------ مجلة علوم الرافدين، المجلد16، العدد7، خاص بعلوم الحياة، ص 69-76، 2005-----

تأثير الإصابة التجريبية لنمطين مصليين من السالمونيلا على الاستجابة المناعية للقاح مرض النيوكاسل في افراخ اللحم

شهاب احمد ياسين صفوان يوسف البارودي فنار ابلحد دانيال

فرع الأحيـاء المجهرية

كليـة الطب البيطري

جامعـة الموصـل

(تاريخ الاستلام 2003/10/1 ، تاريخ القبول 2004/4/13)

الملخص

تم دراسة تأثير الاصابة التجريبية بنوعين من جراثيم السالمونيلا على الاسـتجابة المناعيـة فـي الافراخ . شملت هذه الدراسة اربعة مجاميع من افراخ اللحم ، اذ اصـيبت افـراخ المجموعـة الاولـى بجرثومة *Salmonella typhimurium* بجرعة 10^6 x 2 خلية مولدة للمستعمرة في الملمتر وبواقع 0.5 مل/طير عن طريق الفم عند عمر 5 أيام ، وعوملت افراخ المجموعة الثانية بجرثومـة *S. enteritidis* بجرعة 10^8 x 1 خلية مولدة للمستعمرة في الملمتر وبواقع 0.5 مل/طير عن طريق الفم بعمر 5 أيام ايضا . اما المجموعة الثالثة فتركت بدون اصابة بهذه الجرثومة كسـيطرة موجبـة امـا المجموعـة الرابعـة فاستعملت كسيطرة سالبة. بعدها لقحت المجاميع الثلاثة الاولى بلقاح مرض النيوكاسل عند عمر7 أيـام ثم عرضت المجاميع الأربعة لاختبار التحدي بفايروس مرض النيوكاسل الضـاري وذلـك فـي بدايـة الاسبوع الرابع بعد التلقيح . وقد لوحظ وجود فرق معنوي مع ارتفاع واضح في معيـار الاضـداد فـي المجموعة الثالثة بعد التلقيح مقارنة بالمجموعتين الاولى والثانية . كما بلغت نسبة الحماية في المجموعـة الثالثة 85 % في حين لم تتجاوز هذه النسبة 70 % و 60 % فقط في المجموعتين الاولى والثانية علـى التوالي .

Effect of Experimental Infection with Two Serotypes of *Salmonella* on Immune Response Against Newcastle Disease Vaccine in Broilers

Shehab A. Yassin Safwan Y. Al Baroodi Fanar A. Danail
Department of Microbiology
College of Veterinary Medicine
Mosul University

ABSTRACT

This study was designed to show the effect of experimental infection with two serotypes of *salmonella* on immune response in chickens. Four groups of broilers were used. First group infected by *S.typhimurium* orally with 2 x 10^6 cfu/ml at 5 day age, and the second group infected orally by *S.enteritidis* with 1 x 10^8 cfu/ml at the same age. While the third group don't exposed to *salmonella* and considered as positive control . the forth group was considered as negative control .Then the first three groups vaccinated with Newcastle disease vaccine at 7 day of age. After that all the groups exposed to challenging with virulent Newcastle disease virus at 22 days post vaccination. The results showed significantly high level of antibodies in the 3rd group when compared with 1st and 2nd groups, and the protection ratio in the 3rd group is 85% while it is 70%, 60% only in the 1st and 2nd groups respectively.

المقدمة

تعد الاصابة بجرثومة السالمونيلا من بين احدى اهم المشاكل التي تواجه تربية الـدواجن وذلـك لامكانية انتقال هذه الجرثومة عن طريق البيض (Calnek et al.,1991) . بعد ذلك تظهر الاصـابة بهـا على الافراخ الفاقـسة حديثـا والتي تسبـب هلاكات عالية نسبيا لتلك الافراخ قد تصل إلى 20 % (Lee et al.,1983) وتنتمي هذه الجرثومة إلى عائلة الجراثيم المعوية حيث تغـزو هـذه الجرثومـة الاغشـية الظهارية للامعاء وتتكاثر فيها لتصل إلى الدورة الدموية ومن ثم ظهور الاعراض والعلامات المرضـية كنتيجة للإصابة بها(D'Auost,1991).

