



[19] المملكة العربية السعودية SA
مدينة الملك عبدالعزيز للعلوم والتقنية

[11] رقم البراءة: ١٦٢
[45] تاريخ المنح: ١٤٢٥/٠٤/١٢ هـ
الموافق: ٢٠٠٤/٠٥/٣١ م

[12] براءة اختراع

[24] بداية سريان حقوق الملكية الفكرية: ١٤٢٥/٠٤/١٢ هـ الموافق: ٢٠٠٤/٠٥/٣١ م [30] بيانات الأسبقية: ١٩٩٠/١٢/٢٤ م أوروبا [EP] ٩٠٣١٤٢٩٧ [51] التصنيف الدولي^٧ : Int. Cl.⁷: A61K 39/12, A61K 39/255 [56] المراجع: براءة أمريكية ٤١٦٠٠٢٤ ١٩٧٩/٠٧/٠٣ م براءة أمريكية ٤٨٩٥٧١٨ ١٩٩٠/٠١/٢٣ م	[72] اسم المخترع: وليام باكسيندال [73] مالك البراءة: أكزو ان. في. عنوانه: فيليبس ٧٦، بي أم آر نهيم، ٦٨٢٤، هولندا [74] الوكيل: سليمان ابراهيم العمار [21] رقم الطلب: ٩٢١٢٠٤٣٠ [22] تاريخ الإيداع: ١٤١٢/٠٩/١٤ هـ الموافق: ١٩٩٢/٠٣/١٨ م
---	--

[54] اسم الاختراع: طعم خال من الخلايا مضاد لفيروس مرض مارك

[57] الملخص: يتعلق هذا الاختراع بطعم vaccine لوقاية الدواجن من مرض مارك Marek's Disease . يُسهّل الطعم الخالي من الخلايا cell free وفقاً لهذا الاختراع من تناوله ويخفض من احتمالات سوء الاستخدام physical abuse . كما يتعلق الاختراع بطعوم مزدوجة التكافؤ bivalent أو عديدة التكافؤ polyvalent تتضمن كذلك فيروسات أخرى تتبع مجموعة فيروس مرض مارك Marek's Disease virus group أي " HVT " .

١٠ عناصر حماية ، شكلين

طعم خال من الخلايا مضاد لفيروس مرض ماريك

الوصف الكامل

خلفية الاختراع :

يتعلق هذا الاختراع بطعم واقٍ للدجاج من مرض ماريك Marek's Disease ، وبطريقة تحضيره.

ويعتبر مرض ماريك (MD) مرضاً خبيثاً malignant يسري في الجهاز الليمفاوي lymphoproliferative في الدجاج المنزلي حيث يتسبب في حدوثه فيروس هرpes virus :herpes virus مرض ماريك (MDV). ومرض ماريك متواجد في جميع المناطق التي تنتج الدواجن في كافة أرجاء العالم. وتعاني تربية الدجاج تحت أنظمة الإنتاج المكثفة على نطاق كبير من الفاقد الضخم بسبب مرض ماريك الذي يصيب الفراريج وهي في عمر ٦ أسابيع وتزداد الإصابة بين عمر ١٢ أسبوع و ٢٤ أسبوع.

١٠ وقد تم التعرف على ثلاثة أنماط من مرض ماريك وهي: مرض ماريك التقليدي classical MD والحاد acute MD والشلل المؤقت transient paralysis. ويتميز مرض ماريك التقليدي بتضخم الاعصاب الخارجية peripheral nerve enlargement بسبب الارتشاح الليمفاوي lymphoid infiltration وانتزاع طبقة الميلين demyelination، ويعتبر الشلل paralysis هو العرض السائد اكلينيكيًا. وتختلف نسبة الوفيات ولكنها في العادة تبلغ ١٠ - ١٥ %.

١٥ وفي المرض الحاد يلاحظ وجود أورام ليمفاوية متعددة ومنتشرة multiple and diffuse lymphomatous tumours في الأعضاء الباطنية visceral organs. وتزيد نسبة الوفيات في ذلك النمط عن المرض التقليدي. وعادة ما تبلغ ١٠ - ٣٠ % بين الفراريج غير المحصنة كما قد تصاب أكثر من ٧٠ % من الدواجن في الحالة الوبائية outbreaks. وتتشابه الأعراض الممرضة في كل من النمطين من المرض، حيث تتضمن تكاثر وارتشاح infiltration الخلايا الليمفاوية الأم T المتحورة سرطانياً malignantly transformed T-lymphoblasts في الأنسجة الطبيعية، ٢٠ وفي الأعصاب الخارجية peripheral nerves في حالة المرض التقليدي والأعضاء الباطنية في

حالة المرض الحاد. وقد تبين أيضاً أن فيروس مرض ماريك هو المسئول عن الالتهاب المخي encephalitis في الفراريج الصغيرة والذي يتميز بالشلل المفاجئ sudden paralysis.

وتنقسم فيروسات مرض ماريك من الوجهة المصلية serological classification إلى ثلاثة أنواع مصلية serotypes:

٥ النوع الأول: سلالات فتاكة virulent strains من فيروس مرض ماريك لها قدرة ممرضة pathogenic وهي موجودة في الطبيعة naturally occurring، كما أنها تتسبب في حدوث الأورام tumorigenic بالدجاج، وسلالات ضعيفة غير ممرضة مشتق من تلك السلالات. النوع الثاني: سلالات غير ممرضة nonpathogenic من فيروس مرض ماريك موجودة في الطبيعة.

١٠ النوع الثالث: فيروس هربس herpes virus الخاص بالدجاج الرومي (HVT) turkeys، وهو غير ممرض للدجاج.

وهناك عدة أنواع من طعم مرض ماريك تستخدم عملياً في الوقت الحاضر. وهي تتضمن الطعوم المشتقة من النوع المصلي الأول من سلالات فيروس مرض ماريك. وقد وجد أن المرور التسلسلي serial passage لتلك السلالات يؤدي إلى فقدان القدرة الممرضة pathogenicity والمسرطنة oncogenicity بينما لا تتأثر القدرة المناعية immunogenicity لها. ١٥ وقد رُخص تجارياً باستخدام الفيروسات المضعفة المشتقة من سلالات 16 - HPRS، النمط الأولي prototype لطعم مرض ماريك (Churchill, A.E. et al., J. Gen. Virol. 4, 557, 1969) وسلالات CVI-988 وذلك على هيئة طعم مرض ماريك من النوع المصلي الأول الحي live serotype 1 MD vaccine.

٢٠ وفي العادة تكون فيروسات مرض ماريك من النوع المصلي الثاني serotype 2 MD viruses غير مسرطنة non-oncogenic، وهكذا فهي لا تتسبب في حدوث الأورام في الفراريج المحصنة. وبناء عليه فإن تلك الفيروسات لا تتطلب أية عمليات إضعاف صناعية بالتمرير التسلسلي serial passaging artificial attenuation، ونظراً لأنها تتواجد في حالتها الطبيعية

فإنها لا تنقلب إلى حالتها الفتاكة virulent form. ولقد اتضح أن سلالة HN - 1 قد نجحت في التحصين، بالإضافة إلى السلالة 1 - SB (البراءة الأمريكية رقم ٤١٦٠٠٢٤) حيث رُخص باستخدامها في الولايات المتحدة منذ ١٩٨٣ م. وإلى الآن يتم تناول النوعان المصليان الأول والثاني من الطعوم على هيئة مستحضرات محتوية على خلايا - cell associated preparations (Powell, P. C. , World's Poultry Science Journal 42, 205, 1986;) ٥
Witter, R.L. et al., Avian Diseases 31, 829, 1987; Witter, R.L. et al., Avian Diseases 34, 944, 1990; Schat, K. A. , Internews 3, 13, 1989 .

