المجلة العراقية للعلوم البيطرية، المجلد 23، عدد إضافي 2، 2009 (361-363)
وقائع المؤتمر العلمي الخامس، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل

عزل وتشخيص الفيروس المسبب لمتلازمة موه التامور في فروج اللحم في محافظة نينوى

ثابت معاذ النعمة* و مزاحم ياسين العطار**

*المستشفى البيطري، نينوى، **فرع الأحياء المهجرية، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل، الموصل، العراق

الخلاصة

تم عزل الفيروس المسبب لمتلازمة موه التامور من حقول فروج اللحم في محافظة نينوى بطريقة التنمية في كيس المح لأجنة بيض الدجاج المخصب، حيث شخص الفيروس بواسطة فحص التعادل المصلي مستخدمين المصل المرجعي للنمط المصلي الرابع من فيروس الادينو، تم تعزيز التشخيص بواسطة مشاهدة جزيئات فيروس الادينو مكعبية التناسق ذات أشكال متجانسة في جميع العينات تتراوح أقطارها بين 85-90 نانوميتر بقوة تكبير 34000 باستخدام الصبغة السالبة.

Isolation and diagnosis of hydropericardium hepatitis syndrome virus in broilers in Ninevah province

Th. M. Al-Nima* and M. Y. AL Attar**

*Mosul Veterinary Hospital, **Department of Microbiology,
College of Veterinary Medicine, University of Mosul, Mosul, Iraq

Abstract

Local viral isolates of hydropericardium hepatitis syndrome were isolated and identified by viral propagation in yolk sac of chicken embryo eggs. All isolates were diagnosed as adenovirus serotype 4 by serum neutralization test using specific refererence antisera against serotype 4 adenovirus, and confirmation of diagnosis was done by Electron–microscopic observation, Icosahedral adenovirus –like particles 85-90 nm in diameter were observed in negative staining of all virus isolates.

Available online at http://www.vetmedmosul.org/ijvs

البحث مستل من أطروحة دكتوراه للباحث الأول

المقدمة

متلازمة موه التامور والتهاب الكبد (Hydropericardium Hepatitis Syndrome) من الأمراض الفيروسية التي تصيب الدجاج بأعمار 3-6 أسابيع محدثة هلاكات عالية ويتميز المرض بتجمع سوائل في تجويف التامور وحصول آفات مرضية في الكبد والكلى (1) وقد ظهر المرض لأول مرة عام 1987 في مدينة أنكارا في باكستان. شخص المرض سريريا في العراق لأول مرة عام 1991 (2) وجرت محاولات لعزل المسبب المرضي مختبريا عام 2000 وشخص على أنه النمط المصلي 4 من فيروس الأدينو والمعزول عالميا أيضا (3).

يمكن تنمية الفيروس من خلال التنمية في خلايا الزرع النسجي لكلى أفراخ الدجاج (Chicken kidney cells) وكذلك أكباد أجنة الدجاج Chicken embryonic liver cells وكذلك خطوط الزرع النسجي المستمر لخلايا فيرو (5,4) وأن التأثير المعل للخلايا هو تكوين الأجسام الاشتمالية في انوية الخلايا وكذلك تحبب الخلايا واستدارتها وموتها خلال 3-4 أيام (6). فضلا عن التمرير المتكرر للفيروس في أجنة أفراخ الدجاج عن طريق الحقن في الغشاء اللقانقي المشيمي وكيس المح والتجويف الالنتوسي والذي يؤدي إلى هلاك الأجنة أو توقف نموها أو تشوهها (7).

وقد استخدم المجهر الالكتروني للكشف عن الفيروس باستخدام الصباغ السالب لإظهار الحدود الخارجية والتركيب

الداخلي نظرا لقدرة الصبغة على النفاذ خلال التراكيب الأساسية وحولها أو بين جزيئاتها. وفي العراق استخدم المجهر الالكتروني كذلك في مشاهدة فيروسات الادينو فقد شاهد الباحث (8) تجمعات الفيروس العاري ذي التناسق المكعبي وبقطر 80 نانوميتر في خلايا كلية الأفراخ المصابة. إن مشاهدة الشكل المميز للفيروس وهو الشكل المكعبي في المجهر الالكتروني باستخدام الصبغة السالبة للعينات المصابة بموه التامور والتهاب الكبد تدعم بأن سبب المرض هو فيروس الادينو ويظهر الفيروس في بعض الأحيان على شكل جزيئات ذات شكل اسطواني خشن ومتناظر isometric roughly spherical particles وهذه الجزئيات تكون بقطر 83-93 نانوميتر وتلاحظ هذه الإشكال على نحو أوضح بالقرب من انوية الخلايا الكبدية المصابة بموه التامور المحضرة من خلاصة أو رواسب نبذ المسحوق الكبدي .pellets obtained from liver extracts (9,7).

