جداسازی و شناسایی ویروسهای برونشیت عفونی طیور در بین سالهای ۷۹-۱۳۷۶ از مرغداریهای صنعتی ایران

دکتر مهدی وصفی مرندی[1] دکتر محمد حسن بزرگمهری فرد[1]

مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ٥٦، شماره ٣، ١٢٤-١١٩، (١٣٨٠)

تعداد ۵۴۶ نمونه بافتی شامل ریه، نای و کلیه تهیه شده از گله‌های گوشتی، تخمگذار و مادر در بین سالهای ۱۳۷۹-۱۳۷۶ جهت جداسازی ویروسهای تنفسی طیور به آزمایشگاه ویروس‌شناسی طیور بخش بیماریهای طیور دانشکده دامپزشکی ارجاع داده شد. در مجموع تعداد ۳۷ مورد ویروس برونشیت عفونی طیور در تخم‌مرغهای جنین‌دار ۹-۸ روزه جدا گردید. کلیه ویروسهایی که منجر به مرگ جنین، تاخیر در رشد جنین و رسوب اورات در مزونفرون‌ها را نشان می‌دادند و موجب هماگلوتیناسیون گلبولهای قرمز مرغ نمی‌شدند به عنوان نمونه‌های آنفلوانزا و نیوکاسل منفی تلقی شدند. و سپس حضور ویروس برونشیت عفونی در مایعات آلانتوئیک و سلولهای مایع آلانتوئیک توسط آزمایشات دات ایمنوبلوت و ایمنوفلورسانس غیر مستقیم به کمک آنتی سرم اختصاصی گروه برونشیت عفونی تایید گردید. میزان همخوانی بین آزمایشات ایمنوفلورسانس و دات ایمنوبلوت در شناسایی ویروسهای برونشیت عفونی طیور ۸۰ درصد تعیین گردید. نتایج به دست آمده از آزمایش نوترالیزاسیون ویروس (VNI) نشان داد که خنثی شدن جدایه ۲۱۰۰/۱ توسط آنتی سرم پول به مقدار ۲/۴ (VNI) بیشتر از آنتی سرم اختصاصی سروتیپ ماساچوست H120 می‌باشد. این اختلاف ممکن است بیانگر تفاوت آنتی‌ژنیکی بین سویه فیلد و واکسینال H120 باشد لذا تعیین سروتیپ و ژنوتیپ ویروسهای جدا شده برای اثبات حضور واریانت یا واریانت‌ها در مرغداریهای کشور الزامی است.

واژه‌های کلیدی: بیماری برونشیت عفونی طیور، جداسازی، تخم‌مرغهای جنین‌دار.

ویروس برونشیت عفونی یا IBV (Infectious bronchitis virus)، پروتوتیپ ویروسهای خانواده کوروناویریده و عامل بیماری برونشیت عفونی طیور یا IB (Infectious bronchitis) می‌باشد. برونشیت عفونی طیور بیماری حاد و فوق‌العاده واگیر می‌باشد که دستگاه تنفس و کلیوی گله‌های گوشتی و دستگاه تناسلی گله‌های تخمگذار اعم از تجارتی، مادر، اجداد و لاین را درگیر می‌کنند (۲). این بیماری به دلیل کاهش رشد پرندگان، افزایش ضریب تبدیل غذا، افت تولید و مرگ و میر خسارات اقتصادی سنگینی را به صنعت طیور در سرتاسر دنیا وارد می‌کند (۱۷). بیماری در ماکیان جوان با علایم تنفسی و کالبد گشایی برجسته و در بالغین با افت تولید، تغییرات در پوسته، اندازه و کیفیت تخم‌مرغ همراه با یا بدون همراه با علایم تنفسی تشخیص داده می‌شود (۲). برخی از سویه‌های ویروسهای برونشیت عفونی طیور تمایل خاصی به کلیه داشته و ایجاد نفریت - نفروز در ماکیان جوان و ارولیتیازیس در بالغین تخمگذار می‌کند (۵).

از نظر بالینی، بیماری برونشیت براحتی از برخی از بیماریهای تنفسی طیور مانند نیوکاسل، لارینگوتراکئیت، تشخیص داده می‌شود ولی تفکیک آن با برخی بیماریهای دیگر مانند اشکال تحت حاد آنفلوانزا، بیماری تنفسی مزمن یا CRD مشکل می‌باشد. لذا در چنین مواردی جداسازی ویروس برونشیت عفونی طیور در تخم‌مرغهای جنین‌دار روش مناسبی برای تشخیص تفریقی به حساب می‌آید (۶). از آنجایی‌که انتخاب سویه‌های واکسینال برونشیت عفونی طیور در یک منطقه، براساس سروتیپ جدایه‌های ویروسهای برونشیت عفونی آن منطقه انجام می‌گیرد لذا جداسازی و شناسایی سروتیپهای موجود در یک منطقه برای تغییر سویه واکسینال و ارایه برنامه واکسیناسیون به منظور محافظت مطلوب و بیشتر در مقابل سروتیپهای محلی از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد (۱۲). به دنبال جداسازی ویروسهای برونشیت عفونی طیور، تعیین سروتیپ جدایه‌ها توسط آزمایش نوترالیزاسیون ویروسی یا VN (Virus-neutralization)، آزمایش ممانعت از هماگلوتیناسیون یا HI (Hemagglutination inhibition)، آنتی‌بادیهای منوکلونال و PCR-RFLP انجام می‌گیرد (۱۲، ۱۱، ۹، ۶).

