موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی

اداره کل دامپزشکی خراسان رضوی

وزارت جهاد کشاورزی

عنوان طرح پژوهشی:

تعیین سروتیپ های در گردش ویروس برونشیت عفونی

در مزارع طیور صنعتی استان خراسان رضوی

دستگاه سفارش دهنده (کارفرما):

اداره کل دامپزشکی خراسان رضوی

مجری طرح پژوهشی:

دکتر سید الیاس طباطبائی زاده

استادیار مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی مشهد، ایران

۱۳۹۸

بسم الله الرحمن الرحيم

اداره کل دامپزشکی خراسان رضوی

موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی

عنوان طرح پژوهشی

تعیین سروتیپ های در گردش ویروس برونشیت عفونی در مزارع طیور صنعتی استان خراسان رضوی

دستگاه سفارش دهنده (کارفرما):

اداره کل دامپزشکی خراسان رضوی

مجری طرح:

دکتر سید الیاس طباطبائی زاده

استادیار مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران

همکاران طرح:

دکتر رضا طرقی، دکتر ناصر مرگان ازغدی، دکتر حمیدرضا فرزین، دکتر مجید جمشیدیان مجاور، دکتر مریم ترابی، دکتر محمود قربانزاده، دکتر جواد اعلمی

۱۳۹۸

به نام آفریننده

که به قلم و آنچه می نویسند سوگند یاد کرد.

علم و تحقیق کلید قطعی پیشرفت کشور است . ((مقام معظم رهبری))

پژوهش، فرآیند تولید علم است و تولید فناوری به کارگیری یافته های پژوهشی است و تاثیرگذاری پژوهش وفناوری درتمدن کنونی دنیا و درآینده ی آن بسیار روشن و بدیهی است. ارتقای جایگاه پژوهش با افزایش اعتماد به نفس ، اراده ی مستقل و پذیرش خطر تجربه ، در بوجود آمدن ساختارهای دانایی محور و تقویت این مهم نقش محوری دارد.

نظر به اسناد بالادستی توسعه علمی و نیز به جهت رفع نیازهای اجرایی، با استعانت از خداوند متعال طرح پژوهشی

((تعیین سروتیپ های در گردش ویروس برونشیت عفونی در مزارع طیور صنعتی استان خراسان رضوی))

در راستای اجرای دستورالعمل انجام طرح های پژوهشی تکالیف قانون بودجه سال ۱۳۹۷ و پس از پیشنهاد موضوع فوق در کارگروه تخصصی پژوهش ، فن آوری و نوآوری و تایید شورای برنامه ریزی استان خراسان رضوی به انجام رسیده است .

بدین وسیله از کلیه دست اندرکاران اجرای طرح شامل مجری گرامی آقای دکتر سید الیاس طباطبایی زاده عضو محترم هیات علمی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی ، دستگاههای اجرایی از جمله کمیته آموزش و پژوهش دامپزشکی استان ، دبیرخانه محترم کارگروه آموزش ، پژوهش ، فناوری و نوآوری خراسان رضوی، دانشگاه محترم فردوسی مشهد، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شمال شرق کشور، سازمان مدیریت و برنامه ریزی خراسان رضوی و استانداری محترم خراسان رضوی و نیز همکاران عزیز اداره کل دامپزشکی خراسان رضوی که به هر نحوی در مراحل مختلف بررسی ، تصویب ، نمونه برداری، آزمون ، پردازش ، تحلیل ، نتیجه گیری و در نهایت تدوین کتابچه حاصل تلاش و پشتیبانی نموده اند ، تقدیر و تشکر می گردد.

امید است اجرای تحقیقات کاربردی دستمایه مناسبی در راستای کنترل و پیشگیری از بیماریهای مشترک بین انسان و دام ، بیماریهای واگیر دامی و تامین امنیت غذایی از راه کنترل فرآورده های خام دامی، به منظور اجرای بهتر خدمت رسانی به مردم مهربان کشور عزیزمان جمهوری اسلامی ایران ایجاد کند .

دکتر احمد شریعتی

مدیر کل دامپزشکی خراسان رضوی

چکیده

برونشیت عفونی طیور یکی از بیماریهای تنفسی مهم در ماکیان است. ویروس برونشیت عفونی با درگیر کردن دستگاه های تنفس، کلیه و تولید مثل در طیور گوشتی و تخمگذار منجر به کاهش تولید گوشت، ایجاد مرگ و میر، کاهش کمی و کیفی تولید تخم مرغ و در نتیجه خسارات اقتصادی فراوان در صنعت پرورش طیور می شود. با توجه به شدت بالای مسری بودن بیماری اجرای اقدامات پیشگیری کننده شامل واکسیناسیون و حفظ امنیت زیستی دارای اهمیت زیادی در کنترل بیماری است. برای انجام ایمن سازی مؤثر انتخاب سویه های واکسینال مناسب می تواند بر اساس سروتیپ های بیماریزای در گردش در فیلد انجام شود. در این تحقیق مشاهده گردید که ویروس های در گردش مزارع مرغ تجاری در استان خراسان رضوی غالبا از لینیج های Gl-23، Gl-13 و Gl-19 می باشند. آنالیز فواصل تکاملی نشان داد که بیشترین فاصله تکاملی بین ویروس های سال ۲۰۱۹ و ۲۰۱۰ وجود دارد که نشان دهنده تغییرات زیاد ویروس در این فاصله زمانی است. بر اساس میزان شباهت توالی نوکلئوتیدی ژن S1 مربوط به این ویروس ها با واکسن 793B می توان نتیجه گرفت که استفاده از ترکیب دو واکسن سروتیپ های Mass و 793B جهت واکسیناسیون گزینه مناسبی است. همچنین اجرای قویتر برنامه های مدیریتی از قبیل امنیت زیستی، تجدید جمعیت گله با جوجه های همسن به دنبال تمیز کردن و ضد عفونی کردن مرغداری ها و نیز وسایل و تجهیزات توصیه می شود.

کلمات کلیدی: ژنوتایپینگ، ویروس برونشیت عفونی، گله های مرغ تجاری، استان خراسان رضوی

فهرست مطالب

۱. مقدمه ۱

۱,۱. معرفی و تاریخچه بیماری ۱

۱,۲. طبقه بندی ویروس ۴

۱,۳. شکل و ساختار ویروس ۵

۱,۴. طبقه بندی سویه ها ۵

۱,۵. طبقه بندی سروتیپی ۶

۱,۶. طبقه بندی ژنتیکی ۷

۱,۷. سویه های IBV و تکامل ویروس ۸

۱,۸. تشخیص و تعیین تیپ ویروس برونشیت عفونی با روش های مبتنی بر توالی اسید نوکلئیکی ۹

۱,۹. میزبان های ویروس ۱۰

۱,۱۰. روش های انتقال، حامل ها و ناقل های ویروس ۱۰

۱,۱۱. دوره انکوباسیون ۱۲

۱,۱۲. علائم بالینی ۱۲

۱,۱۳. میزان شیوع و مرگ و میر ۱۴

۱۴,۱. تعریف مسئله ، مشکل و سوالات تحقیق ۱۴

۱۵,۱. اهداف طرح ۱۵

۱۶,۱. مسئله اساسی، اهمیت، ضرورت و توجیه اقتصادی و اجتماعی طرح پژوهشی ۱۵

۱۷,۱. سوابق تحقیق در داخل و خارج از کشور ۱۶

۲. مواد و روش کار ۲۰

۱,۲. جامعه مورد مطالعه و نمونه گیری از گله ها ۲۰

۲,۲. آماده سازی نمونه ها و استخراج RNA ویروسی ۲۰

۳,۲. واکنش رونوشت برداری معکوس (RT) ۲۱

۴,۲. واکنش های PCR و Nested PCR ۲۱

۵,۲. تعیین توالی نوکلئوتیدی ۲۲

۶,۲. فیلوژنتیک آنالیز ۲۲

۳. نتایج و بحث ۲۳

۴. منابع ۳۴

۱. مقدمه

۱,۱. معرفی و تاریخچه بیماری

برونشیت عفونی طیور[۱] (IB) یک بیماری حاد با واگیری بالا، درگیرکننده دستگاه تنفسی فوقانی و مهم از نظر اقتصادی برای ماکیان و سایر پرندگان است که عامل ایجاد کننده آن کروناویروس پرندگان به نام ویروس برونشیت عفونی طیور[۲] (IBV) می باشد. ویروس برونشیت عفونی طیور دارای گسترش جهانی است و از طریق تنفسی یا تماس مستقیم با پرندگان آلوده و نیز از طریق بستر، تجهیزات و سایر وسایل آلوده به ویروس می تواند از پرنده ای به پرنده ای دیگر منتقل شود. انتقال عمودی ویروس از طریق جنین گزارش نشده است اما سطح پوسته تخم مرغ ها می تواند به دنبال دفع ویروس از طریق مجرای تخمدان و سیستم گوارشی با ویروس آلوده شود. میزان بالای تکثیر ویروس منجر به جهش های ژنتیکی و نوترکیبی ژنومی می شود که نتیجه آن ظهور سروتیپ های جدید ویروس است که فاقد حفاظت متقاطع هستند و کنترل بیماری با واکسیناسیون را با مشکل مواجهه می کنند. برونشیت عفونی تأثیر شناخته شده ای بر سلامت انسان ندارد.

عفونت با IBV می تواند در مرغ های جوان منجر به بیماری قسمت فوقانی دستگاه تنفسی شود. علاوه بر علائم تنفسی، افت وزن گیری و کاهش ضریب تبدیل غذایی در مرغ های گوشتی مشاهده می شود. همچنین عفونت با

---

[۱] avian infectious bronchitis

[۲] infectious bronchitis virus

ویروس می تواند حساسیت مرغ های گوشتی در برابر عفونت های فرصت طلب ثانویه را افزایش دهد و در نهایت منجر به التهاب کیسه های هوایی، پریکاردیت و پری هپاتیت شود. شیوع بیماری تقریبا همیشه ۱۰۰٪ است، اما میزان مرگ و میر بسته به سن و وضعیت ایمنی پرندگان، سویه ویروس و درگیری با عفونت های ثانویه ویروسی و باکتریایی بین ۰٪ تا ۸۲٪ متغیر است. برخی از سویه های IBV نفروپاتوژنیک هستند و در گله های حساس به دنبال نارسایی کلیوی می توانند منجر به میزان بالای مرگ و میر شوند.

عفونت با ویروس در مرغ های مادر و تخم گذار می تواند منجر به کاهش تولید تخم مرغ تا ۷۰٪ و افت کیفیت پوسته تخم مرغ شود. ویروس می تواند در مجرای تخمدان تکثیر شود و در مرغ های نابالغ ماده و پولت ها منجر به آسیب دائمی شود که نتیجه آن کاهش تولید تخم مرغ در دوره زمانی طولانی و ایجاد مرغ های تخم گذار کاذب خواهد بود. در نژادهایی که دارای تخم مرغ با پوسته رنگی هستند ممکن است پوسته بی رنگ و آلبومن آبکی شود. تولید تخم مرغ در بیشتر موارد به میزان طبیعی بر می گردد اما در گله های با حساسیت زیاد ممکن است کاهش تولید همیشگی باشد.

برونشیت عفونی برای اولین بار در سال ۱۹۳۰ در ایالات متحده در داکوتای شمالی مشاهده شد و اولین توصیف مستند از بیماری توسط شالک و هاون در سال ۱۹۳۱ منتشر شد. در ابتدا بیماری برونشیت عفونی به عنوان بیماری مرغ ها شناخته شد. توضیحات اولیه این بیماری نشان داد که این بیماری توسط یک عامل قابل فیلتر (ویروس) ایجاد شده است که در واقع ممکن است فرم خفیف لارنگوتراکیت عفونی (ILT)[۱] باشد، اما در سال ۱۹۳۶، بیچ و شالم با استفاده

[۱] infectious laryngotracheitis

از مطالعات خنثی سازی ویروس در مرغ ها نشان دادند که ویروسی که باعث بروز IB شده است با ویروس ایجاد کننده ILT متفاوت است. مدتی بعد ویروس در گله های مرغ نیمه بالغ و تخمگذار مشاهده شد.

یک کشف مهم در سال ۱۹۳۷ اتفاق افتاد که بودوت و هادسون دریافتند که IBV می تواند در حفره آلانتیک تخم مرغ های جنین دار تکثیر شود. در سال ۱۹۴۱، دلاپلان و استوارت اظهار داشتند که IBV تکثیر شده در تخم مرغ های جنین دار ممکن است دارای قابلیت القای پاسخ های ایمنی باشد و این مشاهده منجر به اولین گزارش واکسن IB توسط فان روکل و همکاران شد. اولین واکسن IBV در ایالات متحده با استفاده از سویه M-41 مربوط به فان روکل تولید شد که ویروس سروتیپ Mass است و در سال ۱۹۴۱ در دانشگاه ماساچوست جدا شده است. این سویه ویروس به عنوان سویه مادر واکسن های نوع M41 یا Mass 41 می باشد که امروزه در ایالات متحده استفاده می شود.

