الفصل التاسع والثلاثون

الإصابة بفيروس آربو
ARBOVIRUS INFECTION

جيمس إ. بيرسون
James E. Pearson

الملخص Summary

فيروسات التهاب المخ الخيلي الشرقي eastern equine encephalitis (EEE)، والتهاب المخ الخيلي الغربي western equine encephalitis (WEE)، وهايلاندز جيه Highlands J (HJ)، والتهاب المخ السحائي في الرومي turkey meningoencephalitis (TME) هي فيروسات آربو التي تسبب مرضاً إكلينيكياً في أنواع الطيور. كل الأمراض التالية أعضاء في عائلة فيروسات توجا وهي: التهاب الدماغ الخيلي الشرقي، والتهاب الدماغ الخيلي الغربي، وإتش جيه وكلها تتسبب بواسطة فيروسات من جنس فيروس ألفا. وصفت الإصابة بفيروسات التهاب الدماغ الخيلي الشرقي وإتش جيه في أنواع الطيور ابتداء في شرق وجنوب الولايات المتحدة. الإصابات بفيروس التهاب الدماغ الخيلي الغربي سجلت لأول مرة في غرب الولايات المتحدة. يتسبب التهاب المخ السحائي أو التهاب المخ السحائي الإسرائيلي بواسطة فيروس من جنس فيروس فلافي وسجلت فقط في إسرائيل وجنوب أفريقيا. تختلف الأعراض الإكلينيكية لهذه الإصابات الفيروسية بين الدواجن وأنواع الطيور المصابة الأخرى، لكن لها أعراض مرضية نتيجة إصابة الجهاز العصبي أساساً شاملة عدم الاتزان والشلل. سجل أن فيروسات التهاب الدماغ الخيلي الشرقي والتهاب الدماغ الخيلي الغربي تسبب مرضاً في الدواجن وطيور اللعب. فيروس التهاب المخ السحائي في الرومي سجل تحت ظروف حقلية أنه يسبب مرضاً في الرومي. قد يكون النفوق عالياً حتى ٨٥٪ صاحب المرض الأساسي مع فيروس إتش جيه انخفاض إنتاج البيض في الرومي.

تعريف المسبب Agent Identification

يمكن عزل فيروسات التهاب الدماغ الخيلي الشرقي والتهاب الدماغ الخيلي الغربي من عينات حقلية بحقن الفئران حديثة الولادة وأجنة بيض الدجاج أو مزارع الخلية أو الدجاج حديث الفقس. تعرف فيروسات التهاب

الدماغ الخيلي الشرقي والتهاب الدماغ الخيلي الغربي وإتش جيه بواسطة تثبيت المتمم أو التألق المناعي أو اختبار التعادل بتناقص البقع أو بي آر إن plaque-reduction-neutralization (PRN). يعرف فيروس التهاب المخ السحائي في الرومي بواسطة تعادل الفيروس في مزرعة الحلية.

الكشف المصلي في العائل Serologic Detection in the Host

يمكن التعرف على الأجسام المضادة النوعية لفيروسات التهاب الدماغ الخيلي الشرقي والتهاب الدماغ الخيلي الغربي وإتش جيه في أنواع العائل البسيط اختبارات اختبار التعادل بتناقص البقع أو منع تلازن الدم، ويمكن التعرف على الأجسام المضادة الفيروسية لفيروس التهاب المخ السحائي في الرومي بواسطة اختبار منع تلازن الدم.

مقدمة Introduction

تضم فيروسات آربو مجموعة كبيرة من الفيروسات تجتمع سوياً بقدرتها على التكاثر والانتقال في وبواسطة الحشرات. تصاب عوائل الطيور بعدد من فيروسات آربو وتستخدم الطيور كدليل في اكتشاف دخول فيروسات آربو إلى منطقة ما. سجلت الأنواع الأربعة من فيروسات آربو أنها تسبب أمراضاً في عوائل الطيور. عزلت فيروسات التهاب الدماغ الخيلي الشرقي والتهاب الدماغ الخيلي الغربي كثيراً في النصف الغربي على الرغم أن كل التقارير عن المرض في الدواجن أو أنواع الطيور المستأنسة من الولايات المتحدة ومعظم الإصابات تتسبب بواسطة فيروس التهاب الدماغ الخيلي الشرقي. سجل المرض الإكلينيكي لفيروس التهاب الدماغ الخيلي الشرقي بصورة مبدئية في الشوكار الصغير والسمان والفزان في شرق وجنوب الولايات المتحدة. أيضاً سجلت حالات عزلت من البط الصغير والرومي وطيور الكركي. المرض الإكلينيكي المسبب بفيروس التهاب الدماغ الخيلي الغربي نادر لكن تم تسجيله في الدجاج والفزان والرومي. حديثاً سجلت حالات إصابة بفيروس التهاب الدماغ الخيلي الشرقي والتهاب الدماغ الخيلي الغربي في طيور الإميو (9, 5, 1).

