DOI:10.22092/VJ.2022.358664.1972
شماره ۱۳۸ بهار ۱۴۰۲
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده های بیولوژیک

ایمنی‌زایی کیتوزان، مونتانایـد و آلومینیوم هیدروکسیـد به عنوان ادجوانت در واکسن آزمایشی توکسوپلاسما گوندئی در گوسفند

• محمدحسین مؤثر
گروه دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران
• مهدی نام‌آوری (نویسنده مسئول)
موسسه تحقیقات سرم و واکسن سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز ،ایران
• احد علیایی
گروه انگل شناسی، دانشکده دامپزشکی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران
• سیده زهرا بوترابی
گروه دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران
• زهرا خبازان
موسسه تحقیقات سرم و واکسن سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز ،ایران

تاریخ دریافت: ۲۲-۰۲-۱۴۰۱ تاریخ پذیرش: ۰۵-۰۴-۱۴۰۱
Email: Namavari@yahoo.com

چکیده

توکسوپلاسما گوندئی یک تک‌یاخته انگلی است که باعث بیماری مشترک توکسوپلاسموزیس می‌گردد. این تک‌یاخته خسارات اقتصادی شدیدی در صنعت گوسفندداری ایجاد می‌نماید. این مطالعه باهدف بررسی ایمنی‌زایی واکسن تهیه‌شده از سوش تخفیف حدت‌یافته توکسوپلاسما گوندئی به همراه ادجوانت‌های مختلف در گوسفند بوده است. برای این منظور، ۲۰ رأس گوسفند نژاد قشقایی دوماهه باردار که از نظر توکسوپلاسما گوندئی سرم منفی بودند به‌صورت تصادفی به پنج گروه چهارتایی تقسیم شدند. گروه یک به‌عنوان کنترل، محیط کشت دریافت نمود. واکسن کشته با دوز ۲۵ میلیون به همراه ادجوانت‌های مونتانایـد، آلومینیوم هیدروکسید و کیتوزان در حجم نهایی ۱ میلی‌لیتر به سه گروه مختلف به‌صورت زیرپوستی تزریق گردید. یک گروه نیز با ۲۵ میلیون تاکی‌زوئیت زنده تخفیف حدت‌یافته بدون ادجوانت ایمن گردید. ایمن‌سازی طی یک مرحله انجام گرفت. بیست‌ویک روز پس از ایمن‌سازی، خون‌گیری از تمام حیوانات انجام‌شده و پاسخ ایمنی هومورال و سلولی با روش الایزا ارزیابی گردید. بالاترین تیتر آنتی‌بادی در آزمایش الایزا، در گروه ایمن‌شده با ادجوانت مونتانایـد مشاهده گردید ($P<0/05$). بااین‌وجود، نتیجه اندازه‌گیری گاما اینترفرون نشان داد که واکسن زنده تخفیف حدت‌یافته موجب افزایش معناداری در پاسخ ایمنی سلولی می‌گردد ($P<0/05$) که پس‌ازآن واکسن همراه با ادجوانت کیتوزان و آلومینیوم هیدروکسید قرار داشتند. قابل ذکر است که، تمام گروه‌های ایمن شده با گروه کنترل دارای اختلاف معنی‌داری بودند ($P<0/05$). با توجه به نتایج موفقیت‌آمیز در ایجاد ایمنی سلولی با استفاده از واکسن تخفیف حدت‌یافته توکسوپلاسما گوندئی، لذا؛ این سوش برای ایمن‌سازی گوسفند به‌عنوان میزبان هدف و در تعداد بالاتر پیشنهاد می‌شود.

کلمات کلیدی: توکسوپلاسما گوندئی، واکسن تخفیف حدت یافته، ادجوانت، پاسخ ایمنی، گوسفند

Veterinary Researches & Biological Products No 138 pp: 66-72

Immunogenicity of Chitosan, Montanide and Aluminum hydroxide as an adjuvants in *Toxoplasma gondii* experimental vaccine in sheep

By:Moasser, M.H., Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran. Namavari, M., (Corresponding Author) Razi Serum and Vaccine Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Shiraz, Iran. Olyaei, A., Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran. Bootorabi, S.Z., Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran. and Khabazan, Z., Razi Serum and Vaccine Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Shiraz, Iran.

Email: Namavari@yahoo.com

Received:2022-05-12 Accepted: 2022-06-26

Toxoplasma gondii is a zoonoses protozoan parasite that causes toxoplasmosis. This parasite causes severe economic losses in the sheep industry. The aim of this study was to evaluate the immunogenicity of the live attenuated vaccine with different adjuvants in sheep. 20 two-month-old pregnant Iranian Qashqaeian serum-negative sheep for *Toxoplasma gondii* were randomly divided into five groups of four. Group one injected with media and served as control. Three experimental groups were immunized subcutaneously with 1 ml of 25 ×106 inactivate tachyzoites formulated with Montanide, alum, and chitosan, respectively. Last group was inoculated with live attenuated tachyzoite with the same dose. Immunization was performed once. After 21 days, blood samples were collected for ELISA test to evaluate the humoral and cellular immune response. The highest antibody titer was obtained in the group immunized with montanide adjuvant, which was significantly different from other groups ($P < 0.05$). However, the highest cellular immunity according to gamma interferon measurements was related to live attenuated vaccine which was significantly different from other groups, followed by chitosan or aluminum hydroxide adjuvant. It should b notice that all immunized groups had a significant difference with the control group ($P < 0.05$). According to the successful immune response in the live attenuated vaccine, we concluded that this strain can be used for immunization of sheep as the target host and use in higher numbers of sheeps.

