المجلة العراقية للعلوم البيطرية، المجلد 21، العدد 1، 2007 (53-61)

عزل فايروس التهاب القصبات الخمجي من فروج اللحم

فواز فاضل الحصيرجي و مزاحم ياسين العطار
فرع الاحياء المجهرية، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل. الموصل- العراق

(الأستلام: 9 أيار، 2006؛ القبول: 28 شباط، 2007)

الخلاصة

تم عزل فايروس التهاب القصبات الخمجي Infectious bronchitis virus (IBV) من أفراخ فروج اللحم، وقد جرى عزل الفايروس عن طريق الحقن في أجنة بيض الدجاج بوساطة التجويف اللقانقي الذي اظهر حساسيته لعزل الفايروس ، وقد احدث الفايروس النامي تغيرات مرضية في الاجنة المحقونة تمثلت بتقزم وتكور قسم من الاجنة وتثخن في الغشاء اللقانقي المشيمي Chorioallantoic membrane (CAM) كما درست امكانية تنمية الفايروس عن طريق الحقن في كيس المح وعن طريق الحقن في وريد الجنين. وتمت تنمية الفايروس في خلايا الزرع النسجي المحضرة من كلية افراخ الدجاج Chicken kidney cells (CKC) والتي اظهرت حساسيتها الواضحة لنمو الفايروس من خلال احداث التأثيرات المرضية للخلايا Cytopathic effect (CPE) بعد 24 ساعة من الحقن والتي تمثلت بأنتفاخ الخلايا المحقونة وتجمعها وقد زادت شدة هذه التأثيرات في اليوم الثاني والثالث بعد الحقن . وقد تم تشخيص الفايروس المعزول بالاختبارات المصلية وهي اختبار الترسيب في هلامة الاكار Agar gel precipitation test (AGPT) مع المصل المرجعي الموجب لفايروس التهاب القصبات الخمجي وكذلك اختبار التعادل المصلي Serum neutralization test (SNT) بأستخدام خلايا الزرع النسجي CKC.

ISOLATION OF INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS FROM BROILER

F. F. AL-Haseerchy and *M. Y. AL-Attar
Department of Microbiology, College of Veterinary Medicine,
University of Mosul. Mosul-Iraq.
*Author for correspondence; E- mail: mozahimalattar@yahoo.com

ABSTRACT

Infectious bronchitis virus (IBV) was isolated from broilers chicks. The virus isolation done by samples inoculation in chicken egg embryos via allontoic cavity route which showed sensitivity for virus isolation resulting in stunting and rounding of inoculated embryos, as well as thickening of chorioallantoic membrane (CAM). Cultivation of the isolated virus was carried out in the yolk sac and embryo vein .The virus was grown in chicken kidney cells (CKC) cultures resulting in cytopathic effect (CPE) after 24 h. post inoculation including swelling and accumulation of cells which increased in 2nd& 3rd day post inoculation. The diagnosis of isolated virus was carried out by Agar gel

precipitation test (AGPT) using reference positive antiserum and Serum neutralization test (SNT) using CKC tissue culture.

المقدمة

مرض التهاب القصبات الخمجي من الأمراض الخمجة والمعدية التي تصيب الدواجن يسببه فايروس التهاب القصبات الخمجي (IBV) الذي ينتمي الى عائلة الكورونا (1) وتؤدي الأصابه بهذا الفايروس الى ظهور اعراض مرضية في الجهاز التنفسي او الجهاز التناسلي في بعض الأحيان وفترة حضانة المرض من 1-3 أيام (2) ويسبب نسبة هلاكات عالية وخاصه في الأفراخ صغيرة العمر حيث تصاب بعمر 1-4 أسابيع وقد تصل نسبة الأصابه الى 100% ونسبة الهلاكات الى 30% (3). يسبب المرض خسائر اقتصادية كبيرة حيث يؤدي الى قلة اوزان دجاج اللحم وانخفاض نسبة التحويل الغذائي(4) ، وفي الدجاج البياض يسبب المرض انخفاض شديد في انتاج البيض تتراوح بين 3-10% وقد تصل في بعض الأحيان الى 50% اعتمادا على مرحلة الخمج وعترة الفايروس المسبب للأصابة (5)، وقد يكون انخفاض انتاج البيض هو الميزة الوحيدة للمرض في بعض القطعان المصابة ولكن في معظم القطعان يكون الأنخفاض مرتبطا مع صغر حجم البيض وتدني نوعية القشرة حيث تكون شفافة ومتشوهة فضلا عن حصول تغير المحتويات الداخلية للبيض اذ يكون الألبومين ذات قوام مائي (6). وقد شخص المرض في العراق بالأعتماد على العلامات السريرية ، الصفه التشريحيه ، فضلا عن بعض الصفات البيولوجية (7)، الا انه لم يتم عزل الفايروس المسبب لهذا المرض في فروج اللحم ولا طرق تنميته لذلك تم اجراء هذه الدراسة التي استهدفت عزل وتشخيص فايروس (IBV) من حالات مرضية في فروج دجاج اللحم ودراسة طرق تنميته في خلايا مختلفه.

