

تحضير اللقاح الحي والمقتول لمرض نيوكاسل (عترة ابو غريب 68) وتقييمه مناعياً

تحسين عبود صويحي السعيد
كلية الزراعة/ جامعة القادسية

عبد الامير حسين زاهد
كلية الطب البيطري/ جامعة بغداد

email: tahseenabood477@yahoo.com

الخلاصة

تضمنت هذه الدراسة تنمية فايروس نيوكاسل عترة AG68 بواسطة حقن بيض الدجاج المجنن بعمر (9-10) ايام ، ومن خلال خمسة تمريرات حصلنا على عدة معاير فايروسية ، أخذ منها المعايير الثلاثة القريبة من الجرعة المقررة ($EID_{50}/ml\ 10^{9.1}$, $EID_{50}/ml\ 10^{9.5}$, $EID_{50}/ml\ 10^{9.9}$) وحضر منها اللقاح المقتول للجرع الثلاثة ، كما تم الحصول على الجرعة المختلفة للقاح الحي المضعف بواسطة تخفيف المعايرة ($EID_{50}/ml\ 10^{9.5}$). اشتملت الدراسة استخدام (210) أفراخ قسمت إلى (7) مجاميع كل مجموعة (30) فرخاً لقحت المجاميع الثلاث الأوائل بالجرع المختلفة للقاح المقتول عترة أبي غريب 68 بطريقة الحقن في المنطقة خلف الرقبة بعمر يوم واحد والمجاميع الثلاثة الأخرى لقحت باللقاح الحي المضعف بالجرع المختلفة بعنصره أبي غريب 68 بطريقة التقطير بالعين بعمر يوم واحد والمجموعة السابعة تركت بدون تلقيح ، وأعيد تلقيح المجاميع الست الملقحة بطريقة الرش باللقاح الحي المضعف عترة أبو غريب 68 بعمر 12 يوم . لتقييم الاستجابة المناعية استخدمت تقنية الاليزا عند عمر (1,14,28) يوم وباختبار التحدي في يوم 28 ، جميع المجاميع أظهرت فروق معنوية بمستوى $P < 0.05$ بين عمرين (14 و 28) يوم في اختبار الاليزا ، أما الفروق بين المجاميع فقد ارتفع معدل معيار الأضداد بعمر 14 يوم في المجاميع الملقحة باللقاح الحي المضعف بطريقة التقطير بالعين بعمر يوم واحد وأما في عمر 28 يوم فقد تفوقت المجاميع الملقحة باللقاح المقتول وبشكل معنوي على المجاميع الملقحة باللقاح الحي المضعف لنفس العترة (أبي غريب 68) وتفوقت جميع المجاميع على مجموعة السيطرة . جميع المجاميع الملقحة أظهرت نسبة حماية 100% في اختبار التحدي مما يؤكد الكفاءة التمنيعية لتلك العترة وللوعين المحضرين (اللقاح الحي والمقتول) وبالطرائق المستخدمة (التقطير بالعين والرش والحقن تحت الجلد) ، فيما كانت نسبة الحماية 20% في المجموعة السابعة غير الملقحة ، حيث تميزت الحالة بالإصابة المفاجئة في اليوم الثالث وهلاك جميع الطيور المصابة خلال فترة وجيزة (2 ساعة تقريباً) ، وسبق حدوث الهلاك علامات تنفسية شديدة وشلل الأرجل والأجنحة . من النتائج السابقة يتبين لنا إن أفضل جرعة للقاح المقتول هي $EID_{50}/ml\ 10^{9.5}$ من ناحية اقتصادية حيث إن هذه الجرعة لم تعطي فروق معنوية مع الجرعة الأعلى $EID_{50}/ml\ 10^{10}$ في اختبار الاليزا ، وكانت بنسبة الحماية ذاتها في اختبار التحدي . أما بالنسبة لأفضل جرعة للقاح الحي المضعف هي الجرعة الأقل $EID_{50}/ml\ 10^7$ على الرغم من أنها أعطت انخفاضاً معنوياً لاختبار الاليزا مع الجرعة الأعلى $EID_{50}/ml\ 10^8$ لكنها لم تعطي أعراض مرضية خلال مدة التجربة لمرض نيوكاسل كما ان لها نفس نسبة الحماية في اختبار التحدي .

الكلمات المفتاحية:- لقاح ، نيوكاسل ، الاليزا ، جرعة .