يتم تشخيص المرض من خلال الفحص العياني للطيور الهالكة (10) فضلا عن مشاهدة الأجسام الاشتمالية في انوية الخلايا الكبدية وذلك عن طريق الفحص النسجي للأعضاء المصابة الذي يعد احد الطرائق التي يعتمد عليها في تشخيص المرض (11,9). فضلا عن استخدام طرق عزل الفيروسات عن طريق زرعها في خلايا الزرع النسجي المحضر من خلايا أكباد وكلى أجنة الدواجن وكذلك استعمال خطوط الزرع النسجي الثانوي لخلايا فيرو (12,3) ولغرض تمييز الأنماط المصلية وتصنيفها يستخدم فحص التعادل المصلي باستخدام الأمصال المرجعية reference antiserum (9, 4).

المواد وطرائق العمل

الأمصال المستخدمة

المصل المرجعي الموجب reference antisera - 4 ضد النمط المصلي الرابع تم الحصول على هذا المصل الخاص بالنمط المصلي الرابع من شركة مريال الفرنسية.

البيض المخصب

بيض دجاج محلي مخصب حصل عليه من أسواق مدينة الموصل المحلية.

النماذج المرضية

جمعت النماذج المرضية من الدجاج المريض والنافق حديثا ومن قطعان شخصت من خلال إجراء الصفة التشريحية أصابتها بمتلازمة موه التامور والتهاب الكبد من مناطق مختلفة في محافظة نينوى.

تنمية الفيروس في أجنة أفراخ الدجاج

استخدم البيض المحلي المخصب من الدجاج البياض ذو القشرة البيضاء وقد استخدمت طرائق الحقن التي ذكرها (1).

تشخيص الفيروس المعزول

شخص الفيروس المعزول بطريقتين؛ الاولى اختبار التعادل المصلي serum neutralization test حيث استخدمت الطريقة التي ذكرها (14). والثانية التشخيص بالمجهر الالكتروني حيث استخدمت الطريقة التي اتبعها (13) حيث اخذ قطرة من راشح التمريرة الخامسة من كل عزلة بعد نبذها في جهاز المنبذة 6000 دورة في الدقيقة لمدة 30 دقيقة ووضعت على carbon-coated grid ثم صبغت بحامض 1% فوسفو تنكستك phosphotungstic) (acid ثم فحصت في المجهر الالكتروني لمشاهدة الفيروسات وأجري ذلك في كلية الطب جامعة النهرين.

النتائج

العزل في أجنة أفراخ الدجاج عن طريق الحقن في كيس المح

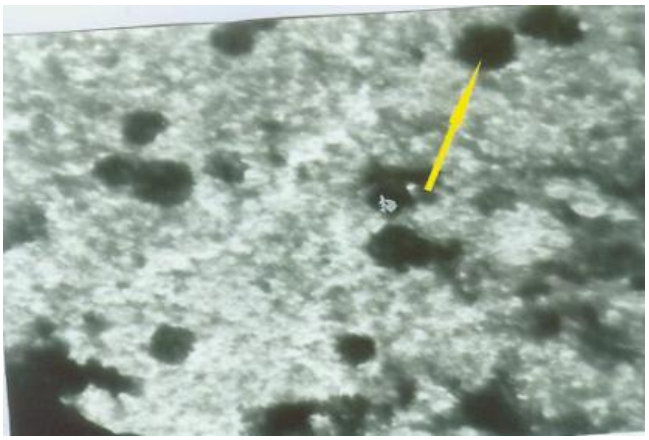
أحدث فايروس الأدينو بعزلاته المختلفة تغيرات ملحوظة على الأجنة شملت حصول آفات متباينة فبعض الاجنة نفقت وظهرت عليها آفات التقزم ووجود نزف على الرأس والرقبة وأخرى ظهر عليها تأخر في النمو و نفقت البقية بدون ظهور أي علامات عليها، هذه الآفات بدأت تظهر في اليوم الثاني والثالث بعد الحقن واستمرت إلى اليوم السادس متميزة بضعف وتأخر ظهورها في التمريرات الأولى وزيادة شدتها واختزال وقت ظهورها بتقدم عدد التمريرات.

نتائج اختبار التعادل المصلي

أظهر المصل المرجعي ضد النمط المصلي الرابع القابلية على معادلة جميع العزلات الفيروسية في هذه الدراسة وبمعيار تراوح قدره من 8-16 باستخدام الحقن في أجنة الأفراخ في كيس المح مما يؤكد ايجابية هذه العزلات من حيث كون هذا الفحص من الفحوصات التشخيصية المهمة من كونها فيروسات الادينو النمط المصلي الرابع دون غيرها من بقية الأنماط وتراوحت معايير التعادل في العينات حيث بلغت 16.

التشخيص بالمجهر الالكتروني

لوحظت جزيئات فيروسية مكعبية التناسق ذات اشكال متجانسة في جميع العينات تتراوح أقطارها بين 85-90 نانوميتر بقوة تكبير 34000 مشابهة للأشكال التي شاهدها ووصفها الكثير من الباحثين بأنها الصورة المميزة لفيروسات الادينو باستخدام الصبغة السالبة. والصورة (1) توضح ذلك.



