المجلة العراقية للعلوم البيطرية، المجلد١٩، العدد ٢، ٢٠٠٥(١١٥-١٢٢)

دراسة التاثيرات المرضية لفايروس مرض النيوكاسل المعزول من الجهاز التنفسي العلوي في فروج اللحم

صفوان يوسف البارودي

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

(الاستلام ١٩ حزيران ٢٠٠٥؛ القبول ٧ تموز ٢٠٠٥)

الخلاصة

تم خلال هذه الدراسة الحصول على ست عزلات لفايروس مرض النيوكاسل بعد اجراء عملية التمرير للعينات التي جمعت من حقول الدواجن لمناطق مختلفة من محافظة نينوى. حيث تم تمرير العينات لاربع مرات متتالية على اجنة بيض الدجاج بأستخدام الحقن على التجويف اللقانقي. اظهرت النتائج بان اربعة من هذه العزلات تعد ضارية واثنتان منها متوسطة الضراوة اعتمادا على الافات العيانية الملاحظة على الاجنة الهالكة (وأغشيتها) ومؤشرات الضراوة المتضمنة متوسط الوقت اللازم لقتل اجنة بيض الدواج (MDT) , والمؤشر المرضي عند الحقن داخل الدماغ (ICPI), والمؤشر المرضي عند الحقن داخل الوريد (IVPI). وبين الخمج التجريبي تفاوتا في ظهور الاعراض التنفسية على الافراخ و حصول هلاكات في المجاميع المحقونة ، ومع ذلك بينت نتائج اختبار تثبيط التلازن الدموي أرتفاعا في معيار الاضداد في المجاميع المخمجة تجريبيا بعد الاسبوع الاول من الاصابة وكان اكثر وضوحا عند الاسبوع الثاني.

STUDY OF PATHOLOGICAL EFFECTS OF NEWCASTLE DISEASE VIRUS ISOLATED FROM UPPER RESPIRATORY SYSTEM IN BROILERS

S Y Al-Baroodi

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

ABSTRACT

This study was conducted to determine the pathogenicity of six local isolates of Newcastle disease virus (NDV) obtained form different area of Ninevah province. Isolation procedures employed via fertile chicken eggs inoculation. This study processed on the 4^{th} passage of this isolate. Depending on the embryonic lesion induced by this isolates, parallel with Mean Death time (MDT), Intravenous Pathogenicity Index (IVPI) and Intra Cerebral Pathogenicity Index (ICPI). The results

of the study demonstrate that four of the isolates were highly pathogenic, while the other two were mesogenics. The experimental infection using this isolate in broiler chick revealed variability in respiratory signs and in mortality rates. However, antibodies Hemagglutination titers (HI) showed elevation in all infected bird in the first week post-infection (PI) and were more prominent in the second week of (PI).

المقدمة

لا يزال مرض النيوكاسل احد اهم العقبات الرئيسية واخطر المشاكل التي تواجه صناعة الدواجن في العراق نظرا للاندلاعات المرضية المتسببة عنه ولضراوة العتر المسببة له في القطر (1). وتكمن اهمية دراسة الافات التي يسببها فايروس مرض النيوكاسل المعزول من الجهاز التنفسي العلوي في الدجاج في كون بعض عتر هذا المرض ضاريةاو متوسطة الضراوة كما ويعتبر الجهاز التنفسي من احد الاجهزة التي تتعرض للاصابة بهذا الفايروس في بداية دخوله الى الجسم ، وبالرغم من اجراء عملية تضعيف لبعض العتر المعزولة من الجهاز التنفسي واستخدامها كعتر لقاحية الا انها في بعض الاحيان وبوجود عوامل الاجهاد وبعض المسببات الجرثومية في الجهاز التنفسي قد تسبب مشاكل تنفسية في الافراخ بعد عملية التلقيح (2). ولهذا السبب ينصح احيانا بعدم تلقيح الافراخ بهذه العتر باعمار صغيرة وخاصة عند التلقيحة الاولى ومن هذه العتر عترتي Lasota و V4 (3).

