شناسایی تیپ ٤/٩١ ویروس برونشیت عفونی در جوجه‌های گوشتی استان چهارمحال و بختیاری

مجید غلامی آهنگران[1*]، عبدالحمید شوشتری[2]، عباس دوستی[3]، عزت اله فتحی هفشجانی[1]، نوشا ضیاء جهرمی[3]

۱. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، دانشکده دامپزشکی، بخش بیماری‌های طیور، شهرکرد، ایران
۲. موسسه واکسن و سرم سازی رازی، بخش بیماری‌های طیور، کرج، ایران
۳. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، دانشکده علوم پایه، گروه میکروب شناسی، شهرکرد، ایران
** نویسنده مسئول مکاتبات: mgholamia@yahoo.com*

(دریافت مقاله: ۹۰/۱۰/۳۰، پذیرش نهایی: ۹۱/۹/۱)

چکیده

بیماری برونشیت عفونی یک بیماری ویروسی واگیردار تنفسی است که عامل بیماری واجد سروتیپ‌های متعددی است. در این بررسی به شناسایی تیپ ٤/٩١ (793/B) برونشیت عفونی در استان چهارمحال و بختیاری پرداخته شده است. به این منظور از ١٨ گله جوجه گوشتی واجد سندرم تنفسی مشکوک به برونشیت عفونی با تلفات بیش از یک درصد در روز نمونه نای اخذ شد. پس از استخراج RNA از نمونه‌های بافتی نای، در واکنش RT-PCR یک مرحله‌ای قطعه‌ای از ژن S1 ویروس برونشیت عفونی تکثیر شد و محصول RT-PCR با پرایمرهای اختصاصی تیپ٤/٩١ به روش Nested-PCR تکثیر شد. نتایج نشان داد از ١٨ گله مبتلا به مشکلات تنفسی ١١ گله یا به‌عبارتی ٦١/١١٪ آلوده به ویروس برونشیت عفونی بودند که در گله‌های مبتلا به برونشیت عفونی، ٤٥/٤٥٪ آلودگی با تیپ ٤/٩١ را نشان دادند. لذا به نظر می‌رسد تیپ ٤/٩١ برونشیت عفونی در شکل‌گیری و پیچیده سازی علایم تنفسی در جوجه‌های گوشتی مبتلا به سندرم تنفسی در استان چهارمحال و بختیاری نقش داشته باشد و لازم است سیاست‌های کنترلی مناسب در جهت پیشگیری از آلودگی با تیپ ٤/٩١ برونشیت عفونی اتخاذ گردد.

مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، ١٣٩١، دوره ٦، شماره ٢، پیاپی ٢٢، صفحات: ١٥٤٧-١٥٤٣.
کلید واژه‌ها: جوجه گوشتی، برونشیت عفونی، ٤/٩١ (793/B ، PCR)، استان چهارمحال و بختیاری

مقدمه

بیماری برونشیت عفونی ماکیان یک بیماری ویروسی تنفسی است که از تمام کشورها گزارش شده است. این بیماری از لحاظ اقتصادی به دلیل هزینه‌های مرتبط با رخداد تلفات، دارو درمانی و حذف لاشه در کشتارگاه واجد اهمیت است. ویروس عامل بیماری از خانوادهٔ کروناویریده و متعلق به گروه ٣ کروناویروس‌ها می‌باشد. این ویروس دارای ٣ پروتئین اصلی شامل گلیکوپروتئین‌های خاری (S)، غشایی (M) و پروتئین داخلی نوکلئوکپسید می‌باشد. پروتئین S دارای دو تحت واحد S_1 و S_2 است. گلیکوپپتیدهای S_1 مسئول القای آنتی بادی‌های ممانعت کننده از هماگلوتیناسیون و آنتی بادی‌های خنثی کننده ویروس و تنوع سروتیپی می‌باشند و تنها تغییر چند اسید آمینه در قسمت S_1 ویروس می‌تواند منجر به ایجاد یک سروتیپ جدید شود (٨). از آنجایی که ویروس عامل برونشیت عفونی شدیداً مستعد تغییرات آنتی ژنی و ژنتیکی می‌باشد و از طرفی

Archive of SID
www.SID.ir

ایمنی علیه هر سروتیپ کاملاً اختصاصی است و درجهٔ حفاظت متقابل بین سویه‌ها با افزایش تفاوت توالی S1 کاهش پیدا می‌کند (٨ و٢) بنابراین شناسایی و بررسی دوره‌ای سروتیپ‌های موجود در منطقه در جهت استفاده از واکسن‌های حاوی سروتیپ‌های موجود در منطقه یک گام مهم در راستای پیشگیری از این بیماری می‌باشد.

