

الفيروسات المعوية

ENTERIC VIRUSES

Donald L. Reynolds

Summary

تسبب الفيروسات المعوية أمراضاً في الأمعاء في الدواجن الصغيرة العمر. تشمل الأعراض السريرية المميزة الإسهال وفقدان الشهية وأكل الفرشة وانتفاش الريش. قد توجد آفات في الأمعاء وعادة تكون منتفخة وممتلئة بالسوائل والمحتويات الغازية. يحدث عادة التقزم أو ضمور الطيور كنتيجة للعدوى مما ينتج عنه قطعان غير متجانسة. العوامل الفيروسية المختلفة (أو اتحاد لهذه العوامل) يمكن أن يسبب الأمراض المعوية.

Rotavirus

فيروس روتا ليس له غلاف وله حامض نووي ريبيوزي مزدوج الشريط مع مجين مقسم. فيروسات روتا ثابتة جداً وتستطيع أن تظل في البيئة لفترة زمنية طويلة. يصيب الدواجن أربعة مجموعات من فيروسات روتا. يعتبر الفيروس الأكثر تكراراً هو فيروس روتا المجموعة D. توجد المجموعة A في الدواجن لكن عامة لا تكون ضارية مثل مجموعة D أيضاً.

Agent Identification

يمكن أن يجري تشخيص الإصابة بفيروس روتا بواسطة رؤية جزيئات فيروس روتا من الأمعاء أو زرق الطيور المصابة. توجد طريقتان عمليتان وأكثر شيوعاً للتفريق بين مجموعات الفيروس وهي المجهر الإلكتروني المناعي (IEM) وتصنيف المجين بواسطة الفصل الكهربائي genome electropherotyping.

Serologic Detection in the Host

طور عدد من التحاليل للكشف عن الأجسام المضادة في المصل لفيروس روتا تشمل الإليزا والترسيب في الآجار والمجهر الإلكتروني المناعي وتعادل المصل والفيروس. تعتمد هذه القياسات على الفيروس المنقى ليستخدم كأنتيجين أو في حالة تعادل الفيروس، يتم تكاثر فيروس روتا في نظام مزارع الخلية. العوامل المحددة التي تشجع استخدام القياسات المصلية لفيروس روتا هي عدم قابلية المجموعة D من فيروس روتا للتكاثر بكميات كبيرة بالوسائل خارج الجسم الحي.

Coronaviruses

هي فيروسات لها غلاف ولها حامض نووي ريبوزي مفرد الشريط وتسبب مرضاً معوياً أساساً في الرومي (مرض العرف الأزرق). الفيروس التاجي يمكنه أن يصيب الرومي في أي عمر وينشأ عنه إسهال شديد وجفاف وضمور. يمكن أن تسبب الفيروسات التاجية زيادة في نفوق القطيع (أكثر من ٥٠٪) وهو الأمر المميز وغير الملحوظ عامة مع الفيروسات المعوية الأخرى.

Agent Identification

يجرى التشخيص بدقة بعزل الفيروس في أجنة البيض ويعقبه خاصية التلازن الدموي والفحص المجهر الإلكتروني للفيروس المنقى. بدلاً من ذلك، يمكن استخدام التحاليل القائمة على المناعة مثل المجهر الإلكتروني المناعي لتجهيزات الفيروس المنقى أو اختبار الأجسام المضادة المتألقة في أمعاء الأجنة المصابة.

Serologic Detection in the Host

يمكن استخدام اختبار التآلق المناعي غير المباشر لكشف الإصابات في قطعان الرومي.

Stunting Syndrome Agent (SSA)

تم التعرف عليه حديثاً ولم يصنف تقسيمياً وهو عامل فيروسي غشائي يسبب الإسهال والتقرم في الرومي.

Agent Identification

يمكن أن يعزل عامل متلازمة التقرم بالإكثار في أجنة الرومي. يمكن تفريق الفيروس النقي عندئذ من الفيروسات الغشائية الأخرى اعتماداً على خاصية التلازن الدموي.

Serologic Detection in the Host

حالياً لا يستعمل تحليل مصلي لعامل متلازمة التقزم.

Astroviruses

تسبب مرضاً معوياً خفيفاً في الرومي وغير مصاحبة بزيادة في النفق. توجد هذه الفيروسات أكثر شيوعاً متحدة مع الفيروسات الأخرى خاصة مجموعة D من فيروسات روتا.

Agent Identification

حالياً المجهر الإلكتروني المناعي هو أكثر طريقة تناسب تشخيص إصابات الفيروس النجمي.

Serologic Detection in the Host

لا يوجد حالياً تحليل مصلي يستخدم لكشف إصابة الفيروس النجمي في الدواجن.

Enteroviruses

تسبب مرضاً معوياً في الرومي والدجاج. تشبه فيروسات روتا والفيروسات النجمية، ولا ترتبط مع زيادة النفق، ولوحظت بالاشتراك مع الفيروسات المعوية الأخرى.

Agent Identification

يمكن أن تعزل في أجنة البيض. المجهر الإلكتروني المناعي ذو فائدة في تشخيص إصابات الفيروس المعوي.

Serologic Detection in the Host

لا يوجد حالياً فحص مصلي يستعمل لاكتشاف إصابات الفيروس المعوي في الدواجن.

Introduction

تسبب الأمراض المعوية التي تحدث في الطيور صغيرة العمر (أقل من ستة أسابيع) مشاكل لمنتجي الدواجن. يتشارك عدد من الفيروسات مع الأمراض المعوية للطيور الصغيرة (15, 17). بعض من هذه الفيروسات تكون ممرضات معوية؛ إلا أن الدور الذي تلعبه هذه الفيروسات في المرض المعوي لم يتحدد بعد. على سبيل المثال: في

الرومي يعرف مرض شائع على أنه مرض العرف الأزرق ويتسبب بواسطة الفيروس التاجي ، إلا أن حالات شبيهة في الرومي تعرف بالالتهاب المعوي في الرومي الصغير أو الالتهاب المعوي الفيروسي في الرومي ارتبطت مع الإصابة بفيروس روتا والفيروس المعوي والفيروس النجمي. حالات شبيهة في الدجاج أرجعت عموماً لمتلازمة ضعف الامتصاص malabsorption ومتلازمة التقزم وأسماء عديدة أخرى اشتركت مع عوامل فيروسية متعددة تشمل فيروس الريو والفيروسات المعوية. تحدث أيضاً متلازمة التقزم في صيصان الرومي وحديثاً تم التعرف على العامل المسبب لهذا المرض (1). منذ نشر الطبعة الثالثة من هذا الكتاب ، أُرجم المرض غير المحدد السبب الحادث في صيصان الرومي عادة على أنه متلازمة النفوق الشوكي spiking mortality أو متلازمة الالتهاب المعوي والنفوق في الرومي pout enteritis mortality syndrome (PEMS) (10).

Clinical Disease

يختلف المرض الإكلينيكي بالنظر إلى حدة الأعراض السريرية اعتماداً على العامل أو العوامل المسببة ونوع الطائر المصاب ، إلا أنه هناك عدد من الخصائص تكون شائعة بين كل إصابات الفيروس المعوي. يحدث المرض الإكلينيكي أكثر شيوعاً خلال الأسبوع الثاني أو الثالث من الحياة وينتهي خلال ١٠ - ١٤ يوماً. ومن ثم تتعافى معظم الطيور المصابة بمرض الفيروس المعوي من الأعراض بمرور ستة أسابيع من العمر. يلاحظ كثيراً استثناء الالتهاب المعوي نتيجة للفيروس التاجي في الرومي وفيه يكون الرومي الكبير أيضاً قابلاً للإصابة. تشمل الأعراض السريرية المميزة الإسهال (الزرق المائي) والخمول وأكل الفرشة والارتخاء والأنواع المختلفة للالتهابات المعوية. يمتلئ الجهاز المعوي عادة بالمحتويات المائية والغازات وفي بعض الحالات غذاء مهضوم جزئياً. ينتفخ الأورع عادة ويمتلئ بالغازات والمحتويات الرغوية. يتباين النفوق ويعتمد على العامل أو العوامل المسببة ونوع الطائر المصاب. قد يتراوح النفوق من خفيف فقط إلى زيادة متوسطة ، إلا أنه مع الإصابات بالفيروس التاجي في الرومي وحالات PEMS ، سجلت خسائر حتى ٥٠٪ أو أكثر (7, 10, 14). تمثل الإصابة كنتيجة لتناقص النمو (التقزم) المشكلة الرئيسية. نمطياً يصبح ٥٪ - ٢٠٪ من القطيع الذي حدث به مرض فيروسي معوي متقزم ويظل هكذا طول أو على مدى فترة النمو.

