بررسی مولکولی میزان ابتلا به بیماری برونشیت عفونی در گله‌های طیور گوشتی

نجمه معتمد[1*]، محسن بشاشتی[2]، محمدحسین فلاح مهرآبادی[2]

۱- استادیار، بخش تحقیق و تولید واکسن‌های طیور، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج ، ایران.
۲- استادیار، بخش تحقیق و تشخیص بیماری‌های طیور، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

دریافت مقاله: ۱۲ دی ۱۳۹۹، بازنگری: ۲۵ بهمن ۱۳۹۹، پذیرش نهایی: ۱۰ اسفند ۱۳۹۹

چکیده

از بیماری‌های مهم در صنعت پرورش طیور بیماری برونشیت عفونی است که علی‌رغم واکسیناسیون گسترده گله‌های صنعتی سالیانه خسارات اقتصادی سنگینی را بر این صنعت در کشور و دنیا تحمیل می‌کند. هدف از این مطالعه شناسایی میزان ابتلا به بیماری برونشیت عفونی در گله‌های گوشتی تجاری دارای علائم تنفسی و تلفات بود. از تعداد ۳۵ مزرعه مرغ گوشتی مبتلا به سندرم تنفسی در مناطق مرکزی و جنوب ایران در سال ۱۳۹۸ نمونه‌های بافت نای و کلیه تهیه و برای بررسی حضور ویروس برونشیت عفونی با روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز آشیانه‌ای معکوس ارزیابی شدند. فراوانی شناسایی ویروس برونشیت عفونی در مجموع از ۳۵ مزرعه ۱۵ مورد (۴۲/۸۵ درصد) بود. برای تعیین ژنوتیپ ویروس‌های برونشیت از توالی‌یابی پارشیال ژن پروتئین اسپایک۱ استفاده شد که نتایج منجر به شناسایی دو ژنوتیپ ماساچوست و واریانت ۲ گردید. بر اساس آنالیز فیلوژنی ویروس‌های واریانت ۲ در دودمان GI- ۲۳ قرار می‌گیرند که فراوانی آن در کشور طی سال‌های اخیر رو به افزایش است. ویروس‌های ماساچوست جدا شده از لحاظ فیلوژنی با ویروس‌های واکسن سروتیپ ماساچوست در یک کلاستر قرار نداشتند تعیین بیماری‌زایی این جدایه‌ها نیاز به مطالعات تکمیلی دارد. نتایج مطالعه حاضر بیانگر این است که در کشور علی‌رغم واکسیناسیون گسترده علیه بیماری برونشیت عفونی همچنان ویروس می‌تواند منجر به بیماری حتی در گله‌های واکسینه شود.

واژگان کلیدی: *برونشیت عفونی، سندروم تنفسی، واکنش زنجیره پلی‌مراز، گله گوشتی*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: motamed62@yahoo.com

