دراسةالاخمادالمناعي الناتج عن الاصابة بفايروس انفلونزا الطيور H9N2 في فروج اللحم

عائدة برع علاوي

فرع الاحياء المجهرية–كلية الطب البيطري –جامعة بغداد – العراق

الخلاصة

تضمنت هذة الدراسة اجراء تجربة مؤلفة من ثلاث مجاميع ,لقحت المجموعة الاولى المؤلفة من 15 فرخا بلقاح نيوكاسل الحي المضعف بعمر 10,20,30 يوم فقط عن طريق ماء الشرب,اما المجموعة الثانية المؤلفة من 15 فرخا ايضا فقد اجري لها اصابة تجريبية بفايروس H9N2(AMR.ANT/IRAQ/2005) بعداعادة تنميتة في اجنة البيض النامي وخلايا الزرع النسيجي اعطي للافراخ بعمر ثمانية ايام بمقدار 0.2 مل لكل فرخ وبجرعة $10^{8.6}$ELD50/0.1ml ثم لقحت بلقاح نيوكاسل الحي المضعف بعمر 10,20,30 يوم عن طريق ماء الشرب ايضا في حين تركت المجموعة الثالثة المؤلفة من 10 افراخ كمجموعة سيطرة(بدون تلقيح). قيست الاستجابة المناعية لافراخ مجاميع التجربةالثلاث بعمر 40 يوم بالاعتماد على فحصي اثباط التلازن الدموي والاليزا.اذاظهرت المجموعة الاولى معيارا اعلى في فحص التلازن الدموي والاليزا مقارنة بالمجموعة الثانية والثالثة.

Study of effect of immunosuppresion caused by H9N2 in broiler

Aida Bara Allawe
Dept. of microbiology- college of Vet. Med.- Baghdad University –Iraq

Summary

This study was concerned with conduction of experiment for these reason three groups of broiler chicks were used.
First group (which consisted of 15 chicks) was vaccinated with live attenuated vaccine (laSota strain) at age 10, 20, 30 days by drinking water. Second group (which consisted of 15 chicks) was infected experimentally with H9N2 (AMR.ANT/IRAQ/2005) $10^{8.6}$ LD50/0.1ml at age 8 day then vaccinated with live attenuated vaccine (LaSota strain) at age 10, 20, 30 days by drinking water .third group (which consisted of 10 chicks) was considered as a control group without vaccination.
Immune response in all chicks groups were estimated at age (40) days depending on Heamagglutination test and ELISA. The first group showed highest titer in HI and ELISA tests in comparison with second and third groups.

المقدمة

مرض انفلونزا الطيور مرض فايروسي شديد العدوى يصيب الانسان والحيوان على حد سواء لاسيما الطيور بمختلف انواعها البرية والداجنة اضافة الى الخنازير والحيوانات الاخرى ,اذيعدمن الامراض الواسعة الانتشار في مختلف انحاء العالم وواحدا من الاخطار التي تهدد العالم حاليا بامكانية حدوث وباء عالمي (1و2).

وقدسجل في الاونة الاخيرة حدوث اصابات في الدجاج سببتها عتر فايروس انفلونزا الطيور نمطH9N2 ظهرت في مناطق مختلفة من العالم منها جنوب افريقيا والولايات المتحدة الامريكية وكوريا وهونغ كونغ والصين (3) اذ اظهرت احدى الدراسات في هونغ كونغ ان فايروس H9N2 هوثاني اكثر الفايروسات انتشارا في اسواق الطيور خلال الانتشار الوبائي عام 1997 وقد تم عزله من حوالي 5%من الدواجن وبالرغم من ذلك فأن فيروس H9N2 له قابلية امراضية منخفضة مقارنة مع فايروسات الانفلونزا الاخرى نمط H5N2,H7N7,H2N2 وهذا لايمنع من حصول اصابات شديدة نتيجة تواجد العوامل المرضية الانتهازية (4),اما في العراق فقد تم عزل هذاالنمط من قبل (5) لاول مرة في القطروتم تشخيص اضداد الفايروس في امصال الدجاج

المصاب الذي عزل منة الفايروس واعاد (6) عزل فايروس الانفلونزا نمط H9N2 اذ استخدم فحص الـ PCR لاول مرة في القطر لتشخيص نماذج H9N2 المعزولة.

