

شناسایی مولکولی سویه‌های وحشی ویروس برونشیت عفونی طیور در گله‌های گوشتی واکسینه استان مازندران

سید مصطفی آقاجانی میر^۱، نریمان شیخی*^۱، هادی حق بین نظرپاک^۱، غلامرضا نیکبخت بروجنی^۲

چکیده

وقوع بیماری برونشیت عفونی بسیار زیاد است. زیان‌های مالی ناشی از بیماری، مثل کاهش تولید و بویژه مرگ و میر در جوجه‌های گوشتی از اهمیت بالایی برخوردار است (۳). جهت کنترل عوارض و تبعات عفونت با ویروس برونشیت عفونی، ایمن‌سازی (واکسیناسیون) در کنار ضد عفونی و رعایت اصول امنیت زیستی توصیه می‌گردد (۳).

ژنوم ویروس برونشیت عفونی (IBV) چهار پروتئین ساختاری را کد می‌کند (اسپایک، پوشینه، غشاء و نوکلئوکسپید) و دو سوم از ژنوم شامل مجموعه‌ای از ژن‌های موثر در تکثیر مانند پروتئاز، هلیکاز و RNA پلیمرز وابسته به RdRp (RNA dependent RNA polymerase) یا RNA است (۴ و ۵).

ویروس برونشیت عفونی در گله‌های طیور در سراسر دنیا گزارش شده است (۶). در ایالات متحده، علاوه بر سویه‌های بومی (نوع Massachusetts یا Mass) سروتایپ‌های دیگری نیز شناسایی شده‌اند و در ابتدای سال ۱۹۵۰ میلادی، انواعی از سویه‌های Mass در اروپا مشاهده شدند. در واقع بسیاری از انواع سروتایپ‌هایی که در آمریکای شمالی شناسایی شده بودند پس از مدتی در آفریقا نیز مشاهده شدند (۷). این بیماری در کشورهای آسیایی چون هند، ژاپن، کره و چین و همچنین استرالیا و اروپا نیز شایع است. مهم اینکه غالباً شیوع بیماری حتی در گله‌های واکسینه شده نیز روی می‌دهد. انواع ویروس‌های جدا شده از گله‌های واکسینه، اغلب و نه همیشه، از سروتایپ‌های متمایز از واکسن هستند (۴ و ۷ و ۹). در ایران، اولین بار در سال ۱۳۷۳ (۱۹۹۴ میلادی) ویروس

بیماری برونشیت عفونی یکی از معضلات مهم صنعت پرورش طیور گوشتی در دنیا است و مطالعات اپیدمیولوژی مولکولی و شناسایی مداوم تغییرات ژنتیکی در میان ویروس‌های شایع در مزارع پرورشی نقش مهمی در کنترل، پیشگیری و طراحی واکسن‌های موثر بر علیه بیماری دارد. در تحقیق حاضر مزارع طیور گوشتی مشکوک به بیماری برونشیت عفونی در استان مازندران مورد آزمایش قرار گرفتند. بدین منظور، نمونه‌های سوآب نای از ۲۸ گله جوجه گوشتی با علائم تنفسی و تلفات ۱۵ تا ۲۵ درصدی در سال ۱۳۹۶ جمع‌آوری شدند. برای تشخیص ویروس از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای افزوده سازی ژن رپلیکاز با پرایمرهای اختصاصی ژن استفاده شد. سویه مرجع سویه HI20 واکسن برونشیت بود. برای تفکیک سویه‌های وحشی از سویه‌های واکسینال از روش توالی‌یابی مستقیم استفاده شد. در آزمون مقدماتی (افزوده سازی)، در ۸۲ درصد (۲۳/۲۸) از مزارعی که مشکوک به عفونت ویروس برونشیت بودند حضور ویروس برونشیت عفونی تشخیص داده شد. بررسی تعیین توالی مشخص کرد که ۵ سویه وحشی در مزارع آلوده (۱۹ مزرعه) وجود دارند. این موضوع نشاندهنده تنوع بالایی در جمعیت مورد مطالعه است. نتایج این مطالعه نشان داد که ظهور سویه‌های جدید ویروس برونشیت عفونی در طیور گوشتی استان مازندران می‌تواند با شرایط پرورشی از جمله تراکم بالا و واکسیناسیون متنوع و مکرر مرتبط باشد.

