جامعة الموصل
كلية الطب البيطري

تأثير اعطاء بيوتاريت الصوديوم لافراخ اللحم على بعض المؤشرات المناعية عند التحصين بلقاحي انفلونزا الطيور المبطل التقليدي والمطور (H9N2)

مهند بسمان غانم الحسيني

رسالة ماجستير
الطب البيطري / امراض الدواجن

بإشراف
الأستاذ الدكتور
فنار ابلحد اسحق

1444 هـ
2022 م

تأثير اعطاء بيوتاريت الصوديوم لافراخ اللحم على بعض المؤشرات المناعية عند التحصين بلقاحي انفلونزا الطيور المبطل التقليدي والمطور (H9N2)

رسالة تقدم بها

مهند بسمان غانم الحسيني

إلى

مجلس كلية الطب البيطري في جامعة الموصل

وهي جزء من متطلبات شهادة الماجستير

في اختصاص الطب البيطري / امراض الدواجن

بإشراف

الأستاذ الدكتور

فنار ابلحد اسحق

1444 هـ 2022 م

بِسْمِ ٱللَّهِ ٱلرَّحْمَٰنِ ٱلرَّحِيمِ

﴿ وَمَا مِن دَآبَّةٍ فِى ٱلْأَرْضِ وَلَا طَٰٓئِرٍ يَطِيرُ
بِجَنَاحَيْهِ إِلَّآ أُمَمٌ أَمْثَالُكُم ۚ مَّا فَرَّطْنَا فِى ٱلْكِتَٰبِ
مِن شَىْءٍ ۚ ثُمَّ إِلَىٰ رَبِّهِمْ يُحْشَرُونَ ﴿٣٨﴾ ﴾

الأنعام:اية ٣٨

الخلاصة

يعد بيوتاريت الصوديوم من الاحماض الدهنية قصيرة السلسلة ويستخدم في القضاء على العديد من المسببات المرضية حيث يوثر على التوازن البيئي للجهاز الهضمي ومعدل النمو وذلك من خلال عمله على كبح تاثير البكتريا الضارة وتحفيز نمو البكتيريا النافعة فضلا عن دوره في تنشيط الخلايا المعوية وترميم نسيج جدار الامعاء.

هدفت هذه الدراسة الى التحري عن تاثير بيوتاريت الصوديوم على الاستجابة المناعية غير المتخصصة والخلوية والخلطية في فراخ فروج اللحم الملقحة بنوعين مختلفين من اللقاحات المبطلة لانفلونزا الطيورنوع H9N2 احدهما تقليدي والآخر مطور وكذلك تاثيرهذه المادة على اداء النمو في افراخ التجربة. تم استعمال 150 من فراخ فروج اللحم بعمر يوم واحد قسمت عشوائيا الى 5 مجاميع (30 طائراً لكل مجموعة) وتم تلقيح المجموعتين الاولى والثانية بلقاح انفلونزا الطيور التقليدي المبطل بعمر يوم واحد بالحقن تحت الجلد في منطقة الرقبة وبكمية 0.25 مل وبعدها تركت المجموعة الاولى بدون معاملة بينما تم اعطاء مادة SB للمجموعة الثانية بجرعة 1 غم / لتر ماء الشرب طيلة مدة التجربة. اما المجموعتان الثالثة والرابعة فقد لقحت بلقاح انفلونزا الطيور المبطل والمطور بالعمر نفسه وطريقة الحقن ، وتركت المجموعة الثالثة ايضا بدون معاملة اما المجموعة الرابعة فقد اعطي لها مادة SB كما في المجموعة الثانية ، وتركت المجموعة الخامسة بدون اية معاملة (مجموعة السيطرة) . بعد ذلك تم جمع الدم للحصول على المصل ومن ثم اجراء الفحوصات المصلية والتي تضمت فحص مستوى كل من ببتيد البيتاديفينسين-10 والكاثليسيدين-B1 والانترفيرون كاما بواسطة تقنية الانزيم المناعي الممتز، كما تم قياس مستوى الاضداد المناعية الناتجة من عملية التلقيح بلقاح الانفلونزا H9N2 بواسطة اختبار الانزيم المناعي الممتز غير المباشر وكذلك بواسطة اختبار تثبيط التلازن الدموي . وقد تم حساب معدل اوزان الجسم والزيادة الوزنية اسبوعيا وحساب الوزن النسبي للاعضاء اللمفية وكذلك حساب معامل التحويل الغذائي في فراخ مجاميع التجربة.

لقد اوضحت النتائج بان مادة SB احدثت ارتفاعاً معنوياً في الببتيد الدفاعي بيتا ديفينسين-10 في المجموعتين الثانية والرابعة (2.2±0.3 , 1.5±0,2 ng/ml) بعمر 14 يوماً مقارنة بالمجموعتين الاولى والخامسة ولكن بلا فرق معنوي يذكر مع المجموعة الثالثة. بينما كان هذا الارتفاع بعمر 35 يوم واضحا في المجموعة الثانية وبلغ (2.6±0,4 ng/ml) مقارنة

بالمجموعة الاولى والخامسة فقط. وكذلك حدث الارتفاع نفس مع الكاثليسيدين B1 في المجموعة الثانية بعمر 35 يوماً وبلغ (543.1±114.5 ng/L)، اظهرت النتائج عدم وجود تاثيرمعنوي يذكر او واضح لمادة SB على مستوى الانترفيرون كاما في المجاميع المعاملة اوالملقحة فقط ، بينما كان هناك تاثير معنوي ومبكر لمادة SB المعطى على مستوى الاضداد ضد فيروس H9N2 المقاسة بواسطة اختبارالاليزا في فراخ المجموعة الرابعة مقارنة مع المجاميع الاخرى عند عمر 14 يوماً اذ وصل المعيار الى (1046±465.1)، كما لوحظ ظهور تاثير معنوي لمادة SB او اللقاح المطورH9N2P او كليهما معا وادى الى زيادة في مستوى الاضداد للمجاميع الثانية والثالثة والرابعة بعمر 35 يوماً وذلك بواسطة اختباري الاليزا وتثبيط التلازن الدموي اذ بلغ معيار هذه الاضداد (12433±937,11518±569,10644±631) (9.2±0.25,8.5±0.64,8±0.4 log2) على التوالي.

كما لوحظت زيادة معنوية في الوزن النسبي لغدة فابريشيا في المجموعة الثانية (0.233±0.03,0.292±0.02) (غم/100غم من وزن الجسم) مقارنة مع المجموعتين الرابعة والخامسة (0.236±0.004,0.228±0.007)(0.133±0.02,0.158±0.009) (غم/100غم من وزن الجسم) بعمر 21 و28 يوماً على التوالي، ولم تُظهر النتائج وجود تاثيرمعنوي يذكر او واضح لمادة SB على معدل اوزان الجسم في المجاميع المعاملة اوالملقحة فقط. بينما لوحظ وجود ارتفاع معنوي في معدل الزيادة الوزنية بعمر 35 يوماً في المجموعة الثانية (751.2±23.6) غم ومن بعدها المجموعة الرابعة (702.2±11.5) غم مقارنة مع المجاميع الاخرى. ان اعطاء مادة SB رفع من قيمة معامل التحويل الغذائي في المجموعتين الثانية والرابعة وبلغت قيمته (1.5±0.06,1.47±0.06) وذلك بعمر 35 يوماً على التوالي مقارنة مع باقي مجاميع التجربة، ومن هذه الدراسة نستنتج بان اعطاء مادة SB بكمية 1غم / لتركان له تأثير ايجابي وواضح من كل من المناعة غير المتخصصة متمثلة بالبيتا ديفينسين -10 والكاثليسيدين –B1 وكذلك المناعة الخلطية متمثلة بمعيار الاضداد ضد فيروس H9N2 دون تاثير يذكر على مستوى الانترفيرون كاما. كما ان اعطاء هذه المادة لم يكن لديه تأثير في معدل اوزان الجسم لكنه أسهمَ برفع معدل الزيادة الوزنية بشكل جيد وكذلك رفع من قيمة معامل التحويل الغذائي في المجاميع المعاملة به.

شكر وثناء

الحمد لله اولاً وآخراً الحمد لله الذي بنعمته تتم الصالحات ، مهما تقدمت وفتحت أمامي طرق النجاح ووصلت لكل ما احلم بهِ فواجب علي أن أستذكر من كان سبباً في نجاحي ومن ساندني وأمسك بيدي للاستمرار في طريقي للنجاح والتقدم وهم الذين بوجودهم خلق النجاح والإبداع فمهما عبرنا لهم فالكلمات قليلة بحقهم ، لاجل ذلك أتقدم بالشكر والامتنان الى عمادة كلية الطب البيطري جامعة الموصل متمثلة بالسيد عميد كلية الطب البيطري الاستاذ الدكتور/ ظافر محمد عزيز والسيد معاون العميد للشوؤن العلمية الأستاذ الدكتور/ رعد عبدالغني بشير والسيد معاون العميد للشوؤن الادارية الأستاذ الدكتور/ سيفان سعد فاضل ، كما اتقدم بالشكر الجزيل للاستاذ الدكتورة / هناء خليل اسماعيل (رئيس فرع الامراض وامراض الدواجن) والدكتور كرم هاشم الملاح كما اتقدم بشكري الجزيل الى رئيس فرع الاحياء المجهرية الاستاذ الدكتور/ صفوان يوسف البارودي وإلى مشرفي الأستاذ الدكتور/ فنار أبلحد أسحق لما قدمه لي من مشورة علمية وعملية لاتمام هذه الرسالة ، ولما بذله من جهد علمي وارشادات مثمرة في إثراء وترصين البحث العلمي، اسأل الله أن يمنَ عليهم بالصحة والعافية الدائمة ، ومن الوفاء أن اتقدم بالشكر والعرفان إلى كل من قدم لي يد العون والمساعدة في انجاز بحثي هذا وهم كل من الدكتورمحمد رأفت جاسم والدكتور محمود جبر العبدربه من شركة باز الجزيرة والى وشركة أفنان لخدمات الثروة الحيوانية والدواجن متمثلة بالدكتور يوسف انيس، وكذلك اتقدم بالشكروالعرفان لزملائي طلبة الدراسات العليا واخص منهم بالذكر الدكتورجاسم يونس جاسم والدكتور محمد عدنان ، وفي الخاتمة أتقدم بالشكر والاعتزاز إلى جميع الأهل والأصدقاء والى كل من كان لي سنداً في إكمال مسيرتي العلمية وفاتني ان اذكره.

ومن الله التوفيق

الباحث

مهند بسمان غانم الحسيني

الإهداء

إلى... من سقاني العلم والمعرفة من ينابيعهُ

كلية الطب البيطري_جامعة الموصل

إلى... قدوتي ومثلي الاعلى في الحياة

ابي اطال الله عمره

إلى... نبع المحبة والإيثار والكرم

امي اطال الله عمرها

إلى... سندي وقوتي وملاذي

اخواني واخواتي وزوجتي وأولادي واصدقائي

إلى... جميع من تلقيت عنهم النصح والدعم

اهدي هذا الجهد المتواضع

ثبت المحتويات

الموضوع	الصفحة
الخلاصة	ا-ب
شكر وثناء	ج
الإهداء	د
ثبت المحتويات	ه-و
ثبت الجداول	ز-ح
ثبت الاشكال	ط
ثبت المختصرات	ي
الفصل الاول: المقدمة Introduction	1
الفصل الثاني : استعراض المراجع Literatures Review	4
2-1 بيوتاريت الصوديوم Sodium butyrate (SB)	4
2-2 ألاستجابة المناعية الفطرية	8
2-2-1 البيتيدات الدفاعية للمضيف (Host defense peptides) (HDPs)	9
2-2-1-1 مجموعة بيتا ديفينسين الدواجن Avian β-defensins	11
2-2-1-2 مجموعة الكاثليسيدينات (CATHs)(Cathlicidins)	12
2-2-2 السايتوكينات cytokines	14
2-3 الاستجابة المناعية الخلطية Humoral immune response	16
2-4 الاستجابة المناعية الخلوية Cellular immune response	16
2-5 نبذة عن مرض انفلونزا الطيور	17
2-5-1 تعريف المرض Disease definition	17
2-5-2 تاريخ المرض Disease history	17
2-5-3 الاهمية الاقتصادية للمرض The economic importance of the disease	18
2-5-4 الإندلاعات المرضية وبعض الدراسات في العراق Disease outbreaks and some studies in Iraq	18
2-5-5 خصائص الفيروس وتصنيفه Virus characteristics and classification	19
2-5-6 التثبيط المناعي لفيروس Immunosuppression of H9N2 Virus	21
2-5-7 انتقال العدوى Transmission of infection	21
2-5-8 مدة الحضانة والعلامات السريرية Incubation period and clinical signs	22
2-5-9 الافات العيانية والمجهرية Gross and microscopic lesions	22
2-5-10 التشخيص Diagnosis	23
2-5-10-1الاختبارات المصلية (اختبار اليزا) Serological tests (ELISA)	23
2-5-10-2 الاختبارات الجزيئية Molecular tests	25
2-5-10-3 عزل وتنمية الفيروس Virus isolation and cultivation	25
2-5-10-4 التلازن وتثبيط التلازن الدموي Agglutination and hemagglutination inhibition	26
2-5-11 التشخيص التفريقي Differential diagnosis	26

الموضوع	الصفحة
12-5-2 التلقيح واللقاحات Vaccination and Vaccines	27
13-5-2 أهمية التلقيح The importance of vaccination	29
6-2 الانماط الجزيئية المرتبطة بالعوامل الممرضة (PAMPs)	29
الفصل الثالث : المواد وطرائق العمل Materials and methods	32
1-3 المواد	32
1-1-3 الاجهزة المستعملة	32
2-1-3 المواد المختبرية والبايولوجية	33
3-1-3 العدد التشخيصية (الكتات)	33
2-3 طرائق العمل	34
1-2-3 الافراخ	34
2-2-3 العلف	34
3-2-3 اللقاحات والمستضد المرجعي H9 الموجب لمرض الانفلونزا	35
1-3-2-3 لقاح الانفلونزا التقليدي NOBILIS® H9N2	35
2-3-2-3 لقاح الانفلونزا المطور NOBILIS® H9N2P	35
3-3-2-3 المستضد المرجعي الموجب H9 لمرض الانفلونزا	35
4-2-3 بيوتاريت الصوديوم	36
5-2-3 تصميم التجربة	36
6-2-3 جمع الدم وفصل المصل	38
7-2-3 اختبارات الاليزا المستعملة في قياس انواع الاستجابات المناعية	38
1-7-2-3 اختبار الساندويج اليزا	38
2-7-2-3 اختبار الاليزا التنافسي	39
3-7-2-3 اختبار الاليزا غير المباشر	41
8-2-3 اختبار تثبيط التلازن الدموي	42
9-2-3 اوزان الاعضاء اللمفية (غدة فابريشيا، الطحال ، التوثة)	43
10-2-3 اداء النمو	43
1-10-2-3 وزن الجسم	43
2-10-2-3 معامل التحويل الغذائي	43
11-2-3 التحليل الاحصائي	44
الفصل الرابع : النتائج Results	45
الفصل الخامس : المناقشة Discussion	62
الاستنتاجات Conclusions	72
التوصيات Recommendations	73
المصادر References	74
Abstract	A-B

ثبت الجداول

الجدول	العنوان	الصفحة
الجدول 1	الاجهزة والمعدات المستعملة في الدراسة	32
الجدول 2	المواد المختبرية والبايلوجية المستعملة في الدراسة	33
الجدول 3	العدد التشخيصية المستعملة في الدراسة	33
الجدول 4	مكونات وتراكيز المواد في العلف البادئ و النامي والناهي	34
الجدول 5	التحليل الكيميائي للاعلاف المستعملة في الدراسة	35
الجدول 6	مستوى ببتيد البيتاديفينسين-10 (AvBDs-10) مقاسا ب(ng/ml) بعمر 14و21و28و35 يوماً في امصال مجاميع التجربة	45
الجدول 7	مستوى ببتيد الكاثليسيدين B1 (CATH-B1) مقاسا ب(ng/L) بعمر 14و21و28و35 يوماً في امصال مجاميع التجربة	46
الجدول 8	مستوى الانترفيرون كاما (interferon γ) مقاسا ب(ng/L) بعمر 14و21و28و35 يوماً في امصال مجاميع التجربة	46
الجدول 9	معيار الاجسام المضادة لفيروس لقاح H9N2 مقاسة بالاليزا بعمر 14و21و28و35 يوماً في امصال مجاميع التجربة	47
الجدول 10	معيار الاجسام المضادة لفيروس لقاح H9N2 بعمر 14و21و28و35 يوم في مجاميع التجربة باستعمال اختبار تثبيط التلازن الدموي HI ومقاسة ب(Log2)	48
الجدول 11	الوزن النسبي (غم /100غم من وزن الجسم) لغدة فابريشيا والتوثة والطحال بعمر 7و14و21و28و35 في مجاميع التجربة	49
الجدول 12	معدل اوزان الجسم (غم) بعمر 7و14و21و28و35 في مجاميع التجربة	50
الجدول 13	معدل الزيادة الوزنية (غم) عند 7 و 14 و 21 و 28 و 35 يومًا في مجاميع التجربة	51
الجدول 14	قيم معامل التحويل الغذائي (FCR) (غم علف / غم من وزن الجسم) عند 7 و 14 و 21 و 28 و 35 يومًا في مجاميع التجربة	52
الجدول 15	معامل الارتباط بين البياديفينسين-10 والكاثليسيدين B1 (المربعات الحمراء تشير الى وجود ارتباط طردي وإيجابي بينهم عند مستوى احتمالية$P\leq0.05$)	53
الجدول 16	معامل الارتباط بين الانترفيرون كاما والاجسام المضادة (المربعات الحمراء تشير الى وجود ارتباط طردي وإيجابي بينهم عند مستوى احتمالية$P\leq0.05$)	54
الجدول 17	معامل الارتباط بين بين الانترفيرون كاما والكاثليسيدين B1 (المربعات الحمراء تشير الى وجود ارتباط طردي وإيجابي بينهم عند مستوى احتمالية$P\leq0.05$)	55
الجدول 18	معامل الارتباط بين البياديفينسين-10 والانترفيرون كاما (المربعات الحمراء تشير الى وجود ارتباط طردي وإيجابي بينهم عند مستوى احتمالية$P\leq0.05$)	56

الجدول	العنوان	الصفحة
الجدول 19	معامل الارتباط بين البيتاديفينسين-10 والاجسام المضادة (المربعات الحمراء تشير الى وجود ارتباط طردي وإيجابي او عكسي وسلبي بينهم عند مستوى احتمالية$P\leq0.05$)	57
الجدول 20	معامل الارتباط بين الكاثليسيدين-B1 والاجسام المضادة (المربعات الحمراء تشير الى وجود ارتباط طردي وإيجابي او عكسي وسلبي بينهم عند مستوى احتمالية$P\leq0.05$)	58
الجدول 21	معامل الارتباط بين معدل وزن الجسم ومعامل التحويل الغذائي (المربعات الحمراء تشير الى وجود ارتباط طردي وإيجابي او عكسي وسلبي بينهم عند مستوى احتمالية$P\leq0.05$)	60
الجدول 22	معامل الارتباط بين الاجسام المضادة بواسطة اختبار الاليزا واختبار تثبيط التلازن (المربعات الحمراء تشير الى وجود ارتباط طردي وإيجابي بينهم عند مستوى احتمالية$P\leq0.05$)	61

ثبت الأشكال

الشكل	العنوان	الصفحة
الشكل 1	ميكانيكية عمل البيوتاريت	7
الشكل 2	المناعة المتخصصة وغير المتخصصة	8
الشكل 3	تاثير الببتيدات الدفاعية للمضيف كمضاد للميكروبات والالتهابات وتفعيل شفاء الجروح و تحفيز الجهاز المناعي	11
الشكل 4	تصميم التجربة	37

ثبت المختصرات

الاختصار	الاسم الكامل
AGID	Agar gel Immunodiffusion
AMPs	Antimicrobial Peptides
AvBDs	Avian beta defensins
AIVs	Avian influenza viruses
CD	Cluster of differentiation
DAMP	Damage-associated molecular patterns
DPI	Day post infection
DIVA	Differentiating Infected from Vaccinated Animals
ELISA	Enzyme linked immune sorbent assay
FCR	Feed conversion ratio
GALT	Gut Associated Lymphoid Tissues
HI	Hemagglutination-Inhibition
HA	Hemagglutinin
HPAI	Highly pathogenic avian influenza
HDPs	Host defense peptides
IFNγ	Interferon Gamma
IL-1	Interlukin-1
LPS	Lipopolysaccharide
LPAI	Low pathogenic avian influenza
NK	Natural killer cell
NA	Neuraminidase
NS	Normal saline
NP	Nuclear protein
PAMP	Pathogen associated molecular patterns
PRRs	Pattern Recognition Receptors
SCFAs	Short-chain fatty acids
SB	Sodium butyrate
SPF	Specific pathogen free
TLRs	Toll like receptors
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor necrotic factor

الفصل الاول

المقدمة

Introduction

يعد الجهاز الهضمي في الدواجن أحد اهم اجهزة الجسم وذلك لدوره المهم في توفير التاثير الايجابي والمفيد لهضم وامتصاص الغذاء وتحسين الحالة الصحية وأداء النمو لدى الطيور ، لذلك فمن الضروري الحفاظ على الغشاء المخاطي للأمعاء لانه يمثل التوازن الديناميكي بين الخلايا الظهارية للامعاء والميكروبيوم والجهاز المناعي واجزاء الجهاز الهضمي (Schenk and Muller, 2008). ونتيجة لحظر استعمال المضادات الحيوية كمحفزات للنمو في تغذية الدواجن في العقود القليلة الماضية ، فقد ادى هذا القرار الى اجبار او الزام خبراء التغذية على البحث عن بدائل أخرى لهذه المضادات الحيوية وذلك لتعزيز كفاءة الأمعاء وإنتاجية الدجاج ، وبالتالي كانت ولازالت الأحماض الدهنية قصيرة السلسلة (Short-chain fatty acids) وأملاحها هي أحد البدائل الواعدة للمضادات الحيوية. وقد تم استعمال العديد من هذه المواد كمكملات علفية وذلك لعملها في تعديل وظائف النبيذ الجرثومي الطبيعي وتحفيز جهاز المناعة (De Vries *et al*., 2012).

وفي الآونة الأخيرة تم استعمال البيوتاريت كأحد الإضافات العلفية بوصفه من الاحماض الدهنية القصيرة السلسلة (SCFA) فقد اكتسب اهتمامًا أكبر كبديل جيد لتحسين إنتاج الدواجن وتأثيره في تحفيز العديد من اجهزة الجسم بما في ذلك الجهاز الهضمي والاستجابة المناعية (Ahsan *et al*., 2016). وحديثا اكتسب بيوتاريت الصوديوم اهتمامًا كبيرًا بسبب تأثيره المفيد في أداء النمو وسلامة وظائف الجهاز المناعي والهضمي وتأثيره في تثبيط الميكروبات الضارة (Song *et al*., 2017). وتتضمن آلية عمل بيوتاريت الصوديوم بقدرته على اختراق جدار الخلية البكتيرية ثم تغيير درجة حموضة هذه الخلايا وبالتالي كبح تكاثر هذه الكائنات الدقيقة (Van Der Wielen *et al*., 2000) ، إن استعمال SB في غذاء الدواجن له تاثير جيد لدوره في التقليل من حموضة الأمعاء (PH) وبالتالي تقليل توطن الكائنات الحية الدقيقة الضارة في الجهاز الهضمي (Sikandar *et al*., 2017a) فضلا عن دوره في تعزيز نمو الخلايا الظهارية للأمعاء وتجهيزها بالطاقة وتحسين اداء النمو (Shahir *et al*., 2013).

إن الديفينسينات Defensins والكاثيليسيدينات Cathlicidins عبارة عن مجموعة كبيرة وواسعة من الببتيدات الدفاعية للمضيف (HDPs) أو الببتيدات المضادة للميكروبات (AMPs) والتي تؤدي آلية دفاعية كخط دفاع اولي للمناعة الفطرية اوغير المتخصصة مع وظائف فعالة ومضادة للميكروبات وداعمة للمناعة. وقد تم اكتشاف أربعة عشر نوعًا من مركبات الدفاع عن المضيف في الدواجن المعروفة باسم Avian β-defensin 1-14 (AvBD1-14) في الدواجن، ويتم التعبير الجيني عن هذه AvBDs على نطاق واسع في أعضاء الدجاج المختلفة ، بما في ذلك الجهاز الهضمي ، في حين تم التعرف على أربعة أنواع اخرى من هذه الببتيدات وعرفت باسم الكاثليسيدينات CATHs وهي fowlicidins 1,2,3 و CATH-B1 وهي فعالة في تدمير مجموعة واسعة من الكائنات الحية الدقيقة (Lyu *et al.*, 2020). لقد أوضح الباحث Achanta *et al.* (2012) بان استعمال تفاعل البلمرة المتسلسل ذي الوقت الحقيقي للتعبير عن هذه الكاثليسيدينات في الجهاز الهظمي والجهاز التنفسي والجهاز البولي-التناسلي والأعضاء اللمفاوية للدجاج في الحالة الطبيعية ادى الى إنتاج CATH-B1بكميات كبيرة في جراب فابريشيا ، وان إنتاج fowlicidins (CATHs) 1 و2 و3 يرتبط بعمر الصيصان ، إذبلغت ذروة جميع أنواع الكاثليسدينات الأربعة في جراب فابريشيا في اليوم الرابع من عمر الصيصان ثم انخفضت تدريجيًا بعمر 28 يوم بعد الفقس. لقد ادى استعمال البيوتاريت غير المغلف بكمية 1 غم / كغم من وزن الجسم في دجاج اللحم إلى احداث تضخيم كبير في جينات الببتيدات الدفاعية للمضيف والتي تشارك بقوة في الاستجابة المناعية الفطرية (Sunkara *et al.*, 2011) وتنظيم مستويات الإنترلوكين -6 في مصل الدم بعمر 21 يوم (Zhang *et al.*, 2011). إن استعمال بيوتاريت الصوديوم كاضافة علفية لها تاثير كبير في تحسين مستوى إفراز IgA في الأمعاء فضلا عن تأثيرها في تحفيز إفراز الأجسام المضادة في تجويف الجهاز الهضمي ، وبالتالي فهو يعزز الوظيفة المناعية للأمعاء .(Sikandar *et al.*, 2017b)

لقد لوحظت العديد من الاندلاعات المرضية بسبب فيروس انفلونزا H9N2 في عدة مناطق من العراق ، وتم تسجيل الكثير من الخسائر الاقتصادية نتيجة الاصابة بهذا المرض في صناعة الدواجن ، بما في ذلك فروج اللحم والبياض والامهات (Mohamed *et al.*, 2019; Kraidi *et al.*, 2017). إذ يمثل انتشار فيروسات H9N2 وانتقالها بين حقول الدواجن التحدي الرئيس للسلطات البيطرية والأطباء البيطريين والمربين. ومع ذلك فان استعمال عمليات التلقيح بشكل مكثف لحماية قطعان الدواجن قد قلل من انتشار المرض ، وتقلل كذلك من

طرح الفيروس ، وبسبب عدم توفر اللقاح الحي المضعف ضد فيروس إنفلونزا الطيور، فإن تحسين الاستجابة المناعية للقاحات المبطلة بتقنيات مختلفة هو من الطرائق الحديثة التي تتوجه الدراسات الحديثة لتحقيقها وذلك لتعزيز التحفيز المناعي ضد فيروس انفلونزا الطيور. أذ يتم حاليا استعمال اللقاح المستحلب الزيتي المبطل والمطور ضد فيروس الانفلونزا وهو H9N2P (النمط الجزيئي المرتبط بالعوامل الممرضة (P=PAMPs) في دجاج التسمين (Choi *et al*., 2008).

اهداف الدراسة:

1- دراسة تأثير بيوتاريت الصوديوم في تحفيز الجوانب المناعية المختلفة بعد التلقيح بلقاحات انفلونزا الطيور المبطلة H9N2 و H9N2P وهي:

أ- المناعة غير المتخصصة وذلك بقياس مستوى الببتيدات الدفاعية للمضيف HDPs وهي كل من البيتا ديفينسين-10 والكاثليسيدين- B1 مع او بلا المعاملة ببيوتاريت الصوديوم وذلك بقياس تركيزها بواسطة اختبار الاليزا.

ب- المناعة الخلطية والمتمثلة بالاجسام المضادة لفيروس H9N2 من خلال قياسها بواسطة تقنية الاليزا واختبار تثبيط التلازن الدموي

ج- المناعة الخلوية وذلك بقياس تركيز مستوى الانترفيرون(IFN-γ) كاما بواسطة اختبارالاليزا

2- استعمال بيوتاريت الصوديوم كبديل للانماط الجزيئية المرتبطة بالعوامل الممرضة PAMPs وذلك في تحفيز الاستجابات المناعية للقاح انفلونزا الطيور التقليدي المبطل H9N2

3- حساب الوزن النسبي للاعضاء اللمفية وهي غدة فابريشيا والتوثة والطحال.

4- حساب معدل اوزان الجسم ومعدل الزيادة الوزنية ومعامل التحويل الغذائي في مجاميع التجربة اسبوعيا

الفصل الثاني

استعراض المراجع

Literatures Review

1-2 بيوتاريت الصوديوم Sodium butyrate (SB)

تم استعمال المضادات الحيوية منذ اكتشافها في علاج العديد من المسببات الجرثومة وكذلك كمحفزات للنمو Growth prompters في الاعلاف الحيوانية لتحسين انتاجها ، وقد تم عدُ المضادات الحيوية كإضافات ومكملات أساسية للاعلاف وذلك لتحسين النمو والحفاظ على توازن النظام البيئي في القناة الهضمية لأكثر من 50 عاما مضت منذ استعمالها في صناعة الدواجن (Yu *et al*., 2021) ، وكانت تستعمل هذه المضادات الحيوية بهيئة مكملات غذائية بشكل واسع وغير مدروس وبدون ان تخضع لشروط ومعايير الأستعمال مما أدى ذلك الى زيادة في معدل مقاومة وعدم استجابة الجراثيم للمضادات الحيوية في الدواجن (Kabir , 2009)، فضلا عن انخفاض وتضاؤل في فعالية تلك المضادات في الانسان في المحصلة النهائية، ونتيجة لزيادة الوعي والثقافة بين عامة الناس فضلا عن زيادة المخاوف تجاه مقاومة البكتيريا الممرضة لعمل المضادات الحيوية ، فقد فرض الاتحاد الأوربي عام 2006 حظراً على استعمال المضادات الحيوية في أعلاف الدواجن ; (Singer and Hofacre 2006 Murarolli *et al*., 2014) ، وقد دخل هذا الحظر حيز التنفيذ في الولايات المتحدة في كانون الثاني 2017 ، وحسب آخر التحديثات قامت وزارة الزراعة الصينية بحظر الاضافات العلفية الدوائية ، لذلك ظهرت هناك حاجة ملحة لايجاد بدائل للمضادات الحيوية والتي يمكن أن تحافظ على صحة وسلامة الحيوانات والانتاج الحيواني دون ان ينتج عنها مقاومة مضادة لها بواسطة الميكروبات (Young-Speirs *et al*., 2018) .

ومنذ تلك المدة بدأت مسيرة البحث لتطوير بدائل للمضادات الحيوية وقد حظيت باهتمام واسع ، وقد كان واجبا توفر بدائل للمضادات الحيوية بنفس الخصائص والمميزات المفيدة نفسها مثل البروبايوتك والبريبايوتك والسمبايوتك والأحماض العضوية ومضادات الاكسدة والمنتجات العشبية (البوليفينول والاعشاب) ، إذ يتم تعريف بعض هذه المركبات على أنها أحماض دهنية ذات سلسلة قصيرة تؤثر بشكل مفيد في المضيف عن طريق التحفيز الاختياري لأنواع البكتريا

المفيدة وتنشيط نموها من جهة مع تأثيرها القاتل او الكابح على البكتريا الضارة في الجهاز الهضمي للدواجن من جهة اخرى (Sugiharto, 2016).

