

دراسة الاستجابة المناعية باستخدام اللقاح الزيتي المبطل التجاري في أجنة دجاج اللحم ضد مرض النيوكاسل

فراس حسين الباوي و عبد الأمير حسين زاهد
كلية الزراعة / جامعة بابل كلية الطب البيطري/جامعة بغداد

الخلاصة

تضمنت هذه الدراسة استخدام ١٢٠ بيضة مجننة بعمر (١٨) يوماً قسمت إلى ثلاثة مجاميع متساوية بواقع (٥٠) بيضة لكل مجموعة ، لقحت المجموعة الأولى باللقاح الزيتي المبطل التجاري عترة لاسوتا بطريقة تلقيح الأجنة بعمر (١٨) يوماً، و حقنت المجموعة الثالثة (السيطرة) بمحلول دارى الفوسفات بنفس العمر ، أما المجموعة الثانية فتركبت بدون حقن لحين الفقس و بعد الفقس لقحت المجموعة الثانية بلقاح حي مضعف عترة B₁ بواسطة النقطير بالعين بعمر يوم واحد و بلقاح زيتي مبطل تجاري عترة لاسوتا عن طريق تحت الجلد في منطقة الرقبة بعمر (٧) أيام.

بينت النتائج إن اللقاح المستخدم في تلقيح الأجنة لم يكن ذا تأثير سالب على نسبة الفقس و حيوية الأفراخ ، وتم استخدام اختبار اثباط التلازن الدموي واختبار الاليزا لقياس المستوى المناعي للأفراخ الملقحة بلقاح النيوكاسل و كذلك أفراخ السيطرة بعمر (١٤،٧،٢١،٢٨،٣٥) يوماً وأظهرت النتائج عدم وجود فرق معنوي بعمر يوم واحد بين مجاميع التجربة و مجموعة السيطرة، فيما ظهر فرق معنوي بمستوى ($P < 0.05$) بعمر (٧) أيام بين مجاميع التجربة و مجموعة السيطرة أما بعمر (١٤،٧،٢١،٢٨،٣٥) يوماً فقد أظهرت النتائج تفوق المجموعة الأولى الملقحة بالأجنة بمستوى ($P < 0.05$) على المجموعة الثانية و الثالثة، وتم استخدام فحص التحدي بعمر (٣٥) يوماً لكل المجاميع، وكانت نسبة الحصانة للمجموعة الأولى (٩٥%) و للمجموعة الثانية (٩٠%) و للمجموعة الثالثة (١٠%) وهذا يدل على كفاءة استخدام اللقاح الزيتي المبطل عترة لاسوتا في تمنيع أفراخ اللحم بطريقة تلقيح الأجنة.

Study of immune response by using oily commercial vaccine in Broiler chick embryo against Newcastle disease.

Abstract

This study (١٥٠) fertile egg at (١٨) days of age were divided in to three equal groups ٥٠ embryonated eggs for each ,the first group was vaccinated with commercial oil inactivated vaccine lasota strain in chick embryo at (١٨) days , the third group (control) inoculated with buffer phosphate in chick embryo at (١٨) days, the second group (left with out injection until hatching) was given live attenuated vaccine B₁ strain by eye drop at one day old and injected by commercial inactivated oil vaccine lasota strain by S/C in the neck region at ٧ day old . Results showed that vaccine used in the injection of embryo had no effect on hatchability and viability ratios. Hemagglutination inhibition test (HI) and ELISA test were used to evaluate the level of immunity in chicks vaccinated with (NDV) and chicks of control group at ١, ٧, ١٤, ٢١, ٢٨ and ٣٥ days, the results of the above tests showed that there were no significant differences at

one day old among the vaccinated groups and control group but a significant differences ($p < 0.05$) were existed at (7) day old .At 14, 21, 28 and 35 days old the result tests were higher in vaccinated chicks of group 1 ($p < 0.05$) as compared with groups 2 and 3. Challenge test was used to estimate the Immunized ratio at (35) days for all groups, the results showed that it was (95%) and (90%) for group (1) and (2) respectively and (10%) only for the control group .The results of the experiment concluded that the use of oil inactivated lasota strain was efficiently immunized the broiler chicks by embryo vaccination.

