

آنالیز ملکولی سه سویه متعلق به سرو تیپ B/793 و ویروس های برونشیت عفونی طیور جدا شده از مرغداری های صنعتی ایران

گیثا اکبری آزاد^۱ مهدی وصفی مرندی^{۱*} حسین کیوانی امینه^۲

دریافت مقاله: ۸ اسفندماه ۱۳۸۴

پذیرش نهایی: ۱۲ آذرماه ۱۳۸۵

MOLECULAR ANALYSIS OF THREE IRANIAN ISOLATES BELONGED TO 793/B SEROTYPE OF INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUSES

AkbariAzad, G.¹, Vasfi Marandi, M.^{1*}, Keyvani aminae, H.²

¹Departement of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran. ²University of Iran Medical Sciences, Tehran-Iran.

Infectious bronchitis (IB) disease is one of the important respiratory diseases of poultry that causes annually large economic losses in poultry industry of Iran. The aim of this study is molecular characterization of S1 gene of Iranian infectious bronchitis virus (IBV) belonged to 793/B serotype. The whole S1 gene of three local IBV strains in RT-PCR, showed a band above 1600 base pair (bp) in gel electrophoresis. RFLP analysis using 3 restriction enzymes, HaeIII, HindIII and EcorI, showed 793/B serotype pattern. The S1 gene of these strains were sequenced and compared with 30 reference IBV strains. Identity Plot (IP) of nucleic acids and amino acids sequences were also designed. Moreover, nucleic acids differences in 1659 bp of S1 gene were calculated by distance method: nucleotide: Kimura 2-parameter and finally, the phylogenetic tree of S1 gene sequence strains with the highest validity in branching were designed. Three Iranian strains belonged to 793/B genotype with nucleotide differences of 5.64-6.07 % to UK/793/B as a prototype of 793/B and 26.02-26.16 % to H120 as a vaccinal strain. Regarding to low homology and weak cross protection between 793/B serotype and Massachusetts vaccinal strain, it would be a possible cause for failure in vaccination and outbreak of IB disease in vaccinated flock of poultry industry. *J. Vet. Res.* 62,1:69-80,2007.

Key words: IBV, 793/B serotype, RT-PCR/RFLP, sequencing.

***Corresponding author's email:** mvmarand@ut.ac.ir, **Tel:** 021-66438322, **Fax:** 021-66933222

بیماری برونشیت عفونی طیور یکی از بیماری های مهم تنفسی طیور است که هر ساله خسارات اقتصادی بسیار زیادی را به صنعت طیور کشور تحمیل می کند. هدف از انجام این مطالعه آنالیز و تعیین خصوصیات ملکولی سکانس نوکلئوتیدی و آمینو اسیدی ویروس های برونشیت عفونی جدا شده از مرغداری های صنعتی ایران می باشد. در این مطالعه کل ژن S1 جدایه های برونشیت عفونی طیور با آزمایش RT-PCR تکثیر و سپس محصول RT-PCR، روی ژل آگار الکتروفورز گردید که تمامی جدایه ها، باند بالای ۱۶۰۰ جفت باز را نشان دادند. در آزمایش RFLP تحت آنزیم های محدودگر HaeIII, HindIII, EcorI، سه جدایه که الگوی سرو تیپ B/793 را نشان دادند انتخاب و سکانس نوکلئوتیدی ژن S1 مشخص و به اسید آمینه های متناظر ترجمه شد. طرح تشابهی (IP plot) نوکلئوتیدی و آمینو اسیدی ژن S1 این سویه ها، با ۳۰ سویه رفرانس برونشیت عفونی ترسیم و در نهایت درخت فیلوژنتیک نوکلئوتیدی و آمینو اسیدی، طراحی شد. آنالیز درخت فیلوژنتیکی نشان داد که هر سه سویه ایران در سرو تیپ B/793 قرار می گیرند. درصد اختلاف نوکلئوتیدی این سه سویه با سویه UK/793/B به عنوان پروتوتیپ سرو تیپ B/793، ۶/۶۴-۵/۶۴ درصد و با سویه واکسن H120، ۲۶/۱۶ تا ۲۶/۰۲ درصد می باشد. با توجه به اینکه B/793 نوعی سرو تیپ با همولوژی پائین نسبت به سویه واکسینال H120 ماساچوست می باشد ممکن است سرو تیپ B/793 مسئول واگیری برونشیت در گله های واکسینه و توجیه کننده شکست در واکسیناسیون این بیماری باشد. مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۸۶، دوره ۶۲، شماره ۱، ۸۰-۶۹.

واژه های کلیدی: بیماری برونشیت عفونی طیور، سرو تیپ B/793، RT-PCR/RFLP, Sequencing.

ویروس برونشیت عفونی (IBV) می تواند موجب بیماری های تنفسی، التهاب کلیوی، اختلالات تولید مثلی و یا کاهش وزن پرندگان مبتلا شود. با این حال هیچکدام از این علائم، اختصاصی بیماری نیستند و بدین ترتیب برای تشخیص عفونت در گله های مبتلا به ابزار تشخیص آزمایشگاهی نیاز است، این تشخیص گاهی مستلزم شناسایی نوع ویروس نیز می باشد تا بتوان با انتخاب برنامه واکسیناسیون بهتر، حفاظت بیشتری در گله های بعدی ایجاد کرد. به طور کلی عفونت با IBV را می توان به دو طریق ردیابی حضور کل یا جزئی از ویروس IBV و همچنین ردیابی آنتی بادی های اختصاصی علیه IBV تشخیص داد. انتخاب روش مناسب از بین انواع روش ها و تفسیر نتایج

حاصل مشکل و گاهی گیج کننده است. با این حال براساس هدف و شرایط منطقه ای، می توان بهترین روش یا تلفیقی از چند روش را انتخاب کرد (۱). ویروس های IBV حداقل حاوی بیش از ۳۰ سرو تیپ هستند (۲۳). از آنجا که این ویروس ها به فراوانی می توانند دچار تغییرات ژنتیکی و آنتی ژنتیکی از طریق موتاسیون های نقطه ای و پدیده نوترکیبی ژنتیکی شوند و از طرفی میزان حفاظت متقاطع بین سویه های مختلف بستگی به درصد همولوژی

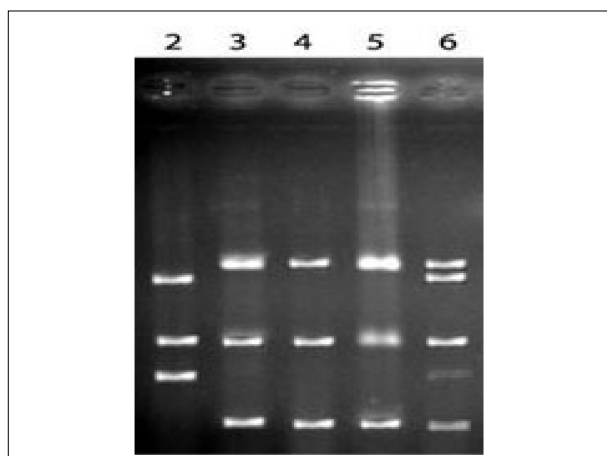
(۱) گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

(۲) دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران - ایران.

(*) نویسنده مسؤول: تلفن: ۰۲۱-۶۶۴۳۸۳۲۲، نمابر: ۰۲۱-۶۶۹۳۳۲۲۲

Email: mvmarand@ut.ac.ir





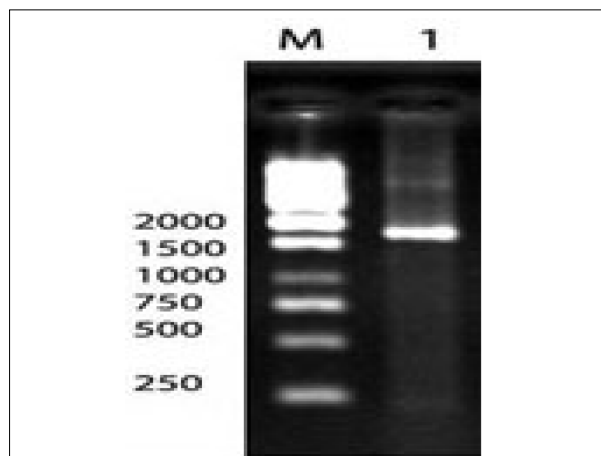
تصویر ۲ - الگوی RFLP در جدایه‌های IBV در هضم آنزیمی با HaeIII ستون‌های ۳، ۴، ۵، ۶ الگوی مشابه سروتیپ ۷۹۳/B و ستون ۲ الگوی مشابه سروتیپ Mass را نشان دادند.

استفاده از محلول استخراج RNA (RNXTM-Plus، شرکت سیناژن)، کروفورم، ایزوآمیل الکل و ایزوپروپانل انجام شد. همچنین از سویه رفرانس ۱۰۰۷ ایران (که قبلاً با تأیید آزمایشگاه Weybridge جزء سروتیپ ۷۹۳/B شناسایی شده بود) (۴) و چند سویه رفرانس IBV تهیه شده از آزمایشگاه Weybridge شامل B D274، D1466، M41، H120، ۷۹۳/B نیز در این مطالعه استفاده شد.

آزمایش RT-PCR/RFLPs: به‌طور خلاصه برای تهیه cDNA از RNA استخراج شده، آنزیم رونوشت برداری معکوس (enzyme, Fermentas Co.)، پرایمر Random Hexamer استفاده شد و سپس با کمک جفت پرایمر (RT Oligo3 (5'-CATAACTAACATAAGGGCAA-3') و S1 (3'-TGAAACTGAACAAAAGAC New S1 Oligo5 و آنزیم DNA

جدول ۱- تعداد ۳۰ سویه رفرانس IBV همراه با Accession Numbers آنها در bank Gene به همراه منابع مورد استفاده در داخل پراکنش نشان داده شده است.

