إكثار وتضعيف فايروس الحمى القلاعية بتمريره في أجنة الدواجن

مثال عبد الكريم عبد عون* أنطوان صبري ألبنا** رواء جميل توما*

استلام البحث 1، اذار، 2009
قبول النشر 13، شباط، 2011

الخلاصــة :

تضمن البحث اكثاروتضعيف فايروس الحمى القلاعية النمط المصليO المعزول من أبقار مصابة بمرض الحمى القلاعية من خلال تمريره في أجنة الدجاج بوصفه طريقة بديلة لإكثاره في المزارع الخلوية التي تكون كلفتها الاقتصادية كبيرة مقارنة بأجنة الدجاج. ومن ثم دراسة إمكانية تحضير لقاح حي مضعف أو مقتول من الفايروس المعزول مرر الفايروس في أجنة الدجاج لعشرة تمريرات متتالية مما أدى إلى انخفاض معيار الفايروس الممرر للتمريرة الثالثة في خلايا خصية العجل الذي بلغ $10^{6.53}$ TCID50/0.1 ml إلى TCID50/0.1 ml 10^3 عند التمريرة العاشرة .

كذلك لوحظ عند فتح البيض المحقون بالفايروس وجود تاثيرات مرضية للفايروس على الجنين وعند حقنه في وسادة القدم لخنازير غنيا ادت الى حدوث علامات مرضية سريرية، كما كشفت اضداد الترسيب في مصول الخنازير بعد 14يوما وبعد 21يوما من التعرض في المجموعة المحقونة بالفايروس المضعف وباستخدام اختبار الترسيب المناعي في هلامة الاكار .

لذلك فان اختبار التحدي بفايروس التحدي غير المضعف أظهرت المجموعة المعرضة له مقاومتها ، بينمااظهرت مجموعة السيطرة العلامات السريرية للمرض. تشير هذه النتائج إلى نجاح عملية تضعيف فايروس الحمى القلاعية باستخدام نظام أجنة الدواجن على مستوى الحيوانات المختبرية.

الكلمات المفتاحية :فايروس ،الحمى القلاعية ،أجنة الدواجن

المقدمــة :

يعد مرض الحمى القلاعية من أهم الإمراض المعدية والسريعة الانتشار التي تصيب الحيوانات المستأنسة والبرية ذات الظلف المشقوق وكذلك الإنسان .

يسبب المرض خسائر اقتصادية عالية جداً نتيجة لانخفاض إنتاجية الحيوانات المنتجة وكذلك التكلفة الزائدة للأدوية واللقاحات المستخدمة للتحكم والسيطرة على هذا المرض [1] .

وقد تضمن هذا البحث إكثار وتضعيف فايروس الحمى القلاعية النمط المصلي O المعزول من خلال تمريره في أجنة الدجاج باعتبارها طريقة بديلة لإكثاره في المزارع الخلويةخارج الجسم و التي تكون كلفتها الاقتصادية كبيرة مقارنة بأجنة الدجاج ومن ثم دراسة إمكانية تحضير لقاح حي مضعف أو مقتول من الفايروس المعزول ، كذلك تحضير مستضدات للفايروس المعزول لغرض استخدامها بوصفها مستضدات مرجعية

المـواد وطـرائق العمـل :

فايروس الحمى القلاعية النمط المصلي O المعزول من عجول مصابة بمرض الحمى القلاعية بتاريخ 2000/3/24 والتي تتراوح أعمارها (8-11) شهراً .

خلايا الزرع النسيجي :

استخدمت خلايا خصية العجل (تم تحضيرها مختبرياً) والمنماة في الوسط الزرعي للنمو 10% Minimum Essential Medium (MEM)* مع إضافة مصل عجل بقري 10% والموضوعة في لدائن بلاستيكية سعة 75 سم³ .

بيض مخصب بعمر يوم واحد تم الحصول عليه من مركز إباء للابحاث الزراعية .

حقن أجنة الدجاج :

جرى حقن الأجنة طبقاً لطريقة [2] حيث استخدمت أجنة دجاج بعمر 11-12 يوما وبهذا الغرض تم تطهير البيض أولاً بوساطة الكحول أو اليود ثم عملت فتحة صغيرة من الكيس الهوائي وأخرى على شكل مثلث في المكان الذي تم تحديده على سطح البيض وينتزع منها القشرة ليظهر تحتها الغشاء الأبيض حيث ضغط ضغطاً يخفض غشاء الكوريوالنتويس إلى الأسفل دون أن يخترق الغشاء ثم تم حقن البيض بفايروس الحمى القلاعية وغلف مكان الفتحة بوساطة شريط لاصق ووضع البيض على وضع أفقي في الحاضنة ويفحص يومياً للتأكد من حالة الجنين ووجود حالات هلاك للأجنة خلال الـ24 ساعة بعد الحقن اذ لم ينتج هذا الهلاك عن تأثير الفايروس أما الأجنة التي تنفق ابتداءً من اليوم