وفي المزاولة العملية فإن ذلك يعني أن تخزين ونقل الطعوم المذكورة يستوجب حفظها في النيتروجين السائل liquid nitrogen عند حوالي - ١٩٦ م وتؤدي أية أخطاء في تخزين تداول الطعم إلى نقصان فاعلية فيروسات مرض مارليك مما يؤدي إلى فشل التحصين بها. ١٠
يصف طلب براءة PCT رقم WO ٨٩/٠٠٢٢٧٨ لقاح ثنائي التكافؤ فعال في مقاومة الإصابة بفيروس مرض مارليك.

يتم تخزين هذا اللقاح (الطعم) في شكل مثلج (متجمد Frozen) ويتضمن فيروس النوع المصلي الثاني 2MD سلالة 1 - SB. بالإضافة إلى سلالة FC - 126 من HVT. ١٥
وعلى وجه الخصوص ففي الأقطار التي يستحيل عملياً التخزين فيها تحت النيتروجين فإنه لا يمكن استخدام طعوم مرض مارليك المحتوية على خلايا. علاوة على ذلك ، فإن الجزيئات particles المحتوية على MDV المعلقة suspended في راسب الطعم المحتوي على خلايا cell - associated vaccine precipitate ، تتطلب خلطاً لتجانس المعلق homogenization of the suspension قبل تناوله. وقد يؤدي الخلط غير الكافي inadequate إلى احتمال أخذ جرعة غير صحيحة من الطعم مما يتسبب في فشل التحصين. علاوة على ذلك ٢٠
فإن الطبيعة الخلوية الصارمة strictly cell - associated لتلك الطعوم تتسبب في احتمال سوء استخدامها physical abuse. ويتسبب تحطم damage الخلايا المصابة infected cells، نتيجة للظروف الأدنى ملائمة من الحصاد harvesting وطرق التجميد freezing procedures وكذلك

تذويب الامبولات thawing of the ampoules ومناولة الطعم handling في مواضع الفقس hatcheries، في تلف الخلايا وموتها وبالتالي فقدان عيارية الطعم vaccine titres.

وفي الوقت الحالي يستخدم طعم MD مشتق من HVT الذي فصل من الديكة الرومية turkeys حيث لا يسبب مرضاً apathogenic لتلك الديكة أو للدواجن العادية fowls ويتصل مناعياً antigenically بالفيروسات MD من النوعين المصلين الأول والثاني. ٥
ويستخدم HVT كثيراً كطعم واقٍ من MD حيث تستخدم السلالة FC126 على نطاق واسع. وغالباً ما يستخدم HVT على هيئة مستحضر يحتوي على خلايا، ولكن نظراً لإمكانية استخلاص كميات فعلية من الفيروس الخالي، فإن من الممكن استخدامه على هيئة طعم مجفف بالتجميد lyophilized خالٍ من الخلايا. وبسبب الضغط المستمر لخفض نسبة الفاقد الاقتصادي من MD إلى أدنى مستوى فإن الحاجة تدعو إلى تحسين قدرة efficacy طعوم MD باستمرار. وقد حدثت في زماننا هذا بوجه خاص، خسائر متزايدة في صناعة الدواجن نتيجة لوجود سلالات فتاكة من فيروس مرض ماريك سواء في الولايات المتحدة أو في أوروبا. ولهذا لم يعد التحصين بفيروس هريس الخاص بالديكة الرومية HVT كافياً للحصول على وقاية تامة من تلك السلالات المعزولة isolates حتى لو أُستعمل بجرعات كبيرة أو بعد فترات طويلة تتوسط التحصين والتعرض للإصابة. كما أن التحصين الغير كافي نسبياً بطعم HVT بمفرده قد يساعد على انتشار السلالات الفتاكة من فيروسات MD. ١٥

وهناك طريقة نافعة تستخدم حالياً للسيطرة على ذلك المرض الذي تحدثه الفيروسات الفتاكة MD، وهي تتمثل في استخدام طعوم مزدوجة bivalent أو متعددة التكافؤ polyvalent تحتوي على مخاليط mixtures من الطعوم الفيروسية التابعة لمختلف الأنواع المصلية serotypes لمجموعة فيروس MD. ولقد وجد أن الطعم المزدوج الذي يتكون من HVT و SD - 1 أو فيروس آخر من النوع المصلي الثاني من MD يحدث وقاية أفضل عن أي فيروس مكون آخر بمفرده. وقد سميت تلك الظاهرة "بالتآزر الوقائي" protective synergy تبعاً لآلية mechanism التحصين الناجم عن زيادة القدرة الوقائية لفيروس MD واحد بعد إضافة طعم فيروس ثانٍ إليه (Witter, R.L. Avian Pathology 11, 49, 1982 ; Witter, R.L. and Lee, L.F. ٢٠

, Avian Pathology 13 , 75 , 1984 ; Witter , R.L. , Avian Diseases 31 , 752 , 1987 ; Schat ,
.K. A. et al . , Avian Pathology 11 , 593 , 1982)

ومن مساوئ تلك الطريقة أن الاستفادة من ذلك التآزر تتطلب تحضير الطعم على
هيئة مستحضر خلوي cell - associated preparation حيث لا يتوافر حتى الآن طعم فيروس
٥ من النوع المصلي الثاني MD الخالي من الخلايا.

تتواجد الأجسام المضادة السلأففة الفولفء MDA , Maternal Derived Antibodies
لأففة الأنواع المصلمفة لاف فيروس MD فف الفرارفج الموفرة فجارفأ
بسبب تعرضها الطبعف فف أماكن الترففة إلى ففروسات MD و/أو ففصفنفا بالففروسات من
الأنواع المصلمفة الالفة. وعموماً فأن الفأفر الضار لـ MDA المفعانس homologous MDA
١٠ على عملفة الففصفن هو أمر معروف. فالأفسام المضادة لـ MDA ففعارض مع الطعم HVT
(الخالف من الخلايا) على مسفوى منفعض فقط. وهكذا فأن من المففء الفوصل إلى ففصفن
الدوافن فف المزارع breeder flocks بطعوم ففروس MD فففوف على HVT بفرض الفصول
على وقافة أفضل لسلافاها ضد HVT. والفطعم المسمى بالففل البففل alternate generation
vaccination هذا ففمفز بفافلففه فف ولو طعمف بطعوم مفعوفة على HVT مزدوفة أو
١٥ معفمفة . ومع ذلك فأن اسفعام هذه الاسفراطففة الفطعمفة ففطلب فوافر طعم فالف من
HVT بفرفة مقففة
Witter, R.L. and Lee, L.F. , Avian Pathology 13 , 75 , 1984 .