Preparation of live attenuated and killed vaccines of Newcastle disease (strain AG 68) and immunity evaluation

A. A. H. Zahid

T. A. AL.- Saeedi

Coll. Of Vet. Med./Univ. Of Baghdad

Coll. Of Agri. / Univ. Of AL- Qadisiya

Abstract

This study has been conducted to propagate Newcastle Disease virus, strain AG68 in (9-11) day old chicken's embryonated eggs . Five passages have been runned to obtain different titers three of them ($EID_{50}/ml\ 10^{9.1}$, $EID_{50}/ml\ 10^{9.5}$, $EID_{50}/ml\ 10^{9.9}$) titers were used to produce three killed different vaccine doses used in this study. The $EID_{50}/ml\ 10^{9.5}$ has been diluted to give different dosage attenuated vaccine .Two hundreds and ten birds were divided to seven groups each 30 chicks each. First three groups were vaccinated with different doses subcutaneously with the oil adjuvant vaccine while the other three groups were vaccinated via eye drop at one day old, the seventh group was left as control. All first six groups were vaccinated with AG68 strain by spray on 12th day .Indirect enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) technique was used to estimate the immune titer at (1st, 14th, 28th) day and with challenge test at (28) day , in ELISA test in all groups there were significant differences ($p < 0.05$) between 14th and 28th day . ELISA test at day 14 in groups vaccinated with attenuated vaccine through eye drop at the first day showed high antibody level. At 28th day, groups vaccinated with oil inactivated vaccine have shown higher anti body titers than

those vaccinated with attenuated vaccine , all six groups have shown higher antibody titer than control . All vaccinated groups have shown 100% protection against challenge test indicating the protective efficacy of AG68 strain and the two types of vaccine prepared (killed and attenuated) through eye drop , spray , and injection, while the protection percentage in group seven was 20% . As a conclusion, the best killed vaccine dose was $EID50 \backslash ml 10^{9.5}$ from economical point of view, this dose shows no significant difference with high dose $EID50 \backslash ml 10^{10}$ through ELISA, also protection percentage through challenge test was the same , The $EID50 \backslash ml 10^7$ is The best of attenuated vaccine doses, although it showed lower significant difference to the high dose $EID50 \backslash ml 10^8$ through ELISA test, but it shows no clinical signs of Newcastle disease and has the same protection percentage in challenge test .

Key words: Newcastle vaccine, ELISA, doses.

استحلاب الزيت (A - Arlacel) جُهزت من شركة الكندي

للقاحات والأدوية البيطرية

6- فايروس نيوكاسل الضاري حصل عليه من كلية الطب البيطري/ فرع الأمراض والدواجن .

طرائق العمل:

أ- عملية تحضير اللقاح الزيتي:

1-عملية حقن البيض وجمع السوائل الجنينية : استخدم البيض المجنن بعمر (10) أيام لتمرير الفايروس لغرض التكاثر وعلى وفق ما ذكره الباحث (8)

2- معايرة العترة اللقاحية استخدم في تحضير اللقاح البذرة اللقاحية (AG68 Seed Vaccine) جُهزت من شركة الكندي لإنتاج اللقاحات والأدوية البيطرية بشكل عبوة مجفدة ، وتمت المعايرة بحساب الجرعة الخامجة لـ (50%) من الأجنة النامية ($EID50$) للعترة ، وتمت عملية المعايرة اعتماداً على ماذكرة الباحث (9)

3-كيفية الحصول على الجرعة المختلفة حلت عبوة البذرة اللقاحية بمحلول دارى الفوسفات المعقم ، وبعد تمرير محتويات العبوة في أجنة بيض الدجاج بعمر (9-11) يوماً لخمس مرات ، في كل مرة تجمع السوائل الجنينية ويتم معايرتها من خلال حساب الجرعة الخامجة لـ 50% من الأجنة النامية ($EID50$) . ومن تلك التمريرات حصلنا على خمسة معايرات هي $EID50 \backslash ml 10^{7.5}$ و $EID50 \backslash ml 10^{8.7}$ و $EID50 \backslash ml 10^{9.1}$ و $EID50 \backslash ml 10^{9.5}$ و $EID50 \backslash ml 10^{9.9}$ ، أخذت العيارية القريبة من العيارية المقررة وهي $EID50 \backslash ml 10^9$ و $EID50 \backslash ml 10^{9.5}$ و $EID50 \backslash ml 10^{10}$ ، بالنسبة $EID50 \backslash ml 10^{9.5}$ هي احد الجرعة الخامجة لـ 50% من الأجنة المطلوبة ، إما $EID50 \backslash ml 10^{9.1}$ فقد خففت بنفس المقدار من (سوائل جنينية لبيض مجنن حضن حتى عمر 14 يوماً بدون حقنها بالفايروس) لنحصل على الجرعة $EID50 \backslash ml 10^9$ ، أما العيارية $EID50 \backslash ml 10^{9.9}$ فعولمت كعيارية كاملة ولكن عند التلقيح اعطي ضعف الحجم (0.4 ml) لتكون العيارية كاملة $EID50 \backslash ml 10^{10}$ وهي العيارية الثالثة المطلوبة.

4-إبطال فعالية الفايروس ابطلت فعالية الفايروس باستخدام الفورمالين بتركيز (40% Formaldehyde) بنسبة 1:1000 (0.1%) ، وقد خفف الفورمالين الى (10%) حسب طريقة الباحث (10).

