

تطبيق طريقة التلقيح في أجنة الدجاج ضد مرض نيوكاسل ونيوكاسل وكمبورو*

عبد الامير حسين زاهد نوال صالح جعفر أنطوان صبري البنا
فرع الأمراض فرع الأمراض فرع الاحياء المجهرية

كلية الطب البيطري - جامعة بغداد

الخلاصة

تعد هذه الدراسة المحاولة الاولى في قطرنا العراق وذلك في تطبيق تلقيح اجنة الدجاج لحماية الافراخ من الامراض الفايروسية في الطيور ، فقد تمت الدراسة في تطبيق طريقة تلقيح الاجنة وذلك باستخدام (150) جنين من امهات لحم تجارية اعمارها (18) يوماً ، قسمت الى ثلاث مجاميع متساوية ، لقحت المجموعة الاولى منها بلقاح نيوكاسل (عتره - B1) ، المجموعة الثانية بلقاحي نيوكاسل وكمبورو المزدوج (عتره - B1 ، وعتره - Lukert) وذلك بحقن اللقاح في كيس الامينون ، اما المجموعة الثالثة فحقنت بمحلول دارى الفوسفات المعقم وهذه عدت مجموعة سيطرة. بينت النتائج ان اللقاحات المستخدمة في حقن الاجنة لم تكن ذات تأثير سالب على نسبة الفقس وحيوية الافراخ. استخدم اختبار اثباط التلازن الدموي ، واختبار الاليزا ، واختبار المتحدي وذلك لقياس المستوى المناعي للافراخ الملقحة بلقاح نيوكاسل ، وبلقاحي نيوكاسل وكمبورو المزدوج وكذلك افراخ السيطرة ، وقد بينت النتائج على الرغم من انخفاض معدلات الاضداد لاختباري اثباط التلازن الدموي والاليزا بعمر (28) يوماً إلا ان الافراخ في المجموعتين الملقحتين قد قاومت اختبار التحدي بفايروس نيوكاسل الضاري ، وذلك بعمر (28) يوماً على حين بلغت نسبة الهلاك في مجموعة السيطرة (60%) .

Study Of Chick Embryo Vaccination Against Newcastle And Newcastle With Gumboro

Abdel Ameer H.Zahid Nawal Salih Jafer Anton S.AL- Bana
Pathology Dep. Pathology Dep. Microbiology Dep.

Coll.of Vet.Med.Baghdad University

Summary

This study is considered the first trail study in our country to apply In ovo-vaccination to immunize chicks against avian viral diseases. This method was conducted by using 150 chick embryos classified into three equal groups (50 embryo each group). The first group was inoculated with Newcastle disease virus-NDV (B1-strain). Second group was vaccinated with NDV. and GV(Gambaro virus). All vaccinated groups were inoculated in the amniotic sac, the

third group (control group) was inoculated with sterile phosphate buffered saline. Result should the both vaccine did not reveal any negative effect on the percentage of hatchability and liaviability of the vaccinated chicks.

Hemagglutination inhibition (HI) , ELISA and challenge test were used to evaluate the level of immunity in chicks vaccinated with (NDV.) alone and (GV.) & (NDV.) double vaccine beside the control group chicks. The result revealed in spite of lower level of mean antibody titer of HI and ELISA in age of 28 days the two vaccinated group were resistant to challenge with virulent NDV. with 60% mortality rate in the control group.

المقدمة

تطورت البحوث والدراسات عن أهمية تحقيق الحماية الكافية للأفراخ فقد أثبتت الدراسات في السنوات الأخيرة ان لقاح نيوكاسل الحي المضعف يمكن اعطاؤه عن طريق الحقن في أجنة الدجاج الخالي من المسببات المرضية (Specific Pathogen free- SPF) وذلك بعمر (18) يوماً من مدة الحضن . كما ان الأفراخ التي تفقس من البيض المحقون باللقاح تكون مقاومة للإصابة بفيروس نيوكاسل الضاري(1) . ولم تقتصر هذه التقنية الحديثة على مرض نيوكاسل بل شملت كثيراً من الامراض ومنها مرض كمبورو فهو الاخر لايزال يصيب حقول الدواجن لذا أخذت البحوث والدراسات التي أجريت لإمكانية تمنيع الافراخ ضد مرض كمبورو بوساطة تلقيح الاجنه قد اخذت حيزاً كبيراً من بين طرائق التلقيح المتبعه حالياً في العالم لما لها من فوائد تشمل : مقاومة مبكرة للجنين ، وحقن جرعة موحدة من اللقاح لكل بيضة ، وتقليل الكلفة والجهد مع قلة التلوث (2).

