تأثير مادة الصوديوم دي اوكسي كوليت(SDC) على انتاج فايروس نيوكاسل والمحقون في قطع الغشاء اللقانقي المشيمي لأجنة الدجاج

*ايمان عبد الرحمن محمود** *عبد اللطيف محمد احمد*** *امنة نصيف جاسم**

استلام البحث 1، تموز، 2009
قبول النشر 27 ، ايار، 2010

الخلاصة:
يعد مرض نيوكاسل واحد من اهم الامراض المنتشرة عالميا والذي يهدد قطعان الدواجن بمختلف الاعمار مما يؤدي الى حدوث خسائر اقتصادية كبيرة . تضمنت الدراسة أختبار تأثير 4 تراكيز من مادة الصوديوم دي اوكسي كوليت (SDC) وهي (2%، 1، 0.5، 0.25) على فايروس نيوكاسل العترة اللقاحية لاسوتا (La Sota) وبأستخدام طريقة الحقن في قطع من الغشاء اللقانقي المشيمي (Fragments of chorioallantoic membrane) . لوحظ ازدياد معيار التلازن الدموي للفايروس المعامل بمادة ال(SDC) وللتراكيز الأربعة (0.25%، 0.5، 1، 2) وحسب التسلسل (2^{8}، $2^{9.6}$، $2^{11.6}$، $2^{14.6}$) مقارنة بالفايروس غير المعامل ($2^{6.6}$) وقد لوحظ عدم وجود فروق معنوية بين جميع التراكيز عدا التركيزين (1% ،2) اذ لوحظ وجود فرق معنوي بينهما عند مستوى الأحتمالية$p> 0.05$. من هذه الدراسة نجد ان لمادة ال (SDC) أهمية كبيرة في تعزيز تضاعف فايروس نيوكاسل من خلال ملاحظة ازدياد معيار التلازن الدموي (Haemagglutination) (HA) وهذا يجعل له أهمية كبيرة في زيادة انتاج اللقاحات ضد مرض نيوكاسل.

الكلمات المفتاحية: فايروس نيوكاسل،الغشاء اللقانقي المشيمي،أجنة الدجاج

المقدمة:

يُعرف مرض نيوكاسل على انه واحد من الامراض الفايروسية التي تصيب الطيور وخاصةً الداجنة منها ، ويُعد المسبب الاول لهذا المرض هو فايروس بارامكسو الطيور النمط المصلي الاول (Avian Paramyxovirus) (APMV-1) Serotype-1) [1].

يمتاز المرض بالتهابات تنفسية أو عصبية أو هضمية حسب نوع العترة الفايروسية . حيثُ يُقسّم فايروس نيوكاسل وحسب ضراوته إلى عُتر ضارية (Velogenic) ومتوسطة الضراوة (Mesogenic) وضعيفة الضراوة (Lentogenic) [2] . كما يعد هذا المرض من الأمراض المشتركة (Zoonotic Diseases) إذ إنهُ يصيب الإنسان سواء أكان ذلك بالشكل الضاري أم ضعيف الضراوة مسبباً التهاب ملتحمة العين (Conjuctivitis) أو أعراض تشبه مرض الأنفلونزا [3].

أجريت هذه الدراسة لمعرفة كفاءة مادة (SDC) في نمو فايروس نيوكاسل عند الحقن في قطع من الغشاء اللقانقي المشيمي بدلا من الحقن في اجنة بيض الدجاج بوصفها طريقة بسيطة وغير مكلفة [4].

المواد وطرائق العمل :

النماذج المرضية: تم استخدام العزلة الفايروسية المحلية وهي عزلة لاسوتا(La Sota) اللقاحية تركية المنشأ وذات معيار($10^{10.1}$) والتي تم الحصول عليها من شركة الكندي لأنتاج الأدوية واللقاحات البيطرية في ابي غريب .

