



## Investigating the Efficiency of Immunogenicity of Specific Peptides Produced Against FMD Virus

Fatemeh Tahoori<sup>1</sup>, Mohammad Mehdi Ranjbar<sup>2</sup>, Rasool Madani<sup>3</sup>, Seyed Mahmood Azimi Dezfoli<sup>2</sup>, Fariba Golchinfar<sup>3</sup>, Arash Ghanizadeh<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Department of Human Bacterial Vaccines Production and Research, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agriculture Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

<sup>2</sup> Department of Foot and Mouth Disease Reference Laboratory, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agriculture Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

<sup>3</sup> Department of R&D, Kit and Anti-Body Laboratory, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agriculture Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

Received: 17 April 2024, Accepted: 22 May 2024

doi [10.22059/jvr.2024.376612.3434](https://doi.org/10.22059/jvr.2024.376612.3434)

### Abstract

**BACKGROUND:** Foot-and-mouth disease is a highly contagious and sometimes fatal viral disease affecting livestock. Like other viruses, this virus continuously evolves and mutates, posing a significant challenge to vaccination due to the vast diversity of serotypes. There is no cross-protection among the serotypes, and two strains within a specific serotype may have nucleotide sequences that differ by up to 30% for a particular gene. This indicates that foot-and-mouth disease vaccines must be highly specific to the strain involved. Given the importance of the foot-and-mouth disease vaccine and its role in health and food security, using new peptide candidates for immunization could be beneficial.

**OBJECTIVES:** The aim of this study was to investigate the immunogenic effects of specific peptides produced against the FMD virus.

**METHODS:** After conducting bioinformatics studies, two sequences of 14- and 20-amino acid peptides from the peptide sequences of the immunogenic regions of the VP1 protein of foot-and-mouth virus O2016 were designed and synthesized. The peptide formulation (conjugated to BSA) was then prepared with aluminum phosphate adjuvant, and injections were administered to groups of nine rabbits at two-week intervals for a total of five times. Subsequently, the amount of antibody production was investigated and analyzed using the indirect peptide ELISA test, comparing it to the negative control samples (non-vaccinated calves) against the peptides attached to the BSA base.

**RESULTS:** The results showed that both peptides were capable of stimulating the immune system in rabbits, and antibodies against these peptides, as well as against the complete foot-and-mouth disease virus, demonstrated cross-reactivity with each other. Additionally, the highest immunogenicity in the ELISA test was related to the 20 amino acid sequence at a concentration of 300 µg per well in the checkerboard ELISA and 400 µg per dose injected into the rabbits.

**CONCLUSIONS:** These two peptides, with further research, could serve as suitable candidates for evaluating the immune response against foot-and-mouth disease virus in serology tests, examining vaccinated and non-vaccinated animals, and conducting immunization studies.

**Keywords:** Diagnosis, ELISA, Foot and mouth disease (FMD) virus, Immunization, Peptide

Copyright © Journal of Veterinary Research: Open Access; Copying, distribution and publication are free for full use with attribution. ©The Author(s).

Publisher: University of Tehran

Conflict of interest: The authors declared no conflict of interest.

**Corresponding author:** Fatemeh Tahoori, Tel/Fax: +9826-34050400 / +9826-34988454



### How to cite this article:

Tahoori F, Ranjbar MM, Madani R, Azimi Dezfoli SM, Golchinfar F, Ghanizadeh A. Investigating the Efficiency of Immunogenicity of Specific Peptides Produced Against FMD Virus. J Vet Res, 2024; 79(3): 167-179.

doi: 10.22059/jvr.2024.376612.3434

### Figure Legends and Table Captions

**Table 1.** Sample Analysis Program after Purification.

**Table 2.** Analysis Results of the Designed Sequences.

**Table 3.** Indirect ELISA Reading Results on Sera of Hyperimmune Rabbits against Peptides.

**Table 4.** Median Values and Interquartile Ranges of OD Related to 20- and 14-Amino Acid Peptides Before and After the Test.

**Chart 1.** Comparison chart of OD ELISA values for 20- and 14-amino acid peptides before and after treatment.

**Figure 1.** The General Path of the Research.

**Figure 2.** The hydrophilicity of 14- (up) and 20-amino acid peptides (down).



## بررسی کارایی ایمنی‌زایی پپتیدهای اختصاصی ایمونوژن ساخته‌شده علیه ویروس تب برفکی

فاطمه طهوری<sup>۱</sup>، محمد مهدی رنجبر<sup>۲</sup>، رسول مدنی<sup>۳</sup>، سید محمود عظیمی دزفولی<sup>۲</sup>فریبا گلچین‌فر<sup>۳</sup>، آرش غنی‌زاده<sup>۳</sup><sup>۱</sup> بخش تحقیق و تولید واکسن‌های باکتریایی انسانی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (تات)، کرج، ایران<sup>۲</sup> آزمایشگاه مرجع بخش بیماری تب برفکی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (تات)، کرج، ایران<sup>۳</sup> بخش تحقیق و توسعه، کیت و آنتی‌بادی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (تات)، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۹ فروردین ماه ۱۴۰۳، تاریخ پذیرش: ۲ خرداد ماه ۱۴۰۳

doi: [10.22059/jvr.2024.376612.3434](https://doi.org/10.22059/jvr.2024.376612.3434)

## چکیده

**زمینه مطالعه:** تب برفکی یک بیماری ویروسی دامی می‌باشد که بسیار واگیر و گاهی کشنده است. این ویروس هم مانند سایر ویروس‌ها، به‌طور مداوم تکامل و جهش می‌یابد، بنابراین یکی از مشکلات واکسیناسیون علیه آن، تنوع بسیار زیاد سروتیپ‌ها می‌باشد. هیچ محافظت متقابل بین سروتیپ‌ها وجود ندارد. علاوه بر این، دو سویه در یک سروتیپ معین ممکن است توالی نوکلئوتیدی داشته باشند که برای یک ژن معین تا ۳۰ درصد متفاوت باشد. این بدان معناست که واکسن‌های تب برفکی باید کاملاً خاص برای سویه درگیر باشند. با توجه به اهمیت واکسن تب برفکی و نقش آن در سلامت و امنیت غذایی، رویکرد استفاده از کاندیدهای جدید پپتیدی جهت ایمن‌سازی می‌تواند کمک‌کننده باشد.

**هدف:** مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر ایمنی‌زایی پپتیدهای اختصاصی ایمونوژن ساخته‌شده علیه ویروس تب برفکی انجام شد.

**روش کار:** پس از مطالعات بیوانفورماتیکی ۲ توالی ۱۴ و ۲۰ آمینواسیدی از توالی‌های پپتیدی نواحی ایمونوژنیک پروتئین VPI ویروس تب برفکی O2016، طراحی و سنتز شدند. سپس پپتیدها با ادجوانت پایه آلومینیوم هیدروکسید فرموله شده و تزریقات در ۳ گروه خرگوش در فواصل زمانی ۲ هفته‌ای و به تعداد ۵ مرتبه انجام شد. در ادامه با استفاده از تست الایزای غیرمستقیم پپتیدی میزان تولید آنتی‌بادی نسبت به نمونه‌های کنترل منفی (گوساله‌های غیرواکسینه) علیه پپتیدهای چسبانده‌شده به پایه BSA بررسی و آنالیز شد.

**نتایج:** مطابق نتایج، اولاً هر دو پپتید در حالت کونژوگه با BSA قادر به تحریک سیستم ایمنی در خرگوش بودند و آنتی‌بادی‌ها علیه این پپتیدها، همچنین علیه ویروس کامل تب برفکی به‌طور متقاطع نیز با یکدیگر قابلیت واکنش داشتند. همچنین بیشترین ایمنی‌زایی در تست الایزا مربوط به توالی ۲۰ آمینواسیدی با غلظت ۳۰۰ میکروگرم در چاهک در چکر بورد الایزا و ۴۰۰ میکروگرم در دُز تزریق به خرگوش بود.

**نتیجه‌گیری نهایی:** این دو پپتید در صورت مطالعات بیشتر می‌توانند کاندیدهای مناسبی جهت ارزیابی پاسخ ایمنی علیه ویروس تب برفکی در تست‌های سرولوژی، بررسی حیوانات واکسینه و غیرواکسینه و مطالعات ایمن‌سازی باشند.

**کلمات کلیدی:** الایزا، ایمن‌سازی، پپتید، تشخیص، ویروس تب برفکی

کپی‌رایت © مجله تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است. © نویسندگان.

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.