هدف از این بررسی، شناسایی مولکولی ویروس‌های برونشیت عفونی در استان چهارمحال و بختیاری است تا با تعیین تیپ جدایه‌های ویروس برونشیت عفونی یک راهبرد مناسب واکسیناسیون هم تراز با سروتیپ‌های موجود در استان اتخاذ شود.

مواد و روش‌ها

نمونه گیری

در این بررسی از ١٨ گله جوجه گوشتی مبتلا به سندرم تنفسی از نقاط مختلف استان چهارمحال و بختیاری، با اخذ تاریخچه، نمونه بافتی نای تهیه شد. گله‌های واجد سندرم تنفسی دارای علایمی همچون عطسه، سرفه، رالهای تنفسی و آبریزش از چشم و بینی به همراه انسداد مجاری تنفسی و تورم سینوس‌ها بودند. تمام گله‌های نمونه‌گیری شده واجد تلفات بالای یک درصد در روز و فاقد برنامه واکسیناسیون علیه سویه ٤/٩١ برونشیت عفونی بودند.

شناسایی ویروس ٤/٩١ برونشیت عفونی در گله‌های واجد علایم تنفسی بر اساس آزمون PCR بر روی نمونه‌های بافتی نای انجام شد. RNA ویروسی از نمونه نای با کیت تخلیص RNA(High Pure Viral Nucleic Acid Kit، ساخت شرکت Roche) استخراج شد.

واکنش RT-PCR با استفاده از سیستم RT-PCR یک مرحله‌ای TITAN (ساخت شرکت Roche) و پرایمرهای XCE2- (٥) و S1Uni2+ (٦) (جدول ١) انجام شد. پرایمرهای مذکور قطعاتی به‌طول ١٢٠٠ جفت بازی از ژن S1 که برای ویروس‌های برونشیت عفونی مشترک است، تکثیر می‌کنند.

واکنش RT-PCR با استفاده از بافر واکنش RT-PCR (همراه با کلرید منیزیم)١٠ میکرولیتر، محلول DTT ٢/٥ میکرولیتر، dNTP ها١ میکرولیتر، پرایمر جلو بر ٢ میکرولیتر، پرایمر عقب بر ٢ میکرولیتر، مخلوط آنزیمی١ میکرولیتر، RNA الگو٤ میکرولیتر، آب دوبار تقطیر استریل ٢٧/٥ میکرولیتر در حجم نهایی٥٠ میکرولیتر انجام شد.

واکنش RT-PCR به‌صورت انجام واکنش نسخه برداری معکوس RNA و سنتز cDNA در دمای ٤٥ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٤٥ دقیقه، واسرشت سازی اولیه cDNA در دمای ٩٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٢ دقیقه، واسرشت سازی cDNA در دمای ٩٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٣٠ ثانیه، همسرشت سازی در دمای ٤٨ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٢ دقیقه، گسترش در دمای ٦٨ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٢ دقیقه و گسترش نهایی در دمای ٦٨ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ١٠ دقیقه انجام شد. در این بررسی مرحله واسرشت سازی، همسرشت سازی و گسترش ٣٥ سیکل تکرار شد (٢).

در مرحله بعدی جهت شناسایی تیپ ٤/٩١ برونشیت عفونی از محصول PCR مرحله اول استفاده شد و با تکنیک PCR Nested(PCR آشیانه‌ای) قطعه اختصاصی تکثیر شد. بدین منظور از رقت یک دهم محصول RT-PCR در PCR آشیانه ای اختصاصی سروتیپ 4/91(793/B) استفاده شد. در واکنش PCR آشیانه‌ای از پرایمر عمومی XCE3- و پرایمر اختصاصی B1+ برای تیپ 4/91(793/B) استفاده شد و قطعه‌ای به طول ٩٧٥ جفت بازی تکثیر شد (٤) (جدول ١).

