است. این ویروس در زمره کوچکترین ویروس‌های شناخته شده حاوی RNA قرار گرفته دارای ۳۰-۲۵ نانومتر قطر با ۲۲۰۰ اسید آمینه و وزن مولکولی  $10^6 \times 8$  دالتون، و فاقد غشا خارجی می‌باشد. ویروس عامل بیماری نسبت به شرایط محیطی و تغییرات دمایی مقاوم بوده و ماندگاری زیادی در محیط دارد. وجه تمایز جنس آفتو ویروس از دیگر جنس‌های خانواده پیکورناویریده خصوصیات فیزیکوشیمیایی آن‌ها شامل حساسیت به PH پایین، داشتن چگالی بالا در رسوب با کلرید سزیم، برجسته بودن و در معرض قرار داشتن مناطق آنتی ژن یا لیگاند ویروس به جای قرار گرفتن در کانیون است (Doel and Pullen, 1990).

## پیامدهای ناشی از تب برفکی

|                         |                   |                                                                                                |
|-------------------------|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| پیامدهای ناشی از بیماری | قابل مشاهده       | کاهش تولید شیر<br>از دست دادن قدرت انتخاب<br>کاهش وزن گیری<br>حیوانات تلف شده<br>مشکلات باروری |
|                         | اثرات مستقیم      |                                                                                                |
|                         | غیر قابل مشاهده   | تغییر در ساختار گله<br>محدودیت فروش حیوانات و محصولات                                          |
|                         | هزینه های اضافی   | واکسن<br>دریافت واکسن<br>کنترل جابجایی<br>آزمایش های تشخیصی<br>حیوانات حذف شده                 |
|                         | اثرات غیر مستقیم  |                                                                                                |
|                         | درآمد از دست رفته | استفاده از نژادهای نامطلوب<br>عدم دسترسی به بازارهای داخلی و خارجی                             |

## مطالعات انجام شده در زمینه پیامدهای ناشی از تب برفکی

خلاصه ای از مطالعات انجام شده در زمینه درگیری به بیماری، مرگ و میر، نرخ سقط، نرخ حذف اجباری، مدت زمان شیوع تب برفکی در کشورهای در حال توسعه

| متغیرها                | درصد (%)  | کشور           | منبع                             |
|------------------------|-----------|----------------|----------------------------------|
| درگیری کلی             | ۷۴/۶-۲۵/۴ | افغانستان      | عبدالرجید و همکاران (۲۰۲۰)(۹۳)   |
|                        | ۳۱/۷      | مغولستان       | لیمون و همکاران (۲۰۱۷)(۵۵)       |
|                        | ۳۵/۵      | بنگلادش        | چاودری و همکاران (۱۹۹۳)(۲۱)      |
|                        | ۳۹/۲      | بوتان          | دوکپا و همکاران (۲۰۱۱)(۲۴)       |
|                        | ۵۰-۵۵     | ایران          | انصاری لاری و همکاران (۲۰۱۷)(۹)  |
|                        | ۵۳/۲      | پنجاب، پاکستان | گورسی و همکاران (۲۰۱۱)(۳۶)       |
|                        | ۵۴/۷۵     | اتیوپی         | بیئی و همکاران (۲۰۱۲)(۱۴)        |
|                        | ۹۱        | کنیا           | کیمانی و همکاران (۲۰۰۵)(۴۸)      |
|                        | ۹۶        | بنگلادش        | فخرالاسلام و همکاران (۲۰۱۶)(۲۷)  |
|                        | ۱۰۰       | مصر            | عابد الرحمن و همکاران (۲۰۰۶)(۷۳) |
| درگیری در حیوانات بالغ | ۱۸/۴-۲/۵  | بنگلادش        | فخرالاسلام و همکاران (۲۰۱۶)(۲۷)  |
|                        | ۲۸/۸      | مغولستان       | لیمون و همکاران (۲۰۱۷)(۵۵)       |
|                        | ۳۲/۲۳     | لاهور، پاکستان | خان و همکاران (۲۰۰۶)(۴۷)         |
|                        | ۴۴/۲      | اتیوپی         | بیئی و همکاران (۲۰۱۲)(۱۴)        |

