



UNIVERZITET U NOVOM SADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET
DEPARTMAN ZA VETERINARSKU MEDICINU

UTVRĐIVANJE GENOTIPOVA VIRUSA INFEKTIVNOG BRONHITISA U VAKCINISANIM JATIMA ŽIVINE

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentori:

Prof. dr Dragan Rogan,
redovni profesor
Dr sc. Milanko Šekler,
viši naučni saradnik

Kandidat:

Bojana Vidović, dr. vet. med.

Novi Sad, 2018. godine

UNIVERZITET U NOVOM SADU

POLJOPRIVREDNI FAKULTET

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Bojana Vidović, MSc
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Dr sc. Dragan Rogan, redovni profesor Dr sc. Milanko Šekler, viši naučni saradnik
Naslov rada: NR	Utvrđivanje genotipova virusa infektivnog bronhitisa u vakcinisanim jatima živine
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinica)
Jezik izvoda: JI	srp. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	AP Vojvodina
Godina: GO	2018.
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 8

Fizički opis rada: FO	(8 poglavlja / 108 stranica / 20 slika / 21 tabela / 1 karta / 221 referenca / bez priloga)
Naučna oblast: NO	Veterinarska medicina
Naučna disciplina: ND	Bolesti životinja i higijena animalnih proizvoda
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Infektivni bronhitis živine, genotipizacija, QX, D274, 4/91
UDK	636.09: 636.5 (043.3)
Čuva se: ČU	U biblioteci Poljoprivrednog fakulteta, Trg Dositeja Obradovića 8, Novi Sad
Važna napomena: VN	Nema
<p>Izvod: IZ</p> <p>Cilj ovog istraživanja bio je da se izoluje, genetski karakteriše i odredi filogenetska pozicija sojeva virusa infektivnog bronhitisa otkrivenih u Srbiji u poređenju sa poznatim referentnim i cirkulišujućim sojevima u svetu. Prikupljeno je ukupno 480 uzoraka trahealnih briseva iz 13 različitih komercijalnih jata koka nosilja. Uzorci prikupljeni tokom 2016. i 2017. godine, analizirani su molekularnim metodama real-time RT-PCR-om, multipleks nested RT-PCR te sekvencionirani. Filogenetske analize bazirane na delimičnim S1 sekvencama pokazale su da su šest sojeva od ukupno deset detektovanih klasifikovani kao genotip D274, dva soja kao QX genotip i dva soja kao genotip 4/91. Razlika u nukleotidnoj sličnosti između naših izolata koji pripadaju D274 grupi kretala se od 0 do 1,2%. Poređenjem dobijenih sojeva i D274 (X15832) utvrđene su razlike od 0 do 0,9%. Najveća nukleotidna sličnost detektovanih QX sojeva bila je sa kineskim sojem QXIBV (KC795604), i kretala se u rasponu od 98,8% do 99,1%. Dva naša izolata koja pripadaju genotipu 4/91 imala su 99,7% i 98,8% nukleotidne sličnosti sa vakcinalnim sojem 4/91 (KF377577). Ova studija je pokazala da virusi koji pripadaju genotipu D274, QX i 4/91 su cirkulisali u jatima živine u Srbiji tokom 2016. i 2017. godine.</p>	

Datum prihvatanja teme od strane NN veća: DP	03.07.2017.
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	<p>_____ Predsednik: Dr sc. Aleksandar Potkonjak, vanredni profesor, Veterinarska mikrobiologija i zarazne bolesti životinja, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad</p> <p>_____ Mentor: Dr sc. Dragan Rogan, redovni profesor, Veterinarska mikrobiologija i zarazne bolesti životinja, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad</p> <p>_____ Mentor: Dr sc. Milanko Šekler, viši naučni saradnik, Biotehničke nauke-Bolesti živine, Veterinarski specijalistički institut Kraljevo, Kraljevo</p> <p>_____ Član: Dr sc. Nikolina Novakov, docent, Veterinarska mikrobiologija i zarazne bolesti životinja, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad</p> <p>_____ Član: Dr sc. Miodrag Radinović, vanredni profesor, Bolesti životinja i higijena animalnih proizvoda, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad</p>

UNIVERSITY OF NOVI SAD

FACULTY OF AGRICULTURE

KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD thesis
Author: AU	Bojana Vidović, MSc
Mentor: MN	Dragan Rogan, PhD, full professor Milanko Šekler, PhD, senior research associate
Title: TI	Determination of infectious bronchitis virus genotypes in vaccinated flocks of poultry
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	eng. / srp.
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	AP Vojvodina
Publication year: PY	2018.
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	Republic of Serbia, Novi Sad, Dositeja Obradovića 8 Square

Physical description: PD	8 chapters / 108 pages / 20 pictures / 21 tables / 1 map / 221 references / without attachments
Scientific field SF	Veterinary medicine
Scientific discipline SD	Animal diseases and food safety
Subject, Key words SKW	Infectious bronchitis virus, genotyping, QX, D274, 4/91
UC	636.09: 636.5 (043.3)
Holding data: HD	Library of The Faculty of Agriculture, University of Novi Sad 21000 Novi Sad, Dositeja Obradovića 8 square, Republic of Serbia
Note: N	None
<p>Abstract: AB</p> <p>The aim of this study was to isolate, genetically characterize and determine phylogenetic relationship of strains of virus IB detected in Serbia in comparison to other known referent and circulating strains in the world. A total of 480 samples collected from 13 different commercial layer flocks, obtained from tracheal swabs were included. Samples are taken from 2016 to 2017 and thereafter samples were molecularly analyzed by real-time RT-PCR, multiplex nested RT-PCR, and by sequencing of the S1 gene. Phylogenetic analyses based on partial S1 sequences revealed that six strains were classified as the D274 genotype, two strains as the QX genotype and two strains as the 4/91 genotype. The difference in nucleotide similarity between the Serbian isolates belonging to the D274 group ranges from 0 to 1.2%. Comparison of the obtained strains and D274 (X15832) showed differences from 0 to 0.9%. The greatest nucleotide of detected QX strains was with Chinese QXIBV (KC795604), ranging from 98.8% to 99.1%. Two Serbian strains belonging to the 4/91 genotype had 99.7% and 98.8% nucleotide similarities with vaccine strain 4/91 (KF377577). This study has shown that viruses belonging to D274, QX, and 4/91 genotypes were circulating in poultry flocks in Serbia during 2016 and 2017.</p>	

Accepted on Scientific Board on: AS	03.07.2017.
Defended: DE	
Thesis Defend Board: DB	<p>_____ President: Aleksandar Potkonjak PhD, Associate Professor, Veterinary microbiology and animal infectious diseases, Faculty of Agriculture, Novi Sad</p> <p>_____ Mentor: Dragan Rogan, PhD, Full Profesor, Veterinary microbiology and animal infectious diseases, Faculty of Agriculture, Novi Sad</p> <p>_____ Mentor: Milanko Šekler, PhD, Senior research associate, Biotechnical sciences- Poultry diseases, Veterinary specialist institute Kraljevo, Kraljevo</p> <p>_____ Member: Nikolina Novakov, PhD, Assistant professor, Veterinary microbiology and animal infectious diseases, Faculty of Agriculture, Novi Sad</p> <p>_____ Member: Miodrag Radinović, PhD, Associate Professor, Animal diseases and Food safety, Faculty of Agriculture, Novi Sad</p>

LISTA SKRAĆENICA

IBV- infektivni bronhitis virus

IB- infektivni bronhitis

RNK- ribozomalna ribonukleinska kiselina

DNK- dezoksiribonukleinska kiselina

ILT- infektivni laringotraheitis

NDV- virus njukastlske bolesti

ZK- zarazma korica

VN test- virus neutralizacioni test

ml- Mililitar

μl- Mikrolitar

nm- Nanometar

nt- nukleotid

S- spajk (engl. spike) glikoprotein

iRNK- informaciona ribozomalna ribonukleinska kiselina

PCR- Lančana reakcija polimeraze (engl. Polymerase chain reaction)

gER- endoplazmatični retikulum

RBD- domen vezivanja za receptor (engl. Receptor binding domain)

HS- heparin sulfat

EDS- sindrom pada nosivosti (engl. egg drop syndrome)

MBL- manoza vezujući lektin (engl. Mannose binding lectin)

HI test- test inhibicije hemaglutinacije

ELISA- imuno-enzimski test (engl. Enzyme linked immunosorbent assay)

SPF- specifični patogen (engl. specific patogen)

CPE- citopatogeni efekat

PCR- Lančana reakcija polimeraze (engl. Polymerase chain reaction)

RT-PCR- polimeraza lančana reakcija u realnom vremenu

RFLP- restriction fragment length polymorphism

cDNA- komplementarna DNA

ORF- otvoreni okviri čitanja (engl. Open reading frame)

UTR- netranslatovane regije (engl. Untranslated region)

TRS- sekvence regulatori transkripcije (engl. Transcription regulatory sequence)

TNF- tumor nekroza faktor (engl. Tumor necrosis factor)

AGID- Imunodifuzija u gelu od agara

NCBI- nacionalni centar za biotehnoške informacije (engl. National center for biotechnology information)

EMBL- evropska laboratorija za molekularnu biologiju (engl. The european molecular biology laboratory)

DDBJ- NK banka Japana (engl. The DNA data bank of Japan)

NGS- sekvencioniranje sledeće generacije (engl. Next generation sequencing)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	2
2.1. Infektivni bronhitis	2
2.2. Istorijat.....	3
2.3. Učestalost i geografska distribucija.....	6
2.4. Etiologija	8
2.4.1. Virus infektivnog bronhitisa (VIB)	8
2.4.1.1. Taksonomija virusa infektivnog bronhitisa	8
2.4.2. Morfologija i hemijska struktura virusa	9
2.4.3. Genomska organizacija virusa IB-a.....	11
2.4.4. Genotipovi virusa IB-a	12
2.4.5. Replikacija virusa	13
2.5. Patogenost.....	17
2.6. Rezistencija virusa IB-a na hemijske i fizičke agense.....	18
2.7. Patogeneza i epizootologija.....	19
2.7.1. Prijemčivi domaćini, starosna i rasna predispozicija.....	19
2.7.2. Receptori i ulazna vrata za virus.....	20
2.7.3. Infekcija, širenje i inkubacioni period IB-a.....	20
2.7.4. Morbiditet i mortalitet	22
2.8. Klinička slika.....	23
2.9. Patomorfološke i patohistološke promene.....	25
2.10. Hematologija i imunitet	26
2.10.1. Protektotipovi virusa IB-a	27
2.10.2. Urođeni imunitet.....	27
2.10.3. Uloga antitela u zaštiti od virusa IB-a	28
2.10.4. Aktivni imunitet.....	29
2.10.5. Čelijski imunološki odgovor	30
2.10.6. Imunitet poreklom od majke.....	30
2.11. Dijagnoza bolesti	31
2.11.1. Molekularna dijagnostika	33
2.11.1.1. RT-PCR metoda	33
2.11.1.2. Polimorfizam dužine restrikcijskih fragmenata- RFLP.....	34
2.11.1.3. RT-PCR u realnom vremenu i druge forme PCR analize	34
2.11.1.4. Sekvence i filogenetska analiza.....	35
2.12. Diferencijalna dijagnoza.....	35
2.13. Serološke metode detekcije	36

2.14. Klasifikacija izolata virusa IB-a	38
2.15. Profilaksa	39
2.15.1. Tipovi vakcina koje se koriste u zaštiti od virusa IB.....	40
2.15.2. Metode primene	41
2.15.3. Buduće vakcine.....	43
2.16. Lečenje.....	43
3. RADNA HIPOTEZA, CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA.....	45
3.1. Radna hipoteza	45
3.2. Cilj i zadaci istraživanja	45
4. MATERIJAL I METODE	46
4.1. Materijal.....	46
4.1.1. Osnovni podaci o geografskoj odrednici i obuhvaćenim farmama	46
4.1.2. Uzorkovanje trahealnih briseva	50
4.1.3. Aparati, reagensi i potrošni material za izvođenje molekularnih metoda virusološke dijagnostike.....	51
4.2. Metode rada	52
4.2.1. Dokaz prisustva virusa infektivnog bronhitisa molekularnim metodama	52
4.2.1.1. Priprema zbirnih uzoraka (“pool”)	52
4.2.1.2. Ekstrakcija virusne RNK iz trahealnih briseva.....	53
4.2.1.3. Reverzna transkripcija i lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu	54
4.2.2. Amplifikacija S1 segmenta genoma virusa IB metodom ugneždene reverzne transkripcije i lančane reakcije polimerazom i sekvencioniranje Sanger metodom.....	59
4.2.2.1. Ugneždjena reverzna transkripcija i lančana reakcija polimerazom (Nested RT-PCR)	59
4.2.2.2. Horizontalna elektroforeza u agaroznom gelu.....	62
4.2.2.3. Prečišćavanje DNK iz agaroznog gela	63
4.2.2.4. Reakcija pre sekvencioniranja i priprema uzoraka za kapilarnu elektroforezu	65
4.2.2.5. Kapilarna elektroforeza	67
4.2.2.6. Sekvence deponovane u bazi GenBank.....	67
4.2.3. Filogenetska analiza i genotipizacija izolata virusa IB	68
5. REZULTATI	70
5.1. Rezultati izolacije virusa IB-a iz uzoraka suspektnog materijala poreklom od živine.....	70
5.2. Ispitivanje prisustva virusa IB-a primenom molekularnih metoda virusološke dijagnostike (RT-PCR, real time RT-PCR)	70
5.3. Molekularna karakterizacija i filogenetska analiza	73
6. DISKUSIJA	83
7. ZAKLJUČCI.....	89
8. LITERATURA	91

1. UVOD

Infekcije virusom infektivnog bronhitisa (IBV) su jedan od najčešćih uzroka ekonomskih gubitaka živinarske industrije. Gubici se ogledaju u vidu smanjene nosivosti, slabijeg kvaliteta jaja, slabijeg prirasta i uginjavanja pilića. Jedna je od najvažnijih respiratornih bolesti i prisutna je u celom svetu. Javlja se, kako u intenzivnom, tako i ekstenzivnom načinu držanja živine. Pojava sekundarnih patogena može dodatno zakomplikovati bolest i rezultirati povećanim morbiditetom i mortalitetom. Zahvaljujući jednolančanom RNK genomu, to jest njegovim slabije razvijenim reparativnim mehanizmima, virus IB poseduje veliku sposobnost menjanja putem spontanih mutacija i genetskih rekombinacija iz čega rezultira stalna pojava novih varijanti virusa IB-a. Nakon prve izolacije virusa IB-a 1936. godine, bolest se pojavila širom sveta. Nadalje, većina zemalja ima svoje najčešće endemske izolate virusa IB-a. Uprkos upotrebi do sada dostupnih živih i atenuiranih vakcina, jedna od najznačajnijih poteškoća kontrole IB-a je povezana sa stalnom pojavom novih sojeva virusa IB-a (Awad et al., 2014).

IB je visoko kontagiozna akutna bolest respiratornog i urogenitalnog trakta živine, i uzrokovana je virusom IB-a, članom familije *Coronaviridae*. Uprkos široko rasprostranjenoj vakcinaciji, IB je najčešće prisutan u eksploataciji, proizvodnji konzumnih jaja, gde dolazi do pojave novih sojeva virusa IB-a koje nije moguće kontrolisati upotrebom postojećih komercijalnih vakcina (Gelb and Jackwood, 2016).

Sigurnu dijagnozu IB-a moguće je postaviti jedino na osnovu izolacije i identifikacije virusa što je vremenski zahtevno. Danas se zbog brzine izvođenja, veće osetljivosti i specifičnosti više upotrebljavaju molekularne metode dijagnostike. One uz identifikaciju virusa IB-a mogu omogućiti i diferencijaciju do nivoa serotipa odnosno genotipa virusa.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. INFEKTIVNI BRONHITIS

Infektivni bronhitis (IB; *Bronchitis infectiosa gallinarum*), je vrlo česta i veoma zarazna, akutna i ekonomski važna virusna bolest živine (*Gallus gallus domesticus*) izazvana virusom infektivnog bronhitisa (IBV) – ptičijim korona virusom (Beach and Schalm, 1936; Cavanagh and Gelb, 2008; Jackwood and de Wit, 2013). Virus pripada rodu *Gammacoronavirus* (*Nidovirales: Coronaviridae: Coronavirinae*) (Boursnell et al, 1987; Mihindukulasuriya et al., 2008; Woo et al., 2010; Abdel-Moneim, 2017). IB je kontagiozno oboljenje respiratornog, urinarnog, genitalnog te gastrointestinalnog trakta živine, karakteristično za intenzivni način živinarske proizvodnje i nije ga lako kontrolisati (Butcher and Shapiro, 2005). Sam naziv oboljenja odnosi se na najčešću kliničku manifestaciju bolesti, iako virus može inficirati druge epitelne ćelije, uključujući bubreg, genitalne organe i mnoge delove crevnog trakta (Cavanagh and Naqi, 2003). Virus se širi i inficira živinu inhalacijom ili direktnim kontaktom sa zaraženim jedinkama, prostirkom, opremom ili drugim predmetima ali i preko zaraženog osoblja i posetioca farmi (OIE, 2013; Cavanagh and Gelb, 2008). Vertikalni prenos virusa nikada nije zabeležen, iako virus može biti prisutan na površini ljuske jaja. Bolest se javlja u svim zemljama sa intenzivnom živinarskom proizvodnjom (Jackwood and de Wit, 2013).

Prvobitno je bolest opisana kod pilića, a kasnije je ustanovljena i kod odraslih jedinki, naročito kod koka nosilja (Di Fábio and Rossini, 2000; Cavanagh and Naqi, 2003; Rauber, 2004, Abdel-Moneim, 2017). Odrasla živina najčešće je izvor novih serotipova virusa IB-a. Kod pilića, infektivni bronhitis uzrokuje respiratorne simptome. Kod brojlera uočeni su smanjeni prirast i konverzija hrane kao i zapaljenje vazdušnih kesica, perikarditis i perihepatitis usled komplikacija sekundarnim bakterijskim infekcijama. Morbiditet je skoro uvek 100%, dok mortalitet varira od 0% do 82% (Jackwood and de Wit, 2013). Nefropatogeni sojevi virusa IB mogu izazvati akutni nefritis i urolitijazu (nefritis-nefroza sindrom) uz mortalitet do 25% u jatuu (Cavanagh and Gelb, 2008). Ova pojava se javlja kao posledica infekcije

vakcinalnim i terenskim (divljim) sojevima virusa IB (Alexander and Gough, 1977). Pad proizvodnje jaja i promena kvaliteta jaja zabeleženi su kod nosilja. Patogenost za reproduktivni trakt zavisi od uzrasta živine u vreme infekcije. Virus se može replikovati u jajovodu i uzrokovati njegovo trajno oštećenje što rezultira kasnijom smanjenom nosivošću u periodu eksploatacije jata (Cavanagh and Gelb, 2012; Jackwood and de Wit, 2013). Ljuske jaja kod jata inficiranog virusom IB su deformisane, naborane i osetljive na lomove, te kod pojedinih rasa svetlije, umesto pigmentisane boje. Viskozitet belanca može biti promenjen i takvo belance je najčešće vodenasto. Zbog izrazitih promena na jajovodima proizvodnja jaja se nikad ne vrati na nivo pre infekcije (Jackwood and de Wit, 2013). Obolele jedinke mogu mesecima služiti kao izvor infekcije jer posle preboljenja izlučuju virus i do pet nedelja (Resanović and Vučićević, 2010). Visok stepen prenošenja bolesti među jedinkama, kao i postojanje velikog broja serotipova virusa uzročnika IB značajno utiče na troškove preventive bolesti putem imunizacije (Resanović and Vučićević, 2010; Jackwood and de Wit, 2013). Navedene patološke promene uzrokuju značajne ekonomske gubitke u živinarskoj proizvodnji.

Koronavirusi srodni virusu infektivnog bronhitisa izolovani su kod golubova (*Columbiformes*), fazana (*Phasianus colchicus*), ćuraka (*Meleagris gallopavo*), biserki (*Numida meleagris*), gusaka (*Anserinae*), jarebica (*Alectoris sp.*), pauna (*Pavo cristato*) kao i kod pataka (*Anas sp.*) i služe kao rezervoar koronavirusa (Jackwood and de Wit, 2013). Navedeni podaci nedvosmisleno potvrđuju da virus IB ima mnogo širu lepezu domaćina nego što se do tada verovalo (Cavanagh and Gelb, 2012).

2.2. ISTORIJAT

Prvi podaci o IB-u potiču iz 1931 godine, u Severnoj Dakoti (SAD), gde je opisana nova do tada nepoznata respiratorna bolest mladih pilića starosti dva do dvadeset dana (Schalk and Hawn, 1931; Jackwood and de Wit, 2013) dok je virus izolovan 1936. godine (Beach and Schalm, 1936; Jackwood and deWit, 2013). Dve godine nakon prvih podataka o IB-u, 1933. godine, kao uzročnik pokazao se filtrabilni agens (virus), za koji se u početku

misli da je blaža forma infektivnog laringotraheitisa (ILT) (Bushnell and Bradly, 1933) a što se kasnije pokazalo da nije tako (Beach and Shalm, 1936).

U nekoliko narednih godina, bolest je otkrivena i u drugim područjima SAD (Van Roekel et al., 1942), a zatim i u svim zemljama sa razvijenim živinarstvom. U početku, bolest je opisana kao isključivo bolest pilića, međutim, kasnije je bolest primećena i kod jedinki u odgoju kao i u jatima koka nosilja. Druge opisane manifestacije IB-a uključuju pad proizvodnje jaja u jatu koka nosilja, simultano sa respiratornim promenama opisanim 1940-ih godina, promenama na bubrezima 1960-ih godina (Cavanagh and Gelb, 2008), enteričnim lezijama opisanim 1985. godine i proventrikulus 1998. godine (Abdel-Moneim, 2017). Velika geografska rasprostranjenost i ekonomski značaj bolesti izazvane sa virusom IB-a je rezultirao u iznalaženju načina da se suzbije IB u jatima koka nosilja. Prvi pokušaji prevencije oboljenja bili su ograničene efikasnosti a sastojali su se u kontrolisanom inficiranju pilića sa virusom IB-a što se smatra prvim korakom ka razvoju programa vakcinacije koji se sa izvesnim modifikacijama i danas koristi (Cavanagh and Gelb, 2008). Dakle, 1950. godine otpočeto je vakcinisanje pilića, što je dovelo do smanjenja gubitaka.

Prva važna otkrića u istraživanjima vezanim za virus IB-a uključuju potvrdu virusne etiologije od strane Beach i Šalma 1936. godine, a potom sledi prvo umnožavanje virusa u embrionu kokošijih jaja od strane Beaudette i Hudson 1937. godine (Beaudette and Hudson, 1937). Delaplane i Stuart (1941) su pretpostavili da ovo može imati značaj u imunizaciji što 1941. godine vodi do izveštaja o prvoj vakcini protiv IB-a (van Roeckel et al., 1942). Prva vakcina protiv IB-a u SAD razvijena je uz pomoć van Roeckel M-41 soja, koji je Mass serotip virusa, izolovan na Univerzitetu u Masačusetsu, Amherstu, 1941. godine (Jackwood and de Wit, 2013).

Jungherr i saradnici (1956) izveštavaju da virus IB-a izolovan u Konektikatu ne pruža unakrsnu zaštitu pilića koji su inficirani originalnim Mass izolatom virusa IB-a. To je bio prvi dokaz da je u etiologiju IB-a uključeno više od jednog serotipa (Fabricant, 2000; Jackwood and de Wit, 2013).

Sa početkom 1960-ih IB je dijagnostikovao u Holandiji što je dovelo do razvoja Mass tipa vakcine poznate kao "H" vakcina i to prema prvom slovu imenu farmera (Huyben) sa čije farme je poticao izolat a ne prema zemlji odakle je izolovan kako se ranije mislilo (Bijlenga et al., 2004; Cavanagh and Gelb, 2008; Jackwood and de Wit, 2013). Vakcina koje sadrže

sojeve H120 i H52 ubrzo su postale česte u upotrebi, dok je H120 danas najčešće korišćen soj vakcine protiv IB (Jackwood and de Wit, 2013).

Tokom 1960-ih je otkriveno da virus IB-a može interferirati sa virusom Njukastl bolesti (NDV) u embrioniranim jajima i ćelijskim kulturama, što je veoma značajno iz razloga što se vakcine protiv virusa IB-a i NDV često aplikuju zajedno (Raggi and Lee, 1963; Beard, 1967). Istih godina Winterfield i Hitchner ukazuju da pojedini sojevi virusa IB-a mogu uzrokovati nefritis-nefroza sindrom a takođe su izolovani i nefropatogeni sojevi Gray i Holte (Winterfield and Hitchner, 1962). Tokom 1970-ih i 1980-ih godina rađeno je dosta na identifikaciji različitih serotipova i sojeva virusa IB testom serum neutralizacije na embrioniranim jajima. (Jackwood and de Wit, 2013).

Nekoliko istraživanja je pokazalo da je bolest bila prisutna u Jugoslaviji. Među prvima su je na području BiH opisali Matuka i saradnici (1964) koji su izolovali virus i dokazali da je nakon nekoliko pasaža na pilećim embrionima patogenost virusa iznosila 70% a da su embrioni uginuli 7-10 dana nakon inokualcije. Tokom 1964. i 1965. Pauković (1965) ustanovio je prisustvo specifičnih antitela protiv virusa IB-a u serumima kokošaka na farmama u Sloveniji i Hrvatskoj te po prvi put prikazao epizootiološku situaciju bolesti IB tih krajeva. U Hrvatskoj su virus IB izolovali Mazija i saradnici (1969) te u Sloveniji Mrzel (1967).

Među prvima koji su predložili mere suzbijanja bolesti IB-a ali i ukazali na neophodnost sprovođenja imunizacije protiv IB-a kod živine bili su Pauković i saradnici (1968).

Sve do 1970. godine istraživanja su mahom obuhvatala samo živinu iz intenzivnog uzgoja te su Naglič i saradnici (1970) obuhvatili i stanje prisustva zaraze u ekstenzivnom uzgoju živine na području Velike Gorice gde su se proizvodila rasplodna jaja. Takođe su utvrdili prisustvo specifičnih antitela, te preporučili primenu specifične imunoprofilakse protiv IB-a.

Nefropatogeni soj virusa infektivnog bronhitisa utvrđen je kod brojlera 1973. godine na području Slovenije blizu granice sa Italijom. U toj oblasti bolest je bila prisutna nekoliko godina i to u obliku enzootije ali se nije širila na druga područja tadašnje Jugoslavije (Josipović and Mrzel, 1984).

Značajan pomak u dijagnostici virusa IB-a desio se tokom 1990-tih kada su laboratorije širom sveta počele sa identifikacijom tipova virusa IB-a upotrebom molekularnih tehnika (Jackwood et al., 1997; Jackwood and de Wit, 2013).

2.3. UČESTALOST I GEOGRAFSKA DISTRIBUCIJA

Za većinu zemalja opisani su domaći sojevi virusa IB-a i neretko su nazivani imenom laboratorije u kojoj je izolovan ili naučnika koji ih je prvi izolovao, a takođe i prema imenu države; npr. Masačusets, Konektikat, Arkanzas, D274 ili QX soj. Pojedini sojevi virusa IB-a se ne replikuju i ne preživljavaju duže vreme. Međutim oni koji imaju tu sposobnost, postaju ekonomski značajni za određenu geografsku odrednicu ili čitav svet.

Virus infektivnog bronhitisa se javlja širom sveta osim Antarktika (de Wit et al., 2011; Jackwood and de Wit, 2013). Prve varijante virusa IB-a su otkrivene 1950-ih u SAD, međutim retrospektivna studija je pokazala da su one postojale i tokom 1940-ih u SAD (Jia et al., 2002; Jackwood and de Wit, 2013).

Prvi izolat virusa IB-a bio je „Beaudette“ soj (Beaudette and Hudson, 1937). Nakon toga je u Severnoj Dakoti izolovan M41 soj koji je serološki bio srodan sa „Beaudette“ sojem (Bracewell, 1975). Sojevi ovih serotipova virusa IB bili su prvi korišćeni u pravljenju žive vakcine (Bijlenga et al., 2004; Awad et al., 2014).

Prvi izolovan soj u Australiji bio je "T" soj 1962. godine (Cumming, 1963; Ignjatovic et al., 1997). Zbog geografske izolovanosti, evolucija ovog soja virusa u mnoge nove varijante odvijala se nezavisno od ostatka sveta (Ignjatovic et al., 2006; Awad et al., 2014; Bande et al., 2017).

U Evropi, svega 30% izolata bili su serološki u vezi sa poznatim američkim serotipovima iz 1970-tih a preostali su, prema VN testu, bili srodni sa četiri holandska serotipa: D207 (poznat i kao D274), D212 (poznat i kao D1466), D3128 i D3896 (Davelaar et al., 1984). Većina izolovanih sojeva između 1981. i 1983. bili su u vezi sa holandskim sojevima: D207, D3128 i D3896 (Cook, 1984). Iako su ovi sojevi virusa uzrokovali respiratorne promene i pad proizvodnje jaja kod nosilja, kvalitet jaja nije bio promenjen (Cook, 1984; Cook and Huggins, 1986). Od tada nadalje, većina sojeva virusa izolovani su u Velikoj Britaniji (Gough et al., 1996) ali i drugim evropskim zemljama uključujući Francusku

(Picault et al., 1986; Auvigne et al., 2013), Belgiju (Meulemans et al., 1987; Meulemans et al., 2001), Italiju (Capua et al., 1994; Zanella et al., 2003), Poljsku (Minta et al., 1998; Domanska-Blicharz et al., 2007) i Španiju (Dolz et al., 2006; Dolz et al., 2008). Unutar pomenutih sojeva virusa IB-a, najveći internacionalni značaj imao je soj pod nazivom 793B (poznat i kao 4/91 ili CR88) koji se pojavio 1990tih i veoma brzo raširio na mnoge delove sveta (Gough et al., 1992; Parsons et al., 1992; Abro et al., 2012). Uz prisustvo lokalnih sojeva virusa IB-a, u Brazilu su detektovani virusi IB-a slični evropskom soju 793B, Mass-tipu i Arkanzas (Villarreal et al., 2010; Awad et al., 2014; Bande et al., 2017).

Novi genotip virusa IB-a koji je imao veliki ekonomski značaj, sekvencioniran je 2002. godine i nazvan Italy 02 te deponovan u GenBank nukleotidnu bazu. Upotrebom VN testa, utvrđena je mala antigenska povezanost između ovog novog soja i referentnih IBV serotipova, što je pokazalo da je Italy 02 najverovatnije novi serotip (Dolz et al., 2006). Nedugo zatim, utvrđeno je da je Italy 02 soj jedan od tri najučestalije detektovana soja virusa IB-a kao i dominantan divlji tip virusa IB-a u Zapadnoj Evropi. Poreklo Italy 02 nije poznato, ali se proširio Evropom (Worthington et al., 2008; Awad et al., 2014).

Do sredine 1990-ih većina publikovanih izveštaja otkrila je širok spektar virusa koji su uzrokovali IB u različitim delovima Kine. Među njima najznačajnija varijanta virusa je QX koja se pojavila i proširila iz Kine a uzrokuje i proventrikulitis (Wang et al., 1998; Awad et al., 2014). Iz Kine se QX proširio prvo u Rusiju a nakon toga i u Evropu gde se povezuje sa bolestima reproduktivnih organa i bolestima bubrega (Terregino et al., 2008), dok je proventrikulitis pronađen samo kod brojlera (Ganapathy, 2012; Awad et al., 2014).

Genotip virusa IB-a, Q1, izolovan je u Kini tokom 1996. i 1998. godine (Yu et al., 2001). Nedavno je detektovan i u Evropi (Toffan et al., 2011), Severnoj Americi (Jackwood, 2012), Bliskom Istoku i Indiji (Awad et al., 2014).

Studija koja je ispitala prisustvo virusa IB-a u Zapadnoj Evropi (Worthington et al., 2008) dokazala je da je najučestaliji 793B serotip, a slede ga Mass tip, H120, M41, IBM, Italy02 i soj blisko srodan kineskom QX. Od spomenutih sojeva virusa IB-a QX je danas najznačajniji u Evropi. U Evropi prvi put je izolovan u Italiji 2004 (Bande et al., 2017).

Genotipovi virusa IB-a sa određenim regionalnim značajem, kao što je IBV IS/855/00 (Meir et al., 2004), i IS/1494/06, izolovani su u Izraelu. Kasnije, ovi sojevi virusa nađeni su u Turskoj (Kahya et al., 2013), Egiptu (Abdel-Moneim et al., 2012), Iraku (Mahmood et al., 2011) i Libiji (Awad et al., 2014).

Najznačajnije globalne varijante virusa IB-a, kao što su 793B ili QX, proširile su se preko Azije, Evrope i Afrike u kratkom periodu, ali nisu detektovane u SAD ili Australiji. Sa druge strane, Arkanzas soj se retko javlja van SAD. Patogeni soj poput D1466, koji je bio endemski za zemlje Zapadne Evrope tri decenije, retko je bio detektovan izvan navedenog područja (Awad et al., 2014).

Postoje podaci da je bolest opisana čak i kod vakcinisanih jedinki gde su izolovani sojevi bili antigenski različiti od vakcinalnog soja ali to nije uvek bio slučaj (Awad et al., 2014). Izuzetno je važno napomenuti da nekoliko genotipova virusa IB-a mogu cirkulisati na određenom geografskom području gde su serološke unakrsne reakcije česte sa više ili manje unakrsne zaštite.

2.4. ETIOLOGIJA

2.4.1. Virus infektivnog bronhitisa (VIB)

2.4.1.1. Taksonomija virusa infektivnog bronhitisa

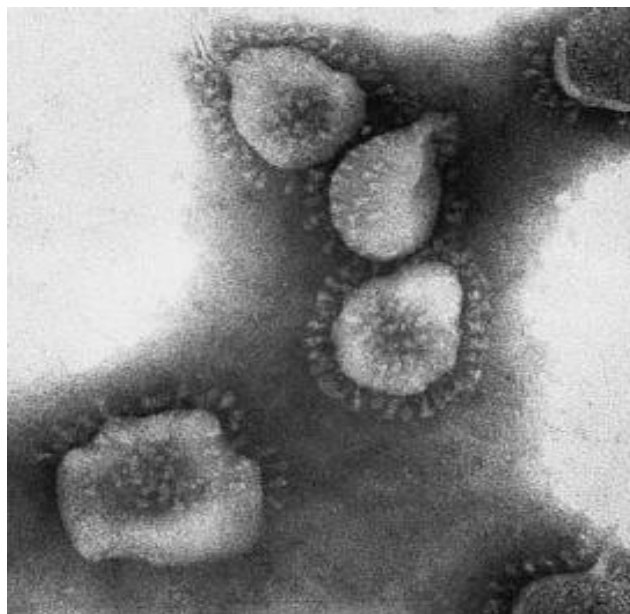
Virus infektivnog bronhitisa (IB) pripada porodici *Coronaviridae* u kojoj se nalaze dve subporodice, i to *Coronavirinae* i *Torovirinae*. Porodica *Coronaviridae* je zajedno sa *Ateriviridae* i *Roniviridae*, unutar reda *Nidovirales* (Enjuanes, 2000; Cavanagh and Gelb, 2008; Jackwood and de Wit, 2013; Abdel-Moneim, 2017). Subporodici *Coronavirinae* obuhvataju četiri roda: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* i *Deltacoronavirus* dok subporodici *Torovirinae* čine dva roda: *Bafinivirus* i *Torovirus* (Slika 1). *Alphacoronavirus* i *Betacoronavirus* su virusi sisara. Virus IB pripada vrsti ptičiji koronavirus, rod *Gammacoronavirus* koji sadrži koronaviruse i drugih vrsta ptica ali i morskih sisara (delfin i Beluga kit) (Jackwood and de Wit, 2013; Abdel-Moneim, 2017).

– Order: <i>Nidovirales</i>	(4 Families)	history
+ Family: <i>Arteriviridae</i>	(5 Genera)	history
– Family: <i>Coronaviridae</i>	(2 Subfamilies)	history
– Subfamily: <i>Coronavirinae</i>	(4 Genera)	history
+ Genus: <i>Alphacoronavirus</i>	(11 Species)	history
+ Genus: <i>Betacoronavirus</i>	(9 Species)	history
+ Genus: <i>Deltacoronavirus</i>	(8 Species)	history
– Genus: <i>Gammacoronavirus</i>	(2 Species)	history
★ Species: <i>Avian coronavirus</i>		history
Species: <i>Beluga whale coronavirus SW1</i>		history
+ Subfamily: <i>Torovirinae</i>	(3 Genera)	history

Slika 1. Taksonomija virusa ICTV, 2016.

