Archive of SID

جداسازی و شناسایی مولکولی ویروس های برونشیت عفونی طیور در مرغداریهای صنعتی ایران

دکتر گیتا اکبری آزاد[1] دکتر مهدی وصفی مرندی[1]* دکتر حسین کیوانی[2]

دریافت مقاله: ۶ دی ماه ۱۳۸۱
پذیرش نهایی: ۱۶ اسفند ماه ۱۳۸۲

هدف: شناسایی مولکولی ویروس های برونشیت عفونی طیور به روش RT-PCR/RFLPs از مرغداریهای صنعتی ایران.

طرح: مطالعه طولی بین سالهای ۱۳۸۲-۱۳۷۷.

نمونه ها: نمونه های بافتی نای، کلیه و ریه گله های مشکوک به بیماری تنفسی.

روش: نمونه های بافتی ارجاع شده به آزمایشگاه ویروس شناسی طیور بخش بیماریهای طیور دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، طی سالهای ۱۳۸۲-۱۳۷۷ از گله های گوشتی و تخمگذار به تخم مرغهای جنین دار ۹-۸ روزه تلقیح شد. ۱۲جدایه از ویروس هایی که در پاساژ سوم باعث تاخیر در رشد جنین، رسوب اورات در مزونفرون ها یا مرگ جنین شده و از نظر هماگلوتیناسیون گلبول قرمز مرغ منفی بودند و همچنین ۵ سویه رفرانس 793/B,D274,M41,D1466,H120 برای آزمایشات مولکولی RT-PCR/RFLPs انتخاب شدند. RNA ویروس استخراج و به کمک آنزیم رونوشت برداری معکوس به cDNA تبدیل و متعاقب آن به کمک تکنیک PCR ژن گلیکوپروتئین S1 با پرایمرهای اختصاصی گروه تکثیر شد و درنهایت محصول PCR با استفاده از ژل آگار ۱ درصد الکتروفورز شده و نمونه های مثبت در PCR که باند اختصاصی بیش از ۱۶۰۰ جفت باز را نشان می دادند توسط آنزیم های محدودگر Hae III,Ecor I,Hind III هضم شده و الگوهای هضم آنزیمی (RFLPs) نمونه های مثبت با الگوی RFLPs سویه های رفرانس 793/B, D274, M41,H120 با استفاده از ژل آگار ۱ درصد الکتروفورز و مقایسه شدند.

نتایج: از ۱۲ نمونه مثبت در RT-PCR ، در هضم آنزیمی با Hac III ، ۸ نمونه الگوی 793/B و بقیه الگوی تیپ Mass را در RFLPs نشان دادند.

نتیجه گیری: با توجه به اینکه 793/B نسبت به سویه واکسینال H120 ماساچوست نوعی سروتیپ با هموlوژی پایین بوده و می تواند تاحدودی مسئول واگیری برونشیت در گله های واکسینه و توجیه کننده شکست در واکسیناسیون این بیماری باشد، جداسازی و شناسایی این سروتیپ ممکن است مقدمه ای برای تغییرسیاست کنترل و پیشگیری علیه بیماری برونشیت عفونی باشد. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، (۱۳۸۳)، دوره ۵۹، شماره ۳، ۲۶۴-۲۵۹.

واژه های کلیدی: بیماری برونشیت عفونی طیور، سروتیپ 793/B,RT-PCR/RFLPs.

ویروس های برونشیت عفونی طیور(IBV) عامل بیماری برونشیت عفونی (IB)، متعلق به خانواده *کرونا ویریده* دارای ژنوم RNA با وزن مولکولی حدوداً ۲۷ kb، با مفهوم مثبت و دارای ۴ پروتئین مهم شامل N (نوکلئوپروتئین)، M (غشائی) و sM یا E (پروتئین کوچک غشائی) و S (زائده گلیکوپروتئینی سطحی) می باشند. گلیکوپروتئین S، مهمترین پروتئین سطحی ویروس از نظر اعمال بیولوژیک، دارای دو تحت واحد S1 و S2 است که تحت واحد S1 القاء کننده آنتی بادهای HI و VN می باشد. این تحت واحد با داشتن مناطق ثابت (Conserved) و متغیر (Variable) و بسیار متغیر (Hyper Variable) مبنای خوبی برای تقسیم بندی ویروس های IBV به سروتیپ ها و واریانت های مختلف است (۱،۹،۱۰).

