

دراسة تجريبية للتغيرات المرضية للرعامي المصاب بفايروس جدري الدجاج المعزول
محليا باستخدام المجهر الإلكتروني الماسح

حارث محمد ابراهيم الحيايلى عدي عبد الرزاق الجميلي

فرع الأمراض والدواجن - كلية الطب البيطري - جامعة بغداد - بغداد - العراق

تاريخ الاستلام 2002/1/5 تاريخ القبول 2002/5/2

الخلاصة

درس تأثير الإصابة التجريبية بفايروس جدري الدجاج المعزول محليا على افراخ بعمر ثمانية اسابيع وبطريقة الحقن في الرعامي وقد اظهرت الافراخ المصابة اعراضا تنفسية بعد 2 و 3 و 4 أيام بعد الحقن مع ظهور احتقان الغشاء المخاطي للرعامي وزيادة ملحوظة للافرازات المخاطية فسي تجويف الرعامي والحنجرة ومنذ اليوم التاسع بعد الإصابة بدأ ظهور بثور بيضاء مصفرة في الجزء العلوي من الرعامي وتكون الغشاء الخناقي أو الخناقي الكاذب. استخدم المجهر الإلكتروني الماسح لدراسة التغيرات التي حصلت في ظاهرة الرعامي المصاب بالجدري إذ وجد ازدياد الخلايا المنتجة للمخاط مع تنكس الخلايا الظهارية وفقدان الاهداب وتجمع الخلايا الظهارية بشكل عناقيد تشبه السورم الحليمي وظهر ارتشاح الخلايا الالتهابية وتجمع النضحة المصلية الليفينية حيث تركزت التغيرات في الايام 9 إلى 19 من الإصابة.

**PATHOLOGICAL STUDY OF LOCALLY ISOLATED FOWL
POXVIRUS –EXPERIMENTALLY INFECTED TRACHEA
USING SCANNING ELECTRON MICROSCOPY**

H.M.Al-Hyali

A. Al-Jumily

Department of Pathology and Poultry Diseases, College of Veterinary Medicine,
University of Baghdad, Iraq.

Summary

In this study fowl poxvirus has been isolated from naturally infected birds. This virus induced respiratory distress, 2, 3 and 4 days post inoculation, in intratracheally inoculated 8 week-

old chickens, these respiratory distress include congestion of tracheal mucosa, increased tracheal secretion and whitish-yellowish pastules appeared at ninth day post inoculation in the upper part of the trachea forming diphtheritic or pseudodiphtheritic membrane. Using scanning electron microscopy to study the changes that occurs in the epithelial surface of trachea. It was found that the virus causes proliferation of epithelial cells forming cluster like papilloma, deciliation and activation of goblet cells.

المقدمة

جدري الدجاج من الامراض الفايروسية التي تصيب مختلف انواع الدجاج وباعمار مختلفة⁽¹⁾ ينتشر المرض في مختلف انحاء العالم بضمنها العراق حيث شخص سريريا ومنذ فترة ليست بالقصيرة إذ ظهر المرض لأول مرة سنة 1975⁽²⁾ وتمكن⁽³⁾ من عزل فايروس الجدري في الطاووس والصقور في حديقة حيوان بغداد ومن الحمام تمكن⁽⁴⁾ من عزل فايروس الجدري كما وسبق سجل حدوث إصابة بالجدري في طيور الدراج المربي في الاقفاص من قبل⁽⁵⁾. ينتشر المرض بواسطة الحشرات الماصة للدم ويمكن ان تحدث الإصابة عن طريق الهواء الحاوي على القشور المتبيسة الحاوية على الفايروس التي تعد مصدرا لاصابة الجهاز التنفسي العلوي⁽⁶⁾،⁽⁷⁾ مسببا ظهور التهاب الرغامى الخناقي Diphtheritic bronchitis والتهاب الحنجرة الخناقي Diphtheritic laryngitis⁽⁸⁾.