Sample Collection

تجمع العينات المعوية من الطيور التي بها مرض إكلينيكي (إسهال... إلخ) وتكون ذات فائدة كبيرة لعزل وتعريف معظم الفيروسات المعوية. يجب أن يؤخذ الجهاز المعوي من الطيور في حالته الكاملة بداية من النقطة حيث يلتقي الاثنا عشر مع المعدة الغدية ويستمر حتى منطقة المجمع أو الجزء من الجهاز المعوي المتبقي بعد منطقة المعدة

الغدية. تكفي الأجهزة المعوية لعدد ٥ - ١٠ طيور للعزل وتوضع في إناء معقم أو خالٍ من الملوثات الفيروسية. تقطع الأمعاء إلى قطع صغيرة من ٢ - ٥ سم طول عند وضعها في الأواني المعقمة وهذا يساعد أو يسمح بالحصول على محتويات الأمعاء بشكل أسهل. يمكن أن تخزن العينات أو ترسل بواسطة التجميد عند -٢٠ م. عند التخزين لوقت طويل تقسم العينات إلى أقسام صغيرة وتحفظ عند -٧٠ م. يجب تجنب التجميد والإذابة المتكررة للعينات لأن هذا قد يحدث موت بعض الفيروسات. تعتبر المحتويات المعوية مصدراً مهماً للمصابة بالفيروس. على الرغم أن ربط الجهاز المعوي ليس ضرورياً لكنه يجب منع محاولات تفريغ المحتويات المعوية. الأجهزة المعوية المثبتة في الفورمالين أو المثبتات الأخرى قد تكون محدودة القيمة لأن التثبيت عادة يؤدي إلى قتل الفيروسات.

عامة، الفيروسات غير المغلفة مثل فيروسات روتا وريو والنجمية والفيروسات المعوية تكون مقاومة جداً والتجميد له تأثير ضئيل عند حفظها، إلا أن الفيروسات الغشائية مثل فيروسات كورونا عامل متلازمة التقرم قد يفقد إمراضيته عند التخزين طويل الأمد. يتطلب تجهيز العينات المعوية لعزل وتعريف الفيروس الخطوات التالية:

(١) تجميد وإذابة العينات على الأقل ثلاثة مرات. هذا يساعد في تمزيق الخلايا المعوية التي تحمل الفيروس ويحطم الأنسجة للتداول الأسهل للعينات. تلغى هذه الخطوة عند محاولة عزل الفيروسات الغشائية أو المغلفة للسبب السابق ذكره.

(٢) تخفف العينات بمحلول منظم ملح الفوسفات بي إتش ٧.٤. يمكن استعمال مخففات أخرى إلا أن محلول الملح الفوسفاتي أكثر شيوعاً واقتصادياً. تعتمد كمية المخفف على العينة. في حالة العينات المفككة المائية أو عينات الإسهال تحتاج إلى تخفيف أقل من العينات المكونة من مواد الزرق الصلبة. نمطياً التخفيف من نسبة ١ : ١ حتى ١ : ٥ (العينة: المخفف) يكون كافياً.

(٣) تجانس العينة بعدد من الطرق. الأكثر شيوعاً من خلال وضع الأكياس التي تحتوي على العينات والمخفف في جهاز الطحن النسيجي stomacher لمدة ثلاث دقائق. باستخدام هذه الطريقة تظل العينة في وعائها الأساسي ومن ثم تقل خطورة تلوث المعمل والأشخاص. يمكن بهذه الطريقة تجهيز عدد من العينات بسرعة بدون ضرورة لمعدات التنظيف. الطريقة السهلة الاقتصادية البديلة هي استخدام أسطوانة أو بكرة لصق ورق الحائط للضغط على العينة داخل كيسها الأساسي فوق سطح مائدة. الطرق الأخرى لمجانسة الأنسجة مثل استعمال طاحن الأنسجة أو خلاط كهربائي.

(٤) يمكن أن تعرض للموجات الصوتية في حمام ثلجي لمدة تتراوح من ١ - ٢ دقيقة. ويجب أن يتم ذلك لمدة ٣٠ ثانية ثم يتبعها ٣٠ ثانية بدون موجات صوتية أو على فترة ٣٠ ثانية لتبديد الحرارة الناتجة من الموجات الصوتية. يساهم التعرض للموجات الصوتية في تحرير الفيروسات من الأنسجة والمواد العضوية وأيضاً يساعد انتشار تجمعات الفيروس. يجب الحرص عند استخدامه لأن ذلك قد يؤثر على الفيروسات الغشائية أو المغلفة

ويجب أن تلغى هذه الخطوة عند توقع عزل الفيروسات المغلفة. بالإضافة إلى ذلك تفصل الموجات الصوتية النسيج من البكتيريا التي تكون موجودة في العينة، وقد يمثل مشاكل محتلمة ومن ثم يمكن اختبار إلغاء عملية التعريض للموجات الصوتية أو إجراؤها بعد إزالة البكتيريا من العينة.

(٥) ترسب العينة بالتردد المركزي بين ٤٠٠ - ٥٠٠ إكس جي لمدة ٣٠ دقيقة. يحفظ الرائق ويستعمل لتجهيزات أكثر. لا يجب التخلص من الراسب لأنه قد يحتوي أو يحتفظ بكميات من الفيروس يمكن تقديرها.

(٦) يرشح الرائق خلال مرشح ٠.٤ μm . عادة ترشيش الرائق خلال مرشحات كبيرة (مثل ١.٢ μm أو ٠.٦٥ μm) ينصح به قبل محاولة الترشيح خلال مرشح ٠.٤ μm . تفيد المحاقن الإيجابية الضغط ذات المرشح في هذه الطريقة. إذا كانت العينة صعبة الترشيح، يمكن أن تكرر خطوة التصفية (انظر خطوة ٥ سابقاً) بزيادة قوة الطرد المركزي حتى ٥٠٠٠ إكس جي. يمكن أن يجمد الراشح المجهز بالموجات الصوتية ويخزن. قد يكون التجميد والإذابة المتكررين لهما تأثيرات غير مرغوبة على بعض الفيروسات، ومن ثم ينصح بتقسيم العينات المجهزة إلى أقسام صغيرة قبل تجميدها. إن جمع أنسجة إضافية أو استعمال طرق أخرى قد يكون ذا فائدة عظيمة اعتماداً على العامل النوعي المعتقد في وجوده.

Preferred Culture Media and Substrates

Coronaviruses

يمكن تنمية الفيروس التاجي المعوي الخاص بالرومي في أجنة بيض الدجاج أو الرومي التي عمرها أكبر من ١٥ يوماً. يجب أن يحضر الطعام من محتويات الأمعاء و/أو نسيج البيرسا فايريبي من صغار الرومي المشتبه فيها. يحضر الطعام من نسيج بيرسا بمجانسة النسيج أولاً ثم الطحن في طاحن الأنسجة. يخفف الخليط المتجانس بمحلول ملح الفوسفات المعقم حتى الحجم المطلوب. التنقية بسرعة قليلة لإعداد البيرسا بالطرد المركزي لمدة ٣٠ دقيقة عند ٥٠٠ إكس جي يعقبها الترشيح للرائق خلال مرشح ٠.٤ μm ثم تضاف المضادات الحيوية (مثل البنسلين وستربتومايسين كما في الفصل الثالث والأربعون عن تنمية الفيروسات في أجنة البيض) إلى الطعام قبل الحقن. تستعمل الطريقة التالية لعزل الفيروسات التاجية في أجنة الرومي عند عمر ٢٣ - ٢٤ يوماً:

(١) ينشط الترسين الطعام. أضف ١٠ ميكروجرام/مل من ترسين النوع XIII (شركة سيجما) إلى الطعام وحضن عند ٣٧ م لمدة ساعة على الأقل.

