المجلة العراقية للعلوم البيطرية المجلد ١ العدد(١)٢ ١٩٨٨

دراسه تحضيريه لانتاج لقاح جدري الماعز من فايروس العتره المحليه *

الدكتور مزاحم ياسين ، الدكتور[1] انطوان صبري البنا

فرع الاحياء المجهريه ، كلية الطب البيطري جامعة الموصل

[1] فرع الاحياء المجهرية ، كلية الطب البيطري جامعة بغداد

الخلاصه

تعد هذه الدراسه الاولى من نوعها في العراق حيث تم من خلالها تضعيف فايرس جدري الماعز عترة حربي العراقيه باتباع اسلوب التمرير التسلسلي للفايرس في خلايا الزرع النسيجي الثانوي لخصية الحملان . ولغرض تقدير درجة تضعيف التمريرات المختلفه للفايرس الضاري المستعمل ، تم استخدام معايرة الفايروس في ادمة الماعز حيث اجرى هذا الاختبار على التمريرات ٢٨، ٣٤، ٤٠، ٥٠ .

وقد اظهر التمرير الخمسين للفايروس تضعيفا مناسبا من حيث نوعية وحجم التفاعل الموضعي الذي احدثه في ادمة الماعز ، وعدم حصول تعميم الاصابه او ارتفاع في درجة الحراره . لذلك تم دراسة تاثير حقن تركيزات مختلفه من هذا الفايروس في ادمة الماعز ودرست الاستجابه المناعيه لهذه الحيوانات باستخدام اختبارات التعادل المصلي والتالق المناعي غير المباشر والتحدي ، وقد اظهرت النتائج تكون الاجسام المناعيه ابتداءا من الاسبوع الاول بعد الحقن كما اظهرت جميع حيوانات التجربه مقاومة كاملة بنسبة ١٠٠% لجرعة التحدي من فايروس جدري الماعز الضاري .

وقد احدث التركيز (2×10^{3}TCID 50 /0.1ml) من فايروس التمرير الخمسين تفاعلا موضعيا مناسبا وارتفاعا بسيطا في درجة حرارة الحيوانات المستخدمه ومستوى عاليا من الاجسام المناعيه المضاده ، لذلك يمكن ان يعد هذا التركيز جرعه لقاحيه مناسبه لتحصين الماعز ضد مرض جدري الماعز

---

* بحث مستل من اطروحة ماجستير ، مقدمة الى كلية الطب البيطري /جامعة بغداد ١٩٨٦.

المقدمة

يعد جدري الماعز من الامراض المتوطنة في العراق ومعروفة منذ زمن بعيد من قبل مربي الحيوانات لما يسببه من خسائر اقتصادية كبيرة في حالات النفوق التي تحصل عند الاصابة الحادة للجديان (صغار الماعز) وخصوصا اذا صاحبت هذه الاصابة مع اختلاطات ثانوية بسبب الاصابات الجرثومية هذا ناهيك عما يسببه المرض من حالات الاجهاض ونقصان الوزن وانخفاض في انتاجية الماعز البالغة من الحليب واللحوم . وقد عزل فايروس جدري الماعز المسبب للمرض لاول مرة في القطر من قبل (Tentawietal1979) واطلق عليه اسم عترة سرسنك . وقد تمكن الباحثان (Al - Bana & Abas 1983) من عزل عترة اخرى من فايروس جدري الماعز وسميت عترة حربي . ولغرض السيطرة على مرض جدري الماعز عترة (Corgan) المحضر في قسم المختبرات والبحوث البيطرية في بغداد الا ان العمل بهذا اللقاح ابطل عام ١٩٨٠ لتلف العترة اللقاحية المستعملة . لذلك وبهدف الحرص على ثروتنا الحيوانية تم اجراء هذه الدراسة لتحضير بذرة لقاحية حية مضعفة يمكن الافادة منها في تحضير وجبات لقاحية على نطاق واسع .

المواد وطرق البحث

١ - الفايروس المستعمل :- تم استخدام فايروس جدري الماعز عترة حربي المحلية المُمرر العشرين وتم الحصول على هذا الفايروس محفوظا في درجة (-٧٠م°) في مختبر الفايروسات كلية الطب البيطري - جامعة بغداد .