من بدائل المضادات الحيوية والمعروفة عالميا هي مادة Sodium butyrate (SB) والتي تمثل ملح الصوديوم لحامض البيوتريك والذي يحتوي على ايون الصوديوم بدل الهايدروجين (-OH) ، إذ يعد SB من الاحماض الدهنية ذات السلسلة القصيرة ويتكون من اربع ذرات كاربون ، إذ ان ذرات الكاربون الطرفية مرتبطة مع ايون الهيدروجين (-OH) ويكون ارتباط مجموعة الهيدروكسيـل هذه ضعيفاً وقابلاً للاستبدال ، إذ يفقد ذرة الهيدروجين المرتبطة به بسهولة لتكوين ايون البيوتاريت ($CH3CH2CH2COO^-$) . ويؤثراعطاء مادة SB في العديد من وظائف الجسم في الفروج مثل كفاءة الاحياء الدقيقة في امعاء الطيور وشكل بطانة الامعاء والجهاز المناعي ، وتكمن اهمية SB كبديل للمضادات الحيوية المحفزة للنمو وذلك بوصفهه مصدراً لحامض البيوتريك والذي تكمن أهميته في الحيوانات ذات المعدة الاحادية ، ويتوفر SB تجاريا بالشكل غير المغلف والمغلف محميا بالدهون أو املاح الأحماض الدهنية (Sikandar *et al*, 2017b).

يتم تحويل SB بسهولة إلى حامض البيوتريك داخل الجهاز الهضمي للطيور إذ ينشط الخلايا المعوية من خلال آليات مختلفة منها المشاركة في ترميم نسيج جدار الأمعاء وتنظيم نمو البكتريا المعوية النافعة فضلا عن تحسين وزن الجسم ومعامل التحويل الغذائي (Feed conversion ratio) والتقليل من غزو الميكروبات الضارة للجهاز الهضمي للطيور ، مع قابليته في زيادة فعالية الاستجابة المناعية لفروج اللحم (Zhou *et al*., 2014). كما أن تحول SB الى حامض البيوتريك يمكنه من دخول واختراق جدارالخلية البكتيرية الضارة بشكل مباشر من خلال خاصية الانتشار والذي يؤدي الى احداث السمية في داخل الخلية البكتيرية من خلال تاثيره في قواعد البيورين للحامض النووي الجرثومي وبالتالي تغيير طبيعة الانزيمات الأساسية داخل الخلية وفي النهاية تحطم هذه البكتريا (Gantois *et al*., 2006) ، اما طريقة عمله غير المباشرة فتتمثل بقيامه بخفض حامضية الأمعاء ، مما يؤدي الى انتاج حامض اللاكتيك من قبل بكتريا (Lactobacilli and Bifidobacteria spp.) والتي تحتاج الى هذا الوسط الحامضي لكي تنمو وبذلك الدخول في عملية التنافس مع البكتريا الضارة في الاحتياجات الغذائية في الامعاء من خلال انتاج الأحماض العضوية (حمض الخليك وحمض اللاكتيك) والتي بدورها تقتل المسببات المرضية وتحافظ على بيئة معوية سليمة للطائر وتثبط نمو البكتريا المرضية مثل السالمونيلا والإشريكيا القولونية وغيرها (Vogt *et al*., 1982).

اما عن تاثير SB على الجهاز المناعي فلا يوجد وفرة من المعلومات التي تصف تأثير SB في جهاز المناعة في فروج اللحم وبشكل خاص عن المناعة غير المتخصصة او الفطرية، لكن الدراسات الحديثة والقليلة اشارت الى نقطة مهمة اضافة لخاصيته في قتل البكتريا بشكل مباشر وهي النشاط المناعي التنظيمي في تحفيز المناعة غير المتخصصة من خلال التحفيز على انتاج الببتيدات الدفاعية للمضيف Host Defense Peptides (HDPs) إذ تمتلك الببتيدات الدفاعية للمضيف وظيفة بايولوجية ومناعية فعالة تم أثباتها من خلال المزيد من الدراسات (Afacan *et al*.,2012; Wang *et al*., 2004) ، ويمتلك SB العديد من الوظائف الاخرى وهي:

1- تاثيره في وظيفة الامعاء

البيوتاريت هو مصدر الطاقة للخلايا الظهارية في الامعاء وكذلك يشارك في الحفاظ على صحة الغشاء المخاطي في المعدة والامعاء لانه حامض ضعيف ، فضلا عن ذلك فهو يحفز نمو الخلايا الظهارية السليمة وتمايزها ، كما يحث على احداث الموت المبرمج للخلايا السرطانية (Comalada *et al*., 2006; Luciano *et al*., 2002)

2- مضاد للالتهابات

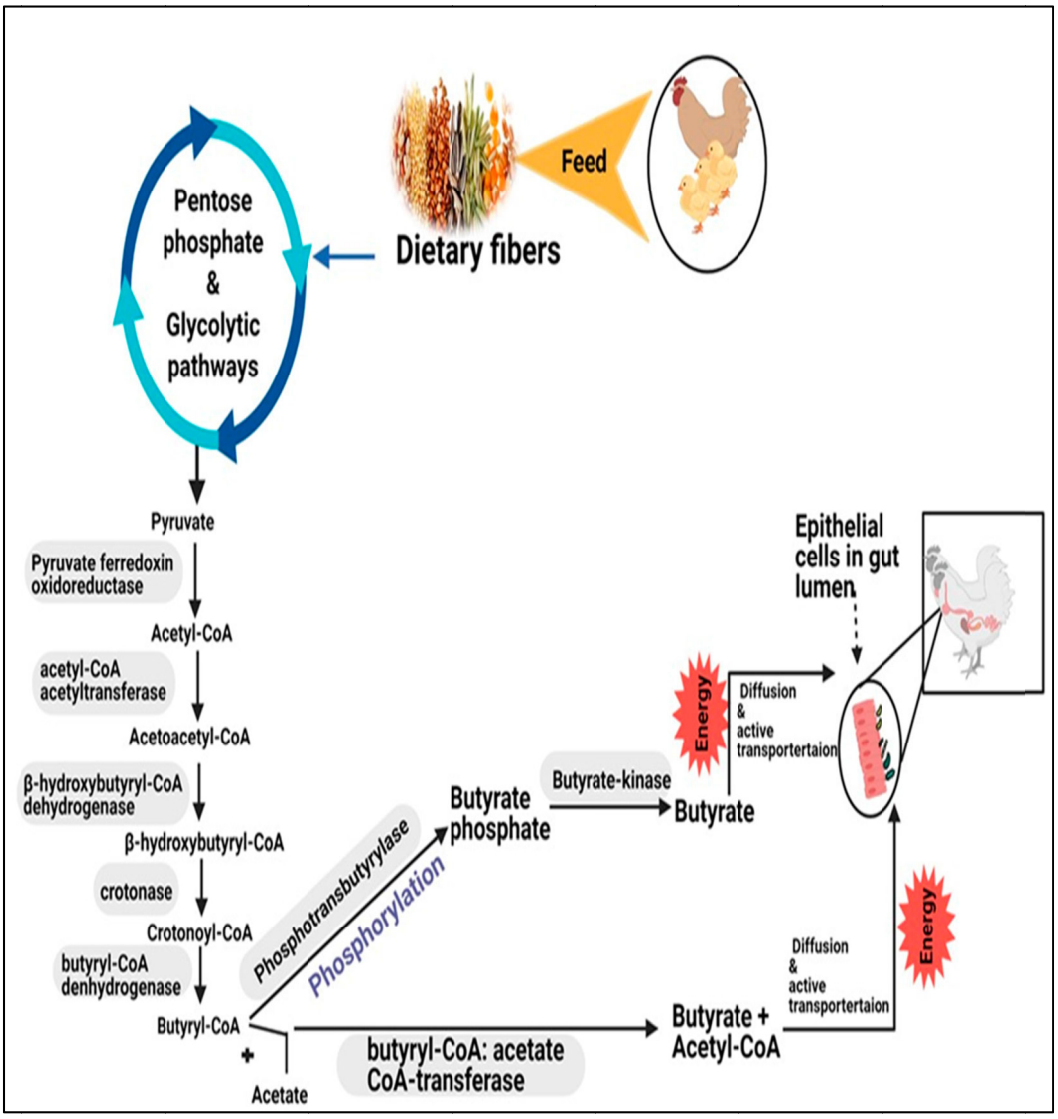
يعمل البيوتاريت كمضاد للالتهابات كما يشارك بشكل فعال في الاستجابة المناعية والالتهابية المبكرة، ويؤثر كذلك في انتاج الانترلوكين 1(IL-1) وعامل نخر الورم (TNF –α) . (Baeuerle & Henkel, 1994)

3- سلامة الغشاء المخاطي المعوي

يؤدي البيوتايت دورا مهما في تعزيز وتكوين حاجز الدفاع المخاطي في القولون من خلال التاثير على عدة مكونات واحدى هذه المكونات هي الجين المعوي المخاطي Mucin gene الذي يشفر لانتاج الميوسين المخاطي (Jiang *et al*., 2013) ، كما ويعمل على تعزيز وظيفة جدار الامعاء مع زيادة في كفاءة وظيفة انزيمات الامعاء وطول الزغابات المعوية، إذ يعمل الاخير كطبقة واقية ضد مسببات الأمراض ، فضلا عن دوره في زيادة أمتصاص المواد الغذائية وكفاءة الهضم ودوره كخط دفاعي في حماية الغشاء المخاطي المعدي - المعوي ضد الغزو البكتيري وبالتالي منع حدوث المرض و العدوى (Hilchie *et al*., 2013 ; Elnesr *et al* ,2020)

4- تأثيره في الاصابات البكتيرية

توجد هناك علاقة بين البيوتاريت وجوده في الامعاء مع قابليته على السيطرة على مسببات الأمراض مثل *Salmonella Enteritidis* ، فقد تبين أن البيوتاريت يقلل بشكل كبير من استعمار وغزو السالمونيلا لخطوط الخلايا الظهارية المعوية ، إذ يعدُ غزو هذه الخلايا خطوة مهمة في التسبب في عدوى السالمونيلا ، فضلا عن دوره في التقليل من تأثير التهاب الأمعاء الناجم عن المكورات العنقودية وذلك من خلال كبح هذه الجراثيم ولكن ليس للبيوتاريت تأثير كبير ومضاد ضد جرثومة Clostridium perfringens ، ولكنه قادر على تقليل عدد الطيور التي ممكن ان تصاب بآفات نخرية في الأمعاء الدقيقة (Timbermont *et al.*, 2011).

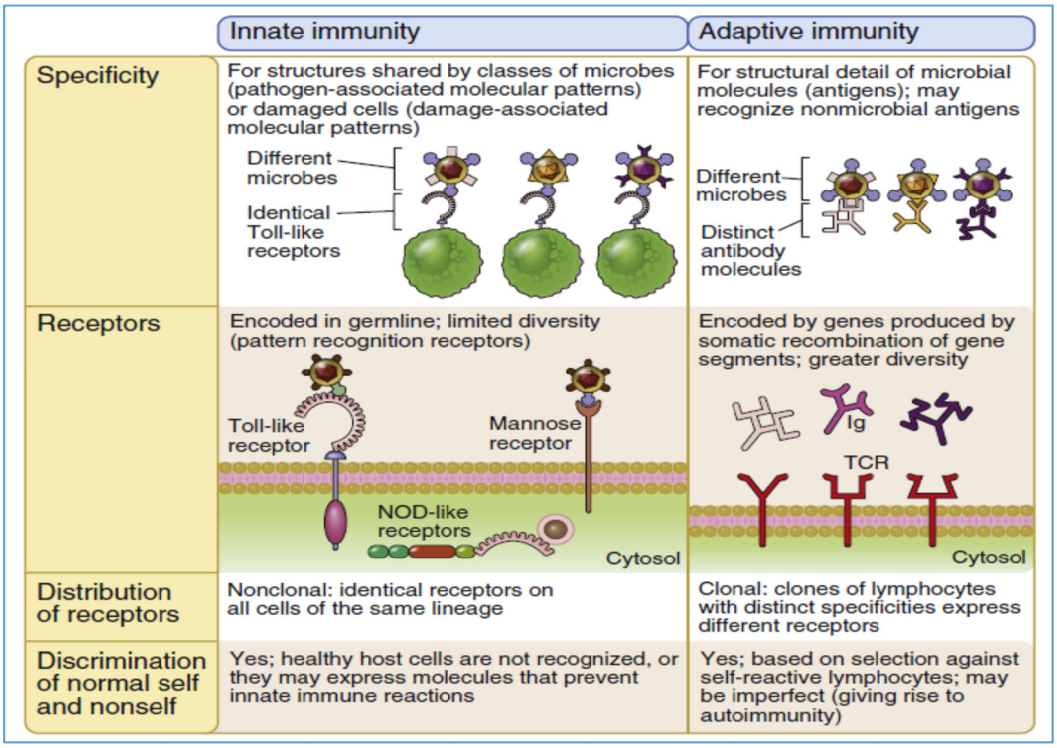


الشكل 1: ميكانيكية عمل البيوتاريت (Melaku *et al.*, 2021)

2-2 الاستجابة المناعية الفطرية Innate immunity

تشكل الاستجابة المناعية الفطرية خط الدفاع الأول للجسم ضد غزو المسببات المرضية ويعتمد ذلك على عائلة كبيرة من مستقبلات التعرف على الأنماط (Pattern Recognition Receptors) ، ويقوم الجهاز المناعي الفطري غير المتخصص بمقاومة العدوى بسرعة ولكن له دور اكبر من خلال تحكمه في تطوير نظام المناعة التكيفي المتخصص من أجل الاستمرار احداث الحماية المطلوبة ضد تلك العدوى ، وتتضمن أسلحة الجهاز المناعي الفطري بشكل أساسي: التعرف على انماط المستقبلات ، الكريات البيض ، السيتوكينات / الكيموكينات ، ومضادات الميكروبات الببتيدات / البروتينات بما في ذلك الببتيدات الدفاعية للمضيف (Zasloff ,2002).

إن نظام المناعة الفطري يعدُ نظاماً دفاعياً يستجيب على الفور ويهاجم مواقع الالتهابات ، إذ يتكون هذا النظام بشكل أساسي من حواجز تحمي المضيف من الاصابات البكتيرية والفيروسية والطفيلية والجزيئات الغريبة الأخرى والتي يؤدي دورا في الحد من قدرة المسببات المرضية على التكاثر والانتشار في المضيف (De la Fuente-Nunez *et al*.,2017).



الشكل (2) المناعة المتخصصة وغير المتخصصة (Abbas *et al*, 2016)

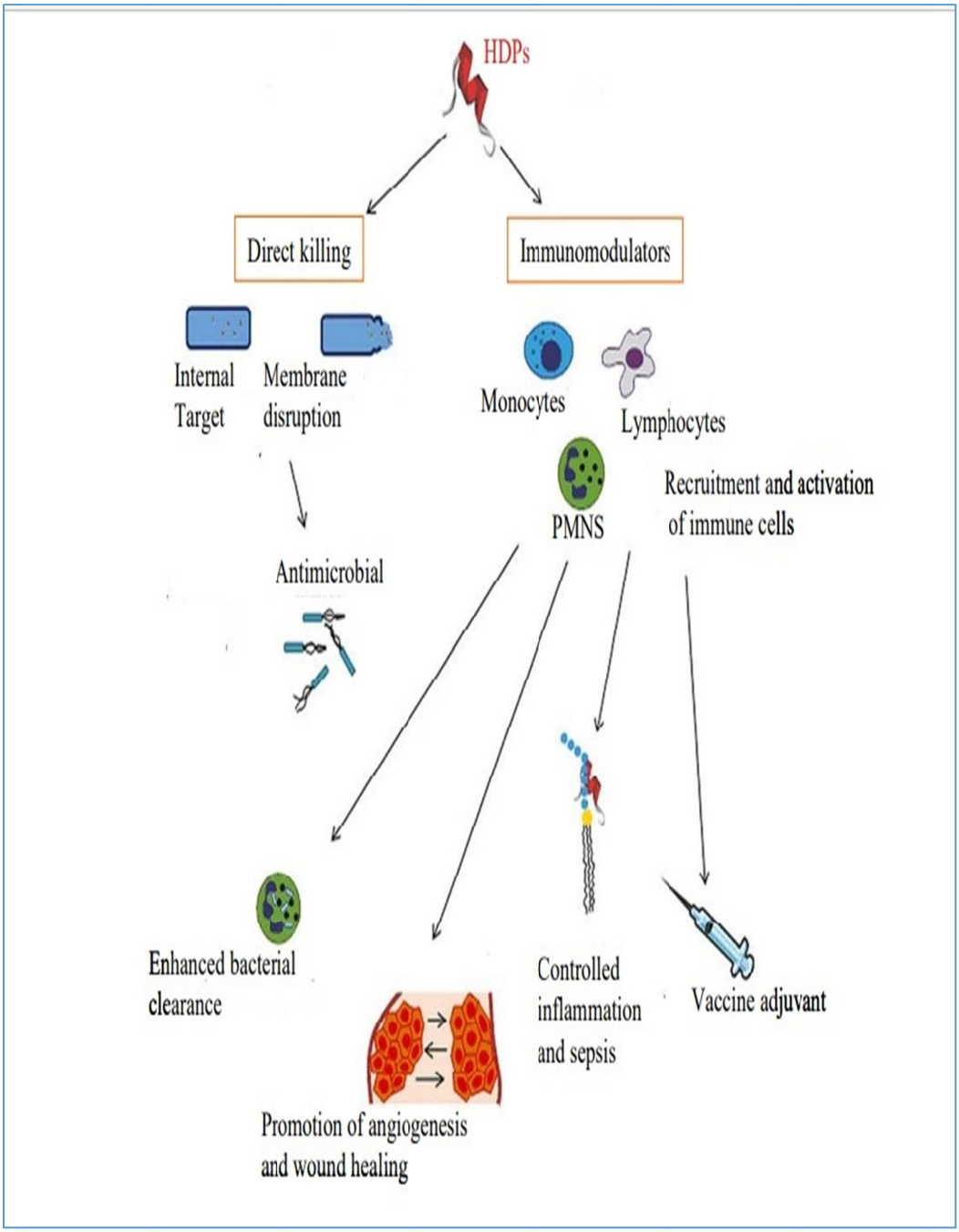
1-2-2 الببتيدات الدفاعية للمضيف Host defense peptides (HDPs)

تشكل الببتيدات الدفاعية للمضيف (HDPs) جزءاً مهماً من الاستجابة المناعية والفطرية وهي تمثل مجموعة كبيرة من مضادات الميكروبات الطبيعية ذات الطيف الواسع وخط الدفاع الأول في جهاز المناعة ، وقد يمثل انتاج الببتيدات الدفاعية للمضيف مستقبلا واعدًا قويا وبديلًا للمضادات الحيوية في محاربة الامراض إذ يوجد ما يقارب 1000 نوع من هذه الببتيدات الدفاعية (Yacoub *et al*, 2015)، وهي عبارة عن مجموعة متنوعة من البروتينات المضادة للميكروبات تتكون من الاحماض الامينية المرتبطة مع بعضها والتي لا يتجاوز عددها 100 حامض اميني (Zasloff ,2002).

تتميز هذه الببتيدات بشحنة موجبة مع احتوائها على نسبة عالية من الأحماض الأمينية الكارهة للماء والتي يمكن أن تظهر نشاطا قويا وقاتلا للجراثيم إذ تعمل على تحطيم متعدد السكريات الدهني في الجراثيم السالبة لصبغة الجرام (lipopolysaccharide) وحمض الليبوتايكويك (lipoteichoic acid) في الجراثيم الموجبة لصبغة الجرام مما يؤدي الى تدمير تلك الخلايا وبالتالي عدم قدرة الخلايا البكتيرية على مقاومة فعل HDPs فضلا عن دورها القاتل للفطريات مثل فطر الاسبرجلس والكانديدا (Yacoub *et al*, 2015)، كما تؤثر كذلك في نضوح الخلية الجرثومية مسببة الموت الاجباري لهذه الخلية ، وتعمل هذه الببتيدات كمثبط للالتهابات وحماية المضيف من كثرة انتاج الوسائط الالتهابية (Proinflammatory mediators) فضلاعن دورها في معادلة السموم الداخلية للبكتريا endotoxins (Kohlgraf *et al*., 2010)

تعرف هذه الببتيدات الدفاعية ايضا باسم آخر وهو الببتيدات المضادة للميكروبات (Antimicrobial Peptides) (AMPs) وتوجد في جميع الكائنات الحية تقريبا وهي جزء من المناعة الفطرية (Brogden *et al*., 2003; Ganz, 2003) وهذه الببتيدات عبارة عن بروتينات يشفر لها من قبل جينات خاصة ولديها انواع معروفة واشهرها Avian beta defensins و Cathlicidins (CATHs ، AvBDs) ومن خصائصها هي فعاليتها كمضادات جرثومية واسعة الطيف ضد العديد من البكتريا والفيروسات والفطريات والطفيليات وذلك بتأثيرها القوي عن طريق الارتباط المباشر بهذه الميكروبات وتحطيم اغشيتها ، اما الذي يميز هذه الببتيدات عن المضادات الحيوية فهو عدم تطور او نشوء مقاومة لها من قبل المسببات المرضية الميكروبية (Ganz, 2003).

تقسم الببتيدات الدفاعية للمضيف (HDPs) الى عائلتين رئيستين وهما Cathelicidins و Defensins ، ويتم تصنيعها بشكل رئيسي في الخلايا البلعمية والخلايا الظهارية في الجلد والجهاز الهضمي والجهاز التنفسي والجهاز البولي والجهاز التناسلي مما يبرهن أن هذه الببتيدات هي بمثابة خط الدفاع الاول ضد الميكروبات (De la Fuente-Nunez *et al*., 2017) ، وتمتلك الدواجن أربعة انواع من (CATHs) وأربعة عشر نوعا من (AvBDs) ، كما تشير العديد من البحوث الى أن AvBDs لديها أنشطة ضد البكتريا السالبة والموجبة لصبغة الكرام وكذلك الفطريات والفيروسات (Jiang *et al*., 2013) ، وتوجد هذه الببتيدات في جميع أنواع الحيوانات وتم التعرف عليها على أنها من المكونات البيولوجية المهمة في المناعة الفطرية، وتمتلك الببتيدات الدفاعية للمضيف HDPs نشاطاً واسع الطيف ضد العديد من الميكروبات من خلال التاثير الموجه لها ضد الاغشية الميكروبية ، ونتيجة لهذه الخاصية والمتمثلة بالتفاعلات الفيزيائية بينها وبين الخلية المستهدفة فمن الصعب للغاية على المسببات المرضية انتاج مقاومة لـها (Haney *et al*., 2019)، وتتمتع الببتيدات الدفاعية للمضيف بقدرة فعالة على تقوية الاستجابة المناعية الفطرية عن طريق تحفيز الانجذاب الكيميائي وتنشيط أنواع مختلفة من الكريات البيض ، فضلا عن اكتشاف فعاليتها كفئة جديدة من العوامل العلاجية ضد الميكروبات المقاومة للمضادات الحيوية والأمراض الالتهابية الأخرى ، وفي دراسات عديدة لانتاج هذه الببتيدات صناعيا وبسبب الكلفة المرتبطة باستعمالها، ولاجل كل ما تقدم فان استراتيجيات عديدة تم اتباعها لتحفيز إنتاج هذه الببتيدات وذلك لتعزيز مناعة المضيف ومقاوته للمرض دون اللجوء الى استعمال المضادات الحيوية التقليدية Hancock (and Sahl , 2006)



الشكل 3: تاثير الببتيدات الدفاعية للمضيف كمضاد للميكروبات والالتهابات وتفعيل شفاء الجروح و تحفيز الجهاز المناعي (Lynn *et al*., 2007)

1-1-2-2 مجموعة بيتا ديفينسين الدواجن Avian β-defensins

هي عبارة عن فئة من الببتيدات الدفاعية المضادة للميكروبات في الفقريات والتي تعمل كخط دفاعي اول في المناعة الفطرية (innate immunity) ، وتصنف هذه الديفينسينات الى ثلاثة انواع رئيسة وهي الفا وبيتا وثيتا ديفينسين ، ان البيتا ديفينسين هو اشهر هذه الانواع في

الدواجن وهناك أربعة عشر نوعاً منها في الطيور وهي بيتا-ديفنسين (1-14) (AvBDs1-14) وقد تم تسجيلها في الدواجن، ونتيجة لكثرة استعمال المضادات الحيوية في الدواجن وازدياد مخاطر نقل المقاومة للمضادات الحيوية الى الانسان والتي بدورها تهدد الصحة العامة ، لذلك كانت هناك حاجة ملحة لاستعمال الببيتدات الدفاعية (HDPs) كبديل للمضادات الحيوية (Zasloff, 2002).

الديفينسينات هي عائلة من الببتيدات الموجبة الصغيرة والتي لها أنشطة واسعة الطيف ضد مجموعة واسعة من المسببات المرضية البكتيرية أو الفطرية أو الفيروسية ، ويتم إنتاج هذه الببتيدات في مجموعة كبيرة ومتنوعة من الكائنات الحية والتي تمثل جزءاً مهماً من دفاعات المضيف ضد الميكروبات. فضلا عن وظيفتها الرئيسة كمضاد للميكروبات ، وجد أيضًا أن هذه الببتيدات تظهر أنشطة مناعية متنوعة ، مما يجعلها مكونات مهمة لكل من الجهاز المناعي الفطري والتكيفي مع دورها الرئيس في دفاعات المضيف ضد مسببات الأمراض سريعة التطور ، وقد تعزز الديفينسينات عملية ترميم الجروح عن طريق تحفيز الخلايا الليفية (Cuperus *et al*., 2013 ; Murphy *et al*., 1993) وكذلك تحفيز الخلايا الظهارية لاتمام عملية تمايزها وانشطارها (Aarbiou *et al*., 2004) ، كما أن هناك بعض الببتيدات التي لها فعالية سريعة لاستقطاب الخلايا التهابية وتنشيطها الكيميائي للانخراط في الدفاع الفطري للمضيف والاستجابة المناعية التكيفية (Yang *et al*., 2000) ، إن طريقة عمل هذه الببتيدات تعتمد على تغيير ثبوتية الايونات الموجودة في غشاء الخلية وتؤثر بالتالي في مكونات الغشاء الخارجي لها وبعد ذلك تعمل على تجمع الببتيدات بشكل موازٍ للغشاء الخلوي وبالتالي تكوين ثقوب في جدار الخلية وفقدان لمحتوياتها ، كما يدخل الى داخل الخلية ايضا ويؤثر في الحامض النووي DNA او RNA او على تصنيع او ظيفة البروتينات الخلوية (Van Dijk *et al*, 2008).

2-1-2-2 مجموعة الكاثليسيدينات (Cathlicidins)(CATHs)

تمتلك الكاثليسيدينات كذلك وظيفة مضادة للميكروبات والبلعمة الخلوية (phagocytosis) ولها ايضا وظيفة تحفيز الجهاز المناعي وتوجد الكاثليسيدينات في العديد من الكائنات الحية بما في ذلك الثديات والزواحف والبرمائيات والاسماك والطيور، ويوجد في الدجاج أربعة انواع منها تختلف في الطول والتركيب وهي (CATH-1,2,3,B1) ، وينتج الكاثليسيدين B1 من قبل الخلايا الظهارية لجراب فابريشيا ، يمكن تجميع الكاثليسيدنات

الناضجة الى نوعين هما فئة α وهي ببتيدات حلزونية او خيطية وفئة β وهي ببتيدات حلقية (Zanetti, 2005).

إن من أهم صفات الكاثليسيدينات هوعملها في تعزيز قدرة الخلايا المناعية على دفاع والتمايز والاستقطاب وتجنيد الكريات البيض وتحريض انتاج ال IFN من النوع الاول ، فضلا عن دورها المضاد للعدوى واسهامها في التئام الجروح وتكوين الاوعية وتحسين فعالية اللقاح (Alford *et al*., 2020) ، تم تحديد أربعة جينات للكاثليسيدين في الطيور وهي CATH 1-3 و CATH-B1 ، وتشترك هذه الجينات في بنية متشابهة مع كاثليسيدينات الثدييات ، ويتكون كل منها من أربعة إكسونات ، لكن إحدى الصفات غير العادية التي تم العثور عليها في جين كاثليسيدين الدجاج CATH-B1 (Achanta *et al*., 2012) هي وجود تسعة تكرارات للاوكتامير N- (PGLDGSXS)، والتي لا تُرى في جينات الكاثليسيدين الأخرى ، تُظهر جميع كاثليسيدينات الدجاج الأربعة مستويات عالية من التعبير لها في أجهزة المناعة والجهاز الهضمي والجهاز التنفسي والجهاز البولي التناسلي مع التعبير عن CATH-1-3 بشكل كبير في نخاع العظام والرئة ، و CATH-B1 في جراب فابريشيا ، وتؤدي كاثليسيدينات الطيور أيضًا مجموعة من الأدوار في تنظيم المناعة ، مثل منع الجراثيم من التعبير الخلوي عن متعدد السكريد الدهني لها LPS أو تحفيز إنتاج كيموكين معين (Xiao *et al*., 2004) ، وفي الاونة الاخيرة أصبح واضحا أن كاثليسيدينات الطيور لديها العديد من الوظائف في تنظيم المناعة وتتضمن بشكل رئيس:

1- تعزيز نظام المناعة المضادة للالتهابات من خلال التحفيز على انتاج كل من CATH-2و CATH-3 من خلال تاثيرهما في Toll like receptors والتي توثر مباشرة في LPS الجرثومي من خلال تثبيط فعاليته (Van Dijk *et al*., 2008; Coorens *et al*., 2017)

2- تاثيرها في تثبيط إنتاج السيتوكينات المنشطة للالتهابات بواسطة الذيفان الداخلي للميكروبات (Van Harten *et al*., 2018)

3- تعديل التعبير للكيموكاينيس (Chemokines) إذ يمكن ان ترتبط الكاثليسيدينات مباشرة بمستقبلات الكيموكاينيس على الخلايا المناعية وتحثه على الهجرة من خلال الجذب الكيميائي للخلايا العدلة ، وتفرز الخلايا المناعية الكاثليسيدينات والتي يمكن أن تودي إلى احداث تركيز عالٍ منها يكفي لقتل الجراثيم ، فضلا عن الى وظيفتها الكيميائية والتي توثر

بشكل غير مباشر في تحفيز تدفق مجموعة متنوعة من مكونات المناعة الفطرية والتكيفية التي تتجمع في المواقع الالتهابية عن طريق زيادة التعبير الجيني لها (Bommineni *et al.*, 2014).

على الرغم من وصف وتحديد وظائف متعددة للكاثيليسيدينات بما في ذلك النشاط المباشر لها كمضادات للميكروبات والعديد من التأثيرات المناعية الايجابية في المضيف ، إلا أنه لا يُعرف سوى القليل نسبيًا عن نشاطها المضاد للفيروسات ، إذ تم فحص النشاط المضاد للفيروسات لمركب الكاثيليسيدين الدجاج مختبريا والآلية الكامنة في هذه الدراسة ضد سلالات مختلفة من فيروس الأنفلونزا نوع A . واظهرت النتائج بان ال CATH-B1 له نشاط واسع ضد فيروس الانفلونزا مقارنةً بالكاثيليسيدينات الاخرى مع قدرته على تثبيط العدوى الفيروسية بنسبة تصل إلى 80٪ ضد سلالات تم اختبارها وهي H1N1 و H3N1 و H5N1. ،إذأثر CATH-B1 في تعبير السيتوكينات الالتهابية التي يسببها الفيروس وهي IFN-β و IL-1β و IL-6 وIL-8 . وأشارت التجارب التي تمت باستعمال المجهر الإلكتروني أيضًا إلى أن ال CATH-B1 يرتبط بالجزيئات الفيروسية ، لكن لم يُلاحظ أي تغيير في شكل الفيروس نفسه عند حضنه مع ال CATH-B1 ، ولكن لوحظت مجاميع كبيرة من الCATH-B1 والجزيئات الفيروسية معا ، مما يشير إلى أن التجمع قد يمثل آلية العمل الخاصة به والتي تقلل من عدوى فيروس الانفلونزا. كما أشارت فحوصات نشاط خميرة Neuraminidase (NA) لفيروس الانفلونزا إلى أن ال CATH-B1 لم يؤثر في نشاط هذه الخميرة في حد ذاته ، ولكنه أثر سلبًا على قدرة جزيئات الفيروس في التفاعل مع مستقبلات الخلية وبالتالي منع دخول الفيروس الى الخلية الهدف (Peng *et al.*, 2020).

