Identification some genotypes of infectious bronchitis virus (IBV) in broiler flocks in Syria by using RT-PCR

Dr. Fahim abdelaziz[*]
Dr. Mohamad salhab[**]
Dr. Anouar Alomar[***]
Tamara Aljallad[****]

(Received 10 / 3 / 2019. Accepted 21 / 10 /2019)

□ ABSTRACT □

Infectious bronchitis (IB) is a highly contagious disease, that affects chickens of all ages, and its risk and losses resulting from infection is greater in young birds. The disease is common throughout the world where chickens are produced commercially, and it appears in the field as a respiratory condition associated with a decrease in egg production , delayed growth and changes in the characteristics of laying hens. Pathological anatomy shows lesions in the bronchi, kidneys and egg production organs. This disease has several forms: respiratory, renal and reproductive form. It causes respiratory dysfunction , renal damage and decrease in egg production. The Infectious Bronchitis Virus (IBV) belongs to the family *Coronaviridae*. It has an envelope of S and M glycoproteins. IBV is an enveloped virus with a single-stranded, positive-sense RNA genome. Reverse transcription PCR technology is an effective technique for IBV detection, and compared to traditional detection methods PCR-based techniques are both sensitive and fast. This research was conducted to identify the infectious bronchitis virus with group specific primers of avian Coronaviruses in Coastal Area of Syria. 50 histological samples from broiler flocks were collected from eleven commercial broiler flocks and these samples were used for RNA extraction. General primers included XCE2+ and XCE2- that amplify all IBV serotypes were used. Primers MCE1+, BCE1+ and DCE1+ was used for amplifying the specific nucleotide sequence of Massachusetts, 4/91 and D274 serotypes, respectively. The results of this study showed that 80% of the sampled flocks were positive to IBV by RT-PCR. Moreover, the Massachusetts was the identified serotype of infectious bronchitis virus. The results provide the first molecular evidence for the presence of infectious bronchitis virus and Massachusetts, 4/91, D274 serotypes in Syria.

Keywords: Infectious Bronchitis Virus, Serotypes, RT-PCR

[*]**Professor, Department of Life Science, Faculty of Science, Tartous University, Tartous, Syria.**
[**]**A Researcher in the General Commission for Scientific Architectural Research, The Research Center of Latakia, Latakia, Syria**
[***]**Professor, Faculty of Science, Al-Baath University ,Homs, Syria.**
[****]**Postgraduate Student, Department of Animal Production, , Faculty of Agriculture, Tishreen University, Lattakia, Syria. Tamara.aljallad@gmail.com**

تحديد بعض الأنماط الوراثية لفيروس التهاب القصبات المعدي المنتشرة في مزارع دجاج اللحم في سورية باستخدامRT-PCR

د. فهيم عبد العزيز*

د. محمد سلهب **

د. أنور العمر***

تماره الجلاد****

(تاريخ الإيداع 10 / 3 / 2019. قبل للنشر في 21 / 10 / 2019)

□ ملخّص □

التهاب القصبات الهوائية المعدي Infectious Bronchitis (IB) من الأمراض المعدية الوبائية التي تصيب الدواجن بكافة الأعمار، وتكون خطورتها والخسائر الناتجة أكبر عند الطيور الفتية. ينتشر المرض في جميع أنحاء العالم حيث تتركز صناعة وإنتاج الدواجن المكثفة. يظهر المرض حقليا كحالة تنفسية تترافق بانخفاض إنتاج البيض وتغير مواصفاته عند الدجاج البياض، وتبيّن الصفة التشريحية المرضية آفات في القصبات والشعب الهوائية وفي الكليتين وفي أعضاء إنتاج البيض. ينتمي الفيروس المسبب Infectious Bronchitis Virus (IBV) إلى فصيلة الفيروسات التاجية Family *Coronaviridae*. وهي ذات غلاف مكون من بروتينات سكرية بنيوية S و M خاصة بالحمة. جينوم RNA وحيد السلسلة الإيجابية، والقفيصة ذات تناظر حلزوني.

تقنية الـ PCR التي تعتمد على النسخ العكسي للـ RNA تقنية فعالة لكشف IBV بالمقارنة مع طرق الكشف التقليدية و تعرف التقنيات المستندة على الـ PCR بأنها حساسة و سريعة. تم إجراء البحث لكشف وتحديد أنماط فيروس التهاب القصبات الهوائية المعدي باستخدام مجموعة من البادئات النوعية المتخصصة بالفيروسات التاجية الطيرية، ولهذا الهدف جُمعت 50 عينة مرضية من الأعضاء التي أظهرت آفات واضحة من مزارع دجاج اللحم المشتبه بإصابتها بالمرض في مناطق مختلفة من سورية. لاستخلاص الحمض النووي RNA من هذه العينات، استخدمت بادئات عامة تتضمن XCE2- و XCE2+ التي تكاثر أو تنسخ كل الأنماط المصلية للIBV .

واستخدمت البادئات التالية: MCE1+ ، BCE1+ و DCE1+ للتسلسل النكليوتيدي الخاص بالأنماط المصلية: ماساتشوسيتس ، 4/91، و D274 على الترتيب.

أظهرت نتائج هذه الدراسة أن 80% من العينات إيجابية للIBV باستخدام تقنية RT_PCR . وبيّنت أيضاً أن النمط المصلي الماساتشوسيتس هو النمط الشائع لفيروس التهاب القصبات الهوائية المعدي في سورية، وتقدم النتائج دليلاً جزيئياً لوجود الفيروس بالأنماط الثلاث ماساتشوسيتس ، 4/91 و D274.

الكلمات المفتاحية: فيروس التهاب الشعب المعدي، الأنماط الوراثية، تقنية RT-PCR.

* أستاذ ، قسم علم الحياة، كلية العلوم، جامعة طرطوس، طرطوس، سورية.

** باحث في الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية- مركز بحوث اللاذقية- اللاذقية- سورية.

*** أستاذ ، علم الفيروسات، كلية العلوم، جامعة البعث، سورية.

**** طالبة دراسات عليا(دكتوراه)، قسم الإنتاج الحيواني، كلية الزراعة، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية.