ولكون مرض النيوكاسل من الامراض الفايروسية الخطيرة وذلك لارتفاع نسبة الهلاكات فيه والتي قد تصل في بعض الاحيان إلى 90 % (Hooper et al.,1999)فضلا عـن اعتبـاره مـن الامـراض المتوطنة في منطقتنا لذلك فمن الضروري اجراء عمليات التمنيع ضد هذا المرض للحد من خطورتـه ، وبالرغم من هذه العمليات المتكررة وبشكل دوري الا ان الاصابة بهذا المرض يمكن ان تحدث وقد يكون سببها لعوامل عدة اهمـها تلك العوامل المثبطـة للاستجابة المناعية (البارودي, 2001) والتـي تؤثر بشكل سلبي على عملية التحصين ضد هذا المرض ، ولان عملية التحصين وكفاءتها ربما تتأثر بوجـود بعض الجراثيم الممرضة التي تصيب الافراخ والتي بدورها تؤثر على الحالة المناعيـة للطيـر . لـذلك

اجريت هذه الدراسة لتوضيح تأثير الاصابة بجرثومة *Salmonella typhimurium* و*S. enteritidis* على كفاءة الاستجابة المناعية ضد مرض النيوكاسل وذلك لان العديد من البحوث اشـارت الـى وجـود تثبيـط مناعي بالانمـاط . *S .typhimuriun* و. *S. enteritidis* مع ندرة البحـوث التي تشـير الى وجود تثبـيط مناعي بالانماط *S. gallinarum* و *S. pallurum*.

المواد وطرائق العمل

الأفراخ

استخدم في هذه التجربة افراخ فروج اللحم بعمر يوم واحد بعد الحصول عليها من احـد المفـاقس التابعة للشركة العامة لخدمات الثروة الحيوانية في محافظة نينوى وكان عددها 90 فرخاً ، بعدها تم اخذ 10 افراخ منها وبصورة عشوائية لجمع نماذج البراز وزرعها للتأكد من خلوها من الاصـابة بجرثومـة السالمونيلا.

اللقاح

تـم استخدام لقـاح مرض النيوكاسـل (freeze-dried live vaccine) عتـرة(Lentogenic B1 strain) والمنتج من قبل شركة Neuva الايطالية والمستورد من قبل الشركة العامة للبيطرة ، إذ لقحـت الافراخ به عن طريق ماء الشرب وبجرعة لقاحية واحدة لكل طير (الاسم التجاري Bio vac B1 / عـدد الجرع في العبوة الواحدة = 1000 / رقم الوجبة 109742 / معيار اللقاح $10^{5.1}$ EID50/0.1 ml) .

المعلق الجرثومي

بعد الوصول إلى الطور اللوغاريتمي لكلا النوعين من جرثومة السالمونيلا . تم غسل كـل منهمـا على حدة بمحلول دارئ الفوسفات لثلاث مرات ليصبح بعدها المعلقين جاهزين للتجربة . إذ تم اسـتخدام المعلق الجرثومي للنمط *S. typhimurium* بجرعة 2×10^6 خلية مولدة للمستعمرة في الملمتر والتي تـم تحديدها من خلال حساب العد الحي باتباع الطريقة القياسية للعد بالاطباق بعد تخفيف المعلق الجرثـومي للنمط أعلاه (Adlard et al.,1998) اذ جرعـت افـراخ المجموعـة الاولـى بهـذا الـنمط بمقـدار 0.5 ml/ طير عن طريق الفم.

في حين جرعت أفراخ المجموعة الثانية بالنمط *S. enteritidis* بمقدار0.5 ml/ طير عن طريـق الفم وبتركيز 1×10^8 خلية مولدة للمستعمرة في الملمتر وذلك بمقارنتها مع انبوبـة الاختبـار القياسـية ماكفرلاند No.1. وقد تم الحصول على العزلتين التابعتين للنوعين المذكورين اعلاه من مختبر الأحيـاء المجهرية في كلية الطب البيطري / جامعة الموصل والمشخصة مصليا في مختبر الصحة المركزي فـي بغداد.