كما أن فوافر طعم فففوف على ففروس MD فالف من الخلايا من النوع المصلف الفاف ، مثل
SD - 1 سوف فكون نافعاً ففاً فف ذلك الفطعم المسمى بالففل البففل.

وصف عام للاففراع

٢٠ وففا لهذا الاففراع، ففوفر طعم لأمافة الدوافن ضد MD، ففمفز فكونه فففوف على
ففروسات MD من النوع المصلف الفاف الفالفة من الخلايا إضافة إلى فامل مقبول صفلافا.
وقد أوفض الاسفعام السابق لففروسات MD من النوعف المصلفف الأول والفاف أن كمفة
الففروس الفالفة من الخلايا (مقاسة بالوحدات المكونة للرقائف الأولى primary plaque

forming units : pfu كانت غير كافية التركيز مما لم يجعلها صالحة لأغراض التطعيم (البراءة الأمريكية رقم ٤٨٩٥٧١٨ ، Powell, Witter, R.L. et al. , Avian Diseases 31 , 829, 1987; P. C. , World's Poultry Science Journal 42 , 205, 1986; Schat , K. A. , Internews 3 , 13, 1989 .

٥ وقد اتضح خاصة أن فيروس SB - 1 لم ينتج كمية جوهرية significant من الفيروس الخالي من الخلايا.

شرح مختصر للرسومات

شكل ١ : هو رسم بياني نسجي لعدد الطيور النافقة في مختلف المراحل التي تلي حقنها بالجرعات المنشطة والعدد الذي وجد بالتالي مصاباً بمرض ماريك (MD) بعد الوفاة أو بالفحص المجهرى. ١٠

شكل ٢ : حدوث مرض ماريك بعد الحقن المنشط في الفراريح المحصنة وغير المحصنة.

الوصف التفصيلي

لقد وجد حالياً أن التمرير الإضافي further passaging لفيروسات MD من النوع المصلي الثاني يؤدي إلى زيادة عظيمة في كمية الفيروسات الخالية من الخلايا وأن تلك الفيروسات الخالية من الخلايا تظل محتفظة بخصائصها الوقائية protective properties. ١٥

وتلك النتيجة هي الأكثر إدهاشاً نظراً لما وضعه Witter في (Avian Diseases 31 , 1987) , 752 بجلاء عن التأثير السلبي للتمرير المتسلسل serial passage على القدرة الوقائية protective efficacy لفيروسات MD من النوع المصلي الثاني المصاحب للخلايا . كما أوضح Witter (المجلة ذاتها ، ١٩٨٧م) أن التأزر قد نقص كلما زاد عدد مرات التمرير : فلم يساعد تمرير فيروسات MD من النوع المصلي الثاني المصاحب للخلايا على زيادة كفاءة السلالة FC 126 من فيروسات HVT ، مقارنة بفيروسات MD من النوع المصلي الثاني ذات العدد التمريري المنخفض low passage number. ٢٠

ومن المدهش أنه قد وجد أن حجم الوقاية الناجمة عن HVT الخالي من الخلايا يزداد بإضافة فيروسات MD من النوع المصلي الثاني الخالي من الخلايا.

وبالإمكان الحصول على الطعم وفقاً لهذا الاختراع أولاً بالتمرير التسلسلي لفيروسات MD من النوع المصلي الثاني ذي العدد التمريري المنخفض، أي من فيروسات MD من النوع المصلي الثاني الذي لا ينتج كمية كافية من الفيروسات الخالية من الخلايا بحيث تصير مفيدة في أغراض التطعيم عندما تزرع في مزرعة خلوية cell culture ملائمة، ثم زراعة الفيروسات التي يحصل عليها هكذا ثم ثالثاً تحضير الفيروسات الخالية من الخلايا المحصول عليها من المزرعة الخلوية على هيئة مستحضر له خصائص مناعية immunizing properties.

وبالإمكان اشتقاق الطعم الخالي من الخلايا وفقاً لهذا الاختراع من سلالة من فيروسات MD من النوع المصلي الثاني، مثل سلالة HPRS B-24 وسلالة SB-1 (Schat et al. ، البراءة الأمريكية ٤١٦٠٠٢٤؛ متوافرة تجارياً من شركة Intervet Inc.) و سلالة HN-1 . 1 Cho, B.R. and Kenzy, S. G. Appl. Microbiol. 24 , 299 , 1972 . أو المعزولات isolates التي وصفها Witter مثل سلالة 30/B/1 (البراءة الأمريكية رقم ٤٨٩٥٧١٨ ، Avian Diseases 31 752, 1987 وسلالة SB-1 هي السلالة المفضلة غالباً. ١٥

وللتمرير المتسلسل للفيروسات MD من النوع المصلي الثاني، يمكن الاستفادة من الطرق المعروفة في ذلك المجال. وباختصار، تنمي الفيروسات في مزرعة خلوية مناسبة ثم يتم حصدها منها وتطعم inoculated في وسط يحتوي على مزرعة خلوية طازجة. تعرض فيروسات من النوع المصلي الثاني إلى عدة تمريرات متسلسلة في مزرعة خلوية يحصل على كمية يمكن استخدامها من الفيروس الخالي من الخلايا ومن ثم تحضيره على شكل طعم. ٢٠

ومن نماذج المزارع الخلوية المناسبة للتمرير المتسلسل مزرعة كل inter alia من كلية الفروج chick kidney (CK) والخلايا الليفية الأم من جنين الفروج (CEF) chicken embryo fibroblast والخلايا الليفية الأم من جنين البط (DEF) duck embryo fibroblast .

وبنحو أخص، يمكن زراعة فيروسات MD من النوع المصلي الثاني فوق طبقات مفردة monolayers من مزارع CK و CEF و DEF لمدة ٢٤ ساعة إلى ٤٨ ساعة ثم الاحتفاظ بها عند ٣٧ م لعدة أيام مع تغيير وسط التنمية على فترات. ومحتويات وسط التنمية هي على سبيل المثال ما يلي:

٥ وسط النور القاعدي (Eagles basal medium (BME وشوربة فوسفات التربتوز Tryptose phosphate broth وبيكربونات الصوديوم sodium bicarbonate ومصل جنين البقر Bovine fetal serum والمضادات الحيوية antibiotics.

تعتبر الخلايا ممررة passaged عندما يصاب أكثر من ٧٥% من خلايا الطبقة المنفردة monolayer بالفيروس. وعند نهاية فترة التحضين incubation period، تغسل كتلة الخلايا بأكملها بمحلول ملح فوسفات منظم phosphate-buffered saline ثم تعلق مع trypsin ويعاد تعليقها في كمية صغيرة من وسط الزراعة ثم تعاد تنميتها على هيئة طبقة منفردة كما سبق وصفه. يعتمد عدد التمريرات المتتالية على كمية الفيروس الخالي التي يحصل عليها من المزرعة وعلى الاحتفاظ بالخصائص المناعية والمعدية immunogenic and infectious properties للفيروس العابر. وبالإمكان غسل خلايا العبور الأخير ثم تعليقها في التريسين وطردها مركزيا centrifuged ثم تعليقها في كمية صغيرة من وسط التنمية المحتوي على ١٥ dimethyl sulfoxide (DMSO).

