دراسة مقارنة بين فايروسات الروتا المسببة للإسهال والمعزولة من الأطفال الرضع والعجول حديثة الولادة

رجاء هندي الفلاحي انطوان صبري البنا شوني ميخائيل أوديشو

فرع الأحياء المجهرية – كلية الطب البيطري ، بغداد – العراق

تاريخ الاستلام 2002/2/16 تاريخ القبول 2002/5/2

الخلاصة

أجريت الدراسة باستخدام عزلات محلية لفايروس الروتا والتي مصدرها عجول وأطفال مصابة بالإسهال والتي سبق تمريرها في خلايا الخط الزرعي المستمر وباستخدام 10 مايكروغرام/مل من خميرة التربسين وإضافته في الوسط الزرعي الحافظ بمقدار 0.5 مايكروغرام/مل حيث احدث الفايروسين المعزولين تأثيرا خلويا متميزا ومتطورا حيث كان أعلى معيار حجمي للفايروس المعزول من الأطفال قدره $2\times 10^{6.1}$ 0.1/50 TCID و $2\times 10^{5.5}$ 0.1/50 TCID لفايروس روتا العجول. وقد تم تشخيص الفايرروسات المعزولة باختبار التألق المناعي غير المباشر وباستخدام مصل مضاد مرجعي لفايروس روتا العجول بالإضافة إلى المصل المحضر في الدراسة ضد مستضد فايروس روتا العجول المرجعي. كما جرت المقارنة بين الفايروسات المعزولة من الأطفال والعجول من ناحية النمو في خلايا الزرع النسيجي المختلفة من خلايا خصية الحملان الخلايا الليفية لاجنة الدجاج، خلايا كلية جنين العجول وخلايا الخط الزرعي المستمر فيرو، حيث أظهرت الأخيرة حساسية جيدة لتنمية كلا الفايروسين. وقد احدث كلا الفايروسين للعجول والأطفال بقع مشبهة الشكل في خلايا الخط الزرعي فيرو ولكن البقع التي أحدثتها عزلة فايروس روتا الأطفال اكبر حجما حيث بلغ قطرها من 1.5 – 2.5 ملم من البقع التي أحدثتها عزلة فايروس روتا العجول بلغ قطرها1.5-2 ملم. كما لوحظ تفاعل مشترك بين مستضدات فايروس روتا العجول والأطفال في اختبار التألق المناعي غير المباشر بينما لم تظهر نتائج اختبار التعادل المصلي وذلك باستخدام المصل المرجعي لمستضد روتا العجول.

COMPARATIVE STUDY BETWEEN ROTA VIRUSES ISOLATED FROM DIARRHEATIC INFANT BABIES AND NEWLY BORN CALVES

Raja.H.Al-Falahy, Anton S. Al-Bana & Shoney M.Odisho

Dept. of Microbiology, college of Veterinary Medicine, Baghdad – Iraq.

Summary

Rota viruses were isolated in vero continuous cell line from infant babies and newly borne calves affected by diarrhea after treatment in every passage with 10 mg/ml of trypsin and adding 0.5 mg/ml of trypsin in the maintenance media. The isolated viruses induced distinctive

and progressive type of cytopatheic effect in infected cells and highest titer was $2x10^{6.1}$ TCID 50/0.1 for human viral isolate and $2x10^{5.5}$ TCID50/0.1 for bovine viral isolate. The isolated viruses were identified by indirect fluorescent antibody technique by using reference calf rotavirus antisera. Comparative study were conducted on both human and bovine viral isolate including growth in different cell culture, vero cell line was very sensitive to support growth of both viruses than secondary embryonic calf kidney cell culture, lamb testes and primary embryonic chicken fibroblast cell culture. Both viruses induced morphologically similar kind or plaques in vero cell line but plaqes formed by human isolate were larger in size about 1.5 – 2.5 mm in diameter than those of bovine isolate 1.5 – 2 mm. Cross reactive viral antigens were detected between the isolated viruses in indirect fluorescent antibody technique but not in serum neutralization test by using reference bovine rotavirus antisera.

المقدمة

شخص فايروس الروتا المسبب للإسهال في العجول حديثة الولادة لأول مرة في الولايات المتحدة وقد أطلقت عليه اسم فايروس إسهال العجول حديثة الولادة وقد عرفت بعزلتي نبراسكا[1]. أما فايروس روتا الإنسان فقد شخص لأول مرة في استراليا[2] وفي نفس الوقت في إنكلترا [3] وتوالى تشخيص الفايروس في مختلف الحيوانات . وتعتبر فايروسات الروتا إحدى المسببات الشائعة لالتهاب المعدة والأمعاء الحاد في العجول حديثة الولادة [4] والأطفال[6,5]. يصيب الفايروس الإنسان بجميع الأعمار ولكن تكثر الإصابة عادة في الأطفال بعمر 6-24 شهر [7] أما في العجول فتكثر الإصابة في الأسابيع الأربعة الأولى من العمر وترتفع الإصابة في الأشهر الباردة [8].