|                              |        |                |                                  |
|------------------------------|--------|----------------|----------------------------------|
| درگیری در حیوانات جوان       | ۱۶/۱۱  | لاهور، پاکستان | خان و همکاران (۲۰۰۶)(۴۷)         |
|                              | ۵۰     | مغولستان       | لیمون و همکاران (۲۰۱۷)(۵۵)       |
|                              | ۵۶/۴۷  | پنجاب، پاکستان | گورسی و همکاران (۲۰۱۱)(۳۶)       |
|                              | ۵۹/۱   | بنگلادش        | فخرالاسلام و همکاران (۲۰۱۶)(۲۷)  |
| مرگ و میر کلی                | ۵ >    | ایران          | انصاری لاری و همکاران (۲۰۱۷)(۹)  |
|                              | ۲-۸    | اتیوپی         | بیثی و همکاران (۲۰۱۲)(۱۴)        |
|                              | ۸/۲    | کنیا           | کیمانی و همکاران (۲۰۰۵)(۴۸)      |
| مرگ و میر در حیوانات بالغ    | ۹/۰۹   | لاهور، پاکستان | خان و همکاران (۲۰۰۶)(۴۷)         |
|                              | ۱۲/۳   | بنگلادش        | اسلام و همکاران (۲۰۰۵)(۴۲)       |
|                              | ۵۶/۴   | ترکیه          | سین ترک و همکاران (۲۰۰۸)(۸۶)     |
| مرگ و میر در حیوانات جوان    | ۶/۱۹   | لاهور، پاکستان | خان و همکاران (۲۰۰۶)(۴۷)         |
|                              | ۲۲     | اتیوپی         | بیثی و همکاران (۲۰۱۲)(۱۴)        |
|                              | ۲۲/۹   | پنجاب، پاکستان | گورسی و همکاران (۲۰۱۱)(۳۶)       |
|                              | ۴۴/۴   | بنگلادش        | اسلام و همکاران (۲۰۰۵)(۴۲)       |
|                              | ۵۰/۹   | بنگلادش        | چاودری و همکاران (۱۹۹۳)(۲۱)      |
|                              | ۶۵     | ترکیه          | سین ترک و همکاران (۲۰۰۸)(۸۶)     |
|                              | ۸۰     | مصر            | عابد الرحمن و همکاران (۲۰۰۶)(۷۳) |
| نرخ سقط                      | ۰/۶۵   | لاهور، پاکستان | خان و همکاران (۲۰۰۶)(۴۷)         |
|                              | ۰/۹    | پنجاب، پاکستان | گورسی و همکاران (۲۰۱۱)(۳۶)       |
|                              | ۲/۷۷   | کنیا           | لوئیس و همکاران (۲۰۱۹)(۵۴)       |
|                              | ۳/۱۳ < | کشمیر          | شاه و همکاران (۲۰۱۱)(۸۷)         |
|                              | ۲۰     | ترکیه          | سین ترک و همکاران (۲۰۰۸)(۸۶)     |
| حذف اجباری                   | ۲/۴۲   | کنیا           | مولی و همکاران (۲۰۰۱)(۶۶)        |
|                              | ۵۱     | اتیوپی         | مزنکیا و همکاران (۲۰۱۰)(۶۴)      |
|                              | ۶۶/۶   | بنگلادش        | چاودری و همکاران (۱۹۹۳)(۲۱)      |
| مدت زمان شیوع تب برفکی (روز) | ۱۷/۸۸  | پنجاب، پاکستان | گورسی و همکاران (۲۰۱۱)(۳۶)       |
|                              | ۲۲/۷   | بنگلادش        | چاودری و همکاران (۱۹۹۳)(۲۱)      |
|                              | ۴۲     | ایران          | انصاری لاری و همکاران (۲۰۱۷)(۹)  |

## تب برفکی در ایران

طبق آمار رسمی ایران جمعیت دام‌های حساس به تب برفکی در ایران به میزان ۸ میلیون راس گاو، دو هزار راس گاو میش، ۴۷ میلیون راس گوسفند و ۱۸ میلیون راس بز است (Jihad, 2017).

که طبق مطالعات انجام شده میزان تلفات این بیماری کمتر از ۵٪ اعلام شده است (Ansari-Lari et al., 2017). از دلایل مهم کنترل این بیماری در ایران می‌توان به این مورد اشاره کرد که با توجه به تاثیر سوء بر اقتصاد از طریق کاهش تولید و ایجاد منع تجارت دام زنده و محصولات دامی باعث زیان اقتصادی زیادی می‌شود، به همین منظور

نخستین گام در کنترل تب برفکی در ایران، واکسیناسیون جمعی دام‌های حساس با استفاده از سویه‌های در گردش در هر منطقه است (Rich et al., 2011, Longjam et al., 2011, Emami et al., 2015).

