التأثير المزدوج لعقار الليفاميزول مع لقاح النيوكاسل الحي المضعف عترة لاسوتا على الاستجابة المناعية في أجنة فروج اللحم.

فراس حسين كاظم

كلية الطب البيطري–جامعة بابل

الخلاصة

شملت الدراسة أستخدم90 بيضة مجننة بعمر 18 يوما قسمت إلى ثلاثة مجاميع متساوية بواقع 30 بيضة لكل مجموعة . حقنت المجموعة الأولى بلقاح نيوكاسل الحي المضعف عتره لاسوتا بجرعة مقدارها 0.1 مل/بيضة الحاوي على 4×10^8 من االمستضد وكذلك عقار اليفاميزول بجرعة مقدارها 0.1 مل / بيضة الحاوي على 1.25 ملغم من المادة الفعالة بطريقة تلقيح الأجنة بعمر 18 يوما , أما المجموعة الثانية فحقنت بلقاح النيوكاسل الحي المضعف عتره لاسوتا بجرعة مقدارها 0.1 مل / بيضة الحاوي4×10^8 من المستضد بطريقة تلقيح الأجنة بعمر 18 يوما , وبالنسبة للمجموعة الثالثة فحقنت 0.1 مل من المحلول الملحي الوظيفي بنفس الطريقة المذكورة سابقا واعتبرت مجموعة سيطرة , أظهرت النتائج بان عقار الليفاميزول له تأثير جيد على نسبة الفقس وحيوية الأفراخ .

أجري اختبارتثبيط التلازن الدموي HI بالاعمار (28,14,1) يوما ووجد فرق معنوي بمقدار $P\leq0.05$ بين المجموعة الأولى وبقية المجاميع وهذا يدل على أن لعقار الليفاميزول تأثير في زيادة نسبة الأضداد مما يؤدي إلى زيادة الاستجابة المناعية ضد مرض النيوكاسل لفروج اللحم .

Abstract:

This Study include using 90 Fertile egg at 18 days of age before hatching were divided into three equal group 30 embryonated egg for each , the first group injected with live attenuated Newcastle vaccine(Lasota strain) in dose 0.1 mL/egg contain 4×10^8 Antigen and Levamisole that dose 0.1 mL/egg contain 1.25mg active ingredient in chick embryo at 18 days. The second group injected live attenuated Newcastle vaccine (lasota strain) in dose 0.1mL/egg contain 4×10^8 Antigen , in chick embryo at 18 days , Third group (control) injected with normal saline in dose 0.1 mL/egg at the same age and method of in first & second group . Result showed that good effect of levamisol in Hatchability and livability ratio , Heamagglutination inhibition test (HI) are used to evaluate the level of Immunity in chicks vaccinated with (NDV) and chicks control group at (1,14,28) days . the results show significant differences $P<0.05$ between the first group and another group this result showed the levamisol effected to increase antibody levels that lead to increase the immune Response against the Newcastle disease in Broiler chicks.

المقدمة :- Introduction

يعد الليفامزول أحد منظمات الاستجابة المناعية للجهاز المناعي (Hyde,1992) . فهو مركب صناعي مضاد للديدان الاسطوانية (Nematodes) ويكون على شكل مسحوق ابيض بلوري يذوب بسهولة في الماء, ويبلغ وزنه الجزيئي (240.75) دالتون , ثابت في الوسط ألحامضي ويتحلل في الوسط القاعدي كما يذوب في الايثانول (96%) والميثانول والكلورفورم ولا يذوب بالا يثر (Martindale,1996) ومن خصائص الليفامزول المناعية أنه يشجع الاستجابة المناعية وذلك باستعادة وظيفة البلعمة والخلايا اللمفاوية التائية (T-Lymphocytes) ويظهر هذا الفعل واضحا في المضائف التي تعاني من نقص مناعي (Panigraphy et.al,1979) . ومن المعروف في الدواجن أن هناك عدة عوامل وظروف تؤدي إلى تعطيل الجهاز المناعي لذلك أجريت هذه الدراسة ولأول مرة لمعرفة تأثير عقار الليفامزول على الاستجابة المناعية في اجنة وأفراخ فروج اللحم ضد مرض نيوكاسل . كما اشار الباحثون(Yungui et.al, 2005) الى ان الليفامزول يحفز الخلايا التائية اللمفية والاستجابة للمستضد وزيادة فعالية الخلايا البلعمية والعدلات وكذلك انتاج الانترفيرون (Interferon) والليمفوكاين (Lymphokine) وقد لاحظ النعيمي (1997) ان جرعة 10 ملغم/كغم من وزن الجسم تعد أكثر الجرع فعالية في التقوية المناعية ووزن الجسم ووزن جراب فابيريشيا ومستوى البروتين الكلي بالدم المعطاة الى فروج اللحم عن طريق الحقن بالعضلة .