Key words: Toxoplasma gondii, live attenuated vaccine, adjuvant, immune response, sheep

مقدمه

توکسوپلاسما گوندئی *(Toxoplasma gondii)* تک‌یاخته‌ای انگلی از شاخه اپی‌کمپلکسا (Apicomplexa) می‌باشد. این تک‌یاخته عامل بیماری توکسوپلاسموزیس (Toxoplasmosis) در انسان و حیوانات می‌باشد که با شیوع فراوان در دنیا گسترده شده است. عفونت در افرادی با نقص سیستم ایمنی عوارض شدید داشته و در زنان باردار منجر به ایجاد ناهنجاری، سقط‌جنین یا مرگ نوزادان می‌گردد. عفونت با توکسوپلاسما گوندئی منجر به ضررهای اقتصادی قابل‌توجهی در صنعت دامپروری، به‌ویژه در گوسفند و بز می‌شود. این تک‌یاخته در گوسفند باردار از عوامل مهم و عمده ایجاد سقط و ناقص‌الخلقگی به شمار می‌رود و بدین ترتیب خسارات اقتصادی فراوانی به صنعت پرورش دام و گوسفند وارد می‌کند (۲۳).

باوجودی که در بسیاری از منابع استفاده از داروهایی همچون پیریمتامین (Pyrimethamine) و سولفادیازین (Sulfadiazine) به‌عنوان روش درمانی استاندارد نام‌برده می‌شود (۴)، استفاده از داروها علیه برادی‌زوئیت‌های بافتی و فاز مزمن عفونت توکسوپلاسموزیس اثر چندانی ندارند (۲۱)؛ بنابراین، واکسیناسیون به‌عنوان مؤثرترین راه پیشگیری از بیماری معرفی می‌شود (۱۴). واکسن زنده تخفیف حدت‌یافته سوش S۴۸ توکسوپلاسما گوندئی با عنوان تجاری توکسوواکس (Toxovax) در گوسفند مورد استفاده قرار می‌گیرد (۳) که با پاساژ طولانی‌مدت در حدت انگل کاهش ایجاد شده است؛ اما این واکسن در انسان قابل استفاده نیست. در مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی، شیراز، تک‌یاخته توکسوپلاسما گوندئی به مدت طولانی بر روی رده سلولی ماکروفاژ موش J۷۷۴ پاساژ داده‌شده است. در مطالعات پیشین، بررسی این سوش نتایجی موفقیت‌آمیز داشته است؛

بطوری‌که در موش بیماری‌زایی نداشته و همچنین پاسخ ایمنی مناسبی را ایجاد کرده است (۱، ۱۸).

با توجه به اینکه انگل توکسوپلاسما گوندئی، یک تک‌یاخته درون‌سلولی است، پاسخ ایمنی مؤثر در کنترل عفونت به‌صورت پاسخ ایمنی سلولی و تولید گاما اینترفرون به‌واسطه سلول‌های CD۴+ و CD۸+ می‌باشد (۶). باوجود تحقیقات بسیار گسترده در زمینه تهیه واکسن علیه توکسوپلاسموزیس، نیاز به تهیه یک واکسن مؤثر هم در انسان و هم در حیوانات برای جلوگیری از سقط احساس می‌شود. تنها واکسن تجاری علیه توکسوپلاسما گوندئی (Toxovax ™)، تنها قابلیت استفاده در گوسفندان را دارد و دارای معایبی از جمله؛ سمیت، پایداری و مکانیسم دقیق اثر آن است که باید بهبود یابد. یکی از استراتژی‌های جدید در تهیه واکسن، استفاده از ادجوانت‌ها می‌باشد که به‌منظور تحریک پاسخ ایمنی، در فرمول واکسن وارد می‌شود و باعث پاسخ ایمنی طولانی‌مدت می‌گردد. همچنین، دوز و هزینه تولید واکسن را در جمعیت‌هایی که به واکسیناسیون پاسخ ضعیفی می‌دهند را کاهش می‌دهد (۲۰). در حال حاضر، چندین واکسن بصورت ترکیب با ادجوانت‌های مختلف برای ایجاد ایمنی محافظتی علیه توکسوپلاسموزیس مورداستفاده قرارگرفته‌اند. مطالعات نشان داده است که ادجوانت‌ها در واکسن‌های تهیه‌شده علیه توکسوپلاسما گوندئی قادرند سیستم ایمنی هومورال و سلولی را به‌صورت قابل‌توجهی تحریک نموده و بدین ترتیب، ترکیبی از پاسخ ایمنی به‌صورت Th۲/Th۱ که برای ایجاد محافظت علیه عفونت توکسوپلاسموزیس ضروری است را القاء نمایند (۱۱).

