Archive of SID

مطالعه فیلوژنیتیکی و ژنوتیپی سویه‌های ویروس برونشیت عفونی گله‌های گوشتی به روش RT- PCR و تعیین توالی ژن گلیکوپروتئین S1

آزاد رحیمی[1*]، عبدالکریم زمانی مقدم[2]، عبدالحمید شوشتری[3]

۱. دانشجوی دکتری تخصصی بهداشت و بیماری‌های پرندگان،گروه علوم درمانگاهی، دنشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.
۲. استاد، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد- ایران.
۳. استاد، گروه تحقیقات بیماری‌های پرندگان، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج- ایران.

دریافت: ۲۳ دی‌ماه ۹۶ **پذیرش:** ۲۱ مردادماه ۹۷

چکیده

تکامل و ایجاد سروتیپ‌های جدید و مختلف ویروس برونشیت عفونی به طور مستمر در حال انجام است که این امر هر ساله ضررهای اقتصادی فراوانی به صنعت طیور وارد می‌کند، لذا تعیین سریع و صحیح سروتیپ‌ها برای انتخاب و توسعه واکسن‌های مناسب سویه‌های هر منطقه به عنوان یک اصل مهم و تعیین کننده در کنترل این بیماری است. در این مطالعه نمونه‌ها از نای، ریه و کلیه گله‌هایی با علایم تنفسی، مشکوک به بیماری برونشیت عفونی از گله‌های پرورش مرغ گوشتی استان فارس و چهارمحال و بختیاری به تعداد ۴۰ نمونه به صورت تجمیع از ۴۰ گله جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها پس از آماده سازی برای ردیابی ویروس برونشیت عفونی با آزمایش RT-PCR انتخاب شدند؛ سپس محصول PCR خالص شده برای تعیین توالی قطعه‌ای به طول ۴۶۴ جفت باز از ژن S1 به شرکت MWG آلمان ارسال شد. پاسخ توالی‌های اخذ شده بررسی و تصحیح شد. نتایج این مطالعه نشان داد سویه variant 2 تبدیل به سویه غالب در این دو منطقه شده است. بیشترین شیوع جدایه‌ها مربوط به سویه variant 2 بود که شامل ۷۵٪ نمونه‌ها (۹ نمونه) می‌گردید و پس از آن سویه ماساچوست قرار داشت که در این بین ۱۶/۶٪ نمونه‌ها (۲ نمونه) و یک نمونه (۸٪) هم متعلق به سویه واکسن H120 بود، بنابراین با توجه به متفاوت بودن سویه‌های غالب در مناطق مطالعه شده، واکسن‌های موجود در بازار نمی‌تواند محافظت و ایمنی مناسبی ایجاد کند و نیازمند توسعه واکسن‌های جدید است.

واژه‌های کلیدی: برونشیت عفونی، سکانس S1، جدایه‌های variant 2، RT-PCR، برونشیت عفونی ایران.

مقدمه

بیماری برونشیت عفونی یکی از مهم‌ترین بیماری‌ها از نظر اقتصادی در صنعت طیور است، که هر ساله ضررهای اقتصادی فراوانی به صنعت طیور وارد می‌کند. یک بیماری بسیار واگیردار و حاد دستگاه فوقانی تنفسی در ماکیان و دیگر پرندگان است که عامل ایجاد آن کرونا ویروس پرندگان است. سرعت بالای تکثیر ویروس منجر به جهش ژنتیکی در ویروس می‌گردد که موجب ایجاد سروتیپ‌های جدید ویروس می‌شود که ممکن است توسط واکسن‌های موجود محافظت نگردد (۱۴). در جوجه‌های جوان علاوه بر علایم تنفسی موجب کاهش رشد و کاهش ضریب تبدیل در جوجه‌های گوشتی می‌گردد، همچنین جوجه‌های گوشتی را به عفونت‌های ثانویه باکتریایی مستعد می‌کند، واگیری ۱۰۰٪ و مرگ و میر بین ۰٪ تا ۸۲٪ بسته به سن و سطح ایمنی پرنده و عفونت ثانویه تغییر می‌کند (۱۴).

