

دراسة مقارنة للكشف عن الاضداد النوعية لفايروس الانفلونزا عترة H9N2 المعزولة محليا في فروج اللحم

عائدة برع علاوي و امين احمد صبار

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

01/10/2008

تاريخ التسليم

12/04/2009

تاريخ القبول

الخلاصة

تضمنت هذه الدراسة اجراء تجربة مؤلفة من ثلاث مجاميع . المجموعة الاولى المؤلفة من 15 فرخا , اجري لها اصابة تجريبية بفايروس H9N2 (AMR.ANT/IRAQ/2005) بعداعادة تنميتها 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 اما المجموعة الثانية المؤلفة من 15 فرخا اجري لها اصابة تجريبية بفايروس H9N2 (AMR.ANT/IRAQ/2005) بعمر (24) يوم بمقدار (0.2) مل لكل فرخ وبجرعة $10^{8.6}$ ELD50/0.1ml) وقدتركت المجموعة الثالثة المؤلفة من (10) افراخ كمجموعة سيطرة(بدون تلقيح). قيست الاستجابة المناعية لافراخ التجربة الثلاث بعمر (24) يوم وعمر (44) يوم بالاعتماد على فحص الاليزا.

Comparative study on specific H9N2 antibodies in broiler

Aida Bara Allawe and amen Ahmed Sabaar

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

Summery

This study was concerned with conduction of experiment for this reason three groups of broiler chicks were used. First group (which is consisted of 15 chicks) was infected experimentally with H9N2 (AMR.ANT/IRAQ/2005) ($10^{8.6}$ ELD50/0.1ml) at age (8) day. Second group (which is consisted of 15 chicks) was infected experimentally with H9N2 (AMR.ANT/IRAQ/2005) ($10^{8.6}$ ELD50/0.1ml) at age (24) day. The third group (which was consisted of 10 chicks) was considered as a control group without infection. Immune response in all chicks groups was estimated at age (24, 44) days depending on ELISA test.

المقدمة

الأنفلونزا كلمة ايطالية تعني الانتشار الواسع , ومرض الانفلونزا او كما يخشى البعض ان يكون طاعون العصر مرض فايروسي شديد العدوى يصيب الانسان والحيوان على حد سواء , ومن الحيوانات التي تصاب بالمرض هي الطيور بمختلف انواعها , الخيول والخنازير هذا فضلا عن الحيتان والفقمات وتغالب الماء , ينتشر هذا المرض في مختلف بقاع العالم مهددا بكارثة قد لا يحمد عقبها (1) . وقد سجل في الآونة الاخيرة حدوث اصابات في الدجاج سببها عترة فايروس انفلونزا الطيور نمط H9N2 ظهرت في مناطق مختلفة من العالم منها جنوب افريقيا والولايات المتحدة الامريكية وكوريا وهونغ كونغ والصين (2) اذ اظهرت احدي الدراسات في هونغ كونغ ان فايروس H9N2 هو ثاني اكثر الفايروسات انتشارا في اسواق الطيور خلال الانتشار الوبائي عام 1997 وقد تم عزله من حوالي 5% من الدواجن وبالرغم من ذلك فان فايروس H9N2 له قابلية امراضية منخفضة مقارنة مع فايروسات الانفلونزا الاخرى نمط H5N2, H7N7, H2N2 وهذا لا يمنع من حصول اصابات شديدة نتيجة تواجد العوامل المرضية الانتهازية (3), اما في العراق فقد تم عزل هذا النمط من قبل الباحثة هدى عبد الهادي النصر اوي عام 2002 (4) لأول مرة في القطر وتم تشخيص اعداد الفايروس في امصال الدجاج المصاب الذي عزل منة الفايروس واعاد امين احمد صبار (5) عزل فايروس الانفلونزا نمط H9N2 اذ استخدم فحص ال (PCR) لأول مرة في القطر لتشخيص نماذج H9N2 المعزولة.

أحدثت الإصابة بفايروس أنفلونزا الطيور نمط H9N2 في باكستان انخفاض في الانتاج البيض بنسبة 30-70% مع حدوث هلاكات بنسبة (5-10)% في الدجاج البيض , اما الإصابة في دجاج اللحم فأدت الى هلاكات تصل نسبتها 45-85% , في عمر 15-20 يوم (6).

أجريت هذه الدراسة للتعرف على شدة الإصابة بفايروس انفلونزا الطيور نمط H9N2 تجريبيا عند اعطاء لافراخ دجاج اللحم بعمرين مختلفين ومقارنة الاستجابة المناعية في كلا العمرين بالاعتماد على فحص الاليزا.

