

Cevac

IBird®



HEALTHY
CHICKENS

کنترل برونشیت عفونی از یکروزگی



واکسن زنده تخفیف حدت یافته برونشیت عفونی

سویه واریانت 1/96 متعلق به سروتیپ 793/B

خبرنامه شماره ۲۳
اختصاصی برونشیت عفونی طیور

احترام به طبیعت، احترام به خالق زندگے است.

برای همراهے باحفظ طبیعت و
دانلود مقالات
به سایت زیر مراجعه نماید.

www.savapars.com

شرکت سواپارس
تلفکس: ۸۸۳۴۵۰۴۶
۸۸۸۴۶۶۷۶
www.savapars.com



فهرست مطالب:

- ۲ مروری اجمالی بر بیماری برونشیت عفونی طیور
- ۱۴ بررسی وضعیت بیماری برونشیت عفونی در ایران
- ۱۵ آنالیز مولکولی ویروس‌های برونشیت عفونی جدا شده در ایران بین سال‌های ۲۰۰۸-۱۹۹۸
نیما قهرمانی، محمدحسن بزرگمهری فرد، عبدالحمید شوشتری، رضا ممیز
- ۲۵ بررسی همه‌گیرشناسی ژنوتیپ‌های ویروس برونشیت عفونی پرندگان در ایران طی سال‌های ۲۰۱۰-۲۰۱۴
حسین حسینی، محمدحسن بزرگمهری فرد، سعید چرخکار و ریما مرشد
- ۳۳ تعیین خصوصیات ملکولی ویروس‌های برونشیت عفونی جدا شده از مرغداری‌های گوشتی ایران در سال‌های ۲۰۱۴-۲۰۱۵
حمیده نجفی، آرش قلیانچی لنگرودی، مسعود هاشم زاده، وحید کریمی، امید مددگار، سیدعلی غفوری، حسین مقصدلو، رضا خلعتبری فراهانی
- ۴۵ مقالات مرتبط با واکسن Cevac IBird
- ۴۶ محافظت پرندگان در برابر چالش با ویروس برونشیت عفونی مشابه واریانت ۲ با استفاده از ترکیب سویه‌های 1/96 و H120
مصطفی حبیبی، وحید کریمی، سید علی غفوری، مسعود هاشم‌زاده، رضا خلعت‌آبادی فراهانی، حسین مقصدلو، حامد عبدالهی و آرش قلیانچی لنگرودی
- ۵۷ ایمنی ناشی از سویه تخفیف حدت یافته V1-1/96 ویروس برونشیت عفونی در برابر سویه فیلدی 793B در طیور صنعتی
Z. Penzes, J. Chacón, P. Soós, R. Glávits, A. Zolnai n. Nógrády, V. Palya
- ۶۲ ترکیب یک برنامه واکسیناسیون جهت کنترل واریانت Q1 ویروس برونشیت عفونی در آمریکای جنوبی
L.Sesti^۱, H.R. Sanguinetti, C.R. Zenobi, M.V.Terrara, M.Jauregui, J.Chacon, L.Sara and P.Paulet
- ۶۷ ارزیابی تطابق واکسن زنده واریانت برونشیت عفونی با واکسن‌های رایج و ایمنوکمپلکس بیماری گامبورو در طیور گوشتی
Jozsef Herczeg, Melinda Papp, Laszlo Makranszki, Katalin Varga and Zoltan Penzes
- ۶۹ ارزیابی روش اسپری در برنامه واکسیناسیون بیماری برونشیت عفونی با استفاده از روش Real-Time RT-PCR
T. Tatár-Kis, B. Felföldi, Z. Homonnay, E. Walkóné Kovács, T. Mató, W. Boyer, Y. Gardin, V. Palya
- ۷۵ محافظت وسیع‌الطیف به‌دست‌آمده با استفاده از واکسیناسیون ترکیبی علیه سویه‌های واریانت ویروس برونشیت عفونی
Timea Tatar-kis, Edit Walkone Kovacs, Balazs Felfold, Zolon Homonnay, Tamas Mato, Pal Soos, Anne Kollar, Zoltan penes, Yannick Gardin, Vilmos Playa
- ۸۳ کاتالوگ واکسن Cevac IBird

اطلاعات علمی Cevac IBird

بیماری برونشیت عفونی ناشی از یک کروناویروس مرغان است. این ویروس شدت مسری بوده و در اکثر نقاط دنیا حضور دارد. این ویروس توانایی تکثیر در مجرای تنفسی، کلیه و اویداکت پرندگان را دارد و موجب ضررهای اقتصادی هنگفت در مرغان تخم‌گذار یا گوشتی می‌شود. برونشیت عفونی با توانایی جهش در ژن خود شناخته می‌شود. بدین ترتیب، چندین واریانت آنتی‌ژنی با شاخص‌های ایمنوتیپ و پاتوتیپ متفاوت ایجاد شده و در گردش هستند. واکسن‌های متعدد مونووالان یا پلی‌والان زنده یا غیرفعال علیه این ویروس در سطح جهان موجود هستند.

برنامه‌های واکسیناسیون معمولاً به صورت اسپری یا آب آشامیدنی واکسن‌های زنده تخفیف‌حدهت‌یافته ماساچوست انجام می‌شوند. با توجه به وضعیت خاص همه‌گیری این بیماری، ترکیب این سویه با یک سویه واریانت و استعمال همزمان در جوجه‌کشی یا به عنوان تکرار واکسیناسیون در مرغداری رایج است. از آنجایی که واریانت‌های جدید مکرراً در فیلد ظاهر می‌شوند، برنامه‌های واکسیناسیون باید با توجه میزان ایمنی که در پرندگان مواجهه با ویروس‌های جدید ایجاد می‌کنند، اصلاح شوند. برای رفع نیاز به ایمنی وسیع‌الطیف در برابر سروتیپ‌های متفاوت برونشیت عفونی، شرکت سوا یک واکسن زنده تخفیف‌حدهت‌یافته (سویه 1/96) متعلق به گروه 793B را با نام Cevac IBird تولید نموده است.

این واکسن امکان کنترل برونشیت عفونی از جوجه‌کشی را با اسپری در یک‌روزگی فراهم می‌سازد. چندین آزمون نشان داده‌اند که Cevac IBird در سازگاری با یک سویه واکسن ماساچوست برای اسپری در یک‌روزگی بوده و ایمنی گسترده‌ای را در برابر سویه‌های متعدد ویروسی از جمله ماساچوست، J2, Q1, Qx, 793B و واریانت ۲ ایجاد می‌کند. پس از استعمال در یک‌روزگی، دیگر نیازی به استفاده مجدد در مرغداری برای ایمن‌سازی طیور گوشتی تا کشتار وجود ندارد و بدین ترتیب، برنامه واکسیناسیون تسهیل می‌یابد. استفاده از دستگاه اسپری Desvac در جوجه‌کشی و اجرای دقیق پروتکل Ceva CHICK Program اطمینان از بهترین روش تجویز واکسن برونشیت عفونی را در مقایسه با واکسیناسیون در مرغداری میسر می‌سازد.

برونشیت عفونی طیور

تعریف

بیماری برونشیت عفونی طیور یک بیماری مسری حاد ناشی از کروناویروس پرندگان بوده که به همراه علائم تنفسی در پرندگان در حال رشد و اختلال کمی و کیفی تخم‌های تولیدی مرغان تخم‌گذار است. برخی سویه‌های ویروسی موجب ایجاد بیماری در کلیه‌ها شده و نفریت بینابینی ایجاد می‌کنند.



تاریخچه

در سال ۱۹۳۱، شالک و هاوک یک بیماری ناشناخته تنفسی را در مرغان بین ۲ تا ۲۰ روز در داکوتای شمالی شناسایی نمودند که همراه با کزکردگی و سختی تنفسی بود. دو سال بعد، ارگانیسیم عامل، یک عامل قابل فیلتر (ویروس) تشخیص داده شد. به دلیل انتقال موفقیت‌آمیز ماده قابل فیلتراسیون و ایجاد علائم تنفسی، بیماری مذکور شکلی از لارنگوتراکئیت عفونی در نظر گرفته شد (فابریکانت ۱۹۹۸). چند سال بعد این تصور با آزمایش‌های ایمنی متقاطع در مرغان تصحیح شد و مشخص گردید که ویروس برونشیت عفونی از عامل بیماری لارینگوتراکئیت عفونی متفاوت می‌باشد (بیچ و شالم ۱۹۳۶). ضمناً مؤلفین نشان دادند که سرم پرنده‌هایی که بعد از بیماری برونشیت عفونی سالم باقی مانده‌اند می‌توانند عفونت‌زایی ویروس را خنثی سازد. تا انتهای دهه ۱۹۳۰، اثر اقتصادی بیماری برونشیت عفونی در زمینه کاهش تخم‌گذاری در مرغان تخم‌گذار بارز گردید (دلایلین و همکاران ۱۹۳۹).

روند بیماری‌زایی در مرغان مبتلا به بیماری برونشیت عفونی و برخی جوانب اپیدمیولوژیکی آن توسط هوفستاد (1945a, 1945b) تشریح شده است. گسترش فرم تنفسی بیماری نیوکاسل در اواسط دهه ۱۹۴۰ موجب بروز مشکلاتی جدی برای تمایز آن از بیماری برونشیت عفونی شد. این امر موجب پیدایش روش‌های تشخیصی بهتری گردید که اجازه جداسازی و تشخیص سرمی ویروس بیماری برونشیت عفونی را ممکن ساخت (فابریکانت ۱۹۹۸). این یافته که مرغان مبتلا به بیماری برونشیت عفونی تنها علائم تنفسی ملایمی را پیش از بلوغ جنسی نشان داده و پس از آغاز تخم‌گذاری به عفونت ایمن می‌شوند، منجر به ایجاد برنامه‌ای برای ایمن‌سازی گله در طی مرحله رشد گردید (ون روکل و همکاران ۱۹۴۲). یک کشف مهم دیگر یافت این نکته بود که عامل بیماری برونشیت عفونی بیش از یک سروتیپ داشته و سویه‌ها از لحاظ ایمنی‌زایی متفاوت هستند (جانگر و همکاران ۱۹۵۶).

شاخص‌ها و رده‌بندی عامل بیماری‌زا

عامل مسبب، یک ویروس RNA دار متعلق به خانواده کروناویروس است. ویروس شش‌گانه داشته و اندازه آن از ۱۲۰ تا ۱۶۰ نانومتر متغیر است. این ویروس دارای پوشینه و ریبونوکلوپروتئین است. در سطح این ویروس، پلومرهای شکافته، ظاهر خاص یک تاج خورشیدی را به ویروس می‌دهند. ژنوم این ویروس دارای RNA عفونی خطی تک‌رشته‌ای، تک‌مولکولی است (زارکوف ۲۰۰۳). این ویروس‌ها مقاومت ضعیفی در محیط از خود نشان می‌دهند. آن‌ها می‌توانند ۲۴ تا ۷۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد زنده مانده و تنها ۱۵ دقیقه در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد دوام می‌آورند. این ویروس‌ها همچنین می‌توانند تا ۳ ماه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد باقی بمانند. حلال‌های ارگانیک و مواد ضد عفونی‌کننده رایج (فرمالین ۱ درصد، فنول، کروسول) سریعاً آن‌ها را غیرفعال می‌کنند. تکثیر ویروس به مدت ۵ ساعت در سیتوپلاسم رخ می‌دهد. مراحل متوالی تکثیر شامل اتصال، نفوذ، پروتئین‌زدایی، رونویسی، تکثیر و ترجمه می‌باشد. گرچه ویروس بیماری برونشیت عفونی یک بیماری تنفسی ایجاد می‌کند، برخی سویه‌ها می‌توانند در دیگر سلول‌های غیرتنفسی نیز تکثیر یابند (مثلاً در کلیه یا مجرای تنفسی) و منجر به القای تاثیرات بیماری‌زا شوند. تکثیر برخی از سویه‌ها در مخاط روده رخ داده و باعث انتشار مدفوعی ویروس بدون بروز بیماری بالینی می‌شود (کاواناگ ۲۰۰۷). تغییر ویروس با انواعی از تغییرات ژنتیکی گسترده از جمله حذف، ورود، جهش و گاهی بازترکیبی ژنی همراه است. این تغییرات پیوسته بوده و موجب بروز چندین فنوتیپ مرتبط با پاتوتیپ و ایمنوتیپ می‌شود. بعلاوه، مشخص شده است که جدایه‌های ویروسی بیماری برونشیت عفونی ترکیبی از موتانت‌های ژنتیکی هستند که با جهش‌ها و بازترکیبی‌های ژنتیکی ایجاد شده‌اند (مونتا سیر ۲۰۱۰). چندین واریانت آنتی‌ژنی با بیماری‌زایی و حدت متفاوت شناسایی شده‌اند: سویه ماساچوست که بیماری تنفسی ایجاد کرده و برای تهیه واکسن‌ها پس از روند تخفیف حدت‌سازی استفاده قرار می‌گیرد؛ سویه کانکتیکات که از پرندگان دارای علائم تنفسی ملایم جدا شده و برای تولید واکسن مورد استفاده قرار می‌گیرد؛ سویه بیماری‌زای هلند که بر روی مجرای تنفسی و کلیه‌ها تأثیر می‌گذارد؛ سویه آرکانزاس که عامل بیماری تنفسی محسوب می‌شود؛ سویه بیودت، یک موتانت آزمایشگاهی از سویه ماساچوست بوده که برای پرندگان بیماری‌زا نمی‌باشد و سویه T که عامل نفریت حاد در استرالیا بوده و شباهت آنتی‌ژنی نسبی با سویه ماساچوست دارد (زارکوف ۲۰۰۳).

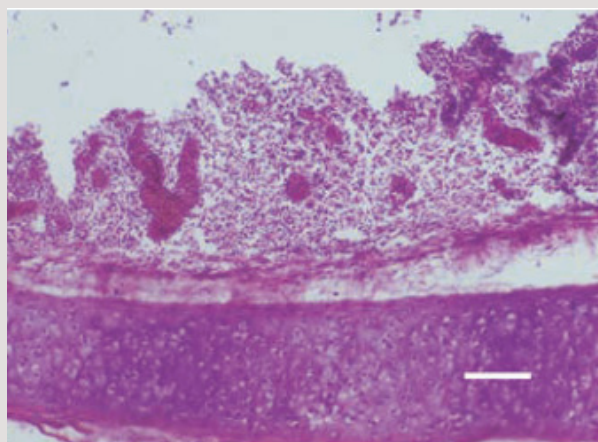
اپیدمیولوژی

ویروس بیماری برونشیت عفونی در مقیاس جهانی انتشار یافته است و اثر بیماری‌زایی‌اش، آن را به یکی از مهم‌ترین چالش‌های صنعت طیور تبدیل نموده است. مرغان بیمار منبع عفونت بوده و بیماری را از مسیر آئروسلی و نیز تا حدودی از طریق دان و آب منتشر می‌کنند. پرندگان بالغ نیز یک منبع مهم عفونت هستند و بعنوان حاملین فاقد علائم بالینی، ویروس را در ترشحات دهانی - بینی و مدفوع خود منتشر می‌سازند. یک الگوی قطعی و ثابت دفع پیوسته ویروس از پرندگان بهبودیافته مشاهده شده است. دفع مجدد ویروس در پرندگان بهبود یافته از چالش در سن یک‌روزگی که برای مدت مشخصی به لحاظ دفع ویروس برونشیت عفونی منفی بوده‌اند، گزارش شده است (جونز و آمبالی ۱۹۸۷). دفع دوره‌ای و طولانی خطر بالقوه‌ای برای انتقال عفونت بین گله‌ها از طریق پرسنل یا تجهیزات محسوب می‌شود. تحقیقات موجود در زمینه اپیدمیولوژی عفونت‌های بیماری برونشیت عفونی نشان می‌دهد که انتشار یک سویه از یک منطقه یا ایالت به منطقه‌ای دیگر می‌تواند ناشی از تجارت طیور، پرندگان مهاجر یا استفاده از واکسن‌های تخفیف حدت یافته باشد (کاواناگ ۲۰۰۵). شناسایی بیماری برونشیت عفونی در پرندگانی که متعلق به خانواده گالیناسه نیستند امکان تأیید فرضیه حمل ویروس توسط دیگر گونه‌های پرندگان را به عنوان حامل ویروس محتمل می‌سازد (کاواناگ و گلب، ۲۰۰۸).

مرغان در تمامی سنین به عفونت حساس هستند. بیماری به حادترین شکل ممکن در جوجه‌های یک‌روزه تا سن ۴-۳ هفته‌گی رخ داده و سبب تلفات می‌گردد. با افزایش سن، پرندگان مقاوم‌تر می‌شوند. اثر نفروپاتوژنیک بیماری برونشیت عفونی معمولاً در مرغان مسن‌تر از ۶-۴ هفته بروز می‌یابد و علائم ناشی از ضایعات مجرای تناسلی پس از شروع تخم‌گذاری دیده می‌شوند (کرینیون و هوفستاد، ۱۹۷۲، آلباسام و همکاران ۱۹۸۶). حدت عفونت تنفسی مرتبط با بیماری برونشیت عفونی با عوامل بیماری‌زای ویروسی یا باکتریایی ثانویه (یعنی مایکوپلازما گالی‌سپتیکوم، ویروس بیماری نیوکاسل و غیره) تشدید می‌شود و منجر به التهاب مزمن کیسه‌های هوایی و پنومونی می‌گردد.

علائم بالینی و آسیب‌شناسی

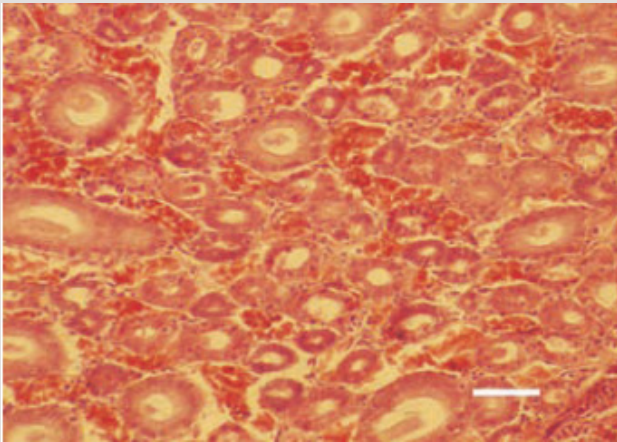
دوره کمون بیماری برونشیت عفونی کوتاه و وابسته به دوز است؛ شاید این دوره در هنگام چالش درون‌نایی کمتر از ۱۸ ساعت باشد و یا پس از استعمال چشمی به ۳۶ ساعت برسد (کاواناگ و گلب، ۲۰۰۸).



شکل ۱. در جوجه‌های تا ۴ هفته، بیماری برونشیت عفونی خود را به فرم علائم تنفسی حاد (عطسه، سرفه و رال تنفسی) نشان می‌دهد. التهاب مخاط بینی و ملتحمه چشم، کزکردگی و تجمع جوجه‌ها به دور منابع حرارتی مشاهده می‌شوند. میزان بیماری‌زایی می‌تواند به ۱۰۰ درصد برسد. در جوجه‌های جوان در صورت عفونت ثانویه درصد تلفات چشم‌گیر خواهد بود. در چنین مواردی، نفوذ متوسط تا حاد سلول‌های التهابی در مخاط مجرای تنفسی فوقانی رخ داده و منجر به ضخیم و فشرده شدن بیشتر مخاط می‌شود. در جوجه‌های یک‌روزه، عفونت بیماری برونشیت عفونی می‌تواند به شکلی دائمی به اویداکت آسیب رسانده و بر روی تخم‌گذاری و کیفیت تخم در طی دوره تولید اثر بگذارد.



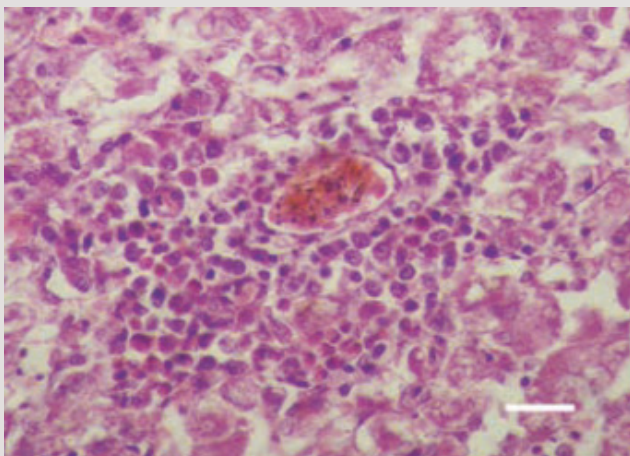
شکل ۲. در مرغان تخم‌گذار مبتلا به ویروس بیماری برونشیت عفونی، التهاب تخمدان و ضایعات نکروبویوتیک تحلیل‌برنده اساساً بر روی یک سوم میانی و انتهایی بافت پوششی مخاط اویداکت اثر می‌گذارند. اویداکت تحلیل رفته، کیستیک شده و بقایای کیسه زرده و یا تخم مرغ‌های شکل‌گرفته در حفره بطنی دیده می‌شوند (به این مرغان؛ مرغ تخم‌گذار داخلی نیز گفته می‌شود).



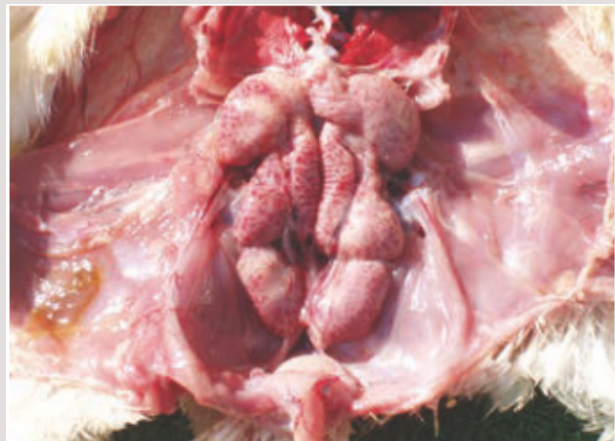
شکل ۵. التهاب به همراه پرخونی، خیز و خونریزی در کلیه‌ها ناشی از سویه‌های متمایل به کلیه



شکل ۳. عواقب این بیماری عبارتند از: افت تخم‌گذاری، به همراه افزایش تعداد تخم‌های تغییرشکل‌یافته و فاقد رنگ‌دانه با پوسته نرم و آلبومن آبکی



شکل ۶. سویه‌های متمایل به کلیه موجب یک نفریت بینابینی حاد به همراه تزاید کانونی لمفوسیت‌ها و پلاسماسل‌ها حول عروق کلیوی می‌شوند.



شکل ۴. سویه‌های ویروس بیماری برونشیت عفونی متمایل به کلیه موجب بروز آسیب‌های نکروبیوتیک تحلیل‌برنده و التهابی حاد کلیه‌ها به همراه سنگ سیستم ادراری می‌شوند.

تشخیص احتمالی بیماری برونشیت عفونی می‌تواند براساس تاریخچه، علائم بالینی و ضایعات صورت پذیرد. تشخیص اولیه با شناسایی عامل یا از طریق تست‌های سرمی تأیید می‌شود. در صورت امکان، تشخیص باید به شناسایی سروتیپ یا ژنوتیپ ویروس، به دلیل میزان بسیار بالای تنوع آنتی‌ژنی در میان سویه‌های بیماری برونشیت عفونی و واکنش‌های متفاوت اختصاصی سروتیپ، پردازد (کاواناگ و گلب ۲۰۰۸).

جمع‌آوری نمونه برای شناسایی بیماری برونشیت عفونی می‌باید بلافاصله پس از ظهور علائم بالینی صورت پذیرد، نمونه‌ها سریعاً فریز شده و در دمای پایین منتقل گردند. نگهداری در دمای پایین باید از لحظه جمع‌آوری تا انتقال به آزمایشگاه حفظ شود. همان‌طور که در بالا ذکر گردید، گسترش جهانی ویروس بیماری برونشیت عفونی به دلیل واریانت‌ها و سروتیپ‌های چندگانه و دائماً در حال ظهور، کنترل آن را به شکلی استثنایی سخت و ایمنی متقاطع را غیرممکن نموده است (کاواناگ ۲۰۰۷). در پرندگان زنده، سواب‌ها باید از مجرای تنفسی فوقانی اخذ شوند. نمونه‌های بافتی نای و ریه‌ها باید از لاشه‌ها جمع‌آوری شوند. سپس این نمونه‌ها باید در یک محیط انتقالی حاوی آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین و استرپتومایسین) کاملاً فریز گردند. در پرندگانی که نفريت یا مشکلات مربوط به تخم‌گذاری دارند، نمونه‌ها باید از کلیه‌ها و اویداکت نیز اخذ شوند. در مورد شناسایی ویروس بیماری برونشیت عفونی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز رونویسی معکوس (RT-PCR)، جداسازی ویروس ضروری نیست.

سواب‌های کلواکی یا تنفسی برای استفاده در تست‌های RT-PCR مناسب هستند و استفاده از محیط انتقالی نیاز نیست. در مواردی که نفريت حاصل از بیماری برونشیت عفونی مورد ظن است، بایستی نمونه‌های کلیوی تازه برای بافت‌شناسی و جداسازی ویروس جمع‌آوری شوند. نمونه‌های خونی باید از پرندگان به شدت بیمار یا در حال بهبودی برای تست سرمی اخذ شوند. برای جداسازی ویروس، پس از همگن‌سازی و سانتریفیوژ نمونه‌ها (سواب‌ها، نمونه‌های بافتی)، ماده فوقانی حاصله به جنین‌های ۱۰-۹ روزه، ترجیحاً SPF، تلقیح می‌شود. نمونه‌ها در صورتی مثبت محسوب می‌شوند که موارد غیرطبیعی همچون بدشکلی، کوتولگی، جنین‌های دارای خونریزی و یا مرگ جنین ۵ یا ۷ روز پس از تلقیح دیده شوند. در صورت آزمایش کشت بافت نای، سیلیواستاز (توقف مژگی نای) یا آسیب بافت پوششی می‌تواند ۷۲-۴۸ ساعت پس از تلقیح دیده شود. با این حال وجود ویروس

باید با تعیین سروتیپ، ژنوتیپ یا شناسایی از طریق ایمنوهیستوشیمی تأیید شود (کاوآنگ و گلب ۲۰۰۸).

تعیین سروتیپ و ویروس برونشیت عفونی از طریق تست‌های بازدارندگی هم‌آگلوتیناسیون (HI) و خنثی‌سازی ویروس (VN) در جنین‌های مرغ و کشت سلول انجام می‌شود (داوسون و گاک، ۱۹۷۱، آکساندر و همکاران ۱۹۸۳، کینگ و هاپکینگ ۱۹۸۴). آنتی‌بادی‌های مونوکلونال در تست‌های ایزا برای تعیین گروه و شناسایی سویه‌های ویروس برونشیت عفونی مورد استفاده قرار می‌گیرند (کاج و همکاران ۱۹۹۲).

تعیین ژنوتیپ با تکنیک‌های RT-PCR می‌تواند تا حدود زیادی جایگزین تست‌های VN و HI برای تشخیص و شناسایی سویه‌های فیلدی ویروس برونشیت عفونی شود. مزایای اصلی این تکنیک‌ها، زمان کوتاه انجام آزمون و پتانسیل شناسایی ژنوتیپ‌های گوناگون هستند. تست RT-PCR RFLP می‌تواند برای شناسایی تمامی سروتیپ‌های ممکن ویروس‌های برونشیت عفونی به عنوان واریانت‌های ویروس استفاده شود.

تست‌های RT-PCR اطلاعاتی در مورد هویت ویروس ارائه می‌دهند که برای مطالعات همه‌گیرشناسی در موارد بروز و وقوع بیماری برونشیت عفونی ضروری‌اند. با این حال، این آزمون اطلاعاتی در مورد بیماری‌زایی سویه ارائه نمی‌دهند. تکنیک‌های ایمنوهیستوشیمی با بهره‌گیری از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال اختصاصی گروه در شناسایی ویروس برونشیت عفونی موجود در غشاهای کوریوآلانتوتیک آلوده به ویروس کمک کننده می‌باشد (نقی، ۱۹۹۰).

تشخیص تفریقی

برونشیت عفونی باید از بیماری‌های بالینی همراه با علائم و ضایعات تنفسی، نفروزونفریت و اختلال در تخم‌گذاری تمایز داده شود. دیگر بیماری‌های تنفسی معمول در طیور عبارتند از: بیماری نیوکاسل (ناشی از سویه‌های تنفسی لنتوژن)، آنفولانزای کم‌حدت پرندگان، لارنگوتراکئیت عفونی، سندرم تورم سر، عفونت مایکوپلازما گالی‌سپتیکوم و غیره. نفروزونفریت ناشی از عفونت بیماری‌زای کلیوی ویروس برونشیت عفونی در پرندگان بالای ۴-۶ هفته تشخیص داده می‌شود که باید از بیماری بورس عفونی (گامبورو)، مسمومیت‌های قارچی (اکراتوکسین A) و غیره متمایز شوند. کاهش تخم‌گذاری و کیفیت بد تخم در مرغان باید از سندرم افت تولید تخم متمایز شود.

پیشگیری و کنترل بیماری برونشیت عفونی

فاکتورهای توصیه‌شده برای پیشگیری از وقوع بیماری برونشیت عفونی، بر روی کنترل اختصاصی و غیراختصاصی بیماری تأکید دارند. فاکتورهای اختصاصی دربرگیرنده واکسیناسیون گله هستند. در حالی که فاکتورهای غیراختصاصی بر پایه فاکتورهای معمول مدیریتی پایه‌ریزی شده‌اند.

امنیت زیستی

مدیریت، پرورش و فرآیندهای کنترلی باید بر اساس قواعد معمول پذیرفته‌شده در صنعت طیور باشند. قسمت‌های مرغداری که مخصوص پرندگان در حال رشد و پرندگان در مرحله تولید هستند باید کاملاً مجزا باشند. کنترل بیماری برونشیت عفونی در گله‌های طیور چندسنی بسیار سخت است. سیستم تولید باید به صورتی جدی اصل «همسنی گله‌ها» برای پرورش در مرغداری‌ها را در نظر بگیرد. پاک‌سازی، شستشو و ضدعفونی اراضی، تجهیزات و وسایل حمل و نقل باید از یک توالی امنیت زیستی مشخص، همانند مدیریت و حذف بستر پیروی کند.

واکسیناسیون

هر دو واکسن زنده و غیرفعال در مرغداری برای ایمن‌سازی فعال بر علیه بیماری برونشیت عفونی استفاده می‌شوند. واکسن‌های زنده عموماً تخفیف حدت یافته‌اند. آن‌ها در تولید طیور گوشتی برای واکسیناسیون اولیه و واکسیناسیون مجدد و در گله‌های مادر و تخم-گذار برای واکسیناسیون با هدف پرایمینگ (آماده‌سازی سیستم ایمنی برای دریافت واکسن کشته) استفاده می‌شوند. در حال حاضر، واکسن‌های زنده تهیه شده از سویه‌های واکسنی سروتیپ ماساچوست (H120, B48, Ma5 و ...) مورد استفاده قرار می‌گیرند. سویه‌های واکسنی معمولاً با توجه به طیف آنتی‌ژنی جدایه‌های منطقه‌ای انتخاب می‌شوند (کاواناگ و گلب ۲۰۰۸). تعیین پتانسیل ایمنی متقاطع نیز حائز اهمیت است. این امر عمدتاً در مورد واکسن‌های زنده مقتضی است. پس از شناسایی سروتیپ‌های جدید در یک ناحیه، واکسن‌های جدایه‌های اخیر نیز ممکن است به عنوان واکسن مد نظر قرار گیرند. در برخی کشورها، واکسن‌هایی بر پایه جدایه‌های محلی نیز مورد استفاده قرار می‌گیرند.

جدا از واکسن‌های بر پایه سویه ماساچوست، واکسن‌های بر پایه سویه واریانت 793B در برخی کشورهای اروپایی و آسیایی نیز به کار گرفته می‌شوند. واکسن‌های غیرفعال با ادجوانت روغنی به عنوان واکسن یادآور برای محافظت از گله‌های مادر و تخم‌گذار بر علیه بیماری برونشیت عفونی استفاده می‌شوند. واکسن‌های غیرفعال بیماری برونشیت عفونی معمولاً تنها شامل سویه M41 ماساچوست و یا به همراه واریانت‌های به اصطلاح "هلندی" D274 هستند. اغلب واکسن‌های غیرفعال بیماری برونشیت عفونی به شکل واکسن‌های پلی‌والان که شامل عامل بیماری گامبورو و نیوکاسل و یا دیگر سویه‌های واکسنی در دسترس می‌باشند. پس از واکسیناسیون صحیح با واکسن‌های غیرفعال و زنده، آنتی‌بادی‌های تولید شده ایمنی پایدار و طولانی گله‌های واکسینه را قطعی می‌سازند. کفایت واکسن‌های غیرفعال به روش استعمال صحیح واکسن‌های پرایم‌کننده بستگی دارد. استفاده گسترده از واکسن‌های زنده عموماً با اسپری توسط قطرات درشت و یا از طریق آب آشامیدنی انجام می‌شود (آندرید و همکاران ۱۹۸۳). دیگر روش‌های استفاده واکسن‌های زنده عبارتند از روش درون‌بینی یا درون‌چشمی که هر دوی این روش‌های زمان‌بر هستند. واکسن‌های غیرفعال باید به صورت تکی و معمولاً به روش تزریق داخل عضلانی یا زیرجلدی استعمال شوند.

REFERENCES

- Albassam, M.A., R.W. Winterfield & H.L. Thacker, 1986. Comparison of the nephropathogenicity of four stains of infectious bronchitis virus. *Avian Dis.*, 30, 468-476.
- Alexander, D.J., W.H. Allan, P.M. Biggs, C.D. Bracewell, J.H. Darbyshire, P.S. Dawson, A.H. Harris, F.T. Jordan, I. Mac Pherson, C.J. McFerran, C.J. Randall, J.C. Stuart, O. Swarbrick & G.P. Wilding, 1983. A standard technique for haemagglutination inhibition tests for antibodies to avian infectious bronchitis virus. *Vet Res.*, 113, 64.
- Andrade, L.F., P. Villegas & O.J. Fletcher, 1983. Vaccination of day-old broilers against infectious bronchitis: Effect of vaccine strain and route of administration. *Avian Dis.*, 27, 178-187.
- Avian infectious bronchitis, OIE Terrestrial Manual, 2008. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.02_AIB.pdf
- Beach, J.R. & O.W. Schalm, 1936. A filterable virus, distinct from that of laryngotracheitis, the cause of a respiratory disease of chicks. *Poult Sci.*, 15, 199-206.
- Cavanagh, D., 2007. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. *Vet Res.*, 38, 281-297.
- Crinion, R.A.P. & M.S. Hofstad, 1972. Pathogenicity of four serotypes of avian infectious bronchitis virus for the oviduct of young chickens of various ages. *Avian Dis.*, 16, 351-363.
- Dawson, P.S. & R.E. Gough, 1971. Antigenic variation in strains of avian infectious bronchitis virus. *Arch Gesamte Virusforsch.*, 34, 32-39.
- Delaplane, J.P. & H.O. Stuart, 1939. Studies of infectious bronchitis. Rhode Island Agricultural Experiment Station, RI. Bulletin 273.
- Gelb, J., Jr., J.K. Rosenberger, P.A. Fries, S.S. Cloud, E.M. Oder, J.D. Dohms & J.S. Jaeger, 1989. Protection afforded infectious bronchitis virus-vaccinated sentinel chickens raised in a commercial environment. *Avian Dis.*, 33, 764-769.
- Hofstad, M.S., 1945. A study of infectious bronchitis in chickens. I. The pathology of infectious bronchitis. *Cornell Vet.*, 35, 22-31 (a).
- Hofstad, M.S., 1945. A study of infectious bronchitis in chickens. II. Observations on the carrier status of chickens recovered from infectious bronchitis. *Cornell Vet.*, 35, 32-35.
- Jones, R.C. & A.G. Ambali, 1987. Re-excretion of an enterotropic infectious bronchitis virus by hens at point of lay after experimental infection at day old. *Vet Rec.*, 120, 617-620.
- Jungherr, E.I., T.W. Chomiak & R.E. Luginbuhl, 1956. Immunologic differences in strains of infectious bronchitis virus. In: Proc. 60th Annual Meeting U.S. Livestock Sanitary Association, 203-209.
- King, D.J. & S.R. Hopkins, 1984. Rapid serotyping of infectious bronchitis virus isolates with the haemagglutination inhibition test. *Avian Dis.*, 28, 727-733.
- Koch, G., A. Kant, J.K.A. Cook & D. Cavanagh, 1992. Location of antigenic sites defined by neutralising monoclonal antibodies on the S1 avian infectious bronchitis virus glycopolyptide. *J Gen Virol.*, 73, 591-596.
- Naqi, S.A., 1990. A monoclonal antibody-based immunoperoxidase procedure for rapid detection of infectious bronchitis virus in infected tissues. *Avian Dis.*, 34, 893-898.
- Van Roeckel, H., K.L. Bullis, O.S. Flint & M.K. Clarke, 1942. Poultry disease control service. Massachusetts Agricultural Experiment Station, MA, Annual Report, Bulletin 388, 99-103.
- Zarkov, I., 2003. Veterinary virology, Avian infectious bronchitis virus, RIK "Iskra-M-I", Stara Zagora, 316-318.

بررسی وضعیت بیماری
برونشیت عفونی در ایران

آنالیز مولکولی ویروس‌های برونشیت عفونی جدا شده در ایران بین سال‌های ۱۹۹۸ تا ۲۰۰۸

نیما قهرمانی^۱، محمدحسن بزرگمهری فرد^۲، عبدالحمید شوشتری^۳، رضا ممیز^۴

۱. متخصص بیماری‌های طیور، بخش فنی شرکت سواپارس

۲. استاد دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران

۳. دانشیار بخش بیماری‌های ویروسی موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی

۴. استادیار بخش بیماری‌های ویروسی موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی

چکیده

۱۰ جدایه ویروس برونشیت عفونی از نای و ریه ماکیان مشکوک به بیماری برونشیت عفونی در ایران بین سال‌های ۱۹۹۸ تا ۲۰۰۸ به روش RT-PCR مورد شناسایی واقع شدند. جهت آنالیز بیشتر، کل ژن S1 این جدایه‌ها با RT-PCR دیگری تکثیر شد. آنالیز فیلوژنتیک بر مبنای توالی‌های نوکلئوتیدی و آمینواسیدی ژن S1 نشان داد که جدایه‌های ایران در دو ژنوتیپ ماساچوست (۳ جدایه) و ۴/۹۱ (۷ جدایه) طبقه‌بندی می‌شوند. ۳ جدایه سروتیپ ماساچوست ارتباط ژنتیکی بسیار نزدیکی را با واکسن‌های تیپ ماساچوست نشان دادند (بالاخص واکسن H120) که این امر احتمال تشخیص و جداسازی سویه‌های واکسینال را نشان می‌دهد. مطالعه حاضر ثابت می‌کند که سروتیپ ۴/۹۱ در گله‌های طیور ایران از سال ۱۹۹۸ در حال چرخش بوده است. مقایسه جدایه‌های ۴/۹۱ ایران و تقریباً همه جدایه‌های ۴/۹۱ دیگر کشورها نشان می‌دهد که جدایه‌های ۴/۹۱ ایران (به استثناء جدایه IR/491/08) متوسط بیشترین شباهت نوکلئوتیدی و آمینواسیدی را با جدایه فرانسوی FR-94047-94 نشان می‌دهند که این یافته احتمال اینکه منشا جدایه‌های ۴/۹۱ ایران، فرانسه باشد را تقویت می‌کند. جدایه IR/491/08 از گله واکسینه شده با واکسن ۴/۹۱ جداسازی شد و شباهت بالایی را در توالی ژن S1 با سویه واکسنی ۴/۹۱ داشت. بنابراین این احتمال وجود دارد که این جدایه، جداسازی سویه واکسینال باشد. نتایج ما همچنین نشان داد که واکسن‌های تیپ ماساچوست به‌طور کامل از تکثیر ویروس‌های تیپ ۴/۹۱ جلوگیری نمی‌کنند.

واژگان کلیدی: ویروس برونشیت عفونی، ژن S1، آنالیز فیلوژنتیک، تکثیر، ایران

مقدمه

برونشیت عفونی یک بیماری ویروسی حاد با واگیری بالا در طیور می‌باشد که انتشار جهانی دارد (Cavanagh and Naqi, 2005; Cavanagh, 2003). اختصاصی‌ترین نشانه‌های بالینی در این بیماری، علایمی هستند که در اثر بیماری‌های تنفسی ایجاد می‌شوند. هرچند، برونشیت عفونی می‌تواند علائم کلیوی (Liu and Kong, 2004)، روده‌ای و تولید مثلی را هم نشان دهد (Dhinakar and Jones, 1997). این بیماری ضرر و زیان عمده اقتصادی را در نتیجه راندمان ضعیف یا کاهش کمی و کیفی تولید تخم مرغ و هم‌چنین بروز عفونت‌های ثانویه موجب می‌شود (Cavanagh and Naqi, 2003).

ویروس برونشیت عفونی، متعلق به خانواده کرونا ویریده است (Cavanagh, 2005). این ویروس یک ویروس غشادار پلئومورف با برجستگی‌های سطحی چماقی شکل (Spikes) در سطح ویریون می‌باشد و ژنوم آن یک مولکول RNA تک رشته‌ای با سنس مثبت است که تقریباً از ۲۷ کیلو باز آلی تشکیل شده است (Boursnell et al., 1987). ویریون حاوی چهار

پروتئین ساختاری عمده است. این پروتئین‌ها شامل پروتئین نوکلئوکپسید (N)، گلیکوپروتئین خاری سطحی (S)، گلیکوپروتئین غشاء داخلی کوچک (M) و پروتئین غشایی (E) می‌باشند. پروتئین S از دو گلیکوپولی پپتید S₁ و S₂ تشکیل شده است (Stern and Sefton, 1982). پروتئین S مسئول اتصال ویریون به سلول‌های میزبان است و تحت واحد S₁ مسئول القای آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده ویروس اختصاصی سروتیپ و آنتی‌بادی‌های ممانعت‌کننده از هم‌آگلوتیناسیون می‌باشد (Cavanagh et al., 1988; Koch et al., 1990). تحت واحد S₁ متغیرترین پروتئین است که شامل ۳ منطقه شدیداً متغیر می‌باشد (HVRs) که این مناطق در توالی‌های آمینواسیدی ۶۷-۳۸، ۱۴۱-۹۱ و ۳۸۷-۲۷۴ واقع شده‌اند (Cavanagh et al., 1988; Moore et al., 1988). شماری از سروتیپ‌ها و تحت‌تیپ‌های ویروس برونشیت عفونی از سراسر جهان گزارش شده است (Jackwood et al., 2005; Mondal and Cardona, 2007). سروتیپ‌ها، تحت تیپ‌ها یا واریانت‌های متنوع ویروس برونشیت عفونی در نتیجه ورود یا حذف نوکلئوتیدی، موتاسیون‌های نقطه‌ای و یا نوترکیبی در ژنوم تحت واحد S₁ حاصل می‌شوند (Cavanagh et al., 1988; Wang et al., 1993) و باعث شیوع بیماری برونشیت عفونی در گله‌های طیور واکسینه می‌گردند. بنابراین تعیین هویت مولکولی ویروس برونشیت عفونی بر روی آنالیز ژن پروتئین S₁ متمرکز شده است.