٢ - خلايا الزرع النسيجي :- تم استخدام خلايا الزرع النسيجي الثانوي لخصية الحملان والمحضرة حسب الطريقة المذكورة من قبل :
(Plowright and Ferris, 1958)
وذلك باستئصال خصية الحملان بشكل معقم وازالة الانسجة والكبسولة المحيطة بها ثم يقطع نسيج الخصية الى قطع صغيرة بواسطة المقص وتمرر بمحلول خميرة التربسين ثم ترسب هذه الخلايا باستعمال المنبذة بسرعة ٣٠٠٠ دورة /دقيقة لمدة (١٥) دقيقة وتعلق الخلايا المترسبة في محلول الوسط الزرعي المحتوي بنسبة ٥,٠% وتوزع في قناني بلاستيكية خاصة لهذا الغرض ثم تحضن بدرجة حرارة (٣٧م) لمدة ٣-٤ ايام

لتكون الطبقه الخلويه الاحاديه الابتدائيه ثم تنزع هذه من على سطح القناني البلاستيكيه باضافة مادة التربسين-فرسين وبعد توزيع الخلايا بكثافه اقل ثم تحضن بدرجة (٣٧°م) لمدة ٢-٣ يوم لغرض الحصول على خلايا الزرع النسيجي الثانوي (Secondary lamb testes cell cultune LTC.)

٣ - طريقة تضعيف الفايروس :- استخدمت طريقه التمرير التسلسلي للفايروس Serial Passage في الزرع النسيجي لغرض تضعيف الفايروس حيث حقن التمرير العشرين للفايروس في خلايا (LTC) وبعد اكتمال ظهور التاثير المرضي الخلوي (CPE) الذي يحتاج الى ٤-٥ ايام . جمدت هذه الخلايا بدرجة حرارة -٧٠ °م واذيبت بدرجة حرارة ٣٧°م وبذلك نحصل على التمرير الحادي والعشرين وهكذا بالنسبة للتمريرات التاليه حسب الطريقه المتبعه من قبل EL-Zein et al, (1983) .

٤ - طريقة معايرة الفايروس في خلايا الزرع النسيجي : استخدمت طريقة التعيير المصغره – (Microtiter Method) وتم حساب المعيار الحجمي للفايروس حسب طريقة (Reed and Muench 1938) والمعبر عنه بكمية الفايروس المعلوم الحجم (٠,١)مليلتر التي تستطيع في اعلى تخفيف لها ان تحدث تاثيرا مرضيا في (٥٠%) من خلايا الزرع النسيجي المحقونه التي يعبر عنها بوحدة القياس TCID 50/0.1 ml

٥ - طريقة تقييم تمريرات الفايروس المختلفه :-لغرض دراسة وتقييم التمريرات المختلفه للفايروس المستخدم بغية الوصول الى تمرير مناسب بمواصفات تمكن من استخدامه كلقاح تم اجراء الاختبارات التاليه :-

أ - اختبار درجة التضعيف تمريرات الفايروس :- استخدام اسلوب معايرة الفايروس في اناث الماعز حسب الطريقه المذكوره من قبل (EL-Zein el al 1983) حيث تلاحظ التفاعلات الموضعيه والتغيرات في درجة حرارة الحيوانات المستخدمه وقد اجري هذا الاختبار على التمريرات ٢٨،٣٤،٤٠،٥٠ .

ب - اختبارات الكفاءة المناعية للفايرس المضعف التمرير الخمسين :- بعد الوصول الى درجة تضعيف مناسبة ظهرت في التمرير الخمسين للفايروس بموجب الاختبار السابق تم اجراء هذه الدراسة بحقن تركيزات مختلفه من هذا الفايروس في مجموعات من الماعز وبعد ذلك

تم مراقبة اي تغيير يطرأ على هذه الحيوانات من تفاعل موضعي والحالة العامة للحيوانات كما تم اخذ نماذج دم اسبوعيا من هذه الحيوانات ولمدة ثلاثة اسابيع متتاليه لغرض الفحص عن الاجسام المضاده المتكونة في مصولها بطريقتي التعادل المصلي وطريقة التألق المناعي غير المباشر المذكور من قبل Rovozzo and Burke (1973) وبعد مرور اربعة اسابيع على حقن الحيوانات تم اجراء اختبار التحدي (Challenge test) باستخدام فايروس جدري الماعز الضاري بمعيار (Rafyi and Ramyar, 1959) (10^{4} TCID-50/0.1 ml) وتصميم هذه التجربه في الشكل رقم (1) .

