

“Research article”

DOI: 10.30495/JVCP.2022.1945808.1343

Tracheal transcriptome analysis in SPF broiler chickens infected with avian infectious bronchitis

Zamzam, S.H.¹, Ghalyanchilangeroudi, A.^{2*}, Khosravi, A.R.²

1- Ph.D Student in Virology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

2- Professor, Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.

*Corresponding author's email: ghalyana@ut.ac.ir

(Received: 2021/12/5 Accepted: 2022/1/31)

Abstract

Avian infectious bronchitis (IB) is an acute and highly contagious disease of the upper-respiratory tract caused by the infectious bronchitis virus (IBV). The virus is a member of the Coronaviridae family and has numerous serotypes and strains. Rapid replication combined with high mutation rate and recombination are the main causes of the observed high diversity. Feed conversion and average daily gain are affected in broilers, and infection is often followed by secondary bacterial infections. In layers, IBV causes a reduction in egg production. Currently, IB is one of the most economically important diseases in the poultry industry. In the present study, transcriptional profiles of tracheal tissue of the infected group (IBV) were studied with control group to evaluate changes in transcriptome profile at the early stages of infection. After the challenge of SPF chickens with IBV IS-1494 like (GI-23) variant, the tracheal tissue was used for RNA extraction, and changes in the transcriptome were investigated by Illumina RNA-seq technique. Up-regulated and down-regulated differentially expressed genes (DEGs) in the transcriptome of trachea were identified. Gene ontology category, KEGG pathway, was analyzed to identify relationships among differentially expressed genes. In general, the numbers of up-regulated genes were higher than of down-regulated genes in the experimental group. In the experimental group, a more severe immune response occurred; among the important up-regulated genes in this group was Toll-like receptor signaling pathway, apoptotic pathway and MAPK signaling pathway. The results of this study could provide a general overview of transcriptome changes in the trachea at the early stage of infection with avian infectious bronchitis (IBV) virus.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: Avian infection bronchitis virus, RNA-Seq, trachea, transcriptome.

DOI: 10.30495/JVCP.2022.1945808.1343

"مقاله پژوهشی"

تجزیه و تحلیل رونوشت نای در جوجه‌های گوشتی SPF آلوده به برونشیت عفونی پرندگان

سیدحسین زمزم^۱، آرش قلیانچی لنگرودی^{۲*}، علیرضا خسروی^۲

۱- دانشجوی دکتری تخصصی ویروس‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

۲- استاد گروه میکروبیولوژی و ایمنولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات: ghalyana@ut.ac.ir

(دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۹/۱۴ پذیرش نهایی: ۱۴۰۰/۱۱/۱۱)

چکیده

برونشیت عفونی پرندگان (infectious bronchitis) یک بیماری حاد و بسیار مسری دستگاه تنفسی فوقانی است که توسط ویروس برونشیت عفونی (infectious bronchitis virus) ایجاد می‌شود. این ویروس از خانواده کرونا ویریده (coronaviridae) است و دارای سروتیپ‌ها و سویه‌های متعددی است. تکثیر سریع همراه با نرخ جهش و نوترکیبی بالا از دلایل اصلی تنوع بالای مشاهده شده است. ضریب تبدیل غذایی و میانگین افزایش روزانه در جوجه‌های گوشتی تحت تأثیر قرار می‌گیرد و عفونت اغلب با عفونت‌های باکتریایی ثانویه همراه است. در مرغ‌های تخم‌گذار، IBV باعث کاهش تولید و کیفیت تخم مرغ می‌شود. امروزه بیماری IBV یکی از مهم‌ترین بیماری‌های اقتصادی در صنعت طیور است. در مطالعه حاضر، پروفایل‌های رونویسی بافت نای گروه آلوده (IBV) با گروه کنترل برای بررسی تغییرات مشخصات رونوشت در مراحل اولیه عفونت مورد مطالعه قرار گرفت. پس از چالش جوجه‌های SPF با ویروس برونشیت عفونی واریانت ۲ IBV IS-1494 (GI-23)، از بافت نای برای استخراج RNA استفاده شد و تغییرات در رونوشت با فن Illumina RNA-seq بررسی شد. ژن‌های تغییربیان یافته (DEGs) در رونوشت نای شناسایی شدند. دسته هستی‌شناسی ژن، مسیر KEGG برای شناسایی روابط بین ژن‌های متفاوت بیان شده مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. به‌طور کلی، در گروه آزمایش تعداد ژن‌های افزایش بیان یافته بیشتر از ژن‌های کاهش بیان یافته بود. در گروه آزمایشی، پاسخ ایمنی شدیدتر رخ داد. از ژن‌های تنظیم شده مهم در این گروه مسیر سیگنال‌دهی گیرنده شبه Toll، مسیر آپوپتوتیک، مسیر سیگنالینگ MAPK بود. نتایج این مطالعه می‌تواند یک نمای کلی از تغییرات رونوشت در نای در مراحل اولیه عفونت با ویروس برونشیت عفونی پرندگان (IBV) ارائه دهد.

کلیدواژه‌ها: ویروس برونشیت عفونی پرندگان، رونوشت، RNA-Seq، نای.

مقدمه

با رشد روزافزون جمعیت انسانی و تمایل بشر به مصرف گوشت مرغ و تخم‌مرغ به‌عنوان منبع اصلی پروتئین، نیاز روزافزونی به این منابع پروتئینی نیز وجود دارد. بنابراین نمی‌توان نقش صنعت طیور را در زنجیره تأمین غذا و شکوفایی اقتصادی نادیده گرفت (Barjesteh *et al.*, 2020). چالش اصلی پیش روی این صنعت بیماری‌های عفونی از جمله بیماری‌های ویروسی است که می‌تواند زیان اقتصادی زیادی به صنعت طیور در سراسر جهان وارد کند (Nawab *et al.*, 2019, Mahdavi *et al.*, 2014).

یکی از تهدیدهای اصلی این صنعت با پیامدهای اقتصادی شدید، ویروس برونشیت عفونی (IBV) است (Barjesteh *et al.*, 2020). عامل ایجادکننده برونشیت عفونی پرندگان یک RNA ویروس تک‌رشته‌ای با سنس مثبت از خانواده Coronaviridae است (Liu *et al.*, 2017). این ویروس به دلیل تکثیر سریع با جهش و فرکانس نوترکیبی بالا شناخته شده است که منجر به ایجاد سویه‌های جغرافیایی متمایز می‌شود (Jackwood *et al.*, 2012, Gholami-Ahangaran *et al.*, 2012). ویروس از طریق دستگاه تنفسی میزبان وارد شده و در آن تکثیر می‌شود پس از ۲۴ تا ۴۸ ساعت دوره نهفتگی علائم تنفسی ایجاد می‌گردد (Awad *et al.*, 2014). برخی از سویه‌های برونشیت عفونی مانند ژنوتیپ QX به بافت‌های اپیتلیال از جمله کلیه‌ها و مجرای تخمک کشیده می‌شوند که در آن باعث عفونت و ضایعه می‌شوند (Ganapathy *et al.*, 2012). بیماری اغلب با عفونت‌های باکتریایی ثانویه همراه است. همچنین ضایعات ناشی از برخی سویه‌ها در مجرای تخمک

به‌طور قابل توجهی کیفیت و تولید تخمک را کاهش می‌دهد. در عرض سه روز پس از عفونت، علائمی مانند افسردگی ظاهر و ضریب تبدیل غذایی و میانگین افزایش وزن روزانه در جوجه‌های گوشتی تحت تأثیر قرار می‌گیرد (Jackwood and Wit., 2020, Feizi and Kaboli., 2012). IBV جوجه‌ها را در تمام سنین و نژادها تحت تأثیر قرار می‌دهد. میزان تلفات بسته به نوع ویروس درگیر و همچنین سن و شرایط سلامتی جوجه‌ها می‌تواند به ۸۳ درصد برسد (Raj and Jones, 1997). به دلیل توانایی انتقال از طریق آئروسول، ویروس می‌تواند به‌سرعت در مزارع منتقل و گسترش یابد و خسارات زیادی به صنعت طیور وارد کند (Awad *et al.*, 2014).