دستورالعمل سازمان دامپزشکی کشور برای تب برفکی (Bagheri et al., 2016):

۱. اعمال اقدامات قرنطینه‌ای و بهداشتی

۲. مراقبت بالینی و سرولوژی: به منظور شناخت تغییرات بیماری و ماهیت سویه‌های در گردش

۳. انجام واکسیناسیون جمعی دام‌ها برای حداقل هر ۴ ماه یک بار

در نهایت بهترین راه برای کنترل تب برفکی پیشگیری از بروز آن با انجام واکسیناسیون دوره‌ای است (Ranjan et al., 2016). تنها هزینه مربوط به بخش سوم از دستورالعمل، یعنی واکسیناسیون، در ده سال منتهی به سال ۱۳۸۹، به طور متوسط ۲۱۰ میلیارد ریال در سال برآورد شده است (Ranjan et al., 2016). این هزینه جدا از ضرر و زیانی است که به طور مستقیم، به واسطه تلفات دام‌های جوان، کاهش تولید شیر، سقط در دام‌های آبستن، کاهش توان جسمی دام، کاهش کیفیت و کمیت گوشت (Ranaei et al., 2009)، کاهش باروری، و به طور غیر مستقیم، به علت منع صادرات بر دامدار و اقتصاد ملی کشورهای اندمیک از جمله ایران، وارد می‌شود (Knight-Depa et al., 2012, Jones and Rushton, 2013).

انصاری و همکاران در سال ۲۰۱۷ با بررسی اثرات تب برفکی روی تولید شیر و وزن‌گیری گوساله‌ها، طبق جدول زیر گزارش کردند تولید شیر در تمامی دوره‌های شیردهی کاهش یافته ولی در دوره‌های اول و دوم این کاهش مشهودتر است و در دوره‌های بالاتر علایم تحت بالینی یا بالینی خفیف غیرقابل تشخیص بودند. همزمان با کاهش تولید شیر، کاهش معنی‌داری در مقدار چربی و پروتئین شیر مشاهده شد ولی تغییری در سلول‌های سوماتیک رخ نداد (Ansari-Lari et al., 2017).

در مورد تلیسه‌ها و کاهش وزن آن‌ها که در بازه ۴ تا ۱۷ ماهگی و در زمان درگیری اندازه‌گیری شد به شدت معنی‌دار بود و هر چه درگیری طولانی‌تر بود باعث کاهش نرخ رشد در اولین زایش و تاثیر بر تولید شیر و تولیدمثل در دوره بعد می‌شد (Ansari-Lari et al., 2017).

در این گزارش ۵۰-۵۵ درصد درگیری برای دام‌های جوان و گوساله‌های متولد شده از گاوهای شکم اول یا گاوهای اولین دوره شیردهی اعلام شد و تفاوت در میزان تلفات مربوط به شرایط محیطی و ژنتیک گله بود (Ansari-Lari et al., 2017). همچنین شیوع در ماه‌های سرد سال یعنی آبان تا اسفند بیشتر بود (Ansari-Lari et al., 2017).

مقایسه مقادیر میانگین تولید شیر روزانه (MDM)، چربی، پروتئین و تعداد سلول‌های سوماتیک (SCC) در دوره‌های قبل، در طول و پس از شروع شیوع تب برفکی، در ماه مارس تا می ۲۰۱۴ در گله‌های شیری صنعتی جنوب ایران

| متغیر                  | قبل شیوع        |                    | موقع شیوع |                    | بعد شیوع |                    | P-value |
|------------------------|-----------------|--------------------|-----------|--------------------|----------|--------------------|---------|
|                        | SD <sup>۱</sup> | میانگین            | SD        | میانگین            | SD       | میانگین            |         |
| MDM(kg)                | ۱۷۸             | ۶۲۶۵ <sup>a</sup>  | ۱۶۸       | ۶۲۴۳ <sup>b</sup>  | ۸۸       | ۶۲۸۳ <sup>ab</sup> | ۰/۰۲۷   |
| چربی (%)               | ۰/۱۷            | ۳/۳۴ <sup>a</sup>  | ۰/۱۲      | ۳/۳۱ <sup>ab</sup> | ۰/۰۸     | ۳/۲۶ <sup>b</sup>  | ۰/۰۱۴   |
| پروتئین (%)            | ۰/۱۴            | ۲/۸۴ <sup>a</sup>  | ۰/۰۷      | ۲/۷۴ <sup>b</sup>  | ۰/۰۵     | ۲/۷۳ <sup>b</sup>  | ۰/۰۰۲   |
| SCC(×10 <sup>3</sup> ) | ۱۳/۰            | ۱۴۹/۳ <sup>a</sup> | ۳۰/۱      | ۱۵۶/۶ <sup>a</sup> | ۶۰/۶     | ۱۴۰/۳ <sup>a</sup> | ۰/۵۹    |