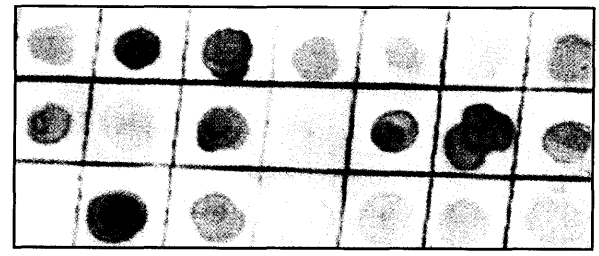
افزون بر اقدامات امنیت زیستی، کنترل بیماری برونشیت عفونی معمولاً با واکسنهای تخفیف حدت یافته و کشته تهیه شده از سروتیپهای واکسینال ویروسهای برونشیت عفونی طیور مانند ماساچوست (Massachusetts)، کانکتیکت (Connecticut) و آرکانزاز (Arkansas) انجام می‌گیرد (۷و۲). ولی علی‌رغم استفاده گسترده از واکسیناسیون برای کنترل بیماری برونشیت عفونی، واگیری آن در گله‌های گوشتی و تخمگذار به دلیل ظهور سویه‌های واریانت اتفاق می‌افتد (۱۴، ۱۰، ۸، ۷، ۴، ۳). در نتیجه برخی از کشورها علی‌رغم واکسیناسیون جوجه‌ها در یکروزگی توسط واکسنهای تخفیف حدت یافته ماساچوست، در ۱۸ روزگی آنها را با واکسنهای دوگانه نیوکاسل و سویه‌های واریانت برونشیت عفونی طیور، مجدداً ایمن می‌کنند (۱۴و۸).

بیماری برونشیت عفونی طیور، یکی از بیماریهای مهم تنفسی گله‌های مختلف طیور در کشور می‌باشد. قریب به ۵۰ درصد گله‌های گوشتی سرتاسر کشور و کلیه گله‌های تخمگذار توسط واکسنهای تخفیف حدت یافته H120 و H52 و واکسنهای کشته چند گانه مبتنی بر سویه ماساچوست M41 واکسینه می‌شوند ولی علی‌رغم واکسیناسیون، بیماری در برخی از گله‌های واکسینه و غیر واکسینه گاها مشاهده می‌شود. در سالهای گذشته، آقاخان و همکاران ویروسهای برونشیت عفونی طیور را از گله‌های گوشتی و تخمگذار جدا نموده‌اند ولی کلیه جدایه‌ها متعلق به سروتیپ ماساچوست بوده‌اند. این محققین، ردپایی از ویروسهای واریانت برونشیت عفونی طیور را در مرغداری صنعتی کشور نیافته‌اند (۱). هدف از انجام این تحقیق جداسازی ویروسهای برونشیت عفونی طیور در تخم‌مرغهای جنین‌دار و سپس شناسایی آنها توسط آزمایش ایمونوفلورسانت غیر مستقیم و دات ایمونوبلوت توسط آنتی سرمهای اختصاصی می‌باشد.

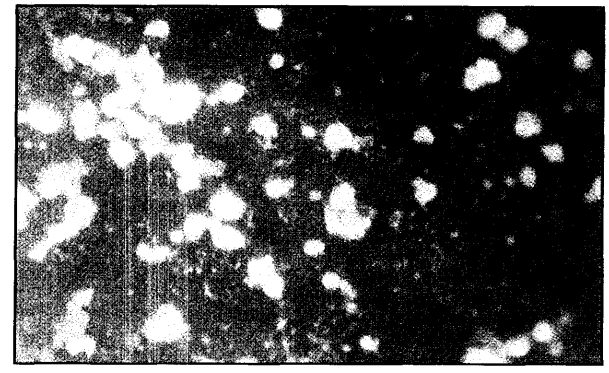
مواد و روش کار

جدا سازی ویروس: جداسازی ویروس براساس دستورالعمل Gelb و Jackwood (۶) با اندکی اصلاح در تخم‌مرغهای جنین‌دار ۹-۸ روزه تهیه شده از یک فارم مادر گوشتی نیرومند عاری از مایکوپلاسم و آنفلوانزا که سه بار واکسن زنده و یکبار با واکسن کشته ماساچوست قبل از مرحله تولید واکسینه شده بودند، انجام گردید. مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های بافتی هموژن شده به ۴-۲ عدد از تخم‌مرغهای جنین‌دار از طریق مسیر داخل حفره آلانتوئیک تلقیح و در انکوباتور قرار داده شدند. در هر مورد جداسازی، حداقل تعداد ۵ عدد تخم‌مرغ جنین‌دار بدون انجام هیچ نوع تلقیح، تا آخر دوره انکوباسیون در انکوباتور نگهداری و به عنوان کنترل منفی در آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گرفتند. کلیه تخم‌مرغهای تلقیح شده روزانه یکبار به مدت ۷-۶ روز بعد از تلقیح، تحت نوربینی با دستگاه نوربین قرار گرفتند. جنینهای تلف شده بلافاصله و جنینهای تلف نشده قبل از ۱۵ روزگی، از انکوباتور خارج و مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شدند. سپس مایع آلانتوئیک کلیه جنینها به شکل استریل برداشت و حضور یا عدم حضور

۱) گروه آموزشی علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.



تصویر ۱- واکنش آنتی سرم اختصاصی گروه برونشیت عفونی طیور با مایعات آلانتوئیک جدایه‌های مختلف فیلد را، با استفاده از آزمایش دات ایمنوبلوت (DIB) نشان می‌دهد.



