

## مقایسه آدجوان‌های هیدروکسید آلومینیوم و ISA70 در القاء پاسخ هومورال علیه پیولیزین نوترکیب باکتری تروپیرلا پیوژنز در گوسفند

احسان قریب ممبنی<sup>۱\*</sup>، مسعود قربانپور نجف آبادی<sup>۲</sup>، بابک محمدیان<sup>۲</sup>، مسعود رضا صیفی آباد شاپوری<sup>۳</sup>، محمد رحیم حاجی حاجی کلایی<sup>۳</sup>، فرید براتی<sup>۳</sup>

۱- دانش آموخته‌ی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۲- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۳- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴ اسفند ۱۳۹۱ تاریخ پذیرش: ۲۹ اردیبهشت ۱۳۹۲

### چکیده

به منظور مقایسه‌ی دو آدجوان مورد استفاده در واکسن‌های تجاری در تحریک ایمنی هومورال در گوسفند، ۴۸ رأس بره ۲ تا ۳ ماهه به چهار گروه ۱۲ رأسی، شامل دو گروه شاهد برای آدجوان‌های هیدروکسید آلومینیوم و ISA70، دو گروه به عنوان تیمار با توکسوئید پیولیزین نوترکیب به همراه آدجوان‌های ISA70 و هیدروکسید آلومینیوم تقسیم گردیدند. بره‌های گروه درمان، از طریق زیر جلدی، دو بار به فاصله‌ی دو هفته، ۰/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر توکسوئید پیولیزین همراه با آدجوان ISA70 یا هیدروکسید آلومینیوم، دریافت نمودند. به بره‌های گروه‌های شاهد، در زمان‌های مشابه، تنها آدجوان به همراه سرم فیزیولوژی استریل تزریق گردید. تمامی بره‌ها در روزهای ۰، ۱۴، ۲۸ و ۹۸ پس از ایمن سازی، مورد خونگیری و اندازه‌گیری عیار پادتن ضد پیولیزین قرار گرفتند. بررسی نتایج و تحلیل آماری میانگین عیار پادتن ضد پیولیزین گروه‌های ایمن شده، نشان داد که عیار حاصله در گروه دریافت کننده توکسوئید پیولیزین به همراه آدجوان ISA70، به صورت معنی‌داری بالاتر از گروه دریافت کننده توکسوئید پیولیزین به همراه آدجوان هیدروکسید آلومینیوم می‌باشد ( $P < 0/05$ ). با توجه به نتایج، توصیه در استفاده از آدجوان ISA70 در تولید واکسن‌ها می‌باشد.

**کلمات کلیدی:** پیولیزین، بره، توکسوئید، آدجوان.

\* نویسنده مسئول: احسان قریب ممبنی

آدرس: دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران. تلفن: ۰۹۳۹۳۱۳۲۵۶۸

پست الکترونیک: e.Mombeni@hotmail.com

## مقدمه

به موازات تلاش برای ساخت واکسن بر ضد بیماری‌های مختلف، استفاده از مواد معروف به آدجوان (کمک واکسن و یا یاور ایمنی) در جهت بهبود تأثیر و عملکرد واکسن‌ها مورد توجه و استفاده قرار گرفته است (۹ و ۷، ۱).

از جمله آدجوان‌های شیمیایی ترکیبات آلومینیوم مثل هیدروکسید آلومینیوم، امولسیون‌های روغنی مثل آدجوان فروند و ISA70 می‌باشند که بیش از سایر آدجوان‌ها در واکسن‌های دامی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۵).