No	IBV strain	Accession Number	No	IBV strain	Accession Number
1	4/91 Attenuated	AF093793 (11)	16	UK2/91	Z83976(6)
2	4/91 Pathogenic	AF093794 (11)	17	UK 7/91	Z83975(6)
3	US variant 1	AF093795 (11)	18	UK91/5	Z83978(6)
4	US variant 2	AF093796 (11)	19	UK91/3	Z83977(6)
5	M41	M21883 (21)	20	UK82/6	X04723(8)
6	Beaudette	X02342 (7)	21	D207	M21969.J04329(17)
7	H120	M21970.J04329 (19)	22	D274	X158325 (15)
8	Ark99	M99482 (28)	23	B1648	X87238(27)
9	ArkDPI	AF006624 (17)	24	JMK	L14070(16)
10	Gray	L14069 (18)	25	Florida	AF027512 (20)
11	Holt	L18988 (17)	26	LD3-China	AY277632
12	D1466	M21971.J04329(17)	27	A2-China	AY043312
13	Qu16	AF349620(25)	28	O2-Italy	AJ457137
14	MV-Qu	(AF349621 (25)	29	JP9758	AY296746
15	UK793/B	Z83979(6)	30	JP8127	AY296744



تصویر ۱ - الکتروفورز روی ژل آگار ژن S1 تکثیر شده در واکنش RT-PCR: M= Gene ruler 1Kb DNA ladder (Fermentas).

بین ژنوم آنها به ویژه ژن S1 دارد، به همین جهت ظهور سویه‌های جدید خطر جدی برای صنعت طیور محسوب می‌شود (۲۹).

جداسازی و شناسایی IBV، برای تشخیص قطعی ضروری است. شناسایی RNA ژنومی معمولاً به روش RT-PCR می‌باشد. استفاده از این تکنیک برای تکثیر ویروس برونشیت در شرایط In vivo و In vitro در حال افزایش است. RNA ویروس برونشیت با آنزیم ترانس کریپتاز به cDNA رونویسی شده و بعد با روش PCR تکثیر می‌شود. از محصول PCR می‌توان به کمک تکنیک دیگر مثل RFLP، هیبریداسیون، تعیین توالی (sequencing) برای تعیین خصوصیت ویروس استفاده کرد. تلفیق PCR با روش‌های ذکر شده می‌تواند برای تعیین ژنوتیپ استفاده شود (۱۴، ۱۸). در شناسایی ژنوم ویروس IBV، معمول‌ترین روش PCR است که گاهی با روش‌های دیگر مثل RFLP و یا سکانس تأیید می‌شود. در طبقه‌بندی سویه‌ها هنوز تست‌های سرولوژیک معتبر و مطلوب هستند. از معایب تعیین سروتیپ فقدان استاندارد بین سیستم‌های متفاوت و استفاده کننده‌های آن است (۱۴).

مواد و روش کار

مرحله اول این مطالعه که شامل نمونه‌گیری، تکثیر ژن S1 ویروس به روش RT-PCR و انجام RFLPs روی ژن تکثیر شده می‌باشد که بر اساس پروتکل ارائه شده توسط اکبری و همکاران در سال ۱۳۸۳ (۲) به شرح مختصر زیر انجام گرفته است.

نمونه‌گیری و استخراج RNA: تعداد صد و بیست نمونه (شامل نای، کلیه و ریه) از گله‌های مبتلا به سندرم‌های تنفسی و مشکوک به بیماری برونشیت عفونی، یک تاسه پاساژ روی تخم مرغ جنین دار داده شد که برخی از نمونه‌ها در پاساژ سوم ایجاد علائم و برخی بدون ایجاد علائم روی جنین بودند. برخی نمونه‌ها، صرفاً یک پاساژ به منظور تکثیر اولیه ویروس در تخم مرغ جنین دار انجام شد. RNA ویروس (از مایع آلانتوییک آلوده)، با



		10	20	30	40	50	60	
Ref-UK7-93	1	MLVTPPLIVT	LLCALCSAAL	YDNNT-YVYY	YQSALRPGPG	WHLHGGAYAV	DKVFNETNNA	59
Ref-2-91	1	..GK.L...	..WY....L.	..K.-....	F...Q.	G....	G....	10
Ref-7-91	1	..GK.L...	..WY....L.	..K.-....	F...Q.	G....	G....	10
Ref-4-91at	1	..GK.L...	..WY....L.	..K.-....	F...Q.	G....	G....	10
Ref-4-91pa	1	..GK.L...	..WY....L.	..K.-....	F...Q.	G....	G....	10
Ref-3-91	1	..GK.L...	..W....L.	..D.-....	F...L.	A....	A....	9
Ref-5-91	1	..GK.L...	..W....L.	..D.-....	F...Q.	A....	A....	8
IR-3654-IB	1	..K.L...	..W....L.	..G.-....	F...S.	R...D--	R...D--	9
IR-1062-IB	1	P.GK.L...	..W....L.	..G.-....	F...S.	R...D--	R...D--	11
IR-1061-IB	1	P.GK.L...	..R....TL.	..G.-...F.	F....	D...R.N----	D...R.N----	13
Ref-USVar1	1	..GK.L...	..WY....L.	..SS-....	F...SS.	I....R....	I....R....	13
Ref-Italy-	1	..GK.L...	..F...N.L.	..G.-....	F...PF.	V....VN.ST.YA..	V....VN.ST.YA..	17
Ref-China-	1	..GKSLF...	..I.....N.	..F.SANN...	F...PN.	Q....VNST.H...	Q....VNST.H...	21
Ref-Ld3-ch	1	..GKSLF...	..I.....N.	..FNSGN...	F...PN.	Q....VNST.H.S...	Q....VNST.H.S...	22
Ref-D274	1	..ERSL.A.	..S....N.	..FG...S...	F...PD.	E...VN...T.SS...	E...VN...T.SS...	19
Ref-Uk6-82	1	..ERSL.A.	..S....N.	..FG...S...	F...SD.	E...VN.ST.SS...	E...VN.ST.SS...	20
Ref-D207	1	..ERSL.A.	..S....N.	..FG...S...	F...PD.	E...VN.ST.SS...	E...VN.ST.SS...	20
Ref-USVar2	1	..KSLFI...	..F.....	..F...E-T...	F...SN.	K....VN.SV.Y...	K....VN.SV.Y...	18
Ref-B1648	1	..VQLSV...	..F.....I.	..FND.Y--N.	F...PS.	Q...VN.T.N...	Q...VN.T.N...	20
Ref-Gray	1	..S.R.L...	..C.L.G.S.	..LN.DS...	F...PN.	K...VN.SE.Y...	K...VN.SE.Y...	20
Ref-JMK	1	..S.R.L...	..C.L.G.S.	..LN.DS...	F...PN.	K...VN.SE.Y...	K...VN.SE.Y...	20
Ref-H120	1	L....		..SSS-....	F...PD.	VNISS.S...	VNISS.S...	13
Ref-H120-1	1	L....		..SSS-....	F...PD.	VNISS.S...	VNISS.S...	13
Ref-M41	1	L....	..V.....	..SSS-....	F...PN.	VNISS.S...	VNISS.S...	14
Ref-M42	1	L....	V.	..SSS-....	F...PS.	Q...VNISS.F...	Q...VNISS.F...	15
Ref-Florid	1	L....	..F.....	..SS-....	F...PN.	VNTSI.S.RQ	VNTSI.S.RQ	15
Ref-Ark99	1	..KSLF...	..I.F....N.	..ES-F...	F...H.	VN.SS.N...	VN.SS.N...	17
Ref-ArkDPI	1	..KSLF...	..I.F....N.	..ES-F...	F...H.	VN.SS.N...	VN.SS.N...	17
Ref-Qu-Mv	1	L....		..DS-....	F...SM.	VN.ST.S...	VN.ST.S...	11
Ref-qul6	1	L....		..DS-....	F...SM.	VN.ST.S...	VN.ST.S...	11
Ref-USHolt	1	..KSLFV...	..F.F....N.	..S-....	F...ST.	VN.Q.Y...	VN.Q.Y...	16
Ref-Jp8127	1	..KSLF...	..F....T.	..KD-....	F...PV.	VN.SQ....	VN.SQ....	15
Ref-Jp9758	1	..KSLF...	..F....T.	..D-....	F...PV.	VN.SQ....	VN.SQ....	14
Ref-D1466	1	..WASLLSV...	..F...SECSI	..VGE.Y--T..	QF...PN.	..K....L.TNETDISY.G	..K....L.TNETDISY.G	33
		70	80	90	100	110	120	
Ref-UK7-93	60	GSGPDCTAGT	FYESHNISAA	SVAMTVPHNG	MSWSVSQFCT	AHCNFSHVTV	FVTHCFKSQP	119
Ref-2-91	11	V.VS.....	Y....	PA.	DF..	N.Q	N.Q	20
Ref-7-91	11	V.VS.....	Y....	PA.	DF..	Q	Q	19
Ref-4-91at	11	V.VS.....	Y....	PA.	A....	DF..	Q	20
Ref-4-91pa	11	V.VS.....	Y....	PA.	DF..	Q	Q	19
Ref-3-91	9	..A.....	Y....	A.D.	DF..	K.A	K.A	17
Ref-5-91	8	..A.....	Y....	A.D.	A.H...	DF..	N.A	18
IR-3654-IB	9	..A.E.....		T...	DF..	NL.	NL.	16
IR-1062-IB	11	..A.E.....		T...	DF..	NL.	NL.	18
IR-1061-IB	13	..ASE.....		P...	DF..	N.	N.	20
Ref-USVar1	13	..VS.....	V	A....	DF..	N.	N.	20
Ref-Italy-	18	HGTS-....	ISW.K.FT...	A.TS.	..A.TA...	TDF..	GT	38
Ref-China-	21	..ASG.V.V	IKDVY.Q...	..I...A.LQ.	..A.K...S	EI...	YS.GT	45
Ref-Ld3-ch	22	..ASQ..G.V	IKDVY.Q...	..I...A.LQ.	..A.K.E.S	EI...	YS.G.	46
Ref-D274	19	..TTG-..V.A	I.W.K.F...	A.Q...	TE...	TDFV.	Y..SH	39
Ref-Uk6-82	20	..TTG-..A	I.W.K.F...	A.Q...	TE...	TDFV.	Y..GH	39
Ref-D207	20	..TTG-..A	I.W.K.F...	A.Q...	TE...	TDFV.	Y..KG.	39
Ref-USVar2	18	..T.G-...V	I.W.K.F.S	A.GT.	TN...	TDF..	Y..GS	37
Ref-B1648	20	..S.T...V	I.Y.K.FT.S	A.PP.	T.E...	TF..	GA	38
Ref-Gray	21	PGNSG.V..A	IFW.K.F...	IA..S.	Q....	T.F..	VGA	41
Ref-JMK	21	PGNSG.V..A	IFW.K.L...	IA..S.	Q....	T.F..	AGA	41
Ref-H120	13	..SSG..V.I	IHGGRVVN.S	..I...A.SS.	..A.S....	..Y...DT..	Y.HVG	40
Ref-H120-1	13	..SSG..V.I	IHGGRVVN.S	..I...A.SS.	..A.S....	..Y...DT..	Y.HVG	40
Ref-M41	14	..S.G.IV..	IHGGRVVN.S	..I...A.SS.	..A.S....	DT..	Y.YDG	39
Ref-M42	15	..SSG..V.I	IHGGRVVN.S	..I...A.SS.	..A.S....	DT..	Y.HGG	41
Ref-Florid	15	-----IL.I	IGGDRVVN.S	..I...A.QP.	..N.S.H...	DI...	Y.HNG	40
Ref-Ark99	17	..TA.S...A	IGY.K.F...	A.LS.	A.S...	TSYI.	GS	37
Ref-ArkDPI	17	..TA.S...A	IGY.K.L...	A.LS.	ANS...	TSYI.	Y..GS	39

