آنالیز ملکولی سه سویه متعلق به سروتیپ B/۷۹۳ ویروس‌های برونشیت عفونی طیور جدا شده از مرغداری‌های صنعتی ایران

گیتا اکبری آزاد[۱] مهدی وصفی مرندی[۱]* حسین کیوانی امینه[۲]

دریافت مقاله: ۸ اسفندماه ۱۳۸۴
پذیرش نهایی: ۱۲ آذر ماه ۱۳۸۵

بیماری برونشیت عفونی طیور یکی از بیماری‌های مهم تنفسی طیور است که هرساله خسارات اقتصادی بسیار زیادی را به صنعت طیور کشور تحمیل می‌کند. هدف از انجام این مطالعه آنالیز و تعیین خصوصیات ملکولی سکانس نوکلئوتیدی و آمینو اسیدی ویروس‌های برونشیت عفونی جداشده از مرغداریهای صنعتی ایران می‌باشد. در این مطالعه کل ژن S1 جدایه‌های برونشیت عفونی طیور با آزمایش RT-PCR تکثیر و سپس محصول RT-PCR، روی ژل آگار الکتروفروزگردید که تمامی جدایه‌ها، باند بالای ۱۶۰۰ جفت باز را نشان دادند. در آزمایش RFLP تحت آنزیم‌های محدودگر HaeIII, HindIII, EcorI، سه جدایه که الگوی سروتیپ B/۷۹۳ را نشان دادند انتخاب وسکانس نوکلئوتیدی ژن S1 آن مشخص و به اسیدآمینه‌های متناظر ترجمه شد. طرح تشابهی (IP plot) نوکلئوتیدی و آمینو اسیدی ژن S1 این سویه‌ها، با ۳۰ سویه رفرانس برونشیت عفونی ترسیم و در نهایت درخت فیلوژنتیک نوکلئوتیدی و آمینو اسیدی، طراحی شد. آنالیز درخت فیلوژنیکی نشان داد که هرسه سویه ایران در سروتیپ B/۷۹۳ قرار می‌گیرند. درصد اختلاف نوکلئوتیدی این سه سویه با سویه UK/793/B به‌عنوان پروتوتیپ سروتیپ B/۷۹۳، ۶/۰-۵/۶۴ درصد و با سویه واکسن H120، ۲۶/۱۶ تا ۲۶/۰۲ درصد می‌باشد. با توجه به اینکه B/۷۹۳ نوعی سروتیپ با هموlوژی پائین نسبت به سویه واکسینال H120 ماساچوست می‌باشد ممکن است سروتیپ B/۷۹۳ مسئول واگیری برونشیت در گله‌های واکسینه و توجیه کننده شکست در واکسیناسیون این بیماری باشد. مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۸۶، دوره ۶۲، شماره ۱، ۸۰-۶۹.

واژه‌های کلیدی: بیماری برونشیت عفونی طیور، سروتیپ B/۷۹۳، RT-PCR/RFLP, Sequencing.

ویروس برونشیت عفونی (IBV) می‌تواند موجب بیماریهای تنفسی، التهاب کلیوی، اختلالات تولید مثلی و یا کاهش وزن پرندگان مبتلا شود. با اینحال هیچکدام از این علایم، اختصاصی بیماری نیستند و بدین ترتیب برای تشخیص عفونت در گله‌های مبتلا به ابزار تشخیص آزمایشگاهی نیاز است، این تشخیص گاهی مستلزم شناسایی نوع ویروس نیز می‌باشد تا بتوان با انتخاب برنامه واکسیناسیون بهتر، حفاظت بیشتری در گله‌های بعدی ایجاد کرد. به‌طور کلی عفونت با IBV را می‌توان به دو طریق ردیابی حضور کل یا جزیی از ویروس IBV و همچنین ردیابی آنتی‌بادی‌های اختصاصی علیه IBV تشخیص داد. انتخاب روش مناسب از بین انواع روش‌ها و تفسیر نتایج حاصل مشکل و گاهی گیج کننده است. با این حال براساس هدف و شرایط منطقه‌ای، می‌توان بهترین روش یا تلفیقی از چند روش را انتخاب کرد(۱). ویروس‌های IBV حداقل حاوی بیش از ۳۰ سروتیپ هستند(۲۳). از آنجا که این ویروس‌ها به فراوانی می‌توانند دچار تغییرات ژنتیکی و آنتی ژنتیکی از طریق موتاسیون‌های نقطه‌ای و پدیده نوترکیبی ژنتیکی شوند و از طرفی میزان حفاظت متقاطع بین سویه‌های مختلف بستگی به درصد هموlوژی

۱) گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
۲) دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران - ایران.
*) نویسنده مسؤول: تلفن: ۶۶۴۳۸۳۲۲-۰۲۱، نمابر: ۶۶۹۳۳۲۲۲-۰۲۱
Email:mvmarand@ut.ac.ir

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

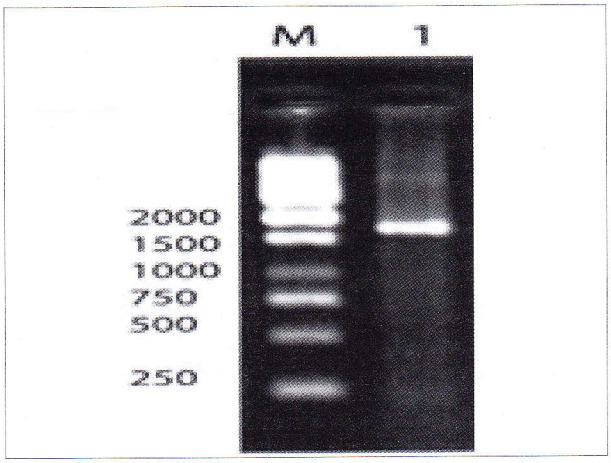
Akbari Azad, G.[1], Vasfi Marandi, M.[1]*, Keyvani aminae, H.[2]

[1]Departement of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran. [2]University 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 viruse (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**



تصویر ۱ - الکتروفورز روی ژل آگار ژن S1تکثیر شده در واکنش RT-PCR: M= Gene ruler 1Kb DNA ladder (Fermentas).