تصاویر ۲- این تصاویر واکنش آنتی‌سرم اختصاصی گروه برونشیت عفونی طیور را با سلولهای مایعات آلانتوئیک سویه ۲۱۰۰/۱ ، با استفاده از آزمایش ایمنوفلورسانس غیر مستقیم (IIF) نشان می‌دهد.

جدول۱ - این جدول نتایج حاصل از آزمایشات ایمنوفلورسانس غیر مستقیم (IIF)، دات ایمنوبلوت (DIB) و شاخص نوترالیزاسیون ویروس (VNI) برونشیت عفونی طیور سروتیپ ماساچوست، سویه H۱۲۰ را با استفاده از آنتی‌بادیهای پلی کلونال اختصاصی سروتیپ ماساچوست و گروه برونشیت عفونی تهیه شده در جوجه‌های SPF را نشان می‌دهد.

آنتی سرم / آزمایش	آنتی سرم اختصاصی سروتیپ ماساچوست، ... روز بعد از تلقیح اولیه			آنتی سرم اختصاصی گروه برونشیت، ... روز بعد از تلقیح اولیه			آنتی سرم کنترل منفی
	۷	۱۴	۲۱	۷	۱۴	۲۱	
IIF	-	۲+	۳+	۲+	۳+	۴+	-
DIB	۱+	۳+	۴+	۴+	۴+	۴+	۱+
VNI	۱/۶	۳/۵	۶/۴	۳/۸	۳/۶	۳/۲	۱/۴

ویروس با فعالیت هماگلوتیناسیون مثبت، ارزیابی گردید. بعد از برداشت مایع آلانتوئیک، وجود خونریزی بر روی جنین، رسوب اورات در کلیه‌ها، تاخیر در رشد جنین و نکروز کانونی کبد تحت مشاهده قرار گرفتند. هر نمونه‌ای که طی ۳ پاساژ متوالی فاقد نشانیهای ماکروسکوپیک ویروس برونشیت عفونی بر روی جنین بود منفی تلقی گردید.

تهیه آنتی سرم اختصاصی: آنتی سرم اختصاصی بر علیه سروتیپ ماساچوست سویه H۱۲۰ و آنتی سرم اختصاصی گروه برونشیت عفونی طیور در ۱۸ قطعه جوجه ۵ هفته SPF نژاد لگهورن براساس دستورالعمل Karaca و Naqi انجام گردید (۹). به همین منظور جوجه‌ها به دو گروه ۱۲ و ۶ تایی تقسیم و در اتاقهای کاملاً مجزا نگهداری شدند. هیچ نوع تلقیح برای گروه ۶ تایی انجام نگردید و به عنوان گروه کنترل تا انتهای دوره آزمایش در شرایط یکسان با گروه آزمایش نگهداری شدند. کلیه جوجه‌های گروه ۱۲ تایی با 10^5 بر مبنای EID۵۰ توسط سویه H۱۲۰ به طریق داخل بینی-چشمی تلقیح گردیدند. جوجه‌ها در روزهای ۷، ۱۴، ۲۱ بعد از تلقیح خونگیری و تحت آزمایش ایمنوفلورسانس، دات ایمنوبلوت و نوترالیزاسیون ویروس قرار گرفتند. در روز ۲۸ بعد از تلقیح، خونگیری به طریق آسپیراسیون داخل قلبی از ۶ قطعه از جوجه‌ها به عمل آمده و سرم آنها تهیه و در بن ماری ۵۶ درجه به مدت ۳۰ دقیقه غیر فعال و به عنوان آنتی سرم اختصاصی سروتیپ ماساچوست مورد استفاده قرار گرفت. هفت روز بعد از آخرین تلقیح با سویه H۱۲۰، نیم دیگری از جوجه‌های تلقیح شده مجدداً توسط ویروسهای رفرانس آرکانزاز، کانکتیکوت و ماساچوست به همان طریق داخل بینی-چشمی تلقیح شدند. سپس در روزهای ۷، ۱۴، ۲۱ بعد از تلقیح ثانویه، خونگیری و سرم تهیه شده به عنوان آنتی سرم اختصاصی گروه برونشیت عفونی طیور در آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

آزمایش ایمنوفلورسانس غیر مستقیم: آزمایش ایمنوفلورسانس غیر مستقیم یا ("IIF" Indirect Immuno Fluorescent) بر مبنای دستورالعمل ارایه شده توسط Braune و Gentry با مختصری اصلاح به شرح زیر انجام گردید (۱۸). ابتدا مایعات آلانتوئیک تخم‌مرغهای جنین‌دار ۹-۸ روزه تلقیح شده توسط نمونه‌های تهیه شده از ماکیان آلوده به بیماریهای تنفس و یا کلیوی جمع‌آوری و بعد از سانتریفوژ با دور ۱۰۰۰ به مدت ۶ دقیقه سلولهای مایع آلانتوئیک رسوب و ۳ بار متوالی با PBS استریل شستشو داده شدند و در نهایت رسوب سلولها در ۳۰۰ میکرولیتر PBS مخلوط و به شکل نقطه‌ای بر روی اسلایدهای شیشه‌ای قرار داده شدند. بعد از خشک شدن سلولها بر روی اسلایدها، نمونه‌ها توسط استن به مدت ۳ دقیقه تثبیت و در ۲۰- درجه نگهداری شدند. برای انجام آزمایش ایمونوفلورسانس، آنتی سرم پلی‌کلونال اختصاصی سروتیپ، گروه برونشیت، PBS و آنتی سرم منفی بر روی ۴ قسمت مجزای سلولهای تثبیت شده بر روی اسلایدها اضافه، و به مدت ۳۰ دقیقه در داخل محفظه مرطوب در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. بعد از ۳ بار شستشو با PBS، آنتی بادی فلورسنت تهیه شده بر علیه IgG ماکیان (.BMB.Co) را با رقت ۱ به ۲۰ افزوده و به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه قرار داده شد. سپس توسط PBS شستشو و بعد از خشک شدن، لامل توسط روغن گلیسرین بر روی نمونه‌های سلولی قرار داده شد. اسلایدهای تهیه شده از نمونه‌های مختلف کلینیکی توسط میکروسکوپ ایمنوفلورسانس تحت مطالعه قرار گرفتند.