واژگان کلیدی: ویروس برونشیت عفونی، شناسایی مولکولی، گله‌های گوشتی،

مازندران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۳/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۸/۲۰

مقدمه

بیماری برونشیت عفونی یکی از معضلات مهم پرورش طیور به شکل تجاری و متراکم است. این بیماری بیش از همه از شرایط اقلیمی حاکم بر مزارع مانند رطوبت ناکافی هوای تنفسی، نوسانات نامطلوب درجه‌ی حرارت، تهویه‌ی ناکارآمد، و عوامل سرکوب‌کننده‌ی ایمنی تأثیر می‌پذیرد (۱ و ۲). در ایران به دلیل شرایط خاصی همچون خشکی هوا و نوسانات شدید درجه حرارت در طول شبانه روز انتظار

۱-گروه علوم بیالینی، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران (n_sheikhi@srbiau.ac.ir)

۲-گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

جوجه گوشتی مشکوک به بیماری برونشیت عفونی با علایمی نظیر تنفسی و تلفات ۱۵ تا ۲۵ درصدی در استان مازندران واقع در شمال ایران طی فصول پاییز و زمستان سال ۱۳۹۶ جمع آوری و تا زمان استخراج در دمای منفی ۷۰ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. از هر گله ۳ نمونه تصادفی از جوجه های مبتلا به علامت تنفسی انتخاب و استخراج RNA تام با کیت استخراج DNA/RNA Gene-spin® Viral (بیوتکنولوژی ایترون، کره جنوبی) در آزمایشگاه پاستور انجام شد. پس از آن از نمونه های RNA استخراج شده cDNA با روش رونوشت برداری معکوس تهیه شد. در حجم ۲۰ میکرولیتر حاوی ۱ میکروگرم RNA، 200 نانوگرم هگزامر تصادفی و (۰,۵ mM) dNTP اضافه شد. مخلوط به مدت ۵ دقیقه در ۶۵ درجه سانتیگراد حرارت داده شد و سپس مخلوط واکنش شامل ۴۰ واحد ممانعت کننده RNase، بافر رونوشت برداری معکوس (50 mM Tris-HCl, 75 mM M- KCl, 3mM MgCl2, 10mM DTT) و ۲۰۰ واحد آنزیم MLV (Fermentas، آلمان) به آن اضافه گردید. این مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و بعد از آن ۵۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری شد. cDNA به دست آمده در دمای ۷۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه حرارت داده شد تا MMLV-RT را دناتوره کرده و سپس در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

افزوده سازی ژن پلی مرز وابسته به RNA ویروس برونشیت عفونی

آغازگرهای اختصاصی برای بخشی از ژن RdRp متعلق به IBV پرندگان (۲۸۸ bp) با تحلیل بیوانفورماتیک طراحی شدند. تمام توالی های ژن IBV RdRp موجود در بانک ژن هم ردیف شده و آغازگرها با هدف افزوده سازی منطقه متغیری از توالی های ژن RdRp طراحی شدند. بر اساس داده های پایگاه NCBI برای ویروس برونشیت عفونی پرندگان و سویه مرجع AY692454، توالی آغازگرها به شکلی طراحی شدند

برونشیت عفونی (IBV) شناسایی شد و در همان زمان به احتمال حضور سویه های متنوع در کشور اشاره شد (۱۰). پس از آن با استفاده از آزمایش واکنش زنجیره ای پلی مرز معکوس (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) به همراه تحلیل قطعات حاصل از آنزیم های محدودالثر (RFLP) حضور سویه های (۴/۹۱) B/ ۷۹۳ و ماساچوست در ایران شناسایی شدند (۱۱). بر طبق نتایج تحقیق سیفی آبادی و همکاران (۲۰۰۴) شیوع سویه B/ ۷۹۳ در ۱۶ استان کشور گزارش شده است. این سویه بیشترین شیوع را در سالهای ۱۹۹۸ الی ۲۰۰۲ در کشور داشته است (۱۲).

تنوع ژنتیکی و تغییرات ژنومی ویروس در طی زمان، گاه بر اثر مدیریت ناصحیح و واکسیناسیون، قابل ملاحظه است. این تغییرات در سطوح پادگنی مانعی بر سر راه ایمنی موثر و محافظت در گله ها محسوب می شوند. از سوی دیگر تنوع در نواحی از ژنوم که برای تشخیص ویروس هدف قرار می گیرند ممکن است باعث عدم توان تشخیص عامل بیماری و کانون یابی بیماری شود (۷).

