مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۴، دوره ۷۰، شماره ۱، ۲۱-۱۵
Original Article
Journal of Veterinary Research. 70,1:15-21, 2015

مقایسه شجره شناسی قطعه ژن *S1* جدایه‌های ویروس برونشیت عفونی پرندگان در حال چرخش با واکسن‌های مصرفی در ایران

مسعودهاشم زاده[۱] شهین مسعودی[۱*] وحیدکریمی[۲] عبدالحمیدشوشتری[۱] آرش قلیانچی لنگرودی[۳] محسن محمودزاده[۱]

۱) بخش تحقیق و تولید واکسن‌های ویروسی طیور، موسسه تحقیقات واکسن وسرم سازی رازی، کرج - ایران
۲) گروه بیماریهای طیور، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران
۳) گروه میکرو بیولوژی و ایمنی شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران

(دریافت مقاله: ۱۸ آبان ماه ۱۳۹۳، پذیرش نهایی: ۲۳ دی ماه ۱۳۹۳)

چکیده

زمینه مطالعه: بیماری برونشیت عفونی پرندگان بسیار مسری، که می‌تواند موجب ضعف در وزن گیری وکاهش کارایی غذا در پرندگان آلوده شود. وجود سروتیپ/ژنوتیپ‌های متعدد گزارش شده، کنترل بیماری را با واکسن مشکل‌تر نموده است. به هر حال تنها معدودی اسیدهای آمینه پروتئین *S1* مسئول حفاظت در سویه‌های واکسن و فیلدی می‌باشند. **هدف:** مقایسه جدایه‌های ویروس برونشیت در گله‌های طیور صنعتی ایران با واکسن‌های رایج مورد مصرف می‌باشد. **روش کار:** قطعه‌ای از ژن پروتئین *S1* که ناحیه پر تغییر و پایدار را پوشش می‌دهد، در جدایه‌های ویروس برونشیت پرندگان ایران با استفاده از روش PCR-TR تکثیر، تعیین توالی و مورد مقایسه قرار گرفتند. **نتایج:** تجزیه وتحلیل فیلوژنی توالی اسیدهای آمینه نشان داد که هشت جدایه از نه جدایه مورد مطالعه با واکسن H۵۲ و H۱۲۰ بیش از ۲۱/۸٪ اختلاف وشش جدایه نیز حداقل ۲۲/۷٪ با سویه واکسن سویه ۴/۹۱ و هر نه جدایه با سروتیپ ۲۷۴D حداقل ۲۰٪ اختلاف داشتند. **نتیجه‌گیری نهایی:** نتایج بدست‌آمده برای بررسی مستمر استراتژی‌های کنترل بیماری و نظارت بر سویه‌های در گردش ضروری می‌باشد، بنابراین اهمیت اصلاح برنامه واکسیناسیون را در ایران تأکید می‌نماید.

