

## نسبة انتشار الفايروس الغدي البقري النمط ٣ باستخدام اختبار التآلق المناعي المباشر في عجل محافظة نينوى

عبد الحكيم عامر شيت<sup>١</sup> و صفوان يوسف البارودي<sup>٢</sup>

<sup>١</sup> طالب ماجستير، <sup>٢</sup> فرع الأحياء المجهرية، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل، الموصل، العراق

(الاستلام ٢ شباط ٢٠١٩، القبول ١ نيسان ٢٠١٩)

### الخلاصة

تم جمع مئتي عينة لمسحات أنفية من ٢٠٠ حيوان وبأعمار وبمناشئ مختلفة، وذلك بهدف التقصي عن مستضدات الفايروس الغدي البقري النمط ٣ وتحديد نسبة الانتشار وعلاقتها بالعمر والعلامات السريرية، باستخدام اختبار التآلق المناعي المباشر. بينت نتائج الكشف عن المستضد الفيروسي أن نسبة الانتشار الكلية في عجل محافظة نينوى كانت ٤٤%، فيما سجلت الحيوانات التي بلغت أعمارها ٦-٩ أشهر أعلى نسبة انتشار مقارنة ببقية الفئات العمرية وبفروقات معنوية واضحة، في حين سجلت العجل المستوردة أعلى نسبة إصابة ٥٠,٣% مقارنة بالمحلية منها ٢٢,٢%، فيما سجلت الحيوانات التي تعاني من علامات سريرية تنفسية أعلى من السليمة ظاهرياً. تستنتج من خلال هذه الدراسة ان للفايروس الغدي البقري النمط-٣- تأثيراً على تربية العجل في محافظة نينوى.

## Prevalence of the bovine adenovirus type 3 by using direct fluorescent antibody technique in calves in Nineveh province

A.A. Sheet<sup>1</sup> and S.Y. Albaroodi<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> MSc students, <sup>2</sup> Department of Microbiology, College of Veterinary Medicine, University of Mosul, Mosul, Iraq

\* Email: Safwanalbaroodi@yahoo.com

### Abstract

A total of 200 samples were collected from the calves for different ages from local and exotic breed by using nasal swabs, to investigate the prevalence of the bovine adenoviruses. The results showed that about 44% of the examined calves gave positive to immunofluorescence test, and the calves aged 6-9 months showed highly significant prevalence compare with other ages. The prevalence of virus infection in the exotic breed was 50.3% compared with local breed 22.2%. The calves with respiratory affections showed a higher prevalence from those which seem to be healthy. The current study concluded that the bovine adenovirus-type 3-virus has an effect on the breeding of calves in Nineveh Governorate.

**Keywords:** Bovine Adenovirus Type 3, Direct Fluorescent Antibody, Nineveh province

Available online at <http://www.vetmedmosul.com>, © 2020, College of Veterinary Medicine, University of Mosul.

This is an open access article under the CC BY 4.0 license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

nonenveloped (٣) متعدد الأوجه icosahedral (٤) يحيط بالجزء الداخلي المؤلف من لب، وهذا اللب يحتوي على الدنا (٥) مضاعف السلسلة خيطي الشكل Double Stranded DNA DS (٦)، يحاط الدنا بالمحفظة Capsid التي تتكون في الفايروسات الغدية من ١٣% حمض النووي لأوكسجين (DNA) وبروتين بنسبة ٨٧% (٧).

### المقدمة

تصنف الفايروسات الغدية البقرية النمط ٣ ضمن الجنس Mastadenoviruse (١) والذي يعود إلى عائلة الفايروسات الغدية Adenoviridae (٢) وبالاعتماد على الخواص العامة والتركيب المورثي وخواص النمو فضلاً عن دراسة شكل الفايروس باستخدام المجهر الإلكتروني تبين أن الفايروس غير مغلف

تمثلت، بإفرازات أنفية متباينة الشدة والنوع في حين كان العدد المتبقي سليماً ظاهرياً.