الصورة (1) فايروس الادينو تحت المجهر الالكتروني.

المناقشة

شخصت العينات في هذه الدراسة جميعا على أنها فيروس الادينو النمط المصلي الرابع دون غيره اعتمادا على النتائج الإيجابية التي أظهرها اختبار التعادل المصلي باستخدام مصل مرجعي للنمط المصلي الرابع من فايروس الادينو ويعتبر هذا الاختبار من أفضل الاختبارات المصلية وأكثرها حساسية لتشخيص العزلات الفايروسية وهذا يتفق مع ما ذكره (4). ولغرض تأكيد نتائج التشخيص تم استخدام المجهر الالكتروني لتصوير الفايروس المعزول بطريقة الصبغة السالبة للعينات المفحوصة وقد تم مشاهدة وتصوير الجزيئات الفايروسية ذات التناسق المكعبي والتي يتراوح قطرها بين 85 – 90 نانوميتر وهذا يتفق مع الملاحظات التي أشار إليها كل من (13، 15) حيث تم الاعتماد على نفس الطريقة المذكورة لتشخيص نفس الفايروس. يستدل مما سبق أن هذه العزلات جميعها تقع ضمن النمط المصلي الرابع نفسه الذي سبق أن عزل وشخص في كثير من البلدان مثل باكستان ودول أمريكا الجنوبية وروسيا وكذلك في العراق (3،6) وهذه العزلات إنما هي استمرار مماثل لما ذكره الباحثين الذين استطاعوا عزل وتشخيص المسبب المرضي لمتلازمة موه التامور والتهاب الكبد منذ ظهور هذه الحالات المرضية بشكل متكرر منذ أواخر الثمانينات ولحد الآن (7،12).

المصادر

1. Shane SM and Jaffery MS. Hydropericardium hepatitis syndrome (Angara disease). In: Disease of poultry. Calnek BW ; Barnes HJ ; Beard CW ; McDougald LR and Saif YM (eds.), 10th ed.:Iowa State University Press, Ames, Iowa; USA. 1997 ;pp: 1022-1919.
2. Abdul-Aziz TA and Al-Attar MA. New syndrome in Iraqi chicks. Vet Rec. 1991;129:272.
3. النعمة، ثابت معاذ. عزل وتشخيص وامراضية فايروس متلازمة موه التامور في الدواجن، رسالة ماجستير كلية الطب البيطري- جامعة الموصل.
4. Kumar R; Chandra R and Shukla. Isolation of etiological agent of hydropericardium syndrome in chicken embryo liver cell culture and its serological characterization. Indian J Exp Biol. 2003; 41(8):821-6.
5. Roy P, Koteeswaran A and Manickam R. Serological ,cytopathological and cytochemical studies on hydropericardium syndrome virus. Veterinary ski Arhiv. 2001;71:97-103.
6. Balamurugan V, Kataria JM, Kataria RS,. Verma KC, Nanthakumar T. Characterization of fowl adenovirus serotype -4 associated with hydropericardium syndrome in chicken. Comp immunol Microbiol Infect Dis. 2002;25:139-147.
7. Hess M. Detection and differentiation of avian adenovirus a review. Avian Pathol. 2000; 29:195-206.
8. Odisho SM, Al-Bana A and Majeed AK. Hydropericardium in broiler chicks in Iraq: Isolation and identification of causative virus. Iraqi J. Vet Med 1995; 19-20(1):130-141.
9. Carter GR; Wise DJ and Flores EF A Concise Review Of Veterinary Virology. (Eds.). International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www.ivis.org), 2005.
10. Anjum AD, Sarbi MA and Iqbal Z. Hydropericardium syndrome in broiler chickens in Pakistan. Vet Rec. 1989;124:247-248.
11. Akhtar S. Hydropericardium syndrome in broiler chickens in Pakistan. World's Poul Sci J. 1994; 50:162-177.
12. Mcferran JB. adenovirus infection in diseases of poultry, 11th ed. Saif YM with Barnes HJ; Glisson JR; Fadly AM; Mc Dougald LR and Swayne DE. Iowa State University Press, Ames 2003 pp.213-227.
13. Chandra R. Electron microscopic demonstration of an adenovirus in the hepatocytes of bird experimentally infected with hydropericardium syndrome. Vet Rec. 1997; 140:70-71.
14. Rovozzo GC and Burke CN. manual of basic virological technique. Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, New Jersey. 1973,Pp.:139-150.
15. Ganesh K; Raghavan R; Gowda RNS; Satyanarayana ML and Suryanaravana VVS. Purification and characterization of the etiological agent of Hydropericardium hepatitis syndrome from infected liver tissues of broiler chickens. Trop Anim Health 2002; 34-7-17.