AF ۲۸۴

✓ پژوهش و سازندگی، شماره ۵۸، بهار ۱۳۸۲

مقایسه اثر بخشی و طول دوره ایمنی واکسن تب برفکی ساخته شده با دو یاور آبی (ژل دالومین + ساپونین) (مونتاناید)

● عبدالمحمد طالب‌شوشتری، ● همایون مهروانی، ● مهدی صالحی‌زاده و ● پرویز اهورائی، اعضای هیأت علمی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی

تاریخ دریافت: آذر ماه ۱۳۸۲ تاریخ پذیرش: تیر ماه ۱۳۸۲

چکیده

باتوجه به گزارشات مختلف مبنی بر اینکه واکسن تب برفکی (FMD) با یاور روغنی می‌تواند به عنوان یک واکنس مطلوب با طول دوره ایمنی‌زائی بیشتر از واکسن تب برفکی با یاور ژل دالومین مورد استفاده قرار گیرد. تصمیم گرفته شد تا در قالب یک پروژه این دو نوع واکسن در سطح آزمایشگاهی مورد مقایسه قرار گیرند. به همین منظور با استفاده از دو تیپ ویروسی O_1 و A_{87} مردآباد دو نوع واکسن دوتائی (بی والان) تهیه شد که تنها تفاوت بین آنها یاور موجود در آنها بود به‌طوری که در یک نوع واکسن تب برفکی یاور ژل دالومین + ساپونین و در دیگری یاور روغنی مونتاناید (ISA_{25}) مورد استفاده قرار گرفت. هر یک از واکسن‌های ساخته شده در یک گروه هشت راسی گاو و گوساله که به‌صورت تصادفی انتخاب شده بودند در ناحیه گردن تزریق شد و یک گروه شش رأسی نیز به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. از این گله ۲۲ رأسی در روزهای ۰، ۲۸، ۶۳، ۹۵، ۱۳۷، ۱۸۶، ۲۲۵، ۲۸۲ خونگیری به‌عمل آمد و با استفاده از آزمایش سرونوترالیزاسیون Sero neutralization (test) و فرمول Reed and muench تیتر لگاریتمی پاسخ پادتن آنها استخراج گردید: و با مقایسه آنها با تیتر حفاظت کننده (PD_{50}=۱/۲) این نتیجه حاصل شد که گرچه هر دو نوع واکسن در طول دورهٔ انجام پروژه تقریباً از تیتر حفاظت کنندگی برخوردار بودند ولی واکسن تولید شده با یاور ISA_{25} هم از نظر تیتر نهائی و هم از نظر دوام بالاترین میزان تیتر در طول دوره و نیز به دلیل خصوصیات فیزیکی و تولید آسان آن از واکسن آبی مطلوبتر است. ضمناً واکسن روغنی در مقایسه با واکسن آبی از دوام بالاتری برخوردار بود.

کلمات کلیدی: واکسن تب برفکی، یاور روغنی، FMD، واکسن تب برفکی با یاور آبی (ژل دالومین)، آزمایش سرونوترالیزاسیون ISA_{25}, Montanide, Reed & muench, (SNT)

✓ Pajouhesh & Sazandegi, No 58 PP: 87-89

Production of FMD oil vaccine, determination of its efficacy and potency and potency in comparison with FMD aqueous vaccine

By: A.M. Taleb Shoushtari. H Mahravani. M. Salehzadeh and P. Ahoorai, Scientific Board of Razi Institute.

According to defferent reports, foot and mouth disease (FMD) oil adjuvant vaccines are desirable with the more prolong immunity than aqueous vaccine. So, in this study we prepared two kind of bivalent FMD vaccines as follow:

a) FMD oil vaccine with ISA_{25} as an adjuvant (oil - in - water)

b) FMD aqueous vaccine with $Al(OH)_3$ + Saponinc as adjuvants

For preparing these vaccine we used type O_1 and type A_{87} (Mardabad) of FMD viruses. Each vaccines was inoculated (2.5 ml for calves and 5ml for adault) in one group of cuttle (8 Specices) Subcutancously in the neck and one group of cattle as blank (6 Specices). Then bleed at days; 0, 28, 63, 95, 137, 186, 252 and 282 post vaccination. then measured the FMD antibody titre against type O_1 and A_{87} by seroneutralization (SN) test, and calculated the Logaritmic antibody titre by read and mounch method. At the result, although each of two vaccines provided protective andtibodytitre during the project period (protection titbody response.

a) it provided best antibody response.

b) Protective antibody titre had been remain longer than the other.

c) It dont need expenive equipment for mixing, such as hemogenizer.