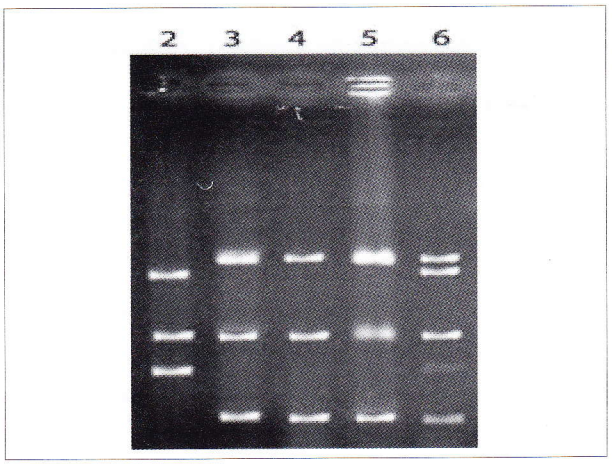
بین ژنوم آنها به‌ویژه ژن S1دارد، به همین جهت ظهور سویه‌های جدید خطر جدی برای صنعت طیور محسوب می‌شود(۲۹).

جداسازی و شناسایی IBV، برای تشخیص قطعی ضروری است. شناسایی RNAژنومی 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 می توان به کمک تکنیک دیگر مثل RFLP، هیبریداسیون، تعیین توالی (sequencing) برای تعیین خصوصیت ویروس استفاده کرد. تلفیق PCR با روش‌های ذکر شده می تواند 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 تائید 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) به‌شرح 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 تا سه 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



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

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

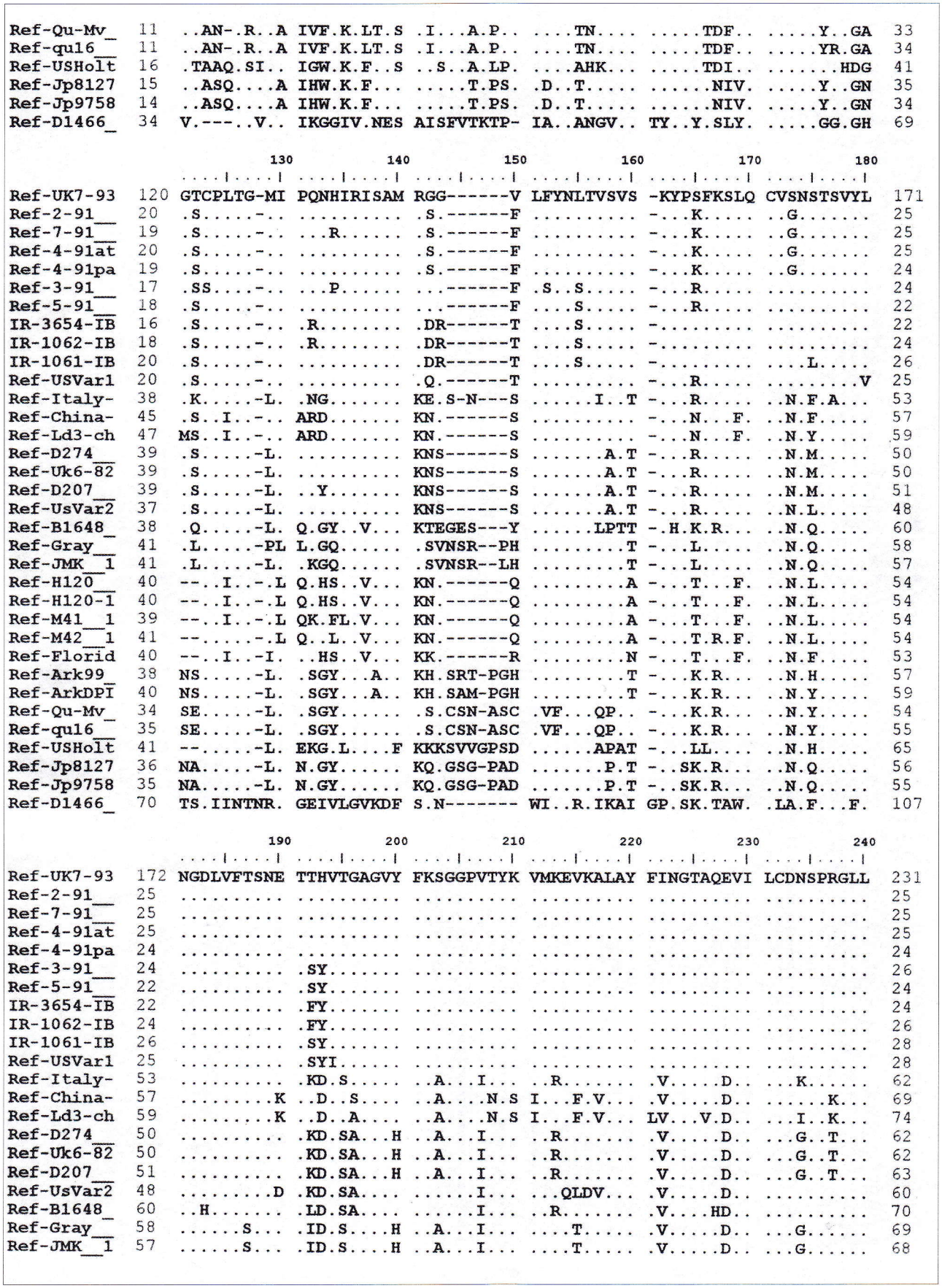
آزمایش RT-PCR/RFLPs: به‌طور خلاصه برای تهیه cDNA از RNA استخراج شده، آنزیم رونوشت برداری معکوس (.Fermentas Co ,enzyme RT)، پرایمر Random Hexamer استفاده شد و سپس با کمک جفت پرایمر S1 Oligo3 (5'-CATAACTAACATAAGGGCAA-3') و (3'-New S1 Oligo5 (5'-TGAAACTGAACAAAAGAC و آنزیم DNA