آزمایش دات ایمنوبلوت: آزمایش دات ایمنوبلوت یا ("DIB" Dot Immunoblotting) برای نشان دادن حضور ویروسهای برونشیت عفونی در مایعات آلانتوئیک به کمک آنتی سرم اختصاصی گروه برونشیت عفونی به شرح زیر تعیین گردید (۱۳). ابتدا مقدار ۱۰ میکرولیتر از مایعات آلانتوئیک جدایه‌های مختلف بر روی کاغذ نیتروسلولز قرار داده تا در درجه حرارت آزمایشگاه خشک گردد. سپس کاغذ نیتروسلولز در PBS-T حاوی آلبومین سرم گاو (BSA) خوابانده و بعد از نیم ساعت با PBS-T شستشو داده شد. در

جدول ۲- این جدول جداسازی ویروسهای برونشیت عفونی را از نمونه‌های بافتی نای ریه و کلیه گله‌های گوشتی، تخمگذار و مادر را در بین سالهای ۷۹-۷۶ و شناسایی آنها توسط آزمایشات ایمنوفلورسانس و دات ایمنوبلوت را نشان می‌دهد. اعداد اعشاری ۱/ بیانگر جداسازی ویروس از نمونه‌های نای، ۲/ از ریه و ۳/ از کلیه را نشان می‌دهد . واکنش مثبت در آزمایش DIB یا IIF مربوط به ویروس جدا شده از یک یا هر دو بافت مختلف می‌باشد.

شماره جدایه	استان	سال	نژاد	بافت	آزمایش IF	آزمایش DIB
۲۰۱۲/۱	تهران	۷۶	گوشتی	نای	انجام نشده	+
۲۰۲۵/۱ و ۲۰۲۵/۲	قم	۷۷	گوشتی	نای و ریه	انجام نشده	+
۲۰۳۵/۱	قم	۷۷	گوشتی	ریه	انجام نشده	+
۲۰۵۳/۱	قزوین	۷۸	گوشتی	نای	-	+
۲۰۶۲/۱	اصفهان	۷۸	گوشتی	نای	-	+
۲۱۶۳/۱ و ۲۱۶۳/۲	گیلان	۷۸	پولت مادر گوشتی	نای و ریه	-	+
۲۲۰۰/۱	خراسان	۷۸	گوشتی	نای	+	+
۲۱۰۴/۱	سمنان	۷۸	گوشتی	نای	+	+
۲۱۸۷/۱ و ۲۱۸۷/۲	بوشهر	۷۸	گوشتی	نای و ریه	+	+
۲۱۹۱/۱ و ۲۱۹۱/۲	بوشهر	۷۸	گوشتی	نای و ریه	+	-
۲۱۹۴/۱ و ۲۱۹۴/۲	بوشهر	۷۸	گوشتی	نای و ریه	+	+
۲۲۰۴/۱	فارس	۷۸	گوشتی	نای	-	+
۲۲۰۶/۱ و ۲۲۰۶/۲	فارس	۷۸	گوشتی	نای و ریه	+	+
۲۲۱۷/۱ و ۲۲۱۷/۲	فارس	۷۸	گوشتی	نای و ریه	+	+
۲۲۲۳/۱ و ۲۲۲۳/۲	فارس	۷۸	گوشتی	نای و ریه	+	+
۲۱۰۰/۱ و ۲۱۰۰/۳	تهران	۷۸	گوشتی	نای و کلیه	+	+
۲۰۰۷/۱	تهران	۷۸	گوشتی	کلیه	+	+
۲۱۵۲/۱ و ۲۱۵۲/۳	تهران	۷۸	گوشتی	نای و کلیه	+	+
۲۱۲۴/۱	تهران	۷۸	گوشتی	نای	-	+
۲۱۳۰/۱	تهران	۷۸	تخمگذار	نای	+	+
۲۱۴۳/۱ و ۲۱۴۳/۳	تهران	۷۸	تخمگذار	نای و کلیه	+	+
۲۱۷۳/۱ و ۲۱۷۳/۲	تهران	۷۸	پولت تخمگذار	نای و ریه	+	+
۲۴۵۱/۱	تهران	۷۹	گوشتی	نای	+	+
۲۴۶۱/۱ و ۲۴۶۱/۲	تهران	۷۹	گوشتی	نای و ریه	+	+