ويمكن تجميد ذلك المستحضر ببطء حتى يصل إلى درجات حرارة النيتروجين السائل (- ٧٠ م) لكي يستخدم كفيروس استزاعي seed virus culture.

ويمكن الحصول على مستحضرات خالية من الخلايا بشكل نموذجي وفقاً للطريقة السالف وصفها، حيث تبلغ تركيزاتها TITRE $10^4 - 10^6$ pfu / مل. ٢٠

إن عدد التمريرات اللازمة للحصول على فيروسات MD من النوع المصلي الثاني التي يمكنها إنتاج كميات كافية من الفيروس الخالي من الخلايا، يعتمد كلياً على سلالة الفيروس MD من النوع المصلي الثاني والكمية المرغوبة أو تركيز الفيروس الخالي من الخلايا.

يتراوح عدد التمريرات النموذجية من فيروسات MD من النوع المصلي الثاني التي تلزم لتحضير طعم وفقاً لهذا الاختراع بين ٢٥ و ٤٠ يفضل بين ٢٨ و ٣٥. وتبعاً لذلك، تنمى مزارع دورية roller cultures من فيروس MD من النوع المصلي الثاني المزروع في خلايا CEF، وذلك بتطعيمها بفيروس معه خلايا أو خالٍ من الخلايا، يتم الحصول عليه كما سلف وصفه، بعد ٢٤ ساعة من التحضين. ٥

وبعد فترة تحضين تبلغ عدة أيام أخرى يلقي الوسط الرائق supernatant ثم تؤخذ الخلايا trypsin المخلوط مع versene وبعدئذ يمكن ترسيب الخلايا بالطرد المركزي ثم يلقي الرائق.

ولتحضير مستحضر خالٍ من الخلايا يتم تعليق الخلايا المترسبة deposited cells في محلول منظم buffer مثل ملح الفوسفات - المنظم (PBS) phosphate - buffered saline، أو يفضل في وسط يحتوي على مادة مثبتة Stabilizer وهي SPGA Bovarnik et al., J. Bacteriology 59, 509, 1950 التي تعتبر أكثر المواد المثبتة تفضيلاً.

وبالإمكان تمزيق الخلايا cell disruption بعدة طرق مثل استخدام الموجات فوق الصوتية sonication أو الطرد المركزي مع التجميد freeze-thaw. ويمكن تقييم الخلايا السليمة intact cells المتواجدة بفحصها في جهاز عد خلايا دموية hemocytometer. ويمكن تعبئة المستحضر الناتج من الموجات فوق الصوتية أو المجدد مركزياً، في قنينات vials، ثم تجفيفه بالتجميد freeze - drying إذا رغب في ذلك في وجود EDTA. وقبل التجفيف تنزع البقايا الخلوية اختياريًا بالترشيح filtration أو بالطرد المركزي centrifugation.

وبالإمكان خلط الفيروسات MD من النوع المصلي الثاني التي حصل عليها بالطريقة السالف وصفها مع طعوم على هيئة فيروسات حية live viruses أو فيروسات غير منشطة inactivated viruses. ٢٠

وبالإمكان تحضير الطعوم المحتوية على فيروسات حية وتسويقها على هيئة معلق suspension أو مسحوق مجفف بالتجميد lyophilized. ويفضل احتواء الطعوم المحففة

بالتحميد على مادة مثبتة أو أكثر. والمواد المثبتة الملائمة هي على سبيل المثال SPGA (Bovarnik et al., J. Bacteriology 59, 509, 1950) والكربوهيدرات carbohydrates (مثل sorbitol و mannitol والنشا starch و sucrose و dextran و glucose) والبروتينات proteins (مثل albumin و casein) أو نواتج تحطيمها degradation products أو المنظمات التي تحتوي على بروتينات (مثل فوسفات المعادن القلوية alkali metal phosphates). وإذا رُغب في ذلك يمكن إضافة مركب له فاعلية إضافية مساندة adjuvant activity، أو أكثر. والمركبات الملائمة لهذا الغرض هي على سبيل المثال خلات فيتامين هـ vitamin - E acetate على شكل مستحلب زيت / ماء و aluminium hydroxide والفوسفات phosphate أو الأكسيد oxide والزيت المعدني mineral oil (مثل Bayol F^(R) و 52^(R) Marcol 52^R والصابونينات saponins). ١٠

الهدف من تعطيل نشاط فيروسات MD هو القضاء على تكاثرها. وعموماً يمكن التوصل إلى ذلك بالوسائل الكيميائية أو الفيزيائية. ويمكن إجراء تعطيل النشاط الكيميائي بمعالجة الفيروسات بالخمائر enzymes على سبيل المثال أو بـ formaldehyde أو β - propiolactone و ethylene - imine أو بمشتقاتها، أو بمذيب عضوي (مثل halogenated hydrocarbon) و/أو بالمنظفات detergents (مثل Tween^(R)، Triton X^(R)، sodium cetyl trimethylammonium salts أو sulphobetain، desoxy-cholate). وعند الضرورة تجري معادلة المادة المعطلة للنشاط فيما بعد، فالمادة المعطلة (المتعطلة) بـ formaldehyde مثلاً يمكن معادلتها thiosulphate. كما يمكن إجراء تعطيل النشاط فيزيائياً بشكل مفضل، بتعريض الفيروسات إلى إشعاعات غنية بالطاقة energy-rich radiation مثل الأشعة فوق البنفسجية UV light وأشعة اكس X - radiation أو أشعة جاما γ - radiation. وعندما يرغب في ذلك، يمكن إرجاع الأس الهيدروجيني (pH) إلى قيمة تناهز حوالي ٧ بعد المعالجة. ٢٠

وعادة ما يضاف عامل مساعد adjuvant (مثل الذي سبق ذكره) كما تضاف عوامل استحلاب emulsifiers أو أكثر عندما يرغب في ذلك مثل Tween^(R) و Span^(R)، إلى المادة الفيروسية المعطلة النشاط.

يتم تعاطي الطعم بجرعة فعالة effective dosage من العامل الفيروسي viral agent (أي) الكمية المناعية من مادة الفيروس الخالي من الخلايا)، والتي تُحدث المناعة immunity في الفروج ضد أية عدوى بالفيروس MD الفتاك. تعرف المناعة بأنها حدوث مستوى عالٍ جوهرياً من الوقاية protection في مزرعة الدواجن بعد تحصينها، مقارنة بمجموعة أخرى غير محصنة. ٥

وبالنسبة للطعوم الحية فإن معدل الجرعة لكل فروج dose rate per chick قد يتراوح بين ١ - ٦ لوغاريتم pfu 1 to 6 logs.

وبشكل نموذجي، يتم إعطاء الطعم الحي وفقاً لهذا الاختراع بجرعة قدرها ٢,٢ لوغاريتم pfu من الفيروس الخالي من الخلايا، ويفضل بجرعة قدرها ٢,٧ لوغاريتم pfu من الفيروس الخالي من الخلايا، والأكثر تفضيلاً بجرعة قدرها ٣,٢ لوغاريتم pfu. ١٠

وفي حالة الإعطاء بالطريق الطبيعي (الرش والتنقيط في العين والأذن spray, eye and nose drop) قد تُستخدم جرعة قدرها 10^{-6} - 10^{-7} pfu / فروج.