(٢) جهز البيض بالتطهير عند الغرفة الهوائية باستخدام الكحول أو اليود (انظر الفصل الثالث والأربعون).

(٣) اقطع ثقب قطره ٠.٧٥ بوصة (٢ سم) في طرف غرفة الهواء للبيضة.

- (٤) ضع ٢ - ٣ نقطة (٠.٥ مل) لكل بيضة من ١٥٪ محلول كحول إيثيلي (في ماء معقم) على غلاف القشرة - الغشاء الكورويوالانتويس. هذا يسمح برؤية الجنين خلال الغشاء.
- (٥) باستخدام إبرة مقاس ٢٦ ، اغرس الإبرة خلال غشاء القشرة والغشاء الكورويوالانتويس بحرص لتجنب الأوعية الدموية وجسم الأجنة (مثل العين... إلخ). اغرس الإبرة بعيداً بدرجة كافية للتأكد أنها خلال الأغشية واحقن ٠.١ - ٠.٢ مل من الطعم تحت الأغشية.
- (٦) أزل الإبرة وغطّ الثقب بالبارفين أو شريط سوليفان. أعد أو أرجع الأجنة المحقونة إلى مفقس البيض باستعمال الحرارة والرطوبة المثالية للتفقيس.
- يمكن إعادة عزل الفيروس التاجي ٣ - ٥ أيام عقب الحقن من أمعاء الجنين والمخ ونسيج بيرسا فابريسي عند الجمع. يمكن أن تجهز هذه المواد بكمية إضافية لتمرير إضافي وتحفظ عند -٧٠ م° أو تفحص لوجود الفيروس.
- تنمو فيروسات الرومي التاجية في خط خلايا سرطان المستقيم في الإنسان ويرمز له HRT-18 (5). إن التنشيط بالترسين ودمج الترسين إلى بيئة الحفظ maintenance media يكون مطلوباً لنمو الفيروس. يمكن أن يحضر الطعم الفيروسي كما سبق وصفه لحقن أجنة البيض. قد يتطلب عدة تمريرات للفيروس التاجي للرومي قبل ظهور التأثير المرضي الخلوي والذي سجل أنه يحدث من ١٤ - ٧٢ ساعة عقب الحقن. لمعرفة الوصف التفصيلي للتأثير المرضي الخلوي الذي يحدث بواسطة الفيروس التاجي للرومي في خلايا HRT-18 انظر Dea et al. (3). إضافة إلى ذلك لا تتأقلم معزولات الفيروس التاجي لخلايا HRT-18 ومن ثم قد تكون هذه الطريقة ذات استخدام محدود اعتماداً على المعزولة محل السؤال.

Stunting Syndrome Agent

يمكن تنقية هذا المسبب في أجنة الرومي بنفس الطريقة مثل الفيروس التاجي الموصوف أعلاه. تستعمل عينات محتويات الأمعاء. التنشيط بالترسين النوع IX (شركة سيجما) باستعمال أي من ١٠ أو ٢٠ ميكروجرام/مل يكون ضرورياً. عامل متلازمة التقزم يحدث آفات نخرية في أمعاء الأجنة من ٣ - ٥ أيام عقب الحقن. مثالياً يكون الجهاز المعوي متمدداً وممتلئاً بالسوائل. يمكن جمع عامل متلازمة التقزم من السوائل المعوية.

Rotaviruses

تنمو فيروسات روتا الطيور مجموعة A (انظر أسفل لتقسيم المجموعة) في مزارع خلايا كلى الدجاج والرومي وكبد أجنة الدجاج الأولية ، إلا أن خط الخلايا المستمر المشتق من أجنة كلى قرودة ريسوس والتي يرمز لها MA104 cell line هو أوسع طريقة شائعة وواسعة الاستخدام لعزل وتنمية هذه الفيروسات.

الأنابيب الأسطوانية شائعة الاستخدام للتنمية الأولية لمعزولات فيروس روتا على الرغم من أنه عند تنمية كمية كبيرة من الفيروس يمكن استخدام زجاجات أسطوانية بسهولة. يمكن أيضاً للمزارع الثابتة لخلايا MA104 أن

تساند نمو فيروس روتا الطيور والدوران المستمر للمزارع (مع الأنايب أو الزجاجات الأسطوانية) يساهم في عزل ونمو فيروس روتا.

تنشيط فيروسات روتا بالترسين يكون ضرورياً للنمو في مزرعة الخلية وأيضاً في دمج الترسين إلى بيئة الحفظ ويستعمل ترسين النوع IX كثيراً في التنشيط. ليس لكل أنواع ترسين IX نفس النشاط. تتأثر كمية الترسين بعوامل مثل العمر والألواط الصناعية المختلفة. من ثم يحتاج الأمر إلى معايرة كمية الترسين في بيئة الحفظ قبل حقن الفيروس. يجرى هذا بخلط التركيزات المختلفة من الترسين (عادة ٠.٥ ، ١ ، ١.٥ ، ... ، ٤ مجم/مل) إلى بيئة الحفظ واستخدام هذه البيئة في أنابيب أسطوانية تحتوي على خلايا الطبقة الواحدة MA104 المندجة غير المحقونة بالفيروس. عادة خلال ساعات تسبب التركيزات المرتفعة من الترسين انفصال الطبقة الواحدة من زجاج الأنبوبة الأسطوانية. التركيز المثالي من الترسين في الاستخدام في بيئة الحفظ هو التركيز الذي يترك على الأقل ٥٠٪ من الطبقة الواحدة ملتصقاً إلى الزجاج بعد ٢٤ ساعة.

لا يتم تنمية أو عزل فيروسات روتا الأخرى غير فيروسات روتا مجموعة A روتينياً على مزارع الخلية. إن العزل والنمو لهذه الفيروسات محدد بالعدوى عن طريق الفم في طيور معروف خلوها من الممرضات المعوية الأخرى (يجذب الطيور الخالية من المسببات المرضية) مع تجهيز هذه العوامل. يمكن إعادة عزل الفيروس من الجهاز المعوي لهذه الطيور من ٣ - ٦ أيام عقب الحقن.

يمكن استعمال الطريقة الآتية لعزل وتنمية فيروسات روتا مجموعة A في مزرعة الخلية:

- (١) تزرع خلايا MA104 في أنابيب ذات غطاء حلزوني وتنمى حتى الاندماج باستخدام بيئة إيجل Eagle's minimum essential medium (EMEM) أو بيئة دليبيكو Dulbecco modified Eagle's medium (DMEM) والمزودة بتركيز ١٠٪ من مصّل أجنة الأبقار ومضادات حيوية (٥٠ وحدة دولية/مل من البنسلين و٠.١٢٥ ميكروجرام/مل من أمفوتريسين B). إذا كانت الأنايب حلزونية الغطاء محكمة الغلق فإنها لا تحتاج إلى تحضينها تحت ظروف مزودة بثاني أكسيد الكربون. تحضن كل المزارع عند ٣٧ م.
- (٢) يجب أن تغسل خلايا الطبقة الواحدة ببيئة خالية من المصل (أو محاليل ملح متزنة أخرى) ثلاث مرات لإزالة أي بقايا لمصل أجنة العجول الذي قد يشبط الفيروس أو يمنع نشاط الترسين المضاف.
- (٣) يجهز الطعام المحتوي على الفيروس من الراشح المعرض للموجات كما وصف سابقاً. يجب أن ينشط الطعام بالترسين أولاً قبل حقنه في الخلايا وحيدة الطبقة ويكون هذا بإضافة الترسين النوع IX إلى تركيز نهائي من ١٠ - ٢٠ مجم/مل من الطعام. قد تحتوي بعض العينات مواداً سامة للخلايا وفي هذه الحالة تخفف العينات ١:٢٥ أو ١:٥٠ بالبيئة الخالية من المصل وبعد ذلك يضاف الترسين.

