✓ پژوهش و سازندگی، شماره ۴۸، پاییز ۱۳۷۹

جداسازی و مطالعه آدنوویروس عامل مولد بیماری برونشیت در بلدرچین‌ها

● نسرین آبشار، عضو هیأت علمی مؤسسه رازی
● سیدمهدی آقاخان، عضو هیأت علمی مؤسسه رازی
● چیمن مارونسی، کارشناس بخش بیماریهای طیور مؤسسه رازی
● زهرا سامی، کارشناس بخش بیماریهای طیور مؤسسه رازی
● ساسان رسول‌نژاد فریدونی، عضو هیأت علمی مؤسسه رازی
● محمد خداشناس، عضو هیأت علمی مؤسسه رازی
● سیدعلی پوربخش، عضو هیأت علمی مؤسسه رازی

تاریخ دریافت: بهمن ماه ۱۳۷۸ تاریخ پذیرش: تیرماه ۱۳۷۹

چکیده

در پی وقوع یک بیماری عفونی واگیردار در یکی از مزارع پرورش دهنده بلدرچین، که با تلفات بسیار زیاد، نشانه‌های شدید تنفسی و همچنین کنژکتیویت همراه بود، از ۲۶ قطعه پرنده بیمار و تلف شده ارسالی به بخش بیماریهای طیور مؤسسه سرم‌سازی رازی، نمونه گیری به عمل آمد. پس از انجام آزمایشات مقدماتی ویروس‌شناسی و مشاهدات میکروسکوپ الکترونی، بیماری مزبور را برونشیت بلدرچین (Quail bronchitis) و عامل آن را ویروس QBV تشخیص دادیم که با استفاده از آزمایشات تکمیلی مانند تزریق به کشت سلولی اولیه کبد جنین جوجه، آزمایشات سرولوژی، مقاومت در مقابل حلال‌های چربی، تغییرات pH و دما و نیز توانایی ایجاد پلاک ویروسی در محیط کشت آگاردار، تشخیص اولیه بیماری تأیید گردید. شایان ذکر است که این بیماری برای نخستین بار در ایران گزارش می‌گردد.

کلمات کلیدی: بلدرچین، برونشیت یزد، آدنوویروس.

✓ Pajouhesh & Sazandegi, No 48 PP: 128-134

Isolation and study of quail bronchitis producting adenovirus

By: N. Abshar, Aghakhan S.M., Marounesi Ch., Sami Z., Rasoul Nejad Fereidouni S., Khodashenas M. and Pourbakhsh S.A., Razi Serum and Vaccin Research Institute.

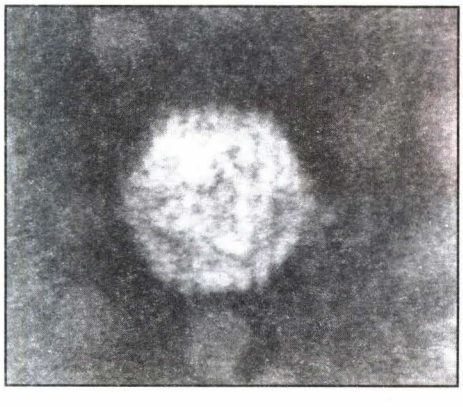
In 1996, an outbreak of an acute highly contagious respiratory and ophthalmic disease occurred in a quail breeding farm, which produced a high mortality rate in quails. In order to determine the etiologic agent of the disease, samples were taken from conjunctiva, respiratory tract, and intestinal contents of affected birds which showed conjunctivitis and severe respiratory symptoms. By use of tests such as inoculation into 9-12 days old SPF chick embryos via the allantoic sac, cultivation on primary chick embryo liver cells, electron micrscopic examination, H&E staining of the monolayers, thermal and lipid solvent stability, pH resistance, agglutination of rat RBCs and also serological tests (i.e neutralization, cross neutralization, agar gel percipitation and electrophoresis) were carried out. The results showed that the causative agent is quail bronchitis virus (QBV). This disease has been reported by Razi vaccin and serum research institute in Iran for the first time.

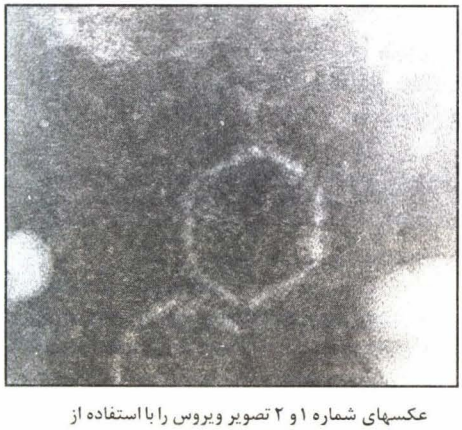
Key words: Quail, Bronchits. Adenovirus, Yazd.

مقدمه

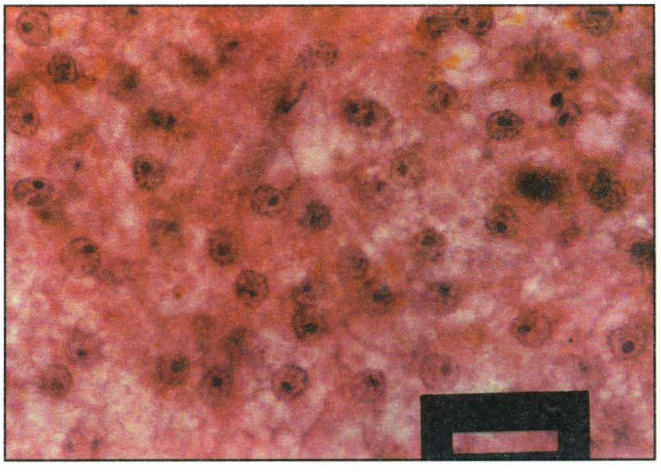
بیماری برونشیت بلدرچین یک بیماری تنفسی حاد و واگیر با میزان کشندگی بالا بوده که توسط آدنوویروس تیپ یک پرندگان در بلدرچین‌ها ایجاد می‌شود. بیماری برای اولین بار در سال ۱۹۴۹ توسط Olson در ویرجینیای غربی گزارش گردید، و طی سالهای بعد گزارشات متعدد دیگری حاکی از وجود بیماری در سایر نقاط دنیا داده شد (۱۹۸۶، ۱۹۸۵ Dubose, Cook). این بیماری در جهان انتشار وسیعی داشته و تاکنون ازکشورهای ایالات متحده آمریکا، کانادا، آلمان، سوئد، فرانسه، لهستان، ایتالیا، یوگسلاوی، انگلستان، چکسلواکی، ایرلند شمالی و جنوبی، هند، کره، مصر و استرالیا گزارش شده است.