ونظراً لما حققته هذه البحوث والدراسات من نجاح هذه الطريقة على الامراض الفايروسية المهمة في أمريكا وأوربا كان من الضروري التخطيط لاجراء دراسة تجريبية اولية لهذا النوع من التلقيح في ظروف قطرنا العزيز، وذلك لاثبات مدى احتمالية حماية الافراخ من التعرض لمرضي نيوكاسل وكمبورو وذلك باستخدام تقنية تلقيح الاجنه معتمدة على حقن اللقاح مره واحدة بعمر (18) يوماً من مدة الحضن . ولهذا السبب شملت الدراسة اجراء عملية تلقيح اجنه بيض الدجاج بعمر (18) يوماً بلقاح نيوكاسل المفرد ، ونيوكاسل وكمبورو مزدوجاً. وفحص الاستجابة المناعية لمرض نيوكاسل ، وذلك باختبار اثباط التلازن الدموي ، واختبار الاليزا ، واختبار التحدي.

المواد وطرائق العمل

اجري البحث في كلية الطب البيطري / جامعة بغداد للمدة من 2/1 لغاية 2001/ 3/20 من اجل تقييم تلقيح بيض الدجاج ولاول مرة محليا باستخدام بيض تفقيس تجاري من أمهات دجاج لحم فاو برو وتم تجهيزة من شركة الاخاء . كما استخدم لقاح نيوكاسل - عترة B1 مجهز من شركة الكندي مجفف (Lyphoalized) في عبوة زجاجية تحوي (2000) جرعة .

ولقاح كمبورو-عترة Lukert مجهز من د.غنيمة صادق محمد جواد (كلية العلوم - جامعة بغداد) على شكل سائل في عبوة زجاجية تحوي 500 جرعة / 1 مل ، المحضر من الخلايا الليفية لجنين الدجاج (Chicken embryo fibroblast-C.E.F) في الزرع النسيجي والمعاير بجرعة (103TCID50) الجرعة الخامجه ل 50% من خلايا الزرع النسيجي (Tissue Culture infective dose) . تم الحصول على فايروس نيوكاسل الضاري مجهز من د. مزاحم ياسين خليل العطار استاذ مساعد / كلية الطب البيطري / جامعة الموصل .

حضان البيض: تم حضان 150 بيضة مخصبة في الحاضنة حتى حين التفقيس بعمر 18 يوماً من مدة الحضان وتم تقسيمها الى ثلاث مجاميع متساوية .

طريقة حقن البيض :تم حقن البيض المخصب بعمر (18) يوماً من مدة الحضان بعد التأكد من حيوية الاجنة ، وذلك باستخدام الكاشف الضوئي (Candle) وتحديد مركز الفسحة الهوائية الذي يمثل مكان الحقن حسب طريقة (3) وتعقم منطقة الفسحة الهوائية بمحلول اليود (Germ Iodine) وتنقب قشرة البيضة بثاقبة ومن ثم حقن اللقاح بمقدار (0.1) مل باستخدام محقنة طبية بسعة (1) مل وابرة بطول (25) سم وقطر (23G-gauge) وادخال الابرة باكملها لضمان وصول اللقاح الى كيس الامنيوتك المحيط بالجنين ، بعد اتمام حقن اللقاح يتم تغطية الثقب بالشمع وارجاع البيض للحاضنة حتى حين الفقس .

ولاجل ذلك تم اجراء تصميم دراسة تجرية تلقيح أجنة الدجاج بلقاحي نيوكاسل وكمبورو بما يأتي :

المجموعة الاولى : لقحت بلقاح نيوكاسل - عترة B1 . (50 EID 7.5 / 10 0.1 مل)

المجموعة الثانية : لقحت بلقاحي نيوكاسل وكمبورو - عترة B1 (50 EID 7.5 / 10 0.1 مل) و Lukert . (50 TCID 4 / 10 0.1 مل)

المجموعة الثالثة : حقنت بمحلول دارى الفوسفات المعقم .

مكان التربية : بعد فقس البيض نقلت الأفراخ الى وحدة تربية الدواجن في كلية الطب البيطري مع تهيئة مستلزمات التربية كافة .

معايرة لقاح نيوكاسل:تمت معايرة لقاح نيوكاسل باستخدام اجنة دجاج بعمر (9) أيام لمعرفة الجرعة الخامجة ل (50%) من الاجنة (Embryo infective dose-EID50) حسب طريقة (4) وتم حساب الجرعة الخامجة ل (50%) من الاجنة حسب طريقة (5) . معايرة فايروس نيوكاسل الضاري :تمت معايرة الفايروس في أجنة دجاج بعمر (9) أيام لمعرفة الجرعة القاتلة ل (50%) من الاجنة (Embryo Lethal dose-ELD50) مع إتباع طريقة معايرة لقاح نيوكاسل نفسه وتحديد معيار الفايروس حسب طريقة (5) .

