فيروسات المايكوبلازما ودورها في امراضية المايكوبلازما في الدواجن

اريج عباس مجيد
قسم الثروة الحيوانية – كلية الزراعة – جامعة بغداد

المستخلص

تعتبر فيروسات المايكوبلازما كائنات دقيقة متخصصة باصابة خلايا عتر المايكوبلازما مثل Mycoplasmatales virus و Mycoplasmatales 1 (MV-L1) laidlawii virus ، (MV-LG51) Laidlawii goat 51 وغيرها . ان هذه الفيروسات تكون السبب في زيادة ضراوتها لاحتواء المايكوبلازما على شفرات لهذه الفايروسات في مادتها الوراثية. ان فايروسات المايكوبلازما لها القابلية على تكوين بقع على خلايا المايكوبلازما . تم اكتشاف الكثير من فايروسات المايكوبلازما خلال الخمسين عام الماضية فهذه الفيروسات تزيد من ضراوة المايكوبلازما ومسببات الامراض حيث تساعد مسببات الامراض الفايروسية مثل فايروس مرض نيوكاسيل New castle Disease virus ، فيروس مرض التهاب القصبات المعدي Infectious Bronchitis disease virus وفيروس التهاب الحنجرة والرغامي المعدي Infectious Lryngeo-trachitits disease virus لتظهر باعراض شديدة. ان هذه الفيروسات قد تنضم لفيروسات المايكوبلازما لتصيب خلايا المايكوبلازما وتنشط وتطور شفرات المادة الوراثية للمايكوبلازما وتزيد من ضراوتها. وتعتبر متخصصة باصابة خلايا المايكوبلازما حتى انها تتخصص باصابة نوع دون الاخر من المايكوبلازما حتى اثبتت الدراسات امكانية احتواء خلية المايكوبلازما الواحدة اكثر من نوع واحد من الفايروسات . ان هذه الكائنات تكمن خطورتها في انها تلعب دوراً كبيراً في اصابة قطيع الدجاج بالمايكوبلازما ، وذلك من خلال زيادة هذه الفايروسات لضراوة عتر المايكوبلازما وبالرغم من اختلاف الباحثون على تسمية خلية المايكوبلازما عند اكتشافها فقد اتفقوا على انها تحتاج لظروف معقدة اكثر عند استزراعها ، كما استطاع الباحثون تشخيص فيروسات المايكوبلازما بين عامي ١٩٦٨–١٩٦٧. ان دراسة وتشخيص هذه الفايروسات ومعرفة الكيفية التي تصيب بها خلايا المايكوبلازما وكذلك دراسة امكانية اصابة خلية المايكوبلازما بفايروسات اخرى مثل فايروس مرض نيوكاسل (NDV) وفيروس مرض التهاب القصبات المعدي (IBV) وفيروس التهاب الحنجرة والرغامي المعدي (ILTV) وفيروس مرض ميرك (MDV) وفيروس التهاب جراب فابريشيا (IBDV) قد يحصل هذا التداخل بين هذه الفايروسات وفايروسات المايكوبلازما ليساعد على تخليق اجيال جديدة من عتر المايكوبلازما العالية الضراوة فتكون خطرة ليس فقط على الطيور الداجنة وانما على جميع الكائنات الحية بما فيها الانسان والحيوان. ان العالم يشهد الان اصابة الانسان بفايروسات كان اغلب الظن انه قد تخلص منها لكنها عادت بصورة اقوى مما كانت عليه منذ زمن طويل. وهذا ينطبق على جميع الفايروسات التي تصيب الانسان والحيوان على حد سواء. ان هذه المقالة ستوضح كيف يزيد الفايروس ضراوة عتر المايكوبلازما ومعرفة فرصة تقليل او منع تخليق مثل هكذا تداخل غريب بين مسببات الامراض لتتآزر ويزيد احدها ضراوة الاخر كالمايكوبلازما وفايروساتها.

The Iraqi Journal of Agricultural Sciences 42 (3): ٩٩-١١٣,2011 Majeed

MYCOPLASMA VIRUSES AND THEIR ROLE IN THE PATHOGENECITY OF AVIAN MYCOPLASMOSIS

Areej Abbas Majeed
Animal Res. Dept. College of Agric. Univ. of Baghdad

ABSTRACT

Mycoplasma viruses return to family Plasmaviridae , and they are small organisms which infect the mycoplasma cells and increase their virulence for containing specialized code in their genetic material. These viruses could characterize by their ability to form plaques on mycoplasma cells or on the host cell that had been mycoplasma isolated from it. Many viruses had been discovered over 50 years ago. If mycoplasma viruses term which is known now , change to include more other known viruses like Newcastle disease viruses (NDV) , infectious laryngeo trachitis viruses (ILTV) and infectious bronchitis viruses (IBV) and play a role by increase mycoplasma virulence in some way then show their signs in sever cases. These viruses activated and developed inside the mycoplasma cell to increase its virulence which specifically infect mycoplasma cells or they could infect a strain not another one of mycoplasma . Scientists mentioned that a specific mycoplasma cells may contain two kinds of mycoplasma viruses which they have microparacitical activity. Mycoplasma virulence which infect poultry fields. Later a lot of scientists had called these mycoplasma viruses in different callers and isolated in different diagnostic methods , since it had been discovered. Its obviously that all scientists agreed that mycoplasma cell needs more complicated conditions than any other bacteria when cultured. had been investigated mycoplasma viruses between 1967-1968. All studies now are going to explain the diagnosis of mycoplasma viruses , and how they could infect mycoplasma cells , and they increase their virulence of mycoplasma cells which may infecting by another species of viruses like Newcastle disease virus (NDV) , Infectious bronchitis disease virus (IBV) , Infectious laryangeo – trachitis disease virus (ILTV) , Marek's disease viruses (MDV) and avian infectious bursa disease viruses (IBDV) . Interfere between these viruses above with mycoplasma cells or any live cells may gives us new mycoplasma viruses generations , which it could be dangerous not for poultry only , but also to human and all other animals . Just like what happened in the world today like disease which infect human , when we had thought destroyed them and they disappeared but later will had backed stronger and that fit all viruses which infect human and animal. So our article try to explain how these viruses increase mycoplasma virulence , and if we could decrease or preventing such interfere between mycoplasma and viruses which increase their virulence in result.

