

پیشرفتهای تازه در مورد تهیه واکسن طاعون گاوی

دکتر فرشاد باغی باغبان، عضو هیات علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد یاسوج - بخش دامپزشکی
با همکاری دکتر بهروز قابوسی، مؤسسه تحقیقاتی رازی

مروری بر تهیه واکسنهای جدید با استفاده از بیوتکنولوژی

پیشرفت در علم بیوتکنولوژی^۱ سبب پیدایش زمینه‌های جدیدی در ساخت واکسن گردیده است. همان‌طور که در تابلوی شماره ۱ خلاصه شده، انواع جدید واکسن شامل واکسنهای ساخته شده از اجزاء سلول یا ساب یونیت^۲، واکسن سنتتیک^۳ و واکسن ناقل^۴ می‌باشند.

واکسن ساب یونیت و سنتتیک

به منظور تهیه واکسن ساب یونیت یا واکسنهای ساخته شده از اجزاء سلول، ژنی که مسئول ایمنی می‌باشد به داخل سلول میزبان از قبیل باکتری، مخمر یا سلولهای حشرات وارد می‌شود. به طوری که ژن مذکور در داخل این سلولها تولید و همانند سازی می‌کند. چون این نوع واکسنها ایمنی کافی تولید نمی‌کنند، استفاده از یاورها^۵ ضرورت دارد، بنابراین ساخت و تولید یاورها که قدرت ایمنی‌زایی واکسن را از دیاد می‌بخشد تحت مطالعه است.

پلی‌پپتید مربوط به پروتئین ویروس که وظیفه ایمنی‌زایی را به عهده دارد مربوط به بخش خاصی از آن است و غالباً از تعدادی معدود از زنجیره اسید آمینه تجاوز نمی‌کند. به طوری که این ناحیه از زنجیره اسید آمینه در ویروس تب برفکی^۶ FMD که از کیسید^۷ مشتق شده و VP1 نام دارد محدود به ۲۰ اسید آمینه بوده و بقیه نواحی زنجیره فاقد خاصیت ایمنی بخش است، از این رو می‌توان این تعداد اسید آمینه را به دنبال هم قرار داده و به طور شیمیایی سنتز نمود که همان واکسن سنتتیک است. از آن جایی که واکسنهای سنتتیک کمتر از واکسنهای اجزاء سلولی یا ساب یونیت خاصیت ایمنی بخشی دارند، بنابراین استفاده از یاور مؤثر در

ساخت این قبیل واکسنها اجباری می‌باشد.

واکسن ناقل

واکسن ناقل عبارت است از باکتری یا ویروس زنده‌ای که ژن مربوط به ایجاد ایمنی به داخل آن انتقال داده شده است. در میان سلولهای میزبان ویروس واکسنیا^۸ فواید متعددی دارد که در ادامه به آنها اشاره خواهد شد.

ویروس واکسنیا به عنوان یک ناقل برای تهیه واکسن

ویروس واکسنیا بزرگترین ویروس DNA بوده که اندازه ژنوم آن در حدود ۱۸۵۰۰۰ نوکلئوتید یا جفت باز می‌باشد. چنین اندازه بزرگی از ژنوم DNA در اثر ورود ژنهای بیگانه دچار نقص نشده و ظرفیت هماهنگ سازی آن ادامه پیدا می‌کند. بنابراین یک ژن (مونوالانت)^۹ و یا چند ژن (پلی والانت)^{۱۰} را می‌توان به طور هم زمان و به صورت تئوریک وارد ویروس نموده و بر علیه چند بیماری واکسن تهیه نمود.

از زمان جنر^{۱۱} قریب به دو قرن از ویروس واکسنیا برای تهیه واکسن آبله انسان استفاده شده است. واکسن آبله انسان مزیت‌های متعددی دارد که در ریشه کنی این بیماری نقش اساسی را در جهان بازی نموده است. از این مزیتها می‌توان در ساخت واکسنهای ناقل همان‌طور که در تابلوی شماره ۲ ذکر گردیده استفاده نمود.