2.4.2. Morfologija i hemijska struktura virusa

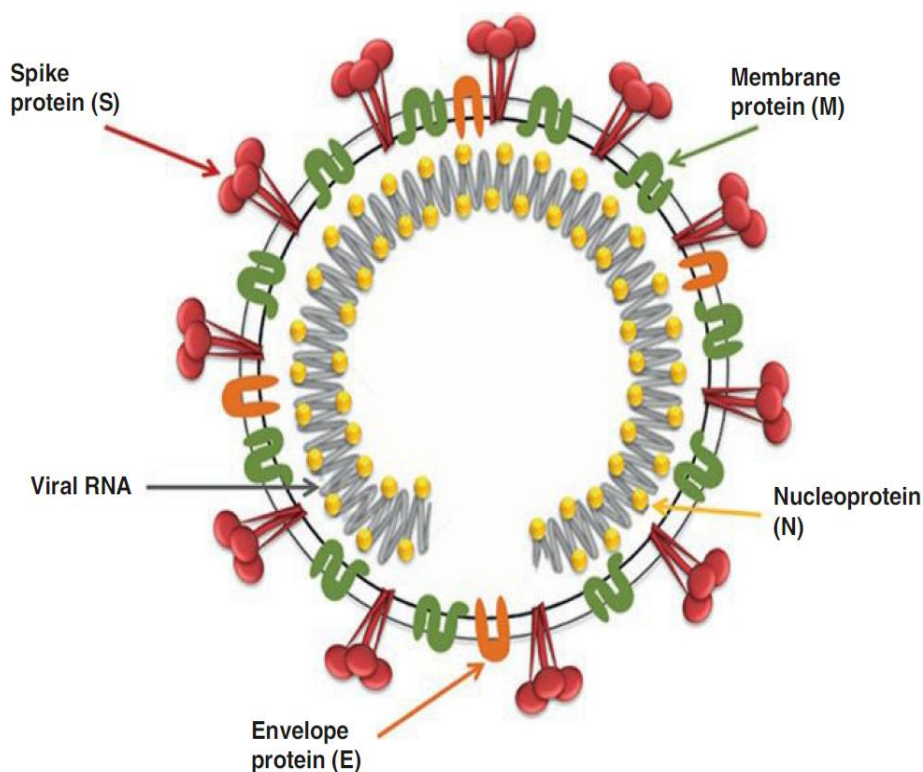
Infektivni bronhitis živine izaziva virus (IBV), koji prolazi kroz filter, veličine pora od 0,22 μm . Posедуje loptastu do pleomorfnu građu (Slika 2) promera 100-160 μm (Cavanagh and Gelb, 2008).



Slika 2. Izgled korona virusa- elektronska mikroskopija (Cavanagh and Gelb, 2008).

Na površini nosi trnaste izdanke u obliku latica ili krune duge 20 nm. (Gonzales et al., 2003; Cavanagh and Gelb, 2008; Abdel-Moneim, 2017). Unutar virusne čestice nalazi se

jednolančana linearna RNK pozitivne polarnosti, koja sa nukleoproteinom formira helični nukleokapsid. Virus je obavijen lipoproteinskom ovojnicom koja sadrži trnaste izdanke od S glikoproteina, strukturni membranski glikoprotein (M) i mali membranski protein (E). (Abdel-Moneim, 2017) (Slika 3).



Slika 3. Šematski prikaz građe IBV (Abdel-Moneim, 2017).

Elektronskom mikroskopijom je utvrđeno da je virus IB-a sličan virusima iz roda koronavirusa, porodice Coronaviridae. Poznato je preko dvadeset pet poznatih genotipova širom sveta (Snyder, 2002). Jednu od prvih klasifikacija virusa objavio je Cunningham 1970. godine.

Hemijska struktura virusa

Lanac RNK je dužine 27 600 nukleotida (nt). Poput drugih članova porodice *Coronaviridae*, genom IBV čine geni koji kodiraju strukturne i nestrukturne proteine. Strukturni protein (komponente virusne čestice - viriona uključuju pomenuti S (spike) glikoprotein, E protein ovojnice, M (protein matriksa) i N nukleokapsidni protein (Lai and

Cavanagh, 1997; Enjuanes, 2000; Butcher and Shapiro, 2005; Cavanagh and Gelb, 2008). Ovi proteini igraju važnu ulogu u vezivanju virusa za ćeliju domaćina, replikaciju i izgradnju viriona kao i indukovanju kliničkog oblika bolesti.

Od svih glavnih strukturnih proteina, M protein je transmembranski protein, koji igra ključnu ulogu kroz interakciju virusne ribonukleokapside i S (spike) glikoproteina (Haan et al., 2000.; Bande et al, 2015). Samo oko 10% M proteina nalazi se u površinskom sloju virusa (Cavanagh and Gelb, 2008).

S protein sadrži tri kopije svakog od dva glikopolipeptida, S1 i S2 (približno 520 i 625 aminokiselina). S1 subjedinica se veruje da formira globularnu glavu S proteina i ima bitnu ulogu u vezivanju i ulasku virusa u ćeliju, i to preko receptora sijalinske kiseline i smatra se odrednicom za raznovrsnost virusa i imunološku zaštitu (Jackwood et al., 2012). S2 subjedinica je glikopolipeptid koji učvršćuje S protein za membrane ćelija i nije povezan sa subjedinicom S1 disulfidnim vezama (Wei et al., 2008; Shi et al., 2011; Bende et al., 2015).

E protein je međutim, oskudan, mali membranski protein. Sadrži domene visoko hidrofobne transmembrane N-terminal i citoplazmatski C-terminal. On je veoma bitan za formiranje virusne čestice.

N protein okružuje jedan deo RNK lanca (Casais et al., 2003; Casais et al., 2005; Youn et al., 2005; Cavanagh and Gelb, 2008).

2.4.3. Genomska organizacija virusa IB-a

Genom virusa IB-a čini jednolančana linearna RNK koja poseduje *cap* modifikacije na 5' kraju i poli (A) *reiterations* na 3' kraju iRNK (informaciona ribonukleinska kiselina). Virusni genom je prosečne dužine od 27 661 nt (bez poli (A) repa). Strukturu genoma IBV čini deset različitih otvorenih okvira čitanja (eng. Open reading frame, ORF) koji kodiraju gene za strukturne i nestrukturne glikoproteine (Slika 4).



Slika 4. Struktura genoma IBV-a. ORF 1a/b je obojen plavom bojom. Gen S proteina dat je u prikazu u svetlo zelenoj boji; E je zelene boje; M je crvene boje; N je maslinasto zelene boje i nalazi se na 3-em delu genoma (preuzeto i prilagođeno iz Abdel-Moneima, 2017).

ORF1ab kodira izgradnju nestrukturnih proteina replikacionog kompleksa, od kojih je jedan poliprotein. ORF2 kodira za Spike glikoprotein; ORF3abc kodira za 3a, 3b i 3c ili mali membranski ili E protein); ORF4 kodira za membranski glikoprotein (M); ORF5ab kodira za proteine 5a i 5b; ORF6 kodira za nukloprotein (N). Genomska organizacija klasičnog IBV-a (Slika 4) je 5'UTR-ORF1a-ORF1b-S-3a-3b-E-M-5a-5b-N- UTR 3' (Abdel-Moneim, 2017).

Virus IB-a kao i svi RNK virusi, ima sklonost da lako mutira i promeni genetski sastav usled slabijeg reparacionog mehanizma za ispravljanje grešaka nastalih tokom procesa replikacije. Virusna RNK polimeraza nema izraženu sposobnost ispravljanja grešaka nastalih pri replikaciji, pa zbog toga češće nastaju promene u RNK tj. mutacije; ne postoji proof reading (potvrda tačnog čitanja). Kao rezultat toga, brojni serotipovi su identifikovani i komplikuju napore u kontroli IB pomoću vakcinacije jer svaka genetska mutacija potencijalno je uslov za stvaranje novih subtipova i serotipova virusa IB (Jackwood et al., 2013).

2.4.4. Genotipovi virusa IB-a

Pretpostavlja se da je pojava virusa IB-a veoma česta i do dana današnjeg poznato je da postoji više od 65 genotipova širom sveta. Različiti serotipovi virusa IB-a uglavnom se mnogo razlikuju (od 20-50%) u izvedenim sekvencama aminokiselina u S1 subjedinici (Abdel-Moneim, 2017). Serotipovi virusa IB koji dele više od 95% istih aminokiselina u S1 trebali bi da imaju unakrsnu zaštitu dok nizovi virusa IB drugih serotipova koji dele manje od 85% istih aminokiselina nemaju unakrsnu zaštitu (Cavanagh and Gelb, 2008). Slaba unakrsna zaštita je pronađena i u virusima koji se razlikuju u samo 2-3% aminokiselina (Abdel-Moneim et al., 2006; Abdel-Moneim, 2017). Ovakva različitost u S1 je verovatno rezultat mutacija, rekombinacija i jakih pozitivnih selekcija *in vivo* (Cavanagh et al., 1990; Abdel-

Moneim, 2017). Široka primena živih atenuiranih vakcina i kasnijeg selektivnog pritiska indukovano neutralizacijom specifičnih antitela protiv "spike" proteina antitelima isforsirali su adaptaciju virusa IB-a da izbegne imunitet, što je dovelo do brže stope evolucije i stvaranja novih serotipova i genotipova (Jackwood, 2012).

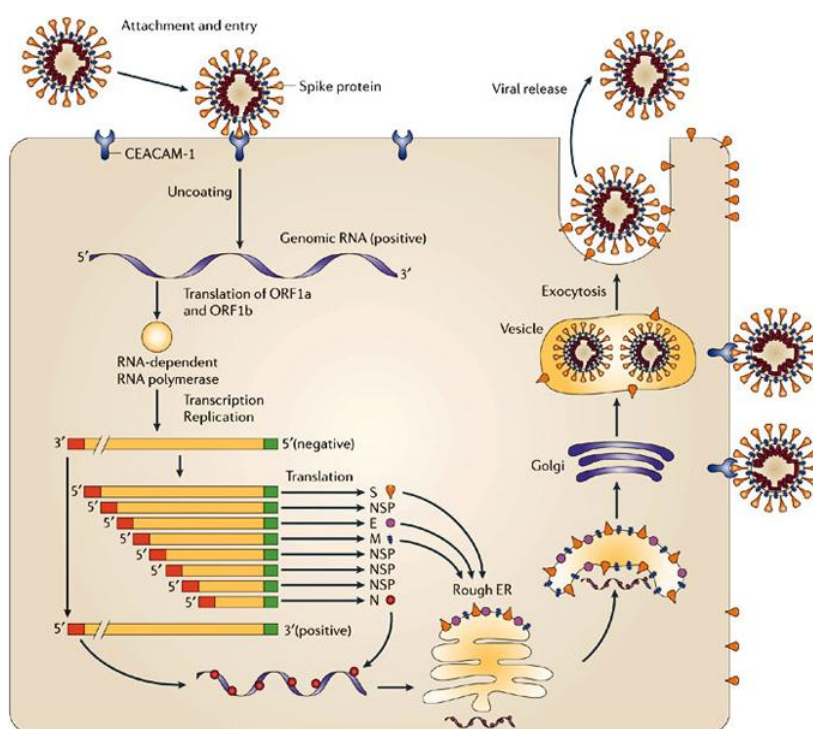
Sklonost RdRp replikaze ka grešci tokom replikacije ne bi trebala igrati važnu ulogu u evoluciji virusa IB-a jer pomenuta replikaza poseduje egzoribonukleaznu aktivnost koja omogućuje delimično proveravanje i ispravljanje grešaka tokom same replikacije genoma koronavirusa. Tokom replikacije, ceo genomski negativni šablon nastaje jedinstvenim kontinuiranim, a subgenomske negativne iRNK nastaju diskontinuiranim mehanizmom koji omogućava rekombinaciju između RNK virusa (Slika 4) (Abdel-Moneim, 2017). Iako je rekombinacija virusa prisutna i pronađena kroz ceo genom virusa IB, žarišta rekombinacije su pronađena ispred S gena u genima za nestrukturane proteine 2, 3 i 16, potom u E i M genima kao i u blizini netranslatovane regije (engl. Untranslated region, UTR) na 3' kraju genoma (Thor et al., 2011). Rekombinacija u različitim genima IBV-a utiče na njegovu patogenost i virulenciju ali rekombinacija S gena može da rezultira stvaranjem novih sojeva virusa IB-a, novih serotipova pa čak i novih virusa koji inficiraju nove domaćine kao i jedinke vakcinisane sa postojećim vakcinama (Jackwood et al., 2010). U prirodi se učestalo zbivaju rekombinacije među genima i tipovima IBV-a. Tako je u Rusiji izolovan mozaični S1 rekombinantni IBV od tri različita genotipa H120, QX i D274 (Ovchinnikova et al., 2011; Abdel-Moneim, 2017). Nadalje, rekombinacija nepoznatog gamakoronavirusa sa poznatim sojem virusa IB-a rezultiralo je evolucijom gamakoronavirusa koji može da inficira ćurke (Jackwood et al., 2010a; Abdel-Moneim, 2017).

2.4.5. Replikacija virusa

Širenje virusa IB-a među inficiranom živinom u jatima se dešava veoma brzo i to najčešće aerosolom kao i mehaničkim sredstvima. Inicijalna replikacija virusa IB-a se dešava u sluzokoži gornjih respiratornih puteva, uzrokujući gubitak trepljastih epitelnih ćelija u sinusima i traheji. Takođe, neki sojevi virusa IB-a se replikuju u tkivu duž digestivnog trakta (ezofagus, proventrikulus, duodenum, jejunum, Burza Farbici, cecalnim tonzilama, rektumu i kloaci) bez značajnijeg patološkog efekta (Raj and Jones, 1997; Boltz et al., 2004; Villarreal et al., 2010).

Oštećenje bubrega povezano sa određenim sojevima virusa IB-a je važna karakteristika infekcije, posebno kod brojlera, jer nefropatogeni sojevi virusa IB-a proizvode manje respiratornih znakova (Ziegler et al., 2002) i lezija (Glahn et al., 1989) ali mogu uzrokovati veći mortalitet (de Wit et al., 2011b). Infekcija mukoze creva se ne manifestuje klinički, ali virus opstaje dugi vremenski period i rezultira izlučivanjem virusa fecesom. Uočeno je da se virus replikuje u crevima duži period nego u respiratornom traktu (Jones, 2010b).

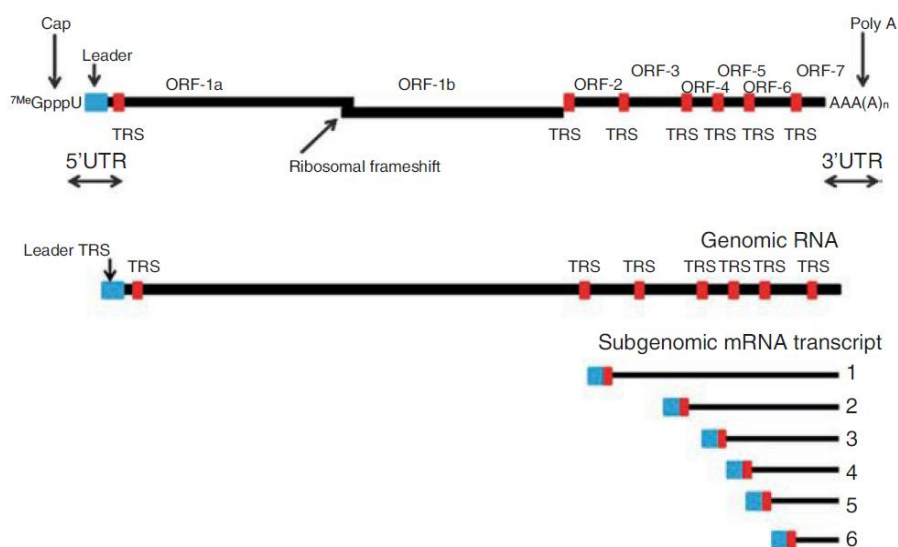
Neki sojevi virusa IB-a uzrokuju proventrikulitis (Yu et al., 2001; Gough et al., 2008; Benyeda et al., 2010; de Wit et al., 2011a., Sun et al., 2011) i enteritis (Jones, 2010a). Terenska infekcija sa 793B povezana je sa pojavom enteritisa (Jones, 2010a). Pored navedenog, virus IB-a se replikuje u jajovodu i testisima inficirane živine, što vodi smanjenoj proizvodnji jaja i oplodnosti (Boltz et al., 2004; Villarreal et al., 2007; Grgic et al., 2008). Kod brojlera i nosilja, pojava virusa IB-a QX pojačao je sposobnost nekih sojeva virusa IB-a u uzrokovanju značajnog patološkog oštećenja ženskog reproduktivnog trakta živine. To posledično uzrokuje odlaganje početka proizvodnje, ne postizanje tehnološkog "peak"-a proizvodnje jaja, povećan postotak lažnih nosilja i nošenja jaja lošeg kvaliteta. (Ganapathy, 2009; de Wit et al., 2011b).



Slika 5. Replikacija IBV-a Fenner's veterinary Virology.

Virus se veže za specifični receptor na plazma membrani ciljne ćelije. Specifični receptor za virus IB-a tek treba da se utvrdi, no zna se da je α 2,3-sialična kiselina potrebna za pokretanje vezivanja virusa posredstvom S proteina za receptor na membrani ciljne ćelije (Wickramasinghe et al., 2011; Promkuntod et al., 2014; Abdel-Moneim, 2017). Vezivanje virusa za receptor pokreće ulazak virusa u ćeliju (Slika 5). Pri tom dolazi do konformacione promene na S proteinu koja dalje pokreće sjedinjavanje virusne membrane sa ćelijskom membranom. Nakon toga se virusni nukleokapsid oslobađa u citoplazmu i odmotava se RNK kako bi se mogla pokrenuti transkripcija i translacija.

Virus se replikuje u citoplazmi. Kada virusna RNK uđe u citoplazmu, ORF 1a i 1b se prevode u funkcionalne nestrukturane proteine koji se sastoje od kompleksa RNK replikaze-transkriptaze. Ovaj kompleks sintetiše ceo lanac kopije RNK negativne polarnosti, koja predstavlja šablon za transkripciju celog lanaca RNK i 6 subgenomskih iRNK koje imaju identične 3' krajeve ali različite dužine (Slika 6) (Abdel-Moneim, 2017). Intergenske sekvence ili sekvence regulatori transkripcije (engl. transcription – regulatory sequence, TRSs, 5' CT(T/G)AACAA(A/T)3') koje se nalaze na 3' kraju vodeće (leader) sekvence i na različitim pozicijama ispred gena označavaju početnu tačku za sintezu genomske i subgenomskih iRNK.



Slika 6. Šematski dijagram IBV, genomska RNK i subgenomska iRNK (Izvor: Abdel-Moneim, 2017).

Dve trećine genoma na 5' kraju čini ORF 1 koji se sastoji od dva dela 1a i 1b. Oni kodiraju poliproteinski prekursor (kompleks RNK replikaze-transkriptaze) koji se u ribozomima prevodi u veliki poliprotein 1ab (Brierley et al., 1989). Poliprotein 1ab se dalje obrađuje u 15 nestrukturnih proteina (nsp2-16) koji učestvuju u replikaciji virusa. Proteinaza slična papainu (PL^{pro}), glavna (M^{pro}) ili proteaza 3CL^{pro} (zato što ima sličnosti sa 3C proteazom pikornavirusa), 1-fosfataza adenzin difosfat-riboze (nsp3), RNK polimeraza zavisna o RNK (nsp12, RdRp) i RNK helikaza (nsp13), egzonukleaza (nsp14), endoribonukleaza (nsp15) i 2-o-metiltransferaza (nsp16) (Fang et al., 2010; Abdel-Moneim, 2017) su važni enzimi za replikaciju koje kodira gen replikaze. Egzonukleaza i endoribonukleaza su uključeni u obrađivanje RNK (Fang et al., 2010; Abdel-Moneim, 2017). Preostala trećina genoma na 3' kraju sadrži gene koji kodiraju strukturne proteine i dodatne gene umetnute između strukturnih gena. Svaka virusna subgenomska iRNK se zasebno prevodi u jedan virusni protein, i to četiri strukturna proteina S, N, M, E (Casais et al., 2005; Hodgson et al., 2006; Cavanagh and Gelb, 2008).

Replikacija genoma virusa IB-a se odvija kroz kontinuiranu transkripciju dok se sinteza subgenomske RNK odvija kroz diskontinuiranu transkripciju (Slike 5 i 6) (Masters, 2006; Tan et al., 2012; Abdel-Moneim, 2017). Pored gena replikaze, za genomsku RNK replikaciju su potrebne UTR sekvence 5' i 3' kraja genoma zajedno sa još nekim specifičnim sekundarnim strukturama. Nukleokapsidni protein (N) je takođe potreban za efikasnu sintezu virusne RNK (Zuniga et al., 2010; Abdel-Moneim, 2017).

Virus IB-a se sastavlja i grupiše intracelularno u lumenu glatkog tubulovezikularnog odeljka koji se nalazi intramedijalno između granulisanog endoplazmatičnog retikuluma (gER) i Goldži aparata (Klumperman et al., 1994; Abdel-Moneim, 2017). Nakon pupljenja, čestice virusa se transportuju kroz Goldži aparat i otpuštaju iz ćelije domaćina mehanizmom egzocitoze (Abdel-Moneim, 2017). S protein u citoplazmatskom repu sadrži signal KKXX-COOH koji je važan za akumulaciji S proteina blizu mesta pupljenja (Ujike and Taguchi, 2015; Abdel-Moneim, 2017). Virusni nukleokapsid se tokom pupljenja virusa ograđuje lipoproteinskim omotačem iz citoplazmatskih membrana. Omotač sadrži S, M i E proteine. Novi virus se pojavljuje 3-4 sata nakon infekcije, gde se maksimalna replikacija (maksimalna koncentracija) dostiže u roku od 12h na temperaturi 37°C (Cavanagh and Gelb, 2008).

2.5. PATOGENOST

IB je primarno bolest živine. Imajući u vidu tropizam virusa prema trepljastom epitelu, infekcija nastaje preko respiratornog trakta (Raj and Jones, 1997; Abdel-Moneim, 2017). Virus se maksimalno umnožava u traheji i nosnim otvorima tri do pet dana nakon infekcije (Cavanagh, 2003; Abdel-Moneim, 2017). Sojevi virusa infektivnog bronhitisa oštećuju respiratorni trakt često otvarajući vrata infekcije sekundarnim bakterijskim infekcijama što povećava mortalitet i komplikuje samu kliničku sliku (Vandekerchove et al., 2004; Abdel-Moneim, 2017). Zapaljenje vazdušnih kesa i sistemska kolibaciloza su česta posledica infekcije virusom IB-a (Matthijs et al., 2005; Cavanagh and Gelb, 2008). Imunosupresija povećava ozbiljnost respiratornih bolesti povezanih sa IBV-om, *E. coli* koinfekcijom i proizvodi značajne ekonomske gubitke (Naqi et al., 2001; Cavanagh and Gelb, 2008).

Međutim, virus IB-a se replikuje i stvara lezije i drugih epitelnih ćelija, uključujući ćelije donjeg respiratornog trakta (pluća, vazdušne kese), Harderove žlezde, bubrega i gonada (jajovod i testis) (Boltz et al., 2004; Cavanagh and Gelb, 2008; Abdel-Moneim, 2017). Virus se takođe umnožava u ćelijama digestivnog trakta (ezofagus, proventrikulus, duodenum, jejunum, Bursa Fabrici, cecalne tonzile, rektum i kloaka) često bez značajnih kliničkih i patomorfoloških znakova (Cavanagh, 2003; Abdel-Moneim, 2005; Abdel-Moneim, 2017). Virus obično perzistira u digestivnom traktu mladih pilića (Alvarado et al., 2006; Cavanagh and Gelb, 2008; Abdel Moneim, 2017) ali kod nosilja nema kliničkih znakova bolesti (Jones and Ambali, 1987; Cavanagh and Gelb, 2008). Neki azijski sojevi (QX) mogu izazvati oštećenje u žlezdanom želucu praćeno hemoragičnim ulceracijama i dijarejom, uz jasne znakove respiratorne bolesti i visoki mortalitet (Cheng et al., 1998; Abdel-Moneim, 2017).

Nefropatogeni sojevi virusa IB ne mogu proizvesti značajnije lezije respiratornih organa (Glahn et al 1989; Cavanagh and Gelb, 2008) ili kliničke znake (Ziegler et al., 2002; Cavanagh and Gelb, 2008). Iako su neki sojevi virusa IB-a vrlo nefropatogeni, izazivajući bolesti bubrega u eksperimentalnim uslovima, mnogi terenski sojevi virusa IB-a mogu biti povezani sa nefritisom (Abdel-Moneim, 2017).

Patogenost za reproduktivni trakt može zavistiti i od sojeva virusa IB-a. Prisustvo maternalnih antitela može da spreči oštećenja na jajovodu tokom ranog toka infekcije virusom IB-a (Chew et al., 1997; Cavanagh and Gelb, 2008). U prijemčivim jatima, različiti

sojevi virusa IB-a izazivaju niz kliničkih i patoloških znakova koji variraju od promena pigmentacije ljuske bez primetnog pada proizvodnje jaja pa sve do pada proizvodnje jaja od 10-50% (Hopkins and Beard, 1985; Cavanagh and Gelb, 2008).

2.6. REZISTENCIJA VIRUSA IB-A NA HEMIJSKE I FIZIČKE AGENSE

Tokom akutne faze bolesti, virus IB se nalazi u značajnoj koncentraciji u sekretu zaraženih ptica, i to u periodu od prvog do sedmog dana nakon infekcije. Virus se takođe može izolovati iz kloakalnog brisa u periodu od prvog do dvadeset četvrtog dana nakon infekcije. Fecesom se virus najduže izlučuje, do 14 dana, kako tokom infekcije tako i u toku faze oporavka (Awad et al., 2014).

Većina sojeva virusa IB-a su termolabilni. Uzorci samog virusa inaktiviraju se nakon 15 minuta na 56°C i svega nekoliko sojeva preživljava nakon 90 minuta na 45°C (Otsuki et al., 1979; Rusov, 1999). Uzorci koji uz virus IB-a sadrže proteine se inaktiviraju nakon barem 30 minuta na 60°C (Jackwood and de Wit, 2013). Za dugotrajno čuvanje virusa IB-a preporučuje se temperatura od -80°C. Zabeleženo je preživljavanje virusa do 12 dana tokom proleća i 56 dana kada temperature spoljne sredine ispod tačke smrzavanja; međutim, uzorke koji se šalju na dijagnostiku neophodno je stalno držati na hladnom (do 4°C) i u što kraćem periodu dostaviti ih referentnoj laboratoriji (Rusov, 1999; Jackwood and de Wit, 2013).

Na sobnoj temperaturi virus ostaje infektivan svega par dana. Iako zaražena alantoisna tečnost sa virusom IB-a nakon skladištenja na -30°C može ostati infektivna više godina, ipak treba izbegavati dugo čuvanje virusa IB-a na -20°C (Cavanagh and Nagi, 2003). U demineralizovanoj destilovanoj vodi virus infektivnog bronhitisa ostaje stabilan na 4°C osam dana. Inficirano tkivo, čuvano u 50% glicerolu, može poslužiti za patohistološka ispitivanja, može se takođe transportovati do laboratorije u istom medijumu bez prethodnog hlađenja. U vodi za piće virus preživi oko 11 sati. Stabilniji je pri nižim pH vrednostima, te na pH 3 virus ostaje stabilan do 14 dana.

Virus IB-a je osetljiv na etar, međutim neki sojevi prežive na 4°C u 20% etru tokom 18h. Takođe virus je osetljiv na 50%-ni hloroform. Sav infektivni materijal se uništava na sobnoj temperaturi nakon 10 minuta i na 4°C tokom 18h u 0,1% natrijum deoksiholatu.

Većina dezificijensa koji se koriste u živinarskoj proizvodnji inaktivni virus IB-a i najvažnije je da površine na kojima se primenjuju budu očišćene od organskih materija, kao i da se upotrebljavaju u koncentraciji koju preporučuju proizvođači (Jackwood and de Wit, 2013). Za vrlo kratko vreme inaktivni ga i 70% alkohol, 6% formalin, fenoli, 2% natrijum hidroksid (Resanović and Vučićević, 2010).

Virus IB-a može se očuvati veoma dugo posle liofilizacije. Infektivna alantoisna tečnost liofilizovana u staklenim ampulama, i čuvana u frižideru, može ostati infektivna najmanje 30 godina (Rusov, 1999; Jackwood and de Wit, 2013). Ako se virusu doda 10%-na glukoza, ona stabilizuje virus IB-a i u sasušenom i zamrznutom stanju. Liofilizovani virus infektivnog bronhitisa se potpuno inaktivira u toku šest meseci kada se čuva na 37°C (Hofstad, 1984; Rusov, 1999; Cavanagh and Gelb, 2008).

2.7. PATOGENEZA I EPIZOOTIOLOGIJA

2.7.1. Prijemčivi domaćini, starosna i rasna predispozicija

Domaća živina (*Gallus gallus domesticus*) i fazani (*Phasianus spp.*) se smatraju prirodnim domaćinima za virus IB (Ignjatović and Sapats, 2000; Cavanagh et al., 2002; Awad et al., 2014). Važno je napomenuti da obolevaju sve starosne i proizvodne kategorije, kao i sve rase, hibridi i provenijencije živine, dok kod pilića virus izaziva najveći mortalitet. Sa starošću jedinki opada i prijemčivost virusa koji izaziva nefropatogeni efekat, lezije jajovoda kao i mortalitet (Smith et al., 1985; Crinion and Hofstad, 1972; Cavanagh and Naqi, 2003). Klinički, IB se kod fazana uglavnom ispoljava kao intersticijalni nefritis, praćen smanjenom proizvodnjom jaja i visokom procentom uginuća.

Međutim virus IB-a inficira širok spektar ptičijih vrsta, posebno onih koje mogu biti češće u kontaktu sa domaćom živinom. Virus sličan IB-u identifikovan je i kod divljih ptica uključujući fazane, paunove, guske, golubove, ćurke, prepelice, plovke i Amazon papagaje (Sea and Tijssen, 1989; Jonassen et al., 2005; Cavanagh, 2005; Circella et al., 2007; Cavanagh, 2007; Cavanagh and Gelb, 2008; de Wit et al., 2011; Awad et al., 2014). Interesantno je napomenuti da su antitela na virus IB-a otkrivena čak i kod jedne vrste pingvina (*Eudyptes Chrysocome*) (Saif et al., 2008; Bande et al., 2016). Uloga divljih ptica u

širenju virusa IB-a do danas je nepoznata i zasniva se na spekulacijama, i potrebna su dodatna opreznost kao i dodatna istraživanja u budućnosti (Awad et al., 2014).

Specifična antitela na virus IB-a detekovana su kod ljudi koji su bili u bliskom kontaktu sa živinom, ali do sada nije ustanovljeno da virus uzrokuje kliničke manifestacije bolesti kod ljudi (Miller and Yates, 1968).

2.7.2. Receptori i ulazna vrata za virus

Mesto vezivanja receptora (engl. Receptor binding domain, RBD) na S1 glikoproteinu virusa IBa igra bitnu ulogu u vezivanju virusa za ćeliju domaćina (Promkuntod et al., 2014; Bande et al., 2016). Nadalje, varijacije u S1 glikoproteinu delimično određuju tkivni tropizam i patogenost virusa (Wentworth and Holmes, 2007; Bande et al., 2016). Virus IB-a napada sluzokožu traheje, bubrega i reproduktivnog trakta preko interakcije S1 glikoproteina vezanjem RBD (19.-69. aminokiselinski ostaci u M41 soju) sa α -2,3-sialinsko kiselinskim ostatkom receptora na površini ćelija (Shahwan et al., 2013; Bande et al., 2016). Receptor za sialinsku kiselinu atenuiranog Baudette-IBV soja pokazuje dodatnu interakciju sa putativnim heparin sulfat- (HS-) mestom vezivanja što možda doprinosi povećanju broja mogućih domaćina (Madu et al., 2007). Nakon vezanja virusa za receptor, na S1 glikoproteinu se dešavaju konformacijske promene, što dovodi do spajanja ćelijske membrane i virusne ovojnice na S2 karboksilnom kraju S glikoproteina (Cavanagh, 2007). Posledično, virus IB-a ulazi u ćeliju i oslobađa svoj nukleokapsid u ćelijsku citoplazmu, što služi kao okidač za replikaciju virusa, njegovo formiranje, pupljenje virusa i njegovo oslobađanje iz ćelije.

2.7.3. Infekcija, širenje i inkubacioni period IB-a

IB virus se širi brzo među živinom u jatima, veoma je patogen a period inkubacije kod IB je veoma kratak, 18 do 36 h. Osnovni način prenošenja bolesti je kontakt sa zaraženim jedinkama a uglavnom se širi horizontalno i to najčešće aerosolom ili peroralnim putem. Patogeneza bolesti se razlikuje u zavisnosti od sistema koji je inficiran, kao i samog soja virusa IB-a (Cavanagh, 2007).

Inkubacioni period je generalno kratak. Vreme koje protekne od inficiranja do ispoljavanja kliničkih simptoma bolesti je između 24-48 h (Hofstad and Yoder, 1966; Abdel-Moneim, 2017). Zavisi od infektivne doze virusa kao i njegove virulentnosti, ulaznih vrata i obično iznosi 18 h od intratrahealne inokulacije, odnosno 36 h od okularne aplikacije (Cavanagh and Gelb, 2008).

Virus se može dokazati u traheji, plućima, bubrezima i burzi Fabrici 24 h od momenta zaražavanja aerogenim putem i prisutan je sve do sedmog dana (Cavanagh and Gelb, 2008; Hofstad and Yoder, 1996).

Virus se primarno replikuje u gornjim respiratornim putevima (traheja i sinusi), izaziva viremiju i potom se širi na druge organe (Raj and Jones, 1997). Uglavnom, virus je prisutan u visokoj koncentraciji u gornjim respiratornim putevima tokom prvih tri do pet dana nakon infekcije (Cook, 1968; El-Houadfi et al., 1986).

Virus se prenosi sekretima zaražene živine, primarno preko respiratornog trakta, okulo-nazalnim putem, kao i fecesom (Cavanagh and Gelb, 2008). U suštini, velika količina virusa je detektovana u trahealnom mukoznom iscetku kao i u fecesu tokom akutne faze bolesti kao i perioda oporavka od bolesti. U pojedinim slučajevima virus IB perzistira kod živine izazivajući latentnu infekciju, a ptice postaju rezervoari i nastavljaju da izlučuju virus preko fecesa (Cavanagh and Gelb, 2008).

Takođe dodatni izvor zaraze su i kontaminirani objekti, oprema i pribor kojima se bolest može preneti iz jednog jata u drugo. Smatra se da je feces, kao i hrana i voda kontaminirana fecesom, bitan izvor infekcije jer virus u fecesu može dugo da preživi te je feces značajan izvor ponovljenih infekcija u jatu tokom faze oporavka od bolesti (Ignjatović and Sapats, 2000). Otpornost virusa u prirodi zahteva dodatna istraživanja, međutim detekcija virusa u cecalnim tonzilama čak do 14 nedelja kao i u fecesu do 20 nedelja nakon infekcije mogu ukazati na ulogu fekalnog izlučivanja na širenje virusa kao i njegovu rezistenciju (Alexander and Gough, 1977).

Vakcinalni sojevi virusa IB-a mogu opstati u različitim unutrašnjim organima čak 163 dana mada je zabeleženo i njegovo duže održavanje (Gay, 2000). Tokom navedenog perioda, virus se periodično može izlučivati nazalnim ekskretima i fecesom. Izveštaji o produženom i povremenom izlučivanju su dokaz potencijalnog rizika prenosa virusa iz jednog jata u drugo preko kontaminiranog osoblja ili opreme. Vertikalno prenošenje virusa infektivnog bronhitisa nije sa sigurnošću potvrđeno, ali se virus može naći na ljusci jaja kontaminiranih fecesom što

doprinosi inficiranju pilića tokom izleganja. Divlje ptice mogu imati ključnu ulogu kao rezervoari i nosioci virusa za različite regije (regionalna distribucija) (Chen et al., 2009; Hughes et al., 2009).

Epizootiološka situacija koja vlada na terenu uz veoma iscrpnu anamnezu je prvi korak ka dokazivanju prisustva IB-a na nekoj farmi. Klinička slika sama za sebe, patognomonična i specifična, nije od velike pomoći uzimajući u obzir širok dijapazon mogućih simptoma, ali uz patomorfološki nalaz može biti od koristi.

