تشخيص وكشف فيروس التهاب القصبات المعدي باستخدام تقنية RT–PCR في مزارع دجاج اللحم في سورية

تماره أحمد الجلاد*(1) فهيم علي عبد العزيز(2) ومحمد جميل سلهب(3) وأنور محمد ديب العمر(3)

(1). قسم الإنتاج الحيواني، كلية الزراعة، جامعة تشرين، سورية.

(2). قسم علم الحياة، كلية العلوم، جامعة طرطوس، طرطوس، سورية.

(3). مركز بحوث اللاذقية، الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، دمشق، سورية.

(4). كلية العلوم، جامعة البعث، حمص، سورية.

(* للمراسلة: م. تماره أحمد الجلاد. البريد الإلكتروني: tamara.aljallad@gmail.com).

تاريخ الاستلام: 2019/08/26 تاريخ القبول: 2019/10/02

الملخص

استُخدمت تقانة تفاعل البوليميراز المتسلسل العكسي (reverse transcriptase–polymerase chain reaction (RT–PCR للكشف عن فيروس التهاب القصبات المعدي IBV) infectious bronchitis virus) في قطعان الفروج التجارية في سورية، حيث جمعت 50 عينة مرضية مشتبهة من أنسجة الرغامى في القصبة الهوائية، والكلى، من 50 قطيع من دجاج اللحم (الفروج) المشتبه بإصابتها بمرض التهاب القصبات المعدي (infectious bronchitis (IB، والموزّعة في مناطق مختلفة من سورية (اللاذقية، وطرطوس، وحماه، وريف دمشق). حيث تم استخلاص الحمض النووي الفيروسي RNA من أنسجة العينات المرضية مباشرة، ومن ثم تحويل RNA إلى cDNA بتقنية النسخ العكسي RT–PCR، واخضاعها لاختبار تفاعل PCR، وتفاعل Nested PCR. اختيرت البادئات المستخدمة في تفاعل RT–PCR من تحت وحدة S1 للمورثة spike (S) التي تتركز فيها الطفرات التي تصيب مورثة الفيروس في هذه المنطقة (منطقة شديدة التباين)، كما تم تمرير 10 من العينات الإيجابية المحتوية على الفيروس بأجنة الدجاج النامية الخالية من العوامل الممرضة، Specific pathogen free embryonated egg (SPF) بعمر 9–11 يوم تحضين وحسب الطرق المعتمدة في علم الفيروسات. نُفذ البحث في مخابر الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية (مركز بحوث اللاذقية) بالتعاون مع مخبر PCR في كلية الطب البيطري بحماه. بيّنت نتائج اختبار RT–PCR، وجود 37 حالة إيجابية للاختبار وبنسبة 74% من عينات المزارع المختبرة، وأظهرت نتائج الحقن في أجنة الدجاج النامية آفات تشريحية واضحة ومميزة لفيروس التهاب القصبات المعدي بعد 5– 6 أيام من الحقن، وتأخر وعدم تطور ونمو الجنين (تقزم)، وتشابك أصابع ونزف دموي، بالمقارنة مع الشاهد السلبي، وأظهرت النتائج أيضاً حساسية تقنية RT–PCR للكشف عن فيروس IBV.

الكلمات المفتاحية: فيروس التهاب القصبات المعدي IBV، RT–PCR، دجاج اللحم.

المقدمة:

التهاب القصبات الهوائية المعدي IBV مرض واسع الانتشار إذ يصيب الدجاج في جميع الأعمار، ويسبب خسائر اقتصادية هامة في صناعة الدواجن، حيث يعزل الفيروس من أعضاء مختلفة من الطيور المصابة كالقصبات الهوائية والكليتين والمبايض (King and Cavanagh, 1991; Cavanagh, 2005; Cavanagh, 2007)، والأمعاء والزرق (Dolz *et al.,* 2012). يتبع فيروس IBV عائلة الفيروسات التاجية Coronavirdiae وحمضه النووي RNA مفرد السلسلة، وإيجابي القطبية. يبلغ طول جينوم IBV حوالي 27 kb (Boursnell *et al.,* 1987) ويشفر 3 بروتينات بنيوية: البروتينات السكرية للبروزات (S) Spike، البروتينات السكرية للغلاف (M) membrane والبروتينات الفوسفاتية (N) nucleocapsid (Siddle *et al.,* 1982; Stern and Sefton, 1982). يتألف البروتين السكري S من تحت وحدتين من البروتينات السكرية S1، S2 (Cavanagh, 1983). يتم توجيه الأضداد المحايدة والنوعية ضد البروتين السكري S1 (Cavanagh *et al.,* 1986; Koch *et al.,* 1990; Parr and Collisson, 1993). يتركز أكبر انحراف في تسلسل الأحماض الأمينية في المواقع 53 و148 في تحت الوحدة S1 (Liu *et al.,* 2003)، وهذا ما يؤدي لحدوث تغايرات بنيوية تظهر ذراري جديدة تنعدم المناعة التصالبية فيما بينها، مما يعيق فعالية اللقاحات ولا يؤمن حماية للطيور ضد المرض. لذلك لا يزال ظهور تفشي IBV مسجلاً في القطعان المحصنة (Liu *et al.,* 2003)، هذا التفشي غالباً يكون نتيجة للعدوى بالذراري المختلفة مصلياً عن ذراري اللقاح (Wang and Tsai, 1996; Tarpey *et al.,* 2006; Bande *et al.,* 2015). تم تحديد منطقتين شديدتي التغير hypervariable regions (HVR) داخل تحت وحدة S1 في الموقع 56–69 وفي الموقع 117–133 من بداية S1 (Niesters *et al.,* 1986) . تستخدم اختبارات عديدة لمراقبة وجود الأنماط المصلية المختلفة لـ IBV في المناطق الجغرافية المختلفة، ومنها طريقة المقايسة المناعية المرتبطة بالأنزيم (ELISA)، التي تعد اختبار مناسب لمراقبة كلاً من الحالة المناعية وعدوى الفيروس في قطعان الفروج (Wit, 2000; Zwaagstra *et al.,* 1992). أشار (Zhang *et al.,* 2005) إلى أن تقنيات البيولوجية الجزيئية المستخدمة لكشف الفيروس حساسة وسريعة، وتعد تقنية PCR للنسخ العكسي لـ RNA من التقنيات الفعالة لكشف فيروس IBV وتحديد التسلسل النكليوتيدي لجزء المورثة S1 وتشخيصه السريع (Haqshenas *et al.,* 2005) (Saif *et al.,* 2008). يتطلب إجراء التسلسل الجيني للمنطقة S1 من مجين الفيروس في بعض الذراري الفيروس الحقلية وجود فيروس قابلٍ للحياة للحصول على RNA جيد النوعية، لذلك يتوجب عزل الفيروس وإعادة تمريره في أجنة الدجاج النامية بعمر بين 9–11 يوم تحضين في بيض تفريخ خال من العوامل الممرضة (SPF egg)، أو في المزارع الخلوية (wit, 2000) . تؤكد الآفات العيانية الملاحظة بعد التمرير في الأجنة وجود تغيرات واضحة وملحوظة تتلخص في عدم تطور نمو الجنين والتقزُّم، والنزف الدموي، ونفوق الجنين (Adzhar *et al.,* 1996). تهدف الدراسة الحالية إلى استخدام تقنية PCR عند طول القطعة 393 bp لكشف فيروس IBV المسبب للمرض في مزارع دجاج اللحم في سورية، وعزله بعد التمرير في أجنة بيض الدجاج الخالي من العوامل الممرضة، وتأكيد الخصائص الإمراضية للذراري المعزولة التي تسببها الأجنة. وبذلك تسهم هذه الدراسة في تحديد الاختلافات الجينية للذراري المعزولة عن غيرها من الذراري الأخرى المستخدمة في إنتاج اللقاحات، ونظراً لانعدام فعالية اللقاحات المستخدمة ضد المرض في بعض المناطق الموبوءة فإنّ كشف التصالبات المناعية للفيروس يؤدي إلى استخدام لقاحات متجانسة مصلياً من الذراري المنتشرة حقلياً توفر حماية أفضل ضد المرض.

مواد البحث وطرائقه:

– **جمع ومعاملة العينات:** بعد المتابعة الحقلية للحالات التنفسية المشتبه بها بالإصابة بمرض IBV في قطعان دجاج اللحم التجارية المختلفة المنتشرة في اللاذقية وطرطوس وحماه وريف دمشق خلال الفترة الواقعة بين عامي 2018 و2017، وبالاعتماد على الأعراض السريرية والآفات التشريحية المميزة للمرض. تم جمع 50 عينة من الآفات المرضية لأعضاء من طيور مريضة أو نافقة /القصبات، الشعب الهوائية والكلى/ من مزارع دجاج اللحم المحصنة بلقاح الذرية H120 بعمر 7 أيام، ووضعت في أكياس معقمة في حافظة مبردة لحين الوصول إلى المخبر، ثم حفظت في الثلاجة على درجة −20 م° لحين الاستخدام.

– **استخلاص الحمض النووي الفيروسي** Viral RNA Extraction: استخدم لهذه الغاية عتيدة تجارية خاصة (GF-1 Total RNA Extraction Kit)، حيث تمت معاملة 30 مغ من العينة بـ 700µ من دارئة TR مع 7µ من Beta-Mercaptoethanol لمجانسة العينة وفقاً لتعليمات الشركة المصنعة، وتم الهرس باستخدام الرمل البحري العقيم ومزج بالرج، ومن ثم ثُقّل بسرعة دوران تعادل gx13000 مدة 3 دقائق، وجمع السائل الطافي وتمت مجانسته بمحلول خاص (TR)، ثم نقل إلى عمود التجانس وأضيف إليه الإيثانول 80% لترسّب RNA وفقاً لتعليمات الشركة المصنعة.