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 البناء.

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

2- الافراخ المستخدمة في التجربة

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

3-تصميم التجربة

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

- 1-المجموعة الاولى: 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.
- 2-المجموعة الثانية: تتألف من 15 فرخا اجري لها اصابة تجريبية بعترة H9N2 اذ اعطي للافراخ بعمر (24) يوم بمقدار (0.2) مل لكل فرخ وبجرعة $10^{8.6}$ ELD50/0.1ml.
- 3-المجموعة الثالثة: تتألف من 10 افراخ لم يتم تلقيحها باي لقاح وتركت كمجموعة سيطرة.

4-جمع نماذج الدم من أفراخ التجربة

جمعت نماذج الدم من أفراخ التجربة بعمر (24,44) يوم من الوريد الجناحي وبمعدل 7 عينات من كل مجموعة ، أخذت عينات الدم من القلب مباشرة ومن الوريد الجناحي وبمعدل (1-2) مل للعينة الواحدة حيث تم وضعها في أنابيب 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 معلّمة حسب المجاميع حفظت في درجة - 20 م، بعد ذلك فحصت باختبار الاليزا.

5-اختبار الاليزا

استخدم اختبار الاليزا للكشف عن الاضداد النوعية لفايروس الانفلونزا في مصول افراخ مجاميع التجربة بعمر (24,44) باتباع تعليمات الشركة المنتجة (Labor Diagnostik Leipzig, Germany) تم الحصول عليه بمساعدة د.مبثم إحسان عيد الرسول.

النتائج

1-العلامات السريرية

اظهرت المجموعة الاولى المخمجة تجريبيا بفايروس الأنفلونزا بعمر ثمانية ايام هلاك ثلاثة من الافراخ بعد مرور ثلاثة ايام من اجراء الاصابة التجريبية بالفايروس، إذ تم اجراء الصفة التشريحية للافراخ الهالكة لتأكيد الاصابة، في حين اظهرت بقية الافراخ علامات تنفسية تمثلت بالعطاس وصعوبة التنفس، اما المجموعة الثانية المخمجة تجريبيا بالفايروس بعمر (24) يوم فلم تظهر هلاكات ولم تكن هناك سوى علامات تنفسية طفيفة.

2-نتائج فحص الاليزا لمجاميع افراخ التجربة بعمر 24 يوم وعمر 44 يوم

كانت نتائج فحص الاليزا للكشف عن الأضداد النوعية لفايروس الأنفلونزا نمط H9N2 في أمصال مجاميع أفراخ التجربة في عمر 24 يوم و 44 يوم كما هو موضح في الجدول (الجدول 1 و 2):

الجدول (1): نتائج فحص الاليزا لمجاميع أفراخ التجربة بعمر 24 يوم للكشف عن الأضداد النوعية الخاصة بفايروس الأنفلونزا نمط H9N2

المعدل	نتائج اختبار الاليزا (أقيام الكثافة الضوئية OD) تسلسل العينات							موعد الإصابة التجريبية	مجاميع أفراخ التجربة
	7	6	5	4	3	2	1		
0.771	0.840	1.290	0.844	1.035	0.459	0.408	0.526	بعمر 8 يوم	المجموعة الاولى
0.207	0.160	0.145	0.246	0.149	0.167	0.280	0.308	قبل الإصابة التجريبية	المجموعة الثانية
0.177	0.150	0.039	0.016	0.316	0.159	0.381	0.184	بلا إصابة	المجموعة الثالثة

الجدول (2): نتائج فحص الاليزا لمجاميع أفراخ التجربة بعمر 44 يوم للكشف عن الأضداد النوعية الخاصة بفايروس الأنفلونزا نمط H9N2

المعدل	نتائج اختبار الاليزا (أقيام الكثافة الضوئية OD) تسلسل العينات							موعد الإصابة التجريبية	مجاميع أفراخ التجربة
	8	7	6	5	4	3	2		
1.098	0.982	1.575	0.359	1.012	1.044	0.967	1.750	بعمر 8 يوم	المجموعة الاولى
0.577	0.247	0.364	0.331	0.209	1.294	0.236	1.359	بعمر 24 يوم	المجموعة الثانية
0.165	0.112	0.067	0.167	0.113	0.356	0.096	0.247	بلا إصابة	المجموعة الثالثة

* تعد قيمة الكثافة الضوئية OD الاكثر من 0.3 نتيجة موجبة (+) في حين تعد قيمة الكثافة الضوئية OD الاقل من 0.3 نتيجة سالبة (-).