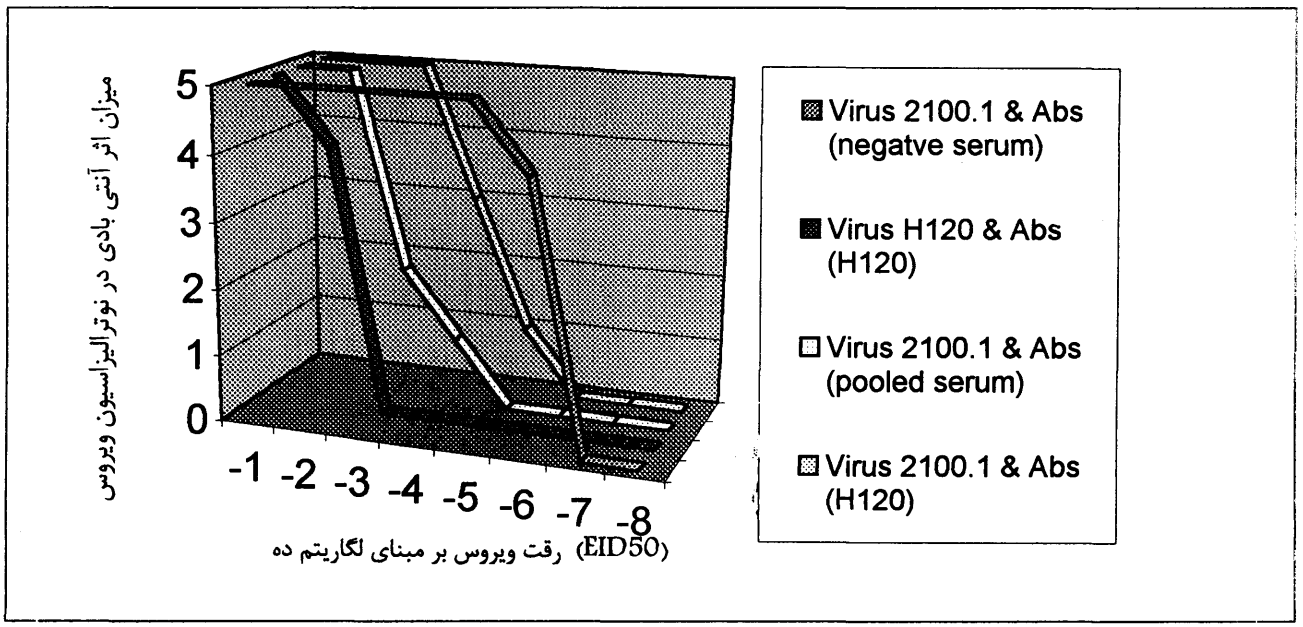
مرحله بعد کاغذهای مختلف نیتروسلولز با آنتی سرم کنترل منفی، اختصاصی گروه به طور جداگانه به مدت یکساعت انکوبه گردید. بعد از ۳ بار شستشو با PBS-T کاغذهای نیتروسلولز با کونژوگه ضد IgG ماکیان (BMB. Co.) انکوبه و بعد از نیم ساعت با محلول PBS-T شستشو داده شدند. واکنشهای مثبت با افزودن سوبسترای ۱- نفتول ۴- کلرو(Bio-Rad) به مدت ۱۰-۵ دقیقه ظاهر و با شستشوی کاغذهای نیتروسلولز با آب مقطر به واکنش سوبسترا با کونژوگه خاتمه داده شد. در این آزمایش واکنشهای منفی، ضعیف، متوسط، قوی و بسیار قوی به ترتیب با -، +۱، +۲، +۳ و +۴ نشان داده شده است.

آزمایش نوترالیزاسیون ویروس: آزمایش نوترالیزاسیون ویروس یا VN (Virus neutralization) بر مبنای دستورالعمل Ohta و همکاران به شرح زیر انجام گردید (۱۸). ابتدا رقت ۱ به ۱۰ جدایه ۲۱۰۰/۱ دارای عیار $10^{8/6}$ بر مبنای EID50 در اپندورفهای استریل با استفاده از PBS استریل حاوی ۰/۱ درصد BSA و آنتی بیوتیک تهیه گردید. سپس رقت ۱ به ۲ از آنتی سرم اختصاصی سروتیپ ماساچوست، آنتی سرم کنترل منفی و آنتی سرم پول شده بر روی رقتهای ۱ به ۱۰ ویروس به طور جداگانه اضافه و به مدت ۱/۵ ساعت در ۳۷ درجه انکوبه گردید. بعد از اتمام انکوباسیون، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از هر نمونه به طور جداگانه به داخل حفره آلانتوئیک ۵ عدد از جنینهای ۹ روزه تلقیح و مدت ۶ روز در ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. نوترالیزاسیون و یا فقدان آن با بررسی علایم تکثیر ویروس برونشیت بر روی جنین و آزمایش DIB تعیین گردید. تعیین عیار EID50 با استفاده از روش Reed و Muench انجام گردید (۱۴). اختلاف بین شاخص عیار EID50 در خنثی نمودن رقتهای ۱ به ۱۰ ویروس ۲۱۰۰/۱ توسط آنتی سرمهای منفی و مثبت به عنوان عیار خنثی نمودن ویروس یا VNI محاسبه گردید.

نتایج

تهیه و ارزیابی آنتی سرم اختصاصی سروتیپ و گروه برونشیت عفونی طیور: آنتی سرم اختصاصی سروتیپ تهیه شده در ۲۱ روز بعد از تلقیح اولیه 10^{5} EID50 سروتیپ ماساچوست سویه HI20 و همچنین آنتی سرم اختصاصی گروه برونشیت تهیه شده در ۲۱ روز بعد از تلقیح ثانویه، بهترین واکنش را با سلولهای مایع آمنیوآلانتوئیک و مایع آلانتوئیک به ترتیب در آزمایشات ایمنوفلورسانس و دات ایمنوبلوت نشان دادند.