بیماری برونشیت عفونی طیور در اوایل دهه ۱۹۶۰ در هلند تشخیص داده شد و این منجر به ایجاد واکسنی از نوع Mass موسوم به سویه H شد ("H" به معنای نام کشاورز [Huyben] است که ویروس از مرغهای وی جدا شده است). واکسنهای حاصل معروف به H120 و H52 به زودی مورد استفاده قرار گرفتند و واکسن H120 احتمالاً متداول ترین واکسن IBV است که در سراسر جهان مورد استفاده قرار گرفته است.

یکی دیگر از کشف های مهم مربوط به کنترل ویروس توسط یونگهر در سال ۱۹۵۶ صورت گرفت. او گزارش داد که IBV جدا شده در کانکتیکات در برابر جدایه Mass در مرغهای چالش شده حفاظت متقاطع ایجاد نمی کند. این یافته منجر به آگاهی از وجود سروتیپهای مختلف ویروس شد و اینکه آنها در برابر یکدیگر حفاظت متقاطع ایجاد نمی کنند.

در دهه ۱۹۶۰ کشف شد که IBV می تواند در رشد ویروس بیماری نیوکاسل (NDV) در تخم مرغ های جنین دار و کشت سلولی اختلال ایجاد کند. این یافته از این جهت مهم بود که در اغلب موارد واکسن های IBV و NDV با هم تجویز می شوند. همچنین در دهه ۱۹۶۰، وینترفیلد و هیچنر گزارش دادند که برخی از سویه های IBV می توانند باعث سندرم نفریت-نفروز شوند و سویه های نفروپاتوژنیک Gray و Holte جدا شدند. بیشتر مطالعات در دهه ۱۹۷۰ و ۱۹۸۰ شامل شناسایی سروتیپ ها و واریانت های مختلف ویروس با آزمایش خنثی سازی سرم در تخم های جنین دار بود.

پیشرفت قابل توجه در تشخیص IBV در دهه ۱۹۹۰ رخ داد وقتی چندین آزمایشگاه شروع به شناسایی نوع IBV با استفاده از تکنیک های مولکولی کردند. این امر باعث شناسایی سریع بسیاری از جدایه ها و مقایسه ویروس ها در سراسر جهان شد. متأسفانه، پیشرفت در تولید واکسن از روش تخفیف حدت ویروس با پاساژ در تخم مرغ های جنین دار فراتر نرفته است.

۲,۱. طبقه بندی ویروس

ویروس برونشیت عفونی یک گاماکرونا‌ویروس از تحت خانواده کرونا‌ویرینه و خانواده کرونا‌ویریده است. خانواده کرونا‌ویریده شامل ۲ تحت خانواده به نام های کرونا‌ویرینه و تورو ویرینه است. تحت خانواده کرونا‌ویرینه شامل ۳ جنس آلفا کرونا‌ویروس، بتا کرونا‌ویروس و گاما کرونا‌ویروس است. آلفا کرونا‌ویروس ها و بتا کرونا‌ویروس ها مربوط به پستانداران هستند. گاماکرونا‌ویروس ها شامل کرونا‌ویروس های پرندگان IBV و TCoV و همچنین کرونا‌ویروس های جدا شده از سایر گونه های پرندگان می باشند.

۳,۱. شکل و ساختار ویروس

ویروس برونشیت عفونی ویروسی دارای پوشش با شکل گرد یا چند شکلی می باشد. پارتیکل ویروس تقریبا ۱۲۰ نانومتر قطر دارد و در سطح آن برجستگی های گرزی شکل تحت عنوان اسپایک ها با طول حدود ۲۰ نانومتر قرار دارد.

ژنوم ویروس RNA تک رشته ای با سنس مثبت با طول حدود ۲۷/۵ تا ۲۸ کیلو باز می باشد. ویریون ها از پروتئین های ساختاری به نام های اسپایک (S)، انولوپ (E)، ممبرین (M) و نوکلئوکپسید (N) تشکیل شده اند. گلایکوپروتئین S پروتئینی ترایمر است و از دو زیرواحد S1 و S2 به ترتیب با طول حدود ۵۲۰ و ۶۲۵ اسید آمینه تشکیل شده است. گلایکوپروتئین S پروتئین غشایی نوع ۱ است که شامل دومین اتصال به گیرنده، ناحیه شکست، دومین پرکویل، پپتید فیوژن، نواحی تکرار های هفتایی، دومین اینتر هلیکال، دومین داخل غشایی و دم سیتوپلاسمی می شود. این گلایکوپروتئین در اتصال به سلول میزبان، فیوژن غشاء سلولی با ویروس و ورود ویروس به داخل سلول میزبان دارای نقش است. آنتی بادی های خنثی کننده ویروس و ممانعت کننده از هماگلوتیناسیون در برابر ناحیه انتهای آمینی اسپایک تولید می شوند.

٤,۱. طبقه بندی سویه ها

روش های زیادی برای تمایز و طبقه بندی جدایه های IBV استفاده شده است و این روش ها کاملاً مورد مقایسه قرار گرفته است. طبقه بندی سروتیپی و اخیرا طبقه بندی ژنوتیپی بر اساس توالی پروتئین S، معمولترین روش برای طبقه بندی سویه ها می باشد. طبقه بندی سروتیپی شامل قرار دادن ویروس در معرض آنتی بادی های خنثی کننده است، در حالیکه طبقه بندی ژنوتیپی شامل بررسی توالی پروتئین S1 می باشد. با اینکه نمی توان آنرا بعنوان یک قانون

همیشگی قلمداد نمود اما سویه های ویروس که توالی اسید آمینه ژن S1 بیش از ۹۰٪ مشابهت دارد (ژنوتیپ) از نظر سرولوژیکی مرتبط هستند (سروتیپ).

در طی سالها، استانداردی برای نامگذاری سویه های IBV وجود نداشته است، اما اخیراً دانشمندان سیستم پیشنهادی توسط کاوانا در سال ۲۰۰۱ را پذیرفته اند که شبیه به آن برای ویروس های آنفلوانزای مرغی موجود است. سویه های IBV با این روش مشخص می شوند: IBV / نوع پرنده / کشور مبدا / ژنوتیپ یا سروتیپ / نام سویه / سال جداسازی. غالباً IBV و نوع پرنده (به فرض اینکه جدایه از مرغ باشد) در نامگذاری آورده نمی شوند، اما اگر جدایه از مرغ نباشد یا نوع مرغ (گوشتی ، تخم گذار، مادر) مهم باشد، در نامگذاری آورده می شود.

۵,۱. طبقه بندی سروتیپی

به طور سنتی، سروتیپ های IBV با آزمایش دو طرفه خنثی سازی-متقاطع ویروس (VN) در تخم مرغ های جنین دار تعریف شده است. این روش شامل واکنش ویروس ناشناخته با آنتی سرم ایجاد شده در برابر سویه های شناخته شده است؛ سپس آنتی بادی اختصاصی سروتیپ علیه ویروس ناشناخته تهیه شده و با سویه های شناخته شده واکنش داده می شود. داده های بدست آمده با استفاده از فرمول اختصاصی برای محاسبه ی میزان ارتباط بین ویروس ها استفاده می شوند. برخی آزمایشگاهها از آنتی بادی های مونوکلونال اختصاصی برای یک سروتیپ معین در روش ELISA[۱]، سنجش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم یا روش VN استفاده کرده اند اما این آنتی بادی های مونوکلونال فقط برای تعداد کمی از سروتیپ ها در دسترس هستند.

[۱] enzyme-linked immunosorbent assay

طبقه بندی سویه ها با استفاده از تست های HI نیز انجام شده است، اما بیشتر سویه های IBV مستقیما قادر به هماگلوتینه کردن نیستند و برای فعالیت HA باید در معرض نورامینیداز قرار داده شوند. پاسخ آنتی بادی HI به دنبال یکبار قرار گرفتن در معرض ویروس می تواند بسیار اختصاصی سویه باشد و ویژگی و واکنش متقاطع محدود در پاسخ ایمنی اولیه بعنوان پایه ای برای تعیین سروتیپ جدایه ها توسط آزمایش های HI است. با این حال قرار گرفتن متعدد در معرض ویروس که در پرندگان واکسینه شده معمول است، منجر به واکنش های متقاطع زیاد و متغیر می شود که تمایز قاطع سویه ها را با استفاده از آزمایش HI دشوار می کند.

٦,١. طبقه بندی ژنتیکی

در حال حاضر بیشتر آزمایشگاه ها از روش های مبتنی بر شناسایی اسید نوکلئیک برای شناسایی ژنوتیپ های ایزوله های IBV استفاده می کنند. به طور معمول روش RT-PCR[١] برای تکثیر ژن S1 و یا ناحیه بسیار متغیر ژن S1 و به دنبال آن تعیین توالی یا با به ندرت آنالیز RFLP[٢] مورد استفاده قرار می گیرد. توالی یابی کامل ژنومی برای خیلی از ایزوله های ویروس انجام شده است و توالی ژن های پروتئین های ساختاری برای تعداد زیادی از سویه های IBV از سراسر دنیا در پایگاه اینترنتی بانک ژنی موجود است.

برای تایپینگ ایزوله های IBV از توالی آمینو اسیدی پروتئین S1 (یا ناحیه بسیار متغیر پروتئین S1) استنتاج شده از تعیین توالی نوکلئوتیدی استفاده می شود. مقایسه توالی های آمینواسیدی با BLAST[٣] یا آنالیز فیلوژنتیک نشان داده است که بسیاری از سروتیپ هایی که با تست خنثی سازی سرم تعریف شده اند اکثراً بیشتر از ١٠٪ در توالی S1 با

---

[١] Reverse transcriptase polymerase chain reaction

[٢] Restriction fragment length polymorphism

[٣] Basic Local Alignment Search Tool

یکدیگر اختلاف دارند. با این حال موارد استثنا که تفاوت پروتئین های S1 دو سروتیپ تنها ۶٪ باشد نیز گزارش شده است. همچنین در رابطه با چندین ایزوله که ۹۷٪ توالی اسید آمینه ای با ایزوله سویه D274 یکسان بود، آزمایش خنثی سازی سرم نشان داد که این ایزوله ها در سروتیپ های متفاوتی قرار می گیرند. بطورکلی یافته ها نشان می دهد که تغییرات حداقلی در توالی آمینو اسیدی می تواند بر اپی توپ های خنثی کننده وابسته به ساختار پروتئین S1 تأثیرگذار باشد. مطالعات انجام گرفته نشان دهنده کاهش میزان حفاظت متقاطع بین سویه ها با افزایش تفاوت بین توالی S1 می باشد.

۷,۱. سویه های IBV و تکامل ویروس

در حال حاضر این مطلب به خوبی شناخته شده است که انواع مختلفی از تیپ ها، تحت تیپ ها و واریانت های IBV وجود دارد و این تنوع به دلیل میزان بالایی تنوع ژنتیکی است که به دنبال میزان زیاد جهش و نوترکیبی رخ می دهد. تعویض بازها یکی از انواع جهش ها هستند که در نتیجه ضریب خطای بالا و قابلیت تصحیح محدود RNA پلیمراز وابسته به RNA ویروسی (RDRP[۱]) ایجاد می شوند و نیز جهش اضافه و حذف شدن بازها به دنبال نوترکیبی یا خطای RDRP اتفاق می افتد. اگرچه IBV (و سایر کروناویروسها) دارای دومین اگزوریبونوکلئاز '۳ به '۵ در پروتئین غیر ساختاری ۱۴ هستند که در زمینه تصحیح و ترمیم دخیل است، اما میانگین نرخ جهش مترادف هنوز نیز بالا و تقریباً در حدود $۱/۲ \times ۱۰^{-۳}$ تعویض در هر محل در سال است. در بسیاری از کروناویروسها از جمله IBV نوترکیبی گزارش شده است. نوترکیبی در پروتئینهای غیر ساختاری مرتبط با RDRP می تواند کارایی تکثیر ویروس را تغییر دهد که به نوبه خود می تواند بر بیماری زایی تأثیر بگذارد. از آنجا که ژن گلیکوپروتئین S در اتصال ویروس

[۱] RNA-dependent RNA polymerase

به سلولهای میزبان دخیل است و حاوی اپی توپ های خنثی کننده ویروسی است، نوترکیبی در ژن گلیکوپروتئین S می تواند منجر به ظهور سویه ها یا سروتیپ های جدیدی شود که قادر به ایجاد بیماری در سایر گونه های میزبان باشند. تیپ ها، تحت تیپ ها و واریانت های جدید IBV حال آنکه نتیجه جهش، نوترکیبی و یا هر دوی این وقایع باشند، همچنان پدیدار می شوند و کنترل IBV را بسیار چالش برانگیز می کنند.