تصویر ۳ - Identity Plot یا طرح تشابهی سکانس اسید آمینه ای سویه های IBV ایران.



Ref-Qu-Mv	11	..AN-.R..A	IVF.K.LT.S	.I...A.P..	TN....	TDF..	Y..GA	33
Ref-qu16	11	..AN-.R..A	IVF.K.LT.S	.I...A.P..	TN....	TDF..	YR.GA	34
Ref-USHol1	16	.TAAQ.SI..	IGW.K.F..S	..S..A.LP.	AHK...	TDI..	HDG	41
Ref-Jp8127	15	..ASQ....A	IHW.K.F...	T.PS.	.D..T....	NIV.	Y..GN	35
Ref-Jp9758	14	..ASQ....A	IHW.K.F...	T.PS.	.D..T....	NIV.	Y..GN	34
Ref-D1466	34	V.----.V..	IKGGIV.NES	AISFVTKTP-	IA..ANGV..	TY..Y.SLY.	GG.GH	69
		130	140	150	160	170	180	
Ref-UK7-93	120	GTCPLTG-MI	PQNHIRISAM	RGG-----V	LFYNLTVSVS	-KYPSEKSLQ	CVSNSTSVYL	171
Ref-2-91	20	.S.....-		.S-----F		K.....	..G.....	25
Ref-7-91	19	.S.....-	...R.....	.S-----F		K.....	..G.....	25
Ref-4-91at	20	.S.....-		.S-----F		K.....	..G.....	25
Ref-4-91pa	19	.S.....-		.S-----F		K.....	..G.....	24
Ref-3-91	17	.SS.....-	...P.....	F	.S..S.....	R.....		24
Ref-5-91	18	.S.....-		F	.S.....	R.....		22
IR-3654-IB	16	.S.....-	.R.....	.DR-----T	S.....			22
IR-1062-IB	18	.S.....-	.R.....	.DR-----T	S.....			24
IR-1061-IB	20	.S.....-		.DR-----T	S.....		...L.....	26
Ref-USVar1	20	.S.....-		.Q-----T		R.....	V	25
Ref-Italy	38	.K.....-L	.NG.....	KE.S-N--S	I..T	R.....	..N.F.A...	53
Ref-China	45	.S..I...-	ARD.....	KN-----S		N..F.	..N.F....	57
Ref-Ld3-ch	47	MS..I...-	ARD.....	KN-----S		N..F.	..N.Y....	59
Ref-D274	39	.S.....-L		KNS-----S	A.T	R.....	..N.M....	50
Ref-Uk6-82	39	.S.....-L		KNS-----S	A.T	R.....	..N.M....	50
Ref-D207	39	.S.....-L	..Y.....	KNS-----S	A.T	R.....	..N.M....	51
Ref-USVar2	37	.S.....-L		KNS-----S	A.T	R.....	..N.L....	48
Ref-B1648	38	.Q.....-L	Q.GY..V...	KTEGES---Y	LPTT	..H.K.R...	..N.Q....	60
Ref-Gray	41	.L.....-PL	L.GQ.....	.SVNSR--PH	T	L.....	..N.Q....	58
Ref-JMK_1	41	.L.....-L	.KGQ.....	.SVNSR--LH	T	L.....	..N.Q....	57
Ref-H120	40	--.I...-L	Q.HS..V...	KN-----Q	A	T..F.	..N.L....	54
Ref-H120-1	40	--.I...-L	Q.HS..V...	KN-----Q	A	T..F.	..N.L....	54
Ref-M41_1	39	--.I...-L	QK.FL.V...	KN-----Q	A	T..F.	..N.L....	54
Ref-M42_1	41	--.I...-L	Q..L..V...	KN-----Q	A	T.R.F.	..N.L....	54
Ref-Florid	40	--.I...-I	..HS..V...	KK-----R	N	T..F.	..N.F....	53
Ref-Ark99	38	NS.....-L	.SGY...A..	KH.SRT-PGH	T	K.R...	..N.H....	57
Ref-ArkDPI	40	NS.....-L	.SGY...A..	KH.SAM-PGH	T	K.R...	..N.Y....	59
Ref-Qu-Mv	34	SE.....-L	.SGY.....	.S.CSN-ASC	.VF...QP..	K.R...	..N.Y....	54
Ref-qu16	35	SE.....-L	.SGY.....	.S.CSN-ASC	.VF...QP..	K.R...	..N.Y....	55
Ref-USHol1	41	-----L	EKG.L....F	KKKSVVGPSD	APAT	LL....	..N.H....	65
Ref-Jp8127	36	NA.....-L	N.GY.....	KQ.GSG-PAD	P.T	SK.R...	..N.Q....	56
Ref-Jp9758	35	NA.....-L	N.GY.....	KQ.GSG-PAD	P.T	SK.R...	..N.Q....	55
Ref-D1466	70	TS.IINTNR.	GEIVLGVKDF	S.N-----	WI..R.IKAI	GP.SK.TAW.	.LA.F...F.	107
		190	200	210	220	230	240	
Ref-UK7-93	172	NGDLVFTSNE	THVTGAGVY	FKSGGPVITYK	VMKEVKALAY	FINGTAQEV	LCDNSPRGLL	231
Ref-2-91	25							25
Ref-7-91	25							25
Ref-4-91at	25							25
Ref-4-91pa	24							24
Ref-3-91	24		.SY.....					26
Ref-5-91	22		.SY.....					24
IR-3654-IB	22		.FY.....					24
IR-1062-IB	24		.FY.....					26
IR-1061-IB	26		.SY.....					28
Ref-USVar1	25		.SYI.....					28
Ref-Italy	53		.KD.S.....	.A...I...	.R.....	.V....D.	...K.....	62
Ref-China	57	K	.D..S.....	.A...N.S	I...F.V...	.V....D.	...K.....	69
Ref-Ld3-ch	59	K	.D..A....	.A...N.S	I...F.V...	LV...V.D.	...I..K...	74
Ref-D274	50		.KD.SA...H	.A...I...	.R.....	.V....D.	...G..T...	62
Ref-Uk6-82	50		.KD.SA...H	.A...I...	.R.....	.V....D.	...G..T...	62
Ref-D207	51		.KD.SA...H	.A...I...	.R.....	.V....D.	...G..T...	63
Ref-USVar2	48	D	.KD.SA...	I...	QLDV...	.V....D.		60
Ref-B1648	60	..H.....	.LD.SA...	I...	.R.....	.V....HD.		70
Ref-Gray	58	S...	.ID.S...H	.A...I...	T....	.V....D.	...G.....	69
Ref-JMK_1	57	S...	.ID.S...H	.A...I...	T....	.V....D.	...G.....	68

تصویر ۱-۳ - Identity Plot یا طرح تشابهی سکانس اسید آمینه‌ای سویه‌های IBV ایران.