به نظر می رسد با توجه به تنوع سویه های ویروس برونشیت عفونی طیور و ظهور سویه های جدید در زمان ها و مناطق جغرافیایی مختلف (۹،۱۳) لازم است تا تحقیقات در زمینه شناسایی ویروس به شکلی پیوسته و با روش های معتبر در کشور صورت گیرند. به همین منظور در تحقیق حاضر فراوانی و تنوع سویه های ویروس برونشیت عفونی در گله های طیور گوشتی مازندران مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار

نمونه برداری، جداسازی RNA و رونوشت برداری معکوس روش تحقیق مطالعه مشاهده ای و نمونه برداری از گله های مبتلا کاملاً تصادفی بود که مشخصات گله ها در جدول ۱ آورده شده است (جدول ۱). نمونه های سواب نای از ۲۸ گله

سپس محصولات مثبت در آزمون PCR برای توالی یابی مستقیم انتخاب شدند. در بین نمونه های مثبت ۱۹ نمونه بر اساس تفاوت های مشاهده شده با سویه های واکسن، ویروس وحشی شناخته شدند. نتایج همردیفی توالی های ژن RdRp سویه های وحشی نشان داد که این ۱۹ نمونه ویروس وحشی در مجموع ۵ توالی نوکلئوتیدی متفاوت و منحصر به فرد داشتند که با شماره های ۶، ۱۴، ۱۶، ۱۸ و ۲۸ در جدول ۱ مشخص شده اند. بر این اساس محتوای تنوع ویروس در جمعیت ۲۶٪ محاسبه شد.

چهار نمونه مثبت در تحلیل توالی سویه های واکسن H120 و یا MA5 شناخته شدند. این نتایج با همردیفی توالی های بدست آمده با سویه های واکسینال و سویه های وحشی گزارش شده در ایران و جهان مشخص شده اند. ویروس های جدید با توجه به توالی نوکلئوتیدی تفاوت های قابل توجهی با سایر سویه های واکسن داشتند. داده های توالی نوکلئوتیدی طیفی از شباهت های (۹۶ تا ۹۹ درصد) را بین پنج سویه وحشی نشان دادند، در حالی که در مقایسه با سویه های واکسینال، شباهت ها بین ۹۰ تا ۹۶ درصد بود (جدول ۲). شباهت سویه های وحشی ایران با سویه های غیر واکسینال گزارش شده در جهان بین ۸۶ تا ۹۵ درصد بود. بیشترین فراوانی در بین سویه های وحشی ایران به سویه ۶ اختصاص داشت که در ۷ گله تشخیص داده شد (جدول ۱).

همچنین سویه ۶ در نمونه های اخذ شده از اغلب مناطق استان (بابل، قائم شهر، ساری، بهنمیر، امیرکلا و بابلسر) شناسایی شد. این سویه کمترین شباهت را با سویه ۴/۹۱ و بیشترین شباهت را با سویه ۱۸ نشان داد. تقریباً تمامی سویه های وحشی در نمونه های بابل شناسایی شدند (جدول ۱).

که آغازگر پیشرو 5'- (F: ACCCGATTCTYATGGGTTGGG-3') در پلی پروتئین b1، nt 14167-14188 ، و برگشتی 5'- (R: AGACGCGCAACATTAGCAGA-3') در پلی پروتئین b1، nt 14436-14455 ، قرار دارد. افزوده سازی در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۲۰ ng از cDNA نمونه، ۱,۵ mM MgCl2، 250 μM از هر dNTPs، بافر (20 mM Tris-HCl) Taq (CinaClon، pH 8.4، 50 mM KCl) واحد آنزیم (Iran) و ۲۰ pmol از پرایمرهای اختصاصی بود. مشخصات چرخه حرارتی شامل ۱ چرخه واسرشت در ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه، ۳۰ چرخه شامل مراحل ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۰,۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ ثانیه، و بسط نهایی ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد بود.