جمع المصل

تم جمع عينات المصل من الافراخ في المجاميع الاربعة قبل التلقيح وذلك للكشف عن وجود اية اضداد في مصول تلك الافراخ . بعدها جمعت عينات الدم من افراخ المجاميع الاولى ، الثانية ، الثالثة اسبوعيا بعد عملية التلقيح وكذلك من المجموعة الرابعة (غير الملقحة) ولمدة ثلاثة اسابيع متتالية لغرض الحصول على المصل وقياس معيار الاضداد في مصول هذه المجاميع .

اختبار تثبيط التلازن الدموي

تم اجراء هذا الاختبار على عينات المصل التي جمعت من المجاميع الاولى ، الثانيـة ، الثالثـة ، الرابعة ولثلاث اسابيع متتالية(Gould and Clegg,1998) .

فايروس التحدي

تم اعطاء جرعـة التحدي للافراخ في المجاميـع الاربعة في بداية الاسبوع الرابع بعـد التلقـيح (أي بعمر 22 يوم بعد التلقيح) وقد استخدم في اختبار التحدي فـايروس مـرض النيوكاسـل الضـاري المعزول والمشخص من اصابات حقلية في محافظة نينوى وتم الحصول عليه من مختبـر الفايروسـات بكلية الطب البيطري / جامعة الموصل بجرعة $10^{7.5}$ x 2 EID50 / 0.1 ml حيث حقن بالعضل بمقـدار 0.1 مل لكل طير (البارودي2001,).

تصميم التجربة

شملت التجربة اربعة مجاميع من الافراخ متساوية العدد (20 فرخ لكل مجموعة) وقد خضعت هذه المجاميع للمعاملات التالية :

المجموعة الاولى

افراخ هذه المجموعة تم معاملتها بجرثومة *S. typhimurium* بعمر 5 ايام بعد ذلـك بيـومين تـم تحصينها بلقاح مرض النيوكاسل وجمع المصل منها اسبوعيا ولثلاث اسابيع متتالية بعدها حقنت بفايروس التحدي في بداية الاسبوع الرابع بعد التلقيح .

المجموعة الثانية

عوملت افراخ هذه المجموعة بجرثومة *S. enteritidis* بعمر 5 ايام ايضا ثم لقحت بعد يومين بلقاح مرض النيوكاسل وتم جمع المصل منها وحقنها بفايروس التحدي كما هو الحال في المجموعة الاولى .

المجموعة الثالثة

لم تعامل افراخ هذه المجموعة باي نوع من الجراثيم لكن لقحت وجمع المصل منها اسبوعيا واجري عليها اختبار التحدي كما هو الحال في المجموعة الاولى والثانية .

المجموعة الرابعة

مثلت هذه المجموعة السيطرة السالبة إذ لم تعامل باي نوع من المعاملات السابقة لكن عرضت لاختبار التحدي كما في المجاميع الثلاثة اعلاه .

وبعد اجراء اختبار التحدي على المجاميع الاربعة تم مراقبة ومتابعة العلامات المرضية التي ظهرت على الافراخ ولمدة عشرة ايام لاحقة مع تسجيل نسبة الحماية والاصابة في كل مجموعة (Landgraph and Vielitz, 1970) .

النتائج

أوضحت نتائج اختبار تثبيط التلازن الدموي الذي اجري على عينات المصل التي جمعت من افراخ المجاميع الاربعة قبل التلقيح عدم وجود اية اضداد خاصة بمرض النيوكاسل في تلك الامصال . لكن بينت نتائج الاختبار بعد التلقيح ان معيار الاضداد في المجموعة الثالثة كان مرتفعا وبلغ (5Log2) في الاسبوعين الاول والثاني ، بينما كان معيار الاضداد في المجموعتين الاولى والثانية هو (4Log2) و (3Log2) على التوالي عند نفس العمر وفي كلتا المجموعتين . وكان معيار الاضداد قبل اختبار التحدي (الأسبوع الثالث بعد التلقيح) في المجموعة الثالثة هو (4Log2) ، بينما انخفض معيار الاضداد وبشكل ملحوظ في المجموعتين الاولى والثانية عند نفس العمر (الاسبوع الثالث بعد التلقيح) وبلغ (3Log2) و(Log2)2 على التوالي . مع وجود فرق معنوي واضح بين معيار الاضداد في المجموعة الثالثة مقارنة بمعيار الاضداد في المجموعتين الاولى والثانية . في حين كان معيار الاضداد صفرا في المجموعة الرابعة (الجدول 1) .