۸,۱. تشخیص و تعیین تیپ ویروس برونشیت عفونی با روش های مبتنی بر توالی اسید نوکلئیکی

آزمون real time RT-PCR که با عنوان "RT-PCR کمّی" نیز شناخته می شود، غالبا برای شناسایی مستقیم ویروس در نمونه های کلینیکی مورد استفاده قرار می گیرد. از مزیت های تست این است که تعداد نمونه های زیادی را در مدت زمانی کم می توان مورد بررسی قرار داد، روشی مقرون به صرفه است و اطلاعات کمّی در رابطه با مقدار اسید نوکلئیک موجود در نمونه را در اختیار ما می گذارد. روش معمول RT-PCR نیز می تواند برای شناسایی ویروس برونشیت عفونی مورد قرار گیرد، با این حال در استفاده از این روش برای حصول پاسخ مثبت ممکن است نیاز به انجام پاساژ ویروس باشد. هنگامیکه مقادیر اندک RNA ویروسی موجود باشد، برای مثال در نمونه گیری با استفاده از سوآب، روش nested PCR بکار گرفته می شود که در آن از محصول RT-PCR اولیه بعنوان الگو برای انجام دومین مرحله PCR استفاده می شود. با این حال باید مد نظر قرار داد که تست nested RT-PCR برای استفاده روتین تشخیصی دارای حساسیت زیادی است که این مورد احتمال آلودگی متقاطع و گرفتن نتیجه مثبت کاذب را افزایش می دهد. در نهایت باید توجه داشت که نتیجه مثبت RT-PCR فقط نشان دهنده حضور اسید نوکلئیک ویروس است و در رابطه با تیپ ویروس اطلاعاتی در اختیار آزمایشگر قرار نمی دهد.

شناسایی تیپ ویروس برونشیت عفونی در نمونه مورد آزمایش تنها با آنالیز توالی آمپلیکون حاصل از ژن S1 حاصل می گردد. روش RFLP با آنالیز الگوهای مهاجرت قطعات اسید نوکلئیکی حاصل از هضم آنزیمی امپلیکن S1 بر روی ژل آگارز می تواند در شناسایی تیپ های ویروس کمک کننده باشد. روش RT-PCR اختصاصی ژنوتیپ با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای ویروس های Mass، Conn، Ark، JMK، DE/072/92 و کالیفرنیا مورد استفاده قرار گرفته است.

پر استفاده ترین روشی که برای تعیین تیپ ژنتیکی ویروس مورد استفاده قرار گرفته است، آنالیز توالی امپلیکون S1 و یا ناحیه بشدت متغییر ژن S1 می باشد. با این روش می توان هر تیپی از ویروس برونشیت عفونی بدست آمده از فیلد را مورد شناسایی قرار داد. از مزیت های بزرگ تعیین توالی، قابلیت انجام آنالیز فیلوژنتیک ایزوله های فیلدی ناشناخته و واریانت ها در کنار سویه های رفرانس برای بررسی ارتباط بین ویروس های مختلف می باشد.

۹,۱. میزبان های ویروس

مرغ تنها میزبان IBV نیست، اگرچه ممکن است IBV فقط در مرغ باعث بیماری شود. همه سنین مستعد هستند، اما بیماری در جوجه ها شدید است و اغلب باعث مرگ و میر می شود. با افزایش سن، مرغها در برابر اثرات نفروپاتوژنیک، ضایعات مجاری تخمدان و مرگ و میر ناشی از عفونت مقاوم تر می شوند.

۱۰,۱. روش های انتقال، حامل ها و ناقل های ویروس

ویروس برونشیت عفونی بسیار مسری است و به سرعت در بین مرغ های گله پخش می شود. بیماری دوره انکوباسیون کوتاه دارد: با قرار گرفتن پرندگان حساس در مجاورت مرغ هایی که به تازگی آلوده شده اند، معمولاً در طی ۲۴ تا ۴۸ ساعت علائم بالینی نشان می دهد.

انتقال بیماری از طرق مختلف از قبیل تماس مستقیم بین پرندگان آلوده و حساس از طریق استنشاقی یا بلعیده شدن پارتیکل های عفونی ویروس؛ از طریق تماس غیر مستقیم از طریق قطرات آئروسل یا مدفوع و نیز در معرض وسایل آلوده به ویروس مانند پوشاک ، کفش ، ابزار و غیره اتفاق افتد. تولید آئروسل از دستگاه تنفسی به دلیل غلظت بالای ویروس در مجاری تنفسی در مرحله حاد عفونت، یک روش انتقال قابل توجه است. بالاترین غلظت IBV را می توان در نای در طی ۳ تا ۵ روز اول بعد از عفونت شناسایی کرد. بعد از این مدت، تیتر ویروس در مجاری تنفسی به سرعت کاهش می یابد و در هفته دوم بعد از عفونت می تواند پایین تر از سطح قابل تشخیص باشد. به احتمال زیاد انتقال توسط آئروسل مخصوصاً در مسافت های کوتاه همانند شرایط موجود در گله مؤثر است، زیرا ویروس پوشش دار در محیط نسبتاً سریع غیرفعال می شود.

ویروس برونشیت عفونی همچنین در مدفوع و ادرار دفع می شود. در طی مراحل مزمن عفونت IBV ویروس می تواند با سهولت بیشتری در دستگاه گوارشی (سکال تونسیل ها یا سواب های کلواک) و نیز برای مدت زمان طولانی تر نسبت به دستگاه تنفسی قابل تشخیص باشد. جدا سازی IBV را برای مدت طولانی (۲ تا ۷ ماه) از گله های آلوده یا واکسینه شده توسط چندین نویسنده گزارش شده است. توضیح احتمالی در مورد جداسازی طولانی مدت یا دفع مجدد ویروس تلقیح شده را میتوان با عفونت متقاطع مداوم در گله های آلوده یا واکسینه شده، دفع مداوم ویروس در سطوح معمولاً پایین تر از سطح تشخیص آزمایش ها و یا فعال سازی مجدد پس از طی مدت زمان نهفتگی مرتبط دانست. لوزه ها و کلیه ها دو بافتی است که در این گزارش ها برای پایداری ویروس ذکر شده اند. پدیده های دفع احتمالی طولانی مدت و دفع مجدد ویروس نهفته ممکن است منجر به انتقال گله به گله با تماس مستقیم یا غیرمستقیم شود و به عنوان منبع احتمالی انتقال مشترک مطرح باشد.

به نظر نمی رسد که انتقال عمودی برای IBV مطرح باشد، اگرچه یکی از محققین با نام کوک توانسته است ویروس چالش را پس از عفونت در مرغ های ماده و نر SPF تخم گذار به مدت ۲ هفته از مایع منی، ۱ تا ۷ هفته از غشای ویتلین تخم مرغ و حتی از تعداد کمی جوجه های هچ شده جدا کند. با این حال، دلالت این یافته آخر برای شرایط فیلد هنوز ناشناخته مانده است، زیرا این جوجه ها هیچ علائم بالینی ایجاد نمی کنند، سروکانورت نمی شوند و در برابر چالش محافظت نمی شوند.

با توجه به شناسایی های اخیر IBV در گونه های غیر از مرغ باید در نظر گرفت که سایر گونه های پرندگان نه تنها می توانند IBV را بصورت مکانیکی حمل کنند بلکه ممکن است IBV را به طور فعال تکثیر کنند یا منبعی برای شیوع IBV باشند.

۱۱,۱. دوره انکوباسیون

دوره انکوباسیون IB وابسته به دوز است و می تواند به کوتاهی ۱۸ ساعت برای تلقیح داخل تراشه تا ۳۶ ساعت برای تلقیح چشمی باشد.

۱۲,۱. علائم بالینی

علائم تنفسی غیر اختصاصی IB در مرغ های حساس شامل تنفس با دهان باز، سرفه، عطسه، رال تراشه و ترشحات بینی است. چشمان خیس و گاهی تورم سینوسی ممکن است در مرغ ها مشاهده شود. مرغ ها افسرده به نظر می رسند و ممکن است در زیر منبع گرما دیده شوند. مصرف خوراک و افزایش وزن به میزان قابل توجهی کاهش می یابد. در

مرغ های بزرگتر از سن ۶ هفته معمولاً علائم کمتر است و حتی ممکن است بیماری قابل توجه نباشد، مگر اینکه پرندگان معاینه دقیق شوند یا با گوش دادن به آنها در شب هنگام که پرندگان به طور معمول ساکت هستند به دقت مورد بررسی قرار گیرند. شدت علائم تنفسی تحت تأثیر کیفیت آب و هوا، محل نگهداری، نوع پرنده، سویه درگیر، برنامه واکسیناسیون IB و وجود عفونت های همزمان از جمله عفونت های ثانویه است.

مرغ های گوشتی آلوده به ویروس نفروپاتوژن ممکن است از مرحله بیماری تنفس بهبود یابند و بعد از آن علائم افسردگی، پرهای نامرتب، دفع آبکی، افزایش مصرف آب و مرگ و میر نشان دهند. استرس سرما، نژاد مرغ و رژیمهای غذایی حاوی پروتئین بالا حاوی فرآورده های جانبی حیوانی به عنوان منبع پروتئین از عوامل مستعد کننده در ایجاد علائم بالینی در هنگام عفونت با سویه نفروپاتوژن هستند.

در گله های تخمگذار، علاوه بر علائم تنفسی، کاهش تولید و کیفیت تخم مرغ نیز مشاهده می شود. علائم تنفسی نیز ممکن است حتی در موارد افت مشهود تولید یا تولید تخم مرغ هایی با پوسته رنگ پریده و بدون پیگمنت وجود نداشته یا بسیار خفیف باشد. میزان کاهش تولید ممکن است از اندک تا ۷۰٪ متغیر باشد و بستگی به عواملی مانند سویه ویروس و میزان ایمنی در برابر آن، زمان عفونت در طول دوره تخم گذاری و وجود عفونت های همزمان مانند سندرم کاهش تخم مرغ (EDS) داشته باشد. عفونت همزمان با IBV باعث افزایش درصد ناهنجاری های پوسته تخم مرغ ناشی از مایکوپلاسما سینوویا می شود. در پی عفونت IBV در ابتدای تولید، افت شدیدتری در کل تولید تخم مرغ های دارای پوسته طبیعی، افزایش تعداد تخم های با پوسته غیر طبیعی و اثرات منفی ماندگارتری بر وزن تخم مرغ و کیفیت داخلی تخم مرغ در مقایسه با عفونت بعد از پیک تولید مشاهده می شود. با افت خفیف تولید، رسیدن به سطح طبیعی تولید را طی ۱ یا ۲ هفته می توان انتظار داشت. با افت شدید تولید، ۶ تا ۸ هفته ممکن است طول بکشد تا تولید به سطح قبل از عفونت برگردد، اما در بعضی موارد این بازگشت هرگز اتفاق نمی افتد.

عفونت IBV علاوه بر کاهش تولید می تواند طیف وسیعی از اثرات روی کیفیت تخم مرغ از جمله از بین رفتن رنگدانه پوسته، کاهش کیفیت پوسته، آلبومین آبکی در تخم مرغ تازه ایجاد کند و نیز میزان هچ را کاهش دهد. گله های دارای مرغ های تخم گذار کاذب در حالی که گله دارای رفتار و ظاهر سالم است و تخم مرغ های با کیفیتی تولید می کند قادر به رسیدن به میزان عادی تخم گذاری نیستند. پیک تولید می تواند به میزان ۳۵ درصد مقادیر مورد انتظار تولید باشد.

۱۳,۱. میزان شیوع و مرگ و میر

در گله همه پرندگان آلوده به ویروس می شوند اما مرگ و میر بسته به حدت و پاتوتیپ سویه ویروس، سن پرنده، وضعیت ایمنی مادری یا فعال و استرس هایی مانند سرما یا عفونت ثانویه باکتریایی متغیر باشد. بیشترین میزان مرگ و میر معمولاً با عفونت های سویه های نفروپاتوژن در پرندگان جوان مشاهده می شود.

۱٤,۱. تعریف مسئله ، مشکل و سوالات تحقیق

بیماری برونشیت عفونی طیور برای چندین سال است که گله های صنعتی طیور در استان خراسان رضوی را درگیر کرده است. این بیماری به تنهایی و یا به صورت عفونت توأم تنفسی با ایجاد اختلال در رشد پرنده، افزایش مرگ و میر و کاهش کمی و کیفی تخم مرغ موجب کاهش تولید در صنعت پرورش طیور می گردد. با توجه به ماهیت تغییر پذیری بالای ویروس همواره ژنوتیپ ها و سروتیپ های مختلفی از ویروس برونشیت در یک منطقه در گردش می باشد. شناسایی ژنوتیپ های در گردش ویروس برای اجرای برنامه های کنترل بیماری دارای اهمیت است از این جهت سازمان دامپزشکی جهت جمع آوری اطلاعات در رابطه با وضعیت بیماری در استان خراسان رضوی سفارش انجام این پروژه را به مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی داده است.

