

تفکیک سریع سویه‌های ویروس برونشیت عفونی طیور به روش آنالیز

HRM

علی مسعودیان^{۱*}، نریمان شیخی^۲، محمدحسن بزرگمهری فرد^۳

چکیده

بیماری برونشیت عفونی یک عفونت حاد کروناویروسی با شیوع بالا در گله‌های ماکیان است که سبب درگیری قسمت فوقانی دستگاه تنفس، سیستم کلیوی و تناسلی در مبتلایان می‌شود. با توجه به اهمیت شناسایی و تفکیک سویه‌های عامل این بیماری در تدوین برنامه‌های کنترلی و پیشگیرانه نظیر واکسیناسیون و زمانبر بودن اغلب روش‌های تشخیصی، یک آزمایش Real-Time PCR به همراه آنالیز HRM بر اساس شناسایی توالی قسمت 3' UTR ژن سویه‌های واکسن برونشیت عفونی، به عنوان ویروس‌های مرجع، طراحی شد تا از این طریق یک روش تشخیص و طبقه‌بندی سریع سویه‌های ویروس برونشیت عفونی پایه‌ریزی گردد. در این مطالعه دیده شد که سویه‌های مرجع واکسن براساس الگوی ذوب محصولات PCR با اندازه‌های ۴۰۰ تا ۴۳۰ bp و با محاسبه درصد اطمینان ژنوتایی (GCP)، به چهار گروه مجزا تفکیک گردیدند که در نهایت این نتایج منجر به معرفی یک مدل هندسی و محاسباتی برای طبقه‌بندی سریع و مطمئن این سویه‌ها براساس آنالیز HRM ناحیه 3' UTR شد.

واژگان کلیدی: آنالیز HRM، تفکیک سریع، ویروس برونشیت عفونی

تاریخ دریافت: ۹۱/۹/۹ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۱/۱۴

مقدمه

ویروس برونشیت عفونی (IBV) متعلق به گروه ۳ جنس کروناویروس‌ها (Coronavirus) و خانواده کروناویروسه (Coronaviridae) و راسته نیدوویرالز (Nidovirales) می‌باشد. این ویروس بسیار عفونت‌زا بوده و شیوع فراوانی در اکثر گله‌های مرغ در جهان دارد (۲). بیماری برونشیت عفونی سبب بروز مشکلات تنفسی و عوارض کلیوی و تولیدمثلی بطور مجزا و یا همراه هم می‌شود که در نتیجه شیوع آن در گله‌های گوشتی افت عملکرد گله و تلفات و در گله‌های تخم‌گذار، کاهش کیفیت پوسته تخم و تغییر غلظت آلبومین رخ داده که در نهایت

این امر سبب بروز ضررهای اقتصادی فراوان به گله‌های طیور می‌گردد. ویروس برونشیت عفونی دارای ۳ پروتئین اصلی ساختاری به نام‌های غشایی (M)، Spike(S) و نوکلئوکپسید (N) می‌باشد (۲). علاوه بر این پروتئین‌های اصلی ساختاری، این ویروس واجد دسته‌ای دیگر از پروتئین‌های کوچک به نام E می‌باشد که در شکل‌گیری ویریون نقش دارند. در این میان پروتئین S، نقش اساسی در اتصال ویروس به سلول میزبان و در نهایت تکثیر و عفونت‌زایی آن دارد. این پروتئین خود به دو تحت واحد S1 و S2 تقسیم می‌شود که S1 پروتئین اصلی ایجادکننده آنتی‌بادی محافظت‌کننده بوده و در حقیقت القاء کننده HI و VN می‌باشد. در این تحت واحد، ۳ ناحیه ثابت (Constant)، متغیر (Variable) و بسیار متغیر (Hyper Variable) وجود دارد که بر این اساس سروتیپ‌های مختلف این ویروس طبقه‌بندی می‌شوند (۲). از دهه ۱۹۳۰ که در آمریکا این بیماری برای اولین بار گزارش گردید، سویه‌های مختلفی از این ویروس در کشورهای مختلف شناسایی و طبقه‌بندی شده‌اند که پس از بررسی‌های مولکولی و اپیدمیولوژیک مشخص گردیده است که سویه‌های جدیدتر اغلب منتج از جهش‌های ژنتیکی و نوترکیبی بین تعدادی از سویه‌های قبلی این ویروس ظهور کرده‌اند. با توجه به عدم وجود روش درمانی مناسب برای این بیماری، رعایت اصول بهداشتی و واکسیناسیون از راهکارهای اصلی پیشگیری و کنترل این بیماری می‌باشند. بین سویه‌های مختلف این ویروس، واکنش ایمنی متقاطع بسیار اندک و در اغلب موارد واکسیناسیون گله‌ها با یک سویه خاص، امکان پیشگیری از