مقدمه

برونشیت عفونی یک بیماری عفونی حاد و بسیار واگیر ماکیان با گستردگی جهانی است که از نظر اقتصادی اهمیت زیادی داشته و از جمله عوامل ایجاد کننده کمپلکس تنفسی در ماکیان محسوب می‌گردد. تولید صنعتی و متراکم طیور باعث افزایش سرعت انتقال بیماری و تشدید آن شده و علی‌رغم واکسیناسیون گسترده هنوز طغیان‌های بیماری در گله‌های تجاری رخ می‌دهد و این بیماری را به‌عنوان یکی از مهم‌ترین چالش‌های صنعت طیور حتی در کشورهای پیشرفته بدل کرده است. ارگان هدف ویروس سلول‌های اپی‌تلیال دستگاه تنفسی و ادراری-تناسلی ماکیان بوده و نشانه‌های بیماری بسته به سویه ویروس ممکن است شامل درگیری دستگاه تنفس، عطسه، سرفه، دیسترس تنفسی، رال تنفسی و افزایش ضریب تبدیل خوراک، ضایعات کلیوی و در گله‌های تخم‌گذار و مادر افت تولید تخم و دفرمیتی و کاهش کیفیت داخلی و خارجی تخم‌مرغ‌ها متغیر باشد. واگیری بیماری تا ۱۰۰ درصد و تلفات تا بیش از ۵۰ درصد در صورت همراه شدن با عوامل پاتوژن ثانویه از جمله کلی‌باسیلوز گزارش شده است (۱). ویروس بیماری برونشیت عفونی یک RNA ویروس از جنس گاما کرونا ویروس است و ژنوم ۲۷/۶kb آن ۴ پروتئین ساختاری (M, E, S و N) را کد می‌کند. گلیکوپروتئین S توسط آنزیم پروتئاز سلولی به دو تحت واحد S1 و S2 شکسته می‌شود که تحت واحد S1 محرک تولید آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده و حاوی اپی‌توپ‌های تعیین سروتیپ ویروس و عامل اتصال به رسپتور سلول میزبان است. مهم‌ترین راه کنترل بیماری واکسیناسیون با واکسن‌های زنده تخفیف حدت یافته و یا کشته است که همیشه با موفقیت ۱۰۰ درصد همراه نیست. یکی از مهم‌ترین دلایل شکست واکسیناسیون عدم وجود ایمنی متقاطع بین سویه‌های مختلف ویروس با سویه واکسن است (۲) چرا که ویروس برونشیت عفونی از لحاظ ژنتیکی بسیار متغیر بوده و از طریق موتاسیون یا نوترکیبی مرتباً در حال تغییر و تحول و تولید واریانت‌های جدید ژنتیکی و آنتی‌ژنیکی است. مانیتورینگ مستمر ویروس‌های برونشیت عفونی در مناطق مختلف جغرافیایی به منظور تهیه نقشه تنوع ژنتیکی (genetic diversity) و شناسایی منشأ و گستردگی ژنوتیپ‌های ویروس اهمیت دارد، همچنین آنالیز ژنتیکی در تعیین بهترین برنامه واکسیناسیون با واکسن‌های رایج (زنده یا غیر فعال) کاربرد دارد. معمولاً آنالیز coding region ژن S1 به منظور تعیین ژنوتیپ، مطالعه ارتباط فیلوژنی و اپیدمیولوژیک جدایه‌های برونشیت انجام می‌شود (۳). هدف از مطالعه حاضر ردیابی و تعیین ژنوتیپ ویروس‌های برونشیت عفونی در گله‌های گوشتی تجاری دارای نشانه‌های تنفسی و با سابقه واکسیناسیون در ایران می‌باشد.

مواد و روش کار

این مطالعه به صورت مقطعی از ابتدای سال ۱۳۹۸ انجام گرفت. جمعیت هدف مزارع طیور گوشتی تجاری با نشانه‌های درگیری تنفسی و تلفات بودند. مجموعاً از ۳۵ مزرعه مشکوک در استان‌های مرکزی، یزد، اصفهان و بوشهر نمونه‌برداری انجام شد. تمامی گله‌ها سابقه واکسیناسیون علیه بیماری برونشیت عفونی را داشتند.

نمونه‌برداری: در هر مزرعه از حداقل ۱۰ پرنده تازه تلف شده یا مبتلا با نشانه درگیری تنفسی، بافت‌های نای و کلیه و لوزه سکومی به صورت تجمیع شده نمونه‌گیری و به آزمایشگاه منتقل شدند. از نمونه‌های بافت پس از هموژن شدن در بافر فسفات سالین (۲/ ۷ =pH) حاوی آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین استرپتومایسین+ آمفوتریسین)

سوسپانسیون ۲۰ درصد (W/V) تهیه شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA: سوسپانسیون بافتی با دور g ۱۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و ۲۰۰ میکرولیترمایع رویی برای استخراج RNA با استفاده از کیت Viral RNA Extraction Kit شرکت Roche آلمان طبق پروتکل توصیه شده کارخانه سازنده استفاده شد. RNA استخراج شده تا زمان استفاده درفریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سنتز cDNA با استفاده از کیت (x-۲step RT-PCR Pre-Mix(Taq),Bio Fact ™) و پرایمر Random hexamers و آنزیم M-MLV RTase در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر (RNA ۹ میکرولیتر، Random Hexamer ۱ میکرولیتر، ۱۰ میکرولیتر XRT mix ۲)و برنامه دمایی ۱۰ دقیقه ۲۵ درجه سانتی‌گراد، ۵۰ دقیقه ۵۰ درجه و ۵ دقیقه ۸۵ درجه انجام شد.