مقدمة:

يُعدُّ مرض التهاب الشعب الهوائية المعدي Infectious Bronchitis (IB) مرضاً خطيراً وحاداً يصيب الدواجن، يسببه فيروس التهاب الشعب الهوائية المعدي Infectious Bronchitis virus IBV، وهو موجود ومنتشر في جميع أنحاء العالم. ويصيب بالدرجة الأولى الجهاز التنفسي والكلى والجهاز التناسلي مسببا خلل تنفسي وتلف كلوي وانخفاض في انتاج البيض (Liu et al., 2006; Cavanagh, 2007). الـ IB مرض مهم اقتصاديا (Cavanagh, 2005)، ووفقا لخصائص الجينوم، يصنف العامل المسبب IBV تحت gammacoronavirus ، فصيلة *Coronaviridae* ، صف *Nidovirales*. يتكون جينوم الفيروس من بروتينات بنيوية وغير بنيوية تشفر أجزاء المورثة. تتضمن البروتينات البنيوية: بروتينات الشويكة S1, S2، بروتين الغلاف E، بروتين الغشاء الداخلي M، بروتين الغشاء النووي الفيروسي N (King and Cavanagh, 1991; Lai and Cavanagh, 1997).

إن S1 عبارة عن بروتين سكري يلعب دور رئيسي في ارتباط الفيروس والتنوع الوراثي للفيروسي وتحديد الاجسام المضادة. تستخدم التنوعات في البروتين السكري S1 في تحديد الأنماط الوراثية الفيروسية الجديدة ومن الممكن أن تستخدم في تحديد الاستجابة المضادة للفيروسات(Valastro *et al.*, 2016). إنّ معظم عترات IBV معطلة عند الدرجة 45 مئوية لمدة 90 دقيقة، وللفيروس القدرة على البقاء على قيد الحياة في درجة ph:6-7.3 (Cowen and Hitchner, 1975). لفيروس IBV مجموعة واسعة من العوائل البرية بين أنواع الطيور، لكن حساسية الطيور لعترات الفيروس تتأثر بعدة عوامل : العمر والوراثة و/أو الاجهاد البيئي (Liu *et al.*, 2009)، وتعتبر الطيور المحلية من عائلة Gallus gallus والفيزان (Phasianus spp) مضيفان طبيعيان للIBV (Cavanagh *et al.*,,1988)، وأيضا تم تحديد العديد من السلالات في أنواع أخرى من الطيور ومنها الرومي والبط البري والاوز والحمام والبط والببغاء، وكذلك عزلت بعض العزلات في السمن وطيور البطريق و طيور غينيا (Liais *et al.*, 2014) . تمت الاشارة إلى وجود مرض IB أول مرة عام 1931 من قبل Schalk و Hawn(Schalk and Hawn, 1931)، وبعد هذا التاريخ أصبح الـ IB يؤثر في صناعة الدواجن بشكل فعلي في جميع أنحاء العالم ويسبب خسائر كبيرة لهذه الصناعة ويهدد الإنتاج المستديم للدواجن وإمداد البروتين في العالم(Liu et al., 2008; Chen et al., 2013)، ينتقل الفيروس بعدة أشكال، فعادة يكون الانتقال إما أفقيا بواسطة العلف أو الماء الملوث، أو الزرق (Abro, 2013) **أو** يكون بواسطة الهواء عن طريق الغبار الجوي حيث ينتقل بسهولة بين الطيور المتواجدة ضمن مسافة 1.5 م، وتساهم الرياح السائدة في مناطق تربية الدجاج في نشر العدوى بين المزارع المنفصلة لمسافات قد تصل لـ 1.2 كم (Abro, 2013).

يعد النقل الميكانيكي للفيروس عن طريق الأفراد والمواد والمعدات من أهم الأسباب الرئيسية للنقل غير المباشر للفيروس إلى المناطق الأخرى، حيث أن الطيور المصابة بالفيروس تلوث باستمرار البيئة المحيطة من خلال حركتها بين القطعان أو ضمن المزارع، كما أن نقل البيض المصاب يعد أحد أهم أشكال نقل العدوى (Ignjatović and Sapats, 2000) ، يتميز فيروس IBV بمعدل عال من الطفرات وإعادة التركيب الفيروسي وضغط اختيار المضيف، ويعتبر التحصين أهم طرق السيطرة على المرض، وتستخدم لهذا الغرض اللقاحات الحية في معظم الاحيان بالرغم من بعض القيود المتعلقة بضعف الثباتية الحرارية، واعادة التركيب بين اللقاحات والفيروسات الحقلية، وتساهم

هذه العوامل في زيادة ظهور ذراري الIBV المتغايرة وراثيا والتي تقوض الجهود المبذولة للسيطرة على المرض (Lee et al., 2010; McKinley, 2009; Tarpey et al., 2006) .

ترتبط بعض الأنماط الوراثية والأنماط المصلية للIBV ارتباطاً وثيقاً بذراري اللقاح، وبعضها الآخر بتغيرات فردية ينتج عنها ذراري جديدة في مناطق جغرافية محددة. حددت القرابة الوراثية (التجانس المستضدي) في الأبحاث الأخيرة اعتماداً على المورثة S1 للـ IBV ، ستة 6 أنماط وراثية مختلفة للفيروس ، 32 ذرية Strain مميزة، والعديد من التراكيب غير محددة بين وداخل الاصل. ويختلف التنوع الوراثي وانتشار الIBV من موقع جغرافي لآخر (de Wit et al., 2011; Bande et al., 2016) . من أنماط IBV المصلية المنتشرة عالميا منها Mass ، 4/91(793B CR88) ، (D207,D212,D1466,D3896) D274-like و D3128 ، QX-like و Italy02 (Bande et al., 2017). تستخدم اختبارات عديدة لمراقبة وجود الأنماط المصلية المخلفة للـ IBV في المناطق الجغرافية، منها طريقة المقايسة المناعية المرتبطة بالإنزيم Enzyme – linked immunosorbent assay (ELISA) التي تعد اختباراً مناسباً لمراقبة كلاً من الحالة المناعية وعدوى الفيروس في قطعان الفروج (Zhang et al., 2005). لكن بالمقارنة مع طرق الكشف التقليدية، فإن تقنيات البيولوجية الجزيئية حساسة وسريعة(Wit, 2000; Handberg et al., 1999; Zwaagstra et al., 1992)، وتقنية الـ PCR للنسخ العكسي للRNA Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) تقنية فعالة لكشف فيروس الIBV ، وتحديد التسلسل النكليوتيدي لجزء المورثة S1 مفيدة للتشخيص السريع وتحديد الأنماط المصلية للـ IBV (Haqshenas et al., 2005; Saif et al., 2008).