نویسنده مسئول: فاطمه طهوری، بخش تحقیق و تولید واکسن‌های باکتریایی انسانی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (تات)، کرج، ایران

## مقدمه

بیماری تب برفکی (Foot-and-Mouth Disease, FMD) یک بیماری بسیار واگیر است که سبب زیان‌های اقتصادی زیادی در دام‌ها می‌شود. این بیماری ناشی از یک ویروس RNA بسیار متغیر از خانواده پیکورناویریده (Picornaviridae) و جنس آفتوویروس (*Aphthovirus*) می‌باشد. این ویروس دارای ۷ سروتیپ به نام‌های SAT1, SAT2, SAT3 و Asia1, C, O, A است (۱، ۲). هر ویروس حاوی ژنوم RNA تک‌ رشته با طول حدود ۸۵۰۰ جفت‌باز و یک ساختار کپسیدی ۲۰ وجهی، دارای ۶۰ کپی پروتئین‌های ساختمانی VP4-VP1 و همچنین ۷ پروتئین غیر ساختمانی است (۳). عفونت زمانی اتفاق می‌افتد که ذرات ویروسی به داخل سلول میزبان راه پیدا می‌کند و ویروس سلول میزبان را مجبور به تولید هزاران کپی از خود می‌کند که نهایتاً با انهدام سلول، ذرات ویروسی در خون رها می‌شوند. این ویروس از نظر آنتی‌ژنی دائماً در حال تغییر است و همین موضوع تأثیر واکسیناسیون را با اشکال روبه‌رو می‌کند (۴، ۵). مقاومت عامل بیماری در طبیعت همراه با سایر عوامل، از جمله تغییرات آنتی‌ژنتیکی ویروس و پیدایش زیرتیپ‌های جدید آن و مهم‌تر از همه توان ایجاد بیماری در گونه‌های مختلف نشخوارکنندگان اهلی و وحشی و وجود دام‌های ناقل و حامل ویروس تب برفکی که اغلب متعاقب عفونت طبیعی پدیدار می‌شوند، در بقای عفونت و بیماری در یک جمعیت و منطقه تأثیر دارند و کنترل این بیماری را بسیار مشکل و همراه با هزینه‌های کلان می‌کند (۶).

طیف وسیع میزبانی و تنوع سروتیپ‌ها و تحت تیپ‌های ناشی از تغییرات آنتی‌ژنتیکی باعث بروز اپیدمی‌هایی از این بیماری در جهان و ایران می‌شود و مبارزه و کنترل این بیماری را مشکل کرده است. آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده، معیار ارزیابی مهم از جهت محافظت علیه بیماری FMD و سایر پیکورنا ویروس‌ها می‌باشند. درک نوع میان‌کنش میان آنتی‌بادی‌ها و ویروس FMD در تهیه آنتی‌ژن‌های اپی‌توپی (پپتیدی) و تهیه آنتی‌بادی جهت مصارف تشخیصی، تفکیک تایپ‌ها و ساخت کیت‌های تشخیصی و واکسن بسیار حائز اهمیت است.

در ایران سروتیپ‌های Asia1-O-A عمده‌ترین ویروس‌های مولد تب برفکی می‌باشند که در بین آن‌ها سروتیپ‌های A و O حدود ۵۰ سال در گردش بوده است (۷).

آنتی‌ژن‌هایی که در واکسن‌ها در حال حاضر برای کنترل تب برفکی استفاده می‌شوند، ماحصل غیرفعال‌سازی ویروس‌ها توسط مواد شیمیایی‌اند که امولسیون‌هایی همراه با ادجوانت می‌باشند و به‌صورت تزریقی مورد استفاده قرار می‌گیرند. از این آنتی‌ژن‌ها جهت توسعه کیت‌های الایزا SPC-ELISA (Solide phase competitive-ELISA) نیز استفاده می‌شود. با وجود استفاده گسترده از این روش، ایمن‌سازی با واکسن‌های حاوی ویروس غیرفعال‌شده توسط مواد شیمیایی مضراتی دارد، از جمله ناقص غیرفعال شدن ویروس، دشواری تشخیص حیوانات واکسینه‌شده از حیوانات آلوده و نیاز به واکسیناسیون مجدد با سویه‌های ویروسی که از نظر آنتی‌ژنی مشابه سویه‌های در چرخش می‌باشند. ضمن اینکه برای هر بار تهیه واکسن به پاساژ مجدد نیاز می‌باشد که همین امر خود به تضعیف و یا حتی تغییر در ویروس منجر خواهد شد. بنابراین واکسن‌های زیرواحد (subunit)، واکسن‌های نوترکیب، DNA واکسن‌ها و واکسن‌های پپتیدی به‌طور وسیعی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند تا جایگزین‌های امن و مؤثری برای واکسن‌های متداول تب برفکی یافت شود (۸).

در صورتی زیرواحدهای پروتئینی می‌توانند به‌عنوان واکسن‌های موفق به کار برده شوند که بتوانیم فعال‌ترین اپی‌توپ‌های آن‌ها را تعیین و پپتیدهای مشابه این اپی‌توپ‌ها را سنتز کنیم و سپس به‌عنوان واکسن به کار بریم (۹، ۱۰). بنابراین به‌دست آوردن پروتئین موردنظر از ارگانسیم، شناخت قطعات پپتیدی مشتق از آن و درنهایت شناسایی فعالیت ایمنی‌زایی آن‌ها لازم است (۱۱).

مزایای این گونه واکسن‌ها شامل سهولت سنتز تحت شرایط کنترل‌شده و همچنین تولید کاملاً ایمن آن‌ها می‌باشد. هرچند پپتیدهای سنتزی به‌عنوان واکسن، به‌دلیل اثرگذاری پایینی که ایجاد می‌کنند تاکنون نتوانسته‌اند فاز بالینی را طی کنند. استفاده از کوژئوگه‌ها و ادجوانت‌ها و روش‌های دارورسانی هدفمند نیاز است تا تحریک کافی و مناسب در سیستم ایمنی ایجاد شود و پاسخ ایمنی طولانی‌تری رخ دهد (۱۲-۱۵).

الایزا یکی از آزمایش‌های سرولوژیکی سریع برای تشخیص آنتی‌بادی‌های اختصاصی علیه پاتوژن‌ها می‌باشد. پروتئین مورد استفاده جهت الایزا باید خواص آنتی‌ژنی، حساسیت، خلوص و قابلیت دسترسی برای سیستم ایمنی را از خود نشان دهد (۱، ۲). بنابراین توسعه رویکردهای سرولوژیکی مبتنی بر پپتیدهایی با قابلیت ایمنی‌زایی و تولیدکننده آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده، برای تشخیص قابل اعتماد و

ردیابی آنتی‌بادی‌های علیه سروتیپ‌های مختلف تب برفکی ارزشمند می‌باشد. از دید دیگر در ارزیابی اثربخشی واکسن تب برفکی و نظارت بر سطح ایمنی گله پس از واکسیناسیون تب برفکی بسیار حائز اهمیت است. از سوی دیگر به دلیل نوع انتخاب این پپتید نتایج آن باید بتواند با تست خنثی‌سازی سرم (Serum neutralization test) برابری کند.

برای بهبود عملکرد الیزا به عنوان رایج‌ترین روش در تشخیص FMD، تمهیدات زیادی انجام شده است که عمدتاً بر توسعه آنتی‌ژن‌های پوششی جدید نظیر پپتیدها در کیت‌های تشخیص سرمی و آنتی‌بادی‌های منوکلونال جدید (mAbs) یا چندوجهی (Polyspecific) به عنوان آنتی‌بادی‌های به دام انداخته شده در هر دوی کیت‌های جستجوی آنتی‌بادی و آنتی ژن تمرکز دارند (۱۶).

در این مطالعه ۲ توالی ۱۴ و ۲۰ آمینواسیدی از توالی‌های پپتیدی نواحی ایمونوژنیک پروتئین VP1 ویروس تب برفکی با روش‌های بیوانفورماتیکی انتخاب و سنتز شدند. برخی شاخص‌ها در انتخاب این دو توالی مدنظر بوده است. در این خصوص می‌توان به مواردی از قبیل قدرت آنتی‌ژنی، حراست و تکرارپذیری آن‌ها در سویه‌های مختلف ویروس تب برفکی و وجود اپی‌توپ‌های B cell (به دلیل اهمیت این رده سلولی در القای پاسخ ایمنی همورال و داشتن نقش کلیدی در مهار تکثیر ویروس تب برفکی در بدن دام) اشاره کرد.