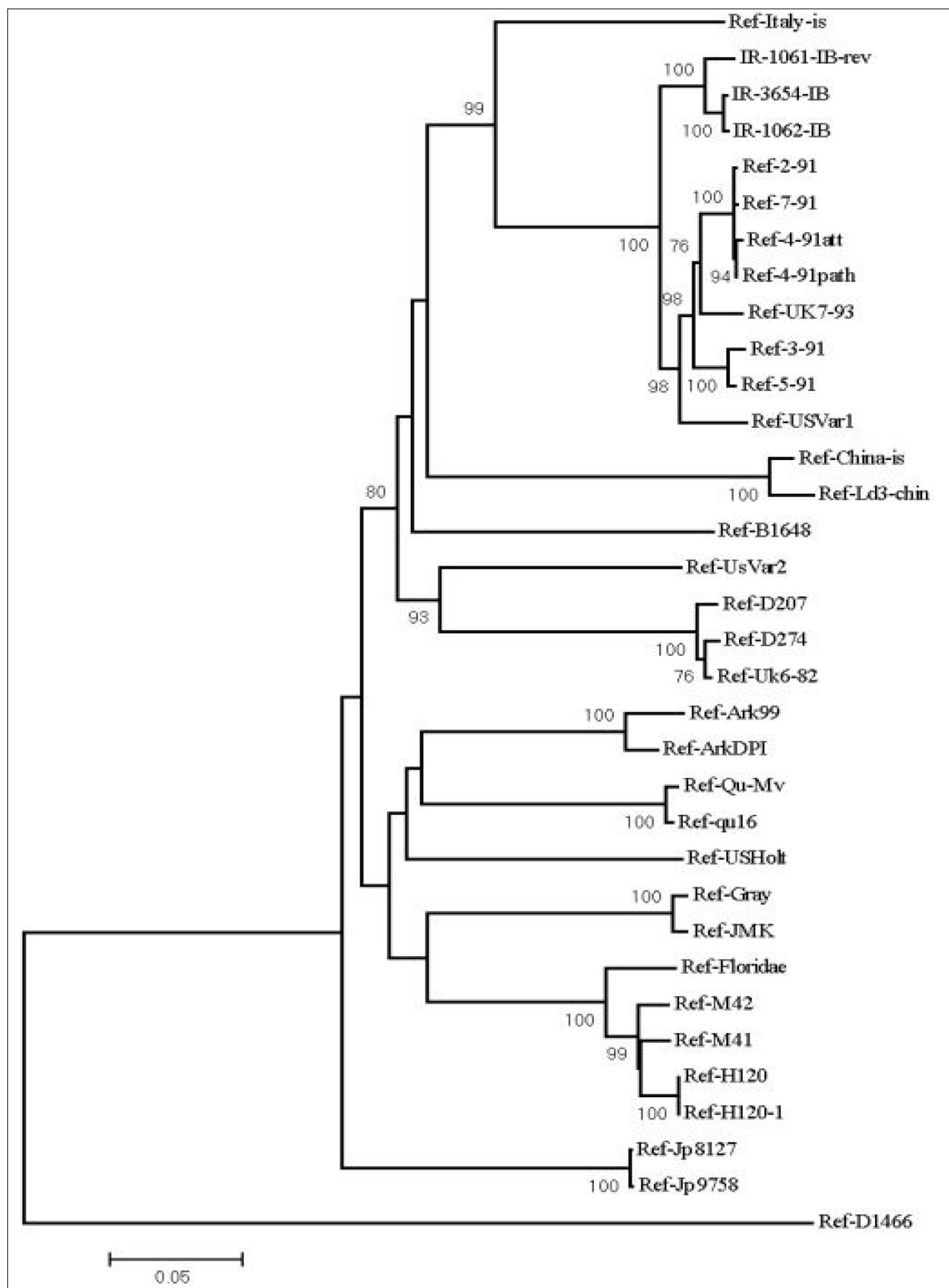


Ref-M41	15	.A...CAG.A	---G.TC...	C..T.....	A..	A..T....T	29	
Ref-M42	14	.A...CAG.A	---G.TC...	C..T.....	C.A..	A..T.G...T	30	
Ref-Florid	14	.A...CAA.A	---G.TC...	C..T.....	A..	A..T....T	28	
Ref-Jp8127	8	.A...CAAA.	---C.....	C..T....T	G....	C.A..	A..GGT...T	25
Ref-Jp9758	8	.A...CAA..	---C.....	C..T....T	G....	C.A..	A..GGT...T	24
Ref-D1466	25	G.A.G.GAAA	-----	CACA.....	T.....G...C	AG.....	G..T....C	43
		130	140	150	160	170	180	
Ref-China-	121	TGGCATCTGC	AAGGGGGTGC	TTATGCAGTA	GTGAATTCTA	CTAATCATAC	TAATAATGCC	18
Ref-Ld3-ch	2				C.....		G.....	4
Ref-2-91	31	A..	T.....		.AT..GGT.T	T...GGA..	C..C....A	46
Ref-7-91	31	A..	T.....		.AT..GGT.T	T...GGA..	C..C....A	46
Ref-4-9lat	31	A..	T.....		.AT..GGT.T	T...GGA..	C..C....A	46
Ref-4-91pa	31	A..	T.....		.AT..GGT.T	T...GGA..	C..C....A	46
Ref-3-91	29	T.A.	T.....		.AT..GGT.T	T...GCA..	C..C....A	45
Ref-5-91	29	T.A.	T.....		.AT..GGT.T	T...GCA..	C..C....A	45
Ref-UK7-93	33	CT.A.	T.....		.AT..GGT.T	T...G.A..	C..C....A	49
Ref-USVar1	33	CA.A.	T.....		.AT.GGGT.T	T...G.A..	C..C....A	50
IR-3654-IB	33	A..	T.....		.AT.GGGT.T	T...G----	--C....A	46
IR-1062-IB	34	A..	T.....		.AT.GGGT.T	T...G----	--C....A	47
IR-1061-IB	35	T.A.	T.....	G.....	.AT.GGGT-	T...G----	--C....A	47
Ref-Italy-	30	G.T.	T..A..C.	G.....	..T...GTA.	G..CGG.GTA	.GC....G	50
Ref-B1648	30	T.A.	T.....	..CA...G	..C...GT..	G.A.A	A	43
Ref-D274	22	T.A.	T..T....	A...	..A..GT.T	T..CGG.AT.	..G....A	39
Ref-Uk6-82	23	T.A.	T..T....	A...	..A..GT.T	..CGG.AT.	..G....A	39
Ref-D207	21	T.A.	T..T....	A...	..A..GT.T	..CGG.AT.	..G....A	37
Ref-USVar2	26	AA..	T.....		..T...GT.T	..GTAG.ATA	..C..C..A	43
Ref-Ark99	22	T.A.	T..A....		..T...GTGT	..G.G.A.A	A	36
Ref-ArkDPI	22	T.A.	T..A....		..T...GTGT	..G.G.A.A	A	36
Ref-Qu-Mv	29	T.A.	T..A..C.		..T...GT.T	..C.G.G..	..G....A	43
Ref-qu16	29	T.A.	T..A..C.		..T...GT.T	..C.G.G..	..G....A	43
Ref-USHolt	21	CT.A.	T.....		..T...GT.T	T.C.GG.ATA	C.....A	38
Ref-Gray	31	T.A.	T..A..G.	..AA....	..T...GT.T	..G.GG.ATA	A	49
Ref-JMK	31	CT.A.	T..A..G.	..AA....	..T...GT.T	..G.GG.ATA	A	50
Ref-H120	29	T.A.	T.....	G...G..T	..T...AT.T	..G.G.AT.	A	44
Ref-H120-1	29	T.A.	T.....	G...G..T	..T...AT.T	..G.G.AT.	A	44
Ref-M41	29	T.A.	C.....	G...	..T...AT.T	..GCG.AT.	A	43
Ref-M42	30	T.A.	C.....	G...	..T...CAT.T	..GCG.ATT	A	45
Ref-Florid	28	T.A.	C.....	G...	..T...A..T	..TAG.AT.	G-A.A	43
Ref-Jp8127	25	T.A.	T..A....		..T...GTG.	G.C.GG.A..	T	39
Ref-Jp9758	24	T.A.	T..A....		..T...GTG.	G.C.GG.A..	T	38
Ref-D1466	43	AAA.	T..T..A.	C...CTT..	ACC...GAA.	..G.CATAT.	CT.....GT	69
		190	200	210	220	230	240	
Ref-China-	181	GGTTCTGCAA	GTGGGTGCAC	TGTTGGTGT	ATTAAGGACG	TCTATAATCA	AAGTGCGGCT	240
Ref-Ld3-ch	4		..CA.....	..G.....	T.....			8
Ref-2-91	46	..TCAG..T.T	C..AT....	..C...AC.	T..T.T..AA	G.....AT	TTC...T..	70
Ref-7-91	46	..TCAG..T.T	C..AT....	..C...AC.	T..T.T..AA	G.....AT	TTC...T..	70
Ref-4-9lat	46	..TCAG..T.T	C..AT....	..C...AC.	T..T.T..AA	G.....AT	TTC...T..	70
Ref-4-91pa	46	..TCAG..T.T	C..AT....	..C...AC.	T..T.T..AA	G.....AT	TTC...T..	70
Ref-3-91	45	..CAGC...C	C..AT....	..C...AC.	T..T.T..AA	G.....AT	TTC...T..	68
Ref-5-91	45	..CAGC...C	C..AT....	..C...AC.	T..T.T..AA	G.....AT	TTC...T..	68
Ref-UK7-93	49	..CAG...G.C	C..AT....	..C...AC.	T..T.T..AA	G.C....AT	TTC...T..	73
Ref-USVar1	50	..CAG...T.T	C..AT....	..C...AC.	T..T.T..AA	G.C....AT	TTC...T..	75
IR-3654-IB	46	..CAG...C	C..A.....	..C...AC.	T..T.T..AA	G.C....AT	TTC...T..	68
IR-1062-IB	47	..CAG...C	C..A.....	..C...AC.	T..T.T..AA	G.C....AT	TTC...T..	69
IR-1061-IB	47	..CAG...T	C..A.....	..C...AC.	T..T.T..AA	G.C....AT	TTC...T..	69
Ref-Italy-	51	CACGG---	CCA.C.....	..C...AC.	..CTCTTGGA	GTA.G...TT	T.C...T..	79
Ref-B1648	43	AT..C	CAACA.....	..CA.....	..T.TT.TA	GTA.A...TT	T.C...TT.	68
Ref-D274	39	..CA---G.	C.....T..	..C...C.	..T.TTGA	GTA.G...TT	C...T..	60
Ref-Uk6-82	39	..CA---G.	C.....T..	..CC...C.	..T.TTGA	GTA.G...TT	C...T..	61
Ref-D207	37	..CA---G.	C.....T..	..CC...C.	..T.TTGA	GTA.G...TT	C...T..	59
Ref-USVar2	43	..CA---G	...T..T..	..CA..G.	..CT.TTGA	GTA.A...TT	T....AT..	67
Ref-Ark99	36	..A....CC	CAA.T.....	..C...C.	..GGCT..A	GTA.G...TT	C.....C	58
Ref-ArkDPI	36	..A....CC	CAA.T.....	..C...C.	..GGCT..A	GTA.G...TT	C.....C	57



