دراسة الامراضية الخلوية لفيروس جدري الدجاج باستخدام اختبار إنزيم البيروكسيد المناعي و صبغة الاكريدين البرتقالية

حارث محمد ابراهيم الحيالي عايد بجعي الزغيبي سعاد عبد الكريم
فرع الامراض و الدواجن – كلية الطب البيطري– جامعة بغداد

الخلاصة

في هذه الدراسة تم حقن فايروس جدري الدجاج المعزول محلياً في الغشاء اللقانقي المشيمي لاجنة الدجاج أذ تسبب و بعد 120 ساعة من الحقن خزباً عاماً للغشاء و ظهور البثور المنتشرة على الغشاء و كانت نتائج المعيار الحجمي للفايروس المنمى على أجنة الدجاج تتراوح بين (^{10}6.8 – ^{10}7.5EID 50 /0.1 ml) . ولدراسة تاثير الفايروس في خلايا الزرع النسيجي استخدم اختبار أنزيم البيروكسيد المناعي و أختبار صبغة الاكريدين البرتقالية لمتابعة التغيرات الخلوية المعلة التي يحدثها الفايروس المحقون في خلايا الارومات الليفية بعد 24 ,48 ,72 ,96 ساعة من الاصابة . فقد لوحظت الاجسام الاشتمالية الهيولية المحتواة في هيولي الخلايا بعد 24 و 48 ساعة . و أصطبغت هذه الاجسام بصبغة قهوائية فاتحة و من ثم غامقة عند معاملتها بأضداد الفايروس المعاملة بانزيم البيروكسيد المناعي و تطابقت هذه النتائج مع نتائج دراسة التغيرات في نفس الخلايا و المصبوغة بصبغة الاكريدين البرتقالية أذ ظهرت هذه الاجسام بصبغة خضراء براقة اللون , و تزداد أعداد هذه الاجسام بمرور الوقت (72 ساعة). أما بعد 96 ساعة من الاصابة فقد لوحظ وجود فجوات متعددة و تحبب في هيولي الخلايا المصابة. وتطابقت نتائج الاختيارين في تحديد مواقع مستضدات فايروس الجدري في شكلها و زمن ظهورها.

Cytopathogenicity studied of fowl pox virus by using indirect immunoperoxidase and acridine orange tests .

Harith M. AL-Hyali , Aied B. AL-Zughaibi and Suad Abdulkarim.

Department of Pathology and Poultry Disease, Collage of Veterinary Medicine , University of Baghdad – Baghdad – Iraq .

Summary

Locally isolated fowl pox virus was inoculated on chorioallantoic membrane of chick embryos, leads to the appearances of odema and pocks lesion on the membrane , 120 hours post inoculation .Virus assay showed that the infectivity titer were ^{10}6.8 to ^{10}7.5 EID50/0.1 ml in embryonated chicken eggs. Monolayer tissue cultures of chick embryo fibroblast cells infected with fowl pox virus were

examined by acridine orange staining and indirect immunoperoxidase test to study the cytopathogenic effects of the virus . The most striking cytoplasmic changes observed was the presence of the intracytoplasmic inclusions at 24-48 hours post inoculation, numerous inclusions were clearly seen at 72 hr. P.I.in addition to cytoplasmic vaculation and granulation were clearly seen at 96 hr. P.I. These changes stained brilliant green with acridine orange and dark brown staining with immunoperoxidase . Both tests demonstrated the localization of pox virus antigens in infected cells at same intervals.

المقدمة

مرض جدري الدجاج من الامراض الوبائية التي تصيب الدجاج وفي مختلف الاعمار مسبباً بثور في المناطق الخالية من الريش كالعرف و الدلايات و الاجفان و زوايا المنقار و كذلك يصيب الغشاء المخاطي المبطن للتجويف الفمي و البلعوم و المرئ و الجزء العلوي للرغامي و قد تم وصف هذا المرض لاول مرة في القطر سنة 1975 و المرض ينتشر في أغلب بلدان العالم(1,2,3) .