سجل فيروس إتش جيه أنه يسبب مرضاً في شرق الولايات المتحدة، والأعراض الإكلينيكية الأولية الملحوظة هي انخفاض إنتاج البيض في الرومي (10). سجل فيروس الرومي في إسرائيل وجنوب أفريقيا. الرومي هو العائل الطيري الوحيد الذي يصاب إكلينيكياً (4, 3, 2). يعمل البعوض كعائل بيولوجي في إدخال الفيروس إلى القطعان. يمكن أن ينتقل الفيروس خلال التقاط الريش والافتراس. فيروس الرومي هو مرض في الولايات المتحدة ويجب أن يبلغ إلى هيئات صحة الحيوان. نتيجة الأهمية على الصحة العامة فإنه يجب التبليغ عن حالات الإصابات الفيروسية المؤكدة لفيروسات التهاب الدماغ الخيلي الشرقي أو التهاب الدماغ الخيلي الغربي إلى جهات الصحة العامة وصحة الحيوان.

سجلت إصابات شديدة ونفوق بسبب فيروسات التهاب الدماغ الخيلي الشرقي والتهاب الدماغ الخيلي الغربي في عمال المعامل. بالتالي يجب أن يؤدى أي عمل لهذه الفيروسات في معامل الأمان الحيوي المستوى الثاني باستخدام كبائن أمان ويجب تحصين كل الأشخاص المعرضين لمنع العدوى (7). إذا لم تتوفر إجراءات أمن مناسبة لا يجب عزل هذه الفيروسات. فالبديل هو أن ترسل كل الأنسجة من الحالات المشتبهة أو المعزولات الممكنة إلى معمل مرجعي.

المرض الإكلينيكي Clinical Disease

الأعراض المبدئية الإكلينيكية لهذه الإصابات هي خلل الجهاز العصبي. الأعراض العصبية تلاحظ أساساً في الطيور الصغيرة المصابة بفيروسات التهاب الدماغ الخيلي الشرقي والتهاب الدماغ الخيلي الغربي، إلا أنه في طيور الإميو تتطور الأعراض عند كل الأعمار عقب الإصابة. لوحظ التهاب المخ السحائي أساساً في الرومي الأكبر من ثمانية أسابيع (5). تشمل الأعراض الخمول وفقد الاتزان وشلل الرجل والجناح والتواء الرقبة وارتعاشات وتمدد على الأرض والموت. قد تختلف الشدة بين الطيور والقطعان والأنواع. في بعض الحالات قد يكون المرض حاداً جداً مع الرقاد على الأرض والموت فقط. لوحظ الالتهاب المعوي النزفي في الإميو المصابة بفيروسات التهاب الدماغ الخيلي الشرقي والتهاب الدماغ الخيلي الغربي. قد تكون معدلات الإصابة والنفوق أعلى من ٨٥٪. تحت الظروف الطبيعية المرض الإكلينيكي الأولي المسجل مع الإصابة بفيروس إتش جيه هو نقص إنتاج البيض في الرومي. لوحظ أيضاً نفس العرض مع التهاب الدماغ الخيلي الشرقي والتهاب المخ السحائي. لم تصاحب العدوى بهذه الأربوفيروس بتغيرات مرضية مميزة أو آفات نسيجية مرضية. الوصف الكامل للأمراض المرتبطة مع فيروسات آربو وصف بواسطة Guy (2).