Archive of SID

جدول۱- اختصاصات پرایمرهای مورد استفاده در واکنش RT-PCR و PCR آشیانه‌ای

نوع واکنش	نام پرایمر	توالی	موقعیت در ژن S1	ویژگی	منبع
RT-PCR	S1Uni2+	5'CCCAATTTGAAAACTGAACA3'	۳۱-٤۷		(٦)
	XCE2-	5'CCTCTATAAACACCCTTGCA3'	۱۱۷۰-۱۱۹۳		(٤)
Nested-PCR	XCE3-	5'CAGATTGCTTACAACCACC3'	۱۰۹۳-۱۱۱۱		(٤)
	B1+	5'AAGTGCCTTTAGGCCTGG3'	۹۳-۱۱۰	4/91	(٤)

واکنش PCR آشیانه‌ای با استفاده از بافر (همراه با کلرید منیزیم) ۵ میکرولیتر،dNTP ها ۱ میکرولیتر، پرایمرها ٤ میکرولیتر، آنزیم Taq پلیمراز ۱ میکرولیتر، DNA الگو (محصول RT-PCR) ٤ میکرولیتر، آب دوبار تقطیر استریل ۳۷ میکرولیتر در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر انجام شد.

واکنش PCR آشیانه‌ای به‌صورت واسرشت سازی اولیه DNA در دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳ دقیقه، واسرشت سازی DNA در دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه، همسرشت سازی در دمای ٤۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲ دقیقه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۹۰ ثانیه و گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. مرحله واسرشت سازی، همسرشت سازی و گسترش ۳۵ سیکل تکرار شد.

در این بررسی از مارکر ۱۰۰ جفت بازی ساخت شرکت فرمنتاز (Fermentase) استفاده شد و محصول تکثیر شدهٔ نهایی به روش الکتروفورز در ژل آگارز ۱٪ رنگ شده با اتیدیوم بروماید، با تابش اشعه UV مشاهده و مورد آنالیز قرار گرفت.

در این بررسی از واکسن ٤/٩١ (Nobilis IB 4/91, Intervet International B.V.) به عنوان کنترل مثبت و آب مقطر استریل به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

یافته‌ها

شناسایی ویروس برونشیت عفونی

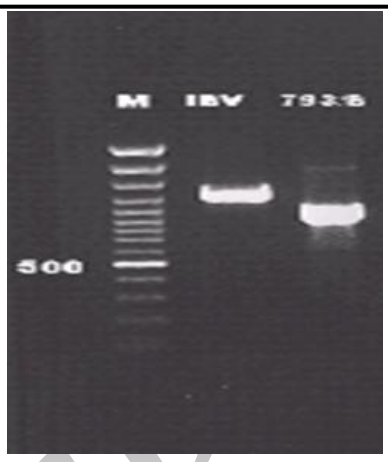
واکنش RT-PCR و PCR آشیانه‌ای

در واکنش RT-PCR با پرایمر عمومی برونشیت عفونی، قطعه‌ای از ژن S1 به طول ۱۲۰۰ جفت بازی مورد تکثیر قرار گرفت. از ۱۸ گله دارای علایم تنفسی مشکوک به برونشیت عفونی، نمونه‌های متعلق به ۱۱ گله مانند سویه‌های رفرانس (کنترل مثبت) قطعه ۱۲۰۰ جفت بازی تکثیر کردند (نگاره ۱). بنابراین از مجموع ۱۸ گله مورد بررسی، ۱۱ گله آلوده به ویروس برونشیت عفونی می‌باشد.

در واکنش PCR آشیانه‌ای، سویه رفرانس تیپ ٤/٩١ قطعه‌ای به طول ۹۷۵ جفت بازی تولید کرد (نگاره ۱). ۵ جدایه چهارمحال و بختیاری درPCR آشیانه‌ای، باند ۹۷۵ جفت بازی تولید کردند. بنابراین ۵ جدایه متعلق به تیپ ٤/٩١ می‌باشند.

