مطالعه تجربی گرایش بافتی جدایه ایرانی سروتیپ 793/B ویروس برونشیت عفونی در جوجه‌های SPF

پیمان بیژن‌زاد[1*]، رضا ممیز[2]، محمدحسن بزرگمهری‌فرد[3]، محمدحسن حبل‌الورید[2]، سیدعلی پوربخش[2]

چکیده

بیماری برونشیت عفونی یکی از عوامل بیماریزای مهم صنعت طیور می‌باشد، که عمدتاً موجب بیماری تنفسی می‌گردد اما سویه‌های مختلف این ویروس می‌توانند سایر بافت‌ها را نیز مبتلا نمایند. هدف از این مطالعه بررسی تجربی گرایش بافتی سروتیپ 793/B ویروس برونشیت عفونی در جوجه‌های SPF بوسیله آزمایش‌های RT-PCR و PCR آشیانه‌ای بود.

در این مطالعه، انتشار بافتی جدایه ایرانی ویروس IR/773/2001(793/B) از سروتیپ 793/B در اندام‌های مختلف جوجه‌های SPF مورد بررسی قرار گرفت. چهل و دو قطعه جوجه یکروزه SPF بطور تصادفی به دو گروه ۲۱ قطعه‌ای تقسیم گردیدند. در سن ۱۲ روزگی جوجه‌های گروه یک با $10^3 EID_{50}$ ویروس برونشیت عفونی به روش قطره چشمی آلوده و گروه دو بعنوان گروه کنترل درنظر گرفته شد. نمونه‌برداری از اندام‌های مختلف در روزهای ۲، ٤، ٦، ۸، ۱۰، ۱۲ پس از تلقیح انجام گردید.

جوجه‌های گروه عفونی شده با ویروس مذکور از روز دوم تا چهارم دچار کزکردگی بودند. ویروس از کلوآک و لوزه‌های سکومی در روز ۱۲-۲، در کلیه روزهای ۱۰-٤، ودر بورس فابریسیوس در روزهای ۱۲-٤ پس از تلقیح ردیابی شد. در نای نیز ویروس در روزهای ۲ و ٤ و در تیموس در روزهای ٦ و ۸ پس از تلقیح ردیابی گردید. در ریه نیز تنها نمونه‌های مثبت مربوط به روز ٤ پس از تلقیح بود.

نتایج مطالعه حاضر نشان دادکه سروتیپ 793/B ویروس برونشیت عفونی به‌تنهایی نمی‌تواند منجر به تلفات، علائم شدید بالینی یا کالبدگشائی در جوجه‌های مبتلا گردد، اما تکثیر این ویروس در برخی اندام‌ها می‌تواند منجر به مستعد شدن پرنده برای ابتلا به سایر بیماری‌ها گردد.

واژگان کلیدی: *گرایش بافتی؛ ویروس برونشیت عفونی؛ سروتیپ 793/B؛ RT-PCR؛ جوجه‌های SPF*

تاریخ دریافت: ۹۱/۱/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۱/٦/۱۲

مقدمه

برونشیت عفونی بیماری ویروسی حاد، با واگیری زیاد است که از نظر اقتصادی در صنعت طیور بسیار مهم می‌باشد و می‌تواند طیور صنعتی را در کل دوران زندگی مبتلا نماید (۸). ویروس برونشیت عفونی عضوی از خانواده کروناویریده بوده و در جنس گاماکروناویروس قرار دارد و تاکنون بیش از ۲٦ سروتیپ مختلف آن شناسایی شده است (۱۲). بیماری برونشیت عفونی اولین بار در سال ۱۹۳۱ از ایالات متحده با علایم تنفسی گزارش گردید (۲۰). اما برخی از سویه‌های ویروس برونشیت عفونی به غیر از بافت‌های دستگاه تنفسی در بافت‌های تناسلی (۲۳)، کلیه‌ها (۲٦)، و دستگاه گوارش (۲۷) نیز تکثیر می‌نمایند. علیرغم اینکه سروتیپ 793/B اولین بار در بریتانیا در سال‌های ۱۹۹۰-۱۹۹۱ شناسایی شد، اما گزارش‌های بعدی تائید نمودن که این سروتیپ از سال ۱۹۸۵ در فرانسه حضور داشته است (۱۸). اولین جداسازی ویروس برونشیت عفونی از گله‌های طیور ایران در سال ۱۹۹٤ بوده است (۲)، و بعد از آن محققین مختلفی وجود سروتیپ 793/B را تائید نمودند. از سال ۲۰۰۰ که سروتیپ 793/B ویروس برونشیت عفونی از طیور صنعتی ایران جداسازی و تائید شده است (۲٤و ۲۱، ۱٦)، براساس نتایج مطالعات این سروتیپ به یکی از سروتیپ‌های عمده موجود در گله‌های طیور تبدیل گشته است (۲۲). علاوه بر تکثیر سروتیپ 793/B برونشیت عفونی در سیستم تنفسی (۱٤و ٦، ٤)، در کلیه‌ها (۲٦) و روده‌ها (۱۹) نیز گزارش شده است. اگر چه تاکنون مطالعاتی با استفاده از سروتیپ 793/B در مورد جراحات پاتولوژیکی (۱٤و ۱۳) و روند بیماریزایی این سروتیپ (٦) انجام گرفته است، اما نتایج متفاوتی گزارش گردیده است، کـه به ویـژه در مـورد جـوجه‌های تجاری تکثیر ویروس بسیار