تعیین توالی نوکلئوتیدی

روش توالی یابی مستقیم (Direct sequencing) برای تأیید تشخیص ویروس و تجزیه و تحلیل ژن RdRp ویروس انجام شد. محصولات PCR با استفاده از کیت خالص سازی (Cat. No.K-3034, Bioneer) تخلیص شده و هر نمونه به طور جداگانه با استفاده از آغازگرهای اختصاصی پیشرو و برگشتی به طور جداگانه توالی یابی شدند. تمام مراحل توالی یابی توسط شرکت ماکروژن (سئول، کره) با استفاده از یک توالی سنج خودکار ABI 3730 XL DNA انجام شد. توالی ها توسط BLAST در پایگاه اطلاعاتی بیوتکنولوژی (NCBI، <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

نتایج

در مجموع ۲۳ نمونه از ۲۸ نمونه اخذ شده از مزارع جوجه گوشتی صنعتی مشکوک به بیماری برونشیت عفونی در واکنش زنجیره ای پلی مرز مثبت تشخیص داده شدند.

جدول ۱. اطلاعات نوع سویه های شناسایی شده ویروس برونشیت عفونی همراه با مشخصات مزارع گوشتی مورد مطالعه در استان مازندران.

واکسن های مصرفی	محل اخذ نمونه	سن در زمان نمونه گیری	تعداد مزارع آلوده	سویه ویروس*
NOBILIS® MA5 + CLONE 30	بابل	۲۲	۲	۴/۹۱
	بابکنار			
NOBILIS® MA5 + CLONE 30	بابل	۲۸ تا ۳۶	۷	۶
NOBILIS® IB 4-91	قائم شهر			
BRONHOPEST® B1 SPF	ساری			
CEVAC® Ibird	بهنمیر			
	امیرکلا			
	بابلسر			
NOBILIS® MA5 + CLONE 30	بابلسر	۲۸	۲	۱۴
	قائم شهر			
NOBILIS® MA5 + CLONE 30	بابل	۲۸ تا ۳۹	۲	۱۶
BRONHOPEST® B1 SPF	بهنمیر			
NOBILIS® MA5 + CLONE 30	بابل	۲۱ تا ۲۹	۳	۱۸
BRONHOPEST® B1 SPF	بابکنار			
	کیاکلا			
NOBILIS® IB MA5	بابل	۲۱ تا ۲۳	۳	۲۸
NOBILIS® IB 4-91	جویبار			
CEVAC® VITABRON L				

*سویه ویروس بر اساس تحلیل توالی ژن RdRp تعیین شده است

بین ۹۰ تا ۹۶ درصد بود (جدول ۲). تشابه سویه های وحشی ایران با سویه های غیر واکسینال گزارش شده در جهان بین ۸۶ تا ۹۵ درصد بود.

بیشترین فراوانی در بین سویه های وحشی ایران به سویه ۶ اختصاص داشت که در ۷ گله تشخیص داده شد (جدول ۱). همچنین سویه ۶ در نمونه های اخذ شده از اغلب مناطق استان (بابل، قائم شهر، ساری، بهنمیر، امیرکلا و بابلسر) شناسایی شد. این سویه کمترین شباهت را با سویه ۴/۹۱ و بیشترین شباهت

چهار نمونه مثبت در تحلیل توالی سویه های واکسن H120 و یا MA5 شناخته شدند. این نتایج با هم ردیفی توالی های بدست آمده با سویه های واکسینال و سویه های وحشی گزارش شده در ایران و جهان مشخص شده اند. ویروس های جدید با توجه به توالی نوکلئوتیدی تفاوت های قابل توجهی با سایر سویه های واکسن داشتند. داده های توالی نوکلئوتیدی طیفی از شباهت های (۹۶ تا ۹۹ درصد) را بین پنج سویه وحشی نشان دادند، در حالی که در مقایسه با سویه های واکسینال، شباهت ها

را در میان نمونه های جمع آوری شده از ۲۰ مورد مشکوک نشان داده است (۱۳).

در حال حاضر برای پیشگیری از بیماری برونشیت عفونی، جوجه های گوشتی بر علیه این بیماری واکسینه می شوند. به طور معمول واکسیناسیون جوجه های تجاری در سن یک روزگی با واکسن زنده تخفیف حدت یافته انجام می گیرد. در آمریکا بیشتر از سروتیپ ماساچوست، کانکتیکوت و ارکانزاس و در اروپا از سروتیپ هلند به منظور تولید واکسن های زنده استفاده کرده اند (۱). در ایران از واکسن های حاوی سویه های H120، ۴/۹۱، MA5 و در ایمن سازی جوجه های گوشتی استفاده می شود (۱۲).

