مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۲، دوره ۶۸، شماره ۲، ۱۴۱-۱۳۵
Original Article
Journal of Veterinary Research. 68,2:135-141, 2013

مطالعه شجره شناسی جدایه‌های ویروس برونشیت عفونی پرندگان در ایران طی سال های ۱۳۸۹-۱۳۸۸ براساس قطعه ژن گلیکوپروتئین S1

مسعود هاشم زاده[۱] وحید کریمی[۲*] شهین مسعودی[۱] عبدالحمید شوشتری[۱] آرش قلیان چی لنگرودی[۲] رضا ممیز[۱] محمد حسین ناظم شیرازی[۳]
حسین مقصودلو[۳] رضا حسن زاده[۴] فاطمه عشرت آبادی[۱]

۱) گروه تحقیق و تولید واکسن های ویروسی طیور، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج - ایران
۲) گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران
۳) گروه بیماریهای طیور، مرکز تشخیص اداره کل دامپزشکی استان خراسان رضوی سازمان دامپزشکی کشور، تهران - ایران
۴) گروه ویروس شناسی، مرکز تشخیص اداره کل دامپزشکی استان خراسان رضوی سازمان دامپزشکی کشور، تهران - ایران

(دریافت مقاله: ۲۴ مهر ماه ۱۳۹۱ ، پذیرش نهایی ۱۷ بهمن ماه ۱۳۹۱)

چکیده

زمینه مطالعه: برونشیت عفونی پرندگان بیماری حاد، بسیار مسری، با انتشار جهانی می‌باشد، جهش‌های نقطه‌ای و نوترکیبی ژنوم ویروس موجب تکامل مداوم آن شده و بنابراین ظهور واریته‌های ویروس برونشیت عفونی پرندگان کنترل این بیماری را پیچیده نموده است. **هدف:** بررسی خصوصیات ژنی واریته‌های جدید ویروس برونشیت عفونی جدا شده در مرغداری‌های صنعتی ایران در نمونه‌هایی که بین سال‌های ۱۳۸۸ و ۱۳۸۹ جمع آوری گردیده است. **روش کار:** قطعه ای از ژن پروتئین S1، ناحیه پر تغییر و پایدار ویروس برونشیت را پوشش می‌دهد، با استفاده از روش RT-PCR متداول تکثیر و تعیین توالی گردید. **نتایج:** تجزیه و تحلیل فیلوژنی چهار ویروس را نشان داد که به اسامی Razi-HKM891، Razi-HKM892، Razi-HKM893 و Razi-HKM894 نامیده شدند. مقایسه اسیدهای آمینه القایی آنها با سایر ژنوتیپ‌ها ویروس برونشیت عفونی پرندگان، انتشار یافته در پایگاه اطلاعات بانک ژن، دلالت دارد که جدایه Razi-HKM891 و Razi-HKM894 داخل سروتیپ بیماریزا 793/B قرار دارند، در حالیکه جدایه‌های Razi-HKM892 و Razi-HKM893 با جدایه‌هایی که قبلا در ایران شناخته شده بودند کاملاً تفاوت داشتند. جدایه Razi-HKM893 با جدایه‌های کشورهای خاورمیانه که اخیراً انتشار یافته است قرابت زیاد داشت و احتمالاً جدایه جدید در ایران می‌باشد. **نتیجه‌گیری نهایی:** یافته‌های این مطالعه بهبود استراتژی‌های کنترل بیماری را ضرورت دانسته و لذا اهمیت برقراری سیستم پایش مستمر بیماری برونشیت عفونی پرندگان و به اشتراک گذاشتن اطلاعات در جوامع علمی جهانی را تاکید می‌نماید، این امر می‌تواند خلل اپیدمیولوژی بیماری در منطقه را پر کند و توانمندی تشخیص را معتبر سازد.

واژه‌های کلیدی: ویروس برونشیت عفونی پرندگان، توالی اسیدآمینه‌های، جدایه، شجره‌شناسی

مقدمه

ویروس برونشیت عفونی (IB)، جنس کورونا ویروس، در خانواده کوروناویریده و در رده نیدوویرال ها (Nidovirales) قرار دارد. جنس کوروناویروس ها دارای ساختار ژنی بزرگ از جنس RNA (بزرگترین RNA از نظر طول ژن) می‌باشد، که به لحاظ ساختار منحصر به فرد ژنی، شیوه تکثیر متفاوت، این ویروس را از سایر ویروس ها متمایز می‌سازد. کورونا ویروس ها به ۳ گروه سرولوژیک تقسیم می‌شوند که تاکنون گروه‌های سرمی I و II از پستانداران و گروه سرمی III از پرندگان جدا گردیده است (۱۶).