*۱- دانشجوی دکتری تخصصی بیماری‌های طیور، گروه بیماری‌های طیور، دانشکده علوم دامپزشکی، واحد علوم و

تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران a.masoudian@live.com

۲- استادیار گروه بیماری‌های طیور، دانشکده علوم دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳- استاد گروه بیماری‌های طیور، دانشکده علوم دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران

نسبت به شناسایی و طبقه‌بندی سویه‌های تحت بررسی اقدام نمود (۱۱ و ۴).

مواد و روش کار

به منظور انجام این مطالعه، تمامی واکسن‌های مورد استفاده در ایران، به عنوان سویه مرجع تهیه گردیدند. همچنین سویه M41 به منظور مقایسه با سایر واکسن‌های سویه ماسچوست تهیه شد (جدول ۱).

جدول ۱- مشخصات نمونه‌های مورد مطالعه

نام سویه	شرکت سازنده	کد	نمونه‌های مورد آنالیز (نام تجاری)
793/B	مریال فرانسه	Ma1	Gallivax IB88
793/B	اینتروت هلند	Ma2	Nobilis 4/91
Ma5	اینتروت هلند	Ma3	Nobilis Ma5+Clone30
H120	وترینا کرواسی	Ma4	Bronhikal SPF
H120	مؤسسه رزی ایران	Ma5	H120
H120	سوا مجارستان	Ma6	Cevac Vitabron L
H120	مریال فرانسه	Ma7	Bioral H120
M41		Ma8	M41

با استفاده از کیت استخراج RNA ایزی اسپین (Easy-spin) ساخت شرکت اینترون (iNtRonBiotechnology Inc.- South Korea)، ویروس واکسن‌ها و سویه M41 طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت، استخراج گردید. به منظور ساخت cDNA از کیت شرکت فرمتاز (Fermentas-Termo Fisher Scientific- Maryland USA) استفاده شد. بدین جهت ابتدا dNTP mix با غلظت ۱۰ میلی مول از طریق مخلوط نمودن ۱۰ میکرولیتر از هر dNTP (با غلظت اولیه ۱۰۰ میلی مول) در میکروتیوپ و سپس رساندن حجم نهایی آن به ۱۰۰ μ l تهیه شد. سپس واکنشگرها شامل محلول بافر X5 به میزان ۴ میکرولیتر، آنزیم ریبولاک (RiboLock enzyme) ۰/۵ μ l، نوکلئوتیدها (dNTP) ۲ μ l، آنزیم رونوشت برداری معکوس (RT-RevertAid) ۱ μ l، پرایمر تصادفی