جدول۱- تعداد ۳۰ سویه رفرانس IBV همراه با Accession Numbers آنها در bank Gene به همراه منابع مورد استفاده در داخل پرانتز 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	UK7/91	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

```
                                10        20        30        40        50        60
                     ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
Ref-UK7-93      1    MLVTPPLLVT LLCALCSAAL YDNNT-YVYY YQSALRPGPG WHLHGGAYAV DKVFNETNNA  59
Ref-2-91__      1    ..GK.L.... .WY.....L. ..K..-.... ....F...Q. .......... .....G....  10
Ref-7-91__      1    ..GK.L.... .WY.....L. ..K..-.... ....F...Q. .......... .....G....  10
Ref-4-91at      1    ..GK.L.... .WY.....L. ..K..-.... ....F...Q. .......... .....G....  10
Ref-4-91pa      1    ..GK.L.... .WY.....L. ..K..-.... ....F...Q. .......... .....G....  10
Ref-3-91__      1    ..GK.L.... .W......L. ...D.-.... ....F...L. .......... .....A....   9
Ref-5-91__      1    ..GK.L.... .W......L. ...D.-.... ........Q. .......... .....A....   8
IR-3654-IB      1    ...K.L.... .W......L. ...G.-.... ....F...S. .......... .R...D--..   9
IR-1062-IB      1    P.GK.L.... .W......L. ...G.-.... ....F...S. .......... .R...D--..  11
IR-1061-IB      1    P.GK.L.... .R.....TL. ...G.-..F. ....F..... ........D.. .R.N-----.  13
Ref-USVar1      1    ..GK.L.... .WY.....L. ..SS.-.... ....F..SS. ..I....... .R.......  13
Ref-Italy-      1    ..GK.L.... ..F...N.L. ...G.-.... ....F..PF. ..V....... VN.ST.YA..  17
Ref-China-      1    ..GKSLF... I.......N. F.SANN.... ....F..PN. ...Q...... VNST.H....  21
Ref-Ld3-ch      1    ..GKSLF... I.......N. FNSGN-.... ....F..PN. ...Q...... VNST.H.S..  22
Ref-D274__      1    ..ERSL..A. ..S.....N. FG..S-.... ....F..PD. ........E. VN..T.SS..  19
Ref-Uk6-82      1    ..ERSL..A. ..S.....N. FG..S-.... ....F..SD. ........E. VN.ST.SS..  20
Ref-D207__      1    ..ERSL..A. ..S.....N. FG..S-.... ....F..PD. ........E. VN.ST.SS..  20
Ref-UsVar2      1    ...KSLFI.. ..F..... F...E-T... ....F..SN. ..K....... VN.SV.Y...  18
Ref-B1648_      1    ...VQLSV.. ..F.....I. FND.Y--N.. ....F..PS. ........Q. VN.T..N...  20
Ref-Gray__      1    .S.R.L.... C.L..G..S. LN.DS-.... ....F..PN. ........K. VN.SE.Y...  20
Ref-JMK__1      1    .S.R.L.... C.L..G..S. LN.DS-.... ....F..PN. ........K. VN.SE.Y...  20