وقد درست العلاقة بين فايروسات روتا العجول والأطفال بطرق عديدة حيث أثبتت وجود مستضدات مشتركة بين كلا الفايروسين وخصوصا في المحفظة الداخلية للفايروسات [9]. كما اظهر الباحثون إن فايروسات روتا العجول والأطفال والفئران تتفاعل مع المصول من مختلف أنواع الحيوانات باختباري التألق المناعي والانتشار في هلامه الاكار . ولم تظهر أي تفاعل باختبار التعادل المصلي[10]. وقد أكد الباحثون إن استخدام المصول من أنواع مختلفة من الحيوانات المصابة مع فايروسات الروتا لهذه الأنواع في اختبار التعادل المصلي المتصالب لا يعادل الفايروس إلا المصل المضاد من نفس النوع[11] كما اثبت الباحثون وجود العلاقة المستضدية بين فايروس روتا العجول والأطفال في اختبارات تثبيت المتمم، التلازن الدموي والتألق المناعي بينما لم يجدوا ذلك في التعادل المصلي[12].

أما من ناحية تكوين البقع فتختلف باختلاف نوع الخلايا حيث إن استخدام خلايا NA-104 مع استخدام التربسين ومادة DEAE– dextran. تعتبر من العوامل الجيدة لإحداث البقع[13] وقد أكد

الباحثون إن العزلات المختلفة تنتج بقع مختلفة الشكل والحجم وتستخدم هذه الصفة في تنمية العزلات المختلفة لفايروس الروتا[14].

وقد عزل فايروس الروتا المسبب للإسهال في العجول حديثة الولادة في العراق[15] كما عزل فايروس روتا الإنسان[16] وقد استهدفت الدراسة مقارنة الصفات العامة المستضدية بين الفايروسات المعزولة.

المواد وطرائق العمل

استخدمت فايروسات روتا العجول وروتا الأطفال المعزولة من عينات براز. حيث تم حقن الفايروسات التي تم الحصول عليها من مختبر الفايروسات في خلايا الخط الزرعي الفيرو وبعد معاملتها بـ10 مايكروغرام/مل من خميرة التربسين وأضيف الى الوسط الزرعي الحافظ بمقدار0.5 مايكروغرام/مل. وعند ظهور التأثيرات المرضية تم إعادة حقنها في الخلايا حيث احدث فايروس روتا الأطفال تأثير خلوي متميز بمعيار $2\times 10^{6.1}$ 0.1/50 TCID وروتا العجول$2\times 10^{5.5}$ 0.1/50 TCID. وقد شخصت الفايروسات باستخدام التألق المناعي غير المباشر وباستخدام مصل مضاد مرجعي.

خلايا الزرع النسيجي

أ. خلايا الخط الزرعي المستمر فيرو تمرير72 تم الحصول عليها من الهيئة العامة للبيطرة/قسم المختبرات.

ب. خلايا خصية الحملان الأولية والثانوية . تم الحصول عليها من شركة الكندي لانتاج اللقاحات.

ج. الخلايا الليفية الابتدائية لاجنة الدجاج. حيث استعملت أجنة الدجاج بعمر10 أيام[17].

د. خلايا كلية جنين العجل الأولية. تم تحضيرها باستخدام كلية جنين عجل بعمر6 اشهر[18].

استعملت بيئة زرعيه MEM والتي تحتوي على مصل بقري بنسبة10 % ومضادات حياتية مع إضافة محلول Lactalbumine hydrolysate وبعد تكوين طبقة متكاملة من الخلايا حقنت بفايروس روتا الأطفال والعجول ثم حضنت الخلايا بدرجة 37 °م لمدة ساعة بعدها اضيف إليه البيئة الزرعية الحافظة مع احتوائها على خميرة التربسين بمقدار 0.5 مايكروغرام/مل لملاحظة التأثيرات المرضية.

