

الكشف عن مرض التهاب الكبد ذي المشتملات عند دجاج اللحم في سورية

نور علي البراقي* أ.د. محمد فاضل**

(الإيداع: 4 تشرين الأول 2022 ، القبول: 13 كانون الأول 2022)

الملخص:

خلال السنوات القليلة الماضية اشتبه بإصابات مشابهة لمرض التهاب الكبد ذي المشتملات في قطعان دجاج اللحم في الجمهورية العربية السورية والمتسبب بالفيروسات الغدية الطيرية، لذلك بادرنّا في إجراء هذه الدراسة وتم وضع المخطط المناسب لتنفيذها.

تم جمع عينات من 10 مزارع لقطعان دجاج اللحم (تراوحت أعمارها بين 25-40 يوماً) والواقعة في منطقة الساحل السوري ومنطقة ريف مدينة حمص. أخذت تلك العينات من طيور أظهرت أعراضاً عامة مثل الخمول والتجمع وانتفاش الريش وقلة الشهية وعلامات فقر دم واضحة على الأرجل والجلد والأجزاء العارية من الجسم وملاحظة فضلات مخاطية صفراء.

ظهر عند تشريح الطيور في الغالب تورم وتضخم في الكبد واصفراره وعدة بؤر بعضها شاحبة وبعضها حمراء نزفية، كما ظهر تضخم في الكلى وموه في التامور عند بعض الطيور.

أخذت من كبد الطيور المصابة عينات نسيجية وحفظت في الفورمالين بتركيز 10% للكشف النسيجي عن مشتملات نووية ووجدت تلك المشتملات في 26 عينة من أصل 100 عينة.

تم حفظ العينات جميعها في التجميد بدرجة -80م لإجراء الدراسة البيولوجية الجزيئية .

وقد نتج عن اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل PCR وجود جينوم الفيروسات الغدية الطيرية في 11 عينة من أصل 15 عينة.

تعتبر هذه الدراسة هي الأولى في تشخيص وجود الفيروسات الغدية الطيرية في قطعان الدواجن في سورية.

الكلمات المفتاحية: دجاج اللحم – التهاب الكبد ذي المشتملات – الفيروسات الغدية الطيرية – تفاعل البوليميراز المتسلسل.

* طالبة دراسات عليا – دكتوراه – قسم أمراض الحيوان اختصاص أمراض الدواجن – كلية الطب البيطري – جامعة حماه.

**أستاذ أمراض الدواجن – قسم أمراض الحيوان اختصاص أمراض الدواجن – كلية الطب البيطري – جامعة حماه.

Detection of Inclusion Body Hepatitis in Broiler Chickens in Syria

Nour Ali Alburaki*

Mohammad Fadel **

(Received: 4 October 2022, Accepted: 13 December 2022)

Abstract:

Over the past few years, similar cases of Inclusion body hepatitis have been reported in broiler herds in the Syrian Arab Republic which is caused by Avian adenovirus. Therefore, we have conducted this study object after an appropriate research plan was designed. Samples from 10 broiler flocks (25–40 days of age) were collected from the Syrian coast region and the countryside of Homs. The samples were taken from birds that showed general symptoms such as listless, huddling, ruffled feathers, inappetence, signs of anemia in legs, skin and bare areas of feathers, yellow mucoid droppings. Post-mortem examination showed that the liver is often enlarged and has yellowish discoloration and multiple pale or red (haemorrhagic) foci, enlargement of kidneys and hydropericardium was observed in some birds.

Samples of the affected liver were taken and preserved in 10% formalin to detect any Inclusion bodies histologically. Twenty-six samples showed INIBs from the total of 100 samples.

All samples were stored in a -80° C deep freezer for a molecular biological study.

By performing PCR. 11 samples were positive for the presence of FADs from a total of 15 samples.

This study is the first to detect the presence of avian adenoviruses in poultry flocks in Syria.

Keywords: Broiler Chickens – Inclusion Body Hepatitis–Fowl Adenovirus – Polymerase chain reaction.

*Postgraduate student (Doctorate) – Department of Animal Diseases (Poultry Diseases) – Faculty of Veterinary Medicine – Hama University.

**Professor of Poultry Diseases, Department of Animal Diseases, Faculty of Veterinary Medicine– Hama University.

1-المقدمة Introduction

التهاب الكبد ذو المشتملات IBH مرض فيروسي حاد يظهر عموماً عند دجاج اللحم (الفروج) بأعمار صغيرة ويلاحظ غالباً ما بين عمر 3-7 أسابيع، وهذا لا يمنع ظهوره بعمر أقل من أسبوعين وبعد 20 أسبوعاً. تسببه العديد من الأنماط المصلية التي تنتمي للفيروسات الغدية الطيرية (FAdV) [Saif et al., 2003] سببت هذه الفيروسات خسائر اقتصادية فادحة في قطاع الدواجن في أغلب بلدان العالم كالولايات المتحدة الأمريكية والهند وكندا وهنغاريا وكوريا ولبنان وإسبانيا [Schachner 2018] و [Niu 2018] و [Marek 2010].