پس از تخلیص و شناسایی توالی‌ها، هر پپتید به صورت جداگانه با ادجوانت فرموله شده و همراه با کنترل (PBS) به حیوان مدل تزریق شد. علاوه بر کنترل علائم بالینی، خون‌گیری انجام شد و با استفاده از تست الیزای پپتیدی توسعه داده شده میزان تولید آنتی‌بادی نسبت به نمونه کنترل منفی بررسی شد (تصویر ۱).

## مواد و روش کار

**مواد شیمیایی و بیولوژیک:** تمام آمینواسیدهای محافظت شده، رزین ۲-کلروتیرتیل کلراید و معرف کوپل کننده ۲-(۱H-بنزوتری آزول-۱-یل)-۳،۳،۱،۱-تترامتیل آمینوم تترافلورورو بورات (TBTU) از کمپانی چینی GL Biochem، سرم گاوی رفرنس (BRS) از مؤسسه انگلیسی پیربرایت، پروتئین آلبومین سرم گاوی، توپین-۲۰ (P1379)، کراس لینکر گلوتر آلدئید، سوبسترای تترامتیل بنزیدین TMB و آنتی‌بادی بزای ضدخرگوشی کونژوگه با HRP از کمپانی سیگما-آلدریج و سایر حلال‌ها و ترکیبات شیمیایی از کمپانی مرک آلمان خریداری شدند. همچنین ادجوانت‌های آلومینیوم هیدروکساید و آلومینیوم فسفات به صورت نوزاد تهیه شد.

**حیوانات تحت آزمایش:** حیوان مدل مورداستفاده خرگوش نر سفید نژاد نیوزیلندی بود که از بخش حیوانات آزمایشگاهی مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی تهیه شد. براساس وزن و سن (سن ۶ هفتگی)، خرگوش‌ها تهیه و سپس به ۳ گروه تقسیم شدند:

گروه ۱: ۳ خرگوش دریافت کننده پپتید ۲۰ آمینواسیدی فرموله شده به میزان ۴۰۰ میکروگرم در هر دُز با ادجوانت آلومینیوم هیدروکساید. نیمی از فرموله به صورت زیرجلدی و نیم دیگر به صورت عضلانی تزریق شد. دُز یادآور ۲۰۰ میکروگرم در نظر گرفته شد.

گروه ۲: ۳ خرگوش دریافت کننده پپتید ۱۴ آمینواسیدی فرموله شده به میزان ۴۰۰ میکروگرم در هر دُز با ادجوانت دوگانه (آلومینیوم هیدروکساید/آلومینیوم فسفات). نیمی از فرموله به صورت زیرجلدی و نیم دیگر به صورت عضلانی تزریق شد. دُزهای یادآور ۲۰۰ میکروگرم در نظر گرفته شد.

گروه ۳: ۳ خرگوش به عنوان کنترل منفی آزمایش که مشابه با نمونه‌های مربوط به سرم خرگوش در روز صفر است.

خرگوش‌ها در روز صفر مورد تزریق اولیه و سپس در روز ۱۴ و ۲۸ مورد تزریق یادآور قرار گرفتند (یادآور نیمی از دُز شروع بود) و سپس خون‌گیری به فاصله ۷ روز پس از آخرین تزریق انجام شد. نمونه‌های خون با ۳۵۰۰ دور در دقیقه، برای مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و سرم‌ها جدا شدند و در میکروتیوب در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

**دستگاه‌های مورداستفاده:** محصولات به دست آمده پپتیدی به کمک دستگاه کروماتوگرافی مایع تهیه‌ای شرکت Knauer آلمان با پمپ دوگانه، آشکارساز UV2500 تک‌رنگ و ستون C18 (۲۰×۱۲۰ میلی‌متر، ۱۰۰ آنگستروم، ۱۰ میکرومتر) خالص شدند. جهت اطمینان از خالص شدن ترکیب از دستگاه کروماتوگرافی تجزیه‌ای شرکت Agilent با پمپ چهارگانه، دکتور طول موج چندگانه و ستون C18 (۴/۶×۱۵۰ میلی‌متر، ۱۰۰ آنگستروم، ۵ میکرومتر) استفاده شد. برای خشک کردن نمونه پپتیدی خالص از فریزدرایر آلمانی Christ، مدل Alpha 1-2 LD plus استفاده شد.

برای شناسایی محصول خالص شده از Ms-LC، دستگاه Agilent Triple Quadrupole LC/MS 6410 و طیف‌سنج جرمی با مشخصات یونیزاسیون‌کننده الکترواسپری با منبع ولتاژ ۳/۵ کیلوولت فشار گاز نیولایزر ۵۰ پوند بر اینچ مربع استفاده شد.

در طی مراحل الیزا از میکروپلیت ۹۶ خانه پلاستیکی Maxiport برند Nunc، برای جداسازی پلاسما از سانتریفیوژ آلمانی Hettich مدل Rotofix 32A، برای کنترل دما از انکوباتور آلمانی Memmert مدل Inc246، برای شست‌وشوی میکروپلیت از الیزا و اشتر ایرانی Hydroflow مدل 2CH-8M و برای خوانش جذب از دستگاه الیزا ریدر آمریکایی Chromate مدل 4306 استفاده شد.

**بیانیه اخلاقی:** بخش کار با حیوانات مطالعه حاضر تحت نظارت کمیته اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی (با کد اخلاق RVSRI.REC. 98.019) و در شرایط نگهداری و تغذیه استاندارد حیوانات توسط افراد خبره و متخصص انجام شد.

**انتخاب توالی‌های پپتیدی:** بررسی مطالعات گذشته‌نگر نشان داد در ناحیه لوپ G-H، ۲ جایگاه شاخص آنتی‌ژنیکی یا ایمونودومیننت وجود دارد. جایگاه اول که اهمیت بیشتری دارد، توالی اسیدآمینه‌های ۱۴۱-۱۶۰ و جایگاه دوم توالی ۱۹۸-۲۱۱ می‌باشد (۱۷، ۱۸). در مطالعه حاضر این دو ناحیه به ترتیب پپتید A و B نامیده شد و به روش بیوانفورماتیک مورد بررسی قرار گرفتند.

برای این منظور ابتدا توالی نوکلئوتیدی VP1 در ویروس تب برفکی سویه O2016 بررسی شد. روش کار به‌طور خلاصه از این قرار بود: ابتدا استخراج RNA ژنومیک از ۲۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون ویروسی O2016 توسط کیت سیلیکا فیلتر (High Pure Viral RNA Extraction Kit, Roche) انجام شد. سپس ژن ID توسط کیت One-Step RT-PCR (Titanium® tube, Roche) و پرایمر اختصاصی تایپ O به طول ۸۰۰bp تکثیر شد. سپس محصول PCR جهت تعیین توالی به روش خوانش دوطرفه (Eurofins MWG Operon LLC) ارسال شد. ویروس O2010 که تا سال ۱۳۹۵ در واکسن مورد استفاده قرار می‌گرفت نیز با همین روش تعیین توالی شده است. پس از بررسی توالی نوکلئوتیدی و کسب اطمینان از کیفیت توالی، ژن مزبور توسط نرم‌افزار Bioedit نسخه 7.2.5 به اسیدآمینه ترجمه شد. توالی اسیدآمینه VP1 در سایت NCBI توسط سرویس BLAST (Protein Biological Local Alignment Tool) بررسی شد. ۲۴ عدد از ویروس‌های همولوگ (E=0) با ویروس مزبور از Genebank انتخاب و با یکدیگر مقایسه شدند. جایگاه‌های آنتی‌ژنیک پروتئین VP1 در ۲۴ ویروس انتخاب و ویروس‌های O2016 و O2010 با یکدیگر مقایسه شدند و توالی پپتیدهای بررسی‌شده جهت تهیه واکسن پپتیدی استفاده شدند (۱۹).

در مطالعه حاضر ۲ توالی، ۱۴ و ۲۰ آمینواسیدی به ترتیب با سکانس‌های EARHKQKIVAPVKQ و ATNVRGDLQVLAQKAARTLP انتخاب شدند. این توالی‌ها جهت سنتز آزمایشگاهی استفاده گردیدند.

**سنتز پپتید:** توالی‌های پپتیدی طبق استراتژی فاز جامد ((Solid phase peptide synthesis (SPPS) و مطابق پروتکل Fmoc بر بستر رزین ۲-کلروتربیتیل کلراید سنتز شدند. در هر مرحله کوپل شدن آمینواسیدها با معرف کایزر چک شد. پس از انجام سنتز با حفظ محافظت‌های زنجیر جانبی و انتهای آمینی، توالی با استفاده از محلول ۱ درصد تری فلئورواستیک اسید از رزین جدا شد.

