دراسة بعض الخصائص الحيوية لعترات فيروس التهاب القصبات المعدي المعزولة من قطعان الدجاج في سورية

د. فهيم عبد العزيز [*]
د. محمد سلهب[**]
د. أنور ديب العمر[***]
د. محمد مسالمة[****]
تماره الجلاد[*****]

(تاريخ الإيداع 1 / 12 / 2020. قبل للنشر في 29 / 4 / 2021)

□ ملخّص □

عزلت 10 عترات فيروس التهاب القصبات المعدي Infectious Bronchitis Virus (IBV) من قطعان دجاج اللحم أعطيت الرموز من Tj-1…Tj-10 خلال الفترة 2018-2019، تم تنميطها بتفاعلات NestedRT-PCR.

بينت دراسة إمراضية العترات المعزولة عند الحقن في أجنة الدجاج النامية SPF، ظهور تغيرات في الأغشية الجنينية شملت: النزف الدموي، وجود بقع تنكرزية، تأخر في تطور نمو الجنين (تقزّم)، التواء والتفاف الأجنة والأرجل، ومتوسط نسبة نفوق 15 %.

بينما أظهرت دراسة إمراضية العترات المعزولة بعد العدوى بحقن المادة المحتوية على الفيروس بطريقة التقطير في الأذن والعين بجرعة 0.2 مل في كل منهما، في طيور الدجاج البلدي (المحلي) local chickens غير المحصنة بعمر 43 أسبوعاً، ظهور الأعراض المميزة لالتهاب القصبات المعدي والتي شملت: انخفاض الشهية، الخمول والضعف العام، السعال، شخير أو خراخر تنفسية، بعد فترة حضانة تراوحت بين 2-3 أيام من العدوى التجريبية. وبلغت نسبة النفوق 10%. ولم يكشف التشريح المرضي للطيور النافقة وجود تغيرات مميزة للIBV. ولم تختلف إمراضية العترات المعزولة من دجاج اللحم (Tj-1…Tj-10) عن بعضها في المظاهر السريرية أو الآفات التشريحية.

لدراسة الخصائص المناعية للعترات المعزولة (Tj-1-Tj-10): تم تحديد مستوى الاستجابة المناعية لهذه العترات عند الطيور بقياس معيار الأضداد في اختبار المقايسة المناعية المرتبطة بالأنزيم(ELISA)، حيث راوح مستوى الأضداد في الأمصال الدموية بين 7939- 14026 بعد 14 يوماً من العدوى التجريبية، وبين 3189- 8453 بعد 21 يوماً من العدوى.

الكلمات المفتاحية: فيروس التهاب القصبات المعدي IBV، ELISA، الإمراضية، الخصائص المناعية، سورية

[*] قسم علم الحياة، كلية العلوم، جامعة طرطوس، طرطوس، سورية.
[**]مركز بحوث اللاذقية، الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، دمشق، سورية.
[***]كلية العلوم، جامعة البعث، حمص، سورية.
[****]قسم البيولوجيا الجزيئية، وزارة الزراعة، دمشق، سورية
[*****] قسم الإنتاج الحيواني، كلية الزراعة، جامعة تشرين، سورية

Study of some Vitality characteristics of infectious bronchitis virus strains isolated from chicken flocks in Syria

Dr. Fahim Abdelaziz [*]
Dr. Mohamad Salhab[**]
Dr. Anouar Dib Alomar[***]
Dr. Mouhamad AL- Masalma[****]
Tamara AL-Jallad[*****]

(Received 1 / 12 / 2020. Accepted 29 / 4 /2021)

□ ABSTRACT □

It is isolated 10 Infectios bronchitis virus (IBV) strains from broiler flocks that has been given symbols Tj-1…..Tj-10(Tj-1, Tj-2,Tj-3, Tj-4, Tj-5, Tj-6, Tj-7, Tj-8, Tj-9, Tj-10) through period 2018-2019 , and identified their types by NestedRT-PCR reaction.

Pathogenesis of specific pathogen free (SPF) embryonated eggs inoculated with isolated strains included changes in the fetal membranes, including: hemorrhage, necrotic spots, fetal growth retardation (stunting), twisting and twisting of fetuses and legs, and a mortality of 15 % .

Whereas, the pathogenicity study of isolated strains after infection by instillation in the ear and eye at a dose of 0.2 ml each, in unvaccinated local chickens, 43 weeks of age, showed the characteristic symptoms of infectious bronchitis. These included: decreased feed intake, depression and general weakness, coughing, sneezing or gasping, after an incubation period ranging between 2-3 days of experimental infection. The mortality rate was 10%. The histopathology of the dead birds did not reveal the characteristic changes of IBV. The pathogenicity of the strains isolated from broiler chickens (Tj-1… Tj-10) did not differ from each other in the clinical manifestations or anatomical lesions. To study the immunological properties of isolated strains (Tj-1-Tj-10), native (local) chickens at 21 weeks of age, not vaccinated at all, were immunized by injecting the substance containing the previously prepared virus as mentioned in the materials and methods, at a dose of 0.2 ml in the nose, and a dose of 0.2 ml in the eye. The level of immune response to these strains was determined in birds by measuring the antibody criterion in the enzyme-linked immunoassay (ELISA) test. The level of antibodies in blood serum ranged between 7939-14026 after 14 days of immunization, and between 3189-8453 after 21 days of immunization.

Keywords: Infectious bronchitis virus (IBV), ELISA, pathogenesis, immunological characteristics, Syria.