واژه‌های کلیدی: برونشیت عفونی ماکیان، شجره‌شناسی، واکسن

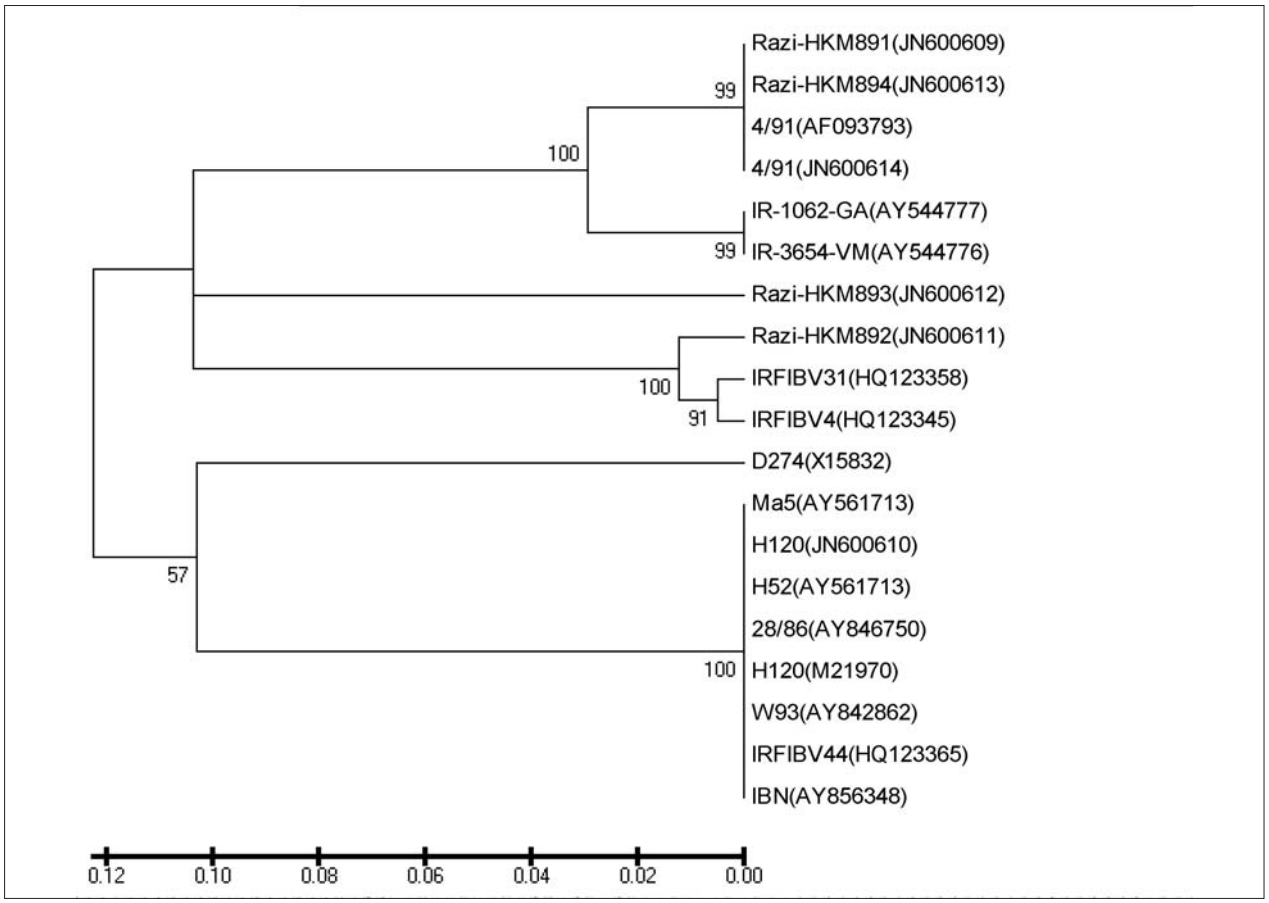
مقدمه

ویروس برونشیت عفونی (Infectious bronchitis virus) از جنس کروناویروس (Coronavirus) عامل ایجاد بیماری حاد و فوق العاده مسری در ماکیان بوده و دارای اهمیت اقتصادی در صنعت طیور کشور می‌باشد. این ویروس می‌تواند از طریق تنفس و تماس مستقیم انتقال یابد. طبیعت قابل انتقال ویروس وظهور سروتیپ‌های متعدد، کنترل این بیماری را علیرغم استفاده از واکسن‌ها امری پیچیده نموده است. ژنوتیپ‌ها و واریانت‌های جدید برونشیت عفونی پرندگان در دو دهه اخیر به دلایل مختلف از جمله توسعه صنعت طیور، افزایش روابط تجاری و اقتصادی بین کشورها رو به تزاید بوده است. به طور مثال واریانت‌های D274، 793/B، سویه ایتالیایی IT-2 و ویروس شبه QX در اروپا (۸)، و واریانت‌های جدید نفروپاتوژن در چین (۱۷) را می‌توان ذکر نمود. صنعت طیور کشور ایران نیز در سال‌های اخیر در اثر ضایعات تنفسی که بطور مستقیم و یا غیر مستقیم مربوط به ویروس برونشیت عفونی پرندگان می‌باشد، خسارات زیادی را متحمل شده است. ویروس برونشیت در حال گردش در کشور ایران احتمالاً شامل سه گروه می شود: گروه اول، ویروس‌های بومی ایران که قبلاً توسط Aghakhan و همکاران در سال ۱۹۹۴ جدا گردیده است، که بر اساس آزمایش VN تمام آن سویه‌ها مرتبط با سروتیپ ماساچوست بودند (۳). گروه دوم که از سال ۱۹۹۷ تا کنون توسط محققین کشور گزارش گردیده است، مرتبط با سویه‌های 793/B (۴/۹۱) می‌باشند (۵،۱۰،۱۴،۱۵،۱۸،۲۱،۲۲،۲۵،۲۶،۲۷،۳۱) و گروه سوم احتمالاً شامل سویه یا سویه‌های نفروپاتوژنی است که اخیراً در خاور میانه دیده شده است (۱،۸،۲۰)، و یا ژنوتیپ‌ها و سروتیپ‌های دیگری مثل سروتیپ‌های گزارش شده D1466 و D274 در کشور همسایه پاکستان (۴)، که نیاز به بررسی‌های بیشتر دارد. هدف این مطالعه ارزیابی میزان نزدیکی قسمتی از ژن *S1* واکسن‌های مصرفی کشور که عمدتاً از دو سروتیپ ماساچوست و ۴/۴۹۱ می‌باشد، با جدایه‌های ویروس برونشیت عفونی پرندگان در ایران می‌باشد.