یکی از خواص ویروس واکسنیا مقاومت آن نسبت به حرارت ۴۵ درجه سانتیگراد برای مدت بیش از یک ماه است. به طوری که با استفاده از این مقاومت می‌توان واکسنهای ناقل را در مناطق استوایی که سیستم زنجیره سرما (ذخیره‌سازی

واکسن در سرما) بخوبی فراهم نیست مصرف نمود. سویه‌هایی از ویروس واکسنیا که در تهیه واکسن به طور معمول مورد استفاده قرار گرفته‌اند، در تابلوی شماره ۳ ذکر گردیده است. در میان آنها سویه‌های Wyeth, Lister به خصوص سویه نخست به طور وسیع برای ریشه کنی جهانی بیماری آبله انسانی مورد استفاده قرار گرفته است. سویه‌های LC16m8, LC16mo که تخفیف حدت یافته می‌باشند از سویه Lister مشتق شده است. سویه LC16MO با ۸ بار پاساژ به دست آمده در سال ۱۹۷۵ در کشور ژاپن به عنوان سویه تخفیف حدت یافته برای تهیه واکسن آبله انسان مورد استفاده قرار گرفته است.

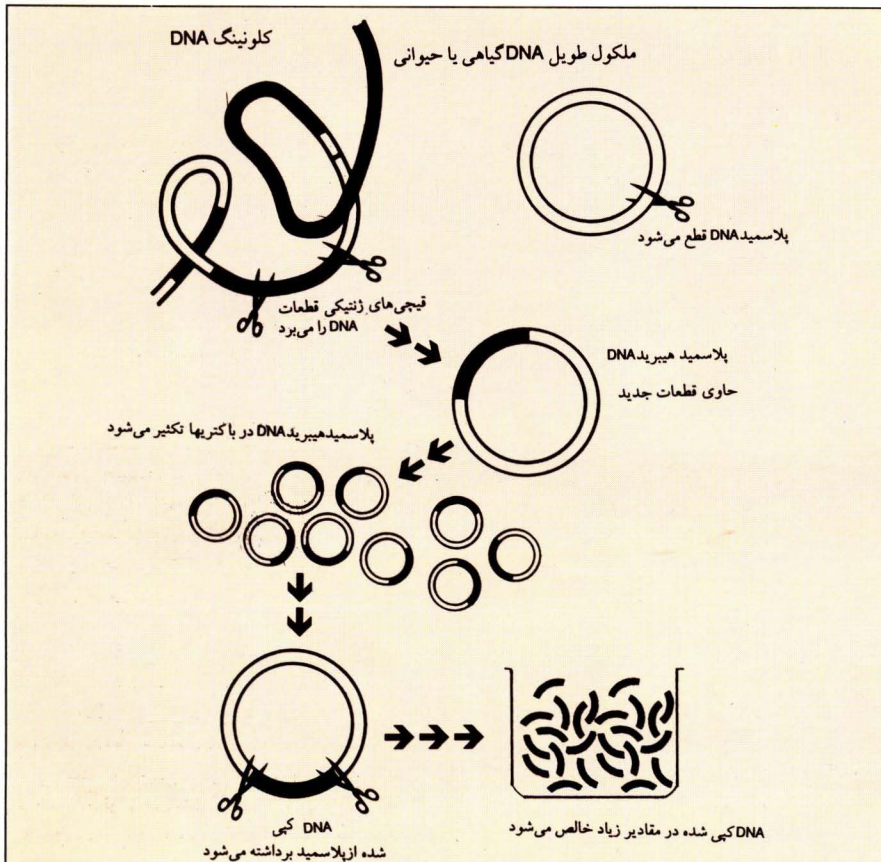
برای دخول ژن مورد نظر به داخل ویروس واکسنیا به طور عمده از محل‌های TK (تایمیدین کیناز^{۱۲}) و H (هما گلویتینین^{۱۳}) استفاده گردیده است.

