DOI: 10.22092/vj.2017.111013.1322
شماره ۱۱۷ زمستان ۱۳۹۶
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده های بیولوژیک

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

• **یداله اسدپور (نویسنده مسئول)**
مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعي گیلان، رشت، ایران
• **سهراب عاقبتی**
اداره کل دامپزشکی استان گیلان، رشت، ایران
• **فرشته زاهدی**
اداره کل دامپزشکی استان گیلان، رشت، ایران
• **ابراهیم رحیم آبادی**
مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعي گیلان، رشت، ایران
• **عبدالحمید شوشتری**
بخش تحقیق و تشخیص بیماریهای طیور، موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج، ایران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۶-۰۴-۰۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶-۰۴-۲۴
Email: yasadpour@yahoo.com

چکیده

برونشیت عفونی طیور (IB) به وسیله کروناویروس ها ایجاد می‌شود. برونشیت یکی از عوامل مهم خسارت اقتصادی در طیور بوده که سبب درگیر شدن بیماریهای تنفسی، نفریت 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 (۷۰درصد) از تعدادکل ۲۸ گله گوشتی از نظر برونشیت عفونی تأیید شد. آزمایش Nested PCR جهت شناسائی سروتیپ‌های درگیر با استفاده از پرایمرهای اختصاصی سه سروتیپ Mass، B / ۷۹۳ و D۲۷۴ انجام شد. نتایج نشان داد که ۱۳ نمونه (۶۵درصد) متعلق به سروتیپ Mass، ۷ نمونه (۳۵ درصد) به سروتیپ B/ ۷۹۳ و در ۲ نمونه (۱۰درصد) 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 Department, Agricultural Research, Education and Natural Resources Center, Guilan, 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., Veterinary Department, Agricultural Research, Education and Natural Resources Center, Guilan, Iran; Shooshtari. A., Department of Research and Diagnosis of Poultry Disease, Razi Research Vaccine and serum Institute, 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 involveled 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 13samples (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 بیماری های اصلی گله‌های طیور در سراسر دنیا مي باشد. وجود سروتیپ‌های مختلفی که علیه یکدیگر ایمني کاملي ایجاد نمي کنند و همچنین ظهور مداوم واریانت های جدید، مشکل عمده ایجاد ایمني علیه ویروس برونشیت عفونی مي باشد. شیوع متعدد بیماری برونشیت عفونی اغلب در نتیجه عفونت با سویه هایي است که از نظر سرولوژی با سویه های واکسن متفاوت هستند (۳). بنابر این شناسائی ویروس‌های در حال چرخش در کشور و تعیین هویت مولکولی آنها ضروری بوده تا بر اساس آن مناسب ترین 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 عواملي نظیر نیوکاسل، آنفلوآنزای H۹N۲، مایکوپلاسموز و کلی باسیلوز به طور هم‌زمان بروز می‌کند که تفکیك آنها به سادگي قابل انجام نیست و نمی‌توان تمام ضایعات تنفسی را به یك عامل اختصاص داد. از آنجائي 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 مناسبي 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.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری

در این مطالعه توصیفی که به مدت دو سال ازخرداد 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 نمونه‌هائی 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 هرگله جمع‌آوری شد اما در آزمایش مولکولی نمونه‌های اخذ شده از هرگله پول شده و به عنوان یک نمونه محسوب گردید. لوله ها به آزمایشگاه منتقل و در دمای ۸۰ - درجه سانتیگراد نگهداری شد.

استخراج RNA

سوسپانسیون ۱۰درصد 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 Neucleic Acid Kit (Roche-Germany) مراحل استخراج انجام شد. ابتدا جهت تهیه محلول کاری (Work Solution) مقدار چهار میکرولیتر محلول آدنیلیك 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 ۱۰درصد نمونه‌های بافتی در يك تیوب ۱/۵ میلي لیتر مخلوط و در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد در حمام بن ماري به مدت ده دقیقه نگهداری شد. سپس ۱۰۰ میکرو لیتر ایزوپروپانل به تیوب اضافه و مخلوط گردید. يك 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 يك Collection tube جدید قرار داده و قبلي حذف شد. سپس ۵۰۰ میکرولیتر از Inhibition removal buffer بر روی فیلتر تیوب اضافه و به مدت یک دقیقه در دور ۸۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. فیلتر تیوب را برداشته و روی يك Collection tube جدید قرار داده و مجددا قبلي 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