* ISA_{25} is an oil adjuvant that produce by Sepic comany in France.

Keywords: FMD vaccine. Oil adjuant. Aqueous vaccine. Seroneutralization (SN) Read and Mounch, ISA25. Montanide.

مقدمه

یاورها (Adjuvants) موادی هستند که به پادگن‌های موجود در یک واکسن اضافه می‌شوند تا باعث تحریک بیشتر سیستم ایمنی گردند. یاورها از طریق مختلف زیر اثر واکسن‌ها را بهبود می‌بخشند.

- افزایش قدرت پادگن
- با استفاده از یاورها می‌توان میزان پادگن مصرفی در یک دز را کاهش داده و واکسن ارزانتری تهیه نمود.
- طولانی شدن مدت زمان ایمنی
- تحریک تولید ترکیبات اختصاصی پاسخ ایمنی (ایزوتایپهای ویژه پادتن‌ها، ایمنی با واسطه سلولی) این عمل ممکن است برای حفاظت در مقابل یک پادگن خالص مورد نیاز باشد (۱۵).

مهمترین یاورها عبارتند از:

۱- یاورهای باکتریائی (Bacteria adjuvants) مانند مایکوباکتریها

۲- یاورهای گیاهی (Plant adjuvants) مانند ساپونین

۳- یاورهای نمک‌های معدنی (Metalic salt adjuvants) مانند هیدروکسید آلومینیم

۴- یاورهای روغنی (Oil adjuvants) مانند Montanide, $Markol_{52}$, $Drakeol_6$

بدیهی است یاور انتخابی برای هر واکسن باید بتواند سیستم ایمنی مسئول حفاظت در مقابل پادگن مورد نظر را تحریک نماید. ضمناً در استفاده از یاورها به واکنش‌های پاتولوژیک ناشی از نوع یاور در طرق مختلف واکسیناسیون باید توجه نمود.

به‌طور مثال: در حیواناتی که گوشت آنها برای تغذیه مورد استفاده قرار می‌گیرد، چنانچه تزریق داخل عضلانی واکسن به کیفیت لاشه حیوان در کشتارگاه لطمه وارد نماید، ممکن است تزریق زیر پوستی واکسن ضرورت پیدا نماید. علاوه بر این، در حال حاضر به‌دلیل امکان توکسیک بودن بالقوه یاورها برای مصرف کننده‌های نهائی، وضع مقررات محدود کننده در مورد استفاده از یاورها در حال افزایش است.

ژل دالومین یا ژل هیدروکسید آلومینیم (Aluminium Hydroxide gel) یکی از رایج‌ترین یاورهای مورد استفاده در ساخت واکسن‌های مورد مصرف دامپزشکی است. این یاور یک ماده آمفوتر با نقطه ایزوالکتریک بیش از ۹ است بنابراین در pH خنثی دارای بار مثبت بوده و در این حدود pH با مواد دارای بار

تابلو شماره ۱: میزان جرم 140S موجود در واکسن‌های با یاورهای ISA_{25} و ژل دالومین

نوع واکسن برحسب یاور	میزان 140S به میکروگرم در 5^{cc}/۲میزان		140S به میکروگرم در هر 5^{cc}	
	O_1	A_{87}	O_1	A_{87}
ISA_{25}	۴/۳	۴/۶	۸/۶	۹/۲
ژل دالومین + ساپونین	۴/۳	۴/۶	۸/۶	۹/۲

تابلو شماره ۲: میانگین حسابی تیتر لگاریتمی آنتی بادی بر علیه تیپ O_1 , A_{87} موجود در واکسن تب برفکی دوتائی با یاورهای مختلف در یک دوره ۹/۵ ماهه