وتشير بعض الأبحاث إلى أن الأعراض لا تظهر إلا بعد التأخر مع فيروسات أخرى أو حدوث تثبيط مناعي سابق في القطيع [Toro et al., 2000] و [McFarland et al., 2001].

وُجد التهاب الكبد ذو المشتملات IBH في أنواع أخرى من الطيور كالديك الرومي والحمام والإوز والبيغانيات [Swayne et al., 2014].

يتصف المرض بنفوق مفاجئ وتصل ذروته في اليوم الثالث والرابع ويعود لطبيعته في اليوم الخامس والسادس وقد يستمر لأسبوعين أو ثلاثة أسابيع وتتراوح نسبة النفوق عادة بين 5-10% أو أقل [Mc Ferran et al., 2000]، ولكنها قد تصل أحياناً إلى 30-40% [Schachner 2018] ، [Swayne et al., 2014]. تكون نسبة الإصابة Morbidity منخفضة وتكون الطيور جاثية مع انتقاش في الريش [Mc Ferran et al., 2000].

تنتقل الفيروسات الغدية الطيرية عمودياً عبر أجنة البيض، أو أفقياً عبر الزرق ومن خلال الأشخاص ووسائل النقل وغيرها [Saif et al., 2003] وقد وُجد أن هناك أدلة على إمكانية بقاء العدوى كامنة وغير مكتشفة في المزارع الخالية من مسببات المرضية SPF لجيل كامل على الأقل [Fadly et al., 1980].

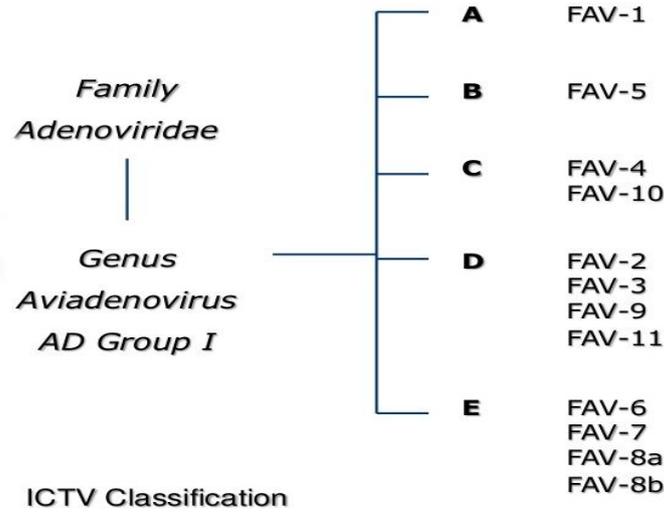
يلاحظ عند الفحص التشريحي أن التغيرات تشمل كل من الكبد والتامور والكليتين.. فيصبح الكبد باهتاً وهش القوام ويتضخم مع ظهور نزف عليه وقد يظهر نزف حبري على العضلات الهيكلية أيضاً.

يرافق المرض أحياناً موه التامور (Hydropericardium) مع ظهور رقع رمادية أو بيضاء على القلب [Saif et al., 2003].

قد تتضخم الكليتان ويشحب لونها وقد يظهر عليها نزف نقطي Petechial haemorrhage ويمتلئ الحالبان بحمض البول ويمكن أن يحدث ضمور الطحال Splenatrophy وجراب فابريشيوس Fabricius ويمكن ملاحظة نقص تنسج في نقي العظام (Aplastic bone marrow) [Saif et al., 2003].

وما يميز مرض التهاب الكبد ذي المشتملات ظهور أجسام احتوائية (مشتملات) INIBs في مقاطع نسيج الكبد خلال الفحص النسيجي حيث تتوضع داخل نوى الخلايا الكبدية [Swayne et al., 2014]. وللمشتملات نوعين؛ الإيوزينية Eosinophilic وهي حمضية التفاعل وتتكون من مواد ليفية حبيبية أما النوع الآخر هي Basophilic قاعدية التفاعل وتتكون من أجزاء من الفيروس [Saif et al., 2003].

تصنّف الفيروسات الغدية الطيرية ضمن الجنس Aviadenovirus والعائلة Adenoviridae وتقسّم إلى 5 أنواع أو مجموعات (من A إلى E) وإلى 12 نمطاً مصلياً [Benko et al., 2000].



الشكل رقم(1): تصنيف الفيروسات الغدية الطيرية حسب اللجنة الدولية لتصنيف الفيروسات ICTV

يبدو أن انخفاض المناعة الناتج عن مرض الجراب المعدي (IBDV) وفقر الدم المعدي عند الدجاج (CAV) أو بعض ذيفانات الفطور تساعد الفيروسات الغدية Adenoviruses لإحداث التهاب الكبد ذي المشتملات IBH [Fadly et al.,1980] و [McFarland et al.,2001]. وبالمقابل وجد بعض الباحثين أن التهاب الكبد ذي المشتملات قد يكون مرضاً أولياً في القطيع دون وجود أمراض أخرى كمرض الجراب المعدي (IBDV) أو فقر الدم (CAV) [Gomis 2006] و [Nakamura 2011]. يمكن تشخيص المرض بالاعتماد على الأعراض التشريحية والتغيرات النسيجية بالكشف عن وجود المشتملات وأيضاً عبر عزل الفيروس وإجراء اختبار "تفاعل البوليميراز المتسلسل" بالاعتماد على الجين "هكسون" [Soumyalekshmi 2014]. كما يمكن استخدام دراسة التسلسلات الجينية والتحليل المعتمد على استخدام التقييد لتنميط عزلات الفيروس [Meulemans et al., 2001].