در ایران وجود ویروس برونشیت عفونی، نخستین بار در سال ۱۹۹۴ با استفاده از روش‌های سرولوژیکی و وجداسازی ویروس تأیید شد و سروتیپ ماساچوست به عنوان سروتیپ اصلی ویروس برونشیت عفونی در حال چرخش در کشور گزارش شد (Aghakhan et al., 1994). بررسی‌های بعدی وجود یک سروتیپ جدید به نام 793/B (4/91) را در ایران نشان داد (Vasfi Marandi and Bozorgmehri Fard, 2000; Momayez et al., 2002). هم‌چنین یک مطالعه جدید نشان داد که تیپ ۴/۹۱ غالب ویروس برونشیت عفونی بین سال‌های ۲۰۰۴-۱۹۹۹ در ایران بوده است (Shoushtari et al., 2008). هدف از این مطالعه، شناسایی جدایه‌های فیلدی ویروس برونشیت عفونی از واگیری‌های مختلف گله‌های طیور تجاری ایران بین سال‌های ۲۰۰۸-۱۹۹۸ می‌باشد تا با آنالیز فیلوژنتیکی آنها، ارتباط بین این جدایه‌ها و سویه‌های فرانس مشخص شود.

مواد و روش کار

نمونه‌ها: نمونه‌های بافتی (نای و ریه) از گله‌های طیور گوشتی و تخمگذار تجاری دارای علائم تنفسی مشکوک به بیماری برونشیت عفونی بین سال‌های ۲۰۰۸-۱۹۹۸ اخذ شد (جدول ۱). برای جداسازی ویروس، بافت‌ها (نای و ریه) از حداقل ۵ پرندۀ از هر گله اخذ شدند و یک سوسپانسیون بافتی ۱۰ درصد وزنی به حجمی از نمونه‌های هر گله در سالیان بافر فسفاتۀ با غلظت ۰/۱ مولار حاوی ۱۰۰ واحد پنی‌سیلین، ۱۰۰ میکروگرم استرپتومایسین و ۸۰ میکروگرم جنتامایسین در هر میلی‌لیتر تهیه شد. پس از ۲ ساعت انکوباسیون در دمای اتاق، ۲۰۰ میکرولیتر از مایع رویی سوسپانسیون‌ها به داخل حفره آلانتوئیک تخم‌مرغ‌های جنین دار ۹-۱۱ روزه SPF تلقیح شد (Lohman, Germany). ۵ تخم‌مرغ برای هر نمونه استفاده شد. پس از ۷۲-۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، مایعات آلانتوئیک جمع‌آوری شدند و برای بررسی حضور ویروس برونشیت عفونی با استفاده از تکنیک RT-PCR مورد آزمایش قرار گرفتند.

استخراج RNA، RT-PCR و nested PCR

RNA ویروسی از ۲۰۰ میکرولیتر مایع آلانتوئیک با استفاده از کیت تخلیص RNA به نام High Pure Viral RNA kit استخراج (Roche, Germany) و در ۵۰ میکرولیتر آب حل شد. واکنش RT-PCR با استفاده از سیستم RT-PCR یک مرحله‌ای TITAN (Roche) انجام شد. پرایمرهای (5'-CCCAATTTGAAAACACTGAACA-3') S1Uni2+ (Binns et al., 1985) و (5'-CCTCTATAAACACCCTTGCA-3') XCE2- (Adzhar et al., 1997)، هر دو از ژن S₁، با ۱

میکرولیتر RNA برای تکثیر قطعه‌ای در حدود ۱۲۰۰ جفت بازآلی (bp)، که مشترک برای همه ویروس‌های برونشیت عفونی است، مورد استفاده قرار گرفتند. برای انجام واکنش RT، مخلوط واکنش در دمای ۴۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ دقیقه انکوبه شد و سپس در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه گرم شد. واکنش PCR با شرایط زیر انجام شد: واسرشت سازی (۹۴ درجه سانتیگراد، ۳۰ ثانیه)، هم‌سرشت‌سازی (۴۸ درجه سانتیگراد، ۲ دقیقه) و گسترش (۶۸ درجه سانتیگراد، ۲ دقیقه)، این سه مرحله ۳۵ سیکل تکرار شد و به دنبال آن مرحله گسترش نهایی (۶۸ درجه سانتیگراد، ۲ دقیقه) انجام شد. قطعه تکثیر شده در سه PCR آشیانه‌ای اختصاصی سروتیپ با پرایمر (5'-CAGATTGCTTACAACCACC-3') XCE3- که برای هر سه سویه D274، Massachusetts و 793/B مشترک است و پرایمرهای (5'-TTCCAATTATCAAACCAGC-3') DCE1+، (5'-AATACTACTACTTTACGTTACAC-3') MCE1+، (5'-AAGTGCCTTTAGGCCTGG-3') B1+ که به ترتیب برای تیپ‌های D274، ماساچوست و 793/B اختصاصی هستند و قطعات به طول ۲۱۷، ۲۹۵ و ۹۷۲ بازی را تولید می‌کنند، استفاده شد (Adzhar et al., 1997). nested PCR با ۱ میکرولیتر از رقت ۱/۱۰ واکنش PCR ابتدایی در حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر با شرایط زیر انجام شد: واسرشت سازی (۹۴ درجه سانتیگراد، یک دقیقه)، هم‌سرشت‌سازی (۴۸ درجه سانتیگراد، ۲ دقیقه) و گسترش (۷۲ درجه سانتیگراد، ۹۰ ثانیه)، این سه مرحله ۳۵ سیکل تکرار شد و در نهایت مرحله گسترش نهایی (۷۲ درجه سانتیگراد، ۱۰ دقیقه) انجام شد. محصول تکثیر شده نهایی به روش الکتروفورز در ژل آگارز ۱ درصد، رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید، با تابش اشعه UV مشاهده و مورد آنالیز قرار گرفت.

تعیین توالی ژن S1:

۱۰ جدایه ویروس برونشیت عفونی که در واکنش RT-PCR به عنوان ویروس برونشیت عفونی شناسایی و در واکنش nested-PCR تعیین تیپ شدند، برای تعیین توالی انتخاب شدند. برای تعیین توالی، کل ژن S1 در RT-PCR دیگری تکثیر شد. برای تکثیر این قطعه، RNA ویروسی به همان روشی که قبلاً توضیح داده شد، استخراج و تخلیص گشت. واکنش RT-PCR با استفاده از سیستم RT-PCR یک مرحله‌ای TITAN صورت گرفت (Roche). در این RT-PCR پرایمرهای: (5'-S1OLIGO3' CATAACTAACATAAGGGCAA-3') و (5'-S1OLIGO5'TGAAAACACTGAACAAAAGACA-3') استفاده شدند (Kwon et al., 1993). برای واکنش RT، مخلوط واکنش در دمای ۴۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ دقیقه انکوبه شد و سپس به مدت ۲ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد گرم شد. واکنش PCR با 35 مرحله واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه، هم‌سرشت‌سازی در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه و گسترش در دمای ۶۸ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵۰ ثانیه انجام شد. مرحله گسترش نهایی در دمای ۶۸ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. سرانجام محصول PCR روی ژل آگارز ۱ درصد آنالیز شد. طول پیش‌بینی شده محصول PCR در حدود ۱۷۲۰ جفت بازآلی بود. محصول PCR با استفاده از کیت تخلیص DNA تحت عنوان High pure PCR product purification kit طبق دستورالعمل شرکت سازنده تخلیص شد. محصولات PCR استخراج شده به صورت مستقیم و دوطرفه تعیین توالی شدند (MWGCo., Germany).

آنالیز توالی‌ها

توالی‌ها با استفاده از بسته نرم‌افزاری DNASTar Version 5.2 تکمیل و مورد ویرایش قرار گرفتند. Align (هم‌طراز کردن) توالی‌های نوکلئوتیدی و آمینواسیدی متناظر با استفاده از برنامه نرم‌افزاری ClustalW انجام گرفت. آنالیز فیلوژنتیک با برنامه MegAlign Version 2.8 انجام شد. توالی‌های نوکلئوتیدی کل ژن S1 ۱۰ جدایه مورد نظر در GenBank قرار داده شد (جدول ۱). سوبه‌های رفرانس استفاده شده در این مطالعه عبارت بودند از:

Ark-DPI (AF006624), Ark-99(L10384), B1648(X87238), Beaudette (X02342), Connecticut (EU283057), D274(X15832), D1466(M21971), Florida (AF027512), FR-85131-85(AJ618985), FR-88061-88(AJ618986), FR-94047-94(AJ618987), Gray(L14069), Holte(L18988), H120(M21970), H52(AF352315), IR-1061-PH (AY544778), IR-1062GA(AY544777), IR-3654-VM(AY544776), Italy 02 (AJ57137), JMK(L14070), M41(X04722), Ma5(AY561713), Spain/92/35(DQ386091), Spain/95/194 (DQ064802), Spain/99/327/(DQ386097), UK/7/91 (Z83975), UK/5/91 (Z83978), UK/7/93 (Z83979), 4/91 attenuated (AF093793) و 4/91 pathogenic (AF093794).

جدول ۱: اطلاعات اپیدمیولوژیکی جدایه‌های فیلدی ویروس برونشیت عفونی ایران مورد استفاده در این مطالعه

شماره دسترسی در بانک ژن	ژنوتیپ	سن (روز)	نژاد	سال جداسازی	نام جدایه
HQ۸۴۲۷۰۶	۴/۹۱	۳۹	گوشتی	۱۹۹۸	IR/۵۷۳/۹۸
HQ۸۴۲۷۰۷	۴/۹۱	۴۲	گوشتی	۱۹۹۹	IR/۵۱۲/۹۹
HQ۸۴۲۷۰۸	۴/۹۱	۴۰	گوشتی	۱۹۹۹	IR/۵۲۵/۹۹
HQ۸۴۲۷۰۹	Mass	۳۸	تخم گذار	۲۰۰۰	IR/۱۷/۰۰
HQ۸۴۲۷۱۰	Mass	نامشخص	گوشتی	۲۰۰۲	IR/۷۰/۰۲
HQ۸۴۲۷۱۱	۴/۹۱	۲۶	گوشتی	۲۰۰۳	IR/۸۰۳/۰۳
HQ۸۴۲۷۱۲	۴/۹۱	۳۵	گوشتی	۲۰۰۷	IR/۱۴/۰۷
HQ۸۴۲۷۱۳	Mass	۴۵	گوشتی	۲۰۰۸	IR/۴۳/۰۸
HQ۸۴۲۷۱۴	۴/۹۱	۳۵	گوشتی	۲۰۰۸	IR/۱۹/۰۸
HQ۸۴۲۷۱۵	۴/۹۱	نامشخص	گوشتی	۲۰۰۸	IR/۴۹۱/۰۸

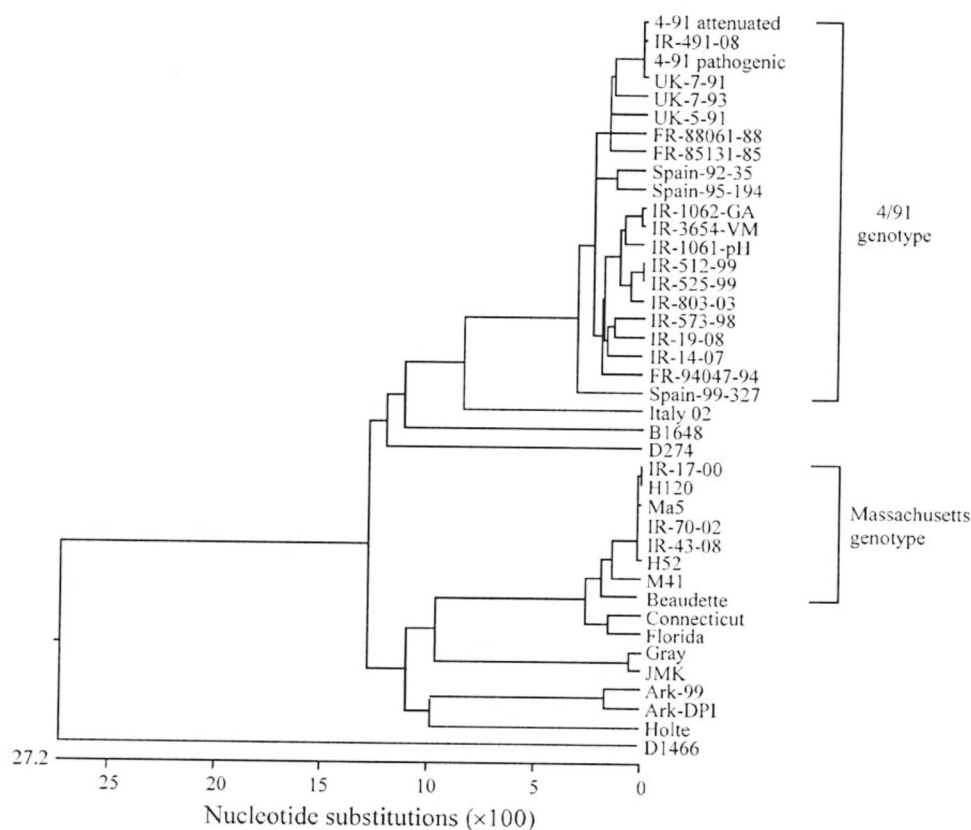
جدایه‌ها به روش پیشنهادی کاواناگ (۲۰۰۱) نام گذاری شده‌اند یعنی (Country/isolate number/year of isolation (I.R. Iran)

نتایج و بحث

تشخیص و تعیین تیپ مولکولی: ۱۰ جدایه ویروس برونشیت عفونی که در واکنش RT-PCR با استفاده از پرایمرهای S1Uni2+ و XCE2- به عنوان ویروس برونشیت مورد شناسایی قرار گرفتند با آزمایش nested PCR به ۲ گروه تقسیم‌بندی شدند. ۷ جدایه (IR/573/98, IR/5772/99, IR/525/99, IR/803/03, IR/14/07, IR/9/08, IR/491/08) در واکنش nested PCR قطعات به طول ۹۷۲ باز آلی تولید کردند و به عنوان تیپ 793/B (4/91) شناسایی شدند و ۳ جدایه (IR/17/00, IR/70/02 و IR/43/08) قطعات به طول ۲۹۵ باز آلی تولید کردند و به عنوان تیپ ماساچوست شناسایی شدند. هیچ بانندی با طول ۲۱۷ باز آلی دیده نشد و بنابراین جدایه‌ای به عنوان تیپ D274 مورد شناسایی قرار نگرفت.

تعیین توالی و آنالیز توالی‌ها: برای آنالیز مولکولی بیشتر این ۱۰ جدایه ویروس برونشیت عفونی، کل ژن S1 آنها تعیین توالی شد. توالی‌های نوکلئوتیدی و آمینواسیدی متناظر این جدایه‌ها مشخص شد و با توالی‌های موجود در پایگاه داده‌های بانک ژنی مقایسه شد. آنالیز داده‌ها نشان داد که جدایه‌های ایران ارتباط ژنتیکی نزدیکی با سویه‌های دو ژنوتیپ 793/B (4/91) و ماساچوست دارند. آنالیز فیلوژنتیکی بر مبنای توالی‌های نوکلئوتیدی و آمینواسیدی ژن S1 ۱۰ جدایه ویروس برونشیت عفونی ایران و سویه‌های فرانس ویروس برونشیت عفونی نشان داد جدایه‌های ایران به دو گروه ژنتیکی مجزا یا دو ژنوتیپ طبقه‌بندی می‌شوند (تصویر ۱). ژنوتیپ I (4/91 genotype) شامل ۷ جدایه فیلدی ویروس برونشیت عفونی ایران است که با سویه‌های

رفرانس ۴/۹۱ در یک گروه طبقه‌بندی می‌شوند و ژنوتیپ II (Mass genotype) شامل ۳ جدایه فیلدی و ویروس برونشیت عفونی ایران است که با جدایه‌های سروتیپ ماساچوست در گروه دیگری طبقه‌بندی می‌شوند.



تصویر ۱: ارتباطات فیلوژنتیک جدایه‌های ویروس برونشیت عفونی ایران و سویه‌های رفرانس انتخابی بر مبنای توالی‌های کل ژن S1 با استفاده از برنامه MegAlign با متد (DNASar, USA) Clustal W.

ژنوتیپ ۴/۹۱: مقایسه توالی‌های نوکلئوتیدی و آمینواسیدی ژن S1 ۷ جدایه ویروس برونشیت عفونی ایران که در ژنوتیپ I قرار گرفتند نشان داد که این جدایه‌ها از نظر توالی نوکلئوتیدی بین ۹۴/۱ درصد (جدایه IR/14/07 و جدایه IR/491/08) تا ۹۹/۹ درصد (جدایه IR/512/99 و جدایه IR/525/99) و از نظر توالی آمینواسیدی بین ۹۰/۹ درصد (جدایه IR/14/07 و جدایه IR/491/08) تا ۹۹/۸ درصد (جدایه IR/512/99 و جدایه IR/525/99) شباهت دارند (جدول ۲). مقایسه توالی‌های کل ژن S1 ۷ جدایه فیلدی ایران و توالی‌های ژن S1 سایر جدایه‌های ۴/۹۱ که قبلاً در پایگاه داده‌های بانک ژن ثبت شده‌اند شامل جدایه‌های بریتانیا، فرانسه، اسپانیا و ۳ جدایه قبلی ایران، نشان داد که ۶ جدایه یعنی جدایه‌های IR/513/98، IR/512/99، IR/525/99، IR/503/03، IR/14/07 و IR/19/08 متوسط بیشترین شباهت نوکلئوتیدی و آمینواسیدی را به ۳ جدایه ۴/۹۱ قبلی ایران (IR/1061/PH، IR/1062/GA و IR/3654/VM) و سپس جدایه فرانسوی FR-94047-94 دارند. جدایه IR/491/08 بیشترین شباهت نوکلئوتیدی و آمینواسیدی را به جدایه UK/4/91 (4/91 pathogenic) به عنوان منشأ سویه واکسینال و سویه واکسینی (4/91 attenuated) نشان می‌دهد. شباهت نوکلئوتیدی و آمینواسیدی ژن S1 این جدایه با سویه ۴/۹۱ واکسینی به ترتیب ۹۹/۸ و ۹۹/۴ درصد می‌باشد. این جدایه کمترین شباهت نوکلئوتیدی و آمینواسیدی را با سایر جدایه‌های ژنوتیپ I ایران نشان می‌دهد (به ترتیب ۹۴/۸-۹۴/۱ و ۹۰/۹-۹۲/۵ درصد). شباهت سایر جدایه‌های ژنوتیپ I ایران به سویه واکسینی ۴/۹۱ تا حدی پایین‌تر است به طوری که شباهت‌های نوکلئوتیدی و آمینواسیدی توالی‌های ژن S1 این جدایه‌ها با سویه واکسینی ۴/۹۱ به ترتیب ۹۴/۸-۹۴/۱ و ۹۰/۷-۹۲/۵ درصد می‌باشد. جدایه‌های ژنوتیپ I ایران ۷۵/۹-۷۴/۱ درصد شباهت در توالی‌های آمینواسیدی ژن S1

با واکنش‌های تیپ ماساچوست (H120, H52, Ma5 و M41) نشان دادند (جدول ۲). مقایسه توالی‌های جدایه‌های فیلدی ۴/۹۱ ایران مشخص کرد ۴ اسید آمینه در موقعیت‌های ۵۵، ۵۶، ۵۷ و ۵۸ (واقع شده در HVRI) در ۲ جدایه که در یک سال جداسازی شده بودند، (IR/512/99 و IR/525/99) مورد حذف قرار گرفته است. ۳ جدایه ۴/۹۱ قبلی ایران و تعدادی از جدایه‌های ۴/۹۱ اسپانیا این حذف آمینواسیدی را در موقعیت‌های ۵۴، ۵۵، ۵۶، ۵۷ و ۵۸ (واقع شده در HVRI) نشان می‌دهند. هم‌چنین هیچ‌گونه ورود نوکلئوتیدی (Insertions) در توالی‌های ژن S1 جدایه‌های ۴/۹۱ ایران مشاهده نشد.

ژنوتیپ Mass (ماساچوست): مقایسه توالی‌های ژن S1 ۳ جدایه ژنوتیپ II نشان داد که این جدایه‌ها بسیار به هم شبیه هستند به طوری که از نظر توالی‌های نوکلئوتیدی بین ۹۹/۸-۹۹/۹ و از نظر توالی‌های آمینواسیدی بین ۹۹/۴-۹۹/۸ درصد شباهت نشان می‌دهند (جدول ۲). توالی ژن S1 جدایه IR/17/00 کاملاً شبیه توالی ژن S1 در سویه H120 است (این سویه به طور معمول در برنامه‌های واکسیناسیون گله‌های ایران استفاده می‌شود). جدایه‌های IR/70/02 و IR/43/08 به ترتیب ۹۹/۸ و ۹۹/۴ درصد شباهت در توالی‌های آمینواسیدی با سویه H120 نشان می‌دهند. مقایسه توالی‌های ژن S1 جدایه‌های ژنوتیپ II با سویه‌های واکسینال ماساچوست (H120, H52, Ma5 و M41) نشان می‌دهد که ۳ جدایه ژنوتیپ ماساچوست متوسط بیشترین شباهت نوکلئوتیدی و آمینواسیدی را با سویه H120 دارند. هم‌چنین این ۳ جدایه کمترین شباهت نوکلئوتیدی (۹۷/۶ درصد) و آمینواسیدی (۹۶/۳-۹۵/۹) را با سویه M41 نشان می‌دهند (جدول ۲). هیچ‌گونه حذف یا ورود نوکلئوتیدی در توالی‌های ژن S1 جدایه‌های ژنوتیپ Mass مشاهده نشد.

J. Anim. Vet. Adv., 10 (22): 2961-2967, 2011

Table 2: Nucleotide and amino acid identities of IBV S1 gene sequences: comparison of the ten Iranian field isolates and 20 reference IBV strains of different serotypes obtained from GenBank

Amino acid identity (%)	Nucleotide identity (%)																														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
4/91 pathogenic	-	99.8	99.8	97.2	97.2	96.5	95.5	95.7	93.0	84.5	94.8	94.9	94.8	94.7	94.9	95.0	94.6	94.1	94.4	99.9	79.0	78.9	78.9	79.0	78.9	78.9	79.2	78.1	78.6	78.9	
4/91 attenuated	99.4	-	99.6	97.0	97.0	96.4	95.3	95.5	92.8	84.4	94.6	94.7	94.7	94.7	94.7	94.8	94.4	94.1	94.2	99.8	78.9	78.8	78.8	78.9	78.8	78.9	79.1	77.9	78.5	78.9	
UK/7/91	99.4	98.9	-	97.3	97.2	96.5	95.3	95.5	92.8	84.3	94.6	94.7	94.6	94.5	94.6	94.7	94.3	93.9	94.2	99.6	78.8	78.8	78.8	78.8	78.8	78.9	79.2	77.9	78.4	78.7	
UK/5/91	94.1	93.5	94.2	-	96.9	96.8	95.7	95.2	93.5	84.5	94.9	95.2	95.1	94.9	95.3	95.3	94.6	94.1	94.4	97.0	78.9	79.0	79.0	78.9	79.0	79.0	79.5	78.1	78.8	79.2	
UK/7/93	94.8	94.2	95.0	93.9	-	96.0	94.7	94.9	92.2	84.5	94.3	94.5	94.5	94.1	94.3	94.3	93.9	93.4	93.3	97.0	79.2	79.2	79.2	79.2	79.2	79.2	79.6	78.1	78.5	79.3	
FR-85131-85	93.3	92.8	93.5	93.3	92.0	-	96.3	96.0	93.9	84.1	95.4	95.7	95.6	95.8	95.6	95.7	95.4	95.1	94.9	96.4	78.5	78.6	78.6	78.5	78.6	78.4	78.6	77.6	78.1	79.2	
FR-94047-94	92.4	91.8	91.8	92.2	90.5	93.3	-	96.5	95.9	84.3	96.9	97.2	97.1	97.0	97.3	97.3	96.6	96.0	95.9	95.4	78.3	78.5	78.5	78.3	78.5	78.3	78.8	78.0	78.2	79.2	
Spain/92/35	93.9	93.3	93.3	92.2	92.4	93.9	94.2	-	93.7	84.5	95.3	95.7	95.8	95.7	95.5	95.5	95.4	95.2	94.9	95.5	78.5	78.6	78.6	78.5	78.6	78.5	78.9	78.2	78.4	79.3	
Spain/99/327	91.6	91.0	91.0	92.0	89.6	92.4	95.0	92.4	-	86.8	94.5	94.7	94.7	94.4	94.8	94.2	93.9	93.7	92.8	78.0	78.1	78.1	78.0	78.1	78.1	78.3	77.8	78.5	78.6		
Italy 02	83.1	82.9	82.7	81.8	82.2	81.8	81.4	82.3	83.8	-	84.7	85.1	85.0	84.2	84.9	84.9	84.2	84.0	83.5	84.5	78.5	78.6	78.6	78.5	78.6	78.6	78.7	79.0	79.6	80.5	
IR-1061-PH	91.2	90.6	90.6	91.2	90.6	92.1	94.0	93.1	92.9	81.6	-	98.1	98.1	97.8	98.2	98.3	97.8	96.7	96.8	94.6	78.4	78.3	78.3	78.4	78.3	78.3	78.8	78.1	78.3	78.5	
IR-1062-GA	91.6	91.1	91.1	92.0	91.4	92.6	94.4	93.1	93.3	81.9	97.2	-	99.8	97.5	98.1	98.1	97.5	96.5	96.5	94.7	77.9	78.0	78.0	77.9	78.0	77.9	78.3	78.1	77.9	79.0	
IR-3654-VM	91.2	90.7	90.7	91.6	91.4	92.2	94.0	93.1	92.9	81.8	96.8	99.6	-	97.5	98.1	98.0	97.4	96.5	96.4	94.7	78.0	78.1	78.1	78.0	78.1	78.0	78.4	78.2	78.0	79.0	
IR/573/98	91.5	91.3	90.9	91.7	90.0	92.4	94.1	93.3	92.9	81.6	95.3	95.3	95.2	-	98.2	98.3	97.5	97.3	97.3	94.7	78.2	78.3	78.3	78.2	78.3	78.2	78.6	77.9	78.0	79.1	
IR/512/99	92.9	92.3	92.3	93.1	91.2	93.8	95.5	94.2	94.2	82.4	97.0	97.4	97.0	97.0	-	99.9	98.7	96.8	97.1	94.8	78.1	78.2	78.2	78.1	78.2	78.0	78.7	78.2	78.3	79.2	
IR/525/99	93.1	92.5	92.5	93.3	91.4	94.0	95.3	94.4	94.4	82.4	97.2	97.2	96.8	97.2	99.8	-	98.8	96.8	97.2	94.8	78.1	78.3	78.3	78.1	78.3	78.1	78.8	78.1	78.3	79.3	
IR/803/03	92.4	91.8	91.8	92.2	90.7	93.1	94.4	93.7	92.9	81.8	96.1	96.1	95.7	95.9	97.9	97.9	-	96.6	96.4	94.4	78.2	78.3	78.3	78.2	78.3	78.1	78.8	77.9	78.0	79.1	
IR/14/07	91.1	90.7	90.5	90.9	89.1	91.8	93.1	93.1	92.7	81.4	94.2	94.4	94.0	95.2	95.5	95.5	95.0	-	96.0	94.1	78.1	78.2	78.2	78.1	78.2	78.1	78.4	77.9	77.6	78.9	
IR/19/08	92.0	91.5	91.5	91.8	89.8	92.8	93.3	92.9	92.4	81.3	94.8	94.6	94.2	95.4	97.0	97.2	95.2	94.4	-	94.2	78.5	78.5	78.4	78.5	78.5	78.4	78.8	78.0	78.1	79.1	
IR/491/08	99.6	99.4	99.1	93.7	94.4	92.9	92.0	93.5	90.7	82.9	90.8	91.2	90.9	91.5	92.3	92.5	92.0	90.9	91.7	-	79.0	78.9	78.9	79.0	78.9	78.9	79.2	78.0	78.5	78.9	
IR/17/00	75.0	74.7	74.7	74.7	75.2	74.3	73.9	76.2	74.8	75.2	75.1	74.7	74.7	74.7	75.5	75.7	75.4	74.9	75.2	74.7	-	99.9	99.8	100.0	99.6	99.8	97.6	79.8	83.9	81.2	
IR/70/02	75.0	74.7	74.7	74.7	75.0	74.3	73.9	76.2	74.8	75.2	75.1	74.7	74.7	74.7	75.5	75.7	75.4	74.9	75.2	74.7	99.8	-	99.9	99.9	99.8	99.8	97.6	79.9	84.0	81.3	
IR/43/08	75.0	74.7	74.7	74.5	75.0	74.3	73.9	76.2	74.8	75.2	75.1	74.7	74.7	74.5	75.3	75.5	75.4	74.9	75.2	74.7	99.4	99.6	-	99.8	99.6	99.8	97.6	79.9	84.0	81.3	
H120	75.0	74.7	74.7	74.7	75.2	74.3	73.9	76.2	74.8	75.2	75.1	74.7	74.7	74.7	75.5	75.7	75.4	74.9	75.2	74.7	100.0	99.8	99.4	-	99.6	99.8	97.6	79.8	83.9	81.2	
H52	74.9	74.5	74.5	74.5	74.9	74.1	73.7	76.0	74.6	75.0	75.1	74.5	74.5	74.5	75.3	75.5	75.2	74.7	75.2	74.5	99.1	99.3	98.9	99.1	-	99.5	97.4	79.8	83.9	81.3	
Ma5	75.0	74.7	74.7	74.5	75.2	74.3	73.9	76.2	74.8	75.2	75.1	74.7	74.7	74.5	75.3	75.5	75.4	74.9	75.4	74.7	99.6	99.4	99.4	99.6	98.7	-	97.7	79.8	83.9	81.2	
M41	74.5	74.1	74.1	74.5	75.2	73.7	73.7	75.8	74.7	74.7	74.3	74.7	74.7	74.1	75.1	75.1	75.0	74.3	74.7	74.1	96.3	96.1	95.9	96.3	95.3	96.1	-	80.1	84.0	80.9	
Ark-99	76.6	76.3	76.3	76.1	76.4	76.3	75.9	76.4	77.2	77.8	75.5	76.2	76.4	75.0	76.1	76.1	74.6	75.7	76.3	77.3	77.3	77.3	77.3	77.3	76.9	77.5	76.9	-	82.4	79.7	
Gray	77.0	76.8	76.6	76.1	76.8	76.4	75.7	77.1	77.1	78.5	76.0	75.8	76.0	75.7	76.4	76.6	76.1	75.1	75.9	76.8	79.9	79.9	79.9	79.9	79.5	79.9	79.3	80.3	-	81.0	
D274	78.8	78.6	78.3	78.1	78.6	79.9	78.3	80.3	78.2	80.1	77.0	78.0	77.8	78.1	78.7	78.9	78.8	78.3	78.6	78.6	78.4	78.4	78.4	78.4	78.4	78.2	78.4	77.7	79.7	79.2	-

تصویر ۲: شباهت‌های نوکلئوتیدی و آمینواسیدی توالی‌های ژن S1 ویروس‌های برونشیت عفونی: مقایسه ۱۰ جدایه فیلدی ایران و ۲۰ سویه ویروس رفرانس از سروتیپ‌های مختلف ثبت شده در بانک ژن

گلیکوپروتئین S ویروس برونشیت عفونی به عنوان یک پروتئین پیش‌ساز می‌باشد (S0) که به دو تحت واحد S1 و S2 شکافته می‌شود. ناحیه تقسیم (شکافتگی) S1-S2 از ۵ اسید آمینه بازی تشکیل شده است (Cavanagh et al., 1986; Jackwood et

(al., 2001). ۶ جدایه ژنوتیپ ۴/۹۱ شامل IR/512/99, IR/525/99, IR/803/03, IR/14/07, IR/19/08 و IR/491/08 در این ناحیه مانند اکثر جدایه‌های ۴/۹۱ و سویه‌های Ark DPI، Gray، و D274 واجد توالی Arg-Arg-Ser-Arg-Arg بودند. در حالی که ۳ جدایه ژنوتیپ Mass واحد توالی Arg-Arg-Phe-Arg-Arg مانند سویه‌های H120، H52، Ma5 و M41 بودند. توالی جدایه IR/513/08 در این ناحیه متفاوت از آن در سایر جدایه‌های ژنوتیپ I بود. این توالی در این جدایه His-Arg-Ser-Arg-Arg مانند سویه Ark-99 بود.

بیماری برونشیت عفونی در حال حاضر یکی از بیماری‌های اصلی گله‌های طیور در سراسر دنیا می‌باشد. وجود سروتیپ‌های مختلفی که علیه یکدیگر ایمنی کامل ایجاد نمی‌کنند و هم‌چنین ظهور مداوم واریانت‌های جدید، مشکل عمده ایجاد ایمنی علیه ویروس برونشیت عفونی می‌باشد. شیوع‌های معمول بیماری برونشیت عفونی اغلب در نتیجه عفونت با سویه‌هایی است که از نظر سرولوژیکی با سویه‌های واکسنی متفاوتند (Xu et al., 2007). بنابراین شناسایی ویروس‌های برونشیت عفونی در حال چرخش در کشور و تعیین هویت مولکولی آنها لازم و ضروری است تا براساس آن مناسب‌ترین برنامه واکسیناسیون جهت کنترل بیماری اتخاذ شود. در این مطالعه، محققین ۱۰ جدایه ویروس برونشیت عفونی در گله‌های طیور ایران را بین سال‌های ۲۰۰۸-۱۹۹۸ شناسایی و هویت مولکولی آنها را مشخص کردند. برای تشخیص اولیه از روش RT-PCR استفاده و به دنبال آن برای تأیید تشخیص از روش تعیین توالی استفاده شد. تشخیص بیماری برونشیت عفونی معمولاً براساس جداسازی ویروس در تخم‌مرغ جنین‌دار و متعاقباً شناسایی جدایه‌ها با استفاده از روش‌های ایمونولوژیکی می‌باشد. این روش وقت‌گیر است و نیاز به استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی پلی‌کلونال یا مونوکلونال دارد. علاوه بر آن برخی از جدایه‌ها می‌توانند مخلوطی از چند تیپ مختلف ویروس برونشیت عفونی باشند که باعث سردرگمی در تفسیر نتایج حاصله می‌شود (Meulemans et al., 2001). نشان داده شده است که تکنیک RT-PCR برای تشخیص ویروس برونشیت عفونی و تعیین تیپ آن بسیار مؤثر است (Adzhar et al., 1996; Jackwood et al., 1999; Handberg et al., 1997). با استفاده از پرایمرهای اختصاصی در nested PCR جدایه‌های ویروس برونشیت عفونی ایران به ۲ تیپ مجزا تقسیم شدند: سروتیپ ماساچوست و سروتیپ 793/B (۴/۹۱) تعیین توالی ژن S1 این جدایه‌ها نتایج تعیین تیپ با آزمایش nested PCR را تأیید کرد. تعیین توالی نوکلئوتیدی ژن S1 با استفاده از پرایمرهای مناسب به عنوان مؤثرترین روش جهت تفریق سویه‌های مختلف ویروس برونشیت عفونی شناخته می‌شود (Bochkov et al., 2006).

آنالیز توالی‌های جدایه‌های ویروس برونشیت عفونی ایران نشان داد که ۲ سروتیپ ماساچوست و ۴/۹۱ در گله‌های طیور ایران حضور دارند. مطالعه حاضر جامع‌ترین و کامل‌ترین آنالیز مولکولی جدایه‌های ویروس‌های برونشیت عفونی ایران تا این تاریخ است. سروتیپ ماساچوست نخستین تیپ ویروس برونشیت عفونی بود که در دهه ۱۹۳۰ در ایالات متحده شناسایی شد. این سروتیپ وسیع‌ترین توزیع جغرافیایی را در کل دنیا دارد و بطور معمول در آمریکای شمالی و جنوبی، اروپا و آسیا شناسایی شده است. این امر در نتیجه مصرف طولانی مدت سویه‌های واکسنی تخفیف حدت یافته این سروتیپ در بسیاری از کشورها می‌باشد. تنها استثناء در این زمینه قاره استرالیا است که در آنجا ویروس برونشیت عفونی از همان اوایل دهه ۱۹۳۰ به طور مستقلی از دیگر نقاط جهان تکامل پیدا کرده است (Bochkov et al., 2006). در ایران واکسن‌های تیپ ماساچوست (به‌خصوص H120) به‌طور وسیعی در گله‌های طیور تجاری علیه ویروس برونشیت عفونی استفاده می‌شوند. ۳ جدایه سروتیپ ماساچوست ارتباط ژنتیکی بسیار نزدیکی را با سویه‌های واکسنی تیپ ماساچوست به خصوص H120 نشان دادند. این جدایه‌ها از گله‌هایی جدا شدند که در طول دوره پرورش با واکسن‌های زنده تیپ ماساچوست واکسینه شده بودند. متأسفانه ما تا لحظه نگارش این مقاله نتوانستیم اطلاعاتی درباره برنامه واکسیناسیون گله‌ای که جدایه IR/43/08 از آن جدا شده بود به دست آوریم. گزارشات متعددی وجود دارد که بیان می‌کند واکسن‌های زنده و ویروس برونشیت هفته‌ها پس از مصرف در پرندگان باقی می‌ماند و قابل ردیابی هستند (Worthington et al., 2006). بنابراین این احتمال وجود دارد که ما در این مطالعه سویه‌های واکسنی را مورد تشخیص و جداسازی قرار داده باشیم.

سروتیپ 793/B (۴/۹۱) اولین بار در سال ۱۹۸۵ در فرانسه جداسازی شد. سپس این سروتیپ در سال ۱۹۹۱-۱۹۹۰ در بریتانیا (Capou et al., 1999; Meulemans et al., 2001) و سایر کشورهای اروپایی، آسیا و آمریکای شمالی شیوع یافت و تبدیل به یکی از تیپ‌های اصلی ویروس برونشیت عفونی در برخی کشورها شد (Bochkov et al., 2006). مطالعه حاضر نشان می‌دهد سروتیپ ۴/۹۱ هم‌چنین به‌عنوان یکی از تیپ‌های اصلی ویروس برونشیت عفونی در ایران بوده است و ثابت می‌کند این سروتیپ حداقل از سال ۱۹۹۸ در گله‌های طیور کشور در حال چرخش بوده است. هر هفت جدایه ۴/۹۱ ایران از گله‌هایی جدا شدند که در طول دوره پرورش با واکسن‌های تیپ ماساچوست واکسینه شده بودند و این نشان می‌دهد که این واکسن حفاظت کاملی را علیه این جدایه‌ها ایجاد نکرده‌اند. ارتباط ژنتیکی ضعیف بین این جدایه‌ها و سویه‌های واکسنی تیپ ماساچوست (۷۵-۷۴/۱-۷۴ درصد شباهت از نظر توالی آمینواسیدی) می‌تواند توجیه‌کننده وقوع بیماری برونشیت عفونی در این گله‌ها باشد، زیرا زمانی که درجه شباهت توالی آمینواسیدی پروتئین‌های S1 بین دو سویه ویروس برونشیت عفونی کاهش می‌یابد میزان حفاظت متقاطع نیز کمتر می‌شود (Gelb et al., 2005; Cavanagh, 2007). مشاهدات ما هم‌چنین گزارشات قبلی مبنی بر اینکه واکسیناسیون با واکسن‌های تیپ ماساچوست ممکن است از تکثیر ویروس تیپ ۴/۹۱ جلوگیری نکند را تقویت می‌کند (Parsons et al., 1992; Cavanagh et al., 1999). مقایسه ۱۰ جدایه فیلدی ایران متعلق به ژنوتیپ ۴/۹۱، ۷ جدایه مورد بررسی در این مطالعه و ۳ جدایه قبلی ۴/۹۱ ایران (Akbari Azad, 2003)، و تقریباً همه جدایه‌های ژنوتیپ ۴/۹۱ خارج از کشور نشان داد که جدایه‌های ایران به استثناء جدایه IR/491/08، متوسط بیشترین شباهت نوکلئوتیدی و آمینواسیدی را با جدایه فرانسوی FR-94047-94 دارند. این یافته این احتمال را که جدایه‌های ۴/۹۱ ایران از جدایه‌های ۴/۹۱ فرانسه منشأ گرفته باشند را تقویت می‌کند. از بین جدایه‌های ژنوتیپ ۴/۹۱ ایران، تنها جدایه IR/491/08 از گله‌هایی جدا شده بود که در آن واکسیناسیون با سویه واکسنی ۴/۹۱ صورت گرفته بود. مقایسه جدایه‌های ژنوتیپ I نشان داد که جدایه IR/491/08 کمترین شباهت نوکلئوتیدی و آمینواسیدی را با ۶ جدایه دیگر دارد. این جدایه شباهت بسیار بالایی را در توالی ژن S1 با سویه واکسنی ۴/۹۱ نشان داد در حالی که شباهت ۶ جدایه دیگر در توالی ژن S1 با سویه واکسنی ۴/۹۱ به مراتب کمتر بود. این یافته نشان‌دهنده این است که ما احتمالاً سویه واکسن را مورد تشخیص و جداسازی قرار داده‌ایم. هرچند مطالعات بیشتری برای تأیید این نتیجه‌گیری لازم است.

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر حضور ۲ سروتیپ ماساچوست و ۴/۹۱ را در گله‌های طیور تجاری ایران نشان می‌دهد. در ایران واکسن‌های تیپ ماساچوست به‌طور وسیعی در گله‌ها علیه ویروس برونشیت عفونی استفاده می‌شوند، در حالی که واکسن‌های تیپ ۴/۹۱ در برخی گله‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. نتایج این مطالعه نشان داد که مصرف واکسن‌های ماساچوست به‌طور کامل از تکثیر ویروس تیپ ۴/۹۱ جلوگیری نمی‌کند. بنابراین ما استفاده از ترکیب ۲ تیپ واکسنی (ماساچوست و ۴/۹۱) را در برنامه واکسیناسیون گله‌های طیور ایران پیشنهاد می‌کنیم. به‌طور کلی ترکیبی از واکسن‌های زنده شامل ۲ سروتیپ مختلف (Gelb et al., 1991) یا تجویز واکسن تیپ ماساچوست در یک روزگی و متعاقباً واکسیناسیون مجدد با سویه ۴/۹۱ در ۲ هفتگی (Cook et al., 1999) حفاظت وسیع‌تری را نسبت به واکسیناسیون با یک سویه ایجاد می‌کند.