زمان مناسب واکسیناسیون بسته به شرایط محیطی و سایر عوامل متفاوت است. باید توجه کرد که جدایه های واکسن زنده ممکن است در شرایطی به شکل حاد و یا به واریانت های مختلفی از ویروس واکسن تبدیل شوند.

یکی از چالش های مهم در تشخیص برونشیت عفونی تمایز موارد مبتلا به سویه های وحشی از سویه های واکسن است. تشخیص عفونت به انجام آزمایش های سرمی و یا جداسازی و شناسایی ویروس بستگی دارد. روش های تشخیص مبتنی بر پاسخ پادتنی مانند ممانعت کننده همآگلوتینین (HI)، آزمون الایزا (ELISA) و خنثی سازی ویروس (VN) ممکن است مفید باشند، اما اغلب قادر به تفکیک پادتن های تولید شده بر علیه واکسن از پادتن های سویه های وحشی نیستند و تلاش ها در این زمینه بیشتر بر ویژگی های مولکولی و توالی نوکلئوتیدی ژن های خاصی از ویروس متمرکز بوده است (۱۱، ۱۳).

عمدتا تشخیص مستقیم و شناسایی ویروس از طریق واکنش زنجیره ای پلیمرز (RT-PCR) و تکنیک های توالی یابی (sequencing techniques) انجام می شود. البته پروتکل RT-PCR و تحلیل دقیق دمای شکافت (HRM) نیز برای تشخیص و طبقه بندی سویه های IBV مورد استفاده قرار گرفته است (۱۴). این روش ها تاکنون بر اساس شناسایی ژن S1 ویروس و

را با سویه ۱۸ نشان داد. تقریبا تمامی سویه های وحشی در نمونه های بابل شناسایی شدند (جدول ۱).

جدول ۲. نتایج بررسی تشابه نوکلئوتیدی ویروس های شناسایی شده با توالی ویروس های واکسینال

تشابه توالی نوکلئوتیدی

(%)

	H120	Ma5	۴/۹۱	۶	۱۴	۱۶	۱۸	۲۸
H120	۱۰۰	۹۴	۹۴	۹۲	۹۳	۹۳	۹۳	۹۶
Ma5		۹۴	۹۴	۹۲	۹۳	۹۳	۹۳	۹۶
۴/۹۱			۹۱	۹۰	۹۲	۹۰	۹۰	۹۲
۶				۹۸	۹۸	۹۹	۹۹	۹۶
۱۴					۹۸	۹۹	۹۹	۹۶
۱۶						۹۹	۹۹	۹۶
۱۸								۹۷
۲۸								

بحث

به دلیل آنکه بیماری برونشیت عفونی یکی از معضلات مهم صنعت پرورش طیور در ایران است، مطالعات اپیدمیولوژی، مولکولی و شناسایی مداوم تغییرات ژنتیکی در میان ویروس های شایع در مزارع پرورشی نقش مهمی در کنترل، پیشگیری و طراحی واکسن های موثر بر علیه بیماری دارد. در آزمون مقدماتی (افزوده سازی) در ۸۲ درصد (۲۳/۲۸) از مزارعی که مشکوک به عفونت ویروس برونشیت بودند حضور ویروس برونشیت عفونی تشخیص داده شد.

طبق گزارش صیفی آباد و همکاران شیوع ویروس برونشیت عفونی در کشور حدود ۴۲ درصد است که نشان دهنده بالا بودن میزان آلودگی با ویروس است (۱۲). البته باید توجه داشت که رقم ۸۲ درصد مربوط به مزارعی است که علائم بالینی بیماری را نشان داده بودند. تحقیق مشابه در مورد سویه های غالب در گردش داخل ایران نتایج مثبتی بالغ بر ۵۵٪ (۱۱/۲۰)