Archive of SID

www.SID.ir



نگاره ١- الکتروفورز سویه‌های رفرانس
ستون ١: مارکر ١٠٠ جفت بازی
ستون٢: نمونه مثبت ویروس برونشیت عفونی با محصول ١٢٠٠ جفت بازی
ستون٣: سویه رفرانس ٤/٩١ با محصول ٩٧٥ جفت بازی

بحث و نتیجه‌گیری

استفاده از RT-PCR به همراه PCR آشیانه‌ای، یک ابزار تشخیصی برای ویروس برونشیت عفونی است که ضمن حساسیت بالاتر نسبت به جداسازی ویروس از طریق تخم مرغ جنین‌دار و شناسایی سریع ویروس برونشیت عفونی (١٢)، سروتیپ‌های مختلف این ویروس با روش PCR آشیانه‌ای قابل تفریق می‌باشد (١٠). از آنجایی‌که تحت واحد S1 ویروس برونشیت عفونی دارای اپی‌توپهای اختصاصی سروتیپ است (٨) لذا در این بررسی مبنای شناسایی ویروس در روش RT-PCR و PCR آشیانه‌ای، تکثیر قسمتی از ژن S1 ویروس برونشیت عفونی در نظر گرفته شد و با پرایمرهای اختصاصی تیپ، به شناسایی تیپ ٤/٩١ پرداخته شد. در بررسی اخیر، از ١١ سویه برونشیت عفونی در استان چهارمحال و بختیاری، ٥ جدایه متعلق به تیپ ٤/٩١ می‌باشد. با توجه به اینکه گله‌های مورد بررسی در طول دورهٔ پرورش از واکسن ٤/٩١ استفاده نکرده‌اند لذا این مطالعه نشان می‌دهد تیپ ٤/٩١ در استان چهارمحال و بختیاری وجود دارد.

بررسی وضعیت بیماری برونشیت عفونی در ایران به گزارش آقاخان و همکاران در سال ١٩٩٤ برمی‌گردد. بررسی جدایه‌های فیلدی توسط ایشان مؤید وجود سروتیپ ماساچوست به عنوان تنها سروتیپ ویروس برونشیت عفونی ایران بوده است (٥). وجود بیماری برونشیت در بسیاری از گله‌های ماکیان با مشکلات تنفسی علیرغم واکسیناسیون با سویه H120 این احتمال را تقویت کرد که ممکن است سروتیپ یا سروتیپ‌های دیگر این ویروس، باعث رخدادهای جدید این بیماری شده باشد. اما حضور سویه ٤/٩١ در ایران به گزارش وصفی مرندی و بزرگمهری فرد، در مورد یک واریانت جدید برونشیت عفونی در گله‌های طیور (١٤) ایران در سال ١٣٧٧ (١٩٩٨) برمی‌گردد که با بررسی‌های مولکولی و تعیین توالی مشخص شد این واریانت متعلق به تیپ٤/٩١ می‌باشد (١). علاوه براین، گزارشاتی از حضور تیپ ٤/٩١ در استان خوزستان (١٣)، فارس (١١) و اصفهان (٢) وجود دارد.

اگرچه چالش تجربی با این ویروس نشان دهنده بیماری‌زایی تیپ ٤/٩١ می‌باشد (٩) و این عامل ویروسی به عنوان یکی از عوامل تنفسی درگله‌های طیور مطرح است (١) اما در مطالعه اخیر بیماری‌زایی این ویروس در فارم‌های مورد بررسی مورد مطالعه قرار نگرفته است که نیاز به مطالعات تکمیلی دارد. به هرحال با آشکار شدن حضور تیپ ٤/٩١ در استان چهارمحال و بختیاری و گزارشات قبلی مبنی بر حضور یک واریانت برونشیت عفونی (١٤) و در مواردی اثبات حضور ویروس ٤/٩١ در نقاط دیگر ایران (٢، ١٣ و ١١) به‌نظر می‌رسد با ورود این ویروس به ایران در نقاط مختلف کشور پراکنده شده است.

در اکثر بررسی‌ها جداسازی سویه ٤/٩١ در اواخر دوره پرورش جوجه گوشتی و در حدود ٨-٦ هفتگی گزارش شده است (٣، ٩ و ١٠) اما گزارشاتی نیز وجود دارد که نشان می‌دهد امکان آلودگی با سویه ٤/٩١ در گله‌های گوشتی غیرایمن (غیر واکسینه)، در سنین پایین‌تر وجود دارد (٧). در بررسی اخیر، با شناسایی سویه ٤/٩١ در جوجه‌های گوشتی ٢١ و ٢٥ روزه، احتمال آلودگی با این سویه در سن پایین تقویت می‌گردد.