۱*- دستیار تخصصی بیماری های طیور، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، گروه بیماری‌های طیور، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران p.bijanzad@srbiau.ac.ir

۲- موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران

۳- دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، گروه بیماری‌های طیور، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

گسترده‌تر از جوجه‌های SPF بوده است که احتمالاً بدلیل حضور عوامل بیماریزای ثانویه می‌باشد. بنابراین مطالعه کاملی به ویژه بر روی بیماری‌زایی ویروس لازم است، تا ویژگی‌های بیماری‌زایی و انتشار بافتی این ویروس مشخص گردد.

هدف از مطالعه حاضر بررسی ویژگی‌هایی بیماری‌زایی سروتیپ 793/B ویروس برونشیت عفونی در جوجه‌های SPF و مشخص نمودن گرایش بافتی این ویروس بوده است. علائم بالینی و جراحات کالبدگشایی ویروس نیز همزمان با شناسایی آنتی‌ژن ویروس در اندام‌های مختلف جوجه‌های آلوده شده با استفاده از آزمایش RT-PCR و Nested-PCR ارزیابی خواهند شد.

مواد و روش کار

ویروس

جدایه ایرانی سروتیپ 793/B ویروس برونشیت عفونی (IR/773/2001) در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت. این سویه از ایران جدا شده و به وسیله آزمایش RT-PCR، و آزمایش Nested-PCR و تعیین توالی مورد شناسایی قرار گرفته است. عیار ویروس با تلقیح ۱/. میلی‌لیتر از رقت‌های متوالی بر مبنای یک دهم ($۱۰^{-۳}$ تا $۱۰^{-۹}$) بذر ویروسی در PBS در داخل کیسه کورویوالانتوئیک تخم مرغ جنین دار ۱۰ روزه SPF محاسبه گردید. تخم مرغ‌های جنین دار SPF تلقیح شده دو بار در روز مورد بررسی قرار گرفتند و تلفات، ۲ تا ۷ روز بعد از تلقیح جهت بررسی علائم اختصاصی ویروس در نظر گرفته شدند. در پایان روز ۷ پس از تلقیح جنین‌های زنده و تلف شده برای مشاهده جراحات ناشی از ویروس برونشیت عفونی، نظیر (کوتولگی)، (پیچش)، چماقی شدن پرها، یا رسوب اورات در مزونفرون‌های کلیه مورد بررسی قرار گرفتند. عیار ویروس به صورت ۵۰ درصد دوز عفونی کننده جنین (EID50) و به روش اسپرمن-کاربر (Spearman-karber) محاسبه شد(۲۵).

پرندگان

چهل و دو قطعه جوجه SPF خریداری شده از شرکت ونکی کشور هند (Venkey's, India) به صورت تصادفی در دو گروه ۲۱ قطعه‌ای توزیع گردید. جوجه‌های هر گروه به صورت جداگانه در داخل ایزولاتورهای دارای فشار مثبت در موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی نگهداری گردیدند.

فرآیند آزمایش

در سن ۱۲ روزگی تمامی پرندگان در گروه آزمایشی اول به میزان EID50 $۱۰^{۳}$ در ۰/۱ سی سی از مایع کوریوالانتوئیک عفونی حاوی سروتیپ 793/B به روش قطره چشمی تلقیح گردید. گروه دوم نیز به عنوان گروه کنترل انتخاب و صرفاً سرم فیزیولوژی جهت تلقیح استفاده گردید. پس از تلقیح ویروس تمامی جوجه‌ها از نظر علائم بالینی و تلفات به صورت روزانه مورد بررسی قرار گرفتند. در روزهای ۲، ٤، ٦، ٨، ۱۰ و ۱۲ پس از تلقیح، سه جوجه از هر گروه به صورت تصادفی انتخاب و از آنها کالبدگشایی و نمونه‌برداری انجام گرفت و علائم کالبدگشایی نیز در صورت موجود بودن ثبت گردید. نمونه‌ها از بافت‌های مختلف شامل نای، تیموس، ریه‌ها، طحال، کلیه‌ها، لوزه‌های سکومی، بورس فابریسیوس، و کلوآک حاوی مدفوع جهت شناسایی ویروس با استفاده از روش RT-PCR اخذ گردید.

