JOURNAL OF VETERINARY CLINICAL RESEARCH

ردیابی سروتیپ 793/B ویروس برونشیت عفونی از گله‌های گوشتی دارای علائم تنفسی در غرب مازندران

علی‌اوسط حسینی علی‌آباد[1*]، رضا ممیز[2]، محسن محمودزاده[2]، اصغر یوسفی امین[2]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد چالوس، دانشکده کشاورزی، گروه دامپزشکی، چالوس، ایران.

۲- موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران.

***نویسنده مسئول:** erfsat@yahoo.com*

دوره چهارم، شماره دوم، تابستان ۱۳۹۲

صفحات ۹۷-۹۱

دریافت مقاله: ۹۲/۳/۱۲

پذیرش مقاله: ۹۲/۵/۲

چکیده

به منظور شناسائی سروتیپ B/۷۹۳ ویروس برونشیت عفونی در عفونت‌های تنفسی گله‌های گوشتی واقع در غرب مازندران در پاییز و زمستان ۱۳۸۹ از ۱۱ گله جوجه گوشتی که دارای علائم تنفسی بودند نمونه گیری از نای، ریه ها، کلیه‌ها و لوزه‌های سکومی به عمل آمد. پس از تزریق نمونه‌ها به تخم مرغ جنین دار، ابتدا از نظر خاصیت هماگلوتیناسیون (HA) برای ویروس‌های ND و AI ارزیابی شدند و نمونه‌های مثبت با آنتی سرم اختصاصی نیوکاسل و آنفلوانزا مجاور شده و از نظر وجود ویروس نیوکاسل یا آنفلوانزا به روش HI مورد بررسی قرار گرفتند. برای شناسائی ویروس برونشیت عفونی یک میلی لیتر مایع آلانتوئیک از تخم مرغ‌های تلقیح شده برداشت شد و RNA ویروس با استفاده از کیت تخلیص RNA از مایع آلانتوئیک استخراج شد و با پرایمرهای عمومی ویروس برونشیت عفونی به روش RT- PCR مورد شناسائی قرار گرفت و قطعه‌ای از ژن S1 با ۴۶۴bp تکثیر شد. در ادامه محصول RT-PCR جهت شناسائی سروتیپ‌های ویروس برونشیت عفونی به روش Nested PCR با پرایمراختصاصی سروتیپ های mass و B/۷۹۳ مورد استفاده قرار گرفت. از مجموع نمونه‌های مثبت اخذ شده از مزارع طیور گوشتی، در واکنش RT-PCR با پرایمر عمومی برونشیت عفونی ۷ مورد مثبت شدند و در واکنش Nested PCR، ۵ مورد از نظر سروتیپ B/۷۹۳ مثبت شدند. با توجه به اینکه در گله‌های مبتلا واکسن B/۷۹۳ مصرف نشده است، نمونه‌ها از نظر آلودگی با ویروس B/۷۹۳ به طور قطعی مثبت قلمداد شدند. از نمونه‌های مثبت در آزمایش HI یک مورد آلودگی به ویروس نیوکاسل و یک مورد نیز آلودگی به ویروس آنفلوانزا مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: عفونت تنفسی، گله گوشتی، برونشیت عفونی، سروتیپ B/793، Nested-PCR، مازندران

Archive of SID

www.SID.ir

JOURNAL OF VETERINARY CLINICAL RESEARCH

J.Vet.Clin.Res 4(2)91-97, 2013
Received: June 2, 2013
Accepted: July 24, 2013

Detection of 793/B serotype of infection bronchitis virus from broiler flocks with respiratory signs in west of Mazandran province

Hosseini Aliabad, S.A.[1*], Momayez, R.[2], Mahmodzadeh, M.[2], Yosefi Amin, A.[2]

1- Islamic Azad University, Chalous Branch, Faculty of Agriculture, Department of Veterinary Medicine, Chalous, Iran.