مصل مضاد للمستضدات المرجعي لفايروس روتا العجول حيث استخدمت 2 من ذكور الأرانب النيوزلندية البيضاء الناضجة والتي تم الحصول عليها من معهد المصول واللقاح. حيث حقن كل أرنب بجرعة 2 مل من مزيج متجانس من المستضد والعامل الفرو يند الكامل Freund's complete

adjuvant بنسبة 1:1 في التجويف البريتوني وبعد اسبوع حقن الأرنبين في العضل بنفس الجرعة من المزيج ثم أعيدت عملية الحقن السابقة في الأسبوع الثالث وتم سحب الدم من الأرنبين والحصول على المصل بعد أسبوعين من الحقنة الأخيرة وخزن بدرجة –20 ° م لحين الاستعمال[19].

دراسة مقارنة بين الفايروس المعزول من الأطفال والعجول:

أ. دراسة خاصية النمو في خلايا الزرع النسيجي، حيث تم دراسة تطور التأثير المرضي الخلوي لفايروسات العجول والأطفال من خلال تنميتها في خلايا الزرع النسيجي المختلفة.

ب. قابلية تكوين البقع، حضرت طبقة كاملة من خلايا فيرو في قناني لدائنيه سعة 25 سم^3 ثم سكب الوسط الزرعي وغسلت الخلايا مرتين وبعدها حقنت بفايروس الأطفال والعجول وبمقدار 0.5 مل بعد معاملتهم بالتربسين بمقدار 10 مايكروغرام/مل لمدة 30 دقيقة بدرجة37 °م حضنت القناني بدرجة37 °م لمدة ساعة للأمتزاز بعدها غسلت الخلايا بالوسط الزرعي الحافظ ثم أضيف6 مل من الوسط الزرعي الحافظ والذي يحتوي على الاكاروز بنسبة 8.9 % و خميرة التربسين 0.5 مايكروغرام/مل ،ونقلت القناني إلى الحاضنة لملاحظة تكوين البقع. بعد مرور5-6 أيام تم صبغ الخلايا باستخدام مزيج من المحلول الدارئ الفوسفاتي والبلورات البنفسجية بنسبة1/1000 والفورمالين10 % للتأكد من وجود البقع مقارنة بخلايا السيطرة غير المحقونة بالفايروس[20].

ج. دراسة العلاقة المستضدية:

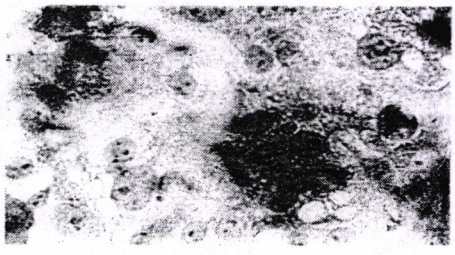
1. اختبار التألق المناعي غير المباشر، استخدمت خلايا الزرع النسيجي المستمر فيرو حيث حضر سطح متكامل من الخلايا على شرائح بلاستيكية ثم حقنت بفايروس روتا الأطفال والعجول وفحصت بعد 48 ساعة للمقارنة بينهما

2. اختبار التعادل المصلي، اتبعت طريقة التعادل المصلي الدقيقة Micro-serum neutralization test حيث حضرت مجموعتين من التخافيف للمصل الممنع للمستضد المرجعي ثم خفف الفايروس الخزين للعجول والأطفال بمقدار 0.5 /100 $TCID_{50}$ وأضيف فايروس روتا العجول لكل أنبوبة من المجموعة الأولى لتخافيف المصل، وأضيف فايروس روتا الأطفال للمجموعة الثانية لتخافيف المصل. تركت الأنابيب ساعة واحدة بدرجة37 °م ثم حقنت الخلايا المحضرة وبعد فترة الامتزاز أضيفت البيئة الزرعية الحافظة الحاوية على التربسين وبعدها تم حساب معيار الضدات وملاحظة أعلى تخفيف للمصل الذي يحمي 50% من الخلايا من الإصابة بالفايروس حسب طريقة Reed &Muench[11].

النتائج

اظهر كلا الفايروسين روتا العجول والأطفال قابلية جيدة للتكيف والنمو في خلايا الخط الزرعي فيرو وقد تشابه التأثير المرضي الخلوي الذي أنتجه فايروس العجول والأطفال من ناحية النوعية ولكنها اختلفت من ناحية سرعة تطبع الفايروس حيث اظهر فايروس روتا الأطفال تأثير مرضي خلوي واضح ومميز في التمرير الخامس واتضح اكثر في التمريرات اللاحقة كما إن المعيار الحجمي كان أعلى عما هو عليه لفايروس روتا العجول. أما عند استخدام صبغة الهيماتوكسلين والايوسين فقد اظهر نفس التأثير المرضي الخلوي في خلايا الخط الزرعي فيرو المحقونة بفايروس روتا العجول أو الأطفال وتميز بتفجي الخلايا حيث نلاحظ الفجوات الكبيرة والصغيرة في سايتوبلازم الخلايا المصابة مع وجود الأجسام الاشتمالية الحامضية للفايروس في المنطقة المحيطة بالنواة والتي تبدو مزدوجة في بعض الخلايا (شكل 1،2). اما خلايا كلية جنين العجل الثانوية فلوحظ بطئ تطبع فايروس روتا العجول والأطفال للنمو فيها. وكان لفايروس روتا العجول قابلية اكبر وأسرع للنمو في هذه الخلايا ولم يكن هناك اختلاف في نوعية التأثير المرضي في هذه الخلايا.