*وزارة العلوم والتكنولوجيا / دائرة المواد الخطرة / مركز الكشف الحيوي
** كلية الطب البيطري / جامعة بغداد

الثاني وحتى اليوم الخامس فتعدت نافقة نتيجة تكاثر الفايروسات وبعد مرور (4-5) أيام يفتح البيض تحت ظروف تعقيم كاملة وجمعت الأجزاء التي ظهرت عليها التأثيرات المرضية للفايروس المحقون .

* (Imperial) Uk

تم اختيار (6) من خنازير غينيا بعمر (6-8) أشهر وبوزن 350 غم .تم الحصول عليها من الشركة العامة للمستلزمات الدوائية .

الحقن في خنازير غينيا :

أتبعت طريقة[3] في معاملة الخنازير بفايروس الحمى القلاعية وحضرت لهذا الغرض ثلاث مجاميع من الخنازير تضم كل مجموعة حيوانيين ثم حقنت خنازير المجموعة الأولى(0.4) مل من الفايروس والمخفف بمعيار $10^{6.53}$ TCID50/ 0.1 ml وحقنت المجموعة الثانية بـ (0.4) مل من فايروس الحمى القلاعية بمعيار 10^{3} TCID50/0.1 ml في وسادة راحة القدم . أما مجموعة السيطرة فقد حقنت خنازير هذه المجموعة بمقدار (0.4) مل من الوسط الزرعي للإدامة في وسادة راحة القدم .

اختبار الترسيب المناعي في هلامة الاكار :

أجري الفحص طبقاً لطريقة[4]. اذ وضع فايروس الحمى القلاعية المضعف في الحفرة الوسطية ووضعت أمصال الخنازير قبل وبعد التعرض للفايروس المضعف في الحفر الجانبية لطبقة الاكار،

النتائج:

1- حقن البيض في أجنة الدواج

لوحظ عند فتح البيض المحقون بالفايروس والمنمى في خلايا خصية العجل والذي معياره TCID50/0.1ml وجود نزف دموي في غشاءالكوريوالنتويسي مع تثخن في منطقة الحقن بشكل بثرة على الغشاءمع وجود وذمة (Odema) كذلك لوحظ عند تشريح الاجنة تضخم القلب مع وجود مناطق ثخثر في جدران القانصة.

2 - معايرة فايروس الحمى القلاعية في اجنة الدواجن

كانت نتيجة التمريرة الاولى للفايروس ا لذي تم حقنه والذي معياره (10^{6}.53TCID50/0.1ml)هي 10^{2}واستمرعلى هذا المعيارحتى التمريرة الخامسة اذ بلغ معياره10^{3} وبقي على هذا المعيار حتى التمريرة العاشرة وكما موضح في الجدول رقم (1)

3 –نتائج الاصابة التجريبية لخنازير غينيا

أظهرت تجربة حقن خنازير غينيا بالفايروس غير المضعف ظهور حويصلات في منطقة الحقن بعد 48 ساعة وانتقلت الى وسادة القدم الثانية ،اما المجموعة المحقونة بالفايروس المضعف وبالطريقة نفسها الطريقة فلم تظهر علامات في موضع الحقن ، واما حيوانات السيطرة المحقونة بالوسط الزرعي الحافظ فلم تظهر عليها أي علامات ايضا جدول رقم (2).

4 – نتائج اختبار التحدي

لوحظ عدم ظهور أي بثورفي المجموعة المحقونة بالفايروس المضعف عند حقنها بالفايروس غير المضعف في حين لوحظ ظهور الحويصلات في منطقة الحقن بعد 48 ساعة وانتقلت الى وسادة القدم الثانية في المجموعة غير المحقونة بالفايروس المضعف جدول رقم (3)

5-نتائج اختبار الترسيب المناعي في هلامة الاكار :

تم الكشف عن اضداد الترسيب في مصول الخنازير قبل تعرض الخنازير للفايروس المعزول اذ لم يلاحظ ظهور أي خط ترسيبي ثم تم الكشف عن اضداد الترسيب بعد 14 و 21 يوما من تعرض الخنازير للفايروس المضعف

المناقشــة :