لذلك تضمن هذا البحث دراسة التاثيرات المرضية لبعض عتر فايروس مرض النيوكاسل المعزولة من الجهاز التنفسي والتي ربما يمكن ان تستخدم مستقبلا كعتر لقاحية بعد اجراء عملية التضعيف لها .

المواد وطرائق العمل

اولا: عزل وتنمية الفايروس على اجنة بيض الدجاج:

تم جمع العينات من حقول تربية افراخ فروج اللحم من مناطق مختلفة في محافظة نينوى وكانت تعاني قطعانها من مرض النيوكاسل اعتمادا على العلامات السريرية والتي تمثلت بالاعراض التنفسية مع صعوبة التنفس ، بعدها تم اخذ القصبة الهوائية ، الرئتان من الطيورالمريضةو الهالكةحديثا ثم اجري عليها عملية سحن تلك العينات بأستخدام الهاون والرمل المعقمين مع اضافة المضادات الحياتية واخذ الراشح بعد اجراء عملية النبذ في جهاز الطرد المركزي المبرد,حقن الراشح في التجويف اللقانقي في اجنة بيض الدجاج (تم جلبه من السوق المحلي) بعمر 10 ايام(4) ، حيث تم تمرير العينات لاربعة مرات متتالية (Four Passages) وتم تسجيل الافات العيانية على الاجنة الهالكة واغشيتها مع قياس معيار الفايروس ومعادلته بمصول عالية التمنيع في السائل اللقانقي لكل تمريرة(5,6)

ثانيا : قياس ضراوة الفايروس:

حيث تم قياس ضراوة العزلات المستخدمة في هذه الدراسة لمعرفة درجة ضراوتها مقارنة بالمقياس العالمي للضراوة(7) وذلك حسب المؤشرات الاتية:

أ.متوسط الوقت اللازم لقتل اجنة بيض الدجاج (MDT) Mean Death Time
بحقن جرعة قاتلة صغرى في أجنة بيض دواجن على التجويف اللقانقي مع حساب وقت موت الاجنة بالساعات.
ب.المؤشر المرضي عند الحقن داخل الدماغ (ICPI) Intra Cerebral Pathogenicity Index.
بحقن افراخ بعمر يوم واحد ب٠.٠٥مليليتر في الدماغ ومراقبتها لمدة اسبوع.
ج.المؤشر المرضي عند الحقن داخل الوريد (IVPI) Intra Venous Pathogenicity Index
بحقن افراخ بعمر ثمانية اسابيع بالوريد بمقدار ٠.٠٢ سم٣.
ثالثا: احداث الخمج التجريبي في افراخ فروج اللحم عند عمر 28 يوما
تم الحصول على افراخ فروج لحم بعمر يوم واحد (عدد 140) فرخا .لم تعامل تلك الافراخ باي نوع من اللقاحات . بعدها تم جمع المصل منها اسبوعيا وحتى الاسبوع السادس من عمرها وذلك لغرض قياس معيار الاضداد في مصولها ، وعند عمر 28 يوما (الاسبوع الرابع من العمر) قسمت الافراخ الى 7 مجاميع متساوية العدد وخمجت ست مجاميع منها بعزلة من العزلات بجرعة$10^{6.5}$ EID50/0.1ML عن طريق الفم ومنخرين (8) ، اما المجموعة السابعة فلم تعرض لاي اصابة وعدت سيطرة سالبة . بعدها تم مراقبة الافراخ لمدة 14يوما من تعريضها للفايروس مع تسجيل كل من الاعراض السريريةو الافات العيانية فضلا عن نسبة الهلاكات على الطيورالمخمجة .
رابعا : اختبار تثبيط التلازن الدموي Haemagglutination Inhibition Test
تم استخدام هذا الاختبار لقياس معيار الاضداد في مصول الافراخ قبل وبعد تعرضها للاصابة (9).

