المجلة العراقية للعلوم البيطرية، المجلد ٢٣، عدد إضافي ١، ٢٠٠٩ (٤٧-٥١)
وقائع المؤتمر العلمي الخامس، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل

مقارنة الأضداد الناتجة من التلقيح بلقاحي أنفلونزا الطيور المبطل عترة H9N2 تجريبيا في أفراخ فروج اللحم باستخدام تقنية الاليزا

فنار ابلحد اسحق دانيال

فرع الأحياء المجهرية، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل، الموصل، العراق

الخلاصة

تضمنت هذه الدراسة قياس ومقارنة لمعيار الاضداد الناتجة عن التلقيح بنوعين من اللقاحات المبطلة لمرض أنفلونزا الطيورعترة H9N2،حيث استخدمت افراخ فروج لحم عدد ٩٠ قسمت بالتساوي الى ثلاثة مجاميع: الاولى لقحت بلقاح Jova zeit 7 بجرعة ٠,٣ مل / طير تحت الجلد عند عمر يوم واحد والثانية بلقاح FLUPASOL وبجرعة ٠,٢٥ مل /طير تحت الجلد وبنفس العمر اما الثالثة فكانت تمثل مجموعة السيطرة. بعدها تم جمع الدم بالاعمار(١،٧،١٤،٢١،٢٨،٣٥،٤٢) يوم لغرض الحصول على المصل، كما تم حساب معدل اوزان الافراخ في الاعمار (١،١٤،٢٨،٤٢) يوم من التجربة. ثم فحصت عينات المصل باستخدام تقنية الانزيم المناعي الممتز غير المباشر Indirect ELISA وأظهرت النتائج ارتفاعا في معيار الأضداد منذ اليوم ١٤ بعد التلقيح في كلا المجموعتين الأولى والثانية لكن كان هذا المعيار اعلى في المجموعة الاولى مقارنة بالمجموعة الثانية وبفرق معنوي واضح،اما نتائج الأوزان فلم يظهر فيها أي فرق معنوي يذكر بين المجاميع الثلاثة.

Comparison of antibodies produced by vaccination with inactivated avian influenza vaccines (H9N2) experimentally in broilers using ELISA technique

F. A. I. Danial

Department of Microbiology, College of Veterinary Medicine, University of Mosul, Mosul, Iraq

Abstract

This study included measuring of antibodies titers after vaccination with two inactivated avian influenza vaccines (H9N2).90 broiler chicks divided equally and randomly in to three groups :1st group vaccinated with Jova zeit 7 vaccine (0.3 ml / bird s.c. at one day age), 2nd group vaccinated with FLUPASOL vaccine (0.25 ml /bird S.c at the same age) and 3rd group control. The body weight of chicks in every group were calculated at (1,14,28,42) day of experiment and blood samples were collected after (1,7,14,21,28,35,42) days post-vaccination to obtain serum. indirect ELISA technique were used for the measuring of antibodies titer in the serum samples. the results showed increasing of antibodies titer (after 14 days from vaccination) in the 1st & 2nd groups but the antibodies titer in the 1st group is higher than the 2nd significantly.the result of body weight did not showed any significance between the three groups of the experiment.

Available online at http://www.vetmedmosul.org/ijvs

المقدمة

تصيب فيروسات الأنفلونزا نوع A الانسان وانواع عديدة من الحيوانات منها الخنازير والخيول والطيور والحيتان وتعتبر الطيور المائية المصدر الرئيسي لجميع فيروسات الانفلونزا التي تصيب الحيوانات الأخرى (1) في حين يعتبر الخنزير المضيف المهم لهذه الفيروسات والذي يكون حساس لكل من فيروس انفلونزا الانسان والطيور (2)، واعتمادا على امراضية فيروسات الانفلونزا في الدواجن تقسم ثانويا الى نوعين ممرضين هما مجموعة فيروسات الانفلونزا عالية الامراضية