### جمع المسحات من الأنف

تم جمع المسحات (من الأنف للحيوانات التي استخدمت في الدراسة) ووضعت في أنابيب معقمة أعدت لهذا الغرض ومن ثم أضيف لكل مسحة ٢ مل من محلول داري الفوسفات المتعادل ومن ثم نقلت الى أنابيب زجاجية أخرى معقمة وضعت هذه الأنابيب في جهاز النذب المركزي المبرد ٦٠٠٠ دورة / دقيقة وبدرجة حرارة ٤ درجة مئوية ولمدة ساعة وبواقع ٤ مرات متتالية لكل عينة إذ أهمل الراشح وأضيف للراسب داري فوسفات المتعادل بواقع ٠,٥ مل ومن ثم رجت الأنبوبة لإذابة الراسب بعد ذلك تم نقل هذا السائل الى أنابيب إندروف معقمة وحفظت في - ٣٠ درجة مئوية (١٣).

### الكشف عن المستضد الفيروسي في المسحات الأنفية باستخدام اختبار التآلق المناعي المباشر إجراء الاختبار

تم أخذ ٥٠ مايكروليتر من العينة والمأخوذ من مسحات الأنف ووضع على شريحة زجاجية وترك في درجة حرارة ٢٥ درجة مئوية الى أن يجف ومن ثم تم تثبيتها وذلك بغمرها في الأسيتون المطلق بدرجة -٢٠ درجة مئوية ليلة كاملة ثم أخرجت الشريحة من الأسيتون وتركت لتجف ومن ثم تم إضافة ١٠٠ مايكروليتر من الأجسام المضادة أحادية النسلة والمعلمة بالفلورسين والمتخصصة لفايروس الغدي البقري النمط ٣ (Bio-X 3 (Diagnostics, Belgium بتركيز ١-٢٠ وحضنت الشريحة لمدة ساعة واحدة في وسط رطب بدرجة حرارة ٢٥ مئوية. غسل الشريحة باستخدام داري الفوسفات المتعادل مدة ١٠ دقائق ومن ثم جففت الشريحة وتم بعد ذلك وضع مادة الكليسرين على الشريحة ومن ثم وضع غطاء شريحة عليها. فحصت الشريحة باستخدام المجهر المتآلق (Optica, Italy) في الظلام لملاحظة التآلق لمعرفة العينات الموجبة والعينات السالبة (١٦).

### التحليل الإحصائي

تم تحليل النتائج إحصائياً باستخدام مربع كاي وباستخدام برنامج الاحصائي SPSS version 19.

### النتائج

#### نتائج الفحص المستضدي للحمة الغدية البقرية النمط ٣ في المسحات الأنفية باستخدام اختبار التآلق المناعي المباشر

بينت نتائج الفحص المستضد الفيروسي باستخدام اختبار التآلق المناعي المباشر الذي يظهر بشكل تآلق مناعي (الأشكال ١-٣) للمسحات الأنفية أن نسبة الإصابة الكلية ٤٤%، إذ سجلت أعلى نسبة إصابة للفئة العمرية ٦-٩ أشهر وبلغت ٧٧,٧%