آدجوان‌های مختلف با مکانیسم‌های متنوعی باعث کمک به سیستم ایمنی بدن در تولید یک پاسخ مؤثرتر می‌شوند، اما به‌طور کلی، اثرات آدجوان‌ها را می‌توان به دو دسته اثرات آدجوان بر پادگن و اثرات آدجوان بر سیستم ایمنی تقسیم نمود. آدجوان‌ها می‌توانند با اثر بر پادگن و اعمال تغییراتی در ساختار و شارژ الکتریکی آن باعث بهبود کیفیت پادگن شوند و با کمک به افزایش خاصیت آب‌گریزی واکسن (مانند آنچه که روغن‌ها انجام می‌دهند) یا ایفاء نمودن نقش حامل، عرضه‌ی پادگن به سیستم ایمنی بدن را بهتر نمایند. اثرات آدجوان بر سیستم ایمنی میزبان نیز شامل مواردی مانند تحریک سیستم ایمنی برای مدت بیشتر با آزادسازی و عرضه آهسته پادگن، به دام انداختن لئوسیت‌ها در موضع حضور پادگن‌ها (در نتیجه افزایش مواجهه‌ی سلول‌های سیستم ایمنی و پادگن)، تغییر در غشاء سلول‌ها و تسهیل ایجاد ارتباط میان آن‌ها، محافظت از پادگن در مقابل آنزیم‌های بدن موجود زنده، تحریک مستقیم سلول‌هایی مانند ماکروفاژها به بیگانه خواری و فعالیت آنزیمی بیشتر، فعال‌سازی سلول‌های T، کاهش و افزایش مولکول‌های واسط

التهابی مانند پروستاگلاندین‌ها، اینترلوکین‌ها و غیره، افزایش فعالیت سیستم کمپلمان و موارد مشابه می‌باشد (۹ و ۱).

آدجوان ISA70 پایه‌ی روغن معدنی دارد که می‌توان مواد محلول در آب را با آن مخلوط کرده و به صورت یک امولسیون یک دست و سفید شیری‌رنگ تهیه کرد. ISA70 منشأ گیاهی دارد و مواد تشکیل دهنده‌اش شامل مانیتول و اسیداولئیک خالص شده می‌باشد. هنگامی که آنتی‌ژن محلول در فاز مایع به این آدجوان اضافه می‌شود، آنتی‌ژن‌ها در سطح میسل‌های تشکیل شده قرار گرفته و توسط سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن مانند ماکروفاژها بلعیده می‌شود. برخلاف آدجوان‌های روغنی هنگامی که آنتی‌ژن با آدجوان هیدروکسید آلومینیوم مخلوط می‌شود یک پیوند واندروالسی بین آن‌ها تشکیل می‌شود که باعث ماندگاری بیشتر آنتی‌ژن در بافت می‌شود. طبق گزارشات حداکثر مدت ماندگاری این آدجوان در بافت هفت هفته است (۱۲ و ۹، ۱).

در این مطالعه از توکسوئید پیولیزین نوترکیب مربوط به ترورپیرلاپیوژنز استفاده گردید که توسط Sordillo و همکاران در سال ۱۹۸۸ به عنوان محرک قوی پاسخ هومورال معرفی شده است.

هدف از مطالعه حاضر مقایسه توان تحریک‌کنندگی ایمنی هومورال دو آدجوان هیدروکسید آلومینیوم و ISA70 که در واکسن‌ها مورد استفاده زیادی دارند، می‌باشد.

## مواد و روش کار

### ۱- تهیه آدجوان

آدجوان ISA70 مصرفی در این تحقیق محصول شرکت Rhone Merieux فرانسه بود که با عنوان Montanide™ ISA70 MVG (Seppic, Fairfield)

استریل در حجم ۱ میلی‌لیتر، به صورت زیر جلدی در ناحیه گردن تزریق گردید.

(۲) به هر یک از گوسفندان گروه دوازده تایی شاهد (C)، در دو نوبت به فاصله دو هفته، آدجوان ISA70 (Mineral oil-based adjuvants) به همراه محلول نمکی نرمال استریل در حجم ۱ میلی‌لیتر، به صورت زیر جلدی در ناحیه گردن تزریق گردید.

(۳) به گوسفندان گروه دوازده تایی درمان (B)، در دو نوبت به فاصله دو هفته، ۰/۲ میلی‌گرم توکسوئید پیولیزین نو ترکیب همراه با آدجوان هیدروکسید آلومینیوم در حجم ۱ میلی‌لیتر، به صورت زیر جلدی در ناحیه گردن تزریق گردید.

(۴) به گوسفندان گروه دوازده تایی درمان (D)، در دو نوبت به فاصله دو هفته، ۰/۲ میلی‌گرم توکسوئید پیولیزین نو ترکیب همراه با آدجوان ISA70 به صورت زیر جلدی در گردن تزریق گردید.

تمامی بره‌ها در روزهای ۱۴، ۲۸ و ۹۸ پس از ایمن‌سازی اول مورد خونگیری و جداسازی سرم قرار گرفتند و عیار پادتن ضد پیولیزین سرم‌ها به روش ممانعت از همولیز مورد بررسی قرار گرفت.