طبق بررسی‌های DuBose و Grumbles ویروس QBV [1] و CELO [2] هر دو یک عامل بوده و جزو آدنوویروس تیپ یک پرندگان طبقه‌بندی می‌شوند (۲، ۱۲، ۱۳ و ۱۷). تاکنون هیچگونه ارتباط سرولوژیکی بین آدنوویروس پرندگان (سروتیپ یک) و دیگر ویروسهای مولد بیماری در آنها، مانند برونشیت عفونی، لارنگوتراکئیت، آنسفالیت پرندگان، نیوکاسل،

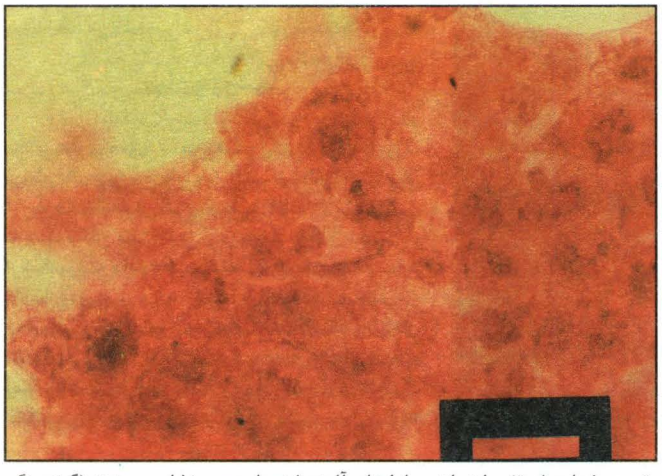




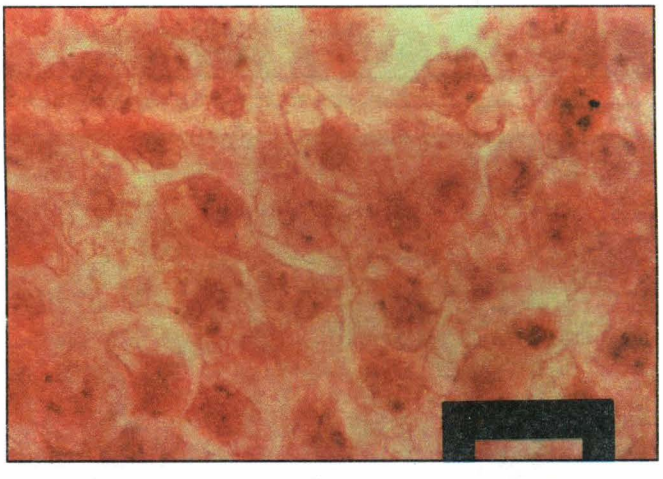
عکسهای شماره ۱ و ۲ تصویر ویروس را با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نشان می‌دهد.



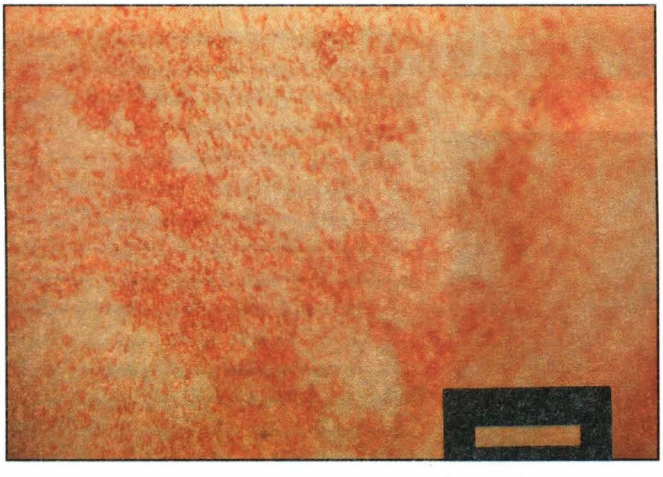
تصویر شماره ۳- سلول‌های کبدی جنین جوجه را در حالت طبیعی نشان می‌دهد.



تصویر شماره ۵- تغییرات را در سلول‌های آلوده شده با ویروس نشان می‌دهد (گنجیدگی درون سلولی در تصویر دیده می‌شود).



تصویر شماره ۴- سلول‌های کبدی جنین جوجه آلوده شده با ویروس را نشان می‌دهد.



تصویر شماره ۶- سلول‌های آلوده شده را در شیشه‌های محتوی کشت سلول نشان می‌دهد.

لنفوماتوزیس یا لکوزیس و آبله پرندگان گزارش نگردیده و این در حالی است که شواهدی دال بر تشدید علائم بیماری از همراهی آدنوویروس‌ها و دیگر بیماریهای پرندگان در دست می‌باشد (۱، ۴، ۷، ۸، ۱۱، ۱۵ و ۱۶). آلودگی طبیعی اغلب در بلدرچین‌های زیر چهار هفته با شروع سریع و ناگهانی نشانه‌های بیماری مانند عطسه، تنفس دهانی، صداهای تنفسی و همچنین کنژکتیویت مشخص می‌گردد. ضایعات آسیب‌شناسی به صورت احتقان حفرات بینی، تورم سینوس زیرکاسه چشمی، تورم کیسه‌های هوایی، نای و برونش دیده می‌شود. در کبد کانونهای نکروتیک به قطر ۲-۷ میلی‌متر مشاهده شده که در مطالعه ریزبینی سلولهای کبدی مجاور این کانونها حاوی گنجیدگی‌های بزرگ داخل سلولی می‌باشند. این گنجیدگی‌ها ۲-۶ روز پس از ورود عامل بیماری در سلول‌های کبدی ظاهر می‌شوند. میزان مرگ و میر از ۱۰ تا ۱۰۰٪ در بلدرچین‌های باب وایت گزارش شده، هر چند که انتشار بیماری در پرندگان پیرتر کندتر بوده و یا حتی ممکن است بدون علائم باشد. گزارشاتی نیز مبنی بر جداسازی ویروس از بلدرچینهای جوانی که فاقد هرگونه علائم جراحتی بوده‌اند، داده شده است (۵، ۸، ۱۲، ۱۳ و ۱۷). به دنبال ایجاد آلودگی با آدنوویروس پرندگان، پادتنهای خنثی‌کننده به سرعت افزایش یافته و پس از یک هفته قابل تشخیص می‌گردند. همچنین پادتنهای رسوب کننده، ممانعت از هماگلوتیناسیون و کمپلمان فیکساسیون حدود ۷ روز پس از شروع بیماری ظاهر شده و ۲ تا ۳ هفته به حداکثر عیار خود می‌رسند. به‌طور کلی بازماندگان از آلودگی‌های طبیعی و تجربی، حداقل برای مدت ۶ ماه نسبت به آلودگی با QBV مقاوم بوده و سطوح بالای پادتن در سرم بلدرچینهای بهبود یافته از بیماری نیز گزارش گردیده است.

