جمهوری اسلامی ایران

سازمان جهاددانشگاهی تهران

معاونت پژوهش و فناوری

تولید آزمایشگاهی واکسن اتوژن کشته برونشیت عفونی پرندگان

(گزارش پایانی)

کد طرح

۲۲۸۸

واحد سازمانی مجری

سازمان جهاددانشگاهی تهران

گروه پژوهشی

فرآورده های بیولوژیک دامی

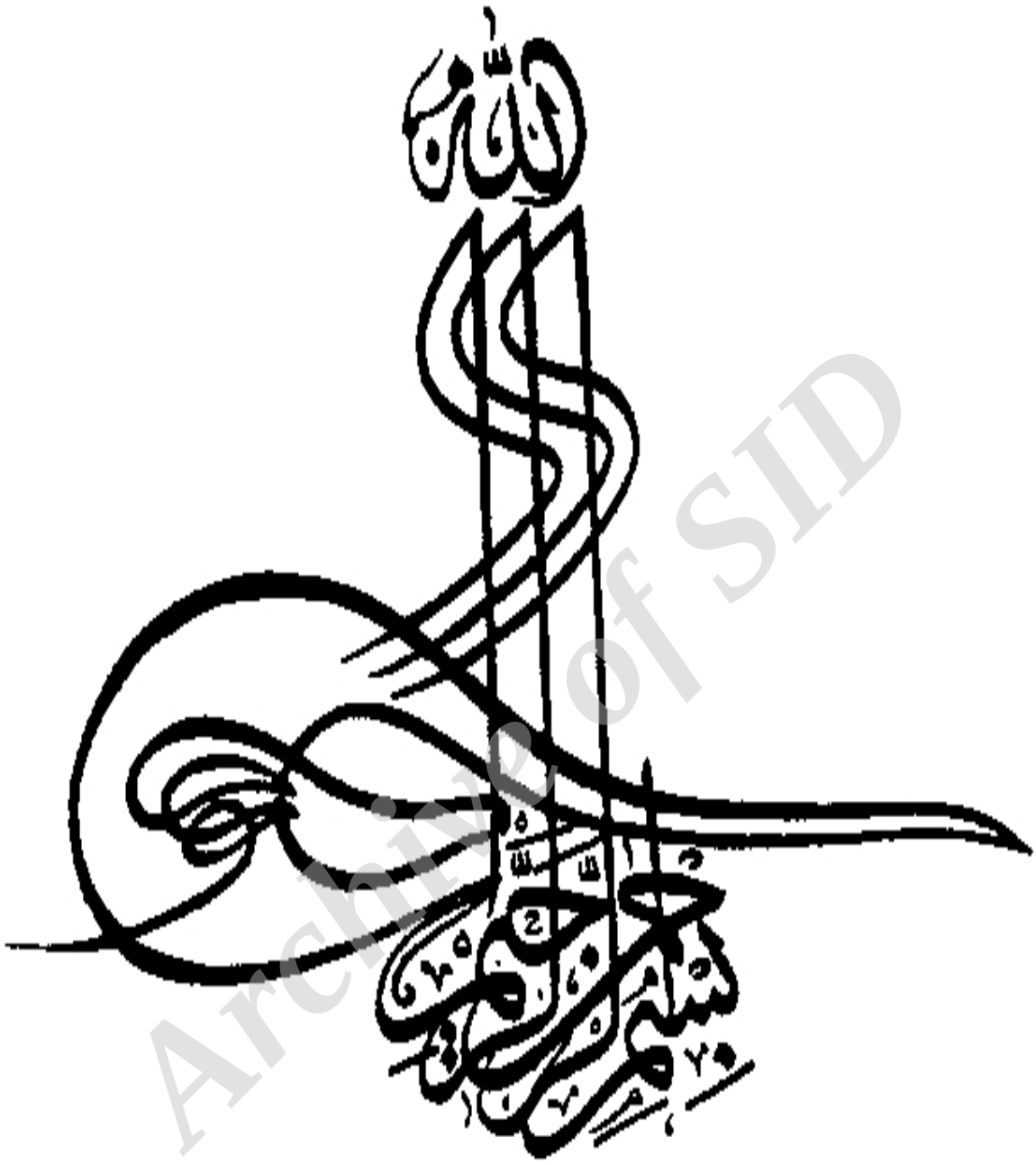
مجری طرح

آرش قلیانچی لنگرودی

پاییز ۹۶

Archive of SID

www.SID.ir



Archive of SID

www.SID.ir

مشخصات **مسئول و همکاران طرح مطابق پرسشنامه مصوب:**

ردیف	نام و نام خانوادگی	مسئولیت در طرح	تخصص	رتبه	جمع کل نفر ساعت همکاری در طرح
۱	آرش قلیانچی لنگرودی	مجری	بیماری‌های طیور	دانشیار	۱۹۲۰
۲	دنیا نیک آئین	همکار اصلی	قارچ‌شناسی	استادیار	۹۶۰
۳	احمد عرفان منش	همکار تولید واکسن	میکروبیولوژی	استادیار پژوهش	٤٨٠
٤	سید علی غفوری	همکار جداسازی و تخلیص ویروس	بیماری‌های طیور	کارشناس	٤٨٠
٥	علیرضا باهنر	مشاور آماری	اپیدمیولوژی	استاد	١٨٠
٦	مسعود هاشم زاده	مشاور آزمایشات بالینی واکسن	بیماری‌های طیور		١٨٠
۷	وحید کریمی	مشاور جداسازی و شناسایی ویروس	بیماری‌های طیور	دانشیار	١٨٠
۸	طاهره مهاجر فر	همکار جداسازی و کشت ویروس	دامپزشکی	مربی پژوهش	٤٨٠
۹	بابک بیک‌زاده	تهیه‌ی گزارش پایانی	ایمونولوژی	کارشناس‌پژوهشی	۳۲

Archive of SID

www.SID.ir

چکیده فارسی

رشد در بخش طیور به خاطر افزایش بروز و ظهور مجدد بیماری های ناشی از تکامل پاتوژن های مختلف ویروسی و استفاده از واکسن زنده به چالش کشیده شده است و با انبوهی از ضررهای اقتصادی ناشی از این بیماری ها مواجه شده است. برونشیت عفونی پرندگان (IB) به وسیله کرونا ویروس ایجاد می شود و در لیست بیماری های OIE قرار دارد و به وسیله درگیری های تنفسی، کلیوی و دستگاه ادراری تناسلی مشخص می شود و باعث مرگ ومیر بالایی می شود. بیماری برونشیت عفونی گسترش و شیوع شدید و خسارت انکار ناپذیر و بسیار زیادی بر پرورش طیور صنعتی در ایران و جهان دارد، بیماری آسیب های متنوعی بر رده های مختلف پرورش ماکیان اعم از گوشتی، تخم گذار و مادر می گذارد. همراهی این ویروس با سایر عوامل بیماری زا که موجب ایجاد کمپلکس های تنفسی و تشدید عفونت های ثانویه می شود، ضرر و زیان شدیدی را مخصوصا در طیور صنعتی به بار می آورد به حالتی که برونشیت عفونی تبدیل به مطرح ترین بیماری در طیور صنعتی در کشور گردیده است. با توجه به واگیری بالای ویروس و کاربرد گسترده واکسن ها به طرق مختلف، بروز تلفات سنگین و متغیر در ارتباط با IBV در کشور رخ می دهد و با توجه به این که استفاده از سویه های بومی هر منطقه می تواند کمک کننده باشد، طرح حاضر با هدف تعیین ژنوتیپ غالب ایران و تهیه واکسن کشته اتوژن از این طراحی و اجرا گردید. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که سویه‌ی غالب کشور در حال حاضر واریانت ۲ با شیوع ۶۴/۳٪ می‌باشد. از سویه‌ی حاضر با استفاده از دستورالعمل OIE و در شرایط آزمایشگاهی واکسن کشته تهیه گردید. مقایسه‌ی این واکسن با واکسن تجاری موجود نشان داد که واکسن آزمایشی قادر است محافظت جوجه‌ها در برابر برونشیت عفونی راافزایش دهد ($p>0/05$). بنابراین انتظار می‌رود شود با ترکیب این واکسن با سویه‌ی مادر M41 و تزریق آن در هنگام تولید بتوان گله را در برابر برونشیت عفونی محافظت کرد (تخمگذار و مادر).

Archive of SID

www.SID.ir

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فصل اول: کلیات	۱
۱-۱ تعریف بیماری	۲
۱-۲ اهمیت بیماری از دیدگاه بهداشت عمومی	۲
۱-۳ زیان‌های اقتصادی ناشی از بیماری	۲
۱-٤- حساسیت گروه‌های مختلف طیور نسبت به بیماری	۳
۱-٥- تاریخچه بیماری	۳
۱-٦- شیوع و پراکندگی جغرافیایی بیماری	٤
۱-۷- خصوصیات ویروس برونشیت عفونی طیور	٤
۱-۷-۱- طبقه بندی و مورفولوژی ویروس	٤
۱-۷-۲- ترکیب شیمیایی	٦
۱-۷-۳- تکثیر ویروس	۷
۱-۷-٤- پروتئین غشایی M و نقش بیولوژیک آن	۷
۱-۷-٥- تنوع ژنتیکی در ویروس‌های برونشیت عفونی	۱۰
۱-٥-۷-۱- موتاسیون‌ها	۱۰
۱-۸- انواع سروتیپ‌های مهم IBV	۱۲
۱-۹- بیماری‌زایی و همه‌گیر شناسی ویروس‌برونشیت عفونی طیور	۱۳
۱-۹-۱- میزبان‌های طبیعی و تجربی	۱٥
۱-۹-۲- انتقال، حامل‌ها و ناقل‌ها	۱٥
۱-۹-۳- دوره‌ی کمون	۱٦
۱-۹-٤- علایم بالینی	۱٦
۱-۹-٥- شیوع و مرگ و میر	۱۷
۱-۹-٦- جراحات کالبدگشایی	۱۷
۱-۹-۷- هیستوپاتولوژی	۱۷
۱-۱۰- شناسایی ویروس برونشیت عفونی طیور	۱۸
۱-۱۰-۱- عوامل تأثیرگذار بر شناسایی IBV	۱۹
۱-۱۰-۲- فاصله‌ی بین شروع عفونت و نمونه‌گیری	۱۹
۱-۱۰-۳- سطح ایمنی جوجه‌ها در زمان عفونت	۲۰
۱-۱۰-٤- انتخاب تعداد پرنده برای نمونه‌گیری	۲۱

Archive of SID

www.SID.ir

۵-۱۰-۱- انتخاب اندام برای نمونه‌گیری ۲۱
۶-۱۰-۱- نحوه‌ی نمونه‌گیری ۲۲
۷-۱۰-۱- ژنتیک جوجه‌ها ۲۳
۸-۱۰-۱- نحوه‌ی پرورش جوجه‌ها ۲۳
۹-۱۰-۱- حضور احتمالی عوامل تضعیف‌کننده‌ی ایمنی ۲۴
۱۱-۱- جداسازی ویروس ۲۴
۱-۱۱-۱- جداسازی ویروس با استفاده از تخم‌مرغ جنین‌دار SPF ۲۵
۲-۱۱-۱- جداسازی ویروس با استفاده از کشت سلولی ۲۶
۳-۱۱-۱- جداسازی ویروس با استفاده از کشت اندام جوجه ۲۶
۱۲-۱- شناسایی ژنوم IBV ۲۶
۱۳-۱- طبقه‌بندی سویه‌ها ۲۷
۱-۱۳-۱- طبقه‌بندی بر اساس بیماری‌زایی (پاتوتیپ) ۲۷
۲-۱۳-۱- طبقه‌بندی بر اساس ایمنی (ایمونوتیپ) یا براساس حفاظت (پروتکتوتیپ) ۲۸
۳-۱۳-۱- طبقه‌بندی بر اساس گروه‌های آنتی‌ژنی ۲۹
۱-۳-۱۳-۱- سروتیپ‌ها ۲۹
۲-۳-۱۳-۱- گروه‌بندی براساس اپی‌توپ ۳۰
۴-۱۳-۱- ژنوتیپ‌ها ۳۰
۱۴-۱-تعیین توالی ۳۰
۱۵-۱- واکسیناسیون ۳۱
۱-۱۵-۱- انواع واکسن‌های برونشیت ۳۱
۱۶-۱- درمان بیماری برونشیت عفونی ۳۲
فصل دوم: مواد و روش‌کار ۳۳
۱-۲-جمع‌آوری نمونه‌های ویروس ۳۴
۱-۱-۲- آماده سازی نمونه ها ۳۴
۲-۲- کشت ۳۴
۳-۲- شناسایی ویروس برونشیت عفونی ۳۵
۱-۳-۲- استخراج RNA از نمونه‌ها ۳۵
۲-۳-۲- اندازه گیری غلظت RNA استخراج شده ۳۵
۳-۳-۲- آزمایش نسخه برداری معکوس و واکنش زنجیره ای پلی مراز ۳۶

Archive of SID

www.SID.ir

۱-۳-۳-۲- ساخت cDNA ۳٦
۲-۳-۳-۲- واکنش زنجیره ای پلیمراز ۳۷
۳-۳-۳-۲- آماده سازی مخلوط اصلی و برنامه حرارتی ۳۷
٤-۳-۳-۲- الکتروفورز فرآورده های PCR ۳۷
۱-٤-۳-۳-۲- طرز تهیه ژل آگارز ۳۸
٤-۳-۲- تعیین ژنوتیپ ویروسهای جدا شده با استفاده از تکثیر بخشی از ژن اسپایک(S1) ۳۹
٥-۳-۲- توالی یابی ژن s1 و تحلیل بیوانفورماتیک ٤۰
٤-۲- تأیید عدم حضور سایر پاتوژن‌های ویروسی ٤۰
۱-٤-۲- آزمایش هماگلوتیناسیون (HA) ٤۰
٥-۲- تعیین تیتر ویروس های جدا شده جهت استفاده در آزمایش ٤۱
٦-۲- تولید واکسن ٤۱
۱-٦-۲- انتخاب سویه ٤۱
۲-٦-۲- آزمایش سترونی ٤۲
۳-٦-۲- آزمایش عیار سنجی ٤۲
٤-٦-۲- آزمایش تعیین هویت ٤۲
٥-٦-۲- آزمایش خلوص[1] ٤۲
٦-٦-۲- غیرفعال کردن ویروس ٤۳
۷-۲- فرمولاسیون واکسن ٤۳
۸-۲- آزمایش بی ضرری (ایمنی)[2] ٤۳
۹-۲- آزمون پایداری ٤۳
۱۰-۲- بررسی سرولوژیک جوجه‌های واکسینه ٤۳
۱۱-۲- آزمایش کارآیی واکسن ٤٤
۱۲-۲- تجزیه و تحلیل نتایج ٤٤
فصل سوم: نتایج ٤٥
۱-۳- نتایج شناسایی ویروس برونشیت عفونی طیور ٤٦
۲-۳- نتایج عیارسنجی ویروس‌ها ٤۸
۳-۳- نتایج تولید واکسن تجربی ٤۹

[1] Purity test
[2] safety

Archive of SID

www.SID.ir

٤-٣- نتایج آزمون استریلیتی ٤٩
٥-٣- آزمون پایداری واکسن‌ها ٤٩
٦-٣- نتایج آزمون بی‌ضرری (ایمنی) ٤٩
٧-٣- نتایج بررسی تیتر آنتی‌بادی علیه واریانت ٢ ویروس برونشیت عفونی ٤٩
٨-٣- نتایج بررسی تیتر آنتی‌بادی علیه ویروس برونشیت عفونی در جوجه‌های SPF پیش از چالش با واریانت ٢ ٥٠
٩-٣- نتایج ارزیابی حفاظت علیه جدایه واریانت ٢ ویروس برونشیت عفونی ٥١
فصل پنجم: بحث و نتیجه‌گیری ٥٢
فهرست منابع ٥٧
چکیده (انگلیسی) ٦١

Archive of SID

www.SID.ir

فصل اول

کلیات

Archive of SID

www.SID.ir

۱-۱ تعریف بیماری

برونشیت عفونی طیور[۱] یک بیماری بسیار مسری دستگاه تنفسی جوجه‌هاست که با رال تنفسی، سرفه، عطسه و همچنین در گله‌های تخم‌گذار با کاهش تولید همراه است. مرگ‌ومیر در جوجه‌های جوان به علت عوارض تنفسی یا کلیوی بیماری است (آزاد ۱۳۸۲)

این بیماری به علت اختلالی که در رشد به وجود می‌آورد باعث کاهش وزن و در نهایت منجر به افزایش ضریب تبدیل غذایی می‌گردد، به همین دلیل از نظر اقتصادی در زمره بیماری‌های مهم طیور به حساب می‌آید (مرندی, وصفی et al. ۲۰۰۱). عامل این بیماری یکی از اجزای عفونت‌های مخلوط و مرکبی است که باعث التهاب کیسه‌های هوایی[۲]، کاهش سرعت رشد نیمچه های گوشتی و کیفیت و کمیت تولید تخم‌مرغ می‌شود. خسارات به وجود آمده از این بیماری که ناشی از کاهش میزان تولید است به‌مراتب بیشتر از خساراتی است که در اثر مرگ‌ومیر طیور ایجاد می‌شود. مسری بودن این بیماری و وجود سروتایپ های متعدد ویروس که برای پیشگیری از بیماری استفاده می‌شود بسیار با ارزش می‌باشد (Adzhar, ۱۹۹۷Gough et al.).

۱-۲ اهمیت بیماری از دیدگاه بهداشت عمومی

انتقال این ویروس به انسان گزارش نشده‌است، بنابراین بیماری از دیدگاه بهداشت عمومی مسئله‌ای ایجاد نمی‌کند. ویروس‌های مشابه (از نظر مورفولوژی) که از انسان جدا کرده‌اند، از نظر آنتی‌ژنی کاملاً متمایز از ویروس برونشیت عفونی (IBV) می‌باشند (۲۰۰۳Cavanagh and Naqi).

آزمایش‌های خنثی‌سازی ویروس که بر روی سرم اختصاصی افرادی که با طیور آلوده به ویروس برونشیت عفونی به صورت مستقیم و یا غیر مستقیم از طریق جابجایی طیور آلوده تماس داشته‌اند نشان داده‌است که تیتر آنتی‌بادی خنثی‌کننده‌ی ویروس در این افراد پایین می‌باشد، لیکن اهمیت این یافته‌ها تاکنون شناخته نشده‌است (۱۹٦۸MILLER and YATES).

۱-۳ زیان‌های اقتصادی ناشی از بیماری

زیان‌های اقتصادی ناشی از این بیماری به طور دقیق قابل محاسبه و اندازه‌گیری نیست. در خصوص این بیماری یکی از نکات حائز اهمیت این است که بیماری اغلب به‌عنوان مستعد کننده و زمینه‌ساز برای هجوم سایر عوامل بیماری زا در گله مطرح است. در موارد بروز بیماری در گله، با اعمال روش‌های مدیریتی صحیح، می‌توان زیان‌های اقتصادی ناشی از بیماری

1- Avian infectious bronchitis
2- Air sacculitis

Archive of SID
www.SID.ir

را به حداقل رساند. در گله‌های جوان مرگ و میر ناشی از بیماری تا ۲۵٪ نیز می‌رسد، ولی در گله‌های مسن‌تر (با سن بیش از شش هفته) معمولاً مرگ و میر ناشی از بیماری ناچیز بوده و بیماری بیشتر با کاهش تولید و باروری خود را نشان می‌دهد (Davelaar, Kouwenhoven et al. ۱۹۸٤, Cavanagh and Naqi ۲۰۰۳).

در سال ۱۹٥٤، برودفوت و اسمیت کاهش تولید تخم مرغ به میزان ۲۵٪ و کاهش قدرت تفریخ به میزان ۷٪ در گله‌ی مبتلا به برونشیت عفونی طیور گزارش کردند (Broadfoot and Smith ۱۹٥٤).

٤-۱- حساسیت گروه‌های مختلف طیور نسبت به بیماری

- در مطالعات انجام شده بر روی نیمچه‌های گوشتی، افزایش ضریب تبدیل غذا، بروز عفونت‌های میکروبی فرصت-طلب مانند آلودگی با *E.coli* و افزایش حدت بیماری، خصوصاً در هفته‌های آخر دوره‌ی پرورش اتفاق می‌افتد (Minta, Bugajak et al. ۱۹۹۰, Ignjatović and Sapats ۲۰۰۰).
- وقوع بیماری در ابتدای دوره‌ی پرورش در گله‌های مادر یا تخم‌گذار باعث ایجاد ضایعاتی در اویدوکت می‌گردد که این ضایعات خصوصاً در غیاب آنتی‌بادی مادری[۱] بسیار بارز است. این مرغ‌ها از لحاظ ظاهری رشد طبیعی دارند اما فاقد قدرت تولید تخم‌مرغ می‌باشند، زیرا ویروس باعث دیسپلازی اویدوکت[۲] می‌گردد و پرندگان مبتلا به این فرم از بیماری برونشیت عفونی، تخم‌گذار کاذب خوانده می‌شوند. این نامگذاری به این علت است که این پرندگان از سرمایه‌گذاری لازم جهت نگهداری، تأمین، تغذیه و... بهره‌مند می‌شوند، اما بازدهی اقتصادی مطلوب را ندارند (Cavanagh and Naqi ۲۰۰۳, Boltz, Nakai et al. ۲۰۰٤).
- اگر گله در زمان پیک تولید و یا در زمان شروع تخم‌گذاری به بیماری مبتلا گردد، ضایعات اقتصادی به طور عمده ناشی از کاهش تولید تخم‌مرغ و از دست دادن کیفیت پوسته است. اغلب پس از بهبودی از بیماری، سطح تولید گله به آن چه قبل از وقوع بیماری بوده برنمی‌گردد و به همین دلیل برای جلوگیری از زیان‌های اقتصادی بیشتر، می‌بایست گله را قبل از زمان مقرر روانه کشتارگاه کرد. علاوه بر این شدت ضایعات بسته به حدت سویه ویروس، سطح ایمنی طیور در زمان ابتلا به بیماری و نیز سن طیور، متفاوت است (Cavanagh and Naqi 2003). بر اساس گزارش‌های موجود، اگر گله‌های مادر گوشتی در سن ۲۰ تا ۲٦ هفتگی به بیماری مبتلا گردند، نسبت به زمان پیک تولید (۲٦ تا ۳۵ هفتگی) خسارت کمتری از بیماری می‌بینند (Parsons, Ellis et al. 1992).

۱-۵ تاریخچه بیماری

---

[1]- Maternal Anti body
3-Oviduct dysplasia

Archive of SID
www.SID.ir

اولین بار در سال ۱۹۳۰ میلادی بیماری با علائم تنفسی و مرگ و میر بالا در جوجه‌های با سنین پایین در در داکوتای شمالی ایالات متحده‌ی آمریکا مشاهده شد (De Wit, Cook et al. 2011). پس از آن در سال ۱۹۳۱ شاک و هاوار[1] بیماری را بر اساس علائم بالینی و مطالعات آزمایشگاهی توصیف کردند (Cavanagh and Naqi 2003).

دیگر موارد بیماری که توسط سایر محققان از دیگر نقاط دنیا گزارش شده است، نشان می‌دهد که این بیماری گرچه در درجه نخست جوجه‌های جوان را در گیر می‌کند، لیکن گله‌های در حال تخم‌گذاری و نیمه‌بالغ نیز با حدت کمتری درگیر بیماری می‌شوند. میزان شیوع بیماری در جوجه‌های مسن‌تر نیز رقم نسبتاً بالایی دارد، گرچه میزان مرگ‌ومیر در این موارد معمولاً پایین است. در سال ۱۹٤۰ علائم تنفسی همراه با کاهش تولید تخم‌مرغ در گله‌های تخم‌گذار مشاهده شد و در سال ۱۹٦۰ نیز ضایعات کلیوی به همراه کاهش میزان تولید گزارش گردید. برونشیت عفونی انتشار جهانی دارد و خسارات اقتصادی ناشی از بیماری، باعث شد تا کوشش برای پیشگیری از این بیماری در گله‌های در حال تخم‌گذاری آغاز گردد و این امر به‌صورتی انجام شد که جوجه‌ها را به طور کنترل‌شده‌ای در مرحله رشد، قبل از شروع تخم‌گذاری در معرض ویروس قراردادند (Gelb Jr, Wolff et al. 1991, Cavanagh and Naqi 2003).

اتیولوژی عامل بیماری در سال ۱۹۳٦ توسط بیچ و شالم ثبت گردید و در سال ۱۹۳۷ برای اولین بار ویروس در تخم مرغ جنین‌دار کشت داده شد (Cavanagh and Naqi 2003, Cavanagh 2007).

در سال ۱۹٤۱ زیربنای برنامه‌های امروزی ایمن‌سازی پرندگان علیه این ویروس پایه‌گذاری شد (Cook, Smith et al. 1986).

در سال ۱۹٥٦، نشان داده شد که سویه‌های کانکتیکات و ماساچوست علی‌رغم ایجاد بیماری‌های مشابه دارای اثر خنثی‌سازی متقابل نسبت به همدیگر نیستند. گزارش‌های بعدی نشان داد که بیش از یک سروتایپ ویروسی در اتیولوژی بیماری نقش دارد (Cowen and Hitchner 1975, Gelb Jr, Perkins et al. 1981).

٦-۱- شیوع و پراکندگی جغرافیایی بیماری

امروزه برونشیت عفونی پرندگان در تمام نقاط دنیا شایع است و در ایران نیز در اکثر نقاطی که پرورش طیور وجود دارد بیماری دیده می‌شود (آزاد ۱۳۸۲, Cavanagh and Naqi 2003). اولین بار در سال ۱۹٦٦لیست کاملی از شیوع بیماری و سال شیوع آن در کشورهای مختلف گزارش گردید (Meulemans, Boschmans et al. 2001).

در سال ۱۹٥۰ در ایالات‌متحده آمریکا چندین سروتایپ دیگر علاوه بر سویه ماساچوست اصلی، مورد شناسایی قرار گرفت. تا اواخر سال ۱۹۷۰ میلادی که سروتایپ های جدید در اروپا شناسایی شد، سویه‌های جداشده را جز سویه

[1] Shalk & Hawar

Archive of SID

www.SID.ir

ماساچوست به حساب می‌آوردند. هم اکنون در پاره‌ای از موارد علی‌رغم واکسیناسیون، بیماری بروز می‌کند و علـتش دخالـت سروتایپی غیر از سروتایپی است که برای تهیه واکسن مورد استفاده قـرار گرفتـه‌اسـت (Cowen and Hitchner 1975, Cook 1984).