النتائج

اولا : عزل وتنمية الفايروس
تبين خلال عملية العزل لفايروس مرض النيوكاسل على اجنة بيض الدجاج الحصول على ست عزلات لهذا المرض بعد معادلتها مع المصول عالية التمنيع المتخصصة لها ، واوضحت نتائج تمرير هذه العزلات في اجنة بيض الدجاج ارتفاع متباين في معيار هذه العزلات بتقدم عملية التمرير مع وجود فروقات واضحة في شدة الافات العيانية على الاجنة واغشيتها وكذلك في وقت موت الجنين بالساعات كما في جدول رقم (1)

ثانيا : ضراوة العتر الفايروسية
اوضحت نتائج قياس ضراوة العتر الفايروسية باستخدام المؤشرات الثلاثةالمستخدمة في هذه الدراسة وجود ارتفاع في تلك المؤشرات لاربع عزل فايروسية(4.3.2.1) ، اما العزلتين الاخريين (6,5) فكانت مؤشراتها اقل مقارنة بالعزل الاربعة الاولى(جدول- 2)

جدول (1): معيار العزلات الفايروسية مقاسا بـ$EID_{50/0.1ml}$ مع تأثيراتها المرضية على اجنة بيض الدجاج

رقم العزلة	رقم التمريرة	معيار العزلة $EID_{S0/0.1ml}$	وقت موت الجنين بالساعات	احتقان كيس المح	ضعف النمو	احتقان الغشاء اللقانقي المشيمي	نزف على الاحشاء
1	P1	$10^{3.1}$	72	+	-	+	-
	P2	$10^{4.7}$	60	++	+	++	+
	P3	$10^{3.8}$	60	++	+	++	+
	P4	$10^{6.6}$	48	+++	++	+++	++
2	P1	$10^{2.8}$	72	+	-	-	+
	P2	$10^{3.6}$	60	+	-	+	+
	P3	$10^{4.4}$	60	++	+	++	+
	P4	$10^{5.9}$	48	++	++	++	++
3	P1	$10^{3.4}$	60	+	-	+	-
	P2	$10^{4.1}$	60	+	-	+	-
	P3	$10^{5.8}$	60	++	+	+	-
	P4	$10^{6.7}$	48	++	++	+	+
4	P1	$10^{2.7}$	72	+	+	+	-
	P2	$10^{3.7}$	60	++	+	+	-
	P3	$10^{4.6}$	60	++	+	+	+
	P4	$10^{5.2}$	60	++	++	+	+
5	P1	$10^{2.8}$	120	_	_	+	_
	P2	$10^{3.9}$	108	-	-	+	-
	P3	$10^{4.8}$	96	+	-	+	+
	P4	$10^{5.9}$	72	+	-	++	+
6	P1	$10^{2.6}$	120	-	-	+	+
	P2	$10^{3.6}$	108	+	+	+	+
	P3	$10^{4.8}$	96	+	+	++	+
	P4	$10^{5.8}$	84	+	+	++	+

الاشارات التالية تمثل شدة الاصابة:- =عدم وجود أفات.+=أفات بسيطة.++=أفات متوسطة الشدة.+++=أفات شديدة. Passage= p = تمريرة

جدول (2): يبين ضراوة العتر الفايروسية المعزولة ومؤشراتها

اسم الاختبار / رقم العزلة	متوسط الوقت اللازم لقتل الاجنة MDT مقاسا بالساعات	المؤشر المرضي عند الحقن داخل الدماغ ICPI	المؤشر المرضي عند الحقن داخل الوريد IVPI
1	48	1.8	2.4
2	48	1.7	2.3
3	52	1.6	2.3
4	52	1.6	2.2
5	72	1.4	1.7
6	84	1.3	1.6
المدى القياسي العالمي*	120-46	2-0	3-0