ویروس های IBV حداقل حاوی بیش از ۳۰ سروتیپ هستند (۲۱). از آنجا که این ویروس ها به فراوانی می توانند از طریق موتاسیون های نقطه ای و پدیده نوترکیبی ژنتیکی دچار تغییرات ژنتیکی و آنتی ژنیکی شوند و از

۱) گروه آموزشی علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
۲) گروه آموزشی میکروبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران - ایران.
*) نویسنده مسؤول mvmarand@ut.ac.ir

Isolation and identification of infectious bronchitis viruses in poultry farms of Iran

Akbari Azad, G.,[1] Vasfi Marandi, M.,[1] Keyvani, H.[2]
[1]Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran. [2]Department of Microbiology University of Iran Medical Sciences, Tehran-Iran.

Objective: Detection of infectious bronchitis viruses by RT-PCR/RFLPs in poultry farms of Iran.

Design: Longitudinal study from 1997 to 2003.

Samples: Tracheas, lungs and kidneys of suspected flocks to respiratory diseases.

Procedure: From 1997-2003, tissues samples including lung, trachea and kidney, had been prepared from broiler and layer flocks were submitted to avian virology laboratory of poultry diseases section in order to isolate respiratory viral diseases viruses. A total number of 50 infectious bronchitis viruses (IBV) were isolated in embryonated chicken eggs. The infected embryos displayed stunting, urate deposition in the mesonephros or death after three passages. Twelve isolates that had showed typical signs in embryos, were selected for molecular identification. Viral RNA was extracted by RNX^{TM} plus (CinnaGen Co.) using chloroform / Isoamyl alcohol, Isopropanol, Ethanol and DEPC water. cDNA was prepared from extracted RNA with RT enzyme, RH primer, RT buffer, dNTP and Rnase inhibitor. For PCR reaction, buffer PCR 10X, $MgCl_2$, S1oligo5' & 3' primer, ampli Taq DNA polymerase and dNTP were added to cDNA and then PCR was conducted in thermal cycler. The PCR products were analyzed on a 1% agarous gel and Ethidium Bromide staining. The S1 glycoprotein genes of IBV strains appeared to be above 1600 bp in size. PCR products were digested by HaeIII, EcorI and HindIII, according to the manufacture's recommendation.

Results: Base on RFLPs patterns and comparison with RFLP references patterns (793/B, D274, M41, H120), 8 of 12 strains showed 793/B pattern and the rests (4 of 12) showed Mass pattern in RFLPs.

Clinical implications: Regarding to low homology and weak cross protection between 793/B serotype and vaccinal strain (Massachusetts), prevention and a controled strategy against IB should be altered.

J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran. 59, 3: 259-264, 2004.
Key words: IBV, 793/B serotype, RT-PCR/RFLPs

Corresponding author's email:mvmarand@ut.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

طرفی میزان حفاظت متقاطع بین سویه های مختلف بستگی به درصدهمولوژی بین ژنوم آنها بویژه ژن S1 دارد، به همین جهت ظهور سویه های جدید خطر جدی برای صنعت طیور محسوب می شود (۲۵).

مواد و روش کار

جداسازی ویروس: جداسازی ویروس بر اساس دستور العمل Jackwood و Gelb (۱۵) با اندکی اصلاح در تخم مرغهای جنین دار ۹-۸ روزه تهیه شده از یک فارم مادر گوشتی عاری از *مایکوپلاسما* و واکسینه شده با واکسن های زنده و کشته ماساچوست قبل از مرحله تولید انجام شد. مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه های بافتی هموژن شده به داخل حفره الانتوئیک ۴ عدد از تخم مرغهای جنین دار تلقیح و سپس در۳۷/۵ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شدند. کلیه تخم مرغهای تلقیح شده تا ۷-۶ روز بعد از تلقیح روزانه یکبار تحت نوربینی با دستگاه نوربین قرار گرفتند (جدول ۱).

استخراج RNA ویروس: استخراج RNA ویروسی با استفاده از محلول استخراج RNA بنام RNX™-Plus (شرکت سیناژن) انجام شد. به طور خلاصه مقدار ۸۰۰ میکرولیتر از RNX™-Plus به ۵۰۰ میکرولیتر مایع آلانتوئیک حاوی ویروس برونشیت عفونی اضافه شد. بعد از ورتکس، ۱۰ دقیقه روی یخ نگهداری شده و سپس ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم- ایزوآمیل الکل (به نسبت ۲۴ به ۱) اضافه و در ۱۲۰۰۰g سانتریفوژ شد. فاز آبی به میکروتیوب دیگری منتقل و ۶۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول به آن اضافه و سپس در ۲۰- درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه نگهداری و در ۱۲۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. در انتها پس از حذف مایع روئی، رسوب در آب مقطر (DEPC-dH20) حل گردید و در ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری و یا بلافاصله برای واکنش RT استفاده گردید.