محافظت‌های زنجیر جانبی آمینواسیدهای توالی‌های سنتز شده با استفاده از واکنشگر K (۸۲/۵ درصد تری فلئورو استیک اسید: ۴/۵ درصد تیوانیسول: ۴/۵ درصد آب: ۴/۵ درصد فنول: ۲/۵ درصد اتیلن دی تیول: ۱/۵ درصد تری اتیل سیلان) جدا شدند. سپس حلال تحت خلأ تقطیر شد و حجم محلول به ۲ میلی‌لیتر کاهش یافت. به محتویات باقیمانده به آرامی دی اتیل اتر اضافه شد. رسوب تشکیل شده پس از فیلتر شدن در آون خشک شد.

**خالص‌سازی پپتیدها:** محصول به دست آمده به کمک کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا تهیه‌ای (Semi-Prep HPLC)، با برنامه گرادیان فاز متحرک (محلول فاز A، آب همراه با یک‌دهم درصد تری فلئورو استیک اسید و فاز B حاوی مخلوط ۷۰ به ۳۰ از استونیتریل و آب همراه با یک‌دهم درصد تری فلئورو استیک اسید) از ۹۵ تا صفر درصد A با سرعت شارش ۱۰ میلی‌لیتر در دقیقه در طول موج ۲۱۸ نانومتر خالص شد. سپس خلوص برش‌های جمع‌آوری شده با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالای تجزیه‌ای مطابق برنامه گرادیان فاز متحرک (فاز A، آب همراه با یک‌دهم درصد تری فلئورو استیک اسید و فاز B حاوی مخلوط ۷۰ به ۳۰ از استونیتریل و آب همراه با یک‌دهم درصد تری فلئورو استیک اسید)، با سرعت شارش ۱ میلی‌لیتر در دقیقه در طول موج ۲۱۸ نانومتر بررسی شد.

(جدول ۱) و به دنبال آن با خارج کردن حلال آلی (استونیتریل)، محلول آبی باقیمانده با استفاده از دستگاه فریزدرایر (در دمای ۵۵- درجه سانتی‌گراد با حداکثر قدرت پمپ برای ایجاد خلأ) خشک و پپتید خالص جمع‌آوری شد.

**شناسایی پپتیدهای سنتز شده:** جهت شناسایی و تأیید ساختار ترکیبات سنتز شده پپتیدی نمی‌توان از روش‌های معمول طیف‌سنجی نظیر رزونانس مغناطیسی هسته‌ای پروتون و کربن بهره گرفت، چراکه به دلیل کثرت تعداد کربن و پروتون در این ترکیبات، طیف‌های پیچیده‌ای حاصل می‌شود که به سختی می‌توان آن‌ها را تفسیر کرد. مگر آنکه طیف‌های دوبعدی ترکیبات تهیه شوند و بر این اساس بتوان در مورد ساختار آن‌ها اظهار نظر کرد. بنابراین بهترین روش برای این منظور استفاده از طیف‌سنجی جرمی است.

**ارزیابی ایمنی‌زایی (فرمولاسیون و تزریقات نمونه‌های پپتیدی):** برای انجام تست میزان پاسخ ایمنی به پپتید، به ایمن‌سازی حیوان مدل و تهیه آنتی‌بادی‌های پیر ایمیون نیاز است. ایمن‌سازی خرگوش‌ها با استفاده از پپتیدها انجام شد. برای تهیه سرم‌های کنترل مثبت نیز از سرم‌های BRS (Bovine Reference Serum) سروتیپ O که سرم‌های منوالان استاندارد علیه یک سروتیپ O تب برفکی با تست خنثی‌سازی (SN)  $\geq 2$  بودند، استفاده شد. ویروس‌ها تغلیظ و پپتیدها در بافر نمکی فسفات ۰/۰۱۱ مولار با  $\text{pH} = 7/4$  حل شدند.

به سبب نقطه ایزوالکتریک (pI, Isoelectric point) (بالای ۱۰)، خصوصیات فیزیکوشیمیایی و ترکیب به‌خصوص پپتیدهای استفاده‌شده، ابتدا این پپتیدها به پروتئین حامل BSA به‌واسطه گلوترآلدئید کراس لینک شدند، سپس فرمولاسیون آن‌ها با ادجوانت آبی آلومینیوم هیدروکساید به نسبت ۱:۳ (ژل آلومینیوم هیدروکساید به کمپلکس پپتید+BSA) انجام و به مدت ۲ ساعت با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه مخلوط شد.

جدول ۱. برنامه آنالیز نمونه پس از خالص‌سازی.

درصد فاز B	درصد فاز A	زمان (دقیقه)
۵	۹۵	۰
۵	۹۵	۵
۴۵	۵۵	۴۵
۱۰۰	صفر	۵۵
۱۰۰	صفر	۶۰

جدول ۲. نتایج آنالیز توالی‌های طراحی‌شده.

پپتید	توالی	شروع	پایان	توالی
۲۰ آمینواسیدی	ATNVRGDLQVLAQKAARTLP	۶	۱۰	GDLQV
		۷	۱۳	DLQVLAQ
۱۴ آمینواسیدی	EARHKQKIVAPVKQ	۵	۱۱	KQKIVAP
		۶	۱۴	QKIVAPVKQ

جدول ۳. نتایج خوانش الایزای غیرمستقیم پپتیدی بر روی سرم‌های خرگوش‌های هایپر ایمیون علیه پپتیدها.

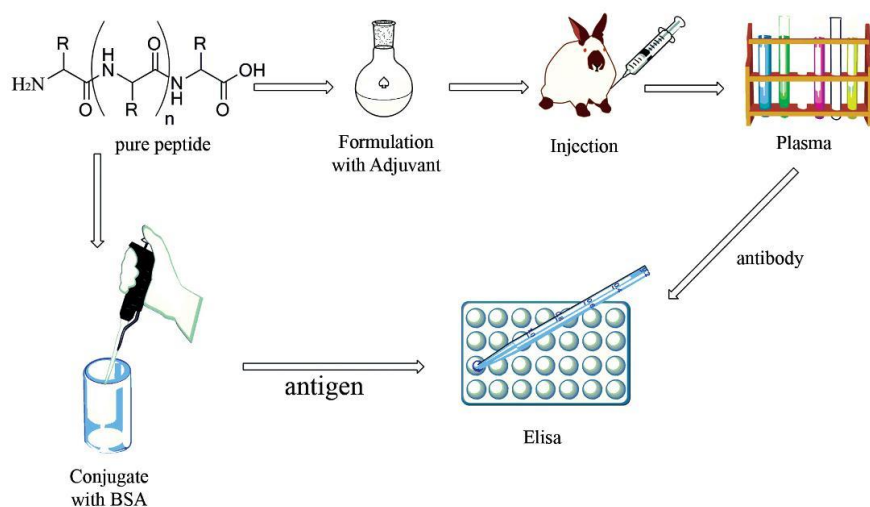
	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲
A	۱/۳۵۸	۱/۲۳۰	۱/۱۲۶	۱/۱۰۰	۱/۲۴۷	۰/۱۰۸	۰/۹۲۹	۱/۰۰۷	۰/۹۹۵	۱/۰۳۰	۱/۰۹۷	۰/۱۲۳
B	۱/۲۲۶	۱/۲۴۸	۰/۹۷۱	۱/۰۷۶	۱/۰۷۳	۰/۰۹۷	۰/۸۴۸	۰/۹۳۷	۱/۰۲۰	۰/۹۱۵	۰/۹۶۲	۰/۱۱۰
C	۱/۱۶۹	۱/۵۰۲	۱/۳۲۷	۱/۲۶۱	۱/۱۴۸	۰/۲۱۵	۰/۹۹۷	۱/۱۰۵	۰/۸۸۸	۱/۰۸۳	۱/۰۶۳	۰/۲۲۵
D	۱/۰۷۹	۱/۲۴۱	۱/۰۴۲	۰/۹۴۴	۱/۰۸۸	۰/۱۶۰	۰/۸۲۵	۰/۸۴۴	۱/۰۴۶	۱/۰۵۴	۱/۱۰۴	۰/۱۷۶
E	۱/۳۲۶	۱/۲۶۶	۱/۰۱۲	۱/۰۷۷	۱/۰۵۷	۰/۱۱۵	۰/۸۴۶	۰/۸۶۵	۱/۰۳۱	۰/۸۸۶	۱/۰۷۶	۰/۱۲۷
F	۱/۲۸۶	۱/۴۰۷	۱/۱۳۱	۱/۰۸۰	۱/۳۹۴	۰/۲۴۷	۰/۹۶۹	۱/۰۹۵	۱/۰۹۱	۱/۰۳۸	۱/۰۳۹	۰/۲۶۳
G	۱/۲۰۹	۱/۰۵۷	۰/۹۸۹	۱/۰۵۹	۰/۹۹۹	۰/۱۱۴	۰/۷۰۹	۰/۸۵۷	۰/۷۷۴	۰/۷۳۶	۱/۰۰۶	۰/۱۲۳
H	۱/۴۱۶	۱/۲۴۳	۰/۹۷۸	۰/۹۹۳	۱/۵۷۷	۰/۲۳۵	۱/۰۵۴	۰/۹۹۹	۰/۹۴۷	۰/۸۸۵	۱/۱۶۶	۰/۳۰۸