REFERENCES

1. Adzhar, A., K. Shaw, P. Britton and D. Cavanagh, 1996. Universal oligonucleotides for the detection of infectious bronchitis virus by the polymerase chain reaction. *Avian Pathology*, 25: 817-836.
2. Adzhar, A., R.E. Gough, D. Haydon, K. Shaw, P. Britton and D. Cavanagh, 1997. Molecular analysis of the 793/B serotype of infectious bronchitis virus in Great Britain. *Avian Pathology*, 26: 625-640.
3. Aghakhan, S.M., N. Afshar, S. Rasoul Nejad Fereidouni, C. Marunesi and M. Khodashenas, 1994. Studies on avian viral infections in Iran. *Archives of Razi Institute*, 44/45: 1-10.
4. Akbari Azad, G., 2003. Molecular characterization infectious bronchitis viruses using RT-PCR-RFLP. Ph.D thesis, Tehran Univ, Veterinary faculty.
5. Binns, M.M., M.E.G. Boursnell, D. Cavanagh, D.J.C. Pappin and T.D.K. Brown, 1985. Cloning and sequencing of the gene encoding the spike protein of the coronavirus IBV. *Journal of General Virology*, 66: 719-726.
6. Bochkov, Y.A., G.V. Batchenko, L.O. Shcherbakova, A.V. Borisov and V.V. Drygin, 2006. Molecular epizootiology of avian infectious bronchitis in Russia. *Avian Pathology*, 35(5): 379-393.
7. Boursnell, M.E.G., T.D.K. Brown, I.J. Foulds, P.F. Green, F.M. Tomley and M.M. Binns, 1987. Completion of the sequence of the genome of the coronavirus avian infectious bronchitis virus. *Journal of General Virology*, 68: 57-77.
8. Capua, I., Z. Minta, E. Karpinska, K. Mawditt, P. Britton, D. Cavanagh and R.E. Gough, 1999. Co-circulation of four types of infectious bronchitis virus (793/B, 624/I, B1648 and Massachusetts). *Avian Pathology*, 28: 587-592.
9. Cavanagh, D., 2001. A nomenclature for avian coronavirus isolates and the question of species status. *Avian Pathology*, 30: 109-115.
10. Cavanagh, D., 2005. Coronaviruses in poultry and other birds. *Avian Pathology*, 34: 439-448.
11. Cavanagh, D., 2007. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. *Vet.Res.*, 38: 281-297.
12. Cavanagh, D. and S. Naghi, 2003. Infectious bronchitis. In *DISEASES OF POULTRY*, 11th edn, Eds., Saif, Y.M., H.J. Barnes, J.R. Glisson, A.M. Fadly, L.R. McDougald and D.E. Swayne. Ames: Iowa State University Press, pp:101-120.
13. Cavanagh, D., P.J. Davis and A.P. Mockett, 1988. Amino acids within hypervariable region 1 of avian coronavirus IBV (Massachusetts serotype) spike glycoprotein are associated with neutralization epitopes. *Virus Research*, 11: 141-150.
14. Cavanagh, D., K. Mawditt, P. Britton and C.J. Naylor, 1999. Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reactions. *Avian Pathology*, 28: 593-605.
15. Cavanagh, D., P.J. Davis, D.J.C. Pappin, M.M. Binns, M.E.G. Boursnell and T.D.K. Brown, 1986. Coronavirus IBV: partial amino terminal sequencing of spike polypeptide S2 identifies the sequence Arg-Arg-Phe-Arg-Arg at the cleavage site of the spike precursor polypeptide of IBV strains Beaudette and M41. *Virus Research*, 4: 133-143.
16. Cook, J.K.A., S.J. Orbell, M.A. Woods and M.B. Huggins, 1999. Breadth of protection of the respiratory tract provided by different live-attenuated infectious bronchitis vaccines against challenge with infectious bronchitis viruses of heterologous serotypes. *Avian Pathology*, 28: 477-485.
17. Gelb, J., J.B. Wolff and C.A. Moran, 1991. Variant serotypes of infectious bronchitis virus isolated from commercial layer and broiler chickens. *Avian Diseases*, 35: 82-87.
18. Gelb, J., Jr., Y. Weisman, B.S. Ladman and R. Meir, 2005. S1 gene characteristics and efficacy of vaccination against infectious bronchitis virus field isolates from the United States and Israel (1996 to 2000). *Avian Pathology*, 34(3): 194-203.
19. Handberg, K.J., O.L. Nielsen, M.W. Pedersen and P.H. Jorgensen, 1999. Detection and strain differentiation of infectious bronchitis virus in tracheal tissues from experimentally infected chickens by reverse transcription polymerase chain reaction. Comparison with an immunohistochemical technique. *Avian Pathology*, 28: 327-335.

20. Jackwood, M.W., N.M.H Yousef and D.A. Hilt, 1997. Further development and use of a molecular serotype identification test for infectious bronchitis virus. *Avian Diseases*, 41: 105-110.
21. Jackwood, M.W., D.A. Hilt, S.A. Callison, C.W. Lee, H. Plaza and E. Wade, 2001. Spike glycoprotein cleavage recognition site analysis of infectious bronchitis virus. *Avian Diseases*, 45: 366-372.
22. Jackwood, M.W., D.A. Hilt, C.W. Lee, H.M. Kwon, S.A. Callison, K.M. Moore, H. Moscoso, H. Sellers and S. Thayer, 2005. Data from 11 years of molecular typing infectious bronchitis virus field isolates. *Avian Diseases*, 49: 614-618.
23. Koch, G., L. Hartog, A. Kant and D.J. Roozelaar, 1990. Antigenic domains on the peplomer protein of avian infectious bronchitis virus: Correlation with biological functions. *Journal of General Virology*, 71: 1929-1935.
24. Kwon, H.M., M.W. Jackwood and Jr. Jack Gelb, 1993. Differentiation of infectious bronchitis virus serotypes using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *Avian Diseases*, 37: 194-202.
25. Liu, S.-W. and X.-G. Kong, 2004. A new genotype of nephropathogenic infectious bronchitis virus circulating in vaccinated and non-vaccinated flocks in china. *Avian Pathology*, 33: 321-327.
26. Meulemans, G., M. Boschmans, M. Decaesstecker, T.P. van den Berg, P. Denis and D. Cavanagh, 2001. Epidemiology of infectious bronchitis virus in Belgian broilers: a retrospective study, 1986 to 1995. *Avian Pathology*, 30: 411-421.
27. Momayez, R., S.A. Pourbakhsh, M. Khodashenas and M. Banani, 2002. Isolation and identification of infectious bronchitis virus from commercial chickens. *Archives of Razi Institute*, 53: 1-10.
28. Mondal, S.P. and C.J. Cardona, 2007. Genotypic and phenotypic characterization of the California 99 (Cal99) variant of infectious bronchitis virus. *Virus Genes*, 34: 327-341.
29. Moore, K.M., J.D. Bennett, B.S. Seal and M.W. Jackwood, 1998. Sequence comparison of avian infectious bronchitis virus S1 glycoproteins of the Florida serotype and five variant isolates from Georgia and California. *Virus Genes*, 17: 63-83.
30. Parsons, D., M.M. Ellis, D. Cavanagh and J.K.A. Cook, 1992. Characterization of an avian infectious bronchitis virus isolated from IB-vaccinated broiler breeder flocks. *Veterinary Record*, 131: 408-411.
31. Raj, G.D. and R.C. Jones, 1997. Infectious bronchitis virus: Immunopathogenesis of infection in the chicken. *Avian Pathology*, 26: 677-706.
32. 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.
33. Stern, D.F. and B.M. Sefton, 1982. Coronavirus proteins: structure and function of the oligonucleotides of the avian infectious bronchitis virus glycoproteins. *Journal of Virology*, 44: 804-812.
34. Vasfi Marandi, M. and M.H. Bozorgmehr Fard, 2000. Isolation and identification of infectious bronchitis viruses in chicken in Iran. *Proceedings of the World Poultry Congress*. 20-25 August, Montreal, Canada.
35. Wang, L., D. Junker and E.W. Collisson, 1993. Evidence of natural recombination within the S1 gene of infectious bronchitis virus. *Virology*, 192: 710-716.
36. Worthington, K.J., R.J.W. Currie and R.C. Jones, 2008. A reverse transcriptase-polymerase chain reaction survey of infectious bronchitis virus genotypes in Western Europe from 2002-2006. *Avian Pathology*, 37(3): 247-257.
37. Xu, C., J. Zhao, X. Hu and G. Zhang, 2007. Isolation and identification of four infectious bronchitis virus strains in China and analyses of their S1 glycoprotein gene. *Veterinary Microbiology*, 122: 61-71.

بررسی همه‌گیرشناسی ژنوتیپ‌های ویروس برونشیت عفونی پرندگان در ایران

طی سال‌های ۲۰۱۰ تا ۲۰۱۴

حسین حسینی^{AB}، محمدحسن بزرگمهری^C فرد^C، سعید چرخکار^C و ریما مرشد^D

^A بخش علوم بالینی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد کرج، ایران

^B آزمایشگاه PCR، ایران-تهران میدان توحید، خیابان گلبار، کوچه خودرو پلاک ۶

^C بخش علوم بالینی دانشکده دامپزشکی دانشگاه علوم تحقیقات تهران-ایران

^D گروه کشاورزی و دامپزشکی موسسه تحقیقات دایره‌المعارف ایران، وزارت علوم تحقیقات و فناوری، تهران-ایران

چکیده

ویروس برونشیت عفونی در گله‌های مرغ واکسینه همچنان ضررهای اقتصادی هنگفتی را به صنعت طیور ایران وارد می‌نماید. در این مطالعه بررسی ملکولی ژنوتیپ‌های ویروس برونشیت عفونی دخیل در موارد بروز بیماری صورت پذیرفت. طی سال‌های ۲۰۱۰ الی ۲۰۱۴ نمونه‌های نای، کلیه و سکال تانسیل از ۲۵۰ گله مشکوک (بیش از ۲۵۰۰ نمونه) جمع‌آوری و مورد بررسی قرار گرفتند. توالی ژن S1 نمونه‌های جمع‌آوری شده نشان‌دهنده هفت ژنوتیپ متمایز، از جمله ماساچوست، 793/B، IS720، واریانت ۲، QX، IR-1 و IR-II بود که در گله‌های طیور کشور در حال گردش بودند. بخش اعظم گله‌ها (۶۷.۶ درصد) با یک واریانت غیر مرتبط با سویه‌های واکسن درگیر بودند. این واریانت‌ها مشابه ۵۴.۱ تا ۷۸.۵ درصدی و ۵۳ تا ۸۶ درصدی را به ترتیب با سویه‌های واکسن H120 و 793/B نشان می‌دادند. این یافته‌ها حاکی از آن است که وجود واریانت‌های ویروس برونشیت عفونی به لحاظ ژنتیکی از سویه‌های واکسن در حال استفاده متفاوت بوده و علت وقوع بیماری در مزارع را مشخص می‌سازد. مطالعه کنونی اولین بررسی جامع ویروس برونشیت عفونی در ایران بوده که لزوم بررسی پیوسته و کنترل مناسب بیماری را آشکارتر می‌سازد.

کلمات کلیدی: ویروس برونشیت عفونی، همه‌گیرشناسی ملکولی، واریانت، ژنوتیپ، ایران

مقدمه:

سروتیپ‌ها و ژنوتیپ‌های جدید ویروس برونشیت عفونی همواره در نتیجه بازترکیبی و جهش‌ها بروز می‌یابند (۸، ۱۵، ۱۶). روش RT-PCR و به دنبال آن توالی‌یابی ژن S1 اجازه تمایز سویه‌های مختلف ویروس برونشیت عفونی را می‌دهد (۱۶). سروتیپ ماساچوست ویروس برونشیت عفونی، اولین تیپ شناخته شده از ویروس برونشیت عفونی در ایران بود که توسط آقاخان و همکارانش (۳) شناسایی گردید. در سال ۱۹۹۸، ویروسی مشابه تیپ اروپایی 793/B در ایران جدا گردید (Iran/793B/19/08) (۲۵). بر طبق گزارشات، این ژنوتیپ ویروس برونشیت عفونی بین سال‌های ۱۹۹۴ تا ۲۰۰۴ در ایران بسیار شایع بوده است (۲۱، ۲۳). متعاقب این شناسایی‌ها واکسن‌های سروتیپ‌های ماساچوست و 793/B در گله‌های طیور کشور مورد مصرف قرار گرفتند. علی‌رغم استفاده از برنامه‌های واکسیناسیون متفاوت، ویروس برونشیت عفونی همچنان مضررات اقتصادی هنگفتی را به صنعت طیور کشور وارد می‌کند. در واقع، موارد بروز ویروس برونشیت عفونی اغلب ناشی از سویه‌ای از ویروس

برونشیت عفونی می‌باشد که به لحاظ سرمی متفاوت از سویه‌های واکنسی بوده و بنظر می‌رسد که واکنس‌های موجود قادر به ایجاد ایمنی متقاطع در برابر آن‌ها نمی‌باشند (۹). هدف این مطالعه، شناسایی، تعیین خصوصیات و رده‌بندی ژنوتیپ‌های شايع ويروس برونشیت عفونی در حال گردش در گله‌های مرغ ایران در بین سال‌های ۲۰۱۰ تا ۲۰۱۴ بود (شکل ۱).

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری: لاشه‌های طیور از موارد مشکوک به ویروس برونشیت عفونی با اختلالات تنفسی، کلیوی یا تناسلی در گله‌های متفاوت (از جمله طیور گوشتی، پالت‌های تخم‌گذار، مرغان تخم‌گذار و مادران گوشتی) به آزمایشگاه تشخیص دامپزشکی PCR (تهران، ایران) ارجاع داده شدند. نمونه‌های نای، کلیه و سکال تانسیل‌ها به صورت تکی یا مخلوط ارگانی (نمونه‌های دو یا سه پرنده در هر ترکیب) جمع‌آوری شده و برای استخراج RNA مورد استفاده قرار گرفتند. در طی تحقیق، بیش از ۲۵۰۰ نمونه از ۲۵۰ گله تست و آنالیز گردید. این نمونه‌ها از نواحی مختلف ایران به آزمایشگاه ارسال شدند. تمامی گله‌ها با واکنس‌های سروتیپ ماساچوست و/یا 793/B زنده واکنسینه شده بودند. مرغان تخم‌گذار و مادر نیز یک واکنس غیرفعال ماساچوست دریافت کرده بودند.

استخراج RNA: کل RNA ویروسی با استفاده از کیت RNeasy Mini Kit (کیازن، هیلدن، آلمان) و با توجه به پروتکل شرکت سازنده از بافت‌های همگن استخراج گردید.

رونویسی معکوس: DNA مکمل (cDNA) با استفاده از کیت RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (ترموساینٹیفیک، برلینگتون، کانادا) و با توجه به راهنمای محصول سنتز گردید. cDNA های سنتز شده به‌عنوان الگوی PCR مورد استفاده قرار گرفتند.

PCR ناحیه ترجمه‌نشده (UTR): دو جفت پرایمر الیگونوکلئوتیدی، ویروس برونشیت عفونی 59U391 (59-GCT TTT 3'UTR) و 59GL533 (59-GCC ATG TTG TCA CTG TCT ATT 5'UTR) و GAG CCT AGC GTT (39) و پرایمرهای 3'UTR و 5'UTR هم‌پوشان هستند بر طبق روش تشریحی پیشین برای تشخیص ویروس‌های (39-G یا 39-GAG CCT AGC GTT) و AIII-F (59-CAG CGC CAA AAC AAC AGC G-39) و Del1-R (59-CAT TTC CCT GGC GAT AGA C-39) که به ترتیب 5'UTR و 3'UTR هم‌پوشان هستند بر طبق روش تشریحی پیشین برای تشخیص ویروس‌های برونشیت عفونی مورد استفاده قرار گرفتند (۷، ۱۴). دو جفت پرایمر، نواحی حفاظت‌شده تمامی ژنوتیپ‌ها و سروتیپ‌های ویروس برونشیت عفونی را هدف قرار دادند.

تقویت نسبی ژن S: نمونه‌های مثبت UTR-PCR برای تحلیل بیشتر ژن S انتخاب شدند. تقویت نسبی ژن S1 بر طبق روش موجود پیشین اجرا شد (۲۶، ۲۷). بخشی از ۳۹۳ جفت باز بین نوکلئوتیدهای ۷۰۵ و ۱۰۹۴ (موقعیت در سویه UK/7/93، شماره دسترسی Z83979) تقویت شده و با آنالیزور ABI 3730XLDNA توالی‌یابی شدند (بیونیر، دیجون، کره جنوبی).

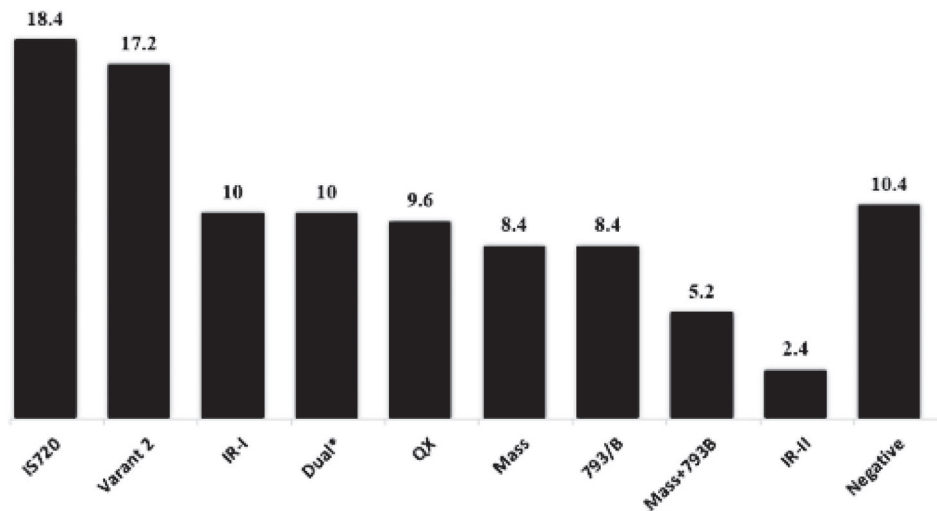
تحلیل اسیدآمینینه حاصله و نوکلئوتید اسید و ساخت درخت فیلوژنی. پس از تخلیص فرآورده‌های مثبت PCR (کیازن)، آمپلیکون در هر دو جهت با استفاده از پرایمرهای SX4 و SX3 (PCR) توالی‌یابی شد. توالی‌های ژنوتیپ‌های مرجع ویروس برونشیت عفونی (UK/7/93 Z83979)، ماساچوست (GQ504724)، (PCRLab/06/2012 VAR2-06)، (AF093796)، (AF093796)، (AY091552) IS/720، (4/91) تخفیف حدت یافته (AF093793)، IRF ویروس برونشیت عفونی 8 (HQ123349)، مصر/بنی-سوئف/۰۱ (JX174183) از GenBank استخراج شد. اطلاعات مرتبط با توالی اسیدآمینینه‌ای پیش‌بینی شده و نوکلئوتیدی تطبیق‌یافته با بخش‌های Clustal W. Excessive توالی‌ها نشان‌دهنده اصلاح توالی پرایمر بودند. درخت‌های فیلوژنی بر اساس اسیدآمینینه (موقعیت ۳۵۷-۲۴۳) توالی ژنی سویه UK/7/93، شماره دسترسی

GenBankZ83979) و با استفاده از مجموعه MEGA 6 روش الحاق به توالی مجاور (تعداد تفاوت‌ها) و تکرار ۱۰۰۰ توالی (۲۴) تهیه شدند.

شماره دسترسی به توالی ویروس برونشیت عفونی در GenBank. توالی‌های ژن S1 نسبی ویروس‌های برونشیت عفونی ایران در پایگاه اطلاعاتی GenBank به شماره‌های KP310017-KP310053 و KR025481-KR025483 ثبت شدند.

نتایج

هفت ژنوتیپ تشخیص داده شده در طی سال‌های ۲۰۱۴-۲۰۱۰. نمونه‌های ۲۶ گله (۱۰.۴ درصد) به لحاظ ویروس برونشیت عفونی با UTR-PCR منفی شدند. با اینحال، ۲۲۴ گله (۸۹.۶ درصد) مثبت بودند. آنالیز بیشتر نمونه‌های مثبت با توالی ژن S1 نشان داد که حداقل هفت ژنوتیپ در گله‌های طیور ایران در حال گردش هستند. این ویروس‌های برونشیت عفونی، همان‌طور که در درخت فیلوژنی نشان داده شده است، در هفت گروه ژنتیکی جای می‌گیرند (تصویر ۲). درصد شباهت نسبی توالی اسیدآمینه‌ای S1 در میان ویروس‌های برونشیت عفونی برگزیده در جدول ۱ نشان داده شده است. این هفت ژنوتیپ متمایز می‌توانند بر اساس توزیع به سه دسته، یعنی ویروس‌های دارای توزیع (۱) وسیع (۲) ناحیه‌ای و (۳) محلی تقسیم شوند.



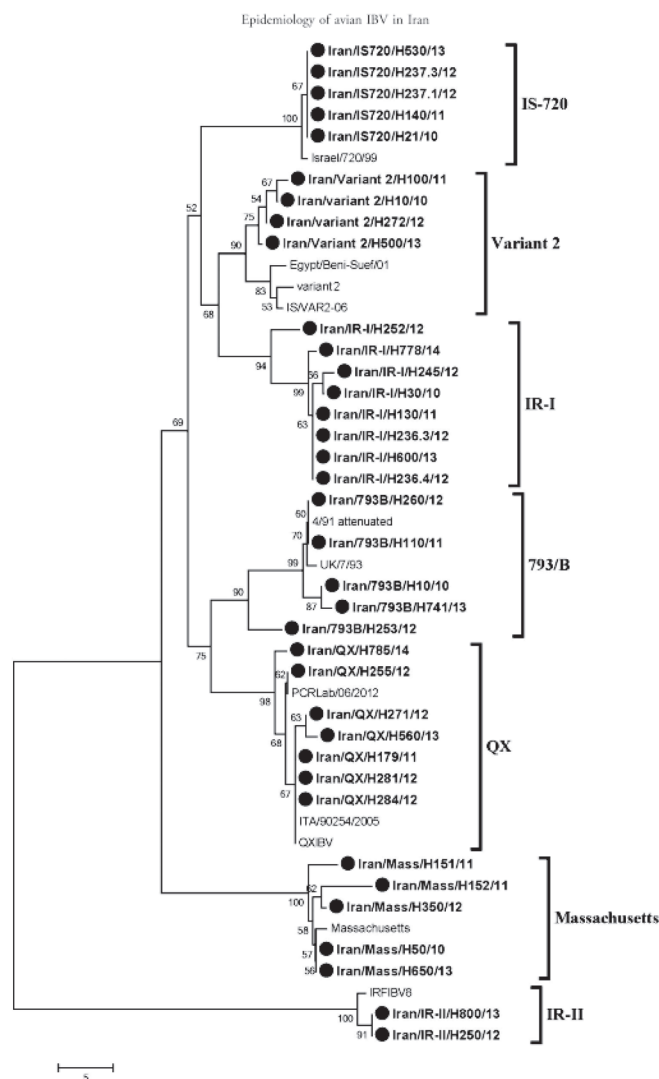
شکل ۱. درصد ژنوتیپ‌های متفاوت ویروس برونشیت عفونی در حال گردش در گله‌های مرغ ایران در طی ۲۰۱۰-۲۰۱۴.

ژنوتیپ‌های ویروس برونشیت عفونی با توزیع گسترده. سه ژنوتیپ ویروس برونشیت عفونی با توزیع گسترده در ایران تشخیص داده شده و در مناطق مختلفی گزارش شده‌اند. این ویروس‌ها عبارت‌اند از ژنوتیپ‌های ماساچوست، 793/B و QX. در هنگام انجام این مطالعه واکسن‌های تیپ ماساچوست (همچون H120 و Ma5) و واکسن‌های تیپ 793/B (4/91 و IB88) موجود بوده و بطور گسترده در گله‌های مرغ ایران استفاده می‌شدند. تیپ ماساچوست در ۲۱ گله (۸.۴ درصد) و 793/B در ۲۱ گله (۸.۴ درصد) شناسایی شد. بعلاوه، هر دو نوع ویروس به‌طور همزمان در ۱۳ گله (۵.۲ درصد) شناسایی شدند. مدارک اولیه مبنی بر ورود ویروس مرتبط با ژنوتیپ QX در ایران در اکتبر ۲۰۱۱ (Iran/QX/H179/11) در این تحقیق شناسایی شد. پس از آن ژنوتیپ QX به شکلی پیوسته شناسایی گردید. در طی دوره این تحقیق، ژنوتیپ QX در ۲۴ گله (۹.۶ درصد) یافت شد.

ژنوتیپ‌های ویروس برونشیت عفونی با توزیع منطقه‌ای: رایج‌ترین تیپ‌های ویروس برونشیت عفونی (۳۵.۶ درصد) در حال گردش در مرغداری‌های ایران در دسته منطقه‌ای قرار می‌گیرند. ویروس‌های غالب این تحقیق رابطه نزدیکی با دو تیپ ویروسی شناسایی شده در کشورهای خاورمیانه داشتند (۱۵). این موارد عبارت‌اند از ژنوتیپ‌های واریانت ۲ و IS720 که به ترتیب

در سال‌های ۱۹۹۶ و ۱۹۹۹ گزارش شدند. بر طبق این تحقیق، هر دو ویروس در ایران تشخیص داده شدند. تاریخچه ورود این ویروس‌ها تا به امروز مبهم باقی مانده است. هر دو ویروس در طیور به عنوان ویروس‌های نفروپاتوژنیک مطرح هستند (۱۳، ۲۰). گله‌های مبتلا به این ویروس‌ها از ضایعات کلیوی و نفوس احشایی رنج می‌بردند. در طی این تحقیق، تیپ IS720 در ۴۶ گله (۱۸.۴ درصد) و واریانت ۲ در ۴۳ گله (۱۷.۲ درصد) شناسایی شدند. هر دو ویروس مکرراً در گله‌هایی که بخوبی در طی کل دوره این تحقیق واکسینه شده‌اند، شناسایی شدند.

ژنوتیپ‌های ویروس برونشیت عفونی با توزیع محلی: در ایران یک ژنوتیپ جدید و متمایز ویروس برونشیت عفونی برای اولین بار در ۲۰۱۰ شناسایی گردید و IR-1 نام گرفت. ژنوتیپ IR-1 در گله‌های چندسنی گوشتی در شمال ایران با علائم تنفسی و افزایش تلفات شناسایی شد. هیچ توالی نوکلئوتیدی مشابهی از دیگر مناطق جهان در طی تحقیق کنونی در GenBank ثبت نشده است. از این رو، این ویروس احتمالاً تنها در ایران بروز یافته و توزیع جغرافیایی محدودی دارد. با این حال، تشخیص این ویروس در ۲۵ گله (۱۰ درصد) در طی این ۴ سال (۲۰۱۴-۲۰۱۰) می‌تواند نشان‌دهنده توانایی آن در انتشار سریع به دیگر مناطق باشد.



شکل ۲. درخت فیلوژنی اتصال به توالی مجاور ژنوتیپ‌های ایرانی ویروس برونشیت عفونی بر اساس اسیدهای آمینه ۳۵۷-۳۳۴ (سویه UK/7/93 کد دسترسی GenBank: Z83979) گلیکوپروتئین S1 با استفاده از مجموعه MEGA6. برخی سویه‌های مرجع در این درخت ذکر شده‌اند. ویروس‌های شناسایی شده در این گزارش با دوایر سیاه و برجسته مشخص شده‌اند.

جدول ۱. درصد مطابقت نسبی توالی اسیدآمینه‌ای ژن S1 حاصله

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1. IR/793B/H253/12											
2. IR/IR-1/H245/12	79.3										
3. IR/Mass/H152/11	72.7	73.6									
4. IR/IS720/H21/10	83.5	81.8	73.6								
5. IR/Variant2/H100/11	81.8	86	75.2	85.1							
6. IR/QX/H179/11	86.8	81.8	72.7	83.5	85.1						
7. Iran/IR-II/H250/12	53.3	54.4	54.4	53	54						
8. H120	74.4	76.9	94.2	76.9	78.5	76.9	54.1				
9. QXIBV	87.6	81	71.9	82.6	84.3	99.2	53.6	76			
10. Variant 2	81.8	85.1	75.2	85.1	95	84.3	54.4	78.5	83.5		
11. IS/720/99	81.8	81	72.7	98.3	85.1	82.6	52.2	76.9	81.2	85.1	
12. 4/91 attenuated	93.4	79.3	71.9	81	81	84.3	53	75.2	85.1	83.5	79.3

قطعه آنالیز شده دربردارنده جایگاه‌های ۲۴۳ تا ۳۵۷ توالی ژنی سویه UK/7/93 بود. شماره دسترسی GenBankZ83979

در طی این تحقیق، یک ژنوتیپ ویروس برونشیت عفونی جدید دیگر در شش گله (۲.۴ درصد) شناسایی شد. این ویروس برونشیت عفونی، تحت عنوان IR-II، به ترتیب ۴۵.۹ و ۴۷ درصد تفاوت اسیدآمینه‌ای با H120 و 4/91 نشان داد. علیرغم تفاوت زیاد در سکانس ژن S1، این نمونه‌ها با پرایمرهای اولیگونوکلئوتیدی برای S1 و نیز پرایمرهای هر دو ناحیه UTR نتایج مثبتی نشان دادند. تحلیل BLAST از GenBank نشان داد که دو توالی بسیار مشابه دیگر توسط یک گروه تحقیقاتی در ۲۰۱۰ گزارش شده (شماره دسترسی HQ123349 و HQ123363) و هیچ توالی مشابه دیگری تشریح نشد. این ویروس در تحقیق ما بین ۲۰۱۰ و ۲۰۱۳ شناسایی شد.

بحث

هیچ تاریخچه شفاف طولانی مدتی از سویه‌های ویروس برونشیت عفونی در ایران موجود نمی‌باشد. واکسن‌های تیپ ماساچوست در طی دوره طولانی پیش از شناسایی ویروس‌ها در دسترس بودند. متعاقباً، سروتیپ 793/B شناسایی شد (۲۲، ۲۵) و به سروتیپ غالب تبدیل گشت (۲۳، ۲۱). واکسن‌های تجاری این سروتیپ در سال ۲۰۰۶ بمنظور پیشگیری از بیماری عرضه شد. روش‌های مورد استفاده در این مطالعه اجازه تمایز بین سویه فیلدی و واکسن با یک سروتیپ مشابه را نمی‌دهند. با این حال، از آنجایی که اغلب گله‌ها تاریخچه واکسیناسیون داشتند، ما به این نتیجه رسیدیم که ویروس‌های تشخیص داده شده به احتمال زیاد از تیپ واکسینال منشأ می‌گیرند.

با توجه به نتایج این تحقیق، حداقل پنج ژنوتیپ متمایز که به شکل معناداری از Mass و 793/B تفاوت داشتند، در حال گردش در ایران بودند. این سویه‌های فیلدی در ۱۶۹ مورد (۶/۶۷ درصد) گله‌های مظنون به ویروس برونشیت عفونی یافت شدند. چهار ژنوتیپ (همچون واریانت ۲، IS720، IR-1 و IR-II) در آغاز این تحقیق در سال ۲۰۱۰ شناسایی شدند. احتمالاً، این چهار ژنوتیپ پیش از این در مرغداری‌های ایران حضور داشتند ولی تا سال ۲۰۱۰ شناسایی نشدند. آن‌ها به دلیل پرایمرهای اختصاصی مورد استفاده برای بررسی ویروس برونشیت عفونی کشف نشدند (۱۲).

مکررترین تیپ شناسایی شده ویروس برونشیت عفونی شباهت بالایی (۹۸.۸ درصد) با تیپ IS720 نشان می‌دهد. این تیپ برای اولین بار از یک گله گوشتی مبتلا به بیماری تنفسی در سال ۱۹۹۹ در اسرائیل جداسازی شد (۱۳). متعاقباً، واریانته تحت عنوان IS/885/00 (مرتبط با IS720) گزارش شد که موجب آسیب کلیوی حاد می‌شود (۲۰). تیپ IS720 ویروس برونشیت عفونی نیز در عراق (۱۹)، مصر (۲) و لیبی (۴) گزارش شد. تیپ IS-720 مکرراً در گله‌های دارای کلیه‌های متورم و رنگ پریده و حالب متسع و مملو از اسیداوریک شناسایی شده است.

دومین تیپ شایع ویروس برونشیت عفونی ایران متعلق به تیپ واریانت ۲ (IS/223/96) است. این تیپ توسط کالیسون و همکارانش در سال ۲۰۰۱ تشریح شد (۶). متعاقباً ویروس‌های دیگری مرتبط با واریانت ۲ (IS/378/97، IS/572/98، IS/585/98، IS/589/98) از بیماری تنفسی یا کلیوی در اسرائیل بازیابی شدند. مطالعات همراه با چالش آزمایشگاهی نشان داد که واکسن H120 ایمنی ضعیفی (۲۵ درصد) علیه واریانت ۲ می‌دهد (۱۳). تا انتهای ۲۰۰۹، واریانت ۲ در اردن و عراق شمالی، Sul/01/09 ظاهر شد (۱). تیپ واریانت ۲ همچنین در لیبی (۴) و ترکیه (۱۸) در حال گردش است. بارزترین یافته‌ها در کالبدگشایی عبارت‌اند از: آسیب‌های جدی کلیوی، تجمع اوریک‌اسید در حالب و به دنبال آن نقرس احشایی که می‌تواند موجب تلفات در کل دوره زندگی گله تخم‌گذار شود.

ژنوتیپ سوم سویه فیلدی متعلق به واریانت جدید IR-1 است. مبدأ IR-1 ناشناخته است ولی شاید پس از ورود واریانت ۲ به ایران مشتق شده باشد. تشخیص یک ویروس (ایران/IR-1/H525/12) با شباهت بالاتر (۹۲ درصد) به واریانت ۲، احتمال این دگرگونی را افزایش می‌دهد. مطالعات پیرامون ایمنی متقاطع باید برای تعیین انشعاب این ژنوتیپ به‌عنوان سروتیپی جدید انجام شوند. از آنجایی که ویروس مکرراً در طی کل این مطالعه جداسازی شد، این باور وجود دارد که این ژنوتیپ جدید، موردی پایدار با پتانسیل انتشار سریع باشد.

ژنوتیپی به نام QX، چهارمین تیپ فیلدی ویروس در این تحقیق بود. یک ویروس تیپ QX (PCRlab/06/2012) مشابه Iran/QX/179/11 به‌عنوان عامل مسبب (اویداکت کیستی) شناسایی شد (۵). ژنوتیپ QX ویروس برونشیت عفونی، اولین بار در اواخر دهه ۱۹۹۰ در چین گزارش شد و به بسیاری از کشورهای اروپایی و آسیایی انتشار یافت (۱۵). میزان شناسایی QX در ایران پس از تشخیص اولیه کاهش یافت و هرگز به یک تیپ غالب در دوره این تحقیق تبدیل نشد. همانند QX اروپایی، این تیپ ویروس موجب القای پرندگان "تخم‌گذار کاذب" در گله‌های مادر و تخم‌گذار می‌شود. بروز گله‌های دارای پرندگان "تخم‌گذار کاذب" در رابطه با تشخیص ویروس در گله‌های مادر و تخم‌گذار نوسان داشت.

ویروس برونشیت عفونی IR-II رابطه نزدیک با توالی‌هایی که توسط یک گروه تحقیقاتی در سال ۲۰۱۰ گزارش شد، نشان می‌دهد (شماره دسترسی: HQ123349 و HQ123363). با این حال هیچ توالی مشابهی در مقالات دیگر دیده نشد. این ویروس بین سال‌های ۲۰۱۰ و ۲۰۱۳ در تحقیق ما شناسایی شد. گرچه سروتیپ‌های ویروس برونشیت عفونی معمولاً ۲۵-۲۰ درصد به لحاظ جایگاه اسیدآمین‌های گلیکوپروتئین S1 متفاوت هستند، تنوع ۵۰ درصدی اسیدآمین‌های نیز شناسایی شد (۱۰). این باور وجود دارد که واریانت مذکور می‌تواند در صورت انتشار، ایجاد بیماری و شناسایی متعدد در دوره کوتاه زمانی، اهمیت یابد (۱۷). با این حال، میزان تشخیص پایین این ویروس در طی این دوره، اهمیت این ویروس را کاهش داده و مطالعات بیشتری باید برای تعیین خصوصیات آن انجام شوند.

در ۲۵ گله (۱۰ درصد)، بیش از یک ژنوتیپ فیلدی به شکل همزمان در نمونه‌های متفاوت یک گله شناسایی شد. مثلاً دو ژنوتیپ متفاوت در سالن‌های متفاوت یک مرغداری شناسایی شد. مشخص شده است که امکان وجود بیش از یک سویه در گله‌ها به شکل همزمان وجود داشته که یکی از آن‌ها غالب می‌شود (۱۱).

ایمنی متقاطع بین سویه‌های ویروس برونشیت عفونی به شباهت اسیدآمین‌های S1 بستگی دارد. بر اساس توالی اسیدآمین گلیکوپروتئینی S1، تشابه ویروس برونشیت عفونی ایران با واکسن تیپ ماساچوست و واکسن تیپ 793/B به ترتیب از ۵۴.۱ درصد تا ۷۸.۵ و از ۵۳ تا ۸۶ درصد را دربر می‌گرفت. این مشاهدات بر نیاز به استراتژی‌های کنترلی جدید علیه ویروس برونشیت عفونی در ایران تأکید دارند.

1. Ababneh, M., A. E. Dalab, S. Alsaad, and M. Al-Zghoul. Presence of infectious bronchitis virus strain CK/CH/LDL/97I in the Middle East. *ISRN Veterinary Science*, ID 201721, 6 pages. 2012.
2. Abdel-Moneim, A. S., M. F. El-Kady, B. S. Ladman, and J. Gelb Jr. S1 gene sequence analysis of a nephropathogenic strain of avian infectious bronchitis virus in Egypt. *Virol. J.* 3:78. 2006.
3. Aghakhan, S. M., N. Abshar, S. Rasoul Nejad Fereidouni, C. Marunesi, and M. Khodashenas. Studies on avian viral infections in Iran. *Arch. Razi Inst.* 44:1–10. 1996.
4. Awad, F., M. Baylis, and K. Ganapathy. Detection of variant infectious bronchitis viruses in broiler flocks in Libya. *Int. J. Vet. Sci. Med.* 2014, 82-2:78.
5. Bozorgmehri-Fard, M. H., S. Charkhkar, and H. Hosseini. Detection of the Chinese genotype of infectious bronchitis virus (QX-type) in Iran. *Iranian J. Virol.* 7(1&2): 57–60. 2013.
6. Callison, S. A., M. W. Jackwood, and D. A. Hilt. Molecular characterization of infectious bronchitis virus isolates foreign to the United States and comparison with United States isolates. *Avian Dis.* 45:492–499. 2011.
7. Callison, S. A., D. A. Hilt, T. O. Boynton, B. F. Sample, R. Robison, D. E. Swayne, and M. W. Jackwood. Development and evaluation of real time taqman RT-PCR assay for the detection of infectious bronchitis virus from infected chickens. *J. Virol. Methods* 138:60–65. 2006.
8. Casais, R., B. Dove, D. Cavanagh, and P. Britton. Recombinant avian infectious bronchitis virus expressing a heterologous spike gene demonstrates that the spike protein is a determinant of cell tropism. *J. Virol.* 2003, 9089-88:9084
9. Cavanagh, D. Severe acute respiratory syndrome vaccine development: experiences of vaccination against avian infectious bronchitis coronavirus. *Avian Pathol.* 32:567–582. 2003.
10. Cavanagh, D., M. M. Ellis, and J. K. A. Cook. Relationship between sequence variation in the S1 spike protein of infectious bronchitis virus and the extent of cross protection in vivo. *Avian Pathol.* 26:63–74. 1997.
11. Cavanagh, D., K. Mawditt, P. Britton, and C. J. Naylor. Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reactions. *Avian Pathol.* 28:593–605. 1999.
12. De Wit, J. J., J. K. Cook, and H. M. van der Heijden. Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures. *Avian Pathol.* 40:223–235. 2011.
13. Gelb, J. Jr., Y. Weisman, B. S. Ladman, and R. Meir. S1 gene characteristics and efficacy of vaccination against infectious bronchitis virus field isolates from the United States and Israel (1996 to 2000). *Avian Pathol.* 2005, 203-34:194.
14. Hewson, K., A. H. Noormohammadi, J. M. Devlin, K. Mardani, and J. Ignjatovic. Rapid detection and non-subjective characterization of infectious bronchitis virus isolates using high-resolution melt curve analysis and a mathematical model. *Arch. Virol.* 154:649–660. 2009.
15. Jackwood, M. W. Review of infectious bronchitis virus around the world. *Avian Dis.* 56:634–641. 2012.
16. Jackwood, M. W., and S. De Wit. Infectious bronchitis. In: *Diseases of poultry*, 13th ed. David E. Swayne, J. R. Glisson, L. R. McDougald, L. K. Nolan, D. L. Suarez, and V. L. Nair, eds. New York: Wiley-Blackwell. pp. 139–159. 2013.
17. Jackwood, M. W., D. A. Hilt, C. W. Lee, H. M. Kwon, S. A. Callison, K. Moore, M. H. Moscoso, H. Sellers, and S. Thayer. Data from 11 years of molecular typing infectious bronchitis virus field isolates. *Avian Dis.* 49:614–618. 2005.

18. Kahya, S., F. Coven, S. Temelli, A. Eyigor, and K. T. Carli. Presence of IS/1494/06 genotype-related infectious bronchitis virus in breeder and broiler flocks in Turkey. *Ankara Univ. Vet. Fak. Derg.* 2013, 31-60:27.
19. Mahmood, Z. H., R. R. Sleman, and A. U. Uthman. Isolation and molecular characterization of Sul/01/09 avian infectious Bronchitis virus, indicates the emergence of a new genotype in the Middle East. *Vet. Microbiol.* 150:21–27. 2011.
20. Meir, R., E. Rosenblut, S. Perl, N. Kass, G. Ayali, S. Perk, and E. Hemsani. Identification of a novel nephropathogenic infectious bronchitis virus in Israel. *Avian Dis.* 48:635–641. 2004.
21. Seyfi Abad Shapouri, M. R., M. Mayahi, K. Assasi, and S. Charkhkar. A survey of the prevalence of infectious bronchitis virus type 4/91 in Iran. *Acta Vet. Hungarica* 52:163–166. 2004.
22. Seyfi Abad Shapouri, M. R., M. Mayahi, S. Charkhkar, and K. Assasi. Serotype identification of recent Iranian isolates of infectious bronchitis virus by type specific multiplex RT-PCR. *Arch. Razi Inst.* 53:79–85. 2002.
23. Shoushtari, A. H., R. Toroghi, R. Momayez, and S. A. Pourbakhsh. 793/B type, the Predominant circulating type of avian infectious bronchitis viruses 1999–2004 in Iran: a retrospective study. *Arch. Razi Inst.* 63:1–5. 2008.
24. Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, and S. Kumar. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30:2725–2729. 2013.
25. Vasfi Marandi, M., and M. H. Bozorgmehri Fard. Isolation and identification of infectious bronchitis in chicken between 1997–2000 in Iran. *J. Faculty Vet. Med.* 56:119. 2001.
26. Villarreal, L. Y., T. L. Sandri, S. P. Souza, L. J. Richtzenhain, J. J. de Wit, and P. E. Brandao. Molecular epidemiology of avian infectious bronchitis in Brazil from 2007 to 2008 in breeders, broilers, and layers. *Avian Dis.* 54:894–898. 2010.
27. Worthington, K. J., R. J. W. Currie, and R. C. Jones. A reverse transcriptase-polymerase chain reaction survey of infectious bronchitis virus genotypes in Western Europe from 2002.