المقدمة

ان فيروسات المايكوبلازما هي كل ما يصيب بدائية النواة ذاتية التكاثر رقيقة الجلد Mollicutes ومنها المايكوبلازما . وقد وصفها Minion (٣٠) انها اصغر جينوم Genomae معروف واكد ذلك Razin و Hayflek (٣٤) بوصفها The smallest living microorganisms . تعود المايكوبلازما الى رتبة رقيقة الجلد mollicutes ، حيث ذكر Razin و Richard (٣٣) احتواء شعبة رقيقة الجلد على اكثر من ٢٠٠ صنفاً وجميعها تفتقد الى الجدار الخلوي وحجمها يتراوح مابين ٠.٢ – ٠.٣ مايكروميتر . واضاف Donald (١٠) ان المايكوبلازما تمثل القسم الاكبر من شعبة رقيقة الجلد ، وتعد المايكوبلازما جسيمات اكبر من الفايروسات واصغر من البكتريا . ذكر Roltan (٣٦) انه تم اكتشاف ما يقرب من ١٩٠ جنس ونوع من المايكوبلازما ، وتظهر تحت المجهر باشكال مختلفة فبعضها كروي يتراوح قطرها بين ٣٠٠–٨٠٠ نانوميتر والاخر خيطي يتراوح قطره ١٠٠–٣٠٠ نانوميتر. ذكر James (١٩) ان المايكوبلازما لها القدرة على غزو الخلايا الحيوانية الحية Eukaryotic cells بواسطة ميكانيكية منظمة لتضمن بقائها داخل الخلية ولا تتأثر بالادوية بسبب قدرتها على التطفل داخل الخلايا الحية Intracellular parasitism وتستطيع مقاومة مناعة المضيف. ذكر Voelker واخرون (٤٠) ان المايكوبلازما تتباين في اشكالها بسبب عدم احتوائها على جدار خلوي وانما تحتوي على غشاء سايتوبلازمي فقط. كما ذكر May (٢٩) ان رقيقات الجلد ذات شكل عصوي Bullet shape وتفتقر الجدار الخلوي ، في حين ليس بالضرورة ان تكون كل رقيقات الجلد عصوية الشكل . وذلك لان فقدان الجدار الخلوي صفة تشمل كل رقيقات الجلد. ذكر عبدالعزيز والعطار (٣) عدم تأثر المايكوبلازما بالمضادات الحياتية كالبنسلين بسبب احتوائها على جدار خلوي لكنها تتأثر بانواع اخرى كالتتراسايكلين والارثرومايسين. اضاف Claverie (٨) ان اكثر انواع المايكوبلازما لا تمتلك شفرة جينية موحدة قريبة لتكون جسيمات طفيلية منها الى بكتريا حقيقية. وذكر James (١٩) انها كانت تدعى (Pleuro Pnemonia Like Orgasimes) PPLO . ان المايكوبلازما ماهي الا جسيمات لاهوائية في النمو Anaerobic growth وكان يعتقد في القديم انها تعد كائنات تشبه مسبب مرض ذات الجنب وذات الرئة (Pleuro Pnemonia) ، وحتى صنفها البعض انها نوع من الطفيليات او الحشرات الى ان تم تشخيصها وسميت بالمايكوبلازما كما ذكره Emanuel واخرون (١٤) وعزلها Drasil واخرون (١٢) من مريض مصاب بالتهاب المفاصل الروماتيزمي التفصصي العام Rheumatoid Arthritis Systemic Lupus وذكر Gourlay واخرون (١٧) ان تسميتها جاءت من شكلها الخيطي الشبيه بالفطريات الذي وصف Fungi-like structure وعدم احتوائها على الجدار الخلوي مثل خلايا البلازما – Plasma like structure فاطلق عليها بعد دمجهما Mycoplasma . عزلت اول عينة من الابقار في المفاصل والرئة وكانت تعاني من حالة التهاب الرئة الجنبي Pleuropnemonia عام ١٨٩٨ . وعزلت في الانسان لاول مرة عام ١٩٣٢ من جرح ملوث . كما ذكر Gourlay واخرون (١٧) ان اول ربط بين المايكوبلازما والامراض كان عام ١٩٣٩ في المدرسة الطبية Medical school من قبل الاطباء Swift و Brown ١٩٥٠. اما Razin و Hermmann (٣٥) فقد ذكرا ان المايكوبلازما هي كلمة اغريقية الاصل Mykes (Fungus) فطريات و Formed (Plasma) . اول من اطلق الاسم على المايكوبلازما هو A. B. Frank عام ١٨٨٩ لها خصائص شبيهة بالفطريات Fungus like characteristics –. وذكر Tomezyk و

Bltcharz (٣٩) وان عمليات تثبيط المايكوبلازما قد اجريت لمعرفة مدى انتشار المايكوبلازما على مستوى العالم حيث قام Assancao (٧) بأخذه طائر منتشر في اميركا واوروبا واسيا فاخذ ٥٠ طائراً اجريت عليها اختبارات الاصابة ببعض امراض الدواجن فتبين ان ٤٩ طائر مصاب بالمايكوبلازمامرافقة لاصابتها ٢٢ منها سالمونيلا و ND3 (مرض نيوكاسل).

ماهية فيروسات المايكوبلازما

صنف الباحثان Maniloff (٢٨) و Gourlay (١٦) فايروسات المايكوبلازما انها تعود لعائلة Plasmaviridae (البلاعم متعددة الاشكال) تحوي في مادتها الوراثية سلسلة كروية مزدوجة تزن 8×10^6 (وحدة قياس اوزان السلاسل الوراثية) مع محفظة دهنية التركيب بقطر يتراوح بين ٥٠-١٢٥ نانوميتر لها لب دقيق وكثيف ثابت الشكل نوعاً ما. يتكون الفايروس بالتبرعم budding في خلايا المايكوبلازما المصابة بالفايروس. وتكون محفظته مكونة من معقد بروتيني نووي ويكون اللب معتم ، لكن التقطيع الدقيق adepuate dissection يظهر اللب شفافاً . كما ذكر Gopalkrishna واخرون (١٥) انها ناتج عن فعاليات البكتريا G+ve لكن الدراسات المناعية القديمة والحديثة اثبتت انها اكثر قرباً في مجمل خصائصها مع الجراثيم G + ve . ذكر Worrall (٤١) ان اكثر عمليات تثبيط المايكوبلازما تكون باستخدام ٠.٥% من Triton X-100 او ٠.٥% من Sodium deoxycholate .