جمع العينات Sample Collection

الطريقة الأفضل للتشخيص والتعريف هي عزل الفيروس. يجب أن يجرى الفحص التشريحي للطيور المشتبهة إصابتها بفيروسات التهاب الدماغ الخيلي الشرقي والتهاب الدماغ الخيلي الغربي في كبائن بها أمان بيولوجي. يجب اختبار الطائر للفحص بمجرد ظهور الأعراض لأن وجود الفيروس في الدم قد يكون لفترة قصيرة. تجمع أنسجة المخ والكبد والطحال. يجب جمع المصل من طيور بها إصابة تحت حادة لأن الأجسام المضادة تكتشف غالباً في الطيور التي بها أعراض مرضية. تحفظ الأنسجة عند −٧٠°م في حالة عدم الحاجة إلى الفحص فوراً. للعزل يجهز معلق ١٠٪ من الأنسجة مع محلول ملح الفوسفات (بي إتش ٧,٨) يحتوي على ٠,٧٥٪ مصل أجنة العجول ١٠٠ وحدة/مل من البنسيلين، و١٠٠ ميكروجرام/ مل ستربتومايسين ويطرد المعلق مركزياً عند سرعة ١٥٠٠ إكس جي لمدة ٣٠ دقيقة.

أوساط الزرع المفضلة Preferred Culture Media and Substrates

الفأر حديث الولادة عائل شديد الحساسية. يحقن فأر عمره ١ إلى ٤ أيام في المخ بطعم ٠.٠٢ مل بواسطة محقن اختبار السل. مكان الحقن عند جانب خط الوسط إلى الجزء الأوسط لإحدى نصفي المخ الجانبي. تلاحظ الفئران لمدة ٧ أيام، وتجمع الفئران النافقة يومياً وتجمد عند —٧٠°م. تجمع أمخاخ الفئران للتعرف على الفيروس بالسحب باستخدام محقن السل. يجرى التمرير الثاني فقط إذا لم يتم التعرف على الفيروس من الفئران التي نفقت عقب الحقن.

يعتبر جنين الدجاج أقل حساسية عن الفئران للعزل الأولي، إلا أنه وصف كطريقة مثلى لعزل فيروس التهاب المخ السحائي في الرومي (3). يشتبه دائماً في إصابة فيروس آربو عند عزل فيروس مميت للجنين من طيور بها مرض عصبي.

يحقن معلق النسيج في كيس المح لجنين بيض الدجاج عند عمر ٦ — ٨ أيام وعادة لا تحدث آفات مرضية في الجنين، إلا أن الجنين المصاب بفيروس الرومي يكون عادة لونه أحمر فاتح قبل النفوق (3). يجب أن تحضن الأجنة لمدة أسبوع لكن يحدث النفوق عادة ٢ — ٤ أيام بعد الحقن. التقليدي، تكون تمريرة واحدة فقط ضرورية، فيما عدا إذا لم يتم التعرف على الفيروس من الأجنة النافقة.

الصيصان حديثة الفقس قابلة للإصابة واُستخدمت لعزل الفيروس، إلا أن هذه الطريقة غير مفضلة لفيروسات التهاب الدماغ الخيلي الشرقي والتهاب الدماغ الخيلي الغربي لأن الطيور المصابة تفرز الفيروس المعدي بكثرة. يعزل فيروس آربو أيضاً في عدة أنظمة مزرعة، لكنها أقل حساسية من الفئران وأكثر الخلايا شيوعاً هي الخلايا الابتدائية من الخلايا الليفية لأجنة الدجاج والبط وخط الخلايا المستمر من Vero، وbaby hamster kidney-21 (BHK-21)، وrabbit kidney-13 (RK-13). يجرى العزل عادة في قوارير مزرعة خلية ٢٥ سم^{٢}. تحقن طبقة الخلايا المندمجة بكمية ١ مل من المعلق بعد ساعة فترة ادمصاص يتم غسل الخلايا ويضاف وسط الحفظ وتحضن لمدة أسبوع ويجرى تمرير أعمى واحد. تنتج الفيروسات الأربعة تأثيراً مرضياً خلوياً. تجمد المزارع التي بها تأثير مرضي خلوي. تذاب المزارع للتعرف الفيروسي.