يبلغ طول مجين IBV حوالي 27.6 kp ويشفر أربعة بروتينات بنيوية رئيسية، والبروتين السكري Spike (S) هو البروتين الرئيسي لـ IBV (Xu et al., 2007) .

نظراً لأنّ التهاب القصبات المعدي IB في سورية هو من أكثر الأمراض التنفسية الفيروسية الخطرة التي تصيب قطاع الدواجن. وبالرغم من استخدام اللقاحات، فإنّ الحماية الكافية الإصابة بالمرض غير متوفرة ولا تؤمن توفير الأضداد اللازمة لحماية الطيور. لذلك تتكرر مشاكل فيروس IBV في الدجاج المحصن وتؤثر سلباً على صحة وإنتاج الدواجن. ويعزى سبب ذلك للاختلافات المستضدية بين الذراري المنتشرة حقليا واللقاحات المستخدمة. لذلك يعد التحديد الدقيق للنمط المصلي عنصرا أساسيا من أجل اختيار اللقاحات المتجانسة مع الذراري الحقلية المنتشرة للحصول على الاستجابة المناعية الفعالة ضد المرض.

أهمية البحث وأهدافه:

بسبب عدم توفر الحماية المطلوبة التي يؤمنها وجود الأضداد الناتجة من عمليات التحصين ضد IBV في قطعان الدواجن في سورية، أصبح خطر التعرض للإصابة بأشكال مختلفة من المرض مشكلة حقيقية تفرض نفسها في واقع صناعة الدواجن في سورية وتستوجب إيجاد الحلول المناسبة المتعلقة بعترات الفيروس المسببة للإصابة. ومن هنا حُدد هدف البحث: كشف الأنماط المستضدية لفيروس التهاب القصبات المعدي IB المتواجدة حقلياً في مزارع تربية دجاج اللحم في المناطق المختلفة من سورية ، وتحديد الاختلاف المستضدي فيما بينها.

طرائق البحث ومواده:

جمع ومعاملة العينات: تمت المتابعة الحقلية للحالات التنفسية المشتبه بها كالإصابة بمرض IBV في قطعان دجاج اللحم التجارية المختلفة المنتشرة في اللاذقية وطرطوس خلال الفترة الواقعة بين 2017- 2018 ، وبالاعتماد على الأعراض السريرية والآفات التشريحية المميزة للمرض. جمعت 50 عينة من الآفات المرضية لأعضاء الطيور المريضة أو النافقة /القصبات، الشعب الهوائية والكلى / من مزارع دجاج اللحم المحصنة بلقاح الذرية H120 بعمر7أيام.، ووضعت في كيس معقم وحافظة مبردة لحين الوصول إلى المخبر، ثم حفظت في الثلاجة عند الحرارة- 20 حتى وقت الاستخدام في العمليات اللاحقة (Bourogaa et al., 2012).

استخلاص الحمض النووي الفيروسي Extraction Viral RNA :

لاستخلاص الحمض النووي الفيروسي، تمت معاملة 30 ملغ من العينة بكيت الاستخلاص (GF-1 Total RNA Extraction Kit)، ومجانسته بمحلول خاص ثم نقله لعمود التجانس وإضافة الايتانول 80%، ليترسب RNA وفقاً لتعليمات الكيت.

النسخ العكسي reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR): استخدم كيت cDNA synthesis التجاري ((2-steps RT-PCR kit, RTPL12®, vivantis, Malaysia)) وتم اتباع تعليمات الشركة المنتجة .....

تحضير المزيج الأولي Primer -RNA كالتالي:

- تم أخذ µl من الـRNA الكلي، 1 µl من كل من البادئة الأولية XCE2+ والبادئة الراجعة XCE2- (Gene- specific primer) و µ l من مزيج النكليوتيدات 10mM dNTP ،وحُضن المزيج على الدرجة 65°م لمدة 5 دقائق، ثم وضع في الثلج لمدة دقيقتين، حُضر مزيج التركيب الثاني cDNA المكون من : 2 µl من 10X Buffer M-MulV، و 0.5 µl من M- Mul V Reverse Transcriptase ، وأُكمل الحجم إلى 10 µl بالماء المقطر ثم أُضيف 10 µl من هذا المزيج إلى كل عينة من عينات مزيج RNA- Primer ، مُزج بلطف و ثُفل لمدة قصيرة ثم حُضن على الدرجة 42° م لمدة 60 دقيقة، أُنهي التفاعل بالتحضين على الدرجة 85 °م لمدة 5 دقائق، ومن ثم وضعت الأنابيب في الثلج و ثفلت لمدة قصيرة، يستخدم تركيب cDNA مباشرةً أو يخزن على الدرجة -20 °م. . تمت مكاثرة تركيب cDNA بتفاعل PCR . بحجم نهائي 25 µl يتضمن: 8 µl من cDNA ، 0.5 µl من كل البادئة XCE2+ و البادئة XCE2- ، 12.5 µl من master mix ، وأُكمل الحجم بالماء المقطر، أجريت عملية المكاثرة Amplification في جهاز الدوران الحراري Eppendorf Mastercycler gradient وفقاً لبرنامج محدد. تم تحميل نواتج الـ PCR على هلامة ذات التركيز 1.5 % من الأجاروز، واستخدم 100 bp ladder وتم التصوير تحت الأشعة فوق البنفسجية ، والحصول على الصورة (1)