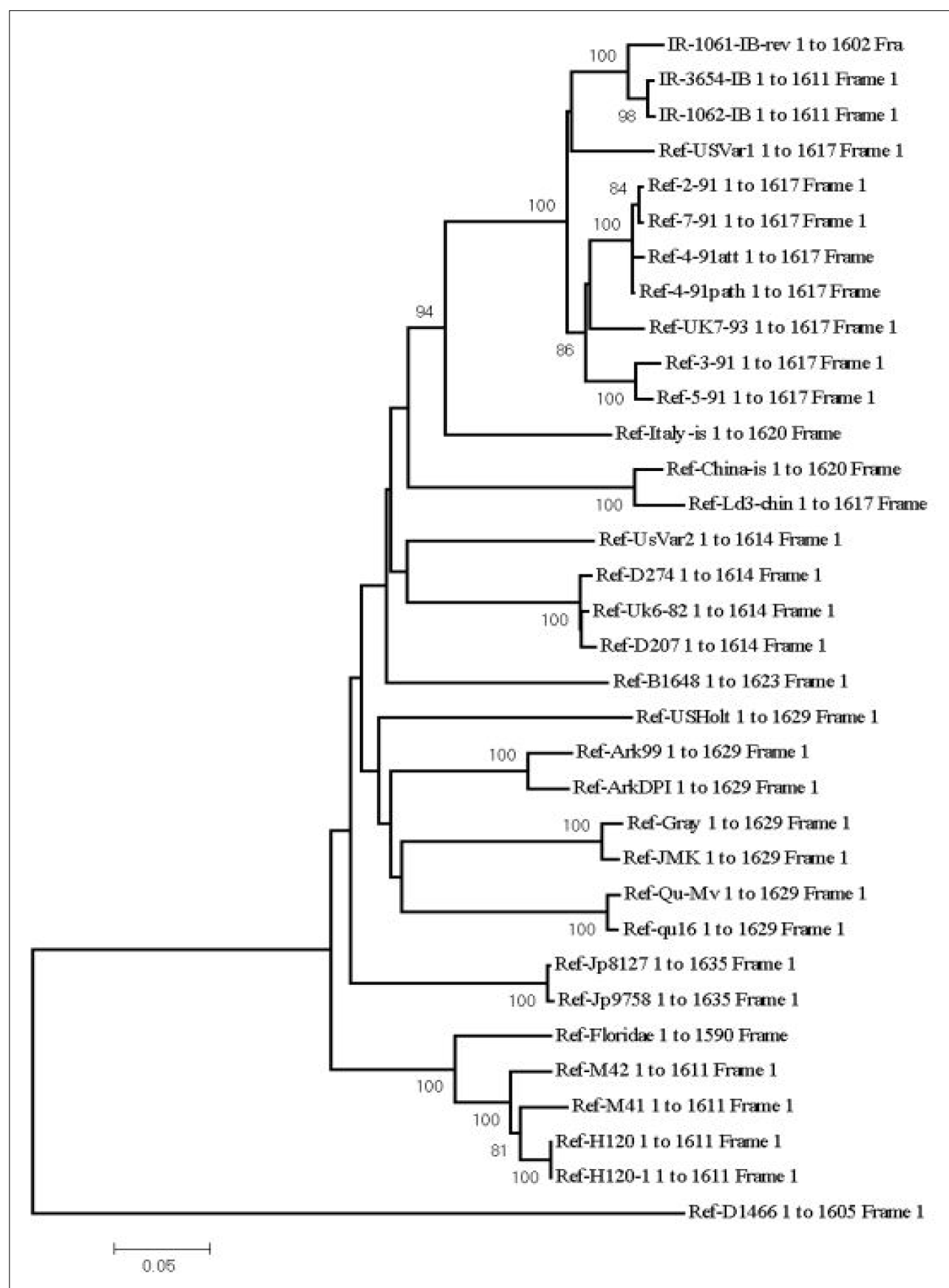
Ref-Qu-Mv	43	..C..G...--	-AAAT...CG	..CC..A.C.	...GTTTTTA	GTA.G....T	T.C...TT.C	72
Ref-qu16	43	..C..G...--	-AAAT...CG	..CC..A.C.	...GTTTTTA	GTA.G....T	T.C...TT.C	72
Ref-USHolt	38	..A.A..TG	CACA...T.	A.....ACA	...GGTTGGA	GTA.G...CTT	TTC...TT..	70
Ref-Gray	50	CC.GGCAATT	C...T..TGT	G.C....CC	...TTTTGGA	G.A.G...TT	T....T...	81
Ref-JMK	51	CC.GGCAATT	C...T..TGT	G.C....CC	...TTTTGGA	G.A.G...T	T....T...	81
Ref-H120	44	..C...T..T	C.....T..	A..	...C.T.GT.	GTCG.GT.GT	T.A...TT..	66
Ref-H120-1	44	..C...T..T	C.....T..	A..	...C.T.GT.	GTCG.GT.GT	T.A...TT..	66
Ref-M41	43	..C...T..C	C.....T.T	AC.	...C.T.GT.	GTCG.GT.GT	T.A...TT..	67
Ref-M42	45	..C...T..T	CA.....T..	A..	...C.T.GT.	GTCG.GT.GT	T.A...TT..	68
Ref-Florid	43	-----	-----T.T	C.....A..	...GGT.GT.	ATCG.GT.GT	T.A...TT..	64
Ref-Jp8127	39	..CAG...TT	C.CAA..T..	..CA..C.C.	...C.TTGGGA	GTA.G...TT	T....A..C	68
Ref-Jp9758	38	..CAG...TT	C.CAA..T..	..CA..C.C.	...C.TTGGGA	GTA.G...TT	T....A..C	67
Ref-D1466	69	.TG.....	-----T..	...G...ACA	..A..A.G..	G.AT.GTCAT	T.A..A.AG.	92
		250	260	270	280	290	300	
Ref-China-	241	TCCATAGCTA	TGACAGCACC	TCTTCAGGGT	ATGGCTTGGT	CTAAGTCACA	ATTTTGTAGT	300
Ref-Ld3-ch	8					G.		9
Ref-2-91	70	..TG...C.	T..	A.C.GCT..	..T.....	AGTT.....	G.....CA	87
Ref-7-91	70	..TG...C.	T..	A.C.GCT..	..T.....	AGTT.....	G.....CA	87
Ref-4-91at	70	..TG...C.	T..	A.C.GCT..	..T.....	AGTTG.....	G.....CA	88
Ref-4-91pa	70	..TG...C.	T..	A.C.GCT..	..T.....	AGTT.....	G.....CA	87
Ref-3-91	68	..TG...C.		A.A.G.T..	..T.....	AGTT.....	CA	82
Ref-5-91	68	..TG...C.		A.A.G.T..	..T.....	AGCT.....	T.....CA	83
Ref-UK7-93	73	..TG...C.	T..	A.A.A.T..	..T.....	AGTT.....	CA	88
Ref-USVar1	75	..TG...C.		A.A.A.T..	..T.....	AGTT.....	CA	89
IR-3654-IB	68	..TG...C.	T..	AAC.A.T..	..T.....	AGTT.....	CA	84
IR-1062-IB	69	..TG...C.	T..	AAC.A.T..	..T.....	AGTT.....	CA	85
IR-1061-IB	69	..TG...C.	T..	A.C.A.T..	..T.....	AGTT.....	CA	84
Ref-Italy-	79	..TG...C.		AC.TCT..	..A.....	..CTG.C..	..C.....C.	94
Ref-B1648	68	..TG...C.	T..	A.CA.CA..A	..T.A....	..C.CT...G.	CG	86
Ref-D274	60	..G.G....		AAA.T..	..T.A....	..CTGAG..	CG	75
Ref-Uk6-82	61	..G.G....		AAA.T..	..T.A....	..CTGAG..	CG	76
Ref-D207	59	..G.G....		AAA.T..	..T.A....	..CTGAG..	CG	74
Ref-USVar2	67	..TG...C.		GG.ACA..	..T.....	..A.CCAAT..	G..C....CG	86
Ref-Ark99	58	..AG...C.	T..	A..AAGT..	..T.A....	..GCC...TC	T.....CA	77
Ref-ArkDPI	57	..AG...C.	T..	A..AAGT..	..T.A....	..GCCAACTC	T.....CA	79
Ref-Qu-Mv	72	..T.....C.	T..G.	A.C.A.T..	..T.A....	..CTAAT..	CG	89
Ref-qu16	72	..T.....C.	T..	A.C.A.T..	..T.A....	..CTAAT..	CG	88
Ref-USHolt	70	..TG.GT..		AT.A.CT..	..T.....	..GCTCACA.	C.CG	90
Ref-Gray	81	..TG...C.	..TT....	A.A.AGT..	..T.G....	..GTCCAG..	C.CG	102
Ref-JMK	81	..TG...C.	..TT....	A.A.AGT..	..T.G....	..GTCCAG..	C.CG	102
Ref-H120	66	..T.....	G....	GTCATCA..		..GCAGT..	G.....C.	82
Ref-H120-1	66	..T.....	G....	GTCATCA..		..GCAGT..	G.....C.	82
Ref-M41	67	..T.....	G....	GTCATCA..		..GCAGT..	G.....C.	83
Ref-M42	68	..T.....	G....	GTCATCA..		..GCAGT..	G.....C.	84
Ref-Florid	64	..T.....	G....	G.AA.CA..	..AA....	..GCAGC..	T.....C.	80
Ref-Jp8127	68	..TG...C.	TA...	A.CGAGT..	A....	..A.CT....	CG	85
Ref-Jp9758	67	..TG...C.	TA...	A.CGAGT..	A....	..A.CT....	CG	84
Ref-D1466	93	G.T...T..T	.TGTTA..AA	AACA.C---C	..T.....	..AGCCAACGG	CG....C.C.	123
		310	320	330	340	350	360	
Ref-China-	301	GCACACTGTA	ACTTTTCTGA	AATTACAGTT	TTTGTACAC	ATTGTTATAG	TAGTGGTACA	360
Ref-Ld3-ch	9						C..	10
Ref-2-91	87	..T..T....	C..A.	CT.....G	T..G.	T..A	A.A.CAACA.	105
Ref-7-91	87	..T..T....	C..A.	CT.....G	T..G.	T..A	A.A.CAACA.	104
Ref-4-91at	88	..T..T....	C..A.	CT.....G	T..G.	T..A	A.A.CAACA.	105
Ref-4-91pa	87	..T..T....	C..A.	CT.....G	T..G.	T..A	A.A.CAACA.	104
Ref-3-91	82	..T..T....	C..A.	CT.....G	..C..T..G.	T..A	A.AGCAAG..	101
Ref-5-91	83	..T..T....	C..A.	CT.....G	..C..T..G.	T..A	A.A.CAAG..	101
Ref-UK7-93	88	..T..T....	C..AC.	CG.....G	..C..T..G.	T..A	A.A.CAAC..C	107
Ref-USVar1	89	..T..T....	C..A.	CT.....G	..C..T..G.	T..A	A.A.CAAC..T	108
IR-3654-IB	84	..T..T....	C..A.	CT.....G	..C..T..G.	T..A	A.A.CTAC..	102
IR-1062-IB	85	..T..T....	C..A.	CT.....G	..C..T..G.	T..A	A.A.CTAC..	103
IR-1061-IB	84	..T..T....	C..A.	CT.....G	..C..T..G.	T..A	A.A.CAAC..	102
Ref-Italy-	94		..T...A.C.	TT.....G	..C..T....	T..A	A.....A..T	107





تصویر ۵ - آنالیز فیلوژنتیک سويه‌های IBV ایران (IR-1061, IR-1062, IR-3654) و ۳۰ سويه رفرانس IBV بر اساس سکانس اسید نوکلئیک قطعه ۱۶۲۰ جفت بازی ژن S1. این آنالیز نشان می‌دهد که ۳ سويه ایران در ژنوتیپ UK793/B قرار می‌گیرند.