المواد وطرائق العمل:-

أولا:- المواد المستخدمة

* اختيرت 90 بيضة تفقيس مخصبة بعد فحصها بجهاز فحص البيض (Candle) من مفقس اسعد للدواجن / محافظة بابل من أمات لحم سلالة روز (rose breed) , وتم حضن البيض داخل المفقس باستخدام حاضنة نوع بيترسايم (peter sime) بلجيكي المنشأ .
* الليفاميزول المنتج من قبل شركة يوفتكو الاردنية وكان بهيئة مسحوق بلوري ابيض والمعبأ في مغلف 50 غم كل غرام يحتوي على 118 ملغم من المادة الفعالة .
* لقاح النيوكاسل الحي المضعف عتره لاسوتا من إنتاج شركة سيفا- هنكاريا .
*كريات الدم الحمر المغسولة وبتركيز 1% و 10% .
*عدة اختبار التلازن الدموي((haemagglutination test (HA))
*عدة اختباراثباط التلازن الدموي ((haemagglutination inhibition test (HI)) .
*محلول الملح الوظيفي (normal saline)

ثانيا:- طرائق العمل

1- حضن البيض

تم حضن البيض المخصب بدرجة حرارة 37 م^{o} ومن ثم تقسيمه إلى ثلاثة مجاميع متساوية بواقع 30 بيضة لكل مجموعة حيث اعتبرت كل مجموعة معاملة تجريبية وكما يلي :-

*المجموعة الأولى:- حقنت بـ 0.1 مل من عقار الليفاميزول الحاوي على 1.25 ملغم لكل بيضة ولقاح نيوكاسل الحي المضعف عتره لاسوتا بمقدار 0.1 مل الحاوي على 4×10^{8} من المستضد لكل بيضة بعمر 18 يوما من الحضن .
*المجموعة الثانية :- حقنت بلقاح النيوكاسل الحي المضعف عتره لاسوتا بنفس المقدار والجرعة وعمر الأجنة للمجموعة الأولى .
*المجموعة الثالثة:- حقنت بـ 0.1 مل من المحلول الملحي الوظيفي بنفس الطريقة المذكورة سابقا واعتبرت مجموعة سيطرة .

2- طريقة الحقن :-

تم حقن البيض المجنن بعمر 18 يوما من مدة الحضن لجميع المجاميع في غرفة معقمة مسبقا وبعد التأكد من حيوية الأجنة باستخدام جهاز فحص الأجنة وتحديد مركز الفتحة الهوائية الذي يمثل مكان الحقن حسب طريقة Ahmed & Sharma (1992) وبعد ذلك تم تعقيم المنطقة الهوائية بمحلول اليود المطهر وباستخدام الثاقبة تم حقن عقار الليفاميزول بمقدار 0.1 مل وبعد ذلك مباشرة ثم حقن اللقاح الحي المضعف عترة لاسوتا بمقدار 0.1 مل لكل بيضة في المجموعة الأولى ,أما المجموعة الثانية فقد حقنت بلقاح النيوكاسل الحي المضعف عترة لاسوتا بمقدار 0.1 مل لكل بيضة فقط , فيما حقنت المجموعة الثالثة (السيطرة) بالمحلول الملحي المستضد بمقدار 0.1 مل لكل بيضة وباستخدام محاقن طبية نبيذة سعة 1 مل وبأبرة طولها 2.5 سم وبقطر 22G (stone,*et.al* .1997) حيث تم إدخال الأبرة بأكملها لضمان وصول العقار واللقاح إلى كيس

الامنيون(السلى) وبعد ذلك تم تغطية الثقوب بالشمع وارجاع البيض المحقون إلى الحاضنة وترك فيها لحين الفقس .