اكتشاف فايروسات المايكوبلازما

ذكر Gourly (١٧) ان فايروسات المايكوبلازما كائنات صغيرة تصيب بعض انواع المايكوبلازما مثل Mycoplasma arthitidis و *Acholeplasma laidlawii* . وسجل Gourlay (١٦) اكتشافه فايروسات المايكوبلازما ١٩٦٠ . وثم تشخيصها خلال الفترة ١٩٦٧-١٩٦٨ عند لاحظها في بعض عتر المايكوبلازما التي تصيب الانسان. وقام بتقديم اول دليل فعلي على وجود فايروسات المايكوبلازما عندما عزلها من جراثيم *Acholeplasma laidlawii* حيث اطلق Gourlay (١٦) على اول فايروس يصيب المايكوبلازما (MV-L1) وهو (Mycoplasmatales viruses – Laidlawii 1) حيث استخدم عترة *A. laidlawii* كعترة كاشفة لعزل فايروسات المايكوبلازما . وذكرت الحسن (١) انها جنس من اجناس الـ *Acholeplasma* ، وبصورة عامة تنمو اجناس المايكوبلازما نمواً سريعاً وتعكر المرق الزرعي broth وتستغرق نموها ٤٨ ساعة ولها عترتان PG8 و B50P ، تكون سريعتا النمو في ظروف الزرع المباشرة وغير المباشرة . وجميع عترها تكون البقع على العترة الكاشفة وعلى المضيف الذي عزلت منه وفيروساتها تختلف عن تلك التي تصيب المايكوبلازما . توصل Emanuel واخرون (١٤) الى قدرة هذه الفيروسات على تكوين بقع. عمل الكثير من الباحثين خلال الخمسين عام الماضية لعزل وتوصيف فايروسات المايكوبلازما فعلى سبيل المثال من بعض المصادر لا الحصر. توصل Juliana واخرون (٢٠) الى توصيف MV-L1 بأنه فايروس عصوي غير مغلف Unenveloped ومادته الوراثية متكونة من حامض نووي رايبي لا اوكسجيني DNA . واشار Das (٩) اكتشاف MV-L51 وهو كروي صغير لا يحتوي على جدار خلوي ويطلق عليه Virion – naked bullet طوله يتراوح بين ١٣-١٦ نانوميتر تم عزله من *Acholeplasma laidlawii* . وفي نفس العام اكتشف Maniloff (٢٦) نمط جديد من نفس العترة الكاشفة *A. laidlawii* فايروس يصيب عترة اخرى من المايكوبلازما تصيب الماعز اطلق عليه (MV-G51) ليس له القابلية على تكوين بقع على المضيف المعزول منه. واكتشف Gourlay (١٦) (MV-G51) ليس له القابلية على تكوين بقع على المضيف المعزول منه. واكتشف Gourlay (١٦) (MV-L2)

فايروس مغلف كروي الشكل والمادة الوراثية للفايروس يتكون من DNA فقط. حتى اكتشف Gourlay (١٦) لاحقاً MV-L3 له شكل مختلف عن كل من MV-L1 و MV-L2 له رأس متعدد السطوح polyhedron وذنب قصير ومادته الوراثية متكونة من DNA ، حتى اكتشف Liss و Cole (٢٢) امكانية تكوين هذا الفايروس البقع على العترة الكاشفة وليس على المضيف الذي عزلت منه. واكتشف Gourlay (١٦) (MV-L4) الذي عزله من *A. laidlawii* واثبت قدرته على تكوين البقع على العترة الكاشفة. حصل اول عزل لفايروسات المايكوبلازما من جنس المايكوبلازما عام ١٩٨٠ من قبل Liss و Cole (٢٢) حيث عزلت من *M. bovirhinis* واطلق عليها (MV-Br 1) وظهر ان لها قابلية تكوين البقع على المضيف الذي عزلت منه ولها رأس متعدد السطوح وذنب طويل . وبعد ذلك تمكن Gourlay (١٧) من اكتشاف (V-Hr1) والذي تم عزله من عترة *M. hyorhinis* له رأس متعدد السطوح قطره ٣٤ نانوميتر وذيل قصير طوله ١٤ نانوميتر ويكون البقع على نفس العترة . واشار Maniloff (٢٧) الى اكتشاف MV-C1 وعزله من *A. laidlawii* واثبت قابليته على تكوين بقع على العترة الكاشفة ، حيث تمكن من صبغة بتترازوليوم كلوريد Tetrazolium chloride ثم تلى ذلك لاحقاً باكتشافه MV-C2 و MV-C3 . واستطاع الباحث Liss (٢٣) عزل group IMV من *A. laidlawii* بعد معاملتها بـ 2.5 µ mg/ml من Nitromycin C واضافتها للمايكوبلازما المزروعة *A. laidlawii* واستطاع عزل M.V. group 1 ، كما عزلها سابقاً (٢٣) من عترة JA2 . وحاول الباحثون Drasil واخرون (١٢) ترسيب DNA فايروسات المايكوبلازما MV-Lg-L172 بوضعه في مادة متعادلة او قاعدية لدراسة كروموسومات هذه الفايروسات فظهرت Double strand circular DNA (سلسلة ثنائية دائرية) يصل اقصى وزن لها الى ١٠٧ دالتون.

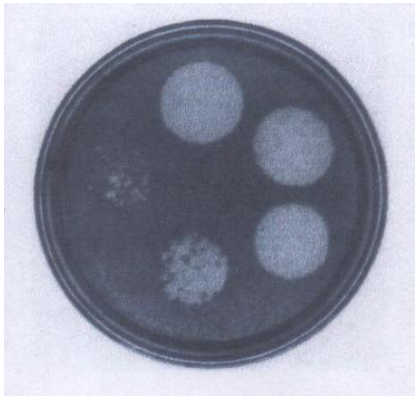
جدول ١. مقارنة شكلية بين MV-L2 و MV-L2 و MV-L3 و MV-C3

الفايروسات	الخلية المضيفة	الصفات الشكلية			تركيب الـ DNA
		التناظر	حجم الفايروس	احتوائه على محفظة	
١- MV-1,2	A.L	شبه دائري	قطره ٥٠-١٢٠ نانوميتر	نعم	دائري
٢- MV-L3	A.L	بلاعم قصيرة	طول الرأس ٦ نانوميتر طول الذيل ١٠-٢٠ نانوميتر	نعم	مستقيم
٣- MVC3	A.L	بلاعم قصيرة	طول الرأس ٦ نانوميتر طول الذيل ١٠-٢٠ نانوميتر	نعم	ترتيب دائري قابل لتغير المواقع مع احتوائه على وفرة طرفية