2-هدف البحث: Purpose of research

يهدف هذا البحث للكشف عن وجود الفيروسات الغدية الطيرية FAdV في قطعان دجاج اللحم والتي تسبب مرض التهاب الكبد ذي المشتملات IBH والمشتبه بانتشاره من خلال الأعراض والآفات التشريحية الملاحظة مؤخراً في قطعان دجاج اللحم في سورية حيث يسبب المرض انخفاض مناعة الطير وظهور تغيرات متفاوتة على الكبد وأعضاء أخرى وبالتالي انخفاض معدل التحويل العلفي مما يؤدي لخسارة اقتصادية فادحة.

3-مواد وطرائق البحث Material and Methods

جمعت العينات من 10 مزارع لتربية دجاج اللحم وذلك من المنطقة الساحلية من سورية وريف مدينة حمص حيث أخذ من كل مزرعة 10 طيور تراوحت أعمارها بين 25 و40 يوماً والتي بدت عليها أعراضاً مرضية مشابهة لأعراض التهاب الكبد ذي المشتملات.

3-1-الصفة التشريحية Postmortem Lesions

بعد وصول الطيور إلى المختبر تم تشريحها وملاحظة الآفات المرضية الظاهرة على كافة الأعضاء المتضررة وأُثبِتَ بذلك طريقة [Brown et al., 2008] وتم تسجيل هذه الآفات ضمن استمارة أُعدت لذلك. أُخذت عينات من الكبد المتضرر ووثِّبَت في الفورمالين ذي التركيز 10% بهدف الفحص النسيجي المرضي Histopathological examination وأُخذت عينات أخرى من الكبد أيضا وتم حفظها في محافظ معقمة بالتجميد في الدرجة -80 درجة مئوية لمتابعة المراحل التالية.

3-2- الفحص النسيجي المرضي Histopathological examination

أُخذ جزء (0.5-1سم³) من كل نسيج من العينات المحفوظة في الفورمالين (تركيز 10%) وأدمج في البرافين لمدة 24 ساعة ثم حضرت المقاطع بسماكة 4 ميكرون وصبغت بصبغة الهيماتوكسيلين والإيوزين حسب طريقة (2008) Kiernan ثم فُحصت مجهريا للكشف عن الأجسام الاحتوائية النووية (المشتملات) INIBs.

3-3- كشف الفيروس باستخدام تفاعل البوليميراز المتسلسل Polymerase chain reaction

تم الكشف عن الفيروسات الغدية الطيرية FAdVs بإجراء تفاعل البوليميراز المتسلسل PCR وذلك من خلال اتباع سلسلة من الخطوات المتتالية بدءا من استخلاص الحمض النووي DNA Extraction من الكبد المصاب حتى قراءة نتائج التفاعل باستخدام الأشعة فوق البنفسجية UV وذلك وفق الخطوات التالية:

أ- استخلاص الحمض النووي DNA Extraction

تم وزن 25 ملغ من العينات الكبدية المشتبهة ثم تم استخلاص الحمض النووي منها باستخدام مجموعة التشخيص التجارية Quick-DNA Miniprep Kit وتسلسلت خطوات العمل بالاعتماد على توصيات الشركة الأمريكية ZYMO Research المصنعة لهذا الكيت.

ب- مجموعة المرئسات Primers

تم الاعتماد على المرئسات التي استخدمها الباحثين [Meulemans et al., 2001] و [Hosseini & Morshed 2012] والتي استهدفت جزء من مورثة الهكسون Hexon المسؤول عن العروة الأولى منه وقد تم الحصول على هذه المرئسات من شركة Invitrogen الأمريكية، والجدول التالي يوضح معلومات المرئسات المستخدمة:

الجدول رقم (1): المرئسات المستخدمة في اختبار الـ PCR

Primers	Sequence (5' to 3')	Position	PCR product (bp)
Hexon A.F	CAARTTCAGRCAGACGGT	144-161	897
Hexon B.R	TAGTGATGMC GSGACATCAT	1041-1021	

ج- تفاعل البوليميراز المتسلسل PCR

تم الاعتماد على أنزيم الـ Taq (Taq DNA Polymerase) المصنع من قبل الشركة الماليزية (Vivantis) لتحضير مزيج تفاعل البوليميراز المتسلسل وفق الجدول التالي:

الجدول رقم(2): مكونات مزيج تفاعل البوليميراز المتسلسل

الكمية	مادة التفاعل وتركيزها
5 µL	DNA
1 µL	P.F (10pmol/ µL)
1 µL	P.R(10pmol/ µL)
1 µL	dnTPs (10mM)
2 µL	Mgcl ₂ (50mM)
5 µL	Buffer (10X)
0.5 µL	Taq (5units/ µL)
34.5 µL	Water

وتم تضخيم الحمض النووي باستخدام جهاز المدور الحراري Thermal cycler الانكليزي الصنع (الاسم التجاري: Techne-512) حيث تمت فيه المراحل التالية:

1-مرحلة تمسخ أولية Initial Denaturation: تمت هذه المرحلة خلال مدة زمنية قدرها 5 دقائق في درجة حرارة 94 مئوية.