مواد و روش کار

نمونه و تعیین جدایه‌ها: سویه‌های واکسن برونشیت عفونی H۱۲۰ تولیدی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی و واکسن ۴/۹۱ وارداتی از شرکت اینتروت به کشور تهیه گردید. چهار جدایه که اخیراً توسط نگارنده شناسایی گردیده است (۱۶) بعلاوه پنج جدایه که قبلاً در ایران گزارش و در بانک ژن (Gene Bank) ثبت گردیده بودند، ابتدا شناسایی و متعاقباً بوسیله نرم افزار CLC Free Workbench مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز شجره شناسی Neighbor Joining توسط نرم افزار Megalign با استفاده از اطلاعات بدست آمده براساس توالی اسید آمین‌های و اطلاعات بانک ژن تعداد پنج جدایه انتخاب شد. این جدایه‌ها همراه با جدایه‌های بدست آمده در این مطالعه با واکسن‌های مورد استفاده در کشور مورد مقایسه قرار گرفتند. استخراج RNA و آزمایش

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۳۴۵۷۰۰۳۸-۰۲۶، نمابر: ۳۴۵۵۲۱۹۴-۰۲۶ Email: masoudi64@yahoo.com



تصویر ۱. درخت شجره‌شناسی بر اساس توالی اسید نوکلوئیک سویه‌های ویروس برونشیت عفونی در حال چرخش در ایران به همراه سویه‌های واکسن مصرفی در کشور با استفاده از روش Neighbor Joining.

نسخه برداری معکوس و واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (RT-PCR) با استفاده از پرایمرهای EXC۱+ (Forward) به توالی CACTGGTAATTTTCAGATGG و XCE۲- (Reverse) به توالی CCTCTATAAACACCCTTGCA (۲) برای روی قطعه‌ای از ناحیه ژن *S1* طبق روش ذکر شده در مطالعه اخیر نگارنده (۱۶) انجام پذیرفت. تعیین توالی ژن‌ها به میزان ۴۶۴ جفت باز (bp) و اسیدهای آمینه متناظر آن با ارسال محصول PCR خالص شده به شرکت GMW کشور آلمان انجام گردید، سپس توسط برنامه MEGA۵ مورد بررسی و تصحیح قرار گرفتند. آنالیز و مقایسه توالی اسیدهای آمینه با سویه‌های مورد بحث بوسیله نرم افزار CLC Free Workbench مورد بررسی قرار گرفتند. آنالیز شجره شناسی توسط نرم افزار Megalign با استفاده از اطلاعات بدست آمده از توالی اسید آمینه‌ای و اطلاعات بانک ژن بر اساس مدل Neighbor Joining رسم شد. سکانس‌ها توسط برنامه Bankit در پایگاه NCBI در بانک ژن ثبت گردید و شماره دسترسی به آن اختصاص یافت.

نتایج

توالی محصول PCR قطعه ژن گلیکوپروتئین *S1* هر یک از جدایه‌ها و نمونه‌های واکسن H۱۲۰ (تولیدی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی) و ۴/۹۱ مورد مصرف در کشور تعیین گردیدند. مقایسه توالی اسیدهای آمینه و درخت شجره شناسی نه جدایه ایران به نام‌های: Razi-HKM۸۹۱، Razi-HKM۸۹۲، Razi-HKM۸۹۳، Razi-HKM۸۹۴، ۴VIRFIB، ۳۱VIRFIB، AG-۱۰۶۲-RI، ۴۴VIRFIB و RI-۳۶۵۴-VM و همچنین سویه‌های واکسن شامل مصرفی در داخل کشور و مصرفی در سایر کشورها (تصویر ۱ و جدول ۱) نشان داد که توالی اسیدهای آمینه هشت جدایه Razi-HKM۸۹۱، Razi-HKM۸۹۲، Razi-HKM۸۹۳، Razi-HKM۸۹۴، AG-۱۰۶۲-RI، IRFIBV۳۱، IRFIBV۴ و RI-۳۶۵۴-MV با واکسن H۵۲ و H۱۲۰ بیش از ۲۱٪ اختلاف داشتند، در حالیکه جدایه IRFIBV۴۴ کاملاً همخوان با واکسن سروتیپ H۱۲۰ و H۵۲ بود. توالی اسیدهای آمینه جدایه‌های Razi-HKM۸۹۱، Razi-HKM۸۹۴ و دو جدایه RI-۱۰۶۲-GA و RI-۳۶۵۴-VM به ترتیب ۱۰۰٪، ۹۹/۳٪ و ۹۲/۳٪ با سویه واکسن ۴/۹۱ همخوانی داشتند، در حالیکه چهار جدایه دیگر، شامل Razi-HKM۸۹۲، Razi-HKM۸۹۳، IRFIBV۳۱ و IRFIBV۴ با سویه واکسن ۴/۹۱ بیش از ۲۲٪ اختلاف نشان دادند. همه جدایه‌های مورد مطالعه در ایران که مورد