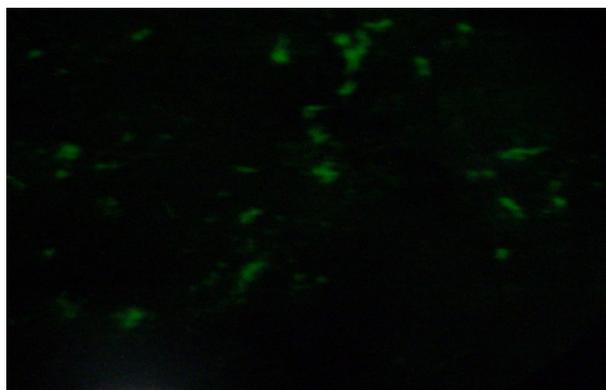
تم عزل الفايروسات الغدية البقرية من النمط ٣ لأول مرة من أبقار سليمة في إنكلترا، وبعد ذلك تم عزلها من الماشية التي تظهر عليها علامات سريرية مصاحبة إما بأمراض معوية او امراض الجهاز التنفسي أو الاثنين معاً، في حين تؤدي الإصابات الثانوية بالمسببات الأخرى إلى التهاب الجهاز التنفسي المتوسط أو الشديد وتعتمد شدة (أو العلامات) السريرية للإصابة بالفايروسات الغدية البقرية النمط ٣ على عوامل عديدة مثل ضراوة العتر المسببة للمرض، وعوامل مقاومة الجسم للإصابة، وعمر الحيوان، وجرعة الفايروس، وطريقة دخول الفايروس ووجود إصابات ثانوية (٨). تعد الإصابة تحت السريرية من أكثر أطوار المرض شيوعاً، وتبين أن لبعض عتر الفايروس الغدية البقرية النمط ٣ قدرة محدودة على إحداث وظهور العلامات السريرية ولذلك صنفت هذه العتر كعتر منخفضة الضراوة، إن الأعراض السريرية المميزة للإصابة بالفايروس تظهر في الإصابة الأولية بالفايروسات ولا سيما عند العجول الرضيعة في البلدان التي يستوطن فيها المرض (٩) إذ تبلغ فترة حضانة الفايروس ٢٤-٧٢ ساعة ويتميز بارتفاع طفيف في درجة الحرارة (١٠).

يعد الفايروس الغدي البقري النمط ٣ من إحدى المعوقات التي تؤثر على الثروة الحيوانية في الكثير من بلدان العالم ولهذا السبب جرى الاهتمام بطرق تشخيصه المختلفة لغرض الحصول على تشخيص سريع ودقيق وحساس للكشف عنه، وبإحداث إصابات تجريبية بالفايروس نتج عنها إصابات تنفسية تحت سريرية أو متوسطة مع إنتاج الأجسام المضادة المعادلة، إذ من الصعب تشخيص العدوى الطبيعية بسبب المتلازمات التي ترتبط مع العديد من الأعراض (١١). إن الالتهاب الرئوي المترافق معه الإصابات المعوية مرتبطة مع الحمة الغدية البقرية ويجب تمييزها عن الالتهاب الرئوي المرتبط مع فايروس الإسهال البقري وفايروس السنشيشيا التنفسي البقري، والبارا إنفلونزا parainfluenza، إذ يمكن اكتشافه بواسطة طرق مختلفة اعتماداً على التشخيص المختبري منها عزل الفايروس عن طريق الزرع في الخلايا واختبار المتمز المناعي المرتبط بالإنزيم وتفاعل سلسلة البوليمير متعدد السلاسل وغيرها من الاختبارات التشخيصية الأخرى (١٢)، ونظراً لعدم وجود دراسات مسبقاً تعنى بالكشف عن الفايروس في العجول في محافظة نينوى، لذلك تم اقتراح هذه الدراسة للكشف عن المستضد الحمي باستخدام تقنية التآلق المناعي المباشر.

### المواد وطرائق العمل

#### حيوانات الدراسة

تم بهذه الدراسة فحص ٢٠٠ مسحة أنفية أخذت من عجول تراوحت أعمارها من ٦ أشهر الى سنتين ومن مناطق مختلفة من محافظة نينوى كان البعض منه يعاني من علامات سريرية



الشكل ٣: صورة مجهرية توضح النتيجة السلبية لاختبار التآلق المناعي المباشر (السيطرة السالبة)،  $\times 400$ .