تعیین خصوصیات مولکولی ویروس‌های برونشیت عفونی جدا شده از مرغداری‌های گوشتی ایران

در سال‌های ۲۰۱۴-۲۰۱۵

حمیده نجفی^۱، آرش قلیان‌چی لنگرودی^۱، مسعود هاشم‌زاده^۲، وحید کریمی^۳، امید مددگار^۱،
سیدعلی غفوری^۴، حسین مقصولو^۴، رضا خلعتبری فراهانی^۴

^۱بخش میکروبیولوژی و ایمنولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران-ایران

^۲بخش توسعه و تحقیق واکسن‌های ویروسی طیور، موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج-ایران

^۳بخش علوم بالینی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران-ایران

^۴سازمان دامپزشکی کشور، تهران-ایران

چکیده

بیماری برونشیت عفونی یک بیماری ویروسی طیور با اهمیت اقتصادی در ایران و کل جهان است. توالی‌یابی ژن S1 برای مطالعات همه‌گیرشناسی مولکولی و تعیین خصوصیات ژنوتیپی ویروس برونشیت عفونی مورد استفاده قرار می‌گیرد. مجموعه ۱۱۸ جدایه ویروس برونشیت عفونی از نمونه‌های بافتی مرغان مشکوک به ویروس برونشیت عفونی بالینی در مرغداری‌های گوشتی ایران (۸ استان، ۲۰۰ نمونه) حاصل شد. جدایه‌ها با واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) تأیید شده و با توالی‌یابی ژن فیلوژنتیک S1 شناسایی شدند. شش گروه فیلوژنی متمایز (مشابه IS/1494/06 یا مشابه واریانت ۲، مشابه 4/91، مشابه IS/720، مشابه QX، IR-1 و مشابه Mass) شکل گرفتند که مرتبط با واریانت‌های جدا شده در ناحیه مذکور بودند. مکررترین ویروس‌های شناسایی شده متعلق به ژنوتیپ مشابه واریانت ۲ (مشابه IS/1494/06) با شیوع ۳۴ درصدی بودند. ۲۱ درصد جدایه‌ها مجموعه‌ای را به همراه تیپ 4/91 ویروس برونشیت عفونی تشکیل دادند که ۱۰ درصد ژنوتیپ QX و ۸ درصد ژنوتیپ IS/720 بودند. به علاوه، ۴ و ۳ درصد جدایه‌ها به ترتیب متعلق به ژنوتیپ ماساچوست و IR-1 بودند. در این مطالعه برای اولین بار واریانت‌های ویروس برونشیت عفونی از مرغداری‌های گوشتی استان‌های متفاوت ایران جداسازی و شناسایی گردید. این مطالعه نشان‌دهنده تکامل پایدار ویروس برونشیت عفونی در ایران و نیاز به نظارت و توسعه پیوسته واکسن‌های جدید بر پایه ویروس‌های بومی می‌باشد.

مقدمه

ویروس برونشیت عفونی، پروتوتیپ تحت خانواده کروناویرینه، خانواده کروناویریده، راسته نیدوویرال‌ها بوده و یک عامل بیماری‌زای مهم در طیور می‌باشد (۴۲). شاخص‌ترین علامت بالینی پرندگان مبتلا به بیماری برونشیت عفونی مربوط به مجرای تنفسی است. با این حال، برونشیت عفونی می‌تواند به همراه عوارض کلیوی، روده‌ای و تناسلی نیز بروز یابد. این بیماری منجر به مضررات اقتصادی هنگفت به دلیل بازدهی کم یا کاهش میزان تخم‌گذاری و کیفیت ضمن احتمال بروز عفونت‌های ثانویه می‌شود (۱۷). ژنوم ویروس برونشیت عفونی یک RNA تک‌ رشته‌ای سنس مثبت تقریباً ۲۷.۶ کیلوبازی است که حداقل ده چارچوب قرائت باز (ORF) را به شکل زیر کدگذاری می‌کند: 5' UTR- 1a-1ab-S-3a-3b-E-M-5a-5b-N-3a-3' UTR

چهار پروتئین ساختاری، از جمله گلیکوپروتئین خاردار (S)، پروتئین غشایی کوچک (E)، گلیکوپروتئین غشایی (M) و پروتئین نوکلئوکپسیدی (N) وجود دارد. گلیکوپروتئین S پس از شکافتگی به دو تحت واحد S1 و S2 تقسیم می‌شود (۳). تحت واحد S1 دارای اپی‌توپ و عوامل تعیین‌کننده آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده ویروس، اتصال به سلول و اختصاصیت سروتیپ است. تحت واحد S2 پروتئین S1 را به غشا چسبانده و در امتزاج غشایی نیز دخیل است (۲۸). تحت واحد S1 از دیرباز برای تعیین سروتیپ ویروس برونشیت عفونی مورد استفاده قرار می‌گرفته است. تغییرات کوچک در توالی‌های اسید آمینه‌ای پروتئین S می‌تواند تیپ‌های آنتی‌ژنی جدیدی را ایجاد کند که ممکن است کاملاً از انواع موجود واکسن متفاوت باشند. اغلب تفاوت‌های سویه‌ای S1 در سه ناحیه فرا متغیر (HVR) واقع در جایگاه‌های اسید آمینه‌ای ۵۶-۶۹ (HVR1)، ۱۱۷-۱۳۱ (HVR2) و ۲۷۴-۳۸۷ (HVR3) رخ می‌دهند. تحت واحد S2 در مقایسه با S1 ثبات بیشتری در میان سروتیپ‌ها داشته و در سطح اسید آمینه‌ای ۱۵-۱۰ درصد تفاوت بین سویه‌ها دیده می‌شود.

بر اساس بروز معمول ولی غیرقابل‌پیش‌بینی ژنوتیپ‌های جدید ویروس برونشیت عفونی، بررسی مداوم میزان بروز و شیوع سویه‌ها برای ارتقای استراتژی‌های واکسیناسیون ضروری است (۴۰). استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با رونویسی معکوس (RT-PCR) به همراه تحلیل پلی‌مورفیسم طول قطعه اندونوکلاز محدود (RFLP) یا توالی‌یابی برای تمایز سویه‌های متفاوت ویروس برونشیت عفونی و تحلیل فیلوژنی تشریح شده است (۲۹). بعلاوه، هوسان و همکارانش یک روش real-time PCR به همراه تحلیل منحنی HRM بر پایه 3'UTR ویروس برونشیت عفونی را برای شناسایی و دسته‌بندی سریع این روش ابداع کردند (۲۰). در ایران، سروتیپ‌های گوناگون ویروس برونشیت عفونی از نواحی مختلف گزارش شده‌اند. اولین جداسازی ویروس برونشیت عفونی در گله‌های مرغ ایران در ۱۹۹۴ انجام شد. سپس، چندین محقق ایرانی به شناسایی سروتیپ 793/B پرداختند که به یکی از غالب‌ترین ویروس‌های برونشیت عفونی در گردش این کشور تبدیل شد (۱۱). هدف اصلی این مطالعه، تعیین خصوصیات واریانت‌های اصلی ویروس برونشیت عفونی گله‌های ایران در طی سال‌های ۲۰۱۴-۲۰۱۵ بود.

مواد و روش کار:

نمونه‌برداری

در این مطالعه، ۲۰۰ نمونه از موارد نشان‌دهنده علائم ویروس برونشیت عفونی در مرغداری‌های گوشتی ۸ استان ایران در طی دوره تحقیق جمع‌آوری شدند (از آوریل ۲۰۱۴ تا فوریه ۲۰۱۵). تعداد نمونه‌ها با توجه به استان متفاوت بود. ۳۰ نمونه از هر کدام از استان‌های اصفهان، خراسان، کردستان و مازندران و ۲۰ نمونه از یکایک استان‌های آذربایجان غربی، قزوین، خوزستان و سمنان اخذ شد (شکل ۱).

جداسازی و تکثیر ویروس

نمونه‌های هر پرنده همگن شده و محلول ۱۰ درصدی (w/v) با PBS تهیه گردید. متعاقباً، نمونه‌ها در دور ۱۵۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. ماده فوقانی برای تلقیح به تخم‌مرغ‌های بارور عاری از عامل بیماری‌زای اختصاصی (SPF) تلقیح شد. نمونه‌های همگن بافتی به همراه ۱۰ هزار واحد بین‌المللی پنی‌سیلین، ۱۰ هزار واحد بین‌المللی استرپتومایسین و ۲۵۰ واحد بین‌المللی آمفوتریسین B بر میلی‌لیتر برای این جداسازی استفاده شدند. پس از یک دوره یک‌ساعته در دمای اتاق، ۲۰۰ میکرولیتر الیکوت از ماده همگن به حفره آلانئوتیک تخم‌مرغ‌های جنین‌دار SPF با سن ۹-۱۱ روزه تلقیح گردید. برای هر نمونه پنج تخم‌مرغ استفاده شد. تخم‌مرغ‌های تلقیح‌شده در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شده و روزانه برای بررسی وضعیت زندگی جنینی کندل شدند. پس از ۲-۳ روز انکوباسیون، مایع آلانئوتیک کشت و برای پاساژهای متوالی استفاده شد. شش پاساژ متوالی

انجام شد و مایع آلانوتوئیک ۴۸-۷۲ ساعت پس از تلقیح جمع‌آوری گردید. به‌علاوه، سه تخم‌مرغ SPF تلقیح نشده بعنوان موارد کنترل در هر یک از فرآیندهای جداسازی مورد استفاده قرار گرفت.



شکل ۱. مکان جغرافیایی استان‌های ایران که جداسازی سویه‌های ویروس برونشیت عفونی از آن‌ها انجام پذیرفته است.
۱. آذربایجان غربی ۲. کردستان ۳. قزوین ۴. خوزستان ۵. مازندران ۶. سمنان ۷. اصفهان ۸. خراسان

استخراج RNA و سنتز cDNA

RNA ویروسی با استفاده از یک کیت استخراج CinnaPure RNA (سیناکلون، ایران) بر اساس روش توصیه‌شده تولیدکننده از مایع آلانوتوئیک جداسازی شد. cDNA با استفاده از کیت (Thermo Scientific) RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Scientific) سنتز گردید.

Real-time PCR برای شناسایی ویروس برونشیت عفونی

Real-time PCR برای شناسایی ویروس برونشیت عفونی بر پایه 5' UTR در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت. تقویت Real-time PCR با استفاده از یک کیت تقویت‌کننده (بیونیر-کره جنوبی)، یک پرایمر جلورونده، یک پرایمر عقب‌رونده و یک پروب دونشانه TaqMan بر طبق مقاله کالیسون و همکارانش انجام شد (۱۴).

Nested PCR برای تعیین ژنوتیپ

یک nested PCR برای تعیین ژنوتیپ استفاده شد (۲۳). PCR اولیه به حجم ۲۰ میکرولیتر در ترکیبی حاوی ۲ میکرولیتر آب مقطر، ۲ میکرولیتر پرایمرهای SX1 و SX2، ۳ میکرولیتر cDNA و ۱۳ میکرولیتر مستر میکس Sinaclon 2x PCR (سیناکلون، ایران) انجام شد. واکنش تقویتی در یک Eppendorf Master Cycler gradient thermocycler (اپندورف، هامبورگ، آلمان) برای دوره دناچوره شدن اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و ۳۵ چرخه دناچوره شدن در ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۱۵ ثانیه، گرمادهی در ۵۸ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و پلیمریزاسیون در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه انجام شد. برای nested PCR، یک الیکوت ۱ میکرولیتری به رقت ۱:۱۰۰ امپلیکون اول با استفاده از پرایمرهای SX3 و SX4 و همان چرخه‌های فوق‌الذکر در دور دوم تقویت DNA انجام شد. فرآورده‌های واکنش با الکتروفورز در ۱.۵ درصد ژل آگاروز در بافر (TBE) Tris/Borate/EDTA جدا شده با GelRed (بیوتیوم آمریکا) رنگ‌آمیزی گردید و تحت نور ماورابنفش مشاهده شد.

تحلیل فیلوژنی و بیوانفورماتیک

فرآورده‌های RT-PCR توسط بیونیر کره جنوبی توالی‌یابی شدند. ساختارهای توالی چندگانه با ClustalW اجرا شده و یک درخت فیلوژنی با نرم‌افزار MEGA5 و با استفاده از روش الصاق به توالی‌های مجاور با تکرار نواری ۱۰۰۰ تایی برای تطبیق سطوح اطمینان با شعبات انجام شدند (۳۶). توالی‌های ویروس برونشیت عفونی با سویه‌های واکسن و مرجع تطبیق یافته و مقایسه شدند. توالی حاصله در پایگاه اطلاعاتی NCBI GenBank ثبت شد. بخش تقویت‌شده توالی ژن S1 از ویروس برونشیت عفونی با شماره‌های دسترسی ذیل در پایگاه اطلاعاتی GenBank ثبت شد: KT583564-KT583601. کشور مبدأ، نام سویه، شماره دسترسی GenBank و ارجاع به مرجع سویه‌های ویروس برونشیت عفونی در جدول ۱ نشان داده شده‌اند.

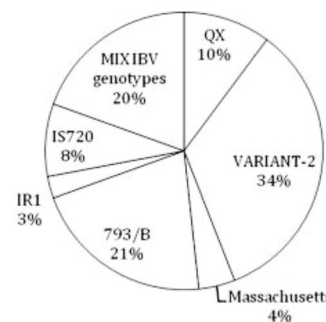
نتایج

مجموع ۲۰۰ نمونه از گله‌های گوشتی واکسینه که مشکلات تنفسی در ۸ استان ایران داشتند جمع‌آوری و ۱۱۸ جدایه ویروس برونشیت عفونی شناسایی شدند. تحلیل فیلوژنی بر اساس توالی‌های نوکلئوتیدی S1 نشان داد که اغلب جدایه‌های ایران از شش گروه ژنتیکی بودند (اشکال ۲ و ۳). گروه ۱ دربردارنده ۴۰ جدایه فیلدی بود (۳۴ درصد) و حداکثر شباهت توالی نوکلئوتیدی را با واریانت ۲ (سویه IS/1494/06) نشان داد. گروه ۲ متشکل از ۲۵ ویروس فیلدی (۲۱ درصد) بود و با سروتیپ 793/B گروه-بندی شد. گروه ۳ متشکل از ۱۲ جدایه فیلدی (۱۰ درصد) بود که در مجموعه مشترکی با سویه QX بودند. نوع ۴، ۱۰ جدایه فیلدی (۸ درصد) داشت که رابطه نزدیکی با سویه IS/720 نشان می‌دادند. پنج مورد از ۱۱۸ جدایه فیلدی (۴ درصد) در گروه ۵ قرار گرفتند که با سویه‌های تیپ ماساچوست (Mass) در یک دسته قرار می‌گرفتند. گروه ۶ سه جدایه از ۱۱۸ جدایه فیلدی (۳ درصدی) را در خود جای داده و با ژنوتیپ IR-1 در درخت فیلوژنی در یک مجموعه قرار گرفت (شکل ۳).

جدول ۱- اطلاعات مربوط به جدایه‌های مرجع ویروس برونشیت عفونی در این مطالعه

Isolate (strain)	Country	GenBank accession number
Ck/CH/AH/2010/13	China	JQ900119
CK/CH/LSD/090519	China	HM194716
QX	China	AF193423
Eg/CLEVB-2/IBV/012	Egypt	JX173488
H120	Iran	JN600610
IR-1062-GA	Iran	AY544777
IR-Razi-HKM1-2010	Iran	JN600609
IR-Razi-HKM2-2010	Iran	JN600611
IR-Razi-HKM3-2010	Iran	JN600612
IR-Razi-HKM4-2010	Iran	JN600613
PCR Lab/06/2012	Iran	JX477827
Sul/01/09	Iraq	GQ281656
IBV/chicken/Kurdistan-Sulaymania/12VIR10065-5/2012	Iraq	KF153243
IS/1494/06	Israel	HM131453
IS/720/99	Israel	AY091552
Q1 (China/LDL/Q1/98)	Singapore	AF286302
UK/E/D3896/84	UK	X52084
4/91 (Attenuated)	UK	AF093793
4/91 (Pathogenic)	UK	AF093794
Holte	USA	IBAS1B
Ark/15C/96	USA	AF169859
Ma5	USA	AY561713
Beaudette	USA	X02342
Connecticut	USA	IBAS1A
Gray	USA	L14069

همان‌طور که در جدول ۲ نشان داده شده است، بیشترین تعداد ویروس‌ها در استان مازندران تشخیص داده شد؛ ۳۵ درصد آن‌ها با واریانت ۲، ۲۵ درصد متعلق به 4/91، ۱۰ درصد تیپ ماساچوست، ۵ درصد مربوط به ژنوتیپ QX و ۵ درصد مرتبط با IS720 بودند. میزان شیوع هر تیپ ویروسی در هر ۸ استان مشابه بود. جدایه IR-1 از نمونه‌های جمع‌آوری شده از اصفهان، خراسان و قزوین جدا شد و این اولین گزارش جداسازی IR-1 در ایران است. بر اساس آنالیز فیلوژنی، ۵۷ درصد ویروس‌های مشابه واریانت ۲ تشابه زیادی با یکدیگر داشتند و بیشترین شباهت (۹۹.۲۲ درصد) با IS/1494/06, Turkey/TR8 و Eg/CLEVB-2/ IBV/012 ویروس برونشیت عفونی و ۹۸.۸۳ درصد شباهت با جدایه 12VIR10065-5 کردستان-سلیمانیه عراق یافت شد. ضمناً ویروس‌های واریانت ۲ شباهت ۹۹ درصدی با جدایه‌های Oman/Ibri/4/12 (KJ206465) و Iran/Var2/H277/12 (KP310026) داشتند.



شکل ۲. شیوع ژنوتیپ‌های متفاوت ویروس برونشیت عفونی در گردش در مرغداری‌های گوشتی ایران در طی سال‌های ۲۰۱۵-۲۰۱۴

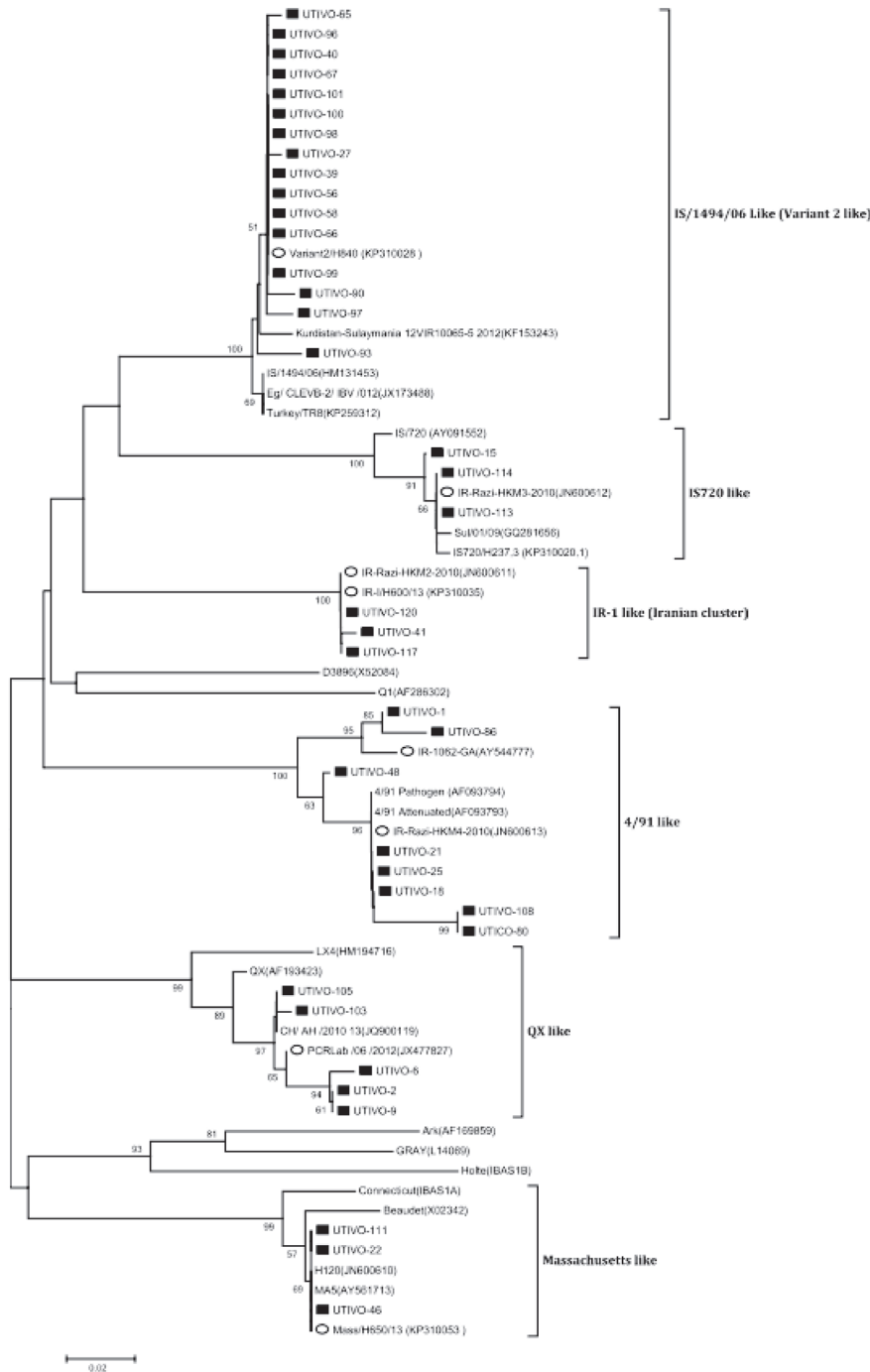
در گروه ۲، توالی‌های نوکلئوتیدی بخشی از ژن S1 سویه تخفیف حدت یافته 4/91 و سویه بیماری‌زای 4/91 ۱۰۰ درصد مشابه هستند. بعلاوه، اغلب جدایه‌های گروه ۲، همانند IR-Razi-HKM4-2010، کاملاً مشابه دو سویه 4/91 بودند. جدایه‌های تیپ QX ویروس برونشیت عفونی بیش از ۹۶ درصد شباهت توالی نوکلئوتیدی با QX اصلی (AF193423) و UTIVO-103 و UTIVO-105 ۹۹ درصد شباهت با Iran/QX/H255/12 (KP310038) داشتند. جدایه UTIVO-14 ۹۶ درصد شباهت توالی با Iran/QX/H179/11 (KP310037) داشتند. در گروه ۴، UTIVO-15 به ترتیب ۹۷.۶۴ و ۹۹.۶۱ درصد شباهت با IS/720 و UTIVO-113 IR-RAZI-HKM3-2010 داشتند. بعلاوه، مطابقت ۹۹.۲۲ درصدی توالی نوکلئوتیدی با Sul/01/09 دیده شد. ۱۰۰ درصدی منطبق با IR-RAZI-HKM3-2010 و ۹۹.۶۱ درصدی با IS720/H273.3 بودند. جدایه‌های تیپ Mass ۱۰۰ درصد مشابه H120 و MA5 نیز ۹۷.۶۵ درصد مشابه سویه بی‌دقت بودند.

تحلیل فیلوژنی گروه ۴ نشان داد که UTIVO120، IR-1 و IR-Razi-HKM2-2010 ۱۰۰ درصد مشابه بودند. UTIVO-41 ۹۹.۶۱ درصد مشابه IR-1 بود. برخی از این ۱۱۸ جدایه ویروس برونشیت عفونی مطالعه حاضر در جدول ۳ و شکل ۴ برای نشان دادن وضعیت همولوگ توالی‌های نوکلئوتیدی ژن S1 آن‌ها با ویروس‌های برونشیت عفونی یافت شده در خاورمیانه و سویه‌های مرجع درج شده‌اند. اشکال ۴ و ۵ به مقایسه توالی‌های نسبی S1 جدایه‌های ویروس برونشیت عفونی ایران با سویه‌های H120 و 4/91 می‌پردازند.

بحث

ویروس برونشیت عفونی یک بیماری ویروسی بسیار مسری است که طیور صنعتی را درگیر می‌کند. تعداد زیادی از ژنوتیپ‌های متفاوت ویروس برونشیت عفونی در سرتاسر جهان شناسایی شدند. توزیع یک ویروس از یک ناحیه یا کشور به ناحیه‌ای دیگر می-

تواند تا حدودی به دلیل معرفی از طریق تجارت پرندگان یا استفاده از واکنش‌های تخفیف حدت یافته باشد (۲۶). گرچه واکنش‌های معمولاً منطبق بر سویه‌های رایج است، موارد همه‌گیری در سرتاسر دنیا در مزارع صنعتی طیور به همراه عواقب شدید اقتصادی به دلیل کاهش تولید رخ می‌دهد.



شکل ۳. درخت فیلوژنی بر اساس توالی نسبی ژن S1، علامت مربع سیاه نشان‌دهنده رابطه بین سویه‌های ایرانی و دیگر سویه‌های ویروس برونشیت عفونی است. روش اتصال مجاور با مدل جایگزین ۲- پارامتری کیمورا و تکرار ۱۰۰۰ تایی نواری برای تخصیص سطح اطمینان به شاخه‌های درخت فیلوژنی استفاده شد. برخی ویروس‌های جداشده در مطالعه کنونی و ویروس‌هایی که پیش از این در ایران شناسایی شده‌اند به ترتیب با مربع سیاه و دایره سفید نشان داده شده‌اند. خطوط عمودی مربوط به فضای شاخه‌ها و نشانه‌ها است. نوار مقیاس‌پذیری نشانگر واحد فاصله بین جفت توالی‌ها می‌باشد. توالی‌ها از GenBank حاصل شدند.

اولین جداسازی ویروس برونشیت عفونی در گله‌های مرغ ایران در سال ۱۹۹۴ گزارش شد. اکنون استراتژی‌های واکسیناسیون بر پایه ویروس برونشیت عفونی گروه Ma5, 793/B و H120 برای کنترل ویروس برونشیت عفونی در مرغداری‌های ایران به کار می‌روند (۳۴، ۱۹). با این حال، گزارش‌های مکرری از موارد مظنون به درگیری با بیماری برونشیت عفونی در کل کشور به دلیل نقصان ایمنی وجود دارد. دلیل این نقصان ایمنی، ایمنی متقاطع ضعیف بین ویروس فیلدی و سویه واکسن و ظهور پیوسته واریانت‌های جدید است. تعیین ژنوتیپ ملی سویه‌های ویروس برونشیت عفونی برای تعیین توزیع ژنوتیپ‌های ویروسی و توسعه و تطبیق استراتژی‌های واکسیناسیون مناسب ضروری است. تعیین خصوصیات آنتی‌ژنی جدایه‌های ویروس برونشیت عفونی برای انتخاب واکسن‌های مناسب و جدید برای نواحی جغرافیایی مرتبط مهم است (۱۶). در اینجا، ما به اجرای تحقیقی بر روی ژنوتیپ‌های ویروس برونشیت عفونی شناسایی شده در گله‌های تجاری طیور ایران پرداختیم؛ شناسایی و تعیین ژنوتیپ ویروس برونشیت عفونی با تشخیص و آنالیز ناحیه در HVR ژن S1 انجام شد.

در مطالعه کنونی، ویروس‌های مشابه واریانت ۲ (مشابه IS/1494/06) با شیوع کلی ۳۴ درصدی شایع‌ترین نوع غالب ویروس برونشیت عفونی در گله‌های مرغ ایران بودند. این ویروس‌ها مشابهت ۹۹.۲ درصدی را با IS/1494/06، Turkey/TR8 و Eg/CLEVB-2/IBV/012 داشتند. جداسازی ویروس برونشیت عفونی IS/1494/06، یکی از جدایه‌های اسرائیلی واریانت ۲ (۱۳) و اطلاعات درزمینه توالی ژنی S1 آن در GenBank (EU350551) برای اولین بار توسط مایر و ماهارات در اسرائیل گزارش شد (اطلاعات منتشرنشده، ثبت مستقیم: 2006). در ۲۰۰۱، جدایه Egypt/Beni-Suef/01 در مصر با ۹۹ درصد شباهت با IS/1494/06 (۲) تشخیص داده شد و واریانت ۲ در سال ۲۰۰۹ در اردن شناسایی شد (۱). کاهیا و همکارانش ۸ ویروس برونشیت عفونی ترکیه‌ای را در نمونه‌های سواب نابی گله‌های مرغ مادر و گوستی ۲۰۱۱ تشخیص دادند. تمامی ۸ جدایه ویروس برونشیت عفونی با شباهت ۹۹ درصدی مرتبط با EU780077 (سویه IS/1494/06) بودند. مؤلفین پیشنهاد کردند که این ویروس برونشیت عفونی از کشورهای خاورمیانه انتقال یافته است (۲۴). توالی‌های S1 جدایه‌های ترکیه‌ای TR8، که توسط کاهیا و همکارانش شناسایی شدند، شباهت ۹۹.۲ درصدی با ویروس‌های واریانت ۲ در تحقیق ما داشتند (۲۴).

جدول ۲. درصد ژنوتیپ‌های شناسایی شده ویروس برونشیت عفونی از ۸ استان ایران در طی سال‌های ۲۰۱۴-۲۰۱۵

	QX (%)	Variant 2 (%)	Massachusetts (%)	793/B (%)	IR1 (%)	IS/720 (%)	MIX types
Azerbaijan	23.08	30.77	0.00	15.38	0.00	7.69	23.08
Ghazvin	8.33	33.33	0.00	25.00	8.33	25.00	0.00
Isfahan	18.75	18.75	6.25	18.75	6.25	6.25	25.00
Khorasan	18.75	37.50	0.00	18.75	6.25	12.50	6.25
Khuzestan	0.00	50.00	0.00	20.00	0.00	0.00	30.00
Kurdistan	5.56	33.33	5.56	22.22	0.00	11.11	22.22
Mazandaran	5.00	35.00	10.00	25.00	0.00	5.00	20.00
Semnan	0.00	38.46	7.69	23.08	0.00	0.00	30.77

در مصر، جدایه Eg/CLEVB-2/IBV/012 در ۲۰۱۲ گزارش شده و ۹۹.۲۲ درصد شباهت توالی با ویروس‌های مشابه واریانت ۲ را نشان داد. در ماه می ۲۰۱۲، ویروسی تحت عنوان IBV/chicken/Egypt/VRLCU154/2012 از سواب‌های نابی یک گله گوستی واکسینه جدا شد و احتمال می‌رفت که عفونت همزمان با ویروس بیماری نیوکاسل در مصر وجود و رابطه نزدیکی با جدایه ویروس برونشیت عفونی IS/1494/06 داشته باشد (۲۱). مطالعه دیگری بر روی ویروس‌های برونشیت عفونی جداسازی شده از مرغداری‌های تخم‌گذار و گوستی در مصر نشان داد که ۱۱ مورد از ۱۳ جدایه دارای رابطه نزدیکی با واریانت‌های اسرائیلی (IS/1494/06 و IS/885) با شباهت توالی نوکلئوتیدی به ترتیب حداکثر ۸۹.۹ و ۸۲.۳ درصدی هستند (۳۳). در لیبی، ۱۲ سویه ویروس برونشیت عفونی حاصله از گله‌های گوستی درگیر بیماری تنفسی و تلفات بالا با توالی‌هایی نوکلئوتیدی HVR ژن

S1 تمایز داده شدند. توالی‌های یک مرغداری یک مجموعه را با ۱۰۰ درصد رابطه با Eg/CLEVB-2/IBV/012 و IS/1494/06 تشکیل دادند (۸). عمان الشکیلی و همکارانش با RT-PCR به بررسی سواب‌های دهانی-حلقی اخذ شده از ۲۴۳ گله متفاوت طیور بومی در سال ۲۰۱۲ پرداختند. ۲.۵۶ درصد نمونه‌ها بیشترین تشابه را با IS/1494/06 داشتند (۶). در این تحقیق، جدایه تحت عنوان Oman/Ibri/4/12 (KJ206465) ارتباطی ۹۹ درصدی با ویروس‌های مشابه واریانت ۲ نشان دادند (۶) و مورد دوم مرتبط با ویروس برونشیت عفونی کردستان-سلیمانیه/5-12VIR10065 (که در سال ۲۰۱۲ در عراق گزارش شد) بود. همان‌طور که نتایج نشان می‌دهند، استراتژی‌های واکسیناسیون ویروس برونشیت عفونی بر پایه مهار واریانت ۲ باید برای کنترل مرغان ایرانی مورداستفاده قرار گیرند.

دومین ژنوتیپ غالب ویروس برونشیت عفونی که در مرغان عفونت ایجاد می‌کند، گروه 793/B با شیوع کلی ۲۱ درصد بود. بعلاوه، اغلب جدایه‌های گروه ۲ کاملاً مشابه سویه واکسنی 4/91 و جدایه‌های ذیل بودند: IR-Razi-HKM4-2010 و IR/15/2011 (JX909289)، CK/CH/LS/110857 (KP118885) چین، یک جدایه از هند (AB626887) و ویروس برونشیت عفونی 32/2011/Morocco (KM594234). از آنجایی که واکسن نوع 793/B در ایران استفاده می‌شود، شیوع بالای 793/B می‌تواند نشان‌دهنده جداسازی مجدد سویه واکسنی باشد. ما توالی‌های ژنی جدایه‌های فیلدی را با توالی‌های مربوط به واکسن استاندارد و سویه‌های بیماری‌زا مقایسه کردیم. توالی‌های کامل S1 برای تمایز سویه‌های واکسن و گروه 793/B وحشی مورد نیاز هستند. نوع 793/B در سال‌های ۱۹۹۰ و ۱۹۹۱ در بریتانیا شناسایی شد ولی اکنون مشخص شده است که این تیپ از ۱۹۸۵ در فرانسه وجود داشته است (۱۵،۴).

آنتی‌بادی‌های واکنش‌دهنده با تیپ 793/B در مرغان تایلند، مکزیک، یونان، بریتانیا، فرانسه، هلند، اسپانیا و آلمان شناسایی شدند (۲۲). کاواناگ و همکارانش ویروس برونشیت عفونی تیپ 793/B در سواب‌های جمع‌آوری‌شده در سال‌های ۱۹۹۷ و ۱۹۹۸ از کشورهای عربستان سعودی، ژاپن، سوئد، دانمارک، لهستان، ایتالیا، فرانسه و آرژانتین را شناسایی کردند (۱۵). Israel/793B/variant1 اولین سروتیپ 793/B شناسایی‌شده خاورمیانه در سال ۱۹۹۶ در اسرائیل است (۲۲). در اردن (۲۰۰۷-۲۰۰۵)، روسان و همکارانش ویروس برونشیت عفونی را در ۶۰ درصد گله‌های گوشتی با استفاده از RT-PCR شناسایی کردند؛ نتایج نشان داد که تیپ‌های اصلی ویروس برونشیت عفونی که در طیور گوشتی اردن در گردش هستند، تیپ ماساچوست و تیپ 793/B بودند (۳۱). در عمان، الشکیلی و همکارانش گزارش دادند که تیپ 793/B ژنوتیپ غالب ویروس برونشیت عفونی عفونت‌زا در گله‌های طیور بومی بود (۶). در ایران، ۱۴ جدایه ویروس برونشیت عفونی با یک RT-PCR چندگانه اختصاصی تیپ در سال ۲۰۰۱ تمایز داده شد. جدایه‌ها از نای طیور گوشتی مبتلا به بیماری تنفسی حاصل شدند. بر اساس RT-PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، ۱۲ جدایه به تیپ ماساچوست و دو مورد از تیپ 793/B (13/2001 و 14/2001) طبقه‌بندی شدند (۳۴). اکبری و همکارانش ویروس برونشیت عفونی را در نمونه‌های بافتی ریه، نای و کلیه مرغداری‌های ایران در طی سال ۲۰۰۳ و با استفاده از RT-PCR/RFLP شناسایی کردند (۵). قهرمانی و همکارانش ۱۰ جدایه ویروس برونشیت عفونی را از مرغان از ۱۹۹۸ تا ۲۰۰۸ با استفاده از RT-PCR شناسایی کردند.

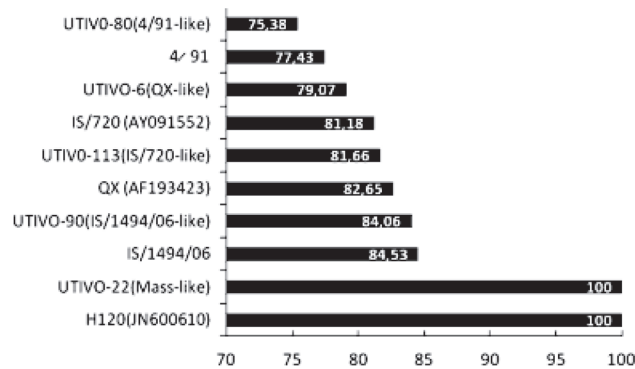
آنالیز فیلوژنی بر پایه توالی‌های برگرفته اسید آمینه‌ای و نوکلئوتیدی ژن S1 نشان‌دهنده سه جدایه متعلق به سروتیپ ماساچوست و هفت مورد متعلق به گروه 793/B بود (۱۸). سیفی و همکارانش عفونت‌های طبیعی همزمان H9N2 بیماری آنفولانزا و ویروس‌های برونشیت عفونی را در گله‌های طیور گوشتی استان فارس بررسی کردند. ویروس برونشیت عفونی در ۴۰ درصد گله‌های بررسی‌شده با استفاده از یک nested RT-PCR چندگانه شناسایی شد. نمونه‌های نایی ۱۱ مورد از ۱۲ گله به لحاظ سویه تیپ 793/B و یک مورد به لحاظ سروتیپ ماساچوست مثبت بودند (۳۲). تحقیقی بر روی ژنوتیپ‌های ویروس برونشیت عفونی گله‌های طیور ایران بین سال‌های ۲۰۰۹ و ۲۰۱۱ توسط هاشم‌زاده و همکارانش انجام شد (۱۹). در آن مطالعه، دو سویه متعلق به ژنوتیپ

تیپ 793/B و دو سویه دیگر بعنوان ژنوتیپ جدید در ایران شناسایی شدند. جدایه‌های Razi-HKM891 و Razi-HKM894 شباهت توالی اسید آمینه‌ای ۹۹.۳۰ درصد و شباهت ۱۰۰ و ۹۹.۳۰ درصدی به ترتیب با سویه بیمارزای 793/B نشان دادند (۱۹).

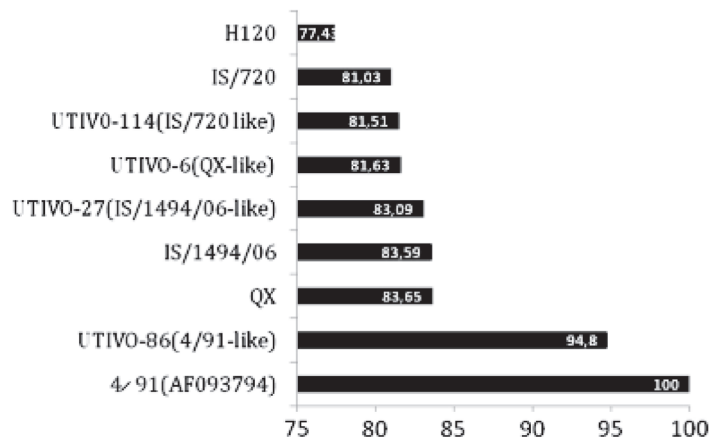
جدول ۳. درصد شباهت توالی‌های نوکلئوتیدی نسبی ژن‌های گلیکوپروتئینی S1 برخی ویروس برونشیت عفونی‌های ایران با سویه‌های مرجع ویروس

برونشیت عفونی

UTIVO-9	100	80.53	81.03	78.60	81.03	81.45	79.33	78.60	81.03
UTIVO-15	80.53	100	81.42	81.15	81.42	87.48	82.67	81.15	87.08
UTIVO-21	81.03	81.42	100	75.99	100.00	82.41	81.84	75.99	82.48
UTIVO-22	78.60	81.15	75.99	100	75.99	82.44	77.50	100.00	82.02
UTIVO-25	81.03	81.42	100.00	75.99	100	82.41	81.84	75.99	82.48
UTIVO-39	81.45	87.48	82.41	82.44	82.41	100	85.91	82.44	100.00
UTIVO-41	79.33	82.67	81.84	77.50	81.84	85.91	100	77.50	85.91
UTIVO-46	78.60	81.15	75.99	100.00	75.99	82.44	77.50	100	82.02
UTIVO-56	81.03	87.08	82.48	82.02	82.48	100.00	85.91	82.02	100
UTIVO-100	81.03	87.08	82.48	82.02	82.48	100.00	85.91	82.02	100
UTIVO-105	98.50	82.51	82.02	80.13	82.02	83.40	81.38	80.13	82.99
UTIVO-108	78.12	78.52	97.75	73.99	97.75	79.54	80.41	73.99	79.63
H120	78.60	81.15	75.99	100.00	75.99	82.44	77.50	100.00	82.02
IR-RAZI-HKM2-2010	79.94	83.24	81.92	78.12	81.92	86.38	99.63	78.12	85.97
IR-RAZI-HKM3-2010	80.02	99.63	80.91	80.66	80.91	87.02	82.16	80.66	86.62
IR-Razi-HKM4-2010	81.03	81.42	100.00	75.99	100.00	82.41	81.84	75.99	82.48
IS/1494/06	80.53	87.08	82.48	81.53	82.48	99.25	85.43	81.53	99.26
IS/720	79.55	97.74	80.45	80.19	80.45	88.80	82.11	80.19	88.40
Kurdistan-sulaymania 12VIR10065-5	79.51	85.70	81.00	80.53	81.00	98.88	86.38	80.53	98.88
PCRLab06/2012	98.88	82.02	82.51	80.13	82.51	82.92	80.87	80.13	82.51
QX	96.58	83.49	82.54	81.59	82.54	83.43	82.41	81.59	83.02
4/91 Path	81.03	81.42	100.00	75.99	100.00	82.41	81.84	75.99	82.48
Column1	UTIVO-100	UTIVO-105	UTIVO-108	H120	IR-RAZI-HKM2-2010	IR-RAZI-HKM3-2010	IR-Razi-HKM4-2010	IS/1494/06	IS/720
UTIVO-9	81.03	98.50	78.12	78.60	79.94	80.02	81.03	80.53	79.55
UTIVO-15	87.08	82.51	78.52	81.15	83.24	99.63	81.42	87.08	97.74
UTIVO-21	82.48	82.02	97.75	75.99	81.92	80.91	100.00	82.48	80.45
UTIVO-22	82.02	80.13	73.99	100.00	78.12	80.66	75.99	81.53	80.19
UTIVO-25	82.48	82.02	97.75	75.99	81.92	80.91	100.00	82.48	80.45
UTIVO-39	100.00	83.40	79.54	82.44	86.38	87.02	82.41	99.25	88.80
UTIVO-41	85.91	81.38	80.41	77.50	99.63	82.16	81.84	85.43	82.11
UTIVO-46	82.02	80.13	73.99	100.00	78.12	80.66	75.99	81.53	80.19
UTIVO-56	100	82.99	79.63	82.02	85.97	86.62	82.48	99.26	88.40
UTIVO-100	100	82.99	79.63	82.02	85.97	86.62	82.48	99.26	88.40
UTIVO-105	82.99	100	79.15	80.13	81.96	82.02	82.02	82.51	81.56
UTIVO-108	79.63	79.15	100	73.99	81.96	77.99	97.75	79.63	77.51
Table 3 continued									
Column1	UTIVO-100	UTIVO-105	UTIVO-108	H120	IR-RAZI-HKM2-2010	IR-RAZI-HKM3-2010	IR-Razi-HKM4-2010	IS/1494/06	IS/720
H120	82.02	80.13	73.98	100	78.12	80.66	75.99	81.53	80.19
IR-RAZI-HKM2-2010	85.97	81.96	81.96	78.12	100	82.74	81.92	85.49	82.69
IR-RAZI-HKM3-2010	86.62	82.02	77.99	80.66	82.74	100	80.91	87.53	98.13
IR-Razi-HKM4-2010	82.48	82.02	97.75	75.99	81.92	80.91	100	82.48	80.45
IS/1494/06	99.26	82.51	79.63	81.53	85.49	87.53	82.48	100	89.28
IS/720	88.40	81.56	77.51	80.19	82.69	98.13	80.45	89.28	100
Kurdistan-sulaymania 12VIR10065-5	98.88	81.53	78.08	80.53	85.49	86.16	81.00	98.88	87.95
PCRLab06/2012	82.51	99.63	79.66	80.13	81.46	81.53	82.51	82.02	81.07
QX	83.02	98.13	79.69	81.59	82.97	83.02	82.54	82.54	82.56
4/91 Path	82.48	82.02	97.75	75.99	81.92	80.91	100.00	82.48	80.45



شکل ۴. درصد شباهت توالی‌های ژنی S1 نسبی برخی ویروس‌های برونشیت عفونی از مطالعه کنونی با سویه H120



شکل ۵. درصد شباهت توالی‌های ژن S1 نسبی برخی ویروس‌های برونشیت عفونی مطالعه کنونی با توالی مربوط به سویه 4/91

ویروس‌های برونشیت عفونی تیپ QX سومین ویروس شایع در گردش در مرغداری‌های ایران بود. در سپتامبر ۱۹۹۶، بروز یک بیماری با شاخص تورم معده، در گله‌های مرغداری کینگادو چین رخ داد (۴۱). آنالیز گذشته‌نگر سویه‌های ویروس برونشیت عفونی جدا شده در روسیه در ۲۰۰۱ نشان داد که برخی جدایه‌ها به لحاظ ژنتیکی مرتبط با تیپ QX بودند (۳۸). در اروپا، وجود یک ویروس برونشیت عفونی بیماری‌زای کلیوی برای اولین بار بین سال‌های ۲۰۰۳ و ۲۰۰۴ در هلند گزارش شد (۳۸). ورتینگتون و همکارانش بیان نمودند که ویروس برونشیت عفونی مشابه QX، ژنوتیپ غالب آلمان (۲۰۰۳)، هلند و بلژیک (۴۰) بود. از آن زمان به بعد، وجود سویه‌های مشابه QX در ایتالیا (۲۰۰۵)، اسلوانی (۲۰۰۵-۱۹۹۰)، لهستان (۲۰۰۶)، بریتانیا (۲۰۰۸)، بلغارستان (۲۰۰۸) و سوئیس (۹، ۱۰، ۲۵، ۳۵، ۳۷، ۳۹) گزارش شد. سویه QX در بخش جنوبی قاره آفریقا (زیمباوه) نیز در سال ۲۰۱۱ شناسایی شد (۷).

