بررسی عیار آنتی بادی و سرعت انتقال افقی واکسن کلون هیپرا در مقایسه با سایر سویه های واکسن نیوکاسل

خلاصه:

بیماری نیوکاسل یکی از مهمترین بیماریهای شایع در کشور می باشد که هرساله خسارات اقتصادی زیادی به صنعت طیور کشور وارد می کند. ایجاد ایمنی اختصاصی با استفاده از واکسنهای زنده و کشته اصلی ترین روش پیشگیری از عوارض اقتصادی این بیماری می باشد. واکسنهای زنده زیادی برای این منظور در بازار موجود و در دسترس می باشد. این واکسنها از دو گروه انتروتروپ و لنتوژن نیوکاسل می باشند. تنوع واکسنهای زنده نیوکاسل از گروه ها و شرکت تولید کننده مختلف انتخاب بین آنها را جهت بکار گیری در برنامه واکسیناسیون مشکل نموده است. اگرچه شاخص بیماری زایی داخل مغزی (ICPI) می تواند در انتخاب واکسن از نظر حدت استفاده شود اما به تنهایی نمی تواند بیانگر سایر خصوصیات واکسن نیوکاسل باشد. واکسنهای نیوکاسل از نظر توان القاء پاسخ آنتی بادی و همچنین سرعت انتشار متفاوت هستند. با شناخت این خصوصیات انتخاب واکسن در مواقع خاص، دقیق تر خواهد بود. در این مطالعه واکسن کلون هیپرا با سه واکسن نیوکاسل زنده پرمصرف کشور از نظر عیار آنتی بادی و سرعت انتشار مقایسه شدند. بدین منظور چهار گروه ده تایی از پولت های سه هفته هر کدام به ترتیب با واکسنهای کلون هیپرا، کلون A، لاسوتای A و B1 به روش قطره چشمی واکسینه شدند و در اتاقهای جداگانه قرارگرفتند. سپس تعداد ۵ قطعه پولت غیرواکسینه بعنوان پرنده های مجاور (contact) به هر کدام از گروهها اضافه شدند. پس از ۱۴ روز از تمامی پرنده ها خونگیری بعمل آمد و عیار آنتی بادی نیوکاسل به روش ممانعت از هماگلوتیناسیون (HI) اندازه گیری شد. براساس نتایج بدست آمده مشخص شد که پرنده های دریافت کننده واکسن کلون هیپرا در مقایسه با سه گروه دیگر آنتی بادی بالاتری داشتند و همچنین واکسن کلون هیپرا توانست در پرنده های مجاور نیز تیتر بالاتری از آنتی بادی را ایجاد کنند که بیانگر انتشار بیشتر و القاء پاسخ ایمنی بهتر در این پرندگان بود. براین اساس واکسن کلون هیپرا علاوه بر توانایی القاء پاسخ بالای آنتی بادی می تواند بطور موثر به پرندگانی که در زمان واکسیناسیون، واکسینه نشده اند منتقل شود و در آنها نیر پاسخ ایمنی ایجاد کنند و درصد پرندهای ایمن گله را افزایش دهد.

مقدمه:

با صنعتی شدن پرورش طیور، اهمیت بیماری های عفونی از جنبه های اقتصادی و بهداشتی افزایش یافته است که در این بین بیماری های ویروسی بسیار مورد توجه می باشند. به خصوص بیماری نیوکاسل که انتشار جهانی داشته و هر ساله خسارات عمده ای را به صنعت طیور وارد می سازد. هرچند برای کنترل