استخراج RNA

تمامی نمونه‌ها با استفاده از بافر تریپتوز فسفات هموژن گردیدند و پس از ۵ دقیقه سانتریفیوژ، مایع رویی حاصل شده تا زمان انجام آزمایش در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. ریبونوکلئیک اسید با استفاده از کیت شرکت Roche بر اساس دستورالعمل سازنده استخراج گردید.

آزمایش RT-PCR

جهت انجام آزمایش RT-PCR از کیت تک مرحله‌ای ساخت شرکت Roche استفاده گردید. دو پرایمر (۱) عمومی (XCE1+ و XCE2-) برای تعیین هویت سه نوع سویه

ویروس برونشیت عفونی انتخاب و با استفاده از ٤ میکرولیتر از RNA استخراج شده در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر آزمایش انجام گرفت (جدول۱). جهت انجام مرحله رونویسی معکوس، مخلوط حاصل در دمای $^{\circ}C$ ٤٥ به مدت ٤٥ دقیقه قرار داده شد و بعد از ۲ دقیقه در دمای $^{\circ}C$ ۹٤ قرار گرفت. سپس واکنش PCR شامل ۳۵ چرخه واسرشت ($^{\circ}C$ ۹٤، یک دقیقه)، هم‌سرشت ($^{\circ}C$ ٤۸، یک دقیقه)، گسترش ($^{\circ}C$ ٦۸، یک دقیقه) انجام شد و سرانجام گسترش نهایی ($^{\circ}C$ ٦۸، ده دقیقه) انجام گردید.

آزمایش Nested-PCR یا PCR آشیانه‌ای با استفاده از الیگونوکلئوتید -XCE3 که بین هر سه سویه برونشیت عفونی مشترک است و الیگونوکلئوتید +BCE1 که اختصاصی سروتیپ 793/B می‌باشد و یک قطعه ۱٥٤ جفت باز را ایجاد می‌نماید، مورد استفاده قرار گرفت(۱). در مورد نمونه‌هایی که در مرحله اول مثبت بودند، آزمایش Nested-PCR، با استفاده از رقت یک دهم محصول مرحله اول در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت اما در مورد نمونه‌های منفی رقت تهیه نگردید. برنامه آزمایش Nested-PCR، شامل ۲۵ مرحله واسرشت ($^{\circ}C$ ۹٤، ۱ دقیقه)، هم‌سرشت ($^{\circ}C$ ٤۸، ۱ دقیقه)، گسترش ($^{\circ}C$ ۷۲، یک دقیقه) و در نهایت گسترش نهایی ($^{\circ}C$ ۷۲، ۱۰ دقیقه) بود. آنزیم‌ها و مواد مورد استفاده در آزمایش‌های RT-PCR و PCR آشیانه‌ای در جدول ۱ ذکر گردیده است. محصول نهایی با انجام آزمایش الکتروفورز در ژل آگارز ۱٪، و پس از رنگ‌آمیزی با رنگ سایبر سیف، نتایج با استفاده از اشعه UV بررسی شد. همچنین توالی، موقعیت، و اندازه محصول پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۲ ذکر گردیده است.

جدول ۱: آنزیم‌ها و مواد مورد استفاده در آزمایش RT-PCR و PCR آشیانه‌ای

آزمایش RT-PCR		آزمایش PCR آشیانه‌ای	
	حجم به میکرولیتر		حجم به میکرولیتر
آب مقطر عاری از نوکلئاز	۲۷,۲۵	آب مقطر عاری از نوکلئاز	۳٦,۷۵
بافر RT-PCR	۱۰	بافر PCR	۵
dtt	۲,۵	$MgCl_2$	۱,۵
dNTPs	۱	dNTPs	۱
پرایمر پیش‌بر	۲	پرایمر پیش‌بر	۲
پرایمر معکوس	۲	پرایمر معکوس	۲
آنزیم ممانعت کننده از فعالیت آنزیم RNase	۰,۲۵	آنزیم Taq	۰,۲۵
آنزیم Taq	۱	DNA	۲
RNA	٤	حجم نهایی ۵۰ میکرولینر برای دو نمونه	
حجم نهایی ۵۰ میکرولینر برای چهار نمونه			

جدول ۲: موقعیت الیگونوکلئوتیدها و توالی پرایمرهای مورد استفاده

منبع	اندازه محصول (جفت باز)	موقعیت ج	ژن	توالی (′۳-′۵)	الیگونوکلئوتید
(1)	٤٦٤ جفت باز	۷۲۸ تا ۷٤۹	S1	CACTGGTAATTTTTCAGATGG	XCE1+الف
(1)		۱۱٦۸ تا ۱۱۹۳	S1	CTCTATAAACACCCTTACA	XCE2-ب
(1)	۱٥٤ جفت باز	۹٥۸ تا ۹۷۸	S1	AGTAGTTTTGTGTATAAACCA	BCE1+
(1)		۱۰۹۳ تا ۱۱۱۱	S1	CAGATTGCTTACAACCACC	XCE3-

الف- الیگونوکلئوتید سنس مثبت، ب- الیگونوکلئوتید سنس منفی، ج- موقعیت اسید آمینه در ژن مورد اشاره