*المدى القياسي العالمي استنادا الى المصدر رقم (7)

ثالثا : الخمج التجريبي:

بنيت نتائج الخمج التجريبي على حصول هلاكات في المجاميع المحقونة وبنسب متفاوتة ابتداءا من اليوم الثالث من تعريضهاللخمج وانتهاءا في اليوم العاشر باستثناء مجموعة السيطرة ، اما العلامات السريرية فتمثلت بصعوبة التنفس ، حشرجة تنفسية ، اسهال ذا لون اخضر مع اعراض عصبية في بعض الاحيان وكانت هذه العلامات متفاوتة بين المجاميع الستة المعرضة للاصابة ، وان الافات العيانية التي ظهرت على الافراخ الهالكة قد تراوحت بين الشديدة جدا ومتوسطة الشدة على كل من الجهاز التنفسي والاعضاء الداخلية الاخرى . (جدول 3).

جدول (3): الافات العيانية ونسبة الهلاكات في الافراخ المعرضة للاصابة التجريبية

الافات العيانية رقم المجموعة	**نزف واحتقان على القصبة الهوائية**	**احتقان الجيوب الانفية**	**تضخم ونزف في اللوز الاعورية**	**تضخم ونزف في الطحال**	**نزف على المعدة الغدية**	**نسبة الهلاكات %**
1	++++	+++	+++	+++	++	**%80**
2	+++	+++	++	++	++	**%75**
3	+++	+++	++	+++	+++	**%70**
4	+++	++	+++	++	++	**%70**
5	++	++	+	+	+	**%40**
6	+	+	+	–	+	**%25**
7 السيطرة	–	–	–	–	–	**%0**

الاشارات التالية تمثل شدة الاصابة:- =عدم وجود أفات.+=أفات بسيطة.++=أفات متوسطة الشدة.+++=أفات شديدة.++++=أفات شديدة جدا

رابعا: معيار الاضداد:

بينت نتائج اختبار تثبيط التلازن الدموي المستخدم لقياس معيار الاضداد انخفاضا تدريجيا في معيار الاضداد الامية منذ اليوم الاول من عمرها حتى بلغ صفراً عند عمر 28 يوم ، وبعد تعريض الافراخ للعزلات الفايروسية الستة كل حسب مجموعته. لوحظ ارتفاع معيار الاضداد في الاسبوع الاول من اعطاءها العزلات وبمعايير متفاوتة ومن ثم استمر المعيار بالارتفاع ايضا عند الاسبوع الثاني من تعريضها للعزلات مقارنة بمجموعة السيطرة. جدول (4).

جدول رقم (4) : معيار الاضداد في مصول الافراخ قبل وبعد الخمج التجريبي باستخدام اختبار تثبيط التلازن الدموي مقاسا بالوسط الحسابي ل Log_2

العمر بالايام / المجاميع	1	7	14	21	28*	35	42
1	2.2	2	1.7	1.1	Zero	5.3	6.7
2	2.2	2	1.7	1.1	Zero	4.7	6.2
3	2.2	2	1.7	1.1	Zero	4.7	5.8
4	2.2	2	1.7	1.1	Zero	5.1	6.1
5	2.2	2	1.7	1.1	Zero	4.1	4.9
6	2.2	2	1.7	1.1	Zero	4.1	4.9
7	2.2	2	1.7	1.1	Zero	Zero	Zero

* اعطاء العزلات الفايروسية

المناقشة

لايزال مرض النيوكاسل احد الامراض الفتاكة والمسببة لخسائر اقتصادية فادحة في حقول انتاج الدواجن في العراق على الرغم من اتباع برامج تلقيحية مكثفة باستعمال عتر في B1 ولاسوتا الا انها فشلت في الحد من الاندلاعات المرضية له (10) وقد يعزى هذا الفشل الى التباعد المستضدي بين هاتين العترتين من جهة وبين العزلات الفايروسية الحقلية الضارية من جهة اخرى(11) . لذلك تدعو الحاجة في قطرنا لانتاج عترة لقاحية محضرة من عزلات محلية .كما حصل في عام 1968 حيث عزلت عترة ابو غريب (ابو غريب 68 ، AG-68) واثبتت هذه العترة اللقاحية كفاءة مناعية جيدة مقارنة بعترة B1 ولاسوتا حيث استمر العمل بها لفترة من الزمن واثبتت نجاحها(12).