۱- انحراف معیار استاندارد

به دلیل اینکه ثبت داده‌های تب برفکی در ایران با دقت انجام نمی‌شود این مهم باعث می‌شود تا در روند برآورد تاثیر اقتصادی این بیماری در گله مشکلاتی ایجاد شود و روش‌های مدیریت معمولی را با اختلال مواجه می‌کند که این نشان از این دارد که در خصوص کنترل این بیماری و ثبت داده‌های آن باید دقت بیشتری بکار رود (Knight-Jones and Rushton, 2013).

### زیان‌های مالی وقوع تب برفکی

در مطالعه بیجاری و همکاران (۱۳۹۹) نتایج زیر از برآورد زیان‌های مالی وقوع تب برفکی گزارش شد.

میانگین زیان‌های مالی ناشی از تب برفکی (ریال / رأس / مورد) در تمامی دام‌های مورد مطالعه

| متغیرها                                                 | میانگین   |                   | درصد | حداقل     |           | حداکثر    |
|---------------------------------------------------------|-----------|-------------------|------|-----------|-----------|-----------|
|                                                         | هزار ریال | دلار <sup>۱</sup> |      | هزار ریال | هزار ریال | هزار ریال |
| زیان ناشی از کاهش تولید شیر                             | ۲۳۱۶۱     | ۱۸۵/۳             | ۲    | ۲۱۰۴۶     | ۲۵۲۷۵     |           |
| زیان ناشی از شیر دور ریخته شده                          | ۱۶۱۰۸     | ۱۲۸/۸             | ۱۴   | ۱۴۶۳۷     | ۱۷۵۷۸     |           |
| زیان ناشی از افت عملکرد تولیدمثلی                       | ۲۹۹۴۴     | ۲۳۹/۶             | ۲۱   | ۲۶۷۱۵     | ۳۲۹۴۱     |           |
| هزینه افزایش تعداد روزهای باز                           | ۲۵۲۵۰     | ۲۰۲               |      | ۲۲۷۲۵     | ۲۵۸۸۱     |           |
| هزینه وقوع سقط                                          | ۲۱۱۴      | ۱۶/۹              |      | ۱۸۸۱      | ۳۷۹۰      |           |
| هزینه وقوع مرده‌زایی                                    | ۲۵۸۰      | ۲۰/۶              |      | ۲۱۰۹      | ۳۲۷۰      |           |
| زیان ناشی از تلفات                                      | ۱۳۸۷۰     | ۱۱۱/۰             | ۱۳   | ۱۳۸۷۰     | ۱۳۸۷۰     |           |
| زیان ناشی از حذف و جایگزینی                             | ۳۷۰۱۹     | ۲۹۶/۲             | ۳۵   | ۳۴۹۹۴     | ۳۷۸۹۵     |           |
| زیان ناشی از کاهش وزن دام                               | ۱۱۶۰۰     | ۹۲/۸              | ۱۱   | ۱۱۶۰۰     | ۱۱۶۰۰     |           |
| هزینه واکسیناسیون، دارو و مکمل، درمان حمایتی و دامپزشکی | ۲۶۸۰      | ۲۱/۴              | ۳    | ۱۴۶۰      | ۳۸۹۶      |           |
| هزینه نیروی کار                                         | ۹۱۲       | ۷/۳               | ۱    | ۶۲۰       | ۱۲۰۰      |           |
| زیان مالی ناشی از هر مورد وقوع تب برفکی                 | ۱۳۵۲۹۳    | ۱۰۸۲/۳            | ۱۰۰  | ۱۲۴۹۴۲    | ۱۴۴۲۵۶    |           |

۱- هزینه‌ها با احتساب هر دلار آمریکا معادل ۱۲۵ هزار ریال ایران در نظر گرفته شده است.