المحاليل المستخدمة:

محاليل الصوديوم دي اوكسي كوليت (SDC):

أ- محلول (SDC) المائي بتركيز % 0.25

ب- محلول (SDC) المائي بتركيز % 0.5

ت- محلول (SDC) المائي بتركيز % 1

ج- محلول (SDC) المائي بتركيز 2 %

عالق الـ R.B.Cs:

تم سَحب (1) مل من دم الوريد العضدي في الدجاج ووضَع في انبوبة زجاجية تحتوي على مادة مانعة لتخثر الدم (EDTA) . ثم نُقل الدم الى انابيب اختبار لاجراءِ عملية غسل كريات الدم الحمر وذلكَ باضافة المحلول الفسلجي (N.S) إلى الدم ثم تَم تدويُره في جهازِ الطردِ المركزي وبسرعة (3000 دورة / دقيقة) ولمدة 5 دقائق . كررت هذه العملية (3) مرات للتخلص من الرائق .

* قسم علوم الحياة/كلية العلوم للبنات/ جامعة بغداد
** مركز التقانة الأحيائية/ جامعة النهرين

ثم اخذ (1) مل من كريات الدم المترسبة واضيف اليه (99) مل من المحلول الفسلجي للحصولِ على عالق (R.B.Cs) وبتركيز (1%) .

تحضير العزلة الفايروسية للحقن:

تم استخدام العزلة اللقاحية لاسوتا ذات المعيار ($10^{10.1}$) . حيث تم تخفيف هذه العزلة تخفيفاً عشرياً باستخدام المحلول الفسلجي واستخدم التخفيف (10^{-4}) للحقن . أما العزلة الفايروسية المعاملة مع مادة (SDC) فتمَ تحضيرها بأخذ (10) مايكروليتر من التخفيفِ (10^{-5}) وجرى تخفيفها بإضافة (50) مايكروليتر من مادة (N.S) ثم اضيف لها (40) مايكروليتر من مادة (SDC) وحسب التراكيز الأربعة المستخدمة وأيضاً استخدم التخفيف (10^{-4}) للحقن .

الوسط الزرعي Egg Bit Media (EBM):

ويتكون من:

كلوريد الصوديوم	80 غم.
كلوريد البوتاسيوم	6 غم.
كلوريد المغنيسيوم	1 غم.
كلوكوز	3 غم.
جيلاتين	20 غم. ذوّب اولاً

في (100) مل من الماء المقطر ووضع في حمام مائي بدرجة حرارة حتى ذاب واصبح بشكل محلول متجانس

10% كلوريد الكالسيوم	80 مل.
0.4 % صبغة الفينول الحمراء	0.25 مل.
كلورامفينيكول	1 غم.

وتذاب هذه المواد في لتر من الماء المقطر الخالي من الايونات De ionized Distel water ثم ضبط الاس الهيدروجيني لها الى pH=7.4 حتى اصبحَ ذو لون وردي ثم عقم باستخدام الـ Filter unite (0.22) مايكرون وحفظ بدرجةِ حرارةِ الغرفةِ او في درجةِ حرارةِ (-20) م°.

المضادات الحياتية المستخدمة Antibiotic:

ت	المضاد الحياتي	الوزن	الشركة المصنعة
1	ستربتومايسين	1غم (vial)	Microlabs limited
2	كلورامفنيكول	250 ملغم	Troge medical GMBH

حقن الفايروس في قطع من الغشاء اللقانقي المشيمي الملتصق بقشرة البيض Fragments of Chorioallantoic membrane:

1- أخذت بيضة تحوي جنين بعمر (10) ايام وقُسمّت الى نصفين لاخراج الجنين مع بقية محتويات البيضة مع الحفاظِ على الغشاء اللقانقي المشيمي ملتصقا على القشرة ومنع تلفهِ او تمزقهِ.
2- قطع كل نصف على شكل اشرطة بحيث وضعت هذه الاشرطة في وعاء معقم يحوي على الوسط الزرعي (EBM) . ثم قسمت هذه الاشرطة الى قطع صغيرة بلغت حوالي (0.5) سم^2 ثم وُزعّت هذه القطع على الحفر الموجودة في طبق الزرع النسيجي (24-wells).
3- حقنت العُزلة الفايروسية في قطع الغشاء اللقانقي المشيمي الموجودة في حُفر طبق الزرع النسيجي وبمقدار (0.2) مل وبواقع (3) حفر للفايروس غير المعامل و (3) حفر للفايروس المعامل بمادة (SDC) ولكل تركيز من التراكيز الاربعة المستخدمة وتركت لمدة (15) دقيقة.
4- حُقنت (1) حفرة بمحلول P.B.S كما حُقنت (4) حفراخرى بمادة (SDC) فقط وبواقع (1) حفرة لكل تركيز من التراكيز الاربعة وتركت كمجاميع سيطرة.
5- أضيف الى كل حفرة من حفر الطبق الوسط الزرعي (Egg Bit Media) وبمقدار (0.2) مل لكل حفرة.
6- تمَ تغطية الطبق بصورة جيدة ووضع الطبق في الحاضنة وبدرجة حرارة (37) م° ولمدة (48) ساعة.
7- تمَ اجراء اختبار التلازن الدموي للوسط الزرعي الحاوي على الفايروس النامي .

