تحضير اللقاح المبطل الزيتى لفايروس نيوكاسل واستخدامه فى تقنيه تلقيح الاجنه

عبد الامير حسين زاهد نوال صالح جعفر صبيحه عبد علي
كلية الطب البيطري/جامعة بغداد

الخلاصه

استخدم في الدراسه (80) بيضه مخصبه من امهات لحم تجاري حيث قسمت في اليوم (18) من الحضن الى مجموعتين متساويه،لقحت المجموعه الاولى بلقاح نيوكاسل المبطل الزيتي الذي تم تحضيره والمجموعه الثانيه تركت كمجموعه سيطره وحقنت فقط بالمحلول الملحي الفسيلوجي(Normal Saline)، اظهرت الدراسه امكانية استخدام اللقاح المبطل الزيتي وبجرعه مقدارها $10^{10.1}$ EID^{50}/0.1ml والمحضر محليا من العتره B1 في تحصين اجنه الدجاج حيث لم يظهر تاثير سلبي في نسبه الفقس وحيويه الافراخ الفاقسه.استخدم اختباري اثباط التلازن الدموي واختبار الانزيم المناعي الممتز(الاليزا) وقد اظهرت النتائج ارتفاع معدل الاضداد المثبطه في المجموعه الملقحه بمستوى معنوي$P<0.05$ مقارنه بمجموعه السيطره بعمر 1،7،14 يوم بعد الفقس ، كما اظهر معيار الاضداد لاختبار الاليزا توافقا مع اختبار اثباط التلازن الدموي في المجموعتين ذاتها.استخدم اختبارالتحدي المبكر في تقييم هذا اللقاح وبعمر (14)يوما بعد الفقس حيث اظهرت النتائج مقاومه المجموعه الاولى(الملقحه) لجرعه التحدى بفايروس نيوكسل الضارى بنسبه حصانه 93.33% مقارنه بمجموعه السيطره التي اعطت نسبه حصانه منخفضه بلغت 26.66% .

المقدمة

يعد مرض نيوكاسل احد الامراض الفايروسيه المعديه والفتاكه لما يسببه من خسائر اقتصاديه كبيره في صناعه الدواجن على الرغم من استخدام اللقاحات بالطرق والبرامج المختلفه،يصيب المرض الطيور والدجاج الذي يعتبر حساس جدا للاصابه بهذا المرض(1) و(2).مسبب المرض Paramyxovirus ينتمي الى عائلة Paramyoviridae وتم تصنيفه الى عدة انماط APMV 1 –APMV 10 (3)و(4). ان التلقيح المبكر مهم جدا في مكافحة المرض ،ولا سيما في العراق بسبب الاصابات الكبيرة بمرض نيوكاسل في دجاج اللحم التجاري (5)،فقد اشارت الدراسات الى ان توفير حمايه للا فراخ ضد المرض لم تقتصر على اتباع الطرق التقليدية للتلقيح بل اشتملت على ادخال تقنية التلقيح في اجنة الدجاج خلال مراحل النمو المتاخرة (6)و(7)و(8)و(9) حيث اشتملت الطرق الحديثة لتمنيع الاجنة على استخدام اللقاح المبطل الزيتي(Oil inactivated vaccine) باستخدام لقاح ضد مرض نيوكاسل والانفلاونزا من قبل الباحثين(9) وايضا في الوقت الحالي اصبحت تستخدم القاحات المركبه ذات التركيب الجينيSubunit vaccine (10) لمرضي نيوكاسل والانفلاونزا في اجنة الدجاج من قبل الباحثين (11).اما في العراق فقد اثبت نجاح هذه التقنيه لاول مرة من قبل الباحثة (12)باستخدام لقاح ثنائي ضد مرض نيوكاسل وكمبورو،كما اثبت (13)عند تلقيح الاجنة بعمر ثمانية عشر يوما بلقاح نيوكاسل الحي المضعف.لذلك تم التخطيط في هذه الدراسة لتحضير اللقاح المبطل الزيتي من عترة B1 لفايروس نيوكاسل لاعطاءه بطريقة تلقيح الاجنه ومقارنته بمجموعة السيطرة من خلال دراسة كفاءة هذا اللقاح وتاثيره في نسبة الفقس و حيوية الافراخ الفاقسة ودراسة استجابة المناعة للافراخ الفاقسة وتقييم كفاءة طريقة التلقيح في اجنة الدجاج باستخدام اختبار التحدي المبكر(Challenge test)ولاول مرة بعمر اربعة عشريوما باستخدام عترة محلية ضارية ضد مرض نيوكاسل.