2- مرحلة التسخين Denaturation: تمت هذه المرحلة خلال مدة زمنية قدرها 1دقيقة في درجة حرارة 94 مئوية.

3-مرحلة الالتحام Annealing: تمت هذه المرحلة خلال مدة زمنية قدرها 45 ثانية في درجة حرارة 52 مئوية.

4-مرحلة الاستطالة (التمديد) Extension: تمت هذه المرحلة خلال مدة زمنية قدرها 1دقيقة في درجة حرارة 72 مئوية.

5- مرحلة استطالة أخيرة Final Extension: تمت هذه المرحلة خلال مدة زمنية قدرها 7دقائق في درجة حرارة 72 مئوية.

ويوضح الجدول التالي مراحل تضخيم الحمض النووي للفيروس المستهدف (FAdv) وعدد الدورات Cycles لكل مرحلة:

الجدول رقم(3): مراحل تضخيم الحمض النووي في جهاز المدور الحراري.

اسم المرحلة	الحرارة/م	المدة الزمنية	عدد الدورات
1-مرحلة التسخين الأولية	94	5 د	1
2-مرحلة التسخين	94	1 د	40
3-مرحلة الالتحام	52	45 ثا	40
4-مرحلة التمديد	72	1 د	40
5-مرحلة التمديد النهائية	72	7 د	1

بعد تضخيم الحمض النووي تم الكشف عن منتجات التضخيم بواسطة الرحلان الكهربائي في هلام الأغاروز 2% Gel Electrophoresis المضاف له بروميد الإيثيديوم Ethidium bromide ثم تم فحص الهلام باستخدام موثق الهلام (Gel documenter) الأمريكي الصنع (الاسم التجاري: UVIPRO-Platinum) وتعرضها للأشعة فوق البنفسجية UV.

4-النتائج والمناقشة Results and discussion

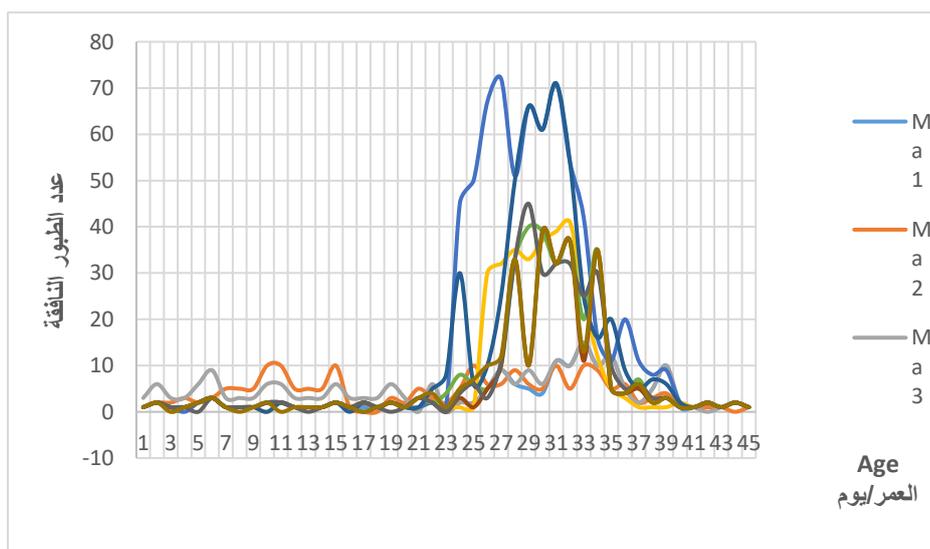
سُجّلت نتائج فحص الطيور (100 عينة من دجاج اللحم) التي أبدت أعراضاً مرضية متوافقة مع أعراض التهاب الكبد ذي المشتملات وفيما يلي جدول يبين معلومات ونسب نفوق قطعان دجاج اللحم التي تمت دراستها في هذا البحث:

الجدول رقم (4): معلومات قطعان دجاج اللحم التي أخذت منها العينات ونسب النفوق

رمز القطيع	عدد الطيور	عمر الطيور/يوم	نسبة النفوق
Ma1	3,000	35	5.03%
Ma2	5,000	25	3.90%
Ma3	5,500	30	3.93%
Maq1	10,000	36	3.36%
Maq2	9,000	40	7.70%
Sf	9,900	30	3.35%
Jab	15,000	35	3.40%
Ts3	3,000	40	9.23%
BH1	17,000	26	1.85%
BH2	5,000	37	5.84%

4-1- نسبة النفوق وعمر الإصابة:

تبين أن الطيور التي أظهرت أعراضاً مطابقة لمرض التهاب الكبد ذي المشتملات IBH تراوحت أعمارها بين 23 و 37 يوم تقريباً وكانت نسبة النفوق تتراوح بين 1.85 و 9.23%. وأكد الباحثون [Elbestawy et al., 2020]



الشكل رقم(2): نموذج عمر الطيور المصابة الداخلة في الدراسة

في دراسة أجريت في مصر أن نسبة النفوق كانت متباينة أيضاً بين 0.4 و 16.6% وكانت أعمار الطيور المختبرة بين 3 و 31 يوم . كما ذكر الباحثان [Barr and Scott, 1998] أن نسبة النفوق متفاوتة بين نسبة منخفضة جداً وحتى 30 % ولوحظت هذه النسبة غالباً عند دجاج اللحم بعمر 3 إلى 5 أسابيع.