المقدمة

يعد مرض النيوكاسل من الامراض السارية شديدة الخطورة ، إذ يصيب الطيور الداجنة وطيور الزينة والطيور البرية ، وتختلف أشكال المرض بين الشكل غير الظاهري أو الخفيف إلى الشديد المسبب للهلاك المفاجئ ، لذا عد من الامراض البالغة الأهمية على نطاق واسع بسبب الخسائر الاقتصادية في صناعة الدواجن (Huang , et. al., 2004) . ومع استعمال الطرق المختلفة المتعددة في التلقيح الا ان مرض النيوكاسل يعد تهديداً لصناعة الدواجن في معظم الأقطار العالمية وبضمنها العراق ، بسبب الاصابات الكبيرة لمرض النيوكاسل في دجاج اللحم والبياض و لحدوث الثورات المرضية بين الحين والآخر نتيجة الطفرات الوراثية للحمة أو نتيجة الاستخدام الخاطئ للقاح (Alexander, 2003) ، لذلك تطورت البحوث والدراسات في السنوات الاخيرة عن إمكانية إعطاء اللقاح الحي المضعف واللقاح الزيتي المبطل ضد مرض النيوكاسل في اجنة الدجاج خلال المراحل المتأخرة من النمو (Stone , et. al. , 1997) ، ولم تقتصر هذه التقنية على لقاح مرض نيوكاسل فقط بل شملت أيضاً استخدام لقاحات ثنائية وثلاثية لامراض أخرى مثل مرض ميرك ومرض التهاب جراب فايبريشيا المعدي (IBD) ومرض جذري الطيور (زاهد وجماعته ، 2005) ، ونظراً لما حققته هذه الطريقة بين طرائق التلقيح المتبعة حالياً في العالم لما لها من فوائد تشمل : مقاومة مبكرة ، حقن جرعة موحدة من اللقاح لكل بيضة مجننة ، تقليل الكلفة والجهد مع قلة التلوث (Ricks , et. al. , 1999) ، لذلك استهدفت هذه الدراسة استخدام اللقاح الزيتي المبطل التجاري واعطائه بطريقة تلقيح الاجنة بعمر 18 يوماً ودراسة كفاءة هذا اللقاح وتأثيره في نسبة الفقس وحيوية الافراخ الفاقسة ومقارنة هذه الطريقة مع حقن الافراخ بنفس العترة اللقاحية بعمر 7 أيام بعد الفقس تحت الجلد في منطقة الرقبة وتقييم كفاءة هاتين الطريقتين عن طريق تقييم معيار الاضداد للافراخ الفاقسة باستخدام اختبار اثباط التلازن الدموي (HI) واختبار الانزيم المناعي الممتاز الغير مباشر (ELISA) واجراء فحص التحدي بعمر 35 يوماً باستخدام العترة المحلية الضارية (Z - 2003) .

المواد وطرائق العمل

١. المواد المستخدمة

أجريت الدراسة باستخدام ١٢٠ بيضة تفقيس مخصصة تم التأكد منها بجهاز فحص الاجنة (Candle) المجهزة من مفقس اسعد للدواجن محافظة بابل من أمات لحم نوع هابرد وتم حضن البيض المجنن داخل المفقس باستخدام حاضنة نوع بيتر سايم (Peter Sime) بلجيكي المنشأ .

٢. اللقاحات المستخدمة

- أ. اللقاح الحي المضعف عترة (B₁) المجهز من شركة الكندي للقاحات والادوية البيطرية التركي المنشأ .
- ب. اللقاح الزيتي المبطل عترة لاسوتا (Lasota) من انتاج شركة سيفا الهنكارية بجرعة (/ ١٠^{١٠} ml ٠.١) .
٣. حمة النيوكاسل الضاري (Z - ٢٠٠٣) المجهز من قبل الأستاذ المساعد الدكتور عبد الأمير حسين زاهد .

٤. عدة اختبار اثباط التلازن الدموي (Heamagglutination inhibition test)

٥. عدة اختبار الانزيم المناعي الممتز الغير مباشر (ELISA) من مختبر المجموعة - بغداد .

٦. المحاليل المستخدمة

- أ. محلول دارئ الفوسفات (Phosphate at Buffer Saline) .
- ب. محلول الملح الفسيولوجي (Normal Saline) .

طرائق العمل

١. معايرة اللقاح الحي المضعف (B₁) والحمة الضارية (Z - ٢٠٠٣)

تم تحضير العترة اللقاحية (B₁) والتي جهزت من شركة الكندي للقاحات والادوية البيطرية بشكل سوائل جنينية (Seed Virus) وتمت المعايرة بحساب الجرعة الخامجة ل(٥٠%) من الأجنة المحقونة (EID_{٥٠}) Embryo infective Dose .

فيما تمت معايرة حمة نيوكاسل (Z - ٢٠٠٣) الضارية بعد تمييزها في اجنة الدجاج بعمر ٩ أيام لمعرفة الجرعة القاتلة ل(٥٠%) من الاجنة المحقونة (ELD_{٥٠}) Embryo Lethal Dose .

٢. المعاملات التجريبية

١. حضن البيض

تم حضن البيض المخصب بدرجة (٣٧ م) وتم تقسيمه إلى ثلاثة مجاميع متساوية وبواقع ٤٠ بيضة مجننة لكل مجموعة حيث اعتبرت كل مجموعة معاملة تجريبية منفصلة وكما يلي :

المجموعة الأولى : لقحت بلقاح نيوكاسل الزيتي التجاري عترة لاسوتا بعمر ١٨ يوماً من الحضن وجرعة مقدارها (٠.١ مل) الحاوي على (١٠^{١٠}) من المستضد .

المجموعة الثانية : لقحت بلقاح نيوكاسل الحي المضعف عترة B₁ بعمر يوم واحد بعد الفقس بالنقطير بالعين بجرعة مقدارها (٠.٢٥ مل) الحاوي على (١٠^{١٠}) من المستضد وباللقاح الزيتي التجاري عترة لاسوتا بجرعة مقدارها (٠.١ مل) تحت الجلد في منطقة الرقبة .

المجموعة الثالثة : حقنت بـ(٠.١ مل) من (PBS) بعمر ١٨ يوماً من الحقن وبعد الفقس تركت بدون تلقيح واعتبرت مجموعة مقارنة (Control) .

