JVM Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره سیزدهم، شماره دوم، ۱۳۹۶، پیاپی ۳۵: ۴۶-۳۹

# شناسایی ویروس برونشیت عفونی در بیماری تنفسی چند عاملی گله‌های گوشتی واکسینه و غیرواکسینه استان بوشهر

**یوسف سعادت [۱]، محمد حسن بزرگمهری فرد [۲*]، سعید چرخکار [۲]، حسین حسینی [۳]، نریمان شیخی [۲]، بیژن اکبرپور [۴]**

*۱-دانشجوی دانشکده دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی تهران، تهران، ایران*

*۲-استاد گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی تهران، تهران، ایران*

*۳-استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران*

*۴-گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران*

*تاریخ دریافت: ۹۵/۱۰/۲۱* *تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۱/۱۹*

**چکیده**

*در سالهای اخیر، بیماری تنفسی چندعاملی منجر به خسارات اقتصادی سنگینی در صنعت طیور بویژه گله‌های گوشتی شده است. عوامل ویروسی و باکتریایی مختلفی در بروز این بیماری دخیل هستند. یکی از شایع‌ترین عوامل دخیل در بیماری تنفسی چند عاملی، ویروس برونشیت عفونی می‌باشد که علیرغم انجام برنامه واکسیناسیون همچنان از مهمترین عوامل بیماریزا در صنعت طیور در سراسر جهان می‌باشد. اخیراً شیوع بیماری تنفسی چندعاملی در استان بوشهر منجر به افزایش قابل توجه خسارات در گله گوشتی شده است. به منظور شناسایی ویروس برونشیت عفونی در گله‌های واکسینه و غیر واکسینه مبتلا به بیماری تنفسی چندعاملی از ۸ گله با سابقه مصرف واکسن برونشیت عفونی و هفت گله با سابقه عدم دریافت واکسن برونشیت عفونی نمونه برداری شد. در تمامی گله‌های واکسینه از واکسن سروتیپ ماساچوست بعنوان واکسن برونشیت استفاده شده بود. در زمان نمونه برداری، گله‌ها مشکلات تنفسی از قبیل سرفه، عطسه، و رال‌های تنفسی داشتند. در این مطالعه ۱۳۵ سوآپ نای و ۱۵۰ نمونه خون از ۱۵ گله مبتلا به عفونت تنفسی و دارای تلفات بالا جمع آوری شد و به روش RT-PCR والیزا مورد بررسی قرار گرفتند. از مجموع ۱۵ گله نمونه برداری شده ۱۲ گله (۸۰٪) از نظر برونشیت عفونی مثبت بودند و سه گله نیز در بررسی مولکولی منفی بودند. تمامی گله‌های غیرواکسینه از نظر برونشیت عفونی مثبت بودند در حالیکه سه گله از گله‌های واکسینه منفی بودند. در بررسی سرولوژی مشخص شد که تمامی گله‌های غیر واکسینه مثبت هستند که با نتایج مولکولی همخوانی داشت. نتایج حاصله بیانگر شیوع بالای ویروس برونشیت عفونی در گله‌های مبتلا به بیماری تنفسی چندعاملی به ویژه گله‌های غیرواکسینه می‌باشد و ضرورت کنترل بیماری برونشیت عفونی را به منظور کاهش خسارت ناشی از بیماری تنفسی چند عاملی را نشان می‌دهد.*

***کلمات کلیدی:*** *ویروس برونشیت عفونی، بیماری تنفسی چندعاملی، گله گوشتی بوشهر*

* نویسنده مسئول: محمد حسن بزرگمهری فرد

آدرس: گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی تهران، تهران، ایران. تلفن:

پست الکترونیک: mhbf@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir

## مقدمه

برونشیت عفونی ماکیان، بیماری حاد و به شدت واگیر دار دستگاه‌های تنفس و ادراری تناسلی است که منجر به تلفات بالا در پرندگان مبتلا، کاهش تولید تخم‌مرغ وکاهش کیفیت تخم مرغ‌ها می‌گردد (۴، ۳). ویروس عامل برونشیت عفونی متعلق به جنس کروناویروس از خانواده کروناویریده می‌باشد ژنوم آن شامل یک مولکول RNA تک رشته‌ای با قطبیت مثبت به طول تقریبی ۲۷۶.۰۰ نوکلوتید است (۳). سه پروتئین ساختمانی اصلی ویروس شامل گلیکوپروتئینهای (S)، گلیکوپروتئینهای (M)و نوکلئوپروتئین داخلی(N) می‌باشند .پروتئین S از دو تحت واحد S1 و S2 تشکیل شده است. آنتی بادی‌های ممانعت کننده ازهماگلوتیناسیون (HI) و بیشترآنتی بادی‌های خنثی کننده توسط پروتئین S1 تولید می‌شوند مطالعات مولکولی نشان داده است که ژن S نقش تعیین کننده‌ای در ا یجاد سروتیپ و نیز پاسخ ایمنی محافظت کننده دارد (۱۱). تنها تغییر در تعداد کمی از اسیدهای آمینه پروتئین S1 می‌تواند منجر به بروز سروتیپ جدید شود از آنجایی که این ویروس‌ها از طریق موتاسیون‌های نقطه‌ای و پدیده نوترکیبی ژنتیکی به فراوانی دچار تغییرات ژنتیکی و آنتی ژنیک می‌گردند و نیز با توجه به وابستگی میزان محافظت متقاطع بین سویه‌های مختلف به درصد همولوژی ژنوم آنها (مخصوصاً ژن S1)، واکسیناسیون علیه بیماری برونشیت عفونی موفقیت نسبی در بردارد (۵، ۱۲ و ۴). تشخیص بیماری برونشیت عفونی بر اساس تاریخچه بیماری، علائم بالینی، ضایعات هیستوپاتولوژیک، افزایش تیترآنتی بادی ضد IBV در سرم (الیزا)، ردیابی آنتی ژن‌های IBV، ردیابی RNA ویروس و جدا سازی ویروس می‌باشد متداولترین این روش‌ها واکنش زنجیره‌ای پلی- مرازترانس کریپتاز معکوس PCRRT می‌باشد، همچنین آزمایش الیزا به عنوان یک روش حساس و قابل توجه برای بررسی موارد تشخیصی در آزمایشگاه همراه با روش مولکولی از اهمیت بالایی برخوردار است (۱۰ و ۶). این بیماری از سال ۱۳۴۵ در ایران شناسایی گردیده در حالیکه اولین گزارش جداسازی عامل در سال ۱۳۷۲ منتشر شده است (۱). هنوز سروتیپ‌های شایع آن در ایران به طور کامل و جامع تعیین نشده است ولی بر اساس گزارشات منتشر شده، تاکنون وجود سروتیپ‌های ماساچوست و ۴/۹۱ محرز شده است (۱۷). در ایران اولین بار صیفی آباد شاپوری و همکاران در سال ۲۰۰۲ به شناسایی مولکولی ویروس برونشیت عفونی پرداختند یافته‌های آنها حضور سروتیپ 793/B را در ایران تأیید نمود (۲۳). از آنجایی که سندرم تنفسی عامل اصلی تلفات و کاهش تولید در استان بوشهر می‌باشد و تشخیص تفریقی در عوامل سندرم تنفسی در این استان انجام نشده این مطالعه برای تعیین میزان شیوع بیماری برونشیت عفونی در گله‌های گوشتی مبتلا در استان از اهمیت بالایی برخوردار است.

## مواد و روش کار

**نمونه‌گیری:** این مطالعه به مدت یکسال از مهر ماه سال ۱۳۹۳ تا مهر ۱۳۹۴ در استان بوشهر انجام گرفت تعداد ۱۵ گله گوشتی نژاد رأس دارای مشکلات تنفسی و تلفات بالا از نواحی مختلف استان انتخاب شدند. واز هر گله ۹ عدد سوآپ نای (جمعاً ۱۳۵ عدد سوآپ) جهت آزمایش RT PCR در زمان بروز بیماری تنفسی و ۱۰ نمونه خون (جمعاً ۱۵۰ نمونه) یک هفته بعد از مشاهده علائم بالینی اخذ و جهت انجام آزمایش الیزا جمع آوری گردید. سوآپ ها بصورت ۳ تائی پول شدند و در لوله حاوی PBS قرار گرفتند و در شرایط

Archive of SID

www.SID.ir

زنجیره سرد به آزمایشگاه (PCR LAB) ارسال گردید و تا انجام کارهای مولکولی در دمای ۷۰ – درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

**استخراج RNA:** استخراج RNA ویروس مستقیماً از سوآپ‌های پول شده نای در بافر RLT و ۲ مرکاپتواتانول با استفاده از RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany),طبق دستور العمل شرکت سازنده انجام شد.