Clemmr (۱۹۶۵) نشان داد جوجه‌هایی که در یک روزگی آلوده شده بودند تا ۴۵ روزگی نسبت به آلودگی مجدد با ویروس مقاوم بوده‌اند(۲). Khawaja در (۱۹۸۸) توانست با استفاده از واکسن D78 (واکسن علیه بیماری گامبورو) جوجه‌های یک روزه را در مقابل آدنوویروس‌ها محافظت نماید(۱۱).

Sharma (۱۹۸۳) در مطالعه بر روی ۶۳۲ مرغ گوشتی و تخمگذار نشان داد که ۲۹٪ از آنها به طور طبیعی دارای پادتنهای علیه ویروس می‌باشند (۱۶).

Yates نیز نشان داد که همراهی ویروس CELO با ویروسهای AAV می‌تواند باعث تحریک و تشدید پاسخ ایمنی شده در حالی‌که ویروسهای AAV به تنهایی قادر به ایجاد پاسخ ایمنی قابل ملاحظه‌ای نبودند (۱۸ و ۱۹). هر چند تشخیص قطعی برونشیت بلدرچین برپایه روشهای آزمایشگاهی استوار می‌باشد اما می‌توان با استفاده از علائمی مانند علائم شدید تنفسی، انتشار سریع بیماری، کونژنکتیویت و بالاخره مرگ و میر بالا تا حدودی به تشخیص اولیه بیماری پی برد. تشخیص آزمایشگاهی بیماری نیز براساس عکسهای تهیه شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی، رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین وائوزین در کشتهای سلولی آلوده شده (جهت اثبات وجود گنجیدگی‌های بازوفیلیک درون سلولی)، تزریق به تخم مرغ جنین‌دار SPF، تزریق به کشت سلول اولیه جنین مرغ، آلوده نمودن تجربی

پـرندگان (جـوجه مـرغ و بـلدرچـین) و آزمـایشهای سرولوژیک می‌باشد.

مواد و روشها

بـیماری مـورد مـطالعه، در یکـی از مـزارع بـزرگ پرورش بلدرچین رخ داد. سن اغلب پرندگان مبتلا بین ۱۶-۸ هـفته گـزارش گـردید. طـبق اظـهارات مسـؤولین فـارم، پـرندگان مـبتلا پس از بـروز نشـانه‌های تـنفسی و کونژنکتیویت حاد به سرعت تلف مـی‌شدند. بـه مـنظور جداسازی ویروس و تهیه پادگن، از مایع چشم، مدفوع و مـحتویات روده بـلدرچـین‌های تـلف شـده و بـیمار، سـوسپانسیون ۱۰٪ تـهیه گـردیده و پس از انـجام آزمـایشات بـاکـتریایی مـتداول، افـزودن آنـتی‌بیوتیک مـناسب و عـبور دادن از فـیلترهای یکـبار مـصرف (۴۵ مـیکرومتری)، سـوسپانسیون را بـه تـخم مـرغ‌های جنین‌دار ۱۲-۹ روزه SPF و سپس به کشتهای سلولی اولیه کبد جنین جوجه تلقیح نمودیم.

تهیه پادگن در تخم مرغهای جنین‌دار SPF

۰/۲ مـیلی‌لیتر از سـوسپانسیون ویـروسی را بـه جنین‌های ۹ روزه از طریق حفره آلانتوئیک تلقیح نموده و پس از ۷۲ تا ۹۶ ساعت در صورت مردن یا در حال مرگ بودن جـنینها، مـایع آلانـتوئیک (AAF) را جـمع‌آوری و پس از سانتریفوژ نمودن و افزودن آنتی‌بیوتیک مناسب به مـیزان ۰/۲ مـیلی‌لیتر بـه هـرتخم مـرغ سـری بـعدی تزریق گردید. این عمل تا پنج تحت کشت مـوفق ادامـه یافت و سپس از پنجمین سری جهت اهداف تیتراسیون و آزمایشات تشخیصی دیگر استفاده گردید.

تهیه پادگن در کشت سلول

کشت سلولی اولیه تک لایه‌ای مطابق روش Burke و Karel (۵، ۱۰) تـهیه گـردید و پس از تـلقیح نـمودن رقتهای 10^{-2} و 10^{-3} از ویروس مورد نظر، تا زمان ایجاد CPE کامل (۷۲ تـا ۹۶ سـاعت)، در گـرمخانه ۳۷ درجـه سانتیگراد قـرار داده شـدند. پس از کـنده شـدن ۸۰-۹۰ درصد سلولها از سـطح شـیشهٔ مـخصوص کشت و انـجام مراحل یخ‌زدن و ذوب‌شـدن، آنـها را سـانتریفوژ نـموده و جـهت مـصارف بـعدی در فـریزر نگـهداری نـمودیم. هـمچنین بـه مـنظور مـقایسه، از یک سـوش CELO آدنـــوویروس تـــیپ یک پـــرندگان (Central Veterinary Lab, Weybridge, UK, 1974) استفاده گردید.

تهیه آنتی‌سرم‌ها

الف - آنـتی سـرم اسـتاندارد CELO - Phelps (SPAFAS, Inc, Norwich Conn, US Vet Licence) به عنوان آنتی‌سرم کنترل مثبت استفاده گردید.

تهیه آنتی‌سرم در خرگوش

بـا اسـتفاده از روش Pereira (۱۴) ویـروسهای CELO (سـوش رفـرانس)، بـرونشیت عـفونی (سـوش بودت) و ویروس مورد نظر (سوش جدا شده) را همراه با یاورهای کامل و ناقص فروند، به صورت زیرجلدی، بـه خـرگوش تـزریق نـموده و پس از خـونگیری و غـیرفعال کردن سرمها (در بن ماری ۵۶ درجه سانتیگراد)، جـهت مصارف بعدی در فریزر ۲۰- درجه نگهداری نمودیم.

تهیه گلبولهای قرمز رات جهت آزمایش هماگلوتیناسیون (HA)

از قلب رات‌هـای سـفید (بـخش پـرورش حـیوانـات آزمایشگاهی مؤسسه رازی) خونگیری به عمل آورده و بر طـبق روش Aghakhan (۳) سـوسپانسیون ۵۰٪ از RBC تهیه گردیدو با غـلظت نـهایی ۱٪ مـورد اسـتفاده قرار گرفت.