ينمو فايروس جدري الدجاج في مختلف خلايا الزرع النسيجي مثل خلايا كلية أجنة الدجاج وخلايا ادمة أجنة الدجاج وفي الخلايا الليفية لجنين الدجاج (4،5،6،7) محدثاً تاثيراً مرضياً معلاًً للخلايا المصابة تتضمن تكور الخلايا و تكون فجوات في الهيولي مع تكون اجسام أشتمالية و نخر و تجمع الخلايا مكونة الخلايا العملاقة (8). تمكن الكثير من الباحثين من ملاحظة التغيرات المرضية المعلة المختلفة في المقاطع النسجية للجلد أو الجزء العلوي من الرغامي او الغشاء اللقانقي المشيمي باستخدام صبغة الاكريدين البرتقالية و صبغة الكمزا و صبغة الهيماتوكسين و الايوزين و اختيار التألق المناعي (9،10) . وقد تمكن الباحث (11 ، 12) باستخدام اختيار انزيم البيروكسيد و صبغة المثيلين الزرقاء من ملاحظة التغيرات الخلوية التي يحدثها فايروس الجدري في خلايا الغشاء اللقانقي المشيمي والخلايا الطلائية للرغامي.

تهدف هذه الدراسة الى متابعة سلسلة التغيرات المعلة في خلايا الارومات الليفية لاجنة الدجاج المصابة بفايروس جدري الدجاج باستخدام انزيم البيروكسيد و صبغة الاكردين البرتقالية .

المواد و طرائق العمل

الفايروس

استخدم فيروس جدري الدجاج المعزول محلياً (13) و ذلك بحقن 0.1 مل من عالق الفيروس في البيض الحاوي على أجنة الدجاج بعمر 12-10 يوم و بطريقة التقطير على الغشاء اللقانقي المشيمي حسب طريقة (14) و تم حساب المعيار الحجمي للفايروس حسب طريقة (15) و التي اعتمدت كمصدر للفايروس لاحداث الاصابة و كان المعيار الحجمي للفايروس $10^{7.5}$ EID 50/0.1 ml .

تحضير المصل فائق التمنيع

تم تحضير المصل فائق التمنيع على الدجاج و حسب طريقة (16) و قد استخدمت 8 دجاجات من النوع المحلي بعمر 8 أسابيع و قد حقنت في طية الجناح بجرعة 0.1 مل و الحاوية على $10^{4.9}$ EID50/0.1 ml مع كمية من المادة المساعدة complete freunds adjuvant (Difco Laboratories) و اعيدت عملية الحقن كل اسبوع و لاربع مرات و تم جمع الدم من وريد الجناح اسبوعياً و تم فصل المصل من الدم و ابطل فعل المتمما ت غير المتخصصة في حمام مائي بدرجة 56 م لمدة 30 دقيقة و حفظ بعدها في المجمدة بدرجة 20- م .

حقن الفايروس في خلايا الزرع النسيجي

استخدمت الخلايا الليفية لاجنة الدجاج و ذلك باتباع طريقة (17) لتحضيرها. ثم تخفيف عالق الفايروس بنسبة 10:1 بمحلول الملح الوظيفي (PBS) و حقن 0.1 مل من العالق في خلايا الارومات الليفية لاجنة الدجاج المنماة على شرائح زجاجية داخل أنابيب لنتون (Leinghton tube) و حضنت بدرجة 37 م لمدة ساعة لغرض امتزاز الفايروس ثم غسلت بمحلول (PBS) ثم اضيف لها محلول هانكس الحاوي على مصل عجل بقري ومضادات حيوية و حضنت الأنابيب المحقونة بالحاضنة مع ضوابط التجربة و تم اخذ عينتين بعد 96,72,48,24 ساعة من الحقن .