**آزمایش الایزا برای تعیین پاسخ آنتی‌بادی:** از آنجاکه pH ایزوالکتریک پپتیدها از بافر کوتینگ کربنات - بی‌کربنات بیشتر بود، ابتدا پروتئین حامل BSA به کف میکروپلیت چسبانده و سپس با استفاده از لینکر، سر آمینی پپتیدها به پروتئین BSA فراکشن V (با نسبت ۲۰:۱ از پروتئین به پپتید) متصل شدند. از این رو BSA در بافر کربنات بی‌کربنات (۰/۰۵ مولار) به مقدار ۱۵ میکروگرم در هر میلی‌لیتر حل شد و کوتینگ با آن انجام گرفت. سپس پلیت با فویل آلومینیومی پوشانده و در ظرف پلاستیکی قرار داده شد. در گام بعدی پس از ۱ شب انکوباسیون در ۴ درجه سانتی‌گراد، مایع رویی (حاوی مقدار کمی پروتئین‌های BSA متصل‌نشده) دور ریخته شد و سپس ۲ بار با PBS شست‌وشو صورت گرفت. در ادامه با به‌کارگیری سیستم متصل‌کننده‌های متقاطع (گلوترآلدئید) به میزان ۰/۲ درصد (حجمی / حجمی)، آمینواسیدهای لایزین سطحی BSA جهت واکنشگری با گروه‌های آمینی پپتید فعال شدند. براین اساس مقدار از پیش تعیین‌شده ۳۰۰ نانوگرم از هر پپتید در هر چاهک براساس نتایج غلظت مناسب آنتی‌ژن (پپتید) به آنتی‌بادی با چکر بورد (Chequerboard test)، میزان ۱۰۰ میکرولیتر از بافر حاوی پپتید به هر چاهک میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای افزوده شد و بدین صورت کوتینگ دومرحله‌ای (یک مرحله کوتینگ BSA و مرحله دوم کوتینگ پپتید به BSA فعال‌شده با گلوترآلدئید) انجام گرفت. پس از ۹۰ دقیقه انکوباسیون در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد، محتویات دور ریخته شد و چاهک‌ها ۳ بار با بافر نمکی فسفات ۰/۰۱۱ مولار شسته شدند. چاهک‌ها با ۲۰۰ میکرولیتر بافر بلاکینگ (۰/۰۵ درصد حجمی / حجمی) PBS-Tween 20 حاوی ۱ درصد کازئین مسدودسازی (Blocking) شدند. سپس ۳ بار شست‌وشوی مجدد با بافر PBS-T صورت گرفت. در ادامه با سرم خرگوشی (رقیق‌شده ۱:۴۰) در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت انکوبه شدند. سپس ۳ بار با PBS-T شست‌وشو صورت گرفت و انکوباسیون با آنتی‌بادی بزی ضدخرگوشی کونژوگه با HRP انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ دقیقه صورت گرفت. سپس ۳ بار با PBS-Tween 20 شست‌وشو صورت گرفت و پس از آن ۱۰۰ میکرولیتر از TMB افزوده و انکوباسیون به مدت ۲۰ دقیقه در فضای تاریک انجام شد. در پایان با افزودن ۵۰ میکرولیتر اسید سولفوریک ۱ مولار متوقف و جذب نوری (OD) در طول موج ۴۵۰ نانومتر، با استفاده از الایزا ریدر خوانش شد. برای تأیید تکرارپذیری نتایج برای هر پپتید، تعداد تکرار متعدد در هر چاهک در نظر گرفته شد.

**جدول ۴.** مقادیر میانه و دامنه میان‌چارکی OD مربوط به پپتیدهای ۲۰ آمینواسید و ۱۴ آمینواسید قبل و بعد از آزمایش.

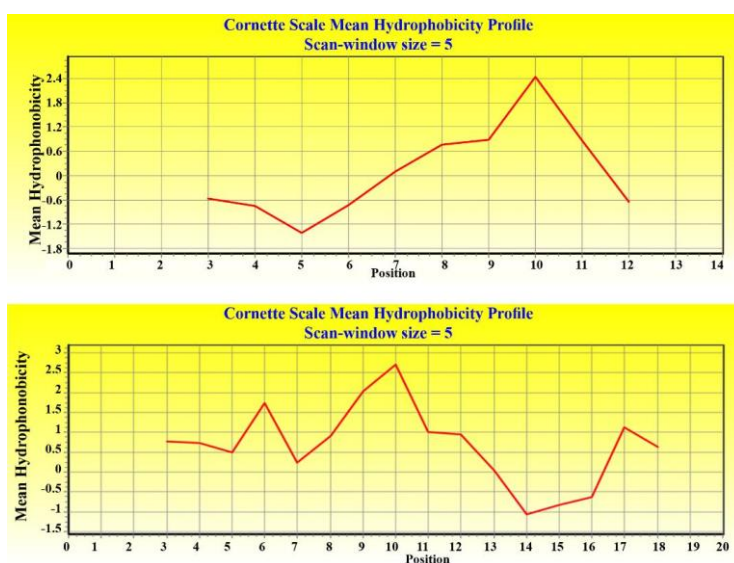
مقدار P مقایسه دو پپتید	پپتید ۱۴ آمینواسید	پپتید ۲۰ آمینواسید	زمان سنجش
۰/۳۸۲	۰/۱۵ (۰/۱۲-۰/۲۵)	۰/۱۴ (۰/۱۱-۰/۲۳)	قبل از تزریق
< ۰/۰۰۱	۱/۰۰ (۰/۸۸-۱/۰۵)	۱/۱۳ (۱/۰۶-۱/۲۶)	بعد از تزریق
	< ۰/۰۰۱	< ۰/۰۰۱	مقدار P مقایسه قبل و بعد



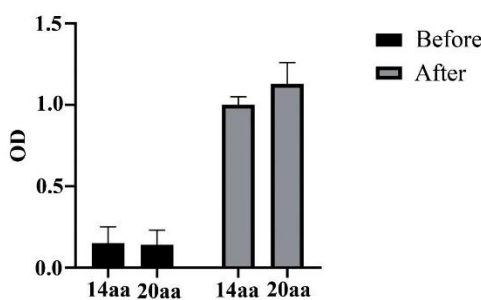
## نتایج

**نتایج بخش طراحی بیوانفورماتیکی پپتید و آنالیزها:** پپتید ۲۰ آمینواسیدی انتخابی با وزن مولکولی ۲۲۲۱/۴۶ بود. pI آن ۱۰/۸۴ و میزان پایداری آن در آزمایشگاه = Instability index = ۱۹/۹۰ و نیمه عمر آن نیز مطلوب است. باتوجه به خصوصیات فیزیکوشیمیایی، pI این پپتید نسبتاً بالا می‌باشد که با استفاده از پروتئین حامل در تست‌ها اصلاح می‌شود. همچنین مقادیر آن در اسپکتروفتومتری به سبب عدم وجود برخی از آمینواسیدها در خوانش نوری، قابل بررسی نمی‌باشد. نیمه عمر آن در حالت محلول و بدون نگهدارنده براساس محاسبات بیوانفورماتیکی (سرور ProtParam)، در دمای آزمایشگاه حدود ۶ ساعت است (مطابق با تست زمان واقعی (Real time) کنترل کیفی در ارزیابی پایداری فرآورده‌های بیولوژیک) و امکان شروع تجزیه آن بعد از این زمان وجود دارد، بنابراین می‌بایست به صورت پودر به طور مستمر در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شود.

