# دراسة عن الاصابة بفايروس أنفلونزا الطيور في الدجاج

هدى عبد الهادي علي النصراوي انطوان صبري البنا رمزيه محمد حسن الخياط
كلية الطب البيطري /جامعة القادسية كلية الطب البيطري/جامعة بغداد

## الخلاصة

تضمنت الدراسة عزل فايروس أنفلونزا الطيور لاول مره في العراق من نماذج مرضيه تم جمعها من قطيع دجاج البيض الذي يعاني من إصابات تنفسية وهضمية وانخفاض في انتاج البيض .فقد استخدم الحقن في كيس الالنتوي لاجنه بيض الدجاج النامي بعمر(١٠) ايام لعزل فايروس انفلوزا الطيور وتنميته وقد تم التحري عن الفايروس في السائل الالنتوي المحصود من البيض المحقون باستخدام التلازن الدموي لكريات الدم الحمر للدجاج كتشخيص اولي . وقد تم تشخيص نوع ونمط الفايروس المعزول عن طريق التشخيص المصلي وذلك باستخدام فحص اثباط التلازن الدموي وفحص تثبيت المتمم وتشخيص فايروس انفلونزا الطيور وكان من نوع (A ) نمط H9N2 وذلك باستخدام مصل مضاد مرجعي لفايروس الانفلونزا نوع (A) ومصل مضاد ومستضد مرجعي لفايروس انفلونزا. H9N2 . كما تم تنمية فايروس انفلونزا الطيور في اجنة بيض الدجاج النامي حيث وصل اعلى معيار للتلازن الدموي للفايروس الى 10Log2 وذلك بعد التمرير السادس . وشخصت اضداد فايروس انفلونزا الطيور.(H9N2) المعزول محليا" في امصال الدجاج الذي عزل منه الفايروس كذلك تم التحري عن وجود اضداد فايروس انفلونزا الطيور في امصال نماذج الدم المأخوذه من قطعان دجاج اللحم ودجاج البيض الذي يربى في حقول مختلفه المواقع وذلك باستخدام فحص اثباط التلازن الدموي وفحص الاليزا Elisa . حيث كانت نسبة الامصال الموجبه ( ٥٦,٦% ) من بين ٩٠ نموذجا" مصليا" فحصت باختبار اثباط التلازن الدموي اما نسبة الامصال الموجبه التي ظهرت في نتائج فحص الاليزا للعدد نفسه من أمصال الدجاج المذكورة اعلاه فكانت بمقدار ( ٧٤,٤% ) .

## المقدمة

يعد مرض الانفلونزا من الأمراض المشتركة المهمة التي تصيب الإنسان والحيوان ولاسيما الخيول الخنازير والطيور Jawetz *et al*.., 2001 ()، و يصيب مرض الانفلونزا ايضاً أنواع عدة من الطيور ،ومنها الطيور الحقلية domestic birds ،وطيور الأقفاص caged birds ، والطيور البرية Wild birds (Alexander, 1993; Easterday et al.,1997) وتعد الطيور المائية المهاجرة المضيف الخازن لمعظم أنماط فايروس الأنفلونزا نوع (A) ، ومصدراً لانتشار الإصابة بهذا الفايروس في مناطق واسعة من العالم ( Webster et al.., 1992 ) ، وظهور عتر جديدة لفايروس الانفلونزا نوع (A)، وذلك بسبب حدوث التغيرات المستضدية لهذا الفايروس ويصيب مرض الأنفلونزا أنواع الطيور المختلفة وفي معظم الأحيان تكون الإصابة بهذا المرض تحت السريرية Subclinical في الطيور الداجنة domestic birds و الطيور البرية Wild birds ، ويمكن ان يسبب فايروس الأنفلونزا في الطيور الداجنة ولاسيما الدجاج إصابة سريرية Clinical infection (Swayne et al., 1998 ).تتباين في شدتها بين حدوث إصابات تنفسية خفيفة و انخفاض في إنتاج البيض ، وهلاك عدد قليل من لطيور الى حدوث إصابات تنفسية وهضمية وعصبية حادة مع حدوث هلاكات بنسبة ١٠٠% في الطيور المصابة وهذا ما كان يعرف بطاعون الطيور Fowl plague ( Eastreday et al., 1997 ) اعتماداً على ضراوة الفايروس ونوع الطيور المصابةوعمرها ووجود الإصابات الجرثومية والفايروسية الأخرى المصاحبة لمرض الأنفلونزا (Alexander,1993) فقد ظهر في السنوات الأخيرة عدد من أوبئة مرض أنفلونزا الطيور في الدجاج حدثت في مناطق مختلفة من العالم ، من أهمها الوباء الذي ظهر في هونك كونك عام (١٩٩٧) والذي سببته فايروسات أنفلونزا الطيورH5N1 ( Zhou,et al 1999,). اذ تسبب فايروس انفلونزا الطيور H9N2 في حدوث إصابات مرضية شديدة في قطعان الدجاج ظهرت مؤخراً في مناطق عدة أدت إلى أحداث خسائر اقتصادية كبيرة في إنتاج الدواجن ( Alexander,2000). ونظراً لاستمرار ظهور إصابات مرضية في قطعان الدجاج لم يشخص فيها العوامل المرضية المسببة ، فقد ترافق ذلك مع ظهور أوبئة مرض أنفلونزا الطيور (H9N2) في مناطق مجاورة لقطرنا منها إيران والمملكة العربية السعودية ومناطق أخرى ( Sluis,2000) .لذا صممت هذه الدراسة للتحري عن وجود فايروس انفلونزا الطيور في قطرنا وتشخيص اضداد الفايروس في امصال الدجاج .