HPAI حيث تشمل هذه معظم فيروسات ال(H5,H7) ولكن ليس جميعها (٣) والتي تسبب هلاكات عالية تصل الى ١٠٠٪ ومجموعة فيروسات قليلة الامراضية LPAI والتي تسبب علامات تنفسية بسيطة مع قلة انتاج البيض وبنسبة هلاكات قليلة (٤). لقد ظهر الوباء الذي تحدثه عترة H9N2 في مدينة هونك كونك في آذار ١٩٩٩ عندما تم عزل هذا الفيروس من طفلين مصابين به وهو الفيروس نفسه الذي اصاب طائر السمان في نفس المدينة بعد ذلك ونتيجة لسلسلة من الأبحاث لوحظ علاقة قوية بين عترة الH9N2 وH5N1 وهي ان ستة جينات لفيروس H9N2 والتي تشفر للمكونات الداخلية لهذا الفيروس مشابهة لجينات عترة الH5N1 المعزول عام ١٩٩٧ بالرغم من اختلاف المستضدات السطحية لهذين الفيروسين وقد تودي هذه العلاقة مستقبلا الى ظهور فيروس من نمط جديد قد يصيب الانسان (٥). إن استعمال اللقاح المقتول في السنوات الاخيرة اصبح شائعا وكثيرا حيث تم استخدام ٢٠ بليون جرعة لقاحية من انواع مختلفة من لقاحات الانفلونزا للسيطرة على المرض في الصين بالرغم من استحالة تلقيح كل طائر على انفراد وذلك بسبب كثرة اعداد الطيور الداجنة وتعقيدات نظم التربية وتجربة التلقيح هذه في الصين لعبت دورا مهما في الوقاية من الاصابة بعترة H5N1 من خلال التقليل من طرح الفيروس في البيئة وحماية الانسان من انتقاله من الدواجن الى البشر (٦).

لقد بدا انتشار مرض انفلونزا الطيور الناتج من عترة H9N2 بعد عام ١٩٩٠ وحدث المرض بشكل وباء واصاب البط والدواجن والرومي في المانيا عام ١٩٩٥ –١٩٩٨ وفي ايطاليا عام ١٩٩٤–١٩٩٦ واصاب الرومي في امريكا عام ١٩٩٥–١٩٩٦ (٧) وحديثا تم تسجيل الاصابة بهذا الفيروس في الشرق الاوسط في كل من باكستان (٨،٩) والسعودية (١٠) والإمارات (١١) وإيران (١٢،١٣) حيث ظهرت الإصابة بهذا الفيروس في المناطق العالية الكثافة في تربية الدواجن بعدها اتبعت هذه الدول إستراتيجية التلقيح ضد المرض (١٤)، وبعد عزل وتسجيل فيروس ال H9N2 في العراق من قبل (١٥) وكذلك الكشف عن أضداد هذا الفيروس في بعض قطعان الدجاج في محافظة نينوى (١٦) ونظرا للارتفاع الكبير في نسبة الهلاكات في قطعان الدواجن وبسرعة عالية فقد تم اللجوء الى التلقيح باللقاح المبطل لهذا الفيروس ولاجل ذلك فقد هدفت هذه الدراسة إلى قياس وتقييم الاستجابة المناعية الخلطية الناتجة عن التلقيح باللقاح المبطل لعترة الH9N2 في فروج اللحم باستخدام تقنية الاليزا للتعرف على معيار الاضداد الناتج من عملية التلقيح بنوعين من اللقاحات المبطلة المتوفرة في القطر ولنفس العترة أعلاه.

المواد وطرائق العمل

تم أستعمال علف الدواجن المركز في تغذية الافراخ طيلة فترة التربية و تم الحصول عليه من احد حقول تربية الدواجن العاملة في منطقة الحمدانية حيث كان العلف ضمن المواصفات الطبيعية. تم أستعمال ماء الحنفية الاعتيادي خلال تربية الافراخ طيلة فترة التجربة.

تم التعامل مع افراخ فروج اللحم بعد الحصول عليها من احد المفاقس العاملة في مدينة الموصل (مفقس الأمين) بعمر يوم واحد، وتمت تربية هذه الافراخ داخل الاقفاص مع توفير ظروف التربية الملائمة من حرارة ورطوبة وتهوية،علما ان التجربة اجريت للفترة من ١٢ نيسان ٢٠٠٩ وحتى ٢٣ ايار٢٠٠٩.

تم استعمال نوعين من اللقاحات المبطلة لعترة H9N2 وهما؛ لقاحJova zeit7، المنتج من قبل شركة جوفاك الاردنية (المركز الاردني للصناعات البيولوجية Jordan bio-industries center) ويعطى بجرعة ٠,٣ مل / طير (سعة العبوة ٣٠٠مل). ولقاح FLUPASOL، المنتج من قبل شركة باسوك الايرانية (Pasouk biological research and manufacturing company) ويعطى بجرعة ٠,٢٥ / طير (سعة العبوة ٢٥٠ مل).