3-جمع عينات الدم والمصل

سحبت عينات الدم من الأفراخ عشوائيا ولكل المعاملات بواقع 5 عينات لكل مجموعة وبطريقتين هما الوريد الوداجي بعمر 14,7 يوما والوريد الجناحي بعمر 21 يوما وجمعت عينات الدم بأنابيب زجاجية سعة 10مل بمقدار 2-4 كل عينة

ثم وضعت في جهاز الطرد المركزي 3000 دورة / دقيقة لفصل المصل الذي جمع في أنابيب زجاجية معلمة حسب المعاملات , وتم إجراء اختبار اثباط التلازن الدموي عليها مباشرة .

4-اختبار تثبيط التلازن الدموي(HI)Heamagglutination Inhibition test

اجري اختيار تثبيط التلازن الدموي في أمصال الدم طيلة فترة الدراسة وحسب طريقة بيتا (Calnk ,1999) واستخدمت اطباق المعايرة (Perspex Plate) لمعرفة مستوى الأضداد في الأفراخ الملقحة طول فترة الدراسة .

ثالثا : الحسابات والتحليلات الإحصائية

1-حساب نسبة الفقس :Hatechability Percentage

تم حساب نسبة الفقس في المجاميع الثلاثة حسب المعادلة التي ذكرها Sharma & Burmester (1982) وكما يلي :-

$$\text{نسبة الفقس} = \frac{\text{عدد الأفراخ الفاقسة}}{\text{عدد البيض المخصب}} \times 100$$

2-حساب حيوية الأفراخ Livability

تم حساب حيوية الأفراخ الفاقسة من عمر يوم واحد وحتى عمر 7ايام بعد الفقس ولجميع المجاميع وبالطريقة المعتمدة من قبل Ahmed & Sharma (1992)

3-التحليلات الإحصائية:-

تم تحليل البيانات بموجب تصميم مربع كاي(qi-squire) واستخدام طريقة (L.S.D) لاختبار الفروقات المعنوية بين المتوسطات . ألمحمد وجماعته (1986)

النتائج والمناقشة

1-نسبة الفقس

يوضح جدول (1) نسبة الفقس في البيض المجنن للمعاملات التجريبية وقد أظهر التحليل الإحصائي عدم وجود فرق معنوي بين المعاملات التجريبية وهذا يدل على أن عقار الليفامزول ليس لة تأثير أو ردة فعل عكسية على أنسجة جنين الدجاج وهذا يتفق مع ما أشار الية Pioter وجماعته عام(2003) عدم حدوث هلاكات للأجنة الفاقسة المعطاة عقار الليفامزول بجرعة 2.5 ملغم لكل بيضة بعمر 18 يوم من الحضن . وأن الهلاك الذي حصل في المعاملات التجريبية يعزى أما إلى لطريقة الحقن أو الظروف البيئية داخل المفقس .

جدول (1) يبين تأثير حقن البيض المجنن بعمر 18 يوم على نسبة الفقس

المعاملات	نوع العقار واللقاح	الجرعة لكل بيضة	عدد الاجنة الفاقسة	نسبة الفقس %

م1	لقاح ND حي مضعف (لاسوتا) +عقار الليفاميزول	0.2 مل	30 / 28	93
م2	لقاح ND حي مضعف (لاسوتا)	0.1 مل	30/ 27	90
م3	المحلول الملحي الوظيفي	0.1 مل	30 / 27	90

2-حيوية الأفراخ

يوضح جدول (2) حيوية الأفراخ للمعاملات التجريبية الثلاثة خلال الأسبوع الأول بعد الفقس , حيث أظهرت نتائج تقويم حيوية الأفراخ بعد الفقس عدم وجود فرق معنوي بين المجموعة الأولى المعطاة لقاح النيوكاسل الحي المضعف وعقار الليفاميزول ومجموعة السيطرة ويرجع ذلك إلى دور عقار الليفامزول في تنشيط المناعة المتوسطة بالخلايا (Cell Mediated Immunity) والمناعة الخلطية (Humoral Immunity) (Zaitisera & Vosilleva, 1994) كذلك أشار الباحثان (Cho. & Musa) عام (1989) الى مدى تاثير الليفاميزول على الاستجابة المناعية للقاح نيوكاسل في الطيور المعطاة عقار الليفامزول بجرعة 20 ملغم / كغم عن طريق الحقن بالعضلة أما المجموعة الثانية فقد سجلت فيها حالة هلاكات واحدة وقد يرجع ذلك إلى التهاب السرة أو لردة الفعل العكسية للقاح الحي المضعف على صحة الافراخ بعد الفقس (Oldoni ,et.al,2005) .