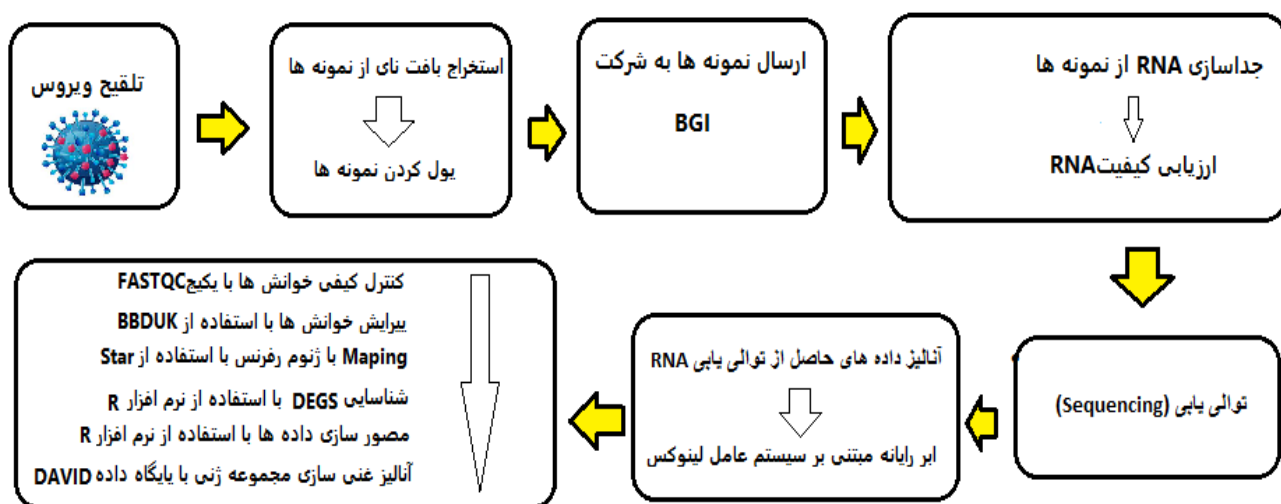
با توجه به موارد فوق، اتخاذ و اجرای سیاست‌ها و اقدامات پیشگیرانه مانند واکسیناسیون غیرفعال، زنده و یا تخفیف‌حدت یافته، تهویه مناسب و دمای بهینه برای صنعت طیور ضروری است. استراتژی‌های پیشگیرانه موجود ترکیبی از شیوه‌های مدیریت مناسب، مکانیسم‌های کنترل دما، تهویه پیشرفته و استفاده از واکسن‌های ویروسی زنده ضعیف شده و غیرفعال است (Wang *et al.*, 2006). با وجود این اقدامات، کنترل این بیماری در سراسر جهان به دلیل وجود گونه‌های متنوع جغرافیایی و عدم وجود ایمنی متقاطع سویه‌ها دشوار است (Jordan., 2017). از این رو، توسعه روش‌های پیشگیرانه و درمانی نوآورانه برای مهار شیوع کاملاً ضروری است. مطالعات گسترده در مورد این موضوع چندین راه را برای مبارزه با این بیماری ارائه کرده است. به‌عنوان مثال، جک‌وود و همکارانش شواهدی در حمایت از اثربخشی سرو تیپ‌های مشخص شده

سلولی و مولکولی در سیستم‌های بیولوژیکی مورد استفاده قرار می‌گیرند. استفاده از فن‌های با کارایی بالا مانند ریزآرایه و توالی‌یابی نسل بعدی (next generation sequencing) در میان محققانی که تعاملات بین ویروس برونشیت عفونی و میزبان را بررسی می‌کنند، شتاب بیشتری یافته است (Xu et al., 2019, Liu et al., 2017, Cong et al., 2013, Wang et al., 2006).

یافته‌های این تحقیقات، بینش‌های جالبی را در مورد نحوه عملکرد مکانیسم‌های ضدویروسی در طیور در برابر ویروس برونشیت عفونی ارائه کرده است. مطالعات اندکی در مورد فرآیندهای ایمونولوژیک درگیر در پاتوژنز IBV انجام شده است. بنابراین، مطالعه حاضر که جریان کار آن به طور خلاصه در شکل ۱ نشان داده شده است باهدف تجزیه و تحلیل رونوشت‌های نای با تمرکز بر پاسخ‌های ایمنی در برابر ویروس برونشیت عفونی در جوجه‌های گوشتی با استفاده از تجزیه و تحلیل RNA-seq انجام شد.

جغرافیایی در ایجاد ایمنی پیدا کرده‌اند (Jackwood and Wit, 2020). علاوه بر این، گزارشی از واکنش‌های نو ترکیب حاوی پروتئین‌های S1 و N که پاسخ ایمنی و محافظت را تقویت کرده وجود دارد (Meir et al., 2012).

با تحقیقات گسترده و طولانی مدتی که روی این بیماری انجام شده است، نتایج امیدوارکننده‌ای را برای روش‌های پیشگیرانه مؤثرتر گزارش کرده است، ولی این بیماری تاکنون مهار نشده و همچنان گسترش یافته و باعث نگرانی می‌شود. به منظور معرفی واکنش‌های مؤثرتر و توسعه اقدامات پیشگیرانه پیشرفته، درک مکانیسم‌های دفاعی در برابر عوامل بیماری‌زا در طیور ضروری است. چنین درکی به ما بینش ارزشمندی در مورد پاتوژنز مولکولی بیماری در پرندگان و مسیرهای مختلف درگیر در تعامل ویروس-میزبان می‌دهد. پیشرفت‌های اخیر در فن‌آوری‌های Omic (ژنومیکس، ترانس کریپتومیکس، پروتئومیکس و متابولومیکس) اغلب در روش‌شناسی برای تجزیه و تحلیل برهم‌کنش‌های



شکل ۱- نمودار جریان کار

مواد و روش‌ها

-طراحی آزمایش: در این مطالعه تجربی شاهددار تصادفی که در سال ۱۳۹۸ در دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران انجام گرفت، ۶۰ قطعه جوجه SPF به‌طور مساوی به یک گروه آزمایش و یک گروه کنترل تقسیم شدند. هر گروه به دو زیرگروه ۱۵ تایی تقسیم شدند. همه گروه‌ها در ایزولاتورهای جداگانه نگهداری شدند. جوجه‌های ۱۲ روزه در گروه آزمایش به روش بینی و چشمی با ۱۰۰ میکرو لیتر مایع آلتوتویک حاوی پنجاه درصد ۱۰^۴ دوز عفونی تخم‌مرغ (egg 50% infective dose) در میلی‌لیتر ویروس برونشیت عفونی (Variant-2-like IBV IS/1494) چالش شدند. در گروه کنترل، جوجه‌ها ۱۰۰ میکرو لیتر سالین استریل بافر فسفات (PBS) دریافت کردند.

-سویه ویروس و تیتراسیون: در این مطالعه از سویه (variant-2-like IBV- IS/1494) استفاده شد. این سویه در سال ۲۰۱۴ از مزارع مرغ گوشتی ایران جدا شد (Najafi *et al.*, 2016). برای تعیین EID50 از روش Reed-Muench استفاده شد (Reed and Muench, 1938).

-جمع‌آوری و آماده‌سازی نمونه: دو روز پس از چالش، ۱۰ قطعه جوجه به‌طور تصادفی از هر گروه انتخاب و با استنشاق دی‌اکسید کربن و در رفتگی مهره‌های گردنی بر اساس اصول اخلاقی دانشگاه تهران در شرایط استریل، کشته شدند. سپس، بافت نای تشریح شده و برای هر گروه ادغام شد. سپس آن‌ها را در لوله‌های استریل ۵ میلی‌لیتری حاوی محلول RNAlater (Thermo Fisher Scientific) قرار دادند تا RNA را با غیرفعال‌سازی فوری RNase تثبیت و محافظت کند. برای ارزیابی

نتایج RNA-seq، مقداری بافت از هر گروه برداشته شد تا آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی (real time PCR) انجام شود. بافت‌های نای ادغام‌شده برای توالی‌یابی با انتهای جفت (HiSeq 2000 System Illumina) [TruSeq SBS KIT-HS V3] به شرکت BGI در چین ارسال شد. لازم به ذکر است که برای استخراج مولکول‌های RNA باکیفیت، کلیه فرآیندهای استخراج RNA و کنترل کیفی توسط این شرکت انجام شد.