۱-۷- خصوصیات ویروس برونشیت عفونی طیور

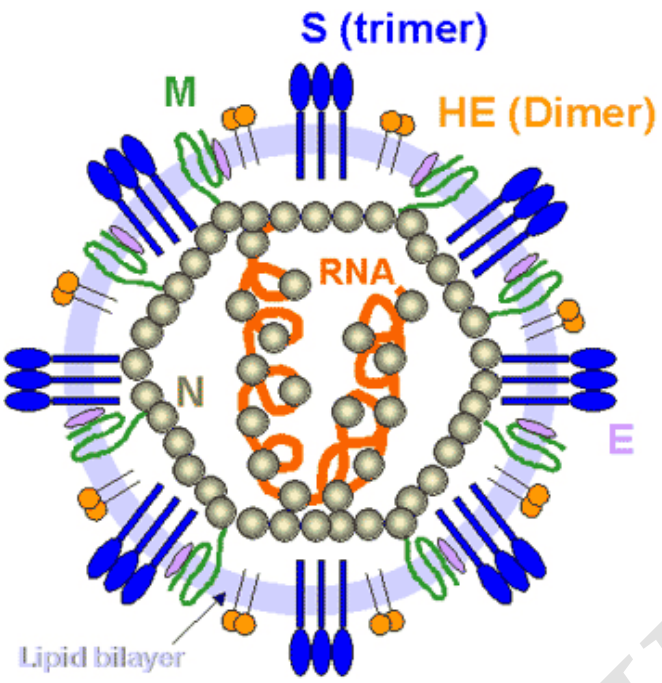
۱-۷-۱- طبقه‌بندی و مورفولوژی ویروس

ویروس برونشیت عفونی (IBV)[۱] ویروسی از گروه سوم متعلق به جنس کرونا ویروس[۲] از خانواده کرونا ویریده[۳] می‌باشد. کروناویروس بوقلمون و کروناویروس قرقاول نیز در همین گروه قرار می‌گیرند. دو گروه دیگر شامل کروناویروس‌های پستانداران می باشند که کاملاً به لحاظ ساختار و سکانس ژنومی از IBV متفاوت هستند (McMARTIN 1993, Cavanagh and Naqi 2003). ویروس برونشیت عفونی دارای اشکال مختلف ولی معمولاً گرد است. قطر این ویروس حدود ۱۲۰ nm می‌باشد. این زوائد مانند زوائد میله‌ای شکل ویروس های خانواده پارامیسکوویریده خیلی نزدیک به هم قرار نگرفته‌اند. ساختارهای ریبونوکلئوپروتئین[۴] (RNP) که به صورت خود به خودی از ذره ویروسی متلاشی وآزاد می‌شوند با رنگ‌آمیزی منفی مشاهده نمی‌شوند و در بیشتر موارد به صورت رشته‌هایی با قطر ۱-۲ mm دیده می‌شود. اما ساختارهای پیچ خورده به قطر ۱۰-۱۵ mm نیز گاهی دیده می‌شوند (شکل ۱-۱). سویه‌های ویروس برونشیت عفونی در چگالی شیب سوکروز با هم تفاوت دارند. حداکثر چگالی ویروس معمولاً در حدود ۱/۱-۱۵/۱۸ g/ml است اما چگالی کمتر در نبود RNP و یا چگالی بالاتر نیز می‌تواند ایجاد شود. سانتریفیوژ در دورهای بالاتر از ۱۰۰۰۰۰ g باعث از بین رفتن زوائد تاجی شکل می‌شود. به نظر می‌رسد این زوائد در سویه Beaudette ویروس برونشیت عفونی ناپایدارتر باشند. انکوباسیون در ۳۷ °C گاهی منجر به از دست دادن زوائد می‌شود (Cavanagh and Naqi 2003).

- Infectious bronchitis virus[۱]
- Coronavirus[۲]
- Coronavirdae[۳]
- Ribonucleoprotein [۴]

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱-۱: طرح شماتیک ویروس برونشیت عفونی طیور(۷۶)

۲-۷-۱- ترکیب شیمیایی

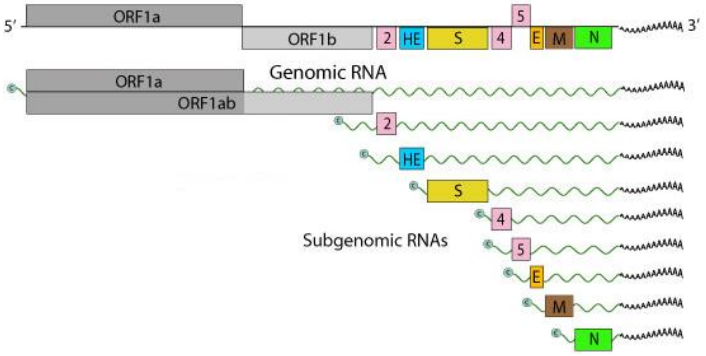
مطالعات متعددی روی ترکیب شیمیایی کروناویروس ها انجام شده است. ویریون‌های ویروس برونشیت عفونی شامل سه نوع پروتیئن اختصاصی ویروس هستند: پروتئین تاجی شکل[۱] S ،گلیکوپروتیئن‌های غشاء[۲] M و پروتئین نوکلئوکپسید داخلی[۳] N و همچنین پروتئین غشائی کوچک[۴] SM (E) که احتمال دارد در ارتباط با غشاء ویروس باشد. پروتئین S شامل ۲ یا ۳ گلیکوپلی پپتید به نام‌های S1 با ۵۲۰ اسید آمینه و S2 با ۶۲۵ اسید آمینه می‌باشد. آنتی بادی‌های ایجاد شده علیه S1 مسئول ممانعت از هماگلوتیناسیون و خنثی سازی ویروس هستند. ساختار و خواص بیولوژیکی پروتئین S اخیراً مورد مطالعه بیشتر قرار گرفته است. اکثر ۲۲۵ آمینو اسید پروتئین M یا از غشاء ویروس بیرون زده است یا در سطح داخلی غشاء ویروس قرار گرفته است. فقط در حدود ۱۰ درصد از این پروتئین از سطح داخلی ویروس بیرون زده است (Cavanagh and Naqi 2003).

ژنوم ویروس تک رشته‌ای با مفهوم مثبت با طول ۲۷۵۰۰ نوکلئوتید (که همه توالی آن مشخص شده است) می‌باشد پروتئین N به دور آن پیچ خورده و RNP را می‌سازد. در تهیه ویروس خالص همواره پلی پپتیدهای سلول میزبان نیز حضور دارد. پروتئین N ویروس در طی روند جداسازی و خالص سازی ممکن است خرد شده و از بین برود (Cavanagh and Naqi 2003). در برخی از کروناویروس ها نظیر کروناویروس های انسانی HCoV-OC43 پروتئین چهارمی در غشاء انولوپ

[1]- Spike protein
[2]- Membrane protein
[3] - Nucleocapsids protein
[4] - Small membrane protein

Archive of SID
www.SID.ir

تحت عنوان هماگلوتنین استراز[1] (HE) وجود دارد که در شکل گیری و تکثیر ویروس دارای نقش های متقابلی با سایر اجزای غشاء می باشد (شکل ۲-۱) (Norkin 2010)



شکل ۲-۱: ساختمان خطی ژنوم ویروس برونشیت عفونی طیور (۷۶)

۳-۷-۱- تکثیر ویروس

ویروس IB در سیستوپلاسم رونویسی می‌شود. شش mRNA بطور مجزا رونوشت برداری می‌شوند که در نتیجه آن ممکن است پدیده نوترکیبی[2] اتفاق بیافتد. ویریون به وسیله جوانه زدن از سطح غشاء رتیکولوم آندوپلاسیک شکل می‌گیرد. گرچه پروتئین S می‌تواند از میان شبکه رتیکولواندوپلاسمیک به سطح سلول مهاجرت کند اما پروتئین M این عمل را نمی‌تواند انجام دهد. ویریون‌ها در وزیکول‌های صاف جمع می‌شوند و از طریق اگزوسیتوز ویریون از سلول خارج می گردد (Norkin 2010). ویروس جدید ٤-۳ ساعت بعد از عفونت ظاهر شده و حداکثر میزان آزادسازی ویروس از سطح سلول آلوده در دمای ۳۷°C، ۱۲ ساعت بعد از عفونت است (Cavanagh and Naqi 2003).

٤-۷-۱- پروتئین غشائی M و نقش بیولوژیک آن

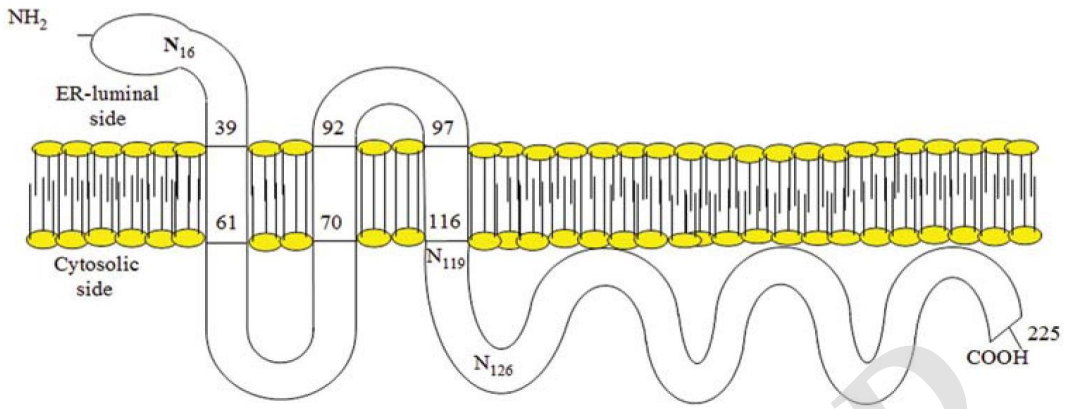
پروتئین M کروناویروس ها یک جزء اصلی ویروس بوده که با همکاری سایر اجزا ویروسی نقش های مهمی در شکل گیری، جوانه زدن و بالغ شدن ویروس دارد (De Haan, Vennema et al. 2000, Wang, Fang et al. 2009). این پروتئین فراوان ترین پروتئن در غشاء ویروس بوده و در چرخه زندگی ویروس نقشی حیاتی بازی می کند (Narayanan, Maeda et al. 2000).

پروتئین M یک پروتئین غشایی تیپ III به طول ۲۲۵ اسید آمینه است (Wang, Fang et al. 2009). با استفاده از تجزیه و تحلیل های بیوشیمیایی و ایمنولوژیکی مشخص شده است که این پروتئین دارای یک دمباله آمینی کوتاه خارجی، ۳ قطعه بین غشایی و یک زنجیره بلند ایمنولوژیک در انتهای کربوکسیلیک خود می باشد. به طوری که دمباله سیتوزولی اسید

[1] -Heamaggluteninestrase
- Recombination [2]

Archive of SID
www.SID.ir

آمینه های پروتئین M بین جایگاه ۱۹۵ تا ۲۱۰ نقش موثری به عنوان یک ایمنوژن در تولید آنتی بادی بازی می کند (شکل۳-۱) (Voß, Pfefferle et al. 2009).



شکل ۳-۱: طرح شماتیک پروتئین M ویروس برونشیت عفونی طیور (Voß, Pfefferle et al. 2009)

به نظر می‌رسد جایگاه های گلیکوزیله شدن در پروتئین M به شدت در بین ۳ گروه کروناویروس حفاظت شده است (Voß, Pfefferle et al. 2009). علی رغم تفاوت بالای موجود در سکانس پروتئین M کروناویروس ها، عملکرد شیمیایی یکسانی برای این پروتئین در ویروس مطرح است (Adzhar, Shaw et al. 1996).

عملکرد متقابل بین پروتئین های M در شکل گیری غشاء ویروس موثر می باشد (Nguyen and Hogue 1997). زمانی که پروتئین M به تنهایی بیان می شود به صورت فرم کمپلکس های هومو مولتی متریک [1] در دستگاه گلژی تجمع می یابد (Locker, Griffiths et al. 1992, Klumperman, Locker et al. 1994). مشخص شده است ۱۳٤ اسید آمینه ابتدایی پروتئین M که شامل سه قطعه بین غشایی می باشد نقش قاطعی در تجمع پروتئین M در دستگاه گلژی دارد (در ویروس برونشیت عفونی طیور به نظر می رسد سیگنالی که باعث تجمع پروتئین M در دستگاه گلژی می شود در اولین قطعه بین غشایی قرار دارد) (Voß, Pfefferle et al. 2009).

انتهای کربوکسیلیک پروتئین M که به شدت آمفی فیلیک [2] است، با یک انتهای هیدروفیلیک [3] سبب ایجاد ساختار محکمی برای پروتئین M شده که این ویژگی ساختاری اهمیت این قسمت پروتئین M را در شکل گیری و جوانه زنی کروناویروس ها نشان می دهد (Vennema, Godeke et al. 1996).

- Homomultimetric[1]
- Amphiphilic[2]
- Hydrophilic[3]

Archive of SID
www.SID.ir

شکل ٤-١: ساختار خطی و جایگاه های مهم پروتئین M(٧٦)

پروتئین M در همکاری با پروتئین HE در جوانه زنی و تشکیل اشکال شبه ویروس[1](VLPs) با شباهت بالا در سایز و شکل نقش داشته که این موضوع نشان دهنده نیاز بالای شکل گیری انولوپ اکثر کروناویروس ها به پروتئین M و HE است (Vennema, Godeke et al. 1996). حذف یا موتاسیون در اسیدآمینه آلانین در جایگاه ١٥٩ و لیزین در جایگاه ١٦٠ پروتئین M سبب اختلال در عملکرد متقابل پروتئین M، پروتئینHE می گردد (Wang, Fang et al. 2009).

ارتباط بین پروتئین M و پروتئین N از طریق ١٦ جایگاه اسید آمینه ای موجود انتهای کربوکسیلیک واقع شده در سیتوپلاسم صورت می گیرد، این ناحیه نقش موثری در شکل گیری ویروس دارد (٢٦ و ٣٢). در مورد ویروس هپاتیت موش عملکرد متقابل پروتئین M و N در شکل گیری ویروس در شبکه اندوپلاسمیک مشخص شده است (Narayanan, Maeda et al. 2000).

در عملکرد مشترک بین پروتئین M و S در شکل گیری کرونا ویروس ها قسمت های مختلف پروتئین دارای نقش های متفاوتی هستند به نحوی که:

– انتهای آمینی پروتئین M در عملکرد مشترک پروتئین های M و S مهم نمی باشد؛ به طوری که حذف، وارد شدن، جابجایی کامل و گلیکوزیلاسیون این قطعه اثری بر توانایی این پروتئین برای همکاری با پروتئین S ندارد (de Haan, Smeets et al. 1999).

– قطعه های داخل غشایی پروتئین M در همکاری موثر پروتئین های M و S کاملا ضروری بوده به نحوی که هر نوع تغییری در این سه قطعه سبب نقص در عملکرد پروتئین M و S شده و شکل گیری و جوانه زدن ویروس را دچار اختلال می کند (de Haan, Smeets et al. 1999).

– عملکرد متقابل بین پروتئین M و S در حضور پروتئینهای M واجد حذف شدگی در انتهای کربوکسیلیک بشدت دچار اختلال می گردد.

اکتین موجب شکل گیری صحیح پروتئین M، پایداری آن، کمک به جابجایی پروتئین در دستگاه گلژی و در نتیجه جوانه زنی و آزاد سازی صحیح ویروس می گردد. به طوری که حذف یا موتاسیون در اسیدآمینه آلانین در جایگاه ١٥٩ و لیزین در جایگاه ١٦٠ پروتئین M سبب اختلال در عملکرد متقابل پروتئین M و اکتین می گردد (Wang, Fang et al. 2009).

---

[1] - Virus-like particle

Archive of SID
www.SID.ir

۱-۷-۵- تنوع ژنتیکی در ویروس‌های برونشیت عفونی

تنوع ژنتیکی کروناویروس‌های پرندگان و اهمیت آن در اپیدمیولوژی بیماری برونشیت عفونی طیور اولین بار توسط Jungherr و همکاران (۱۹۵۹) در ارتباط با تغییر ژنتیکی بین سروتیپ‌های ماساچوست[۱] و کانکتیکوت[۲] گزارش شد. بعدها تنوع ژنتیکی بین سروتیپ‌ها و حتی بین سویه‌های یک سروتیپ با آنالیز انگشت‌نگاری RNA توسط Clewley (۱۹۸۱) و Butcher و همکاران (۱۹۹۰) نشان داده شد و متعاقباً نواحی متغیر و ارتباط فیلوژنتیکی سویه‌های IBV با آنالیز سکانس نوکلئوتیدی ویروس به ترتیب توسط Cavanagh (۱۹۸۸) و Kusters (۱۹۸۹) ارائه شد (Wang and Tsai 1996). موتاسیون‌های شناسایی شده در کرونا ویروس‌ها و از جمله IBV شامل موارد زیر است:

۱-۵-۷-۱- موتاسیون‌ها

موتاسیون‌ها یا تغییرات آنتی ژنتیکی ویروس‌های IBV می‌تواند از نوع نقطه‌ای[۳]، حذف[۴] یا الحاقی[۵] یک یا چند نوکلئوتید باشد و یا از نوع نوترکیب[۶] باشد که ناشی از الحاق تعداد زیادی نوکلئوتید باشد. در این نوع موتاسیون تغییرات ژنومی از نوع بزرگ و عمده است و اصطلاحاً به آن Shift گویند. نوع دیگر این تغییرات، تغییرات سریع است که در ترکیب ژنتیکی بسیاری از ویروس‌ها و از جمله کروناویروس‌ها رخ می‌دهد و می‌تواند به عنوان نتیجه‌ای از فرایندهای نوترکیبی باشد به عنوان مثال بین ژنوم کروناویروس موش چه در شرایط درون تنی[۷] و چه در شرایط بیرون تنی[۸] تحت حضور و عدم حضور فشارهای بیولوژیکی، در عفونت مخلوط با چند نوع ویروس، تغییرات نوترکیبی سریعی رخ می‌دهد این مبادلهٔ اطلاعات ژنتیکی یک مکانیسم حیاتی برای کروناویروس‌های زندهٔ موجود در طبیعت، می‌تواند باشد. این تغییرات سریع معمولاً گذرا و کم دوام‌اند و به ندرت منجر به یک سویه جدید مقاوم و پایدار می‌شوند (Saif 1993). مطالعات بر روی سویه‌های IBV، دستیابی به یک سری تغییرات آن را فراهم می‌کند مقایسه توالی نوکلئوتیدهای ژن S1 در سویه‌های جدا شده از اروپا، آمریکا، ژاپن، استرالیا و دیگر نقاط دنیا تقسیم‌بندی‌های متفاوتی را ارائه می‌دهد. در یک مطالعه وسیع که توسط Wang و همکاران (۱۹۹٤) انجام شد، چهارگروه کلی مجزا از نظر ژنتیکی شناسایی شد. گروه Dutch بیشترین انشعاب و تقسیم را داشت و حدود ٦۰٪ با گروه آمریکایی شباهت داشت. گروههای Mass و اروپایی حدود ۸۰٪ همولوژی داشتند. گروه‌های آمریکایی بیشترین تغییر را در بین خود داشتند و حدود ۸۰٪ با هم شباهت داشتند. شباهت گروههای Mass ، اروپایی و Dutch در نهایت ۹۵٪ با هم بود (Saif 1993). میزان موتاسیون معمولا در ژنوم‌های RNA بیشتر از DNA است (۱۰ باز نوکلئوتید در

- Massachusetts[۱]
- Connecticut[۲]
- Mutation Point[۳]
- Deletion[٤]
- Insertion[٥]
- Recombinant [٦]
- In vivo[۷]
- In vitro[۸]

Archive of SID

www.SID.ir

موتاسیون‌های نقطه‌ای). این میزان بالای موتاسیون در ژنوم RNA به نظر می‌رسد به دلیل فقدان مکانیسم‌های تصحیح کنندگی در طی تکثیر RNA مانند فقدان Proof reading در RNA پلی مراز) باشد. پدیده نوترکیبی در ویروس‌های IBV می‌تواند بین دو سویه‌ای که از نظر ژنتیکی مجزا هستند نیز رخ دهد. موتاسیون‌های نقطه‌ای، حذف، الحاق و نوترکیبی در ژنوم، به طور طبیعی هم می‌تواند رخ دهد که عمدتاً بین ویروس Mass- Serotype like و Ark-Serotype like می‌باشد (Saif 1993, Ignjatović and Sapats 2000, Cook, Chesher et al. 2001, Sambrook and Russell 2001). این سه نوع موتاسیون در هر سه ژن S، M N می‌تواند رخ دهد (SNEED, BUTCHER et al. 1989, Lin, Kato et al. 1991, Sapats, Ashton et al. 1996)

پروتئین نوکلئوپروتئین معمولاً ثابت و بدون تغییر در نظر گرفته می‌شود. سکانس آمینو اسیدی پروتئین N در ۲۷ ویروس جدا شده در طی ٦٠ سال در مناطق آمریکا، انگلستان، لهستان، عربستان و ژاپن صرفاً ٦-٢٪ تفاوت آمینواسیدی را نشان دادند. در حالی که تفاوت آمینو اسیدی در پروتئین S1 اینها ٤٦٪ بوده است. با این حال در مطالعه Sapats و همکاران (١٩٩٦) با مقیاسه سکانس نوکلئوتیدی ٨ سویه IBV جدا شده از استرالیا در طی یک دوره ٣٠ ساله صرفاً ٩٩/٢-٦٤/٩ درصد شباهت را نشان دادند (Sapats, Ashton et al. 1996)

پروتئین M نیز می‌تواند دچار تغییر شود و تحت واحد S2 نیز طبق برخی گزارشات به میزان S1 دچار موتاسیون می‌شود. اما از آنجا که آنتی‌ژن‌ها و اپی توپ‌های مهم روی S1 مهمتر و کلیدی‌تر است و مبنای مطالعات قرار می‌گیرد. مقایسه تقسیم‌بندی آنتی‌ژنی و تقسیم‌بندی ژنتیکی در تعیین تداخلات ویروس- میزبان (که منجر به تولید ایمنی در میزبان می‌شود) مهم است. ویروس‌های IBV می‌توانند به طور همزمان در یک گله چرخش داشته باشند و حتی به طور همزمان یک سلول میزبان با بیش از یک نوع ویروس IBV آلوده شود که همگی این حالت شانس بروز سویهٔ جدید را بالا می‌برد (١٦، ٤٧، ٧٨). موتاسیون‌ها می‌توانند یک دلیل اساسی برای بقای این ویروس در طبیعت باشند و تنوع ژنتیکی و آنتی ژنی در تحت واحد S1 ویروس نوعی تطابق ویروس نسبت به فشار ایمنی مربوط به واکسیناسیون وسیع و فشرده علیه IBV و دیگر اقدامات مدیریتی علیه بیماری باشد. این تغییرات ویروس مسئول تکامل و بقای IBV است. شیوع بیماری IB در گله‌ها در غالب موارد نتیجه‌ای از بروز و ظهور سویه‌های است که از نظر سرولوژیکی با سویه واکسن فرق می‌کند(Saif 1993) .

به نظر می‌رسد ظهور واریانت در گله‌های تخم‌گذار نسبت به گله‌های گوشتی از فراوانی بیشتری برخوردار باشد علت این امر می‌تواند به دلایل زیر باشد:

١- اکثر فارم‌های پرورش پولت- تخم‌گذار چند سنی هستند و IBV به طور مرتب بین این گله‌ها در چرخش است.

٢- طول مدت نگهداری گله‌های پولت- تخم گذار در مقایسه با گله‌های گوشتی طولانی‌تر است و شانس ایجاد واریانت‌های جدید را بالا می‌برد.

Archive of SID

www.SID.ir

۳- برنامه واکسیناسیون علیه IB در گله‌های تخم‌گذار فشرده‌تر و با تکرار بیشتری است و سطح ایمنی جمعیت طیور بالاتر و در نتیجه فشار ایمنی روی ویروس بیشتر است. فرار از این سد ایمنی احتمال وقوع واریانت را افزایش می‌دهد(Gelb Jr, Wolff et al. 1991).

۸-۱- انواع سروتیپ‌های مهم IBV

تاکنون بیش از ۳۰ سروتیپ و حدود ۱۰۰ سویه واریانت ویروس برونشیت شناسایی شده است. متاسفانه مرزبندی دقیق و ثابتی بین سروتیپ‌های و سویه‌ها دیده نمی‌شود و به نظر می‌رسد که روند پیدایش سویه‌های جدید به دلیل فراوانی موتاسیون در ویروس ادامه‌دار باشد. گرچه بسیاری از سویه‌های نوظهور بتدریج حذف می‌شوند با این حال تعدادی از مهم‌ترین سروتیپ‌ها در اینجا آورده می‌شود.

۱- Massachusetts به نام‌های M41 , VR21, IBV41 نیز نامیده می‌شود. اولین بار توسط Van Roekel (۱۹٤۱) در ماساچوست آمریکا جدا شد. به علت کامل بودن ترکیب آنتی‌ژنی این سروتیپ، بصورت واکسن‌های تخفیف حدت یافته در آمریکا مصرف می‌شود. حتی تا ٤۰۰ پاساژ در تخم‌مرغ جنین‌دار، مرگ و میر ایجاد نمی‌کند. این سروتیپ پرتوتیپ ویروس‌های IBV است (McMARTIN 1993)

۲- Beaudette 66579: بنام‌های BEL, M42, IBV42 و همچنین VR22 هم گفته می‌شود. ابتدا توسط (۱۹۳۷) Beaudette و Hudson جدا شد. سابقه اولیه آن خیلی دقیق مشخص نیست اما پاساژ۲۸ روی تخم‌مرغ جنین‌دار بسرعت آنرا در عرض کمتر از ٤۸ ساعت می‌کشد و به دلیل همین خصوصیت بین ویروس‌های IBV منحصر به فرد است.

از این خاصیت برای تست‌های سرولوژی استفاده می‌شود. با بسیاری از آنتی بادی‌های علیه ویروس‌های سروتیپ ماساچوست خنثی می‌شود (McMARTIN 1993).

۳- Connecticut A5963 بنام های IB46، VR817 نیز نامیده می‌شود. اولین بار در ایالت کانکتیکوت توسط Junngherr (۱۹٥٦) جدا شد. بطور ناحیه‌ای در آمریکا بصورت واکسن مصرف می‌شود (McMARTIN 1993).

