Archive of SID

Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره پانزدهم، شماره اول، ۱۳۹۸، پیاپی ۳۸: ۱۲۹-۱۱۹

ژنوتایپینگ ویروس برونشیت عفونی پرندگان در گله‌های گوشتی استان اردبیل در سال ۲۰۱۶

سمیرا ذاکری قره درویشلو[۱]، آرش قلیانچی لنگرودی[۲*]، محمد رضا ذولفقاری[۱]، محمد سلیمانی[۱]، علی یوسف زاده کلخوران[۲]، امیر مدیری همدان[۲]

۱- دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران

۲- دانشیار، گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت:۱۳۹۷/۱/۲۹ تاریخ پذیرش:۱۳۹۷/۸/۲۰

چکیده

ویروس برونشیت عفونی (IBV) عامل بیماری ویروسی حاد تنفسی در طیور همراه با رال‌های تنفسی و سرفه و عطسه می‌باشد. کرونا ویروس‌ها طیف گسترده‌ای از بیماری‌های تنفسی، روده‌ای، کبدی، عصبی با حدت‌های مختلف در گربه‌ها، سگ‌ها، خوک‌ها، جوندگان، گاو، پرندگان و انسان ایجاد می‌کنند. ویروس برونشیت عفونی عامل بسیار واگیردار بیماری برونشیت عفونی در طیور می‌باشد. کرونا ویروس‌ها توانایی نوترکیبی و جهش زیادی دارند. توالی‌یابی ژن S1 برای مطالعات اپیدمیولوژی مولکولی و مشخصات ژنوتیپی ویروس برونشیت عفونی کاربرد دارد. به منظور فراهم شدن درک بهتری از اپیدمیولوژی مولکولی ویروس برونشیت عفونی در ایران جدایه‌های ژن S1 ویروس برونشیت عفونی طیور که در مزارع گوشتی در استان اردبیل جمع‌آوری شده بود، در این مطالعه توالی یابی شد. در سال ۱۳۹۵ در محدوده استان اردبیل ۳۰ عدد سواب نای از گله‌های گوشتی به صورت تصادفی برای ردیابی و تعیین ژنوتیپ ویروس جمع‌آوری گردید. سپس RNA آنها با استفاده از کیت تخلیص RNA استخراج گردید. ساخت cDNA با روش RT-PCR صورت گرفت و محصول RT-PCR با روش Nested- PCR با پرایمرهای کد کننده5'UTR، تکثیر شد. این کار جهت شناسایی ویروس برونشیت عفونی صورت گرفت.برای تعیین ژنوتیپ نمونه‌های مثبت (توالی یابی ژن گلیکوپروتئین S) با ارسال به شرکت کره‌ای انجام شد. ۷۰ درصد نمونه‌های نایی مثبت بودند که در ادامه شناسایی سروتیپ‌ها بر اساس پروتکل‌های موجود انجام شد. در این مطالعه مراحل استخراج و RT-PCR بر روی نمونه‌های مشکوک مثبت چندین بار تکرار شد. می‌توان نتیجه گرفت که کرونا ویروس در بین گله‌های گوشتی کشور در حال چرخش است. در طول مراحل آزمایش از دو کنترل منفی شامل کنترل منفی استخراج و کنترل منفی واکنش RT-PCR استفاده گردید. آنالیز ژنتیکی بر اساس توالی نوکلئوتیدی بخش بسیار تغییر پذیر ژن S1 نشان داد که میزان کلی عفونت ۶۵-۷۰٪ بود و این ژنوتیپ‌ها با این درصد مشخص شد: (واریانت۲ (IS/1494), ۵۲,۳٪، 793/B ۳۳,۵٪ MASS , ۹,۵٪، QX ۴,۷٪)

کلمات کلیدی: ویروس برونشیت عفونی، گله گوشتی، اردبیل، تعیین ژنوتیپ، روش RT-PCR

*نویسنده مسئول : آرش قلیانچی لنگرودی

آدرس: گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران. تلفن: ۰۲۱۶۱۱۱۷۱۵۴

پست الکترونیک: ghalyana@ut.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

ویروس برونشیت عفونی پرندگان (IBV)، عامل بیماری برونشیت عفونی (IB)، در خانواده کرونا ویریده در جنس گاما کرونا ویروس قرار دارد. ویروس برونشیت عفونی برای اولین بار در دهه‌ی ۱۹۳۰ از پرندگان جدا شد(۹). کرونا ویروس‌ها RNA دار تک رشته ای و سنس مثبت بوده و طول ژنوم آن بین ۲۷ تا ۳۰ kb می‌باشد و دارای ۵۰ توالی Cap و ۳۰ دم Poly A است. IBV به ۶ گروه زیر ژنومی مولکلول mRNA با ۳۰ Co-terminal دسته بندی می‌شود. چهار پروتئین ساختاری ویروس شامل: اسپایک (S)، پوششی (E)، غشایی (M) و نوکلئوکپسید (N)، همراه با RNA ویروین را تشکیل می‌دهند(Belouzard, Millet et al. 2012). IBV در پرندگان تحت جهش و نوترکیبی قرار گرفته و در نتیجه به دلیل عدم وجود مکانیسم تصحیح کنندگی در RNA پلیمراز، در طول تکثیر مکررا می‌تواند به درج نوکلئوتید، حذف یا جهش نقطه‌ای و ایجاد جهش به خصوص در بخش S1 ژن Spike منجر می‌شود، که باعث ایجاد سروتیپ‌ها و ژنوتیپ‌های جدیددر جمعیت‌های این ویروس می‌شود. سویه‌های جهش یافته جدید ممکن است در مقایسه با سویه‌های واکسن، به اندازه ۵۵ ٪ در توالی آمینواسید S1، متفاوت باشند (۲). ظهور مداوم سویه‌های جهش یافته از IBV گزارش شده و حداقل ۳۰ سروتیپ در سراسر جهان شناسایی شده است(۱۲). در ایران چندین سروتیپ و ژنوتیپ متفاوت از مناطق مختلف گزارش شده است. اولین جداسازی IBV از مرغداری‌های ایران در سال ۱۹۹۴ گزارش شده است(۱). پس از آن، چندین محقق ایرانی سروتیپ 793/B را شناسایی کردند، که تبدیل به یکی از شایع ترین انواع IBV در حال گردش در کشور شده است(۳). ژنوتایپینگ سویه‌های IBV جدا شده از ایران در هفت گروه شجره شناسی (Mass، شبه B، شبه IS/1494، شبه IS/720، شبه QX، IR-1 و IR-2براساس بررسی نواحی HVR از ژن گلیکوپروتئین S طبقه بندی شده است(۲۳). هدف از این مطالعه، بررسی میزان شیوع IBV در کمپلکس‌های تنفسی استان اردبیل و ژنوتایپینگ نمونه‌های مثبت بود.