2-Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran

**** Corresponding author:*** erfsat@yahoo.com

Abstract

For detection of the 793/B serotype of infection bronchitis virus in respiratory infections, 11 samples were taken from broiler flocks with respiratory signs in west of Mazandran province in autumn and winter of 2010. After inoculation of samples into the embryonated SPF chicken eggs, samples were checked for heamagglutination (HA) characteristic by HA test for Newcastle disease (ND) and Avian Influenza (AI) viruses, and then the cases having HA property were tested by ND and AI specific antiserum and evaluated for ND and AI virus by heamagglutination inhibition (HI) test. For identification of infection bronchitis virus, 1 ml of allantoic fluid was harvested from allantoic fluid and viral RNA was extracted with RNA purification kit and at the first step a fragment of S1 gene was amplified by general primers of IB virus in RT-PCR reaction. In the second step the RT- PCR product was amplified for differentiation of Mass and 793/B by type specific primers in Nested-PCR. Results revealed that 7 of 11 samples were positive for IB virus in RT-PCR reaction and 5 samples were positive for 793/B serotype in Nested-PCR. While the affected flocks didn't take any vaccination against 793/B serotype, samples were considered positive for 793/B serotype infection. Also, ND virus and AI virus were detected in two IB positive samples.

Key words: Respiratory infection, broiler flock, infection bronchitis, 793/B serotype, Nested RT-PCR, Mazandran

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

از بین عوامل مختلفی که منجر به عفونت تنفسی در طیور می‌شوند، بیماری های ویروسی به دلیل واگیری شدید، تنوع سویه ها، تفاوت دربیماریزائی آن ها، تلفات بالا و غیر قابل درمان بودن از اهمیت زیادی برخوردارند. از طرفی دیگر عفونت‌های ویروسی در صورت شناسائی با رعایت بهداشت و امنیت زیستی و مصرف واکسن‌های مناسب قابل پیشگیری می‌باشند. ازینرو جداسازی و شناسائی ویروس‌ها و سروتیپ‌های آن‌ها و مشخص نمودن نقش انفرادی یا همزمان آنها در ایجاد عفونت تنفسی جهت برنامه ریزی برای پیشگیری از این بیماری‌ها حائز اهمیت می‌باشد. یکی از ویروس‌های مهم عفونت‌های تنفسی در جوجه‌های گوشتی، عامل بیماری برونشیت عفونی است.

بیماری برونشیت عفونی یک بیماری ویروسی تنفسی حاد و بسیار واگیر ماکیان است که با علائم رال‌های تنفسی، سرفه و عطسه مشخص می‌شود. بیماری برونشیت عفونی دارای انتشار جهانی است و در اثر ویروسی از خانواده کروناویروس ایجاد می‌شود. این بیماری به دلیل کاهش رشد، کاهش بازده غذائی، ایجاد عفونت‌های توأم که منجر به تورم کیسه‌های هوائی و حذف لاشه‌های طیور گوشتی در کشتارگاه‌ها می‌شود و نیز به دلیل کاهش تخمگذاری و کاهش کیفیت تخم مرغ از اهمیت اقتصادی بالائی برخوردار است. (۸و۶). برخی از سرو تیپ‌های ویروس نیز نفروتروپ بوده و باعث جراحات کلیوی می‌شوند(۱۰و۶). قدرت بالای انتقال ویروس برونشیت عفونی و نیز تنوع در سروتیپ‌های آن باعث پیچیده تر شدن بیماری و افزایش هزینه پیشگیری از بیماری شده است. ویروس برونشیت عفونی دارای سه پروتئین ساختمانی اصلی شامل گلیکوپروتئین‌های (S)،گلیکوپروتئین‌های (M) و نوکلئوپروتئین داخلی (N) می‌باشند. پروتئین S از دو تحت واحد S۱ و S۲ تشکیل شده است. آنتی بادی‌های ممانعت کننده از هماگلوتیناسیون (HI) و بیشترآنتی بادی‌های خنثی کننده توسط پروتئین S۱ تولید می‌شوند. مطالعات مولکولی نشان داده است که ژن S نقش تعیین کننده‌ای در ایجاد سروتیپ و نیز پاسخ ایمنی محافظت کننده دارد (۵). تنها تغییر در تعداد کمی از اسیدهای آمینه پروتئین S۱ می‌تواند منجر به بروز سروتیپ جدید شود. از آنجا که عفونت همزمان با چند سروتیپ ویروس IB نیز ممکن است رخ دهد، بنابراین بروز سروتیپ جدید علاوه بر روش موتاسیون می‌تواند ناشی از نوترکیبی ژن‌ها بین دو سروتیپ مختلف ویروس باشد. با بروز تغییرات آنتی ژنیک در ویروس امکان بروز تغییر در حدت و نیز تغییر در تمایلات بافتی ویروس ایجاد می‌شود(۶). تا کنون سویه‌های زیادی از ویروس در ایالات متحده آمریکا،آمریکای جنوبی، اروپا، آفریقا، آسیا و استرالیا شناسائی شده اند. در سال‌های اخیر واریانت‌های زیادی از ویروس برونشیت عفونی نیز شناسائی شدند و تعداد آنها دائماً در حال افزایش است (۹و۶). در حال حاضر مهمترین سروتیپ ویروس که دارای انتشار جهانی است سویهٔ ماساچوست است. به تدریج در کشورهای مختلف سروتیپ‌های دیگر ویروس شناسائی شده است که یکی از مهمترین آنها سروتیپ B/۷۹۳ که به اسامی دیگری مانند ۴/۹۱ و IB۸۸ نیز نامیده می‌شود که اولین بار در سال ۱۹۹۱ در بریتانیا شناسائی شد (۸). و سپس به سایر کشورهای اروپائی انتشار یافت (۷و۵، ۴). از آنجا که ایمنی متقاطع بین سروتیپ‌ها و واریانت‌های ویروس بسیار کم بوده و یا اصلا وجود ندارد، لذا شناسائی سروتیپ‌های ویروس برونشیت عفونی هر منطقه در پیشگیری از بروز بیماری می‌تواند موثر باشد و مطالعهٔ حاضر نیز با همین هدف انجام گرفته است.