وفي دراسة للباحث (7) حول مرض انفلونزا الطيور نمط H9N2 في العراق اكد فيها ان فايروس انفلونزاالطيور نمط H9N2 يلعب دورا اساسيا كعامل مثبط للمناعة ومهيئا لتفشي الامراض الاخرى كمرض نيوكاسل ومرض التهاب القصبات المعدي وهي المسببات الرئيسية للهلاك في حقول الدجاج العراقية على طول الفترة الممتدة من عام 2004الى عام 2007.

من هنا جاءت هذة الدراسة مكملة للدراسات السابقة التي اجريت حول مرض انفلونزا الطيور نمط H9N2 اذ استهدفت هذة الدراسة التعرف على مدى تأثير الاصابة التجريبية بعترة الH9N2 على الاستجابة المناعية للقاح مرض نيوكاسل عند اصابة افراخ دجاج اللحم تجريبيا باالفايروس بعمر ثمانية ايام.

المواد وطرائق العمل

1- عترة فايروس H9N2 المستخدمة في الاصابة التجريبية

استخدمت عترة فايروس H9N2(AMR.ANT/IRAQ/2005) المعزولة محليا في العراق من قبل د.امين احمد صبار و د.انطوان صبري البنا.

وقد تم تمريرها عدة تمريرات في اجنة البيض النامي وخلايا الزرع النسيجي ثم اجري لها فحصي التلازن الدموي واثباط التلازن الدموي باستخدام مصل ممنع مرجعي مضاد لفايروس H9N2 (هولندي المنشأ) ,كما تم فحص الفايروس باستخدام العدة التشخصية السريعة المستوردة من شركة Anigen الكورية.

2-لقاح نيوكاسل المضعف عترة LaSota المستخدم في تمنيع افراخ التجربة

استخدم لقاح نيوكاسل المضعف عترة LaSota المنتج من شركة الكندي لانتاج اللقاحات والادوية البيطرية في تمنيع افراخ التجربة اعطي للافراخ عن طريق ماء الشرب.

3-الافراخ المستخدمة في التجربة

الافراخ المستخدمة في التجربة افراخ لحم تم الحصول عليها من مفقس الراشدية .ربيت الافراخ في وحدة التجارب التابعة لمعهد المصول واللقاحات بمساعدة د.امين احمد صبار اذ وضعت الافراخ في اماكن معزولة عن بعضها البعض.

4-تصميم التجربة

استخدم (40) فرخا من افراخ دجاج اللحم قسمت الى ثلاث مجاميع:

1-المجموعة الاولى:تتألف من 15 فرخا تم تلقيحها بلقاح نيوكاسل عترة LaSota بعمر 10,20,30 يوم فقط وعن طريق ماءالشرب .

2-المجموعة الثانية: تتألف من 15 فرخا اجري لها اصابة تجريبية بعترة H9N2 اذ اعطي للافراخ بعمر ثمانية ايام بمقدار 0.2 مل لكل فرخ وبجرعة $10^{8.6}$ELD50/0.1ml ثم تم تلقيحها بلقاح نيوكاسل عترة LaSota بعمر 10,20,30 يوم فقط وعن طريق ماء الشرب .

3-المجموعة الثالثة: تتألف من 10 افراخ لم يتم تلقيحها باي لقاح وتركت كمجموعة سيطرة.