مواد و روش کار

در این مطالعه، نمونه‌های بافت نای از ۳۰ مرغداری جمع‌آوری شد. انتخاب مرغداری‌ها، براساس موارد مشکوک به بیماری برونشیت عفونی بوده و نمونه‌ها از طیور دارای علائم مشکوک تنفسی انتخاب شدند.

استخراج RNA

با استفاده از کیت سیناپیور (سیناکلون) و طبق دستورالعمل سازنده کیت استخراج RNA انجام گرفت. میزان خلوص RNA استخراج شده با استفاده از خوانش در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ nm مشخص شد و تا زمان ساخت cDNA در ۷۰- ذخیره گردید .

ساخت cDNA

برای ساخت cDNA، (0.2 Ig) 1 IL از پرایمر رندم هگزامر (سیناکلون، ایران)، به 5 IL از RNA استخراج شده اضافه شد و مخلوط به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵° درجه سانتی گراد حرارت دید. 14 IL از مخلوط cDNA الگو شامل 7.25 IL از آب DEPC-treated (سیناکلون، ایران)، 2 IL مخلوط dNTP (سیناکلون، ایران)، 0.25 IL از RiboLock بازدارنده RNase (ترمو فیشر ساینتیفیک، آمریکا)، 5 IL آنزیم Reverse Transcriptase (ترمو فیشر ساینتیفیک، آمریکا) و 4 IL بافر 5X واکنش RT به هر لوله اضافه شد. حجم نهایی 20 IL شد. سپس مخلوط به مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه، ۶۰ دقیقه در ۴۲ درجه، ۵ دقیقه در ۹۵ درجه و ۱ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد انکوبه گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

cDNA تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگه داری شد.

Real-time PCR برای تشخیص IBV

در این مطالعه، از Real-time PCR براساس 5'UTR برای تشخیص IBV استفاده شد. تکثیر با استفاده از کیت تکثیر انجام شد (بایونیر کره جنوبی)، با توالی پرایمر فوروارد 5′GCTTTTGAGCCTAGCGTT3′ و پرایمر ریورس 5′GCCATGTTGTCACTGTCTATTG3′ و دو پروب نشان دار Taqman با توالی probe FAM-CACCACCAGAACCTGTCACCTC-BHQ1.

