مجلة جامعة تشرين للدراسات والبحوث العلمية – سلسلة العلوم الزراعية المجلد (22) العدد (10) 2000
Tishreen University Journal for Studies and Scientific Research – Agriculture Science Series Vol. (22) No (10) 2000

دراسة بعض الخصائص الحيوية لذراري فيروس التهاب الجراب المعدي المعزولة من الفروج

الدكتور. فهيم عبد العزيز*

يهدف البحث الحالي إلى عزل وتصنيف الذراري المحلية لفيروس التهاب الجراب المعدي ودراسة خصائصها الحيوية كالنمو و الإمراضية والفوعة التي تساهم في تحديد الإجراءات الوقائية وبرامج التحصين في مناطق انتشار المرض.

تم عزل وتصنيف خمس ذراري فيروسية MR. 96 , SA. 95 , BKH. 95 , NK. 94 , BZ. 93 من الطيور المصابة في حالات انتشار العدوى الطبيعية (الحقلية) لمرض التهاب الجراب المعدي في مزارع رعاية الفروج.

بيّنت دراسة خصائص نمو الذراري الفيروسية المعزولة في أجنة الدجاج النامية 11 يوم تحضين، وجود تغيرات ملحوظة تميّزت بتشكل ارتشاحات مائية في الأغشية السقائية – المشيمائية، وزيادة سماكتها وانعدام شفافيتها مع مساحات نزفية، إضافة لتأخر نمو وتطور الجنين (تقزّم).

أظهرت دراسة الخصائص الإمراضية للذراري الفيروسية المعزولة عند عدوى صيصان الفروج بعمر 15 يوم عن طريق الحقن في الأنف وملتحمة العين توافق درجة فوعة الذراري المعزولة ونسبة إصابة الصيصان في العدوى التجريبية مع الفيروسات المسببة للمرض عند العدوى الطبيعية في المزارع المدروسة.

* أستاذ مساعد في قسم الإنتاج الحيواني – كلية الزراعة – جامعة تشرين – اللاذقية – سورية.

مجلة جامعة تشرين للدراسات والبحوث العلمية - سلسلة العلوم الزراعية المجلد (22) العدد (10) 2000
Tishreen University Journal for Studies and Scientific Research –Agriculture Science Series Vol. (22) No (10) 2000

A Study of the Biological Characterization of Some Viral Strains of Infectious Bursal Disease "IBDV" Isolated from Broilers

Dr. Faheem ABDEL AZIZ*

(Accepted 29/6/2000)

❐ ABSTRACT ❐

The object of this paper is to isolate and classify the viral strains "IBDV", and to study their biological characteristics such as growth, pathogenesis, and virulence, in order to improve prophylactic – vaccination measures in areas of disease outbreak.

Five viral strains were isolated and classified (BZ.93,NK.94,BKH. 95, SA.95 , MR.96) from infected broilers during the natural outbreak of infectious bursal disease in broiler farms.

Injection of the viral strains into 11- day old embryonating eggs to study their growth in embryonated eggs caused a gross lesion " edematous, intumesence, caliginous in the "CAM" with hemorrhagic areas and retardation of embryonic development (nanous).

Nasal and conjunctival injection of the viral strains in 15-day old broilers showed a concordance between virulent viral strains isolated in experimental infection and the natural infection.

* Associate professor at Animal production Department, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Lattakia, Syria.

المقدمة

تشير المصادر إلى انتشار مرض التهاب الجراب المعدي Infectious Bursal Disease (IBD) بشكل واسع في معظم بلدان العالم ومناطقه الجغرافية المختلفة [1] يصيب طيور الدجاج بعمر من 2 حتى 15 أسبوع [2,3,4]، تسببه ذراري فيروسية مختلفة الفوعة، تُظهر المرض بشكل تحت سريري عند الطيور بعمر أقل من 3 أسابيع، وبشكل حاد عند الطيور بعمر أكثر من 3 أسابيع [2,4]. يتميز الشكل الحاد بالظهور المفاجئ ونسبة الإصابة المرتفعة التي تتراوح ما بين (40-100)%[4] . تصاب طيور دجاج سلالات البيض غالباً بعمر بين 6 – 8 أسابيع أما طيور دجاج سلالات اللحم فتصاب بعمر بين 3 – 4 أسابيع [4].