النتائج

1- اختبار درجة تضعيف التمريرات المختلفه من فايروس جدري الماعز :-

أ - التمرير الثامن والعشرين :- احدث فايروس هذا التمرير تفاعلا موضعيا شديدا في مكان الحقن ، كما ظهرت افات مرضيه مماثله للاصابه مما يدل على ضراوة الفايروس الجزئية في هذا التمرير .

ب - التمرير الرابع والثلاثين :- كان التفاعل الموضعي الذي احدثه فايروس هذا التمرير اقل شده مما هو عليه في التمرير السابق كما لم تظهر اية افة مرضيه في غير موضع حقن الفايروس مما يدل على بداية ضعف ضراوة الفايروس في هذا التمرير .

ج - التمرير الاربعين :-ظهر التفاعل الموضعي الذي احدثه فايروس هذا التمرير على هيئة عقد جلديه اقل حده مما كان عليه في التمرير الرابع والثلاثين وتميز بصغر قطر العقده المتكونه بما لا يزيد عن ٢ سم .

د - التمرير الخمسين :- اظهر فايروس هذا التمرير تفاعلا موضعيا خفيفا لا يزيد قطره على ٠,٥ - ١ سم ، كما لم تظهر اية افة مرضيه في مناطق الجسم الاخرى ولم يلاحظ اي تغييرات او مضاعفات اخرى على الحيوانات المستخدمه . نتائج هذه الاختبارات موضحة في الجدول رقم (1) الذي يشير الى مراحل تضعيف الفايروس التدريجيه في تمريراته المختلفه وان فايروس التمرير

الخمسين وصل الى درجه من ضعف الفراوه تبين امكانية استخدامه كبذره لقاحيه لذلك استخدام هذا التمرير في كافة الاختبارات الاخرى .

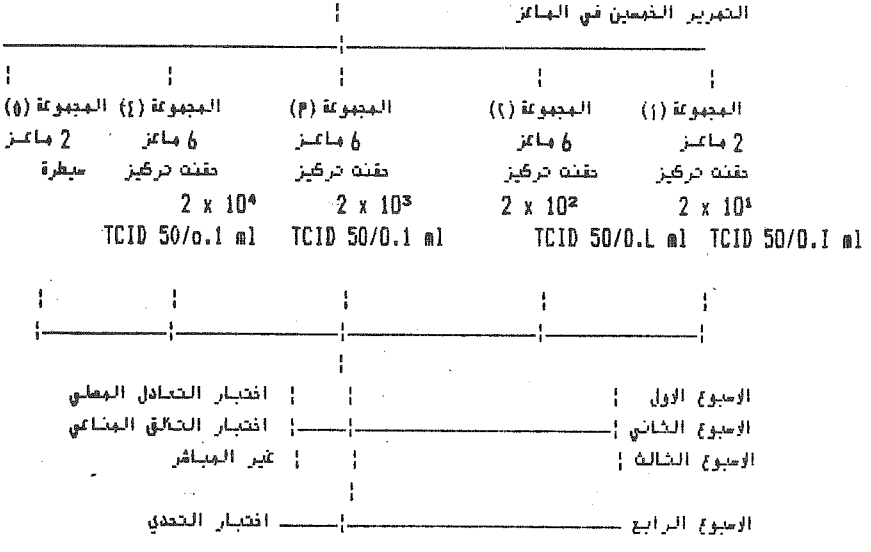
٢ - نتائج اختبارات الكفاءة المناعيه :- الجدولان (٢) ، (٣) يوضحان نتائج الاختبارات التي تم بموجبها تحديد الجرعه المناسبه والكفاءه المناعية للفايروس المضعف وهي :-

أ - اختبار التعادل المصلي :- اظهر الاختبار تكون الاجسام المضاده في مصول حيوانات التجربه منذ الاسبوع الاول بعد الحقن وكان اعلى معيار لهذه الاجسام هو (٣٢) وسجل في الاسبوع الثاني من الحقن .

