

واکسن Vectormune® ND (یک واکسن وکتور بر پایه هرپس ویروس بوقلمون) انتقال ویروس نیوکاسل چالش را در جوجه‌های گوشتی تجاری دارای آنتی بادی مادری کاهش می‌دهد

*Timea Tatár-Kis¹, Egil A.J. Fischer², Christophe Cazaban³, Edit Walkó-Kovács¹,
Zalan G. Homonnay¹, Francisca C. Velkers², Vilmos Palya¹ and J. Arjan Stegeman^{2,*}*

¹Scientific Support and Investigation Unit, Ceva-Phylaxia/ ² Population Health Department,
Veterinary Medicine Faculty, Utrecht University/ ³ Science and Investigation Department, Ceva
Animal Health

مقدمه

واکسیناسیون علیه بیماری نیوکاسل در بسیاری از نقاط جهان انجام می‌شود اما هدف از واکسیناسیون در هر منطقه متفاوت است. در مناطق دچار آلودگی اندمیک، واکسیناسیون معمولاً با هدف پیشگیری از وقوع بیماری بالینی، کاهش تلفات و کنترل زیان‌های ناشی از کاهش تولید انجام می‌شود. در مناطق غیر اندمیک، واکسیناسیون برای جلوگیری از شیوع همه‌گیری‌ها و یا گسترش بیشتر بیماری اعمال می‌شود. برای دستیابی به این هدف، یک واکسن باید بتواند به اندازه کافی شدینگ و انتقال ویروس را کاهش دهد. میزان انتقال یک عامل عفونی را می‌توان با نسبت تکثیر¹ R بیان کرد که نشان‌دهنده میانگین تعداد عفونت‌های ناشی از یک پرنده آلوده است. مقدار R باید کمتر از ۱ باشد تا از انتشار عامل عفونی جلوگیری شود.

پروتئین فیوژن (F) یکی از مهم‌ترین پروتئین‌های موجود در سطح ویروس نیوکاسل است که به ویروس اجازه می‌دهد به سلول‌های هدف بچسبد و وارد آنها شود؛ بنابراین یک عامل حدت کلیدی برای بیماری‌زایی ویروس و همچنین یک آنتی‌ژن کلیدی در بحث ایمنی علیه ویروس است. در نتیجه، این پروتئین عامل حدت ترجیحی برای استفاده در فناوری واکسن نو ترکیب بیماری نیوکاسل است.

هرپس ویروس بوقلمون (HVT) به دلیل استفاده گسترده از آن در سرتاسر دنیا جهت ایمن‌سازی در مقابل بیماری مارک، ثابت شده که ویروسی بسیار ایمن و پایدار است و همچنین این قابلیت را دارد که ژن‌های خارجی را در خود جای دهد.

¹ Reproduction ratio

Vectormune® ND یکی از واکسن‌های نو ترکیب موجود علیه بیماری نیوکاسل است که ژن F یک ویروس از ژنوتیپ I بیماری نیوکاسل را بیان می‌کند و قادر به ایجاد محافظت بالینی در برابر چالش با ویروس نیوکاسل از ژنوتیپ‌های مختلف همانند ژنوتیپ‌های II، V، VII و ... در جوجه‌های گوشتی و تخمگذار تجاری است. در این مطالعه، اثر یک بار واکسیناسیون با استفاده از واکسن Vectormune® ND در یک‌روزگی برای کاهش انتقال ویروس بیماری نیوکاسل ولوژنیک ژنوتیپ VII در جوجه‌های گوشتی تجاری دارای آنتی‌بادی‌های مادری بیماری نیوکاسل مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار

سویه چالش، یک ویروس نیوکاسل ولوژنیک ویسروتروپیک از ترکیه بود که اخیراً جداسازی شده است و نماینده کلاس II ژنوتیپ VIIi (بر اساس طبقه‌بندی انجام شده توسط Diel و همکاران، ۲۰۱۲) و ژنوتیپ VII.2 (بر اساس آخرین طبقه‌بندی ژنتیکی انجام شده) می‌باشد. این سویه با دز $5.0 \log_{10} \text{ELD}_{50}$ به روش تلقیح داخل بینی در روز ۴-۵ پس از چالش، تلفات ۱۰۰٪ در جوجه‌های تخمگذار SPF^۲ در سن ۲-۳ هفتگی ایجاد می‌کند (اطلاعات منتشر نشده شرکت Ceva).