تتراوح فترة الحضانة في الحالات النموذجية للعدوى الطبيعية بين 2 – 3 أيام [1,2,3,5]. وفي حالات أخرى تكون أقصر وتتراوح بين 36 – 48 ساعة [2]. ينمو الفيروس في أجنة الدجاج النامية بعمر 9 – 11 يوم تحضين، وتعد الأغشية (السقائية – المشيمائية) Chorioallantioc membrane (CAM) من الأعضاء الحساسة تجاه الفيروس ويصل تركيزه فيها إلى 10^{-4}ــ10^{-6} EID_{50} [2].

وبعد سلسلة تمريرات للفيروس في هذه الأجنة تظهر تركيز الفيروس بشكل مرتفع في السائل السقائي السلوي Allantoamonionic Fluid (AAF) [1]).

مواد وطرق البحث:

- **مكان وزمان تنفيذ البحث:** نفذ البحث في كلية الزراعة بجامعة تشرين وبالتعاون مع مخبر أمراض الدواجن التابع لمصلحة الصحة الحيوانية بدمشق خلال الأعوام من 1996 –1998.
- **العينات المرضية:** جمعت العينات المرضية من خمس مزارع لرعاية الفروج في ظروف انتشار العدوى الحقلية بمرض التهاب الجراب المعدي، وقد اشتملت كل عينة على (جراب - طحال – كلية) الطيور المريضة، واستخدمت كمادة لعزل الذراري الفيروسية.
- **عزل الذراري الفيروسية:** لتنفيذ عملية العزل استخدمت الطرق المتبعه في علم الفيروسات لتحضير العينات المحتوية على الفيروس وتجهيز الأجنة للحقن [6] ومن ثم الحقن في الجوف (الكيس) السقائي allantoic Sac (AS) بكمية 0.2مل، خُصصت لكل عينة 10 أجنة. بعد الانتهاء من عملية الحقن حُضنّت الأجنة عند الحرارة 37° م مع الرطوبة المناسبة لمدة 7 أيام خلال ذلك تم فحص ومراقبة الأجنة يومياً بواسطة الفاحص الضوئي، أخذت الأجنة النافقة ووضعت في البراد عند الحرارة 4° م لمدة 4-5 ساعة بعد ذلك تمَّ فتحها ودراسة التغيرات الموجودة فيها. بانتهاء المدة تؤخذ الأجنة الحية المتبقية وتوضع في البراد عند الحرارة +4°م من 4 إلى 5 ساعات، ثم تفتح في ظروف وشروط معقمة وتجمع الأغشية والسوائل السقائية المشيمائية في أنابيب اختبار معقمه لكل عينة على حده. فحصت محتويات كل أنبوبة للكشف عن التلوث الجرثومي بزرع 0.2 مل منه على منبت الآجار المغذي. استبعدت الأنابيب الملوثة وحفظت الأنابيب العقيمة المحتوية على المادة الفيروسية في الثلاجة حتى الاستخدام في العمليات (البحوث) اللاحقة. سوية مع ذلك وضعت مجموعة شاهدة.
- **تصنيف العزولات الفيروسية:** تم تصنيف العزولات الفيروسية بعد العزل الأولي وبشكل تمهيدي في اختبار التراص الدموي المباشر [7] أما التصنيف الأساسي فتم عن طريق اختبار الترسيب الانتشاري في الآجار الهلامي حسب طريقة اختر لوني وتعديلات باشكايف 1961 [3,7] باستخدام خلاصة الأغشية

والسوائل المقائية المشيمائية كمستضد مع المصل المناعي النوعي المعلوم ضد فيروس التهاب الجراب المعدي (I B D V) Infectious Bursal Disease virus.