تصویر ۶ - آنالیز فیلوژنتیک سویه‌های IBV ایران (IR-1061, IR-1062, IR-3654) و ۳۰ سویه رفرانس IBV بر اساس سکانس آمینو اسیدی قطعه ۱۶۲۰ جفت بازی ژن S1. این آنالیز نشان می‌دهد که ۳ سویه ایران در ژنوتیپ UK793/B قرار می‌گیرند.



دو طرفه (Bidirectional) انجام شد و نتایج حاصل از سکانس ها به صورت ۴ قطعه برای نمونه های ۳۶۵۴، ۱۰۶۲ (با استفاده از ۴ پرایمر برای هر کدام) و ۵ قطعه برای نمونه ۱۰۶۱ (با استفاده از ۵ پرایمر) ارسال شد. این سکانس ها ابتدا با پروتکل (CAP Protocole Contagious Assembly) مرتب شد و سپس بر اساس پیک های قرائت شده با استفاده از نرم افزارهای Choromace به صورت دستی تصحیح گردید. سکانس ۳۰ سویه IBV مرجع از Gene bank آمریکا گرفته شد. Multiple Alignment مقدماتی با بهره گیری از روش W Clustal انجام شد. تمامی باقیمانده ها (Residual) مرتب گردید. هم چنین کلیه توالی ها از نظر طول همسان شد. به منظور رسیدن به حداکثر اعتبار (validity)، توالی های نوکلئوتیدی بر اساس کدهای معادل به آمینو اسیدهای متناظر ترجمه و توالی های آمینو اسیدی به صورت همزمان با توالی های نوکلئوتیدی مورد ارزیابی قرار گرفتند. کلیه توالی ها با استفاده از روش Pileup (که به طریقه Local Alignment محاسبات عملیاتی خود را انجام می دهد) و یا روش Clustal W (که به طریقه Global Alignment محاسبات عملیاتی خود را انجام می دهد) و با منظور نمودن انواع ماتریکس های عملیاتی مانند Blosum و Pam مجدداً همسان (Align) شدند و نتایج همسان شده در صورت نیاز تصحیح شدند. این توالی های همسان شده که واجد حداکثر دقت لازم برای مبحث بعدی یعنی آنالیز فیلوژنتیک بودند مورد استفاده قرار گرفتند. برای آنالیز فیلوژنتیک، انواع مدل های مختلف و امتیازبندی (Scoring) ماتریکس های متنوع نظیر Distance base method و Character base method به کار گرفته شدند و آنالیزهای مورد نیاز روی توالی ها به انجام رسید. تصویر ۳، ۴ به ترتیب اختلاف اسید آمینه ای در ۵۲۰ اسید آمینه در ژن S1 و اختلاف اسید نوکلئیکی در ۱۶۰۰ جفت باز در ژن S1 را بین ۳۰ سویه رفرانس IBV و ۳ سویه IBV ایران را به روش Identity plot (IP) نشان می دهد. تمامی سکانس های نوکلئوتیدی و پلی پپتیدی به روش Pileup algorithm ردیف شده اند. جدول ۲، اختلاف اسید نوکلئیکی ۱۶۵۹ جفت باز در ژن S1 بین ۵ سویه رفرانس IBV و ۳ سویه IBV ایران را که به روش Kimura 2-parameter [Pairwise distances] Distance method: Nucleotide محاسبه شده است، نشان می دهد. در نهایت درخت فیلوژنتیک که واجد ماکزیم صحت در شاخه بندی و خوشه چینی سکانس های رفرانس بود به عنوان درخت نهایی از بین سایر درخت های ساخته شده انتخاب گردید و وضعیت جدایه های ایرانی در این درخت مورد ارزیابی قرار گرفت. اعتبار گره ها (Node) و شاخه های (Branching) درخت های فیلوژنتیک حاصله با استفاده از متد Strapping Boot و منظور نمودن ۱۰۰۰ تکرار (Repeat) به انجام رسیده و مقادیر بالاتر از ۷۰ درصد، به عنوان گره های معتبر پذیرفته شد (تصویر ۸، ۷). بسته نرم افزاری مورد استفاده، PHYLIP (Phylogeny inference package, Ver.3.5) بود. سویه رفرانس B1648 به لحاظ قرابت ژنتیکی پایین با دیگر سویه ها در درخت فیلوژنتیک به شکل مجزا قرار گرفته است که ناشی از هتروژنیتی حدوداً ۳۵ درصد با سویه ماساچوست و ۲۳ درصد با سویه ۷۹۳/B می باشد

پلیمرز (Cinna Gen Co.) Taq و DNTPs، مخلوط PCR تهیه شد که بعد از ۳۵ سیکل تکثیر ژن مورد نظر در ترموسایکلر، در الکترو فوروژی آگارژل تحت لامپ UV در حضور مارکر DNA، بررسی شد. در تمام موارد آزمایش PCR-RT از نمونه های کنترل مثبت و منفی استفاده گردید. سپس برای آزمایش RFLP محصول PCR با آنزیم های محدودگر HindIII، EcoRI و HaeIII هضم شده و روی آگارژل الکترو فوروژ شد (۲).

تعیین سکانس: سه سویه که در آزمایش RFLP الگوی سرو تیپ B/۷۹۳ را با استفاده از آنزیم HaeIII نشان داده بودند (۳۶۵۴، ۱۰۶۲، ۱۰۶۱) برای سکانس انتخاب شدند. محصول PCR این سه سویه با کیت خالص سازی DNA (Gibco, BRL) خالص و تغلیط شد تا نوکلئوتیدهای اضافه آزاد و بقیه مواد مصرف نشده در محصول حذف شود و تداخلی در سکانس ایجاد نکند. سپس همراه پرایمر به میزان ۲۰-۱۰ و غلظت ۱۰ برای هر نمونه به آزمایشگاه سکانس (Seq Lab, Ger) ارسال شد. سکانس به روش Walking Primer یک طرفه انجام شد. سکانس کل ژن S1 و ویروس های IBV ۳۰ نمونه از سویه های رفرانس IBV از Gene bank گرفته شد. نام این ویروس ها همراه با Accession Numbers آنها در Gene bank در جدول ذکر شده است.

نتایج

تکثیر ژن S1 در آزمایش RT-PCR: از مجموع ۱۲۰ نمونه مشکوک جمع آوری شده در سالهای ۱۳۸۲-۱۳۷۷، تعداد ۲۰ نمونه در آگارژل باند مثبت حدود ۱۶۵۰ جفت باز را نشان دادند. سویه های رفرانس B/۷۹۳، H120، D274، M41، نیز با پرایمرهای اختصاصی گروه که کل قطعه S1 را در بر می گیرد در واکنش PCR تکثیر شده و باند مورد نظر را تولید کردند ولی ژن سویه رفرانس D1466 با پرایمرهای مورد استفاده در این آزمایش تکثیر نشد (تصویر ۱).

آزمایش RFLP: ژن S1 سویه های رفرانس IBV (B/۷۹۳، H120، D274، D1466، M41) در هضم آنزیمی با HaeIII دو الگوی متفاوت RFLP را نشان دادند. آنزیم EcoRI قادر به هضم آنزیمی این سویه ها نبود ولی HindIII سویه رفرانس D274 را در دو ناحیه هضم کرده و ۳ قطعه حاصل شد. ژن S1 از ۲۰ جدایه IBV، در هضم آنزیمی با HaeIII دو الگوی متفاوت RFLP را نشان دادند. الگوی ۱۱ جدایه IBV (به عنوان مثال ستون های ۳، ۴، ۵، ۶ در تصویر ۲) دقیقاً مشابه الگوی سرو تیپ B/۷۹۳ و ۹ جدایه دیگر (به عنوان مثال ستون ۲ در تصویر ۳) الگوی مشابه سرو تیپ Mass را نشان دادند. الگوی RFLP جدایه ۱۰۶۱ (ستون ۶ در تصویر ۲) هر دو نوع الگوی سرو تیپ Mass و B/۷۹۳ را نشان داد (باند اضافی حدوداً در ناحیه ۹۰۰bp و یک باند ضعیف در ناحیه ۲۳۰bp). صحت الگوی RFLP حاصله و طول قطعات تولید شده و وجود توالی نوکلئوتیدی خاص برای برش (Cleavage sites) توسط آنزیم های محدودگر مورد استفاده در این مطالعه در سکانس ژن S1 این سه جدایه، با برنامه Gene runner تایید شد.

تعیین سکانس: سکانس های سه جدایه به روش Primer-Walking و



جدول ۲- اختلاف اسید نوکلئیکی ژن S1 بین سویه رفرانس IBV و ۳ سویه IBV ایران به روش method: Nucleotide: Kimura 2-parameter [Pairwise distances] Distance. (در صورت ضرب کردن این اعداد در ۱۰۰، این اختلاف به صورت درصد خواهد بود).

