الفصل الثالث والأربعون

تكاثر الفيروس في أجنة البيض
VIRUS PROPAGATION IN EMBRYONATING EGGS

دينيس أ. سين
Dennis A. Senne

الملخص Summary

أجنة البيض هي أحد أهم أنظمة العائل الفائقة وواسعة الاستخدام لعزل وتنمية العديد من فيروسات الطيور. يمكن أن تؤثر العديد من المتغيرات على نجاح أو فشل أجنة البيض لدعم نمو الفيروس، وبعض المتغيرات التي سيتم تغطيتها في هذا الفصل تشمل مصدر البيض المخصب وأنواعه وعمر الجنين وطريقة الحقن وظروف التحضين. يعطي هذا الفصل أيضاً مقالة مفصلة على تحضير العينة وحقن البيض عن طريق الكيس السقائي وكيس المح والغشاء الكوريوني والكيس الأميني وجمع العينات من الأجنة المحقونة وطرق تمرير البيض.

المقدمة Introduction

تمثل أجنة بيض الدجاج منذ زمن أهم أنظمة العائل واسعة الاستخدام لعزل وتنمية وتوصيف فيروسات الطيور ولإنتاج اللقاحات الفيروسية. يعطي الجنين وأغشيته المدعمة تعدداً لأنواع الخلية الضرورية لزراعة عديد من أنواع الفيروسات المختلفة، إلا أن نجاح أو فشل هذا النظام لنمو وعزل الفيروسات يعتمد على ظروف عديدة (1) وهي: طريقة الحقن، وعمر الجنين، وحرارة التحضين، وطول فترة التحضين عقب الحقن، وحجم وتخفيف الطعم المستخدم، والحالة المناعية للقطيع مصدر البيض. لتقنين الظروف لعزل ونمو الفيروس في أجنة البيض، يجب أن يؤخذ كل من هذه المقاييس في الاعتبار للفيروس محل السؤال.

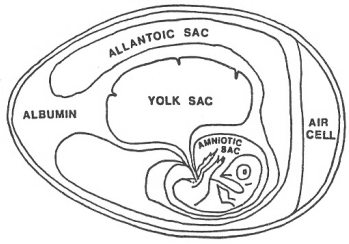
كما في أي نظام يستعمل لعزل الفيروس، كشف إصابة الفيروس قد يكون محتملاً. يمكن أن يكتشف نمو الفيروسات في أجنة بيض الدجاج في أغلب الحالات بواحدة أو أكثر من الطرق التالية (3): موت الجنين، وآفات في الغشاء الكوريوالانتويس مثل الأديما أو تكوين البقع، وآفات جنينية مثل التقزم، والأنزفة الجلدية، والنمو غير

الطبيعي للعضلات والريش، والتغيرات في الأعضاء الحشوية التي تشمل تضخم الكبد والقلب، وتغير لون الكبد إلى الأخضر، وتكوين ترسيبات بولية في نسيج الكلى.

تشمل الطريقة المباشرة والمحددة لكشف الإصابة بالفيروس في أجنة الدجاج: قدرة السوائل السقائية الأمينية (AAF) في إحداث تلازن الدم (HA) للخلايا الحمراء المغسولة من الدجاج، واستعمال تقنيات مصلية وجزيئية مثل الإليزا ومسابير الحامض النووي دي إن إيه المكمل والمجهر الإلكتروني (1 ,3). يجب أن يؤخذ حرص خاص لتفريق الآفات التي قد تسبب بوجود العوامل البكتيرية.