-تجزیه و تحلیل رونوشت: داده‌های به‌دست‌آمده از پلتفرم Illumina HiSeq 2000 برای به‌دست‌آوردن خوانش‌های خام پردازش شد که سپس برای کنترل کیفیت و نقشه‌خوانی استخراج شد. حدود ۴۰ میلیون خوانش خام با انتهای جفت برای هر نمونه با طول ۹۰ تا ۱۰۰ جفت باز (bp) از کتابخانه‌های RNA-seq به شکل FASTQ تولید شد. قبل از تراز خوانش‌ها، برای کنترل کیفیت خوانش‌های خام، از ابزار FASTQ

(<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) استفاده شد و برای حذف آلودگی‌های احتمالی، خوانش‌ها پیش‌فیلتر شدند. پیرایش باکیفیت، تعداد خوانش‌های خوب را افزایش داد و دقت اندازه‌گیری فراوانی را بهبود بخشید. نوکلئوتیدهای باکیفیت پایین و توالی‌های آداپتور در داده‌های خام توسط ابزار BBDuk 38.87 (BBtools, California, USA) پیرایش شد (DOE Joint Genome Institute, USA). BBDuk برای از بین بردن آلودگی خوانش‌ها با استفاده از kmers توسعه‌یافته است (<https://anaconda.org/bioconda/bbmap>). پس از پیرایش، برای مشخص کردن این‌که خوانش‌ها از کجای

6.8) برای تفسیر، مشاهده و کشف یکپارچگی مورد بررسی قرار گرفت (Huang et al., 2009). مسیرهای KEGG و شرایط GO با مقدار $p < 0.05$ به عنوان داده‌های آماری معنی‌دار در نظر گرفته شدند

-اعتبارسنجی نتایج RNA-seq با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز رونویسی معکوس کمی: نمونه‌های RNA از گروه‌های آزمایش با استفاده از کیت (RNA

SinaPoreSinaClon, Iran) استخراج و سپس با DNase I تیمار شد. با استفاده از اندازه‌گیری‌های طیف‌سنجی در ۲۳۰، ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر، کمیت و کیفیت استخراج RNA ارزیابی شد. نمونه‌های RNA با نسبت جذب ۲/۲-۱/۹ در OD260/280 و بیشتر از ۲ در OD260/230 برای سنتز cDNA استفاده شد.

cDNA تک‌رشته‌ای از ۲ میکروگرم RNA کل و با استفاده از ترانس کریپتاز معکوس و پرایمر هگزامر تصادفی ساخته شد. برای انجام این کار، طبق دستورالعمل سازنده از کیت RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) استفاده گردید.

برای اعتبارسنجی داده‌های RNA-seq، نمونه‌های RNA کل در گروه آزمایش با (qRT-PCR) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (Thermo Fisher Scientific). یک میکروگرم از نمونه‌های RNA به cDNA رونویسی معکوس شد. پنج ژن تنظیم مثبت

شامل TLR2B، TLR4، TLR7، IL1R2 و MyD88 انتخاب شدند. همه پرایمرهای qRT-PCR با استفاده از Primer-BLAST

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) طبق جدول ۱ طراحی شدند.

ژنوم مرغ سرچشمه گرفته است، قرائت‌های تمیز با ژنوم مرجع (GCA_000002315.5) با استفاده از STAR (spliced transcripts alignment to a reference) تراز گردید. فایل تفسیر شده و ژنوم مرجع از پایگاه داده Ensembl به دست آمد و نمایه‌سازی ژنوم با استفاده از STAR "run Mode genome Generate" ساخته شد.

-شناسایی ژن‌های تغییر بیان یافته: ژن‌های تغییر بیان یافته (differentially expressed genes) با استفاده از edgeR 3.28.1 که یک بسته از زبان برنامه نویسی R می‌باشد، شناسایی شدند و با استفاده از ژنوم مرجع (gallus gallus reference national center for biotechnology) استخراج شده از مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (information) هم‌تراز شدند. ژن‌هایی با مقدار $p < 0.05$ و تغییر لگاریتم $1 < \text{LogFC} < 1$ به عنوان DEGs شناسایی شدند. جهت مقایسه سطح بیان ژن، DEGs بین گروه‌ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای مشاهده شکل DEGs، با استفاده از نرم‌افزار R 1.0.12 (the heatmap package; <https://cloud.r-project.org/web/packages/pheatmap>) یک نقشه حرارتی ایجاد گردید. نمودار MD حاوی تغییر لگاریتم DEG در گروه آزمایش در مقایسه با گروه کنترل و همچنین میانگین فراوانی هر ژن، با استفاده از نرم‌افزار R (MD package) ساخته شد.

-تجزیه و تحلیل‌های عملکردی: برای تعیین نقش بیولوژیکی DEGs، اصطلاحات هستی‌شناسی ژن (ontology) شامل (اجزاء سلولی، فرآیند بیولوژیکی و عملکرد مولکولی و مسیرهای دایره المعارف ژن و ژنوم کیوتو (KEGG) با استفاده از پایگاه داده دیوید (<https://david.ncicrf.gov/>) نسخه ۶/۸) (version ۶/۸)

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده در q RT-PCR

اندازه (bp)	محل نوکلوتید اگزون	پرایمر برگشت (۵'-۳')	محل نوکلوتید اگزون	پرایمر رفت (۵'-۳')	ژن‌ها
۱۴۰	Exon 4 ۷۲۲-۷۰۴	CACATTCATCACTTCCAG	Exon 3 ۵۸۳-۶۰۱	CAAACCTGAAGCTGTGTGTG	<i>MyD88</i>
۱۰۲	Exon 2 ۱۶۴۴-۱۶۲۶	GCACACATTATCTTTGGGC	Exon 2 ۱۵۴۳-۱۵۶۰	CGTATCTCTCCAGCATCC	<i>TLR7</i>
۱۶۱	Exon 2 ۱۸۳-۱۶۶	CAGGGTGGTGTGGGAT	Exon 1 ۲۳-۳۸	CCGCGCTGACTCTTGG	<i>TLR4</i>
۲۲۱	Exon 8 ۱۰۴۹-۱۰۳۲	CTTCCTGCTTGACCCGTG	Exon 7 ۸۲۹- ۸۴۸	CGTGGAATGGTTAGCGAATG	<i>IL1R2</i>
۱۶۱	Exon 3 ۳۶۰۹-۳۵۹۱	GAGAAATGGCAGTTGCAGT	Exon 3 ۳۴۴۹-۳۴۶۷	GTGAGATTCCAGACATGTG	<i>TLR2B</i>

یافته‌ها

مشخصات بیان ژن: میانگین طول خوانش‌ها حدود ۱۰۰ جفت باز توسط پلتفرم Illumina HiSeq 2000 و توالی‌یابی رشته‌ای خاص با انتهای جفت تولید شد. میانگین تعداد خوانش‌ها حدود ۴۰ میلیون خوانش در هر نمونه بود.

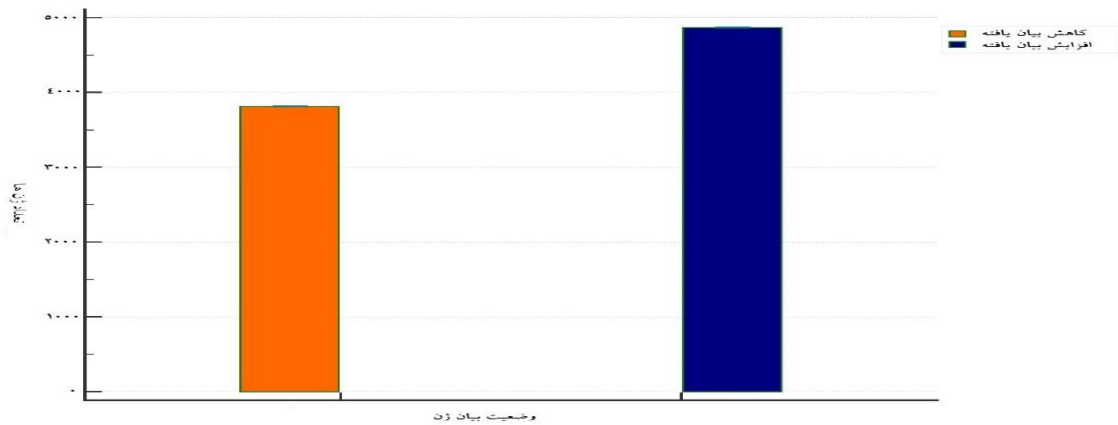
جدول ۲ تعداد خوانش‌های نقشه‌برداری شده، خوانش‌های پیرایش شده و خوانش‌های خام و همچنین کارایی نقشه‌برداری برای همه نمونه‌ها را نشان می‌دهد.

qRT-PCR با استفاده از کیت qPCR Green Master (Jena Bioscience)، طبق دستورالعمل سازنده انجام شد. شرایط PCR شامل یک دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و به دنبال آن ۴۰ چرخه PCR با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه با استفاده از Rotor-Gene Q (Qiagen) Real-time PCR از روش $-\Delta\Delta Ct^2$ برای تجزیه و تحلیل بیان نسبی ژن‌های هدف استفاده شد و GAPDH به عنوان یک ژن تنظیم‌کننده درون‌زا برای عادی‌سازی سطوح بیان استفاده شد. تمامی نمونه‌ها در سه تکرار مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

جدول ۲- تجزیه و تحلیل نسبت خوانش‌ها (خام، بریده‌شده، و نقشه‌برداری) در گروه آزمایش

نام نمونه	تعداد خوانش‌های خام	تعداد خوانش‌ها پس از برش	تعداد خوانش‌های برش شده منحصربه‌فرد که به ژنوم مرجع نقشه‌برداری می‌شوند
گروه کنترل ۱	۳۹۹۶۰۵۶۶	۳۹۶۰۰۹۲۰ (درصد ۹۹/۱)	۳۳۲۶۴۷۲۲ (درصد ۸۴)
گروه کنترل ۲	۳۹۹۶۷۵۶۶	۳۹۰۸۱۲۷۹ (درصد ۹۷/۸)	۳۳۶۱۵۹۲۰ (درصد ۸۶)
گروه آزمایش ۱	۳۹۸۹۸۶۵۶	۳۸۷۰۱۶۹۶ (درصد ۹۷)	۳۲۱۲۲۴۰۷ (درصد ۸۳)
گروه آزمایش ۲	۳۹۸۹۹۶۵۶	۳۸۳۰۳۶۶۹ (درصد ۹۶)	۳۱۴۰۹۰۰۹ (درصد ۸۱)