Ref-H120__      1    .....L.... .......... ..SSS-.... ....F..PD. .......... VNISS.S...  13
Ref-H120-1      1    .....L.... .......... ..SSS-.... ....F..PD. .......... VNISS.S...  13
Ref-M41__1      1    .....L.... ...V...... ..SSS-.... ....F..PN. .......... VNISS.S...  14
Ref-M42__1      1    .....L.... ........V. ..SSS-.... ....F..PS. ...Q...... VNISS.F...  15
Ref-Florid      1    .....L.... ..F.....   ...SS-.... ....F..PN. .......... VNTSI.S.RQ  15
Ref-Ark99_      1    ...KSLF... I.F.....N. ...ES-F... ....F...H. .......... VN.SS.N...  17
Ref-ArkDPI      1    ...KSLF... I.F.....N. ...ES-F... ....F...H. .......... VN.SS.N...  17
Ref-Qu-Mv_      1    .....L.... .......... ...DS-.... ....F..SM. .......... VN.ST..S..  11
Ref-qu16__      1    .....L.... .......... ...DS-.... ....F..SM. .......... VN.ST..S..  11
Ref-USHolt      1    ...KSLFV.. F.F.....N. ....S-.... ....F..ST. .......... VN..Q.Y...  16
Ref-Jp8127      1    ...KSLF... ..F.....T. ..KD.-.... ....F..PV. .......... VN.SQ.....  15
Ref-Jp9758      1    ...KSLF... ..F.....T. ...D.-.... ....F..PV. .......... VN.SQ.....  14
Ref-D1466_      1    .WASLLSV.. ..F..SECSI VGE.Y--T.. ...QF..PN. ..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  20
Ref-7-91__      11   V.VS...... ....Y..... .......PA. .......... ......DF.. .........Q  19
Ref-4-91at      11   V.VS...... ....Y..... .......PA. .....A.... ......DF.. .........Q  20
Ref-4-91pa      11   V.VS...... ....Y..... .......PA. .......... ......DF.. .........Q  19
Ref-3-91__       9   ..A....... ....Y..... .....A..D. .......... ......DF.. .......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.  16
IR-1062-IB      11   ..A.E..... .......... .......T.. .......... ......DF.. .......NL.  18
IR-1061-IB      13   ..ASE..... .......... .......P.. .......... ......DF.. .......N..  20
Ref-USVar1      13   ..VS...... .........V .....A.... .......... ......DF.. .......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__1      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__1      14   ..S.G.IV.. IHGGRVVN.S .I...A.SS. .A..S..... ......DT.. .....Y.YDG  39
Ref-M42__1      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 آمینه‌ای سویه‌های IBV ایران.



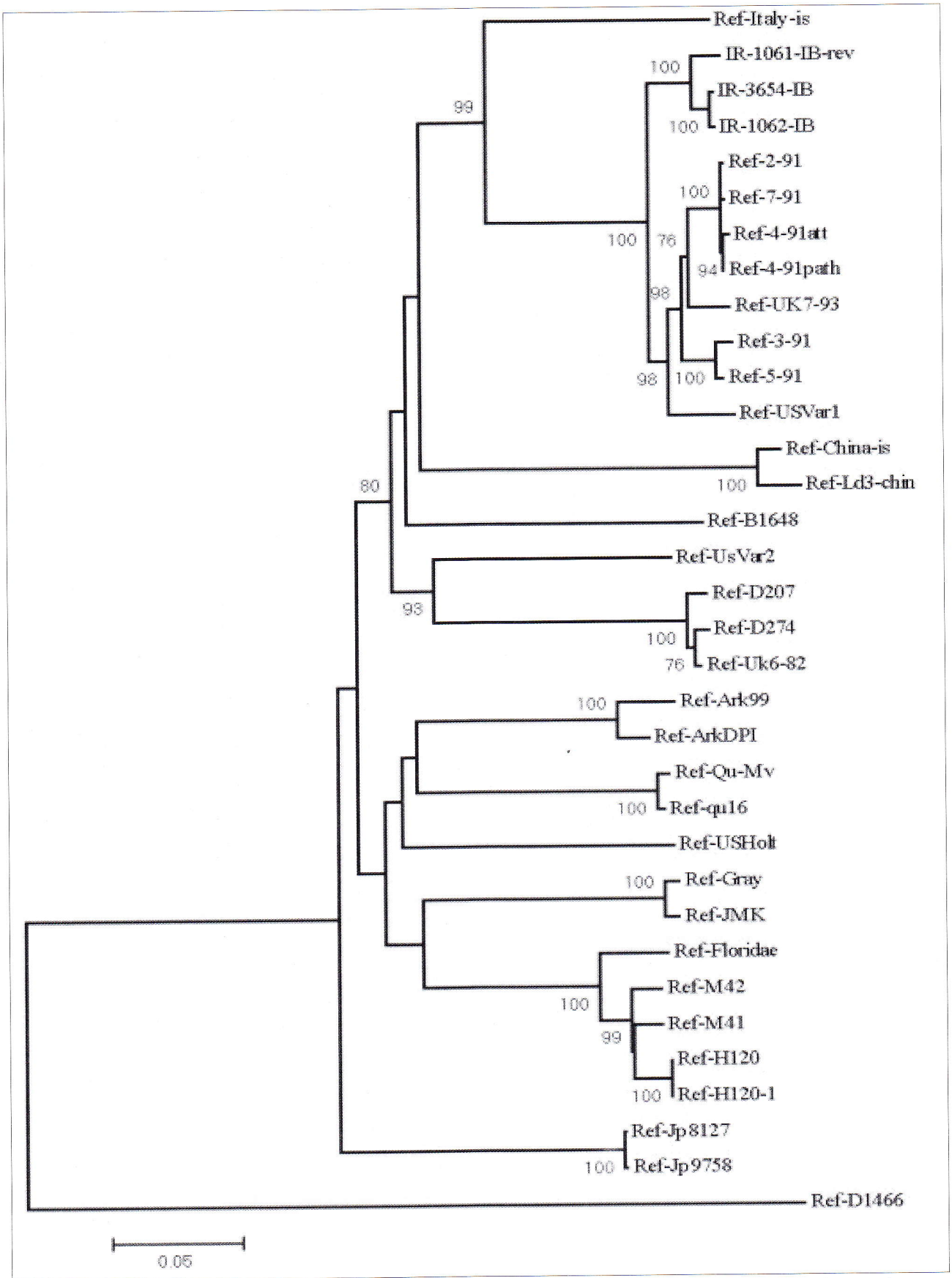
تصویر ۱-۳ - Identity Plot یا طرح تشابهی سکانس اسید آمینه‌ای سویه‌های IBV ایران.