٢. طريقة الحقن

تم حقن البيض المجنن بعمر ١٨ يوماً من مدة الحضن في غرفة معقمة مسبقاً وبعد التأكد من حيوية الاجنة وذلك باستخدام جهاز فحص البيض وتحديد مركز الفسحة الهوائية الذي يمثل مكان الحقن حسب طريقة (Sharma & Burmester , ١٩٨٢) ، وبعد ذلك تم تعقيم منطقة الفسحة الهوائية بمحلول اليود المطهر ، وتقب القشرة باستخدام الناظفة وحقن اللقاح الزيتي المبطل بمقدار (٠.١ مل) لكل بيضة (المجموعة الأولى) باستخدام محاقن طبية سعة (١ مل) وبإبرة طولها (٢.٥ سم) وبقطر (٢٢G) (Stone , et. al. , ١٩٩٧) ، تم ادخال الابرة بكاملها لضمان وصول اللقاح إلى كيس الامنيون (السلى) ، بعد ذلك تم تغطية الثقوب بالشمع وارجاع البيض المحقون إلى الحاضنة لحين الفقس ، وبنفس الأسلوب المذكور تم حقن البيض المخصص للمجموعة الثالثة (مجموعة المقارنة) بمحلول (PBS) حيث ترك في الحاضنة لحين الفقس .

المعايير المستخدمة في التجربة:

١. حساب نسبة الفقس Hatchability Percentage

تم حساب نسبة الفقس في المجاميع الثلاثة حسب المعادلة التي ذكرها (Sharma & Burmester , ١٩٨٢) وكما يلي :

$$\text{نسبة الفقس} = \frac{\text{---}}{100} \times 100$$

٢. حساب حيوية الأفرخ Viability

تم حساب حيوية الأفرخ الفاقسة إلى عمر ٧ أيام بعد الفقس (Ahmed & Sharma , ١٩٩٢) بموجب جمع عينات الدم وفصل المصل .

سحبت عينات الدم من الأفرخ عشوائياً بواقع ٥ عينات لكل مجموعة وبطريقتين من الوريد الوداجي بعمر (١ ، ٧ ، ٤ ، ٢١) ومن الوريد الجناحي بعمر (٢٨ ، ٣٥) يوماً ، وجمعت عينات الدم بأنابيب زجاجية سعة (١٠ مل) وتركت بصورة مائلة في حافظة فيها ثلج ثم وضعت في جهاز الطرد المركزي ٣٠٠٠ دورة/ دقيقة لفصل المصل ثم جمعت الامصال في أنابيب زجاجية أخرى معلمة حسب المجاميع وحفظت في المجمدة بدرجة حرارة (-٢٠) لحين إجراء الفحوصات المصلية .

أما اختبار التلازن الدموي (HA) Heamagglutination test فقد اجري باستخدام العترة اللقاحية لاسوتا وباستخدام الاطباق البلاستيكية (Prespex Plate) لغرض تحضير عالق الحمة الذي يستخدم في اختيار اثباط التلازن الدموي والذي كان ٨ وحدات تلازنية حسب طريقة (Hanson , ١٩٧٨) .

٣. اختبار اثباط التلازن الدموي (HI) Heamagglutination Inhibition Test

اجري اختبار اثبات التلازن الدموي طيلة فترة الدراسة وحسب طريقة بيتا واستخدم في الاختبار اطاق المعاييرة (Perspex Plate) لمعرفة مستوى الاضداد في الأفراخ الملقحة طول فترة التجربة .

٤ . اختبار الانزيم المناعي الممتز غير المباشر

Indirect Enzyme – Linked Immuno Sorbant Assay (ELISA)

استخدم هذا الاختبار للتحري عن الاضداد الخاصة بحمة النيوكاسل أثناء الدراسة ، حيث تم الاختبار حسب تعليمات الشركة المصنعة .

٥ . اختبار التحدي Challenge test

تم إجراء اختبار التحدي باستخدام العترة الضارية (Z - ٢٠٠٣) لكل المجاميع بعمر ٣٥ يوماً بمعيار مقداره (LD_{٥٠}^{٩٠٣}) وبجرعة مقدارها (٠.٥ مل) لكل طير عن طريق التقطير بالعينين والمنخرين والفم ، وتم تسجيل العلامات السريرية ونسبة الهلاكات (Mortality rate) ، وتم تقدير نسبة الحصانة لكل المجاميع بموجب المعادلة التالية :

$$\text{نسبة الحصانة} = \frac{\text{—}}{100} \times 100$$

٦ . التحليلات الإحصائية

جمعت البيانات المتعلقة بالصفات المدروسة خلال التجربة وحللت إحصائياً حسب تصميم مربع كاي (qi-square) وتم اختبار الفروقات المعنوية بين المتوسطات باستخدام (Least Significant Differences L.S.D) .

النتائج والمناقشة

١ . نتائج معاييرة العترة اللقاحية والعترة الضارية لمرض نيوكاسل

احتسبت الجرعة الخامجة ل(٥٠%) من الاجنة للعترة اللقاحية (B_١) وكذلك احتسبت الجرعة القاتلة الضارية (Z - ٢٠٠٣) ل(٥٠%) من الاجنة حسب طريقة (Sperman - Karber) التي ذكرها الباحث (Young , et. al. , ٢٠٠٢) وبين جدول (١) نتائج معاييرة العترتين .