وقوع بیماری با سویه‌های دیگر را میسر نمی‌سازد. همچنین در برنامه‌های واکسیناسیون فعلی بطور گسترده از واکسن‌های زنده استفاده شده که امکان بازگشت حدت این سویه‌ها در مزارع پرورشی همواره وجود دارد. بنابراین تشخیص منشاء ویروس شناسایی شده از این جهت که آیا عامل بیماری یک ویروس وحشی است، یا یک ویروس واکسینال افزایش حدت یافته و یا حتی یک سویه جدید ثبت نشده، اهمیت بسیاری در تنظیم یک برنامه موفق کنترلی در هر منطقه خواهد داشت (۵ و ۳، ۲). اغلب آزمایش‌های مولکولی که به منظور شناسایی ویروس برونشیت طیور انجام می‌شوند بر اساس تعیین توالی ژن S1 می‌باشند (۳)، که به علت احتمال بالای بروز جهش‌ها و نوترکیبی بین سویه‌ها در این ناحیه و نیز زمانبر و پرهزینه بودن این تکنیک‌ها، امکان بررسی توالی ناحیه 3'UTR ژنوم این ویروس به وسیله آزمایش آنالیز نقطه ذوب با وضوح بالا (High Resolution Melting = HRM)، جهت شناسایی و تفکیک سویه‌های برونشیت عفونی، در این مطالعه ارزیابی گردید. در سال‌های اخیر آزمون به منظور شناسایی بسیاری از تغییرات ژنتیکی و نیز تشخیص طیف وسیعی از بیماری‌های عفونی انسان و دام به کار گرفته می‌شود. آزمون HRM یک تکنیک بعد از آزمایش زنجیره پلی مرز (PCR) است که طی آن یک ناحیه همپایل به رنگ فلورسانس در DNA دورشته‌ای (dsDNA) تزیاید می‌یابد. رنگ فوق در هنگام اتصال به dsDNA دارای قابلیت درخشندگی بالا است و بالعکس هنگام جداشدن دو رشته فوق، با جداشدن آن از رشته DNA، قابلیت فلورسانس آن کاهش می‌یابد. با ارزیابی نوسانات نوری و سپس ارسال اطلاعات فوق به نرم افزار مربوطه، منحنی روند ذوب dsDNA ترسیم می‌شود. به عبارت دیگر نوع نوکلئوتیدها و نسبت C/G به همراه طول رشته و میزان هتروزیگوت بودن دو رشته فوق، بر شکل و شیب منحنی مذکور تأثیر گذار بوده و از این رو آنالیز منحنی‌های ترسیم شده بیانگر توالی و ترکیب نوکلئوتیدها در dsDNA می‌باشد و با مقایسه آنها می‌توان

مرحله تقلیب اولیه (Initial Denaturation)، ۱ دقیقه با دمای ۹۴°C، تقلیب (Denaturation) به مدت ۲۰ ثانیه و دمای ۹۴°C، مرحله اتصال پرایمر (Annealing) به مدت ۲۰ ثانیه و با دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد، مرحله طولی‌سازی (Extension) به مدت ۳۰ ثانیه و دمای ۷۲°C و در نهایت مرحله طولی‌سازی نهایی (Final Extension) با زمان ۲ دقیقه و در دمای ۷۲°C با ۴۵ بار تکرار مراحل دوم تا چهارم انجام شد. پس از پایان برنامه تکثیر قطعات مورد نظر و تولید محصولات PCR، بدون قطع روند فوق، دستگاه بطور خودکار مرحله ذوب (Melt) و ترسیم منحنی HRM را انجام داد. مرحله ذوب (Melt) در بازه‌های دمایی ۷۰ تا ۹۰ درجه سانتی‌گراد، با رمپ ۰/۳ (افزایش دمایی درجه در هر مرحله = Ramp)، با ۴۰ تکرار در یک چرخه (Cycle) انجام شد. در نهایت با استفاده از نرم افزار Rotor-Gene Q Series نسخه ۲/۰/۲/۴، درصد اطمینان از شباهت ژنوتایپی HRM (Genotype Confidence Percentage = GCP) بر اساس توالی ناحیه تکثیر یافته از 3' UTR برای هر نمونه در مقایسه با سایرین محاسبه گردید که طبق آن سویه‌های مساوی یا با بیش از ۹۳ درصد GPC HRM به عنوان سویه‌های یکسان تلقی گردیدند و در نهایت منحنی‌های مربوط به روند ذوب بصورت اولیه و هم‌تراز شده ترسیم شدند.

همچنین در کنار روش Real Time PCR، به منظور اطمینان از ساخت محصولات PCR و صحت روش‌های استخراج RNA و ساخت cDNA، از ترموسایکلر Bio Rad با برنامه دمایی و حجم واکنش‌گرهای یکسان با Real Time PCR، محصولات PCR تولید شده و به آگارز ۱/۵ درصد، منتقل گردید و نتایج الکتروفورز ژل پس از ۳۰ دقیقه با ولتاژ ۹۰، ارزیابی شد.