```
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  180
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-4-91at       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-- ---------- ---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 TGTTGGTGTT 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-4-91at       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.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.TTGGA GTA.G...TT C.....T...  60
Ref-Uk6-82       39  ..CA---.G. C......T.. ..CC....C. ...T.TTGGA GTA.G...TT C.....T...  61
Ref-D207         37  ..CA---.G. C......T.. ..CC....C. ...T.TTGGA GTA.G...TT C.....T...  59
Ref-UsVar2       43  ..CA---..G ....T..T.. ..CA..G... ..CT.TTGGA 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....T C.........C  57
```

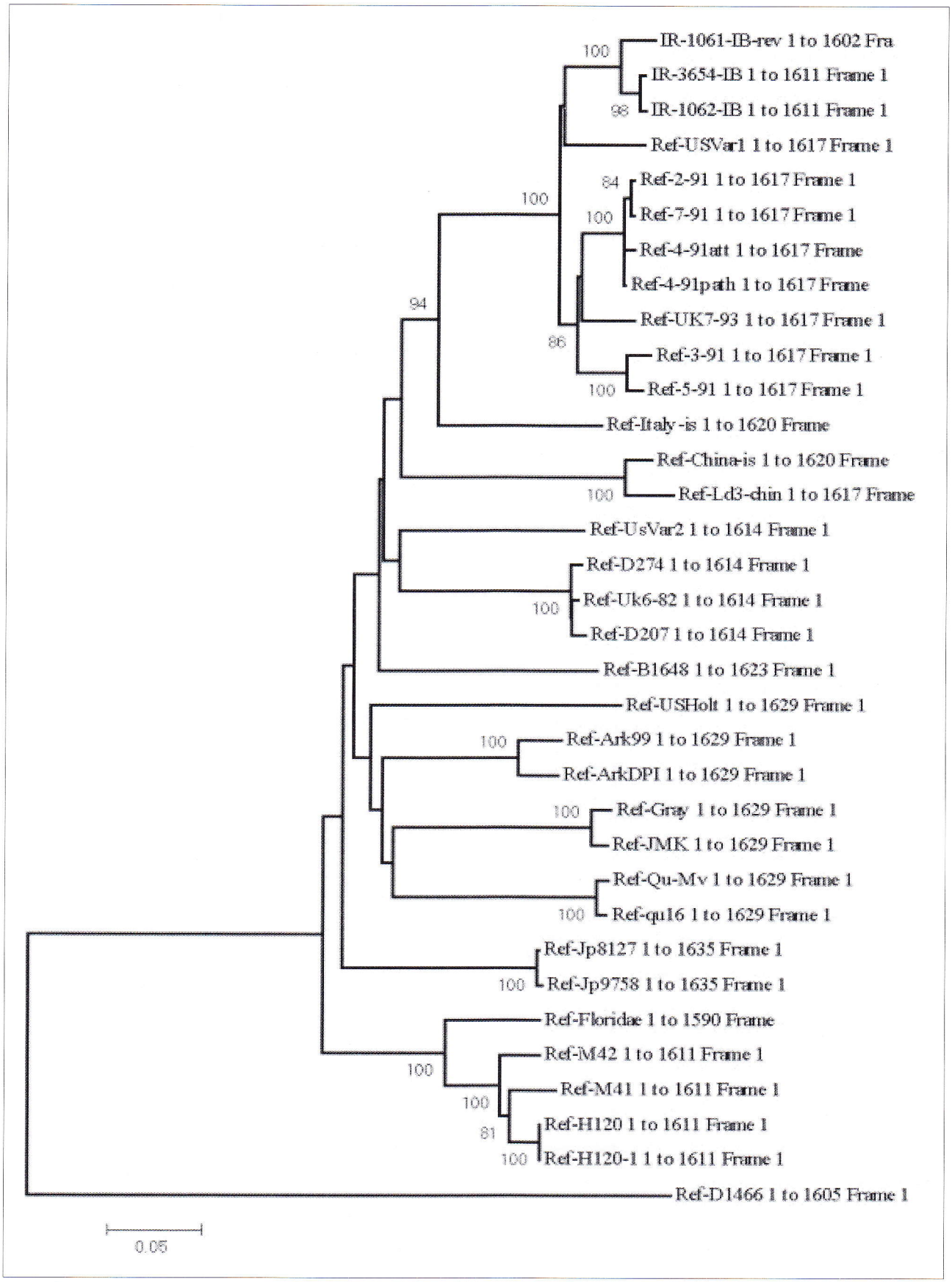
تصویر ۴ - Identity Plot با طرح تشابهی سکانس اسید نوکلئیکی سویه‌های IBV ایران.