تركيب البيض المخصب الجنيني Structure of the Embryonating Egg

يقع مباشرة تحت قشرة البيضة غشاء القشرة. يبطن هذا الغشاء السطح الداخلي الكلي للبيضة ويُكَوِّن خلية الهواء عند الناحية المنثلمة للبيضة (الشكل رقم ٤٣,١) وهو يساعد في الحفاظ على العدد الميكروبي للبيضة، بينما يسمح بدخول الغازات في وخارج البيضة. يسهل توزيع الغازات خلال البيضة بتكوين الغشاء الكوريوالانتويس كثير الأوعية الدموية والذي يعمل كعضو تنفسي للجنين. إن تكوين هذا الغشاء يحدث بالقرب من غشاء القشرة في كل أنحاء البيضة. أثناء التطور يكون هذا الغشاء تجويفاً كبيراً نسبياً يعرف بالكيس السقائي الذي يحوي بين ٥ و١٠ مل من السائل القانقي (الشكل رقم ٤٣,١)، ويحاط الجنين مباشرة بالغشاء الأميني مكوناً الكيس الأميني الذي يحتوي ١ – ٢ مل من السائل الأميني. يتصل الجنين بكيس المح الذي يقع قريباً في مركز البيضة ويمد التغذية الضرورية لتطور الجنين (2).



الشكل رقم (٤٣,١). تكوين البيض الجنيني.

مصدر البيض وطرق التحضين التمهيدية

Source of Eggs and Preliminary Incubation Procedures

يجب أن يحصل على البيض المخصب أقل من أسبوع من قطيع أمهات نشط متعافٍ خالٍ من الممرضات النوعية والذي يختبر بانتظام لمعظم الممرضات الفيروسية والبكتيرية الشائعة في الطيور. تعطي معظم المصادر نشرات

الاختبارات حسب الطلب. صلاحية أي عزل قد تقيم بواسطة وجود العوامل المنتقلة عن طريق البيض مثل فيروسات أدينو الطيور، وفيروس التهاب الدماغ الطيري، وفيروس مرض النيوكاسل، وفيروس سرطان الطيور، وفيروس الالتهاب الشعبي المعدي، وفيروس الجمبورو، وفيروس ريو الطيور، وفيروس أنيميا الدجاج، والميكوبلازما، والسالمونيلا (1). قد يستعمل بيض الأجنة من الأنواع الأخرى (مثل الرومي والسمان والبط) أيضاً (1)، إلا أن بعض الضوابط في العمر الذي يحقن عنده الجنين قد تكون ضرورية نظراً للفروق في التطور الجيني. يحتاج بيض البط على سبيل المثال ٢٨ يوماً من التحضين ليفقس مقارنة مع بيض الدجاج (٢١ يوماً).

قد توجد أيضاً أجسام مضادة في صفار البيض المنتج من دجاجات نوعية المناعة. قد يستخدم البيض من دجاجات إيجابية الأجسام المناعية لعزل الفيروس أو تنميته إذا كانت الطرق المستخدمة غير طريق كيس المح وتكتمل طريقة العزل قبل وصول الأجنة لليوم الخامس عشر من التحضين وهو الوقت عندما يبدأ الجنين في امتصاص الأجسام المضادة من المح. يجب أن يستخدم البيض إيجابي الأجسام المضادة فقط عند عدم توفر مصدر بديل جيد.

عند العمل مع بعض الفيروسات مثل سرطان الطيور، قد يلعب التكوين الجنيني لقطيع الأمهات دوراً مهماً في تحديد ملائمة بعض البيض المستخدم في عزل الفيروس أو تكاثره، وبعض سلالات الدجاج تكون مقاومة طبيعياً لعترات محددة لفيروس الليكوزيس أو سرطان الطيور.

