عزل فايروس نيوكاسل من الحمام البري وتشخيصة

انطوان صبري البنا عائدة برع علاوي امين احمد صبار
فرع الاحياء المجهرية–كلية الطب البيطري– جامعة بغداد

الخلاصة

تم عزل وتشخيص فايروس نيوكاسل من الحمام البري في احد المواقع التابعة لجامعة بغداد(كلية الهندسة خوارزمي) والتي شهدت اصابة شديدة ومهلكة للطيور اذ تم عزل فايروس نيوكاسل من الطحال والرئتين للطيورالنافقة في الاورمات الليفية لاجنة بيض الدجاج Chicken embryos fibroblasts(CEF) حيث لوحظ وجود تأثير مرضي واضح ومميز بعد مرور 24ساعة من عملية حقن العالق المرضي المأخوذ من الطيور المصابة وبعد ذلك تم تشخيص الفايروس باستخدام مصل ممنع مرجعي مضاد لفايروس نيوكاسل باختبار اثباط التلازن الدموي.

Isolation &Identification of Newcastle Disease Virus From Wild Pigeons

Anton Sabri AL-bana Aida Bara Allawe Ameen Ahmed Sebbar
Dept. Of Microbiology.-College of Vet. Med-Baghdad University

SUMMARY

Isolation &identification of Newcastle disease virus from wild pigeons inhabiting University of Baghdad (Al-Khwarizmi College of engineering) where velogenic and devastating infection of birds was encountered. Chicken embryos fibroblasts (CEF) were used for virus isolation (from infected spleen and lungs) and propagation. Viral cytopathogenic effect was noticed on infected (CEF) cell culture within (24) hr post inoculation. The virus was identified by heamagglutination inhibition (HI) test using reference anti NDV serum.

المقدمة

مرض نيوكاسل (Newcastle Disease) واحد من أهم الأمراض الفايروسية الفتاكة التي تصيب الدجاج والطيور الأخرى بمختلف الأعمار مسبباً هلاكات عالية وخسائر اقتصادية كبيرة منذ تسجيل المرض لأول مرة في جزيرة جافاباًندونسيا سنة (1926) م ولحد الآن فقد أصبح هذا المرض واحداً من الأمراض المستوطنة في شتى بقاع العالم ومنها العراق.

وفي مقدمة الطيور التي تصاب بالمرض اضافة الى الدجاج ,الحمام بكافة انواعهففي نهاية السبعينيات عزلت عترة ضارية لفايروس نيوكاسل من الحمام في الشرق الاوسط عرفت هذة العزلةب(pigeon paramyxovirus-1) ,اظهرت هذة العترة اختلافات مستضدية عن عترات فايروس نيوكاسل التقليدية المعزولة من الدواجن اما في اوربا فعزل الفايروس من الطيورالداجنة لاول مرة عام 1981في ايطاليا(1) بعد ذلك حدثت اوبئة كثيرة بالفايروس انتشرت في معظم انحاء العالم ضمت كافة انواع الحمام (2)اذان الحمام قابل للاصابة بمرض نيوكاسل عند تعرضة للفايروس وبمختلف الطرق التي استعملها الباحثون في احداث الاصابة التجريبية(3) كما ذكر الباحثون ان اغلب الاصابات في الطيور البرية تحدث نتيجة لتماسها بالطيور الداجنة(4).

وفي العراق اثبت الباحث خماس(1981) امكانية اصابة الحمام بفايروس نيوكاسل تجريبيا.اهم العلامات االسريرية التي تلاحظ على الحمام المصاب هي العلامات العصبية وتشمل فقدان التوازن ,التواء الرقبة ,شلل الارجل او شلل الاجنحة هذا اضافة الى العلامات التنفسية(5).

وبناءا على استدعاء رسمي من عمادة كلية الهندسة خوارزمي للتحري عن وجود اصابة يشك بكونها تعود لانفلونزا الطيور في الحمام المصاب والهالك في بناية الاقسام العلمية التابعة لكلية الهندسة خوارزمي قام الفريق البحثي باجراء زيارة ميدانية للتحري عن الحالة وجمع النماذج اللازمة للتشخيص وقد تم عزل فايروس نيوكاسل وتشخيصة من الحمام المصاب طبيعيا لاول مرة في العراق والتعرف على التاثيرات المرضية التي يحدثها الفايروس في خلايا الزرع النسيجي .