تم استخدام أفراخ فروج لحم (عدد ٩٠) بعمر يوم واحد وقسمت هذه الافراخ بالتساوي الى ثلاثة مجاميع (٣٠ فرخ لكل مجموعة)، المجموعة الأولى: تم تلقيح افراخ هذه المجموعة بلقاح Jova zeit 7 الاردني المنشا بعمر يوم واحد وبجرعة ٠,٣ مل / طير تحت الجلد في منطقة الرقبة. المجموعة الثانية: لقحت افراخ هذه المجموعة بلقاح FLUPASOLالايراني المنشا بعمر يوم واحد وبجرعة ٠,٢٥ مل / طير تحت الجلد في منطقة الرقبة ايضا. المجموعة الثالثة: الأفراخ في هذه المجموعة كانت تمثل مجموعة السيطرة. بعدها تم جمع الدم من الأفراخ ومن المجاميع كافة بعمر (١،٧،١٤،٢١،٢٨،٣٥،٤٢) يوم لغرض الحصول على عينات المصل و إجراء اختبار الاليزا غير المباشر عليها.

تم إجراء اختبار الانزيم المناعي الممتز غير المباشر (Indirect ELISA) على عينات المصل للمجاميع كافة و بالاعمار الموضحة في اعلاه باستخدام العدة التشخيصية لهذا الاختبار والمجهزة من قبل شركة جوفاك الأردنية و أجري الاختبار حسب تعليمات هذه الشركة، بعدها تم قراءة النتائج باستخدام جهاز المطياف الضوئي (ELISA reader) عند طول موجي 405 نانوميتر (مختبر الأبحاث المركزي / كلية الطب البيطري / جامعة الموصل).

القيم القياسية لمعيار الاضداد في الKIT الخاص بأنفلونزا الطيور

Titer range	Antibodies status
436 or less	Negative

Suspect	437-655
Positive	655 or greater

أوزان الأفراخ

تم حساب أوزان الأفراخ في المجاميع الثلاثة في الأعمار(٤٢,٢٨,١٤,١) للتعرف على الفروقات في الأوزان إن وجدت بين هذه المجاميع.

التحليل الاحصائي

تم تحليل نتائج معايير الاضداد المقاسة باستخدام تقنية الإنزيم المناعي الممتز غير المباشر Indirect ELISA وأوزان الأفراخ إحصائياً باستخدام اختبار تحليل التباين (ANOVA) ومقارنتها باستخدام اختبار Duncan Test عند مستوى احتمالية 0.05 (١٧).

النتائج

يلاحظ في جدول ١ بان الاضداد الناتجة عن التلقيح بلقاح الـ7 Jova zeit والـ FLUPASOL في المجموعة الاولى والثانية على التوالي كان مرتفعا نسبيا مقارنة بمجموعة السيطرة وبدا هذا الارتفاع تدريجيا بعد التلقيح لكن هذا المعيار كان عاليا في المجموعة الاولى مقارنة بالمجموعة الثانية وبفرق معنوي واضح منذ اليوم الرابع عشر بعد التلقيح عند مستوى احتمالية ٠,٠٥، كما ان معيار الاضداد في المجموعة الاولى وصل الى القيمة الموجبة لمعيار الاضداد القياسي عند عمر ٢٨ يوم بعد التلقيح واستمر هذا المعيار مرتفعا حتى نهاية التجربة، اما معيار الاضداد في المجموعة الثانية فلم يرتفع كثيرا ولم يصل الى القيمة الموجبة لمعيار الاضداد القياسي طول فترة التجربة مما يدل بان الاستجابة المناعية كانت جيدة مع لقاح Jova zeit 7 وعلى العكس منها مع لقاح FLUPASOL، اما معيار الاضداد عند عمر يوم واحد فقد كانت نتيجته سلبية بالمقارنة مع القيمة القياسية لمعيار الاضداد (أي عدم وجود اضداد لمرض انفلونزا الطيور قادمة من الام). وفي جدول ٢ لم يلاحظ وجود أي فرق معنوي يذكر بين اوزان الافراخ في المجاميع الثلاثة طيلة فترة التجربة.