تخم‌مرغ‌های جنین‌دار جوجه‌های گوشتی (Ross 308) در روز ۱۸ جنینی از یک جوجه‌کشی تجاری در مجارستان خریداری شدند و سپس در شرایط آزمایشگاهی تفریخ شدند تا از هرگونه آلودگی با واکسن در جوجه‌کشی جلوگیری شود. سطح تیتراژ HI آنتی‌بادی مادری (MDA) جوجه‌ها علیه بیماری نیوکاسل $5.5 \log_2$ بود.

جوجه‌ها در یک‌روزگی به طور تصادفی به دو گروه تقسیم شدند. یکی از گروه‌ها با یک دوز واکسن Vectormune® ND به صورت زیرجلدی واکسینه شد و جوجه‌های گروه دیگر واکسینه دریافت نکردند. از ۲۰ جوجه در یک‌روزگی نمونه خون گرفته شد تا سطح آنتی‌بادی مادری در برابر بیماری نیوکاسل تعیین شود.

جوجه‌ها بر روی بستر و با دسترسی آزاد به آب و دان پرورش داده شدند و تراکم پرورش نیز ۳ جوجه بر مترمربع بود. ۴۲ روز پس از واکسیناسیون، جوجه‌های هر گروه به طور تصادفی به دو زیرگروه (سیدر و تماسی) تقسیم و علامت‌گذاری شدند. در گروه واکسینه، ۲۰ پرنده در هر زیرگروه (سیدر و تماسی) قرار گرفت و در گروه غیرواکسینه ۲۱ جوجه (تماسی) و ۱۶ پرنده سیدر باهم ترکیب شدند. پرندگان سیدر به اتاق مجزایی منتقل شدند و ۸ ساعت پس از تلقیح داخل بینی ویروس سویه چالش (D3273/1/16TR) به اتاق‌های مذکور وارد شدند.

² Specific Pathogen Free

در طول دوره ۱۴ روزه مشاهدات پس از چالش، علائم بالینی (زمین گیر شدن، ژولیدگی پرها، علائم عصبی مانند فلجی و پیچ خوردگی گردن) و مرگومیر به صورت روزانه ثبت شد. نمونه سواب‌های دهانی (از شکاف شوان) و کلوآکی روزانه با استفاده از سواب‌های استریل جمع‌آوری شدند و نمونه خون در پایان دوره آزمایش (روز ۱۴) گرفته شد. طرح کلی مطالعه در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- طراحی مطالعه جهت بررسی کمی اثر واکسن Vectormune® ND بر انتقال ویروس بیماری نیوکاسل در جوجه‌های گوشتی

گروه	زیرگروه	واکسیناسیون	چالش	نمونه‌گیری
واکسینه شده	سیدر (واکسن-سیدر)	Vectormune® ND	داخل بینی (n=20)	روز تفریح (تعداد= همه): نمونه خون.
	تماسی (واکسن-تماس)		از طریق تماس (n=20)	روز ۱ تا ۱۴ پس از چالش، به صورت روزانه (تعداد = همه): سواب‌های بینی دهانی و کلوآکی.
واکسینه نشده (کنترل)	سیدر (غیرواکسینه-سیدر)	فاقد دریافت واکسن	داخل بینی (n=16)	مشاهدات بالینی روز ۱۴ پس از چالش (تعداد= همه): نمونه خون.
	تماسی (غیرواکسینه-تماس)		از طریق تماس (n=21)	

آزمایش HI با استفاده از ۴ واحد HA آنتی ژن LaSota و مطابق دستورالعمل OIE انجام شد. همچنین نمونه‌های سرمی اخذ شده قبل از چالش، توسط یک کیت الایزای تجاری حساس به تشخیص پاسخ ایمنی همورال در برابر واکسن‌های rHVT-ND (NDV F ELISA KIT, BioChek) مورد ارزیابی قرار گرفتند. نمونه‌های سرمی اخذ شده در روز ۱۴ پس از چالش، توسط یک کیت الایزای نوکلئوپروتئین (NDVNP, IDvet) برای تشخیص افتراقی ایمنی ناشی از واکسیناسیون با واکسن rHVT-ND و چالش با ویروس زنده مورد آزمایش قرار گرفتند.

نمونه سواب‌های اخذ شده توسط Real-Time RT-PCR بمنظور ردیابی تفاوت در میزان شدینگ ویروس در گروه‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت.