مقایسه میزان نوترالیزاسیون (VN) سویه ۲۱۰۰/۱ با سویه HI20: نتایج به دست آمده از آزمایش نوترالیزاسیون (VN) در تخم‌مرغهای جنین‌دار با استفاده از آنتی سرم کنترل منفی و آنتی سرم کنترل مثبت بر علیه سروتیپ ماساچوست، و آنتی سرم پول تهیه شده از گله‌ای که سویه ۲۱۰۰/۱ جدا شده است در نمودار ۱ نشان داده شده است. آنتی سرم کنترل مثبت HI20 قادر به نوترالیزاسیون رقتهای 10^{-3}-10^{-9} سویه HI20 ویروس برونشیت می‌باشد در حالی‌که ویروس ۲۱۰۰/۱ در حضور آنتی سرم کنترل منفی به تکثیر در جنین تا رقت 10^{6} ادامه می‌دهد. تنها رقتهای بالای 10^{-5}-10^{-8} ویروس ۲۱۰۰/۱ کاملاً توسط آنتی سرم HI20 خنثی شده است ولی رقتهای بالای 10^{4} ویروس ۲۱۰۰/۱ کاملاً توسط آنتی سرم هومولوگ تهیه شده از گله آلوده به ویروس ۲۱۰۰/۱ خنثی گردیده است. عیار ویروس ۲۱۰۰/۱ بر مبنای لگاریتم ۱۰ (EID50) در حضور آنتی سرمهای کنترل منفی، کنترل مثبت و آنتی سرم پول شده به ترتیب ۶/۸، ۵/۲ و ۲/۸



نمودار ۱- این نمودار اثرات آنتی سرم اختصاصی سروتیپ ماساچوست (HI20)، آنتی سرم پول تهیه شده از گله گوشتی درگیر با سویه ۲۱۰۰/۱ و آنتی‌سرم کنترل منفی را در خنثی نمودن اثرات سویه‌های ۲۱۰۰/۱ و HI20 برونشیت عفونی طیور بر روی جنینها را، با استفاده از آزمایش دات ایمنوبلوت نشان می‌دهد. محور افقی رقتهای ۱ به ۱۰ ویروس ۲۱۰۰/۱ یا HI20 و محور عمودی تعداد جنینهای حاوی ویروس برونشیت عفونی طیور را متعاقب نوترالیزاسیون ویروسهای ۲۱۰۰/۱ و HI20 توسط آنتی سرمهای مختلف را معرفی می‌کند. برای هر رقت ویروس خنثی شده توسط آنتی سرمهای مختلف، تعداد ۵ عدد تخم‌مرغ جنین‌دار ۹ روزه تلقیح و بعد از ۶ روز میزان خنثی شدن اثر ویروس بر روی جنینها توسط آزمایش دات ایمنوبلوت (DIB) تعیین گردید.

می‌باشد. در نتیجه شاخص نوترالیزاسیون ویروس یا VNI برای ویروس ۲۱۰۰/۱ توسط آنتی سرم کنترل مثبت (HI20) معادل ۱/۶ و برای آنتی سرم پول هومولوگ تهیه شده از گله درگیر معادل ۴ می‌باشد.

بحث

ویروسهای برونشیت عفونی طیور دارای سروتیپهای متعدد بوده و واریانتهای جدید به طور مرتب ظهور یافته که از اکثر کشورهای جهان با صنعت مرغداری پیشرفته گزارش شده است (۱۴، ۸، ۴). به هنگام طراحی یک برنامه واکسیناسیون مناسب برای کنترل برونشیت عفونی طیور، جداسازی و شناسایی سویه‌های فیلد از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است زیرا آزمایشات تعیین میزان محافظت کنندگی متقاطع با استفاده از آنتی سرمهای تهیه شده از پرندگان مبتلا به برونشیت عفونی به دلیل وجود سروتیپها و واریانتهای مختلف از اهمیت محدودی برخوردار است(۱۲). لذا هدف از انجام این تحقیق جداسازی ویروسهای برونشیت عفونی طیور در تخم‌مرغهای جنین‌دار و سپس شناسایی آنها توسط آزمایش ایمونوفلورسانت غیر مستقیم و دات ایمونوبلوت توسط آنتی بادیهای اختصاصی می‌باشد.

به دلیل احتمال چرخش ویروسهای برونشیت عفونی طیور در مرغداریهای صنعتی، آنتی سرم اختصاصی سروتیپ نمی‌تواند غالب سروتیپها و واریانتهای موجود در یک منطقه را شناسایی کند. به همین جهت در این مطالعه از آنتی سرم اختصاصی گروه برونشیت که با استفاده از ۳ سروتیپ اصلی برونشیت یعنی ماساچوست، کانکتیکت و آرکانزاز در جوجه‌های SPF تهیه و تولید شده بود، استفاده گردید. این آنتی سرم قادر به تشخیص سروتیپ رفرانس ماساچوست و سروتیپ رفرانس آرکانزاز و کانکتیکت بود (جدول ۱). از آنجایی‌که تنها سروتیپ برونشیت عفونی جدا شده در ایران تاکنون، ماساچوست بوده (۱) و سویه‌های HI20 و H52 ماساچوست در سطح گسترده‌ای به عنوان واکسن تخفیف حدت یافته در مرغداریهای کشور استفاده شده است در نتیجه برای تشخیص اولیه سروتیپ ویروسهای برونشیت عفونی طیور کشور آنتی سرم اختصاصی سروتیپ ماساچوست تهیه گردید این آنتی سرم قادر به نوترالیزاسیون کامل ویروس هومولوگ در روش نوترالیزاسیون آلفا بود.