استخدمت خلايا الخط الزرعي فيرو لهذا الاختبار وقد لوحظ تكون بقع مفتوحة غير منظمة الشكل بعد أربعة ايام من حقن فايروس روتا العجول والأطفال وقد احتوت قسم من هذه البقع على خلايا متنكسة بينما لم تحتوي بقع أخرى عليها. وقد زاد قطر البقع بمرور الوقت حتى اليوم السابع حيث تراوحت أقطارها بين 1.5-2 ملم لفايروس روتا العجول و1.5– 2.5 ملم لفايروس روتا الأطفال ولم يلاحظ اختلاف بين فايروس روتا العجول والأطفال في شكل البقع المنتجة. اثبت اختبار التألق المناعي غير المباشر وجود علاقة مستضدية مشتركة بين عزلات فايروس روتا العجول والأطفال حيث كان هذا الاختبار موجب لكلا الفايروسين عند استخدام المصل الممنع المحضر في الدراسة. اظهر اختبار التعادل المصلي المصل الممنع المحضر في الدراسة عدم مقدرته على اثباط ومعادلة فايروس روتا الأطفال بينما استطاع معادلة روتا العجول بمعيار 32.



الشكل 1: التأثير المرضي الخلوي في خلايا الخط الزرعي المستمر بعد حقنها بالتمرير الثامن لفايروس روتا العجول وصبغها بصبغة الهيماتوكسلين والايوسين حيث يلاحظ التفجي في سايتوبلازم الخلية المصابة

الشكل 2: التأثير المرضي الخلوي في خلايا الخط الزرعي المستمر والمحقونة بالتمرير الثامن لفايروس روتا الأطفال والمصبوغة بصبغة الهيماتوكسلين والايوسين حيث تظهر بوضوح الأجسام الاشتمالية الحامضية في سايتوبلازم الخلايا المصابة .

المناقشة

ازداد الاهتمام في السنوات الأخيرة بفايروس الروتا كأحد أهم المسببات للإسهال والالتهاب المعدة والأمعاء الحاد في الإنسان والحيوانات. حيث ينتشر في جميع أنحاء العالم وعلى مدار السنة وبالذات فصل الشتاء حيث ترتفع الإصابة بالفايروس[6،8].

وقد أظهرت خلايا الخط الزرعي المستمر فيرو حساسية جيدة لتنمية كلا الفايروسين حيث ظهر التأثير المرضي الخلوي من التمرير الأول وبدأ بالتطور والوضوح حيث وصل أعلى معيار له في التمرير العاشر لفايروس روتا الأطفال وفي التمرير الثامن لفايروس روتا العجول. ومن ثم الهبوط في المعيار حيث يعود إلى خصوصية هذه الفايروسات وصعوبة تطبيعها في الخلايا وهذا ما أكده[21] وعند مقارنة الفايروسات من ناحية النمو يلاحظ عدم وجود اختلاف في نوعية التأثير المرضي ولكن هناك اختلاف في شدة التأثير المرضي وقابلية التطبع[22]. كما إن للفايروسين قابلية على إحداث البقع في خلايا الخط الزرعي فيرو متشابهة في الشكل ولكن مختلفة في الحجم حيث إن العزلات المختلفة لفايروس الروتا تحدث بقع مختلفة في الأحجام حيث يتفق هذا مع الباحثين الاخرين[14]. في حين أكد بعض الباحثين على عدم قابلية الفايروسات على إنتاج البقع[13] وقد أظهر اختبار التألق المناعي غير المباشر اشتراك فايروسات روتا العجول والأطفال بمستضد عام بينما لم يلاحظ وجود هذا التفاعل المشترك بين الفايروسات باختبار التعادل المصلي حيث اتفقت النتائج مع بقية الباحثين[10].