[*]**Department of life Science, Faculty of Science, Tartous University, Tartous, Syria**
****Research Center of Lattakia, General Commission for Scientific Agricultural Research GCSAR, Damascus, Syria.**
[***] **Faculty of science, Al-Baath University, Homs, Syria.**
[****] **Department of Molecular Biology, Ministry of Agriculture, Damascus, Syria**
[*****] **Department of animal Production, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Lattakia, Syria.**

مقدمة:

يعتبر التهاب الشعب الهوائية المعدي Infectious bronchitis (IB) مرضاً شديد العدوى، له أهمية اقتصادية كبيرة في صناعة الدواجن في جميع أنحاء العالم. صدر أول تقرير عن الـ IB حيث أشار أنّ المرض في الصيصان ترافق مع ظهور أعراض تنفسية حادة في ولاية داكوتا الشمالية (Schalk and Hawn, 1931). وكانت التغيرات المسببة للمرض واضحة في الجهاز التنفسي العلوي من الطيور. وبالتالي تم تسمية المرض "التهاب الشعب الهوائية المعدي".

يعد فيروس الـ IBV (Infectious bronchitis virus) مسبباً مرضياً شديد العدوى، ينتمي إلى رتبة *Nidovirales*، وعائلة الفيروسات التاجية *Coronaviridae*، جنس الفيروسات التاجية غاما *Gammacoronavirus* (Gonzalez et al., 2003). الحمض النووي للفيروس RNA مفرد السلسلة إيجابي القطبية. يبلغ حجم الجينوم حوالي 27.6 kb (Boursnell et al., 1987; Ziebuhr et al., 2000; Mo et al., 2012).

ينتشر بسرعة بين الدجاج في القطيع (De Wit et al., 1998; Matthijs et al., 2003). ويتطور ظهور العلامات السريرية في الطيور المعدية بسرعة كبيرة خلال 36–48 ساعة غالباً. يتكاثر الفيروس بشكل أولي في القناة التنفسية العليا، وبعدها ينتشر إلى الأعضاء الأخرى (Raj and Jones, 1997). بشكل عام، يتم اكتشاف الفيروس بكمية كبيرة في مخاط الرغامى، القصبة الهوائية والبراز خلال الطور الحاد النشيط وطور النقاهة من المرض.

ينتشر الفيروس أفقياً عن طريق الغذاء، الماء والبراز الملوث. حيث تنشر الطيور المصابة الفيروس باستمرار في البيئة وتنشر العدوى في الوسط المحيط، مثل التجهيزات، المعدات، البيض وأيضاً من خلال العمال والشاحنة التي تنقل سواء الصيصان، العلف أو الفروج عند التسويق أو البيض الناتج، بين المزارع. وتعتبر هذه مصادر رئيسة للانتقال غير المباشر للمناطق المختلفة (Ignjatović and Sapats, 2000).

ترتبط الحالات السريرية للعدوى بالتهابات الجهاز التنفسي والتناسلي والجهاز الهضمي والكلى في الدواجن (Cavanagh, 2005)، ويمكن أن تتفاوت إمراضية الـ IBV بشكل كبير بين العترات. وتتنوع الاعراض اعتماداً على عمر الطيور، وإمراضيه عترة الفيروس والحالة المناعية (التحصين، كبت المناعة، والأجسام المضادة المشتقة من الأم) والعدوى المشتركة (Ignjatovic and Sapats, 2000)، وكذلك الظروف البيئية مثل المناخ والغبار والأمونيا والإجهاد الناتج عن انخفاض الحرارة (Jackwood and de Wit, 2013).

تظهر أعراض المرض سريرياً عند دجاج اللحم (الفروج) المصاب من خلال السعال، العطاس، الشخير، الافرازات الأنفية، نقص تناول الأعلاف وتحويلها، فقدان وزن الجسم، تورم الجيوب الأنفية، زيادة استهلاك المياه، الفضلات الرطبة، الضعف العام وسوء النمو.

أمّا في الدجاج البياض، فيظهر المرض على شكل فشل وضع البيض وانخفاض كمية الإنتاج، كما تتأثر نوعية البيض الناتج وجودته، فتصبح قشرة البيضة رقيقة، خشنة، هشة، مع تشوه في شكل القشرة، ويصبح بياض البيض مائياً رقيقاً. تسبب عدوى الفيروس في بعض الحالات أضراراً بالغة في قناة البيض وتنتج عنها انخفاض أو خسارة دائمة في انتاج البيض. (Cavanagh, 2005; Cavanagh and Naqi, 2003; Cavanagh and Gelb, 2008; Worthington et al., 2008). تؤدي الإصابة بالـ IB إلى نفوق 20–30% من القطيع وتصل هذه النسبة الى أعلى من ذلك عند عمر 5–6 أسابيع (Ignjatovic et al., 2002; Seifi et al., 2010).

تؤدي العوامل البيئية والإدارية، بالإضافة إلى معدل الطفرات العالية للفيروس إلى صعوبة السيطرة على المرض، وتقوّض فعالية اللقاحات المتاحة. تعتمد قدرة الجهاز المناعي للطيور في الاستجابة للتحديات على سلامة الغشاء المخاطي، وعلى توليد استجابات تكيفية خلطية وخلوية، وقد تؤثر على الحالة الصحية.

يهدف تحصين الطيور من عمر يوم واحد في المفقس إلى إثارة استجابات مناعية، وتعتبر الاستجابة الخلطية (IgY وIgA) مهمة أيضًا للتخلص من الفيروس في التحديات اللاحقة. يعتبر وجود الأضداد ضد بروتين S1 في الطيور بعمر3 إلى 4 أسابيع أمراً مهماً في كل من الفروج، ومن أجل الذاكرة المناعية في الأماتbreeders والبياض layers. تعد المناعة الفطرية أمرًا ضروريًا للسيطرة على العدوى الحقلية لـIBV، ويعتمد تنشيطها المبكر بشكل أساسي على عمل إنترفيرون جاما، كنتيجة لعمل الخلايا البلعمية Macrophages، بالإضافة إلى المواد الأخرى، أثناء عملية الالتهاب المبكرة (Catani et al., 2000)