الموادوطرائق العمل

1-جمع النماذج المرضية

اخذت نماذج الدم من الحمام المصاب الذي ظهرت علية اعراض المرض من القلب مباشرة في انابيب اختبار معقمة وقد تم فصل المصول باستخدام جهاز الطرد المركزي وبسرعة 1500دورة في الدقيقة لغرض الكشف عن الاضداد النوعية الخاصة بفايروس نيوكاسل في امصال الحمام المصاب وبعد اجراء التشريح المرضي للطيور المصابة والهالكة حديثا وملاحظة الافات المرضية على الاعضاء اخذت نماذج من الكبد والطحال والرئتين لغرض عزل الفايروس .

2-اختبار اثباط التلازن الدموي للمصول الماخوذة من الطيور

تم أجراء هذا الاختبار بطريقة بيتا وفقا لما ذكرة الباحثون (6) وباستخدام اطباق المعايرة الدقيقة وكما يأتي:

1- إضافة مقدار (0.025) مل من محلول الملح الفسيولوجي إلى كل حفرة من حفر الطبق الخاص بالاختبار والمؤلف من (96) حفرة.

2- إضافة المصل (المراد فحصة) بمقدار (0.025) مل إلى الحفرة الأولى ثم عملت تخافيف ثنائية للمصل.

3- إضافة مقدار (0.025) مل من الفايروس الحاوي على ثمان وحدات تلازنية إذ استخدمت عترة (LaSota) إلى جميع الحفر بالتساوي تم رج الطبق باستخدام جهاز الهزاز وترك الطبق في الحاضنة في درجة (37)مْ مدة (15) دقيقه.

4- أضيف مقدار (0.025) مل من عالق كريات الدم الحمر الخاصة بالدجاج تركيز (1%) إلى جميع الحفر بالتساوي ثم رج الطبق وتم وضعه في الحاضنة في درجة (37) مْ مدة (30) دقيقة ثم قرأت النتيجة وتم حساب معيار الأضداد المثبطة للتلازن الدموي بقراءة مقلوب أخر تخفيف مصلي أعطى اثباط للتلازن الدموي.

استخدم ضابطان للاختبار الأول ضابط لعالق كريات الدم الحمر والذي احتوى على محلول الملح الفسيولوجي مضافا إليه عالق كريات الدم الحمر والضابط الثاني للفايروس والذي احتوى على محلول الملح الفسيولوجي مضافا إليه الفايروس وعالق كريات الدم الحمر.

3-تحضير النماذج المختبرية

اتبعت طريقة الباحث (7) في تحضير النماذج المرضية التي تم أخذها (الطحال والرئتين) .

4-تنمية الفايروس في خلايا الزرع النسيجي احادي الطبقة

1- تحضير خلايا الزرع النسيجي من أجنة بيض الدجاج النامي

1. أتبعت طريقة الباحث (8) في تحضير الاورمات الليفية لأجنة بيض الدجاج (Chicken embryos fibroblast) .

2-حقن العالق المرضي في خلايا الزرع النسيجي

حقنت اربعة من القناني الحاوية على خلايا الزرع النسيجي بالعالق المرضي المحضرمن النماذج الماخوذة من الطيور المصابة بمقدار (0.5) مل للقنينة الواحدة وتركت اثنين من القناني كمجموعة سيطرة دون ان يتم حقنها بالفايروس ، ثم وضعت القناني في الحاضنة في درجة (37)^{o} م

مدة (45) دقيقة بعد ذلك أضيف إليها الوسط الزرعي الحافظ ثم أعيدت مرة ثانية إلى الحاضنة وتم مراقبة التأثير المرضي الناجم عن نمو الفايروس يومياً لحين اكتمال التأثير المرضي.

ثبتت الخلايا باستخدام الفورمالين بنسبة (10%) وقد تم تسجيل التأثير المرضي على خلايا الزرع النسيجي وجرى مقارنته مع مجموعة السيطرة وقد تم تمرير الفايروس تمريرات عدة على خلايا الزرع النسيجي في نفس نوعية الخلايا وبالطريقة نفسها.