Nested-PCR و تعیین توالی برای تشخیص ژنوتیپ

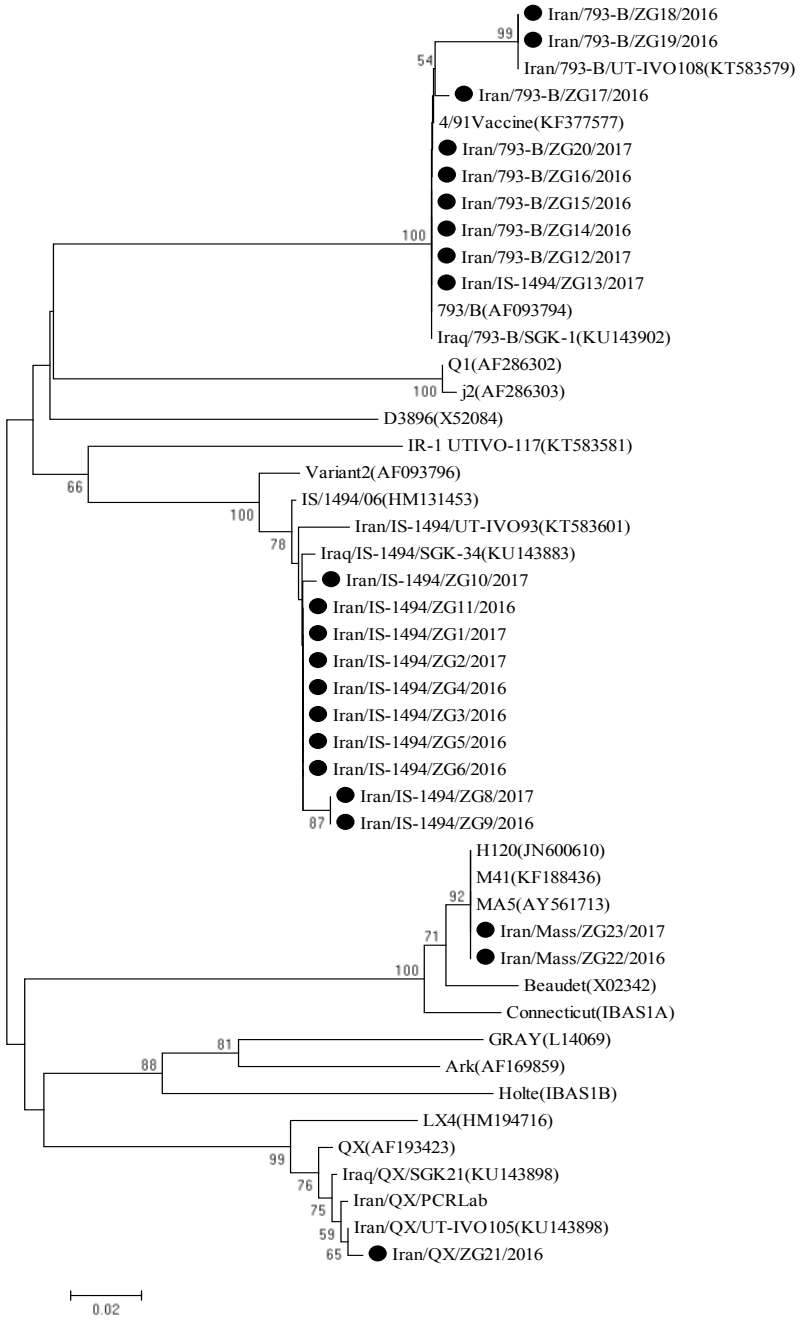
آزمایش Nested-PCR برای ژنوتایپینگ استفاده شده است. PCR اولیه در حجم ۲۰ میکرولیتر در یک مخلوط حاوی ۲ میکرولیتر آب مقطر، ۲ میکرولیتر از پرایمر SX1 (5′-CACCTAGAGGTTTGYTWGCATG-3′) و SX2 (5′-TCCACCTCTATAAACACCYTTAC-3′)، ۳ میکرولیتر cDNA و ۱۳ میکرولیتر از کیت مستر میکس PCR سیناکلون انجام شد (سیناکلون، ایران). واکنش تکثیر در دستگاه ترموسایکلر اپندورف انجام شد (اپندورف، هامبورگ، آلمان). برای اولین دوره تکثیر، دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۲ دقیقه، و ۳۵ چرخه برای دناتوراسیون در ۹۴ درجه برای ۱۵ ثانیه، و پلیمریزاسیون در ۷۲ درجه برای ۳۰ ثانیه. افزایش طول نهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. برای واکنش Nested-PCR ۱ میکرولیتر از نمونه‌ها با رقت ۱:۱۰۰ از محصول PCR برای دومین دوره تکثیر مورد استفاده قرار گرفت، و از پرایمرهای SX3 (5′-TAATACTGGYAATTTTTCAGATGG-3′) و SX4 (5′-(AATACAGATTGCTTACAACCACC-3′) و روش چرخه‌های مشابه استفاده شد. محصولات این واکنش به وسیله الکتروفورز در ۱/۵ درصد ژل آگارز در بافر تریس، بورات، EDTA (TBE) رنگ شده با رنگ Gel Red (بیوتیوم، آمریکا) مورد بررسی قرار گرفت و تحت اشعه UV مشاهده شد. کیت خالص سازی PCR، AccuPrep (شرکت بایونیر کره) برای خالص سازی محصولات PCR استفاده شد. تعیین توالی با پرایمرها (درهر دو جهت) در PCR انجام شد(شرکت بایونیر کره). برای تشخیص ژنوتیپ‌های IBV، Blast نوکلئوتید (NCBI) نتایج توالی‌های به دست آمده انجام گرفت. برای خالص سازی محصولات PCR از کیت خالص سازی Accu Perp (بایونیر، کره) استفاده شد. توالی یابی با استفاده از پرایمرهایی که در مرحله دوم nested PCR استفاده شده بودند، در هر دو جهت انجام گرفت (بایونیر، کره). کروماتوگرام‌ها، به وسیله CromasPro (CromasPro Version 1.5) مورد بررسی قرار گرفتند. درخت فیلوژنتیک توسط روش Neighbor-joining با استفاده از نرم افزار Mega 5.1 رسم شد و هر درخت با تکرار بوت استرپ ۱۰۰۰ تولید شد. توالی نوکلئوتیدی بخشی از ژن S1 با توالی‌های S1 متعددی از بانک ژنی شامل: H120 (KF377577)Vaccine/4/91، (JN600610)، MA5(AY561713)، M41(KF188436)، (KU143902)-Iraq/793/B/SGK-1، (Iran/IS-1494/ZG1/2017)، MA5 (AY561713)، Hl20(JN600610)، M41(KF188436)، MA5 (KU143898)-Iraq/QX/SGK21، H120(JN600610)، MA5 (AY561713)، M41(KF188436) مقایسه شد. توالی ژن S1 ویروس‌های برونشیت عفونی به پایگاه داده بانک ژنی NCBI، ارسال شد. با توجه به نتایج به دست آمده، و با مقایسه نتایج با سایر اطلاعات در دسترس از توالی سروتیپ‌های موجود در ایران و همچنین سروتیپ‌های واکسن، درخت فیلوژنتیک ترسیم شد(شکل ۱).