2.7.4. Morbiditet i mortalitet

Tokom infekcije virusom IB-a uglavnom sva živina u jatru biva zaražena. Morbiditet može dostići 100%, dok mortalitet kao što je prethodno opisano, varira u zavisnosti od virulentnosti soja virusa, prisustva sekundarnih infekcija, starosti jedinke, imunološkog statusa (maternalnih antitela ili aktivnog imuniteta) i stres faktora poput hladnoće. Umeren, do visok, mortalitet zabeležen je kod infekcije pojedinim sojevima respiratornog i nefropatogenog afiniteta (Cumming, 1963; Cumming, 1969; Saif, 2003; Awad et al., 2014). Stopa smrtnosti može biti 25% i više kod pilića mlađih od šest nedelja starosti, dok je zanemarljiva kod pilića starijih od šest nedelja. Sekundarne bakterijske infekcije (*E.coli*) ili koinfekcije zajedno sa imunosupresivnim virusima (npr. virus Marekove bolesti ili virus infektivne bolesti burze) (Cavanagh and Gelb, 2008; Ariaans et al., 2008; Gallardo et al., 2012) mogu pogoršati ishod infekcije virusom infektivnog bronhitisa. U slučajevima pojave urolitijaze, mortalitet je u rasponu od 0.5-1.0% nedeljno. Kod lovnih fazana, kod kojih je bio izolovan koronavirus, zabeležen je mortalitet od 45% kod jedinki starosti deset nedelja, (Lister et al., 1985) dok je kod starijih jedinki bio 15%. Stopa mortaliteta može biti 1%, a živina može brzo da se oporavi, ako je infekciju uzrokovao neki slabije virulentni soj virusa i ukoliko nisu prisutne sekundarne bakterijske infekcije (Cavanagh and Gelb, 2008).

2.8. KLINIČKA SLIKA

Klinička slika infektivnog bronhitisa zavisi od starosti, pola, genetske predispozicije i imunološkog statusa jedinke u vreme infekcije, virulence i količine samog soja virusa, prisustva stresora kao što su hladno vreme, prašina, amonijak kao i sekundarne bakterijske infekcije (Ganapathy, 2009). Najznačajniji simptomi su oni koji potiču od respiratornog trakta, ali postoje i druge forme koje pogađaju reproduktivni, renalni i gastro-intestinalni sistem. Izbijanje bolesti može biti eksplozivno kada dolazi do brzog širenja virusa unutar čitavog jata kroz samo nekoliko dana.

Postoje podaci da virus može izazvati neplodnost muških pilića (Jones, 2010). Virus je izolovan iz testisa i semenika inficiranih jedinki (Gallardo et al., 2011).

Nespecifični respiratorni znaci virusa IB-a kod osetljivih pilića su glad za vazduhom, kašljanje, kijanje, krkljanje i nazalna disfunkcija. Otežano disanje, glad za vazduhom, prepoznaje se po otvorenim ustima, ispruženom vratu te raširenim krilima (Resanović and Vučićević, 2010). Inficirane ptice su tromе i bezvoljne, sa nakostrešenim perjem. Mogu se uočiti vodenaste oči, a povremeno pilići mogu imati otečene sinuse. Takođe, javljaju se i konjuktivitis, profuzno suzenje, edemi i celulitis periorbitalnog tkiva (Terregino et al., 2008). Pilići su letargični, depresivni i skupljaju se oko izvora toplote (Cavanagh and Gelb, 2008; Jackwood and de Wit, 2013). Konzumacija hrane je značajno smanjena te posledični gubitak težine. Kod pilića starijih od šest nedelja, znaci su nejasni i bolest može proći neopaženo ukoliko se jato detaljno ne pregleda noćnim osluškivanjem, kada je jato mirno, kao i pojedinačnim pregledom pilića (Rusov, 1999; Jackwood and de Wit, 2013). Na ozbiljnost respiratornih znakova utiču vremenske prilike, način držanja, vrsta pilića, soj virusa, program vakcinacije IB-a kao i prisustvo koinfekcije uključujući i sekundarne infekcije (Cavanagh and Gelb, 2008.; Ganapathy, 2009; Jackwood and de Wit, 2013).

Nekoliko sojeva virusa infektivnog bronhitisa imaju jak tropizam za bubrege te ovi nefropatogeni sojevi mogu izazvati ozbiljnu štetu kao i visoku stopu mortaliteta. Brojlerski pilići inficirani sa nefropatogenim virusom mogu se oporaviti od respiratorne faze a potom pokazati znake depresije, imati nakostrešeno perje, vodenast izmet, te povećan unos vode i mortalitet (Cumming, 1969; Swayne et al., 2013; Jackwood and de Wit, 2013). Jata mogu biti izrazito mokra i urin može sadržati povećanu količinu urata. U slučajevima kada je urolitijaza povezana sa IB virusom kod nosilja, može doći do povećanja mortaliteta premda se jato čini

zdravo (Brown et al, 1987; Cowen et al., 1987; Swayne et al., 2013). Stres usled hladnoće, rasta pilića kao i visokoproteinske dijetе koje sadrže animalne nus-produkte kao izvore proteina su predisponirajući faktori za razvoj kliničkih znakova tokom infekcije nefropatogenim sojem virusa (Klieve and Cumming, 1988; Swayne et al., 2013).

Infekcija nastaje u epitelnim ćelijama Harderove žlezde, traheje, pluća i vazdušnih kesa. Virus nakon toga prelazi u bubrege i urogenitalni trakt gde izaziva sistemsku infekciju (Cavanagh and Gelb, 2008; Arshad et al., 2002). Težina infekcije i klinička manifestacija infekcije IB-a zavisi od organa, odnosno sistema organa koji su zahvaćeni.

Kod nosilja, infekcija reproduktivnog trakta povezana je sa lezijama na jajovodu. Pad produkcije i kvaliteta jaja su uočeni uz respiratorne znakove. Respiratorni znakovi mogu izostati ili biti vrlo blagi čak i u slučajevima pada proizvodnje jaja kao i proizvodnje jaja sa bledom, nepigmentisanom ljuskom. Može doći do nošenja deformisanih jaja, jaja sa nepravilnim oblikom i tankom, mekanom ljuskom (Slika 7). Uočljivo je i vodenasto belance te smanjena izvođenost pilića (Crinion, 1972; Cavanagh and Gelb, 2008).



Slika 7. Izgled ljuske jaja porekla od IB zaraženih koka nosilja.

Kvalitet sadržaja jaja takođe može biti promenjen. Kvalitet jaja se određuje tako što se jaje razbije na ravnu površinu. Kod jaja inficiranih koka se uočava tanko i vodenasto belance, bez jasne razlike između tanjeg i debljeg sloja belanca kao što je to slučaj kod jaja koja nisu zaražena virusom IB-a (Awad et al., 2014).

Pojedini sojevi virusa IB-a kod jednodnevnih pilića mogu da dovedu do trajnog oštećenja jajovoda, što dovodi do smanjene proizvodnje jaja kao i proizvodnje jaja slabijeg kvaliteta u periodu nošenja (Raj and Jones, 1997; Benyeda et al., 2009; Ganapathy, 2009).

Infekcija kod nosilja rezultira padom proizvodnje jaja i stepen oštećenja reproduktivnog trakta varira u zavisnosti od vremena infekcije kao i zdravstvenog statusa jedinke (Cook and Mockett, 1995). Vrlo mala je verovatnoća da će se inficirana jata vratiti na normalan nivo proizvodnje jaja (Benyeda et al., 2009; Ganapathy, 2009). Prisustvo specifičnih maternalnih antitela može zaštititi jajovod od oštećenja virusom u ranom periodu života (Chew et al., 1997; Cavanagh and Gelb, 2008).

Nivo pada proizvodnje može varirati od blagog do čak 70% (Eck, 1983; Cavanagh and Gelb, 2008) i zavisi od soja virusa IB-a koji je uzrokovao bolest, nivoa imuniteta protiv tog soja, vremena zaražavanja unutar perioda nošenja ali i koinfekcije drugim virusima, kao što su virus sindroma pada nosivosti (EDS) adenovirus (Jackwood and de Wit, 2013). Koinfekcija sa *Mycoplasma synoviae* povećava procenat pojave abnormalne ljuske jaja (Feberwee et al., 2009; Jackwood and de Wit, 2013). Ukoliko je pad proizvodnje jaja bio blag, tehnološki nivo proizvodnje može se dostići nakon jedne do dve nedelje. Sa većim padom proizvodnje može proći i šest do osam nedelja dok se proizvodnja ne vrati na period pre infekcije ali često se taj nivo ne dostigne u potpunosti. Jata sa kokama koje leže u gnezdu ali ne nose jaja, tzv "lažnim" nosiljama, ne uspevaju da povrate normalnu nosivost dok jato izgleda zdravo, ponaša se normalno i produkuje naizgled jaja dobrog kvaliteta. Vrhunac proizvodnje može biti do 35% od očekivane proizvodnje jaja (Jackwood and de Wit, 2013).

Značajan pad u proizvodnji jaja je tipičan simptom infektivnog bronhitisa. Iako se jata obično vakcinišu protiv zaraznog bronhitisa u periodu uzgoja pilića, pre ulaska u proizvodnju ali i kasnije na način da bude zaštićena tokom proizvodnje, pojedina živina može biti inficirana iako pokazuje tipične kliničke znake bolesti. Upravo zbog ovoga, teško se sa sigurnošću može utvrditi pravi razlog za smanjenje kvaliteta ljuske jaja i smanjenu proizvodnju jaja bez dodatne dijagnostike (Jackwood and de Wit, 2013).

2.9. PATOMORFOLOŠKE I PATOHISTOLOŠKE PROMENE

Patomorfološki nalaz ne mora da bude karakterističan, pogotovo u početku bolesti, i često je zamaskiran nekim drugim oboljenjem. Najizrazitije promene nalaze se na organima respiratornog trakta i to najčešće u smislu pojave kataralnog i hemoragičnog bronhitisa i traheitisa. Bronhije su ispunjene seroznim, sluzavim a ponekad i kazeoznim eksudatom, koji se može naći i u traheji. U izraženim slučajevima, kod malih pilića zapaža se sluzav, zatim

sluzavo-gnojav iscedak iz nosa i očnih kapaka, koji može da se nadje i u sinusima i traheji. Ređe se mogu zapaziti sluzavi, fibrinski čepovi u traheji i laringsu koji mogu da dovedu do zapušnja njihovih lumena. Kod pilića starijih od dva meseca promene su retko izražene.. Sluzokoža gornjih respiratornih puteva obično je edematozna. U plućima mogu da se ustanove mala pneumonična žarišta, naročito oko većih bronhijalnih grana. Histološki se konstatuje hipertrofija epitela sluznice traheje, infiltracija lamine proprije mononuklearnim ćelijama, proliferacija mononuklearih ćelija i edem. Epitelne ćelije postaju kubičnog oblika. U primarnim i sekundarnim bronhijama se pored kataralnog zapaljenja ustanovi intenzivna hiperplazija limfocitnih ćelija, u vidu ognjišta u zidu bronhija (Orlić and Kapetanov; 2007). Vazdušne kese su obično u kasnijem toku bolesti zamućene i u njima se nalazi žućkasto-beli kazeozni eksudat koji može da dovede do zapušnja lumena. Pluća mogu biti kongestirana. Ponekad se javlja i serofibrinozni perikarditis (Saif, 2003; Awad et al., 2014).

Nefropatogena infekcija uzrokuje pojavu otečenih i bledih bubrega sa tubulima i ureterima često proširenim od prisutnog sadržaja urata (Cumming, 1963; Ziegler et al., 2002; Boroomand et al.,2012; Cong et al.,2013). Promene na bubrezima odgovaraju promenama koje se sreću kod intersticijalnog nefritisa. U težim slučajevima nefropatogene infekcije virusom IB-a dolazi do promena i na ovarijumu i oviduktu. Ako se pilići inficiraju u prvih 18 dana života, nastaju trajne promene na organima za reprodukciju. Pojedinačni jajni folikuli su atrofični sa jako iniciranim krvnim sudovima pa čak i krvarenjima. Ponekad jajni folikuli otpadnu i nalaze se slobodni u trbušnoj duplji. Smatra se da su anomalije na jajovodu utoliko veće ukoliko je infekcija ranije usledila. Kod kokošaka nosilja nađe se atrofija, degeneracija ili zapaljenje jajnika i jajovoda. Takođe se mogu pojaviti ciste na jajovodu. Kod "lažnih" nosilja jajnik je funkcionalno sposoban ali je jajovod zakržljao.

2.10. HEMATOLOGIJA I IMUNITET

U prva dva dana nakon infekcije pilića virusom IB-a uočena je leukopenija, zatim leukocitoza, koja se posle sedam dana smanjuje i oko 15. dana broj leukocita dostiže normalni nivo. Pilići, koji su preboleli bolest izazvanu infekcijom terenskim ili divljim virusom, otporni su na intratrahealno aplikovani homologni soj virusa IB. Nakon izlaganja pilića virusu IB potrebno je do tri nedelje da se kod pilića produkuje visok titar specifičnih

antitela. Pluralitet sojeva virusa komplikuje izučavanje imuniteta kod infektivnog bronhitisa (Rusov, 1999).

2.10.1. Protektotipovi virusa IB-a

Antigenske i genetske varijacije između sojeva infektivnog bronhitisa same po sebi nisu dovoljne da bi se utvrdila unakrsna zaštita između sojeva. Iz tog razloga prihvaćen je termin protektotip koji određuje unakrsnu zaštitu između postojećih vakcinalnih sojeva i novonastalih serotipova i genotipova virusa IB-a.

Novi genotipovi se mogu pojaviti kao rezultat malih promena aminokiselinske sekvence S1 gena virusa. Iako se čini da se radi o novom genotipu, većina ostatka virusnog genoma je ostala nepromenjena. Ovo je najverovatnije razlog zašto vakcina protiv IB određenog genotipa može pružiti zaštitu i protiv sojeva IB koji ne pripadaju istom genotipu.

Istraživanja pokazuju da vakcinacija sa dva različita genotipa vakcina virusa IB-a može omogućiti zaštitu protiv različitih genotipova virusa IB-a. Kao najbolja kombinacija vakcinacije protiv IB-a pokazala se upotreba vakcine soja MA5 aplikovana prvog dana, koju prati vakcina soja 4/91 aplikovana četrnaestog dana starosti (Cook et al., 1999). Međutim, ni jedna vakcina ili kombinacija vakcina neće pružiti zaštitu protiv svih tipova virusa IB-a i jedini siguran način da se utvrdi da li je vakcinalni program adekvatan je taj da se eksperimentalno testira na živini.

2.10.2. Urođeni imunitet

Urođeni imunološki odgovor smatra se važnim samo u ranim fazama infekcije virusom; ograničava širenje virusa sve dok se adaptivni odgovori T i B ćelija ne mobilišu kako bi se kontrolisala infekcija. Urođeni i adaptivni odgovori su visoko integrisani. Poznato je da virus IB-a indukuje različite lokalne urođene efektore i Th1 adaptivni imunitet tokom početne faze infekcije, i ovi efektori su odgovorni za brzo uklanjanje virusa iz traheje (Laudert et al., 1993). Manosa vezujući lektin (MBL-Mannose-binding lectin) važan je protein urođenog imunološkog odgovora, koji ima ulogu u regulaciji adaptivnog imunog odgovora na virus IB-a (Juul-Madsen et al., 2011).

Hiperplazija peharastih ćelija i alveolarnih žlezda sluzokože sa dodatnim povećanjem nazalnog seromukoznog iscetka kao i kataralnog eksudata u traheji su prvi znaci odgovora urođenog imuniteta na infekciju sa virusom IB-a (Nakamura et al., 1991). Toll-slični receptori (TLR21) su stimulisani sa prisustvom dezoksinukleotida koji sadrže CpG motive, koji indukuju proizvodnju NF-kB što uslovljava transkripciju velikog broja citokina (Brownlie et al., 2009). Brz influks makrofaga u inficirano tkivo odigrava se u prvim časovima infekcije i ima izuzetno veliku ulogu u ograničenju replikacije virusa IB-a u respiratornom tkivu. Heterofili su odgovorni za destrukciju ćelija inficiranih virusom IB-a posredstvom fagocitoze i oksidativnog lizozomalnog enzimskog oslobađanja (Fulton et al., 1997). Međutim u trahealnom epitelu heterofili ne smanjuju virusnu replikaciju ali umanjuju patologiju lezija (Raj et al., 1997). Proizvodnja interferona u plazma ćelijama i u svim u tkivima tela (Otsuki et al., 1987), sa simultanom up-regulacijom informacione ribonukleinske kiseline iRNK, proinflamatornih citokina (Interleukin 6, Interleukin 1B) i lipopolisaharid indukovan tumor nekroza faktor (TNF) se proizvode tokom infekcije virusom infektivnog bronhitisa. Ovo je sve primećeno tokom visoke koncentracije virusa u tkivima i mikroskopskim lezijama što ukazuje da visoki titrovi virusa i citokina izazivaju trahealne i bubrežne lezije (Okino et al., 2014; Chhabra et al., 2015). Za razliku, il6 ekspresija gena i povećana regulacija IFN- γ , IL-8 (CXCLi2) i MIP-1b gena zajedno sa manosa vezujućim lecitinom (engl. Mannose-binding lectin; MBL), koji aktivira komplement, inhibira replikaciju virusa (Luul-Madsen et al., 2007). Apoptoza je dodatni odbrambeni mehanizam protiv IB infekcije sa ranom lizom inficiranih ćelija, sprečavajući umnožavanje virusa (Cong et al., 2013).

2.10.3. Uloga antitela u zaštiti od virusa IB-a

Cirkulatorna specifična antitela nisu u znatnoj korelaciji sa zaštitom od infekcije virusom IB-a. (Gough and Alexander, 1979) Suprotno, visoki titri humoralnih antitela bili su u direktnoj korelaciji sa odsustvom izolacije virusa iz bubrega i genitalnog trakta (Gough et al., 1977; Yachida et al, 1985). Specifična antitela za virus IB su vrlo bitna u sprečavanju širenja virusa sa inficirane traheje na ostale prijemčive organe, uključujući bubrege i ovidukt (Raj and Jones, 1997). Generalno, nivo serumskih specifičnih antitela nije usko u korelaciji sa zaštitom svih prijemčivih tkiva, ali prisustvo lokalnih antitela sprečavaju infekciju respiratornog trakta (Ignjatović and McWaters, 1991). Nadalje, specifični imunoglobulini klase A su najpre dokazani u suzama a potom u krvnom serumu što nagoveštava da su

imunoglobulini klase A vrlo važni u neutralizaciji virusa IB na površinama mukoza i imaju veoma bitnu ulogu u lokalnoj kontroli virusa IB (Develaar et al., 1982; Gelb et al., 1998).

2.10.4. Aktivni imunitet

Živina koja se oporavila od subkličičke i kliničke infekcije je rezistentna na ponovnu infekciju istim virusom (homologna protekcija), dok obim protekcije na zaražavanje drugim sojevima virusa IB-a varira (heterologna protekcija). Faktori koji komplikuju istraživanje mehanizma i trajanja imuniteta na IB su brojni serotipovi, varijacije u virulentnosti različitih sojeva virusa kao i različita manifestacija IB infekcije za koju je zaštita neophodna.

Kontakt vakcinisanih ptica sa homolognim virusom rezultira mnogo nižim titrom virusa nakon oporavka nego kod nevakcinisanih ptica. Takođe titar virusa IB-a je kraće vreme prisutan kod vakcinisanih nego kod nevakcinisanih ptica (Cook et al., 1986; Lambrechts et al., 1993; Pensaert and Lambrechts, 1994; de Wit et al., 1998). Kada dođe do infekcije virusom heterolognog tipa, on se replikuje do višeg titra i uzrokuje pojavu kliničke manifestacije bolesti.

Stepen zaštite disajnih organa obično se ocenjuje tri do četiri nedelje nakon IB infekcije ili sprovedene imunizacije i može se uraditi na nekoliko različitih načina: ispitivanjem trahealnog, intranazalnog i intraokularnog brisa. Nemogućnost da se detektuje virus IB-a iz traheje četiri do pet dana posle inokulacije koristi se kao jedinstveni kriterijum imuniteta (Hofstad, 1981). Sveobuhvatnije ocene uključuju dva ili više dodatnih kriterijuma otpornosti na infekciju, uključujući i neuspeh izolacije virusa iz bubrega i ovidukta, izostanak kliničkih znakova IB-a, izostanak trahealnih lezija, ili prisustvo aktivnosti trahealnih cilija (Winterfield et al., 1962; Darbyshire, 1985; Boltz et al., 2004; Hodgson et al., 2004). Alternativni pristup je evaluacija vakcinisanih pilića na zaštitu od smrtnog ishoda inokulacijom mešavine IBV-a i *E. coli*. Ova metoda je dokazala unakrsnu zaštitu nakon vakcinacije više nego druge metode procene trahealnog imuniteta (Cook et al., 1986).

Zaštita od smrtnosti od nefritisa važna je kao dokaz zadovoljavajućeg vakcinalnog imuniteta u kojem je nefritis glavni klinički simptom (Klieve and Cumming, 1988; Ratanasethakul and Cumming, 1983). Sposobnost da se smanji ili spreči pad proizvodnje jaja usled infekcije je dokaz zaštite jata koka nosilja od IB (Box et al., 1988).

Poznavanje mehanizma zaštite protiv kliničkog ispoljavanja bolesti IB-a je nepotpuna, iako je utvrđeno da S1 podjedinica S proteina podstiče stvaranje VN (virus neutralizacioni test) i HI (test inhibicije hemaglutinacije) specifičnih antitela protiv virusa IB-a i odgovarajući zaštitni imunitet (Macnaughton et al., 1981; Ignjatovic and Galli, 1994; Song et al., 1998; Johnson et al., 2003).

Mehanizmi lokalnog imuniteta respiratornog tkiva su važni u zaštiti jer prisutna neutrališuća specifična antitela u nazalnim sekretima igraju ulogu u sprečavanju ponovne infekcije virusom IB-a (Holmes, 1973) kao i da Harderova žlezda doprinosi lokalnom imunitetu (Davelaar and Kouwenhoven, 1977). Specifična antitela protiv virusa IB-a su otkrivena u suzama vakcinisanih pilića pomoću ELISA testa i pomoću testa neutralizacije virusa (Gelb et al., 1998). Međutim, titri specifičnih antitela u suzama nisu pouzdani pokazatelji imuniteta na infekcije virusom IB-a kao što su to respiratorni testovi sa virusom IB-a.

2.10.5. Čelijski imunološki odgovor

U poslednjih 10 godina čelijski imunološki odgovor je znatno ispitivan. Jansen i saradnici (2006) su ustanovili da je imunoloski odgovor na virus infektivnog bronhitisa u traheji posredovan T ćelijama. CD4 i CD8 su prisutne u trahealnoj sekreciji. Uloga čelijskog imunog odgovora najbolje je potvrđena kada su autori koristili imunosupresivni lek-citospotin i dokazali da je titar virusa kod tretiranih jedinki sa citosporinom bio signifikantno niži u odnosu na grupu koja nije tretirana.

2.10.6. Imunitet poreklom od majke

Izleženi pilići sa visokim titrom specifičnih maternalnih At su zaštićeni od infekcije virusom IB-a ukoliko se izvrši veštačka infekcija prvog dana ali ne i sedmog dana. Zaštita je u korelaciji sa nivoom lokalnog imuniteta ali ne i sa sistemskim humoralnim antitelima (Mondal and Naqi, 2001).

Visok novo maternalnih antitela značajno smanjuje obim kliničkih znakova, odnosno oštećenje traheje, bubrega i jajovoda usled infekcije virusom IB-a kod pilića tokom infekcije

prvih dana života (Cumming, 1969; Mondal and Naqi, 2001; de Wit et al., 2011). Nekoliko istraživača prijavilo je negativan uticaj visokog nivoa specifičnih maternalnih antitela protiv vakcinalnog soja kada je vakcina primenjena prvog dana nakon izleganja (Pensaert and Lambrechts, 1994), dok drugi nisu detektovali nižu efikasnost vakcinacije istog dana u prisustvu specifičnih maternalnih antitela (Cook et al., 1991).

2.11. DIJAGNOZA BOLESTI

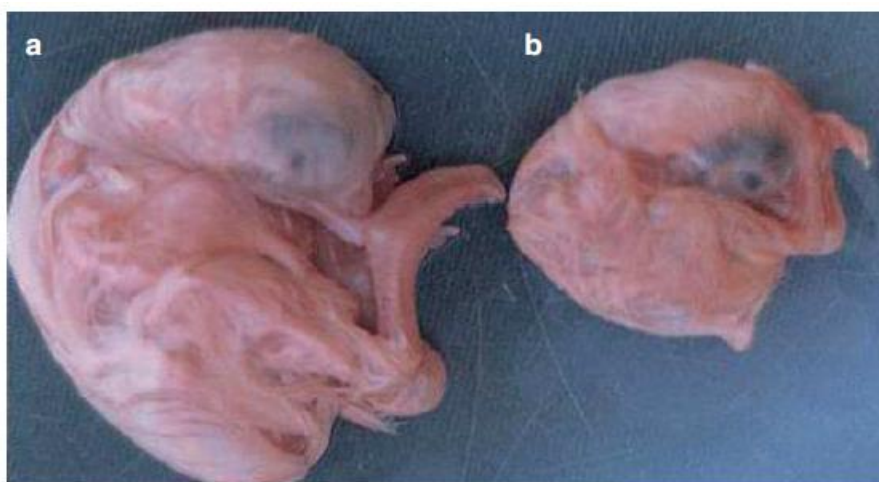
Dijagnoza bolesti se bazira na istoriji bolesti, kliničkoj slici, patoanatomskom nalazu, serokonverziji (rastućem titru specifičnih antitela protiv virusa IB-a), detekciji antigena virusa IB-a različitim serološkim testovima, izolaciji virusa, kao i detekciji RNK virusa IB-a (Gelb and Jackwood, 2008; Jackwood and de Wit, 2013). Od kliničkih znakova i anamneze, inficirana jata pokazuju smanjenje produkcije jaja kao i kvaliteta ljuske. Klinički znaci bolesti respiratornog trakta mogu izostati međutim ovo nije dovoljno za postavljanje sigurne dijagnoze, obzirom da se slični problemi javljaju usled problema sa hranom i menažmentom kao i usled prisustva nekih drugih bolesti (Šekler, 2004). Konačna dijagnoza IB-a zahteva identifikaciju serotipa ili genotipa virusa IB-a kako bi se zbog velikih antigenskih varijacija između virusa IB-a primenila odgovarajuća vakcina. Postoje mnogi načini potvrde virusa IB-a ili specifičnih antitela izazvanih njime (de Wit, 2000; Cavanagh and Gelb, 2008), ali ne postoji potpuno zadovoljavajuća tehnika, bilo da je bazirana na antitelima, izolaciji virusa IB-a ili biomolekularnim tehnikama, za potvrdu infekcije određenog IB serotipa na terenu (Jackwood and de Wit, 2013).

Izolacija i identifikacija uzročnika: Iako je prvenstveno respiratorni patogen, IBV može da se umnožava u epitelnim ćelijama drugih organa kao što su bubreg, jajovod, digestivni trakt. Stoga je poznavanje patogeneze IBV bitno za detekciju virusa (Dhinaker and Jones, 1997; Cavanagh and Gelb, 2008; Jackwood and de Wit, 2013). Prilikom uzorkovanja treba uzeti u obzir sledeće faktore: vreme koje je proteklo između infekcije, uzorkovanja i imunološkog statusa ptice na infekciju virusom IB-a (de Wit, 2000; Cavanagh and Gelb, 2008).

Izolacija virusa: traheja je primarni organ za razmnožavanje virusa IB-a i, stoga je pogodna za uzorkovanje, naročito u prvoj nedelji infekcije. Odgovarajući uzorak je trahealni bris ili sveži uzorak trahealnog tkiva uzet tokom obdukcije a da je uzorak čuvan do analize na

niskoj temperaturi. Kod pojedinih pilića, titar virusa IB-a je maksimalan četvrtog ili petog dana posle infekcije nakon čega brzo opada. Kloakalni bris ili bubrezi i cecalne tonzile prikupljeni tokom post mortalnog pregleda adekvatni su uzorci u slučajevima kada je više od nedelju dana prošlo od početka infekcije. To je delom zbog toga što se virus u početku umnožava u gornjim delovima respiratornog trakta a potom se širi na nerespiratorne organe. Treba napomenuti da vakcinalni virus IB-a može da opstane, naročito u nerespiratornim tkivima, npr, cekalnim tonzilama (Alexander and Gough, 1977.; Jordan and Nassar, 1973; Lucio and Fabricant, 1990; Cavanagh and Gelb, 2008). Virus IB se teško izoluje iz kloakalnih briseva i fecesa. U zavisnosti od kliničke slike bolesti preporučuje se uzimanje uzoraka iz pluća, bubrega i jajovoda. Uzorkovanje izuzetno velikih jata može biti problem jer poskupljuje proces izolacije virusa zbog velikog reprezentativnog uzorka (Gelb et al., 1989b; Cavanagh and Gelb, 2008; Jackwood and de Wit, 2013).

Uzorci za izolovanje virusa IB-a obično se inokulišu u embrioniranim kokošijim jajima ili primarnim ćelijskim kulturama traheje, poreklom od jata slobodnih od specifičnih patogena (engl. specific pathogen free -SPF). Alantoisnu tečnost od inokulisanih jaja ili sadržaj inficirane ćelijske kulture treba sakupiti posle 48-72 časova. Mogu se uočiti specifične lezije na embrionima ukoliko je u ispitujućem materijalu bio prisutan virus IB-a, kao što su kržljivosti (patuljasti rast) i krivljenje embriona i njegovih nogu (slika 8) javljaju se sa povećanjem broja pasaža baš kao i incidenca uginuća inokulisanih pilećih embriona (Jackwood and de Wit, 2013).



Slika 8. Izgled embriona: a) Normalni embrion; b) Zakržljao, patuljast embrion nastao nakon inokulacije SPF jaja sa virusom IB-a (Abdel-Moneim, 2017).

Da bi se virus izolovao, potrebno je najmanje tri do četiri puta pasirati inokulisani materijal da bi virus izazvao smrt ili zaostajanje u razvoju embriona ili citopatogeni efekt (CPE) na ćelijskoj kulturi. Ciliostaza se može posmatrati na početnim pasażama u kulturi trahealnog organa. Nakon otvaranja vazdušne komore jajeta, embrion se vidi uvijen u sferni oblik sa nogama deformisanim i komprimovanim nad glavom i sa zgusnutim amniomom uz njega (slika 8) (Jackwood and de Wit, 2013).

Gore navedena zapažanja nisu dovoljna da se potvrdi prisustvo virusa IB-a; ono mora biti potvrđeno serološkim metodama (npr, VN, HI, ELISA test), imunohistohemijski, biomolekularnim tehnikama (PCR, real-time RT-PCR) ili sa elektronskim mikroskopom (Gelb et al., 1989a; de Wit, 2000; Cavanagh and Gelb, 2008).

2.11.1. Molekularna dijagnostika

Molekularne metode, zbog visoke osetljivosti i brzog dobijanja rezultata, kao što su polimeraza lančana reakcija u realnom vremenu (RT-PCR; eng. Real-Time Polymerase Chain Reaction), polimorfizam dužine restrikcijskih fragmenata (engl. Restriction Fragment Length Polymorphism: RFLP) i sekvencioniranje genoma su skoro zamenile konvencionalne serološke i virološke metode za dijagnostiku virusa IB-a (Bande et al., 2016). *In situ* hibridizacija takođe može poslužiti za detekciju virusne RNK (Collisson et al., 1990).

2.11.1.1. RT-PCR metoda

RT-PCR koristi virusnu RNK, umnoženu direktno (one-step RT-PCR) ili sa prethodnom cDNA sintezom (two-step RT-PCR). RT-PCR analiza je dizajnirana i prvi put upotrebljena 1991. godine za otkrivanje IBV-S2 gen (Lin et al., 1991). Opšte i serotip-specifične RT-PCR analize su dizajnirane ciljano za delove i/ili fragmente u genomu virusa IB. RT-PCR analize specifične za neprevođene krajeve (UTR) genoma virusa IB-a i N gen koriste se za univerzalno otkrivanje zbog evolucijske očuvanosti ciljanog dela genoma u većini serotipova virusa IB-a (Adzhar et al., 1996). Tako univerzalni panel-koronavirus prajmer može takođe da se koristi za jednostepenu RT-PCR analizu različitih sojeva virusa

IB-a (Stephensen et al., 1999). Serotip specifična PCR metoda je dizajnirana da omogući diferencijaciju različitih terenskih izolata virusa IB-a (Masačusets, Konektikat, Arkanzas i Delaver) (Keeler et al., 1998; Bande et al., 2016). Međutim, u novije vremen, umnožavanje i sekvencioniranje S1 gena sve se više koriste za genotipsku klasifikaciju novih sojeva virusa IB-a (Zhu et al., 2007; Valastro et al., 2016).

2.11.1.2. Polimorfizam dužine restrikcijskih fragmenata- RFLP

Polimorfizam dužine restrikcijskih fragmenata (RFLP) je metod za genotipsku diferencijaciju različitih poznatih sojeva virusa IB i za otkrivanje novih varijanti nakon RT umnožavanja (Lin et al., 1991). Kompletna sekvenca virusa IB-a, S1 glikoproteina, može biti šablon za umnožavanje i analizu enzima (Mardani et al., 2006). RFLP omogućava diferencijaciju raznih poznatih sojeva virusa IB-a (Montassier et al., 2008). Analiza je uporediva sa tradicionalnom virus neutralizacijom (VNT) iako je neke sojeve, kao što su Grej i JMK, bilo veoma teško za diferencirati korišćenjem nizova restriktivnih enzima. Zato je univerzalna primena RFLP metode ograničena (Abdel Moneim, 2017).

2.11.1.3. RT-PCR u realnom vremenu i druge forme PCR analize

Zbog povećane osetljivosti i specifičnosti, real time RT-PCR analize su počele da se koriste za detekciju virusa IB-a (Chousalkar et al., 2009; Acevedo et al., 2013). Prednost je što se više uzoraka može pregledati u kratkom vremenskom roku, isplativije je i daje podatak o nivou virusne nukleinske kiseline u uzorku, odnosno količini virusa.

Konvencionalni RT-PCR se takođe koristi za identifikaciju prisustva nukleinske kiseline virusa IB-a, međutim može biti neophodna pasaža u embrioniranim jajima pre nego što se dobije pozitivan rezultat. Kada je dostupna samo mala količina virusne RNK (npr. na brisevima), nested PCR se koristi. Međutim nested PCR testovi su previše osetljivi za upotrebu u rutinskoj dijagnostici i nedostatak je što su moguće kroskontaminacije i mogućnost dobijanja lažno pozitivnog rezultata. Naposljetku, treba naglasiti da je pozitivan

RT-PCR test pokazatelj nalaza virusne nukleinske kiseline i nije dovoljan da bi se utvrdio tip virusa IB-a.

2.11.1.4. Sekvence i filogenetska analiza

Za genotipizaciju virusa IB-a uglavnom je umnožavan S1 gen pomoću RT-PCR, sekvencioniran i podvrgnut bioinformatičkoj analizi. Nakon sekvencioniranja S1 gena, izolati bivaju okarakterisani kroz bioinformatičke analize na osnovu njihove filogenetske povezanosti sa referentnim sekvencama dostupnim u bazi podataka sekvenci, kao što su nacionalni centar za biotehnoške informacije (engl. National center for biotechnology information; NCBI), evropska laboratorija za molekularnu biologiju (engl. The european molecular biology laboratory; EMBL) i NK banka Japana (engl. The DNA Data Bank of Japan; DDBJ). Manjak standardizovanih metoda između laboratorija posebno za S1 genski segment koji se koristi za filogenetsku analizu ograničava genotipizaciju do neke mere. Trenutno molekularne metode, kao što je sekvencioniranje sledeće generacije (engl. Next generation sequencing; NGS) koriste se za sekvencioniranje čitavog genoma u ograničenim vremenskim periodima.