المصدر : Razin و Hayflecle (٣٤). A.L = *Acholeplasma laidlawii*

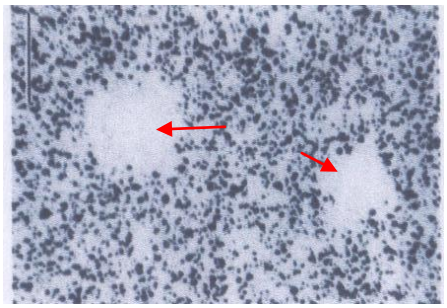
كما ذكر الباحثان Just و Guntherkld (٢١) ان الصفتان TR و CP موجودتان كذلك في MV-L3 حيث تعتبر CP : Circular permutation : الترتيب الدائري قابل لتغيير المواقع Tr : Redundancy Terminal : الترتيب الدائري قابل لتغيير المواقع . TR :

Terminal Redundency وفرة طرفية. اكتشف Ogawa و Nakamura (٣١) MV-O1 عـــن طريق عزلها من مستعمرات *Achoplelasma oculi* 19 مكوناً بقع عليها ولا ينمو على *A. laidlawii* . يتميز باحتوائه على محفظة دائرية يتراوح قطرها ٨٠-١٣٠ نانوميتر والحامض النووي الفايروسي هو DNA وهي عترة تصيب الانسان وكما موضح في الصور (١-٦).



صورة ١. فايروس MV-O1 ينتج البقع على *A.Oculi* 19L صبغت بالتترازوليوم طريقة (W/V%0.05) Fraser&Crum 1975

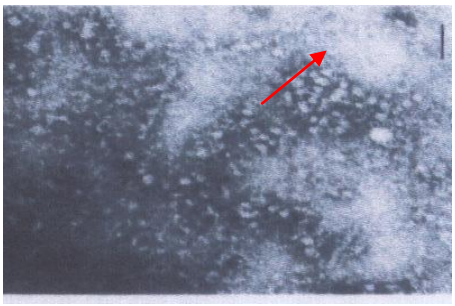
المصدر : Ogawa و Nakamura (٣١)



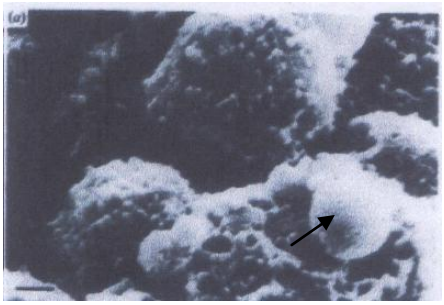
صورة ٢. تكوين فيرس MV-O1 البقع على A. *Oculi* 19L

المصدر : Ogawa و Nakamura (٣١)

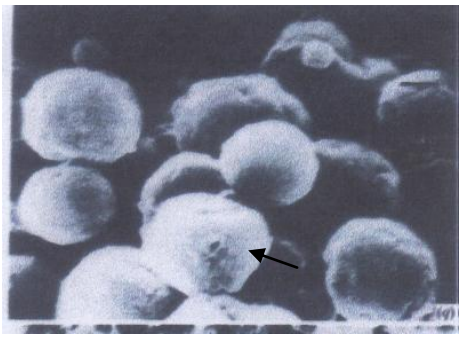
صورة ٣. تكوين فايروس MV-O1 جسيمات
كروية غير منتظمة للفيروس قطرها ٨٠-١٣٠ نانوميتر
كما مؤشر أعلاه المصدر : Ogawa و Nakamura (٣١)



صورة ٤. ملاحظة المحفظة وتركيب الكبسولة غير
واضح والعديد من الجسيمات والجزيئات تحيط
بالفيروس كما مؤشر أعلاه . المصدر : Ogawa و Nakamura (٣١)



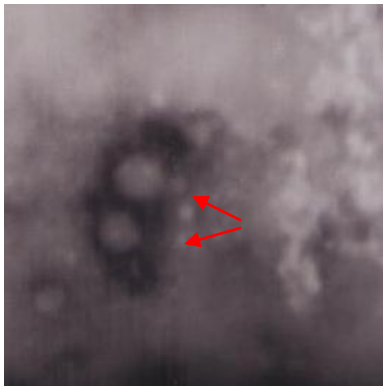
صورة ٥ . بقع أنتجها السائل المخفف الحاوي على
MV-O1 زرع على *A. Oculi 19L* توضح خلية
A. oculi 19 L مصابة بفيروس MV-O1 لاحظ
الفيروس على سطح الخلية المصابة كما مؤشر اعلاه
المصدر : Ogawa و Nakamura (٣١)



صورة ٦ . خلية *A. Oculi* 19L غير مصابة بفيروس MV- O1 . كما مؤشر أعلاه. المصدر : Ogawa و Nakamura (٣١)

حتى كان اكتشاف Anh و Voelker (٦) MV-PI الذي تم عزله من *M. pulmonis* فظهر ان له شكل متعدد السطوح وذنب متوسط الطول واثبت انه من الممكن احتواء فايروس المايكوبلازما على حامض نووي رايبي RNA . كما اثبت Dybvig و Voelker (١٣) احتواء فيروسات المايكوبلازما على حامض نووي رايبي لا اوكسجيني DNA ، أي ان فايروسات المايكوبلازما قد تحتوي على DNA او RNA واستطاعوا اكتشاف اربعة انماط جديدة من فايروسات المايكوبلازما التي عزلت من *M. pulmonis* . وظهر ان لها القابلية على اصابة خلايا المضيف الذي عزلت منه في تراكيبه البروتينية. وكذلك استطاعت الحسن (١) اكتشاف فايروس MV-B1 حيث عزلته من *M. bovis* وهو فايروس عصوي الشكل ويكون بقع على المضيف المعزول منه وعلى العترة الكاشفة *A. laidlawii* عترة PG8 وكما موضح شكله في الصورتين ٧ و ٨.

صورة ٧. صورة مجهر الكتروني صبغة سالبة لفيروس معزول من*M-bovis* عترة B98P كما مؤشر أعلاه . المصدر :الحسن (١)



صورة ٨ . صورة مجهر الكتروني صبغة سالبة لفيروس معزول من*A-laidlawii* عترة PG8. كما مؤشر أعلاه، المصدر : الحسن (١)

بعدها عاود Gourlay واخرون (١٧) عزل فايروس IMV group من *A. laidlawii* عترة JA2 وباتباع طريقة Liss و Maniloff (٢٢) ، كذلك تم عزل MV-L-51 من *A. laidlawii* وبنفس الطريقة.