مواد و روش کار

با توجه به سابقهٔ بروز برونشیت عفونی سروتیپ B/۷۹۳ در گله‌های گوشتی در برخی از مناطق ایران و جهت شناسائی نقش آن در بروز عفونت‌های تنفسی گله‌های گوشتی در غرب مازندران، در پاییز و زمستان سال ۱۳۸۹ اقدام به نمونه گیری از

Archive of SID

www.SID.ir

گله‌های گوشتی مبتلا به عفونت تنفسی شد. برای این منظور با مراجعه به واحدهای پرورش طیور که دارای علائم تنفسی بودند، پس از گرفتن تاریخچه بیماری، روند تلفات و واکسن‌های مصرفی، نمونه‌ها ی مناسب از بافت‌های مختلف مانند نای، کلیه ها، سکال تونسیل انتخاب شدند. نمونه‌ها به طور جداگانه و در کنار یخ برای بررسی ویروس شناسی به موسسه رازی ارسال شدند. از نمونه‌ها ابتدا یک سوسپانسیون ۱۰% در محلول سالین بافر فسفاته با PH خنثی تهیه شد. سپس برای جلوگیری از آلودگی ثانویه به آن آنتی بیوتیک اضافه شد و داخل کیسه آلانتوئیک تخم مرغ‌های جنین دار ۸ تا ۱۱ روزه تزریق شدند. ۴۸ ساعت پس از تلقیح از تخم مرغ هائی که جنین‌های آن‌ها تلف شده، مایع آلانتوئیک را برداشت نموده و با استفاده از سانتریفیوژ با دور ۱۵۰۰ آن را شفاف کرده و سپس با استفاده از میکروپلیت‌های استاندارد، بررسی خاصیت هماگلوتیناسیون (HA) برای ویروس‌های ND و AI را انجام داده و نمونه‌های مثبت با آنتی سرم اختصاصی نیوکاسل و آنفلوانزا مجاور شده و از نظر وجود ویروس نیوکاسل و آنفلوانزا به روش HI بررسی شدند. برای شناسائی ویروس برونشیت عفونی، ۴۸ ساعت پس از تزریق، یک میلی لیتر مایع آلانتوئیک از تخم مرغ‌های تلقیح شده را برداشت نموده، مجدداً در تخم مرغ جنین دار تزریق نموده و حداقل ۳ تا ۴ بار پاساژ تکرار شد. همچنین از مایع آلانتوئیک استحصالی بعد از پاساژ، ابتدا برای انجام RT-PCR جهت شناسائی ویروس برونشیت عفونی و در ادامه به روش Nested PCR جهت شناسائی سروتیپ‌های ویروس استفاده شد. برای این منظور RNA ویروسی با استفاده از کیت تخلیص High Pure Viral Nucleic Acid Kit (RNA) ساخت شرکت Roche استخراج شد. پرایمر عمومی مورد استفاده برای RT-PCR شامل XCE۲ و XCE۱ بود که به ترتیب از توالی‌های ۱۱۶۸ تا ۱۱۹۳ و ۷۲۸ تا ۷۴۹ ژن S۱ استخراج شده است و محصول PCR آن در آگار ژل الکتروفورز در ۴۶۴bp تشکیل باند می‌دهد(۱) و در واکنش Nested PCR از پرایمر عمومی XCE۳ و پرایمرهای اختصاصی شامل BCE۱ و MCE۱ استفاده شده است که به ترتیب برای سروتیپ B/۷۹۳ و سروتیپ Mass اختصاصی می‌باشند و قطعاتی به طول ۱۵۴ و ۲۹۵ جفت باز تولید می‌نمایند(۱).