وقد تحتوي الطعوم المعطلة النشاط على مكافئ من مولدات الأجسام المضادة antigenic equivalent يتراوح بين ٣ و ٧ لوغاريتيمات pfu لكل جرعة فروج، ويفضل أن يتراوح بين ٤ و ٦ لوغاريتيمات pfu لكل جرعة فروج، ويفضل أن يتراوح بين ٤ و ٦ لوغاريتيمات pfu. ١٥

ويمكن إعطاء أو تناول الطعوم وفقاً لهذا الاختراع بالرش spray باستخدام مركبات عالية titre أو بالتنقيط في العين eye drop أو الأنف nose drop أو بطريق الفم orally (في ماء الشرب مثلاً) أو بواسطة الحقن العضلي intramuscular injection أو تحت الجلد subcutaneous أو في المبيض in ovo عند أي عمر، بعد إن يكتسب الفروج قدرة على تكوين المناعة immunocompetence. وفي العادة يعطي الطعم للفروج بعد ٢٤ - ٢٨ ساعة من الفقس hatching. ٢٠

ويتمثل جانب آخر من هذا الاختراع في اتحاد combination فيروسات MD الخالية من الخلايا من النوع المصلي الثاني cell - free MD serotype مع فيروسات HVT الخالية من

الخلايا cell - free HVT على شكل طعم مزدوج التكافؤ bivalent vaccine. ومن المدهش أنه قد وجد أن الفيروسات MD الخالية من الخلايا من النوع المصلي الثاني قد احتفظت بقدرتها على مساعدة كفاءة efficacy فيروسات HVT وذلك بالرغم من زيادة مرحلة التمرير stage .of passaging

٥. وتستخدم فيروسات MD من النوع المصلي الثاني الخالية من الخلايا من سلالة SB - 1 بنحو خاص متحدة مع الفيروسات HVT الخالية من الخلايا.

وقد يكون فيروس HVT الذي يخلط في الطعم وفقاً لهذا الاختراع، من أية سلالة متوافرة مثل FC 126 أو THV PB1 (المتوافرة تجارياً من Intervet Inc) ويتضمن فيروس HVT اختيارياً مورثة غريبة foreign gene تشفر encoding مولداً للأجسام المضادة antigen لمولدات مكونات ممرضة للدواجن poultry pathogen وذلك بإقحامها insertion في جسم الفيروس viral genome التابع فيتكون بذلك طعم عديد التكافؤ polyvalent.

كما يتضمن الاختراع طعوماً متحدة تتضمن بالإضافة إلى طعم MD الخالي من الخلايا من النوع المصلي الثاني طعوماً من مادة فيروسات مشتقة من مولدات مكونات ممرضة pathogen أخرى للدواجن. كما يمكن إعطاء أو مناوله فيروس MD من النوع المصلي الثاني الخالي من الخلايا متحداً مع طعم فيروس يختار من مجموعة تتضمن فيروس مرض Newcastle Disease Virus (NDV) وفيروس التهاب الشعب المعدي Infectious Bronchitis virus (IBV) وفيروس مرض الحوصلة المعدي Infectious Bursal Disease virus (IBDV).

مثال ١

أ. تمرير فيروسات MD من النوع المصلي الثاني SB - 1 و B - 24.

٢٠. يطعم فيروس SB - 1 أو B - 24 المصاحب للخلايا فوق مزارع SPF عمر ٢٤ ساعة لخلايا جنين فروج منمأة في أطباق Falcon Petri قطرها ٦ سم (١,٥ × ١٠^٦ خلية جنينية / طبق CEF / dish). يطعم ٠,١ مل من الطعم المحتوي على ١٠٠ pfu على الأقل في وسط زرع أنسجة tissue culture medium (٥ مل) في

أطباق ثم يستقر الفيروس المصاحب للخلايا على الطبقات المنفردة monolayer من الخلايا فيصيبها. وبعد مرور ٥ أيام من التحضين عند ٣٨ م في جو من ثاني اكسيد الكربون (CO₂) ٥٪، تنتزع الخلايا من الأطباق كما يلي:

١. سكب الوسط،

٥. ٢. إضافة trypsin versen في محلول PBS لفك الخلايا الملتصقة بطبق Petri،

٣. إلقاء مخلوط trypsin versen PBS قبل تفكك الخلايا cells detach من طبق Petri،

٤. غسل الخلايا من الأطباق بواسطة التنمية growth medium.

يستخدم معلق الخلايا المصاحبة للفيروسات التي حصل عليها من الخطوة ٤ كطعم للتمرير التالي في خلايا CEF. تمرر الفيروسات ٥ مرات بعد استقبالها كما سبق وصفه. ومن العبور السادس (بالإضافة إلى التمريرات السالفة) تم ضبط فترة الحضانة فقدرت بأربعة أيام.

النتائج:

SB-1

١٥. تم تمرير فيروس SB-1 الذي حصل عليه من جامعة Cornell، عشرة مرات بالفعل على المستقبل (٧ مرات تمرير في مزارع أنسجة في خلايا CEF و CK، متبوعة بتمريرتين في فراريج SPF ثم تمريرة أخرى في خلايا CEF).

عندما عولجت الخلايا المصابة بشدة heavily infected cells (مستوى التمرير العاشر) في طبق Petri بغرض الحصول على فيروس خالي من الخلايا ثم أعيد تعليقها في ٥ مل من SPGA، لم يلاحظ أي فيروس حي خالي من الخلايا في تخفيف ١٠^{-٢} عند المعايرة. وعندما مررت SB-1 ٢١ مرة بعد استقبالها من جامعة Cornell، ثم عولجت بالطريقة ذاتها حصل على تركيز قدره ١٠^{٤.٩} pfu / مل من الفيروس الحي الخالي من الخلايا.

وقد أنتجت فيروسات SB-1 التي مررت ٢٦ مرة تركيزاً يصل إلى ١٠^{٦.٠} pfu / مل من الفيروس الحي الخالي من الخلايا. وقد احتفظت تلك الفيروسات SB-1 الخالية من الخلايا بقدرتها على عدوى الفراريج وإحداث فيروسية الدم viraemia والانتشار في الطيور

الموجودة برفقة الطيور المصابة، كما كانت قادرة على إحداث استجابة مناعية وقائية
protective immune response.

B - 24

عندما عولجت الخلايا المصابة بشدة من التمرير التاسع لـ B - 24 للحصول على
٥ فيروس خالي من الخلايا كما سبق وصفه، كان التركيز أقل من 10^2 pfu / مل. وعندما
أُختبرت الخلايا المصابة بشدة من التمرير ٣٥ كان التركيز المحصول عليه هو $10^{4,7}$ pfu /
مل.