حساب نسبة الفقس : تم حساب نسبة الفقس للمجاميع الثلاث كافة ، وذلك باستخراج النسبة المئوية لكل مجموعة حسب (6). حساب حيوية الافراخ :تم حساب حيوية الافراخ بملاحظة ومراقبة الافراخ الى عمر (7) أيام بعد الفقس وتسجيل الحالات الهالكة حسب (1). اختبار التلازن الدموي : استخدمت العترة اللقاحية La Sota لاجراء هذا الفحص حسب طريقة (7). اختبار تثبيط التلازن الدموي : تم إجراء الاختبار باستعمال فايروس عترة (La Sota) ذات معيار (8) وحدات تلازن دموي حسب الطريقة التي ذكرها (7). جمع عينات الدم وفصل المصل: سحبت عينات الدم من الافراخ عشوائياً بمعدل 15 عينة لكل مجموعة .

اختبار التحدي: تم إعطاء فايروس نيوكاسل الضاري ذي معيار ELD50 0.1/107.4 مل بمقدار (0.2) مل بالتنظير بالمنخرين ، العين والفم لكل طير وللمجاميع كافة وبعمر (28) يوماً وتمت ملاحظة العلامات السريرية وتسجيلها للطيور وإجراء الصفة التشريحية للطيور الهالكة على مدى اسبوعين بعد اعطاء الفايروس. حساب مؤشر الحصانة :تم حسابها على وفق (8). تقنية الانزيم المناعي الممتز غير المباشر (Indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay-ELISA) للتحري عن الاضداد الخاصة لمرض نيوكاسل ، وأجري الفحص بإتباع التعليمات الموصى بها من المختبر المنتج للعدة (KIT) *

التحليلات الإحصائية : استخدم تحليل التباين (Analysis of Variance) وفحص (F-test) لبيان الفروقات بين المجاميع والمعاملات المقارنة ، تبع ذلك اجراء فحص مجال الثقة 95% للمقارنات المتعددة وفحص اصغر فرق معنوي (5% و 1%) لغرض تحديد مواقع الاختلافات بين معدلات المعاملات المختلفة ، واستخدم ايضاً اختبار مربع كاي (Chi-Square) لتقدير الفروقات الاحصائية للهلاك (9) .

* عدة اختبار الانزيم المناعي الممتز نوع ProFlok صنعت في الولايات المتحدة الامريكية (KPL) - (Kirkegaard and Perry Laboratories) مجهزة من مختبرات الشركة العامة للبيطرة .

النتائج

نسبة الفقس في الأجنة الملقحة: اظهرت نتائج الأجنة للمجموعتين الملقحتين المختلفة نسبة فقس واحدة بلغت (86%) ولم تشكل فرقاً معنوياً عن نسبة فقس أجنة مجموعة السيطرة البالغة (88%) كما موضح في الجدول رقم (1).

الجدول (1) تأثير اللقاح على نسبة فقس الأجنة عند تلقيحها بعمر (18) يوماً

المجاميع	نوع اللقاح	الجرعة	عدد الأجنة المحقونة / عدد الأجنة الفاقسه	نسبة الفقس
المجموعة الاولى	* لقحت بلقاح نيوكاسل (عتره - B1)	107.5EID50	43/50	% 86a**
المجموعة الثانية	لقحت بلقاهي نيوكاسل وكمبورو معاً (B1- Lukert)	(ND) 107.5EID50 (IBD)104 TCID50	43/50	% 86a
المجموعة الثالثة	حقنت بمحلول دارئ الفوسفات المعقم (سيطرة)	-	44/50	% 88a

* حقنت الأجنة في تجويف الامنيون.

** a = يمثل عدم وجود فرق معنوي بين نسب فقس المجاميع الثالثة. حيوية الافراخ: سجلت حيوية الافراخ خلال الاسبوع الاول من الفقس حيث لم تظهر المجموعتان الاولى هلاكات خلال الاسبوع الاول على حين اظهرت المجموعة الثانية هلاك طيرين اما المجموعة الثالثة فظهرت هلاك طير واحد .

نتائج معيار اضرار مرض نيوكاسل: سجلت النتائج وذلك باجراء اختبار اثباط التلازن الدموي (HI) واختبار الاليزا (ELISA) وبما يأتي:

نتائج اختبار اثباط التلازن الدموي: اظهر تحليل التباين وفحص F الإحصائي وجود فروقات معنوية ($P < 0.0001$) ولغرض تحديد مواقع الاختلافات بين المجاميع تم اجراء فحص مجال الثقة (95%) للمقارنات المتعددة وكما موضح في الجدول رقم (2) . ونلاحظ في اليوم الاول ان المجموعة الثانية قد اظهرت معدل اضرار منخفض بفرق معنوي قدره ($P < 0.05$) عن المجموعة الثانية (الملقحة نيوكاسل) اما في اليوم السابع فتلاحظ ان المجموعة الثانية قد اظهرت اقل معدلاً للاضرار المثبطة لتلازن الدم بفرق معنوي قدره ($P < 0.05$) عن المجموعتين الثانية والسيطرة.