– **النسخ العكسي** (RT-PCR) reverse-transcription polymerase chain reaction): باستخدام عتيدة تجارية cDNA ((2-steps RT-PCR kit, RTPL12®, vivantis, Malaysia synthesis))، وطبقاً لتعليمات الشركة المنتجة حيث أجريت هذه الخطوة على مرحلتين:

آ- **تحضير المزيج الأولي** RNA- Primer كالتالي: 7 µl من الـ RNA الكلي، 2 µl من البادئة Gene- specific) -SX2 primer) و1 µl من مزيج النكليوتيدات mM dNTP10، يُحضن المزيج على الدرجة 65 م° لمدة 5 دقائق، ثم وضع في الثلج لمدة دقيقتين، يُحضر مزيج التركيب الثاني cDNA المكون من : 2 µl من X Buffer M-MulV10، و 0.5 µl من M- Mul V Reverse Transcriptase، ويستكمل الحجم إلى 10 µl بإضافة الماء المقطر، يُضاف 10 µl من هذا المزيج إلى كل عينة من عينات مزيج RNA- Primer، يمزج بلطف ويثقل لمدة قصيرة حوالي نصف دقيقة، ثم يحضن على الدرجة 42° م لمدة 60 دقيقة، يُوقف التفاعل بالتحضين على الدرجة 85 °م لمدة 5 دقائق، ثم توضع الأنابيب في الثلج و تثفل لمدة قصيرة أقل من نصف دقيقة. يستخدم تركيب cDNA مباشرةً أو يخزن على الدرجة −20 م°.

ب – تفاعل البوليميراز المتسلسل المعشش: Nested-PCR

– **مرحلة التضخيم:** Amplification Reactions: أُجري تفاعل البوليميراز المتسلسل الأولي PCR باستخدام زوج من المرئسات النوعية Primers الخاصة، بحجم نهائي 25 µl يتضمن: 8 µl من cDNA، µl 0.5 من كل البادئة +SX1 والبادئة −SX2، 2.51 µl من master mix , ويستكمل الحجم بإضافة الماء المقطر، أجريت عملية التضخيم Amplification في المدور الحراري Thermal cycler وفقاً للبرنامج التالي: مرحلة التمسخ الأولي 94° / Initial denaturation مئوية 2 دقيقة دورة واحدة/ دورات التضخيم وعددها 35 دورة على الشكل التالي: 94° مئوية 30ثانية، 56 مئوية 30ثانية، 72° مئوية 1دقيقة. مرحلة الاستطالة النهائية Final extension 72° مئوية لمدة 7 دقائق دورة واحدة. استخدمت مرئسات أخرى للتفاعل الثاني المعشش Secondary PCR بهدف تضخيم قطعة بطول 393 bp وهي نوعية من أجل منطقة hypervariable في جزء المورثة +SX3 S1، -SX4 (من شركة

metabion) وبمزيج وبرنامج تضخيم مماثل لما ورد آنفاً (باستثناء درجة حرارة الارتباط 53°)، وتم الانطلاق من 1 µl من ناتج التفاعل الأولي كمرصاف (قالب) Template في التفاعل الثاني. واستخدم لقاح H120 كشاهد إيجابي Positive control في تفاعلات التضخيم، كما استخدم الماء المقطر منزوع الشوارد كشاهد سلبي.

الجدول 1. التسلسل النكليوتيدي للبادئات المستخدمة في تفاعل RT- PCR و Nested PCR

الموقع في التسلسل S1	التسلسل النكليوتيدي للبرايمر	اسم البرايمر
698-677	5'- CACCTAGAGGTTTG T/C T A/T GCAT-3'	SX1+
1148-1168	5'- TCCACCTCTATAAACACC C/T TT-3'	SX2-
705-725	5'TAATACTGG C/T AATTTTTCAGA-3'	SX3+
1075-1097	5'- AATACAGATTGCTTACAACCACC-3'	SX4_

(Ball, *et al.*, 2017)

– **الرحلان الكهربائي في هلامة الأغاروز**: Agarose Gel Electrophoresis: حضرت في البداية دارئة الرحلان (TBE (10x) Brody and Kern, 2004) باستخدام هلامة الآغاورز بتركيز 1.5% ثم إجراء التالي:

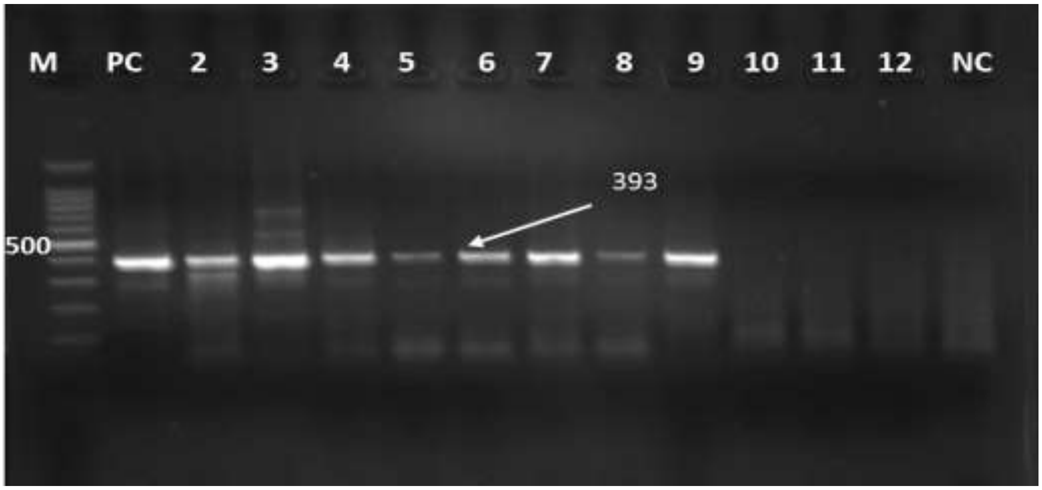
مزج 10 µl من ناتج تفاعل البوليميراز المتسلسل لكل عينة مع 4 µl من دارئة التحميل Loading buffer ذات التركيز x6، ونقل المزيج باستخدام ماصة مكروية مناسبة إلى إحدى حفر الهلامة، وطبقت هذه العملية على كافة العينات. كما وضع في الحفرة اليسارية الأولى من حفر الهلامة واسم الأطوال المعياري (سلم أطوال DNA) الـ DNA ladder الذي تتراوح قياساته من 100bp – 1.5kbp. تم تمرير تيار كهربائي بفرق كمون مقداره 100 فولت، وبعد فترة كافية من الرحلان فحصت الهلامة على جهاز توثيق الهلامة بالأشعة فوق البنفسجية Gel Documenter لتحري وجود حزم DNA المطلوبة حيث تم الاستدلال عليها بواسطة واسم الأطوال.

تنمية وعزل فيروس IBV من بيض SPF:

– **الحقن في أجنة الدجاج**: تم تحضير وتجهيز أجنة دجاج نامية خالية من العوامل الممرضة (SPF)، (OIE, 2013). واختيرت 10 عينات إيجابية للإصابة بفيروس التهاب القصبات المعدي في اختبار الكشف RT–PCR، للتمرير في الأجنة. جهزت العينة المحتوية على الفيروس بالهرس (أو الطحن) جيداً، ومجانستها بإضافة ضعفي كمية العينة من محلول NaCl وأضيف البنسلين بتركيز ml/U 1000 والستربتومايسين بتركيز 10 ml/ mg. تم تثفيل العينة وجمع الطافي وتم ترشيحه بفلتر ذو قطر 0.22 ميكرون. ثم استخدمت الرشاحة لحقن الأجنة، خصصت 3 أجنة بعمر 10 أيام لكل عينة مع عينة شاهد. في ظروف معقمة وحسب الطرق المعتمدة في علم الفيروسات تم تحضير الأجنة وحقن 0.2 ml في الكيس السقائي المشيمائي chorioallantoic sac أو الأغشية السقائية المشيمائية chorioallantoic membrane، وبالفحص الضوئي تمت مراقبة الأجنة يومياً، واستبعد النافق في اليوم الأول بعد الحقن، والاحتفاظ بالنافق فيما بعد في البراد، لدراسته من الناحية المرضية. بعد 7 أيام تم تشريح جميع الأجنة ولكل العينات، وسحب السائل السقائي المشيمائي المحتوي على الفيروس والاحتفاظ به في الثلاجة عند الحرارة –20 °م من أجل الاختبارات اللاحقة. أما الأغشية والأجنة فقد درست تشريحياً ومرضياً لتسجيل النتائج.

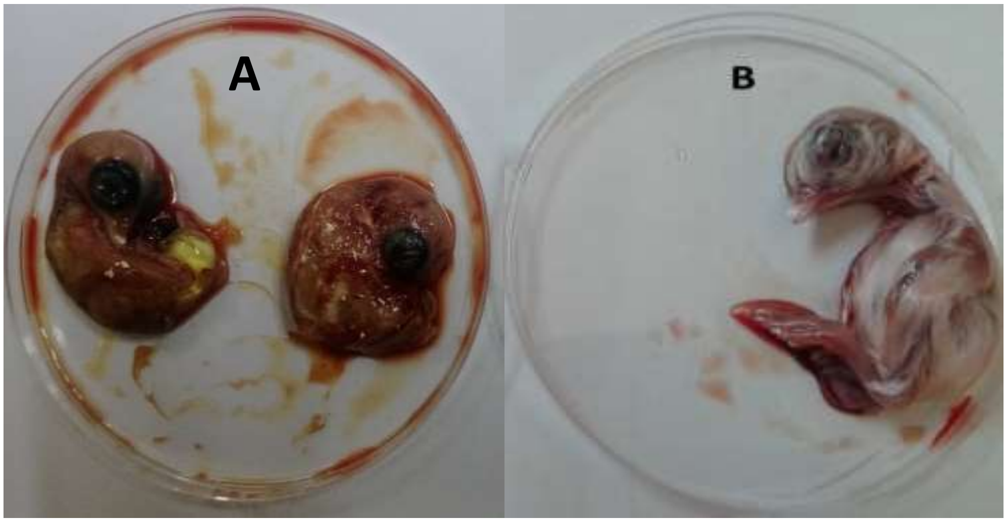
النتائج والمناقشة:

1- **نتائج الكشف عن فيروس IBV:** أظهرت تقنية RT–PCR ومن ثم تفاعل Nested–PCR وجود حزم من DNA بطول 393 bp في 37 عينة من أصل 50 (74 %) وذلك بعد فحص ناتج التفاعل بالرحلان الكهربائي في هلامة الأغاروز (الشكل 1).