۱۵,۱. اهداف طرح

با توجه به شیوع ویروس برونشیت عفونی در گله های تجاری استان خراسان رضوی انجام برنامه های نظارتی سالانه جهت تعیین آلودگی با ژنوتیپ های مختلف ویروس دارای اهمیت است. بر این اساس اجرای این پروژه با درخواست و تأیید و همکاری اداره کل دامپزشکی استان خراسان رضوی شده است. با شناسایی این ژنوتیپ ها و میزان شیوع آن ها می توان به سمت اجرای امنیت زیستی و انتخاب سویه های واکسینال و برنامه های واکسیناسیون مؤثرتر حرکت کرد. در برنامه های نظارتی آینده میزان تأثیر برنامه های مختلف واکسیناسیون بر گردش ویروس هایی که در این پروژه شناسایی شده است بررسی می گردد.

۱٦,۱. مسئله اساسی، اهمیت، ضرورت و توجیه اقتصادی و اجتماعی طرح پژوهشی

بیماری برونشیت عفونی با کاهش تولید گوشت و تخم مرغ منجر به خسارات اقتصادی در صنعت پرورش طیور کشور می گردد. صنعت پرورش طیور گوشتی و تخمگذار کشور از منابع مهم تأمین کننده پروتئین در ایران است و از نظر امنیت غذایی دارای اهمیت زیادی می باشد. با توجه به اینکه استان خراسان رضوی از نظر تولید تخم مرغ و گوشت مرغ به ترتیب در جایگاه های دوم و سوم کشور می باشد، کنترل و پیشگیری از بیماری هایی مانند برونشیت عفونی طیور که می تواند منجر به ایجاد تلفات و کاهش تولید گوشت و تخم مرغ گردد، دارای اهمیت است. با توجه به تغییرات ژنتیکی سریعی که در ژنوم ویروس برونشیت عفونی اتفاق می افتد، همواره تغییرات آنتی ژنیک در ویروس صورت می گیرد. بنابراین جهت برنامه ریزی برنامه های کنترل بیماری نیاز به شناسایی و ژنوتایپینگ مستمر و سالانه ویروس وجود دارد. با توجه به اهمیت بیماری در استان، انجام این پروژه توسط مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی

رازی توسط اداره کل دامپزشکی استان خراسان رضوی درخواست شده است و مورد حمایت آن سازمان قرار گرفته است.

۱۷,۱. سوابق تحقیق در داخل و خارج از کشور

سال ها قبل، آقا خان و همکاران بیماری برونشیت عفونی را در مزارع مرغ صنعتی ایران گزارش کردند (۱). تمامی جدایه های ویروسی بر اساس آزمایش خنثی سازی ویروس در سروتیپ ماساچوست قرار گرفتند و در آن زمان هیچگونه شاهدی مبنی بر وجود واریانت های این ویروس وجود نداشت (۱). برونشیت عفونی یکی از بیماریهای مهم تنفسی در گله های طیور صنعتی در استان خراسان رضوی است که موجب خسارت های اقتصادی فراوانی عموماً در اشکال عفونت های توأم و کاهش تولید گوشت و تخم مرغ می شود. بر اساس مطالعه ای که توسط طرقی و همکاران (اوایل بهار تا اواسط پاییز ۱۳۸۹) در استان خراسان رضوی انجام گرفت، جداسازی و ردیابی ویروس در ۲۲ گله مرغ گوشتی تأیید شد. براساس نتایج تعیین توالی نوکلئوتیدی ۶۸٪ (۱۵/۲۲)، ۲۷٪ (۶/۲۲) و ۴/۵٪ (۱/۲۲) از این ویروسها به ترتیب در گروه های واریانت یک، سروتیپ ماساچوست و سروتیپ ۴/۹۱ قرار گرفتند. شباهت زیادی در سطح نوکلئوتید و آمینواسید بین این واریانت ها با واریانت های گزارش شده از کشورهای عراق (۹۹/۴٪) و اسرائیل (۹۷/۹٪) مشاهده شد. این واریانت ها با واکسن های H120 و ۴/۹۱ شباهت نوکلئوتیدی حدود ۸۲٪ داشتند.

در مطالعه ای که توسط حسینی و همکاران بر روی نمونه های حاصل از ۲۵۰ گله مرغ مشکوک به بیماری در سال های بین ۲۰۱۰ و ۲۰۱۴ انجام گرفت، ۷ ژنوتیپ شامل Mass (۸,۴٪) ، 793/B (۸,۴٪) ، IS720 (۱۸,۴٪)، Variant 2 (۱۷,۲٪)، QX (۹,۶٪)، IR-I (۱۰٪)و IR-II (۲,۴٪) شناسایی گردید (۲).

در مطالعه ای توسط شکری و همکاران بر روی نمونه های جمع آوری شده از گله های مرغ بومی در استان مازندران در سال ۲۰۱۴ انجام گرفت، سه ژنوتیپ (۶۷/۷٪) 793/B، واریانت ۲ (۲۵/۸٪) و (۶/۵٪) QX گزارش گردید (۳).

در مطالعه ای که توسط قلیانچی و همکاران بر روی ۴۰ نمونه بافتی جمع آوری شده از گله های گوشتی تجاری در شرق ایران (خراسان جنوبی و سیستان بلوچستان) در سال ۲۰۱۵ انجام گرفت، ۱۵ نمونه به روش real-time PCR برای IBV مثبت شد. در این مطالعه سه ژنوتیپ واریانت ۲ (IS/1494 like)، 793/B و QX با فراوانی به ترتیب ۶۶,۶۶٪، ۲۶,۷٪ و ۶,۶٪ شناسایی شد (۴).

در مطالعه ای که توسط نجفی و همکاران در ۸ استان کشور (اصفهان، خراسان، کردستان، مازندران، آذربایجان، قزوین، خوزستان و سمنان) در طی سال های ۲۰۱۴-۲۰۱۵ انجام گرفت، ۱۱۸ ایزوله IBV شناسایی گردید. بر اساس آنالیز فیلوژنتیک، ایزوله ها در شش گروه شامل واریانت ۲ (IS/1494 like) (۳۴٪)، 4/91-like (۲۱٪)، IS/720-like (۸٪)، QX-like (۱۰٪)، IR-1 (۳٪)و Mass-like (۴٪) قرار می گرفتند. شیوع ژنوتیپ ها در استان خراسان به ترتیب واریانت ۲ (IS/1494 like) (۳۷,۵٪)، 4/91-like (۱۸,۷۵٪)، QX-like (۱۸,۷۵٪)، IS/720-like (۱۲,۵٪) و IR-1 (۶,۲۵٪) گزارش گردید (۵).

در مطالعه ای که توسط مدیری و همکاران بین سال های ۲۰۱۵ تا ۲۰۱۷ انجام شد، نمونه های نای جمع آوری شده از ۲۷۸ گله مرغ گوشتی از ۸ استان کشور (گلستان، کرمان، اردبیل، اصفهان، قزوین، کردستان، خراسان رضوی و خوزستان) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آزمایش مولکولی نشان داد که ۵۲/۱۶٪ گله ها IBV مثبت هستند. چهار ژنوتیپ (۷۰/۳۴٪) IS-1494-like ، (۱۹/۳۱٪) 793/B، (۷/۵۸٪) QX، ماساچوست (۲/۷۵٪) شناسایی شدند. فراوانی ژنوتیپ ها در استان خراسان رضوی به ترتیب (۷۳/۳۳٪) IS-1494-like ، (۱۳/۳۳٪) 793/B، (۶/۶۶٪) QX، ماساچوست (۶/۶۶٪) گزارش شد (۶).

در مطالعه ای که توسط سعادت و همکاران در طی سال های ۲۰۱۴ تا ۲۰۱۵ در استان بوشهر بر روی نمونه هاس سوآب نای جمع آوری شده از ۱۵ گله مرغ گوشتی انجام گرفت، ٪۸۰ گله ها مثبت تشخیص داده شد. ژنوتیپ های واریانت ۲ (۴۶/٪۶) و ماساچوست (٪۲۰) گزارش شد (۷).

در مطالعه ای که توسط رحیمی و همکاران در بین سال های ۹۴ تا ۹۵ بر روی گله های مرغ گوشتی در استان های فارس و چهار محال بختیاری انجام گرفت، از ۴۰ گله تعداد ۱۲ مورد برای IBV مثبت بود. از این میان ٪۷۵ موارد مربوط به واریانت ۲ و ٪۲۵ مربوط به سویه ماساچوست گزارش شد.

در مطالعه ای که توسط غلامی و همکاران بر روی جدایه های ویروس برونشیت از هشت استان کشور طی سال های ۲۰۱۵-۲۰۱۶ انجام گرفت، میزان شیوع واریانت ۲ (IS/1494/06)، ۴/۹۱، QX و ماساچوست به ترتیب ٪۶۶/۶۷، ٪۲۴/۴۵، ٪۴/۴۴ و ٪۴/۴۴ گزارش شد. از مجموع ۱۳ نمونه مربوط به خراسان ۵ نمونه مثبت بود که دو مورد مربوط به واریانت ۲، دو مورد B/۷۹۳ و یک مورد QX بوده است (۸).

در مطالعه ای که توسط حاجی عبداللهی و همکاران در طی سالهای ۲۰۱۵-۲۰۱۶ انجام گرفت، ۲۳۳ گله مرغ گوشتی از ۳۱ استان ایران از نظر عوامل ویروسی مؤثر در ایجاد سندرم تنفسی مورد بررسی قرار گرفتند. IBV در ٪۷۵ گله ها بصورت تک عامل یا همراه با ویروس های آنفلوانزا H9N2 و نیوکاسل مورد شناسایی قرار گرفت. از تعداد ۶۰ ویروس جدا شده برونشیت عفونی ژنوتیپ های (٪۳۱,۶) 793/B، (IS/1494) variant 2(٪۲۸,۳)، Massachusetts (16.6%)، IR (٪۵)، IR2 (٪۵) و سایر واریانت های مخلوط (٪۵) گزارش شدند (۹).

در مطالعه ای که توسط یلماز و همکاران بین سال های ۲۰۱۳ تا ۲۰۱۵ در ۴ ناحیه جغرافیایی در کشور ترکیه بر روی ۴۹ گله مرغ تجاری گوشتی و ۱۴ گله مرغ تخمگذار انجام گرفت، IBV در ٪۸۳/۶ گله های گوشتی و ٪۶۴/۲ گله

های تخمگذار به روش مولکولی (TaqMan real-time RT-PCR) شناسایی شد. مطالعه فیلوژنتیکی نشان داد که ۱- ویروس های شناسایی شده در ۵ گله گوشتی دارای شباهت به سویه های واکسینال Ma5، H120 و M41 می باشد؛ ۲- ویروس های شناسایی شده در ۲۴ گله گوشتی شبیه به ویروس هایی که در گذشته از ترکیه گزارش شده و سویه های Israel variant-2 می باشد؛ ۳- ویروس های شناسایی شده در ۷ گله تخمگذار شبیه به ویروس های گزارش شده از ایران، هند، و چین (مشابه با Israel variant-1 و ۴/۹۱) می باشد. در نهایت نتیجه گیری شد که سویه های ژنتیکی مختلفی شامل سویه های شبه واکسن در گله های طیور گوشتی و تخمگذار در ترکیه در گردش هستند و سویه Israeli variant-2 در حال گردش و تغییر می باشد (۱۰).

در مطالعه ای که توسط سگر و همکاران بین سال های ۲۰۱۴ تا ۲۰۱۵ بر روی ۴۶ گله صنعتی مرغ گوشتی در جنوب عراق انجام گرفت، ٪۷۴ گله ها برای IBV به روش مولکولی مثبت تشخیص داده شدند. نتایج nested PCR نشان داد که ۵۰٪ و ٪ ۵/۸۹ نمونه های مثبت به ترتیب مربوط به ژنوتیپ های 793/B و ماساچوست بوده اند (۱۱).

در مطالعه ای که توسط رفیق و همکاران از کشور پاکستان در سال ۲۰۱۸ منتشر شد، از ۹۰۵ نمونه کلینیکی که مورد آزمایش قرار گرفت تعداد ۳۵۸ مورد مثبت شناسایی شد. از این بین سروتیپ های ماساچوست (٪۴۳)، (٪۵۱) ۴/۹۱ و واریانت های مختلف ویروس (٪۵) گزارش گردید. مطالعه فیلوژنتیکی یکی از این واریانت های با نام Pak-973 شباهت زیادی را به یک واریانت از کشور هند نشان داد (۱۲).