درگله‌های تخم گذار و مادر عفونت ممکن است منجر به کاهش تولید تا ۷۰٪ و کاهش کیفیت پوسته گردد. با بررسی‌های مولکولی و اپیدمیولوژیک مشخص گردیده است که سویه‌های جدیدتر ویروس برونشیت عفونی اغلب از جهش‌های ژنتیکی و نوترکیبی بین تعدادی از سویه‌های

* پست الکترونیک نویسنده‌ی مسؤول: azad.rahimi@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

قبلی این ویروس ایجاد شده است (۱۴). به‌روشنی مشخص شده که امکان کنترل برونشیت عفونی، به دلیل توانایی ویروس در ایجاد واریانت‌های جدید آنتی ژنتیکی به‌دلیل موتاسیون یا گاهی نوترکیبی در ژن گلیکوپروتئین S1 مشکل است. با توجه به بروز غیر قابل پیش‌بینی ژنوتیپ‌های جدید ویروس برونشیت عفونی، نیازمند ارزیابی مستمر سویه‌ها و بروز ویروس‌های جدید است، که این امر ممکن است استراتژی استفاده از واکسن‌های موجود را تغییر دهد (۱۵). با توجه به اهمیت بیماری در طیور صنعتی مطالعات فراوانی در زمینه بیماری برونشیت عفونی پرندگان در جهان و همچنین در ایران انجام گرفته است. ویروس برونشیت عفونی سویه ماساچوست برای اولین بار در ایران از سوی آقاخان و همکاران شناسایی گردید (۲). در سال ۱۹۹۸ ویروس مشابه نوع 793/B اروپایی در ایران (Iran/793/B/19/08) جداسازی گردید (۶). این ژنوتیپ بین سال‌های ۱۹۹۴ تا ۲۰۰۴ شیوع بالایی در ایران داشته است. به دنبال آن واکسن ویروس‌های ماساچوست و 793/B در گله‌های ماکیان استفاده گردید (۶). طی مطالعات انجام شده از سوی Hosseini و همکاران در سال ۲۰۱۵ سه ژنوتیپ در ایران گستردگی زیادی داشتند، ماساچوست و 793/B هر کدام ۸/۴ درصد و هر دو ویروس با هم ۵/۲ درصد شیوع داشته‌اند؛ همچنین ویروس وابسته به QX (Iran/QX/H179/11) برای اولین بار در ایران در سال ۲۰۱۱ در این مطالعه جدا شد (۹). Najafi و همکاران در سال ۲۰۱۶ با مطالعه سویه‌های جدا شده از ایران به روش PCR و تعیین توالی قطعه ژن S1 به این نتیجه رسیدند که اغلب ایزوله‌های ایران در ۶ گروه ژنتیکی متفاوت از هم قرار می‌گیرند که به ترتیب فراوانی، در دسته‌های variant 2، 793/B، QX ، IS/720، mass و IR1 قرار می‌گیرند (۱۲). Hashemzadeh و همکاران در سال ۲۰۱۳ با بررسی نمونه‌های به دست آمده از سال ۱۳۸۹-۱۳۸۸ به‌روش RT-PCR اظهار داشتند که جدایه‌های به دست آمده داخل سروتیپ بیماری‌زای 793/B قرار می‌گیرند (۷). Cavanagh و همکاران در سال ۲۰۰۵ با روش خنثی سازی مشخص کردند ایزوله‌های جدا شده در سال ۲۰۰۰ از ایران و عربستان سعودی متعلق به سروتیپ 793/B هستند (۴). با توجه به نبود روش درمانی مناسب برای بیماری برونشیت عفونی، رعایت اصول بهداشتی و واکسیناسیون از راه‌کارهای اصلی پیش‌گیری و کنترل این بیماری است (۱۴). هدف اصلی از انجام این طرح یافتن جدایه‌های اصلی ویروس برونشیت عفونی و تعیین تنوع ژنتیکی ویروس‌های حاضر در فارم‌های جوجه گوشتی سویه‌ی راس ۳۰۸ و کاپ استان فارس و چهارمحال و بختیاری در زمستان ۹۴ و بهار ۹۵ و مقایسه آن با سویه‌های حاضر و گذشته ایران و دیگر نقاط جهان است.