**سنتزcDNA:** برای سنتز cDNA از کیت تک مرحله‌ای شرکت (Thermo Scientific, Burlington, Canada) و بر اساس دستور العمل آن استفاده گردید.cDNA تولیدی بلافاصله در واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت و یا برای استفاده بعدی در دمای ۲۰–درجه سانتیگراد ذخیره گردید.

**واکنش RT PCR:** واکنش Nested RT PCR با استفاده از پریمرهای ژن $S_1$ برای تکثیر قطعه 392bp انجام شد (۱۱). مرحله اول، تکثیر قطعه 495bp با استفاده از پریمرهای (5´-SX1 CACCTAGAGGTTTGT/CTA/TGCAT-´3) and SX2 (5´-TCCACCTCTATAAACACCC/TTT-´3) primers انجام گرفت. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر که شامل یک میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی مول)، ۵/. میکرولیتر از هر پریمر (۲۵ پیکو مول)، ۱ میکرولیتر MgCl2 (۵۰ میلی مول)، ۲.۵ میکرولیتر بافر PCR 10X، ۲/. میکرولیتر (Taq DNA Polymerase)، ۲/۵ میکرولیتر cDNA و ۸/ ۱۶ dH2O انجام گرفت. تکثیر در ۳۵ سیکل حرارتی به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در ۵۸ درجه سانتی‌گراد، و ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام گردید. محصول PCR بعنوان الگو برای مرحله دوم تکثیر با استفاده از پریمرهای (5´-SX3 TAATACTGGC/TAATTTTTCAGA-´3), and SX4 (5´´AATACAGATTGCTTACAACCACC-´3) مورد استفاده قرار گرفت، واکنش PCR همانند مرحله اول انجام گردید در انتها محصول PCR برروی ژل آگارز ۲٪ الکترفورز و پس از رنگ آمیزی با محلول اتیدیوم بروماید، نتایج با استفاده از اشعه UV بررسی شد. (شکل-۱)

**سرولوژی:** پس از جدا سازی سرم ها، بروی نمونه‌ها آزمایش الیزا با استفاده از کیت IDEEX انجام شد و نتایج در طول موج ۴۰۵ نانومتر توسط دستگاه ELX800 قرائت شد.