5-تحضير التركيبة اللقاحية خلطت السوائل الجنينية الحاوية على عترة فايروس مرض نيوكاسل المبطل بالفورمالين مع العامل المساعد الزيتي (Oil Adjuvant) ، وخُضر الجزء المائي (Liquid Phase) بإضافة (1%)

المقدمة

يعد مرض نيوكاسل من الأمراض واسعة الانتشار في العالم ، وهو أحد أهم الأمراض التي تصيب الدواجن والطيور الأخرى (1). ويستوطن المرض في أكثر البلدان المنتجة للدواجن حيث اعتمد على التلقيح لإبقاء المرض تحت السيطرة (2)، وعلى كل حال استمرت حالات التفشي المستمر لفايروس مرض نيوكاسل الضاري حتى في الطيور الملقحة (3) . والسيطرة على المرض ممكنة لكن تحتاج إلى التطبيق الكفوء للتلقيح (4) ، ذكر الباحثون (5) بأن اللقاحات المنتجة من فايروسات عزلت من وباء محلي سابق تنتج حماية أفضل ، لذلك استخدمت عترة أبي غريب 68 اللقاحية في هذه الدراسة والناتجة من عترة أبي غريب 68 الضارية (AG68 V) التي عزلت من قطعان مصابة في منطقة أبو غريب من قبل الباحث Kascheulla في عام 1968، اثبت الباحثان (6) أن عترة AG 68L أكثر كفاءة تمنعية من عترتي (F, B1) ، للإفادة من تلك الكفاءة التمنعية وبما إن كفاءة اللقاحات الفايروسية بأحداث الحماية ضد المرض تتباين حسب العترة المستخدمة وكمية المستضد في اللقاح (7) ، لذلك صممت التجربة على أساس اختيار إي جرعة اللقاح الحي والمقتول تعطي أفضل استجابة مناعية لعترة أبي غريب 68، وتكون أكثر أمان واقل كلفة اقتصادية.

المواد وطرائق العمل

المواد

- 1- البيض المخصب** مجهز من قبل الشركة العامة للأبحاث الزراعية في أبي غريب
- 2- الأفراخ المستخدمة :-** استخدمت أفراخ اللحم عرق (Cubb) عددها 225 فرخاً بعمر يوم واحد واختيرت (15) فرخاً منها بصورة عشوائية ثم ضحي بها لغرض جمع نماذج الدم ، وقياس مستوى المناعة الامومية بعمر يوم واحد قبل التمنيع باللقاحات المبطله واللقاح الحي ، جُهزت من مفقس (كنعان) في ديالى ، وقد رببت الأفراخ في وحدة التجارب التابعة لكلية الطب البيطري - جامعة بغداد .
- 3- اللقاحات الفايروسية المستخدمة :-** البذرة اللقاحية لعترة أبي غريب اللقاحية (AG68 Seed Vaccine) جُهزت من شركة الكندي للقاحات والأدوية البيطرية
- 4 - عدة اختبار الأنزيم المناعي الممتز غير المباشر (ELISA)** أمريكية الصنع
- 5 - المواد الداخلة في التركيبة اللقاحية :-** عامل استحلاب الماء Tween- 80 ، زيت البارافين ، عامل

بعمر يوم واحد وأعيد التلقيح بعمر 12 يوماً بطريقة الرش باللقاح الحي يحوي كل مل جرعة 10^8
7- المجموعة السابعة :- اشتملت هذه المجموعة على (30) فرخاً تركت بدون تلقيح ، وُعِدَت كمجموعة سيطرة .
د- الاختبارات المستخدمة في تقييم الحالة المناعية في أفراخ التجربة

1- اختبار الأنزيم المناعي المتميز غير المباشر: أجري الاختبار باتباع التعليمات الموصى بها من قبل الشركة المنتجة لل (KIT)
2- اختبار التحدي : اعتمدت الطريقة التي ذكرها الباحثون (13) .