Ref. Iso.	793B	D274	4/91 Atten.	4/91 Path.	H120
3456	0.056 4	0.2456	0.0551	0.0431	0.2616
1062	0.058 3	0.2480	0.0557	0.0537	0.2648
1061	0.060 7	0.2526	0.0567	0.0547	0.2602

میزان اختلاف سکانس بین سویه‌های متعلق به یک سروتیپ متفاوت است. به عنوان مثال جدایه‌ها و سویه‌های متعلق به سروتیپ ارکانزاس آمریکای شمالی (Ark) دارای بیش از ۹۳ درصد شباهت سکانس در نوکلئوتید و بیش از ۸۹ درصد شباهت در سکانس آمینو اسیدی S1 دارند. در حالی که آنالیز جدایه‌های سروتیپ B/793 ۷۹۳ کشورهاى مختلف طی یک دوره ۳ ساله بیش از ۹۶ درصد شباهت در نوکلئوتید و بیش از ۹۲ درصد شباهت در آمینو اسید را نشان داده‌اند (۲۰۱۱، ۱۷). تعیین توالی، ارتباط ژنومی بین سویه‌ها را نشان میدهد اما باید به خاطر داشت که محل سویه‌های معمول در درخت فیلوژنیک نسبت به تکنیک به کار رفته و یا نسبت به بخشی از ژنوم که مورد تجزیه قرار گرفته است می‌تواند فرق کند. اطلاعات توالی، فقط اطلاعات را در مورد ساختار اولیه پروتئین (توالی آمینو اسیدها) فراهم می‌سازد. تفاوت‌های آشکار در توالی‌های ۲ سویه را نمی‌توان به اختلافات آنتی ژنی یا بیولوژیکی سویه‌ها که به خاطر ساختمان دوم و سوم پروتئین که برای عمل بیولوژیکی و آنتی ژنی آنها مهم است، تعمیم داد. همچنین بروز نوترکیبی بین سویه‌های متفاوت ویروس برونشیت در عفونت‌های مخلوط، مانعی برای ترجمه اطلاعات از روی ژنوتیپ به سروتیپ یا پروتکتوتیپ است (۱۴). سکانس یک نمونه می‌تواند با استفاده از وکتور یا بدون آن به طور مستقیم مثلاً به روش DACS (Direct Automated Cycle Sequencing) باشد. تعیین توالی می‌تواند به روش‌های مختلف مثل Short sequencing, Hot shot, Long run برای قطعات کوچک، با قابلیت خواندن حداکثر ۸۵۰ جفت باز (با دقت ۹۹ درصد) یا بروش Primer walking برای قطعات خیلی بلند (بیش از ۱Kb) با دقت ۹۹/۹ درصد باشد. سابقه مطالعه ویروس برونشیت عفونی طیور ایران وصفی مرنندی و بزرگمهری فرد در سال ۱۳۸۰ (۴) با تست VN، حضور واریانت را در بین ویروس‌های برونشیت عفونی طیور گزارش کردند که بعد از ارسال به آزمایشگاه weybridge انگلستان واریانت یا سروتیپ آن به عنوان B/793 اعلام شد و سپس بطریق ملکولی به روش RT-PCR/RFLP توسط وصفی مرنندی و همکاران، اکبری آزاد و همکاران، تایید شد (۲، ۳). صیفی آباد شاپوری و همکاران در سال ۲۰۰۲ به روش ملکولی وجود سروتیپ B/793 را در سویه‌های برونشیت عفونی طیور ایران به روش Multiplex RT-PCR نشان دادند و متعاقب تعیین سکانس قطعه ۱۵۴ bp ژن S1 متعلق به سویه جدا شده (14/2001)، میزان شباهت ۹۵/۶۲، ۸۲/۴۶،

(تصویر ۷، ۸). نتایج سکانس اسید نوکلئیکی نشان می‌دهد که هر سه سویه (۱۰۶۱، ۱۰۶۲، ۳۶۵۴) متعلق به ژنوتیپ B/793 هستند. سویه ۱۰۶۱ دارای یک باند اضافی در RFLP بود که آنالیز این سکانس در برنامه Blast، ۸۹ درصد همولوژی با سویه H120 نشان داد. تمامی آنزیم‌های RE و قطعات حاصله با برنامه Gene runner تأیید شد. سکانس این سه سویه با ژنوتیپ B/793 در بانک اطلاعاتی Gene Bank با Accession number های زیر ثبت شده است:

Strain	Accession number
3654	AY544776
1061	AY544777
1062	AY544778

(IR-1061, IR-1062, IR-3654) و ۳۰ سویه رفرانس IBV که بر اساس قطعه ۵۴۰ آمینو اسیدی ژن S1، ردیف شده‌اند. تعداد تفاوت اسید آمینه‌ای هر سویه نسبت به سویه ردیف اول (سویه UK/793/B) به طریق تجمعی، در سمت راست هر سوبه درج شده است. به علت بزرگی فایل صرفاً قسمتی از ناحیه بسیار متغیر اول (HVR1) بین اسید آمینه‌های ۱۷۰-۵۰ انتخاب شده است. (IR-1061, IR-1062, IR-3654) و ۳۰ سویه رفرانس IBV که بر اساس قطعه ۱۶۵۰ جفت بازی ژن S1، ردیف شده‌اند. تعداد تفاوت اسید نوکلئیکی هر سویه نسبت به سویه ردیف اول (سویه China) به طریق تجمعی، در سمت راست هر سوبه درج شده است. به علت بزرگی فایل صرفاً قسمتی از ناحیه بسیار متغیر اول (HVR1) بین نوکلئوتیدهای ۳۶۰-۱۵۰ انتخاب شده است.

بحث

تنوع ژنتیکی کرونا ویروس‌های پرندگان و اهمیت آن در اپیدمیولوژی بیماری برونشیت عفونی اولین بار توسط Jungherr و همکاران در سال ۱۹۵۹ در ارتباط با تغییر ژنتیکی بین سروتیپ‌های Mass و Conn گزارش شد. بعدها تنوع ژنتیکی بین سروتیپ‌ها و حتی بین سویه‌های یک سروتیپ با آنالیز انگشت نگاری RNA توسط Clewley در سال ۱۹۸۱ و Butcher و همکاران در سال ۱۹۹۰ نشان داده شد و متعاقباً نواحی متغیر و ارتباط فیلوژنتیکی سویه‌های IBV با آنالیز سکانس نوکلئوتیدی ویروس به ترتیب توسط Cavanagh در سال ۱۹۸۸ و Kusters در سال ۱۹۸۹ ارائه شد (۲۹). توالی کل ژنوم IBV اولین بار برای سویه Beaudette تعیین شد (۹، ۱۰) و متعاقباً توالی ژن‌های پروتئین‌های ساختمانی اکثر ویروس‌های IBV مشخص شد. بیشترین ژن سکانس شده، ژن کد کننده پروتئین S1، تحت واحد گلیکو پروتئینی S یا Spike است که نقش ویژه‌ای در تعیین نوع سروتیپ و ژنوتیپ و در القاء ایمنی محافظت کننده دارد. بدین ترتیب درصد بالای اختلاف بین پروتئین S1 سویه‌ها، نشانه درصد پائین ایمنیت متقاطع بین آنهاست. مقایسه توالی آمینو اسیدی ژن S1 سویه‌های IBV مربوط به سروتیپ‌های مختلف، تفاوتی در حدود ۲۵-۲۰ درصد و حتی تا ۴۸ درصد نشان می‌دهد.



یافته به عنوان بذر واکسن Nobilis IB 4/91 و سویه ۹۱/۴ بیماری زا، نشان می دهد که هر سه جدایه با ۹۱/۴ بیماریزا شباهت بیشتری را در مقایسه با ۹۱/۴ تخفیف حدت یافته نشان می دهند. (به ترتیب ۵/۶۷-۵۱-۵ درصد در مقایسه با ۴۷/۴-۳۱-۴ درصد) هم چنین در بررسی درخت فیلوژنیک نیز، به نظر می رسد منشأ این سویه ها (۱۰۶۱، ۱۰۶۲، ۳۶۵۴) از سویه بیماریزای ۹۱/۴ باشد تا از سویه ۹۱/۴ و اکسینال. این فرضیه در هر ۶ مدل درخت فیلوژنیک طراحی شده در این مطالعه (۳ مدل بر مبنای سکانس های آمینواسیدی و سه مدل بر مبنای سکانس های نوکلئوتیدی سویه ها) تأیید می شود.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران به خاطر تصویب پروژه تحقیقاتی بررسی مولکولی ویروس های برونشیت عفونی و پرداخت هزینه های طرح تشکر و قدردانی به عمل می آید.

References

۱. اکبری آزاد، گ. (۱۳۷۹): ویروس برونشیت عفونی طیور، فصلنامه تخصصی طیور چکاوک، ۴۸: ۷۱-۵۱.
۲. اکبری آزاد، گ.، و صفی مرندی، م.، کیوانی امینه، م. (۱۳۸۳): جدا سازی و شناسایی ویروس های برونشیت عفونی طیور در مرغداری های صنعتی ایران. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، (۳) ۲۶۴-۲۵۹.
۳. صیفی آباد شاپوری، م.، میاحی، م.، اساسی، ک.، پوربخش، س. ع. (۱۳۸۰): جدا سازی و شناسایی ویروس برونشیت عفونی طیور در ایران و تعیین تیپ آن با آزمایش RT-PCR. سومین سمینار بهداشت و بیماری های طیور، شیراز-۵ اردیبهشت ماه.
۴. و صفی مرندی، م.، بزرگمهری فرد، م. ح. (۱۳۸۰): جدا سازی و شناسایی ویروس های برونشیت عفونی طیور در بین سال های ۷۹-۱۳۷۶ از مرغداری های صنعتی ایران. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، (۳) ۱۲۴-۱۱۹.
۵. و صفی مرندی، م.، بزرگمهری فرد، م. ح.، کیوانی، ح.، پیغمبری، س. م.، پور بخش، س. ع.، اکبری آزاد، گ. (۱۳۸۰): جدا سازی و شناسایی واریانت ۴/۹۱ ویروس های برونشیت عفونی طیور در مرغداری های ایران. سومین سمینار بهداشت و بیماری های طیور، شیراز-۵ اردیبهشت ماه.
6. Adzhar, A.B., Gough, R.E., Hydon, D., Show, K., Britton, P., Cavanagh, D. (1997) Molecular analysis of the 793/B serotype of Infectious bronchitis virus in Great Britain. Avian Pathol. 26:625-640.
7. Binns, M.M., Boursnell, M.E., Cavanagh, D., Pappin, D. J., Brown, T.D. (1985) Cloning and sequencing of the gene encoding the spike protein of the coronavirus IBV. J. Gen. Virol. 66: 719-726.
8. Binnes, M.M., Boursnell, M.E., Tomley, F.N., Brown, D.K. (1986) Comparison of the spike precursor sequences of coronavirus IBV strains M41 and 6/82 with that of IBV Beaudette. J. Gen. Virol. 67: 2825-28318.