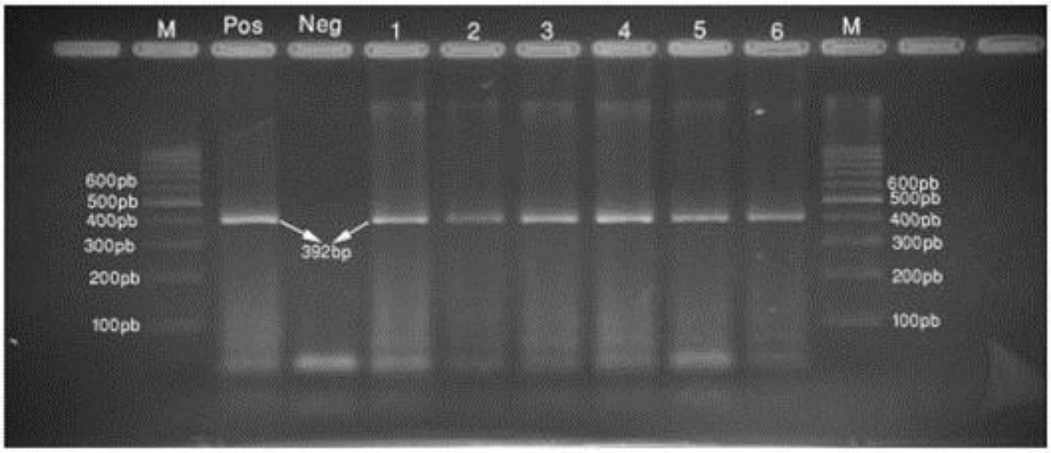
## نتایج

برای تحلیل و آنالیز آماری نتایج کلیه داده‌ها در نرم افزار spss طبقه بندی و جهت مقایسه عیار آنتی بادی در آزمایش نمونه‌ها به روش الیزا از t-Test در سطح کمتر از ۵٪ استفاده شد. در این مطالعه در صورتیکه یک نمونه از سه نمونه هر گله در آزمایش RT PCR مثبت بود، گله مثبت در نظر گرفته شد. پس از جمع آوری نمونه‌ها و ارسال آنها در کنار زنجیره سرد به آزمایشگاه،RNA استخراج و محصول cDNA سنتز شد و قطعه‌ای از ژن به طول (392bp) به روش RT PCR Nested تکثیر گردید. دوازده گله (۸۰٪) از نظربرونشیت عفونی مثبت بودند و سه گله نیز منفی بودند. تمامی گله‌های غیرواکسینه از نظر برونشیت عفونی مثبت بودند در حالیکه سه گله از گله‌های واکسینه منفی بودند. (جدول ۱). همچنین بر اساس تنایج الیزا میانگین عیار پادتن بیماری درگله هایی که واکسن دریافت نکرده بودند ودر آزمایش RT-PCR مثبت شدند برابر ۴۲۷۳ که بالاتر از گله‌های منفی با میانگین ۳۰۸۶ و کمتر از گله‌های مثبت واکسینه با

Archive of SID

www.SID.ir

میانگین ۵۲۵۸ از لحاظ آماری در سطح کمتر از ۵٪
معنی دار است.




**شکل ۱: الکترو فروز قطعه bp ۳۹۲ ژن $S_1$ ویروس برونشیت عفونی**

**جدول ۲: نتایج آزمون‌های PCR و الیزا ی گله‌ها تحت مطالعه**

| شماره گله | سن گله روز | شهرستان | سابقه واکسیناسیون | نتایج RT PCR | نتایج آزمایش الیزا میانگین تیتر | نتایج آزمایش الیزا ٪CV |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ۱ | ۳۲ | برازجان | – | + | ۴۵۹۰ | ۱۰/۱۵ |
| ۲ | ۲۸ | برازجان | – | + | ۴۹۰۰ | |
| ۳ | ۳۶ | گناوه | – | + | ۴۵۸۰ | |
| ۴ | ۲۶ | گناوه | – | + | ۳۹۸۰ | |
| ۵ | ۴۰ | بوشهر | – | + | ۴۲۰۰ | |
| ۶ | ۳۷ | برازجان | – | + | ۳۶۶۷ | |
| ۷ | ۲۹ | بوشهر | _ | + | ۳۹۸۷ | |
| ۸ | ۲۰ | برازجان | + | + | ۵۴۸۰ | ۳/۸۹ |
| ۹ | ۳۵ | بوشهر | + | + | ۵۴۳۰ | |
| ۱۰ | ۴۳ | برازجان | + | + | ۵۲۱۰ | |
| ۱۱ | ۳۴ | گناوه | + | + | ۴۹۷۰ | |
| ۱۲ | ۲۴ | بوشهر | + | + | ۵۲۰۰ | |
| ۱۳ | ۳۴ | برازجان | + | – | ۳۴۰۰ | ۹/۰۸ |
| ۱۴ | ۳۵ | بوشهر | + | – | ۲۸۶۰ | |
| ۱۵ | ۳۲ | برازجان | + | _ | ۳۰۰۰ | |

## بحث

علائم بالینی و کالبد گشایی برای تشخیص بیماری برونشیت عفونی غیر اختصاصی است و به منظور تشخیص قطعی بیماری از روش‌های اختصاصی‌تر همچون سرم شناسی، شناسایی آنتی ژن ویروس، جداسازی ویروس و اثبات حضور RNA استفاده می‌گردد (۲۱). بر اساس مطالعات انجام شده روش RT PCR در شناسایی ویروس برونشیت عفونی حساسیت بالاتری نسبت به روش سرم شناسی دارد و برای تشخیص ویروس برونشیت عفونی در مزرعه بسیار سریع‌تر عمل می‌کند (۱۶). براساس نتایج مطالعه حاضر از ۱۵ گله مبتلا به سندرم تنفسی تعداد ۱۲ گله (۸۰٪) از نظر ویروس برونشیت عفونی مثبت بودند و ۳ گله (۲۰٪) نیز منفی بود. تمام گله‌های غیر واکسینه مثبت