النتائج والمناقشة

اختبار الأمان بينت نتائج هذا الاختبار عدم وجود علامات سريرية شديدة أو هلاك لمرض نيوكاسل سوى الخمول ونفوش الريش لبعض الطيور بعد 48 ساعة من إعطاء 10 أضعاف الجرعة اللقاحية للجرع الثلاث المقررة للقاح الحي المضعفة لمرض نيوكاسل عثره أبي غريب 68 وتلاشت بعد ثلاث أيام من ظهورها ، أما ضعف الجرعة اللقاحية للقاح المقتول للثلاث جرع المحضرة فلم تظهر أي علامات سريرية لمدة (14) يوماً بعد إعطائها لأفراخ لحم بعمر 21 يوماً ، مما يؤكد إن عثره أبي غريب 68 أمانة عند الاستخدام وهذا يتفق مع ما ذكره الباحثون (14) بأن اللقاح المحضر من عثره أبي غريب 68 لم يعطي إعراضاً جانبية . في حين في التجربة الفعلية بالمجموعة السادسة المعطاة أكبر جرعة لقاح حي مضعف (جرعته 10^8) بواسطة التقطير بالعين حدثت إصابة حيث أظهرت علامات سريرية بعد اليوم الحادي عشر من التلقيح حيث تميزت بالخمول و نفوش الريش و دوران الطير حول نفسه عند الانزعاج وعدم القدرة على المشي و شلل الأرجل والأجنحة و التواء الرقبة (الصورة 1) ، وكان عدد الأفراخ المصابة (5) أفراخ من تلك المجموعة هلك منها (2) في اليوم الرابع عشر بعد التلقيح ، أما التغيرات المرضية فكانت عبارة عن نزوفات في المعدة الحقيقية ونزوفات في اللوز الاوروية و لطخات باير واحتقان في الأوعية الدموية للدماغ (كما موضح بالصور 2،3،4) ، وهذا يشير إلى أن هذه العترة تحتاج إلى مزيد من التضعيف أو أن تستخدم بجرعة 10^7 أو أقل بقليل وهذا يتفق مع ما ذكره الباحثون (14) أن عثره أبي غريب 68 اللقاحية تقع على الحد الأدنى لعثر مرض نيوكاسل متوسطة الضراوة ، وهذا خلاف اختبار الأمان فقد يعود السبب إلى التلقيح بعمر يوم واحد واختبار الأمان بعمر (21) يوماً ، حيث أن الجهاز المناعي يصل مرحلة الكفاءة المناعية بتقدم العمر (15) أو بسبب طريقة إعطاء اللقاح بالتقطير بالعين وإعطاء اختبار الأمان بالفم ، لأن إعطاء اللقاح العالي الجرعة عن طريق العين سمح للعترة بالتكاثر في أنسجة العين والجهاز التنفسي وبالتالي عدم قدرة الأضداد المصلية على معادلة الفيروس وهذا يتفق مع ما ذكره الباحثان (16) بأن الخمج يحدث عن طريق دخول الفيروس الجهاز الهضمي بجرعة عالية من الفيروس ، وتكفي جرعة أقل من الفيروس لإحداث المرض عن طريق الجهاز التنفسي.

من عامل استحلاب الماء (tween-80) إلى السوائل الجينية المبطلّة، وقد مزج الخليط باستعمال جهاز الرج المغناطيسي لمدة (2) ساعة وفي الوقت نفسه حضر الجزء الزيتي المتكون من زيت البارافين (Paraffin Oil) مضافاً إليه (10%) من مادة استحلاب الزيت (Arlacel – A) حسب طريقة الباحث (10).

ب- اختبار الأمان يعد هذا الاختبار من الاختبارات المهمة لتحديد صلاحية اللقاحات المصنعة من حيث عدم إحداثها علامات جانبية ، أو هلاك عند مضاعفة الجرعة اللقاحية للّقاحات المقتولة أو 10 إضعاف الجرعة للّقاحات الحية وحسب طريقة الباحث (11) ومنظمة OIE (12) تم جلب 60 فرخاً بعمر (21) يوماً لأجل اختبار الأمان قسمت إلى (6) مجاميع كل مجموعة 10 أفراخ ، الثلاثة مجاميع الأولى أعطيت ضعف الجرعة اللقاحية للثلاث جرع لقاح المقتول (Double Dose) ، والمجاميع الثلاثة الأخرى تم إعطاؤها 10 أضعاف الجرعة المقررة للثلاث جرع لقاح الحي عن طريق الفم وتم ملاحظة جميع المجاميع لمدة (14) يوماً لتسجيل ظهور العلامات السريرية والتغيرات المرضية والهلاك طوال تلك المدة .

ج- تصميم التجربة :

1- المجموعة الأولى :- اشتملت هذه المجموعة على (30) فرخاً لقحت بلقاح مرض نيوكاسل المبطل بطريقة الحقن تحت الجلد خلف الرقبة بعمر يوم واحد بلقاح جرعة $10^{9.9}$ ml EID50\ (0.4) مل/طير، وأعيد التلقيح بطريقة الرش باللقاح الحي يحوي كل مل جرعة 10^7 بعمر 12 يوماً.

2- المجموعة الثانية :- اشتملت هذه المجموعة على (30) فرخاً لقحت بلقاح مرض نيوكاسل المبطل بطريقة الحقن تحت الجلد خلف الرقبة بعمر يوم واحد بلقاح جرعة $10^{9.5}$ ml EID50\ (0.2) مل/طير، وأعيد التلقيح بطريقة الرش باللقاح الحي يحوي كل مل جرعة 10^7 بعمر 12 يوماً .