المواد وطرائق العمل

تم استخدام بيض تفقيس تجاري(80)بيضة مخصبة مجهزة من مفقس الزيتون/محافظة بابل،وحضنت بحاضنة بيض تابعة للمفقس نفسه حتى حين الفقس،بعمر18 يوما من مدة الحضن تم اجراء عملية الحقن حسب(14) ،بالاضافة الى تحضير لقاح نيوكاسل الزيتي المبطل بالفورمالين حسب(15)و(16) والمنتج محليا بتحضيره في اجنة الدجاج بعمرتسعة ايام عن طريق الحقن في سائل الالنتوي وبالتعاون مع شركة الكندي باستخدام جهاز الخلاط المغناطيسي(Magnetic stirrer) بجرعة مقدارها 0.1ml/ EID^{50} $10^{10.1}$،تم استخدام فايروس نيوكاسل الضاري لاجراء اختبارالتحدي مجهزمن قبل الاستاذ المساعد د.عبد الامير زاهد/كلية الطب البيطري_جامعة بغداد.استخدمت عدةاختبار الانزيم المناعي الممتز(ELIZA)،تم اجراء اختبارالتلازن الدموي حسب طريقة(17)واختبار اثباط التلازن الدموي(17)و(18) ،تم حساب نسبة البيض الفاقس(18)وحيوية الافراخ بعد مراقبة الافراخ الفاقسة الى عمر سبعة ايام وسجلت الهلاكات حسب طريقة(7) ،اجريت التحليلات الاحصائية باستخدام T_test لبيان الفرق بين المجموعتين واختبرت الفروقات المعنوية بين المجموعتين بطريقة(19).

النتائج

1-نسبة الفقس Hatchability Percentage :
اظهرت النتائج وجود فرق معنوي بمستوى p<0.05 في نسبة الفقس بين المجموعة الاولى (الملقحة)و الثانية(السيطرة)والتي كانت اعلاها في المجموعة الثانيه كما موضح في الجدول(1)

جدول (1) يوضح المجموعة الملقحة ونوع الجرعة ونسبة الفقس

المجاميع	نوع القاح	الجرعة	العدد الكلي/عددالافراخ	النسبة المئوية
المجموعة الاولى	*لقاح نيوكاسل المبطل الزيتي	**0.1 مل	36/40	%90
المجموعة الثانية	سيطرة لقحت فقط بالمحلول الملحي الفسيولجي	0.1مل	38/40	%95

*مكان حقن الاجنة في التجويف الامنيوتي Amniotic sac بعمر(18)يوم من الحقن
**يحتوي على $10^{10.1}/EID_{50}$

2_ حيوية الافراخ Livability:
سجلت حيوية الافراخ خلال الاسبوع الاول من الفقس فقد اظهرت المجموعة الاولى(الملقحة) هلاك طير واحد اما المجموعة الثانية(السيطرة) فلم تظهر اية هلاكات.
3_نتائج معيار الاضداد المثبطة باختبار اثباط التلازن الدموي(HI):
اظهرت النتائج وجود فرق معنوي بمستوىP<0.05 بين المجموعتين في معدل الاضداد المثبطة للتلازن،فقد تفوقت المجموعة الاولى الملقحة بلقاح المبطل الزيتى في عمر يوم واحد،7ايام و14يوما على المجموعة الثانية(السيطرة).جدول(2)