## خصوصیات واکسن تب برفکی

واکسن تب برفکی اولین واکسن حیوانی بود که در اواخر قرن نوزدهم ساخته شد. واکسن تب برفکی یک فرآورده بیولوژیک است که می‌تواند حفاظتی ویژه به واسطه توسعه ایمنی اکتسابی در برابر ویروس بیماری‌زا از طریق تلقیح ترکیبات ایمونوژن (آنتی‌ژن) که خاصیت بیماری‌زایی آن‌ها از بین رفته است ایجاد نماید. واکسن می‌تواند موجب تحریک پاسخ ایمنی هومورال، سلولی و یا هر دو شود تا در نهایت حفاظت مناسب را در بدن دام از طریق شناسایی هویت عامل بیماری‌زا و یادآوری آن ایجاد کرده و از بیماری، درد و رنج حاصل از آن رهایی دهد. واکسن تب برفکی از نوع واکسن‌های ویروسی غیرفعال یا به اصطلاح ویروس کشته شده می‌باشد. تولید صنعتی واکسن غیرفعال شده تب برفکی از سال ۱۹۵۰ با استفاده از تکثیر ویروس بر روی اپی‌تلیوم زبان گوساله‌های سالم کشتار شده آغاز گردید و در سال ۱۹۶۰ با بکارگیری سلول لاین BHK21 پیشرفت بیشتری نمود.

ایمنی فعال در نشخوارکنندگان و سایر دام‌های حساس علیه تیپ‌های مختلف شایع ویروس تب برفکی، با استفاده از واکسن غیرفعال از نوع دو یا سه ظرفیتی (حاوی ۲ یا ۳ ویروس از تیپ‌های مختلف) که از سویه‌های در گردش بومی تهیه می‌شود امکان‌پذیر است. ویروس تب برفکی توانایی تحریک سیستم ایمنی هومورال را هم در حیوان آلوده و هم در حیوان واکسینه دارد. این پاسخ ایمنی علیه اپی‌توپ‌های است که ساختمان سه پروتئین خارجی ویروس شامل VP1، VP2 و VP2 را تشکیل می‌دهند.

## روش صحیح واکسیناسیون و تزریق واکسن تب برفکی

واکسن تب برفکی جهت پیشگیری از بیماری تب برفکی در گاو، گوسفند و بز مورد استفاده قرار می‌گیرد. سن تزریق از ۴ ماهگی به بالا است و ۳-۴ هفته پس از اولین تزریق یک واکسن یادآور زده می‌شود. تزریقات بعدی هر ۶-۴ ماه خواهد بود. این واکسن نباید با سایر واکسن‌های ویروسی، همزمان استفاده شود.

با توجه به اینکه واکسن‌های تب برفکی رایج در کشور از نوع واکسن‌های کشته می‌باشند می‌بایستی بر اساس شرایط شیوع بیماری در منطقه و یا کشور هر چهار تا شش ماه پس از تزریق بوستر واکسیناسیون مجدد صورت پذیرد. اگر در فواصل دوره‌های واکسیناسیون، دام جدید و یا تازه متولد شده ای به جمعیت گله اضافه گردید به شرح زیر واکسیناسیون انجام گیرد: a: برای دام‌های جدیدالورد در هر سنی که باشند بلافاصله واکسیناسیون دز اول انجام و دز بوستر به فاصله ۲۱ تا ۳۰ روز بعد انجام پذیرد. b: واکسیناسیون نوزادان تازه متولد شد های که پس از تولد از آغوز مادران ایمن واکسن خورده استفاده کرده باشند، یک ماه پس از تولد، اولین دز واکسن را دریافت نمایند و اگر از آغوز ایمن استفاده نکرده باشند می‌توان واکسیناسیون این گروه را یک هفته پس از تولد آغاز نمود. c: در صورت رسیدن گله به دوره واکسیناسیون، دام‌های جدیدالورود واکسن خورده را در صورتی که حداقل ۲۱ روز

از واکسن دز اول آنها گذشته باشد همراه گله واکسینه شوند که این واکسن به عنوان واکسن بوستر عمل کرده و همسان سازی واکسیناسیون گله نیز صورت می گیرد.

### **تاثیر واکسیناسیون بیماری تب برفکی بر پارامترهای کیفی و کمی مایع منی گاو نژاد هلشتاین**

در مقاله فروغی و همکاران (۱۴۰۱) گزارش کردند که واکسیناسیون تاثیر معنی داری ( $P < 0/05$ ) بر تحرک پیشرونده، آرام، لوکال و درصد اسپرم های بی تحرک پس از انجماد و انکوباسیون در هر دو بازه زمانی پس از تزریق دارد. در حالیکه تاثیری بر حجم، غلظت، تحرک پیشرونده و درصد اسپرم های بی تحرک نمونه های تازه ندارد ( $P < 0/05$ ). این مشاهدات نشان می دهند که واکسیناسیون اثرات منفی بر پارامترهای کیفی مایع منی گاوهای نژاد هلشتاین دارد. با توجه به آنالیزهای انجام شده بر ویژگی های مایع منی در دوره پس از واکسیناسیون، بهتر است اسپرم گیری تا زمانی که دام به تولید نرمال برگردد به تعویق بیوفتد.