درست التغيرات النسيجية للغشاء المخاطي الرغامى المصاب بفايروس الجدري من قبل الكثير من الباحثين^(9, 10, 11) وكما درس تأثير الفايروس على خلايا الزرع النسيجي والغشاء المشيمي اللقائقي والجزء العلوي من الجهاز التنفسي للدجاج باستخدام المجهر الاليكتروني النافذ من قبل الكثير من الباحثين⁽¹²⁾. وبالنظر لاقتصار الدراسات في القطر على العزل والتوصيف لفايروس الجدري⁽¹³⁾ على تحضير اللقاحات على خلايا الزرع النسيجي⁽¹⁴⁾، يهدف هذا البحث دراسة التغيرات السطحية لظاهرة الرغامى المصاب بفايروس الجدري باستخدام المجهر الاليكتروني الماسح Scanning electron microscope (SEM).

المواد وطرائق العمل

تم استخدام 45 فرخا من نوع فاوبرو بعمر ثمانية اسابيع خالية من الإصابة بجدري الدجاج وسليمة مرضيا. تم عزل الفايروس من الحالات الحقلية. ومن الدجاج المعروض للبيع في سوق الغزل وسوق الملحاني في بغداد وتم تمريره على بيض الدجاج الحاوي على الاجنة وبطريقة الحقن على الغشاء

اللقائقي المشيمي ولاربعة تمريرات متتالية وتمت معايرة الفايروس بعد كل تمريرة واعتمدت التمريرة الرابعة كمصدر للفايروس لاحداث الإصابة وكان المعيار الحجمي للفايروس $10^{6.3} \text{EID}_{50}/\text{ml}$ وحسب طريقة⁽¹⁵⁾.

تم إصابة 30 فرخة داخل الرغامي وبكمية 0.1 مل من عالق الفايروس ومن التمريرة الرابعة وبمعيار حجمي $10^{6.3} \text{EID}_{50}/\text{ml}$ واحتفظ ببقية الافراخ البالغ عددها 15 فرخة كمجموعة سيطرة. وبعد ساعتين ومن ثم يوميا من بعد الإصابة ذبحت اربعة افراخ اثنان من المصابة واثنان من افراخ السيطرة وأخذ جزء من الرغامي 1 سم اسفل الحنجرة وقطع إلى قطع صغيرة 3×3 ملم وثبتت بمحلول 2.5% كلوترالديهايد المبرد بدرجة 4 م°.

ثبتت العينات المثبتة سابقا بمحلول الكلوترالديهايد بمحلول 1% رباعي اوكسيد الازوميوم *Cacodylate-buffered Osmium tetroxide* لمدة ساعتين وبدرجة 4 م° ومن ثم غسلت عدة مرات بالمحلول الداري الفوسفاتي ومررت بعدها بالاسيتون وبتراكيز تصاعديّة 35، 50، 75، 95 و100% ولمدة ربع ساعة لكل تركيز وجففت العينات إلى الدرجة الحرجة *critical-point drying* بواسطة استخدام ثاني اوكسيد الكربون السائل وبدرجة 34 م° وضغط 1300 جو/بار ثم وضعت على قرص خاص (*Aluminum stubs*) وغطيت بدقائق الذهب باستخدام جهاز (*Bio Rad E 5000 SEM coater*) وبعدها تكون العينات جاهزة للفحص بالمجهر الاليكتروني الماسح نوع Philips 515.

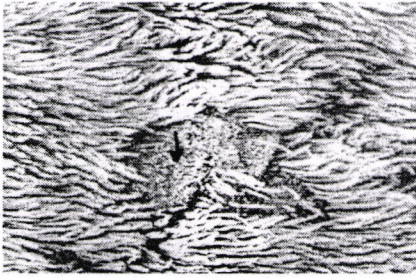
النتائج

اظهرت افراخ المجموعة المصابة بالفايروس وبطريقة الحقن بالرغامي ومنذ اليوم الخامس بعد الحقن علامات الخمول وعدم الاقبال على تناول العلف وفي اليوم الثامن ظهرت غرغرة رطبة تطورت إلى صعوبة تنفس شهيق وسعال ولوحظ ظهور البثور الجلدية ما بعد الثلاثين يوم بعد الإصابة. اما افراخ مجموعة السيطرة التي لم يتم اصابتها فلم يظهر عليها أي من العلامات المذكورة سابقا بعد اجواء الفحص التشريحي للافراخ التي قتلت في الايام الأولى بعد 2 و3 و4 ايام من احداث الإصابة عن طريق الرغامي لم تلاحظ أي تغيرات مرضية واضحة على اعضاء الجهاز التنفسي باستثناء احتقان الغشاء المخاطي للرغامي مع زيادة ملحوظة للافرازات المخاطية في تجويف الرغامي والحنجرة. وفي الايام التاسع إلى اليوم 45 بعد الإصابة لوحظ امتلاء الحنجرة بالافرازات المخاطية الكثيفة القوام مع بداية