مبدئياً يجب أن يحضن البيض في حضان مناسب عند درجة ٣٨ – ٣٩°م ورطوبة نسبية ٦٠٪ – ٧٠٪ إذا أمكن. يجب أن يقلب البيض عدة مرات يومياً ليسمح بنمو أمثل ويمنع التصاق الأغشية الجنينية (2). عادة يحضن البيض ٦ – ١١ يوماً قبل إمكانية حقنه، ويتحدد طول التحضين بطريقة الحقن المستخدمة. يجب أن يفحص البيض بعد ٥ – ٦ أيام من التحضين لتحديد المخصب وغير المخصب أو الميت. يجب أن يستبعد البيض الذي به أجنة ضعيفة أو خلية هوائية غير طبيعية في الحجم أو الموقع. يجرى الفحص في غرفة مظلمة باستخدام إضاءة مجهر أو آلة فحص مناسبة. تسمح إضاءة المجهر المحمولة للبيض أن يفحص بينما يوضع على مسطح البيضة، ومن ثم تلغى الحاجة لتداول كل بيضة.

تحضير العينة Sample Preparation

يختلف نوع العينة المرسلة لعزل الفيروس تبعاً للمرض المشتبه لكن يتكون عادة من الأنسجة أو المسحات. يجب أن تجهز معلقات العينات في شوربة تربتوز–تريس (١,٢١ جم تريس لكل لتر من شوربة التربتوز) أو شوربة التغذية أو شوربة بي إتش آي أو وسط مناسب آخر يحتوي على مضادات حيوية. قد يعتمد تركيز المضاد الحيوي المستخدم على نوع العينة لكن يجب أن يحتوي كحد أعلى على بنسللين (١٠٠٠٠ وحدة/مل)، وسلفات

ستربتوميسين (٢ مجم/مل)، وسلفات جنتاميسين (١ مجم/مل)، وسلفات كاناميسين (٠,٦٥ مجم/مل)، وأمفوتربسين B (٠,٠٢ مجم/مل). من المهم أن تكون درجة الأس الهيدروجيني لمخفف المضادات الحيوية مضبوطة حتى معدل ٧ – ٧,٤. للأفضل يحضر محلول مركز من المضادات الحيوية وتضبط درجة الأس الهيدروجيني للمخفف المستخدم ويجهز مقدماً ويحفظ عند –٢٠°م. يمكن أن تجهز الأنسجة كمعلق ١٠٪ - ١٥٪ بالطحن بالطرق السالف ذكرها، وفي كابينة زرع ذات أمان حيوي. يجب أن تخفف المسحات في حجم صغير عادة (٣ – ٤ مل)، ثم توضع على هزاز لاستخلاص أكبر قدر من العينة بقدر الإمكان من ألياف المسحة. يطرد معلق العينات والمسحات مركزياً عند ١٠٠٠ – ١٥٠٠ إكس جي لمدة ٢٠ دقيقة في جهاز طرد تحت تبريد (٤ – ١٠°م) لترسيب بقايا الأنسجة ومعظم البكتيريا ثم ينقل الرائق بشكل معقم ويوضع في عبوات كافية لحقن الأجنة والحفظ. يجب أن تحفظ العينات عند درجة حرارة الغرفة مع المضادات الحيوية لمدة ١ - ٢ ساعة قبل حقنها في البيض لتخفيض المشاكل البكتيرية. يمكن أن ترشح العينات شديدة التلوث بالبكتيريا التي لا تزول بالطرد المركزي أو المضادات الحيوية خلال مرشح غشائي معقم ٤٥٠ نانوميكروناً، وهذا يعتبر كحل أخير بسبب احتجاز تجمعات الفيروس على سطح المرشح، ومما يقلل من العزل الناجح. يجب حفظ العينات عقب الحقن عند –٧٠°م للاستخدام المستقبلي.

طرق الحقن Routes of Inoculation

الطرق الرئيسية الأربع للحقن في أجنة البيض عن طريق الكيس السقائي وكيس المح والغشاء الكوريوالانتويس والكيس الأميني. يفضل الغشاء الكوريوالانتويس بسبب حساسيته لعدد كبير من الفيروسات ولأنه أقل تأثراً بالتلوث البكتيري (3). يشيع استخدام كيس المح والكيس السقائي ولهما نفس الحساسية لعزل عوامل عديدة. يجب أن يستخدم الحد الأدنى ٤ أجنة لكل عينة ولكل طريقة حقن.