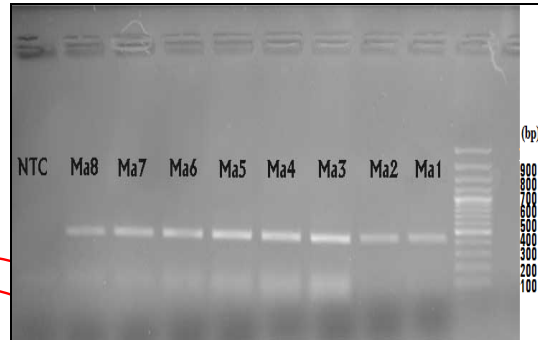
هگزامر (Random Hexamer) ۱ μl، RNA الگو (Template) ۵ μl و آب به میزان ۶/۵ μl به میکروتیوپ افزوده شد. حجم محلول نهایی ۲۰ میکرولیتر بود. سپس مخلوط نهایی در ترموسایکلر Bio-Rad ساخت شرکت Bio-Rad - آمریکا با برنامه RT ran شامل: ۱۰ دقیقه دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد و ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد، قرار داده شد و در نهایت پس از اتمام کار، محصول نهایی بلافاصله به دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد منتقل گردید.

به منظور انجام واکنش Real Time RT-PCR و آنالیز HRM، ابتدا پرایمرها با استفاده از نرم افزار gene runner نسخه ۳/۰/۵ طراحی گردیدند. توالی پرایمر پیش ران (Forward) که در ناحیه ۲۶۹۳۰-۲۶۹۴۴ قسمت 3'UTR ژنوم ویروس قرار داشت، CAGCGCCAAAACAACAGCG بود و توالی پرایمر پس ران (Reverse) که در ناحیه ۲۷۳۴۴-۲۷۳۶۲ قسمت 3'UTR واقع بود، CATTTCCTGGCGATAGAC تعیین شد. واکنشگرها با حجم واکنش ۲۵ μl شامل محلول بافر به میزان ۲/۵ μl که قبلاً با رنگ سایتو ۹ (Cyto9- Invitrogen) به نسبت ۱۰ μl از رنگ به ۱۰ میلی لیتر بافر مخلوط شده بود، به همراه نمک MgCl₂ ۵۰ میلی مول (mM)، dNTP ۱۰ mM، پرایمرهای پیش ران (Forward) و پس ران (Reverse) هر کدام به میزان ۰/۵ μl، آنزیم DNA پلی مراز Taq (Taq DNA Polymerase) به میزان ۱ واحد، cDNA الگو به میزان ۲ μl و در نهایت آب به میزان ۱۶/۵ μl مخلوط شدند.

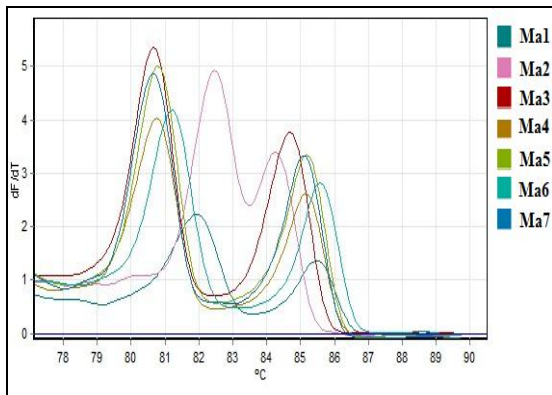
سپس نمونه‌ها در دستگاه ترموسایکلر Rotor- Gene Q (Corbett Life Science) قرار داده شدند و با استفاده از کانال قرمز (Red Channel) و با نسبت شناسایی/ برانگیزش (Excitation/Detection) ۶۲۵/۶۶۰ نانومتر، طبق برنامه دمایی

نتایج

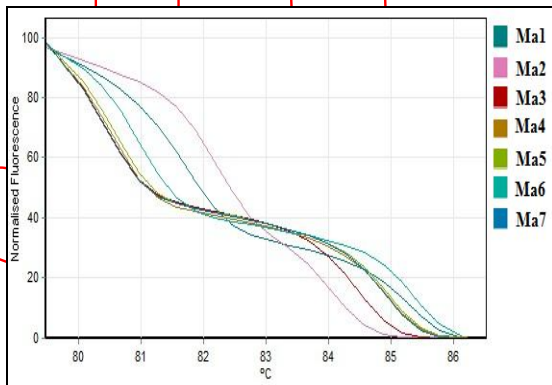
پس از ساخت محصولات PCR و الکتروفورز آنها، باندهای مربوط به ناحیه تکثیر یافته در تمامی نمونه‌ها مشاهده شد (نگاره ۱).