بیماری نیوکاسل، واکسنهای زنده و غیر فعال شده‌ی نیوکاسل به شکل وسیع در گله‌ها به کار می روند، ولی همچنان چهره بالینی بیماری بروز می نماید[۱]. ویروس نیوکاسل به خانواده پارامیکسو ویریده تعلق دارد که دارای یک RNA تک رشته‌ای با وزن مولکولی حدودا" ۵×۱۰^{۶} است که حدودا" ۵ درصد از وزن کل ویروس را تشکیل می‌دهد. توالی نوکلئوتیدهای ژنوم نیوکاسل، نشان می‌دهد که شامل ۱۵۱۹۸ نوکلئوتید می-باشد[۲]. انواع ویروس نیوکاسل را می توان با آزمون های مختلف از جمله شاخص بیماری زایی داخل مغز (ICPI) به گروه های "ولوژنیک"، "مزوژنیک"، "لنتوژنیک و "بدون علامت یا روده ای"تقسیم کرد[۳]. واکسن‌های زنده بیماری نیوکاسل به سه گروه انتروتروپ بدون علامت، لنتوژنیک و مزوژنیک تقسیم می-شوند. هدف از به کارگیری واکسن‌های زنده، ایجاد بیماری(عفونت) در گله ترجیحا" در هر یک از پرندگان در زمان اجرای برنامه است. تا بتواند تیتر یکنواختی از آنتی‌بادی ایجاد کند. واکسن‌های زنده معمولا" به شکل مایع آلانتوئیک لیوفیلیزه شده حاصل از کشت ویروس در تخم مرغ‌های جنین‌دار به دست می آیند و نسبتا" ارزان بوده و طریقه استفاده از آنها نیز ساده است و به طور گسترده‌ای استفاده می‌شوند. ایمنی موضعی به وسیله واکسن زنده ایجاد شده و حفاظت بلافاصله بعد از مصرف حاصل می‌شود. در اثر چرخش ویروس، ویروس‌های واکسن ممکن است از پرندگان واکسینه، به آن‌هایی که خوب واکسینه نشده‌اند منتقل شود[۴].

واکسیناسیون باید در کنار مدیریت و امنیت‌زیستی کارآمد انجام شود. در ایران از واکسن های زنده مختلف نیوکاسل با گرایش تنفسی (B1, LaSota , clone) و گوارشی (PHY.LMV.42، I2، V4HR، VG/GA و ND6/10) با شاخص ICPI متفاوت استفاده می‌شود . شاخص بیماریزایی استاندارد برای ویروس‌های نیوکاسل، ضریب بیماریزایی داخل مغزی (ICPI) است. طبق دستورالعمل OIE، مقادیر ICPI زیر ۰/۷ نشان دهنده ویروس‌های کم‌حدت NDV است که به صورت بالقوه قابلیت استفاده در واکسن را دارند. این شاخص در حال حاضر برای ویروس‌های غیرحاد واکسینال موجود از صفر تا ۰/۴۴ متغیر است. در این میان، لاسوتا دارای بالاترین شاخص بیماری زایی است که از ۰/۲ تا ۰/۴۴ متغیر است. در واکسن های کلون لاسوتا ادعا

شده است که این شاخص زیر ۲ دهم و شبیه به واکسن B1 می باشد . اکثر سویه های گوارشی به جز VG/GA دارای شاخص صفر میباشند[۷].