ب- اختبار التألق المناعي غير المباشر :- كانت نتائج هذا الاختبار مطابقه لنتائج اختبار التعادل المصلي الا ان اختبار التألق المناعي كشف عن تكون الاجسام المضاده المتكونه في مصول حيوانات التجربه بمعيار اعلى وصل الى (٦٤) في الاسبوع الثاني من التجربه .

ج - اختبار التحدي :- اظهرت نتائج هذا الاختبار مقاومة جميع الحيوانات هذه التجربه لجرعة التحدي من فايروس جدري الماعز الضاري بنسبة ١٠٠٪ وذلك بعد مرور شهر كامل على حقن هذه الحيوانات بتركيزات مختلفه من فايروس التمرير .

شكل رقم (١) تصميم تجربة اختبار الكفاءة المناعية لفايروس جدري الماعز



جدول رقم (1) نتائج معايرة فايروس جدري الماعز في خلايا الزرع النسجي وادمة جلد الماعز.

رقم التمرير	معيار الفايروس في خلايا الزرع النسيجي	معيار الفايروس في ادمة جلد الماعز	نوع التفاعل الموضعي في ادمة جلد الماعز
	TCID 50/0.1ml	RD 50 /0.I ml	
2	$2 \times 10^{6.6}$	$10^{6.6}$	تفاعل موضعي ثم تعمم الاصابة
28	$2 \times 10^{6.6}$	$10^{6.6}$	تفاعل موضعي يزيد قطره عن 5سم مع تعمم الاصابة الجزئي
34	$2 \times 10^{6.6}$	10^{5}	تفاعل موضعي قطره 4-5 سم
40	$2 \times 10^{4.3}$	$10^{4.6}$	تفاعل موضعي متوسط قطره 1-2 سم
50	$2 \times 10^{6.6}$	$10^{6.6}$	تفاعل موضعي بسيط قطره 0.5-1سم

جدول رقم (٢) تأثير تركيزات مختلفة من فايروس جدري
الماعز المضعف التمرير الخمسين في الماعز

تركيز الفايروس	عدد الحيوانات المستخدمة	عدد الحيوانات التي اظهرت تفاعل موضعي	معدل الارتفاع في درجات الحرارة بعد الحقن	تاريخ ظهور التفاعل الموضعي بالايام
2×10^1	2	0	0.4 م	-
2×10^2	6	3	0.6 م	8
2×10^3	6	5	0.7 م	7
2×10^4	6	5	0.9 م	6
سيطرة	2	0	0	-

جدول رقم (٣) الاستجابة المناعية للماعز المحقونة بتركيزات مختلفة من فايروس جدري الماعز المضعف التمرير الخمسين باستخدام اختبارات التعادل المصلي والتألق المناعي غير المباشر والتحدي في الحيوانات .

تركيز الفايروس TCID 50 / 0.1ml	رقم الحيوان	الاسبوع الاول معيار التعادل المصلي	الاسبوع الاول معيار التألق المناعي	الاسبوع الثاني معيار التعادل المصلي	الاسبوع الثاني معيار التألق المناعي	الاسبوع الثالث معيار التعادل المصلي	الاسبوع الثالث معيار التألق المناعي	الاسبوع الرابع معيار التعادل المصلي / التألق المناعي	الحيوانات التي قاومت جرعة التحدي
2×10^{1}	1	2	4	4	8	2	8		+
	2	2	4	8	16	4	8		+
2×10^{2}	3	4	8	8	16	4	8		+
	4	4	8	8	32	8	16		+
	5	4	16	8	32	8	16		+
	6	2	4	4	8	2	8		+
	7	2	4	4	8	4	8		+
	8	4	8	32	32	16	32		+
2×10^{3}	9	4	8	8	32	8	16		+
	10	8	16	16	64	16	32		+
	11	4	8	8	32	4	16		+
	12	4	8	16	32	16	32		+
	13	4	16	32	64	16	32		+
	14	4	8	8	16	4	16		+
2×10^{4}	15	8	16	16	64	16	32		+
	16	4	8	8	32	8	32		+
	17	4	8	8	16	4	16		+
	18	2	16	16	32	8	16		+
	19	4	16	32	64	16	32		+
	20	4	16	32	64	16	32		+
سيطرة	21	0	0	0	0	0	0		–
	22	0	0	0	0	0	0		–