- (٤) يوضع الطعم المجهز سابقاً إلى الخلايا وحيدة الطبقة. يستخدم للأنايب حلزونية الغطاء ٠.٢ مل من الطعم لكل أنبوبة. يمكن أن تدور الأنايب باليد مرة كل ١٠ - ١٥ دقيقة أو توضع مباشرة إلى جهاز أسطوانة دائرية وتدور أو تهز بطريقة دائرية. فترة الحقن تكون ساعة.
- (٥) عقب الحقن، تغسل الخلايا بالبيئة الخالية من المصل لإزالة أي بقايا للطعم. تضاف بيئة الحفظ المتكونة من EMEM أو DMEM خالية من المصل وتحتوي على المضادات الحيوية مع ١ - ٢ ميكروجرام/مل من ترابين نوع IX لكل أنبوبة.
- (٦) تحضن الأنايب لمدة ٤٨ - ٧٢ ساعة قبل الحصد. يشاهد التأثير المرضي الخلوي نمطياً خلال ٢٤ ساعة من الحقن، إلا أن التمرير الأعمى المتعدد للمعزولات الأولية قد يكون مطلوباً قبل ملاحظة التأثير المرضي الخلوي، وللوصف الكامل للتأثير المرضي الخلوي لفيروس روتا في خلايا MA104 انظر Theil *et al.* (20).
- (٧) يجمع الفيروس بين ٤٨ و ٧٢ ساعة عقب الحقن. تجمد الأنايب المحتوية على الخلايا عند -٢٠ م أو أقل وتذاب وتعرض للموجات الصوتية وتنقى بالطرد المركزي عند سرعة منخفضة. الفيروس الموجود في الرائق يمكن أن يستعمل لتمرير إضافي ثم التنقية وهكذا.

Reoviruses

يمكن أن تنمى بطرق مزرعة الخلية. لمعلومات إضافية ارجع إلى الفصل الثامن والثلاثون عن التهاب المفاصل الفيروسي وفيروسات ريو الأخرى.

Small Enteric Viruses

يمكن أن تنمى الجزيئات شبيهة الفيروس المعوي Enteroviruslike particle جسيمات من الدجاج تسلسلياً بالحقن في الغشاء الكوريوالانتويس السقائي في أجنة البيض. يمكن أن تنمى الجزيئات شبيهة الفيروس المعوي من الرومي بالحقن في أجنة بيض الرومي عند عمر ١٨ يوماً بطريق كيس المح ويجمع الجهاز المعوي ستة أيام عقب الحقن (9). يمكن أن يجهز الطعم من محتويات الأمعاء كما وصف بأعلى (انظر جمع العينات). طرق حقن الغشاء الكوريوالانتويس وكيس المح تم وصفها في الفصل الثالث والأربعون.

الفيروسات المعوية الأخرى الصغيرة مثل الفيروسات النجمية وفيروسات بارفو وفيروسات بيكوآر إن إيه الكاذبة pseudopicornaviruses والأخرى لا تنمو روتينياً في مزرعة الخلية أو أجنة البيض. عادة يجري عزل وتنمية هذه العوامل بالعدوى عن طريق الفم في الطيور القابلة للإصابة ويعاد عزل الفيروس من أجهزتها المعوية.

Agent Identification

استعملت عدد من التقنيات لتعريف الفيروسات المعوية. عرف العديد منها أولاً بالرؤية المباشرة للفيروس باستعمال المجهر الإلكتروني. وقد يكون تطبيق هذه الطريقة هو التقنية المفضلة أو قد تكون الوحيدة المتاحة لتعريف وكشف عديد من الفيروسات المعوية. ينصح أو يشار بالمجهر الإلكتروني المناعي (IEM) لتعريف العديد من الفيروسات المعوية خاصة هذه التي يعرف القليل عن خصائصها الفيزيائية الكيميائية. التكلفة والإتاحة وغيرها ربما تحد من استعمال المجهر الإلكتروني في التشخيص الروتيني للفيروسات المعوية. تقنيات أخرى مثل التألق المناعي والتصنيف بالفصل الكهربائي للمجعين الفيروسي والإليزا والتلازن الدموي يستخدم لكشف بعض الفيروسات المعوية. أكثر الطرق المستخدمة شيوعاً للكشف ودراسة الخصائص الفيزيوكيميائية الرئيسية للفيروسات المعوية توصف أسفل.

Coronaviruses

الفيروس التاجي المعوي في الرومي (عامل العرف الأزرق) هو فيروس آر إن إيه مفرد الشريط يتراوح حجمه من ٥٠ - ١٥٠ نانوميكروناً، وله غشاء حساس لمذيبات الدهون وهي بروتينات سطحية مثل التاج مميزة للفيروسات التاجية. قد يساهم هذا الغشاء أيضاً في الشكل المتعدد للفيروس. يقاوم الفيروس الحرارة عند ٥٠ م في غياب أيونات كلوريد الماغنسيوم الثنائية لكن حساس للحرارة في وجودها. الفيروس ثابتاً عند بي إتش ٣ تدل التقارير عن التباين في العترة لمزولات الفيروس التاجي المعوي في الرومي أنها تكون متشابهة أو تكون قريبة الصلة جداً (5, 14)، إلا أن التقارير الحديثة تقترح أن بعض هذه الفيروسات في الرومي قد يكون لها علاقة أنتيجينية لفيروس الالتهاب الشعبي الطيري (11).

Hemagglutination Test

تستطيع هذه الفيروسات أن تلزن خلايا الدم الحمراء لخنازير غينيا والأرانب. تستعمل هذه الخاصية لكشف ومعايرة الفيروسات التاجية للرومي التي يتم عزلها وتنميتها في أي من أجنة البيض أو مزرعة الخلية. يستعمل معلق ٠.٥٪ من خلايا الدم الحمراء وتخلط مع حجم متساوٍ من الأنتيجين. يجب أن يجرى الاختبار عند درجة حرارة الغرفة لمدة ساعة. يجب أن يجرى تركيز وتنقية الأنتيجين (الفيروس) قبل الاختبار. للوصف التوضيحي لطريقة تركيز وتنقية الأنتيجين انظر *Dea et al.* (4).

Fluorescent Antibody Test

اختبار التآلق المناعي ذو فائدة في كشف الفيروسات التاجية من الجهاز المعوي للأجنة المصابة أو صغار الرومي. تؤخذ قطاعات من الجهاز المعوي عند الفحص التشريحي وتجمد سريعاً وتخزن عند -٢٠ م أو أقل حتى تجهز للاختبار بواسطة التقطيع في الحالة المتجمدة cryostat sectioning. يستطيع هذا الاختبار المباشر أن يكشف الأنتيجين للفيروس التاجي خلال ٢٤ ساعة عقب العدوى. يلاحظ في صغار الرومي الكشف الأنتيجيني متأخراً حتى ٢٨ يوماً عقب العدوى.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

استخدم اختبار الإليزا بالجسم المضاد بنجاح لكشف الفيروسات التاجية من محتويات أمعاء صغار الرومي. انظر Dea and Tijssen للمعلومات الإضافية حول هذه الطريقة (5).

Stunting Syndrome Agent

هو فيروس مغلف غير مصنف نصف قطره من ٦٠ - ١١٠ نانوميكرونات. هو متعدد الأشكال وله بروزات سطحية ونيوكليوكاسيد على شكل القرص المنحني أو شكل الكلية ويستطيع أن يلزن خلايا الدم الحمراء للفأر عند ٤ م ودرجة الغرفة لكن ليس عند ٣٧ م. هذه هي الصفات التي تفرق بين عامل متلازمة التقزم والفيروس التاجي في الرومي الذي يلزن خلايا الدم الحمراء لخنزير غينيا والأرنب.