اختبار انزيم البيروكسيد المناعي غير المباشر

استخدم هذا الاختبار باتباع طريقة (16) حيث تم استخراج الشرائح الزجاجية الحاوية على الخلايا الزرع النسيجي و المحقون بفايروس جدري الدجاج مع ظوابط التجربة. ثبتت الشرائح بالاسيتون لمدة خمسة دقائق ثم غسلت بال PBS و جففت أضيفت لها المصل الفائق التمنيع بنسبة 10:1 وحفظت في حمام مائي رطبا لمدة 45 دقيقة ثم غسلت وجففت واضيف لها المصل الممنع المقترن مع انزيم البيروكسيد و المخفف بنسبة 20:1 ولمدة 45 دقيقة بدرجة حرارة الغرفة ثم غسلت الشرائح و جففت و صبغت بمحلول يحتوي على بيروكسيد الهيدروجين بنسبة 1% و ايثانول 2% المشبع بمادة OPD (Orthophsphadimine)

لمدة 15-30 دقيقة بدرجة حرارة الغرفة غسلت و جففت الشرائح و ثبتت على شرائح زجاجية اكبر و تم اخذ عينتين بعد 96,72,48,24 ساعة من الحقن .

تحضير عينات صبغة الاكريدين البرتقالية

بعد استخراج الشرائح الزجاجية من انابيب لينتون و الحاوية على الخلايا المصابة مع ظوابط التجربة ثم غسلت و ثبتت بمحلول كاروني (Carnoy`s fluid) ثم مررت بالايثانول بتراكيز تنازلية ثم شطفت بمحلول كبريتات المغنيسيوم وو ضعت بعد ذلك بحامض الخليك لمدة دقيقة واحدة و غسلت مرة ثانية بمحلول كبريتات المغنيسيوم ثم شطفت بالPBS ثم صبغت بمحلول الاكردين البرتقالية لمدة ثلاث دقائق ثم غسلت و جففت و ثبتت على شرائح زجاجية بمادة لاصقة و فحصت بالمجهر الاعتيادي اذ تم اخذ عينتين بعد 96,72,48,24 ساعة من الحقن .

النتائج

نتائج الحقن في البيض الحاوي على الاجنة

اظهرت الاغشية المحقونة بعالق فايروس جدري الدجاج تاثيراً مرضياً واضحاً اذ لوحظ في اليوم الخامس بعد الحقن تثخن و تورم عام للغشاء اللقانقي المشيمي بعد التمريرة الاولى . اما في التمريرات الثانية و الثالثة فقد ظهرت بثوراً بيضاء اللون بارزة فوق سطح الاغشية (صورة1).

معايرة الفايروس

اظهرت نتائج معايرة الفايروس بعد التمريرة الثالثة بان المعيار هو $10^{7.5}$ EID 50/0.1ml و الذي استخدم في الدراسة .

نتائج اختبار انزيم البيروكسيد المناعي

اظهرت نتائج اختبار انزيم البيروكسيد المناعي بعد 24 ساعة من حقن خلايا الاورمات الليفية بفايروس جدري الدجاج ظهور تفاعل ايجابي يتمثل بلون قهوائي فاتح يتمركز في هيولي الخلايا المصابة (صورة 2) . و تزداد عتامة الصبغة القهوائية في هيولي الخلايا بعد 48 ساعة من الحقن مع ملاحظة الاجسام الاشتمالية الهيولية ذات اللون القهوائي الداكن التي تعمل على ازاحة النواة الى احد جوانب الخلية , و بعد 72 ساعة من الحقن لوحظ وجود اعداد كبيرة من الاجسام الاشتمالية الهيولية القهوائية اللون و ظهور الخلايا العملاقة في الهيولي و كبر حجم النواة (صورة 3).

بعد 96 ساعة من الحقن لوحظ وجود فجوات متعددة في هيولي الخلايا المصابة بالقرب من النواة مع كبر حجمها مع ملاحظة التحبب في الهيولي الذي يظهر ذا لون قهوائي خافت.

نتائج اختبار صبغة الاكردين البرتقالية

اظهرت نتائج فحص الخلايا المثبتة و المصبوغة بصبغة الاكردين البرتقالية ظهور اجسام محتواة في هيولي الخلايا المصابة ذات اللون الاخضر البراق و تظهر بصورة واضحة اكثر بعد 24 ساعة من الحقن. و قد لوحظت الاجسام المحتواة ذات اشكال عديدة و احتواء الخلية الواحدة على اكثر من جسم محتوى واحد (صورة 4) . و بعد مرور 48 ساعة من الحقن لوحظ زيادة في عدد الاجسام الاشتمالية المحتواة التي تاخذ اللون الاخضر البراق. اما بعد 72 ساعة من الحقن نلاحظ حدوث تطور في التاثير المعل في عدد كبير من الخلايا و انويتها الذي يتميز باستدارة بعض الخلايا و ظهور الخلايا العملاقة و زيادة في عدد الاجسام الاشتمالية المحتواة و يزداد التاثير الخلوي المعل للفايروس في الخلايا بعد 96 ساعة من الحقن.