جدول (2) حيوية الأفراخ في المجاميع التجريبية خلال الأسبوع الأول بعد الفقس

المعاملات	عدد الأفراخ الكلي / عدد الأفراخ الهالكة	النسبة المئوية %
م1	0 / 28	100
م2	1 / 27	96
م3	0 / 27	100

3-نتائج اختبار تثبيط التلازن الدموي HI

يوضح جدول (3) معدل معيار الاضداد لاختبار التلازن الدموي بالاعمار المختلفة , حيث أظهرت نتائج تقيم الاستجابة المناعية بواسطة الاختبار الذي أجري على الأفراخ بالأعمار (28,14,1) يوما فرق معنوي بمقدار ($P\leq0.01$) لمعدل معيار الأضداد في أفراخ المعاملة الأولى بالمقارنة مع المعاملات الأخرى وقد يرجع ذلك الى ان التلقيح بالاجنة بعمر 18 يوما من الحضن أعطى مناعة مبكرة (Ahmed & Sharma ,1992), كذلك دور عقار الليفاميزول في زيادة الاستجابة المناعية وهذا يتفق مع ما جاء به Soppi وجماعته عام 1979 حيث لاحظ زيادة بمعدل الأضداد صنفي IgM و IgG في الأفراخ المعاملة بعقار الليفامزول بالأعمار (9,5) أيام . كما أشار Rahman وجماعته 1989 إلى دور الليفامزول في تقوية الاستجابة المناعية ضد الإصابة بداء الاكريات نوع (Eimeria Tenella) كذلك لاحظ ألنعيمي (1997) عند إعطاء الليفاميزول بجرعة 20 ملغم/كغم من وزن الجسم الى ارتفاع ملحوظ في معدل معيار الأضداد المثبطة للتلازن الدموي في الأفراخ المثبطة مناعيا بواسطة الفايروس المسبب لمرض الكمبورو عند إعطائها الليفامزول مقارنة مع المجموعة الغير معاملة (Singh and Dhawedhar ,1993) بنفس العقار. وهذا يدل

على إن عقار الليفامزول ذو تأثير ايجابي في زيادة المناعة الخلطية والمناعة الخلوية من خلال زيادة فعالية تمايز الخلايا التائية (T-cell differentiation) والاستجابة للمستضد وزيادة فعالية الخلايا البلعمية والعدلات وكذلك زيادة انتاج الانترفيرون (Interferon) وإنتاج اللمفوكاين(Lymphokins) وزيادة تمايز الخلايا البائية (B-cell differentiation) إلى خلايا بلازمية منتجة للأضداد (Porchezhian and Punniamurthy ,2006) .

أما المعاملة الثالثة فقد لوحظ انحدار تدريجي بمعدل عيار الأضداد ليصل إلى أدنى مستوى له بعمر 28 يوما وقد ذكر Alexander (2003) . بان الأضداد المتكونة بعمر يوم واحد تنخفض بتقدم العمر وتصل الى أدنى مستوى له بعمر 14 – 21 يوما اعتمادا على كمية الأضداد الأمية.

جدول (3) معدل معيار الأضداد لاختبار تثبيط التلازن الدموي (HI) بالأعمار المختلفة

يوم 28 بعمر HI	يوم 14 بعمر HI	بعمر يوم واحد HI	المعاملات
A ± 72.50 20.07	A ± 80 16	A ± 96 18.47	م1
B ± 31.5 12.26	B ± 36 10.06	B ± 60 24.62	م2
B ± 12 2.30	B ± 28 4	B± 44 12	م3

الحروف المتشابه تعني عدم وجود فرق معنوي

الحروف المختلفة تعني وجود فرق معنوي

الاستنتاجات والتوصيات

1- إن لعقار الليفاميزول دور فعال في زيادة سرعة الاستجابة المناعية الخلطية من خلال زيادة معدل الأضداد المثبطة للتلازن الدموي .
2- إن لعقار الليفاميزول ليس له دور سلبي على نسبة الفقس وحيوية الأفراخ بجرعة 20 ملغم /كلغم.
3- نوصي باجراء دراسة على العقار وذلك باعطاءه بجرع وطرق مختلفة الى فروج اللحم .