ژن ویروس IB متشکل از یک RNA تک رشته ایی با قطبیت مثبت به طول ۲۷/۶ kb است (۴) و سه نوع پروتئین اصلی را رمزگذاری می‌کند: گلیکوپروتئین خارشکل سطحی S (Spike)، گلیکوپروتئین غشایی (M) و پروتئین نوکلئوکپسید (N). بعلاوه، یک پروتئینی به نام پروتئین غشایی کوچک (E) در ساختمان ویروس وجود دارد که ذکر می‌شود وجود این پروتیئن به همراه غشاء سلول در شکل گیری ذرات ویروس ضروری است (۹). گلیکوپروتئین S خارهای بزرگ، گلبرگی شکل (Petal-shaped) به اندازه ۲۰nm روی سطح ویروس برونشیت عفونی می‌باشد (۷). پروتئین S به دو تحت دامنه S1 و S2 تقسیم می‌گردد، پروتئین S1 بخش کروی S را تشکیل می‌دهد، این پروتئین مسئول چسبیدن به گیرنده‌های خاص موجود در سطح سلول های حساس است. توالی ژن ها در ژنوم S1 متفاوت و درجاتی از حذف و جایگزینی در توالی آن همراه با تغییرات آنتی ژنی و پاتوژنیسیته ویروس می‌باشد. در مقابل پروتئین S2 دارای توالی پایدارتر و در ساقه خار قرار دارد (۱۶). مشخصه سروتیپ ویروس برونشیت عفونی در نواحی بسیار متغیر (Hypervariable) گلیکوپروتئین S1 قرار دارد و تحت واحد S1 آنتی بادی خنثی سازی را القامی نماید (۸،۱۵). این ویروس می‌تواند از راه‌های تنفس و تماس مستقیم انتقال یابد. ویروس IB در پرندگان جوان موجب عفونت دستگاه تنفسی، کاهش وزن گیری و عدم استفاده بهینه از دان مصرفی می‌گردد. این ویروس می‌تواند عامل مستعد کننده‌ای برای سایر عوامل باکتریایی که موجب تورم کیسه هوایی، پری

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۶۱۱۱۷۱۵۰-۰۲۱ نمابر: ۶۶۴۲۷۵۱۷-۰۲۱ Email: vkarimi@ut.ac.ir

کاردیت وپری هپاتیت برای طیور می‌گردند، به شمار می‌رود (۹). طبیعت قابل انتقال ویروس از یکسو و ساختار خاص ژنومی و قابلیت ظهور سروتیپ‌های متعدد موجب گردیده که کنترل این بیماری را علیرغم استفاده از واکسن امری پیچیده نماید و دیده می‌شود که پرنده‌های بالغ می‌توانند بعنوان منبع جدید برای سروتیپ‌ها و یا واریانت‌های جدید باشند (۹). با وجود اقدامات پیشگیرانه رایج بر علیه بیماری در سراسر کشور ظهور سروتیپ‌های جدید ویروس برونشیت و گزارشات شکست واکسیناسیون علیه بیماری ووقوع مکرر همه‌گیری‌های زیان‌بار، مطالعات و بررسی‌های مستمر برای تعیین ژنوتیپ ویروس‌های در گردش را امری ضروری می‌گرداند. هدف این مطالعه بررسی و مقایسه شجره شناسی توالی اسیدهای آمینه قطعه ای از ژن S1 که مشمول ناحیه پر تغییر (III Hypervariable region) III و ناحیه پایدار این ژن (۶) در موقعیت ۷۲۹-۱۱۹۳ ژن S1 (۴۶۴ جفت باز) در جدایه‌های ویروس برونشیت عفونی پرندگان و جدایه‌هایی گه قبلاً در ایران گزارش گردیده است با سویه‌های استاندارد و وحشی در سایر کشورها به ویژه با جدایه‌های کشورهای همسایه بود.

مواد و روش کار

نمونه: ۵۶ نمونه ارسالی شامل سواب‌های نای و کلواک که بطور معمول از استان‌های کشور به مرکز تشخیص سازمان دامپزشکی برای ردیابی آنفلوانزای پرندگان ارسال شده بودند، همچنین بافت‌هایی از نای، کلیه و ریه از گله‌هایی با علائم بیماری تنفسی که توام با مرگ و میر بودند، جمع آوری گردید. نمونه‌ها ابتدا از نظر آنفلوانزا مورد آزمایش‌های PCR-RT قرار گرفت و نمونه‌های منفی آنفلوانزا برای مطالعه برونشیت عفونی انتخاب شدند. نمونه‌های سواب مستقیماً آزمایش RT-PCR انجام می‌پذیرفت، در حالیکه نمونه‌های بافتی به منظور افزایش بار ویروس ابتدا در تخم مرغ SPF پاساژ داده شدند (۱۱)، سپس مایع آلانتوئیک آنها برای آزمایش مولکولی برداشت و در فریزر منفی $70^{o}C$ تا زمان مصرف نگهداری شدند. نمونه‌ها از نظر قدرت جمع‌کنندگی گلبول‌های قرمز مرغ (هماگلوتیناسیون، HA) مورد آزمایش قرار گرفتند و موارد منفی آنها از نظر HA برای ردیابی ویروس برونشیت عفونی با استفاده از آزمایش RT-PCR انتخاب گردیدند.

استخراج RNA: استخراج RNA نمونه‌ها با کیت استخراج به نام "High Pure Viral Nucleic Acid Kit" شرکت رش (Roche) آلمان مطابق دستورالعمل شرکت سازنده کیت و با رعایت نکات بهداشتی و زیست محیطی انجام پذیرفت.