2-2-2 السايتوكينات Cytokines

تعد السيتوكينات مهمة جدًا كوسيط في الدفاع ضد العدوى المبكرة ، ويكمن دورها في توصيل استجابة بعض السيتوكينات مباشرة لتنشيط آليات الدفاع الفطرية في الخلايا المصابة ، ومن السيتوكينات المنظمة للمناعة هي إلانترلوكين 1L-13 , IL-10 , IL-5 إذ تحفز نظام الدفاع عن طريق تنشيط الخلايا المناعية بما في ذلك الخلايا القاتلة الطبيعية (NK) وبشكل خاص في حالات العدوى الفيروسية ، يعد الانترفيرون من السيتوكينات الحيوية في الدفاع ضد الفيروسات، ويتم انتاج الانترفيرونات في المراحل المبكرة من الإصابات الفيروسية ويتم تنظيم

مستوياتها من قبل المضيف أو العامل الممرض أو العوامل البيئية المحددة وذلك لمنع تلف الانسجة او الاغشية للمضيف .

لقد تم اكتشاف IFN في الدجاج لأول مرة عن طريق التغيرات التي احدثها فيروس الأنفلونزا المعطل بالحرارة في الأغشية المشيمية لجنين الدجاج ، وتمت تسميته انذاك بالانترفيرون لقدرته على التدخل بشكل مباشر في دورة حياة فيروس الأنفلونزا (Santhakumar *et al*., 2017a)، وتؤدي السيتوكينات من عائلة الانترفيرون من النوع I بشكل عام كجزيئات مضادة للفيروسات من خلال الارتباط بمركب مستقبلات مشترك يتكون من مستقبل IFN-α 1 (IFNAR1) و IFNAR2 الموجدين على غشاء معظم الخلايا ، وتم في دراسة خاصة استعمال الدجاج كنموذج لتحديد نظام IFN في الطيور ، وتم تحديد جينات مختلفة للنوع IFN بما في ذلك IFN-α و IFN-β وIFN-γ على الرغم من أن الدراسات حول دور أو آلية النوع الأول من ال IFNs في عدوى الفيروس في الدجاج كانت محدودة ، ولكن تم التحري عن أهمية دورها في العدوى الفيروسية في العديد من الدراسات (Ivashkiv and Donlin , 2014) ومن الوظائف الرئيسة الثلاث لل IFNs هي :

1- استحداث التأثير الخلوي المضاد للفيروسات في الخلايا المصابة .

2- تعديل الاستجابات المناعية الفطرية عن طريق تثبيط إنتاج السايتوكين والمسار المؤيد للالتهابات

3- تعزيز تطوير استجابات الخلايا التائية والخلايا البائية T and B Lymehocyte الخاصة بالمستضد وكذلك الذاكرة المناعية عن طريق تنشيط جهاز المناعة التكيفي.

إن استجابات الإنترفيرون (IFN) ، يتوسطها عدد لا يحصى من الجينات المحفزة وهي من الاستجابات المناعية الفطرية الأكثر عمقًا ضد الفيروسات وبشكل تراكمي ، وتُنشئ مؤثرات IFN هذه حالة مضادة للفيروسات متعددة الطبقات لحماية المضيف من مسببات الأمراض الفيروسية الغازية . إن فهم هذه الخصائص الفريدة لنظام IFN في الدجاج يمثل أهدافًا قيمة لتطوير علاجات محتملة لمجموعة أوسع من الفيروسات ذات الأهمية البيطرية والحيوانية .(Santhakumar *et al*., 2017b)

3-2 الاستجابة المناعية الخلطية Humoral immune response

إن الاصابة بفيروسات أنفلونزا الطيور وكذلك التحصين باللقاحات المضادة لهذه الفيروسات ينتج عنه أجسام مضادة خلطية على مستويات جهازية وتتضمن هذه الاستجابة انتاج IgM لمدة 5 ايام بعد الاصابة (DPI) ، تليها استجابة IgY بعد مدة وجيزة ، كما تختلف شدة الاستجابة للاجسام المضادة حسب نوع الطيور ، إذ يبدو أن دجاج الليكهورن أعلى استجابة يليهه الدراج والديك الرومي والسمان والبط ، ويمكن أن تشمل العدوى الطبيعية الجهازية أيضا انتاج الأجسام المضادة المخاطية (Suarez and Schultz, 2000) ، ونظرا للارتفاع الكبير في نسبة الاصابة والهلاكات العالية بفيروس الانفلونزا نوع H9N2 في العراق سنة 2008 فقد قام الباحث (Danial , 2009) بدراسة لمستويات الاستجابة المناعية الخلطية ضد فيروس الانفلونزا H9N2 من خلال التلقيح باللقاح المبطل لل H9N2 وقياس المناعة الخلطية الناتجة عن التلقيح باستعمال الاليزا للتعرف على معيار الاضداد الناتجة من عملية التلقيح باللقاحات المتوافرة في القطر ولنفس العترة انذاك ، إذ تم ملاحظة بان معيار الاضداد الناتجة عن عملية التلقيح كان عاليا مقارنة مع مجموعة السيطرة واستمر مرتفعا حتى نهاية تجربته ، وتم كذلك تأكيد بوجود اضداد لفيروس الانفلونزا عترة H9N2 في قطعان الدواجن في محافظة نينوى عن طريق دراسة اخرى اجراها الباحث (Al-Attar , 2007)

4-2 الاستجابة المناعية الخلوية Cellular immune response

بغض النظر عن عملها المضاد للميكروبات ، فإن الببتيدات الدفاعية للمضيف تتميز بقدرتها على التكيف والدفاع ، وتتمتع العديد من الببتيدات الدفاعية للمضيف بقدرات قوية على جذب أنواع مختلفة من الخلايا المناعية وتعزيز خاصية التمايز ونضج الخلايا العارضة للمستضد مثل الخلايا المتشجرة ، كما ترتبط الببتيدات الدفاعية للمضيف أيضًا بالبكتيريا وبالتالي تقييد قدرتها على تحفيز إنتاج السيتوكينات المؤيدة للالتهابات ، فضلا عن ذلك تحد الببتيدات الدفاعية للمضيف من الالتهاب عن طريق تحفيز تخليق السايتوكينات المضادة للالتهابات مثل IL-10 وتعزيز موت الخلايا المبرمج (Sunkara , 2011) ، وتؤدي الاستجابة المناعية الخلوية دوراً حاسما في السيطرة على العدوى الفيروسية ، إذ يتم إنتاج كل من الاجسام المضادة والخلايا اللمفاوية التائية النشطة والمتمثلة ب كل من CD4 و CD8 في هذه الاصابات الفيروسية (Campen *et al*., 1989)

2-5 نبذة عن مرض انفلونزا الطيور

2-5-1 تعريف المرض Disease definition

تعد فيروسات انفلونزا الطيور من نوع H9N2 من أكثر الفيروسات انتشاراً في الدجاج المحلي ، إذ تم التسجيل عن العديد من الاندلاعات والثورات المرضية في آسيا وامريكا الشمالية منذ عام 1990 ، وتصنف فيروسات نوع H9N2 على انها فيروسات منخفضة الامراضية Low pathogenic avian influenza (LPAI) وذلك بالاعتماد على التوصيف الجزيئي والتنميط المرضي ، إذ انها تصيب مجموعة متنوعة من الطيور والدجاج والديك الرومي والبط والوز والسمان (Tang *et al*., 2000; Peiris *et al*., 2001; Alexander, 2000) فضلا عن قدرة هذا النوع الفرعي H9N2 على الانتشار واصابته لمجموعة كبيرة من الطيور الداجنة ، إذ تتسبب هذه الانواع بظهور اعراض قليلة او قد تكون معدومة في الدواجن ولا يتم تشخيصها بسهولة ، لكن الاصابة بفيروسات الانفلونزا عالية الامراضية تتسبب بظهور الاشكال الخطيرة Highly pathogenic avian influenza (HPAI) من المرض مع وجود أعراض وخيمة وموت مفاجئ للدواجن قد يصل الى 100% (Swayne, 2007) ،

2-5-2 تاريخ المرض Disease history

في شمال إيطاليا وفي عام 1878 كان هناك اول وصف لأنفلونزا الطيور، إذ كان هذا الوصف مرتبطا بمعدل نفوق مرتفع واطلق عليه انذاك تسمية "طاعون الطيور" ، إذ تم في البداية الخلط بينه وبين الشكل الحاد لتسمم الدم او كوليرا الطيور ، ومع ذلك في عام 1880 تم وصفه في كلية ولاية أيوا قسم "امراض الدواجن" على أنه يختلف عن كوليرا الطيور اعتمادا على الخصائص السريرية والمرضية التي تميز بها هذا المرض، وأطلق عليه اسم التيفوس النضحي (exudative typhus) ، وفي عام 1901 وجد أن طاعون الطيورهذا سببه فيروس ، ومع ذلك لم يوصف المسبب المرضي حتى عام 1955 إذوجد أن فايروس طاعون الطيور الكلاسيكي هو احد أنواع فيروسات الأنفلونزا من النوع A استنادا الى وجود البروتين النووي الخاص بفيروس الأنفلونزاA ، وبعدها استبدل مصطلح طاعون الطيور بمصطلحاً اكثرملاءمة وهو أنفلونزا الطيور شديد الإمراضية في وقائع الندوة الاولى حول إنفلونزا الطيور عام 2003 (Lupiani and Reddy, 2009)

3-5-2 الاهمية الاقتصادية للمرض The economic importance of the disease

تتفاوت الخسائر الاقتصادية اعتماداً على عدة اسباب منها سلالة الفايروس وأنواع الطيور المصابة وطرائق المكافحة المستعملة وسرعة تنفيذ استراتيجيات المكافحة أو احتواء المرض ، وهناك العديد من الخسائر الاقتصادية المرتبطة بتفشي مرض أنفلونزا الطيور وخاصة من النوع عالي الامراضية في معظم البلدان ذات الدخل العالي ويتم السيطرة على المرض من خلال القضاء التام والامن الحيوي في حالة الاصابة ، ومن الناحية العملية يمكن السيطرة على المرض من خلال سياسة الاستبعاد او التطعيم (Capua and Marangon 2006) ، أما في البلدان ذات الدخل المنخفض والمتوسط ومنها العراق فيعد المرض مستوطناً خاصة فيروس H9N2 إذ ينتشر في الشرق الاوسط واسيا وشمال وجنوب أفريقيا ، ويعد سوق الدجاج الحي من اكثر اسباب انتشار المرض ، ومن الجدير بالذكر أنه يمكن لهذا المرض المعدي جدًا أن يؤدي في بعض أشكاله إلى نفوق أعداد كبيرة من أنواع الطيور الداجنة والبرية بما فيها الدجاج والبط والديك الرومي والإوز والسمان ، كما يمكن أن ينتقل إلى البشر عن طريق الاتصال المباشر أو غير المباشر بالطيور المصابة وأن يتسبب في باعراض خطيرة أو حالات موت احيانا (World Health Organization, 2009).

4-5-2 الأندلاعات المرضية وبعض الدراسات في العراق

Disease outbreaks and some studies in Iraq

تم تسجيل مرض أنفلونزا الطيورمن نوع H9N2 في العراق كجزء من منطقة أوراسيا منذ عام 2001-2005 ومنذ ذلك الحين أصبح المرض مستوطنا في العراق مما تسبب في خسائر اقتصادية كبيرة في صناعة الدواجن (Kraidi *et al*., 2017)، ولم يعرف سوى القليل عن المعلومات الجينية لفيروسات H9N2 المنتشرة حاليا في العراق ، حتى تم الكشف عن التسلسلات الجينية لستة من أنواع AIVs منها النوع H9N2 وتحليلها في المدة مابين 2014-2015 وذلك نتيجة لاندلاعات مرضية مختلفة من قطعان الدجاج اللاحم في خمس محافظات تقع في الاجزاء الوسطى والجنوبية من العراق ، وقد أشارت المقارنات الجينية للتسلسل الجزيئي لجين HA إلى أن جميع فيروسات هذا النوع في العراق مرتبطة ببعضها البعض ويمكن تقسيمها الى مجموعتين فرعيتين ، وقد أظهرت فيروسات هاتين المجموعتين الفرعيتين هوية مشابهة وبدرجة عالية للفيروسات الباكستانية والإيرانية واللبنانية في تسلسلاتها النيوكليوتيدية إذ تمتلك جميع الفيروسات هيستيدين ، ألانين ، وليوسين في المواضع 183 ،

190 ، و 226 ، على التوالي ، وهي البقايا الرئيسة في مواقع الارتباط بالمستقبلات وهذا يشير إلى إمكانية اشتقاق الروابط الوبائية من أصل مشترك لهذه الفيروسات (Kraidi *et al.*, 2017) ، وفي دراسة اخرى في مدينة الموصل تم فيها استعمال مجموعة اختبار المستضد السريع لفايروس انفلونزا الطيور نوع H5 وH9N2 للكشف عن هذين المستضدين وقد تم في اثناء هذه الدراسة فحص 1143 عينة ماخوذة من كل من الدجاج المنزلي ودجاج التسمين والدجاج البياض واسواق الدواجن خلال سنة 2007 في مدينة الموصل وكانت النتائج سالبة لمستضدات H5 حتى ديسمبر 2007 ، في حين اوضحت الدراسة بان 78% من الدجاج المفحوص اعطى نتيجة موجبة لمستضد H9N2 ونسبة 81.8% نتيجة موجبة في الحمام (Al-Attar and Al-Nimma , 2008) .

ومن الدراسات الاخرى على فايروس انفلونزا الطيور من النوع A في الطيور البرية والحمام والزرازير والتي جرت في مدينة الموصل/العراق والتي قام من خلالها الباحثون (Al-Attar *et al.*,2008) باجراء دراسة عن دور الطيور البرية كناقل طبيعي لهذا الفايروس وذلك بعد جمع الدم ومن ثم المصل واجراء اختبار تثبيط التلازن واختبار الاليزا ، حيث اظهرت الطيور البرية مستوى عالي من الاجسام المضادة لهذا الفيروس من دون ظهور علامات مرضية عليها ،وهذا اوضح بان الطيور البرية تلعب دور اساسي في انتشار الفيروس بين البلدان.

5-5-2 خصائص الفيروس وتصنيفه Virus characteristics and classification

هناك عدة أنواع من فايروس أنفلونزا الطيور وهي A,B,C,D وهي تابعة لعائلة Orthomyxoviridae ، إذ يحتوي هذا الفيروس على بروتينات سطحية وهما بروتين الهيماجلوتينين (HA) وبروتين النيورامنيديز(NA) (Causey and Edwards, 2008) ، ويتكون جينوم فيروس انفلونزا الطيور من ثمانية اجزاء من الحمض النووي الريبي أحادي الخيط ذي الحس السلبي والذي يشفر الى ما لا يقل عن عشرة بروتينات بما في ذلك أثنان من البروتينات السكرية السطحية (الهيماكلوتنين (HA) والنيورامينديز(NA))، والبروتين النووي (NP)،وثلاثة بوليمرز PB1 و PB2 والبوليمرز الحمضي PA، وبروتينان مصفوفان (M1,M2) واثنان من البروتينات غير الهيكلية (NS1,NS2).(Lee *et al.*, 2000) ، إذ يتم عن طريق بروتينات HA و NA الموجودة في غلاف الفايروس تقسيمه الى انواع فرعية ، وحتى الآن تم تحديد 18 بروتيناً مختلفا من HA و11 بروتينا مختلفاً من NA في فيروسات

الأنفلونزا (Kirui *et al*., 2014) ويعتقد أن فايروسات الانفلونزا شديدة الضراوة تتزايد بسبب وجود الأحماض الأمينية الأساسية عند موقع الانقسام في ال HA الذي يجب ان ينكسر قبل اصابته للخلية ، إذ يستطيع موقع الانقسام الانشطار بتأثير مجموعة كبيرة من انزيمات البروتياز proteases (Suguitan *et al*., 2012) ويتميز فايروس الانفلونزا بقابليته على احداث التغيرات المستضدية بشكل متكرر مما يؤدي الى حدوث إصابات تحت السريرية واخرى سريرية متباينة في شدتها ، فضلا عن قابليته على احداث الطفرات الوراثية وظهور انماط جديدة شديدة الضراوة بسبب إعادة ترتيب قطع الجينوم المجزأ وإمكانية حدوث ظاهرتي Antigenic drifts و Antigenic shifts مما يؤدي الى تغير الشفرة الوراثية المحمولة على البروتينات السكرية المكونة للمحددات المستضدية الملزنة لكريات الدم الحمر الهيماكلوتينين (HA) وكذلك البروتينات الغلافية من نوع النيوامنيديز (NA) ، ونتيجة لهذا التنوع لمستضدات HA و NA فقد ظهرت انماط خطرة ومنها النمط H5N1 الذي عزل اول مرة عام 1961 من الدواجن فقط ، وكذلك في عام 1997 عندما حصل وباء في مدينة هونك كونك والذي أصاب الدواجن ونتج عنه هلاكات كبيرة وكذلك أدى الى وفاة 20 شخص في حينها تبيـــن سببها هو النمط H5N1 الذي كـان مقتصـرا على أصابة الدواجن وتحول ليصـيب الانســان (Guan *et al*., 2002).

غالبا ما يتم العثور على فيروسات H9N2 في الدواجن مع الأنواع الفرعية الأخرى لفيروس الانفلونزا مثل H7 وH5 وهناك أدلة تشير إلى أن العدوى السابقة أو المتزامنة مع فيروس H9N2 يمكن أن تؤدي الى معدل وفيات مرتفع بسبب هذه الفيروسات التي تسمح بالانتشار "الصامت" لفيروس HPAIV ، وإحباط المراقبة الدورية للقطعان وجهود المتابعة الوبائية (Naguib *et al*., 2017) ، ومن الناحية التطورية يمكن تقسيم جين HA لفيروسات H9N2 على نطاق واسع إلى فرعين رئيسين ، فرع أوروبي آسيوي وفرع أمريكي ، وتوجد فيروسات H9N2 الأمريكية في الغالب في الطيور البرية ولكن تم وصفها بأنها تصيب الديوك الرومية المرباة دون أن تنتشر بشكل ثابت في الدواجن ، على العكس من ذلك نشأت من فيروسات H9N2 الأوروبية الآسيوية ما لا يقل عن ثلاث سلالات مستقرة من الدواجن ، سميت على اسم فيروساتها النموذجية , A/quail/HongKong/G1/1997 A/chicken/Beijing/1/1994

.(Nagy *et al*., 2017) A/chicken/Hong Kong/Y439/1997

6-5-2 التثبيط المناعي لفيروس immunosuppression of H9N2 virus

يؤثر فايروس H9N2 في مجموعات الخلايا اللمفاوية خاصة نوع T والأعضاء المناعية ،إذ يلاحظ تاثيره في الغدة الصعترية وجراب فابريشيا والطحال ،وتم الكشف عن تغيرات في المجموعات الفرعية لخلايا T وموت الخلايا اللمفاوية المبرمج عن طريق تقنية التدفق الخلوي (flow cytometry) ، لقد لوحظ تناقص في موشرات الأعضاء المناعية ، وكما لوحظ بالفحص المجهري وجود تنكس في الغدة الصعترية وجراب فابريشيا مع احتقان بالطحال ، كما أظهرت نتائج قياس تقنية التدفق الخلوي انخفاظا كبيرا في عدد خلايا CD4+ و+CD8 مما تسبب في تثبيط مناعي شديد وتلف جهاز المناعة في دجاج التسمين (Qiang and Youxiang, 2011).

وبالرغم من كون فيروس أنفلونزا الطيور النمط H9N2 من الفايروسات ضعيفة الضراوة إلا أنها تؤدي دورا كبيرا في تثبيط المناعة لدى الطيور الداجنة لكون هذا الفايروس يصيب الخلايا المبطنة للقناة التنفسية المغطاة بمادة المخاط (mucin) والتي تؤدي دورا مهما كحاجز دفاعي في القناة التنفسية العليا كما ويحتوي فايروس الانفلونزا على انزيم النيورامنديز والذي بدوره يشطر ال neuramic acid ويحطم حاجز المخاط وبالتالي تنكشف مستقبلات حامض السياليك الموجود تحته مما يساعد على عملية التصاق الفيروس بهذه المستقبلات فضلا عن جعله عرضة للاصابات الثانوية الاخرى (Nguyen *et al*., 2019) ، وقد اشارت بعض الدراسات الى التأثير المثبط للمناعة المرتبط بفيروس LPAI-H9N2 إذ يعمل إما عن طريق تغيير تمايز الخلايا المفاوية أو السيتوكينات الالتهابية او احداث الموت المبرمج لبعض الخلايا المناعية (Talat *et al*., 2020).

7-5-2 انتقال العدوى Transmission of infection

تطرح الطيور المصابة هذا الفيروس في اللعاب وأفرازات الأنف والبراز ، وتعدُ الطيور البرية المضيف الطبيعي للفيروس وعادة ما تكون حاملة للفيروس دون ظهور أي اعراض للمرض، ويمكن ان ينتقل الفيروس كذلك من الطيور البرية الى الطيور الداجنة وذلك من خلال الاتصال المباشر او غير المباشر من خلال تلوث الماء بفضلات الطيور البرية المصابة. أما في الإندلاعات المرضية المتكررة فعادة ما ينتقل الفيروس عن طريق التنفس بواسطة قطيرات الرذاذ الملوثة به. إن انتقال العدوى بين الحقول هو نتيجة عدم تطبيق اجراءات الأمن الحيوي ، وبشكل أساسي عن طريق حركة الدواجن المصابة أو البراز الملوث

وتواجد إفرازات الجهاز التنفسي على المعدات أو الملابس (Killingley and Nguyen-Van-Tam , 2013)، كما تمت الاشارة الى ان تغذية الدواجن التي تعتمد على استعمال إضافات الدواجن غير المطبوخة على أنها طريقة مباشرة للتعرض للاصابة وأنها تاتي بنتائج عكسية من الناحية الاقتصادية (Harder *et al*., 2009)

يعد الانتقال عن طريق البراز –الفم هو الطريق الرئيس لانتقال العدوى بهذا الفيروس في العديد من أنواع الطيور،على الرغم من أن الانتقال عن طريق إفرازات الجهاز التنفسي قد يكون أكثر شيوعا في أنواع الطيور البرية (Spickler *et al*., 2008 ; Ellstrom *et al*., 2008)

2-5-8 مدة الحضانة والعلامات السريرية Incubation period and clinical signs

تتراوح مدة الحضانة من عدة ساعات إلى عدة أيام وذلك حسب العمر والجنس والأنواع المصابة وإمراضية الفيروس. ويمكن رؤية علامات تنفسية وسعال وعطاس واكتئاب والتهاب الجيوب الأنفية وهزال وعدم تناول الطعام واضطرابات عصبية وإسهال ، ويعتمد هذا على سلالة الفيروس وطريق الدخول والأنواع المضيفة وعمر المضيف والحالة المناعية للطائر. عادة ما يحدث النفوق السريع وقد يصل الى 100٪ ، مع السلالات شديدة الضراوة (Danial, 2009) ، اما في الدجاج البياض فيمكن أن يكون هناك اصابات قد تحدث بدون أعراض ، ويمكن اكتشاف تكاثر الفيروس في قناة البيض بعد خمسة إلى سبعة أيام من الاصابة ، وكذلك حدوث التغيرات النسيجية في أجزاء من قناة البيض بما في ذلك تنكس الرحم والطبقات الظهارية المهبلية (Wang *et al*., 2015)

2-5-9 الافات العيانية والمجهرية Gross and microscopic lesions

يتميز هذا المرض بوجود مواد مخاطية في القصبة الهوائية والتهاب الحويصلات الهوائية مع تورم الرأس أو الدلايات وتغير في لونها الى اللون الارجواني كما يلاحظ التهاب في غشاء التامور وافات تنخرية في الجهاز الهضمي مع وجود نزيف على الدلايات والأمشاط والساقين ، فضلا عن امكانية مشاهدة البؤر النخرية على الكبد والطحال والكلى والرئتين والنزيف عند تقاطع المعدة الغدية مع القانصة ، كذلك وجود علامات تنفسية حادة واصابة الجهاز التناسلي ، ومن الصعوبة التمييز بين انفلونزا الطيور الذي يصيب الجهاز التنفسي العلوي من الاصابة بالتهاب القصبات المعدي الفيروسي والنيوكاسل التنفسي ، ومن الضروري اجراء التشخيص

التفريقي باستعمال الفحص المختبري والذي يتم بواسطة العزل الفيروسي في الحقن بأجنة البيض أو باستعمال الزرع النسيجي (Bano *et al*., 2003) ، وتعتمد التغيرات المرضية في الطيور المصابة بالنوع LPAI على جنس المضيف وعترة الفايروس ووقت الموت وكذلك وجود اصابات بكترية ثانوية (Mutinelli *et al*., 2003; Pantin-Jackwood and Swayne, 2009) ويمكن العثور على الأفات العيانية في أعضاء مختلفة بما في ذلك التهاب الأنف والتهاب الجيوب الأنفية وأحتقان الغشاء المخاطي في القصبة الهوائية مع آفات التهاب الشعب الهوائية ووذمة ولاسيما عند وجود عدوى ثانوية أو ظروف بيئية غير ملائمة مثل ارتفاع درجة الحرارة (Spackman *et al*., 2015).

2-5-10 التشخيص Diagnosis

2-5-10-1الاختبارات المصلية (الايزا) Serological tests(ELISA)

تعد الاختبارات المصلية من أكثر الاختبارات استعمالا في تشخيص الاصابة بمرض أنفلونزا الطيور وذلك بتحديد وجود الاجسام المضادة المتخصصة للفايروس (AI-specific antibodies) والتي يمكن اكتشاف وجودها في اول خمسة ايام بعد الاصابة ، وهناك العديد من الطرائق المصلية و التشخيصية منها اختبار الانتشار المناعي في هلامة الاكار (Agar Gel Immunodiffusion or AGID) واختبار اليزا ELISA للكشف عن وجود هذه الاضداد ، وتوجد العديد من اختبارات الأليزا ومنها النوع التجاري غير المباشر والذي يعد الاكثر استعمالا في الدواجن ، إذ يعدُ فحص الاليزا أكثر حساسية وخصوصية من AGID واختبار تثبيط التلازن الدموي ولكن يستعمل الاختباران لتاكيد نتيجة الاليزا (Marche *et al*., 2010).

تعتمد تقنية ال ELISA على مفهوم تفاعلات المستضد والاجسام المضادة ، والتي تمثل التفاعل الكيميائي بين الأجسام المضادة التي تنتجها الخلايا البائية والمستضدات ، ومن خلال استغلال هذا التفاعل يمكن لتقنية ELISA القيام بالتحليل الكمي والنوعي العالي الحساسية والانتقائي للمستضدات بما في ذلك البروتينات والببتيدات والأحماض النووية والهرمونات وذلك في الكشف عن هذه الجزيئات (Crowther, 2009) ، ومن انواع اختبارات الاليزا والتي استعملت في دراستنا:

1- النوع غير المباشر Indirect Elisa

يعتمد هذا النوع على وجود مستضد خاص (specific antigen) ملتصق على سطح حفر الطبق والذي يرتبط مع نظيره (الجسم المضاد) في العينة التي تحتوي او قد لاتحتوي عليه ، كما ويستعمل في التفاعل للكشف عن هذا الارتباط بين المستضد والجسم المضاد مادة كاشفة وهي المضاد المعلم بانزيم خاص ، وللكشف عن اكتمال هذه التفاعلات تتم اضافة مادة الكروموجين (Chromogenic substrate) لتعطي لونا لمحلول التفاعل ثم تنتهي العملية بايقاف التفاعل باستعمال محلول خاص وبعدها قراءة شدة اللون المتكون ليعطي النتيجة النهائية للتفاعل (Zhang *et al*., 2017a).

2- النوع التنافسي Competitive Elisa

لقد قام Belanger وجماعته في عام 1973 بتطويرالشكل التنافسي من تقنية الاليزا وذلك لاكتشاف بروتين فيتو ألفا في الجرذان ، والتي كانت تتضمن تطويراً لتقنيتي ELISA غير المباشر والساندويج. ويتمثل الجزء الرئيس لتقنية ELISA التنافسية في التفاعل التنافسي بين الأهداف (مستضد أو جسم مضاد) في العينة والأهداف التي تحمل علامة الإنزيم (مستضد أو جسم مضاد) ضد الجسم المضاد أو المستضد المعطل المقابل، ولاكتشاف المستضد في تقنية ال ELISA التنافسية ، يتم استعمال مستضد يحمل علامة إنزيم للتنافس مع المستضدات المستهدفة ضد الجسم المضاد المعطل وبالتالي ، كلما زادت كمية المستضد في العينة ، قلت كمية المستضد المعلم بالإنزيم الذي يرتبط بالجسم المضاد ، أي مع زيادة كمية المستضد المستهدف ، تقل الإشارة او اللون وفي هذه الحالة تكون ELISA التنافسية مناسبة لقياس الجزيئات الكبيرة فقط لأن الإنزيم وضع العلامات المطلوبة لقياس المستضد بعد الارتباط ، إذا كان المستضد عبارة عن مركب منخفض الوزن الجزيئي على سبيل المثال hapten فلا يتم التعرف على اقترانات إنزيم هابتن الناتجة عن طريق الجسم المضاد الثابت ، مما يؤدي إلى فشل التحليل لاكتشاف الجسم المضاد (Belanger *et al*,1973)

3- نوع الساندويج اليزا sandwich Elisa

هذا النوع من الاليزا يتم فيه الكشف عن المستضد المستهدف عن طريق التثبيت بين جسمين مضادين يتعرفان على محددات مستضدية (epitopes) مختلفة. يتضمن هذا النوع تثبيت الجسم المضاد على طبق Microtiter ، ثم يُسمح للمستضد الموجود في العينة بالتفاعل مع

الجسم المضاد ، ثم يتم حصر المستضد المرتبط بالجسم المضاد الملتقط بجسم مضاد آخر مرتبط بالإنزيم لاظهار اللون وتزداد الإشارة مع زيادة كمية المستضد ، إذ يكون ال IgM ملتصقا على السطح للحفرة ويضاف له عينة الفحص التي تحتوي او قد لاتحتوي على (IgM Ab) ، وفي حال وجود الاخيرة سوف ترتبط بالمضاد الموجود بالحفرة وتضاف بعدها مادة (Ag-conjugated complex) الذي بدوره يرتبط ب IgM Ab ، وتستعمل مادة (chromogenic substrate) المرتبطة بالانزيم لتقوم بتغير لون المحلول في الحفر ، ثم ايقاف التفاعل وقراءة درجة اللون والتي تدل على كمية الاضداد الموجودة في العينة (Belanger *et al*, 1973).