تضمن البحث دراسة إمكانية إكثار وتضعيف فايروس الحمى القلاعية النمط المصلي O المعزول من العجول[5] من خلال تمريره في أجنة الدواجن وقد لوحظ ذلك بالفعل من خلال تمريره عشرة تمريرات متتالية اذ كان معيار الفايروس المحقون $10^{6.53}$TCID50/0.1 ml في خلايا خصية العجل والممرر ثلاث تمريرات متتالية وانخفض المعيار إلى 0^{2} 1عند حقنه في أجنة البيض للتمريرة الأولى وحتى التمريرة الرابعة وقد يعزى السبب إلى كون الدواجن ليست المضيف الأصلي للفايروس[6] وهذا يؤدي الى حدوث تغيرات تركيبية فى الجينوم تشتمل على نقصان واضح في طول متعدد السايتوسين كذلك وجود اختلافات في جميع انواع متعدد الببتايد الاولي عدا متعددالببتايد الذي يشفر لتكوين vp4[8,7] ثم ارتفع إلى 10^{3} عند التمريرة الخامسة واستمر على هذا الارتفاع حتى التمريرة العاشرة كما موضح في جدول رقم (1) اذ تؤدي التمريرات المتكررة للفايروس إلى تطبع وانتخاب للفايروسات المتكيفة للنمو على ذلك النوع من خلايا [9,5]. وقد أدى الفايروس المحقون في أجنة البيض إلى ظهور نزف دموي في غشاء الكوريوالنتويس مع تثخن في منطقة الحقن بشكل بثرة على الغشاء كذلك اظهرت المنطقة تجمع وذمة (Odema) كما لوحظ عند تشريح الأجنة تضخم القلب مع وجود مناطق تنخر في جدران القانصة

وهذا يتفق مع ما حصل عليه الباحث[2] عند قيامه بتمرير فايروس الحمى القلاعية النمط المصلي C عن طريق حقنه في غشاء الكوريوالنتويس لـ (25) تمريرة متتالية في أجنة البيض وقد لاحظ حصول تضعيف للفايروس عند حقنه في الأبقار . كذلك قام الباحث[10]بتمرير فايروس الحمى القلاعية المعزول من الأبقار في أجنة الدواجن وذلك بحقنها في الوريد ،ويشترك فايروس الحمى القلاعية بهذه الصفة مع فايروسات عائلة Picorna viridae التي يمكن اكثارها في اجنة الدواجن وكذلك Influenza virus وCardio virus [11-15].وعند حقن خنازير غينيا لوحظ عدم ظهور انتفاخ وبثور في منطقة الحقن لخنازير غينيا المحقونة بالفايروس غير المضعف جدول رقم (2) وهذا يدل على تقليل ضراوة الفايروس وقد كشفت أضداد الترسيب في مصول الخنازير بعد 14 و بعد 21 يوما من التعرض للفايروس وباختبار الترسيب المناعي في هلامة الاكار والتي كانت خالية من أضداد الترسيب قبل تعرض الخنازير للفايروس المعزول وكما هو موضح في الجدول رقم (3) لذلك فان اختبار التحدي بفايروس التحدي غير المضعف أظهرت المجموعة المعرضة للفايروس المضعف مقاومتها له بينما أظهرت مجموعة السيطرة العلامات السريرية. وهذا يعني بان خنازير غينيا المحقونة بالفايروس المضعف أصبحت أكثر مقاومة لفايروس الحمى القلاعية غير المضعف ومن هذا نستدل أن بالإمكان تحضير مستضدات فايروس الحمى القلاعية بتمرير الفايروس وإكثاره في أجنة الدواجن ،وبان فايروس الحمى القلاعية المنمى في اجنة البيض قادر على تحفيز الجهاز المناعي لخنازير غينياولتكوين اضداد مرسبة في اختبار الترسيب المناعي في هلامة الاكار وكذلك مقاومة جرعة التحدي للفايروس الضاري .

جدول (1) : يوضح نتائج تمرير فايروس الحمى القلاعية في أجنة الدواجن

التمريرات	TCID50/0.1 ml
1- التمرير الأول	10^{2}
2- التمرير الثاني	10^{2}
3-التمرير الثالث	10^{2}
4-التمرير الرابع	10^{2}
5-التمرير الخامس	10^{3}
6-التمرير السادس	10^{3}
7-التمرير السابع	10^{3}
8-التمرير الثامن	10^{3}
9-التمرير التاسع	10^{3}
10-التمرير العاشر	10^{3}

جدول (2) : يوضح نتائج الإصابة التجريبية لخنازير غينيا

المجاميع	عدد الحيوانات	طريقة الحقن	أهم العلامات المرضية
المجموعة الأولى المحقونة بالفايروس غير المضعف	2	وسادة راحة القدم	ظهور حويصلات في منطقة الحقن بعد 48 ساعة وانتقلت إلى وسادة القدم الثانية
المجموعة الثانية المحقونة بالفايروس المضعف	2	وسادة راحة القدم	لا توجد
المجموعة الثالثة مجموعة السيطرة	2	وسادة راحة القدم	لا توجد