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج

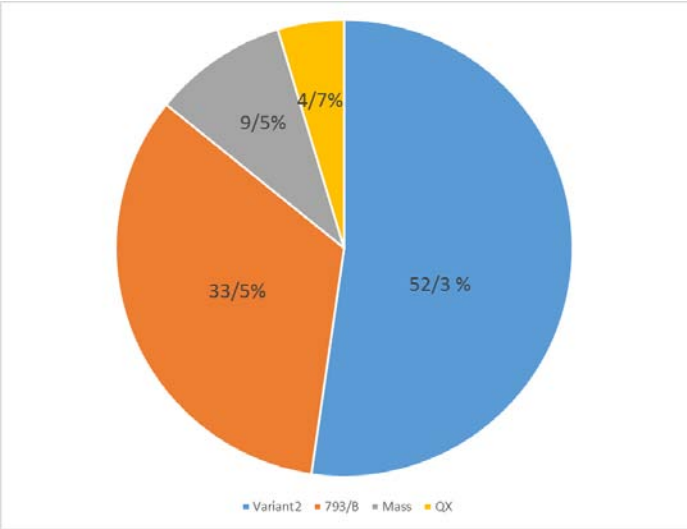
از ۳۰ نمونه تهیه شده از طیور گوشتی واکسینه استان اردبیل که علائم تنفسی داشتند، با روش RT-PCR، ۲۱ نمونه مثبت از نظر IBV وجود داشت، بعبارتی دیگر با توجه به نتایج به دست آمده، ۷۰٪ نمونه‌ها از نظر IBV مثبت بودند. هر ۲۱ نمونه مثبت توالی یابی شدند. آنالیز ژنتیکی بر اساس توالی نوکلئوتیدی بخش بسیار تغییر پذیر ژن S1 نشان داد که میزان کلی عفونت ۷۰٪ بود و وجود این ژنوتیپ‌ها را در این منطقه مشخص کرد: درصد واریانت ۲ (IS/1494)، ۷۹۳/B، Mass و QXبه ترتیب (۵۲,۳٪، ۳۳,۵٪، ۹,۵٪، ۴,۷٪)بود. سروتیپ واریانت ۲ و B/ ۷۹۳ ژنوتیپ‌های غالب در این منطقه بود (نمودار ۱).



شکل ۱ : درخت فیلوژنتیک ویروس برونشیت عفونی

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۱: توزیع ژنوتیپ‌های برونشیت عفونی در استان اردبیل

بحث و نتیجه گیری

کروناویروس‌ها بدلیل خاصیت موتاسیونی بالا توانایی نوترکیبی و جهش زیادی دارند. توانایی بالای آن‌ها در جهش و نوترکیبی این امکان را می‌دهد در میزبان‌های مختلف و شرایط اقلیمی متفاوت فعال باشند. از طرفی طیف میزبانی کروناویروس‌ها بیش از چیزی است که تصور می‌شود. بیماری‌های برونشیت عفونی در مرغداریهای ایران همواره خسارات قابل توجهی ایجاد می‌کند و به همین جهت از اهمیت اقتصادی بسیار زیادی برخوردار می‌باشد. از طرفی با توجه به تنوع سروتیپ‌های ویروس برونشیت عفونی طیور و واکنش ایمنی بسیار اندک بین سویه‌های مختلف این ویروس عملاً واکسیناسیون با یک سویه خاص امکان پیشگیری از وقوع بیماری با سویه‌های دیگر را میسر نمی‌سازد. لذا شناسائی دقیق سروتیپ‌های ویروس در برنامه‌ریزی کنترل و پیشگیری از بیماری از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد (۱۲). تنوع مشاهده شده در توالی ژن تکثیر کروناویروس‌ها نشان می‌دهد که این ویروس به طور فعال در جمعیت پرندگان در گردش است. تحقیقات نشان داد پرندگان جوان و مسن به یک نسبت آلوده می‌شوند و مثبت بودن ویروس تاثیر قابل توجهی در وزن بدن دارد و این مطلب بیانگر این است که عفونت دارای اهمیت بالینی در پرندگان است(۱۲). باید مشخص شود که کروناویروس عفونی در پرندگان روده‌ای، کلیوی، تنفسی یا سیستمیک است (۵). ویروس برونشیت عفونی توانایی بالایی از لحاظ بیماری زایی و تنوع ژنتیکی دارد و بیش از ۵۰ سروتیپ مختلف آن شناسایی شده و واریانت‌های جدید هم به طور مکرر ظهور می‌کنند(۴). علائم تنفسی شامل رال‌های نای، عطسه و سرفه از علائم این بیماری در ماکیان است. در گله‌های تخمگذار ممکن است کاهش کمی و کیفی تخم مشاهده گردد. این بیماری از بعد اقتصادی در جوجه‌های گوشتی باعث کاهش اضافه وزن، کاهش راندمان غذایی و افزایش ضبط لاشه در کشتارگاه می‌شود.در تحقیقات انجام شده توسط ممیز و همکاران نشان داده شد که برخی از سویه‌های ویروس برونشیت موجود در ایران با آنتی سرم اختصاصی ویروس سروتیپ ماساچوست خنثی نمی‌شود که این امر می‌تواند نشانگر وجود سروتیپ‌های دیگر باشد(۲۱). برای تشخیص بیماری تنها جراحات بافت شناسی و چهره بالینی بیماری کافی نیست ممکن است شکل تنفسی بیماری با سایر عوامل بیماری‌زا که منجر به