نوع واکسن برحسب یاور	روزه		روز ۲۸		روز ۶۳		روز ۹۵		روز ۱۳۷		روز ۱۸۶		روز ۲۵۲		روز ۲۸۲	
	O_1	A_{87}	O_1	A_{87}	O_1	A_{87}	O_1	A_{87}	O_1	A_{87}	O_1	A_{87}	O_1	A_{87}	O_1	A_{87}
ISA_{25}	۱/۶	۱/۴	۲	۱/۹	۲/۳	۲/۲	۲	۲	۲/۱	۲/۱	۲/۳	۲/۳	۱/۹	۱/۹	۱/۵	۱/۵
ژل دالومین +ساپونین	۱/۲	۱/۳	۱/۹	۱/۹	۱/۹	۲/۲	۱/۹	۲	۱/۸	۲	۱/۵	۱/۸	۱/۴	۱/۵	۱/۱	۱/۱
شاهد	۱/۳	۱/۴	۲/۲	۱/۴	۱/۱	۱/۲	۱/۱	۱/۲	۱/۱	۱	۱	۱	۰/۹	۰/۹	۰/۹	۰/۹

الکتریکی منفی (اغلب پروتئین‌ها) باند می‌شود (۹). در کنار pH عوامل دیگری شامل غلظت و طبیعت پادگن و مواد همراه آن مثل نمک‌ها و یونهای بافر روی خاصیت جذب آلومینیم ژل تأثیر دارند (۱۴). غلظت زیاد یونهای چندتائی مانند فسفات‌ها، سولفات‌ها و بورات‌ها، قدرت بار الکتریکی بین پادگن و ژل راکاهش داده و در نتیجه جذب پادگن به ژل نیز کاهش می‌یابد (۲).

گرچه یاورهای آلومینیم بیش از ۵۰ سال است که استفاده می‌شوند ولی هنوز مکانیسم افزایش ایمنی توسط آنها به خوبی شناخته شده است.

ساپونین‌ها فرآورده‌های طبیعی هستند که به‌طور وسیع در سلسله گیاهان منتشر شده‌اند ساپونین به‌خاطر ساختمان حلقوی خود خاصیت هیدروفوب و به دلیل وجود زنجیره‌های قندی خارجی در آن خاصیت هیدروفیلیک دارد بنابراین اغلب خاصیت شبیه به دترجنت داشته و گلبولهای قرمز را لیز می‌نماید.

بیشتین استفاده از ساپونین در ساخت واکسن تب برفکی (FMD) و بعضی از واکسن‌های باکتریائی بوده است ساپونین همچنین یک یارو اختصاصی خوب برای واکسن‌های ضد انگل‌های تک یاخته است (۶، ۷).

به هر حال توکسیک بودن ساپونین عامل محدود کننده‌ای برای مصرف آن در واکسن‌های مصرفی انسانی و دامی بوده است(۵).

امولسیون‌های روغنی از پیش از سال ۱۹۲۵ به‌منظور محرک سیستم ایمنی به پادگن‌های تزریقی افزوده شد. در سال ۱۹۳۷ فروند و همکاران ایشان، آدجوان فروند را ساختند (۹). آدجوان ناقص فروند حاوی امولسیون آب در روغن پادتن آبی (روغن معدنی سبک و مانیتول منواولئات به‌عنوان امولسیفایر) است. در حال حاضر روغن‌های معدنی بسیار خالصی مانند $Marcol_{82}$, $Marcol_{52}$, $Drakoel_{6VR}$ در $Whitrex_{307}$, $VestanA_{50}B$, $Sonten_{55}$ واکسن‌های تجارتی استفاده می‌شوند.

مانیتول منواولئات خالص شده مانند Arlacel-A مخصوص و Montanide 80 نیز در دسترس است. استفاده از آرلاسل به‌عنوان امولسیفایر به علت کار سینوژن بودن کاهش یافته است (۲).

