زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس
دوره 8، شماره 3، پاییز 1396

بررسی قدرت ایمنی زایی واکسن ژنتیکی DNA علیه بیماری نیوکاسل درواکسیناسیون جوجه‌های عاری از پاتوژن

معصومه فیروز امندی[1*]، حسن معینی[2]، سید داوود حسینی[3]، منیژه ساریخانی[4]، ثنا غفاری[4]

1- استادیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز
2- استادیار مرکز تحقیقات سرطان المان
3- استادیار مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی- شعبه اراک
4- دانش‌آموخته دکتری عمومی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز

*** تبریز، صندوق پستی 16471- 51666**
m.firouzamandi@tabrizu.ac.ir
(دریافت مقاله: 94/12/13 پذیرش مقاله: 95/11/18)

چکیده- بیماری نیوکاسل یک بیماری ویروسی واگیردار کشنده است که اغلب گونه‌های پرندگان و طیور تجاری را مبتلا می‌کند و یک تهدید مهم برای صنعت طیور به حساب می‌آید. در این بیماری هر دو ژن F و HN از ژن‌های خیلی مهم و اساسی برای ایجاد عفونت و بیماری می‌باشند. در این تحقیق ایمنی واکسن‌های DNA ساخته شده از ژن‌های HN وF ویروس بیماری نیوکاسل هرکدام به طور مجزا از هم pIRES/HN, pIRES/F و همچنین هردو ژن باهم pIRES/HN/F مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته است. در مطالعه‌ی قبلی بیان آنتی‌ژنی ژن‌های قرار داده شده در شرایط آزمایشگاهی به اثبات رسیده بود. در این مطالعه تجزیه وتحلیل تکنیک الایزا و تست HI از سرم بدست آمده از جوجه‌های SPF (عاری از هرگونه آلودگی و عامل بیماری‌زا) واکسینه شده با واکسن DNA نشان داد که انجام 2 بار واکسیناسیون با واکسن DNA (pDNA)، قادر به القای ایمنی هومورال و تولید قابل توجهی از تیتر آنتی‌بادی ($P<0.05$) با استفاده از پلاسمید monocistronic (pIRES/HN و pIRES/F) و bicistronic (pIRES/HN/F) یک هفته بعد از دومین واکسیناسیون pDNA (واکسن یاداور) می‌شود. نتایج نشان دهد که ایمن‌سازی با واکسن DNA درجوجه‌ها در بار دوم پاسخ بطور موفقیت‌آمیز تولید آنتی‌بادی را افزایش می‌دهد. همچنین واکسیناسیون با پلاسمید pIRES/HN/F که دارای هردو ژن است، می‌تواند پاسخ قوی‌تری از آنتی‌بادی در مقایسه با واکسیناسیون با پلاسمیدهایpIRES/HN وpIRES/F که دارای فقط یک ژن هستند، باشد.

کلیدواژگان: DNA واکسن، پاسخ آنتی‌بادی، ویروس بیماری نیوکاسل.

1- مقدمه

ویروس بیماری نیوکاسل (Newcastle Disease Virus: DV) به عنوان یک ویروس کشنده با عفونت‌زایی بالا شناخته شده است که بسیاری از حیوانات اهلی و گونه-