Rotaviruses

هي فيروسات آر إن إيه مزدوجة الشريط تتراوح في الحجم من ٦٠ - ٧٥ نانوميكروناً وقد تلاحظ كجزيئات مزدوجة الغلاف تتراوح في الحجم التقريبي من ٧٠ - ٧٥ نانوميكروناً أو كجزيئات مفردة الغلاف تتراوح في الحجم التقريبي من ٦٠ إلى ٦٥ نانوميكروناً. لها شكل مميز والذي يساهم في التعرف عليها. لمعلومات أكثر انظر Devitt and Reynolds (6) أو McNulty (12) أو Theil *et al.* (20). كثافة الطفو لفيروسات روتا في كلوريد السيزيوم تكون تقريباً ١.٣٦ جم/سم^٣ للجزيئات مزدوجة الغطاء و ١.٣٨ جم/سم^٣ للجزيئات مفردة الغطاء. يمكن استخدام عدد من الاختبارات للتعرف على فيروسات روتا. الأكثر شيوعاً في التقنيات المستعملة هو التآلق المناعي والمجهر الإلكتروني المناعي، لكن يستعمل التصنيف بالفصل الكهربائي أيضاً بواسطة بعض المختبرات. بالإضافة إلى الاختبارات التي تستطيع كشف فيروسات روتا المتوفرة تجارياً. أمثلة لبعض هذه الاختبارات التي تشمل اختبار تلازن اللاتكس latex agglutination والإليزا. كما كتب سابقاً توجه أطقم التشخيص المتاحة تجارياً إلى

كشفت فيروسات روتا الثدييات المجموعة A وهي ذات فائدة محدودة لأنها لا تستطيع كشف مجموعة D أو فيروسات روتا الطيور الأخرى. لمعلومات إضافية على كيفية إجراء تقنيات التألق المناعي المباشر انظر Gardner (8).

تقسيم هذه الفيروسات تبعاً للمجموعة اعتماداً على التحليل المصلي (انظر أسفل في المجهر الإلكتروني المناعي) والتصنيف بالفصل الكهربائي للمجسين (انظر الفصل الكهربائي الهلامي في الأكريلاميد لفيروسات روتا الطيور آر إن إيه بأسفل). حتى الآن تم التعرف على أربع مجموعات من فيروسات روتا الطيور التي تصيب أنواع الطيور. المجموعة التي تعزل أكثر شيوعاً من الرومي هي مجموعة D وتدعى شبيهة فيروس روتا و/أو نظير فيروس روتا. المجموعة الأخرى التي تعزل بصورة متكررة من الطيور هي مجموعة A.

Immune Electron Microscopy (IEM)

تستخدم الطرق التالية لكشف فيروسات روتا.

- (١) تحضير مضادات الأمصال: يمكن أن تستخدم مضادات أمصال من طيور ناقهة من الإصابة (يفضل أن تكون طيوراً خالية من الممرضات النوعية) أو مضادات أمصال فاتقة المناعة من حيوانات محقونة. قبل استخدامها تثبت الأمصال حرارياً عند ٥٦ م لمدة ٣٠ دقيقة وتخضع للطرز المركزي فائق السرعة عند ٤٥٠٠٠ إكس جي لمدة ٤٥ دقيقة، وتعقم بالترشيح وتوزع في عبوات صغيرة ويمكن أن تحفظ عند ٤ م. يجري تحديد لأمثل محلول للاختبار بواسطة الأمصال المخففة تسلسلياً في محلول فوسفات معقم وعمل باقي طريقة المجهر الإلكتروني المناعي. نمطياً تتراوح محاليل العمل من الأمصال من الطيور الناقهة من ٥٠:١ إلى ٢٠٠:١ (مصل: محلول فوسفات). عادة تكون الأمصال فاتقة المناعة أعلى تحفيماً.
- (٢) تجهيز العينة: عند فحص العينات المعوية، الأجهزة المعوية يمكن أن تجهز كما وصف سابقاً (انظر جمع العينات). يستخدم الراشح الناتج من المعاملة بالموجات الصوتية لباقي الطريقة في حالة استخدام مزرعة الخلية يستعمل الرائق المجموع من الخلايا المصابة.
- (٣) تحضير العينة ومضادات المصل: أفضل حجم كلي من العينة مع مضاد المصل المجهز هو ٠.٥ - ١ مل. نسب العينة إلى مضادات المصل عامة بين ١:٢ و ١:٤ (مثال ٠.٥ مل عينة + ٠.٢ مل مضاد المصل). يمكن أن يختلف التحضين أيضاً اعتماداً على العينة ومضاد المصل المستخدم. لأقصى تأثير يحضن الخليط عند ٤ م طوال الليل على الرغم أن التحضين لمدة ساعة عند درجة الغرفة عادة يكون كافياً.
- (٤) يعبأ مركب الفيروس والجسم المضاد بالطرز المركزي فائق السرعة عند ٥٥٠٠٠ إكس جي لمدة ٤٥ دقيقة في حالة ما إذا كانت العينة من العينات المعوية (أو مواد مشابهة)، وقد تحتوي على رواسب غير مرغوبة وقد تتداخل مع التجهيز النهائي عند الفحص بالمجهر الإلكتروني. لإزالة مثل هذه الرواسب يمكن إجراء التعبئة في

طبقة من ٤٠٪ - ٦٠٪ من السكروز. تعمل طبقة السكروز كحاجز لإمساك الرواسب قليلة الكثافة. لا تستخدم طبقة السكروز إذا كانت العينة نقية نسبياً (مثل الفيروس النامي على مزرعة الخلية) لأن بعض الرواسب تساعد في نشر العينة المصبوغة على الشبكة (انظر أسفل). إضافة إلى ذلك قد يعمل السكروز لحجز الفيروسات مع الكثافات المنخفضة (مثل بعض الفيروسات الغشائية) في حالة ترسيب مركب العينة ومضاد المصل على طبقة من السكروز، ويجب أن يغسل السكروز من العينة بواسطة استبعاد الرائق (المحتوي على السكروز) ويعاد تعليق المركب المعبأ في محلول ملح الفوسفات وتعبأ كما سبق.

(٥) إعادة تعليق تجهيزات العينة: عقب الطرد المركزي الفائق، يستبعد الرائق ويمكن أن يعاد تعليق المركب المعبأ في ماء معقم عالي النوعية أو محلول تريس (بي إتش ٧.٢). لاحظ أن أنابيب الطرد المركزي الفائق يجب أن تحدد قبل الطرد لتحديد مكان الراسب المعبأ لأن الراسب المرئي نادراً ما يكون معروفاً. يجب أن يعاد تعليق الراسب في قطرة (بواسطة ماصة باستير) من المخفف المختار.

(٦) صبغة العينة المجهزة بالصبغة السالبة: تضاف إلى القطرة المحتوية الراسب المعبأ المعلق قطرة من صبغة حمض فوسفوتنجستيك ٣٪ (PTA) بحيث يكون تركيز العينة النهائي ١.٥٪ تقريباً. تحضر صبغة حمض فوسفوتنجستيك بإضافة ٣ جم من الحمض إلى الماء عالي الدرجة وتضبط درجة الأس الهيدروجيني إلى ٧.٢ - ٧.٤ باستخدام محلول ١ عياري من هيدروكسيد البوتاسيوم. يمكن أن يرشح المحلول النهائي في مرشح مقاس ٠.٢٢ ميكرومتر ويحفظ في وعاء عالي الحماية. تساعد المواد البروتينية (مثل الجسم المضاد ورواسب العينة) في انتشار العينة فوق الشبكة في حالة العينات النظيفة نسبياً من أي رواسب (مثل العينة من مزرعة الخلية)، ومن ثم قد تحدث الصعوبة المصاحبة لنشر العينة فوق الشبكة. إضافة بروتين بنسبة قليلة (مثل ٠.١٪ زلال مصال العجول) إلى المخفف قد تساعد في حل هذه المشكلة. يمكن أن تخلط العينة مع الصبغة بالسحب بواسطة الماصة أعلى وأسفل. ضع قطرة من العينة المصبوغة على شبكة مغلقة بالكربون. بعد ١ - ٣ دقائق، تطبع قطرة من الشبكة باستعمال ورق بييلوس عند حافة الشبكة.

