

ردیابی مولکولی سویه های برونشیت عفونی طیور در گله‌های گوشتی دارای علائم تنفسی در استان گیلان

• یداله اسدپور (نویسنده مسئول)

بخش تحقیقات دامپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گیلان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران

• سهراب عاقبتی

اداره کل دامپزشکی استان گیلان، رشت، ایران

• فرشته زاهدی

اداره کل دامپزشکی استان گیلان، رشت، ایران

• ابراهیم رحیم آبادی

بخش تحقیقات دامپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گیلان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران

• عبدالحمید شوشتری

بخش تحقیق و تشخیص بیماریهای طیور، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶-۰۴-۰۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶-۰۴-۲۴

Email: yasadpour@yahoo.com



چکیده

برونشیت عفونی طیور (IB) به وسیله کروناویروس‌ها ایجاد می‌شود. برونشیت یکی از عوامل مهم خسارت اقتصادی در طیور بوده که سبب درگیر شدن بیماریهای تنفسی، نفريت و کاهش تولید و کیفیت تخم مرغ می‌شود. ویروس برونشیت دارای سروتیپ‌های متعددی بوده که ایمنی متقاطع در مقابل همدیگر ایجاد نمی‌کنند. هدف از این مطالعه ردیابی سروتیپ‌های ویروس برونشیت عفونی طیور در فارم‌های گوشتی استان گیلان دارای علائم تنفسی بوده است. در مطالعه حاضر به طور تصادفی نمونه‌های نای و ریه ۲۸ گله گوشتی که دارای علائم تنفسی بودند جمع‌آوری شد. آزمایش RT-PCR بعد از استخراج RNA ویروس از نمونه‌ها جهت تشخیص برونشیت عفونی انجام شد. ۲۰ گله (۷۰ درصد) از تعداد کل ۲۸ گله گوشتی از نظر برونشیت عفونی تأیید شد. آزمایش Nested PCR جهت شناسایی سروتیپ‌های درگیر با استفاده از پرایمرهای اختصاصی سه سروتیپ Mass، B/۷۹۳ و D۲۷۴ انجام شد. نتایج نشان داد که ۱۳ نمونه (۶۵ درصد) متعلق به سروتیپ Mass، ۷ نمونه (۳۵ درصد) به سروتیپ B/۷۹۳ و در ۲ نمونه (۱۰ درصد) هر دو سروتیپ Mass و B/۷۹۳ به طور توأمان ردیابی گردید امادر هیچ یک از نمونه‌ها سروتیپ D۲۷۴ شناسائی نشد. نتیجه اینکه به منظور وضعیت ایمنی بر علیه برونشیت در گله‌های گوشتی استان گیلان، استفاده دو سروتیپ ماساچوست و B/۷۹۳ در برنامه واکسیناسیون و امنیت زیستی توصیه می‌شود.

کلمات کلیدی: برونشیت طیور، RT-PCR، Nested-PCR، گیلان

• Veterinary Researches & Biological Products No 117 pp: 260-267

Molecular detection of avian infectious bronchitis serotypes in broiler chicken flocks with respiratory clinical signs in Guilan province

By: *Asadpour, Y., (Corresponding Author) Veterinary Research Department, Gilan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center (AREEO), Rasht, Iran.; Aghebati S., Iran Veterinary Organization, Guilan Provincial Veterinary Service, Rasht, Iran; Zahedi F., Iran Veterinary Organization, Guilan Provincial Veterinary Service, Rasht, Iran; Rahimabadi, E., Gilan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center (AREEO), Rasht, Iran. and Shooshtari. A., Department of Research and Diagnosis of Poultry Disease Razi Vaccine and Serum Research Institute (AREEO), karaj, Iran..*

Email: yasadpour@yahoo.com

Received: 2017-06-24 Accepted: 2017-07-15

Avian infectious bronchitis (IB) is caused by corona viruses. Infectious bronchitis virus (IBV) is a major cause of economic losses in poultry and can be involved in respiratory disease, nephritis, and both poor egg production and quality by reproductive tract infection. IBV has many serotypes that do not confer cross protection against each other. The aim of this study was conducted to detect IBV serotypes in broiler chicken farms of Guilan province were involved with clinical signs respiratory disease. In the present study, tracheal and lung tissue samples were collected randomly from 28 broiler chicken farms with respiratory signs. Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) method was done after extraction of RNA virus from samples for diagnosis of IBV. 20 flocks (70%) out of 28 flocks were positive. Nested- PCR method was performed for detection of 3 serotypes of IBV (Mass, 793/B and D274) by using of specific primers. The results showed that 13 samples (65%) belonged to Mass serotype, 7 samples (35%) to 793/B and both of Mass, 793/B serotypes were detected from 2 samples (10%), but in all of samples D274 serotype was not detected. In conclusion, for the best immunity against IB in broiler flocks of Guilan province, using of 2 serotypes (Mass, 793/B) in vaccination programs with biosecurity in farms are recommended.