Archive of SID

www.SID.ir

به طور کلی، این بررسی نشان داد شیوع ویروس برونشیت عفونی محصوصاً تیپ ٤/٩١ برونشیت عفونی در فارم‌های جوجه گوشتی استان چهارمحال و بختیاری به‌عنوان یکی از استان‌های واقع در نواحی غرب ایران بالاست. لذا در مرحله اول لازم است بیماری‌زایی این ویروس در فارم‌های پرورشی طیور بررسی شود و در مرحله بعد سیاست‌های کنترلی مناسب جهت پیشگیری از این بیماری اتخاذ شود.

منابع

١. اکبری آزاد، گ.، وصفی مرندی، م. و کیوانی، ح. (١٣٨٣): جداسازی و شناسایی مولکولی ویروس‌های برونشیت عفونی طیور در مرغداریهای صنعتی ایران. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ٥٩(٣): صفحات: ٢٦٤-٢٥٩.

٢. غلامی آهنگران، م.، چرخکار، س.، شوشتری ع.، بزرگمهری فرد م.ح.، و عشرت آبادی ف. (١٣٨٧): شناسایی مولکولی و تعیین تیپ ویروس برونشیت عفونی در موارد سندرم تنفسی جوجه‌های گوشتی در استان اصفهان. مجله علوم دامپزشکی ایران، ٥ (٣): صفحات: ٤٧٦-٤٦٩.

3. Adzhar, A.B., Show, K.B., Britton, P., and Cavanagh, D. (1995): Avian infectious bronchitis virus: differences between 793/B and other strains. Veterinary Record. 136(27):548.
4. Adzhar, A., Gough, R.E., Haydon, D., Shaw, K., Britton, P., and Cavanagh, D. (1997): Molecular analysis of the 793/B serotype of infectious bronchitis virus in Great Britain. Avian Pathology. 26:625-640.
5. Aghakhan, S.M., Abshar, N., Rasoul Nejad Fereidouni, S., Marunesi, C., and Khodashenas, M. (1994): Studies on avian viral infections in Iran. Archive del Institut Razi. 44/45:1-10.
6. Binns, M.M., Boursnell, M.E.G., Cavanagh, D., Pappin, D.J.C., and Brown, T.D.K. (1985): Cloning and sequencing of the gene encoding the spike protein of the coronavirus IBV. Journal of General Virology. 66:719-726.
7. Cavanagh, D., Mawditt, K., Britton, P., and Naylor, C.J. (1999): Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broiler using type specific polymerase chain reaction. Avian Pathology. 28:593-605.
8. Cavanagh, D. and Gelb, J. Infectious bronchitis. In: Saif, Y.M. Fadly, A.M. Glisson, J.R. McDougald, L.R. and Nolan, L.K. Swayne, D.E. (2008): Diseases of Poultry. 12th ed. Blackwell Publishing, Iowa State University Press, USA, Ames, pp: 117-135.
9. Mahdavi, S., Tavasoly, A., Pourbakhsh, S.A., Momayez, R. (2007): Experimental histopathologic study of the lesions induced by serotype 793/B (4/91) infectious bronchitis virus. Archives of Razi Institute, 62(2): 15-22.
10. Meulemans, G., Boschmans, M., Decaesstecker, M., van den Berg, T.P., Denis, P., and Cavanagh, D. (2001): Epidemiology of infectious bronchitis virus in Belgian broilers: a retrospective study1986-1995. Avian Pathology. 30:411-421.
11. Nouri, A., Assasi, K., and Seify-abad Shapouri, M.R. (2003): Field study of infectious bronchitis virus in broiler using type-spscific RT-PCR. Archives of Razi Institute. 55:1-10.
12. Ramneek, R., Mitchel, N.L., and Mcfarlane, R.G. (2005): Rapid detection and charecterisation of IBV from New Zealand using RT-PCR and sequence analysis. New Zealand Veterinary Journal. 53(6):457-461.
13. Seify-abad Shapouri, M.R., Mayahi, M., Charkhkar, S., and Assasi, K. (2002): Serotype identification of recent Iranian isolates of infectious bronchitis virus by type specific multiplex RT-PCR. Archives of Razi Institute. 53:79-85.
14. Vasfi Marandi, M., and Bozorgmehri Fard, M.H. (2000): Isolation and identification of infectious bronchitis virus in chicken in Iran. Proceeding of the 21st World's Poultry Congress, Aug:20-25, Montreal, Canada.

Archive of SID

www.SID.ir