## المواد وطرائق العمل

تم اخذ نماذج مرضية ونماذج دم من دجاج اللحم ودجاج البيض المصاب باعراض تنفسية وهضمية مع انخفاض في إنتاج البيض وتشمل النماذج المرضية مسحات من الرغامي والمخرج ونماذج نسيجية من الرغامي والرئةوالأمعاء.

| مصدر النماذج | نوع النماذج | عدد النماذج |
|---|---|---|
| * العيادة الاستشارية لكلية الطب البيطري / جامعة بغداد ( حالات لدجاج اللحم والبيض المصابة من حقول واقعة في مناطق مختلفة ) منها :-جرف النداف ، اليوسفية، الصويرة، ابو غريب ، التاجي ، الغالبية | مسحات من الرغامي والمخرج ونماذج من الأنسجة والدم | ٣٠ |
| * مختبر الدواجن / مختبرات الشركة العامة للبيطرة / وزارة الزراعة( حالات لدجاج اللحم والبيض المصابة من حقول واقعة في مناطق مختلفة ) | مسحات من الرغامي والمخرج ونماذج من الأنسجة والدم | ١٥ |
| * حقول دجاج البيض / شركة الصفاء / محافظة القادسية | مسحات من الرغامي والمخرج ونماذج من الأنسجة والدم | ٥ |
| * حقول لدجاج اللحم / قضاء الشامية / محافظة القادسية | مسحات من الرغامي والمخرج ونماذج من الأنسجة والدم | ١٠ |
| حقول دواجن في محافظة الموصل | نماذج دم | ٣٠ |

استخدمت طريقة (Grist et. al . 1979 ; Hawkes 1979 ) للحقن في كيس الالنتوي وذلك لغرض عزل و تنمية فايروس أنفلونزا الطيور وقد تم استخدام اختبارالتلازن الدموي لتعيين وجود الفايروس الملزن لكريات الدم الحمر للدجاج في السائل الالنتوي لاجنة بيض الدجاج المحقون بالنماذج المرضية . وقد استخدم اختباراثباط التلازن الدموي واختبار تثبيت المتمم لتشخيص نوع ونمط الفايروس المعزول من الدجاج وذالك باستخدام مصل مضاد مرجعي لفايروس الانفلونزا نوع (A) ومصل مضاد ومستضد مرجعي لفايروس انفلونزا الطيور ($H_9N_2$) . كما استخدم اختبار اثباط التلازن الدموي واختبارالاليزا( Elisa) المحضر محليا لتشخيص امصال الدجاج.

## النتائج

**نتائج عزل الفايروس في أجنة الدجاج النامي**

عزل الفايروس من النماذج المرضية المأخوذة من قطيع دجاج بياض عمره ٦٤ أسبوعاً يربى في حقل تربية الدجاج في منطقة جرف النداف/ محافظة بغداد ، وقد كان القطيع مصاب باعراض مرضية تمثلت بانخفاض انتاج البيض وانتاج بيض خال من القشرة وانخفاض في استهلاك العلف مع ظهور إصابات تنفسية وهضمية وحدوث هلاكات للدجاج المصاب بمعدل (٥-٨ )دجاجات يومياً. وبعد اجراء الصفة التشريحية للدجاج المصاب والهالك لوحظ ضمور المبايض ، والتهاب في قناة البيض واحتقان في الرغامي والرئة ووجود تنخر في الأمعاء والتهاب في البريتون واحتقان شديد في الكبد .وقد أظهرت نتائج اختبار التلازن الدموي للسائل الالنتوي المحصود من بيض جنين الدجاج النامي بعد ٧٢ ساعة من حقن السائل المحضر لنماذج مسحات المخرج وانسجة الامعاء نتيجة تفاعل موجبة للتلازن الدموي مع كريات الدم الحمراء للدجاج حيث اعطى السائل الالنتوي لمسحات المخرج اعلى معيار بمقدار $4Log_2$ ، اما السائل الالنتوي للتمرير الاول لنماذج انسجة الامعاء فقد أعطى اعلى معيار مقدار $5Log_2$ ، اما السائل الالنتوي للتمرير الاول لمسحات الرغامي وانسجة الرغامي ، والرئة فقد اعطى نتيجة تفاعل سالبة للتلازن الدموي مع كريات الدم الحمر للدجاج .وقد اعطى السائل الالنتوي للتمرير الثاني لنماذج مسحات الرغامي وانسجة الرئة والرغامي في اجنة الدجاج النامي نتيجة تفاعل موجبة في اختبار التلازن الدموي مع كريات الدم الحمر للدجاج واعطى السائل الالنتوي للنماذج المرضية من مسحات الرغامي معيار مقداره $3Log_2$ . اما السائل الالنتوي للتمرير الثاني لانسجة الرغامي والرئة فقد اظهر معيار للتلازن الدموي مقداره $4Log_2$ في حين اعطى السائل الالنتوي للتمرير الثاني للفايروس المعزول من انسجة الامعاء ومسحات المخرج وذلك بعد ٧٢ ساعة من الحقن اعلى معيار للتلازن الدموي مقداره $6Log_2$ كما في جدول رقم (١) . اما بقية النماذج المرضية التي جمعت من الدجاج البياض ودجاج اللحم والتي اظهرت نتيجة تفاعل سالبة في اختبار التلازن الدموي فقد اهملت بعد تمريرها ثلاث مرات في كيس الالنتوي لجنين الدجاج النامي ، كما اظهر السائل الالنتوي والامنيون لبيض السيطرة السالب نتيجة تفاعل سالبة في فحص التلازن الدموي مع كريات الدم الحمر للدجاج . اما ضابط الفحص الموجب لفحص التلازن الدموي مع كريات الدم الحمر للدجاج اظهر معيار قدره $9Log_2$ .