در این مطالعه از پیولیزین نو ترکیب باکتری تروپیرلا پیوژنر استفاده گردید. که توسط فرمالین ۰/۲۵ درصد به صورت توکسوئید تبدیل شده بود. و به منظور حذف فرمالین از آن، دیالیز گردید (۸ و ۴).

### ۳- آزمایش ممانعت از همولیز

حضور آنتی‌بادی ضد پیولیزین در سرم بره‌ها با استفاده از روش ممانعت از همولیز (۴) بررسی گردید. برای از بین بردن عوامل کمپلمان مخدوشگر در آزمایش، قبل از انجام آزمایش، سرم‌ها، ۳۰ دقیقه در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شدند (۱). از هر سرم در میکروپلیت رقت‌های دو برابر به صورت

عرضه می‌شود. ۷۰ درصد این آدجوان از روغن معدنی گیاهی تشکیل شده است و ۳۰ درصد مابقی آن شامل قند مانیتول و اسیداولئیک می‌باشد که به‌عنوان پایدارکننده به آن اضافه می‌شود. برای تهیه آدجوان هیدروکسید آلومینیوم نیز ابتدا آلومینیوم پتاسیم سولفات ۱۰ درصد توسط آب مقطر استریل تهیه گردید و با عبور از فیلتر سرسنگی (۰/۴۵ میکرومتر) استریل شد. به ۱۰ میلی‌لیتر از این محلول ۲۲/۸ میلی‌لیتر، سود سوز آور ۰/۲۵ مولار اضافه گردید و ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید و ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰ سانتریفوژ گردید. مایع رویی دور ریخته شد و رسوب دو بار شست‌وشو گردید. رسوب حاصل توزین شد و به ۵ گرم آن PBS (Phosphate buffered saline) استریل تا حجم ۵۰ میلی‌لیتر اضافه گردید (۱۳).

### ۲- ایمن‌سازی

به منظور ایمن‌سازی بره‌ها، تعداد ۴۸ رأس بره نر با دامنه سنی ۲ تا ۳ ماه و میانگین وزن ۱۸ تا ۲۰ کیلوگرم در یک گله اطراف شهر اهواز انتخاب گردید و سلامتی آن‌ها مورد بررسی و تأیید قرار گرفت. قبل از ایمن‌سازی، تمامی بره‌ها آلبندازول خوراکی (۷/۵ mg/kgBW)، آیورمکتین زیرجلدی (mg/kgBW) و (۰/۲) AD<sub>3</sub>E (۱۰ mg/kgBW) به صورت داخل عضلانی دریافت نمودند. بره‌ها قبل از مطالعه از نظر داشتن آنتی‌بادی ضد پیولیزین تروپیرلا (آرکانوباکتریوم) پیوژنر با روش ممانعت از همولیز (۴) مورد ارزیابی قرار گرفتند. بعد از اطمینان از پایین بودن عیار آنتی‌بادی ضد پیولیزین، بره‌ها به صورت تصادفی به چهار گروه دوازده تایی به شرح ذیل تقسیم شدند:

(۱) به هر یک از گوسفندان گروه دوازده تایی شاهد (A)، در دو نوبت به فاصله دو هفته، آدجوان هیدروکسید آلومینیوم به همراه محلول نمکی نرمال

## ۲- تحلیل آماری

در جدول و نمودار ۱ تغییرات سطح سرمی آنتی‌بادی ضد پیولیزین تروپرلا پیوژنر پس از ایمن‌سازی با توکسوئید پیولیزین نوترکیب به همراه دو نوع آدجوان مصرفی در بره‌ها نشان داده شده‌است. بر این اساس، در مدل مورد مطالعه تغییرات سرم آنتی‌بادی معنی‌دار ( $P < 0/0001$ ) ارزیابی شد.