در سال ۲۰۰۹، بر اساس تعیین خصوصیات ژنتیکی جدایه‌های عراقی، یک واریانت جدید فرضی برونشیت عفونی غیرمرتبط با سویه QX مشخص شد (۷). در اوایل سال ۲۰۱۱، پنج جدایه ویروس برونشیت عفونی حاصل از موارد رخداد بیماری تنفسی در عراق، اردن و عربستان سعودی بررسی شدند. جدایه‌ها متعلق به سویه CK/CH/LDL/971 بودند (۱). ویروس‌های برونشیت عفونی تیپ QX جدا شده در این مطالعه شباهتی بیش از ۹۶ درصدی در توالی نوکلئوتیدی با QX اصلی (AF193423) نشان دادند. در ایران، بزرگمهری‌فرد و همکارانش سویه Iran/QX/H179/11 را در سال ۲۰۱۱ و سویه‌های Iran/QX/H255/12، Iran/QX/H281/12 و Iran/QX/H284/12 را در سال ۲۰۱۲ جداسازی کرد (۱۲). جدایه‌های تیپ QX آن مطالعه شباهت توالی بیش از ۹۶ درصد با این سویه‌های ایران نشان دادند (۱۲). به دلیل اثرات بازگشت‌ناپذیر سویه QX بر روی سیستم تولیدمثل،

مطالعات بیشتری باید بر روی گله‌های تخم‌گذار و پالت ایران انجام شوند. بدین ترتیب در موارد شیوع بالا و بروز مشکلات پیرامون تخم‌گذاران کاذب، یک واکسن مناسب و برنامه واکسیناسیون (خصوصاً در مرغداری‌های تخم‌گذار) توصیه می‌شوند. مکررترین ویروس‌های شناسایی شده با سویه مشابه IS/720 در یک گروه قرار دارند. سویه IS/720/99، که اساساً از سواب‌های نایی یک گله گوشتی مبتلا جداسازی می‌شود، با RT-PCR و RFLP از طریق توالی‌یابی ژن S1 و تست ایمنی واکسن تعیین تیپ شد (۳۰). یک واریانت ویروس برونشیت عفونی تحت عنوان IS/885/00 که عامل نفريت محسوب می‌شود از موارد شیوع بیماری در ۲۳ مرغداری گوشتی اسرائیل در ۱۹۹۹ جداسازی گردید. آنالیز توالی ژن S1 و توالی استنتاجی اسیدآمین، شباهت پروتئینی ۹۷.۲ درصد با ژنوتیپ IS/720/99 و ۷۱.۶ درصد با سویه واکسن H120، تنها سویه مجاز برای استفاده در اسرائیل، را نشان داد. این واریانت رابطه نزدیکی با Egypt/Beni-Seug/01 با شباهتی ۹۶.۶ درصدی دارد (۳۰). در مطالعه انجام شده توسط محمود و همکارانش، جدایه‌ها (Sul/01/09) از بافت‌های نای و کلیه طیور گوشتی در ناحیه کردستان عراق حاصل شدند (۲۷). ویروس‌های مشابه IS/720 در این مطالعه شباهتی ۹۹.۲۲ درصدی با Sul/01/09 نشان دادند. جدایه‌های این گروه رابطه نزدیکی با IR-RAZI-HKM3-2010، تشخیص داده شده توسط هاشم‌زاده و همکارانش در سال ۲۰۱۰ (اولین جداسازی و شناسایی شبه IS/720 در ایران) داشتند (۱۹). در این مطالعه، ۴ درصد جدایه‌ها متعلق به سروتیپ ماساچوست بودند. ماساچوست و 793/B در میان مهم‌ترین و شایع‌ترین سروتیپ‌های ویروس برونشیت عفونی در سطح جهان هستند (۴۲).

جداسازی اولیه ویروس برونشیت عفونی در ماساچوست در دهه ۱۹۳۰ انجام شد و سروتیپ ماساچوست ویروس برونشیت عفونی تنها سروتیپ شناخته شده برای سالیان متمادی بود (۲۲). توالی جدایه‌های تیپ ماساچوست شباهتی ۱۰۰ درصدی با H120 و MA5 و ۹۷.۶۵ درصدی با سویه بیودت داشتند. از آنجایی که واکسن‌های زنده تخفیف حدت یافته ویروس برونشیت عفونی (مثلاً سویه‌های مشابه ماساچوست H120 و MA5) در مرغداری‌های ایران استفاده می‌شوند، سویه‌های مذکور می‌توانستند حاصل از واکسن باشند.

تنها ۲ درصد جدایه‌های شناسایی شده متعلق به ژنوتیپ IR-1 (که برای اولین بار توسط هاشم‌زاده و همکارانش تشریح شد) بود. جدایه UTIVO-120 جدا شده در این تحقیق مشابه IR-Razi-HKM2-2010 (که توسط هاشم‌زاده و همکارانش در ۲۰۱۲ گزارش شد) (۱۹) و IR-I/H600/13 بود (که توسط حسینی و همکارانش در سال ۲۰۱۳ تشخیص داده شد؛ اطلاعات چاپ نشده). سویه IR-1 در دیگر بخش‌های جهان و بیرون از ایران گزارش نشده است. از آنجایی که هیچ تغییری در توالی نوکلئوتید ژن S1 سویه IR-1 در سالیان اخیر دیده نشده است، توالی‌یابی نوکلئوتیدی کامل ژنوم برای تعیین مبدأ این سویه و بررسی امکان اینکه این مورد نتیجه رخدادهای باز ترکیب است یا خیر، ضروری است.

این اولین گزارش موارد فعال ویروس برونشیت عفونی در ایران است که شامل جداسازی و تعیین خصوصیات مولکولی واریانت‌های ویروس برونشیت عفونی نیز می‌شود. نمونه‌ها از مزارع گوشتی مشکوک به بیماری برونشیت عفونی در استان‌های متفاوت ایران در طی ۲۰۱۴-۲۰۱۵ جمع‌آوری شدند. ما وجود ژنوتیپ را که تاکنون جدا نشده بود، تأیید کردیم. گردش همزمان تیپ‌های چندگانه ویروس برونشیت عفونی، چه سویه‌های مرتبط با واریانت‌های خاورمیانه (همانند IS/720 و IS/1494/06) و چه جدایه‌هایی که همولوگ ژنوتیپ چینی QX هستند، یک چالش اپیدمیولوژیکی در ایران محسوب می‌شود. کشورهای خاورمیانه و ایران تجارت و تبادل کنترل نشده گسترده‌ای را در زمینه زیست‌بوم‌ها و حیوانات دارند که می‌تواند منجر به انتشار کلونی سویه‌های IS/1494/06 و IS/702 ایران و کشورهای همسایه آن (همانند ترکیه و عراق) شود. انجام مطالعات بیشتر برای تشریح فرآیند بروز واریانت‌ها و شاخص‌های زیستی آن‌ها (همچون بیماری‌زایی و تولید واکسن‌های مناسب از سویه‌های بومی ویروس) مورد نیاز است.

1. Ababneh M, Dalab AE, Alsaad S, Al-Zghoul M (2012) Presence of Infectious Bronchitis Virus Strain CK/CH/LDL/971 in the Middle East. *ISRN Vet Sci* 2012:1-6
2. Abdel-Moneim AS, Afifi MA, El-Kady MF (2012) Emergence of a novel genotype of avian infectious bronchitis virus in Egypt. *Arch Virol* 157:2453-2457
3. Abolnik C (2015) Genomic and single nucleotide polymorphism analysis of infectious bronchitis coronavirus. *Infect Genet Evol* 32:416-424
4. Adzhar A, Gough RE, Haydon D, Shaw K, Britton P, Cavanagh D (1997) Molecular analysis of the 793/B serotype of infectious bronchitis virus in Great Britain. *Avian Pathol J WVPA* 26:625-640
5. Akbari AG, Vasfi MM, Keyvani H (2004) Isolation and identification of infectious bronchitis viruses in poultry farms of Iran. *J Vet Res* 59:259-264
6. Al-Shekaili T, Baylis M, Ganapathy K (2015) Molecular detection of infectious bronchitis and avian metapneumoviruses in Oman backyard poultry. *Res Vet Sci* 99:46-52
7. Amin OG, Valastro V, Salviato A, Drago A, Cattoli G, Monne I (2012) Circulation of QX-like infectious bronchitis virus in the Middle East. *Vet Rec* 171:530
8. Awad F, Baylis M, Ganapathy K (2014) Detection of variant infectious bronchitis viruses in broiler flocks in Libya. *Int J Vet Sci Med* 2:78-82
9. Beato M, De Battisti C, Terregino C, Drago A, Capua I, Ortali G (2005) Evidence of circulation of a Chinese strain of infectious bronchitis virus (QXIBV) in Italy. *Vet Rec* 156:720
10. Benyeda Z, Mato T, Süveges T, Szabo E, Kardi V, Abonyi-Toth Z, Rusvai M, Palya V (2009) Comparison of the pathogenicity of QX-like, M41 and 793/B infectious bronchitis strains from different pathological conditions. *Avian Pathol* 38:449-456
11. Bijanzad P, Momayez R, Bozorgmehrfard MH, Hablolvarid MH, Pourbakhsh SA (2013) Experimental study on histopathological changes and tissue tropism of Iranian infectious bronchitis serotype 793/B-like virus in SPF chickens. *J S Afr Vet Assoc* 84:E1-E7
12. Bozorgmehri-Fard M, Charkhkar S, Hosseini H (2014) Detection of the Chinese Genotype of Infectious Bronchitis Virus (QX-type) in Iran. *Iran J Virol* 7:21-24
13. Callison SA, Jackwood MW, Hilt DA (2001) Molecular characterization of infectious bronchitis virus isolates foreign to the United States and comparison with United States isolates. *Avian Dis* 45:492-499
14. Callison SA, Hilt DA, Boynton TO, Sample BF, Robison R, Swayne DE, Jackwood MW (2006) Development and evaluation of a real-time Taqman RT-PCR assay for the detection of infectious bronchitis virus from infected chickens. *J Virol Methods* 138:60-65
15. Cavanagh D, Picault J-P, Gough RE, Hess† M, Mawditt M, Britton P (2005) Variation in the spike protein of the 793/B type of infectious bronchitis virus, in the field and during alternate passage in chickens and embryonated eggs. *Avian Pathol* 34:20-25
16. de Wit JJ, Cook JK (2014) Factors influencing the outcome of infectious bronchitis vaccination and challenge experiments. *Avian Pathol: J WVPA* 43:485-497
17. Dolz R, Vergara-Alert J, Perez M, Pujols J, Majo N (2012) New insights on infectious bronchitis virus pathogenesis: characterization of Italy 02 serotype in chicks and adult hens. *Vet Microbiol* 156:256-264
18. Ghahremani N, Fard MB, Shoushtari H, Momayez R, Sheikhi N, Khoshzahmat A, Eshratbadi F (2011) Molecular Analysis of Infectious Bronchitis Viruses Isolated in Iran from 1998-2008. *J Anim Vet Adv* 10:2961-2967
19. Hashemzadeh M, Karimi V, Masoudi S, Shoushtari A, Langeroudi A, Momayez R, Shirazi M, Maghsodloo H, Hasanzadeh R, Eshratbadi F (2013) Phylogenetic study of Iranian infectious bronchitis virus isolates during 2010-2011 using glycoprotein S1 gene. *J Vet Res* 68:135-141
20. Hewson K, Noormohammadi AH, Devlin JM, Mardani K, Ignjatovic J (2009) Rapid detection and non-subjective characterization of infectious bronchitis virus isolates using high-resolution melt curve analysis and a mathematical model. *Arch Virol* 154:649-660
21. Hussein AH, Emara M, Rohaim M, Ganapathy K, Arafa A (2014) Sequence analysis of infectious bronchitis virus IS/1494 like strain isolated from broiler chicken co-infected with newcastle disease virus in egypt during 2012. *Int J Poultry Sci* 13:530-536
22. Jackwood MW (2012) Review of infectious bronchitis virus around the world. *Avian Dis* 56:634-641
23. Jones RC, Worthington KJ, Capua I, Naylor CJ (2005) Efficacy of live infectious bronchitis vaccines against a novel European genotype, Italy 02. *Vet Rec* 156:646-647
24. Kahya S, Coven F, Temelli S, Eyigor A, Carli KT (2013) Presence of IS/1494/06 genotype-related infectious bronchitis virus in breeder and broiler flocks in Turkey. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 60:27-31
25. Krapež U, Slavec B, Barlič-Maganja D, Rojs OZ (2010) Molecular analysis of infectious bronchitis viruses isolated in Slovenia between 1990 and 2005: a retrospective study. *Virus Genes* 41:414-416
26. Liu S, Zhang Q, Chen J, Han Z, Liu X, Feng L, Shao Y, Rong J, Kong X, Tong G (2006) Genetic diversity of avian infectious bronchitis coronavirus strains isolated in China between 1995 and 2004. *Arch Virol* 151:1133-1148
27. Mahmood ZH, Sleman RR, Uthman AU (2011) Isolation and molecular characterization of Sul/01/09 avian infectious bronchitis virus, indicates the emergence of a new genotype in the Middle East. *Vet Microbiol* 150:21-27
28. Marandino A, Pereda A, Tomás G, Hernández M, Iraola G, Craig MI, Hernández D, Banda A, Villegas P, Panzera Y, Pérez R (2015) Phylodynamics analysis of avian infectious bronchitis virus in South America. *J Gen Virol* 96(Pt 6):1340-1346
29. Mardani K, Noormohammadi AH, Ignatovic J, Browning GF (2006) Typing infectious bronchitis virus strains using reverse transcription-polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis to compare the 3' 7.5 kb of their genomes. *Avian Pathol* 35:63-69
30. Meir R, Rosenblut E, Perl S, Kass N, Ayali G, Hemsani E, Perk S (2004) Identification of a novel nephropathogenic infectious bronchitis virus in Israel. *Avian Dis* 48:635-641
31. Roussan D, Totani W, Khawaldeh G (2008) Molecular subtype of infectious bronchitis virus in broiler flocks in Jordan. *Poult Sci* 87:661-664
32. Seifi S, Asasi K, Mohammadi A (2010) Natural co-infection caused by avian influenza H9 subtype and infectious bronchitis viruses in broiler chicken farms. *Veterinarski Arhiv* 80:269-281
33. Selim K, Arafa AS, Hussein HA, El-Sanousi AA (2013) Molecular characterization of infectious bronchitis viruses isolated from broiler and layer chicken farms in Egypt during 2012. *Int J Vet Sci Med* 1:102-108
34. Seyfi Abad Shapouri M, Mayahi M, Assasi K, Charkhkar S (2004) A survey of the prevalence of infectious bronchitis virus type 4/91 in Iran. *Acta Vet Hung* 52:163-166
35. Sigrist B, Tobler K, Schybl M, Konrad L, Stockli R, Cattoli G, Luschow D, Hafez HM, Britton P, Hoop RK, Vogtlin A (2012) Detection of Avian coronavirus infectious bronchitis virus type QX infection in Switzerland. *J Vet Diagn Investig Official Publ Am Assoc Vet Lab Diagno* 24:1180-1183
36. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28:2731-2739
37. Terregino C, Toffan A, Beato MS, De Nardi R, Vascellari M, Meini A, Ortali G, Mancin M, Capua I (2008) Pathogenicity of a QX strain of infectious bronchitis virus in specific pathogen free and commercial broiler chickens, and evaluation of protection induced by a vaccination programme based on the Ma5 and 4/91 serotypes. *Avian Pathol J WVPA* 37:487-493
38. Terregino C, Toffan A, Serena Beato M, De Nardi R, Vascellari M, Meini A, Ortali G, Mancin M, Capua I (2008) Pathogenicity of a QX strain of infectious bronchitis virus in specific pathogen free and commercial broiler chickens, and evaluation of protection induced by a vaccination programme based on the Ma5 and 4/91 serotypes. *Avian Pathol* 37:487-493
39. Valastro V, Monne I, Fasolato M, Cecchetti K, Parker D, Terregino C, Cattoli G (2010) QX-type infectious bronchitis virus in commercial flocks in the UK. *Vet Rec* 167:865-866
40. Worthington KJ, Currie R, Jones RC (2008) A reverse transcriptase-polymerase chain reaction survey of infectious bronchitis virus genotypes in Western Europe from 2002 to 2006. *Avian Pathol* 37:247-257
41. Yudong W, YongLin W, Zichun Z, GenChe F, Yihai J, Xiang L, Jiang D, Shushuang W (1998) Isolation and identification of glandular stomach type IBV (QX IBV) in chickens. *Chin J Anim Quar* 15:1-3
42. Zhang T, Han Z, Xu Q, Wang Q, Gao M, Wu W, Shao Y, Li H, Kong X, Liu S (2015) Serotype shift of a 793/B genotype infectious bronchitis coronavirus by natural recombination. *Infect Genet Evol* 32:377-387

مقالات مرتبط با واکسن

Cevac IBird

محافظت پرندگان در برابر چالش با ویروس برونشیت عفونی مشابه واریانت ۲ با استفاده از ترکیب سویه‌های 1/96

و H120

مصطفی حبیبی^۱، وحید کریمی^۱، سید علی غفوری^۲، مسعود هاشم‌زاده^۲، رضا خلعت‌آبادی فراهانی^۲، حسین مقصودلو^۲،
حامد عبدالهی^۲ و آرش قلیان‌چی لنگرودی^۴

۱. گروه بیماری‌های طیور دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران

۲. سازمان دامپزشکی کشور

۳. مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی

۴. گروه میکروبیولوژی و ایمنولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران

چکیده

بیماری برونشیت عفونی یک بیماری جهانی پرندگان می‌باشد که تمامی لاین‌های طیور پرورشی را درگیر می‌کند. این مطالعه با هدف بررسی محافظت ایجاد شده توسط دو واکسن از دو سروتیپ متفاوت (ماساچوست و 793/B) علیه چالش با ویروس‌های مشابه IS/1494/06 (ویروس‌های مشابه واریانت ۲)، با گسترش خاورمیانه‌ای، صورت گرفت. پرندگان به ۴ گروه تقسیم شدند (تعداد ۲۰ پرنده در هر گروه). گروه‌های اول و دوم (به عنوان گروه‌های کنترل منفی و گروه واکسن نخورده-چالش داده شده) هیچ واکسنی را دریافت نکردند. گروه‌های ۳ و ۴ در ۱ و ۱۴ روزگی به ترتیب واکسن‌های H120-H120 و H120-1/96 را دریافت نمودند. ۲۱ روز بعد از واکسن دوم چالش صورت گرفت. پنج روز پس از چالش نمونه‌های بافتی نای و کلیه‌ها جهت ارزیابی فعالیت سیستم مژکی دستگاه تنفس و میزان RNA در بافت‌ها (با استفاده از روش Real-Time RT-PCR کمی) جمع‌آوری گردید. به‌طور کلی، نتایج حاکی از قابلیت محافظتی قابل قبول برنامه واکسیناسیون استفاده شده بود. فعالیت بهتر سیستم مژکی نای (۶۹/۲ درصد محافظت) در گروه دریافت‌کننده واکسن‌های H120-1/96 مشاهده گردید. تکثیر ویروس چالشی در گروه دریافت‌کننده واکسن‌های H120-1/96 در مقایسه با گروه H120-H120 حاکی از کاهش قابل توجهی از ویروس چالشی در نای (۵۰۳ در مقایسه با $10^3 \times 1/5$) و کلیه (صفر در مقایسه با ۱۹۰) بود. نتیجه‌گیری نهایی این که، استفاده از ترکیب واکسن‌های متفاوت از سروتیپ‌های مختلف جهت کنترل ویروس مشابه واریانت ۲ نتیجه بهتری در مقایسه با استفاده از واکسن یک سروتیپ به همراه دارد. با این وجود استفاده از سایر سویه‌های در حال چرخش جهت یافتن بهترین برنامه واکسن مورد نیاز می‌باشد.

لغات کلیدی: برونشیت عفونی طیور، واکسیناسیون، سویه 1/96، محافظت متقاطع، سروتیپ 793/B

مقدمه

ویروس برونشیت عفونی یکی از عوامل بیماری‌زای مهم، مضررات اقتصادی فراوانی را به صنعت طیور تحمیل کرده که می‌تواند به شکل بیماری تنفسی، نفريت و کاهش کمی و کیفی تولید تخم‌مرغ نمایان گردد. ویروس برونشیت عفونی یک کروناویروس می‌باشد که عمدتاً طیور صنعتی را درگیر می‌کند. این ویروس یک ویروس RNA دار تک‌رشته‌ای با سنس مثبت بوده و دارای ژنوم ۲۷ تا ۳۱

کیلوباز می‌باشد (۱۱)، خانواده کروناویروس‌ها به چهار گروه تقسیم‌بندی می‌شود که شامل آلفا، بتا، گاما و دلتا کروناویروس‌ها می‌باشد (۱۵). ژن ویروس برونشیت عفونی پروتئین‌های ویروسی متعددی را کد می‌کند که نقش‌های مهم آنتی‌ژنیک و ایمنولوژیک را در ساختار ویروس به عهده دارند. آنتی‌ژن S یا Spik، که به عنوان آنتی‌ژن ایمنولوژیک اصلی ویروس برونشیت عفونی شناخته می‌شود، شامل دو بخش S_1 و S_2 می‌باشد. بخش S_1 که متغیرترین بخش ویروس می‌باشد، مسئول تغییرات و جهش‌های بزرگ در ویروس می‌باشد. صدها سروتیپ مختلف از ویروس برونشیت عفونی وجود دارند که اغلب در آمینواسیدهای ژن S_1 حدود ۲۵-۲۰ درصد با یکدیگر تفاوت دارند (۳۴، ۱۲). با این وجود، بعضی از سروتیپ‌ها تا ۵۰ درصد نیز با یکدیگر تفاوت دارند (۱۶). تحت واحد S_1 بعنوان اصلی‌ترین الفاکنده ایمنی محافظت‌کننده بوده و دارای غالب اپی‌توپ‌های خنثی‌کننده، شامل اپی‌توپ‌های مخصوص سروتیپ، می‌باشد (۴۵). واریانت‌های جدید ویروس برونشیت عفونی ممکن است تا ۵۵ درصد در سکانس اسیدآمینه S_1 آن در مقایسه با سویه‌های واکسن تفاوت داشته باشند (۲۷، ۳۸). واریانت‌های جدید زیادی از گله‌های تجاری مختلفی جدا شده است (۳۶، ۵۰). با در نظر گرفتن میزان تشابه ژن S_1 (یا بخشی از آن) و سطح محافظت متقاطع، احتمال محافظت متقاطع بین سویه‌هایی که از لحاظ ژنومی تشابه دارند، بیشتر از سویه‌هایی است که مشابهت ژنومی کمتری دارند (۱۳). با این وجود، نتایجی نیز وجود دارد که نشان از ضعف چنین رابطه‌ای دارد (۲۴). بطوری که در بعضی از سویه‌ها با حداقل تفاوت در سکانس ژنومی، میزان محافظت متقاطع به طرز فاحشی کاهش یافته است (۲۵)، در حالی که در سویه‌های با تفاوت زیاد در سکانس ژنومی محافظت متقاطع قابل قبول‌تری به همراه دارد. ظهور مداوم سروتیپ‌های مختلف ویروس برونشیت عفونی در سرتاسر جهان سبب می‌شود که به فکر یافتن بهترین محافظت متقاطع با استفاده از واکسن‌های موجود باشیم (۲۶). طبق انتظار، با کاهش تشابه ژنومی در ژن S_1 بین دو سویه، میزان محافظت متقاطع بین آن‌ها نیز کاهش می‌یابد (۱۲). مطالعات مختلف حاکی از این می‌باشند که واکسیناسیون مجدد با استفاده از واکسن با سروتیپ متفاوت، می‌تواند سبب ایجاد سطح گسترده‌تری از محافظت گردد (۴۸). بعضی از سویه‌های ویروس برونشیت عفونی توانایی ایجاد محافظت متقاطع علیه سایر ژنوتیپ‌ها را دارند که به عنوان پروتکتوتیپ‌ها معرفی می‌شوند. پروتکتوتیپ‌ها به عنوان روش ارزشمندی در استراتژی‌های کنترلی بیماری برونشیت عفونی می‌باشند (۴۸). در ایران، جداسازی ژنوتیپ‌های متعددی از ویروس‌های برونشیت عفونی گزارش شده است (۳، ۲۹). اولین جداسازی ویروس برونشیت عفونی در گله‌های طیور توسط آقاخان و همکارانش گزارش گردید (۲). بعدها محققان ایرانی متعددی سروتیپ 793/B را از ایران جداسازی نمودند (۳). این سروتیپ به عنوان یکی از سروتیپ‌های غالب در حال چرخش در ایران می‌باشد (۴۹). حضور ویروس‌های واریانت ۲ (ویروس‌های مشابه IS/1494/06) در گله‌های طیور صنعتی ایران تایید شده است (۳۱). جداسازی IS/1494/06 یکی از سویه‌های واریانت ۲ اسرائیلی، و اطلاعات مرتبط با ژن S_1 آن در بانک ژنی (شماره دسترسی: EU 780077) ابتدا توسط مییر و ماهر از اسرائیل گزارش گردید (۴۴). این سویه در حال حاضر همچنان به عنوان یکی از سویه‌های غالب در حال چرخش کشورهای اسرائیل، اردن، مصر، ترکیه و سایر کشورهای خاورمیانه می‌باشد (۳۱، ۳۲، ۳۷). سویه IS/1494/06 به عنوان سویه نفروپاتوژن و تنفسی مطرح می‌باشد (۵۱). بایستی به این نکته اشاره نمود که در ایران واکسن‌های ماساچوست و گروه 793/B متعددی در حال مصرف می‌باشند. سویه 1/96 برای اولین بار در مجارستان جدا شده و توسط شرکت CEVA Sante animale با نام تجاری IBird تولید گردید. این مطالعه، با هدف ارزیابی محافظت متقاطع حاصل از مصرف واکسن‌های H120 و سویه 1/96 علیه چالش با ویروس مشابه واریانت ۲ صورت گرفت.

مواد و روش کار

طرح مطالعه

پرندگان لگهورن سفید عاری از پاتوژن اختصاصی (SPF) به ۴ گروه ۲۰ تایی تقسیم شدند و هر گروه به طور جداگانه در ایزولاتورهای فشار منفی نگهداری شدند که به غذا و آب دسترسی آزاد داشتند. این گروه‌ها برنامه واکسن و چالش را بر اساس جدول شماره ۱ دریافت نمودند. واکسیناسیون با استفاده از واکسن‌های ماساچوست (Cevac Bron 120 L) و گروه 793/B (سویه 1/96): Cevac IBird به روش قطره چشمی انجام گرفت. پرندگان در گروه ۲ (واکسن نخورده-چالش یافته)، گروه ۳ (دریافت واکسن H120 در یک و واکسن H120 در ۱۴ روزگی) و گروه ۴ (دریافت واکسن H120 در یک و واکسن 1/96 در ۱۴ روزگی)، در سن ۳۵ روزگی به روش قطره بینی چالش داده شدند (10^4 EID50). ۵ روز پس از چالش، نمونه‌های باقی‌مانده از نای و کلیه جهت آزمون Real time RT-PCR کمی و فعالیت مژگی نای (Ciliostasis) جمع‌آوری شدند.

جدول شماره ۱: طرح مطالعه بر اساس روز واکسیناسیون و چالش با سویه IS/1494/06، ۲۱ روز پس از آخرین واکسن

گروه‌ها	نوع برنامه	روز ۱	روز ۱۴	روز چالش (۳۵ روزگی)
۱	کنترل منفی	-	-	-
۲	واکسن نخورده-چالش داده شده	-	-	+
۳	H120-H120	H120 (CEVA)	H120 (CEVA)	+
۴	H120-1/96	H120 (CEVA)	IBird-1/96 (CEVA)	+

تاریخچه سویه چالشی

نمونه‌های نای و کلیه از گله‌های طیور گوشتی با علایم مشکوک به برونشیت عفونی جمع‌آوری شدند. این نمونه‌ها از ۸ استان کشور و از گله‌های واکسن‌خورده تهیه شده بودند. جهت جداسازی ویروس، نمونه‌های هموژن شده به کیسه آلانتویک تخم‌مرغ‌های SPF جنین‌دار ۹-۱۱ روزه تزریق گردید. تشخیص اولیه ویروس با استفاده از PCR با هدف شناسایی بخش ۵'-UTR ژنوم ویروس برونشیت عفونی صورت گرفت. به منظور ارزیابی ژنوتیپ، نمونه‌های مثبت جهت تکثیر ژن S1 در روش nested PCR تکثیر یافتند. براساس ژنوتیپ‌بندی و اپیدمیولوژی مولکولی، نمونه‌ها به ویروس‌های مشابه IS/1494/06 (ویروس مشابه واریانت ۲) تشابه بیشتری داشتند. از حدود ۴۰ جدایه مشابه واریانت ۲، یک جدایه در پاساژ پنجم در تخم‌مرغ انتخاب گردید. با استفاده از روش PCR و کشت، مشخص شد که نمونه انتخاب شده عاری از ویروس‌های نیوکاسل، آنفولانزا، لارنگوتراکئیت عفونی، رئوویروس، مایکوپلاسما و سایر باکتری‌ها می‌باشد. سکانس ژن S1 ویروس چالشی در سامانه NCBI (شماره دسترسی: KR869776) ثبت گردید. میزان EID50 براساس روش Reid-Muench محاسبه شده و مورد استفاده قرار گرفت.

تست توقف مژگی (ciliostasis):

ارزیابی محافظت علیه چالش با استفاده از روش تست توقف مژگی مورد بررسی قرار گرفت (۲۰). پنج روز پس از چالش ۵ پرنده از هر گروه به طریق مرگ با ترحم معدوم شدند. نای‌ها با دقت جدا شده و جهت ارزیابی حرکت مژگی با روش‌های توصیف‌شده مورد استفاده قرار گرفتند (۱۲). بطور مختصر، ۱۰ حلقه (۳ حلقه از بالا، ۴ حلقه از وسط و ۳ حلقه از بخش پایینی نای) از هر نای جدا شده و با میکروسکوپ کم نور بررسی شدند که نمره‌دهی فعالیت مژگی به صورت مقابل بود: نمره صفر = تمام مژک‌ها در حال فعالیت هستند،

نمره ۱ = ۷۵٪ فعالیت مژکی، نمره ۲ = ۵۰٪ فعالیت مژکی، نمره ۳ = ۲۵٪ فعالیت مژکی و نمره ۴ = فعالیت مژکی وجود ندارد (یعنی ۱۰۰ درصد توقف مژکی). این نمره‌بندی سبب تعریف نمره ۴۰ برای ۱۰ حلقه نای در صورت توقف مژکی کامل می‌گردد (یعنی عدم وجود هر گونه محافظتی).

استخراج RNA و سنتز cDNA و Real-time PCR کمی

RNA ویروسی با استفاده از کیت استخراج (Sinaclone, Iran) Cinna pure طبق توصیه شرکت سازنده استخراج گردید. سنتز DNA، با استفاده از کیت سنتز استاندارد cDNA (Thermo scientific). روش Real time PCR برای شناسایی ویروس برونشیت عفونی براساس بخش 5'-UTR در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت. تکثیر با استفاده از Real time-PCR با استفاده از کیت تکثیر (Bioneer, south korea)، پرایمر ابتدایی (3'-GCTTTTGGAGCCTAGCGTT-) و پرایمر Reverse شامل (5'-GCCATGTTTCTATTG-) و پروب Taqman dual-label (FAM-CACCAGAACCTGTCTCACCT-BHQ1) انجام گرفت (۹). چرخه پارامتری PCR در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه سپس ۴ چرخه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه می‌باشد. واکنش در Qiagen Rotor-Gene Q (Corbett Rotor 6000 Gene) (USA,CA) صورت گرفت.

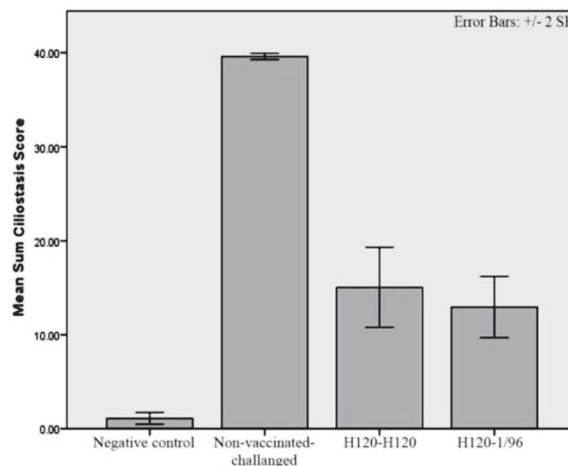
آنالیز آماری

ارزیابی و مقایسه نمره‌بندی بالینی، توقف مژکی بین گروه‌ها توسط تست Mann-Whitney با استفاده از نرم‌افزار مناسب صورت گرفت و سطح معنی‌داری، ۰/۰۲ در نظر گرفته شد. نتایج آنتی‌بادی با استفاده از Students t-test مقایسه شدند. در نهایت، روش one-way ANOVA با سطح معنی‌داری ۰/۰۵ برای مقایسه میزان جداسازی ویروس مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج

تست توقف مژکی (ciliostasis)

نتایج بین گروه‌ها با استفاده از تست Mann-whitney براساس میانگین میزان تحرک مژکی هر پرنده مورد مقایسه قرار گرفت. مقایسه گروه‌ها حاکی از یک تفاوت معنی‌دار ($P < 0.02$) بین گروه‌های واکسن نخورده-چالش داده شده با گروه دریافت‌کننده واکسن H120-H120 و H120-1/96 مشاهده شد و میزان محافظت در گروه‌های واکسن خورده به ترتیب ۶۰ و ۶۹/۲ درصد بود. میانگین درصد توقف مژکی گروه‌ها در شکل شماره ۱ نشان داده شده است.



شکل شماره ۱: میانگین نمره بندی توقف تحرک مژکی ۵ روز پس از چالش با ویروس IS/1494/06. تفاوت معنی داری ($P < 0.05$) بین گروه‌های واکسینه و واکسن نخورده-چالش داده شده مشاهده می‌شود

Real-time RT-PCR کمی

میانگین تیترو ویروس در بافت‌های نای و کلیه در اشکال شماره ۲ و ۳ نشان داده شده است. بررسی نمونه‌های نای نشان‌دهنده تفاوت معنی دار ($P < 0.05$) بین گروه واکسن نخورده-چالش یافته با گروه‌های واکسینه می‌باشد، اما بین گروه‌های واکسینه تفاوتی مشاهده نشد. تکثیر ویروس در نمونه‌های کلیوی در تمام گروه‌ها با تفاوت معنی داری ثبت گردید که بهترین نتیجه به هنگام استفاده از واکسن‌های H120-1/96 بود. جدول شماره ۲ میزان تیترو ویروسی را در ارگان‌های مختلف نشان می‌دهد.

جدول شماره ۲: میزان تیترو ویروسی در نای و کلیه در گروه‌ها

گروه‌ها	میزان ویروس در نای	میزان ویروس در کلیه
کنترل منفی	۰	۰
واکسن نخورده-چالش یافته	$۱.۶۲ * ۱۰^۶$	$۲.۸۳ * ۱۰^۵$
H120-H120	$۱.۵ * ۱۰^۳$	۱۹۰
H120-1/96	۵۰۳	۰

بحث

در سال‌های اخیر صنعت طیور ایران با افزایش چشمگیر مشکلات تنفسی و کلیوی در گله‌ها روبرو بوده است که نتیجه آن ضررهای شدید اقتصادی مرتبط با مشکلات حاصل از برونشیت عفونی می‌باشد. بروز واریانت‌های جدید ویروس برونشیت عفونی مشکلات فراوانی را در طرح‌ریزی برنامه واکسیناسیون مناسب به همراه داشته است (۴۱). با این وجود گسترش واکسن‌های مختلف علیه واریانت‌های ویروس برونشیت عفونی بطور معمول گزینه مطلوبی تلقی نمی‌شود (۷، ۳۵). برخی از سویه‌های واکسن ویروس برونشیت عفونی متعلق به یک سروتیپ خاص است محافظتی را علیه سویه‌های دیگری از برونشیت عفونی متعلق به یک سروتیپ دیگر ایجاد کند (۲۱). بنابراین مطالعات محافظتی علیه واریانت‌های جدید ویروس برونشیت عفونی می‌تواند روش کمک‌کننده‌ای در استراتژی کنترل ویروس برونشیت عفونی تلقی شود، چرا که این مطالعات اطلاعات کاربردی از تاثیر واکسن‌های تجاری موجود را در اختیار محققین قرار می‌دهد. تا به امروز سویه‌های ماساچوست به عنوان اولین و پرمصرف‌ترین واکسن‌های زنده معرفی شده که به دلیل گستردگی

اپیزوتیک و قابلیت محافظت متقاطع بالای آن‌ها می‌باشد (۸,۳۳). علی‌رغم مصرف گسترده‌ی واکسن‌های بیماری برونشیت عفونی، همه‌گیری‌های مرتبط با سروتیپ‌های مختلف ویروس برونشیت عفونی در بسیاری از کشورها افزایش یافته (۴۰,۴۲)، از سویی دیگر حضور مشکلات مرتبط با جدایه‌های واریانت اسرائیلی (IS/1494/06) حتی در گله‌های گوشتی واکسینه شده با واکسن H120 گزارش شده است که حضور ویروس برونشیت عفونی IS/1494/06 در کشورهای خاورمیانه را تایید می‌کند (۴۳,۴۴). یک مقایسه دو طرفه از سکانس ژن S1 ویروس IS/1494/06 نشان داد که میزان مشابهت پایینی بین سروتیپ ماساچوست (۸۱ درصد مشابهت با سویه H120) و 793/B (۸۰ درصد مشابهت با سویه CR88) وجود دارد (۴). در این مطالعه ما از دو سروتیپ مختلف ویروس برونشیت عفونی به عنوان واکسن جهت ارزیابی تاثیرات مصرف ترکیبی این دو واکسن در قالب پروتکتوتیپ‌ها علیه ویروس برونشیت عفونی IS/1494/06 استفاده نمودیم.

واکسیناسیون علیه بیماری برونشیت عفونی به بیش از نیم قرن پیش باز می‌گردد (۲۹). افزون بر این واکسن‌های تجاری سروتیپ ماساچوست و واکسن‌های 793/B (به عنوان گروه واریانت ۱) توسط کمپانی‌های متعددی همچون اینتروت (4/91) مریال (IB88) سوا (IBird) و فیبرو (233A) تولید شده‌اند. همچنین واکسن Tabic IB VAR206 توسط کمپانی فیبرو به عنوان واکسن واریانت ۲ (با منشا IS/1494/06) تولید شده است. در ایران واکسن‌های ماساچوست (H120 و Ma5) و 793/B (4/91) IBird و IB88 به عنوان اصلی‌ترین سروتیپ‌های مورد استفاده محسوب می‌شوند (۱۶,۴۹). مشخص شده است که ترکیب استفاده از واکسن‌های ماساچوست و 793/B می‌تواند محافظت گسترده‌تری را حتی علیه چالش‌های هترولوگ ایجاد کند. در یک مطالعه صورت گرفته توسط De wit و همکارانش بر روی مرغان مادر گوشتی تجاری گزارش گردید که استفاده از واکسن‌های ماساچوست (روزصفر) + 793/B (روز ۱۴) محافظت ۵۱ درصدی در تست توقف تحرک مژکی ۵ روز پس از چالش با D388 (ژنوتیپ QX) در سن ۲۸ روزگی به همراه داشت، درحالی که ۷ روز پس از چالش محافظت به ۷۴ درصد افزایش یافت (۲۴). در مطالعه حاضر ترکیب واکسیناسیون انتخاب شده شامل سروتیپ ماساچوست (واکسن H120) و سروتیپ 793/B (سویه 1/96 با نام تجاری IBird از شرکت CEVA) بود. استفاده از این دو سروتیپ سبب افزایش میزان محافظت علیه سویه‌های مختلف ویروس برونشیت عفونی یافت شده از سرتاسر جهان می‌گردد (۱۴)، بطوریکه که در این مطالعه نیز بیشترین میزان محافظت در گروه دریافت کننده هر دو واکسن دیده شد. در مطالعه ما، واکسن‌ها به روش قطره چشمی در یک و ۱۴ روزگی مصرف شدند، از آنجایی که این پروتکل بطور مداوم برای دستیابی به بالاترین میزان محافظت مورد استفاده قرار گرفته است، نشان دادن نتایج قابل اعتماد با این روش محتمل‌تر است (۲۱).