الجدول رقم (١): نتائج عزل فايروس أنفلونزا الطيور من النماذج المرضية في أجنة الدجاج النامي مع نتائج اختبار التلازن الدموي

| نوع النموذج المرضي* | تسلسل التمرير** | اختبار التلازن الدموي<br>معيار/$Log_2$ التلازن الدموي*** |
|---|---|---|
| مسحات من الرغامي | التمرير الاول | ٠ |
| | التمرير الثاني | ٣ |
| مسحات من المخرج | التمرير الاول | ٤ |
| | التمرير الثاني | ٥ |
| أنسجة الأمعاء | التمرير الاول | ٥ |
| | التمرير الثاني | ٦ |
| أنسجة الرغامي والرئة | التمرير الاول | ٠ |
| | التمرير الثاني | ٤ |

* مصدر النموذج المرضي للدجاج هو حقل تربية الدجاج البياض في منطقة جرف النداف/ م/ محافظة بغداد.
** التمرير الأول والثاني للنماذج المرضية/ هو الحقن في كيس الالنتوي لاجنة الدجاج النامي بعمر( ١٠ ) أيام
*** تركيز كريات الدم الحمر للدجاج المستخدمة في الاختبار : ٠.٥% .

**نتائج تشخيص الفايروس المعزول من الدجاج**

أظهر تفاعل المصل المرجعي لفايروس انفلونزا الطيور ($H_9N_2$ )مع الفايروس المعزول من الدجاج ، وكذلك مع المستضد المرجعي لفايروس انفلونزا الطيور $H_9N_2$ نتيجة موجبة وبمعيار متماثل مقداره (١٢٨) في اختبار اثباط التلازن الدموي . في حين اظهر المصل المرجعي لفايروس النيوكاسل مع الفايروس المعزول من الدجاج وكذلك مع المستضد المرجعي لفايروس انفلونزا الطيور ($H_9N_2$ ) نتيجة تفاعل سالبة . وقد أظهر المصل المرجعي السالب لاضداد فايروس أنفلونزا نوع (A) نتيجة تفاعل سالبة مع العزله الفايروسية للدجاج وكذلك مع المستضد المرجعي لفايروس انفلونزاانفلونزا الطيور ($H_9N_2$) في فحص اثباط التلازن الدموي .اظهر الفايروس المعزول من الدجاج نتيجة تفاعل موجبة مع المصل المضاد المرجعي لفايروس الانفلونزا نوع (A) وكان معيار المستضدات الفايروسية المثبتة للمتمم مقداره (٣٢) اما معيار الاضداد في المصل المرجعي المثبتة للمتمم فكانت بمقدار (٣٢) . واظهر تفاعل العزلة الفايروسية مع المصل المضاد المرجعي لفايروس انفلونزا الطيور ($H_9N_2$ )نتيجة ايجابية في فحص تثبيت المتمم وكان معيار المستضدات الفايروسية المثبتة للمتمم بمقدار (١٢٨) اما معيار الاضداد للمصل المضاد المرجعي لفايروس انفلونزا الطيور ($H_9N_2$ ) المثبتة للمتمم فكانت مقدارها (٦٤) ، وقد اعطت العزلة الفايروسية. كما اظهرت ضوابط الفحص السالبة لتخافيف (المصل المرجعي والمستضد الفايروسي) نتيجة تفاعل سالبة وذلك بتحلل كريات الدم الحمر للأغنام . كما أظهرت ضوابط فحص تثبيت المتمم السالبة لمحلول مخفف دارئ الفيرونال والمتمم والنظام الكاشف نتيجة تفاعل سالبة بترسيب كريات الدم الحمر للأغنام