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای استفاده شده در تشخیص و شناسایی ویروس برونشیت عفونی

پرایمر	محل توالی	توالی پرایمر ('۳- '۵)	طول محصول PCR/ رفرانس
-F۱۰۳N -R۱۰۲N	۴۶۴-۴۴۵ ۷۸۲-۸۰۱	CCTGATGGTAATTTCCGTTG ACGCCCATCCTTAATACCTT	(۱۲)/۳۵۷bp
+۱SX _۲SX +۳SX _۴SX	۶۷۸-۶۹۸ ۱۱۴۸-۱۱۶۸ ۷۰۵-۷۲۵ ۱۰۷۵-۱۰۹۶	CACCTAGAGGTTTG T/C T A/T GCAT TCCACCTCTATAAACACC C/T TT TAATACTGG C/T AATTTTTCAGA AATACAGATTGCTTACAACCACC	(۱۹)/۴۹۰bp ۳۹۰bp

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز معکوس(RT-PCR) و تعیین توالی ژن: کلیه نمونه‌های مشکوک به برونشیت ابتدا با استفاده از جفت پرایمر اختصاصی مربوط به توالی حفاظت شده ژن نوکلئوکپسید (N) ویروس بیماری برونشیت عفونی ارزیابی شدند (۴). در ادامه از نمونه‌هایی که در ردیابی ژن N مثبت شده بودند در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز آشیانه‌ای و با استفاده از دو جفت پرایمر (SX_{1-} SX_4) یک بخش به طول ۳۹۰ جفت باز از ژن گلیکوپروتئین اسپایک۱ برای تعیین ژنوتیپ ویروس و آنالیز فیلوژنیک تکثیر و توالی‌یابی گردید (۵، ۶). واکنش زنجیره پلی‌مراز در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر (۲/۵ میکرولیتر بافر X ۱۰ ،MgCl2 ۱/۵میکرولیتر، ۰/۸ میکرولیتر dNTPs, ۰/۸میکرولیتر از هر پرایمر، ۰/۲میکرولیتر Taq DNA polymerase، ۱۷/۱میکرولیتر آب، ۲میکرولیتر cDNA) انجام شد در هر واکنش ویروس برونشیت عفونی واکسن H۱۲۰ به‌عنوان کنترل مثبت و آب عاری از نوکلئاز به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شدند. توالی نوکلئوتیدی پرایمرها در جدول ۱ و برنامه دمایی واکنش در جدول ۲ نمایش داده شده است. نمونه‌هایی که در واکنش PCR تکثیر نشدند حداقل ۵-۳ نوبت متوالی در تخم‌مرغ جنین‌دار ۱۱-۹ روزه SPF پاساژ داده شدند و از لحاظ بروز علایم اختصاصی ویروس برونشیت عفونی از جمله کوتولگی و کاهش رشد جنین بررسی شدند.

توالی‌های تکثیر شده ژن S1 با استفاده از کیت استخراج محصول PCR (High Pure PCR Product Purification Kit , Roche, Germany) تخلیص و به همراه پرایمرهای پیشرو و معکوس (SX۳ و SX۴) برای تعیین توالی ژن دو طرفی به شرکت ماکروژن کره ارسال شدند. توالی‌های نوکلئوتیدی S1 ارسال شده ابتدا Blast شده و پس از Align شدن توالی‌ها در نرم افزار Clustal W با توالی‌های رفرانس مشابه به‌دست آمده در NCBI GenBank database مقایسه شدند. با استفاده از نرم‌افزار Mega.۷ آنالیز توالی‌ها انجام و سپس درخت فیلوژنی با روش Neighbor-Joining و Bootstrap ۱۰۰۰ رسم شد.