ظهور واکسن نوترکیبی طاعون گاوی^{۱۴}

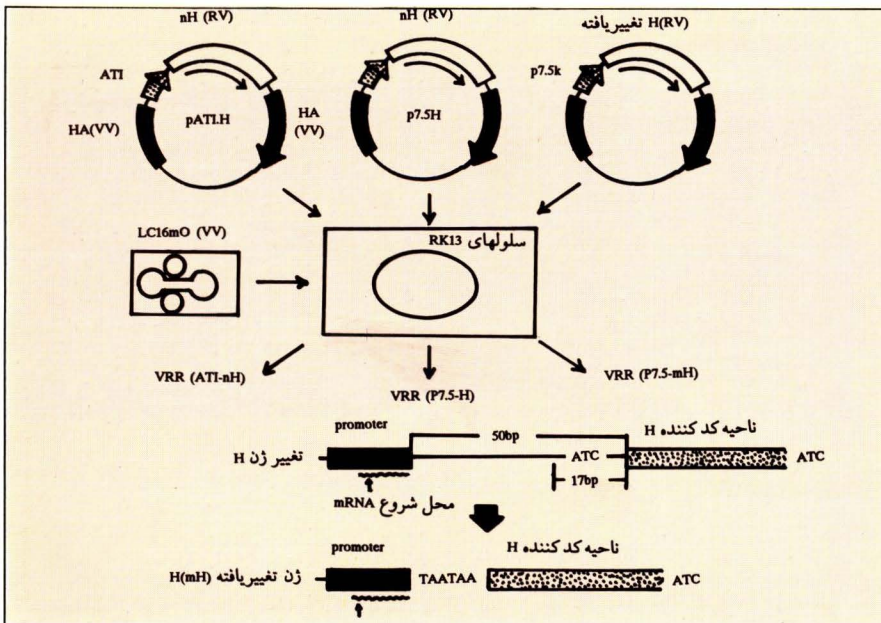
ساختمان واکسن نوترکیبی طاعون دانشمندان DNA مکمل (cDNA) مربوط به RNA پیامبر، ژن هما گلویتینین (H) ویروس طاعون گاوی سویه L را جدا کردند. از آن جایی که پروتئین H نقش عمده ایمنی‌زایی را به عهده دارد. ژن مذکور را وارد محل هما گلویتینین ویروس واکسنیا سویه LC16mo نمودند. سویه نامبرده نسبت به سویه Lister از نظر عوارض جانبی و بیماری‌زایی برای بافت عصبی^{۱۵} در حیوانات آزمایشگاهی و انسان دارای حدت کمتری بوده ولی در سطحی مشابه با سویه LC16m8 می‌باشد (شکل شماره ۱) همچنین نظر به اینکه سویه LC16m8 نسبت به سویه LC16mo عفونت‌زایی کمتری در گاو دارد به عنوان یک کاندیدای ناقل مناسب برای ساخت واکسن نوترکیبی طاعون مورد توجه قرار گرفت.

تابلوی ۱- ویروس واکسنهایی که به طور ژنتیکی مهندسی شده‌اند.

ویژگیها	مثال	استفاده از اجوان
واکسن ساب یونیت	بیماری تب برفکی (VP1)، پولیو (VP1)، هپاتیت B(S) هپاتیت B(S) هپاتیت AIDS	بله
واکسن سنتتیک	کپسید سنتتیک از رشته آمینواسید پروتئین پوشش/کپسید در E.coli	بله
واکسن ناقل	نقوذ ژن پوشش/کپسید بداخل ویروس ناقل	خیر



این تصویر نشان دهنده کلونینگ DNA به منظور تولید واکنشهای ساب یونیت است.