2.12. DIFERENCIJALNA DIJAGNOZA

Prilikom kliničke dijagnostike IB može ličiti na druge akutne respiratorne bolesti kao što su Njukastl bolest (ND), infektivni laringotraheitis (ILT), nisko patogeni avijarnu influencu i zaraznu koricu (ZK). Njukastl bolest izazvana velogenim viscerotropnim ili neurotropnim sojem avulavirusa tipa 1, uzrokuje mnogo veći mortalitet a i sami klinički znaci su mnogo jače izraženi nego kod infektivnog bronhitisa. Lentogena ND zajedno sa pneumotropnim sojem i nisko patogenim sojem avijarne influencu uzrokuje umerenu respiratornu bolest sa niskom mortalitetom te mogu u prvi mah podsećati na virus IB. Laringotraheitis ima tendenciju sporijeg širenja u jatima dok respiratorni simptomi mogu biti ozbiljniji nego kod IB-a. Međutim, neki sojevi virusa ILT izazivaju umerenu bolest koja može proći neopaženo. Infektivni laringotraheitis retko se javlja u jatima tek izležanih pilića, a IB se pojavljuje i kod mladih pilića i kod odrasle živine. Pad proizvodnje jaja i problem sa

kvalitetom ljuske jaja u jatima inficiranim virusom sindroma pada nosivosti, su slični onim kod IB osim što sam kvalitet sadržaja jajeta nije promjenjen u slučaju sindroma pada nosivosti. Zarazna korica se može razlikovati na bazi facijalnog otoka, koji se kod infektivnog bronhitisa retko nalazi. Kod ZK obično nastaje nazalni iscedak dok se iste promene kod infektivnog bronhitisa mogu naći samo kod mladih pilića. Promene u traheji mogu se naći i kod zarazne korice ali to nije karakteristično kao kod infektivnog bronhitisa (Rusov, 1999).

2.13. SEROLOŠKE METODE DETEKCIJE

Izbor prikladne serološke metode i analizu dobijenih rezultata otežava postojanje velikog broja različitih serotipova virusa IB-a i antigenske varijacije unutar opisanih tipova. Svi serotipovi virusa IB izgleda da imaju zajedničke epitope (grupno specifični antigeni), što nije iznenađujuće, najverovatnije zbog visoke homologije aminokiselinskih sekvenci unutar N i M proteina kao i S nepromenljive regije S2 dela spajk proteina. Tokom prve infekcije sa virusom IB-a, humoralni odgovor je serotip specifičan. Tokom naknadne infekcije, čak i sa istim serotipom, humoralni imunološki odgovor je širokog spektra i pokriva veći broj serotipova. Obzirom da se pilići tokom proizvodnog ciklusa vakcinišu više puta sa modifikovanim živim vakcinama (brojleri i jednodnevni pilići) ali i inaktivisanim (nosilje i roditeljska jata), treba naglasiti da dobijen serum sa farmi nije pouzdan za serotipizaciju. Samo serumi proizvedeni eksperimentalno na SPF (engl. Specific pathogen free) pilićima treba koristiti za serotipizaciju, zbog toga što ELISA, imunoflorescencija i AGID test vezuju samo grupno specifične antigene te se ne mogu koristiti za razlikovanje serotipova (Cavanagh and Gelb, 2008).

Trenutno se najviše koristi ELISA test i sigurno je najupotrebljiviji serološki test, zato što nije skup i može se koristiti za pregled velikog broja seruma u vrlo kratkom vremenskom periodu. Komercijalni testovi postoje, i obično detektuju antitela (IgG) posle prve nedelje od infekcije (Mockett and Darbyshire, 1981).

Rutinska serologija obično se obavlja testom neutralizacije virusa (engl. Virus serum neutralization; VN), testom inhibicije hemaglutinacije (engl. HI) ili ELISA testom (de Wit, 2000). Može se koristiti grupno specifičan test imunodifuzije u gelu od agara (AGID), ali precipitirajuća antitela su kratkotrajna, a test može dovesti do lažno negativnih rezultata, jer

test teško otkriva niske titrove specifičnih antitela. Pozitivni rezultati AGID testa su indikativni za nedavne infekcije, tačnije prve nedelje od infekcije i to zahvaljujući znatnoj ulozi precipitirajućih Ig klase M, mada treba imati na umu da se IgM ne održavaju dugo u cirkulaciji. Prema tome, AGID se ne preporučuje za detekciju At dve nedelje nakon infekcije. De Wit i saradnici (1997) vakcinisali su sa H120 vakcinalnim sojem dve grupe pilića: jednodnevne brojlerske piliće sa maternalnim i devetonedeljne SPF piliće; ni jedna grupa ptica nije dala precipitirajuća antitela detektabilna od strane AGID testa. Posle infekcije, AGID test je bio pozitivan, i njegova osetljivost je oko 40%. Infekcija sa virusom istog serotipa kao i vakcina može dovesti do loše produkcije specifičnih antitela, kako ih detektuje AGID test (de Wit et al., 1997; de Wit et al., 1998a).

IB ELISA testovi su specifični za grupu (de Wit et al., 1997; Karaca and Naqi, 1993). Metoda se koristi široko i kompleti za sprovođenje procedure su komercijalno dostupni. ELISA otkriva antitela protiv virusa IB u roku od jedne nedelje od infekcije, i to ranije od HI ili VN testova (de Wit et al., 1997; de Wit et al., 1998a; Marquardt et al., 1981; Mocket and Darbyshire, 1981). Potrebna su dva uzorka seruma (takozvani princip pranog seruma), jedan uzet na prvi znak infekcije i jedan uzet nedelju ili više kasnije; kašnjenje prvog uzorkovanja može sprečiti otkrivanje serokonverzije. Sinteza IgM antitela se indukuju vrlo brzo nakon infekcije virusom IB-a i tranzita, i samim tim i detekcija IBV-specifičnih IgM pokazuje nedavnu infekciju (de Wit et al., 1997; de Wit et al., 1998). Neki rezultati mogu biti kontradiktorni; rutinsko otkrivanje IgM-a se još uvek ne obavlja.

Uobičajeno se smatra da su VN i HI testovi tip-specifični za virus IB-a, iako postoje unakrsne reakcije između serotipova, posebno kod HI testa. Serumi sakupljeni nakon pojedinačnih infekcija, uključujući vakcinaciju, mogu biti soj - specifični, kao i specifični za serotip (de Wit et al., 1997; Gelb and Killian, 1987; Karaca and Naqi, 1993). Ovo može ograničiti upotrebu HI testa u praćenju odgovora na vakcine. Na primer, HI test sa M41 kao antigenom se loše pokazao kada se koristi za otkrivanje specifičnih antitela nakon vakcinacije sa H120, iako su oba ova virusa istog serotipa, kao što je definisano VN testovima.

Unakrsna reaktivna specifična At mogu se detektovati HI testom, mada osetljivost ovog testa nije visoka zato što je HI test serotip specifičan u najvećem broju slučajeva. Bez obzira na nedostatke osetljivosti HI testa, on je dosta u upotrebi iz razloga što nije skup, zahteva jednostavnu opremu, vrlo se brzo izvodi i smatra se vrlo upotrebljivim testom ukoliko se uzmu u obzir njegova ograničenja (de Wit, 2000).

Monoklonalna At su vrlo značajna u dijagnostici virusa IB-a. Najčešće se koristi tzv. blok ELISA za određivanje specifičnih At za pojedine sojeve virusa IB-a kao što su Masačusets, Arkansas i pojedini Tajvanski sojevi (Karaca and Naqi, 1993). Ukratko, princip rada, blok ELISA testa sastoji se u dodavanju pilećeg seruma koji sadrži specifična At na virus IB-a u mikrotitarsku ploču koja je presvučena sa virusom IB-a, a potom dodata pileća specifična monoklonska At. Pileća At specifična za serotip virusa IB-a, blokiraju vezivanje monoklonskih At koja su specifična za isti serotip; blokiranje monoklonskih At je proporcionalno koncentraciji At u pilećem serumu (de Wit, 2000).

2.14. KLASIFIKACIJA IZOLATA VIRUSA IB-A

Razne metode su korišćene ne bi li se diferencirali i klasifikovali izolati virusa IB-a. Serotipizacija kao i genotipska klasifikacija, bazirane na osnovu karakteristika S proteina, korišćene su za klasifikaciju sojeva. Detektovano je više serotipova i genotipova virusa IB-a i sasvim sigurno da će ih biti detektovano još mnogo više u skoroj budućnosti.

Za otkrivanje specifičnih antitela protiv virusa IB-a, koriste se testovi neutralizacije virusa, imunodifuzije, hemaglutinacije inhibicije, indirektna hemaglutinacije, imunofluorescencije i ELISA.

Serotipizacija

Tradicionalno za detekciju serotipova virusa IB-a, korišćeni su VN i HI testovi. Virus-neutralizujući test je jedini soj-specifični test, dok je test hemaglutinacije inhibicije soj specifičan samo tokom primarnog imunološkog odgovora. Pojedine laboratorije koriste monoklonska antitela za određeni serotip i ona mogu biti korišćena za ELISAs test, koji je ekonomičniji test od VN. Upotreba ovog testa je takođe ograničena zbog dostupnosti malog broja monoklonskih antitela za određeni serotip.

Upotreba HI i VN testova za karakterizaciju virusa IB-a je opala kako se primena RT-PCR i sekvencioniranja povećavala (biomolekularna tehnika).

Virus-neutralizujući test se uglavnom ne koristi za monitoring jata, jer je težak za izvođenje i dugo traje, rezultat se dobije posle sedam dana. Negativan i nizak titar specifičnih

antitela pri prvom ispitivanju, tokom rane faze bolesti i visok titar pri drugom ispitivanju, nakon tri nedelje, govori u prilog infekciji virusom zaraznog bronhitisa.

Genotipizacija

Danas serotipizaciju zbog praktičnosti i brzine, u laboratorijima sve više zamenjuju biomolekularne metode umnožavanja dela genoma i sekvenciranje. Danas je u rutinskoj upotrebi u laboratorijama RT-PCR za produkovanje komplementarne DNK kopije gena virusa IB-a, i to obično subjediniće S1 proteinskog gena S, nakon čega sledi sekvencioniranje. Na ovaj način se definiše genotip virusa.

Utvrđivanje zaštitnih sojeva virusa IB-a

Antigenske i genske varijacije u samom virusu IB-a nisu same po sebi dovoljne za definisanje unakrsne zaštite između sojeva virusa IB-a (Cavanagh et al., 1997; Abdel-Moneim, 2017). Zbog toga je predložen termin zaštitni tip (protektotip) (Lohr, 1988) da se utvrdi unakrsna zaštita dobijena od postojećih vakcinalnih sojeva protiv prijavljenih serotipova/genotipova. Unakrsni imunološki testovi (engl. cross immunity tests; CIT) su urađeni na eksperimentalnim pticama (Lambrechts et al., 1993); ali se može koristiti i kultura ćelija od traheje (engl. tracheal organ cultures; TOCs) poreklom od virusom IB-a imunizovanih ptica (Darbyshire, 1980; Hinze et al., 1991). Pošto virus IB-a ima tropizam ka epitelijalnim ćelijama respiratornog trakta, bubrega, reproduktivnih organa i digestivnog sistema, iz tog razloga IB vakcinama se određuje imunološka zaštita na ćelijskim kulturama traheje (McMartin, 1993), bubrega (Lambrechts et al., 1993) i reproduktivnih organa (Dhinakar et al., 1996).

2.15. PROFILAKSA

Idealne nespecifične mere profilakse obuhvataju striktnu izolaciju i repulaciju sa jednodnevnim pilićima, nakon čišćenja i dezinfekcije objekata za smeštaj živine. Sadašnje metode komercijalne proizvodnje, koje uključuju ograničeno čišćenje i dezinfekciju između brojerskih jata i jata različitih starosti u okviru kompleksa farme otežava kontrolu i zahteva

upotrebu imunizacije u pokušaju da se spreče proizvodni gubici zbog IB-a. Imunizacija se takođe koristi u izolovanim jatima jednodnevnih pilića kako bi se sprečili teški gubici u proizvodnji koje mogu nastati zbog infekcije virusom IB-a osetljivog jata (Jackwood and de Wit, 2013).

2.15.1. Tipovi vakcina koje se koriste u zaštiti od virusa IB-a

U praksi se koristi imunizacija sa živim i inaktivisanim vakcinama protiv virusa IB-a. Žive vakcine se koriste na pilićima za proizvodnju mesa (brojleri) i za inicijalnu vakcinaciju kokošaka u odgoju. Sojevi virusa IB-a koji se koriste za žive vakcine su oslabljeni - atenuirani serijskim pasiranjem u kokošijim embrionima (Klieve and Cumming, 1988; Huang and Wang, 2006). Obimne pasaže treba izbegavali da bi se sprečilo smanjenje imunogenosti. Stepen i stabilnost takvog slabljenja virusa IB-a varira među različitim vakcinama. Dokazi da su neke vakcine povratile virulenciju posle povratnih pasaža kod pilića (Hopkins and Yoder, 1986) pokazuju potencijal za porast virulencije takvih vakcina cikličkom infekcijom u jatu (Jackwood and de Wit, 2013).

Vakcine koje sadrže virus serotipa Masačusets se u mnogim zemljama vrlo često koriste. Vakcinalni sojevi, koji se primenjuju u određenoj zemlji ili regionu, su izabrani na temelju epizootiološke situacije da predstavljaju antigenski spektar prisutnih izolata virusa IB-a. Kada vakcinacija jednim serotipom virusa IB-a ne pruži dovoljnu zaštitu protiv određenog terenskog soja, vakcine drugih serotipova mogu biti dodate u program imunoprofilakse. Masačusets (M41) soj, H120 i druge vakcine iz Masačusets serotipa se koriste širom sveta. Novi sojevi virusa IB-a naknadno mogu biti uključeni u vakcinalni program kada je prevalencija novog tipa uspostavljena u nekoj državi ili regionu. U Sjedinjenim Državama, sojevi koji pripadaju Masačusets, Konektikat i Arkansas serotipovima se široko koriste u proizvodnji vakcina; dok se drugi serotipovi, kao što je DE072, koriste samo regionalno. U nekim evropskim i azijskim zemljama, pored H120 i drugih Masačusets vakcina, koriste se lokalni sojevi serotipa, u Evropi D274, D1466 i 4/91 (takođe poznati kao 793/B i CR88), a i vakcine na bazi QX soja (Lin et al., 2005). U Australiji su dozvoljene samo vakcine bazirane na lokalnim izolatima virusa IB-a (Klieve and Cumming, 1988; Wadey and Faragher, 1981; Jackwood and de Wit, 2013).

Istraživanja su pokazala da vakcinacija sa dve antigenski različite (žive, potom inaktivisane) vakcine kao što je Mass i 4/91 pruža unakrsnu zaštitu protiv više različitih genotipova virusa IB-a (Cook et al., 1999; Terregino et al., 2008; De Wit et al., 2011). Unakrsna zaštita je bila i veća kada su vakcine aplikovane sa vremenskim razmakom od dve nedelje nego zajedno istog dana.

Inaktivisane uljane vakcine (Box et al., 1988) se najčešće administriraju pre početka proizvodnje jaja. Mlade kokoške mogu biti vakcinisane između 10. i 18. nedelje starosti zavisno od programa imunizacije. Virus inaktivisanih vakcina su u potpunosti inaktivisani formalinom, beta propiolaktonom ili drugim pogodnim inaktivatorom. Adjuvansi na bazi mineralnog ulja se obično koriste za formulisanje vakcine (Jansen et al., 2006). Efikasnost inaktivisanih vakcina zavisi od pravilno sprovedene prethodne vakcinacije živom vakcinom. Inaktivisane vakcine moraju se aplikovati na pticama pojedinačno, najčešće intramuskularnim ili subkutanim aplikacijama. Inaktivisana vakcina indukuje proizvodnju serumskih antitela i zaštitu unutrašnjih tkiva, bubrega i reproduktivnog trakta dok nisu dobri stimulatori ćelijskog imunološkog odgovora kao i lokalnog. Za razliku od žive vakcine, inaktivisane vakcine nisu jednako efikasne u sprečavanju infekcije respiratornog trakta posle infekcije sa homologim virulentnim virusom IB-a iz gore navedenih razloga. Inaktivisane vakcine smanjuju učestalost prisustva virusa u respiratornom traktu inficiranih pilića i na taj način ograničavaju prenos na druge osetljive ptice (Ladman et al., 2002). Novi "varijantni" sojevi IB-a mogu se koristiti za pripremu inaktivisane autogene vakcine za kontrolu IB bez rizika od korišćenja žive atenuirane vakcine koja se može proširiti i potencijalno uzrokovati bolesti u okolnim jatima.

2.15.2. Metode primene

Prilikom upotrebe živih vakcina, aplikacija istih predstavlja kritičan korak. Virus IB-a je osetljiv virus koji se vrlo lako inaktivira (Cavanagh and Gelb, 2008), te može rezultirati neadekvatnom efikasnošću vakcinacije kada se vakcinacija vrši na terenu (Jackwood et al., 2009; De Wit et al., 2010b). Vakcina se može aplikovati intraokularno ili intranazalno, putem spreja (aerosol) ili vode za piće i veoma je važno da sve jedinke dobiju određenu dozu vakcine (De Witt et al., 2011). Neadekvatna administracija vakcine može rezultirati

smanjenim nivoom zaštite, odloženom zaštitom ili produženim prisustvom vakcinalnog virusa unutar jata što dalje dovodi do povećanog rizika od infekcije sa *Escherichia coli* ili nekom drugom bakterijom (Matthijs et al., 2003) pa čak i povećanjem virulencije samog virusa (Hopkins and Yoder, 1986).

Metode masovne administracije vakcina IB-a su poznate po brojnim varijacijama u tehnikama aplikacije, u kvantitetu, kvalitetu i temperaturi vode koja se koristi za razređivanje vakcina, dozi kao i kombinacijama upotrebljenih vakcina (IBV sa NDV vakcinom). Svi ovi faktori mogu imati negativan uticaj na efikasnost vakcine protiv IB-a (Jackwood and de Wit, 2013).

Posebna pažnja se mora posvetiti podešavanju i održavanju opreme za aerosol. Takođe treba naglasiti da primena aerosola može izazvati teže respiratorne reakcije. Aplikacija putem vode za piće zahteva odgovarajuće mere u vidu osiguravanja da sve jedinke popiju dovoljnu količinu sveže pripremljene vakcine kroz svega par sati, što prethodno podrazumeva kompletno uskraćivanje vode životinjama u trajanju od nekoliko časova. Voda koja se u te svrhe koristi treba da je visokog kvaliteta, hladna i slobodna od hemikalija (u smislu dezinficijensa) koje mogu uticati na vakcinu. Sanitizatori se dodaju za kontrolu bakterija i gljivične kontaminacije sistema za pojenje. Uklanjanje tih sanitazora pre vakcinacije i uključivanje mleka u prahu u koncentraciji od 1:400 stabilizuje titar virusa tokom primene vakcine (Gentry and Braune, 1972; Jackwood and de Wit, 2013).

Inaktivisane vakcine zahtevaju individualnu aplikaciju za svaku pticu. U živinarskoj industriji, ove vakcine se primenjuju između 10. i 18. nedelja starosti i daju se dve do četiri nedelje nakon prethodno sprovedene primarne imunizacije sa živom vakcinom tri do četiri puta. Često se daju u kombinaciji sa drugim inaktiviranim vakcinama (sa ND, Reovirus).

Brojleri i nosilje se najčešće vakcinišu živom IB vakcinom u starosti dve do tri nedelje. Druga vakcina najčešće je inaktivisana. U područjima sa povećanim nivoom prirodne ekspozicije živine, žive atenuirane vakcine se periodično upotrebljavaju tokom perioda nosivosti na namerom da se održava lokalna zaštita respiratornog trakta. Inaktivisane vakcine se takođe koriste za roditeljska jata i kod koka nosilja, i zahtevaju inokulaciju individualnih jedinki. Vakcine IB obično se aplikuju od 10 do 18 nedelja starosti. Daju se dve vakcine u razmaku od 4 do 6 nedelja. Vreme početne „booster“ imunizacije varira zbog titra materinskih antitela kod pilića i primenjene metode vakcinacije. Revakcinacija sa inaktivisanim vakcinama može da se vrši ako je primarna vakcinacija urađena sa živim

vakcinama. Svrha inaktivisanih vakcina kod roditeljskih jata je da indukuju visoki titar serumskih At koja će se preneti na potomke. (Jackwood and de Wit, 2013).

Za sada se još ne primenjuje ni jedna IB vakcina *in ovo*; jer upotreba dostupnih komercijalnih vakcina smanjuje izleganje jaja do neprihvatljivih nivoa (Jackwood and de Wit, 2013).

2.15.3. Buduće vakcine

Verovatno ima na desetine genotipova virusa IB-a koji još uvek nisu izolovani. Budući izolovani virusi predstavljaju izazov proizvođačima vakcina. Ekonomski nije opravdano da se razvije nova vakcina protiv velikog broja novih tipova virusa IB-a pogotovo ukoliko postojeće komercijalne vakcine obezbeđuju adekvatnu zaštitu. Vakcine ili kombinacije više sojeva virusa IB odnosno više epitopa S1 proteina vakcina koje su u stanju da indukuju unakrsnu zaštitu protiv više sojeva virusa ima više koristi od onih sojeva koji omogućavaju zaštitu od homolognih izazivača (Jackwood and de Wit, 2013). S obzirom da se virus IB-a umnožava na velikom broju različitih vrsta epitelnih tkiva, moguće je da će neki od još neotkrivenih tipova virusa IB-a biti povezani sa novim kliničkim manifestacijama. Na osnovu nedavnih spoznaja i iskustava sa koronavirusima kod drugih vrsta životinja, možemo spekulirati da neki novi tipovi virusa IB-a mogu poticati iz drugih vrsta ptica ili sisara, koji će možda zahtevati adaptaciju na piliće da bi postali patogeni.

2.16. LEČENJE

Specifično lečenje ili terapija za IB ne postoji. Adekvatna toplota u objektu može da eliminiše stres koji nastaje usled hladnoće. Treba voditi računa da ne dođe do prenatrpanosti i nastojati da se održi uobičajena potrošnja hrane kako bi se sprečio gubitak telesne mase u jatu. Sve ovo su faktori upravljanja koji mogu doprineti smanjenju direktnih ili indirektnih gubitaka zbog IB-a. Upotreba odgovarajućih antibakterijskih preparata može da pomogne u smanjenju gubitaka nastalih delovanjem sekundarnih bakterijskih patogena. Zamene za elektrolite, koje se koriste u vodi za piće, preporučuju se i koriste da se nadoknadi akutni

gubitak natrijuma i kalijuma i tako smanji gubitke usled nefritisa. Preporučena koncentracija za tretman je 72 mEq natrijuma i/ili kalijuma, sa najmanje jednom trećinom citrata u obliku soli bikarbonata (Cumming, 1969; Cavanagh and Gelb, 2008).

Kontrola infektivnog bronhitisa je veoma teška zbog prisustva stalno inficiranih pilića u određenim jatima i kontinuiranog javljanja bolesti (Jackwood and de Wit, 2013).

Za sprečavanje pojave infektivnog bronhitisa, osim efikasnog imunizovanja živine, potrebno je i striktno izolovano držanje jata, odnosno farmi koje se naseljavaju jednodnevnim pilićima. Takođe, neophodno je na jednoj farmi živine uvek držati jednu istu starosnu kategoriju, a ne više, kako bi se smanjila cirkulacija virusa IB-a. Uspješnije sprečavanje pojave bolesti, čiji se uzročnici prenose vazduhom, može se postići držanjem živine u objektima sa filtrovanim vazduhom pod pozitivnim pritiskom. Objekti za živinu, po završenom gajenju, moraju se potpuno isprazniti i pre useljavanja novih pilića detaljno očistiti, dezinfikovati i odmoriti. Slabo otporni virus IB-a se može lako uništiti uobičajenim dezinfekcionim sredstvima. Visoke letnje temperature takođe pomažu prekidanje infektivnog lanca. Izolovane i nevakcinisane kokice, nakon preseljenja u drugi objekat, mogu se vrlo brzo inficirati. Kriva nosivosti je uvek ispod tehnoloških normi. Sprečavanje infekcije živine i posledica IB-a se može postići upotrebom odgovarajućih vakcina (Jackwood and de Wit, 2013)

3. RADNA HIPOTEZA, CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA

3.1. Radna hipoteza

Infektivni bronhitis je oboljenje koje može da se javi kod svih proizvodnih i starosnih kategorija živine. Klinički simptomi neretko izostanu ili su veoma blagi i bolest može dovesti do velikog uginuća pa je i ekonomski značaj bolesti izuzetno veliki. Bitno je ukazati na važnost dijagnostike virusa IB u smislu da je potrebno utvrditi genotipove virusa koji cirkulišu na našem području. Radnom hipotezom očekuje se prisustvo nekoliko različitih genotipova virusa IB-a u vakcinisanim jatima živine.

3.2. Cilj i zadaci istraživanja

U većini država u našem okruženju izvršeno je sekvencioniranje genoma virusa IB-a i na osnovu genetske tipizacije određen je virus koji će se koristiti tokom vakcinacije. Zbog nedostataka podataka u Republici Srbiji kao i vakcinaciji na osnovu pretpostavki a ne činjeničnog stanja, dešava se pojava oboljenja nakon redovne vakcinacije i programa zaštite.

S obzirom na porast detekcije virusa IB-a u našim krajevima, smatramo da je neophodno uraditi sledeće:

1. Izvršiti sekvencioniranje ustanovljenih virusa IB-a koji izazivaju oboljenje kod vakcinisanih jedinki, ili onih virusa IB-a čije se prisustvo ustanovi bez kliničkih simptoma bolesti;
2. Utvrditi prevalenciju genotipa virusa IB-a;
3. Utvrditi efikasnost postojećih protokola vakcinacije na određenom geografskom području kao i efikasnost upotrebljenih sojeva virusa u vakcini.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. MATERIJAL

4.1.1. Osnovni podaci o geografskoj odrednici i obuhvaćenim farmama

Istraživanje je vršeno na teritoriji Republike Srbije, epizootiološkom području koje pokriva Veterinarski specijalistički institut “Kraljevo”, a koje obuhvata 4 okruga: Zlatiborski, Moravički, Raški i Rasinski (karta 1; područje obojeno tamno plavom bojom), i sledeće opštine: Kosjerić, Gornji Milanovac, Bajina Bašta, Užice, Požegu, Čačak, Lučane, Arilje, Čajetinu, Priboj, Novu Varoš, Prijepolje, Sjenicu, Ivanjicu, Tutin, Novi Pazar, Rašku, Kraljevo, Vrnjačku Banju, Brus, Aleksandrovac, Trstenik, Kruševac, Varvarin i Ćićevac.

U Republici Srbiji se godišnje eksploatiše 11 163 000 koka nosilja, a na navedenom području 4 461 000 koka nosilja (Republički zavod za statistiku, 2016).



Karta 1. Geografska karta epizootičkih područja Srbije.

Uzimanje trahealnih briseva poreklom od koka nosilja je obavljeno u dva navrata na ukupno sedam različitih lokacija (farmi) i obuhvatilo je ukupno 13 objekata (Slika 9.a i b) - živinarnika, tj. jata živine različite starosti (Tabela 1). Prikupljeno je ukupno 480 pojedinačnih uzoraka trahealnih briseva živine.

Istovremeno sa uzimanjem trahealnih briseva, prikupljeni su i dodatni epizootički podaci, kao i podaci o sprovedenim imunoprofilaktičkim merama (Tabela 1), odnosno vakcinaciji protiv infektivnog bronhitisa.



Slika 9. a, b Neke od farmi nosilja na kojima su uzorkovani trahealni brisevi.

Tabela 1. Epizootiološki podaci o jatima živine, od kojih je izvršeno uzorkovanje traelanih briseva, kao i podaci o sprovedenim merama imunoprofilakse protiv IB-a.

Oznaka uzorka	Broj uzoraka	Objekat	Jato	Životinje	Hibrid	Starost	Mesec proizvodnje	Sprovedene mere imunoprofilakse (Vakcinacije)proti v IB-a
A	30	1	1	nosilje	Lohman	11.	7.	1.d MA5 35.d MA5 8 nedelja 4/91
B	30		2	nosilje	Lohman	21.	17.	
C	30	2	1	nosilje	Tetra	5.	1.	1.d MA5 35.d MA5 8 nedelja 4/91
D	30		2	nosilje	Lohman	8.	4.	
E	30	3	1	nosilje	Isa	12.	12.	1.d MA5 35.d MA5 8 nedelja 4/91
F	30		2	nosilje	Brown	19.	15.	
G	30	4	1	nosilje	Lohman	10.	6.	1.d MA5 35.d MA5 8 nedelja 4/91
H	30	5	1	nosilje	Isa Brown	5.	1.	1.d MA5 35.d 4/91 8 nedelja MA5
I	30	6	1	nosilje	Isa Brown	15.	11.	1.d MA5 10.d 4/91 31.d MA5 8.nedelja MA5
J	30		2	nosilje		7.	3.	
K	60	7	1	nosilje	Lohmann Roditelji nosilja	6.	2.	1.d MA5 35.d 4/91 8 nedelja MA5
L	60		2	nosilje	Lohman	6.5.	2.5.	
M	60		3	nosilje	Lohmann	6.	2.	
UKUPNO	480							

Sprovedene imunopofilaktičke mere su izvršene prema predlogu programa imunopofilaktičkih mera, datih od strane epizootiološke službe mesno nadležnog veterinarskog specijalističkog instituta, u ovom slučaju od strane "Specijalističkog veterinarskog instituta Kraljevo" u Kraljevu. Navedene mere su sprovedene u toku odgoja koka nosilja od 1. dana starosti do 18. nedelje starosti kako je prikazano Tabelom 2. Pored istorije prisustva virusa IB-a na navedenim farmama, u momentu uzorkovanja nisu prijavljeni niti uočeni klinički simptomi.

Tabela 2. Program vakcinacije koka nosilja u odgoju protiv IB-a, Specijalistički veterinarski institut Kraljevo, Kraljevo. Srbija, 2017.

Starost živine	Vakcinalni soj virusa IB-a	Način aplikacije vakcine
1. dan	H-120 ili MA5	sprej ili p/o
35. dan	H-120 ili MA5	p/o
10-11. nedjelja	H52 ili 4/91 ili D274	p/o
13. nedjelja	H52 ili 4/91 ili D275	p/o

4.1.2. Uzorkovanje trahealnih briseva

Brisevi iz traheje uzimani su nasumičnim odabirom živine, sterilnim drvenim štapićem sa pamučnom vatom na vrhu, iz kompleta za bris (Samplast, Čačak, Srbija) u koji je naknadno stavljen fosfatni pufer (PBS, pH 7,4; Sigma-Aldrich, Nemačka) (Slike 10 i 11).



Slika 10. Uzimanje trahealnih briseva kod kokošaka nosilja.



Slika 11. Prikupljeni uzorci trahealnih briseva živine.

4.1.3. Aparati, reagensi i potrošni materijal za izvođenje molekularnih metoda virusološke dijagnostike

- Automatski analizator za kapilarnu elektroforezu AB 3130 (Applied Biosystems, SAD);
- Stratagene Mx3000P (Stratagene, USA)
- POP-7 (Applied Biosystems, SAD);
- Optička mikrotitraciona ploča (Applied Biosystems, SAD);
- Thermal cycler 2720 (Applied Biosystems, USA);
- Thermal cycler for RealTime PCR Stratagene Mx3000P (Stratagene, SAD);
- Centrifuga (Hermle Labortechnik, Nemačka; Tehnica, Slovenija);
- Mini-Sub Cell GT Cell (Bio-Rad, SAD);
- Gel Doc XR system (Bio-Rad, SAD);
- BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, SAD);
- Formalin
- GeneJet gel extraction kit (Thermo);

- 3 M natrijum acetata (pH 5.2, Sigma Aldrich, Nemačka)
- Ethidium Bromide (Bio-Rad, SAD);
- GeneRuler 100bp (Fermentas, Litvanija);
- TAE pufer: EDTA (Sigma Aldrich, Nemačka);
- UltraPure™ Agarose (Invitrogen, USA);
- Oligonukleotidni prajmeri i proba za RealTime RT-PCR odabrani su prema Callison i sar. (2006) , za ugnežđeni RT-PCR prema Roussan i sar. (2008) i dalje za sekvencioniranje prema Worthington i sar. (2008) (Vivagen, Invitrogen);
- Apsolutni etanol (99,8%; Zorka farm, Šabac);
- Thermo Scientific™ DreamTaq™ Green PCR (Thermo Fisher Scientific, SAD);
- SuperScript™ III Platinum™ One Step qRT-PCR (ThermoFisher Scientific, SAD);
- Referentni antigen virusa infektivnog bronhitisa (Invitrogen, Nemačka);
- QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Nemačka);
- Puferizovani fiziološki rastvor (PBS, Sigma Aldrich);
- Komplet za bris (Sam Plast, Čačak, Srbija);
- Epruvete od 5mL i 10mL (Spektar, Čačak, Srbija);
- PCR epruvete 1,5 mL (PCR Clean, Eppendorf, Nemačka);
- Microkrotube od 0,2mL ili stripovi od 8 mikrotubi (Agilent Technologies, SAD);
- Mikropipete od 10, 200 i 1000μL (Eppendorf Research plus) i nastavci za mikropipete s filterom (Top Line, Nemačka), istog volumena;

4.2. METODE RADA

4.2.1. Dokaz prisustva virusa infektivnog bronhitisa molekularnim metodama

4.2.1.1. Priprema zbirnih uzoraka („pool“)

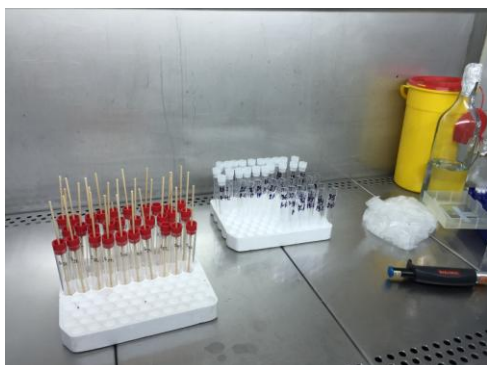
Trahealni brisevi poreklom od živine su najpre potapani u puferizovani fiziološki rastvor (PBS, pH7,4; Sigma Aldrich, Nemačka) (Slika 12). Brisevi su nakon toga kratko vorteksovani, oko

četiri sekunde (Slika 3), centrifugovani a zatim je supernatant prebacivan u novu i sterilnu epruvetu, i to tako što je pravljen zbirni uzorak („pool“), od 6 i 10 briseva u jednu epruvetu:

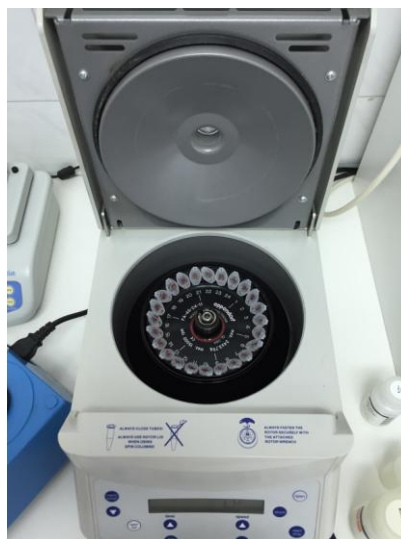
- 1) u prvom uzorkovanju od šest briseva u jednu epruvetu; ukupno $300/6= 50$ zbirnih uzorak
- 2) u drugom uzorkovanju od 10 uzoraka; ukupno $180/10= 18$ zbirnih uzoraka (Tabela 3.).

Tabela 3. Oznake zbirnih uzoraka.

Jato	Prvo uzorkovanje										Drugo uzorkovanje		
	G	H	E	J	B	F	D	I	A	C	K	L	M
Oznaka zbirnih (pool) uzoraka	1-5	6-10	11-15	16-20	21-25	26-30	31-35	36-40	41-45	46-50	1-6	7-12	13-18



Slika 12. Priprema zbirnih uzoraka.



Slika 13. Mikrocentrifuga Eppendorf.