مقایسه با سروتیپ D۲۷۴ قرار گرفتند حداقل ۲۰٪ اختلاف داشتند.

توالی اسیدهای آمینه در سویه واکسن H۱۲۰ تولیدی موسسه رازی با سویه واکسن H۱۲۰ در کشورهای هلند، آمریکا و چین (۸۶/۲۸، W۹۳، Ma۵، H۵۲، H۱۲۰) کاملاً همخوان بودند. توالی اسیدهای آمینه سویه واکسن ۴/۹۱ وارداتی به کشور با سویه کشور انگستان همخوانی کامل داشت.

بحث

ایمنی پرندگان به ویروس واکسن برونشیت عفونی پرندگان و یا عفونت‌های طبیعی معمولاً در مقابل ویروس همولوگ بسیار اختصاصی و طولانی می‌باشد. میزان و دوره پاسخ به واکسن به عوامل زیادی از جمله: سن جوجه، سطح ایمنی مادری، ایمونوژن بودن واکسن، روش به کار گیری واکسن، حدت سویه فیلدی، تناوب بین واکسیناسیون، سلامت جوجه در هنگام واکسیناسیون بستگی دارد. پرنده‌ای که در شرایط طبیعی ایمن شده باشد، می‌تواند برای ماه‌ها در برابر سویه‌های همولوگ محافظت گردد. حضور سویه‌های هترولوگ و واریانت‌ها، کنترل برونشیت عفونی پرندگان را در شرایط مزرعه با مشکلات عدیده‌ای روبرو ساخته است(۶). ویروس واکسن H۱۲۰ در جوجه‌های گوشتی به عنوان واکسن اولیه در سراسر جهان طی ۵۰ سال گذشته مصرف گردیده است، این واکسن درگله‌های مادر و تخمگذار نیز به عنوان واکسن آغازین مصرف گسترده دارد. سویه واکسن H برای حفاظت دستگاه تنفسی می‌باید در بافت‌های تنفسی تکثیر یابد و در صورت عدم تکثیر ایمنی لازم ایجاد نمی‌گردد، لذا تعادل بین میزان تکثیر و میزان حدت ویروس می‌باید وجود داشته باشد (یعنی تکثیر به حدی باشد که ایجاد ضایعات جدی ننماید). به نظر می‌رسد واکسن H۱۲۰ این تعادل را به ویژه در جوجه‌های جوان دارا باشد. واکسن H۵۲ از نظر حدت بالاتر و در جوجه‌های جوان ایجاد مشکل می‌نماید، ولی در بالغین مناسب است، به ویژه اگر قبل از این واکسن سویه کم حدت واکسن مصرف گردد. البته باید به خاطر داشت، علیرغم بی‌خطری واکسن H۱۲۰، هر واکسن زنده ایی می‌تواند حساسیت پرنده را نسبت به عفونت کلی باسیلوز افزایش دهد، به خصوص زمانیکه بار اشریشیاکلی در محیط بالا باشد (۲۸، ۱۹). ویروس واکسن تخفیف حدت یافته تحریک موضعی، عمومی، و ایمنی با واسطه یاخته‌ای (CMI) ایجاد می‌نماید. غده هاردرین (Harderian) در توسعه ایمنی القایی پس از تجویز واکسن به صورت قطره چشمی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در مطالعه هیستوپاتولوژی نشان داده شده است که پس از مصرف قطره چشمی واکسن، تعداد پلاسماسل‌ها افزایش یافته و کانون‌های لنفوئیدی در این غده بزرگ شدند(۳۰)، بنابراین ایجاد ایمنی موضعی ضروری بوده و هنگام مصرف واکسن می‌باید به آن توجه لازم نمود. همچنین القائ سطح پایدار و بالای ایمنی عمومی ضروری است. نقش ایمنی با واسطه یاخته‌ای متعاقب مصرف واکسن سویه H نشان داده شده است (۲۹).