www.SID.ir

بودند در حالیکه گله‌های منفی همگی واکسن برونشیت دریافت کرده بودند. ۷ گله از ۱۲ گله مثبت واکسن دریافت نکرده بنابراین تیتر بالای الیزا در این گله می‌تواند دلیلی بر آلودگی آنها به ویروس برونشیت باشد. همچنین تیتر ۵ گله مثبت که واکسن برونشیت دریافت کرده، بصورت معنا داری نسبت به گله‌های مثبت عدم واکسینه بالاتر بود که تائیدی براین بود که سیستم ایمنی این گله‌ها یکبار با واکسن تحریک شده و دارای سلولهای خاطره‌ای بوده و مجدداً که با ویروس فیلد درگیرشده تیتر الیزای بالاتری داده، همچنین میانگین تیتر الیزای ۳ گله منفی واکسینه بصورت معنادار با ۱۲ گله مثبت پائین تر بوده که نشان دهنده تیتر واکسن برونشیت تخفیف حدت یافته است. نظر به اینکه نمونه‌ها از گله‌هایی اخذ گردید که دارای مشکلات تنفسی بودند، پس احتمالاً گله‌های که در این مطالعه منفی بودند و بوسیله واکسیناسیون ایمن شده بودند عوامل دیگری غیر ویروس برونشیت عفونی مثل نیوکاسل، میکوپلاسما و آنفلوانزا در تلفات و بیماریهای تنفسی آنها دخیل باشد. مطالعه‌ای که شوشتری و همکاران (۲۰۰۸) برای تعیین میزان شیوع و نوع سویه ویروس برونشیت عفونی انجام دادند نشان داد که ۷۲ درصد نمونه‌های تحت مطالعه از نظر حضور ویروس برونشیت عفونی مثبت بودند که ازاین مقدار ۵۲/۷ درصد نمونه‌ها به سروتیپ ۷۹۲/B و ۱۶ درصد به سویه ماساچوست مربوط بودند (۲۴). اسد پور و همکاران در سال ۲۰۱۵ با روش مولکولی Nested PCR از ۵۰ گله گوشتی مورد مطالعه در استان گیلان ۳۲ نمونه (۶۴٪) آلوده به ویروس به ویروس برونشیت گزارش کردند که به ترتیب ۱۰ نمونه (۳۱/۲۵٪) و ۲۲ نمونه (۶۸/۷۵٪) آلوده به ویروس 793/B و ماساچوست بودند (۲). سیگر و همکاران در سال ۲۰۱۶ با بررسی مولکولی ویروس برونشیت عفونی از ۴۶ گله گوشتی در جنوب عراق ۳۴ گله (۷۴٪) مثبت گزارش کردند (۲۲). نوری و همکاران در سال ۲۰۰۳ سوآپ نایی ۳۰ جوجه گوشتی از نظر آلودگی به ویروس برونشیت عفونی با روش RT- PCR بررسی نمودند. در این بررسی ۵۶/۶ نمونه آلوده به این ویروس گزارش شد که ۱۶ مورد (۹۴ درصد) سروتیپ ۴/۹۱ و ۱ مورد سروتیپ ماساچوست نشان داده شد (۱۷). نبوی و همکاران از مجموع ۲۰۰ نمونه اخذ شده از گله‌های گوشتی ۸ استان کشور، با روش RT PCR ۱۱۸ گله (۵۹٪) ویروس برونشیت عفونی جدا کردند (۱۵). در یک مطالعه صیفی آباد شاپوری و همکاران در سال ۲۰۰۲ از مجموع ۱۸۱ نمونه مورد آزمایش ۲۷ نمونه (۱۴/۹٪) آلوده به ویروس برونشیت گزارش کردند که شامل ویروس‌های 793/B و ماساچوست بودند (۲۳). پور باقی وهمکاران در سال ۲۰۱۱ فراوانی برونشیت عفونی و سروتیپ‌های شایع آنرا در ۳۲ گله جوجه گوشتی با علائم بالینی مشکوک به برونشیت عفونی در استان فارس با روش RT-PCR و Nested PCR بررسی نمودند یافته‌های آنها نشان دهنده شیوع ۷۲ درصدی این ویروس بود (۱۸). طی بررسی که رحیمیان (۲۰۰۸) از ۱۸ گله گوشتی مشکوک به بیماری برونشیت عفونی پس از استخراج RNA ویروس از نمونه‌ها وتکثیر ویروس انجام داد، مشخص شد که ۱۱ گله (۶۱/۱۱٪) از ۱۸ گله مشکوک به بیماری برونشیت، آلوده به ویروس برونشیت عفونی بودند (۱۹). هفشجانی و همکاران در سال (۲۰۱۴) با بررسی ۱۰۰ نمونه از ۱۰ گله گوشتی استان چهارمحال و بختیاری مبتلا به سندرم تنفسی با روش RT PCR ۷ گله (۷۰٪) را از نظر آلودگی به ویروس برونشیت عفونی مثبت و ۳ گله (۳۰٪) را اعلام منفی کردند (۸). فلاحی و همکاران در