الجدول (1) يُظهر التسلسل النكليوتيدي للبادئات المستخدمة في تفاعل RT- PCR

اسم البرايمر	التسلسل النكليوتيدي للبرايمر	طول القطعة	المرجع
XCE2+	5'-CACTGGTAATTTTTCAGATGG-3'	466	Adzhar et al., 1997
XCE2-	5'-CCTCTATAAACACCCTTGCA-3'،		

تفاعل Nested PCR:

لتحديد الأنماط المصلية، تم اجراء تفاعل nested PCR باستخدام بادئات Oligonucleotide تتضمن MCE1+، DCE1+، وBCE1+ على الترتيب وهي نوعية من أجل منطقة hypervariable في جزء المورثة S1 للأنماط الوراثية Massachusetts، D274 و 4/91 ، و البادئة XCE3- شائعة من أجل الثلاثة أنماط المصلية المستخدمة حسب (Nouri et al., 2003; Roussan et al., 2008).

ظروف التفاعل:

أجري تفاعل nested PCR في حجم نهائي قدره 25 مكروليتر، احتوى على:

1 ميكروليتر من التفاعل الايجابي لمنتج RT-PCR، 0.5 ميكرولتر من البادئة XCE3 ، 0.5 ميكرولتر من البادئة DCE1+، 0.5 ميكرولتر من البادئة BCE1+، 0.5 ميكرولتر من البادئة MCE1+، 12.5 ميكرولتر من Master Mix، وأُكمل الحجم بالماء المقطر والمعقم.

أجريت عملية المكاثرة Amplification في جهاز الدوران الحراري وفقاً لبرنامج محدد، ومن ثم تم تحميل 10µl من نواتج الـPCR على هلامة ذات التركيز 1.5 % من الأجاروز. واستخدم ladder 100 bp، وتم التصوير تحت الأشعة فوق البنفسجية الصورة (2).

البرايمرات المستخدمة في اختبار Nested RT-PCR: تم استخدام برايمرات خاصة لتحديد ثلاث ذراري من فيروس التهاب القصبات المعدي باختبار Nested PCR في حال إيجابية المرحلة الأولى من الاختبار كما هو موضح بالجدول (2):

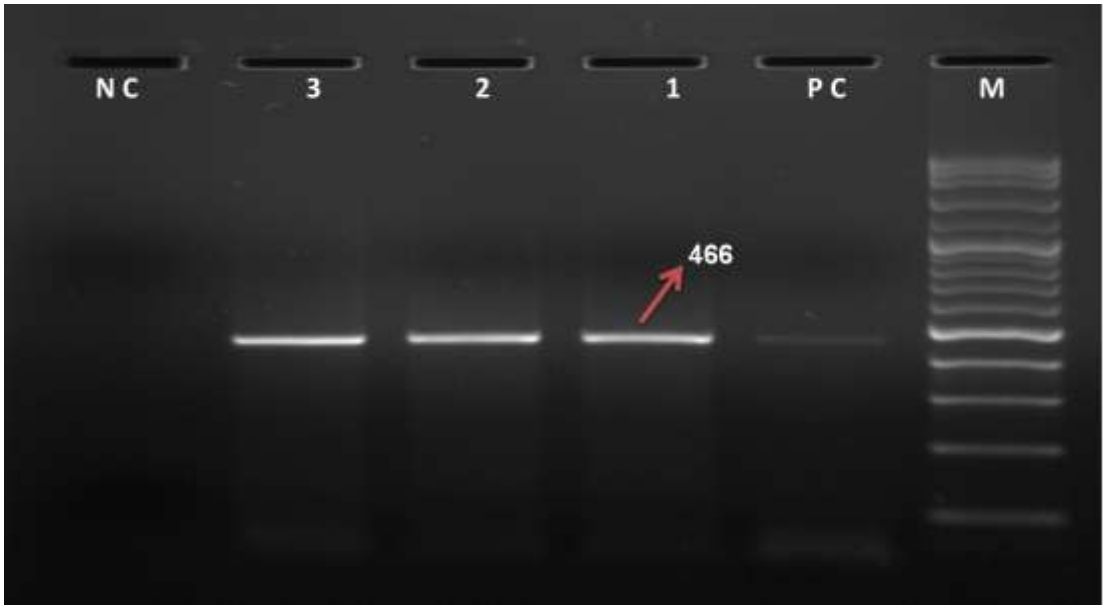
الجدول رقم (2) يظهر التسلسل النكليوتيدي للبادئات المستخدمة في تفاعل RT- PCR

اسم البرايمر	التسلسل النكليوتيدي	طول القطعة	العترة	المرجع
DCE1+	5'-TTCCAATTATATCAAACCAGC-3'	217bp	D274	(Adzhar et al., 1997)
MCE1+	5'- AATACTACTTTTACGTTACAC-3'	295bp	MASS	Adzhar et al., 1997)
BCE1+	5'-AGTAGTTTTGTGTATAAACCA-3'	154bp	4/91	Adzhar et al., 1997)
XCE3-	5'-CAGATTGCTTACAACCACC-3'			

النتائج والمناقشة:

أظهرت نتيجة تحليل عينات البحث المشتبه بإصابتها بالتهاب القصبات المعدي، عند مكاثرة قطعة الـ DNA المتوقعة (466 bp) لكل من الشاهد الايجابي والعينات النسيجية الايجابية أنّ تفاعل الـ RT–PCR تم تنفيذه بشكل صحيح، كما توضح الصورة (1).