این تغییرات معنی‌دار هم در گروه‌های مختلف ( $P < 0/0001$ ) و هم در روزهای مختلف ( $P < 0/0001$ ) مشاهده شد. الگوی تغییرات عیار آنتی‌بادی بین گروه‌ها در روزهای مختلف معنی‌دار ( $P < 0/0001$ ) بود. جدول ۱ نشان می‌دهد که ۱۴ روز پس از تزریق توکسوئید پیولیزین، سطح آنتی‌بادی به صورت معنی‌داری نسبت به گروه کنترل در گروه دریافت‌کننده‌ی توکسوئید پیولیزین به همراه آدجوان هیدروکسید آلومینیوم ( $125/3 \pm 24/42$ ) و گروه دریافت‌کننده توکسوئید پیولیزین به همراه ISA70 ( $170/6 \pm 18/19$ ) افزایش یافته است ( $P < 0/05$ ). این روند افزایشی تا روز ۲۸ ادامه داشته است ( $P < 0/01$ ). سطح سرمی آنتی‌بادی سه ماه پس از اولین تزریق توکسوئید پیولیزین روند کاهشی نسبت به روز ۲۸ داشته است، اما این تغییرات در داده‌های گروه هیدروکسید آلومینیوم ( $85/3 \pm 9/09$ ) نسبت به گروه ISA70 ( $245/3 \pm 4/04$ ) کمتر ( $P < 0/05$ ) بوده است.

به طور کلی یک ماه پس از تزریق توکسوئید پیولیزین سطح سرمی آنتی‌بادی در گروه ISA70 ( $448 \pm 64$ ) به صورت معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) بالاتر از گروه هیدروکسید آلومینیوم ( $245/3 \pm 4/04$ ) بوده است.

متوالی ۱، ۱:۲، ۱:۴ تا ۱:۵۱۲ تهیه و به ۵۰ میکرولیتر از هر رقت ۵۰ میکرولیتر پیولیزین (محتوی ۵ واحد پیولیزین) اضافه و پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر گلوبول قرمز ۰/۵ درصد گوسفند به هر حفره اضافه گردید. بعد از یک ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی-گراد، عیار ممانعت از همولیز محاسبه گردید. عکس رقتی از سرم که توانایی خشی نمودن کامل پیولیزین را داشت به عنوان عیار ممانعت از همولیز ثبت می‌گردید.

## ۴- تحلیل آماری

به منظور تحلیل آماری اطلاعات مربوط به سطح سرمی آنتی‌بادی در گروه‌های مختلف مورد مطالعه، از روش GLM (General linear model) در نرم‌افزار آماری SAS (Statistical analysis system) با روش تحلیل مقادیر واریانس با اندازه مکرر (Repeated measure analysis of variance) استفاده گردید. میانگین و خطای استاندارد تعیین و برآورد و تفاوت میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی (Tukey) بررسی گردید. مقدار P کمتر از ۰/۰۵ به عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد.

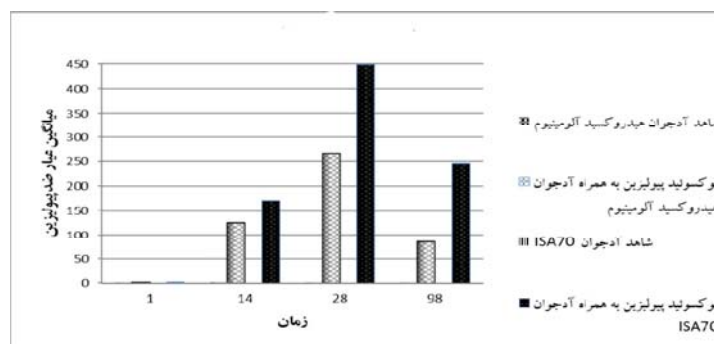
## نتایج

### ۱- عیار ضد پیولیزین بره‌های گروه شاهد و واکسینه

تعیین عیار ضد پیولیزین بره‌های گروه شاهد و تیمار به روش ممانعت از همولیز، نشان داد که حداکثر عیار ضد پیولیزین بره‌های گروه شاهد ۴ و حداکثر عیار ضد پیولیزین در بره‌های گروه تیمار ۱۰۲۴ می‌باشد.

جدول ۱: میانگین و انحراف معیار آنتی‌بادی ضد پیولیزین در بره‌های دریافت‌کننده‌ی توکسینید پیولیزین نوترکیب به همراه آدجوان‌های مختلف (حروف بزرگ اختلاف معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) داخل ستون و حروف کوچک اختلاف معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) داخل ردیف را نشان می‌دهند).