جدول ۲- سیکل دمایی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

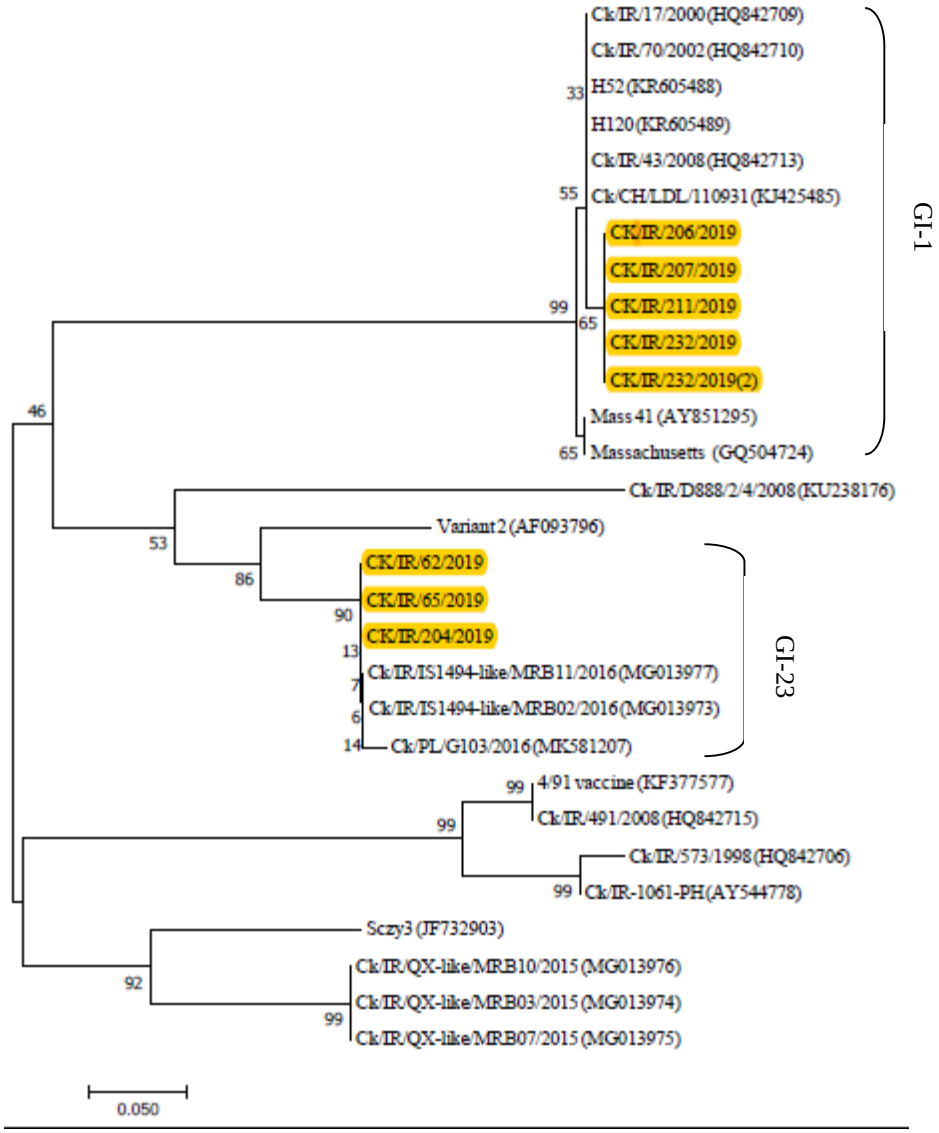
مرحله	دما(درجه سانتی‌گراد)	تعداد سیکل	زمان
واسرشت سازی اولیه	۹۴	۱	۲دقیقه
واسرشت سازی	۹۴		۳۰ ثانیه
اتصال پرایمر	۵۰	۳۵	۶۰ ثانیه
افزایش طول	۷۲		۶۰ ثانیه
افزایش طول	۷۲	۱	۷ دقیقه

نتایج

از مجموع ۳۵ مزرعه مرغ گوشتی تجاری با نشانه‌های تنفسی تعداد ۱۵ مزرعه بر اساس ردیابی ژن نوکلئوکپسید ویروس به روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز مثبت شدند. به عبارتی شیوع ویروس برونشیت عفونی در کمپلکس تنفسی گله‌های گوشتی ۴۲/۸۵درصد بود. بر اساس طبقه‌بندی Valastro و همکاران (۲۰۱۶) پس از آنالیز فیلوژنی توالی قسمتی از ژن پروتئین اسپایک۱؛ جدایه‌های این مطالعه در دو دودمان (Lineage) از ژنوتیپ۱(GI) ویروس برونشیت عفونی پرندگان قرار می‌گیرند:

۱- سه جدایه متعلق به GI-۲۳ است که ویروس‌های IS/۱۴۹۴ like ، یا به بیان دیگر ویروس‌های واریانت ۲ را شامل می‌شدند. از نظر توالی نوکلئوتیدی پارشیال پروتئین اسپایک۱، این سه جدایه با ویروس‌های گزارش شده قبلی دودمان GI-۲۳ از ایران با کد دسترسی بانک ژن : MG_۰۱۳۹۷۷ و MG_۰۱۳۹۷۳ (خراسان رضوی، سال ۲۰۱۶ (unpublished data)) قرابت ۱۰۰ درصدی داشته و در یک کلاستر قرار گرفتند، همچنین با ویروس واریانت ۲ گزارش شده از هلند در سال ۲۰۲۰ با کد دسترسی ۵۸۱۲۰۷ MKشباهت ۹۸/۴۶درصدی داشتند.