بهینه سازی آزمایش RT-PCR: آزمایش رونوشت برداری معکوس یا RT (Reverse Transcriptase): با استفاده از موارد زیر در حجم نهایی ۲۰میکرولیتر انجام گردید:

5x RT buffer 4 µl, 10 mM dNTPs 2µl, Random Hexamer primer 1.5 µl (0.2 µg), M- MVLV Reverse Trascriptase Enzyme (Fermentas)1µl(200 units), RNase inhibitor (Fermentas) 0.5 µl (40 units), Template RNA 11 µl (1-5 µg)

مخلوط در ۴۰ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ دقیقه گرمخانه گذاری و سپس واکنش PCR به روش زیرانجام شد:

واکنش زنجیره ای پلیمرازی یا PCR: در این بررسی از پرایمرهای اختصاصی گروه با توالی (5'-CATAACTAACATAAGGGCAA-3') S1OLIGO3 و (5'-TGAAACTGAACAAAAGAC-3') New S1OLIGO5 که متعلق به ژن S1 می باشد استفاده گردید(۶).

واکنش PCR با حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر با استفاده از cDNA reaction mixture 10µl, 10X PCR buffer 5 µl, 50 mM $MgCl_2$ 3.5 µl, 10 µM dNTPs 2.5 µl, Reverse primer 1µl(50 pmol), Forward primer 1µl (50 pmol), Taq DNA Polymerse (CinnaGen) 1 µl (5 units), D H20 26 µl

و ترموسایکلر(Eppendorf Master cycler gradient) با برنامه حرارتی دناتوراسیون اولیه ۹۴ درجه سانتیگراد برای ۵ دقیقه و پلیمریزاسیون نهائی ۷۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه و ۳۵ سیکل حاوی ۹۴ درجه سانتیگراد ۱دقیقه، ۴۵ درجه سانتیگراد ۲دقیقه و ۷۴ درجه سانتیگراد ۵ دقیقه انجام شد. محصول واکنش با آگار ژل ۱ درصد الکتروفورز شده و بعد در تانک رنگ حاوی اتیدیوم برماید(۰/۵ میلیگرم در لیتر). رنگ آمیزی و بعد از رنگ بری در آب مقطر با لامپ UV (GDAS-1200 System) بررسی شد.

آزمایش RFLPs: محصول PCR با آنزیم های محدودگر HindIII, HaeIII و EcorI در حجم نهائی ۲۵ میکرولیتر با ترکیب PCR Product 21 µl, 10x reaction buffer 3µl, Enzyme (DcsjcotZs) 1 µl (10 units) انجام و سپس در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲ ساعت گرمخانه گذاری و محصول آن از نظر چند شکلی طول قطعات ناشی از هضم آنزیمی (RFLPs) روی آگارژل ۱ درصد الکتروفورز و با لامپ UV بررسی شد.

نتایج

جداسازی ویروس: جنینهای تلف شده بلافاصله و جنینهای تلف نشده قبل از ۱۵ روزگی از انکوباتور خارج و به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شدند. سپس مایع الانتوئیک کلیه جنینها را به شکل استریل برداشت نموده و حضور یا عدم حضور ویروس از نظر خاصیت هماگلوتیناسیون ارزیابی گردید. بعد از برداشت مایع الانتوئیک، وجود خونریزی بر روی جنین، رسوب اورات در کلیه ها، تأخیر در رشد و نکروز کانونی کبد مورد مشاهده قرار گرفت. هر نمونه که طی ۳ پاساژ متوالی فاقد نشانیهای ماکروسکوپیک ویروس برونشیت عفونی بر روی جنین بود، منفی تلقی گردید. در این بررسی در مجموع تعداد ۱۲ نمونه که روی جنین تخم مرغ علائم واضح ایجاد کرده بودند انتخاب شدند. همچنین از سویه رفرانس ایران به نام ۱۰۰۷ (که قبلاً با تایید آزمایشگاه Weybridge متعلق به سروتیپ 793/B شناسایی شده بود) (۳،۲۵) و چند سویه IBV تهیه شده از آزمایشگاه Weybridge شامل D274, 793/B, H120, M41, D1466, به عنوان سویه های رفرانس برای مراحل بعدی استفاده شد.