در این مطالعه به دلیل احتمال دارا بودن آنتی‌بادی مادری در جوجه‌های تجاری، از جوجه‌های عاری از پاتوژن خاص (SPF) استفاده شد. با این وجود در مطالعات پیشین (۲۳) نشان داده شده است که واکسیناسیون موفق را می‌توان حتی در حضور آنتی‌بادی مادری انجام داد. همانطور که در مطالعه حاضر نشان داده شد، استفاده از واکسن دو سروتیپ متفاوت (H120 و 1/96) نتیجه معنی‌دار ($P < 0.05$) بهتری را در مطالعه محافظت توقف مژکی (محافظت ۶۹.۲ درصدی در مقایسه با ۶۰ درصدی) به همراه داشت که قبلاً نیز توسط سایر محققین تایید شده بود (۲۱,۲۳). نتایج مطالعه ما همخوانی زیادی با یافته‌های تحقیقی در اسرائیل داشت که با استفاده از ویروس IS/1494/06 چالش صورت گرفته بود (ارائه شده در کنگره جهانی طیور ۲۰۱۵، کیپ تاون، آفریقای جنوبی). در این مطالعه نتایج نشان دهنده محافظت ۷۰ درصدی گروه دریافت کننده واکسن H120 در یکروزگی و واکسن گروه 793/B در ۱۴ روزگی بود. این مطالعه همچنین محافظت ۸۳ و ۹۵ درصدی را به ترتیب در گروه‌های دریافت کننده واکسن‌های 793/B+793/B و Var206+Var206 را به همراه داشت. دریافت بالاترین میزان محافظت در چالش همولوگ (استفاده از واکسن Var206 و چالش با سویه IS/1494/06) امری بدیهی می‌باشد. علی‌رغم تفاوت ژنومی قابل توجه عنوان شده (حدود ۱۹ الی ۲۱ درصد) ما بین ژن S1

ویروس IS/1494/06 و ویروس‌های H120 و 793/B، محافظت موفق بدست آمده با استفاده از برنامه واکسیناسیون مطالعه حاضر ممکن است در ارتباط با ویژگی‌های مشترک پروتئین S1 در ویروس چالشی و ویروس‌های واکسن باشد (۱۰). در ارتباط با توقف مژگی نای، مطالعه‌ی جدیدی توسط Awad و همکارانش (۵) صورت گرفته است که نتایج تقریباً مشابهی با نتایج تحقیق ما به همراه داشته است، بطوریکه در گروه دریافت کننده واکسن H120 در یکروزگی و واکسن 793/B در ۱۴ روزگی حاکی از محافظت ۸۰ درصدی علیه چالش با ویروس IS/1494/06 بود. آن‌ها همچنین واکسیناسیون با واکسن 793/B+H120 در یکروزگی و مجدداً واکسن 793/B در ۱۴ روزگی را با سویه چالشی IS/1494/06 نیز انجام دادند که محافظت ۹۴ درصدی را به همراه داشت. نتیجه‌گیری این محققین محافظت حداکثری در برابر چالش هترولوگ به هنگام استفاده از این دو واکسن بود. محافظت ایجاد شده بیشتر به هنگام استفاده دوبار از واکسن گروه 793/B+H120 در یکروزگی و مجدداً واکسن 793/B در ۱۴ روزگی می‌تواند به دلیل تحریک بیشتر و بهتر ایمنی موضعی و سلولی در نای باشد (۳۹). بطوریکه مشخص شده است استفاده از هر دو واکسن H120 و 793/B در یکروزگی در مقایسه با استفاده تکی از واکسن H120، سبب القای مقادیر معنی‌دار بیشتری از بیان CD4+, CD8+ و سلول‌های B تولید کننده IgA در نای می‌گردد (۴). با وجود محافظت قابل قبول در برنامه استفاده از واکسن‌های ماساچوست و 793/B علیه چالش با IS/1494/06، مطالعه‌ای مشابه با استفاده از واکسن ماساچوست در یکروزگی و واکسن دسته QX در ۱۴ روزگی صورت گرفت که تنها محافظت ۵۰ درصدی را علیه چالش با IS/1494/06 به همراه داشت.

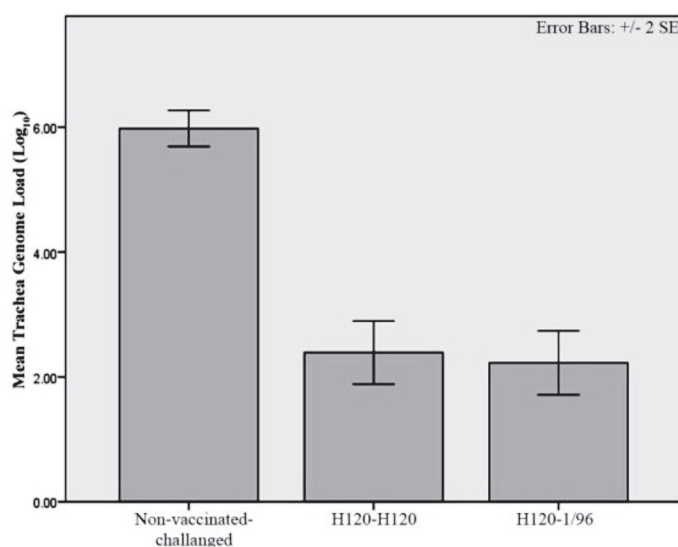
در واکسن‌شناسی بیماری برونشیت عفونی بایستی به این نکته توجه نمود که توانایی هر واکسن بر اساس میزان کنترل توقف مژگی توسط ویروس چالشی ارزیابی می‌شود. با این وجود فاکتورهای دیگری همچون نفوذ ویروس به بافت‌ها و نیز نمره‌بندی علایم بالینی از دیگر معیارهای ارزیابی محسوب می‌گردند. ارزیابی نمره‌بندی علایم بالینی و نیز نفوذ بافتی ویروس در مطالعه حاضر همانند سایر نتایج، حاکی از تاثیر قابل قبول واکسیناسیون در افزایش محافظت علیه بیماری بود. این یافته‌ها در مطابقت با یافته‌های Cook و همکارانش بود که نشان دهنده محافظت کامل برنامه واکسیناسیون با دو سروتیپ مختلف در برابر تعداد زیادی از سویه‌های برونشیت عفونی بود (۱۹). بایستی به این نکته دقت کرد که در مطالعات متقاطع، حتی در مطالعات کاملاً کنترل شده، ما هرگز به انتظاراتمان نرسیم و تا ۱۰ درصد از پرندگان نسبت به واکسیناسیون و چالش همولوگ پاسخ ایمنی ایجاد نمی‌کنند (۱۹،۴۷،۵۴). این نتایج حاکی از آن است که پرندگان نسبت به پاسخ ایمنی علیه واکسیناسیون پاسخ یکنواختی ایجاد نمی‌کنند، لذا روش RT-PCR به عنوان ابزار کمکی جهت تشخیص درگیری به برونشیت عفونی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۹). جهت ارزیابی توانایی واکسن‌ها در کنترل تکثیر ویروس چالشی در بافت‌ها، روش RT-PCR کمی برای بافت‌های نای و کلیه مورد استفاده قرار گرفت. تیترو ویروس بطور معمول در بینی و نای ۳ روز پس از چالش در بیشترین حد خود بوده و تا ۲ تا ۵ روز پس از آن نیز در حد بالا حفظ می‌گردد (۳۰). در این مطالعه اگرچه تفاوت معنی‌داری بین دو گروه واکسن خورده مشاهده نشد، نتایج حاکی از کمترین میزان تیترو ویروس در بافت‌ها در گروه دریافت کننده واکسن‌های H120-1/96 و همچنین کاهش قابل توجه تیترو ویروس در بافت‌ها در گروه‌های واکسن خورده در مقایسه با گروه‌های واکسن نخورده بود. در ارتباط با ویروس‌های با تروپیسم کلیوی همانند ویروس‌های با تروپیسم تنفسی مشخص شده است که بهترین میزان محافظت به هنگام استفاده از سروتیپ‌های واکسن زنده همولوگ به دست می‌آید. در این مطالعه هیچ ویروس چالشی در بافت کلیه گروه دریافت کننده واکسن H120-1/96 یافت نشد، با این وجود تفاوت بین گروه واکسینه شده با H120-H120 با گروه H120-1/96 معنی‌دار نبود. این نتایج حاکی از توانایی واکسن‌ها در مهار تکثیر ویروس چالشی در کلیه‌ها در گروه‌های واکسن خورده در مقایسه با گروه واکسن نخورده می‌باشد (۱۹۰ و صفر در مقایسه با $10^3 * 283$). گزارش شده است که تکثیر کمتر ویروس برونشیت عفونی در کلیه‌ها، در مصرف ترکیبی دو واکسن (H120-1/96) به دلیل کاهش تکثیر ویروس در نای و همچنین آنتی‌بادی بالای خون

در گروه‌های واکسینه شده با این برنامه می‌باشد (۳۹)، که سبب کاهش تکثیر ویروس در بافت‌ها گردید. این یافته در بالین اهمیت فراوانی دارد چرا که شرایط آسیب رسان به کلیه‌ها در بالین بسیار فراوان بوده و ویروس برونشیت عفونی می‌تواند این شرایط را وخیم‌تر نیز کند. این عوامل آسیب رسان کلیوی شامل پروتئین و کلسیم بالای جیره، مایکوتوکسین‌ها، داروهای هم‌چون سولفانامیدها، استرس سرمایی، بیماری‌های نفروتوکسیک، دهیدراتاسیون و نهایتاً هر عامل آسیب رسان کلیوی می‌باشند که می‌توانند سبب کاهش عملکرد و مرگ‌ومیر بیشتر ناشی از ویروس برونشیت عفونی گردند.

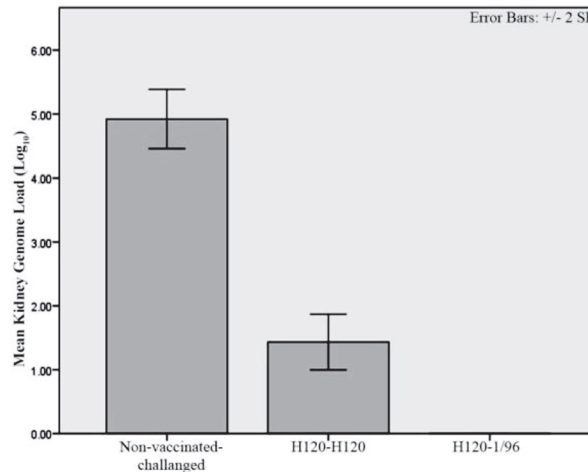
نتیجه‌گیری اینکه؛ استفاده از واکسن‌های حاصل از دو سروتیپ نتیجه بهتری را در مقایسه با استفاده از یک سروتیپ به همراه خواهد داشت. با این وجود حضور واکسن‌های سروتیپ ماساچوست به عنوان یکی از پایه‌های ثابت واکسیناسیون به دلیل گستردگی محافظت ایجاد کننده در برابر سویه‌های مختلف نایستی فراموش شود. از سوی دیگر استفاده از واکسن‌های گروه B/793 همچون سویه 1/96 نیز به سبب ایجاد ایمنی قوی‌تر و وسیع‌الطیف‌تر بایستی مد نظر قرار گیرد. بطوریکه در مطالعه حاضر تمامی فواید استفاده هم‌زمان دو سروتیپ B/793 و 1/96 در برابر چالش با سویه IS/1494/06 به عنوان سویه غالب در حال چرخش در منطقه و ایران رویت شد. مطالعات بیشتری در ارتباط با برنامه‌های واکسیناسیون جهت دستیابی به بهترین برنامه واکسیناسیون جهت کنترل عفونت در مزارع طیور نیاز می‌باشد.

تقدیر و تشکر

این مطالعه با گرانته شماره ۹۳۱۸۹ تامین شده توسط شرکت سوپارس نماینده انحصاری شرکت CEVA Sante Animal انجام پذیرفت. همچنین گرانته دانشگاه تهران و نیز سازمان دامپزشکی کشور با شماره (No. 22/39007) نیز به این مطالعه تعلق گرفت. نویسندگان همچنین از آقای بهروز اسدی و آقای جوانمردی به جهت کمک‌های فنی‌شان نهایت قدردانی را دارند.



شکل شماره ۲: تیر ویروسی نای گروه‌های چالش یافته. نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین گروه واکسن‌نخورده-چالش یافته و گروه‌های واکسینه



شکل شماره ۳: تیترو پروسی کلیه در گروه‌های چالش یافته. نشان دهنده تفاوت معنی دار بین گروه واکسن نخورده-چالش یافته و گروه‌های واکسینه

منابع:

1. Adzhar A, Shaw K, Britton P, Cavanagh D (1995) Avian infectious bronchitis virus: differences between 793/B and other strains. *Veterinary Record* 136:548-548
2. Aghakhan S, Abshar N, Fereidouni SRN, Marunesi C, Khodashenas M (1994) Studies on avian viral infections in Iran. *Archives de l'Institut Razi*:1-10
3. Akbari Azad G, Vasfi Marandi M, Keyvani Aminae H (2007) Molecular analysis of three Iranian isolates belonged to 793/B serotype of Infectious bronchitis viruses. *J Vet Res* 62:69-80
4. Awad F, Baylis M, Ganapathy K (2014) Detection of variant infectious bronchitis viruses in broiler flocks in Libya. *International Journal of Veterinary Science and Medicine* 2:78-82
5. Awad F, Forrester A, Baylis M, Lemiere S, Ganapathy K, Hussien HA, Capua I (2015) Protection conferred by live infectious bronchitis vaccine viruses against variant Middle East IS/885/00-like and IS/1494/06-like isolates in commercial broiler chicks. *Veterinary Record Open* 2:e000111
6. Bande F, Arshad SS, Hair Bejo M, Moeini H, Omar AR (2015) Progress and Challenges toward the Development of Vaccines against Avian Infectious Bronchitis. *Journal of immunology research* 2015
7. Bijlenga G, Cook JK, Gelb J, Jack, Wit Jd (2004) Development and use of the H strain of avian infectious bronchitis virus from the Netherlands as a vaccine: a review. *Avian Pathology* 33:550-557
8. Bijlenga G, Cook JK, Gelb J, Jr., de Wit JJ (2004) Development and use of the H strain of avian infectious bronchitis virus from the Netherlands as a vaccine: a review. *Avian pathology : journal of the WVPA* 33:550-557
9. Callison SA, Hilt DA, Boynton TO, Sample BF, Robison R, Swayne DE, Jackwood MW (2006) Development and evaluation of a real-time Taqman RT-PCR assay for the detection of infectious bronchitis virus from infected chickens. *Journal of virological methods* 138:60-65
10. Cavanagh D, Davis PJ, Darbyshire JH, Peters RW (1986) Coronavirus IBV: virus retaining spike glycopolypeptide S2 but not S1 is unable to induce virus-neutralizing or haemagglutination-inhibiting antibody, or induce chicken tracheal protection. *Journal of General Virology* 67:1435-1442
11. Cavanagh D (1996) Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. *Archives of virology* 142:629-633
12. Cavanagh D, Elus M, Cook J (1997) Relationship between sequence variation in the S1 spike protein of infectious bronchitis virus and the extent of cross-protection in vivo. *Avian Pathology* 26:63-74
13. Cavanagh D, Elus MM, Cook JK (1997) Relationship between sequence variation in the S1 spike protein of infectious bronchitis virus and the extent of cross-protection in vivo. *Avian pathology : journal of the WVPA* 26:63-74

14. Cavanagh D, Mawditt K, Britton P, Naylor C (1999) Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reactions. *Avian Pathology* 28:593-605
15. Cavanagh D (2005) Coronaviruses in poultry and other birds. *Avian Pathology* 34:439-448
16. Cavanagh D, Picault J-P, Gough RE, Hess† M, Mawditt K, Britton P (2005) Variation in the spike protein of the 793/B type of infectious bronchitis virus, in the field and during alternate passage in chickens and embryonated eggs. *Avian Pathology* 34:20-25
17. Chen B, Hosi S, Nunoya T, Itakura C (1996) Histopathology and immunohistochemistry of renal lesions due to infectious bronchitis virus in chicks. *Avian Pathology* 25:269-283
18. Collisson EW, Pei J, Dzielawa J, Seo SH (2000) Cytotoxic T lymphocytes are critical in the control of infectious bronchitis virus in poultry. *Developmental & Comparative Immunology* 24:187-200
19. Cook J, Orbell S, Woods M, Huggins M (1996) A survey of the presence of a new infectious bronchitis virus designated 4/91 (793B). *The Veterinary record* 138:178-180
20. Cook JK, Darbyshire J, Peters R (1976) The use of chicken tracheal organ cultures for the isolation and assay of avian infectious bronchitis virus. *Archives of virology* 50:109-118
21. Cook JK, Orbell SJ, Woods MA, Huggins MB (1999) Breadth of protection of the respiratory tract provided by different live-attenuated infectious bronchitis vaccines against challenge with infectious bronchitis viruses of heterologous serotypes. *Avian Pathology* 28:477-485
22. Cook JK, Chesher J, Baxendale W, Greenwood N, Huggins MB, Orbell SJ (2001) Protection of chickens against renal damage caused by a nephropathogenic infectious bronchitis virus. *Avian pathology : journal of the WVPA* 30:423-426
23. Davelaar F, Kouwenhoven B (1977) Influence of maternal antibodies on vaccination of chicks of different ages against infectious bronchitis. *Avian Pathology* 6:41-50
24. De Wit J, Cook JK, Van Der Heijden HM (2011) Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures. *Avian Pathology* 40:223-235
25. De Wit J, Guerrero P, Calvo J, Hidalgo H, Lierz M, Heffels-Redmann U, Kaleta E, Heckmann J (2012) Report of the genotyping, pathotyping, and protectotyping of recent strains from Chile. In: VII International symposium on avian corona- and pneumoviruses and complicating pathogens, Rauschholzhausen, Germany, 18-21 June 2012. Druckerei Schröder, pp 61-67
26. Gelb Jr J, Wolff J, Moran C (1991) Variant serotypes of infectious bronchitis virus isolated from commercial layer and broiler chickens. *Avian diseases*:82-87
27. Gelb Jr J, Weisman Y, Ladman BS, Meir R (2005) S1 gene characteristics and efficacy of vaccination against infectious bronchitis virus field isolates from the United States and Israel (1996 to 2000). *Avian pathology : journal of the WVPA* 34:194-203
28. Ghadakchi H, Dadras H, Pourbakhsh S, Hosseini S (2005) Standardization of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Infectious Bronchitis Virus Antibody. *Archives of Razi* 59:75-83
29. Ghahremani N, Fard MB, Shoushtari H, Momayez R, Sheikhi N, Khoshzahmat A, Eshratabadi F (2011) Molecular Analysis of Infectious Bronchitis Viruses Isolated in Iran from 1998-2008. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 10:2961-2967
30. Hofstad M, Yoder HW (1966) Avian infectious bronchitis: Virus distribution in tissues of chicks. *Avian diseases* 10:230-239
31. Hosseini H, Bozorgmehri Fard MH, Charkhkar S, Morshed R (2015) Epidemiology of Avian Infectious Bronchitis Virus Genotypes in Iran (2010-2014). *Avian diseases*
32. Hussein AH, Emara M, Rohaim M, Ganapathy K, Arafa A (2014) Sequence Analysis of Infectious Bronchitis Virus IS/1494 like Strain Isolated from Broiler Chicken Co-Infected with Newcastle Disease Virus in Egypt During 2012. *International Journal of Poultry Science* 13:530-536
33. Ignjatović J, Sapats S (2000) Avian infectious bronchitis virus. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 19:493-508
34. Jackwood MW, Hilt DA, Callison SA, Lee CW, Plaza H, Wade E (2001) Spike glycoprotein cleavage recognition site analysis of infectious bronchitis virus. *Avian diseases* 45:366-372

35. Jackwood MW, Hilt DA, Brown TP (2003) Attenuation, safety, and efficacy of an infectious bronchitis virus GA98 serotype vaccine. *Avian diseases* 47:627-632
36. Jackwood MW (2012) Review of infectious bronchitis virus around the world. *Avian diseases* 56:634-641
37. Kahya S, Coven F, Temelli S, Eyigor A, Carli KT (2013) Presence of IS/1494/06 genotype-related infectious bronchitis virus in breeder and broiler flocks in Turkey. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 60:27-31
38. Kusters J, Niesters H, Lenstra J, Horzinek M, Van Der Zeijst B (1989) Phylogeny of antigenic variants of avian coronavirus IBV. *Virology* 169:217-221
39. Lambrechts C, Pensaert M, Ducatelle R (1993) Challenge experiments to evaluate cross-protection induced at the trachea and kidney level by vaccine strains and Belgian nephropathogenic isolates of avian infectious bronchitis virus. *Avian Pathology* 22:577-590
40. Li H, Yang H (2001) Sequence analysis of nephropathogenic infectious bronchitis virus strains of the Massachusetts genotype in Beijing. *Avian Pathology* 30:535-541
41. Liu S, Chen J, Han Z, Zhang Q, Shao Y, Kong X, Tong G (2006) Infectious bronchitis virus: S1 gene characteristics of vaccines used in China and efficacy of vaccination against heterologous strains from China. *Avian Pathology* 35:394-399
42. Liu S, Zhang Q, Chen J, Han Z, Liu X, Feng L, Shao Y, Rong J, Kong X, Tong G (2006) Genetic diversity of avian infectious bronchitis coronavirus strains isolated in China between 1995 and 2004. *Archives of virology* 151:1133-1148
43. Mahmood ZH, Sleman RR, Uthman AU (2011) Isolation and molecular characterization of Sul/01/09 avian infectious bronchitis virus, indicates the emergence of a new genotype in the Middle East. *Veterinary microbiology* 150:21-27
44. Meir R, Rosenblut E, Perl S, Kass N, Ayali G, Hemsani E, Perk S (2004) Identification of a novel nephropathogenic infectious bronchitis virus in Israel. *Avian diseases* 48:635-641
45. Mockett AA, Cavanagh D, Brown TDK (1984) Monoclonal antibodies to the S1 spike and membrane proteins of avian infectious bronchitis coronavirus strain Massachusetts M41. *Journal of General Virology* 65:2281-2286
46. Nakamura K, Cook JK, Otsuki K, Huggins MB, Frazier JA (1991) Comparative study of respiratory lesions in two chicken lines of different susceptibility infected with infectious bronchitis virus: histology, ultrastructure and immunohistochemistry. *Avian pathology : journal of the WVPA* 20:241-257
47. Nix W, Troeber D, Kingham B, Keeler Jr C, Gelb Jr J (2000) Emergence of subtype strains of the Arkansas serotype of infectious bronchitis virus in Delmarva broiler chickens. *Avian diseases*:568-581
48. Raj GD, Jones R (1996) Protectotypic differentiation of avian infectious bronchitis viruses using an in vitro challenge model. *Veterinary microbiology* 53:239-252
49. Seyfi Abad Shapouri M, Mayahi M, Assasi K, Charkhkar S (2004) A survey of the prevalence of infectious bronchitis virus type 4/91 in Iran. *Acta veterinaria Hungarica* 52:163-166
50. Sjaak de Wit JJ, Cook JK, van der Heijden HM (2011) Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures. *Avian pathology : journal of the WVPA* 40:223-235
51. Susan S, El-Hady M, Soliman Y (2010) Isolation and characterization of Nephropathogenic strain of infectious Bronchitis virus in Egypt. *J Am Sci* 6:669-675
52. Susan S, YA S, MM E-H (2011) Preparation and Evaluation of Master Seed for infectious bronchitis vaccine from local variant isolate. *Nature and Science* 9:145-150
53. Winterfield R, Hitchner S (1962) Etiology of an infectious nephritis-nephrosis syndrome of chickens. *American journal of veterinary research* 23:1273
54. Winterfield R, Fadly A, Hoerr F (1976) Immunity to infectious bronchitis virus from spray vaccination with derivatives of a Holland strain. *Avian diseases*:42-48
55. Zanella A (1988) Avian infectious bronchitis: properties and application of attenuated vaccine prepared with nephropathogenic strain AZ-23/74. In: *Proc International Symposium on Infectious Bronchitis, Rauschholzhausen, Germany*, pp 335-342

ایمنی ناشی از سویه تخفیف حدت یافته V1-1/96 ویروس برونشیت عفونی

در برابر سویه فیلدی 793/B در طیور صنعتی

Z. PENZES¹, J. CHACÓN¹, P. SOÓS¹, R. GLÁVITS², A. ZOLNAI¹,
N. NÓGRÁDY¹, V. PALYA¹

Ceva-Phylaxia Veterinary Biologicals, 1107 Budapest, Szállás u. 5. HUNGARY

چکیده

یک سویه فیلدی ویروس برونشیت عفونی مرتبط با سویه 793/B از یک گله گوشتی مجارستان جدا گردید. این سویه تحت عنوان V1-1/96 تخفیف حدت یافته و کفایت آن در ایجاد ایمنی بر علیه سویه فیلدی 793/B ارزیابی شد. جوجه‌های گوشتی یکروزه با استفاده از سویه V1-1/96 تخفیف حدت یافته به روش اسپری و یک واکسن برونشیت عفونی تجاری موجود و متعلق به سروتیپ 793/B واکسینه شدند. مرغان واکسینه نشده به عنوان گروه کنترل نگهداری شدند و پرندگان ۳ هفته پس از واکسیناسیون تحت چالش قرار گرفته و کفایت واکسن ۶-۵ روز پس از چالش بر اساس افزایش وزن روزانه بدن، ایمنی در برابر علائم بالینی، اثر بروی فعالیت مژه‌ای دستگاه تنفس، جداسازی ویروس، تعیین بار ویروسی با qPCR و ضایعات بافتی در نای ارزیابی شد. با توجه به تمامی پارامترهای ارزیابی شده، ایمنی خوبی در برابر چالش همولوگ حاصل شد. این مطالعه نشان می‌دهد که سویه تخفیف حدت یافته V1-1/96 ویروس برونشیت عفونی می‌تواند برای القای ایمنی بر علیه یک گروه مهم اپیدمیولوژیکی از ویروس‌ها، همچون ویروس‌های سروتیپ 793/B مورد استفاده قرار گیرد.

مقدمه

بیماری برونشیت عفونی یکی از عوامل اصلی ضررهای اقتصادی در صنعت طیور در سطح جهان است و می‌تواند در بیماری تنفسی، نفريت، انتریت، مشکلات مربوط به باروری و کاهش تخم‌گذاری و کیفیت تخم دخیل باشد (کاواناگ و گلب ۲۰۰۸). ویروس برونشیت عفونی حاوی چهار پروتئین ساختاری است. تحت واحد S1 گلیکوپروتئین S حاوی اپی‌توپ‌ها و فاکتورهای تعیین‌کننده برای آنتی‌بادی‌های خنثی‌سازی ویروس، ایمنی حفاظتی، اتصال سلولی و اختصاصیت سروتیپ است (ایگناتوویچ و گالی ۱۹۹۴). کنترل برونشیت عفونی سخت است زیرا این بیماری دارای تنوع ژنتیکی گسترده، دوره تولید کوتاه و میزان جهش بالا است. سروتیپ‌ها یا واریانت‌های ویروس برونشیت عفونی متعددی در سطح جهان شناسایی شده‌اند که هیچ ایمنی متقاطع بر علیه آن‌ها وجود ندارد. سروتیپ 793/B به عنوان یک سویه شایع و مهم اروپا شناخته شده بود (ووتینگتون ۱۹۹۶). بعلاوه، این سویه در قاره‌های دیگر نیز شناسایی شده است (کوک و همکاران ۱۹۹۶). یک سویه ویروس برونشیت عفونی که به لحاظ مولکولی مرتبط با 793/B است از یک گله گوشتی مجارستان جدا شد. پس از تعیین خصوصیات مولکولی، این ویروس تحت عنوان سویه V1-1/96 تخفیف حدت یافته و میزان ایمنی‌زایی آن در مرغان SPF و تجاری تست شد. هدف این مطالعه، ارزیابی اثرگذاری سویه V1-1/96 ویروس برونشیت عفونی برای محافظت از مرغان تجاری در برابر چالشی با استفاده از یک سویه فیلدی همولوگ بود.

مواد و روش کار

ویروس‌ها

سویه تخفیف حدت یافته VI-1/96 ویروس برونشیت عفونی برای واکسیناسیون و یک سویه فیلدی همولوگ، 793/B به عنوان ویروس چالش استفاده شدند. در این آزمایش، یک واکسن تجاری برونشیت عفونی متعلق به سروتیپ 793/B برای مقایسه مورد استفاده قرار گرفت.

طرح مطالعه

تعداد ۶۰ مرغ تجاری یکروزه به سه گروه تقسیم شدند. گروه ۱ با $\log_{10} \text{EID}_{50}$ ۲.۸ سویه VI-1/96 و به روش اسپری واکسینه شد. گروه ۲ با $\log_{10} \text{EID}_{50}$ ۳.۷ واکسن تجاری گروه 793/B و به روش اسپری واکسینه شد. گروه ۳ به عنوان گروه کنترل واکسینه نشده استفاده شد. سه هفته پس از واکسیناسیون، مرغان سه گروه به روش درون نایی با $\log_{10} \text{EID}_{50}$ ۴.۲ ویروس چالش تلقیح شدند.

مشاهدات بالینی

پس از واکسیناسیون و چالش، مرغان به شکل روزانه به لحاظ وجود علائم بالینی بررسی شدند. وضعیت بالینی (نوع علائم، تعداد حیوانات نشان‌دهنده علائم و ...) ثبت شد. در روزهای ۵ و ۶ پس از چالش، مرغان به لحاظ علائم بالینی بررسی شده و در مقیاس صفر تا ۳ به شکل زیر امتیازبندی شدند:

صفر = تنفس نرمال شنیده می‌شود.

۱ = رال‌های نایی نادر/ناچیز پس از تحریک جوجه به تحرک شنیده می‌شوند.

۲ = رال‌های نایی مکرر/متوسط می‌توانند بدون تحریک حرکت جوجه، ولی نه به شکل پیوسته، شنیده شوند.

۳ = رال‌های نایی پیوسته و بارز شنیده می‌شوند.

وزن‌گیری و افزایش وزن بدن روزانه

وزن مرغ‌ها در روزهای ۲۱، ۲۶ و ۲۷ پس از واکسیناسیون اندازه‌گیری شد. وزن بدن و افزایش روزانه وزن بدن هر گروه ثبت شد.

تست فعالیت مژکی

۳، ۴ و ۳ حلقه به ترتیب از بخش‌های فوقانی، میانی و پایینی نای بریده شده و در محیط MEM-H بر روی پلت ۹۶-چاهکی قرار داده شد. حلقه‌های نای تحت بزرگ‌نمایی کم بررسی شده و به لحاظ سیلیواستاز از صفر (۱۰۰ درصد فعالیت مژکی) تا ۴ (عدم فعالیت) درجه‌بندی گردیدند. میانه امتیاز سیلیواستاز برای هر گروه محاسبه شد. حداکثر امتیاز هر نای ۴۰ (برای ۱۰ حلق/نای بررسی شده) بود. ارزیابی فعالیت مژکی در ۲ ساعت انجام شد.

فعالیت مژکی نیز با توجه به مونوگراف 04/2008:0442، نقطه ۱-۳-۴-۲ فارماکوپ اروپا ارزیابی شد. فعالیت مژکی یک مقطع نایی زمانی که حداقل ۵۰ درصد حلقه‌های داخلی حرکت مژکی شدید (مربوط به امتیاز ۰، ۱ یا ۲ یا به ترتیب ۱۰۰، ۷۵ و ۵۰ درصد فعالیت مژکی) داشتند، مد نظر قرار می‌گرفت. یک مرغ در صورتی که کمتر از ۹ از ۱۰ حلقه فعالیت مژکی نرمال نشان می‌دادند، غیرمبتلا در نظر گرفته می‌شد.

بازیابی ویروس

شش روز پس از چالش مرغان به روش مرگ با ترحم معدوم شده و تقریباً ۲.۵ سانتی‌متر بخش میانی نای جدا شد سپس یک

اپلیکاتور سوایی استریل به آرامی وارد نای گشته و با یک حرکت عمودی سواب برداری انجام شد. سواب‌های مخاط نای هر مرغ به ۱.۵ میلی‌لیتر فسفات بافر سولفات استریل منتقل و بر روی یخ مرطوب نگهداری شد. سپس ۰.۲ میلی‌لیتر این محلول به حفره آلانتوئیک پنج تخم جنین دار ۱۰ روزه SPF تلقیح گردید و این تخم‌ها برای ۶ روز انکوبه شدند. تخم‌هایی که پس از یک روز انکوباسیون هیچ جنین زنده‌ای نداشتند، حذف شده و به عنوان مرگ غیراختصاصی در نظر گرفته شدند. مرگ و ضایعات شاخص ویروس برونشیت عفونی در تخم‌های باقیمانده در انتهای دوره انکوباسیون بررسی شدند. مایع آلانتوئیک هر نمونه (۵ تخم) به لحاظ وجود ویروس برونشیت عفونی با الیزا بررسی شد.

تعیین کمیت ویروس چالش

محلول مخاط نای که برای جداسازی ویروس آماده شده بود در یک تست qRT-PCR به منظور تعیین کمیت RNA ویروس برونشیت عفونی مورد استفاده قرار گرفت (کالیسون و همکاران ۲۰۰۶). به طور خلاصه، RNA با استفاده از کیت QIAamp Viral RNA mini (کیازن) استخراج شد. RNA ویروسی به شکل معکوس به cDNA و با استفاده از ph(N)6 random hexamer 5'-phosphate (Fermentas) و با توجه به دستورالعمل سازنده رونویسی شد. cDNA برای تعیین کمیت IBV در نمونه تحت qPCR قرار گرفت. پرایمرهای IBV5_GU391 و IBV5_GL533 و Taqman dual-labeled probe و IBV5_G برای تقویت یک قطعه ۱۴۳ جفت بازی از 5'-UTR مورد استفاده قرار گرفتند.

بافت شناسی

یک قطعه از بخش فوقانی و تحتانی نای برداشته شده و در لوله‌های حاوی محلول ۱۰ درصد فرمالدهید بافره قرار داده شد. پس از تثبیت، مقاطع ۳-۵ میکرومتر آماده شده و با هماتوکسیلین-ائوزین رنگ‌آمیزی گردید. وجود مژک‌زدایی پوششی، متاپلازی پوششی و دژنراسیون و نفوذ لمفوسیتی در لامینا پروپیا در نای بررسی شده و ضایعات با توجه به سیستم امتیازبندی ذیل امتیاز بندی شدند: صفر= نرمال، ۱= ضایعات ناچیز، ۲= ضایعات متوسط، ۳= ضایعات حاد.

تحلیل آماری

وزن بدن، افزایش روزانه وزن بدن و تیترو ویروس آنالیز شده و به لحاظ آماری با تست یک‌طرفه ANOVA (Statgraphics) با سطح اطمینان ۵ درصد مقایسه شد.

نتایج

افزایش روزانه وزن بدن

گروه کنترل غیرواکسینه بطور معنی‌داری وزن پایین‌تری نسبت به گروه‌های واکسینه در ۵ و ۶ روز پس از چالش داشت. در ۵ روز پس از چالش هیچ تفاوت آماری بین دو گروه واکسینه یافت نشد ولی گروه واکسینه با سویه V1-1/96 وزنگیری روزانه به مراتب بالاتری از گروه واکسینه با واکسن تجاری در ۶ روز پس از چالش داشت.

امتیازبندی بالینی

در این مطالعه هیچ علامت بالینی به واکسیناسیون با ویروس برونشیت عفونی نسبت داده نشد. تنها یک جوجه از گروه‌های واکسینه علائم تنفسی ملایمی را پس از چالش از خود نشان داد. در این موارد، امتیاز ۱ (ملایم) بود، در حالی چند مرغ علائم بالینی متوسطی در گروه کنترل از خود نشان دادند.

فعالیت مژکی

سیلیواستاز مژکی در ۵ و ۶ روز پس از چالش در گروه غیرواکسینه و چالش یافته نشان دهنده یک مدل چالش صحیح بود. گروه‌های واکسینه امتیاز کمتری از گروه کنترل داشته و هیچ تفاوت بارزی بین آن‌ها مشاهده نشد. با توجه به معیار فارماکوپه اروپا "یک مرغ زمانی فعالیت مژکی نرمال دارد که ۹ مورد از ۱۰ حلقه ارزیابی شده بیش از ۵۰ درصد فعالیت مژکی داشته باشند"، هیچ کدام از مرغ‌های گروه کنترل فعالیت مژکی نرمالی در ۵ و ۶ روز پس از چالش نداشتند. در گروه واکسینه با V1-1/96، ۸۰ درصد مرغان فعالیت مژکی نرمال در ۵ و ۶ روز پس از چالش داشتند، در حالی که تحرک مژکی گروه واکسینه با واکسن تجاری به ترتیب در ۵ و ۶ روز پس از چالش، ۷۰ و ۸۰ درصد بود.

جداسازی ویروس

ویروس چالش از گروه‌های واکسینه، ولی با درصد کمتری در مقایسه با گروه کنترل، جداسازی شد. ویروس چالش دومرتبه از مرغان چالش یافته غیر واکسینه جداسازی گردید. درصد بازیابی ویروس چالش در گروه واکسینه با V1-1/96 (۳۰ درصد) مشابه گروه واکسینه با واکسن تجاری بود.

بار ویروس در نای

در ۶ روز پس از چالش، تفاوت بارزی با qPCR در تیتراژ RNA ویروس چالش گروه‌های واکسینه و غیرواکسینه مشاهده شد. تیتراژ گروه کنترل غیرواکسینه به مراتب (۲.۷ لگاریتم ۱۰ EID₅₀) بالاتر از گروه‌های واکسینه (۱.۷-۱.۸ لگاریتم ۱۰ EID₅₀) بود. هیچ تفاوت آماری بین دو گروه واکسینه مشاهده نشد.

بررسی میکروسکوپی

ضایعات میکروسکوپی ناشی از ویروس چالش (از دست رفتن مژه‌ها و دژنراسیون بافت پوششی) در تمامی مرغان گروه غیرواکسینه و در یک مرغ گروه واکسینه با واکسن تجاری مشاهده شد. در کل، ضایعات ملایمی در گروه واکسینه مشاهده گردید. میانگین امتیاز بافتی گروه در نای بالاتر از گروه کنترل (امتیاز ۲.۵) بود، در حالی که امتیاز گروه‌های واکسینه پایین‌تر (امتیاز ۱.۱-۱.۲) بود. هیچ تفاوتی بین امتیازات گروه‌های واکسینه مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری

با توجه به تمامی پارامترهای آنالیز شده در مطالعه کنونی، تفاوت بارزی می‌تواند بین گروه‌های واکسینه و غیرواکسینه در ۵ و ۶ روز پس از چالش مشاهده شد. گروه‌های واکسینه عملکرد مشابهی پس از چالش داشتند. به طور خلاصه، ایمنی خوبی بر علیه چالش همولوگ 793/B در گروه واکسینه با V1-1/96 مشاهده شد که مشابه ایمنی حاصله در گروه واکسینه با واکسن تجاری بود.

منابع

- Callison, S.A., Hilt, D.A., Boyton, T.O., Sample, B.F., Robison, R., and Swayne, D.E. 2006. Development and evaluation of a real-time Taqman RT-PCR assay for the detection of infectious bronchitis virus from infected chickens. *Journal of Virological Methods*. 138: 60-65
- Cavanagh D., and Gelb, J. 2008. Infectious bronchitis. In Y.M. Saif, H.J. Barnes, J.R. Glisson, A.M. Fadly, L.R. McDougald & D.E. Swayne (Eds.), *Diseases of Poultry*, 12th ed (pp. 117-135). Ames: Iowa State Press.
- Cook, JK., Orbell, S.J., Woods, M.A., and Huggins, M.B. A survey of the presence of a new infectious bronchitis virus designed 4/91 (793B). 1996. *Veterinarian Record*. 138: 178-180.
- European Pharmacopoeia 6.1 04/2008:0442 Avian Infectious Bronchitis Vaccine (live) monograph, 2-4-3. Immunogenicity, 2-4-3-1. Ciliary activity of tracheal explants.; 2-4-3-2. Virus recovery from tracheal swabs.
- Ignjatovic J., and Galli, L. 1994. The S1 glycoprotein but not N or M proteins of avian infectious bronchitis virus induces protection in vaccinated chickens. *Archives of virology*, 138, 117-134.
- Worthington, K.J., Currie, R.J.W., and Jones, R.C. 2008. A reverse transcriptase polymerase chain reaction survey of infectious bronchitis virus genotypes in Western Europe from 2002 to 2006. *Avian Pathology*, 37, 247-257.

ترکیب یک برنامه واکسیناسیون جهت کنترل واریانت Q1 ویروس برونشیت عفونی در آمریکای جنوبی

L.Sesti¹, H.R. Sanguinetti², C.R. Zenobi², M.V.Terrara², M.Jauregui², J.Chacon¹, L.Sara and P.Paulet⁴

1,3,4 Ceva Animale Health-Sao Paulo and compinas-Brazil

3 Buenos Aires – Argentina,

4 Lilbourn- France

2 SENASA Buenos Aires – Argentina

چکیده

در این مطالعه ترکیبی از برنامه واکسیناسیون با استفاده از دو واکسن متفاوت از دو سروتیپ مختلف، جهت تعیین میزان محافظت ایجاد شده علیه واریانت Q1 در حال چرخش در بسیاری از کشورهای آمریکای جنوبی مورد استفاده قرار گرفت. یک گروه از پرندگان SPF در سن یک روزگی از طریق قطره چشمی واکسن‌های سروتیپ ماساچوست و 793/B را دریافت نمودند (گروه A). دو گروه دیگر از پرندگان SPF به عنوان گروه‌های کنترل (گروه B: چالش یافته - واکسن نخورده و گروه C: چالش نیافته - واکسن نخورده). پرندگان در سن ۲۵ روزگی از طریق داخل نای توسط جدایه آرژانتینی Q1 ویروس برونشیت عفونی جدا شده از مزارع طیور گوشتی چالش داده شدند. محافظت علیه چالش ویروس Q1 در سن ۳۰ و ۳۱ روزگی از طریق ارزیابی نمره بندی علائم بالینی، افزایش وزن روزانه و تست توقف تحرک مژگی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از برنامه استفاده ترکیبی از واکسن دو سروتیپ برونشیت عفونی نشان دهنده توانایی این برنامه واکسیناسیون جهت محافظت قابل قبول پرندگان علیه ویروس Q1 برونشیت عفونی در حال چرخش در آرژانتین بود.