Archive of SID

www.SID.ir

سال ۲۰۱۵ برای تشخیص ویروس برونشیت عفونی ۳۶۰ گله که واکسن H120 دریافت کرده بودند را باروش مولکولی مورد بررسی قرار دادند که تعداد گله (۵۱/۷٪) آلوده به ویروس برونشیت عفونی گزارش شد (۹). سلطان و همکاران درسال ۲۰۱۵ با روش RT-PCR ۷۰ گله گوشتی، تخمگذار و مادر مورد آزمایش قرار دادند که ۲۰ گله (۲۸/۵٪) آلوده به ویروس برونشیت عفونی بودند با بررسی بیشتر از همین ۲۰ گله مثبت، بترتیب مشخص گردید ۴۵٪، ۴۵٪، ۱۰٪ و ۱۰٪ آلوده به IBV، IBV & ND، IBV& H9 و IBV, H9 & بودند (۲۵). سابرینات (۲۰۱۱) درایسلند شیوع بیماری برونشیت عفونی را در گونه‌های مختلف پرندگان حدود ۳۱ درصد گزارش کرد که از شیوع بالایی برخوردار بود (۲۰). لویز (۲۰۰۶) میزان شیوع ویروس برونشیت عفونی در فارم‌های تحت بررسی با روش RT PCR را ۵۰ درصد گزارش کرد و نقش استرسهای محیطی را در این مورد بسیار قابل توجه دانست (۱۴). در یک مطالعه درگام وهمکاران در سال ۲۰۰۹، ۷۰ گله (گوشتی، تخمگذار و مادر) را باروش RT PCR به منظور رد یابی ویروس برونشیت عفونی مورد بررسی قرار دادند که تعداد ۳۰ گله (۴۴/۴٪) آن‌ها مثبت گزارش شدند (۷).

مطالعه حاضر اولین گزارش شیوع بیماری برونشیت عفونی در مزارع طیور گوشتی استان بوشهر است و نشان دهنده چرخش ویروس در گله‌های غیر واکسینه می‌باشد. با توجه به اینکه هدف از این مطالعه بررسی میزان شیوع بیماری برونشیت عفونی در گله‌های گوشتی مبتلا به سندرم تنفسی در استان بوشهر بوده و تشخیص اولیه از روی علائم کلینیکی انجام شده بود، نتایج این مطالعه نشان داد تلفیقی از علائم کلینیکی و بکارگیری روش RT PCR و سرم شناسی در تشخیص دقیق و میزان شیوع این بیماری بسیار مؤثر می‌باشد. نتایج این مطالعه نشان داد که بیماری برونشیت عفونی در گله‌های گوشتی غیر واکسینه استان بوشهر که مبتلا سندرم تنفسی بودند، از شیوع بسیار بالایی (۱۰۰٪) برخوردار بود. بروز همزمان این بیماری با سایر بیماری‌های تنفسی می‌تواند باعث ضرر و زیان اقتصادی هنگفتی به گله‌های گوشتی این استان شود لذا پیشنهاد می‌گردد سروتیپ و ژنوتیپ‌های شایع در بین گله‌های گوشتی استان شناسایی و استراتژی کنترل و پیشگیری از بیماری بر اساس یک برنامه واکسیناسیون مطابق با سویه‌های درگردش طراحی و اجرا گردد.

## تقدیر و تشکر

این پژوهش با همکاری آقای **دکتر سید حسین حسینی** به اجرا درآمده که بدین وسیله از حمایت‌های به عمل آمده ایشان سپاسگزاری می‌شود.

