Assiut Vet. Med. J. Vol. 60 No. 141 April 2014

DETECTION OF SPECIFIC ANTIBODIES AGAINST NEWCASTLE DISEASE IN THE EGG YOLK OF DIFFERENT TYPES OF CHICKS AND BIRDS

A.Z. ALZUBEADY; A. TAHA and A.A.K. SHEEHAN
Department of Microbiology, College of Veterinary Medicine, University of Mosul, Mosul, Iraq
Email: abd.imt74@yahoo.com

Received at: 20/1/2014

Accepted: 27/3/2014

ABSTRACT

This study was aimed to detection of specific antibodies against Newcastle disease in the egg yolk of different types of chicks and birds, Five samples of eggs were obtained from each of local breed chicks, House breeding (Al-Arab) chicks, ducks, pigeon birds, in addition to hatching birds of broiler, Yolk was separated and diluted in distal water (1:1) and divided in to two parts: First part was used to evaluate the specific antibodies against Newcastle disease in the egg yolk whereas second part was used as an attemption to elevate levels of protection against ND in small chicks at 28 days old by i.m injection of diluted yolk extract at a dose of 0.5 ml, Thirty chicks classified into six groups was used for this purpose, each group was injected by type of diluted yolk extract of different eggs and last group kept as control group without any treatment, Levels of specific antibodies against ND in egg yolk and serum of injected chicks with diluted yolk were tested by Heamagglutination inhibition test using 4 HA for live attenuated ND virus (lasota). Results were showed that highest titer of specific antibodies against ND was in the yolk of hatching eggs at a level of (32) whereas the lower titer was in the yolk of Duck eggs at a level of (2.6), Whereas the highest titer of injected chicks by yolk extract was in the first group which injected by yolk extract of hatching eggs at a level of (19.2) and lower titer was in group of chicks which injected by yolk extract of Duck egg at a level of (2.2).

Key words: *Specific A.b., Newcastle Disease, Egg yolk, Chicks.*

التحري عن الأجسام المضادة لمرض النيوكاسل في صفار البيض لأنواع مختلفة من الدجاج والطيور

أنوار زكي الزبيدي ، أحمد طه ، عبد الله عبدالعزيز خليل شيحان
Email: abd.imt74@yahoo.com

استهدفت هذه الدراسة التحري عن الأجسام المضادة لمرض النيوكاسل في صفار البيض لأنواع مختلفة من الدجاج والطيور ، تم أخذ خمسة عينات مختلفة من بيض كل من الدجاج المحلي وسلالة دجاج التربية المنزلية (العرب) والبط وطيور الحمام إضافة إلى بيض التفقيس لفروج اللحم ، تم فصل الصفار وتخفيفه بالماء المقطر بنسبة ١:١ وقسم إلى قسمين: استخدم القسم الأول لقياس مستوى الأجسام المضادة لمرض النيوكاسل في الصفار في حين استخدم القسم الثاني في محاولة لرفع مستوى الحماية عند الأفراخ الصغيرة بعمر ٢٨ يوما ضد مرض النيوكاسل بحقنه عن طريق العضل بجرعة ٠.٥ مل حيث استخدم لهذا الغرض ثلاثون فرخا قسمت إلى ستة مجاميع متساوية حقنت كل مجموعة بنوع معين من مستخلص الصفار لأحد أنواع البيض المستخدم وتركت ألمجموعة الأخيرة بدون معاملة كمجموعة سيطرة ، تم قياس مستوى الأجسام المضادة لمرض النيوكاسل في صفار البيض ومصل الأفراخ المحقونة بمستخلص الصفار باختبار تثبيط التلازن الدموي وباعتماد 4HA لفيروس النيوكاسل الحي المضعف (لاسوتا). وقد أظهرت النتائج إن أعلى معيار للأجسام المضادة أعطاها صفار بيض التفقيس بمعيار (٣٢) واقل معيار كان لصفار بيض البط بمعيار (٢.٦) أما أعلى معيار لمصل الأفراخ المحقونة بمستخلص الصفار أعطتها المجموعة الأولى المحقونة بمستخلص صفار بيض التفقيس بمعيار (١٩.٢) واقل معيار كان عند مجموعة الأفراخ المحقونة بمستخلص صفار بيض البط بمعيار (٢.٢).