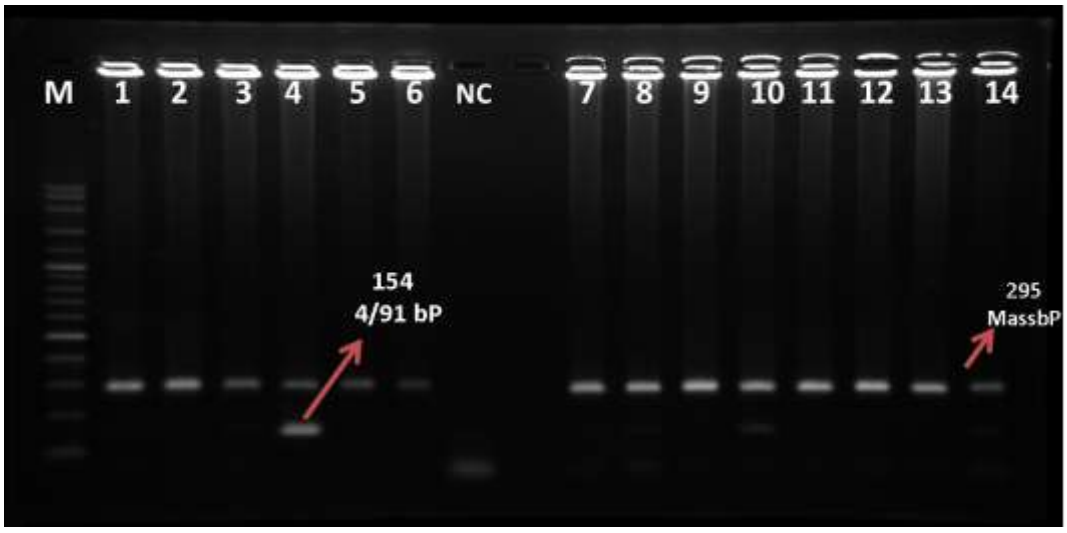
وأشارت النتائج أن 40 من 50 (80%) من العينات كانت إيجابية للـ IBV بتفاعل RT–PCR. وتبيّن في تفاعل nested pcr للعينات الايجابية في الـ RT–PCR ، أن النمط المصلي ماساتشوسيتس هو النمط الشائع في سورية، حيث كانت الإيجابية 27 عينة من 40 أي ما نسبته 67.5% ، كما توضح الصورة (2)، التي كشفت أيضاً وجود قطعان مصابة بالنمط 4/91 ، والنمط المصلي D274 ، تراوحت نسبتها 27.5%، و5% من العينات على الترتيب. كما لوحظ أنّ بعض العينات احتوت على أكثر من نمط .



الصورة رقم (1) كشف فيروس IBV باستخدام RT_PCR في عينات نسيجية من الفروج

الاختصارات: Marker M = 100 bp – 1.5 kbp DNA ladder marker

الشاهد الايجابي PC: Positive control، الشاهد السلبيNC: negative control.



الصورة رقم (2) النمط Mass هو النمط الشائع، وجود عينات تحتوي أكثر من نمط لفيروس IBV باستخدام nested PCR

المناقشة:

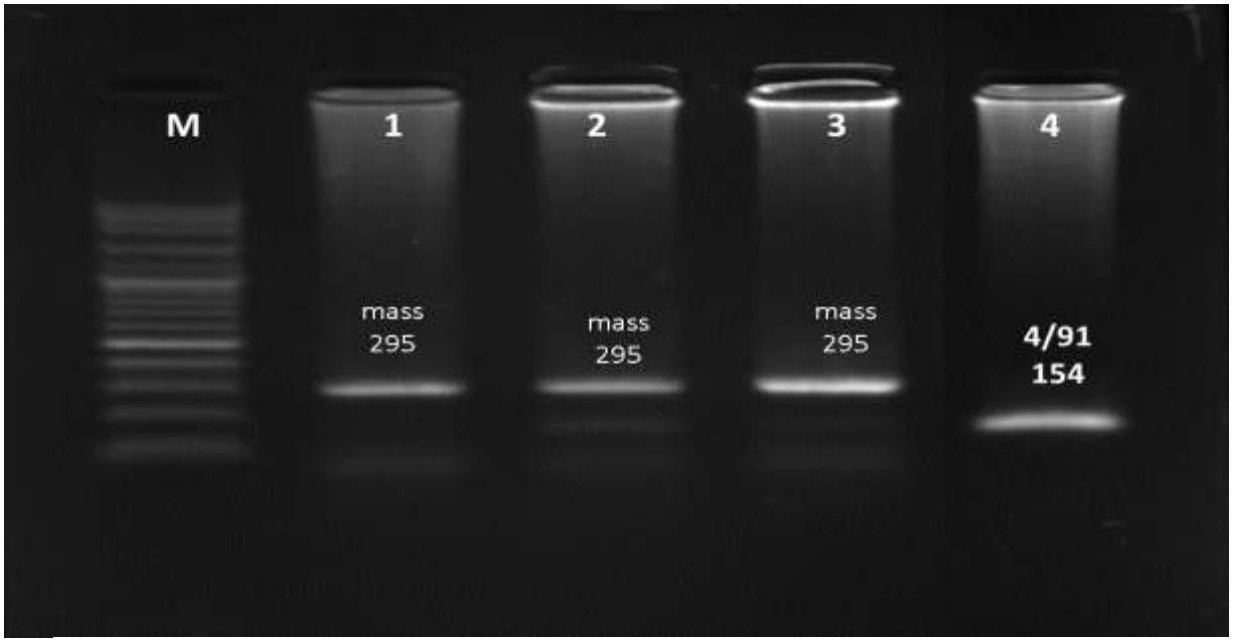
لمرض التهاب القصبات المعدي تأثير اقتصادي كبير على صناعة الدواجن حيث يتسبب بخسارة كبيرة في أنحاء العالم (Mckinely, 2009)، يستند عادةً تشخيص التهاب القصبات الهوائية المعدي على عزل الفيروس في أجنة الدجاج النامية بعمر 9–11 يوم تحضين، ويتبع ذلك تحديد مناعي للعزلات، هذا الإجراء يستغرق وقتًا طويلاً، وقد تضم بعض العزلات أكثر من نمط لفيروس IBV وهذا ما يعيق تفسير نتائج التنميط المصلي. بينما يمكن استخلاص الحمض النووي الريبي من السائل السقائي، ومن أنسجة القصبات والكلى، ومن ثم استخدام تقنية النسخ العكسي RT– PCR للكشف عن IBV وللتعرف على أنماطه، حيث لهذه التقنية فعالية هامة في التشخيص والتنميط. حيث أظهرت الدراسات الجزيئية لـ IBV أنّه ونتيجة لمعدل الطفرات المرتفع وإعادة التركيب الفيروسي يمكن أن تظهر ذراري جديدة يرافقها تغيرات مستضدية بسبب التبدلات في التسلسل النكليوتيدي للمورثة S1 ، بينما غالبية جينوم IBV يبقى دون تغيير. (Jia et al., 1995; Lim et al., 2011; Jackwood et al., 2012)، ويمثل التباين الوراثي في تحت وحدة S1 للبروتين السكري ارتفاع في آلية تكيف الفيروس مع الضغوط الانتخابية المناعية المرتبطة بالتحصين المكثف لـIBV وممارسات الادارة الأخرى ونتيجة لذلك، تم التعرف على العديد من الأنماط المصلية للفيروس التي تستمر فيها الأخطاء الجينية التي تؤدي لنشوء وتطور ذراري جديدة تسبب نشوبات وبائية جديدة من المرض، فبعد أن تم وصف المرض للمرة الأولى في الولايات المتحدة الامريكية ، تم تحديد النمط المصلي 4/91 في عدة بلدان ، وأصبح واحداً من أكثر الأنماط المصلية انتشاراً (Cavanagh, et al., 205; Bochkov, et al., 2007)، و على الرغم من توفر لقاح مضعف ضد النمط المصلي 793/B، إلا أن الدراسات الحديثة تشير إلى أن الفيروسات التي تنتمي إلى مجموعة النمط المصلي 793/B لا تزال تنتشر في القطعان الأوروبية وتعد مصدر قلق لصناعة الدواجن في البلدان المختلفة (Armesto, et al., 2011)، وأيضاً أشير إلى وجود النمط المصلي 793/B في كل من المملكة العربية السعودية، اليابان، الدانمارك، بولندا، فرنسا، إيطاليا ، الارجنتين (Nouri, et al., 2003)، إلا أنّ نمط Mass يعتبر النمط المصلي الأساسي المنتشر في جميع أنحاء العالم، لذلك يتم تضمينه في معظم القاحات التجارية(Benyeda, et al., 2010)، أشير إلى إمكانية التحصين بالنمط ماساتشوستس في اليوم الأول من العمر بعد الفقس ، ويمكن