تفحص كل الأجنة قبل الحقن لحيويتها ولتحديد موضع الحقن وتطهر بمحلول ٧٠٪ كحول إيثيلي يحتوي على ٣,٥٪ يود و١,٥٪ يوديد الصوديوم على مكان القطع المعد للحقن. يصنع ثقب في القشرة باستخدام مثقاب له طرف مدبب بعد تطهيره بالمطهر السابق قبل كل استخدام لتجنب تلوث مكان الحقن. عقب الحقن، يقفل الثقب بالصمغ أو البارافين الذائب ويعاد البيض إلى الحضان. في حالة إبقاء البيض المحقون محضناً حتى الفقس فإنه يجب أن يقلب عدة مرات يومياً ليضمن التطور الطبيعي للجنين، إلا أنه لا يكون مطلوباً لمعظم طرق العزل الفيروسي الروتينية. تشبه الطرق المذكورة لاحقاً تلك الطرق الموصوفة سابقاً (3, 2, 1).

حقن الكيس السقائي Allanotic Sac Inoculations

الطريقة أ Method A

هي الأكثر استخداماً وهي كالتالي :

١) افحص بيض الأجنة عمر ٨ — ١١ يوماً وحدد مكان خلية الهواء.

٢) ضع البيض على مسطح وغرفة الهواء لأعلى وطهر مكان الحقن في الخطوة ١. اصنع ثقباً صغيراً خلال القشرة مباشرة فوق غرفة الهواء وكن حذراً حتى لا تجرح غشاء القشرة كما في الشكل رقم (٤٣,٣).

٣) احقن ٠,١ — ٠,٣ مل من الطعم لكل بيضة بغرس إبرة بطولها الكامل رأسياً خلال الثقب من المنتصف واحقن الكمية المرغوبة.

٤) أغلق الثقب وأعد البيض إلى الحضان. يحضن البيض المحقون بهذه الطريقة ٣ — ٧ أيام عقب الحقن.

الطريقة ب Method B

١) افحص بيض أجنة عمر ٨ — ١١ يوماً، وتأكد أن كل الخلايا الهوائية في وضعها الطبيعي.

٢) ضع البيض على مسطح وكرر الخطوة ٢ في الطريقة أ.

٣) كرر الخطوة ٣ كما في الطريقة أ بما يخص الحقن كما في الشكل رقم (٤٣,٢) وتجنب تحريك الإبرة إلى الأجناب عند غرسها لمنع تهتك غشاء الكوريون الذي قد يسبب نزفاً ونفوق الجنين.

٤) أغلق الثقب وأعد البيض إلى الحضانة كما في خطوة ٤ من الطريقة أ.

حقن كيس المح Yolk Sac Inoculation

١) افحص بيض الأجنة عمر ٦ — ٨ أيام وحدد مركز خلية الهواء.

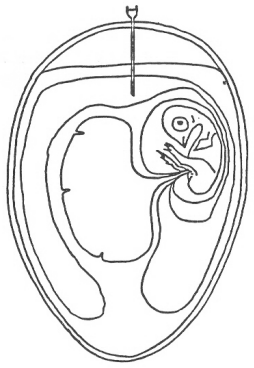
٢) ضع البيض مسطحاً وغرفة الهواء لأعلى وطهر سطح قمة البيضة حول خلية الهواء.

٣) اثقب ثقباً صغيراً خلال القشرة على المحور المركزي عند قمة البيضة (الشكل رقم ٤٣,٤).

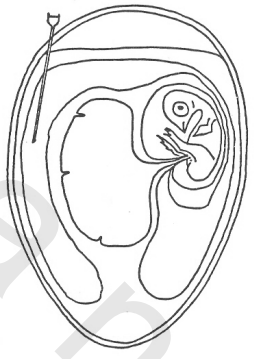
٤) احقن ٠,١ — ٠,٥ مل من الطعم لكل بيضة بغرس الإبرة عمودياً بطولها الكامل. للتأكد أن موضع الحقن في كيس المح، اسحب المحقن بهدوء، ويسحب الصفار عندما تكون الإبرة داخل كيس المح.