Key words: Infectious bronchitis virus, RT-PCR, Nested- PCR, Guilan

مقدمه

بیماری برونشیت عفونی در حال حاضر یکی از بیماری‌های اصلی گله‌های طیور در سراسر دنیا می‌باشد. وجود سروتیپ‌های مختلفی که علیه یکدیگر ایمنی کاملی ایجاد نمی‌کنند و همچنین ظهور مداوم واریانت‌های جدید، مشکل عمده ایجاد ایمنی علیه ویروس برونشیت عفونی می‌باشد. شیوع متعدد بیماری برونشیت عفونی اغلب در نتیجه عفونت با سویه‌هایی است که از نظر سرولوژی با سویه‌های واکسن متفاوت هستند (۳). بنابر این شناسایی ویروس‌های در حال چرخش در کشور و تعیین هویت مولکولی آنها ضروری بوده تا بر اساس آن مناسب‌ترین برنامه واکسیناسیون جهت کنترل بیماری اتخاذ شود. در ایران وجود ویروس برونشیت عفونی نخستین بار در سال ۱۹۹۴ توسط آقاخان و همکاران تأیید شد و سروتیپ ماساچوست به عنوان سروتیپ اصلی ویروس در حال چرخش در کشور گزارش گردید (۱). با توجه به اینکه تا چند سال قبل جدایه‌های بدست آمده از فیلد تنها وجود سروتیپ ماساچوست را به عنوان سروتیپ ایران ردیابی نموده اما در سالهای

اخیر با مشاهده مشکلات تنفسی مشابه در گله‌های گوشتی دارای سابقه واکسیناسیون با سویه واکسینال H۱۲۰ این احتمال تقویت گردید که ممکن است سروتیپ‌های جدید این ویروس باعث وقوع بیماری شوند. بیماری برونشیت از نظر علائم کلینیکی و کالبدگشائی قابل تفریق از سایر بیماریها نیست و معمولا با عواملی نظیر نیوکاسل، آنفلوآنزای H۹N۲، مایکوپلاسموز و کلی باسیلوز به طور هم‌زمان بروز می‌کند که تفکیک آنها به سادگی قابل انجام نیست و نمی‌توان تمام ضایعات تنفسی را به یک عامل اختصاص داد. از آنجائی که عمدتاً گزارش بیماری بر اساس علائم بالینی و ضایعات کالبدگشائی و پیشگیری از آن از طریق واکسیناسیون انجام می‌گیرد با تأیید تشخیص بیماری به روش مولکولی و همچنین مشخص نمودن سروتیپ‌های درگیر در گله‌های گوشتی منطقه، می‌توان راهکار مناسبی جهت پیشگیری و کنترل بهینه بیماری ارائه نمود. هدف از اجرای طرح تحقیقاتی حاضر نیز شناسایی سروتیپ‌های ویروس برونشیت عفونی طیور دارای علائم تنفسی در گله‌های گوشتی استان گیلان بوده است.

مراحل استخراج انجام شد. ابتدا جهت تهیه محلول کاری (Work Solu-tion) مقدار چهار میکرولیتر محلول آدنیلک اسید (Poly A کریر RNA)، ۲۰۰ میکرولیتر Binding buffer، ۵۰ میکرولیتر پروتئیناز K (هضم کننده پروتئین و لیز سلولی) و ۲۰۰ میکرولیتر از مایع روئی سوسپانسیون ۱۰ درصد نمونه‌های بافتی در یک تیوب ۱/۵ میلی لیتر مخلوط و در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد در حمام بن ماری به مدت ده دقیقه نگهداری شد. سپس ۱۰۰ میکرو لیتر ایزوپروپانل به تیوب اضافه و مخلوط گردید. یک عدد فیلتر تیوب روی Collection tube قرار داده شد و محتویات تیوب روی فیلتر تیوب ریخته شد و در مدت یک دقیقه در دور ۸۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردید. فیلتر تیوب را برداشته و روی یک Collection tube جدید قرار داده و قبلی حذف شد. سپس ۵۰۰ میکرولیتر از Inhibition removal buffer بر روی فیلتر تیوب اضافه و به مدت یک دقیقه در دور ۸۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردید. فیلتر تیوب را برداشته و روی یک Collection tube جدید قرار داده و مجدداً قبلی حذف شد. ۴۵۰ میکرولیتر از بافر مخصوص شستشو (Washing buffer) اضافه شد، پس از تکرار مراحل سانتریفوژ و شستشو، تیوب ابتدا در ۸۰۰۰ rpm دور در یک دقیقه و سپس در ۱۳۰۰۰ rpm

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری

در این مطالعه توصیفی که به مدت دو سال از خرداد ماه ۹۴ شروع شد، تعداد ۲۸ گله گوشتی در سنین مختلف که دارای علائم تنفسی همراه با تلفات بودند و علائم کالبد گشائی آنها نشان دهنده بیماری برونشیت عفونی بود، بعد از کالبد گشائی نمونه‌هایی از بافت نای و ریه طیور تلف شده برداشت و در لوله فالکون جمع‌آوری شد. در هر گله تعداد پنج بافت نای و پنج بافت ریه که در کل تعداد ۲۸۰ نمونه در هر گله جمع‌آوری شد اما در آزمایش مولکولی نمونه‌های اخذ شده از هر گله پول شده و به عنوان یک نمونه محسوب گردید. لوله‌ها به آزمایشگاه منتقل و در دمای ۸۰ - درجه سانتیگراد نگهداری شد.