شکل ۱- ساختن واکنش نوترکیبی طاعون گاوی

مسئولین تهیه واکنش نوترکیبی علیه بیماری طاعون گاوی، سه نوع واکنش مختلف با استفاده از پروموتورهای گوناگون و اصلاح و تغییر ژن هماگلوتینین ساخته اند. در نهایت مشخص گردید که آن نوع واکنش نوترکیبی که ژن هماگلوتینین آن توسط پروموتور P 7.5 K اصلاح شده است. بالاترین حد ایمنی زایی را در خرگوشها نشان داده است (تابلوی شماره ۴) لذا براساس نتایج حاصله این نوع واکنش نوترکیبی برای آزمایشهای بعدی موضوع مطالعه گردید.

ایمنی زایی واکنش نوترکیبی طاعون (RRV) در خرگوشها

خرگوشهایی که با واکنش نوترکیبی ذکر شده طاعون ایمن شدند، هر دو نوع پادتن خنثی کننده^{۱۷} و ضد هماگلوتینین را تولید نمودند. پس از تزریق با ویروس حاد یا Challenge، تمام خرگوشهای ایمن شده از نظر کلینیکی سالم باقی ماندند در حالی که حیوانات شاهد یا ایمن نشده بیماری را به فرم کشنده نشان دادند. ضایعات هیستوپاتولوژیک^{۱۸} که معمولاً در بافتهای لنفاوی پس از آلودگی به ویروس حاد به وجود می آید و هدف اصلی این ویروس است، در خرگوشهای ایمن شده مشاهده نگردید. علاوه بر این ویروس از نسوج لنفاوی نیز جدا نگردید. بنابر این به علت فقدان ضایعات هیستوپاتولوژیک و جدا نشدن ویروس، مقاومت خرگوشها در برابر ویروس حاد به اثبات رسید. حداقل دز ایمن کننده در برابر ویروس حاد کمتر از ۱۰^۲ واحد تولید کننده پلاک^{۱۹} یا PFU می باشد. دوام پادتن خنثی کننده در برابر ویروس طاعون گاوی و ویروس متجاوز از یک سال می باشد که این کار هنوز ادامه دارد (شکل ۲).

مقاومت در برابر گرما

واکنش طاعون گاوی ساخته شده همراه با ماده محافظ پپتن به صورت خشک و لیوفیلیزه در آمد. واکنش خشک شده به مدت یک ماه و در درجه حرارت ۳۷ و ۴۵ سانتیگراد قدرت ایمنی زایی خود را حفظ نمود. این سطح از مقاومت در گرما مشابه با مقاومت ویروس واکنشینیا بوده و برابر با سطح

تابلوی ۲- فواید واکسن ناقل ویروس آبله گاوی

واکسن ناقل	واکسن آبله انسانی (ویروس آبله گاوی)	
بالا	بالا	امن بودن در انسان
بالا	بالا	ثبات ژنتیکی
		ایمنیت
بله	بله	-ایمنیت هومورال
بله	بله	-ایمنیت با واسطه سلولی
خیر	خیر	استفاده از آجوان
بالا	بالا	مقاومت در مقابل گرما
آسان	آسان	تجویز
نسبتاً آسان (کشت سلولی)	آسان (گاوها)	ساخت
خیر	خیر	تومورزایی
واکسن چندطرفیتی	-	سایر موارد

استانداردی است که سازمان بهداشت جهانی (WHO) برای واکسن آبله انسان در نظر گرفته است. با ذخیره‌سازی طولانی‌تر در دمای ۳۷ و ۴۵ درجه سانتیگراد مشخص شد که واکسن طاعون گاوی همان طور که در شکل شماره ۳ نشان داده شده است، به خوبی برای بیش از ۶ ماه دوام دارد. پس از رقیق نمودن واکسن طاعون گاوی با حلال مربوطه مشاهده شد که واکسن مذکور به مدت ۲ روز در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد مقاومت کرده و از این نظر استفاده از چنین واکسنی در شرایط آب و هوایی مناطق استوایی مقدور می‌باشد.