3- المجموعة الثالثة :- اشتملت هذه المجموعة على (30) فرخاً لقحت بلقاح مرض نيوكاسل المبطل بطريقة الحقن تحت الجلد خلف الرقبة بعمر يوم واحد بلقاح جرعة 10^9 ml EID50\ (0.2) مل/طير، وأعيد التلقيح بطريقة الرش باللقاح الحي يحوي كل مل جرعة 10^7 بعمر 12 يوماً

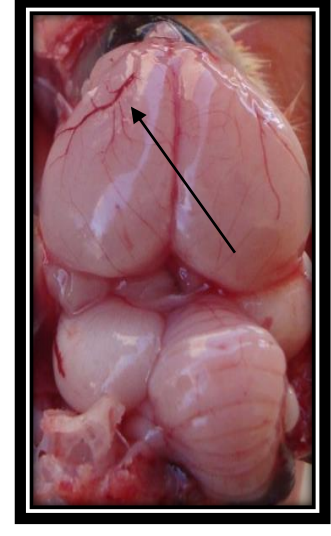
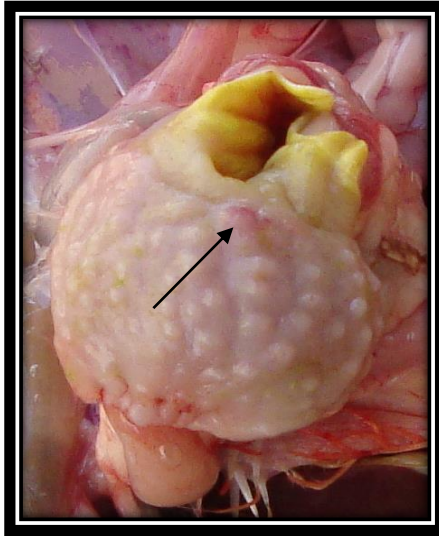
4- المجموعة الرابعة :- اشتملت هذه المجموعة على (30) فرخاً لقحت بلقاح مرض نيوكاسل الحي بطريقة التقطير بالعين بحجم 0.02 مل لكل طير يحوي جرعة 10^7 بعمر يوم واحد وأعيد التلقيح بعمر 12 يوماً بطريقة الرش باللقاح الحي يحوي كل مل جرعة 10^7

5- المجموعة الخامسة:- اشتملت هذه المجموعة على (30) فرخاً لقحت بلقاح مرض نيوكاسل الحي بطريقة التقطير بالعين بحجم 0.02 مل لكل طير يحوي جرعة $10^{7.5}$ بعمر يوم واحد وأعيد التلقيح بعمر 12 يوماً بطريقة الرش باللقاح الحي يحوي كل مل جرعة $10^{7.5}$

6- المجموعة السادسة :- اشتملت هذه المجموعة على (30) فرخاً لقحت بلقاح مرض نيوكاسل الحي بطريقة التقطير بالعين بحجم 0.02 مل لكل طير يحوي جرعة 10^8



شكل (1) يوضح التواء الرقبة في احد الطيور المصابة بعمر (14) يوم



شكل (2) يوضح احتقان في الأوعية الدموية للدماغ . شكل (3) يوضح نزوفات في جدار الأمعاء في لطخات باير . شكل (4) يوضح نزوفات في المعدة الحقيقية

ذكره الباحثون (18) بان إعطاء اللقاح المقتول مع القاح الحي المضعف يعطي مناعة جيدة ولمدة طويلة مقارنة بإعطاء اللقاح الحي المضعف أكثر من مرة لوحدة . وتفوقت المجموعة السادسة الملقحة باللقاح الحي المضعف عيارية 10^8 حيث كان معدل معيار الأضداد (2862) على المجموعة الخامسة الملقحة باللقاح الحي المضعف عيارية $10^{7.5}$ بشكل غير معنوي حيث كان معدل معيار الأضداد فيها (2390) ، وعلى المجموعة الرابعة الملقحة باللقاح الحي المضعف عيارية 10^7 حيث كان معدل معيار الأضداد فيها (2128) بشكل معنوي ، وتفوق اللقاح عالي المعيارية يتفق مع ما ذكره الباحثون (19) أن اللقاحات عالية المعيار تؤدي إلى إنتاج أضداد تستمر بالارتفاع التدريجي نتيجة الاستجابة المناعية لتبلغ أقصاها (10-14) يوماً بعد التلقيح في حين أن اللقاحات منخفضة المعيار تؤدي إلى إنتاج أضداد تصل أعلى قيم لها بعد (7-10) أيام من التلقيح ، جميع المجاميع الملقحة تفوقت بشكل معنوي على مجموعة السيطرة حيث كان معدل معيار الأضداد (289) بصورة عامة الاختبار يظهر في عمر (14) يوماً تفوق المجاميع الملقحة باللقاح الحي المضعف بعمر يوم واحد على المجاميع الثلاث الملقحة باللقاح الزيتي بعمر يوم واحد ، وهذا يتفق مع ما ذكره الباحث (20) إن اللقاح