روز				شاهد آدجوان هیدروکسید آلومینیوم
۹۸	۲۸	۱۴	صفر	
$1/83 \pm 0/39^{Aa}$	$1/83 \pm 0/39^{Aa}$	$1/83 \pm 0/39^{Aa}$	$1/5 \pm 0/43^{Aa}$	
$85/3 \pm 9/09^{Bb}$	$245/3 \pm 4/04^{Bc}$	$125/3 \pm 24/42^{Bb}$	$1/6 \pm 0/33^{Aa}$	توکسینید پیولیزین به همراه آدجوان هیدروکسید آلومینیوم
$1/5 \pm 0/43^{Aa}$	$1/5 \pm 0/43^{Aa}$	$1/6 \pm 0/48^{Aa}$	$1 \pm 0/3^{Aa}$	شاهد آدجوان ISA70
$245/3 \pm 4/04^{Dd}$	$448 \pm 64^{Cc}$	$170/6 \pm 18/19^{Bb}$	$2/16 \pm 0/52^{Aa}$	توکسینید پیولیزین به همراه آدجوان ISA70



نمودار شماره ۱: میانگین عیار ضد پیولیزین در گروه‌های مختلف بر حسب زمان

هیدروکسید آلومینیوم در اغلب موارد بر خلاف گزارشاتی که در مورد استفاده از آدجوان‌های فروند شده است (۹ و ۷، ۱) که همراه با کم‌اشتهایی، تب و گرانولوماتوز می‌باشد، با علائم درمانگاهی خاصی همراه نبودند.

در تحقیقی که Reddy و همکاران (۱۹۹۶) و Sotoodehnia و همکاران (۲۰۰۵) روی واکسیناسیون علیه سپتی‌سمی خونی در گاو به همراه آدجوان ISA70 انجام دادند، به نتایج رضایت‌بخشی دست یافتند و البته ایمن‌سازی بدون بروز هیچگونه التهابی در محل تزریق بوده است در حالی که Phuong (۱۹۹۲) برای عدم ایجاد التهاب مجبور به استفاده از امولسیون رقیق‌تری از ISA70 شده بود.

Yamanaka و همکاران (۱۹۹۲) بعد از گذشت دوهفته از تزریق عضلانی ویروس نیوکاسل غیرفعال به همراه آدجوان ISA70، در محل تزریق با واکنش

## بحث

برای توسعه واکسیناسیون موفق، مقرون به صرفه و بدون خطر و عوارض نامطلوب پس از واکسیناسیون از جمله حساسیت، التهاب و ایجاد ضایعات گرانولوماتوز، انتخاب بهترین آدجوان بسیار مهم می‌باشد. در این تحقیق نتایج مقایسه‌ای اثر دو نوع آدجوان بر ایمنی‌زایی به صورت واضح نشان داد که هر دو نوع آدجوان قدرت تحریک ایمنی هومورال را به خوبی دارا می‌باشند ولی عیار ناشی از آدجوان ISA70 بیشتر و با دوام‌تر از عیار حاصل از آدجوان هیدروکسید آلومینیوم بود ( $P < 0/05$ ). در این تحقیق متعاقب اولین تزریق، پاسخ ایمنی قابل ملاحظه‌ای دیده شد که با مطالعه Benedict و Pollard (۱۹۷۲) و Work و همکاران (۲۰۰۰) هم‌خوانی دارد. ولی سطح ایمنی قابل ملاحظه در این تحقیق بسیار سریعتر (طی دو هفته) از مطالعه آن‌ها (طی شش هفته) دیده شد. آدجوان‌های ISA70 و

### تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از مساعدت‌های حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز که هزینه‌های تحقیق اخیر را فراهم نمودند تقدیر و تشکر می‌نمایند.