ب . تحضير طعم MD من فيروسات SB - 1 الخالية من الخلايا من النوع المصلي الثاني

١٠ طعمت مزرعتان دوريتان roller culteres (١٧٥٠ سم^٢) من خلايا CEF ٢٠٠ ×
١٠ في الوسط مع ١ مل من الفيروس المعدي المصاحب للخلايا SB - 1، الذي حصل عليه
بالطريقة السالفة الذكر، بتركيز يبلغ 10^9 pfu / مل بعد ٢٤ ساعة من التحضين. وبعد
فترة تحضين إضافية بلغت ٥ أيام، القي الوسط الرائق supernatant medium ثم أخذت الخلايا
مخلوط trypsin versene. رسبت الخلايا بالطرد المركزي ثم القي المحلول الرائق وخلطت
الخلايا مع ٢٠ مل من المثبت SPGA ثم عرضت للموجات فوق الصوتية لمدة ٢٠ ثانية. عبئ
١٥ المستحضر المعالج بالموجات فوق الصوتية في قنينات سعة كل منها ١ مل ثم جفف بالتجميد
freeze dried.

التركيز قبل Titre pre التحفيف بالتجميد $10^{4,8}$ pfu / مل.

التركيز بعد Titre post التحفيف بالتجميد 10^9 pfu / مل.

٢٠

مثال ٢

كفاءة طعم MD من النوع المصلي الثاني الخالي من الخلايا.

طعمت ثلاثة مجموعات من الفراريج القابلة للعدوى بالفيروسات MDA من الأنواع المصلية الثلاثة serotype 1, 2 and 3 بجرعات مختلفة من فيروس SB - 1 الخالي من الخلايا عند عمر يوم واحد (بالحقن بالعضل i/m). وقد كانت الجرعات المستخدمة هي ١٧٦ pfu / فروج و ٤٦٠ pfu / فروج و ١٥٢٠ pfu / فروج.

٥ اختبرت كفاءة الطعوم بتحديد نسبة الفيروسات في الدم viraemia. ونظراً لثبوت انتشار العدوى بين الفراريج غير المطعمة عندما تخالط فراريج محصنة بـ SB - 1 (تمرير مرتفع high passage) وذلك بنسبة ١ إلى ٣ من الطيور المتعايشة في عمر أسبوعين بعد التطعيم postinoculation حيث كانت جرعة الطعم vaccination هي ٢٠٠ pfu من الفيروس المصاحب للخلايا cell - associated virus، وذلك من التجارب السابقة، فقد قررنا ألا نختبر انتشار الفيروس بالدم بعد أسبوعين. ١٠

أخذت مساحات جلدية بعد مرور فترة أسبوع وأسابيع من التطعيم ثم اختبرت بالطرق القياسية فوق خلايا CEF لوجود فيروس SB - 1. خضعت المزارع لمدة أسبوع قبل أن تقرأ، وقد دونت النتائج في جدول ١ حيث تبين أن معدل الأخذ في الفراريج التي أعطيت ١٧٦ pfu / فروج كان ٥٦٪ على الأقل، بينما أصبحت كافة الفراريج حاملة للفيروسات في دمائها بعد التطعيم بجرعة ٤٦٠ pfu / فروج أو ١٥٢٠ pfu / فروج. ١٥

جدول ١

جرعة الطعم Vaccine dose	عدد الطيور الموجبة / المختبرة في اليوم الرابع عشر من التطعيم (p . v) post vaccination
١٧٦ pfu	٩ / ٥
٤٦٠ pfu	١٠ / ١٠
١٥٢٠ pfu	٧ / ٧

مثال ٣

مقارنة المناعة الناجمة عن طعم HVT الخالي من الخلايا مع المناعة الناجمة عن الطعم / HVT SB-1 في الفراريج موجبة الـ MAD.

الفيروسات- كانت سلالات الفيروسات المستخدمة كما يلي:

٥ HVT - وهي عبارة عن سلالة PV1 THV من شركة Intervet.

SB-1 - مررت تلك السلالة حتى أصبح الفيروس سريع النمو rapidly growing وأطلق فيروسات خالية من الخلايا.

حضرت المستحضرات الخالية من الخلايا بتعريض الخلايا المصابة CEF للموجات فوق الصوتية في مثبت SPGA.

١٠ قسمت فراريج عمرها ٢ - ٣ أيام وتحمل أجساما مضادة بالوراثة maternally derived antibody (MDA) إلى ثلاثة مجموعات كما يلي:

المجموعة أ	٣٧ فروج	لم تطعم
المجموعة ب	٤٢ فروج	طعمت بـ ١٠٠٠ pfu / فروج من الطعم HVT
المجموعة ج	٤٢ فروج	طعمت بـ ١٠٠٠ pfu / فروج من الطعم HVT
١٥	ومعه ٢٥٠ pfu / من فيروس SB-1	

وعند عمر ٩ أيام أعطيت كافة المجموعات الفيروس الفتاك RBIB. خلال فترة التجربة كانت بعض الفراريج تذبح بين الفترة والأخرى في كل مجموعة بغرض تخفيف التزاحم في الأقفاص. فحصت كافة الفراريج التي ماتت أو ذبحت بالعين المجردة macroscopic وبالمجهره microscopic لتقييم الإصابة بمرض مارليك (MD). وبعد مناولة الفيروس الفتاك مات أحد الفراريج في اليوم الرابع من كل مجموعة محصنة، كما مات ٥ فراريج بين اليوم الخامس واليوم التاسع من المجموعات غير المحصنة. وقد اتضح من الفحص المجهرى النسيجي histological examination ضمور ليمفاوي lymphoid depletion خاصة في الكيس الزلالي

٢٠

bursa والغدة التيموسية thymus أيضا. تبين تلك الملاحظات مع توقيت الوفاة، أن الوفيات نتجت عن تأثيرات التحلل الخلوي cytolytic effects بسبب MD.

يوضح الرسم البياني النسيجي في شكل ١ عدد الطيور التي ذبحت في كل مرة بعد تعرضها للفيروس الفتاك، عدد الطيور التي أصيبت بعدئذ بمرض مارليك بالفحص المجهرى النسيجي histological examination قبل أو بعد الموت. ٥

ويوضح الرسم البياني النسيجي في شكل ٢ حدوث مرض مارليك بعد تعرض الفراريج المحصنة وغير المحصنة للفيروس الفتاك.

وقد لوحظ أن مرض مارليك قد حدث في المجموعة الغير محصنة بدرجة كبيرة (شكلا ١ و ٢). وقد شوهدت الأورام MD tumours في ٣ فراريج من بين السبعة التي قتلت في اليوم ١١ بعد التعرض للفيروس الممرض. وقد بدأت الوفيات بسبب مرض مارليك في اليوم ١١ بعد التعرض للفيروس الممرض. وفي اليوم ٢٨ بعد التعرض ذبحت ٨ فراريج مريضة، وفي اليوم ٣٢ بعد التعريض ذبحت كافة الطيور الثمانية المتبقية حيث أن اثنين منها كانت تبدو مريضة بشكل حاد. وقد تبين أن تلك الستة عشر طيراً كانت تعاني من أورام مرض مارليك في الكبد والكلية وأعضاء أخرى. ومن بين مجموع ٣٧ طائر اتضح أن خمسة منها قد ماتت بسبب "مرض مارليك المحلل للخلايا cytolytic MD وأن ٢٧ قد أصيبت بأورام مرض مارليك أو ماتت بسبب MD نفسه. ذبحت الفراريج الأربعة التي لم تظهر عليها أية أعراض بعد اليوم ١١ من التعرض، وذلك لإعطائها فرص لظهور مرض مارليك عليها. مات أحدها لأسباب غير نوعية nonspecific causes.