بينت هذه الدراسة الحصول على ست عزلات لمرض النيوكاسل وكان المعيار لها متفاوتا عند تمريرها على اجنة بيض الدجاج ومنخفضا في نفس الوقت عند مقارنته مع عدد مماثل من التمريرات لباحثين اخرين (13) حيث وصل معيار تلك العزلات الى $10^{8.5}EID_{5.0}/0.1ml$ وربما يعود السبب في ذلك لاستخدام بيض من نوع (Specific Pathogen Free SPF) مقارنة بالبيض المستخدم قيد الدراسة. اما شدة الافات العيانية الملاحظة على الاجنة المحقونة ومؤشرات الضراوة الثلاثة المتضمنة ICPIو IVPI MDT اظهرت ان اربعة من هذه العتر هي ضارية جدا وهذه النتيجة تتفق مع الباحث (14) في حين صنف الباحث القدو (15) العزلات التي تم عزلها من قبلة عام 1988في محافظةنينوىبانها متوسطة الضراوة وقد يعود سبب هذا الاختلاف الى ظهور عتر جديدة

ضارية ، اما العزلتين الاخريين فتدل الافات العيانية لها ومؤشراتها بانها عزلتين متوسطتي الضراوة (2) حيث ان مؤشراتها والافات العيانية لها كانت اقل مقارنة بالعزلات الاخرى.

ان تفسير التباين في ضراوة العزلات المعزولة هو ان العراق يعتبر من الدول الموبوئة بمرض النيوكاسل, ونظرا لاختلاف النظرة السابقة في كون فايوس مرض النيوكاسل موحد مستضديا,فقدت تبين من خلال تقنيات الهندسة الوراثية ظهور تباعد مستضدي واضح,وهذا يعني لنا فشل التلقيح نظرا للتباعد بين العترللقاحية والحقلية الضارية(16).

اما الصورة السريرية للافراخ المعرضة للخمج التجريبي بهذه العزلات فتمثلت بصعوبة التنفس ، حشرجة تنفسية مع علامات عصبية وهضمية في بعض الاحيان بدرجات متباينة وكانت نسبة الهلاكات معتمدة على ضراوة هذه العتر (3) . كما بينت نتائج اختبار تثبيط التلازن الدموي بان معيار الاضداد وصل الى مستوى عالي بعد مرور 14 يوم من تعريض الافراخ للعزلات الستة وهومطابق لملاحظة سابقة (14) وكان هذا المعيار اعلى مع العتر الضارية مقارنة بالعتر متوسطة الضراوة ويعود السبب في ذلك لكون الاستجابة المناعية تتناسب طرديا مع ضراوة الفايروس وعكسيا مع عدد التمريرات التي تجري على العزلات (17). ان العزلات التي تم عزلها في هذه الدراسة تستوجب بعض الدراسات الموسعة منها التمرير المتكرر لها على اجنة بيض الدجاج من نوع (SPF Embryonated eggs) او على خلايا الزرع النسجي وذلك لزيادة معيار الامان لهذه العزلات بهدف استعمالها كعتر لقاحية وبالتالي اختبار كفاءتها من خلال استخدام اختبار التحدي الذي يعتبر المؤشر الحقيقي لنسبة الحماية التي تحدثها العتر اللقاحية بعد التلقيح بها مقارنة بمعيار الاجسام المضادة الذي لايعطي صورة كاملة لدرجة الحماية بعد التلقيح (18).