المصادر References

المصادر العربية

ألنعيمي ,حاتم مجيد (1997) .تاثير الليفاميزول في الاستجابة المناعية الخلطية للقاح نيوكاسل في الدجاج .اطروحة ماجستير .كلية الطب البيطري – جامعة بغداد .

ألمحمد، نعيم ثاني ،خاشع الراوي،مؤيد يونس و وليد ألمراني .(1986). مبادئ الاحصاء. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي.جامعة الموصل.

المصادر الأجنبية

Porch Zhian.T.and Punniamurthy .N.(2006). Effect of Oral Levamisol Hydro chloride on Humoral Immune Response and Serum Protein of Broilers.Jornal of animal and Veterinary Advances .5(10) .873 – 874.

Soppi.E.LASSILA,o.VILJanen ,M.K. Lehtonen ,O.P.(1979) In Vivo effect of Levamisol on cellular and Humoral Immumity in Normal Chickens. Clin. exp. Immunol .38,609 – 614.

Singh,K-C.and Dhawed har ,R.G.(1993) Immuno Modulating effect of Levamisole in chiks Immuno Compromisd by Mfectious Bursal Disease Virus.Trop. anima. Health . Prod .Vol (25) .11 – 14 Jomrnal .

Pioter ,S.Ewa , k. Wojciech ,B.Wanda , B.and Grazyna ,K.(2003). Evaluation of chosen Immuno Wodualters Toxicity for chicken Eymryos in one day old chicks .Bull.Vet .Inst.Pvlawy.47,411 – 417 .

Stone, H.; Mitchell, B. and Brugh , M. (1997) . In ovo vaccination of chicken embryo with experimental Newcastle disease and Avian influenza oil-emulsion vaccines, Avian Dis. , 14 : 856-863.

Sharma , J.M. and Burmester, B.R. (1982). Resistance to Marek's disease at hatching in chickens vaccinated as embryos with the turkey herpes virus. Avian Dis. 26: 134-149 .

Oldoni , I. ; Brown , C.C. ; King , D.J. ; Samal , S. and B.S. (2005) . The use of in situ hybridazation and Immuno histochemistry to study the pathogenesis of various Newcastle disease virus strains and Recombinants in embryonated chicken eggs . Microbe pathog . National Library of medicine .

Alexander , D.J. (2003) . Newcastle disease and other paramyoxvirus . Pneumovirus. In: Disease of poultry, 11th Ed., Eds. by Calnek , B.W.; Saif, Y.M.; Mcdougald, L.R. and Swayne , D.E. Iowa stat press , PP. 64-81 .

Ahmed , J. and Sharma , J.M. (1992) . Evaluation of modified live virus vaccine administered in ovo to protect chickens against Newcastle disease , Am. J. vet Res. 53 : 1999-2004 .

Rahman ,S.A.Adel ,F.and Jagannath .M.S.(1989) Role of Levamisole in the Induction of cell Mediated Immunity in experimental cecal coccidiosis of chickens . Ind,Vet.J,66(8) : 706 – 710 .

Cho ,Y.and Musa ,K..(1989) .Immunomodulatory effect of Levamisol in Normal and Immuno Suppressed Broiler chicks .Poult .sci.63.79.

Zaitsera ,L.G. and Vosilleva ,E,J.(1994) .the meehanism of combired action of immuno modulater on the phayocytic cells .Zh .Microbiol.Epidemiol .,4: 737.

Panigraphy, B.; Grumbles ,L.C.; Millaris,D; Nagi, S.A. and Hall ,C.G.(1979). Antibiotic induce Immuno Supperssion and levamisol Induce Immuno Potentiation in Turkeys.Avian .Dis .,23 ;401 -408 .

Martindale ,J.E.(1996) .the Exrapharmacopoeia .1st .ED. the Royal Pharmaceutical Society of great Britain .London .P 116.

Yungui Guo ; Dianhui zhao; Prifeng Qian and Haifang wang. (2005).Effect Levamsole on Immune Response and disease Resistance of clarias fuscus.Gllage of Animal science ,South china Agricultural university .

Hyde ,R.M.(1992) .the national Medical Series for Independent Study, Zend. Ed. Harwal publicshing co. Malvera Pennsylvania.