2-10-5-2 الاختبارات الجزيئية Molecular tests

من اكثر الاختبارات الجزيئية المستعملة في تشخيص الاصابة بمرض انفلونزا الطيور هي تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase Chain Reaction ، إذ يتم فيها الكشف عن فايروس أنفلونزا الطيور من النوع الفرعي H9N2 والفيروسات الفرعية الاخرى ، وهي من الاختبارات الحساسة بنسبة تصل الى 100% في الدجاج المصاب تجريبيا بالانفلونزا. تعتمد هذه التقنية على تضخيم الحمض النووي Rt-PCR لفيروس الانفلونزا ، إذ يتم بشكل عام عمل دورات من درجات الحرارة يتم فيها النسخ العكسي عند درجة حرارة 50 لمدة 30 دقيقة ، وبعد ذلك خطوة تنشيطية اولية عند 95 درجة مئوية لمدة 15 دقيقة تليها 40 دورة عند 94 درجة مئوية لمدة 30 ثانية و 58 درجة مئوية لمدة 30 ثانية و 72 درجة مئوية لمدة دقيقة واحدة ثم اخيرا 72 درجة مئوية لمدة 10 دقائق ، واخيرا يتم ترحيل نتائج التضخيم اعتمادا على بروتوكول او تعليمات العدة التشخصية (Amer *et al*., 2018).

2-10-5-3 عزل وتنمية الفيروس Virus isolation and cultivation

تاريخيا كان لعزل فايروس أنفلونزا الطيور عن طريق تنميته على خلايا الزرع النسيجي من الامور المهمة والمعتمدة لتشخيص الاصابة بالفيروس، ويمكن عزل الفايروس عن طريق أخذ مسحة الانف أو الحنجرة او الانسجة من الطيور النافقة او المقتولة ، إذ يتم الكشف عن الفايروس في مجموعات متنوعة من خلايا الزرع النسيجي عن طريق مشاهدة وتسجيل التأثيرات المعلة للخلايا ، إذ ان اكثر من 90% من الزرع الايجابي يمكن الحصول عليه في غضون 3 ايام من الحضن (الحقن) ، كما يمكن أن تتم عملية تنمية الفايروس بحقنه في اجنة بيض الدجاج الخالي من الامراض (SPF) ، إذ يتم بعد ذلك استعمال الطرائق التشخيصية

المصلية والمناعية والجزيئية وذلك لتشخيص الفايروس المنمى كما في اختبار التلازن وتثبيط التلازن واختبار تفاعل البلمرة المتسلسل واختبار الاليزا وغيرها من الفحوصات التشخيصية الاخرى(Eisfeld *et al*., 2014).

4-10-5-2 التلازن وتثبيط التلازن الدموي Agglutination and hemagglutination inhibition

يعد اختبار تثبيط التلازن الدموي (HI)(Hemagglutination-Inhibition) احد الاختبارات التقليدية المستعملة في تصنيف الفيروسات الملزنة لكريات الدم الحمر. ويستعمل هذا الاختبار مع فيروس الانفلونزا وذلك لتحديد النوع الفرعي بعد عملية العزل الفيروسي لفيروس الانفلونزا غير المعروف أو لتحديد خصوصية النوع الفرعي وذلك حسب نوع ال HA والأجسام المضادة المقترنة به ، ولأن اختبار تثبيط التلازن الدموي هو اختبار كمي ، لذلك يتم تطبيقه بشكل متكرر لتقييم العلاقات المستضدية بين عزلات فيروس الانفلونزا المختلفة من النوع الفرعي المحدد نفسه .إن أساس اختبار تثبيط التلازن الدموي هو تثبيط التراص agglutination الدموي بواسطة الأجسام المضادة الخاصة بالنوع الفرعي ، وهذا الاختبار هو إجراء غير مكلف نسبيًا يستعمل فيه معدات المختبرات القياسية التقليدية، وهو أقل تطورا من تقنية الاختبارات الجزيئية ، ويمكن إكماله بسهولة في غضون مدة وجيزة . ومع ذلك ، عند العمل مع فيروسات غير معروفة او مشخصة أو أنواع فرعية جديدة ، فإن مصدر الامصال المرجعية المطلوبة لتحديد فيروسات الانفلونزا والتي تكون من سلالات متعددة حسب نوع هيماجلوتينين تتطلب دعمًا مختبريًا واسعًا لتوفير هذه الامصال التي تساعد في تحديد النوع الفرعي للفيروس (Pedersen, 2008).

11-5-2 التشخيص التفريقي Differential diagnosis

هناك العديد من العلامات والآفات الخاصة بالعديد من امراض الدواجن المتشابهة مع مرض أنفلونزا الطيور وبسبب هذا التشابه والتداخل بين العلامات يجب إجراء التشخيص النهائي واعتماد الفحوصات المصلية والجزيئية للتفريق بين هذه الامراض وهنا يتم التفريق بين مرض أنفلونزا الطيور عالي الأمراضية عن مرض النيوكاسل شديد الامراضية وكوليرا الدواجن والاجهاد الحراري وبعض السموم الفطرية ، أما الشكل الواطئ الامراضية من مرض انفلونزا الطيور فيتم تفريقه عن Avian metapneumo virus وفيروس التهاب الشعب الهوائية المعدي (Samy and Naguib, 2018)

12-5-2 التلقيح واللقاحات Vaccination and Vaccines

بسبب الخسائر الاقتصادية الناجمة عن الاصابة بفيروس انفلونزا النوع H9N2 ، فقد قامت العديد من البلدان بما في ذلك الصين وكوريا الجنوبية والمغرب وباكستان ومصر وإيران والإمارات بعمليات التحصين على المستوى الوطني كبرنامج رئيس للوقاية من مرض H9N2 في الدواجن . إن التقليح هو طريقة فعالة وكفوءة للوقاية من فيروس H9N2 LPAIV وتساعد في رفع امكانية مكافحته في الدواجن ، إذ تتكون اللقاحات التجارية H9N2 LPAIV بشكل أساس من الفيروس الكامل المعطل ، والذي يمزج معه العامل المساعد لتقوية المناعة ، وعلى الرغم من كفاءة العديد من المواد المساعدة ، فإن لقاحات H9N2 LPAIV التجارية لا يمكن أن توفر حماية جيدة ضد الفيروسات المتغايرة مستضديًا ، فضلا عن ذلك فقد كانت هناك محددات او ضعف في تحفيز الخلايا التائية المساعدة Th1 أو Th2 عند التلقيح بهذه اللقاحات التجارية (Zhang *et al*., 2017b) .

يوجد هناك العديد من تقنيات التلقيح المتطورة والتي أظهرت كفاءة في البحوث التجريبية في الدجاج والتي تعطي حماية ضد فايروسات انفلونزا الطيور بنوعيها العالية والواطئة الامراضية (Swayne, 2004) ، ولتطوير لقاح مستحلب الزيت او اللقاح الزيتي تتم تنمية فيروس اللقاح او البذرة اللقاحية في أجنة بيض الدجاج ، ثم يتم تعطيلها بمواد كيميائية خاصة مثل الفورمالدهايد ثم استحلابها. ان النوع الشائع من لقاحات أنفلونزا الطيور التي تستخدم في الدواجن هي تلك اللقاحات التي تستعمل فيها الفيروسات المعطلة ، (Krammer and Palese, 2015) ، إذ يعمل الفورمالديهايد على تثبيط وظيفة البروتين الفيروسي ونتيجة لذلك يمكن أن يؤدي الى تعطيل الفايروس فضلا عن تاثيره على القواعد النيكليوتيدية (الادنين والجوانين) (Pawar *et al*., 2015) ، كما ان هناك طرائق مختلفة أخرى لتعطيل الفيروس في اللقاحات بما في ذلك التعطيل عن طريق أشكال مختلفة من الإشعاع (gamma-radiation) وهي قادرة على إتلاف الأحماض النووية لفيروس الأنفلونزا مما يؤدي الى حدوث انكسار في خيوط الحمض النووي وتضرر النيوكليوتيدات (Alsharifi and Müllbacher, 2010; Nunnally *et al*., 2015) كما ان هناك مواد اخرى تستعمل لتعطيل الفيروس وهي التعطيل الكيميائي بمادة (beta-propiolactone)(BPL) وهي مادة قاعدية لها القابلية على احداث تغيير في الحامض النووي للفيروس من خلال تكوين روابط بين الاحماض النووية والبروتينات وذلك بتفاعل BPL بشكل أساس مع النتروجين في جزيئتي الادينوسين والكوانوسين (Pawar *et al*., 2015) . لقد أظهرت نتائج التقييمات المختبرية والميدانية للقاحات المستحلب الزيتي أنها لا تسبب عدوى ، لكنها تمنع الأعراض السريرية وما يرتبط بها من انخفاض في إنتاج البيض استجابةً لتحدي الاصابة بالنمط المصلي نفسه لفيروس

إنفلونزا الطيور بعد مرور ما يقارب 2 إلى 3 أسابيع من التلقيح ، لكن من عيوب اللقاح الفيروسي المعطل بشكل أساس ضعفه في إحداث مناعة مخاطية وخلوية فعالة ، وانما يقتصر دروه على إلى احداث استجابة مناعية خلطية فقط (Akira *et al*., 2006).

بسبب وجود 18 نمطًا مصليًا مختلفًا للهيماكلوتنين HA لذلك لا تظهرالحماية المقاطعة بين هذه الانماط على الإطلاق ، وعليه يجب ان يحتوي اللقاح على النمط المصلي HA المتطابق مع الفيروس الحقلي وذلك من أجل الفعالية اللقاحية بعد التلقيح (Swayne *et al*.,) 2004 ولتوفير حماية كافية ضد الاصابة الحقلية ، وتعتمد لقاحات انفلونزا الطيورالحالية على تحفيز انتاج الأجسام المضادة المتكونة ضد بروتين الهيماجلوتينينHA والذي يمكن أن يقيد بشكل فعال فيروس الأنفلونزا ويقلل بشكل كبير من شدة المرض والهلاكات العالية (Tompkins *et al*., 2007) ، وفي العقود الاخيرة تم تطوير لقاح انفلونزا الطيور المحمل على فيروس جدري الطيور عن طريق إدخال جين HA لفيروس AI في جينوم فيروس الجدري. وينتج عن تلقيح هذا اللقاح في الدجاج أجسامُ مضادة ضد فيروس الجدري مع اجسام مضادة اخرى ضد البروتين الفيروسي HA لفيروس الانفلونزا ، ويعد هذا النوع من اللقاحات مفيداً عند التمييز بين الاصابة الحقلية والاستجابة المناعية للقاح ، وان معيار هذه الاجسام المضادة المتكونة كافٍ من الناحية السريرية للحماية من اختبارالتحدي بفيروس أنفلونزا الطيور الحقلي وقد تم استعماله بنجاح في المكسيك (Beard *et al*., 1991).

لقد تم في الاونة الاخيرة تطبيق العديد من الأستراتيجيات للسيطرة على اندلاعات مرض أنفلونزا الطيور بما في ذلك اجراءات الأمن الحيوي والتحكم في حركة الاشخاص والطيور والتحصين ضد الفايروس كما تمت التوصية بالتلقيح كآحدى أستتراجيات مكافحة أنفلونزا الطيور وكذلك استعمال لقاح H9N2 LPAI المبطل (Perk *et al*.,2006).

ولكن فشل عملية التلقيح قد يكون بسبب التطبيق غير الفعال للتلقيح أو الجرعة المنخفضة كما ان ظروف نقل اللقاح والاستعمال المكثف طويل الامد لبعض اللقاحات قد يودي الى تغيرات مستضدية في الفيروس (Sitaras *et al*., 2020) ، ونتيجة لفشل في بعض عمليات التلقيح في مزارع الدواجن تم اقتراح استتراتيجية المراقبة المستمرة على المستوى الدولي والمحلي للحقول وهي DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) (التفريق بين الحيوانات المصابة من الملقحة) (Capua and Marangon, 2006).

13-5-2 أهمية التلقيح The importance of vaccination

يعدُ التقليل من طرح فيروس H9N2 عاملا مهما في التقليل من انتشاره ووبائيته ،إذ كلما قل طرح الفيروس من الطيور كان بإمكاننا السيطرة على المرض بشكل افضل ، وقد أظهرت نتائج الدراسة التي قامت بها (Talat *et al*., 2020) بأن التلقيح يقلل بشكل كبيرمن طرح الفيروس إذ لوحظ أنخفاض في طرح الفيروس مع حماية أعلى ضد هذا المرض.

6-2 الانماط الجزيئية المرتبطة بالعوامل الممرضة (PAMPs) pathogen associated molecular patterns

وهي عبارة عن جزيئات ميكروبية تعمل على تحفيز المناعة الفطرية من خلال وجودها كمواد محملة في اللقاحات التي تحتوي على مسببات الأمراض الكاملة الحية المضعفة أو المقتولة ومثال عليها هو جدار الخلية البكتيرية او جينوم الحمض النووي والتي تعمل كأنماط جزيئية مرتبطة بالعوامل الممرضة (PAMPs) وتكون هذه العوامل ذات قدرة كافية لتحفيز الاستجابة المناعية التكيفية (adaptive immune responses) ، وكذلك الحال بالنسبة للقاحات المعتمدة على البروتين او المستضدات والتي عادة ما تفتقتر الى تحفيز المناعة الفطرية الذاتية ، لذا فان إضافة مواد مساعدة خارجية ضرورية لانجاح مثل هذا النوع من اللقاحات (Aoshi, 2017)، وفي دراسات اخرى وجد هناك أنماط عمل أخرى تسمى بمحرضات النمط الجزيئي المرتبط بالضرر(DAMP) Damage-associated molecular pattern وتعمل عن طريق إتلاف الخلايا المضيفة مما يجعلها تطلق العديد من العوامل المصنفة على انها DAMPs(مثال ذلك DNA,RNA) والتي تنشط مستقبلات المناعة الفطرية (Goulopoulou *et al*,2016 ; Piccinini and Midwood , 2010).

تعمل المواد المساعدة للقاح على تحفيز الاستجابات المناعية الفطرية وتساعد إضافة المواد المساعدة الى اللقاح ايضا على تحفيز المناعة التخصصية في المضيف ، وعادةً ما تحتوي اللقاحات التي تستعمل مسببات الأمراض الكاملة الحية المضعفة أو المقتولة على مواد مساعدة داخلية ، مثل منتجات جدار الخلية البكتيرية وأحماضها النووية ، والتي تعمل كأنماط جزيئية مرتبطة بالعوامل الممرضة وتكون كافية للحث على الاستجابات المناعية التكيفية ومع ذلك ، فإن اللقاحات الحاوية على البروتين أو المستضدات ، عادة ما تفتقد الى هذه المحفزات

المناعية الفطرية الذاتية ، لذا فإن إضافة مادة مساعدة خارجية ضرورية لنجاح هذه الأنواع من اللقاحات.

ان تحفيز الاستجابات المناعية الفطرية ضروري جدا لبدء المناعة التكيفية . وتؤدي الاستجابة المناعية الفطرية المبكرة دورًا رئيساً في تحديد حجم ونوعية ومدة الاستجابات المناعية التكيفية. ان بعض المستضدات النقية الموجودة في اللقاحات ينتج عنها استجابة مناعية رديئة لأنها تفتقر إلى الإشارات التي تحفز الاستجابات المناعية الفطرية ونتيجة لذلك لا يمكنها توليد الإشارات النهائية المطلوبة لتعزيز الاستجابات التكيفية. على العكس من ذلك ، فإن اللقاحات الحية المعدلة والتي تشبه الاصابة الطبيعية تسبب تلفًا للخلايا ، وتحفز إطلاق الأنماط الجزيئية المرتبطة بالعوامل الممرضة (PAMPs) والأنماط الجزيئية المرتبطة بالضرر (DAMPs)، وتعزز الاستجابات الفطرية والتكيفية القوية (Takeuchi and Akira, 2010).

وتؤدي هذه المواد المساعدة إلى تحفيز الاستجابة الفطرية الاجبارية اللازمة لتحسين الاستجابات التكيفية وتعزيز امتصاص مستضدات اللقاح بواسطة الخلايا التي تعرض المستضد (الخلايا المتشجرة) . وتحفز الجزيئات الناتجة عن تلف الأنسجة (DAMPs) أو الجزيئات من الميكروبات الغريبة (PAMPs) استجابات فطرية من خلال مستقبلات التعرف على الأنماط (PRRs) ، إذ يؤدي تنشيط PRRs والمستقبلات الخلوية الأخرى على الخلايا المتشجرة إلى إطلاق السيتوكينات ، وتعمل هذه السيتوكينات على تعزيز استجابات الخلايا التائية (T-lymphocyte) المساعدة ، بينما تعمل الاخيرة بدورها على تنشيط الخلايا البائية والتائية (B&T lymphocyte) وبالتالي تعزيز المناعة التكيفية. وقد تتسبب بعض المواد المساعدة في تلف الخلايا والأنسجة وبالتالي تزود الجسم بـ DAMPs إذ تعمل هذه المواد المساعدة عن طريق احداث التحفيزالكيميائي أو لها تأثيرات مباشرة على الجهاز المناعي مما يجعلها تولد السيتوكينات وبالتالي تنشيط الخلايا التائية المساعدة (Tizard, 2020) .

يتم التعرف على ال PAMPs بواسطة مستقبلات خاصة تعرف ب TLRs إذ توجد عدة انماط او انواع منها TLR1 و TLR2 و TLR4 و TLR6 والتي تتعرف على المستضدات الدهنية ، بينما تتعرف TLR3 و TLR7 و TLR8 و TLR9 على الأحماض النووية ، ويمكن لهذه المستقبلات التعرف على PAMPs إما من خلال التفاعل المباشر أو غير مباشر ، ومن الامثلة على PAMPs هو السكريد الدهني (LPS) لجرثومة E.coli. وعادة

ما يتم التعرف على البكتيريا سالبة الجرام بواسطة (TLR4) عبر الجزء الدهني (A) من LPS ، بينما يتم الكشف عن حمض الليبوتيكويك والبروتينات الدهنية والببتيدوغليكان للبكتيريا موجبة الجرام يكون بواسطة TLR2 ، ومع ذلك يمكن لمعظم البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة الجرام تنشيط TLRs إضافية عبر PAMPs البديلة الموجودة في غشاء الخلية أو جدار الخلية أو داخل الخلايا (Alexopoulou *et al*, 2001) ، بينما يتم تنشيط TLR7 و TLR8 بواسطة RNA أحادي الجديلة (ssRNA) (Heil *et al*, 2004). يتضح مما تقدم بأن اللقاحات المقتولة والمطورة بإضافة الPAMPs لها القابلية على تحفيز كل من المناعة الخلطية والخلوية إذ تكون الاستجابة المناعية لهذه اللقاحات جيدة وفعالة مقارنة بالانواع التقليدية من اللقاحات.

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

Materials and methods

1-3 المواد:

1-1-3 الاجهزة المستعملة: تم ادراج اسماء اهم الاجهزة والمعدات المستعملة في الدراسة في الجدول 1

الجدول 1 : الاجهزة المستعملة في الدراسة

ت	الجهاز	الشركة المصنعة والمنشأ	المنشأ
1	جهاز قاريء الاليزا ELISA microplate reader	BioTek	USA
2	جهاز غسل اطباق الاليزا ELISA microplate washer	BioTek	USA
3	جهاز الطرد المركزي microcentrifuge Eppendorf	Wisd	Germany
4	جهاز مزج العينات Vortex shaker	Thermo	USA
5	ماصات متعددة الاحجام Pipettes variable (1000, 100, 10 µl)	Dragon	China
6	ماصة متعددة الاذرع Multichannel pipette	Slamed	Germany
7	ميزان الكتروني حساس Sensitive electric balance	Want	China
8	حاضنة Incubator	JARAD	Syria
9	ثلاجة Refrigerator	Samsung	Korea
10	ميزان حساس صغير	Pocket scale	China
11	ميزان حساس كبير	SF-400	China
12	طبق فحص اختبار تثبيط التلازن Micro-titer plate	Citotest	China

3-1-2 المواد المختبرية والبايولوجية والمعدات: في الجدول 2 تم ادراج اسماء اهم المواد المختبرية والبايولوجية قيد الدراسة

الجدول 2 : المواد المختبرية والبايولوجية والمعدات المستعملة في الدراسة

ت	اسم المادة	الشركة المنتجة	المنشأ
1	انابيب جمع الدم مع مادة جيلاتينية	IVD	اسبانيا
2	انابيب ابندروف	Citotest	الصين
3	حامل انابيب	Citotest	الصين
4	سيت جراحي		
5	ماصة باستور	---	الصين
6	كمامات	Hanmalaser	الصين
7	كفوف مطاطية	Wally plastic	الصين
8	رؤوس ماصات	Citotest	الصين
9	المستضد الفيروسي H9N2	GD academy	Netherland
10	كريات دم حمر مغسولة	---	---
11	ماء مقطر	---	---

3-1-3 العدد التشخيصية (الكتات): تم استعمال عدد من العدد التشخيصية في هذه الدراسة ومن مناشئ مختلفة كما موضح في الجدول

الجدول 3 : العدد التشخيصية المستعملة في الدراسة

ت	اسم العدة التشخيصية	الشركة	المنشأ	Cataloge No.
1	عدة قياس Avian beta defensia-10	BT LAB	China	E0338CH
2	عدة قياس Avian cathlicidin-B1	BT LAB	China	E0337CH
3	عدة قياس Chicken interferon Gamma	BT LAB	China	EA0005CH
4	عدة قياس Avian influenza H9N2 antibodies	ID.Vet	France	FLUH9SVERO620EN

2-3 طرائق العمل

1-2-3 الافراخ : أستعمل في هذه الدراسة فراخ فروج لحم نوع ROSS 308 بعمر يوم واحد (عدد 150) بعد الحصول عليها من احد المفاقس الخاصة في محافظة نينوى (مفقس النبراس)، وقد نقلت الفراخ الى حقل الدواجن الخاص بكلية الطب البيطري / جامعة الموصل ، ووضعت الفراخ في المكان المخصص لها كل حسب مجموعته ، وقد تم تجهيز الحقل سابقا من حيث درجة الحرارة والفرشة المصنوعة من الخشب والتي وضعت بسمك 7-10 سم ، وفي الوقت نفسه تم تقسيم الفراخ عشوائيا الى 5 مجاميع ، وقد تمت معاملة المجاميع حسب ما تم ذكره في تصميم التجربة المرفق في ادناه.

2-2-3 العلف: تمت تغذية الفراخ على علف فروج لحم بعد الحصول عليه من احد المعامل الخاصة وهو معمل علف اربيل فيد وللمراحل الاولى والثانية والثالثة، وقد أعطي علف المرحلة الاولى والمسمى بالبادئ من عمر يوم واحد وحتى اليوم 15 من عمر الفراخ ، وتم اعطاء علف المرحلة الثانية والمسمى بالعلف النامي من عمر 16-28 يوماً ، بينما تم اعطاء علف المرحلة الثالثة والمسمى بالعلف الناهي من عمر 29-35 يوماً (NRC, 1994) ، علما ان مكونات وتفاصيل الاعلاف المجهزة موضحة في الجدول 4 ، كما تم ادراج التحليل الكيميائي للانواع العلفية الثلاثة في الجدول 5 كما زودت من قبل السركة المصنعة.

الجدول 4 : مكونات وتراكيز المواد الخام في العلف البادئ و النامي والناهي

اسم المادة %	العلف البادئ	العلف النامي	العلف الناهي
مركز علفي 2.5%	2.5% بادئ	2.5% نامي	2.5% ناهي
صويا	27.9%	22.00%	16.5%
حنطة	30.80%	33.86%	35.6%
نخالة حنطة	5.8%	3.78%	3.6%
طحين حنطة	10%	15%	17%
ذرة	20%	20%	21%
زيت الصويا	1%	1%	2%
حجر كلس	2%	1.86%	1.8%

الجدول 5: التحليل الكيميائي للاعلاف المستعملة في الدراسة

الاسم	العلف البادئ	العلف النامي	العلف الناهي
البروتين الخام	22.11%	20.20%	18.8%
الطاقة	3000 Kcal/Kg	3100 Kcal/Kg	3175 Kcal/Kg
مادة جافة	92.31%	92.20%	92%
دهون	2.63%	2.63%	5%
الالياف	%4.55	4.11%	2.5%
رماد	6.32%	5.5%	4.7%

3-2-3 اللقاحات والمستضد المرجعي H9 الموجب فايروس الانفلونزا: تم استعمال نوعين من لقاحات انفلونزا الطيور المبطلة وهما:

1-3-2-3 لقاح الانفلونزا التقليدي NOBILIS® H9N2 : هو لقاح مبطل ضد مرض أنفلونزا الطيور من النوع (A) والنوع الفرعي H9N2 ، ومحضر من عترة A/CK/UAE/415/99 وتنتجه شركة MSD الامريكية - الهولندية ويستعمل اللقاح في تلقيح الدواجن وذلك للوقاية من مرض أنفلونزا الطيورنوع H9N2 ويعطى اللقاح بالحقن تحت الجلد بجرعة 0.25 مل في منطقة الرقبة.

2-3-2-3 لقاح الانفلونزا المطور NOBILIS® H9N2P: يمتلك هذا اللقاح التفاصيل المذكورة نفسها في اللقاح السابق الا انه تمت اضافة مايسمى بالانماط الجزيئية المرتبطة بالعوامل الممرضة (PAMPs) وذلك بهدف تدعيم او احداث استجابة مناعة مبكرة وفطرية في الطيور الملقحة به ، ويتم اعطاء اللقاح بطريقة الحقن تحت الجلد بجرعة 0.25 مل في منطقة الرقبة.

3-3-2-3 المستضد المرجعي الموجب H9 فايروس الانفلونزا: تم الحصول على المستضد المرجعي الموجب من اكاديمية GD الهولندية عن طريق احد المختبرات الخاصة بشكل مجفف-مجمد Lypholization (freeze-dried) حيث تم تحضيره فيما بعد باستخدام محلول الملح الفسيولوجي واستخراج قيمة اربع وحدات ملزنة (4HAU) بواسطة اختبار التلازن الدموي لاستخدامها لاحقا في اختبار تثبيط التلازن الدموي.

4-2-3 بيوتاريت الصوديوم : تم استعمال هذه المادة بعد الحصول عليها بشكل نقي من شركة Biopoint البولندية ، وقد تم اعطاؤها بجرعة 1 غم / لتر ماء الشرب في المجاميع المعاملة وطيلة مدة التجربة (35 يوم).

5-2-3 تصميم التجربة : تم تقسيم فراخ التجربة الى خمس مجاميع (30 فرخاً لكل مجموعة) وتمت معاملة المجاميع كالاتي:

المجموعة الاولى (G1) : تم اعطاؤها لقاح انفلونزا الطيور H9N2 التقليدي فقط وذلك بالحقن تحت الجلد في منطقة الرقبة بعمر يوم واحد وبجرعة 0.25 مل / طير

المجموعة الثانية (G2) : تم تلقيحها بلقاح انفلونزا الطيور H9N2 التقليدي ايضا بالطريقة نفسها والجرعة نفسها لكن اعطيت لهذه المجموعة مادة بيوتاريت الصوديوم بجرعة 1 غم / لتر ماء الشرب يوميا وطيلة مدة التجربة 35 يوم

المجموعة الثالثة (G3) : تم تلقيح الفراخ فيها بلقاح انفلونزا الطيور المطور H9N2P وتركت بدون معاملة بمادة بيوتاريت الصوديوم

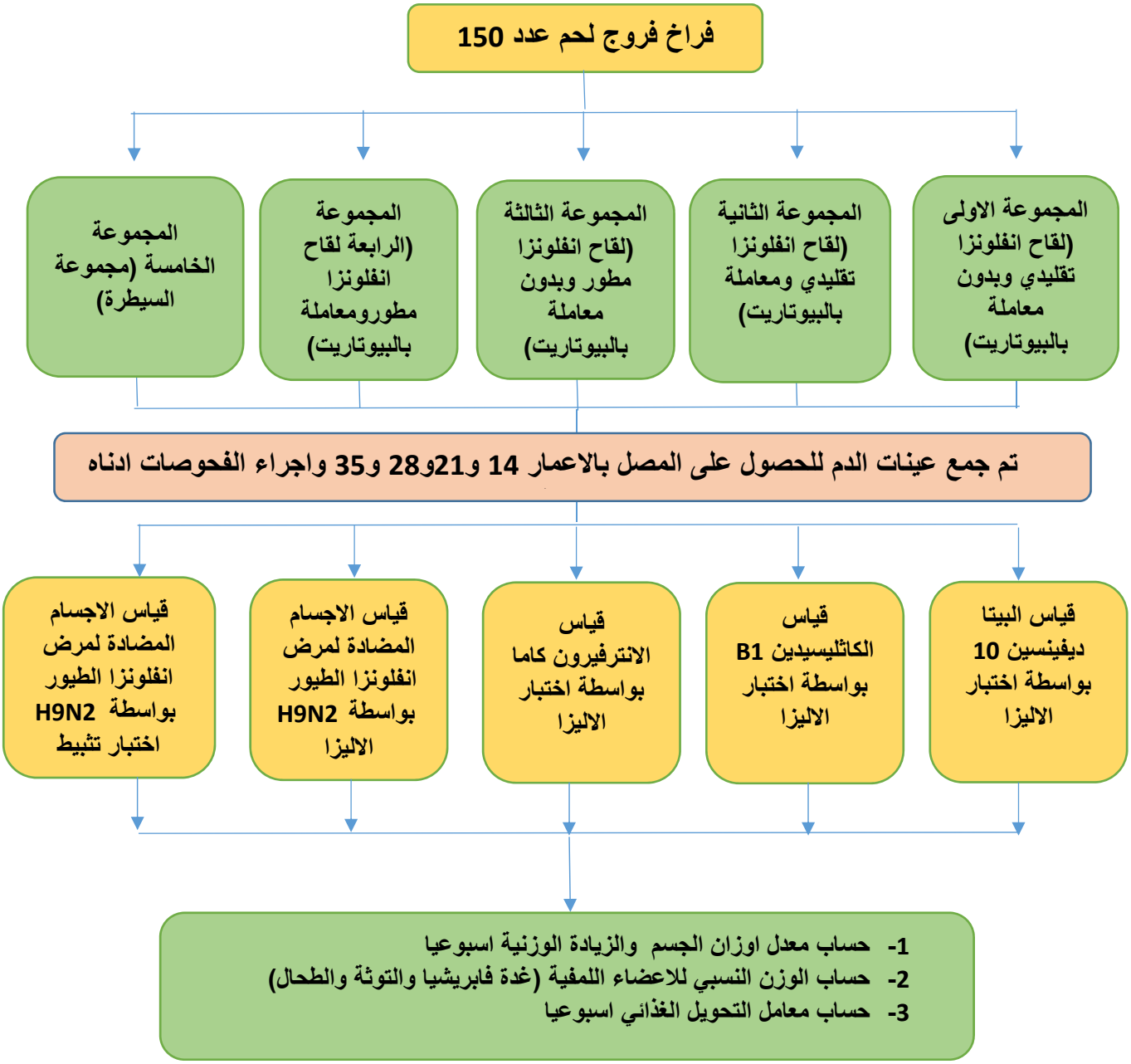
المجموعة الرابعة (G4) : تم تحصين الفراخ هذه المجموعة بلقاح انفلونزا الطيور المطور H9N2P وعوملت بمادة بيوتاريت الصوديوم بجرعة 1 غم / لتر ماء الشرب يوميا وطيلة مدة التجربة.