جدول ١: معيار الاضداد بتقنية الانزيم المناعي الممتز غير المباشر indirect ELISA وباستخدام لقاحين.

المجاميع	عمر ١ يوم قبل التلقيح*	العمر بالايام بعد التلقيح				
		٧	١٤	٢١	٢٨	٣٥	٤٢
المجموعة الأولى	٣١,٦±٤٠٣	٤,٧±٤٠٤ a	١٥,٦±٥٦٠ a	١٥,٧±٦٥٣ a	١٥,٥±٦٩٣ a	٧,٥±٧٠٧ a	٦,٧±٧٠١ a
المجموعة الثانية	١٨,٤±٣٩٠	٨,٧±٣٩٨ a	٢٠,٦±٤٥٨ b	١٦,٢±٥٧٣ b	٤,٥±٥٩٣ b	٧,٤±٥٩٢ b	٦,٧±٥٦٨ b
مجموعة السيطرة	١١,٦±٣٩٣	١٤,٢±٣٨٨ b	٢٠,٦±٣١٥ c	١٢,٥±٢١٤ c	١٩,٤±١٦٩ c	٢٠,٢±١٤٩ c	١١,٥±١١٨ c

** الاحرف المختلفة a,b,c ضمن العمود الواحد تعني وجود فرق معنوي عند مستوى احتمالية P≤0.05.

* عمر التلقيح، ELISA mean titers=ELISA units، القيم معبر عنها بالمعدل ± الخطأ القياسي.

جدول ٢: معدل أوزان الأفراخ مقاسا" بالغرام.

المجاميع	عمر ١ يوم قبل التلقيح	العمر بالأيام بعد التلقيح		
		١٤	٢٨	٤٢
المجموعة الاولى	٣,٢±٤٥,٢	٨,٣±١٩٤,٨	٧,٦±٦٠٤,٦	١٥,١±١٢٢٤,٤
المجموعة الثانية	١,٨±٤٣,٨	٥,٦±١٩٥,٢	٨,٤±٦٠١,٤	١٦,٢±١٢١٨,٦
مجموعة السيطرة	٢,٨±٤٦	٥,٩±١٩٢	٧,٤±٥٩٩	١٥,٢±١٢٢١,٦

القيم معبر عنها بالمعدل ± الخطأ القياسي.

المناقشة

إن اللقاح الفعال المحضر ضد مرض انفلونزا الطيور هو اللقاح الذي يبرهن قدرته في تحفيز الاستجابة المناعية والتي بدورها تحمي الطيور من المرض والخمج (١٨). ان اللقاحات التجارية الحالية لا توفر حماية كاملة ضد المرض لكن الدراسات التجريبية اظهرت بان استعمال اللقاحات بصورة صحيحة يمكن ان يحقق عدة اهداف منها الحماية من الاصابة وظهور المرض (العلامات السريرية) ومن ثم الموت،التقليل من طرح الفيروس الحقلي اذا ما اصيبت الدواجن الملقحة،منع انتقال الفيروس الحقلي عن طريق الاحتكاك،حماية الطيور من الجرعة الواطئة او العالية للفيروس الحقلي،اعطاء الحماية ضد الفيروسات

المتغيرة وزيادة مقاومة الطيور للاصابة بفيروس انفلونزوا الطيور(٢٠،١٩).لقد تم استخدام تقنية الإنزيم المناعي الممتز غير المباشر في قياس معيار أضداد مرض أنفلونزا الطيور كونها احد الاختبارات الأكثر حساسية وذا خصوصية عالية لأضداد مرض الأنفلونزا (٢١-٢٣).