سال‌های ۲۰۱۰ تا ۲۰۱۴ که با داده‌های توالی ژن S1 و ویروس تحلیل شده اند، هفت ژنوتیپ Mass, 793/B, IS720, Variant, IR-I, IR-II, QX, 2, و IR-II گزارش شده اند (۷؛۹؛۱۱). در مقایسه با تنوع ویروسی شناسایی شده در کشور این حجم از تنوع ویروس در یکی از استان‌های کشور (مازندران) می‌تواند ناشی از دو عامل اصلی در بروز سویه‌های جدید باشد. عامل اول تراکم مزارع پرورشی (۲۴۰۰ مزرعه) در مساحت کم است که گردش و بقای ویروس را تضمین می‌کند. عامل دوم استفاده گسترده و مکرر از واکسن است که احتمال بازگشت به حدت سویه واکسن و یا نوترکیبی ویروس وحشی و ویروس واکسینال بالا می‌برد (۱۷، ۶، ۴، ۲). حضور پادتن‌های ناشی از واکسن نیز به خودی خود عاملی برای گریز سویه‌های موتانت از پاسخ دستگاه ایمنی و بروز تنوع بیشتر در سویه‌های وحشی است. این دو عامل نقشی کلیدی در بقا و تنوع ویروسی دارند که رونوشت برداری RNA آن تابع اصلاح خوانش (Proof reading) نیست (۱۸). حضور سویه وحشی ۶ در مزارعی که از واکسن‌های متنوعی برای ایمن سازی استفاده کرده‌اند (جدول ۱) به فرضیه‌ی ظهور سویه‌های جدید در نتیجه واکسیناسیون قوت می‌بخشد.

در پایان خاطر نشان می‌گردد که روش تشخیص بر مبنای ژن پلی مرز ویروس برونشیت با توجه به تنوع مناسب از امکانات بیشتری برای تایپینگ ژنتیکی ویروس در مناطق جغرافیایی گوناگون و تفکیک سویه ویروس وحشی از سویه واکسن برخوردار است.

طبقه بندی سویه‌ها با تکیه بر تنوع توالی‌های این ژن طراحی شده‌اند. با این وجود گروه بندی براساس منطقه S1 برای شناسایی و تمایز سویه‌های وحشی از سویه‌های واکسن کافی و قابل اعتماد نیستند (۱۴؛۱۵).

در رویکردهای اپیدمیولوژی مولکولی، تنوع زیاد در شاخص بررسی (ژن هدف) گیج کننده بوده و تنوع کم نیز با درجه پایینی از قدرت تفکیک پذیری سویه‌ها همراه است. مشکل تنوع زیاد و یا کم به این معنی است که احتمال کمی وجود دارد که یک نوع جدید، دارای مشخصات قابل اعتماد و متمایز برای طبقه بندی قابل استفاده باشد.

در نتیجه، با توجه به درجه بالایی از پلی مورفیسم، تعیین گروه‌های ژنتیکی متنوع بر اساس توالی S1، با تاریخ فیلوژنتیک سازگار نیست. در مطالعه حاضر، تشخیص بر اساس ژن پلی مرز وابسته به RNA یا RdRp صورت گرفت. این ژن برای اولین بار توسط ما برای تایپینگ ویروس مورد استفاده قرار گرفته است. انتخاب ژن RnRP مبتنی بر تحلیل‌های دقیق بیوانفورماتیک بود و می‌تواند اطلاعات جدیدی از تنوع ویروس و اختلافات گسترده سویه‌های واکسن و وحشی به دست دهد. تجزیه و تحلیل ژنتیکی RdRp می‌تواند در ردیابی تاریخ تکامل و مهاجرت ویروس مفید باشد. ژن رپلیکاز ویروس برونشیت عفونی تعیین کننده پاتوژنیسته بیماری نیز هست و توالی متمایز از سویه واکسن ممکن است منعکس کننده احتمال همبستگی بین این ژن و حدت ویروس باشد (۱۶). علاوه بر این داده‌های به دست آمده از ژن RdRp ممکن است برای طراحی و توسعه واکسن مناسب باشد.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که روش تشخیص و توالی مستقیم بر اساس توالی ژن RdRp، قادر به شناسایی سویه‌های وحشی و سویه‌های واکسن بودند. تجزیه و تحلیل توالی نیز نشان داد که ۶ سویه کاملاً متمایز از واکسن و سویه‌های گزارش شده در جهان در استان مازندران حضور دارند. مطالعه انجام شده بر روی سویه‌های برونشیت عفونی ایران در بین