در مطالعه ای که توسط صدری و همکاران در کشور افغانستان در سال های ۲۰۱۶ تا ۲۰۱۷ انجام گرفت، از تعداد ۱۰۰ گله مرغ گوشتی صنعتی دارای علائم تنفسی تعداد ۴۵ گله به روش مولکولی مثبت تشخیص داده شد. مطالعه فیلوژنتیک نشان داد که سویه های شناسایی شده شامل دو ژنوتیپ (9/45) (GI-19) LX4 و IS-1494 like (34/45) (GI-23) می باشند (۱۳).

همچنین گزارشات مختلفی از شیوع ویروس برونشیت و شناسایی آن از سایر کشورهای دنیا گزارش شده است که نشان دهنده تغییرات مداوم ویروس با وجود واکسیناسیون گسترده حتی در کشورهایی با سیستم های نظارتی و کنترلی مناسب است.

۲. مواد و روش کار

۱,۲. جامعه مورد مطالعه و نمونه گیری از گله ها

نمونه برداری از گله های گوشتی و تخمگذار مشکوک به بیماری برونشیت عفونی در استان خراسان رضوی انجام گرفت. در هنگام کالبدگشایی نمونه برداری در شرایط بهداشتی از بافت های نای، کلیه و سکال تونسیل تعداد ۵ تا ۱۰ پرنده تلف شده انجام شد. نمونه های نای و کلیه پرنده های یک گله با هم به صورت پول (پول نای+کلیه) و همچنین نمونه های سکال تونسیل پرنده های یک گله به صورت پول (پول سکال تونسیل) در داخل محیط انتقال (بافر ۵۰ درصد گلیسرول) در کنار یخ در حداقل زمان ممکن بعد از نمونه گیری به مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی شعبه مشهد ارسال گردید. مقداری از نمونه های پول نای+کلیه و نیز تمامی نمونه های پول سکال تونسیل هر گله بعد از رسیدن به آزمایشگاه در فریزر ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری و ذخیره شد. مقداری از نمونه پول نای+کلیه مستقیم وارد مرحله استخراج RNA و آنالیز مولکولی برای ویروس برونشیت عفونی گردید.

۲,۲. آماده سازی نمونه ها و استخراج RNA ویروسی

در آزمایشگاه سوسپانسیون ۱۰ درصد از نمونه های بافتی دریافت شده تهیه شد و محلول حاصل جهت استخراج RNA مورد استفاده قرار گرفت. در ابتدا استخراج RNA برای نمونه های پول نای+کلیه برای هر گله انجام شد. در

صورت منفی شدن آزمایش مولکولی نمونه های پول نای+کلیه، نمونه های پول سکال تونسیل که در فریزر ۷۰- درجه سانتیگراد ذخیره شده بودند جهت استخراج RNA و انجام PCR مورد استفاده قرار گرفت. استخراج RNA با استفاده از کیت استخراج RNA ویروسی (High Pure Viral RNA Kit, Roche) انجام شد. کیفیت و کمیت RNA استخراجی با استفاده از دستگاه نانودراپ مورد بررسی قرار گرفت. مقداری از RNA استخراج شده مستقیما جهت ساخت cDNA استفاده شد و باقی مانده RNA در چندین الیکوت در دمای ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

۳,۲. واکنش رونوشت برداری معکوس (RT)

واکنش RT و ساخت cDNA با استفاده از آنزیم رونوشت برداری معکوس بلافاصله بعد از استخراج RNA انجام شد. برای ساخت cDNA از پرایمر اختصاصی ژن S1 که توسط ورتینگتون و همکاران بکار گرفته شده است به نام پرایمر SX2 استفاده شد (۱۴). cDNA ساخته شده جهت انجام PCR مورد استفاده قرار گرفت و باقی مانده آن در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

٤,۲. واکنش های PCR و Nested PCR

از آنتی ژنهای ۴/۹۱، D274 و واکسن H120 بعنوان کنترل مثبت واکنش های مولکولی استفاده شد. Nested PCR با استفاده از پرایمرهای یونیورسال به نام های +SX1، -SX2، +SX3 و -SX4 انجام شد (۱۴). این پرایمرها برای اکثر سویه های شناخته شده ویروس IBV مشترک می باشد و ناحیه ای از ژن S1 را تکثیر می نماید. این ناحیه ژنی برای ژنوتیپ های مختلف IBV متغیر می باشد. برای اولین مرحله PCR از پرایمرهای SX1 و SX2 استفاده شد. nested PCR (PCR دوم) با استفاده از محصول PCR اول (یک میکرولیتر از رقت یک به ده برای ۲۰

میکرولیتر واکنش PCR) و پرایمرهای SX3+ و SX4- انجام شد که برای واکنش های مثبت باند DNA با اندازه 393 bp بر روی ژل آگارز قابل مشاهده بود. تأیید اندازه محصولات واکنش PCR با آگارز ژل الکتروفورز غلظت ۱/۵٪ انجام گرفت. در صورتیکه برای گله ای مشکوک به بیماری نتیجه آزمایش nested PCR برای نمونه پول نای+کلیه مثبت نمی شد، برای نمونه پول سکال تونسیل آن گله واکنش RT و nested PCR انجام میگرفت.

۵,۲. تعیین توالی نوکلئوتیدی

تعیین توالی محصول PCR حاصل از پرایمرهای SX3+ و SX4- بطول 393 bp بعد از خالص سازی محصول PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام گرفت. کروماتوگرام های حاصل از تعیین توالی ها توسط نرم افزار BioEdit version 7.5.2 مورد بررسی قرار گرفت و نتایج در صورت نیاز ویرایش گردید. نتایج تأیید شده نهایی جهت فیلوژنتیک آنالیز مورد استفاده قرار گرفت.

٦,۲. فیلوژنتیک آنالیز

جهت فیلوژنتیک آنالیز توالی های ژن S1 مربوط به ویروس های تعیین سروتیپ و ژنوتیپ شده از GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) گرفته شد. ویرایش این توالی ها با نرم افزار BioEdit version 7.5.2 انجام شد و الاینمنت نوکلئوتیدی این توالی ها همراه با توالی های بدست آمده از این مطالعه به تعداد ۳۱ توالی با ClustalW (BioEdit) انجام شد که در مجموع شامل ۱۶۳ توالی می گردید. فایل الایمنت بدست آمده جهت بررسی بهترین مدل برای رسم درخت فیلوژنی توسط نرم افزار MEGA6 مورد استفاده قرار گرفت. درخت فیلوژنیک با روش Maximum Likelihood و مدل های جایگزینی GTR+G با ۱۰۰ تکرار رسم گردید.