آزمایش نسخه برداری معکوس و واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR-RT): آزمایش نسخه برداری معکوس و واکنش زنجیره ای پلی مراز با کیت یک مرحله‌ای "Titan one tube RT-PCR system" شرکت رش آلمان انجام پذیرفت. در این کیت آنزیم AMV نسخه برداری معکوس برای ساخت اولین رشته cDNA، و مخلوط آنزیم‌های DNA polymerase Tag و Tgo DNA polymerase برای تکثیر cDNA در واکنش زنجیره‌ای پلی مراز بکار گرفته شده است. مخلوط دو آنزیم اخیر علاوه بر واجد بودن بازدهی تولید بالا قدرت تصحیح قرائت در هنگام تولید محصول PCR را دارا می‌باشند. غلظت نهایی هر یک از مواد برای هر واکنش زنجیره پلی مراز نسخه بردای معکوس (RT-PCR) شامل: MgCl2، ۱/۵ mmol، مخلوط dNTPs، ۱۰ mmol، هریک از پرایمرها (۱۰ pM/µL)، ۰/۴ µmol، DTT، ۱۰ mmol و ممانعت کننده از RNase ۵ الی ۱۰ واحد مورد استفاده قرار گرفت. ژن S برونشیت عفونی پرندگان ۳/۵k باز (kb) طول و در انتهای ژن پلیمراز قرار دارد. تحت واحد S1، ۱۵۳۲ تا ۱۶۰۵ نوکلوئیک طول دارد که ۵۳۵ الی ۵۴۴ اسید آمینه گیلیکوپروتئین ساختمانی را رمز گذاری می‌کند (۵). دو ناحیه از ژن S1 در نظر گرفته شد و پرایمرهای XCE1 و XCE2 که در مورد سروتیپ‌های Mass، ۴/۹۱ و D۲۷۴ مشترک می‌باشند (۶) مورد بهره برداری قرار گرفتند (جدول۱) (۲). برنامه حرارتی شامل حرارت اتصال (Annealing)، جداشدن (Denaturation) و تکثیر (Elongation) به ترتیب $48^{o}C$، ۹۴ و ۶۸ و زمان اتصال یک دقیقه، جداشدن اولیه ۳ دقیقه و در سیکل‌های حرارتی یک دقیقه و زمان تکثیر نیز یک دقیقه و تعداد سیکل حرارتی ۳۵ بار تنظیم گردید.

بررسی شجره شناسی: ۵۰µL از محصول PCR خالص شده با کیت "High pure PCR product purification kit" شرکت رش آلمان برای تعیین توالی قطعه‌ای به طول ۴۶۴ جفت باز از ژن S1 به شرکت MWG آلمان ارسال گردید. پاسخ توالی‌های اخذ شده توسط برنامه MEGA 4 مورد بررسی و تصحیح قرار گرفت. توالی و آنالیز مقایسه توالی آمینو اسیدی با سویه‌های مورد بحث بوسیله نرم افزار CLC Free Workbench مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز شجره شناسی توسط نرم افزار MEGA 4 با استفاده از اطلاعات بدست آمده از توالی اسید آمینه ای و اطلاعات بانک ژن بر اساس مدل Neighbor Joining صورت گرفت. سکانس‌ها توسط برنامه Bankit در پایگاه NCBI در بانک ژن ثبت گردیدند و شماره دسترسی به آنها اختصاص یافت. ژن S1 ۲۳ جدایه مرجع و جدایه‌های وحشی IBV از کشورهای مختلف، به عنوان نماینده سویه‌های آن کشورها، به علاوه ۳ جدایه ایران که قبلاً در بانک ژن ثبت شده بودند به عنوان نمایده جدایه‌های ایران، با ۴ جدایه مورد بررسی در این مطالعه، از نظر توالی اسیدهای نوکلوئیک و اسیدهای آمینه مورد مقایسه قرار گرفتند.

نتایج

از ۵۶ نمونه که از مناطق مختلف کشور در زمستان ۱۳۸۸ و بهار سال ۱۳۸۹ اخذ و مورد بررسی قرار گرفت، چهار نمونه در آزمایش RT-PCR مثبت و توالی محصول PCR قطعه ژن گلیکوپروتئین S1 **هر** یک از جدایه‌ها تعیین گردید، و سپس اسیدهای آمینه متناظر آن‌ها تعیین

جدول۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت مطالعه ویروس برونشیت عفونی پرندگان بر اساس قطعه ژن S.