بی‌ضرری واکسن طاعون گاوی در حیوانات آزمایشگاهی

خاصیت بیماری‌زایی واکسن نوترکیبی طاعون گاوی برای بافت عصبی در موشهای Balb C، خرگوشها و میمونهای سنجابی ۲۰ به وسیله تزریق داخل مغزی مورد آزمایش قرار گرفت. به عنوان مقایسه سویه اصلی ویروس LC16m0 که واکسن مذکور روی آن تهیه شده و همچنین سویه WR ویروس واکسینا به طور مشابه آزمایش گردید. همان طور که در تابلوی شماره ۵ خلاصه شده، ثابت گردید که واکسن طاعون گاوی در تمام حیوانات آزمایشگاهی مورد استفاده مشابه با سویه ویروس اولیه واکسینا LC16m0 بیماری‌زایی اندکی برای بافت عصبی دارد.

ایمنی‌زایی

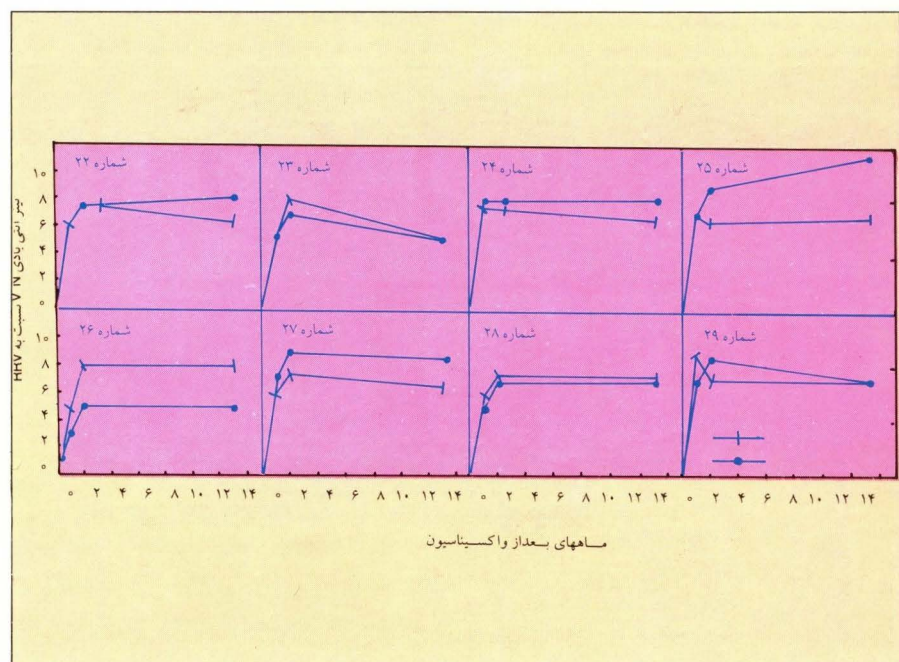
تمام آزمایشات در اصطبلهای کنترل شده مربوط به طاعون و بیماریهای مشابه در انستیتوی تحقیقاتی دامپزشکی هند به نام Mukteswar انجام گردید. سه گروه از گاوهای نژاد هیل بول ۲۱ که هر کدام شامل چهار رأس بودند به طور زیر جلدی با دزهای ۱۰^۶ و ۱۰^۷ و ۱۰^۸ PFU از واکسن طاعون گاوی ساخته شده تلقیح گردیدند. در همان اصطبل چهار رأس گاو به عنوان شاهد نگه داشته شد. پس از واکسیناسیون تب یا هیچ نوع ضایعه پوستی قابل لمس در محل تزریق مشاهده نگردید. ۶ هفته بعد تمام دامها منجمله شاهد به طور زیر جلدی با ویروس حاد تزریق گردیدند. ۳ رأس از دامهای شاهد علائم بیماری طاعون گاوی را نشان داده و تلف شدند. از نظر هیستوپاتولوژی دامهای تلف شده مبتلا به طاعون تشخیص داده شدند در حالی که دامهای واکسینه از نظر بالینی کاملاً سالم باقی ماندند. نتایج حاصله از این آزمایش سه نکته را مشخص می‌کند. اولاً- واکسن طاعون گاوی هیچ گونه واکنش یا عوارض جانبی و مشخصی را در حیوانات واکسینه نشان نمی‌دهد.