تکثیر ژن گیلکوپروتئین S1 در آزمایش PCR: ژن S1 جدایه های IBV (جدول ۱) وسویه های رفرانس (H120, M41, D274, 793/B) با پرایمرهای اختصاصی گروه که کل قطعه S1 را در بر می گیرد در واکنش PCR تکثیر شده و قطعه ای به طول حدوداً ۱۶۵۰ جفت باز تولید شد (تصویر ۱). ژن سویه رفرانس D1466 با پرایمرهای مورد استفاده در این آزمایش تکثیر نشد.

آزمایش RFLPs: ژن S1 سویه های رفرانس IBV (D274, 793/B, H120, M41, D1466,) در هضم آنزیمی با HaeIII دو الگوی متفاوت RFLPs را نشان دادند. آنزیم EcorI قادر به هضم آنزیمی این سویه ها نبود ولی HindIII سویه رفرانس D274 را در دو ناحیه هضم کرده و ۳ قطعه حاصل شد (تصویر۲). ژن S1 از ۱۲ جدایه IBV ، در هضم آنزیمی با HaeIII دو الگوی متفاوت RFLPs را نشان دادند. الگوی ۸ جدایه (۱،۳،۴،۶،۹،۱۰،۱۱)

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۱- شماره نمونه های اخذ شده، نوع گله و سال نمونه گیری.

شماره نمونه	نوع و سن گله	سال نمونه گیری
۱۰۵۲	گوشتی ۳۴ روزه	۱۳۷۷
۴۰۳۱	گوشتی ۳۸ روزه	۱۳۷۶
۱۰۶۲	گوشتی ۳۱ روزه	۱۳۷۸
۱۰۰۷	گوشتی ۳۴ روزه	۱۳۷۸
۱۰۳۷	گوشتی۴۰ روزه	۱۳۷۸
۱۰۶۱	تخمگذار ۱۰ هفته	۱۳۷۸
۴۰۹۲	گوشتی ۳۸ روزه	۱۳۸۰
۴۰۳۴	گوشتی ۴۲ روزه	۱۳۷۹
۱۰۰۹	گوشتی ۳۶ روزه	۱۳۷۸
۱۰۴۰	گوشتی ۴۶ روزه	۱۳۸۲
۴۰۳۹	گوشتی ۳۵ روزه	۱۳۸۱
۳۶۵۴	گوشتی ۲۱ روزه	۱۳۷۹

در تصویر ۳) دقیقاً مشابه الگوی 793/B و۴ جدایه دیگر (۲،۷،۸،۱۲ در تصویر ۳) الگوی مشابه H120 و M41 (الگوی تیپ Mass) را نشان دادند. الگوی RFLPs جدایه ۱۰۶۱ (شماره ۶ در تصویر ۳) یک باند اضافی ۹۰۰bp نیز نشان داد. آنزیم های Hind III و EcorI قادر به هضم آنزیمی ۱۲ جدایه مثبت IBV نبودند. الگوی هیچ یک از جدایه ها مشابه D274 نبود (تصویر۳).

بحث

ویروس برونشیت عفونی (IBV) می تواند باعث ایجاد بیماری تنفسی، التهاب کلیوی، اختلالات تولید مثلی و کاهش وزن شود. با این حال هیچ کدام این علائم اختصاصی بیماری نیستند و بدین ترتیب برای تشخیص عفونت در گله های مبتلا به ابزار تشخیصی نیاز است. این تشخیص گاهی مستلزم شناسایی نوع ویروس نیز می باشد تا بتوان با انتخاب برنامه واکسیناسیون بهتر، حفاظت بیشتری در گله های بعدی ایجاد کرد. به طور کلی عفونت با IBV را می توان به دو طریق شناسایی کل یا جزئی از ویروس IBV (شناسایی آنتی ژن یا ژنوم ویروس) و شناسایی آنتی بادی اختصاص علیه IBV تشخیص داد (۱۲).

به علت تغییرات آنتی ژنی و ژنتیکی که مرتباً در ویروس های برونشیت عفونی رخ می دهد، این ویروس همواره نقطه هدف برای توسعه و اصلاح تست های تشخیصی و روشهای شناسایی IBV بوده است. انتخاب روش مناسب از بین انواع روشها و تفسیر نتایج حاصله مشکل و گاهی گیج کننده است. با این حال براساس هدف و شرایط منطقه ای می توان بهترین روش یا تلفیقی از چند روش را انتخاب کرد. با گذشت زمان، روشهای تشخیص مولکولی جایگاه ویژه ای یافته اند. از آنجا که تست های سرولوژیک، بر مبنای شناسایی تولید یا افزایش در تغییر آنتی بادی های مخصوص علیهIBV، تست های پر زحمت و وقت گیرند و به طور معمول به منظور تشخیص مشکل بالینی به دوبار نمونه گیری نیازمند است، امروزه روشهای تشخیصی بر مبنای ژنوم ویروس کاربرد وسیعی یافته اند. عمده این تکنیک ها واکنش زنجیره ای پلمیرازی (PCR) است که می توان به کمک تکنیک های دیگر مثل RFLPs (چند شکلی طول قطعات ژنی ناشی از هضم آنزیم های محدودگر) یا هیبریداسیون یا تعیین سکانس، اطلاعات بسیار ارزشمندی را در ارتباط با شناسایی ویروس به دست آورد (۱۲).