تعتبر الـ ELISA من التقنيات المختبرية التشخيصية واسعة الاستخدام في معظم مختبرات التحاليل المرضية وخاصة في تشخيص الفيروسات وذلك للأسباب التالية: تحليل عدد كبير من العينات، تستغرق وقتاً قليلاً نسبيا، حساسيتها(Sensitivity) العالية، حيث تبلغ 99%، وخصوصاً الـELISA غير المباشرة التي تعتبر ملائمة وقياسية لكشف أضداد الـ IBV(Wing et al., 2000)، تساعد المجموعة التجارية االخاصة بالـ ELISA (Kit) في كشف مستويات الأضداد لـIBV (Cavanagh and Gelb., 2008)يعتبر عزل الفيروس تقنية حساسة للكشف عن IBV و خاصةً العزل في أجنة بيض التفريخ الخالي من العوامل الممرضة (SPF) Specific pathogen free حيث ينمو IBV بشكل جيد في SPF بالحقن في التجويف أو الأغشية السقائية المشيمائية. يتم الوصول إلى أقصى عيار للفيروسات في السائل الالنتويسي (AF) allantoic fluid بعد يوم أو يومين من الحقن (De Wit, 2000). يختلف مدى التغيرات المرضية في الأجنة المصابة التي يسببها IBV اختلافا كبيرا وتعتمد على الجرعة. تحدث الآفات المميزة مثل التقزم وتجعد الجنين، والتفاف أصابع القدمين (Loomis et al., 1950).

أهداف الدراسة:

هدف البحث إلى دراسة إمراضية 10 عزلات من مزارع الدجاج في سورية 2018-2019 ، نمطت مصلياً وبتفاعلات Nested RT-PCR بالذريتين (H120، 4/91) كعترات لفيروس التهاب القصبات المعدي، لأجنة الدجاج النامية والطيور البالغة. ودراسة مستوى الاستجابة المناعية لهذه العترات بعد العدوى التجريبية لطيور الدجاج البلدي (المحلي) بكشف الأضداد في اختبار الـELISA.

طرائق البحث ومواده

مكان تنفيذ البحث:

نُفذ البحث في الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية- مركز بحوث اللاذقية: مخبر الثروة الحيوانية، وحدة الدواجن. مخبر شركة قطان التجارية. خلال الفترة الممتدة من 2019-2020.

1-العترات المعزولة: تم استخدام العترات (Tj-10-Tj-1) لفيروس التهاب القصبات المعدي (IBV)، المعزولة من قطعان الدجاج من محافظات (طرطوس، اللاذقية، حمص، حماه) في سورية ، خلال الفترة 2018-2019، والتي تم تنميطهما بطريقة NestedRT-PCR إلى النمطين H120، 4/91 (Abdelaziz et al., 2019).

2 – دراسة إمراضية العترات المعزولة (T1–T10) لأجنة الدجاج النامية:

2–1– تجهيز العينة: هُرست العينة المحتوية على الفيروس (سوائل وأغشية سقائية مشيمائية) جيداً، وتمت مجانستها بإضافة ضعفي كمية العينة من محلول فيزيولوجي NaCl تركيزه 0.9 وأضيف البنسلين بتركيز 1000 ml/U والستربتومايسين بتركيز 10 ml/mg لتجنب التلوث البكتيري. ثم ثفلت وسُحب السائل الطافي ونُقي بالترشيح الفائق بمرشحات (0.22) ميكرون. استخدمت المادة كمستضد للدراسات اللاحقة (حقن أجنة الدجاج والدجاج المحلي لدراسة الخصائص الإمراضية).

2–2– الحقن في أجنة الدجاج النامية:

- خصصت لكل عينة 3 أجنة بعمر 11 يوماً (حُضِن البيض عند الدرجة 37.7 مئوية، مع توفير الرطوبة المناسبة)، وتم حقن 0.2 ml من العينة المحتوية على الفيروس ضمن الكيس السقائي المشيمائي chorioallantoic sac. مع الاحتفاظ بأجنة (2) كمجموعة شاهد.
- اختيرت نقطة فوق حدود الحجرة الهوائية بـ 2.ملم، وبعيدة عن الأوعية الدموية.
- تم مسح القشرة بالكحول وثقبت باستخدام رأس محقن قياسي G23.
- حقنت كمية 0.2 ml من العينة المصابة باستخدام محقن قياس G27، وذلك عبر الثقب المحدث في القشرة ونحو الأسفل بزاوية 45 °.
- تم سد الثقب بقطرة من الشمع، وسجل على كل بيضة تاريخ الحقن، واسم العينة، ورقم التمرير، وأعيد البيض المحقون إلى الحضّانة.
- بعد 24 ساعة من الحقن تم فحص البيض، واستبعاد النافق (لأسباب ميكانيكية تتعلق بالعمل)، فحصت العينات بشكل يومي، وتم وضع النافق في البراد.
- تمت المراقبة اليومية والكشف على الأجنة المحقونة حتى اليوم الثامن عشر، استبعدت الأجنة النافقة من الحاضنة واحتفظ بها في الثلاجة لعدة ساعات 6– 8 ساعات، وبعدها تم التشريح وتسجيل الآفات المرضية المشاهدة في الأغشية السقائية المشيمائية والأجنة. وما تبقى من أجنة تم أخذه من الحاضنة في اليوم الثامن عشر، وتم تشريحه بعد وضعه في الثلاجة لعدة ساعات لدراسة التغيرات المرضية

3– العدوى التجريبية لطيور الدجاج البلدي:

تم استخدام 20 طيراً من طيور الدجاج البلدي (المحلي) بعمر 21 أسبوعاً، غير المحصنة إطلاقاً، لدراسة الخصائص الحيوية للعترات المعزولة في أجنة بيض SPF وامراضيتها على طيور الدجاج البلدي (لكل عينة طيرين)، وذلك بحقن المادة المحتوية على الفيروس (العترات العزولة : Tj–1–Tj–10) بجرعة 0.4 مل موزعة بالتساوي في الأنف والعين. كررت العدوى مرة ثانية بعد أسبوع وبنفس الجرعة والطريقة، وبعد 15 يوماً، 21 يوماً تم أخذ الدم في أنابيب اختبار والحصول على الأمصال بعد عملية النبذ (التثفيل) 2500 دورة بالدقيقة/ لمدة 5 دقائق.