كما لوحظت بعض العلامات السريرية على افراخ المجموعتين الاولى والثانية والتي تضمنت حالات الاسهال والخمول ونقص استهلاك المادة العلفية نتيجة الاصابة بجرثومة السالمونيلا .

الجدول 1: معيار الاضداد في المجاميع الاربعة باستخدام اختبار تثبيط التلازن الدموي (مقاسا بـ Log2).

المجاميع	نوع المعاملة			معيار الاضداد باستخدام اختبار تثبيط التلازن الدموي مقاسا بـ Log2 العمر/بالاسابيع بعد التلقيح			بداية الاسبوع الرابع بعد التحصين (اختبار التحدي)
	الاصابة بـ *S. typhimurium* بعمر5أيام	الاصابة بـ *S. entritidis* بعمر5أيام	التلقيح ضد مرض النيوكاسل بعمر7أيام	الاسبوع الاول	الاسبوع الثاني	الاسبوع الثالث	
الاولى	+	-	+	4	3	3	
الثانية	-	+	+	4	3	2	
الثالثة	-	-	+	5*	5*	4*	
الرابعة	-	-	-	0	0	0	

* وجود فرق معنوي عند مقارنة معيار الاضداد بين المجموعة الثالثة من جهة والمجموعتين الاولى والثانية من جهة اخرى عند مستوى احتمالية $p \leq 0.05$.

وكانت نتائج اختبار التحدي بفايروس مرض النيوكاسل الضاري هي ارتفاع نسبة الاصابة في المجموعتين الاولى والثانية حيث بلغت 30 % و 40 % على التوالي في حين كانت نسبة الاصابة هي 15 % فقط في المجموعة الثالثة. بينما بلغت نسبة الاصابة 100 % في المجموعة الرابعة (الجدول 2).

الجدول 2: نتائج اختبار التحدي بفايروس مرض النيوكاسل الضاري.

المجاميع	نسبة الاصابة %	نسبة الحماية %
الاولى	30	70
الثانية	40	60
الثالثة	15	85
الرابعة	100	0

المناقشة

اظهرت نتائج هذه الدراسة مدى أو درجة تأثر الاستجابة المناعية عند الافراخ بعد تحصينها بلقاح مرض النيوكاسل عند وجود اصابة مسبقة بجرثومتي *S.. typhimurium* و*S. enteritidis* كل على حدة حيث تاثرت هذه الاستجابة سلبيا وبشكل واضح وظهر ذلك على افراخ المجموعتين الاولى والثانية إذ لم يتجاوز معيار الاضداد فيها (3Log2) و (2Log2) على التوالي عند الاسبوع الثالث بعد التحصين . ان السبب في انخفاض معيار الاضداد في هاتين المجموعتين هو نتيجة الاصابة بجرثومة السالمونيلا سواء *S. typhimurium* أو *S. enteritidis* حيث تمتلك هذه الجرثومة القدرة على اصابة خلايا الدم البيضاء وفي مقدمتها الخلايا اللمفية والعدلات والخلايا احادية النواة وكذلك البلعميات الكبيرة (Curtiss et al.,1996) وان اصابة الجرثومة لمثل هذه الخلايا يعدّ عامل كبح لوظيفتها في الدفاع عن الجسم والتقليل من فعالية بعض هذه الخلايا في الاستجابات المناعية وبالتالي تعرض الافراخ المصابة بها لحالة التثبيط المناعي (Immunosuppression)(Mcgruder et al., 1995) ونتيجة لهذا فقد ارتفعت نسبة الاصابة في المجموعتين الاولى والثانية وبلغت 30 % و 40 % على التوالي بعد تعريضها لاختبار التحدي . في حين كان معيار الاضداد في المجموعة الثالثة (4Log2) عند الاسبوع الثالث بعد التلقيح وبلغت نسبة الحماية فيها 85 % والسبب في ذلك يعود لعدم تعرض افراخ هذه المجموعة لحالة التثبيط المناعي وهذا يتطابق مع ما ذكره (Dorminto, 1992) .