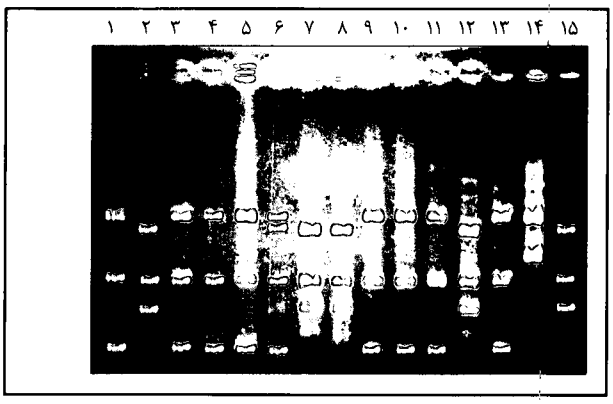
از مزایای تکنیک های مولکولی، حساسیت، سرعت و ویژگی بالای آن است. در تکنیک PCR می توان از نمونه مستقیم استفاده کرد (۱۶). حتی به زنده بودن میکروارگانیسم در نمونه آلوده نیاز نیست چون این تکنیک می تواند ویروس کشته را هم شناسایی کند (۱۸،۲۰). از نظر تئوری حد تشخیصی در این روش در حد ۱۰ ویروس در نمونه آلوده است که البته در عمل شاید رسیدن به این مرز تشخیصی کمی مشکل باشد. می توان بیش از یک ویروس یا چند سروتیپ یا سویه از یک ویروس را همزمان در نمونه آلوده تست کرد (Nested/multiplex RT-PCR). از مشکلات اقدامات کنترلی و مطالعات اپیدمیولوژیک در بیماری برونشیت گروه بندی سویه های IBV است که به دلیل فقدان استاندارد در روشهای به کار رفته و تنوع این آزمایشات و مهمتر از همه ماهیت این ویروس می باشد. به طور کلی طبقه بندی ویروس های IBV می تواند بر دو مبنای طبقه بندی ساختاری (Functional) مربوط به عمل بیولوژیکی ویروس و طبقه بندی غیر ساختاری(Non-functional) برمبنای ژنوم ویروس باشد. از گروه اول می توان ایمونوتیپ، پروتکتوتیپ و سروتیپ و از گروه دوم ژنوتیپ را نام برد که عمدتاً تلفیقی از PCR با یک روش دیگر همچون RFLPs، هیبریداسیون و سکانس می باشد(۱۲). در RFLPs محصول PCR توسط آنزیم های محدودگر در نواحی تقسیم با ویژگی بالا قطع می شود و در صورت تفاوت در DNA، طولهای ناهمسان که نشانه پلی مورفیسم بودن است به وجود می آید. در این روش، گرچه برخی اوقات حتی از تغییرات کوچک به اندازه یک نوکلئوتید تفاوتها آشکار می شود ولی عمدتاً این روش برای آشکار سازی حذف یا افزوده شدن قطعه بزرگ DNA قابل استفاده است. الگوهای RFLPs به راحتی می توانند با همدیگر مقایسه شوند. روش تلفیقیRT-PCR/RFLPs ، یک تشخیص دقیق با ویژگی بالا و با قابلیت تکرار بالا و مناسب برای طبقه بندی سریع سویه ها است. گرچه اطلاعات ژنومی به دست آمده با کمک RFLPs، قابلیت تعمیم به اطلاعات بیولوژیکی را ندارد اما این نکته نمی تواند به عنوان ضعف این تکنیک قلمداد شود (۱۲،۱۷،۱۸۱۹،۲۳).