يتبين عند إيجاد العلاقة بين نسبة الإصابة ومصدر العجول باستخدام اختبار التآلق المناعي المباشر للكشف عن المستضد الفيروسي في المسحات الأنفية أن أعلى نسبة إصابة كانت في العجول المستوردة (السلالات الأجنبية) وبزيادة معنوية عن السلالات المحلية منها (جدول ٢).

الجدول ٢: يبين علاقة نسبة الإصابة بفايروس الغدي البقري النمط ٣ بمنشأ العجول باستخدام اختبار التآلق المناعي المباشر

المنشأ	عدد الحيوانات المفحوصة	عدد الحيوانات الموجبة (%)
محلي	٤٥	١٠ (٢٢,٢%) a
مستورد	١٥٥	٧٨ (٥٠%) b

الحروف المختلفة تعني هنالك اختلاف معنوي ( $P < 0.05$ ).

أظهرت نتائج الفحص السريري للحيوانات التي استخدمت في الدراسة ان نسبة الإصابة في الحيوانات التي أظهرت علامات تنفسية متمثلة بافرزات انفية متفاوتة الشدة والنوع  $44,4\%$  في حين بلغت نسبة الإصابة في الحيوانات السليمة ظاهريا  $42,1\%$  باستخدام اختبار التآلق المناعي المباشر (جدول ٣).

الجدول ٣: علاقة نسبة الإصابة بفايروس الغدي البقري النمط ٣ باستخدام اختبار التآلق المناعي المباشر

المنشأ	عدد الحيوانات المفحوصة	عدد الحيوانات الموجبة (%)
إفرزات أنفية	١٦٢	٧٢ (٤٤,٤%) a
سليمة ظاهريا	٣٨	١٦ (٤٢,١%) a
المجموع	٢٠٠	٨٨ (٤٤%)

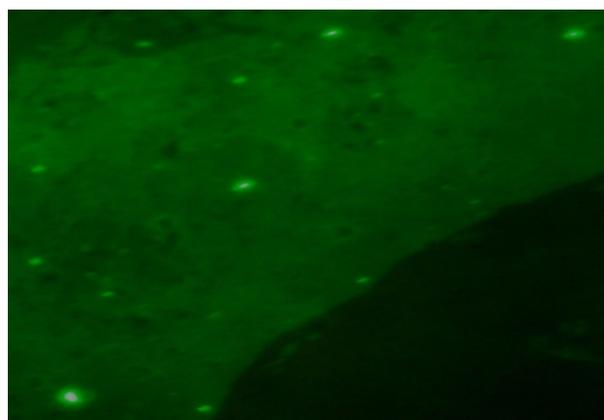
الحروف المختلفة تعني هنالك اختلاف معنوي ( $P < 0.05$ ).

وكانت هنالك زيادة معنوية مقارنة ببقية المجاميع وتناقصت النسبة بتقدم العمر (الجدول ١).

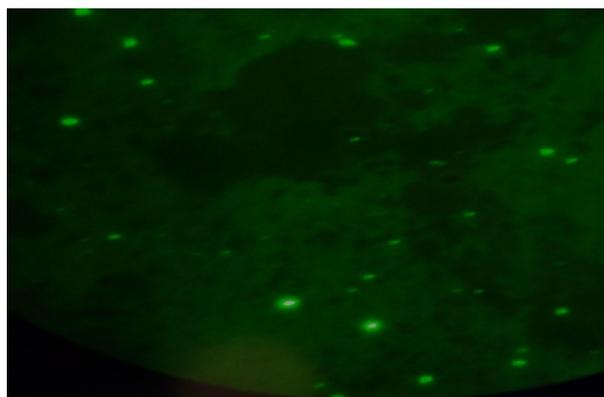
جدول ١: يبين نسبة الإصابة بالفايروسات الغدية البقرية النمط ٣ وعلاقتها بالفئات العمرية باستخدام اختبار التآلق المناعي المباشر

الأعمار	عدد الحيوانات المفحوصة	عدد الحيوانات الموجبة (%)
٦-٩ أشهر	٤٥	٣٥ (٧٧,٧٧%) a
من ١٠ أشهر - سنة	٧١	٢٦ (٣٦,٦%) b
من ١ - ١,٥ سنة	٦٣	٢٠ (٣١,٧%) b
من ١,٥ - ٢ سنة	٢١	٧ (٣٣,٣%) b
المجموع	٢٠٠	٨٨ (٤٤%)

الحروف المختلفة تعني هنالك اختلاف معنوي ( $P < 0.05$ ).