(٧) رؤية العينة عند ٧٥ - ٨٠ KV عند تكبير من ٣٠٠٠٠ - ٦٠٠٠٠ مرة: تجمعات الفيروس عادة بها خمسة إلى ألف جزئي فيروس. لوصف فيروسات روتا المشاهدة بالمجهر المناعي انظر Devitt and Reynolds (6) و Theil et al. (20) و Saif et al. (18).

Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Avian Rotavirus RNA

يمكن وضع فيروسات روتا الطيور في مجاميع على أساس الاختبارات المناعية مثل التآلق المناعي والمجهر الإلكتروني المناعي (انظر سابقاً) والتصنيف بالتحليل الكهربائي. بسبب وجود مجين فيروسات روتا الذي يتكون من

١١ قطعة، فإن استخلاص آر إن إيه الفيروسي والتحليل الكهربائي على هلام بولي أكريلاميد يظهر شكل الحلقات ويرجع إلى أنه غمط تحليل كهربائي خاص بالفيروس (انظر أسفل). المجاميع المختلفة لفيروسات روتا الطيور لها أنماط تحليل كهربائي مميزة (أشكال الحلقات). لوحظت فروقات طفيفة لفيروسات روتا خلال المجموعة الواحدة. لا يكتشف الاختلاف عامة بالاختبارات المصلية لكن يكتشف بواسطة التحليل الكهربائي. تستخدم الطرق التالية:

(١) تجهيز الفيروس: قد تعتمد عملية القدرة على تمييز حلقات مرئية في الهلام النهائي على كمية مواد الخلفية الموجودة في تجهيز الفيروس. بالرغم من أن الطرق الموجودة تساعد في تركيز وتنقية الحمض النووي الريبوزي للفيروس فإنها تعتمد على الوضع وتنقية الفيروس قبل الاستخلاص لتقليل الخلفية غير المرغوبة. يمكن أن تجهز العينات المعوية كما وصف سابقاً (جمع العينات). يمكن أن يستعمل الراشح الناتج أو ينقى أكثر بالاستخلاص بالفلوركاربون الذي يمكن أن يتم بواسطة خلط العينة مع ترائي كلورو ترائي فلورو إيثان البارد عند ٤ م° (فريون) ويطحن بخلاط عالي السرعة لمدة ٢ - ٣ دقائق. الخليط الناتج يمكن أن يطرد مركزياً عند ٣٠٠ - ٥٠٠ إكس جي لفصل الأشكال العضوية من المرحلة السائلة (الطبقة العليا) والتي تحتوي على الفيروس. يمكن التنقية أكثر بتقنيات الطرد المركزي مثل تعبئة الفيروس خلال طبقة من السكروز.

(٢) استخلاص الحمض الريبوزي: بتعليق الفيروس المجهز في محلول اختزالي (٢٪ دوديسيل سلفات الصوديوم، و ٢٠٪ جلسرول، و ٤٪ ميركابتو إيثانول، و ٣٠٪ يوريا في محلول تريس-جليسين). يمكن إجراء الطرد المركزي وتحتجز السوائل الراتقة. يضاف الفينول-كلوروفورم (٣: ٢) إلى الراتق ويخلط ثم يطرد مركزياً مثل السابق. تحتوي طبقة القمة الحمض الريبوزي المستخلص ويمكن أن يستخدم في التحليل الكهربائي. قد تشمل التقنيات الإضافية للتقنية الترسيب بالكحول الإيثيلي البارد و كروماتوجرافي السليلوز CF11 (انظر Theil (19)، و Theil *et al.* (21)).

(٣) التحليل الكهربائي للحمض الريبوزي: تعتمد كمية العينة المطلوبة والظروف التي يمكن أن تستعمل أثناء التحليل الكهربائي بشدة على طريقة ونوع الجهاز المستخدم. أستخدم الهلام المختلف (Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, N.J.) بنجاح. يتطلب عامة الهلام القياسي الحجم التقليدي باستخدام جهاز الهلام الرأسي ٢٠ مل من العينة بينما يتطلب نظام فاست ٢ مل. يتم الفصل لمدة ٤ - ٥ ساعات عند ٤٠ مللي أمبير باستخدام ٧.٥ هلام عديد الأكريلاميد. يمكن أن يفصل هلام فاست عند ١٢ مللي أمبير بما يوازي ١٧٥ فولت-ساعة (حوالي ساعة) باستخدام ١٠٪ - ١٥٪ هلام عديد الأكريلاميد المتدرج. هذان الطريقتان هما النقيضان بين التقنيات الأكبر/الأبطأ والأصغر/الأسرع التي تعطي نتائج معقولة.

(٤) صباغة الهلام: الطريقة الأكثر شيوعاً للفيروسات مزدوجة الشريط هي طريقة صبغة الفضة. لمعلومات أكثر انظر Theil (19) و Theil *et al.* (21) وتقنية تطور نظام فاست الملف رقم ٢١٠ المتوافر من فارماسيا Pharmacia.

Reoviruses

هي فيروسات ذات حمض ريبيوزي مزدوجة الشريط ولها مجين به ١٠ قطع. لمعلومات إضافية شاملاً تباين العترة انظر الفصل الثامن والثلاثون.

Small Enteric Virus

هي الفيروسات التي قطرها ٣٥ نانوميترًا أو أقل وتشمل الفيروسات النجمية والفيروسات المعوية وفيروسات بارفو وفيروسات بيكوآر إن إيه الكاذبة. تم التقسيم والتسمية التالية لهذه الفيروسات على أساس حجم جزيء الفيروس والشكل كما تحدد بواسطة دراسات المجهر الإلكتروني.

الفيروسات النجمية تقريباً حوالي ٣٠ نانوميترًا. نسبة صغيرة من الجزيء يظهر شكلاً نجمياً له خمس نقاط أو ستة نقاط عند مشاهدته بالمجهر الإلكتروني. الفيروسات المعوية أيضاً حوالي ٣٠ نانوميترًا لكنها دائرية وخالية من أي أشكال سطحية. للمزيد عن هذه الفيروسات انظر *Saif et al.* (18)، و *Guy et al.* (11)، و *McNulty et al.* (13).

لأن نسبة صغيرة من الفيروسات النجمية تظهر الشكل النجمي وفيروسات أسترو والمعوية تقريباً لها نفس الحجم، فإنه من الصعب إذا لم يكن مستحيلاً التعرف بدقة عليها بدون مساعدة المجهر الإلكتروني المناعي (انظر أعلى).

فيروسات بارفو حوالي ١٥ - ٢٠ نانوميترًا ويمكن أن تشاهد بالمجهر الإلكتروني من المحتويات داخل الأنوية للخلايا الطلائية الماصة المعوية عندما تجهز بطريقة القطاع فائق النحافة.

حتى هذا التاريخ، لم تجرى تقارير تدل على التفريق بين المعزولات لنفس الفيروس.

Serologic Detection in the Host

Coronaviruses

Virus Neutralization

يجرى اختبار تعادل الفيروس كالتالي :

- (١) تجهيز الفيروس : يحصل على الفيروس المطلوب لهذا الاختبار من المتجانس المعوي لأجنة بيض الدجاج المحقونة (انظر أعلى). معيار الفيروس من هذا المصدر عادة يكون ٥ لو.١، متوسط جرعة معدية للدواجن لكل مليلتر (PID₅₀/ml).
- (٢) تستخدم طيور صغيرة قابلة للإصابة بالفيروس.
- (٣) لاختبار المصل يخلط مع الفيروس المخفف ويعطى للطيور. عادة تحتوي عينات المصل المجمعة من الطيور الناقهة معاملات تعادل ٢ - ٣ لو.١، PID₅₀، بينما تحتوي عينات الأمصال من طيور قابلة للإصابة على ١ - ٠ لو.١ PID₅₀.

Indirect Fluorescent Antibody Test

يمكن أن تستخدم لاكتشاف الأجسام المضادة للفيروس التاجي. يمكن أن تجهز الشريحة من الأمعاء الجينية لأجنة البيض المحقونة بالفيروس التاجي بجمع من ٢٤ - ٤٨ ساعة بعد الحقن. تجمد الأنسجة الجينية بسرعة وتقطع وتحفظ عند ٧٠° م حتى تستخدم. لمعلومات إضافية على كيفية إجراء تقنيات الجسم المضاد المباشرة وغير المباشرة انظر Gardner (8).