ثانیاً- واکسن طاعون گاوی در دز پائین مثلاً ۱۰^۶ PFU نیز سبب ایمنی می‌گردد. ثالثاً- ویروس واکسن طاعون گاوی در اثر تماس و در اصطبل به حیوانات مجاور منتقل نمی‌گردد. برای تأیید بیشتر آزمایش دیگری نیز با استفاده از طیف وسیعی از واکسن طاعون گاوی در رفتهای ۱۰^۴ الی ۱۰^۸ PFU انجام شد. عدم وجود واکنشهای جانبی

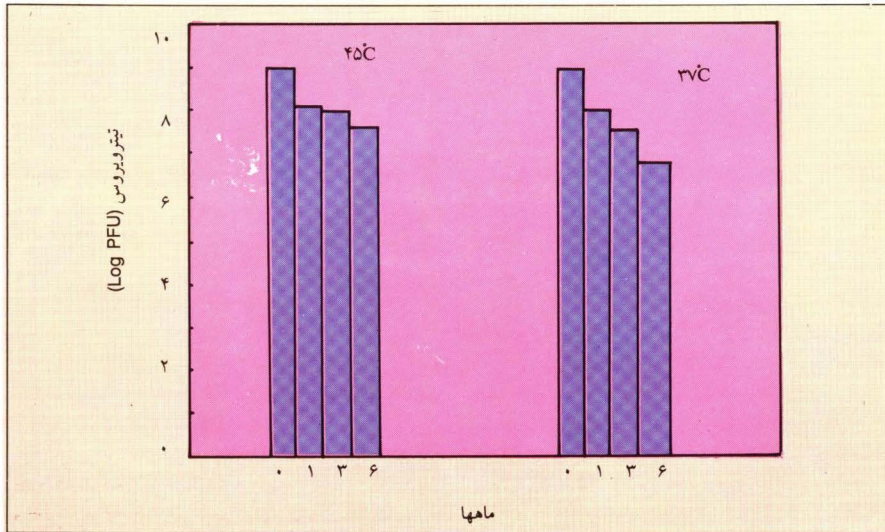
تابلوی ۳- خصوصیات سویه‌های ویروس آبله گاوی

ویروس	منشاء	واکنشهای جانبی در انسان		خاصیت بیماری‌زایی برای بافت عصبی در حیوانات آزمایشگاهی	
		آریتما	تب	رشد ویروس	میزان ابتلاء
سویه WR	سویه NYBH-Weyth	؟	؟	+++	+++
سویه Copenhagen	؟	+++	+++	+	-
Lester *	؟	+++	+++	+	+
LC16m0	کلون شده از Lester	+++	+++	±	±
LC16m8 **	کلون شده از LC16m0	++	±	±	±

* سویه واکسن که به‌طور وسیع در ریشه‌کنی جهانی آبله انسانی بکار رفته است.
** به عنوان واکسن تخفیف حدت یافته آبله صاحب جواز شده است.



شکل ۲- پادتن خنثی ویروس طاعون گاوی و ویروس واکسینا



● پیشرفت در علم بیوتکنولوژی
سبب پیدایش زمینه‌های جدیدی
در ساخت واکنش گردیده است.
انواع جدید واکنش شامل
واکنشهای ساخته شده از اجزاء
سلول یا ساب یونیت، واکنش
سنتتیک و واکنش ناقل می‌باشند.