المصادر

1. Alexander DJ. Newcastle disease in: Diseases of poultry, ed. Saif YM, Barnes HJ, Fadly AMG, Lisson JR.11th ed. Iowa State Press Black Well Publishing Company.2004 PP 64-88.
2. Hasson E, Young JG, Hooper PT, Della-Porta AJ. Virulance and transmissibility of some Australia and exotic strains of Newcastle disease virus used in some vaccines . Aust Vet J 1999; 77(1): 51-52.
3. Hooper PT, Hansson E, Young JG, Russell GM, Della-Porta AJ.Lesions in the upper respiratory tract in chicks experimentally infected with Newcastle disease virus isolated in Australia. Aust Vet J 1999; 77(1): 50-51.
4. Ibrahim RS, Fatima AM, Mubarak M. Paramyxovirus Infection in Pigeons. Assiut Vet Med J 2000; 44(87): 206-219.
5. Reed LJ, Muench H. A simple Method of estimating fifty percent end points. Am J HYG 1938; 27(3): 493-494.
6. Dimmock NJ. Mechanism of Neutralization of Animal Viruses. J Gen Virol 1984; 65:1012-1015.

7.Yong-Chang Y,Chang-Poa C, Hwang Chieh HK, Yang CY,Chang-Pc ,Hwang JM. Nuclotid sequence and phylogenetic analysis of New Castle disease virus isolates from recent out breaks in Taiwan. Avian. Disease 1997; 4: 365-373.

8. Hassan MK, Afify MA, Ally MN. Genetic resistance of Egyptian chickens to infectious bursal disease and Newcastle Disease. Trop Animal Health Prod 2004; 36: 1-9.

9. Yeo SG, Nagy E, Krell PJ. Indirect Method for prediction of haemagglutination Inhibition antibody titers to Newcastle disease virus in chickens and titration of antibodies in egg yolk. J Vet Diag Invest 2004; 15: 184-187.

10. Sukker IMH, Sawa MI. Evaluation of two NDV strains of vaccine preparation and Application in Iraq. J Egypt Vet Med Ass 1974; 34:5.

11.Grindstaff JL, Edmund D, Brodie II, Ketterson ED. Immune Function across generations integrating mechanism and evolutionary process in material antibody. Proc R Soctland B. 2003; 2309-2319.

12.عبد ، عبد الامير حسين .دراسة تقييم اللقاحات لمرض النيوكاسل المنتجة محليا في افراخ فروج اللحم . رسالة ماجستير ، كلية الطب البيطري ، جامعة بغداد ،1980.

13.Wehman E, Herczeg J, Tony J, Nagy E, Lomnicz B. Lentogenic field isolates of Newcastle disease virus isolated in Canada and Hungary are identical with the vaccine type, used in region. ACC 1999; 28: 6-12.

14.البارودي، صفوان يوسف. دراسة مقارنة للقاحات المتوفرة في القطر للسيطرة على مرض النيوكاسل . رسالة ماجستير ، كلية الطب البيطري ، جامعة الموصل ،2001.

15. القدو ، رافع حمزة .عزل وتوصيف عترات حمة مرض النيوكاسل من الدواجن المصابة بالمرض في محافظة نينوى . رسالة ماجستير ، كلية الطب البيطري ، جامعة الموصل، 1989.

16. Roy P, Venugopalen AT. Virulence of Newcastle disease vaccine Virus (es) in the field (Bibliographic citation). Tropical Animal Health and Production. 1998; 30: 41-44.

17. Elsisi MA, Shakal M, Aly A, Abou Hashem N. Pathogenicity of recent isolated of pigeon paramyxovirus in pigeon in Egypt. Vet Med J Giza.1995; 43: 207-212.

18. Alexander DJ.Newcastle disease in: manual of standers for diagnostic tests and vaccines. Office International des Epizooties Paris France 1992: PP 130-141.