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

نام ویروس	اندازه قطعه حاصل (bp)	توالی پرایمرها ('5- '3)
Infectious Bronchitis Virus (IBV)	۴۶۴	CACTGGTAATTTTTCAGATGG (Forward)
		CTCTATAAACACCCTTACA (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 ('5- '3)
Mass	۲۹۵	Forward Reverse	AATACACTTTTACGTTACAC CAGATTGCTTACAACCACC
۷۹۳/B (۴/۹۱)	۱۵۴	Forward Reverse	AGTAGTTTTGTGTATAAACCA CAGATTGCTTACAACCACC
D۲۷۴	۲۱۷	Forward Reverse	ATACAATTATATCAAACCAGC CAGATTGCTTACAACCACC

دور در ده ثانیه جهت خروج بافر شستشوی اضافی سانتریفوژ شد. فیلتر تیوب روی يك ميكروتيوب ۱/۵ ميلي ليتری عاري از نوكلئاز قرار داده شد و ۵۰ ميكروليتر 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 كافي اسيد نوكلئيك RNA و همينطور عاري بودن از ناخالصیهای پروتئینی نمونه‌ها، قرائت جذب نوری با دستگاه اسپکتوفتومتري در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر انجام شد که در مورد RNA میزان ۲-۱/۸ قابل قبول است. سپس به منظور تعیین مقدار نمونه برای انجام واکنش RT ضریب OD محاسبه و میزان نمونه بر اساس میکرولیتر محاسبه شد.

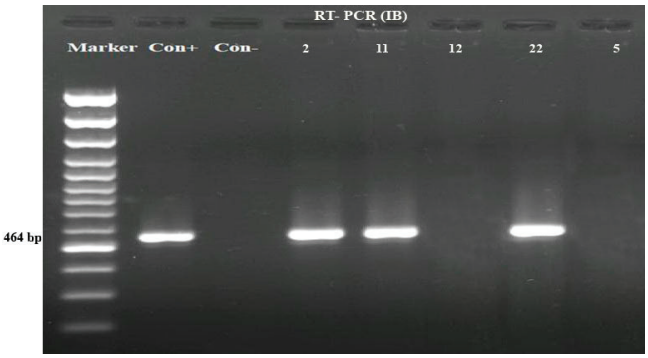
روش RT-PCR

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 کاواناق 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 چاهك‌های ۲، ۱۱، ۲۲ نشان دهنده تأیید بیماری برونشیت در گله و چاهك ۱۲ و ۵ عدم تأیید برونشیت ب- چاهک Con^+: کنترل مثبت ج - چاهک Con^-: کنترل نمونه‌های د- چاهک M مارکر: 100 جفت بازی



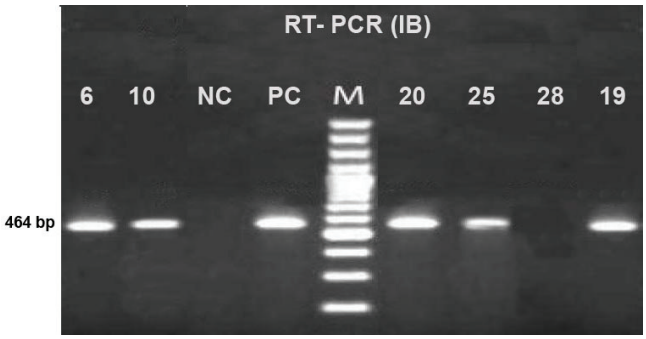
نتایج

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 ۱و شکل ۲،۱). با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، آزمایش Nested PCR برای سه سروتیپ D۲۷۴، Mass، ۷۹۳/B انجام شد (جدول ۲). نتایج نشان داد که ۱۳ نمونه (۶۵ درصد) سروتیپ Mass (شکل۳)، هفت نمونه سروتیپ ۷۹۳/B (۳۵ درصد)(شکل۴) و در دو گله (۱۰ درصد) هر دو سروتیپ Mass و ۷۹۳/B (شکل ۵) به طور توامان ردیابی شدند و در هیچکدام از نمونه‌ها سروتیپ D۲۷۴ شناسائی نشد.

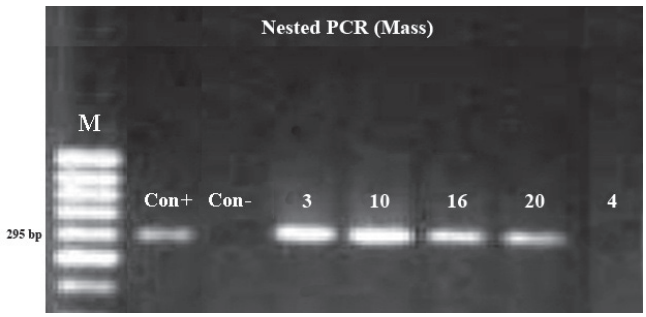
بحث

در مطالعه حاضر تعداد ۲۸ گله که از نظر علائم کالبد گشائی مشکوك به درگیري 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 گشائي با سایربیماریهای ویروسی تنفسی مثل آنفلوانزا، نیوکاسل و پنوموویروس و تداخل چند بیماری در گله‌های