على حين لم يلاحظ وجود فروقات معنوية بين المجاميع الثلاث في الايام 14 ، 21 و 28 من عمر الطير ، وبشكل عام نلاحظ هنالك انخفاضاً في معدلات معيار الاضرار المثبطة لتلازن الدم بمرور الوقت وللمجاميع الثلاث.

الجدول (2) نتائج اختبار اثبات التلازن الدموي لفايروس مرض نيوكاسل

(المعدل \pm الخطأ القياسي)

28	21	14	7	1	العمر بالايام
3.20a	2.70a	3.75a	67.2a	56.5ab	المجموع
0.61 \pm	0.64 \pm	0.85 \pm	10.2 \pm	12.3 \pm	المجموعة الاولى (ملقحة نيوكاسل)
2.20a	4.33a	9.53a	7.29b	34.0ac	المجموعة الثانية (ملقحة نيوكاسل وكمبورو)
0.46 \pm	0.54 \pm	2.31 \pm	2.18 \pm	9.01 \pm	
1.55a	0.25a	9.41a	52.1a	40.5a*	المجموعة الثالثة (سيطرة)
0.93 \pm	0.17 \pm	1.6 \pm	12.3 \pm	8.03 \pm	

* الفرق بين المعدلات التي تحمل حروفاً مختلفة مهمة إحصائياً بنسبة ($P < 0.05$)

نتائج اختبار الاليزا: اظهر تحليل التباين وفحص F الاحصائي وجود فروقات معنوية ($P < 0.0001$) ولغرض تحديد مواقع الاختلافات بين المجموع تم اجراء فحص مجال الثقة (95%) للمقارنات المتعددة ، وكما هو موضح في الجدول رقم (3) حيث نلاحظ في اليوم الاول والسابع ارتفاع معدلات اقيام الكثافة الضوئية للمجموعتين الاولى الثانية بفرق معنوي قدره ($P < 0.01$) عن مجموعة السيطرة على حين لم تلاحظ أية فروقات معنوية بين المجموع الثلاث في الايام 14 ، 21 و 28 . ونلاحظ أيضاً ان هنالك انخفاضاً في معدلات اقيام الكثافة الضوئية بمرور الوقت وللمجموع الثلاث.

الجدول (3) نتائج * اقيام الكثافة الضوئية في اختبار الاليزا لفايروس مرض نيوكاسل

(المعدل \pm الخطأ القياسي)

28	21	14	7	1	العمر بالايام
0.07a	0.08a	0.11a	0.17b	0.41b	المجموع
0.008 \pm	0.006 \pm	0.01 \pm	0.01 \pm	0.02 \pm	المجموعة الاولى (ملقحة بنيوكاسل)
0.10a	0.09a	0.12a	0.19b	0.43b	المجموعة الثانية (ملقحة بنيوكاسل وكمبورو)
0.01 \pm	0.008 \pm	0.009 \pm	0.01 \pm	0.06 \pm	
0.11a	0.07a	0.11a	0.10a	0.28a**	المجموعة الثالثة (سيطرة)
0.02 \pm	0.004 \pm	0.009 \pm	10.03 \pm	0.02 \pm	

* Optical density = OD (الكثافة الضوئية).

** الفرق بين المعدلات التي تحمل حروفاً مختلفة مهم احصائياً نسبته ($P < 0.01$) .

نتائج اختبار التحدي بفايروس نيوكاسل الضاري :سجلت نتائج اختبار التحدي بملاحظة الافراخ مدة اسبوعين بعد اجراء اختبار التحدي الذي اجري على عمر (28) يوماً ويجرعة 0.1/107.4ELD50 مل ، اذ اظهرت افراخ مجموعة السيطرة اولى العلامات السريرية بعد (48) ساعة من وقت تعرضها للفايروس الضاري وتميزت العلامات بقلة الشهية ، والحمول ، وخشونة وعدم ترتيب الريش والعلامات التنفسية ومنها صعوبة التنفس ، والعطاس ، والحشرجة وكذلك عدم القدرة على الحركة وقد لوحظت علامات الإسهال على بعض الأفراخ على حين سجلت حالات الهلاك بعد (7) يوم من اعطاء الفايروس الضاري وبلغت نسبة الهلاك في مجموعة السيطرة (60%) . اما التغيرات المرضية التي شوهدت في الأفراخ التي هلكت بعد إجراء اختبار التحدي تميزت بوجود التقرحات النزفية في بطانه المعدة الحقيقية لمعظم الأفراخ وتضخم لوز الاعورين بالاضافة الى تضخم لطخات باير على طول الأمعاء الدقيقة ووجود نتخر وتقرح على بعض منها.