مقدمه

در سال‌های اخیر، یک سویه جدید برونشیت عفونی، سویه واریانت چینی Q1 (هم‌چنین به عنوان J2 یا T3 شناخته می‌شود) در بسیاری از کشورهای آمریکای جنوبی شناسایی شده است. جداسازی و شناسایی مولکولی این سویه ارتباط بسیار شناخته شده‌ای با مشکلات بالینی در حال وقوع بسیاری از شرکت‌های شیلی (de wit et al. 2012)، آرژانتین (sesti et al. 2014) و کلمبیا (Jack wood 2012) نشان داد. به طور کلی سویه Q1 تشابه ژنتیکی (در ژن S1) حدود ۸۲-۷۷ درصد، با سویه استاندارد (M41) و واکسن (H1۲۰) سروتیپ ماساچوست نشان می‌دهد (de witt et al, 2012, Abubneh 2012). این مطالعه نتایج حاصل از تأیید ترکیب واکسن‌های سروتیپ‌های 793/B و ماساچوست را علیه چالش با سویه واریانت Q1 انجام شده در آرژانتین را گزارش می‌کند.

مواد و روش کار

حیوانات: ۳ گروه حاوی ۱۱ جوجه SPF تخم گذار در ایزولاتورهای جداگانه جاگذاری شده و برنامه واکسیناسیون و چالش آن‌ها طبق جدول شماره ۱ صورت پذیرفت. این طرح در ایزولاتورهای مجموعه آزمایشگاه‌های SENA در بوئنوس آیرس آرژانتین انجام گرفت.

سویه چالش Q1 توسط مؤسسه ملی تکنولوژی غذایی واقع در بوئنوس آیرس آرژانتین مورد تأیید قرار گرفت. این سویه ویروس برونشیت عفونی از یک شرکت یک پارچه تولیدکننده مرغ گوشتی واقع در بخش مرکزی- شرقی کشور آرژانتین جدا گردید. پرندگان گوشتی جمع آوری شده از گله‌های بیمار کالبدگشایی شده و نمونه‌های بافتی (نای، ریه، سکال تانسیل‌ها و کلیه‌ها) جهت جداسازی و شناسایی مولکولی جمع آوری شدند (Rimondi et al. 2009).

پاتویپ‌بندی

میزان پاتوژنیسته سویه چالشی مورد استفاده، با استفاده از سیستم نمره‌بندی علائم بالینی و میزان وزن‌گیری مورد ارزیابی قرار گرفت.

نمره‌بندی علائم بالینی

طی ۵ یا ۶ روز پس از چالش پرندگان به دقت تحت نظر قرار گرفتند، تا از لحاظ کسلی، علائم تنفسی، ملتحمه کف آلود و ترشحات بینی ارزیابی شوند. نمره‌بندی مشاهده‌ای از نمره صفر (عدم وجود علائم بالینی) تا ۳ (علائم بالینی قوی و واضح) چیده شده بودند. دو نفر از محققین نمره‌بندی بالینی را در زمان‌های مختلف ثبت می‌کردند تا در نهایت میانگین نمره‌بندی برای هر جوجه تعیین گردد.

وزن‌گیری: جوجه‌ها در روز چالش و نیز ۵ روز پس از چالش وزن‌گیری شدند تا میزان وزن‌گیری به ازای هر پرنده تعیین گردد.

تست توقف تحرک مژگی (ciliostasis):

تست تحرک مژگی ایجاد شده توسط چالش با سویه Q1 و ویروس برونشیت عفونی (سویه 1128 - INTA IBV) در روزهای ۵ و ۶ پس از چالش به روش زیر ارزیابی گردید:

- ۱۰ حلقه نای به ازای هر پرنده (حلقه‌های ۱،۲،۳ = یک سوم بالای نای، حلقه‌های ۴،۵،۶،۷ = یک سوم میانی نای و حلقه‌های ۸،۹،۱۰ = یک سوم انتهایی نای)
- سیستم نمره‌بندی فعالیت مژگی شامل صفر تا ۴ بود که صفر برابر با فعالیت ۱۰۰ درصدی مژگ‌ها و ۴ برابر با عدم وجود حرکت مژگی بود (نمره‌های ۱،۲،۳ = صفر = محافظت و نمره‌های ۴،۳ = عدم محافظت)
- گروه‌های محافظت شده = جمع نمره‌بندی حلقه‌های نای بایستی کمتر یا مساوی ۲۰ باشد.
- در این بخش نیز ۲ محقق، هر یک از حلقه‌های نای را ارزیابی و نمره‌دهی کردند تا میانگین اعداد این دو محقق برای هر حلقه مدنظر قرار گیرد.

واکسیناسیون

برنامه ترکیبی واکسیناسیون توسط سویه H120 ماساچوست + سویه گروه 793/B (سویه ۱/۹۶؛ Cevac IBird-Ceva Animale Health Libourne-France). حدود ۳۰ میکرولیتر حاوی یک دوز کامل واکسن واکسینه شدند. تمامی واکسن‌های مصرفی در میانه عمر قفسه‌ای خود قرار داشتند.

جدول شماره ۱: گروه‌های مورد مطالعه در چالش با ویروس Q1

Treatment group	IB live vaccination program *	Intra-tracheal challenge with IBV Q1 (INTA IBV 1128)
Group A (Mass strain + 1/96 strain) *	<ul style="list-style-type: none"> day 1, eye drop, 	<ul style="list-style-type: none"> 25 days of age
Group B	<ul style="list-style-type: none"> Positive control No Vaccine challenge 	<ul style="list-style-type: none"> 25 days of age
Group C	<ul style="list-style-type: none"> Negative control, No Vaccine No Challenge 	<ul style="list-style-type: none"> No challenge

*** Vaccine Combination Program:**

Mass strain + 1/96 strain =
Massachusetts strain (H120) + 1/96 (793/B-type vaccine strain; Cevac IBird, Ceva Animal Health, Libourne - France)

چالش: سویه چالشی Q1 (INTA IBV-1128) در سن ۲۵ روزگی به طریق داخل نای (۱۰۰ میکرولیتر) با تیترا $10^{2.5}$ CID₅₀ به ازای هر پرند (یک لوگ ۱۰ بالاتر از کمترین تیترا، توانایی ایجاد علایم بالینی در ۵۰ درصد پرندگان چالشی را دارد) صورت گرفت.

ارزیابی محافظت: محافظت به دست آمده توسط واکسیناسیون با ترکیب دو واکسن علیه چالش با ویروس Q1 با استفاده از روش توقف تحرک مژکی انجام شده ۶ روز پس از چالش صورت گرفت.

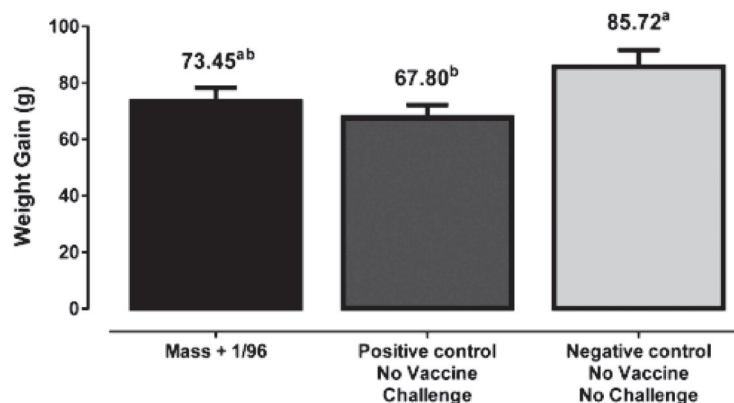
آنالیز آماری

تمامی اطلاعات آماری به صورت آنالیز اتفاقی و واریانس و میانگین مقایسه توسط روش LSD-All-Pairwise در سطح اطمینان $P < 0.05$ آنالیز شدند (نرم افزار Statistix ۹/۰)

نتایج

وزن گیری

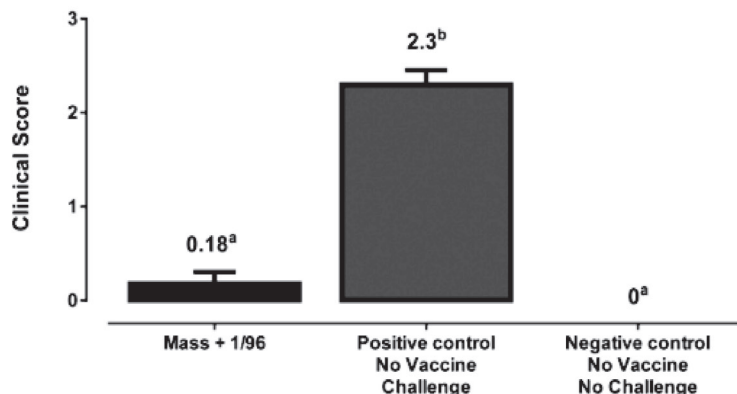
داده های وزن گیری پرندگان بین روز چالش با Q1 (۲۵ روزگی و روز تست توقف تحرک مژکی (۳۰ روزگی) در شکل ۱ نشان داده شده اند. پرندگان در گروه C (کنترل منفی) بالاترین میزان وزن گیری را داشته و از لحاظ آماری با پرندگان گروه A (واکسن خورده) تفاوتی نداشتند. میزان وزن گیری بین پرندگان گروه های A و B نیز از لحاظ آماری تفاوتی با یکدیگر نداشتند.



شکل ۱: وزن گیری کلی پرندگان طی ۵ روز پس از چالش با سویه Q1

نمره بندی علایم بالینی

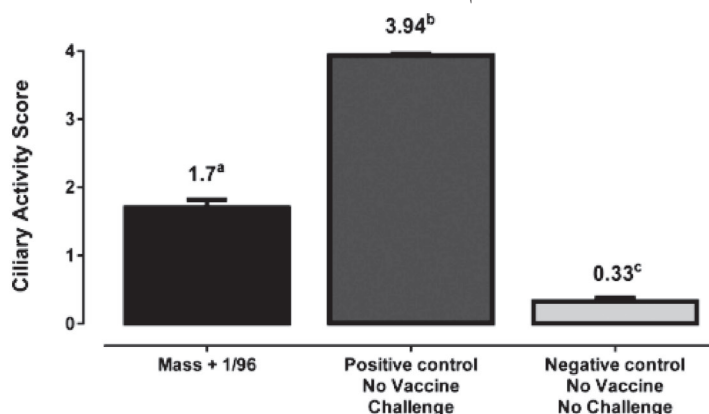
توانایی پاتوژنیسته سویه برونشیت عفونی Q1 استفاده شده در این مطالعه از طریق بروز علایم بالینی شدید در گروه C تأیید شد. پرندگان واکسینه شده (گروه A) علائم بالینی مشابه پرندگان در گروه C (بدون واکسن و بدون چالش) را نشان دادند. پرندگان گروه B (واکسن نخورده چالش یافته) نمره بندی علائم بالینی بالایی را نشان دادند که از لحاظ آماری با دو گروه دیگر تفاوت داشتند (شکل ۲؛ $P < 0.05$).



شکل ۲: نمره بندی کلینیکی در گروه های مختلف

تست فعالیت مژگی و محافظت علیه چالش

نتایج حاصل از تست فعالیت مژگی (شکل ۳) مشخص می کند که برنامه واکسیناسیون ترکیبی (گروه A) محافظت بالاتری را نسبت به گروه B نشان داد که نتایج معنی دار بود. این گروه هم چنین با گروه C نیز تفاوت معنی داری داشت.



شکل ۳: ارزیابی فعالیت مژگی در گروه های مختلف

بحث

چالش با استفاده از ویروس Q1 سبب کاهش وزن گیری در هر دو گروه چالش یافته می شود. گروه C که واکسن نخورده و چالش نیز نیافته بود، بیشترین میزان وزن گیری را نشان داد ($P < 0.05$). از لحاظ آماری تفاوتی بین میزان وزن گیری گروه واکسینه شده (گروه A) با گروه کنترل منفی (گروه C بدون دریافت واکسن و بدون چالش) وجود نداشت. کاهش وزن حاصل از درگیری با سویه Q1 برونشیت عفونی سبب کاهش عملکرد پرندگان گوشتی در ایتالیا (Toffan et al. 2013)، شیلی (de wit et al. 2012) و آرژانتین (Sesti et al 2014) می گردد.

سویه Q1 آرژانتینی توانایی ایجاد آسیب بافتی خود را در جوجه‌های SPF اثبات کرده است. پرندگان در گروه B (واکسن نخورده چالش یافت) علائم بالینی بارزی را پس از چالش نشان دادند (علایم تنفسی، بی حالی، التهاب ملتحمه و ترشحات بینی) که از لحاظ آماری با سایر گروه‌ها تفاوت فاحشی از لحاظ شدت علایم داشتند. با این وجود، پرندگان در گروه واکسینه شده تماماً در برابر بیماری بالینی محافظت شده و نمره‌بندی بالینی آن با گروه C (واکسن نخورده-چالش نیافته) تفاوتی نداشت. در آزمون تحرک مژگی ۱۰۰ درصد پرندگان در گروه B (واکسن نخورده-چالش یافته) حداقل تحرک مژگی را در حلقه‌های نای آزمایش شده نشان دادند. این خود نشان‌دهنده پاتوژنیسته‌ی سویه چالشی می‌باشد. طبق انتظارات، پرندگان در گروه C (واکسن نخورده و چالش نیافته) فعالیت مژگی ۱۰۰ درصدی را در حلقه‌های نای نشان دادند. برنامه واکسیناسیون با ترکیب دو واکسن (سویه ۱/۹۶ و ماساچوست) در یک‌روزگی محافظت قابل توجهی را علیه چالش با سویه واریانت Q1 نشان داد. اثرگذاری محافظت به‌دست آمده توسط این واکسیناسیون در بالین نمود بهتری داشته که به همراه کاهش قابل توجهی از تلفات دیرهنگام و نیز بهبود شرایط بالینی گله‌های واکسینه شده می‌گردد (Sesti et al.2014).

نتیجه‌گیری

به‌طور خلاصه طرح واکسیناسیون علیه بیماری برونشیت عفونی گزارش شده در این مقایسه نتایج قابل قبولی را به‌هنگام استفاده از دو واکسن (سویه ۱/۹۶ و ماساچوست)، در برابر چالش با سویه واریانت Q1 در حال چرخش در صنعت طیور آرژانتین به‌همراه دارد.

منابع:

- Ababneh, M., Dalab, A.E., Alsaad, S. and Al-Zghoul, M. (2012) Presence of Infectious Bronchitis Virus Strain CK/CH/LDL/97I in the Middle East. International Scholarly Research Network – ISRN Veterinary Science, Volume 2012, Article ID 201721, 6 pages, doi:10.5402/2012/201721
- Cook, J. K. A., Orbell, S. J., Woods, M. A. & Huggins, M. B. (1999) Breadth of protection of the respiratory tract provided by different live-attenuated infectious bronchitis vaccines against challenge with infectious bronchitis viruses of heterologous serotypes. Avian Pathology, 28, 477-485.
- de Wit, J.J., Guerrero, P., Calvo, J., and Hidalgo, H. (2012) Report of the genotyping, pathotyping, and protectotyping of recent strains from Chile. VII. International Symposium on Avian Corona- and Pneumoviruses and complicating pathogens. Rauschholzhausen, Germany, 18-21 June 2012, pages 61-67.
- Jackwood, M. (2012) Molecular diagnostics and characterization of infectious bronchitis virus. Proceedings of XXXI Seminario Avícola Internacional de AMEVEA, Bogota, Colombia. 18-20 de Abril de 2012, 4 pages.
- Rimondi, A., Craig, M.I., Vagnozzi, A., König, G., Delamer, M. and Pereda, A. (2009) Molecular characterization of avian infectious bronchitis virus strains from outbreaks in Argentina (2001-2008). Avian Pathology (April 2009) 38(2), 149-153
- Sesti, L., Sara, L., Alvarado, L., Palya, V., Mató, T., de Wit, J.J. (2014) Diagnostic, epidemiology and control of the Q1 infectious bronchitis virus (IBV) variant strain in Peru, Colombia, Argentina and Chile. VIII. International Symposium on Avian Corona- and Pneumoviruses and complicating pathogens. Rauschholzhausen, Germany, 17-20 June 2014.
- Toffan, A., Bonci, M., Bano, L., Valastro, V., Vascellari, M., Capua, I. and Terregino, C. (2013) Diagnostic and clinical observation on the infectious bronchitis virus strain Q1 in Italy. Veterinari-Italiana 2013, 49 (4), 347-355.

ارزیابی تطابق واکسن زنده واریانت برونشیت عفونی با واکسن ایمنو کمپلکس بیماری گامبورو در طیور گوشتی

Jozsef Herczeg, Melinda Papp, Laszlo Makranszki, Katalin Varga and Zoltan Penzes

Ceva-Phylaxia Veterinary Biologicals, 1107 Budapest, Szállás u. 5. Hungary

مقدمه

یک واکسن زنده تخفیف حدت یافته از واریانت ویروس برونشیت عفونی (گروه 793/B)، حاوی سویه 1/96 برای ایمنی زایی علیه سویه‌های واریانت IBV گروه 793/B تولید شده توسط شرکت سوا در این مطالعه به عنوان شاخص واکسن‌های بیماری برونشیت عفونی مورد استفاده قرار گرفت.

مواد و روش کار:

۳ گله ۱۸ هزارتایی طیور گوشتی (راس ۳۰۸) در تست تطبیق‌پذیری مورد استفاده قرار گرفتند. مطالعه از سه فاز تشکیل شده بود:

(۱) واکسیناسیون در هجری Cevac Transmune به روش داخل تخم‌مرغی در روز هجدهم انکوباسیون به همراه واکسن‌های Cevac IBird و Cevac Bron 120 L به صورت اسپری در یکروزگی مصرف شدند.

(۲) پرندگان در یک مرغداری تجاری نگهداری می‌شدند. گروه‌ها از همدیگر (۱۸ هزار در هر کدام) جدا بوده و ۲۰ مرغ از هر گروه درمانی در سن ۳ هفتگی به یک مرکز تحقیقاتی منتقل شدند.

(۳) چالش‌ها تحت شرایط آزمایشگاهی به همراه طیور گوشتی غیرواکسینه و گروه کنترل SPF اجرا شدند. تطابق Cevac IBird با Cevac Bron 120 L و Cevac Transmune به این وسیله مشخص شد؛

الف) چالش با ویروس برونشیت عفونی جهت ارزیابی عملکرد واکسن‌های برونشیت عفونی

ب) تست سرمی نشان دهنده پاسخ سرمی مثبت به ترانسمیون در حضور واکسن‌های برونشیت عفونی مصرف شده به همراه ترانسمیون

میزان اثرگذاری با یک چالش درون‌نایی پرندگان با دو سروتیپ متفاوت ویروس برونشیت عفونی نشان داده شد. سویه چالش 793/B ویروس برونشیت واریانت (۴.۵ لگاریتم ۱۰ EID50) و تیپ ماساچوست، سویه M41 (۳.۵ لگاریتم ۱۰ EID50) استفاده شدند. نتایج حاصل از چالش با تست‌های فعالیت مژکی ۶ روز پس از چالش ارزیابی شدند.

پاسخ سرمی به Cevac Transmune با تست خنثی‌سازی ویروس (VN) نشان داده شد. تیرهای ایمنی VN بر اساس کفایت موجود و جمع‌آوری مجموعه اطلاعاتی مقایسه‌ای پاسخ سرمی (حداقل ۷.۴ لگاریتم ۲ تیر VN در طی فرآیند ثبت، کافی در نظر گرفته شد) مشخص شدند. نتایج چالش و سرمی در جدول زیر نشان داده شدند.

تیترهای IBD VN لگاریتم ۲ TCID50			ایمنی* در برابر برونشیت عفونی		گروه‌های درمانی و منبع آنها بر اساس مرغداری مبدأ
روز ۳۰	روز ۲۰	روز صفر	سویه واریانت Mass M41	سویه واریانت 793/B	
۱۱.۷	۹.۶	۱۳.۹	-	۸۰ درصد	گروه ۱ (Transmune, IBird) مرغداری
۱۲.۵	۹.۶		۷۵ درصد	۷۵ درصد	گروه ۲ (Bron 120, Transmune, IBird)
-	-	-	صفر درصد	صفر درصد	گروه ۳ غیرواکسینه، پرندگان SPF چالش یافته
-	-	-	صفر درصد	صفر درصد	گروه ۴ غیرواکسینه، طیور گوشتی چالش یافته

*ایمنی = درصد فعالیت نرمال مژکی، ۶ روز پس از چالش درون نایی

سطوح بالای ایمنی در برابر چالش‌های تیپ واریانت نشان می‌دهد که اثرگذاری Cevac IBird تحت تأثیر وجود همزمان واکسن‌های دخیل نبوده و بخوبی اثرگذاری صورت گرفته است. تیترهای VN مربوط به Cevac Transmune مندرج در جدول بالا، کاملاً در برابر چالش بسیار حاد ویروس بیماری بورس عفونی (گامبورو) با توجه به اطلاعات مقایسه‌ای اثرگذاری و پاسخ سرمی منتشره در گذشته ایمن بودند.

نتیجه‌گیری

واکسن Cevac IBird موجب القای سطح بالایی از ایمنی در برابر سویه واریانت 793/B برونشیت عفونی در پاسخ همزمان واکسن‌های Cevac Bron 120L و Cevac Transmune می‌شود. واکسن Cevac Bron 120 L ایمنی سطح بالایی را در برابر چالش با سویه تیپ M-41 Mass در وجود و استعمال همزمان Cevac Transmune و Cevac IBird (گروه ۲) از خود نشان می‌دهد (شکل ۲ را نیز مشاهده کنید). این نتایج نشان می‌دهند که هیچ اثر سویی در کفایت (علیه برونشیت عفونی) واکسن‌های Cevac IBird یا Cevac Bron 120 L وجود ندارد و این امر می‌تواند به درمان همزمان با یکی یا هیچ کدام از واکسن‌های Cevac Transmune نسبت داده شود.

ارزیابی روش اسپری در برنامه واکسیناسیون بیماری برونشیت عفونی با استفاده از روش Real-Time RT-PCR

T. TATÁR-KIS, B. FELFÖLDI, Z. HOMONNAY, E. WALKÓNÉ KOVÁCS, T. MATÓ,

W. BOYER, Y. GARDIN, V. PALYA

Ceva-Phylaxia Veterinary Biologicals, 1107 Budapest, Szállás u. 5. HUNGARY

چکیده

بیماری برونشیت عفونی یکی از مهم‌ترین بیماری‌های ماکیان محسوب شده که از لحاظ اقتصادی اهمیت فراوانی دارد. اولین واکسن علیه این بیماری معمولاً در جوجه‌کشی توسط اسپری قطرات درشت صورت می‌گیرد. دستگاه‌های اسپری مختلفی را می‌توان براساس شرایط متنوع محیطی بکار برد که هر دو عامل (دستگاه اسپری مناسب و شرایط مطلوب محیطی) تاثیر بسزائی در عملکرد واکسیناسیون دارند، لذا اجرای واکسیناسیون مناسب یکی از مهم‌ترین ابزارهای موثر جهت حصول بهترین محافظت ایجاد شده در گله واکسینه شده می‌باشد.

در مطالعه اول، دو نوع دستگاه اسپری مخصوص جوجه‌کشی در مقایسه با واکسیناسیون به روش قطره چشمی - بینی در جوجه‌های تجاری، تحت شرایط معمول جوجه‌کشی مورد مطالعه قرار گرفتند. در مطالعه‌ای دیگر واکسیناسیون در جوجه‌های یک‌روزه در فارم با استفاده از دستگاه اسپری دستی مورد ارزیابی قرار گرفت. نمونه‌های مختلفی در طول هفته اول جمع‌آوری شده و برای حضور یا عدم حضور ویروس برونشیت عفونی با استفاده از روش Real-Time RT-PCR بررسی شدند. نتایج حاکی از دریافت کامل واکسن بلافاصله پس از اسپری با دستگاه‌های مدنظر در پرندگان واکسینه شده بود که این امر می‌تواند سبب عملکرد مناسب واکسیناسیون گردد.

مقدمه

پیشگیری از بیماری برونشیت عفونی بشدت متکی به واکسیناسیون می‌باشد (Jack wood and De Wit -2013). واکسیناسیون به روش اسپری یکی از رایج‌ترین روش‌های واکسیناسیون علیه این بیماری در جوجه‌کشی یا در مرغداری می‌باشد. استفاده صحیح واکسن جهت دریافت حداکثری واکسن در گله، نه تنها از لحاظ اثرگذاری بلکه از لحاظ ایمنی نیز بسیار مهم می‌باشد. اولین واکسن علیه بیماری برونشیت عفونی اغلب در جوجه‌کشی به روش اسپری با قطرات بزرگ صورت می‌گیرد. دستگاه‌های اسپری مختلفی را می‌توان براساس شرایط متنوع محیطی بکار برد که هر دو عامل (دستگاه اسپری مناسب و شرایط مطلوب محیطی) تاثیر بسزائی در عملکرد واکسیناسیون دارند. ارزیابی کارایی واکسیناسیون به روش اسپری را می‌توان به موارد زیر تقسیم‌بندی نمود:

الف. مطالعه ایمنی‌زایی (تنها در نمونه‌های معدود قابل اجرا می‌باشد، این روش رایج نمی‌باشد)

ب. بررسی سرولوژیک

ج. ارزیابی حضور ویروس واکسن و نیز میزان تکثیر آن در تعدادی زیادی نمونه

مزیت روش اسپری، امکان نمونه‌برداری سریع پس از واکسیناسیون می‌باشد. بنابراین واکسیناسیون یک‌روزگی را می‌توان به راحتی بررسی نمود و دریافت واکسن (تعداد پرندگانی که ویروس واکسن را دریافت کرده‌اند) را در پرندگان ارزیابی کرد. هدف از این مطالعه بررسی دریافت واکسن توسط پرنده‌ها در طول هفته اول زندگی با استفاده از روش Real Time RT-PCR و انتخاب بهترین روش واکسیناسیون اسپری برای مطالعات فارمی می‌باشد.

مواد و روش کار

ویروس واکسن

واکسیناسیون یک‌روزگی جوجه‌های گوشتی توسط یک واکسن تجاری زنده تخفیف حدت یافته حاوی سویه H120 (Cevac Bron 120 L) بعنوان آزمایش اول صورت گرفت. واکسیناسیون یک‌روزگی پرندگان تخم‌گذار تجاری با واکسن زنده تخفیف حدت یافته دیگر حاوی سویه B48 (Cevac Mass L) بعنوان آزمایش دوم مورد استفاده قرار گرفت.

پرندگان مورد استفاده

در آزمایش اول جوجه‌های یک‌روزه تجاری (Ross 308) دارای آنتی‌بادی مادری علیه ویروس بیماری برونشیت عفونی مورد استفاده قرار گرفتند. تیر الایزای (IDEXX) آنتی‌بادی مادری در این جوجه‌ها $3/1 \pm 0/3$ بر پایه لگاریتم 10 بود. در آزمایش دوم جوجه‌های تخم‌گذار تجاری (Lohmann Brown-Classic) مورد استفاده قرار گرفتند. آنتی‌بادی مادری این جوجه‌ها با استفاده از کیت الایزای بیوچک در سن 3 روزگی $4 \pm 0/1$ بر پایه لگاریتم 10 بود. پرندگان به روش اسپری در شرایط فیلدی (در آزمایش اول اسپری در جوجه کشی و در آزمایش دوم بلافاصله پس از رسیدن پرندگان به مرغداری بصورت اسپری) واکسینه شدند. پس از واکسیناسیون، پرندگان مورد آزمایش به قسمت‌های ایزوله شده منتقل شدند تا از درگیری‌های برونشیت عفونی ناخواسته جلوگیری گردد. پرندگان بر روی بستر پوشال نگهداری شده و دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند.

تجهیزات مورد استفاده جهت اسپری

دستگاه اسپری در خط (Desvac in line spray) یک دستگاه اسپری اتوماتیک برای جوجه‌های یک‌روزه بوده که بر روی ریل انتقال جوجه‌ها نصب می‌گردد. در این روش جعبه حاوی جوجه بر روی ریل انتقال حرکت می‌کند و به هنگام رسیدن جعبه به دستگاه، جعبه شناسایی شده و عمل اسپری بر روی آن انجام می‌گیرد. هنگامی که جوجه‌ها از زیر دستگاه اسپری واکسن رد می‌شوند، دستگاه دوز مورد نیاز یک جعبه را به صورت قطرات یکنواخت و در اندازه مورد نیاز اسپری می‌کند. این دستگاه در 4 مدل مختلف ریل انتقال جوجه با سرعت‌های متفاوت و نازل‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفت. دو ریل متفاوت از لحاظ سرعت دارای سرعتی معادل 20 متر در دقیقه (سرعت کند) و 35 متر در دقیقه (سرعت تند) بودند. اندازه قطرات ایجادشده توسط نازل‌ها حدود 150 میکرومتر بود. دستگاه اسپری در خط به گونه‌ای تنظیم شده بود تا براساس سرعت حرکت ریل تعداد 100 دوز واکسن را به طور یکنواخت بر روی هر جعبه اسپری کند. حجم واکسن مصرفی تهیه شده براساس سرعت ریل و تعداد نازل به ازای هر 100 جوجه برای دستگاه‌های 2 نازل و سرعت کند، 4 نازل و سرعت تند، 2 نازل و سرعت تند و 4 نازل و سرعت تند به ترتیب شامل 8 ، 16 ، 5 و 10 سی‌سی می‌باشد.

دستگاه کابینت اسپری (Desvac hatch spray) یک دستگاه دیگر برای واکسیناسیون در جوجه‌کشی می‌باشد که هنگام قراردادن جعبه در داخل کابینت و قرار گرفتن جعبه در محل مناسب 4 نازل مخروطی بطور همزمان واکسن را بر روی پرندگان اسپری می‌کنند. در این دستگاه اسپری از چهار نازل قرمز رنگ استفاده گردید که قطره‌ای با میانگین قطر 150 میکرومتر تأمین نماید. حجم واکسن به صورت 100 دوز واکسن در 20 سی‌سی آب مقطر تهیه گردید.

دستگاه اسپری دستی (Desvac kit2) برای واکسیناسیون در مرغداری استفاده می‌شود و معمولاً برای پرندگان با سن بالاتر کاربرد دارد. در این مطالعه، جوجه‌های تخم‌گذار علیه بیماری برونشیت در جوجه‌کشی واکسینه نشدند و در مرغداری در سن یک‌روزگی مورد واکسیناسیون قرار گرفتند. اندازه قطرات در حدود 140 – 115 میکرومتر بود. 10 سی‌سی محلول واکسن به ازای هر جعبه 50 قطعه‌ای جوجه تخصیص داده شد. همه دستگاه‌ها دارای فشارسنج بودند تا سایز قطرات در طول واکسیناسیون قابل کنترل باشد.

طراحی مطالعات

مطالعه اول

در این مطالعه دو نوع دستگاه اسپری (اسپری در خط و کابینت اسپری) در جوجه‌های گوشتی تجاری در جوجه‌کشی مورد استفاده قرار گرفتند. واکسیناسیون به صورت قطره چشمی-بینی به عنوان روش واکسیناسیون مرجع مورد استفاده قرار گرفت. دستگاه اسپری در خط به ۴ روش اسپری مختلف مورد آزمایش قرار گرفت که شامل موارد ذیل می‌باشد:

- الف. ۲ نازل و سرعت کم
- ب. ۴ نازل و سرعت کم
- ج. ۲ نازل و سرعت تند
- د. ۴ نازل و سرعت تند

در این مطالعه ۴ جعبه دارای ۱۰۰ جوجه توسط هر نوع اسپری مورد واکسیناسیون قرار گرفتند، اما ۱۵۰ جوجه برای هر گروه به صورت تصادفی انتخاب شدند تا پرورش یافته و نمونه‌برداری از آنها صورت گیرد. در مورد کابینت اسپری، ۱۵۰ جوجه واکسن دریافت کردند و تمامی آنها مورد ارزیابی قرار گرفتند. واکسیناسیون انفرادی (قطره چشمی-بینی) در ۶۵ جوجه به عنوان روش مرجع صورت گرفت.

مطالعه دوم

دستگاه اسپری دستی در جوجه‌های تخم‌گذار تجاری یک‌روزه در مرغداری مورد استفاده قرار گرفت. در این روش نیز، روش قطره چشمی - بینی به عنوان روش مرجع واکسیناسیون انتخاب شد. غالب جوجه‌ها (حدوداً ۴۰۰۰۰) جوجه توسط دستگاه اسپری دستی واکسینه شدند که از این تعداد، ۹۰ جوجه به صورت تصادفی انتخاب شدند و در مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند (در یک محل آزمایشگاهی مورد پرورش قرار گرفتند) گروه دریافت کننده واکسن به صورت چشمی-بینی شامل ۳۰ جوجه بود.

نمونه‌برداری

در هر دو مطالعه، نمونه‌برداری در روزهای ۲، ۴ و ۷ پس از واکسیناسیون صورت گرفت.

مطالعه اول

طی کالبدگشایی جوجه‌ها، نمونه‌ها از نای، پلک و ملتحمه جمع‌آوری گردید. از گروه‌های واکسینه در هر روز نمونه‌برداری از ۵۰ جوجه و در روش قطره چشمی-بینی از ۱۰ جوجه صورت گرفت. در روش اسپری در خط در هر حالت اسپری (به‌طور مثال ۴ نازل و سرعت پائین)، به منظور نمونه‌برداری ایده‌آل جهت ارزیابی دریافت واکسن، نمونه‌برداری با سواب از تعداد معدودی پرنده زنده (۱۰ پرنده) از ناحیه دهانی-بینی و ملتحمه اخذ گردید.

مطالعه دوم

مشابه مطالعه اول نمونه‌های نای و ملتحمه از ۳۰ جوجه واکسینه با دستگاه و ۱۰ جوجه واکسینه به صورت قطره چشمی-بینی جمع‌آوری گردید. علاوه بر اخذ نمونه‌های بافتی، از تمامی پرندگان سواب دهانی-بینی نیز گرفته شد. نمونه‌های سواب با استفاده از سواب‌های سرنازک صورت گرفت (سواب Eurotubo) که مخصوص نمونه‌برداری از پرندگان بسیار جوان می‌باشد. سواب‌ها در محیط انتقال مخصوص دارای آنتی‌بیوتیک در دمای ۷۰ الی ۸۰ درجه نگهداری شدند.

الایزا

سطح آنتی‌بادی مادری در جوجه‌ها با استفاده از کیت‌های الایزا مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. در مورد مطالعه اول کیت الایزا آزمایشگاهی بیماری برونشیت عفونی مورد استفاده قرار گرفت، درحالی‌که در مطالعه دوم کیت بیوچک مورد استفاده قرار گرفت و میانگین STD بر پایه لوگ ۱۰ در هر دو کیت اندازه‌گیری شد.

ارزیابی میزان تکثیر ویروس برونشیت عفونی در نای توسط Real Time RT-PCR

یکنواخت سازی نمونه های نای و چشم با استفاده از LYSER II بافتی (QIAGEN) صورت گرفت. نمونه های نای قبل از انتقال به لوله Eppendorf به صورت طولی در دو قسمت بریده شده و در آن قرار داده شدند. محصول هموژن شده به مدت یک دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ گردید. پس از سانتریفیوژ محلول رویی جدا شده و جهت ارزیابی تعداد ویروس برونشیت عفونی توسط real-time RT-PCR مورد استفاده قرار گرفت. نمونه های سوآب نیز جهت جدا شدن محتویات سوآب به مدت ۱۰ دقیقه به صورت مارپیچی مخلوط شدند سپس نمونه ها توسط سانتریفیوژ جدا شده و ۲۰۰ میکرولیتر از محلول رویی جهت استخراج RNA توسط استخراج کننده شرکت کیاژن، براساس دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. ۲۰۰ میکرولیتر از محلول استخراج شده برای استخراج RNA با روش Real-time PCR استفاده شد. پرایمرها و پراب ها برای تکثیر و شناسایی قطعه 5' UTR قبلا طراحی شده اند (Callison et al 2006).

نتایج

مطالعه اول: نتایج در جدول ۱ و شکل ۱ و ۲ خلاصه شده اند. در پرندگان واکسینه شده به روش چشمی-بینی، تمامی نمونه های دریافت شده از چشم و نای ۱۰۰ درصد مثبت بود. درصد پرندگان مثبت در گروه های واکسینه شده به روش اسپری بدون در نظر گرفتن نوع دستگاه کمتر بود. اکثر گروه های واکسینه شده به روش اسپری عملکرد مشابه یکدیگر داشتند، به جز دستگاه اسپری ۲ نازل با سرعت ریل تند که در این گروه در تمامی نمونه های روز دوم بعد از واکسیناسیون، عملکرد ضعیف تری دیده شد. در گروه های واکسینه شده به روش اسپری، نمونه مثبت نای کمتر از نمونه های مثبت ملتحمه بودند. نتایج مثبت قابل قبولی در هر دو نمونه چشم و نای به هنگام نمونه برداری مکرر به دست آمد به طوری که تعداد نمونه های مثبت ۱۰۰-۹۰ درصدی در روز هفتم پس از اسپری واکسن به دست آمد. بیشترین میزان RNA ویروسی بدون در نظر گرفتن نمونه، در روش قطره چشمی-بینی، ۲-۴ روز پس از واکسیناسیون به دست آمد. در روش اسپری در ۲ نمونه گیری اول (۲ و ۴ روز پس از واکسن) میزان ویروس و نمونه ها کم بود اما ۷ روز پس از واکسیناسیون نمونه ها قابل مقایسه با روش قطره چشمی-بینی بود. به طور کلی میزان RNA ویروسی در نای کمتر از چشم بود.

مطالعه دوم: نتایج در جدول ۲ و شکل ۳ خلاصه شده اند. نسبت بالایی از پرندگان حتی در روز دوم پس از واکسیناسیون از هر دو گروه و تمامی نمونه ها مثبت بودند (نمونه های چشم و نای و سوآپ های دهانی-بینی)، بیشترین میزان RNA ویروسی از سوآپ های دهانی-بینی بدست آمد و کمترین میزان آن از اندام نای جدا گردید. به دلیل نسبت بالایی از نمونه ها و قابلیت مقایسه نتایج در ۲ و ۴ روزگی، نمونه برداری در ۷ روزگی از این پرنده ها حذف گردید.

بحث

در این مطالعه ۲ دستگاه اسپری کننده متفاوت با تنظیم های مختلف در جوجه های گوشتی و یک اسپری کننده دیگر در مرغان تخم گذار تجاری تحت شرایط مرغداری مورد استفاده قرار گرفتند. استفاده واکسن به صورت انفرادی (قطره چشمی-بینی) به عنوان مرجع در نظر گرفته شد. پس از واکسیناسیون در یک روزگی، دریافت واکسن برونشیت عفونی توسط پرندگان در هفته اول توسط روش Real Time RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت. نمونه های بافتی (نای، پلک و ملتحمه) و نمونه های سوآب (ملتحمه و دهانی-بینی) برای دریافت واکسن مورد مقایسه قرار گرفتند. شناسایی میزان دریافت واکسن و میزان RNA ویروس در روش اسپری در مقایسه با روش انفرادی (قطره چشمی-بینی) در طی ۲ و ۴ روز پس از واکسیناسیون ضعیف تر بود. با این وجود، ۷ روز پس از

واکسیناسیون نتایج کاملاً قابل مقایسه با روش انفرادی بودند که به دلیل گسترش ویروس می‌باشد. اگرچه دریافت اولیه واکسن در روش واکسیناسیون دسته جمعی (اسپری) در مقایسه با روش انفرادی ضعیف‌تر بود، اما پس از گذشت چند روز درصد عظیمی از گله از لحاظ دریافت واکسن مثبت بودند. در مطالعه‌ای که بر روی پرندگان تخم‌گذار صورت گرفت، هیچ تفاوت معنی‌داری بین گروه دریافت‌کننده واکسن به صورت دسته‌جمعی در مقایسه با گروه دریافت‌کننده واکسن به صورت انفرادی نبود و کمترین سوآپ‌های دهانی - بینی منفی به دست آمد. نتایج حاکی از آن بود که روش مولکولی مورد استفاده برای دریافت واکسن بلافاصله پس از واکسیناسیون مناسب بوده که نشان از دریافت نتیجه سریع از عملکرد واکسیناسیون دارد. لذا استفاده از این روش برای تشخیص سریع شکست در واکسیناسیون مفید بوده و امکان تغییر سریع روش واکسیناسیون در جوجه‌کشی را امکان‌پذیر می‌نماید.