در دهه ۱۹۷۰ آزمایشگاه‌های تحقیقاتی پاساژهای با لاتر از H۵۲ را به عنوان واکسن علیه سویه‌های هترولوگ در ایالات متحده آمریکا ارزیابی نمودند. Winterfield و Fadly در سال ۱۹۷۶ گزارش نمودند که واکسن H۵۳ ایمنی خوبی داشته و ۷۰٪ الی ۱۰۰٪ علیه سروتیپ‌های چالش tConnecticu، KJM، ۹۷ Iowa، ۶۰۹ Iowa، eHolt، ۲۷DM و ۱۷ES حفاظت ایجاد می‌نماید(۳۲). Rosenberger و همکاران در سال ۱۹۷۶ در آمریکا دریافتند که H۵۲ حفاظت متقاطع خوبی (۵۸ تا ۸۸٪) علیه چلنج با سروتیپ‌های Connecticut، KJM، Florida و Holte ایجاد می‌نمایند، ولی میزان خیلی کمتری (۱۱- ۳۳٪) علیه سروتیپ‌های sArkansa، Gray و Maine ۲۰۹ محافظت ایجاد نمود (۲۴). واکسن H۱۲۱ خیلی تخفیف حدت یافته است و به طور متوسط حدود ۵۰٪ حفاظت می‌کند. واکسن H۱۲۰ میزانی محاظت متقاطع علیه سویه‌های هترولوگ ۱۶۴۸B بلژیک، فرانسه ۸۴۰۸۴، فرانسه ۸۴۲۲۱ ایجاد می‌نماید (۱۲)، گرچه حفاظت با تکرار واکسیناسیون با سروتیپ ۹۱/۴ بهبود می‌یابد (۱۳). در مطالعه‌ای توسط Cook و همکاران در سال ۱۹۸۶ شرایطی مشابه شرایط مزرعه یجاد نمودند، جوجه‌ها با واکسن H۱۲۰ در یک روزگی واکسینه شدند و با جدایه‌های مخلوط اشریشیاکلی (*E.Coli*) و سویه‌های هترولوگ ویروس IB (غیر از سویه‌های مرتبط با ماساچوست) مورد چالش قرار گرفتند، محافظت خوبی در مقابل سویه‌های هترولوگ، نه در همه موارد، دیده شد. این محافظت‌ها شامل سروتیپ‌های Holte، ۹۷ Iowa (آمریکا)، T استرالیا، D۲۷۴، D۳۸۹۸ هلند و چندین سویه در انگلستان بود(۱۳). واکسن‌های اینترمدیت سویه H از نظر بی خطری در جوجه‌های گوشتی مورد تحقیق قرار گرفت، جوجه‌ها علائم تنفسی جدی نشان ندادند و ایمنی متقاطع خوب ایجاد گردید. سویه H پاساژ ۹۲ برای واکسیناسیون اولیه علیه سروتیپ‌های هترولوگ چالش بکار رفت (۳۳). تکرار واکسیناسیون با واکسن اینترمدیت H سطح ایمنی متقاطع را علیه سویه‌های واریانت افزایش داد (۳۴).

از آنجائیکه سویه‌های داخل یک سروتیپ که قریب ۹۰٪ یا بیشتر در اسیدهای آمینه پروتئین *S1* همخوانی داشته باشند را می‌توان گفت متعلق به یک ژنوتیپ *S1* مشابه هستند، که در این صورت هم احتمال دارد این جدایه‌ها که از نظر ژن‌های *S1* مشابهت دارند هنوز در یک سروتیپ قرار نگیرند و یا واکنش سرمی متقاطع ضعیفی نسبت به هم داشته باشند (۹)، لذا با توجه به اختلاف زیاد توالی اسیدهای آمینه هشت جدایه از نه جدایه مورد مطالعه با واکسن‌های سروتیپ ماساچوست (بالای ۲۱٪)، می‌توان نتیجه گرفت که این جدایه‌ها با سروتیپ ماساچوست متفاوت هستند. توالی اسیدهای آمینه پنج جدایه مورد مطالعه بیش از ۲۲٪ با سروتیپ ۴/۹۱ اختلاف دارند، لذا این جدایه‌ها همسان با سروتیپ ۴/۹۱ تلقی نمی‌گردند.