نگاره ۱- باندهای حاصل از بارگزاری ژل آگارز ۱/۵ درصد برای هفت نمونه واکسن (Ma1 تا Ma7) و نمونه مرجع M41 (Ma8) و نمونه کنترل منفی (NTC) - اندازه قطعه تکثیر یافته محصولات PCR در محدوده ۴۰۰ تا ۴۳۰ bp مشاهده گردید.



نمودار ۱- مقایسه منحنی‌های HRM نمونه‌های Ma1 تا Ma7

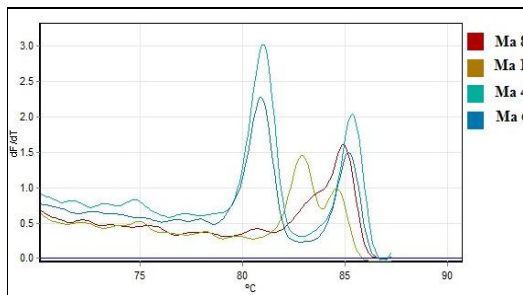


نمودار ۲- آنالیز همطراز شده HRM نمونه‌های Ma1 تا Ma7

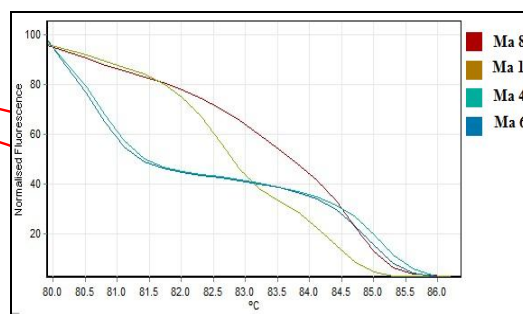
منحنی HRM نمونه Ma8 (M41) نیز کاملاً از سایر سویه‌های ماساچوست متفاوت و قابل تفکیک بوده بطوریکه دارای یک پیک بعد از یک پله بود. در نمودار HRM همطراز شده نیز این سویه ماساچوست دارای الگوی ذوب مشخص و متفاوت بود که بصورت یک منحنی با تحذب به سمت بالا دیده شد (نمودار ۴).

همچنین نمودارهای HRM و همطراز شده تمامی هفت نمونه واکسن (از Ma1 تا Ma7) به همراه نمونه مرجع M41 (Ma8) ترسیم شده و با هم مقایسه گردیدند (نمودارهای ۱، ۲، ۳ و ۴). سویه‌های نمونه‌های فوق به چهار گروه 793/B (Ma1) و (Ma2)، H120 (Ma4، Ma5، Ma6 و Ma7)، MA5 (Ma3) و M41 (Ma8) تقسیم شدند. در بررسی ظاهری منحنی HRM هر یک از چهار گروه فوق مشخص گردید که گروه 793/B دارای دو پیک با فاصله اندک از همدیگر بود که اولی بلندتر از پیک دوم دیده می‌شد. در نمونه Ma2 (۴/۹۱ ایتروت) هر دو پیک بلند و کشیده بوده و این درحالیست که در Ma1 (IB88) هر دو پیک کوتاه بود. همچنین فاصله دو پیک در Ma1 در مقایسه با Ma2 (۴/۹۱ ایتروت) بسیار بیشتر بود (نمودار ۱). در نمودار HRM همطراز شده، دیده شد که هر دو نمونه گروه 793/B در شروع منحنی روند ذوب مشابه داشته ولی در انتها کاملاً از هم تفکیک شدند (نمودار ۲).