٤- Holland: همراه با ویروس‌های Holt, Gray به عنوان ویروس‌هایی با تمایل کلیوی طبقه‌بندی می‌شود. از ویروس‌های Holland به طور وسیع برای تولید واکسن‌های تخفیف حدت یافته با پاساژ در تخم مرغ جنین‌دار (H52 , H120) در سراسر دنیا استفاده می‌شود (McMARTIN 1993).

Archive of SID

www.SID.ir

۵- Strain G: ابتدا توسط Ambli (۱۹۸۷) در مراکش جدا شد. از خصوصیات غیرمعمول آن، تمایل به دستگاه گوارش و روده و باقی ماندن در آنهاست. سویه‌هایی با تمایل به پیش معده نیز گزارش شده است که از آن جمله IPV-ZJ971 از چین می‌باشد که حدود ۹۹/٤- ۷۷/۸ درصد با دیگر سروتیپ‌های IBV همولوژی دارد (Raj and Jones 1997).

٦- Georgia 98 (GA98): اولین بار توسط Jockwood و Lee جدا شد و به نظر می‌رسد نوعی سویه جهش یافته از واکسن DE072 باشد با این حال با واکسن DE072 تنها ۵۰٪ حفاظت علیه آن ایجاد می‌شود و از نظر تقسیم‌بندی سرولوژی، با تست VN در یک سروتیپ جدید طبقه‌بندی می‌شود (٥٤،٥٥). DE072 یا DE/072/92 که برای اولین بار از ایالت Delaware آمریکا جدا شد و به شکل محدود در برخی مناطق آمریکا بصورت واکسن مصرف می‌شود.

۷- 793/B: که CR88، و 4/91 هم نامیده می‌شود. این سروتیپ شامل گروهی از ویروس‌ها هستند که اولین بار توسط Parsons- Gough و همکاران (۱۹۹۲) در بریتانیا جدا شد و براساس تست VN و HI در یک سروتیپ جدید طبقه‌بندی شدند (٦٤). این سروتیپ به تفضیل در قسمت بحث آورده شده است.

۸- Australian T یا Aus/T182: ضایعات بیماری اولین بار توسط Hungerford (۱۹٦۲) توصیف شد و بعد Cumming (۱۹٦۷ و ۱۹٦۲) ویروس را جداسازی کرد. ضایعات کلیوی شدید و تلفات نسبتاً بالا می‌دهد که جنس نر، نژاد سبک، هوای سرد و سن کم از فاکتورهای مستعد کننده آن است. واکسن علیه این ویروس در استرالیا مصرف می‌شود (McMARTIN 1993). خلاصه‌ای از این سروتیپ‌ها در جدول ۱ آورده شده است.

۹- QX: در سال ۱۹۹٦.م شیوع تیپ پیش معده‌ای ویروس برونشیت عفونی با علایم تورم پیش معده، زخم همراه با خونریزی و مرگ و میر ۱۵ الی۸۰ درصدی در جوجه‌های گوشتی مشاهده شد. در پرنده های بیمار دپرسیون، چشمهای متورم همراه با ریزش اشک، اسهال و متعاقب آن علایم واضح تنفسی وجود دارد. میزان واگیری بیماری ۱۰۰ درصد و مرگ و میر ۲۰ درصد است. در کالبدگشایی پرنده های تلف شده ،تورم پیش معده غده‌ای مشاهده می‌شود. از نمونه های گرفته شده ویروس برونشیت عفونی جدا گردید که تحت عنوان QX نامگذاری شد (Cavanagh and Naqi 2003).

۹-۱- بیماری زایی و همه گیر شناسی ویروس برونشیت عفونی طیور

ویروس برونشیت عفونی طیور در بافت گوارشی، تنفسی، کلیه‌ها ، اویداکت و غدد هاردرین ماکیان تکثیر می یابد. جدایه های ویروس برونشیت عفونی طیور بدون توجه به بافت منشاء آن، مجرای تنفسی ماکیان را به آسانی آلوده نموده و جراحات مشخصی را در نای به وجود می‌آورند. حداقل یک سویه نفروپاتوژن ویروس برونشیت عفونی طیور به نام سویه T استرالیایی

Archive of SID

www.SID.ir

شناخته شده که پاسخ التهابی کمی در مجرای تنفسی جوجه های جوان ایجاد می‌کند. این سویه، جزو سویه های حاد بوده و از عواملی است که باعث بروز ضایعات کلیوی ومرگ و میر در ماکیان می شود. عفونت های ثانویه باکتریایی باعث التهاب کیسه های هوایی شده و عارضه کلیوی متعاقب فاز تنفسی بیماری ایجاد می شود. در جوجه های آلوده به سویه Gray (نفروپاتوژن) ویروس برونشیت عفونی طیور، بالا بردن کلسیم جیره غذایی منجر به ایجاد ضایعات کلیوی و تشکیل سنگ کلیه می شود. ویروسهای دیگر سروتیپ ها نظیر سویه های آمریکایی Holte و Gray، سویه Mass-Holland 52 و جدایه B١٦٤٨ بلژیک نیز برای کلیه ها بیماریزا هستند. هر چند در مقایسه با سویه T استرالیایی حدت کمتری دارند. سروتیپ‌های ویروس برونشیت عفونی و خصوصیات آن‌ها از نظر حدت در جدول ۱-۱ آورده شده‌است.

جدول ۱-۱: سروتیپ‌های مهم IBV (Reference and Influenza 1982)

سروتیپ ویروس	خصوصیات ویروس
Massachusetts	بسیار پاتوژن برای دستگاه تولید مثل مرغ، اما غیر بیماری‌زا برای کلیه. فرم تخفیف حدت یافته آن در آمریکا بعنوان واکسن مصرف می‌شود.
Beaudette	جنین ماکیان را به سرعت در عرض کمتر از ٤٨ ساعت می‌کشد بطوری که حتی کوتولگی در جنین ایجاد نمی‌شود.
Connecticut	در مقایسه با سروتیپ ماساچوست بیماری‌زایی کمتری دارد گزارشی از ضایعات کلیوی و تولید مثلی این سروتیپ در ماکیان وجود ندارد. در آمریکا بعنوان واکسن مصرف نمی‌شود.
(H) Holland	بیماری‌زا برای دستگاه تنفس، سیستم تولید مثلی و کلیوی ماکیان می‌باشد. بعلت کامل بودن ترکیب آنتی‌ژن به طور وسیعی به عنوان واکسن در اروپا، آمریکا و آسیا مصرف می‌شود. H52 بر خلاف H120 برای کلیه بیماری‌زا است و هر دو (H120, H52) می‌تواند برای بورس فابرسیوس بیماری‌زا باشند.
Arkansas 99	نوعی واریانت است که برای دستگاه تنفس و تولید مثل ماکیان بیماری‌زا است اما ضایعات کلیوی نمی‌دهد در برخی مناطق آمریکا بعنوان واکسن مصرف می‌شود.
Australian T	باعث نفریت شدید با مرگ ومیر بالا و همچنین ضایعات تنفسی و تولید مثلی در ماکیان در استرالیا می‌شود. ترکیب آنتی ژنی وسیع و پیچیده‌ای دارد و تا حدی با سویه ماساچوست واکنش متقاطع می‌دهد.
Strain G	تمایل کمی به سیستم تنفسی و کلیوی دارد ولی به دستگاه گوارش تمایل دارد (Enterotrop)

Archive of SID

www.SID.ir

793/B	در سال‌های ۹۱-۱۹۹۰ شناسایی شد. به عضلات تمایل دارد و باعث ایجاد میوپاتی خصوصاً در عضله سینه می‌شود از ویژگی‌های غیرمعمول آن تلفات در بالغین ، اسهال، درگیری تنفسی خفیف، پخش آهسته و تغییر سرمی آهسته در گله است.
QX	تیپ پیش معده‌ای ویروس برونشیت عفونی با علایم تورم پیش معده، زخم همراه با خونریزی و مرگ و میر ۱۵ الی ۸۰ درصدی در جوجه‌های گوشتی مشاهده شد. در پرنده های بیمار دپرسیون، چشمهای متورم همراه با ریزش اشک، اسهال و متعاقب آن علایم واضح تنفسی وجود دارد. میزان واگیری بیماری ۱۰۰درصد و مرگ ومیر ۲۰ درصد است.

در حالت طبیعی ایجاد بیماری، سویه‌های حاد ویروس IB بیماری تنفسی شدید به همراه مرگ و میر ایجاد می کنند. بیشترین مرگ و میر در خروس ها دیده می شود، در صورت وجود استرس سرمایی و یا وجود پروتئین حیوانی به عنوان منبع عمده تأمین پروتئین در جیره‌های با پروتئین بالا، عوارض کلیوی نیز مشاهده می شود. مواجهه جوجه ها با IBV، به همراه استرس سرمایی و مایکوپلاسما ها منجر به التهاب کسیه هوایی می شود که شدت بیماری و میزان شیوع آن به حدت سویه IBV بستگی دارد. تلقیح داخل بینی سویه‌های مختلف IBV و باکتری اشرشیاکلی، باعث بروز مرگ و میر در جوجه های جوان می شوند. در حالی که هیچ کدام از این دو عامل به تنهایی کشنده نیستند. سویه های مختلف IBV که حدت های متفاوتی دارند مرگ و میر ۱٤ تا ۸۲ درصد را در ماکیان ایجاد می کنند. عفونت ویروس برونشیت عفونی به همراه اشرشیاکلی، می تواند منجر به ایجاد آسیت در جوجه های گوشتی گردد. در مرغان تخم‌گذار ، رنگ پوسته تخم مرغ تغییر یافته و کاهش تولید۱۰الی ۵۰ درصدی به وجود می‌آورند و گاه ممکن است میزان تولید تخم مرغ کاهش نیابد (Cavanagh and Naqi 2003).

۱-۹-۱- میزبان‌های طبیعی و تجربی

نژادها و سویه های مختلف پرندگان حساسیت متفاوتی در برابر بیماری دارند و ماکیان تنها پرندگانی هستند که به صورت طبیعی توسط IBV آلوده و بیمار می‌شوند. کروناویروس ها از قرقاول های دچار بیماری های کلیوی و تنفسی جدا شده و تعیین ترادف ژن مربوط به پروتئین S این ویروس ها نشان داد که از لحاظ ژنومی بسیار شبیه IBV هستند. تعیین ترادف ژنومی جدایه های مربوط به بوقلمون ها نشان داد که نظیر IBV با همدیگر متفاوتند. ماکیان در هر سنی نسبت به بیماری حساس هستند. بیماری در جوجه های جوانتر شدیدتر بوده و با مرگ و میر بیشتری همراه است. ماکیان با افزایش سن، در برابر ضایعات کلیوی و اویدوکت و مرگ و میر ناشی از بیماری مقاومتر می‌شوند (McMARTIN 1993).

Archive of SID

www.SID.ir

۲-۹-۱- انتقال، حامل‌ها و ناقل‌ها

ویروس برونشیت عفونی سرعت انتشار بالایی دارد. پرنده های حساسی که در مجاورت پرنده های بیمار قرار دارند، علایم بیماری را در عرض ٤٨ ساعت نشان می‌دهند. در صورت مواجهه ماکیان با IBV از طریق آیروسل، ویروس از نای، ریه، کلیه و بورس جوجه ها در طی ۱ تا ۷ روز بعدی به طور مداوم جدا می‌شود. میزان جداسازی ویروس با گذشت زمان بسته به سویه ویروس کاهش می‌یابد. ویروس برونشیت عفونی از تانسیل‌های سکومی ١٤ هفته و از مدفوع ۲۰ هفته پس از آلودگی جدا شده است. دفع دوبارهٔ ویروس در مرغ هایی که چندین هفته پس از تلقیح ویروس منفی بوده اند، مشاهده شده است. ویروس از سواپ های کلواکی و نایی مرغ ها در شروع تخم‌گذاری و در سن نوزده هفتگی جدا شده است. میزان انتشار بیماری از طریق هوا نامعلوم است و ناقل ها در انتشار IBV نقشی ندارند (McMARTIN 1993).

۳-۹-۱- دوره کمون

دوره کمون بیماری برونشیت عفونی طیور بسته به میزان ویروس و روش تلقیح ۱۸ الی ٣٦ ساعت است. پخش طبیعی ویروس بیشتر از ٣٦ ساعت طول می کشد.

٤-۹-۱- علایم بالینی

علایم مشخصهٔ تنفسی در ماکیان بلع هوا، سرفه، رال های نایی و ترشحات بینی می باشد. چشمهای مرطوب، سینوسهای متورم، دپرسیون، کاهش مصرف غذا و کاهش وزن دیده می شود و جوجه ها زیر یک منبع گرمایی کنار هم جمع می شوند. علایم بیماری قابل مشاهده در ماکیان بزرگتر از شش هفته و پرنده های بالغ، مشابه علایم مشاهده شده در جوجه هاست اما ترشحات بینی، کمتر دیده شده و در صورت عدم معاینه دقیق گله و عدم مشاهده گله در تاریکی شب (که همه پرنده‌ها به صورت طبیعی ساکت‌اند) بیماری تشخیص داده نمی شود. در صورت درگیری جوجه های گوشتی با ویروس های نفروپاتوژن، علایم تنفسی بیماری ممکن است رفع شود. پس از آن دپرسیون، ژولیدگی پرها، مرطوب شدن مدفوع و افزایش مصرف آب مشاهده می شود(١٦). در گله‌های تخم‌گذار علایم تنفسی، کاهش میزان تولید و کاهش کیفیت تخم‌مرغ دیده می شود. در گله‌هایی که میزان تولید شان کاهش مختصری داشته ، پوسته تخم‌مرغهای تولید شده رنگ پریده بوده و فاقد علایم تنفسی بودند، ویروس برونشیت عفونی طیور از سواپ‌های کلواکی و نمونه تانسیل‌های سکومی جدا شده است.میزان کاهش تولید بسته به دوره تخم‌گذاری و سویه ویروس برونشیت عفونی طیور فرق می‌کند. ٦ الی ٨ هفته طول می‌کشد تا تولید تخم مرغ به حالت عادی باز گردد و در اکثر مواقع، تولید تخم مرغ به میزان تولید قبلی برنمی گردد. میزان جوجه درآوری کاهش می یابد. تعداد تخم‌مرغ های پوسته نرم، بدشکل و پوسته زبر افزایش یافته و تعداد تخم‌مرغ های ارسالی به جوجه کشی کاهش می

Archive of SID

www.SID.ir

یابد.کیفیت داخلی تخم‌مرغ ها ممکن است کاهش یابد. آلبومین نازک و آبکی شده و مرز مشخصی میان دو بخش ضخیم و نازک آن وجود ندارد. در مرغهای تخم‌گذار در صورت همراه شدن سنگ کلیه با بیماری برونشیت عفونی همراه گردد، تلفات کلی گله افزایش می یابد. در صورت درگیری جوجه‌های یکروزه با ویروس برونشیت عفونی، اویدوکت، دچار ضایعه دائمی شده و در دوره تخم گذاری جوجه های مزبور، کاهش تولید و کاهش کیفیت تخم‌مرغ دیده می شود. آنتی بادی های مادری در سنین اولیه جوجه‌ها، از ایجاد ضایعه ویروس برونشیت عفونی در اویدوکت جوجه ها، جلوگیری می‌کنند (McMARTIN 1993, Vegad 2008).

۵-۹-۱- شیوع و مرگ‌ومیر

میزان واگیری بیماری ممکن است به ۱۰۰٪ در گله‌ی مبتلا برسد. میزان مرگ و میر ایجاد شده به حدت ویروس، سن پرنده، وضعیت ایمنی مادری، وضعیت ایمنی فعال پرنده‌ها و وجود استرس‌هایی نظیر سرما و یا عفونت های ثانویه باکتریایی بستگی دارد. جنسیت، نژاد و تغذیه شدت بیماری های کلیوی را تحت تاثیر قرار می‌دهند. مرگ و میر در جوجه‌های زیر ٦ هفته به میزان ۲۵ درصد و یا بیشتر بوده و در جوجه های بالای شش هفته قابل توجه نیست، میزان مرگ و میر گله های دچار سنگ کلیوی ۱-۰/۵ درصد در هفته می باشد. در چین در تیپ پیش معده‌ای بیماری در جوجه های گوشتی، مرگ و میر ۸۰-۱۵ درصدی مشاهده شده و مرگ و میر ٤٥ درصدی در یک فارم زینتی قرقاول با سن ده هفته گزارش شده است (Cook, Smith et al. 1986, McMARTIN 1993).

٦-۹-۱- جراحات کالبدگشایی

ترشحات سروزی، نزله ای و یا پنیری در نای، بینی وسینوس پرنده های مبتلا وجود دارد. کیسه‌های هوایی کدر شده و ترشحات اگزودایی پنیری زرد رنگ در داخل شان دیده می شود. پلاک های پنیری در بخش پایینی نای و برونش جوجه‌های تلف شده و نقاط کوچک پنومونی در اطراف برونش های بزرگ دیده می شود. در صورت درگیری کلیه ها، تورم کلیه و رنگ پریدگی آن و پر شدن توبولها و حالب ها با اورات مشاهده می شود. در محوطه شکمی پرنده های در حال تولید محتویات زرده آبکی دیده می شود، این حالت در بیماریهای دیگری نیز (که به صورت مشخصی موجب کاهش تولید تخم‌مرغ می‌شوند) دیده می‌شود. در صورت آلودگی جوجه‌های یکروزه با IBV ، یک سوم میانی اویدوکت ممکن است دچار ضایعه دائمی شده، بخوبی رشد نکرده و غدد کمی داشته باشد و کاهش تولید در دوره تخم گذاری پرنده های مبتلا مشاهده شود. در قرقاول های آلوده به کروناویروس ها نقرس احشایی، سنگ کلیه، تورم واضح و رنگ پریدگی کلیه ها بیشتر از بقیه ضایعات مشاهده می شود (Cavanagh and Naqi 2003, Pattison 2008, Vegad 2008).

۷-۹-۱- هیستو پاتولوژی

Archive of SID

www.SID.ir

مخاط نای جوجه‌های درگیر با IBV، ادماتوز است. در طی ۱۸ ساعت پس از آلودگی از دست رفتن مژکها، گرد شدن و کنده شدن سلولهای اپی تلیومی و نفوذ کم هتروفیلها و لنفوسیتها دیده می شود و بازسازی اپی تلیوم نای پس از ٤٨ ساعت شروع می‌شود. پس از ۷ روز هیپرپلازی به همراه نفوذ وسیع سلولهای لنفوئیدی در لایه لامینا پروپریا و تشکیل تعداد زیادی مراکز زایا دیده می‌شود. در صورت درگیری کیسه‌های هوایی، ادم، تغییر شکل سلولهای اپی تلیومی و اگزودای فیبرینی در عرض ٢٤ ساعت دیده می شود. نفریت بینابینی عمده ترین ضایعه کلیوی مشاهده شده در بیماری برونشیت عفونی می‌باشد. در مراحل حاد بیماری، دژنراسیون گرانولی، واکوئله شدن و تغییر شکل اپی تلیوم توبولها و نفوذ وسیع هتروفیلها در بافت بینابینی دیده می‌شود. ضایعات توبولی بیشتر در بخش مدولای آن است. در طی مراحل التیامی، جمعیت سلولهای التهابی به لنفوسیتها و پلاسماسل‌ها تغییر پیدا می‌کند. تغییرات دژنراتیو ممکن است باقی مانده و باعث آتروفی شدید یک یا همهٔ قسمتهای نفرونها شود. درصورت وجود سنگ کلیه، حالبها با اورات انباشته شده، اغلب واجد سنگ از جنس اورات بوده و کلیه‌ها آتروفی می شوند. با استفاده از میکروسکوپ الکترونی، معلوم شده است که سلول‌های اپی‌تلیومی نفرون‌ها و مجاری پایین تر، اهداف اولیه تکثیر IBV هستند. ذرات ویروسی در سلول‌های اپی تلیومی مجاری و توبول‌های جمع‌کننده، توبول‌های خلفی و لوپ هنله بیشتر از توبول‌های قدامی دیده می‌شوند. در سیتوپلاسم سلول‌های اپی‌تلیومی آلوده به ویروس، تورم میتوکندری‌ها، بزرگ شدن وزیکول‌های گلژی و افزایش مقدار رتیکولوم اندوپلاسمیک خشن (RER) دیده می‌شود. درآلودگی تجربی اویدوکت مرغ‌های بالغ با IBV، کاهش ارتفاع و از دست رفتن مژک‌های سلول‌های اپیتلیومی، اتساع غدد توبولی، نفوذ لنفوسیت‌ها، پلاسماسل‌ها، هتروفیل‌ها و دیگر سلول‌های تک هسته‌ای، ادم و فیبروپلازی مخاط تمامی قسمت‌های اویدوکت مشاهده می‌شود. در پولت قرقاول‌های آلوده به کروناویروس‌ها، نفریت بینابینی نسبتاً شدید کلیه ها دیده می شود. نفوذ سلول‌های تک هسته‌ای، اتساع و پهن شدن اپی تلیوم داخل توبول‌ها و تشکیل کیست و نکروز موضعی دیده می‌شود (Cavanagh and Naqi 2003, Pattison 2008, Vegad 2008).

۱۰-۱- شناسایی ویروس برونشیت عفونی طیور

ویروس برونشیت عفونی (IBV) می‌تواند موجب ایجاد بیماری‌های تنفسی، کلیوی، تولید مثلی و کاهش وزن پرندگان مبتلا شود. با این حال هیچ کدام از این علایم، اختصاصی بیماری نیستند و بدین ترتیب برای تشخیص عفونت در گله‌های مبتلا به ابزار تشخیص نیاز است این تشخیص گاهی مستلزم شناسایی نوع ویروس نیز می‌باشد تا بتوان با انتخاب برنامه واکسیناسیون بهتر، حفاظت بیشتری در گله‌های بعدی ایجاد کرد. بطور کلی عفونت با IBV را می‌توان به دو طریق ردیابی حضور کل یا جزئی از ویروس IBV (شناسایی آنتی‌ژن یا ژنوم ویروس) و همچنین ردیابی آنتی بادی‌های اختصاصی علیه IBV، تشخیص داد (Cavanagh and Naqi 2003, Pattison 2008, Vegad 2008).

Archive of SID

www.SID.ir

انتخاب روش مناسب از بین انواع روش‌ها و تفسیر نتایج حاصله مشکل و گاهی گیج کننده است. با این حال بر اساس هدف و شرایط منطقه‌ای، می‌توان بهترین روش یا تلفیقی از چند روش را انتخاب کرد. در این جا روش‌های شناسایی ویروس‌های IBV، با ذکر مزایا و معایب هر روش ذکر خواهد شد.

۱-۱۰-۱- عوامل تاثیرگذار بر روی شناسایی IBV

برای شناسایی موفق IBV از نمونه‌های مزرعه (به روش جداسازی یا روش‌های دیگر) دانستن سیر بیماری و مرحله بیماری در گله ضروری است. بدین ترتیب تعداد نمونه‌های منفی و نتایج منفی کاهش پیدا خواهد کرد.

میزان موفقیت در شناسایی IBV بعد از وقوع یک بیماری، تحت تاثیر عوامل مختلفی از جمله فاصله بین شروع عفونت و نمونه‌گیری، سطح ایمنی گله در زمان عفونت، تعداد پرندگانی که نمونه گیری شده‌اند، محل‌های نمونه‌گیری شده، کیفیت نمونه‌های اخذ شده، خصوصیات ژنتیکی پرنده، نحوه پرورش و احتمال وجود عوامل تضعیف کننده‌های ایمنی می‌باشد. که هر کدام در ذیل توضیح داده می‌شوند.

۲-۱۰-۱- فاصله بین شروع عفونت و نمونه‌گیری

قسمت‌های فوقانی دستگاه تنفس اولین محل تکثیر IBV می‌باشد که بدنبال ویرمی، ویروس بطور وسیعی در دیگر بافت‌ها منتشر می‌شود. اطلاعات نسبتاً جامعی در مورد تناوب زمانی شناسایی ویروس در اندام‌های مختلف وجود دارد. همه سویه های IBV می‌تواند از دستگاه تنفس با بالاترین غلظت در نای در طی ۵-۳ روز اول بعد از عفونت جداسازی شود. بعد از این دوره، تیتر ویروس به سرعت در هفته دوم کاهش یافته و به کمتر از حد تشخیص می‌رسد. وقتی جوجه ها در مرحله مزمن عفونت با IBV نمونه‌گیری می‌شوند دستگاه گوارش (لوزه‌های سکومی یا سواب مقعدی) از نظر تشخیص با ارزش‌تر از نمونه های نایی است.

طبق برخی مطالعات ویروس چالش شده بعد از عفونت در مرغ تخم‌گذار SPF، از مایع منی خروس تا دو هفته بعد از چالش و از غشاء وتیلین تخم مرغ ۷-۱ هفته بعد از چالش و حتی در تعداد مقدار کمی از جوجه‌های تازه هچ شده جداسازی شده است. اهمیت جدا شدن ویروس از جوجه هیچ شده نامشخص است زیرا این جوجه‌ها هیچ علایم بالینی و تغییر سرمی را نشان نمی‌دهند و در برخورد با ویروس ایمنی ندارند (Raj and Jones 1997, De Wit 2000).

یک مسئله مهم در تشخیص، پایداری ویروس در عفونت‌هاست. گرچه IBV عموماً یک بیماری تنفسی حاد در نظر گرفته می‌شود، اما جداسازی طولانی مدت ویروس به کرات گزارش شده است. اگر جوجه یکروزه با سویه آنتروتروپ G عفونی شود، دفع مدفوعی ویروس تا ۳۵ روز شناسایی نمی‌شود اما وقتی به بلوغ جنسی رسید، دفع مجدد ویروس رخ می‌دهد. دفع مجدد ویروس با هورمون تراپی رخ نمی‌دهد اما متعاقب تضعیف سلول‌های T با سیکلوسپورین A، پرنده ویروس IBV را دفع می‌کند. فعال شدن مجدد ویروس با ظهور IgM اختصاصی ضد IBV در سرم پرنده تایید می‌شود.

Archive of SID

www.SID.ir

به علت دفع طولانی مدت و یا متناوب IBV از بافت‌ها، عمدتاً دو بافت منتخب برای بررسی حضور ویروس در جوجه، کلیه و لوزه‌های سکومی است. براساس مطالعات انجام شده به نظر می‌رسد کلیه‌ها اندام مناسب‌تری برای جداسازی ویروس هستند (16). در بررسی Dhinakar و Jones (۱۹۹۷)، روی جوجه‌های یک روزه عفونی شده با سویه M41 و درمان شده با سیکلوسپورین A، ویروس ابتدا از کلیه، سپس از نای و ریه جدا گردید، لیکن از لوزه‌های سکومی ویروسی جدا نشد. سلول‌های هدف ویروس در کلیه، سلول‌های اپی تلیال مجاری کلیوی است که یک ناحیه انتخابی برای ویروس به دلیل ماهیت ایمونولوژیکی است.