جدول(2)معدل معيارالاضداد المثبطة للتلازن لفايروس مرض نيوكاسل في اختباراثباط التلازن الدموي(المعدل +_ الخطا القياسي

المجاميع / الايام	1يوم	7 يوم	14 يوم
المجموعة الاولى	12.8±2.6 [a]	7.4 ±1.5	22.4 ±3.3
المجموعة الثانية	7.2 ±1.6 [b]	3.4±0.8	2 ±1.03

(a،b) تعني وجود فرق معنوي بين المجموعتين في معدل الاضداد

4-نتائج اختبار الاليزا بعمر(14)يوما قبل اجراء اختبارالتحدي:
اظهرت النتائج تفوق المجموعة الاولى بمستوى p<0.05 على المجموعة الثانية،كما موضح في الجدول(3)

جدول(3)يوضح نتائج قيم الكثافة الضوئية(O.D*)في اختبار الاليزا واثباط التلازن الدموي لفايروس مرض نيوكاسل بعمر(14) يوما قبل اجراء اختبار التحدي(المعدل+_ الخطا القياسي)

المجاميع	اقيام الاليزا	HI
المجموعة الاولى	0.651±0.06 [a]	22.4±3.3
المجموعة الثانية	0.416±0.03 [b]	2.6±1.03

(b،a) تعني وجود فرق معنوي بين المجموعتين في معدل اقيام الكثافة الضوئية
*(O.D)الكثافة الضوئية (Optical density)

5_ نتائج اختبار التحدي بعمر(14)يوما لفايروس نيوكاسل الضاري:
سجلت نتائج اختبار التحدي بعد مراقبة الافراخ لمدة(10)ايام بعد اعطاءها جرعة التحدي من الفايروس الضاري وبعمر(14)يوما للمجموعة الملقحة ومجموعة السيطرة، كما موضح في الجدول(4)

جدول (4) يبين نسبة الحصانة ضد مرض نيوكاسل بعد اجراء اختبار التحدي للمجموعتين بعمر 14 يو بعد الفقس

المجموعة	جرعة التحدي	عدد الهلاكات/العدد الكلي	النسبة المئوية للحصانة
الاولى	$10^{7.5}$	1 /15	% 93.33
الثانية	$10^{7.5}$	15/11	%26.66