على حين شملت التغيرات المرضية التنفسية وجود بعض المواد المخاطية في القصبة الهوائية واحتقانها أحياناً. أظهرت أيضاً بعض أفراخ مجموعة السيطرة بعد (10) ايام من اختبار التحدي العلامات العصبية التي تمثلت بالتواء الرقبة وشلل الاطراف وعدم القدرة على الوقوف والحركة وان العلامات الاخيرة تمت ملاحظتها على بعض افراخ المجموعتين الاولى والثانية التي لم تظهر أي علامات تنفسية او هضمية منذ اليوم الاول الى الرابع وفي اليوم الرابع اظهرت علامات تنفسية خفيفة في طيرين من المجموعتين اللتين لم تعطيا أي هلاك على مدى اسبوعين من اجراء اختبار التحدي ، فقد سجلت هاتان المجموعتان نسبة حصانة (100%) كما موضح في الجدول رقم (4) .

الجدول (4) نتائج اختبار اثباط التلازن الدموي واختبار التحدي لمجاميع الافراخ الملقحة جنينياً

المجاميع	عدد العينات الكلي/ عدد العينات الموجبة لاختبار اثباط التلازن الدموي	عدد الكلي/ عدد الهلاكات	نسبة الحصانة
المجموعة الاولى (ملقحة نيوكاسل)	10/10 (3.20)	0/15	% 100
المجموعة الثانية (ملقحة بنيوكاسل وكمبورو)	8/10 (2.20)	0/15	% 100
المجموعة الثالثة (السيطرة)	3/10 (1.55)*	9/15	% 40

* العدد بين قوسين يمثل معدل أضداد اختبار اثباط التلازن الدموي بعمر (28) يوماً قبل اختبار التحدي.

المناقشة

تعد الدراسة في طريقة تلقيح أجنة الدجاج ضد مرضي نيوكاسل وكمبورو الاولى من نوعها في القطر ، اذ تهدف الدراسة الى معرفة تأثير لقاح نيوكاسل الحي (عترة - B1) ولقاحي نيوكاسل وكمبورو المزدوج حين حقنها لأجنة دجاج لحم بعمر (18) يوماً. أظهرت النتائج ان تقنية تلقيح الأجنة بلقاح نيوكاسل عترة B1 وبجرعة (107.5 EID50) للجنين بالحقن في سائل الامنيوتك لم تؤثر تأثيراً معنوياً على نسبة الفقس مقارنة بمجموعة السيطرة وقد تعزى لكون هذه الأجنة من امهات ممنعة الى اصول تجارية وهذا خلاف ما ذكره (1) بان تلقيح أجنة لحم تجارية بلقاح نيوكاسل - عترة B1 - قد قلل من نسبة الفقس بمقدار (10%) ولكن قلة نسبة الفقس كانت اشد حين حقن اللقاح لأجنة خالية من المسببات المرضية (SPF).

اما المجموعة الملقحة نيوكاسل وكمبورو بالجرع المذكورة آنفاً فهي الاخرى لم تؤثر تأثيراً معنوياً على نسبة الفقس مقارنة بمجموعة السيطرة على خلاف ما اشار اليه الباحثون (10) بان تلقيح أجنة دجاج خالية من المسببات المرضية (SPF) بمزيج من الفايروسات اللقاحية لمرضي ميرك وكمبورو لم يؤثر على نسبة الفقس على حين ان اضافة مزيج من فايروسي الجدري الحامل لجينات فايروس نيوكاسل (rFP - NDV) ولقاحي ميرك وكمبورو قد ادت الى انخفاض نسبة الفقس الى (23% - 26%). واطهرت نتائج تقويم حيوية الافراخ بقاء الافراخ الفاقسة ونشاطها خلال الاسبوع الاول بعد الفقس وهذا ما يشير الى عدم تأثر الافراخ سلباً بجرعة اللقاح المحقون سواء أكان نيوكاسل ام كمبورو مما يدل على سلامة وامن اللقاحات المستخدمة، على الرغم من هلاك طيرين من المجموعة الملقحة بنيوكاسل وكمبورو المزدوج وطير واحد من مجموعة السيطرة إلا ان الصفة التشريحية لم تظهر أي آفات عيانية لمرض كمبورو او نيوكاسل .