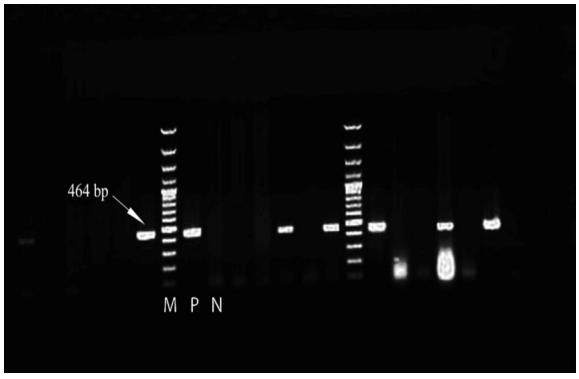
نتایج

علائم بالینی

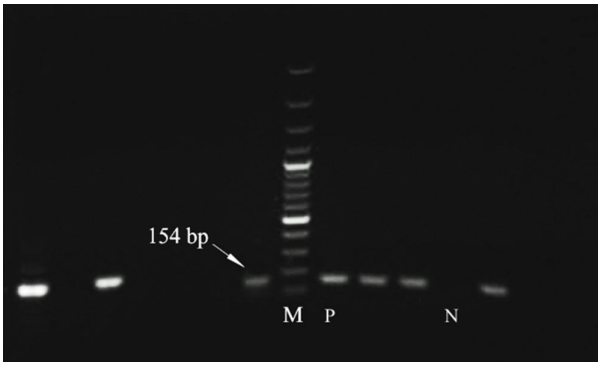
تعدادی از جوجه‌های مربوط به گروه آلوده شده از روز دوم پس از تلقیح دچار کزکردگی و مشکل تنفسی گردیدند، اما علایم از روز چهارم پس از تلقیح بسیار کم شده بود. در هیچ یک از گروه‌ها در طی مطالعه تلفاتی مشاهده نگردید. اما میزان مصرف دان و افزایش وزن در مقایسه با گروه شاهد در گروه آلوده شده کاهش یافت و هیچ علامت بالینی در گروه شاهد مشاهده نشد.

شناسایی ویروس در بافت‌ها متعاقب تلقیح ویروس

جهت بررسی حضور ویروس در بافت‌ها تمامی نمونه‌های اخذ شده از هر دو گروه مورد مطالعه در روزهای مختلف پس از تلقیح مورد آزمایش قرار گرفتند. در نمونه‌هایی که قبل از تلقیح ویروس اخذ گردیده بودند و همچنین نمونه‌های اخذ شده از گروه کنترل ویروس شناسایی نگردید. ویروس برونشیت عفونی در تمامی نمونه‌های اخذ شده از گروه عفونی شده به استثناء بافت طحال در روزهای مختلف پس از تلقیح شناسایی گردید. نتایج حاصل از آزمایش RT-PCR در نگاره ۱ و نتایج حاصل از آزمایش PCR آشیانه‌ای با استفاده از پرایمر اختصاصی سروتیپ 793/B در نگاره ۲ ذکر شده است. انتشار ویروس در اندام‌های مختلف پس از تلقیح ویروس نیز در جدول ۳ ذکر شده است، اما به طور خلاصه در لوزه‌های سکومی و کلوآک جوجه‌های آلوده شده با ویروس در طی کل دوره مطالعه سروتیپ 793/B ویروس برونشیت عفونی شناسایی گردید، اما در کلیه‌ها، ویروس از روز ٤ تا ۱۰ پس از تلقیح، در بورس فابریسیوس از روز ٤ تا ۱۲ پس از تلقیح و در نای در روزهای ۲ و ٤ پس از تلقیح، و در نمونه‌های مربوط به تیموس ویروس در روزهای ٦ و ۸ پس از تلقیح شناسایی شد. تنها نمونه مثبت مربوط به بافت ریه نیز در روز ٤ پس از تلقیح ثبت گردید.



نگاره ۱: شناسایی ویروس برونشیت عفونی از بافت‌ها مختلف به روش RT-PCR. M، مارکر ۱۰۰ جفت بازی، N، کنترل منفی، P، کنترل مثبت.



نگاره ۲: شناسایی سروتیپ 793/B ویروس برونشیت عفونی از بافت‌های مختلف به روش PCR آشیانه‌ای. M، مارکر ۱۰۰ جفت بازی، N، کنترل منفی، P، کنترل مثبت.