جدول (3) : يوضح نتائج اختبار التحدي

المجاميع	عدد الحيوانات	طريقة الحقن	أهم العلامات المرضية
المجموعة الأولى المحقونة بالفايروس المضعف	2	وسادة راحة القدم	لا توجد
المجموعة غير المحقونة بالفايروس			ظهور حويصلات في منطقة الحقن بعد 48 ساعة وانتقلت إلى وسادة القدم الثانية

المصادر:

1. Radostitis. O.M; Blood, D.C. and Gay, C.G.1997 "Veterinary Medicine" 8th ed, London, W.B, Sanders company, Ltd. PP.913-920.
2. Gillespie, 1955 .Foot and mouth disease viruses' epidemiology, 145,170.
3. Richmond. J.Y, 1975 production, Isolation and partial characterization of three foot and mouth disease temperature sensitive mutant Infection and Immunity. 11(6):1291-129.
4. Preer. J.R, 1956 A quantitative study of technique of double diffusion in agar Journal of Immunology.
5. Escarmis. C, Carrilo. E.C, ferrer. M, Arriaza. J.F, 1998 Rapid selection in modified BHK 21 cells of foot mouth disease virus Journal of virology, 72 (12): 107171-9.
6. Skinner, H.H, 1953 one week old white mice as test animal in foot

diffusion ana- lysis .American T.of vet.Res., 35.

11. Manual of standards Diagnostic Tests and Vaccines, 2000. Office international des epzooties. World organization for animal health.
12. Al-Janabi. Methal AK, 2001 Isolation and identification of foot and mouth disease virus from cattle and study the infectivity of the virus of different types of cells from human and animals. Thesis submitted to the council of the college of veterinary medicine .University of Baghdad.
13. Sreevalsan, 1970.Association of viral Ribonucleic Acid with cellular membarane sin chick embryo .J.Virology. 6(4); 438-444.
14. Brownson. JM, and Mahy. BW, 1979. Productive influenza virus infection of synchronized chick embryo fibroblast cells .society for general microbiology. Douglas Gscraba, Ann Cpalmenbery, 2004 Cardioviruses (Picorna Viridae).Encyclopedia of virology, (7th ed) R.G Webester and Granoff Eds.

and mouth disease research. Proc of the internal veterinary cent part H.P.208-240 Stockholm.

7. Parisi. JM, Costa Giomip, Grigerea. P, Augedemello. P, Bergmann. IE, Latorre.JL, Scodeller. EA, 1987; Biochemical characterization of an aphtho virus typeo1 Strain campo attenuated for cattle by serial passages in chicken emberyos. Journal of virology, 147(2):61-71.
8. Sagedahl A, Girando, AT, Demello, PA, Bergmann,IE, LatorreJL, ScodellerEA. 1987 ;Biochmical characterization of an aphtho virus type C3 strain resend attenuated for cattle by serial passages in chicken embryos .Journal of virology;157(2):366-74
9. Neem.M, 1990. Cell culture vaccine against hydro pericardium syndrome in poultry Pakistan .vet.J.3:15.
10. -Lobo Cesar, Cowan Keithm, Trautman Rods, Hanso Robert. 1974. Defferentiation type. A foot and mouth disease virus subtype by double and radial immuno

Replication and attenuation of foot and mouth disease virus in chick embryo

*Mithal Abdul Kareem Al-Janabi** *Antwan sabri Al – Banna***
*Rawaa jamil Toma**

* Ministry Of Science and Technology/ Department of Hazardous Substances
**College of veterinary medicine - University of Baghdad.

Abstract:

This study includes replication and attenuation of foot and mouth disease virus type O which isolated from infected calves.

Many passages for the virus in chick-Embryo were established as a substitute method to the tissue culture which is highly caustic in contrast to the chick embryo. The virus passed ten consequent passages which lead to the reduce of the titer of the virus from $10^{6.53}$ TCID50/ 0.1 ml in cattle testis tissue culture to 10^{3} TCID50/ 0.1 ml. the pathogenecity of attenuated FMD virus were also studied in both chick-embryo and guinea pigs.

Using agar gel diffusion test precipitation antibodies was detected in guinea pig serum after 14 and 21 days post exposure to the attenuated virus.

The inoculated guinea pig group with the chick-embryo attenuated virus appear resistance to the challenge virus. The result suggested the efficacy of attenuation of foot and mouth disease virus by using chick-embryo system for immunization against this disease on the level of laboratory Animal.