المواد وطرائق العمل

1- النماذج المرضية : تم اخذ الرغامي، الرئتين، الكليتين من افراخ فروج اللحم يتراوح اعمارها بين 2-5 أسابيع والتي ظهرت عليها العلامات السريرية المميزة لمرض التهاب القصبات الخمجي ، وتم اخذ تلك الأعضاء المصابه بشكل معقم وجزئت الى اجزاء صغيرة كلا على انفراد في هاون خزفي معقم مع اضافة كمية مماثلة من الرمل المعقم وسحنت لحين تجانسها ثم اضيف عشرة امثالها من محلول PBS المعقم والحاوي على 500 وحدة عالمية من البنسلين البلوري مع 250 ميكروغرام من الستربتومايسين لكل 10 مللتر من السائل ثم دورت في المنبذة بسرعة 2500 دورة / دقيقه ولمدة 15 دقيقه ثم اخذ السائل الطافي وحفظ في المجمدة بدرجة – 20 م ° لحين استخدامه (8).

2- عزل الفايروس: تم استخدام طريقة التنمية في التجويف اللقانقي لبيض الدجاج المحلي المخصب بعد تحضينه 9-10 أيام ويفحص للتأكد من حيوية الجنين ثم يحقن كمية 0.1 مللتر من العالق الفايروسي المحفوظ في -20 م ° ثم يوضع البيض المحقون في الحاضنه بدرجة حرارة 37م ° ولمدة 6 أيام مع الفحص اليومي ثم قرأت النتائج ولعدة تمريرات متتالية (9).

تشخيص الفايروس المعزول: تم تشخيص الفايروس المعزول بأستخدام مصل مرجعي موجب مضاد لفايروس التهاب القصبات الخمجي تم الحصول عليه من ممثل شركة ميريال الفرنسية في الأردن واجري التشخيص بطريقتين:

أ- اختبار التعادل المصلي: حيث استخدمت طريقة Microneutrilization In cell culture بأستخدام خلايا الزرع النسجي المحضرة من كلية الدجاج CKC والتي تم تنميتها في اطباق الزرع النسجي الدقيقة (10).

ب- اختبار الترسيب في هلامة الأكار: حيث استخدمت اطباق بلاستيكية تحوي اكاروز متصلب بتركيز 1%, ثم يضاف العالق الفايروسي المراد تشخيصه في حفرة الأكاروز الوسطية ووزع المصل المرجعي الموجب ومصل سالب في الحفر المحيطية الأخرى وحضنت الأطباق في بيئة رطبه بدرجة حرارة 25م ° وتقرأ النتائج يوميا حتى اليوم الخامس (11).

3- تنمية الفايروس المعزول:

أ – التنمية في كيس المح : استخدم بيض الدجاج بعمر 6-7 أيام وتم حقن 0.1 مللتر من الفايروس المعزول التمرير الثالث في كيس المح (8).