جدول ۳: نتایج حضور ویروس در بافت‌های مختلف پس از تلقیح سروتیپ 793/B ویروس برونشیت عفونی

روز پس از تلقیح	نای	ریه	لوزه‌های سکومی	کلیه‌ها	طحال	بورس فابریسیوس	تیموس	کلوآک
۲	+*	−	+	−	−	−	−	+
٤	+	+	+	+	−	+	−	+
٦	−	−	+	+	−	+	+	+
۸	−	−	+	+	−	+	+	+
۱۰	−	−	+	+	−	+	−	+
۱۲	−	−	+	−	−	+	−	+

* +: نمونه‌های مثبت، − نمونه‌های منفی

بحث

اولین شیوع بیماری برونشیت عفونی در گله‌های طیور ایران مربوط به سال ۱۹۹٤ می‌باشد که توسط آقاخان گزارش گردید (۲). شیوع سروتیپ 793/B نیز در ایران توسط محققین مختلفی گزارش شده است (۲٦و ۲۱، ۲) و از آن زمان تاکنون بیماری برونشیت عفونی تبدیل به یکی از بیماری‌های مهم صنعت طیور گردیده است. اگرچه بیماری‌زایی ویروس برونشیت عفونی با استفاده از روش‌های مختلفی بررسی گردیده است (۱٤و ۱۰، ۹، ۵)، اما هدف مطالعه حاضر بررسی روند بیماری‌زایی، و گرایش بافتی سروتیپ 793/B ویروس برونشیت عفونی گزارش شده از گله‌های طیور ایران توسط ممیز و همکاران در سال ۲۰۰۲ بوده است (۱٦).

مطالعات پیشین مشخص نموده‌اند که تکثیر ویروس برونشیت عفونی در بافت‌های تنفسی منجر به علائم مشخص ولی غیر اختصاصی مربوط به بیماری نظیر دهنک زدن، سرفه، رال‌های نایی، و ترشحات از بینی می‌شوند (۷). گهگاهی نیز تورم و باد کردن چشم‌ها و آماس سینوس‌ها قابل مشاهده است. Mc Martin (۱۹۹۳) گزارش نمود که سیستم تنفسی فوقانی کانون ابتدایی تکثیر ویروس برونشیت عفونی بوده و پس از آن در اثر بروز ویرمی ویروس به صورت گسترده‌ای به سایر اندام‌ها گسترش می‌یابد (۱۵). نتایج حاصل از مطالعه Benyeda و همکاران (۲۰۱۰) با استفاده از هفت سویه مختلف ویروس برونشیت عفونی نشان دهنده عدم بروز علائم بالینی و یا تلفات در جوجه‌های آلوده شده با سروتیپ 793/B بود (۵). در مطالعه دیگری مشخص گردید که در طی سه روز پس از بروز عفونت در جوجه‌ها میزان وزن گیری و مصرف دان کاهش یافته و جوجه‌ها دچار کزکردگی شدند (۱۷). در مطالعه حاضر تنها نشانی بالینی کزکردگی و کاهش وزن گیری در مقایسه با گروه شاهد بود، که با نتایج حاصل از مطالعات پژوهشگران همسو می‌باشد (۲۵و ۲٤، ۲۳، ۲۰، ۱٦).

مهدوی و همکاران (۲۰۰۷)، حضور ویروس را در سلول‌های بافت پوششی نای در طی روزهای ۲ تا ۵ پس از تلقیح ویروس ردیابی نمودند (۱٤). همچنین Benyeda و همکاران (۲۰۱۰)، آنتی‌ژن سروتیپ 793/B را ٤ روز پس از تلقیح در نای ردیابی کردند، درحالی‌که نتوانستند آنتی‌ژن ویروسی را ۷ روز پس از تلقیح ردیابی نمایند (۲۰). همچنین در مطالعه‌ای دیگر، تا ۷ روز پس از تلقیح سروتیپ 793/B ویروس به جوجه‌های SPF یک‌روزه ویروس در نای شناسایی شده است، اما در جوجه‌های گوشتی با سن ٦ هفته، ویروس در روز سوم پس از تلقیح ردیابی گردید (۱). البته برخی از پژوهشگران نیز ویروس برونشیت عفونی را در مدت بیشتری در نای ردیابی نموده‌اند (٦و ۳). در مطالعه حاضر سروتیپ 793/B در نای تنها در روز ۲ و ٤ پس از تلقیح شناسایی شد. به نظر می‌رسد این سروتیپ از ویروس می‌تواند در حضور سایر عوامل بیماری‌زا و یا در

ابتدای دوران زندگی جوجه‌ها در نای به مدت بیشتری تکثیر یابد.

برخی از سویه‌های ویروس برونشیت عفونی نفروپاتوژنیک بوده و علاوه بر سیستم تنفسی در کلیه‌ها نیز تکثیر می‌نمایند، که جراحات ایجاد شده توسط سویه‌های مزبور در کلیه‌ها واضح‌تر از سیستم تنفسی می‌باشد(۸). مطالعات متعددی گرایش سروتیپ 793/B ویروس برونشیت عفونی جهت تکثیر در کلیه‌ها را تائید نموده‌اند، و عمدتاً ویروس تا روز ۷ پس از تلقیح در کلیه‌ها شناسایی گردیده است (۲٦و ۲۳). در مطالعه حاضر نیز ویروس از روز ۲ تا ۱۰ پس از تلقیح در کلیه‌ها شناسایی گردید، که نتایج حاصل از مطالعه حاضر با نتایج مطالعات پیشین مطابقت دارد (۲٤و ۲۳، ۱).