ماندگاری ویروس به سن پرنده در زمان عفونت نیز بستگی دارد. اگر جوجه‌ها در ۲ هفتگی آلوده شوند و ۵ هفته بعد در معرض سیکلوسپورین A قرار گیرند، دفع مجدد ویروس رخ نمی‌دهد اما اگر آلودگی در ۱ روزگی رخ دهد، دفع مجدد ویروس با سیکلوسپورین A بخوبی مشاهده می‌شود. لازم به ذکر است که این دفع مجدد ویروس با علایم بالینی همراه نمی‌باشد. مدت زمان ماندگاری ویروس IBV در بدن پرنده، می‌تواند تفسیرهای اپیدمیولوژیکی بیماری را دچار مشکل نماید و شاید این باقی-ماندن ویروس در ظهور واریانت‌های جدید نقش داشته باشد. علاوه بر این، دفع مجدد ویروس میتواند به عنوان منشأ عفونت در جوجه‌های حساس باشد (Raj and Jones 1996, Raj and Jones 1997, De Wit 2000).

یکی از دلایل جداسازی یا دفع مجدد ویروس توسط پرندگان مبتلا در درازمدت می‌تواند تماس مکرر با ویروس و دفع متعاقب آن در سطح کمتر از حد تشخیص آزمایشگاهی یا عفونت فعال مجدد متعاقب یک دوره نهفته طولانی در گله‌های عفونی یا واکسینه باشد.

با این حال جداسازی طولانی مدت ویروس IBV تفسیر شناسایی IBV را با اشکال مواجه می‌کند. بدین معنی که شناسایی ویروس در گله مشکوک به IBV که پیشتر واکسینه یا عفونی شده است، لزوماً تاییدی بر عفونت اخیر(جدید) با IBV نیست. بنابراین در مواردی که IBV از یک گله مشکوک جدا می‌شود لازم است که نبود حضور دیگر عوامل بیماری‌زای عفونی و غیرعفونی تأیید گردد (De Wit 2000).

۳-۱۰-۱- سطح ایمنی جوجه‌ها در زمان عفونت

سطح ایمنی اکتسابی در زمان عفونت، نقش مهمی در شناسایی IBV دارد. نتایج عفونت‌های تجربی IBV در پرندگان غیرواکسینه و واکسینه ای که با همان ویروس چالش شده‌اند نشان می‌دهد که ویروس چالش در جوجه‌های واکسینه در دوره کوتاه‌تر و به میزان کمتری (10^2 تا 10^4) نسبت به جوجه های غیرواکسینه جدا می‌شود.

براساس گزارشات موجود، در بیش از ۹۰٪ پرندگان غیر واکسینه ٤-۳ روز بعد از عفونت، ویروس را می توان از نای جداسازی نمود. این میزان ۷-٦ روز بعد از عفونت به ۷۰٪ کاهش می‌یابد. در مورد پرندگان واکسینه که با ویروس واکسن مواجهه داده شدند، میزان جداسازی ویروس در روزهای اشاره شده به ترتیب ۲۰ و ۰ ٪ بود. بنابراین دوره جدا سازی IBV از

Archive of SID

www.SID.ir

نای بعد از عفونت تجربی با ویروس واکسن در پرندگان واکسینه می‌تواند محدود به چند روز باشد. در حالی که در پرندگان غیر واکسینه دفع ویروس تا چند هفته طول می‌کشد. چنانچه ویروس واکسن با ویروس چالش از یک نوع نباشند، درصد جدا سازی ویروس از گله واکسینه حد واسط دو گروهی است که قبلاً ذکر شد. عامل سومی که می‌تواند روی شناسایی عفونت در یک گله واکسینه اثر منفی بگذارد این است که در جوجه‌های واکسینه در مقایسه با غیر واکسینه، انتشار و چرخش ویروس در گله کمتر است. این اطلاعات نشان می‌دهد که برای تفریخ ویروس مزرعه از ویروس واکسن، لازم است که نمونه‌گیری در ابتدای مرحله عفونت و با استفاده از تست‌های تشخیصی با حساسیت بالا انجام شود. حضور آنتی بادی‌های مادری، میزان جداسازی ویروس را از نای و کلیه بعد از چالش در جوجه‌های ۲ روزه کاهش نمی‌دهد (Raj and Jones 1997, De Wit 2000).

٤-١٠-١- انتخاب تعداد پرنده برای نمونه‌گیری

در مرحله حاد عفونت با IBV در جوجه‌های غیر ایمن در اکثر پرندگان، IBV به میزان قابل توجهی در نای تکثیر می‌یابد. بنابراین در موارد عفونت مزمن یا عفونت در گله‌های واکسینه، مانند گله‌های تخم‌گذار و مادر، مقدار اندکی از ویروس ممکن است صرفاً در درصد کمی از پرندگان (به دلیل شیوع پایین) حضور داشته باشد. بدین ترتیب برای شناسایی عفونت در پرندگان، نمونه گیری بیشتری از دستگاه تنفس، کلیه، لوزه‌های سکومی و کلواک می‌بایست انجام گیرد. هر چقدر تعداد نمونه بیشتر باشد، نتایج مطمئن‌تر خواهد بود اما هزینه بیشتر و خطر نتایج مثبت کاذب نیز در روش‌های آزمایشگاهی که ویژگی ۱۰۰٪ ندارند (تقریباً تمام روش‌ها)، وجود دارد (De Wit 2000).

تعداد نمونه با استفاده از فرمول Connon و Roe (۱۹۸۲) بدین ترتیب محاسبه می‌شود:

$$n = \left\{1-\left(1-C\right)^{1/Dxsens}\right\}\left\{N-0.5\left(D-1\right)\right\}$$

n؛ تعداد نمونه مورد نیاز،

C؛ سطح اطمینان دلخواه در شناسایی عفونت در گله‌های مبتلا (۱=٪۱۰۰ اطمینان)،

sens؛ تخمین حساسیت تست (۱=٪۱۰۰)،

D؛ شیوع بیماری بین حیوانات نمونه‌گیری شده و N؛ سایز گله را نشان می‌دهد.

تعداد نمونه کمتر از حد نیاز، شانس شناسایی عفونت را کاهش می‌دهد. به عنوان مثال، وقتی انتظار می‌رود که ویروس در ۱۰٪ پرندگان نمونه‌گیری شده از یک گله ۱۰۰۰ قطعه‌ای حضور داشته باشند (مثلاً مرحله مزمن عفونت) و حساسیت تست ۱۰۰٪ باشد، ۲۹ پرنده باید نمونه‌گیری شود تا با ۹۵٪ اطمینان ویروس شناسایی شود. زمانی‌که بر اساس علایم بالینی واضح پرندگان جهت نمونه‌گیری انتخاب می‌شوند، تعداد نمونه‌ها کاهش پیدا می‌کند (بزرگ شدن D). اگر IBV را بتوان از ۵۰٪ پرندگان

Archive of SID

www.SID.ir

انتخاب شده از چنین گله‌ای شناسایی کرد، پنج پرنده برای نمونه‌گیری کافی است تا با همان درصد اطمینان، IBV با موفقیت شناسایی شود (De Wit 2000).

۵-۱۰-۱- انتخاب اندام مناسب نمونه‌گیری

در مرحله حاد بیماری، دستگاه تنفس برای نمونه‌گیری ترجیح داده می‌شود. در مراحل مزمن عفونت یا در موارد بروز عفونت در گله‌های واکسینه مانند طیور تخم‌گذار و مادرها که مقدار کمی از ویروس در دستگاه تنفس موجود است، کلیه، لوزه‌های سکومی و کلواک نیز باید ترجیحاً نمونه‌گیری شوند (De Wit 2000, Cavanagh and Naqi 2003).

٦-۱۰-۱- نحوه‌ی نمونه‌گیری

نمونه‌های تهیه شده (سواب و بافت) برای جداسازی IBV بایستی در شرایط دمایی ٤°C-۵ هر چه سریعتر به آزمایشگاه منتقل گردند تا ویروس زنده بماند. اگر روند جداسازی ویروس در طی یک روز باشد، احتیاجات خاصی برای ذخیره‌سازی نمونه‌ها لازم نیست. برای نگهداری طولانی مدت نمونه باید در محیط نگهدارنده سرد همراه آنتی بیوتیک (برای ممانعت از رشد باکتری و قارچ) قرار داده شود. سواب‌ها در ۲ml-۳ بافر تریپتوز فسفات[1] (TPB) (PH-7-7/2) حاوی ۱۰/۰۰۰ IU/ml پنی سیلین، ۱۰/۰۰۰ mg/ml استرپتومایسین و ۲۵۰ IU/mg آمفتریسین B قرار داده می‌شوند. لوله حاوی سواب باید بلافاصله در یخ قرار داده و در $-۲۰^{o}C$ فریزر شود. بافت‌های دیگر، مثل ریه، کلیه، اویدوکت و لوزه‌های سکومی بایستی در شرایط استریل نمونه‌گیری شوند و در ظروف پلاستیک تمیز، با ذکر مشخصات در $-۲۰^{o}C$ فریز و سپس به آزمایشگاه ارسال شوند. از آن-جایی که IBV در دستگاه گوارش نیز حضور دارد، ممکن است تا هفته‌های بعد از برطرف شدن علائم بالینی، سویه‌های ویروس از لوزه‌های سکومی و سواب‌های کلواکی جداسازی شوند. بنابراین جداسازی IBV از این نواحی نقش این ویروس‌ها را در شیوع بیماری اخیر IB در گله تایید نمی‌کند (Purchase and Pathologists 1989, De Wit 2000).

بافر TPB فریز شده حاوی سواب کلواکی و نایی باید ذوب و مخلوط و قبل از تلقیح، در دمای اتاق به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه به منظور کاهش عفونت‌های باکتریایی و قارچی، انکوبه شود. آلودگی باکتریائی مربوط به جداسازی و سواب‌های کلواکی را می‌توان با سانتریفوژ بافر محتوی سواب در ۱۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه و سپس فیلتر کردن مایع رویی از میان فیلتر $۰.٤۵\mu m$ کاهش داد یا برطرف کرد (Jackwood, Kwon et al. 1992). نمونه‌های بافتی شامل ریه، کلیه، اویدوکت و لوزه‌های سکومی را باید ابتدا با کمک TPB و همراه آنتی بیوتیک به نسبت حجمی ۱ به ۱۰ هموژن و سپس با استفاده از گلوله‌های شیشه‌ای خرد و یا با هاون یا همزن له کرد. هموژن بافتی نیز بایستی قبل از تلقیح در دمای اتاق به مدت ٦۰-۳۰ دقیقه انکوبه شود.

[1]- Tryptose phosphate buffer

Archive of SID

www.SID.ir

گاهی جوجه‌های قرقاول حساس برای کمک به جداسازی IBV در گله‌های تجاری رهاسازی می‌شوند. بعد از یک هفته رها سازی آنها در داخل گله، این قرقاول‌ها جمع‌آوری شده و سواب نائی از آنها گرفته می‌شود. بهتر است ۵ پرنده بعد از ۵ روز و بقیه بعد از ۱۰ روز به آزمایشگاه ارسال شوند. اگر جوجه‌های قرقاول در دسترس نباشند، توصیه می‌شود حداقل ۲۵ پرنده داخل سالن علامت‌گذاری شده و سواب گیری شوند (Callison, Jackwood et al. 2001). استفاده از قرقاول‌های ایمن نسبت به ویروس IBV، یک شانس خوب برای جداسازی ویروس‌های واریانت‌های IBV است که ممکن است در گله‌های تجاری در حال چرخش باشند (Purchase and Pathologists 1989, Da Silva Martins, Mockett et al. 1991, De Wit 2000).

برای نگهداری طولانی مدت، نمونه‌ها باید هر چه سریع‌تر به دمای $-۲۰^{o}C$ منتقل شوند. سواب‌ها باید در محیط استریل سرد مانند تریپتوز فسفات براث (pH=۷–۷/۲) همراه با آنتی بیوتیک (پنی سیلین ۱۰۰۰۰IU/ml، استرپتومایسین ۱۰mg/ml و آمفوتریسین B ۲۵۰IU/ml) به منظور کاهش رشد باکتریایی و قارچی قرار داده شوند (Boursnell, Brown et al. 1987).

اگر امکان فریز کردن نمونه‌ها وجود ندارد، نمونه ها باید در گلیسرین ۵۰٪ قرار داده شوند. تحت این شرایط IBV برای روزهای طولانی، حتی در دمای محیط، زنده باقی خواهد ماند (De Wit 2000).

۷–۱۰–۱– ژنتیک جوجه‌ها

نتایج گزارشات متعدد نشان می‌دهد که ژنتیک می‌تواند روی حساسیت پرنده نسبت به IBV تاثیر بگذارد. در یک بررسی علایم بالینی، رشد ویروس در بافت‌ها و آسیب بر اپی تلیوم نایی در دو سویه مختلف نژاد لگهورن سفید (سویه بسیار حساس ۱۵۱ و سویه بسیار مقاوم C) مقایسه شد. در سه آزمایش مجزا ویروس از نای گروه C، ۷–۱۲ روز بعد از عفونت جدا سازی گردید در حالی که همان ویروس از نای گروه چالش یافته با سویه بسیار حساس ۱۵۱، ۲۱–۱۶ روز پس از عفونت نیز جدا شد. مرگ و میر بین سویه‌های مختلف جوجه‌ها بعد از تلقیح IBV به تنهایی یا همراه با اشریشیا کلی متفاوت است.

جوجه‌های حساس علایم تنفسی شدیدتر و دوره بهبودی طولانی‌تری داشتند. در تکثیر ویروس بین این دو سویه تفاوتی مشاهده نشد. تفاوت در حساسیت سویه‌ها نسبت به IBV می‌تواند روی آزمایشات مختلف یا روش تشخیص اثر بگذارد (De Wit 2000, Ignjatović and Sapats 2000).

۸–۱۰–۱– نحوه پرورش جوجه‌ها

به طور کلی اگر ویروس بین پرنده‌ها در حال چرخش باشد، IBV می‌تواند در یک دوره طولانی مدت در این جوجه‌ها شناسایی شود. بنابر این احتمال دارد که سیستم پرورش روی بستر در مقایسه با پرورش در قفس و هم چنین نسبت تراکم پرنده‌ها روی چرخش IBV در یک گله تاثیر بگذارد (De Wit 2000).

Archive of SID

www.SID.ir

۹-۱۰-۱- حضور احتمالی عوامل تضعیف کننده‌ی ایمنی

ابتلا در سنین اولیه زندگی با ویروس بیماری بورس عفونی[۱] (IBDV) می‌تواند پاسخ بدن به واکسیناسیون IBV را کاهش دهد و در نتیجه حساسیت به عفونت IBV بالا می‌رود. ازآنجا که سطح ایمنی مورد نیاز نسبت به IBV روی مدت و مقدار ویروس IBV که می‌تواند بعد از چالش از گله جداسازی و شناسایی شود تاثیر می‌گذارد، تضعیف ایمنی بوسیله IBDV می‌تواند تشخیص عفونت IBV را بهبود بخشد. این فرضیه به وسیله مطالعات Cook و همکاران (۱۹۹۱) نیز تایید شد. او نشان داد که میزان IBV جدا شده بعد از چالش با IBV در جوجه هایی که در زمان جنینی بورسکتومی شده‌اند در مقایسه با جوجه‌های کنترل، از نظر تیتر جداسازی و مدت زمان جداسازی افزایش می‌یابد (Cook, Davison et al. 1991). تضعیف سلول‌های T با سیکلوسپورین نیز تاثیر عمده‌ای روی میزان شناسایی و تیتر ویروس سویه ماساچوست (M41) بعد از چالش نداشته است. اگرچه مرگ و میر و ضایعات هیستوپاتولوژی در گروهی که تحت درمان با سیکلوسپورین بوده‌اند شدیدتر بوده است. در مورد اثر عوامل تضعیف کننده دیگر یا مواد شیمیایی تضعیف کننده در رابطه با IBV گزارشی وجود ندارد. به هر حال به نظر می‌رسد که IBDV و سیکلوسپورین تنها تضعیف کننده‌هایی باشند که روی عفونت با IBV اثر می‌گذارند (Raj and Jones 1997, De Wit 2000).

۱۱-۱- جداسازی ویروس

جداسازی ویروس می‌تواند وقت‌گیر، پر زحمت و هزینه بر باشد. روش‌های کلاسیک جداسازی مثل پاساژ روی تخم مرغ جنین دار و بررسی آن از نظر کوتولگی، خمیدگی اندام‌ها، مرگ و میر جنین امروزه به وسیله تلفیقی از روش‌های جداسازی سریعتر برای تکثیر ویروس و یک روش ثانویه مثل IFA، الیزای تشخیص دهنده آنتی ژن یا PCR برای شناسایی IBV جایگزین شده است. با استفاده از تلفیقی از جداسازی ویروس و تکنیک‌های دیگر، کل روند جداسازی می‌تواند با حفظ حساسیت روش، سریع‌تر شود گرچه جداسازی ویروس یک تکنیک حساس برای شناسایی IBV است، اما در موارد عدم موفقیت این تکنیک، تکنیک‌های دیگر می‌توانند موفقیت آمیز باشند. به طور مثال، وقتی آنتی ژن IBV غیرفعال است مانند جوجه تلف شده‌ای که در دمای بالا رها شده است، تکنیک‌های دیگر شامل PCR, IPA, IFA یا آنتی ژن الایزا می‌توانند آنتی ژن یا اسید نوکلئیک IBV را بهتر از ذره عفونت زای ویروس IBV شناسایی کنند. همچنین در مواردی که عفونت مخلوط با IBV و یک ویروس دیگر بطور همزمان رخ می‌دهد ممکن است جداسازی ویروس موفقیت آمیز نباشد. در این شرایط تکثیر IBV ممکن است به وسیله ویروس دیگر تضعیف شده و در نتیجه IBV شناسایی نشود. تحت شرایط آزمایشگاهی، وقتی ویروس رقیب مشخص باشد، آنتی سرم

[۱] - Infectious bursal disease virus

Archive of SID
www.SID.ir

اختصاصی ممکن است برای خنثی سازی ویروس رقیب لازم باشد. برای نمونه‌های مزرعه‌ای ، این مورد ممکن است مشکل‌تر باشد زیرا ویروس‌های مختلفی ممکن است تداخل ایجاد کنند.

جداسازی IBV ممکن است با استفاده از سیستم‌های مختلف بیولوژیکی مانند تخم مرغ جنین‌دار SPF، کشت سلول[1] یا کشت اندام[2] (OC) باشد. در هیچ کدام از این سیستم‌ها IBV نمی‌تواند ضایعات اختصاصی ایجاد کند. بنابراین حضورآنتی‌ژن IBV باید به وسیله یک روش شناسایی آنتی‌ژن IBV تایید شود مطالعات متعددی حساسیت این سه روش مختلف بیولوژیکی را بررسی و مقایسه کرده‌اند. تخم‌مرغ جنین‌دار SPF و OC هر دو، خصوصاً در موارد دخالت سویه‌های مزرعه، حساس‌تر از کشت سلول هستند (Raj and Jones 1997, De Wit 2000, Cavanagh and Naqi 2003).

۱-۱۱-۱- جداسازی ویروس با استفاده از تخم مرغ جنین‌دار SPF

تخم مرغ جنین دار از گله‌های SPF برای جداسازی ویروس توصیه می‌شود. معمولاً ده جنین ۱۱-۹ روزه با ۱ml از مایع لوله‌های سوابی یا هموژن بافتی به داخل کیسه آلانتوئیک تلقیح می‌شوند. تخم‌مرغ‌ها، روزانه نور بینی شده و مرگ و میر روزهای دوم تا هفتم بعد از تلقیح انتخاب شده در $٤^{o}C$ به مدت ٢٤-١٨ ساعت قرار داده می‌شود. مایع آلانتوییک به روش استریل از تخم مرغ برداشت شده، این مایع باید فاقد خاصیت هماگلوتیناسیون روی گلبولهای قرمز ماکیان باشد. جنین‌های تلف نشده تا ۷ روز، نیز در یخچال قرار داده شده تا از نظر ضایعات IBV مثل کوتولگی، خمیدگی، پرچماقی، رسوب اورات در مزونفروز کلیه بررسی شوند. خونریزی‌های جلدی غالباً به علت سویه‌های IBV با خاصیت کشندگی جنینی می‌باشند. پرده کوریوآلانتوئیک جمع‌آوری شده، هموژن شده و از نظر آدنوویروس تیپ I با روش ایمونودیفوزیون باید بررسی شود. عفونت با تیپ I آدنوویروس‌ها در گله‌های تجاری شایع است و ویروس غالباً جنین‌های کوتوله، شبیه عفونت با IBV ایجاد می‌کند. برخی سویه‌های IBV که عادت یافته به جنین تخم مرغ نیستند، مرگ و میر یا علایم ظاهری روی جنین در اولین پاساژ ایجاد نمی‌کنند. بنابراین قبل از این که نمونه‌ای منفی قلمداد شود، لازم است حداقل ۳ پاساژ داده شود. مرگ و میر جنین و کوتولگی با بالا رفتن تعداد پاساژها، افزایش می‌یابد. همچنین حداکثر عیار ویروسی در مایع آلانتوئیک آلوده ۲ روز بعد از عفونت است. این زمان برای سویه‌های مزرعه عادت نیافته به جنین تخم‌مرغ طولانی تر است.

نشان داده شده که از ۷۰ ویروس جدا شده از فیلد، ٢٤ جدایه در سومین پاساژ هیچ علایم کوتولگی نشان ندادند. برای تایید حضور آنتی ژن IBV در تخم مرغ‌های تلقیح شده، ترجیحاً باید ۳-۲ روز بعد از تلقیح ویروس و بدون در نظر گرفتن وجود ضایعات روی جنین، از یک روش شناسایی آنتی ژن استفاده کرد (Purchase and Pathologists 1989, De Wit 2000).

- Cell culture[1]
- Organ culture[2]

Archive of SID

www.SID.ir

۲-۱۱-۱- جداسازی ویروس با استفاده از کشت سلولی

جداسازی اولیه IBV از مواد پاتولوژیکی که بطور مستقیم در کشت سلول تک لایه معمولی تلقیح می‌شود، ناموفق بوده است. بطور کلی، عادت دادن سویه‌های IBV برای تکثیر کامل و القاء اثرات ضایعات سلولی لازم است. سلول‌های کلیه جنین جوجه[1] (CEK) و سلول‌های کلیه جوجه، بالاترین حساسیت را برای عادت دادن سویه‌های IBV نشان می‌دهند (Purchase and Pathologists 1989, De Wit 2000).

۳-۱۱-۱- جداسازی ویروس با استفاده از کشت اندام جوجه

کشت اندام نائی (TOC) که ترجیحاً از جنین ۲۰ روزه SPF تهیه می‌شود، برای جداسازی، عیار سنجی و طبقه‌بندی سرمی IBV بسیار مناسب است زیرا برای رشد و توقف حرکت مژه‌های نایی (ضایعه غیر اختصاصی) توسط سویه‌های IBV عادت یافتن ویروس لازم نیست. از معایب آن لزوم در دسترس بودن امکانات کشت سلول برای تهیه و نگهداری OC است.

توقف حرکت مژه‌ها را به راحتی می‌توان با میکروسکوپ با بزرگنمائی پایین مشاهده کرد که معمولاً ٤-۳ روز بعد از تلقیح رخ می دهد اما این زمان بسته به سویه‌های مختلف، مقدار تلقیح و احتمالاً فاکتور ژنتیکی میزبان متفاوت است. حضور IBV در نمونه‌های سرمی باید توسط یک آزمایش اختصاصی IBV تایید شود زیرا تعداد زیادی از عوامل بیماری زا قادر به توقف حرکت مژه‌های نای هستند. به عنوان مثال ویروس نیوکاسل بعد از سه روز می‌تواند باعث توقف حرکت مژه‌ها شود و نیز آدنوویروس پرندگان که می‌تواند در TOC تکثیر یابد اما به دلیل سرعت تکثیر پایین و توقف ناقص حرکت مژه‌ها معمولاً شناسایی نمی‌شود. کشت سایر اندام‌ها به غیر از دستگاه تنفسی برای شناسایی IBV توصیه نمی‌شود زیرا حساسیت پایین‌تری دارند (Purchase and Pathologists 1989, De Wit 2000).

۱۲-۱- شناسایی ژنوم IBV

تکنیک‌هایی که تمام یا بخشی از ژنوم IBV را شناسایی می‌کند می‌توانند برای شناسایی ویروس برونشیت نیز به کار روند. این تکنیک‌ها بین ذرهٔ ویروس عفونت زا و غیر عفونت‌زا را تفریق نمی‌دهند. شناسایی RNA ژنومی معمولاً بر مبنای PCR می‌باشد. استفاده از این تکنیک برای تکثیر نوع ویروس برونشیت در شرایط In vivo و In vitro در حال افزایش است. RNA ویروس برونشیت به صورت معکوس به cDNA رونویسی شده و بعد cDNA به دفعات زیاد با روش PCR تکثیر می‌یابد. محصول PCR می‌تواند به کمک تکنیک‌های دیگر مثل[2] RFLP (چند شکلی طول قطعات ناشی از هضم آنزیم‌های محدودگر) یا

---

[1] Chicken embryo kidney

[2] - Restriction fragment length polymorphism

Archive of SID

www.SID.ir

هیبریداسیون، یا تعیین سکانس تعیین خصوصیت شود. تلفیق آزمایش PCR با متدهای ذکر شده می‌تواند برای تعیین ژنوتیپ استفاده شود (Kwon and Jackwood 1995, De Wit 2000).

۱۳-۱- طبقه‌بندی سویه‌ها

گروه‌بندی سویه‌های ویروس برونشیت برای تکمیل اقدامات کنترلی، اهداف تحقیقاتی و برای مطالعات اپیدمیولوژیکی و ارزیابی ویروس برونشیت مفید است. از موانع طبقه‌بندی سویه‌ها، فقدان استاندارد در تست‌هایی است که در سراسر جهان به کار می‌روند، نام‌های متفاوتی که برای یک نوع ویروس استفاده می‌شود و تنوع روش‌های آزمایش در دسترس و شاید از همه مهمتر طبیعت این ویروس باشد. ژنوم IBV شامل یک RNA تک رشته‌ای با موتاسیون بالاست. مطالعات مولکولی بر روی ویروس برونشیت سروتیپ‌های جدید IBV نشان داده که یک سروتیپ و ژنوتیپ جدید می‌توانند به عنوان نتیجه‌ای از تغییرات بسیار کم یا موتاسیون‌هایی در توالی آمینواسید ژن S باشد در صورتی که ساختار اصلی بقیه ویروس معمولاً غیرقابل تغییر می‌ماند (De Wit 2000).