های وحشی پرندگان را تحت تأثیر قرار می‌دهد[1]. کل ژنوم آن شامل 15186 نکلئوتید با 6 ژن ساختاری با ترتیب 3′- NP-P-M-F-HN-L-5′ است، که حداقل 8 پروتئین را کدگذاری می‌کند [3،2]. پروتئینF (پروتئین ترکیب و امتزاج) مهمترین پروتئین مربوط به بیماری‌زایی ویروس است که نقش مهمی در آغاز عفونت به واسطه‌ی ترکیب ویروس روی غشای سلولی میزبان را داشته و ویروس را قادر به ورود به غشای سلول میزبان می‌سازد[1]. پروتئین HN (هماگلوتینین- نورآمینیداز) یک گلیکوپروتئین چند عملکردی است که نقش مهمی در اتصال ویروس داشته و باعث افزایش فعالیت‌های ترکیبی می‌شود[1]. پروتئین‌های HN و F اهداف اصلی برای پاسخ ایمنی به ویروس بیماری نیوکاسل هستند[5،4]. اجرای برنامه‌های واکسیناسیون در پرورش‌دهندگان طیورمعمولا با استفاده از واکسن‌های غیرفعال و یا واکسن‌های زنده تخفیف حدت یافته است. متاسفانه ایمن‌سازی غیرفعال موقتی و نیاز یه تکرار دارد. به علاوه واکسیناسیون با واکسن‌های غیرفعال زمان بر، مشکل، هزینه بر واغلب ناکارامد می‌باشد.

واکسیناسیون DNA همان مزایای ایمنولوژیک مثل ایمنی سازی با میکروارگانیسم‌های زنده تخفیف حدت یافته را بدون نگرانی‌های مربوط به عفونت‌زایی ویروس زنده و برگشت به حال بیماری‌زایی ویروس را به شکل گسترده فراهم می‌آورد. واکسن‌های ژنتیکی DNA باعث تحریک هم‌زمان سیستم ایمنی هومورال و سیستم ایمنی سلولی و ایجاد ایمنیت در مقابل عوامل بیماری‌زای ویروسی و باکتریایی می‌نمایند که برای مقابله با این عوامل فعال شدن هر دو نوع پاسخ ایمنی برای حفاظت نیاز است[6]. این قبیل واکسن‌ها برای ایجاد ایمنی در برابر سویه‌های ویروس بیماری نیوکاسل مورد استفاده قرار گرفته‌اند. برای مثال: Sakaguchi و همکاران بیش از 40% حفاظت در برابر ویروس بیماری نیوکاسل با استفاده از واکسیناسیون DNA با استفاده از تک ژن F ویروس بیماری نیوکاسل به حالت خطی (بدون وارد کردن ژن داخل وکتور حلقوی) را گزارش کرده‌اند. در این تحقیق حفاظت در برابر ویروس نیوکاسل با استفاده از پلاسمید DNA حلقوی که بیان کننده‌ی ژن F ویروس بود، مشاهده نشد[7]. در یک مطالعه‌ی دیگر توسط Loke و همکاران تیتر بالای آنتی‌بادی و با حفاظت 50% بعد از ایمنی‌سازی با هر دو نوع پلاسمید خطی و حلقوی بیان‌کننده‌ی ژن F ویروس نیوکاسل گزارش شده است[8]. گزارش‌های اخیر نشان داد که هر دو نوع گلیکوپروتئین‌های F و HN برای تقویت فعالیت ترکیبی در تعامل با یکدیگر بوده و ایمنی‌سازی با DNA پلاسمید کدکننده‌ی هردونوع پروتئین ممکن است پاسخ ایمنی را برای طیف وسیع تری از اپی‌توپ‌ها القا کند[9]. در مطالعه قبلی، واکسن ژنتیکی DNA برای ویروس بیماری نیوکاسل طراحی و درست شد و بیان ژن‌های داخل شده به پلاسمید pIRES در سطح آزمایشگاه با روش‌های مختلف مولکولی سنجیده و تأیید شد. بنابراین در تحقیق حاضر برای مطالعه‌ی پاسخ ایمنی القایی، جوجه‌ها بعد از ایمن‌سازی با 3 واکسن جدید که حاوی ژن‌های کدکننده‌ی پروتئن F و HN بطور جداگانه (pIRES/HN and pIRES/F) یا هر دو نوع ژن HN و F باهم (pIRES/F/HN)در یک بار و دو بار واکسیناسیون مورد آزمایش قرار گرفتند.