مقادیر واکنشگرها و برنامه حرارتی در روش RT-PCR: مقادیر مواد RT-PCR در حجم نهائی ۵۰ میکرولیتر شامل: آب دو بار تقطیر شده ۲۷,۲۵ میکرولیتر، بافر واکنش RT-PCR ۱۰ میکرولیتر، محلول DTT ۲,۵ میکرولیتر، dNTP ۱میکرولیتر، پرایمرها(جلودار و برگشتی) ۴ میلی لیتر، مهار کننده RNAas ۰,۲۵ میکرولیتر، آنزیم ۱ میکرولیتر و RNA الگو ۴ میکرولیتر می‌باشد.

مراحل واکنش RT-PCR شامل: ۱- مرحله نسخه برداری معکوس از RNA و سنتز cDNA در دمای ۴۵ درجه به مدت ۴۵ دقیقه، ۲- واسرشت سازی اولیه cDNA (primary Denaturation) در دمای ۹۴ درجه به مدت ۲ دقیقه، ۳- واسرشت سازی ثانویه در دمای ۹۴ درجه به مدت ۱ دقیقه، ۴- اتصال پرایمرها (Annealing) یا هم سرشت سازی در دمای ۴۸ درجه به مدت ۱ دقیقه، ۵- گسترش اولیه در دمای ۶۸ درجه به مدت ۱ دقیقه و ۶- گسترش ثانویه در دمای ۶۸ درجه به مدت ۱۰ دقیقه می‌باشد. لازم به یادآوری است که مراحل ۳ تا ۵ یعنی واسرشت سازی ثانویه، هم سرشت سازی و گسترش اولیه ۳۴ مرتبه تکرار شده است.

مقادیر واکنشگرها و برنامه حرارتی در روش Nested-PCR: مقادیر مواد مورد استفاد در روش Nested PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر شامل آب دوبار تقطیر استریل ۳۶,۲۵ میکرولیتر، بافر PCR۵ میکرولیتر، Mgcl۲ ۱,۵ میکرولیتر، dNTP ۱میکرولیتر، پرایمرها (جلودار و برگشتی) ۴ میلی لیتر، Taq DNA Polymerase ۰,۲۵ میکرولیتر، و DNA الگو ۲ میکرولیتر می‌باشد.

برنامه حرارتی در روش Nested-PCR شامل: ۱- واسرشت سازی اولیه cDNA در دمای ۹۴ درجه به مدت ۳ دقیقه، ۲- واسرشت سازی ثانویه در دمای ۹۴ درجه به مدت ۱ دقیقه، ۳- اتصال پرایمرها یا هم سرشت سازی در دمای ۴۸

www.SID.ir

درجه به مدت ۱ دقیقه، ۴- گسترش اولیه در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه و ۵- گسترش ثانویه در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه می‌باشد. مراحل ۲ تا ۴ یعنی واسرشت سازی ثانویه، هم سرشت سازی و گسترش اولیه ۲۵ بار تکرار شده است.