5-جمع نماذج الدم من افراخ التجربة

جمعت نماذج الدم من افراخ التجربة بعمر 40 يوم من الوريد الجناحي وبمعدل 7 عينات من كل مجموعة ، آخذت عينات الدم من القلب مباشرة ومن الوريد الجناحي وبمعدل 1-2 مل للعينة الواحدة حيث تم وضعها في أنابيب اختبار معقمة تركت بصور مائلة مدة ساعة واحدة في درجة حرارة الغرفة تم بعد ذلك فصل المصول باستخدام جهاز الطرد المركزي (1500 دورة /الدقيقة) مدة 30 دقيقة ثم جمعت الأمصال في أنابيب بلاستيكية معلمة حسب المجاميع حفظت في درجة -20 مْ بعد ذلك فحصت باختباري أثباط التلازن الدموي والاليزا.

6-قياس الاستجابة المناعية لمجاميع افراخ التجربة:

تم قياس الاستجابة المناعية لافراخ مجاميع التجربة بالاعتماد على اختباري اثباط التلازن

الدموي والاليزا وكما يأتي:

1-اختبار اثباط التلازن الدموي

اجري اختبار اثباط التلازن الدموي(طريقة بيتا)(8) لقياس المناعة الاموية للافراخ بعمر يوم كما اجري هذا الاختباراللمصول التي تم جمعها من افراخ مجاميع التجربة بعمر 40يوم للكشف عن الاضداد النوعية لفايروس نيوكاسل باستخدام فايروس نيوكاسل عترة LaSota باستخدام اطباق المعايرة الدقيقة.كما اجري اختبار اثباط التلازن الدموي للكشف عن اضداد فايروس الانفلونزا نمط H9N2 في امصال افراخ المجموعة الثانية (التي تم اصابتها تجريبيا بفايروس الانفلونزا نمط H9N2) وكذلك المجموعة الاولى الملقحة بلقاح نيوكاسل فقط ومجموعة السيطرة باستخدام اطباق المعايرة الدقيقة وباستخدام فايروس الانفلونزا عترة H9N2 المحلية.

2-**اختبارالاليزا**

استخدم اختبار الاليزا للكشف عن الاضداد النوعية لفايروس نيوكاسل في مصول افراخ مجاميع التجربة بعمر 40 باتباع تعليمات الشركة المنتجة*

اذ تم بهذين الاختبارين مقارنة الاستجابة المناعية للقاح مرض نيوكاسل لافراخ المجموعة الاولى (الملقحة بلقاح نيوكاسل فقط) مع الاستجابة المناعية للقاح مرض نيوكاسل للمجموعة الثانية (التي اجري لها اصابة تجريبية بعترة H9N2 المحلية) مع الاستجابة المناعية للمجموعة الثالثة (مجموعة السيطرة)التي لم يتم تلقيحها باي لقاح .لغرض دراسةمدى تأثير الاخماد المناعي الذي تحدثة الاصابة بعترة H9N2 على الاستجابة المناعية للقاح مرض نيوكاسل.

النتائج

1–نتائج اعادة تنمية عترة فايروس H9N2 المستخدمة في الاصابة التجريبية

اظهرت نتائج اعادة تنمية فايروس الانفلونزا نمطH9N2 نتيجة موجبة في اختبار التلازن الدموي وبعيار بلغ 256وحدة تلازنية كما اعطى نتيجة موجبة بأختبار اثباط التلازن الدموي وبأستخدام مصل ممنع مرجعي مضاد لفايروس الانفلونزا نمطH9N2 كما اعطى نتيجة موجبة بفحص العدة التشخصية السريعة المستوردة من شركة Anigen الكورية.

2-نتائج اختباراثباط التلازن الدموي

اظهرت نتائج اختبار اثباط التلازن الدموي لقياس المناعة الامومية الخاصة بفايروس نيوكاسل نتيجة موجبة وبمعيار بلغ ثمان وحدات تلازنية.