استخراج RNA

سوسپانسیون ۱۰ درصد از نمونه‌ها در محلول سالین بافر فسفات با غلظت ۰/۲ مولار با pH خنثی تهیه شد. استخراج RNA بر اساس دستور سازنده کیت High Pure Vired Nucleic Acid Kit (Roche-Germany)

جدول (۱): شناسائی برونشیت عفونی در گله‌های طیور با استفاده از پرایمرها اختصاصی

نام ویروس	اندازه قطعه حاصل (bp)	توالی پرایمرها (3' -5')
Infectious Bronchitis Virus (IBV)	۴۶۴	CACTGGTAATTTTTCAGATGG (Forward)
		CTCTATAAACACCCCTTACA (Reverse)

جدول (۲): شناسائی سه سروتیپ شایع برونشیت عفونی در گله‌های گوشتی طیور با استفاده از پرایمر اختصاصی

نام سروتیپ	اندازه قطعه (bp)		توالی پرایمرهای اختصاصی (3' -5')
Mass	۲۹۵	Forward Reverse	AATACACTTTTACGTTACAC CAGATTGCTTACAACCACC
۷۹۳/B (۴/۹۱)	۱۵۴	Forward Reverse	AGTAGTTTTGTGTATAAACCA CAGATTGCTTACAACCACC
D۲۷۴	۲۱۷	Forward Reverse	ATACAATTATATCAAACCAGC CAGATTGCTTACAACCACC

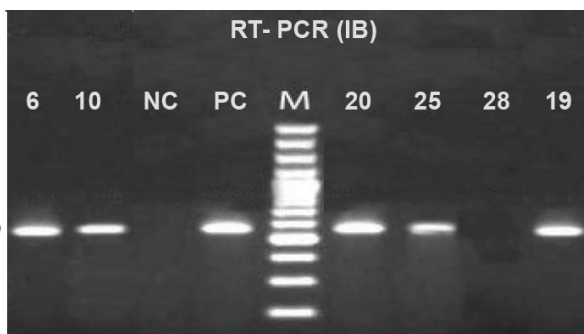
نتایج

برونشیت عفونی طیور در ۲۰ گله (۷۰ درصد) از نمونه‌های نای و ریه ۲۸ گله گوشتی دارای علائم تنفسی در آزمایش RT-PCR شناسایی شد (جدول ۱ و شکل ۱، ۲). با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، آزمایش Nested PCR برای سه سروتیپ Mass، D2۷۴، و ۷۹۳/B انجام شد (جدول ۲). نتایج نشان داد که ۱۳ نمونه (۶۵ درصد) سروتیپ Mass (شکل ۳)، هفت نمونه سروتیپ ۷۹۳/B (۳۵ درصد) (شکل ۴) و در دو گله (۱۰ درصد) هر دو سروتیپ Mass و ۷۹۳/B (شکل ۵) به طور توأمان ردیابی شدند و در هیچکدام از نمونه‌ها سروتیپ D2۷۴ شناسایی نشد.

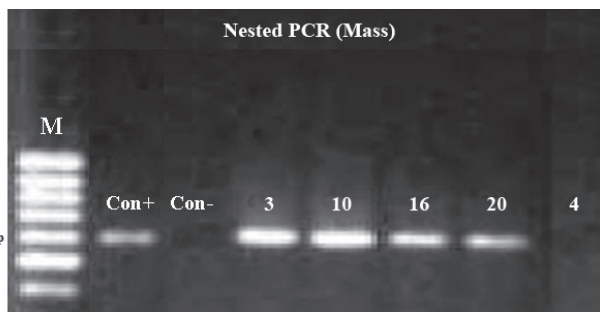
بحث

در مطالعه حاضر تعداد ۲۸ گله که از نظر علائم کالبد گشائی مشکوک به درگیری با ویروس برونشیت بودند نمونه برداری از نای و ریه انجام شد و در هشت گله ویروس برونشیت تشخیص داده نشد که احتمالاً بعلت شباهت علائم کالبد گشائی با سایر بیماری‌های ویروسی تنفسی مثل آنفلوانزا، نیوکاسل و پنوموویروس و تداخل چند بیماری در گله‌های

شکل (۲): الف- تکثیر باند ۴۶۴ bp جفت بازی در نمونه‌های کلینیکی چاهک‌های ۶، ۱۰، ۲۰، ۲۵، ۱۹، ۲۵ نشان‌دهنده تأیید بیماری برونشیت در گله و چاهک ۲۸ عدم تأیید برونشیت ب- چاهک PC: کنترل مثبت ج- چاهک NC: کنترل نمونه‌های د- چاهک M: مارکر: ۱۰۰ جفت بازی



شکل (۳): تکثیر باند ۲۹۵ bp جفت بازی در چاهک ۳، ۱۰، ۱۶، ۲۰ و سروتیپ Mass را در نمونه‌های کلینیکی نشان می‌دهد چاهک ۴: نمونه کلینیکی منفی، چاهک Con⁺: کنترل مثبت، چاهک Con⁻: کنترل منفی، چاهک M: مارکر ۱۰۰ bp جفت بازی



دور در ده ثانیه جهت خروج بافر شستشوی اضافی سانتریفوژ شد. فیلتر تیوب روی یک میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری عاری از نوکلئاز قرار داده شد و ۵۰ میکرولیتر Elution buffer اضافه شد و به مدت یک دقیقه در دور ۸۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردید در انتها فیلتر تیوب حذف و تیوب حاوی RNA استخراج شد. به منظور تأیید صحت آزمایش استخراج و حصول اطمینان از وجود مقدار کافی اسید نوکلئیک RNA و همینطور عاری بودن از ناخالصیهای پروتئینی نمونه‌ها، قرائت جذب نوری با دستگاه اسپکتوفتومتری در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر انجام شد که در مورد RNA میزان ۱/۸-۲ قابل قبول است. سپس به منظور تعیین مقدار نمونه برای انجام واکنش RT ضریب OD محاسبه و میزان نمونه بر اساس میکرولیتر محاسبه شد.