الشكل ١: صورة مجهرية توضح النتيجة الإيجابية لاختبار التآلق المناعي المباشر لأحدى العينات من المسحات الأنفية،  $\times 400$ .



الشكل ٢: صورة مجهرية توضح النتيجة الإيجابية لاختبار التآلق المناعي المباشر (السيطرة الموجبة)،  $\times 400$ .

## المناقشة

الحيوانات باصابات تحت سريرية وهذا موافق لما ذكره (٢٣) إذ ذكر ان معظم الاصابات بالفايروس تكون تحت سريرية.

## الاستنتاجات

نستنتج من خلال هذه الدراسة ان نسبة انتشار الفايروس الغدي البقري النمط ٣- في العجول المستوردة كانت مرتفعة مقارنة بالمحلية منها، فضلا عن ارتفاع نسبة الاصابة في العجول التي تعاني من مشاكل تنفسية مقارنة بالسليمة الظاهرية منها.

## شكر وتقدير

الشكر والتقدير الى عمادة كلية الطب البيطري وفرع الأحياء المجهرية لما أبدته من مساعدات وتسهيلات من اجل إنجاز هذا البحث.

## المصادر

1. Zhu Y, Yu Z, Cai H, Gao Y R, Dong X M, Lili Z, Shi H F, Meng Q F, Lu C, Xue F. Isolation identification and complete genome sequence of a bovine adenovirus type 3 from cattle in China. *Virol J.* 2011;8(557):1-8. doi: 10.1186/1743-422X-8-557
2. Elgadi M. Molecular cloning and restriction endonuclease analysis of bovine adenovirus type 3 [MSc thesis]. Ontario: Brock University; 1993. p.20-23. DOI: 10.1159/000150272
3. Gaba A. Role of polypeptide pVIII In bovine adenovirus (BAV)-3 lifecycle [PhD dissertation]. Saskatchewan: University of Saskatchewan; 2016. p.40-49. <http://hdl.handle.net/10388/7553>
4. Russell WC. Adenoviruses: Update on structure and function. *J Gene Virol.* 2009;90:1-20. doi: 10.1099/vir.0.003087-0.
5. Imperiale MJ. The amphipathic helix of adenovirus capsid protein VI contributes to penton release and postentry sorting. *Am Soci Microbiol J Virol.* 2014;92:1-23. doi: 10.1128/JVI.02257-14
6. Marco B, Palma SD, Joost CL, Moyer VS, Reddy RN, Albert JR. Adenovirus composition proteolysis and disassembly studied by in depth qualitative and quantitative proteomics. *J Biol Chem.* 2014;289:11421-11430 doi: 10.1074/jbc.M113.537498..
7. Whipple MJ. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the serologic diagnosis of bovine adenovirus Type 3 [MSc thesis]. Oregon: College of Veterinary Medicine; 1992. p. 11-14. [https://ir.library.oregonstate.edu/concern/graduate\\_thesis\\_or\\_dissertations/8c97kt95c](https://ir.library.oregonstate.edu/concern/graduate_thesis_or_dissertations/8c97kt95c)
8. Mittal SK, Tikoo SK, Donkersgoed JV, Beskorwayne T, Godson DL, Babiuk LA. Experimental inoculation of heifers with bovine adenovirus type 3. *Can J Vet Res.* 1999;63:153-156. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1189536/>
9. Paterson CP. Molecular characterization of 52k protein of bovine adenovirus type 3 [PhD dissertation]. Saskatchewan: University of Saskatchewan; 2010. p.78-79. <http://hdl.handle.net/10388/etd-08252010-105314>
10. Narita M, Yamada M, Tsuboi T, Kawashima K. Immunohistopathology of calf pneumonia induced by endobronchial inoculation with bovine adenovirus 3. *Vet Pathol.* 2002;39:565-571. <https://doi.org/10.1354/vp.39-5-565>
11. Anand SK. Role of mitochondria during bovine adenovirus 3 [PhD dissertation]. Saskatchewan: University of Saskatchewan; 2011. p.12. <http://hdl.handle.net/10388/ETD-2011-11-283>
12. Ahmet A k, and Kale M. Detecting the effect of Umckaloabo /Eps 7630 liquid extract after its therapeutic purposed usage in calves showing