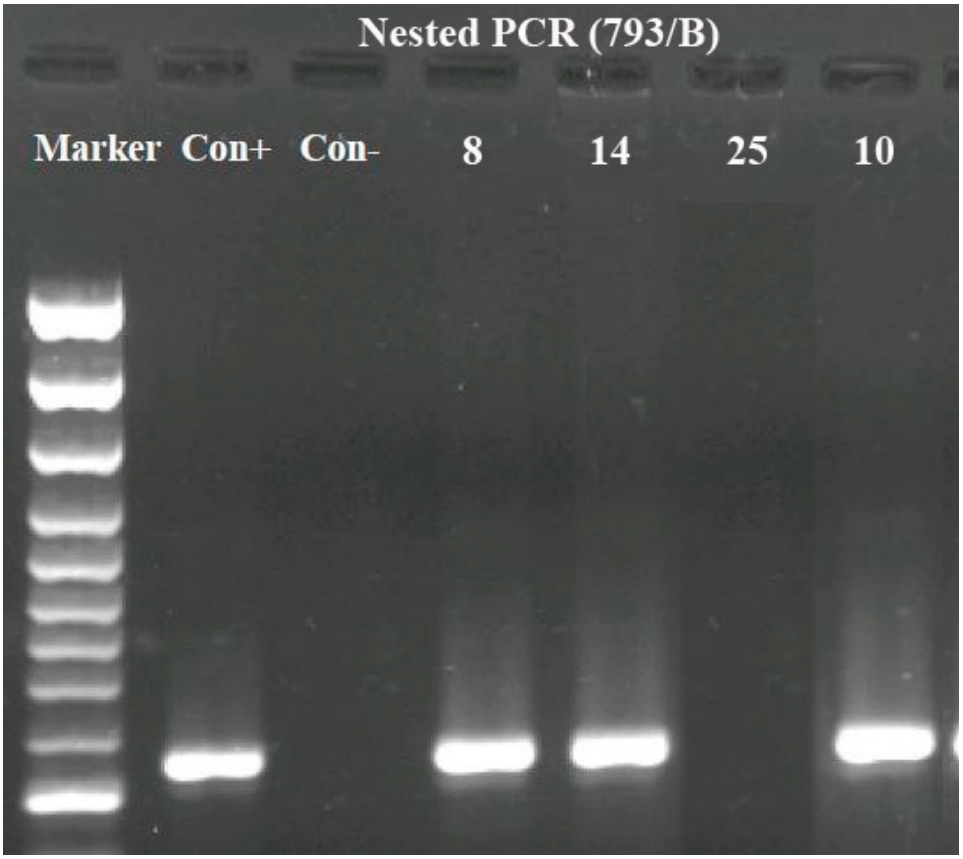
شکل (۲): الف- تکثیر باند ۴۶۴ bp جفت بازی در نمونه‌های کلینیکی چاهك‌های ۶، ۱۰،۲۰، ۱۹،۲۵ نشان‌دهنده تأیید بیماری برونشیت در گله و چاهك ۲۸ عدم تأیید برونشیت ب - چاهك PC: کنترل مثبت ج – چاهک NC : کنترل نمونه‌های د- چاهک M: مارکر: ۱۰۰ جفت بازی