المجموعة الخامسة (G5) : تركت هذه المجموعة بدون معاملة وعُدتْ مجموعة السيطرة السالبة (الشكل 2)

تمت متابعة المجاميع بشكل يومي وطيلة مدة التجربة من حيث تجهيز الماء والعلف ومراقبة الطيور ومتابعة معدل اوزان الجسم والزيادة الوزنية اسبوعيا وكذلك استهلاك المادة العلفية بهدف حساب معامل التحويل الغذائي ، مع جمع الدم بهدف الحصول على المصل اسبوعيا وحساب الوزن النسبي للاعضاء اللمفية وهي غدة فابريشيا والتوثة والطحال. أما بالنسبة للاختبارات المصلية او فحوصات الاليزا فقد تم اجراؤها بواسطة قياس كل من :

1- مستوى الببتيدات الدفاعية للمضيف وهي كل من Avian Beta defensin -10 و Cathelicidin B1 وهي مؤشر للاستجابة المناعية الفطرية
2- مستوى interferon gamma وهو مؤشر للمناعة الخلوية
3- معيار اضداد مرض انفلونزا H9N2 دليل للمناعة الخلطية

4- اختبار تثبيط التلازن الدموي HI لقياس الاضداد المناعية المتكونة بعد التلقيح كمؤشر للمناعة الخلطية ايضا (الشكل 4)



الشكل 4 : تصميم التجربة

6-2-3 جمع الدم وفصل المصل :

تم جمع الدم من الوريد الجناحي للطيور وللمجاميع كافة بالاعمار 14 و 21 و 28 و 35 وبواقع 4 عينات من كل مجموعة ولكل مدة ، وقد تم استعمال انابيب خاصة حاوية على مادة جيلاتينية لوضع الدم فيها ، تركت الانابيب بدرجة حرارة الغرفة لمدة 2-3 ساعات بعدها تم نبذها بجهاز الطرد المركزي بسرعة 1500 دورة / دقيقة ولمدة 10 دقائق. وتم سحب مصل الدم من هذه الانابيب ووزع في انابيب ابندروف معقمة وبواقع 3 انابيب لكل عينة ثم حفظت عينات المصل بدرجة -16 م لحين استعمالها بالفحوصات المصلية.

7-2-3 اختبارات الاليزا المستعملة في قياس انواع الاستجابات المناعية

1-7-2-3 اختبار الساندويج اليزا : تم اجراء هذا الاختبار لقياس الاستجابة المناعية الفطرية والمتمثلة بكل من البيتا ديفينسين 10 والكاثليسيدين B1 إذ يتم الكشف الكمي الدقيق لكل منهما في المصل وحسب تعليمات الشركة المنتجة والمرفقة مع العدة التشخيصية ، تبدا عملية الفحص اولا بترك مجموعة المحاليل والكواشف والعينات بدرجة حرارة الغرفة ولمدة 30 دقيقة ومن بعدها تم التاكد من ترتيب الاضافات الى الحفر والترتيب والترقيم للعينات المطلوب فحصها ، مع اتباع جميع التعليمات والمحاذير المشار اليها في العدة التشخيصية

- **تحضير المحلول القياسي للبيتا ديفينسين-10**

- تم تحضير المحلول القياسي بكمية 120 ميكرولتر والحاوي على (16 نانوغرام/ مل) باستعمال 120 ميكرولتر من المادة المخففة القياسية
- ترك هذا المحلول لمدة 15 دقيقة ، بعدها تم رجه جيدا قبل إجراء التخافيف الاخرى
- تم عمل تخافيف مزدوجة ومكررة بواسطة تخفيف المحلول القياسي للحصول على التخافيف (8 نانوغرام / مل) (4 نانوغرام / مل) (2 نانوغرام / مل) (1 نانوغرام / مل) (0.5 نانوغرام / مل)

- **تحضير المحلول القياسي للكاثليسيدين B1**

- تم تحضير المحلول القياسي بكمية 120 ميكرولتر والحاوي على (4000 نانوغرام/ لتر) باستعمال 120 ميكرولتر من المادة المخففة القياسية
- ترك هذا المحلول لمدة 15 دقيقة ، بعدها تم رجه جيدا قبل إجراء التخافيف الاخرى

- تم عمل تخافيف مزدوجة ومكررة بواسطة تخفيف المحلول القياسي للحصول على التخافيف (2000 نانوغرام / لتر) (1000 نانوغرام / لتر) (500 نانوغرام / لتر) (250 نانوغرام / لتر) (125 نانوغرام / لتر)

تحضير محلول الغسل للبيتا ديفينسين-10 والكاثليسيدين B1 (25X) : تم تخفيف 20 مل من محلول الغسل المركز باستعمال الماء المقطر لتحضير 500 مل منه.

طريقة إجراء الفحص :

1. بعد ان تم تحضير جميع الكواشف والمحاليل القياسية والعينات بدرجة حرارة الغرفة وهي الدرجة المثلى لاجراء هذا الاختبار ايضا
2. تم تحضير طبق الاختبار المجهز مع العدة التشخيصية
3. تمت اضافة 50 مايكرولتر من المحلول القياسي الى حفر الطبق القياسية فقط .
4. تمت اضافة 40 مايكرولتر من عينات المصل الى الحفر الخاصة بها وبعدها اضيف 10 مايكرولتر من مضاد CATHB1 الى حفر العينات فقط ، ومن ثم اضيف بعدها 50 مايكرولتر من الستربتافيدين –HRP الى حفر العينات والحفر القياسية في حين تركت حفر السيطرة (Blank) فارغة.
5. تم رج الطبق جيدا وبعدها تمت تغطيته باستعمال لاصق او غطاء خاص وحضن لمدة 60 دقيقة عند 37 درجة مئوية.
6. بعد انتهاء مدة الحضن تمت ازالة اللاصق او الغطاء وغسل الطبق 5 مرات باستعمال محلول الغسل المحضر سابقاً ولمدة 30 ثانية الى دقيقة واحدة لكل غسلة ومن ثم نجفف الطبق باستعمال مناشف خاصة .
7. تمت اضافة 50 مايكرولتر من محلول Substrate A لكل حفرة ومن بعدها اضافة 50 مايكرولتر من محلول Substrate B ايضا ، بعدها تم حضن الطبق لمدة 10 دقائق عند 37 درجة مئوية في الظلام.
8. تمت اضافة 50 مايكرولتر من محلول ايقاف التفاعل لكل حفرة.
9. اخيرا تمت قراءة النتائج باستعمال جهاز الاليزا عند طول موجي 450 نانوميتر خلال مدة 10 دقائق بعد إضافة محلول ايقاف التفاعل .

2-7-2-3 اختبار الاليزا التنافسي : تم اجراء هذا الاختبار لقياس الانترفيرون كاما Interferon γ وقد تم الكشف الكمي الدقيق له في المصل وحسب تعليمات الشركة المنتجة

والمرفقة مع العدة التشخيصية ، بدات عملية الفحص اولا بتدفئة مجموعة المحاليل والكواشف والعينات بدرجة حرارة الغرفة ولمدة 30 دقيقة ومن بعدها تم التاكد من ترتيب الاضافات الى الحفر والترتيب والترقيم للعينات المطلوب فحصها ، مع اتباع جميع التعليمات والمحاذير المشار اليها في العدة التشخيصية من قبل الشركة المنتجة.

- **تحضير المحاليل الخاصة بقياس الانترفيرون كاما**

اولا: تحضير المحلول القياسي

- تم تحضير المحلول القياسي بكمية 150 ميكرولتر والحاوي علي (1600 نانوغرام/ لتر) باستعمال 120 ميكرولتر من المادة المخففة القياسية ، ويكون استعمال هذا الحلول خلال 24 ساعة بعد تحضيره
- ترك المحلول لمدة 15 دقيقة بعدها تم رجه جيدا قبل إجراء التخافيف الاخرى
- تم عمل تخفيفات مزدوجة ومكررة بواسطة تخفيف المحلول القياسي للحصول على التخافيف (800نانوغرام / لتر) (400 نانوغرام / لتر) (200 نانوغرام / لتر) (100 نانوغرام / لتر) (50 نانوغرام / لتر)

ثانيا: تحضير Biotinylated Antigen تم تحضيره باضافة 1 مل من محلول التخفيف ثم مزجه جيدا وبعدها تم اكمال الحجم ليصبح 6 مل وترك لمدة 10 دقائق ليصبح جاهز للاستعمال.

ثالثا: تحضير مركز Avidin-HRP وتم ذلك بنقل هذا المركز الى محلول التخفيف الخاص به وتم مزجهم جيدا ليصبح حجمه 6 مل وبعدها ترك لمدة 10 دقائق ايضا ليصبح جاهزاً للاستعمال.

رابعا: تحضير محلول الغسل (25X) تم تخفيف 20 مل من محلول الغسل المركز باضافة 480 مل من الماء المقطر لتحضير 500 مل منه ويصبح جاهزا لاجراء اختبار الاليزا.

طريقة إجراء الفحص :

1- تمت اضافة مادة substrate A ومادة substrate B ومحلول ايقاف التفاعل فقط الى حفر السيطرة Blank

2- تمت اضافة 50 مايكرولتر من المحاليل القياسية المخففة وكذلك 50 مايكرولتر من العينات الى حفر الطبق ومن بعدها اضيف 50 مايكرولتر من biotinylated antigen

الى جميع الحفر ومزجت جيدا وتم وضع غطاء الطبق ووضع بعد ذلك في الحاضنة بدرجة 37 درجة مئوية لمدة ساعة واحدة

3- تمت ازالة الغطاء من الطبق وكذلك ازالة المزيج الموجود في حفر الطبق ، وتم غسل الطبق بمحلول الغسل خمس مرات متتالية ثم تم تجفيفه باستعمال ورق خاص لهذا الغرض

4- تمت اضافة 50 مايكرولتر من مادة avidin-HRP لحفر المحاليل القياسية وحفر العينات ثم تمت تغطية الطبق ووضع في الحاضنة بدرجة 37 درجة مئوية لمدة ساعة واحدة

5- تمت ازالة غطاء الطبق ثم تمت اضافة 50 مايكرولتر من مادة substrate A الى جميع الحفر ومن بعدها تمت اضافة 50 مايكرولتر من مادة substrate B كذلك الى جميع الحفر وحضن الطبق لمدة 10 دقائق بدرجة 37 درجة مئوية في الظلام

6- تمت اضافة محلول ايقاف التفاعل بكمية 50 مايكرولتر الى جميع الحفر

7- اخيرا تمت قراءة النتائج باستعمال جهاز الاليزا عند طول موجي 450 نانوميتر خلال مدة 10 دقائق بعد إضافة محلول وقف التفاعل.

3-7-2-3 اختبار الاليزا غير المباشر: تم اجراء هذا الاختبار لقياس معيار الاجسام المضادة لفيروس انفلونزا الطيور H9N2 في المصل وحسب تعليمات الشركة المنتجة والمرفقة مع العدة التشخيصية ، وقد تم وضع العدة التشخيصية والعينات المطلوب فحصها في درجة حرارة الغرفة (21 م) لمدة نصف ساعة.

ملاحظة: تم تجهيز عينات السيطرة الموجبة والسالبة والخاصة بالفحص في اعلاه لتستعمل بشكل مباشر ومن دون اجراء اي تخفيف لها و ذلك حسب التعليمات المرفقة من قبل الشركة المجهزة.

وبعد التاكد من ترتيب العينات المطلوب فحصها وتهيئة المحاليل الخاصة بالعدة التشخيصية ، تم اتباع جميع تعليمات الشركة المنتجة والخاصة بخطوات اجراء الفحص وهي كالاتي:

1- تم نقل 5 مايكرولتر من كل عينة مصل الى حفر طبق التخفيف المخصصة لها وذلك بعد ترتيب وتوزيع العينات على الطبق ثم تمت اضافة 245 مايكرولتر من محلول التخفيف الى كل حفرة تحتوي على عينات المصل ليصبح المجموع 250 مايكرولتر في كل حفرة ونسبة التخفيف فيها 1:50 فيما تم ترك 6 حفر اثنان منها لكل من عينات

المصل الموجبة والسالبة والمصل المرجعي ، وكانت هذه الحفر هي الحفر A1,B1,C1,D1,E1,F1

2- تم وضع 90 مايكرولتر من محلول التخفيف في جميع حفر الطبق الخاص بالفحص والمغطى بالمستضد H9N2 عدا حفر مجاميع السيطرة الستة في اعلاه

3- تم نقل 10 مايكرولتر من عينات المصل المخففة من طبق التخفيف الى نظيراتها من حفر الطبق الخاص بالفحص والمغطى بالمستضد H9N2 ليصبح المجموع 100 مايكرولتر في كل حفرة ونسبة التخفيف اصبحت 1:500

4- تمت اضافة 100 مايكرولتر من محلول المستضد الموجب والجاهز للاستعمال الى حفر السيطرة الموجبة A1,B1 وكذلك 100 مايكرولتر اخرى من محلول السيطرة السالب الى الحفر المخصصة له وهي C1,D1 ، في حين تمت اضافة 100 مايكرولتر من المصل المرجعي الجاهز الى الحفرE1,F1

5- تمت تغطية طبق الفحص ووضع بعدها بدرجة 21م ولمدة ساعة واحدة

6- تم غسل الطبق كاملا باستعمال محلول الغسل المخفف وبكمية 300 مايكرولتر/ حفرة ثلاث مرات متتالية وذلك بواسطة جهاز الغسل الاوتوماتيكي

7- تمت اضافة 100 مايكرولتر من المقترن (conjugate) الى جميع حفر الطبق وحضن الطبق بعد تغطيته لمدة 30 دقيقة وبدرجة 21 م

8- تم غسل الطبق للمرة الثانية ثلاث مرات متتالية كذلك باستعمال محلول التخفيف بكمية 300 مايكرولتر لكل حفرة بواسطة جهاز الغسل الاوتوماتيكي

9- تمت اضافة محلول ال substrate بكمية 100 مايكرولتر لكل حفرة من الطبق وحضن بعد تغطيته لمدة 15 دقيقة بدرجة 21 م

10- وفي الخطوة الاخيرة تمت اضافة 100 مايكرولتر من محلول ايقاف التفاعل

11- تمت قراءة النتائج باستعمال جهاز الاليزا من نوع Biotek 800ts عند طول موجي 405 nm .

3-2-8 اختبار تثبيط التلازن الدموي : تم استعمال هذا الاختبار للكشف عن الاجسام المضادة المصلية المتكونة بعد عملية التحصين ضد مرض انفلونزا الطيور H9N2 . وقد تم اولا استخراج ال 4HAU بواسطة اختبار التلازن الدموي HA للمستضد الفيروسي ثم تم اجراء اختبار تثبيط التلازن الدموي حسب (OIE ,2015) وذلك باجراء تخافيف ثنائية لعينات المصل على طبق Micro-titer plate بواسطة محلول الملح الفسيولوجي Normal saline (NS) إذ

تم وضع 25 مايكرولتر من هذا المحلول في الحفر المخصصة له ومن بعدها تمت اضافة عينات المصل بكمية 25 مايكرولتر ايضا الى الحفرة الاولى فقط وعمل لها تخافيف ثنائية ، ثم تمت اضافة فيروس او مستضد H9N2 (4HAU) بكمية 25 مايكرولتر الى جميع الحفر وحضن الطبق بدرجة حرارة الغرفة لمدة 20 دقيقة للسماح بتفاعل المستضد مع الاجسام المضادة واخيرا تمت اضافة كريات الدم الحمر المغسولة بتركيز 1% ايضا بكمية 25 مايكرولتر الى جميع حفر الطبق ، وترك الطبق لمدة 30-40 دقيقة بدرجة حرارة الغرفة ثم تمت قراءة النتائج لمعرفة معيار الاجسام المضادة في عينات المصل المفحوصة إذ إن اعلى معيار للاجسام المضادة يمثل اخر حفرة من شريط الطبق اعطت نتيجة موجبة لاختبار تثبيط التلازن.

9-2-3 اوزان الاعضاء اللمفية (غدة فابريشيا، الطحال ، التوثة) بعد ان تم قتل الفراخ بعملية ازاحة الرقبة تم اجراء الصفة التشريحية واستخراج كل من غدة فابريشيا والطحال والتوثة خلال الاوقات 7و14و21و28و35 يوماً من عمر الفراخ وبعدها تم حساب الوزن النسبي لهذه الاعضاء نسبة الى وزن الجسم على وفق المعادلة الاتية:

الوزن النسبي للعضو = وزن العضو / وزن الجسم x 100

10-2-3 اداء النمو

1-10-2-3 وزن الجسم : تم حساب معدل اوزان الجسم اسبوعيا في المدد 7 و14و21و28 و35 يوماً من عمر الفراخ ، كما تم استخراج معدل الزيادة الوزنية الاسبوعية لمجاميع التجربة وذلك للتعرف على الفروقات المعنوية إن وجدت بين المجاميع الخمسة (ابراهيم ، 1987)

معدل الزيادة الوزنية = معدل وزن الجسم نهاية الاسبوع – معدل وزن الجسم في بداية الاسبوع

2-10-2-3 معامل التحويل الغذائي: تم حساب معامل التحويل الغذائي وذلك بعد حساب معدل الزيادة الوزنية الاسبوعية وكمية العلف المستهلكة اسبوعيا كذلك ، وتم استخراج قيمة معامل التحويل الغذائي حسب المعادلة الاتية:

معامل التحويل الغذائي (غم علف/غم زيادة وزنية) = كمية العلف المستهلك / طائر(اسبوعيا) ÷ معدل الزيادة الوزنية اسبوعيا

11-2-3 التحليل الاحصائي : تم تحليل النتائج احصائيا باستعمال اختبار تحليل التباين (ANOVA) ثم تم ايجاد الفروقات المعنوية لمختلف المعايير بين مجاميع التجربة باستعمال اختبار Duncan بواسطة برنامج (SPSS.version.2021) عند مستوى احتمالية ($P\leq0.05$) (Steel *et al*., 1997) ، كما تم استعمال معامل ارتباط بيرسون (Pearson correlation) وذلك لايجاد قيمة معامل الارتباط بين معايير التجربة قيد الدراسة.

الفصل الرابع

النتائج Results

تم إجراء اختبار الاليزا للكشف عن مستوى ببتيد البيتاديفينسين-10 (AvBD-10) في امصال حيوانات التجربة ، وتبين أن المعاملة بمادة بيوتاريت الصوديوم لمدة 14 يوماً كان لها تاثير ايجابي ومعنوي ($P < 0.05$) في تحسين من مستوى هذا الببتيد في مصل المجموعتين المعاملتين وهما الثانية والرابعة ولكن من دون فرق معنوي يذكر مقارنة بالمجموعة الثالثة غير المعاملة ، بينما كان هناك فرق معنوي في مستوى هذا الببتيد مقارنة مع المجموعة الاولى والخامسة ، وفي عمر 21 و 28 يوما من المعاملة لم تُلاحظ اية فروق معنوية تذكر بين المجاميع ، وفي عمر 35 يوماً من المعاملة اظهرت المجموعتان الاولى والخامسة مستوى منخفضاً للبيتاديفينسين-10 بالمقارنة مع المجاميع الثلاثة الأخرى (الجدول 6).

الجدول 6: مستوى ببتيد البيتاديفينسين-10 (AvBDs-10) مقاسا ب(ng/ml) بعمر 14و21و28و35 يوماً في امصال مجاميع التجربة (mean±SE)

المجاميع					
العمر/بالايام	الاولى	الثانية	الثالثة	الرابعة	الخامسة
14	1.1±0.2 c	2.2±0.3 a	1.9±0.2 ab	1.5±0.2 abc	1.3±0.1 c
21	2.6±0.7 a	3.4±0.8 a	2.2±0.2 a	2.1±0.3 a	4.1±1.1 a
28	1.5±0.1 a	2.2±0.5 a	1.9±0.3 a	1.9±0.5 a	2.8±0.8 a
35	1.2±0.2 b	2.6±0.4 a	2.5±0.6 ab	1.9±0.2 ab	1.3±0.2 b

*الاحرف المختلفة a,b,c تعني وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمالية ($P < 0.05$)

اوضحت النتائج في (الجدول 7) عدم وجود فرق معنوي في مستوى ببتيد الكاثليسيدين-B1 (CATH-B1) بعمر 14 و 28 يوماً بين مجاميع التجربة ، بينما كان هناك ارتفاع معنوي في مستوى هذا الببتيد في المجموعة الثانية مقارنة مع المجموعة الخامسة ولكن من دون فرق معنوي يذكر مع باقي المجاميع عند عمر 21 يوماً ، اما بعمر35 يوماً من التجربة فقد كان هناك زيادة وبشكل ملحوظ ومعنوي في هذا الببتيد في المجموعة الثانية مقارنة مع المجموعة الاولى والخامسة ولكن من دون فرق معنوي مع المجموعتين الثالثة والرابعة

الجدول 7: مستوى ببتيد الكاثليسيدين-B1 (CATH-B1) مقاسا ب(ng/L) بعمر 14و21و28و35 يوماً في امصال مجاميع التجربة (mean±SE)

المجاميع					
العمر/بالايام	الاولى	الثانية	الثالثة	الرابعة	الخامسة
14	144.4±5.7 a	152.9±12.0 a	156.5±13.9 a	151.5±13.4 a	133.7±6.2 a
21	171.6±21.2 ab	315±83.1 a	173.9±9.4 ab	240.5±49.3 ab	159.7±16 c
28	180.4±16.8 a	376.4±97.8 a	245.9±56.8 a	313.9±74.3 a	177.7±17.2 a
35	168.8±18.7 b	543.1±114.5 a	347.6±126.3 ab	342±64.2 ab	175.2±16.2 b

* الاحرف المختلفة a,b,c تعني وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمالية ($P < 0.05$)

تم قياس مستوى الانترفيرون كاما (interferon γ) في امصال مجاميع التجربة ولوحظ أن تاثير بيوتاريت الصوديوم بعمر 21 و 35 يوماً بعد المعاملة ادى الى انخفاض في مستوى الانترفيرون كاما في المجاميع الثانية والرابعة ولكن من دون فرق معنوي ملحوظ ($P < 0.05$) مع باقي المجاميع عدا المجموعة الخامسة ، اما بعمر 14 و 28 يوماً بعد المعاملة فلم يلاحظ اي تاثير معنوي لبيوتاريت الصويوم على مستوى الانترفيرون كاما بين المجاميع (الجدول 8)

الجدول 8: مستوى الانترفيرون كاما (interferon γ) مقاسا ب(ng/L) بعمر 14و21و28و35 يوماً في امصال مجاميع التجربة (mean±SE)

المجاميع					
العمر/بالايام	الاولى	الثانية	الثالثة	الرابعة	الخامسة
14	118.5±21.8 a	88.3±8.3 a	139.6±23.1 a	136±13.2 a	128.3±7.8 a
21	132.4±29.7 ab	116±25.1 ab	195.4±62.5 a	141.6±14.5 ab	71.5±14.5 b
28	210.8±43.8 a	126.8±15.5 a	173.4±52.1 a	214.9±52.1 a	89.7±17.8 a
35	473.6±159.5 a	217.5±46.6 ab	494.8±145 a	298.6±84..5 ab	113±33.5 b

* الاحرف المختلفة a,b,c تعني وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمالية ($P < 0.05$)

توضح النتائج في الجدول 9 بأن تاثير بيوتاريت الصوديوم على معيار الاجسام المضادة ظهر مبكرا بعمر 14 يوماً بعد المعاملة في المجموعة الثالثة والرابعة وبشكل معنوي ، بينما بعمر 21 يوماً بعد المعاملة اظهرت المجموعة الثالثة والرابعة زيادة معنوية واضحة في مستوى الاضداد بالمقارنة مع باقي مجاميع التجربة ، اما في الاسبوع الاخير من التجربة فقد لوحظ هناك زيادة معنوية واضحة في معيار الاضداد للمجاميع الثانية والثالثة والرابعة بالمقارنة مع المجموعة الاولى والخامسة.

الجدول 9: معيار الاجسام المضادة لفيروس لقاح H9N2 مقاسة بالاليزا بعمر 14و21و28و35 يوماً في امصال مجاميع التجربة (mean±SE)

المجاميع					
العمر/بالايام	الاولى	الثانية	الثالثة	الرابعة	الخامسة
14	150.5±145.5 b	130±26.7 b	315.2±189.3 a	1046.2±465.1 a	198.7±67.9 b
21	3404±1239 b	2114±1901 b	23445±2628 a	18574±836 a	233±206 c
28	9745±1539 ab	11152±1071 ab	27036±913 a	15491±4611 ab	241±120 c
35	8110±990 b	10644±631 a	11518±569 a	12433±937 a	49±7 c

*الاحرف المختلفة a,b,c تعني وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمالية ($P < 0.05$)

اظهرت نتائج اختبار تثبيط التلازن الدموي بعمر 14 يوماً من التجربة ارتفاعا معنويا في معيار الاضداد في المجموعة الرابعة ومن ثم بعدها المجموعة الثالثة مقارنة مع المجاميع الاخرى ، وفي عمر 21 يوماً لوحظ ارتفاع معنوي في معيار الاجسام المضادة في المجموعتين الثالثة والرابعة مقارنة بالمجموعتين الاولى والثانية من جهة وفرق معنوي بين المجاميع الاربعة المعاملة مع المجموعة الخامسة غير المعاملة من جهة اخرى ، اما في العمر 28 و35 يوماً فقد لوحظ ارتفاع معنوي في معيار الاضداد في المجاميع الثانية والثالثة والرابعة مقارنة بالمجموعة الاولى والخامسة (الجدول 10).

الجدول 10 : معيار الاجسام المضادة لفيروس لقاح H9N2 بعمر 14و21و28و35 يوماً في مجاميع التجربة باستعمال اختبار تثبيط التلازن الدموي HI ومقاسة ب(Log2) (mean±SE)

المجاميع					
العمر/بالايام	الاولى	الثانية	الثالثة	الرابعة	الخامسة
14	2.2±0.25 c	2.5±0.28 c	4.5±0.86 b	8.5±0.28 a	3±0.4 c
21	5.5±0.86 b	5.5±0.95 b	8.7±0.47 a	9.2±0.47 a	2±0.4 c
28	5.7±0.85 b	8.2±0.62 a	8.7±4.7 a	9.2±0.25 a	1.7±0.47 c
35	6.2±0.85 b	8±0.4 a	8.5±0.64 a	9.2±0.25 a	1.5±0.5 c

* الاحرف المختلفة a,b,c تعني وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمالية ($P < 0.05$)

لقد اختلفت نتائج الوزن النسبي للاعضاء اللمفية باختلاف المُدَد ، ولكن فروقات معنوية ظهر ارتفاع في الوزن النسبي لغدة فابريشيا في المجموعة الثانية بالمقارنة مع المجموعة الرابعة والخامسة بعمر 21 و 28 يوماً على التوالي ، بينما انخفض الوزن النسبي لغدة فابريشيا والتوثة بعمر 35 معنويا ($P < 0.05$) في المجموعة الثالثة بالمقارنة مع المجموعة الرابعة ، في حين ارتفع الوزن النسبي للتوثة بشكل معنوي ($P < 0.05$) في المجموعتين الثالثة والرابعة فقط مقارنة بالمجموعة الخامسة بعمر 14 يوماً ، في حين انخفض الوزن النسبي للتوثة وبشكل معنوي في المجموعتين الاولى والثالثة مقارنة بالمجموعة الرابعة بعمر 35 يوماً ، لقد لوحظ ارتفاع معنوي في الوزن النسبي للطحال بعمر 35 يوماً ($P < 0.05$) في المجموعة الرابعة بالمقارنة مع المجموعتين الثانية والخامسة (الجدول 11).

الجدول 11: الوزن النسبي (غم /100غم من وزن الجسم) لغدة فابريشيا والتوثة والطحال بعمر 7و14و21و28و35 يوماً في مجاميع التجربة (mean±SE)

المجاميع العمر/ بالايام	الاعضاء	الاولى	الثانية	الثالثة	الرابعة	الخامسة
7	غدة فابريشيا	0.244±0.27 a	0.221±0.12 a	0.213±0.42 a	0.246±0.40 a	0.25±0.21 a
	التوثة	0.223±0.06 a	0.316±0.02 a	0.291±0.06 a	0.293±0.05 a	0.296±0.03 a
	الطحال	0.082±0.12 a	0.084±0.18 a	0.069±0.06 a	0.06±0.07 a	0.064±0.08 a
14	غدة فابريشيا	0.254±0.01 a	0.246±0.01 a	0.269±0.01 a	0.259±0.04 a	0.236±0.03 a
	التوثة	0.34±0.05 Ab	0.419±0.03 ab	0.493±0.03 a	0.481±0.02 a	0.345±0.02 b
	الطحال	0.70±0.01 a	0.86±0.05 a	0.56±0.05 a	0.68±0.06 a	0.80±0.03 a
21	غدة فابريشيا	0.244±0.01 ab	0.292±0.02 a	0.243±0.01 ab	0.228±0.007 b	0.236±0.004 b
	التوثة	0.250±0.02 a	0.290±0.02 a	0.302±0.02 a	0.244±0.01 a	0.260±0.03 a
	الطحال	0.085±0.007 a	0.075±0.01 a	0.068±0.006 a	0.095±0.008 a	0.091±0.009 a
28	غدة فابريشيا	0.171±0.01 ab	0.233±0.03 a	0.185±0.01 ab	0.158±0.009 b	0.133±0.02 b
	التوثة	0.247±0.008 a	0.266±0.01 a	0.235±0.02 a	0.209±0.02 a	0.201±0.01 a
	الطحال	0.120±0.006 a	0.146±0.01 a	0.123±0.1 a	0.112±0.01 a	0.132±0.01 a
35	غدة فابريشيا	0.146±0.03 ab	0.174±0.02 ab	0.126±0.02 b	0.215±0.01 a	0.181±0.007 ab
	التوثة	0.160±0.03 b	0.246±0.02 ab	0.172±0.01 b	0.309±0.03 a	0.225±0.02 ab
	الطحال	0.109±0.008 ab	0.080±0.006 c	0.101±0.009 abc	0.116±0.009 a	0.088±0.007 bc

*الاحرف المختلفة a,b,c تعني وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمالية ($P < 0.05$)

لقد تباينت نتائج المعاملة بمادة بيوتاريت الصوديوم على وزن الجسم ، وبخلاف المتوقع أظهرت المجموعة الاولى غير المعاملة ارتفاعا معنويا في وزن الجسم بعمر 7 ايام بالمقارنة مع المجاميع الثانية والثالثة والرابعة ، وفي عمر 14 يوماً اعطت المجموعة الاولى زيادة

معنوية في معدل وزن الجسم بالمقارنة مع المجموعة الثانية فقط ، كما اظهرت المجموعتان الاولى والخامسة زيادة معنوية في وزن الجسم بالمقارنة مع المجموعة الرابعة فقط وبعمر 21 يوماً ، اما بعمر 28 يوماً فقد ارتفع معدل وزن الجسم بشكل معنوي في المجموعة الخامسة مقارنة مع المجموعة الثانية فقط ، وأخيرا لم يكن هناك اي تاثير معنوي يذكر لبيوتاريت الصوديوم على معدل اوزان الجسم وللمجاميع الخمسة عند عمر 35 يوماً (الجدول 12).

الجدول 12: معدل اوزان الجسم (غم) بعمر 7و14و21و28و35 يوماً في مجاميع التجربة (mean±SE)

المجاميع					
العمر/بالايام	الاولى	الثانية	الثالثة	الرابعة	الخامسة
7	206.5±3.3 a	179.4±5 c	193.3±3.3 b	186.8±3.8 bc	199.2±4.9 ab
14	521.8±7.7 a	490.5±7.7 b	499.5±12.4 ab	513±9.7 ab	517.6±8.4 ab
21	998.9±17.5 a	940.5±23.5 ab	977.5±25.3 ab	913.2±24.1 b	990.8±20.2 a
28	1516.8±40.6 ab	1418.5±53.4 b	1468.1±44.7 ab	1454.6±55.2 ab	1528.3±36.4 a
35	1964.6±121.7 a	2170.4±104.8 a	2079±126.5 a	2157.3±106.5 a	2130.5±53.3 a

*الاحرف المختلفة a,b,c تعني وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمالية ($P < 0.05$)

أظهرت بيانات الجدول 13 العديد من الاختلافات في معدل الزيادة الوزنية الاسبوعية لمجاميع التجربة ، ففي عمر 7 أيام بعد المعاملة حدث فرق معنوي ($P <0.05$) تمثل بتباين معدل الزيادة الوزنية في المجموعة الثانية مقارنة مع المجموعة الاولى فقط ، كما ظهر فرق معنوي آخر بعمر 21 يومًا تمثل ايضا بوجود تباين بمعدل الزيادة الوزنية في المجموعة الرابعة مقارنة مع المجاميع الاولى والثالثة والخامسة ، وأظهرت المجموعة الخامسة فرقا معنويا مقارنة بالمجموعة الثانية فقط عند عمر 28 يوماً ، وأخيرًا وفي عمر 35 يومًا أظهرت المجموعة الثانية اعلى معدل للزيادة الوزنية وبشكل معنوي ($P <0.05$) تلتها كل من المجموعة الرابعة والخامسة ثم الثالثة والاولى على التوالي.