همچنین مطالعات دیگر نشان داده که ویروس برونشیت می‌تواند در زمان عفونت مخلوط با دو نوع ویروس برونشیت، دچار نوترکیبی شود. در نتیجه سویه‌های IBV ممکن است واکنش متقاطع چندگانه‌ای را نشان دهند و بنابراین طبقه‌بندی روشنی همواره ممکن نیست. از طرفی ممکن است یک سویه که واکنش‌های متقاطع چندگانه را نشان می‌دهد ترکیبی از سویه‌های گوناگون ویروسی باشد. سیستم‌های طبقه‌بندی می‌تواند به طور عمده به دو گروه تقسیم شود. آزمایشات عملکردی[1] مربوط به عمل بیولوژیکی ویروس و آزمایشات غیر عملکردی[2] که توجه به ژنوم ویروس دارد (De Wit 2000).

طبقه‌بندی به کمک تست‌های عملکردی گروه‌های ایمونوتایپ[3] یا پروتکتوتایپ[4] و انواع گروه‌های آنتی ژنتیک (سروتیپ‌ها) را ایجاد می‌کند و تست‌هایی که توجه به ژنوم دارند ژنوتیپ‌ها را تشخیص می‌دهند. انتخاب سیستم طبقه‌بندی بسته به هدف آن (مثلاً انتخاب برنامه‌های واکسیناسیون یا مطالعات اپیدمیولوژیکی) ، تکنیک‌های قابل دسترس، مهارت و هزینه‌ها متفاوت است (De Wit 2000).

۱-۱۳-۱- طبقه‌بندی براساس بیماری زایی (پاتوتیپ)

گرچه بین سویه‌های IBV، از نظر حدت و تمایل بافتی تفاوت وجود دارد، اما تقسیم‌بندی بر این اساس دقیق و عملی نیست. مطالعات زیادی بر این مبنی انجام شده است اما هنوز مرزبندی دقیقی وجود ندارد . تست بیماری زائی به طور خلاصه به این

[1] functional
[2] Non functional
[3] immunotype
[4] protectotype

Archive of SID
www.SID.ir

صورت انجام می‌شود: چندین گروه ۱۰ تائی از جوجه‌های یکروزه SPF، عاری از آنتی بادی برونشیت عفونی، با $۱۰^{۴/۳}$ – $۱۰^{۶}$ $EID_{۵۰}$ سویه‌های برونشیت به طور داخل بینی تلقیح شده و سپس در شرایط قرنطینه‌ای به مدت ۱۴ روز، نگهداری می‌شوند. تلفات و علایم بالینی تک تک پرنده‌ها هر روز ثبت شده و در انتهای آزمایش، همه پرنده ها را کشته و کالبدگشایی می‌شوند. علایم بالینی، ضایعات نکروپسی و میزان بیماری زائی بدین ترتیب اندازه‌گیری می‌شود:

علایم بالینی: ۰= بدون علائم بالینی ۱= ترشح از چشم، لرزش ملایم سر و مدفوع آبکی ۲= ترشح چشمی، اکسودا در بینی، بیحالی، مدفوع آبکی ۳= علایم مانند نوع ۲ ولی شدیدتر.

ضایعات نائی : ۰= بدون ضایعه ۱= افزایش خفیف موکوس در نای ۲= افرایش شدید موکوس نائی ۳= موکوس فراوان در نای و پرخونی مخاط نای.

ضایعات کلیوی: ۰= بدن ضایعه ۱= توم، حضور اورات بشکل خیلی خفیف ۲= تورم با اورات ۳= ضایعات مانند نوع ۲ همراه با رسوب اورات واضح در کلیه.

ضریب بیماری زائی= تعداد پرندگان با ضایعات بیشتر یا مساوی ۱+۱ امتیاز برای هر ۱۰٪ مرگ و میر پرندگان. بر این اساس سه دسته ویروس می‌توانند طبقه‌بندی شوند:

۱- بیماری‌زائی بالا (بیشتر یا مساوی ۱۹)

۲- بیماری‌زائی متوسط (بین ۱۰ تا ۱۸)

۳- بیماری‌زائی خفیف (بین ۱ تا ۹) (Ignjatović and Sapats 2000, Wang and Huang 2000)

۲-۱۳-۱- طبقه‌بندی براساس ایمنی (ایمونوتیپ) یا براساس حفاظت (پروتکتوتیپ)

گروه‌بندی سویه‌های برونشیت به ایمونوتیپ یا پروتکتوتیپ از نظر عملی و کاربردی مهمترین سیستم طبقه‌بندی است زیرا اطلاعات مستقیمی را در مورد کارآیی واکسن‌ها ارائه می‌دهد. سویه‌هایی که ایجاد ایمنی بر علیه یکدیگر می‌کنند، متعلق به یک تیپ ایمنی یا حفاظتی هستند تعداد پروتکتوتیپ‌ها هنوز شناخته نشده‌اند اما آزمایش چالش‌های متقاطع در جوجه‌ها تعداد کمتری پروتکتوتایپ‌ها را در مقایسه با سروتیپ‌ها تقسیم‌بندی کرده است که احتمالاً به خاطر اینکه پاسخ ایمنی کامل را اندازه‌گیری کنند در صورتی که در سروتیپ فقط یک بخش از ایمنی حفاظت کننده اندازه‌گیری می‌شود. ویروس‌های IBV در سروتیپ‌ها و ژنوتیپ‌های متفاوت نه تنها اپی توپ‌های متفاوتی دارند بلکه اپی توپ‌های معمولاً مشترکی هم دارند که در ایمنی متقاطع و همچنین در پاسخ‌های ایمنی با واسطه سلولی نیز نقش مهمی دارد. برای تعیین پروتکتوتایپ یک سویه مطالعه، بایستی ایمنی زائی متقاطع (CI)[۱] انجام گیرد. CI روشی پر زحمت، گران و به حیوانات زیاد و همچنین به ابزار جداسازی زیادی محتاج

۱- Cross immunitiy

Archive of SID

www.SID.ir

است. Hinze و همکارانش در سال 1991و Dhinakr Raj و Jones در سال ۱۹۹۶ روش متناوب In vitro را که از نظر اقتصادی به صرفه‌تر بود، برای CI به کار بردند. پرنده‌های واکسن شده با گروه‌های مختلفی از سویه ها مورد چالش قرار گرفتند و برای اجرای این تست، چالش در پرندگان واکسینه با آزمایش کشت اندام نائی به روش ایمنی متقاطع در نای، که از همان پرندگان تهیه می‌شد، انجام می‌گرفت. به خاطر این که یک پرنده دارای تعداد زیادی حلقه‌های نائی است هر پرنده می‌تواند با تعداد متفاوتی از سویه ها مورد چالش واقع شود، اگرچه کشت اندام نائی شباهت بیشتری را با شرایط بدن جوجه نسبت به شرایط روش In vitro دارد، اما تفاوت‌هایی نیز می‌تواند وجود داشته باشد. مثلاً نحوه عمل سویه‌های فاقد حدت در محیط کشت سلول نائی در مقایسه با بدن جوجه‌ها عملکرد متفاوتی دارند. موقعی که چالش در جوجه ها ایجاد می‌شود تمام سیستم ایمنی واکنش نشان می‌دهد ولی این شرایط احتمالاً در موارد کشت اندام نائی ایجاد نمی‌شود اینکه آیا روش می‌تواند به عنوان یک راه حل معتبر برای CI باشد یا نه، نیاز به کار بیشتری بر روی آن دارد و ترجیحاً باید مطالعات مقایسه‌ای با استفاده از سویه‌های متفاوت با تروپیسم‌های متفاوت انجام شود (Raj and Jones 1996, De Wit 2000).

۳-۱۳-۱- طبقه‌بندی براساس گروه‌های آنتی ژنی

۱-۳-۱۳-۱- سروتیپ‌ها

سروتایپینگ، یا تعیین سروتیپ سیستم عملی طبقه‌بندی کلاسیکی است که بر اساس واکنش بین سویه IBV و آنتی بادی خاص سروتیپ ویروس برونشیت می‌باشد. دو سویه مثلاً B و A اگر که تیتر خنثی سازی هترولوگ دو طرفه آنها (آنتی سرم A با ویروس B و آنتی سرمB با ویروس A) ۲۰ برابر کمتر از تیترهای همولوگ آنها (آنتی سرم A با ویروس A و آنتی سرم B با ویروس B) باشد به نظر می‌رسد که از یک سروتیپ باشند. از آنجا که تیترهای همولوگ همواره از تیترهای هترولوگ بیشتر است با مقایسه این تیترها می‌توان میزان وابستگی[1] (r Value) را تعیین کرد و از این طریق، می‌توان برای شناسایی و طبقه‌بندی سروتیپ‌ها و همچنین میزان حفاظت متقاطع بین سروتیپ‌ها استفاده کرد. میزان وابستگی با کمک فرمول Horsfall و Archetti اندازه‌گیری می‌شود و ویروس‌هایی که میزان وابستگی بین آنها کمتر از ۵٪ باشد، سروتیپی مجزا قلمداد می‌شوند.

میزان وابستگی یا r Value از میانگین هندسی r_1 و r_2 بدست می‌آید و در واقع r_1 از تقسیم تیتر هترولوگ ویروس ۲ بر تیتر همولوگ ویروس ۱ بدست می‌آید و r_2 از تقسیم تیتر هترولوگ ویروس ۱ بر تیتر همولوگ ویروس ۲ بدست می‌آید.

بطور قراردادی ، طبقه‌بندی سویه به سروتیپ‌ها به وسیله تست‌های خنثی سازی[2] (VN) در سیستم‌های متفاوتی شامل تخم‌مرغ‌های جنین‌دار، محیط کشت سلولی یا کشت اندامی نائی (TOCs) انجام می‌گیرد (Raj and Jones 1996, Wang and Huang 2000, Cavanagh and Naqi 2003). گزارشاتی در مورد سروتایپینگ به وسیله HI نیز وجود دارد که امروزه کمتر استفاده می‌شود. Brown و Bracewell در سال ۱۹۸۵ واکنش متقاطع زیادی را بین سروتیپ‌ها در HI مشخص

[1] - Relatedness Value
[2] - Virus nutralization

Archive of SID

www.SID.ir

کردند (۱۰). Cook و همکارانش در سال ۱۹۸۷ نشان دادند که ارتباطات آنتی ژنی سویه‌ها، در گروه‌بندی سرمی با تست خنثی سازی (با استفاده از کشت اندام نای) و تست HI شبیه به هم است اما به دلیل واکنش‌های مقاطع زیاد و متغیر در تست HI، تفاوت‌های بین سویه ها در این تست کمتر واضح است (Cook, Brown et al. 1987).

۲-۳-۱۳-۱- گروه بندی براساس اپی توپ

آنتی بادی مونوکلونال (MAb) : با استفاده MAb می توان تعیین کرد که آیا اپی توپ خاص در یک سویه وجود دارد یا نه. هنگامی که این اپی توپ‌ها ، مرتبط با سروتیپ خاص باشد، می‌تواند در ایجاد تست اختصاصی سروتیپ مثل Antigen capture ELISA یا IFA به کار رود. روش دیگر تعیین آنتی ژن‌های گروهی سویه‌ها به کمک آنتی بادی‌های مونوکلونال بر اساس حضور یا عدم حضور تعدادی از اپی توپ‌هاست.

مزایا و ریسک‌های به کارگیری آنتی بادی مونوکلونال به جای آنتی سرم‌ها برای تعیین نوع سویه‌ها قبلاً ذکر شده است. هنگامی که آنتی بادی‌های مونوکلونال مختص سروتیپ بر علیه مناطق با خصوصیت تغییر پذیری بالای[1] گلیکو پروتئین S1 به کار می‌روند خطر نتایج کاذب منفی بیشتر از هنگامی است که بر علیه مناطق با خصوصیت ثبات بالا استفاده می‌شود. یک موتاسیون در اپی توپ که MAb بر علیه آن است لزوماً این معنی را نمی‌دهد که این سویه در سروتیپ واکنش نداده است ترجیحاً با تکنیک دیگری باید دوباره تست شود که آیا این در سروتیپ دیگری است یا یکی از این اپی توپ‌ها به وسیله موتاسیون تغییر کرده است و بنابراین با آن مجموعه از مونوکلونال آنتی بادی‌هایی که به کار رفته است واکنش نمی‌دهد (De Wit 2000).

٤-۱۳-۱- ژنوتیپ‌ها

مبنای گروه بندی سویه‌ها براساس خصوصیات ژنتیکی ژنوم (و یا بخشی از آن) را ژنوتیپ می‌گویند. این روش‌ها شامل تعیین توالی، شناسایی بخش‌های اختصاصی ژنوم به وسیله RT-PCR و یا تعیین ناحیه تقسیم آنزیمی (RELP، انگشت نگاری یا T1 RNase) است. هدف، بدست آوردن اطلاعات ژنتیکی است و اطلاعات ضروری را برای مطالعات اپیدمیولوژیکی فراهم می‌سازد. اخیراً Jackwood و همکاران (۲۰۰۳) از روش RRT-PCR (Real time-PCR) استفاده کردند و نشان دادند که این روش می‌تواند برای تعیین تیپ سویه‌های واکسنی مفید باشد ولی برای طبقه‌بندی سویه‌های مزرعه‌ای، بدلیل پیچیدگی در تفسیر روش مناسبی نمی‌باشد (٤٤). برخی محققین گزارش کرده‌اند که یک ارتباط قوی بین ژنوتیپ و سروتیپ سویه‌ها وجود دارد در صورتی که دیگر مقالات این نتایج را نفی می‌کنند (Lin, Kato et al. 1991, Kwon, Jackwood et al. 1993, Cook 2000, Callison, Jackwood et al. 2001).

[1] - hypervariable

Archive of SID

www.SID.ir

۱۴-۱- تعیین توالی[1]

تعیین توالی و متعاقباً مقایسه توالی‌های آمینواسید پروتئین‌های ویروسی ابزار مفیدی برای کمک به تعیین محل نواحی حفاظت شده در پروتئین‌هاست که ممکن است برای ساختار و عملشان ضروری باشد و همچنین برای مطالعات اپیدمیولوژیکی آن مفید می‌باشد. تعیین توالی در هر بخش از ژنوم می‌تواند انجام گیرد اما معمولاً بر روی یک بخش انتخاب شده عمدتاً از ژن پروتئین S و یا بر روی ژن M و یا ژن N انجام می‌گیرد. براساس اطلاعات بدست آمده از توالی می‌توان یک درخت فیلوژنیک را طراحی و ارتباط ژنومی بین سویه‌ها را نشان داد (De Wit 2000).

۱۵-۱- واکسیناسیون

از آن‌جایی که در پرورش طیور صنعتی خطر انتشار بیماری بالا است، پرورش‌دهندگان طیور این مخاطرات را به‌وسیله اجرای یک برنامه واکسیناسیون موثر علیه عوامل بیماری‌زای مهم اقتصادی مدیریت و کنترل می‌نمایند (Marangon and Busani 2007).

همانگونه که پیشتر نیز بیان شد بیماری برونشیت عفونی ۳ فرم تناسلی، تنفسی و کلیوی دارد. جراحات گوارشی هم در اثر IBV مطرح شده‌اند، زیرا IBV یک کروناویروس است و پدیده نوترکیبی و موتاسیون در این ویروس‌ها بالا است. معمولاً در گله همیشه بیماری به درجاتی وجود دارد که این مسئله به دلیل بروز ویروس‌های جدید است و ایمنی ایجادشده توسط واکسن‌های قبلی ممکن است حفاظت کامل را ایجاد نکند. در IBV یک سری آنتی‌ژن‌های مشترک گروهی است که در گروه‌های مشخص از سروتیپ‌ها مشترک‌اند و این آنتی‌ژن‌ها مادامی که باهم ایمنی متقاطع می‌دهند می‌توانند حفاظت نسبی ایجاد کنند ولی برخی سروتیپ‌های برونشیت وجود دارند که آنتی‌ژن‌های آن‌ها مختص به خود آن‌ها است و در این حالت آنتی‌ژن های مشترک گروهی نمی‌توانند ایمنی خوبی ایجاد کنند (Burger, Davelaar et al. 1988, Johnson, Pooley et al. 2003, Cavanagh 2007).

در جوجه‌های گوشتی بهترین زمان واکسیناسیون یک روزگی است که واکسیناسیون به صورت قطره چشمی و یا اسپری (مثل قطرات ریز باران که دیده شود و پودر نباشد) انجام می‌شود. چنانچه ذرات واکسن به صورت آئروسل باشند ویروس به قسمت تحتانی دستگاه تنفسی می رود و منجر به واکنش هم می‌شود (Cavanagh and Naqi 2003, Cavanagh 2007). به منظور اسپری کردن می‌توان جوجه‌ها را در کارتن‌های ۱۰۰ تایی کنار هم قرار دارد و ۲۵-۳۵ml واکسن به هر ۱۰۰ جوجه اسپری کرد (Cavanagh and Naqi 2003, Cavanagh 2007). بعد از نوبت اول واکسیناسیون می‌توان از واکسن یادآور ۱۴-۱۲ روز بعد استفاده کرد.

[1]- Sequencing

Archive of SID

www.SID.ir

۱-۱۵-۱- انواع واکسن‌های برونشیت

دو نوع معمول واکسن برونشیت به صورت تجاری در دنیا وجود دارد که با نام واکسن تیپ ماساچوست و تیپ کانکتیکات نامیده می‌شوند. لیکن بسته به شرایط محلی ممکن است از سایر سروتیپ‌ها از جمله واریانت آرکانزاس یا Dutch جهت واکسیناسیون استفاده شود. همچنین برای مرغ‌های مادر یا تخم‌گذار تجاری در بعضی از کشورهای اروپایی از سویه D/274، ٤/٩١، (٧٩٣/B) استفاده می‌شود (Cavanagh and Naqi 2003, Cavanagh 2007).

واکسن به دو صورت زنده یا کشته وجود دارد. ولی در عمل بیشتر از واکسن‌های زنده استفاده می‌شود. دو سویه‌ی H120 و H52 در بازار وجود دارد که واکسن H120 در مرحله اولیه زندگی جوجه‌ها و واکسن H52 در مراحل بعدی مورد استفاده قرار می‌گیرند. H52 قوی تر است و اصلاً نباید در سنین کمتر از ٦٠ روزگی استفاده شود معمولاً واکسیناسیون به صورت روش‌های آشامیدنی یا اسپری استفاده می‌شود (Cavanagh and Naqi 2003, Cavanagh 2007).

گله‌ی ناسالم و وازده نباید واکسیناسیون شود. در بعضی موارد ممکن است ۱۰-۵ روز بعد از واکسیناسیون عوارض خفیف تنفسی گاهی همراه با سرفه و عطسه در گله به وجود آید. این عوارض به‌مرور برطرف می‌شود. در گله‌هایی که زمینه بیماری مایکوپلاسمایی وجود دارد اغلب ممکن است بعد از واکسیناسیون برونشیت، آثار بیماری مزمن تنفسی ظاهر گردد. در این‌گونه مواقع باید بعد از واکسن از یک آنتی‌بیوتیک مناسب استفاده نمود. در هنگامی که از واکسن به طریق آشامیدنی استفاده می‌شود آب باید فاقد مواد ضدعفونی‌کننده از قبیل کلر باشد (Cavanagh and Naqi 2003, Cavanagh 2007). برنامه‌ی پیشنهادی سازمان دامپزشکی کشور برای واکسیناسیون علیه بیماری برونشیت عفونی در جدول ۱-۲ آورده شده است.

جدول ۱-۲: برنامه پیشنهادی سازمان دامپزشکی برای واکسیناسیون علیه برونشیت در ایران

	سن	سویه واکسن	طریقه تجویز
نیمچه های گوشتی برنامه اول	یک روزه	H_{120}	اسپری
	۲۱ روزه	H_{120}	قطره چشمی یا آشامیدنی (ترجیحاً قطره چشمی)
نیمچه های گوشتی برنامه دوم	هفته اول	H_{120}	قطره چشمی یا آشامیدنی (ترجیحاً قطره چشمی)
	هفته سوم	H_{120}	آشامیدنی
پولت تخم‌گذار	۱ روزه	H_{120}	اسپری
	۲۱ روزه	H_{120}	اسپری یا قطره چشمی یا آشامیدنی
	۵۰ تا ٦٠ روزه	H_{52}	اسپری یا قطره چشمی یا آشامیدنی

Archive of SID

www.SID.ir

	۱۰۰ تا ۱۲۰ روزه	H_{41}	تزریق داخل عضله سینه
مادر گوشتی و مادر تخم‌گذار	۱ روزه	H_{120}	اسپری یا قطره چشمی یا آشامیدنی
	۲۱ روزه	H_{120}	اسپری یا قطره چشمی یا آشامیدنی
	۵۰ تا روزه ۶۰	H_{52}	اسپری یا قطره چشمی یا آشامیدنی
	۱۸ تا ۲۰ هفتگی	H_{41}	تزریق داخل عضله سینه

۱۶-۱- درمان بیماری برونشیت عفونی

درمان ویژه‌ای برای برونشیت عفونی وجود ندارد. به‌منظور محدود کردن استرس سرمایی بهتر است حرارت سالن بالابرده شود. بهتر است جمعیت محدود شود و اقداماتی برای افزایش تغذیه طیور انجام شود. درمان آنتی‌بیوتیکی به‌منظور جلوگیری از عفونت ثانویه باکتریایی کیسه‌های هوایی لازم است.بهتر است از مکمل‌های الکترولیتی هم استفاده شود، غلظت توصیه‌شده سدیم و یا پتاسیم ۷۲ میلی اکی والان است که حداقل ۱/۲ به صورت نمک سیترات یا بی‌کربنات است (Cavanagh and Naqi 2003, Cavanagh 2007)

Archive of SID

www.SID.ir

فصل دوم

مواد و روش کار

Archive of SID

www.SID.ir

۱-۲-جمع‌آوری نمونه‌های ویروس

در این مرحله، بر اساس نواحی جغرافیایی کشور و نیز مراکز شیوع بیماری برونشیت ۸۰ نمونه از واحد های صنعتی مرغداری (اعم از تخم گذار، گوشتی و مادر) مشکوک به بیماری برونشیت عفونی پرندگان دارای علائم بالینی، از هشت استان کشور شامل اردبیل، آذربایجان شرقی، تهران، اصفهان، مرکزی، گلستان، کرمان و خوزستان جمع آوری گردید. نمونه ها شامل نای (تمامی پرندگان) و کلیه‌ی (پرندگان با علائم نفریت و مشکلات تولید تخم‌مرغ) پرندگان مشکوک به بیماری بودند. نمونه‌های اخذ شده در محیط انتقال (حاوی پنی‌سیلین ۱۰۰۰۰IU/ml و استرپتومایسین ۱۰mg/ml) در کنار یخ به آزمایشگاه ارسال شدند. نمونه‌ها تا زمان مصرف در ۲۰°C- نگهداری گردیدند (Cavanagh 1991, Cavanagh, Mawditt et al. 1999, Cavanagh and Naqi 2003).

۱-۱-۲- آماده سازی نمونه ها

الف) سلایه کردن نمونه ها: هر نمونه بافتی اخذ شده به طور جداگانه در زیر هود لامینار فلو در شرایط استریل ابتدا توسط اسکالپل خرد و در آون چینی له گردید و سپس تعلیق ۱۰٪ نمونه در بافر فسفات استریل حاوی ۱۰۰۰۰IU/ml پنی‌سیلین، ۱۰۰۰۰IU/ml استرپتومایسین و ۲۵۰ IU/ml آمفوتریسین B در ۷,۲pH ساخته شد. نمونه های هموژن شده به مدت یک ساعت در دمای اتاق گرمخانه گذاری گردیدند.

ب) سانتریفوژ نمونه ها: به منظور ته نشین ساختن بافت‌ها و سایر اجرام زاید، نمونه‌ها به طور جداگانه در لوله آزمایش استریل ریخته شده و به مدت ۷-۸ دقیقه در دمای ٤°C و با دور ۳۰۰۰rpm سانتریفیوژ گردیدند.

ج) برداشت مایع حاوی ویروس: مایع رویی در هر یک ازلوله های سانتریفیوژ شده به میزان ml ۸-۱۰ به شکل استریل و جداگانه برداشت گردید و از میکروفیلترهای دارای منافذی با قطر ۰,۲۲ میکرومتر گذرانده شد . سپس هریک از نمونه ها در ویال های استریل که قبلاً روی آن مشخصات نمونه درج شده بود ریخته شد. ویال ها متعاقباً به فریزر 20°C- منتقل و بعد از ٢٤ ساعت از فریزر خارج و در محیط آزمایشگاه نمونه ها ذوب و سپس به فریزر 70C°- منتقل گردید و تا زمان تلقیح به تخم مرغ های بارور عاری از هر نوع پاتوژن در فریزر 70C°- نگهداری شد.

۲-۲- کشت

جهت جداسازی ویروس IBV، از تخم‌مرغ‌های جنین‌دار SPF استفاده شد. ابتدا سوسپانسیون‌های بافتی (w/v ٪۱۰-۲۰) در فسفات بافر سالین (PBS) استریل تهیه گردید. سوسپانسیون‌های آماده شده در دور پایین سانتریفیوژ، سانتریفیوژ گردیدند و از فیلتر ۰/۲µ عبور داده شدند. میزان ۰/۲ml از سوپرناتانت هر نمونه داخل حفره‌ی آلانتوئیک جنین‌های ۱۱-۹ روزه تلقیح

Archive of SID

www.SID.ir

گردید. تخم‌مرغ‌ها روزانه به مدت ۷ روز با روش نوردهی بررسی شدند و تلفات ۲٤ ساعت اول غیراختصاصی در نظر گرفته شد. بعد از ۷ روز، مایع آلانتوئیک تخم‌مرغ‌ها جمع‌آوری و پس از رقیق‌سازی به نسبت یک پنجم در محیط مایع حاوی آنتی-بیوتیک، مجدداً به تخم‌مرغ‌های SPF دیگری پاساژ داده شد. هر نمونه تا چهار بار پاساژ داده شد تا علائم ماکروسکوپی ویروس (جنین‌های خمیده و کوتوله همراه با دیستروفی پرها و رسوب اورات بر روی مزونفروس) بر روی جنین مشخص گردد. پس از مشاهده علائم بالینی، مایع آلانتویک تخم‌مرغ‌ها جمع‌آوری و مایعات مربوط به هر نمونه ادغام گردید. مایعات آلانتوئیک حاوی ویروس، در دمای ۲۰°C- جهت نگه‌داری کوتاه‌مدت و ٦۰°C- جهت نگهداری بلندمدت قرار داده شدند (Cook, Darbyshire et al. 1976, Mahmood, Sleman et al. 2011).