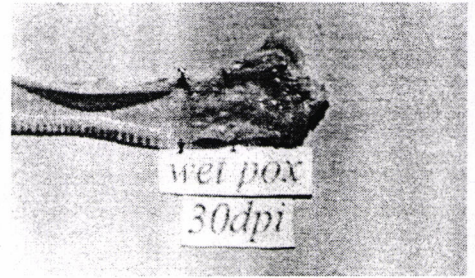
ظهور بثور بيضاء مصفرة في الحنجرة والجز العلوي من الرغامي سرعان ما تكبر هذه البثور بالحجم لتتحد مع بعضها مكونة غشاء خناقي أو خناقي كاذب (الصورة 1). اما افراخ مجموعة السيطرة فلم يظهر عليها أي من هذه العلامات.

تبين من خلال فحص عينات رغامي افراخ السيطرة بالمجهر الالكتروني الماسح بان ظهارة الرغامي تتألف من مجموعة من الخلايا المهذبة ذات اهداب طويلة تنتشر بينهما خلايا غير مهذبة ذات اهداب قصيرة (الصورة 2).

اظهرت نتائج فحص ظهارة الرغامي بعد 16 يوم من الحقن باستخدام المجهر الاليكتروني الماسح ، فقدان الاهداب من بعض الخلايا وتجمع الخلايا للمفاوية وارومات الخلايا للمفاوية lymphoblast على سطح الغشاء المخاطي (الصورة 3) وتجمع الخلايا الظهارية بشكل عناقيد تشبه الورم الحليمي papilloma مع فقدان تام للاهداب (الصورة 4)، وبعد 19 يوم من الحقن اظهرت نتائج الفحص تنكس وتآكل في خلايا الظهارة مع فقدان تام للاهداب مع وجود مواد مخاطية مكونة غطاء رقيق على الظهارة وتجمع الخلايا الالتهابية (الصورة 5 ، 6) ولوحظ أيضا تضخم الغدد المخاطية مع زيادة تجمع النضحة المصلية وتجمع الخلايا الالتهابية (الصورة 7) ووجدت أيضا مناطق ظهرت عليها تجدد الاهداب (الصورة 8).

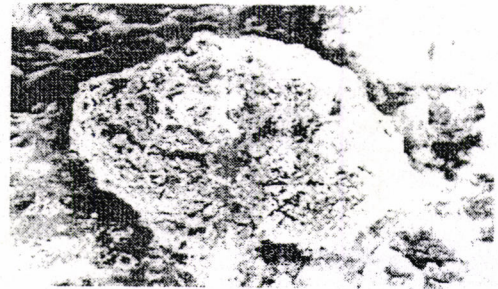
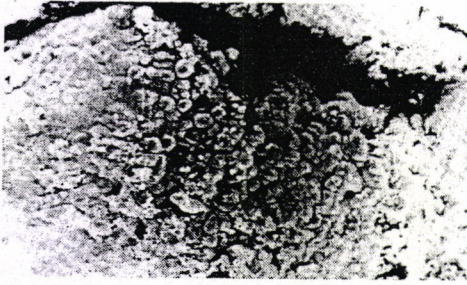
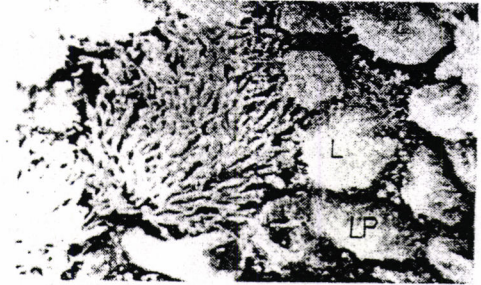


الصورة 2: صورة بالمجهر الالكتروني الماسح لرغامي فرخ من مجموعة السيطرة توضح الخلايا المهذبة وبينها خلايا تمتاز بقصر اهدابها (↓) 4000X.