المناقشة

هدفت هذه التجربة الى امكانية تحضير اللقاح الزيتي المبطل بمادة الفورمالين والمحضر من العترة الحية المضعفة B1 وتمنيع اجنة دجاج اللحم التجاري بعمر 18 يوما من الحقن بهذا اللقاح ومقارنته مع مجموعة السيطرة لغرض تقويم كفاءة الجرعة اللقاحية المستخدمة في هذه التقنية ،خصوصا ان هنالك عددا من الباحثين العراقيين استخدموا تقنية تلقيح اجنة الدجاج بعمر18يوما من الحضن ضد مرض نيوكاسل(12) (13) باستخدام العترة اللقاحية الحية المضعفة B1 الايطالية والتركية المنشا على التوالي،واثبت كلا الباحثين امكانية التمنيع بهذه العترة ومقاومة الافراخ الفاقسة لجرعة التحدي بالفايروس الضاري.كما اثبت(9)امكانية استخدام اللقاح الزيتي المبطل ضد مرض نيوكاسل والانفلاونزا دون التاثير على نسبة الفقس، بالاضافة الى مااشارت اليه البحوث الحديثة في تقنية اللقاحات المركبة Sub unit vaccinesمعتمدة على التركيب البروتيني(F or HN) الجيني لفايروس نيوكاسل والتي لم يكن لها تاثير سلبي على نسبة الفقس ايضا(11). لم تظهرالمجموعة الملقحة اية علامات سريرية في الاسبوع الاول بعد الفقس اما هلاك طير واحد والذي لم يظهر اية صفة تشريحية تتوافق مع الاصابة بمرض نيوكاسل مما يعني ان اللقاح لم يؤثر سلبا في الافراخ.اما نتائج تقويم الاستجابة المناعية للمجموعة الملقحة فقد اظهرت ارتفاع معدل الاضداد في الايام(1،7،14)مقارنة بمجموعة السيطرة فيعود السبب الى طريقة التلقيح المبكر محفزا الاستجابة المناعية خلال الايام الاولى بعدالتلقيح على الرغم من وجود الاضداد الامومية(7) (11) (20) كما اشار(15)ان اللقاح المبطل قادر على توفير مستوى عال من المناعة الخلطية خاصة عند معاملته بالمواد المساعدةAdjuvant اذ ان اللقاحات المبطلة الزيتية تعطي استجابةمناعية افضل من اللقاحات المبطلة المستخدم فيها هيدروكسيد الالمنيوم ،كما ان اللقاح المبطل الزيتي واستخدامه باعمار مبكرة حيث يولد استجابة مناعية ترتفع معاييرها بمرور الايام وتظهر على نحو واضح جدا بعد مرور 14-21 يوما من التلقيح (21) مما يوفر حماية للافراخ ضد العتر الضارية للمرض(22)(23)(24) ويعزى سبب الارتفاع في معيار الاضداد الى تخصص الجهاز المناعي في المراحل المتاخرة من التطورالجنيني كما اشار اليه(9)والذي لاحظ ارتفاع معدل الاضداد بمعيار عال عند التلقيح باللقاح المبطل الزيتي في اجنة الدجاج الذي ارتفع مع تقدم العمر مما يوفر حماية عالية ومقاومة لجرعة التحدي بالفايروس الضاري. اما نتائج اختبار الاليزا بعمر 14يوما قبل اجراء اختبار التحدي فقد توافقت مع نتائج اختبار التلازن الدموي مع ارتفاع ملحوظ في معيار الاضداد في المجموعتين الملقحة مقارنة باختبار التلازن وذلك يعزى الى حساسية اختبار الاليزا(3).اما في مجموعة السيطرة التي لم تلقح جنينيا فقد انحدر معدل الاضداد على نحو تدريجي لتلاشي الاضداد الامومية بتقدم العمر حيث يصبح دون مستوى الحماية خلال 15-20 يوما كما اشارالى ذلك(25). وعند اجراء اختبار التحدي تم استخدام العترة المحلية Z-2003 و اعطائها بجرعة مقدارها (0.5 مل)عن طريق التقطير بالعين،الفم،والمنخرين بعمر14يوما بعد الفقس فقد اظهرت هذه العترة ضراوتها في اصابة الاحشاء الداخلية للافراخ الفاقسة وتسببها لهلاكات وصلت الى 73.33% في مجموعة السيطرة غيرالملقحة والتي اظهرت علامات سريرية تنفسية وعصبية خلال اليوم الرابع والخامس بعد اعطاء جرعة التحدي وتتفق هذه التغييرات المرضية مع التغييرات التي تحدثها الاصابة بالعترة الحشوية الضارية التي وصفها الكثير من الباحثين بانها تصيب الاحشاء الداخلية للطير(22)(26)(27).ويعود سبب مقاومة المجموعة الملقحة للفايروس الضاري الى امتلاكها الاضداد المثبطة المناسبة للحماية هذا ما اشار اليه(25)الذي ذكر ان الطيور التي تمتلك اجسام مثبطة بحدود32 فما فوق تكون مقاومة لاصابة التحدي،اما الطيور التي لا تمتلك هذا المستوى من الاضداد والتي اظهرت مقاومة لجرعة التحدي فقد يعود سبب مقاومتها الى الدور الذي تؤديه المناعة الخلوية فضلا عن المناعة الخلطية التي اشار اليها الكثيرمن الباحثين التي يمكن الكشف عنها خلال 3-4 ايام بعد التلقيح وتؤدي دورا كبيرا في حماية الطيورعند تعرضها للعترة الضارية(28) في حين اشار (7)الى ان الافراخ الملقحة بطريقة تلقيح الاجنة التي تظهر حالات موجبة لاختبار اثباط التلازن بغض النظر عن معيار الاضداد تكون مقاومة لاختبار التحدي.كما ان الباحثين(29)اشارا الى انانخفاض المعيار للاجسام المثبطة للتلازن لا يشير حساسية الطيور للمرض اذ ان المناعة الموضعية مشمولة في الية الحماية وهذا يدعم الاعتقاد في الية عمل اللقاح عند التلقيح بالاجنة الذي من شانه تحفيز المناعة المخاطية الموضعية IgA التي توجد في مخاطية الجهاز الهضمي والتنفسي.