مواد و روش کار

نمونه‌ها از نای و ریه پرندگان با علایم تنفسی و مشکوک به بیماری برونشیت عفونی از گله‌های پرورش مرغ گوشتی استان چهارمحال و بختیاری و فارس از ۴۰ گله ۴۰ نمونه به صورت تجمیع شده (حداقل ۵ پرنده از هر گله) جمع‌آوری و متعاقباً در شرایط سرما به آزمایشگاه اختصاصی طیور مؤسسه تحقیقاتی واکسن و سرم‌سازی رازی منتقل شد. اطلاعات مربوط به هر فارم از نظر سن گله، محل نمونه‌گیری، وضعیت تلفات در زمان نمونه‌برداری، واکسیناسیون گله، به ویژه واکسن‌های برونشیت به دقت ثبت شد. نمونه‌های گرفته شده هموژنیزه گردید و به‌صورت سوسپانسیون ۱۰٪-۱۵در بافر PBS آماده شد. به‌دنبال آن، نمونه‌ها در دور g ۱۵۰۰ برای ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. مایع رویی برای تلقیح به تخم‌مرغ‌های نطفه‌دار عاری از پاتوژن برداشته شد. نمونه‌های بافت هموژنیزه با ۱۰۰۰۰ واحد پنی‌سیلین و ۱۰۰۰۰ واحد استرپتومایسین

www.SID.ir

Archive of SID

و ۲۵۰ واحد آمفوتریپسین B یک‌دهم برای این جداسازی استفاده شد (۱۳). استخراج RNA نمونه‌ها با کیت استخراج به نام « High Pure Viral Nucleic Acid Kit» شرکت رش (Roche) آلمان مطابق دستورالعمل شرکت سازنده کیت و با رعایت نکات بهداشتی و زیست‌محیطی انجام شد (۳). آزمایش PCR با کیت یک مرحله‌ای «Titan one tube RT-PCR system» شرکت رش آلمان انجام شد. غلظت نهایی هر یک از مواد برای هر واکنش زنجیره پلی‌مراز نسخه‌برداری معکوس (RT-PCR) شامل: MgCl2 (۱/۵ میلی‌مول) مخلوط dNTPs (۱۰ میلی‌مول)، هر یک از پرایمرها (μL ۴/)، (۱۰ PM/μL)، DDTT (۱۰ میلی‌مول) و ممانعت کننده از RNase ۵ الی ۱۰ واحد استفاده شد. آزمایش PCR با استفاده چهار پرایمر که عموماً برای شناسایی ویروس برونشیت به کار می‌رود، انجام شد (۱۵) (جدول ۱).

برای آزمایش RT-PCR از جفت پرایمر SX1 و SX2 و به منظور تکثیر قطعه‌ای از محصول آزمایش RT-PCR در آزمایش Nested-PCR، از پرایمرهای SX3 و SX3 استفاده شد. برنامه حرارتی شامل حرارت اتصال (Annealing)، جدا شدن (Denaturation) و تکثیر (Extention) به ترتیب در دمای ۴۸، ۹۴ و ۶۸ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت و زمان اتصال و تکثیر هر کدام به‌مدت یک دقیقه و تعداد سیکل حرارتی ۳۵ بار بود (۳).

جدول ۱- پرایمرهای الیگونوکلئوتیدی استفاده شده در RT-PCR برونشیت عفونی در دنیا (۳)

الیگونوکلئوتید برونشیت عفونی	سکانس ′۵ به ′۳	S1 محل قرار گیری در سکانس *
SX1+	CACCTAGAGGTTTG T/C T A/T GCAT	۶۷۷ تا ۶۹۸
SX2+	TCCACCTCTATAAACACC C/T TT	۱۱۴۸ تا ۱۱۶۸
SX3+	TAATACTGG C/T AATTTTTCAGA	۷۰۵ تا ۷۲۵
SX4+	AATACAGATTGCTTACAACCACC	۱۰۷۵ تا ۱۰۹۷

×محل نوکلئوتیدها بر اساس سویه UK/7/93 است، شماره بانک ژن مربوطه Z83979.