الصورة 1: رغامي وحنجرة يلاحظ عليها احتقان وتجمع بثور بيضاء متصلة مع بعضها مكونة غشاء خناقي في بداية الرغامي بعد 30 يوم من الإصابة.

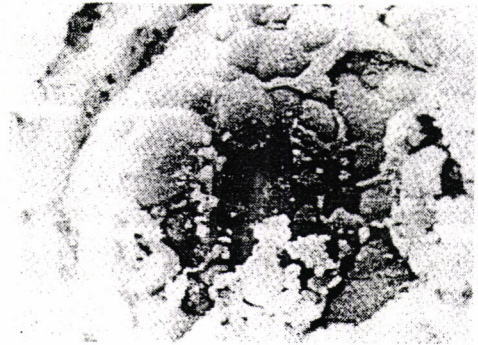
الصورة 3: صورة بالمجهر الاليكتروني الماسح
لرغامي مصاب بالجذري توضح فقدان
الاهداب من بعض الخلايا مع تجمع الخلايا
اللمفاوية (L) واورمات الخلايا للمفاوية
(LP)، 16 يوم بعد الإصابة X 4400.



الصورة 5: صورة بالمجهر الاليكتروني الماسح
لرغامي مصاب بالجذري توضح التآكل في
الظهارة (سهم كبير) مع فقدان تام بالاهداب
وجود مخاط مكونا غطاء رقيق على الظهارة
وتجمع الخلايا الالتهابية (سهم صغير)، 19
يوم بعد الإصابة X 263.

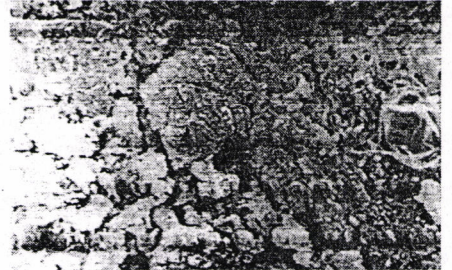
الصورة 4: صورة بالمجهر الاليكتروني الماسح
لرغامي مصاب بالجذري توضح تبرعم
خلايا الظهارة وبروزها على شكل ورم
حليمي مع فقدان تام للاهداب، 16 يوم بعد
الإصابة X 274.

الصورة 6: مقطع مكبر للصورة 5 يلاحظ تجمع
الخلايا للمفاوية ووجود المواد المخاطية مكونة
غشاء خنقاقي على الظهارة (→) X 1050.





الصورة 8: صورة بالمجهر الاليكتروني
الماسح لرغامي مصاب بالجذري
توضح تجدد الاهداب بعد 19 يوم
بعد الإصابة X 5450.



الصورة 7: صورة بالمجهر الاليكتروني
الماسح لرغامي مصاب بالجذري توضح
تضخم الغدد المخاطية (↓ مع زيادة
تجمع النضحة المصلية . ، 19 يوم بعد
الإصابة X 1050.

المناقشة

يعد مرض جذري الدجاج من الامراض الفايروسية الخمجية الذي يصيب الدجاج بمختلف الاعمار ويحدث بشكلين الجلدي والخناقي ويعد المرض من العقبات المهمة التي تواجه صناعة الدواجن وخاصة الدجاج البياض مسببا خسائر كبيرة متمثلة بالهلاكات بسبب الاختناق وخاصة عند حصول الشكل الخناقي بالاضافة إلى انخفاض إنتاج البيض⁽¹⁶⁾.

ادى حقن الفايروس داخل الرغامي الى ظهور علامات تنفسية وظهور الافات الجلدية بعد 30 يوم من الاصابة وتفسير هذه الحالة هو انه نتيجة لتخديش الرغامي حصل تكاثر موضعي للفايروس في الجز العلوي من الرغامي وهذا يخالف ما وجدته⁽¹⁷⁾ الذي لاحظ عدم حصول إصابة عن طريق الحقن داخل الرغامي. تمثلت العلامات التنفسية بحدوث بهر شديد sever dyspnea وهسة ولوحظت نثرة في الرأس في بداية ظهور العلامات التنفسية في محاولة من الطير للتخلص من الافرازات المخاطية التي تتجمع في القنوات التنفسية وهذا يتفق مع ما وجدته⁽⁸⁾ وهذه العلامات قد تسببها فايروسات اخرى مثل فايروس الهيريز المسبب لالتهاب القصبات والحجرة الخمجي ويمكن التفريق بينهما لان الدجاج المصاب بهذا المرض تنتج افرازات مخاطية مصبوغة بالدم كعلامة مميزة لهذا المرض⁽¹⁸⁾.