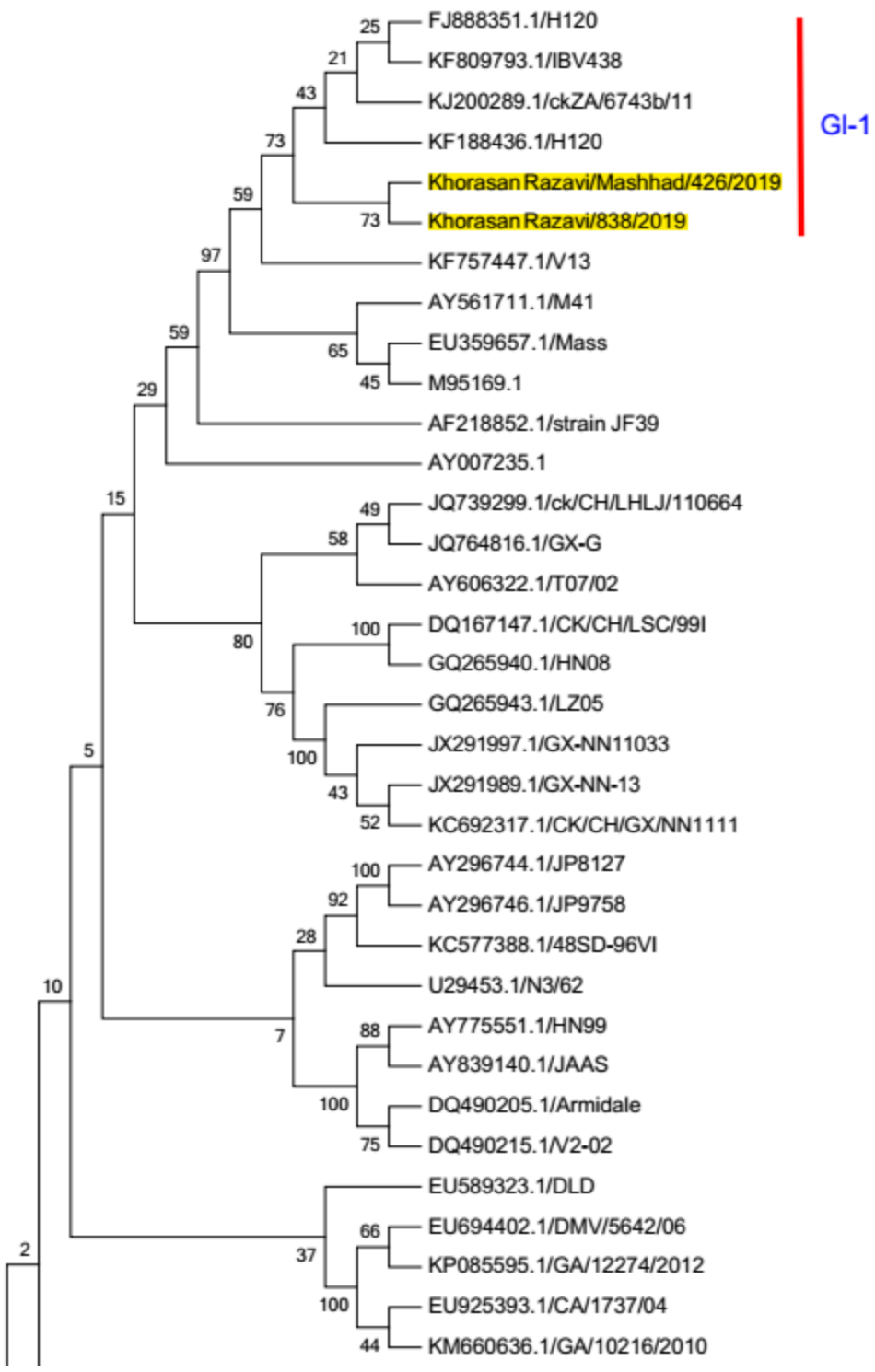
۳. نتایج و بحث

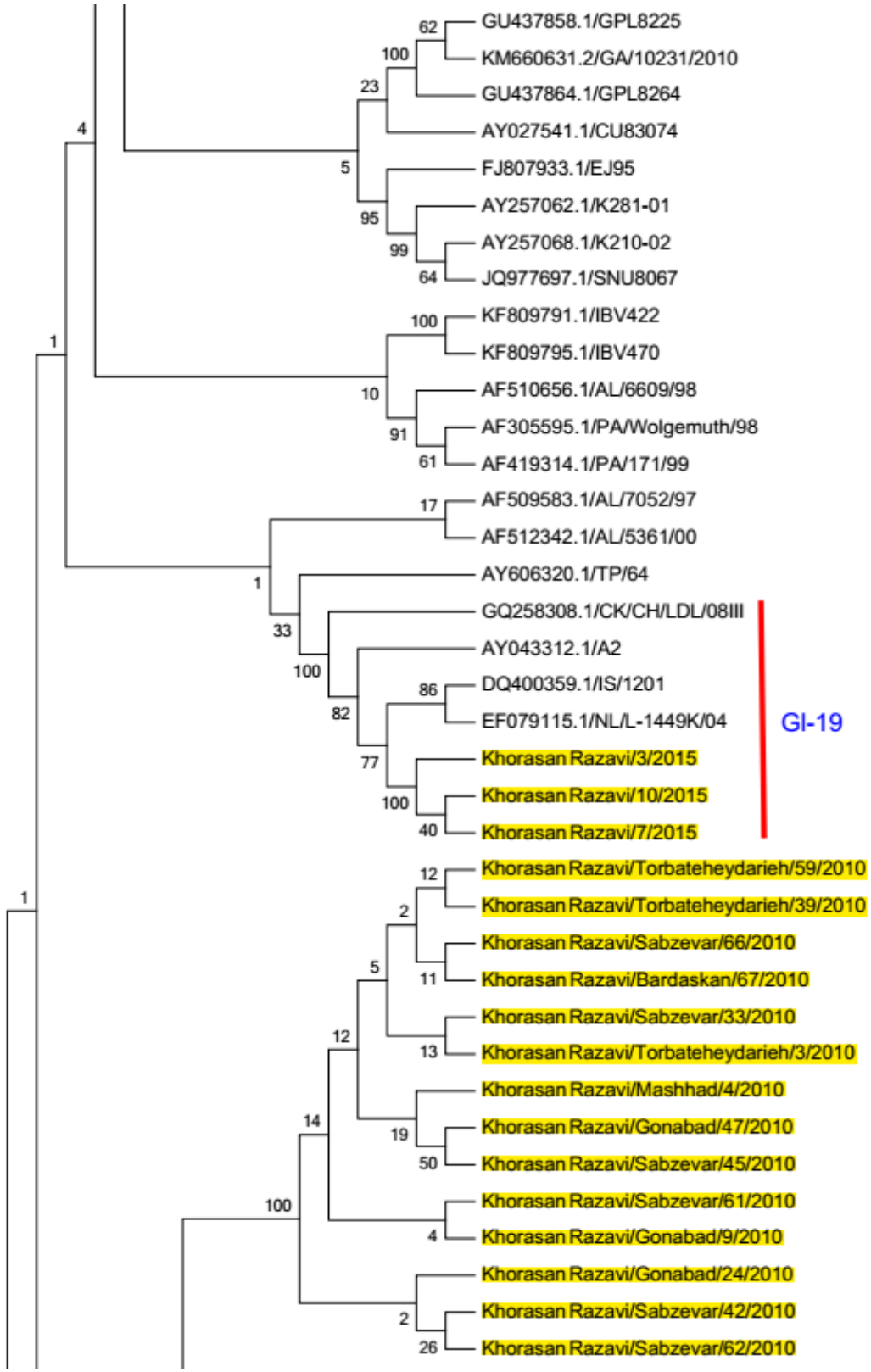
ویروس برونشیت عفونی طیور یکی از عوامل مهم در ایجاد سندرم تنفسی در گله های صنعتی طیور در استان خراسان رضوی می باشد. در این مطالعه شناسایی ویروس های برونشیت ایجاد کننده بیماری برونشیت عفونی در گله های تجاری گوشتی و تخمگذار با تعیین توالی نوکلئوتیدی و آنالیز فیلوژنتیک بر اساس توالی فوق متغیر ژن S1 انجام گرفت. جهت بررسی روند شیوع ویروس های برونشیت عفونی طیور در استان خراسان رضوی، تعدادی از ویروس های مربوط به سال های گذشته نیز همراه با ویروس های شناسایی شده در سال ۱۳۹۸ مورد فیلوژنتیک آنالیز قرار گرفتند. مجموع این ویروس های شناسایی شده در استان خراسان رضوی تعداد ۳۱ ویروس می باشد که همراه با تعداد ۱۳۲ ویروس دیگر از سراسر دنیا مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۱). ویروس های استان خراسان رضوی مربوط به بازه زمانی ۲۰۱۰ تا ۲۰۱۹ می شوند که نتایج تعیین توالی آنها جهت رسم درخت فیلوژنی مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۱).

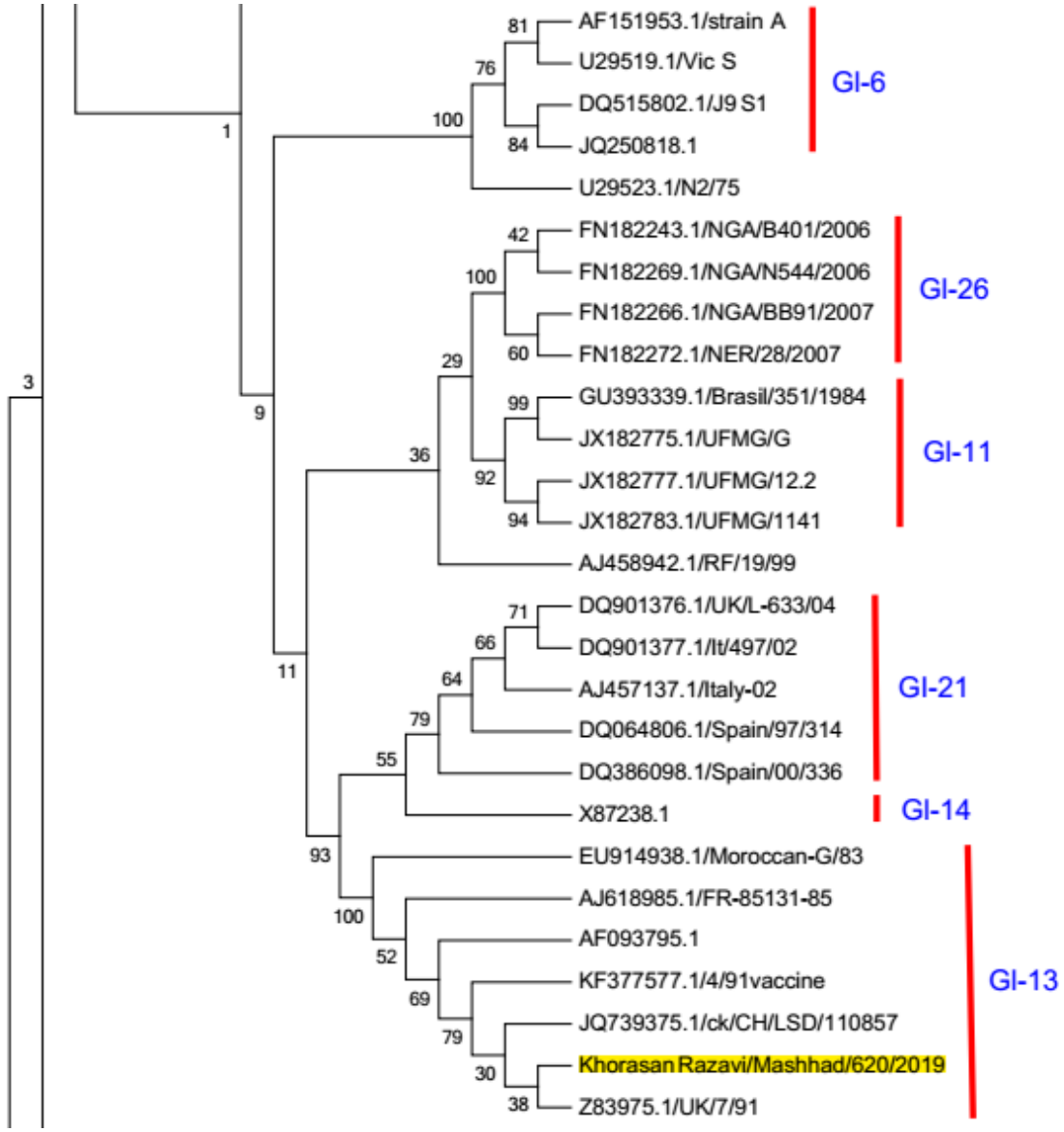
بر اساس آنالیز انجام گرفته تمامی ۱۴ ویروس مربوط به سال ۲۰۱۰ استان خراسان رضوی در یک خوشه جداگانه از سایر ویروس های تشکیل دهنده درخت فیلوژنیک قرار گرفتند (شکل ۱). این ویروس ها احتمالاً با ویروس های مربوط به لینیج های Gl-13، Gl-14، Gl-21، Gl-11، Gl-26 و Gl-6 دارای منشأ ویروسی مشترک هستند(شکل ۱).

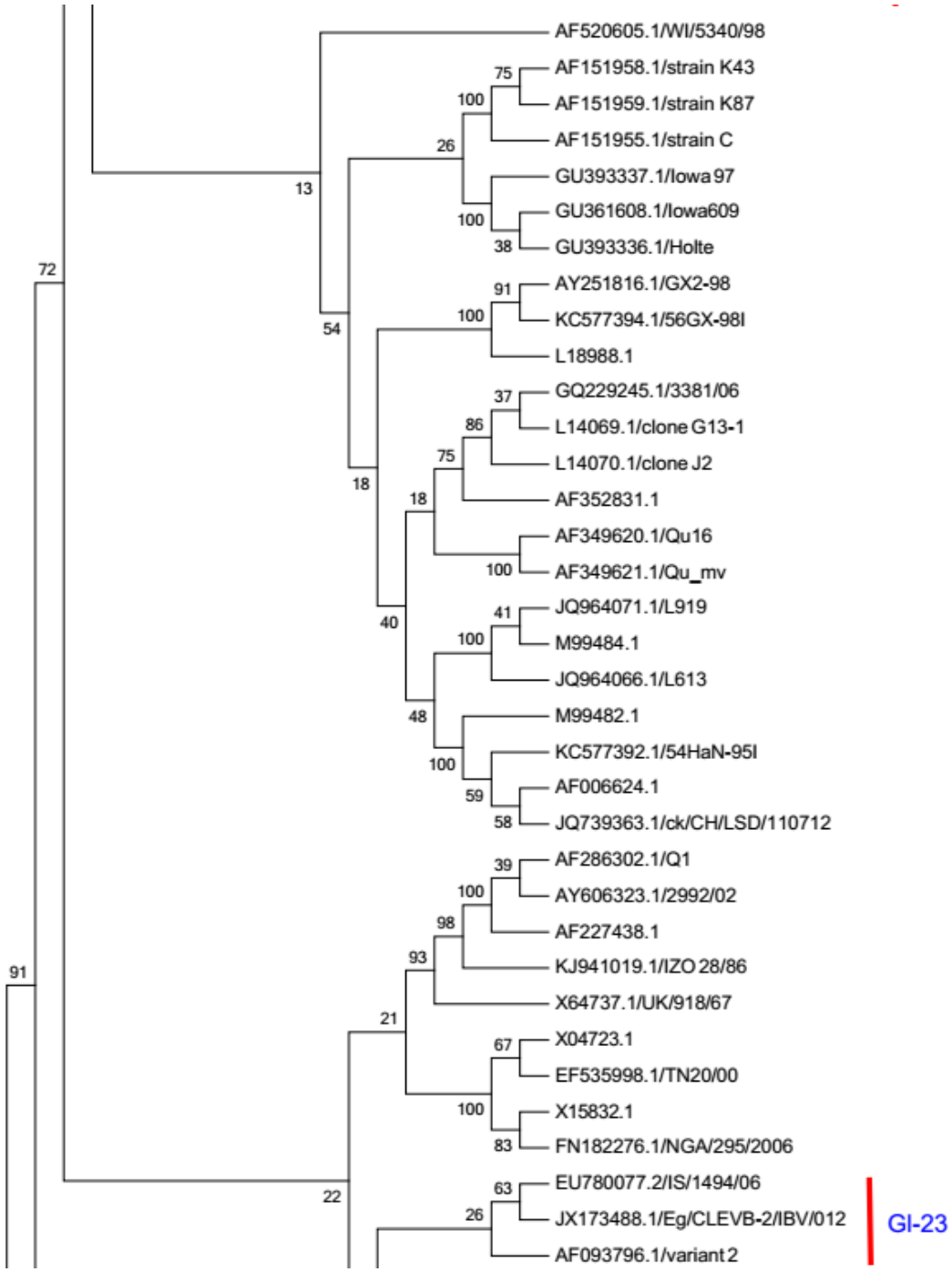
سه ویروس استان خراسان رضوی مربوط به سال ۲۰۱۵ ایجاد یک خوشه مشترک دادند و هر سه ویروس در لینیج Gl-19 قرار گرفتند (شکل ۱). بر اساس مطالعه والاسترو بیشترین تعداد سویه های IBV مربوط به لینیج GI-19 است که شامل ۵۴۶ ویروس جمع آوری شده بین سالهای ۱۹۹۳ تا ۲۰۱۲ است (۱۵). واریانت GI-19 یا سویه