حدود μL ۵۰ از محصول PCR خالص شده با کیت «High Pure Viral Nucleic Acid Kit» شرکت Roche آلمان برای تعیین توالی قطعه‌ای به‌طول ۴۶۴ جفت باز از ژن S1 به شرکت MWG آلمان ارسال شد. پاسخ توالی‌های اخذ شده با برنامه MEGA 7 بررسی و تصحیح شد. توالی و آنالیز مقایسه توالی نوکلئوتیدی با سویه‌های موجود در ایران و جهان با نرم‌افزار MEGA 7 و CLC Free Workbench بررسی شد. آنالیز شجره‌شناسی با نرم‌افزار MEGA 7 و با اطلاعات به‌دست آمده از توالی اسید آمینه‌ای و اطلاعات بانک ژن بر اساس مدل Neighbor Joining ترسیم شد. ژن S1 جدایه مرجع و جدایه‌های وحشی IBV از کشورهای مختلف، به عنوان نماینده سویه‌های آن کشورها، به علاوه جدایه‌های ایران که قبلاً در بانک ژن ثبت شده بودند به عنوان نماینده جدایه‌های ایران، از نظر توالی نوکلئوتیدها بررسی شدند.

نتایج

از تعداد ۴۰ گله تعداد ۱۲ نمونه از نظر ویروس برونشیت عفونی مثبت شد. از تعداد نمونه‌های مثبت شده هفت فارم (۵۸٪) واکسن برونشیت دریافت کرده بودند و پنج فارم (۴۲٪) هیچ نوع واکسن برونشیتی دریافت نکرده بودند.

میزان ژنوتیپ‌های مختلف به صورت درصد از نمونه‌های مثبت ویروس برونشیت عفونی بیان شده است. نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان داد که از تعداد

www.SID.ir

Archive of SID

۱۲ نمونه مثبت شده بیشترین جدایه مربوط به سویه variant 2 بود که شامل ۷۵٪ نمونه‌ها (۹ نمونه) و پس از آن سویه‌ی ماساچوست قرار داشت که ۲۵٪ نمونه‌ها (۳ نمونه) را شامل می‌شود. از میان نمونه‌هایی که مثبت شده‌اند ۵۸٪ گله‌ها واکسن H120 را دریافت کرده‌اند و یک گله هم واکسن ۴/۹۱ دریافت کرده بود؛ همچنین بیشترین سن درگیری بین ۲۰ تا ۴۰ روزگی بود. بیشتر جدایه‌های این مطالعه در منطقه‌ی کوار استان فارس و چهارمحال و بختیاری از نوع واریانت بود و بین جدایه (Iran/variant/NA2/2017) که از منطقه چهارمحال و بختیاری این مطالعه به دست آمده و جدایه‌های (Iran/variant/NA4/2017), (Iran/variant/NA8/2017), که در این مطالعه از منطقه کوار به دست آمده بیش از ۹۹٪ شباهت وجود دارد. همرا با جدایه‌های (Iran/mass/AVR1/2017)، (Iran/variant/NA1/2017)، (Iran/mass/AVR2/2017) و (Iran/variant/NA2/2017) ویروس آنفولانزای H9 هم جدا شد و همراه با (Iran/variant/NA3/2017) و (Iran/variant/NA4/2017) ویروس نیوکاسل جدا شد.

بحث

واکسن‌های ماساچوست خیلی پیشتر از انجام هر گونه جداسازی ویروس برونشیت عفونی در ایران استفاده می‌شده است. در ابتدا سویه ماساچوست جدا شد و به دنبال آن 793/B جداسازی گردید و تبدیل به سروتیپ غالب شد (۳). سویه variant 2 در ایران و در منطقه خاورمیانه جداسازی شده است اما تاریخچه مشخصی از آن وجود ندارد (۱۰). واکسن‌های تجاری (۴/۹۱) از سال ۱۳۸۵ برای جلوگیری از بیماری برونشیت عفونی وارد بازار شد. هر چند روش استفاده شده در این مطالعه امکان تفریق بین سویه واکسن و فیلد مشابه را نمی‌دهد، ثبت تاریخچه دقیق مصرف واکسن‌های برونشیت گله‌ها به تفریق نسبی سویه واکسن از سویه‌های فیلد کمک می‌کند. بر اساس نتایج این مطالعه ژنوتیپ variant 2 بالاترین میزان شیوع را داشت، شباهت اغلب جدایه‌های مطالعه حاضر با ژنوتیپ variant 2 بیش از ۹۰٪ است. بر اساس مطالعه انجام شده از سوی حسینی و همکاران در سال ۲۰۱۴ اولین بار در سال ۸۹ این جدایه شناسایی شد، هر چند ممکن است این سویه از قبل هم در ایران حضور داشته است، لیکن به دلیل استفاده از پرایمر اختصاصی در این دو مطالعه شناسایی شده است (۹).