عند دراسة الافات المرضية العيانية لوحظت تغيرات مرضية مميزة للشكل الرطب لمرض الجدري تمثلت بظهور بثور بيضاء مصفرة مرتفعة عن سطح ظهارة الحنجرة والرغامي وقد يخطأ في تشخيصها مع الافات المشابهة التي تحدث نتيجة لنقص فيتامين A الذي يمكن التفريق بينها بازالة هذه الافة بسهولة من دون ان تترك نزف في حالة نقص فيتامين A⁽¹⁹⁾ ويمكن التفريق بينهما أيضا بالفحص النسيجي إذ يلاحظ وجود الاجسام الاستمالية الهيولية في حالة الجدري، كما وان تكون الغشاء الخناقي على ظهارة الحنجرة والرغامي قد يكون مشابها مع نفس الافة التي يسببها فايروس الهيريز المسبب لـ ILT حيث يمكن تفريقهما نسيجيا إذ نلاحظ وجود اجسام استمالية نواتية في حالة ILT ولكن بعد 16-36 ساعة من الإصابة .

من اهم العلامات الملفتة للانتباه التي تحصل في بداية الإصابة بالجدري هو فرط تنسج وتضخم الخلايا المنتجة للمخاط والتي تم ملاحظتها باستخدام المجهر الاليكتروني الماسح. ان هذا التضخم قد يكون بسبب زيادة فعالية هذه الخلايا لانتاج المخاط كوسيلة دفاعية ضد الفايروس المستخدم وهذا يتوافق مع ما وجدته⁽²⁰⁾ وان الافات التي لوحظت في الـ SEM هي فقدان الاهداب وتجمع الخلايا الالتهابية ووجود النضحة المصلية الليفينية على سطح الخلايا وفرط تنسج وتضخم الخلايا التي تبرز فوق سطح المخاطية مكونة ما يشبه الورم الحليمي نتيجة لفرط تنسج خلال القاعدية

ان التغيرات السطحية في الرغامي تعكس قابلية الفايروس على ابطال الوسائل الدفاعية للقناة التنفسية مما يعرضها بالتالي إلى مضاعفات ثانوية للدجاج المصاب. ان الفايروس قد يسبب تغيير في العملية الافرازية للخلايا المنتجة للمخاط والغدد تحت المخاطية التي تفرز عدد من المواد تتضمن الكلوبولين المناعي A و mucous glycoproteing (IgA) و proteoglycons⁽²¹⁾ وان التغيير في هذه الافرازات سيؤدي إلى اضعاف قابلية الدجاج المصاب للمسببات المرضية الاخرى لما لهذه الافرازات من دور في التفاعل مع الفايروسات والبكتريا.

ان الدمار الذي حصل للخلايا الطلائية للرغامي كان بسبب التأثير التآزري بين زيادة حجم الغدد المخاطية وتحت المخاطية والضغط الناتج عن الوذمة والارتشاح الخلوي مما يؤدي إلى تنكس وتخر الخلايا وتموتها والتي تصبح جزءا من النضحة المخاطية التي بدت واضحة عند فحصها بـ SEM.

بدأت علامات التجدد بالظهور عند فحص مخاطية الرغامي بـ SEM بعد 19 يوم من الإصابة ولاسيما الاهداب وان ظاهرة التجدد هذه مشابهة لتجدد الاهداب التي تحصل في الامراض

التنفسية الاخرى^(22,23) والفرق بينهما هو ان عملية التجدد بالاهداب بدأت بعد مرور 19 يوم من الاصابة بالجدي اما في الامراض التنفسية الاخرى فكانت مبكرة.
ان هذه الدراسة اوضحت بان الفحص بـ SEM كانت فعالة لتوضيح التغيرات المرضية لظاهرة لرغامي المصابة بفايروس الجدي المعزول محليا.