المناقشة

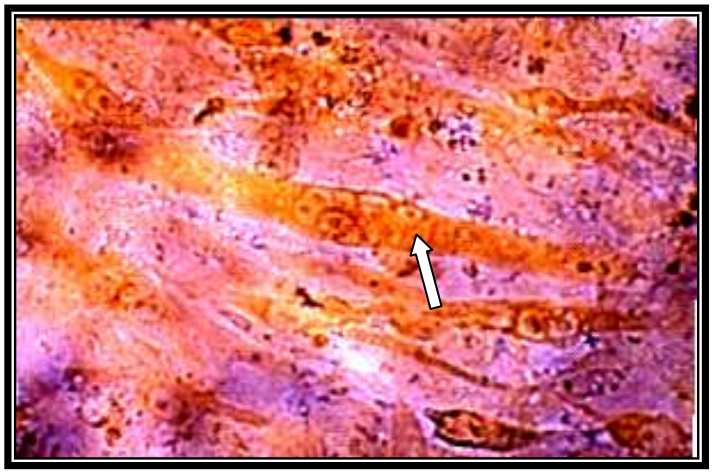
لقد بينت نتائج هذه الدراسة الصفات البايولوجية للفايروس المحقون في أجنة الدجاج النامية اذ ان فايروس جدري الدجاج يحدث على الغشاء اللقانقي المشيمي افات واضحة تمثلت بحصول تثخن وتوذم الغشاء في التمريرة الاولى اما في التمريرتين الثانية و الثالثة فقد ظهرت بثور بيضاء مصفرة اللون بعد خمسة أيام من الحقن و هذا يدل على وجود المسبب المرضي . ان معايرة الفايروس قد تمت على أجنة الدجاج و اظهرت اختلافاً في المعيار الحجمي للفايروس بين التمريرة الاولى و الثانية و الثالثة و ان هذا الاختلاف يعود الى الاختلاف في درجة التكيف للفايروس في أجنة الدجاج التي تعد ذات قابلية عالية لنمو و تكاثر فايروس جدري الدجاج (16) .

يعد اختبار انزيم البيروكسيد المناعي غير المباشر مع صبغة الاكريدين البرتقالية فحوصات مهمة عن طريقها ثم تزويدينا بادق التفاصيل حول سلوك الفايروس و تكاثره واستجابة الخلية الى ذلك الفايروس , فهما يعدان من اكثر الاختبارات حساسية اذ يشيران الى ان التغيرات الشكلية التي تحدث في سايتوبلازم و نواة الخلية و موقع مستضد الفايروس في الخلية , فقد اظهرت خلايا الاورمات الليفية لاجنة الدجاج وجود اجسام اشتمالية في هيولي الخلايا بعد 48,24 ساعة من الاصابة و تلونت هذه الاجسام بلون قهوائي فاتح او غامق عند صبغها بصبغة البيروكسيد و هي تدل على تفاعل المستضد المعزول مع المصل الممنع ضد فايروس الجدري و هنا يتفق مع ما لاحظه (16) و لا يتفق مع ما وجده (18) اذ لاحظوا عدم وجود الاجسام الاشتمالية في هيولي الخلايا المصابة بالجدري .