٥) أغلق الثقب وأعد البيض إلى الحضانة، ويحضن البيض الذي تم حقنه بهذه الطريقة عامة من ٣ — ١٠ أيام أو في بعض الأحيان حتى الفقس.

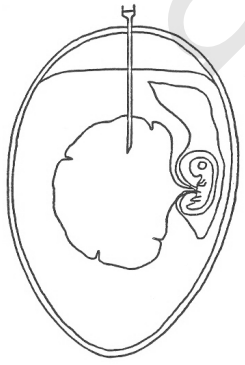
obeikandl.com



الشكل رقم (٤٣,٢). طريقة حقن الكيس السقائي طريقة A.



الشكل رقم (٤٣,٣). طريقة حقن الكيس السقائي طريقة B.



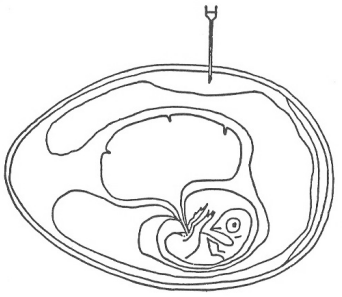
الشكل رقم (٤٣,٤). طريقة حقن كيس المح.

حقن الغشاء الكوريوالانتويس Chorioallantoic Membrane Inoculation (CAM)

١) افحص بيض الأجنة عمر ١٠ – ١١ يوماً وحدد جانب البيضة تقريباً في منتصف الطريق على طول المحور الطولي حيث يكون تركيب الوريد واضحاً.

٢) ضع البيض في الوضع الأفقي على مسطح وعقم كلاً من خلية الهواء وجانب البيضة المحدد في الخطوة السابقة (الشكل رقم ٤٣,٥).

obeikandl.com



الشكل رقم (٤٣,٥). طريقة حقن الغشاء الكوريوني السقائي.

٣) اثقب ثقباً صغيراً خلال القشرة وغشاء القشرة عند مركز خلية الهواء.واثقب ثقباً آخر على جانب البيضة وكن حريصاً حتى لا تخترق غشاء القشرة.

٤) عند هذه النقطة يجب أن تؤخذ البيضة إلى غرفة مظلمة لعمل وملاحظة انكماش الغشاء الكوريوني. جهز محقن اختبار السل يحتوي على محلول ملح فوسفات واستخدم ماصة مطاطية متصلة بمصدر شفط أو شفاط مطاطي. بينما تحمل البيضة على جهاز الفحص اشفط بهدوء عند الثقب في خلية الهواء. اغرس سن الإبرة عند الثقب على جانب البيضة مباشرة تحت القشرة عند زاوية سطحية ثاقباً غشاء القشرة وليس الغشاء الكوريوني ليسقط ، ومن ثم تتكون خلية هواء وهمية جديدة مباشرة فوق الغشاء الكوريوني. أحياناً يكون حقن قطرة صغيرة جداً من محلول الملح المعقم على الثقب المصنوع جانب القشرة مساعداً في تسهيل عملية التنقيط ويعمل كمزلق لفصل الغشاء الكوريوني من غشاء القشرة. بمجرد أن يقطر الغشاء الكوريوني أغلق الثقب عند خلية الهواء واترك البيضة أفقياً.

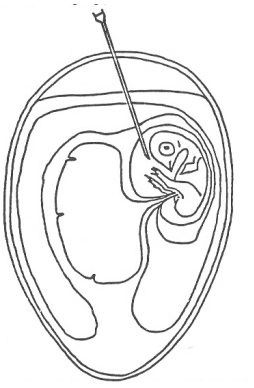
٥) باستعمال محقن وإبرة مقاس ٢٥ ، ٠,٦٢٥ بوصة (١٦ ملم) احقن ٠,١ — ٠,٣ مل من الطعم لكل بيضة عمودياً مباشرة داخل القشرة واحقن الكمية المرغوبة.