در حال حاضر واکسن‌های روغنی تجارتی برای انواع بیماریهای ویروسی و باکتریائی گاو، خوک، گوسفند و به‌ویژه طیور در دسترس است. به‌طور کلی سه نوع امولسیون روغنی در واکسن‌های مصرف دامپزشکی وجود دارد (۲).

۱- امولسیون‌های روغن در آب (Oil-in-water) دارای فاز آبی مداومی داشته و کاملاً غلیظ بوده و تزریق آنها مشکل است. این امولسیونها معمولاً ایمنی سطح بالا و طولانی می‌دهند.

۲- امولسیون‌های روغن در آب (Oil-in-water) دارای فاز آبی مداوم بوده و امولسیون کننده‌های آب دوست (Hydrophilic) هستند. این امولسیونها دارای غلظت کمتری از نوع قبلی بوده و ساده‌تر از آنها تزریق می‌شوند البته مدت زمان ایمنی حاصل از آنها اغلب کم است.

۳- امولسیون‌های آب در روغن - روغن در آب (Water - in- oil - in water) امولسیون آب در روغن (Water - in- oil) در یک فاز آبی مداوم پخش شده است. این نوع امولسیون غلظت کمتری نسبت به امولسیونهای آب در روغن دارد و لی تولید آن مشکل‌تر و پایداری آنها از انواع دیگر کمتر است. مکانسیم عمل یاورهای روغنی به‌خوبی شناخته نشده، ولی احتمالاً شبیه ژل دالومین است. یاور روغنی ISA_{25} ساخت کمپانی Sepic فرانسه بوده و از نوع امولسیون روغن در آب (O/W) است (۱۷).

مواد و روشها

۱- حیوانات تحت آزمایش: حیوانات انتخاب شده جهت انجام این پرژوه تعداد ۲۲ رأس گاو و گوساله با سنین ۲۴-۴ ماه بود.

۲- تهیه یاور روغنی: یاور روغنی بنام Montanide ISA25 ساخت کمپانی Sepic فرانسه از نوع امولسیون روغن در آب (۱۷).

۳- آماده کردن واکسن: برای انجام این کار از دو تیپ ویروس تب برفکی بنام‌های O_1 و A_{87} مردآباد (تیپ‌های شایع در کشور) به ترتیب با ID50=6.9,7.1 به‌عنوان پادگن و ژل دالومین + ساپونین به‌عنوان یاور واکسن آبی و ISA_{25} به‌عنوان یاور روغنی استفاده گردید.

۴- واکسیناسیون گاوها: تعداد ۲۲ رأس گاو و گوساله به قید قرعه به سه دسته زیر تقسیم و به ترتیب زیر عمل گردید.

الف - گروه A به تعداد هشت رأس واکسن ISA_{25} تزریق گردید.

ب- گروه B به تعداد هشت رأس واکسن آبی (ژل دالومین + ساپونین) تزریق گردید.

ج- به گروه C به تعداد شش رأس به عنوان شاهد هیچگونه واکسنی تزریق نگردید.

واکسیناسیون انجام شده به میزان ۲/۵ میلی‌لیتر در گوساله‌ها و تلیسه‌ها و به‌صورت زیرپوستی و در ناحیه گردن صورت گرفت. البته تعدادی از گاوها و تلیسه‌ها هشت ماه قبل از شروع پروژه واکسینه شده بودند که در آزمایش سرولوژیکی اولیه مشخص بود. ضمناً در این پروژه فقط یکبار واکسیناسیون صورت گرفت.

۵- خونگیری و آزمایش SN: از کلیه دامهای تحت پوشش (هر سه گروه) در روزهای ۰، ۲۸، ۶۳، ۹۵، ۱۳۷، ۱۸۶، ۲۵۲، ۲۸۲ خونگیری به‌عمل آمد و توسط بخش تب برفکی از طریق آزمایش سرونوترالیزاسیون (SN) با روش میکروپلیت تیتر پادتن محاسبه گردید. ضمناً عکس‌العمل واکسن در ناحیه تزریق نیز مورد بررسی قرار گرفت میزان جرم 140S موجود در هر واکسن در تابلو شماره ۱ نشان داده شده است.