فهرست منابع

1. Najafi H, Ghalyanchi LA, Hashemzadeh M, Karimi V, Madadgar O, Khaltabadi FR, et al. Pathogenicity study of Iranian genotype of avian infectious bronchitis virus (IR-1). *Vet Res Forum* 2017;8(1):35-41.
2. Okino CH, Mores MA, Trevisol IM, Coldebella A, Montassier HJ, Brentano L. Early immune responses and development of pathogenesis of avian infectious bronchitis viruses with different virulence profiles. *PLoS One*. 2017;12(2):e0172275.
3. Dhama K, Singh SD, Barathidasan R, Desingu PA, Chakraborty S, Tiwari R, et al. Emergence of Avian Infectious Bronchitis Virus and its variants need better diagnosis, prevention and control strategies: a global perspective. *Pak J Biol Sci* 2014 Jun;17(6):751-67.
4. Fraga AP, Graf T, Pereira CS, Ikuta N, Fonseca ASK, Lunge VR. Phylodynamic analysis and molecular diversity of the avian infectious bronchitis virus of chickens in Brazil. *Infect Genet Evol* 2018 Jul;61:77-83.
5. Jiang L, Han Z, Chen Y, Zhao W, Sun J, Zhao Y, et al. Characterization of the complete genome, antigenicity, pathogenicity, tissue tropism, and shedding of a recombinant avian infectious bronchitis virus with a ck/CH/LJL/140901-like backbone and an S2 fragment from a 4/91-like virus. *Virus Res* 2018 Jan 15;244:99-109.
6. Bande F, Arshad SS, Omar AR, Hair-Bejo M, Mahmuda A, Nair V. Global distributions and strain diversity of avian infectious bronchitis virus: a review. *Anim Health Res Rev* 2017 Jun;18(1):70-83.
7. Khataby K, Fellahi S, Loutfi C, Mustapha EM. Avian infectious bronchitis virus in Africa: a review. *Vet Q* 2016 Jun;36(2):71-5.
8. Jakhesara SJ, Nath B, Pal JK, Joshi CG, Kumar S. Emergence of a genotype I variant of avian infectious bronchitis virus from Northern part of India. *Acta Trop* 2018 Jul;183:57-60.
9. Li TT, Li JY, Huang T, Ge XY. Complete Genome Sequence of a Novel Strain of Infectious Bronchitis Virus, Isolated from Chickens in China in 2016. *Genome Announc* 2017 Nov 9;5(45).
10. Aghakhan S, fshar M, Fereidouni N, Manuresi C, Khodashenas M. Studies on avian viral infections in Iran. *Archive de L, Institute Razi* 1994;44(45):1-10.
11. Hosseini H, Fard MH, Charkhkar S, Morshed R. Epidemiology of Avian Infectious Bronchitis Virus Genotypes in Iran (2010-2014). *Avian Dis* 2015 Sep;59(3):431-5.
12. Seyfi Abad Shapouri MR, Mayahi M, Charkhkar S. A survey of the prevalence of infectious bronchitis virus type 4/91 in Iran. *Acta Vet Hung* 2004;52(2):163-6.
13. Masoudian A, Sheikhi N, Bozorgmehri-Fard MH. Identification of new avian Infectious Bronchitis virus variants in Iranian poultry flocks by High Resolution Melting curve analysis. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society* 2018; 69(1):783-90.
14. Hewson KA, Browning GF, Devlin JM, Ignjatovic J, Noormohammadi AH. Application of high-resolution melt curve analysis for classification of infectious bronchitis viruses in field specimens. *Aust Vet J* 2010 Oct;88(10):408-13.
15. Hewson K, Noormohammadi AH, Devlin JM, Mardani K, Ignjatovic J. Rapid detection and non-subjective characterisation of infectious bronchitis virus isolates using high-resolution melt curve analysis and a mathematical model. *Arch Virol* 2009;154(4):649-60.
16. Armesto M, Cavanagh D, Britton P. The replicase gene of avian coronavirus infectious bronchitis virus is a determinant of pathogenicity. *PLoS One* 2009 Oct 9;4(10):e7384.
17. Okino CH, Montassier MFS, Oliveira AP, Montassier HJ. Rapid detection and differentiation of avian infectious bronchitis virus: an application of Mass genotype by melting temperature analysis in RT-qPCR using SYBR Green I. *J Vet Med Sci* 2018 Apr 27;80(4):725-30.

18. Mousavi FS, Ghalyanchilangeroudi A, Hosseini H, Nayeri FB, Ghafouri SA, Abdollahi H, et al. Complete genome analysis of Iranian IS-1494 like avian infectious bronchitis virus. *Virusdisease* 2018 Sep;29(3):390-4.