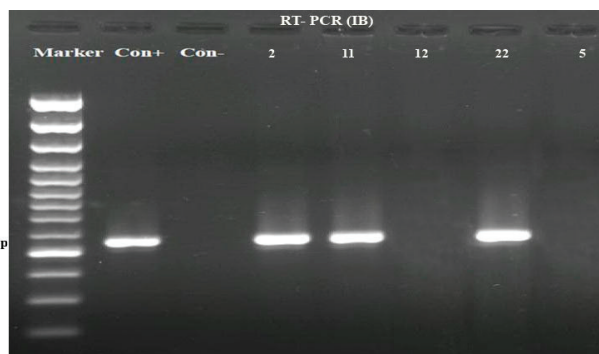
روش RT-PCR

روش RT-PCR طی مراحل مختلف انجام گرفت که شامل: ۱- مرحله نسخه برداری معکوس از RNA و سنتز cDNA در حجم ۲۰ میکرولیتر در دمای ۴۵ °C به مدت ۴۵ دقیقه ۲- واسرشت سازی اولیه (Primary Denaturation) در دمای ۹۴ °C به مدت دو دقیقه (یک سیکل) ۳- واسرشت سازی اصلی در دمای ۹۴ °C به مدت یک دقیقه ۴- اتصال پرایمر (Annealing) یا هم سرشت سازی در دمای ۴۸ °C به مدت یک دقیقه ۵- بسط اصلی (Extention) در دمای ۶۸ °C به مدت یک دقیقه (مرحله ۳ تا ۵ سیکل اصلی با ۳۵ مرتبه تکرار). ۶- بسط انتهائی در دمای ۶۸ °C به مدت یک دقیقه (یک سیکل). پرایمر اختصاصی بر اساس طراحی کاوناناق و همکاران (۲) در RT-PCR استفاده شد.

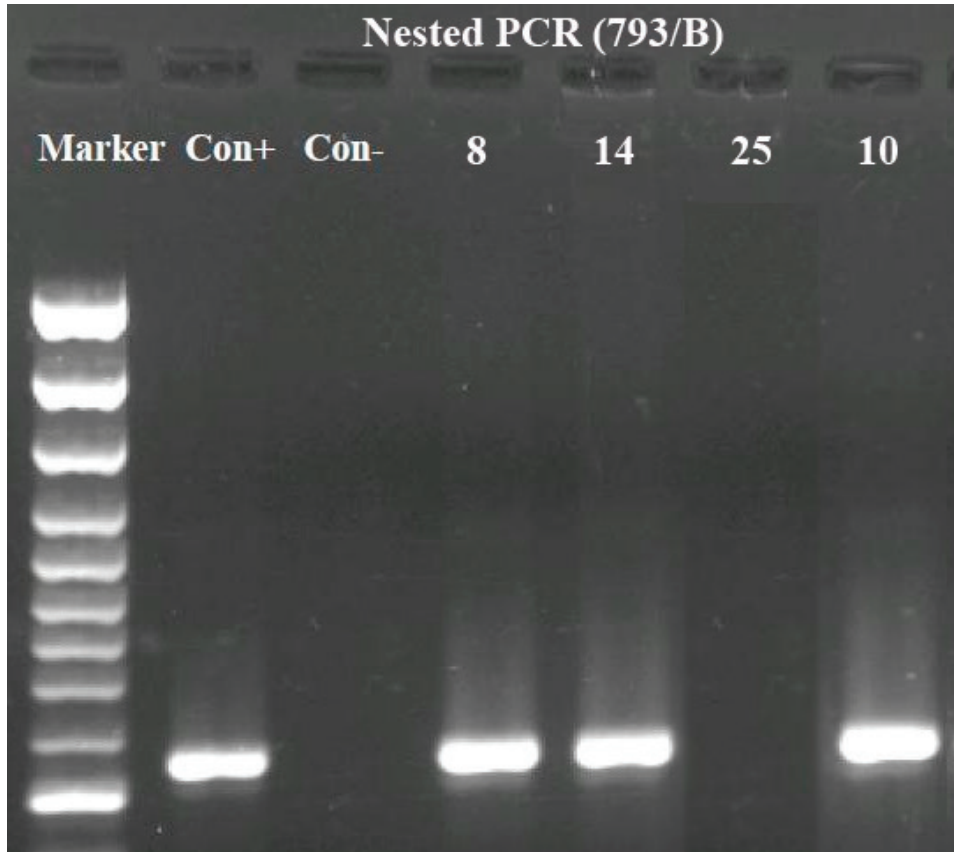
روش Nested PCR

به منظور تعیین سروتیپ‌های ویروس برونشیت عفونی در آزمایش RT-PCR از روش PCR آشیانه‌ای استفاده شد. در این روش محصول PCR ساخته شده در مرحله قبلی به نسبت یک به ده رقیق شد.