2- مواد و روش‌ها

2-1- ایمن‌سازی DNA جوجه‌های SPF (عاری از هرگونه عامل بیماری‌زا)

24 جوجه‌ی SPF 4هفته‌ای بر اساس نوع پلازمید واکسینه شده مثل PIRES/F/HN ، PIRES/HN و PIRES به عنوان کنترل منفی به 4 گروه با 6 جوجه در هرگروه تقسیم شدند. در این واکسیناسیون 100 µg پلاسمید حل شده در 200 ماکرولیتر بافر PBS (بافر فسفات سالین) به

عنوان DNA واکسن به شکل داخل عضلانی در عضله‌ی سینه‌ی جوجه‌های 5 هفته‌ای تزریق شد. تمام گروه‌های واکسینه شده با دز مشابه در 3 هفته بعد از تلقیح اولیه تقویت شدند (واکسن یادآور دریافت کردند). نمونه خون تمام جوجه‌های واکسینه شده از رگ بالی به شکل هفتگی جمع‌آوری شد. سرم‌ها در دماهای 20- تا زمان انجام تست‌های ایمنولوژیکی نگه‌داری شدند.

2-2- بررسی HI (هماگلوتینین - اینهیبیشن)

تست HI آن‌گونه که قبلاً توسط Allen و Gough با بعضی تغییرات توصیف شده بود، اجرا شد[10]. به شکل خلاصه در میکروپلیت‌های V شکل 96 چاهکی 25 µl از بافر فسفات سالین به هر چاهک اضافه شد. بعداز اضافه کردن 2 برابر رقعت از سرم (50 µl) , 25 µl از آنتی‌ژن (ویروس خالص شده سویه ی AF2240) در 4 واحد فعالیت هماگلوتینین (HAU) به چاهک‌ها اضافه شد. بعد از 30 دقیقه انکباسیون در RT، 25 µl از سلول‌های قرمزخونی 1% جوجه‌ها (v/v) در چاهک‌ها قرار داده شده و به طور کامل مخلوط گردید. بعداز 45 دقیقه انکباسیون در دمای اتاق آگلوتیناسیون (لخته شدن) در چاهک‌ها بررسی شد. لخته شدن سلول‌های قرمز عدم حضور آنتی‌بادی ضد ویروس بیماری نیوکاسل در نمونه‌های سرم را نشان می‌داد.

3-2- سنجش‌های ایمنوسوربنت با واسطه آنزیمی (الایزا)

تیتر آنتی‌بادی ضد ویروس بیماری نیوکاسل در سرم نمونه‌ها با استفاده از کیت الایزا (USA,IDEXX) بر اساس پروتکل شرکت سازنده تعیین شد.

4-2- تجزیه و تحلیل آماری

داده‌ها با استفاده از تست t مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و دامنه معنی‌داری آماری برحسب $p \leq 0.05$ تعیین شد. نتایج به صورت میانگین ± خطای استاندارد از میانگین بیان شد. تمام آنالیزها با استفاده از نرم‌افزار آماری minitap15 و ماکروسافت اکسل 2010 انجام شد.

3- نتایج و بحث

1-3- تیترهای آنتی‌بادی NDV-HN با استفاده از تست HI در آزمایش

تست HI با استفاده از 4 واحد HA از آنتی‌ژن ویروس بیماری نیوکاسل و سلول‌های خونی 1% جوجه انجام شد. 2 برابر رقّت از هر نمونه سرم ساخته شده و تیترها تعیین گردید. نتایج میانگین تیترهای HI در جدول 1 نشان داده شده است.

تمام جوجه‌های ایمن‌شده با پلاسمیدهای pIRES/HN و pIRES/F/HNتیتر آنتی‌بادی‌های آن‌ها یک هفته بعد از دومین ایمن‌سازی (دومین واکسیناسیون) افزایش یافت. اگرچه تیتر آنتی‌بادی‌ها 3 هفته بعد از ایمن‌سازی در محدوده‌ی پایینی قرار گرفت. در هردو گروه تیتر HI 3 هفته بعداز واکسن یاداور (واکسیناسیون دوم) با log2 3.83±1.6 و log4.83±1.16 افزایش یافت (جدول 1). تیتر معناداری از HI در جوجه‌های واکسینه شده با pIRES/HN در مقایسه با جوجه‌های واکسینه شده با pIRES/F/HN در 6،5 و 7 هفته بعد از واکسن یادآور یافت نشد.