اختبار التلازن الدموي Haemagglutination) (Test:

تم اتباع طريقة [5] وكما يأتي:

1- أضيف مقدار (25) مايكروليتر من المحلول الفسلجي المتعادل (N.S) الى كل حفرة من حفر طبق المعايرة الدقيقة (Microtitration plate).
2- أضيف مقدار (25) مايكروليتر من مستضد الفايروس الى الحفرةِ الاولى و تم مزجها بصورة جيدة ثم عملت منها تخافيف ثنائية بنقل (25) مايكروليتر من الحفرةِ الاولى الى الثانية وصولاً الى آخر حفرة اذ تم التخلص من الـ (25) مايكروليتر الاخيرة.
3- أضيف مقدار (25) مايكروليتر من عالق الـ (R.B.Cs) (1%) الى كل حفرة ثم حُرّك الطبق بصورة دائرية لمزج مستضد الفايروس مع الدم.
4- تم عمل حفرة سيطرة تحوي الاولى على المحلول الفسلجي مع الـ (R.B.Cs) فقط.

تُرّك الطبق في الحاضنةِ وبدرجة حرارة (37) م° ولمدة (15) دقيقة ثم قُرأت النتائج بحسابِ معيار التلازن الدموي عند اخر حفرة والتي تمثل اعلى تخفيف حدث به التلازن الدموي.

التحليل الاحصائي:

اخضعت نتائج الدراسة الى التحليل الاحصائي لغرض معرفة الفروق المعنوية بين معدلات تراكيز المعاملات المستخدمة ومقارنتها بالسيطرة ، وعدت الفروق مهمة احصائياً وعالية على مستوى (5%) لاحتمال الخطأ، باستعمال برنامج (SPSS 10.0) الاحصائي من شركة Microsoft.

النتائج:

نتائج حقن الفايروس في قطع الغشاء اللقانقي المشيمي: بعد معاملة الفايروس بمادة الـ (SDC) ولمدة (1.5-2) دقيقة تم حقنه في قطع صغيرة من الغشاء اللقانقي المشيمي والموضوعة في طبق الزرع النسيجي (24-Wells). وبعدَ حضن البيض لمدة (48) ساعة وبدرجة حرارة (37) مْ تم حساب عيارية الفايروس بطريقة التلازن الدموي وكانت النتائج كالاتي:

اولاً: عند حساب عيارية الفايروس غير المعامل بمادة (SDC) كانت النتيجة تتراوح بين معيارية (2^{7}-2^{6}) وبمعدل ($2^{6.66}$) أي (97.00) وحدة تلازنية .

ثانياً: عيارية الفايروس المعامل بمادة (SDC 0.25 %) كانت النتيجة تتراوح بين معيارية (2^{9}-2^{8}-2^{7}) وبمعدل (2^{8}) أي (256) وحدة تلازنية .

ثالثاً: عيارية الفايروس المعامل بمادة (SDC 0.5 %) كانت النتيجة تتراوح بين معيارية (2^{11}-2^{10}-2^{8}) وبمعدل ($2^{9.66}$) أي (776.04) وحدة تلازنية .

رابعاً: عيارية الفايروس المعامل بمادة (SDC 1 %) كانت النتيجة تتراوح بين معيارية (2^{13}-2^{12}-2^{10}) وبمعدل ($2^{11.66}$) أي (3104.19) وحدة تلازنية .

خامساً: عيارية الفايروس المعامل بمادة (SDC 2 %) كانت النتيجة تتراوح بين معيارية (2^{17}-2^{15}-2^{12}) وبمعدل ($2^{14.66}$) أي (24833.5) وحدة تلازنية وقد تم توضيح النتائج في الجدول (1) .