4.2.1.2. Ekstrakcija virusne RNK iz trahealnih briseva

Ekstrakcija virusne RNK iz svih trahealnih briseva vršena je korišćenjem QIAamp viral RNA mini kita (Qiagen, Nemačka), po uputstvu proizvođača:

1. Zbirni uzorci trahealnih briseva pipetirani su u minutube sa 560 μ l AVL pufera kome je dodato 5,6 μ l nosača RNK.
2. Zatim su uzorci inkubirani 10 minuta na sobnoj temperaturi (Slika 12).
3. Posle inkubiranja u uzorke je pojedinačno dodato po 560 μ l apsolutnog etanola, vorteksovano 15 sekundi i centrifugirano u trajanju od nekoliko sekundi (Slika 13).
4. Sadržaj minutuba je prebačen u QIAamp mini kolonu (smeštenu u tubi za sakupljanje RNK od 2mL), i zatim ponovo centrifugovan u trajanju od 1 minuta na 8000 o/min.
5. QIAamp mini kolone sa uzorcima su posle centrifugovanja prebačene u nove, prazne tube za sakupljanje RNK, a tube sa filtratom su odbačene. U minikolone je ponovo dodato 630 μ l supernatanta zbirnog uzorka, a odmah potom ponovljen postupak tačke 3.
6. QIAamp mini kolone sa uzorcima su nakon centrifugovanja premeštene u nove prazne tubice koje služe za sakupljanje RNK, a tubice sa filtratom su odbačene. U mini kolone je dodato po 500 μ l AW1 pufera. Uzorci su zatim centrifugovani 1 minut na 6000xg (8000 o/min).
7. QIAamp mini kolona sa zbirnim uzorkom je posle centrifugovanja stavljena u novu praznu tubicu za sakupljanje RNK, a tubica sa filtratom je odbačena. U kolonu je dodato po 500 μ l AW2 pufera, a uzorak je zatim centrifugovan 3 minuta na 12000xg (14000 o/min).
8. QIAamp mini kolona sa uzorcima je posle centrifugovanja stavljena u PCR mikrotubu (1,5mL; PCR Clean, Eppendorf) i u nju dodato 60 μ l AVL pufera za eluciju RNK. Uzorci su zatim centrifugovani 1 minut na 6000xg (8000 o/min).

Kolona je odbačena, a u filtratu se nalazi ekstrahovana ukupna RNK. Ekstrahovana RNK čuvana je na -80°C do početka izvođenja RT-PCR reakcije.

4.2.1.3. Reverzna transkripcija i lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu

U ispitivanjima koja su imala za cilj dokazivanje prisustva ribonukleinske kiseline (RNK) virusa IB-a u zbirnim uzorcima ekstrahovane RNK korišćena je reakcija reverzne transkriptaze i lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (engl. Real-time RT-PCR; qRT-PCR) i potom

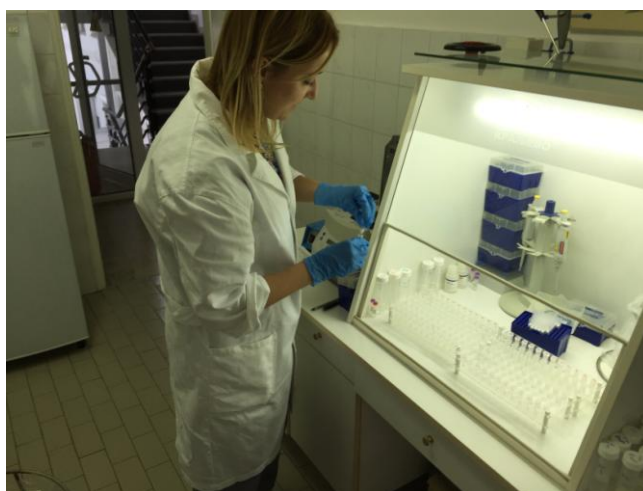
sekvencioniran prečišćeni PCR produkt. Korišćen je set prajmera i probe (Tabela 4) prema Callison et al. (2006).

Tabela 4. Prajmeri i proba za qRT-PCR (prema Callison et al., 2006.).

Oznaka prajmera	Sekvenca (5'-3')	Lokacija *	Veličina (bp)	Ciljna sekvenca
IBV5' GU391	GCT TTT GAG CCT AGC GTT	391–408	143	5'UTR
IBV5' GL533	GCC ATG TTG TCA CTG TCT ATT G	533-512		5'UTR
IBV5' G probe	FAM-CAC CAG AAC CTG TCA CCT C-BHQ1	494–473		5'UTR

*lokacija u sekvenci M41 soja virusa IB (GenBank pristupni broj AY851295).

Reakcija qRT-PCR za obe analize izvođena je primenom komercijalnog kita SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR System (ThermoFisher Scientific, USA). Kit sadrži SuperScript™ III reverznu transkriptazu i Platinum™ Taq DNA polimerazu u istoj enzimskoj mešavini. Tako je moguće u istoj tubi odraditi sintezu komplementarne DNK(cDNK) i PCR iz ukupne ili informacione RNK (mRNK), uz upotrebu prajmera i probe specifičnih za deo genoma virusa IB.-a, što je u našem slučaju sekvenca koja se ne prepisuje na 5' kraju genoma virusa IB (engl. Untranslated region; 5'UTR).



Slika 14. Priprema mešavine za qRT-PCR.

Mešavina za izvođenje qRT-PCR pripremana je (Slika 14) u mikrotubama (strip od 8 tuba (Agilent Technologies, USA) za svaki uzorak pojedinačno i bila je sastava kako je prikazano u Tabeli 5.

Tabela 5. Sastav mešavine za izvođenje qRT-PCR-a.

SuperScript™ III Platinum™ Quantitative One-Step RT-PCR System (ThermoFisher Scientific, SAD)	Za 1 uzorak
2x Reaction Mix	12,5 µl
SuperScript™ III/ Platinum™ Taq Mix (enzimi)	0,5 µl
Forward prajmer (10 µM), finalna konc. 0,08 µM	0,2 µl
Reverse prajmer (10 µM), finalna konc. 0,08 µM	0,2 µl
TaqMan proba (10 µM), finalna konc. 0,05 µM	0,125 µL
DEPC-om tretirane vode	9 µl
ekstrahovane ukupne RNK zbirnog uzorka	4 µl
Ukupna zapremina reakcione mešavine	25 µl

Mikrotube sa uzorcima zatim su smeštene u uređaj za izvođenje lančane reakcije polimeraze Stratagene Mx3000P (Stratagene, USA) (Slika 15 a i b). Stripovi od 8 mikrotuba sa uzorcima ukupne RNK u reakcionoj mešavini postavljeni su u uređaj kako je prikazano u tabeli 6.: (a) u prvoj analizi i (b) u drugoj analizi.

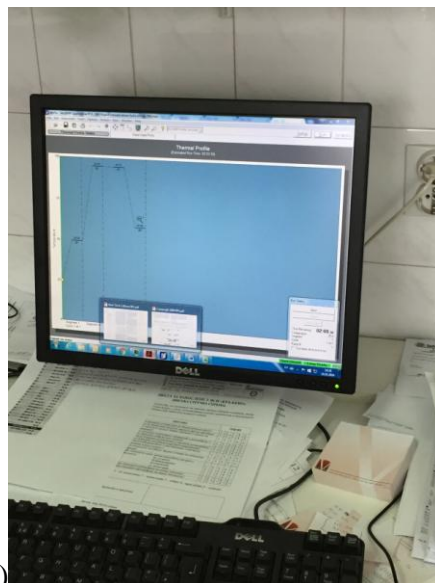
Tabela 6. Postavka mikrotuba u uređaj za izvođenje qRT-PCR-a u prvoj (a) i drugoj (b) analizi.

(a)	1	2	3	4	5	6	7
A	1	9	17	25	33	41	49
B	2	10	18	26	34	42	50
C	3	11	19	27	35	43	NegK1
D	4	12	20	28	36	44	NegK2
E	5	13	21	29	37	45	PozK1
F	6	14	22	30	38	46	PozK2
G	7	15	23	31	39	47	
H	8	16	24	32	40	48	

(b)	1	2	3
A	K1	L3	M5
B	K2	L4	M6
C	K3	L5	PozK1
D	K4	L6	PozK2
E	K5	M1	NegK1
F	K6	M2	NegK2
G	L1	M3	
H	L2	M4	



a)



b)

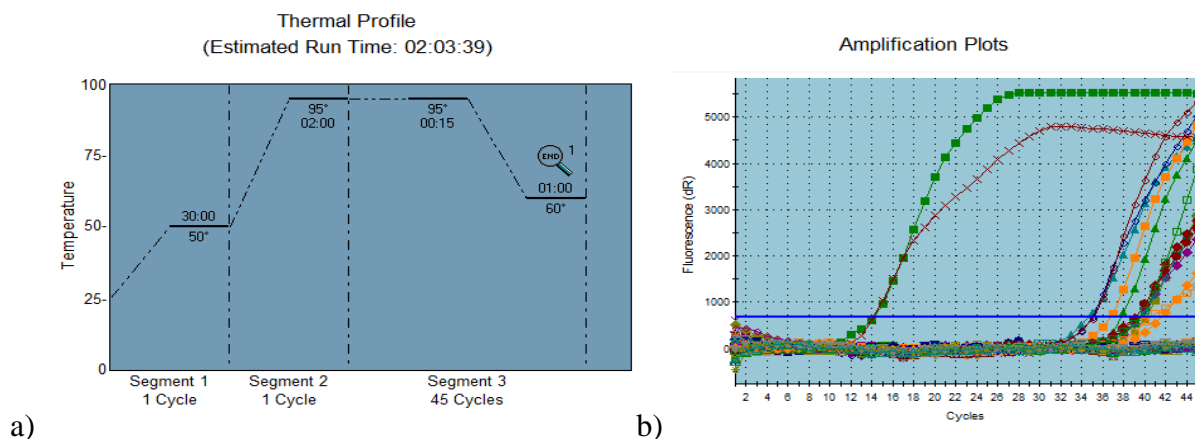
Slika 15. a) i b). Termocikler za izvođenje RT-PCR u stvarnom vremenu (Stratagene Mx300P, Stratagene, USA).

Reakcija qRT-PCR u jednom koraku izvedena je prema termalnom profilu prikazanom u tabeli 7 i slici 16.

Tabela 7. Termalni profil za izvođenje qRT-PCR reakcije (prema Callison et al., 2006).

One-Step qRT-PCR		Temperatura (°C)	Vreme
Reverzna transkripcija (RT)		50	30 min
Aktivacija Platinum [®] Taq polimeraze		95	2 min
PCR 45 ciklusa	Denaturacija NK lanaca	95	15 sek
	Vezivanje prajmera	60	60 sek

Na završetku svakog od ciklusa vezivanja prajmera vršeno je očitavanje fluorescencije. Svi zbirni uzorci sa Ct (engl. cycle treshold) vrednošću < 40 su proglašeni pozitivnima. Granica detekcije ovog testa (engl. Limit of detection, LOD) je 100 kopija genoma IBV po reakciji (Callison et al., 2006).



Slika 16. a) Termalni profil i b) amplifikacijske krivulje qRT-PCRa.

Sve pozitivne zbirne uzorke, u kojima je potvrđena prisutnost RNK genoma virusa IB-a razbili smo u pojedinačne uzorke i ponovo analizirali koristeći reakcijsku mešavinu istog sastava te iste prajmere i probu. Postavka mikrotuba je prikazana u tabelama 8.a i 8.b.

Tabela 8. Postavka stripova 8-mikrotuba sa razbijenim zbirnim uzorcima (a) prve analize i (b) druge analize.

(a)	1	2	3
A	C25	J3	G17
B	C26	J4	G18
C	C27	J5	NegK1
D	C28	J6	PozK1
E	C29	G13	PozK2
F	C30	G14	NegK2
G	J1	G15	
H	J2	G16	

(b)	1	2	3	4	5	6	7	8
A	K1-1	K1-9	K3-7	L1-5	L5-3	M3-1	M3-9	M6-7
B	K1-2	K1-10	K3-8	L1-6	L5-4	M3-2	M3-10	M6-8
C	K1-3	K3-1	K3-9	L1-7	L5-5	M3-3	M6-1	M6-9
D	K1-4	K3-2	K3-10	L1-8	L5-6	M3-4	M6-2	M6-10
E	K1-5	K3-3	L1-1	L1-9	L5-7	M3-5	M6-3	PozK1
F	K1-6	K3-4	L1-2	L1-10	L5-8	M3-6	M6-4	PozK2
G	K1-7	K3-5	L1-3	L5-1	L5-9	M3-7	M6-5	NegK1
H	K1-8	K3-6	L1-4	L5-2	L5-10	M3-8	M6-6	NegK2

4.2.2. Amplifikacija S1 segmenta genoma virusa IB-a metodom ugneždene reverzne transkripcije i lančane reakcije polimerazom i sekvencioniranje Sanger metodom

4.2.2.1. Ugneždjena reverzna transkripcija i lančana reakcija polimerazom (Nested RT-PCR)

U ispitivanjima koja su imala za cilj sekvencioniranje dela genoma virusa infektivnog bronhitisa smo umnožili hipervarijabilni deo (HVR) S1 subjedinice S gena pomoću metode ugneždene reverzne transkripcije i lančane reakcije polimerazom (*engl.* Nested RT-PCR) u dve faze. U prvoj fazi je izvršena reverzna transkripcija i lančana reakcija polimerazom (RT-PCR) u 10 pozitivnih uzoraka ekstrahovane RNK (prethodno IBV pozitivnih pomoću qRT-PCR), a u drugoj je PCR produkt prve (RT-PCR) reakcije korišćen kao matrica za izvođenje reakcije PCR-a. U tu svrhu korišćeni su oligonukleotidni prajmeri prikazani u Tabeli 9. (Worthington et al., 2008) i komercijalni kitovi SuperScript™ III Platinum™ Quantitative One-Step qRT-PCR System (Invitrogen) za RT-PCR u jednom koraku, te Thermo Scientific™ DreamTaq™ Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific, SAD) za PCR u drugoj fazi.

Tabela 9. Detalji prajmera upotrebljenih u nested RT-PCR reakcijama (prema Worthington et al., 2008).

Oznaka prajmera	Sekvenca (5'-3')	Lokacija u S1 sekvenci*
RT-PCR		
SX1+	CACCTAGAGGTTTGyTWGCAT	677-698
SX2-	TCCACCTCTAAACACCYTT	1148-1168
Ugneždjeni PCR (PCR 2)		
SX3+	TAATACTGGYAATTTTCAGA	705-725
SX4-	AATACAGATTGCTTACAACCACC	1075-1097

* Lokacija nukleotida u S1 sekvenci soja UK/7/93 (Genbank pristupni broj Z83979).

U prvoj fazi je izvršena reverzna transkripcija i lančana reakcija polimerazom (RT-PCR) na uzorcima ekstrahovane ukupne RNK i korišćeni su SX1+ i SX2- prajmeri u master mešavini reagensa (Tabela 10) iz komercijalnog kita za RT-PCR u jednom koraku SuperScript™ III Platinum™ One Step RT-PCR System po uputstvu proizvođača.

Tabela 10. Sastav master mešavine po uzorku za RT-PCR reakciju u jednom koraku.

SuperScript™ III Platinum™ One Step RT-PCR System (ThermoFisher Scientific, SAD)	Za 1 uzorak
2x Reaction Mix	12,5 µl
SuperScript™ III/ Platinum™ Taq Mix (enzimi)	0,5 µl
Forward prajmer (10 µM), finalna konc. 0,08 µM	0,2 µl
Reverse prajmer(10 µM), finalna konc. 0,08 µM	0,2µl
DEPC-om tretirane vode	9,6 µl
ekstrahovane ukupne RNK zbirnog uzorka	2 µl
Ukupna zapremina reakcione mešavine	25 µl

U drugoj fazi je PCR produkt prve (RT-PCR) reakcije korišćen kao matrica za izvođenje reakcije PCR-a (PCR2) u koju su u master mešavinu dodati SX3+ i SX4- prajmeri iz komercijalnog kita Thermo Scientific™ DreamTaq™ Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific, SAD). Prednost ovog kita je što PCR Master Mix-a (2X) pored DNK polimeraze (DreamTaq DNA polymerase), prilagođenog PCR pufera (DreamTaq Green buffer), MgCl₂ i deoksinukleotida (dNTPs), sadrži dve potražne (tracking) boje (plavu i žutu, koje daju zelenu) i gusti reagens koji omogućava da se PCR produkt direktno nanese na agarozni gel za elektroforezu. Pritom, boje su inertne pa ne ometaju samu PCR reakciju, niti kasnije elektroforezu, DNK sekvenciranje, ligaciju ili restrikcijsku digestiju dobijenih PCR produkata.

Tabela 4. Sastav master mešavine po uzorku za ugneždenu PCR reakciju.

Thermo Scientific™ DreamTaq™ Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific, SAD)	Za 1 uzorak
DreamTaq Green PCR Master Mix (2X)	12,5 µl
Forward prajmer (10 µM), finalna konc. 0,08 µM	0,2 µl
Reverse prajmer(10 µM), finalna konc. 0,08 µM	0,2 µl
DEPC-om tretirane vode	11 µl
Pročišćeni RT-PCR produkt(10 pg do 1 µg)	2 µl
Ukupna zapremina reakcione mešavine	25 µl

U mikrotube je dodato po 23 μ L master mešavine (Tabela 11), kratko centrifugovano i dodato 2 μ L ekstrahovane ukupne RNK uzorka ili PCR produkta, zavisno od fazi ugneždene RT-PCR.

Pripremljene mikrotube posložene su na način kako je prikazano u tabeli 12. u termocikler AB 2720 (Applied Biosystems, SAD) koji se koristi za izvođenje RT-PCR i ugneždenu PCR reakciju.

Tabela 5. Raspored mikrotuba u termocikleru za RT-PCR i PCR2 reakcije.

	1	2
A	K3-8	J6
B	K3-9	G30
C	M3-6	pozK1
D	M3-9	NegK1
E	M6-2	
F	M6-9	
G	M6-10	
H	J5	

Reakcije RT-PCR u jednom koraku i PCR2 su se odvijale prema termalnom profilu prikazanom u Tabeli 13.

Tabela 6. Termalni profil za izvođenje RT-PCR i PCR2 (prema Worthington et al., 2008).

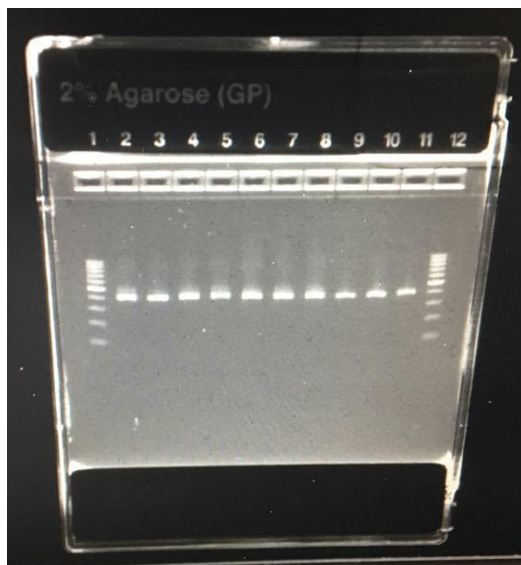
Ugneždena RT-PCR (Nested)		RT-PCR u jednom koraku (SX1+ \rightarrow SX2-)		PCR2 (SX3+ \rightarrow SX4-)	
		Temperatura (°C)	Vreme	Temperatura (°C)	Vreme
Reverzna transkripcija (RT)		50	30	-	
Aktivacija Taq polimeraze		95	15 min	94	3 min
PCR (30 ciklusa)	Denaturacija NK lanca	94	1 min	94	1 min
	Vezivanje prajmera	50	1,5 min	48	1,5 min
	Elongacija NK lanca	72	2 min	72	2 min
Završno produžavanje NK lanaca		72	10 min	72	10 min

Na kraju umnoženi PCR produkti su analizirani horizontalnom elektroforezom na 1% agaroznom gelu i vizualizovani pod UV svetlom.

4.2.2.2. Horizontalna elektroforeza u agaroznom gelu

Nakon izvođenja lančane reakcije polimeraze je vršena horizontalna gel-elektroforeza ispitivanih uzoraka u 1% agaroznom gelu radi vizualizacije dobijenih PCR produkata (Slika 17). U 100 ml Tris-acetat-EDTA pufera (1xTAE, pH 8.0; 40mM Tris, 3 mM EDTA) je dodato 1 g UltraPure agaroze (Invitrogen, SAD) i zagrevanjem rastvorena u TAE puferu. Posle hlađenja rastvora agaroze do temperature od 50°C, ista je izlivana u kadicu za izvođenje elektroforeze Mini-Sub Cell GT Cell (Bio-Rad, SAD) u kojoj je bio postavljen češalj za formiranje bazenčića u agaroznom gelu. Posle uranjanja gela agaroze, u kadicu za elektroforezu dodat je TAE pufer. U bazenčiće formirane u agaroznom gelu mikropipetom je nanošeno po 20 µl dobijenog PCR produkta.

Horizontalna gel-elektroforeza izvođena je tokom vremenskog perioda od 45 minuta pri naponu struje od 100V. Posle elektroforeze, agarozni gel je prebacivan u kadicu sa etidijum bromidom (Bio-Rad) u kojoj se bojio sledećih 30 minuta. Odbojavanje gela je vršeno u drugoj kadici sa dejonizovanom vodom tokom 10 minuta. Nakon toga gel je bio prenet u Gel Doc XR system (Bio-Rad) radi vizualizacije pod UV svetlom. Pojava trake (benda) određene veličine na agaroznom gelu je smatrana pozitivnim nalazom što ujedno predstavlja i PCR produkt.



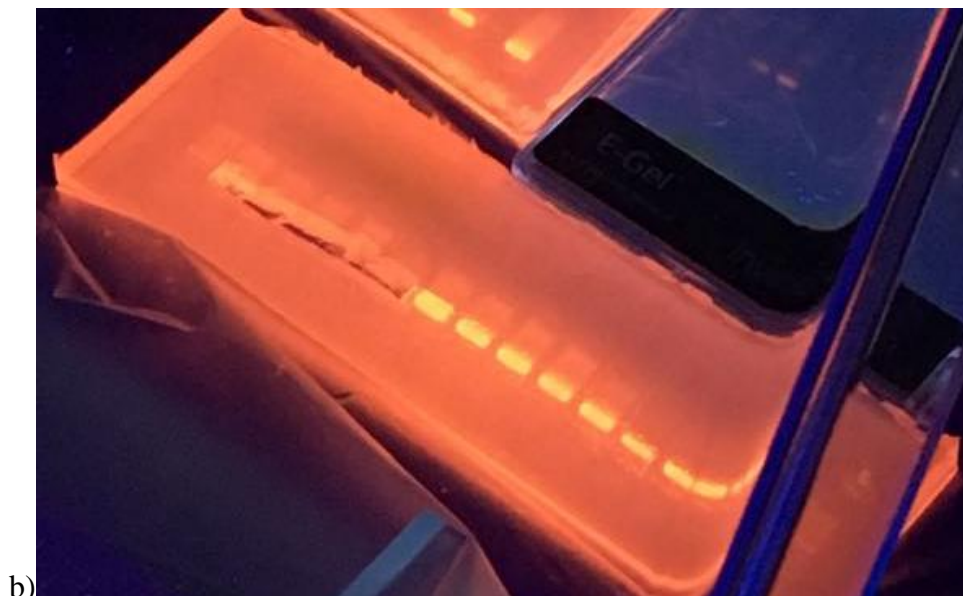
Slika 17. Vizualizacija pozitivnih uzoraka na agaroznom gelu pod UV svetlom.

4.2.2.3 Prečišćavanje DNK iz agaroznog gela

Da bi se dobijeni PCR proizvod oslobodio neinkorporisanih nukleotida, etidijum bromida kao i drugih nespecifičnih proizvoda PCR reakcije koji mogu negativno uticati na izvođenje Sanger metode sekvencioniranja umnoženog segmenta virusnog genoma, neophodno je prethodno izvršiti ekstrakciju i prečišćavanje dobijenog PCR proizvoda iz gela agaroze.

Postupak prečišćavanja gela je vršen primenom GeneJet gel extraction kita (Thermo Scientific, SAD), prema uputstvu proizvođača.





Slika 18. a) Umnoženi DNK fragmenti i b) gel nakon isecanja.

Ekstrakcija DNK iz gela pomoću centrifugiranja rađena je po sledećem postupku:

1. Odsečak agaroznog gela koji sadrži umnoženi fragment DNK isečen je pomoću skalpela (Slika 18), potom premešten u prethodno odmerenu epruvetu od 1,5 ml. Zatim je izračunata masa odsečka po formuli:
$$m(\text{odsečak}) = m(\text{epruveta sa odsečkom}) - m(\text{prazna epruveta})$$
2. Odsečak gela pomešan je sa vezivnim puferom u promeru 1:1 (masa: zapremina)
3. Dobijena smesa je potom inkubirana na 50-60 °C tokom 10 minuta dok se odsečak gela nije u potpunosti rastvorio. Sadržaj epruvete pomešan je okretanjem gore-dole svakih nekoliko minuta kako bi se olakšao proces topljenja.
4. Nakon što je gel potpuno rastvoren, gel mešavina je kratko vorteksovana te proverena boja koja ukazuje na pH rastvora pre nego što je rastvor prebacivan u kolonu. Žuta boja ukazuje na optimalni pH za vezivanje DNK. Potom je dodato 10 µl 3 M natrijum acetata (pH 5.2, Sigma Aldrich, Nemačka) u rastvor i pomešano. Boja mešavine postala je žuta.
5. Očekivana dužina PCR produkta bila je oko 390bp. Potom je dodata ista zapremina 100% izopropanola u rastvor i temeljno pomešano.
6. U GeneJET kolone za prečišćavanje preneto je po 800 µl rastvora gela, centrifugovano 1 min pri 13 000 o/min. Odbačen je filtrat iz epruvete za sakupljanje i ponovo vraćen u kolonu u istu

epruvetu. Ukupna zapremina rastvora gela prelazila je 800 μL , te je rastvor dodavan u kolonu u fazama, ponavljajući postupak sve dok celokupan volumen nije primenjen na membranu kolone.

7. Učinjen je dodatni korak vezivanja jer se prečišćena DNK kasnije koristila za sekvencioniranje. Znači, u kolonu za prečišćavanje GeneJET dodato je 100 μl pufera za vezivanje i centrifugovano 1 min pri 13 000 o/min. Odbačen je filtrat i vraćen nazad u kolonu u istu epruvetu za sakupljanje.
8. Dodato je 700 μl pufera za ispiranje prethodno razblaženog etanolom na kolone za prečišćavanje GeneJET i centrifugovali 1 min pri 13 000 o/min. Zatim smo odbacili nastavak i vratili kolonu nazad u istu epruvetu za sakupljanje.
9. Da bi potpuno uklonili (za)ostatke pufera za pranje, centrifugovali smo još jednom praznu kolonu za pročišćavanje GeneJET-a u trajanju od 1 minut.
10. GeneJET kolonu za pročišćavanje prebacili smo u čistu epruvetu za mikrocentrifugu od 1,5 mL. U centar membrane na prečišćavajućoj koloni dodali smo 50 μl Elution Buffer-a (pufera za ispiranje) i centrifugovali 1 min pri 13 000 o/min.
11. Odbacili smo GeneJET prečišćavajuću kolonu i smestili prečišćenu DNK na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do sekvencioniranja.

Na ovaj način je dobijeno 20 μl prečišćenog PCR proizvoda. Pre primene Sanger metode sekvencioniranja, odredili smo koncentraciju dobijenog molekula DNK na spektrofotometru.

4.2.2.4. Reakcija pre sekvencioniranja i priprema uzorka za kapilarnu elektroforezu

Sekvencioniranje dobijenog prečišćenog PCR produkta vršeno je primenom BigDye Terminator v3.1 kita (Applied Biosystems). Sastav master mešavine za izvođenje reakcije sekvencioniranja prikazan je u tabeli 14. i razlikuje se sa obzirom na primenjeni prajmer. U mikrotubu dodato je master mešavine do 20 μl i dodato je 4 μl prečišćenog PCR produkta u tubu sa F prajmerom (SX3+) i 6 μl prečišćenog PCR produkta u mikrotubu sa R prajmerom (SX4-).

Tabela 7. Sastav master mešavina za reakcije sa "forward" i "reverse" prajmerima pre sekvencioniranja.

BigDye Terminator v3.1	(SX3+)	(SX4-)
Ready Reaction mix (2,5x)	4 µl	4 µl
Pufer za sekvencioniranje(5x)	2µL	2µL
Prajmer (10 µM)	0,8µl	0,8µl
Vode slobodne od nukleaza	9,2 µl	7,2µl
UKUPNO	16,0	14,0
Prečšćeni PCR produkt	4 µl	6 µl

Mikrotube su postavljene u termocikler na način kako je prikazano u tabeli 15.

Tabela 8. Postavka mikrotuba u termocikleru za PCR reakciju pre sekvencioniranja.

	1	2	3
A	K3-8	J6	M6-10
B	K3-9	G30	J5
C	M3-6	K3-8	J6
D	M3-9	K3-9	G30
E	M6-2	M3-6	pozK1
F	M6-9	M3-9	NegK1
G	M6-10	M6-2	
H	J5	M6-9	

*sivo obojena polja=uzorci sa reverse (SX4-) prajmerom.

Reakcija se odvijala pod temperaturnim režimom iz tabele 15.

Tabela 9. Termalni profil PCR reakcije pre sekvencioniranja.

PCR BigDye Terminator v3.1		Temperatura (°C)	Vreme
Početna denaturacija		96	5 min
PCR 25 ciklusa	DenaturacijaNK lanaca	96	10 sek
	Vezivanje prajmera	50	5 sek
	Produžavanje NK lanaca	60	4 min

Priprema uzoraka za sekvencioniranje je uključivala precipitaciju PCR produkta sekvencioniranja u obliku peleta na dno mikroeprevete sa dodatkom 2 µl rastvora natrijum acetata (pH 5.2) i 60 µl 99% etanola (Zorka farm). Kratko je vorteksovano te inkubirano na sobnoj temperaturi tokom 20 minuta i centrifugirano 20 minuta pri brzini od 13 000 o/min (4°C). Nakon uklanjanja gotovo svog alkohola bez dodirivanja pelete, dodato je 250 µl 75% etanola i kuckanjem

po epruveti peleta je oslobođena u alkohol. Potom je izvršeno centrifugiranje prema istom režimu. Uklonjen je sav etanol i tubice ostavljene u mraku da ostatak alkohola ispari na vazduhu. Uzorci su čuvani na 4°C do sekvencioniranja.

4.2.2.5. Kapilarna elektroforeza

Neposredno pre sekvencioniranja, pelete su rastvorene u 16 µl formalina, vorteksovane i kratko centrifugirane.

Optička mikrotitraciona ploča (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD) sa uzorcima za elektroforezu je stavljena u ležište genetskog analizatora Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems, SAD). Na uređaj su postavljene četiri kapilare dužine 36 cm a kao polimer je korišćen POP-7 (Applied Biosystems, SAD). Uređaj je podešen na RapidSeq protokol za POP-7 polimer i kapilare navedene dužine. Izvođenje elektroforeze je trajalo oko jedan čas, a dobijeni rezultati su obrađivani korišćenjem SeqScape programa (Applied Biosystems, SAD). Nukleotidne sekvence su prikupljene tokom kapilarne elektroforeze pomoću programa 3130xl genetic analyzer data collection software version 3.0 (Applied Biosystems Inc, Foster City, CA, USA). Svaki pozitivni uzorak bio je sekvencioniran u oba smera: forward i reverse.

Dobijene sekvence nukleotida virusa infektivnog bronhitisa obrađivane su u genetskom analizatoru i korigovane u Chromat Lite programu (Technelysium Pty, Ltd, Australija).

4.2.2.6. Sekvence deponovane u bazi GenBank

Dobijene delimične S1 sekvence naših IBV izolata su nakon analize i uređenja deponovane u bazu GenBank pod pristupnim brojem MH010330 - MH010339.

4.2.3. Filogenetska analiza i genotipizacija izolata virusa IB-a

Genotipizacija i filogenetska analiza, koje uključuju: poravnavanje sekvenci nukleotida, izračunavanje filogenetske udaljenosti i izradu filogenetskog stabla, su odrađene pomoću kompjuterskog programa MEGA 7.0 (Tamura et al, 2016).

Za upoređivanje sekvenci nukleotida izolovanih virusa IB i izradu filogenetskog stabla su korišćene sekvence najčešće korišćenih vakcinalnih sojeva virusa IB (Tabela 17.).

Tabela 10. Vakcinalni sojevi virusa IB-a korišćeni za upoređivanje sa dobijenim sojevima

X15832	Infectious Bronchitis Virus genomic RNA for spike precursor protein S1 and S2 (=peplomer subunits S1 and S2)
DQ431199	Infectious bronchitis virus isolate L-1148 spike glycoprotein S1 (S1) gene, partial cds
DQ901377	Infectious bronchitis virus isolate It/497/02 spike glycoprotein S1 gene, partial cds
FJ899688	Infectious bronchitis virus strain Ark52930 spike protein (S1) gene, partial cds
KC795604	Infectious bronchitis virus strain QX spike protein (S1) gene, partial cds
KF377577	Infectious bronchitis virus strain 4/91 vaccine, complete genome
X87238	Avian infectious bronchitis virus gene for spike protein.
M21970 J04329	Avian infectious bronchitis virus (strain H120) peplomeric protein
M21971 J04329	Avian infectious bronchitis virus (strain D1466) peplomeric protein
DQ834384	Infectious bronchitis virus strain M41, complete genome
KU736747	Infectious bronchitis virus strain MA5 commercial vaccine S1 gene, partial cds
FJ888351	Infectious bronchitis virus strain H120, complete genome

Za određivanje genotipa upoređeni su sa ukupno 43 sekvence vakcinalnih sojeva virusa IB i prototipova sojeva virusa IB dostupnih u Gen Bank bazi nukleotidnih sekvenci (Tabela 18.) (Valastro et al., 2016). Poravnavanje sekvenci učinjeno je primenom Clustal O, deo Unipro UGENE softvera (Okonechnikov, et al., 2012). Evolucijska udaljenost i filogenetska analiza odrađeni su "maximum likelihood" metodom na bazi general time reversible model 10.

Tabela 11. Sekvence prototipova sojeva virusa IB korišćene u filogenetskoj analizi.

GenBank pristupni broj	Soj prototip	Zemlja porekla	Godina izolovanja	Period cirkulisanja	Linija (Valastro i sar.,2016)
	Naziv soja				
M95169	Beaudette	SAD	1937	1937–2013	GI-1
GU393336	Holte	SAD	1954	1954–2006	GI-2
L14069	Gray	SAD	1960	1960–2006	GI-3
L18988	Holte	SAD	1962	1962–1998	GI-4
U29522	N1/62	Australija	1962	1962–2012	GI-5
U29519	VicS	Australija	1962	1962–2010	GI-6
AY606320	TP/64	Tajvan	1964	1964–2012	GI-7
JQ964061	L165	SAD	1965	1965–1967	GI-8
M99482	ARK99	SAD	1973	1973–2011	GI-9
AF151954	B	Novi Zeland	1970s	1970s–2000s	GI-10
JX182775	UFMG/G	Brazil	1975	1975–2009	GI-11
X52084	D3896	Holandija	1978	1978–2006	GI-12
EU914938	Moroccan-G/83	Maroko	1983	1983–2013	GI-13
X87238	B1648	Belgija	1984	1984–2006	GI-14
FJ807932	B4	Koreja	1986	1986–2008	GI-15
KJ941019	IZO 28/86	Italija	1986	1986–2011	GI-16
AF419315	CA/Machado/88	SAD	1988	1988–1999	GI-17
AY296744	JP8127	Japan	1993	1993–1999	GI-18
KC577395	58HeN-93II	Kina	1993	1993–2012	GI-19
AF349621	Qu_mv	Kanada	1996	1996–1999	GI-20
DQ064806	Spain/97/314	Španija	1997	1997–2005	GI-21
KC577382	40GDGZ-97I	Kina	1997	1997–2011	GI-22
AF093796	Variant 2	Israel	1998	1998–2012	GI-23
KF757447	V13	Indija	1998	1998–2013	GI-24
EU925393	CA/1737/04	SAD	2004	2004–2013	GI-25
FN182243	NGA/B401/2006	Nigerija	2006	2006–2007	GI-26
GU301925	GA08	SAD	2008	2008–2013	GI-27
M21971	D1466	Holandija	1979	1979–1984	GII-1
U29450	N1/88	Australija	1988	1988–2008	GIII-1
U77298	DE/072/92	SAD	1992	1992–2003	GIV-1
DQ059618	N4/02	Australija	2002	2002–2008	GV-1
GQ26594	TC07-2	Kina	2007	2007–2012	GVI-1

5. REZULTATI

5.1. Rezultati izolacije virusa IB-a iz uzoraka suspektnog materijala poreklom od živine

U periodu od marta 2016 do juna 2017 godine u laboratoriji za virusologiju Veterinarskog specijalističkog instituta “Kraljevo” iz Kraljeva izvršeno je ispitivanje 480 pojedinačnih uzoraka živine, trahealnih briseva, radi utvrđivanja prisustva virusa Infektivnog bronhitisa. Izolovani sojevi virusa infektivnog bronhitisa obeležavani su rednim brojevima dok su jata označavana slovima abecede. Pozitivnih pool-ova bilo je 9 od ukupnih 13. Najreprezentativnijih 10 izolata uzeto je dalje za sekvencioniranje. Najučestaliji genotip bio je D274, zatim 793B takođe poznat kao 4/91 i QX.