جدول (١): نتائج معاييرة العترة اللقاحية والعترة الضارية لمرض النيوكاسل

الجرعة القاتلة	الجرعة الخامجة	العترة
-	١٠ ^{٩٠١} EID _{٥٠} / ٠.١ ml	B _١
١٠ ^{٨٠٢} ELD _{٥٠} / ٠.١ ml	-	Z - ٢٠٠٣

٢. نسبة الفقس

يوضح جدول (٢) نسبة الفقس للمجاميع المستخدمة في التجربة حيث اظهر التحليل الاحصائي ان تلقيح الاجنة بلقاح نيوكاسل الزيتي المبطل عترة لاسوتا بعمر ١٨ يوماً من الحضن لم يؤثر معنوياً على نسبة الفقس مقارنة بمجموعة السيطرة ، وهذه النتيجة تتفق مع ما توصل إليه (Stone , et. al. , ١٩٩٧) الذي اشار إلى ان التلقيح باللقاح الزيتي ضد مرض نيوكاسل والانفلونزا بعمر ١٨ يوماً من الحضن لم يؤثر معنوياً في نسبة الفقس ، وذلك لأن العترة المبطله لم تسبب ردة فعل عكسية لعدم وجود تكاثر الحمة داخل انسجة الأفراخ فيما أدى استخدام العترة الحية المضغفة B_١ في تلقيح الاجنة بعمر ١٨ يوماً إلى انخفاض نسبة الفقس بمعدل ١٠% مقارنة مع مجموعة السيطرة ، وقد يرجع السبب في ذلك إلى ردة الفعل العكسية وقدرة تكاثر الحمة اللقاحية داخل انسجة الجنين (Ahmed & Sharma , ١٩٩٢) .

جدول (٢): تأثير حقن البيض المجنن بعمر ١٨ يوماً من الحقن على نسبة الفقس (%)

المجاميع	نوع اللقاح	الجرعة	عدد الاجنة الفاقسة	نسبة الفقس (%)
المجموعة الأولى	لقاح زيتي تجاري عترة لاسوتا	١.٠ ml / ٠.١	٤٠/٣٨	٩٥
المجموعة الثانية	-	-	٤٠/٣٩	٩٧.٥
المجموعة الثالثة	محلول داري الفوسفات (PBS)	٠.١ ml	٤٠/٣٨	٩٥

٣. حيوية الأفراخ

يوضح جدول (٣) حيوية الأفراخ للمجاميع التجريبية الثلاثة خلال الأسبوع الأول بعد الفقس حيث اظهرت نتائج تقييم حيوية الأفراخ بعد الفقس خلال الأسبوع الأول بأن الهلاكات التي سجلت في جميع المجاميع قد بلغت طير واحد في كل مجموعة بدون ظهور علامات سريرية وعند إجراء الصفة التشريحية لم تتوافق مع الاصابة بمرض نيوكاسل مما يدل على ان اللقاح الزيتي المبطل الذي استخدم في تلقيح الاجنة بعمر ١٨ يوماً في المجموعة الأولى واللقاح الحي المضغف الذي استخدم بعمر يوم واحد بالتقطير بالعين في المجموعة الثانية لم يؤثر سلباً على حيوية الأفراخ مقارنة بمجموعة المقارنة ، وان سبب الهلاكات قد يرجع إلى المضاعفات الثانوية أو الظروف البيئية أو ضعف الجهاز المناعي وهذا يتفق مع ما توصلت إليه (الشمري ، ٢٠٠٥) عند حقن الاجنة قد يرجع ذلك إلى ان اللقاح الزيتي المبطل لا يتكاثر في انسجة الاجنة وليس له القدرة على إحداث ردة فعل عكسية على الجنين بعد الفقس (Dege Fa , et. al. , ٢٠٠٤) .

جدول (٣): حيوية الأفراخ في المجاميع التجريبية خلال الأسبوع الأول بعد الفقس (%)

النسبة المئوية (%)	عدد الأفراخ الكلي / عدد الأفراخ الهالكة	المجاميع
٩٧.٥	١/٣٨	المجموعة الأولى
٩٧.٥	١/٣٩	المجموعة الثانية
٩٧.٥	١/٣٨	المجموعة الثالثة