جدایه HKM۸۹۳ - Razi در شاخه‌های درخت شجره شناسی با

جدایه‌های کشورهای فلسطین اشغالی و عراق قرابت دارد و همخوانی اسیدهای آمینه آن به ترتیب ۹۸/۶۰٪ و ۹۰/۳۱٪ می‌باشد. با توجه به اینکه جدایه فلسطین اشغالی و عراق نفروپاتوژن می‌باشند (۲۰،۳۵) و بیشترین آسیب خود را به کلیه‌ها وارد می‌سازند و از طرفی سویه واکسن H قسمت فوقانی دستگاه تنفسی را حفاظت نموده و دستگاه ادراری را علیه ویروس محافظت نمی‌نماید و اثربخشی واکسن در کلیه دیده نشده است (۲۰)، لذا با توجه به مطالعه‌ای که مصرف توام دو واکسن سویه‌های ماساچوست و ۹۱/۴ برای جلوگیری از ضایعات کلیوی جدایه نفروپاتوژن ویروس IB بلژیک، B۱۶۴۸ انجام شده است (۱۱) و همچنین مطالعه‌ی مصرف واکسن سروتیپ‌های ماساچوست در یک روزگی و ۹۱/۴ در ۱۴ روزگی که حفاظت خوبی علیه واریانت‌های شبیه QX نشان داده است (۷)، به نظر می‌رسد مصرف توام این واکسن‌ها با برنامه صحیح می‌تواند برای جلوگیری سویه‌های مختلف هترولوگ بسیار مؤثر باشد.

در پایان با توجه به حضور جدایه‌های متفاوت با سویه‌های واکسن مورد مصرف در کشور به نظر می‌رسد بررسی‌های جامع اپیزئولوژی بیماری برونشیت عفونی پرندگان در کشور لازم باشد. از طرفی با توجه به اینکه مصرف واکسن H۵۲ در چند سال اخیر از چرخه مصرف مرغداری‌های کشور حذف شده است، و این واکسن می‌تواند علیه طیف وسیعی از سروتیپ‌ها و واریانت‌های ویروس برونشیت عفونی پرندگان ایجاد حفاظت نماید، لذا مطالعه بیشتر در خصوص مصرف این واکسن به ویژه در گله‌های تخمگذار، مادر و بررسی سرولوژی و حفاظت متقاطع آن بر علیه جدایه‌های در گردش در نتاج مادرها می‌باید انجام پذیرد. همچنین مطالعه واکسن‌های اینترمدیت سویه H که می‌تواند طیف وسیع تری از سروتیپ را شامل شود نیز می‌باید مورد توجه قرار گیرد. همچنین برنامه‌های واکسیناسیون به ویژه در روزهای نخستین پرورش با واکسن‌های توام سروتیپ‌های ماساچوست و ۴/۹۱ به طور هم زمان و یا با فاصله زمانی مناسب و ارزیابی میزان حفاظت این برنامه‌ها در مقابل جدایه‌های در گردش می‌باید صورت پذیرد.

تشکر و قدردانی

از معاونت محترم تشخیص و تحقیق، همکاران محترم بخش تحقیق و تشخیص بیماریهای طیور و بخش تحقیق و تولید واکسن‌های طیور موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، از معاونت پژوهشی دانشکده دامپزشکی تهران و اساتید و همکاران ارجمند آن دانشکده که در این مطالعه یاری نمودند و همچنین از سازمان دامپزشکی کشور و همکاران محترم مرکز تشخیص سازمان دامپزشکی کشور تشکر و قدردانی می‌نمایم.

References

1. Abdel-Moneim, A.S., El-Kady, M.F., Ladman, B.S., Gelb, J. (2006) S1gene sequence analysis of a nephropathogenic strain of avian infectious bronchitis virus in Egypt. Virol J. 3: 78-82.
2. Adzhar, A., Gough, R.E., Haydon, D., Shaw, K., Britton, P., Cavanagh, D. (1997) Molecular analysis of the 793/B serotype of infectious bronchitis virus in Great Britain. Avian Pathol. 26: 625–640.
3. Aghakhan, S.M., Abshar, N., Rasoul Nejad, F., Marunesi, C., Khodashenas, M. (1994) Studies on avian viral infections in Iran. Arch Inst Razi. 44/45: 1-10.
4. Ahmed, Z., Naeem, K., Hameed, A. (2007) Detection and seroprevalence of infectious bronchitis virus strains in commercial poultry in Pakistan. Poultry Sci. 86: 1329-1335.
5. Akbari Azad, G., Vasfi Marandi, M., Keyvani Aminae, H. (2007) Molecular analysis of three Iranian isolates belonged to 793/B serotype of infectious bronchitis. J Vet Res. 62: 69-80.
6. Bijlenga, G., Cook, J., Gelb, J., de Wit, J.J. (2004) Development and use of the H strain of avian infectious bronchitis virus from the Netherlands as a vaccine: a review. Avian Pathol. 33: 550-557.
7. Calogero, T., Toffan, A., Serena Beato, M., De Nardi, R., Vascellari, M., Meini, A., Ortali, G., Marzia Mancin., Ilaria Capua. (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.
8. Capua, I., Minta, Z., Kaepinska, E., Mawditt, K., Britton, P., Cavanagh, D., Gough, R.E. (1999) Co-circulation of four types of infectious bronchitis virus (793/B, 624/I, B1648 and Massachusetts). Avian Pathol. 28: 587-592.
9. Cavanagh, D., Naqi, S.A. (2008) Infectious Bronchitis. Diseases of Poultry. (12th ed.) Blackwell Publishing Professional, Ames, Iowa USA.
10. Cavanagh, D., Picaul, J.P., Gough, R.E., Hess, M., Mawditt, K., Britton, P. (2005) Variation in the spike protein of the 793/B type of infectious bronchitis

