

Perbandingan Sekuen Daerah Hipervariabel (HVR) Subunit Gen S-1 Virus *Infectious Bronchitis* Isolat Lapang I-37 dengan Serotipe Connecticut 46

N.L.P. INDI DHARMAYANTI, RISA INDRIANI dan DARMINTO

Balai Penelitian Veteriner, PO BOX 151, Bogor 16114

(Diterima dewan redaksi 19 Mei 2003)

ABSTRACT

DHARMAYANTI, NLP I., R. INDRIANI and DARMINTO. 2003. Comparison of sequences of hypervariable region (HVR) subunit S-1 gene of field isolate I-37 infectious bronchitis virus with Connecticut serotype. *JITV* 8(2): 107-113.

Infectious Bronchitis is a contagious and acute respiratory disease in chickens caused by infectious bronchitis virus (IBV). Antigenic differences in IBV are associated with changes in the sequence of the spike glycoprotein (S). The subunit S1 which demonstrates more sequence variability than S-2 have been identified as hypervariable region (HVR-1 and 2). There were several IB virus field isolates included I-37 have been identified in Indonesia by serum neutralization method. However, gene sequence variation in HVR subunit S-1 had not yet been identified. Isolate I-37 was close to the serotype Connecticut 46 (Conn 46). The aim of this study is to identify sequence variation of HVR subunit S-1 gene of isolate I-37 produced by Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) and sequencing. Several procedures were carried out in the study including virus titration, propagation and was concentrated from the allantoic fluid infected with IBV. Then, RNA was extracted for RT-PCR. Further the product was sequenced and its homology with IBV references from GenBank was compared by GenMac version 8.0. Result showed that isolate I-37 produced 515 bp of amplification product. Isolate I-37 and Conn 46 are same serotype, yet their HVR subunit S-1 nucleotides and amino acids (protein) differ by 6.9% and 15.6% respectively. It might be concluded that isolate I-37 was variant of Conn 46.

Key words: Sequences variation, IBV, I-37 field isolate, HVR subunit S-1 gene

ABSTRAK

DHARMAYANTI, NLP I., R. INDRIANI dan DARMINTO. 2003. Perbandingan sekuen daerah hipervariabel (HVR) subunit gen S-1 virus *Infectious bronchitis* isolat lapang I-37 dengan serotipe Connecticut 46. *JITV* 8(2): 107-113.

Infectious bronchitis adalah penyakit pernapasan yang kontangius dan akut pada ayam yang disebabkan oleh *infectious bronchitis virus* (IBV). Perbedaan antigenik diantara serotipe IBV dihubungkan dengan variasi struktural dari bulir *glikoprotein* (S). Subunit S-1 menunjukkan variabilitas sekuen yang lebih tinggi dibandingkan dengan subunit S-2 dan sekuen S-1 dikenal sebagai *hypervariable region* (HVR)-1 dan HVR-2. Terdapat beberapa isolat lapang virus IB di Indonesia termasuk diantaranya adalah isolat I-37 yang telah diidentifikasi dengan uji serum netralisasi. Tetapi variasi sekuen dalam daerah HVR gen S1 belum pernah diidentifikasi. Isolat I-37 mempunyai kekerabatan dekat dengan serotipe Conn 46. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi variasi sekuen HVR subunit gen S-1 isolat I-37 dengan menggunakan teknik *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) dan sekuensing. Tahapan penelitian meliputi titrasi virus, propagasi dan pembuatan virus pekat dari cairan alantois terinfeksi IBV. RNA kemudian diekstraksi untuk digunakan dalam RT-PCR. Hasilnya disekuensing dan homologi dengan virus IB referensi dari *GenBank* dibandingkan dengan GenMac version 8.0. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat I-37 menghasilkan pita hasil amplifikasi sekitar 515 bp. Isolat I-37 dan Conn 46 adalah serotipe yang sama dengan perbedaan nukleotida dan asam amino daerah HVR subunit S-1 sekitar 6,9 dan 15,6% berturut-turut. Isolat I-37 mungkin merupakan varian dari serotipe Connecticut 46.