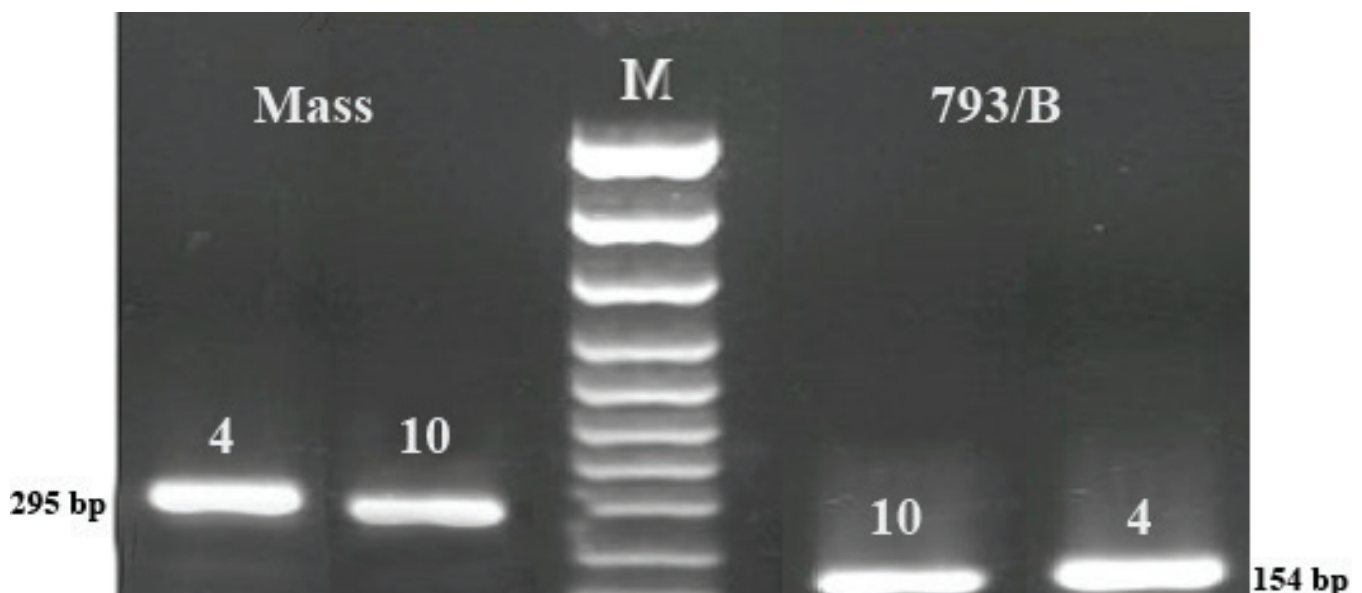
شکل (۱): الف- تکثیر باند ۴۶۴ bp جفت بازی در نمونه‌های کلینیکی چاهک‌های ۲، ۱۱، ۲۲ نشان‌دهنده تأیید بیماری برونشیت در گله و چاهک ۱۲ و ۵ عدم تأیید برونشیت ب- چاهک Con⁺: کنترل مثبت ج- چاهک Con⁻: کنترل نمونه‌های د- چاهک M: مارکر: 100 جفت بازی



شکل (۴): تکثیر باند ۱۵۴ bp جفت بازی در چاهک ۸، ۱۴، ۱۰، ۲۵ و ۱۰ سروتیپ ۴/۹۱ را در نمونه‌های کلینیکی نشان می‌دهد، چاهک Con⁺: کنترل مثبت، چاهک Con⁻: کنترل منفی، چاهک ۲۵: نمونه کلینیکی منفی، چاهک مارکر (M): ۱۰۰ جفت بازی



شکل (۵): نمونه‌های کلینیکی ۴ و ۱۰ در باند ۲۹۵ و باند ۱۵۴ جفت بازی تکثیر یافته که نشان‌دهنده حضور توامان سروتیپ‌های Mass و ۷۹۳/B توامان در گله بود.



استفاده شد که موردی از آلودگی با این سروتیپ مشاهده نگردید (۱۹). به منظور شناسایی ویروس B/۷۹۳ از ۴۰ واحد مرغداری گوشتی اطراف شیراز نمونه‌گیری شد که تعداد شش واحد آلوده به برونشیت عفونی بودند و در آزمایش Nested-PCR تعداد چهار واحد از نظر آلودگی به ویروس B/۷۹۳ ردیابی گردید (۹). قهرمانی و همکاران در سال ۲۰۱۱ تعداد ده جدایه از سالهای ۱۹۹۸-۲۰۰۸ را مورد بررسی فیلوژنی قرار دادند که سه جدایه متعلق به سروتیپ ماساچوست و هفت جدایه دیگر به سروتیپ B/۷۹۳ تعلق داشت (۴).

روز و همکاران در سال ۲۰۰۸ به مدت ۱۵ سال در اسپانیا بر روی ۱۶ جدایه ویروس کار کردند که چهار ژنوتیپ شناسایی گردید و همچنین نتایج نشان داد که سروتیپ غالب از ۴/۹۱ به Italy 02 تغییر یافته است (۱۲). همایونی‌مهر و همکاران در سال ۲۰۱۶ بر روی ده جدایه از نای، سکال تونسلی و بافت کلیه از فارم‌های گوشتی و تخم‌گذار ایران با پرایمرهای اختصاصی طراحی شده توانستند حداقل سه ژنوتیپ ویروس برونشیت شامل ماساچوست، B/۷۹۳ و واریانت ۲ را شناسایی نمایند (۶). حسینی و همکاران در سال ۱۳۹۲ از مجموع نه نمونه اخذ شده از مزارع طیور گوشتی دارای علائم تنفسی، شش مورد از نظر ویروس‌های تنفسی مثبت بودند. نتیجه آزمایش RT-PCR با پرایمرهای عمومی ویروس برونشیت عفونی در چهار مورد مثبت بود و در واکنش Nested PCR همه موارد از نظر سروتیپ‌های ۴/۹۱ و Mass تشخیص داده شد (۷).