شاخص Gravy پپتید ۲۰ آمینواسیدی نشان می‌دهد حل شدن این پپتید در آب مقطر یا PBS ایزوتونیک (pH فیزیولوژیک) کمی با تأخیر و اندکی کمتر از حالت معمول است، اما این امر برای پپتید ۱۴ آمینواسید پایین‌تر از ۱- بوده است. بنابراین حلالیت آن مناسب‌تر است. این پپتید بعداً نیز در حل شدن به PBS کدورت ضعیفی می‌داد. عموماً gravity بالای ۰/۵- می‌بایست باشد و کمتر از آن حلالیت پپتید پایین است (Gravy هرچه منفی‌تر باشد، حلالیت بیشتر است). از نظر موقعیت ژنومی، در مقایسه با سوش فرانس این پپتید در موقعیت آمینواسیدی ۸۶۵ تا ۸۸۴، ژنوم ویروس تب برفکی تایپ O و در توالی پروتئینی مابین اسیدآمینه ۱۶۱-۱۴۱: VP1 واقع شده است.



تصویر ۲. میزان آب‌دوستی پپتیدهای ۱۴ آمینواسیدی (بالا) و ۲۰ آمینواسیدی (پایین).



تصویر ۳. مقایسه مقادیر OD ایزا درمورد پپتید ۲۰ آمینواسیدی و پپتید ۱۴ آمینواسیدی قبل و بعد از تیمار.



در پپتید ۱۴ آمینواسیدی با توجه به خصوصیات فیزیکیوشیمیایی، pI نسبتاً بالا می‌باشد. همچنین به دلیل نوع توالی آمینواسید آن در اسپکترومتری قابل بررسی از نظر مقدار نیست. نیمه عمر آن در حالت محلول و بدون نگهدارنده در دمای آزمایشگاه براساس محاسبات بیوانفورماتیکی حدود ۲ ساعت می‌باشد. پپتید ناپایدار است و امکان تجزیه آن بعد از گذشت این زمان وجود دارد، بنابراین می‌بایست به صورت پودر باشد و به طور مستمر در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شود. همچنین مدت این نگهداشت کمتر از ۱ سال است (مطابق با تست زمان واقعی کنترل کیفی در ارزیابی پایداری فرآورده‌های بیولوژیک و معادله آرنیوس در کنترل کیفی). شاخص gravity پپتید ۱۴ آمینواسیدی نشان می‌دهد این پپتید به راحتی در آب مقطر ایزوتونیک (pH فیزیولوژیک) حل می‌شود و حلالیت آن از پپتید ۲۰ آمینواسیدی بهتر است.

جهت ارزیابی قدرت آنتی‌ژنی و وجود اپی‌توپ‌های B cell از نرم‌افزار تحت شبکه با آدرس دسترسی <http://tools.iedb.org/main/bcell> استفاده شد (۲۰).

**نتایج و آنالیزهای بخش سنتز پپتید (خالص‌سازی پپتیدها):** پس از انجام کروماتوگرافی مایع با کارایی بالای تهیه و خشک شدن با استفاده از فریز درایر، خلوص نمونه‌های پپتیدی ۱۴ و ۲۰ آمینواسیدی به ترتیب ۹۶ و ۹۸ درصد بودند.

**شناسایی توالی‌های سنتز شده:** در طیف جرمی توالی ۱۴ آمینواسیدی، پیک‌های شاخص  $[M+2H]^{2+}/2$ ،  $[M+3H]^{3+}/3$  و  $[M+4H]^{4+}/4$  به ترتیب در جرم‌های ۸۱۷/۸، ۵۴۵/۲ و ۴۰۸/۹ تأییدکننده سنتز نمونه بودند. برای ترکیب با توالی ۲۰ آمینواسیدی نیز پیک‌های ۱۰۶۳ و ۷۰۸ به ترتیب نشان‌دهنده جرم‌های  $[M+2H]^{2+}/2$ ،  $[M+3H]^{3+}/3$  بودند.

**ارزیابی قدرت آنتی‌ژنی و وجود اپی‌توپ‌های B cell:** ارزیابی شاخص‌های آنتی‌ژنی و وجود اپی‌توپ‌های B cell حاکی از آن بود که علی‌رغم کوتاه بودن ۲ پپتید سنتز شده، می‌توانند در القای ایمنی موفق عمل کنند. نکته دیگر اینکه اپی‌توپ‌های B cell در داخل و یا منطبق بر بخش آنتی‌ژنی هر دو توالی بودند. در **جدول ۲** به نتایج آنالیز این دو شاخص اشاره شده است. میزان آبدوستی پپتیدهای سنتز شده با نرم‌افزار Bioedit نسخه 7.0.9.0 بررسی شد که نتایج در **تصویر ۲** آورده شده است. نواحی‌ای که بیشترین میزان آبدوستی را نشان می‌دهند، با نواحی آنتی‌ژنیک و اپی‌توپ‌های B cell منطبق بودند.

**نتایج ایمن‌سازی و بررسی پاسخ ایمنی به پپتیدها با روش الایزای غیرمستقیم:** پس از انجام تزریق سوم و تکمیل شدن ایمن‌سازی، خون‌گیری انجام و سرم جدا شد. سپس نمونه‌ها با اضافه کردن ۲۰ درصد گلیسرول در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده ذخیره‌سازی شدند. چکر بورده جهت بررسی میزان غلظت مناسب آنتی‌ژن پپتیدی به آنتی‌بادی و سپس کونژوگه نسبت به این دو انجام شد. نتایج نشان‌دهنده ارزش ایمن‌سازی با مقدار ۴۰۰ میکروگرم پپتید متصل به پروتئین حامل (BSA) در دُز آغازین و ۲۰۰ میکروگرم در دُزهای یادآور بود. در چکر بورده، غلظت مناسب پپتیدی جهت کوتینگ ۳۰۰ نانوگرم در هر چاهک برای هر پپتید و غلظت مناسب سرم ۱:۴۰ به دست آمد. همچنین کونژوگه نیز با رقت ۱:۱۰۰۰۰ به عنوان بهترین غلظت انتخاب شد.

نقطه جداکننده (Cutt-off) برای تمایز بین سیگنال‌های مثبت و منفی ۰/۴ واحد OD تعیین شد که با استفاده از مقدار متوسط ۳ آزمایش مستقل و میانگین ۳ نمونه سرم مرجع منفی استاندارد خرگوش، به علاوه ۰/۱۵ به دست آمد.

در ادامه بر روی نمونه‌های سرم‌های به دست آمده از اولین روز تزریق (روز صفر) و ۷ روز بعد از تزریق سوم خرگوش تست الایزا گذاشته شد. نتایج بیانگر موفقیت ایمن‌سازی و نتایج بهتر ایمنی‌زایی در حیوان مدل، توسط پپتید ۲۰ آمینواسیدی در مقایسه با پپتید ۱۴ آمینواسیدی بود. در **جدول ۳**، ستون ۱ تا ۵ نتایج پلیت الایزای پوشش داده شده با پپتید ۲۰ آمینواسیدی و ستون ۷ تا ۱۱ نتایج پپتید ۱۴ آمینواسیدی نشان داده شده است. از سرم خرگوش‌های هایپر ایمنیون پس از ۵ بار تزریق جهت الایزا استفاده شده است. ستون ۶ (پپتید ۲۰ آمینواسیدی) و ۱۲ (پپتید ۱۴ آمینواسیدی) سرم‌های خرگوش در روز صفر بوده که به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شدند. هرچه طول توالی پپتید بیشتر باشد در موفقیت پاسخ ایمنی تأثیرگذارتر است و از سوی دیگر اگر این پپتید علاوه بر ایمنی‌زایی خواص خنثی‌کنندگی هم داشته باشد، می‌تواند در محافظت و خنثی‌سازی علیه ویروس نقش پررنگ‌تری ایفا کند و همچنین نتایج بالاتری در تست خنثی‌سازی ویروس نشان دهد.

میانگین کلی OD برای پپتید ۲۰ آمینواسیدی و ۱۴ آمینواسیدی در چاهک‌های پلیت به ترتیب ۱/۱۱۶ و ۰/۹۷۰ بوده است. همچنین پپتید ۱۴ آمینواسیدی تفاوت بیشتری در CV در یک سنجش را (Intra-assay The coefficient of variation (CV)) در بین چاهک‌ها نسبت به پپتید ۲۰ آمینواسیدی نشان می‌دهد. از سوی دیگر، اگر در اتصال پپتیدها به ته چاهک میکروپلیت پلی استیرن از پروتئین BSA به عنوان پروتئین پایه‌ای نگهدارنده به پلیت استفاده نشود، سیگنال‌های به دست آمده به سبب pH ایزوالکتریک بالای پپتیدها، طول کوتاه توالی آن‌ها، پایداری کم و امکان دفن شدن حین بلاکینگ، پایین‌تر از ODهای ۰/۶ خواهد بود.