- **دراسة الخصائص الحيوية للذراري الفيروسية المعزولة**

أ – النمو (التكاثر) في أجنة الدجاج النامية: حقنت كل ذرية فيروسية في الجوف (الكيس) ــ السقائي (AS) حسب الطريقة المبينة في [6] بجرعة 0.2 مل لـ10 أجنة دجاج ناميه بعمر 11 يوم تحضن ثم حضنت حتى الفقس وتمت المراقبة والفحص الضوئي بشكل يومي، اعتبر نفوق الأجنة بعد 48 ساعة نوعي وتم وضعها في البراد 4–5 ساعات ثم قمنا بعملية الفتح ودراسة الآفات والتغيرات الموجودة في الأغشية والجنين. تمت دراسة كل ذرية من خلال تمريرين في أجنة الدجاج ووضعت مجموعة شاهدة في كل مرة.

ب ــ الخصائص الإمراضية للذراري الفيروسية المعزولة: نفذت دراسة الخصائص الإمراضية للذراري الفيروسية المعزولة بإحداث العدوى التجريبية عند صيصان الفروج بعمر 15 يوم بحقن المادة الفيروسية لكل ذرية بجرعة 0.2 مل مقسمة إلى 0.1 مل في ملتحمة العين 0.1مل في الأنف لكل صوص من مجموع 25 صوص لكل ذرية. صيصان كل مجموعة وضعت على حدة في حظيرة واحدة مع مجموعة شاهدة في حظيرة مجاورة. تمت مراقبة مجموعات التجربة بشكل يومي لمدة 30 يوم وقيمت النتائج تبعاً لمجموعة العلامات السريرية والآفات المرضية والنفوق. نفذت الدراسة على مكررين. قدمت للصيصان خلال سير التجربة الرعاية والتغذية المطلوبة وبالطريقة اليدوية.

النتائج والمناقشة

- **عزل وتصنيف الذراري الفيروسية:**

تم عزل خمس ذراري فيروسية من مزارع رعاية الفروج في ظروف انتشار العدوى الطبيعية بالمرض في مناطق مختلفة وهي كما مبيّنة في الجدول (1).

الجدول (1) نتائج عزل الذراري الفيروسية

تسلسل	رمز المزرعة	عمر الطيور عند الإصابة	الأعضاء / العينة المرضية	الذرية المعزولة
1	BZ	40 يوماً	الجراب + الطحال	BZ – 93
2	NK	28 يوماً	الجراب + الكلية	NK.94
3	BKH	35 يوماً	الجراب + الكبد	BKH. 95
4	SA	23 يوماً	الجراب + الطحال + الكبد	SA. 95
5	MR	17 يوماً	الجراب + الطحال + الكبد	MR. 96

وقد صنفت هذه الذراري بشكل تمهيدي في اختبار التراص الدموي المباشر حيث أظهرت جميعها نتائج سلبية في الاختبار ولم تحدث أو تسبب أية ذرية فيروسية من الذراري المعزولة تراص كريات الدم الحمراء الطيرية وهذا يتوافق مع خصائص فيروس التهاب الجراب المعدي(IBDV) الذي لا يملك خصائص راصة لكريات الدم الحمراء للدجاج والأرانب والماعز والإنسان [3] والنتائج موضحة في الجدول

(2) أما التصنيف الأساسي للذراري المعزولة فقد تم بالاعتماد على نتائج اختبار الترسيب الانتشاري في الآجار الهلامي حيث كانت النتائج إيجابية بالنسبة لجميع الذراري مع المصل المناعي النوعي لفيروس التهاب الجراب المعدي (IBDV) والذي استخدم لإظهار المستضدات في المادة الفيروسية المعزولة لكل ذرية حيث ظهرت خطوط الترسب بشكل واضح بعد مرور 18 – 24 ساعة من إجراء الاختبار ويوضح الجدول (2) أيضاً نتائج اختبار الترسيب.