تعد الاصابات التنفسية في الابقار والتي تنجم عن مسببات الفايروسية من اكثر المشاكل التي تواجه سلسلة الإنتاج في المجترات الكبيرة، وتؤدي عوامل كثيرة دورا اساسيا في تطور هذه الاصابات منها الاجهاد الناجم عن النقل او العوامل المسببة لتثبيط الجهاز المناعي (١٤)، ومن ابرز مسببات الفايروسية وأكثرها شيوعا فايروس الاديونو البقري النمط ٣ فايروس السنشيشيا التنفسية البقرية، وفايروس الباربا - إنفلونزا النمط ٣ وفايروس الحلني البقري النمط-١، وتعد حمة الاديونو البقري النمط ٣ من أكثر أنواع الفايروسات أهمية في هذه الإصابات إذ تحتل المرتبة الأولى أو الثانية أهمية في العديد من دول العالم (١٥).

استخدم في هذه الدراسة اختبار التآلق المناعي المباشر للكشف عن المستضد الفيروسي في المسحات الأنفية، إذ أن هذا الاختبار واسع الاستخدام على مستوى الاختبار التشخيصية الفايروسية لما يتمتع به من رخص الثمن، دقة النتائج وحساسيته العالية وسرعة اعطاء النتائج (١٦). بينت نتائج هذا الاختبار أن مجمل الإصابة الكلية في حيوانات الدراسة ٤٤% إذ كانت بأعلى مستويات لها في الحيوانات صغيرة العمر ٦-٩ أشهر وبزيادة معنوية عن باقي المجاميع وهذا يتطابق مع ما ذكره Nada (١٦) إذ بين أن اختبار التآلق المناعي المباشر أكثر دقة وحساسية من اختبار الممنتر المناعي المرتبط بالأنزيم من النوع المباشر وبفارق ١٢ عينة. أظهرت نتائج اختبار التآلق المناعي المباشر أن نسبة الإصابة في العجول المستوردة كانت اعلى من المحلية منها وبزيادة معنوية، وهذه النتائج تختلف عن ما ذكره Afshar (١٧) إذ ذكره في دراسته ان نسبة الإصابة في الأبقار المحلية ٩,٣٠% في حين سجل نسبة إصابة في الأبقار المستوردة ٢٠% من خلال دراسة مسحية قام بها في ايران، ويعود سبب هذا الاختلاف والتباين لاسباب عديدة منها الاختلاف في منشأ الحيوانات المستوردة، ونظام تطبيق الحجر الصحي على الحيوانات المستوردة، وضراوة العتر المسببة للإصابة، فضلا عن الاختلاف في زمن إجراء الدراسات فضلا عن ذلك فان العجول المستوردة الواردة الى العراق الذي كان منشأها من دول غير خالية من هذا الفايروس مثل إيران، تركيا، المملكة السعودية العربية وفي سوريا (١٨-٢١).