2-3- بررسی پاسخ آنتی‌بادی در برابر NDV

تیتر آنتی‌بادی الایزا با سرمی با رقت 1:500 با استفاده از کیت الایزا IDEXX مورد ارزیابی قرار گرفت. میانگین کنترل مثبت 0/165 و میانگین کنترل منفی 0/046 بوده (شکل 1) و نسبت S/P برای هر نمونه با توجه به فرمول زیر محاسبه شده:

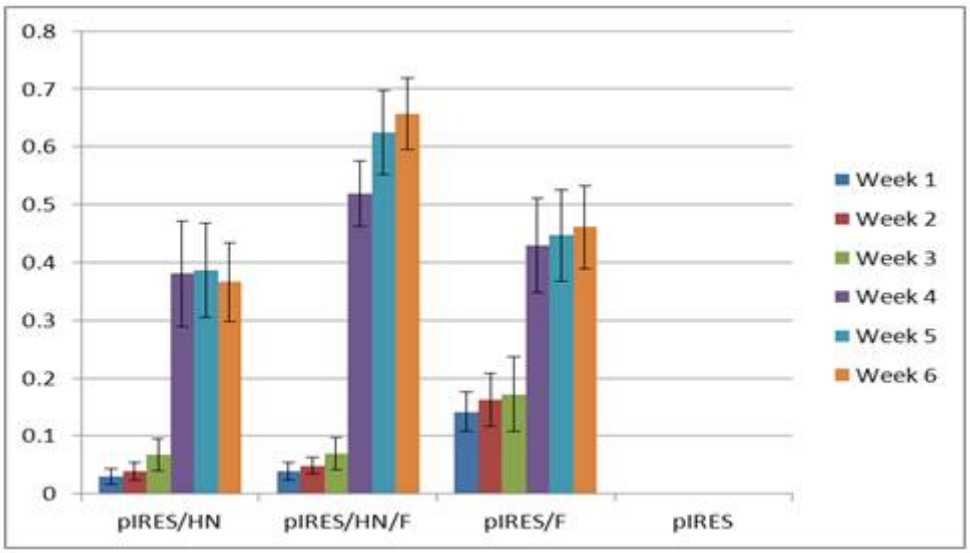
میانگین S/P= مینگین کنترل منفی–نسبت میانگین

نمونه(میانگین جذب نوری) / میانگین کنترل مثبت– میانگین کنترل منفی

در این آزمایش 24 جوجه عاری از پاتوژن در 4 گروه مجزا دو مرتبه با DNA پلاسمید واکسینه شدند. نخستین واکسیناسیون در سن 5 هفتگی و دومین دوز دریافت کننده (دوز تقویتی) در سن 8 هفتگی به مرغ‌ها تزریق شد. مطابق با شکل 1، تیتر S/P در قبل و بعد از ایمن‌سازی در اولین و دومین ایمن‌سازی نشان داده شده است. در همه گروه‌های واکسینه شده، تیتر آنتی‌بادی به طور قابل توجهی نسبت به گروه کنترل بالاتر بود ($P<0.05$). با این حال، سطح انتی‌بادی 3 هفته پس از ایمن‌سازی اولیه همچنان پایین بود. تیتر آنتی‌بادی در تمامی جوجه‌های واکسینه شده با pIRES/F/HN، pIRES/HN و pIRES/F مثبت بوده و به طور قابل توجهی میزان تیتر در واکسیناسیون دوم بالا بوده است ($P<0.05$). همچنین نتایج آزمایش‌ها نشان داد که تیتر آنتی‌بادی الایزا در پلاسمیدهای Monocistronic (pIRES/F, pIRES/HN) و Bicistronic (pIRES/F/HN)، در یک هفته پس از تلقیح دوم یک تفاوت قابل مشاهده ای وجود داشت.