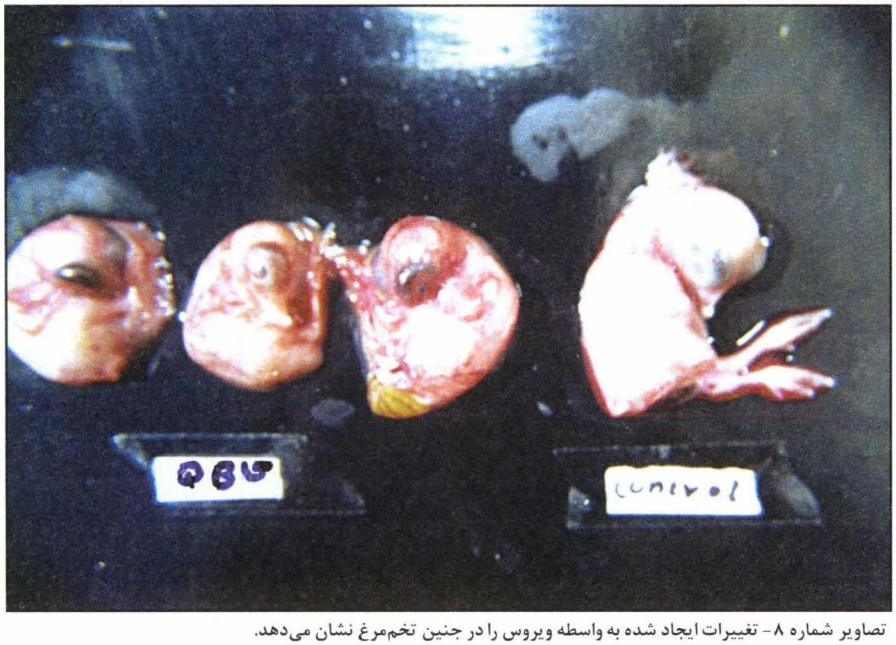
تهیه کشت اندام نای از جنین جوجه

پس از خارج کردن اندام نای از جنین‌های ۲۰-۱۹ روزه SPF، حلقه‌های نای را از یکدیگر جـدا نـموده و در محیط کشت HANKS همراه با TPB نگـهداری کـرده و پس از انجام مراحل شستشو با PBS ویروس مورد نظر را به رقت 10^{-1} به لوله‌هـای آزمـایش مـحتوی حـلقه‌های نای تلقیح نمودیم.

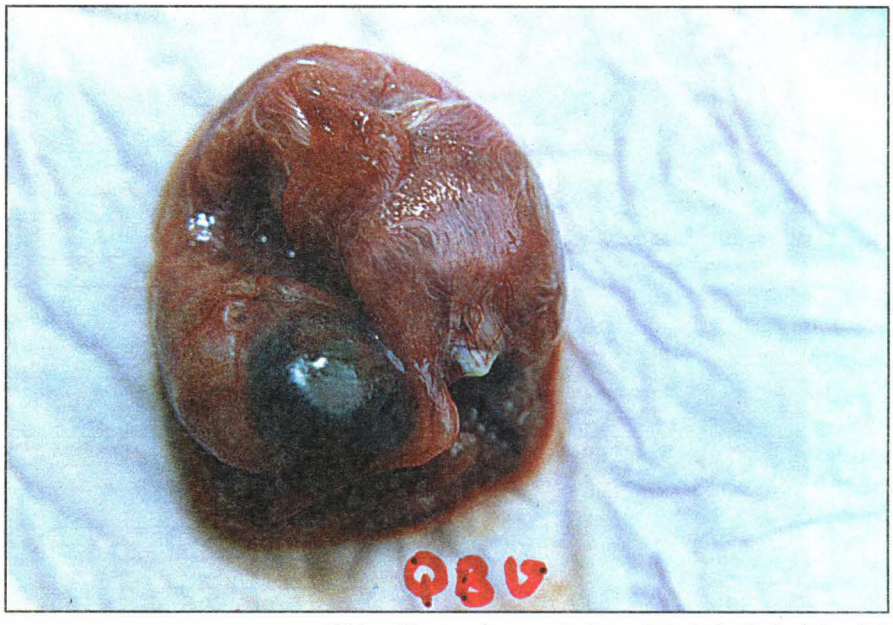
تهیه محیط کشت سلولی آگاردار

بـا اسـتفاده از روش Jasty (۹) کشت سـلولی تک

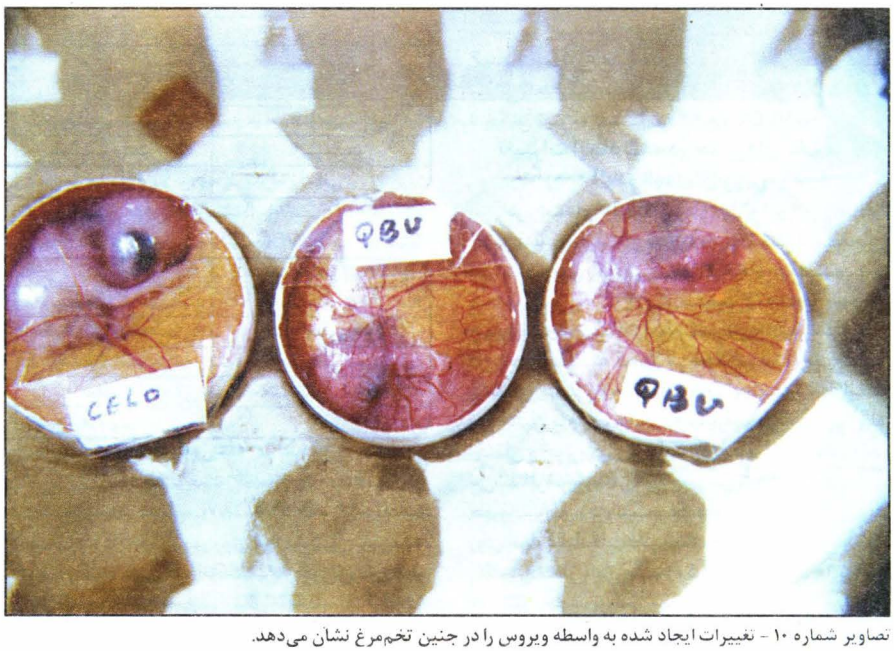
تصویر شماره ۷- تولید پلاک را توسط ویروس در پلیت‌های حاوی کشت سلول نشان می‌دهد.



تصاویر شماره ۸- تغییرات ایجاد شده به واسطه ویروس را در جنین تخم‌مرغ نشان می‌دهد.