www.SID.ir

Archive of SID

عفونت منفرد یا چند گانه تنفسی می‌شوند، اشتباه شود(۶). همچنین رکود در تولید و کیفیت تخم‌مرغ ممکن است بدلیل چند عامل، از حالات عفونی تا مشکلات غیر عفونی مانند مدیریت ضعیف یا سوء مدیریت رخ دهد. بعلاوه ممکن است علل دیگری برای ایجاد ناهنجاری‌های مجرای تخم‌بر و بیماری‌های کلیوی مانند کمبودهای غذایی و علل ناشناخته دیگر وجود داشته باشد(۱۴). تعیین سروتیپ و ژنوتیپ ویروس به دلیل وجود تنوع آنتی ژن در بین سویه‌های مختلف برونشیت لازم است تا بر اساس آن علیه سروتیپ خاص موجود، برنامه واکسیناسیون طراحی شود. یکی از مشکلات بزرگ در مورد IBV، ظهور مداوم سویه‌های جدید می‌باشد، شناسایی و تشخیص سویه‌های جدید برای کنترل IBV امری حیاتی است(۳۲). اطلاعات زیادی در مورد نحوه گسترش IBV، در میان کشورهای خاورمیانه در دسترس نیست. با این حال، جابجایی مرزی طیور و محصولات مربوط به آن، به احتمال زیاد از عوامل مهم ظهور سویه‌های جدید می‌باشد(۱۸). علل ظهور سروتیپ‌های جدید ممکن است به علت تغییرات کمی باشد که در توالی آمینو اسیدی پروتئین S1، رخ می‌دهد. این تغییرات می‌تواند بعلت فشار ایمنی ناشی از استفاده گسترده از واکسن‌ها، نوترکیبی به عنوان نتیجه عفونت مخلوط یا کاهش شیوع سروتیپ‌های غالب در نتیجه واکسیناسیون، که به سویه‌های دیگر در فیلد اجازه ظهور می‌دهد، باشد. سیستم تقسیم‌بندی سویه‌ها مشخص می‌کند یک سویه به چه تیپ ویروسی متعلق است. به هر حال، ژنوم ویروس برونشیت عفونی یک RNA تک رشته‌ای با احتمال موتاسیون بالاست. مطالعات مولکولی روی ویروس برونشیت عفونی نشان داده است که سروتیپ‌های جدید و ژنوتیپ‌های جدید ویروس برونشیت عفونی یا اندکی تغییرات با موتاسیون در توالی اسید آمینه S رخ می‌دهد در حالی که قسمت عمده ویروس بدون تغییر باقی می‌ماند(۷). علاوه بر این، ویروس برونشیت عفونی ممکن است در عفونت‌های مخلوط دچار نوترکیبی شود. بنابراین سویه‌های ویروس برونشیت عفونی ممکن است تحت واکنش‌های متقاطع قرار بگیرند و همیشه یک تقسیم‌بندی شفاف وجود ندارد. بر عکس، یک جدایه که واکنش متقاطع جداگانه نشان می‌دهد ممکن است نوترکیبی از چند سویه ویروس باشد (۶). استفاده از RT-PCR به همراه Nested PCR یک ابزار تشخیصی برای ویروس برونشیت عفونی است که ویروس را سریع شناسایی کرده و سروتیپ‌های ویروس با روش Nested PCR تفریق داده می‌شوند. بنابراین حساسیت و ویژگی تکثیر بطور قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌یابد(۱۹). از روش‌های دیگر تعیین ویروس، روش تلفیقی RT-PCR/RFLP می‌باشد. در این روش یک تغییر جزئی ناشی از موتاسیون در ناحیه تقسیم آنزیمی می‌تواند از تقسیم مولکول جلوگیری کند و با یک ناحیه تقسیم جدید به وجود آورد و الگوی قطعات پلی مورف را تغییر دهد و از طرفی ممکن است یک تغییر نوکلئوتیدی که در عملکرد بیولوژیکی ویروس نقش مهمی دارد در الگوی تقسیم تغییری ایجاد نکند لذا این روش مخصوصاً در برونشیت عفونی که شدیداً مستعد تغییرات آنتی ژن و ژنتیکی است، دقیق نیست و در موارد آلودگی‌های مخلوط با چند سروتیپ ممکن است الگوهای متعددی ایجاد کند که تفسیر آن مشکل می‌شود(۱۸). گزارشاتی وجود دارد که بیان می‌کند برخی از ویروس‌های برونشیت تلفیقی RT-PCR/RFLP قابل تعیین تیپ نباشند و برای تعیین تیپ نیاز به تعیین توالی سویه‌ها می‌باشد(۱۶). RT-PCR در شناسایی ویروس برونشیت