Kata kunci: Variasi sekuen, virus IB, isolat lapang I-37, HVR subunit gen S-1

PENDAHULUAN

Infectious bronchitis (IB) adalah penyakit respirasi yang bersifat kontangius dan akut pada ayam, disebabkan oleh virus *infectious bronchitis* (IBV). Penyakit ini menyerang saluran pernapasan bagian atas dan saluran urogenital pada ayam dan ditandai dengan gejala pernapasan seperti sesak napas, batuk, bersin, dan keluarnya cairan dari hidung. Kerugian ekonomi yang ditimbulkan oleh penyakit ini cukup besar karena pada

beberapa kasus, stres pernafasan dapat terjadi pada ayam muda sedangkan pada ayam petelur menyebabkan stres pernafasan, penurunan produksi telur dan menurunnya atau hilangnya kualitas kulit telur seperti kulit telur lembek, tipis dan bentuk tidak beraturan. Pada beberapa strain virus menyebabkan kerusakan ginjal yang mengakibatkan tingginya kematian (BUTCHER, 1998).

Virus IB mempunyai banyak serotipe dan varian-varian baru yang secara terus menerus terbentuk

melalui mutasi titik, insersi, delesi dan rekombinasi RNA (CAVANAGH *et al.*, 1992a). Hanyutan dan pergeseran antigenik (*drift* dan *shift*) secara alami terjadi pada famili *Coronaviridae* (CAVANAGH *et al.*, 1992b). Virus IB termasuk famili *Coronaviridae*, berantai tunggal RNA dengan polaritas positif, dengan panjang genom sekitar 27.6 Kb (BOURNELL *et al.*, 1987). Genom virus ini mengandung informasi untuk empat protein struktural yaitu glikoprotein bulir (S), membran glikoprotein (M), membran glikoprotein kecil (sM) dan nukleokapsid (N). Glikoprotein bulir terkait dengan virus neutralisasi, kespesifikasi serotipe dan perlekatan sel dan dipisahkan pada saat pascatranslasi menjadi subunit N terminal S-1 dan C terminal S-2 (NIESTERS *et al.*, 1989; KOCH *et al.*, 1990).

Perbedaan antigenik diantara serotipe virus IB didasarkan pada variasi struktural dari glikoprotein bulir (S) yang merupakan sebuah struktur peplomer pada permukaan amplop virus. Subunit S-1 dan S-2 merupakan daerah hipervariabel dan dikenal sebagai *hypervariable region* (HVR)-1 dan HVR-2. Sekuen HVR-1 lebih bervariasi dari HVR-2 (BINNS *et al.*, 1986).

Penelitian yang dilakukan DARMINTO (1992) menghasilkan beberapa serotipe virus IB isolat lapang, diantaranya adalah I-37. Isolasi ini telah dibedakan secara serologi yaitu dengan menggunakan uji serum neutralisasi yang dibandingkan dengan serotipe virus vaksin yaitu Massachusetts 41 (Mass 41) dan Connecticut 46 (Conn 46). Hasilnya menunjukkan bahwa isolat I-37 termasuk strain Conn 46. Penelitian tersebut belum mengupas tentang karakter molekuler virus tersebut termasuk kemungkinan terdapatnya variasi sekuen terutama pada daerah HVR gen S-1 dibandingkan dengan Conn 46, sehingga diketahui daerah yang bermutasi. Berdasarkan latar belakang di atas, maka penelitian ini bertujuan adalah untuk mengetahui variasi sekuen virus IB isolat I-37 pada daerah hipervariabel gen S-1, yang dibandingkan dengan isolat referensi yaitu Conn 46 dan Mass 41.

MATERI DAN METODE

Titirasi virus IB

Penelitian diawali dengan titrasi stok virus IB yaitu telur ayam berembrio non SPF (*specific pathogen free*) umur 9 hari yang diperoleh dari PT. Vaksindo Satwa Nusantara. Embrio diinokulasi virus IB dengan pengenceran 10^{-1} - 10^{-10} sebanyak 0,1 ml setiap telur dengan 5 kali ulangan masing-masing pengenceran dan diinkubasi selama 7 hari. Setelah inkubasi selama 7 hari semua telur dibunuh dengan cara ditempatkan pada suhu 4°C selama 24 jam. Setelah 24 jam, dilakukan uji HA virus ND (*Newcastle Disease virus*) untuk mengetahui adanya kontaminasi dari virus ND. Uji

dilakukan dengan menggunakan sel darah merah ayam dicampurkan dengan antigen virus ND dan cairan allantois yang akan diuji. Hasil dari uji ini menyatakan tidak adanya kontaminasi dari virus ND. Setelah itu dilakukan penghitungan terhadap embrio-embrio yang menciri infeksi IB seperti kerdil, hemoragi, bulu jarang, kaki keriting dan penimbunan asam urat serta embrio-embrio yang tidak menciri IB (negatif). Data yang diperoleh digunakan untuk penentuan EID₅₀ (BURLESSON *et al.*, 1992).