5.2. Ispitivanje prisustva virusa IB-a primenom molekularnih metoda virusološke dijagnostike (RT-PCR, real time RT-PCR)

Primenom metode RT-PCR, dokazano je prisustvo nukleinske kiseline virusa infektivnog bronhitisa u zbirnim uzorcima ekstrahovane RNK (Tabela 18, 19 i 20). Rezultati ispitivanja su potvrdili da su svi izolovani sojevi pokazali karakteristične sigmoidne krive nastale kao rezultat procesa amplifikacije (Slika 19). Dobijene Ct vrednosti svih pool-ovanih uzoraka su se kretale u intervalu 35-40 dok su se Ct vrednosti razbijenih pool-ova i odabranih najpozitivnijih 10, kretale u interval od 28-40.

Tabela 18. Dokaz prisustva RNK virusa IB u zbirnim (pool) uzorcima traheje. Pozitivni uzorci su na prikazu obojeni sivo. Postavka mikrotuba u uređaj za izvođenje qRT-PCR-a u prvoj (a) i drugoj (b) analizi.

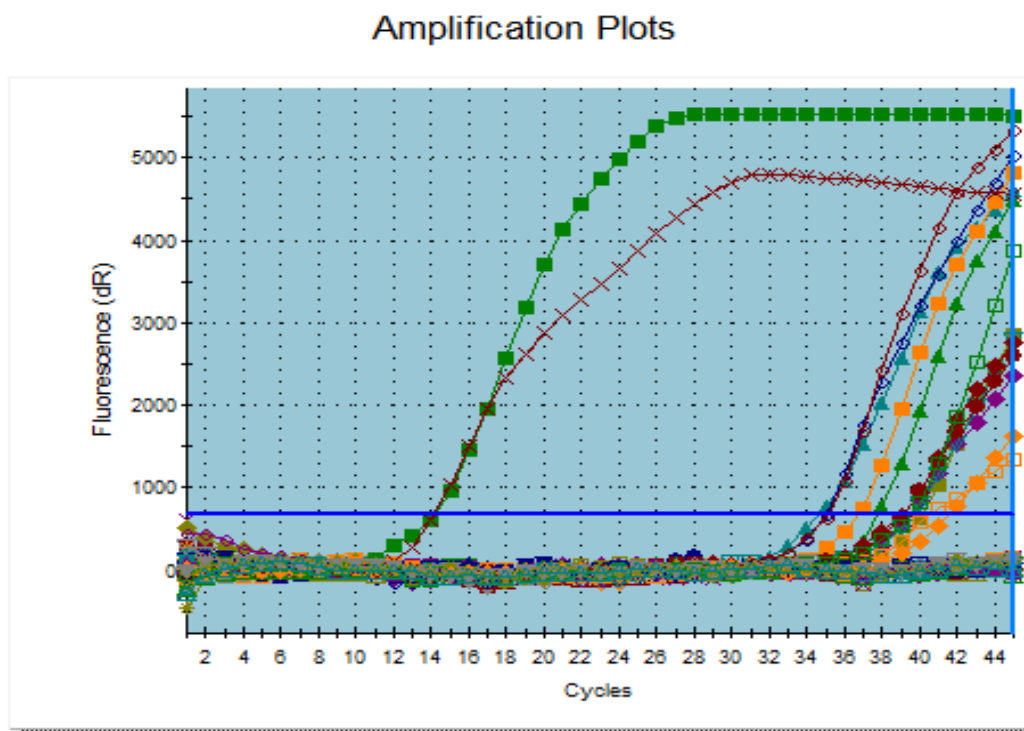
(a)	1	2	3	4	5	6	7
A	1	9	17	25	33	41	49
B	2	10	18	26	34	42	50
C	3	11	19	27	35	43	NegK1
D	4	12	20	28	36	44	NegK2
E	5	13	21	29	37	45	PozK1
F	6	14	22	30	38	46	PozK2
G	7	15	23	31	39	47	
H	8	16	24	32	40	48	

(b)	1	2	3
A	K1	L3	M5
B	K2	L4	M6
C	K3	L5	PozK1
D	K4	L6	PozK2
E	K5	M1	NegK1
F	K6	M2	NegK2
G	L1	M3	
H	L2	M4	

Tabela 19. Dokaz prisustva RNK virusa IB u uzorcima koji pripadaju razbijenim prethodno pozitivnim zbirnim (pool) uzorcima traheje. Pozitivni uzorci su na prikazu obojeni sivo (a) prva analiza i (b) druga analiza.

(a)	1	2	3
A	C25	J3	G17
B	C26	J4	G18
C	C27	J5	NegK1
D	C28	J6	PozK1
E	C29	G13	PozK2
F	C30	G14	NegK2
G	J1	G15	
H	J2	G16	

(b)	1	2	3	4	5	6	7	8
A	K1-1	K1-9	K3-7	L1-5	L5-3	M3-1	M3-9	M6-7
B	K1-2	K1-10	K3-8	L1-6	L5-4	M3-2	M3-10	M6-8
C	K1-3	K3-1	K3-9	L1-7	L5-5	M3-3	M6-1	M6-9
D	K1-4	K3-2	K3-10	L1-8	L5-6	M3-4	M6-2	M6-10
E	K1-5	K3-3	L1-1	L1-9	L5-7	M3-5	M6-3	PozK1
F	K1-6	K3-4	L1-2	L1-10	L5-8	M3-6	M6-4	PozK2
G	K1-7	K3-5	L1-3	L5-1	L5-9	M3-7	M6-5	NegK1
H	K1-8	K3-6	L1-4	L5-2	L5-10	M3-8	M6-6	NegK2



Slika 19. Šema amplifikacije RT-PCR reakcije sojeva virusa. Plava horizontalna linija predstavlja "threshold". Sigmoidne krive predstavljaju kinetiku amplifikacije PCR proizvoda u realnom vremenu.

Tabela 20. Postavka mikrotuba u termocikleru za PCR reakciju pre sekvencioniranja za odabrane pozitivne uzorke.

	1	2	3
A	K3-8	J6	M6-10
B	K3-9	G30	J5
C	M3-6	K3-8	J6
D	M3-9	K3-9	G30
E	M6-2	M3-6	pozK1
F	M6-9	M3-9	NegK1
G	M6-10	M6-2	
H	J5	M6-9	

5.3. Molekularna karakterizacija i filogenetska analiza

Za molekularnu karakterizaciju i filogenetsku analizu kao uzorci uzeti su trahealni brisevi živine različite starosne dobi.

Amplifikovani PCR produkti su ekstrahovani i sekvencionirani. Nakon sekvencioniranja urađena je filogenetska analiza sačinjena pomoću MEGA 7 softvera (Kumar et al., 2016). Filogenetsko stablo izrađeno je na bazi parcijalnog sekvencioniranja S1 gena pomoću Neighbour-joining (NJ) algoritma. Uz pomoć BLAST analize pretražena je baza podataka Gen Bank (National Centre of Biotechnology Information) da bi se utvrdila podudarnost sekvenci amplifikovanih PCR produkata i već postojećih gena.

Virus IB-a je detektovan u izabranih deset reprezentativnih izolata. Na osnovu njihovih parcijalnih S1 genskih sekvenci, identifikovani izolati tokom ove studije mogu se podeliti u tri grupe.

Prvu grupu predstavlja D274 genotip sa izolatima MH010330, MH010331, MH010332, MH010334, MH010335 i MH010336.

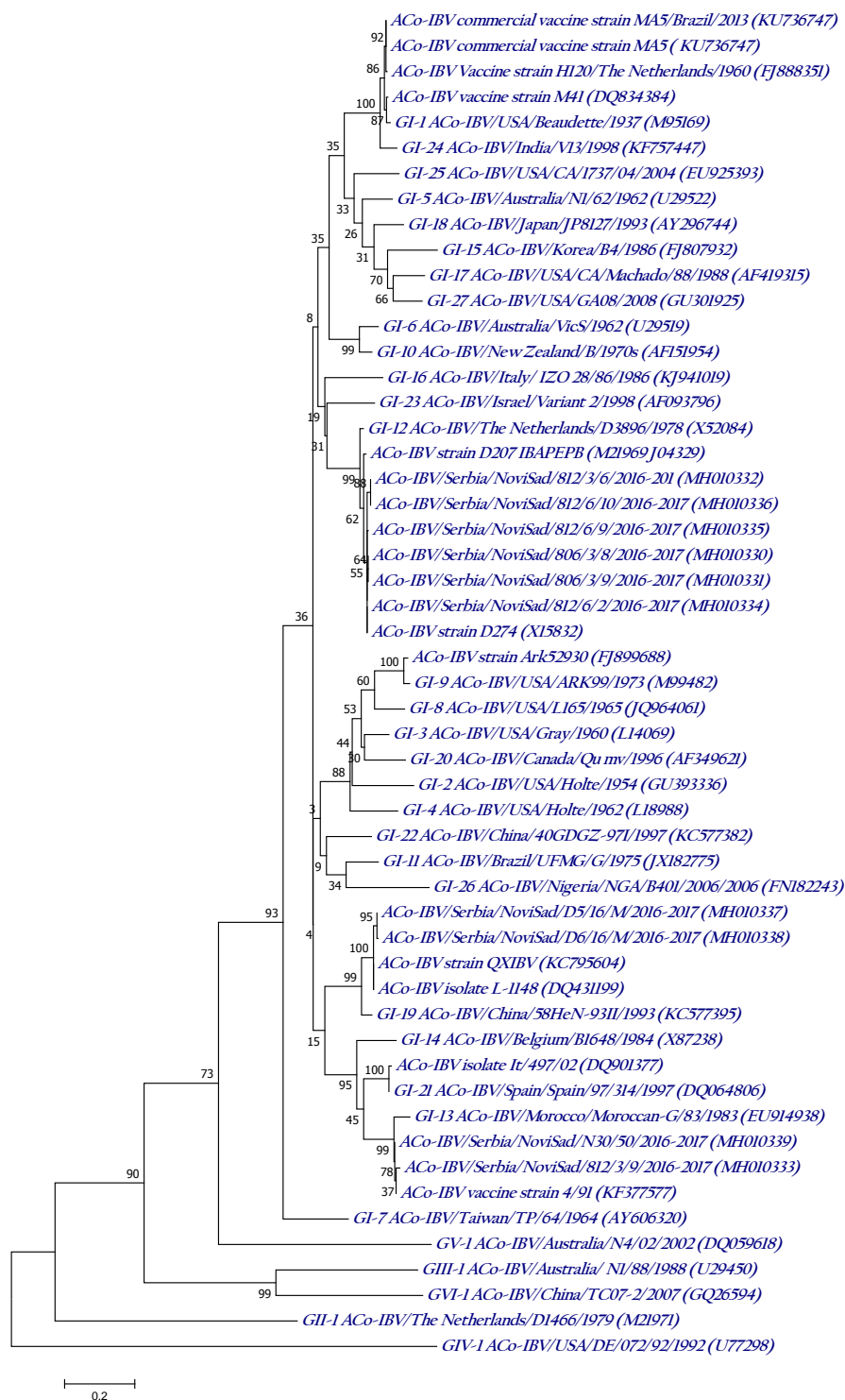
Drugu grupu čini genotip 4/91 sa izolatima MH010333 i MH010339.

Treću grupu čini genotip QX sa izolatima MH010337 i MH010338 (Slika 20).

Izolati MH010330 i MH010331 pokazuju 100% nukleotidne sličnosti kao i izolati MH010332 i MH010336. Izolat MH010335 pokazuje 99.7% sličnosti sa MH010330, MH010331 i MH010334 kao i 98.8% sličnosti sa MH010332 i MH010336. Izolat MH010334 pokazao je 99.1% nukleotidne sličnosti sa MH010332 i MH010336. Sojevi MH010330 i MH010331 pokazuju takođe veliku sličnost (99.4%) sa izolatima MH010332 i MH010336. Razlike u sličnosti nukleotida između sojeva D274 izolovanih u ovoj studiji sa D274 (X15832) varirali su od 0 do 0.9% i od 2.4 do 2.7% u poređenju sa D3896 (X52084) koji je izolovan u Holandiji 1978.godine (Slika 20). Naši izolati koji pripadaju QX genotipu pokazali su 99.7% nukleotidne sličnosti. Razlike u nukleotidnim sekvencama između izolata koji pripadaju D274 grupi varirale su od 0 do 1.2%.

Naši izolati MH010337 i MH010338 koji su slični sa QXIBV (KC795604) i L-1148 (DQ431199) varirali su od 0.9 do 1.2% dok je QX (KC577395) varirao od 5.8 do 6.1% (slika 20).

Naš izolat MH010333 i MH010339 koji pripadaju 4/91 genotipu, pokazuju 98.5% nukleotidne sličnosti dok je izolat MH010339 bio 99.7% sličan sa vakcinalnim sojem 4/91 (KF377577) a izolat MH010333 98.8% (slika 20).



Slika 20. Filogenetsko stablo bazirano na poređenju parcijalnih sekvenci S1 gena IBV izolata detektovanih u Srbiji i referentnih sojeva virusa IB-a. Maximum likelihood tree (1000 bootstop replicates) izrađeno Neighbour-joining metodom (Tamura et al., 2004).

Tabela 21. Nukleotidna podudarnost izolovanih sa filogenetski najrodnijim izolatima virusa IB-a.

		D274 cluster					QX cluster		4/91 cluster		
Maksimalna identičnost nukleotidnih sekvenci/procent		ACo-IBV/Serbia/NoviSad/812/6/2/2016-2017 (MH010334)	ACo-IBV/Serbia/NoviSad/806/3/8/2016-2017 (MH010330)	ACo-IBV/Serbia/NoviSad/806/3/9/2016-2017 (MH010331)	ACo-IBV/Serbia/NoviSad/812/3/6/2016-2017 (MH010332)	ACo-IBV/Serbia/NoviSad/812/6/9/2016-2017 (MH010335)	ACo-IBV/Serbia/NoviSad/812/6/10/2016-2017 (MH010336)	ACo-IBV/Serbia/NoviSad/D5/16/M/2016-2017 (MH010337)	ACo-IBV/Serbia/NoviSad/D6/16/M/2016-2017 (MH010338)	ACo-IBV/Serbia/NoviSad/812/3/9/2016-2017 (MH010333)	ACo-IBV/Serbia/NoviSad/N30/50/2016-2017 (MH010339)
IZOLATI IZ SRBIJE	ACo-IBV/Serbia/NoviSad/812/6/2/2016-2017_(MH010334)		99,70%	99,70%	99,10%	99,70%	99,10%	80,60%	80,30%	81,50%	82,30%
	ACo-IBV/Serbia/NoviSad/806/3/8/2016-2017_(MH010330)	99,70%		100,00%	99,40%	99,40%	99,40%	80,30%	80,00%	81,20%	82,00%
	ACo-IBV/Serbia/NoviSad/806/3/9/2016-2017_(MH010331)	99,70%	100,00%		99,40%	99,40%	99,40%	80,30%	80,00%	81,20%	82,00%
	ACo-IBV/Serbia/NoviSad/812/3/6/2016-201_(MH010332)	99,10%	99,40%	99,40%		98,80%	100,00%	80,30%	80,00%	81,20%	82,00%
	ACo-IBV/Serbia/NoviSad/812/6/9/2016-2017_(MH010335)	99,70%	99,40%	99,40%	98,80%		98,80%	80,90%	80,60%	81,70%	82,60%
	ACo-IBV/Serbia/NoviSad/812/6/10/2016-2017_(MH010336)	99,10%	99,40%	99,40%	100,00%	98,80%		80,30%	80,00%	81,20%	82,00%
	ACo-IBV/Serbia/NoviSad/D5/16/M/2016-2017_(MH010337)	80,60%	80,30%	80,30%	80,30%	80,90%	80,30%		99,70%	80,90%	81,70%
	ACo-IBV/Serbia/NoviSad/D6/16/M/2016-2017_(MH010338)	80,30%	80,00%	80,00%	80,00%	80,60%	80,00%	99,70%		80,60%	81,50%
	ACo-IBV/Serbia/NoviSad/812/3/9/2016-2017_(MH010333)	81,50%	81,20%	81,20%	81,20%	81,70%	81,20%	80,90%	80,60%		98,50%

		D274 cluster						QX cluster		4/91 cluster	
Maksimalna identičnost nukleotidnih sekvenci/procent		ACo-IBV/Serbia/NoviSad/812/6/2/2016-2017 (MH010334)	ACo-IBV/Serbia/NoviSad/806/3/8/2016-2017 (MH010330)	ACo-IBV/Serbia/NoviSad/806/3/9/2016-2017 (MH010331)	ACo-IBV/Serbia/NoviSad/812/3/6/2016-2017 (MH010332)	ACo-IBV/Serbia/NoviSad/812/6/9/2016-2017 (MH010335)	ACo-IBV/Serbia/NoviSad/812/6/10/2016-2017 (MH010336)	ACo-IBV/Serbia/NoviSad/D5/16/M/2016-2017 (MH010337)	ACo-IBV/Serbia/NoviSad/D6/16/M/2016-2017 (MH010338)	ACo-IBV/Serbia/NoviSad/812/3/9/2016-2017 (MH010333)	ACo-IBV/Serbia/NoviSad/N30/50/2016-2017 (MH010339)
ACo-IBV/Serbia/NoviSad/N30/50/2016-2017_(MH010339)		82,30%	82,00%	82,00%	82,00%	82,60%	82,00%	81,70%	81,50%	98,50%	
KOMERCIJALNI VAKCINALNI SOJEVI	ACo-IBV_strain D207_IBAPEPB (M21969_J04329)	98,50%	98,20%	98,20%	97,60%	98,20%	97,60%	80,60%	80,30%	81,50%	82,30%
	ACo-IBV_strain D274_(X15832)	100,00%	99,70%	99,70%	99,10%	99,70%	99,10%	80,60%	80,30%	81,50%	82,30%
	ACo-IBV_strain QXIBV_(KC795604)	80,90%	80,60%	80,60%	80,60%	81,20%	80,60%	99,10%	98,80%	80,90%	81,70%
	ACo-IBV_isolate L-1148_(DQ431199)	80,90%	80,60%	80,60%	80,60%	81,20%	80,60%	99,10%	98,80%	80,90%	81,70%
	ACo-IBV_vaccine strain 4/91_(KF377577)	82,00%	81,70%	81,70%	81,70%	82,30%	81,70%	81,50%	81,20%	98,80%	99,70%
	ACo-IBV_vaccine_strain H120/The Netherlands/1960_(FJ888351)	83,20%	83,50%	83,50%	83,50%	83,50%	83,50%	78,90%	78,60%	75,70%	76,80%
	ACo-IBV_vaccine_strain M41_(DQ834384)	82,90%	83,20%	83,20%	83,20%	83,20%	83,20%	79,10%	78,90%	76,50%	77,70%
	ACo-IBV_commercial vaccine strain MA5/Brazil/2013_(KU736747)	83,50%	83,80%	83,80%	83,80%	83,80%	83,80%	79,10%	78,90%	76,00%	77,10%
	ACo-IBV_commercial vaccine_strain MA5_(KU736747)	83,50%	83,80%	83,80%	83,80%	83,80%	83,80%	79,10%	78,90%	76,00%	77,10%
	ACo-IBV_strain Ark52930_(FJ899688)	78,00%	78,30%	78,30%	78,30%	78,30%	78,30%	80,00%	79,70%	77,40%	78,60%

		D274 cluster						QX cluster		4/91 cluster	
Maksimalna identičnost nukleotidnih sekvenci/procent		ACo-IBV/Serbia/NoviSad/812/6/2/2016-2017 (MH010334)	ACo-IBV/Serbia/NoviSad/806/3/8/2016-2017 (MH010330)	ACo-IBV/Serbia/NoviSad/806/3/9/2016-2017 (MH010331)	ACo-IBV/Serbia/NoviSad/812/3/6/2016-2017 (MH010332)	ACo-IBV/Serbia/NoviSad/812/6/9/2016-2017 (MH010335)	ACo-IBV/Serbia/NoviSad/812/6/10/2016-2017 (MH010336)	ACo-IBV/Serbia/NoviSad/D5/16/M/2016-2017 (MH010337)	ACo-IBV/Serbia/NoviSad/D6/16/M/2016-2017 (MH010338)	ACo-IBV/Serbia/NoviSad/812/3/9/2016-2017 (MH010333)	ACo-IBV/Serbia/NoviSad/N30/50/2016-2017 (MH010339)
	ACo-IBV_ isolate It/497/02_(DQ901377)	79,40%	79,10%	79,10%	79,10%	79,70%	79,10%	81,20%	80,90%	87,50%	87,80%
PREDSTAVNICTVO GENOTIPOVA (Valastro et al., 2016)	GI-1_ACo-IBV/USA/Beaudette/1937_(M95169)	82,90%	83,20%	83,20%	83,20%	83,20%	83,20%	78,30%	78,00%	75,70%	76,80%
	GI-2_ACo-IBV/USA/Holte/1954_(GU393336)	76,80%	76,50%	76,50%	77,10%	77,10%	77,10%	76,50%	76,30%	74,80%	75,40%
	GI-3_ACo-IBV/USA/Gray/1960_(L14069)	78,90%	78,60%	78,60%	78,60%	79,10%	78,60%	80,00%	79,70%	79,70%	80,60%
	GI-4_ACo-IBV/USA/Holte/1962_(L18988)	78,30%	78,60%	78,60%	78,60%	78,60%	78,60%	80,00%	79,70%	78,60%	79,40%
	GI-5_ACo-IBV/Australia/N1/62/1962_(U29522)	81,70%	82,00%	82,00%	82,00%	82,00%	82,00%	80,30%	80,00%	80,00%	80,60%
	GI-6_ACo-IBV/Australia/VicS/1962_(U29519)	81,20%	81,50%	81,50%	81,70%	81,50%	81,70%	77,70%	77,40%	78,90%	79,40%
	GI-7_ACo-IBV/Taiwan/TP/64/1964_(AY606320)	78,20%	77,90%	77,90%	77,90%	78,50%	77,90%	79,60%	79,30%	76,70%	77,30%
	GI-8_ACo-IBV/USA/L165/1965_(JQ964061)	79,10%	79,40%	79,40%	79,40%	79,40%	79,40%	79,40%	79,10%	79,10%	79,70%
	GI-9_ACo-IBV/USA/ARK99/1973_(M99482)	78,00%	78,30%	78,30%	78,30%	78,30%	78,30%	80,00%	79,70%	76,80%	78,00%
	GI-10_ACo-IBV/New Zealand/B/1970s_(AF151954)	80,90%	81,20%	81,20%	81,20%	81,20%	81,20%	79,70%	79,40%	80,60%	80,90%

		D274 cluster						QX cluster		4/91 cluster	
	Maksimalna identičnost nukleotidnih sekvenci/procent	ACo-IBV/Serbia/NoviSad/812/6/2/2016-2017 (MH010334)	ACo-IBV/Serbia/NoviSad/806/3/8/2016-2017 (MH010330)	ACo-IBV/Serbia/NoviSad/806/3/9/2016-2017 (MH010331)	ACo-IBV/Serbia/NoviSad/812/3/6/2016-2017 (MH010332)	ACo-IBV/Serbia/NoviSad/812/6/9/2016-2017 (MH010335)	ACo-IBV/Serbia/NoviSad/812/6/10/2016-2017 (MH010336)	ACo-IBV/Serbia/NoviSad/D5/16/M/2016-2017 (MH010337)	ACo-IBV/Serbia/NoviSad/D6/16/M/2016-2017 (MH010338)	ACo-IBV/Serbia/NoviSad/812/3/9/2016-2017 (MH010333)	ACo-IBV/Serbia/NoviSad/N30/50/2016-2017 (MH010339)
	GI-11_ACo-IBV/Brazil/UFMG/G/1975_(JX182775)	79,70%	80,00%	80,00%	80,30%	80,00%	80,30%	81,20%	80,90%	79,70%	80,60%
	GI-12_ACo-IBV/The Netherlands/D3896/1978_(X52084)	97,30%	97,60%	97,60%	97,60%	97,60%	97,60%	80,90%	80,60%	81,50%	82,00%
	GI-13_ACo-IBV/Morocco/Moroccan-G/83/1983_(EU914938)	80,30%	80,00%	80,00%	80,00%	80,60%	80,00%	80,00%	79,70%	95,90%	96,20%
	GI-14_ACo-IBV/Belgium/B1648/1984_(X87238)	81,20%	80,90%	80,90%	81,50%	81,50%	81,50%	80,90%	80,60%	84,60%	86,10%
	GI-15_ACo-IBV/Korea/B4/1986_(FJ807932)	75,00%	75,30%	75,30%	75,90%	75,30%	75,90%	74,40%	74,20%	74,70%	75,00%
	GI-16_ACo-IBV/Italy/ IZO 28/86/1986_(KJ941019)	82,60%	82,90%	82,90%	82,90%	82,90%	82,90%	81,20%	80,90%	78,60%	79,40%
	GI-17_ACo-IBV/USA/CA/Machado/88/1988_(AF419315)	76,70%	77,00%	77,00%	76,50%	77,00%	76,50%	77,90%	77,60%	75,00%	76,20%
	GI-18_ACo-IBV/Japan/JP8127/1993_(AY296744)	80,50%	80,80%	80,80%	80,80%	80,80%	80,80%	78,70%	78,50%	77,60%	78,70%
	GI-19_ACo-IBV/China/58HeN-93II/1993_(KC577395)	82,60%	82,30%	82,30%	82,30%	82,90%	82,30%	94,20%	93,90%	82,30%	83,20%
	GI-20_ACo-IBV/Canada/Qu_mv/1996_(AF349621)	78,00%	78,30%	78,30%	78,30%	78,30%	78,30%	77,70%	77,40%	77,40%	78,00%
	GI-21_ACo-IBV/Spain/Spain/97/314/1997_(DQ064806)	79,70%	79,40%	79,40%	79,40%	80,00%	79,40%	82,00%	81,70%	87,80%	88,70%

		D274 cluster						QX cluster		4/91 cluster	
		ACo-IBV/Serbia/NoviSad/812/6/2/2016-2017 (MH010334)	ACo-IBV/Serbia/NoviSad/806/3/8/2016-2017 (MH010330)	ACo-IBV/Serbia/NoviSad/806/3/9/2016-2017 (MH010331)	ACo-IBV/Serbia/NoviSad/812/3/6/2016-2017 (MH010332)	ACo-IBV/Serbia/NoviSad/812/6/9/2016-2017 (MH010335)	ACo-IBV/Serbia/NoviSad/812/6/10/2016-2017 (MH010336)	ACo-IBV/Serbia/NoviSad/D5/16/M/2016-2017 (MH010337)	ACo-IBV/Serbia/NoviSad/D6/16/M/2016-2017 (MH010338)	ACo-IBV/Serbia/NoviSad/812/3/9/2016-2017 (MH010333)	ACo-IBV/Serbia/NoviSad/N30/50/2016-2017 (MH010339)
	Maksimalna identičnost nukleotidnih sekvenci/procent										
	GI-22_ACo-IBV/China/40GDGZ-971/1997_(KC577382)	79,10%	79,40%	79,40%	79,40%	79,40%	79,40%	79,70%	79,40%	81,70%	82,00%
	GI-23_ACo-IBV/Israel/Variant 2/1998_(AF093796)	83,80%	84,10%	84,10%	84,10%	84,10%	84,10%	80,90%	80,60%	82,00%	82,30%
	GI-24_ACo-IBV/India/V13/1998_(KF757447)	82,30%	82,60%	82,60%	82,60%	82,60%	82,60%	77,40%	77,10%	76,80%	78,00%
	GI-25_ACo-IBV/USA/CA/1737/04/2004_(EU925393)	80,30%	80,60%	80,60%	80,60%	80,60%	80,60%	80,30%	80,00%	78,90%	79,70%
	GI-26_ACo-IBV/Nigeria/NGA/B401/2006/2006_(FN182243)	77,40%	77,10%	77,10%	77,40%	77,70%	77,40%	80,30%	80,00%	78,90%	79,70%
	GI-27_ACo-IBV/USA/GA08/2008_(GU301925)	76,70%	76,50%	76,50%	76,50%	77,00%	76,50%	77,90%	77,60%	76,70%	76,50%
	GII-1_ACo-IBV/The Netherlands/D1466/1979_(M21971)	58,30%	58,60%	58,60%	58,60%	58,00%	58,60%	58,60%	58,30%	60,60%	61,20%
	GIII-1_ACo-IBV/Australia/N1/88/1988_(U29450)	59,70%	60,00%	60,00%	60,30%	60,00%	60,30%	58,90%	58,60%	59,20%	59,20%
	GIV-1_ACo-IBV/USA/DE/072/92/1992_(U77298)	52,20%	52,50%	52,50%	53,00%	52,50%	53,00%	52,20%	51,90%	55,00%	54,40%
	GV-1_ACo-IBV/Australia/N4/02/2002_(DQ059618)	66,10%	65,90%	65,90%	65,90%	66,40%	65,90%	65,60%	65,30%	64,70%	65,90%
	GVI-1_ACo-IBV/China/TC07-2/2007_(GQ26594)	59,20%	59,20%	59,20%	59,70%	59,40%	59,70%	59,70%	59,40%	58,90%	59,40%

		D274 cluster						QX cluster		4/91 cluster	
Broj različitih nt između sekvenci		A Co-IBV/Serbia/NoviSad/812/6/2/2016-2017 (MH010334)	A Co-IBV/Serbia/NoviSad/806/3/8/2016-2017 (MH010330)	A Co-IBV/Serbia/NoviSad/806/3/9/2016-2017 (MH010331)	A Co-IBV/Serbia/NoviSad/812/3/6/2016-2017 (MH010332)	A Co-IBV/Serbia/NoviSad/812/6/9/2016-2017 (MH010335)	A Co-IBV/Serbia/NoviSad/812/6/10/2016-2017 (MH010336)	A Co-IBV/Serbia/NoviSad/D5/16/M/2016-2017 (MH010337)	A Co-IBV/Serbia/NoviSad/D6/16/M/2016-2017 (MH010338)	A Co-IBV/Serbia/NoviSad/812/3/9/2016-2017 (MH010333)	A Co-IBV/Serbia/NoviSad/N30/50/2016-2017 (MH010339)
IZOLATI IZ SRBIJE	A Co-IBV/Serbia/NoviSad/812/6/2/2016-2017 (MH010334)		1	1	3	1	3	67	68	64	61
	A Co-IBV/Serbia/NoviSad/806/3/8/2016-2017 (MH010330)	1		0	2	2	2	68	69	65	62
	A Co-IBV/Serbia/NoviSad/806/3/9/2016-2017 (MH010331)	1	0		2	2	2	68	69	65	62
	A Co-IBV/Serbia/NoviSad/812/3/6/2016-2017 (MH010332)	3	2	2		4	0	68	69	65	62
	A Co-IBV/Serbia/NoviSad/812/6/9/2016-2017 (MH010335)	1	2	2	4		4	66	67	63	60
	A Co-IBV/Serbia/NoviSad/812/6/10/2016-2017 (MH010336)	3	2	2	0	4		68	69	65	62
	A Co-IBV/Serbia/NoviSad/D5/16/M/2016-2017 (MH010337)	67	68	68	68	66	68		1	66	63
	A Co-IBV/Serbia/NoviSad/D6/16/M/2016-2017 (MH010338)	68	69	69	69	67	69	1		67	64
	A Co-IBV/Serbia/NoviSad/812/3/9/2016-2017 (MH010333)	64	65	65	65	63	65	66	67		5
	A Co-IBV/Serbia/NoviSad/N30/50/2016-2017 (MH010339)	61	62	62	62	60	62	63	64	5	
GENOTIPOVA KOMERCIJALNI VAKCINALNI SOJEVI	A Co-IBV_strain D207_IBAPEPB (M21969_J04329)	5	6	6	8	6	8	67	68	64	61
	A Co-IBV_strain D274_(X15832)	0	1	1	3	1	3	67	68	64	61
	A Co-IBV_strain QXIBV_(KC795604)	66	67	67	67	65	67	3	4	66	63
	A Co-IBV_isolate L-1148_(DQ431199)	66	67	67	67	65	67	3	4	66	63
	A Co-IBV_vaccine strain 4/91_(KF377577)	62	63	63	63	61	63	64	65	4	1
	A Co-IBV_vaccine_strain H120/The Netherlands/1960_(FJ888351)	58	57	57	57	57	57	73	74	84	80
	A Co-IBV_vaccine_strain M41_(DQ834384)	59	58	58	58	58	58	72	73	81	77
	A Co-IBV_commercial vaccine strain MA5/Brazil/2013_(KU736747)	57	56	56	56	56	56	72	73	83	79
	A Co-IBV_commercial vaccine_strain MA5_(KU736747)	57	56	56	56	56	56	72	73	83	79
	A Co-IBV_strain Ark52930_(FJ899688)	76	75	75	75	75	75	69	70	78	74
A Co-IBV_isolate It/497/02_(DQ901377)	71	72	72	72	70	72	65	66	43	42	
GENOTIPOVA	GI-1_A Co-IBV/ USA/Beaudette/1937_(M95169)	59	58	58	58	58	58	75	76	84	80
	GI-2_A Co-IBV/ USA/Holte/1954_(GU393336)	80	81	81	79	79	79	81	82	87	85
	GI-3_A Co-IBV/ USA/Gray/1960_(L14069)	73	74	74	74	72	74	69	70	70	67
	GI-4_A Co-IBV/ USA/Holte/1962_(L18988)	75	74	74	74	74	74	69	70	74	71
	GI-5_A Co-IBV/ Australia/N1/62/1962_(U29522)	63	62	62	62	62	62	68	69	69	67

	D274 cluster						QX cluster	4/91 cluster		
	A Co-IBV/Serbia/NoviSad/812/6/2/2016-2017 (MH010334)	A Co-IBV/Serbia/NoviSad/806/3/8/2016-2017 (MH010330)	A Co-IBV/Serbia/NoviSad/806/3/9/2016-2017 (MH010331)	A Co-IBV/Serbia/NoviSad/812/3/6/2016-2017 (MH010332)	A Co-IBV/Serbia/NoviSad/812/6/9/2016-2017 (MH010335)	A Co-IBV/Serbia/NoviSad/812/6/10/2016-2017 (MH010336)	A Co-IBV/Serbia/NoviSad/ID5/16/M/2016-2017 (MH010337)	A Co-IBV/Serbia/NoviSad/ID6/16/M/2016-2017 (MH010338)	A Co-IBV/Serbia/NoviSad/812/3/9/2016-2017 (MH010333)	A Co-IBV/Serbia/NoviSad/N30/50/2016-2017 (MH010339)
Broj različitih nt između sekvenci										
GI-6_ACo-IBV/Australia/VicS/1962_(U29519)	65	64	64	63	64	63	77	78	73	71
GI-7_ACo-IBV/Taiwan/TP/64/1964_(AY606320)	76	77	77	77	75	77	71	72	81	79
GI-8_ACo-IBV/USA/L165/1965_(JQ964061)	72	71	71	71	71	71	71	72	72	70
GI-9_ACo-IBV/USA/ARK99/1973_(M99482)	76	75	75	75	75	75	69	70	80	76
GI-10_ACo-IBV/New Zealand/B/1970s_(AF151954)	66	65	65	65	65	65	70	71	67	66
GI-11_ACo-IBV/Brazil/UFGM/G/1975_(JX182775)	70	69	69	68	69	68	65	66	70	67
GI-12_ACo-IBV/The Netherlands/D3896/1978_(X52084)	9	8	8	8	8	8	66	67	64	62
GI-13_ACo-IBV/Morocco/Moroccan-G/83/1983_(EU914938)	68	69	69	69	67	69	69	70	14	13
GI-14_ACo-IBV/Belgium/B1648/1984_(X87238)	65	66	66	64	64	64	66	67	53	48
GI-15_ACo-IBV/Korea/B4/1986_(FJ807932)	87	86	86	84	86	84	89	90	88	87
GI-16_ACo-IBV/Italy/ IZO 28/86/1986_(KJ941019)	60	59	59	59	59	59	65	66	74	71
GI-17_ACo-IBV/USA/CA/Machado/88/1988_(AF419315)	81	80	80	82	80	82	77	78	87	83
GI-18_ACo-IBV/Japan/JP8127/1993_(AY296744)	68	67	67	67	67	67	74	75	78	74
GI-19_ACo-IBV/China/58HeN-93II/1993_(KC577395)	60	61	61	61	59	61	20	21	61	58
GI-20_ACo-IBV/Canada/Qu_mv/1996_(AF349621)	76	75	75	75	75	75	77	78	78	76
GI-21_ACo-IBV/Spain/Spain/97/314/1997_(DQ064806)	70	71	71	71	69	71	62	63	42	39
GI-22_ACo-IBV/China/40GDGZ-97L/1997_(KC577382)	72	71	71	71	71	71	70	71	63	62
GI-23_ACo-IBV/Israel/Variant 2/1998_(AF093796)	56	55	55	55	55	55	66	67	62	61
GI-24_ACo-IBV/India/V13/1998_(KF757447)	61	60	60	60	60	60	78	79	80	76
GI-25_ACo-IBV/USA/CA/1737/04/2004_(EU925393)	68	67	67	67	67	67	68	69	73	70
GI-26_ACo-IBV/Nigeria/NGA/B401/2006/2006_(FN182243)	78	79	79	78	77	78	68	69	73	70
GI-27_ACo-IBV/USA/GA08/2008_(GU301925)	82	82	81	82	80	82	77	78	82	81
GII-1_ACo-IBV/The Netherlands/D1466/1979_(M21971)	143	143	144	143	145	143	143	144	134	136
GIII-1_ACo-IBV/Australia/	143	143	144	142	143	142	147	148	146	146

	D274 cluster						QX cluster	4/91 cluster		
Broj različitih nt između sekvenci	A Co-IBV/Serbia/NoviSad/812/6/2/2016-2017 (MH010334)	A Co-IBV/Serbia/NoviSad/806/3/8/2016-2017 (MH010330)	A Co-IBV/Serbia/NoviSad/806/3/9/2016-2017 (MH010331)	A Co-IBV/Serbia/NoviSad/812/3/6/2016-2017 (MH010332)	A Co-IBV/Serbia/NoviSad/812/6/9/2016-2017 (MH010335)	A Co-IBV/Serbia/NoviSad/812/6/10/2016-2017 (MH010336)	A Co-IBV/Serbia/NoviSad/ID5/16/M/2016-2017 (MH010337)	A Co-IBV/Serbia/NoviSad/ID6/16/M/2016-2017 (MH010338)	A Co-IBV/Serbia/NoviSad/812/3/9/2016-2017 (MH010333)	A Co-IBV/Serbia/NoviSad/N30/50/2016-2017 (MH010339)
N1/88/1988_(U29450)										
GIV-1_ACo-IBV/USA/DE/072/92/1992_(U77298)	170	170	171	168	170	168	171	172	163	161
GV-1_ACo-IBV/Australia/N4/02/2002_(DQ059618)	120	120	119	120	118	120	121	122	120	124
GVI-1_ACo-IBV/China/TC07-2/2007_(GQ26594)	146	146	146	144	145	144	144	145	145	147

6. DISKUSIJA

Infektivni bronhitis je oboljenje koje se javlja kod svih proizvodnih i starosnih kategorija živine. Klinički simptomi neretko izostanu ili su veoma blagi ali nisu retki slučajevi kad bolest može dovesti do velikog uginuća pa je i ekonomski značaj bolesti izuzetno veliki. U većini država u našem okruženju izvršeno je sekvencioniranje genoma virusa IB-a i na osnovu genetske tipizacije određen je virus koji će se koristiti tokom vakcinacije. Zbog nedostataka podataka u Republici Srbiji kao i vakcinaciji na osnovu pretpostavki a ne činjeničnog stanja, dešava se pojava oboljenja nakon redovne vakcinacije i programa zaštite.