سویه های تنفسی ویروس نیوکاسل شامل الف: واکسن B1: این واکسن از سویه Hitchner B1 که یک ویروس بیماری نیوکاسل لنتوژن است، ساخته شده است. واکسن B1 یک واکسن متمایل به دستگاه تنفسی، با حدت کمتر نسبت به واکسن لاسوتا می‌باشد. ب: واکسن لاسوتا: این واکسن از سویه لاسوتا که یک ویروس لنتوژن است ساخته شده است. سویه لاسوتا (LaSota) و سایر ویروس‌های زنده‌ای هستند که در اوایل و اواخر دهه ۱۹۵۰ جدا شده‌اند [۸]. سویه لاسوتا، نخستین بار در فوریه ۱۹۴۶ از مزرعه آدام لاسوتا در وست وود، نیوجرسی از جوجه‌هایی جدا و شناسایی شد که وی برای معاینه پس از مرگ ارسال کرده بود[۹]. سویه LaSota تقریباً در همه کشورهایی که ویروس حاد نیوکاسل در آنها بومی است، استفاده می‌گردد [۱۰]. با توجه به بروز واکنش‌های پس از واکسیناسیون در استفاده از سویه‌ی لاسوتا، سویه‌ی کلون لاسوتا از برندهای مختلف تجاری تولید و در بازار ارائه شد که از نظر شاخص ICPI ملایم‌تر از سویه LaSota می‌باشد. ویروس این واکسن به دستگاه تنفس تمایل داشته و به خوبی در آنجا تکثیر می‌یابد. به دلیل حدت بالای واکسن، احتمال بروز واکنش‌های پس از واکسیناسیون در این سویه بالاست اما باید در نظر داشت که واکسن لاسوتا قوی‌ترین واکسن زنده موجود در ایران علیه مبارزه با ویروس مزرعه حاد نیوکاسل می‌باشد. ج: واکسن کلون‌شده‌ی لاسوتا: بعضی از شرکت‌های تولید کننده واکسن با استفاده از تکنیک کلونینگ اقدام به تولید واکسن‌هایی با ایمنی‌زایی بالا و حدت پایین کرده‌اند. در این تکنیک شرکت سازنده یک جدایه ویروس لاسوتا را تکثیر می‌دهد تا یک جمعیت هموژنی از آن بدست آورده و در قالب واکسن مورد استفاده قرار دهد. این واکسن‌ها با هدف کاهش حدت سویه واکسن نسبت به ویروس لاسوتای رایج و در عین حال حفظ ایمنی‌زایی مشابه با سویه لاسوتا می‌باشد. با توجه به تنوع بالای واکسنهای زنده نیوکاسل در ایران انتخاب واکسن بسادگی امکان پذیر نیست اما با مشخص شدن خصوصیات بیشتری از هرکدام از واکسنها می توان انتخاب دقیقتری داشت. هدف از این مطالعه بررسی و مقایسه سویه های لاسوتا و کلون لاسوتا های مختلف در مقایسه با B1 در سرعت ایجاد آنتی بادی و سرعت انتشار بین جوجه ها ی واکسن نخورده بود.

مواد و روش کار :

۴۰ قطعه پولت سه هفته (از سویه تجاری LSL) بصورت تصادفی به ۴ گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند و در شرایط یکسان و در اتاق های جداگانه نگهداری شدند. کلیه جوجه ها از یک جیره استاندارد مطابق سویه تجاری LSL دریافت نمودند. قبل از تقسیم بندی و جداسازی پولتها از ۲۰ قطعه از پولتها خونگیری شد و عیار آنتی‌بادی علیه ویروس نیوکاسل اندازه گیری شد. پس از جداسازی گروهها، در هر گروه ۱۰ قطعه جوجه توسط روش چشمی (یک دز) واکسن های لاسوتای A، کلون A، کلون هیپرا و B1 را دریافت نمودند. سپس پنج قطعه جوجه دیگر بدون دریافت واکسن بعنوان جوجه Contact یا مجاور به هرکدام از گروهها اضافه شدند. بدین ترتیب هر گروه شامل ده قطعه جوجه واکسینه و پنج قطعه جوجه غیرواکسینه بود. چهارده روز پس از واکسیناسیون از همه گروهها خونگیری صورت گرفت.

آزمون ممانعت از هماگلوتیناسیون (HI):

با توجه به دستورالعمل استاندارد سازمان دامپزشکی کل کشور و با استفاده از آنتی ژن اختصاصی ویروس نیوکاسل (۸ واحد هماگلوتیناسیون)، آزمون آزمون ممانعت از هماگلوتیناسیون (HI) بصورت همزمان برای همه نمونه های سرمی به روش بتا انجام گرفت.