سروتیپ 793/B ویروس برونشیت عفونی علائم ملایم و تکثیر محدودی در سیستم تنفسی دارا می‌باشد. در جوجه‌های یک‌روزه آلوده شدن با سویه ایتالیایی 02 ژنوم ویروس در نای تنها در روز ۹ پس از تلقیح به روش In situ hybridization (ISH) شناسایی شد. اما Dolz و همکاران (۲۰۱۲) نمونه‌ای با رنگ آمیزی مثبت در ریه را گزارش نکردند(۱۱)، در مطالعه‌ای دیگر حضور ویروس در سلول‌های بافت پوششی ریه شناسایی گردید. از سوی دیگر، Benyeda و همکاران (۲۰۱۰) حضور ویروسی را در ریه‌های جوجه‌های آلوده شده با جدایه شبه QX مشخص نمودند، اما آن‌ها نتوانستند در جوجه‌های آلوده شده با سویه‌های M41 و 793/B آنتی‌ژن ویروس را شناسایی نمایند (۵)، هرچند که تفاوت معنی‌داری از نظر جراحات ایجاد شده در گروه‌های مختلف نیز در مطالعه مزبور گزارش نگردید. مهدوی و همکاران (۲۰۰۷)، حضور ویروس را ۲ روز پس از تلقیح در بافت پوششی و غدد مخاطی آلوئولی شناسایی نمودند. در مطالعه حاضر نیز ویروس تنها در روز ٤ پس از تلقیح در بافت ریه شناسایی گردید (۱٤). با توجه به گرایش سروتیپ 793/B ویروس برونشیت عفونی به کلیه، بنظر می‌رسد که این ویروس تنها به مدت محدودی در دستگاه تنفسی تکثیر می‌نماید و بافت هدف اصلی برای این سروتیپ دستگاه ادراری می‌باشد.

ژنوم ویروس با استفاده از روش ISH در بافت‌های پوششی توربینیت‌های بینی، نای، ریه، کلیه، لوزه‌های سکومی، کلوآک و بورس فابریسیوس جوجه‌های یک‌روزه گزارش گردیده است، همچنین در این مطالعه تکثیر شدید ویروس در انتروسیت‌های لوزه‌های سکومی و رکتوم نیز گزارش شده است (۳). موارد مثبت در بافت پوششی بورس فابریسیوس از روز ۳ تا ۷ پس از تلقیح، در رکتوم نیز از روز ۱۸ تا ۲۷ پس از تلقیح و در لوزه‌های سکومی تا روز ۲٤ پس از تلقیح گزارش شده است. نتایج مطالعه ایمنوهیستوشیمی نیز نشانگر تکثیر ابتدایی ویروس در نای و ریه‌ها و سپس تکثیر آن در روده‌ها و به ویژه سلول‌های بافت پوششی کلیه‌ها می‌باشد. Raj و همکاران (۱۹۹٦)، ذکر نمودند که حضور ویروس در نای و ریه در جوجه‌های SPF به مراتب بیشتر از جوجه‌های گوشتی می‌باشد. اما در مورد غدد هاردرین و بورس فابریسیوس مدت حضور ویروس در آن‌ها مشابه بوده و تا روز ۷ پس از تلقیح ادامه داشته است. در مورد ریه نیز، پاک‌سازی ویروس در هر دو نوع جوجه‌ها تا روز ۱۰ پس از تلقیح ادامه می‌یابد (۱۹).

جداسازی و شناسایی ویروس برونشیت عفونی از بورس فابریسیوس در طی مطالعه تجربی آلودگی ناشی از H52 و H120 توصیف گردیده است. همچنین اسید ریبونوکلئیک ویروس در بافت‌های پوششی نای، ریه، روده، و بورس فابریسیوس جنین‌های آلوده شده با ۸ سویه از ویروس برونشیت عفونی تا ۲ روز پس از تلقیح ردیابی شده است (۳).

اخیراً نیز گزارشاتی از گرایش روده‌ای و تنفسی سروتیپ 793/B وجود داشته است که ارتباط این ویروس را با اسهال ایجاد شده در گله‌های گوشتی مشخص می‌سازد، اما با وجود گرایش روده‌ای این ویروس تغییرات کالبدگشایی و یا بافتی در این مورد گزارش نگردیده است (٦).