نتایج

از مجموع ۱۱ نمونه اخذ شده از مزارع طیور مبتلا به علائم تنفسی، ۷ مورد از نظر ویروس‌های تنفسی مثبت شدند. از نمونه‌های مورد مطالعه یک مورد از نظر نیوکاسل و یک مورد نیز آنفلوانزا مثبت شد. از نظر برونشیت عفونی، در واکنش RT-PCR با پرایمر عمومی برونشیت عفونی ۷ مورد مثبت شدند و در واکنش Nested PCR، ۵ مورد از نظر ویروس برونشیت سروتیپ B/۷۹۳ مثبت شدند و دو مورد از نظر سروتیپ Mass مثبت شدند و در یک نمونه نیز هر دو سروتیپ Mass و B/۷۹۳ تأیید شد. با توجه به اینکه در گله‌های مبتلا واکسن B/۷۹۳ مصرف نمی شد، نمونه‌ها از نظر آلودگی با ویروس B/۷۹۳ به طور قطعی مثبت قلمداد شدند، اما در خصوص مثبت شدن Mass با توجه به مصرف واکسن H۱۲۰ برای تفکیک ویروس واکسینال از ویروس فیلد احتیاج به بررسی مولکولی و تعیین توالی نوکلئوتیدی دارد. (جدول ۱).

جدول ۱ - نمونه‌های مثبت برونشیت عفونی اخذ شده از مرغداری‌های گوشتی غرب مازندران

ردیف	سن ابتلا	ویروس جدا شده	ملاحظات
۱	۲۸ روز	IB	Mass
۲	۱۶ روز	IB	۷۹۳/B و Mass
۳	۲۵ روز	IB	۷۹۳/B
۴	۲۵ روز	IB	۷۹۳/B
۵	۲۵ روز	IB	۷۹۳/B
۶	۳۱ روز	IB	۷۹۳/B
۷	۱۳ روز	IB	Mass

بحث و نتیجه گیری

بیماری برونشیت عفونی یک بیماری ویروسی حاد و بسیار واگیر ماکیان است که دارای انتشار جهانی است و در کشور ما نیز به دلیل ابتلای جوجه‌های جوان و گله‌های بالغ تخمگذار و مادر به شکل‌های تنفسی، تولید مثلی و یا ایجاد ضایعات کلیوی از اهمیت اقتصادی بسیار زیادی برخوردار می‌باشد. با توجه به تنوع سروتیپ‌های ویروس برونشیت عفونی و عدم ایجاد واکنش ایمنی متقاطع بین آن‌ها شناسائی سروتیپ‌های ویروس در برنامه ریزی کنترل و پیشگیری از بیماری حائز اهمیت می‌باشد. در ایران بیماری برونشیت عفونی با آزمایشات سرولوژی توسط آقاخان و همکاران (۲) و با روش جداسازی توسط وصفی مرندی و همکاران (۱۴) مورد شناسائی قرار گرفت. ممیز و همکاران (۱۱) نیز نشان دادند که برخی از سویه‌های ویروس برونشیت موجود در ایران با آنتی سرم اختصاصی ویروس سروتیپ ماساچوست خنثی نمی شوند که بیانگر حضور سروتیپ‌های دیگر می‌باشد. در بررسی انجام شده توسط وصفی مرندی و همکاران در جریان واگیری کمپلکس تنفسی طیور در

Archive of SID

www.SID.ir

سال ۱۳۷۸ و انجام آزمایش خنثی سازی VN با استفاده از آنتی سرم اختصاصی سویه B/۷۹۳، حضور این سویه در مرغداری‌های ایران به اثبات رسید(۱۵). صیفی آباد شاپوری و همکاران (۱۲) از مجموع ۱۸۱ نمونه مورد آزمایش از ۲۷ نمونه ویروس برونشیت عفونی جدا نمودند که بر اساس نتایج آزمایش RT-PCR بر روی ۱۴ جدایه، ۱۲ جدایه متعلق به سویه Mass و ۲ جدایه متعلق به سویه B/۷۹۳ بوده است. اکبری آزاد و همکاران با مطالعه مولکولی به روش RFLP بر روی ۲۰ جدایه از ویروس برونشیت عفونی اعلام داشتند که ۱۱ جدایه در هضم آنزیمی الگوی RFLP مشابه سروتیپ B/۷۹۳ داشتند و ۹ جدایه دیگر الگوئی مشابه H۱۲۰ نشان دادند(۳). در بررسی انجام شده توسط طرقی (۱۳) نقش سویه B/۷۹۳ ویروس برونشیت عفونی در بین بقیه عوامل ویروسی ایجاد کننده کمپلمس تنفسی حائز اهمیت بوده است.