www.SID.ir

Archive of SID

عفونی بسیار حساس‌تر از روش ایمنوفلورسنت است (تقریباً دو برابر) و در موارد آلودگی با بیش از یک سویه حساسیت RT-PCR بسیار بیشتر از ایمنوفلورسنت است(۳۰). Nested PCR نسبت به RT- PCR معمولی می‌تواند حساسیت بیشتری در تشخیص داشته باشد، که به علت وجود دومین مرحله تکثیر می‌باشد. به علت تیتر ویروسی پایین در برخی نمونه‌ها، استفاده از RT-PCR ممکن است نتایج خوبی را نشان ندهد و Nested PCR می‌تواند به تشخیص بهتر IBV کمک کند و به علت حساسیت بالای آن، روش Nested PCR می‌تواند به عنوان یک روش تشخیصی سریع و قابل اطمینان برای شناسایی IBV به کار رود(۲۲). زیر واحد S1 پروتئین S دارای اپی توپ‌های اتصال ویروس به سلول، خنثی سازی ویروس و اختصاصی سروتیپ می‌باشد لذا مسئول القای آنتی بادی‌های ممانعت کننده از هماگلوتیناسیون و آنتی بادی‌های خنثی کننده ویروس می‌باشد و از آنجایی که این زیر واحد شدیداً مستعد تغییرات آنتی ژنی و ژنتیکی است بنابراین یک تغییر جزئی در ردیف نوکلئوتیدی این زیر واحد ممکن است منجر به ایجاد یک سروتیپ جدید گردد و باعث شکل‌گیری عدم حفاظت متقاطع و یا حفاظت متقاطع ضعیف در بین سروتیپ‌های مختلف گردد(۱۵). لذا در این بررسی مبنای شناسایی ویروس در روش RT- PCR و Nested PCR، تکثیر ژن S1 ویروس برونشیت عفونی در نظر گرفته شد. شیوع IBV از هر منطقه به منطقه دیگر به حمل و نقل طیور و میزان استفاده از واکسن و کارآیی آن بستگی دارد(۱۷). وقوع این بیماری در سال‌های اخیر به صورت مکرر در ایران اتفاق افتاده است. IBV از پاتوژن‌های مهم صنعت طیور و همراه با ضررهای اقتصادی فراوان در این صنعت می‌باشد.(۲۰) . واکسیناسیون بر پایه H120-Ma5 و سویه تضعیف شده ۴/۹۱ برای کنترل IB در گله‌های ایران استفاده شده است(۱۰). با این حال، گزارش‌های مکرر از وقوع IB در سراسر کشور به خاطر شکست ایمنی وجود داشته است. علت این شکست ایمنی حفاظت متقاطع ضعیف بین ویروس فیلد و سویه واکسن و ظهور مداوم سویه‌های جدید ویروس می‌باشد(۲۵). تعیین ژنوتیپ IBV در کشورها به منظور توسعه و آداپته کردن استراتژی‌های واکسیناسیون مناسب، ضروری به نظر می‌رسد(۲۴). اکبری آزاد، وصفی مرندی و کیوانی سروتیپ 793/B را شناسایی کردند(۲۹). وصفی و همکاران تعیین سروتیپ روی تعدادی از جدایه‌های IBV ایرانی را بین سال‌های ۲۰۰۰-۱۹۹۷انجام دادند. آن‌ها سویه‌ای را یافتند که احتمالاً از نظر آنتی ژنتیکی با سویه ماساچوست (H120) متفاوت بود و حضور ژنوتیپ جدید را پیش‌بینی کردند(۲۸). وصفی و همکاران تجزیه و تحلیل مولکولی سه جدایه ایرانی که به سروتیپ 793/B ویروس برونشیت عفونی تعلق داشت، را انجام دادند. سه سویه ایرانی با دارا بودن ۵/۶۴-۶/۰۷٪ تفاوت نوکلئوتیدی با UK/793/B بعنوان یک پروتوتیپ 793/B و ۱۶/۰۲ -۲۶٪.۰/۲۶ با H120 بعنوان یک سویه واکسینال، به ژنوتیپ 793/B تعلق داشتند(۲۹). شوشتری و همکاران با مطالعه فیلوژنی بر اساس ژن S1، حضور سویه‌های 793/B و Mass را در ایران نشان دادند و بیان نمودند که آلودگی همزمان این دو سروتیپ نشان می‌دهد که احتمالاً این سروتیپ محافظتی علیه یکدیگر ایجاد نمی‌کنند(۲۶). در گزارشی مشخص شد که سویه‌های ۴/۹۱ جدا شده در ایران (به جز IR/491/08)، بیشترین شباهت نوکلئوتیدی را به سویه فرانسوی FR-49047-94، دارند که می‌تواند این احتمال را ایجاد کند که سویه‌های ۴/۹۱ ایران از فرانسه منشا گرفته‌اند و سویه IR/491/08 نیز، شباهت

www.SID.ir

Archive of SID

زیادی به سویه واکسینال ۴/۹۱ داشت(۱۵). همچنین شباهت ژنتیکی بالای سویه‌های ماساچوست جدا شده، به سویه واکسینال Mass، احتمال شناسایی و جداسازی سویه‌های واکسینال را نشان داد(۹). در مطالعه حاضر، میزان شیوع IBV در استان اردبیل، ۷۰٪ بود و ویروس‌های برونشیت عفونی IS/1494 ژنوتیپ غالب در این منطقه محسوب شد. در سپتامبر ۱۹۹۷ یک شیوع از بیماری که با ورم معده، اسهال و از دست دادن وزن در جوجه‌های ۲۵ تا ۷۵ روزه مشخص شد، در شهر کینگدا در چین رخ داد. با این حال این، به عنوان یک نوع جدید از IBV در آن زمان به رسمیت شناخته نشد. از سال ۱۹۹۹ تا ۲۰۰۴، پنج گله مرغ در ۴ استان در چین را مورد بررسی قرار گرفتند و نتیجه به دست آمده نشان داد که واریانت‌های شبه QX یک سویه جدید نفروپاتوژنیک می‌باشد. یک تجزیه و تحلیل گذشته نگر از سویه IBV جدا شده در روسیه در سال ۲۰۰۱، نشان داد که بعضی از سویه‌ها از نظر ژنتیکی به سویه QX مربوط بودند(۲۷). در اروپا، . ورتینگتون و همکاران اظهار داشتند که ویروس‌های شبه QX ژنوتیپ غالب IBV در آلمان، هلند و بلژیک محسوب می‌شوند(۳۱). سویه QX در سال ۲۰۱۱ در بخش جنوبی قاره آفریقا کشف شد. این سروتیپ، سویه فیلدی غالب در اکثر کشورهای دنیا شده است، و با علائم نفریت و سندرم تخم‌گذار کاذب، در ارتباط است(۷). جهان تیغ و همکاران تصمیم به شناسایی IBV، با پرایمرهای اختصاصی گروه در زابل در جنوب شرقی ایران گرفتند. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که ۳۶/۳۶٪، از گله‌های نمونه‌گیری شده از لحاظ IBV به روش RT-PCR مثبت بودند. علاوه بر این ماساچوست، سروتیپ شناخته شده از IBV بود که این کار، اولین مطالعه در این منطقه از ایران است(۱۳). در این مطالعه درصد شیوع IBV در استان اردبیل ۷۰ درصد بود که این نتیجه قابل مقایسه با مطالعه‌ای است که در عربستان سعودی انجام شده که در آن ۳۵/۳۶ درصد گله‌های گوشتی از نظر IBV مثبت بودند(۱۱). بررسی فیلوژنتیک نشان داد جدایه‌های استان اردبیل به ۴ دسته تقسیم می‌شوند. IS/1494 و 793/B و Mass و QX که ۲۱ نمونه از ۳۰ نمونه مثبت گزارش شد و سویه قالب IS/1494 بود. همچنین مطالعات مشابهی در لبنان، اردن، کویت و ترکیه هم انجام شد که سویه رایج IS/1494 را نشان داد(۸). مطالعه حاضر وجود ۵۲/۳ درصد از سروتیپ IS/1494 و ۳۳/۵ درصداز سروتیپ 793/B را در گله‌های گوشتی استان اردبیل نشان داد. سویه 793/B اولین بار در سال ۱۹۸۵ در فرانسه و سپس در سال ۱۹۹۱ در بریتانیا شناسایی شده و سپس به سایر کشورهای در اروپا، آسیا (مخصوصا ایران و ترکیه) و آمریکای شمالی منتقل شده است(۵). به منظور شناسایی IBV با استفاده از روش RT-PCR و طراحی پرایمرهای مناسب برای تکثیر ژن S1 و بکار بردن آن‌ها در Nested PCR، گردش ژنوتیپ ۷۹۳/B مورد مطالعه قرار گرفت و جدایه ۴/۹۱ بیشترین سهم را داشت(۱۵).