شکل ۳- پایداری واکنش نو ترکیبی طاعون گاوی

تابلوی ۴- تأثیر واکنش نو ترکیبی طاعون (VRR)

PO5 ***	غلبه بر آلودگی				پاسخ آنتی بادی			ظاهر (invitro)	H زن داخل شده	مشوق	واکنش نو ترکیب
	ضایعه لمفونیدی	جداسازی ویروس	جلوگیری از ایمنی	علامت بالینی	آنتی H**	آنتی VN*	آنتی				
ND	ND	ND****	-/±	-/±	+	++/+	+++	بدون تغییر	ATI	VRR(ATI-H)	
۱۰۴/۵	ND	ND	-	-	++	++	++	بدون تغییر	P7.5 K	VRR (P7.5-H)	
≤۱۰۲/۰	-	-	-	-	+++	++	+++	تغییر یافته	P7.5 K	VRR(P7.5-MH)	

در اثر واکنش‌های سبوسون و نیز فقدان عفونت ناشی از تماس مورد تأیید قرار گرفت. به هر حال تمام دامهای واکنش از نظر بالینی سالم باقی ماندند که این امر نشان می‌دهد، حداقل دز ایمن کننده حدود ۱۰^۴ PFU و یا کمتر می‌باشد.

* VN= Virus neutralizing antibody

** Anti - H= antibody estimated by immunoprecipitation

*** PD50= 50% protective dose

**** ND= Not done

آنتی بادی خنثی کننده ویروس
آنتی بادی ضد H تخمین زده شده به وسیله رسوب ایمنی
۵۰٪ حفاظت کننده
انجام نشده

پاورقی‌ها

1. Biotechnology
2. Sub unit Vaccine
3. Synthetic Vaccine
4. Vector Vaccine
5. Adjuvant
6. Foot and Mouth Disease (FMD)
7. Capsid
8. Vaccinia
9. Monovalent
10. Polyvalent
11. Jenner
12. Thymidine Kinase (TK)
13. Hemagglutinin (H)
14. Recombinant Rinderpest Vaccine (RRV)
15. Neurovirulence
16. Promoters
17. Neutralizing Antibody
18. Histopathologic lesions
19. Plaque Forming Unit
20. Squirrel Monkeys
21. Hill Bull

تابلوی ۵- خاصیت بیماری‌زایی RRV برای بافت عصبی در حیوانات آزمایشگاهی

حیوانات	سویه ویروس	دوز ویروس	میزان ابتلاء	میزان تلفات	LD50 (logpfu)
موشهای BALB/C (۵-۶ هفته)	WR	۷		۵/۵	۴
		۶		۵/۵	
		۵		۵/۵	
		۴		۵/۵	
LC16mo	LC16mo	۷		۴/۵	۶/۶
		۶		۰/۵	
		۵		۰/۵	
		۴		۰/۵	
RRV	RRV	۷		۵/۵	۶/۲
		۶		۲/۵	
		۵		۰/۵	
		۴		۰/۵	
خرگوشهای NZW (۲ کیلوگرمی)	WR	۶	۲/۲	۲/۲	ND*
		۶	۰/۲	۰/۲	ND
		۶	۰/۲	۰/۲	ND
		۶	۰/۲	۰/۲	ND
میمونهای سنجایی	WR	۷	۲/۲**	۲/۲	ND
		۷	۰/۲	۰/۲	ND
		۷	۰/۲	۰/۲	ND
		۷	۰/۲	۰/۲	ND

ND* = تعیین نشده ** دو تا از میمونها علامت عصبی شامل فلجی و لرزش را نشان دادند.

منبع مورد استفاده

FAO regional office, Bangkok, Thailand, 1991, Recent advances on rinderpest vaccine, Asian livestock, P: 49-53