مرجع	موقعیت در توالی ژن	ژن	توالی '3-'5	پرایمر
Adzhar et al., 1997	۷۲۹ - ۷۴۹	S1	CACTGGTAATTTTTCAGATGG	XCE1+ (Forward)
Adzhar et al., 1997	۱۱۷۰ - ۱۱۹۳	S1	CCTCTATAAACACCCTTGCA	XCE2- (Reverse)

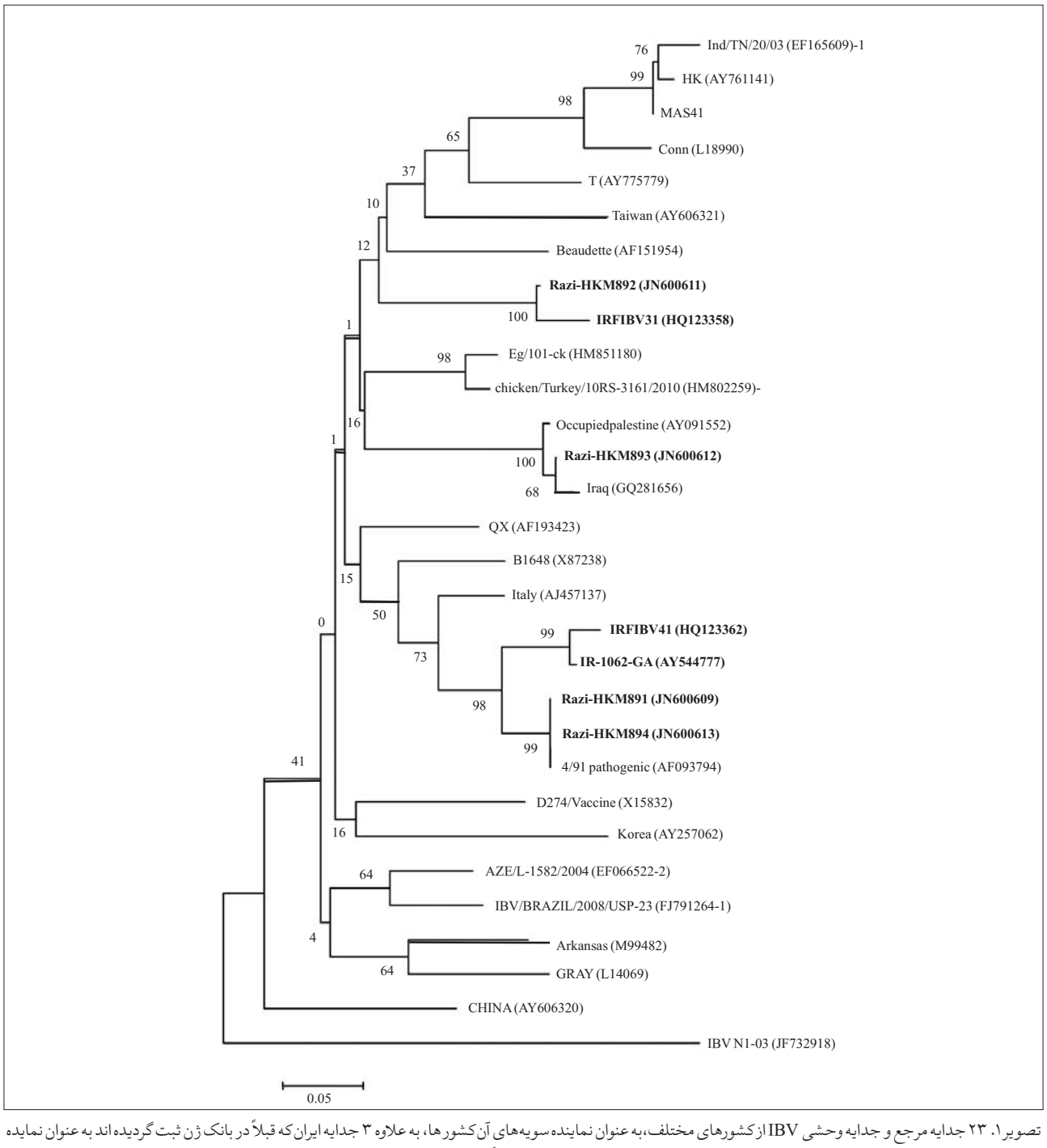
گردید. توالی اسیدهای آمینه‌های متناظر در چهارجدایه این مطالعه، Razi-HKM891 Razi-HKM892, Razi-HKM893, Razi-HKM894-Razi (تصویر۲) و ۲۳ جدایه مرجع و جدایه‌های وحشی IBV از کشورهای مختلف و ۳ جدایه ایران که قبلاً در بانک ژن ثبت گردیده‌اند مورد مقایسه قرار گرفت.

اسیدهای آمینه جدایه Razi-HKM891 با جدایه Razi-HKM894 دارای ۹۹/۳۰٪ تشابه بودند، این جدایه‌ها به ترتیب ۱۰۰ و ۹۹/۳۰٪ تشابه با سویه پاتوژن ۴/۹۱ داشتند، ولی با سویه پاتوزن ماساچوست (M41) به ترتیب دارای ۲۴/۴۸ و ۲۵/۱۷٪ تفاوت بودند. همچنین این جدایه‌ها با جدایه IR-1062-GA که قبلا گزارش گردیده بود(۳)، ۹۲/۳۲٪ و با جدایه‌ای از کشور ایتالیا به شماره دسترسی AJ457137 به میزان ۹۱/۶۱ و۹۰/۹۱٪ تشابه داشتند. فیلوژنی این جدایه‌ها نیز در قرابت با یکدیگر می‌باشند (تصویر۱).