الجدول (2) نتائج تصنيف الذراري الفيروسية المعزولة

تسلسل	الذرية	نتائج الاختبارات	
		اختبار التراص الدموي المباشر	اختبار الترسيب في الآجار
1	BZ. 93	–	+
2	NK. 94	–	+
3	BKH. 95	–	+
4	SA. 95	–	+
5	MR. 96	–	+

وتبعاً لنتائج الاختبارات المذكورة وخاصة اختبار الترسيب الانتشاري في الآجار الهلامي الذي يعد من الاختبارات المصلية النوعية المستخدمة بشكل واسع من قبل البحاثة لتشخيص المرض ودراسة الفيروس والكشف عنه أو عن أضداده وذلك إما باستخدام المستضد المعلوم لكشف الأضداد في الأمصال الدموية أو باستخدام المصل المناعي النوعي المعلوم لكشف المستضد (الفيروس) في العينات المرضية [1,2,3,5] فقد تم تصنيف العزولات الفيروسية كذراري لفيروس التهاب الجراب المعدي (I B D V).

- **نتائج دراسة الخصائص الحيوية للذراري الفيروسية المعزولة:**

أ ــ خصائص النمو (التكاثر) في أجنة الدجاج النامية:

أظهرت معطيات حقن أجنة الدجاج النامية بالذراري الفيروسية المعزولة حدوث النفوق الجنيني في اليوم التالي للحقن مباشرة وقد أعزي هذا النفوق إلى أسباب تقنية تتعلق بعملية الحقن، واستمر النفوق حتى مراحل متأخرة من التحضين واعتبر نفوق الأجنة بعد 48 ساعة نوعي وبسبب الذراري الفيروسية المحقونة وهذا ما أشير إليه في دراسات سابقة [3,4] وحسب معطيات [1,2] فإن نفوق الأجنة يظهر خلال 3 – 5 أيام بعد العدوى.

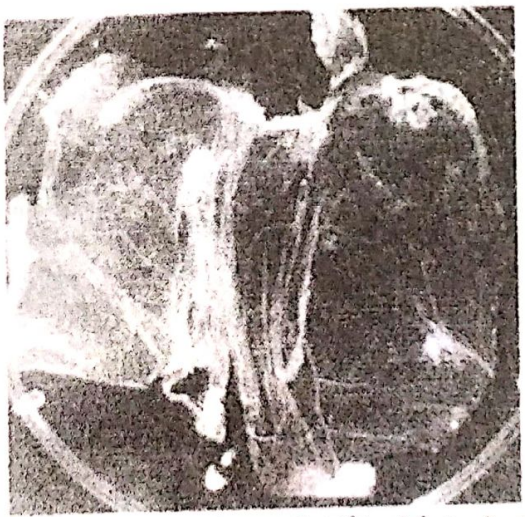
في دراستنا هذه تراوح النفوق بين 40 – 80 % في التمرير الأول وبين 40 –70% في التمرير الثاني وكان بالمتوسط بين 40 – 75 %، في الجدول (3) نرى نسبة نفوق الأجنة بعد العدوى وتبعاً لكل ذرية على حدة.

الجدول (3) نسبة نفوق الأجنة بعد الحقن بالذراري الفيروسية المعزولة

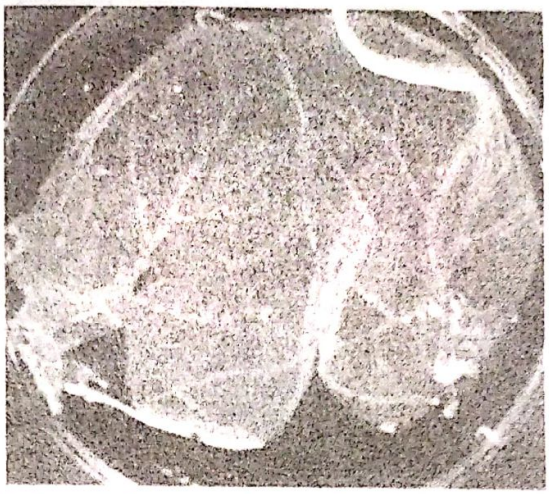
تسلسل	الذرية	% نسبة النفوق		
		التمرير الأول	التمرير الثاني	المتوسط
1	BZ. 93	80	70	75
2	NK. 94	60	50	55
3	BKH. 95	60	60	60
4	SA. 95	60	40	50
5	MR. 96	40	40	40
6	الشاهد	10	20	15