وفي المجموعة التي أعطيت طعم HVT، ظهرت أورام MD مرئية بالعين macroscopic tumors أولاً في اليوم ٢١ في ٢ من ١٠ من الفراريج التي ذبحت وفي فروجين من الذين ماتوا في ذلك الوقت. وتبين من فحص الفراريج الخمسة المريضة بعد موتها post mortem، في اليوم ٣٢ واليوم ٤٢، أنها كانت تعاني من أورام MD. وقد مات ٧ فراريج من مرض MD أثناء التجربة. وبقيت ٨ طيور فقتلت بعد ٥٣ يوماً من التعرض ولم تظهر عليها أية أعراض لمرض مارليك. ومن بين مجموع ٤٢ فروج، ظهرت الأورام في ١٦ بعد ذبحها أو موتها

بسبب مرض ماريك. ولم تظهر أية أعراض lesions في العشرة فراريج التي ذبحت في اليوم ١١ بعد التعرض حيث ذبحت ٨ منها في اليوم ٢١ و ٨ في اليوم ٥٣ بعد التعرض للفيروس الممرض.

٥ كان انتشار مرض ماريك في المجموعة المحصنة ثنائياً منخفضاً جداً حيث أن طيراً واحداً فقط وجد به أورام مرض ماريك في الكبد عندما قُتل في اليوم ٥٣ بعد التعرض للفيروس الممرض. وقد مات ٤ كتاكيت (فراخ) من إجمالي ٤٢ كتكوت لأسباب غير محددة، أحدها ربما مات بسبب التحلل الخلوي لمرض ماريك. لم توجد أضرار لمرض ماريك في ١٠ كتاكيت تم قتلها في اليوم ١١ بعد التعرض للفيروس الممرض، وتم قتل ١١ كتكوت عند اليوم ٢١ بعد التعرض للفيروس الممرض، و ٣ كتاكيت تم قتلها في اليوم ٤٢ بعد التعرض للفيروس الممرض و ١٣ كتكوت من ١٤ كتكوت تم قتلها في اليوم ٥٣ بعد التعرض للفيروس الممرض.

١٥ تبين النتائج أن الطعم المزدوج الخالي من الخلايا SB-1/HVT يحدث درجة وقائية كبيرة ضد فعالية فيروس RB1B الشديدة عندما تتعرض فراريج الشواء الحاملة للأجسام المضادة MDA من النوعين المصلين الثاني والثالث، لذلك الفيروس. كما يحدث طعم HVT وقاية جوهرية ضد التعرض الشديد لذلك الفيروس، غير أن حوالي ٣٧٪ من الفراريج قد ظهرت عليها بعض أعراض مرض ماريك.

٢٠ ويجب ملاحظة أن أعراض مرض ماريك قد ظهرت بشدة على غالبية الفراريج غير المحصنة التي استمرت على قيد الحياة خلال ٤ أسابيع من التعرض ولذلك تم قتلها جميعاً في اليوم ٣٢ بعد التعرض. وعند إتمام التجربة في اليوم ٥٣ من التعرض لوحظ أن الفراريج التي طعمت بالطعم المزدوج كانت أثقل وزناً عن التي طعمت بـ HVT وحده. وقد كان ذلك مدهشاً نظراً لأنه لم تظهر على أي واحد من الفراريج الثمانية المطعمة أية أعراض أو إصابات لمرض ماريك بعد ذبحه وفحصه.

مثال ٤

مقارنة المناعة الناجمة عن طعم فيروس SB-1 الخالي من الخلايا وطعم HVT/SB-1 في الفراريج التي لا تحمل أجساماً مضادة لمرض ماريك.

- ٥ طعمت فراريج SPF عمر ٢٠ يوماً، بـ ٢٠٠ pfu من فيروس SB-1 المجفف بالتجميد والخالي من الخلايا، تحت الجلد، بعد حله reconstituted بمحلول SPGA بجرعة قدرها ٠,١ مل / فروج. حقنت مجموعة ثانية من الفراريج بـ ٢٠٠ pfu من طعم SB-1 مع ١٠٠٠ pfu من طعم فيروس HVT. بعد أسبوع واحد، عرضت تلك الفراريج مع عشرين فروجاً أخرى غير محصنة unvaccinated ومن المزرعة ذاتها والعمر ذاته، للفيروس الممرض بحقنها في العضل (i.m.) بسلالة RBIB العنيفة. وعلى مدى فترة طولها ٦ أسابيع حسب عدد الفراريج التي ماتت بسبب مرض ماريك في كل مجموعة.
- ١٠

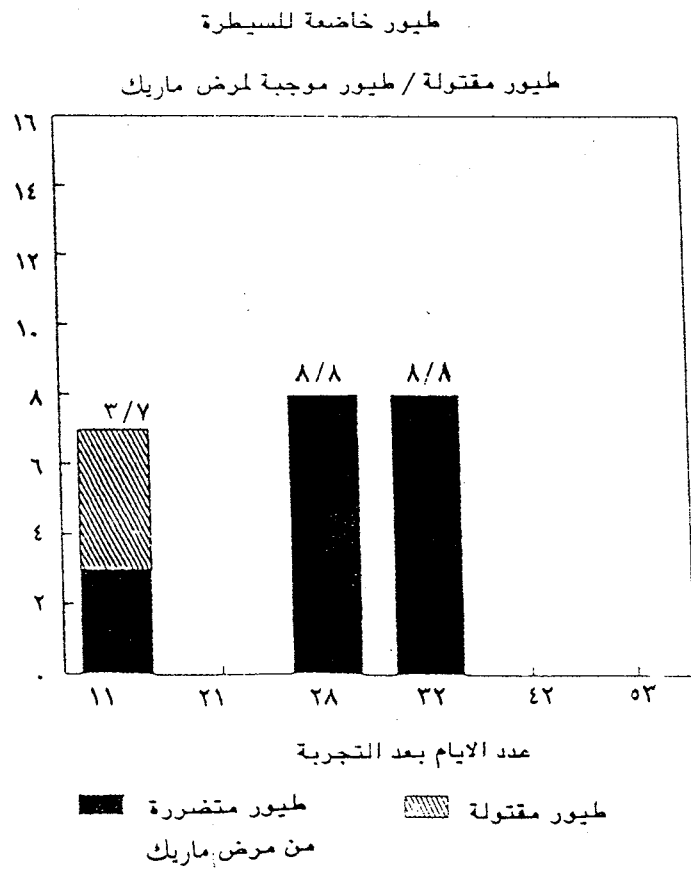
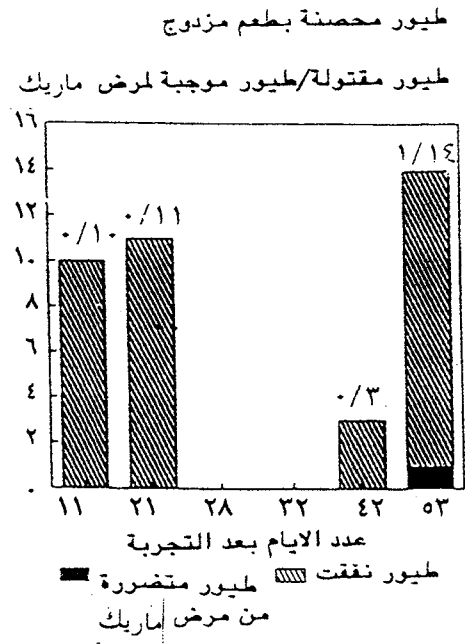
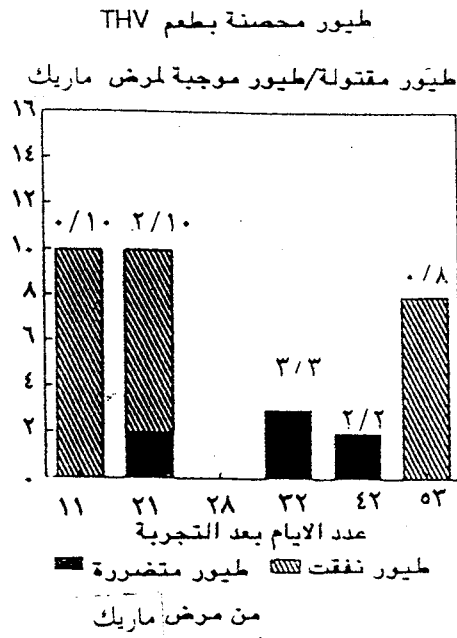
جدول ٢