اسیدهای آمینه جدایه Razi-HKM892 با جدایه Razi-HKM893 حدود ۱۶٪ با یکدیگر و با دو جدایه Razi-HKM891 و Razi-HKM894 حدود ۲۰٪ تفاوت نشان می‌دهند. این جدایه‌ها ۱۹/۵۸٪ با ژنوتیپ B/۷۹۳ و با سویه ماساچوست (M41) به ترتیب دارای ۱۹/۵۸ و ۲۲/۳۸٪ تفاوت داشتند. این جدایه‌های همچنین با جدایه‌هایی که قبلا در ایران شناخته و در بانک ژنی ثبت شده بودند بین ۲۱-۴۴٪ تفاوت را نشان می‌دادند. جدایه Razi-HKM892 در شاخه‌های درخت شجره شناسی با جدایه نفروپاتوژن کشور استرالیا به شماره ثبت AY775779 و با جدایه کشور تایوان به شماره ثبت AY606321 و همچنین با سویه بودت کشور نیوزیلند وکشور چین قرابت داشته و به ترتیب ۸۴/۶۲، ۸۳/۹۲، ۸۵/۳۱، ۸۳/۹۲٪ همسانی در اسیدهای آمینه داشتند. جدایه Razi-HKM893 که برای اولین بار در ایران گزارش می‌شود، در شاخه‌های درخت شجره شناسی با جدایه‌های کشورهای فلسطین اشغالی و عراق به شماره‌های ثبتی AY091552 و GQ281656 قرابت دارد و همسانی اسیدهای آمینه آن به ترتیب ۹۸/۶۰ و ۹۰/۳۱٪ می‌باشد.

بحث

صنعت پرورش مرغ گوشتی و تخم‌گذار کشور به دلیل بیماری برونشیت عفونی سالانه خسارات هنگفتی را متحمل می‌گردد و علیرغم استفاده گسترده واکسن‌های سروتیپ مورد مصرف موجود، این بیماری به صورت همه‌گیری‌های وسیع در سطح کشور مشاهده می‌شود. در یک دهه گذشته سروتیپ و جدایه‌های جدیدی از ویروس برونشیت عفونی در ایران ظهور پیدا کرده‌اند. مطالعات Vasfi Marandi و همکاران در سال ۲۰۰۱ در نمونه‌هایی که طی سال‌های ۷۹-۱۳۷۶ جمع آوری نموده بودند، جدایه‌هایی از این ویروس را جدا و شناسایی نمودند (Marandi, M Vasfi)(۲۲). Akbari Azad و همکاران در سال ۱۳۸۵ از مجموع یک صد و بیست نمونه مشکوک که بین سال‌های ۱۳۸۲-۱۳۷۷ جمع آوری گردیده بود، تعداد بیست نمونه در آگارژل باند مثبت حدود ۱۶۵۰ جفت باز را نشان دادند. سویه‌های رفرانس 793/B، H120، M41 و D274 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. در آزمایش Polymorphism (RFLP) Restriction Fragment Length الگوی یازده جدایه IBV دقیقاً مشابه الگوی سروتیپ ۷۹۳/B و نه جدایه دیگر الگوی مشابه سروتیپ ماساچوست را نشان دادند. سه جدایه ایران که الگوی ۷۹۳/B را نشان می‌دادند انتخاب و سکانس نوکلئوتیدی ژن S1 آن مشخص و به اسیدهای آمینه متناظر ترجمه گردید، و پس از آن درخت شجره شناسی ترسیم و مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج سکانس اسیدهای نوکلئو یک نشان داد که هر سه نوع سویه ایران متعلق به ژنوتیپ ۷۹۳/B است (۳)، abad Shapori Seify و همکارانش در سال ۱۳۸۱ از نمونه‌هایی که از هشت استان جنوبی و مرکزی ایران جمع آوری نموده بودند در واکنش multiplex RT-PCR انجام شده روی سروتیپ‌های ماساچوست و ویروس‌های کنترل ۴/۹۱، در باندهای ۲۹۵ و ۱۵۴ جفت باز را نشان دادند که ۱۲ مورد از جدایه‌ها (۱۲/۲۰۰۱-۱/۲۰۰۱) باندهای مشابه با تیپ ماساچوست را تولید نمودند، در حالیکه دو مورد از جدایه‌ها (۱۴/۲۰۰۱-۱۳/۲۰۰۱) باندهای مشابه سروتیپ ۴/۹۱ را ایجاد نمودند، هیچ یک از جدایه‌ها با باندهای D۲۷۴ مرتبط نبود. متعاقباً توالی ژنی ناحیه S1 جدایه‌های ۴/۹۱ تعیین و مورد مقایسه قرارگرفت که تشابه بالایی را نشان دادند (۲۰)، شوشتری سروتیپ غالب بین سال‌های ۱۹۹۹- ۲۰۰۴ را ۷۹۳/B اعلام نمود (۲۱). Momayez و همکاران در سال ۲۰۰۱/۱۳۸۰ از نمونه‌هایی که تقریباً طی یک سال جمع آوری شده بودند، توانستند ویروس برونشیت عفونی را جدا نمایند و در آزمایش VN سروتیپ ماساچوست در سه نمونه مثبت بودند، در حالیکه دو نمونه دیگر با آن سروتیپ خنثی نشدند، تصور گردید که علاوه بر سروتیپ ماساچوست سروتیپ‌های دیگری نیز مطرح باشند (۱۸)، Cavanagh و همکاران در سال ۲۰۰۵ طی مطالعه ای که تغییرات پروتئین S، تیپ ۷۹۳/B و یروس یرونشیت عفونی را در فیلد و در خلال پاساژ در پرنده و تخم مرغ جنین دار بررسی نمودند، وجود دو جدایه از ایران را که قرابت حدود ۹۵٪ تشابه با جدایه اروپایی داشت را بیان نمودند (۱۹). Ghahremani و