### **روش های مقایسه کیفیت واکسن های تب برفکی**

#### **الف) روش های مقایسه کمیت و کیفیت واکسن ها**

به هنگام تکثیر و رشد ویروس در سلول و پس از برداشت مایع رویی چهار آنتی ژن قابل ردیابی هستند: ۱) ذرات با ضریب سدیمانتاسیون ۱۴۰ یا ذرات ویروسی کامل (ذره D) که ایمنی زاترین آنتی ژن محسوب شده و میزان تراکم آن یکی از معتبرترین معیارهای فیزیکی برای بررسی قدرت عمل و کارآیی واکسن به حساب می آید. ۲) ذرات ۷۵s یا C (کپسید بدون ژنوم) که ویروس بدون قرار گرفتن ژنوم داخل آن مونتاژ می شود. این ذره نیز با درصدی کمتر از ذره D ایمنوژن است. ۳) ذرات ۱۲۵ یا پروتئین های مونتاژ شده کپسید شامل سه پروتئین خارجی که قدرت ایمنی زایی این ذرات در مقایسه با ویروس کامل بسیار کم است. ۴) ذرات ۳/۸ s یا آنتی ژن (VIA) Virus infected Associated Antigen که فرم غیر فعال RNA پلی مرز ویروس هستند. حیواناتی که با ویروس کشته واکسینه می شوند قادر به تولید این آنزیم نیستند و در نتیجه آنتی بادی ضد VIA در سرم آنها وجود ندارد و این افتراق اساس تشخیص حیوانات واکسینه از غیر واکسینه است (Herrera et al., 2008). در فرآیند تولید واکسن غیرفعال موثر و مناسب علیه ویروس های تب برفکی، تغلیظ ویروس با کارایی بالا برای تعیین کمیت و کیفیت آنتی ژن های ۱۴۰s، ۷۵s، ۱۲۵s به عنوان ایمنوژن ها در دو مرحله پیش و پس از غیرفعال سازی ویروس، با آزمایش های مختلف ارزیابی می شود.

تعداد ذرات ویروس در یک دز واکسن غیرفعال تب برفکی تا حدود زیادی تعیین کننده کیفیت واکسن است. به وسیله تغلیظ می توان می توان به تعداد ذرات ویروسی مناسب و نتیجه مطلوب رسید. بانک های واکسن ترجیح می دهند به جای ذخیره واکسن، آنتی ژن غیرفعال شده کنسانتره را در برودت بسیار پایین ذخیره سازند (Rodriguez and Grubman, 2009). در گذشته از روش رسوب کمپلکس آنتی ژن همراه ۳(AIOH) برای کنسانتره ویروس استفاده می شد.

پس از آن روش رسوب ویروس با پلی اتیلن گلیکول (PEG) ابداع شد که با اتصال ویروس به این پلیمر و ایجاد ذره سنگین، رسوب بوسیله سانتریفوژ امکان پذیر می شود. پس از سانتریفوژ و حذف مایع رویی، ویروس ها به همراه PEG رسوب کرده و با استفاده از بافرهای خاص از PEG جدا می شوند (Sim et al., 2012). انواع رزین ها نیز برای تغلیظ و خالص سازی ویروس تب برفکی از سوسپانسیون ویروسی در شرایط آزمایشگاهی معرفی شده اند اما این سیستم برای حجم زیاد کاربرد ندارد (Doel, 2003). غشاها به طور موفقیت آمیز در تغلیظ بسیاری از بیومولکول ها در سطح تولید انبوه استفاده شده اند. از دوده پیش، اولترافیلتر (UF) برای کنسانتره کردن آنتی ژن ویروس به کار گرفته شده است. این روش در آمریکای جنوبی در تولید واکسن های روغنی که به آنتی ژن با غلظت بسیار بالا نیاز است، کاربرد وسیعی دارد (Barteling, 2002). اگرچه این روش بسیار خوبی برای کنسانتره کردن ویروس در فرمانتور و با حجم بالا می باشد اما از نظر خالص سازی با محدودیت های مواجهه است. برای تغلیظ ویروس تب برفکی با UF، ابتدا باید سوسپانسیون ویروسی را از فیلتر ۰/۲ میکرومتر عبور داد سپس با استفاده از اولترا فیلتر ۲۵ الی ۴۰۰ بار ویروس را کنسانتره نمود (Ryan et al., 2008, Adkane et al., 1997).