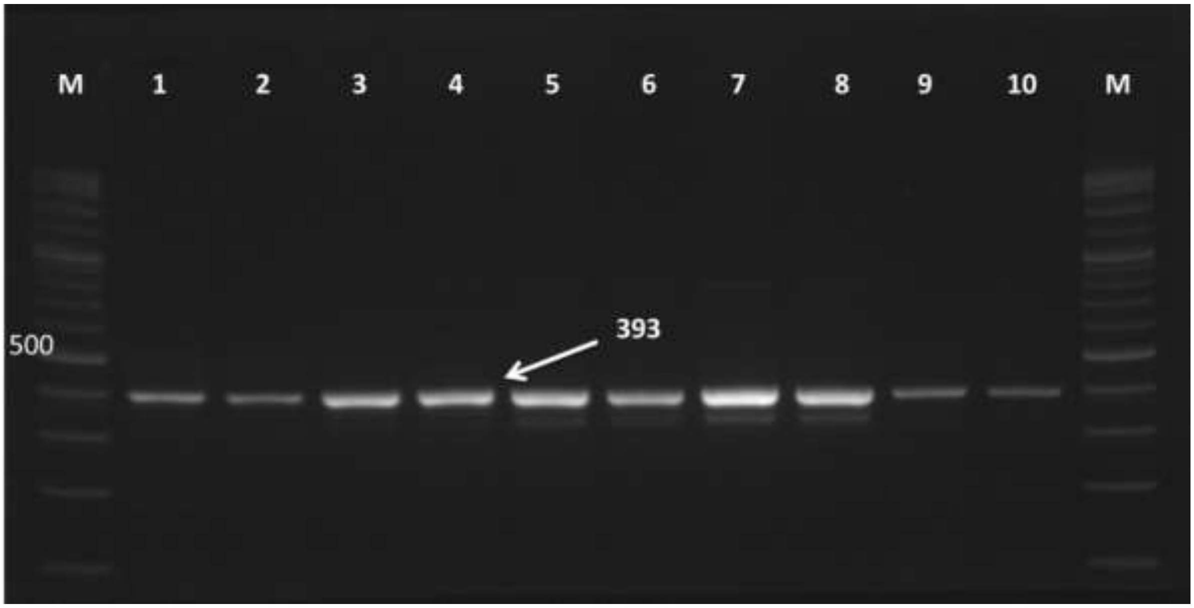
الشكل 1. نتائج بعض العينات لتفاعل Nested-PCR وتبدو أنطقة الـDNA بطول 393، PC: شاهد إيجابي عينات إيجابية - الأعمدة 2 -9، عينات سلبية :10، 11، 12 DNA مُعَلِم أطوال الـ M: ، شاهد سلبي NC

2-**نتائج عزل فيروس IBV في أجنة الدجاج:** بيّن تشريح الأجنة بعد الحقن وتمرير العينات المحتوية على ذراري الفيروس وجود أجنة نافقة بنسب متفاوته بين ذرية وأخرى، ونزف دموي في الأغشية والأجنة، مع تأخر واضح في تطور نمو الجنين وتقزم، وملاحظة التفاف الأجنة والأصابع (الصورة 2).



الصورة 2. A- أجنة متقزمة، B- الشاهد

– **اختبار تفاعل Nested–PCR :** بعد عزل الذراري التي أظهرت خصائص مميزة لفيروس التهاب القصبات المعدي في أجنة الدجاج النامية، تم استخدام 5 µl من السائل السقائي لكل عينة لإجراء تفاعل Nested–PCR بظروفه المذكورة سابقاً للحصول على أشرطة الـ DNA بطول 393 (الشكل 3)، وارسالها للسلسلة بغية معرفة التركيب النكليوتيدي لها ومقارنتها مع العترات اللقاحية، ودراسة وكشف الاختلافات بينها، والاستفادة من السوائل والأغشية الجنينية التي يمكن أن تحتوي على تراكيز مرتفعة من ذراري الفيروسات.