تصویر۱. ۲۳ جدایه مرجع و جدایه وحشی IBV از کشورهای مختلف، به عنوان نماینده سویه‌های آن کشورها، به علاوه ۳ جدایه ایران که قبلاً در بانک ژن ثبت گردیده اند به عنوان نماینده جدایه‌های ایران، با ۴ جدایه در این مطالعه از نظر توالی اسیدهای نوکلوئیک (جدایه‌های ایران پر رنگ نشان داده شده است).

همکاران در سال ۲۰۱۱ در مطالعه‌ای بین سال‌های ۱۹۹۸-۲۰۰۸ جدایه‌های ماساچوست و ۴/۹۱ مشاهده نمودند و اضافه نمودند که ژنوتیپ ۴/۹۱ ایران شبیه به جدایه کشور فرانسه می‌باشد (۱۳).

نوترکیبی بدون شک یک چهره از تکثیر و تکامل IBV است که تصور می‌شود به سه علت ایجاد گردد: جمعیت بسیار زیاد طیور در سطح جهان (حدود ۴۰ میلیارد قطعه در سال) که عمدتاً بشکل متراکم نگهداری می‌گردند؛ سهولت پراکنده شدن ویروس و همچنین گردش توام سروتیپ‌ها در طبیعت از علل آن قلمداد می‌شود. تجزیه و تحلیل توالی اسیدهای نوکلوئیک و اسیدهای آمینه قطعه ژن S1 نشان می‌دهد که تغییرات آنتی ژنی کوروناویروس‌ها بسیار بالا بوده و در اپیزئولوژی برونشیت عفونی پرندگان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. که قبلا توسط Jungherr و همکارانش در سال ۱۹۵۶ مشخص گردیده است (۱۴). تغییرات ژنی در تحت واحد S1 یک مکانیزم سازش ویروس به فشارهای انتخابی ایمنی است که همراه با ایمن سازی متراکم علیه IBV و همچنین

سایر اقدامات مدیریتی انجام می‌پذیرد، این موضوع قبلا توضیح داده شده است (۱۲). بر همین اساس تکامل و ایجاد سروتیپ‌های مختلف به شکل مستمر در حال انجام است، لذا تعیین سریع و صحیح سروتیپ‌ها بعنوان یک اصل مهم و تعیین کننده در کنترل این بیماری ضروری می‌باشد. در این مطالعه دو جدایه (Razi-HKM891, Razi-HKM894-Razi) مشابه با ژنوتیپ‌های قبلی در ایران دیده شد، و دو جدایه "Razi-HKM893 و Razi-HKM892" با اختلاف زیاد با ژنوتیپ‌ها ی قبلی ایران مشاهده گردید. جدایه Razi-HKM892 ضمن اختلاف بالا با جدایه‌های قبلی ایران، همسانی قابل توجهی با جدایه‌های بودت، T استرالیا، تایوان و جدایه کشور فلسطین اشغالی دارا بود.

به نظر می‌رسد جدایه Razi-HKM893 که همسانی بالای اسیدهای آمینه با جدایه کشور فلسطین اشغالی، جدایه عراق و مصر دارد، دارای قدرت بیماریزای بالایی باشد (۱،۱۷،۲۳) و به عنوان یک ژنوتیپ جدید در خاورمیانه مطرح باشد (۲۳). از طرفی با توجه به میزان همسانی و اختلاف دو جدایه اخیر، Razi-HKM892 و Razi-HKM893، تصور می‌شود که این جدایه‌ها با تغییرات در توالی اسیدهای نوکلوئیک از یک منشأ بوده و در طبیعت دستخوش تغییرات حذف و جایگزینی اسیدهای نوکلوئیک شده باشند، و هر یک از آنها ویژگی‌های منحصر بفردی را حاصل نموده باشند. در مطالعه Mahmood و همکاران در سال ۲۰۱۱ (۲۳) در سلیمانیه عراق جدایه نفروپاتوژن Sul/01/09 با جدایه کشور فلسطین اشغالی ۹۵٪ و با جدایه کشور مصر ۹۴٪ در اسیدهای آمینه همسانی داشت، و این جدایه با جدایه Razi-HKM893 ۹۱-۹۰٪ همسانی در توالی اسیدهای آمینه را دارا می‌باشد. در مطالعه محمود ذکر شده بود که علیرغم مرز طولانی بین کشور ایران و عراق و حجم مبادلات بین دو کشور از سال ۲۰۰۳، عجیب است که جدایه‌های ایران با حدود ۲۷ ٪ تفاوت با جدایه عراق وجود دارد و جدایه مشابه Sul/01/09 در ایران مشاهده نشده است. لذا با تشخیص و تعیین جدایه Razi-HKM893 در این مطالعه پاسخ سوال Mahmood و همکاران در سال ۲۰۱۱ ارائه گردیده است.