٦) اقفل الثقب واطرق البيضة بهدوء لتوزع الطعم بالتساوي فوق سطح الغشاء الكوريوني وأعد البيضة إلى الحضانة. يجب أن تحضن البيضة أفقياً لمنع غرفة الهواء الوهمية من الانحراف لأن ذلك يسبب نفوقاً غير نوعي. يحضن البيض المحقون بهذه الطريقة لمدة ٥ — ٧ أيام.

حقن الكيس الأميني Amniotic Sac Inoculation

١) افحص بيض الأجنة عمر ١٠ — ١١ يوماً وحدد الموضع العام للجنين عند قاعدة خلية الهواء.

٢) ضع البيضة وخلية الهواء لأعلى وطهر المساحة على قمة البيضة مباشرة واصنع ثقباً صغيراً خلال القشرة على المحور الطولي عند قمة البيضة (الشكل رقم ٤٣,٦).



الشكل رقم (٤٣,٦). طيقة حقن الكيس الأميني.

٣) خذ البيضة إلى غرفة مظلمة لأن هذه الطريقة تتطلب إضاءة البيضة أثناء الحقن. استخدم محقناً له إبرة مقاس ٢٢ ، ١,٥ بوصة (٣٨ ملم) ووجه الإبرة ناحية ظل الجنين. عند اقتراب طرف الإبرة للكيس الأميني اطعن باتجاه الجنين للسماح للإبرة أن تخترق الغشاء الأميني وعندئذ احقن ٠,١ — ٠,٢ مل من الطعم. لرؤية أن الإبرة في الكيس الأميني حرك الإبرة بحرص على الأجناب، وإذا كانت الإبرة في الكيس يجب أن يكون هناك رد فعل للجنين لحظة حركة طرف الإبرة.

٤) أغلق الثقب وأعد البيضة إلى الحضانة. في هذه الطريقة عامة يحضن البيض من ٢ — ٤ أيام عند درجة حرارة مناسبة للفيروس المراد تنميته.

جمع العينات من بيض الأجنة

Collection of Specimens from Embryonating Eggs

يجب أن يفحص البيض المحقون على الأقل مرة يومياً للتعرف على البيض نافق الأجنة ويجب أن يزال من الحضانة لأن استمراره قد يسبب انخفاضاً في تركيز الفيروس نتيجة للتثبيط الحراري ومن الممكن أن يسبب تغيرات في الأنسجة الجنينية مما يؤدي إلى صعوبة تقييم الآفات في الجنين أو أغشيته المدعمة (1). يجب أن تستبعد الأجنة النافقة في الـ ٢٤ ساعة الأولى كنفوقات غير نوعية بسبب جرح أو تلوث بكتيري. يجب أن تعتبر كل الأجنة النافقة بعد ٢٤ ساعة مشتبهة. في حالة بقاء الأجنة حية بعد الزمن المحدد، يجب أن تبرد بحد أدنى ٥ ساعات (يفضل طول الليل) لقتل الأجنة والسماح للدم أن يتجلط قبل جمع مكونات البيضة. يمكن أن يسبب وجود خلايا حمراء في السائل السقائي والأميني انخفاضاً في معيار بعض الفيروسات مثل فيروسات باراميكسو وأرثوميكسو الملزنة لخلايا الدم الحمراء. عند العمل مع الأنسجة والسوائل الجنينية المعدية فإنه يوصى باستخدام كابينة ميكروبيولوجية آمنة من المستوى الثاني Class II.