درصد شباهت بین جدایه واریانت جداشده از سوی حسینی و همکاران Iran/variant2/H840/14 و جدایه‌های (Iran/variant/NA4/2017) و (Iran/variant/NA9/2017) جدا شده در این مطالعه به طور برابر ۹۹/۵٪ است، که این موضوع بیانگر احتمال گسترش سویه‌های واریانت در مناطق مختلف کشور و پایین بودن میزان محافظت واکسن‌های موجود در بازار ایران علیه سویه‌های واریانت است. طی مطالعه نجفی و همکاران در سال ۲۰۱۵ نتایج به‌دست آمده مشابه مطالعه حاضر است، بیشترین شیوع جدایه‌های به دست آمده مربوط به سویه مشابه variant 2 بوده که جدایه (IBVchickenIranUTIVO-C2014) با جدایه‌های مشابه variant 2 جدا شده در این مطالعه بیش از ۹۹٪ شباهت دارد و با برخی جدایه‌های (Iran/variant/NA7/2017) و (Iran/variant/NA5/2017) این مطالعه ۱۰۰٪ شباهت دارد. نتایج به دست آمده در مطالعات اخیر بسیار قابل‌توجه است و بیانگر شیوع گسترده سویه‌های واریانت در مناطق مختلف کشور با شباهت‌های بالاست که خود بیانگر غالب شدن سویه‌های واریانت در کشور و چرخش آن در مزارع گوشتی است. طی مطالعه دیگری که از سوی قلیانچی و همکاران در سال ۲۰۱۶ انجام شد جدایه (Chicke/Iran/IS-1494/UT- KX702168