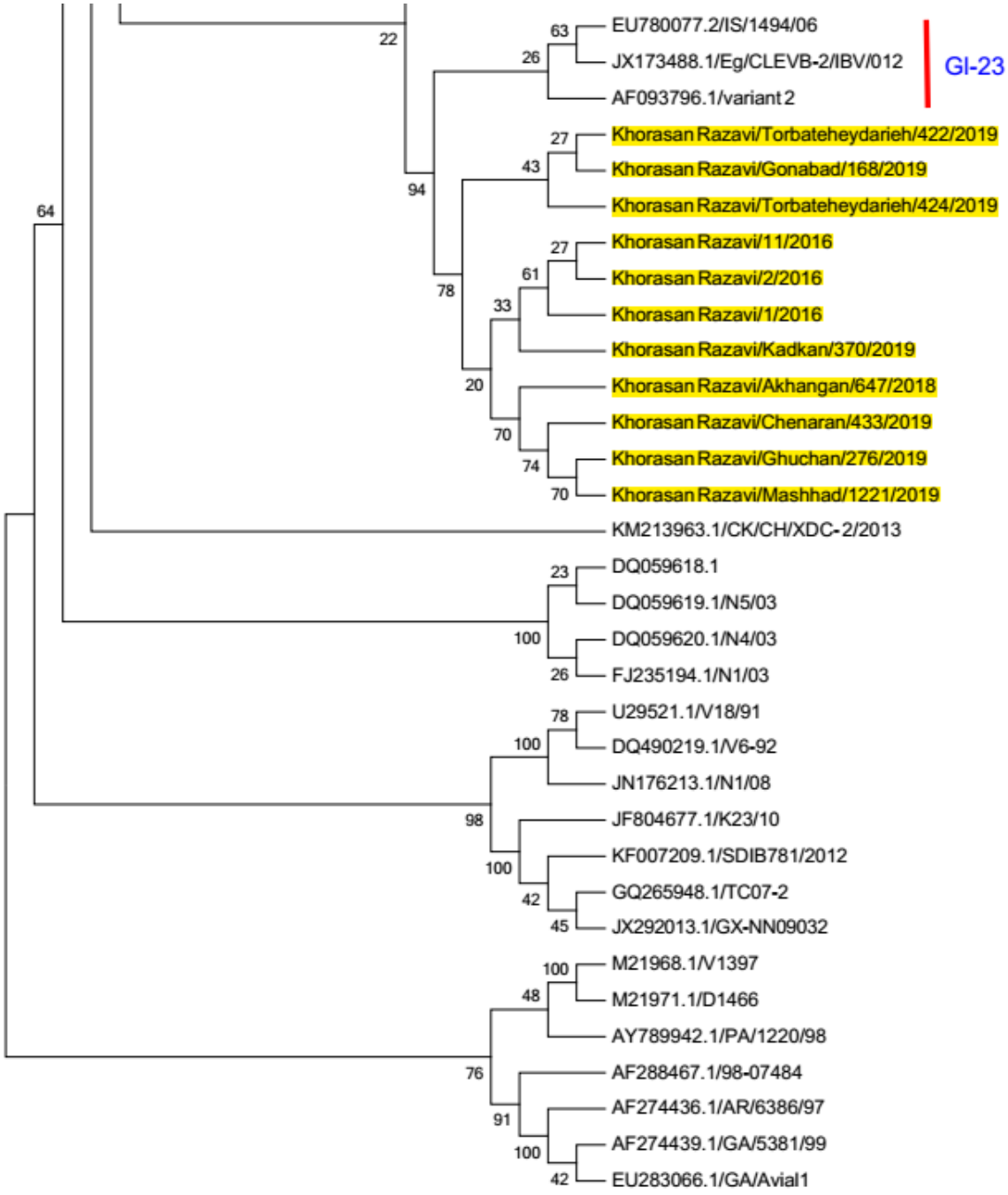
QXIBV برای اولین بار در سال ۱۹۹۶ در چین شناسایی شد و به طور عمده با نفریت شدید، سندرم "تخم گذار کاذب" و التهاب پیش معده همراه بود (۱۶). از آن زمان، چندین سویه از نوع QX در چین شناسایی شده است، اگرچه بیشتر موارد با درگیری کلیوی همراه بوده است. در اروپا گزارش های بی شماری از سویه های QX به دنبال مورد چینی توصیف شده است (۱۷). در همان زمان اولین سویه های QX مانند در ژاپن و کره شناسایی شدند. پس از آن در مدت کوتاهی این ویروس در مناطق مختلفی مانند روسیه ، آفریقا و خاورمیانه گزارش شد. بنابراین تمام سویه های قرار گرفته در لینیج GI-19 شامل دسته ای از ویروس های QX (و یا تحت عناوین LX4 و A2) می شوند. شیوع ویروس های QX در مطالعات مختلقی از ایران گزارش شده است (۲-۵). درگیری با ویروس QX در پولت ها می تواند منجر به از بین رفتن مجرای تخم بر و ایجاد پرندگانی شود که در گله تولید تخم مرغ نمی کنند و با اینکه گله تخم گذار از نظر ظاهری سالم است و کیفیت تخم مرغ ها مناسب است، اما تولید کلی تخم مرغ در این گله ها می تواند تا حدود ۵۰ درصد کاهش یابد.


FJ888351.1/H120
KF809793.1/IBV438
KJ200289.1/ckZA/6743b/11
KF188436.1/H120
Khorasan Razavi/Mashhad/426/2019
Khorasan Razavi/838/2019
KF757447.1/V13
AY561711.1/M41
EU359657.1/Mass
M95169.1
AF218852.1/strain JF39
AY007235.1
JQ739299.1/ck/CH/LHLJ/110664
JQ764816.1/GX-G
AY606322.1/T07/02
DQ167147.1/CK/CH/LSC/99I
GQ265940.1/HN08
GQ265943.1/LZ05
JX291997.1/GX-NN11033
JX291989.1/GX-NN-13
KC692317.1/CK/CH/GX/NN1111
AY296744.1/JP8127
AY296746.1/JP9758
KC577388.1/48SD-96VI
U29453.1/N3/62
AY775551.1/HN99
AY839140.1/JAAS
DQ490205.1/Armidale
DQ490215.1/V2-02
EU589323.1/DLD
EU694402.1/DMV/5642/06
KP085595.1/GA/12274/2012
EU925393.1/CA/1737/04
KM660636.1/GA/10216/2010
GI-1


GU437858.1/GPL8225
KM660631.2/GA/10231/2010
GU437864.1/GPL8264
AY027541.1/CU83074
FJ807933.1/EJ95
AY257062.1/K281-01
AY257068.1/K210-02
JQ977697.1/SNU8067
KF809791.1/IBV422
KF809795.1/IBV470
AF510656.1/AL/6609/98
AF305595.1/PA/Wolgemuth/98
AF419314.1/PA/171/99
AF509583.1/AL/7052/97
AF512342.1/AL/5361/00
AY606320.1/TP/64
GQ258308.1/CK/CH/LDL/08III
AY043312.1/A2
DQ400359.1/IS/1201
EF079115.1/NL/L-1449K/04
Khorasan Razavi/3/2015
Khorasan Razavi/10/2015
Khorasan Razavi/7/2015
GI-19
Khorasan Razavi/Torbateheydarieh/59/2010
Khorasan Razavi/Torbateheydarieh/39/2010
Khorasan Razavi/Sabzevar/66/2010
Khorasan Razavi/Bardaskan/67/2010
Khorasan Razavi/Sabzevar/33/2010
Khorasan Razavi/Torbateheydarieh/3/2010
Khorasan Razavi/Mashhad/4/2010
Khorasan Razavi/Gonabad/47/2010
Khorasan Razavi/Sabzevar/45/2010
Khorasan Razavi/Sabzevar/61/2010
Khorasan Razavi/Gonabad/9/2010
Khorasan Razavi/Gonabad/24/2010
Khorasan Razavi/Sabzevar/42/2010
Khorasan Razavi/Sabzevar/62/2010


AF151953.1/strain A
U29519.1/Vic S
DQ515802.1/J9 S1
JQ250818.1
U29523.1/N2/75
GI-6
FN182243.1/NGA/B401/2006
FN182269.1/NGA/N544/2006
FN182266.1/NGA/BB91/2007
FN182272.1/NER/28/2007
GI-26
GU393339.1/Brasil/351/1984
JX182775.1/UFMG/G
JX182777.1/UFMG/12.2
JX182783.1/UFMG/1141
GI-11
AJ458942.1/RF/19/99
DQ901376.1/UK/L-633/04
DQ901377.1/It/497/02
AJ457137.1/Italy-02
DQ064806.1/Spain/97/314
DQ386098.1/Spain/00/336
GI-21
X87238.1
GI-14
EU914938.1/Moroccan-G/83
AJ618985.1/FR-85131-85
AF093795.1
KF377577.1/4/91vaccine
JQ739375.1/ck/CH/LSD/110857
Khorasan Razavi/Mashhad/620/2019
Z83975.1/UK/7/91
GI-13
81
76
100
84
1
42
100
60
29
3
9
99
36
92
94
71
66
64
79
55
11
93
100
52
69
79
30
38


AF520605.1/WI/5340/98
AF151958.1/strain K43
AF151959.1/strain K87
AF151955.1/strain C
GU393337.1/Iowa 97
GU361608.1/Iowa609
GU393336.1/Holte
AY251816.1/GX2-98
KC577394.1/56GX-98I
L18988.1
GQ229245.1/3381/06
L14069.1/clone G13-1
L14070.1/clone J2
AF352831.1
AF349620.1/Qu16
AF349621.1/Qu_mv
JQ964071.1/L919
M99484.1
JQ964066.1/L613
M99482.1
KC577392.1/54HaN-95I
AF006624.1
JQ739363.1/ck/CH/LSD/110712
AF286302.1/Q1
AY606323.1/2992/02
AF227438.1
KJ941019.1/IZO 28/86
X64737.1/UK/918/67
X04723.1
EF535998.1/TN20/00
X15832.1
FN182276.1/NGA/295/2006
EU780077.2/IS/1494/06
JX173488.1/Eg/CLEVB-2/IBV/012
AF093796.1/variant 2
GI-23



شکل ۱– درخت فیلوژنی ۱۶۳ ویروس برونشیت عفونی طیور از نقاط مختلف دنیا بر اساس توالی نوکلئوتیدی ناحیه بسیار متغیر ۳ از ژن S1. الاینمنت توالی ها با استفاده از الگوریتم ClustalW نرم افزار BioEdit انجام گردید. درخت فیلوژنی با روش Maximum Likelihood با تکرار ۱۰۰ توسط MEGA6 رسم گردید. ویروس های مربوط به استان خراسان رضوی با رنگ متفاوت نشان داده شده است.

سه ویروس خراسان رضوی مربوط به سال ۲۰۱۶ همراه با یک ویروس مربوط به ۲۰۱۸ و هفت ویروس مربوط به ۲۰۱۹ استان خراسان رضوی یک خوشه مشترک را ایجاد کردند که در دسته ویروس های Gl-23 قرار می گیرند (شکل ۱). لینیج GI-23 نمایانگر خوشه ای از ویروس های وحشی منحصر به فرد است که از نظر جغرافیایی محدود به خاورمیانه است. سویه های متعلق به این لینیج از سال ۱۹۹۸ در اسرائیل شناسایی شده اند و هنوز در این منطقه گردش می کنند (۵, ۱۸). برخی از این ویروس ها در اکثر فارم ها غالب شده اند و سیستم های تنفسی و کلیوی را درگیر می کنند. سویه ها ی واریانت ۲ اسرائیلی در این دسته بندی قرار میگیرند (۱۹). تعدادی از مطالعاتی که در ایران در طی سال های اخیر انجام گرفته است، نشان داده اند که سویه های واریانت ۲ در ایران حضور دارند.

دو ویروسی که در این مطالعه در سال ۲۰۱۹ تعیین توالی شدند (۸۳۸ و ۴۲۶)، در دسته ویروس های لینیج Gl-1 قرار گرفتند. لینیج GI-1 شامل اولین سروتیپ IBV است که شناسایی شده و حتی امروزه نیز یکی از شناخته شده ترین و پراکنده ترین گروه های ژنتیک است که احتمالاً به دلیل استفاده گسترده از واکسن همولوگ مشتق شده از یکی از سویه های آن است. بر اساس طبقه بندی والاسترو (۱۵)، این گروه شامل ۱۸۹ ویروس جمع آوری شده در سرتاسر جهان (به استثنای اقیانوسیه) است که از قبل تحت عناوین ماساچوست (همچنین به عنوان Mass یا M41 معروف بودند)، H120 و کانکتیکات نامیده شده اند. سروتیپ ماساچوست عمدتا با بیماری تنفسی همراه است. سویه های ماساچوست همواره در مطالعات مختلف انجام گرفته در ایران درصد کمی از ویروس های شناسایی شده را به خود اختصاص داده است.

یکی از ویروس هایی که در این مطالعه مورد شناسایی قرار گرفت (Khorasan Razavi/Mashhad/620/2019)، در دسته ویروس های Gl-13 طبقه بندی گردید (شکل ۱). لینیج GI-13 در بسیاری از نقاط جهان وجود دارد و شامل سویه های ویروسی واکسینال و نیز سویه های بیماریزای فیلد می شوند

که به نام 793B (۴/۹۱ و یا CR88) شناخته می شوند (۲۰, ۲۱). ویروس های واریانت ۱ از اعضای این لینیج هستند (۱۹, ۲۱). اولین سویه شناخته شده سروتیپ CR88 در سال ۱۹۸۵ در فرانسه جدا شد، در حالی که سویه 793B در سال ۱۹۹۱ در انگلستان ظهور یافت و در ابتدا به عنوان یک سروتیپ منحصر به فرد مسئول سندرم های شدید تنفسی توصیف شد (۱۹). با توجه به شباهت توالی ۹۶٪ بین یک سویه جدا شده در مراکش در سال ۱۹۸۳ و واریانت 793B نظر بر این است که این ویروس آفریقای شمالی ایجاد کننده این لینیج است (۲۲). اخیراً این تیپ ژنتیکی برای اولین بار در کانادا در شیوع های با بیماری تنفسی و مشکلات تولید تخم مرغ در کانادا شناسایی شد (۲۳).