5-تشخيص الفايروس

تم فحص السائل الزرعي المأخوذ من قناني الزرع النسيجي باختبار التلازن الدموي وكما ياتي :

أجري فحص التلازن الدموي للسائل الزرعي الذي تم حصادة حسب طريقة)الباحثين(9) و(10) باستخدام أطباق المعايرة الدقيقة المؤلفة من(96) حفرة خاصة بهذا الفحص وكما يأتي:

1. أضيف مقدار (0.025) مل من محلول الملح الفسيولوجي (normal saline) إلى جميع الحفر بالتساوي.
2. أضيف مقدار (0.025) مل من السائل الزرعي للحفرة الأولى وجرى تخفيفه ثنائيا بنقل نفس الكمية من الحفرة الأولى إلى الثانية وصولا إلى الحفرة الأخيرة.
3. أضيف مقدار (0.025) مل من خلايا الدم الحمر المغسولة (بتركيز 1%) إلى جميع الحفر بالتساوي ثم رج الطبق في كافة الاتجاهات باستخدام جهاز الهزاز (Shaker) ووضع الطبق في الحاضنة في درجة (37)^{o} م مدة (15-20) دقيقة بعد ذلك قرأت النتيجة وتم تسجيلها.

ثم تم اجراء فحص اثباط التلازن الدموي للسائل الفايروسي المحصود (الوسط الزرعي للخلايا المصابة) باستخدام مصل ممنع مرجعي مضاد لفايروس نيوكاسل وبالطريقة المذكورة سابقا .

النتائج

1-العلامات السريرية والمرضية

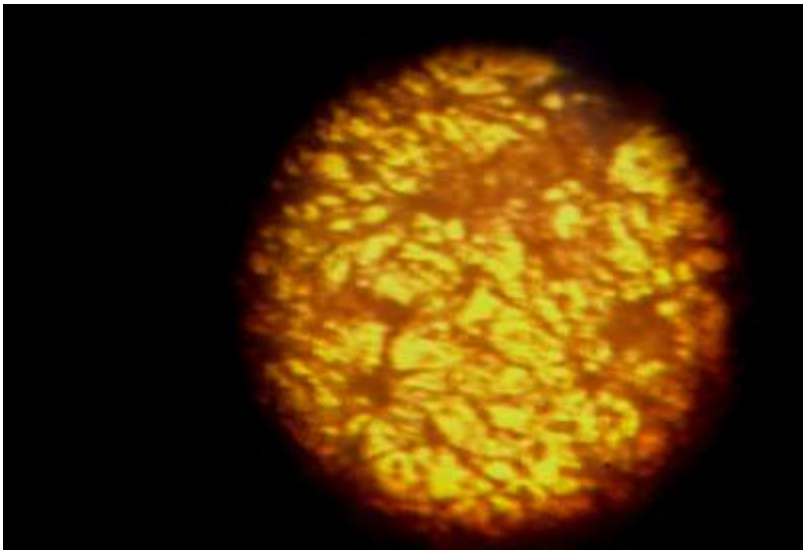
اظهرت الطيور المصابة علامات عصبية واضحة تمثلت بالتواء الرقبة والشلل الكلي او الجزئي حيث لوحظ شلل الاجنحة وعدم القدرة على الطيران كما لوحظ هزال شديد. وعنداجراء الصفة التشريحية على الافراخ الهالكة لوحظ وجود تقرحات ونزوفات في منطقة المعدة الحقيقية اضافة الى تضخم الطحال وملاحظة ديدان معوية ومنها الشريطية .

2- نتائج اختبار اثباط التلازن الدموي لعينات المصل المأخوذة من الطيور

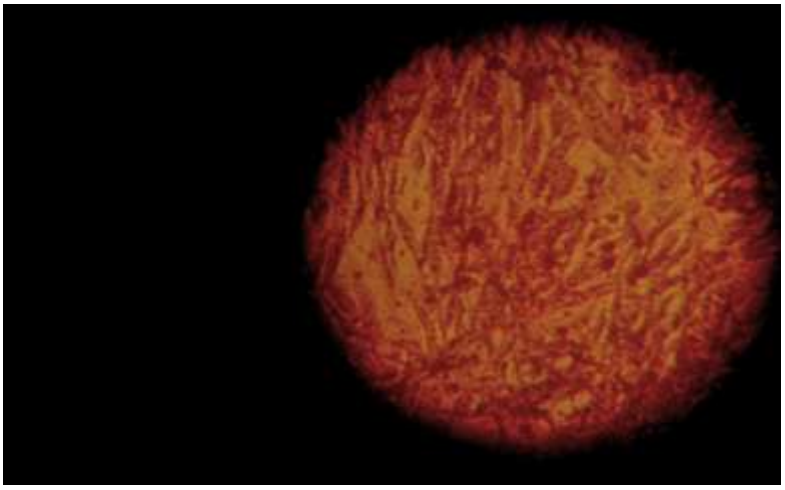
لم يظهر اختبار اثباط التلازن الدموي لعينات المصل المأخوذة من الطيوروجود اضداد مثبطة للتلازن الدموي .