virus, in the field and during alternate passage in chickens and embryonated eggs. Avian Pathol. 34: 20-25.

11. Cook, J., Chester, J., Baxendale, N., Greenwood, N., Huggins, M.B., Orbell, S.J. (2001) Protection of chickens against renal damage caused by nephropathogenic infectious bronchitis virus. Avian Pathol. 30: 423-426.
12. Cook, J.K.A., Orbell, S.J., Woods, M.A., Huggins, M.B. (1999) Breadth of protection of the respiratory tract provided by different live-attenuated infectious bronchitis vaccines against challenge with infectious bronchitis viruses of heterologous serotypes. Avian Pathol. 28: 477-485.
13. Cook, J.K.A., Williams Smith, H., Huggins, M.B. (1986) Infectious bronchitis immunity: its study in chickens experimentally infected with mixtures of infectious bronchitis virus and *Escherichia coli*. J Gen Virol. 67: 1427-1434.
14. Ghahremani, N., Bozorgmehri Fard, M.H., Shoushtari, H., Momayez, R., Sheikhi, N., Khoshzahmat, A., Eshratabadi, F. (2011) Molecular analysis of infectious bronchitis viruses isolated in Iran from 1998-2008. J Anim Vet Adv. 10: 2961-2967.
15. Haqshenas, G., Assasi, K., Akrami, H. (2005) Isolation and molecular characterization of infectious bronchitis virus isolate Shiraz 3. IBV, by RT-PCR and restriction enzyme analysis. Iran J Vet Res, University of Shiraz. 6: 9-15.
16. Hashemzadeh, M., Karimi,V., Masoudi, Sh. Shoushtary, A.H., Ghalyanchi Langeroudi, A., Momayez, R., Nazem Shirazi, M.H., 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. 68:135-140.
17. Liu, S., Kong, X. (2004) A new genotype of nephropathogenic infectious bronchitis virus circulating in vaccinated and nonvaccinated flocks in China. Avian Pathol. 33: 321-327.
18. Mahdavi, S.,Tavasoly, A., Pourbaksh, S.A., Momayez, R. (2007) Experimental histopathologic study of the lesions induced by serotype 793/B (4/91) infectious bronchitis virus. Arch Razi Inst. 62: 15-22.
19. Matthijs, M.G.R., Van Eck, J.H.H., Landman, W.J.M., Stegeman, J.A. (2003) Ability of Massachusetts-type infectious bronchitis virus to increase colibacillosis susceptibility in commercial broilers: a comparison between vaccine and virulent field virus. Avian Pathol. 32: 473-481.
20. Meir, R., Rosenblut, E., Perl, S., Kass, N., Ayali, G., Hemsani, E., Perk, S. (2004) Identification of a novel nephropathogenic infectious bronchitis virus in Israel. Avian Dis. 48: 635–641.
21. Momayez, R., Pourbakhsh, S.A., Khodashenas, M., Banani, M. (2002) Isolation and identification of infectious bronchitis virus from commercial chickens. Arch Razi Inst. 53: 1-9.
22. Nouri, A., Assasi, K., Seyfi Abad Shoupouri, M.R. (2003) Field study of infectious bronchitis virus using. Type specific RT-PCR. Arch Razi Inst. 55: 1-10.
23. Parsons, D., Ellis, M.M., Cavanagh, D., Cook, J.K.A. (1992) Characterization of an infectious bronchitis virus isolated from vaccinated broiler breeder flocks. Vet Rec. 131: 408-411.
24. Rosenberger, J.K., Alphin, R.L., Krauss, W.S. (1976) Cross-protection studies with a Holland strain of IBV. Avian Dis. 20: 199-201.
25. Seifi, S., Asasi, K., Mohammadi, A. (2010) Natural co-infection caused by avian influenza H9 subtype and infectious bronchitis viruses in broiler chicken farms. Vet Archiv. 80: 269-281.
26. Seify abad Shapori, M.R, Mayahi, M., Charkhkar, S., Assasi, k. (2002) Serotype identification of recent Iranian isolates of infectious bronchitis virus by type-specific multiplex RT-PCR. Arch Razi Inst. 5: 79- 85.
27. Shoushtari, A.H., Toroghi, R., Momayez, R., Pourbakhsh, S.A. (2008) 793/B type, the Predominant circulating type of Avian Infectious Bronchitis Viruses 1999 - 2004 in Iran: A retrospective study. Arch Razi Inst. 63: 1-5.
28. Smith, H.W., Cook, J.K.A., Parsell, Z.E. (1985) The