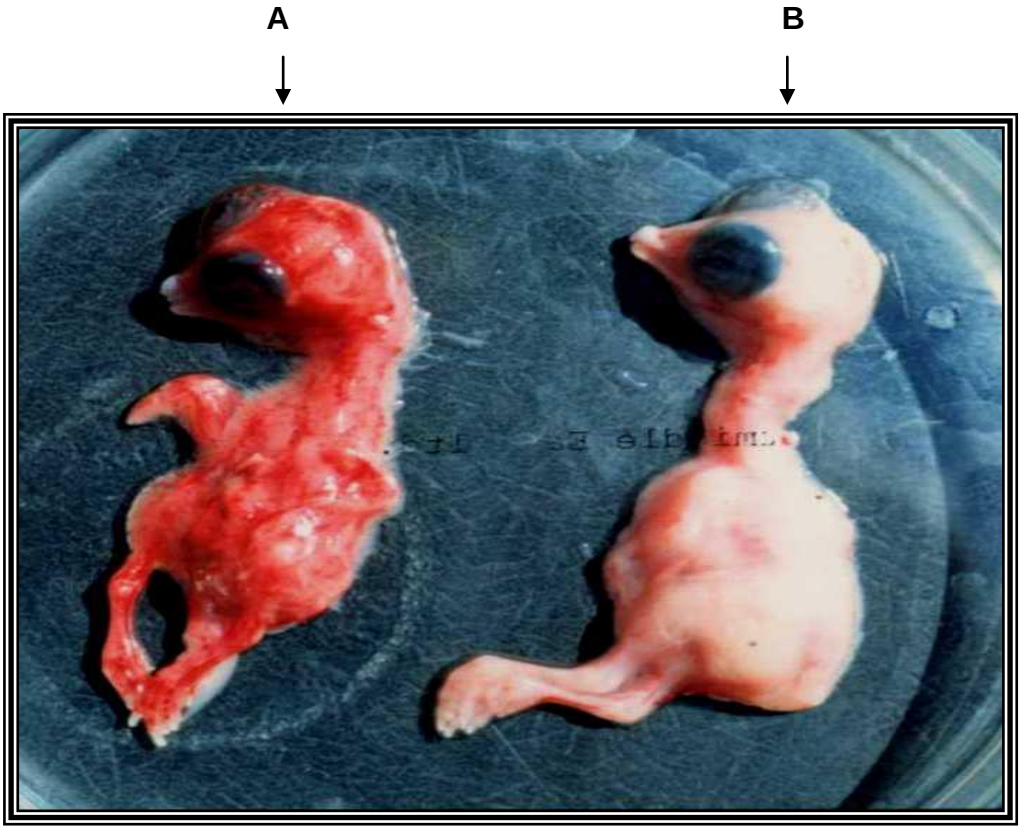
**تنمية عزلة فايروس انفلونزا الطيور**

أظهرت نتائج تنمية عزلة فايروس أنفلونزا الطيور في أجنة بيض الدجاج النامي حدوث ارتفاع تدريجي في معيار التلازن الدموي للفايروس مع كريات الدم الحمر للدجاج وذلك عند تكرار التمرير الفايروس المعزول في أجنة الدجاج النامي بواسطة الحقن في كيس الالنتوي حيث وصل معيار التلازن الدموي الى( $Log_2$ 10 ) بعد التمرير السادس للفايروس كما موضح في الجدول رقم (٢). وقد اظهر السائل الالنتوي لبيض ضابط التجربة السالب المحقون بمحلول دارئ الفوسفاتي المعقم نتيجة تفاعل سالبة في فحص التلازن الدموي .وقد لوحظ حدوث هلاك في الأجنة المحقونة عند زيادة تكرار تمرير الفايروس في أجنة البيض الدجاج النامي وذلك بعد (٤٨-٧٢ ) ساعة من الحقن وكما لوحظ على الأجنة الهالكة احتقان شديد مع وجود نزف نقطي على الجلد كما موضح في صورة رقم ( ١ ) .

الجدول رقم (٢) :نتائج تنمية عزلات فايروس أنفلونزا الإنسان والطيور في أجنة الدجاج النامية

| تسلسل التمرير في كيس الالنتوي | معيار /$Log_2$ للتلازن الدموي* | | |
|---|---|---|---|
| | العزلة الاولى لفايروس انفلونزا الانسان | العزلة الثانية لفايروس انفلونزا الانسان | عزلة فايروس انفلونزا الطيور |
| التمرير الثالث | ٦ | ٤ | ٦ |
| التمرير الرابع | ٦ | ٥ | ٧ |
| التمرير الخامس | ٧ | ٨ | ٨ |
| التمرير السادس | ٨ | ١٠ | ١٠ |

*تركيز كريات الدم الحمر للدجاج المستخدمة في الفحص : ٠.٥%




الصورة رقم(١).توضح التأثير المرضي في اجنة بيض الدجاج المحقونة بالفايروس/التمرير الخامس لفايروس انفلونزا الطيور H9N2 (الكيس الالنتوي).
A – جنين هالك بعد ٧٢ ساعة من الحقن بفايروس انفلونزا الطيور
B – جنين بيض السيطرة الغير محقون بالفايروس

**نتائج تشخيص الاضداد بفايروس أنفلونزا الطيور $H_9N_2$ في امصال الدجاج**

باستخدام الاختبارات التالية :

١-اختبار اثباط التلازن الدموي

أظهرت أمصال نماذج الدم الأولى التي جمعت من (٥) دجاجات (عزل منها فايروس أنفلونزاالطيور $H_9N_2$ ) نتيجة تفاعل موجبة مع المستضد المرجعي لفايروس أنفلونزا الطيور $H_9N_2$ وكذلك مع فايروس أنفلونزا الطيور المعزول من الدجاج نفسه وبمعيار متماثل للأضداد المثبطة للتلازن الدموي مقداره (٨) . أما أمصال النماذج الثانية للدم التي جمعت من (١٥) دجاجة أخذت بصورة عشوائية من القطيع الذي عزل منه الفايروس وذلك بعد ٢١ يوم من عزل الفايروس ، فقد أظهرت نتيجة تفاعل موجبة بمعيار مقداره (١٢٨) كما موضح في الجدول رقم (٣) .

٢-اختبار الاليزا Elisa

أظهرت أمصال نماذج الدم الأولى التي أخذت من الدجاج الذي عزل منه الفايروس نتيجة تفاعل موجبة مع فايروس أنفلونزا الطيور المعزول محلياً حيث كانت قيمة الكثافة الضوئية لهذه الأمصال في الفحص بمقدار (٠.٤٩٣) ، أما أمصال نماذج الدم الثانية ( التي أخذت من نفس قطيع الدجاج الذي عزل منه فايروس وذلك بعد ٢١ يوم من عزل الفايروس) نتيجة تفاعل موجبة مع فايروس أنفلونزا الطيور المعزول محلياً وكانت قيمة الكثافة الضوئية لهذه الأمصال في الفحص بمقدار (١.١٤١) ،كما موضح في جدول رقم (٣) ، واظهر تفاعل المصل المضاد المرجعي لفايروس أنفلونزا

الطيور $H_9N_2$ مع فايروس أنفلونزا الطيور المعزول محلياً في فحص الاليزا نتيجة موجبة كان معدل قراءات الكثافة الضوئية لهذا المصل بمقدار (٢.٦٩٤) (وقد استخدم معدل قراءات هذا المصل في حساب قيم الكثافة الضوئية لقراءات النماذج المصلية للدجاج في فحص الاليزا ) ويمثل مصل السيطرة الموجب في الفحص . كما استخدم مصل دجاج اظهر نتيجة تفاعل سالبة في فحص اثباط التلازن الدموي ولم يظهر أي تفاعل مع فايروس أنفلونزا الطيور المعزول محلياً في طبق الاليزا وقد كان معدل قراءات هذا المصل في الفحص بمقدار (٠.١٠٩) (استخدم معدل قراءات هذا المصل في حساب قيمة الكثافة الضوئية للنماذج المصلية للدجاج في فحص الاليزا ) ويمثل مصل السيطرة السالب في الفحص.