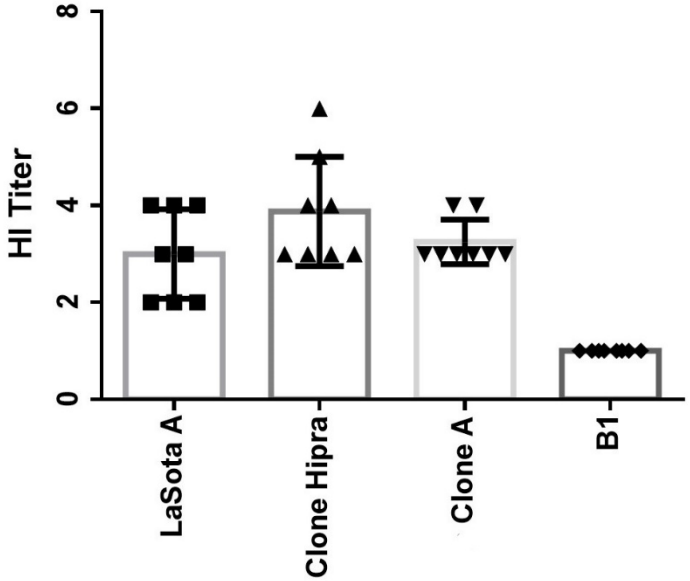
تجزیه و تحلیل آماری:

جهت توصیف داده‌ها میانگین تیترها و نمودارهای مربوطه استفاده از نرم افزار Office Excel و Graph pad 6 انجام گرفت. مقایسه میانگین تیتر در گروههای مختلف با استفاده از آزمون ANOVA باو نرم افزار SPSS (با سطح معنی داری $P<0.05$) انجام گرفت.

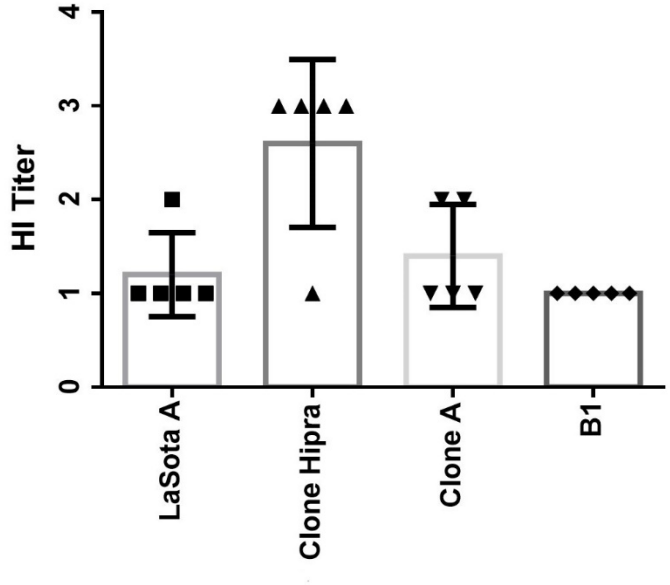
نتایج :

بررسی تیتر آنتی بادیها در ۱۴ روز پس از واکسیناسیون و در چهار گروه مورد مطالعه نشان داد که جوجه هایی که واکسن کلون هیپرا را دریافت نموده بودند دارای تیتر بالاتری (۱/۱۲ ± ۳/۷۸) نسبت به سایر گروهها بودند. واکسن کلون A با میانگین ۳/۲۵ و لاسوتای A با میانگین تیتر ۳ در رده بعدی قرار گرفتند. واکسن B1 کمترین پاسخ آنتی بادی را در طی ۱۴ روز القاء نمود. براساس این نتایج حداقل (minimum) تیتر ایجاد شده در هر دو گروه کلون هیپرا و کلون A شبیه یکدیگر بودند اما واکسن کلون هیپرا توانست حداکثر (maximum) بالاتری از آنتی بادی را مقایسه با کلون A ایجاد نمایید (تصویر شماره ۱).