www.SID.ir

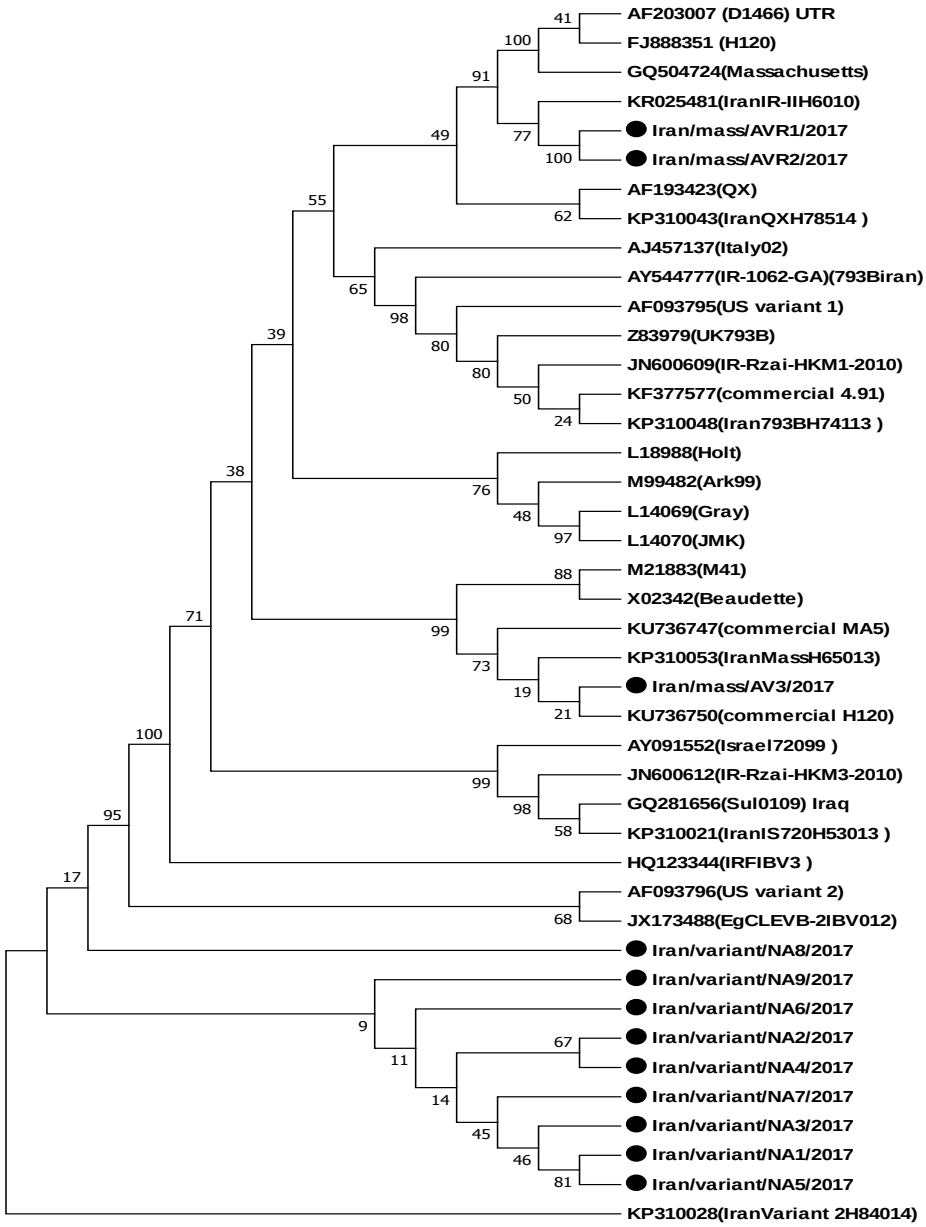
Archive of SID

(GKHG20/2016) بیش از ۹۹/۷٪ با جدایه‌های variant 2 مطالعه حاضر قرابت دارد (ارسال مستقیم منتشر نشده) (۱۲). مطالعه دیگری از سوی همایونی‌مهر و همکاران در سال ۲۰۱۷ نشان می‌دهد سویه KY001928 بیش از ۹۸٪ با جدایه‌ای مشابه variant 2 این مطالعه شباهت دارد (۸). مطالعات انجام شده در منطقه‌های مختلف کشور غالباً منجر به جدا شدن سویه‌های variant 2 گردیده که همگی بیانگر این مسأله است که سویه‌های واریانت در مناطق مختلف کشور در حال چرخشند و واکسن‌های موجود هم محافظت مناسبی علیه این سویه‌ها ایجاد نمی‌کند. Meir و همکاران در سال ۲۰۰۶ اولین بار در اسرائیل ایزوله مشابه variant 2 در خاورمیانه را شناسایی کردند و این ایزوله همچنان بزرگ‌ترین مشکل در این کشورها و دیگر کشورهای خاورمیانه از جمله اردن و مصر است، ایزوله جدا شده از اسرائیل (ارسال مستقیم، منتشر نشده) IS/1494/06 (EU780077) ۹۸٪ با سویه‌های جدا شده دراین مطالعه شباهت دارد (۱۱). مطالعه Ganapathy و همکاران در سال ۲۰۱۴ در کشورهای خاورمیانه شامل عربستان سعودی، مصر، اردن، امارات متحده عربی، لبنان، کویت نشان داد بیشترین شیوع مربوط به سویه 793/B است به میزان ۴۳/۶۶٪ از کل نمونه های مثبت و سویه بعدی واریانت ۲ به میزان ۱۸/۳۱٪ و سویه ماساچوست به میزان ۱۲/۹۶٪ در رده بعدی قرار داشتند (۵). مطالعه Abdel-Moneim و همکاران در سال ۲۰۱۲ در کشور مصر نشان داد که سویه واریانت ۲ در این کشور در حال چرخش است (۱)؛ همچنین دو جدایه (Iran/variant/NA7/2017) و (Iran/variant/NA5/2017) به ترتیب ۹۷/۴٪ و ۹۷٪ با جدایه کشور مصر Eg/CLEVB-2/IBV/012 شباهت دارند (۷). شباهت جدایه‌های این مطالعه با جدایه رفرانس US2 variant بیش از ۹۰ درصد است.