جدول (1) قيم الـ (HA) لفايروس نيوكاسل المعامل بمادة الـ (SDC) والمحقون في قطع الغشاء اللقانقي المشيمي

N0.	Treatment	HA titer
1	Virus alone	$2^{6.66}$
2	Virus + SDC (0.25 %)	2^{8}
3	Virus + SDC (0.5 %)	$2^{9.66}$
4	Virus + SDC (1 %)	$2^{11.66}$
5	Virus + SDC (2 %)	$2^{14.66}$
6	P.B.S	0
7	SDC (0.25 %)	0
8	SDC (0.5 %)	0
9	SDC (1 %)	0
10	SDC (2 %)	0

وعند اجراء التحليل الاحصائي لقيم (HA) للفايروس المعامل بمادة الـ (SDC) وعند مستوى الاحتمالية ($P < 0.05$) لوحظ عدم وجود فروق معنوية بين الفايروس غير المعامل والفايروس المعامل بمادة (SDC 0.25 %) . كما لوحظ عدم وجود فروق معنوية بين الفايروس المعامل بمادة (SDC 0.25 %) والفايروس المعامل بمادة (SDC 0.5%) . أيضاً لم تلاحظ أي فروق معنوية بين الفايروس المعامل بمادة (SDC 0.5%) والفايروس المعامل بمادة (SDC 1 %) . لكن لوحظ وجود فروق معنوية بين الفايروس المعامل بمادة (SDC 1 %) والفايروس المعامل بمادة (SDC 2 %) . وكما موضح في الجدول (2) .

جدول (2) مقارنة بين قيم التلازن الدموي بين فايروس نيوكاسل غير المعامل والفايروس المعامل بمادة الـ (SDC) وللتراكيز الاربعة المستخدمة (المعدل ± الخطأ القياسي).

N0.	Treatment	Mean	Standard Erorr
1	Virus alone	a $2^{6.66}$	$\pm 2^{0.33}$
2	Virus + SDC (0.25 %)	a 2^{8}	$\pm 2^{0.57}$
3	Virus + SDC (0.5 %)	a $2^{9.66}$	$\pm 2^{0.88}$
4	Virus + SDC (1 %)	a $2^{11.66}$	$\pm 2^{0.88}$
5	Virus + SDC (2 %)	b $2^{14.66}$	$\pm 2^{1.45}$

ملاحظة : الحروف المختلفة تشير الى وجود فروق معنوية. اما الحروف المتشابهة فتشير الى عدم وجود فروق معنوية وعند مستوى الاحتمالية ($P < 0.05$).

المناقشة:

ان معظم ال (Orthomyxoviruses) و (Paramyxoviruses) تتضاعف في الغشاء اللقانقي لاجنةِ بيض الدجاج . فعندما يدخل الفايروس الى السائل الذي يملأ الـ Allantois عندئذ سوف تصاب الخلايا التي تبطن تجويف الالنتوي عندئذٍ يبدأ تضاعف الفايروس داخل الخلايا وبعد اكتمال التضاعف يُطرح الفايروس الى السائلِ وبالتالي يتم الكشف عن الفايروس باستخدام اختبار الـ (HA) بسبب احتواء الفايروس على بروتين الـ Haemagglutinin. وقد أُستغلت هذه الخاصية في تطوير طريقة Egg Bit Technique وذلكَ بمضاعفة الفايروس في قطعٍ صغيرةٍ من غشاء اللقانقي المشيمي والذي مازالَ ملتصقاً بقشرة البيض ومن ثم غمرها في وسط زرعي مغذي وهو Egg Bit media وايضاً يتم

الكشف عن نمو الفايروس باجراء اختبارالـتلازن الدموي للوسط الزرعي المحيط بقشرة البيض المحقونة بالفايروس [6] .

وفي هذهِ الدراسةِ عندما تم حقن الفايروس المعامل بمادة (SDC) وجد ازدياد معيار HAبازدياد التراكيز المستخدمة . وهذه الزيادة في معيار التلازن الدموي قد تُعزى الى انَّ جزيئة فايروس نيوكاسل تمتلك فعالية تصنيع الحامض النووي RNA اي ان انزيم الاستنساخ (Transcriptase) يمكن ان يتم تنشيطه او تحفيزه عند ازالة غلاف الفايروس باستخدامِ المنظفاتِ [7].

