جامعة الموصل

كلية الطب البيطري

دراسة مصلية وجزيئية ومرضية لمرض شمالنبرغ الفيروسي في الضأن في محافظة نينوى، العراق

فهد ياسين طه الصالح

رسالة ماجستير

الطب البيطري/ التشخيصات المرضية البيطرية

بإشراف

الأستاذ المساعد الدكتور

عمر خزعل سلو الحنكاوي

ربيع الأول/١٤٤٤هـ

تشرين الأول/٢٠٢٢م

الخلاصة

تعد هذه الدراسة الأولى التي أجريت في محافظة نينوى للتحري عن وجود الأجسام المضادة لفيروس شمالنبرغ في مصول الضأن وتشخيصهُ جزيئياً مع وصف التشوهات الخلقية والآفات المرضية المجهرية في بعض أعضاء الأجنة المجهضة المصابة بالفيروس والتي تشمل جذع الدماغ والحبل الشوكي والقلب والرئة والكبد والطحال.

أُستخدمت إستمارة خاصة لجمع المعلومات عن قطعان تربية الضأن أثناء جمع العينات. حيث تضمنت الدراسة (٦٧) من إناث الضأن التي مضى على إجهاضها اكثر من (١٠) أيام و(٢٥) من الذكور. سحبت عينات الدم من الوريد الوداجي ونقلت الى أنابيب تحتوي على الهلام وفصلت المصول ونقلت الى أنابيب إبيندروف وحفظت عند درجـــــة -٢٠م° لحين اجراء اختبار الاليزا التنافسي. كما تم جمع (١٥) جنيناً مجهضاً تراوحت أعمارهم تقريبا بين (٦٠-١٣٥) يوماً خلال المدّة الممتدة من أيلول ٢٠٢١م الى نهاية كانون الثاني ٢٠٢٢م ومن مناطق مختلفة في محافظة نينوى. أجريت الصفة التشريحية على الأجنة المجهضة وأخذت عينات من جذع الدماغ والحبل الشوكي والطحال والكبد والرئة وسوائل البطن وحفظت عند درجة -٢٠م° لغرض التشخيص الجزيئي. كما تم أخذ مقاطع نسيجية من جذع الدماغ والحبل الشوكي والقلب والرئة والكبد والطحال ووضعت في علب بلاستيكية حاوية على الفورمالين المتعادل لغرض التقطيع النسيجي وملاحظة الآفات المرضية المجهرية. أُستخدم لغرض التشخيص المصلي عدة إختبار الإليزا التنافسي، كما أُستعملت العدّة الجاهزة لإستخلاص الحمض النووي الريبي من العينات التي جمعت من الأجنة المجهضة. أجري النسخ العكسي للحمض النووي الريبي المستخلص الى الحمض النووي الريبي منقوص الأكسجين المتمم. بعد ذلك أستخدمت أربعة أزواج من البادئات لتضخيم الجين S خلال تفاعل البلمرة المتسلسل-النسخ العكسي. أجريت التمريرات والتقطيع النسيجي الروتيني للعينات، ثم صبغت المقاطع النسيجية بإستعمال ملون الهاريس هيماتوكسلين والأيوسين.

بينت النتائج بأنّ النسبة الكلية لوجود أضداد فيروس شمالنبرغ في الضأن كانت (٧٩.٣٥٪)، وتراوحت بين (٥٧,١٤٪) إلى (٨٦,٢٪) للمناطق التي شملتها الدراسة. حيث سُجِّلت أعلى نسبة (٨٦,٢٪) في قضاء تلكيف الذي شمل مركز القضاء وناحية وانة ومنطقة تلسقف، في حين سُجِّلت أقل نسبة (٥٧,١٤٪) في قضاء الحمدانية الذي شمل مركز القضاء وناحية النمرود وناحية برطلة، في حين توسط قضاء الموصل الذي شمل

مركز القضاء وناحية بعشيقة وناحية بادوش هاتين النسبتين بنسبة إصابة بلغت (٧٥٪) مع وجود فروقات معنوية بين المناطق عند مستوى معنوية ($p \leq ٠,٠٥$). كما لوحظ فرق معنوي بين النسبة المئوية لتواجد الأضداد في الإناث والتي كانت الأعلى (٨٥,٠٧٪) بالمقارنة مع الذكور (٦٤٪). كما سُجِّلت الإصابة من النوع الشديد أعلى نسبة بلغت (٥٥,٤٣٪) بالمقارنة مع النوعين الأخريين المتوسط والخفيف واللَتانِ بلغتا (١٨,٤٧٪) و(٥,٤٣٪) على التوالي.