الجدول 13: معدل الزيادة الوزنية (غم) عند 7 و 14 و 21 و 28 و 35 يومًا في مجاميع التجربة (mean±SE)

المجاميع					
العمر/بالايام	الاولى	الثانية	الثالثة	الرابعة	الخامسة
7	170.4±8.6 a	141.2±11.5 b	153.1±4.1 ab	147±7.5 ab	158.3±8.9 ab
14	312.6±4.6 a	309.6±17.3 a	305.1±13.5 a	326.3±2.6 a	320.3±22.8 a
21	477.1±23.1 a	450.6±24.5 ab	478.3±20.2 a	400.2±5.7 b	473.6±28.8 a
28	517.4±9.8 ab	478.3±28.8 b	490.2±34.6 ab	541.4±23.9 ab	538.2±28.8 a
35	446.9±17.6 d	751.2±23.6 a	610.3±17.3 c	702.2±11.5 ab	602.1±23.2 bc

*الاحرف المختلفة a,b,c تعني وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمالية ($P < 0.05$)

اما النتائج في الجدول 14 فتوضح تاثير المعاملة ببيوتاريت الصوديوم على معامل التحويل الغذائي FCR ، واختلفت قيم معامل التحويل الغذائي بين المجاميع في المُدَد المختلفة ، ففي عمر 7 ايام كان افضل معامل تحويل غذائي في المجموعة الخامسة ثم الرابعة والاولى ومن بعدها الثانية والثالثة ، وفي عمر 14 يوماً لوحظ بان المجموعة الرابعة اعطت قيمة معنوية لافضل معامل تحويل غذائي ومن بعدها المجموعة الثانية ثم باقي المجاميع ، اما بعمر 28 يوماً فان افضل قيمة لمعامل التحويل الغذائي كانت في المجموعة الرابعة تلتها المجموعة الخامسة ثم باقي المجاميع ، وفي نهاية التجربة كان لمادة بيوتاريت الصوديوم تاثير ايجابي ومعنوي في المجاميع المعاملة به فقد لوحظ بان افضل معامل تحويل كان في المجموعتين الثانية والرابعة المعاملتين بهذه المادة على التوالي ومن بعدها المجموعتان الثالثة والخامسة ثم الاولى.

الجدول 14: قيم معامل التحويل الغذائي (FCR) (غم علف / غم من وزن الجسم) عند 7 و 14 و 21 و 28 و 35 يومًا في مجاميع التجربة (mean±SE)

المجاميع					
العمر/بالايام	الاولى	الثانية	الثالثة	الرابعة	الخامسة
7	0.97±0.03 b	1.02±0.04 c	1.087±0.04 d	0.98±0.07 b	0.94±0.06 a
14	1.26±0.04 d	1.15±0.06 b	1.22±0.05 d	1.09±0.07 a	1.17±0.07 c
21	1.07±0.05 a	1.08±0.02 a	1.04±0.03 a	1.1±0.08 a	1.03±0.02 a
28	1.422±0.05 d	1.409±0.06 c	1.402±0.05 c	1.235±0.07 a	1.313±0.08 b
35	2.15±0.03 d	1.47±0.06 a	1.75±0.06 c	1.5±0.07 b	1.83±0.04 c

*الاحرف المختلفة a,b,c تعني وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمالية ($P < 0.05$)
** اقل قيمة تمثل افضل معامل تحويل غذائي.

دراسة معامل الارتباط الاحصائي (بيرسون) بين متغيرات التجربة: حيث تم من خلاله قياس العلاقة بين متغيرين مختلفين من متغيرات التجربة وان قيمة معامل الارتباط تقع بين +1 و -1 وهي القيمة التي تقرر شكل العلاقة على النحو التالي:

- قيمة معامل الارتباط بين 0-0.3 علاقة ضعيفة

- قيمة معامل الارتباط بين 0.31-0.5 علاقة متوسطة

- قيمة معامل الارتباط بين 0.51-1 علاقة قوية

علما اذا كانت العلاقة موجبة فهي طردية وان كانت سالبة فهي عكسية

العلاقة بين مستوى البيتاديفينسين-10 والكاثليسيدين B1 : بينت النتائج في الجدول 15 وجود ارتباط معنوي طردي ($r\leq0.95, P\leq0.5$) بين هذين البيتيدين وبشكل خاص في المجموعة الثانية الملقحة باللقاح التقليدي لمرض انفلونزا الطيور H9N2 والمعاملة بمادة بيوتاريت الصوديوم وفي كل المُدَد العمرية ، بينما تباينت نتائج معامل الارتباط في باقي المجاميع مع وجود فروق معنوية متفاوتة.

الجدول (15) معامل الارتباط بين البياديفينسين-10 والكاثليسيدين B1 (المربعات الحمراء تشير الى وجود ارتباط طردي ومعنوي بينهم عند مستوى احتمالية $P\leq0.05$)

الكاثليسيدين B1-	المجاميع		المجاميع	البيتاديفينسين-10																
				المجموعة الأولى				المجموعة الثانية				المجموعة الثالثة				المجموعة الرابعة				المجموعة الخامسة			
				العمر بالايام																			
	المجاميع			14	21	28	35	14	21	28	35	14	21	28	35	14	21	28	35	14	21	28	35
	المجموعة الأولى	العمر بالايام	14	0.99																			
			21		0.93																		
			28			0.98																	
			35				0.85																
	المجموعة الثانية		14					0.95															
			21						0.97														
			28							0.97													
			35								0.99												
	المجموعة الثالثة		14									0.79											
			21										0.97										
			28											0.95									
			35												0.84								
	المجموعة الرابعة		14													0.83							
			21														0.98						
			28															0.94					
			35																0.81				
	المجموعة الخامسة		14																	0.1			
			21																		0.96		
			28																			0.97	
			35																				0.88

العلاقة بين مستوى الانترفيرون كاما والاجسام المضادة لفيروس H9N2 : اظهرت نتائج التحليل الاحصائي وجود ارتباط معنوي طردي ($r \leq 0.95, P \leq 0.5$) بين مستوى الانترفيرون كاما والاضداد المضادة لفيروس الانفلونزا H9N2 في المجموعة الاولى عند عمر 14 و 28 يوماً والملقحة بلقاح الانفلونزا H9N2 التقليدي فقط ، في حين ظهرت قيم معامل الارتباط في باقي المجاميع بشكل متذبب وتفاوتت بين ارتباط طردي معنوي وغير معنوي (الجدول 16).

الجدول (16) معامل الارتباط بين الانترفيرون كاما والاجسام المضادة (المربعات الحمراء تشير الى وجود ارتباط طردي ومعنوي بينهم عند مستوى احتمالية $P \leq 0.05$)

			الانترفيرون كاما																			
			المجاميع	المجموعة الأولى				المجموعة الثانية				المجموعة الثالثة				المجموعة الرابعة				المجموعة الخامسة			
				العمر بالايام																			
				14	21	28	35	14	21	28	35	14	21	28	35	14	21	28	35	14	21	28	35
الاجسام المضادة	المجاميع																						
	المجموعة الأولى	العمر بالايام	14	0.99																			
			21		0.89																		
			28			0.96																	
			35				0.89																
	المجموعة الثانية		14					0.81															
			21						0.95														
			28							0.84													
			35								0.93												
	المجموعة الثالثة		14									0.87											
			21										0.66										
			28											0.64									
			35												0.71								
	المجموعة الرابعة		14													0.98							
			21														0.04						
			28															0.11					
			35																0.78				
	المجموعة الخامسة		14																	0.96			
			21																		0.86		
			28																			0.92	
			35																				0.88

العلاقة بين مستوى الانترفيرون كاما والكاثليسيدين B1: في الجدول 17 لوحظ وجود ارتباط معنوي طردي ($r\leq0.95, P\leq0.5$) بين مستوى الانترفيرون كاما وببتيد الكاثليسيدين B1 في المجموعة الثالثة عند عمر 14 و 28 و35 يوماً ، في حين كانت نتائج الارتباطات بينهما في المجاميع الاخرى المعاملة باللقاح فقط او مع بيوتاريت الصوديوم وكذلك المجموعة الخامسة (السيطرة) متغايرة بين معنوية تارة وغير معنوية تارة اخرى.

الجدول (17) معامل الارتباط بين الانترفيرون كاما والكاثليسيدين B1 (المربعات الحمراء تشير الى وجود ارتباط طردي ومعنوي بينهم عند مستوى احتمالية $P\leq0.05$)

الانترفيرون كاما																						
المجموعة الخامسة				المجموعة الرابعة				المجموعة الثالثة				المجموعة الثانية				المجموعة الأولى				المجاميع		
العمر بالايام																						
35	28	21	14	35	28	21	14	35	28	21	14	35	28	21	14	35	28	21	14			المجاميع
																			0.72	14	العمر بالايام	المجموعة الأولى
																		0.99		21		
																	0.94			28		
																0.90				35		
															0.95					14		المجموعة الثانية
														0.95						21		
													0.79							28		
												0.89								35		
											0.99									14		المجموعة الثالثة
										0.94										21		
									0.97											28		
								0.96												35		
							0.91													14		المجموعة الرابعة
						0.32														21		
					0.91															28		
				0.97																35		
			0.97																	14		المجموعة الخامسة
		0.13																		21		
	0.91																			28		
0.93																				35		

الكاثليسيدين B1

العلاقة بين مستوى البيتاديفينسين-10 والانترفيرون كاما: اوضحت نتائج الدراسة في الجدول 18 وجود ارتباط معنوي وطردي (r≤0.95, P≤0.5) بين ببتيد البيتاديفينسين والانترفيرون كاما في المجموعة الثالثة بعمر 21 و28 يوماً فقط ، وكذلك في المجموعة الخامسة (السيطرة) بعمر 14 و28 يوماً ، بينما كانت قيم معامل الارتباط في المجاميع الاخرى متباينة بين معنوية وغير معنوية احصائيا.

الجدول (18) معامل الارتباط بين البياديفينسين-10 والانترفيرون كاما (المربعات الحمراء تشير الى وجود ارتباط طردي ومعنوي بينهم عند مستوى احتمالية P≤0.05)

				البيتاديفينسين-10																			
			المجاميع	المجموعة الأولى				المجموعة الثانية				المجموعة الثالثة				المجموعة الرابعة				المجموعة الخامسة			
				العمر بالايام																			
	المجاميع			14	21	28	35	14	21	28	35	14	21	28	35	14	21	28	35	14	21	28	35
الانترفيرون كاما	المجموعة الأولى	العمر بالايام	14	0.7																			
			21		0.88																		
			28			0.97																	
			35				0.71																
	المجموعة الثانية		14					0.99															
			21						0.88														
			28							0.8													
			35								0.84												
	المجموعة الثالثة		14									0.85											
			21										0.99										
			28											0.98									
			35												0.67								
	المجموعة الرابعة		14													0.91							
			21														0.59						
			28															0.99					
			35																0.88				
	المجموعة الخامسة		14																	0.98			
			21																		0.86		
			28																			0.97	
			35																				0.78

العلاقة بين مستوى البيتاديفينسين-10 والاجسام المضادة : يوضح الجدول 19 وجود ارتباط طردي ومعنوي ($r=0.96, P\leq0.5$) بين ببتيد البيتاديفينسين-10 واضداد فيروس H9N2 في المجموعة الاولى الملقحة باللقاح التقليدي فقط بعمر 28 يوماً ، اما في المجموعة الثالثة والملقحة بلقاح انفلونزا الطيور المطور H9N2P فقط، فقد لوحظ وجود ارتباط طردي معنوي بين هذين المتغيرين عند عمر 14 يوماً ($r=0.98, P\leq0.5$) ، كما لوحظ وجود ارتباط معنوي وطردي بين المتغيرين ايضا في المجموعة الخامسة (السيطرة) عند عمر 21 يوماً ، بينما تباينت قيم معامل الارتباط بين المجاميع المختلفة لكن من دون فروقات معنوية تذكر.

الجدول (19) معامل الارتباط بين البيتاديفينسين-10 والاجسام المضادة (المربعات الحمراء تشير الى وجود ارتباط طردي ومعنوي بينهم عند مستوى احتمالية $P\leq0.05$)

		البيتاديفينسين-10																				
		المجموعة الأولى				المجموعة الثانية				المجموعة الثالثة				المجموعة الرابعة				المجموعة الخامسة				المجاميع
		العمر بالايام																				
	المجاميع	14	21	28	35	14	21	28	35	14	21	28	35	14	21	28	35	14	21	28	35	
الاجسام المضادة	المجموعة الأولى	0.66																				14
			0.68																			21
				0.96																		28
					0.85																	35
	المجموعة الثانية					0.86																14
							0.7															21
								0.84														28
									0.97													35
	المجموعة الثالثة									0.98												14
											0.72											21
												0.62										28
													0.65									35
	المجموعة الرابعة													0.77								14
															0.8							21
																0.94						28
																	0.93					35
	المجموعة الخامسة																	0.94				14
																			0.99			21
																				0.85		28
																					0.53	35

العلاقة بين مستوى الكاثليسيدين-B1 والاجسام المضادة: في الجدول 20 يلاحظ وجود ارتباط طردي ومعنوي ($r\leq0.95, P\leq0.5$) بين مستوى هذين المتغيرين في المجموعة الاولى بعمر 28 يوماً وكذلك في المجموعة الاولى والثانية على التوالي بعمر 35 يوماً ، اما في المجموعتين والثالثة والرابعة فقد ظهر هذا الارتباط بينهما بشكل معنوي بعمر 35 و 14 يوماً على التوالي ، في حين تباينت قيم معامل الارتباط من دون فروق معنوية تذكر بين المجاميع في المُدَد المختلفة للتجربة.

الجدول (20) معامل الارتباط بين الكاثليسيدين-B1 والاجسام المضادة (المربعات الحمراء تشير الى وجود ارتباط طردي ومعنوي بينهم عند مستوى احتمالية $P\leq0.05$)

الكاثليسيدين-B1																					
المجموعة الخامسة				المجموعة الرابعة				المجموعة الثالثة				المجموعة الثانية				المجموعة الأولى				المجاميع		
العمر بالايام																						
35	28	21	14	35	28	21	14	35	28	21	14	35	28	21	14	35	28	21	14			المجاميع
																			0.69	14	العمر بالايام	المجموعة الأولى
																		0.84		21		
																	0.98			28		
																1				35		الاجسام المضادة
															0.79					14		المجموعة الثانية
														0.82						21		
													0.93							28		
												0.99								35		
											0.82									14		المجموعة الثالثة
										0.68										21		
									0.44											28		
								0.95												35		
							0.99													14		المجموعة الرابعة
						0.87														21		
					0.84															28		
				0.91																35		
			0.92																	14		المجموعة الخامسة
		-0.21																		21		
	0.78																			28		
0.8																				35		

العلاقة بين معدل وزن الجسم ومعامل التحويل الغذائي : يلاحظ في الجدول 21 وجود عدة علاقات عكسية ومعنوية بين معدل وزن الجسم ومعامل التحويل الغذائي في كل من المجموعة الاولى الملقحة باللقاح التقليدي فقط بعمر 14 يوماً (r= - 0.98, P≤0.5) والمجموعة الثانية الملقحة باللقاح التقليدي والمعاملة ببيوتاريت الصوديوم بعمر 14 و28 يوماً (r= - 0.98, P≤0.5) (r= - 0.99, P≤0.5) على التوالي ، كما لوحظ وجود الارتباط العكسي والمعنوي نفسه (r= - 0.99, P≤0.5) في كل من المجموعة الثالثة الملقحة باللقاح المطور فقط بعمر 14 يوماً والمجموعة الرابعة (r= - 0.99, P≤0.5) الملقحة باللقاح المطور والمعاملة ببيوتاريت الصوديوم بعمر 28 يوماً والمجموعة الخامسة (السيطرة) (r= - 0.98, P≤0.5) بعمر 14 يوماً على التوالي ، بينما لوحظ وجود ارتباط طردي معنوي (r= 0.99, P≤0.5) فقط في المجموعة الاولى بعمر 35 يوماً ، فيما تباينت باقي قيم معامل الارتباط بين الطردية والعكسية من دون اي معنوية تذكر.

الجدول (21) معامل الارتباط بين معدل اوزان الجسم ومعامل التحويل الغذائي (المربعات الحمراء تشير الى وجود ارتباط طردي وإيجابي او عكسي وسلبي بينهم عند مستوى احتمالية P≤0.05)

		معدل وزن الجسم																			
	المجاميع	المجموعة الأولى				المجموعة الثانية				المجموعة الثالثة				المجموعة الرابعة				المجموعة الخامسة			
		العمر بالايام																			
المجاميع		14	21	28	35	14	21	28	35	14	21	28	35	14	21	28	35	14	21	28	35
معامل التحويل الغذائي - المجموعة الأولى	14	−0.98																			
	21		−0.8																		
	28			−0.8																	
	35				0.99																
المجموعة الثانية	14					−0.98															
	21						0.8														
	28							−0.99													
	35								−0.1												
المجموعة الثالثة	14									−0.99											
	21										−0.2										
	28											0.32									
	35												−0.41								
المجموعة الرابعة	14													−0.82							
	21														0.23						
	28															−0.99					
	35																0.84				
المجموعة الخامسة	14																	−0.98			
	21																		0.48		
	28																			0.34	
	35																				0.49

(العمر بالايام)

العلاقة بين معيار الاضداد بواسطة اختبار الاليزا واختبار تثبيط التلازن: يبين الجدول 22 وجود ارتباط معنوي طردي بين هذين العاملين في المجموعة الاولى بعمر 14 يوماً وفي المجاميع الثانية والرابعة والخامسة بعمر 28 يوماً ($r\leq0.95, P\leq0.5$) عند مستوى احتمالية ($P\leq0.5$).

الجدول (22) معامل الارتباط بين الاجسام المضادة بواسطة اختبار الاليزا واختبار تثبيط التلازن (المربعات الحمراء تشير الى وجود ارتباط طردي ومعنوي بينهم عند مستوى احتمالية $P\leq0.05$)

معيار الاجسام المضادة بواسطة اختبار تثبيط التلازن	المجاميع	العمر بالايام	المجاميع	المجموعة الأولى				المجموعة الثانية				المجموعة الثالثة				المجموعة الرابعة				المجموعة الخامسة			
				14	21	28	35	14	21	28	35	14	21	28	35	14	21	28	35	14	21	28	35
معيار الاجسام المضادة بواسطة اختبار تثبيط التلازن	المجاميع																						
	المجموعة الأولى		14	1																			
			21		0.78																		
			28			0.84																	
			35				0.87																
	المجموعة الثانية		14					0.75															
			21						0.90														
			28							0.99													
			35								0.86												
	المجموعة الثالثة	العمر بالايام	14									0.70											
			21										0.65										
			28											0.64									
			35												0.93								
	المجموعة الرابعة		14													0.87							
			21														0.91						
			28															0.97					
			35																0.64				
	المجموعة الخامسة		14																	0.88			
			21																		0.75		
			28																			0.99	
			35																				0.79

الفصل الخامس

المناقشة

Discussion

تعرض الانتاج العالمي للدواجن ولازال يتعرض الى مخاطر كبيرة بعد تفشي فايروس انفلونزا الطيور وذلك بسبب ارتفاع الخسائر الاقتصادية وانحسار التبادل التجاري بين الدول وخاصة تلك الدول التي تفشى فيها المرض ، لذلك كان من الضروري التعمق في اجراء الدراسات والابحاث على هذا الفايروس الممرض وحتى هذه اللحظة هناك انتشار مستمر لفيروس انفلونزا الطيور بسبب هجرة الطيور البرية وسوء ادارة الازمات المصاحبة لتفشي هذا الفيروس في مناطق متفرقة من العالم ، ومن هنا تم التطرق في العديد من الدراسات لهذا الفيروس وخاصة النوع H9N2 من خلال دراسة العوامل المؤثرة في الفيروس وعمليات التلقيح ونوع اللقاحات والاضافات التي قد تؤثر في فعالية الفايروس وحتى الاضافات او المكملات الغذائية التي قد ترفع من الاستجابة المناعية للطيور بهدف مقاومة الاصابة الناتجة عنه ومثال على ذلك هو دراسة التأثير المناعي لمادة بيوتاريت الصوديوم والذي تم تناوله في موضوع دراستنا ودوره في رفع الاستجابة المناعية للتلقيح بنوعين مختلفين من لقاحات انفلونزا الطيور للنوع H9N2 ، وقد ذكرت العديد من الابحاث دور بيوتاريت الصوديوم في تحسين الاداء الانتاجي للطيور وغيرها من التأثيرات الايجابية المهمة للوظائف الفسلجية للجسم ، ومن هنا جاء تصميم هذه الدراسة لتقييم دور هذه المادة في تحفيز الجوانب المناعية المختلفة للطيور الملقحة باللقاحات الخاصة بالنوع H9N2.

كانت نتائج تحفيز انتاج الببتيد الدفاعي البيتا ديفينسين-10 في الجدول 6 بواسطة بيوتاريت الصوديوم في المجموعات المعاملة قد تفاوتت بين المُدَد الأسبوعية وعُدَت هذه النتائج مرتبطة او معتمدة على وقت او طريقة او مدة اعطاء هذه المادة ولاجل ذلك اختلفت هذه النتائج تارة واتفقت تارة اخرى مع الباحثين (Sunkara *et al*, 2011) وذلك عندما وجدوا بأن التركيز العالي 0.2% من بيوتاريت الصوديوم كان له دور سلبي في انتاج الببتيدات الدفاعية للمضيف مقارنة بالتركيز الواطئ 0.1% وذكر السبب في ذلك بانه قد يعود الى ان استعمالها بالتركيز العالي قد يسبب توقفاً لنمو الخلايا وحدوث حالة موت خلوي مبرمج Apoptosis كما اشار في دراسته الى امتلاك بيوتاريت الصوديوم تأثيرات تنظيمية لانتاج الببتيدات الدفاعية

للمضيف في الوقت نفسه ، ومن هنا اوضحت هذه النتائج بان بيوتاريت الصوديوم هو منبه قوي لتحفيز انتاج هذه البيتيدات الدفاعية في الدجاج ، كما تم دعم وتاكيد هذه النتائج من قبل الباحثين (Bar-Shira and Friedman, 2006) فقد ذكروا أن الجهاز المناعي المعوي أظهر ارتفاعًا في التعبير الجيني لل mRNA الخاص بالبيتا ديفينسين بعمر يوم واحد بعد الفقس ، ثم انخفض لاحقًا في اثناء الأسبوع الأول من العمر ، فضلا عن وجود دراسات اخرى (Raqib *et al*, 2006) اثبتت قدرة هذه المادة على زيادة البيتيدات الدفاعية للمضيف كعوامل مناعية غير متخصصة ومنها CATHs و defensins وهي مجموعات رئيسية من البيتيدات الدفاعية في الثدييات وتوجد في أنسجة مختلفة من الدواجن بما في ذلك جراب فابريشيا ونخاع العظام ، وقد لوحظ ايضا ارتفاع في مستوى البيتاديفينسين-10 في المجموعة الثالثة غير المعاملة ببيوتاريت الصوديوم ويرجع ذلك إلى وجود الانماط الجزيئية المرتبطة بالعوامل الممرضة PAMPs كعوامل معززة للمناعة في لقاح H9N2P المعطل (Jang *et al*, 2020) وذلك عندما ذكر بان الجهاز المناعي للمضيف يقوم بتنشيط السايتوكينات المختلفة وفي النهاية تحفيز لسلسلة الإشارات المناعية وتنشيط التعبير الجيني للبيتيدات الدفاعية للمضيف ، لكن ظهور المستوى الثابت للبيتاديفينسين-10 بين المجاميع خلال عمر 21 و28 يوماً يمكن ان يكون ناتجًا عن الاستعمار البكتيري في الأمعاء مما يؤدي إلى زيادة مستوى التعبير عن جينات البيتا ديفينسين و CATH في الدجاج كمكونات للجهاز المناعي الفطري وهذا ما تم تفسيره من قبل (De Buck *et al*, 2004) ، اما ماحدث من ارتفاع في مستوى هذا البيتيد عند عمر 35 يومًا من التجربة فقد كان بسبب تحفيز الاستجابة المناعية الفطرية بواسطة SB مع / أو PAMPs والذي ظهر في المجاميع الثانية والثالثة والرابعة فقط والتي ادت في النهاية الى التحفيز انتاج هذا البيتيد الدفاعي وقد اتفق هذا مع الباحثين (Optiz *et al*, 2010) وذلك عندما اشاروا الى قدرة هاتين المادتين في تحفيز انتاج وتكوين البيتيدات الدفاعية للمضيف ، كما ذكر الاخير قدرة Lipopolysaccharide وهو احد انواع ال PAMPs من خلال ارتباطه بال Toll like receptors على تحفيز المناعة غير المتخصصة ومن ضمنها البيتيدات الدفاعية للمضيف.

على العكس من بيتيد البيتاديفينسين-10 فقد ارتفع مستوى بيتيد الكاثليسيدين-B1 عند عمر 21 يومًا بدلاً من اليوم 14 بعد المعاملة (الجدول7) وهو يتطابق مع ماذكره Sunkara (*et al*, 2011) وذلك عندما لاحظ وجود تنظيم في عملية انتاج الكاثليسيدين-B1 بواسطة بيوتاريت الصوديوم وحدث هذا في المجاميع الملقحة والمعاملة بهذه المادة ، إذ أثبت أن لهذه المادة دوراً فعالاً وقوياً في تحفيز وانتاج العديد من البيتيدات الدفاعية للمضيف ولكن ليس

جميعها ، كما يمكن تعليل ارتفاع هذا البيتيد بشكل خاص في المجاميع الملقحة فقط بعلاقته بفيروس أنفلونزا الطيور بشكل خاص وذلك حسب ماذكره (Peng *et al*,2020) عندما اشارو الى قابلية هذا البيتيد على الارتباط بالمستضدات السطحية للفيروس والمتمثلة بكل من HA و NA وبالتالي عمله كمضاد لفيروس الانفلونزا وذلك بمنع التحام او ارتباط ال HA لهذا الفيروس مع مستقبلات خلية المضيف وتاثيره في NA كذلك من خلال منعه من المساعدة في تحرير مكونات الفيروس الى داخل خلية المضيف نتيجة لارتفاع تركيزه في الجسم ، ان الانخفاض البسيط في مستوى هذا البيتيد في المجموعتين الاولى والخامسة بعمر 35 يومًا من التجربة ربما قد يتوافق مع دراسة (Achanta *et al*, 2012) وذلك عندما سجلوا اختلافات في مستوى الكاثليسيدينات 1و2و3 ، في حين أن الكاثليسيدينات الأربعة التي من ضمنها B1 بلغت ذروتها في جراب فابريشيا في اليوم 4 بعد الفقس مع حدوث انخفاض بطيء لها بحلول اليوم 28 من العمر والتي بينت اعتماد مستواها على عمر الطيور ، فضلا عن ذلك فإن التباين الطفيف في مستوى الكاثليسيدين B1– في الاوقات المختلفة من دراستنا لربما يعود إلى الكمية المعتدلة من التعبيرالجيني عن هذا البيتيد في الأنسجة المختلفة ، وبالتالي فإن الكاثليسيدين يمتلك القدرة على التحكم بالاستجابة المناعية عن طريق قدرته على تحفيز الخلية المتشجرة Dentric Cell ، (Yang *et al*, 2009)

ومن هنا توضح دراستنا بان استعمال البيوتاريت كمكمل غذائي ادى الى تحسين إنتاج الكاثليسيدين B1 بعمر35 يومًا بعد المعاملة ، ان فعالية كل من بيوتاريت الصوديوم والانماط الجزيئية المرتبطة بالعوامل الممرضة PAMPs الموجودة مع اللقاح ومثال عليها متعدد السكريد الشحمي البكتيري (LPS) ادت إلى تسليط الضوء على هذه المادة في تعزيز التعبير الجيني للكاثليسيدين B1 الذي يوفر قاعدة اساسية في الدفاع ضد الميكروبات الغازية في الفراخ حديثة الفقس (Achanta *et al*, 2012). قد يكون هناك تفسير آخر يوضح سبب ارتفاع الكاثليسيدين B1 وهو تاثيره الواضح والمضاد لفيروس انفلونزا الطيور مقارنةً بـالكاثليسيدينات الأخرى لأن استجابة هذا البيتيد للتلقيح بلقاح H9N2 تحدث من خلال حجز والتقاط وتجميع جزيئات الفيروس ثم اعطاء الاشارة للخلايا المتشجرة وبالتالي تحفيز لسلسلة التفاعلات المناعية المطلوبة للتعامل مع المستضد اللقاحي (Peng *et al*, 2020).

يمتلك بيوتاريت الصوديوم العديد من التاثيرات المفيدة في أداء النمو مع تقليل وجود المسببات المرضية في الدجاج وتنشيط الاستجابات المناعية ، ونتيجة لهذه الميزات فقد تم استعماله مؤخرًا في صناعة الدواجن مع مكملات الأعلاف كعامل بديل للمضادات الحيوية

وذلك اعتمادًا على كثير من التأثيرات الإيجابية والتي تشمل ايضا تعزيز الاوجه المختلفة من الجهاز المناعي، ومن هذه الميزات هو توافق نتائج الانترفيرون كاما في دراستنا (الجدول 8) مع ماذكره (Sedeik *et al*, 2019) وذلك عندما لاحظوا زيادة معنوية ($P < 0.05$) في مستوى الانترفيرون كاما في المجاميع الملقحة بلقاح مرض النيوكاسل مقارنة بغير الملقحة وخاصة في المجموعة التي تم تلقيحها بلقاح مبطل يحتوي على محددات مستضدية لكل من فيروسي إنفلونزا الطيور النوع H5 والنيوكاسل. وتوافقت هذه النتائج ايضا مع (Astill *et al*, 2018) إذاشار الى حدوث ارتفاع في التعبير الجيني للانترفيرون كاما في المجموعة الملقحة بلقاح H9N2 والمبطل بمادة البيتا بروبيولاكتون.

وعلى الرغم من عدم وجود فروق معنوية في مستوى الانترفيرون كاما بين المجاميع الاربعة الملقحة ولكن بيوتاريت الصوديوم لم يسمح بارتفاع مستواه في هذه المجاميع ، وبالتالي هذه النتائج توضح آلية عمل بيوتاريت الصوديوم بشكل عام عن طريق تعزيز التعبير الجيني للعديد من الجينات الخلوية لكنه يثبط بقوة 60٪ من الجينات المحفزة للإنترفيرون (Dai *et al*, 2022). وفي دراسة اخرى ذكر الباحثون (Chemudupati *et al*, 2020) اهمية البيوتاريت في التقليل من تحطم الانسجة نتيجة الاستجابات المناعية وكبح انتاج اشكال عديدة من الانترفيرون. كما أشارت دراسة أخرى إلى دور Microcin C7 كاحد انواع الببتيدات الدفاعية للمضيف وذلك بوصفه ببتيدًا مهمًا يعمل على تقليل التعبير الجيني للسايتوكينات موهبه للالتهاب Pro-inflammatory cytokines في اثناء الالتهابات بما في ذلك الانترفيرون كاما وهذا ما يفسر عدم وجود فروقات معنوية تذكر او ملموسة بين مجاميع التجربة مقارنة بمجموعة السيطرة غير الملقحة (Park *et al*, 2015).

في حين اختلفت نتائج القراءات للانترفيرون كاما في هذا البحث عن الدراسة التي اجراها الباحثون (Ali *et al*, 2017) وذلك عندما ذكروا بانه عند قياس مستوى هذا الانترفيرون بواسطة qRT-PCR ارتفع مابين اليوم 5-10 بعد التلقيح بنوعين من اللقاحات الزيتية المبطلة احدهما احادي (H5N1) والاخر ثلاثي (H9N2+ND+H5N1) في حين لم تلاحظ اية فروقات معنوية بين المجاميع الملقحة عند عمر 21 يوماً بعد اعطاء اللقاح. ان انتاج الكاثليسيدين-B1 في المجاميع المعاملة ببيوتاريت الصوديوم والملقحة له علاقة وطيدة بالتقليل من انتاج الانترفيرون في هذه المجاميع وهذا ما اكده الباحثون (Peng *et al* , 2020) .