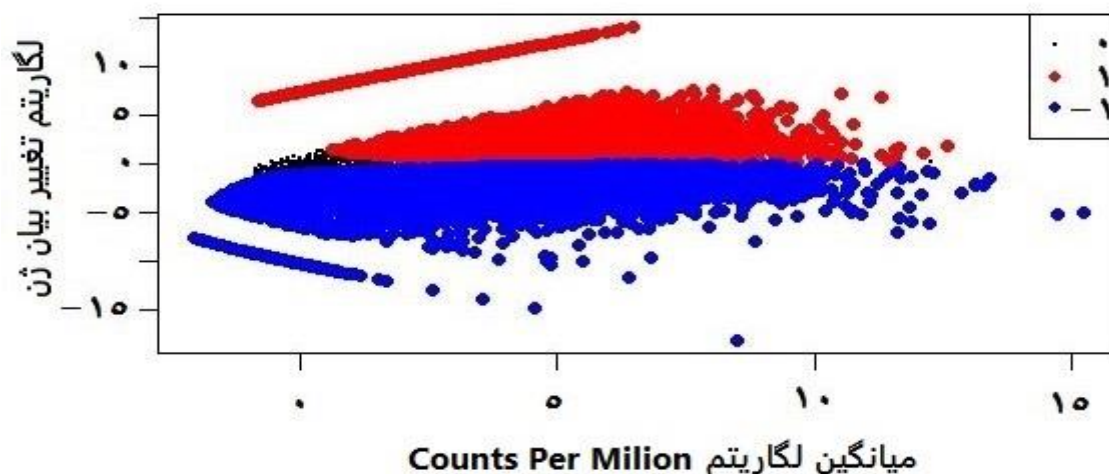
از بین تمام ژن‌های تفسیر شده در ژنوم مرغ، ۸۶۸۳ (با ۴۸۶۹ ژن افزایش بیان یافته و ۳۸۱۴ ژن کاهش بیان یافته)، در گروه آزمایش در مقایسه با گروه کنترل به عنوان DEG شناسایی شدند (شکل ۲).



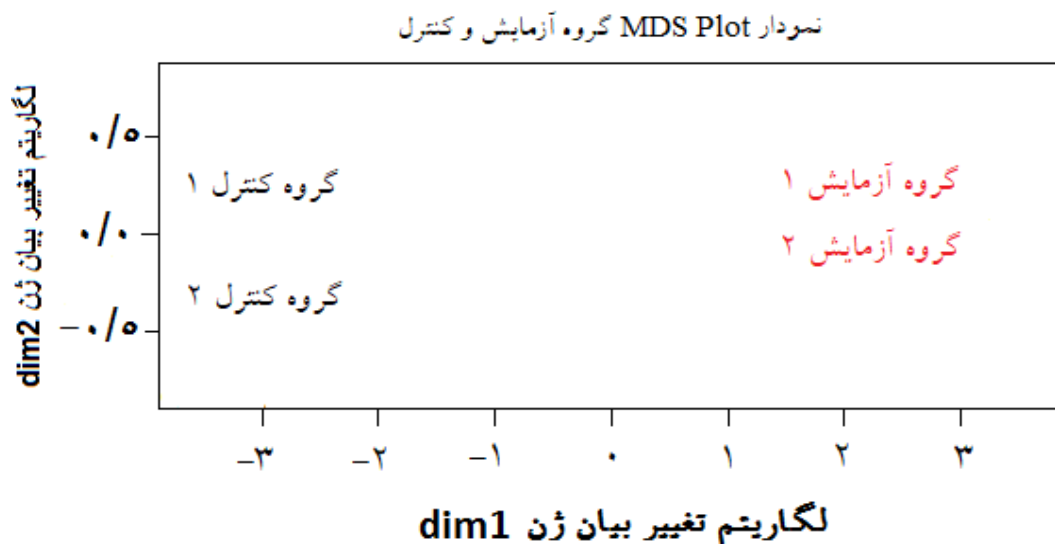
شکل ۲- وضعیت بیان ژن گروه آزمایش در بافت نای دو روز پس از عفونت

نمودار MD، نمودار MDS و نقشه حرارتی DEG ها در گروه‌های کنترل و آزمایش بترتیب در شکل‌های ۳ تا ۵ نشان داده شده است.

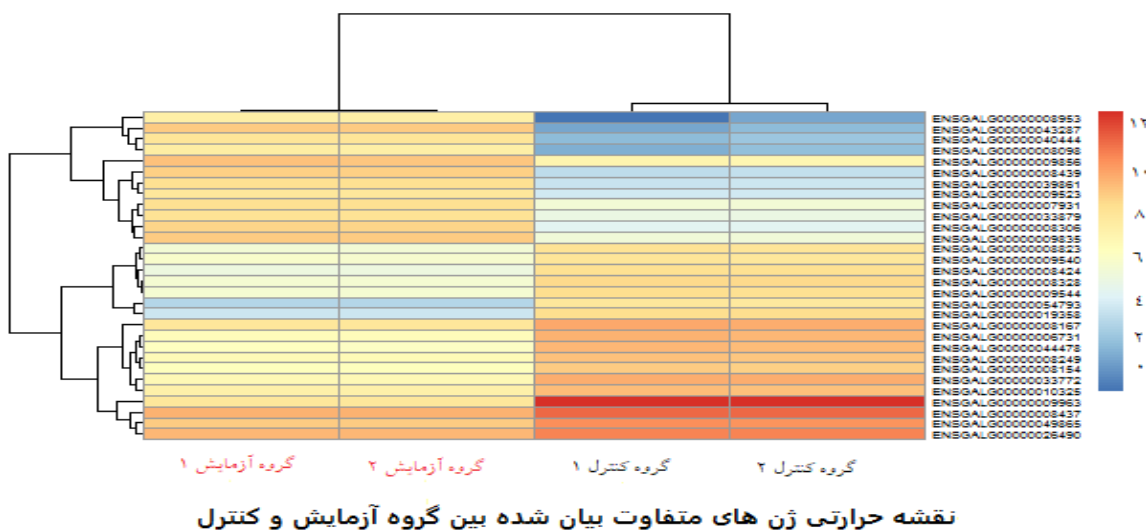
نمودار MD Plot گروه آزمایش در مقابل گروه کنترل



شکل ۳- نمودار MD. افزایش و کاهش بیان‌های قابل توجه DEG ها در نمودار MD به ترتیب با رنگ‌های قرمز و آبی مشخص می‌شوند.



شکل ۴- نمودار MDS. تکرارهای هر یک از گروه‌ها در یک کلاستر قرار دارند. این امر نشان‌دهنده هموزن بودن تکرار هر یک از گروه‌ها و کیفیت بالای توالی یابی است همچنین بین کلاستر گروه کنترل و گروه بیمار فاصله وجود دارد که این امر نشان می‌دهد بیان ژن در گروه بیمار در مقایسه با گروه کنترل متفاوت است.



شکل ۵- نقشه حرارتی DEG ها بین گروه آزمایش و گروه کنترل. افزایش غلظت رنگ‌ها به سمت قرمز نشان‌دهنده افزایش بیان و به سمت آبی نشان‌دهنده کاهش بیان ژن می‌باشند.

شد. در مطالعه حاضر، پنج مسیر بیشتر غنی شده GO در همه دسته‌ها (اجزای سلولی، عملکرد مولکولی و

تفسیر عملکردی DEGs: دسته‌بندی‌های عملکردی ممکن DEG با انجام یک تحلیل عملکردی نشان داده

فرآیندهای بیولوژیکی)، مربوط به ژن‌های افزایش‌بیان‌یافته در گروه آزمایشی در جدول ۳ فهرست شده‌اند. علاوه بر این، پنج مسیر بیشتر غنی‌شده GO در تمام دسته‌ها مربوط به ژن‌های کاهش‌بیان‌یافته در گروه آزمایشی در جدول ۴ نشان داده شده‌اند.

جدول ۳- مقایسه آنالیز آنتولوژی ژن‌ها (فرایندهای بیولوژیکی، اجزای سلولی و عملکردهای مولکولی) برای DEG‌های افزایش‌بیان‌یافته (الف-ج).