References

1. Mebus, C. A., Vnderdahl, N. R., Rhodes, M.B. and Twiehaus, M. J. (1969) Calf diarrhoea: Reproduced with a virus from a field out break. Univ. Nebr .Res. Bull 233:1
2. Bishop, P.F., Davidson, G.P., Holmes, I.H. and Ruek, B.J. (1973) Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non- bacterial gastroenteritis. Lancet, 2:1281.
3. Flewett, T.H., Bryden, A.S. and Davis, H. (1973) Virus particles in gastroenteritis. Lancet, 2: 1497.
4. Estes, M.K., Palmer, E.L. and Objieski, J. (1983). Rotaviruses. A review. curr. Tap. Microbiol. Immunol. 105:123.
5. Vesikar, T.M., Sarkkinen, H.K., Arstil, P.P. and Malonen, P.S. (1981) Rotavirus, adenovirus and non- viral enteropathogen in diarrhoea. Arch. Dis. Child. 56:264.
6. Al-Najar, S.A., S.A., Mukhlis, F.A., Shoney, M.O., and Tahir, R.M. (2000) Intestinal parasites and rotavirus in diarrhea. J.Fac.Med. Baghdad. 42:2.
7. Issa, A.H. (1998) Incidence of rotavirus and parasitic infection of patient children suffering from diarrhoea in Basrah city, Basrah Sci. J. 2:11-16.
8. الموسوي ، عباس يعقوب جاسم (1997) دراسة سريرية و تشخيصية لبعض مسببات الإسهال الخمجية في العجول حديثة الولادة. رسالة ماجستير، كلية الطب البيطري، جامعة بغداد.
9. Flewet, T.H., Bryden, A.S., Davis, H., Wood, G.N., Bridger, J.C. and Derrick, J.M. (1974) Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. Lancet, 2:61.
10. Wood, G.N., Bridger, J.C., Jones, J.M., Flewett, T.H., Bryden, A.S., Davies, H.A. and White B.B. (1976) Morphological and antigenic relationship between viruses (rotaviruses) from acute gastroenteritis of children, calves, piglets, mice and foals. Infect. Immun. 14:804.
11. Thoaless, M.E., Bryden, A.S., Flewett, T.H., Wood, G.N., Bridger, J.C., Snodgrass, D.R. and Herring, J.A. (1977) Serological relationship between rotavirus from different species as studied by complement fixation and neutralization. Arch.Virol.53: 287.

12. Matsuno, S., Inouye, S. and Kono, R. (1977) Antigenic relationship between human and bovine rotaviruses heamagglutination and complement fixation tests. Infect. Immun. 17:661.
13. Smith, E.M., Estes, M.K., Graham, D.Y. and Derba, C.P. (1979) A plaque assay for the simian rotavirus SA-11.J.Gen.Virol. 43:513.
14. Wassel, M.S. (1996) Isolation and preparation of bovine Rotavirus (BRV) Vaccine in Minnesota, USA. Vet. Med. J. 44 (3): 503.
15. Odisho, S.M. Muhamad, N.A. and Al-Bana, A.S. (1998) Isolation and identification of Rotavirus from neonatal calves. Iraqi J.Vet.Med. 19 & 20:42
16. Al-Bana, A.S., Al-Falahy, R.H. and Shony, M.O. (2001) Isolation and identification of rotavirus from infants with biochemical and histophysical studies of isolated viruses. Iraqi J. Microbiol. 13:13
17. Hitchner, S.B., Dornermuch, C.H., Graham, P.H. and William, J.E. (1980) Isolation and identification of avian pathogens. 2nd ed. Am. Ass. Avian Pathologists .152-160.
18. Medin, S.H., Andriese, P.C. and Darby, N. (1957) The in vitro cultivation of tissue of domestic and laboratory animals. Am.Vet. Res. 18.932.
19. Sato, K., Inaba, Y., Shinozakl, T., Fujll, R. and Matumoto, M. (1981) Isolation of human rotavirus in cell culture. Arch.Virol.69-155.
20. Mochizuki, M., Nagagomi, O. and Shibata, S. (1992) Hemagglutinin activity of two distinct genogroup of feline and canine rotavirus strain. Arch.Virol.122: 373.
21. Castrucci, G., Ferrai, M., Frigeri, F., Cilli, V., Perucca, L. and Donelli, G. (1985) Isolation and characterization of cytopathic strain of rotavirus from rabbits. Arch.Virol.83: 99.
22. Aboudly, Y., Shif, H., Silberstein, H. and Stematsky, T.G. (1989) Efficiency of isolation of human rotavirus in primary African green monkey kidney cells. J. Virol. Meth. 25:251.