در مطالعه حاضر، سوش زنده تخفیف حدت‌یافته توکسوپلاسما گوندئی در گوسفند باردار مورد ارزیابی قرار گرفت و واکسن کشته این انگل به همراه سه ادجوانت مختلف مونتانايد، آلوم و کیتوزان در مدل حیوانی گوسفند، به‌عنوان یکی از مهم‌ترین میزبان‌های حد واسط، موردمطالعه قرار گرفت. هدف از این مطالعه در ابتدا بررسی ایمنی‌زایی سوش زنده تخفیف حدت‌یافته در گوسفند است و همچنین پاسخ ایمنی سلولی و هومورال (Humoral) تولیدشده در حیوان پس از ایمن‌سازی با ادجوانت‌های مختلف موردبررسی قرار گرفت. نتایج به‌دست‌آمده می‌تواند نقش بسیار مهمی در تحقیقات کاربردی برای تهیه واکسن در آینده داشته باشد.

مواد و روش‌ها

حیوانات مورد آزمایش

بیست رأس میش نژاد قشقایی با میانگین سنی ۱/۵ سال و اولین آبستنی که دوماهه باردار بودند انتخاب شدند. حیوانات با استفاده از آزمایش الایزا از نظر حضور IgG علیه توکسوپلاسما گوندئی بررسی شدند و تنها حیوانات سرم منفی در آزمایش قرار گرفتند. تشخیص آبستنی به روش اولتراسوند و با استفاده از پروب ۳/۵ مگاهرتز از ناحیه کشاله ران سمت راست از روی سطح پوست انجام شد.

گوسفندها به‌صورت تصادفی به پنج گروه چهارتایی تقسیم‌بندی شده و آب و غذای معمولی در اختیار آن‌ها قرار گرفت. تمامی مراحل کار با حیوانات، طبق دستورالعمل کار با حیوانات مؤسسه دامپزشکی کل کشور و طبق شناسه کد اخلاق IR.IAU.KAU.REC.۱۴۰۰,۱۵۸ انجام گرفت.

سوش واکسن

در این مطالعه از سوش زنده تخفیف توکسوپلاسما گوندئی تهیه‌شده در مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی استفاده شد. این سوش با پاساژ طولانی‌مدت بر روی رده سلولی JVV۴ تهیه‌شده و حدت آن به‌شدت کاهش‌یافته است و در مؤسسه رازی شیراز به‌صورت منجمد نگهداری می‌شود (۱، ۱۸). آماده‌سازی واکسن به‌این‌ترتیب انجام گرفت که سوش موردنظر پس از انجمادزدایی بر روی رده سلولی Vero به همراه محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گوساله و آنتی‌بیوتیک به مقدار ۵ میلی‌گرم، ۱۰ درصد سرم جنین گوساله و آنتی‌بیوتیک (جنتامایسین ۵۰ میکروگرم، استرپتومایسین ۱۰۰ میکروگرم و ضدقارچ ۲۵ میکروگرم) کشت داده شد و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی‌اکسید کربن قرار گرفتند. بررسی فلاسک‌های کشت سلولی به‌صورت روزانه انجام گرفت و پس از رشد انگل و آزاد شدن تاکی‌زوئیت‌ها، جمع‌آوری و شمارش آن‌ها انجام گرفت. دوز واکسن به‌صورت ۲۵×۱۰^{۶} تاکی‌زوئیت در حجم ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات سالین تنظیم شد.

جهت تهیه واکسن کشته از فرمالین استفاده شد و تاکی‌زوئیت‌ها با فرمالین ۱ درصد به مدت ۲۴ ساعت غیرفعال شدند (۵) و به همراه ژل آلوم تجاری ۳۰٪ (شرکت سیگما، آلمان)، کیتوزان ۵۰٪ (شرکت سیگما، آلمان) و مونتانايد ISA ۷۲۰ ۷۰٪ (شرکت سپیک) برای ایمنی‌زایی مورداستفاده قرار گرفت. واکسن زنده نیز با همین دوز بدون اضافه نمودن ادجوانت تهیه گردید.

ایمن‌کردن حیوانات

ایمن‌سازی حیوانات به‌صورت زیرپوستی در ناحیه پشت گردن حیوانات به‌این‌ترتیب صورت پذیرفت که گروه اول به‌عنوان کنترل تنها محیط کشت دریافت نمود. گروه دوم، سوم و چهارم به ترتیب تاکی‌زوئیت کشته توکسوپلاسما گوندئی با دوز ۲۵×۱۰^{۶} به همراه ادجوانت مونتانايد ISA ۷۲۰ ۷۰٪، آلوم ۳۰٪ و کیتوزان ۵۰٪ در حجم ۱ میلی‌لیتر دریافت کردند و گروه پنجم از گوسفندان موردمطالعه نیز با سوش زنده تخفیف حدت‌یافته توکسوپلاسما گوندئی با دوز ۲۵×۱۰^{۶} به‌صورت زیرپوستی ایمن گردید. حیوانات به‌صورت روزانه موردبررسی قرار گرفتند و شرایط سلامت جسمانی آن‌ها ثبت گردید.

بررسی ایمنی هومورال

بیست‌ویک روز پس از تزریق دوز ایمن‌سازی به‌منظور بررسی تیتر آنتی‌بادی علیه توکسوپلاسما گوندئی خون‌گیری انجام گرفت. بررسی پاسخ آنتی‌بادی علیه توکسوپلاسما گوندئی به‌صورت IgG با استفاده از روش الایزا انجام گرفت. برای انجام آزمایش الایزا طبق روش Ismael و همکارانش، سرم‌ها با رقت ۱:۱۰۰ تهیه شدند و به چاهک حاوی ۲×۱۰^{۶} آنتی‌ژن توکسوپلاسما گوندئی اضافه گردید (۹). Cut off در تست الایزا بصورت میانگین تیترهای منفی بعلاوه ۰,۱۳ در میانگین تیترهای مثبت (برابر با ۰,۲۲۹) در نظر گرفته شد.