اما نتائج اختبار اثباط التلازن الدموي للكشف عن الاضداد النوعية الخاصة بفايروس نيوكاسل في المصول الخاصة بأفراخ مجاميع التجربة فيمكن توضيحها بالجدول (1)

* Synbiotic corporation.

جدول (1) :نتائج اختبار اثباط التلازن الدموي للكشف عن الاضداد النوعية لفايروس نيوكاسل في مصول افراخ التجربة بعمر 40 يوم

ت	مجاميع التجربة	اختبار اثباط التلازن الدموي (تسلسل العينات)	المعدل
1	**المجموعة الاولى**	**1 2 3 4 5 6 7**	**21.4**
2	**المجموعة الثانية**	2 4 8 8 32 32 64 222 4 4 16 16	**6.5**
3	**المجموعة الثالثة**	0 0 20 2 2 2	**1.14**

اما نتائج اختبار اثباط التلازن الدموي للكشف عن الاضداد النوعية الخاصة بفايروس الانفلونزا نمطH9N2 لنفس العينات السابقة فيمكن توضيحها بالجدول (2)

جدول (2): نتائج اختبار اثباط التلازن الدموي للكشف عن الاضداد النوعية الخاصة بفايروس الانفلونزا نمطH9N2 في مصول افراخ مجاميع التجربةبعمر 40 يوم

ت	مجاميع التجربة	اختبار اثباط التلازن الدموي(تسلسل العينات)						
		1	2	3	4	5	6	7
.1	**المجموعة الاولى**	–	–	–	–	–	–	–
.2	**المجموعة الثانية**	+	+	+	+	+	+	+
.3	**المجموعة الثالثة**	–	–	–	–	–	–	–

3-نتائج اختبار الاليزا:

اظهرت نتائج الاليزا اتفاقا مع نتائج اختبار اثباط التلازن الدموي كما هو موضح في الجدول (3)

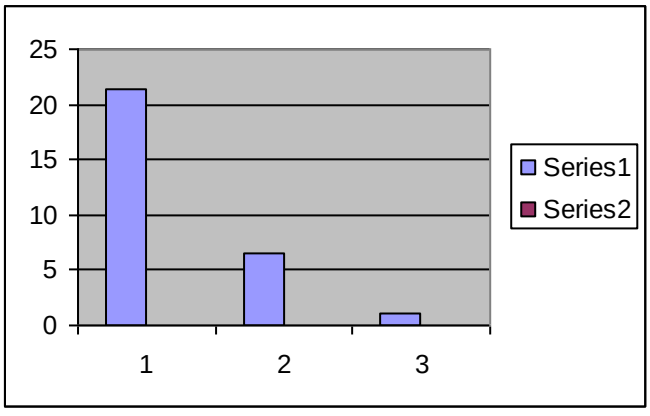
جدول (3): نتائج فحص الاليزا لافراخ مجاميع التجربة بعمر 40 يوم

مجاميع التجربة	معيار فحص الاليزا(تسلسل العينات)							المعدل
	1	2	3	5	5	6	7	
المجموعة الاولى	0	393	464	731	1299	1392	924	886.1
المجموعة الثانية	0	0	0	470	629	809	972	411
المجموعة الثالثة	0	0	0	0	0	0	0	0

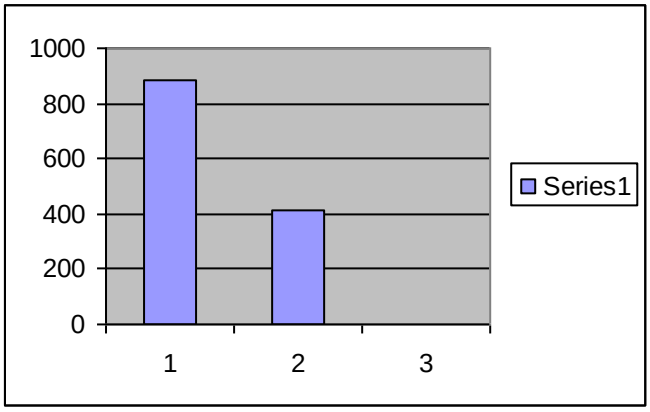
4-نتائج مقارنة الاستجابة المناعية لافراخ مجاميع التجربة:

اظهرت نتائج مقارنة الاستجابة المناعية للقاح مرض نيوكاسل بين مجاميع افراخ التجربة في اختبار اثباط التلازن الدموي وفي عمر (40) يوم تفوقا لصالح المجموعة الاولى(الملقحة بلقاح نيوكاسل فقط) وبفارق معنوي قدرة $p>0.01$ عن المجموعة الثانية(التي اجريت لها اصابة تجريبية بفايروس الانفلونزا نمط H9N2 والثالثة (مجموعة السيطرة) كما هو موضح في الشكل(1) .

كما اظهر اختبار الاليزا وفي نفس العمر تفوقا لصالح المجموعة الاولى وبفارق معنوي قدرة $p>0.01$ عن المجموعة الثانية والمجموعة الثالثة كما هو موضح في الشكل(2).



شكل(1): نتائج مقارنة الاستجابة المناعيةللقاح مرض نيوكاسل بين مجاميع افراخ التجربة الثلاث باختبار اثباط التلازن الدموي



شكل(2): نتائج مقارنة الاستجابة المناعية للقاح مرض نيوكاسل بين مجاميع افراخ التجربة الثلاث باختبار الاليزا

المناقشة

احدث فايروس انفلونزا الطيور نمط H9N2 اصابات مرضية في الطيور الداجنة لاسيما الدجاج ,البط والديك الرومي ادت الى حدوث خسائراقتصادية كبيرة في دول عديدة منها دول قارة اسيا تمثلت بارتفاع نسبة الهلاكات وانخفاض انتاج البيض في الدول المجاورة منها تركيا ,ايران والمملكة العربية السعودية (9) ويعد فايروس انفلونزا الطيور نمط H9N2 من الفايروسات ضعيفة الضراوة الاانها تؤدي دورا كبيرا في تثبيط المناعة لدى الطيور الداجنة لكون فايروس الانفلونزا يصيب الخلايا المبطنة للقناة التنفسية المغطاة بمادة المخاطين(mucin) التي تشكل الحاجز الدفاعي في الجزء العلوي من القناة التنفسية ولاحتواء فايروس الانفلونزا على انزيم النيورامنديز فانة يشطر الـneuraminic acid ويدمر الحاجز المكون من المخاطين وبالتالي تتكشف مستقبلات حامض ال sialic acid الموجود تحتة فيكون عرضة للاصابات الاخرى (10), اذ وجد ان تفشي معظم الامراض التي تصيب الدواجن وفي مقدمتها مرض نيوكاسل والتهاب القصبات المعدي غالبا مايكون في المناطق الموبؤة بفايروس انفلونزا الطيور نمط H9N2 مما ادى الى ظهور اصابات كثيرة بالمرض فعلى الرغم من اتباع برنامج مدروس في السيطرة على مرض نيوكاسل بوساطة التلقيحات المتوالية مما ادى الى تكوين مناعة جيدة ضد مرض نيوكاسل الا انها سرعان ما تهبط بسبب الاصابة بفايروس انفلونزا الطيور نمط H9N2 مما ادى الى استفحال مرض نيوكاسل الامر الذي الحق خسائر كبيرة بصناعة الدواجن(7) من هنا صممت هذة الدراسة للتعرف على تأثير الاصابة التجريبية بعترةH9N2 المعزولة محليا على الاستجابة المناعية للقاح مرض نيوكاسل فمن ملاحظة نتائج فحصي اثباط التلازن الدموي