۳-۲- شناسایی ویروس برونشیت عفونی

تأیید موارد مشکوک به برونشیت عفونی و شناسایی سویه‌ی ویروس با استفاده از روش RT-PCR انجام شد.

۱-۳-۲- استخراج RNA از نمونه‌ها

استخراج RNA ویروسی با استفاده از کیت Cinna Pure RNA (شرکت سیناکلون- ایران) مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده انجام گشت. به طور خلاصه، ابتدا نمونه‌های بافتی در یک هاون استریل خرد و هموژن شدند. سپس در یک میکروتیوب میزان ٤۰۰ µl از بافر لیز کننده به ۱۰۰ µl از مایع هموژن شده‌ی نمونه‌ها افزوده و به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس گردید. پس از آن میزان ۳۰۰ µl از بافر رسوب‌دهنده افزوده شد. محتوای میکروتیوب ها پس از ۵ ثانیه ورتکس با استفاده از پیپتینگ به ستون های اسپین منتقل گردید. ستون‌ها به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰rpm سانتریفیوژ گردیدند. سپس میزان ٤۰۰ µl از بافر شستشوی شماره یک و بعد از سانتریفیوژ و دور ریختن محلول حاصل از شستشو، ٤۰۰ µl از بافر شستشوی شماره‌ی ۲ اضافه و سپس سانتریفیوژ گردید. این مرحله دو بار تکرار گشت. در نهایت بعد از تخلیه محتوای جمع شده در لوله های جمع آوری، ستون‌های اسپین به مدت ۲ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردیدند و سپس به میکروتیوب‌های استریل انتقال داده شدند. در این مرحله میزان ۳۰ µl از بافر شستشو با دمای ٥٥°C به مرکز لوله های اسپین افزوده شد، لوله ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ٥٥°C گرمخانه گذاری شده و در نهایت RNA ویروس توسط سانتریفیوژ نمودن لوله ها به مدت ۱ دقیقه با دور ۱۳۰۰۰ rpm استحصال گردید. محصول RNAی استخراج شده در این روش تا زمان استفاده در فریزر ۷۰°C- نگهداری شد.

برای جلوگیری از آلودگی با DNA اسید نوکلئیک استخراج شده از آنزیم DNase شرکت سیناکلون مطابق با دستورالعمل سازنده استفاده شد.

Archive of SID

www.SID.ir

۲-۳-۲- اندازه گیری غلظت RNA استخراج شده

انجام این کار قبل از انجام عملیات مولکولی بر روی RNA جهت بررسی خلوص و اطمینان از کافی بودن غلظت آن انجام شد. این کار توسط دستگاه اسپکتروفتومتر ABI انجام گرفت. پس از استخراج RNA برای بدست آوردن غلظت آن به روش جذب نوری (OD)[1] به روش زیر عمل شد (٦٦):

الف- ۱ µl از RNA تخلیص شده (محلول آماده شده) در ٤٩ µl آب مقطر حل شد (رقت ۱:۵۰).

ب- ۵۰۰ µl آب مقطر داخل کووت کوارتز ریخته شده و جذب نوری آن بوسیله اسپکتروفتومتر قرائت شد و سپس جذب نوری دستگاه صفر شد.

ج- آب مقطر داخل کووت خالی و محلول حاوی RNA در درون آن ریخته شد و بعد جذب نوری در طول موجهای ۲٦۰ و ۲۸۰ نانومتر قرائت شد (طول موج ۲٦۰ نانومتر میزان RNA و طول موج ۲۸۰ نانومترمیزان پروتئین تخلیص شده را نشان می دهند). نسبت میزان جذب نوری ۲٦۰ nm به ۲۸۰nm نشان دهنده خالص بودن RNA می باشد. چنانچه میزان نسبت جذب نوری حدود ۰/۰۵ - ۲ باشد تخلیص RNA بخوبی انجام شده است و نسبت های کمتر حاکی از ضعف در انجام عمل تخلیص می باشد. معمولا غلظت RNA نمونه اصلی از طریق فرمول زیر محاسبه می شود:

$C\ (\mu g/\mu l) = 40 \times 260 \times$ فاکتور رقت

۳-۳-۲- آزمایش نسخه برداری معکوس و واکنش زنجیره ای پلی مراز

۱-۳-۳-۲- ساخت cDNA

میزان ۱/۵µl از آنزیم رندوم هگزامر (سیناکلون) به ۵µl از RNA استخراج شده افزوده گردید و در ترموسیکلر با برنامه ۵ دقیقه در دمای ٦۵°C و یک دقیقه دمای ۵ °C قرار گرفت. سپس به آن میزان‌های ۷/۲۵µl آب مقطر(سیناکلون)، ٤µl بافر 5X(سیناکلون)، ۲µl dNTP با غلظت ۱۰mM (سیناکلون)، ۰/۲۵µl آنزیم مهارکننده‌ی RNase (Thermo scientific) و ۰/۵µl آنزیم رونوشت‌برداری معکوس (Thermo scientific) افزوده و در برنامه دمایی زیر قرار داده شد.

دمای ۲۵°C به مدت ۵ دقیقه،

دمای ٤۲ °C به مدت یک ساعت،

دمای ۹۵ °C به مدت ۵ دقیقه

---

[1]- Optical Density

Archive of SID

www.SID.ir

دمای ۵ °C به مدت یک دقیقه.

۲-۳-۳-۲- واکنش زنجیره ای پلیمراز

در این مرحله آزمون واکنش زنجیره ای پلیمراز با هدف تکثیر ناحیه حفاظت شده 5’-UTR که واقع در انتهای '۵ ژنوم ویروس برونشیت عفونی می باشد به منظور تشخیص اولیه این ویروس استفاده گردید.

کلیه مراحل این قسمت در مجاورت یخ انجام می شود و در هر مرحله دستکش عوض شد تا آلودگی به حداقل برسد. جهت یکنواخت کردن شرایط آزمایش و به دلیل کاهش دفعات استفاده از سمپلر و باز و بسته کردن در تیوب ها و انتقال آلودگی، ابتدا یک مخلوط اصلی (مسترمیکس[۱]) تهیه شد. در ابتدا حجم هر واکنش بایستی مشخص شود که در این تحقیق حجم هر واکنش ۲۵µl در نظر گرفته شده بود. پس از مشخص کردن حجم واکنش، تعداد نمونه ها با احتساب کنترل مثبت و منفی و احتساب یک نمونه بیشتر محاسبه گردید. در نظر گرفتن نمونه اضافی به این دلیل بود که در جریان تقسیم مخلوط اصلی در تیوب های مخصوص واکنش PCR مقداری از مخلوط اصلی از راه های مختلف از دست می رود که در پایان برای تیوب آخر مقدار مخلوط کافی نخواهد بود.

۳-۳-۳-۲- آماده سازی مخلوط اصلی و برنامه حرارتی

در این واکنش پرایمر مستقیم MHGIBJF1 با توالی 5’ -GCTTTTGAGCCTAGCGTT-3’ و پرایمر معکوس MHGIBJR1 با توالی 5’- GCCATGTTGTCACTGTCTATTG-3’ جهت تکثیر قطعه ؟؟؟؟ جفت بازی واقع در ناحیه 5’-UTR ژنوم استفاده گردید. واکنش زنجیره ای پلیمراز با استفاده از کیت رش (ساخت کشور آلمان، Lot number: 122242000) استفاده شد.

به طور خلاصه میزان ۲۵ میکرولیتر از Master mix PCR (Platinum Taq DNA Polymerase Kit)، 2 میکرولیتر از هر کدام از پرایمر هابا غلظت 10 µM به آن افزوده (پرایمر ها توسط شرکت تکاپوزیست سنتز گردید و توسط nuclease-free water به حجم ٤٧ میکرولیتر رسانده شد و در انتها ۳ میکرولیتر از cDNA ساخته شده در مرحله قبل به آن اضافه شده و طبق برنامه زیر در دستگاه ترموسایکلر Eppendorf قرار می گرفت. ابتدا 3 دقیقه در دمای □ 95مرحله واسرشت اولیه و سپس ۳۵چرخه که هر کدام دارای ۳ مرحله باشند صورت می گرفت. ۳۰ ثانیه در ۹۵0C، ۳۰ ثانیه ٤٨0C، ۲۰ ثانیه ۷۲0C وطویل شدن نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در 0C ۷۲ انجام شد.

٤-۳-۳-۲- الکتروفورز فرآورده های PCR

[۱] mastermix

Archive of SID

www.SID.ir

برای انجام الکتروفورز نیاز به یکسری مواد از جمله ژل اگارز و محلول بافر 0/5X TBE می باشد.این بافر برای تهیه ژل و هم برای داخل تانک الکتروفورز لازم است. بافر (Tris-Borate –EDTA) TBE را می توان به صورت استوک 10 X ، 5X تهیه و نگهداری کرد.

در این مطالعه نیز بافر TBE به صورت استوک 0/5X Working استفاده گردید.

بافر 5X TBE شامل موارد زیر می باشد

۱-تریس پایه ٥٤ گرم

۲- پودر بوریک اسید ۲۷/٥ گرم

۳-0/5EDTA مولار با pH=8 ۲۰ میلی لیتر

برای تهیه 0/5 X TBE ، 1000 سی سی از بافر 5X TBE را در یک ارلن ریخته و به وسیله ۹۰۰ سی سی آب مقطر حجم به ۱۰۰۰ میلی لیتر رسانده شود. برای تهیه ژل نیاز به ۷۰ سی سی بافر0/5 X TBE است و برای داخل تانک هم ۷۰۰ سی سی از این بافر نیاز می باشد.

۱-٤-۳-۳-۲- طرز تهیه ژل آگارز

درصد ژل مورد استفاده در این تحقیق ۱/۲ گرم در ۱۰۰ سی سی بود (۱٪/۲) در صورتی که با توجه به تانک مورد استفاده ، ۷۰ سی سی نیاز باشد با بستن یک تناسب میزان پودر ژل به راحتی به دست می آید. در این مطالعه میزان پودر آگارز ۰/۸٤ گرم بوده ، این مقدار پودر را داخل ۷۰ سی سی بافر0/5 X TBE ریخته و داخل مایکروویو گذاشته تا بجوشد و کاملا حل شود و وقتی که خنک شد در داخل cast ریخته و شانه را نیز داخل cast قرار داده و اجازه داده می شد تا ژل ببندد. وقتی ژل بسته شد شانه را با دقت و به آرامی از داخل ژل بیرون آورده و ژل در جای مخصوص خود در تانک الکتروفورز قرار داده می شود و به طوریکه گود ه های ایجاد شده خلاف جهت قطب مثبت قرار گیرد. بایستی دقت شود که قطر ژل حداکثر از ٥ میلی متر تجاوز نکند زیرا افزایش قطر ژل از کیفیت ژل می کاهد.(به علت آزادی بیشتر که برای DNA فراهم می شود.)

سپس تانک بوسیله بافر0/5X TBE پر می شد به طوریکه ۳-۲ میلی متر از بافر روی ژل را هم بپوشاند.

فراورده های PCR را به نسبت ۲ به ۱۰ با Loading buffer(Fermentase 6x) رقیق می کنیم .که این عمل را می توان داخل تیوب های ۰/۲ سی سی و یا روی نوار چسب انجام داد. برای سهولت کار در این تحقیق ۲ میکرولیتر از Loading Buffer را به تعداد نمونه ها روی نوار چسب ریخته و سپس ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR را با آن بوسیله سمپلر مخلوط کرده و در نهایت ۱۰ میکرولیتر به داخل گوده ها انتقال داده می شود که البته بسته به نوع شانه مقدار متفاوت است.

Archive of SID

www.SID.ir

در گوده اول به میزان ۵ میکرولیتر مارکر و در گوده دوم کنترل مثبت ریخته می شد و کنترل منفی هم در گوده آخر. بعد، نمونه ها ریخته می شد.پس از اینکه کلیه نمونه ها و مارکر در گوده ها ریخته شد تانک الکتروفورز را به دستگاه مولد برق وصل نموده و ولتاژ آن تنظیم می گردید که در این تحقیق ولتاژ ۹۰ و آمپر ٤٣ در نظر گرفته شد. بعد از آن زمانی حدود ٦٠-٨٠ دقیقه هنگامی که رنگ مربوط به L.B دو سوم از طول ژل را پیمود برق سیستم را قطع نموده و ژل برای رنگ امیزی در داخل محلول اتیدیوم بروماید به مدت ١٥-١٠ دقیقه قرار می گیرد (بسته به درصد ژل ، کهنه و تازه بودن رنگ).پس از طی این زمان ژل را با آب شستشو داده و آن را بر روی دستگاه ترانس ایلومیناتور(UV) قرار داده و توسط دوربین مخصوص و پرینتر عکس ژل را تهیه و نتایج بررسی می گردید.

٤-٣-٢- تعیین ژنوتیپ ویروسهای جدا شده با استفاده از تکثیر بخشی از ژن اسپایک(S1)

بدین منظور آزمون واکنش زنجیره ای پلیمراز nested طراحی گردید. واکنش زنجیره ای با استفاده از کیت 2X PCR master سیناکلون (ساخت شرکت سیناکلون- ایران) انجام شد. حجم نهایی واکنش ۲۰ میکرولیتر و شامل ۲ میکرولیتر آب مقطر،یک میکرولیتر ازهر یک از پرایمرهای دژنره SX1M,SX2 M با غلظت Mμ25 (تکاپوزیست) ، ۳ میکرولیتر از cDNA ساخته شده در مرحله قبل و ۱۳ میکرولیتر مسترمیکس×۲ سیناکلون بود. تکثیر قطعه مورد نظر با برنامه دمایی شامل واسرشت اولیه در دمای C° ٩٤ به مدت ۲ دقیقه، ۳۵ سیکل با دمای واسرشت C°٩٤ به مدت ۱۵ ثانیه، دمای اتصال C°٥٨ به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله طویل شدن با دمای C°٧٢ به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت به مدت ۱۰ دقیقه در دمای C°٧٢ در دستگاه ترموسیکلر Eppendorf (Epprndorf – آلمان) قرار گرفت. رقت ۱/۱۰۰ از محصول حاصل از واکنش زنجیره ای پلیمراز مرحله اول جهت استفاده در مرحله دوم آزمون nested pcr تهیه شد. بدین ترتیب که یک میکرولیتر از محصول pcr توسط آب مقطر به حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر رسانده شد. سپس یک میکرولیتر از این محلول رقیق شده به عنوان الگو، به همراه ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای SX3 و SX4 با غلظت μM ٢٥(تکاپوزیست)، ٤ میکرولیتر آب مقطر و۱۳ میکرولیتر مسترمیکس×۲ سیناکلون وارد مرحله دوم واکنش زنجیره ای شدند. چرخه حرارتی مشابه مرحله اول آزمون nested pcr بود. توالی پرایمرها در جدول نمایش داده شده است.

جدول ۲-۱: پرایمر های مورد استفاده در آزمون Nested PCR جهت تکثیر بخشی از ژن اسپایک ویروس برونشیت عفونی

Reagent	Company/code	Storage
SX1 m(25µl primer+75 µl distilled water) 5’CACCTAGAGGTTTGYTWGCATG3’	Takapouzist	-20° C

Archive of SID

www.SID.ir

SX2 m(25µl primer+75 µl distilled water) 5'TCCACCTCTATAAACACCYTTAC3'	Takapouzist	-20° C
SX3(25µl primer+75 µl distilled water) 5'TAATACTGGYAATTTTTCAGATGG3'	Takapouzist	-20° C
SX4(25µl primer+75 µl distilled water) 5'AATACAGATTGCTTACAACCACC3'	Takapouzist	-20° C

۵-۳-۲- توالی یابی ژن s1 و تحلیل بیوانفورماتیک

فراورده های PCR به دست آمده جهت خالص سازی و تعیین توالی به شرکت Source BioScience انگلستان فرستاده شدند. خوانش توالی با استفاده از هر دو پرایمر مستقیم و معکوس SX3 و SX4 انجام شد. نرم افزار تحلیلی هم ترازی چندگانه ClustalX (نسخه ۱,۸۳) جهت محاسبه درصد شباهت توالی های نمونه های مثبت با توالی های سویه های مرجع و دیگر سویه های ویروس برونشیت عفونی استفاده گردید. درخت فیلوژنی با روش Neighbor-Joining و مدل Kimura 2-Parameter توسط نرم افزار MEGA (نسخه ۵,۱) ترسیم گشت. تحلیل bootstrap re-sampling به منظور آزمودن robustness گروه های فیلوژنتیک اصلی مورد استفاده قرار گرفت.

٤-۲- تأیید عدم حضور سایر پاتوژن‌های ویروسی

۱-٤-۲- آزمایش هماگلوتیناسیون (HA):

جهت اطمینان از عدم حضور ویروس‌های هماگلوتینه کننده (نیوکاسل، انفولانزا و ...) آزمون هماگلوتیناسیون بر روی مایع آلانتوئیک انجام گشت.

نمونه ها (مایع آلانتوئیک) از نظر انعقاد گلبول های قرمز مرغ مورد آزمایش قرار گرفتند، موارد منفی از نظر HA برای آزمایش های ملکولی انتخاب شدند. خلاصه مراحل آزمایش HA به شرح زیر می باشد:

۱. تهیه گلبول قرمز سه بار شسته شده: ابتدا از جوجه‌های SPF خون گیری به عمل آمد و خون گرفته شده به نسبت مساوی با محلول ضد انعقاد آلسور (alsver) مخلوط گردید. سپس این مخلوط در لوله های سانتریفوژ ریخته شد و با دور rpm ۱۲۰۰ الی ۱٤۰۰ سانتریفیوژ گردید. سپس مایع رویی را دور ریخته و رسوب گلبول ها با PBS مخلوط گشت. مخلوط حاصل دوبار با PBS شستشو گردید. در مرحله آخر رسوب گلبول قرمز به نسبت یک به صد با PBS رقیق شده و گلبول شسته شده ۱٪ به دست آمد.

Archive of SID

www.SID.ir

۲. آزمایش HA سریع: یک قطره نمونه مایع آلانتوئیک در کنار یک قطره گلبول قرمز شسته شده ۱٪ روی لام شیشه ای قرار داده شد و سپس دو قطره مخاوط و هم‌زمان به صورت دورانی تکان داده شدند. انعقاد و یا عدم انعقاد گلبول قرمز در زیر نور با زمینه سفید بررسی گردید. موارد مشکوک به هماگلوتیناسیون، زیر میکروسکوپ معکوس برای اطمینان از عدم انعقاد مطالعه گردیدند.

۳. آزمایش میکروپلیت HA: برای هر نمونه یک ردیف ۱۲ حفره ای در میکروپلیت ۹۶ خانه ای در نظر گرفته شد. ابتدا به هر ۱۲ گوده ۲۵µl PBS اضافه شد. مقدار ۲۵µl از نمونه به گوده اول اضافه گردید و از آن رقت‌های سریال دوتایی تا گوده ۱۱ تهیه شد. گوده‌ی آخر به عنوان کنترل گلبول قرمز در نظر گرفته شد. بدین ترتیب رقت های ۱/۲، ۱/٤، ۱/۸، ۱/۱٦ و ... از نمونه حاصل گشت. در مرحله بعد ۲۵µl از گلبول قرمز شسته شده ۱٪ به همه گوده ها (۱ الی ۱۲) اضافه شد و پلیت در دور مناسب شیکر به مدت ۳۰–۲۰ ثانیه تکان داده شد. متعاقباً پلیت به مدت ۳۰min در شرایط آزمایشگاه بر روی سطح صاف قرار داده شد. هماگلوتیناسیون بر اساس تشکیل تکمه قرائت گردید.

۵-۲- تعیین تیتر ویروس های جدا شده جهت استفاده در آزمایش

ابتدا رقت های دهگانه متوالی از ویروس از رقت 10^{-1} الی 10^{-7} تهیه گشت. بدین منظور ۱۰۰ µl از منبع ویروس به ۹۰۰ µl از بافر فسفات افزوده شد. این رقت به عنوان رقت ۰/۱ در نظر گرفته شد، جهت تهیه رقت ۰/۰۱، ۱۰۰ µl از رقت ۰,۱ برداشت و با ۹۰۰ µl از بافر فسفات مخلوط گشت. این عمل تا رسیدن به رقت 10^{-7} ادامه یافت. در مرحله بعد ۱۰۰ µl از هر رقت به تخم مرغ‌های جنین دار ۹ الی ۱۱ روزه از راه کوریوآلانتوئیک مانند آنچه در بخش ۲-۲ ذکر شد تلقیح گشت. تخم مرغ‌های تلقیح شده در رطوبت ۵۵٪ و دمای ۳۷□ گرمخانه گذاری گریدند. تخم‌مرغ‌ها روزانه دو بار نوربینی شدند. تلفات ۲٤ ساعت اول حذف شدند و تحم مرغ‌ها به مدت ۵ روز بررسی شده و جنین‌های تلف شده به یخچال منتقل گردیدند و اطلاعات آن‌ها ثبت شد. تمام تخم مرغ ها در روز ٦ به یخچال منتقل شدند و در روز ۷ مایع آلانتوئیک با استفاده از سرنگ به صورت استریل جمع‌آوری گردید. میزان EID50 با استفاده از روش Reed-Muench محاسبه شد.

٦-۲- تولید واکسن

۱-٦-۲- انتخاب سویه

سویه‌ی واکسن بر اساس نتایج حاصل از مرحله شناسایی و نیز اطلاعات موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی و سازمان دامپزشکی کشور انتخاب گردید.

۲-٦-۲- تکثیر سویه ویروس

Archive of SID

www.SID.ir

ویروس انتخاب شده برای تولید واکسن در بافر مناسب رقیق و با غلظت معین به حفره آلانتوئیک تخم‌مرغ‌های SPF جنین دار ۱۰ روزه تلقیح گردید. تخم‌مرغ‌های تلقیح شده در دمای ۳۷/۵°C انکوبه و پس از طی دوره انکوباسیون به سردخانه منتقل شدند. سپس مایع آلانتوئیک در شرایط استریل برداشت گردید.

۳-۶-۲- آزمایش سترونی (استریلیتی)

مایع آلانتوئیک برداشت شده در محیط های رشد باکتری هوازی و بی هوازی، قارچ ها و مایکوپلاسماها طبق دستورالعمل OIE و فارماکوپه اروپا بخش ۲,۶,۱ کشت داده شدند. محیط مورد استفاده برای آلودگی باکتریایی ژلوز خوندار و مک‌کانکی و محیط مورد استفاده برای آلودگی‌های قارچی سابورودکستروز آگار بود. محیط ها در شرایط هوازی و بی‌هوازی به مدت ۷-۱۰ روز در دمای ۳۰°C و ۳۷°C قرار داده شدند و روزانه از نظر هر گونه رشد میکربی بررسی گشتند (European pharmacopoeia, 2010).

برای بررسی آلودگی ویروسی، آزمایش هماگلوتیناسیون با استفاده از تیتر بالای آنتی‌سرم اختصاصی ویروس واکسن انجام داده شد.

٤-٦-٢- آزمایش عیار سنجی

برای عیار سنجی و تیتر ویروس‌ها رقت‌های (۳- تا ۹-) ویروس با محلول‌های فسفات بافر سالین (PBS) رقیق و به پرده‌ی کوریوالانتوئیک پنج تخم مرغ جنین‌دار (SPF) ۱۰روزه تلقیح شدند. کیسه Allantoic تخم مرغ جنین‌دار با ۰/۱ میلی لیتر از هر رقت از ویروس تلقیح شد. تخم‌ها در انکوباتور ۳۷ ºC قرار داده شدند .تخم مرغ‌ها روزانه بررسی شدند و مرگ بین روزهای ۲ تا ۷ بعد از تلقیح به علت تاثیر ویروس در نظر گرفته شد. در انتهای روز هفتم پس از تلقیح، جنین‌های مرده و زنده از جهت ضایعات رایج IBV ، از جمله کوتولگی، پیچش، گرزی شکل شدن پاها و یا رسوبات اورات در مزونفروس کلیه مورد بررسی قرار گرفتند. تیترها به ترتیب ۵۰٪ دوز علیه جنین (EID50) با روش Spearman-Karber محاسبه شدند. تیترهای ویروسی IBV برای هر دوز واکسن قبل از غیر فعال شدن EID50 $10^{6.5}$ تنظیم شده بود (Cowen and Hitchner 1975).

٥-٦-٢- آزمایش تعیین هویت

ویروس جدا شده از مایع آلانتوئیک بر اساس روش گفته در مراحل قبلی توسط RT-PCR شناسایی می‌گردد.

٦-٦-٢- آزمایش خلوص[1]

[1] Purity test

Archive of SID

www.SID.ir

برای تعیین خلوص بذر ویروس، آزمایش PCR با استفاده از پرایمر جندین سویه‌ی شایع (مانند آدنوویروس پرندگان) انجام شد.

۷-٦-۲- غیرفعال کردن ویروس

ویروس با فرمالین ۳۷ ٪ (غلظت نهایی ۰/۱٪) به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷°C غیر فعال گردید. برای تأیید غیر فعال شدن ویروس، نمونه‌ها به صورت کور سه بار در ۱۰ تخم‌مرغ جنین‌دار پاساژ داده شدند. جنین‌های تلقیح شده هیچ علائم خاص IBV مانند مرگ و میر، کوتولگی و بازماندگی از رشد، پیچش و رسوبات اورات در کلیه را پس از حداقل ۳ پاساژ کور نشان ندادند.

۷-۲- فرمولاسیون واکسن

پس از غیرفعال شدن کامل، ویروس‌های کشته شده با نسبت ۳۰ به ۷۰ در یک فاز آبی از امولسیون اسیدهای معدنی-ISA 70، (SEPPIC, Cosmotics/Pharmacy Division, Paris, France) امولسیون شدند. هر دوز واکسن شامل ۰,۵ میلی لیتر امولسیون واکسن و ۰,۰۵ میلی گرم تیمورسال بود. تمام روش‌های تولید واکسن در شرایط کنترل شده و زیر هود انجام شد. واکسن‌ها در دمای ٤°C نگهداری شدند.

۸-۲- آزمایش بی ضرری (ایمنی)[1]

دو دوز واکسن به صورت زیر پوستی به هر کدام از ده مرغ لگهورن سفید (SPF) ۲۱ روزه تزریق شد. جوجه‌ها برای مدت ۲۱ روز پس از تزریق برای واکنش‌های غیر طبیعی مورد بررسی قرار گرفتند.