نتائج اختبار الاليزا أظهرت نتائج اختبار الاليزا كما موضح في الجدول (1) بعمر 28 يوم تفوق المجاميع الملقحة باللقاح الزيتي بعمر يوم واحد على المجاميع الملقحة باللقاح الحي بمستوى $P < 0.05$ حيث أظهرت النتائج تفوق المجموعة الأولى الملقحة باللقاح الزيتي عيارية 10^{10} EID50/ml ، وكان معدل معيار الأضداد (5059) على المجاميع الثالثة والرابعة والخامسة والسادسة بشكل معنوي حيث كان معدل معيار الأضداد (2128, 4296, 2390, 2862) على التوالي بينما تفوقت على المجموعة الثانية بشكل غير معنوي حيث كان معدل معيار الأضداد (4851) ، كما تفوقت المجموعة الثانية الملقحة باللقاح المقتول عيارية $10^{9.5}$ EID50/ml على المجاميع الرابعة والخامسة والسادسة بشكل معنوي ، بينما كانت الفروق غير معنوية مع المجموعة الثالثة ، وتفوقت المجموعة الثالثة الملقحة باللقاح المقتول عيارية 10^9 EID50/ml على المجاميع الرابعة والخامسة والسادسة بشكل معنوي ، إن ارتفاع معيار الأضداد للمجاميع الملقحة باللقاح المقتول بعمر 28 يوماً نتيجة وجود المستضد في الأنسجة وعملية انتشار اللقاح من مكان الحقن بصورة بطيئة تؤدي إلى التحفيز المتواصل للجهاز المناعي لأحداث استجابة مناعية عالية لمدة طويلة من الزمن (17) ، وهذا يتفق مع ما

التوالي . وهذا يتفق مع ما أشار إليه الباحث (20) إن الأضداد التي تنتج من اللقاح الزيتي المبطل تحتاج إلى فترة طويلة تقريباً (21) يوماً حتى تصل إلى مستوى عالٍ من إنتاج الأضداد . كذلك في المجاميع الملقحة باللقاح الحي كانت هناك فروق معنوية بين الأعمار المختلفة حيث تفوق معدل معيار الأضداد بعمر (28) يوماً للمجاميع الرابعة والخامسة والسادسة حيث كانت (2128 و 2390 و 2862) على التوالي ، بينما في عمر (14) يوماً كان معدل معيار الأضداد فيها (1535 و 1737 و 2121) ، وهذا يتفق مع ما ذكره الباحثون (22) أن زيادة معيار الأضداد بعد التلقيح الأول تكون تدريجية بينما تكون الاستجابة أقوى بعد التلقيح الثاني .

جدول (1) يوضح نتائج معيار الأضداد لمجاميع التجربة باختبار الاليزا .

المجموعة	معدل معيار الأضداد ± الخطأ القياسي بعمر 1 يوم	معدل معيار الأضداد ± الخطأ القياسي بعمر 14 يوم	معدل معيار الأضداد ± الخطأ القياسي بعمر 28 يوم
1م	204.06±5637.46 A a	85.75±1109.83 BC b	601.82±5059.50 A a
2م	204.06±5637.46 A a	55.68±1058.16 BC c	777.22±4851.16 AB b
3م	204.06±5637.46 A a	40.00±1011.00 BC c	260.10±4296.50 B b
4م	204.06±5637.46 A a	115.90±1535.66 AB c	128.87±2128.33 D b
5م	204.06±5637.46 A a	91.67±1737.17 A c	248.33±2390.83 CD b
6م	204.06±5637.46 A a	135.17±2121.66 A c	393.72±2862.00 C b
7م	204.06±5637.46 A a	49.00±926.83 C b	37.67±289.66 E c

1- اختلاف الأحرف الكبيرة عمودياً يشير إلى وجود فروق معنوية $P < 0.05$ بين المجاميع .

2- اختلاف الأحرف الصغيرة أفقياً يشير إلى وجود فروق معنوية $P < 0.05$ بين الفترات الزمنية (العمر) .

نتائج اختبار التحدي

أظهرت النتائج في مجموعة السيطرة نسبة هلاك 80% و هلاك معظم الطيور المصابة خلال (5) أيام مما يؤكد ضراوة فايروس التحدي ، حيث تميزت الحالة بالإصابة المفاجئة في اليوم الثالث و هلاك جميع الطيور المصابة خلال فترة وجيزة (2 ساعة تقريباً) ، ويكون الهلاك مسبوق بعلامات تنفسية شديدة وشلل الأرجل والأجنحة ، مما يشير إلى أن هذه الحالة فوق حادة (Per acute) للمرض وهذا يتفق مع ما أشار إليه الشخيلي (23) بأن أهم العلامات السريرية التي تشاهد على الأفراخ غير المحصنة ، أو التي حصانتها غير كافية مع وجود عترة ضارية لهذا المرض تشتمل على هلاك أعداد غير قليلة من الأفراخ دون وجود أي أعراض مرضية على قطيع الأفراخ وقد يلاحظ بعض الأفراخ مصابة بالشلل التام حيث تبدو بدون حركة ، أو أعراض أخرى وهذه الصورة تمثل المرحلة فوق الحاد (Per acute) للمرض. وسبب ظهور العلامات التنفسية الشديدة هو إعطاء الفايروس عن طريق التقطير بالعين والمنخرين والفم والذي يعد المدخل الطبيعي للفايروس في الخمج الطبيعي (24). إما المجاميع الملقحة لم تظهر أعراضاً مرضية بعد اختبار التحدي وهذه النتيجة تتفق مع ما ذكره الباحث (25) في أن الأفراخ التي حصنت بلقاح AG68 كانت الأعراض فيها معدومة تقريباً خلاف