المصادر

1.Alexander,D.J.(2000). Newcastle disease and other avian Paramyxovirus .Rev. Sci.tech.off.int.Epiz.,19(2), 443-462.

2.Ahmad,M.,Chaudhry,M.,Farooq,M.R.and Rashid,H.B.(2007) Evaluation of two vaccination schemes using live Vaccine against Newcastle disease in chicken. Turk. J. Vet. Anim. Sci.,31(3):156-169.

3.Alexander,D.J.and Senne,D.A.(2008) Newcastle disease and other avian Paramyxovirus ,and pneumovirus infection.In:Disease of Poultry,12th Edition,Saif Y.M, Fadly A.M., Glisson J.R.,McDougald L.R., Nolan L.K.andSwayne D.E. eds .Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA,75-116

4.Miller,P.J.,AFonso C.L.,SpackmanE.,Scott M.A., Pedersen S.C., Senne D.A., Brown J.D.,Fuller C.M., Uhart M.M., Karesh W.B., Brown I.H., Alexander D.J. and Swayne D.E. (2010).Evidence for a new Avian Paramyxovirus serotype-10 detected in Rockhopper Penguins from the Falkland Islands. J. Virol., 84(21),11496-11504.

5.Zahid,H.A.(1997). Field evaluation of Newcastle disease vaccin es in broiler.Iraqi J. of Microbiology, (9),(1).

6.Sharma,J.M.(1985).Embryo vaccination with infectious bursal disease virus alone or in combination with Marek's disease vaccine.Avian Dis.29:1155.

7.Ahmad,J.and Sharma, J.M. (1992). Evaluation of amodified –live Virus vaccine administered in ova to protect chickens against ND. Amj.Vet.Res,53, ,PP1999-2004.

8.Reddy S.k.,Sharma,J.M.,Ahmad J.,Reedy D.N.,McMillen J.K.,Cook S.M.,Wild M.A&Schwartz R.D. (1996). Protective efficacy of a recombinant herpesvirus of turkeys as in ovo vaccine against Newcastle and Mareks disease in specific-pathogen-free chicken.Vaccine,14(6),469-477.

9. Ston , H. ; Mitchell , B. and Brugh , M. (1997) . In ovo vaccination of chicken embryos with experimental Newcastle disease and avian influenza oil .emulsion vaccines . Avian Dis. 41: 856-863.

10.Office International des Epizooties (OIE) (2012). Newcastle disease.In Terrestrial Manual for diagnostic tests ,reagents and vaccines,3rd Ed.OIE,Paris,1-19.

11.STEEL J.,BURMAKINA S.V., THOMAS C.,SPACKMAN E., GARCIA-SASTRE A., SWAYNE D.E. & PALESE P. (2008). A combination in-ovo vaccine for avian influenza virus and Newcastle disease virus. Vaccine, 26 (4), 522–531.

12. جعفر ، نوال صالح (2002) .دراسة طريقة التلقيح في أجنحة الدجاج ضد مرض نيوكاسل وكمبورو . رسالة ماجستير ، كلية الطب البيطري – جامعة بغداد

13 . الساعدي ، ماجد يونس (2003) دراسة مقارنة لتلقيح اجنة الدجاج والأفراخ الفاقسة ضد مرض نيوكاسل . رسالة ماجستير ، كلية الطب البيطري – جامعة بغداد

14. Sharma , J. M. and Burmester , B.R. (1981) . Resistance to Marek's disease at hatching in chicken vaccinated as embryos with the turkey herpesvirus . Avian Dis. . 26 . 1: 134 – 149 .