تشمل الأدوات والمواد اللازمة للجمع اثنين من الكؤوس سعة ٢٥٠ مل مملوءة بمطهر (واحد للقشرة وآخر للملاقط المستعملة)، وملقطاً رباعي الأطراف منحنياً معقماً، وماصات ٥ مل معقمة أو محاقن ٥ — ١٠ مل لها إبر مقاس ١٨ أو ٢٠ أو ١,٥ بوصة (٣٨ ملم) لجمع سوائل البيض، وأنابيب بغطاء معقمة سعة ١٢ x ٧٥ ملم بلاستيكية أو عبوات مناسبة أخرى، ووعاء للماصات في حالة استخدامها.

يجب أن يعقم البيض المحتوي على العينات على السطح بالمطهر المذكور سابقاً أو أي نوع آخر مناسب. يمكن أن يستعمل الكحول بسهولة وسرعة بواسطة رشاش ضباب أو رزاز ويترك ليجف من المطهر قبل جمع العينات.

جمع السوائل السقائية Collection of AAF

من البيض الذي به الأجنة النافقة From Eggs with Dead Embryos

١) اكسر القشرة فوق خلية الهواء بواسطة ملقاط معقم. أزل جزءاً من القشرة المكونة لخلية الهواء وتخلص منها في مطهر. تخلص من الملقاط في كأس به مطهر.

٢) استخدم ملاقط مختلفة لتقطيع غشاء القشرة والغشاء الكوريوني والأميني لإطلاق السوائل السقائية. اضغط على الأغشية فوق كيس المح بملاقط لتسمح بتجمع السوائل فوق الملاقط. اسحب السوائل بماصة أو محقن في العبوات كما سبق وصفها. لاحظ أنه يمكن سحب السوائل الأمينية والسقائية منفصلة باستخدام محقن من كل تجويف قبل ثقب الأغشية.

٣) ازرع السوائل لخلوها من البكتيريا باستخدام آجار الدم أو الآجار المغذي وحضن عند ٣٧°م طول الليل وسجل النتائج.

٤) نقِّ السوائل بالطرد المركزي عند ١٥٠٠ إكس جي لمدة ١٠ دقائق واختبرها لنشاط تلازن الدم باستعمال طريقة المعايرة الدقيقة لفيروسي مرض نيوكاسيل وإنفلونزا الطيور.

٥) احفظ السوائل عند —٧٠°م للتمرير أو استخدام آخر.

جمع السوائل الجنينية من البيض الذي به أجنة حية From Eggs with Live Embryos

يمكن أن تؤخذ عينات من السوائل من البيض ٢٤ — ٧٢ ساعة عقب الحقن بدون اختبار للبيض. وهذا يكون مهماً في ظروف حيث يكون التشخيص مطلوباً بشكل طارئ. إذا تم بحرص يمكن إعادة البيض للحضانة لاستمرار التحضين. استخدم الطريقة التالية:

١) اصنع ثقباً خلال القشرة فوق خلية الهواء، واستعمل محقناً له إبرة مقاس ٢٢، ١,٥ بوصة (٣٨ ملم)، وأدخل الإبرة في اتجاه القشرة بزاوية ٤٥ — ٦٠ درجة من المحور الرأسي.

٢) اسحب ٠,١ — ٠,٥ مل من السوائل السقائية لتقييم دلائل الإصابة بالفيروس باستعمال اختبار تلازن الدم أو المجهر الإلكتروني أو الطرق الأخرى المناسبة.

٣) أقفل الثقب وأعد البيض للتحضين.

جمع الغشاء الكوريوني السقائي Harvesting the CAM

طريقة أ Method A

هي الأكثر استخداماً وهي كتالي :

١) اكسر القشرة فوق الغرفة الهوائية الوهمية كما سبق وصفه وأزل قشرة البيضة على أطراف الغرفة الهوائية وتخلص من القشرة والملاقط في مطهر.

٢) لاحظ الغشاء الكوريوني للأعراض مثل السمك (الأوديما) وتكوين البقع.