الاوساط الزرعية المستخدمة في تنمية عتر المايكوبلازما واحتساب المعيار الحجمي لفايروسات المايكوبلازما

أجمالاً تختلف أشكال فايروسات المايكوبلازما وقابليتها من حيث أمكانية زرعها كما ذكرت الحِسن (1)، حيث تم زرع المايكوبلازما في أوساط زرعية خاصة تسمى PPLO (وهو وسط زرعي خاص لتنمية فايروسات المايكوبلازما حيث أنها لا تنمو بسهولة على الاوساط و تحتاج لمواد خاصة لمساعدتها على النمو عند استزراعها بصورة مباشرة او غير مباشرة ويجب دعمها بمصل الدم وبعض الخمائر وبدرجة حرارة ٣٧-٣٨ ْم وبظروف تعقيم ١٠٠% . وتحتاج المستعمرات ٣-١٤ يوم لكي تنمو بوسط PPLO بصعوبة وبطء) كما جاء في طريقة الحِسن (1). وأستطاع Lorenz (24) باستخدام PPLO وبسلسلة عمليات معقدة استزراع فايروسات المايكوبلازما ومن ثم فحص البقع لاحقا حتى بالعين المجردة في الوسط الزرعي وذلك باستخدام الصبغات الحيوية ، حيث تصطبغ خلايا المايكوبلازما بلون الصبغة الحيوية (vital stain) مثل صبغة Dienes، بينما خلايا المايكوبلازما المصابة بالفايروس لا تأخذ الصبغة وتبقى معتمة مكونة بقع او plaques . اما بالنسبة لاحتساب المعيار الحجمي لفايروسات المايكوبلازما فقد استخدم Gourlay (١٦) فيروسات المايكوبلازما باستخدام PFU (Plaques formation unit) لحساب المعيار الحجمي للفيروسات. كما اثبت نفس العالم انه من الممكن تنقية فايروسات المايكوبلازما بسلسلة عمليات معقدة ، مختصرها اخذ المرق الزرعي (broth) الحاوي على المايكوبلازما وترسيب خلاياها بجهاز الطرد المركزي ٦٠٠٠ دورة / دقيقة لمدة ٣ دقائق، حيث يتم أخذ السائل الطافي الحاوي على الفايروس ليتم ترشيحه والتخلص من بقايا جراثيم المايكوبلازما ومن ثم تتم معاملته بمواد كيمياوية واجراء عملية الديلزة (الميز الغشائي)، وهي عملية فصل المواد شبه الغروية عن المواد الاخرى القابلة للذوبان باستخدام غشاء فارز لحين الوصول لنقطة التعادل على جانبي الغشاء وتدعى العملية بالميز وذلك لعزل الفيروسات الموجودة في العينة من أي مركبات موجودة حولها لتنقيتها وحفظها، ويمكن حفظ الفايروس مجمداً بدرجة حرارة -٢٠ °م لحين الفحص كما أكد ذلك Worrall (41) .

الاوساط الزراعية المستخدمة في تنمية المايكوبلازما: ان الاوساط الزراعية المستخدمة في تنقية التنمية وكما ذكرتهاباضافة ١ مل من معلق خلايا الزرع ومصل بقري او الحسن (١) هي :

١- Broth media –SA وسط المرق ألزرعي المكون من PPLO ومصل جنين الأبقار وخلاصة الخميرة ومحلول الكلوكوز والارجنين ومحلول الفينول الأحمر وجميعها بنسب معينة.

٢- Broth medium-EP يتكون من PPLO ومصل جنين الأبقار وخلاصة الخميرة ومحلول الحامض النووي وفوسفات البوتاسيوم وخلات الثاليوم جميعها بنسب معينة.

٣- Broth medium-MC يتكون من ٢٠ مل من الماء المقطر المضاف إلـى mycoplasma supplement oxide G-ve ، اذ يخلطان جيداً ويضاف ٨٠ مل من المرق المايكوبلازمي الاساسي Broth media ويوزع في انابيب. ويعتبر الوسط الزرعي MC افضل وسط لتنمية المايكوبلازما، وطريقة الزرع غير المباشرة افضل من طرق الزرع المباشرة لزرع المايكوبلازما. اثبت Claverie (8) أن طريقة تفاعل السلاسل البوليمري Polymearase chain reaction (PCR) هي المستخدمة في الوقت الحاضر لدراسة حساسية وفاعلية المايكوبلازما ومدى تلوث المايكوبلازما ، و تتلخص طريقة PCR خلايا مايكوبلازما مزروعة اصلاً ويتم وضعها في جهاز الطرد المركزي Centrifuge لمدة ٦ دقائق بسرعة ٣٠٠٠ دورة / دقيقة، كما اضاف Clavori (٨) انه يتم غسلها بـ ١ مل من محلول Phosphate Buffer Solution (PBS) وتحضن لمدة ١٥ دقيقة في 95 م واستخدمت PCR لتنمية ١٤ مصدر من المايكوبلازما. كما اثبت Dovrokonva (11) أن PCR امثل طريقة لتشخيص المايكوبلازما بانواعها على سبيل المثال الـ *M-Synoviae* بكل عترها البالغة اكثر من ١٢ نوع كما ذكر Assancao (٧). كذلك ذكر Selwyn وآخرون (37) إمكانية تشخيص البروتينات الخاصة بالاجسام المضادة (Antibodies) التي تعود للمايكوبلازما باستخدام طريقة PCR . أن جميع أنواع المايكوبلازما التي تصيب الدجاج تكون plaques على العترة الكاشفة *A-laidlawi*i لكن قليل منها التي تكون بقع على المضيف الذي عزلت منه ، عملياً فايروسات المايكوبلازما موجودة في اغلب عتر المايكوبلازما وكما موضح في جدول(2) ..

جدول ٢. نمو العتر المختلفة لانواع مايكوبلازما الدواجن على الاوساط الزرعية وبالطريقتين المباشرة وغير المباشرة وقابلياتها على انتاج البقع على المضيف او العترة الكاشفة.

نوع المايكوبلازما	العتر	الزرع بالطرق المباشرة			الزرع بالطرق غير المباشرة			تكوين البقع	
		الوسط الزرعي MC	الوسط الزرعي EP	الوسط الزرعي SA	الوسط الزرعي MC	الوسط الزرعي EP	الوسط الزرعي SA	غير الكاشفة	المضيف
M.galisepticum	**F**	–	-	-	+	-	-	+	-
M.gallinerum	**PG16**	+	-	+	+	-	+	-	-
M.pullorum	**GC2**	-	-	-	+	-	-	-	لم تجرب
M.gallopavonis	**R3**	–	-	-	+	-	+	+	+
M.iowae	**695-0**	-	-	-	+	-	-	+	-
M.laidlawii	**CA4**	+	-	+	+	-	+	+	+
M.columtinasale	**YGL-1**	+	-	+	+	-	+	+	-
M.meleagridis	**BHB**	+	-	-	+	-	+	+	لم تجرب

المصدر : الحسن (١).