```
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.TTGGA GTA.G...TT T.....A..C  68
Ref-Jp9758    38   ..CAG...TT C.CAA..T.. ..CA..C.C. ...C.TTGGA 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 TTTGTCACAC 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...CAACA.  104
Ref-4-91at     88  ..T..T.... ....C..A.. CT.......G .....T..G. ......T..A A...CAACA.  105
Ref-4-91pa     87  ..T..T.... ....C..A.. CT.......G .....T..G. ......T..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...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 ۱- ۴ - Identity Plot یا طرح تشابهی سکانس اسید نوکلئیکی سویه‌های IBV ایران.



تصویر۵ - آنالیز فیلوژنتیک سویه‌های IBV ایران (IR-3654, IR-1062, IR-1061) و ۳۰ سویه رفرانس IBV بر اساس سکانس اسید نوکلئیک قطعه ۱۶۲۰ جفت بازی ژن S1. این آنالیز نشان می‌دهدکه ۳ سویه ایران در ژنوتیپ UK793/Bقرار می‌گیرند.



تصویر ۶ - آنالیز فیلوژنتیک سویه‌های IBV ایران (IR-3654, IR-1062, IR-1061) 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.

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

تعیین سکانس: سه سویه که در آزمایش RFLP الگوی سروتیپ B/۷۹۳ را با استفاده از آنزیم HaeIII نشان داده بودند(۱۰۶۱،۱۰۶۲،۳۶۵۴) برای سکانس انتخاب شدند. محصول PCR این سه سویه با کیت خالص‌سازی DNA (Gibco ,BRL) خالص و تغلیظ 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 ویروس‌های IBV ۳۰ نمونه از سویه‌های رفرانس IBV از Gene bank گرفته شد. نام این ویروس‌ها همراه با Accession Numbers آنها در Gene bank در جدول ۱ ذکر شده است.

نتایج

تکثیر ژن S1 در آزمایش RT-PCR: از مجموع ۱۲۰ نمونه مشکوک جمع‌آوری شده در سالهای ۱۳۸۲-۱۳۷۷، تعداد ۲۰ نمونه در آگارژل باند مثبت حدود ۱۶۵۰ جفت باز را نشان دادند. سویه‌های رفرانس B/۷۹۳، H120 D274, M41, نیز با پرایمرهای اختصاصی گروه که کل قطعه S1 را در بر می‌گیرد 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 سویه‌های رفرانس IBV (H120, ۷۹۳/B, D274, D1466, M41,) در هضم آنزیمی با HaeIII و الگوی متفاوت RFLP را نشان دادند. آنزیم EcoRI قادر به هضم آنزیمی این سویه‌ها 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 ستون‌های ۳،۴،۵،۶ در تصویر ۲) دقیقاً مشابه الگوی سروتیپ B/۷۹۳ و ۹ جدایه دیگر (به عنوان مثال ستون ۲ در تصویر ۳) الگوی مشابه سروتیپ Mass را نشان دادند. الگوی RFLP جدایه ۱۰۶۱ (ستون ۶ در تصویر ۲) هر دو نوع الگوی سروتیپ 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 آنزیم‌های محدودگر مورد استفاده در این مطالعه در سکانس ژن S1 این سه جدایه، با برنامه Gene runner تایید شد.

تعیین سکانس: سکانس‌های سه جدایه به روش Primer-Walking و دو طرفه (Bidirectional) انجام شد و نتایج حاصل از سکانس‌ها به صورت ۴ قطعه برای نمونه‌های ۳۶۵۴، ۱۰۶۲ (با استفاده از ۴ پرایمر برای هر کدام) و ۵ قطعه برای نمونه ۱۰۶۱ (با استفاده از ۵ پرایمر) ارسال شد. این سکانس‌ها ابتدا با پروتکل (CAP Protocole Contagious Assembly) مرتب شد و سپس براساس پیک‌های 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 بهره‌گیری از روش W Clustal انجام شد. تمامی باقیمانده‌ها (Residual) مرتب گردید. هم چنین کلیه توالی‌ها از نظر طول همسان شد. به منظور رسیدن به حداکثر اعتبار (validity)، توالی‌های نوکلئوتیدی بر اساس کدهای معادل به آمینو اسیدهای متناظر ترجمه و توالی‌های آمینو اسیدی به صورت همزمان با توالی‌های نوکلئوتیدی مورد ارزیابی قرار گرفتند. کلیه توالی‌ها با استفاده از روش Pileup (که به طریقه Local Alignement محاسبات عملیاتی خود را انجام می‌دهد) و یا روش Clustal W (که به طریقه Global Alignement محاسبات عملیاتی خود را انجام می‌دهد) و با منظور نمودن انواع ماتریکس‌های عملیاتی مانند Blosome و Pam مجدداً همسان (Align) شدند و نتایج همسان شده در صورت نیاز تصحیح شدند. این توالی‌های همسان شده که واجد حداکثر دقت لازم برای مبحث بعدی یعنی آنالیز فیلوژنتیک بودند مورد استفاده قرار گرفتند. برای آنالیز فیلوژنتیک، انواع مدل‌های مختلف و امتیازبندی (Scoring) ماتریکس‌های متنوع نظیر Distance base method و Character base method به‌کار گرفته شدند و آنالیزهای مورد نیاز روی توالی‌ها به انجام رسید. تصویر ۴، ۳ به ترتیب اختلاف اسید آمینه‌ای 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 می‌دهد. تمامی سکانس‌های نوکلئوتیدی و پلی پپتیدی به روش Pileup algorithm، ردیف شده‌اند. 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 می‌دهد. در نهایت درخت فیلوژنتیک که واجد ماکزیمم صحت در شاخه بندی و خوشه چینی سکانس‌های رفرانس بود به عنوان درخت نهایی از بین سایر درخت‌های ساخته شده انتخاب گردید و وضعیت جدایه‌های ایرانی در این درخت مورد ارزیابی قرار گرفت. اعتبار گره‌ها (Node) و شاخه‌های (Branching) درخت‌های 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 گره‌های معتبر پذیرفته شد (تصویر ۷،۸). بسته نرم افزاری مورد استفاده، PHYLIP (Phylogeny inference package,Ver.3.5) بود. سویه رفرانس B1648 به لحاظ قرابت ژنتیکی پایین با دیگر سویه‌ها در درخت فیلوژنیک به شکل مجزا قرار گرفته است که ناشی از هترولوژی حدودا ۳۵ درصد با سویه ماساچوست و ۲۳ درصد با سویه B/۷۹۳ می‌باشد