٣) اجمع الأغشية بإمساكها بملاقط واسحب السوائل المتبقية بملقاط آخر. ضع الأغشية في طبق بتري معقم للفحص الإضافي أو في أنابيب بغطاء أو أوعية أخرى مناسبة للحفظ.

٤) توضع الأنابيب للحفظ في التجميد عند —٧٠ °م.

طريقة ب Method B

١) افتح البيض لجمع AAF كما وصف سابقاً.

٢) باستخدام الملاقط المعقمة ، أزل الجنين والمح بعناية.

٣) اسكب السوائل المتبقية.

٤) لاحظ الغشاء لوجود تغيرات كما سبق وللفحص الأقرب يؤخذ الغشاء في طبق بتري معقم للفحص.

٥) يحفظ الغشاء في أنابيب ذات غطاء محكم ١٢ x ٧٥ ملم أو أمبولات وتجمد عند —٧٠ °م

جمع غشاء كيس المح Harvesting the Yolk Sac Membrane

١) افتح البيضة كما وصف سابقاً.

٢) مزق الغشاء الكوريوني لتسمح بمدخل إلى غشاء كيس المح.

٣) أمسك غشاء كيس المح بعناية بواسطة ملقاط وارفعه لتفصله من الجنين والأغشية الأخرى. استعمل ملقطاً آخر وتخلص من الصفار وضعه في أنابيب معقمة بغطاء ١٢ x ٧٥ ملم أو أي وعاء آخر.

٤) احفظ كيس المح عند —٧٠ °م.

obeikandl.com

جمع الجنين/أنسجة الطائر أو الأعضاء Harvesting Embryo/Bird Tissues or Organs

قد تكون الأنسجة و/أو الأعضاء من الأجنة المحقونة مصدراً مفيداً للمواد المصابة بالفيروس ويجب أن لا تهمل. بالإضافة إلى ذلك يكون الانتظار حتى تفقس الأجنة المحقونة وعند ذلك تجمع العينات من الطائر حديث الفقس يكون مفيداً أحياناً. يجب أن تجمع الأنسجة والأعضاء من الأجنة والطيور بشكل معقم باستخدام طرق التشريح القياسية وتقيم للاستدلال على إصابة الفيروس بالطرق المناسبة.

تمرير مواد البيض Passage of Egg Material

في معظم الحالات حيث لا يكتشف الفيروس عند التمرير الأول، يتطلب تمريراً إضافياً أعمى. عند استخدام السوائل السقائية كطعم للتمرير يجب طردها مركزياً لمدة ١٠ – ٢٠ دقيقة عند ١٥٠٠ إكس جي وتخفف ١ : ١٠ أو أكثر في مخفف يحتوي على مضادات حيوية قبل الحقن. يجب أن يجهز الغشاء الكوريوني السقائي وكيس المح وأعضاء وأنسجة الجنين كمعلق ١٠٪ في مخفف مضادات حيوية وتطرد مركزياً عند ١٥٠٠ إكس جي لمدة ٢٠ دقيقة قبل الحقن.

المراجع References

1. Cottral, G. E., ed. Manual of standardized methods for veterinary microbiology. Comell University Press, Ithaca, N.Y. pp. 47-52. 1978.
2. Hawkes, R. A. General principles underlying laboratory diagnosis of viral infections. In: Diagnostic procedures for viral, rikettsial and chlamydial infections, 5th ed. E. H. Lennette, and N. J. Schmidt, eds. American Public Health Association, Washington, D.C. pp. 1-48. 1979.
3. Hitchner, S. B. Virus propagation in embryonating eggs. In: Isolation and identification of avian pathogens. S. B. Hitchner, C. H. Domermuth, H. G. Purchase, J. E. Williams, eds. Creative Printing Company, Endwell, N.Y. pp. 120-121. 1980.

obeikandl.com