تم تحديد مستوى الاستجابة المناعية بقياس معيار الأضداد في اختبار المقايسة المناعية المرتبطة بالأنزيم (ELISA). كما تمت المراقبة اليومية لدجاج التجربة 30 يوم، سجلت خلالها الملاحظات والظواهر المرضية.

4-اختبار المقايسة المناعية الأنزيمية

من أجل قياس معيار الأضداد النوعية لعترات فيروس التهاب القصبات المعدي الموجودة في الأمصال الدموية المختبرة لعينات التجربة، استخدم كيت المقايسة المناعية المرتبطة بالانزيم (ELISA) الموضح في صورة (1).

صورة (1) كيت ELISA المستخدم في الكشف عن الإصابة بفيروس IBV

طريقة إجراء الاختبار

أُضيف 245 مكروليتر من سائل تمديد العينة للحفر ثم أُضيف 5 مكروليتر من عينة المصل (التي يتم مزجها بشكل جيد) ثم وضعت في حفرة البفر بزاوية 45 درجة مع المزج. تمت إضافة محلول تمديد (90) مكروليتر ماعدا أول 4 حفر. تم المزج جيداً وأُخذ 10 مكروليتر من الطبق الأول. تمت إضافة الشواهد (100) مكروليتر بكل حفرة (عند إضافة الشواهد ضُبط الزمن 30 دقيقة). تُرك الطبق بدرجة حرارة الغرفة 25 مئوية (في هذه المرحلة يتفاعل الضد مع المستضد). ثم أُضيف 300 مكروليتر لكل حفرة من محلول الغسيل، وكُرر الغسيل 3 مرات. أُضيف (100) مكروليتر من محلول Conjejed لكل الحفر، تم رج الطبق بشكل بسيط على الأطراف (ضُبط الزمن نصف ساعة) وضُبطت الحرارة على 25م. أضُيف 100 مكروليتر من محلول (substrate) لكل حفرة (تم التحضين على الدرجة 25 م ولمدة ربع ساعة).

النتائج والمناقشة

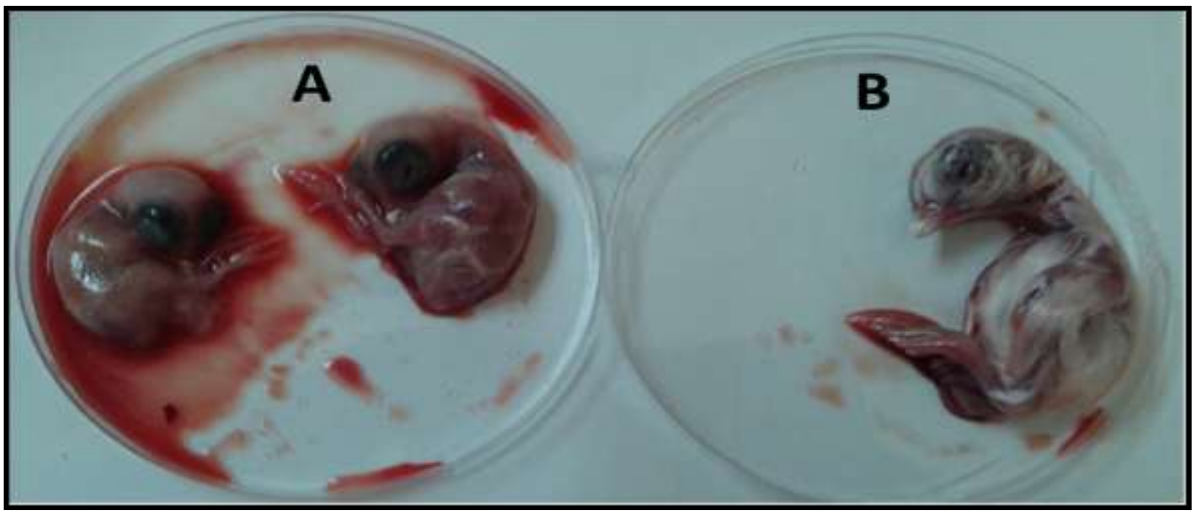
1- نتائج دراسة إمراضية العترات المعزولة لأجنة الدجاج النامية:

بيّن تشريح وفحص الأجنة النافقة والمتبقية حتى اليوم الثامن عشر في المفرخة، وجود نزف دموي في الأغشية والأجنة، مع تأخر واضح في تطور نمو الجنين وتقزمه، وملاحظة التفاف الأجنة والأصابع، كما هو موضح في الصور(2,3) ، وسُجل نفوق الأجنة كما هو موضح في الجدول (1).

جدول (1) يوضح عدد الأجنة النافقة في الأيام 13-18 بعد التحضين

عمر الأجنة والنفوق / العترات	13	14	15	16	17	18	متوسط نسبة النفوق%
4/91		1ت1	3ت2	1ت1	3ت2	3ت2- 2ت2	**%10**
H120	3ت**1**				3ت2-2ت2		%5