ب – التنمية بطريقة الحقن في وريد الجنين : استخدم بيض الدجاج المخصب والمحضون لمدة 10-12 يوم حيث تكون الاوردة الجنينية واضحه عند الفحص الضوئي وتم اختيار اكبر وريد ثابت ويؤشر مساره بين خطين ثم يحقن كمية 0.05 مللتر من الفايروس المعزول التمرير الثالث بواسطة ابرة دقيقة G 26 يتم ادخالها بين الخطين المؤشرين لمسار الوريد ثم يتم سحب كمية من الدم للتأكد من ان الأبرة داخل الوريد ثم يحقن المعلق الفايروسي وتغلق الفتحة بالبارافين ويحضن البيض بدرجة حرارة 37م ° ويفحص يوميا حتى اليوم السابع من الحقن حيث يفتح البيض وتقرأ النتائج بالمقارنة مع السيطرة السالبة (9).

ج – التنمية في خلايا الزرع النسجي لكلية الدجاج : تم تحضير خلايا الزرع النسجي احادية الطبقه لكلية الدجاج وبعد اكتمال نمو هذه الخلايا على سطح قناني بلاستيكية معقمة خاصة ذات سعة 25 سم ^{3} حقنت بكمية 1 مللتر من العالق الفايروسي التمرير الثالث وحضنت الخلايا في 37م ° لمدة ساعة كاملة لمنح الفايروس فترة مناسبه لالتصاقه على تلك الخلايا ثم اضيف اليها كمية كافية من الوسط الزرعي الحافظ ثم اعيد الحضن في 37م ° مع الفحص اليومي لملاحظة ظهور التأثير المرضي الخلوي للفايروس مع مقارنته بمجموعة السيطرة المتكونة من خلايا غير محقونة (8).

النتائج

1- عزل الفايروس: تم عزل فايروس مرض التهاب القصبات الخمجي من نماذج الرغامي والرئتين بعد تمريرها ثلاث مرات في التجويف اللقانقي لاجنة بيض الدجاج حيث لم تظهر اية تغيرات ملحوظه في التمرير الأول.وقد لوحظت تغييرات على الجنين المحقون وغشاء اللقانقي المشيمي بعد خمسة أيام من الحقن بنسبة 25% بينما وصلت هذه النسبة إلى 50% في التمرير الثالث جدول (1) مع زيادة شدة التغيرات على الجنين شملت حدوث التقزم والتكور لبعض الأجنة مقارنة بمجموعة السيطرة صورة (1).

2- تنمية الفايروس المعزول:

أ- التنمية في كيس المح: لوحظ إمكانية نمو الفايروس المعزول عن طريق الحقن في كيس المح من خلال حدوث تقزم الأجنة المحقونة مع احتقان شديد في بعض الأجنة صورة(2) وإنكماش كيس المح وتثخنه وذلك بعد مرور 6 أيام من الحقن جدول (2).

ب- التنمية عن طريق الحقن في الوريد: لم تظهر الأجنة المحقونة عن هذا الطريق تغيراً ملحوظاً في حجم الجنين مقارنة مع مجموعة السيطرة باستثناء وجود الخزب واحتقان على الغشاء اللقانقي المشيمي جدول (2).

ج- تنمية الفايروس المعزول من خلايا الزرع النسيجي المحضرة من كلية الدجاج:

لوحظ التأثير المرضي المعل Cytopathic effect (CPE) للفايروس على الخلايا المحقونة بشكل إستدارة الخلايا وتجمعها وإنتفاخها بعد 24 ساعة من الحقن ثم زادت نسبة الخلايا المتأثرة بعد مرور 48-72 ساعة من الحقن ليصل إلى مرحلة إنفصال الخلايا من على السطح.

3- تشخيص الفايروس المعزول:

تم تشخيص الفايروس المعزول باستخدام مصل مرجعي موجب متخصص لفايروس التهاب القصبات الخمجي وبطريقتين:

أ- إختبار التعادل المصلي: أظهر المصل المضاد المرجعي قابليته على معادلة المستضدات الفايروسية المعزوله باستخدام خلايا الزرع النسيجي المحضرة من كلية الدجاج عند إستخدام إختبار التعادل المصلي الدقيق وبمعيار يتراوح 8-32 .

ب- إختبار الترسيب في هلامة الاكار: تم إختبار الفايروسات المعزولة كمستضدات في هذا الاختبار مع المصل المرجعي الموجب وكانت نتائج هذا الإختبار ظهور خط ترسيبي واضح بين المستضد والمصل المرجعي الموجب بعد مدة من 24-72 ساعة بدرجة 25°م وكانت النتيجة واضحة عند إستخدام عالق CAM منها عن إستخدام السائل اللقانقي .