منابع

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

2-Belouzard Sandrine, Jean K. Millet, Beth N. Licitra and Gary R. Whittaker .(2012). Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. *Viruses*, **4**: 1011-1033.

3- Bijanzad, P., Momayez, R., Bozorgmehrifard, 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. *Journal of the South African Veterinary Association* **84**: 00-00.

www.SID.ir

Archive of SID

4-Bochkov, Y. A., Batchenko, G. V., Shcherbakova, L. O., Borisov, A. V., & Drygin, V. V. (2006). Molecular epizootiology of avian infectious bronchitis in Russia. *Avian Pathology,* **35**: 379-393.

5-Cavanagh, D. (2005). Coronaviruses in poultry and other birds. *Avian pathology **34**: 439-448.*

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

7-De Wit, J. J., Cook, J. K., Van der Heijden, H. M. (2011). Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures. *Avian Pathology*, **40**: 223-235.

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

9-Ghahremani, N., Fard, M. B., Shoushtari, H., Momayez, R., Sheikhi, N., Khoshzahmat, A., Eshratabadi, F. (2011). Molecular Analysis of Infectious Bronchitis Viruses Isolated in Iran from 1998-2008. J*ournal of Animal and veterinary advances,* **10**: 2961-2967.

10-Hashemzadeh, M., V. Karimi, S. Masoudi, A. H. Shoushtary, A. G. Langeroudi, R. Momayez, M. H. N. Shirazi, H. Maghsodloo, R. Hasanzadeh, F. Eshratabadi (2013). Phylogenetic study of Iranian infectious bronchitis virus isolates during 2010-2011 using glycoprotein S1 gene. *Journal of Veterinary Research*, **68**: 135-141..

11-Hemida, M. G., Al-Hammadi, M. A., Daleb, A. H. S., Gonsalves, C. R. (2017). Molecular characterization and phylogenetic analyses of virulent infectious bronchitis viruses isolated from chickens in Eastern Saudi Arabia. *VirusDisease,* **28**: 189-199.

12-Jackwood, M. W. (2012). Review of infectious bronchitis virus around the world. *Avian diseases* **56**: 634-641.

13- Jahantigh, M., Salari, S., Hedayati, M (2013). Detection of infectious bronchitis virus serotypes by reverse transcription polymerase chain reaction in broiler chickens. *SpringerPlus*, **2**: 36.

14-Jordan, F. T. and M. Pattison (1996). *Poultry diseases.*

15-Kalokhoran, A. Y., et al. (2017). Co-circulation of three clusters of 793/B-like avian infectious bronchitis virus genotypes in Iranian chicken flocks. *Archives of virology* **162**: 3183-3189.

16-Lee, S. K., Sung, H. W., Kwon, H. M. (2004). S1 glycoprotein gene analysis of infectious bronchitis viruses isolated in Korea. *Archives of virology* **149**: 481-494.

17- Liu, S., Han, Z., Chen, J., Liu, X., Shao, Y., Kong, X., Tong, G., Rong, J. (2007). S1 gene sequence heterogeneity of a pathogenic infectious bronchitis virus strain and its embryo-passaged, attenuated derivatives. *Avian Pathology* **36**: 231-234.

18-Mahmood, Z. H., Sleman, R. R., & Uthman, A. U. (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.

19- Meulemans, G., Boschmans, M., Decaesstecker, M., Van den Berg, T. P., Denis, P., Cavanagh, D. (2001). Epidemiology of infectious bronchitis virus in Belgian broilers: a retrospective study, 1986 to 1995. *Avian Pathology* **30**: 411-421.