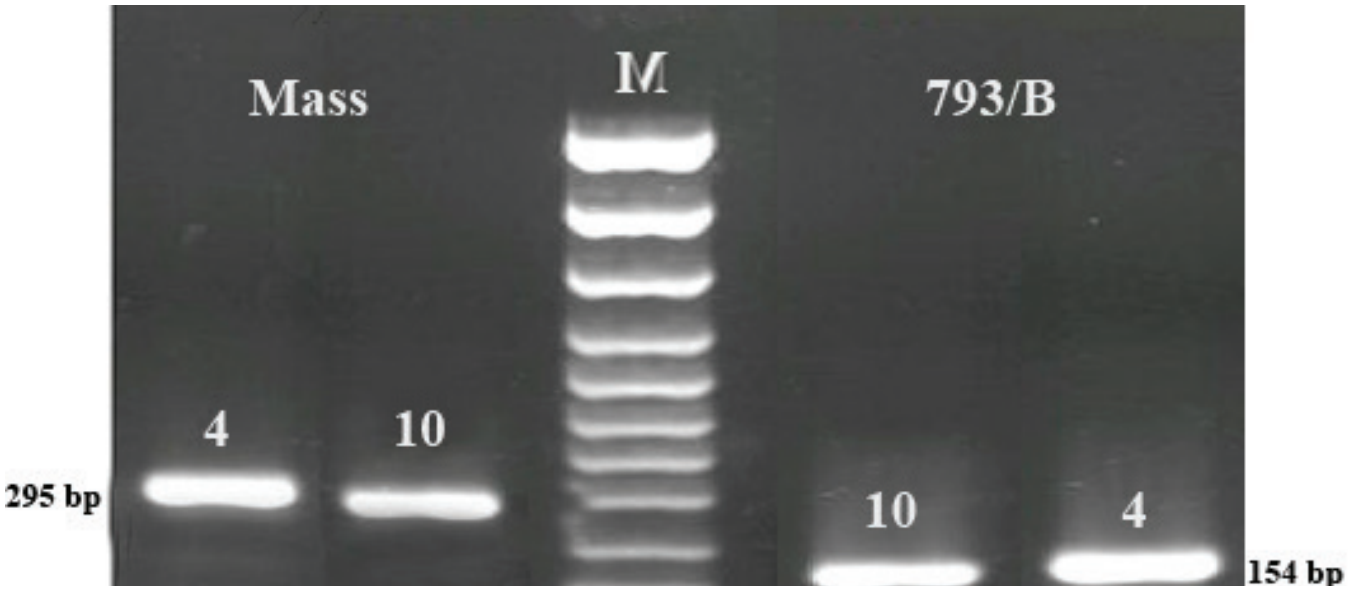
شکل (۳): تکثیر باند ۲۹۵ bp جفت بازی در چاهک ۳، ۱۰،۱۶ و ۲۰: سروتیپ Mass را در نمونه‌های کلینیکی نشان می‌دهد چاهک ۴: نمونه کلینیکی منفی، چاهک Con^+: کنترل مثبت، چاهک Con^-: کنترل منفی، چاهک M: مارکر ۱۰۰ bp جفت بازی



شکل (۴): تکثیر باند bp ۱۵۴ جفت بازی در چاهك ۸، ۱۴، ۱۰سروتیپ ۴/۹۱ را در نمونه‌های کلینیکی نشان می‌دهد، چاهک Con^+: کنترل مثبت، چاهک Con^-: کنترل منفی، چاهک ۲۵: نمونه کلینیکی منفی، چاهك 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.



گوشتی، بیماری برونشیت ردیابي نشده است و شاید هم بخاطر این که نمونه‌ها ابتدا بعد از برداشت در ۲۰°C- نگهداری شده و ممکن است ویروس ازبین رفته و عملاً ردیابي ویروس امکان پذیر نبوده است. در خصوص وضعیت سویه های بیماری برونشیت در استانهای مختلف و در سایرکشورها، توسط محققین مطالعات مشابهی صورت گرفته است.

صیفی آباد شاپوري و همکاران در سال ۱۳۸۱ نمونه‌های ناي و ریه مشکوك به ویروس را به حفره آلانتوئیک تخم مرغ های 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 ۷۹۳/B بود (۱۸).

سیفی 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 آنفلوانزای پرندگان شناسایی نمودند. نمونه‌های ناي 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 H۹ بود (۱۷).

پور باقی و همکاران در سال ۲۰۱۱ با نمونه‌گیری از۳۲ گله گوشتی با علائم مشکوک به برونشیت در استان فارس شیوع برونشیت را ۷۲ درصد گزارش دادند که۷۴/۹ درصد گله ها آلوده به سروتیپ ۴/۹۱ و به سروتیپ ماساچوست ۲۱/۸ درصد بود. سروتیپ ویروس در هفت گله شناسائی نشد (۱۱).

نوری و همکاران در سال ۲۰۰۳ سوآب نای ۳۰ جوجه گوشتی از مرغداریهای استان فارس درسنین ۸-۷ 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 موردسروتیپ 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 سال۲۰۰۸ حضور سویه ۴/۹۱ ویروس برونشیت عفونی ردیابی شد (۵).

جهان تیغ و همکاران در سال ۲۰۰۳ نمونه‌های ۱۱ گله ماکیان 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 D۲۷۴ 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، ناي و ریه ۱۵۰ گله مرغ گوشتی کشور (استانهای تهران، آذربایجان، قزوین، اصفهان، سمنان، مرکزي، خراسان، فارس، کرمانشاه، لرستان، همدان، خوزستان) که دارای علائم تنفسی بودند را بعد از تلقیح به تخم مرغ SPF، مایع آلانتوئیك 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 ۷۹۳/B، ۱۸ گله (۱۶ درصد) به سویه Mass، ۳۳ گله (۳۰/۵ درصد) توامان به سویه‌های ۷۹۳/B و Mass و در مجموع ۸۳ درصد گله به ۷۹۳/B آلوده بودند. در این مطالعه از پرایمر D۲۷۴ استفاده شد که موردي از آلودگی با این سروتیپ مشاهده نگردید (۱۹).