وضعیت مطالعات چند سال اخیر کشورمان نیز بیان می‌کند که سویه‌های variant 2 در حال تبدیل به معضل اصلی برونشیت مزارع کشورمان است. هر چند مشخص نیست که سویه variant 2 چه زمان و چگونه وارد ایران شده است، اما با توجه به جداسازی آن در کشورهای خاورمیانه و امکان تکثیر ویروس برونشیت عفونی در اردک‌سانان ممکن است از طریق پرندگان مهاجر و یا از طریق واردات پرندگان آلوده به کشورمان وارد شده باشد (۱۱). با توجه به گسترش سویه‌های واریانت ویروس برونشیت عفونی و جداسازی آن در مطالعات چند سال اخیر کشورمان و همچنین جداسازی آن در مطالعه حاضر که در هر دو منطقه استان چهارمحال و بختیاری و فارس بوده، به نظر می‌رسد این سویه در اغلب مناطق کشورمان تبدیل به سویه غالب شده باشد، بنابراین لازم است با انجام مطالعات اپیدمیولوژیک در مناطق مختلف کشور به بررسی بیشتر این مسأله پرداخت. پیشنهاد می‌شود با توجه به این که علی‌رغم انجام واکسیناسیون با سویه‌های ماساچوست و 793/B در کشورمان، ویروس برونشیت عفونی همچنان موجب ایجاد تلفات در فارم‌های گوشتی و تخم‌گذار می‌شود و با توجه به شباهت پایین سویه‌های جدا شده در این مطالعه با سویه‌های واکسن موجود در بازار، به نظر می‌رسد برای ایجاد محافظت و ایمنی بیشتر، باید نسبت به توسعه واکسن‌هایی که با این سویه‌ها ایمنی متقاطع بیشتری داشته باشند، اقدام کرد.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱– درخت فیلوژنتیک سویه‌های جدا شده ویروس برونشیت عفونی ایران و جهان (بر اساس اسید نوکلئیک شماره ۳۵۷-۲۳۴ سویه (accession number UK/7/93 Z83979) از گلیکوپروتئین S1 با نرم‌افزار MEGA 7. برخی سویه‌های رفرنس در درخت وجود دارد. ویروس‌های جدا شده در این مطالعه با دایره توپر سیاه رنگ مشخص شده. اعداد در هر گره بیانگر bootstrap values (1000 replicates > 50% included) است.

منابع

1- Abdel-Moneim, A. S; Afifi, M. A. and El-Kady, M. F; Emergence of a novel genotype of avian infectious bronchitis virus in Egypt. Arch .Virol; 2012; 157(12): 2453-2457.

2- Aghakhan, S. M. N; Abshar, S. and Rasoul Nejad Fereidouni, C; Studies on avian viral infections in Iran. Arch. Razi Inst; 1996; 44: 1-10.

3- Callison, S. A; Jackwood, M. W. and Hilt, D. A; Molecular characterization of infectious bronchitis virus isolates foreign to the United States and comparison with

www.SID.ir

Archive of SID

United States isolates. Avian. Dis; 2001: 492-499.

4- Cavanagh, D; Picault, J. P; Gough, R. E; Hess, M; Mawditt, K. and Britton, P; Variation in the spike protein of the 793/B type of infectious bronchitis virus, in the field and during alternate passage in chickens and embryonated eggs. Avian. Pathol; 2005; 34(1): 20-25.

5- Ganapathy, K; Ball, C. and Forrester, A; Genotypes of infectious bronchitis viruses circulating in the Middle East between 2009 and 2014. Virus. Res; 2015; 210: 198-204.

6- Ghahremani, N; Fard, M; Shoushtari, H; Momayez, R; Sheikhi, N; Khoshzahmat, A. and Eshratabadi, F; Molecular analysis of infectious bronchitis viruses isolated in Iran from 1998-2008. J .Vet. Res.; 2011; 10(22): 2961-7.