در نهایت به منظور بدست آوردن یک مدل کمی ریاضی برای تفکیک سویه‌ها بصورت غیر عامل، درصد اطمینان شباهت ژنوتایپی (Genotype Confidence) بین تمامی نمونه‌های مورد ارزیابی محاسبه شد. سویه‌های واکسن 793/B کاملاً از نظر ژنوتایپی با یکدیگر متفاوت بود. در بین سویه‌های ماساچوست نیز واکسن‌های H120 که دارای الگوی منحنی HRM یکسان بودند، درصد شباهت ژنوتایپی بالایی با هم داشتند که البته در بین آنها، نمونه Ma5 کمترین شباهت را داشت. سویه M41 که اگر چه از سویه‌های ماساچوست بود ولی همانگونه که در آنالیز HRM تفاوت ظاهری آن با سایر موارد دیده شد، دارای کمترین درصد شباهت ژنوتایپی با سایر سویه‌های ماساچوست و 793/B بود (جدول ۲).



نمودار ۳- منحنی‌های HRM نمونه‌های (Ma8) (M41) و مقایسه آن با منحنی‌های Ma1 و (793/B) Ma2 و Ma4 و (H120) Ma6



نمودار ۴- منحنی‌های HRM هم‌طراز شده نمونه‌های (Ma8) (M41) و مقایسه آن با منحنی‌های Ma1 و (793/B) Ma2 و Ma4 و (H120) Ma6

جدول ۲- درصد اطمینان شباهت ژنوتایپی (Genotype Confidence) ناحیه 3'UTR نمونه‌های مورد آنالیز با یکدیگر در رمپ ۰/۳ درجه سانتیگراد

کد	MA1	MA2	MA3	MA4	MA5	MA6	MA7	MA8
MA1	۱۰۰	۸۵/۷	۴/۶۳	۷/۴۶	۱۰/۸۷	۳۱/۶۲	۶/۴۶	۰/۰۱
MA2	۱۰۰	۱۰۰	۰/۲۴	۰/۰۹	۰/۱۴	۰/۲۱	۰/۰۹	۳/۰۰
MA3	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۶۹/۵۹	۶۲/۸۹	۱۴/۲۱	۷۲/۳۱	۰
MA4	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۹۶/۰۲	۳۸/۰۴	۹۷/۵۹	۰/۰۱
MA5	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۹۴/۴۸	۹۳/۵۵	۰
MA6	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۳۲/۰۳	۰/۰۲
MA7	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۰/۰۱
MA8	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰

۴/۹۱ ایتروت، گروه M41 و در نهایت گروه مربوط به واکسن‌های با سویه H120 و MA5 که در یک دسته قرار گرفتند.

در نهایت با توجه به نتایج آنالیز منحنی‌های HRM و محاسبه درصد اطمینان شباهت ژنوتایپی (GCP)، سویه‌های مورد مطالعه به چهار گروه تقسیم شدند که عبارتند از: IB88 مریال،

بحث

در یکی از اولین پژوهش‌های مولکولی انجام شده به منظور شناسایی ویروس برونشیت عفونی طیور در ایران، اکبری آزاد و همکاران در سال ۱۳۸۳، با روش RT-PCR/RFLP تعدادی از نمونه‌های بافتی اخذ شده از کشور را مورد ارزیابی قرار دادند که بر طبق نتایج آن، بطور غالب سویه 793/B و پس از آن سویه ماساچوست جداسازی و شناسایی گردید (۱). همچنین سیفی‌آبادی و همکاران در سال ۲۰۰۴ با استفاده از آزمایش RT-PCR، وضعیت شیوع سویه 793/B را ارزیابی نمودند که بر طبق نتایج آن تحقیق، شیوع این سویه در کشور بالا بوده بطوریکه در ۱۶ استان سویه فوق شناسایی شده است (۱۲). در پژوهشی دیگر شوشتری و همکاران، در سال ۲۰۰۸، در بررسی نمونه‌های بافتی اخذ شده بین سال‌های ۱۹۹۹ تا ۲۰۰۴ در ایران با استفاده از روش RT-PCR، مشخص نمودند که ۷۲٪ نمونه‌های فوق از نظر آلودگی به ویروس برونشیت عفونی، مثبت بوده که در آن بین ۵۲/۷٪ آلوده به سویه 793/B و ۱۸٪ ماساچوست به تنهایی و ۳۰/۵٪ مابقی نیز آلوده به هر دو سویه بودند که آن نتایج بیانگر شیوع بسیار بالای سویه 793/B در کشور بود (۱۳). مجدانی و همکاران در سال ۲۰۱۱، از طریق آنالیز مولکولی ژن‌های نوکلئوکپسید و 3'UTR دو سویه جدا شده از مزارع مرغ ایران و مقایسه آن با واکسن‌های H120 و H52، اعلام نمودند که سویه‌های فیلد در گردش کشور از نظر فیلوژنیکی متمایز از سویه واکسن‌های رایج فوق بوده و بنابراین بر لزوم تغییر در سویه‌های واکسن کشور تأکید نمودند (۸). در یکی از پژوهش‌های انجام شده در جهت تفکیک سویه‌های فیلد از واکسن، مردانی و همکاران در سال ۲۰۰۶، پس از تعیین توالی قطعه تکثیر یافته ژن‌های S، M و N نتیجه گرفتند که به علت حذف نوکلئوتیدی (Deletion) در قسمت 3' UTR در سویه‌های واکسن و عدم وقوع این پدیده در سویه‌های فیلد، امکان تفریق سویه‌های واکسن از فیلد بر اساس توالی این ناحیه وجود دارد (۱۰).