20- Mohammadi, M.P., Karimi, V., Hashemzadeh, M., Ghalyanchi Langeroudi, A., Ghafouri, SA., Khaltabadi Farahani, R., Maghsoudloo, H., And Abdollahi, H. (2014). Combination of H120 and 793/B Types of Infectious Bronchitis Virus Vaccine Protects Chickens against Challenge with OX Like Strain of the Virus. *Iranian Jornal Of Virology **8**:20-24*

21- Momayez, R., Pourbakhsh, S. A., Khodashenas, M., Banani, M. (2002). Isolation and Identification of Infectious Bronchitis Viruse Frome Commercial Chicken. *Archive of Razi institute **53**:1-10*

22-Momeni-Moghaddam, M. (2015). Development of a Nested Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Assay to Detect Infectious Bronchitis Virus. *Journal of Genes and Cells* **1**: 51-56.

23-Najafi, H., Langeroudi, AG., Hashemzadeh M., Karimi, V., Madadgar, O., Ghafouri, SA., Maghsoudlo, H., Farahani RK. (2016). Molecular characterization of infectious

www.SID.ir

Archive of SID

bronchitis viruses isolated from broiler chicken farms in Iran, 2014-2015. *Archives of virology* 161: 53-62.

24-Pohuang, T., Chansiripornchai, N., Tawatsin, A., Sasipreeyajan, J., (2009). Detection and molecular characterization of infectious bronchitis virus isolated from recent outbreaks in broiler flocks in Thailand. *Journal of veterinary science* **10**: 219-223.

25-Shokri, S., Karimi, V., Langeroudi, AG., Marandi, MV., Hashamzadeh, M., Zabihipetroudi, T., Najafi, H., Tehrani, F. (2018). Seroprevalence and genotyping of avian infectious bronchitis virus detected from Iranian unvaccinated backyard chickens. *Iranian Journal of Microbiology* **10**: 65.

26-Shoushtari, A. H., Toroghi, R., Momayez, R., & Pourbakhsh, S. A. (2008). 793/B type, the predominant circulating type of avian infectious bronchitis viruses 1999-2004 in Iran: a retrospective study. *Archive of Razi institute* **63**:1-5

27-Terregino, C., Toffan, A., Serena Beato, M., De Nardi, R., Vascellari, M., Meini, A., Ortali, G., Mancin, M. and 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 Pathology* **37**: 487-493.

28-Vasfi-Marandi, M., M. Bozorgmehrifard (2001). Isolation and identification of infectious bronchitis viruses in chickens between 1997-2000 in Iran.*Journal Faculty Veterinary Medicine University Tehran* **56**: 119-124.

29-Vasfi, Marandi M., Amineh H. Keyvani , Azad G. Akbari. (2007). Molecular analysis of three Iranian isolates belonged to 793/B serotype of Infectious bronchitis viruses. *Journal of Veterinary Reaserch,* **62**:69-80

30- Wang, C., Miguel, B., Austin, F. W., Keirs, R. W. (1999). Comparison of the immunofluorescent assay and reverse transcription-polymerase chain reaction to detect and type infectious bronchitis virus. *Avian diseases*,**43**: 590-596.

31-Worthington, K. J., Currie, R. J. W., & 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.

32-Zwaagstra, K. A., Van der Zeijst, B. A., & Kusters, J. G. (1992). Rapid detection and identification of avian infectious bronchitis virus. *Journal of clinical microbiology* **30**: 79-84.

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 15, Issue 1, 2019

Genotyping of avian Infectious bronchitis viruses in suspected broiler flocks in Ardebil, 2016

Zakeri GharahDarvishloo, S.[1], Ghalyanchilangeroudi, A.[2], Zolfaghari, M.R.[1], Soleimani, M.[1], Yousefzadeh Kalkhoran, A.[2], Modiri Hamdan, A.[2]

1. Associated Professor, Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom. Iran
2. Associated Professor, Department of Microbiology and Immunology, University of Tehran, Tehran, Iran
Received: 18 April 2018 Accepted: 11 November 2018

Abstract

Infectious bronchitis virus (IBV) is the cause of acute respiratory viral disease in poultry with respiratory rats and coughing and sneezing. Corona viruses are created a wide range of respiratory, intestinal, liver and nervous disease with different virulence in cats, dogs, pigs, rodents, cows, birds and human. Corona viruses are able lots of recombination's and mutations. This ability gives them the opportunity to be active in different hosts and different climatic conditions, such as avian infectious bronchitis disease in poultry that can cause losses in broilers. S1 gene sequencing is used for molecular epidemiology and genotype characteristics of infectious bronchitis virus. For better understand the molecular epidemiology of infectious bronchitis virus in Iran, the IBVs gene isolates of broiler poultries from Ardebil province were sequenced in this study. A total of 30 tracheal swabs were collected from broilers in random in Ardebil province in 2016. For detection and genotyping of virus, RNA extraction was performed using RNA extraction kit. RT-PCR was used in one process for the production of cDNA, and then, RT-PCR product were amplified to identify infectious bronchitis virus using Nested-PCR with primers encoding 5'UTR, then, for genotyping of positive samples, gene sequencing of spike glycoprotein was performed 70% of tracheal swabs were positive and strain identification was done according to existing protocols. It can be concluded that the corona virus is spinning among broiler flocks in Iran. In this study, extraction and RT-PCR on suspected positive samples was repeated several times. During the test two negative controls was used including extraction negative control and RT-PCR negative control. Genetic analysis based on the highly variable nucleotide sequence of S1 gene showed that, the overall rate of infection was 70% and detected three genotypes in this area: Variant 2 (IS/1494), 793/B and MASS and QX overall percentages in respectively 52/3%, 33/5%, 9/5% and 4/7%.

Keywords: infectious bronchitis virus, broiler flock, Ardebil, genotyping, RT-PCR

**Corresponding Author: Ghalyanchilangeroudi, A.*
Address: Department of Microbiology & Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Iran.
Tel: 021-61117154
Email: ghalyana@ut.ac.ir

www.SID.ir