***ت: تدل على التمرير**

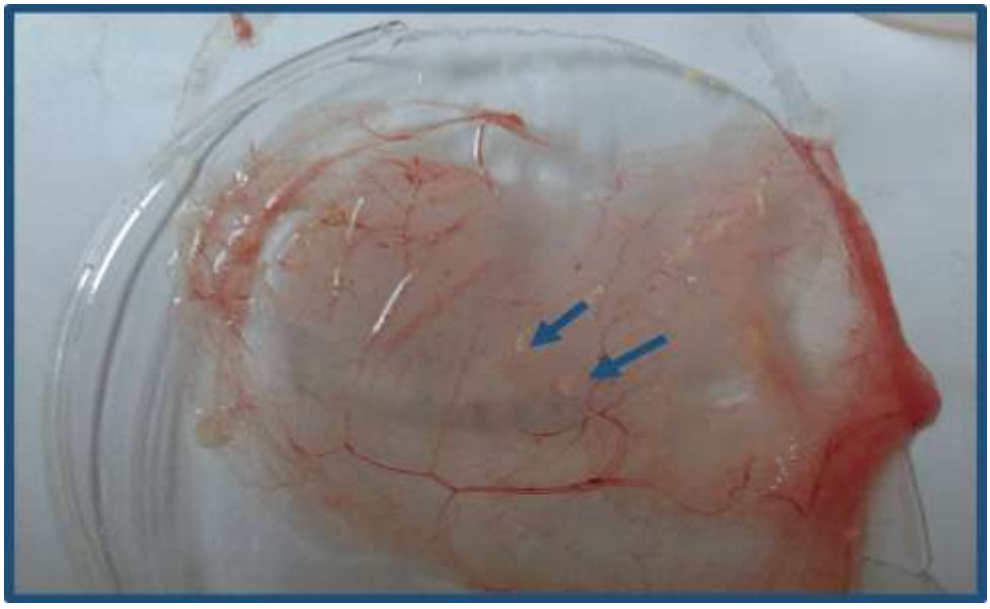


الصورة (2):A - تأخر نمو وتقزم ، B- الشاهد

حيث لوحظ في التمرير الأوّل أنّ 30 % (9 من 30) من الأجنة تظهر هذه العلامات، وزادت هذه النسبة في التمرير الثاني لتصل إلى 50 % (15 من 30) ، في حين زادت هذه النسبة بشكل واضح في التمرير الثالث لتصل إلى 80 % (24 من 30) وأصبحت العلامات أكثر وضوحاً، لوحظ بعد التمرير الثالث في SPFEE أن هناك أجنة نزفية وتأخر واضح في النمو مع حدوث التقزم. كما لوحظ أن الأجنة كانت مجعدة ومثنية حول نفسها وأصابعها ملفوفة صورة (3). كما زاد عدد الأجنة النافقة بلغت9 أجنة.

الصورة (3): تقزم جميع الأجنة لنفس العينة

كذلك لوحظت التغيرات المرضية التالية على الأغشيةالسقائية المشيمائية: ارتشاحات وسماكة مع عكارة واضحة، احتقان دموي وتبقع فبريني الصورة (4).



الصورة (4) نزف دموي ونقاط تنكرز وسماكة أغشية

3 نتائج دراسة إمراضية العترات لطيور الدجاج البلدي:

أظهرت المتابعة والمراقبة اليومية لطيور الدجاج البلدي (المحلي) المعداة بالعترات المعزولة تسجيل الأعراض والعلامات التالية:

- مدة فترة الحضانة 24 ساعة، إذ لم تظهر عند طيور مجموعات العدوى أي علامات أو أعراض، في اليوم الأول بعد العدوى، ثم ظهرت في اليوم الثاني علامات انخفاض الشهية والإنهاك وضيق التنفس. وتفاوتت حدة هذه العلامات من طير لآخر ومن ذرية لأخرى.
- حدوث انخفاض كبير في استهلاك العلف من اليوم الثاني إلى اليوم الثاني عشر بعد العدوى، مع علامات ضعف وخمول واضحة عند جميع طيور التجربة.
- انخفاض إنتاج البيض، وتوقفه كلياً عند 90 % من طيور التجربة.
- نسبة نفوق 10 %، 0% عند مجموعة الطيور المحقونة بالذرية .H120 والذرية 4/91 على التوالي.

4 نتائج دراسة الخصائص المناعية للذراري المعزولة:

تم تنفيذ الدراسة على عزلات فيروس التهاب القصبات المعدي **(IBV)** من **Tj-1** وحتى **Tj-10** التي تعود إلى النمطين (H120، 4/91) ، ويظهر الجدول (2) و الجدول (3) نتائج مستوى الاستجابة المناعية لهذه العزلات والعترات ومعيار الأضداد في الأمصال الدموية لطيور التجربة من خلال المقايسة المناعية المرتبطة بالأنزيم **(ELISA)**

الجدول (2) نتائج مستوى الاستجابة المناعية لعزلات IBV ومعيار الأضداد النوعية للعترات المعزولة في اختبار ELISA

العزلات الفيروسية	متوسط عيار الاضداد Mean titer بعد العدوى بـ14 يوماً	Titer Group	متوسط عيار الاضداد Mean titer بعد العدوى بـ21 يوماً	Titer Group	نمط وذرية الفيروس
Tj-1	10165	8	7783	6	4/91
Tj-2	10130	8	7720	6	-
Tj-3	14026	10	7658	6	-
Tj-4	10953	8	7287	6	4/91
Tj-5	7939	6	3189	3	4/91
Tj-6	10368	8	-	-	4/91
Tj-7	111150	8	8453	7	4/91
Tj-8	10238	8	698	6	4/91
Tj-9	13311	9	7820	6	4/91
Tj-10	11666	8	7221	6	H120

يوضح الجدول (3) معطيات اختبار الـ **ELISA** لأمصال طيور الدجاج البلدي التي أجريت عليها عملية العدوى التجريبية، التي تظهر مستوى الأضداد الذي تراوح بين 7939- 14026 بعد 14 يوماً من العدوى، وبين 3189- 8453 بعد 21 يوم من العدوى.