٤. نتائج اختبار اثبات التلازن الدموي HI

كما موضح في جدول (٤) أظهرت نتائج تقييم الاستجابة المناعية بواسطة اختبار اثبات التلازن الدموي بعمر يوم واحد وجود فرق معنوي بين مجاميع التجربة ، وسجلت افضل القيم في المجموعة الثالثة (المقارنة) ويليهما المجموعة الأولى فالمجموعة الثانية قد يرجع السبب في ذلك إلى كون المناعة الامية ذات مستوى عالٍ تنتقل من الأمات إلى الأفراخ عن طريق صفار البيض (Alexander , ١٩٩٧) . أما بعمر ٧ أيام فقد اظهرت النتائج وجود فرق معنوي بين مجاميع التجربة ومجموعة المقارنة بمستوى ($P < ٠.٠٥$) حيث بلغ معدل الاضداد للمجاميع الأولى والثانية والثالثة على التوالي (٤٠٠.٥٠ ، ٣٨.٤ ، ٢٢.٣٠) وقد يعزى ذلك إلى تلقيح الاجنة الذي يعطي مناعة مبكرة في المجموعة الأولى تؤدي إلى تحفيز الاستجابة المناعية خلال بضعة أيام بعد إعطاء اللقاح الزيتي المبطل (الشمري ، ٢٠٠٥) ، أما بالنسبة إلى المجموعة الثانية فان طريقة التقطير بالعين بعمر يوم واحد تعطي مستوى عالٍ من الاضداد المثبطة للتلازن الدموي فضلاً عن ان هذه الطريقة تعتبر اقل تأثيراً بالمناعة الأمية حيث يمكن التحسس بالاضداد خلال الأسبوع الأول من التلقيح (Alexander , ٢٠٠٣) ، أما في الاعمار (١٤ ، ٢١) يوماً فقد لوحظ انحدار مستوى معيار الاضداد المثبطة لتلازن خلايا الدم الحمراء عما هو عليه بعمر ٧ أيام ليصل إلى ادنى مستوى عند هذا المدى من العمر وهذا يتفق مع ذكره (Bennegean , et. al. , ١٩٧٨) بأن الاضداد المتكونة بعمر يوم واحد تتخفف بتقدم العمر وتصل إلى ادنى مستوى لها بعمر (١٤ - ٢١) يوماً من التلقيح اعتماداً على كمية الاضداد الامية وهذا يدل على ان المناعة الأمية مازالت قادرة على معادلة حمة اللقاح ، لهذا نلاحظ انحدار في مستوى الاضداد في هذه الاعمار ، مما يؤدي إلى قلة فعالية اللقاح لانتاج الاضداد ، كما لوحظ وجود فرق معنوي ($P < ٠.٠٥$) بين المجموعة الأولى (الملقحة بالاجنة) والمجموعتين الثانية والثالثة وقد يرجع ذلك إلى كفاءة اللقاح الزيتي المستخدم باعمار مبكرة إذ يولد استجابة مناعية ترتفع معيارها بمرور الايام ، وتظهر على نحو واضح بعد مرور (١٤ - ٢١) يوماً من التلقيح (Alexander , ٢٠٠٣) ، فضلاً عن وجود مستضد الحمة في الانسجة وان عملية تحرره تكون مستمرة وبصورة بطيئة حيث يؤدي ذلك إلى التحفيز المتواصل للجهاز المناعي لاحداث استجابة مناعية طويلة الامد (Allan , et. al. , ١٩٧٨) .

أما في عمر ٢٨ يوماً فقد اظهرت النتائج تفوق المجموعة الأولى بمستوى ($P < ٠.٠١$) على بقية المجاميع ، إذ سجلت المجموعة الأولى اعلى قيمة لمعدل معيار الاضداد المثبطة للتلازن الدموي ، فيما سجلت مجموعة المقارنة ادنى قيمة لذلك المعدل و يتفق ذلك مع ما جاء به (Stone وجماعته ،

(١٩٩٧) ، إذ لاحظ ارتفاع معدل معيار الاضداد في الأفراخ الملقحة باللقاح الزيتي المبطل بطريقة تلقيح الأجنة بعمر ١٨ يوماً من الحضان ، مما يوفر حماية ومقاومة ضد جرعة التحدي بالحمة الضارية ، وقد اشارت نتائج الدراسة الحالية إلى انخفاض معدل معيار الاضداد في المجموعة الثانية وقد يرجع السبب في ذلك إلى التحصين باللقاح الحي المضعف الذي يؤدي إلى ارتفاع معيار الاضداد خلال (٩ - ١٤) يوماً بعد التلقيح ثم يبدأ بالانخفاض بعد (١٥ - ١٧) يوماً بعد التلقيح (, Hanson ١٩٩٩ , et. al.) ، فضلاً عن ان الاضداد التي تنتج من اللقاح الزيتي المبطل تحتاج إلى فترة طويلة نسبياً (٢١ - ٢٤) يوماً كي تصل إلى مستوى عالٍ من انتاج الاضداد (Girmes , ٢٠٠٢) .

أما عمر ٣٥ يوماً فقد لوحظ زيادة في مستوى الاضداد في المجموعتين الأولى والثانية مقارنة مع مستوى الاضداد بعمر ٢٨ يوماً وقد يرجع ذلك إلى انتهاء تأثير المناعة الأمية في عمل اللقاح (Erganis & Ucan , ٢٠٠٣) ، كما لوحظ أيضاً ارتفاع مستوى الاضداد في المجموعة الملقحة بالاجنة (الأولى) مقارنة مع مستوى الاضداد في المجموعة الثانية ويدل ذلك على ان التلقيح المبكر يعطي مناعة ومستوى اضداد مبكر (زاهد وجماعته ، ٢٠٠٥) ، وقد اشار (Stone وجماعته ، ١٩٩٧) ارتفاع معدل معيار الاضداد في الاجنة الملقحة باللقاح الزيتي المبطل بتقدم العمر .