در مطالعه حاضر حضور ویروس در کل دوره مطالعه در بافت‌های لوزه‌های سکومی و کلوآک ثابت گردید که نتایج بدست آمده با نتایج مطالعات پیشین در مورد تکثیر ویروس در بافت روده هم‌خوانی دارد. اگرچه حضور سروتیپ ماساچوست ویروس برونشیت عفونی در طحال قبلاً گزارش شده است (۱۷)، اما در این مطالعه ویروس در طحال حضور نداشت. بنظر می‌رسد تکثیر ویروس برونشیت عفونی در طحال با توجه به سروتیپ آلوده کننده و سویه پرندگان آلوده شده متفاوت بوده وسروتیپ 793/B گرایش بافتی به طحال ندارد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که سروتیپ 793/B برونشیت عفونی به تنهایی منجر به بروز تلفات، یا بروز علائم شدید بالینی یا کالبدگشائی در جوجه‌های دچار عفونت نمی‌گردد، همچنین در تحقیقات پیشین که با استفاده از جوجه‌های SPF انجام گرفته است، در هیچ یک از آن‌ها علائم بالینی و کالبدگشایی مرتبط با برونشیت عفونی به خصوص سروتیپ 793/B ذکر نگردیده است(۱۹و ۱۳، ٤). اما در تحقیقات انجام گرفته در جوجه‌های تجاری علائم بالینی مختلفی بروز کرده است که غیر اختصاصی برونشیت عفونی بوده‌اند(٦)، بنابراین بنظر می‌رسد ویروس برونشیت عفونی به تنهایی قادر به ایجاد علایم بالینی و یا کالبدگشایی خاصی نمی‌باشد و صرفاً در اثر وجود عوامل بیماریزای باکتریایی، ویروسی و یا عوامل تاثیرگذار نظیر نوع جیره غذایی و عوامل محیطی نظیر دما و شرایط تهویه‌ای سالن علایم ناشی از بیماری بروز می‌نماید که آن‌هم اختصاصی ویروس برونشیت عفونی نمی‌باشد(۸). اما تکثیر این ویروس در بورس فابریسیوس و بافت روده می‌تواند موجب مستعد شدن پرنده به ابتلا به سایر بیماری‌ها گردد، تکثیر ویروس در بافت بورس و تیموس منجربه تحلیل رفتن این اندام‌ها در طی مطالعه گردید که می‌تواند بر پاسخ ایمنی بدن در برابر سایر بیماریها بخصوص در شرایط مزرعه تاثیرگذار باشد و در نتیجه منجربه ابتلا به بیماری‌های باکتریایی یا ویروسی همزمان و تشدید علایم بالینی و کالبدگشایی و بروز تلفات گردد. بنابراین مطالعات بیشتری نیاز است تا نقش نژاد پرندگان و سایر عوامل بیماری‌زا نظیر ویروس آنفلوانزای پرندگان، ایشریشیا کولی و اورنیتوباکتریوم راینوتراکئال در عوارض حاصل از بیماری تعیین گردد.

REFERENCES

1- Adzhar, A., Gough, R. E., Haydon, D., Shaw, K., Britton, P. and Cavanagh, D. (1997): Molecular Analysis of the 793/B Serotype of Infectious Bronchitis Virus in Great Britain. Avian Pathology, 26(3): 625 - 640.

2- Aghakhan, S. M., Abshar, N., Fereidouni, S. R., Marunesi, C. and Khodashenas, M. (1994): Studies on Avian Viral Infections in Iran. Archives of Razi Institute, 44(45): 1-5.

3- Ambali, A. G. and Jones, R. C. (1990): Early Pathogenesis in Chicks of Infection with an Enterotropic Strain of Infectious Bronchitis Virus. Avian Diseases, 34(4): 809-817.

4- Benyeda, Z., Mató, T., Süveges, T., Szabó, É., Kardi, V., Abonyi-Tóth, Z., et al. (2009): Comparison of the Pathogenicity of Qx-Like, M41 and 793/B Infectious Bronchitis Strains from Different Pathological Conditions. Avian Pathology, 38(6): 449 - 456.

5- Benyeda, Z., Szeredi, L., Mató, T., Süveges, T., Balka, G., Abonyi-Tóth, Z., et al. (2010): Comparative Histopathology and Immunohistochemistry of Qx-Like, Massachusetts and 793/B Serotypes of Infectious Bronchitis Virus Infection in Chickens. Journal of Comparative Pathology, 143(4): 276-283.

6- Boroomand, Z., Asasi, K. and Mohammadi, A. (2012): Pathogenesis and Tissue Distribution of Avian Infectious Bronchitis Virus Isolate Irfibv32 (793/B Serotype) in Experimentally Infected Broiler Chickens. The Scientific World Journal, 2012: 6.

7- Capua, I., Gough, R. E., Mancini, M., Casaccia, C. and Weiss, C. (1994): A Novel Infectious Bronchitis Strain Infecting Broiler Chickens in Italy. Journal of Veterinary Medicine Series B, 41: 83-89.

8- Cavanagh, D. and Gelb, J. (2008). Infectious Bronchitis In: Diseases of Poultry. Y. M. Saif. Wiley-Blackwell Publishing, Iowa, IA: 117-135.

9- Chong, K. T. and Apostolov, K. (1982): The Pathogenesis of Nephritis in Chickens Induced by Infectious Bronchitis Virus. Journal of Comparative Pathology, 92(2): 199-211.