جدول (2) يوضح العلاقة بين المستوى المناعي لمجاميع التجربة واختبار التحدي بعمر 28 يوم

المجاميع	الاليزا	نسبة الحماية
م1	601.82±5059.50 A	100%
م2	777.22±4851.16 AB	100%
م3	260.10±4296.50 B	100%
م4	128.87±2128.33 D	100%
م5	248.33±2390.83 CD	100%
م6	393.72±2862.00 C	100%
م7	37.67±289.66 E	20%

اختلاف الأحرف عمودياً يشير إلى وجود فروق معنوية $P < 0.05$ بين المجاميع

الفايروس الحقل أكثر من العتر اللقاحية المستوردة. كذلك اتفقت نتيجة اختبار التحدي مع نتيجة اختبار الاليزا بنسب مختلفة كما موضح بالجدول (2) حيث ان المجاميع الملقة باللقاح الحي المضعف بعمر (28) يوماً أعطت مستوى مناعي منخفض خصوصاً الجرعة الأقل بالمقارنة بالمجاميع الملقة باللقاح المقتول ألا أنها قاومت الإصابة بنسبة 100% وهذا يتفق مع ما ذكره الباحثون (29) بان التلقيح بطريقة الرش أو التقطير بالعين يعطي مناعة موضعية قوية عن طريق قناة الدمع وغدة الهرديريان والجهاز التنفسي، مما يعطي حماية عالية بعد التحدي بالرغم من انخفاض مستوى الأضداد المصلية.

المصادر

1. Dashab, G. and Sadeghi, G. (2007). Performance and humoral immune response to Newcastle disease in two strains of broiler chickens. Journal of animal and veterinary advances.6(3): 451-453.
2. Alexander, D. J. and Senne, D. A. (2008). Newcastle disease, other avian paramyxoviruses, and pneumovirus infections. In: Saif Y M, Fadly A M, Glisson J R, McDougald L R, Nolan L K, Swayne D E (eds) Diseases of poultry (12th edn). Blackwell Publishing Professional, Ames, Iowa: 7-100.
3. Van Boven, M.; Bouma, A.; Fabri, T.H.F.; Katsma, E.; Hartog, L., and Koch, G. (2008). Herd immunity to Newcastle disease virus in poultry by vaccination. Avian Pathology, 37(1):1-5.
4. Chandana Manna, S.; Manna, K.; Das, R.; Batabya, K. and Roy, R. (2007). Development of in ovo vaccine against Newcastle disease of birds. current science Vol. 93, NO. 9 (10).
5. Kapczynski, D.R. and King, D.J. (2005). Protection of chickens against overt clinical disease and determination of viral shedding following vaccination with commercially available Newcastle disease virus vaccines upon challenge with highly virulent virus from the California 2002 exotic Newcastle disease outbreak. Vaccine 23(26):3424-33.
6. Borland, L.J. and Allan, W.H. (1980). Laboratory tests for comparing live lentogenic Newcastle disease vaccines. Avian Pathology. 9:45-59.
7. Mass, R. A.; Komen, M.; Van diepen, M.; Oei, H. L. and Claassen, I. J. (2003). Correlation of haemagglutinin- neuraminidase and fusion protein content with protective antibody response after immunization with inactivated Newcastle disease vaccines. Vaccine. 12: 3137-3142.
8. Alexander, D. J. (1998). Newcastle disease and other paramyxovirus. In: Isolation and Identification of Avian Pathogens; 4th Ed, Eds by Swayne, D.E.; Glisson, J.R.; Jackwood, M.W.;
- Pearson, J.E. and Reid, W.M. American Association of Avian Pathologists. U.S.A. Pp.156-163.
9. Villegas, P. (1998). Titration of biological suspensions. In: Swayne, D. E.; Glisson, J. R.; Jackwood, M. W.; Pearson, J. E. and Reed, W. M. ed. Laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens, 4th ed. American Association of Avian Pathologists. Pennsylvania: 248-254.
10. Palya, V. (1991). Manual for the production of Marek's disease, Gumboro disease and inactivated Newcastle disease vaccines, animal production and health paper 89. Food and Agriculture organization Rome, PP. 29-60.
11. Folitse, R.; Halvorson, D.A. and Sivanandan, V. (1998). Efficacy of combined killed- in- oil emulsion and live Newcastle disease vaccines in chickens. Avian Dis. 42: 173-178.
12. OIE Office International des Epizooties (OIE). (2008). Newcastle Disease In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals Chapter 2.3.14.
13. Brugh, M.; Stane, H.D and Lupton, H. W. (1983). Comparison of inactivated Newcastle disease viral vaccines containing different emulsion adjuvants. Am. J. Vet. Res. 44: 72-75.
14. حوا، نونيل جميل و علي، سندس عون و كنعان، لميس (2001). إعادة تحضير لقاح نيوكاسل من العترة المحلية AG68 ودراسة كفاءة المناعة. وقائع المؤتمر الرابع / كلية الطب البيطري / جامعة بغداد / العدد الأول.
15. Qureshi, M. A.; Hussain, L. and Heggen, C. L. (1998). Understanding immunology in disease development and control. Poult. Scie. 77: 1126-1129.
16. Grasso, M. Ebako, D. (2003). Newcastle disease. Cooperative Extension, Institute of Agriculture and Natural Resource, University of Nebraska-Lincoln.