FDR	p-value(-log)	تعداد ژن مشاهده‌شده	توضیحات مسیر	نوع آنالیز آنتولوژی ژن
۳/۰۰	۱۰/۴۶	۸۰۵	cytoplasm	الف- اجزای سلولی (افزایش بیان گروه آزمایش)
۱/۶۰	۹/۴۴	۳۲۴	cytosol	
۵/۰۰	۶/۷۶	۱۲۲	perinuclear region of cytoplasm	
۱/۴۰	۵/۱۹	۶۴	lysosomal membrane	
۱/۴۰	۵/۱۱	۴۲۸	plasma membrane	
۳/۵۰	۱۰/۶۵	۴۱۴	ATP binding	ب- عملکردهای مولکولی (افزایش بیان گروه آزمایش)
۳/۹۰	۷/۳۰	۳۰	Rab GTPase binding	
۱/۵۰	۶/۵۵	۷۶	GTPase activator activity	
۱/۵۰	۵/۴۲	۸۵	protein serine/threonine kinase activity	
۷/۳۰	۴/۶۳	۶۳	ubiquitin-protein transferase activity	
۱/۱۰	۷/۶۷	۱۱۴	intracellular signal transduction	ج- فرایندهای بیولوژیکی (افزایش بیان گروه آزمایش)
۵/۲۰	۵/۷۲	۵۶	protein ubiquitination involved in ubiquitin-dependent protein catabolic process	
۷/۰۰	۵/۴۲	۵۲	peptidyl-serine phosphorylation	
۱/۶۰	۴/۹۲	۱۹	regulation of vesicle fusion	
۲/۴۰	۴/۶۷	۳۰	regulation of Rho protein signal transduction	

جدول ۴- مقایسه آنالیز آنتولوژی ژن‌ها (فرایندهای بیولوژیکی، اجزای سلولی و عملکردهای مولکولی) برای DEG‌های کاهش‌بیان‌یافته (الف-ج).

FDR	p-value(-log)	تعداد ژن مشاهده‌شده	توضیحات مسیر	نوع آنالیز آنتولوژی ژن
۵/۷۰	۱۵/۰۸	۳۷	cytosolic large ribosomal subunit	الف- اجزای سلولی (کاهش بیان گروه آزمایش)
۶/۳۰	۷/۷۴	۲۱	cytosolic small ribosomal subunit	
۱/۴۰	۵/۲۲	۲۰	mitochondrial respiratory chain complex I	
۴/۷۰	۳/۵۶	۱۵	perikaryon	
۷/۰۰	۳/۲۹	۸۳	extracellular region	
۹/۶۰	۱۹/۱۱	۷۹	structural constituent of ribosome	ب- عملکردهای مولکولی (کاهش بیان گروه آزمایش)
۱/۹۰	۸/۵۰	۱۰۶	sequence-specific DNA binding	
۹/۵۰	۷/۶۳	۱۸۷	poly(A) RNA binding	
۵/۳۰	۳/۷۶	۱۵	NADH dehydrogenase (ubiquinone) activity	
۸/۱۰	۳/۴۹	۱۶	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity	
۷/۷۰	۱۵/۷۲	۷۰	translation	ج- فرایندهای بیولوژیکی (کاهش بیان گروه آزمایش)
۵/۲۰	۳/۶۰	۱۰۹	regulation of transcription, DNA-templated	
۵/۲۰	۳/۳۳	۱۱	cytoplasmic translation	
۵/۲۰	۳/۲۹	۸	uterus development	
۹/۸۰	۲/۹۲	۵۷	multicellular organism development	

-تجزیه و تحلیل مسیر KEGG: پس از تجزیه و تحلیل آماری، سطوح بیان ژن بین دو گروه برای تجزیه و تحلیل DEG مقایسه شد. برای درک بهتر نقش‌های بیولوژیکی DEGs، مسیرهای KEGG غنی‌سازی شدند (Kanehisa *et al.*, 2019). مسیرهای KEGG به‌طور معنی‌داری در زیرمجموعه ژن‌های افزایش بیان یافته و کاهش بیان یافته در هر گروه غنی‌سازی شد. تجزیه و تحلیل

غنی‌سازی مسیر KEGG نشان داد که ژن‌های افزایش بیان یافته بیشتر در مسیرهای سیگنال دهی نقش دارند (سیگنال‌دهی TLR، مسیر سیگنالینگ MAPK و مسیرهای آپوپتوز (جدول ۵). علاوه بر این، تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مسیر KEGG ژن‌های کاهش بیان یافته در جدول ۶ ارائه شده است.

جدول ۵- تجزیه و تحلیل مسیر KEGG برای DEG های افزایش بیان یافته

FDR	p-value(-log)	تعداد ژن مشاهده شده	توضیحات مسیر KEGG	
۸/۲۰	۸/۲۹	۵۸	Phosphatidylinositol signaling system	۱
۲/۲۰	۶/۵۵	۴۴	Inositol phosphate metabolism	۲
۲/۸۰	۵/۲۷	۵۴	Insulin resistance	۳
۳/۳۰	۵/۰۸	۶۵	Ubiquitin mediated proteolysis	۴
۹/۷۰	۴/۵۲	۸۸	Focal adhesion	۵
۱/۲۰	۴/۳۴	۳۱	mTOR signaling pathway	۶
۱/۶۰	۴/۱۴	۵۹	Insulin signaling pathway	۷
۱/۶۰	۴/۱۰	۹۷	MAPK signaling pathway	۸
۱/۲۰	۳/۱۵	۹۶	Endocytosis	۹
۱/۵۰	۳/۰۱	۴۰	ErbB signaling pathway	۱۰
۱/۷۰	۲/۹۲	۷۹	Regulation of actin cytoskeleton	۱۱
۲/۲۰	۲/۷۶	۳۱	VEGF signaling pathway	۱۲
۳/۴۰	۲/۵۵	۴۱	Toll-like receptor signaling pathway	۱۳
۳/۶۰	۲/۵۰	۱۵	Regulation of autophagy	۱۴
۵/۴۰	۲/۲۹	۲۸	Apoptosis	۱۵

تجزیه و تحلیل مسیرها با استفاده از DEG بین گروه کنترل و آزمایش. FDR < 0.05 به عنوان آستانه‌ای برای انتخاب مسیرهای KEGG استفاده شد.

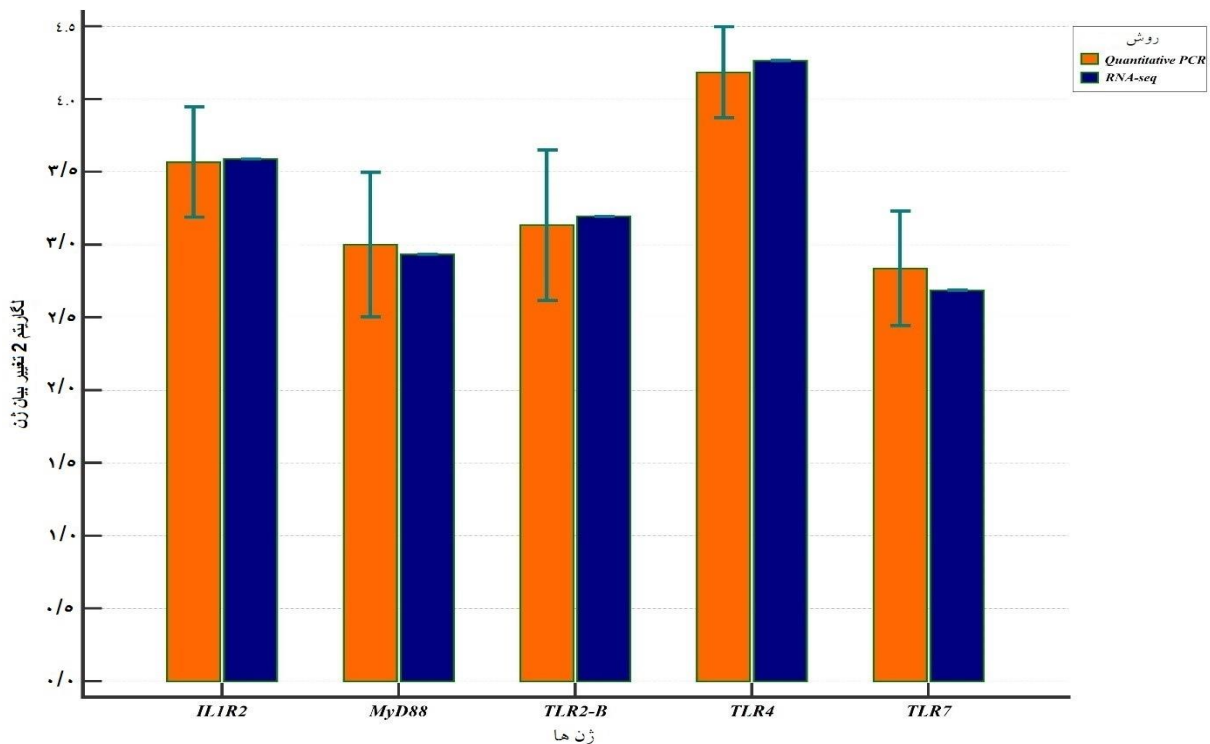
جدول ۶- تجزیه و تحلیل مسیر KEGG برای DEG های کاهش بیان یافته