واظهرت النتائج ان نسبة الاصابة في الحيوانات التي تعاني من اعراض تنفسية كانت أعلى من السليمة ظاهريا، وهذه النتيجة توافق لما ذكره (٢٢) إذ سجل نسبة اصابة مرتفعة للمسحات الانفية للعجول المصابة باعراض تنفسية باستخدام اختبار التآلق المناعي المباشر للكشف عن المستضد الفيروسي وقد فسر الباحثون انفي الذكر لما لدور الفايروس الغدي البقري النمط ٣ لإحداث الإصابات التنفسية فضلا عن ان تلك العجول كانت تعاني من أعراض تنفسية وهي تمثل المرحلة الحادة من الإصابة بالمرض، وتشير نسبة الإصابة في الحيوانات السليمة الى اصابة

18. Sakhaee E, Khalili M, Kazeminia S. Serological study of bovine viral respiratory diseases in dairy herds in Kerman province Iran. Iranian J Vet Res. 2009;10(1):49-53. 10.22099/IJVR.2009.1089
19. Kale M, Ozturk D, Hasircioglu S, Pehlivanoglu F, Turutoglu H. Some viral and bacterial respiratory tract infections of dairy cattle during the summer season. Acta Vet. 2013;63(2-3):2227-236. DOI:10.2298/AVB1303227K
20. Al-Hammadi MA, Hemida MG. Sero-Prevalence of common bovine respiratory viral diseases in Saudi Arabia. Med J. 2014;60(140):76-81. doi:10.5455
21. Giangaspero M, Vacirca GV, Anopdenbosch E, Blondeel H. Epidemiological survey on viruses' diseases of cattle in north Syria. Trop Tura. 1992;10(2):55-57. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=BE9400202>
22. Nada EM, Intisar KS, Selma BE, Ali YH. Epidemiology of cattle respiratory infection in Gezira State, Sudan: Serological evidence of adenovirus 3 infection. IJAVMS. 2015;9:289-299. <https://pdfs.semanticscholar.org/c5ed/f7a4fb2319a5b688ebbd6d47f5570cda48a4.pdf>
23. Debey BM, Lehmkuhl HD, Chard C, Bergstrom L, Hobbs A. Ovine adenovirus serotype 7 associated mortality in lambs in the United States. Vet Pathol. 2011;38:644-648. doi.org/10.1354/vp.38-6-644.
- symptoms of respiratory tract infection. Acta Scand Vet. 2017;45:1-8. DOI: 10.22456/1679-9216.80475
13. Rai A. Laboratory manual of cell culture and animal virology. Indian Vet Res Inst. 2008;1:8-12. <http://ivri.nic.in/division/ah/biotech/ScientistDetails.aspx?ID=161>
14. Ceribasi AO, Ozkaraca M, Ceribasi S, Ozer H. Histopathologic immunoperoxidase and immunofluorescent examinations on natural cattle pneumonia originated from parainfluenza type3, respiratory syncytial virus, adenovirus type 3 and herpesvirus type 1. Revue Med Vet. 2014;165:201-212. <http://wwwi.vef.hr/vetarhiv/papers/2016-86-1-2.pdf>.
15. Roshtkhari F, Mohammadi G, Mayameei A. Serological evaluation of relationship between viral pathogens (BHV-1, BVDV, BRSV, PI-3V, and Adeno3) and dairy calf pneumonia by indirect ELISA. Trop Anim Health Prod. 2012;41(3): 1105-1110. DOI: 10.1007/s11250-011-0046-4
16. Intisar K S, Ali Y H, Khalafalla A I, Taha K M, Mahasin E. Adenovirus type -3infection in camels in Sudan. Afr. J. microbial. Res, 2010.4 (13): 1356-1358 <https://academicjournals.org/journal/AJMR/article-full-text-pdf/5BF8F0913729>.
17. Afshar A. The occurrence of precipitating antibodies to bovine adenoviruses in sera of farm animals and man in Iran. Vet Rec. 1969;84:571-572. DOI: 10.1136/vr.84.23.571