اندازه گیری تیتر آنتی بادی در پرنده‌های مجاور یا contact که بطور مستقیم واکسنی دریافت نکرده بودند نشان داد که پرنده‌ها در گروه کلون هیپرا دارای آنتی بادی بالاتری (۰/۹۸± ۲/۶) نسبت پرنده های مجاور در سایر گروهها بودند. دو واکسن کلون A و لاسوتای A تقریبا شبیه یکدیگر عمل کردند. پرنده های مجاور در گروه B1 کمترین میزان پاسخ آنتی بادی را ایجاد نمودند (تصویر شماره ۲).



تصویر شماره ۱ : میزان تیتر ناشی از سویه های واکسن مختلف نیوکاسل، ۱۴ روز بعد از واکسیناسیون در جوجه پولت بدون انتی بادی



تصویر شماره ۲ : میزان تیتر ناشی از سویه های واکسن مختلف نیوکاسل، ۱۴ روز بعد از در معرض قرار دادن در کنار جوجه های واکسن خورده

بحث:

بیماری نیوکاسل یکی از بیماریهای مهم صنعت طیور می باشد که با ایجاد تلفات و کاهش تولید گوشت و تخم مرغ خسارات اقتصادی زیادی را به این صنعت وارد می کند. با توجه به آندمیک بودن ویروسهای ولوژنیک نیوکاسل در کشور، مهمترین راهکار پیشگیری از بیماری نیوکاسل استفاده از واکسن می باشد که در کنار سایر اقدامات حفاظت زیستی می تواند میزان خسارت ناشی از بیماری را کاهش دهد. جهت واکسیناسیون واکسنهای زنده و کشته زیادی در بازار ایران در دسترس می باشند که در گله های گوشتی، تخمگذار و مادر استفاده می شود. در یک برنامه واکسیناسیون ابتدا واکسن زنده و سپس واکسن کشته تجویز می شود. هرچند در عمل ممکن است واکسن زنده و کشته نیوکاسل بطور همزمان تجویز شود. واکسن زنده با القائ پاسخ ایمنی علاوه بر ایجاد محافظت سریع نقش مهمی در عملکرد پاسخ واکسن کشته

دارد. از طرف دیگر راحتی و تنوع راههای تجویز و ارزان بودن واکسنهای زنده آنرا به یک روش ساده جهت پیشگیری از بیماری نیوکاسل تبدیل نموده است.

طیف گسترده‌ای از واکسنهای زنده بیماری نیوکاسل در کشور موجود می باشد که انتخاب بین آنها می تواند چالش برانگیز و گیج کننده باشد. همواره ایجاد پاسخ ایمنی سریعتر و تیتر بالاتر در واکسیناسیون علیه بیماری نیوکاسل، یکی از دغدغه های مدیران بهداشتی گله ها می باشد که بویژه در موارد شیوع بیماری در منطقه یا مزرعه اهمیت بیشتری پیدا می‌کند. همچنین با توجه به عدم توزیع یکنواخت واکسن بویژه در روشهای آشامیدنی و اسپری، ایجاد پاسخ ایمنی در بخشی از گله وابسته به توانایی انتشار و چرخش ویروس واکسن در گله می باشد. چرخش ویروس واکسن می تواند بخشی از گله را که در فاز اولیه و در زمان واکسیناسیون، واکسینه نشده اند را ایمن نمایند. هرچند در صورتی که این چرخش و پاساژ ویروس واکسن بیش از حد و یا در گله های حساس باشد می تواند عوارض سویی داشته باشد. بهرحال ایجاد ایمنی و محافظت کافی گله در برابر بیماری نیوکاسل اولویت اول می باشد و راکسیون واکسن در مقایسه با عوارض ناشی از بیماری نیوکاسل قابل چشم پوشی می باشد.