الصورة 3. نتائج 10 عينات لتفاعلِ Nested-PCR بعد المكاثرة في بيض SPF، تبدو أنطقة الـDNA بطول 393، DNA مُعَلِم أطوال الـM:

المناقشة:

يستند تشخيص التهاب القصبات الهوائية المعدي على عزل الفيروس في أجنة الدجاج النامية بعمر 9–11 يوم تحضين، ويتبع ذلك تحديد مصلي للعزلات، هذا الإجراء يستغرق وقتًا طويلاً ويتطلب استخدام أضداد وحيدة النسيلة أو متعددة النسيلة، وقد تضم بعض العزلات أكثر من نمط لفيروس IBV وهذا ما يعيق تفسير نتائج التنميط المصلي. بينما يمكّن استخلاص الحمض النووي الريبي من أنسجة القصبات والكلى، ومن ثم استخدام تقنية النسخ العكسي RT– PCR من الكشف عن الفيروس في القطعان المصابة بسهولة وسرعة ودقة عالية بالمقارنة مع طريقة العزل التقليدي في أجنة دجاج SPF، وبالمقابل لا بعد من استخدام تقنية العزل في أجنة بيض خالٍ من العوامل الممرضة، للاستفادة من السوائل والأغشية الجنينية واستخدامها كمادة أولية للكثير من الدراسات والفحوص المخبرية المتعلقة بفيروس التهاب القصبات المعدي عند الدواجن. توافقت معطيات نتائج التمرير في أجنة الدجاج للعينات المحتوية على ذراري الفيروس المكتشفة في الدراسة الحالية التي بينت وجود نفوق أجنة، وتقزم، والتفاف أجنة وتشابك أصابع الاجنة، مع معطيات (Patel *et al.,* 2015; Khataby *et al.,* 2016; Dhaygude *et al.,* 2018). كما كشفت الفحوص التشريحية المرضية للأجنة عن احتقانات مختلفة الشدة في أغشية القصبات الهوائية، وعتامة على الأكياس الهوائية، والتهاب الكلى مع ضخامة كلوية، وزيادة رواسب أملاح البولة في الحالبين والسوائل الجنينية، وهذا ما أشار إليه (Boroom, *et al.,* 2012; Terrigino *et al.*, 2008).

من أهم المشاكل الأساسية لالتهاب القصبات المعدي نشوء تأشبات جديدة (Abdel–Moneim *et al.,* 2002; Sediek, 2010). ويعد الكشف عن تغيرات التركيب هذه وتحديدها أمراً بالغ الأهمية للتحكم والسيطرة على المرض (Nakamura *et al.,* 1996). يوجد العديد من الامراض الفيروسية المتشابهة سريريا والتي يمكن أن تنتشر في الإنتاج المكثف للدواجن وتتطلب تشخيصاً تفريقياً.

من هنا أجريت الدراسة الحالية التي تستخدم المرئسات المذكورة من قبل (Balla *et al.,* 2017)، والتي تستخدم لتضخيم المورثة S1 في العينات المرضية النسيجية التي يحتمل الإصابة بـ IBV تعتبر حجر الأساس في المجال الجزيئي بما يخص IBV، حيث تم تحديد نطاقات bands من DNA بطول 393 bp في 37 عينة من أصل 50 عينة وهو ما يشكل نسبة (74 %) من العينات، حيث تعتبر

تقنية RT–PCR تقنية حديثة أثبتت جدواها العلمي في الكشف عن الفيروس، وتوافق ذلك مع الأعراض السريرية الظاهرة على الطيور التي تم جمع العينات النسيجية منها من 37 مزرعة، وتعتبر هذه التقنية أكثر دقة من التقنيات المستخدمة سابقاً ومنها الاليزا وهذا يتوافق مع نتائج (ALMustafa, 2011) ومع نتائج (Ganapathy *et al.*, 2015; Fellahi *et al.*, 2015) مع اختلاف طول قطعة DNA المكتشفة، وفي هذه الدراسة وبعد إنماء الذراري المشخصة تبعاً لـ RNA الفيروس في أجنة الدجاج النامية لبيض SPF، واستخدام السوائل والأغشية الجنينية في تفاعل Nested–PCR تم تحديد نطاقات bands من DNA بطول 393 bp في 10 عينات من أصل 37 عينة، وبذلك شكلت السوائل والأغشية الجنينية لهذه العينات الخطوة الأولى لتصنيع اللقاح من العترات الحقلية المحلية، والتي لابد أن تؤمن حماية مناعية كافية ضد هذه العترات.

الاستنتاجات والتوصيات:

- تساعد الأعراض السريرية لمرض التهاب الشعب الهوائية المعدي، والتغيرات التشريحية المرضية المرافقة بالاشتباه بوجود المرض.
- أثبت جزيئياً وجود IBV بواسطة RT–PCR و Nested PCR، في مزارع الدجاج المتوزعة في مناطق محافظات اللاذقية، وطرطوس، وريف دمشق.
- أثبتت تقنية RT–PCR جدواها العلمي في الكشف عن الفيروس.
- يعزى فشل برامج التحصين المطبقة ضد المرض في بعض المزارع لوجود ذراري IBV مغايرة لذراري اللقاحات المستخدمة في هذه المزارع.
- تتطلب عملية زيادة الاستجابة المناعية للقاحات كشف وتحديد الأنماط المصلية المسببة للمرض واستخدام اللقاحات ذات التصالب المناعي المرتفع.