أن بعض عتر مايكوبلازما في الدواجن لها القابلية على اختزال التترازوليوم لتصطبغ خلايا المايكوبلازما غير المصابة تاركة خلايا المايكوبلازما المصابة بالفيروس معتمة مكوناً البقع كما في الصورتان (2،1) سابقاً.

جدول ٣. قابلية بعض عتر مايكوبلازما الدواجن على اختزال التترازوليوم وعدم مقدرة البعض الآخر.

نوع المايكوبلازما	العترة	فحص اختزال التترازوليوم
M. gallisepticum	F	+
M. gallinerum	PG16	+
M. iowae	*695-0*	+
M. columbinasale	*YGL-1*	+
M. gallopavois	*R3*	−
M. pallorum	GC2	−
M. meleagridis	BHB	−
M.A.laidlawii	CA4	+

المصدر : الحسن (١)

كيف يزيد الفايروس ضراوة عترة المايكوبلازما :

ذكر Maniloff (25) أن فيروسات المايكوبلازما تلعب دوراً كبيراً في ضراوة عتر المايكوبلازما حيث تنقسم الى عتر عالية الضراوة ومنخفضة الضراوة . يعود السبب لامتلاك العتر العالية الضراوة في مادتها الوراثية شفرة خاصة لفايروس MV-L1 ، MV-L2 ، MV-L3 ، وذكر Gourlay (١٦) كذلك Odry (32) أنه تكون هذه الشفرة غير موجودة في العتر المنخفضة الضراوة. أن اغلب عتر مايكوبلازما الدواجن تصاب بهذه الفايروسات وتلعب دوراً في ضراوتها. وبمرور السنين قد تتطور هذه الشفرات لترتبط بها فايروسات اخرى تختص بالدواجن أو لا تختص بها حيث تأخذ طريقها لاصابة خلايا المايكوبلازما. فلو تم إدخال الفيروس لأحد العتر المنخفضة الضراوة ستزداد ضراوتها، حيث تم فعلاً دراسة العلاقة بين فايروس المايكوبلازما وضراوة عترة المايكوبلازما من قبلVoelker وأخرون (40) حيث تم استخدام *M. arthritidis* المسببة لالتهاب المفاصل المتعدد في الجرذان، لكن العلاقة لم تتوضح فقام بدراسة ٢٠ صنف لعترة واحدة. كانت نتيجة الدراسة بأن قسمت اصناف العترة الواحدة الى

مجموعتين عالية الضراوة ومنخفضة الضراوة . ولاحظ ان معظم العتر المصيبة للدواجن تمتلك فايروسات ترتبط بها ووجد قسماً مرتبطاً بجنس المايكوبلازما والقسم الاخر مرتبط بجنس الـ *Achole plasma* . حيث أكد ألشمري (5) احتواء جنس الـ *Achole plasma* على مستقبلات Receptors sites لارتباط الفايروسات بها لتكون بقع على العترة الكاشفة او على المضيف الذي عزلت منه. كما ذكر Heru (18) انه وإثناء إصابة الفيروس لخلية المايكوبلازما يحصل انتاج DNA بواسطة الترسيب التحللي للبلاعم phage ويصاحبه تطوير وإنتاج بلاعم بكتيرية bacteriophage مع الغشاء البكتيري.

أن الارتباط بين الفيروس والمايكوبلازما خلوياً سيهدد امن المختبرات والنتائج عند حدوث بعض الاخطاء وينتج عنها طفرات جديدة كما ذكر النجار(4). وأكد Martin (28)انه قد تحتوي خلية العترة الكاشفة نوعين مختلفين من الفايروسات في ان واحد وظهور احدهما وعدم ظهور الاخر يعود للتغيرات في ظروف النمو الذي يلعب دوراً في ضراوة العترة في المستقبل أن احتوت نوع او نوعين من الفايروسات الخاصة بالمايكوبلازما حصراً. كما قام باحث الهندسة الوراثية Worrall(41) بتخليق هذا الارتباط مابين *A. laidlawii* وبلازميد streptococcus وباستخدام Streptococcal plasmid و*Spiroplasma* viruses كعوامل لإحداث الإصابة في الخلية لكنها لم تنجح. وذكر النجار (4) أن علماء الهندسة الوراثية واحدهم كريغ فنتر قد نجحوا بتأليف جينوم (يحتوي خصائص جينية) وإعادة بناء الشفرة الوراثية الكاملة (الجينوم) من نقطة الصفر ولم يثبت ان الحامض النووي المؤلف يمكن ان يعوض عن المادة الوراثية الحقيقية حيث سيمهد السبيل لانتاج بكتريا تساعد الانسان في المستقبل لانتاج عقاقير اكثر فاعلية ووقوداً حيوياً وغير ذلك من الجزئيات المفيدة للبشرية. أستخدم النجار (٤) *Mycoplasma. genetilicum* التي تعيش في الجهاز البولي التناسلي للانسان وتعتبر اصغر جينوم وراثي معروف لاي من الكائنات الحية لاجل تحويل البكتريا الى مرفق تصنيع كيمياوي حيوي.

بعض الاختبارات المصلية المستخدمة في تحديد عتر المستعمرات المايكوبلازمية وفايروساتها