(تصویر ۷،۸). نتایج سکانس اسید نوکلیکی نشان می‌دهد که هر سه سویه (۳۶۵۴،۱۰۶۲،۱۰۶۱) متعلق به ژنوتیپ B/۷۹۳ هستند. سویه ۱۰۶۱ دارای یک باند اضافی در RFLP بود که آنالیز این سکانس در برنامه Blast، ۸۹درصد همولوژی با سویه H120 نشان داد. تمامی آنزیمهای RE و قطعات حاصله با برنامه Gene runner تائید شد. سکانس این سه سویه با ژنوتیپ B/۷۹۳ در بانک اطلاعاتی Gene Bank با Accession numberهای 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 آمینواسیدی 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 سویه 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 سویه 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 کروناویروس‌های 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 انگشت‌نگاری 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 آمینواسیدی ژن S1 سویه‌های IBV مربوط به سروتیپ‌های مختلف، تفاوتی در حدود ۲۵-۲۰درصد و حتی تا ۴۸درصد نشان می‌دهد.

جدول ۲- اختلاف اسید نوکلئیکی ژن S1 بین ۵ 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	0.0564	0.2456	0.0551	0.0431	0.2616
1062	0.0583	0.2480	0.0557	0.0537	0.2648
1061	0.0607	0.2526	0.0567	0.0547	0.2602

میزان اختلاف سکانس بین سویه‌های متعلق به یک سروتیپ متفاوت است. به‌عنوان مثال جدایه‌ها و سویه‌های متعلق به سروتیپ ارکانزاس آمریکای شمالی (Ark) دارای بیش از ۹۳درصد شباهت سکانس در نوکلئوتید و بیش از ۸۹درصد شباهت در سکانس آمینو اسیدی S1 دارند. در حالی‌که آنالیز جدایه‌های سروتیپ B/۷۹۳ کشورهای مختلف طی یک دورهٔ ساله بیش از ۹۶درصد شباهت در نوکلئوتید و بیش از ۹۲درصد شباهت در آمینو اسید را نشان داده‌اند(۲،۱۱،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 به‌کار رفته و یا نسبت به بخشی از ژنوم که مورد تجزیه قرار گرفته است می تواند فرق کند. اطلاعات توالی، فقط اطلاعات را در مورد ساختار اولیه پروتئین (توالی آمینواسیدها) فراهم می‌سازد. تفاوت‌های آشکار در توالی‌های ۲ سویه را نمی توان 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 درعفونت‌های مخلوط، مانعی برای ترجمهٔ اطلاعات از روی ژنوتیپ به سروتیپ یا پروتکتوتیپ است(۱۴). سکانس یک نمونه می تواند با استفاده از وکتور یا بدون آن به‌طور مستقیم مثلاً به روش DACS(Direct Automated Cycle Sequencing) باشد. تعیین توالی می تواند به روشهای مختلف مثل shot, Short sequencing Hot, Long run برای قطعات کوچک، با قابلیت خواندن حداکثر ۸۵۰ جفت باز (با دقت ۹۹درصد) یا بروش Primer walkingبرای قطعات خیلی بلند (بیش از ۱Kb) با دقت ۹۹/۹درصد باشد. سابقه مطالعه ویروس برونشیت عفونی طیور ایران وصفی مرندی و بزرگمهری فرد درسال ۱۳۸۰ (۴) باتست VN، حضور واریانت را در بین ویروس‌های برونشیت عفونی طیورگزارش کردند که بعد از ارسال به آزمایشگاه weybridge انگلستان واریانت یا سروتیپ آن به‌عنوان B/۷۹۳ اعلام شد و سپس بطریق ملکولی به روش RT-PCR/RFLP توسط وصفی مرندی و همکاران، اکبری آزاد و همکاران، تایید شد(۲،۳). صیفی آباد شاپوری و همکاران درسال ۲۰۰۲ به روش ملکولی وجود سروتیپ B/۷۹۳ را در سویه‌های برونشیت عفونی طیور ایران به روش Multiplex RT-PCR نشان دادند و متعاقب تعیین سکانس قطعه ۱۵۴bp ژن S1 متعلق به سویه جدا شده (14/2001)، میزان شباهت ۹۵/۶۲، ۸۲/۴۶،