4-2-الأعراض العامة:

كانت الأعراض الظاهرة على الطيور اصفراراً بالوجه والمناطق العارية من الريش والأرجل وإجهاداً وانفاساً بالريش مع جثو على الأرض ولوحظ عند بعض الطيور إسهالاً مائياً watery diarrhea أو كان الزرق مخاطياً أصفر اللون ، وقد ذكرت تلك الأعراض في معظم الدراسات السابقة حول مرض التهاب الكبد ذي المشتملات [Saif et al., 2003] و [Swayne et al., 2014].

4-3-نتائج التشريح المرضي:

كانت الأعراض المرضية التشريحية متركزة على الكبد وهذا ما تؤكدته معظم الأبحاث بصدد التهاب الكبد ذي المشتملات [Saif et al, 2003] وبالإضافة للكبد ظهرت تغيرات مرضية على الكلى والتامور وغدة فابريشيوس. بينما لم يلاحظ تغيرات في نقي العظام والعضلات الهيكلية.

تفاوتت التغيرات التي لوحظت على الكبد حيث ظهر الكبد باهت اللون pale ومنتضخ أو مصفر وهش Friable كما ظهرت بؤر نخرية Necrosis أو نزفية على سطحه وهذا يوافق ما ذكره الباحث [Shiyamala et al., 2020]. إن أغلب الأكباد تكون متضخمة حتى ضعفي حجمها الطبيعي وبعضها أظهرت مناطق باهتة جداً ومناطق أخرى طبيعية فظهر الكبد بصورة مخططة وهذا يوافق ما دونه كل من [Swayne et al., 2014] و [Shiyamala et al., 2020].



الشكل رقم (5):

تضخم شديد للكبد مع ظهور مناطق مخططة ونزف تحت المحفظة
دجاج لحم بعمر 30 يوم



الشكل رقم (4):

تضخم الكبد مع ظهور مناطق باهتة ونزف تحت المحفظة
دجاج لحم بعمر 30 يوم



الشكل رقم (3):

تضخم واصفرار الكبد مع مناطق نزفية تحت المحفظة
دجاج لحم بعمر 35 يوم

ظهرت الكلى في العديد من العينات متضخمة ومحتقنة وكذلك امتلأت الأنابيب الكلوية بترسبات لحمض البول Urate وهذا ما وجده كلاً من الباحثين [Utku et al., 2020] و [Swayne et al., 2014]



الشكل رقم (7):

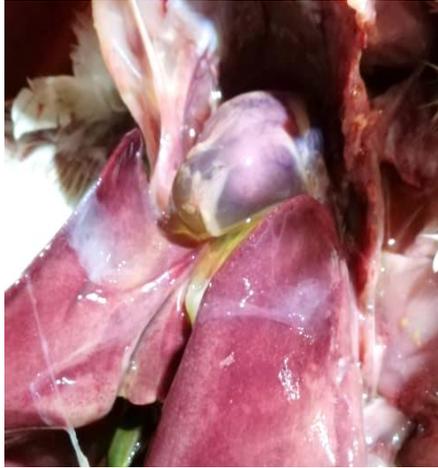
تورم الكلى وترسب حمض البول فيها
دجاج لحم بعمر 35 يوم



الشكل رقم (6):

تورم الكلى وشحوبها مع ترسب حمض البول فيها
دجاج لحم بعمر 35 يوم

كما وظهر موه التامور Hydropericardium في العديد من العينات فتجمعت السوائل حول القلب بنسب متفاوتة بين متوسطة إلى كبيرة نسبياً [Shiyamala et al., 2020] و [Dutta et al., 2017].



الشكل رقم (9):

موه التامور، ارتشاح بسيط لسائل أصفر اللون حول
القلب

دجاج لحم بعمر 35 يوم



الشكل رقم (8):

موه التامور، ارتشاح كبير لسائل أصفر اللون حول
القلب

دجاج لحم بعمر 30 يوم

وقد وجدت في بعض العينات أعراض التهابية في جراب فابريشيوس Bursa of Fabricius كالاختقان والتوذم مع وجود نتحات التهابية متجينة داخله.



الشكل رقم (11):
احتقان وتوذم الأثلام مع نتح التهابي
(دجاج لحم بعمر 37يوم)



الشكل رقم (10):
تجنب داخل الجراب نتيجة النخر
(دجاج لحم بعمر 35يوم)

شوهده أيضاً تضخم في الطحال Enlargement مع احتقان Congestion وبؤر نخرية Necrotic Foci بيضاء في بعض العينات.