الجدول رقم (٣) :نتائج تشخيص الأضداد لفايروس أنفلونزا الطيور $H_9N_2$ في أمصال الدجاج الذي عزل منه الفايروس باختباري اثباط التلازن الدموي والاليزا Elisa

| المستضد الفايروسي المستخدم | اختبار اثباط التلازن الدموي | | اختبار الاليزا Elisa | |
|---|---|---|---|---|
| | معيار الاضداد المثبطة للتلازن الدموي /٠.٠٢٥ مل* | | قيم الكثافة الضوئية** | |
| | أمصال النماذج الأولى للدم | أمصال النماذج الثانية للدم | أمصال النماذج الأولى للدم | أمصال النماذج الثانية للدم |
| فايروس أنفلونزا الطيور H9N2 المعزولة محلياً | ٨ | ١٢٨ | ٠.٤٩٣ | ١.١٤١ |
| المستضد المرجعي لفايروس الأنفلونزا H9N2 | ٨ | ١٢٨ | NT*** | NT |

*المعيار الموجب للأضداد المثبطة للتلازن الدموي ≤ ٨

**المصل الموجب هو الذي يعطي قيمة للكثافة الضوئية ≤ ٠.١ ،معدل قراءات مصل السيطرة الموجب = ( ٢.٦٩٤)،معدل قراءات مصل السيطرة السالب = (٠.١٠٩)

not Tested***

**تشخيص الأضداد في أمصال الدجاج من حقول واقعة في مناطق مختلفة**

استخدمت في التشخيص الاختبارات التالية :

١-اختبار اثباط التلازن الدموي

عند فحص ٩٠ نموذج مصلي (لدجاج لحم ودجاج بيض يربى في حقول تقع في مواقع مختلفة والمصاب بأعراض تنفسية وهضمية وكذلك انخفاض في إنتاج البيض)، باستخدام اختبار اثباط التلازن الدموي ، وكان عدد الأمصال (التي أعطت نتيجة تفاعل موجبة مع فايروس أنفلونزا الطيور $H_9N_2$ المعزول محلياً) بمقدار (٥١) وبنسبة (٥٦.٦%) ، ومعدل معيار الأضداد المثبطة للتلازن الدموي لهذه الأمصال مقداره (٢٥.٦) وبمدى مقداره (٨-١٢٨).

٢-اختبار الاليزا Elisa

اجري هذا الاختبار على (٩٠) نموذجاً مصلياً لدم الدجاج الذي اخذ من حقول تقع في مواقع مختلفة ، اظهر (٦٧) نموذجاً مصلياً نتيجة تفاعل موجبة مع فايروس الطيور المعزل محلياً وقد كانت النسبة للأمصال الموجبة بمقدار ( ٧٤.٤%) وقد اعتمدنا في قراءة النتائج الموجبة على أساس ان المصل الموجب هو الذي يعطي قيمة للكثافة الضوئية ≤ ٠.١ . واظهر أجراء التحليل الإحصائي باستخدام فحص (T-test) لنتائج تشخيص الأضداد لفايروس أنفلونزا الطيور في أمصال الدجاج عدم وجود فرق إحصائي مهم على مستوى ($P<0.05$) في نسبة عدد الأمصال الموجبة التي ظهرت في اختبار الاليزا واختبار اثباط التلازن الدموي بالرغم من وجود فرق حسابي بينها .

## المناقشة

تم التخطيط لهذه الدراسة التي تعد الأولى من نوعها في القطر العراقي وذلك لأهمية مرض الأنفلونزا الذي يعد من الأمراض المشتركة المهمة التي تصيب الإنسان والحيوان ، والتي يمكن ان تسبب أوبئة مرضية شديدة الخطورة في الإنسان ( Oxford, ٢٠٠٠ ). وكذلك الطيور الداجنة ولاسيما الدجاج مما يؤدي الى حدوث خسائر اقتصادية كبيرة في إنتاج الدواجن ، ومنها الوباء الذي حدث ١٩٩٧ في هونك كونك وكان سببه فايروس أنفلونزا الطيور ($H_5N_1$) الذي أدى الى هلاك عددكبير من الدجاج المصاب ( MMWR,1997 )كما تسبب في حدوث إصابات تنفسية شديدة في البشر أدت الى وفاة (٦) أشخاص ( MMWR,1998 ). وقد احدث فايروس أنفلونزا الطيور$H_9N_2$ إصابات مرضية شديدة في الطيور الداجنة ولاسيما الدجاج منها ، ادت الى حدوث خسائر اقتصادية في دول عديدة ومنها إيران والمملكة العربية السعودية ودول اخرى (Zigger, 1999 ; Sluis , 2000) . فضلاً عن حدوث إصابات مرضية بفايروس أنفلونزا الطيور( $H_9N_2$ ) في البشر نتيجة انتقال الإصابة بهذا الفايروس من الدجاج الى الإنسان (

Peiris et al.,1999 ). ونظراً للانتشار الواسع لمرض أنفلونزا الطيور في مناطق مجاورة من قطرنا دفعنا هذا الى التخطيط لبحثنا الذي تضمن جوانب عدة أهمها :-