الجدول (3) نتائج مستوى الاستجابة المناعية للذريتين (4/91 ، H120) ومتوسط عيار الأضداد النوعية للعترات المعزولة في اختبار ELISA

معيار الأضداد / العترات	بعد 14 أيام	بعد 21 يوم
4/91	12447	7111
H120	11017	7820

المناقشة:

تظهر معظم عترات فيروس التهاب القصبات المعدي المعزولة في مناطق مختلفة من العالم أعراضاً وآفات مشتركة، تتضمن انخفاضاً في كمية ونوعية إنتاج البيض عند الدجاج البياض، ومشاكل تنفسية وفشلاً كلوياً في دجاج اللحم. ويعد تفشي أمراض الجهاز التنفسي الحادة في كل من قطعان الدجاج غير المحصنة والمحصنة، من المشاكل الخطرة التي تواجه صناعة الدواجن، إذ ينتشر المرض بسرعة إلى قطعان أخرى وتظهر عليها علامات ضيق التنفس وانتفاخ الكلى مع ترسب حمض البول أو النفوق في الفروج وانخفاض إنتاج البيض والزلال المائي في البياض (Abro, 2013)، على الرغم من أنّ عزل الفيروس في أجنة الدجاج النامية بعمر 9–11 يوماً، إجراء يستغرق وقتاً طويلاً إلا أنّه لابد من تقنية العزل للاستفادة من السوائل والأغشية الجنينية واستخدامها كمادة أولية للكثير من الدراسات والفحوص المخبرية المتعلقة بفيروس التهاب القصبات المعدي عند الدواجن، ولمعرفة العلامات المميزة لمرض IB في أجنة SPF والآفات التي يسببها في هذه الأجنة. وفي دراستنا استخدمت عترتان من عترات الـIBV المنمطة بطريقة NestedRT–PCR إلى النمطH120 ، والنمط 4/91 لحقنهما في بيض SPF ، لدراسة الخصائص الامراضية للعترات المعزولة، وللاستفادة من السوائل الجنينية كمادة حاوية على عيار مرتفع من IBV لاستخدامه في العدوى التجريبية ودراسة إمراضية الفيروس على طيور الدجاج البلدي.

توافقت معطيات نتائج التمرير في أجنة الدجاج للعينات المحتوية على عترات الفيروس المكتشفة في الدراسة الحالية التي بينت وجود أجنة نافقة، تقزم، التفاف أجنة وتشابك أصابع الأجنة، مع معطيات (Patel et al., 2015; Khataby et al., 2016)). عند التشريح وفتح الأجنة شُوهد الجنين ملتفاً بشكل كروي مع تشوه القدمين وضغطها على الرأس، ولم تشاهد اختلافات مميزة في درجة الآفات والنفوق بين العترات، حتى داخل نفس النمط المصلي أو النمط الوراثي. تَظهر التغيرات المميزة للجنين بعد عدة أيام من حقن الفيروس حيث يمكن أن تكون التغييرات المرئية في الأجنة في التمريرات الأولى ضئيلة للغاية، خاصة بالنسبة للعترات الحقلية. يزداد عادةً معدل نفوق الأجنة وتقزمها مع زيادة عدد التمريرات التسلسلية. لذلك يفضل إجراء تأكيد وجود مستضد IBV أو RNA الفيروسي في البيض المحقون بطريقة الكشف عن المستضد 3–2 أيام (post infection)PI وبشكل مستقل عن حدوث آفات الجنين. تشكل السوائل والاغشية الجنينية لهذه العينات الخطوة الأولى في تصنيع اللقاح من العترات الحقلية المحلية، والتي لا بد أن تؤمن حالة مناعية كافيه ضد هذه العترات.

أشار(Grgic et al., 2008) في كندا في تجربته لدراسة إمراضيه خمس عترات من IBV على دجاج SPF أنّ العترات المدروسة سببت آفات خفيفة في الجهاز التنفسي، كذلك الأمر لوحظت في دراستنا علامات الضائقة التنفسية

مثل السعال، وإفرازات الأنف، والعيون الدامعة، وصعوبة التنفس المتمثلة في فتح المنقار، لكن بشكل خفيف الى معتدل وهذا يتوافق مع (Ignjatovic and Sapats, 2000).

كذلك أشار Purcell و McFerran (1972) إلى أنّ النتائج السريرية تمثلت بالشخير في غضون 48 ساعة بعد العدوى، وفتحت الطيور مناقيرها، وأصيبت بسعال. أثناء العدوى، كان لدى الدجاج انخفاض طفيف في استهلاك العلف، بالإضافة إلى ذلك، كان هناك تأثير طفيف على صوت الطيور وخلال فترة انخفاض تناول العلف بدت الطيور هادئة بشكل غير طبيعي، لم نلاحظ أي تغيرات جسيمة في الحويصلات الهوائية، والتي كانت رقيقة وواضحة وشفافة وهذا يتوافق مع (Grgic et al., 2008). كما اتفقت ملاحظاتنا مع (Cavanagh and Naqi, 2003) من حيث الضعف العام المصحوب بالكسل.

على الرغم من أنّ العلامات السريرية التي شوهدت كانت خفيفة إلى معتدلة، إلا أن أياً من العزلات لم تسبب آفات جسيمة، وقد يعزى ذلك لمقاومة الدجاج البلدي لفيروس IBV بالمقارنة مع الدجاج الهجين. ولم تكن هذه النتائج السلبية بعد النفوق متوافقة مع نتائج (Purcell and McFerran, 1972) اللذين وجدا غشاء مخاطيًا سميكًا ومتورمًا في القصبة الهوائية والشعب الهوائية خارج الرئة، ويعزى ذلك على الأغلب لسببين: أن التجربة طبقت على الدجاج البلدي بدلاً من دجاج SPF، وعمر الدجاج البلدي; حيث أنّ الأعمار الصغيرة عادةً أكثر تأثراً بالفيروس.

أبلغ عدد من الباحثين عن انخفاض الوزن المرتبط بعدوى IBV (Ignjatovic and Sapats, 2000; Cavanagh and Naqi, 2003) لكن في دراستنا لم نتطرق الى دراسة تأثير IBVعلى الوزن كون الدجاج البلدي ثنائي الغرض.

يجب توخي الحذر عند تفسير بياناتنا عن الطيور المحصنة بالفيروسات للأسباب التالية: إذ تم الحصول على هذه النتائج لطيور الدجاج البلدي التي كانت خالية من العدوى الأخرى وتم الاحتفاظ بها في ظروف تربية أقرب ما يمكن إلى المثالية. هذه الظروف غير محتملة في الحقل، إذ قد تتعرض الطيور للعديد من مسببات الأمراض في وقت واحد.