شاخص ICPI برای تقسیم بندی واکسنهای نیوکاسل بکار گرفته شده است و جهت انتخاب واکسن زنده مناسب می توان از آن استفاده نمود اما این شاخص نمی تواند معرف خوبی برای ایمنی زایی (immunogenicity) و عفونت زایی (infectivity) و یا قدرت انتشار (transmissibility) آن باشد. با شناخت بیشتر خصوصیات سویه های واکسن، امکان انتخاب بهتر واکسن متناسب با شرایط مهیا می شود. با توجه به اینکه مقایسه این شاخص ها در شرایط مزرعه غیرممکن می باشد در این مطالعه تعدادی از واکسنهای موجود از مورد بررسی قرار گرفت.

براساس نتایج بدست آمده در این مطالعه واکسن کلون هیپرا توانست تیتر بالاتری از آنتی بادی را پس از ۱۴ روز در مقایسه با سه واکسن دیگر ایجاد نمایید. تیتر آنتی بادی شاخص مناسبی از میزان محافظت در

برابر بیماری نیوکاسل می باشد و تیتر بالاتر به معنی محافظت بیشتر قلمداد می گردد. در این مطالعه واکسن B1 نتوانست طی این مدت پاسخ ایمنی مناسبی ایجاد نمایید.

با بررسی نتایج سرولوژی پرنده های مجاور یا contact مشخص شده که واکسن نیوکاسل می تواند از پرنده واکسینه به غیرواکسینه منتقل شود و این انتقال می تواند بهمراه پاسخ سرولوژی باشد. عیار آنتی بادی در پرنده های مجاور در گروه کلون هیپرا بالاتر از سه گروه دیگر بود که می تواند بیانگر توانایی انتشار بیشتر واکسن کلون هیپرا باشد.

باتوجه به نتایج این مطالعه واکسن کلون هیپرا را می توان واکسنی با توانایی بالای القای آنتی بادی و همچنین قدرت انتشار بالا ارزیابی نمود و در زمانیکه که تیتر بالا مورد نیاز است استفاده نمود. همچنین این واکسن قدرت انتشار خوبی در سطح گله داشته و در پرنده های که در زمان واکسیناسیون واکسن دریافت نکرده اند می تواند پاسخ ایمنی ایجاد نماید.

منابع :

۱. Hosseini, H., A.G. Langeroudi, and R. Torabi, Molecular characterization and phylogenetic study of Newcastle disease viruses isolated in Iran, 2010–2012. Avian diseases, 2014. 58(3): p. 373-376.

۲. Ghalyanchilangeroudi, A., et al., Emergence of a Virulent Genotype VIIi of Newcastle Disease Virus in Iran. Avian Pathology, 2018(just-accepted): p. 1-22.

۳. Alexander, D.J., E.W. Aldous, and C.M. Fuller, The long view: a selective review of 40 years of Newcastle disease research. Avian pathology, 2012. 41(4 :(p. 329-335.

۴. Allan, W.H., J.E. Lancaster, and B. Toth, Newcastle disease vaccines, their production and use. 1978: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

۵. Dimitrov, K.M., et al., Newcastle disease vaccines—A solved problem or a continuous challenge? Veterinary Microbiology, 2017. 206: p. 126-136.

۶. Miller, P.J. and G. Koch, Newcastle disease. Diseases of poultry, 2013. 13: p. 89-138.

۷. Al-Garib, S., et al., Review of Newcastle disease virus with particular references to immunity and vaccination. World's poultry science journal, 2003. 59(2): p. 185-200.

.٨ Bhuvaneswari, S., et al., Evaluating the efficacy of LaSota vaccination induced protection in chickens upon challenge with a genotype IV strain of Newcastle disease virus. Virus Disease, 2017. 28(3): p. 328-336.

.٩ Goldhaft, T.M., Guest editorial: Historical note on the origin of the LaSota strain of Newcastle disease virus. Avian diseases, 1980. 24(2): p. 297-301.

.١٠ Diel, D.G., et al., Complete genome and clinicopathological characterization of a virulent Newcastle disease virus isolate from South America. Journal of clinical microbiology, 2012. 50(2): p. 378-387.