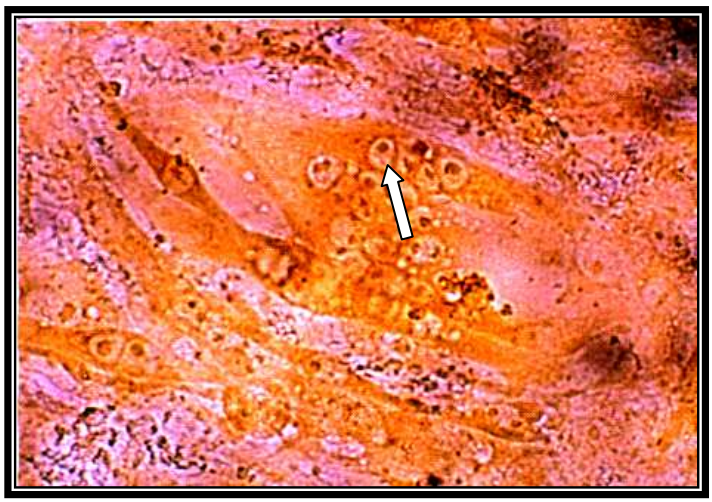
أما بالنسبة للتغيرات الخلوية التي تحدث في خلايا الاورمات الليفية المصبوغة بانزيم البيروكسيد فقد تطابقت مع نتائج اختبار الاكردين البرتقالية حيث لوحظ بعد 24 – 48 ساعة وجود اجسام اشتمالية هيولية خضراء براقة في الخلايا المصابة بفايروس الجدري و إن هذه الاجسام الخضراء البراقة ناتجة من قصر مادة ثنائي كلوريد الكالسيوم للصبغة البرتقالية وهذا يتفق مع ما وجده (19).

إما بعد 72 ساعة من الاصابة فقد ظهرت زيادة في عدد الاجسام الاشتمالية القهوائية و الخضراء البراقة داخل هيولي الخلايا و التي اظهرها كلا الاختبارين , و هذا يدل على زيادة في وصول الانزيمات و البروتينات التي تشترك في عملية تكوين الحامض النووي الفايروسي إلى هيولي الخلية و إن هذه الاجسام المتكونة تعد من التغيرات الخلوية الهامة و المميزة التي تحدث في الخلايا المصابة , إن هذه التراكيب ربما قد تكون متجمعة من مواد هيولية حبيبية أو الحامض النووي منقوص الاوكسجين أو الجسيمات الفايروسية الغير ناضجة وهذا يتفق مع ما وجده (11،12) وفي دراسة امراضية فايروس جدري الدجاج على خلايا الارومات الليفية لاجنة الدجاج بعد 96 ساعة من الاصابة لكلا الاختيارين فان من اهم التغييرات التي تحدث في الخلايا هو وجود العديد من الفجوات و زيادة التحبب في هيولي الخلايا و قد يعود سببه إلى قلة التراكيب الخلوية في المراحل المتاخرة من الاصابة في الخلية و هذا ما يتفق مع ما لاحظه (20، 21). يعد اختبار انزيم البيروكسيد المناعي من أكثر الفحوصات المصلية حساسية و يعزز التغييرات التي اظهرها اختبار صبغة الاكردين البرتقالية و أشار كلا الاختبارين تموضع المستضد الفايروسي في الخلايا المصابة .

صورة(1) تبين الغشاء اللقانقي المشيمي لاجنة الدجاج في اليوم الخامس بعد الحقن بفايروس جدري الدجاج يلاحظ عليه التثخن و بثور بيضاء بارزة فوق سطحه .



صورة(2) تبين وجود الاجسام الاشتمالية الهيولية في خلايا الاورمات الليفية لاجنة الدجاج ذات اللون القهوائي الفاتح بعد 48 ساعة من الاصابة . صبغة البيروكسيد المناعي x 400



صورة (3) تبين كبر حجم خلايا الاورمات الليفية لاجنة الدجاج و زيادة عدد الاجسام الاشتمالية القهوائية من هيولي الخلايا . وبعض الخلايا العملاقة (سهم) , بعد 72 ساعة من الحقن , صبغة البيروكسيد المناعي x 400 .

صورة (4) تبين اللون الاخضر البراق للاجسام الاشتمالية في هيولي خلايا الاورمات الليفية لاجنة الدجاج (سهم) بعد 48 ساعة من الحقن , صبغة الاكردين البرتقالية x 400 .