ان ظهور علامات الاسهال والخمول على افراخ المجموعتين الاولى والثانية هو نتيجة الاصابة التجريبية بجرثومة السالمونيلا التي عرّضت اليها هاتين المجموعتين . وجاء اختيار عمر 5 ايام لحقن الافراخ بهذه الجرثومة نظرا لان هذا العمر هو اقرب إلى العمر الذي تصاب به الافراخ طبيعيا فضلاً عن كون اعراض الاصابة بها تظهر بشكل واضح على الافراخ حديثة الفقس (Trunbull and Snoeyenbos, 1974) . بينما كان اختيار عمر7 ايام للتحصين بلقاح مرض النيوكاسل لكونه الاكثر استخداما في برامج تلقيح فروج اللحم (Basher et al ., 1991) .

المصادر العربية

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

المصادر الاجنبية

Adlard, P.A., Kirov, S.M., Sandderson. And Cox, G.E., 1998. Pseudomonas aeruginosa as a cause of infectious diarrhoea. Epidemiol. Infect., 121:pp. 237-241.

Basher, H.A.; Azab, A. and Qubbih, T.S; 1991. The efficacy of Newcastle disease vaccination programme in broiler. Iraqi J. Vet. Sci. 4(1):pp. 54-60.

Calnek, B.W.; Barnes, H.J.; Beard, C.W.; Reid, W.M. and Yoder, Jr.H.W., 1991. Diseases of Poultry, 9th ed., Wolf Publishing Ltd., Iowa State University.

Curtiss, R.III-; Burns-Keliher, L.L.; Morrow, B.J.; Nickerson, C.A. and Wilmes-Riesenberg, M.R., 1996. Toward an understanding of Salmonella pathogenicity. Bulletin of the Polish, Academy of Science, Biological Sciences. 44(3-4):pp. 189-203.

D'Aoust, J.Y., 1991. Pathogenicity of food borne *Salmonella*. Int. J. Food Microbiol. 12:pp. 17-40.

Darminto, K., 1992. Efficacy of Newcastle disease vaccination in broilers. Peny. Hewa., 42(24):pp. 4-8.

Gould, E.A. and Clegg, J.C.S., 1998. Growth titeration and purification of alphaviruses and flaviviruses. In: Virology. A practical approach. Mahy B.W., (Ed.), IrI .,press, Oxford, pp. 65-67.

Hooper, P.T.; Uansson, E.; Young, J.G.; Russell, G.M.; and Della-Porta, A.J. ,1999. Lesion in the upper respiratory tract in chickens experimentally infected with Newcastle disease virus isolate in Australia. Aust. Vet. J. 77(1):pp. 50-51.

Landgraph, H. and Vielitz, E., 1970. Efficacy of vaccination against Newcastle disease with different vaccination programs and different type of vaccines. Dutsch. Tiera. Wschr. 77(15):pp. 393-420.

Lee, G.M.; Jackson, D.F. and Cooper, G.N., 1983. Infection an immune response in chickens exposed to *Salmonella. typhimurium*. Avian Dis. 27(3):pp. 577-583.

Mcgruder, E.D.; Kogut, M.H.; Corrier, D.E.; Deloach, J.R. and Hargis, B.M. ,1995. Response to *Salmonella. enteritidis* infection by the immunocompramised avian host. Poult. Sci. 74(4):pp. 656-665, Apr. ISSN..

Turnbull, P.C.B. and Snoeyenbos, G.H., 1974. Experimental Salmonellosis in chickens. 1-Fate and host response in alimentary canel, liver and spleen. Avian Dis. 18(2):pp. 153-177.