- 23 . الشخيلي ، فؤاد إبراهيم (2003) . أمراض الدواجن - شركة الاطلس للطباعة المحدودة - بغداد . الطبعة الثانية . صفحة (259-287).
- 24 . Alexander, D.J. (1997) .Newcastle disease and other paramyxoviridae infections. In:Disease of poultry, 10th Ed ,Eds by . Calnek , H.J .; Barnes , B.W.; Beard , C.W.; Reid , W.M. and Yoder, H.W. Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa. Pp. 541-570.
- 25 . زاهد ، عبد الامير حسين (1980) . دراسة في تقييم اللقاحات لمرض نيوكاسل المنتجة في افراخ اللحم . رسالة ماجستير ، كلية الطب البيطري - جامعة بغداد.
- 26 . Degefa , T. ; Dadi , L. ; Yami , A. ; Marian , G. and Nassir , M. (2004) . Technical and economic evaluation of different Methods of Newcastle disease vaccine . Administration . J. Vet. Med. Aphysiol. Pathol. Clin. Med. 51 (7-8) : 365-369.
- 27 . خضير ، محاسن عبد الرزاق (2006) . دراسة مقارنة لتقييم اللقاحات المبطللة ضد مرض نيوكاسل المنتجة محلياً في افراخ اللحم . رسالة ماجستير ، كلية الطب البيطري - جامعة بغداد .
- 28 . Panshin, A.; Shihmanter,E.; Weisman, Y.; Orvell,C. and Lipkind, M. (2002). Antigenic heterogeneity amongst the field isolates of Newcastle disease virus (NDV) in relation to the vaccine strain. Part II: Studies on viruses isolated from domestic birds in Israel. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 25:173-185.
- 29 . قاسم ، قصي عارف و قيع ، طارق سالم (2009) . مقارنة مستوى الأضداد الجسمية لبرامج تلقيح مختلفة ضد مرض نيوكاسل في فروج اللحم . المجلة العراقية للعلوم البيطرية ، المجلد 23 ، العدد 2 ، 2009 (403-407) .
- 17.Erhard, M.H.; Schmidt, P.; Zinsmeister, P.; Hofmann, A.; Munster, U.; Kaspers, B.; Wiesmuller, K.H.; Bessler, W.G .and Stangassinger, M. (2000). Adjuvant effects of various lipopeptides and interferon- γ on the humoral immune response of chickens. Poult. Sci., 79: 1264-1270.
- 18 . Rahman , M.M.; Bari, A.S.; Giasuddin .; M, Islam , M.R .;Alam , J.and Sil , G.C. (2002). Evaluation of maternal and humoral immunity against Newcastle disease virus in chicken . International Journal of Poultry Sci. I (15) : 161-163.
- 19 . Hooper, P.T.; Hanson, E.; Young, J.G.; Russell, G.M; Dellaporta, A.L.(1999). Lesions in the upper respiratory tract in chickens experimentally infected with Newcastle disease virus isolated in Australia. Aust. Vet.J.77: 50-51.
20. Grimes, E. Sall,J. (2002). A basic laboratory manual for the small- scaie production and testing of I-2 Newcastle disease vaccine. Australian Center for International Agricultural Research . ISBN . 946-974.
21. Hanson , E. ; Young , J.G. ; Hopper , P.T. Della- ports , A.J. (1999) . Virulance and transmissibility of some Australian and exotic strain of Newcastle disease virus used in some vaccines . Aust. Vet. J. , 77 : 51-53.
- 22.Muhammad, S.; Hamayun, K.; S,R. and Muhammad, A.(2006). Humoral Immune Response to Newcastle Disease Vaccine (Lastoa Strain) in Broilers. Department of Animal Health, NWFP, Agricultural University, Peshawar, Pakistan Department of Microbiology, University of Agriculture, Faisalabad, Pakistan.