Propagasi virus IB pada telur SPF

Suspensi virus IB isolat I-37 hasil perhitungan EID₅₀ yaitu $10^{6.85}$ EID₅₀/ml diinjeksikan ke dalam cairan allantois sebanyak 0,2 ml/telur. Telur SPF berembrio yang digunakan berumur 9 hari sebanyak 10 butir dan diinkubasikan selama 48 jam. Setelah 48 jam, semua embrio dimatikan dengan ditempatkan pada suhu 4°C selama 24 jam. Setelah itu cairan allantois dipanen. Cairan allantois kemudian disentrifugasi 12.000 g untuk memisahkan dari sel-sel dan sel darah merah yang terikat, supernatan diambil dan dimasukkan pada tabung steril lalu disimpan pada -20°C sampai digunakan atau dilanjutkan dengan pembuatan virus pekat.

Pembuatan virus pekat

Cairan allantois yang mengandung virus dimasukkan dalam tabung (*quick seal tube*, Beckmann) dan disentrifugasi pada suhu 4°C selama 2 jam dengan kecepatan 93.000 g. Pelet yang terbentuk diencerkan dengan 500 µl PBS steril dan dipindahkan ke dalam tabung steril (WANG and KHAN, 2000).

Isolasi RNA virus IB

Isolasi RNA virus dilakukan menggunakan *Quick Prep Total RNA Extraction Kit* (Amersham Pharmacia) sesuai instruksi penggunaan dengan modifikasi. Tabung yang mengandung pelet virus ditambahkan 150 µl bufer ekstraksi (guanidinium tiosianat dan N-Lauril sarkosin), dan 3 µl β-merkaptotanol, kemudian dicampur hingga homogen. Litium klorida (LiCl) kemudian ditambahkan dan dicampur hingga homogen. Setelah tabung ditempatkan di atas bongkahan es, ditambahkan Cesium Trifluoroasetat (CsTFA) ke dalam sampel yang telah dihomogenisasi tersebut, untuk selanjutnya dicampur dengan menggunakan pipet steril sampai merata. Tabung ditempatkan kembali pada es selama 10 menit, setelah itu dipusingkan dengan mikrosentrifugasi selama 15 menit pada suhu ruang. Tanpa mengganggu pelet yang terbentuk, supernatan dibuang, dan pelet ditambah etanol 70% dingin sebanyak 500 µl dan dikocok dengan vortek beberapa kali. Tabung kemudian dipusingkan kembali selama 5 menit, etanol diaspirasi

dan pelet dikeringkan pada suhu ruang selama 10 – 15 menit. Tabung ditempatkan pada bongkahan es dan ditambahkan DEPC-dH₂O pada pelet RNA. Pelet dipecahkan dengan mengocok dengan vortek beberapa kali sampai tercampur dengan baik, kemudian larutan RNA ini disimpan pada suhu -20 atau -70°C sampai digunakan.

Analisis RNA pada gel agarose

Hasil isolasi RNA dielektroforesis dalam 1% gel agarosa yang mengandung ethidium bromide 0,4 µg/ml dengan menggunakan 1 x bufer Na-fosfat. Sebanyak 1 – 2 µg RNA dimasukkan dalam larutan yang mengandung 1 x gel loading bufer. Elektroforesis dilakukan pada 100 volt selama kurang lebih 20 menit (Amersham Pharmacia).

Amplifikasi cDNA virus dengan Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Reaksi RT-PCR dilakukan dengan menggunakan kit *Ready to go RT-PCR beads* (Amersham Pharmacia) sesuai instruksi penggunaan dengan modifikasi. Masing-masing bead mengandung ~ 2 unit Taq DNA polimerase, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0 pada suhu ruang), 60 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM masing-masing dNTP, *Moloney Murine Leukemia Virus* (M-MuLV) *Reverse Transcriptase*, *RNAguard Ribonuclease Inhibitor* (porcine) dan stabiliser termasuk *RNase/DNase-free* BSA. Tabung bead yang mengandung bahan-bahan tersebut ditempatkan di atas bongkahan es.