FDR	p-value(-log)	تعداد ژن مشاهده شده	KEGG مسیر توضیحات	
۱/۵۰	۳۰/۰۲	۸۷	Ribosome	۱
۱/۲۰	۹/۷۹	۵۹	Oxidative phosphorylation	۲
۶/۸۰	۳/۸۸	۸۸	Neuroactive ligand-receptor interaction	۳
۷/۸۰	۲/۶۹	۱۶	Tyrosine metabolism	۴
۲/۲۰	۲/۱۵	۳۷	Spliceosome	۵
۱/۰۰	۱/۳۸	۱۳	Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	۶
۱/۰۰	۱/۲۹	۲۱	Cardiac muscle contraction	۷
۱/۰۰	۱/۲۷	۱۵	Tryptophan metabolism	۸
۱/۰۰	۱/۲۲	۱۴	Proteasome	۹
۱/۰۰	۱/۰۵	۱۲	Intestinal immune network for IgA production	۱۰

تجزیه و تحلیل مسیرها با استفاده از DEG بین گروه کنترل و آزمایش. FDR < 0.05 به عنوان آستانه‌ای برای انتخاب مسیرهای مهم KEGG استفاده شد.

نشان‌دهنده این است که یافته‌های RNA-seq قابل تکرار و دقیق هستند (شکل ۶).

نتیجه Real Time-PCR: یافته‌های تجزیه و تحلیل PCR کمی نشان داد که ژن‌های انتخاب شده به طور متفاوتی بین گروه آزمایش و کنترل بیان می‌شوند که این



شکل ۶- RT-PCR اعتبار سنجی ژن‌های افزایش بیان یافته که به طور تصادفی از نمونه‌های گرفته شده از گروه آزمایش انتخاب شده است (نوارهای خطای ۹۵ درصد CI را نشان می‌دهند).

بحث و نتیجه‌گیری

پاتوژن‌های تنفسی معمولاً از طریق سیستم تنفسی وارد بدن می‌شوند و نای تأثیر قابل توجهی بر تحریک سیستم ایمنی جوجه‌ها، به‌ویژه پس از چالش با عوامل بیماری‌زا مانند IBV دارد. گزارش شده است که IBV ابتدا از طریق دستگاه تنفسی وارد میزبان می‌شود (Awad *et al.*, 2014) بنابراین، پس از عفونت، بررسی تغییرات در Transcriptome می‌تواند اطلاعات مهمی در مورد فعل و انفعالات ویروس و میزبان ارائه دهد. بر این اساس، این مقاله باهدف شناسایی تغییرات رونوشت نای مرغ بین گروه شاهد و گروه چالش داده شده با IBV (IS/1494)، با تمرکز بر تعیین دقیق‌تر بیان ژن انجام شد. ما به ترتیب ۸۶۸۳ ژن شناخته شده را برای گروه آزمایش شناسایی کردیم که در مقایسه با گروه کنترل متفاوت بیان شدند.

در بررسی ما، تعداد ژن‌های افزایش بیان یافته بیشتر از ژن‌های کاهش بیان یافته بود و در گروه آلوده، القای مسیرهای ایمنی بیشتری مشاهده شد. مسیرهای ژنی کاهش بیان یافته در فرآیندهای متابولیک و تولید پروتئین و انرژی دسته‌بندی شدند. علاوه بر این، تعدادی از این ژن‌ها با استفاده از روش RT-PCR تأیید شدند.

ژن‌هایی که به‌طور متفاوت به عفونت پاسخ می‌دهند حاوی اطلاعات قابل توجهی در مورد مکانیسم‌های تنظیم‌کننده میزبان در برابر عفونت با IBV هستند (Xu *et al.*, 2019, Wang *et al.*, 2006). تجزیه و تحلیل ما سه مسیر سیگنالینگ را پیدا کرد که همگی در تحریک پاسخ‌های ایمنی ذاتی به عفونت نقش دارند. آن‌ها گیرنده‌های تشخیص الگو (PRRs)،

از جمله سیگنال دهی TLR، سیگنالینگ پروتئین کیناز فعال شده با میتوژن (MAPK) و مسیرهای آپوپتوز بودند.

پاسخ ایمنی ذاتی که می‌تواند توسط سدهای فیزیکی مانند پوست و غشاهای مخاطی ایجاد شود، اولین خط دفاعی در برابر عوامل بیماری‌زا است. سایر اجزایی که نقش‌های محافظتی غیراختصاصی ایفا می‌کنند PRRها، سیستم کمپلمان، سیتوکین‌ها، کموکاین‌ها، هتروفیل‌ها، ماکروفاژها، سلول‌های دندریتیک (DCs)، سلول‌های NK و سایر عوامل برای ارتباط سلول‌های ایمنی و آپوپتوز هستند. PRRها (مانند Toll Like Receptorها، RIG Like Receptorها و NOD like Receptorها) عوامل عفونی را سریع شناسایی می‌کنند. آن‌ها هر دو پاسخ ایمنی اختصاصی و ذاتی را آغاز می‌کنند (Chhabra *et al.*, 2015). TLRها کلیدهای عملکرد و کارایی سیستم ایمنی هستند زیرا ساختارهای محافظت شده را در بسیاری از عوامل بیماری‌زا شناسایی می‌کنند. تاکنون TLR1A، TLR2A، TLR5، TLR7، TLR15، TLR21، TLR1B، TLR2B و TLR3 در جوجه‌ها شناسایی شده است (Paul *et al.*, 2013).

در جوجه‌ها، TLR3 و TLR7 محصولات ویروسی RNA را تشخیص می‌دهند (Chen *et al.*, 2013, Cook *et al.*, 2012). علاوه بر این، افزایش بیان mRNA ژن TLR3 و TLR7 در نای و ریه در طول عفونت‌های ویروسی شناسایی شد (Wang *et al.*, 2006, Miettinen *et al.*, 2001).

مسیر سیگنالینگ TLR3 اینترفرون ضد ویروسی نوع I (IFN- α/β) تولید می‌کند و مسیر سیگنالینگ TLR7

محل التهابی جذب می‌شوند (Chhabra *et al.*, 2015). نشان داده شده است که هتروفیل‌ها سلول‌های آلوده به IBV را با آزادسازی آنزیم‌ها از بین می‌برند (Fulton *et al.*, 1997).

بر اساس تعدادی از مطالعات، ماکروفاژهای تنفسی ممکن است تکثیر IBV را در بافت‌های تنفسی محدود کنند (Kameka *et al.*, 2014, Matthijs *et al.*, 2009). ماکروفاژها به‌عنوان منبع اکسید نیتریک (NO)، در دفاع در برابر عفونت‌های میکروبی و همچنین در تولید عوامل مؤثر و تنظیم‌کننده‌های ایمنی مهم نقش دارند (He *et al.*, 2011, Ariaans *et al.*, 2008). آن‌ها همچنین نقش مهمی به‌عنوان سلول‌های ارائه‌دهنده آنتی‌ژن دارند (Wu and Kaiser., 2011). بیان این سیتوکین‌ها و کموکاین‌های پیش‌التهابی از درگیری ماکروفاژها حمایت می‌کند و ماکروفاژهای فعال‌شده انواع سیتوکین‌های پیش‌التهابی تولید می‌کنند و واکنش التهابی را از طریق تنظیم افزایش بیان چند سایتوکین التهابی تعدیل می‌کنند (Holmes and Darbyshire, 1978). این نشان می‌دهد که گیرنده‌های سلول میزبان ممکن است ارگانیسم‌ها را شناسایی کرده و سیتوکین‌ها را برای مقابله با مهاجم پاتوژن ترشح کنند. مسیر سیگنالینگ MAPK در گروه آزمایش افزایش بیان یافته بود.

یکی از مهم‌ترین پاسخ‌های ضدویروسی میزبان القای آپوپتوز است که می‌تواند به‌طور مؤثر تکثیر ویروس را پس از عفونت سلول‌های هدف محدود کند (Hay and Kannourakis, 2002). عفونت‌های ویروسی مسیرهای انتقال سیگنال را تحریک می‌کنند که بر تنظیم بسیاری از رویدادها مانند تمایز/تکثیر سلولی، آپوپتوز،

سیتوکین‌های پیش‌التهابی تولید می‌کند (Guillot *et al.*, 2005). در یک مطالعه مروری، بیان ژن‌های TLR1LA، TLR1LB، TLR2 و TLR3 در سلول‌های اپیتلیال نای جوجه‌های سه‌هفته‌ای که با سویه ضعیف شده IBV ماساچوست (IBV-Mass) واکسینه شده بودند به‌طور قابل توجهی افزایش بیان یافت (Guo *et al.*, 2008). مسیر سیگنالینگ TLR و آپوپتوز معمولاً در گروه آزمایشی ما افزایش بیان داشت که شامل ژن‌های کدکننده TLR2A، TLR3، TLR4، TLR5 است. مطابق با مطالعه حاضر، مطالعات قبلی افزایش بیان TLR15 را در ریه‌های جوجه‌های آلوده به آنفلوآنزای H9N2، بیماری مارک و بورس عفونی نشان داده‌اند (Le Goffic *et al.*, 2007).