كلمة شكر:

الشكر الكبير إلى المؤسسة البحثية الداعمة للبحث مادياً وفنياً وهي الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، والشكر إلى كلية الطب البيطري بجامعة حماه للسماح باستخدام مخبر PCR وللتعاون في إنجاز البحث.

المراجع

المصطفى، حازم (2011). عزل وتصنيف فيروس التهاب القصبات المعدي في الدجاج في سورية. أطروحة دكتوراه. قسم أمراض الدواجن، كلية الطب البيطري، جامعة البعث، سورية. 156 ص.

Abdel-moneim, A.S.; H.M. Madbouly; J.R. Gelb; and B.S. Ladman (2002). Isolation and identification of Egypt/Beni-Suef/01 a novel genotype of infectious bronchitis virus. Vet. Med. J. Giza. 50(4): 1065-1078.

Adzhar, A.; K. Sha; P. Britton; and D. Cavanagh (1996). Universal oligonucleotides for the detection of infectious bronchitis virus by the polymerase chain reaction. Avian Pathology. 25: 817-836.

Balla, C.; F. Awada; S. Huttona; M. Forrestera; M.Baylisa; and K. Ganapathy (2017). Infectious bronchitis vaccine virus detection and part-S1 genetic variation following single or dual inoculation in broiler chicks. Avian Pathology. 46(3): 309–318.

Bande, F.; S. Arshad; M. Bejo; H. Moeini; and A. Omar (2015). Progress and challenges toward the development of vaccines against avian infectious bronchitis. Journal of Immunology Research. doi: 10.1155/2015/424860.

Brody, J.; and S. Kern (2004). History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis" (PDF). Anal Biochem., 333 (1):13.

Boroom, Z.; K. Asasi; and A. Mohammadi (2012). Pathogenesis and tissue distribution of avian infectious Bronchitis Virus Isolate IRFIBV32 (793/B Serotype) in experimentally infected broiler chickens. The Scientific World Journal. Volume Article ID 402537, 6 pages.

Boursnell, M.; T. Brown; I. Foulds; P. Green; F. Tomley; and M. Binns (1987). Completion of the sequence of the genome of coronavirus avian infectious bronchitis virus. J. Gen. Virol., 68: 55-77.

Cavanagh, D. (1983). Coronavirus IBV: structural characterization of the spike protein. J. Gen. Virol., 64: 2577-2583.

Cavanagh, D.; P. Davis; J. Darbyshire; and R. Peters (1986). Coronavirus IBV: virus retaining spike glycopolypeptide S2 but not Sl is unable to induce virus-neutralizing or hemagglutination-inhibiting antibody, or induce chicken tracheal protection. J. Gen. Virol., 67: 1435-1442.

Cavanagh, D. (2007). Coronavirus avian infectious bronchitis virus. Veterinary Research. 38: 281–297.

Cavanagh, D. (2005). Coronaviruses in poultry and other birds. Avian in Taiwan. Avian Dis., 40: 620-625.

Dhaygude, V.; S. Moregaonkar; N. Bulbule; and M. Chawak (2018). Infectious Bronchitis Virus Detection and isolation from broiler chicken. Journal of Animal Research. 8(5): 891-898.

Dolz, R.; J. Vergara-Alert; M. Perez; J. Pujols; and N. liaMajo (2012). New insights on infectious bronchitis virus pathogenesis: characterization of Italy 02 serotype in chicks and adult hens. Veterinary Microbiology. 156: 256–264.

Fellahi, S.; M. Ducatez; M. El Harrak; J. Guérin; N. Touil; G. Sebbar; E. Bouaiti; K. khataby; M. Ennaji; and M. El-Houadfi (2015). Prevalence and molecular characterization of avian infectious bronchitis virus in poultry flocks in Morocco from 2010 to 2014 and first detection of Italy 02 in Africa. Avian Pathology. 44(4): 287–295.

Ganapathy, K.; C. Ball; and A. Forrester (2015). Genotypes of infectious bronchitis viruses circulating in the middle east between 2009 and 2014. Virusres. 7(19):1-24.

Haqshenas, G.; K. Assasi; and H. Akrami (2005). Isolation and molecular characterization of infectious bronchitis virus (IBV) Shiraz3 isolate by RT-PCR and restriction enzyme analysis. Iranian. J. Vet. Res., 6: 9-15.

Khataby, F.; C. Loutfi; and M. Ennaji (2016). Assessment of pathogenicity and tissue distribution of infectious bronchitis virus strains (Italy 02 genotype) isolated from moroccan broiler chicken. BMC Veterinary Research. 12(94):1-10.

King, J.; and D. Cavanagh (1991). Infectious bronchitis. In: Calnek, B.W., Barnes, H.J., Beard, C.W., Reid, W.M., Yoder, H.W., Jr. (Eds.), Disease of Poultry, 9th ed. Iowa State University 3.

Liu, H.; L. Lee; W. Shih; M. Lin; and M. Liao (2003). Detection of infectious bronchitis virus by multiplex polymerase chain reaction and sequence analysis. Journal of Virological Methods. 109: 31-37.