D1466, D274, H120, 4/91 در صدرابه ترتیب با سویه های ۷۳/۶۹ و ۸۱/۷۱ گزارش کردند (۳، ۲۵). نوری و همکاران در سال ۲۰۰۳، ۱۳۸۲ و ویروس ۹۱/۴ را در ۱۸ گله از ۳۰ گله گوشتی مبتلا در استان فارس با نمونه گیری مستقیم از سواب نایی و تشخیص ملکولی به روش RT-PCR گزارش کردند (۲۲). در این مطالعه ژن S1 تکثیر شده در واکنش PCR برای سه سویه (۱۰۶۱، ۱۰۶۲، ۳۶۵۴) با استفاده از کیت تخلیص DNA (Gibco BRL) تخلیص و به روش Primer Walking دو طرفه سکانس شد. به نظر می رسد که جدایه ۱۰۶۱ یا نوعی عفونت مخلوط (Mix infection) سویه های H120 و ۷۹۳/B باشد و هر دو نوع سویه (H120, 793/B) به طور همزمان در نمونه اخذ شده از گله بوده و در تخم مرغ تکثیر شده است یا ممکن است محصول نوترکیب (Recombination) از H120 و ۷۹۳/B باشد. گرچه الگوی RFLP سویه ۷۹۳/B را، واضح تر نشان می دهد. در تنظیم اولیه (alignment Primary) قطعه اضافی ۱۰۶۱ که در ابتدای سکانس قرار گرفته بود کنار گذاشته شد و بقیه ۴ قطعه دیگر برای آنالیز به کار رفت. این قطعه اضافی در برنامه Blast، ۸۹ درصد همولوژی با سویه H120 را نشان داد و به نظر می رسد قطعه ای از سویه واکسن H120 باشد. و از آنجا که کل نمونه های اخذ شده در این مطالعه از گله های مایه کوبی شده با واکسن های زنده برونشیت بوده است احتمال وجود سویه واکسن به طور همزمان در نمونه همراه با سویه ۷۹۳/B بعید نمی باشد. هم چنین احتمال نوترکیب بودن نمونه ۱۰۶۱ را نیز نمی توان رد کرد. از طرفی این قطعه صرفاً قطعه ناقصی (حدود ۴۰ جفت باز) از سویه H120 است اینکه آیا این قطعه در واقع خود قسمتی از ویروس کامل H120 بوده که در واکنش PCR تکثیر شده و در RFLP برش خورده است و در سکانس تنها قسمتی از آن سکانس شده است یا قطعه چسبیده به ویروس ۷۹۳/B است که به صورت محصول نو ترکیب ظاهر شده است مشخص نیست. با اینحال شناسایی دو ویروس مختلف به طور همزمان در یک نمونه اخذ شده به روش RT-PCR/RFLP می تواند از مزایای خاص این روش محسوب شود. چنین حالتی را Callison و همکاران در سال ۲۰۰۱ در مورد نمونه ویروس IBV که حاوی ویروس UK/167/84 و ویروسی از سروتیپ Mass بود و دو الگوی RFLP را همزمان در یک نمونه نشان داد، گزارش کرده اند (۱۱). با این وجود برای تفکیک این دو حالت، نیاز به سکانس نمونه به روشی غیر از Primer Walking مثلاً روش استفاده از وکتور پلاسمیدی یا کلونینگ می باشد. همان طور که در آنالیز سکانس ذکر شد (رجوع شود به بخش مواد و روش ها) سکانس های مربوطه بعد از تنظیم و آنالیز مختلف، در دو نوع توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی با ۳۰ سویه رفرانس مقایسه شدند. بر مبنای آنالیز درخت فیلوژنیک، هر سه جدایه ارسالی در ژنوتیپ ۷۹۳/B قرار می گیرند (تصویر ۸، ۷). درصد اختلاف نوکلئوتیدی یا هترو لوزی این سه جدایه با سویه UK/793/B به عنوان پروتوتیپ ژنوتیپ ۷۹۳/B ۶/۰۷-۵/۶۴ درصد و با سویه واکسن H120، ۲۶/۱۶ تا ۲۶/۰۲ درصد می باشد (بر مبنای متد Kimura 2 parameter distance (جدول ۲). مقایسه شباهتها و تفاوت های نوکلئوتیدی این سه جدایه با سویه ۹۱/۴ تخفیف حدت



9. Bousnell, M.E.G., Brown, T. D., Binns, M.M. (1984) Sequence of the membrane protein gene from avian coronavirus IBV. *Virus Res.* 1:303-313.
10. Boursnell. M.E.G., Brown, T.D., 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. *J. Gen. Virol.* 68:57-77.
11. Callison, S.A., Jackwood, M.W., Hilt, D.A. (2001) Molecular characterization of infectious bronchitis virus isolates foreign to the United States and comparison with United States isolates. *Avian Dis.* 45:492-499.
12. Capua, I., Miinta, Z., Karpinska, E., Mawditt, K., Britton, D., Cavaagh, D., Gough, R.E. (1999) Cocirculation of four types of infectious brocnchitis virus (793/B, 624/I, B1648 and Massachusetts). *Avian Pathol.* 28:587-592.
13. Cavanagh, D., Mawditt, K., Gough, R., Oicault, J.F., Britton, P. (1998) Sequence analysis of strains of 793/B genotypes (CR88, 4/91) of IBV isolated between 1985 and 1997. *Proceeding of international symposium on infectious bronchitis and pneumovirus infections in poultry.* June, 252-256, Giessen, Germany.
14. De Wite, J.J. (2000) Infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.* 29:71-93.
15. Jordi, B.J., Kremers, D.A., Kusters, H.G., Van der Zeijst, B.A. (1989) Nucleotide sequence of the gene coding for the peplomer protein (spike protein) of infectious bronchitis virus, strain D274. *Nucleic Acids Res.* 17: 6726.
16. Karaca, K., Naqi, S., Palukaitis, P., Lucion, B. (1990) Serological and molecular charcterization of three enteric isolates of infectious bronchitis virus of chickens. *Avian Dis.* 34: 899-904.
17. Keeler, C.L., Reed, K.L., Nix, W.A., Gelb, J. (1998) Serotypes identification of avian infectious bronchitis virus by RT-PCR of the peplomer S1 gene. *Avian Dis.* 42:275-284.
18. Kwon, H.M., Jackwood, M.W. (1995) Molecular cloning and sequence comparison of the S1 glycoprotein of the Gray and JMK strains of avian infectious bronchitis virus. *Virus Gen.* 9: 219-229.
19. Kusters, J.G., Niesters, H.G., Lenstra, J.A., Horzinek, M.C., Van der Zeijst, B.A. (1989) Phylogeny of antigenic variants of avian coronavirus IBV. *Virol.* 169: 217-221.
20. Moore, K.M., Bennett, J.D., Seal, B.S., Jackwood, M.W. (1998) Sequence comparison of avian infectious bronchitis virus S1 glycoproteins of the Florida serotype and five variant isolates from Georgia and California. *Virus Genes.* 17: 63-83.
21. Niesters, H.G., Lenstra, J.A., Spaan, W.J., Zijderveld, A.J., Bleumink-Pluym, N.M., Hong, F., Van Scharrenburg, G.J., Horzinek, M.C., Van der Zeijst, B.A. (1986) The peplomer protein sequence of the M41 strain of coronavirus IBV and its comparison with Beaudette strains. *Virus Res.* 5: 253-263.
22. Nouri, A., Assasi, K., Seyfi Abad shoupouri, M.R. (2003) Field study of infectious bronchitis virus using type specific RT-PCR. *Arch. Razi. Ins.* 55:1-10.
23. Parsons, D., Elis, M.M., Cavanagh, D. and cook, J.K.A. (1992) Characterization of an infectious bronchitis virus isolated from vaccinated broiler breeder flocks. *Vet. Rec.* 131: 408-411.
24. Sapats, S.L., Ashtin, F., Wright, P.J., Ignjatovic, J. (1996) Novel variation in the N protein of avian infectious bronchitis virus. *Virol.* 226:412-417.
25. Seify abad shapouri, M.R., Mayahi, M., Charkhkar, S., Assasi, K. (2002) Serotype identification of recent Iranian isolates of infectious bronchitis virus by typespecific multiplex RT-PCR. *Arch. Razi Ins.* 53:79-85.
26. Smati, R., Merzouki, A. Silim, A.N., Vasfi Marandi, M., Allera, M., Calude, G. (2002) Molecular characterization of three new avian infectious bronchitis virus isolated in Quebec. *Virus Genes.* 25: 85-93.
27. Wang, C.H., Huang, Y.C. (2002) Relationship between serotypes and based an the hypervariable region of the S1 gene of infectious bronchitis virus. *Arch. Virol.* 145:291-300.
28. Wang, L., Junker, D., Collisson, E.W. (1993) Evidence of natural recombination within the S1 gene of infectious bronchitis virus. *Virol.* 192: 710-716
29. Wang, L., Junker, D., Hoch, L., Ebiary, E., Collison, E.W. (1994) Evolutionary implications of genetic variation in the S1 gene of infectious bronchitis virus. *Virus Res.* 34:327-338.