۲- پنج جدایه هم به دودمان GI-1 یا همان ویروس‌های Massachusetts like تعلق داشتند (شکل ۱). که با جدایه‌های ماساچوست ایران و همچنین ویروس‌های واکسن H۵۲ و H۱۲۰ و ویروس ماساچوست M۴۱ فیلدی استخراج شده از بانک ژن (NCBI) شباهت داشته اما در یک کلاستر قرار نگرفتند (شکل۱).



شکل ۱- آنالیز فیلوژنتیک قسمتی از ژن S1 جدایه‌های IBV با سایر ویروس‌های استخراج شده از بانک ژنی. جدایه‌های این مطالعه هایلات شده اند. خطوط عمودی سروتیپ‌های شایع در ایران را نشان می‌دهند. خطوط افقی تعداد جایگزین نوکلئوتید را به ازای هر موقعیت نشان می‌دهد. درخت فیلوژنتیک بر اساس روش آماری Neighbor joining و مدل Maximum Composite Likelihood با نرم‌افزار MEGA ۷ رسم شده است. بررسی درخت فیلوژنتیک با تکرار بوت‌استرپ ۱۰۰۰ انجام گردید.

بحث و نتیجه‌گیری

یکی از دلایل شکست واکسیناسیون و بروز بیماری با نشانه‌های تنفسی در گله‌های گوشتی تجاری طیور ظهور واریانت‌های جدید برونشیت است که از لحاظ آنتی‌ژنیکی با واکسن‌های رایج تفاوت دارند لذا پایش مداوم و تعیین ژنوتیپ ویروس‌های در گردش علاوه بر کمک به فهم روند تحول (evolution) ویروس در تعیین استراتژی کنترلی و برنامه مناسب واکسیناسیون کمک کننده است. در مطالعه حاضر ویروس‌های برونشیت عفونی شناسایی شده در موارد درگیری تنفسی به ژنوتیپ‌های like/۱۴۹۴/IS و Mass type تعلق داشتند. سروتیپ ماساچوست که انواع مختلفی از آن در کشور به‌عنوان واکسن برای کنترل بیماری استفاده می‌شود، جزو سروتیپ‌هایی است که برخلاف برخی از ویروس‌های برونشیت عفونی توزیع