تصاویر شماره ۹- تغییرات ایجاد شده به واسطه ویروس را در جنین تخم‌مرغ نشان می‌دهد.



تصاویر شماره ۱۰ - تغییرات ایجاد شده به واسطه ویروس را در جنین تخم‌مرغ نشان می‌دهد.

لایه‌ای اولیه از جنین جوجه به عمل آمده و پس از آلوده کردن آنها با رقتهای 10^{-4}، 10^{-5} و 10^{-6} از ویروس مورد نظر، محیط آگاردار رویی را که شامل محیط HANKS همراه با TPB و FCS و آگار خالص شده دیفکو بود، به آن اضافه نمودیم. سپس به منظور ظهور پلاکهای ویروسی، نترال رد یک هزارم به آنها اضافه گردید.

آزمایشات پایداری ویروس در مقابل عوامل فیزیکوشیمیایی

با استفاده از روشهای توضیح داده شده توسط Aghakhan و Burke (۳ و ۵) سوش جدا شده در مقابل حلال‌های چربی مانند اتر و کلروفرم، تغییرات دما (۵۰ و ۵۶ درجه سانتیگراد) و تغییرات pH آزمایش گردید.

پرندگان مورد آزمایش

جوجه مرغهای دو روزه (هچ شده از تخم مرغهای SPF) و بلدرچین‌ها

الف - جوجه مرغها: ۴۵ قطعه جوجه دو روزه با ویروس مورد نظر به صورت زیر تلقیح گردیدند:

۱۰ قطعه به عنوان کنترل، ۱۰ قطعه به روش درون نایی، ۹ قطعه به روش تزریق درون صفاقی، ۸ قطعه به روش درون چشمی و ۸ قطعه به روش خوراکی.

ب - بلدرچین‌ها: ۴۵ قطعه بلدرچین با ویروس مورد مطالعه به صورت زیر تلقیح گردیدند:

۵ قطعه به عنوان کنترل، ۱۰ قطعه به روش درون نایی، ۱۰ قطعه به روش درون چشمی و ۲۰ قطعه به روش خوراکی - چشمی - نایی، به طور توام.

آزمایشات خنثی‌سازی ویروس

با استفاده از آنتی‌سرمهای علیه ویروسهای CELO QBV و IBV تهیه شده در خرگوش و همچنین به کارگیری آنتی‌سرم استاندارد ویروس CELO، آزمایشات نوترالیزاسیون و کراس نوترالیزاسیون انجام گردید. برای این منظور با استفاده از ویروسهای QBV, CELO و IBV به میزان $100\ EID_{50}/ml$ رقتهای کار ^{3} تهیه گردید. سپس سرمها به ترتیب به شیشه‌های محتوی ویروس اضافه شده و رقت‌های سریال دو برابر به دست آمد (تا رقت $\frac{1}{8192}$). در ضمن ویروسهای فوق‌الذکر را علاوه بر آنتی سرم مخصوص خودشان با آنتی‌سرمهای ویروس دیگر نیز مجاور نمودیم. پس از سپری شدن زمان لازم (۷۵ دقیقه)، محتویات شیشه‌ها (آنتی‌سرم به علاوه ویروس) به تخم مرغهای ۱۰ روزه SPF به میزان ۰/۲ میلی‌لیتر تزریق شد (به هر رقت ۶ عدد تخم مرغ تعلق گرفت). به منظور کنترل، از هر ویروس به طور همزمان یک تیتراسیون انجام گردید.

آزمایش رسوب در ژل

از این آزمایش به صورت کمی و کیفی (با استفاده از روش اوکتر‌لونی) برای ارزیابی آنتی سرمها و پادگن‌های ویروس استفاده شد. بدین منظور از مخلوط آگار ۱٪ و کلرور سدیم ۵٪ برای تهیه پلیت‌های ژل استفاده گردید. پس از تخلیه چاهکها، پادگن ویروسهای QBV, CELO و IBV در چاهک‌های وسط و آنتی‌سرمهای مختلف در چاهک‌های اطراف ریخته شد (از آنتی‌سرمها رقت‌های net، $\frac{1}{2}$ $\frac{1}{4}$ $\frac{1}{16}$ $\frac{1}{32}$ و $\frac{1}{64}$ تهیه شد). خطوط ایجاد شده پس از ۲۴-۴۸ ساعت مورد بررسی قرار گرفت.

آزمایش ژل الکتروفورزیس

با استفاده از آنتی سرم استاندارد CELO و همچنین ویروسهای QBV و CELO با کمک بخش بیوتکنولوژی مؤسسه رازی، آزمایش ژل الکتروفورز به عمل آمد (که متأسفانه قادر به تهیه عکس از لامها نشدیم).

آزمایش هماگلوتیناسیون

برای انجام این آزمایش، از میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای با ته U شکل و لوله‌های آزمایش ۱۲×۷۵ میلی‌متری ته‌گرد، استفاده گردید. ابتدا رقتهای سریال ۲ برابر از ویروس مورد نظر (۰/۰۵ml در هر چاهک) تهیه شد و سپس با افزودن حجمهای مساوی از نرمال سالین و سوسپانسیون ۱٪ گلبولهای قرمز رات آزمایش ادامه یافت. لوله‌ها و میکروپلیت‌ها برای مدت ۹۰ دقیقه در گرمخانه ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شدند.

تهیه عکسهای میکروسکوپ الکترونی

مایع آلانتوآمینوتیک برداشت شده از تخم‌مرغهای

دسته کنترل و آلوده شده تقسیم گردیدند، سپس در

جدول شماره ۱- نتیجه پایداری ویروس در مقابل حلال‌های چربی

حلال چربی	ویروس	در معرض حلال بوده است	در معرض حلال نبوده است
کلروفرم	QBV	۹/۹۵/ml	۱۰/ml
کلروفرم	NDV	۰	۹/۹۵/ml
اتر	QBV	۱۰/۲/ml	۱۰/۲/ml
اتر	NDV	۰	۹/۴/ml

جدول شماره ۲- نتیجه پایداری ویروس در مقابل تغییرات pH

زمان (ساعت)	pH=۳	pH=۷/۲
۱	۱۰/ml	۱۰۱/ml

جدول شماره ۳- نتیجه پایداری ویروس در مقابل تغییرات دما

ویروس	در ۵۰ درجه(نیم ساعت)	در ۵۶ درجه(نیم‌ساعت)	در ۵۶ درجه (یکساعت)
QBV	۱۰/۱/ml	۹/۹/ml	۰
IBV	-	۰	۰