الجدول 1: العلامات العيانية الملاحظة عند عزل فيروس التهاب القصبات الخمجي في أجنة أفراخ الدجاج عند حقنها عن طريق التجويف اللقانقي.

التغيرات المرضية في الأجنة			
رقم التمرير	الجنين	CAM	النسبة المئوية للتغيرات
1	-	-	% 0
2	+	*	% 25
3	+	**	% 50

-عدم حدوث تغيرات؛ + صغر حجم الجنين وتكوره؛ * تثخن الغشاء اللقانقي المشيمي ك؛ ** تثخن وإحتقان الغشاء اللقانقي المشيمي.

الجدول2: العلامات العيانية الملاحظة عند عزل فيروس التهاب القصبات الخمجي في أجنة أفراخ الدجاج عند حقنها عن طريق كيس المح والوريد.

التغيرات المرضية في الأجنة (السائل اللقانقي المأخوذ من التمرير الثالث عند الحقن عن طريق الكيس اللقانقي)					
الحقن بكيس المح			الحقن بوريد الجنين		
الجنين	CAM	النسبة المئوية للتغيرات (للأجنة)	الجنين	CAM	النسبة المئوية للتغيرات (للأجنة)
# +	–	% 50	–	# *	% 0

–عدم حدوث تغيرات ؛ + صغر حجم الجنين وتكوره ؛ * تثخن في الغشاء اللقانقي المشيمي؛ # إحتقان .

صورة 1: يلاحظ حدوث التقزم والتكور للجنين مقارنة بمجموعة السيطرة .

صورة 2: يلاحظ حدوث تقزم الأجنة المحقونة مع احتقان شديد في الأجنة مقارنة بمجموعة السيطرة.

المناقشة

نظرا للتداخل الحاصل في تشخيص الأمراض الفايروسية التي تصيب الجهاز التنفسي في أفراخ فروج اللحم ومنها مرض التهاب القصبات الخمجي الذي كان معروف سابقا بإصابته للدجاج البياض فقط لذا أصبح من الضروري عزل العامل المسبب لهذا المرض ودراسة طرق تنميته وتأثيراته المرضيه وصولا إلى الاستفادة من هذه العزلات المحلية لتصنيع لقاح فعال للسيطرة على هذا المرض (12،13).

وقد كانت طريقة عزل الفايروس في أجنة بيض الدجاج عن طريق الحقن في التجويف اللقانقي حساسة لعزل هذا الفايروس بالرغم من عدم ظهور تأثير ملحوظ للنمو في التمرير الأول والذي يعزى الى عدم تطبع الفايروس للنمو وهذا مايلاحظ عند العزل الأولي للفايروسات الحقلية. بينما ظهر التأثير المعل واضحا على الأجنة في التمرير الثاني والثالث وهذا يتفق مع ما ذكره(1) كما أظهرت التنمية للفايروس عن طريق الحقن في كيس المح تغيرات مرضية في الأجنة وبنسبة 50 % على الرغم مما أشار إليه كل من (14، 15) من أن المح يحتوي على أجسام مضادة اميه إلا أن سبب نمو الفايروس في كيس المح في هذه الدراسة قد يرجع إلى إستخدام بيض محلي من دجاج غير ملقح ضد مرض التهاب القصبات الخمجي.

ولم يحدث الحقن في وريد أجنة الدجاج أي تغيرات على حجم الأجنة وإنما كانت التغيرات مقتصرة على CAM ربما يرجع السبب إلى أن خلايا CAM تعتبر أكثر

حساسية واستعداد للإصابة بهذا الفايروس (16) كما أشار (17) إلى إمكانية إستخدام خلايا CAM بشكل خاص في المزارع النسيجية لتنمية الفايروس.

هذا فضلاً عن إمكانية وجود بعض المثبطات في الدم التي تؤثر على تركيز الفايروس المحقون في الوريد بحيث لايصل الى حد تأثيره على الجنين (18).

وقد تم عزل الفايروس من الرغامي والرئتين دون الكلية حيث أن الرغامي هو الموضع الأولي لنمو الفايروس وتكاثره إلى الرئتين ثم الأعضاء الأخرى (5).