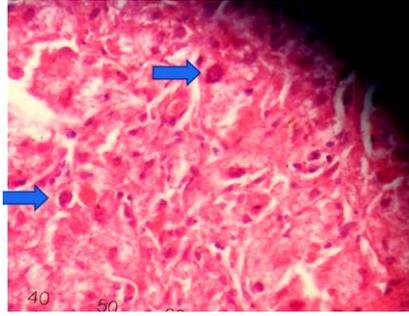
الشكل رقم (13):
تضخم الطحال مع ظهور نقط نخرية
(دجاج لحم بعمر 30يوم)



الشكل رقم (12):
احتقان وتضخم الطحال مع ظهور بؤر نخرية
(دجاج لحم بعمر 26يوم)

4-4- نتائج الكشف عن المشتملات:

بعد فحص المقاطع النسيجية التي أظهرت علامات مرضية واضحة ومميزة لمرض التهاب الكبد ذي المشتملات - ظهرت تحت المجهر الضوئي وبتكبير $\times 100$ أجسام احتوائية (مشتملات) INIBs قاعدية Basophilic في نوى الخلايا الكبدية حيث أوضح الباحثين [Swayne et al., 2014] ظهور هذه المشتملات المميزة للمرض كعلامة مؤكدة لوجود الفيروس في العينة المدروسة.

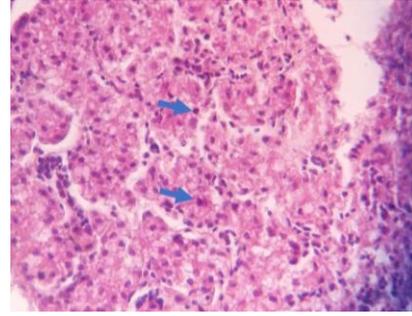


الشكل رقم (15):

مقطع لنسيج الكبد، ظهور المشتملات النووية بتكبير

×400

(دجاج اللحم عمر 35 يوم)



الشكل رقم (14):

مقطع لنسيج الكبد، ظهور المشتملات النووية

بتكبير ×100

(دجاج اللحم عمر 30 يوم)

كانت عدد العينات الإيجابية لظهور المشتملات 26 عينة من مجموع 100 عينة، وعدد العينات المشتبهة 5 عينات وعدد العينات السلبية 69 عينة. يوضح الجدول التالي بيانات العينات التي أظهرت وجودا للمشتملات في الفحص النسيجي للكبد:

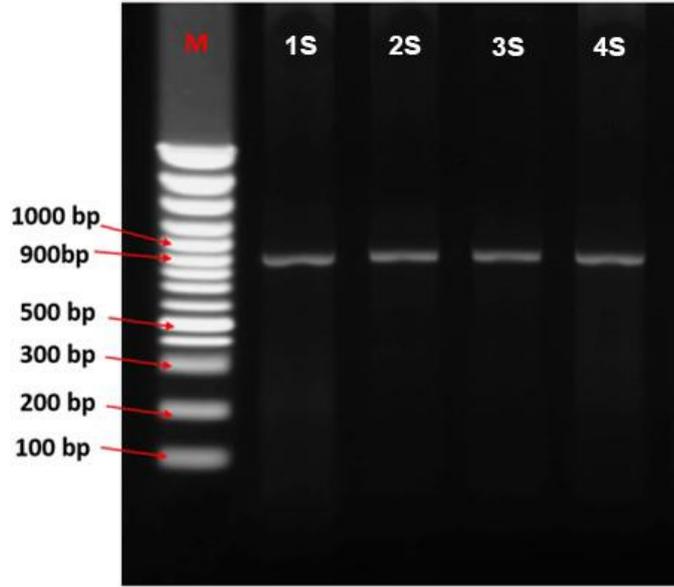
الجدول رقم (5): نتائج ظهور المشتملات في النسيج الكبدية

رقم القطيع	رمز القطيع	عدد العينات	المشتملات	المشتبهة	السلبية
1	Ma1	10	3	0	7
2	Ma2	10	5	0	5
3	Ma3	10	4	0	6
4	Maq1	10	3	0	7
5	Maq2	10	2	1	7
7	Sf	10	3	0	7
6	Jab	10	1	1	8
8	Ts3	10	5	1	4
9	BH1	10	0	2	8
10	BH2	10	0	0	10
المجموع		100	26	5	69

4-5- نتائج اختبار الـ PCR والرحلان الكهربائي في هلام الأغاروز Agarose Gel Electrophoresis:

تم انتقاء 15 عينة لاختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل، وتقصيها أن 11 عينة منها تم انتقاؤها من العينات التي أظهرت مشتملات واضحة، و 2 عينة كانت مشتبهة لوجود مشتملات، و 2 عينة كانت سلبية لوجود المشتملات.

وبعد تحليل نتائج التضخيم عبر الرحلان الكهربائي في هلام الأغاروز (Agarose Gel Electrophoresis) ظهرت الأحجام الجزيئية لشدة (Fragments) الحمض النووي لـ 11 عينة من أصل 15 عينة في مسافة قريبة من 897 زوج أساس (Base Pairs) مما دل على وجود الحمض النووي للفيروسات الغدية الطيرية في 11 عينة أي نسبة 73%، بينما كانت 4 عينات سلبية. وتوضح الصورة التالية وصول شدة الحمض النووي إلى مسافة قريبة جدا من 900bp وذلك بتحليل نتائج التضخيم للحمض النووي لأربع عينات إيجابية لوجود المشتملات في الفحص النسيجي للكبد.