العزل الاولي لفايروس الأنفلونزا ولاجل ذلك جمعت النماذج المرضية من الدجاج المصاب بأعراض تنفسية وهضمية وانخفاض في إنتاج البيض فقد تم اخذ مسحات من الرغامي والمجمع وكذلك نماذج نسيجية من الرغامي والرئة والأمعاء من الدجاج المصاب ، وذلك لقابلية فايروسات أنفلونزا الطيور على التكاثر في الخلايا الظهارية المبطنة للقناة التنفسية والأمعاء وهذا ما اشار الية ( Smith et al .,1980 ) . وقد استخدمت طريقة الحقن في بيض جنين الدجاج النامي بعمر (١٠) أيام لعزل فايروس الأنفلونزا وذلك لاعتبارها افضل طريقة لعزل الفايروس وهذا ما أكده (Jawetz et al., 2001) واتبعت طريقة الحقن في كيس الالنتوي لعزل فايروس أنفلونزا الطيور من النماذج المرضية للدجاج حسب ما أشار اليه (Beard 1992;Swayne et al.,1998), وقد تم تشخيص الفايروس الملزن لكريات الدم الحمر للدجاج ( باختبار التلازن الدموي ) في السائل الالنتوي الملزن لكريات الدم الحمر للدجاج في السائل الالنتوي للتمرير الأول والثاني للنماذج المرضية المأخوذة من الدجاج باستخدام اختبار التلازن الدموي، ولم يشخص الفايروس الملزن لكريات الدم الحمر في السائل الالنتوي للتمرير الأول لنماذج مسحات الرغامي وكذلك نماذج أنسجة الرغامي والرئة وذلك لعدم وصول الفايروس المعزول الى المعيار المطلوب لتلزين كريات الدم الحمر للدجاج . حسب ما أشار إليه (Mukhlis , 1978 ; AL-Dabbagh ,1989). وقد استخدم في دراستنا اختبار اثباط التلازن الدموي وذلك لتشخيص المستضدات الخاصة بنتوءات التلازن الدموي للفايروسات المعزولة ، وذلك لانه يمتلك خصوصية عالية في تحديد النمط المصلي لفايروس الأنفلونزا ، وهذا ما أكده (Potter , 1990 ; Swayne et al,.1998) . وقد أظهرت نتائج تشخيص الفايروس المعزول من الدجاج( باستخدام اختبار اثباط التلازن الدموي ) تفاعل الفايروس المعزول مع المصل المضاد المرجعي لفايروس أنفلونزا الطيور ( $H_9N_2$ ) ، ويشير هذا الى ان الفايروس يمتلك مستضدات للتلازن الدموي نمط ( $H_9$ ) ، قد تفاعلت مع أضداد نتوءات التلازن الدموي نمط ( $H_9$ ) الموجودة في المصل المضاد المرجعي لفايروس أنفلونزا الطيور ( $H_9N_2$ ) ، وقد أعطى تفاعل الفايروس المعزول محلياً والمستضد المرجعي لفايروس أنفلونزا الطيور ( $H_9N_2$ ) مع المصل المضاد المرجعي لفايروس أنفلونزا الطيور( $H_9N_2$ ) معيار متماثل للأضداد المثبطة للتلازن الدموي وذلك لاستخدام نفس وحدات التلازنية وهي ( ثماني وحدات تلازنية ) للفايروس المعزول وكذلك للمستضد المرجعي لفايروس الأنفلونزا ( $H_9N_2$ ) في الفحص ، كما لم يظهر الفايروس المعزول من الدجاج تفاعلاً مع المصل المضاد المرجعي لفايروس النيوكاسل ، مما يشير هذا الى ان الفايروس المعزول من الدجاج ليس فايروس النيوكاسل .وقد تم استخدام فحص تثبيت المتمم في تشخيص المستضدات الداخلية لفايروس الأنفلونزا الطيور المعزول من الدجاج وذلك وباستعمال مصل مضاد مرجعي لفايروس الأنفلونزا نوع ( A ) وهذا يتفق مع ما استخدمه(pereira et al ., 1962) . وقد أظهرت نتائج اختبار تثبيت المتمم تفاعل الفايروس المعزول من الدجاج مع المصل المضاد المرجعي لفايروس الأنفلونزا نوع ( A ) . ويشير هذا الى ان الفايروس المعزول من الدجاج هو فايروس الأنفلونزا نوع ( A ) كما أظهرت نتائج اختبار تثبيت المتمم تفاعل الفايروس المعزول محلياً من الدجاج مع المصل المضاد المرجعي لفايروس أنفلونزا الطيور ( $H_9N_2$ ) وهذا يشير الى ان نمط فايروس الأنفلونزا المعزول من الدجاج هو ( $H_9N_2$ ) ،وهذا يؤكد النتيجة التي تم الحصول عليها في اختبار اثباط التلازن الدموي .ومن نتائج اختباري اثباط التلازن الدموي وتثبيت المتمم استطعنا ان نتوصل الى تشخيص نوع ونمط الفايروس المعزول محليا من الدجاج وكما ياتي :الفايروس المعزول من الدجاج : هو فايروس أنفلونزا الطيور نوع ( A ) نمط ( $H_9N_2$ ) وقد سميت العزلة الفايروسية كما ياتي : - A/chicken/Iraq /1/2001 ($H_9N_2$)