بينت نتائج التشخيص الجزيئي بأن عدد العينات الكلية الموجبة بلغت (١١) وبنسبة (٢٣,٤٪) لزوج البادئات (S1)، في حين لم تُظهِر البادئات الأُخرى نتائج إيجابية. حيث أظهرت عينات جذع الدماغ أعلى نسبة (٣٧,٥٪) بتفاعل البلمرة المتسلسل- النسخ العكسي تلتها عينات الحبل الشوكي والكبد والرئة والطحال وسوائل البطن وبنسب بلغت (٣٣,٣٣٪) و(١٦,٦٦٪) و(١٤,٢٨٪) و(٢٠٪) و(١٤,٢٨٪) على التوالي. إذ إنّ نواتج التضخيم الخاصة بالجين S للعينات الموجبة كانت بحجم (٤٧٤) زوجاً قاعدياً بالمقارنة مع السيطرة السالبة بعد ترحيل نواتج التضخيم في هلام الأكاروز بتركيز (١,٥٪).

أظهرت ثلاثة حملان مجهضة تشوهات خلقية متفاوتة بين الإعوجاج المفصلي الخلقي المتعدد للأطراف الأمامية والخلفية فضلا عن قصر الفك السفلي بالمقارنة مع العلوي. كما لوحظ أيضا تشوهات خلقية في العمود الفقري متمثلاً بالحداب والقعس والصعر والجنف، فضلا عن تسطح القفص الصدري وصغر تجويف الصدر. وأظهرت الأجنة أيضاً تشوهات في الجهاز العصبي المركزي متمثلاً بإنعدام الدماغ ونقص تنسج المخ والمخيخ وموه وتَنَخْرُبُ الدِّماغ.

أوضحت الآفات المرضية المجهرية لجذع الدماغ عن تجمع الخلايا اللمفية والدباقية وتنكس الخلايا العصبية وتنخرها مع وجود وذمة وإحتقان حول الأوعية الدموية. كما لوحظ تجمع الخلايا الدبقية حول الخلايا العصبية ومحاورها مع وجود الأجسام الإشتمالية القاعدية داخل الأنوية وتَفجّي المادة العصبية. كما أظهرت آفات الحبل الشوكي تجمع للخلايا اللمفية والدباقية وتنكس الخلايا العصبية وتنخرها والوذمة حول الأوعية الدموية مع وجود نزف وتنكس ليفيني في جدار الوعاء الدموي مع تثخنهِ، ووجود الأجسام الإشتمالية القاعدية داخل الأنوية وتنخر الخلايا العصبية الحركية وتفجّي المادة العصبية. لوحظ ايضاً آفات مرضية في الكبد متمثلة بالتنخر التجلطي وتنكس الخلايا الكبدية وتجمع طفيف للخلايا الالتهابية واحتقان الجيبانيات. في حين كشفت نتائج الآفات المرضية للطحال عن تنخر وفقدان الخلايا اللمفية باللب الأبيض والتنكس الليفيني للشرينات الغمدية وتنكس الخلايا

الظهارية باللب الأحمر. أظهرت الآفات المرضية للقلب تنكس وتنخر الخلايا العضلية القلبية وضمورها والوذمة بين الالياف العضلية القلبية وتجمع الخلايا الالتهابية. أما في الرئة فقد لوحظ وجود النضحة المصلية الليفينية وارتشاح الخلايا الالتهابية في الأسناخ وتنخر الخلايا المبطنة للقصيبات.

استنتج من هذه الدراسة بأنَّ فيروس شمالنبرغ منتشر في محافظة نينوى بين قطعان الضأن وبنسبة عالية مع ارتفاع نسبة تواجدهِ في النعاج المجهضة مقارنة مع الذكور وبصفة إصابة شديدة. إن جذع الدماغ والحبل الشوكي من أكثر الأعضاء مناسبة للتشخيص الجزيئي لفيروس شمالنبرغ في أجنة الضأن المجهضة. كما تعد تشوهات الجهاز العضلي الهيكلي والجهاز العصبي من ابرز التشوهات التي تم مشاهدتها في الأجنة المجهضة مع ملاحظة آفات مرضية مجهرية لخلايا جذع الدماغ والحبل الشوكي والقلب والرئة والكبد والطحال الناجمة عن الإصابة بالفيروس.

University of Mosul

College of Veterinary Medicine

Serological, Molecular and Pathological Study of Schmallenberg Viral Disease in Sheep in Nineveh province, Iraq

Fahad Yaseen Taha Alsalih

MS.C. / Thesis
Veterinary Medicine / Veterinary Clinical Pathology

Supervised by
Assistant Professor
Dr. Omer Khazaal Sallou Alhankawe

2022 A.C. **1444 A.H.**

Abstract

This is the first study conducted in Nineveh Province to investigate the presence of Schmallenberg virus antibodies in sheep sera and molecularly diagnose it with a description of congenital malformations and microscopic pathological lesions in some organs of aborted fetuses infected with the virus, which include the brain stem, spinal cord, heart, lung, liver and spleen.