Reaksi PCR hasil optimasi dengan menggunakan primer CK4 (*forward*) dengan total panjang 23 basa dengan sekuen TCAAAGCTTCANGGNGGCNTA dan primer CK2 (*reverse*) total panjang 25 basa dengan sekuen CTCGAATTCCNGTRTAYTGRCA adalah sebagai berikut, tabung bead ditambahkan DEPC-dH₂O 44 µl dan dibiarkan selama 5 menit di atas es hingga semua bead larut. Kemudian 2 µl RNA virus sebagai templat, 50 pmol/µl primer CK2 dan CK4 masing-masing 2 µl ditambahkan pada tabung bead. Total keseluruhan reaksi pada setiap tabung 50 µl. Tabung kemudian ditempatkan pada mesin *thermal cycler* (Perkin Elmer 2400). Optimasi program RT-PCR yang digunakan untuk isolat I-37 adalah untuk reaksi RT pada suhu 42°C selama 30 menit dan inaktivasi enzim reverse transcriptase pada suhu 95°C selama 4 menit. Reaksi PCR dilakukan dengan denaturasi, 94°C selama 30 detik; annealing, 50°C selama 1 menit; ekstensi, 72°C selama 1 menit; final ekstensi, 72°C selama 15 menit dengan siklus PCR sebanyak 35 kali.

Visualisasi DNA hasil RT-PCR

Hasil PCR dielektroforesis dengan menggunakan gel agarosa (Promega, *analytical grade*) 1% selama 20 menit dan setelah selesai divisualisasi dengan ultraviolet transluminator.

Sekuensing

Purifikasi produk PCR dan sekuensing dilakukan di Lembaga Molekuler Eijkman. Purifikasi produk PCR dilakukan dengan menambahkan hasil PCR sebanyak 1 kali ditambahkan 5 kali volume buffer PB dan dicampur dengan merata dan dipurifikasi menggunakan *QIAquick spin column* (Qiagen). Sekuensing dilakukan dengan menggunakan mesin *sequencer* ABI PRISM model 377, version 3.4.1, proses sekuensing menggunakan *fluorescent DNA sequencer*. Primer yang digunakan adalah primer yang dipakai untuk PCR yaitu primer *forward* (CK4) dan primer *reverse* (CK2) dengan konsentrasi masing-masing 2 pmol/reaksi. Konsentrasi yang dibutuhkan untuk sekuensing tersebut adalah 200 ng/µl dengan total volume 100 µl.

Analisis sekuen DNA

Analisis sekuen DNA dan translasi asam amino dilakukan dengan menggunakan *software* komputer *Genetyx Mac Version 8.0*. Homologi sekuen antara isolat virus I-37 dengan isolat-isolat IB dari *GenBank*. Sekuen I-37 yang diperoleh dibandingkan dengan sekuen S-1 IBV Conn 46 (L18990) dengan menggunakan *Gen-Mac analysis*.

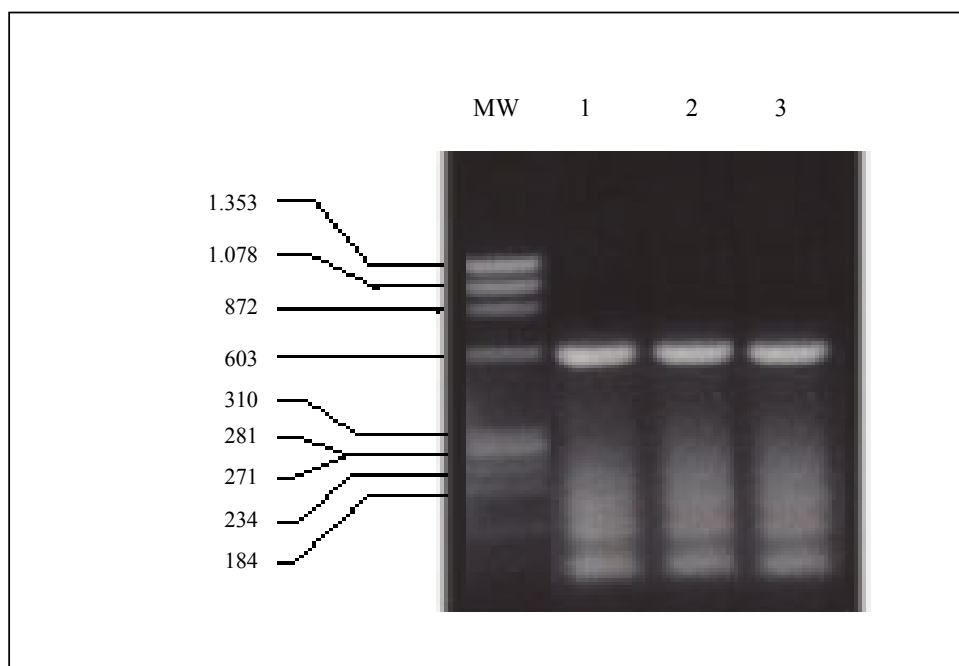
HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi RNA dan RT-PCR HVR gen S-1 IBV