من المعطيات الموضحة في الجدول (3) نرى أن النفوق في التمرير الأول وبالنسبة لجميع الذراري أعلى مما هو عليه في التمرير الثاني وهذا يتوافق مع ما جاء في معطيات [1] فقد نفقت كل الأجنة في التمرير الأول ووصلت إلى 30% في التمرير الثاني. وبملاحظة نسبة النفوق في المجموعة الشاهدة الذي كان 10+20 وبالمتوسط 15% وهي نسبة طبيعية ومقبولة في ظروف التجربة فإن متوسط نسبة النفوق بسبب الذراري الفيروسية المعزولة يتراوح بين 25–60 %.

بينت عملية فتح الأجنة النافقة وتشريحها ملاحظة التشابه في التغيرات والآفات المرضية الموجودة على الأغشية السقائية المشيمائية (CAM) وفي الجنين وبالنسبة لجميع الذراري وقد ظهرت واضحة بعد 4–5 أيام من الحقن. ففي الأغشية السقائية المشيمائية شوهدت ارتشاحات مائية القوام، زيادة ثخانة الأغشية (انتباج) وانعدام في شفافيتها (عكارة) مع وجود مساحات نزفية أحياناً وهذا ما توضحه الصورة (1) بالمقارنة مع الصورة (2) الشاهدة. أما عند الأجنة النافقة في هذه الفترة فقد شوهدت احتقانات تحت جلدية في منطقة الرأس والرقبة، الصورة (3). وأظهر التشريح تضخم الكبد وتلونه بالأصفر إضافة لوجود مساحات باهتة أو مائلة للاخضرار على السطح، الصورة (4). كما لوحظ تضخم الطحال وتوضع البولات في الحالبين وفي المراحل المتأخرة من التحضين أي بعد 8–9 يوم من الحقن ظهر تأخر نمو وتطور الجنين واضحاً بشكل جلي، الصورة (5). هذا ويعتبر تأخر النمو والتطور الجنيني (التقزم) في المراحل المتوسطة والأخيرة من التحضين من الخصائص المميزة لفيروس التهاب الجراب المعدي (IBDV) [3].



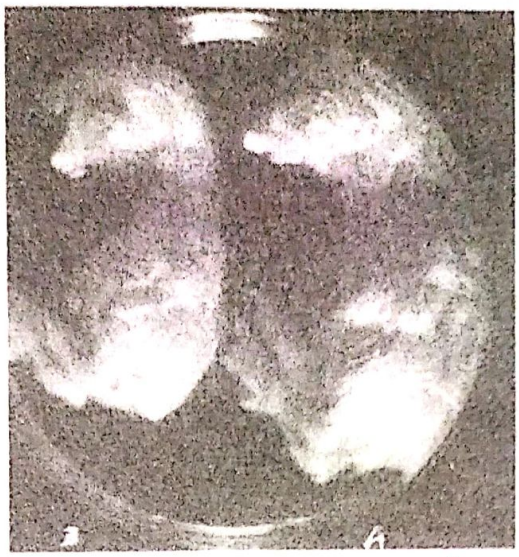
الصورة (1): توضح الآفات المرضية في الأغشية السقائية المشيمائية (ارتشاحات، عكارة، نزف دموي).



الصورة (2): توضح الأغشية السقائية المشيمائية الطبيعية (الشاهدة)

الصورة (3): توضح الاحتقانات والنزف الدموي على الجلد في منطقة الرأس والرقبة عند الأجنة المحقونة.