Najčešći izvor novih serotipova virusa je odrasla živina. Kod mladih pilića, infektivni bronhitis uzrokuje respiratorne simptome bolesti dok su kod brojlera uočeni smanjena konverzija hrane, prirast kao i zapaljenje vazdušnih kesica, perikarditis i perihepatitis. Sekundarne bakterijske infekcije često mogu da komplikuju bolest. Pojedini sojevi virusa infektivnog bronhitisa izazivaju nefropatogene promene uz mortalitet do 25% u jatu, a mogu izazivati i akutni nefritis i urolitijazu. Ova pojava uočena je i sa vakcinalnim i prirodnim sojevima virusa infektivnog bronhitisa (Alexander and Gough, 1977).

U Sjedinjenim Američkim Državama, pored masačusets (Mass), identifikovano je nekoliko serotipa IBV (Johnson and Marquardt, 1975; Fabricant, 2000; Mondal and Naqi, 2001, Cavanagh and Gelb, 2008). Sojevi Mass tipa su izolovani u Evropi i Aziji od 1940. godine do danas. Na desetine drugih serotipova je izolovano u Africi, Aziji, Indiji, Australiji, Evropi i Južnoj Americi (Chen et al., 1997; Cavanagh, 2001; Cavanagh, 2003; Cavanagh, 2005; Cavanagh and Gelb, 2008). Bolest je opisana i kod vakcinisanih jedinki gde su izolovani sojevi bili antigenski različiti od vakcinalnog soja ali to nije uvek bio slučaj (Cavanagh and Gelb, 2008). Izuzetno je važno napomenuti da nekoliko genotipova virusa IB može cirkulisati na određenom geografskom području gde su serološke unakrsne reakcije česte sa više ili manje unakrsne zaštite.

Tokom proteklih decenija, mnoge nove varijante virusa su opisane, ali dva varijeteta: italijanski IT02 i QX se ponašaju nešto drugačije od tradicionalnog. Vrlo brzo se ustanovilo da je genotip IT02 bio široko rasprostranjen i često distribuiran u mnogim evropskim zemljama. QX serotip virusa IB je visoko patogen. Prvi put je prijavljen u Kini tokom dvadesetih godina 20. veka,

a potom se brzo proširio po Rusiji (Bochkov et al, 2006; Cook et al.,2012) a nakon toga i zapadnoj Evropi gde se virusi ovog genotipa detektuju od 2004. godine (Worthington et al., 2008). Od tada, QX tip virusa IB-a postao je dominantan terenski genotip u Nemačkoj i Holandiji tokom 2005-e, a u Francuskoj i Belgiji u 2006. godini. Rezultati prikazani u ovoj studiji takođe ukazuju na prisustvo kineskog soja QX i na našim prostorima.

Primećeni su višestruki serotipovi virusa IB-a i antigenske varijacije unutar opisanih tipova što povećava složenost izbora odgovarajuće serološke metode i analizu rezultata ispitivanja.

Svi serotipovi virusa IB-a izgleda da imaju zajedničke epitope (grupno specifični antigeni), što nije iznenađujuće sa obzirom na umereno visoki aminokiselinski identitet sekvenci unutar N i M proteina i S2 deo spajk proteina. IBV takođe indukuje tip – specifična antitela, naravno, određena epitopom S1 proteina.

Sekvenca celog genoma ustanovljena je za nekoliko izolata, a poznata je i sekvenca gena koji kodiraju za strukturne proteine za veoma veliki broj sojeva. Gen koji je najčešće sekvencioniran je onaj koji kodira S1 podjedinicu S (spike) glikoproteina, zato što S1 protein određuje serotip i najvažnije, glavni je induktor stvaranja zaštitnog imuniteta. Šta više, za veliku varijaciju sekvence uočenu kod S1 proteina (Wang et al, 1994) se veruje da je u velikoj meri odgovorna za pojavu sojeva onog serotipa koji su u stanju da se repliciraju i uzrokuju bolest, uprkos imunom odgovoru indukovanom od drugih serotipova. Veliki broj genske sekvence podjedinica S1 proteina su publikovane i deponovane u bankama podataka nukleotidnih sekvenci dok su i genske sekvence nekih dodatnih izolata publikovani samo u bankama podataka.

Postoji nekoliko široko rasprostranjenih genotipova virusa IB-a (de Wit i sar., 2011; Valastro et al., 2016). Divlji sojevi razlikuju se fenotipski od onih u vakcinama (McKinley et al., 2008; van Santen and Toro 2008; Gallardo et al., 2010). Serotipovi pokazuju varijacije u približno 20-25% u S1 proteinskoj sekvenci. Ipak postoje i dokazi da ponekad varijacije mogu biti i više, čak i 50%, što utiče na unakrsnu zaštitu prema vakcinalnim sojevima virusa (Cavanagh et al., 1992).

Kao i kod većine RNK virusa promene u genomu virusa IB-a, dovode do stvaranja generacija nekoliko virusnih genotipova, koji imaju promenjen tropizam prema tkivima i drugačije ishode infekcije (Jia et al., 1995; Lim et al., 2011; Jackwood et al., 2012).

Iako nije u potpunosti jasno kako koronavirusi, naročito virus IB-a, evoluiraju. pretpostavlja se da su za to odgovorni jedan ili više sledećih faktora.

Prvi je mutacija usled umetanja nukleotida, delicija nukleotida, ili tačkaste mutacije kao posledica aktivnosti polimeraza.

Drugi je genomska rekombinacija između vakcinalnih sojeva i divljih sojeva, što dovodi do višestrukih preklapanja što je zabeleženo kod jako virulentnih CK / CH / 2010 / JT-1 IBV izolata koji potiču od rekombinacije QX, CK / CH / LSC / 99I-, t1 / CH / LDT3 / 03- i 4 / 91 tipa IBV (Kusters et al., 1990; Rowe et al., 1998; Nix et al., 2000; Zhou et al., 2017).

Analiza genoma virusa IB-a pokazala je da regije koje kodiraju nestrukturane proteine 2, 3 i 16, i S1 protein imaju najviši stepen raznolikosti (Thor et al., 2011).

Prema tropizmu ka određenim tkivima postoje tri tipa virusa IB-a, respiratorni, nefropatogeni i gastrointestinalni. Većina klasičnih virusa IB-a kao što je serotip massachusetts (Mass), ima tropizam ka respiratornim putevima. Nefropatogeni serotipovi koji se javljaju uglavnom u Aziji i zemljama Bliskog istoka, dovode do oštećenja bubrega. Skorašnja istraživanja dokazala su da marokanski soj IBV-G ima tropizam ka gastrointerstinalnom traktu, dok QX IBV serotip izlovan prvo u Kini iz proventrikulusa (Yudong et al., 1998), sada je prisutan i u drugim delovima Azije, Evrope, Srednjeg istoka i Afrike. Kod njega je zapažen i tropizam ka tkivu bubrega ali i reproduktivnog trakta, a dovodi do visoke smrtnosti (Beato et al., 2005; Irvine et al., 2010; de Wit et al., 2011b; Amin et al., 2012; Ganapathy et al., 2012; Naguib et al., 2016).

Pojedini genotipovi i serotipovi virusa IB-a su usko međusobno povezani i sa druge strane su karakteristični za određene geografske regione. Ono što je sigurno da virus IB-a u svakoj od regija treba biti opisan, kako bi se stekla slika o prevladajućem genotipu, kako bi se povećala efikasnost vakcina, ali i opisali novi sojevi virusa IB-a bitni za kontrolu i prevenciju izbijanja oboljenja.

Od nedavno filogenetska klasifikacija virusa IB-a na temelju S1 proteina identifikovala je šest različitih genotipova iz 32 loze, kao i nekoliko ne klasifikovanih. Zanimljivo je da se raznovrsnost i distribucija genotipova virusa IB-a razlikuje u zavisnosti od geografskog područja pa čak i od zemlje do zemlje (de Wit et al., 2011; Valastro et al., 2016).

Različite varijante virusa IB-a registrovane su u Evropi početkom 1970-ih (Dawson and Gough, 1971). Nakon toga u Holandiji izolovana su četiri serotipa označena kao: D207 (takođe poznat kao D274), D212 (takođe poznat kao D1466), D3896 i D3128, od vakcinisanih jata klasičnim vakcinalnim sojevima (Davelaar et al., 1984). Neki od globalno rasprostranjenih serotipova virusa IB su IBV 4/91 (793B ili CR88), D274 (D207, D212 ili D1466, D3896) i D3128, QX i Italy02. Neki serotipovi, kao na primer, 4/91 (CR88) u Velikoj Britaniji i H52 i H120 sojevi u Holandiji prouzrokuju bolesti na lokalnom ili regionalnom nivou, ali sa potencijalom za širenje i na druge predele (de Wit et al., 2011; Jackwood, 2012.). Iz tog razloga, vakcine bazirane na QX- slični

serotipovi i anti-IBV varijantama se razvijaju kako bi sprečile i kontrolisale njihovo širenje (Jones et al., 2005; Sasipreeyajan et al., 2012; Kim et al., 2013).

Ostali evropski serotipovi „Mass“ genotipa bili su takođe identifikovani u Velikoj Britaniji (Gough et al., 1992), Francuskoj (Auvigne et al., 2013), Belgiji (Meulemans et al., 2001), Italiji (Capua et al., 1994; Zanella et al., 2003), Poljskoj (Domanski-Blicharz et al., 2007), i Španiji (Dolz et al., 2006, 2008).

Evropski serotipovi 793 / B (poznat još i kao 4/91 i CR88) i D274 pokazali su veliku sposobnost širenja i van evropskog kontinenta. (Gough et al., 1992; Abro et al., 2012). Studija koja je odredila tipove virusa IB-a u Zapadnoj Evropi pokazala je da je dominantan 793B serotip, nakon čega slede „Mass“ serotipovi, H120, M41, IBM, Italy02, i jedan usko povezan s kineskim QX serotipom (Worthington et al., 2008).

Važno je napomenuti da QX IBV, koji je po prvi izolovan u Evropi 2004. godine, od nedavno je jedna od najizazovnijih serotipova virusa IB-a. Iako je u Kini ovaj soj bio u početku poznat po tome što je dovodio do kliničkih simptoma proventrikulitisa (Yudong et al., 1998), u Evropi je pokazao promenjen tropizam prema tkivu bubrega i jajovoda (Monne et al., 2008). Zabeležena je pojava QX IBV serotipova u Škotskoj (Worthington et al., 2008), Italiji (Beato et al., 2005), Holandiji, Poljskoj (Domańska-Blicharz et al., 2007), Sloveniji (Krapez et al., 2011), Španij, Velikoj Britaniji (Valastro et al., 2010; Ganapathy et al., 2012) i Švedskoj (Abro et al., 2012).

Slično kao QX, i D274-slični i 4/91-slični IBV serotipovi nedavno su prijavljeni i izolovani u Finskoj gde se vakcinacija protiv IBV-a ne praktikuje (Pohjola et al., 2014).

U Rusiji izolovani su prvenstveno „Mass“ serotipovi virusa IB-a, dok su neki izolati povezani sa D274, 4/91, B1648, 624 / I i IT-02 serotipovima evropskog porekla.

Dva QX-slična serotipa detektovana su i izolovana u graničnom području, jedan sa Evropom, drugi sa Kinom. Pored tih izolata, još 27 su jedinstveni za Rusiju, inače različiti po svojoj strukturi od poznatih IBV sojeva (Bochkov et al., 2006). Opsežna studija o IB-u u regionu koji je obuhvatio Rusiju, Ukrajinu i Kazahstan, između 2007 i 2010, pokazala je da se dinamika pojavljivanja i zastupljenosti serotipova virusa IB-a promenila. (Ovchinnikova et al., 2011).

Naše istraživanje je pokazalo da D274, QX i 4/91 virusi IB-a cirkulišu simultano u Srbiji. Dominantni genotip detektovan u okviru izvršenih ispitivanja bio je D274 koji je od utvrđen u 6 od 10 sojeva. Razlika u srodnosti nukleotida između izolata koji pripadaju grupi D274 kreću se od 0 do 1,2%. Upoređivanjem dobijenih izolata i D274 (X15832) može se videti da je soj MH010334 pokazao 100% sličnosti sa D274 (X15832) čime se može reci da se radi o reizolatu vakcinalnog

soja; izolati MH010330, MH010331 i MH010335 su imali 99.7% sličnih nukleotida i izolati MH010332 i MH010336 pokazali su 99.1% nukleotidne sličnosti. Navedeni nalaz ne treba da čudi obzirom da se soj virusa IB D274 široko koristi za vakcinaciju. Nedostatak živih vakcina je što se vakcinalni virusi lako šire na terenu (Meulemans et al., 2001; Farsang et al., 2002), što omogućava opstanak i cirkulaciju vakcinalnih virusa u jatima. Ovo je takođe podržano činjenicom da nije bilo kliničkih simptoma u jatima iz kojih je virus izolovan, ali je virus kružio. Na osnovu podataka prikazanih u tabeli 1, može se videti da jata iz kojih je virus izolovan nisu vakcinisana vakcinom D274. Ova vakcina se u velikoj meri koristi u Srbiji, i zajedno sa MA5 i 4/91 preporučuje se u kontroli IB-a kod nosilja. U prošlosti, D274 vakcina je korišćena na farmama sa kojih potiču izolovani sojevi, takođe i na farmama u blizini farmi odakle je izolovan D274 genotip. Takođe, soj D3896 (X52084) izolovan u Holandiji 1978 godine ima visoku sličnost sa našim sojevima u rasponu od 97.3-97.6% i soj D207 (M211969 J04329) u rasponu 97.6 do 98.5%. Najčešći genotip virusa IB-a u nekim zapadnoevropskim zemljama u ranim i srednjim osamdesetim je bio D274-sličan, i to je bio razlog za pokretanje vakcinacije (Cook, 1984; Develaar et al., 1984).

Dva QX izolata (MH010337 i MH010338) detektovana su u ovom istraživanju. Najveća nukleotidna sličnost detektovanih sojeva bila je sa QX IBV (KC795604) i L-1148 (DQ431199); za izolat MH010337 sličnost je bila 99.1% i 98.8% za izolat MH010338.

Poređenje naših izolata sa QX (KC577395) sojem MH010337 pokazalo je 94.2% sličnosti, i sa izolatom MH010338 93.9%. QX soj prvobitno je izolovan u Kini (Yu et al., 2001) i na početku nije cirkulisao izvan granica Kine, nakon čega je detektivan kod brojlera u Italiji 2011. godine (Toffan et al., 2011), potom Poljskoj (Domanska-Blicharz et al., 2007) i u Mađarskoj (Benyeda et al., 2009). U Evropi, ovi sojevi su opisani kao Evropski QX, te detektovani u Velikoj Britaniji (Irvine et al., 2010; Valastro et al., 2010; Ganapathy et al., 2012), Finskoj (Pahjola et al., 2014), Rusiji (Ovchinnikova et al., 2011), Sloveniji (Krapez et al., 2010), Španiji (Moreno et al., 2016) i Švedskoj (Abro et al., 2012).

Ovo je prva naučno utemeljena potvrda QX u Srbiji, tako da je veoma teško reći odakle dolazi, i pretpostavka je da je iz okolnih susednih zemalja, ali nije isključena ni mogućnost unošenja uvozom živine iz evropskih zemalja. QX virusi IB-a izolovani su iz jata gde je izvršena vakcinacija sa MA5 i 4/91 sojem. Terregino et al. (2008) utvrdili su da vakcine MA5 i 4/91, aplikovane prvi i četrnaesti dan, štite od infekcije i bolesti IB-a izazvane sojem virusa QX-sličan, što ovakav vakcinalni protokol čini veoma korisnim u smanjenju ekonomskih gubitaka uzrokovanim QX sojevima. Pošto je virus izolovan u ovom istraživanju, izolovan iz jata bez kliničkih simptoma, to

ukazuje na činjenicu da iako je virus bio prisutan, zbog adekvatne vakcinacije nije bilo kliničkih manifestacija.

Kako je prvi put opisan početkom devedesetih u Velikoj Britaniji (Gough et al., 1992), 4/91 genotip virusa IB-a se proširio u mnoge druge zemlje i postao jedan od najdominantnijih u Evropi (Gough et al., 1992; Cook et al., 1996; Capua et al., 1999; Meulemans et al., 2001; Cavanagh et al., 2005).

Istraživanje je pokazalo da je 4/91 takođe prisutan u Srbiji i da cirkuliše unutar jata. Teško je reći koliko je dugo prisutan jer je ovo verovatno jedina studija u zemlji koja se bavi genotipizacijom virusa IB-a. Vakcina 4/91 je korišćena u oba jata iz kojih je virus izolovan (Tabela 1). Naš izolat MH010339 pokazao je 99.7% sličnosti, dok je izolat MH010333 pokazao 98.8% sličnosti sa vakcinalnim sojem 4/91 (KF377577). Diferencijacija vakcinalnog soja od divljeg soja je teška i moguća nukleotidnim sekvencioniranjem S1 gena gde je veoma bitan procenat nukleotidne sličnosti. Worthington i saradnici (2008) kategorisali su sojeve koji su slični vakcinalnim, a koji imaju manje od 99% sličnosti na S1 subjednici, kao terenske sojeve. U našem istraživanju, gde je izolat MH010339 pokazao 99% sličnosti sa vakcinalnim sojem, ukazuje na to da se radi o vakcinalnom virus. Soj MH010333 se razlikovao za 1.2% što ukazuje da može biti i terenski soj, naročito imajući u vidu činjenicu da se takvi virusi vremenom mogu pojaviti usled antigenskog "drifta", i to usled kontinuirane upotrebe sojeva homolognih vakcina (Farsang et al., 2002; Caron 2010). Takođe je postojala velika sličnost naših izolata sa Marokan-G (EU914938), 95,9% za izolat MH010333 i 96,2% za izolat MH010339.

Naše istraživanje je pokazalo da su virusi iz D274, QX I 4/91 genotipova cirkulisali u jatima živine u Srbiji tokom 2016. i 2017.godine, i ovo je jedno od prvih genotipizacija virusa IB-a na ovom prostoru. S obzirom na to da izolovani sojevi potiču od jata bez kliničkih simptoma, može se reći da vakcinacija uz upotrebu MA5, 4/91 I D274 sojeva pruža dobru trenutnu zaštitu, zato što štiti jato od IB-a, a samim tim prevenira ekonomske gubitke. Svakako u budućnosti treba pratiti situaciju sa eventualnom pojavom novih genotipovima u Srbiji, kao i sprovesti istraživanja koja uključuju veći broj farmi kao i šire područje.

7. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata ispitivanja izvršenih u okviru ove disertacije mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. U uzorcima trahealnih briseva poreklom od vakcinisanih jata živine, dokazano je prisustvo virusa infektivnog bronhitisa.
2. Ustanovljeno je prisustvo ukupno tri različita genotipa virusa IB-a: D274, QX i 4/91 koji su cirkulisali u ispitivanim jatima živine tokom 2016. i 2017. godine.
3. Filogenetske analize sekvencioniranog dela genoma virusa ukazuju da genom virusa infektivnog bronhitisa je pod stalnom evolucijom. Ovaj podatak je koristan za buduća istraživanja kao i za bolje razumevanje infektivne biologije samog virusa IB-a. Nadalje, može biti koristan za razvoj novih dijagnostičkih analiza kao i vakcina.
4. Zapažanja u pogledu konstrukcije genoma i evolutivnim aspektima sojeva virusa infektivnog bronhitisa, kao i razvoj novih načina detekcije, pružaju informacije i nove mogućnosti za borbu protiv virusa IB-a, virusne bolesti od globalnog značaja.
5. Izolati detektovani u ovom istraživanju potiču iz jata živine bez kliničkih simptoma što ukazuje na to da vakcinacija koja se koristi u Srbiji, a uključuje MA5, 4/91 i D274 vakcine predstavlja dobru zaštitu jer u adekvatnoj meri štiti jata živine od kliničke manifestacije (pojave oboljenja) IB-a samim tim i od značajnijih ekonomskih gubitaka.
6. Ovo istraživanje biće korisno za dijagnostiku, epidemiologiju, monitoring bolesti kao i usvajanje efektivnih mera kontrole.
7. Detaljna epizotiolška istraživanja na području čitave države su neophodna kako bi se izvršio monitoring efikasnosti aktuelnih vakcinalnih protokola na terenu. Time bi se takođe imao uvid u prevalencu i širenje sojeva virusa IB-a što bi bilo od značaja za farmere, proizvođače vakcina, dijagnostičke laboratorije i naučnike koji se bave izučavanjem virusa

infektivnog bronhitisa. Takođe, dalja istraživanja trebala bi da se bave detekcijom novih genotipova IBV u Srbiji i da uključuju veći broj farmi kao i šire geografsko područje.

8. LITERATURA

1. Abdel-Moneim, A.S., 2017. Coronaviridae: Infectious bronchitis virus, In: Emerging and re-emerging infectious diseases of livestock, ed. Springer link, pp. 133-166.
2. Abdel-Moneim, A.S., Afifi, M.A., El-Kady, M.F., 2012. Emergence of a novel genotype of avian infectious bronchitis virus in Egypt. *Archives of Virology* 157, 2453-2457.
3. Abdel-Monein, A.S., El-Kady, M.F., Ladman, B.S., Gelb, J., 2006. S1 gene sequence analysis of a nephropathogenic strain of avian infectious bronchitis virus in Egypt. *Virology journal* 3, 78.
4. Abro, S.H., Renstrom, L.H.M., Ullman, K., Isaksson, M., Zohari, Z., 2012. Emergence of novel strains of avian infectious bronchitis virus in Sweden. *Veterinary Microbiology* 155, 237-246.
5. Acevedo, A.M., Martínez, N., Brandão, P., Perera, C.L., Frías, M.T., Barrera, M., Pérez, L.J., 2013. Phylogenetic and molecular characterization of coronavirus affecting species of bovine and birds in Cuba. *Bioteconología Aplicada* 30, 228-231.
6. Adzhar, A., Shaw, K., Britton, P., Cavanagh, D., 1996. Universal oligonucleotides for the detection of infectious bronchitis virus by the polymerase chain reaction. *Avian Pathology* 25, 817-836.
7. Alexander, D.J., Gough, R.E., 1977. Isolation of avian infectious bronchitis virus from experimentally infected chickens. *Research in Veterinary Science* 23, 344-347.
8. Alvarado, I.R., Villegas, P., El-Attrache, J., Jackwood, M.W., 2006. Detection of Massachusetts and Arkansas serotypes of infectious bronchitis virus in broilers. *Avian Disease* 50, 292-297.
9. Ambali, A.G., Jones, R. C., 1987. Re-excretion of an enterotropic infectious bronchitis virus by hens at point of lay after experimental infection at day old. *Veterinary Record* 120, 617-620.

10. Andrade, L. F., Villegas, P., Fletcher, O.J., 1983. Vaccination of day-old broilers against infectious bronchitis: Effect of vaccine strain and route of administration. *Avian Disease* 27, 178–187.
11. Ariaans, M.P., Matthijs, M.G., van Haarlem, D., van de Haar, P., van Eck, J.H., Hensen, E.J., Vervelde, L., 2008. The role of phagocytic cells in enhanced susceptibility of broilers to colibacillosis after Infectious Bronchitis Virus infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 123, 240–250.
12. Arshad, S.S., 2006. Infectious bronchitis. In: Zamri-Saad M., *Diseases of Poultry in South East Asia*. Serdang, Malaysia, ed. Universiti Putra Malaysia Press, pp. 199–206.
13. Auvigne, V., Gibaud, S., Leger, L., Mahler, X., Currie, R., Riggi, A., 2013. A longitudinal study of the incidence of Avian Infectious Bronchitis in France using strain-specific haemagglutination inhibition tests and cluster analysis. *Revue de Medecine Veterinaire* 164, 417-424.
14. Awad, F., Baylis, M., Ganapathy, K., 2014. Detection of variant infectious bronchitis viruses in broiler flocks in Libya. *International Journal of Veterinary Science and Medicine* 2, 78-82.
15. Awad F., Ganapathy, K., 2014. An overview of infectious bronchitis virus in chickens. *Worlds Poultry Science Journal* 70, 375-384.
16. Bande, F., Arshad, S.S., Bejo, M.H., Omar, A.R., 2015. Progress and challenges toward the development of vaccines against avian bronchitis. *Journal of Immunology research*. Artic.id: 424860.
17. Bande, F., Arshad, S.S., Omar, A.R., Bejo, M.H., 2017. Global distributions and strain diversity of avian infectious bronchitis virus: a review. *Animal health research reviews* 18, 70-83.
18. Beach, J.R., Schalm, O.W., 1936. A filtrable virus distinct from that of laringotracheitis: the cause of a respiratory disease in chicks. *Poultry Science* 15, 199-206.
19. Beaudette, F.R., Hudson, C.B., 1937. Cultivation of the virus of infectious bronchitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 90, 51-60.
20. Beard, C.W., 1967. Infectious bronchitis virus interference with Newcastle disease virus in monolayers of chicken kidney cells. *Avian Disease* 11, 399-406.
21. Benyeda, Z., Mato, T., Suveges, T., Szabo, E., Kardi, V., Abonyi-Toth, Z., Rusvai, M., Oalya, V., 2009. Comparison of the pathogenicity of QX-like, M41 and 793/B infectious bronchitis strains from different pathological conditions. *Avian Pathology* 38, 449-456.

22. Bijlenga, G., Cook, J.K.A., 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 Pathology* 33, 550–557.
23. Boltz, D.A., Nakai, M., Bahra, J.M., 2004. Avian infectious bronchitis virus: a possible cause of reduced fertility in the rooster. *Avian Disease* 48, 909–915.
24. Boroomand, Z., Asasi, K., Mohammadi, A., 2012. Pathogenesis and tissue distribution of avian infectious bronchitis virus isolate IRFIBV32 (793/B serotype) in experimentally infected broiler chickens. *The Scientific World Journal*. Artic.id. 402537.
25. Bournnell, M.E.G., Brown, T.D.K., Foulds, I.J., Green, P.F., Tomley, F.M., Binns, M.M., 1987. Completion of the sequence of the genome of the Coronavirus avian infectious bronchitis virus. *Journal of General Virology* 68, 57–77.
26. Box, P.G., Holmes, H.C., Finney, P.M., Froymann, R., 1988. Infectious bronchitis in laying hens: The relationship between hemagglutination inhibition antibody levels and resistance to experimental challenge. *Avian Pathology* 17, 349–361.
27. Bracewell, C.D., 1975. Antigenic relationships between strains of infectious bronchitis virus as shown by the plaque reduction test in chicken kidney cell culture. *Proceedings of the fifth international congress of the World Veterinary Poultry Association*, 803-818.
28. Brown, T.P., Glisson, J. R., Rosales, G., Villegas, P., Davis, R.B., 1987. Studies of avian urolithiasis associated with an infectious bronchitis virus. *Avian Disease* 31, 629–636.
29. Bushnell, L.D., Brandly, C.A., 1933. Laryngotracheitis in chicks. *Poultry Science* 12, 55-60.
30. Butcher, G., Shapiro, D., 2005. Infectious bronchitis virus: Range of viral strains makes control complicated. *Poultry international*
31. Capua, I., Gough, R.E., Mancini, M., Casaccia, C., Weiss, C., 1994. A novel infectious-bronchitis strain infecting broiler-chickens in Italy. *Journal of Veterinary Medicine* 41, 83-89.
32. Capua, I., Minta, Z., Karpinska, E., Mawditt, K., Britton, P., Cavanagh, P.D., Gough, R.E., 1999. Cocirculation of four types of infectious bronchitis virus (793/B, 624/I, B1648 and Massachusetts). *Avian Pathology* 28, 587–592.
33. Casais, R., Dove, B., Cavanagh, D., Britton, P., 2003. Recombinant avian infectious bronchitis virus expressing a heterologous spike gene demonstrates that the spike protein is a determinant of cell tropism. *Journal of Virology* 77, 9084–9089.
34. Casais, R., Davies, M., Cavanagh, D., Britton, P., 2005. Gene 5 of the avian coronavirus infectious bronchitis virus is not essential for replication. *Journal of Virology* 79, 8065–8078.

35. Cavanagh, D., Brian, D.A., Enjuanes, L., Holmes, K.V., Lai, M.M.C., Laude, H., Siddell, S.G., Spaan, W., Taguchi, F., Talbot, P.J. 1990. Recommendations of the coronavirus study group for the nomenclature of the structural proteins, mRNAs, and genes of coronaviruses. *Virology* 176, 306-307.
36. Cavanagh, D., Davis, P.J., Cook, J.K.A., 1992. Infectious bronchitis virus, evidence for recombination within the Massachusetts serotype, *Avian pathology* 21, 401-408.
37. Cavanagh, D., Ellis, M.M., Cook, J.K.A., 1997. Relationship between variation in the S1 spike protein of infectious bronchitis virus and the extent of cross-protection. *Avian Pathology* 26, 63-74.
38. Cavanagh, D., 2001. A nomenclature for avian coronavirus isolates and the question of species status. *Avian Pathology* 30, 109-115.
39. Cavanagh, D., Mawditt, K., Welchman, D., Britton, P., Gough, R. E., 2002. Coronaviruses from pheasants (*Phasianus colchicus*) are genetically closely related to coronaviruses of domestic fowl (infectious bronchitis virus) and turkeys. *Avian Pathology* 31, 81-93.
40. Cavanagh, D., Nagi, S., 2003. Infectious bronchitis. In: *Diseases of poultry*, 11th edition. Edited by Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AM, McDougald LR, Swayne DE. Ed: Iowa State University Press, 101-119.
41. Cavanagh, D., 2003. Severe acute respiratory syndrome vaccine development: experiences of vaccination against avian infectious bronchitis coronavirus. *Avian pathology* 32, 567-582.
42. Cavanagh, D., 2005. Coronaviruses in poultry and other birds. *Avian Pathology* 34, 439-448.
43. Cavanagh, D., 2007. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. *Veterinary Research* 38, 281-297.
44. Cavanagh, D., Gelb J., 2008. Infectious bronchitis. In: *Diseases of Poultry*, 12th edition. Y.M. Saif, Ed. Blackwell Publishing, Ames, Iowa. 117-135.
45. Chen, H.W., Huang, Y.P., Wang, C.H., 2009. Identification of Taiwan and China-like recombinant avian infectious bronchitis viruses in Taiwan. *Virus research* 140, 121-129.
46. Chen, C.H., Shao, C.L., Peng, D.X., 1997. Isolation and identification of a kidney type strain of infectious bronchitis virus. *Chinese Journal of Veterinary Science Technology* 27, 22-23.
47. Cheng, A.C., 1998. Research on a new infectious disease of goslings. *Veterinary Science China* 28, 3-6.
48. Chew, P.H., Wakenell, P.S., Farver, T.B., 1997. Pathogenicity of attenuated infectious bronchitis virus for oviduct of chickens exposed *in ovo*. *Avian Disease* 41, 598-603.

49. Chousalkar, K.K., Cheetham, B.F., Roberts, J.R., 2009. LNA probe-based real time RT-PCR for the detection of infectious bronchitis virus from the oviduct of unvaccinated and vaccinated laying hens. *Journal of Virology Methods* 155, 67-71.
50. Chubb, R. C., 1974. The effect of the suppression of circulating antibody on resistance to the Australian avian infectious bronchitis virus. *Research in Veterinary Science* 17, 169–173.
51. Chubb, R. C., Huynh, V., Law, R., 1987. The detection of cytotoxic lymphocyte activity in chickens infected with infectious bronchitis virus or fowl pox virus. *Avian Pathology* 16, 395–405.
52. Chubb, R.C., Huynh, V., Bradley, R., 1988. The induction and control of delayed type hypersensitivity reactions induced in chickens by infectious bronchitis virus. *Avian Pathology* 17, 371–383.
53. Circella, E., Circella, E., Camarda, A., Martella, V., Bruni, G., Lavazza, A., Buonavoglia, C., 2007. Coronavirus associated and enteritic syndrome on a quail farm. *Avian Pathology* 36, 251-258.
54. Collisson, E.W., Li, J., Sneed, L.W., Peters, M.L., Wang, L., 1990. Detection of avian infectious bronchitis using situ hybridization and recombinant DNA. *Veterinary Microbiology* 24, 261-271.
55. Cong, F., Liu, X., Han, Z., Shao, Y., Kong, X., Liu, S., 2013. Transcriptome analysis of chicken kidney tissues following coronavirus avian infectious bronchitis virus infection. *BMC Genomics*. 14, 743.
56. Cook, J.K.A., 1968. Duration of experimental infectious bronchitis in chickens. *Research in Veterinary Science* 9, 506-514.
57. Cook, J.K.A., 1984. The classification of new serotypes of infectious bronchitis virus isolated from poultry flocks in Britain between 1981 and 1983. *Avian pathology* 13, 733-741.
58. Cook, J.K.A., Huggins, M.B., 1986. Newly isolated serotypes of infectious bronchitis virus-their role in disease. *Avian pathology* 15, 129-138.
59. Cook, J.K.A., Davidson, T.F., Huggins, M.B., McLaughlan, P.I., 1991. Effect of in ovo bursectomy on the course of an infectious bronchitis virus infection in line C White Leghorn chickens. *Archive Virology* 118, 225–234.
60. Cook, J.K.A., Smith, H.W., Huggins, M.B., 1986. Infectious bronchitis immunity: Its study in chickens experimentally infected with mixtures of infectious bronchitis virus and *Escherichia coli*. *Journal of General Virology* 67, 1427–1434.