جدول ۱- تخمین فواصل تکاملی نوکلئوتیدی بین گروه های ویروس برونشیت بر اساس سال شناسایی در استان خراسان رضوی. تعداد جایگزینی بازهای توالی نوکلئوتیدی قطعه حدود ۳۴۰ بازی ژن S1 در هر محل حاصل از میانگین گرفتن تمامی جفت بازها بین ویروس های شناسایی شده در سال های مختلف نشان داده شده است.

Detection year (number of analyzed sequences)	No. of base substitutions per site			
	Khorasan Razavi 2010	Khorasan Razavi 2015	Khorasan Razavi 2016	Khorasan Razavi 2018
Khorasan Razavi 2010 (n = 14)				
Khorasan Razavi 2015 (n = 3)	0.2439			
Khorasan Razavi 2016 (n = 3)	0.1723	0.2318		
Khorasan Razavi 2018 (n = 1)	0.1842	0.2525	0.0062	
Khorasan Razavi 2019 (n = 10)	0.2157	0.2831	0.0875	0.0824

آنالیز فواصل تکاملی نوکلئوتیدی بین گروهی ویروس های شناسایی شده در استان خراسان رضوی انجام گرفت (جدول ۱). با مقایسه ویروس های برونشیت عفونی استان خراسان رضوی مشاهده گردید که فاصله تکاملی بالای حدود ۲۱ درصدی بین ویروس های شناسایی شده در سال ۲۰۱۹ و ۲۰۱۰ وجود دارد که نشان دهنده تغییرات زیاد ویروس در این فاصله زمانی است.

برخی از لینیج های شناخته شده مانند GI-1 و G-13 دارای توزیع جغرافیایی گسترده ای در دنیا هستند که احتمالاً بدلیل استفاده از واکسن های حاصل از آنها می باشد. واکسن های این دو لینیج بخصوص سروتیپ ماساچوست در ایران بطور گسترده مورد استفاده قرار گرفته است. بر این اساس اکثر سویه های IBV موجود در این لینیج ها ممکن است واکسن و سویه هایی مانند واکسن باشند. اولین واکسن برای کنترل بیماری در ایالات متحده آمریکا در دهه ۵۰ با استفاده از سویه فان راکل M-41 ساخته شد که بعنوان مادر بیشتر واکسن های نوع Mass مورد استفاده در آن زمان است. در اوایل دهه ۱۹۶۰، IB در هلند تشخیص داده شد و منجر به ایجاد واکسن مبتنی بر Mass به نام سویه H شد. واکسنهای حاصل به نام های H120 و H52 به زودی مورد استفاده گسترده قرار گرفتند. امروزه سویه های Mass و H120 از GI-1 همچنان رایج ترین واکسن های زنده تخفیف حدت یافته هستند. برخلاف سویه های واکسن GI-1، واکسن هایی مانند 793B که در دهه ۱۹۹۰ در اروپا ساخته شده و در بسیاری از کشورها مورد استفاده قرار گرفته اند، هرگز در آمریکای شمالی استفاده نشدند. تا به امروز لینیج GI-13 در ایالات متحده، اقیانوسیه و بسیاری از کشورهای آفریقایی و آمریکای لاتین شناسایی نشده است.

اگرچه احتمالاً گردش گسترده برخی از لینیج های خاص به استفاده از برنامه های واکسیناسیون مبتنی بر سویه های حاصل از آنها نسبت داده شده است، اما همیشه اینگونه نیست. به طور خاص، گسترش واریانت هایی مانند QX نفروپاتوژنیک از لینیج GI-19 مدتها قبل از استفاده از واکسن همولوگ آن ها در فیلد اتفاق افتاده است. این لینیج چینی که نیز در پولت ها در ایران منجر به ایجاد پرنده های تخم گذار کاذب می شود، به دلیل توانایی تبدیل شدن به بیماری اندمیک، و خسارت های عمده اقتصادی در صنعت طیور در سراسر جهان به استثنای قاره آمریکا و اقیانوسیه مورد توجه قرار گرفته است. منشأ این لینیج و عوامل توزیع متمایز آن هنوز ناشناخته مانده است. نقش پرندگان وحشی بر اساس شواهدی مبنی بر تکثیر IBV در Anseriformes به صورت فرضیه مطرح شده است.

با توجه به حضور بیماری برونشیت در استان خراسان رضوی در رابطه با کنترل بیماری انتخاب برنامه ها و سویه های مناسب واکسینال با توجه به ویروس های در گردش در فیلد به همراه برنامه های مدیریتی کنترل بیماری دارای اهمیت است.

برنامه واکسیناسیون بیماری در استان بیشتر به ترتیب به صورت تجویز دو بار واکسن H120، ترکیب دو واکسن H120 و ۴/۹۱ و یک بار واکسن H120 بود. پائین ترین میزان تیتر آنتی بادی مربوط به یک بار واکسیناسیون با واکسن H120 و بالاترین میزان تیتر مربوط به ترکیب دو واکسن H120 و ۹۱/۴ بود.

با توجه به اینکه ویروس های شناسایی شده در استان خراسان رضوی غالبا از لینیج های Gl-23، Gl-13 و Gl-19 می باشند، بر اساس میزان شباهت توالی نوکلئوتیدی ژن کامل S1 مربوط به این ویروس ها با واکسن 793B و در نتیجه اشتراک بیشتر اپی توپ های این ویروس های شناسایی شده در استان با ویروس های سروتیپ 793B می توان توصیه نمود که جهت واکسیناسیون استفاده از ترکیب دو واکسن سروتیپ های Mass و 793B گزینه مناسب تری جهت واکسیناسیون طیور در استان باشد.

در کنار واکسیناسیون باید برنامه های مدیریتی از قبیل رعایت جداسازی و امنیت زیستی، تجدید جمعیت گله با جوجه های همسن به دنبال تمیز کردن و ضد عفونی کردن مرغداری و نیز تجهیزات در تماس با پرنده ها یا مدفوع آنها انجام گردد.

٤. منابع

.١ Aghakhan S, Abshar N, Fereidouni SRN, Marunesi C, Khodashenas M. Studies on avian viral infections in Iran. Archives de l'Institut Razi. 1994(44/45):1-10.

.٢ Hosseini H, Fard MH, Charkhkar S, Morshed R. Epidemiology of Avian Infectious Bronchitis Virus Genotypes in Iran (2010-2014). Avian Dis. 2015;59(3):431-5.

.٣ Shokri S, Karimi V, Langeroudi AG, Marandi MV, Hashamzadeh M, Zabihipetroudi T, et al. Seroprevalence and genotyping of avian infectious bronchitis virus detected from Iranian unvaccinated backyard chickens. Iran J Microbiol. 2018;10(1):65-71.

.٤ Ghalyanchi-Langeroudi A, Karimi V, Jannat A, Hashemzadeh M, Fallah M, Gholami F, et al. Genotyping of Infectious Bronchitis Viruses in the East of Iran, 2015. Iranian Journal of Virology. 2015;9(2):3.٥-١

.٥ Najafi H, Langeroudi AG, Hashemzadeh M, Karimi V, Madadgar O, Ghafouri SA, et al. Molecular characterization of infectious bronchitis viruses isolated from broiler chicken farms in Iran, 2014-2015. Arch Virol. 2016;161(1):53-62.

.٦ Modiri Hamadan A, Ghalyanchilangeroudi A, Hashemzadeh M, Hosseini H, Karimi V, Yahyaraeyat R, et al. Genotyping of Avian infectious bronchitis viruses in Iran (2015-2017) reveals domination of IS-1494 like virus. Virus Res. 2017;240:101-6.

.٧ Saadat Y, Bozorgmehri Fard MH, Charkhkar S, Hosseini H, Shaikhi N, Akbarpour B. Molecular characterization of infectious bronchitis viruses isolated from broiler flocks in Bushehr province, Iran: 2014 - 2015. Vet Res Forum. 2017;8(3):195-201.

.٨ Gholami F, Karimi V, Ghalyanchi Langeroudi A, Hashemzadeh M, Vasfi Marandi M. Genotyping of Infectious bronchitis viruses isolated from broiler chicken farms in Iran during 2015-2016. Iranian Journal of Veterinary Medicine. 2018;12(1):9-17.

.٩ Haji-Abdolvahab H, Ghalyanchilangeroudi A, Bahonar A, Ghafouri SA, Vasfi Marandi M, Mehrabadi MHF, et al. Prevalence of avian influenza, Newcastle

disease, and infectious bronchitis viruses in broiler flocks infected with multifactorial respiratory diseases in Iran, 2015-2016. Trop Anim Health Prod. 2019;51(3):698-95.

.۱۰ Yilmaz H, Altan E, Cizmecigil UY, Gurel A, Ozturk GY, Bamac OE, et al. Phylogeny and S1 Gene Variation of Infectious Bronchitis Virus Detected in Broilers and Layers in Turkey. Avian Dis. 2016;60(3):596-602.

.۱۱ Seger W, Ghalyanchi Langeroudi A, Karimi V, Madadgar O, Vasfi Marandi M, Hashemzadeh M. Prevalence of avian infectious bronchitis virus in broiler chicken farms in south of Iraq, 2014 - 2015. Vet Res Forum. 2016;7(4):317-21.

.۱۲ Rafique S, Siddique N, Abbas MA, Shah AA, Sharif A, Naeem K. Isolation and Molecular Characterization of Infectious Bronchitis Virus (IBV) Variants Circulating in Commercial Poultry in Pakistan. Pakistan Veterinary Journal. 2018;38(4.(

.۱۳ Sadri N, Ghalyanchilangeroudi A, Fallah Mehrabadi M, Hosseini H, Shayeganmehr A, Sediqian M, et al. Genotyping of avian infectious bronchitis virus in Afghanistan (2016-2017): the first report. Iranian Journal of Veterinary Research. 2019;20(1):60-3.

.۱۴ Worthington KJ, Currie RJ, Jones RC. A reverse transcriptase-polymerase chain reaction survey of infectious bronchitis virus genotypes in Western Europe from 2002 to 2006. Avian Pathol. 2008;37(3):247-57.

.۱۵ Valastro V, Holmes EC, Britton P, Fusaro A, Jackwood MW, Cattoli G, et al. S1 gene-based phylogeny of infectious bronchitis virus: an attempt to harmonize virus classification. Infection, Genetics and Evolution. 2016;39:349-64.

.۱۶ Wang Y, Wang Y, Zhang Z, Fan G, Jiang Y, Liu X, et al. Isolation and identification of glandular stomach type IBV (QX IBV) in chickens. Chinese Journal of Animal Quarantine. 1998;15(1):1-3.

.۱۷ Abro SH, Renström LH, Ullman K, Isaksson M, Zohari S, Jansson DS, et al. Emergence of novel strains of avian infectious bronchitis virus in Sweden. Veterinary microbiology. 2012;155(2-4):237-46.

.۱۸ Ganapathy K, Ball C, Forrester A. Genotypes of infectious bronchitis viruses circulating in the Middle East between 2009 and 2014. Virus research. 2015;210:198-204.

.١٩ Callison S, Jackwood M, Hilt D. Molecular characterization of infectious bronchitis virus isolates foreign to the United States and comparison with United States isolates. Avian Diseases. 2001:492-9.
.٢٠ Gough R, Randall C, Dagless M, Alexander D, Cox W, Pearson D. A'new'strain of infectious bronchitis virus infecting domestic fowl in Great Britain. Veterinary record. 1992;130(22):493-4.
.٢١ Gelb Jr J, Weisman Y, Ladman B, Meir R. S1 gene characteristics and efficacy of vaccination against infectious bronchitis virus field isolates from the United States and Israel (1996 to 2000). Avian pathology. 2005;34(3):194-203.
.٢٢ Jones R, Savage C, Naylor C, Cook J, El-Houadfi M, editors. Possible North African progenitor of the major European infectious bronchitis variant (793B, 4/91, CR88). Proceedings of the IV International Symposium on Avian Corona-and Pneumovirus Infections; 2004: Rauischholzhausen Germany.
.٢٣ Martin EA, Brash ML, Hoyland SK, Coventry JM, Sandrock C, Guerin MT, et al. Genotyping of infectious bronchitis viruses identified in Canada between 2000 and 2013. Avian Pathology. 2014;43(3):264-8.

Veterinary Organization of Khorasan Razavi

Razi Vaccine and Serum Research Institute

Title:

Determination of Circulating Serotypes of Infectious Bronchitis Virus in Industrial Poultry Farms of Khorasan Razavi Province

Ordered by:

Veterinary Organization of Khorasan Razavi

Executive:

Dr. Seyed-Elias Tabatabaeizadeh, DVM, Ph.D

Assistant Professor, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Mashhad, Iran

2019