در کشور اردن مطالعات زیادی توسط روسان و همکاران در سال ۲۰۰۸ بر روی شناسایی ملکولی عوامل بیماری‌زای تنفسی در گله‌های گوشتی انجام شد. نتایج نمونه‌گیری ۱۱۵ گله نشان داد که ۱۵ گله (۱۳ درصد) به نیوکاسل، ۱۷ گله (۱۱/۳ درصد) به برونشیت عفونی به تنهایی درگیر بودند در صورتی که درگیر شدن گله‌ها به دو عامل بیماری‌زا به ترتیب ۱۸ گله (۱۵/۷ درصد) به برونشیت عفونی و ویروس آنفلوآنزا، ۱۳ گله (۱۱/۳ درصد) به ویروس نیوکاسل و آنفلوآنزا، ۱۲ گله (۱۰/۴ درصد) به برونشیت عفونی و میکوپلازما گالی‌سپتیکوم، ۱۱ گله (۹/۶ درصد) به برونشیت عفونی و ویروس نیوکاسل، هفت گله (۶ درصد) پنوموویروس و میکوپلازما گالی‌سپتیکوم، شش گله (۵/۲ درصد) به نیوکاسل و میکوپلازما گالی‌سپتیکوم شناسایی شد و ویروس‌های برونشیت عفونی، نیوکاسل، پنوموویروس به صورت هم‌زمان در سه گله (۶/۲ درصد) تعیین هویت شد (۱۳). همان محقق و همکارانش در سال ۲۰۰۸ نیز از ۱۷۵ گله گوشتی در فاز حاد تنفسی سوآب نای جمع‌آوری و در نتایج مولکولی ۳۵/۲، ۳۱/۴ و ۸/۶ درصد گله‌ها به ترتیب به سروتیپ ماساچوست، ۴/۹۱ و D2۷۴ مبتلا بودند و در ۲۴/۸ درصد از گله‌های آزمایش شده دو سروتیپ شناسایی گردید (۱۴).

همچنین در مطالعه‌ی دیگری توسط محقق مذکور در سال ۲۰۰۹ نیز نمونه‌های سرمی ۷۰ گله بدون علائم تنفسی (۴۰ گله گوشتی، ۱۸ گله تخم‌گذار و ۱۲ گله مرغ مادر) از نظر برونشیت با آزمایش (HI) از نظر سه سویه ماساچوست (M۴۱)، D2۷۴ و ۴/۹۱ بررسی شد که ۵۱ گله (۲۵ گوشتی، ۱۵ تخم‌گذار و ۱۶ گله مادرگوشتی) از نظر برونشیت مثبت بود. ۹۲/۹ درصد گله‌های عاری از بیماری تنفسی دارای آنتی بادی به سویه M۴۱ مثبت در صورتی که ۹۰ درصد و ۶۱/۴ درصد از گله‌ها نسبت به ۴/۹۱ و D2۷۴ مثبت شدند از نظر مولکولی نیز در گله‌های دارای علائم

گوشتی، بیماری برونشیت ردیابی نشده است و شاید هم بخاطر این که نمونه‌ها ابتدا بعد از برداشت در ۲۰°C نگهداری شده و ممکن است ویروس از بین رفته و عملاً ردیابی ویروس امکان پذیر نبوده است. در خصوص وضعیت سویه‌های بیماری برونشیت در استانهای مختلف و در سایر کشورها، توسط محققین مطالعات مشابهی صورت گرفته است. صیفی آباد شاپوری و همکاران در سال ۱۳۸۱ نمونه‌های نای و ریه مشکوک به ویروس را به حفره آلانتوئیک تخم مرغ‌های جنین دار ۹ روزه تلقیح نمودند. از مجموع ۱۸۱ نمونه مورد آزمایش، ۲۷ نمونه ویروس برونشیت عفونی جدا شد و بر اساس نتایج از ۱۴ جدایه، ۱۲ جدایه متعلق به سویه Mass و دو جدایه متعلق به سویه B/۷۹۳ بود (۱۸).

صیفی و همکاران (۱۳۸۷) از مجموع ۳۰ گله طیور گوشتی دارای علائم تنفسی در استان فارس، ۱۲ گله (۴۰ درصد) ویروس برونشیت عفونی و در ۱۶ گله (۵۳/۳ درصد) ویروس آنفلوآنزای پرندگان شناسایی نمودند. نمونه‌های نای ۱۱ گله دارای سروتیپ ۴/۹۱ و یک گله نیز از نظر سروتیپ Mass مثبت بود. چهار گله دارای عفونت توام سروتیپ ۴/۹۱ برونشیت با تحت تیپ H9 بود (۱۷).

پور باقی و همکاران در سال ۲۰۱۱ با نمونه‌گیری از ۳۲ گله گوشتی با علائم مشکوک به برونشیت در استان فارس شیوع برونشیت را ۷۲ درصد گزارش دادند که ۷۴/۹ درصد گله‌ها آلوده به سروتیپ ۴/۹۱ و به سروتیپ ماساچوست ۲۱/۸ درصد بود. سروتیپ ویروس در هفت گله شناسایی نشد (۱۱).

نوری و همکاران در سال ۲۰۰۳ سوآب نای ۳۰ جوجه گوشتی از مرغداریهای استان فارس در سنین ۷-۸ هفتگی از نظر آلودگی به ویروس برونشیت عفونی با روش RT-PCR بررسی و سروتیپ نمونه‌های مثبت را به روش Multiplex RT-PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تعیین تیپ نمودند در این بررسی ۱۶ مورد سروتیپ ۴/۹۱ و یک مورد سروتیپ ماساچوست گزارش شد (۱۰). با بررسی گله‌های مبتلا به سندرم تنفسی و با تلفات بالا در استان اصفهان توسط غلامی آهنگران و همکاران در سال ۲۰۰۸ حضور سویه ۴/۹۱ ویروس برونشیت عفونی ردیابی شد (۵). جهان تیغ و همکاران در سال ۲۰۰۳ نمونه‌های ۱۱ گله مایکان تجاری در شهرستان زابل بعد از استخراج RNA با پرایمر عمومی XCE۲+ و XCE۲- جهت تکثیر باند برای اثبات برونشیت و از پرایمرهای MCE۱+، BCE۱+ و DCE۱+ جهت تکثیر باند به ترتیب برای سروتیپ ماساچوست، ۴/۹۱ و D2۷۴ استفاده کردند. نتایج نشان داد که چهار گله (۳۶/۳۶ درصد) از نظر برونشیت مثبت بوده و سروتیپ ماساچوست سروتیپ اختصاصی در گله‌های زابل بوده است (۸).