Hemagglutination Inhibition (HI)

يمكن أن يستخدم أيضاً لكشف الأجسام المضادة للفيروسات التاجية للرومي. وصف هذه الطريقة قد يوجد في الفصل السادس والأربعون. يلاحظ التالي:

- (١) يجب أن يتميز المصل محل الاختبار مع الكاولين ويخلط مع كرات الدم الحمراء لتقليل التلازن غير النوعي. يمكن أن تجرى معالجة المصل بالكاولين بتحضير تخفيف ١ : ٥ من المصل مع محلول ملح فوسفات معقم. يضاف لهذا التحضير حجم مساوي من ٢٥٪ معلق كاولين (سيجما) في محلول الملح. يجب أن يخلط المحضر جيداً ويحضر عند درجة الغرفة لنصف ساعة مع الرج على فترات. عقب التحضير يترد مركزياً عند ٥٠٠ إكس جي لنصف ساعة ويستخدم الرائق الناتج (المصل) (لاحظ أن التخفيف النهائي للمصل هو ١ : ١٠). يمكن أن تضاف عند ذلك كرات الدم الحمراء إلى المصل المتميز مع الكاولين بطريقة مماثلة.
- (٢) أنتيجين الفيروس يجب أن ينقى أولاً ويركز (انظر [4] Dea et al.) ويخفف ليعطي أربعة وحدات تلازن الدم.
- (٣) المستويات المكتشفة للأجسام المضادة المصلية عادة تحدث بعد الإصابة بأسبوعين.

Rotaviruses

يمكن أن تكتشف الأجسام المضادة لفيروسات روتا الطيري عقب الإصابة. تكون الطيور عامة أجسام مضادة بعد العدوى بحوالي أسبوع إلى أسبوعين. يمكن أن تجهز المجموعة A من فيروس روتا بالتمرير في مزرعة الخلية (انظر أعلى) وتنقى أكثر بتقنيات الطرد المركزي فائق السرعة باستخدام كلوريد السيزيوم. من سوء الحظ فيروسات روتا المجموعة D (الأكثر أهمية) لا تنمو بسهولة خارج الجسم. يجب تحضير الأنتيجين لمجموعة D لفيروس روتا بالحقن في طيور قابلة للإصابة. لمعلومات إضافية انظر Devitt and Reynolds (6). تعطل عدم قابلية المجموعة D لفيروس روتا على التكاثرات الجهود لاستخدام الاختبارات المصلية للتشخيص التقليدي. تشمل الاختبارات التي استخدمت بنجاح لكشف الأجسام المضادة لفيروسات روتا المجهر الإلكتروني المناعي والإليزا والانتشار المناعي في الآجار وتعادل الفيروس (مجموعة A من فيروسات روتا فقط).

Immune Electron Microscopy

وصف سابقاً. يمكن أن تقيم مضادات الأمصال المجهولة لوجود الجسم المضاد بتحصين المصل المخفف (ابتداءً بتخفيف ١:١٠ في محلول ملح وبعد ذلك تخفيف ثنائي) مع عينات معلومة تحتوى فيروس روتا. استعمال عينات عالية التثنية للفيروس (مثال، من الطرد المركزي فائق السرعة الإيزوبيكينك) يكون منفصلاً لكن ليس ضرورياً.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

المرحلة الصلبة للإليزا التي تستخدم أفيدين بيوتين كما وصف سابقاً ليكوبلازما الطيور (2) يمكن أن تستخدم لفيروسات روتا. باختصار تنقط التجهيزات المنقاه لمجموعة A و D من فيروس روتا على أقراص نيتروسيليلوز في طبق مزرعة خلية مسطح القاع وبه ٩٦ حفرة. يجب أن ينقط الأنتيجين (فيروس روتا) بالزيادة. يمكن أن يتم ذلك باستخدام ١ ميكروليتر/نقطة من الفيروس عند تركيز ١٠٠ - ٢٠٠ ميكروجرام/مل من البروتين (كما هو محدد بواسطة Bio Rad® Protein Assay, Hercules, Calif.). لاحظ أن أكثر من أنتيجين واحد (مثل مجموعة A ومجموعة D لفيروسات روتا) يمكن أن تنقط على كل قرص نيتروسيليلوز إذا أُعطي الانتباه لموقع التنقيط. عقب خطوة الإغلاق لمدة ساعة باستخدام ١٠٠ ميكروليتر/حفرة من حليب بودرة ٣٪ (وزن/حجم) في ماء مقطر، يضاف المصل المختبر. يجب أن يخفف المصل المختبر عبر الطبقة في تخفيفات ثنائية ابتداءً من تخفيف ١:١٠٠ لتعطي ١٠٠ ميكروليتر/حفرة من المصل المخفف. يحضن المصل لمدة ساعة عند درجة الحرارة. يغسل الطبقة بعد ذلك ثلاث مرات بمحلول الملح-تريس (TBS) مع ٠.٥٪ توين ٢٠ (سيجما) وتغلق المواضع غير النوعية كما سبق ويضاف الجسم المضاد الثانوي (مضاد جلوبولين G للدجاج المقترن مع البيوتين [IgG]، معامل فيكتور بيرلنجم، كاليفورنيا) عند تخفيف ١:٢٠٠٠ في محلول ملح-تريس بمعدل ١٠٠ ميكروليتر/حفرة ثم يحضن لمدة ساعة عند درجة الحرارة. لاحظ أن الجلوبيولين المناعي المقترن مع البيوتين متساوي الفعالية لاختبار أمصال الرومي. عقب التحصين مع الجسم المضاد الثانوي يغسل الطبقة وتغلق المواضع غير النوعية blocking كما سبق ويضاف إنزيم بيرأوكسيداز هورس رادش المقترن مع أفيدين D عند تخفيف ١:٢٠٠٠ في محلول ملح-تريس بمعدل ١٠٠ ميكروليتر/حفرة. يحضن الطبقة لمدة ٢٠ - ٣٠ دقيقة عند درجة الحرارة ويغسل ويضاف ١٠٠ ميكروليتر/حفرة من محلول الإظهار الذي يتكون من إضافة ٦ ميكروليتر من ٣٠٪ فوق أكسيد الهيدروجين إلى ١٠ مل من محلول ملح-تريس وعند ذلك يضاف ٢ مل من المحلول المركز A (المحلول المركز A: ١٠٠ مل كحول ميثيلي + ٣٠٠ مجم من ٤-كلورو-١-نافثول [سيجما] ويحفظ في وعاء واقى من الضوء ويستبعد إذا ظهر لونه أصفر). يجب أن يستخدم محلول إظهار اللون فوراً. يظهر لون الطبقة في الظلام لمدة ٥ - ١٥ دقيقة. اللون الأزرق/الوردي الداكن على خلفية بيضاء يدل على نتيجة إيجابية، بعد تطوير اللون يشطف محلول إظهار اللون ويضاف ماء مقطر معقم لإيقاف التفاعل. اترك

الطبق ليُجف (ساعات قليلة) قبل القراءة. يمكن أن تقرأ الأطباق عند الطول الزراعي تحت ضوء الغرفة المتألق. يمكن أن تحفظ الأطباق المكونة للون لفترات طويلة من الوقت إذا حفظت من الضوء، والأطباق/الحفر التي لم تتفاعل إيجابياً يمكن أن يعاد استخدامها عند الحاجة.