وانگ و همکاران در سال ۲۰۰۶ افزایش بیان TLR3 را در روز سوم عفونت با IBV-M41 نشان داد (Wang *et al.*, 2006). گزارش شده است که TLR3 به‌طور معنی‌داری به ایمنی‌زایی ویروسی کمک می‌کند (Liu *et al.*, 2007, Wang *et al.*, 2006, Le Goffic *et al.*, 2007). علاوه بر این، طبق گفته چن و همکاران در سال ۲۰۱۳، TLR7 عمدتاً توالی‌های RNA تک‌رشته‌ای (ssRNA) ویروس‌های RNA را که از طریق اندوسیتوز وارد آندوزوم‌ها می‌شوند، شناسایی می‌کند. در این مطالعه ژن‌های TLR2A، TLR3، TLR4 و TLR5 در گروه آزمایش افزایش بیان داشتند (Chen *et al.*, 2013).

به‌عنوان یکی از مهم‌ترین مسیرها، مسیر سیگنالینگ MAPK برای ارتقای پاسخ التهابی از طریق فعال‌سازی ماکروفاژها ضروری است (Khatri and Sharma, 2006). هتروفیل‌های فاگوسیتیک و ماکروفاژها از جمله سلول‌هایی هستند که با فعال شدن سیستم ایمنی ذاتی به

منوسیت‌ها، ماکروفاژها را متمایز می‌کند (Garceau *et al.*, 2010). در این مطالعه، افزایش بیان ژن‌های SPI1 در گروه آزمایش یافت شد. افزایش بیان برای مجموعه‌ای از سایر ژن‌های مرتبط با ایمنی نیز شامل ژن‌های سیستم مکمل C1R، C4A، C1S و مشاهده شد. بر اساس نتایج، می‌توان فرض کرد که القای IFN- α باعث تحریک بیان قوی‌تر ISG و IFI در گروه آزمایش می‌شود. از سوی دیگر، می‌توان گفت که IFN- α تأثیر قابل توجهی بر تحریک ISG و IFI دارد. بنابراین، در مجموع با توجه به افزایش بیان تعدادی از TLRها، مسیر سیگنالینگ ISG، MAPK و ژن‌های آپوپتوزیس ما فکر می‌کنیم که گروه آزمایش ممکن است پاسخ ایمنی قوی‌تری به عفونت در مقایسه با گروه کنترل داشته باشد. مطالعه حاضر جوجه‌های SPF را از نظر تغییرات رونوشت در بافت‌های نای آن‌ها دو روز پس از چالش با عفونت با IBV مورد بررسی قرار داد. با در نظر گرفتن تعداد بیشتر ژن‌های افزایش بیان یافته که دو روز پس از عفونت در گروه آزمایش شناسایی شده‌اند، به‌طور آزمایشی می‌توان این فرضیه را مطرح کرد که این گروه پاسخ ایمنی قوی‌تری در برابر عفونت دارد. این موضوع می‌تواند در مطالعات آتی بیشتر مورد بررسی قرار گیرد.

سپاسگزاری

نویسندگان مایل‌اند از مرکز ملی محاسبات با عملکرد عالی شیخ بهایی (SBNHPCC) برای اهدای منابع و زمان محاسباتی تشکر کنند. SBNHPCC توسط معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری و دانشگاه صنعتی اصفهان پشتیبانی می‌شود.

تولید سیتوکین و همچنین مرگ/بقای سلولی و تحریک پاسخ‌های ایمنی تأثیر می‌گذارند (Hynes *et al.*, 2013, Zhang and Liu, 2002). مطالعات نشان داده‌اند که IBV باعث القای آپوپتوز سلولی در سلول‌های آلوده می‌شود (Chhabra *et al.*, 2015, Li *et al.*, 2007). در این مطالعه آپوپتوز و تنظیم اتوفازی در گروه آزمایش در مراحل اولیه عفونت افزایش بیان داشت.

ژن‌های دخیل در مسیر پیام‌رسانی آپوپتوز از جمله CASP3، CASP6، CASP7 و عمدتاً افزایش بیان داشته و به‌عنوان فاکتورهای بقای نقش دارند. گزارش شده است که PAMP‌های مختلف TLRهای مختلف را فعال می‌کنند و رونویسی اینترفرون‌های نوع I را القاء می‌کنند. فعال‌سازی اینترفرون به نوبه خود باعث تولید ژن تحریک‌شده با اینترفرون (ISG) می‌شود (Cong *et al.*, 2013, Matsumoto and Seya, 2008). در این مقاله، افزایش بیان برخی از ISGها و عوامل تنظیم‌کننده اینترفرون (IRFs) از جمله IRF1، IFI35، IFIH1، IFIT5 و MYD88 و RSAD2 مشاهده شد.

به‌عنوان عضوی از پروتئین‌های خانواده TLR، TLR3 اینترفرون نوع I را القاء می‌کند و RNA دو رشته‌ای ویروسی (dsRNA) را شناسایی می‌کند (Matsumoto and Seya, 2008). در حین تکثیر، کروناویروس‌ها قادر به تولید واسطه‌های dsRNA هستند (Xu *et al.*, 2019). افزایش بیان ژن SPI1 در جوجه‌های آلوده به IBV در سویه Mass توسط Guo و همکاران در سال ۲۰۰۸ گزارش شده است (Guo *et al.*, 2008). در راستای این یافته‌ها، افزایش سطح بیان ژن SPI1 در گروه آزمایش مشاهده شد. SPI1 با ایفای نقش کلیدی در مسیرهای سیگنال‌دهی ماکروفاژها و

تعارض منافع

روابط شخصی رقیب شناخته شده‌ای ندارند که به نظر بر

کار گزارش شده در این مقاله تأثیر بگذارد.

همه نویسندگان نسخه نهایی را برای انتشار تأیید

کردند. نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ منافع مالی یا

منابع

- Ariaans, M. P., Matthijs, M. G., van Haarlem, D., van de Haar, P., van Eck, J. H., Hensen, E. J. and Vervelde, L. (2008), "The role of phagocytic cells in enhanced susceptibility of broilers to colibacillosis after infectious bronchitis virus infection", *Veterinary Immunology and Immunopathology*, Vol. 123 No. 3-4, pp. 240-250.
- Awad, F., Chhabra, R., Baylis, M. and Ganapathy, K. (2014), "An overview of infectious bronchitis virus in chickens", *World's Poultry Science Journal*, Vol. 70 No. 2, pp. 375-384.
- Barjesteh, N., O'Dowd, K. and Vahedi, S. M. (2020), "Antiviral responses against chicken respiratory infections: Focus on avian influenza virus and infectious bronchitis virus", *Cytokine*, Vol. 127, p. 154961.
- Chen, S., Cheng, A. and Wang, M. (2013), "Innate sensing of viruses by pattern recognition receptors in birds", *Veterinary research*, Vol. 44 No. 1, pp. 1-12.
- Chhabra, R., Chantrey, J. and Ganapathy, K. (2015), "Immune responses to virulent and vaccine strains of infectious bronchitis viruses in chickens", *Viral immunology*, Vol. 28 No. 9, pp. 478-488.
- Cong, F., Liu, X., Han, Z., Shao, Y., Kong, X. and Liu, S. (2013), "Transcriptome analysis of chicken kidney tissues following coronavirus avian infectious bronchitis virus infection", *BMC genomics*, Vol. 14 No. 1, pp. 1-13.
- Cook, J. K., Jackwood, M. and Jones, R. (2012), "The long view: 40 years of infectious bronchitis research", *Avian Pathology*, Vol. 41 No. 3, pp. 239-250.
- Feizi, A. and Kaboli, K. (2012), "Comparative survey on ascites syndrome incidence rate in broiler chickens infected and non-infected by infectious bronchitis", *Veterinary Clinical Pathology The Quarterly Scientific Journal*, Vol. 6 No. 2 (22) Summer, pp. 1561-1571.
- Fulton, R., Thacker, H., Reed, W. and DeNicola, D. (1997), "Effect of Cytoxan®-Induced Heteropenia on the Response of Specific-Pathogen-Free Chickens to Infectious Bronchitis", *Avian diseases*, pp. 511-518.
- Ganapathy, K., Wilkins, M., Forrester, A., Lemiere, S., Cserep, T., McMullin, P. and Jones, R. (2012), "QX-like infectious bronchitis virus isolated from cases of proventriculitis in commercial broilers in England", *The Veterinary record*, Vol. 171 No. 23, p. 597.