ابتدا آزمون آماری کولموگوروف اسمیرنوف (Kolmogorov-Smirnov) برای تست نرمالیتی داده‌ها انجام شد و از آنجاکه توزیع داده‌ها نرمال نبود، از آزمون آماری ناپارامتریک من ویتنی یو (Mann-Whitney U) برای مقایسه مقادیر قبل و بعد و نیز ۲ گروه پپتید ۲۰ و پپتید ۱۴ اسیدآمینه‌ای استفاده شد (۴۰ نمونه در گروه پپتید ۲۰ آمینواسیدی، ۴۰ نمونه در گروه پپتید ۱۴ آمینواسیدی بعد از تزریق و ۸ نمونه در گروه پپتید ۲۰ آمینواسیدی قبل از تزریق و ۸ نمونه نیز در گروه پپتید ۱۴ آمینواسیدی قبل از تزریق تحلیل شدند). براساس نتیجه آزمون آماری، مقادیر قبل و بعد در هر دو پپتید ۲۰ و ۱۴ اسیدآمینه‌ای با هم تفاوت آماری معنی‌دار دارند و نیز مقادیر OD بعد از تزریق، در پپتید ۲۰ اسیدآمینه‌ای به طور معنی‌دار بیشتر است. در مورد مقادیر قبل از تزریق، OD تفاوت آماری معنی‌دار ندارد (جدول ۴ و تصویر ۳).

## بحث

یک بخش مجزا از پروتئین آنتی‌ژن می‌تواند به عنوان یک واکنش زیرواحد مؤثر عمل کند. این بخش کوچک آنتی‌ژن پپتید است که از زنجیره‌ای کوچک از آمینواسیدها تشکیل شده است و یک اپی‌توپ واحد را تشکیل می‌دهد. پپتیدهای کوچکی که شامل اپی‌توپ‌ها می‌باشند، ایمونوژن بوده و می‌توانند به عنوان واکنش پپتیدی استفاده شوند. به عنوان مثال پروتئین -FMDV (VP1)، یک پپتید ایمونوژنیک است که به طور شیمیایی سنتز شده و برای ایجاد پاسخ ایمنی مورد آزمایش قرار گرفته است. با این حال، پپتیدهای خیلی کوچک شامل ۱۵ تا ۲۰ آمینواسید، به اندازه کافی ایمونوژنیک نمی‌باشند و نسبت به پپتیدهای بزرگ‌تر ایمنی‌زایی کمتری دارند (۱۵).

واکنش پپتیدی یک واکنش زیرواحدی است که براساس هر پپتیدی که برای ایمن‌سازی ارگانسیم در برابر عامل بیماری‌زا عمل می‌کند، طراحی می‌شود. واکنش‌های پپتیدی اغلب سنتزی می‌باشند و پروتئین‌های طبیعی موجود در عوامل بیماری‌زا را تقلید می‌کنند (۲۱). این واکنش‌ها در برانگیختن پاسخ ایمنی بسیار مؤثر و گزینشی عمل می‌کنند. علاوه بر عوامل بیماری‌زا واکنش‌های پپتیدی می‌توانند به عنوان واکنش‌های درمانی سرطانی استفاده شوند (۲۲).

در حال حاضر، الیزا یکی از رایج‌ترین رویکردها در تشخیص FMDV علاوه بر روش‌های جداسازی ویروس، VNT و تکنیک‌های مبتنی بر PCR است. طبق گزارشی از آزمایشگاه مرجع منطقه‌ای برای FMD در آسیای جنوب شرقی، بیش از ۱۳۰۰۰ الیزا در مقایسه با ۳۰۴ VNT و ۷۹۰ سنجش مبتنی بر PCR برای تشخیص FMD در سال ۲۰۱۷ انجام شده است (۱، ۲، ۱۶).

الیزای رقابتی فاز جامد SPC-ELISA نیز برای تشخیص FMDV توسعه داده شده است. این روش براساس رقابت بین آنتی‌بادی‌های موجود در سرم‌های آزمایش شده و آنتی‌بادی‌های ضد FMDV کوچک هندی اختصاصی سروتیپ است (۱، ۲). Wong و همکاران در سال ۲۰۲۰ با توجه به ارزیابی داده‌های آزمایشگاهی بیان کردند که هر دو LPB-ELISA و SPC-ELISA دارای حساسیت و محدودیت تشخیص مشابهی می‌باشند، اما با وجود این ویژگی SPC-ELISA بالاتر گزارش شده و یک روش تشخیصی براساس آنتی‌بادی اختصاصی FMDV بهبودیافته را برای غربالگری انبوه (Mass screening) ارائه می‌دهد. همچنین Hatem و همکاران در سال ۲۰۲۲ و سایر محققین نشان دادند SPC-ELISA نسبت به VNT برای تشخیص زودهنگام عفونت FMDV در گاو و گوسفند حساس‌تر است (۱، ۲، ۱۶).

علاوه بر این، حساسیت SPC-ELISA کمتر تحت تأثیر سویه‌های FMDV مورد استفاده در سنجش قرار می‌گیرد، در حالی که حساسیت VNT می‌تواند به طور قابل توجهی در صورت استفاده از ویروس هترولوگ کاهش یابد.

الیزای رقابتی فاز جامد که کیت‌های رایج در ایران و جهان می‌باشند، می‌توانند آنتی‌بادی‌ها علیه ۶ سروتیپ غیر (A, C, SAT 1, SAT 2, SAT 3, and Asia 1) FMDV O با ویژگی بین ۹۹/۴ تا ۹۹/۹ درصد و حساسیت قابل مقایسه با LPB-ELISA و VNT

را تشخیص دهند (۱۶). اخیراً طی مطالعه‌ای حساسیت کیت SPC-ELISA برای تشخیص اختصاصی سروتیپ O FMDV کمتر بود و نتایج مثبت کاذب بیشتری در مقایسه با LPB-ELISA و VNT ایجاد کرد (۱، ۲).

در این پروژه مطالعاتی، توالی‌های طراحی شده پس از بررسی روش‌های سنتز بر روی رزین ۲-کلروتیرنیل کلراید طبق پروتکل فاز جامد سنتز شدند. پس از محافظت‌زدایی زنجیره جانبی توالی‌ها، خالص‌سازی توسط کروماتوگرافی انجام و سپس با استفاده از طیف جرمی، ساختار توالی‌های سنتز شده بررسی شد. در قدم نهایی برای بررسی توالی‌های طراحی شده، نمونه‌ها پس از فرموله شدن با ادجوانت مناسب، در حیوان مدل تزریق شدند. پس از ۳ دوره تزریق با فاصله زمانی ۲ هفته در هر تزریق، خون‌گیری انجام و سرم‌ها جداسازی شدند. با سرم‌های به‌دست‌آمده تست ایمنی‌زایی انجام شد.

**نتیجه‌گیری نهایی:** نتایج تست الیزا نشان می‌دهد این دو پپتید در صورت مطالعات بیشتر می‌توانند کاندیدهای مناسبی جهت ارزیابی پاسخ ایمنی علیه ویروس تب برفکی در تست‌های سرولوژیک و در حیوانات واکسینه و غیرواکسینه یا آلوده به ویروس وحشی باشند. در این میان پپتید ۲۰ آمینواسید نتایج ایمنی‌زایی بهتری را نسبت به پپتید ۱۴ آمینواسیدی در خرگوش نشان داد.