بررسی ایمنی سلولی

برای اندازه‌گیری گاما اینترفرون، خون‌گیری ۳۰ روز پس از ایمن‌سازی

انجام گرفت و مراحل کار طبق دستورالعمل کیت تجاری BT (Bioassay Technology Laboratory شانگهای چین با کد تجاری کیت E۰۰۴۹sh انجام گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

نتایج به‌دست‌آمده از آزمایش‌ها، به‌وسیله برنامه آماری spss نسخه ۱۷ موردبررسی آماری قرار گرفت. تفاوت در داده‌ها (پاسخ آنتی‌بادی و تولید گاما اینترفرون) بین همه گروه‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) مقایسه شد. در این مطالعه سطح معنی‌داری بین گروه‌ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد (P<۰/۰۵).

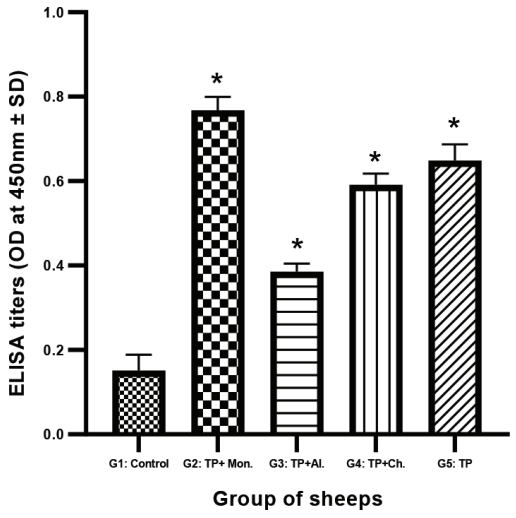
نتایج

نتایج بررسی گوسفندان بعد از ایمن‌سازی

بعد از انجام واکسیناسیون، گروه‌های ایمن شده هیچ‌گونه علایم بیماری‌زایی از جمله؛ تب، بی‌حالی و بی‌اشتهایی را نشان ندادند. همچنین گوسفندهای باردار ایمن‌شده نیز دچار سقط جنین نشدند.

نتایج بررسی ایمنی هومورال

برای بررسی ایمنی هومورال از آزمایش الایزا استفاده شد. نتایج به‌دست‌آمده با استفاده از تست ANOVA نشان داد که بالاترین تیتر آنتی‌بادی در گروه ایمن‌شده با واکسن به همراه ادجوانت مونتانايد ایجادشده است. بین گروه‌های ایمن‌سازی شده هم با یکدیگر و هم با گروه کنترل دارای اختلاف معنادار می‌باشد (P<۰/۰۰۰۱). (نمودار ۱).



نمودار ۱- بررسی پاسخ ایمنی هومورال. علامت ستاره نشاندهنده تفاوت معنادار با گروه کنترل می‌باشد. در نمودار میزان ایجاد پاسخ ایمنی هومورال با استفاده از میانگین تیتر بدست آمده از تست الایزا در گروه ایمن شده با مونتانايد نسبت به بقیه گروه‌ها بالاتر می‌باشد. G۱: گروه کنترل، G۲: واکسن+ ادجوانت مونتانايد، G۳: واکسن+ ادجوانت آلوم، G۴: واکسن+ ادجوانت کیتوزان، G۵: واکسن زنده تخفیف حدت یافته.

نتایج بررسی ایمنی سلولی

نتایج بررسی ایمنی سلولی با استفاده از اندازه‌گیری گاما اینترفرون نشان داد بالاترین میزان گاما اینترفرون مربوط به گروه گوسفندهای ایمن شده با واکسن زنده می‌باشد که هم با گروه‌های دیگر و هم با گروه کنترل دارای اختلاف معنادار بودند (P<۰/۰۵). پس‌ازآن گروه ایمن‌شده با واکسن کشته همراه با ادجوانت کیتوزان و آلوم قرار دارند (نمودار ۲). قابل ذکر است که تمام گروه‌های ایمن‌شده با گروه کنترل دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشند (P<۰/۰۵).

بحث

طی دهه‌های اخیر، پیشرفت‌های قابل‌توجهی در تهیه واکسن برای انگل توکسوپلاسما گوندئی صورت پذیرفته است و محققین از استراتژی‌های متعددی همچون آنتی‌ژن‌های جدید، ادجوانت‌ها و غیره برای بهبود واکسن تهیه‌شده بهره می‌برند. واکسن‌های زنده، غیرفعال، نوترکیب و واکسن‌های تهیه‌شده از RNA و DNA انگل از مهم‌ترین راهکارهای به‌کاربرده شده در سال‌های اخیر است (۲۴). در مطالعه حاضر نیز هدف بررسی پاسخ ایمنی واکسن زنده و غیرفعال توکسوپلاسما گوندئی از یک سوش تجربی بود.