در پایان باید ذکر نمود که تعیین توالی اسیدهای نوکلوئیک و اسیدهای آمینه ارتباط ژنومی بین سویه‌ها را نشان می‌دهد اما باید به خاطر داشت که جایگاه سویه‌های معمول در درخت شجره‌شناسی نسبت به روش به کار رفته و یا نسبت به بخشی از ژنوم که مورد مطالعه قرار گرفته است می‌تواند تفاوت داشته باشد. اطلاعات توالی اسیدهای آمینه فقط ساختار اولیه پروتئین را نشان می‌دهد، لذا تفاوت آشکار در توالی دو سویه را نمی‌توان به اختلاف آنتی‌ژنی یا بیولوژی آن‌ها تعمیم داد. همچنین بروز نوترکیبی بین سویه‌های متفاوت ویروس برونشیت عفونی در آلودگی‌های مخلوط، مانعی برای ترجمه اطلاعات از روی ژنوتیپ به سروتیپ یا پروتکتوتیپ (protectotype) است (۱۰). بنابراین بررسی‌های بیشتر برای شناخت ژنوتیپ‌های در حال گردش کشور و برقراری پایش‌های مستمر از تغییرات ویروس برونشیت عفونی اعم از مرغداری‌های صنعتی، بومی و پرندگان مهاجر و همچنین ارزیابی میزان قرابت‌های واکسن مصرفی، و توان حفاظت آن‌ها در مقابل سروتیپ‌ها و سویه‌های وحشی برای پیشگیری و کاهش خسارات ناشی از بیماری ضروری می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با استفاده از اعتبارات پژوهشی شورای پژوهشی دانشگاه تهران (۷۵۰۸۰۱۳/۶/۶) انجام شده است. از معاونت پژوهشی دانشکده دامپزشکی تهران، معاونت آموزش و پژوهش و همکاران محترم بخش تحقیق و تشخیص بیماریهای طیور و بخش تحقیق و تولیدواکسن‌های طیور موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی و همچنین از سازمان دامپزشکی کشور و همکاران محترم مرکز تشخیص سازمان دامپزشکی کشور تشکر و قدردانی می‌نمایم.

References

1. Abdel-Moneim, A.S., El-Kady,M.F., Ladman, B.S., Gelb, J. (2006) S1gene sequence analysis of a nephro-pathogenic strain of avian infectious bronchitis virus in Egypt. Virol J. 3:78.
2. Adzhar, A., Gough, R.E., Haydon, D., Shaw, 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
3. Akbari Azad, G., Vasfi Marandi, M., Keyvani aminae, H. (2007) Molecular analysis of three Iranian isolates belonged to 793/B serotype of infectious bronchitis. J Vet Res. 62: 69-80
4. Boursnel, M.E., Brown, T.D., Binns, M.M. (1984) Sequence of the membrane protein gene from avian coronavirus IBV. Virus Res. 1: 303-313.
5. Calvin, L., Keeler, J.R., Karen, L., Reed, W., Allen Nix., Jack Gelb, J.R. (1998) Serotype identification of avian infectious bronchitis virus by RT-PCR of the peplomer (S1) gene. Avian Dis. 42: 275-284.
6. Capua, I., Minta, Z., Kaepinska, E., Karen Mawditt, P., Britton, D., Cavanagh, R., Gough, E. (1999) Co-circulation of four types of infectious bronchitis virus (793/B, 624/I, B1648 and Massachusetts). Avian Pathol. 28: 587-592.
7. Cavanagh, D. (2007) Coronavirus avian infectious bronchitis virus. Vet Res. 38: 281-297.