7- Hashemzadeh, M; Karimi, V; Masoudi, S; Shoushtary, A; Langeroudi, A; Momayez, R; Shirazi, M; Maghsodloo, H; Hasanzadeh, R. and Eshratabadi, F; Phylogenetic study of Iranian infectious bronchitis virus isolates during 2010-2011 using glycoprotein S1 gene. Vet. Rec.; 2013; 68(2): 135-141.

8- Homayounimehr, A; Pakbin, A; Momayyez, R. and Fatemi, S. M. R; Detection and identification of infectious bronchitis virus by RT-PCR in Iran. Trop Anim .Health .Prod; 2016; 48(5): 973-978.

9- Hosseini, H; Fard, M. H. B; Charkhkar, S. and Morshed, R; Epidemiology of avian infectious bronchitis virus genotypes in Iran (2010-2014). Avian. Dis; 2015; 59(3): 431-435.

10- Jackwood, M. W; Review of infectious bronchitis virus around the world. Avian Dis; 2012; 56(4): 634-641.

11- Kahya, S; Coven, F; Temelli, S; Eyigor, A. and Carli, K. T; Presence of IS/1494/06 genotype-related infectious bronchitis virus in breeder and broiler flocks in Turkey. Ankara. Univ. Vet. Fak Derg.; 2013; 60(1): 27-31.

12- Najafi, H; Langeroudi, A. G; Hashemzadeh, M; Karimi, V; Madadgar, O; Ghafouri, S. A; Maghsoudlo, H. and Farahani, R. K; Molecular characterization of infectious bronchitis viruses isolated from broiler chicken farms in Iran, 2014-2015. Arch. Virol; 2016; 161(1): 53-62.

13- Shoushtari A. H; Toroghi R. and Momayez R; 793/B type, the Predominant Circulation Type of avian Infectious Bronchitis Virus 1999-2004 in Iran:a retrospective study. Arch. Razi Inst; 2008: 1-5.

14- Swayne, D. E. and Glisson, J. R; Disease of Poultry. 13th ed. 2013: John Wiley & Sons, Inc. 400-450.

15- Worthington, K. J; Currie, R. and Jones, R. C; A reverse transcriptase-polymerase chain reaction survey of infectious bronchitis virus genotypes in Western Europe from 2002 to 2006. Avian Pathol; 2008; 37(3): 247-257.

www.SID.ir

Archive of SID

Phylogenetic and genotypic study of Infectious bronchitis virus isolated from broiler herds by RT-PCR and S1 gene sequence analysis

Rahimi, A. [1*]; Zamani-moghadam, A. K.[2]; Shoshtari, A. H.[3]

1. Resident, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.
2. Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord- Iran.
3. Professor, Avian Disease and Scientific Research Department, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj- Iran.

Received: 13 January 2018 ***Accepted:*** 12 August 2018

Summary

Evolution and formation of IBV's new serotypes Bare continuously in processing that every year cause a lot of economic loses in poultry industries, so rapid and accurate determination test is critical in order to choose and develop suitable vaccines for controlling of this disease in every region as an important and determinative principle. Despite vaccination against IBD, this disease is one of the economical important disease in the poultry industry that every year cause a lot of economic loses and despite vaccination also it happens. Specimens of trachea and lungs were taken from 40 suspected flock with respiratory problems collected from chicken farms in Fars and Chaharmahal and Bakhtiari Provinces. Samples were tested by Chicken Red Blood Cell Hem-agglutination and negative samples selected for determining Infectious bronchitis viruses by RT-PCR test. Then PCR product was purred by "High pure PCR product purification Kit" Germany (Roche) company has been sent to sequencing a piece with 464 nucleotide base pair. Sequences checked and corrected by MEGA 7 program. Phylogenetic analysis was made by MEGA 7 program using sequencing and National Center for Biotechnology Information. This study results show the majority of flocks infected by variant 2 (75% samples), then mass type (16.6% samples) and finally (8% samples) were H120 vaccine- like isolates. So in according to difference in dominant serotypes in this study with market place vaccines could not create cross immune therefore need to develop new vaccines.

Keywords: Infectious bronchitis,S1 sequencing, Infectious bronchitis isolates, RT-PCR, Iran Infectious bronchitis, variant 2.

* Corresponding Author E-mail: azad.rahimi@gmail.com

www.SID.ir