تعريف المسبب Agent Identification

تنتمي فيروسات التهاب الدماغ الخيلي الشرقي والتهاب الدماغ الخيلي الغربي وإتش جيه تحت جنس فيروس ألفا من عائلة توجا، بينما فيروس التهاب المخ السحائي من جنس فلافي.

الصفات الكيميائية والفيزيائية Chemical and Physical Characteristics

هذه الفيروسات لها حمض نووي آر إن إيه محاط بغلاف دهني وهي حساسة للإيثير والكلولوفورم، ويتكون الكابسيد من ٣٢ كابسوميراً في نظام ثماني يضم مجين آر إن إيه مفرد الشريط.

تعريف الفيروس Virus Identification

يمكن التعرف على فيروسي التهاب الدماغ الخيلي الشرقي والتهاب الدماغ الخيلي الغربي في أمخاخ الفأر المصابة أو سوائل مزرعة الخلية أو السوائل السقائية القانقي والسلسي بواسطة اختبار تثبيت المتمم. يحضر معلق ١٠٪ من أمخاخ الفئران في محلول فيرونال، وتستخدم سوائل البيض أو مزارع الخلية غير مخففة أو تخفف ١ : ١٠ في محلول فيرونال. تطرد مركزياً عند ٩٠٠٠ إكس جي لمدة ٣٠ دقيقة وتختبر السوائل الرائقة ضد المصل فائق المناعة أو السائل الاستسقائي المحضر ضد فيروسات آربو المشتبهة باستخدام طريقة تثبيت المتمم القياسية (6). يتطلب اختبار تثبيت المتمم تحضين مخلوط الأنتيجين والمصل طوال الليل مع ٧ وحدات من المتمم. يمكن التعرف على فيروسات آربو في مزرعة الخلية بطريقة صباغة التألق المناعي غير المباشرة. يمكن أيضاً التعرف على فيروس الرومي بواسطة اختبار تعادل الفيروس أو اختبار منع تلازن الدم، والأمخاخ من الفئران المصابة بفيروس الالتهاب المخ السحائي تلزن كرات دم الأوز الحمراء (3). الطريقة الأقل شيوعاً للتعرف على فيروسات التهاب الدماغ الخيلي الغربي والتهاب الدماغ الخيلي الشرقي هي اختبار التعادل بتناقص البقع كما هو موضح في الفقرة التالية.

اُكتشف وجود الحمض النووي لفيروس التهاب الدماغ الخيلي الشرقي في البعوض والأنسجة باختبار تفاعل البلمرة المتسلسل (9). يستخلص الحمض آر إن إيه بواسطة الفينول وحمض جوانيديام أيزوثيوسيانات. تحضر البوادئ من تتابع مشفر لجين الكابسيد. يستخدم ٤٠ تكراراً لدورة تكبير ثلاثية الخطوة: ٩٤°م لمدة ١ دقيقة، و٥٦°م لمدة ١ دقيقة، و٧٢°م لمدة ١ دقيقة. الخطوة النهائية عند ٧٢°م لمدة ٥ دقائق تكمل امتداد البادئ. تتحلل منتجات التفاعل أو امتدادها القصري على ٢٪ – ٢,٦٪ آجاروز سبق صياغته مع ١ ميكروجرام/مل من بروميد الإيثيديوم. يكون البديل بواسطة التهجين مع مسبار نوعي.

الكشف المصلي في العائل Serologic Detection in the Host

يمكن أن يجرى التشخيص الافتراضي للإصابة بفيروس آربو باستخدام عينة مفردة من المصل من طائر ناقه من المرض أو طيور بها أعراض مرضية. يمكن أن يجرى التأكيد باختبار أمصال مزدوجة مجموعة على فترة أسبوعين. اتحاد اختباري تناقص البقع مع منع تلازن الدم أو اختبار تناقص البقع منفرداً هي طرق تستخدم أكثر شيوعاً لكشف الجسم المضاد لفيروسات التهاب الدماغ الخيلي الشرقي والتهاب الدماغ الخيلي الغربي وإتش جيه. يسمح اختبار تناقص البقع