تعد تقنية ELISA طريقة ملائمة لمراقبة الحالة المناعية وعدوى الفيروس في قطعان الدجاج. من هنا أجريت الدراسة الحالية التي تستخدم تقانة الـ ELISA لقياس مستوى الأضداد في مصل مجموعة من الدجاج البلدي الذي طبقت عليه العدوى التجريبية لذريتين من عترات فيروس IBV وهما الذرية H120 و الذرية 4/91 إذ وجد مستوى عال من الأضداد في اليوم 14 بعد العدوى لكن انخفض في اليوم 21 بالنسبة لجميع العزلات والعترات العينات،

على الرغم من أن الـELISA تقنية تفتقر الى خصوصية النمط المصلي (serotype specificity Marquardt et al., 1981; Nagano et al., 1987)، إلّا أنّها مؤشر دقيق لمستوى أضداد الIBV (Cardoso et al., 2006;Emikpe et al., 2010;; Chhabra et al., 2015). يعتبر استخدام المجموعات التجارية لكشف الأضداد بالELISA عملاً روتينياً في الكثير من البلدان (Wing et al., 2002; Ghadakchi et al., 2005; Hadipour et al., 2011)، يدعم التفاعل المتبادل لـ IB ELISA مع العديد من عترات الفيروس والأضداد للكشف عن الأنماط المصلية الأخرى (Zellen & Thorsen 1986، De Wit 2000) فكرة أن ELISA هي أداة واعدة للدراسات المصلية، خاصة لاستخدامها في تقييم فعالية نظم التحصين ومراقبة الحالة المناعية للطيور في القطيع (Wing et al 2002 ،Cavanagh & Naqi 2003; Rauber et al., 2004)

الاستنتاجات والتوصيات

- العترات المعزولة ممرضة لأجنة الدجاج النامية، مع ظهور آفات تشريحية مميزة فيها.
- ظهور الأعراض السريرية المميزة للـ IBV على الدجاج المحلي المعدي بالعترات المعزولة بدون ظهور الآفات التشريحية الخاصة بالمرض.
- ارتفاع مستوى الأضداد بعد 14 يوماً من العدوى التجريبية ومن ثم تدنيها بعد 21 يوماً، ولكنها بقيت مرتفعة.
- ضرورة اجراء توصيف جزيئي للعترات المعزولة.
- ضرورة اجراء اختبار التحدي بين العترات المعزولة واللقاحات المستخدمة حقلياً.

Reference

1. ABDELAZIZ, F.; SALHAB, M.; ALOMAR, A. and ALJALLAD, T. " *Identification Some Genotypes Of Infectious Bronchitis Virus (IBV) in Broiler Flocks in Syria by Using RT-PCR*". Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol, (14) No (5)2019, 95-107.

2. ABRO, S. *Molecular Characterization and Detection of Infectious Bronchitis Virus*. Doctoral Thesis Swedish University of Agricultural Sciences. 2013. 7-54.

3. BOURSNELL, M.; BROWN, T.; FOULDS, I.; GREEN, P.; TOMLEY, F. and BINNS, M. *Completion of the sequence of the genome of coronavirus avian infectious bronchitis virus*. J. Gen. Virol. (68)1987, 55-77.

4. CARDOSO, W. M.; GOMES, L. P.; ROMAO, J. M. and SALLES, R.P.R. *Antibodies specific to infectious bronchitis in broilers in Ceará state, Brazil*. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia 58(3)2006, 20-25

5. CATANI T.; SHIRAISHI, Y.; TSUKAMOTO, Y.; KUWAMURA, M.; YAMAE, J.; SAKUMA, S. and GOHDA, M. *Ephithelial cell kinetics in the inflammatory process of chicken trachea infected with infectious bronchitis virus*. Journal Veterinary Medicine Science , 62(2)2000, 129-134.

6. CAVANAGH, D. *Coronaviruses in poultry and other birds.* Avian Pathol 34(6), 2005, 439-48.

7. CAVANAGH, D. and GELB, J. *Infectious Bronchitis. IN: SAIF, Y. M.; FADLY, A. M.; GLISSON, J. R.; MC DOUGALD, L. R.; NOLAN, L.K. & SWAYNE, D. E.* eds. Diseases of Poultry. 12th edition. Ames, IA, Blackwell Publishing, Ames, Iowa. 2008, 117-135.

8. CAVANAGH, D. and NAQI, S.A. *Infectious bronchitis. In: Saif, Y.M. (Ed.) Diseases of Poultry. 11th ed. Iowa: Iowa State Press*, 2003. 101-119.

9. CHHABRA, R.; FORRESTER, A.; LEMIERE, S.; AWAD, F.; CHANTREY, J.; GANAPATHY, K. *Mucosal, Cellular, and Humoral Immune Responses Induced by Different Live Infectious Bronchitis Virus Vaccination Regimes and Protection Conferred against Infectious Bronchitis Virus Q1 Strain.* Clin Vaccine Immunol 22: no. 9. 2015,1050 –1059.

10. DE WIT, J.J.; DE JONG, M.C.M.; PIJPERS, A. & VERHEIJDEN, J.H.M. *Transmission of infectious bronchitis virus within vacci- nated and unvaccinated groups of chickens*. Avian Pathology, 27, 1998b, 464–471.