إن إجراء الفحوص المصلية كأختبار التآلق المناعي (immunoflurecens test) يعتمد على تفاعل المستضد Ag مع الجسم المضاد Ab الخاص به، حتى تتفاعل المستعمرات المايكوبلازمية مع الاجسام المضادة المقترنة بالمادة المشعة الخاصة بها. وذكرت الحسن(1) انه دليل هذا التفاعل يكون بملاحظة الومضات عند استخدام المجهر الاستشعاعي ذي الاشعة فوق البنفسجية لتلاحظ مستعمرات خضراء مشعة عند اضافة المصل المضاد المقترن الخاص بهذا النوع . او قد تلاحظ مستعمرات مشعة عند اضافة المصل المقترن لنوعين من فايروسات المايكوبلازما. ذكر Razin و Herrmann (٣٥) أن ضراوة المايكوبلازما قد تكون خطيرة ولا يستهان بها لدرجة كبيرة لانها قد تحتوي على نوعين او اكثر من فايروسات المايكوبلازما التي تعمل على زيادة ضراوتها خاصة عندما تصيب الافراخ الصغيرة وقد تسبب هلاكات عالية كما ذكر عبد العزيز والعطار (3) لان إهمالها أو التأخر في علاجها او علاج المسببات التي تعمل كعوامل مساعدة لاصابة الأفراخ ومن هذه العوامل الرطوبة العالية ، تغيير درجة الحرارة في القاعة صعوداً ونزولاً خاصة في الشتاء ، زيادة مستوى الامونيا في جو القاعة. عند اصابة القطيع بالمايكوبلازما قد تعمل على تنشيط امراض فايروسية اخرى مثل مرض النيوكاسل (ND)، التهاب القصبات الهوائية المعدي (IB) او مرض التهاب الحنجرة والرغامي المعدي ILT. فقد اثبت ذلك الباحث Razin و Hayfleck (34) حيث اجرى تجربة وذلك بحقن رغامي فأر لاختبارها كطريقة زرع لدراسة تداخل الاصابة بين فايروس الانفلونزا APR8 و *Mycoplasma pulmonis* فعند الحقن حطم الفايروس الظهارة المهدبة وقلل من فاعليتها منتجا إضرار وتغييرات مرضية نسجية Histopathogenic damage كما اظهرت المايكوبلازما علامات اصابة واضحة بعد الحقن لفترة اطول حيث شوهدت على الرغامي خلايا وفجوات سايتوبلازمية متنخرة عديدة (newmerous cytoplasmic vacuoles and cell necrosis) حيث لوحظ في خلايا الرغامي ظهور فجوات سايتوبلازمية عديدة وتنخر خلاياه الظهارية Epithelial cells مكونة mycoplasma bodies مابين الاهداب على سطح غشاء الخلايا الظهارية كما لوحظ ظهور أجسام اشتمالية فايروسية داخل السايتو بلازم Viral-cytoplasmic inclusion bodies كما نتج عن ذلك سرعة في سير المرض وظهور الاعراض لكلا المسببين المايكوبلازما وفايروس الانفلونزا مبكرا عما لو حدثت اصابة كل منهما على حدة. ذكر عبد العزيز والعطار (3) أن المايكوبلازما تصيب حتى النباتات، ويجب أن تبدا المعالجة أولا إداريا بالإضافة إلى المعالجة البيطرية وذلك بإعطاء المضادات الحياتية الخاصة بها مثل Tylosin وأدوية أخرى ربما تتطلبها درجة الإصابة بالمايكوبلازما فيعطى معه مضاد حياتي للقطيع لمعالجة الإصابات البكتيرية الثانوية secondary bacterial complications التي تنجم عن نشاط

البكتريا المرافقة للاصابة . ذكر سراقبي (2) أن المايكوبلازما قد تنشط حتى عند اعطاء لقاحات الامراض الفايروسية حيث أن ضراوة الفايروسات التنفسية الموجودة في اللقاحات مثل لقاح مرض النيوكاسل والتهاب القصبات المعدي وغيرها قد تؤثر على شدة العدوى بالمايكوبلازما وحتى على ضراوتها. ولأجل ربط الدراسات القديمة لفيروسات المايكوبلازما بالدراسات الحديثة، نلاحظ أن مصطلح فيروسات المايكوبلازما قد تطور ليشمل حتى المايكوبلازما مع فيروسات معروفة كالتي تسبب مرض النيوكاسل ND والتهاب القصبات المعدي IB ، والتهاب القصبات والرغامي المعدي ILT وغيرها التي لها اشكال تنفسية ترافق ظهور المايكوبلازما عند الإصابة خاصة في اعمار الافراخ الصغيرة. ذكر النجار(4) ان فايروسات المايكوبلازما ستمهد في المستقبل لمايكوبلازما تحتوي في الـ DNA الخاص بها شفرات لفايروسات قديمة ومعروفة لتدخل ضمن تسلسل شفراتها ولتعطي انماط من فايروسات المايكوبلازما جديدة وستزيد من ضراوة عتر المايكوبلازما. فمن البديهي ان أي قطيع غير ملقح او مناعته ضعيفة ضد أي مرض فايروسي مثل مرض النيوكاسل ND والتهاب القصبات المعدي IB ، والتهاب القصبات والرغامي المعدي والتهاب جراب غدة فابريشيا IBD ومرض الميرك MD فعند حصول أي اصابة تنشط مع المايكوبلازما لتعطي صور واعراض إمراضها. ذكر عبد العزيز والعطار (3) وسراقبي (2) أن الإمراض التي تنتشر في عالمنا في الوقت الحاضر كالتي تصيب الانسان وظهورها المفاجيء وبشكل أقوى واشد ماهو إلا دليل على سلوك الفايروسات لانها وان تم القضاء عليها ستعود اقوى مما كانت عليه بعد ان تطور نفسها واليات مقاومتها لسنوات او عقود وحتى قرون كيف وهذه الفايروسات تتكاثر وتتحفظ داخل خلايا حية كالمايكوبلازما لاشك في انها ستطور نفسها أكثر مما نتوقع. وستكون لدينا دراسة لاحقة في مقارنة بين فايروسات المايكوبلازما في الدواجن والتي تصيب الإنسان. وملاحظة التطورات مابين النوعين ومقارنتها لان سلامة الانسان في تناول بيض ولحوم ذات نوعية جيدة خالية من المسببات المرضية هي غايتنا . وهل من الممكن ان تنقل الاصابة من الدواجن الى الانسان وهل ستلعب فايروسات المايكوبلازما دوراً في هذا الانتقال اللقاح دوراً في مكافحة فايروسات المايكوبلازما وبالتالي يقلل من ضراوة عترة المايكوبلازما في قطعان تربية الدجاج

المصادر

١- الحِسن ، سناريا فوزي مجيد. ١٩٩٧. دراسة بعض الصفات البايولوجية لمجموعة من عتر المايكوبلازما. رسالة ماجستير ، قسم الاحياء المجهرية، كلية الطب البيطري ، جامعة بغداد. ص ٨-٥٠.

٢- سراقيبي ، تركي .٢٠٠٦. ماهي اسباب الاعراض التنفسية (الشخرة) في الدجاج. ع ص ٥. ٥.

٣- عبدالعزيز، تحسين علي وماجد احمد العطار، ١٩٨٩. التشخيص السريري لامراض الدواجن، فرع الدواجن والاسماك، كلية الطب البيطري ، جامعة بغداد، ع ص ٢٩٦.