نتایج

همانطور که در روش کار توضیح داده شد در این پروژه دو تیپ ویروسی O_1, A_{87} مردآباد تب‌برفکی در ساخت واکسن دوتائی به ترتیب با یاورهای ISA_{25} و ژل دالومین + ساپونین مورد استفاده قرار گرفت. تابلو شماره ۲ میانگین حسابی تیتر لگاریتمی پادتن ناشی از تزریق واکسن تب‌برفکی دوتائی فوق‌الذکر را به نمایش می‌گذارد. براساس نتایج به‌دست آمده تیتر پادتن برعلیه واکسن روغنی تا آخر دوره ۹/۵ ماهه محافظت کننده بوده است. (تیتر محافظت کننده ۱/۲ در نظر گرفته شده است).

ولی تیتر پادتن بر علیه واکسن ژل دالومین و ساپونین در پایان دوره محافظت کننده نبوده است. ضمناً حداکثر تیتر پادتن در واکسن روغنی ۲/۳ بوده (روز ۱۸۶) در حالی که حداکثر تیتر واکسن آبی ۱/۹ برای O_1 و ۲/۲ برای A_{87} (روز ۶۳) بوده است. ضمناً در حالی که حداکثر تیتر در واکسن روغنی از روز ۶۳ تا روز ۱۸۶ در مورد هر دو تیپ نوسان کمی داشته این نوسان در مورد واکسن آبی زیاد بوده است.

نتایج حاصل از بازدید مرتب مواضع تزریق واکسن نیز به شرح زیر بوده است:

ایجاد ورم و آبسه در گروه A (ISA_{25}) سه مورد

ایجاد ورم و آبسه در گروه B (ژل دالومین + ساپونین) دو مورد

قطر این آبسه‌ها از ۱۰-۳ سانتیمتر متغیر بوده و همگی آنها از هفته اول تا حدود یک ماه بعد از تزریق از بین رفتند. ضمناً در هیچکدام از گوساله‌های تزریق شده، ورم یا آبسه در محل تزریق مشاهده نشد.

بحث

تحقیقات به‌عمل آمده نشان داده است که جزء اصلی ایمنوژن واکسن تب‌برفکی جزء 140S آن است و به همین دلیل تلاش‌های بسیاری صورت گرفته است تا بطور مثال رابطهٔ میزان 140S در یک دز واکسن و میزان حفاظت کنندگی واکسن را مشخص نمایند. Anderson و همکاران ایشان (۱۱) دریافتند که تا مدت ۲۸ روز پس از واکسیناسیون، بین مقدار پادگن و پاسخ پادتن بادی رابطه کمی وجود دارد. در حالی که در زمانهای طولانی‌تر پس از واکسیناسیون، هر چه میزان پادتن رابطه کمی وجود دارد. در حالی که در زمان‌های طولانی‌تر پس از واکسیناسیون، هر چه میزان پادگن بالاتر باشد، پاسخ پادتن هم بیشتر است، ولی میزان کمی از پادگن نیز در زمان طولانی‌تر قادر به ایجاد تیتر پادتن حفاظت کننده می‌باشد.

Margan و همکاران (۳) نشان دادند که کمترین دز موثر ویروس تب برفکی خالص شده (تیپ A_{119}) مقدار ۱/۶ میلکروگرم است. Rweyemamu و همکاران (۱۶) نشان دادند که میزان ۱/۱۲ میکروگرم از تیپ O_1 BFS1860 ویروس تب برفکی معادل یک PD_{50} است. Hingley و Pay (۱۱) با استفاده از همین ویروس در واکسن FMD دریافتند که مقدار ۲/۲ میکروگرم پادگن معادل یک PD_{50} بود. تحقیقات انجام شده حاکی از این مطلب است که در مورد تیپ‌های دیگر ویروس تب برفکی ارتباط مشابهی نسبت به موارد فوق‌الذکر وجود دارد (۳، ۱۰). مرکز تب برفکی Pan American در برزیل میزان ۳ میکروگرم از تیپ O غیرخالص را برای ساخت واکسن مورد استفاده قرار داده است (۴). به هر حال در تمام مطالعات انجام شده، یاور (Adjuvant) مورد استفاده طریقه ساخت واکسن و مدت زمان مطالعه متنوع بوده است.