جدول شماره ۴- نتایج آزمایش هماگلوتیناسیون

ویروس	میکروپلیتAg(کشت‌سلول)	لوله‌Ag(کشت سلول)	میکروپلیتAg(مایع‌تخم‌مرغ)	لوله Ag(مایع تخم‌مرغ)
QBV	$\frac{1}{64}$	$\frac{1}{128}$	$\frac{1}{64}$	$\frac{1}{128}$
CELO	$\frac{1}{32}$	$\frac{1}{64}$	$\frac{1}{128}$	

جدول شماره ۵- نتایج آزمایشات رسوب در ژل

آنتی‌سرمها	QBV(Ag)	CELO(Ag)	IBV(Ag)
آنتی‌سرم نرمال خرگوشی	منفی	منفی	منفی
آنتی‌سرم خرگوشی ضد QBV	تا رقت $\frac{1}{32}$ مثبت	تا رقت $\frac{1}{32}$ مثبت	تا net مثبت
آنتی‌سرم خرگوشی ضد CELO	تا رقت $\frac{1}{16}$ مثبت	تا رقت $\frac{1}{32}$ مثبت	تا $\frac{1}{2}$ مثبت
آنتی‌سرم خرگوشی ضد IBV	تا رقت $\frac{1}{2}$ مثبت	تا رقت $\frac{1}{2}$ مثبت	تا $\frac{1}{32}$ مثبت
آنتی‌سرم‌استاندارد ضدCELO(بامنشاءجوجه‌ای)	تا رقت $\frac{1}{16}$	تا رقت $\frac{1}{16}$	منفی

جدول شماره ۶- نتایج آزمایشات خنثی‌سازی ویروس

آنتی‌سرمها	QBV	CELO	IBV
آنتی‌سرم نرمال خرگوشی	منفی	منفی	منفی
آنتی‌سرم خرگوشی ضد QBV	تا رقت $\frac{1}{4096}$ مثبت	تا رقت $\frac{1}{512}$ مثبت	منفی
آنتی‌سرم خرگوشی ضد CELO	تا رقت $\frac{1}{1024}$ مثبت	تا رقت $\frac{1}{1024}$ مثبت	منفی
آنتی‌سرم خرگوشی ضد IBV	منفی	منفی	تا رقت $\frac{1}{136}$ مثبت
آنتی‌سرم‌استاندارد ضدCELO(بامنشاءجوجه‌ای)	تا رقت $\frac{1}{136}$	تا رقت $\frac{1}{136}$	-

آلوده به ویروس و همچنین کشتهای سلولی آلوده را جهت تهیه عکس به بخش میکروسکوپ الکترونی مؤسسه رازی ارسال نمودیم.

تهیه عکسهایی از جنین تخم‌مرغ‌های آلوده شده با ویروس

به منظور نشان دادن ضایعات ایجاد شده به وسیله ، ویروس بر روی جنینهای ۹ روزه SPFپس از تزریق ویروس، آنها را به مدت ۸ روز در گرمخانه ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده و در خلال این مدت، جنین‌های مرده و یا در حال مرگ را از پوسته تخم مرغ خارج نموده و عکسهایی از آنها تهیه گردید.

تهیه عکس‌هایی از کشت سلولی آلوده شده با ویروس

کشت‌های سلولی تک لایه‌ای کبد جنین جوجه، که در لوله‌های مخصوص لایتون[۴] تهیه شده بود، به دو فواصل زمانی مناسب (۱۸، ۲۴، ۴۸ و ۹۶ ساعت)، لامل‌ها راکه لایه سلولی بر روی آنها تشکیل شده بود، جهت رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین به بخش آسیب‌شناسی مؤسسه رازی ارسال نمودیم.

نتایج

عکسهای تهیه شده با میکروسکوپ الکترونی

در این عکسها، ذرات ویروسی به صورت ویریون‌های بدون پوشش، با ساختمان ایکوزوهیدرال، مشاهده گردیدند (عکسهای شماره ۱ و ۲).

عکسهای تهیه شده از نمونه‌های آلوده (با استفاده از روش رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین)

در نمونه‌های آلوده شده، قبل از ۹۶ ساعت تغییر قابل ملاحظه‌ای مشاهده نشد، اما پس از طی زمان مذکور، تغییرات اساسی در هسته‌های سلولی دیده شد. گنجیدگیها حلقه‌ای شکل و هسته‌کهایی که در کنار حاشیه غشاء قرار داشتند، جلب نظر می‌کرد. گنجیدگیها در مراحل اولیه صورتی کمرنگ (ائوزینوفیلیک) دیده شده و در مراحل بعدی خشن‌تر و تیره رنگتر به‌نظر می‌رسیدند. همچنین در بطری‌ها و پلیت‌های محتوی کشت سلولی آلوده شده با ویروس، CPE به صورت سلولهای گرد شده، متورم و شفاف دیده می‌شد. در این حالت سیتوپلاسم سلولها متراکم بوده و سلولها به صورت خوشه‌های انگور دیده می‌شدند و به تدریج از جدار شیشه محتوی کشت سلول کنده شدند (عکسهای شماره ۳، ۴، ۵ و ۶).

ایجاد پلاک در محیط کشت آگاردار

شش روز پس از آلوده نمودن کشت سلولی توسط ویروس، سومین محیط آگاردار رویی راکه شامل نترال رد $\frac{1}{1000}$ بود به آن افزوده و ظهور پلاکها را پس از ۱۸ ساعت مشاهده نمودیم. اندازه پلاکها اغلب یکی دو میلی‌متر بوده و به اشکال گرد دیده می‌شدند اما گاهی به دلیل اتصال به یکدیگر اشکال نامنظمی را نشان می‌دادند (عکس شماره ۷).

تیتراسیون ویروس در تخم‌مرغ‌های جنین‌دار SPF

از مایع آلانتوامنیوتیک (AAF)، پاساژ پنجم ویروس در تخم‌مرغ، رقت‌های ۱۰ تایی تهیه شده و به هر رقت ۶عدد تخم مرغ تعلق گرفت. تیتراسیون برای دوبار متوالی انجام گردیده، و به روش رید و مونج محاسبه شد. میانگین تیتر به دست آمده $10\ EID_{50}/ml$ بود.