به نظر می‌رسد سنتز پپتیدهای انتخابی برداشت‌شده از ناحیه VI ژنوم ویروس که مسئول سنتز کل کپسید می‌باشد، قدرت ایمنی‌زایی مؤثر در حیوان آزمایشگاهی داشته و همچنین این ایمنی واکنش متقاطع با ویروس کامل دارد. این پپتید در ادامه قادر به استفاده جهت توسعه کیت‌های الیزا پپتیدی می‌باشد. مطالعات صورت‌گرفته حاکی از آن است که کوتاه بودن پپتیدهای سنتزی ممکن است شکل فضایی منطبق با نواحی متناظر با ویروس کامل را ایجاد نکند و از سوی دیگر سبب سرعت تخریب سریع‌تر آن شود. احتمالاً این موضوع اثر نامطلوبی بر قدرت ایمنی‌زای پپتیدها در حیوان خواهد داشت. بنابراین پیشنهاد می‌شود از پپتیدهای بالای ۲۰ آمینواسید با ارزیابی میزان پاسخ ایمنی، حفظ کانفورمیشن فضایی و مهندسی ساخت با بهینه‌سازی خواص فیزیکوشیمیایی برای فرمولاسیون مؤثرتر و همچنین استفاده در ساخت کیت و امکان کونژوگاسیون بعدی استفاده شود. همه این داده‌ها نشان می‌دهد پپتیدها قادر به تحریک سیستم ایمنی در خرگوش بوده و کیت‌های الیزای پپتیدی تهیه‌شده حاصل از آن‌ها که در مطالعه حاضر تولید شده است، می‌توانند به‌عنوان یک ابزار نظارت سرولوژیکی سریع و قابل‌اعتماد برای نظارت بر عفونت یا سطح ایمن‌سازی پس از واکسیناسیون باشد.

## سپاسگزاری

نویسندگان از معاونت پژوهشی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی جهت حمایت مالی از مطالعه حاضر تشکر و قدردانی می‌کنند.

## تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

## References

1. Abd Hatem A, Ahmed Abdul Wahid Al Anbagi N, Al-Alo KZK, Sabah Bustani G. Detection of clinical and subclinical foot and mouth disease virus in cattle in Al-Najaf Province. Arch Razi Inst. 2022;77(3):1185-1189. doi: 10.22092/ARI.2022.357621.2074 PMID: 36618320
2. Wong CL, Yong CY, Ong HK, Ho KL, Tan WS. Advances in the diagnosis of foot-and-mouth disease. Front Vet Sci. 2020;7:477. doi: 10.3389/fvets.2020.00477 PMID: 32974392
3. Perry BD, Rich KM. Poverty impacts of food-and-mouth disease and the poverty reduction implications of its control. Vet Rec. 2007;60:238-241. doi: 10.1136/vr.160.7.238 PMID: 17308024

4. Ashir Zia1 M, Dobson SJ, Rowlands DJ, Stonehouse NJ, Salahuddin Shah M, Habib M. Development of an ELISA to distinguish between foot-and-mouth disease virus infected and vaccinated animals utilising the viral non-structural protein 3ABC. *J Med Microbiol.* 2022;71:001516. doi: [10.1099/jmm.0.001516](https://doi.org/10.1099/jmm.0.001516)
5. Knowles NJ, Samuel AR. Molecular epidemiology of foot-and- mouth disease virus. *Virus Res.* 2003;91:65-80. doi: [10.1016/s0168-1702\(02\)00260-5](https://doi.org/10.1016/s0168-1702(02)00260-5) PMID: [12527438](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12527438/)
6. Rodriguez LL, Gay CG. Development of vaccines to ward the global control and eradication of food-and-mouth disease. *Expert Rev Vaccine.* 2011;10:377-387. doi: [10.1586/erv.11.4](https://doi.org/10.1586/erv.11.4) PMID: [21434805](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21434805/)
7. Zibaei M, Kianizadeh M, Keivanfar H, Rabani M, Hematzadeh F, Bokaei S. Identification of the foot and mouth disease foci from susceptible foci in khorasan razavi, province. *J Vet Res.* 2007;62:151-55.
8. Forner M, Cañas-Arranz R, Defaus S, de León P, Rodríguez-Pulido M, Ganges L, et al. Peptide-based vaccines: foot-and-mouth disease virus, a paradigm in animal health. *Vaccines (Basel).* 2021;9(5):477. doi: [10.3390/vaccines9050477](https://doi.org/10.3390/vaccines9050477) PMID: [34066901](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34066901/)
9. Nardin E, Calvo-Calle J, Oliveira G, Nussenzweig R, Schneider M, Tiercy J, et al. A totally synthetic polyoxime malaria vaccine containing plasmodium falciparum B cell and universal T cell epitopes elicits immune response in volunteers of diverse *HLA* types. *J Immunol.* 2001;166:481-489. doi: [10.4049/jimmunol.166.1.481](https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.1.481) PMID: [11123327](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11123327/)
10. Guo H, Song Y, Li H, Hu H, Shi Y, Jiang J, Guo J, Cao L, Mao N, Zhang Y. A mixture of t-cell epitope peptides derived from human respiratory syncytial virus F protein conferred protection in DR1-TCR Tg mice. *Vaccines.* 2024;12(1):77. doi: [10.3390/vaccines12010077](https://doi.org/10.3390/vaccines12010077)
11. Muhanguzi D, Ndekezi C, Nkamwesiga J, Kalayou S, Ochwo S, Vuyani M, et al. Anti-tick vaccines: Current advances and future prospects. *Methods Mol Biol.* 2022;2411:253-267. doi: [10.1007/978-1-0716-1888-2\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1888-2_15) PMID: [34816410](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34816410/)
12. Yang H, Kim DS. Peptide immunotherapy in vaccine development: From epitope to adjuvant. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2015;99:1-14. doi: [10.1016/bs.apcsb.2015.03.001](https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2015.03.001) PMID: [26067814](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26067814/)
13. Kaushik S, Kumari L, Deepak RK. Humanized mouse model for vaccine evaluation: an overview. *Clin Exp Vaccine Res.* 2024;13(1):10-20. doi: [10.7774/cevr.2024.13.1.10](https://doi.org/10.7774/cevr.2024.13.1.10) PMID: [38362371](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38362371/)
14. Pilon JL, Rhyan JC, Wolfe LL, Davis TR, McCollum MP, O'Rourke KI, et al. Immunization with a synthetic peptide vaccine fails to protect mule deer (*Odocoileus hemionus*) from chronic wasting disease. *J Wildl Dis.* 2013;49(3):694-8. doi: [10.7589/2012-07-200](https://doi.org/10.7589/2012-07-200) PMID: [23778624](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23778624/)
15. Malonis RJ, Lai JR, Vergnolle O. Peptide-based vaccines: Current progress and future challenges. *Chem Rev.* 2020;120(6):3210-3229. doi: [10.1021/acs.chemrev.9b00472](https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00472) PMID: [31804810](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31804810/)
16. Ivani Z, Ranjbar MM., Hemati B, Harzandi N, azimi SM. Evaluation of specific chicken IgY antibody value developing diagnostic capture antibody ELISA kit against Foot and Mouth disease. *Arch Razi Inst.* 2024;79(1):201-210. doi: [10.32592/ARI.2024.79.1.201](https://doi.org/10.32592/ARI.2024.79.1.201)
17. Ochoa WF, Kalko SG, Mateu MG, Gomes P, Andreu D, Domingo E, et al. A multiply substituted G-H loop from foot-and-mouth disease virus in complex with a neutralizing antibody: a role for water molecules. *J Gen Virol.* 2000;81(Pt 6):1495-505. doi: [10.1099/0022-1317-81-6-1495](https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-6-1495) PMID: [10811933](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10811933/)
18. Wang G, Liu Y, Feng H, Chen Y, Yang S, Wei Q, et al. Immunogenicity evaluation of MS2 phage-mediated chimeric nanoparticle displaying an immunodominant B cell epitope of foot-and-mouth disease virus. *Peer J.* 2018;6:e4823. doi: [10.7717/peerj.4823](https://doi.org/10.7717/peerj.4823)
19. Azimi SM, Mahravani H, Lotfi M. Genetic and antigenic evaluation of foot-and-mouth disease virus type a in the endemic area of iran within 2014-2015. *Arch Razi Inst.* 2020;75:349-357. doi: [10.22092/ari.2019.123610.1287](https://doi.org/10.22092/ari.2019.123610.1287)

20. Jespersen MC, Peters B, Nielsen M, Marcatili P. BepiPred linear epitope prediction 2.0. 2017. BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. *Nucleic Acids Res (Web Server issue)*. 2:2.
21. Nelde A, Rammensee HG, Walz JS. The peptide vaccine of the future. *Mol Cell Proteomics*. 2021;20:100022. [doi: 10.1074/mcp.R120.002309](https://doi.org/10.1074/mcp.R120.002309) PMID: 33583769
22. Melief CJ, van der Burg SH. Immunotherapy of established (pre)malignant disease by synthetic long peptide vaccines. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(5):351-60. [doi: 10.1038/nrc2373](https://doi.org/10.1038/nrc2373) PMID: 18418403