در بررسی حاضر نیز بیشترین آلودگی ویروسی مربوط به سروتیپ B/۷۹۳ ویروس برونشیت عفونی بوده است. از آنجا که تمامی گله‌های آلوده به سروتیپ B/۷۹۳، واکسن‌های مربوط به سویه B/۷۹۳ را مصرف نکرده بودند آلودگی آن‌ها قطعی محسوب می‌شود و حضور سویه B/۷۹۳ ویروس برونشیت عفونی و اهمیت آن را در ایجاد عفونت تنفسی یک بار دیگر مورد تائید قرار می‌دهد. لذا استفاده از واکسن سروتیپ B/۷۹۳ در برنامه پیشگیری از بیماری برونشیت عفونی بایستی مد نظر قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد چالوس انجام شده است که بدینوسیله از همکاری مسئولین دانشگاه صمیمانه تشکر می‌شود.

References

1. 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.

2. Aghakhan, SM., Afshar Fereidouni, N.A., Marunesi, C., Khodashenas,M. (1994) Studies on avian viral infection in Iran. Archives of Razi Institute, 44(45): 1-10.

3. Akbari Azad, Gita. Vasfi Marandi, M., and Kayvani Amineh, H. (2005). Detection and molecular characterization of infectious bronchitis viruses by RT-PCR/RFLP and sequencing. The 14 th world veterinary poultry congress. 22-26 August 2005, Istanbul-Turkey.

4. Capua, I., Minta, Z., Karpinska, E., Mawditt, K., Britton, P., Cavanagh, D. and Gough, R.E. (1999). Co-circulation of four typesof infectious bronchitis virus (793/B, 624/I, B1648 and Massachusetts). Avian Pathology, 28: 587-592.

5. Cavanagh, D., Davis, P.J., Cook, J.K.A., Li, A., Kant, A. and Koch, G. (1992). Location of the amino acid differences in the S1 spike glycoprotein subunit of the closely related serotypes of infectious bronchitis virus. Avian pathology, 21:33-43.

6. Cavanagh, D. and 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.

7. 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 (793B). Veterinary Record, 138: 178-180.

8. Gough, R. E., Randall, C. J. Dagless, M. Alexander, D. J. Cox,W. J. and Pearson, D. (1992). A "new" strain of infectious bronchitis virus infecting domestic fowl

Archive of SID

www.SID.ir

in Great Britain. Veterinary Record, 130: 493-494.

9. Gough, R.E., Cox, W.J., de, B., Welchman, D., Worthington, K.J., Jones, R.C. (2008). Chinese QX strain of infectious bronchitis virus isolated in the UK. Veterinary Record, 162:99–100.

10. Liu, S., Kong, X. (2004). A new genotype of nephropathogenic infectious bronchitis virus circulating in vaccinated and non-vaccinated flocks in China. Avian Pathology, 33:321–327.

11. Momayes,R., Pourbakhsh, SA., Khodashenas, M. and Banani , M. (2002). Isolation and Identification of infections bronchitis virus from commertial chickens. Archives of Razi Institute, 53:1-10

12. 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.

13. Toroghi,R. (2010). Detection of avian influenza virus, infection bronchitis virus and Newcastle disease virus in affected commercial chicken showing fibrinonecrotic cast at the bronchi and trachea bifurcation. In proceeding of the second international veterinary poultry congress. Tehran. Iran.45

14. Vasfi Marandi, M. and Bozorgmehri Fard, M. (2000). Isolation and Identification of infection bronchitis viruses in chicken in Iran. Paper presented in World's Poultry Congress. Montreal, Canada / August 20-25.

Archive of SID

www.SID.ir