أن تكتشف ذرية اللقاح في كل قطعان الفروج المختبرة بتقنية RT_PCR ، بنسبة مرتفعة في الأسبوع الأول من العمر .(Cavanagh et al. 1999).

يشكل تحصين قطعان الفروج بشكل دوري باللقاح الحي المضعف ضد المرض IB بالذرية H120، التي تعود إلى النمط المصلي ماساتشوستس، مشكلة إضافية للتمييز بين الذراري الحقلية الضارية من هذا النمط باستخدام تقنية RT _ PCR.لذلك، من المهم جدا معرفة العلاقة بين العزلات الحقلية و عترة اللقاح (Bochkov, et al., 2007).

أظهرت نتائج هذه الدراسة أن 40(80%)من أصل 50 عينة إيجابية للـ IBV بتقنية RT–PCR ،وأظهرت أيضاً توزع الأنماط المصلية Mass ، 4/91 ، D274 بنسبة انتشار 67.5%، 27.5%، 5%على الترتيب، لكن من المحتمل وجود أنواع أخرى ، لكنه لم يكن بالإمكان كشفها بالمرئسات المستخدمة في هذه الدراسة، حيث أنها تستطيع الكشف عن 3 أنماط للIBV .لذلك فإنّ عترات الـ IBV الإيجابية غير المعروفة يجب تحديد التسلسل النكليوتيدي لها ليتم تمييزها.وهذا يتوافق مع (Seger, et al., 2016) حيث برهن باستخدام تقنية (RT–PCR) وجود تراكيبB/763 و IBV Mass (لقاح أو سلالة حقلية) في قطعان الدجاج التجارية في جنوب العراق، على الرغم من استخدام لقاحات H120 و 91/4 في العراق.

من الشائع العثور على مرض التهاب القصبات المعدي في الدجاج المحصن. في هذه الدراسة، لم يتم تحديد التسلسل النكليوتيدي لمنتجات PCR، وبالتالي، فإن أصل هذه الأنواع غير واضح في الوقت الحاضر. لكن يجب أن يشمل العمل في المستقبل تسلسل عترات IBV في منطقة الدراسة من أجل تحديد نوع السلالات غير المعروفة واختيار برنامج التحصين المناسب.



الصورة رقم (3) كشف نمطين وراثيين لفيروس IBV باستخدام nested PCR

الاستنتاجات والتوصيات:

1- أثبتت الدراسة الحالية وجود فيروس IBV بتفاعل RT_PCR .

2- تبيّن أن عترة ماساتشوسيتس هي الشائعة في مناطق الدراسة من خلال تفاعل Nested PCR للعينات الإيجابية.

3- تعتبر هذه الدراسة الأولى التي تظهر وجود النمط المصلي ماساتشوسيتس لفيروس التهاب القصبات المعدي في المنطقة الساحلية.

ساهم استخدام لقاح الذرية H120 لـ IBV في قطعان دجاج اللحم في سورية في توفير الحماية ضد المرض، غير أن ظهور الذراري الجديدة أدى إلى فشل برنامج التحصين ضد المرض IB في بعض المناطق الجغرافية. لذلك:

1- يقترح المراقبة المستمرة وكشف ذراري فيروس الـ IBV المنتشرة في المنطقة المحددة لاختيار ذرية اللقاح المناسبة لعمليات التحصين اللازمة .