شوشتری و همکاران (۲۰۰۸) نمونه‌های کلیه، نای و ریه ۱۵۰ گله مرغ گوشتی کشور (استانهای تهران، آذربایجان، قزوین، اصفهان، سمنان، مرکزی، خراسان، فارس، کرمانشاه، لرستان، همدان، خوزستان) که دارای علائم تنفسی بودند را بعد از تلقیح به تخم مرغ SPF، مایع آلانتوئیک آنها را جمع‌آوری و با روش RT-PCR و سپس با Nested-PCR بررسی نمودند. ۱۰۸ گله (۷۲ درصد) از نظر برونشیت مثبت بود. ۵۷ گله (۵۲/۷ درصد) تنها به سویه B/۷۹۳، ۱۸ گله (۱۶ درصد) به سویه Mass، ۳۳ گله (۳۰/۵ درصد) توامان به سویه‌های B/۷۹۳ و Mass و در مجموع ۸۳ درصد گله به B/۷۹۳ آلوده بودند. در این مطالعه از پرایمر D2۷۴

منابع مورد استفاده

- 1- Aghakhan, S.M., N. Afshar., S. Rasoul Nejad Fereidouni., C. Marunesi and M. Khodashenas. 1994. Studies on avian viral infection in Iran. *Archives of Razi Institute* 44 (45): 1-10.
- 2- Cavanagh, D., K.Mawditt., P. Britton and C.J. Naylor. 1999. Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broiler using type- specific polymerase chain reaction. *Avian Pathology* 28:593-605.
- 3- Cavanagh, D. and J. R. Gelb. 2008. Infectious Bronchitis in Diseases of poultry Saif, Y.M., Fadly, A.M., Glisson, J.R, McDougald, L.R., Nolan, L.K., Swayne, D.E. 12th edition. Iowa State University Press, Ames, Iowa; 117-130.
- 4- Ghahremani, N., M.H. Bozorgmehri Fard., H. Shoushtari., R.Momayez., N.Sheikhi., A.Khoshzahmat. and F. EshratAbadi. 2011. Molecular analysis of infectious bronchitis virus isolated in Iran from 1998-2008. *Journal of Animal Veterinary Advance* 10: 2961-2967.
- 5- Gholami Ahahngaran, M., S.Charkhkar., A.H. Shoushtari, M.H. Bozorgmehrfard and F. Eshrat-Abadi. 2008. Molecular identification and typing of infectious bronchitis virus in respiratory syndrome cases of broiler chickens in Isfahan province. *Journal of Iranian Veterinary Science* 3: 469-76.
- 6- Homayounimehr, A., A. Pakbin , R. Momayyez and S.M. Fate-mi. 2016. Detection and identification of infectious bronchitis virus by RT-PCR in Iran. *Tropical Animal Health Production* 48(5):973-8.
- 7- Hosseini Aliabad, S.A., R. Momayez, M. Mahmoodzadeh and A. Yosefi. 2013. Detection of 793/B serotype of infection bronchitis virus from broiler flocks with respiratory signs in west of Mazandran province. *Journal of Veterinary Clinical Research* 4(2):91-97 [In Farsi].
- 8- Jahantigh, M., S. Salari and M. Hedayati. 2003. Detection of infectious bronchitis virus serotypes by reverse transcription polymerase chain reaction in broiler chickens Springer Plus, 2:36.
- 9- Mehrabanpour, M.J. and Sh. Emadi. 2016. Detection of Infectious Bronchitis Virus B/793 Serotype in Broiler Chicken in Shiraz by Molecular Method. *Journal of Veterinary Microbiology* 12(1):21-27 [In Farsi].
- 10- Nouri, A., K. Assasi and M.R. Seyfi-Abad Shapouri. 2003. Field study of Infectious Bronchitis Virus in broiler using type-specific RT-PCR. *Archives of Razi Institute* 55:1-10.
- 11- Poorbaghi, S.L., A. Mohammadi and K.Asasi. 2012. Molecular detection of avian Infectious Bronchitis Virus serotypes from clinically suspected broiler chicken flocks in Fars province of Iran. *Pakistan Veterinary Journal* 32(1): 93-96.

تنفسی ویروس برونشیت عفونی در ۱۶ گله گوشتی (۶۴ درصد)، هشت گله تخم گذار (۳۸ درصد) و در شش گله مادر (۵۴/۵۴ درصد) شناسایی شد (۱۵).

نمونه‌های نای ۴۶ گله گوشتی تجاری مشکوک به برونشیت در سه استان جنوب عراق با استفاده از پرایمرهای اختصاصی سروتیپ‌های ماساچوست، ۴/۹۱ و D۲۷۴ بررسی شد که ۳۴ (۷۴ درصد) از ۴۶ نمونه مبتلا به برونشیت و در آزمایش Nested PCR ۵۰ درصد و ۵/۸۹ درصد نمونه‌ها بترتیب به ۷۹۳/B و ماساچوست تعلق داشتند و ۴۴/۱۱ درصد از نمونه‌ها نیز از نظر سروتیپ شناسائی نشدند (۱۶).