لذلك فإن الرغامي يعتبر العضو الهدف لنمو فايروس IBV وتكاثره،والعضو الملائم أيضاً لعزل الفايروس خاصة خلال الأسبوع الأول من الإصابة حيث تؤخذ العينه من مسحات الرغامي حيث أن فيروسات IBV ذات الفة عالية للخلايا الظهارية المهدبه المبطنة للرغامي وهذا ما يتفق مع (19، 20)

أما عدم إمكانية عزل الفايروس من الكلية فقد يعود إلى نوع العتره الفايروسية المعزولة حيث أن العتره من نوع T الاستراليه هي التي تصيب الكلية فقط وهذا يتفق مع (21).

وقد أظهرت خلايا الزرع النسيجي الوارده من كلية أفراخ الدجاج حساسيتها لنمو فايروس IBV وتكاثره حيث بدأ ظهور CPE بعد 24 ساعة من الحقن مع زيادة شدة التأثيرات المعله للخلاياخلال الأيام الثلاثة اللاحقة وهذا يتفق مع ماذكره (22). كما إن فايروس IBV يتكيف بسرعه وسهوله في خلايا الزرع النسجي فضلاً عن سهولة قراءة النتائج بملاحظة تكون ال CPE وهذا ما ذكره (10). ولغرض تشخيص الفايروس المعزول تم إستخدام أكثر من إختبار مصلي أولها إختبار الترسيب في هلامة الاكار والذي يعد من الإختبارات السهلة والسريعة لتشخيص IBV(23 ، 24) فقد استخدم مصل موجب مرجعي مقابل عالق CAM الذي اظهر نتائج اوضح من إستخدام السائل اللقانقي وقد يرجع السبب في ذلك الى احتواء CAMعلى تركيز اعلى من الفايروس بألمقارنة مع السائل اللقانقي وهذا ماأشار اليه (25) .

أما الإختبار الثاني المستخدم لتشخيص العزلات الفيروسيه فهو إختبار التعادل المصلي في خلايا الزرع النسيجي الوارده من كلية أفراخ الدجاج وهذا الإختبار يعد من الإختبارات الحساسة المهمة في تشخيص الفايروس وذا حساسية أكبر من إختبار تثبيط التلازن الدموي (5 ، 26) كما ان إجراء هذا الاختبار في خلايا الزرع النسيجي يعتبر افضل من اجراءه في أجنة بيض الدجاج (10) وقد يرجع السبب في ذلك الى أن الفايروس يتكيف بسرعه للنمو في خلايا الزرع النسيجي والتي لاتحتوي على أجسام مضادة ، بينا ذكر (27 ، 28) بأن اختبار الاليزا يمكن الاستفادة منه ايضاً في الكشف عن الاجسام المضادة خلال الاسبوع الاول من الاصابة.

المصادر

1. Cavanagh D, Naqi SA. Infectious Bronchitis In: Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, McDougald LR, Saif YM. Disease of poultry. 10 th Ed. Mosby Publishing Company, UK, 1997; 511-521.
2. Jordan F, Pattison M, Alexander D, Faragher T. Diseases of poultry 5th Ed. W. B .Saunders, 2002.
3. Murphy FA, Gibbs EPJ, Horzinek MC, Studdert MJ. Veterinary Virology 3rd ed. Academic press, USA, 1999, 505.