3–نتائج عزل و تنمية الفايروس في خلايا الزرع النسيجي

أظهرت نتائج تنمية فايروس نيوكاسل المعزول من الحمام على الاورمات الليفية لأجنة بيض الدجاج تأثيراً مرضياً خلوياً واضحاً ومميزاً ابتدأ بعد مرور (24) ساعة من عملية الحقن إذ تمثل باستدارة الخلايا وانتفاخها مقارنة بخلايا مجموعة السيطرة واكتمل التأثير المرضي بعد مرور (48) ساعة من عملية الحقن إذ لوحظ تكوين الخلايا العملاقة giant cells اضافة الى تمزق خلايا الطبقة الواحدة وتكوين بؤر انتكاسية مختلفة الأحجام كما يلاحظ في الصورة رقم (1) مقارنة بخلايا مجموعة السيطرة التي لم يظهر عليها أي تغيير وللمدة نفسها كما هو موضح في الصورة رقم (2).



صورة (1): تبين التأثير المرضي الخلوي لفايروس نيوكاسل المعزول من الحمام علىالاورمات الليفية لأجنة الدجاج التمرير الأول بعد مرور (48) ساعة تكبير (100x)



صورة (2): تبين الشكل الطبيعي المغزلي للخلايا الليفية لاجنة الدجاج تكبير (100x)

4-نتائج تشخيص الفايروس:

اظهرت نتائج تشخيص الفايروس باختبار التلازن الدموي نتيجة موجبة وبمعيار لايتجاوز 2^3 وحدة تلازنية كما اظهر اختبار اثباط التلازن الدموي نتيجة موجبة باستخدام مصل ممنع مرجعي مضاد لفايروس نيوكاسل .

المناقشة

ان تاريخ الحالة ونسبة الهلاكات العالية ضمن قطعان الطيور وبمقدار (8-10) طير في كل يوم امرا يشير الى ضراوة فايروس نيوكاسل المعزول حيث ان نسبة الهلاكات وفترة حضانة المرض تعتمد بدرجة اساسية على ضراوة الفايروس اضافة الى العوامل الاخرى كما اشار الى ذلك الباحث(1998) ,Alexander (7) ومن ملاحظة العلامات السريرية التي ظهرت على الحمام لاسيما العلامات العصبية (التواء الرقبة وشلل الاجنحة) نجد انها تتفق مع علامات المرض التي اشارت اليها نتائج الباحثون (1980).Erickson,*etal* (5) وكذلك مشابهة لعلامات المرض في الدجاج والتي اشارت اليها نتائج الباحث(1978) ,Hanson (11) كما ان التغيرات المرضية التي تمت ملاحظتها على الحمام المصاب (التقرحات والنزوفات التي شوهدت على الجهاز الهضمي وكبرحجم الطحال) مشابهة للتغيرات المرضية التي ذكرها الباحثان(1971) ,Steven &Trainer (12) في الحمام المصاب وهي مشابهه للتغيرات التي تحدث في الدجاج كما اشار الى ذلك نفس الباحثين. وعندتنمية العالق المرضي على خلاياالزرع النسيجي (الاورمات الليفية لاجنة الدجاج) لوحظ التأثير المرضي للفايروس على الخلايا بعد مرور 24 ساعة مع تكوين بؤر كبيرة الحجم من طبقة الخلايا الواحدة وخلايا عملاقةومن ملاحظة سرعة تكوين التأثير المرضي يتأكد لنا كون