جدول 1 تیترهای آنتی‌بادی جوجه‌های SPF (عاری از هرگونه عامل بیماری‌زا) با تست HI (log2) بعد از ایمن‌سازی با DNA واکسن‌ها (میانگین هندسی ± sd ; n= 6)

نوع واکسن	تیتر HI بعد از هفته‌های مختلف پس از واکسیناسیون					
	هفته 2	هفته 3	هفته 4	هفته 5	هفته 6	هفته 7
pIRES/HN	1/67±0/8	1/67±0/51	1/83±0/75	3/67±1/36	3/83±1/6	3/83±1/6
pIRES/F/HN	1/5±0/83	1/5±0/54	1/67±0/81	3/83±0/98	4/57±0/75	4/98±1/16
pIRES	1±0	1/17±0/4	1/17±0/40	1/33±0/51	1/17±0/40	1/17±0/4



شکل 1 نمودار ستونی نسبت S/P را با ستون SD در هفته‌های بعد از تزریق واکسن DNA را نشان می‌دهد. بعد از خون‌گیری در هفته سوم بعد از تزریق اول واکسن یادآور (بار دوم) نیز تزریق شد. این اطلاعات با استفاده از روش الایزا تعیین شده و بارهای میله‌ها نشان دهنده میزان انحراف استاندارد است.

در جوجه‌های ایمن شده با پلاسمید pIRES/F/HN در دو و سه هفته بعد از دریافت دومین دوز (دوز تقویت کننده) تیتر آنتی‌بادی به طور قابل توجهی بالاتر ($P<0.05$) از جوجه‌های ایمن سازی شده تنها با پلاسمیدهای pIRES/HN و یا pIRES/F می‌باشد.

نتایج حاصل از ازمایش‌ها در روی بدن جوجه‌ها نشان داد که که ایمن‌سازی با پلاسمیدهای ساخته شده که بیان کننده هر دو ژن (co-expression) هستند که در اینجا pIRES/F/HN نامیده شده است، بی‌درنگ پاسخ ایمنی قوی‌تری نسبت به واکسیناسیون با پلاسمید بیان کننده یک ژن همانند pIRES/HN و pIRES/F ایجاد می‌شود (شکل 1).

نتایج یک مطالعه توسط Rayal و همکارانش که ایمن‌سازی مرغ با پروتئین‌های ویروسی pIRES/HN + pIRES/F را انجام می‌دادند نشان داد که استفاده از این روند می‌تواند تا 73% موجب ایجاد حفاظت در مقابل درگیری به NDV شود و این درحالی است که در مرغ‌های واکسینه شده تنها با NDV/HN و NDV/F فقط به ترتیب 20% و 66% از درگیری به NDV جلوگیری می‌کند. به هر حال مرغ‌های ایمن شده با هر کدام از واکسن‌های حاصل از ویروس در درگیری با بیماری تا 80% امکان زنده‌مانی بیشتری نسبت به آن‌هایی که واکسن را دریافت نکرده‌اند دارند [14]. یافته‌های این تحقیق مطابق با گزارش‌های قبلی نشان داد که حضور هر دو آنتی‌ژن HN و F با هم در بدن به طور مؤثرتری نسبت به حضور هر کدام از ژن‌ها به تنهایی، سیستم ایمنی را به شکل فعال‌تری می‌تواند تحریک کند [12،11].

در این تحقیق نشان داده شد که تیتر آنتی‌بادی در مرغ‌های واکسینه شده با پلاسمید pIRES/F در یک، دو و سه هفته بعد از اولین واکسیناسیون DNA و همچنین پس از دریافت دوز تقویت کننده بالاتر از مرغ ایمن‌سازی شده با pIRES/HN بوده است (شکل 5). بنابراین نتیجه این یافته‌ها ممکن است مربوط به ایمنی بیشتر ژن NDV F در مقایسه با ژن NDV HN باشد. ژن F در NDV حدت بسیاری نسبت به سایر ژن‌های القا کننده عفونت دارد [9]. از سوی دیگر این افزایش تیتر آنتی‌بادی بالا در pIRES/F ممکن است مربوط به اثر بخشی پلاسمید pIRES باشد.