در این بررسی به دلیل عدم دسترسی سریع و به موقع به تخم‌مرغهای SPF، از تخم‌مرغهای تهیه شده از یک فارم مادر گوشتی عاری از مایکوپلاسم و آنفلوانزا که سه بار با واکسن زنده و یکبار با واکسن کشته ماساچوست قبل از مرحله تولید واکسینه شده بودند، استفاده گردید. آنتی بادیهای موجود در زرده تخم‌مرغ، نمی‌تواند با جداسازی ویروسهای تنفسی طیور مانند برونشیت عفونی تداخل داشته باشد. زیرا اولاً جداسازی این ویروس در کیسه آلانتوئیک انجام می‌گیرد و آنتی بادی در این محل وجود ندارد و ثانیاً قبل از هجوم آنتی بادی از کیسه زرده به کیسه الانتوئیک در ۱۵ روزگی، مراحل جداسازی ویروس به اتمام می‌رسد (۱۵).

اگر چه این مطالعه در بین سالهای ۷۹-۷۶ انجام گردید ولی بیشترین تعداد ویروسهای جدا شده از هر دو گله‌های واکسینه و غیر واکسینه، مربوط به زمستان سال ۱۳۷۸ می‌باشد که نشان می‌دهد ممکن است واگیری زمستان ۷۸ بیماری برونشیت عفونی طیور در مرغداریهای واکسینه و غیر واکسینه استانهای بوشهر، فارس، سمنان، خراسان، اصفهان، قزوین و تهران ناشی از ویروسهای واریانت باشد. کلیه ویروسهای جدا شده که منجر به مرگ و یا تأخیر در رشد جنین در پاساژ سوم شده و مایعات آلانتوئیک آنها قادر به فعالیت هماگلوتیناسیون نبود به عنوان ویروس برونشیت عفونی طیور یا آدنوویروس تیپ I تلقی شده، و برای اثبات حضور ویروس برونشیت عفونی طیور در هر یک از مایعات آلانتوئیک یا سلولهای مایع آلانتوئیک به ترتیب از آزمایشات DIB و IIF استفاده شد. در این بررسی میزان همخوانی بین آزمایشات DIB و IIF ۸۰ درصد تعیین گردید. از آنجایی‌که آنتی سرم کنترل منفی قادر به واکنش ضعیف (+۱) در آزمایش DIB بود، لذا به نظر می‌رسد حساسیت آزمایش DIB در مقایسه با IIF برای غربال نمونه‌های مثبت برونشیت عفونی طیور با استفاده از آنتی سرم اختصاصی گروه برونشیت عفونی طیور کمتر باشد.

جداسازی ویروسهای برونشیت عفونی از نای، ریه و کلیه نشان می‌دهد که برخی از ویروسهای جدا شده علاوه بر دستگاه تنفس دارای تروپیسم به دستگاه کلیوی نیز هستند. به همین جهت یکی از گله‌های گوشتی که

ویروس برونشیت از نای و کلیه پرندگان درگیر جدا شده بود انتخاب و میزان نوترالیزاسیون آن توسط آنتی‌سرمهای اختصاصی سروتیپ، آنتی سرم منفی و آنتی سرم پول تهیه شده از همان فارم در تخم‌مرغهای جنین‌دار ارزیابی گردید. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که شاخص نوترالیزاسیون سویه ۲۱۰۰/۱ (VNI) توسط آنتی سرم پول شده در مقایسه با آنتی سرم کنترل مثبت ۲/۴ بیشتر می‌باشد. عدم نوترالیزاسیون کامل ویروس ۲۱۰۰/۱ توسط آنتی سرم اختصاصی سروتیپ ماساچوست می‌تواند بیانگر هترولوگ بودن ویروس مورد آزمایش باشد. انجام آزمایشات تکمیلی با استفاده از آنتی سرم اختصاصی ۲۱۰۰/۱ جهت بررسی میزان قرابت آنتی‌ژنیکی بین سویه‌های HI20 و ۲۱۰۰/۱ الزامی است.

به طور کلی، نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان می‌دهد که حساسیت آزمایش IIF در مقایسه با آزمایش DIB برای شناسایی ویروسهای برونشیت عفونی طیور با استفاده از آنتی سرم اختصاصی گروه برونشیت عفونی بیشتر است و ممکن است ویروسهای واریانت برونشیت عفونی طیور در بین مرغداریهای کشور وجود داشته باشد لذا تعیین سروتیپ و ژنوتیپ ویروسهای جدا شده برای اثبات حضور واریانت یا واریانتها الزامی است.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه تهران که در تصویب و پشتیبانی مالی طرح برونشیت عفونی طیور به شماره ۲۸۲/۱/۲۱۸،کمال مساعدت را داشته‌اند و همچنین از مساعدتهای بخش بیماریهای طیور سازمان دامپزشکی کشور و از همکاری فنی آقای مسیب واحدی کارشناس آزمایشگاه ویروس شناسی طیور بخش بیماریهای طیور دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران و خانم دیان فرینت کارشناس آزمایشگاه ویروس شناسی طیور دانشکده دامپزشکی دانشگاه مونترال تقدیر و تشکر می‌گردد.