۹-۲- آزمون پایداری

پایداری واکسن‌ها برای یک هفته در دمای ۳۷°C و دوره‌های مختلف در دمای ٤°C مورد آزمایش قرار گرفت. در واکسن تغییر فیزیکی نباید وجود داشته باشد و پس از یک لرزش سریع باید وضعیت امولسیون سابق خود را دوباره به دست آورد.

۱۰-۲- بررسی سرولوژیک جوجه‌های واکسینه

سه هفته پس از واکسیناسیون از جوجه‌ها خونگیری شد و سرم آن‌ها برای تعیین میزان آنتی بادی توسط آزمون الایزا آزمایش شد.

[1] safety

Archive of SID

www.SID.ir

۱۱-۲- آزمایش کارآیی واکسن

این آزمایش مطابق دستورالعمل OIE با اندکی تغییرات انجام شد. جوجه‌های SPF به سه گروه ۲۰ تایی شامل دریافت‌کننده واکسن واریانت ۲، دریافت‌کننده واکسن تجاری (M41) و گروه کنترل تقسیم‌بندی شدند. همه‌ی جوجه‌ها در یک روزگی با واکسن زنده‌ی H120 واکسینه شدند. سپس در سه هفتگی واکسن غیرفعال به روش زیرجلدی مطابق با گروه‌بندی بیان شده دریافت کردند. گروه شاهد ۰/۵ml بافر تریپتوز فسفات دریافت کردند. چهارهفته پس از واکسیناسیون یادآور، جوجه‌ها از نظر تیتر آنتی‌بادی نمونه‌گیری شدند و با ویروس واریانت ۲ ($EID50=10^3$) با روش قطره چشمی چالش داده شدند. تیتر آنتی‌بادی با روش الایزا (IDEXX) اندازه‌گیری شد. در روز ۵ پس از چالش، جوجه‌های هر گروه به صورت انسانی کشته شدند. نای‌ها با دقت برداشته شدند و برای فعالیت مژک‌های تنفسی مورد بررسی قرار گرفتند. به طور خلاصه، ده حلقه نازک نایی(شماره‌های ۳ از بالا و پایین و ٤ از وسط سینه) از هر پرنده انتخاب شد. حلقه‌ها با میکروسکوپ کم توان ارزیابی شدند(Cubillos et al 1991, Cavanagh et al 1997). تمامی مراحل آزمایش در درون ایزولاتور انجام شد.

مبنای فعالیت مژک‌های تنفسی به شرح تعیین گردید:

۰) تمام مژک‌ها زنش داشتند.

۱) ٪۷۵ از مژک‌ها زنش داشتند.

۲) ٪۵۰ از مژک‌ها زنش داشتند.

۳) ٪۲۵ از مژک‌ها زنش داشتند.

٤) هیچ کدام از مژک‌ها زنش نداشتند (۱۰۰٪ ciliostasis).

۱۲-۲- تجزیه و تحلیل نتایج

در این طرح نمونه‌گیری به صورت غیرتصادفی هدفمند انجام گرفت. داده‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار SPSS ورژن ۲۱ و آزمون آماری t-student و مربع کای تحلیل شدند. ارزش p کوچک‌تر از ۰,۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

Archive of SID

www.SID.ir

فصل سوم

نتایج

Archive of SID

www.SID.ir

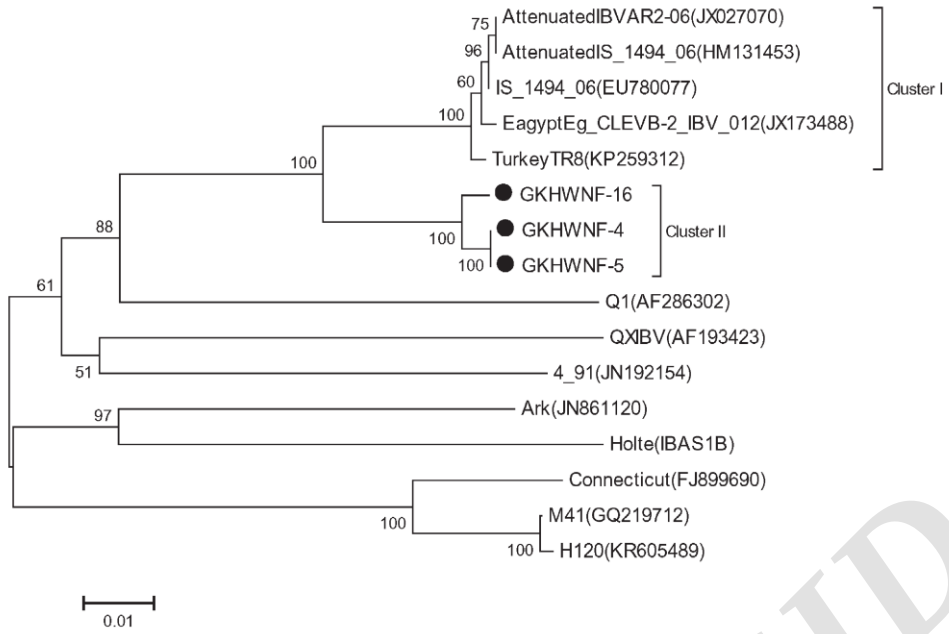
۱-۳- نتایج شناسایی ویروس برونشیت عفونی طیور

از مجموع ۸۰ نمونه مشکوک به ویروس برونشیت عفونی از مزارع پرورشی در ایران، از ٥٦ نمونه بافتی ویروس برونشیت عفونی جدا گردید. این جدایه ها با استفاده از روش PCR و توالی یابی ژن گلیکوپروتئین اسپایک (S) (شکل ۳-۱) شناسایی وتأیید شدند. در بررسی فیلوژنتیکی مشخص شد که جدایه‌ها متعلق به گروه‌های فیلوژنتیک متمایز هستند (شکل ۳-۲ و ۳-۳). بر این اساس جدایه‌ها در چهار گروه شبه QX، شبه ماساچوست، 793/B و شبه واریانت ۲ (IS/1494/06) قرار گرفتند. پرتکرارترین ژنوتیپ شناسایی شده جدایه‌های مشابه واریانت ۲ بودند که شیوعی حدود ٦٤٪ داشتند (جداول ۳-۱ و ۳-۲).

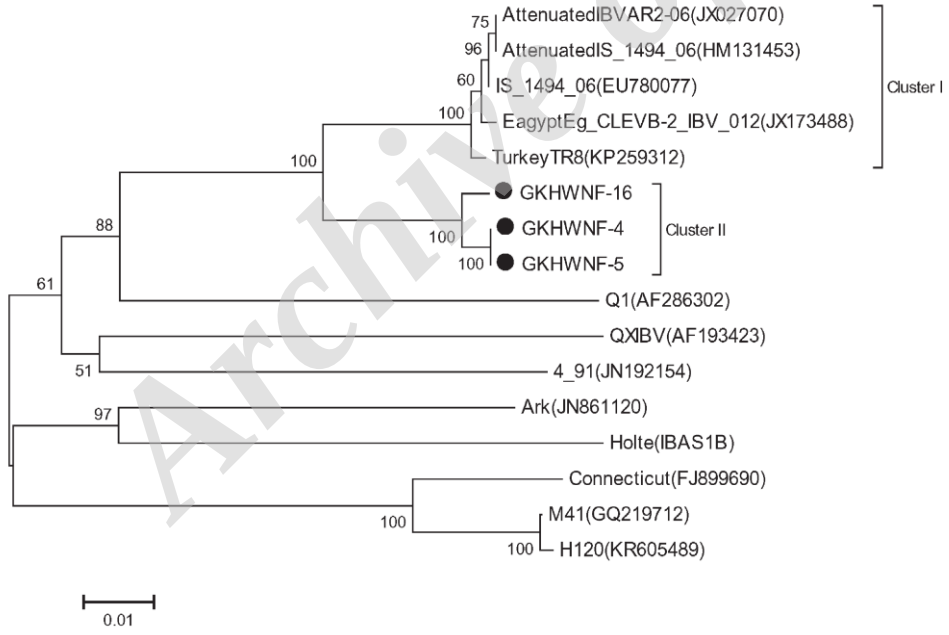
ATGTTGGTGAAGTCACTGTTTATAGTGACTCTTTTGTTTGCACTATGTAGTGCCGCCCTGTTTGATAATAATCAGACCGTTTAC
TACTACCAAAGTGCTTTCCGACCATCTGGTGGCTGGCATAAGCATGGGGGTGCTTATGCAGTAGCTAATGTTTCTTTAGAATA
TGCTAATGCAGGCTCATCTACACACTGTACTGCAGGGGCTATTTATTGGAGTAAAAATTTTACTGCATCTTCTGTAGCCATGA
CAGCACCTGGTACAGGTATGTCTTGGTCAACTGCTCAATTTTGTACGGCGCACTGTAACTTTTCGGATTTTACAGTGTTCGTTA
CACATTGTTATAAAAGTGGTGAACATGTATGTCCACTAACAGGTCTTATTCCAAGTGGCTATATTCGTATCTCTGCCATGACG
AAAGGAACTACTTCCTTGTTTTACAATCTAACAGTTCCAGTGACTAAATACCCTAAATTTAAGTCTCTGCAATGTGTTGATAA
TTTTACATCTGTGTATTTAAATGGTGACCTTGTATTCACTTCTAATGAGACTAAAGATGTTAGTGCTGCAGGTGTTCATTTTAA
AGCTGGTGGACCTATAACTTATAAGGTTATGGAAAAAGTTGATGTCCTAGCTTATTTTGTTAATGGTACCGCACAAGATGTTA
TTTTGTGTGATAATTCACCAAGAGGTTTATTAGCATGCCAGTATAATACTGGTAATTTTTCAGATGGCTTTTATCCTTTTACTA
ACATTAGTTTAGTTAAAGAAAAGTTTATTGTGTATCGTGAAACTAGTGTTAACACCACGTTGGTTTTAACTAATTTCACCTTTA
CAAATGTAAGTAATGCCTTGCCTAATACAGGTGGTGTCAATACTATTAACATATATCAAACACAAACAGCTCAGAGTGGTTG
TTATAATTTTAATTTTTCTTTTCTGAGTAGTTTTGTTTATAAGCAGTCTGATTTTATGTATGGGTCTTATCACCCAAAGTGTGAT
TTTAGACCGGAAACTATTAATAATGGTTTGTGGTTTAATTCTCTATCTGTTTCACTAGCCTATGGGCCGCTACAAGGTGGTTGT
AAGCAGTCTGTCTTTAGTAATAGGGCAACGTGTTGTTATGCTTATTCATACAATGGTCCTCGTTTGTGTAAAGGTGTTTATATT
GGTGAATTACAACAATATTTTGAATGTGGATTGCTGGTTTATGTAACTAAGAGTGATGGTTCTCGTATACAAACCAGGAATG
AACCACTTGTGTTAACTCATCACAATTATAATAATATTACTTTGGATAGGTGTGTAGAGTATAATATATATGGCAGATCTGGC
CAAGGTTTTATTACTAATGTAACAGCCGCAGCTGCCAATTATAATTATTTAGCAGATGGTGGTTTAGCCATCCTAGACACATC
TGGTGCCATAGACATCTTCGTTGTACAAGGTGAATATGGTCCTAATTATTATAAGGTTAACCCTTGTGAAGATGTTAACCAGC
AGTTTGTAGTGTCTGGTGGTGGCATAGTAGGTGTTCTCACATCGCATAATGAAACTGGTTCTCAACAGCTTGAAAATCTGTTT
TATGTTAAACTTACCAATAGTACACGTCGTACACGACGTTCTACTATAGCTAATGTCACAACTTGCCCTTATGTAAGTTATGG
CAGGTTTTGTATAAAACCAGATGGTTTAGTTTCAGAAATAGTACCACAAGAATTAGATTATTTTGTGGCACCTTTACTGAATG
TTACAGAACATGTACTCATACCTAATAGTTTTAATTTGACTGTTACTGACGAGTACATACAGACACGTATGGAGAAAGTTCAA
ATTAACTGCCTCCAATATGTTTGTGGTAATTCTATTGAGTGCAGAAACTTGTTTCAACAGTATGGTCCCGTTTGCGACAACAT
ATTGTCTATAGTGAATAGTGTTGGTCAAAGAGAGGATATGGAATCTTTAACTTTCTATTCCTCTACTAAACCAAAGGGTTATA
ATACACCAATCTTTAGTAATATTAGTACTGGTGATTTTAATATTTCTCTTATGTTAACACCACCAAGTAGTCCTAGTGGGCGTT
CTTTCATTGAAGATCTTTTATTTACAAGTGTTGAAACAGTTGGTTTGCCAACTGATGCTGAATATAAAAAATGCACAGCGGGA
CCTTTGGGTACTCTTAAAGATCTTATCTGTGCTAGGGAATATAATGGTTTATTAGTGTTGCCTCCAATTATTACGGCGGATATG
CAAACAATGTATACTGCTTCTTTAGTGGGTGCTATGGCCTTTGGTGGTATTACATCAGCTGCAGCCATACCTTTTGCTACTCAG
ATTCAGGCAAGAATTAATCATCTTGGTATTACACAGTCTTTGTTAATGAAAAATCAAGAAAAGATTGCTGCTTCCTTCAATAA
GGCCATTGGTCATATGCAGGAAGGTTTTAGAAGCACTTCGCTAGCATTACAACAGATTCAAGATGTTGTTAATAAGCAGAGT
GCTATTCTTACTGAAACTATGAATTCTCTTAATAAGAATTTTGGTGCTATTACATCAGTCATTCAAGATATTTACGCTCAACTT
GATGCAATTCAAGCAGATGCACAAGTTGACCGCCTTATTACTGGTAGACTTTCATCACTCTCAGTGCTAGCCTCTGCTAAACA
GTCTGAGTATATTAGAGTTTCCCAGCAGCGTGAATTAGCCACTCAAAAAATTAATGAGTGCGTTAAATCACAATCTAATAGG
TACGGATTTTGTGGTAGTGGAAGACATGTTCTTTCGATACCACAAAATGCACCTAATGGTATAGTGTTTATACACTTTACTTA
TACACCAGAGAGTTTTGTTAATGTTACTGCAATAGTGGGTTTTTGTGTAAGTCCTGCTAATGCTAGTCAGTATGCCATAGTAC
CTGCTAATGGAAGGGGTATTTTTATACAAGTTAATGGCACGTACTATATCACTGCACGTGATATGTATATGCCACGAGACATT
ACTGCAGGAGATATAGTTACTCTTACGTCTTGTCAAGCAAATTATGTTAATGTAAATAAAACCGTCATTACTACATTTGTAGA
AGATGACGATTTTGATTTTGATGATGAACTGTCAAAGTGGTGGAATGAAACTAAGCATGAGATACCAGACTTTGACGAGTTC
AATTATACAGTGCCCATACTTAACATTAGTAGTGAAATTGATCGTATTCAAGGTGTTATACAGGGTCTTAATGACTCCCTTAT
TAACCTTGAAGAACTTTCAATAATTAAAACTTATATTAAGTGGCCTTGGTATGTTTGGCTTGCCATAGGCTTTGCTATTATTAT
TTTTATCCTTATTTTAGGGTGGGTGTTTTTCATGACTGGTTGTTGTGGTTGTTGTTGTGGATGCTTTGGTATCATTCCCCTAATG
AGTAAGTGTGGTAAGAAATCTTCTTACTACACAACTTTTGATAATGATGTGGTAACTTAA

شکل ۳-۱- توالی ژن S1

www.SID.ir



شکل ۳-۲- درخت فیلوزنیک بر اساس توالی کامل ژن S1. این شکل رابطه‌ی بین سویه IS-1494 ویروس برونشست عفونی ایران و دیگر سویه‌های برونشیت عفونی را نشان می‌دهد. سایر توالی‌ها از gene-bank استخراج شدند.



شکل ۳-۳- درخت فیلوژنی براساس توالی قسمتی از ژن S1. این شکل رابطه بین سویه‌های IS-1494 برونشیت عفونی ایران و دیگر سویه‌های برونشیت را نشان می‌دهد. سویه‌های جدا شده در این مطالعه با علامت ●مشخص شده است.

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۳-۱- فراوانی و درصد شیوع سویه‌های برونشیت عفونی در نمونه‌های جمع‌آوری شده

سویه ویروس	فراوانی	درصد شیوع
793/B	۱۶	۲۸/۵۷
Var2	۳۶	٦٤/۳
QX	۱	۱/۸
Mass	۳	۵/۳
جمع	۵٦	

جدول ۳-۲- فراوانی سویه‌های جداشده از ویروس برونشیت عفونی در استان‌های تحت مطالعه

نام استان	تعداد نمونه	مثبت	ماساچوست	793/B	QX	IS-1494 like
گلستان	۱۰	٦	۱	۲		٤
کرمان	۱۰	٦		۲		۵
اردبیل	۱۰	۸		۲		٤
اصفهان	۱۰	۷	۱	۲		۵
آذربایجان شرقی	۱۰	٦		۱	۱	۳
کردستان	۱۰	۸		۳		۵
تهران	۱۰	۷	۱	۲		۵
خوزستان	۱۰	۸		۲		۵
جمع	۸۰	۵٦	۳	۱٦	۱	۳٦

۲-۳- نتایج عیارسنجی ویروس‌ها

پس از تزریق رقت‌های مختلف ویروس به تخم مرغ‌ها، تخم‌مرغ‌ها از نظر مرگ و میر جنینی بین روزهای ۲-۷ بررسی شدند. در انتهای روز هفتم پس از تلقیح، جنین‌های مرده و زنده از جهت ضایعات رایج IBV ، از جمله کوتولگی، پیچش، گرزی شکل شدن پاها و یا رسوبات اورات در مزونفروس کلیه مورد بررسی قرار گرفتند. تیترها به ترتیب ۵۰٪ دز علیه جنین (EID50) با روش Spearman-Karber محاسبه شدند. تیترهای ویروسی IBV برای هر دوز واکسن قبل از غیر فعال شدن $10^{6.5}$ EID50 تنظیم گردید.

Archive of SID

www.SID.ir

۳-۳- نتایج تولید واکسن تجربی

سویه واریانت۲ ایران یک جدایه تازه از سویه‌ی جدید واریانت ۲ است. ٤٨ ساعت پس از تزریق ویروس به درون حفره‌ی آلانتوئیک و مایع آلانتوئیک جمع‌آوری و تیتر ویروس تعیین گردید. تعیین تیترهای ویروسی، تیترهای برداشت شده از ویروس غیر فعال شدند. ویروس‌های برداشت شده با استفاده از فرمالین ۰,۱٪ غیرفعال شدند. غیرفعال سازی با پاساژ ویروس‌ها به تخم‌مرغ جنین‌دار تأیید گردید و جنین‌های تلقیح شده هیچ علائم خاص IBV مانند مرگ و میر، کوتولگی و بازماندگی از رشد، پیچش و رسوبات اورات در کلیه را پس از حداقل ۳ پاساژ کور نشان ندادند. ویروس‌های کشته شده با نسبت ۳۰ تا ۷۰ در یک فاز آبی از امولسیون اسیدهای معدنی ISA-70 ، (SEPPIC, Cosmotics/Pharmacy Division, Paris, France) امولسیون شدند .هر دوز واکسن شامل ۰,۵ میلی لیتر و ۰,۰۵ میلی گرم تیمورسال بود. واکسن تولیدی از نظر ویژگی‌های ظاهری، باقی‌ماندن فرمالین، ویسکوزیته و اندازه ذرات بررسی شد.

٤-۳- نتایج آزمون استریلیتی (سترونی)

آزمایش استریلیتی واکسن طبق فارماکوپه اروپا بند ۲,٦,۱ انجام شد. بدین منظور از محیط مایع تیوگلوکونات که بیشتر برای شناسایی باکتری های بی هوازی استفاده میگردد ولی قادر است باکتری های هوازی را هم شناسایی کند استفاده گردید و بعد از کشت در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شد. محیط کازئین – سویا برای شناسایی قارچ ها و باکتری های هوازی استفاده گردید و در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شد. محیط ها به مدت ١٤ روز گرمخانه گذاری شدند و رشد هیچ گونه میکروارگانیسمی مشاهده نگردید.

۵-۳- آزمون پایداری واکسن‌ها

پایداری واکسن‌ها با نگهداری واکسن به مدت یک هفته در دمای ۳۷°C و در دوره‌های مختلف در دمای ٤°C مورد آزمایش قرار گرفت. در این آزمون پس از طی مدت زمان بیان شده، تغییر فیزیکی در واکسن مشاهده نشد و با اندکی تکان واکسن مجدداً وضعیت امولسیونی سابق خود را به دست آورد. بنابراین واکسن برای یک هفته در دمای ۳۷°C و حداقل ۳ ماه در دمای ٤°C بدون هیچ گونه تغییری پایدار خواهد بود.

٦-۳- نتایج آزمون بی‌ضرری (ایمنی)

جوجه‌های SPF بعد از تزریق زیرجلدی واکسن برای مدت ۲۱ روز برای واکنش‌های غیر طبیعی مورد بررسی قرار گرفتند. این واکسن‌ها برای مرغ‌ها ایمن بودند و هیچ یک از پرندگان تلقیح شده واکنش‌های غیر طبیعی موضعی یا سیستمیک نشان ندادند.

Archive of SID

www.SID.ir

۳-۷- نتایج بررسی تیتر آنتی‌بادی علیه واریانت ۲ ویروس برونشیت عفونی

جوجه‌های مورد استفاده در مرحله قبل، سه هفته بعد از واکسیناسیون خونگیری شده و سرم آن‌ها برای تعیین میزان آنتی بادی توسط آزمون الایزا آزمایش شد. نتایج اندازه‌گیری میزان آنتی‌بادی در جدول شماره ۳-۳ قابل مشاهده می‌باشد.

جدول شماره ۳-۳- میانگین تیتر آنتی‌بادی علیه ویروس برونشیت عفونی مورد آزمایش سه هفته بعد از واکسیناسیون در جوجه‌ها

گروه	نوع واکسن	تیتر الایزا (ng/ml)
۱	واریانت ۲	۸۳۲
۲	M41	۵۵۵
۳	کنترل منفی	۰

۳-۸- نتایج بررسی تیتر آنتی‌بادی علیه ویروس برونشیت عفونی در جوجه‌های SPF پیش از چالش با واریانت ۲

در این مرحله با توجه به نتایج آزمایش اول و مشورت محققین این ویروس در دانشگاه جرجیا و دانشگاه اوترخت هلند، تصمیم گرفته شد در ابتدا جوجه‌ها با واکسن زنده‌ی H120 ایمن گردند تا تیتر آنتی‌بادی بالاتری به دست آید. بدین منظور سه گروه از جوجه‌های یک روزه با واکسن H120 واکسینه گردیدند. سپس هر کدام از گروه‌ها در سه هفتگی مجدداً با واکسن کشته به صورت زیر جلدی واکسینه شدند. یک گروه نیز بعنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. گروه‌ها به شرح زیر بود:

گروه اول: واکسن واریانت ۲

گروه دوم: واکسن M41

گروه سوم: گروه کنترل

سه هفته بعد، از جوجه‌ها خونگیری به عمل آمد و سرم جوجه‌ها مورد بررسی سرولوژیکی با الایزا (IDEXX) قرار گرفت. نتایج آزمون سرولوژیکی این مرحله در جدول ۳-٤ آورده شده است.

جدول ۳-٤- نتایج میانگ تیتر انتی‌بادی در جوجه‌های دریافت کننده‌ی واکسن زنده H120 و واکسن کشته پیش از چالش با واریانت ۲

گروه	نوع واکسن	تیتر الایزا (ng/ml)

Archive of SID

www.SID.ir

۱	واریانت ۲	[a]٤٦٠٠
۲	M41 (تجاری)	[a]٤٩٤٠
۳	کنترلH120	[b]۱۰۰۰
٤	کنترل منفی	[c]۰

*اعداد متفاوت نشانگر اختلاف آماری معنی‌دار است (p<۰/۰۵)

۹-۳- نتایج ارزیابی حفاظت علیه جدایه واریانت ۲ ویروس برونشیت عفونی

از آن‌جایی که واکسن اتوژن حاصل به منظور جلوگیری از بیماری تنفسی در جوجه‌ها تولید گردید. حدود ٤ هفته پس از واکسیناسیون جوجه‌های هر گروه به روش قطره چشمی با $EID50 / 10^3$ توسط ویروس واریانت۲مواجهه داده شدند. میزان مرگ و میر جوجه‌ها تا روز پنج بعد از مواجهه ثبت گردید. میزان محافظت واکسن آزمایشی در برابر چالش با واریانت ۲ در گروه‌های مورد مطالعه، در جدول ۳-۳ نشان داده شده‌است. پنج روز پس از مواجهه جوجه‌ها اوتانایز گردیدند و فعالیت مژک‌های نایی بررسی گردید. ده حلقه نازک نایی(شماره‌های ۳ از بالا و پایین و ٤ از وسط سینه) از هر پرنده انتخاب شد. نتایج محافظت مژک‌های نایی در برابر واریانت ۲ ویروس برونشیت عفونی در جدول ۳-۵ نشان داده شده است.

جدول ۳-۵- میزان محافظت در برابر واریانت ۲ ویروس برونشیت عفونی در گروه‌های تحت مطالعه

گروه	نوع واکسن	میزان محافظت
۱	واریانت ۲	[a]٦٧٪
۲	M41	[a]٦٠٪
۳	H120	[b]۳۰٪

*اعداد متفاوت نشانگر اختلاف آماری معنی‌دار است (p<۰/۰۵)

Archive of SID

www.SID.ir

Archive of SID

فصل چهارم

www.SID.ir

بحث و نتیجه گیری

Archive of SID

www.SID.ir

ویروس برونشیت عفونی یک بیماری مسری ویروسی است که توانایی آلوده کردن جوجه ها در تمام سنین را دارد بگونه ای که پرندگان جوانتر علائم شدیدتری از بیماری و مرگ و میر بیشتر به ویژه در مواردی که با عفونت های همزمان ثانویه باکتریایی همراه می شوند نشان می دهد. بیماری زایی این ویروس در حقیقت مربوط به دستگاه تنفسی و کلیوی جوجه ها می شود اما این موارد زمینه ساز کاهش وزن، کاهش تخم و بدشکلی در تخم ها نیز می گردد که در نهایت منجربه افزایش تلفات پرندگان به ویژه در حالت تولید صنعتی می شود (Cavanagh & Gelb, 2008).

همانگونه که پیش تر شرح داده شد این ویروس از خاصیت جهش زایی و نوترکیب بالایی بر خوردار بوده که نتیجه آن تغییرات آنتی ژنی shift و drift است. از این رو بزرگ ترین چالش در زمینه طرح های تولید واکسن، از خصوصیات ذاتی این ویروس می باشد (Cook et al, 2012).