به بیان دیگر، در مطالعه حاضر نتایج نشان داد که آنتی‌بادی HN که به قسمت B پلاسمید pIRES کلون شده است، کمتر از آنتی‌بادی F است که به قسمت A از پلاسمید pIRES کلون شده است. این سطح پایین آنتی‌بادی نیز می‌تواند نشان دهنده کاهش ترجمه ناشی از متفاوت بودن جایگاه ژن‌ها در روی پلاسمید مورد استفاده باشد.

نتایج حاصل از الایزا در مطالعه حاضر به خوبی با آزمون HI مطابقت داشته و هر دو نشان دهنده بالا بودن قابل توجه تیتر آنتی‌بادی در گروه‌های دریافت کننده دوز تقویتی می‌باشد.

بالاترین تیتر آنتی‌بادی در جوجه‌ها بعد از 5-6 هفته پس از دریافت واکسن با دوز تقویت کننده با pIRES/F/HN مشاهده شد. این نتایج نشان می‌دهد که مشارکت هم‌زمان ژن‌های HN و F می‌تواند موجب افزایش ایمنی هومورال در برابر ویروس شود.

تصور می‌شود که تعامل گلیکوپروتئین‌های HN و F با یکدیگر [۱۳،۱۱] و در نتیجه ایمن‌سازی با DNA پلاسمید تأثیر بیشتری نسبت به هر دو جز به تنهایی داشته است. مطالعات قبلی نشان دادند که وجود بیان هر دو ژن F و HN برای ایجاد پاسخ ایمنی در مقابل با بیماری NDV مؤثرتر است [۸،۱۴].

تصور بر این است که هر دو ایمنی سلولی (CMI) و هومورال نقش مهمی را در برابر عفونت به بیماری نیوکاسل در مرغ‌ها ایجاد می‌کند [15-17]، اگر چه در مطالعه اخیر نشان داده شد که اثر حفاظتی ناشی از واکسن DNA ویروس NDV بیشتر مربوط به پاسخ ایمنی

هومورال بوده تا CMI [14].

اثر بخشی واکسن‌های NDV را با بکارگیری آن‌ها به شکل پوشش داده شده با موادی مانند سایتوکاین‌ها بهبود بخشیده شده است. [18،14]. سایر روش‌های بهبود دهی به این واکسن‌ها شامل میکروانکوباسیون یا ارتباط نانوذرات با DNA پلاسمید است که موجب بهبود انتقال ژن در داخل سلول و در نتیجه افزایش پاسخ ایمنی بدن می‌شوند [۱۹،۲۰].

4- نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نیز نشان می‌دهد که همکاری بیان ژن‌های HN و F از ویروس NDV می‌تواند موجب القای پاسخ ایمنی شود. همچنین نتایج نشان داد که تزریق دوز تقویت کننده واکسن DNA دار به طور قابل توجهی موجب افزایش تیتر آنتی‌بادی در جوجه‌ها نسبت به آن‌هایی شده که تنها یک دوز از واکسن را دریافت کرده‌اند. این نتیجه بیان کننده آن است که ایمن سازی با DNA در بار دوم، موجب افزایش موفقیت و بهره‌وری از واکسیناسیون شده است. این نتیجه در مورد ارزش‌های بالقوه واکسن‌های DNA دار در برابر عفونت NDV اطلاعات بیشتری را فراهم آورده است.

5- سپاسگزاری

در اینجا از مؤسسه واکسن و سرم سازی رازی-شعبه اراک برای تأمین هزینه‌های این پژوهش، تقدیر و تشکر می‌شود.

6- منابع

[1] Alexander D., Newcastle disease and other avian Paramyxoviridae infection, In Diseases of Poultry, 10th ed, p 541–569.