توکسوپلاسموزیس منجر به مرگ جنین در گوسفند آلوده می‌شود (۲۳) که این موضوع اهمیت گوسفند را به‌عنوان میزبان حد واسط افزایش می‌دهد. در حال حاضر تنها واکسن تجاری توکسوواکس (Toxovax) برای استفاده در گوسفند در دسترس است که به دلیل کوتاه‌بودن ایمنی ایجادشده و تأثیر اندک آن، توجهات به تهیه واکسن مؤثرتر که قابلیت استفاده در انسان را نیز داشته باشد جلب شده است (۲).

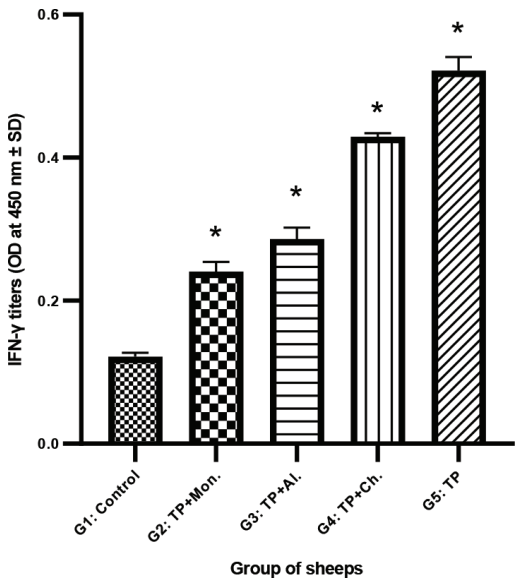
در مطالعه حاضر، از تاکی‌زوئیت سوش زنده تخفیف حدت‌یافته توکسوپلاسما گوندئی که در مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه شیراز، با استفاده از پاساژ طولانی‌مدت در محیط کشت ایجادشده است، استفاده گردید. مطالعات پیشین نشان داده است که این سوش علاوه بر بیماری‌زا نبودن، می‌تواند پاسخ ایمنی قابل قبولی را در موش ایجاد نماید (۱، ۱۸). نتایج ما نشان داد که واکسن تهیه‌شده از تاکی‌زوئیت‌های زنده تخفیف حدت‌یافته قادر به ایجاد پاسخ ایمنی بسیار مناسبی در گوسفند می‌باشد. این موضوع نشان می‌دهد که سوش زنده تخفیف حدت‌یافته انگل توکسوپلاسما گوندئی، گزینه مناسبی جهت ایجاد محافظت علیه عفونت توکسوپلاسموزیس و استفاده به‌عنوان واکسن می‌باشد.

وجود خطرات احتمالی در واکسن‌های زنده استفاده از آن‌ها را محدود کرده است. بااین‌وجود، واکسن‌های زنده به‌عنوان مؤثرترین واکسن‌های ایجاد ایمنی محافظتی به شمار می‌روند. سوش تخفیف حدت‌یافته RH توکسوپلاسما گوندئی که با حذف ژنی تهیه‌شده است می‌تواند به‌صورت نسبی در موش ایمنی محافظتی ایجاد نماید (۲۵). همچنین استفاده از سوش تخفیف حدت‌یافته ME۴۹ قادر به تحریک پاسخ ایمنی هومورال و سلولی در موش ایمن‌شده بوده و از رشد انگل جلوگیری به عمل می‌آورد (۲۲). در مطالعه حاضر، استفاده از سوش تخفیف حدت‌یافته در گوسفند باردار موجب بالا رفتن پاسخ ایمنی سلولی گردید و سقط جنین

در حیوانات باردار مشاهده نشد. در مطالعه مشابه از سوش TgShSp1 در گوسفند باردار استفاده شد. این سوش قدرت تکثیر آهسته دارد ولی ساختارهای کیست مانند را به‌صورت In vitro ایجاد می‌نماید. گوسفندها با اووسیست این سوش و همچنین سوش TgME49 که حدت بالاتری داشت به‌صورت خوراکی آلوده شدند. باوجودی که سوش TgShSp1 علائم بیماری اندکی را نشان داد ولی در مقایسه با سوش TgME۴۹ در سقط‌جنین و مرده‌زایی تفاوت معناداری را نشان نداد. همچنین چالش گوسفند در نیمه بارداری با این سوش منجر به سقط‌جنین در ۶۶ تا ۶۸ درصد گوسفندان (بسته به دوز چالش) شد درصورتی‌که در موش تنها ۵۰ درصد مرگ‌ومیر نشان داد (۱۷). در مقایسه با نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه ما، سوش زنده تخفیف حدت‌یافته هیچ‌گونه بیماری‌زایی برای گوسفندهای باردار نداشت و پاسخ ایمنی سلولی را نیز به مقدار قابل‌توجهی افزایش داد.

در مطالعه حاضر، از سوش زنده استفاده شد و بدون استفاده از ادجوانت، افزایش قابل‌توجهی در گاما اینترفرون تولیدشده توسط حیوانات باردار مشاهده گردید.

در این پژوهش ادجوانت‌های مختلف همراه با سوش تجربی غیرفعال شده با فرمالین نیز در گوسفند باردار موردبررسی قرار گرفت. ادجوانت‌ها به‌عنوان مهم‌ترین اجزاء واکسن به شمار می‌روند زیرا علاوه بر دارابودن خواص ایمونوژنی، قابلیت استفاده در انسان و حیوانات را دارند. در این پژوهش، استفاده از ادجوانت روغنی مونتانايد موجب



نمودار ۲- پاسخ ایمنی سلولی. علامت ستاره نشان‌دهنده اختلاف معنادار با گروه کنترل است. براساس میانگین تیتر بدست آمده از تست گاما اینترفرون، بیشترین پاسخ ایمنی در گروه ایمن شده با واکسن زنده تخفیف حدت یافته مشاهده شد. G1: گروه کنترل، G2: واکسن+ ادجوانت مونتانايد، G3: واکسن+ ادجوانت آلوم، G4: واکسن+ ادجوانت کیتوزان، G5: واکسن زنده تخفیف حدت یافته.