ویروس برونشیت عفونی سروتیپ 793/B (که در فرانسه CR88 و در هلند 4/91 خوانده می شود) اولین بار در فرانسه در سال ۱۹۸۸ شناسایی شد. گرچه به نظر می رسد این ویروس از سال ۱۹۸۵ در فرانسه وجود داشته است. در انگلیس، سروتیپ 793/B اولین بار در سال ۱۹۹۱ توسط Gough وParsons در گله های واکسینه شده با سویه ماساچوست IB گزارش گردید که براساس تست VN و HI در سروتیپ جدیدی طبقه بندی شد (۱۰،۲۰،۲۱). گستردگی عفونت با سروتیپ 793/B بتدریج تا آسیای شرقی، مکزیک و

www.SID.ir

Archive of SID

تصویر ۱- الکتروفورز روی ژل آگار ژن S1 تکثیر شده در واکنش RT-PCR: M= Gene ruler 1Kb DNA ladder (Fermentas) Lane1= 793/B, lane 2= D274, lane 3= M41, Lane 4= H120, Lane 5= 1007

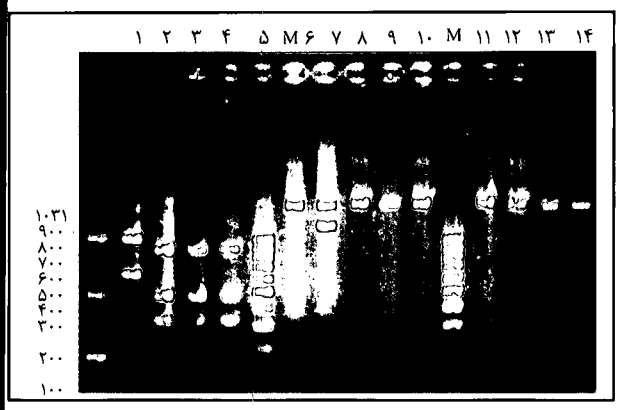


تصویر ۳- الگوی RFLPs در ۱۲ جدایه IBV در هضم آنزیمی با HaeIII در مقایسه با سویه های رفرانس: Lane 13=793/B, Lane 14= D274, Lane 15= H120. شماره های ۱، ۳، ۴، ۶، ۹، ۱۰و ۱۱ الگوی مشابه 793/B و شماره های ۲، ۷، ۸ و ۱۲ الگوی مشابه H120 (تیپ Mass) را نشان دادند.

بسیاری از کشورهای دیگر کشیده شد و امروزه به نظر می رسد که غالبترین سروتیپ بعد از ماساچوست در برخی کشورها (از جمله بریتانیا) باشد (۸). اختلاف سکانس آمینواسیدی ژن S1 سروتیپ 793/B با سروتیپ های دیگر IBV حدود ۴۸-۲۱ درصد می باشد. به عنوان مثال 793/Bدر توالی آمینواسیدی ژن S1 با H120 حدود ۲۵ درصد تفاوت دارد. این اختلاف سکانس خود می تواند توجیهی برای واگیری بیماری در گله های واکسینه باشد چرا که حفاظت متقاطع بین سویه ها در بیماری IB به درصد همولوژی ژن S1 بستگی دارد (۵).

علائم بیماری در گله های مادر درگیر با سروتیپ 793/B شامل: مرگ و میر و میوپاتی عضله عمقی سینه و گاهی همراه با عضله سطحی سینه می باشد. در گله های گوشتی واکسینه، مرگ و میرعموماً روزهای آخر دوره پرورش (حدود ۶ هفتگی) در یک دوره یک هفته می باشد. در گله های تخمگذار، عفونت با این سروتیپ کاهش خفیف تولید، با تأثیر کم یا بدون تأثیر روی رنگ پوسته تخم مرغ و بدون تلفات گزارش شده است (۱۰،۱۱،۱۰،۲۱). گرچه در برخی گزارشات، کاهش تولید مشخص همراه با بد شکلی تخم مرغ و تلفات نیز نشان داده شده است (۱۴).

در اروپا واکسن Nobilis IB 4/91 یا Merial CR88 که به صورت زنده



تصویر ۲- الگوی RFLPs در ۴ سویه رفرانس IBV: M= Gene ruler 1Kb DNA ladder (Fermentas). Lane 1-5: digested by HaeIII, Lane 6-10: digested by HindIII, Lane11-14: digested by EcorI, Lane 1, 6, 11= 793/B, Lane 2, 7, 12= D274, Lane 3, 8, 13= H120, Lane5, 9, 14= Field Isolates, Lane 5,10= M41

تخفیف حدت یافته لیوفیلیزه است. علیه این سروتیپ موجود می باشد که در برخی گله های گوشتی استفاده می شود و به نظر می رسد که شانس ایجاد سویه های جدید در چالش با سایر سویه های واکسینال دیگر بالا رود (۷). از سویه های مهم این سروتیپ می توان 3/91،7/91 و 2/91 را نام برد که با اندکی تفاوت در ژنوم S1 همگی در یک ژنوتیپ و سروتیپ طبقه بندی می شوند. مقایسه سویه های متعلق به سروتیپ 793/B جدا شده در بریتانیا و سویه های متعلق به سروتیپ CR88 در فرانسه نشان می دهد که بیشترین اختلاف آمینواسیدی در کل پروتئین S1 بین این دو سروتیپ حداکثر ۷/۶ درصد بوده است (۷).