جدول (٤): معدل اضداد لقاحات حمة مرض نيوكاسل \pm الخطأ القياسي للفترات الزمنية المختلفة مقاساً باختبار التلازن الدموي (HI)

معدل معيار الاضداد \pm الخطأ القياسي بعمر (٣٥) يوماً	معدل معيار الاضداد \pm الخطأ القياسي بعمر (٢٨) يوماً	معدل معيار الاضداد \pm الخطأ القياسي بعمر (٢١) يوماً	معدل معيار الاضداد \pm الخطأ القياسي بعمر (١٤) يوماً	معدل معيار الاضداد \pm الخطأ القياسي بعمر (٧) يوم	معدل معيار الاضداد \pm الخطأ القياسي بعمر يوم واحد	المجاميع
٣٤.٩٠ \pm ٦.١٠ A	٢٦.٩٠ \pm ٤.٩٠ A	٢٢.٢٠ \pm ٣.٣٧ A	٣٣.٥ \pm ٥.٣٠ A	٤٠.٥٠ \pm ٨.٨٥ A	٣٨.٤٠ \pm ٨.٣٨ A	١م
٣١.٩٠ \pm ٣.٨٥ A	١٤.٤٠ \pm ٢.٩٥ B	١٧.١٠ \pm ٢.١٠ B	١٩.٩٠ \pm ٣.٢٠ B	٣٨.٤ \pm ٨.١٠ A	٣٨.٠ \pm ٧.١٨ A	٢م
١.٠ \pm ٠.٠ B	١.٤٠ \pm ٠.٢٤ B	٢.٤٠ \pm ٠.٦٧ B	٧.٨ \pm ٢.١٣ B	٢٢.٣٠ \pm ٦.٢٠ A	٤٨.٩٠ \pm ٨.٤٠ A	٣م

م١: لقت باللقاح الزيتي المبطل التجاري بعمر ١٨ يوم من الحضان بطريقة تلقيح الأجنة

م٢: لقت باللقاح الزيتي المبطل التجاري بعمر ٧ يوم بعد الفقس

م٣: حقنت بال BPS بعمر ١٨ يوم من الحضان واعتبرت مجموعة سيطرة

● الأحرف المتشابهة عمودياً تعني عدم وجود فروق معنوية

- الأحرف المختلفة تعني وجود فروق معنوية

٥. اختبار الإنزيم المناعي الممتاز الغير مباشر ELISA

يوضح جدول (٥) معدل معيار اضرار لقاحات حمة مرض نيوكاسل للفترات الزمنية المستخدمة في الدراسة حيث لوحظ توافق نتائج اختبار الاليزا مع نتائج اختبار اثناب التلازن الدموي صاحبه ارتفاع ملحوظ في معيار الاضرار المحسوبة للمجاميع الثلاثة وبالعمر المختلفة ، وقد يرجع السبب في ذلك الارتفاع إلى ان اختبار الاليزا هو في الواقع أكثر دقة وحساسية لقياس المستويات القليلة من الاضرار المثبطة للتلازن ، المعادلة للحمة المثبثة للمتم والمرسبة للمستضد مقارنة مع اختبار اثناب التلازن الدموي الذي يقيس الاضرار المثبثة للتلازن فقط (Huang,et.al.,٢٠٤) ، كما اظهرت النتائج ان معيار الاضرار للمجموعة الثالثة (المقارنة) غير الملقحة قد سجل انحداراً وبصورة تدريجية اعتماداً على كمية الاضرار المنتقلة من الامات إلى الأفرخ الفاقسة لعدم معادلتها باللقاح الحي أو المقتول مما يؤدي إلى انخفاض مستمر لمعيار الاضرار ومن ثم نضوبها مع تقدم العمر وعدم امتلاكها حصانة ضد الخمج خلال (١٤ - ٢١) يوماً (Rahman, et. al., ٢٠٠٢).

جدول (٥): معدل معيار اضرار لقاحات حمة مرض نيوكاسل \pm الخطأ القياسي للفترات الزمنية المختلفة مقاساً باختبار الانزيم المناعي الممتاز الغير مباشر (ELISA)

معدل معيار الاضداد \pm الخطأ القياسي بعمر (٣٥) يوماً	معدل معيار الاضداد \pm الخطأ القياسي بعمر (٢٨) يوماً	معدل معيار الاضداد \pm الخطأ القياسي بعمر (٢١) يوماً	معدل معيار الاضداد \pm الخطأ القياسي بعمر (١٤) يوماً	معدل معيار الاضداد \pm الخطأ القياسي بعمر (٧) يوم	معدل معيار الاضداد \pm الخطأ القياسي بعمر يوم واحد	المجاميع
٣٥٩٥.٧ \pm ٦٨٥.٣٥ A	٣١٤١.٠٥ \pm ٣٥٢.١ A	٢٥١٠.٥ \pm ١١٤٨.٢٨ A	٤٢٥٣.٢٥ \pm ٨١٦.٨ A	٧٨٦٥.٦٥ \pm ٧٣٥.٨ A	٧١٩٩.٦ \pm ١٧١٩.١ A	١م
٢٩٦٥.١ \pm ٩٦٧.٢٠ A	٢١٥٠.٣ \pm ٣٢٢.٤ B	١٨٨٨.٨ \pm ٤٢١.٥ B	٢٥٩٠.٤ \pm ٨٧٧.١ B	٦٩٩٠.٧ \pm ٩٧٥.٤ A	٦٧٠١.٧ \pm ٧٨٨.١ A	٢م
١٥٨ \pm ١٥٢ B	٥١٠ \pm ١٠١.٢ B	٧٦٦.٧ \pm ٥٦.٢ B	١٩٦٦ \pm ١٥٧.٥ B	٤٢٠٦.٣ \pm ٦٤٤.٦ B	٩٤٠٧.٦ \pm ١٥٣٥.٨ A	٣م