المناقشة

صنف فايروس انفلونزا الطيور نمط H9N2، ضمن الفايروسات التي تصيب الطيور الداجنة مثل الدجاج، والديك الرمي، والبط..... الخ مسببا علامات تنفسية بسيطة مع انخفاض في انتاج البيض وفي بعض الاحيان هلاكات بنسبة 5-10% في الدجاج البياض، اما الإصابة في دجاج اللحم فتؤدي إلى إصابة تنفسية مع هلاكات قد تصل نسبتها (45-85) %، كما حدث في باكستان عام 1998 م (6).

ومن ملاحظة نتائج الإصابة التجريبية بفايروس الأنفلونزا نمط H9N2 في مجاميع أفراخ التجربة نجد ان نسبة الهلاكات في المجموعة الاولى المخمجة تجريبيا بفايروس الأنفلونزا في عمر ثمانية ايام بلغت 20 % مقارنة بالمجموعة الثانية المخمجة تجريبيا بفايروس الأنفلونزا في عمر 24 يوم، وقد يعود السبب في ذلك إلى تطور الجهاز المناعي لمقاومة الإصابة في عمر 24 يوم مقارنة بالإصابة في عمر ثمانية أيام، كما ان نسبة الهلاكات في المجموعة الاولى كانت قليلة مقارنة بنسبة الهلاكات التي أحدثتها الإصابة الطبيعية بفايروس الأنفلونزا نمط H9N2 في باكستان (6).

في حين لم يسجل حدوث هلاك في المجموعة الثانية المخمجة بعمر 24 يوم، وهذا يتفق مع ما ذكره الباحث (7)، الذي أشار إلى ان الإصابة التجريبية بفايروس الأنفلونزا نمط H9N2 لا ينتج عنها إلا علامات تنفسية بسيطة.

أما الاستجابة المناعية للفايروس فقد كانت عالية جدا في أمصال الدجاج المصاب تجريبيا بعمر ثمانية أيام، فمن ملاحظة أقيام الكثافة الضوئية الخاصة بفحص الاليزا لمصول أفراخ التجربة نجد تفوقا للمجموعة الاولى في عمر 44 يوم وبفارق معنوي مقداره $p > 0.01$ عن المجموعة الثانية والثالثة، وقد يرجع السبب في ذلك إلى الإصابة المبكرة بالفايروس، كما يدل على شدة الإصابة بالفايروس في

المجموعة الأولى المخمجة تجريبيا بعمر ثمانية أيام مقارنة بالمجموعة الثانية المخمجة تجريبيا بعمر 24 يوم، إذ يعد فحص الاليزا من الفحوصات المصلية شائعة الاستخدام في تشخيص الأضداد النوعية لفايروس الأنفلونزا (8). ومن الأسباب التي تبرر شدة الإصابة طبيعيا مقارنة بالإصابة التجريبية، هو وجود الإصابات البكتيرية التي تزيد من حدة الإصابة حقليا، لاسيما جرثومة الإشريشيا القولونية (*E.coli*) والمكورات العنقودية (*Staph.aureus*)، إذ تزيد من قابلية انشطار مستضد الهيكلوتين مما يزيد من ضراوة الفايروس عند الإصابة في حقول الدواجن المختلفة (3).

المصادر

- 1- Nicholson, K.G.; Wood, J.M. & Zambon, M. (2005). Lancet, 362:1733-1754.
- 2- Gibbs, W.W. & Soares, C. (2005). Preparing for a Pandemic. Scientific American, p: 23-31.
- 3- Bano, S.; K.Naeem & Malik, A. (2002). Avian Influenza in: Fifth international symposium. University of Georgia, Athens, GA.
- 4- النصر اوي, هدى عبدالهادي علي (2002). دراسة حول الاصابة بفايروس الانفلونزا في الانسان والطيور - رسالة ماجستير - كلية الطب البيطري - جامعة بغداد.
- 5- صبار, امين احمد (2007). دراسة وبائية وتشخيصية لمرض انفلونزا الطيور في العراق - رسالة ماجستير - كلية الطب البيطري - جامعة بغداد.
- 6- Naeem, K.; Ullan, A.; Mavell, R.J. & Alexander, D.J. (1999). Avian influenza a subtype H9N2 in poultry in Pakistan. Vet. record. 145:560.
- 7- Alexander, D.J. (1993). Orthomyxovirus infection. In McFerran, J.B. & M.S. McNulty (eds.). Virus infections of birds. Science: 287-316.
- 8- OIE (2005). Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals: avian influenza. Chap 2.7-12..