References

1. FAO, (1992). Animal health year book.
2. Reed, W. M. and Schrader, D. L.(1989). Pathogenicity and Immunogenicity of mynah pox virus in chickens and Bob white quail. Poult. Sci. 68:631-638.
3. Tripathy, D.N. and Cunningham, C.H. (1984). (Cited by Al-Fahad, A., A. (1993). Preparation of fowl pox vaccine in tissue culture. MSc. Thesis, Veterinary Medicine College, Uniersity of Baghdad (Arabic).
4. Tripathy, D.N.; Hanson, L.E. and Killinger, A.H. (1974). Atypical fowl pox in poultry farm in Illinois. Avian Dis. 17: 274-278.
5. EL-Zein, E.; Nehme, S.; Ghoraib, V.; Hasbani, S. and Toth, B. (1974). Preparation of fowl pox vaccine on chicken. Embryo-dermis cell Culture. Avian Dis. 18:495-504.
6. Silim, A.; EL-Azhary, M. A. Y. and Roy, R. S. (1982). A simple technique for preparation of chicken embryo skin cell cultures inoculated with fowl pox virus. 26:182-185.
7. Moss, B.; Fields, B. N.; Knipe, N. M.; Chanock, R. M.; Melnick, J. L.; Roizman, B. and Shop, R. E. (1990).Pox viridae and their replication. Virology 2th ed. Raven press. New York. Pp. 2079-2111.
8. Rao, C. V.; Jayaraman, M. S. and Masillamong, R. R. (1978). Laboratory and field trials with cell culture fowl pox vaccine. Indian Vet. J. 55:133-136.
9. Tripathy, D.N. and Reed, W.M. (1997). Pox In: Diseases of Poultry. (Calnek, B.W.; Barres, H.J.; Beard, C.W.; McDongald, L.R. and Saif, Y.M. Eds.). (10th ed.). Iowa State University Press, Ames. PP.643-659.
10. Bickford, A. A.; Gallina, A. M.; Winterfield, R. W. and Bolte, H. (1971). Studies of an unusual pox infection in Turkeys. Avian Dis. 15: 614-625.
11. AL-Hyali, H. M.(2001 a).Immunoenzyme detection of fowl pox virus cells of chorioallatoic member and treachea. Iraqi. J. Vet. Sci. Vol. 16(1) P.121-127
12. AL-Hyali, H. M. (2001 b). Use of Immunoperoxidase and Methylein Blue staining techniques for detection of pathological changes of Fowl pox virus infected Treacheal epithelial cells. Iraqi. J. Vet. Sci. (accepted for publication).
13. الجميلي, عدي عبد الرزاق عبد الوهاب(2001). دراسة امراضية فايروس جدري الدجاج المعزول محلياً باستخدام المجهر الكتروني النافذ والماسح, رسالة ماجستير مقدمة إلى كلية الطب البيطري /جامعة بغداد.
14. Versteege, J. (1985). A colour atlas of Virology. Published by Wolfe Medical. PP.54-63.
15. Reed, L. J.and Muench,A.(1938). Simple method for estimating fifty percent endpoint. AM. J. Hyg. 27:493-497.

16. Tripathy, D.N. ; Hanson, L.E. and Killinger, A.H. (1973). Immunoperoxidase technique for detection of fowl pox antigen. Avian Dis. 18: 84-90.
17. Hitchner, S. B.; Dornermuch, C. H.; Graham, Purchase, H. and William, J. E. (1980). Isolation and identification of avian pathogens 2nd Ed. Published by the Am. Asso. of Avian pathologists. PP.152-160.
18. Tajiman, M. and Ushijima, T.(1966). Electron microscopy of avian pox viruses with special reference to the significance of inclusionbodies in viral replication. Jop. J. Vet. Sci. 28:107-118.
19. Gluck, L. and Kulovich, M. V. (1964). Histochemical studies of the disturibution of RNA in tissues of the developing chick embryo. Yale. J. Biol. Med. 36:379.
20. Taylor, C. D. (1978). Immunoperoxidase techniqe practical and Theoretical aspects. Arch. Path. Lab. Med. 1:113-114.
21. Chasey, D. (1980).A simple and rapid immunoperoxidase test for detection of virus antigens in tissue culture. Vet. Rec.14:506-407.