الصورة (4): توضح الآفات التشريحية المرضية في كبد الأجنة المحقونة.



الصورة (5): تبين مقارنة النمو والتطور الجنيني: A – طبيعي (جنين مجموعة الشاهدة).
B – متأخر(جنين مجموعة محقونة).

ب – الخصائص الإمراضية للذراري الفيروسية المعزولة:

جاءت نتائج الاختبارات الحيوية على الصيصان لتثبت أن إمراضية الذراري الفيروسية عند العدوى التجريبية لها كانت متوافقة في درجة الفوعة مع الفيروسات المسببة للعدوى الحقلية للمرض في مزارع رعاية القروج التي أخذت منها العينات ويوضح الجدول /4/ معطيات الدراسة.

الجدول /4/ نتائج دراسة الخصائص الإمراضية للذراري الفيروسية المعزولة

تسلسل	الذرية	عند العدوى الحقلية		عند العدوى التجريبية		
		العمر عند الإصابة /يوم	% النفوق	مدة الحضانة	متوسط% الإصابة	متوسط %النفوق
1	BZ.93	40 يوماً	40	2	60	45
2	NK.94	28 يوماً	30	3	45	25
3	3KH.95	35 يوماً	35	2	55	35
4	SA.95	23 يوماً	30	3	35	25
5	MR.96	17 يوماً	15	4	20	10
6	الشاهد			--	--	--

من الجدول (4) نشاهد بعض الاختلافات بين ذرية وأخرى سواء بالنسبة لفترة الحضانة أو مدتها أو بالنسبة للإصابة والنفوق عند العدوى التجريبية ولكنها تتناسب مع نسبة النفوق عند العدوى الطبيعية وبالنسبة لجميع الذراري المعزولة ويمكن أن يعزى هذا الأمر لاختلافات حقيقية في فوعة وإمراضية الذراري المعزولة عن بعضها البعض التي كانت واضحة في حالة العدوى الحقيقية فالذراري NK94, BKH.95 , BZ.93 التي سببت العدوى الحقلية عند القروج في أعمار تتراوح بين 4-6 أسابيع قد ترافقت بعلامات سريرية وتغيرات تشريحية مرضية واضحة ومميزة للشكل الحاد [1,2,3,4,5,8,9] وبلغت نسبة النفوق 40%

و 35% و30% بالترتيب، قد سببت إصابة سريرية واضحة عند العدوى التجريبية بعد حضانة مدتها 2 يـوم بالنسبة للذريتين BZ.93 و BKH.95 و 3 أيام بالنسبة للذرية NK.94 وبلغت نسـبة النفـوق 45% 35% و25% بالترتيب وكانت أيضاً الأعراض السريرية والأفات التشريحية مميزة للشكل الحاد من الإصابة بمرض التهاب الجراب المعدي (IBD) [1,2,4,8,10] كما هو موضح في الصورتين (6,7) بينما الذراري، SA.95 MR.95 التي عزلت من فراريج مصابة بعمر 2-3 أسابيع قد سببت إصابة ظهرت بعلامات غير واضحة أو مميزة بعد حضانة تراوحت بين 3-4 أيام وهذا يتوافق مع معطيات [1,4,11] بالرغم من أن نسبة النفوق تراوحت بين 10 – 25 % فإن الآفات التشريحية أيضاً كانت أقل وضوحاً.وهذه المعطيات موضـحة فـي الجدول (5) الذي يبين العلامات السريرية والافات التشريحية المشاهدة عند صيصان كل مجموعة تبعا لكـل ذرية فيروسية.

الصورة (6): تظهر تضخم واحتقان الجراب عند الصيصان بعد العدوى التجريبية.

الصورة (7): تظهر النزف الدموي على الفخذ عند الصيصان بعد العدوى التجريبية.

الجدول (5) العلامات السريرية والافات التشريحية المشاهدة عند العدوى التجريبية للصيصان بالذراري الفيروسية المعزولة.