افزایش قابل‌ملاحظه‌ای در تیتر آنتی‌بادی حیوانات ایمن شده گردید. ادجوانت مونتانايد جهت افزایش پاسخ ایمنی سلولی و هومورال در تهیه واکسن علیه ویروس FMDV (Foot and Mouth Disease Virus)، لیشمانیا ماجور *(Leishmania major)* و همچنین توکسوپلاسما گوندئی استفاده شده است (۸، ۱۶، ۱۹). در این مطالعات، استفاده از مونتانايد موجب بالا رفتن بصورت معنی‌داری در پاسخ ایمنی هومورال گردید و در کنار آن پاسخ ایمنی سلولی نیز به مقدار مناسبی افزایش یافت. استفاده از مونتانايد به همراه واکسن نوترکیب توکسوپلاسما گوندئی باعث افزایش فراوانی در تیتر آنتی‌بادی IgG و IgG2a گردید و افزایش معناداری در ترشح گاما اینترفرون مشاهده شد (۱۶). در مطالعه حاضر نیز استفاده از این ادجوانت موجب بالا رفتن تیتر آنتی‌بادی علیه توکسوپلاسما گوندئی در مقایسه با گروه کنترل، با اختلاف معنی‌داری گردید.

مطالعات نشان می‌دهد این ادجوانت قادر به ایجاد ایمنی هومورال به‌صورت طولانی‌مدت است که این موضوع یکی از مزیت‌های استفاده از این ادجوانت می‌باشد (۱۰).

ایمنی هومورال به‌تنهایی نمی‌تواند در محافظت علیه عفونت توکسوپلاسموزیس کافی باشد به همین دلیل باید ایمنی سلولی مورد بررسی قرار گیرد. پاسخ ایمنی کلیدی ناشی از عفونت اولیه گوسفند در ابتدا IFNγ را درگیر کرده و سلول‌های T-cells CD۴+ را فعال می‌نماید، سپس سلول‌های T cells CD۸+ را فعال کرده و به دنبال آن آنتی‌بادی‌های خاصی را تشخیص می‌دهد (۶).

در ایجاد ایمنی محافظتی علیه توکسوپلاسموزیس، ایمنی سلولی نقش بسیار مهمی ایفاء می‌کند. پاسخ ایمنی سلولی به‌صورت بالا رفتن تولید و ترشح سیتوکین‌های مختلف ازجمله گاما اینترفرون می‌باشد. گاما اینترفرون توسط سلول‌های T تولید می‌شود و نقشی حیاتی در بقاء سلول میزبان دارد زیرا چندین مکانیسم داخل سلولی را تحریک می‌کند که باعث کشته شدن انگل می‌شوند (۱۵). همچنین مطالعات نشان داده است موشی که قادر به تولید گاما اینترفرون نیست، به‌شدت به انگل توکسوپلاسما گوندئی حساس می‌باشد (۲۳).

در مطالعه حاضر، استفاده از ادجوانت کیتوزان و آلوم توانست به مقدار قابل‌توجهی میزان تولید اینترفرون گاما را بالا ببرند. ادجوانت آلوم می‌تواند به‌خوبی پاسخ ایمنی Th۲ را به‌صورت پاسخ ایمنی هومورال بالا ببرد که در مطالعه حاضر نیز بالا رفتن تیتر آنتی‌بادی در حیوانات ایمن شده توسط این ادجوانت مشاهده شد و تفاوت معناداری را با گروه کنترل نشان داد P≤۰/۰۵. بااین‌وجود، این ادجوانت قادر است پاسخ ایمنی سلولی را نیز القاء نماید که اهمیت آن را دوچندان می‌کند.

تحقیقات متعددی از ادجوانت آلوم جهت تهیه واکسن علیه توکسوپلاسموزیس بهره برده‌اند. نتایج به‌دست‌آمده حاکی از قابلیت این ادجوانت در بالا بردن پاسخ ایمنی سلولی است (۱۳). استفاده از آلوم می‌تواند موجب بالا رفتن گاما اینترفرون و همچنین سیتوکین‌هایی همچون اینترلوکین ۴ و ۵ گردد (۱۲). در مطالعه حاضر میزان گاما اینترفرون در گروه ایمن‌شده با آلوم به نسبت موفق عمل نمود. در مطالعه‌ای که برای ایجاد ایمنی محافظتی علیه توکسوپلاسما گوندئی از ادجوانت آلوم استفاده شده بود، میزان اینترلوکین ۵ و گاما اینترفرون افزایش نشان داد. همچنین میزان زنده‌مانی موش‌های ایمن شده افزایش