لقد لوحظ خلال تنمية فايروس أنفلونزا الطيور المعزول محلياً في الكيس الالنتوي لاجنة بيض الدجاج النامي حدوث ارتفاع في معيار التلازن الدموي للفايروس باستخدام كريات الدم الحمر للدجاج وذلك عند تكرار تمرير الفايروس في أجنة بيض الدجاج النامي وهذا يتفق مع النتائج التي توصلت أليها ( باقر ، ١٩٩٩) .وكما لوحظ حدوث هلاك للأجنة المحقونة بفايروس أنفلونزا الطيور( $H_9N_2$ ) خلال ٤٨-٧٢ ساعة بعد الحقن عند تكرار تمرير الفايروس في أجنة بيض الدجاج النامي حيث ويلاحظ احتقان الأجنة الهالكة مع وجود نزف نقطي على الجلد ، كما موضح في صورة رقم (١) . وهذا يتفق مع ما أشار إليه (Halvorson et al., 1979 ; Lany et al.,1981;Shan ,1996) واستخدم في دراستنا اختباري اثباط التلازن الدموي والاليزا Elisa للتحري عن وجود الأضداد لفايروس أنفلونزا الطيور $H_9N_2$ في أمصال الدجاج وذلك لاعتبارها اكثر الاختبارات خصوصية وحساسية لتشخيص الأضداد الخاصة بالنمط والنوع لفايروس الأنفلونزا وهذا ما أكده (White and Fenner , 1986 ; Swayne *et* al.,1998) .وبينت نتائج اختبار اثباط التلازن الدموي واختبار والاليزا Elisa وجود أضداد فايروس أنفلونزا الطيور $H_9N_2$ في أمصال الدجاج الذي عزل منه الفايروس ، حيث أعطت هذه الأمصال نتيجة تفاعل موجبة مع فايروس أنفلونزا الطيور( $H_9N_2$ ) المعزول محلياً وكذلك مع المستضد المرجعي لفايروس أنفلونزا الطيور( $H_9N_2$ ) في اختبار اثباط التلازن الدموي وكما لوحظ ارتفاع معيار أضداد فايروس الأنفلونزا ( $H_9N_2$ ) في أمصال نماذج الدم التي أخذت من قطيع الدجاج نفسه ( بعد ٢١ يوم من عزل فايروس ) بمقدار اكثر من أربعة أمثال معيار

الأضداد في أمصال نماذج الدم التي أخذت من الدجاج المصاب في بداية ظهور الأعراض المرضية . وهذا يؤكد تعرض القطيع للإصابة بفايروس أنفلونزا الطيور( $H_9N_2$ ) .كما أظهرت أمصال نماذج الدم الأولى ونماذج الدم الثانية للدجاج الذي عزل منه الفايروس نتيجة تفاعل موجبة في فحص الاليزا وكانت قيمة الكثافة الضوئية لأمصال نماذج الدم الثانية أكثر من قيمة الكثافة الضوئية لامصال النماذج الدم الأولى وذلك لان معيار الأضداد في أمصال النماذج الثانية أعلى من معيار الأضداد في أمصال نماذج الدم الأولى وهذا يتفق مع نتائج اختبار اثباط التلازن الدموي . وقد أظهرت نتائج تشخيص الأضداد لفايروس أنفلونزا الطيور ( $H_9N_2$) المعزول محلياً في أمصال نماذج الدم التي جمعت من الدجاج المصاب بأعراض تنفسية وهضمية وانخفاض في إنتاج البيض( الذي يربى في حقول تقع في مواقع مختلفة ) باستخدام اختبار اثباط التلازن الدموي واختبار الاليزا ، حيث بلغت نسبة الأمصال الموجبة التي أظهرها فحص اثباط التلازن الدموي ( ٥٦.٦%) وهي اقل من نسبة الأمصال الموجبة التي أظهرها فحص الاليزا وبلغت ( ٧٤.٤% ) ، ويشير هذا الى تعرض بعض قطعان الدجاج في قطرنا للإصابة بفايروس أنفلونزا الطيور ($H_9N_2$ ) حيث يمكن ان يكون فايروس أنفلونزا الطيور ( $H_9N_2$ ) هو أحد أسباب ظهور الإصابات المرضية الشديدة في قطعان الدجاج ، إذ أن هذا الفايروس قد سبب في حدوث إصابات مرضية شديدة في قطعان دجاج اللحم والدجاج البياض في العديد من الدول ومنها الدول المجاورة للقطر وهي إيران والمملكة العربية السعودية وهذا ما أشار أليه ( Zigger , 1999 ; Sluis 2000 ) . وقد لوحظ نسبة الأمصال الموجبة في فحص الاليزا اكثر من نسبة الأمصال الموجبة التي ظهرت في فحص إثبات التلازن الدموي ويعود ذلك الى ان فحص الاليزا اكثر حساسية من فحص اثباط التلازن الدموي في تشخيص المعيار الواطئ للأضداد في المصل وهذا ما أكده (Turner et al., 1982 ; snyder et al., 1984)

## المصادر


باقر ، سرى محمد حسن (١٩٩٩). عزل وتشخيص فايروس الانفلونزا من الانسان و الخيول و دراسة العلاقة المناعية بينهما- رسالة ماجستير – كلية الطب البيطري – جامعة بغداد.

Al-Dabbagh, A.S. (1989). A study of influenza virus isolated from an outbreak in Baghdad during 1987-1988. Thesis , College of Medicine, University of Al-Mustansiriya, Iraq.

Alexander, D.J. (1993). Orthomyxovirus infection. In: Virus infections of birds. McFerran, J.B. and Mcnulty, M.S. (eds.). Elsevier Science Publishing Company. New York, USA.Pp.:287-315.

Alexander,D.J. (2000).The history of avian influenza in Poultry. World Poultry. November (Special Issue: Avian Influenza ). Pp.:7-8.

Easterday, B.C. ; Hinshaw, V.S. and Halvorson, D.A. (1997). Influenza. 10th (ed.) In: Disease of poultry. Calnek, B.W. ; Barnes, H.J. ; Beard, C.W. ; McDougald, L.R. and Salf, Y.N. (eds.), Iowa State University Press, Ames , Iowa, USA. Pp.: 583-605.