Hasil elektroforesis RT-PCR isolat I-37 dan isolat referensi Mass 41 dan Conn 46 dapat dilihat pada Gambar 1. Hasil RT-PCR isolat, I-37 dengan primer CK2/CK4 menghasilkan pita pada posisi sekitar 600 bp seperti yang dihasilkan oleh virus referensi Mass 41 dan Conn 46 (KEELER *et al.*, 1998).

Analisis homologi I-37 dengan sekuen virus IB dari *GenBank*

Dari hasil sekuensing dapat diketahui jumlah sekuen nukleotida HVR gen S1 dari isolat I-37 adalah 515 bp dan hasil translasi menunjukkan jumlah asam amino sebanyak 171 asam amino (aa) (Gambar 2 dan 3). Hasil homologi isolat I-37 dengan Conn 46 menunjukkan



Gambar 1. Produk RT-PCR IBV dengan primer CK4 dan CK2. RNA dipurifikasi dari isolat lapang I-37 (pita nomor1), Mass 41 (pita nomor 2) dan Conn 46 (pita nomor 3). Posisi standar berat molekul (ϕ X174) (M) di sebelah kiri

homologi sekuen nukleotida yang cukup tinggi. Hasil amplifikasi isolat I-37 mempunyai kemiripan dengan Conn 46 dan Mass 41 yaitu sekitar 600 bp (KEELER *et al.*, 1998). Isolat I-37 mempunyai homologi nukleotida dengan Conn 46 sebesar 93,1% dan asam amino sekitar 84,4%.

Dari analisis perbandingan sekuen gen S-1 menyatakan adanya daerah yang *conserved* diantara banyak serotipe. Dua daerah yang *conserved* ini digunakan untuk mengembangkan *degenerate general primer* untuk mengamplifikasi genom RNA dengan RT-PCR (KEELER *et al.*, 1998) yaitu primer CK2 dan CK4 yang mengapit daerah S-1 yang mempunyai arti diagnostik dan daerah hipervariabel dari serotipe yaitu HVR-1 dan HVR-2 yang mengandung sekuen yang terkait dengan serotipe virus IB spesifik seperti epitop netralisasi (KOCH *et al.*, 1990; KANT *et al.*, 1992; CAVANAGH and NAQI, 1997). Daerah hipervariabel dimulai dari sekuen nukleotida ke-127 sampai sekuen nukleotida ke-708 (BINNS *et al.*, 1986; KUSTERS *et al.*, 1989 dalam KINGHAM *et al.*, 2000). Homologi isolat I-37 dengan Conn 46 (DARMINTO, 1992) dimulai di daerah hipervariabel pada posisi nukleotida ke-168 dengan persentase homologi nukleotida yang cukup tinggi. Berarti ini sejalan dengan penelitian terdahulu yang menyatakan isolat I-37 mempunyai kekerabatan dekat dengan Conn 46. Hasil sekuensing nukleotida isolat I-37 menunjukkan terdapatnya beberapa perubahan sekuen nukleotida yang mungkin mengarah