تغییرات ایجاد شده در جنین‌های تخم‌مرغ آلوده شده با ویروس

در رقت‌های پایین ویروسی (10^{-4} و 10^{-5}) تلفات جنین اغلب در روزهای چهارم و پنجم پس از تلقیح رخ داد، در صورتی که در رقت‌های بالاتر در ششمین یا هفتمین روز پس از تزریق صورت گرفت. در روزهای چهارم و پنجم پس از تزریق رشد جنین متوقف گردیده و در داخل پوسته کاملاً بی‌حرکت به نظر می‌رسید. غشاهای جنینی ضخیم شده و غشای آمنیوتیک کاملاً به دور جنین پیچیده و آن را به صورت حلقه در می‌آورد. احتقان و خونریزی زیر جلدی در اندامهای مختلف دیده می‌شد. پرخونی و افزایش حجم کبد و طحال همراه با حضور مناطق نکروتیک و لکه‌های سبز مایل به زرد بر روی آنها، غالباً جلب نظر نموده و قلب نیز گاهی پریده رنگ به نظر می‌رسید (عکس‌های ۸، ۹، ۱۰ و ۱۱). همچنین جهت بررسی تغییرات ایجاد شده در جنین‌ها پس از خروج از تخم، تعداد شش عدد از آنها راکه پس از آلوده شدن با ویروس، زنده مانده بودند، تا زمان خروج از تخم، در اتو ۳۷ درجه نگهداری نموده، که همگی آنها جوجه‌هایی ضعیف با پاهای لرزان و چشمهای متورم بودند (عکس شماره ۱۲ و ۱۳).

وجود آنتی سرمهای ضد ویروس در بلدرچین‌های آلوده شده با QVB

دو هفته پس از آلودگی تجربی، ۴ قطعه از بلدرچین‌ها را به طور تصادفی انتخاب کرده و پس از خونگیری آزمایش رسوب در ژل به عمل آمد. در هر چهار مورد خطوط رسوبی کاملاً مشخصی در مقابل پادگن ویروسی QBV ایجاد گردید.

تصاویر شماره۱۱ - تغییرات ایجاد شده به واسطه ویروس را در جنین تخم‌مرغ نشان می‌دهد.

تشخیص وجود ویروس در محتویات روده پرندگان

دو هفته پس از آلودگی تجربی پرندگان (بلدرچین‌ها و جوجه مرغها)، ویروس از محتویات روده و مدفوع آنها جداگردید.

پایداری ویروس در مقابل حلال‌های چربی

جدول شماره ۱ نشان می‌دهد چنانچه ویروس در مقابل حلال‌های چربی (اتروکلروفرم) قرار بگیرد، تغییر قابل توجهی در عیار آن ایجاد نمی‌گردد.

پایداری ویروس در مقابل تغییرات pH

جدول شماره ۲ مقاومت ویروس را در مقابل تغییرات pH نشان می‌دهد. همانطور که از جدول بر می‌آید ویروس قادر است تغییرات pH را به خوبی تحمل نماید.

پایداری ویروس در مقابل تغییرات دما

همانطور که از جدول شماره ۳ بر می‌آید، ویروس QBV حرارت ۵۶ درجه را برای مدت ۳۰ دقیقه به خوبی تحمل کرده، در حالی که ویروس IBV (برونشیت عفونی) قادر به تحمل این درجه حرارت نمی‌باشد. در ضمن هر دو ویروس (IBV و QBV) در دمای ۵۶ درجه سانتیگراد (یک ساعت) از بین رفتند.

آزمایش هماگلوتیناسیون (HA)

همانطور که از جدول شماره ۴ برمی‌آید ویروس QBV عیار $\frac{1}{64}$ را در میکروپلیت، و $\frac{1}{128}$ را در لوله نشان می‌دهد در حالیکه عیار ویروس CELO در میکروپلیت $\frac{1}{32}$ و در لوله $\frac{1}{64}$ نشان داده شد.

آزمایش رسوب در ژل

جدول شماره ۵ نشان می‌دهد که ویروسهای CELO, IBV و QBV با آنتی‌سرمهای مخصوص خودشان، توانستند تا عیار $\frac{1}{32}$ خط رسوبی تشکیل دهند. هیچیک از ویروسهای QBV و CELO با آنتی سرم IBV واکنش قابل ملاحظه‌ای را نشان ندادند. در حالی‌که هر دو ویروس مذکور با آنتی سرم استاندارد CELO-Phelps تا رقت $\frac{1}{16}$ خط رسوبی ایجاد کردند.

آزمایشات خنثی‌سازی ویروس

همانطور که از جدول شماره ۶ بر می‌آید، آنتی سرم ضد ویروس QBV توانست آن را تا رقت خنثی نماید. همچنین آنتی‌سرم ضد ویروس CELO نیز قادر به خنثی نمودن ویروس QBV تا رقت $\frac{1}{1024}$ بود. ویروس CELO نیز متقابلاً تا رقت $\frac{1}{1024}$ با آنتی سرم ضد خودش و $\frac{1}{1024}$ با آنتی‌سرم ضد QB واکنش نشان داد و این در حالی است که هیچیک از دو ویروس مذکور (QBV, CELO) با آنتی‌سرم IBV واکنش نشان ندادند. اما پاسخ هر دو ویروس در مقابل آنتی‌سرم CELO استاندارد، یکسان بود.

نتایج تلقیح ویروس مورد مطالعه در پرندگان

الف - جوجه مرغها: جوجه‌هایی را که به چهار روش صفاقی، چشمی، دهانی و بینی - نای، تلقیح نموده بودیم، روزانه تا مدت دو هفته مورد بررسی قرار دادیم. پس از طی زمان مذکور جهت بررسی‌های میکروسکوپی و ماکروسکوپی کالبد شکافی گردیدند. جوجه‌ها در زمان حیاتشان، هیچگونه آثار و علائم غیرطبیعی ناشی از بیماری را نشان ندادند و در کالبد شکافی نیز تغییر قابل ملاحظه‌ای دیده نشد. براساس گزارشات بخش آسیب شناسی، فقط در سه مورد از آنها ریه‌ها و کلیه‌ها پرخون بودند.

ب- بلدرچین‌ها: همانطور که قبلاً ذکر گردید، بلدرچین‌ها به سه روش درون‌نایی، درون چشمی و توأم (دهانی - چشمی - نایی) تلقیح شدند. بلدرچین‌ها تا سه روز اول علائم خاصی را نشان ندادند، در صورتیکه از روز چهارم علائمی چون بی‌اشتهایی، کز کردن و تنفس دهانی، در تعدادی از آنها مشاهده شد. تورم چشمی در ۱۵ قطعه از آنها کاملاً مشهود بود. از بین پرندگان آلوده شده ۲۵ قطعه هیچگونه علائمی را نشان نداده و کاملاً سالم به نظر می‌رسیدند.

در مشاهدات کالبد شکافی به استثناء ۵ مورد که ریه و نای پرخون و ۵ مورد که بورس فابریسیوس کوچک و تیره رنگی داشتند، سایر پرندگان علائم قابل توجهی نشان ندادند (عکس شماره ۱۴).