INTRODUCTION
المقدمـــة

يعد مرض النيوكاسل في الدواجن من الأمراض الفايروسية الوبائية الخطيرة على صناعة الدواجن في العالم وذلك من خلال ما يسببه من خسائر اقتصادية كبيرة في أفراخ اللحم وأمهات بيض التفقيس وبيض المائدة (Rivets *et al*., 1985). يتسبب المرض بواسطة فايروس ينتمي إلى عائلة فايروسات Paramyxoviridae وتحت عائلة Paramyxovirinae جنس avulavirus النمط PMV1 (Llariacapua and Alexander , 2009; Quinn *et al*., 2002). هذه الفايروسات لها القابلية على إصابة أنواع أخرى من الطيور البرية والمستأنسة ويتميز المرض بعلامات هضمية وتنفسية وعصبية متباينة الشدة كما يحدث المرض إصابات في مناطق مختلفة من العالم ويمكن أن ينتشر أيضا بواسطة الطيور البرية

والحمام (Alexander, 1990). وتلعب الدواجن الحاملة للفايروس carrier والطيور المستوردة والمهاجرة والطيور البرية دورا كبيرا في نشر المرض (Quinn *et al*., 2002 ; الزبيدي ، ١٩٩٥; Alexander, 1988). إن مستوى الأجسام المضادة الموجودة في صفار البيض له علاقة مباشرة مع مستوى الأجسام المضادة المصلية للدجاج والطير ولذلك يمكن استخدام صفار البيض لقياس مستوى الأجسام المضادة بدلا من سحب الدم وذلك لسهولتها حيث إن سحب الدم يعرض الطائر إلى الكلم والإجهاد ويحتاج إلى جهد ووقت أطول وتكون مكلفة ولذلك يمكن استخدام صفار البيض لهذا الغرض حيث يتم فصل الصفار عن البياض وتخفيفه بطرق متعددة مثل استخدام المذيبات العضوية كالكلوروفورم أو تخفيف الصفار باستخدام ملح دارئ الفوسفيت PBS أو الماء المقطر أو التجميد والتذويب المتكرر أو استخدام الملح الفسيولوجي Normal saline (الزبيدي ، ١٩٩٥ ;Rudiger and Straughan, 1996; Alexander, 2003). ولذلك استهدفت الدراسة التحري عن الأجسام المضادة لمرض النيوكاسل في صفار البيض من خلال اختبار تثبيط التلازن الدموي ومقارنة مستوى تلك الأجسام المضادة في صفار البيض لأنواع مختلفة من الدواجن والطيور وبالتالي إمكانية استخدامها في رفع مستوى الحماية للأفراخ ضد مرض النيوكاسل من خلال حقن الأفراخ بمستخلص الصفار وقياس مستوى الأجسام المضادة في المصل.

MATERIALS and METHODS
مواد وطرائق العمل

عينات البيض

تم جمع البيض من مصادر مختلفة بواقع خمسة عينات لكل مصدر حيث تم الحصول على نماذج بيض المفقسة من مفقس الامين التجاري للإنتاج الزراعي والحيواني المحدودة أما بقية الأنواع فتم الحصول عليها بشكل عشوائي من المربين هواة تربية الدجاج المنزلي ومن الأسواق المحلية.