با این حال مطالعات انجام شده توسط Doel مشخص کرده است که افزایش میزان پادگن در یک دز واکسن بیش از ۹/۲ میکروگرم در هر دز تنها قادر است، افزایش کمی در Potency واکسن ایجاد نماید. ایشان معتقد است که محدوده عملی ظرفیت پادگن در هر دز واکسن حدود ۹/۲-۱/۵ میکروگرم از جزء 140S می‌باشد (۸).

در مطالعه انجام شده در پروژهٔ حاضر، میانگین تیتر پاسخ ایمنی در مورد واکسن ساخته شده با ISA_{25} هم در مورد تیپ A_{87} و هم در مورد تیپ O_1 پس از یک دورهٔ ۹/۵ ماهه حفاظت کننده بوده است ولی در مورد واکسن ساخته شده با ژل دالومین + ساپونین با همان میزان جرم، میزان محافظت کنندگی پائین‌تر بوده است.

Barnett و همکاران (۱۲) در سال ۱۹۹۲ نتیجه گرفتند که پایداری و پتانسی واکسن ساخته شده با ISA_{206} بالاتر از واکسن ساخته شده با ژل دالومین است. مجدداً Baemett و همکاران او (۱۳) در سال ۱۹۹۶ به این نتیجه رسیدند که خوکهائی که با واکسن ساخته شده با ISA_{25} واکسینه شدند در مقایسه با خوکهای واکسینه شده با واکسن ساخته شده با ISA_{206} از پاسخ ایمنی بهتری برخوردار هستند.

مطالعه حاضر نیز نشان داده است که پاسخ پادتن ناشی از واکسن ساخته شده با ISA_{25} در مقایسه ژل دالومین + ساپونین در گاو و گوساله‌های تحت پوشش بهتر بوده است.

Baenett و همکاران او (۱۵) نتیجه گرفتند که با استفاده از واکسن ساخته شده با ISA_{25} و ISA_{206} به‌صورت زیرجلدی، واکنش موضعی در گاوها و خوکها ایجاد می‌شود، در صورتی که با استفاده از این واکسن‌های روغنی به‌صورت داخل عضلانی حتی پس از واکسیناسیون یادآور، واکنش موضعی دیده نشده است در مطالعه حاضر در مؤسسه رازی از ۱۶ رأس گاو و گوساله واکسینه شده مجموعاً در ۵ رأس از آنها واکنش موضعی ایجاد شده که از این تعداد ۳ رأس مربوط به واکسن ISA_{25} و دو رأس مربوط به واکسن ژل دالومین بوده است. ضمناً در هیچکدام از گوساله‌ها راکسیون موضعی دیده نشد.

لازم به ذکر است گرچه در این مطالعه به‌نظر می‌رسد یاور روغنی در ایجاد واکنش موضعی نقشی نداشته است ولی در یک مطالعه بعدی که پس از ۱۴ ماه نگهداری واکسن انجام شد. کلیه دامهائی که واکسن روغنی دریافت کردند (زیر جلد و به طریق واکسیناسیون قبلی) واکنش موضعی به‌وجود آمد که بعضی از آنها بیش از یک ماه دوام داشتند. در صورتی که هیچ یک از دامهائی که با واکسن آبی (ژل دالومین) واکسینه شدند. واکنش موضعی دیده نشد. (مطالعه چاپ نشده نویسنده). در خاتمه با توجه به مطالعات انجام شده در کشورهای مختلف و اطلاعات به‌دست آمده در خلال اجرای پروژه حاضر در سطح آزمایشگاهی به‌نظر می‌رسد استفاده از روغن ISA_{25} به عنوان یاور واکسن تب برفکی به دلیل سطح ایمنی مطلوب و طولانی و ساده بودن تولید و نیز پایداری آن می‌تواند در کشور ما ساخته شده و به منظور ایجاد یک ایمنی مطلوب و طولانی مدت‌تر از واکسن آبی به مصرف برسد. بدیهی است نتایج دقیق‌تر باید در بررسی‌های میدانی مشخص گردد.