جغرافیایی وسیعی در تمام دنیا دارد و همچنان از موارد بیماری در کشور جدا می‌شود (۷، ۸ و ۹). با توجه به این که تا همین چند وقت اخیر واکسن سویه واریانت ۲ در کشور استفاده نمی‌شد می‌توان موارد جدا شده را مستقیماً به ویروس‌های فیلدی نسبت داد اما ویروس‌های ماساچوست شناسایی شده در این پژوهش از موارد بیماری تنفسی جدا شده‌اند، تفکیک ویروس واکسن از ویروس وحشی نیاز به مطالعات تکمیلی دارد. به علاوه در موارد درگیری تنفسی سایر پاتوژن‌ها از جمله نیوکاسل، آنفلوانزا و مایکوپلاسما نیز باید در تشخیص تفریقی مد نظر قرار گیرند. ویروس IS/۱۴۹۴/like اولین بار توسط Callison و همکاران در سال ۲۰۰۱ در فلسطین اشغالی گزارش شد و پس از آن در نقاط مختلف دنیا از جمله مصر، ترکیه، لیبی، افغانستان، عراق و ایران (۵، ۱۰، ۱۱، ۱۲ و ۱۳) گسترش پیدا کرد. در ایران اولین بار ژنوتیپ IS/۱۴۹۴ در سال ۲۰۱۰ از سوی Hosseini و همکاران گزارش شد. در آن زمان شایع‌ترین ژنوتیپ 793/B بود (۹). با توجه به مطالعات گذشته به نظر می‌آید از سال ۲۰۱۴ به بعد شیوع ژنوتیپ IS/ ۱۴۹۴ در کشور روند صعودی داشته تا جایی که در سال‌های اخیر به شایع‌ترین جدایه در کشور مبدل شده بود. Najafi و همکاران در سال ۲۰۱۶ شایع‌ترین ویروس (۳۴درصد) را در سال‌های ۲۰۱۴ تا ۲۰۱۵ از گله‌های گوشتی ژنوتیپ IS/۱۴۹۴ گزارش کردند (۱۱) در حالی که در فاصله سال‌های ۲۰۱۰ تا ۲۰۱۴ Hosseini و همکاران (۲۰۱۵) ژنوتیپ IS/۱۴۹۴ را دومین ویروس شایع در طیور صنعتی کشور گزارش کرده بودند (۹). Gholami و همکاران در سال ۲۰۱۷ شیوع ژنوتیپ IS/۱۴۹۴ در کشور را ۶۶/۶۷ درصد (۹) اما Modiri و همکاران فراوانی این ویروس در ۸ استان کشور، در فاصله سال‌های ۲۰۱۵ تا ۲۰۱۷ را ۷۰/۳۴ درصد گزارش کردند (۱۴) در هر دو مطالعه شیوع سروتیپ ماساچوست کمتر از واریانت‌ها و به‌ترتیب ۲/۷۵ و ۴/۴۴ درصد بود. ویروس‌های جدا شده در مطالعه Saadat و همکاران در سال ۲۰۱۷ از ۱۵ گله گوشتی دارای علایم تنفسی در استان بوشهر متعلق به سروتیپ ماساچوست و واریانت ۲ بود (۱۵). مطالعات مولکولی و ژنوتایپینگ بیانگر شیوع بالای ویروس برونشیت عفونی و چرخش جدایه‌های مشابه در صنعت طیور منطقه است. به دلیل مناسبات تجاری بین کشورهای همسایه و شاید قاچاق غیر قانونی بین آنها ویروس‌های در حال گردش در یک منطقه مشابه هم هستند نقش انتقال ویروس‌های مختلف توسط پرندگان وحشی (۱۶) نیز در اپیدمیولوژی ویروس در کشورهای همسایه در یک منطقه نیز باید مد نظر باشد. Yilmaz و همکاران در ۲۰۱۶ شباهت ویروس‌های جدا شده ترکیه به ویروس‌های ایران، چین و هند را بیان می‌دارد (۱۳). Sadri و همکاران (۲۰۱۹) در افغانستان شیوع بالای ویروس‌های برونشیت ژنوتیپ LX-like viruses (GI-I) و (GI-۲۳) IS/۱۴۹۴ را گزارش و شباهت ایزوله‌های IS/۱۴۹۴ جدا شده به ویروس‌های ایران و عراق بیان کردند. در مطالعات گذشته در کشور نیز توالی ویروس‌های برونشیت IS/۱۴۹۴ با ایزوله‌های عراق و ترکیه و اسرائیل شباهت زیادی داشت (۹، ۱۱) این امر می‌تواند بیانگر منشأ یکسان این ویروس باشد (۱۷).

De Wit در سال ۲۰۰۰ بیان می‌دارد که ایمنی متقاطع بین سروتیپ‌های مختلف ویروس وجود ندارد، اما برخی سویه‌ها هستند که در صورت استفاده به صورت واکسن می‌توانند ایمنی متقاطع علیه سایر سروتیپ‌ها ایجاد کنند که به آنها protectotype گفته می‌شود (۲). با توجه به این‌که مهم‌ترین راه کنترل بیماری واکسیناسیون است نشان داده شده که واکسیناسیون با دو نوع واکسن زنده تخفیف حدت یافته متفاوت از لحاظ