الأفراخ

تم استخدام ٣٠ فرخ فروج لحم بعمر ٢٨ يوما تم الحصول عليها من بيت الحيوانات التابع لكلية الطب البيطري/ جامعة الموصل استخدمت لأغراض حقن مستخلص صفار البيض وبواقع ٠.٥ مل في العضل/ طائر وقسمت إلى خمسة مجاميع:

المجموعة الأولى / خمسة أفراخ حقنت بصفار البيض المستخلص من بيض التفقيس
المجموعة الثانية / خمسة أفراخ حقنت بصفار البيض المستخلص من بيض الدجاج المحلي
المجموعة الثالثة / خمسة أفراخ حقنت بصفار البيض المستخلص من بيض التربية المنزلية (العرب)
المجموعة الرابعة / خمسة أفراخ حقنت بصفار البيض المستخلص من بيض الحمام
المجموعة الخامسة / خمسة أفراخ حقنت بصفار البيض المستخلص من بيض البط
المجموعة السادسة / خمسة أفراخ تركت بدون معاملة واستخدمت كمجموعة سيطرة

عينات المصل

جمع الدم من مجاميع الأفراخ بعد خمسة أيام من عملية حقن مستخلص صفار البيض ومن القلب مباشرة ومن دون استخدام موانع التخثر وتم فصل المصل وحفظ تحت التجميد لحين استعماله في الاختبار المصلي.

عترة الفيروس

استخدمت عترة اللقاح الحي المضعف (لاسوتا) 10^6 EID_{50} شركة لوهمان في اختبار التلازن الدموي.

الملح الفسيولوجي

استخدم الملح الفسيولوجي الجاهز المتوفر في الأسواق في كل من اختبار التلازن الدموي لتخفيف عترة اللقاح (لاسوتا) وفي عملية غسل خلايا الدم الحمراء وفي عملية فصل صفار البيض.

خلايا الدم الحمراء المغسولة

استخدم دم الدجاج لهذا الغرض وتم غسلها باستعمال محلول الملح الفسيولوجي وبواسطة جهاز الطرد المركزي بسرعة (٢٠٠٠) rpm لمدة خمسة دقائق أهمل الطافي وخفف الراسب بنسبة (١%) للاستعمال في اختبار التلازن الدموي.

فصل صفار البيض

فصل صفار البيض عن البياض باستخدام أدوات نظيفة ومعقمة وغسل كيس الصفار جيدا لإزالة المتبقي العالق من البياض وثقب الكيس وترك الصفار لينساب في أنبوبة خاصة معقمة وخفف بعد ذلك بواسطة محلول الملح الفسيولوجي بنسبة (١:١) مزج جيدا وفصل بعد ذلك بجهاز الطرد المركزي بسرعة (١٥٠٠) rpm أهمل الراسب وحفظ الراشح تحت التجميد لحين الاستخدام.

الفحوصات المستخدمة

اختبار التلازن الدموي Haemagglutination test (HA test)

استخدمت أطباق المعايرة الدقيقة Micro titer palate وتم معايرة الفيروس اللقاحي (لاسوتا) بطريقة التخفيف الثنائي واستخدم وحدة التلازن (4HA) لإجراء اختبار تثبيط التلازن الدموي لعينات الصفار والمصل.

اختبار تثبيط التلازن الدموي Haemagglutination Inhibition test (HI test)

استخدم اختبار تثبيط التلازن الدموي باعتماد (4HA) لعترة الفيروس اللقاحي الحي المضعف (لاسوتا) حيث تم وضع محلول الملح لفسيولوجي في أطباق المعايرة الدقيقة Micro titer palate وبواقع ٠.٠٥ مل لجميع الحفر وقد تم وضع ٠.٠٥ مل من صفار البيض في الحفرة الأولى فقط واجري التخفيف الثنائي لها ثم أضيف الفايروس اللقاحي بمقدار ٠.٠٥ مل لجميع الحفر وترك الطبق لمدة ١٥- ٢٠ دقيقة لتسهيل حصول التفاعل بين الضد والمستضد بعد ذلك أضيف معلق خلايا الدم الحمراء المغسولة بواقع ٠.٠٥ مل لجميع الحفر وترك الطبق في درجة حرارة الغرفة لمدة ٣٠- ٤٥ دقيقة قبل قراءة النتيجة وتم إجراء الاختبار نفسه على جميع عينات الصفار والمصل.