15. Allan, W.H. ; Lancaster , J.E. and Toth , B . (1978)Newcastle disease Vaccines and Use food and Agriculture organization of the united nation , Rome .

16. Lensing , H.H. (1974) . Newcastle disease – live vaccine lasting Dev. Biol . Stand , 25 , 189 – 194 .

17. Hanson , R.P. (1980) . Newcastle disease . In :Isolation and Identification of Avian pathogen Hitchner , S.B. ; Domermu , H.C. parchase , H.G. and Williar , J.E. Eds2nd ed ., American Associated of Avian pathologists , U.S.A. Pp.63-66.

18 . خطاب ، نزار عبدالله ، أثير كامل كساب وصباح (1992) إدارة الدواجن وزارة التعليم العالي والبحث العلمي – مديرية دار الكتب للطباعة والنشر – جامعةالموصل.

19.Snedecar, G.W. and W. G. Cochran, (1968) . Statisticul methods . Iwa state uni. press .

20. Mebastion , T. ; Verstegen , S. ; Devaan , Leonardo , T.C. ;Oberorfer , A.R. and Schrier , C. (2001) . A Recombinant Newcastle disease virus with low level V protein expression IS Immunogenic and lacks pathogenicity for chicken embryos . Journal of Virology . 75 , 1 : 420 – 428 .

21. Ston , H. D. (1985) . Determination of heamagglutination activity recoverd from oil emulsion Newcastle disease vaccine as aperdiction of efficiency . Avi. Diseas. 29 . : 721-728.

22 . زاهد ، عبد الأمير حسين (1999) تقييم برنامجين مختلفين للتلقيح ضد مرض نيوكاسل في أفراخ البياض في العراق . مجلة الطبيب البيطري 90 : 51 – 58

23 . زاهد ، عبد الأمير ، ونبي ، منهل نعمان (2002) تمنيع أفراخ اللحم ضد مرض نيوكاسل باستخدام اللقاح الزيتي. المجلد 12 العدد 2 .

24.علاوي ، عائدة بُرع (2004) دراسة مقارنة للكشف عن الأضداد والنوعية لفايروس نيوكاسل في الدجاج والعاملين في حقول الدواجن رسالة ماجستير ، كلية الطب البيطري – جامعة بغداد .

25. Rhaman , M.M. Bari , A.S. ; Giasuddin , M. ; Islam M.R. ,Alam , J. Sil , G.G. and Rhaman , M.M. (2000) .Evaluation of maternal and humoral Immunity against of Poultry Science . (5): 161 – 163 .

26. Hanson , R.P. ; Splatin , J. and Jocobson , G. S. (1973). The viscerotropic pathotype of Newcastle disease virus Avian Disease 17 : 354 – 361 .

27. Chandra , R. ; Roa , V.D.P. ; villamados , J.C.G. ; Shukla ,S.K. and Banergee , P.S. (2001) . Newcastle disease. In : Dis of poultry and their control .

28. Timms , L. and Alexander , D.J. (1977) . Cell mediated immune response of chickens to Newcastle disease vaccines . Avian Pathology , 6 : 51 – 59 .

Prepration of oil inactivated Newcastle vaccine and using in ovo technology

Abstract

In this study ,eighty(80)fertile eggs taken from commercial breeders were used .These eggs were divided into(2)equal group,group (1) was vaccinated with prepaired oil inactivated vaccine &the second group as control group which given normal saline.Result show that can be used the oil inactivated vaccine to protect the chick embryo,which did not reveal any negative effect on the hatchbility & livability percentage.Heamagglutination Inhibition test(HI)&ELISA test were used,the result revealed increase of inhibitor antibodyes in group (1) with level of $P<0.05$ in comparative with group(2) at the age of 1,7,14 days after hatching.Early challenge test was used in 14 day after hatch to evaluate this vaccine the result show resistance of group (1) to challenge dose with virulent Newcastle virus & protective percent reach %93.33 compairtive with control group which give %26.66.