در ایران، این سروتیپ اولین بار توسط وصفی مرندی و بزرگمهری در سال۱۳۷۷ از یک گله گوشتی از مرغداری گوشتی اطراف کرج جدا شد که متعاقباً بعد از تأیید آزمایشگاه Weybridge به عنوان سروتیپ 793/B شناسایی شد (۳،۲۴). اولین گزارش شناسایی مولکولی ویروس توسط وصفی مرندی و همکاران در سال۱۳۸۰ (۴) و صیفی آباد شاپوری و همکاران در سالهای۱۳۸۰ و ۱۳۸۲ می باشد (۲،۲۲).

در این مطالعه کل ژن S1 جدایه های IBV و چند سویه رفرانس IBV توسط پرایمرهای اختصاصی گروه تکثیر شد. تنها استثنای سویه رفرانس D1466 بود که ژن S1 آن با این پرایمر تکثیر نشد. محصولات PCR در هضم آنزیمی با سه آنزیم محدودگر Hae III و Hind III و EcorI مورد مقایسه قرار گرفتند. در هضم آنزیمی با Hae III الگوی RFLPs در ۸ جدایه از ۱۲ جدایه IBV و از جمله سویه ۱۰۰۷ ایران که قبلاً به تأیید آزمایشگاه Weybridge انگلستان رسیده بود و به عنوان 793/B اعلام شده بود دقیقاً مشابه سویه رفرانس 793/B بود. الگوی ۴ جدایه مزرعه ای دیگر مشابه سویه رفرانس H120 یا M41 بود و۳ قطعه تولید کرد. الگوی RFLPs جدایه ۱۰۶۱ (شماره ۶ در تصویر ۳) یک باند اضافی در ناحیه ۹۰۰bp نیز نشان داد. الگوی هیچ کدام از جدایه های مزرعه ای شبیه D274 نبود. فقط سویه رفرانس D274 دارای ناحیه هضمی برای آنزیم HindIII بود و سه قطعه ایجاد کرد ولی این آنزیم قادر به هضم جدایه های مزرعه ای و بقیه سویه های رفرانس نبود. همچنین آنزیم EcorI نیز قادر به هضم هیچ کدام از ۱۲ جدایه مزرعه و ۴ سویه رفرانس نبود.

www.SID.ir

Archive of SID

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه تهران که در تصویب و پشتیبانی های طرح برونشیت عفونی طیور به شماره ۲۱۸/۱/۲۸۲ مساعدت داشته اند و از قطب علوم درمانگاهی که در تأمین بخشی از هزینه های این طرح همکاری داشته اند، کمال تشکر را می نمائیم.

References

۱. اکبری آزاد، گ. (۱۳۷۹): ویروس برونشیت عفونی طیور ، فصلنامه تخصصی طیور چکاوک، شماره ۴۸، صفحه :۷۱-۵۱.

۲. صیفی آباد شاپوری، م.، میاحی ، م.، اساسی، ک. و پوربخش، س. ع. (۱۳۸۰): جدا سازی و شناسایی ویروس برونشیت عفونی طیور در ایران و تعیین تیپ آن با آزمایش RT-PCR . سومین سمینار بهداشت و بیماریهای طیور، شیراز ۵-۳ اردیبهشت ماه، صفحه: ۱۰.

۳. وصفی مرندی، م . و بزرگمهری فرد، م. ح. (۱۳۸۰): جدا سازی و شناسایی ویروس های برونشیت عفونی طیور در بین سالهای ۱۳۷۹-۱۳۷۶ از مرغداریهای صنعتی ایران. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران ، دوره ۵۶، شماره ۳، صفحه: ۱۲۴-۱۱۹.

۴. وصفی مرندی، م.، بزرگمهری فرد، م. ح.، کیوانی، ح.، پیغمبری، س. م.، پور بخش، س. ع. و اکبری آزاد، گ. (۱۳۸۰): جدا سازی و شناسایی واریانت ۴/۹۱ ویروس‌های برونشیت عفونی طیور در مرغداریهای ایران. سومین سمینار بهداشت و بیماریهای طیور، شیراز. ۵-۳ اردیبهشت ماه، صفحه:۱۱.