تفاوت ژنوتیپی این ویروس که گستره جهانی دارد می تواند به واسطه دو عامل اصلی رخ دهد: ۱- مهاجرت پرندگان به نقاط مختلف جهان، ۲- استفاده از واکسن های تخفیف حدت یافته (Liu et al, 2006). اگرچه واکسیناسیون یک امر عادی در طی دوران پرورش طیور است با این حال اپیدمی های این ویروس در مزارع صنعتی پرورش طیور باعث خسارات جبران ناپذیری می گردد.

در ایران اولین گزارش جداسازی ویروس به سال ۱۹۹٤ از مزارع پرورش مرغ بر می گردد. امروزه از سویه های Ma5، H120 و ٤/۹۱ برای کنترل بیماری زایی ویروس در مزارع پرورش طیور استفاده می گردد (Hashemzadeh et al, 2013; Seyfi abad et al, 2004). با این وجود گزارشاتی مبنی بر رخ داد بیماری از سراسر کشور به دلیل شکست ایمنی وجود دارد. دلیل این امر نیز، عدم امکان القاء حفاظت متقاطع از جانب سویه های واکسن با سویه های بیماری زایی است که به طور مستمر ظهور پیدا می کنند. از این رو مشخص کردن تمامی سویه ها بویژه سویه های غالب کشور از ضروریات تهیه واکسن مناسب برای مقابله با بیماری است. بنابر این در بخش ابتدایی این طرح سویه های غالب کشور براساس ژن گلیکوپروتئین اسپایک (S) شناسایی وتأیید شدند. این مطالعه نشان داد جدایه‌های بدست آمده متعلق به گروه‌های فیلوژنتیک متمایزی هستند. بر این اساس جدایه‌ها در چهار گروه شبه QX، شبه ماساچوست، 793/B و شبه واریانت ۲ (IS/1494/06) قرار گرفتند و پرتکرارترین ژنوتیپ شناسایی شده جدایه‌های مشابه واریانت ۲ بودند که شیوعی حدود ٦٤٪ دارد. این ژنوتیپ بیشترین اشتراک را با IS/1494/06، Turkey/TR8، CLEVB-2 /IBV/012/Eg دارد. واریانت ۲ IS/1494/06 یکی از جدایه های گزارش شده از فلسطین اشغالی است و اطلاعات آن در بانک ژنی (EU350551) به عنوان اولین گزارش ثبت گردیده است. در سال ۲۰۰۱ در مصر جدایه Egypt/Beni-Suef/01 گزارش گردید که ۹۹ درصد با IS/1494/06 واریانت ۲ جداسازی شده در اردن مشابهت دارد (Ababneh et al, 2012; Abdel-Moneim et al, 2012). در سال ۲۰۱۱ از سوآپ نای جوجه ها ۸ نمونه Turkish IBVs جداسازی گردید که همه آن ها مشابه

Archive of SID

www.SID.ir

EU780077 (IS/1494/06 IBV strain) با ۹۹ درصد تشابه بودند. بنابر این به نظر می رسد که این نوع زنوتیپ از برونشیت عفونی در میان کشورهای خاورمیانه گسترش یافته و غالب است (Kayha et al, 2013).

توالی شناسایی شده S1 از جدایه TR8 Turkish که توسط Kahya گزارش گردیده است با مطالعات ما (شبه واریانت ۲)، ۹۹/۲۲ درصد تشابه دارد (۲٤). در مصر جدایه Eg/CLEVB-2/IBV/012 در سال ۲۰۱۲ با شبه واریانت ۲ حاصل از ماطلعه ما ۹۹/۲۲ درصد تشابه دارد. در سال IBV/chicken/Egypt/VRLCU154/2012 جداسازی شده از سوآپ نای جوجه های گوشتی که مشکوب به عفونت همزمان با ویروس بیماری نیوکاسل در مصر بود تشابه زیادی با IS/1494/06 داشت (Hussein et al, 2014).

مطالعات دیگر از IBV جداشده از جوجه های گوشتی و لاین در مصر نشان داد که ۱۱ تا از ۱۳ جدایه تشابه زیادی با واریانت جداشده از فلسطین اشغالی داشته است (Selim et al, 2013). در لیبی ۱۲ سویه از ویروس از جوجه های گوشتی مبتلا به بیماری تنفسی و مرگ و میر بالا به دست آمد که توالی ژن S1 ان ها متفاوت بود. همچنین توالی از یک مزرعه شناسایی شد که به طور ۱۰۰ درصد مشابه Eg/CLEVB-2/IBV/012 و IS/1494/06 بود (Awad et al, 2014). همچنین از سوآپ های حاصله از اروفارنژیال ۲٤۳ مرغ خانگی در سال ۲۰۱۲ ، ۲/٥٦ درصد همولوزی بالایی با IS/1494/06داشتند (Al-Shekaili et al, 2015). در عمان جدایه Oman/Ibri/4/12 (KJ206465) ۹۹ درصد تشابه با جدایه مشابه واریانت ۲ در مطالعه ما نشان داد. علاوه بر این جدایه مشابه واریانت ۲ مشابه سویه‌های IBV/chicken/Kurdistan-Sulaymania/ 12VIR10065-5/ در عراق می باشد. بنابراین استفاده از واریانت ۲ برای واکسیناسیون می تواند برای کنترل بیماری برونشیت عفونی مناسب باشد.

دومین ژنوتیپ غالب ویروس ٤/۹۱ با شیوع۲۱ درصدی است. به علاوه بیشترین جدایه های گروه ۲ کاملا مشابه سویه واکسن ٤/۹۱، IR-Razi-HKM4-2010 و JX909289) IR/15/2011) از ایران، CK/CH/LSD/110857 KP118885)) از چین و (AB626887) از هند بود. از آنجایی که ٤/۹۱ به عنوان واکسن در کشور مصرف می شود، شیوع بالای 793/B ممکن است بازتاب دهنده جداسازی مجدد سویه واکسن باشد.

ژنوتیپ شبه QX سومین نوع ویروس غالب در طیور کشور است. در سپتامبر ۱۹۹٦، اپیدمی از بیماری در چین رخ داد و در سال ۲۰۰۱ مشخص گردید که بیشتر جدایه ها از نوع QX می باشند (Terregino et al, 2008). همچنین مشخص گردیده است که در کشورهای هلند، بلژیک و آلمان ژنوتیپ شبه QX غالب ترین نوع از ویروس است (Worthington et al, 2008). از طرفی دیگر شیوع سویه های شبه QX در ایتالیا، اسلوونی، لهستان، انگلستان، مجارستان و سوئیس نیز گزارش شده است.

Archive of SID

www.SID.ir

در سال ۲۰۰۹ در عراق یک واریانت متفاوت از شبه QX جداسازی شد (Amin et al, 2012). در سال ۲۰۱۱، ۵ جدایه CK/CH/LDL/97I از ویروس برونشیت عفونی در اپیدمی عراق، اردن و عربستان سعودی شناسایی شدند.

جدایه شبه QX در این مطالعه بیش از ۹۶ درصد تشابه نوکلئوتیدی با QX اصلی AF193423 نشان داد. به دلیل برگشت پذیری اثر QX در تولید مثل، مطالعات آینده بر روی این سویه باید بر روی مرغ های تخم گذار و لاین باشد تا جایی که واکسن هایی بر پایه‌ی این سویه رای آن ها ساخته شود.

اولین گزارش از جداسازی ویروس برونشیت عفونی در ماساچوست به سال ۱۹۳۰ بر می گردد. جدایه نوع Mass تشابه ۱۰۰ درصدی با با H120 و MA5 و ۹۷/۵در صدی با سویه Beaudette دارد. به عنوان واکسن زنده تخفیف حدت یافته IBV (مثل سویه های شبه Mass ، H120 و Ma5) استفاده می شوند برای مزارع پرورش طیور در ایران. تنها ۲ درصد از جدایه ها متعلق به ژنوتیپ IR-1 بوده که برای اولین بار توسط هاشم زاده در سال ۲۰۱۲ گزارش گردید (Hashemzadeh et al, 2013). سویه‌ی IR-1 تاکنون از دیگر بخش های خارج از ایران گزارش نشده است. زیرا تغییرات ژنی در توالی این ژن رخ نداده است و توالی یابی کامل این ژنوتیپ لازم است تا منشاء آن مشخص گردد و همچنین امکان نوترکیب بودن آن نیز روشن شود.

نتایج واکسیناسیون به ما نشان داد که از آن‌جایی که واکسن اتوژن حاصل، به منظور جلوگیری از بیماری تنفسی در جوجه‌ها تولید گردید، واکسن تهیه شده از واریانت ۲ و M41 حفاظت بهتری نسبت H120 ایجاد کرده است. این نتایج با بررسی تیتر آنتی بادی ها در سرم خون جوجه ها نیز تأیید گردیده است. اگرچه اختلاف میزان حفاظت بین دو سویه M41 و واکسن آزمایشگاهی واریانت ۲ از نظر آماری معنی‌دار نبود لیکن در کل گله ۷٪ افزایش حفاظت رقم قابل توجهی است و از نظر ساختاری بسیار معنی‌دار می‌باشد. با این وجود به منظور افزایش میزان حفاظت بهبود روش تهیه واکسن در آینده ضروری می‌باشد. در مطالعه‌ی Awad و دیگران در سال ۲۰۱۵ واکسیناسیون جوجه‌ها با ترکیبی از سویه‌های H120 و 793B توانست ایمنی محتفظت کننده‌ای در جوجه‌ها علیه سویه‌های IS/1494 و IS/885 ایجاد کند (Awad et al, 2015).

نتیجه گیری

نتایج این طرح نشان داد که در حال حاضر واریانت ۲ سویه غالب کشور است، این سویه هم اکنون تهدیدی برای اتحادیه اروپا نیز به حساب می آید. بررسی‌ها نشان می‌دهند که تاکنون هیچ گونه سیاست واکسیناسیون رایجی در کشور و منطقه نتوانسته این سویه را کنترل کند. طبق مطالعات صورت‌گرفته میزان محافظت علیه این ویروس با واکسن های زنده‌ی ماساچوست و ۷۹۱ به حدود ۷۰٪ می‌رسد. اگرچه گزارشات تجاری این عدد را بالای ۸۰٪ نشان می دهند. با این وجود شرایط مزرعه و افزایش بی سابقه سهم این ویروس با محافظت ۸۰٪ در تضاد است. از سوی دیگر برخی از کمپانی های

Archive of SID

www.SID.ir

واکسن سازی در فلسطین اشغالی شروع به ساخت واکسن زنده و کشته ی این سویه نموده اند. بر مبنای ادعای آنها، تنها راهبرد مبارزه و کنترل این ژنوتیپ استفاده از واکسن اتوژن می باشد.

با توجه به مسائل ذکر شده و همچنین منابع موجود مبنی بر اینکه استفاده از واکسن اتوژن می‌تواند بسیار مفید واقع شود، با ترکیب این واکسن با سویه‌ی مادر M41 و تزریق آن در هنگام تولید مرغان مولد می توان انتظار داشت که یک گله در سطح تولید محافظت گردد (تخمگذار و مادر) و مهم‌تر از آن با انتقال آنتی بادی مادری علیه این ژنوتیپ از طریق زرده جوجه‌ها در هفته اول در برابر برونشیت عفونی محافظت خواهند شد. امید است با سرمایه گذاری بتوانیم واکسن زنده تخفیف حدت یافته این ویروس را نیز در کشور تولید نماییم.

Archive of SID

www.SID.ir

فهرست منابع

Ababneh M, Dalab AE, Alsaad S, Al-Zghoul M (2012) Presence of Infectious Bronchitis Virus Strain CK/CH/LDL/97I in the Middle East. ISRN Vet Sci 2012:1–6

Abdel-Moneim AS, Afifi MA, El-Kady MF (2012) Emergence of a novel genotype of avian infectious bronchitis virus in Egypt. Arch Virol 157:2453–2457.

Adzhar, A., et al. (1997). "Molecular analysis of the 793/B serotype of infectious bronchitis virus in Great Britain." Avian Pathology **26**(3): 625-640.

Adzhar, A., et al. (1996). "Universal oligonucleotides for the detection of infectious bronchitis virus by the polymerase chain reaction." Avian Pathology **25**(4): 817-836.

Al-Shekaili T, Baylis M, Ganapathy K (2015) Molecular detection of infectious bronchitis and avian metapneumoviruses in Oman backyard poultry. Res Vet Sci 99:46–52.

Amin OG, Valastro V, Salviato A, Drago A, Cattoli G, Monne I (2012) Circulation of QX-like infectious bronchitis virus in the Middle East. Vet Rec 171:530.

Awad F, Baylis M, Ganapathy K (2014) Detection of variant infectious bronchitis viruses in broiler flocks in Libya. Int J Vet Sci Med 2:78–82.

Awad, F., Forrester, A., Baylis, M., Lemiere, S., & Ganapathy, K. (2015). Protection conferred by live infectious bronchitis vaccine viruses against variant Middle East IS/885/00-like and IS/1494/06-like isolates in commercial broiler chicks. Veterinary record open, 2(2), e000111.

Boltz, D. A., et al. (2004). "Avian infectious bronchitis virus: a possible cause of reduced fertility in the rooster." Avian diseases **48**(4): 909-915.

Cavanagh, D. (1991). Sequencing approach to IBV antigenicity and epizootiology. Proceedings of the second international symposium on infectious bronchitis, Rauischholzhausen.

Cavanagh, D., Elus, M.M. & Cook, J.K.A. (1997). Relationship between sequence variation in the S1 spike protein of infectious bronchitis virus and the extent of cross-protection in vivo. Avian Pathology 26, 63-74.

Cavanagh, D., K. Mawditt, P. Britton and C. Naylor (1999). "Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reactions." Avian Pathology **28**(6): 593-605.

Cavanagh, D. and S. Naqi (2003). "Infectious bronchitis." Diseases of poultry **11**: 101-119.

Cook, J. K ,.J. Darbyshire and R. Peters (1976). "The use of chicken tracheal organ cultures for the isolation and assay of avian infectious bronchitis virus." Archives of virology **50**(1-2): 109-118.

Boursnell, M., et al. (1987" .(Completion of the sequence of the genome of the coronavirus avian infectious bronchitis virus." Journal of general virology **68**(1): 57-77.

Broadfoot, D. and W. M. Smith (1954). "Effects of infectious bronchitis in laying hens on egg production, percent unsettable eggs and hatchability." Poultry Science **33**(3): 653-654.

Burger, A. G., et al. (1988). Infectious bronchitis vaccines, Google Patents.

Archive of SID

www.SID.ir

Callison, S., et al. (2001). "Molecular characterization of infectious bronchitis virus isolates foreign to the United States and comparison with United States isolates." Avian diseases: 492-499.

Cavanagh, D. (2007). "Coronavirus avian infectious bronchitis virus." Veterinary research **38**(2): 281-297.

Cavanagh, D. and S. Naqi (2003). "Infectious bronchitis ".Diseases of poultry **11**: 101-119.

Cook, J., et al. (2001). "Protection of chickens against renal damage caused by a nephropathogenic infectious bronchitis virus." Avian Pathology **30**(4): 423-426.

Cook, J., et al. (1991). "Effect of in ovo bursectomy on the course of an infectious bronchitis virus infection in line C White Leghorn chickens." Archives of virology **118**(3-4): 225-234.

Cook, J. K. (1984). "The classification of new serotypes of infectious bronchitis virus isolated from poultry flocks in Britain between 1981 and 1983." Avian Pathology **13**(4): 733-741.

Cook, J. K., et al. (1987). "Comparison of the haemagglutination inhibition test and the serum neutralisation test in tracheal organ cultures for typing infectious bronchitis virus strains ".Avian Pathology **16**(3): 505-511.

Cook, J. K., et al. (1986). "Infectious bronchitis immunity: its study in chickens experimentally infected with mixtures of infectious bronchitis virus and Escherichia coli." Journal of general virology **67**(7): 1427-1434.

Cook, J. K. A. (2000). Poultry vaccine, Google Patents.

Cook J.K.A., Jackwood M. & Jones R.C. (2012). The long view: 40 years of infectious bronchitis research. Avian Pathology 41, 239-250.

Cowen, B. and S. Hitchner (1975). "Serotyping of avian infectious bronchitis viruses by the virus-neutralization test." Avian diseases: 583-595.

Da Silva Martins, N., et al. (1991). "IgM responses in chicken serum to live and inactivated infectious bronchitis virus vaccines." Avian diseases: 470-475.

Davelaar, F., et al. (1984). "Occurrence and significance of infectious bronchitis virus variant strains in egg and broiler production in the Netherlands." Veterinary Quarterly **6**(3): 114-120.

de Haan, C. A., et al. (1999). "Mapping of the coronavirus membrane protein domains involved in interaction with the spike protein." Journal of virology **73**(9): 7441-7452.

De Haan, C. A., et al. (2000" .(Assembly of the coronavirus envelope: homotypic interactions between the M proteins." Journal of virology **74**(11): 4967-4978.

De Wit, J. (2000). "Detection of infectious bronchitis virus." Avian Pathology **29**(2): 71-93.

De Wit, J., et al. (2011). "Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures." Avian Pathology **40**(3): 223-235.

European Pharmacopoeia Commission, & European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare. (2010). European pharmacopoeia (Vol. 1). Council of Europe.

Gelb Jr, J., et al. (1981). "Serologic and cross-protection studies with several infectious bronchitis virus isolates from Delmarva-reared broiler chickens." Avian diseases: 655-666.

Gelb Jr, J., et al. (1991). "Variant serotypes of infectious bronchitis virus isolated from commercial layer and broiler chickens." Avian diseases: 82-87.

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

Hussein AH, Emara M, Rohaim M, Ganapathy K, Arafa A (2014) Sequence analysis of infectious bronchitis virus IS/1494 like strain isolated from broiler chicken co-infected with Newcastle disease virus in egypt during 2012. Int J Poultry Sci 13:530–536.

Ignjatović, J. and S. Sapats (2000" .(Avian infectious bronchitis virus." Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics) **19**(2): 493-508.

Archive of SID

www.SID.ir

Jackwood, M. W., et al. (1992). "Infectious bronchitis virus detection in allantoic fluid using the polymerase chain reaction and a DNA probe." Avian diseases: 403-409.

Johnson, M. A., et al. (2003). "A recombinant fowl adenovirus expressing the S1 gene of infectious bronchitis virus protects against challenge with infectious bronchitis virus." Vaccine **21**(21): 2730-2736.

Kahya S, Coven F, Temelli S, Eyigor A, Carli KT (2013) Presence of IS/1494/06 genotype-related infectious bronchitis virus inbreeder and broiler flocks in Turkey. Ankara U¨ niv Vet Fak Derg 60:27–31.

Klumperman, J., et al. (1994). "Coronavirus M proteins accumulate in the Golgi complex beyond the site of virion budding." Journal of virology **68**(10): 6523-6534.

Kwon, H. M. and M. W. Jackwood (1995). "Molecular cloning and sequence comparison of the S1 glycoprotein of the Gray and JMK strains of avian infectious bronchitis virus." Virus Genes **9**(3): 219-229.

Kwon, H. M., et al. (1993). "Differentiation of infectious bronchitis virus serotypes using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis." Avian diseases: 194-202.

Lin, Z., et al. (1991). "A new typing method for the avian infectious bronchitis virus using polymerase chain reaction and restriction enzyme fragment length polymorphism." Archives of virology **116**(1-4.19-31 :(

Liu S, Zhang Q, Chen J, Han Z, Liu X, Feng L, Shao Y, Rong J, Kong X, Tong G (2006) Genetic diversity of avian infectious bronchitis coronavirus strains isolated in China between 1995 and 2004. Arch Virol 151:1133–1148.

Locker, J. K., et al. (1992). "O-glycosylation of the coronavirus M protein. Differential localization of sialyltransferases in N-and O-linked glycosylation." Journal of Biological Chemistry **267**(20): 14094-14101.

Marangon, S. and L. Busani (200" .(7The use of vaccination in poultry production." Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties **26**(1): 265.

Mahmood, Z. H., R. R. Sleman and A. U. Uthman (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**(1): 21-27.

McMARTIN, D. A. (1993). "Infectious bronchitis." Virus infections of vertebrates. JB McFerran and MS McNulty, eds. Elsevier Sci. Publ., Amsterdam, the Netherlans: 249-275.

Meulemans, G., et al. (2001). "Epidemiology of infectious bronchitis virus in Belgian broilers: a retrospective study, 1986 to 1995." Avian Pathology **30**(4): 411-421.

MILLER, L. T. and V. J. YATES (196" .(8Neutralization of infectious bronchitis virus human sera." American journal of epidemiology **88**(3): 406-409.

Minta, Z., et al. (1990). "Infectious bronchitis in broilers." Medycyna Weterynaryjna **46**(10): 379-380.

Narayanan, K., et al. (2000). "Characterization of the coronavirus M protein and nucleocapsid interaction in infected cells." Journal of virology **74**(17): 8127-8134.

Nguyen, V.-P. and B. G. Hogue (1997). "Protein interactions during coronavirus assembly." Journal of virology **71**(12): 9278.9284-

Norkin, L. C. (2010). Virology: molecular biology and pathogenesis, ASM press.

Parsons, D., et al. (1992). "Characterisation of an infectious bronchitis virus isolated from vaccinated broiler breeder flocks." The Veterinary Record **131**(18): 408-4.11

Pattison, M. (2008). Poultry diseases, Elsevier Health Sciences.

Purchase, H. G. and A. A. o. A. Pathologists (1989). A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens, Kendall.

Raj, G. D. and R. Jones (1996). "Protectotypic differentiation of avian infectious bronchitis viruses using an in vitro challenge model." Veterinary microbiology **53**(3): 239-252.

Raj, G. D. and R. Jones (1997). "Effect of T-cell suppression by cyclosporin on primary and persistent infections of infectious bronchitis virus in chickens." Avian Pathology **26**(2): 257-276.

Archive of SID

www.SID.ir

Raj, G. D. and R. Jones (1997). "Infectious bronchitis virus: immunopathogenesis of infection in the chicken." Avian Pathology **26**(4): 677-706.

Reference, W. C. C. f. and R. o .Influenza (1982). Concepts and procedures for laboratory-based influenza surveillance, US Department of Health and Human Services.

Saif, L. J. (1993). "Coronavirus immunogens." Veterinary microbiology **37**(3): 285-297.

Sambrook, J. and D. W. Russell (20" .(01Molecular cloning: a laboratory manual 3rd edition." Coldspring-Harbour Laboratory Press, UK.

Sapats, S., et al. (1996). "Novel variation in the N protein of avian infectious bronchitis virus." Virology **226**(2): 412-417.

Selim K, Arafa AS, Hussein HA, El-Sanousi AA (2013) Molecular characterization of infectious bronchitis viruses isolated from broiler and layer chicken farms in Egypt during 2012. Int J Vet Sci Med 1:102–108.

Seyfi Abad Shapouri M, Mayahi M, Assasi K, Charkhkar S (2004) A survey of the prevalence of infectious bronchitis virus type 4/91 in Iran. Acta Vet Hung 52:163–166.

SNEED, L. W., et al. (198" .(9Comparisons of the structural proteins of avian infectious bronchitis virus as determined by Western blot analysis." Viral immunology **2**(3): 221-227.

Terregino C, Toffan A, Serena Beato M, De Nardi R, Vascellari M, Meini A, Ortali G, Mancin M, 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 Pathol 37:487–493.

Vegad, J. (2008). Poultry diseases: a guide for farmers and poultry professionals, IBDC Publishers.

Vennema, H., et al. (1996). "Nucleocapsid-independent assembly of coronavirus-like particles by co-expression of viral envelope protein genes." The EMBO journal **15**(8): 2020.

Voß, D., et al. (2009). "Studies on membrane topology, N-glycosylation and functionality of SARS-CoV membrane protein." Virology journal **6**(1): 1.

Wang, C.-H. and Y.-C. Huang (2000). "Relationship between serotypes and genotypes based on the hypervariable region of the S1 gene of infectious bronchitis virus." Archives of virology **145**(2): 291-300.

Wang, C.-H. and C.-T. Tsai (1996). "Genetic grouping for the isolates of avian infectious bronchitis virus in Taiwan." Archives of virology **141**(9): 1677-1688.

Wang, J., et al. (2009). "Interaction of the coronavirus infectious bronchitis virus membrane protein with β-actin and its implication in virion assembly and budding." PLoS One **4**(3): e4908.

Worthington KJ, Currie R, Jones RC (2008) A reverse transcriptase- polymerase chain reaction survey of infectious bronchitis virus genotypes in Western Europe from 2002 to 2006. Avian Pathol 37:247–257.

آزاد, گ. ا. (1382). شناسایی و تعیین خصوصیات مولکولی ویروس برونشیت عفونی طیور با استفاده از روش RT-PCR/RFLP. دانشکده دامپزشکی. تهران, دانشگاه تهران. دکترای تخصصی.

مرندی, د. م. و., et al. (2001). "جداسازی و شناسایی ویروسهای برونشیت عفونی طیوردر بین سالهای 79-1376 از مرغداریهای صنعتی ایران." مجله تحقیقات دامپزشکی (Journal of Veterinary Research) **56**(3).

Archive of SID

www.SID.ir

Abstract

Economic loss in poultry breeding has increased in recent years. A large amount of these losses is because of disease outbreaks. Infectious bronchitis (IB) is an acute and highly contagious respiratory disease of chicken, caused by infectious bronchitis virus (a corona virus). IB is on the list of OIE reportable diseases list. Annual mortality and morbidity rates of this disease are high in Iran despite overall vaccination programs. IBV is able to involve breeders, broillers and layers. IB has become one of the most prevalent and challenging diseases in Iran in last decade. IBV has great variablity genetically and phenotypically, with hundreads of serotypes and strains described. The RNA forms a single strand and single segment. IBV diversity is mainly based on transcriptional error, which may become very relevant if occurring in genomic sequences coding for proteins, involved in adsorption to target cell or inducing immune responses. The advantage of using native strains of each area in vaccine production has been well documented. This study was designed with the aim of identification of most prevalent IBV in Iran and evaluating its application as autovaccine in poultry. The results indicated Varient 2 as the most prevalent strain in Iran. This strain was used in inactivated vaccine production according to OIE instructions. Comparison the immunization of this vaccine with the commercial vaccine showed increase in survival rates by 7% ($p>0.05$). It can be concluded that with combinmation of the mentioned autovaccine with M41 vaccine, suitable protection will be achieved in chickens.

Archive of SID

www.SID.ir