References

1. Tripathy, D.N. and Hanson, L.E.(1975) Immunity to fowl pox. Am. J. Vet. Res. 36:541-544.
2. FAO (1992) Animal health yearbook.
3. Al-Falluji, M.M.; Tantawi, H.H.; Al-Bana, A. and Al-Sheikly, F.(1979) Pox infection among captive peacocks. J. Wild Dis. 15:597-600.
4. Tantawi, H.H; Al-Falluji, M.M. and Shony, M.O.(1979) Heat-selection mutants of pigeon poxvirus. Acta Virol. 23:249-252.
5. Al-Ani, M.O.(1986) An outbreak of pox among pheasants in Iraq. Avian Pathol. 15:795-796.
6. Trampel, D.W.(1996) Fowl pox update. In: Poultry news, Nebraska Poultry Newsletter (1997). Biannual Meeting of the Veterinarians, Iowa State University.
7. Aiello, E. and Mays, A.(1998) The Merck Veterinary Manual 8 th ed. Whitehouse station, NJ, USA: 1960-1962.
8. Griffiths, G.L. and Purcell, D.A.(1986) Fowl pox in the trachea of laying hens. Aust. Vet.J. 63:91-92.
9. Tripathy, D.N. and Reed, W.M.(1997) Pox. In: Diseases of Poultry. Calnek, B.W., Barnes, H.J., Beard, C.W., McDougald, L.R. and Saif, Y.M. eds. 10 th ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa. 643-659.
10. Al-Hyali, H.M. (2001a) Immunoenzyme detection of fowl poxvirus in cells of chorioallantoic membrane and trachea. Iraqi J. Vet. Sci. (accepted for publication).
11. Al-Hyali, H.M. (2001b) Use of immunoperoxidase and methylen blue staining techniques for detection of pathological changes of fowl poxvirus-infected cell culture and tracheal epithelial cells. Iraqi J. Vet. Sci. (accepted for publication).

12. Brooks,G.F., Butel,J.S., Ornston,L.N, Jawets,E., Melnick,J.I. and Adelbg, E. (1995) Medical Microbiology. 20th ed. Asimon and Schoster Company, USA, 381-390.
13. Mohammed, N.A.(1979) Comparative study of fowel pox and pigeon poxviruses. M.Sc. Thesis, College of Veterinary Medicine,University of Baghdad.
14. Al-Fahad, A.A.(1993) Fowel pox vaccine preparation on tissue cultural. M.Sc. Thesis, College of Veterinary Medicine, University of Baghdad.
15. Reed, L.J. and Muench. A.(1938) Simple method for estimating fifty percent endpoint. Am.J.Hyg. 27:493-497.
16. Buscaglia,C., Bankowski,R.A. and Miers, L.(1985) Cell cuture virus-neutralization test and ELIZA for evaluation of immunity in chickens against fowl pox. Avian Dis. 29:672-678.
17. Minbay,A. and Kreier,J.P.(1973) An experimental study of the pathogenesis of fowl pox infection in chicken. Avian Dis. 17:532-539.
18. Al-Hyali, M.M., Al-Joboury, K.H. and Ismai,A.D. (1998) Pathological study on laryngotracheitis in layers. Iraqi. J. Vet. Sci. 22:50-66.
19. Austic, R.E. and Scott, M.L.(1997) Nutritional Diseases In: Diseases of Poultry. Calnek *et al.* 10th ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, 643-659.
20. Tanizaki, E., Kotani, T. and Odagiri, Y.(1987) Pathological changes of tracheal mucosa in chickens infected with fowl pox virus. Avian Dis. 31:169-175.
21. Bashoum,C.B.(1986) Regulation of airway secretory cell. Clin. Chest Med. 7: 231-237.
22. Hayashi,S. Odagiri, Y., Kotani, T. and Honochi,T.(1985) Pathological changes in the tracheal mucosa of chicken infected with ILT virus. Avian Dis.29:943-950.
23. Lai, M.C. and Ibrahim, A.L.(1985) A study on a velogenic viscerotropic Newcastle disease virus in Vitro and in Vivo. Ph. D. Thesis, University Pertanian Malaysia, Selangor, Malaysia.