5. Adzhar, A.B., Shaw, K., Britton, P. and Cavanagh, D. (1995): Avian infectious bronchitis virus: differences between 793/B and other strains. Vet. Rec. 27: 548.

6. Callison, S.A., Jackwood, M. W. and Hilt, D.A. (2001): Molecular characterization of infectious bronchitis virus isolates foreign to the united states and comparison with united states isolates. Avian Disease. 45: 492-499.

7. Cavanagh, D., Mawditt, K., Gough, R., Picault, J.F. and Britton, P. (1998): Sequence analysis of strains the 793 / B genotype (CR88,4/91) of IBV isolated between 1985 and 1997. Proceeding International Symposium on Infectious Bronchitis and Pneumovirus Infections in Poultry. Jun: 252-256, Giessen, Germany.

8. 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 reactions. Avian Pathol. 28: 593-605

9. Cavanagh, D. and Naqi, S.A. (1997): Infectious bronchitis. In: Diseases of Poultry, Calnek (ed) ,10th ed., Iowa State Univ. Press, Ames , Iowa, USA. PP: 511-526.

10. Collison, E.W., Parr, R.L., Wang, L. and Williams, A.K. (1992): An over view of the molecular characteristics of avian infectious bronchitis virus. Poul. Sci. Rev. 4: 41-55.

11. Cook, J.K.A., Orbell, S. J., Woods, M.A. and Huggins, M.B. (1996): A survey of the presence of a new infectious bronchitis virus designated 4/91 (793 B). Vet. Rec. 138: 178-180.

12. De Wit, J.J. (2000): Detection of infectious bronchitis virus. Avian Pathol. 29: 71-93.

13. Dhinakar Raj, G. and Jones, R.C. (1997): Infectious bronchitis virus: Immunopathogenesis of infection in the chicken. Avian Pathol. 26: 677-706.

14. Elankumaran, S., Balachandran, C., Chandran, N.D.J., Roy, P., Albert, A. and Manickam, R. (1999): Serological evidence for a 793/B related avian infectious bronchitis virus in India. Vet. Rec. 13: 299-300.

15. Gelb, Jr. J. and Jackwood, M.W. (1998): Infectiouus bronchitis. In: A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens, 4th ed. Swayne, D.E., Glisson, J.R., Jackwood, M.W., Pearson, J.E., and Redd, W.M. American Associdtion of Avian Pathologists, Kendall Hunt, Iowa. PP: 169-174.

16. Handberg, K.J., Nielsen, O.L., Pedersen, M.W. and Jorgensen, P.H. (1999): Detection and strain differentiation of infectious bronchitis virus in tracheal tissue from experimentally infected chickens by reverse transcriptase - polymersase chain reaction. Avian pathol. 28: 327-335.

17. Jackwood, M.W.(2002): Evalution of IBV through RT-PCR/RFLP. The challenge of IBV, Supplement to Poulry Inter. PP: 1-18.

18. Jackwood, M.W., Yousef, N.M.H. and Hilt, D.A. (1997): Further development and use of a molecular serotype identification test for infectious bronchitis Virus. Avian Pathol. 23: 513-523.

19. Kown, H.M., Jackwood, M.W. and Gelb, Jr.J. (1993): Differentiation of infectious bronchitis serotypes using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. Avian Disease. 37: 194-202

20. Parsons, D., Elis, M.M., Cavanagh, D. and Cook , J.K.A. (1992): Characterisation of an infectious bronchitis virus isolated from vaccinated broiler breeder flocks. Vet. Rec. 131: 408-411.

21. Picault, J.P., Lamande, J., Allee, C. and Morin, Y. (2003): The pathogenicity and prophylaxy of infectious bronchitis serotype CR88 in chicken. World Poultry Sci. 19: 34-36.

www.SID.ir

Archive of SID

22. 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. Arch. Razi Ins. 53: 79-85.

23. Smarti, R., Silim A., Guertin, C., Henrichon, M., Vasfi marandi, M., Arella, M. and Merzouki, A. (2002): Molecular characterization of three new avian infectious bronchitis virus (IBV) strains isolated in Quebec. Virus Genes. 25: 85-93.

24. 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.

25. Wang, L., Junker, D., Hock, L., Ebiary, E. and Collisson, E.W. (1994): Evolutionary implication of genetic variations in the S1 gene of infectious bronchitis virus. Virus Res. 34: 327-338.

www.SID.ir