ومن النتائج يتضح بان لقاح Jova zeit 7 أعطى معدلا لمعيار الاضداد اعلى مقارنة بلقاح FLUPASOL وهذا يعتمد على نوعية اللقاح،كفاءته،نقاوته ونسبة الامان فيه حيث ان نوعية اللقاح وشروط تحضيره يجب ان تتوفر في ذلك اللقاح وان تطبق اثناء تحضيره اعتمادا على البلد او المنطقة التي يصنع لها اللقاح (٢٤) ان ارتفاع معيار الاضداد كان تدريجيا مع كلا اللقاحين ووصل هذا المعيار الى القيمة القياسية لمعيار الاضداد عند عمر ٢٨ يوم مع لقاح ال Jova zeit 7 (٢٦،٢٥) وذلك لان فترة تكون المناعة الكفوءة تختلف بالاعتماد على عدد الجرع المعطاة وعمر الطيور ووقت التلقيح وكمية المستضد في الجرعة اللقاحية الواحدة (٢٧)، بينما لم يرتفع هذا المعيار في المجموعة الثانية ليصل الى القيمة القياسية لمعيار الاضداد. ان السبب في اختلاف المستوى المناعي بين اللقاحين يأتي نتيجة لاختلاف القابلية المستضدية لكلا اللقاحين وكذلك مكونات كل لقاح مثل نوع العامل المساعد (٢٩,٢٨) كما ان سبب انخفاض معيار الاضداد في المجموعة الثانية قد يعود لعدة اسباب تودي بدورها لفشل عملية التلقيح ومنها نوع اللقاح نفسه او اعطاء جرعة اقل من الجرعة المقررة او الحفظ والتعامل غير الجيد مع اللقاح او عدم اتباع تعليمات الشركة المصنعة او اخطاء في عملية التلقيح (٣٠،١٩). اضافة لذلك فان نسبة الحماية التي يوفرها اللقاح غير ثابتة لان اللقاح ليس بالمحلول السحري الذي يعطي حماية كاملة ضد أنفلونزا الطيور (٣١).

ولما كان الفيروس المعزول في العراق هو من نوع الH9N2 (٣٢،١٥) ومع تاكيد وجود اضداد لهذا الفيروس في قطعان الدواجن في محافظة نينوى (٣٣،١٦) فضلا عن وجود دراسة اخرى في نفس المحافظة أثبتت وجود اضداد لفيروس انفلونزا الطيورعترة H9N2 في الحمام ودور هذا الطائر كناقل طبيعي لهذا المرض (٣٤) لذلك فان التلقيح باللقاح المماثل لنفس العترة المعزولة هو من الاشياء الاساسية التي تقلل من احتمالية الاصابة بالفيروس والتقليل كذلك من طرحه من قبل القطعان الملقحة به وبالتالي الحد من انتشاره مع تضاؤل فرص حصول اعادة الترتيب له مع فيروسات انفلونزا اخرى وهذا هو احد الاهداف الاساسية المستحصلة من التلقيح ضد المرض (٣٥)، كما ان استعمال هذا اللقاح في العراق جاء بعد ان تم استعمال لقاح من نفس العترة في بعض دول الشرق الاوسط (٣٦) حيث ان النوعية الجيدة من اللقاح تحمي الدواجن من المرض وتزيد من مقاومتها له وتقلل من معدل طرح الفيروس اذا ما اصيبت الطيور الملقحة به (٣٧). ان عملية التلقيح تقلل فعليا من فرصة حدوث الطفرات الطبيعية او اعادة الترتيب للفيروس (٣٨). كما ان عملية التلقيح ضرورية جدا لان القطعان غير الملقحة تزداد فيها اعداد الفيروسات المتكاثرة وتطرح بالتالي كميات كبيرة من الفيروس والتي يمكن ان تصيب اعداد اكثر من الدواجن وربما الانسان (٣٩). وجاء تلقيح الافراخ بعمر يوم واحد وذلك لان تلقيح الطيور التي يكون فيها معيار الاضداد الامية منخفض او معدوم يجب ان يكون بهذا العمر وذلك لاعطاء حماية مبكرة ضد المرض كما توصي بعض الدراسات ضرورة اعادة التلقيح بعد ١٥-٢٠ يوم (٢٥) لان التلقيح هو الاداة الفعالة في الوقاية والسيطرة على مرض أنفلونزا الطيور مع تطبيق إجراءات الأمن الحيوي (٤١،٤٠).

شكر وتقدير

تم دعم البحث من قبل كلية الطب البيطري، جامعة الموصل.