آنتی‌ژنیکی می‌تواند ایمنی مناسبی علیه تیپ‌های مختلف IBV ایجاد کند (۳). تا حدود بیست سال قبل تنها واکسن مورد استفاده در کشور از سروتیپ ماساچوست بود اما به تدریج با شیوع واریته‌های جدید واکسیناسیون با واکسن زنده تخفیف حدت یافته سروتیپ B/۷۹۳ نیز انجام شد. شاید بتوان کاهش جداسازی ژنوتیپ QX در مطالعات سال‌های۲۰۱۷ و ۲۰۱۵ به ۴/۴ و ۷/۵ درصد را تأثیر واکسیناسیون با دو نوع تیپ متفاوت از لحاظ آنتی‌ژنی و بروز ایمنی متقاطع مناسب علیه این ژنوتیپ دانست (۱۴).پس از شناسایی سروتیپ B ۷۹۳ توسط بزرگمهری‌فرد و وصفی مرندی در سال ۱۹۹۸ واکسیناسیون علیه برونشیت عفونی به منظور افزایش دامنه و وسعت حفاظت پرندگان در مقابل سروتیپ‌های شایع، معمولاً دو یا چند نوبت واکسن برونشیت با سویه‌های مختلف سروتیپ Massو B ۷۹۳در ایران صورت می‌گیرد (۲۰). با توجه به استراتژی واکسن در کشور و استفاده از واکسن‌های ماساچوست وB ۷۹۳ است و با در نظر گرفتن این نکته که واکسن ژنوتیپ (GI-۲۳) IS/۱۴۹۴ به صورت تجاری وجود ندارد احتمالاً واکسیناسیون رایج بر این ژنوتیپ چندان مؤثر نبوده و نتوانسته شیوع آن را کنترل کند و همچنان این ژنوتیپ از موارد طغیان بیماری جدا می‌گردد، البته در اثرگذاری واکسیناسیون تنها نوع سویه ویروس مطرح نبوده و فاکتورهایی مثل روش استفاده و تهویه هم می‌توانند بر میزان تأثیر واکسن اثر سوء بگذارند (۳).

براساس نتایج مطالعه حاضر ویروس بیماری برونشیت عفونی با وجود واکسیناسیون گسترده در گله‌های تجاری گوشتی همچنان یکی از مهم‌ترین عوامل خسارات اقتصادی در صنعت طیور و وقوع بیماری‌های تنفسی چندعاملی در کشور محسوب می‌شود. لذا پایش مداوم گله‌ها و شناسایی سویه یا ژنوتیپ‌های غالب در گردش در شناسایی روند تحول ویروس و به دنبال آن تعیین شیوهنامه واکسیناسیون و یا حتی تغییر واکسن‌های استفاده شده جایگاه مهمی دارد.

References

1- Jackwood M.W. Review of Infectious Bronchitis Virus Around the World. *Avian Dis*. 2012; 56: 634-641.

2- De Wit J. Detection of infectious bronchitis virus. *Avian Pathol*. 2000; 29: 71-93.

3- De Wit J, Cook J. K. Factors influencing the outcome of infectious bronchitis vaccination and challenge experiments. *Avian Pathol*. 2014; 43: 485-497.

4- Loa C, Lin T, Wu C, Bryan T, Hooper T. Schrader D. Differential detection of turkey coronavirus, infectious bronchitis virus, and bovine coronavirus by a multiplex polymerase chain reaction. *J Virol Meth*. 2006; 131: 86-91.

5- Seger W, Ghalyanchilangeroudi A, Madadgar O, Vasfi Marandi M, Hashemzadeh M. Genotyping of infectious bronchitis viruses from broiler farms in Iraq during 2014-2015. *Arch virol*. 2016; 161: 34-38.

6- Selim K, Arafa A, Ahmed H, El-Sanousi A. Molecular characterization of infectious bronchitis viruses isolated from broiler and layer chicken farms in Egypt during 2012. *Int J Vet Sci Med*. 2013.

7- Bochkov YA, Batchenko GV, Shcherbakova LO, Borisov AV, Drygin VV. Molecular epizootiology of avian infectious bronchitis in Russia. *Avian Pathol*. 2006; 35: 379-393.

8- De Wit J, Cook JK, Van der Heijden HM. Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures. *Avian Pathol*. 2011; 40: 223-235.

9- Sadri, N., Ghalyanchilangeroudi, A., Fallah Mehrabadi, M. H., Hosseini, H., Shayeganmehr, A., Sediqian, M. S., Mousavi, F. S. Genotyping of avian infectious bronchitis virus in Afghanistan (2016-2017): the first report. *Iran J Vet Res*. 2019; 20(1): 60-63 [In Persian].

10- Awad F, Baylis M, Ganapathy K. Detection of variant infectious bronchitis viruses in broiler

flocks in Libya. *I J Vet Sci Med*. 2014; 2: 78-82.

11- Gholami F, Karimi V, Ghalyanchi Langeroudi A, Hashemzadeh M, Vasfi Marandi, M. Genotyping of Infectious bronchitis viruses isolated from broiler chicken farms in Iran during 2015-2016. *I J Vet Med*. 2018; 12: 9-17 [In Persian].