Nakamura, K.; K. Imai; and N. Tanimura (1996). Comparison of the effects of infectious bronchitis and infectious laryngotracheitis on the chicken respiratory tract. J. Comp. Path., 114(1):11-21.

Sediek, M.E.M. (2010). Further studies on infectious bronchitis in chickens. Ph.D. Thesis, poultry Dis; Alex. Univ., Egypt.

Patel, B.; M. Bhimani; B. Bhanderi; and M. Jhala (2015). Isolation and molecular characterization of nephropathic infectious bronchitis virus isolates of Gujarat state, India. Virus. Dis., 26(1-2):42–47.

Siddle, S.; H. Wege; and V. ter Meulen (1982). The structure and replication of coronaviruses. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 99: 131-163.

Saif, Y.; A. Fadly; J. Glisson; L. Mc Dougald; K. Nolanl; and D. Swayne (2008). Diseases of poultry. 12th Ed, chap (4) infectious bronchitis. Pp:117-135.

Stern, D.; and B. Sefton (1982). Coronavirus proteins: biogenesis of avian infectious bronchitis virus proteins. J. Virol., 44: 794- 803.

Tarpey, I.; S. Orbell; P. Britton; R. Casais; T. Hodgson; F. Lin; E. Hogan; and D. Cavanagh (2006). Safety and efficacy of an infectious bronchitis virus used for chicken embryo vaccination. Vaccine. 24: 6830–6838.

Terregino, C.; A. Toffan; M. Beato; R. De Nardi; M. Vascellari; A. Meini; G. Ortali; M. Mancin; and I. Capua (2008). Pathogenicity of a QX strain of infectious bronchitis virus in specific pathogen free and commercial broiler chickens, and evaluation of protection induced by a vaccination programme based on the Ma5 and 4/91 serotypes," Avian Pathology. 37(5): 487–493.

Wang, C.; M. Hsieh; and P. Chang (1996). Isolation, pathogenicity, and Hl10 Protection Efficacy of Infectious Bronchitis Viruses Isolated in Taiwan. Avian Diseases. 40:620-625,

Wang, C.; and C. Tsai (1996). Genetic grouping for the isolates of avian infectious bronchitis virus in Taiwan Genetic**.** Arch Virol., 141:1677-1688**.**

Wit, J. (2000). Detection of infectious bronchitis virus. Avian Pathology. 29(2): 71-93.

World Organization for Animal Health [OIE]. (2013). Chapter 2. 3. 2. Avian Infectious Bronchitis. In: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Available in: <http://www.oie.int/doc/ged/D7710.pdf>. Accessed in:10.Out.16.

Zwaagstra, K.; P. Van der zeijst; and J. Kusters (1992). Rapid detection And Identification of Avian Infectious Bronchitis Virus. Journal of Clinical Microbiology. 30(1):79-84.

Diagnosis and Detection of Infectious Bronchitis Virus Using RT-PCR Technology in Broiler Farms in Syria

Tamara Ahmad Al-Jallad*(1) Fahim Ali Abdelaziz(2) Mohamad Jamil Salhab(3) and Anouar Mohamad Dib Alomar(4)

(1). Department of Animal Production, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Lattakia, Syria.
(2). Department of Life Science, Faculty of Science, Tartous University, Tartous, Syria.
(3). Research Center of Latakia, General Commission for Scientific Agricultural Research GCSAR, Damascus, Syria
(4). Faculty of Science, Al-Baath University, Homs, Syria.
(*Corresponding author: Eng. Tamara Ahmad Al-Jallad. E-Mail: tamara.aljallad@gmail.com).

Received: 26/08/2019 Accepted: 02/10/2019

Abstract

A reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) technique was used to detect infectious bronchitis virus (IBV) in the commercial broiler flocks in Syria. 50 tissue samples were taken from tracheal tissue, trachea and kidney of the broilers suspected of infectious bronchitis (IB) from different governorates of Syria i.e. Latakia, Tartous, Hama and Damascus countryside. RNA was extracted directly from the tissue samples and then RNA was converted to cDNA by RT-PCR technology; PCR reaction and Nested PCR interaction were carried out sequentially. The primers used in the RT-PCR reaction were selected from the S1 gene (spike), where mutations of the virus genome were concentrated in this region (the hypervariable region). Some positive samples (10) were injected at an age of 9-11 days old SPFEE-specific pathogen free embryonated eggs according to the methods adopted in virology. This research was carried out at the laboratories of Latakia Research Center, General Commission for Scientific Agricultural Research GCSAR, in cooperation with the PCR laboratory at the Faculty of Veterinary Medicine in Hama. The results showed the existence of 37 positive case for RT-PCR (74%), and the infectious embryos showed clear and characteristic anatomical lesions of the infectious bronchitis virus after 5-6 days post injection, delayed and undeveloped fetal (dwarfism), fingertip entanglement and hemorrhage compared with the negative control. The results also showed the sensitivity and speed of the RT-PCR test in the detection of the IBV virus.

Key words: Infectious Bronchitis Virus IBV, RT-PCR, Broiler.