نتیجه اینکه در مطالعه حاضر اکثر مرغداران اطلاع درستی از سویه های واکسینال برونشیت نداشتند ولی با توجه به اینکه علی رغم انجام واکسیناسیون برونشیت، گله آنها دچار بیماری گردیده بود، مدعی بودند. بنابر گفته این مرغداران در مورد تعدادی از گله‌های نمونه برداری شده، واکسن برونشیت به همراه واکسن نیوکاسل در یک روزگی و در محل کارخانه جوجه کشی به صورت اسپری مورد استفاده قرار گرفته بود که البته اطلاعی از سویه واکسینال مورد استفاده مشخص نبود. عدم واکسیناسیون مجدد گله در طول دوره پرورش و عدم استفاده از سایر سروتیپ‌های واکسینال می‌تواند سبب بروز بیماری شده باشد. این دسته از مرغداران که در منطقه پرخطر و درگیر برونشیت هستند تجویز هر دو واکسن Mass و ۷۹۳/B به صورت اسپری و آشامیدنی در طول دوره پرورش توصیه می‌شود. با وجود اینکه استفاده از دونوع سویه مختلف برای واکسیناسیون برونشیت سبب بالارفتن سطح ایمنی می‌گردد، اما توصیه نمی‌شود که دو واکسن Mass و ۷۹۳/B به صورت اسپری و توامان و در یک زمان مصرف شود. ژنوم ویروس برونشیت همانند آنفلوانزا سگمانته نیست اما وقتی که ویروس وارد سلول می‌گردد از ژنوم اولیه کپی برداری صورت می‌گیرد و هر تکه از ژنوم mRNA subgenomic ایجاد می‌کند که حالتی مشابه ژنوم قطعه آنفلوانزا است ایجاد می‌گردد. بنابراین وقتی یک سلول با دو ویروس آلوده می‌گردد ممکن است تبادل قطعات صورت گیرد و ژنوتیپ جدیدی ایجاد شود که به راحتی از سیستم دفاعی بدن فرار نموده و سبب شکست واکسیناسیون گردد. اما در منطقه ای که ویروس ۷۹۳/B چرخش کمتری دارد علاوه بر اسپری سویه Mass در جوجه های یک روزه و تجویز اسپری و یا آشامیدنی آن در طول دوره پرورش، استفاده از سویه واکسینال ۷۹۳/B در ۱۴-۱۰ روزگی به صورت اسپری و یا آشامیدنی نیز توصیه می‌شود. در صورت اطلاع مرغداران و رعایت استفاده از سویه های واکسینال در مناطق پرخطر و درگیر، مشاهده علائم کالبدگشائی بیماری برونشیت عفونی در گله‌های گوشتی که بیانگر شکست برنامه واکسیناسیون می باشد را می‌توان به عوامل دیگر نظیر حضور پادتن های مادری، بیماری تضعیف کننده سیستم ایمنی مثل ویروس گامبورو (IBD) و کم خونی عفونی جوجه ها (CAV)، وجود مایکوتوکسین‌ها و حمل و نقل و آماده سازی واکسن مرتبط نمود.

سیاسگزاری

نویسندگان مقاله بر خود لازم دانسته تا از اداره کل دامپزشکی استان گیلان جهت تأمین مالی این پروژه که با کد (۴-۵۸-۱۸-۰۰۱-۹۴۰۰۴۹) در موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی مصوب شده تقدیر و تشکر به عمل آورند.

- gar., M. Vasfi Marandi. and M. Hashemzadeh. 2016. Prevalence of avian infectious bronchitis virus in broiler chicken farms in south of Iraq, 2014 – 2015. *Veterinary Research Forum* 7(4):317-321.
- 17- Seifi, S., K. Asasi. and A. Mohammadi. 2009. A study of natural co-infection caused by avian influenza (H9 subtype) and infection bronchitis viruses in broiler chicken farms showing respiratory signs. *Online Journal of Veterinary Research* 13: 53-62.
- 18- Seifyabad Shapouri, M.R., M. Mayahi, S. Charkhkar, and K. Assasi. 2002. Serotype identification of recent Iranian isolates of infectious bronchitis virus by type-specific multiplex RT-PCR. *Archives of Razi Institute* 53: 79-85.
- 19- Shoushtari, A.H., R. Toroghi, R Momayez. and S. A. Pourbakhsh. 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.
- 12- Roser, D., J.Pujols., G.Ordonez., R. Porta. and N.Majo. 2008. Molecular epidemiology and evolution of avian infectious bronchitis virus in Spain over a fourteen-year period. *Journal of Virology* 374(1): 50-59.
- 13- Roussan, D.A., R. Haddad And G. Khawaldeh. 2008a. Molecular survey of respiratory pathogens in commercial broiler chicken flocks with respiratory diseases in Jordan. *Poultry science* 87:444- 448.
- 14- Roussan, D.A., W. S. Totanji and G.Y. Khawaldeh. 2008b. Molecular subtype of infectious bronchitis virus in broiler flocks in Jordan. *Poultry science* 7:661–664.
- 15- Roussan, D.A., G.Y. Khawaldeh. and I.A. Shaheen. 2009. Infectious bronchitis virus in Jordanian chickens: seroprevalence and detection. *Canadian Veterinary Journal* 50(1):77-80.
- 16- Seger, W., A. Ghalyanchi Langeroudi, V. Karimi. , O. Madad-