اساس اولترافیلتر به روش کراس فلو عبور ذرات ریز از منافذ فیلتر که در این سیستم با دالتون نامگذاری می شوند و عدم عبور ذرات درشت تر استوار است. با پیشرفت کار از میزان مایع حاوی ذرات درشت تر (کنسانتره) کم شده و بر میزان مایع فیلتر شده که فاقد ذرات می باشد اضافه می گردد (Venkatachalam et al., 2014). بدین ترتیب میزان تغلیظ قابل کنترل بوده و دستیابی به هر میزان از غلظت میسر خواهد بود. وزن مولکولی ویروس تب برفکی با قطر ۳۰-۲۵ نانومتر، ۸۰۰۰۰۰۰ - ۶۰۰۰۰۰۰ دالتون است و برای تغلیظ آن باید از کاست های چند دالتونی (به طور مثال ۱۰۰۰۰۰ دالتون) استفاده شود. با در نظر گرفتن سطح فیلتراسیون، تعداد کاست های فیلتر براساس حجم مایع انتخاب می شود. در انتهای فیلتراسیون اغلب وجود ۵۰ تا ۱۰۰ ویروس در مایع فیلتر شده امری طبیعی است اما چنانچه بیش از این مقدار باشد فیلتر آسیب دیده است.

نتایج جذب ویروس در ژل هیدروکسید آلومینیوم نشان دهنده توانایی ژل در جذب ویروس های کنسانتره است. این میزان جذب تفاوتی با جذب ویروس های غیرکنسانتره ندارد و این به دلیل قدرت بالای جذب پروتئین توسط ژل هیدروکسید آلومینیوم است. کیفیت ژل بستگی به نحوه عمل آوری و ساخت آن دارد و در صورت کیفیت مناسب ضریب تغلیظ ۸۳ خواهد بود. بنابراین نگرانی در مورد جذب ویروس تغلیظ شده به ژل وجود ندارد و به رقت بیش از ۱/۶۵ ژل نیازی نیست.

در عمل تغلیظ ویروس نکته مهم میزان بازیافت است که تا چه حد به نسبت فاکتور تغلیظ، ویروس‌های تغلیظ شده بازیافت شده‌اند و نیز تا چه حد ویروس از دست رفته است. به طور کلی هر چه میزان بازیافت بیشتر باشد عمل تغلیظ بهتر انجام شده و با کمترین ضایعات همراه بوده است. اگرچه میزان بازیافت مطلق نبوده و به نوع آزمایش بستگی دارد (Yvonne et al., 2013). در محاسبه ضریب بازیافت، میزان کنسانتره پیش و پس از تغلیظ در نظر گرفته شده است در نتیجه عدد ثابتی با توجه به تغییرات فاکتور رقت در آزمایش‌های مختلف بدست می‌آید که با یکدیگر قابل مقایسه هستند (Morrow, 1972). برای محاسبه ضریب بازیافت از آزمایش‌های TCID<sub>50</sub>، ثبوت مکمل و آزمایش گرادیان غلظتی سوکروز (اندازه‌گیری میزان ۱۴۰S، ۷۵S، ۱۲S) استفاده می‌شود. در کل از آزمایش‌های مانند جذب ژل، ثبوت مکمل، الیزا، TCID<sub>50</sub> و گرادیان غلظتی سوکروز برای اندازه‌گیری میزان ۱۴۰S و برآورد میزان بازیافت ویروس پس از تغلیظ انجام می‌شود. دلیل بالاتر بودن میزان بازیافت در ثبوت مکمل مشارکت بیشتر پروتئین‌های ویروسی چه به صورت کپسید کامل و چه به صورت پروتئین‌های کپسیدی مونتاژ نشده با آنتی بادی است. در حالی که در دو آزمایش دیگر کپسید کامل ویروسی مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. علاوه بر این، در TCID<sub>50</sub> فقط فعالیت ویروس زنده بررسی می‌شود در نتیجه امکان از دست رفتن فعالیت در مراحل تغلیظ مکانیکی و شیمیایی وجود دارد (Ryan et al., 2008). در عمل امکان محاسبه ویروس زنده تغلیظ شده نسبت به پیش از تغلیظ وجود ندارد. در آزمایش گرادیان غلظتی سوکروز برای اندازه‌گیری میزان ۱۴۰S، ذره کامل ویروسی مورد ارزیابی قرار می‌گیرد و احتمال این که در فرآیند تغلیظ تعدادی از ویروس‌ها واسرشت شده و ذره کامل خود را از دست بدهند وجود دارد. بنابراین میزان ۱۴۰S و در نهایت درصد بازیافت آن کاهش می‌یابد (Ichim and Wells, 2011).