الشكل رقم (16): تحليل نتائج تفاعل الـ PCR لأربع عينات عشوائية بإجراء الرحلان الكهربائي في هلام الأغاروز

ويوضح الجدول التالي نتائج اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل حسب القطعان المدروسة:

الجدول رقم (6): نتائج اختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل

نتيجة الـ PCR	الخاضعة للـ PCR	الإيجابية للمشتملات	عدد العينات	رمز القطيع	رقم القطيع
(+)	1	3	10	Ma1	1
(+)	2	5	10	Ma2	2
(+)	2	4	10	Ma3	3
(+)	1	3	10	Maq1	4
(+)	1	2	10	Maq2	5
(+)	1	3	10	Sf	7
(+)	1	1	10	Jab	6
(+)	2	5	10	Ts3	8
(-)	2	2مشتبهة	10	BH1	9
(-)	2	0	10	BH2	10
11	15	82	100	10	المجموع

تبين حسب نتائج تفاعل البوليميراز المتسلسل وجود نتيجة ايجابية للـ PCR مقابل كل عينة حاوية على مشتملات بالفحص النسيجي وهذا ما ذكره الباحثين [Boulianne et al., 2013] فوجود المشتملات في النسيج الكبدي يعطي مؤشر مؤكد لوجود جينوم فيروس الـ FAdV.

إن العينتين اللتين اشتبهنا بوجود مشتملات فيهما تبين بعد إخضاعهما لاختبار الـ PCR أنهما سلبيتان لوجود جينوم الفيروس وبالتالي لا يمكن الجزم بالاصابة بالفيروس لمجرد الاشتباه نسيجياً بوجود المشتملات، بل يجب إخضاع العينة لاختبار الـ PCR حتماً.

وبالمقابل وحسب الدراسة هذه، تبين أن عدم وجود المشتملات في نسيج الكبد بعد الفحص الدقيق تحت المجهر يعطي مؤشر مؤكّد لعدم وجود جينوم الفيروس في العينة بعد اجراء اختبار الـ PCR.

5-الاستنتاجات Conclusions

1-إن الطيور الحاملة للفيروسات الغدية الطيرية والتي أظهرت أعراضاً واضحة لمرض التهاب الكبد ذي المشتملات IBH تراوحت أعمارها بين 23 إلى 37 يوم.

2-تباينت نسب النفوق في القطعان المدروسة بين 1.85% و 9.23%.

3-تم إثبات وجود الفيروسات الغدية الطيرية نسيجياً في العينات المدروسة بملاحظة المشتملات INIBs في نسيج الكبد ووجودها بنسبة 26% من الطيور المختبرة.

4-تم إثبات وجود الفيروسات الغدية الطيرية في العينات المدروسة باختبار تفاعل البوليميراز المتسلسل PCR بنسبة 73.3% من الطيور المختبرة.

6-التوصيات Recommendations

1-هناك حاجة إلى مزيد من الدراسات في حالات الاصابة بالتهاب الكبد ذي المشتملات IBH باعتباره مرض يؤدي لخفض مناعة الطيور وكذلك قد تصاب الطيور به عند ضعف مناعتها نتيجة وجود أمراض أخرى في القطيع وبالتالي التأثير سلباً على صناعة الدواجن.

2-يجب اتخاذ الخطوات اللازمة للسيطرة على المرض ويمكن أن يتم ذلك من خلال الإدارة السليمة جنباً إلى جنب مع برنامج التحصين.

3-ضرورة العمل على تحديد أنماط الفيروسات الغدية الطيرية في سورية ووضع خطة للعمل على إنتاج لقاح ذاتي المنشأ.

4- العمل على دراسة إمراضية الأنماط المعزولة من قطعان دجاج اللحم في سورية.

7-المراجع References

1. Ahmed R. Elbestawy, Mahmoud Ibrahim, Haitham Hammam, Ahmed Elsayed Noreldin, Amanallah El Bahrawy, Hany F. Ellakany.2020; Molecular Characterization of Fowl Adenovirus D Species in Broiler Chickens with Inclusion Body Hepatitis in Egypt, Alexandria Journal of Veterinary Sciences AJVS. Vol. 64 (1): 110–117 Jan. 2020
2. Barr, D. A., Scott, P. 1998; Adenoviruses and IBH. Proceedings of 2nd Asian/Pacific Poultry Health Conference [Proc 112]. Post Graduate Communication Veterinary Science, University of Sydney, Australia: 323–326.
3. Benko M, Harrach B, Russel WC. Family Adenoviridae. In: van Regenmortel MHV et al, editors. Virus Taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses: Academic Press, San Diego; 2000. pp. 227–238.