### منابع

1. Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pillai, S. (2011). *Cellular and Molecular Immunology*. 7<sup>th</sup> Edition. Philadelphia, PA: W.B. Saunders Co. pp: 21-40.
2. Barbey, C., Cauchard, S., Cauchard, J., Laugier, C., Hartke, A., Petry, S. (2012). Immune response to *Rhodoccus equi* ATCC33701-secreted proteins in mice and identification of immunogenic recombinant proteins by dot-blotting. *Research in Veterinary Science* **93**: 172-6.
3. Benedict, A.A., Pollard, L.W. (1972). Three classes of immunoglobulins found in the sea turtle, *Cheloniemydas*. *Folia Microbiologica* **17**: 75-8.
4. Billington, S.J., Jost, B.H., Cuevas, W.A., Bright, K.R., Songer, J.G. (1997). The *Arcanobacterium* (*Actinomyces*) *pyogeneshemolysin*, *pyolysin*, is a novel member of the thiol-activated cytolysin family. *Journal of Applied Bacteriology* **179**: 6100-6.
5. Deville, S., Pooter, A.D., Aucouturier, J., Laine-prade, V., Cote, M., Boireau, P., Vallee, I. (2005). Influence of adjuvant formulation on the induced protection of mice immunized with total soluble antigen of *Trichinella spiralis*. *Veterinary Parasitology* **132**: 75-80.
6. Griffen, P.S., Turton, J., Andrews, C.M., Barrett, P., Clarke, C.J., Fung, K.W., Munday, M.R., Roman, I.F., Smyth, R., Walshe, K., York, M.J. (2003). Markers of experimental acute inflammation in the Wistar Han rat with particular reference to haptoglobulin and C-reactive protein. *Archive of Toxicology* **77**: 392-402.
7. Gwinn, W.M., Johnson, B.T., Kirwan, S.M., Sobel, A.E., Abraham, S.N.,

گرانولوماتوز شدیدی که مشابه ضایعات ایجاد شده به دنبال استفاده از آدجوان کامل فروند می‌باشد روبرو شدند. شاید به دلیل روش تزریق این ضایعات ایجاد شده باشد. زیرا که Lee و همکاران (۲۰۱۳) به صورت زیرپوستی دو سویه از ویروس آنفلوانزای پرندگان را به همراه آدجوان ISA70 تزریق کردند که بعد از سه هفته از اولین تزریق، عیار آنتی‌بادی بالای دیده شد و همچنین هیچگونه ضایعه‌ای در محل تزریق دیده نشد. در ضمن طبق گزارش‌های Griffen و همکاران (۲۰۰۳) و Leenars و همکاران (۱۹۹۴) تزریق داخل صفاقی آدجوان ISA70 با درد و تغییر رفتار جوندگان همراه بوده است. طبق این گزارش‌ها و نتایج حاصل از تحقیق حاضر توصیه می‌شود از آدجوان ISA70 به صورت زیرجلدی استفاده شود. Barbey و همکاران در سال ۲۰۱۲ اعلام کردند که مقرون به صرفه و بهترین آدجوان برای تولید واکنس علیه رودوکوکوس اکوئی، مخلوط پروتئین نو ترکیب ATC33701 به همراه آدجوان ISA70 می‌باشد.

در بررسی حاضر استفاده از توکسوئید پیولیزین به همراه آدجوان‌های هیدروکسید آلومینیم و ISA70 در گوسفند با تولید تیترا بالای پادتن ضد پیولیزین برای مدت طولانی همراه با ایمنی قابل ملاحظه‌ای بود که از این نظر با مطالعه‌ی Lovell و همکاران (۱۹۵۰) همخوانی دارد. ایشان گزارش نموده‌اند ایمنی‌زایی با توکسوئید پیولیزین نو ترکیب ترورپیرلا پیورنر به همراه آدجوان هیدروکسید آلومینیم در ۴۷ رأس گوسفند با تولید پادتن قابل توجه همراه است که پس از سه ماه با افت عیار آنتی‌بادی اختصاصی همراه است.

در مجموع با توجه به نتایج به نظر می‌رسد که استفاده از آدجوان ISA70 در واکنس‌های دامی ارجح بر آدجوان هیدروکسید آلومینیم باشد.