References

1. Aghakhan, S.M., Afshar, N., Rasoul Nejad Fereidouni, S., Marunesi, C., and Khodashenas, M. (1994): Studies on avian viral infections in Iran. Arch. Inst Razi. 44/45: 1-10.
2. Cavanagh, D., and Naqi, S.A. (1997): Infectious bronchitis. In: Diseases of poultry, Calnek (ed), 10th Ed., Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa, USA. PP. 511-526.
3. Capua, I., Gough, R.E., Mancini, M., Casaccia, C., and Weiss, C. (1994): A novel infectious bronchitis strain infecting broiler chickens in Italy. J. Vet. Med. B. 41:83-89.
4. Cook, J.K.A. (1984): The classification of new serotypes of infectious bronchitis virus isolated from poultry flocks in Britain between 1981 and 1983. Avian Pathol. 13: 733-741.
5. Cowen B.S., Wideman R.F., Braune M.O., and Owen R.L. (1987): An infectious bronchitis virus isolated from chickens experiencing a urolithiasis outbreak. I. In vitro characterization studies. Avian Dis. 31: 878-883.
6. Gelb, Jr.J. and Jackwood, M.W. (1998): Infectious bronchitis. In: A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens, 4th ed. Swayne, D.E., Glisson, J.R., Jackwood, M.W., Pearson, J.E., and Redd, W.M. American Association of Avian Pathologists, kendall Hunt , Iowa. PP: 169-174.
7. Gelb, Jr.J. Wolff, J.B., and Morran, C.A. (1991): Variant serotypes of infectious bronchitis virus isolated from commercial layer and broiler chickens. Avian. Dis. 35: 82-87.
8. Gough, R.E., Randall, C.J., Daless, M., Alexander, D.J., Cox, W.J., and Pearson: (1992): A new strain of infectious bronchitis virus infecting domestic fowl in Great Britain. Vet. Rec. 130: 493-494.
9. Karaca, K., and Naqi, S.A. (1993): Imonoclonal antibody blocking ELISA to detect serotype specific infectious bronchitis virus antibodies. Vet. Microbiol. 34: 249-257.
10. King, D.J. (1988): Identificatin of recent , infectious bronchitis virus isolates that are serologically different from current vaccine strains. Avian Dis. 32: 362-364.
11. King, D.J., and Hopkins, S.R. (1984): Rapid serotyping of infectious bronchitis virus isolates with the hemagglutination inhibition test. Avian Dis. 28: 727-733.
12. Kwon, H.M., Jackwood, M.W., and Gelb, Jr. J. (1993): Differentiation of infectious bronchitis virus serotypes using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. Avian Dis. 37: 194-202.
13. Lanqung Li, J., Giambrone, J., Panangala, V.S., and Hoerr, F.J. (1996): Production and characterization of monoclonal antibodies against avian reovirus strain S1133. Avian Dis, 40: 349-357.
14. Parsons D., Ellis, M.M., Cavanagh, D., and Cook, K.A. (1992): Characterization of an infectious bronchitis virus from vaccinated broiler breeders. Vet. Rec. 131: 408-411.
15. Senne, D.A. (1998): Virus propagation in embryonating eggs. In: A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens, 4th ed. Swayne, D.E.,

Glisson, J.R., Jackwood, M.W., Pearson, J,E., and Redd, W.M. American Association of Avian Pathologists, kendall Hunt, Iowa. PP: 235-240.

16. Thayer, S.G., and Beard, C.W. (1998): Serologic procedures. In: A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens, 4th ed. Swayne, D.E., Glisson, J.R., Jackwood, M.W., Pearson, J.E., and Redd, W.M. American Association of Avian Pathologists, kendall Hunt, Iowa. PP: 255-266.
17. Van Roekel, H., Clarke, M.K., Bullis, K.L., Olesiuk, O.M., and Sperling, F.G. (1951): Infectious bronchitis. Am. J. Vet. Res. 12: 140-146.
18. Yagyu, K., and Ohta, S. (1990): Detection of infectious bronchitis virus antigen from experimentally infected chickens by indirect immunofluorescent assay with monoclonal antibody. Avian Dis. 34: 246-252.

Isolation and identification of infectious bronchitis viruses in chickens between 1997-2000 in Iran

Vasfi Marandi, M.[1] Bozorgmehri Fard, M.H.[1]
[1]*Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran – Iran.*

From 1997-200, tissues samples including lung, trachea and kidney prepared from broiler layer and breeder flocks were submitted to avian virology laboratory of poultry diseases section in order to isolate respiratory viral diseases viruses.
A total number of 37 infectious bronchitis viruses (IBV) were isolated in embryonated chicken eggs. The infected embryos displayed stunting, urate deposition in the mesonephros, or death. A group specific polyclonal antiserum was produced and used in dot-immunoblotting and immunofluorescent assys. There was 80% similarity between these tests in the identification of IBV field isolates. A field IBV strain designated as 2100/1 was selected to compare virus neutralizing index (VNI) using H120 Massachusetts, pooled and negative control sera. The VNI of 2100/1 strain by using of pooled antiserum was 2.4 greater than those H120 Massachusetts antiserum indicating that this strain may antigenically different from H120 Massachusetts strain. Further studies are needed to characterize IBV isolates.
Key words: Infectious bronchitis virus, Virus isolation, Embryonated chicken egg.