والاليزا نجد ان المجموعة الاولى الملقحة بلقاح نيوكاسل فقط اعطت اعلى نسبة من الاضداد المثبطة للتلازن وكذلك اعلى قيمة في فحص الاليزا مقارنة بالمجموعة الثانية والثالثة اذ نجد ارتفاعا لمستوى المناعة الخلطية وفي كلا الاختبارين (اثباط التلازن الدموي والاليزا) بمستوى من شانه توفير الحماية من مرض نيوكاسل وهو ماشار اليه (11) في حين اظهرت المجموعة الثانية مستوى مناعي منخفض والسبب يعود لاصابتها تجريبيا بفايروس الانفلونزا نمط H9N2 اذنجد ان المجموعةالثانية اعطت مستوى مناعي اقل من المجموعةالاولى في كلا الاختبارين والسبب يعود لاصابتها في وقت مبكر الامر الذي ادى الى قلة الاستجابة المناعية للقاح مرض نيوكاسل (7) كما اظهرت نتائج الاليزا اتفاقا مع نتائج فحص اثباط التلازن الدموي اذ نستنتج من خلال النتائج التي تم الحصول عليها من كلا الفحصين (اثباط التلازن الدموي والاليزا) ان لفحص الاليزا حساسية كبيرة في قياس الاضداد المعادلة للفايروس في حين يظهر فحص اثباط التلازن الدموي الاضداد المثبطة للتلازن فقط وهذا يفسر لنا الارتفاع في معيار فحص الاليزا مقارنة بفحص اثباط التلازن الدموي ولنفس العينات التي تم فحصها (12).

المصادر

1-Swayane, D.E.;Senne,D.A. and Beard,C.W.(1998).Avian Influenza in: Isolation and identification of avian pathogens, 4th ed. Edited by Swayane,D.E.;Glisson,J.R.;Jackwood,M.W.;pearson,J.E.and Reid, W.M. American Association of Avian Pathologists. U.S.A. Pp: 150-155.

2- Jawetz, E.; Melnick, J. and Adelberg, E. (2004).
Orthomyxoviruses (influenza viruses). In: Medical microbiology, 23st ed.
Pp. 536-549.

3-Gibbs, W.W. &Soares, C. (2005).Preparing for a Pandamic.Scientific American, p: 23-31.

4-Bano, S.; K.Naeem & Malik, A. (2002).Avian Influenza in: Fifth international symposium. University of Georgia, Athens, GA.

5-النصراوي, هدى عبدالهادي علي (2002). دراسة حول الاصابة بفايروس الانفلونزا في الانسان والطيور-رسالة ماجستير-كلية الطب البيطري -جامعة بغداد.

6-صبار, امين احمد (2007) .دراسة وبائية وتشخيصية لمرض انفلونزا الطيورفي العراق- رسالة ماجستير-كلية الطب البيطري -جامعة بغداد.

7-KHamas, E.J. (2007).Avian influenza (H9N2) outbreak in Iraq. Iraqi Vet.Med.Journal.Vol.31.NO.2.

8- Allan, W.H.; J.E. Lancaster, and B.Toth. (1978). Newcastle disease Vaccines, their production and use. F.A.O. Rome.

9- Alexander, D. J. (2000).A review of avian influenza in different bird species.Vet.Microbiology.74:3-13.

10- Flint,S.G.; L.W. Enquist, and V. Racaniello, (2004) .Principles of Virology .Molecular biology ,Pathogenesis and Control of animal-viruses , Second- edition, AMS Press,Washington ,USA .

11- Kim, J.H.; Y.O. Rhee; C.S. Song, and S. Namgoong. (1989).Early Vaccination of one day old broiler chicks against Newcastle disease using inactivated oil or gel adjuvant vaccine and / or live B1 vaccine . The research reports of the rural development administration (Korea R).31:12-18.

12-Reynolds, D.L. and Maraqa, A.D. (2000a).Protective Immunity against Newcastle Disease The role of antibodies specific to Newcastle disease virus polypeptides .Avi. Dis.44:138-144.