يوضح الجدولان 9 و 10 الأهمية الوظيفية والفعالة لبيوتاريت الصوديوم في تحفيز إنتاج الاجسام المضادة وتوافقت هذه النتائج مع ماذكره (Sikandar *et al*, 2017b) وذلك عندما اشار الى وجود معيار مرتفع من الاجسام المضادة لمرض نيوكاسل في الافراخ المعاملة ببيوتاريت الصوديوم بواسطة اختبار تثبيط التلازن الدموي ، وهذا يوضح التأثير الايجابي لبيوتاريت لصوديوم في خلايا B و T اللمفاوية خلال عمليات عرض المستضد الفيروسي بعد عملية تحفيز للخلايا المتشجرة ، فضلا عن التأثير الداعم له على زيادة وتكاثر خلايا T المساعدة وهي T-helper-1 و T-helper-17 (Park *et al*, 2015) ، وكان تفسير حدوث الزيادة المعنوية والعالية في معيار الاجسام المضادة للمجاميع المعاملة ببيوتاريت الصوديوم مع PAMPs هو تأثير هذين العاملين في تعزيز المناعة الخلطية عن طريق تحسين معيار الاجسام المضادة لمرض الكمبورو والتهاب القصبات الخمجي ،

وقد كان للانماط الجزيئية المرتبطة بالعوامل الممرضة (PAMPs) دور فعال في رفع مستوى الاجسام المضادة في المجموعتين الثالثة والرابعة وهذا ما اتفق مع دراسة (Ploegaert *et al* ,2007) وذلك عندما قاموا باستعمال ال PAMPs عن طريق الاستنشاق واثبتوا قدرة هذه الانماط المشتقة اما بكتيريا موجبة او سالبة لصبغة الكرام مثل LPS,LTA وغيرها على تحفيز الاوجه المختلفة من الجهاز المناعي للطيور ومنها خلايا T-Helper والانترلوكينات، كما واتفقت النتائج الايجابية لبيوتاريت الصوديوم في رفع مستوى الاجسام المضادة مع ما ذكره (Zhou *et al*, 2014) نظرًا للتأثير الداعم لهذه المادة في دورخلايا B و T مع تقليل التعبير الجيني عن السيتوكينات ومن ضمنها الانترفيرون كاما.

كما اكد الباحثون (Lan *et al*, 2020) من خلال محاولتهم في دعم الاستجابة المناعية باستعمال بيوتاريت الصوديوم كمكمل غذائي إذ اوضحت دراستهم الدور المعزز لهذه المادة على الاستجابة المناعية للقاح مرض النيوكاسل والانفلونزا في الفراخ الملقحة وذلك حسب نتائج اختبار الاليزا فقد لاحظوا ان هناك ارتفاعاً واضحاً في معيار الاجسام المضادة في المجاميع الملقحة والمعاملة ببيوتاريت الصوديوم . كما ذكر الباحثون (Deepa *et al*,2018) أن البيوتاريت يعمل على انتاج البروتينات السكرية المخاطية في ظهارة الامعاء والتي تعمل كحاجز دفاعي للغشاء المخاطي وكذلك يعمل البيوتاريت على زيادة تركيز الكلوبيولينات المناعية في الدم ويقلل من نسبة الالبومين ، كما ان له دوراً في تطوير مايسمى الاعضاء اللمفية المعوية Gut Associated Lymphoid Tissue (GALT) .

إن ارتفاع معيار الاضداد في المجموعة الرابعة حدث بشكل مبكر ومنذ الاسبوع الثاني بعد التلقيح وبلغ (8.5 Log2) وهذه النتيجة اختلفت عن النتائج التي سجلها الباحثون Ali *et al*, 2017) وذلك عندما اشاروا الى ان اللقاحات المبطلة عملت على رفع مستوى الاضداد عند الاسبوع الثالث بعد التلقيح فقد بلغ المعيار (7.67 Log2) وهذا يدل على كفاءة بيوتاريت الصوديوم في تحفيز المناعة الخلطية لدى الفراخ.

ولم تتفق نتائج هذه الدراسة مع ماذكره (Ibrahim and Seioudy , 2020) حول استعمال نوعين من اللقاحات المبطلة لفيروس الانفلونزا H9N2 احدهما محلي والاخر مستورد والذي لم يتجاوز معيار الاضداد الناتج عن عملية التلقيح بهما بعمر 28 يوماً (5.2 log2) في حين بلغ معيار الاضداد عند العمر نفسه في المجموعتين المعاملتين ببيوتارت الصوديوم (9.2 log2 , 8.2 log2) على التوالي وهو معيار مرتفع واعلى بكثير مقارنة مع تلك الدراسة.

اتفقت نتائج زيادة الوزن النسبي للاعضاء اللمفية قيد الدراسة مع ما ذكره الباحثون (El-Sayed *et al*, 2011) وذلك عندما أشاروا إلى تأثير اللقاحات المعطلة المختلفة ضد انفلونزا الطيور في رفع الوزن النسبي لكل من الطحال غدة فابريشيا. إن ارتفاع وزن غدة فابريشيا جاء مطابقا ايضا لما ذكره (Eshak *et al*, 2016) وفسر هؤلاء الباحثون حدوث هذا التغيير الى تثخن النسيج الداخلي لهذه الغدة إذ إن ارتفاع الوزن النسبي للاعضاء المناعية يعد مؤشراً جيداً لاستجابة مناعية عالية .

وذلك بعدم وجود اي تاثير لبيوتاريت الصوديوم على الوزن النسبي للطحال عند المعاملة ببيوتاريت الصوديوم بتركيز 700 جزء بالمليون واختلفت فقط عند اليوم 35 من التجربة ، كما اتفقت هذه النتائج مع (Lan *et al*, 2020) عندما اشاروا الى ارتفاع اوزان هذه الاعضاء اللمفية الثلاثة خلال المدة من 21-5 يوماً بعد المعاملة ببيوتاريت الصوديوم ، وبسبب قلة المعلومات المتوافرة حول تأثير اللقاحات المبطلة لانفلونزا الطيور على الوزن النسبي لهذه الاعضاء اللمفية ،

كان هناك صعوبة في ايجاد تفسير ومناقشة اضافية لهذه النتائج ، ولكن تفسيرنا للاختلافات الكبيرة والمتفاوتة النسق للأعضاء اللمفاوية قد تكون بسبب المُدَد الزمنية التي تبدأ فيها اللقاحات المبطلة في تحفيز الجهاز المناعي في المجاميع الملقحة مقارنة مع المجموعة الخامسة إذ إن معالجة او معاملة المستضد الفيروسي المبطل في اللقاحات قيد الدراسة بواسطة خلايا الجهاز المناعي يؤدي إلى تحفيز او رد فعل مناعي في هذه الأعضاء اللمفاوية خلال عملية عرض المستضد وبدء المناعة الخلوية والخلطية مما يؤدي في النهاية إلى زيادة الوزن

النسبي لهذه الأعضاء. لكن اختلفت هذه النتائج مع ماذكره (Abonyi *et al* , 2020) وذلك عندما استعملوا بيوتاريت الصوديوم بتركيز 200 ملغم / كغم لمدة 49 يوماً في افراخ فروج اللحم لكن لم يلاحظوا اي تاثير معنوي يذكر لهذه المادة على الوزن النسبي لكل من الاعضاء الثلاثة وكذلك اللوز الاعورية.

عند البحث والتحري لمناقشة وتفسير نتائج تأثير بيوتاريت الصوديوم في معدل اوزان الجسم ، أظهرت هذه الدراسة تأثيرًا سلبيًا بسيطا لـهذه المادة على معدل اوزان الجسم في الأسبوع الأول ، واستمر هذا التاثير الطفيف في المجموعتين الثانية والرابعة بشكل خاص عند عمر 14 و 21 و 28 يومًا من المعاملة، وكان هذا مطابقا لما ذكره (Lan *et al*, 2020) وذلك عندما اشار الى ان استعمال تركيز عالٍ من بيوتاريت الصوديوم بجرعة (1.2 غم / كغم مادة علفية) خلال المدة من عمر يوم واحد وحتى 21 يوماً أدى إلى انخفاض معدل الوزن اليومي مقارنة بجرعة 0.3 غم / كغم أو جرعة 0.6 غم / كغم من بيوتاريت الصوديوم، وبالتالي فإن التركيز العالي من هذه المادة له تأثير سلبي خلال المرحلة المبكرة من التربية وقد فسر هذا التاثير السلبي الباحثون (Guilloteau *et al*, 2010) حينما اشاروا الى ان التركيز العالي من هذه المادة يتسبب بتسمم الخلايا وتوقف النمو واحداث الموت المبرمج لها ، فيما انخفض هذا الثاثير السلبي في المدة من عمر 22-45 بعد المعاملة ضمن الدراسة نفسها. في حين اختلفت النتائج مع الباحثين (M'Sadeq *et al*, 2016) حين اشاروا الى استعمال هذه المادة بتركيز2 غم / كغم مادة علفية اظهر نتائج جيدة من خلال زيادة الوزن ومعامل التحويل الغذائي والحالة العامة للفراخ،

كما وجد هناك تفسير آخر لهذه النتائج السلبية الطفيفة في اداء النمو والذي تضمن عدم كفاية عمل الإنزيمات الهضمية في الفراخ الصغيرة حديثة الفقس والمعاملة بهذه المادة ، إذ تغلف هذه المادة بالشحوم داخل الجهاز الهضمي وبالتالي فإن عملية هضم وامتصاص مكونات العلف الاساسية لا يتم تحقيقها بشكل كامل في الأسبوع الأول من العمر (Ahsan *et al*, 2016) ، كما ذكر هولاء الباحثون بأن استعمال بيوتاريت الصوديوم غير المغلف له تاثير يختلف إذ إن امتصاصه يحدث فقط في الجزء العلوي من الامعاء وتاثيره ضعيف في مايتعلق بالوزن على عكس SB المغلف الذي يعمل على زيادة مدة الامتصاص ويؤثر بصورة اكبر في خلايا (colonocytes) وطول زغابات الامعاء وفعالية الغشاء المبطن على طول الامعاء وحتى الجزء السفلي منها. لقد توافقت هذه النتائج ايضا مع ما ذكره الباحثون (Zhang *et al*, 2011) وذلك عندما لاوحظوا أن اعطاء مادة بيوتاريت الصوديوم المغلفة بكمية عند 1 غم /

كغم لم يؤدي إلى زيادة معنوية تذكر في اوزان الجسم والاس الهيدروجيني الوسط PH للجهاز الهضمي ، في حين اختلفت هذه النتائج مع النتائج الايجابية والمعنوية لبيوتاريت الصوديوم على اوزان الجسم وذلك عندما تم تفسيرها بقدرة هذه المادة في رفع مستوى الامتصاص المعوي لكل من البروتينات والمعادن حسب ما ذكره (Abonyi *et al,* 2020). إن التباين الذي حدث في اوزان المجاميع في بداية التجربة بشكل خاص قد يعزى الى تأثير الأنواع المختلفة من اللقاحات المستخدمة وهذا اتفق مع الباحثون (Essalah-Bennani *et al*, 2021) وذلك عندما ظهرت لديهم اختلافات معنوية نتيجة التلقيح بثلاثة أنواع مختلفة من لقاحات انفلونزا الطيور المبطلة . ان تفسير القيم العالية لمعدل وزن الجسم بعمر 28 و 35 يومًا في المجاميع كافة ومقاربتها للاوزان القياسية العالمية قد يكون بسبب العدد المحدود من الفراخ في كل مجموعة والجودة العالية للأعلاف والظروف القياسية للتربية. اما بعمر 35 يومًا من التجربة فلم تظهر هناك فروق معنوية بين المجاميع وهذه النتائج لم تتفق مع (Shahir *et al,* , 2013) والذي أشار إلى التأثير الإيجابي لبيوتاريت الصوديوم على وزن الجسم وذلك عندما استعمله بتراكيز من 0-2غم / كغم مادة علفية. ان الاختلاف السلبي او الايجابي الذي يظهر بين الدراسات حول تأثير بيوتاريت الصوديوم على الاوزان قد يكون مرتبطا بتوافر هذه المادة في الامعاء الدقيقة وكذلك البيئة الميكروبية التي يتعرض لها الدجاج ، كما أنه لاتوجد استجابة محسوسة ومحفزة للنمو بهذه المادة عندما يربى الدجاج في بيئة ذات محتوى منخفض من المسببات المرضية أو عندما تكون الحالة الصحية للطيور جيدة (Pascual *et al*, 2020) ربما هذا تفسير اضافي آخر لنتائج دراستنا إذ لم يلاحظ اي فرق معنوي في الاوزان في المجاميع المعاملة نتيجة للصحة الجيدة تمتعت بها الفراخ.

اما بالنسبة لنتائج الزيادة الوزنية الاسبوعية فلم تتفق هذه النتائج مع (Shahir *et al*, 2013 , Zou *et al*, 2019) وذلك عندما ذكروا عدم وجود أي تأثير لبيوتاريت الصوديوم في الزيادة الوزنية ، بينما اتفقت النتائج مع (Sikandar *et al*, 2017a) إذ كانت الفروق المعنوية واضحة في نهاية التجربة ($P < 0.05$) في المجاميع المعاملة ببيوتاريت الصوديوم ويرجع السبب في ذلك الى التأثير المحدود لـهذه المادة خلال المرحلة المبكرة من التربية نتيجة لاستعمالها بشكل غير مغلف ، واتفقت نتائج الدراسة مع الباحثين (Chamba *et al*, 2014) الذين لاحظوا أن استعمال بيوتاريت الصوديوم المغلف جزئيًا ادى الى احداث تحسن في أداء الجسم بما في ذلك تحويل هذه المادة داخل الجهاز الهضمي الى حامض البيوتريك والذي بدوره يحسن وظيفة الزغابات المعوية وبالتالي امتصاص المواد الغذائية من الامعاء. ومن التفاسير

المتعددة للتاثير الايجابي لبيوتاريت الصوديوم هي أولاً: امداد الخلايا الظهارية للأمعاء بالطاقة ، وبالتالي تحفيز تكاثر هذه الخلايا وتمايزها بشكل واضح. ثانياً: تحسين هضم المكونات العلفية. ثالثًا: الأداء الفعال لـبيوتاريت الصوديوم في تغيير بيئة الجهاز هظمي إلى الحامضية والتي تؤدي إلى تكوين بيئة مضادة للميكروبات وبالتالي التقليل من الحمل الجرثومي للعوامل الممرضة (Moquet *et al*, 2016) رابعًا: تعمل هذه المادة على التقليل من عملية الموت المبرمج للخلايا المعوية الطبيعية ، وبالتالي فإن كل هذه التأثيرات المفيدة مجتمعة قد تعلل أسباب قيام هذا المكمل الغذائي بتحسين الوزن النسبي ووظائف الخلايا المعوية والحالة المناعية للطيور (Lan *et al*, 2020)

لقد بينت نتائج الدراسة حدوث تحسن في معامل التحويل الغذائي (FCR) في المجاميع التي تمت معاملتها بمادة بيوتاريت الصوديوم وهما المجموعتان الثانية والرابعة وكان هذا التحسن واضحًا في اليوم 35 من التجربة على الرغم من أن هاتين المجموعتين تم تلقيحهما بلقاحين مختلفين ، ولذلك يرجع هذا التحسن في معامل التحويل الى قدرة بيوتاريت الصوديوم على تعزيز طبقة الخلايا الظهارية في بطانة الأمعاء وكذلك التقليل من عدد البكتيريا الضارة مع زيادة في اعداد البكتيريا النافعة من خلال تأثير حامض البيوتريك في الجهاز الهضمي (Chamba *et al*, 2014)، كما تزيد هذه المادة من تضاعف الخلايا المعوية وتحسين طول الزغابات خاصة في الاثني عشري والصائم (Antongiovanni *et al*, 2007) ، كما يمتلك بيوتاريت الصوديوم قدرة على زيادة انتاج الانزيمات الهاضمة من البنكرياس ومنها انزيم الامايليز الى التجويف المعوي والذي يسهم ايضا في زيادة كفاءة امتصاص المواد الغذائية من التجويف المعوي (Wu *et al* , 2016)، ومن التاثيرات الايجابية الاخرى لبيوتاريت الصوديوم هي قدرته على زيادة طول الزغابات في الامعاء وبالتالي زيادة في المساحة السطحية للامتصاص مع زيادة انتاج مادة الميوسين التي تعمل على حماية بطانة الجهاز الهضمي من الغزو الميكروبي الضار والممرض نتيجة زيادة الحامضية فضلا قدرته العالية على حماية الخلايا الظهارية للامعاء من الجروح مع التقليل من التأثير المرضي المجهد (alleviate enteropathic stress) وذلك بزيادة مستوى هرمون الثايروبد (Sikandar *et al*, 2017b) ، وعلى عكس نتائج دراستنا فإن النتائج التي تم الحصول عليها من قبل الباحثين (Naghizadeh *et al*, 2022 ; Pascual *et al,* 2020 ; Mahdavi and Torki , 2009) كانت قد تضمنت عدم وجود اي تاثير لبيوتاريت الصوديوم على البكتريا النافعة والقياسات الشكلية للمكونات المعوية ، إن التأثير الضعيف لبيوتاريت الصوديوم في معامل

التحويل الغذائي في الأسبوع الأول من هذه الدراسة قد يكون ناتجًا عن أن كمية المواد العلفية المستهلكة بالكامل من قبل الفراخ لا تزيد عن 20 ٪ من كمية المواد العلفية التي تستهلك في اثناء التربية بشكل عام فضلا عن الى الطعم لربما غير المقبول لـهذه المادة من قبل الفراخ لحين تكيف الطيور على استساغتها بعد 2 إلى 3 أسابيع من تناول المادة

ومن خلال استعمال بيوتاريت الصوديوم يتضح في جدول العلاقة بين البيتاديفينسين-10 والكاثليسيدين-B1 بان لهذه المادة دوراً مهماً في تحفيز انتاج انواع مختلفة من الببتيدات الدفاعية للمضيف ولكن بدرجات وكميات مختلفة قد تصل الى مئات الاضعاف عن كمياتها الاعتيادية وهذا ماذكره الباحثون (Sunkara *et al*, 2011) وهو ما يفسر التناسب الطردي والمعنوي الذي لوحظ بينهما وبشكل خاص في المجموعة الثانية.

وقد يعود الارتباط الناشئ بين الكاثليسيدين-B1 مع الانترفيرون كاما في المجاميع غير المعاملة الى ان هذا الببتيد مشتق من الخلايا الظهارية وتفرزه غدة فابريشيا بكميات كبيرة وخاصة في بداية عمر الفراخ لكون غدة فابريشيا في قمة نشاطها في اثناء المرحلة العمرية المبكرة للفراخ (Goitsuka *et al*, 2007).إن ظهور الارتباط بين الاجسام المضادة والكاثليسيديين-B1 في افراخ التجربة بشكل عام لربما يعود الى التعبير الجيني لهذا الببتيد والذي يتناوب بين ارتفاع وانخفاض خلال دورة حياة الفروج (Achanta *et al*, 2012). في حين لم يتم تفسير باقي نتائج الارتباطات وذلك لعدم وجود بحوث علمية تتبنى هكذا نوع من الارتباطات بشكل واضح وصريح، لكن التفسير العلمي والاكثر قبولا في ظهور الارتباطات المعنوية الطردية بين معايير المتغيرات المناعية المختلفة التي تم قياسها في هذه الدراسة هو نتيجة لتحفيز المناعة الفطرية بواسطة المستضدات والمتمثلة بمستقبلات التعرف على الانماط وكذلك خلايا العدلات والخلايا القاتلة الطبيعية NK والخلايا المتشجرة العارضة للمستضد والتي بدورها تنتج السايتوكينات الكيموكينات إذ تقود مجمل هذه التفاعلات المناعية الى تعاقب الاحداث وتحفيز اذرع المناعة المتخصصة بنوعيها الخلطية والخلوية (Kaiser , 2010) .

واخيرا ولتفسير نتائج الارتباط بين معدل اوزان الجسم ومعامل التحويل الغذائي إذ يعد هذا العاملان من العناصر الرئيسة في جدول الاداء الانتاجي للفروج ، ومن خلال دراسة اجراها الباحثون Berger *et al*, (2022) وجدوا أن هناك ارتباطاً ضعيفاً بين معامل التحويل الغذائي واوزان الجسم عند مقارنة خطين او نوعين مختلفين من الفروج ، ولربما يمكن تفسير هذا التباين في معامل الارتباط بوجود عوامل خارجية من ضمنها المعاملة ببيوتاريت الصوديوم مع او اللقاحات المنفردة.

الاستنتاجات

Conclusions

1- إن استعمال مادة بيوتاريت الصوديوم كان لها دور ايجابي وواضح في رفع مستويات الببتيدات الدفاعية المتخصصة للمضيف وهي , Cathlicindin-B1 Betadefensin-10 قيد الدراسة لكن بشكل متفاوت.

2- لم يكن لمادة بيوتاريت الصوديوم تأثير ملحوظ وقوي في مستوى الانترفيرون كاما في الفراخ المعاملة

3- ان اعطاء مادة بيوتاريت الصوديوم وحدها او مع H9N2P كان لها دور مهم وقوي في تحفيز انتاج الاجسام المضادة ضد المستضدات اللقاحية المستعملة في الدراسة

4- لم تظهر مادة بيوتاريت الصوديوم اي تاثير ايجابي يذكر في معدل اوزان الجسم بينما كان تاثيرها معنويا وواضحا في معدل الزيادة الوزنية ومعامل التحويل الغذائي

5- عند مقارنة نتائج لقاحي الانفلونزا المبطلين قيد الدراسة بغض النظر عن بيوتاريت الصوديوم ، لوحظ بأن اللقاح المطور اظهر معياراً مرتفعاً من الاضداد مقارنة باللقاح التقليدي وذلك بعمر 14 و21 يوماً بعد التلقيح.

التوصيات

Recomendations

1- اجراء دراسة مناعية حول دور بيوتاريت الصوديوم في تعزيز انتاج الاجسام المضادة الموضعية IgA بعد التلقيح باللقاحات المضعفة الحية بطريقة الرش.

2- محاولة استخلاص واستعمال نوع واحد او اكثر من الببتيدات الدفاعية للمضيف كعوامل مناعية مساعدة في تحضير اللقاحات تجاريا.

3- العمل على توفير مستحضرات من الببتيدات الدفاعية للمضيف وتغليفها coating بهدف استعمالها كمحفزات مناعية في صناعة الدواجن.

4- اجراء دراسات للانواع الاخرى من الببتيدات الدفاعية للمضيف وعلاقتها بالاستجابة المناعية للقاحات المبطلة او المضعفة الحية

5- دراسة علاقة الببتيدات الدفاعية بتحفيز الخلايا اللمفية B و T والخلايا المتشجرة.

6- البحث عن مواد اخرى لها تاثير محفز لانتاج الببتيدات الدفاعية للمضيف والاعتماد عليها لاستعمالها كبدائل للمضادات الحياتية.

7- دراسة آلية عمل الببتيدات الدفاعية للمضيف بانواعها المختلفة كعوامل مضادة للميكروبات.

References: **المصادر**

1- **ابراهيم اسماعيل خليل** (1987) . تغذية الدواجن. الطبعة الاولى – جامعة الموصل – العراق

- Aarbiou, J., Verhoosel, R.M., Van Wetering, S., De Boer, W.I., Van Krieken, J.H.J.M., Litvinov, S.V., Rabe, K.F., Hiemstra, P.S., 2004. Neutrophil defensins enhance lung epithelial wound closure and mucin gene expression in vitro. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 30, 193–201.

- Abbas, A.K., Lichman,A.H., Pillai Shev. 2016. Basic immunology: Functions and diorders of immune system.copyright.Alsever Inc.

- Abonyi, F.O., Attama, E.C., Okoroafor, O.N., Aronu, C.J., Ugwu, I.C., Eze, D.C., Machebe, N.S., Udoumoh, A.F. 2020.Comparative evaluation of growth performance, gut morphology, micro-flora, haematology and immune response of broilers fed with Sodium butyrate and Saccharomycescerevisiae supplemented diets. Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research. 9 . 2.

- Achanta M, Sunkara LT, Dai1 G, Bommineni YR, Jiang W, Zhang G. 2012.Tissue expression and developmental regulation of chicken cathelicidin antimicrobial peptides. J. Anim. Sci. Biotechnol. 3 (1): 15.

- Afacan, N.J., Yeung, A.T.Y., Pena, O.M., Hancock, R.E.W., 2012. Therapeutic potential of host defense peptides in antibiotic-resistant infections. Curr. Pharm. Des. 18:807–819.

- Ahsan, U., Cengíz O., Raza, I., Cacher, M. F. A., Iqbal, Z., Umar, S., and Çakir, S. 2016. Sodium butyrate in chicken nutrition: the

dynamics of performance, gut microbiota, gut morphology, and immunity. Worlds Poult. Sci. J. 72:265-275.

- Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O., 2006. Pathogen recognition and innate immunity. Cell . 24;124 (4):783-801.
- Al-Attar, M.Y. and Al-Nimma، T.M., 2008. Screening test for avian influenza virus antigen in poultry in Mosul، Iraqi Journal of Veterinary Sciences, Vol. 22, No. 2: 77-79.
- Al-Attar, M.Y., 2007. Detection of antibodies against avian influenza virus in chickens in Nineveh province/ Iraq. Iraqi J. Vet. Med. 21.1:44-39
- Al-Attar MY, Isihak F, AL baroodi SY. Detection of antibodies against avian influenza virus in wild pegions and starlings, October 2008. Journal of Animal and Veterinary Advances 7(4):448-449.
- Alexander, D.J., 2000. A review of avian influenza in different bird species. Vet. Microbial. 74, 3–13
- Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R., Flavell, R.A., 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. Nature 413:732-738.
- Alford, M.A., Baquir, B., Santana, F.L., Haney, E.F., Hancock, R.E.W., 2020. Cathelicidin Host Defense Peptides and Inflammatory Signaling: Striking a Balance, Microbiol., 27.
- Ali, Z.M., Hassan, M.A., Hussein, H.A., Ahmed, B.M., and El Sanousi, A.A. 2017. Protective efficacy of combined trivalent inactivated ISA 71 oil adjuvant vaccine against avian influenza virus subtypes (H9N2 and H5N1) and Newcastle disease virus. Vet World ;10(10):1212-1220.

- Alsharifi, M., and Mullbacher, A., 2010. The gamma-irradiated influenza vaccine and the prospect of producing safe vaccines in general. Immunol Cell Biol. 88:103–4
- Amer، M. M., Maatouq, A.M., Abdel-Alim, G.A., Awaad, M.H.H., and Kutkat, M.A., 2018. Isolation and Identification of H9N2 Avian Influenza and Newcastle Disease Viruses co-Infections in Chicken. Egypt. J. Vet. Sci. Vol. 49. No. 2, pp. 135 – 146.
- Antongiovanni, M., Buccioni, A., Petacchi, F., Leeson, S., Minnieri, S., Martini, A., Cecchi, R. 2007. Butyric acid glycerides in the diet of broiler chickens: effects on gut histology and carcass composition. Italian Journal of Animal Science. 6: 19-25.
- Aoshi, T., 2017. Modes of action for mucosal vaccine adjuvants. Viral Immunol. ;30:463–470.
- Astill, J., Alkie, T., Yitbarek, A., Abdelaziz, K., Bavananthasivam, J., Nagy, E., Petrik, J.J., Sharif, S. 2018. Induction of immune response in chickens primed in ovo with an inactivated H9N2 avian influenza virus vaccine. BMC Res Notes. 2018.11:428.
- Baeuerle, P. A. & Henkel, T., 1994. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. Annual review of immunology 12, 141-179.
- Bano, S., Naeem, K., Malik, S.A., 2003.Evalation of pathogenic potential of avian influenza virus serotype (H9N2)in chicken Avian Dis. ,47:817-822
- Bar-Shira, E. and Friedman. A. 2006. Development and adaptations innate immunity in the gastrointestinal tract of the newly hatched chick. Dev Comp Immunol.30 (10):930–41.

- Beard, C.W., Schnitzlein, W.M., & Tripathy, D.N., 1991. Protection of chickens against highly pathogenic avian influenza virus (H5N2) by recombinant fowlpox viruses. Avian Dis., 35, 356–359.
- Belanger, L., Sylvestre, C., Dufour, D., 1973. Enzyme-linked immunoassay for alpha-fetoprotein by competitive and sandwich procedures. Clin Chim Acta.;48:15–18.
- Berger, Q., Guettier, E., Bernard, J., Ganier, P., Chahnamian, M., Bihan-Duval, E., Mignon-Grasteau, S. 2022. Profles of genetic parameters of body weight and feed efciency in two divergent broiler lines for meat ultimate Ph. BMC Genomic Data. 23:18
- Bommineni, Y. R., Pham, G.H., Sunkara, L.T., Achanta, M., Zhang, G. 2014. Immune regulatory activities of fowlicidin-1, a cathelicidin host defense peptide. Mol. Immunol. 59:55–63.
- Brogden, K.A., Ackermann, M., McCray, J. P. B., Tack,. B. F.2003. Antimicrobial peptides in animals and their role in host defenses. Int. J. Antimicrob. Agents. 22(5):465-78.
- Campen, H. V., Easterday, B. C., Hinshaw, V. S.1989. Virulent avian influenza A viruses: their effect on avian lymphocytes and macrophages in vivo and in vitro. J Gen Virol. 70. (11):2887-95.
- Capua, I., and Marangon, S.2006. Control of avian influenza in poultry. Emerg Infect Dis. 12: 1319.
- Causey, D and Edwards, S.V. 2008. Ecology of Avian Influenza Virus in Birds. The Journal of Infectious Diseases. 197:29–33.
- Chamba, F., Puyalto, M., Ortiz, A., Torrealba, H., Mallo J.J., Riboty, R. 2014. Effect of Partially Protected Sodium Butyrate on Performance, Digestive Organs, Intestinal Villi and E. coli

Development in Broilers Chickens. International Journal of Poultry Science. 13.7: 390-396.

- Chemudupati, M., Kenney, A.D., Smith, A.C., Fillinger, R.J., Zhang, L., Zani, A.,Liu, S., Anderson, M.Z., Sharma, A., Yount, J.S. 2020. Butyrate Reprograms Expression of Specific Interferon- Stimulated Genes. Journal of virology. 94. 16
- Choi JG, Lee YJ, Kim YJ, Lee EK, Jeong OM, Sung HW, Kim JH, Kwon JH. 2008.An inactivated vaccine to control the current H9N2 low pathogenic avian influenza in Korea. J. Vet. Sci.: 9. 67–74. doi.org/10.4142/jvs.2008.9.1.67.
- Comalada, M., Bailon, E., De Haro, O., Lara-Villoslada, F., Xaus, J., Zarzuelo, A. & Galvez, J. 2006. The effects of short-chain fatty acids on colon epithelial proliferation and survival depend on the cellular phenotype. Journal of cancer research and clinical oncology. 132, 487-497
- Coorens, M., Scheenstra, M.R., Veldhuizen, E.J.A., Haagsman, H.P.2017. Interspecies cathelicidin comparison reveals divergence in antimicrobial activity, TLR modulation, chemokine induction and regulation of phagocytosis. Sci Rep. 7:40874.
- Crowther, J.R. 2009. Stages in ELISA. Methods Mol Biol. 516:43–78.
- Cuperus, T., Coorens, M., van Dijk, A., Haagsman, H.P.2013. Avian host defense peptides. Dev. Comp. Immunol. 41:352–69
- Dai, Z., Shang, L., Wang, F., Zeng, X., Yu, H., Liu, L., Zhou, J., Qiao, S. 2022. Effects of Antimicrobial Peptide Microcin C7 on Growth Performance, immune and Intestinal Barrier Functions, and Cecal Microbiota of Broilers. Frontiers in Veterinary. 8.