Liu در سال ۱۹۹۰ عنوان نمود که قسمت 3' UTR نسبت به ژن S1 تمایل کمتری به بروز جهش‌های ژنتیکی دارد (۶). همچنین Liu و همکاران در پژوهشی اشاره نمودند که ژن S1 در برابر جهش‌ها بسیار مستعد بوده و در پاساژهای متوالی یک سویه احتمال بروز تغییر توالی در آن زیاد است (۷). در مطالعه‌ای دیگر، مجدانی و همکاران در سال ۲۰۱۰، امکان طبقه بندی ویروس IB را بر اساس توالی ژن‌های S1، 3'UTR و N-3'UTR، ژن ۳ را به روش RFLP بررسی نموده و نتیجه گرفتند که توالی S1 و 3'UTR توان تفریقی بالاتری در مقایسه با ژن ۳ داشته است (۹). در این مطالعه نیز تفریق سویه‌های IBV بر اساس توالی ناحیه 3'UTR از ژنوم ویروس صورت گرفت که با توجه به نتایج بدست آمده در آن می‌توان استنباط نمود امکان این امر به روش آنالیز HRM وجود دارد (۹). در مطالعه حاضر بر اساس آنالیز HRM ناحیه 3'UTR چهار گروه مختلف سویه‌های IBV شناسایی گردیدند که در بین آنها سویه‌های واکسن IB88 و ۴/۹۱ با وجود وابستگی ژنتیکی به سروتیپ 793/B، دارای منحنی‌های مختلف HRM بودند که این یافته با نتایج پژوهش مجدانی و همکاران در خصوص تفکیک سویه‌های IBV به روش RFLP همخوانی داشت (۹). در آن مطالعه که در سال ۲۰۱۱ انجام شده بود، مشخص شد که سویه‌های 793/B فیلد و واکسن (۴/۹۱ ایتروت و IB88 مریال)، سویه فیلد MNS-7862-1 و سویه‌های واکسن H120، H52 و MA5 (ایتروت) در چهار گروه مختلف براساس الگوی هضم آنزیمی RFLP ژن‌های S1 و N-3'UTR قرار گرفتند و بر اساس توالی ژن ۳، تنها سه گروه مشخص شد که بر آن اساس سویه‌های IB88 و واکسن مریال با سویه فیلد MNS-7862-1 در یک گروه واقع شدند (۹). براساس یافته‌های حاصل از این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که با استفاده از آنالیز HRM می‌توان در مدت زمان کوتاه و با دقت بالا در مقایسه با سایر روش‌های رایج قبلی نظیر تکثیر ویروس و انجام آزمایش VN و آزمون PCR-RFLP، اقدام به