4. Boulianne, M. L. Brash. B. R. Charlton. S. H. Fitz-Coy. R. M.Fulton. R. J. Julian. M.W. Jackwood. D. Ojkic. L.J.Newman. J. E. Sander. H. L. Shivaprasad. E. Wallner-Pendleton. P. R. Woolcock. 2013; Avian Disease Manual 7th ed. American Association of Avian Pathologists. <https://www.aaap.info/avian-disease-manual-past-edition->.
5. Brown C, Rech R, Rissi D, Costa T, Department of Pathology, University of Georgia, Athens, Georgia poultry necropsy manual The Basics 2008.
6. Dutta B., Pankaj Deka, SM Gogoi, M Sarmah, MK Bora and DC Pathak 2017; Pathology of inclusion body hepatitis Hydropericardium syndrome (IBH-HPS) in broiler chicken. International Journal of Chemical Studies 2017; 5(3): 458-461.
7. Fadly, A.M., B.J. Riegele, K. Nazerian, and E.A. Stephens. 1980. Some observations on an adenovirus isolated from specific Pathogen free chickens. Poult Sci. 59:21-7.
8. Gomis S. A. Goodhope. A.Ojkic. P.Willson. 2006; Inclusion body hepatitis as a primary disease in broilers in Saskatchewan, Canada. Avian Dis. 2006 Dec;50(4):550-5.
9. Swayne D.E. M Boulianne, C.M. Logue, L.R. McDougald, V. Nair & D.L. Suarez 2014; Aviadenovirus infections, Diseases of poultry 14th ed. (pp. 328-329).
10. Hosseini H and Morshed R. 2012; Molecular Identification of Fowl Adenovirus Associated with Inclusion Body Hepatitis in Iran. Iranian Journal of Virology, Volume 6, Number 4, 2012. P.7-12.
11. Kiernan, J.A. (2008); Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice. pp.103-131. Bloxham, UK.
12. Maged Gomaa HEMIDA and Mohamed Al-HAMMADI., 2017; Prevalence and molecular characteristics of fowl adenovirus serotype 4 in eastern Saudi Arabia. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences P:506-513.
13. Marek A., Günes A., Schulz E., Hess M.: Classification of fowl adenoviruses by use of phylogenetic analysis and high-resolution melting-curve analysis of the hexon L1 gene region. J Virol Methods 2010, 170, 147-154.
14. McFarland M.D. P.R. Woolcock, and Shivaprasad H.L., 2001. Group I avian adenovirus and avian adeno-associated virus in turkey poults with inclusion body hepatitis. Avian Pathol. 30(6):661-6.
15. McFerran JB, Smyth JA. Avian adenoviruses. Rev.—Off. Int. Epizoot. 2000; 589-601. pmid:10935281

16. Meulemans, G., Boschmans, M., Van den Berg, T., Decaesstecker, M., 2001; Polymerase chain reaction combined with restriction enzyme analysis for detection and differentiation of fowl adenoviruses. *Avian Pathology* 30, 655–660.
17. Nakamura K, M Mase, Y Yamamoto, K Takizawa, M Kabeya, T Wakuda, M Matsuda, T Chikuba, Y Yamamoto, T Ohyama, K Takahashi, N Sato, N Akiyama, H Honma, K Imai. 2011; Inclusion body hepatitis caused by fowl adenovirus in broiler chickens in Japan, 2009–2010. *Avian Dis.* 2011 Dec;55(4):719–23.
18. Niu Y., Sun Q., Zhang G., Sun W., Liu X., Xiao Y., Liu S.: Epidemiological investigation of outbreaks of fowl adenovirus infections in commercial chickens in China. *Transbound Emerg Dis* 2018, 65, 121–126.
19. Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AM, McDougald L Ret al, *Diseases of poultry*, 11th Ed. Ames: Iowa State Press. 2003; pp. 214–227.
20. Schachner A., Matos M., Grafl B., Hess M.: Fowl adenovirus–induced diseases and strategies for their control – a review on the current global situation. *Avian Pathol* 2018, 47, 111–12
21. Shiyamala S, Mote Chandrashekhar S, Jadhav SN, Kadam AS and Kamdi BP .2020; Pathological investigation into outbreak of inclusion body hepatitis from poultry flocks. *Journal of Entomology and Zoology Studies*.P:170–174.
22. Soumyalekshmi S, Ajith MK, Meshram C. Isolation of fowl adenovirus in chicken embryo liver cell culture and its detection by hexon gene–based PCR. *Indian Journal of Scientific Research and Technology*. 2014; 2(3): 33–36
23. Toro, H., Gonzalez, C., Cerda, L., Hess, M., Reyes, E. and Geisse, C. (2000). Chicken anemia virus and fowl adenovirus 363668es: association to induce the inclusion body hepatitis/ hydropericardium syndrome. *Avian diseases*. 51–58.
24. Utku Yusuf Cizmecigil, Sajid Umar, Aysun Yilmaz, Erhan Bayraktar, Nuri Turan, Besim Tali, Ozge Aydin, Hasan Emre Tali, Mehmetcan Yaramanoglu, Semaha Gul Yilmaz, Ahmet Kolukisa, Jean–Remy Sadeyen, Munir Iqbal, Huseyin Yilmaz, 2020: Characterisation of fowl adenovirus (FAdV–8b) strain concerning the geographic analysis and pathological lesions associated with inclusion body hepatitis in broiler flocks in Turkey . *J Vet Res* 64, 231–237, 2020.