المصادر

1. Juan O. Structure & function of the influenza A virus ribonucleo-protein : transcription & replication. Mongor Virol.2008; 26:168-186.
2. Ian H B. The role of pigs in interspecies transmission. Mongor Virol.2008; 27:88-100.
3. Alexander D J. A review of avian influenza in different bird species. Vet Microbial.2000;74 (1-2):3-13.
4. Capua I and Alexander D J. The challenge of avian influenza to the veterinary community. Avian Pathol.2006; 53: 189-205.
5. Lin Y P, Shaw M, Gregory V, Cameron K, Lim W, Klimov A, Subbarno K, Guan Y, Kruass S, Shortridge K, Webester R, Cox N and Hay A. Avian to human transmission H9N2 subtype influenza A viruses : relation between H9N2 &H5N1 human isolates. proc natl acad Sci. 2000; 97(17):9654-9658.
6. Hualan C, Zhigoa B, Jingfei W. Epidemiology & control of H5N1 avian influenza in China.Mongor Virol. 2008;27:27-40.
7. Bano S, Naeeem K and Malil S A. Evaluation of pathogenic potential of avian influenza virus serotype H9N2 in chickens. Avian Dis. 2003; 47: 817-822.
8. Naeem K, Ullah A, Manvell R J and Alexander D J. Avian influenza A subtype H9N2 in poultry in Pakistan. Vet Rec 1999;145: 560.
9. Banks J, Specidel E C, Harris P A and Alexander D J. Phylogenetic analysis of influenza A viruses of H9 hemagglutinin subtype. Avian Pathol. 2000; 29: 353-360.
10. Alexander DJ. Report on avian influenza in Eastern Hemisphere during 1997-2002. Avian Dis. 2003; 47: 792-797.
11. Aamir UB, Wernery U, Ilyushina N and Webster R G. Characterization of avian H9N2 influenza viruses from United Arab Emirates 2000 to 2003.Virol. 2007; 361: 45-55.
12. Vasfi Marandi M. and Bozorgmehri – Fard M H. Isolation of H9N2 subtypes of avian influenza viruses during an outbreak in chickens in Iran. Iranian Biomed. J. 2002; 61: 13-17.
13. Nili H and Asasi K. Natural cases and an experimental study of H9N2 avian influenza in commercial broiler chickens of Iran. Avian Pathol. 2002; 31: 247-252.
14. Jafer P, Mehdi V M , Javad A , Seyyad H M & Farid G. Pathlogical studies of A/chicken/Tehran/ZMT -173/99 (H9N2) influenza virus in commercial broiler chickens of Iran. Inter J Poult Sci.2008; 7(5):502-510.

١٥. النصراوي، هدى عبد الهادي علي،البنا،انطوان صبري،الخياط، رمزية محمد حسن.دراسة عن الاصابة بفيروس انفلونزا الطيور في الدجاج. مجلة القادسية لعلوم الطب البيطري.٢٠٠٥.المجلد ٤.العدد١ ص ٦-١٤.

١٦. العطار، مزاحم ياسين خليل.التحري عن الاجسام المضادة لفيروس انفلونزا الطيور في الدجاج في محافظة نينوى.المجلة العراقية للعلوم البيطرية. ٢٠٠٧.المجلد ٢١.العدد١ :٣٩-٤٤.