اما بالنسبة لنتائج معدل معيار الأضداد المثبطة لتلازن الدم للمجاميع الثلاث : الملقحة بنيوكاسل ، والملقحة بنيوكاسل كمبورو المزدوج والسيطرة ، اظهرت النتائج انخفاضاً في معدل الاضداد في المجموعة الثانية عن معدل أضداد المجموعتين الاولى والثالثة في اليوم الاول والسابع . وهذا قد يعود الى استخدام لقاح كمبورو - عترة Lukert في تلقيح المجموعة الثانية حيث تحدث هذه العترة كبتاً مناعياً يؤثر سلباً على الاستجابة المناعية الناتجة من التلقيح بلقاح نيوكاسل (11) و (12) . كذلك في الأيام 14، 21 و 28 لم يكن هنالك ارتفاع في معدل معيار الاضداد المثبطة لتلازن الدم للمجاميع الثلاث ولكن عدد الحالات الموجبة لاختبار اثباط التلازن الدموي الى العدد الكلي للمجموعتين الملقحة بنيوكاسل ، والملقحة نيوكاسل وكمبورو وبعمر (28) يوماً كان (10/10 , 8/10 على التوالي) أكثر من مجموعة السيطرة التي أعطت (3/10) راجع الجدول رقم (4) ، وهذا ما اشار اليه الباحثان (13) في اعتماد هذا المقياس

لتوضيح الفرق في المناعة بين المجاميع الملقحة والسيطرة، مما يؤكد استجابة الأفراخ للقاح . على حين أشارت نتائج اختبار الاليزا الى ارتفاع معدل الاقيام للمجموعتين الأولى والثانية عن المجموعة الثالثة وهذا قد يعزى الى حساسية اختبار الاليزا في قياس الكلوبولين المناعي IgG الموجود في مصل الأفراخ الملقحة الذي يشكل الكمية الأكبر في المصل عن باقي الكلوبولينات المناعية (14) و (15) كما ان المصل الممنع المستخدم في عدة الاختبار للكشف عن أضداد النيوكاسل متخصص لقياس الكلوبولين المناعي IgG فقط . وعلى هذا الأساس يتضح ان أفراخ المجموعة الثانية تمتلك مستوى من الكلوبولين المناعي IgG في مصلها على حين لم يستطع اختبار اثباط التلازن الدموي الكشف التام عن هذا الكلوبولين المناعي IgG وهذا قد يعود الى حساسية الاختبار (16) .

اما في الايام 14 ، 21 و 28 فلم يسجل اختبار الاليزا ارتفاعاً في معدل المجاميع الثلاث . ولكن على الرغم من ذلك فان المجموعتين الأولى والثانية قد قاومت اختبار التحدي بفايروس نيوكاسل الضاري الذي اجري بعمر (28) يوماً على عكس مجموعة السيطرة التي اعطت نسبة هلاك بلغت (60%) .

ويمكن تفسير مقاومة المجموعتين الملقحتين لاختبار التحدي بالاسباب الآتية:

أ- عدم وجود ارتباط بين معيار الاضداد المثبته لتلازن الدم ودرجة حماية الجهاز التنفسي (17) و (18) و (19) فقد اظهرت الدراسات ان مقاومة القناة التنفسية للاصابة بفايروس نيوكاسل لا يرتبط بمستوى الاضداد الموجودة في المصل (20).

ب- فضلاً عن وجود المناعة الخلوية التي تحقق الحماية ضد الاصابات الفايروسية في الطيور الممنعة التي لا تمتلك مستويات ملحوظة من الاضداد المثبته لتلازن الدم (21).

ج- بالاضافة الى ان اختبار اثباط التلازن الدموي (HI) لا يعطى مؤشراً حقيقياً للمستوى المناعي في بعض الاحيان ، فقد يكون معيار الاضداد المعادلة للفايروس عالي في مصل الافراخ على حين ان فيها مستوى (HI) منخفضاً او صفراً (22) و (23) و (24) .

د- وقد تعزى حماية هذه المجموعتين ضد التعرض للاصابة بفايروس نيوكاسل الضاري الى طريقة دخول الفايروس اللقحي المحقون في سائل الامنيون المحيط بالجنين ، التي لم تعرف ميكانيكية عمل هذا اللقاح ، ولكن يعتقد ان أخذ فايروس اللقاح يكون عن طريق استنشاق او ابتلاع السائل الامنيون الحاوي على الفايروس من قبل الجنين ، ومن ثم تحفيز المناعة الموضعية المخاطية في القناة التنفسية والهضمية ومن ثم بدء الاستجابة المناعية العامة (1) .

هـ- وجود الأضداد الموضعية في منطقة دخول الفايروس المعادلة لفايروس الاصابة (25) .
تتفق هذه التفسيرات وما اشار اليه (22) من ان نسبة الحصانة تتناسب مع مستوى الاضداد في القصبه الهوائية وليس مع مستواها المعياري في مصل الدم .