- Garceau, V., Smith, J., Paton, I. R., Davey, M., Fares, M. A., Sester, D. P., Burt, D. W. and Hume, D. A. (2010) "Pivotal Advance: Avian colony-stimulating factor 1 (CSF-1), interleukin-34 (IL-34), and CSF-1 receptor genes and gene products", *Journal of leukocyte biology*, Vol. 87 No. 5, pp. 753-764.
- Gholami-Ahangaran, M., Shoushtari, A., Doosti, A., Fathi Hafshejani, E. and Zia-Jahromi, N. (2012), "Detection of infectious bronchitis virus (4/91 type) in broiler chickens in Chahrmahal-va-bakhtiyari province", *Veterinary Clinical Pathology The Quarterly Scientific Journal*, Vol. 6 No. 2 (22) Summer, pp. 1543-1547.
- Guillot, L., Le Goffic, R., Bloch, S., Escriou, N., Akira, S., Chignard, M. and Si-Tahar, M. (2005), "Involvement of toll-like receptor 3 in the immune response of lung epithelial cells to double-stranded RNA and influenza A virus", *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 280 No. 7, pp. 5571-5580.
- Guo, X., Rosa, A. J., Chen, D.-G. and Wang, X. (2008), "Molecular mechanisms of primary and secondary mucosal immunity using avian infectious bronchitis virus as a model system", *Veterinary immunology and immunopathology*, Vol. 121 No. 3-4, pp. 332-343.
- Hay, S. and Kannourakis, G. (2002), "A time to kill: viral manipulation of the cell death program", *Journal of General Virology*, Vol. 83 No. 7, pp. 1547-1564.
- He, H., Genovese, K. J. and Kogut, M. H. (2011), "Modulation of chicken macrophage effector function by TH1/TH2 cytokines", *Cytokine*, Vol. 53 No. 3, pp. 363-369.
- Holmes, H. and Darbyshire, J. (1978), "Induction of chicken interferon by avian infectious bronchitis virus", *Research in veterinary science*, Vol. 25 No. 2, pp. 178-181.
- Huang, D. W., Sherman, B. T. and Lempicki, R. A. (2009), "Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists", *Nucleic acids research*, Vol. 37 No. 1, pp. 1-13.
- Hynes, N. E., Ingham, P. W., Lim, W. A., Marshall, C. J., Massagué, J. and Pawson, T. (2013), "Signalling change: signal transduction through the decades", *Nature reviews Molecular cell biology*, Vol. 14 No. 6, pp. 393-398.
- Jackwood, M. W., Hall, D. and Handel, A. (2012), "Molecular evolution and emergence of avian gammacoronaviruses", *Infection, Genetics and Evolution*, Vol. 12 No. 6, pp. 1305-1311.
- Jackwood, M. W. and Wit, S. d. (2020), *Infectious Bronchitis, Diseases of poultry*.
- Jordan, B. (2017), "Vaccination against infectious bronchitis virus: a continuous challenge", *Veterinary microbiology*, Vol. 206, pp. 137-143.
- Kameka, A. M., Haddadi, S., Kim, D. S., Cork, S. C. and Abdul-Careem, M. F. (2014), "Induction of innate immune response following infectious bronchitis corona virus infection in the respiratory tract of chickens", *Virology*, Vol. 450, pp. 114-121.
- Kanehisa, M., Sato, Y., Furumichi, M., Morishima, K. and Tanabe, M. (2019), "New approach for understanding genome variations in KEGG", *Nucleic acids research*, Vol. 47 No. D1, pp. D590-D595.

- Khatri, M. and Sharma, J. M. (2006), "Infectious bursal disease virus infection induces macrophage activation via p38 MAPK and NF- κ B pathways", *Virus research*, Vol. 118 No. 1-2, pp. 70-77.
- Le Goffic, R., Pothlichet, J., Vitour, D., Fujita, T., Meurs, E., Chignard, M. and Si-Tahar, M. (2007), "Cutting Edge: Influenza A virus activates TLR3-dependent inflammatory and RIG-I-dependent antiviral responses in human lung epithelial cells", *The Journal of Immunology*, Vol. 178 No. 6, pp. 33۶۸-۳۳۷۲
- Li, F. Q., Tam, J. P. and Liu, D. X. (2007), "Cell cycle arrest and apoptosis induced by the coronavirus infectious bronchitis virus in the absence of p53", *Virology*, Vol. 365 No. 2, pp. 435-445.
- Liu, H., Yang, X., Zhang, Z., Li, J., Zou, W., Zeng, F. and Wang, H. (2017), "Comparative transcriptome analysis reveals induction of apoptosis in chicken kidney cells associated with the virulence of nephropathogenic infectious bronchitis virus", *Microbial pathogenesis*, Vol. 113, pp. 451-459.
- Liu, P., Jamaluddin, M., Li, K., Garofalo, R. P., Casola, A. and Brasier, A. R. (2007), "Retinoic acid-inducible gene I mediates early antiviral response and Toll-like receptor 3 expression in respiratory syncytial virus-infected airway epithelial cells", *Journal of virology*, Vol. 81 No. 3, pp. 1401-1411.
- Mahdavi, S., Zakeri, A. and Mehmannaavaz, Y. (2014), "Comparison of serum antibody titer of 8 types of commercial live infectious bronchitis vaccine in broiler chickens", *Veterinary Clinical Pathology The Quarterly Scientific Journal*, Vol. 8 No. 2 (30) Summer, pp. 473-479.
- Matsumoto, M. and Seya, T. (2008), "TLR3: interferon induction by double-stranded RNA including poly (I: C)", *Advanced drug delivery reviews*, Vol. 60 No. 7, pp. 805-812.
- Matthijs, M. G., Ariaans, M. P., Dwars, R. M., van Eck, J. H., Bouma, A., Stegeman, A. and Vervelde, L. (2009), "Course of infection and immune responses in the respiratory tract of IBV infected broilers after superinfection with *E. coli*", *Veterinary immunology and immunopathology*, Vol. 127 No. 1-2, pp. 77-84.
- Meir, R., Krispel, S., Simanov, L., Eliahu, D., Maharat, O. and Pitcovski, J. (2012), "Immune responses to mucosal vaccination by the recombinant S1 and N proteins of infectious bronchitis virus", *Viral immunology*, Vol. 25 No. 1, pp. 55-62.
- Miettinen, M., Sareneva, T., Julkunen, I. and Matikainen, S. (2001), "IFNs activate toll-like receptor gene expression in viral infections", *Genes & Immunity*, Vol. 2 No. 6, pp. 349-355.
- Najafi, H., Langeroudi, A. G., Hashemzadeh, M., Karimi, V., Madadgar, O., Ghafouri, S. A., Maghsoudlo, H. and Farahani, R. K. (2016), "Molecular characterization of infectious bronchitis viruses isolated from broiler chicken farms in Iran, 2014-2015", *Archives of virology*, Vol. 161 No. 1, pp. 53-62.
- Nawab, A., An, L., Wu, J., Li, G., Liu, W., Zhao, Y., Wu, Q. and Xiao, M. (2019), "Chicken toll-like receptors and their significance in immune response and disease resistance", *International reviews of immunology*, Vol. 38 No. 6, pp. 284-306.

- Paul, M. S., Brisbin, J. T., Abdul-Careem, M. F. and Sharif, S. (2013), "Immunostimulatory properties of Toll-like receptor ligands in chickens", *Veterinary immunology and immunopathology*, Vol. 152 No. 3-4, pp. 191-199.
- Raj, G. D. and Jones, R. (1997), "Infectious bronchitis virus: immunopathogenesis of infection in the chicken", *Avian Pathology*, Vol. 26 No. 4, pp. 677-706.
- Reed, L. J. and Muench, H. (1938), "A simple method of estimating fifty per cent endpoints", *American journal of epidemiology*, Vol. 27 No. 3, pp. 493-497.
- Wang, X., Rosa, A. J., Oliverira, H. N., Rosa, G. J., Guo, X., Travnicek, M. and Girshick, T. (2006), "Transcriptome of local innate and adaptive immunity during early phase of infectious bronchitis viral infection", *Viral immunology*, Vol. 19 No. 4, pp. 768-774.
- Wu, Z. and Kaiser, P. (2011), "Antigen presenting cells in a non-mammalian model system, the chicken", *Immunobiology*, Vol. 216 No. 11, pp. 1177-1183.
- Xu, P., Liu, P., Zhou, C., Shi, Y., Wu, Q., Yang, Y., Li, G., Hu, G. and Guo, X. (2019), "A Multi-omics study of chicken infected by nephropathogenic infectious bronchitis virus", *Viruses*, Vol. 11 No. 11, p. 1070.
- Zhang, W. and Liu, H. T. (2002), "MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells", *Cell research*, Vol. 12 No. 1, pp. 9-18.