[2] Payal Arora, B D Lakhchaura, S K Garg. (2010) Evaluaion of immunogenic potential of 75kDa and 56kDa proteins of newcastle disease virus (NDV). Indian J of Exp Biol. 48, 889-895.

[3] Krishnamurthy S, Huang Z, and Samal SK. (2000) Recovery of a virulent strain of Newcastle disease virus from cloned cDNA: expression of a foreign gene results in growth retardation and attenuation. Virology. 278, 168-182.

[4] Morgan RW, Gelb Jr J, Schreurs CS, Lütticken D, Rosenberger JK and Sondermeijer PJ. (1992) Protection of chickens from Newcastle and Marek's diseases with a recombinant herpesvirus of turkeys vaccine expressing the Newcastle disease virus fusion protein. Avian Dis. 858-870.

[5] Nagai Y, Klenk H-D and Rott R. (1976) Proteolytic cleavage of the viral glycoproteins and its significance for the virulence of Newcastle disease virus. Virology. 72, 494-508.

[6] Gurunathan S, Klinman DM, and Seder RA. (2000) DNA vaccines: immunology, application, and optimization. Immunol. 18, 927-974.

[7] Vijayarani K, Kumanan K, Albert A, Padmanaban VD. (1993) Immunogenicity of Newcastle virus subunits. Indian J Viro. 9,9.

[8] Loke C, Omar AR, Raha A, and Yusoff K. (2005) Improved protection from velogenic Newcastle disease virus challenge following multiple immunizations with plasmid DNA encoding for F and HN genes. Vet. Immunol. Immunopathol. 106, 259-267.

[9] Dortmans JCFM, Guus K, Peter JMR, and Peeters BPH. (2011) Virulence of Newcastle disease virus: what is know so far?J. Vet. Res. 122, 2-11.

[10] Allan W and Gough, R. (1974) A standard haemagglutination inhibition test for Newcastle disease.(1). Vet. Rec 1997, 95, 120-123.

[11] Stone-Hulslander J and Morrison TG. (1997) Detection of an interaction between the HN and F proteins in Newcastle disease virus-infected cells. J. Virol. 71, 6287-6295.

[12] Reynolds D and Maraqa A. (2000) Protective immunity against Newcastle disease: the role of antibodies specific to Newcastle disease virus polypeptides. Avian Dis. 138-144

[13] Payal Arora, B D Lakhchaura, S K Garg. (2010) Evaluaion of immunogenic potential of 75kDa and 56kDa proteins of newcastle disease virus (NDV). Indian J of Exp Biol. 48, 889-895.

[14] Donnelly JJ, Wahren B, and Liu MA. (2005) DNA vaccines: progress and challenges. J. Immunol. 175, 633-639.

[15] Reynolds D and Maraqa A. (2000) Protective immunity against Newcastle disease: the role of cell-mediated immunity. Avian Dis. 145-154.

[16] Reddy GS & Srinivasan VA. (1992) Use of BHK cell culture adapted Newcastle disease virus for immunization of chicks. Vaccine. 10(3),164-6.

[17] Sakaguchi M, Nakamura H, Sonoda K, Hamada F and Hirai K. (1996) Protection of chickens from Newcastle disease by vaccination with a linear plasmid DNA expressing the F protein of Newcastle disease virus. Vaccine. 14, 747-752.

[18] Vijayarani K, Kumanan K, Albert A, Padmanaban VD. (1993) Immunogenicity of Newcastle virus subunits. Indian J Viro. 9,9.

[19] Jazayeri SD, Ideris A, Zakaria Z, Shameli K, Moeini H, and Omar AR. (2012) Cytotoxicity and immunological responses following oral vaccination of nanoencapsulated avian influenza virus H5 DNA vaccine with green synthesis silver nanoparticles. Controlled Release. 161, 116-123.

[20] Pedersen N, Hansen S, Heydenreich AV, Kristensen HG and Poulsen HS. (2006) Solid lipid nanoparticles can effectively bind DNA, streptavidin and biotinylated ligands. Eur. J. Pharm. Biopharm. 62, 155-162.