محاسبات مربوط به کمی‌سازی میزان انتقال ویروس (نسبت تکثیر R) نیز توسط فرمول‌های مربوطه مورد محاسبه قرار گرفت.

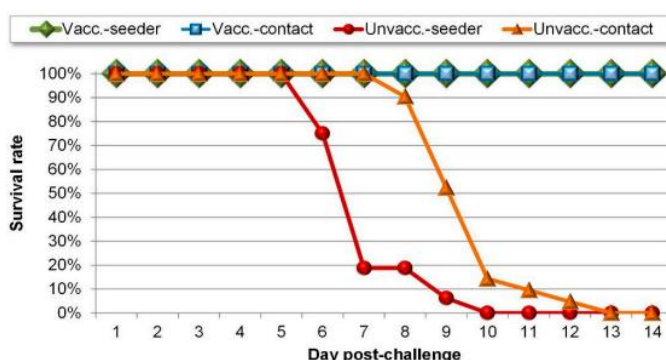
نتایج

دریافت مناسب واکسن توسط جوجه‌ها با اندازه‌گیری سطح آنتی‌بادی سرمی قبل از چالش در ۴۲ روزگی به تایید رسید.

جدول ۲- نتایج سرولوژی قبل از چالش و محافظت بالینی در برابر چالش با vNDV

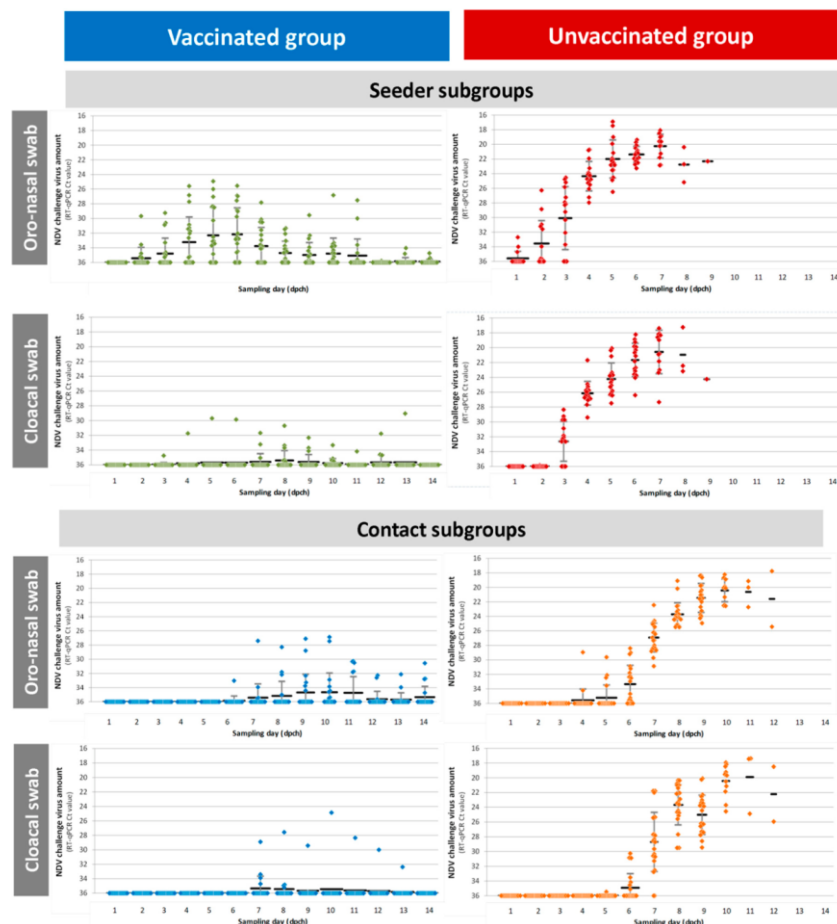
محافظت بالینی (%)	سرولوژی قبل از چالش		گروه
	تیتراژ HI بر مبنای Log_2 (میانگین + بازه انحراف معیار و مثبت بودن)	تیتراژ الایزا (میانگین + بازه انحراف معیار و مثبت بودن)	
100%	3.9 ± 1.2 (1; 7) 95%	25144 ± 5254 (8222; 33593) 100%	واکسینه شده
0%	0.9 ± 0.7 (0; 2) 0%	146 ± 111 (1; 470) 0%	غیر واکسینه