قد يكونُ هناكَ سببٌ او تفسيرٌ آخر لهذهِ الزيادة وهو ان مادة الـ SDC وبوصفها مادة منظفة فهي تعمل على تحليلِ واذابةِ الاغشيةِ الخلويةِ كما ان لها القدرة على اذابة الغلاف الخارجي للفايروس والذي يحتوي على نسبة عالية من الدهون اذ انه يتألف من بروتين شحمي مكون من طبقة واحدة من البروتين وطبقتين من الدهون التي ياخذها الفايروس خلال عملية التبرعم من الاغشية البلازمية لخلية المضيف [7]. لذا فقد يكوُن لهذه المادة دور مهم في تسريع او تسهيل عملية تضاعف الفايروس من خلال تاثيرها على عملية نزع الغلاف(uncoating) والتي تحدث مع او بعد مدة قصيرة من عملية الاختراق(penetration) [8]. وهذه النتائج التي تم الحصول عليها تؤكد امكانية استخدام هذه الطريقة كبديلٍ للحقنِ في اجنةِ بيضِ الدجاج في بعض وليس كل الحالات وبالتالي أكثر اقتصادية بأستعمال البيض الحاوي على الأجنة .

المصادر:

1- Alexander, D. J.; Bell, J. G. and Alders, R. G. 2004. A Technology Review: Newcastle disease-with emphasis on it’s effect on village chickens. FAO animal production and health paper.pp161.ISBN 92-5-105080-5.

2- Oberdorfer, A. R.; Veits, O. W. J.; Mebatsion, T. and Mettenleiter, T. C. 2003. Contribution of the length of the HN Protein and the Sequence of the F Protein Cleavage site to Newcastle disease virus pothogenecity. J. Gen. Virol. (84): 3121-3129

3-علاوي،عائدة برع. 2004 .دراسة مقارنة للكشف عن الاضداد النوعية لفايروس نيوكاسل في الدجاج والعاملين في حقول الدواجن. رسالة ماجستير، كلية الطب البيطري - جامعة بغداد.

4- Sama, HA. And Bankowski, RA. 1977. Application of the egg-bit technique in poultry-disease search. J. Avian Dis. 21(4): 623-629

5- Lancaster, J. E. 1966. Newcastle disease – a review 1926-1964. Monograph No. 3. Canadian Department of Agriculture, Ottawa.

6- Beard, C. W. 1968. The egg-bit technique for measuring Newcastle disease virus and it's neutralizing antibodies. J. Avian Dis. 13(2): 309-320.

7- Alexander, D. J. 1988. Development in veterinary virology. Newcastle disease virus. Bosten, Kluwer academic Publisher. P. 45.

8- Jawetz, E.; Melnick, J. L. and Adelberg, E. A. 2002.Medical microbiology. 19th ed.. Prentice-Hall International Inc. P. 374, 380.

The effect of Sodium deoxycholate on the production of Newcastle virus inoculated in chorioallantoic membrane

*Eman A. Mahmood** *Abdul-Latif M .Ahmad***

*Amna N. Jassim**

*Department of Biology,College of Education for Women,Baghdad university
**Bioytechnology Research Center, Nahrain university

Abstract:

Newcastle Disease is one of the most important disease world wide distributions which invade the flock in different age resulting in large economic losses. This study aimed to evaluate the effect of treatment with 4 different concentrations (0.25, 0.5, 1.0 and 2.0 %) of Sodium deoxycholate (SDC) on the vaccinal virus (La Sota) using inoculation in the fragments of Chorioallantoic membrane. The treatment with each of the above 4 concentrations of SDC resulted in an increase in the Hemagglutination titer (HA) of the virus (2^8, $2^{9.6}$, $2^{11.6}$, $2^{14.6}$) respectively as compared to the HA titer value for the untreated virus ($2^{6.6}$). No significant differences were noticed among all concentrations with regard to their effect on the HA titer, except the concentrations of 1.0 and 2.0 % where significant differences were recorded ($P > 0.05$).

The results of this study suggest that SDC has an important activity in enhancement of the replication of NDV through increasing the Hemagglutination titer, which has a great importance in vaccine production.