## منابع

1- Aghakhan, S.M., Bshar, N., NajadFereidoni, R.S., Marunesi, C., Kodashenas, M. (1994). Studies on avian viral infections in Iran. *Archives of Razi Institute,* 44:1-10

2- Asadpour, L. (2015). Molecular identification of avian infectious bronchitis virus serotypes of broiler chicken in Gilan province. *Journal of Microbial World*, **7**: 275 -281.

3- Boltz, D. A., Nakai, M., Bahr, G.M. (2004). Avian Infectious Bronchitis Virus: a possiblecause of reduced fertility in the rooster. *Avian Disease*, **48**: 909-915.

4- Cavanag, D. (2007). Coronavirus avian Infectious Bronchitis Virus. *Veterinary Research*, **38**: 281-97

5- Cavanagh, D., Naqi, S.A. (2003). Infectious Bronchitis. In: Diseases of poultry, 11th ed. Saif,Y.M., Barnes,H.J., Glisson, J.R., Fadly, A.M., McDougald,L.R. and Swayne,D.E. Iowa State University Press, Ames, IA. 101–119.

6- De Wit, J J. (2000). Detection of infectious bronchitis. *Avian Pathology*, **29**: 71-93.

Archive of SID

www.SID.ir

7-Dergham, A., Roussan,.Ghassan, Y., Khawaldeh., Ibrahem, A. Shaheen. (2009). Infectious bronchitis virus in Jordanian chickens: Seroprevalence and detection. *Canadian Veterinary Journal*, **50**: 77–80.

8- Fathi Hafshejani, E., Khalafian, H. (2014). The Prevalence of Infectious Bronchitis in Respiratory Syndrome in Broiler Chicken Flocks of Chaharmahal va Bakhtiyari Province. *Journal of Veterinary Microbiology*, **10**: 75-82

9- Fellahi, S., Ducatez, M., El Harrak, M., Guérin, JL., Touil, N., Sebbar. G., Bouaiti. el A., Khataby, K., Ennaji, MM., El-Houadfi, M. (2015). Prevalence and molecular characterization of avian infectious bronchitis virus in poultry flocks in Morocco from 2010 to 2014 and first detection of Italy 02 in African. *Avian Pathology*, **44**:287-95.

10- Ghadakchi, H. (2005). Standardization of an enzyme lined immuoabsorbent assay for detection of infection bronchitis virus antibody. *Archive of Razi Institute*, **59**: 75-85.

11-Hosseini Aliabadi O, A., Momayez, R., Mahmoudzadeh, M., Yousefi, Amini, A. (2013). Detection of 793/B serotype in broiler chicken flocks with respiratory out breaks in west of Mazandaran. *Journal Veterinary Clinical Research,***4**: 91- 97. [In Persian]

12- Ignjatovic, J., Sapats, S. (2000). Avian Infectious Bronchitis Virus. Reverse. *Science*. technology. Off. international. *Epizotiology*, **19**: 493-508.

13- Jones, RC., Worthington, KJ., Gough, RE. (2005). Detection of the Italy 02 strain of infectious bronchitis virus in the UK. *Veterinary Record*, 19: 260.

14- Looez, J.C. (2006). Effect of environmental stressors on the immune response to avian IBV. *Avian Diseases*, **l55**: 145-60.

15- Nabavi, H., Karimib, V., Ghalyanchilangeroudi, A., Saeed, S., Seger, W., Najafi, H. (2016). Phylogenetic analysis and full-length characterization of S1 gene of IS-1494 (Variant 2) like infectious bronchitis virus isolates, Iran, *Virology Reports* **6**, 18–20.

16- Nagi, S.A. (1990). A monoclonal antibody based IP procedure for rapid detection of IBV in infected tissues. *Avian Disease*, **34**: 893-98.

17- Nouri. A., Assasi, k., Saify-abadShapouri, M.R. (2003). Field Study of infectious bronchitis virus in broiler using type-specific RT-PCR. *Archive Razi Institution*, **55**:1-10

18- Poorbaghi. SL., Mohammadi, A., Asasi, K. (2012). Molecular detection of avian Infectious Bronchitis Virus serotypes from clinically suspected broiler chicken flocks in Fars province of Iran. *Pakistan Veterinary Journal*, **32**: 93-96.

19- Rahimian, F. (2009). Molecular identification of infectious bronchitis virus (4/91 serotype) in broiler chickens in chaharmahalvabakhtiyari province, DVM Thesis, Islamic Azad University shahre-kord brunch Iran.