12- Najafi H, Langeroudi AG, Hashemzadeh M, Karimi V, Madadgar O, Ghafouri SA, Farahani RK. Molecular characterization of infectious bronchitis viruses isolated from broiler chicken farms in Iran, 2014-2015. *Arch Virol*. 2016; 161: 53-62 [In Persian].

13- Yilmaz H, Altan E, Cizmecigil UY, Gurel A, Ozturk GY, Bamac OE, Turan N. Phylogeny and S1 Gene Variation of Infectious Bronchitis Virus Detected in Broilers and Layers in Turkey. *Avian Dis*. 2016; 60(3), 596-602.

14- Modiri Hamadan A, Ghalyanchilangeroudi A, Hashemzadeh M, Hosseini H, Karimi V, Yahyaraeyat R, Najafi H. Genotyping of Avian infectious bronchitis viruses in Iran (2015-2017) reveals domination of IS-1494 like virus. *Virus Res*. 2017; 240: 101-106 [In Persian].

15- Saadat Y, Bozorgmehri Fard MH, Charkhkar S, Hosseini H, Shaikhi N, Akbarpour B. Molecular characterization of infectious bronchitis viruses isolated from broiler flocks in Bushehr province, Iran: 2014 - 2015. *Vet Res Forum*. 2017; 8(3): 195-201 [In Persian].

16- De Wit J, Swart WA, Fabri THF. Efficacy of infectious bronchitis virus vaccinations in the field: association between the α-IBV IgM response, protection and vaccine application parameters. *Avian Pathol*. 2010; 39: 123-131.

17- Ghalyanchi-Langeroudi A, Karimi V, Jannat A, Hashemzadeh M, Fallah MH, Gholami F, Heidarzadeh M. Genotyping of Infectious Bronchitis Viruses in the East of Iran, 2015. *I J Virol*. 2015; 9: 31-35 [In Persian].

18- Hosseini H. Fard MHB, Charkhkar S, Morshed R. Epidemiology of Avian Infectious Bronchitis Virus Genotypes in Iran (2010-2014). *Avian Dis*. 2015; 59: 431-435 [In Persian].

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

20- Gholami-Ahangaran M , Shoushtari AH, Doosti A, Fathi Hafshejani E, Zia-Jahromi N. Detection of Infectious Bronchitis Virus (4/91 type) in Broiler Chickens in Chahrmahal-va-bakhtiyari Province .*Vet. J. of Islamic Azad Uni*. 2012; 6(2): 1543-1547 [In Persian].

Molecular detection of Infectious Bronchitis virus in broiler chicken flocks

Najmeh Motamed[*1], Mohsen Bashashati[۲], Mohammad Hossein Fallah Mehrabadi[۲]

1- Assistant Professor, Department of poultry vaccines research and production, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural research, Education and Extension organization, Karaj,Iran.
2- Assistant Professor, Department of Avian diseases research and diognostic, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural research, Education and Extension organization, Karaj,Iran.

Receive: January 1, 2021; Revise: February 13, 2021; Accept: February 28, 2021

Summary

Infectious bronchitis disease is one the most important diseases in poultry industry worldwide. Despite vast vaccination with different vaccines, the virus causes major economic losses in commercial poultry production. The main objective of this study was to detect infectious bronchitis virus infection in respiratory complex in broiler chicken flocks. Tissue samples from 35 flocks in central and south regions of Iran in 2018 and 2019 were collected and investigated by RT-PCR reaction. For phylogenetic analysis, Nucleotide sequence of partial S1 gene was amplified then evaluated. Totally from 35 flocks with vaccination history against IBV and suffering from respiratory problems15 flocks were positive for IBV infection (42/85 percent). Two genotypes were detected including GI-23 Is/1494 like (variant2) and Mass type ones. IS/1494 like viruses isolated in this study were clustered with other Variant2 viruses reported from Iran which have had increasing trend in recent years. Massachusetts viruses were not clustered with Iranian mass type viruses including vaccinal strains and had some differences. Thereafter, results of this study indicate that even with frequent vaccination, IBVs can cause outbreaks and severe problems in vaccinated chicken flocks.

Key words: *Infectious Bronchitis, respiratory Syndrome, PCR, Broiler flocks*