الفايروس احد الفايروسات الضارية كما اشار الى ذلك الباحث(1998) ,Alexander (7) ,وبعد ذلك تم تشخيص الفايروس باختباري التلازن واثباط التلازن الدموي باستخدام مصل ممنع مرجعي مضاد لفايروس نيوكاسل اذلوحظ ان معيار الفايروس لم يتجاوز ثمان وحدات تلازنية وهو احد سمات الفايروس الضاري كما اشار الى ذلك الباحثون (1974).Gough,*etal* (13).اما في ما يخص اثباط التلازن الدموي لعينات المصل المأخوذة من الطيورفلم يظهر الاختبار وجود اضداد مثبطة للتلازن مما يدلل على الاصابة الحادة بالمرض اذان معيار اثباط التلازن الدموي للاضداد المثبطة للتلازن الذي يتراوح بين (zero−8) يدلل على الطور الحاد من الاصابة كما اشار الى ذلك الباحثون(1973).Allan,*etal* (4). كما ان النتائج السالبة في اختبار اثباط التلازن الدموي في هذة الدراسة دلت على عدم وجود الاضداد المثبطة للتلازن ولكنها لاتعني عدم وجود الاضداد المعادلة لفايروس نيوكاسل كما اشار الى ذلك الباحث(1980) , Husain (14) كما ان القابلية على انتاج الاضداد المثبطة للتلازن مسيطر عليها وراثيا وهي تختلف باختلاف انواع الطيوركما اشار الى ذلك الباحثان (1978)Vickers &Hanson (15) .

المصادر

1. خماس، عمادجواد (1981): دراسة بعض اوجة مرض نيوكاسل في الطيور المصابة تجريبيا.رسالة ماجستير، كلية الطب البيطري – جامعة بغداد.
2. Biancifiori F. and Fioroni A.(1983).An occurrence of Newcastle disease virus in pigeons :virological and serological studies on the isolates .Comp.Immunol.Microbiol.infec.Disease,6,247-252.
3. Alexander, D.J. (1997). Newcastle disease and other paramyxoviridae infections. In: Diseases of poultry, 10th ed. B.W. Calnek; H.J. Barnes; C.W. Beard; W.M. Reid and H.W. yoder, eds. Iowa state Univ. Press, Ames, Iowa. Pp.541-570.
4. Lancaster, J. E., and D.J. Alexander. (1975). Newcastle disease. Virus and spread. Monograph No.11, Canadian Department of Agriculture, Ottawa.
5. Allan, W.H.; Lancaster,J.E., and Toth, B. (1973).The production and use of Newcastle disease vaccines. Food and Agriculture organization of the United Nation, Rome.
6. Erickson, G.A., Brugh,M.& Beard, C.D. (1980).Viscero Velogenic Newcastle disease in pigeons :clinical disease& immunization .Avian Dis.24:257-267.
7. Allan, W.H.; J.E. Lancaster, and B.Toth. (1978). Newcastle disease vaccines, their production and use. F.A.O. Rome.
8. Alexander, D. J. (1998). Newcastle disease virus and other paramyxo

viruses. In: Isolation and identification of avian pathogens, 4th ed. Edited by Swayane,D.E.;Glisson,J.R.;Jackwood,M.W.;pearson,J.E.and Reid, W.M. American Association of Avian Pathologists. U.S.A. Pp.156-163.

9. Hitchner , S. B.; Donermuch, C.H. ; Graham purchas , H. and William , J.E. (1980). Isolation and identification of pathogens, 2nd ed. Puplished by the Am. Asso. Of Avian Pathologists. PP. 152-160.
10. Beard, C.W. and Wilkes, W.J. (1973). Asimple and rapid microtest procedure for determining of Newcastle disease virus heamagglutination inhibition antibody titers. Proc. 77th Ann. Meet. U.S.A. Anim. Health Associ.
11. Lancaster, J. E. (1966). Newcastle disease – a review 1926-1964. Monograph No.3. Canadian Department of Agriculture, Ottawa.
12. Hanson, R.P. (1978).Newcastle disease. In: Diseases of poultry, 7th ed. Edited by Hofstad, M.S.; Calnek, B.W.; Helmbodt, C.F.; Reid, W.M., and Yoder, H.W. Iowa State Univ. Press, Ames., Iowa, U.S.A. Pp.668-671.
13. Steven,F.P.&D.Q.Trainer(1971).NewcastleDisease.Edit.J.W.Davis.R.C.Anders, L.Karstod&D.O.Trainer.In infection&parastic diseases of wild birds.
14. Gough, R.E.; Allan, W.H.; Knight, D.J., and Leiper, J.W. G. (1974). The Potentiating effect of an interferone inducer (BRL 5907) on oil –based inactivated Newcastle disease vaccine. Res. Vet. Soc. 17: 280-284.
15. Husain, A. (1980). Studies on evalution of Newcastle disease vaccines produced locally in broiler chickens. M.Sc. Thesis, University of Baghdad.
16. Vickers, M.L. &R. P. Hanson (1978).Experimental new virus infection in three species of wild birds. Avian Dis.23:70-79.