١م: لقت باللقاح الزيتي المبطل التجاري بعمر ١٨ يوم من الحضن بطريقة تلقح الأجنة

٢م: لقت باللقاح الزيتي المبطل التجاري بعمر ٧ يوم بعد الفقس

٤م: حقنت بالـ BPS بعمر ١٨ يوم من الحضن واعتبرت مجموعة سيطرة

- الاحرف المتشابهة عمودياً تعني عدم وجود فروق معنوية
- الاحرف المختلفة تعني وجود فروق معنوية

اختبار التحدي

اظهرت نتائج اختبار التحدي لمجاميع التجربة بعد تعريضها لحمة نيوكاسل العترة المحلية (Z - ٢٠٠٣) الضارية التي اعطيت بطريقة التقطير بالعين والمنخر والفم بجرعة مقدارها (٠.٥ مل / طير) بضراوة (١ ml / ١٠^{٩.٣} ELD_{٥٠}) وسببت هلاكات مرتفعة في مجموعة المقارنة غير الملقحة بلغت (٩٠%) مع ظهور علامات تنفسية شديدة في اليومين الثالث والرابع صاحبها حالات الاسهال الاخضر المائي صورة (١) ، بسبب إعطاء الحمة عن طريق التقطير بالعين والمنخرين والفم الذي يعد المدخل الطبيعي للحمة في الخمج الطبيعي (Alexander , ١٩٩٧) ، أما العلامات العصبية والتي تمثلت بشلل الأطراف والاجنحة والتواء الرقبة قد لوحظت في اليوم السابع والتي أدى إلى قابلية الحمة الضارية على تحطيم الحاجز الدموي الدماغي (Blood Brain Barrier) وقدرتها على تحطيم الخلايا المبطنة للاوعية الدموية وخلايا المتن (Rahman , et. al. , ٢٠٠٤) ، فضلاً عن ملاحظة الافات العيانية المتمثلة بالنزف في كل من المعدة الحقيقية والقانصة للطيور الهالكة مع احتقان القصبه الهوائية ووجود مواد مخاطية فيها واحتقان الامعاء والرئتين مع وجود بقع نزفية في التجمعات للمفاوية في الامعاء (لخات باير واللوز الاعورية) (صورة ٢ و ٣) ، أما بالنسبة للهلاكات في المجموعة الأولى فقد بلغت (٥%) مقابل (١٥%) في المجموعة الثانية وهذا يعكس قابلية اللقاح على حماية المجاميع الملقحة بالاجنة التي قاومت جرعة التحدي وهذا يتفق مع المستوى المناعي المتمثل بعمل الاضداد الذي تم معايرته باختبار اثباط التلازن الدموي والاليزا ، أما نسبة الحصانة فقد بلغت في المجموعة الملقحة بالاجنة (٩٥%) والمجموعة الثانية الملقحة بعمر ٧ أيام بعد الفقس (٨٥%) كما موضح في جدول (٦) ، قد يرجع سبب مقاومة المجاميع الملقحة للحمة الضارية إلى امتلاكها الاضداد المثبته والمناسبة للحماية (Alexander , ١٩٩٧) ، ان تفوق افراخ المجموعة الأولى مقارنة مع افراخ المجموعة الثانية في نسبة الحصانة (٩٥ مقابل ٨٥%) قد يرجع إلى التحصين المبكر في الاجنة فيما اشار Erhard وجماعته ، (١٩٩٧) إلى ان كفاءة اللقاح تتأثر بنوع العترة المستخدمة فاللقاح الزيتي عترة لاسوتا يعطي معيار اعداد اعلى من بقية العترة وبالتالي يكون لها تأثير اكبر في نسبة الحصانة .

جدول (٦): العلاقة لمعيار الاجسام المناعية لاختباري HI والاليزا والحصانة ضد جرعة التحدي بالعترة الضارية لمرض نيوكاسل

المجاميع	معيار HI بعمر ٣٥	معيار ELISA بعمر ٣٥	العدد الكلي للهلاكات	نسبة الحصانة (%)
١م	34.90 ± 6.10	3595.7 ± 685.35	١ / ٢٠	٩٥

۸۵	۳/۲۰	2965.1± 967.20	31.90± 3.85	۲م
۱۰	۱۸/۲۰	158± 152	1.0± 0.0	۳م

الاستنتاجات و التوصيات

١. أظهرت الدراسة ان اللقاح الزيتي المبطل عترة لاسوتا التجاري المنشأ المستخدم للحصانة ضد مرض نيوكاسل ذو كفاءة عالية في تمنيع اجنة دجاج اللحم التجاري بعمر (١٨) يوماً من الحضن واعطى نسبة حصانة بلغت ٩٥% ضد جرعة التحدي
٢. أظهرت الدراسة على ارتفاع معيار الاضداد في الافراخ الملقحة بطريقة تلقيح الاجنة بعمر (١٨) يوماً مقارنة مع الافراخ الملقحة بعمر (٧) أيام بعد الفقس .
٣. نوصي باجراء دراسة جرع مختلفة من اللقاح الزيتي المحضر والمعطى بطريقة تلقيح الاجنة لمعرفة مدى تأثيرها على الافراخ الفاقسة .
٤. نوصي باجراء دراسة باستخدام اللقاح الزيتي الثنائي أو الثلاثي الذي يحتوي على عتر لقاحية لامراض خاصة بهذه الطريقة .