+ مقاوم بجرعة التحدي

– غير مقاوم لجرعة التحدي واصيب بالمرض

المناقشة

لغرض السيطرة على مرض جدري الماعز تم استخدام عدة انواع من اللقاحات كان افضلها اللقاحات المحضرة من الفايروسات الحية المضعفة بطريقة التمرير التسلسلي في خلايا الرزع النسيجي .تتميز هذه الطريقة بقلة تكاليفها وبسهولة الحصول على الفايروس بكميات كافية كما يقل فيها احتمال التلوث الجرثومي الذي قد يسبب مشاكل كبيرة في الحقل (El- Zeine ، 1983) وقد اشار الباحث (Ramyar , 1966) بأن اللقاحات المحضرة من عشر فايروسية معزولة من منطقة معينة تعطي مناعة جيدة وثابتة لحيوانات تلك المنطقة بينما قد يسبب تعميم الاصابة للحيوانات المستوردة من مناطق اخرى لذلك اصبح من الافضل تحضير اللقاحات من العشر المعزولة محليا للحصول على لقاح ذي كفاءة مناعية جيدة وبدون احداث مضاعفات جانبية .

وقد تطابقت نتائج معايرة التمرير الخمسين لفايروس جدري الماعز من النتائج التي توصل اليها (Ramyar, et. al.;1974) عند معايرتهم التمرير السادس والخمسين لفايروس جدري الماعز عشرة (Gorgan) وكذلك EL-Zein ,et. al. وعند معايرتهم التمرير العشرين بعد المائة للعشرة اللقاحية اللبنانية .

وكانت نتائج اختبار التألق المناعي غير المباشر اكثر حساسية في الكشف عن الاجسام المضادة مما يشير الى امكان استخدام هذا الاختبار في التشخيص والكشف عن اقل معيار للاجسام المضادة بالمقارنة مع اختبار التعادل المصلي ، وتتفق هذه الملاحظات مع ما سجله (Sharkar,et.al.;1980) وقد يعزى هذا الى ان التعادل المصلي يقيس الاجسام المضادة المعادلة لمستضدات معينة ربما تلك التي تتفاعل مع مستقبلات الفايروس على الخلية بينما يقيس اختبار التألق المناعي الاجسام المضادة التي تتفاعل مع معظم المستضدات المتوفرة في تركيب الفايروس . اما اختبار التحدي الذي يعتبر المقياس الاساس والمقيم في تقدير الكفاءة المناعية لعموم اللقاحات الفايروسية وبالذات فايروسات

الجدري (Ramyar & Hessami 1971) فقد تم استخدامه بعد مرور اربعة اسابيع على حقن الحيوانات بتركيزات مختلفة من الفايروس المضعف فيما اشارت الابحاث الى ان هذا الاختبار يعتمد نتيجته بعد مرور اسبوعين او ثلاثة اسابيع فقط من تلقيح الحيوانات المراد دراسة كفائته المناعية فيها . (Rafyi & Ramyer , 1959) لذلك ومن خلال النتائج المذكورة يستنتج بأن فايروس جدري الماعز عترة حرير التمرير الخمسين يمكن استخدامه لقاحا لحماية الماعز ضد مرض جدري الماعز بنسبة ١٠٠٪ وان انسب تركيز من هذا التمرير يمكن استخدامه جرعة لقاحية في اذامة الماعز هو (2x10³ TCID 50/0.1 ml) لما وفرت من مقاومة كاملة للحيوانات ضد اختبار التحدي دون حدوث مضاعفات جانبية ، كما انه حفز تكون الاجسام المضادة بمعيار مناسب .