ان استخدام اختبار التحدي فضلا عن قياس مستوى الأضداد المتبطة للتلازن الدموي (HI) لغرض تقدير مستوى المناعة ، ان العلامات التنفسية الناتجة من اجراء اختبار التحدي تعود الى طريقة اعطاء الفايروس الضاري حيث يسبب دخوله تحطم الخلايا المهذبة للقصبه الهوائية التي لا تلبث ان تسترجع بناءها خلال مدة قصيرة وقد تطول الى عشرة ايام حيث تختفي العلامات التنفسية وهذا يتفق وتفسير الباحثين (26) و (27) عند الاصابة بالعتز الاحشائية وما يصاحبها من اعراض تنفسية .

اما التغيرات المرضية للشكل الهظمي فكانت واضحة في معظم الأفرخ التي هلكت وتعد من اهم التغيرات المرضية التي يحدثها فايروس مرض نيوكاسل الضاري المنتشر في منطقة آسيا (27) و (28) . اما العلامات العصبية التي سجلتها هذه الدراسة فهي تتفق ونتائج الباحثين (29) و (28) .

ويعود سبب ظهور العلامات العصبية الى بعض الأفرخ في المجموعتين الاولى والثانية والتي أعطت نسبة حماية (100%) ضد التعرض لفايروس نيوكاسل الضاري الى امتلاك تلك الأفرخ أضداد لم تكن بالمقدار الذي يحميها من المرض ولكنها استطاعت ان تغير طور المرض من الحاد الى تحت الحاد وان علامة التواء الرقبة وشلل الأطراف شوهدت ايضاً في الأفرخ التي تشفى من الطور الحاد مما تستطيع فيه ان تعيش ولكنها تعاني من تلف دائم في انسجة الدماغ (29) .

وقد اعطت نتائج اختبار التحدي بفايروس نيوكاسل الضاري للمجموعة الملقحة نيوكاسل وكمبورو نسبة حصانة بلغت (100%) وهذه النتيجة بينت عدم وجود اثباط مناعي بلقاح كمبورو للاستجابة المناعية ضد مرض نيوكاسل .

نستنتج من ذلك ألكانية تطبيق طريقة تلقيح أجنة الدجاج من اصول تجارية ضد مرض نيوكاسل لما اعطته من حماية جيدة ضد اختبار التحدي بفايروس نيوكاسل الضاري وكذلك ألكانية تلقيح الأجنة المذكورة بلقاحي نيوكاسل وكمبورو المزوج حيث اعطت المجموعة الملقحة حصانة جيدة ضد فايروس نيوكاسل الضاري كما اثبتت الدراسة ان التأثير غير سالب على نسبة فقس الأجنة الملقحة ، وكذلك حيوية الأفرخ في الاسبوع الاول .

References

1. Ahmad , J and Sharma , J.M. (1993). Protection against hemorrhagic enteritis and Newcastle disease in turkeys by embryo vaccination with monovalent and bivalent disease. Avian Dis. 37: 485-491.
2. Ricks, C.A.; Avakian, A.; Bryan, T.; Gildersleeve, r.; Haddad, E.; Ilich, R.; King, S.; Murray, L.; Phelps, P. Poston, R.; Whitfill, C. and Wiliams, C. (1999). Inovo vaccination technology. Adv. In Vet. Med. 41:495-515.
3. 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.