8. Cavanagh, D., Davis, P.J., Mockett, A.P.A. (1988) Amino acids within hypervariable region 1 of avian coronavirus IBV (Massachusetts serotype) spike glycoprotein are associated with neutralization epitopes. Virus Res. 11: 141-150.
9. Cavanagh, D., Naqi, S.A. (2008) Infectious Bronchitis. Diseases of Poultry, (12th ed.). p.117-137.
10. De Wit, J.J. (2000) Detection of infectious bronchitis virus. Avian Pathol. 29: 71-93.
11. Gelb, J., Mark, R., Jackwood, W., (1998) A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens. (4th ed.) Published by the American Association of Avian Pathol. USA.
12. Gelb, J., Wolff, B., Moran, C.A. (1991) Variant serotypes of infectious bronchitis virus isolated from layer and broiler chickens. Avian Dis. 35: 82-87.
13. Ghahremani, N., Bozorgmehri Fard, M.H., Shoushtari, H., Momayez, R., Sheikhi, N., Khoshzahmat, A., et al. (2011) Molecular analysis of infectious bronchitis viruses isolated in Iran from 1998-2008. J Anim Vet Adv. 10: 2961-2967.
14. Jungherr, E.L., Chomiak, T.W., Luginbuhl, R.E. (1956) Immunological differences in strains of infectious bronchitis virus. In: Proceeding of the 60th U.S. Livestock Sanitary Association. Chicago, USA. IL. p. 203-209.
15. Koch, G., Hartog, L., Grant, A., Van Roozelaar, D.J., (1990) Antigenic domains on the peplomer protein of avian infectious bronchitis virus correlation with biological functions. J Gen Virol. 71: 1929 -1935.
16. Lai, M.M.C., Perlman, S., Anderson, L. (2007) Coronaviridae. Fields virology, (5th ed.) Volume one, Lippincott Williams, Philadelphia, PA, USA.
17. Meir, R., Rosenblut, E., Perl, S., Kass, N., Ayali, G., Hemsani, E., et al. (2004) Identification of a novel nephropathogenic infectious bronchitis virus in Israel. Avian Dis. 48: 635-641.
18. Momayez, R., Pourbakhsh, S.A., Khodashenas, M. Banani, M. (2002) Isolation and identification of infectious bronchitis virus from commercial chickens. Arch Razi Inst. 53: 1-9.
19. 1Seifi, S., Asasi, K., Mohamadi, A. (2010) Natural co-infection caused by avian inflfluenza H9 subtype and infectious bronchitis viruses in broiler chicken farms. Vet Arhive. 80: 269-281.
20. Seify abad Shapori, M.R., Mayahi, M., Charkhkar, S., Assasi, k. (2002) Serotype identification of recent Iranian isolates of infectious bronchitis virus by type-specific multiplex RT-PCR. Arch Razi Inst. 5: 79- 85.
21. Shoushtari, A.H., Toroghi, R., Momayez, R., Pourbakhsh, S.A. (2008) 793/B type, the predominant circulating type of avian infectious bronchitis viruses 1999-2004 in Iran: a retrospective study. Arch Razi Inst. 63: 1-5.
22. Vasfi Marandi, M., Bozogmehri Fard, M.H. (2001) Isolation and identification of infectious bronchitis viruses in chickens between 1997-2000 in Iran. J Vet Res. 56: 119-124.
23. Zana, H., Mahmood, Rizgar R. Sleman, Aumaid U. Uthman. Isolation and molecular characterization of sul/01/09 avian infectious bronchitis virus, indicatees the emergence of a new genotype in the Midde East. (Article in press, Vet Microbiol. 2011).

Phylogenetic study of Iranian infectious bronchitis virus isolates during 2010-2011 using glycoprotein S1 gene

Hashemzadeh, M.[1], Karimi, V.[2*], Masoudi, Sh.[1], Shoushtary, A.H.[1], Ghalyanchi Langeroudi, A.[2], Momayez, R.[1], Nazem Shirazi, M.H.[3], Maghsodloo, H.[3], Hasanzadeh, R.[4], Eshratabadi, F.[1]

[1]*Department of Research and Production of Poultry Viral Vaccine, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj- Iran*

[2]*Departments of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran*

[3] *Department of Avian Diseases, Diagnostic Center Veterinary Organization of Iran, Tehran-Iran*

[4]*Department of Virology, Diagnostic Center Veterinary Organization of Iran, Tehran-Iran*

(Received 15 October 2012 , Accepted 5 February 2013)

Abstract:

BACKGROUND: Infectious bronchitis is an acute, highly contagious, viral disease of poultry with worldwide distribution, and is continuously evolving through point mutation and recombination of their genome; subsequently the emergence of IBV variants complicates disease control. **OBJECTIVES:** To investigate genetic characterization of new IBV variants isolated from commercial chicken flocks in Iran collected between 2009 and 2010. **METHODES:** The partial S1 gene of the spike protein, covering a hypervariable and constant regions, was amplified and sequenced using conventional RT-PCR. **RESULTS:** Phylogenetic analysis revealed four viruses designated as Razi-HKM891, Razi-HKM892, Razi-HKM893 and Razi-HKM894. Deduced amino acid sequence comparison with other IBV genotypes, published in the GenBank database, indicated that the isolates Razi-HKM891 and Razi-HKM894 were placed into the pathogenic 793/B serotype. However, the isolates Razi-HKM892 and Razi-HKM893 were different with previously described isolates in Iran. The Razi-HKM893 is closely related to recently published isolates from countries in Middle East and likely indigenous to Iran. **CONCLUSIONS:** These findings is essential for improving the disease control strategies and thus emphasize the importance of continuous surveillance of the disease and of sharing the information to the global scientific community, which would help to fill the epidemiological gaps in the regions and to validate the robustness of diagnostic screening.

Key words: phylogenetic analysis, avian infectious bronchitis virus

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Sequence and genome location of the primers.

Figure 1. Phylogenetic relationships of 7 strains of isolated IBV in Iran and 23 selected reference and isolated field strains in other countries based on the partial S1 gene sequences by MegA4 program using the Neighbor Joining model. Iranian isolates are shown in bold type.

***Corresponding author's email: vkarimi@ut.ac.ir, Tel: 021-61117150, Fax: 021-66427517**