الذرية	العلامات السريرية						الأفات التشريحية			
	الكساب وخمول	امتناع عن الأكل	عنبية مصطربة	اسهال مائي مصفر	نفش ريش	ظرف نموي في عضلات الصدر والفخذ والأجنحة	التهابات معوية رئوية	احتقان وتضخم الكلى	تصخم الجراب
BZ 93	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NK 94	+	+	+	+	+	+	+	+	-
BKH95	+	+	+	+	+	-	-	-	-
SA 95	+	+	+	-/+	+	-	-	+	-
MR 96	+	-	+	-/+	-	-	+	+	-
الشاهد	-	-	-	-	-	-	-	-	-

حساب معامل الارتباط بين نسبة النفوق عند العدوى الطبيعية ونسبة النفوق عند العدوى التجريبية بالنسبة لجميع الذراري، تبين أنه يساوي الواحد R=1 وهو يدل على ارتباط قوية وبالتالي إمراضية الذراري عند العدوى التجريبية مع قوة وإمراضية الفيروسات المسببة للعدوى الحقلية عند العرن.

تبين معطيات الدراسة وجود ذراري محلية لفيروس التهاب الجراب المعدي مختلفة القوة، تسبب بشكل مختلف الاصابة بالمرض في مزارع رعاية القروج وهذا يتطلب تحسين ورفع فعالية الإجراءات الوقائية وذلك بمتابعة الدراسة واختبار الذرية النموذجية المناسبة لتحضير اللقاحات منها واستخدامها في عمليات التحصين ضد المرض في القطر.

REFERENCES المراجع

1- P.D.Lukert and S.B.Hitchner, 1984, Infectious bursal disease-Disease of poultry. Iowa State University, Press, Ames. Iowa USE, P-560.

2- J.B.Mcferran, 1984, Diagnosis and control of infectious bursal disease (Gumboro disease), Poultry disease in the near east. F.A.O., Rome, P-187.

3- كودر يافتسيف،ف.س.، رادوتشوك،ل.أ.، 1979. تشخيص التهاب الجراب المعدي، معهد البحوث العلمية البيطرية للدواجن لعموم الاتحاد السوفيتي . لينينغراد: 1-21.(باللغة الروسية)

4- جيرمان ــ ف،ف.، كراسينكوف ج.أ.، 1994، التهاب الجراب المعدي ــ معهد تجارب وسريريات الطب البيطري. أوكرانيا ــ خاركوف. 1-12.(باللغة الروسية)

5- بايدفلاتف، أ.ب. بيسرابف، ب.ف.، 1980، مرض الجمبورو، أمراض الطيور الزراعية. أوراجاي كييف 151- 153. (باللغة الروسية)

6- سيورين،ف.ن.، بيلاسوف،ب،ف.، 1986. طرق التشخيص المخبري للإمراض الفيروسية عند الحيوانات الزراعية أغروبروم. موسكو. 226- 230- 262. (باللغة الروسية)

7- كوروفين، ر.ن.، زيلينيسكي، ف. ب.، 1989، التشخيص المخبري لأمراض الدواجن أغروبروم. موسكو 104-106. (باللغة الروسية)

8- D.H.Ley, R. Yamamoto and A.A. Bickford, 1983, The pathogenesis of infectious bursal disease: Serologic, Histopathogenic and clinical chemical observation, Avian dis. Vol 27, N4, P-1060

9- A.M. Fadly and K. Nazerian, 1983, Pathogenesis of infectious bursal disease in chickens infected with virus at various ages, Avian dis., Vol. 27, N3, P-714

10- Nobuhiko Tanimora, Kenji Tsukamoto, Kikuyasu Nakamora, Ninoru Narita and Ninora Maeda, 1995, Association between pathogenicity of infectious bursal disease and viral antigen distribution detected by immunohistochemistry, Avian dis., Vol. 39, N 1, P-9.

11- Bursaplex™. A virus-antibody complex vaccine for infectious bursal disease, March 1999, Zootecnica, international, P-48