بتفريق الأجسام المضادة المنتجة بواسطة فيروسات التهاب الدماغ الخيلي الشرقي والتهاب الدماغ الخيلي الغربي شديدة التقارب أنتيجينياً. التفريق بين الجسم المضاد لفيروس التهاب الدماغ الخيلي الغربي وإتش جيه صعب جداً بسبب تقارب العلاقة الأنتيجينية. يمكن أن يجرى التشخيص الافتراضي المبني على الجزء من البلد الذي نشأ منه الطائر. المعيار الأعلى لاختباري التعادل بتناقص البقع ومنع تلازن الدم لفيروس آربو النوعي أيضاً تعطي دلالة على نوع الفيروس. يمكن أن يستخدم اختبار منع تلازن الدم منفرداً للتعرف على الجسم المضاد لفيروس التهاب المخ السحائي للرومي، ونادراً ما يستخدم اختبار تثبيت المتمم لكشف الجسم المضاد لفيروس آربو في مصل الطيور.

اختبار التعادل بتناقص البقع PRN Test

يجرى في الخلايا الليفية لأجنة بيض البط أو خلايا فيرو. يمكن أن تختبر الأمصال عند تخفيفات نهائية ١ : ١٠ و١ : ١٠٠. يختبر المصل المستخدم في اختبار التعادل بتناقص البقع ضد ١٠٠ وحدة مكونة للبقع من الفيروس. يحضن خليط الفيروس والمصل عند ٣٧°م لمدة ساعة و١٥ دقيقة قبل الحقن في طبقة الخلايا الواحدة المندمجة في قوارير ٢٥ سم٢. يترك الطعم لمدة ساعة ويعقبه إضافة ٦ مل من وسط التغطية المتكون من محلولين منفردي التجهيز. يحتوي المحلول XC I محلول ملح إيرلي القاعدي بدون الفينول الأحمر، و٦,٦٪ مستخلص خميرة، و٤٪ مصل أجنة الأبقار، و٨٠٠ وحدة/مل بنسللين، و٤٠٠ ميكروجرام/مل ستربتوميسين، و٢٠٠ ميكروجرام/مل نيستاتين، و٦٪ من ٧,٥٪ محلول بيكربونات صوديوم، و٣,٣٪ من تخفيف ١ : ١٥٠٠ من الأحمر المتعادل (١ : ٨٠٠٠).يتكون محلول II من آجار نوبل ٢٪ سبق تعقيمه ويحفظ عند ٤٧°م. تخلط أحجام متساوية من محاليل I و II وتضبط درجة الحرارة عند ٤٧°م مجرد قبل الاستخدام. يحضن الاختبار لمدة ٤٨ — ٧٢ ساعة وتبنى نقط النهاية على ٩٠٪ تناقص في عدد البقع بالمقارنة مع قوارير الفيروس الضابط التي تحتوي على ١٠٠ بقعة.

اختبار منع تلازن الدم Hemagglutination-Inhibition Test

يستخدم مستخلص مخ الفأر بواسطة الأسيتون والسكروز كأنتيجين. يثبط الأنتيجين الإيجابي بالمعالجة بواسطة بيتا-بربيولاكتون عند تركيز نهائي ٠,١٪. في غياب المصل المرجعي الدولي يجب أن يعاير الأنتيجين لتحضير ٤ — ٨ وحدات ملزنة للدم لتستخدم في اختبار منع تلازن الدم. يحدد مستوى التلازن ودرجة الأس الهيدروجيني الأمثل لكل أنتيجين مع خلايا دم الأوز الحمراء المخففة في محاليل تتراوح درجة الأس الهيدروجيني لها من ٥,٨ — ٦,٦ على مسافة ٠,٢. تخفف الأمصال ١٠/١ في محلول ملح بورات وبي إتش ٩ وتثبط عند ٥٦°م لمدة ٣٠ دقيقة. تستخدم المعالجة بالكاولين للإزالة مثبطات المصل غير النوعية. يجب أن تمتز الأمصال مع حجم ٠,٠٥ مل من خلايا دم الأوز الحمراء المعبأة المغسولة لمدة ٢٠ دقيقة عند ٤°م لإزالة ملزنات المصل الطبيعية. يضاف المصل إلى طبق