During sample collection, data about sheep herds were recorded using a customized form .A total of (67) aborted females more than ten days ago and (25) males were used in this study. Blood samples were drawn from the jugular vein and transferred to gel tubes, the serum was separated, transferred to Eppendorf tubes, and kept at -20°C until the ELISA test. Additionally, (15) aborted fetuses, with ages ranged between (60-135) days, were collected from various locations throughout Nineveh Province between September 2021 and the end of January 2022. Aborted fetuses were autopsied, and samples from brain stem, spinal cord, spleen, liver, lung, and abdominal fluids were collected and stored at -20°C for molecular analysis. Additionally, tissue samples from the brain stem, spinal cord, spleen, liver, lung and heart were collected in plastic containers with neutralized formalin for the purpose of tissue cutting and observation of microscopic pathological lesions. A competitive ELISA kit was used for serological diagnosis, and the ready-made kit was used to extract RNA from samples collected from aborted fetuses. In order to create complementary deoxyribonucleic acid, reverse transcription of the extracted RNA to complementary deoxyribonucleic acid was performed. Then four pairs of primers were used to amplify the S gene during the reverse transcription polymerase chain reaction. The samples were passed

and routine histological cutting was carried out, then the tissue sections were stained using Harris hematoxylin and eosin stains.

The results showed that the total percentage of the presence of Schmalenberg virus antibodies in sheep was (79.35%), and ranged from (57.14%) to (86.2%) for the areas studied. Where the highest percentage of (86.2%) was recorded in the Tel Kaif district, which included the district center, Wana sub-district and the town of Talskof, while the lowest percentage was recorded of (57,14%) in the Hamdaniya district, which included the district center, Nimrod district and Bartella district, Whereas, the Mosul district, which included the district center, Bashiqa district, and Badush district, mediated these two percentages, with significant differences between regions at a significant level ($p \leq o.o5$). There was also a significant difference in the percentage of females who had antibodies, which was higher (85.07%) than the percentage of males (64%). The severe type of infection was recorded the highest (55,43%), compared to the other two types, moderate and mild, which were (18.47%) and (5.43%), respectively.

Molecular examination revealed a total of (11) positive samples, with the proportion for the primer pair (S1) being (23.4%), other primers were negative. The highest RT-PCR rate was observed in brain stem samples (37,5%), followed by spinal cord, liver, lung, spleen, and abdominal fluid samples with percentage of (33,33%), (16,66%), (14,28%), (20%), and (14,28%), respectively. Furthermore, the S gene amplification products of the positive samples were (474) base pairs in size as compared to the negative control in agarose gel at a concentration of (1.5%).

Three aborted lambs had various congenital deformities, including varying degrees of arthrogryposis multiplex congenital of the front and hind limbs and shortness of the lower jaw relative to the upper one. In addition, flattening of the rib cage and a tiny chest cavity were seen, as

well as congenital spinal deformities such as kyphosis, lordosis, torticollis, and scoliosis. The fetuses also showed anomalies of the central nervous system, including hydranencephaly, hydrocephaly, cerebral and cerebellar hypoplasia, and porencephaly.

Microscopic lesions of brain stem showed lymphocyte and glial aggregates, neuronal degeneration and necrosis, edema, and perivascular congestion. Additionally, basal inclusion bodies were seen inside the nuclei of the neurons as well as the striations of the neuronal material, which indicated that glial cells had congregated around the neurons and their axons. The spinal cord lesions characterized by accumulation of lymphocytes and glial cells, neuronal degeneration and necrosis, edema around the blood vessels, hemorrhage, fibrotic degeneration of the vessel wall and thickening, basal inclusion bodies within the nuclei, necrosis of motor neurons, and edema of nerve substance. Pathological lesions of the liver were also observed, represented by coagulative necrosis, vacuolar degeneration of hepatocytes, infiltration of inflammatory cells and congestion of sinusoids. Whereas, the results of pathological lesions of the spleen revealed necrosis and loss of the lymphocytes in the white pulp, fibrinoid necrosis of ellipsoidal sheath and degeneration of epithelial cells in the red pulp. The pathological lesions of the heart showed necrosis and degeneration of myocardial muscles cells with atrophy and edema and infiltration of inflammatory cells. In the lung, the presence of pneumonia with serofibrinous exudate and inflammatory cells infiltration in the alveoli and necrosis of epithelial cells of bronchioles were observed.

It was concluded from this study that Schmallenberg virus is widely spread in the Nineveh povince among sheep herds, with a high rate of presence in aborted ewes compared to males, and with a severe infection. The brain stem and spinal cord are the most suitable organs for molecular

diagnosis of Schmallenberg virus in aborted sheep. Abnormalities of the musculoskeletal system and nervous system are the most common lesions that can be seen in aborted fetuses, with the observation of pathological microscopic lesions of the cells of the brain stem, spinal cord, heart, lung, liver and spleen caused by infection with the virus.