16. Sordillo, L.M., Oliver, S.P., Guidry, A.J., Dermody, J.T. (1988). Humoral immune response of bovine mammary glands colonized with *Corynebacterium bovis*: enumeration of plasma cell populations in tissue and immunoglobulin concentrations in milk. *Journal of Veterinary Medicine* **35**: 617-27.
17. Sotoodehnia, A., Moazeni, G., Ataei, S., Omid, B. (2005). Study on immunity of an experimental oil adjuvant haemorrhagic septicaemia vaccine in cattle. *Archives of Razi Institute* **59**: 95-101.
18. Work, T.M., Balazs, G.H., Rameyer, R.A., Chang, S.P., Berestecky, J. (2000). Assessing humoral and cell-mediated immune response in Hawaiian green turtles, *Cheloniemydas*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **74**: 179-94.
19. Yamanaka, M., Okabe, T., Nakai, M., Goto, N. (1993). Local pathological reactions and immune response of chickens to ISA70 and other adjuvants containing Newcastle disease virus antigen. *Avian Disease* **37**: 459-66.
- Gunn, M.D., Staats, H.F. (2013). A comparison of non-toxin vaccine adjuvants for their ability to enhance the immunogenicity of nasally-administered anthrax recombinant protective antigen. *Vaccine* **31**: 1480-9.
8. Harlow, E., Lane, D. (1988). *Antibodies: A Laboratory Manual*, illus., appendices, bibliography, index. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
9. Harold, F.S.J.R. (2005). Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. *Institute for Laboratory Animal Research journal* **46**: 280-93.
10. Lee, K.J., Choi, J.G., Kang, H.M., Kim, K.I., Park, C.K. and Lee, Y.J. (2013). Development of neuraminidase subtype-specific reference antisera by recombinant protein expressed in baculovirus. *Clinical and Vaccine Immunology* **20**: 140-5.
11. Leenaars, P.P.A.M., Hendriksen, C.F.M., Koedam, M.A., Claassen, I., Claassen, E. (1994). Comparison of adjuvants for immune potentiating properties and side effects in mice. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **48**: 123-38.
12. Lovell, R., Foggie, A., Pearson, J.K.L. (1950). Field trials with *Corynebacterium pyogenes* alum-precipitated toxoid. *Journal of Comparative Pathology* **60**: 225-9.
13. O'hagan, D.T. (2008). *Vaccine adjuvants: preparation methods and research protocols*. Illustrated, Humana Press, 2000, the University of Michigan. 65-90.
14. Phuong, P.T. (1992). Haemorrhagic septicaemia in Vietnam and its control. *ACIAR Proceedings* **43**: 116-22.
15. Reddy, G.S., AnandRaq, K., Asrinivasan, V. (1996). Immunity conferred by oil-adjuvant haemorrhagic septicaemia vaccine. *Indian Journal of Animal Sciences* **66**: 703-4.



## **The Comparison of Aluminum Hydroxide and ISA70 Adjuvants for Induction of Humoral Response against Recombinant Pyolysin of *Trueperellapyogenes* in Sheep**

**Gharib Mombeni, E.<sup>1\*</sup>, Ghorbanpoor Najaf Abadi, M.<sup>2</sup>, Mohammadian, B.<sup>2</sup>, Seyfiabad Shapouri, M.R.<sup>2</sup>, Haji Hajikolaei, M.R.<sup>3</sup>, Brati, F.<sup>3</sup>**

- 1- Graduated from Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran  
2- Department of Pathobiology, School of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran  
3- Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran

Received Date: 4 March 2013

Accepted Date: 19 May 2013

---

### **Abstract**

*This study was conducted to compare the efficacy of sheep humoral immune response induction of two commercial adjuvants used routinely in veterinary vaccines. Forty-eight (48) local native-bred lambs of 2 to 3 months old were chosen and divided into four groups; the treatment groups were immunized twice, two weeks apart, with 0.2 mg of pyolysin toxoid in combination with aluminum hydroxide or ISA70 adjuvants by subcutaneous injection. The lambs in the control groups received the same sterile normal saline solution with equal amounts of aluminum hydroxide or ISA70 adjuvants at the same times. The blood samples were taken in days 14, 28, and 98 from all of the lambs after the first immunization, and their sera were measured for anti-pyolysin antibodies by hemolytic neutralization assay. According to the results, the mean titers of anti-pyolysin antibodies in immunized lambs with pyolysin toxoid and ISA70 adjuvants were significantly higher than the mean titers of antibodies in the group that received toxoid with aluminum hydroxide adjuvant ( $P < 0.05$ ). It appears that the use of ISA70 adjuvant in vaccines is more efficacious than hydroxide aluminum adjuvant.*

*Key words: Pyolysin, Lamb, Toxoid, Adjuvant.*

---

*\*Corresponding author: Gharib Mombeni, E.*

*Address: Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran. Tel:09393132568*

*Email: E.Mombeni@hotmail.com*