قابل‌توجهی را نشان داد (۱۲). در مطالعه‌ای که از کیتوزان همراه با واکسن پروتئینی توکسوپلاسما گوندئی برای ایمن‌سازی موش استفاده شده بود، پاسخ ایمنی به‌صورت افزایش معنادار در سطح گاما اینترفرون، اینترلوکین ۴ و اینترلوکین ۱۰ گردید و محققین نتیجه گرفتند که استفاده از کیتوزان می‌تواند به‌عنوان سیستم حامل مؤثری در واکسن علیه عفونت توکسوپلاسموزیس به شمار رود (۷). این تحقیقات نشان می‌دهد که این ادجوانت نیز می‌تواند به‌عنوان ادجوانتی قابل‌قبول جهت مصرف در واکسن توصیه گردد. این موضوع قابل‌ذکر است که در پژوهش‌ها از کیتوزان به‌صورت نانو ذرات استفاده می‌شود، اما در پژوهش ما کیتوزان به‌صورت نانوذره نبود. بااین‌وجود، پاسخ ایمنی ایجاد شده در سطح بسیار قابل‌توجهی قرار داشت.

همان‌گونه که اشاره شد، یکی از نتایج جالب‌توجه به‌دست‌آمده در این پژوهش، بالا رفتن قابل‌توجه پاسخ ایمنی سلولی در گروه ایمن‌شده با سوش زنده است به‌گونه‌ای که در مقایسه با تمام گروه‌ها بیشترین پاسخ ایمنی سلولی را ایجاد نمود. تحقیقات انجام‌شده نشان می‌دهد که ایمنی محافظتی برای توکسوپلاسما گوندئی به‌عنوان یک تک‌یاخته انگلی درون‌سلولی، در درجه اول به ایمنی سلولی وابسته به سلول‌های +CD۴ و +CD۸ و توانایی آن‌ها در تولید گاما اینترفرون دارد (۶)؛ اما علاوه بر این، به نظر می‌رسد ایمنی هومورال در کنار ایمنی سلولی برای مقاومت در برابر عفونت ضروری است.

واکسن توکسوپلاسما گوندئی استفاده‌شده به فرم زنده توانست به‌خوبی پاسخ ایمنی سلولی را تحریک نماید و استفاده از ادجوانت در تقویت پاسخ ایمنی سلولی و هومورال مؤثر بود و می‌توان ترکیب سوش زنده تخفیف حدت‌یافته همراه با ادجوانت کیتوزان و یا آلوم را برای مطالعات آتی پیشنهاد نمود. علاوه با توجه به بالا بودن هزینه تولید واکسن زنده تخفیف حدت‌یافته، با استفاده از ادجوانت موجب تأثیر بهتر واکسن شده و با کاهش دوز آن باعث کم شدن قابل‌توجه هزینه‌های تولید گردد.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که سوش زنده تخفیف حدت‌یافته تجربی که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت قادر است به‌خوبی موجب بهبود پاسخ ایمنی در گوسفند باردار شده و هیچ‌گونه بیماری‌زایی را در گوسفند ایجاد ننماید. علاوه، استفاده از ادجوانت کیتوزان و یا آلوم قادر بود پاسخ ایمنی هومورال و سلولی را به مقدار قابل‌توجهی بالا ببرد. با توجه به اینکه گوسفند به‌عنوان مهم‌ترین میزبان حد واسط توکسوپلاسما گوندئی به شمار می‌رود، پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی در مقیاس بزرگ‌تر از این واکسن همراه با ادجوانت به‌منظور تقویت پاسخ ایمنی، استفاده گردد و ایمنی محافظتی این واکسن را پس از چالش در گوسفند مورد مطالعه قرارداد. همچنین می‌توان ایمن‌سازی بصورت دو مرحله‌ای مورد بررسی قرار گیرد. بدین‌صورت که، دوز اول با استفاده از واکسن زنده و دوز دوم با استفاده از واکسن غیرفعال به‌همراه ادجوانت باشد.

منابع مورد استفاده

1. Abbasifar, A., Namavari, M., & Rezayian, A. (2017). Evaluation of Razi attenuated variety of *Toxoplasma gondii* in Balb/c mice. *Veterinary Researches & Biological Products*, 30(4), 107-113. (In persian)

2. Buxton, D. (1998). Protozoan infections (*Toxoplasma gondii*, Neospora caninum and Sarcocystis spp.) in sheep and goats: recent advances. *Veterinary research*, 29(3-4), 289-310.

3. Buxton, D., & Innes, E. A. (1995). A commercial vaccine for ovine toxoplasmosis. *Parasitology*, 110(S1), S11-S16.

4. Dunay, I. R., Gajurel, K., Dhakal, R., Liesenfeld, O., & Montoya, J. G. (2018). Treatment of toxoplasmosis: historical perspective, animal models, and current clinical practice. *Clinical microbiology reviews*, 31(4), e00057-17.

5. Fulton, J. D., & Sutton, R. N. P. (1962). Pure suspension of *Toxoplasma gondii* for use in complement-fixation test. *Immunology*, 5(5), 621-6.

6. Gazzinelli, R. T., Wysocka, M., Hayashi, S., Denkers, E. Y., Hieny, S., Caspar, P., ... & Sher, A. (1994). Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Immunology*, 153(6), 2533-2543.

7. Guo, J., Sun, X., Yin, H., Wang, T., Li, Y., Zhou, C., ... & Cong, H. (2018). Chitosan microsphere used as an effective system to deliver a linked antigenic peptides vaccine protect mice against acute and chronic toxoplasmosis. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8, 163.