#### **ب) روش‌های مقایسه اثر بخشی و طول دوره ایمنی**

امروزه با توجه به پیشرفت که در تولید واکسن صورت گرفته، بر اساس فرمولاسیون و ادجوانت مورد استفاده دو نوع واکسن به صورت تجاری در دسترس دامداران قرار دارد که هریک دارای مزایای نسبی می‌باشند. (۱) واکسن پایه آبی حاوی ژل آلومینیوم هیدروکساید و ساپونین که در گاو، گوسفند و بز استفاده می‌شود. این واکسن به صورت زیرجلدی تزریق شده و در مدت زمان ۷ الی ۱۴ روز منجر به تولید آنتی‌بادی محافظت کننده بر علیه ویروس می‌گردد. طول دوره ایمنی در واکسن آبی در حدود ۴ الی ۶ ماه است. (۲) واکسن پایه روغنی که در دو حالت (الف) امولسیون تک فازی آب در روغن و (ب) W/O؛ امولسیون دوفازی آب در روغن در آب W/O/W می‌باشند. این واکسن‌ها حاوی روغن‌های معدنی و گیاهی هستند که ۲۱ تا ۲۸ روز پس از تزریق ایمنی فعال در بدن دام ایجاد کرده و با توجه به ماهیت آنها طول دوره ایمنی حداقل ۶ ماه می‌باشد (Kamel et al., 2019).

هدف از واکسیناسیون ایجاد پاسخ‌های ایمنی به آنتی ژن تجویز شده است که باید محافظت طولانی مدت در برابر عفونت ایجاد کند. علیرغم پیشرفت‌هایی که در زمینه واکسن‌شناسی صورت گرفته است، واکسن‌های غیرفعال شده با FMD هنوز هم معمولاً برای مبارزه با این بیماری استفاده می‌شوند. یکی از مهم‌ترین عواملی که باعث افزایش ایمنی‌زایی این واکسن‌ها می‌شود، ماهیت ادجوانت است. القای پاسخ‌های ایمنی قوی و طولانی مدت با واکسن‌های غیرفعال شده به جای واکسن‌های ویروسی ضعیف شده زنده اغلب نیاز به افزودن یک ادجوانت قوی و ایمن دارد (Petrovsky et al., 2004). بسیاری از انواع ادجوانت‌ها در واکسن‌های دامپزشکی استفاده می‌شوند، با این حال، ادجوانت‌های مبتنی بر آلومینیوم و روغن معدنی با یا بدون ساپونین بیشتر برای واکسن‌های FMD غیرفعال استفاده می‌شوند (Park et al., 2014).

واکسن‌های حاوی هیدروکسید آلومینیوم و ساپونین به عنوان ادجوانت دارای کمبودهای متعددی هستند، مانند القای پاسخ‌های آنتی‌بادی کوتاه‌مدت که نیاز به واکسیناسیون مجدد نسبتاً مکرر در فواصل ۶ یا حتی ۴ ماهه دارد. در مقابل، به نظر می‌رسد واکسن‌های کمکی FMD مبتنی بر روغن دارای چندین مزیت مانند القای تیترهای بالا و پاسخ‌های آنتی‌بادی طولانی مدت هستند که منجر به محافظت مؤثرتر می‌شود (Aucouturier et al., 2001; Cloete et al., 2008). برخلاف واکسن‌های کمکی مبتنی بر آلومینیوم، واکسن‌های کمکی مبتنی بر روغن می‌توانند بر تداخل آنتی‌بادی‌های مادر در نوزادان غلبه کنند و در نتیجه می‌توانند در مراحل اولیه زندگی استفاده شوند (Iyer et al., 2000).

برای تخمین اثربخشی واکسن در مورد FMD، ۱) تست خنثی‌سازی سرم<sup>۱</sup> (SNT) اختصاصی سروتیپ است و به آنتی‌بادی‌ها علیه ویروس FMD بسیار حساس در نظر گرفته می‌شود (Selim et al., 2010; OIE, 2012). ۲) پوتنسی یا توانمندی واکسن (تیتر حفاظت‌کننده) (PD50) یکی دیگر از روش‌های قابل اعتماد برای تخمین اثر بخشی واکسن با تعیین حفاظت از گاوهای واکسینه شده با دوزهای مختلف واکسن پس از به چالش کشیدن با یک ویروس همولوگ است (OIE, 2012).

---

<sup>1</sup> serum neutralization test