Grist, N.R. ; Ross, C.A. and Bell, E.J. (1979). Diagnostic method in clinical virology. 7th ed. Kamp Hall Bindery. Oxford.

Guo, Y.J. ; Krauss, S. ; Senne, D.A. ; Mo, I.P. ; Lo, K.S.; Xiong, X.P. ; Norwood, M. ; Shortridge, K.F. ; Webster, R.G. ; Guan, Y. (2000). Characterization of the pathogenicity of members of newly established $H_9N_2$ influenza virus lineages is Asia. Virol., 267:279-288.

Hawkes, R.A. (1979). General principles underlying laboratory diagnosis of viral infections. In: Diagnostic procedures for viral , rikettsial and chlamydial infections, 5th ed. Lennette, E.H. and Schmidt, N.J. (eds.). American Public Health Association, Washington DC. Pp.:1-48.

Jawetz, E.M.D. ; Melnick, J.L. and Adelberg's, E.A. (2001). Orthomyxo viruses (Influenza viruses). In: Medical Micro-bilogy. 20th ed , Lange Medical Book, McGraw-Hill,Pp.: 459-469.

MMWR.Update (1997). Isolation of avian influenza A( $H_5N_1$) viruses form human Hong Kong may– Decem-

antibody against avian influenza virus. Avian. Dis., 29(1):136-145.

Smith, V.W.; Coackley, W. and Maker, D. (1980). The serological response of chickens to an avian influenza A virus administered by various routes. Res. Vet.Sci., 29:248-250.

Swayne, D.E. ; Senne, D.A. and Beard, C.W. (1998). Avian Influenza. In : Isolation and identification of avian pathogen.Swayne, D.E. ; Glisson, J.R. ; Jackwood, M.W. ; Pearson, J.E. and Reed,

Turner, R. ; Lathey, J.L. ; Voris, L.P.V. and Belshe, R.B. (1982). Serological diagnosis of B virus infection : Comparison of an Enzyme linked Immunosorbent assay and haemagglutination inhibition.J. Clin. Microbiol.,15 (5) : 824-829.

Webster, R.G. ; Bean ,W.J. ; Gordman, O.T. ; Chambers, T.M. and Kawaoka, Y.(1992). Evolution and ecology of influenza viruses. Microbiol. Rev., 56:152-179.

Zhou, N.N. ; Shordidge, F.K. ; Krauss, L.S. and Webster, G.R. (1999). Rabid evolution of $H_5N_1$ influenza viruses in chicken in Hong Kong. J. Virol., 73 (4): 3366 - 3374.

Ziggers,D. (1999) Avian Influenza in Iran unpredictable outbreak with serious losses. World Poultry. 15(4):49-50.

ber 1997.MMWR-MORB-Mortal - Wkly Rep., 46 (50):1204-1207.

MMWR.Update. (1998). Isolation of avian influenza A ($H_5N_1$) viruses from human-Hong Kong, 1997-1998. MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep. Jan 9, 46(52-53):1245-1247.

Mukhlis, F.A. (1978). Studies on recombinants of influenza virus type (A) : with reference to vaccine preparation. Thesis College of Medicine , University of Baghdad , Iraq.

Oxford, J.S. (2000). Influenza A pandemic of the 20th century with special references to 1918: Virology, Pathology and Epidemiology . Rev. Med. Virol., 10:119-133.

Pereira, G.H. ; Tumova , B.; Law, G.V. (1965). Avian influenza A viruses . Bull. Org. Mond. Sante. Bull. Wld. Hlth. Org., 32:855-860.

Potter, C.W. (1990). Influenza. In: Principles and practice of clinical virology. Zuckerman, A.J.; Banatvala, J.E. and Pattisom ,J.R. (eds.). Printedby John Wiley and Sons Ltd., London.Pp.:213-238.

Sluis, W.V. (2000). AI in Southern Asia and the middle east. World Poultry .Nov. Special Issue: Avian Influenza .Pp.: 25.

Snyder, D.B. ; Marquardt, W.W.; Yancey, F.S. and Savage, P.K. (1984). An enzyme linked immunosorbent assay for the detection of

# Study on infection with avian influenza virus in chicken

H.A.Al-Nasrawei A.S.Al-Bana R.M.Al-Khayatt
Coll . of Vet. Med, Univ. of AL- Qadisiya Coll. of Vet. Med./ Unive of Baghdad

## Abstract

Study include isolation of a single viral isolate of avian influenza virus from disease sample collected from egg layering flock suffering from respiratory and digestive infection and decline in egg production. Embryonated chicken eggs 10 days old used for virusallentoic sac route only used for both isolation and propagation of avian influenza virus.The virus was detected in the harvested allantoic fluid after 72 hours of inoculation by haemagglutination of chicken red blood cells as a primary diagnostic method , but viral type and subtype was determined serologically in haemagglutination inhibition (HI) and Complement fixation (CF)

tests.Avian influenza virus was diagnosed as type (A) and subtype ($H_9N_2$) by using reference antiserum to type (A) virus and reference antiserum and antigen to avian influenza virus subtype ($H_9N_2$) in (HI) and (CF) tests.avian influenza viral isolates were propagated in embryonated chicken eggs as highest titer by haemagglutination for virus was 10 Log2 after (6) serial passages. Avian influenza virus $H_9N_2$ antibodies were detected in chicken sera from whom the virus were isolated . also anti $H_9N_2$ antibodies were diagnosed in serum samples collected from chicken flocks for both egg and meat production in different areas by using HI and ELISA tests and the percentage of positive sera were 56.6% from 90 serum samples by using HI test , but by ELISA test were 74.4 %.