4. Ambali AG. Recent studies on the enterotropic strain of avian infectious bronchitis virus. Vet. Res Commun 1992; 16 (2):153-157.
5. Ignjatovic J, Sapats S. Avian infectious bronchitis virus. Rev Sci Tech 2000; 19 (2): 493-508.
6. Quinn PJ, Marky Bk, Carter ME, Donnelly WJC, Leonard FC. Veterinary Microbiology & Microbial disease. Blackwell publishing company. UK, 2002; 419-420.
7. Azab A, Basher HA, Hassan SM. Infectious bronchitis in broiler chicken in Iraq. Isolation & identification of the isolant (AM 88). Indian J Vet Med 1989; 9 (2): 104-107.
8. Rovozzo GC, Burke CN. A manual of basic virological techniques prentie Hali Inc; Englewood cliffs New Jersey 1973; 139-150.
9. Biggs PM, Milne BS. Use the embryonating egg in studies of Marek's disease. Am J Vet Res 1971; 23: 1795-1809.
10. Wooley RE, Brown J, Davis RB, Blue JL, Lukert PD. Comparison of a microneutralization test in cell culture and virus neutralization test in embryonated eggs for determining infectious bronchitis virus antibodies. J Clin Microbiol 1976; 3(2):149-156.
11. Lohr J E. Infectious bronchitis agar-gel precipitin test--use of infected allantoic fluid as antigen. Avian Dis 1980; 24(2):463-467.
12. Hofstad MS. Infectious bronchitis In: Hofstad MS, Barnes HJ, Calnek BW, Reid WM, yoder HW. Diseases of poultry 8TH Edi. Iowa State University Press Ames Iowa USA 1984; 429.
13. Villegas P. Viral diseases of the respiratory system. Poult Sci 1998; 77(8):1143-1145.
14. Keck LD, Skeeles JK, McNew RW. Antibody detection in matched chicken sera and egg-yolk samples by commercial enzyme-linked immunosorbent assay kits for Newcastle disease virus, Infectious bronchitis virus,infectious bursal disease virus, and avian reovairus.Avian Dis 1993 ; 37(3): 825-858.
15. Silim A, Venne D. Comparison of egg-yolk and serum antibody titers to four avian viruses by enzyme-linked immunosorbent assay using paired field samples. Avian Dis 1989; Des; 33(4): 643-648.
16. Buxton A, Fraser G. Animal microbiology. Vol 2, Blackwell Scientific publication. Oxford UK; 1977: 573 .
17. Cursiefen D, Becht H. In vitro cultivation of cells from the chorioallantoic membrane of chick embryos. Med Microbiol Immunol 1975; 1161(1): 3-10.
18. Purchase H G, Cunningham CH, Burmester BR. Genetic differences among chicken embryos in response to inoculation with an isolate of infectious bronchitis virus. Avian Dis 1966; 10(2):162-172.
19. Jones RC, Ambali AG. Re-excretion of an eterotropic infectious bronchitis virus by hens at point of lay after experimental infection at day old. Vet Rec 1987; 120(26): 617-618.
20. Alexander DJ, Cough MS. Isolation of avian infectious bronchitis virus from experimentally infected chickens. Res Vet Sci 1997; 23: 344-347.
21. Ignjatovic J, Reece R, Ashton F. Susceptibility of three genetic lines of chicks to infection with a nephropathogenic T strain of avian infectious brochitis virus. J Comp Pathol 2003; 128 (2-3): 92-98.

22. Alexander DJ, Collins MS. Effect of pH on the growth and cytopathogenicity of avian infectious bronchitis virus in chick kidney cells. Arch Virol 1975; 49 (4): 339-348.
23. Yamakami MT, Koimaru H, Yoshimura M, Masu S, Shirai J, Kawamura H. Serotypes of avian infectious bronchitis virus isolates fom field cases in Japan. Avian Dis 1982; 26 (4): 946-952.
24. Lohr JE. Diagnosis of infectious bronchitis by examination of tracheal mucus for IB-precipitating antigens. Avian Dis 1981; 25(4): 1058.
25. Cavanagh D, Nagi SA. Infectious Bronchitis. In: Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, McDougald LR, Saif YM. Diseases of poultry10th Ed. Mosby Publishing Company UK 1997; 511-521.
26. Cook JKA, Brown AJ, Bracewell CD. Comparsion of heamagglutination inhibition test & the neutralization test in tracheal organ culture for typing of infectious bronchitis virus strain. Avian Pathol. 1987; 16: 505-511.
27. De Wit JJ, Van Eck JH, Crooijmans RP, Pijpers AA. Serological survey for pathogens in old fancy chicken breeds in central and estern part of the Netherlands. Tijdschr Diergeneeskd. 2004; 129(10): 324-327.
28. Manoharan S, Parthiban M, Prabhakar TG, Rajavelu G. Rapid serological profiling by an immunocomb-based dot-enzyme-linked immunosorbent test for three major poultry diseases. Vet Res Commun 2004; 28(4): 339-346.