المعايرة الدقيق المكون من ٩٦ حفرة مستديرة القاع في تخفيفات ثنائية في محلول ملح بورات، وبي إتش ٩ ويحتوي على ٠.٤٪ زلال مصل أبقار. تضاف أحجام متساوية من الأنتيجين إلى المصل المخفف وتحضن الأطباق عند ٤°م طول الليل. تؤخذ كرات الدم الحمراء من ذكر الأوز الأبيض الطبيعي وتغسل ثلاثة مرات في محلول دكستروز-جيلاتين-فيرونال ويخفف معلق ٧٪ بنسبة ١/٢٤ في محلول بي إتش مناسب فوراً قبل الإضافة إلى الأطباق. تغلق الأطباق بشريط شفاف وتحضن لمدة ٣٠ دقيقة عند ٣٧°م قبل قراءة النتائج. تضم الأمصال الضابطة السالبة والإيجابية إلى كل اختبار. يعتبر الاختبار صالحاً فقط إذا أعطت الأمصال الضابطة النتائج المتوقعة. المعايير من ١/١٠ و١/٢٠ تكون محل اشتباه، والمعايير ١/٤٠ فأكثر تعتبر موجبة.

التفريق من العوامل الممرضة المشابهة Differentiation from Closely Related Agents

الإصابات الفيروسية بفيروسات التهاب الدماغ الخيلي الشرقي والتهاب الدماغ الخيلي الغربي والتهاب المخ السحائي تحدث أعراضاً إكلينيكية في الدواجن تشبه جداً اضطرابات الجهاز العصبي المركزي التي تسببها عوامل أخرى مثل فيروس مرض نيوكاسيل وفيروس التهاب المخ الطيري والمطثية الوشيقية. تسبب جميع فيروسات آربو انخفاضاً في إنتاج البيض مشابهة لتلك المسببة بفيروس التهاب الأنف والقصبة الهوائية في الرومي. يمكن تفريق هذه العوامل بالعزل والتعرف على العامل المسبب أو بواسطة الاختبارات المصلية. يمكن أن يفرق اللقاح الحي المضعف لفيروس التهاب المخ السحائي من العترات الضارية بواسطة اختبار معامل الإمراضية في العضل والذي يجرى في صغار الرومي عند عمر يوم (3).

المراجع References

1. Ayers, J. R., T. L. Lester, and A. B. Angulo. An epizootic attributable to western equine encephalitis virus infection in emus in Texas. J. Am. Vet. Med. Assoc. 205:600-601. 1994.
2. Guy, J. S. Arbovirus infections. In: Diseases of poultry, 10th ed. B. W. Calnek, H. J. Barnes, C. W. Beard, L. R. McDougald, and Y. M. Saif, eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa. pp. 765-772. 1997.
3. Ianconescu, M. Turkey meningoencephalitis. In: A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens, 3rd ed. H. G. Purchase L. H. Arp, C. H. Dommermuth, and J. E. Pearson, eds. American Association of Avian Pathologists, Kennett Square, Pa. pp. 163-164. 1989.
4. Malkinson, M. Turkey meningo-encephalitis. In: Virus infection of birds. J. B. McFerran and M. S. McNulty, eds. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, The Netherlands, pp. 243-245. 1993.
5. Randolph, K. D., S. L. Vanhooser, and M. Hoffman. Western equine encephalitis virus in emus in Oklahoma. J. Vet. Diagn. Invest. 6:492-493. 1994.
6. United States Department of Health, Education, and Welfare. A guide to the performance of the standardized complement fixation method and adaptation to micro test. Centers for Disease Control, Atlanta, Ga. 1974.
7. United States Department of Health and Human Services. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C. 1993.
8. Veazey, R. S., C. C. Vice, D.-Y. Cho, T. N. Tully, Jr., and S. M. Shane. Pathology of eastern equine encephalitis in emus (Dromaius novaehollandiae). Vet. Pathol. 31:109-111. 1994.

9. Vodkin, M. H., G. L. McLaughlin, J. F. Day, R. E. Shope, and R. J. Novak. A rapid diagnostic assay for eastern equine encephalomyelitis viral-RNA. Am. J. Trop. Med. Hyg. 49(6):772-776. 1993.
10. Wages, D. P., M. D. Ficken, J. S. Guy, T. S. Cummings, and S. R. Jennings. Egg-production drop in turkeys associated with alphaviruses: eastern equine encephalitis virus and Highlands J virus. Avian Dis. 37:1163-1166. 1993.

obeikandl.com