Agar-gel Immunodiffusion

يمكن أن يستخدم لاختبار الأمصال للأجسام المضادة لفيروس روتا. الطريقة المستخدمة وصفت سابقاً بواسطة Devitt and Reynolds (6). باختصار، تغطي شريحة مجهر نظيفة مقاسها ٢,٥ x ٧,٥ بكمية ٥ مل من آجار نوبل ١٪ (معامل دفكو) مضبوط لدرجة بي إتش ٨,٥ ويحتوى على ٨,٥٪ كلوريد صوديوم، و ١٪ بولي إيثيلين جليكول، و ٠,٥٪ آزيد الصوديوم. تبرد الشرائح عند ٤ م لمدة ١٢ ساعة وتقطع الحفر باستخدام القالب القياسي. يوضع الفيروس المنقى في الحفرة المركزية (٢٥ - ٣٥ ميكروليترًا بمعدل ٢٠٠ - ٥٠٠ ميكروجرام/مل من البروتين) ويصنع التخفيف الثنائي للمصل في محلول ملح (٢٥ - ٣٥ ميكروليترًا/حفرة) ويوضع في الحفر الطرفية ثم تحضن الشرائح لمدة ٢٤ - ٤٨ ساعة عند درجة الحرارة في غرفة رطبة. يمكن أن تقرأ خطوط الترسيب باستخدام الضوء المائل.

Virus Neutralization

يمكن أن يستخدم لتحديد الأجسام المضادة لمجموعة A من فيروسات روتا لأن المجاميع الأخرى لا تنمو بسهولة في أنظمة مزرعة الخلية. تستخدم خلايا MA104 (انظر أعلى) لتنمية مجموعة A لفيروسات روتا وتنمى لحد أدنى ٨٥٪ اندماج في أطباق مزرعة الخلية مسطحة القاع لها ٩٦ حفرة. الطريقة المستخدمة هي فيروس ثابت مع تخفيف المصل. تم تمرير مجموعة A من فيروسات روتا سابقاً في خلايا MA104 وأُستخدمت عند تركيز نهائي ١٠^٢ متوسط جرعة معدية لمزرعة الخلية (TCID₅₀). يجب أن ينشط الفيروس أولاً بواسطة الترسين لمدة ساعة عند ٣٧ م مع ١٠ ميكروجرام/مل من نوع IX ترينين (انظر أعلى) وعقب ذلك يخلط الفيروس مع تخفيفات المصل المقابلة. تبدأ التخفيفات الثنائية المتسلسلة بتخفيفات ١ : ١٠. عند ذلك يضاف مخلوط الفيروس والمصل إلى الخلايا المغسولة في طبق بمعدل ١٠٠ ميكروليتر/حفرة ويحضن لمدة ٩٠ دقيقة عند ٣٧ م للسماح للفيروس بالامتزاز وبعد ذلك تغسل الحفر (الخلايا) مرتين بالأوساط الخالية من المصل (انظر سابقاً) وتضاف أوساط الحفظ الخالية من المصل بمعدل ١٠٠ ميكروليتر/حفرة وتحضن الأطباق لمدة ٤٨ ساعة. يمكن أن يقرأ الطبق باستخدام المجهر المقلوب ويفحص لوجود التأثير المرضي الخلوي.

Small Enteric Viruses

لا توجد اختبارات مصلية لتحديد الإصابة في العائل.

Reoviruses

للتعرف المصلي في العائل ارجع للفصل الثامن والثلاثون عن التهاب المفاصل الفيروسي والتهاب غمد الوتر وإصابات الربو الفيروسية الأخرى.

Differentiation from Closely Related Agents

الفيروسات المعوية المختلفة كما وصفت سابقاً يمكن أن يفرق بعضها عن بعض باستخدام التقنيات المميزة الموصوفة سابقاً. إضافة إلى ذلك فإن العوامل غير الفيروسية الأخرى يجب أن تؤخذ في الاعتبار أيضاً عند محاولة تشخيص الأمراض المعوية في الطيور الصغيرة. يجب أن يؤخذ في الاعتبار كلاً من العوامل المعدية وغير المعدية. أمثلة للعوامل المعدية تشمل العوامل الطفيلية وحيدة الخلية (الأولية) (مثل أميريا وكربتوسبورديا وهيكساميتا)، والعوامل البكتيرية (مثل أنواع السالمونيلا). أمثلة للعوامل غير المعدية قد تشمل السموم ونقص الغذاء والزيادات. المرض المعوي هو مرض مركب وقد يكون له مسببات مركبة ومن ثم قد تدخل في هذا الأمر عوامل عديدة (كلاً من الفيروسية وغير الفيروسية).

References

1. Ali, A., and D. Reynolds. Stunting syndrome in turkey poult: further characterization of the etiologic agent. In: Proceedings of the North Central Avian Disease Conference, Minneapolis, Minn., Sept. 17-19. p. 109. 1995.
2. Cummins, D. R., D. L. Reynolds, and K. R. Rhoades. An avidin-biotin enhanced dot-immunobinding assay for the detection of Mycoplasma gallisepticum and M. synoviae serum antibodies in chickens. Avian Dis. 34:36-43. 1990.
3. Dea, S., S. Garzon, and P. Tijssen. Isolation and trypsin-enhanced propagation of turkey enteric (bluecomb) coronavirus in a continuous human rectal adenocarcinoma cell line. Am. J. Vet. Res. 50:1310-1318. 1989.
4. Dea, S., G. Marsolais, J. Beaubien, and R. Ruppner. Coronaviruses associated with outbreaks of transmissible enteritis of turkey in Quebec: hemagglutination properties and cell cultivation. Avian Dis. 30:319-326. 1986.
5. Dea, S., and P. Tijssen. Detection of turkey enteric coronavirus by enzyme-linked immunosorbent assay and differentiation from other coronaviruses. Am. J. Vet. Res. 50:226-231. 1989.
6. Devitt, C. M., and D. L. Reynolds. Characterization of a group D rotavirus. Avian Dis. 37:749-755. 1993.
7. Dziuk, H. E., O. A. Evanson, and C. T. Larson. Physiologic effects of fasting and bluecomb in turkeys. Am. J. Vet. Res. 30:1045-1056. 1969.
8. Gardner, P. S. Immunofluorescence. In: Clinical virology manual. S. Specter and G. J. Lancz eds. Elsevier Science Publishing Co., New York, N.Y. pp. 95-109. 1986.
9. Guy, J. S., and H. J. Barnes. Partial characterization of a turkey enterovirus-like virus. Avian Dis. 35:197-203. 1991.

10. Guy, J. S., and H. J. Barnes. Poulter enteritis and mortality syndrome ("spiking mortality"): an acute, transmissible disease of unknown origin. Presented at the 1996 Enteric Disease Control Symposium, AAAP/AVMA annual meeting, Louisville, Kentucky, July 20, 1996.
11. Guy, J. S., H. J. Barnes, L. G. Smith, and J. Breslin. Characterization of coronaviruses identified in turkeys with poulter enteritis and mortality syndrome. Abstract. In: Proceedings of the 46th Western Disease Poultry Disease Conference. Sacramento, Calif., March 1-4, 1997. p. 42.
12. McNulty, M. S. Rotavirus 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. 692-699. 1997.
13. McNulty, M. S., W. L. Curran, D. Todd, and J. B. McFerran. Detection of viruses in avian faeces by direct electron microscopy. *Avian Pathol.* 8:239-247. 1979.
14. Pomeroy, B. S., and K. V. Nagaraja. Coronaviral enteric infections of turkeys (bluecomb disease). 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. 686-692. 1997.
15. Reynolds, D. L. Enteric virus infections of young poultry. *Poult. Sci. Rev.* 4:197-212. 1992.
16. Reynolds, D. L. Astrovirus 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. 701-705. 1997.
17. Reynolds, D. L. Enteric disease complex. 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. 1016-1018. 1997.
18. Saif, L. J., Y. M. Saif and K. W. Theil. Enteric viruses in diarrheic turkey poults. *Avian Dis.* 29:798-811. 1985.
19. Theil, K. W. A modified genome electropherotyping procedure for detecting turkey rotaviruses in small volumes of intestinal contents. *Avian Dis.* 31:899-903. 1987.
20. Theil, K. W., D. L. Reynolds and Y. M. Salt. Isolation and serial propagation of turkey rotaviruses in a fetal rhesus monkey kidney (MAI04) cell line. *Avian Dis.* 30:93-104. 1986.
21. Theil, K. W., D. L. Reynolds, and Y. M. Salt. Genomic variation among avian rotavirus-like viruses detected by polyacrylamide gel electrophoresis. *Avian Dis.* 30:829-834. 1986.