8. Ibrahim, E. E. S., Gamal, W. M., Hassan, A. I., Mahdy, S. E. D., Hegazy, A. Z., & Abdel-Atty, M. M. (2015). Comparative study on the immunopotentiator effect of ISA 201, ISA 61, ISA 50, ISA 206 used in trivalent foot and mouth disease vaccine. *Veterinary World*, 8(10), 1189.

9. Ismael, A. B., Sekkai, D., Collin, C., Bout, D., & Mévélec, M. N. (2003). The MIC3 gene of *Toxoplasma gondii* is a novel potent vaccine candidate against toxoplasmosis. *Infection and immunity*, 71(11), 6222-6228.

10. Jang, S. I., Lillehoj, H. S., Lee, S. H., Lee, K. W., Lillehoj, E. P., Bertrand, F., ... & Deville, S. (2011). Montanide™ ISA 71 VG adjuvant enhances antibody and cell-mediated immune responses to profilin subunit antigen vaccination and promotes protection against Eimeria acervulina and Eimeria tenella. *Experimental parasitology*, 127(1), 178-183.

11. Kang, H. J., Kim, M. J., Chu, K. B., Lee, S. H., Moon, E. K., & Quan, F. S. (2021). Passive Immunity and Antibody Response Induced by *Toxoplasma gondii* VLP Immunization. *Vaccines*, 9(5), 425.

12. Meshkini, E., Aminpour, A., Tappeh, K. H., Seyyedi, S., & Shokri, M. (2021). Evaluation of Adjuvant Effectiveness of Alum-

Propranolol Mixture on the Immunogenicity of Excreted/Secreted Antigens of *Toxoplasma gondii* RH Strain. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 11(3), 570.

13. Petersen, E., Nielsen, H. V., Christiansen, L., & Spenter, J. (1998). Immunization with E. coli produced recombinant T. gondii SAG1 with alum as adjuvant protect mice against lethal infection with *Toxoplasma gondii*. *Vaccine*, 16(13), 1283-1289.

14. Rémy, V., Zöllner, Y., & Heckmann, U. (2015). Vaccination: the cornerstone of an efficient healthcare system. *Journal of market access & health policy*, 3(1), 27041.

15. Robert-Gangneux, F., & Dardé, M. L. (2012). Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clinical microbiology reviews*, 25(2), 264-296.

16. Şahar, E. A., Can, H., İz, S. G., Döşkaya, A. D., Kalantari-Dehaghi, M., Deveci, R., ... & Döşkaya, M. (2020). Development of a hexavalent recombinant protein vaccine adjuvanted with Montanide ISA 50 V and determination of its protective efficacy against acute toxoplasmosis. *BMC Infectious Diseases*, 20(1), 1-16.

17. Sánchez-Sánchez, R., Ferre, I., Regidor-Cerrillo, J., Gutiérrez-Expósito, D., Ferrer, L. M., Arteche-Villasol, N., ... & Benavides, J. (2019). Virulence in mice of a *Toxoplasma gondii* type II isolate does not correlate with the outcome of experimental infection in pregnant sheep. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8, 436.

18. Setasimy, A., & Namavari, M. (2016). Use of chicken embryonated eggs for evaluating the virulence of *Toxoplasma gondii*. Journal of Parasitic Diseases, 40(4), 1223-1225.

19. Shokri, M., Roohvand, F., Alimohammadian, M. H., Ebrahimirad, M., & Ajdary, S. (2016). Comparing Montanide ISA 720 and 50-V2 adjuvants formulated with LmSTI1 protein of Leishmania major indicated the potential cytokine patterns for induction of protective immune responses in BALB/c mice. *Molecular immunology*, 76, 108-115.

20. Sun, B., Yu, S., Zhao, D., Guo, S., Wang, X., & Zhao, K. (2018). Polysaccharides as vaccine adjuvants. Vaccine, 36(35), 5226-5234.

21. Wang, J. L., Zhang, N. Z., Li, T. T., He, J. J., Elsheikha, H. M., & Zhu, X. Q. (2019). Advances in the development of anti-*Toxoplasma gondii* vaccines: challenges, opportunities, and perspectives. *Trends in parasitology*, 35(3), 239-253.

22. Yang, J., Yang, C., Qian, J., Li, F., Zhao, J., & Fang, R. (2020). *Toxoplasma gondii* α-amylase deletion mutant is a promising vaccine against acute and chronic toxoplasmosis. *Microbial biotechnology*, 13(6), 2057-2069.

23. Yap, G. S., & Sher, A. (1999). Effector cells of both nonhemopoietic and hemopoietic origin are required for interferon (IFN)-γ– and tumor necrosis factor (TNF)-α–dependent host resistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*. *The Journal of experimental medicine*, 189(7), 1083-1092.

24. Zhang, N. Z., Wang, M., Xu, Y., Petersen, E., & Zhu, X. Q. (2015). Recent advances in developing vaccines against *Toxoplasma gondii*: an update. *Expert Review of Vaccines*, 14(12), 1609-1621.

25. Zhuo, X., Du, K., Ding, H., Lou, D., Zheng, B., & Lu, S. (2021). A Carbamoyl Phosphate Synthetase II (CPSII) Deletion Mutant of *Toxoplasma gondii* Induces Partial Protective Immunity in Mice. *Frontiers in microbiology*, 3549.