4. Allan, W. H.; Lancaster, J. E. and Toth, B. (1978). "Newcastle disease Vaccines their production and use" Food and Agriculture organization of the united nation , Rome.
5. Reed, L. J. and Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty percent and points. Am. J. Hyg. 27: 493-497.
6. خطاب ، نزار عبدالله ، اثير كامل كساب وصباح الطائي (1992) . ادارة الدواجن وزارة التعليم العالي والبحث العلمي . مديرية دار الكتب للطباعة والنشر - جامعة الموصل.
7. Hanson, R. P. (1980). Newcastle disease. In: "Isolation and identification of avian pathogen". Hitchner, S. B.; Domermu, H. C.; Purchase, H. G. and William , J. E. Eds. 2nd ed. American Association of Avian Pathologists. USA. PP.36-66.
8. Jackson, C.; Lehrbach, P. R.; Whitfill, C. E. and Cheetle , N. (1997). Developments in the Vaccination of broiler chickens and larger pullets againts infectious bursal disease. In: Proc. Australian poultry science symposium, Vol. 9. P.103.
9. المحمد ، نعيم ثاني ، خاشع محمد الراوي ، مؤيد يونس ووليد المراني (1986) . مبادئ الاحصاء . مديرية دار الكتب للطباعة والنشر ، جامعة الموصل.
10. Gagic, M.; Hill, C. a. and Sharma, J. m. (1999). Inovo vaccination of specific - pathogen- free chicken with vaccines containing multiple agents. Avian Dis. 43:293-01.
11. حسن ، صلاح مهدي (1986) تقييم بعض اللقاحات التجارية لالتهاب غدة فايريشيا المعدي (مرض كمبورو) في الافراخ . رسالة ماجستير ، كلية الطب البيطري - جامعة بغداد.
12. Khan, S. Z.; Mushtaq, A.; Ayaz , m. and Raziq , E. (1998). Immunosuppressive effect of four different Gumboro vaccine strain on - HI antibody titer against Newcastle disease vaccine in broiler. Sarhad. J. Agric. 14:1-3.
13. Ahmad, J. and Sharma , J.M. (1992). Evaluation of a modified-live virus vaccine administered in ovo to protect chicken against Newcastle disease. Am. J. Vet. Res. 53:1999-2004.
14. Powell, J. R. (1982). The immune system B- cells and T- cells. In: "Avian Immunology" Powell, J. R. Ed. British Veterinary Poultry association. PP.7-15.
15. Higgins, D. A. (1996). Comparative immunology of avian species. In: "Poultry Immunology". Davison , T. F.; Morris, T. R. and Panyne , L. N. Eds. Jr. 1st Ed. Oxford, U.K. PP.149-205.
16. Snyder, D.B.; Marquardt, W.W.; Mallinson, E.T. and Russek, E. (1983). Rapid serological profiling by enzyme- linked immunosorbent assay. I. measurement of antibody activity titer against Newcastle disease virus in a single serum dilution. Avian Dis. 27;161-170.

17. Knezevic, N. (1989). Comparative study of two vaccination methods employing Newcastle vaccines (Lasota strain) for passively immune chicken under laboratory conditions. *Vet. Archive.* 59:225-231.
18. Holmes, H. C. (1979a). virus - neutralizing antibody in sera and secretions of upper and lower respirators tract of chickens inoculated with live and inactivated Newcastle disease virus. *J. Comp. Path.* 89:21-29.
19. Knezevic, N.; deKic, J.; Krecov, M. and Kozlina, B. (1994). Comparative survey of different programmes of immunoprophylaxis against Newcastle disease in broiler chickens. *Vet. Glasnik.* 48:869-873.
20. Holmes, H. C. (1979b). Respirators tract of chickens to Newcastle disease virus infection following vaccination the effect of passively acquired antibody on its development. *J. Comp. Path.* 89:11-19.
21. Jayawardan, G. W. and Spradbrow, P. B. (1995). Cell - mediated immunity in chickens vaccinated with the V4 strain of Newcastle disease virus. *Vet. Microbiol.* 46:37-41.
22. Martin, S. F.; Mc Williams, M. and Huizenga, C. G. (1972). Use of chicken tracheal organ cultures for studying resistance of respiratory epithelium to viral infection. *J. Immuno.* 108:183-194.
23. حسين ، عبدالامير (1980) . دراسة في تقييم اللقاحات لمرض النيوكاسل المنتجة محلياً في افراخ اللحم . رسالة ماجستير ، كلية الطب البيطري - جامعة بغداد .
24. زاهدة ، عبدالحافظ حسن (1986) . مرض النيوكاسل في الدواجن . الطبعة الاولى . شركة فابكو ، عمان - الاردن .
25. (25)Spanoghe, L.J.; Peeters, E.; Cotlear, J.C.; Doves, A.H. and Viane, N. (1977). Kinetics of serum and local heamagglutination inhibition antibodies in chicken following vaccination and experimental infection with Newcastle disease virus and their relation with immunity. *Avian Pathol.*6:101-109.
26. (26)Cheville, N.F.; Stone, H.; Riley, J. and Ritechic, A.E. (1972). Pathogenesis of virulent Newcastle disease chickens. *J.Am. Vet. Ass.* 161: 169-179.
27. Hanson, R. P. (1978). Newcastle disease. In: "Disease of poultry". Hofstad, M. S.; Calnek , B. W.; Helmbodt , C.F.; Reid , W. M. and Yoder , H. W. Eds. 7th ed., Iowa state university press , Ames , Iowa, U.S.A. PP.668-671.
28. زاهد ، عبدالامير حسين (1999) . تقييم برنامجين مختلفين لتلقيح ضد مرض النيوكاسل في افراخ البياض في العراق . مجلة الطبيب البيطري 90:51 - 58 .
29. Al-Sheikly , F. and Carlson , M.C. (1975). The pathology of Velgenic Newcastle disease virus infection. *Avian Dis.* 19 : 397-407.