به منظور شناسایی ویروس ۷۹۳/B از ۴۰ واحد مرغداري گوشتی اطراف شیراز نمونه‌گیري شد که تعداد شش واحد آلوده به برونشیت عفونی بودند و در آزمایش Nested-PCR تعداد چهار واحد از نظر آلودگی به ویروس ۷۹۳/B ردیابي گردید (۹). قهرمانی و همکاران در سال ۲۰۱۱ تعداد ده جدایه از سالهای ۱۹۹۸-۲۰۰۸ را مورد بررسی فیلوژني قرار دادند که سه جدایه متعلق به سروتیپ ماساچوست و هفت جدایه دیگر به سروتیپ ۷۹۳/B تعلق داشت (۴).

روزر 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 تونسیل و بافت کلیه از فارم‌های گوشتی و تخم گذار ایران با پرایمرهای اختصاصی طراحی شده توانستند حداقل سه ژنوتیپ ویروس برونشیت شامل ماساچوست، ۷۹۳/B و واریانت ۲ را شناسائی 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 عمومي ویروس برونشیت عفونی در چهار مورد مثبت بود و در واکنش Nested PCR همه موارد از نظر سروتیپ های ۴/۹۱ و Mass تشخیص داده شد (۷).

در کشوراردن مطالعات زیادي توسط روسان و همکاران در سال ۲۰۰۸ بر روی شناسائی ملکولی عوامل بیماری زای تنفسی در گله‌های گوشتی انجام شد. نتایج نمونه‌گیری ۱۱۵ گله نشان دادکه ۱۵ گله (۱۳درصد) به نیوکاسل، ۱۷ گله (۱۱/۳ درصد) به برونشیت عفونی به تنهائی درگیر بودند در صورتی که درگیر شدن گله ها به دو عامل بیماری زا به ترتیب ۱۸ گله (۱۵/۷ درصد) به برونشیت عفونی و ویروس آنفلوانزا، ۱۳ گله (۱۱/۳ درصد) به ویروس نیوکاسل و آنفلوانزا، ۱۲ گله (۱۰/۴ درصد) به برونشیت عفونی و مایکوپلاسما گالی‌سپتیکوم، ۱۱ گله (۹/۶ درصد) به برونشیت عفونی و ویروس نیوکاسل، هفت گله (۶ درصد) پنوموویروس و مایکوپلاسماگالی سپتیکوم، شش گله (۵/۲ درصد) به نیوکاسل و مایکوپلاسما گالی‌سپتیکوم شناسائی 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 گله ها به ترتیب به سروتیپ ماساچوست، ۴/۹۱ و D۲۷۴ 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 تخم گذار و ۱۲ گله مرغ مادر) از نظر برونشیت با آزمایش (HI) از نظر سه سویه ماساچوست (M۴۱)، D۲۷۴ و ۴/۹۱ بررسی شد که ۵۱ گله (۲۵ گوشتی، ۱۵ تخم گذار 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 گله ها نسبت به ۴/۹۱ و D۲۷۴ مثبت شدند از نظر مولکولی نیز در گله‌های دارای علائم

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 ولي با توجه به اینکه علي رغم انجام واکسیناسیون برونشیت، گله آنها دچار بیماری گردیده بود، مدعی بودند. بنابر گفته این مرغداران در مورد تعدادی از گله‌های نمونه برداري شده، واکسن برونشیت به همراه واکسن نیوکاسل در يك روزگي ودر محل کارخانه جوجه کشي به صورت اسپري مورد استفاده قرارگرفته بودکه البته اطلاعي 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 هردو 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 می گردد، 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 می گردد از ژنوم اولیه کپی برداری صورت می گیرد و هر تکه از ژنوم mRNA subgenomic ایجاد می کند که حالتی مشابه ژنوم قطعه قطعه آنفلوانزا است ایجاد مي گردد. بنابراین وقتی یک سلول با دو ویروس آلوده می گردد ممکن است تبادل قطعات صورت گیرد و ژنوتیپ جدیدي 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 صورتپ 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.

سپاسگزاری

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

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. Bozorgmehrifard 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. Fatemi. 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. Mahmodzadeh 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, SL., 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.

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. Madadgar., 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.