61. Cook, J.K.A., Mockett, A.P.A., 1995. Epidemiology of infectious bronchitis virus, In: Siddell S.: *The Coronaviridae*. Ed. Springer USA. pp. 317-335.
62. Cook, J.K.A., Huggins, M.B., Orbell, S.J., Mawditt, K., Cavanagh, D., 2001. Infectious bronchitis virus vaccine interferes with the replication of avian pneumovirus vaccine in domestic fowl. *Avian Pathology* 30, 233–242.
63. Cook, J.K.A., Jackwood, M., Jones, R.C., 2012. The long view: 40 years of infectious bronchitis research. *Avian Pathology* 41, 239–250.
64. Cowen, B.S., Wideman, R.F., Rothenbacher, H., Braune, M.O., 1987. An outbreak of avian urolithiasis on a large commercial egg farm. *Avian Disease* 31, 392–397.
65. Crinion, R.A.P., 1972. Egg quality and production following infectious bronchitis virus exposure at one day old. *Poultry Science* 51, 582–585.
66. Crinion, R.A.P., Hofstad, M.S., 1972. Pathogenicity of four serotypes of avian infectious bronchitis virus for the oviduct of young chickens of various ages. *Avian Disease* 16, 351–363.
67. Cunningham, C.H., 1970. Avian infectious bronchitis. *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine* 14, 105-148.
68. Cumming, R.B., 1963. Infectious avian nephrosis (uraemia) in Australia. *Australia Veterinary Journal* 39, 145–147.
69. Cumming, R.B., 1969. The control of avian infectious bronchitis/nephrosis in Australia. *Australia Veterinary Journal* 45, 200–203.
70. Darbyshire, J.H., 1980. Assessment of cross-immunity in chickens to strain of avian infectious bronchitis virus using tracheal organ culture. *Avian pathology* 9, 179-184.
71. Darbyshire, J.H., 1985. A clearance test to assess protection in chickens vaccinated against avian infectious bronchitis virus. *Avian Pathology* 14, 497–508.
72. Davelaar, F.G., Kouwenhoven, B., 1977. Influence of maternal antibodies on vaccination of chicks of different ages against infectious bronchitis. *Avian Pathology* 6, 41-50.
73. Davelaar, F.G., Kouwenhoven, B., Burger, A.G., 1984. Occurrence and significance of infectious bronchitis virus variant strains in egg and broiler production in the Netherlands. *Veterinary Quarterly* 6, 114-120.
74. Dawson, P.S., Gough, R.E., 1971. Antigenic variations in strains of avian infectious bronchitis virus. *Archive Gesante Virus Forsch* 34, 32-39.

75. Delaplane, J.P., Stuart, H.O., 1941. The modification of infectious bronchitis virus of chickens as the result of propagation in embryonated chicken eggs. Rhode Island Agriculture Experiment Station RI Bulletin 284.
76. De Haan, C.A., Vennema, H., Rottier, P.J., 2000. Assembly of the coronavirus envelope: homotypic interactions between the M proteins. *Journal of Virology* 74, 4967-4978.
77. De Haan, C.A., Masters, P.S., Shen, X., Weiss, S., Rottier, P.J., 2002. The group-specific murine coronavirus genes are not essential, but their deletion, by reverse genetics, is attenuating in the natural host. *Virology* 296, 177-189.
78. De Wit, J.J., Mekkes, D.R., Kouwenhoven, B., Verheijden, J.H.M., 1997. Sensitivity and specificity of serological tests for detection of infectious bronchitis virus induced antibodies in broilers. *Avian Pathology* 26, 105-118.
79. De Wit, J. J., 2000. Detection of infectious bronchitis. *Avian Pathology* 29, 71-93.
80. De Wit, J.J., Mekkes, D.R., Koch, G., Westenbrink, F., 1998a. Detection of specific IgM antibodies to infectious bronchitis virus by an antibody-capture ELISA. *Avian Pathology* 27, 155-160.
81. De Wit, J.J., de Jong, M.C.M, Pijpers, A., Verheijden, J.H.M., 1998b. Transmission of infectious bronchitis virus within vaccinated and unvaccinated groups of chickens. *Avian Pathology* 27, 464-471.
82. De Wit, J.J., Cook, J.K.A., Van Der Heijden, H.M.J.F., 2011a. Infectious bronchitis virus variants: A review of the history, current situation and control measures. *Avian Pathology* 40, 223-235.
83. De Wit, J.J., Nieuwenhuisen-van Wilgen, J., Hoogkamer, A., van de Sande, H., Zuidam, G.J., Fabri, T.H., 2011b. Induction of cystic oviducts and protection against early challenge with infectious bronchitis virus serotype D388 (genotype QX) by maternally derived antibodies and by early vaccination. *Avian pathology* 40, 463-471.
84. Dhinaker Ray, G., Jones, R.C., 1996. Immunopathogenesis of infection in SPF chicks and commercial broiler chickens of variant infectious bronchitis virus of economic importance. *Avian pathology* 25, 481-501.
85. Dhinaker Ray, G., Jones, R.C., 1997. Infectious bronchitis virus: immunopathogenesis of infection in the chicken. *Avian Pathology* 26, 677-706.

86. Di Fabio, J., Rossini, L.I., Orbell, S.J., Paul, G., Huggins, M.B., Malo, A., Silva, B.G., Cook, J.K., 2000. Characterization of infectious bronchitis viruses isolated from outbreaks of disease in commercial flocks in Brazil. *Avian Disease* 44, 582-9.
87. Dolz, R., Pujols, J., Ordonez, G., Porta, R., Majo, N., 2006. Antigenic and molecular characterization of isolates of the Italy 02 infectious bronchitis virus genotype. *Avian Pathology* 35, 77-85.
88. Dolz, R., Pujols, J., Ordonez, G., Porta, R., Majo, N., 2008. Molecular epidemiology and evolution of avian infectious bronchitis virus in Spain over a fourteen-year period. *Virology* 374, 50-59.
89. Domanska-Blicharz, K., Smietanka, K., Minta, Z., 2007. Molecular studies on infectious bronchitis virus isolated in Poland. *Bulletin of the Veterinary Institute of Pulawy*. 51, 449-452.
90. Eck, J.H.H., 1983. Effects of experimental infection of fowl with EDS'76 virus, infectious bronchitis virus, and/or fowl adenovirus on laying performance. *Veterinary Quarterly* 5, 11-25.
91. El-houadfi, M., Jones, R.C., Cook, J.K.A., Ambali, A.G., 1986. The isolation and characterisation of six avian infectious bronchitis viruses isolated in Morocco. *Avian Pathology* 15, 93-105.
92. Enjuanes, L., Brian, D., Cavanagh, D., Holmes, K., Lai, M.M.C., Laude, H., Masters, P., Rottier, P., Siddell, S., Spaan, W.J.M., Taguchi, F., Talbot, P., 2000. Coronaviridae. In: *Virus Taxonomy*. Murphy F.A., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Ghabrial S.A., Jarvis A.W., Martelli G.P., Mayo M.A., Summers M.D. Eds. Academic Press: New York 835-849.
93. Fabricant, J., 2000. The early history of infectious bronchitis. *Avian Disease* 42, 648-650.
94. Fabricant, J., 2000. The early history of infectious bronchitis. *Avian Diseases*. 42, 648-650.
95. Feberwee, A., de Wit, J.J., Landman, W., 2009. Induction of eggshell apex abnormalities by *Mycoplasma synoviae*: field and experimental studies. *Avian Pathology* 38, 77-85.
96. Fulton, R.M., Reed, W.M., Thacker, H.L., 1993. Cellular responses of the respiratory tract of chickens to infection with Massachusetts 41 and Australian T infectious bronchitis viruses. *Avian Disease* 37, 951-960.
97. Gallardo, R.A., van Santen, V.L., Toro, H., 2010. Host intraspatial selection of infectious bronchitis virus populations. *Avian Diseases* 54, 807-813.

98. Gallardo, R.A., Hoerr, F.J., Berry, W.D., van Santen, V.L., Toro, H., 2011. Infectious bronchitis virus in testicles and venereal transmission. *Avian Diseases*. 55, 255–258.
99. Gallardo, R.A., van Santen, V.L., Toro, H., 2012. Effects of chicken anaemia virus and infectious bursal disease virus-induced immunodeficiency on infectious bronchitis virus replication and genotypic drift. *Avian Pathology* 41, 451–458.
100. Ganapathy, K., Bradbury, J.M., 1999. Pathogenicity of *Mycoplasma imitans* in mixed infection with infectious bronchitis virus in chickens. *Avian Pathology* 28, 229–237.
101. Ganapathy, K., 2009. Diagnosis of infectious bronchitis in chickens. *In Practice* 31, 424–431.
102. Ganapathy, K., Wilkins, M., Forrester, A., Lemiere, S., Cserep, T., McMullin, P., Jones, R.C., 2012. QX-like infectious bronchitis virus isolated from cases of proventriculitis in commercial broilers in England. *Veterinary Record*. 171, 597.
103. Gay, K., 2000. Infectious bronchitis virus detection and persistence in experimentally infected chickens. M.S. thesis, eds. Cornell University, Ithaca, New York.
104. Gelb, J.Jr., Nix, W.A., Gellman, S.D., 1998. Infectious bronchitis virus antibodies in tears and their relationship to immunity. *Avian Disease* 42, 364–374.
105. Gelb, J.Jr., Killian, S.L., 1987. Serum antibody responses of chickens following sequential inoculations with different infectious bronchitis virus serotypes. *Avian Disease* 31, 513–522.
106. Gelb, J.Jr., Jackwood, M.W., 1989. Infectious bronchitis. In: *A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens*, 4th ed. D.E. Swayne, J.R. Glisson, M.W. Jackwood, J.E. Pearson, W.M. Reed, eds. American Association of Avian Pathologists, Kennett Square, PA. 169–174.
107. Gelb, J.Jr., Jackwood, M.W., 1989a. Infectious bronchitis. In: *A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens*, 4th ed. D.E. Swayne, J.R. Glisson, M.W. Jackwood, J.E. Pearson, W.M. Reed, eds. American Association of Avian Pathologists, Kennett Square, PA. 169–174.
108. Gelb, J.Jr., Rosenberger, J.K., Fries, P.A., Cloud, S.S., Odor, E.M., Dohms, J.E., Jaeger, J.S., 1989b. Protection afforded infectious bronchitis virus-vaccinated sentinel chickens raised in a commercial environment. *Avian Disease* 33, 764–769.
109. Gelb, J.Jr., Jackwood, M., 2008. Infectious bronchitis. In: *A Laboratory Manual for the Isolation, Identification and Characterization of Avian Pathogens*, 5th edition. L. Dufour-Zavala, D.E. Swayne, J.R. Glisson, J.E. Pearson, W.M. Reed, M.W. Jackwood, P. Woolcock, eds. American Association of Avian Pathologists (AAAAP), Kennett Square, PA. 146–149.

110. Gentry, R.F., Braune, M.O., 1972. Prevention of virus inactivation during drinking water vaccination of poultry. *Poult Science* 51, 1450–1456.
111. Glahn, R.P., Wideman, R.F.J., Cowen, B.S., 1989. Order of exposure to high dietary calcium and Gray strain infectious bronchitis virus alters renal function and the incidence of urolithiasis. *Poultry Science* 68, 1193–1204.
112. Gonzalez, J.M., Gomez-Puertas, P., Cavanagh, D., Gorbalenya, A.E., Enjuanes, L., 2003. A comparative sequence analysis to revise the current taxonomy of the family Coronaviridae. *Archive of Virology* 148, 2207–2235.
113. Gough, R.E., Randal, C.J., Dagless, M., Alexander, D.J., Cox, W.J., Pearson, D., 1992. A new strain of infectious bronchitis virus infecting domestic fowl in Great Britain. *Veterinary Record* 130, 493–494.
114. Gough, R.E., Cox, W.J., Welchman, D.D.B., Worthington, K.J., Jones, R.C., 2008. Chinese QX strain of infectious bronchitis virus isolated in the UK. *Veterinary Record* 162, 99–100.
115. Gough, R.E., Randal, C.J., Dagless, M., Alexander, D.J., Cox, W.J., Pearson, D., 2012. QX-like infectious bronchitis virus isolated from cases of proventriculitis in commercial broilers in England. *Veterinary Record* 171, 597.
116. Gough, R.E., Cox, W.J., Winkler, C.E., Sharp, M.W., Spackman, D., 1996. Isolation and identification of infectious bronchitis virus from pheasants. *Veterinary Record* 138, 208–209.
117. Gough, R.E., Rendall, C.J., Dagless, M., Alexander, D.J., Cox, W.J., Pearson, D., 1992. A new strain of infectious bronchitis virus infecting domestic fowl in Great Britain. *Veterinary Record* 130, 493–494.
118. Grgic, H., Hunter, D.B., Hunton, P., Nagy, E., 2008. Pathogenicity of infectious bronchitis virus isolates from Ontario chickens. *Canadian Journal of Veterinary Research* 72, 403–410.
119. Hinze, V., Lohr, J.E., Kaleta, E.F., 1991. IBV strain differentiation attempts by cross-immunity studies in tracheal organ cultures derived from immunized chickens. *Proceedings of the 2nd International Symposium on Infectious Bronchitis*. 200–207.
120. Hodgson, T., Casais, R., Dove, B., Britton, P., Cavanagh, D., 2004. Recombinant infectious bronchitis coronavirus Beaudette with the spike protein gene of the pathogenic M41 strain remains attenuated but induces protective immunity. *Journal of Virology* 78, 13804–13811.
121. Hodgson, T., Britton, P., Cavanagh, D., 2006. Neither the RNA nor the proteins of Open Reading Frames 3a and 3b of the Coronavirus infectious bronchitis virus are essential for replication. *Journal of Virology* 80, 296–305.

122. Hofstad, M.S., Yoder, H.W.Jr., 1966. Avian infectious bronchitis- virus distribution in tissues of chicks. *Avian disease* 10, 230-239.
123. Hofstad, M.S., 1981. Cross-immunity in chickens using seven isolates of avian infectious bronchitis virus. *Avian Disease* 25, 650–654.
124. Hofstad, M.S., 1984. Avian infectious bronchitis. In: *Diseases of Poultry*. 8th Ed., Hofstad M.S., H. J. Barnes, B. W. Calnek and W. M. Reid, Jr, eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA. PA. 429-443.
125. Hofstad, M.S., Yoder, H.W.Jr., 1996. Avian infectious bronchitis-virus distribution in tissues of chicks. *Avian Disease* 10, 230–239.
126. Holmes, H.C., 1973. Neutralizing antibody in nasal secretions of chickens following administration of avian infectious bronchitis virus. *Archive fur die Gesamte Virusforschung* 43, 235–241.
127. Hopkins, S.R., Beard, C.W., 1985. Studies on methods for determining the efficacy of oil emulsion vaccines against infectious bronchitis virus. *Journal of American Veterinary Medicine Association* 187, 305.
128. Hopkins, S.R., Yoder, H.W.Jr., 1986. Reversion to virulence of chicken passaged infectious bronchitis vaccine virus. *Avian Disease* 30, 221–223.
129. Huang, Y.P., Wang, C.H., 2006. Development of attenuated vaccines from Taiwanese infectious bronchitis virus strains. *Vaccine* 24, 785–91.
130. Hughes, L.A., Savage, C., Naylor, C., Bennet, M., Chantrey, J., Jones, R.C., 2009. Genetically diverse coronaviruses in wild bird populations of northern England. *Emerging Infectious Disease* 15, 1091-1094.
131. Ignjatovic, J., Galli, L., 1994. The S1 glycoprotein but not the N or M proteins of avian infectious bronchitis virus induces protection in vaccinated chickens. *Archive of Virology* 138, 117–134.
132. Ignjatovic, J., Sapats, S.I., Ashton, F.A., 1997. A long-term study of Australian infectious bronchitis viruses indicates a major antigenic change in recently isolated strains. *Avian Pathology* 26, 535-552.
133. Ignjatović, J., Sapats, S., 2000. Avian infectious bronchitis virus. *Revue Scientifique et Technique* 19, 493-508.

134. Ignjatovic, J., Gould, G., Sapats, S., 2006. Isolation of a variant infectious bronchitis virus in Australia that further illustrates diversity among emerging strains. *Archives of Virology* 151, 1567-1585.
135. Jackwood, M.W., 2012. Review of infectious bronchitis virus around the world. *Avian Diseases* 56, 634-641.
136. Jackwood, M.W., Hall, D., Handel, A., 2012. Molecular evolution and emergence of avian gammacoronaviruses. *Infection, Genetics and Evolution*. 12, 1305-1311.
137. Jackwood, M.W., de Wit, S., 2013. Infectious bronchitis. In: Swayne D.E. *Diseases of poultry*. 13th edition, eds. West Sussex, Wiley-Blackwell. PP. 139-160.
138. Janse, M.E., van Rooselaar, D., Koch, G., 1994. Leukocyte subpopulations in kidney and trachea of chickens infected with infectious bronchitis virus. *Avian Pathology* 23, 513-523.
139. Jansen, T., Hofmans, M.P., Theelen, M.J., Manders, F., Schijns, V.E., 2006. Structure and oil type-based efficacy of emulsion adjuvants. *Vaccine* 24, 5400-5405.
140. Jia, W., Karaca, K., Parrish, C.R., Naqi, S.A., 1995. A novel variant of avian infectious bronchitis virus resulting from recombination among three different strains. *Archive of Virology* 140, 259-271.
141. Jia, W., Mondal, S.P., Naqi, S.A., 2002. Genetic and antigenic diversity in avian infectious bronchitis virus isolates of the 1940s. *Avian Diseases* 46, 437-441.
142. Johnson, M.A., Pooley, C., Ignjatovic, J., Tyack, S.G., 2003. A recombinant fowl adenovirus expressing the S1 gene of infectious bronchitis virus protects against challenge with infectious bronchitis virus. *Vaccine* 21, 2730-2736.
143. Jonassen, C.M., Kofstad, T., Larsen, I.L., Lovland, A., Handeland, K., Follestad, A., Lillehaug, A., 2005. Molecular identification and characterization of novel coronaviruses infecting graylag geese (*Anser anser*), feral pigeons (*Columbia livia*) and mallards (*Anas platyrhynchos*). *Journal of General Virology* 86, 1597-1607.
144. Jones, R.C., 2010. Viral respiratory diseases (ILT, aMPV infections, IB): Are they ever under control? *British Poultry science* 51, 1-11.
145. Jordan, F.T.W., Nassar, T.J., 1973. The combined influence of age of embryo and temperature and duration of incubation on the replication and yield of avian infectious bronchitis (IB) virus in the developing chick embryo. *Avian Pathology* 2, 279-294.

146. Jungherr, E.L., Chomiak, T.W., Luginbuhl, R.E., 1956. Immunologic differences in strains of infectious bronchitis virus. Proceedings 60th Annual Meeting US. Livestock sanitary Association. Chicago, Illinois, USA. 203-209.
147. Juul-Madsen, H.R., Norup, L.R., Jorgensen, P.H., Handberg, K.J., Watrang, E., Dalgaard, T.S., 2011. Crosstalk between innate and adaptive immune responses to infectious bronchitis virus after vaccination and challenge of chickens varying in serum mannose-binding lectin concentrations. *Vaccine* 29, 9499-9507.
148. Kahya, S., Coven, F., Temelli, S., Eyigor, A., Carli, K., 2013. Presence of IS/1494/06 genotype-related infectious bronchitis virus in breeder and broiler flocks in Turkey. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 60, 27-31.
149. Karaca, K., Naqi, S., 1993. A monoclonal antibody-based ELISA to detect serotype-specific infectious bronchitis virus antibodies. *Veterinary Microbiology* 34, 249-257.
150. Keeler, C.L., Reed, K.L., Nix, W.A., Gelb, J., 1998. Serotype identification of avian infectious bronchitis virus by RTPCR of the peplomer (S1) gene. *Avian Disease* 42, 275-284.
151. Klieve, A.V., Cumming, R.B., 1988a. Immunity and cross-protection to nephritis produced by Australian infectious bronchitis viruses used as vaccines. *Avian Pathology* 17, 829-839.
152. Klieve, A.V., Cumming, R.B., 1988b. Infectious bronchitis: Safety and protection in chickens with maternal antibody. *Australian Veterinary Journal* 65, 396-397.
153. Klumperman, J., Locker, J.K., Meijer, A., Horzinck, M.C., Gueze, H.J., Roittier, P.J., 1994. Coronavirus M protein accumulates in the Golgi Complex beyond the site of virion budding. *Journal of virology* 68, 6523-6534.
154. Krapez, U., Slavec, B., Barlic-Maganja, D., Rojs, O.Z., 2010. Molecular analysis of infectious bronchitis viruses isolated in Slovenia between 1990 and 2005: A retrospective study. *Virus Genes* 41, 414-416.
155. Krapez, U., Slavec, B., Rojs, O.Z., 2011. Circulation of infectious bronchitis virus strains from Italy02 and QX genotypes in Slovenia between 2007 and 2009. *Avian Diseases* 55, 155-161.
156. Ladman, B.S., Pope, C.R., Ziegler, A.F., Swieczkowski, T., Callahan, C.J., Davison, S., Gelb, J., 2002. Protection of chickens after live and inactivated virus vaccination against challenge with nephropathogenic infectious bronchitis virus. *Avian Disease* 46, 938-933.
157. Lai, M.M., Cavanagh, D., 1997. The molecular biology of coronaviruses. *Advances in Virus Research* 48, 1-100.

158. Lambrechts, C., Pensaert, M., Ducatelle, R., 1993. Challenge experiments to evaluate cross-protection induced at the trachea and kidney level by vaccine strain and Belgian nephropathogenic isolates of infectious bronchitis virus. *Avian Pathology* 22, 577-590.
159. Laudert, E., Sivanandan, V., Halvorson, D., Shaw, D., Webster, R.G., 1993. Biological and molecular characterization of H13N2 influenza type A viruses isolated from turkeys and surface water. *Avian Disease* 37, 793–799.
160. Lin, Z., Kato, Y., Kudou, Y., Ueda, S., 1991. A new typing method for the avian infectious bronchitis virus using polymerase chain reaction and restriction enzyme fragment length polymorphism. *Archive of Virology* 116, 19-31.
161. Lister, S. A., Beer, J.V., Gough, R.E., Holmes, R.G., Jones, J.M.W., Orton, R.G., 1985. Outbreaks of nephritis in pheasants (*Phasianus colchicus*) with a possible coronavirus aetiology. *Veterinary Record* 117, 612–613.
162. Lohr, J.E., 1988. Differentiation of IBV strains. In: *Proceedings of the 1st International symposium on Infectious Bronchitis*. Deutsche Veterinarmedizinische Gesellschaft Gissen, Germany. 199-207.
163. Lucio, B., Fabricant, J., 1990. Tissue tropism of three cloacal isolates and Massachusetts strain of infectious bronchitis virus. *Avian Disease* 34, 865–870.
164. Macnaughton, M.R., Hasony, H.J., Madge, M.H., Reed, S.E., 1981. Antibody to virus components in volunteers experimentally infected with human coronavirus 229E group viruses. *Infection and Immunity* 31, 845–849.
165. Madu, I., Chu, V., Lee, H., Regan, A., Bauman, B., Whittaker, G., 2007. Heparan sulfate is a selective attachment factor for the avian coronavirus infectious bronchitis virus Beaudette. *Avian Diseases* 51, 45-51.
166. Mahmood, Z.H., Sleman, R.R., Uthman, A.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. *Veterinary Microbiology* 150, 21-27.
167. Mardani, K., Noormohammadi, A.H., Ignatovic, J., Browning, G.F., 2006. Typing infectious bronchitis virus strains using reverse transcription-polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis to compare the 3' 7.5 kb of their genomes. *Avian Pathology* 35, 63–9.

168. Marquardt, W.W., Snyder, D.B., Schlotthober, B.A., 1981. Detection and quantification of antibodies to infectious bronchitis virus by enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian Disease* 25, 713–722.
169. Masters, P.S., 2006. The molecular biology of coronaviruses. *Advances in Virus Research* 66, 193-292.
170. Matthijs, M.G., van Eck, J.H., de Wit, J.J., Bouma, A., Stegeman, J.A., 2005. Effect of IBV-H120 vaccination in broilers on colibacillosis susceptibility after infection with a virulent Massachusetts-type IBV strain. *Avian Disease* 49, 540–545.
171. McKinley, E.T., Hilt, D.A., Jackwood, M.W., 2008. Avian coronavirus infectious bronchitis attenuated live vaccines undergo selection of subpopulations and mutations following vaccination. *Vaccine* 26, 1274-1284.
172. Meir, R., Rosenblut, E., Perl, S., Kass, N., Ayali, G., Perk, S., Hemsani, E., 2004. Identification of a novel nephropathogenic infectious bronchitis virus in Israel. *Avian Diseases* 48, 635-641.
173. Meulemans, G., Carlier, M.C., Gonze, M., Petit, P., Vandebroek, M., 1987. Incidence, characterization and prophylaxis of nephropathogenic avian infectious bronchitis viruses. *Veterinary Record* 120, 205-206.
174. Meulemans, G., Boschmans, T., Berg, P., Decaesstecker, M., 2001. Polymerase chain reaction combined with restriction enzyme analyses for detection and differentiation of fowl adenoviruses. *Avian Pathology* 30, 655-660.
175. Mihindikulasuriya, K.A., Wu, G., St Leger, J., Nordhausen, R.W., Wang, D., 2008. Identification of a novel coronavirus from a beluga whale by using a panviral microarray. *Journal of Virology* 82, 5084–5088.
176. Miller, L.T., Yates, V.J., 1968. Neutralization of infectious bronchitis virus by human sera. *American Journal of Epidemiology* 88, 406-409.
177. Minta, Z., Bugajek, P., Karpinska, E., Gough, R., Cavanagh, D., Mawditt, K., Cox, W.J., Bartnicka, B., Wiercinski, J., 1988. Isolation of new strains of IBV from broiler chickens in Poland, in: Leirz, M., Huffels-Redman, U., Kaleta, E.F. & Heckman, J., VII International symposium on avian corona-and pneumovirus infections. Eds. Druckerei Schroder, Germany. 180-188.

178. Mockett, A.P.A. Darbyshire, J.H., 1981. Comparative studies with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies to avian infectious bronchitis virus. *Avian Pathology* 10, 1–10.
179. Mockett, A.P.A., Cook, J.K.A., Huggins, M.B., 1987. Maternally-derived antibody to infectious bronchitis virus: Its detection in chick trachea and serum and its role in protection. *Avian Pathology* 16, 407–416.
180. Mondal, S.P., Naqi, S.A., 2001. Maternal antibody to infectious bronchitis virus: its role in protection against infection and development of active immunity to vaccine. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 79, 31-40.
181. Montassier, M.F.S., Brentano, L., Montassier, H.J., Richtzenhain, L.J., 2008. Genetic grouping of avian infectious bronchitis virus isolated in Brasil based on RT-PCR/RFLP analyses of the S1 gene. *Pesquisa Veterinaria Brasileira* 28, 190-194.
182. Naqi, S., Thompson, G., Bauman, B., Mohammed, H., 2001. The exacerbating effect of infectious bronchitis virus infection on the infectious bursal disease virus-induced suppression of opsonization by *Escherichia coli* antibody in chickens. *Avian Disease* 45, 52–60.
183. Nix, W.A., Troeber, D.S., Kingham, B.F., Keeler, C.L.Jr., Gelb, J.Jr., 2000. Emergence of subtype strains of the Arkansas serotype of infectious bronchitis virus in Delmarva broiler chickens. *Avian Diseases* 44, 568–581.
184. OIE, 2008. *Avian Infectious Bronchitis*. chapter 2. 3. 2. p.1-15.
185. Orlić, D.B., Kapetanov, M. Bolesti živine. <http://veterina.info/zivina-i-ptice/61-bolesti-perad/598-infektivni-bronhitis> (Accessed 1 September 2017)
186. Otsuki, K., Noro, K., Yamamoto, H., Tsubokura, M., 1979. Studies on avian infectious bronchitis virus (IBV) 2. Propagation of IBV in several cultured cells. *Archive of Virology* 60, 115-122.
187. Otsuki, K., Nakamura, T., Kawaoka, Y., Tsubokura, M., 1988. Interferon induction by several strains of avian infectious bronchitis virus, a coronavirus, in chickens. *Acta Virologica* 32, 55-59.
188. Ovchinnikova, E.V., Bochkov, Y.A., Shcherbakova, L.O., Nikonova, Z.B., Zinyakov, N.G., Elatkin, N.P., Mudrak, N.S., Borisov, A.V., Drygin, V.V., 2011. Molecular characterization of infectious bronchitis virus isolates from Russia and neighbouring countries: identification of intertypic recombination in the S1 gene. *Avian Pathology* 40, 507–514.

189. Parsons, D., Ellis, M.M., Cavanagh, D., Cook, J.K., 1992. Characterisation of an infectious bronchitis virus isolated from vaccinated broiler breeder flocks. *Veterinary Record* 131, 408-411.
190. Pensaert, M., Lambrechts, C., 1994. Vaccination of chickens against a Belgian nephropathogenic strain of infectious bronchitis virus B1648 using attenuated homologous and heterologous strains. *Avian Pathology* 23, 631-41.
191. Picault, J.P., Drouin, P., Guittet, M., Bennejean, G., Protais, J., L'hospitalier, R., Gillet, J.P., Lamande, J., Bachelier, A.L., 1986. Isolation, characterisation and preliminary cross-protection studies with a new pathogenic avian infectious bronchitis virus (Strain PL-84084). *Avian Pathology* 15, 367-383.
192. Promkuntod, N., van Eijndhoven, R.E.W., de Vrieze, G., Grone, A., Verheije, M.H., 2014. Mapping of the receptor-binding domain and amino acids critical for attachment in the spike protein of avian Coronavirus infectious bronchitis virus. *Virology* 448, 26-32.
193. Raggi, L.G., Lee, G.G., 1963. Infectious bronchitis virus interference with growth of Newcastle disease virus. I. Study of interference in chicken embryos. *Avian Disease* 7, 106-122.
194. Ratanasethakul, C., Cumming, R.B., 1983. The effect of route of infection and strain of virus on the pathology of Australian infectious bronchitis. *Australian Veterinary Journal* 60, 209-213.
195. Rauber, R.H., Flores, M.L., Pereira, C.E., Grigulo, M., 2004. Elisa evaluation of the levels of antibodies against infectious bronchitis virus in laying hens using egg yolk as substrate. *Revista Brasileira de Ciencia Avicola* 6, 117-119.
196. Resanović, R., Vučićević, M., 2010. Infektivni bronhitis živine. www.vetks.org.rs/documents/edukacija/2014/.../Infektivni%20bronhitis%20zivine.doc (Accessed 22 Mart 2017)
197. Rosenberger, J.K., Gelb, J.Jr., 1987. Response of several avian respiratory viruses as affected by infectious bursal disease virus. *Avian Disease* 22, 95-105.
198. Saif, Y.M., 2013. Viral enteric infection. In: *Diseases of Poultry*. Swayne, D.E., Glisson, J.R., McDougald, L.R., Nair, V., Nolan, L.K., Suarez, D.L., Nair, V. Eds. Willey-Blackwell. Ames, Iowa. 375-376
199. Schalk, A.F., Hawn, M.C., 1931. An apparently new respiratory disease of baby chicks. *Journal of the American Veterinary Medicine Association* 78, 413-416.

200. Schultze, B., Cavanagh, D., Herrler, G., 1992. Neuraminidase treatment of avian infectious bronchitis coronavirus reveals a hemagglutinin activity that is dependent on sialic acid-containing receptors on erythrocytes. *Virology* 189, 792-794.
201. Seo, H.S., Collisson, E.W., 1997a. Specific cytotoxic T lymphocytes are involved in *in vivo* clearance of infectious bronchitis virus. *Journal of Virology* 71, 5173–5177.
202. Seo, H.S., Collisson, E.W., 1997b. The carboxyl-terminal 120-residue polypeptide of infectious bronchitis virus nucleocapsid induces cytotoxic T lymphocytes and protects chickens from acute infection. *Journal of Virology* 71, 7889–7894.
203. Snyder, J., 2002. Packaging and shipping of infectious substances. *Clinical Microbiology Newsletter* 24, 89-93.
204. Song, C.S., Lee, Y.J., Lee, C.W., Sung, H.W., Kim, J.H., Mo, I.P., Izumiya, Y., Jang, H.K., Mikami, T., 1998. Induction of protective immunity in chickens vaccinated with infectious bronchitis virus S1 glycoprotein expressed by a recombinant baculovirus. *Journal of General Virology* 79, 719–723.
205. Stephensen, C.B., Casebolt, D.B., Gangpadhyay, N.N., 1999. Phylogenetic analyses of a highly conserved region of the polymerase gene from eleven coronaviruses and development of a consensus polymerase chain reaction assay. *Virus Research* 60, 181-189.
206. Swayne, D.E., Suarez, D.L., Sims, L.D., 2013. Influenza. In: *Diseases of Poultry*. Swayne, D.E., Glisson, J.R., McDougald, L.R., Nair, V., Nolan, L.K., Suarez, D.L., Nair, V. Eds. 13. Wiley-Blackwell. Ames, Iowa. 181–218.
207. Terregino, C., Toffan, A., Serena Beato, M., de Nardi, R., Vasdellari, M., Meini, A., Ortalli, 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 Pathology* 37, 487-493.
208. Thompson, G., Naqi, S., 1997. Cytotoxic activity of cells recovered from the respiratory tracts of chickens inoculated with infectious bronchitis virus. *Avian Disease* 41, 690–694.
209. Thompson, G., Mohammed, H., Bauman, B., Naqi, S., 1997. Systemic and local antibody responses to infectious bronchitis virus in infectious bursal disease inoculated and control chickens. *Avian Disease* 41, 419-527.
210. Thor, S.W., Hilt, D.A., Kissinger, J.C., Paterson, A.H., Jackwood, M.W., 2011. Recombination in avian gamma-coronavirus infectious bronchitis virus. *Viruses* 3, 1777-1799.

211. Thornton, D.H., Muskett, J.C., 1975. Effect of infectious bronchitis vaccination on the performance of live Newcastle disease vaccine. *Veterinary Record* 96, 467–468.
212. Timms, L.M., Bracewell, C.D., 1983. Cell mediated and humoral immune response of chickens to inactivated oil-emulsion infectious bronchitis vaccine. *Research in Veterinary Science* 34, 224–230.
213. Toffan, A., Terregino, C., Mazzacan, E., Castaldello, I., Capua, I., Bonci, M., 2011. Detection of Chinese Q1 strain of infectious bronchitis virus in Europe. *Veterinary Record* 169, 212–213.
214. Villarreal, L.Y.B., Brandao, P.E., Chacon, J.L., Assayag, M.S., Maiorka, P.C., Raffi, P., Saidenberg, A.B.S., Jones, R.C., Ferreira, A.J.P., 2007. Orchitis in roosters with reduced fertility associated with avian infectious bronchitis virus and avian metapneumovirus infections. *Avian Diseases* 51, 900–904.
215. Villarreal, L.Y., Sandri, T.L., Souza, S.P., Richtzenhain, L.J., de Wit, J.J., Brandao, P.E., 2010. Molecular epidemiology of avian infectious bronchitis in Brazil from 2007 to 2008 in breeders, broilers, and layers. *Avian Diseases* 54, 894–898.
216. Wadey, C.N., Faragher, J.T., 1981. Australian infectious bronchitis viruses: Identification of nine subtypes by a neutralization test. *Research in Veterinary Science* 30, 70–74.
217. Wang, Y., Wang, Y., Zhang, Z., Fan, G., Jiang, Y., Liu Xiang, E., Ding, J., Wang, S., 1998. Isolation and identification of glandular stomach type IBV (QX IBV) in chickens. *Chinese Journal of Animal Quarantine* 15, 1–3.
218. Winterfield, R.W., Hitchner, S.B., 1962. Etiology of an infectious nephritis-nephrosis syndrome of chickens. *American Journal of Veterinary Research* 23, 1273–1279.
219. Woo, P.C., Huang, Y., Lau, S.K., Yuen, K.Y., 2010. Coronavirus genomics and bioinformatics analyses. *Viruses* 2, 1804–1820.
220. Worthington, K.J., Currie, R.J., Jones, R.C., 2008. A reverse transcriptase-polymerase chain reaction survey of infectious bronchitis virus genotypes in Western Europe from 2002 to 2006. *Avian Pathology* 37, 247–257.
221. Yachida, S., Sugimori, G., Aoyama, S., Takahashi, N., Iritani, Y., Katagiri, K., 1981. Effectiveness of maternal antibody against challenge with infectious bronchitis viruses. *Avian Diseases* 25, 736–741.