- Danial, F. A. I. 2009. Comparison of antibodies produced by vaccination with inactivated avian influenza vaccines (H9N2) experimentally in broilers using ELISA technique, Iraqi Journal of Veterinary Sciences. 23. (1):47 - 51
- De Buck, J., Van Immerseel, F., Haesebrouck, F., Ducatelle, R. 2004. Colonization of the chicken reproductive tract and egg contamination by Salmonella. J. Appl. Microbiol.97 (2):233–45.
- De la Fuente-Nunez, C., Silva, O.N., Lu, T.K., Franco, O.L. 2017. Antimicrobial peptides: role in human disease and potential as immunotherapies. Pharmacology & Therapeutics, vol. 178, pp. 132–140.
- De Vries, S., A. M. Pustjens, H. A. Schols, W. H. Hendriks, and W. J. J. Gerrits. 2012. Improving digestive utilization of fiber-rich feedstuffs in pigs and poultry by processing and enzyme technologies: A review. Anim. Feed Sci. Technol. 178:123-138.
- Deepa, K., Purushothaman, M.R., Vasanthakumar, P., Sivakumar, K. 2018. Butyric Acid as an Antibiotic Substitute for Broiler Chicken–A Review. Advances in Animal and Veterinary Sciences. 6 .2 . 63-69.
- Eisfeld, A. J., Neumann, G., Kawaoka, Y., 2014. Influenza A virus isolation, culture and identification, Nature Protocols volume 9, pages, 2663–2681.
- Ellstrom, P., Latorre-Margalef, N., Griekspoor, P., Waldenstrom, J., Olofsson, J., Wahlgren, J., Olsen, B. 2008. Sampling for low-pathogenic avian influenza A virus in wild Mallard ducks: Oropharyngeal versus cloacal swabbing. Vaccine, 26, 4414–4416.

- Elnesr, S.S., Alagawany, M., Elwan, H.A.M., Fathi, M.A. , Farag. M.R.2020. Effect of sodium butyrate on intestinal health of poultry – a review. Ann. Anim. Sci., Vol. 20, No. 1. 29–41
- El-Sayed, D.A.A., Abdou, A.M., Shalash, S.M.M., Safaa, M.H., Riad. S.A. 2011. Productivity and Immune Response of Broiler Chickens Vaccinated with Different Avian Influenza Vaccines at One or Seven Days of Age. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 5(10): 325-334.
- Eshak, M.G., Elmenawey, M.A., Atta, A., Gharib, H.B., Shalaby, B., Awaad, M.H.H. 2016. The efficacy of Na-butyrate encapsulated in palm fat on performance of broilers infected with necrotic enteritis with gene expression analysis. Vet World ;9: 450-7
- Essalah-Bennani, A., Bidoudan, Y., Fagrach, A., Balil, H., Abderrazak, E., Tligui, N., Nassik, A., Ouafaa, F.F.2021. Experimental study of the efficacy of three inactivated H9N2 influenza vaccine on broiler flocks. Ger. J. Vet. Res. 1(2): 35-45.
- Gantois, I., Ductelle, R., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Hautefort, I., Thompson, A., Hinton, J.C., Immerseel V. F. 2006. Butyrate specifically down-regulates Salmonella pathogenicity island 1 gene expression. Applied and Environmental Microbiology 72: 946-949.
- Ganz, T. 2003. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. Nature Reviews Immunology 3: 710- 720
- Goitsuka, R., Chen, C.H., Benyon, L., Asano, Y., Kitamura, D., Cooper, M.D.2007. Chicken cathelicidin-B1, an antimicrobial guardian at the mucosal M cell gateway. PNAS. 104 : 38 .15063 – 15068.

- Goulopoulou, S., Mc Carthy, C.G., Webb, R.C.2016. Toll-like receptors in the vascular system: sensing the dangers within. Pharmacol Rev. 68:142–167.
- Guan, Y., Peiris, J.S.M., Lipatov, A.S., Ellis, T.M., Dyrting, K.C., Krauss, S., Zhang,L.G., Webster, R.G., Shortridge, K.F. 2002. Emergence of multiple genotypes of H5N1 avian influenza viruses in Hong Kong SAR. PNAS . 99 .13 : 8950–8955.
- Guilloteau, P., Martin, L., Eeckhaut, V., Ducatelle, R., Zabielski, R., Immerseel, F.V. 2010. From the gut to the peripheral tissues: the multiple effects of butyrate. Nutr. Res. Rev. Dec; 23(2):366-84.
- Hancock, R.E., and Sahl, H.G. 2006. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. Nat. Biotechnol. 24: 1551–1557.
- Haney, E. F., Straus, S. K., Hancock, R. E. W. 2019. Reassessing the host defense peptide landscape. Front. Chem. 7:43.
- Harder, T.C., Teuffert, J., Starick, E., Gethmann, J., Grund, C., Fereidouni, S., Durban, M., Bogner, K.H., Neubauer-Juric, A., Repper, R., Hlinak, A., Engelhardt, A., Nockler, A., Smietanka, K., Minta, Z., Kramer, M., Globig, A., Mettenleiter, T.C., Conraths, F.J. Beer, M. 2009. Highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) in frozen duck carcasses, Germany, 2007. Emerging Infectious and Diseases, 15, 272–279.
- Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., Bauer, S., 2004. Species-specific recognition of single-stranded RNA via Toll-like receptor 7 and 8. Science 303:1526-1529

- Hilchie, A. L., Wuerth, K. & Hancock, R. E. 2013. Immune modulation by multifaceted cationic host defense (antimicrobial) peptides. Nature chemical biology 9, 761-768.
- Ibrahim, H.H. and Seioudy, M. 2020. Comparison of the efficacy of local and imported inactivated combined H9-ND virus vaccines in protection of broiler flocks against H9N2 infection in Egypt. Benha Veterinary Medical Journal 83 (2020) 52-56.
- Ivashkiv, L. B., and Donlin, L. T., 2014. Regulation of type i interferon responses. Nat. Rev. Immunol., 14: pp. 36-49.
- Jang, H.J., Monson, M., Kaiser, M., Lamont, S.J. 2020. Induction of Chicken Host Defense Peptides within Disease-Resistant and -Susceptible Lines. Genes. 11:
- Jiang, Z., Applegate, T. J. & Lossie, A. C. 2013. Cloning, annotation and developmental expression of the chicken intestinal MUC2 gene. PloS one 8, e53781.
- Kabir, S.M.L., 2009. The role of probiotics in the poultry industry. International Journal of Molecular Sciences 10: 3531-3546
- Kaiser P. 2010. Advances in avian immunology - prospects for disease control: a review. Avian Pathology (October 2010) 39(5), 309-324.
- Killingley, B., Nguyen-Van-Tam, J., 2013. Routes of influenza transmission. Influenza Other Respir. Viruses ;7:42–51.
- Kirui, J., Bucci, M.D., Poole, D.S., and Mehle, A., 2014. Conserved Features of the PB2 627 Domain Impact Influenza Virus Polymerase Function and Replication. Journal of Virology. 88, 11, 1: 5977-5986.

- Kohlgraf, K. G., Pingel, L. C., Dietrich, D. E. & Brogden, K. A. 2010. Defensins as anti-inflammatory compounds and mucosal adjuvants, Future Microbiol. 5, 99-113
- Kraidi, Q. A., Madadgar, O., Langeroudi , A. G., Karimi, V., 2017. Genetic analysis of H9N2 avian influenza viruses circulated in broiler flocks: a case study in Iraq in 2014-2015 Virus Genes. 53(2):205-214
- Krammer, F., and Palese P. 2015. Advances in the development of influenza virus vaccines. Nat Rev Drug Discov. 14:167–82.
- Lan, R.X., Li, s.q., Zhao, Z., An, L.L. 2020. Sodium butyrate as an effective feed additive to improve growth performance and gastrointestinal development in broilers, Vet Med Sci. 6(3): 491–499.
- Lee, C.W., Song, C.S., Lee, Y.J., Mo, Y.P., Garcia, M., Suarez, D.L., Kim. S.J., 2000. Sequence analysis of the hemagglutinin gene of H9N2 Korean avian influenza viruses and assessment of the pathogenic potential of isolate MS96.2000.Avian Dis. 44(3):527-35.
- Luciano, L., Groos, S., Busche, R., Von Engelhardt, W. & Reale, E., 2002. Massive apoptosis of colonocytes induced by butyrate deprivation overloads resident macrophages and promotes the recruitment of circulating monocytes. Cell and tissue research 309, 393-407.
- Lupiani, B., and Reddy, S.M., 2009. The history of avian influenza. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 32 (4):311-23.
- Lynn, D. J., Higgs, R., Lloyd, A. T., O'Farrelly, C., Herve-Grepinet, V., Nys, Y., Brinkman, F. S., Yu, P. L., Soulier, A., Kaiser, P.,

Zhang, G. & Lehrer, R. I., 2007. Avian beta-defensin nomenclature: a community proposed update, Immunol Lett. 110, 86-9.

- Lyu W, Zhang L, Gong Y, Wen X, Xiao Y, Yang H. Developmental and Tissue Patterns of the Basal Expression of Chicken Avian β-Defensins. Bio-Med Research International. 2020. P: 12. https://doi.org/10.1155/2020/2567861.
- M'Sadeq, S.A., Swick , R.A., Choct, M., Wu, S.B. 2016. The Role of Coated Sodium Butyrate on Performance of Broilers Fed High Protein and Reduced Energy Diets, Journal of Applied Animal Nutrition, Vol. 4; e2; 1 of 9
- Mahdavi, R. and Torki, M.2009. Study on usage period of dietary protected butyric acid on performance, carcass Characteristics, serum metabolite levels and humoral immune response of broiler chickens. Journal of Animal Veterinary Advances.8:1702–1709
- Marche, S., and van den Berg, T., 2010. Evaluation of different strategies for the use of ELISA tests as first screening tools for serologic surveillance of low pathogenic avian influenza in the Belgian poultry sector. Avian Dis. 54:627–631
- Melaku,M., Zhong, R., Han. H., Wan, F., Yi, B. , Zhang, H., 2021. Butyric and Citric Acids and Their Salts in Poultry Nutrition: Effects on Gut Health and Intestinal Microbiota. Int. J. Mol. Sci. 22 .10392.
- Mohamed NS, Kandeil A, AL-Zubaidy IAH, Kayali G Ali MA. 2019. Genetic and antigenic characterization of avian influenza H9N2 viruses during 2016 in Iraq. Open Vet. J.. 9 (2): 164–171. DOI: 10.4314/ovj.v9i2.12

- Moquet, P.C.A., Onrust, L., Immerseel, F.V., Ducatelle, R., Hendriks, W.H., Kwakkel, R. 2016. Importance of release location on the mode of action of butyrate derivatives in the avian gastrointestinal tract. World's Poult Sci J. 72:61-80.
- Murarolli, V.D.A., Burbarelli, M.F.C., Polycarpo, G.V., Ribeiro, P.A.P., Moro, M.E.G., Albuquerque. R., 2014. Prebiotic, Probiotic and Symbiotic as Alternative to Antibiotics on the Performance and Immune Response of Broiler Chickens. Brazilian Journal of Poultry Science. 16 .3: 279-284.
- Murphy, C.J., Foster, B.A., Mannis, M.J., Selsted, M.E., Reid, T.W., 1993. Defensins are mitogenic for epithelial cells and fibroblasts. J. Cell Physiol. 155, 408–413.
- Mutinelli, F., Capua, I., Terregino, C. & Cattoli, G. 2003. Clinical, gross, and microscopic findings in different avian species naturally infected during the H7N1 low- and high-pathogenicity avian influenza epidemics in Italy during 1999 and 2000. Avian Diseases, 47, 844–848.
- Naghizadeh, M., Klaver, L., Schönherz, A.A., Rani, S., Dalgaard, T.S., Engberg, R.M.2022. Impact of Dietary Sodium Butyrate and Salinomycin on Performance and Intestinal Microbiota in a Broiler Gut Leakage Model. Animals. 12, 111.
- Naguib, M.M., Grund, C., Arafa, A.S., Abdelwhab, E.M., Beer, M., Harder, T.C., 2017. Heterologous post-infection immunity against egyptian avian influenza virus (AIV) H9N2 modulates the course of subsequent infection by highly pathogenic AIV H5N1, but vaccination immunity does not. J. Gen. Virol. ; 98:1169–1173.

- Nagy, A., Mettenleiter, T.C., Abdelwhab, E.M., 2017. A brief summary of the epidemiology and genetic relatedness of avian influenza H9N2 virus in birds and mammals in the Middle East and North Africa. Epidemiol Infect.145:3320–3333.
- National Research Council (NRC). 1994. Nutrient requirement of poultry.9th ed. Washington: National Academy press.
- Nguyen, G.T., Rauw, F., Steensels, M. , Ingrao, F. , Bonfante, F. , Davidson, I., Lambrecht, B., 2019. Study of the underlying mechanisms and consequences of pathogenicity differences between two in vitro selected G1-H9N2 clones originating from a single isolate. BMC. Veterinary Resaerch. 50:18
- Nunnally, B. K., Turula, V.E., Sitrin, R.D., 2015. Vaccine analysis: Strategies, principles, and control. In: Inactivated Viral Vaccine, eds B. Sanders, M. Koldijk & H. Schuitemaker, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Chapter 2.
- OIE. 2015. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals-Avian Influenza. In OIE Terrestrial Manual, OIE: Rome, Italy, 2015.
- Opitz, B., van Laak, V., Eitel, J., Suttorp, N. 2010. Innate immune recognition in infectious and noninfectious diseases of the lung. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 181, 1294–1309
- Pantin-Jackwood, M.J. and Swayne, D.E., 2009. Pathogenesis and pathobiology of avian influenza virus infection inbirds. Revue scientifique et technique, 28, 113–136.olo

- Park, J., Kim, M., Kang, S.G., Jannasch, A.H., Cooper, B., Patterson, J., Kim, H.C. 2015. Short-chain fatty acids induce both effector and regulatory T cells by suppression of histone deacetylases and regulation of the mTOR–S6K pathway. Mucosal Immunol. 8:80-93.
- Pascual, A., Trocino, A., Birolo, M., Cardazzo, B., Bordignon, F., Ballarin, C., Carraro, L., Xiccato, G. 2020. Dietary supplementation with sodium butyrate: growth, gut response at different ages, and meat quality of female and male broiler chickens. Italian Journal of Animal Science.19, 1134-1145.
- Pawar, S.D., Murtadak, V.B., Kale, S.D., Shinde, P.V., Parkhi, S. S., 2015. Evaluation of different inactivation methods for high and low pathogenic avian influenza viruses in egg-fluids for antigen preparation. Journal of Virological Methods. 222: 28-33.
- Pedersen, J.C., 2008. Hemagglutination-inhibition test for avian influenza virus subtype identification and the detection and quantitation of serum antibodies to the avian influenza virus, Methods Mol Biol.436:53-66.
- Peiris, J.S., Guan, Y., Markwell, D., Ghose, P., Webster, R.G., Shortridge, K.F. 2001. Cocirculation of avian H9N2 and contemporary "human" H3N2 influenza A viruses in pigs in southeastern China: potential for genetic reassortment? J Virol 75:9679–9686.
- Peng, L., Du , W., Balhuizen , M.D., Haagsman , H.P., De Haan , C.A.M., Veldhuizen, E.J.A., 2020. Antiviral Activity of Chicken Cathelicidin B1 Against Influenza A Virus, Front Microbiol. 19;11:426.

- Perk, S., Panshin, A., Shihmanter, E., Gissin, I., Pokamunski, S., Pirak, M., Lipkind, M., 2006. Ecology and molecular epidemiology of H9N2 avian influenza viruses isolated in Israel during 2000-2004 epizootic. Dev Biol (Basel). 124:201–209.
- Piccinini, A.M., and Midwood, K.S., 2010. DAMP ening inflammation by modulating TLR signalling. Mediators Inflamm . Article ID 672395
- Ploegaert, T.C.W., Reilingh, G.D.V., Nieuwland, M.G.B., Lammers, A., Savelkoul , H.F.J., Parmentier, H.K. 2007. Intratracheally Administered Pathogen-Associated Molecular Patterns Affect Antibody Responses of Poultry. Poultry Science. 86:1667–1676.
- Qiang, F., Youxiang, D., 2011.The Effects of H9N2 Influenza A on the Immune System of Broiler Chickens in the Shandong Province, Transbound Emerg. Dis. 58(2):145-51.
- Raqib, R., Sarker, P., Bergman, P., Ara, G., Lindh, M., Sack, D.A., Islam, K.M.N., Gudmundsson, G.H., Andersson, J., Agerberth, B.2006. Improved outcome in shigellosis associated with butyrate induction of an endogenous peptide antibiotic. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.103: 9178–9183.
- Samy, A., and Naguib, M. M., 2018. Avian Respiratory Coinfection and Impact on Avian Influenza Pathogenicity in Domestic Poultry: Field and Experimental Findings. Vet Sci. 5(1): 23.
- Santhakumar, D., Rubbenstroth, D., Martinez-Sobrido, L., Munir, M. 2017a. Avian Interferons and Their Antiviral Effectors, Front. Immunol. 8. 31
- Santhakumar, D., Iqbal, M., Nair, V., Munir, M. 2017a. Chicken IFN kappa: a novel cytokine with antiviral activities Sci. Rep., 7 : 27-19

- Schenk M, Mueller C. The mucosal immune system at the gastrointestinal barrier. Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.2008. 22: 391–409. DOI: 10.1016/j.bpg.2007.11.002.
- Sedeik, M.E., Elbestawy, A.R., El-shall, N.A., Abd El-Hack, M.E., Saadeldin, I.M., Swelum, A.A. 2019. Comparative efficacy of commercial inactivated Newcastle disease virus vaccines against Newcastle disease virus genotype VII in broiler chickens. Poultry Science 98:2000–2007.
- Shahir, M.H., Moradi, S., Afsarian O., Esmaeilipour, O. 2013. Effects of Cereal Type, Enzyme and Sodium Butyrate Addition on Growth Performance, Carcass Traits and Intestinal Morphology of Broilers. Brazilian Journal of Poultry Science. 15 .3 : 169-286.
- Sikandar, A., Zaneb, H., Younus, M., Masood, S., Aslam, A., Ashraf, S., Adil, M., Rehman, H. 2017a. Protective effect of sodium butyrate on growth performance, immune responses and gut mucosal morphometry in salmonella-challenged broiler chickens. Int. J. Agri. Biol.19: 1387–1393.
- Sikandar, A., Zaneb, H., Younus, M., Masood, S., Aslam, A., Khattak, F., Ashraf, S., Yousaf, M.S., Rehman, H. 2017b. Effect of Sodium Butyrate on Performance, Immune Status, Microarchitecture of Small Intestinal Mucosa and Lymphoid Organs in Broiler Chickens. Asian Australas. J. Anim. Sci. 30, 690–699.
- Singer, R.S., and Hofacre, C.L., 2006. Potential impacts of antibiotic use in poultry production. Avian Diseases 50: 161-172.

- Sitaras, I., Spackman, E., De Jong, M.C., Parris, D.J. 2020. Selection and antigenic characterization of immune-escape mutants of H7N2 low pathogenic avian influenza virus using homologous polyclonal sera. Virus Res. 290:198188.
- Song, B., H. Li, Y. Wu, W. Zhen, Z. Wang, Z. Xia and Y. Guo .2017. Effect of microencapsulated sodium butyrate dietary supplementation on growth performance and intestinal barrier function of broiler chickens infected with necrotic enteritis. Anim. Feed Sci. Tech. 232:6-15. doi.org/10.17221/190/2019-CJAS.
- Spackman, E., Pantin-Jackwood, M., Swayne, D.E., Suarez, D.L., and Kapczynski, D.R., 2015. Impact of route of exposure and challenge dose on the pathogenesis of H7N9 low pathogenicity avian influenza virus in chickens. Virology, 477, 72–81
- Spickler, A.R., Trampel, D.W., and Roth, J., 2008. The onset of virus shedding and clinical signs in chickens infected with high-pathogenicity and low-pathogenicity avian influenza viruses. Avian Pathology, 37, 555–577
- Steel, R.G.D., Torrie, J.H., Dickey, D.A. 1997. Principles and procedures of statistics: A Biometrical Approach. 3rd ed. New York: McGraw-Hill Book Co; 350-386 p.
- Suarez, D.L., and Schultz., C.S., 2000. Immunology of avian influenza virus: a review. Dev Comp Immunol. 24:269–283.
- Sugiharto, S. 2016. Role of nutraceuticals in gut health and growth performance of poultry. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences.15:99-111.

- Suguitan, A.L., Jr Matsuoka, Y., Lau, Y.F., Santos, C.P., Vogel, L., Cheng, L.I., Orandle, M., Subbarao, K., 2012. The multibasic cleavage site of the hemagglutinin of highly pathogenic A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) avian influenza virus acts as a virulence factor in a host-specific manner in mammals. J. Virol. 86:2706–2714.
- Sunkara, L.T., 2011. Enhancing chicken innate immunity and disease resistance by boosting host defense peptide synthesis. Oklahoma State University, PhD thesis.
- Sunkara, L.T., Achanta, M., Schreiber, N.B., Bommineni, Y.R., Dai, G., Jiang, W., Lamont, S., Lillehoj, H., Beker, A., Teeter, R.J., Zhang, G. 2011. Butyrate Enhances Disease Resistance of Chickens by Inducing Antimicrobial Host Defense Peptide Gene Expression. PLOS ONE 6 (11): e27225.
- Swayne, D.E. 2004. Application of new vaccine technologies for the control of transboundary diseases. Dev Biol (Basel). 119:219–228.
- Swayne, D.E., 2007. Understanding the complex pathobiology of high pathogenicity avian influenza viruses in birds. Avian Dis.51(1 Suppl):242-9
- Takeuchi, O., and Akira, S., 2010. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. Cell. 19; 140 (6):805-20.
- Talat, S., Abouelmaatti, R.R., Almeer, R., Abdel-Daim, M.M., and Elfeil, W.K., 2020. Comparison of the Effectiveness of Two Different Vaccination Regimes for Avian Influenza H9N2 in Broiler Chicken. Animals . 14; 10(10):1875.

- Tang, X., Fu, C., Feng, J. 2000. Prevalence and control of subtype H9 of avian influenza. In: Proceedings of the 10th symposium on avian diseases, Hangzhou, September 2000, Chinese Association of Animal Science and Veterinary Medicine, pp 125–128.
- Timbermont, L., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., Van Immersee, F., 2011. Necrotic enteritis in broilers: an updated review on the pathogenesis. Avian Pathol. 40(4):341-7.
- Tizard, I. R. 2020. Adjuvants and adjuvanticity, Vaccines for Veterinarians. 2021 : 75–86.e1. Published online 2020 Jul 10.
- Tompkins, S. M., Zhao, Z., Lo, C. Y., Misplon, J. A., Liu, T., Ye, Z., Hogan, R. J., Wu, Z., Benton, K. A. , Tumpey, T.M., Epstein, S. L. 2007. Matrix protein 2 vaccination and protection against influenza viruses including subtype H5N1. Emerg. Infect. Dis. 13(3), 426–435.
- Van Der Wielen, P.W., S. Biesterveld, S. Notermans, H. Hofstra, B.A. Urlings and F. van Knapen. 2000. Role of volatile fatty acids in development of the cecal microflora in broiler chickens during growth. Appl Environ Microbiol. 66:2536–2540. DOI: 10.1128/AEM.66.6.2536-2540.2000.
- Van Dijk, A.,Veldhuizen, E.J., and Haagsman, H.P., 2008. “Avian defensins,” Veterinary Immunology and Immunopathology, vol. 124, no. 1-2, pp. 1–18.
- Van Harten, R.M., Van Woudenbergh, E., Van Dijk, A., Haagsman, H.P., 2018. Cathelicidins: immunomodulatory antimicrobials. Vaccines. 6:63.

- Vogt, H., Matthes, S., and Harnisch, S. 1982. The effect of organic acids on productivity of broilers. Archives für Geflügelkunde 46: 223-227.
- Wang, J., Tang, C., Wang, Q., Li, R., Chen, Z., Han, X., Wang, J., Xu, X., 2015. Apoptosis induction and release of inflammatory cytokines in the oviduct of egg-laying hens experimentally infected with H9N2 avian influenza virus. Vet. Microbiol. 177, 302–314.
- Wang, Y. Z., Xu, Z.R., Lin, W.X., Huang, H.Q., and Wang, Z.Q., 2004. Developmental gene expression of antimicrobial peptide PR-39 and effect of zinc oxide on gene regulation ofPR-39 in piglets. Asian Austral. J. Anim. 17:1635–1640.
- World Health Organization.2009. New influenza (H1N1) virus infections: global surveillance summary. Wkly Epidemiol. Rec, 84.
- Wu, Y., Zhou, Y., Lu, C., Ahmad, H., Zhang, H., He, J., Zhang, L., Wang, T. 2016. Influence of Butyrate Loaded Clinoptilolite Dietary Supplementation on Growth Performance, Development of Intestine and Antioxidant Capacity in Broiler Chickens. PLoS ONE . 11, e0154410
- Xiao, Y.J., Hughes, A.L., Ando, J., Matsuda, Y. 2004. A genome-wide screen identifies a single b-defensin gene cluster inthe chicken: Implications for the origin and evolution of mammalian defensins. BMC Genomics 5:56 – 66.
- Yacoub, H.A., Elazzazy , A.M., Abuzinadah, O.A.H., Al-Hejin, A.M., Mahmoud, M.M., Harakeh, S.M. 2015. Antimicrobial activities of chicken b-defensin (4and10) peptides against pathogenic bacteria and fungi. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.5.36.

- Yang, D., Chen, Q., Schmidt, A.P., Anderson, G.M., Wang, J.M., Wooters. J., Oppenheim, J.J., Chertov, O., 2000. LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. J Exp Med 192: 1069 – 1074.
- Yang, D., de la Rosa, G., Tewary, P., Oppenheim, J.J. 2009. Alarmins link neutrophils and dendritic cells. Trends in immunology 2009. 30 (11):531–537.
- Young-Speirs, M., Drouin, D., Cavalcante, P.A., Barkema, H.W., and Cobo, E.R., 2018. Host defense cathelicidins in cattle: types, production, bioactive functions and potential therapeutic and diagnosticapplications. Int. J. Antimicrob. Agents 51:813–821
- Yu, K., Choi, I.,and Yun, C.2021. Immunosecurity: immunomodulants enhance immune responses in chickens. Anim.2021. Biosci. Vol. 34, No. 3:321-337
- Zanetti, M. 2005. The role of cathelicidins in the innate host defenses of mammals. Curr. Issues Mol. Biol. 7, 179–196. doi: 10.21775/cimb.007.179
- Zasloff, M., 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. Nature .415: 389–395.
- Zhang, A.G., Lai, H.Z., Xu, J.H., Huang, W.K., Liu, Y.F., Zhao, D.W., Chen, R.A.2017a. Evaluation of the protective efficacy of Poly I:C as an adjuvant for H9N2 subtype Avian influenza inactivated vaccine and its mechanism of action in ducks. PLoS One ; 12:e0170681.

- Zhang, W., Hou, L., Song, J., Zhang, S., Li, Y., Li, J., Sun, L., Fan, W., Liu, W. 2017b. Establishment of a high sensitive indirect ELISA for detecting specific antibodies against H9 subtype avian influenza virus. Journal of Biological Engineering. 25; 33(8):1253-1264
- Zhang, W.H., Jiang, Y., Zhu, Q.F., Gao, F., Dai, S.F., Chen, J., Zhou, G.H. 2011. Sodium butyrate maintains growth performance by regulating the immune response in broiler chickens. British Poultry Science. 52: 292–301.
- Zhou, Z.Y., Packialakshmi, B., Makkar, S.K., Dridi, S. and Rath, N.C. 2014. Effect of butyrate on immune response of a chicken macrophage cell line. Veterinary Immunology and Immunopathology 162: 24-32.
- Zou, X., Ji, J., Qu, H., Wang, J., Shu, D.M., Wang, Y., Liu, T.F., Li, Y., Luo, C.L. 2019. Effects of sodium butyrate on intestinal health and gut microbiota composition during intestinal inflammation progression in broilers. Poult. Sci. 98:4449-4456.

Abstract

This study aimed to determine the effect of sodium butyrate (SB) on innate (non-specefic), cellular, and humoral immune responses in broilers vaccinated with two different avian influenza (AI) inactivated H9N2 vaccines, including classical and developed vaccines, as well as the effect of this substance on experimental bird's performance. 150 broiler chicks were divided into five groups at random (each with 30 birds). At 1 day old, the first and second groups received 0.25 ml S.C (in the neck) of classical inactivated AI H9N2 vaccine. The first group received no further therapy, while the second received SB at 1 gm/L of drinking water till the end of experiment. The third and fourth groups received the same age and mode of vaccination with the developed AI inactivated vaccine H9N2P. The third group was left untreated, while the fourth was given SB in the same way as the second group. Finally, the fifth group is the control group. SB caused a significant increase in avian beta-defensin-10 levels (2.2±0.3 and 1.5±0.2 ng/ml) at 14 days in the second and fourth groups, but not in the first and fifth. In comparison to the 1st and 5th groups, the elevation in this peptide at 35 days was noticeable in the 2nd group, reaching 2.6±0.4 ng/ml. At 35 days, the similar rise of cathlicidin-B1 occurred in the second group, reaching 543.1±114.5 ng/L. SB had a no substantial influence on interferon gamma levels in treated and/or vaccinated groups. An early significant effect with SB was identified on antibody titer against H9N2 vaccine evaluated with ELISA in group 4 chicks at 14 days (1046±465.1) compared to other groups. A significant effect of SB and/or developed H9N2P vaccine was observed, resulting in a significant increase in antibody titer of groups 2, 3, and 4 by ELISA and hemagglutination inhibition tests at 35 days, reaching (10644±631, 11518±569, 12433±937) (8±0.4,8.5±0.64, and 9.2±0.25 log2). Significant

increase in the relative weight of bursa of fabricius was detected in the 2nd group (0.292±0.02, 0.233±0.03) (gm/100gm body weight) in comparison with the 4th and 5th groups (0.228±0.007, 0.236±0.004) (0.158±0.009, 0.133±0.02) (gm/100gm body weight) at 21 and 28 days, respectively. SB had no discernible effect on body weight, but there was a significant increase in weight gain at 35 days in groups 2 (751.2±33.6) and 4 (702.2±11.5) that was greater than in the other groups. The supplementation of SB raised the food conversion ratio in the 2nd and 4th groups (1.47±0.06, 1.5±0.06) at 35 days in comparison with the other groups. Thus, we concluded that supplementation of SB with a dosage of 1 gm/L has an appositive effect on innate (nonspecific) immune responses, including avian betadefensin-10 and cathlicidin-B1, with a significant impact on humoral immune responses (antibodies), but with no influence on interferon gamma. While SB had no effect on body weight, it did have a significant effect on weight gain and feed conversion ratio in treated chicks.

University of Mosul

College of Veterinary Medicine

Effect of administration of sodium butyrate to broilers on some immunological indicators of inactivated classical and developed avian influenza (H9N2) vaccines

Mohanad Basman Ghanim Alhusainy

MSc/Thesis

Veterinary Medicine / Poultry Diseases

Supervised by

Professor

Dr. Fanar Ablahad Isihak

2022 A.D. **1444 A.H.**

Effect of administration of sodium butyrate to broilers on some immunological indicators of inactivated classical and developed avian influenza (H9N2) vaccines

A Thesis Submitted

By

Mohanad Basman Ghanim Alhusainy

To
The Council of the College of Veterinary Medicine
University of Mosul
In
Partial Fulfillment of the Requirements
For the Degree of Master of Science
In
Veterinary Medicine / Poultry Disease

Supervised by

Professor

Dr. Fanar Ablahad Isihak

2022 A.D. **1444 A.H.**