RESULTS
النتائــج

أظهرت نتائج اختبار تثبيط التلازن الدموي لعينات صفار البيض من مصادر مختلفة وجود أعلى معيار من الأجسام المضادة لفيروس مرض النيوكاسل في صفار بيض التفقيس وبمعيار (٣٢) واقل معيار كان في صفار بيض البط وبمعيار (٢.٦) وكما في الجدول رقم (١).

كما أظهرت نتائج اختبار تثبيط التلازن الدموي لعينات مصل الأفراخ أن أعلى معيار له كان في مصل الأفراخ التي حقنت بصفار البيض المستخلص من بيض التفقيس وكان معياره (١٩.٢) واقل معيار له كان في مصل الأفراخ التي حقنت بصفار البيض المستخلص من بيض البط والذي كان معياره (٢.٢) وكما هو موضح في الجدول رقم (٢).

جدول رقم ١: معدل معيار الأجسام المضادة لفيروس النيوكاسل في صفار البيض في اختبار تثبيط التلازن الدموي.

نوع البيض	معدل معيار تثبيط التلازن الدموي
بيض التفقيس	٣٢
بيض الدجاج المحلي	١٦
بيض التربية المنزلية (العرب)	٤
بيض الحمام	٤.١
بيض البط	٢.٦

جدول رقم ١: معدل معيار الأجسام المضادة لفيروس النيوكاسل في مصل الأفراخ التي حقنت بأنواع مختلفة من مستخلص صفار البيض في اختبار تثبيط التلازن الدموي.

المجاميع	متوسط معيار تثبيط التلازن الدموي
المجموعة الأولى	١٩.٢
المجموعة الثانية	٨.٢
المجموعة الثالثة	٣.٦
المجموعة الرابعة	٤.١
المجموعة الخامسة	٢.٢
المجموعة السادسة	١.٤

DISCUSSION
المناقشة

إن الأجسام المضادة المتخصصة للمستضد والسائدة في دم الدواجن هي من نوع الـ IgY والذي يشبه الـ IgG من ناحية الوظيفة ولكن يختلف عنها بعض الشيء من ناحية التركيب ويمكن للـ IgY أن ينتقل من الدورة الدموية للدجاج البياض إلى صفار البيض Egg Yolk والذي اكتسب تسميته منها وان نسبته في الصفار يتناسب بشكل طردي مع نسبته في الدم وبالتالي يمكن استخدام الصفار كدليل على تواجد الـ IgY في الدم. إن تلقيح الدجاج البياض بالفيروس أللقاحي والتي هي بمثابة مستضد يكون قادرا على تحفيز الجهاز المناعي على إنتاج الأجسام المضادة المتخصصة من نوع IgY الذي يتركز في الدم وينتقل فيما بعد إلى الصفار. وقد بينت النتائج في هذه الدراسة إلى أن البيض المعد للتفقيس أعطى أعلى نسبة من الـ IgY مقارنة مع الأنواع الأخرى من عينات البيض والسبب في ذلك يعود إلى إن أمهات بيض التفقيس Parent stocks قد لقحت بشكل مكثف ضد المرض قبل مرحلة وضع البيض ، حيث إن التلقيح المبرمج للام يؤدي إلى زيادة مستوى الـ IgY في الدم ومن ثم انتقاله إلى صفار البيض الذي استخدم كدليل لتواجده في الدم وان قلة نسبة الـ IgY في صفار البيض لباقي الأنواع يعود إلى قلة برامج التلقيح وعدم إتباعها نظام مبرمج ومتواصل ضد المرض (الزبيدي ، ١٩٩٥ ; Tizard , 2004 ; رمضان ، ٢٠١٠; شيحان ، 2010). يحدث انتقال الـ IgY من الدورة الدموية للأمهات إلى البيضة في طور النضوج داخل جريبات البيض ovarian follicle عن طريق مستقبلات خاصة موجودة على غشاء صفار البيض المسمى IgY receptors on ovarian follicles والذي يسمح بنقل جميع أنواع Subpopulation of IgY الموجودة في دم الأمهات (Rose and Orlans , 1981). والخطوة الثانية انتقال الـIgY من صفار البيض egg yolk إلى ألصوص عن طريق دوران الدم في المرحلة الجنينية Embryonic circulation، ويمكن استخدام الـ IgY المستخلص من الصفار في إعطاء الحماية والسيطرة ضد الاخماج المختلفة عن طريق إعطاءه كمناعة جاهزة منفعلة passive immunity وهي من التوجهات الحديثة في استخدام الـ IgY كتطبيق علاجي للسيطرة على العديد من