20- Sabarinath, A. (2011). Seroprevalence of IBV in birds of Granadaint. *Journal of Poultry Science*, **10**: 266-68.

21- Saif, Y.M., Barnes, H.J., Glisson, J.R., Fadly, A.M., Mc Dougald, L.R., Swayne, D.E. (2007). Disease of Poultry.11th ed., Blackwell Publishing co., USA, pp: 101-21.

22- Seger, W., GhalyanchiLangeroudi, A., Karimi, V., Madadgar, O., VasfiMarandi, M., Hashemzadeh, M. (2016). Prevalence of avian infectious bronchitis virus in broiler chicken farms in south of Iraq, 2014–015.*Veterinary Research Forum*, **7**:317-321.

23- Seify Abad Shapouri, MR., Mayah, M., Charkhkar, S., Assasi, K. (2002). Serotype identification of recent Iranian isolates of Infectious Bronchitis Virus by type - specific multiplex RT-PCR. *Archive. Razi. Institution*, **53**: 79-85.

24- Shoushtari, A.H., Toroghi, R., Momayez, R., Pourbakhsh, S.A. (2008): 793/B type, the Predominant Circulation Type of avian Infectious Bronchitis Virus 1999-2004 in Iran: a retrospective study.. *Archiv Razi Institute*. **63**: 1-5.

25- Sultan, H., Abdel-Razik, AG.,Shehata, AA., Ibrahim, M., Talaat S., Abo-Elkhair, M., Bazid, AE., Moharam, IM., Vahlenkamp. T. (2015). Characterization of Infectious Bronchitis Viruses Circulating in Egyptian Chickens during 2012 and 2013. *Journal Veterinary Science Medicine Diagnosis*, 4:5

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 13, Issue 2, 2017

# Detection of Infectious Bronchitis Virus in Multicausal Respiratory Disease in Vaccinated and Unvaccinated Broilers in Bushehr Province

***Saadat, Y.[1], Bozorgmehri Fard, M.H.[2]*, Charkhkar, S.[2], Hossein, H.[3], Shaikhi, N.[2], Akbarpour, B. [4]***

*1. Student of Faculty of Veterinary Medicine, Sciences and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran*
*2. Professor, Department of Poultry and obstetrics Sciences and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran*
*3. Assistant Professor, Department of sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Karaj Branch, Islamic Azad University, Alborz, Iran*
*4. Department of Basic sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran*

*Received Date: 10 January 2017 Accepted Date: 7 February 2017*

***Abstract:*** *In recent years, the multicausal respiratory disease has caused severe economic losses in poultry industry, particularly in broiler flocks. A variety of viral and bacterial factors are involved in the incidence of this disease, one of the most prominent of which is infectious bronchitis virus (IBV). Despite the vaccination program, this disease is still regarded as the most prevalent virulence factor in poultry industry throughout the world. Recently, the outbreak of multicausal respiratory disease has led to an increase of considerable losses in broiler flocks in Bushehr province. In order to detect the infectious bronchitis virus in vaccinated and unvaccinated broilers with multicausal respiratory disease, 8 flocks, vaccinated against infectious bronchitis and 7 as unvaccinated flocks were selected as samples. For all vaccinated broilers, the Massachusetts Serotype Vaccine was used as bronchitis vaccine. During the study, representative samples showed respiratory problems including coughing, sneezing, and respiratory rales. In the present survey, 135 tracheal swabs and 150 blood samples of 15 flocks with respiratory infection and with high mortality rate were collected and examined using RT-PCR method and ELISA. Out of 15 sampled broilers, 12 (80%) were positive for IBV, and 3 were negative for molecular detection. All unvaccinated broilers were positive for IBV, while 3 among vaccinated ones were negative. In serological assay, it was elucidated that all unvaccinated flocks were positive, demonstrating correlation with molecular results. The findings revealed a high incidence of infectious bronchitis virus in broilers with multicausal respiratory disease; especially in unvaccinated flocks, showing an immediate action in controlling infectious bronchitis disease as to decrease the damages caused by multicausal respiratory disease.*

***Keywords:*** *infectious bronchitis virus; multicausal respiratory disease; broiler flocks; Bushehr*

**Corresponding author: Bozorgmehri Fard, M.H.*
*Address: Department of Poultry and obstetrics Sciences and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. Tel:*
*Email: mhbf@yahoo.com*

www.SID.ir