10- Crinion, R. A. and Hofstad, M. S. (1972): Pathogenicity of Four Serotypes of Avian Infectious Bronchitis Virus for the Oviduct of Young Chickens of Various Ages. Avian Diseases, 16(2): 351-363.

11- Dolz, R., Vergara-Alert, J., Pérez, M., Pujols, J. and Majó, N. (2012): New Insights on Infectious Bronchitis Virus Pathogenesis: Characterization of Italy 02 Serotype in Chicks and Adult Hens. Veterinary Microbiology, 156(3–4): 256-264.

12- King, A. M. Q., Adams, M. J., Carstens, E. B. and Lefkowitz, E. J. (2012): Virus Taxonomy, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Ninth ed., Elsevier Inc, International Committee on Taxonomy of Viruses.

13- Mahdavi, S., Tavasoly, A., Pourbakhsh, S. A. and Momayez, R. (2007): Experimental Histopathologic Study of the Lesions Induced by Serotype 793/B (4/91) Infectious Bronchitis Virus. Archives of Razi Institute, 62(2): 15-22.

14- Mahdavi, S., Tavasoly, A., Pourbakhsh, S. A., Momayez, R. and Shamseddini, M. (2007): The Immunohistochemistry Study of Lesions Due to Avian Infectious Bronchitis (Serotype 4/91) on Different Tissues in Specific Pathogen Free Chicks. Journal of Veterinary Researches, 62(4): 97-101.

15-Mc martin, D. A. (1993). Infectious Bronchitis. In: Virus Infections of Vertebrate. Virus Infections of Birds. J. B. McFerran and M. S. McNulty. Elsevier Science Publisher, Amsterdam. 4: 249-27۵،

16-Momayez, R., Pourbakhsh, S. A., Khodashenas, M. and Banani, M. (2002): Isolation and Identification of Infectious Bronchitis Virus from Commercial Chickens. Archives of Razi Institute, 53(1): 1-9.

17- Otsuki, K., Huggins, M. B. and Cook, J. K . A. (1990): Comparison of the Susceptibility to Avian Infectious Bronchitis Virus Infection of Two Inbred Lines of White Leghorn Chickens. Avian Pathology, 19(3): 467 - 475.

18- Picault, J. P., Drouin, P., Lamande, J., Allee, C., Toux, J. Y., Coq, H. L ,.et al. (1995): L'epizootie Recente De Bronchite Infectieuse Aviaire En France: Importance, Evolution Et Etiologie. Prooceedings of Angers 1eres Journee de la Recherche Avicole, Centre de Congres, d' Angers

19- Raj, G. D. and Jones, R. C. (1996): Immunopathogenesis of Infection in Spf Chicks and Commercial Broiler Chickens of a Variant Infectious Bronchitis Virus of Economic Importance. Avian Pathology, 25(3): 481 - 501.

20- Schalk, A. F. and Hawn, M. C. (1931): An Apparantly New Respiratory Disease of Baby Chicks. Journal of the American Veterinary Medical Association, 78: 413-422.

21-Seify Abad Shapouri, M. R., Mayahi, M., Charkhkar, S. and Assasi, K. (2002): Serotype Identification of Recent Iranian Isolates of Infectious Bronchitis Virus by Type-Specific Multiplex Rt-Pcr. Archives of Razi Institute, 53: 79-58.

22- Shoushtari, A. H., Toroghi, R., Momayez, R. and Pourbakhsh, S. A. (2008): 793/B Type, the Predominant Circulating Type of Avian Infectious Bronchitis Viruses 1999-2004 in Iran :A Retrospective Study. Archives of Razi Institute, 63(1): 1-5.

23- Van Roekel, H., Clarke, M. K., Bullis, K. L., Olesiuk, O. M. and Sperling, F. G. (1951): Infectious Bronchitis. American Journal of Veterinary Research, 12: 140-146.

24- Vasfi Marandi, M. and Bozorgmehrifard, M. H. (2000): Isolation and Identification of Infectious Bronchitis Viruses in Chickens in Iran. Prooceedings of The World's PoultryCongress, Montreal, Canada,August 20-25.

25-Villegas, P. (1998). Titration of Biological Suspensions. In: A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens. D. E. Swayne, J. R. Glisson, M. W.

Jackwood, J. E. Pearson and W. M. Reed. American Association of Avian Pathologists, Inc, University of Pennsylvania: 248-253.

26- Winterfield, R. W. and Hitchner, S. B. (1962): Etiology of an Infectious Nephritis-Nephrosis Syndrome of Chickens. American Journal of Veterinary Research, 23: 1273-1278.

27- Yu, L., Jiang, Y., Low, S., Wang, Z., Nam, S. J., Liu, W., et al. (2001):Characterization of Three Infectious Bronchitis Virus Isolates from China Associated with Proventriculus in Vaccinated Chickens. Avian Diseases, 45(2): 416-424.