سپاسگزاری

در اینجا لازم می‌دانم از همکاری صمیمانه کلیه دوستان و همکاران بخش تب برفکی و قسمت خونگیری سرمهای درمانی مؤسسه به ویژه آقای رضا فریدون‌پور و همکاران زحمتکش ایشان در قسمت سرمهای درمانی که در خونگیری از دامهای تحت پوشش در دفعات مختلف با پروژه همکاری بیدریغ داشتند تشکر و قدرانی نمایم.

منابع مورد استفاده

1- Anderson. EC, Masters RC, Mowat Gn. 1971. Immune response of pigs to inactivated. FMD vaccines: Response to emulsion vaccines. Res Vet Sci: 12: 351-357.

2- A.R. Peters. 1993. Vaccines for veterinary applicutions. Vaccine adjuvants and carriers. (225-306).

3- A.V. Lyer, Ghosh. S.Singh, S.N. Deshmukh. R.A. 2001. Evaluation of three, ready to formulate, oil adjuvants for FMD Disease vaccine production. Vaccine 19- (1097-1105).

4- Bahnemann. H, Mesquita. J, Astudillo V.Dora F. 1989. The production and applicvation of an oil adjuants vaccine against FMD disease in cattle. In: Spier RE - Griffiths. JB, editors, Modern Approaches to Animal cell technology. Butterworth and co, 17: (1767-71).

5- Bengt. Ronnberg, Makonnen Fekadu, Shahriar Behboudi, Lennurt Kenne, and Bror Morcin, 1997. Effect of carbohydrate modification of Quillaja Saponaria Molina QH-b fraction on adjuvant activity, cholesterol - binding capactity and toxicity; Vaccine. Vol, 15, No. 17.18- (1820-1826).

6- Dalsgaard. K, Astudy of the isolation and characterisation of the sapomine QuilA. Acta Vet. Scand., Suppl. 69: (7-40).

7- Dalsgaard, K., Hilgers, L& Trouve, G. 1990. Classical and new approaches to adjuvant use in domestic food animals. Adv. Vet sci. Comp. Med., 35; 121-159.

8- Doel. TR. 1999. Optimisation of the immune response to FMD vaccines. Vaccine. 17; (1767-71).

9- Lei, J.C. 1985. Aluminium hydroxide gel - guidelines for adsorption vaccine. 3, (54-55).

10- Mckercher PD, Gravesj. H.A. 1997. Review of current status of oil adjuvants in FMD. disease. Dev biol standard: 35- (107-112).

11- Pay TWF. Hingley. 1987; correlation of 140 antigendoes the serum neutralizing antibody respon so and The lesel of protection induced in catlle by FMD vaccine. Vaccine, 5: 60-4.

12- P.V. Barnett and Doel. 1992. Stability and potency studies with FMD vaccine prepard from antigens stored in the pirbright bank: Comparisons between oil and AL $(OH)_3$ formulations. Presented at the FAO. Research group of the standing technical committee for control of FMD, Switzerland, september, 1992.

13- P.V. Barnett, P.V. Bullen, L. Wiliams, L. and Doel. T.R. 1996. Interenational bank for FMD vaccine Assessment of montanide ISA_{25} and ISA_{206}, two commercially available oil adjuvants. Vaccine; 14(13): 1187-90.

14- Ramanathan. V.D., Badenoch - Jones. P. and Turk. J.L. 1979. Complement activation by aluminium and zinconium compounds. Immunology, 37, (881-888).

15- R. Bomford. 1997. Adjuvants in veterinary vaccines. Vaccine manual. FAO. (277-284).

16- Rwegemamu MM. Black, L. Boge A, Thorn AC. Terry G. 1984. The relationship between the 140s antigen dose in aqueous FMD vaccines and the serum antibody response of catlle J. Biol stand. 12. 111-120

17- SEPPIC catalegue. Montanide ISA. Dedicated to human Applicution.