2- يجب وصف التنوع الوراثي للIBV في كل منطقة لتحديد الأنماط الوراثية والذراري المتوطنة. لتحسين فعالية اللقاحات، و يجب العمل دائماً على تحديد الأنماط المنتشرة وتطوير أو إنتاج لقاحات جديدة متجانسة معها مصلياً لتسهم بذلك في عملية التحكم والسيطرة على المرض.

المراجع :

1- ABRO, S. "Molecular Characterization and Detection of Infectious Bronchitis Virus", Doctoral Thesis Swedish University of Agricultural Sciences, Sweden. Sweden. 2013. 1-54.

2- ADZHAR, A., GOUGH, R. E., HAYDON, D., SHAW, K., BRITTON, P.and CAVANAGH, D., "Molecular Analysis of the 793/B Serotype of Infectious Bronchitis Virus in Great Britain." Avian Pathology Avian Pathology 26, no. 3 ,1997,625-40.

3- ARMESTO, M., EVANS, S., CAVANAGH, D., et al. A Recombinant Avian Infectious Bronchitis Virus Expressing a Heterologous Spike Gene Belonging to the 4/91 Serotype. PLoS ONE 2011; 6(8): e24352.

4- BANDE, F., ARSHAD, S., OMAR, A.., BEJO, M., ABUBAKAR, M. and ABBA, Y. Pathogenesis and Diagnostic Approaches of Avian Infectious Bronchitis. Virology, Volume 2016, Article ID 4621659,2016: 11.

5- BANDE, F., ARSHAD, S., OMAR, A., HAIR-BEJO, M., ALIYU MAHMUDA, A., and VENUGOPAL, N. "Global distributions and strain diversity of avian infectious bronchitis virus: a review" Animal Health Research Reviews 18(1) ,2017, 70–83.

6- BENYEDA, Z., SZEREDI, L., MATÓ, T. et al. Comparative histopathology and immunohistochemistry of QX-like, Massachusetts and 793/B serotypes of infectious bronchitis virus infection in chickens. J Comp Pathol 2010; 143(4): 276-283.

7- BOCHKOV, Y., Tosi, G., Massi, P., et al. Phylogenetic analysis of partial S1 and N gene sequences of infectious bronchitis virus isolates from Italy revealed genetic diversity and recombination. Virus Genes 2007; 35(1): 65-71.

8- BOUROGÂA, H., HELLAL, I., HASSEN, J., FATHALLAH, I. and GHRAM, A. S1 Gene Sequence Analysis of New Variant Isolates of Avian Infectious Bronchitis Virus in Tunisia. Veterinary Medicine: Research and Reports (3),2012, 41-48.

9- CAVANAGH, D., DAVIS, P. and MOCKETT, A. "Amino acids within hypervariable region 1 of avian coronavirus IBV (Massachusetts serotype) spike glycoprotein are associated with neutralization epitopes". Virus Research 11:1988, 141–150.

10- CAVANAGH, D. "Coronaviruses in poultry and other birds". Avian Pathology 34:2005, 439–448.

11- CAVANAGH, D., PICAULT, J., GOUGH, R., et al. Variation in the spike protein of the 793/B type of infectious bronchitis virus, in the field and during alternate passage in chickens and embryonated eggs. Avian Pathol 2005; 34(1): 20-25.

12- CAVANAGH, D" .Coronavirus Avian Infectious Bronchitis Virus. Veterinary research 38, no. 2 , 2007, 281-297.

13- CAVANAGH, D., MAWDITT, K., BRITTON, P. and NAYLOR. C."Longitudinal Field Studies of Infectious Bronchitis Virus and Avian Pneumovirus in Broilers Using Type-Specific Polymerase Chain Reactions. Avian Pathology 28, no. 6 ,1999, 593-605

14- CHEN, G., ZHUANG,Q., WANG, K., LIU, S., SHAO, J., JIANG, W., HOU, G., LI, J., and CHEN, J., Identification and Survey of a Novel Avian Coronavirus in Ducks. PloS ONE 8(8) ,2013,10-13.

15- COWEN, B. and HITCHNER, S. "pH stability studies with avian infectious bronchitis virus (coronavirus) strains". Journal of Virology 15:1975,430–432.

16- DE WIT, J. J., NIEUWENHUISEN-VAN WILGEN, J., HOOGKAMER, A., VAN DE SANDE, H., ZUIDAM, G. J. and FABRI,T. "Induction of Cystic Oviducts and Protection against Early Challenge with Infectious Bronchitis Virus Serotype D388 (Genotype Qx) by Maternally Derived Antibodies and by Early Vaccination."Avian pathology : journal of the Avian pathology, 40, no. 5 ,2011, 1-32.

17- DOLZ, R., PUJOLS, J., ORDÓNEZ, G., et al. Molecular epidemiology and evolution of avian infectious bronchitis virus in Spain over a fourteen-year period. J Virol 2008; 374(1): 50-59.

18- HANDBERG, K. J., NIELSEN, O., PEDERSEN، M.and JOERGENSEN, P. "Detection and Strain Differentiation of Infectious Bronchitis Virus in Tracheal Tissues from Experimentally Infected Chickens by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction. Comparison with an Immunohistochemical Technique. AVIAN PATHOLOGY 28, no. 4 ,1999, 327-36.

19- HAQSHENAS, G., ASSASI, K. and AKRAMI, H. Isolation and molecular characterization of infectious bronchitis virus, isolate Shiraz 3. IBV, by RT-PCR and restriction enzyme analysis. Iranian J Vet Res. ;6: ,2005: 9–15.

20- Ignjatović, J. and Sapats. S. Avian infectious bronchitis virus. Rev. Sci. Tech. 19: 2000, 493–508.

21- JACKWOOD, M.W. Review of Infectious Bronchitis Virus around the World. Avian Diseases 56(4) ,2012, 634-641. https://doi.org/10.1637/10227-043012-Review.1

22- JIA, W., KARACA, K., PARRISH C. and NAQI S. A novel variant of avian infectious bronchitis virus resulting from recombination among three different strains. Archives of Virology 140,1995, 259–271.