- of infectious bursal disease virus strains using real-time RT-PCR and high resolution melt curve analysis. *J. Virol. Methods*. 171(1): 264-271.
6. Lai, M.M.C. (1990): Coronavirus: organization, replication and expression of genome. *Annu. Rev. Microbiol.* 44(1): 303.
 7. Liu, S., Han, Z., Chen, J., Liu, X., Shao, Y., Kong, X., Tong, G., Rong, J. (2007): S1 gene sequence heterogeneity of a pathogenic infectious bronchitis virus strain and its embryo-passaged attenuated derivatives. *Avian Pathol.* 36(3):231-234.
 8. Majdani, R., Mardani, K., Morshedi, A., Vasfi Marandi, M., Talebi, A. (2011): Molecular analysis of the nucleocapsid gene and 3' untranslated region of two Infectious Bronchitis Virus field isolates from Iranian poultry farms. *Int. J. Vet. Res.* 5: 1: 53-58.
 9. Majdani, R., Mardani, K., Morshedi, A., Vasfi Marandi, M., Talebi, A. (2010): Molecular Comparison of three Different regions of the Genome of Infectious Bronchitis Virus Field Isolates and Vaccine Strains. *Vet. Res. F.*, 1: 2: 73-81.
 10. Mardani, K., Browning, G.F., Ignjatovic, J., Noormohammadi, A.H. (2006): Rapid Differentiation of current Infectious Bronchitis Virus vaccine strains and field isolates in Australia. *Aust. Vet. J.* 84 (1-2): 59-62.
 11. Reed, G.H., Kent, J.O., Wittwer, C.T. (2007): High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics*: 8(6): 597-608.
 12. Seify Abad Shapouri, M.R., Mayahi, M., Assasi, K., Charkhkar, S. (2004): A Survey of the prevalence of Infectious Bronchitis Virus type 4/91 in Iran. *Acta. Vet. Hung.* 52(2): 163-166.
 13. Shoushtari, A.H., Toroghi, R., Momayez, R., Pourbakhsh, S.A. (2008): 793/B type, the Predominant Circulation Type of avian Infectious Bronchitis Virus 1999-2004 in Iran: a retrospective study. *Arch. Razi Institute.* 63 (1): 1-5.

تفکیک و طبقه‌بندی سویه‌های ویروس برونشیت عفونی نمود تا از این طریق با شناسایی سویه‌های غالب در همه‌گیری‌های این عفونت در سطح کشور، برنامه مناسب واکسیناسیون و سایر استراتژی‌های پیشگیرانه انتخاب گردد. پیشنهاد می‌شود با انجام مطالعات بیشتر امکان استفاده از این تکنیک در تفریق بین سویه‌های واکسن از سویه‌های ویروس وحشی در سطح مزارع کشور بررسی شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از اساتید ارجمند آقایان دکتر سعید چرخکار، دکتر پیام حقیقی خوشخو و دکتر رضا ممیز، بابت همکاری صمیمانه و راهنمایی‌های سودمند ایشان در اجرای این پژوهش، سپاس فراوان خود را تقدیم می‌دارد.

فهرست منابع

1. اکبری آزاد، ک.، وصفی مرندی، م.، کیوانی، ح. (۱۳۸۳): جداسازی و شناسایی مولکولی ویروس‌های برونشیت عفونی در مرغداری‌های صنعتی ایران، م. تحقیقات دامپزشکی، ۵۹(۳): ۲۵۹-۲۶۴.
2. Cavanagh, D., Gelb, J.J. (2008): Infectious Bronchitis. In: *Diseases of Poultry*, 12th edition (ed. Saif, Y.M., Barns, H.J., Fadly, A. M., Glisson, J. R., McDougald, L. R., Swayne, D. E.). Iowa State University Press: Iowa; 117-135
3. De Wit, J.J. (2000): Detection of Infectious Bronchitis Virus. *Avian Pathol.* 29: 71-93.
4. Farrar, J.S., Reed, G.H., Wittwer, C.T. (2010): High-Resolution Melting Curve Analysis for Molecular Diagnostics. In: *Molecular Diagnostics*, 2nd edition. (ed. Patrino, G. P., Anson, W. J.). Elsevier Ltd.: Amsterdam; 229-245.
5. Ghorashi, S.A., O'Rourke, D., Ignjatovic, J., Noormohammadi, A.H. (2011): Differentiation

JCP