هذا بالاضافة الى وجود دراسة اخرى ستنشر لاحقا حول استخدام هذا الفايروس المضعف في تجربة حقلية واسعة النطاق ، ودراسة مقارنة تبين الفايروس المضعف والفايروس الضاري وخواصه الفيزياوية والكيمياوية والحياتية .

PRELIMINARY STUDY OF THE PRODUCTION OF GOAT POX VACCINE LOCAL VIRUS STRAIN

M. Y AL Attar , A. S .[1]Al . Bana
Department of Microbiology
College of Mosul , Mosul .
[1]Department of Microbiology ,
College of Veternary Medecine ,
University of Baghdad , Baghdad .

ABSTRACT

This study is the first attempt in Iraq to accomplish attenuation of the local Virulent goat pox virus (GPV) (Harirstrain) following serial passages in cell calture made from secondary lamb testis .

The degree of attenuation was evaluated by titrating the Virus of Passage , 28, 34, 40 and 50 , intradermally in the skin of goats . Passage 50 GPV was adequantely attenuated as Judged by the size and nature of the local skin reaction and by absence of both generalized pox infection and temperature responce in goats .

Passage 50 GPV was studied further by intradermal moculation of different diluctions of the virus in goats to determin the Immunological response by serum nutralization test .

Antibodies were detected one week after inoculation and all vaccinated animals rested challenge with virulent GPV . Intradrmal inoculation of $2x10^{3}$ TCID 50/0.1ml of attenuated GPV in Goat Generated a medium local reaction , mild temperature response and and a relatively high antibody titer .

REFERENCES

Al-Bana, A.S and Abas , A. H. 1983 . Growth Characteristics Electron Microscopy and Immunoflourscence studies on Goat Pox Virus I solated in Iraq. Symposium , Third International Conference on Impact of Vrial Diseases on the Developmen of African and Middle East Countries , Kuwait, P,122.

El - Zein A . Nehme , S., amd Singh , K. V.1983 . Preparation and Testing of a Goat Pox Vaocine from a Pathogenic Field Isolate Atrenuauted in cell Culture . zbl .Vet. Med. B., 30:341 -348 .

Plowright,W. and Ferris , R.D 1958 . The Grouth and Cytopath ogenicty of sheep Pox Virus in Tissue Culture . Brit. J, Exp . Path . 39: 424 .

Rafyi,A, and Ramyar , H. 1959 . Goat Pox in Iran -Serial Passage in Goats and the Developing Egg , and Relationshipwith sheep Pox .J.Comp . Path . 69:141.

Ramyar,H. 1966. Propogation of Goat Pox Virus on Monolayer Cell Culture . Zentbal . Vet . Med . 15:334.

Ramyar ,H.and hessami , M. 1971. Studies on the Duration of Immunity Conferred by a Live Modifid Sheep Pox Tissue Culture Virus Vaccine , Arch . Inst . Razi ., 23:27 .

Ramyar,H. Hessami , M. and Ghaboussi , B. 1974 . . La Variolen odifi Sur Cultures Cellulaires . Reoueil . de Medicne

Veterinaire Tom ., 150 :(2) 131.

Reed ,L.J.,and Muench , H. 1938 . A Simple Method of Estimating Fifty Percent end Points . Am . J . Hyg. 27: 493 .

Rovozzo, G. C ., and Burk , C. N . 1973 . A Manual of Basic Virological Technique , Prentice - Hali .In . Englewood Cliffs , New Jersey , PP . 139-150 .

Sarkar,P.,,Singh , S. P. Pandey , A.K., Kathuria , B.K and Kumar , S . 1980 . Application of Fluorescent Antibody Test in the Diagnosis of Sheep Pox Virus Multipation in Cell Culture . Ind . J. Anim . Soi. , 50:(5). 428-433.

Tantawi, H. H., Shoney , M. o. and Hassan , F. K. 1979. Isolation and Identification of the Sersenk Strain of Goat Pox Virus in Iraq . Trop . Anim . SH1th . Prod . 11:208-210