experimental infection of chickens with mixtures of infectious bronchitis virus and *Escherichia coli*. J Gen Virol. 66: 777-786.

29. Timms, L.M., Bracewell, C.D. (1981) Cell mediated and humeral immune response of chickens to live infectious bronchitis vaccines. Res Vet Sci. 31: 182-189.
30. Toro, H., Godoy, V., Larenas, J., Reyes, E., Kaleta, E.F. (1996) Avian infectious bronchitis: viral persistence in the Harderian gland and histological changes after eyedrop vaccination. Avian Dis. 40: 114-120.
31. Vasfi Marandi, M., Bozogmehri Fard, M.H. (2001) Isolation and identification of infectious bronchitis viruses in chickens between 1997-2000 in Iran. J Vet Res. 56: 119-124.
32. Winterfield, R.W., Fadly, A.M. (1975) Potential for polyvalent infectious bronchitis vaccines. Am J Vet Res. 36: 524-526.
33. Winterfield, R.W., Fadly, A.M., Hoerr, F.J. (1976) Immunity to infectious bronchitis virus from spray vaccination with derivatives of a Holland strain. Avian Dis. 20: 42-48.
34. Winterfield, R.W., Fadly, A.M., Hoerr, F.J. (1976) Vaccination and revaccination with a Holland (H) strain of infectious bronchitis virus. Avian Dis. 20: 369-374.
35. Zana, H.M.,Rizgar, R.S., Aumaid, U.U. (2011) Isolation and molecular characterization of sul/01/09 avian infectious bronchitis virus, indicates the emergence of a new genotype in the Middle East.Vet Microbiol. 150: 21-27.

Phylogenetic analysis comparing partial *S*1 gene of avian infectious bronchitis virus to commercial vaccine strains in Iran

Hashemzadeh, M.[1], Masoudi, Sh.[1*], Karimi, V.[2], Shoushtary, H.[1], Ghalyanchi-Langeroudi, A.[3], Mahmoodzadeh, M.[1]

[1]*Department of Research and Production of Poultry Viral Vaccine, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj-Iran.*

[2]*Departments of Poulty Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran*

[3]*Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran*

(Received 9 November 2014, Accepted 13 January 2015)

Abstract:

BACKGROUND: Infectious bronchitis is a highly contagious disease which may cause poor weight gain and low feed efficiency in infected chickens. There are a large number of reported serotypes/genotypes, which makes the control of the disease more difficult through vaccination. However, there are only a few amino acid differences in the S1 protein of vaccine and wild type strains which are responsible for protection. **OBJECTIVES:** The purpose of this study is to compare IBV variants isolated from commercial chicken flocks in Iran with currently used vaccine strains. **METHODES:** The partial *S*1 gene of the spike protein, covering a hypervariable and constant regions, was amplified and sequenced using conventional RT-PCR. **RESULTS:** Phylogenetic analysis of amino acid sequences revealed that eight of total nine isolates were divergence at least 21.8% from vaccinal Massachusetts serotypes, and six of nine isolates were divergence at least 22.7% from 4/91, and none of the nine isolates were similar to Dutch-type, D274,vaccine serotypes. **CONCLUSIONS:** These findings are essential for continuous surveillance disease control strategies and monitoring of variants, and thus emphasize on the importance of improving the vaccination program in Iran.

Key words: Infectious bronchitis, phylogenetic, vaccine

Figure Legends and Table Captions

Figure 1. Neighbor Joining phylogenetic tree based on nucleotide sequences of avian infectious bronchitis virus isolates in Iran with vaccine strains through Neighbor Joining method.

***Corresponding author's email: masoudi64@yahoo.com, Tel: 026-34570038, Fax: 026-34552194**