11. DE WIT, J. J. *Detection of Infectious Bronchitis Virus.* Avian Pathology 29, no. 2, 2000,71-93.

12. EMIKPE, B. O.; OHORE, O. G., OLUJONWO, M. and AKPAVIE, S. O. *Prevalence of antibodies to infectious bronchitis virus (IBV) in chickens in southwestern Nigeria.* African Journal of Microbiology Research Vol. 4(1). 2010. pp. 092-095.
13. GHADAKCHI, H.; DADRAS, H.; POURBAKHSH, S.A.; HOSSEINI, S.M.H. *Standardization of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Infectious Bronchitis Virus Antibody.* Archives of Razi Institute,2005; 59, pp. 75–83.
14. GRGI´C, H.; HUNTER, D. B.; HUNTON, P.; NAGY, E. *Pathogenicity of infectious bronchitis virus isolates from Ontario chickens*. The Canadian Journal of Veterinary Research. 72, 2008,40 3–410.
15. GONZALEZ, J. M.; GOMEZ-PUERTAS, P.; CAVANAGH, D.; GORBALENYA, A. E. and ENJUANES, L. *A comparative sequence analysis to revise the current taxonomy of the family Coronaviridae*. Arch. Virol. 148, 2003, 2207–2235.
16. HADIPOUR, M.M.; AZAD, F.; VOSOUGHI, A.; FAKHRABADIPOUR, M. and OLYAIE, A. *Measurement of Antibodies to Infectious Bronchitis Virus in Indigenous Chicken Flocks Around Maharlou Lake in Iran*. International Journal of Animal and Veterinary Advances 3(3),2011, 182-185.
17. IGNJATOVIC, J.; ASHTON, D.F.; REECE, R.; SCOTT, P. & HOOPER, P. *Pathogenicity of Australian strains of avian infectious bronchitis virus.* J Comp Pathol 126(2-3), 2002.115-23.
18. IGNJATOVIĆ, J. & SAPATS, S. *Avian infectious bronchitis virus*. Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics) 19(2), 2000, 493- 508.
19. JACKWOOD, M.W. and DE WIT, J.J. *Infectious Bronchitis*. In D.E. Swayne, J.R. Glisson, L.R. McDougald, L.K. Nolan, D.L. Suarez, & V. Nair (Eds.), Diseases of Poultry 3th edn, 2013, 142–143.
20. KHATABY, K.; KICHOU, F.; LOUTFI, C. and ENNAJI, M.M. *Assessment of pathogenicity and tissue distribution of infectious bronchitis virus strains (Italy 02 genotype) isolated from moroccan broiler chickens*. BMC Veterinary Research 12:942016, 1-10.
21. LOOMIS, L.N.; CUNNINGHAM, C. H.; GRAY, H.L. and THORP, F. 1950. *Pathology of the chicken embryo infected with infectious bronchitis virus.* Am.j. vet.Res.11; 1950. 245-251.
22. MATTHIJS, M.G.; VAN ECK, J.H.; LANDMAN, W.J. & STEGEMAN, J.A. *Ability of Massachusetts-type infectious bronchitis virus to increase colibacillosis susceptibility in commercial broilers: a comparison between vaccine and virulent field virus*. *Avian Pathol* 32(5), 2003. 473-81.
23. MARQUARDT, W.W.; SYNDER, D.B. and SCHLOTHOBER, B.A. *Detection and quantification of antibodies to infectious bronchitis virus by enzyme-linked immunosorbent assay*. Avian Diseases 25, 1981,713-722.
24. MO, M.; HUANG, B.; WEI, P.; WEI, T.; CHEN, Q.; WANG, X.; LI, M.; FAN, W. *Complete Genome Sequences of Two Chinese Virulent Avian Coronavirus Infectious Bronchitis Virus Variants.* Journal of Virology, 86(19),2012, 10903–10904.
25. NAGANO, H.; HOHDATSU, T.; TSUCHIMOTO, M.; IDE, S.; YAMAGAMI, T.; YAMAGISHI, H.; FUJISAKI, Y. *Cross-reactivity among infectious bronchitis viruses in enzyme-linked immunosorbent assay.* Jpn. J. Vet. Sci., 49 1987, pp. 491-497.
26. Patel, B.H.; Bhimani, M.P.; Bhanderi, B.B.; Jhala, M.K. *Isolation and molecular characterization of nephropathic infectious bronchitis virus isolates of Gujara state, India*. Virusdisease 26,2015,42-47.

27. PURCELL, D.A. & MCFERRAN, J.B. *The histopathology of infectious bronchitis in the domestic fowl.* Research in Veterinary Science, 13, 1972, 116-122.
28. RAJ, G.D. and JONES, R. C. *Infectious bronchitis virus: Immuno- pathogenesis of infection in the chicken*. Avian Pathol. 26, 1997,677–706.
29. RAUBER, R. H.; FLRES, M. L.; PEREIRA, C. E.; FIORENTIN, L. *OcorrÍncia de Mycoplasma gallisepticum em poedeiras comerciais no Estado do Rio Grande do Sul e sua relaÁ,,o com a biosseguridade*. Revista Brasileira de CiÍncia AvÌcola, v.1, 2004, p.206.
30. SCHALK, A.F. and HAWN, M.C. *An apparently new respiratory disease in baby chicks.* J Am Vet Med Ass. USA, 78, 1931, 413-422.
31. SEIFI, S.; ASASI, K. & MOHAMMADI, A. *Natural co-infection caused by avian influenza H9 subtype and infectious bronchitis viruses in broiler chicken farms*. *Veterinarski Arhiv* 2, 2010, 269-281.
32. WING, C.H.; HONG, C.C. and SEAK, J.C.H. *An ELISA for antibodies against infectious bronchitis virus using an S1 spike polypeptide*. Veterinary Microbiology 85, 2002, 333-342.
33. WORTHINGTON, K.J.; CURRIE, R.J. & JONES, R.C. *A reverse transcriptase polymerase chain reaction survey of infectious bronchitis virus genotypes in Western Europe from 2002 to 2006*. Avian Pathol .37(3), 2008. 247-57.
34. ZELLEN, G.K.; THORSEN, J. *Standardization and application of the EnzymeLinked Immunosorbent Assay for infectious bronchitis*. Avian Diseases 30, 1986, 695- 698.
35. ZIEBUHR, J.; SNIJDER, E.J. & GORBALENYA, A.E. *Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the Nidovirales.* J Gen Virol 81(4), 2000, 853-79.