٤- النجـار، مـازن. ٢٠٠٨. اساسـيات الاحيـاء الدقيقة. ع ص ٢٠ .

5-Al-Shammari, A.J.N. 2008. Mycoplasma viruses MV-Lg-L172 and MV-L2. J.Virology 54:455-456 .

6- Anhhue,J. and L. Voelker .2001.Complete nucleotide sequence of Mycoplasma Viruses B1 genome. J. of Molecular Microbiology of Mycoplasma . 46 : 122-126.

7 -Assancäo, P. 2007 Principle-sialidase activity in mycoplasma synoviae of apllied animal reach of great white pellcons. Indian J. General Biology . 132 : 225-227.

8-Claverie, J.M. 2005. Miniviruses and Emerging Concept of Giant Viruses. J. of Gen. Viros 67 (2) : 179 – 908.

9-Das, J.1982. Replication of MVL-5,J.gen.Virology . 28-30.

10-Donald, W.S.2002. Specific mycoplasma diseases of poultry .J of Gen. Micro. and Dis. 3 : 129.

11-Dovrokonva, H., L., Voelker. and M.Reichelova . 2005. Detection of mycoplasma . J. of Virology . 28 : 364-368.

12-Drasil, V., S. Viklicka and L. Tkadlecek.1978. Size and shape of MV-Lg-L172 DNA.J. Virologym, 22 : 443-456.

13-Dybvig, K. and L.Voelker. 2003. Transformation of *Acholeplasma laidlawi* with *Streptococcal plasmid* uses aspiroplasma virus as lonning vecture. J. Molecular Biology of Mycoplasma. 50: 25-57.

14- Emanuel, G., H. Lorrence and S. Green. 2006. Practical from hand book of microbiology. J. Sci. News , 24 : 467.

15-Gopalkrishna, V. and H. Verma. 2008 .Detection of mycoplasma spp. In cell culturing by PCR and RFIF-BM cycline to cure infection. Brazelian J. of Virology . 25 : 364-368.

16- Gourlay, R.N. 1971. Mycoplasmatalis virus- laidlawii, a new virus isolated from Acholeplasma laidlawii. J. Gene. Virology, 12:65-67.

17- Gourlay, R.N., S.G. Wyld and M.Pulton.1993. Institute for Research on Animal Diseases. Agricultural research council. Some characteristics of MV-Hr1.Isolated and infecting mycoplasma hyorihinis. Compton. New bury-Besks hire. PP: 81-85.

18-Heru, M. 2009.Viruses and host cell DNA synthesis during infection of Acholeplasma. J. Nucleic Acids Research, 137 : 265-270.

19-James.A.R. 2008.Emerging and exotic diseases of animal. Veterinarian Research Council. School of Medicine , Department of Microbiology , U.S.A . PP.200.

20-Juliana,B.,R.C. Odry, K. Takei and R. Aryfloriodo. 2005. Characterization of mycoplasmapenetrans and mycoplasmafermentance immune odominant protins.Brazelian J. Microbiology, 36 : 72-75.

21-Just, W. and Z. Guntherkld. 1990.Same characteristic of mycoplasma viruses.J.Gene. Virology..135 : 198-205.

22-Liss, A. 1974. Mycoplasmatalis virus group L1,isolation, characterization, grouth and transfection studies. Ph.D. thesis Rochester University. Rochesterm, N.Y.PP:52.

23- Liss, A.1988. Same specific theasis about mycoplasma viruses J. Virology , 40 : 285-288.

24-Lorenz, A.1988. Electroporation-Mediated transfect ion of *Acholeplasma laidlwii*, MVL1,MVL2 and MVL3 DNA.J.Virology. 62 : 3050-3052.

25-Maniloff, J.1982.Isolation and growth of MVL1 and MVL2. J. Virology. 24 : 18-21.

26- Maniloff, J.1983. Mycoplasma Molecular Biology and Pathogenesis. Department of Microbiology , Michigan University , School of Medicine , Michigan , USA. PP:43.

27-Maniloff, J. 1992. Molecular virology & pathogenesis.from Google books Result. Brazelian . J. of Molecular Virology . 77 : 42.

28-May ,M.2007 . Information of principles- sialidase activity of *Acholeplasma* spp. J.Virology.51(4):201-203.

29-Minion, F.C. 2003. Molecular pathogenesis of mycoplasma expression system.J.Virology.23 : 87-90.

30- Ogawa,H. and M. Nakamura. 1985.Charactrization of MV-OL Derived from infecting *Acholeplasma laidlawii*. Department of microbiology, Kurume University, School of medicine , Kurume 830. Japan PP.:312-325.

31-Odry,.P. 2007. Avian *Mycolasma gallisepticom* , avian mycoplasmosis. J. General Virology. 7 : 65-70.

32- Razin.S. and H. Richard. 2002. Molecular biology and pathogensity of mycoplasma. .Indian J. of General Biology . 25 : 188 – 255.

33-Razin.S. and L. Hayflick. 2010. Highlights of mycoplasma research-An historical perspective. Department of microbiology, WHO Doc.No.VPH/MIC/74.1 world health organization,Geneva.

34-Razin.S. and R. Herrmann. 2002. Molecular biology and pathogensity of mycoplasma . J.General Virology, 14 : 197-205.

35- Rolten,S. 2003. Interaction of mycoplasmas with host cell. J. Sci. News antibiotics for hunting ons diseases. 158: 120-121.

36-Selwyn, A., D. Wilson, V. Dmitry, V. Zhiping and C.Valdimir. 2010. Evaluation of Mycoplasma in Activation During Production of Biologics Egg-Based Viral Vaccine Applied and Environmental Microbiolog, J. of Environmental Microbiology .38 : 2718-2828.

37-Selwyn, A.,2008. Introduction to equilibrium dialysis and specialized tools for Bio research. J. Molecular Biology, 4 : 398-488 .

38-Tomezyk, G. and K.Bltcharz. 2009. Compersion of different molecular methods for detection of *Mycoplasma synovaie* IA.Bul vet Linsid Pulawy 53.. J. of Environmental Microbiology . 35 : 357-360.

39-Voelker, L., K. Weave, L.Ehle and L.Washburn. 1995. Association of lyogenic bacteriophage MAV1 with virulence of mycoplasma. Indian J. of General Virology , 63 : 41-49.

40-Worrall, E.E. 2003. Method for preservation of viruses and mycoplasma on electronic position.J. of Virology, 51 : 162-165.