الاخماج حيث يتم حقن الدجاج بمستضد معين لتقوم هذه الطيور بمقام المصنع البايلوجي لتصنيع الـ IgY المطلوب لاستخدامه لاحقا ، كما إن له دور بإعطائه عن طريق العضل ذلك إن إعطاءه عن طريق الفم قد يعرضه إلى التحلل والتفكك عن طريق الأنزيمات الموجودة في المجرى المعدي المعوي والذي يقلل من تأثيره ونسبة إعطاءه (Rudiger and Straughan, 1996; Alexander, 2003 ;شيحان ، 2010 ; ٢٠١٢) Alzubeady and Alattar, وتكمن خلاصة هذا البحث بإعطاء فكرة مستقبلية عن أهمية استخدام صفار البيض كتطبيق علاجي ووقائي ضد كثير من الاخماج ولكن بأسلوب علمي مدروس لإنجاح عملية تطبيقه.

REFERENCES
المراجـع

Alexander, D.J. (1988): Newcastle disease. Kulwer Acad. Pubsbosten.

Alexander, D.J. (1990): Avian Paramyxo viridae. Recent development Vet. Microbiol. 23:3-114.

Alexander, D.J. (2003): Newcastle disease. In: Diseases of poultry CY.M.SA. F, edj. 11th Ed Iowa state university press, Ames, 64-87.

Alzubeady, A.Z. and Alattar, M.Y. (2012): Effect of hyper immunized egg yolk on maternal immunity of Newcastle disease vaccine in broiler chicks. Accepted research in 6th conference of Vet. Med. College of Mosul in No. 393. 2012.

IANR, Tizard (2004): Veterinary Immunology An Introduction. seventh ED. Elsevier (USA).

Llariacapua and D.J. Alexander (2009): Avian Influenza and Newcastle disease. Springer. Verlag, Italia: 19-24.

Quinn, P.J.; Markwy, B.K.; Carter, M.E.; Donnelly, W.J.C. and Leonard, F.C. (2002): Veterinary Microbiology and Microbiol; Black well publishing company, UK.

Rivets, B.; Weisman, Y.; Herband, M.R. and Herzberg, M. (1985): Evaluation of a novel rapid kit for vistual detection of Newcastle disease virus antibodies. Avi. Dis. 29(4): 929-942.

Rose, M.E. and Orlans, E. (1981): Immunoglobulins in the egg embryo, and young chick. Dev. Comp. Immunol., 5, 15-20.

Rudiger, S. and Straughan, D. (1996): The production of Avian (Egg Yolk) Antibodies: IgY, ATLA 24, 925-934.

الزبيدي , أنوار زكي (١٩٩٥): الكشف عن الأضداد الواردة من الأمهات والمضادة لفايروس مرض نيوكاسل الدواجن في البيض والصيصان وعلاقتها بمستوى التحصين والتحدي , رسالة ماجستير , كلية الطب البيطري , جامعة الموصل.

رمضان , عباس شيناوة (2010): دراسة الاستجابة المناعية والتداخل للقاحي أنفلونزا الطيور النمط المصلي H9N2 ومرض النيوكاسل في فروج اللحم . رسالة ماجستير , كلية الطب البيطري , جامعة الموصل.

شيحان , عبدالله عبدالعزيز (2010): تداخل المناعة الأمية مع الاستجابة المناعية للأفراخ الملقحة بلقاح كمبورو . رسالة ماجستير , كلية الطب البيطري , جامعة الموصل.