17. Steel R G D and Torrie J H. Principles and procedures of statistics 2nd ed , McGraw-Hill Company , Inc., London.1980.
18. Swayne D E& Kapczynski. Vaccines, vaccination & immunology for avian influenza viruses in poultry. In: avian influenza. Blackwell publishers.2008. Ames, Iowa , in press.
19. Swayne DE. Principles for vaccine protection in chickens & domestic water fowl against avian influenza :Emphasis on Asian H5N1 High pathogencity avian influenza.Annals of new york academy of sciences.2006. 1801: 174-181.
20. Bublot M, Pritchard N, Swayne D E, Selleck P, Karaca K, Suarez D L, Audonnet J C & Mickle T R.Development and use of foul pox vectored vaccines for avian influenza. Animals newyork academy sci.2006.1081:193-201.
21. Jin M, Wang G, Zhang R, Zhao S, Li H, Tan Y, and Chen H. Development of enzyme-linked immunosorbent assay with nucleoprotein as antigen for detection of antibodies to avian influenza virus. Avian Diseases.2004. 48(4): 870-8.
22. Wu R,Hu S, Xiao Z, Li D, Shi and D Bi. Development of indirect enzyme-linked immunosorbent assay with nucleoprotein as antigen for detection & quantification of antibodies against avian influenza virus. Veterinary research communications.2007.31:631-641.
23. Al Natour M Q and Abo Shehada M N. Sero-prevalence of avian influenza among broiler-breeder flocks in Jordan. Preventive Veterinary Medicine.2005. 70(1-2): 45-50.
24. OIE.Avian influenza.Manual of diagnostic tests & vaccines for terrestrial animals.http://www.oieint/ing/norms/ mmanual/ A_summry.htm?e1d11.oie: paris, france.2007.
25. Ka-Oud H A,Zakia M A & Mervat M. Kamel. Evaluation of immune response in AI vaccinated broiler chickens : Effect of biosecurity faults on immune response. International journal of poultry science.2008.7(4) :390-396.
26. Sultan H A and Hussien H A. The immune response of broilers vaccinated with different commercial H5N2 Avian Influenza Vaccines. 8th Sci.Conf. EVPA, Giza (Egypt), 10-13 March.2008.
27. Karunakaran D, Newman J A, Halvorson D A, &Abraham A. Evaluation of inactivated influenza vaccines in market turkeys. Avian diseases.1987.31:498-503.
28. Claassen J T M, Jonas E, Sahesti A , Farida A , Balk F and Bouma A. PD-50 Experiments demonstrate that avian influenza vaccine used in Indonesia differ greatly in protective capacity. An OIE\FAO\IZSVe Scientific Conference, Verona (Italy).2007.20-22 March, pp: 73.
29. Cristalli, A, Terregino C T, Lovg T H, Gilbert J, Lubbroth J and Capua I. Field and laboratory evaluation of a vaccination programme against H5N1 in water fowl. An OIE\FAO\IZSVe Scientific Conference, Verona (Italy). 20-22 March.2007. pp: 74.
30. Vegad J L. Biosecurity in (Poultry Diseases influenza virus vaccine with all eight genes from avian viruses.2004. 25: 7379-84.
31. Swayne DE. Current status of avian influenza with emphasis on pathobiology, ecology, disease diagnosis and control. 8th Sci. Conf. EVPA, Giza (Egypt), 10-13 March.2008.

٣٢. حسن، امين احمد صبار.دراسة وبائية وتشخيصية لمرض أنفلونزا الطيور في العراق. رسالة ماجستير /كلية الطب البيطري/جامعة بغداد.٢٠٠٧.

٣٣. جلميران، رصين علي حسن.دراسة احتمالية تواجد الاصابة بفيروس أنفلونزا الطيور من النوع المصلي A في الثورات المرضية عالية الهلاكات في حقول الدجاج.رسالة دبلوم عالي /كلية الطب البيطري / جامعة الموصل. ٢٠٠٩.

34. Al-Attar M Y, Danial F A, Al- Baroodi S Y. Detection of antibodies against avian influenza virus in wild pigeons and starlings. Journal of animals and veterinary advances.2008.7(4):448-449.
35. Suarez D L. Selection of vaccines strains for avian influenza vaccination. Proceeding of the American College of poultry veterinarians Work shop"highly pathogenic avian influenza,H5N1:An evolving global challenge "March ,26, 2006.Las Vegas. Nevada.
36. Naeem K, Siddiqe N ,Ayaz M & Jalalee A M. Avian influenza in Pakistan :Out break of low & high pathogenecity avian influenza in Pakistan during 2003-2006.2007.avian dis.51:189-193.
37. Tian G ,Zhang S ,Li Y , Bu Z , Lu P ,Zhou J ,Li C, Shi J , Yu K, Chen H. Protective efficacy in chickens ,geese & ducks of an H5N1 inactivated vaccine developed by reverse genetics. Virology.2005.341:153-162.
38. Food & agricultural organization of the united nations(FAO).FAO recommendations on the prevention , control & eradication of highly pathogenic avian influenza(HAPI) in Asia.September 2004.
39. Ellis T M, Hustas L, MacKenzie J S and Watson I M. Rapid detection of group specific influenza A virus antigen [avian influenza; fowl plague]. Australian Veterinary Journal.1988; 65(11): 357-358.
40. Lu J, Shi H, Liu X F, Zhang X, Chen S and Sun L. Generation of an attenuated H5N1 avian influenza virus vaccine with all eight genes from avian viruses. 2007; 25: 7379-84.
41. Ahmed A S A. Highly pathogenic avian influenza in Egypt: Epidemiology prevention and control. The 15th Congress and Exhibition of WVPA. Beijing(China), Oct., pp: 113.2007.