بحث

تمامی یافته‌های به‌دست آمده در این مطالعه، نشان می‌دهند که عامل ایجاد کننده این بیماری که منجر به تلفات و در نتیجه خسارات اقتصادی سنگینی گردیده بود، ویروس برونشیت بلدرچین می‌باشد. میزان بالای واگیری و تلفات سنگین و همچنین حضور نشانه‌های تنفسی و کونژنکتیویت، همانطور که توسط Winterfield, Macferan و Dubose شرح داده شده است، از علائم و نشانه‌های خاص این بیماری می‌باشند (۸، ۱۲ و ۱۷). عکسهای تهیه شده به وسیله میکروسکوپ الکترونی نشان داد که ویروس مورد

تصویر شماره ۱۲ و ۱۳- تغییرات ایجاد شده را در جوجه‌های تازه هچ شده از تخم از تخم‌مرغ‌های آلوده شده ویروس را نشان می‌دهد تورم چشمی و ضعف شدید مشهود می‌باشد.

تصویر شماره ۱۴- بلدرچین آلوده شده به وسیله ویروس را نشان می‌دهد در این تصویر تورم چشمی کاملاً مشهود است.

مطالعه دارای ساختمانی آیکوزوهیدرال با تقارن مکعبی به صورت ۵:۳:۲ بوده که با ساختمان سایر آدنوویروس پرندگان توافق دارد (۲، ۵ و ۱۳).

با آلوده نمودن کشتهای سلولی اولیه جنین جوجه، تغییراتی همچون تراکم سیتوپلاسمی، گرد و متورم شدن سلولها، توده توده و جداشدن تدریجی آنها از جدار شیشه کشت سلول، ملاحظه گردید. در لامهای رنگ‌آمیزی شده به روش هماتوکسیلین وائوزین نیز تغییرات اصلی در هسته سلولها به وجود آمده و گنجیدگیهای بازوفیلیک در درون سلول به وضوح قابل مشاهده بودند، که مطالعات Burke در این زمینه، مؤید چنین تغییراتی در سلولها می‌باشد (۵).

تزریق ویروس به تخم مرغ‌های جنین‌دار SPF منجر به تغییراتی نظیر حلقه‌ای شدن، توقف در رشد و کوتولگی جنین، پیچیده شدن محکم کیسه زرده به دور جنین، خونریزی و احتقان در احشاء و بالاخره مرگ جنین گردیده که با مشاهدات سایر محققین سازگاری دارد (۲، ۵، ۶ و ۱۷). البته بایستی متذکر شد که ویروس برونشیت عفونی نیز قادر به ایجاد چنین تغییراتی در جنین تخم‌مرغ می‌باشد، که می‌توان آنها را به کمک آزمایشات خنثی‌سازی از یکدیگر متمایز ساخت.

ویروس مورد مطالعه ما قادر به ایجاد پلاک در سلول‌های کبدی جنین جوجه بوده و همچنین در مقابل حلال‌های چربی (اتر و کلروفرم) و تغییرات دما و pH مقاوم می‌باشد که این ویژگیها با یافته‌های محققینی چون Burke و Denny مطابقت دارد (۵ و ۷). ویروس برونشیت بلدرچین قادر به آگلوتینه نمودن گلبولهای قرمز جوجه نبوده اما گلبولهای قرمز رات را آگلوتینه می‌نماید، که Burke و Pereira این ویژگی را در مورد سایر آدنوویروس پرندگان نشان دادند (۵ و ۱۴). در آلودگی تجربی جوجه مرغها با ویروس، هیچگونه علائم کلینیکی قابل ملاحظه‌ای مشاهده نگردید و این در حالیست که علائمی چون کونژنکتیویت و باز و بسته کردن دهان در بلدرچین‌های آلوده شده دیده شد، که با توضیحات Macferran و Winterfield مطابقت دارد (۱۳ و ۱۷). لازم به توضیح است که مجموعه نشانه‌های بالینی و آزمایشگاهی ذکر شده در بیماریهای تنفسی دیگر همانند آسپرژیلوزیس و یا نیوکاسل دیده نمی‌شوند. بنابر اظهارات مسئولین فارم پرورش دهنده بلدرچین، پس از شیوع بیماری و بهبودی بلدرچین‌های بازمانده از تلفات، هیچگونه علائمی حاکی از شیوع مجدد بیماری مشاهده نگردید. شایان ذکر است که نژاد بلدرچین‌های مورد مطالعه ما ژاپنی بوده و سن اغلب پرندگانی که جهت آلودگی تجربی به آزمایشگاه ارسال گردیده بودند، بین ۸ تا ۱۶ هفته گزارش گردید.

1- Quail bronchitis Virus 2- Chicken emberyo lethal orphan 3- Working dilution 4- Leighton tubes

منابع مورد استفاده

1- Aghakhan S.M. Pattison M., 1994. Pathology. 84(4), 495-513.

2- Aghakhan S.M., 1994. Review, Veterinary bulletin. Vol 44, No 9, 531-552.

3- Aghakhan S.M. Unpublished data, characterization of an avian adenovirus (strain B 1209).

4- Bagshaw C., Yates V.J., 1980. Journal of wildlife diseases, 16:2, 287-291.

5- Burke C.N., 1968. Luginbuhl R.E. PhD these.

6- Dawson G.H. & Yates V.J., 1979. American journal of veterinary research, 40:11, 1627-1628.

7- Denny F.S., 1961. Journal of Immunol, 86:567.

8- DuBose R.T., 1971. Quail bronchitis, Infectious and parasitic diseases of wild birds, PP:42-47, Iowa state univ press, Ames.

9- Jasty V. & Yates V.J., 1973. Avian dis, 1973, 17, PP: 49-65.

10- Karel A.S. & Purchase H.G., 1989. A laboratory manual for the isolation and identifiction of avian pathogens, chapter 40, P:167, American association of avian pathologists, third edition.

11- Khawaja D.A. & Sattar A., 1988. Journal of veterinary research, 1:1, P:51-52.

12- Macferran J.B., 1977. Review, P:189-217.

13- Macferran J.B., 1997. Diseases of poultry, section 22, adenovirus infection, Ninth edition P:552.

14- Pereria H.G., 1962. Virology, 18, 1-8.

15- Riddell C. & Denhurk J.V., 1992. Avian dis, 36(1), P:158-63.

16- Sharma K. & Sharma S.N., 1983. Indian journal of animal sciences, 53, 12, P:1357-1358.

17- Winterfield R.W. & DuBose R.T., 1991. Diseases of poultry. Quail bronchitis, P:564-565, Ninth edition.

18- Yates V.J. & Rhee Y.O., 1977. Avian dis, 21:3, 408-418.

19- Yates V.J. & Rhe Y.O., 1977. Avian dis, 20:1, 146-153.