الطعم Vaccine	عدد الطيور الميتة في المجموعة المختبرة
مجموعة ضبط النتائج control	٢٠/٢٠
SB - 1	٢٠/٦
HVT / SB - 1	صفر / ٢٠

عناصر الحماية

- ١ - لقاح a vaccine لوقاية الدواجن من مرض "ماريك" Marek's Disease ، ١
- ٢ يتميز باحتوائه على فيروسات مرض ماريك من النوع المصلي الثاني خالية من ٢
- ٣ الخلايا cell - free Marek's Disease serotype 2 viruses ، مع مادة ناقلة مقبولة ٣
- ٤ من الناحية الصيدلانية a pharmaceutically acceptable carrier ٤
- ١ - اللقاح a vaccine وفقاً لعنصر الحماية ١ ، ويتميز باحتوائه على فيروسات ١
- ٢ SB - 1 الخالية من الخلايا cell - free SB-1 viruses ٢
- ١ - اللقاح a vaccine وفقاً لعنصر الحماية ١ ، ويتميز باحتوائه على ١
- ٢ فيروسات B-24 الخالية من الخلايا cell - free SB-1 viruses ٢
- ١ - اللقاح a vaccine وفقاً لعنصر الحماية ١ ، ويتميز باحتوائه على ٢,٢ ١
- ٢ لوغاريتم logs pfu لكل جرعة per dose على الأقل. ٢
- ١ - اللقاح a vaccine وفقاً لعنصر الحماية ٤ ، ويتميز باحتوائه على ١
- ٢ ٢,٧ لوغاريتم logs pfu لكل جرعة per dose على الأقل. ٢
- ١ - اللقاح a vaccine وفقاً لعنصر الحماية ٥ ، ويتميز باحتوائه على ٣,٢ ١
- ٢ لوغاريتم logs pfu لكل جرعة per dose على الأقل. ٢
- ١ - اللقاح a vaccine وفقاً لعنصر الحماية ١ - ٦ ، ويتميز أيضاً باحتوائه ١
- ٢ على HVT خالية من الخلايا cell - free HVT ٢

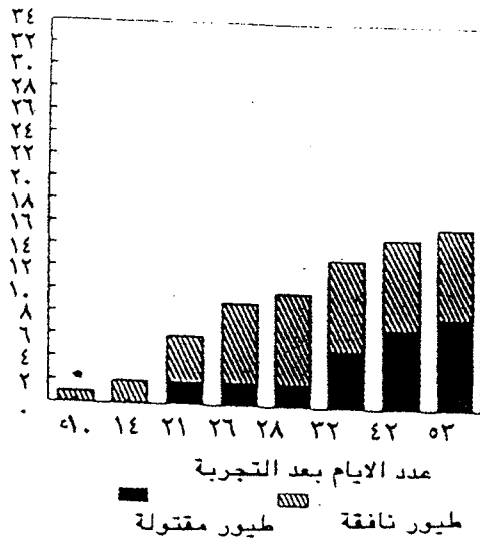
- ١ ٨ - اللقاح a vaccine وفقاً لعنصر الحماية ١ - ٧، ويتميز بكونه مجففاً بطريقتي التجفيد lyophilized.
- ٢ ٩ - طريقة لتحضير لقاح a vaccine لوقاية الدواجن من مرض " ماريك " Marek's Disease ، وتشتمل على الخطوات الآتية :
 - ٣ أ (إنماء فيروسات مرض " ماريك " من النوع المصلي الثاني a serotype 2 Marek's Disease virus في وسط خلوي cell culture والذي يمكن الحصول منه على كميات كافية من الفيروسات الخالية من الخلايا cell-free viruses
 - ٤ لتحضير جرعات مناعية فعالة effective immunizing dosage.
 - ٥ ب (تمزيق الخلايا disrupting the cells.
 - ٦ ج (ومن ثم جمع الفيروسات الخالية من الخلايا cell-free viruses.
 - ٧ د (يتم معالجة المادة المتحصل عليها في الخطوة " ج " بإحدى الطرق الآتية على الأقل:
 - ٨ ١. تنقية clarifying بواسطة الطرد المركزي centrifugation أو الترشيح filtration.
 - ٩ ٢. إضافة مادة منظمة buffer.
 - ١٠ ٣. إضافة مادة مثبتة stabilizing agent.
 - ١١ ٤. وضع المادة في قنينة vial.
 - ١٢ ٥. التجفيف بطريقتي التجفيد freeze-drying.
- ١ ١٠ - استخدام فيروسات مرض ماريك من النوع المصلي الثاني الخالية من الخلايا cell-free Marek's Disease serotype 2 viruses لتحضير طعم لوقاية الدواجن من مرض " ماريك " Marek's Disease.



شكل ١

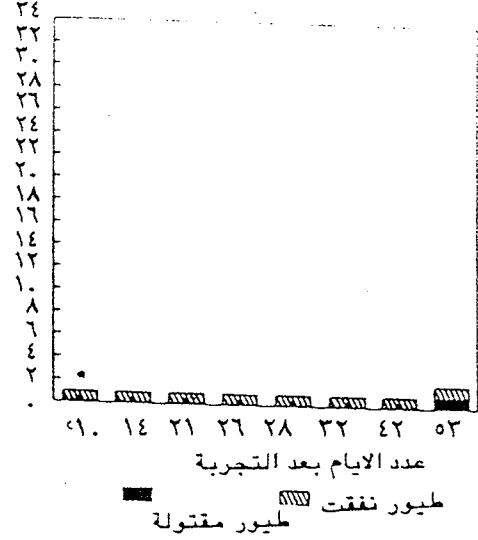
طيور متضررة من مرض ماريك

مطعمة بـ THV



طيور متضررة من مرض ماريك

مطعمة بطعم مزدوج



طيور متضررة من مرض ماريك

تحت السيطرة