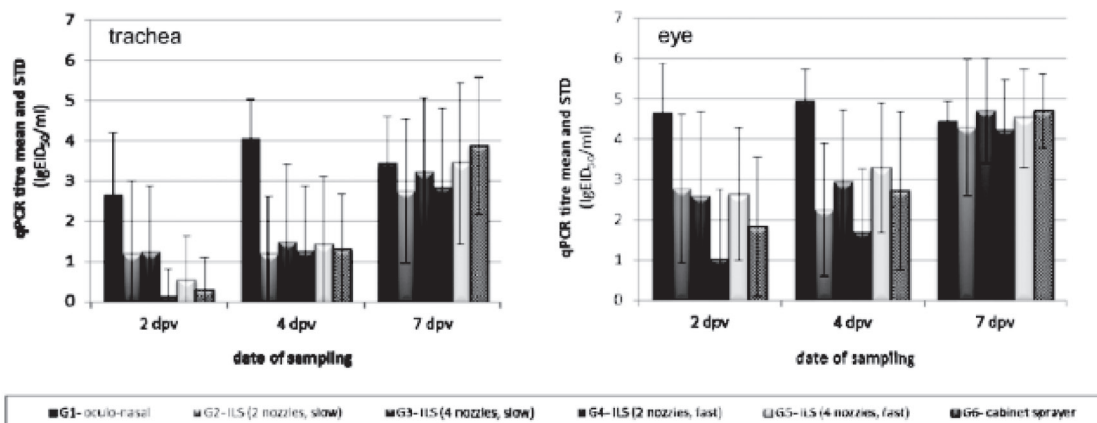
جدول ۱: درصد پرنده‌های مثبت پس از واکسیناسیون در مطالعه اول

گروه	روش	۲ روز پس از واکسیناسیون		۴ روز پس از واکسیناسیون		۷ روز پس از واکسیناسیون	
		چشم	نای	چشم	نای	چشم	نای
۱	چشمی - بینی	%۱۰۰	%۱۰۰	%۱۰۰	%۱۰۰	%۱۰۰	%۱۰۰
۲	اسپری در خط (۲ نازل سرعت پائین)	%۴۱	%۸۲	%۸۸	%۵۴	%۹۰	%۹۰
۳	اسپری در خط (۴ نازل سرعت پائین)	%۴۲	%۷۶	%۹۰	%۵۲	%۹۰	%۹۰
۴	اسپری در خط (۲ نازل سرعت تند)	%۶	%۲۶	%۷۰	%۵۴	%۹۰	%۹۰
۵	اسپری در خط (۴ نازل سرعت تند)	%۲۸	%۸۸	%۹۶	%۶۰	%۹۰	%۹۰
۶	کابینت اسپری	%۱۶	%۷۰	%۸۶	%۶۸	%۱۰۰	%۱۰۰

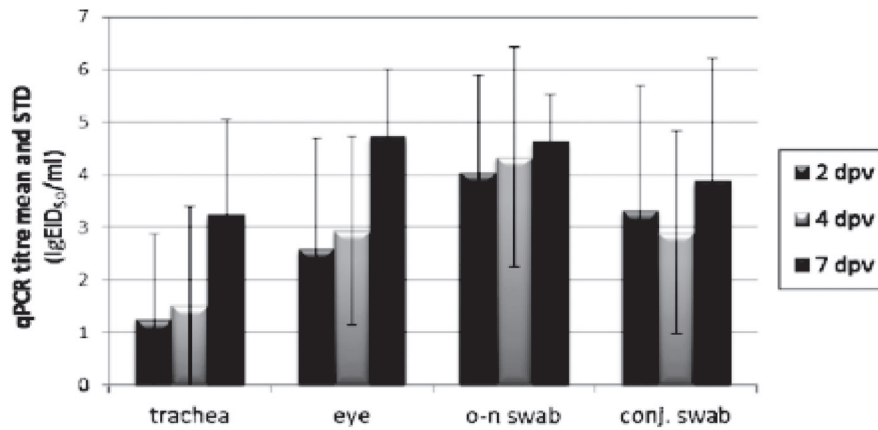
گروه	روش	۲ روز پس از واکسیناسیون		۴ روز پس از واکسیناسیون		۷ روز پس از واکسیناسیون	
		سواب دهان و بینی	سواب منحلحه	سواب بینی	سواب منحلحه	سواب دهان و بینی	سواب ملتحمه
۳	اسپری در خط (۴ نازل سرعت پائین)	%۹۰	%۹۰	%۹۰	%۹۰	%۱۰۰	%۸۰

جدول ۲: درصد پرنده‌های مثبت پس از واکسیناسیون در مطالعه دوم

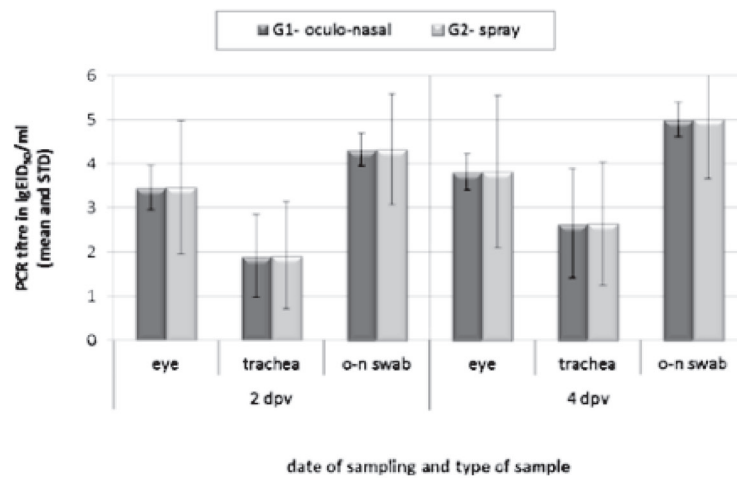
گروه	روش	۲ روز پس از واکسیناسیون			۴ روز پس از واکسیناسیون		
		نای	چشم	سواب دهان	نای	چشم	سواب دهان
۱	چشمی - بینی	%۸۷	%۹۰	%۹۷	%۸۳	%۸۷	%۹۷
۲	اسپری	%۹۰	%۱۰۰	%۱۰۰	%۹۰	%۱۰۰	%۱۰۰



شکل ۱: میزان RNA ویروسی در نمونه‌های نای و چشم پس از استفاده از واکسن H120 در جوجه‌های گوشتی (مطالعه اول) - dpv: روز پس از واکسیناسیون



شکل ۲: مقایسه میزان حضور RNA ویروس برونشیت عفونی (سویه H120) در نمونه‌های مختلف جمع‌آوری شده از همان گله گوشتی (مطالعه ۱ گروه ۳).
o-n swab: سوآپ بینی-دهانی



شکل ۳: مقایسه میزان حضور RNA ویروس برونشیت عفونی (سویه B48) در نمونه‌های مختلف جمع‌آوری شده از گله تخمگذار (مطالعه دوم)

منابع

1. Callison, S.A., Hilt, D.A., Boyton, T.O., Sample, B.F., Robison, R., and Swayne, D.E. 2006. Development and evaluation of a real-time Taqman RT-PCR assay for the detection of infectious bronchitis virus from infected chickens. *Journal of Virological Methods*. 138: 60-65.
2. Jackwood, W. M. and de Wit, S. 2013. Infectious bronchitis. In D.E. Swayne, J. R. Glisson, L. R. McDougald, L. K. Nolan, D. S. Suarez and V. Nair (Eds.) *Diseases of Poultry* 13th ed. (139-159). Wiley-Blackwell Publication.

محافظت وسیع‌الطیف به‌دست آمده با استفاده از واکسیناسیون ترکیبی علیه سویه‌های واریانت ویروس برونشیت عفونی

Timea Tatar-kis¹, Edit Walkone Kovacs¹, Balazs Felfold¹, Zolon Homonnay¹, Tamas Mato¹, Pal Soos¹,
Anne Kollar¹, Zoltan penes¹, Yannick Gardin², Vilmos Playa¹

¹CEVA Animal Health BUDAPEST, Hungary

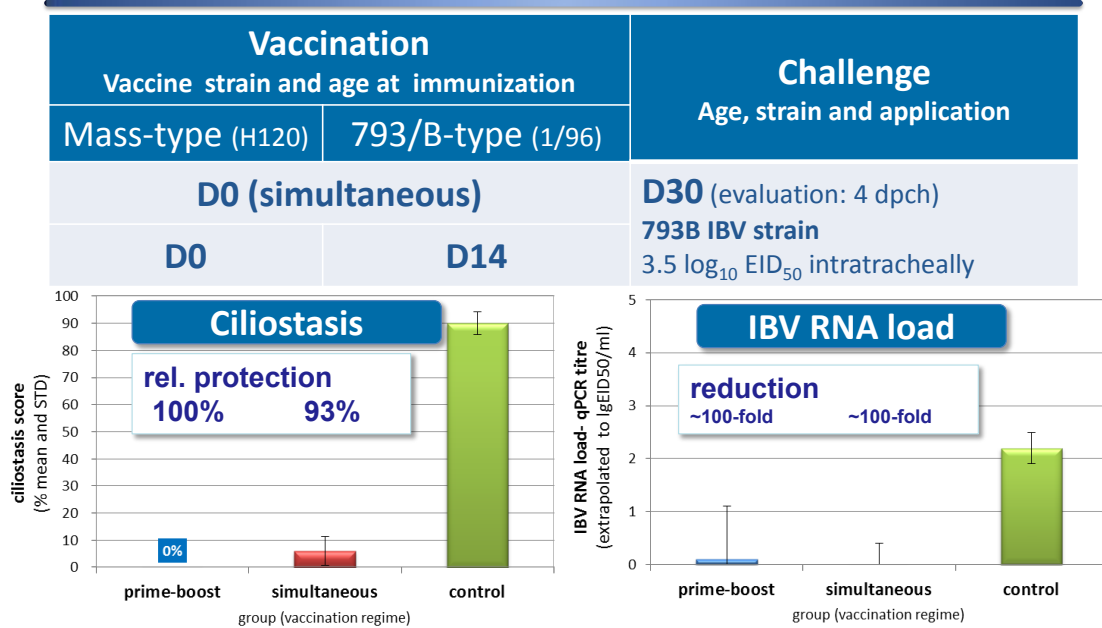
²CEVA Animal Health Libourne, France

روش مطالعات:

- ✓ مطالعات ارزیابی محافظت بر پایه روش‌های استاندارد صورت گرفته که در آن پرندگان مورد استفاده جوجه‌های یک‌روزه نژاد تخمگذار بوده و روش استفاده واکسن‌ها به شکل قطره داخل چشمی و داخل بینی بود.
- ✓ واکسن‌های گروه ماساچوست و واریانت 793/B به‌صورت همزمان در یک‌روزگی یا در قالب مصرف در یک‌روزگی و ۱۱ روزگی مورد استفاده قرار گرفتند.
- ✓ چالش ۲۱ روز پس از واکسیناسیون صورت گرفت.
- ✓ ارزیابی عملکرد و تأثیرگذاری واکسن ۴-۵ روز پس از چالش بررسی گردید.
- ✓ اندازه‌گیری تیترو ویروس برونشیت عفونی در نای با استفاده از روش توصیف شده قبلی صورت گرفت (Cslison et al 2006, I.Virol 138:60-65)
- ✓ تست توقف تحرک مژکی (Ciliostasis) با محاسبه نمره تحرک مژکی هر قطعه نای و تجمع آن برای هر پرنده و کل پرندگان صورت گرفت و محافظت نسبی در پرندگان با استفاده از فرمول زیر به‌دست آمد که به شکل درصد بیان می‌گردد.

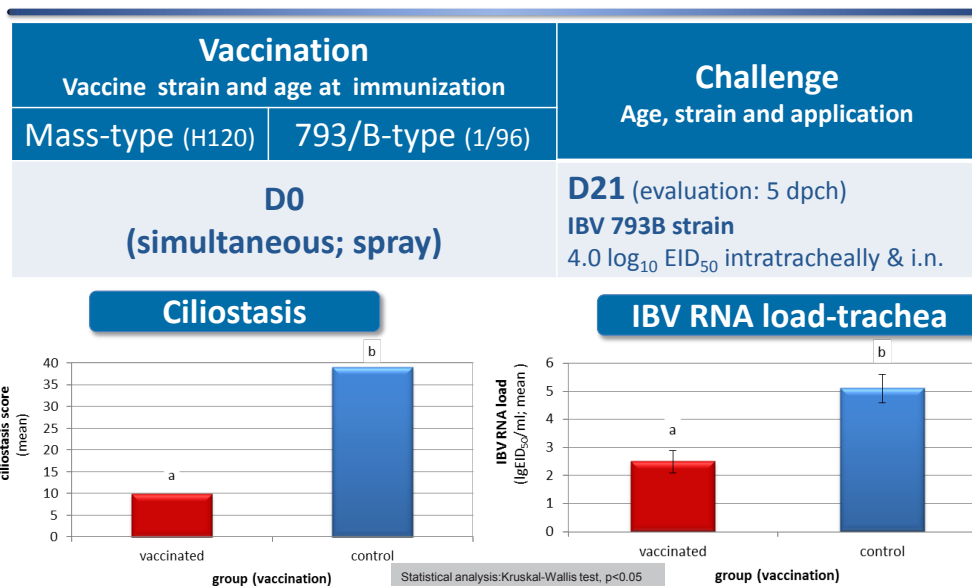
$$100 * \left(1 - \frac{\text{میانگین نمره سیلیواستاز برای گروه‌های واکسینه چالش یافته}}{\text{میانگین سیلیواستاز برای گروه چالش یافته و واکسن نخورده}} \right) = \text{محافظت نسبی}$$

Efficacy in SPF (793B) Simultaneous vs. Prime-boost



تصویر شماره ۱: مقایسه استفاده همزمان یا جداگانه (یکروزگی و ۱۱ روزگی) واکسن‌های H120 و 1/96 در جوجه‌های SPF علیه چالش با ویروس وحشی 793/B از لحاظ میزان محافظت تست توقف تحرک مژکی و تیترو ویروس موجود در نای. محافظت قابل مقایسه علیه سیلیواستاز و کاهش تیترو RNA ویروسی (در گروه واکسینه شده ویروس برونشیت عفونی جداسازی نشد). محافظت ۱۰۰٪ و ۹۳٪ به ترتیب در مصرف جداگانه (آبی) و همزمان (قرمز) این دو واکسن در مقایسه با گروه کنترل (سبز) دیده شد.

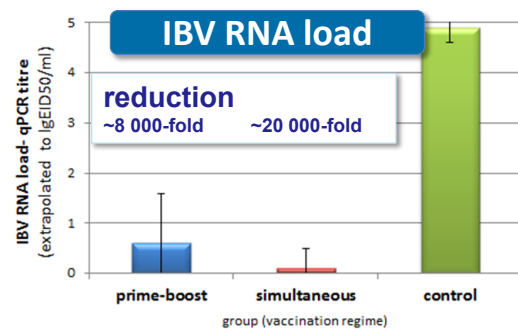
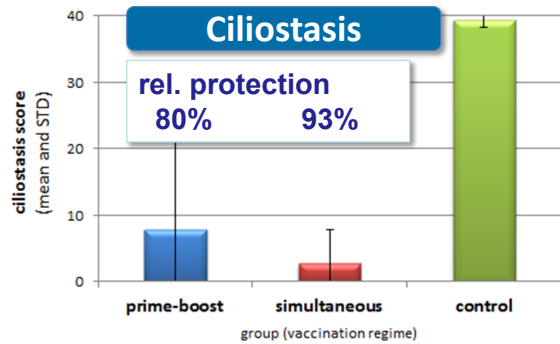
Protection against 793B challenge-broiler



تصویر شماره ۲: ارزیابی میزان توقف تحرک مژکی و میزان تیترو ویروس نای در مصرف همزمان واکسن‌های H120 و 1/96 در جوجه‌های گوشتی تجاری علیه چالش با ویروس وحشی 793/B. محافظت قابل توجه در بررسی تست تحرک مژکی و نیز کاهش میزان ویروس عفونی در نای گروه واکسینه (قرمز) در مقایسه با گروه کنترل (آبی).

Efficacy in SPF (QX) Simultaneous vs. Prime-boost

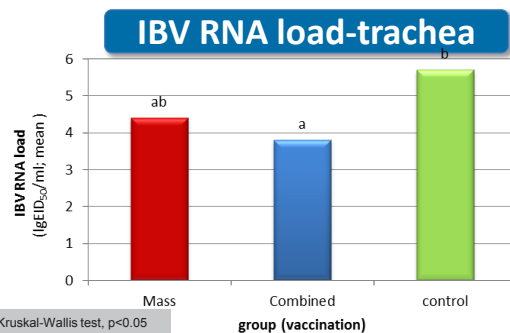
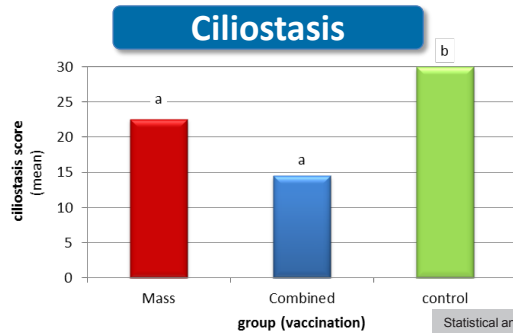
Vaccination		Challenge
Vaccine strain and age at immunization		
Mass-type (H120)	793/B-type (1/96)	D27 (evaluation: 4 dpch) D535/7 FR IBV QX-like strain 3.5 log ₁₀ EID ₅₀ intratracheally
D0 (simultaneous)		
D0	D14	



تصویر شماره ۳: مقایسه استفاده همزمان (قرمز) یا جداگانه (یکروزگی و ۱۱ روزگی) واکسن‌های H120 و 1/96 (آبی) در جوجه‌های SPF علیه چالش با ویروس QX و ارزیابی میزان محافظت ایجاد شده در تست توقف تحرک مژکی و میزان تیترو ویروس در نای که کاهش قابل توجه تیترو ویروس در نای و نیز محافظت قابل قبول را به همراه دارد. محافظت نسبی ۸۰ و ۹۳ درصدی به ترتیب در مصرف جداگانه و همزمان واکسن‌های مذکور دیده می‌شود.

Protection against QX challenge-broiler

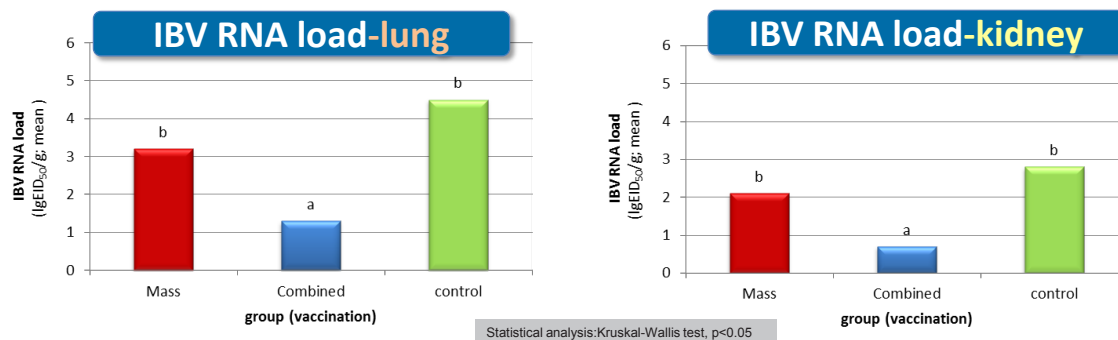
Vaccination		Challenge
Vaccine strain and age at immunization		
Mass-type (B48)	793/B-type (1/96)	D21 (evaluation: 5 dpch) D1866/3/3/12/CN QX-like IBV strain 4.0 log ₁₀ EID ₅₀ intratracheally
D0 (simultaneous; spray)		



تصویر شماره ۴: ارزیابی میزان توقف تحرک مژکی و میزان تیترو ویروس نای در مصرف ترکی واکسن B48 (قرمز) و ترکیب واکسن‌های B48 و 1/96 (آبی) در جوجه‌های گوشتی تجاری علیه چالش با ویروس وحشی QX و مقایسه آن با گروه کنترل (سبز). محافظت معنی‌دار و کاهش RNA ویروس عفونی در نای مشاهده می‌گردد.

Protection against QX challenge-broiler

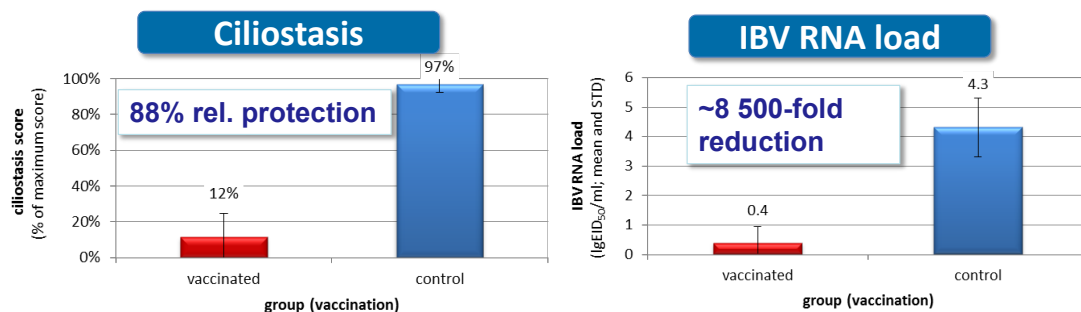
Vaccination		Challenge
Vaccine strain and age at immunization		
Mass-type (B48)	793/B-type (1/96)	Age, strain and application
D0 (simultaneous; spray)		
		D21 (evaluation: 5 dpch) D1866/3/3/12/CN QX-like IBV strain 4.0 log ₁₀ EID ₅₀ intratracheally



تصویر شماره ۵: ارزیابی میزان تیترو ویروسی در کلیه و ریه در مصرف مصرف تکلی واکسن B48 (قرمز) و ترکیب واکسن های B48 و 1/96 (آبی) در جوجه های گوشتی تجاری علیه چالش با ویروس وحشی QX در مقایسه با گروه کنترل (سبز). کاهش قابل توجه تیترو ویروس در کلیه و ریه دیده می شود.

Protection against Var2 challenge-SPF

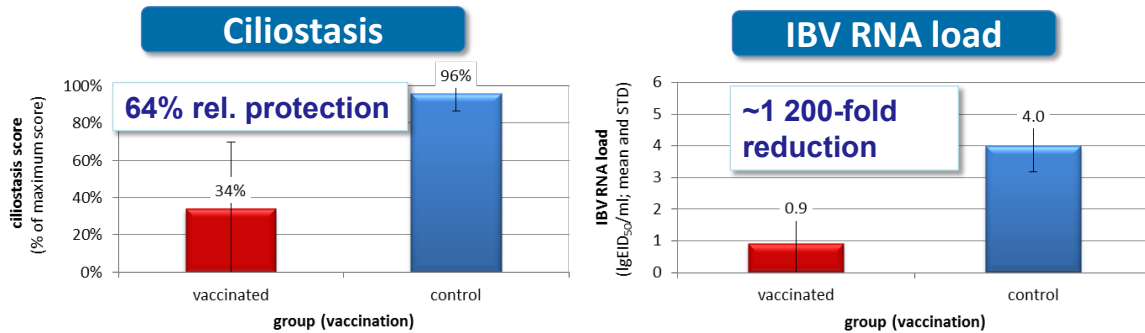
Vaccination		Challenge
Vaccine strain and age at immunization		
Mass-type (B48)	793/B-type (1/96)	Age, strain and application
D0 (simultaneous)		
		D23 (evaluation: 5 dpch) D1344/2/4/10 EG IBV Var2-like strain 5.3 log ₁₀ EID ₅₀ intratracheally



تصویر شماره ۶: ارزیابی میزان محافظت بدست آمده در پرندگان SPF در تست توقف تحرک مژگی از مصرف همزمان دو واکسن B48 و 1/96 و میزان تیترو ویروسی در نای گروه واکسینه (قرمز) و کنترل (آبی) در برابر چالش با واریانت ۲. محافظت ۸۸ درصد در برابر سیلیواستاز و کاهش قابل توجه تیترو ویروس در نای دیده می شود.

Protection against D1456 challenge-SPF

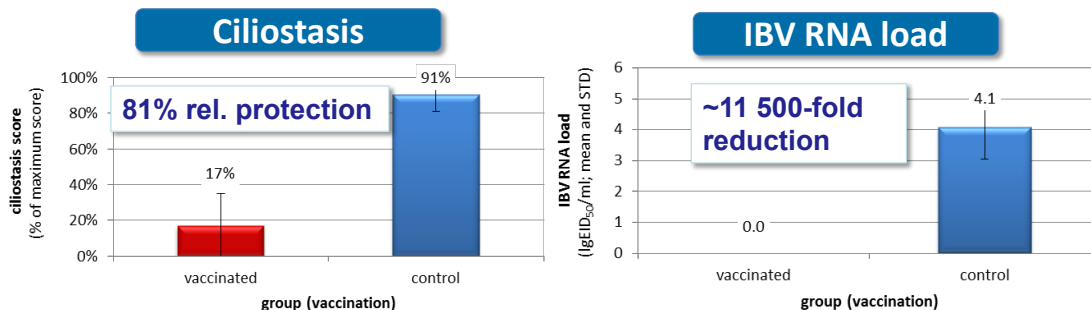
Vaccination		Challenge
Vaccine strain and age at immunization		
Mass-type (B48)	793/B-type (1/96)	Age, strain and application
D0 (simultaneous)		
		D23 (evaluation: 5 dpch) D1456/1/5/10 EG IBV variant strain 5.3 log ₁₀ EID ₅₀ intratracheally



تصویر شماره ۷: ارزیابی میزان محافظت بدست آمده در پرندگان SPF در تست توقف تحرک مژگی از مصرف همزمان دو واکسن B48 و 1/96 و میزان تیترو ویروسی در نای گروه واکسینه (قرمز) و کنترل (آبی) در برابر چالش با ویروس D1456. تاثیر معنی دار واکسیناسیون رویت می شود با این حال در چالش با D1456 در مقایسه با چالش واریانت ۲، محافظت کمتری دیده شد.

Protection against Q1(J2) challenge-SPF

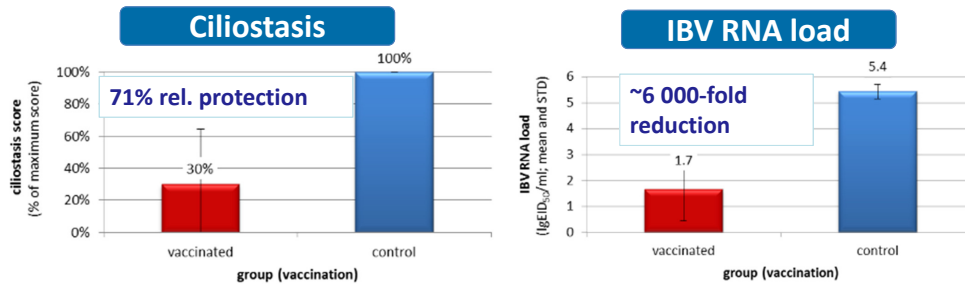
Vaccination		Challenge
Vaccine strain and age at immunization		
Mass-type (H120)	793/B-type (1/96)	Age, strain and application
D0 (prime)	D11 (boost)	
		D27 (evaluation: 5 dpch) D1344/2/2/10 EG IBV variant strain 5.3 log ₁₀ EID ₅₀ intratracheally+i.o.



تصویر شماره ۸: بررسی میزان محافظت و تیترو ویروس چالش در نای پرندگان SPF کنترل و واکسینه دریافت کننده واکسن های H120 و 1/96 به ترتیب در یک و ۱۱ روزگی علیه چالش با سویه Q1. میزان محافظت در برابر سیلیواستاز ۸۱ درصد بوده و کاهش قابل توجه تیترو ویروس در گروه واکسینه (قرمز) در مقایسه با گروه کنترل (آبی) دیده می شود.

Protection against GA08 challenge

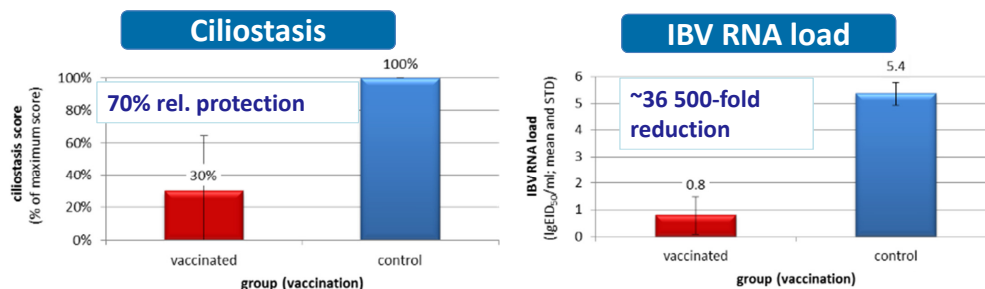
Vaccination		Challenge
Vaccine strain and age at immunization		
Mass-type (B48)	793/B-type (1/96)	Age, strain and application
D0 (simultaneous)		
		D24 (evaluation: 5 dpch) D2342/1/2/US GA 08-8225 IBV strain 4.3 log ₁₀ EID ₅₀ intratracheally



تصویر شماره ۹: ارزیابی میزان محافظت بدست آمده در پرندگان SPF در تست توقف تحرک مژگی از مصرف همزمان دو واکسن B48 و 1/96 و میزان تیترو ویروسی در نای دو گروه واکسینه (قرمز) و کنترل (آبی) در برابر چالش با ویروس GA08. محافظت نسبی ۷۱ درصد در گروه واکسینه دیده می شود.

Protection against Ark challenge

Vaccination		Challenge
Vaccine strain and age at immunization		
Mass-type (B48)	793/B-type (1/96)	Age, strain and application
D0 (simultaneous)		
		D24 (evaluation: 5 dpch) D2342/1/6/US variant IBV strain 4.3 log ₁₀ EID ₅₀ intratracheally



تصویر شماره ۱۰: ارزیابی میزان محافظت بدست آمده در پرندگان SPF در تست توقف تحرک مژگی از مصرف همزمان دو واکسن B48 و 1/96 و میزان تیترو ویروسی در نای دو گروه واکسینه (قرمز) و کنترل (آبی) در برابر چالش با ویروس Ark. محافظت ۷۰ درصدی در پرندگان واکسینه در مقایسه با گروه کنترل دیده شد.

اثر بخشی واکسن و سویه چالش داده شده			واکسیناسیون		
کاهش تیترا RNA ویروس برونشیت عفونی	محافظة نسبی	سویه چالشی (گروه ژنتیکی)	نوع برنامه	سویه واکسن	
60,000X	4.8 log	93%	QX	مصرف همزمان واکسن در یک‌روزگی	H120-1/96
8,500X	3.9 log	88%	واریانت ۲	مصرف همزمان واکسن در یک‌روزگی	B48-1/96
1,200X	3.1 log	64%	D1456 خاورمیانه- ای	مصرف همزمان واکسن در یک‌روزگی	B48-1/96
11,500X	4.1 log	81%	J2/Q1	واکسن H120 در یک‌روزگی و واکسن 1/96 در ۱۱ روزگی	H120-1/96
6,000X	3.8 log	71%	GA08	مصرف همزمان واکسن در یک‌روزگی	B48-1/96
36,500X	4.6 log	70%	Ark	مصرف همزمان واکسن در یک‌روزگی	B48-1/96

نتیجه‌گیری:

- با توجه به نتایج حاصل از مطالعات می‌توان چنین نتیجه گرفت که واکسن‌های گروه ماساچوست و Cevac IBird توانایی ایجاد محافظت را در پرندگان داشته و محافظت ایجاد شده ۲۱ روز پس از دریافت واکسن قابل قبول می‌باشد.
- ترکیب استفاده این دو واکسن در یک‌روزگی توانایی ایجاد محافظت قابل قبول در آزمایش توقف تحرک مژگی را نشان می‌دهد.
- به هنگام استفاده از هر دو واکسن گروه ماساچوست و 793/B طیف گسترده‌ای از محافظت علیه سویه‌های مختلف ویروس برونشیت عفونی (همچون Q1/J2, Qx, Br1, Ga8, Ark, Var2-IS1494 group, Var2-IS885 group) ایجاد می‌شود.
- استفاده از واکسن Cevac IBird امکان استفاده از روش PCR برای تفریق درگیری‌های بالینی به بیماری برونشیت عفونی را از سویه واکسینال مقدور می‌سازد در حالی که این امکان برای سایر واکسن‌ها وجود ندارد چراکه اکثر سویه‌های واکسینال شکل وحشی فیلدی نیز دارند ولی سویه 1/96 فرم وحشی فیلدی ندارد.
- بررسی مداوم استفاده از واکسن Cevac IBird مشخص کرده است که این واکسن توانایی منحصر به فردی در کاهش تیترا ویروس عفونی دفعی از پرنده داشته که این مهم خود سبب کاهش گسترش فرد به فرد ویروس عفونی در گله می‌گردد.

**استفاده از واکسن Cevac IBird امکان کنترل بیماری برونشیت عفونی را
از یک‌روزگی در جوجه‌کشی مقدور می‌سازد.**



ڪاتالوگ واکسن
Cevac IBird

Cevac

IBird®



HEALTHY
CHICKENS

کنترل برونشیت عفونی از یکروزگی



واکسن زنده تخفیف حدت یافته برونشیت عفونی
سویه واریانت 1/96 متعلق به سروتیپ 793/B

شرکت سواپارس
تلفکس: ۸۸۴۵۰۴۶
۸۸۴۶۶۷۶
www.savapars.com



Cevac
IBird®

برونشیت عفونی



برونشیت عفونی توسط کروناویروس پرندگان رخ می‌دهد.

این ویروس به شدت مسری بوده و در سرتاسر دنیا گسترش دارد. ویروس توانایی تکثیر در مسیر تنفسی، کلیه‌ها و دستگاه تناسلی ماکیان را دارد. این ویروس سبب خسارات شدید اقتصادی در جوجه‌های گوشتی یا مرغان تخم‌گذار می‌گردد. ویژگی خاص ویروس، توانایی ذاتی آن در بروز جهش در ژنوم خود می‌باشد. بنابراین واریانت‌های آنتی‌ژنیک متعددی از این ویروس ایجاد شده و با ویژگی‌های پاتوتیپی و ایمنوتیپی مختلفی در حال گردش در مزارع می‌باشند.

واکسن‌های برونشیت عفونی

واکسن‌های زنده و یا کشته تک‌گانه یا چندگانه متعددی علیه بیماری برونشیت عفونی در سرتاسر دنیا وجود دارد. برنامه‌های واکسیناسیون عمدتاً برپایه استفاده از واکسن‌های زنده تخفیف حدت یافته سروتیپ ماساچوست به روش اسپری، قطره چشمی و یا آشامیدنی می‌باشد. براساس موقعیت اپیدمیولوژیکی، تلفیق این سویه‌ها با یک سویه واریانت و استفاده همزمان آن‌ها در هچری و یا به عنوان تکرار واکسن در مزرعه معمول می‌باشد. از آنجایی که واریانت‌های جدید به طور متداول در فارم ظهور پیدا می‌کنند، بنابراین برنامه‌های واکسیناسیون باید براساس میزان محافظت در برابر مواجهه با ویروس منطبق گردد.

واکسن Cevac IBird®

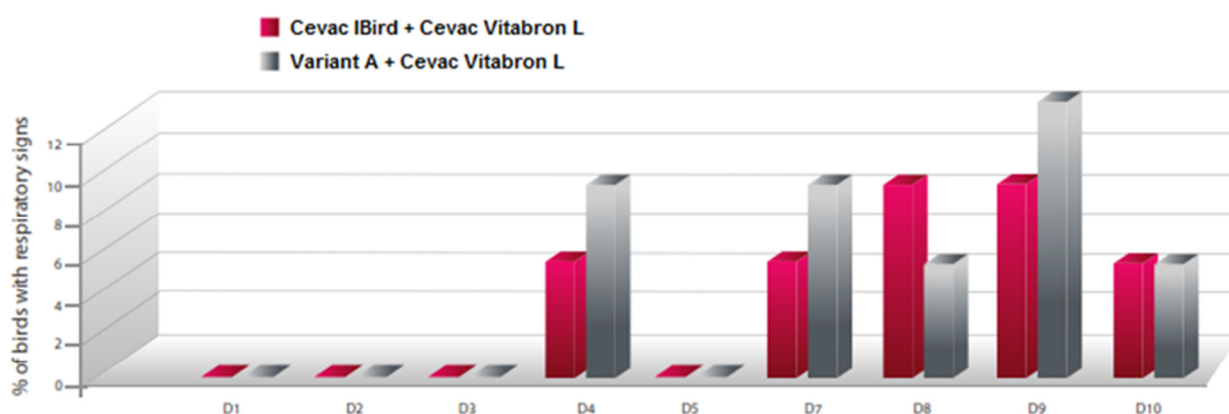


✓ Cevac IBird واکسن زنده تخفیف حدت یافته (سویه ۱/۹۶) متعلق به گروه 793/B

✓ Cevac IBird واکسن لیوفیلیزه در ویال‌های ۲۵۰۰ و ۵۰۰۰ دوزی

میزان بی خطری واکسن (Safety)

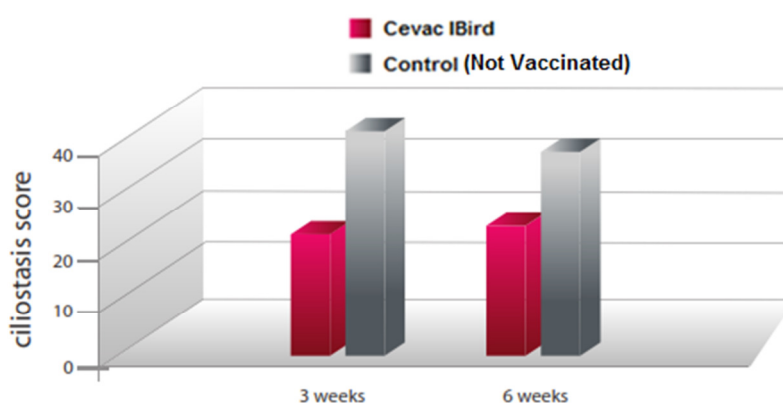
در یک بررسی فارمی در جوجه‌های گوشتی واکسینه شده به روش اسپری قطرات درشت در هچری توسط واکسن‌های Cevac IBird به همراه واکسن Cevac Vitabron L در مقایسه با گروه کنترل دریافت‌کننده یک واکسن زنده برونشیت واریانت (Variant A) به همراه واکسن Cevac Vitabron L، مورد ارزیابی قرار گرفته که نتایج آن در ذیل نشان داده شده است.



مقایسه میزان علائم تنفسی بعد از واکسیناسیون

شروع و طول مدت زمان ایمنی (Onset and duration of immunity)

در مطالعه‌ای چالش توسط ویروس حاد 793/B بر روی جوجه‌های گوشتی در سن ۳ الی ۶ هفتگی صورت گرفت. این جوجه‌ها واکسن Cevac IBird را در سن یک‌روزگی به صورت اسپری دریافت کرده بودند.



میزان عدم تحرک مژک‌های دستگاه تنفس پس از چالش توسط ویروس 793/B

استفاده از این واکسن در سن یک‌روزگی جوجه‌های گوشتی نشان‌دهنده شروع ایمنی علیه چالش با ویروس 793/B در سن ۳ هفتگی بوده و آخرین سنی که چالش در آن صورت گرفته است، ۶ هفتگی می‌باشد که نتایج همچنان نشان‌دهنده وجود ایمنی علیه این ویروس می‌باشد.

اثربخشی (Efficacy)

واکسن IBird Cevac در مطالعات چالشی متعددی به منظور ارزیابی اثربخشی آن و ایجاد محافظت علیه سروتیپ‌های مختلف به صورت تنها و یا به همراه واکسن‌هایی از سروتیپ ماساچوست مورد استفاده قرار گرفته است.

برنامه واکسیناسیون: IBird + Mass	
سویه چالش	محافظت
793 B	دارد
Mass	دارد
QX	دارد
Q1	دارد
J-2	دارد

QX: جدا شده از آسیا یا اروپا Q1: جدا شده از آمریکای لاتین J-2: جدا شده از خاورمیانه

- ✓ **Cevac IBird** محافظت بسیار قوی علیه ویروس سویه 793/B ایجاد می‌کند.
- ✓ **Cevac IBird** به همراه واکسن سویه ماساچوست توانایی ایجاد یک ایمنی وسیع‌تری علیه سویه‌های ویروس برونشیت عفونی QX، Q1 یا J-2 جدا شده از بخش‌های مختلف دنیا را دارد.



گروه ها	محافظت علیه برونشیت عفونی (چالش در ۳ هفتگی)		تیترا گامبورو با تست VN		
	چالش با Mass	چالش با 793B	روز ۱	روز ۲۰	روز ۳۰
	درصد محافظت (۶ روز بعد چالش)		تیترا مادری 13.9	9.6	12.5
Cevac Transmune Cevac IBird + Mass	%75	%75		بسیار ناچیز	بسیار ناچیز
کنترل	%0	%0			

در بررسی فوق، واکسن Cevac Transmune به صورت تزریق داخل تخم مرغی و سپس اسپری واکسن Cevac IBird به همراه واکسن زنده سروتیپ ماساچوست در سن یکروزگی بر روی جوجه های گوشتی صورت گرفته و نشان دهنده دریافت کامل واکسن گامبورو و محافظت عالی علیه چالش با سویه های ماساچوست و 793/B بود.

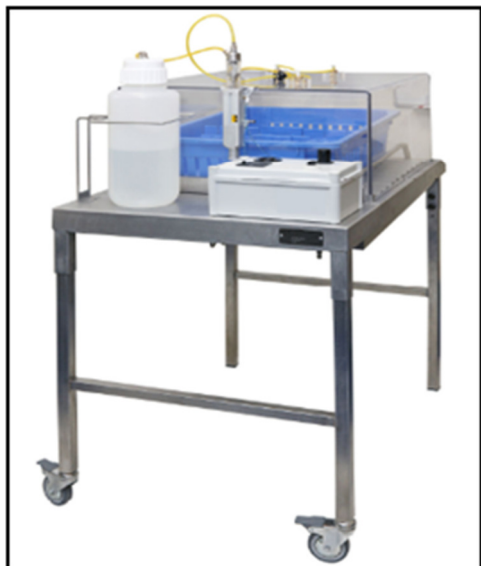
برنامه های واکسیناسیون

در صورت احتمال چالش با سویه های Q1 ، QX ، 793B ، Mass و یا J-2	
برنامه واکسیناسیون	یکروزگی: اسپری با قطرات درشت
	سویه ماساچوست + Cevac IBird

در پولت های مادر و تخمگذار، تکرار مجدد واکسیناسیون با سویه های ماساچوست و Cevac IBird در طول دوره پرورش نیاز می باشد

واکسن Cevac IBird را می‌توان در جوجه‌کشی به صورت اسپری با قطرات درشت استفاده کرد. تجهیزات مخصوص Desvac به طور اختصاصی جهت استفاده از واکسن Cevac IBird در جوجه‌کشی طراحی شده‌اند.

Desvac Hatch spray



Desvac In-Line Spray



کنترل برونشیت عفونی از جوجه کشی



References

1. Cavanagh D and Naqui S,A. Infectious Bronchitis. IN saif YM editor. Disease of poultry 11th edition IA:Iowa State Press;2003. P. 63-87.
2. Cook, J.K;A., Jackwood M. And Jones R.C.. The long view : 40 years of infectious bronchitis research. Avian Pathology june 2012, 41(3), 239-250.
3. De Witt J.J., Cook J. K. A. and Van der Heijden Harold M. J. F. Infectious bronchitis virus variants:a review of the history, current situation and control measures. Avian Pathology june 2011, 40 (3), 223-235.
4. T Tatar-Kis,Walkone Kovacs E., Felfoldi A., Nagy Z, Kiss I, Mato T, Palya V. Portection achieved by a vaccination programme comprising Mass and 793 B type vaccines against recent variant IBV strains circulating in the Middle East.VII Symposium on avian corona-& pneumovirus. Rauischholzhausen, Germany, june 2012, 194-203.
5. TJ Herczeg, M Papp, L Makranszki, K Varga, Z Penzes. Evaluation the compatibility efficacy of variant infectious bronchitis live vaccine with conventional bronchitis and immune complex IBD vaccine in broilers. XXIV World's poultry congress Bahia 2012.

ویژگی‌های واکسن Cevac IBird به طور مختصر:

این واکسن حاوی ویروس زنده برونشیت عفونی، سویه ۱/۹۶ می باشد. مصرف آن به جهت ایمن کردن جوجه‌های گوشتی و مرغان تخم‌گذار با هدف به حداقل رساندن ضایعات ناشی از ویروس وحشی فارم به سیستم مژکی نای و بروز علائم تنفسی می‌باشد. در صورت استفاده از یک واکسن، ایمنی قابل سنجش، سه هفته پس از واکسن امکان‌پذیر بوده و مدت زمان بقاء ایمنی، ۶ هفته پس از دریافت واکسن می‌باشد. مصرف در نیمچه‌های گوشتی: یک دوز از واکسن باید در سن یک‌روزگی به صورت اسپری با قطرات درشت به پرندۀ رسانیده شود. می‌توان در سن بالاتر نیز پرندگان را با ذرات درشت اسپری کرد. در پرندگان مادر و تخمگذار نیز تکرار مجدد واکسیناسیون در طول دوره پرورش نیاز می‌باشد. احتیاطات لازم: هرگز پرندگان بیمار را واکسینه نکنید.