هیچ علائم بالینی و یا تلفاتی که بتواند با عفونت ویروس نیوکاسل ولوژنیک مرتبط باشد در گروه واکسینه مشاهده نشد. در مقایسه، همه پرندگان غیرواکسینه در چالش با ویروس درگیر شدند. در گروه غیر واکسینه علائم بالینی ملایم (پره‌ای ژولیده و زمین‌گیری) طی روزهای ۴ تا ۶ پس از چالش ظاهر شد و متعاقب آن تلفات بین روزهای ۶ تا ۹ پس از چالش در زیرگروه سیدر رخ داد (تصویر ۱). اولین تظاهرات بالینی در روزهای ۶ تا ۹ پس از چالش در زیرگروه تماسی مشاهده شد و متعاقب آن تلفات بین روزهای ۸ تا ۱۳ پس از چالش رخ داد. همه جوجه‌های چالش شده غیرواکسینه، شدینگ شدید ویروس چالش را نشان دادند (تصویر ۲).



تصویر ۱: دوره زمانی بروز تلفات در زیرگروه‌های مختلف

تصویر ۲:



این تصویر کینتیک شدینگ ویروس ولوژنیک نیوکاسل را در پرندهای واکسینه و غیر واکسینه پس از آلودگی مستقیم (گروه سیدر) یا پرندگان در تماس (گروه تماس) نشان می‌دهد. گروه سیدر با 5.0 log₁₀ELD₅₀ ویروس ولوژنیک نیوکاسل بصورت تلقیح داخل دهانی-بینی چالش داده شدند. پرندهای گروه تماسی ۸ ساعت پس از چالش در مواجهه با گروه‌های چالش شده، قرار گرفتند. روزانه سواب دهانی-بینی و کلوآک به مدت ۱۴ روز پس از چالش از پرندها اخذ شد. میزان دفع ویروس توسط RT-qPCR اندازه‌گیری شد. در تصویر روبرو Ct هر نمونه و میانگین Ct‌ها نشان داده شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

- ✓ در این مطالعه برای اولین بار، برای یک واکسن نو ترکیب HVT-ND (Vectormune® ND) نشان داده شد که کاهش شدینگ ویروس با کاهش قابل توجه در میزان انتقال ویروس در بین پرندگان همراه است.
- ✓ مشخص شده است که واکسن Vectormune® ND (که بیان‌کننده ژن F ویروس بیماری نیوکاسل در سطح خود می‌باشد) به طور موفقیت‌آمیزی می‌تواند جوجه‌های یک‌روزه و یا جنین‌های ۱۸ روزه را در حضور آنتی‌بادی‌های مادری محافظت کند.
- ✓ کینتیک پاسخ ایمنی به Vectormune® ND یک افزایش تدریجی در ایمنی را نشان می‌دهد. محافظت بالینی قوی همراه با کنترل قابل توجه شدینگ در جوجه‌های گوشتی دارای آنتی‌بادی مادری در سن ۳ هفته‌گی حاصل می‌شود، که متعاقب آن محافظت بالینی کامل ایجاد شده و سرکوب قوی تکثیر ویروس چالش رخ می‌دهد.
- ✓ واکسن Vectormune® ND قادر به کاهش قابل توجه انتقال عفونت ویروس نیوکاسل در گروه واکسینه بود (ضریب > ۱) که نشان می‌دهد عفونت پس از ورود به جمعیت پرندگان واکسینه از بین خواهد رفت.

- ✓ این مطالعه تجربی توانایی Vectormune® ND را برای پیشگیری و کنترل شیوع بیماری نیوکاسل ناشی از ویروس های نیوکاسل متعلق به ژنوتیپ هترولوگ را نشان می دهد.
- ✓ ترکیب Vectormune® ND با واکسن های زنده که استراتژی پیشگیری معمول در مناطق اندمیک است، احتمالاً میزان انتقال را به طرز مؤثرتری کاهش می دهد.
- ✓ در نتیجه، نتایج این مطالعه به وضوح قابلیت Vectormune® ND را برای پیشگیری و کنترل شیوع بیماری نیوکاسل در جوجه های گوشتی نشان می دهد.

Reference:

1. Timea Tatár-Kis , Egil A.J. Fischer , Christophe Cazaban , Edit Walkó-Kovács , Zalan G. Homonnay, Francisca C. Velkers , Vilmos Palya and J. Arjan Stegeman ;A Herpesvirus of Turkey-Based Vector Vaccine Reduces Transmission of Newcastle Disease Virus in Commercial Broiler Chickens with Maternally Derived Antibodies; Vaccines; 2020; 8, 614.