۸۱/۷۱ و ۷۳/۶۹ درصد را به ترتیب با سویه‌های D1466, D274, H120, 4/91 گزارش کردند(۳،۲۵). نوری و همکاران در سال ۲۰۰۳، ۱۳۸۲ ویروس ۹۱/۴ را در ۱۸ گله از ۳۰ گله گوشتی مبتلا در استان فارس با نمونه‌گیری 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. به‌نظر می‌رسد که جدایه ۱۰۶۱ یا نوعی عفونت مخلوط (Mix infection) سویه‌های H120 و ۷۹۳/B باشد و هر دو نوع سویه (H120,793/B) به‌طور 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، واضح‌تر نشان می‌دهد. در تنظیم اولیه (alignment Primary) قطعه اضافی ۱۰۶۱ که درابتدای 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 به‌نظر می‌رسد قطعه‌ای از سویه واکسن H120 باشد. واز آنجا که کل نمونه‌های اخذ شده در این مطالعه از گله‌های مایه کوبی شده با واکسن‌های زنده برونشیت بوده است احتمال وجود سویه واکسن به‌طور همزمان در نمونه همراه با سویه ۷۹۳/B بعید نمی‌باشد. هم چنین احتمال نوترکیب بودن نمونه ۱۰۶۱ را نیز نمی‌توان رد کرد. از طرفی این قطعه صرفاً قطعه ناقصی (حدود ۴۰ جفت باز) از سویه H120 است اینکه آیا این قطعه درواقع خود قسمتی از ویروس کامل H120 بوده که درواکنش 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 به‌صورت محصول نو ترکیب ظاهر شده است مشخص نیست. با اینحال شناسایی دو ویروس مختلف به‌طور همزمان در یک نمونه اخذ شده به روش RT-PCR/RFLP می‌تواند از مزایای خاص این روش محسوب شود. چنین حالتی را Callison و همکاران درسال 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 کرده‌اند(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 می‌باشد. همان‌طور که درآنالیزسکانس ذکر شد (رجوع شود به بخش مواد و روش‌ها) سکانس‌های مربوطه بعد از تنظیم و آنالیز مختلف، در دو نوع توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی با ۳۰ سویه رفرانس مقایسه شدند. برمبنای آنالیز درخت فیلوژنیک، هر سه جدایه ارسالی در ژنوتیپ ۷۹۳/B قرار می‌گیرند(تصویر ۸،۷). درصد اختلاف نوکلئوتیدی یا هترولوژی این سه جدایه با سویه UK/793/B به‌عنوان پروتوتیپ ژنوتیپ ۷۹۳/B، ۶/۰۷- ۵/۶۴ درصد و با سویه واکسن H120، ۲۶/۱۶ تا ۲۶/۰۲ درصد می‌باشد (برمبنای متد Kimura 2 parameter distance) (جدول ۲). مقایسه شباهتها و تفاوت‌های نوکلئوتیدی این سه جدایه با سویهٔ ۹۱/۴ تخفیف حدت یافته به‌عنوان بذر واکسن Nobilis IB 4/91 و سویه ۹۱/۴ بیماری‌زا، نشان می‌دهد که هر سه جدایه با ۹۱/۴ بیماریزا شباهت بیشتری را در مقایسه با ۹۱/۴ تخفیف حدت یافته نشان می‌دهند. (به ترتیب ۵/۶۷- ۵/۵۱ درصد در مقایسه با ۵/۴۷- ۴/۳۱ درصد) هم چنین در بررسی درخت فیلوژنیک نیز، به‌نظر می‌رسد منشأ این سویه‌ها (۱۰۶۱،۱۰۶۲،۳۶۵۴) از سویه بیماریزای ۹۱/۴ باشد تا از سویه ۹۱/۴ واکسینال. این فرضیه در هر ۶ مدل درخت فیلوژنیک طراحی شده در این مطالعه (۳ مدل بر مبنای سکانس‌های آمینو اسیدی و سه مدل برمبنای سکانس‌های نوکلئوتیدی سویه‌ها) تأیید می‌شود.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران به خاطر تصویب پروژه تحقیقاتی بررسی مولکولی ویروس‌های برونشیت عفونی و پرداخت هزینه‌های طرح تشکر و قدردانی به‌عمل می‌آید.

References

۱. اکبری آزاد، گ. (۱۳۷۹): ویروس برونشیت عفونی طیور، فصلنامه تخصصی طیور چکاوک، ۴۸: ۷۱-۵۱.

۲. اکبری آزاد، گ.، وصفی مرندی، م.، کیوانی امینه، م. (۱۳۸۳): جدا سازی و شناسایی ویروس‌های برونشیت عفونی طیور در مرغداری‌های صنعتی ایران. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، (۳) ۵۹: 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 بیماری‌های طیور، شیراز ۵-۳ اردیبهشت ماه.

۴. وصفی مرندی، م.، بزرگمهری فرد، م. ح. (۱۳۸۰): جدا سازی و شناسایی ویروس‌های برونشیت عفونی طیور در بین سال‌های ۷۹-۱۳۷۶ از مرغداری‌های صنعتی ایران. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، (۳) ۵۶: ۱۲۴-۱۱۹.

۵. وصفی مرندی، م.، بزرگمهری فرد، م. ح.، کیوانی، ح.، پیغمبری، س. م.، پور بخش، س. ع.، اکبری آزاد، گ. (۱۳۸۰): جدا سازی و شناسایی واریانت ۹۱/۴ ویروس‌های برونشیت عفونی طیور در مرغداری‌های ایران. سومین سمینار بهداشت و بیماری‌های طیور، شیراز. ۵-۳ 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 lnfectious 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.

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 bronchits 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 IBVand 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.