23- KING, D. and CAVANAGH, D. "Infectious bronchitis" . Diseases of Poultry 9: 1991,471–484.

24- LAI, M. and CAVANAGH, D. "The molecular biology of coronaviruses". Advances in Virus Research 48: 1997,1–100.

25- LEE, H., YOUN, H., KWON, J., LEE, Y., KIM, J., LEE, J., PARK, S., CHOI, I. and SONG,C., "Characterization of a Novel Live Attenuated Infectious Bronchitis Virus Vaccine Candidate Derived from a Korean Nephropathogenic Strain. JVAC Vaccine 28, no. 16 ,2010: 2887-94.

26- LIAIS, E., CROVILLE, G., MARIETTE, J., DELVERDIER, M., LUCAS, M., KLOPP, C., LLUCH, J., DONNADIEU, C., GUY, J., CORRAND, L., DUCATEZ, M. and GUÉRIN, J. "Novel avian coronavirus and fulminating disease in guinea fowl, France". Emerging Infectious Diseases 20: 2014,105–108.

27- LIM, T., LEE, H., LEE, D., LEE, Y., PARK, J., YOUN, H., KIM, M., LEE, J., PARK, S., CHOI, I. and SONG, C. An emerging recombinant cluster of nephropathogenic strains of avian infectious bronchitis virus in Korea. Infection, Genetics and Evolution 11 (3) ,2011,678–685.

28- LIU, S., CHEN, J., CHEN, J., KONG, X., SHAO, Y., HAN, Z., FENG, L., Cai, X. Gu, S. and Lui, M. Isolation of Avian Infectious Bronchitis Coronavirus from Domestic Peafowl (Pavo Cristatus) and Teal (Anas). The Journal of general virology 86 ,2005, 719-25.

29- LIU, S., CHEN, J., HAN,Z., ZHANG, Q., SHAO, Y., KONG, X. and TONG. G. "Infectious Bronchitis Virus: S1 Gene Characteristics of Vaccines Used in China and Efficacy of Vaccination against Heterologous Strains from China. Avian Pathology 35, no. 5 ,2006, 394-99.

30- LIU, S., WANG,Y., MA,Y., HAN, Z., ZHANG, Q., SHAO, Y., CHEN, J., and KONG, X. "Identification of a Newly Isolated Avian Infectious Bronchitis Coronavirus Variant in China Exhibiting Affinity for the Respiratory Tract. avdi Avian Diseases 52, no. 2 ,2008, 306-14.

31- LIU, S., ZHANG, X., WANG, Y., LI, C., HAN. Z., SHAO, Y., LI, H. and KONG, X. "Molecular characterization and pathogenicity of infectious bronchitis coronaviruses: complicated evolution and epidemiology in China caused by cocirculation of multiple types of infectious bronchitis coronaviruses". Intervirology 52:2009, 223–234.

32- MCKINLEY, E. T. "Molecular Diversity, Evolutionary Trends, and Mutation Rates in Avian Coronavirus Infectious Bronchitis Virus. GEORGIA, 2009, 1-202.

33- NOURI, A., ASSASI, K., SHAPOURI, M. Field study of infectious bronchitis virus in broiler using type-specific RT-PCR. Arch Razi Ins 2003; 55: 1-10.

34- ROUSSAN, D., TOTANJI, W. and KHAWALDEH. G. "Molecular Subtype of Infectious Bronchitis Virus in Broiler Flocks in Jordan. Poultry Science 87, no. 4 ,2008, 661-64.

35- SAIF, Y., FADLY, A., GLISSON, J., MCDOUGALD, L., NOLAN, L. and SWAYNEM, D. 2008. Diseases of poultry. 12th edition. Iowa State University Press, Ames, Iowa, 117-130.

36- SCHALK, A. and HAWN, M. An apparently new respiratory disease of baby chicks. Journal of the American Veterinary Medicine Association 1931; 78:413-416.

37- SEGER, W., LANGEROUDI, A., KARIMI, V., MADADGAR, O., MARANDI, M. and HASHEMZADEH, M. Prevalence of avian infectious bronchitis virus in broiler chicken farms in south of Iraq, 2014 – 2015. Veterinary Research Forum. 2016; 7 (4) 317 - 321

38- TARPEY, I ،.ORBELL, S., BRITTON, P., CASAIS, R. R., HODGSON, T., LIN, F., HOGAN, E. and CAVANAGH, D. "Safety and Efficacy of an Infectious Bronchitis Virus Used for Chicken Embryo Vaccination. Vaccine. 24, no. 47-48 ,2006,6830-38.

39- VALASTRO, V., EDWAR, H., BRITTON, P., FUSARO, A., JACKWOOD, M., CATTOLI, G. and MONNE, I. S1 Gene-Based Phylogeny of Infectious Bronchitis Virus: An Attempt to Harmonize Virus Classification. Infection, Genetics and Evolution Infection, Genetics and Evolution 39 ,2016, 349-64.

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

41- XU, C., ZHAO, J., HU, X. and ZHANG, G. "Isolation and Identification of Four Infectious Bronchitis Virus Strains in China and Analyses of Their S1 Glycoprotein Gene. VETMIC Veterinary Microbiology 122, no. 1 ,2007, 61-71.

42- XU, G., LIU, X., ZHAO, Y., CHEN,Y., ZHAO, J. and ZHANG, G. "Characterization and Analysis of an Infectious Bronchitis Virus Strain Isolated from Southern China in 2013. Virology Journal 13, no. 40, 2016,1-9.

43- ZHANG, D., YZHOU, J., FANG, J., HU, J., WU, J., and MU,.A. An Elisa for Antibodies to Infectious Bronchitis Virus Based on Nucleocapsid Protein Produced in Escherichia Coli. Vet. Med. Veterinarni Medicina 50, no. 8,2005: 336-44.

44- ZWAAGSTRA, K. A., B. A. VAN DER ZEIJST, and J. G. KUSTERS. "Rapid Detection and Identification of Avian Infectious Bronchitis Virus." Journal of clinical microbiology 30, no. 1 ,1992و 79-84.