المصادر

- أشمري ، صبيحة عبد علي (٢٠٠٥) . دراسة مقارنة للقاحات مرض نيوكاسل المختلفة بطريقة التلقيح بأجنة الدجاج . رسالة ماجستير ، كلية الطب البيطري - جامعة بغداد .
- زاهد ، عبد الامير حسين ، جعفر ، نوال صالح ، الينا ، انطوان صبري (٢٠٠٥) . تطبيق طريقة التلقيح في اجنة الدجاج باستخدام لقاح نيوكاسل وكمبورو ونيوكاسل المزدوج . المجلة الطبية البيطرية العراقية . المجلد (٢٩) . العدد الثاني.
- Ahmed, J. and Sharma, J.M. (١٩٩٢). Evaluation of modified live virus vaccine administered in ovo to protect chickens against Newcastle disease, Am. J. vet Res. ٥٣ : ١٩٩٩-٢٠٠٤ .
- Alexander, D.J. (١٩٩٧). Newcastle disease and other paramyxo viridae infection. In: Disease of poultry, ١٠th 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. ٥٤١-٥٧٠ .
- Alexander, D.J. (٢٠٠٣). Newcastle disease and other paramyoxvirus. Pneumovirus. In : Disease of poultry , ١١th Ed. , Eds. by Calnek , B.W. ; Saif , Y.M. ; Mcdougald , L.R. and Swayne , D.E. Iowa stat press , PP. ٦٤-٨١ .
- Allan, W.H.; Lancaster, J.E. and Toth, B. (١٩٧٨). Newcastle disease vaccines and use food and use food and Agriculture organization of the united nations, Rome.
- Bennejean , G. ; Guittet , M. Cautit , J.P. ; Bonquest , J.P. ; Devoux , B. Guard , D. and Morean , Y. (١٩٧٨) . Vaccination of day old chick against Newcastle disease using inactivated oil adjuvant vaccine and / or live vaccine. Avian Pathol. ٧ : ١٥-٢٧

- 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): 360-369.
- Erganis, O. and ucan, U.S. (2003). Evaluation of three different vaccination regimes against Newcastle disease in entral Anatolia-turak J. Vet. Anim. Sci. 27: 1060-1069.
- Erhard, M.H. ; Schmidt, P. Hofmann, A. ; Bergman, J. ; Mittermeier, Kaufmann, P. and Losch, U. (1997). An alternative adjuvant to freunds adjuvant for the immunization of chicken to produce egg youlk antibodies. Alternative to laboratory Animal (A+LA). 20: 173-181. (Cited by Erhard et al, 2000).
- Grimes, S.E. (2002). Abasic Laboratory Manual for the small-scale production, and testing of 1-2 Newcastle disease vaccine. Australian center for international Agricultural Research.
- 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: 51-52.
- Hanson, R.P. (1978). Newcastle disease I: Disease of poultry, 4th Ed. Eds. By Hofstad, M.S. ; Calnek, B.W. ; Helmbodt, C.F. ; Reid, W.M. and Yoder, H.W. Iowa univ. press, Ames ; Iowa, U.S.A., PP. 668-671.
- Huang, Z. ; Panda, A. ; Elank umaran, S. ; Gouindarajan, D. ; Roc kemann, D.D. and Samel, S.K. (2004). The Hemagglutinin-neuraminidase Protein of Newcastle disease virus determines tropism and virulence. J. Virol. 78 (8): 4176-4184.
- Rahman, M.B. ; Rahman, S.M. ; Kabir, K.H. ; Nazir, N.H. ; Mmin, M. (2004). Efficacy of V_ε-HR Newcastle disease vaccine in broiler bird in Bangladesh. Inter. J. Poult. Sci. 3(5): 360-369.
- Rahman, M.M. ; Bari, A.S. ; Giasuddin ; M. Islam, M.R. ; Alam, J. and Sil, G.C. (2002). Evaluation of maternal and humeral Immunity against Newcastle disease virus in chicken. International Jourral of Poultry Sci. I. (10): 161-163.
- Ricks, C.A. ; Avakian, A. ; Bryan, T. , Gildersleeve, R. ; Haddad, E. ; Ilich, R. ; King, S. ; Murray, L. ; Phelps, P. ; Poston, R. ; Whitfill, G. and Wiliams, C. (1999). In ovo vaccination technology. Adv. In Vet. Med. 41: 490-510.

- 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: 134-139.
- Stone, H.; Mitchell, B. and Burgh, M. (1997). In ovo vaccination of chicken embryo with experimental Newcastle disease and Avian influenza oil-emulsion vaccines, *Avian Dis.*, 14: 806-813.
- Young, M. ; Grimes, R. ; Spradbrow, P. , Dias, P. ; Siwa, A. and Labo, Q. (2002). Controlling Newcastle disease, A laboratory Manual in village chickens, Australian center for International Agriculture Research.