kepada mutasi jika dibandingkan dengan Conn 46 yaitu berupa penggantian sejumlah basa, penyisipan 2 nukleotida yaitu A dan C pada posisi sekitar basa 225 dari Conn, pengurangan 1 nukleotida pada posisi 208 dan 395, pengurangan 3 nukleotida pada posisi 278-280 dan posisi 338-340 (Gambar 2). Perbandingan asam amino antara I-37 dan Conn 46 dapat dilihat pada Gambar 3. Pada asam amino posisi ke 66, tampak Isoleusin digantikan oleh Glisin, pada posisi asam amino ke 71-74 tampak asam amino Valin-Valin-Asparagin-Alanin digantikan oleh Sistein-sistein-Phenilalanin-Leusin. Demikian juga terdapat beberapa perubahan asam amino lainnya. Adanya perubahan pada asam amino pada daerah hipervariabel akan menyebabkan kemungkinan adanya perubahan sekuen epitop, perubahan konformasi *folding protein* sehingga akan mengakibatkan adanya perubahan pengenalan antibodi sel inang terhadap virus.

CAVANAGH *et al.* (1992a) menyatakan bahwa dari perbandingan sekuen asam amino gen S-1 dinyatakan bahwa beberapa serotipe yang telah ditentukan test virus netralisasi (VN) umumnya berbeda sekitar 20-25% dan kadang-kadang sebesar 48% dengan beberapa perkecualian seperti pada strain Conn 46 dan Mass 41 dengan perbedaan protein S-1 sekitar 7,6% asam amino (4,6% nukleotida) dan kedua virus IB ini merupakan serotipe yang berbeda. Pada I-37 yang secara serologi termasuk Conn 46 (DARMINTO, 1992), menunjukkan perbedaan protein sebesar 15,6% (nukleotida sebesar

6,9%). Hal ini berbeda jika I-37 dibandingkan dengan Mass 41, yaitu mempunyai perbedaan protein sekitar 54,5% aa (nukleotida sebesar 11,6%), serta homologi pada daerah hipervariabel pada tempat yang berbeda yaitu dimulai dengan posisi nukleotida ke-265 (data tidak ditunjukkan). Dari hasil analisis homologi protein dapat diketahui besar perbedaan antara I-37 dengan Mass 41 karena sedikit saja perubahan atau mutasi asam amino pada daerah gen *spike* akan membentuk serotipe yang berbeda (CAVANAGH *et al.*, 1992a). Ini membuktikan bahwa virus I-37 dan Mass 41 merupakan serotipe yang berbeda, karena mempunyai perbedaan asam amino lebih dari 20% yaitu sekitar 54,5%. Dari hasil ini dapat diketahui bahwa I-37 mungkin merupakan varian dari Conn 46 setelah virus berada di lapangan sebagai hasil dari berbagai program vaksinasi dan upaya manajemen lainnya sehingga perbandingan hanya dilakukan antara isolat I-37 dengan isolat referens Conn 46 (Gambar 2 dan 3).

Conn 46 merupakan virus IB referens dan banyak digunakan sebagai vaksin yang beredar di dunia termasuk Indonesia. Karena virus IB merupakan virus

yang mudah mengalami mutasi sebagai salah satu pertahanan melawan antibodi induk semang, maka di lapangan sangat mungkin ditemukannya virus vaksin yang mengalami mutasi dan I-37 merupakan salah satu dari virus Conn 46 yang mengalami mutasi setelah berada di lapangan, khususnya Indonesia.

Dari hasil analisis homologi tersebut dapat diketahui bahwa isolat I-37 merupakan strain Conn 46 yang mungkin mengalami mutasi. Mutasi merupakan fenomena penting bagi Coronavirus termasuk virus IB, karena laju *antigenic drift* yang tinggi sebagai salah satu mekanisme pertahanan diri terhadap pertahanan tubuh induk semang. Variabilitas genetik dalam subunit S-1 dari amplop (pelekatan glikoprotein) menunjukkan adanya mekanisme adaptif dari virus untuk menekan imunitas selektif yang berkaitan dengan vaksinasi IB yang intensif dan beberapa upaya manajemen lainnya (GELB *et al.*, 1991). Menentukan strain virus IB sangat berguna untuk implementasi dari berbagai tindakan kontrol, untuk tujuan penelitian dan untuk mengetahui epidemiologi dan evolusi dari virus IB. Untuk genom virus IB yang terdiri dari RNA untai tunggal dengan

CONN I-37	130 CATTACACG	140 GGGGTGCTTA	150 TGCGGTAGTT	160 AATACTTTTA	170 TAGAATCTAA	180 TTTAAGAGAG A CCC
CONN I-37	190 TGTATTGTTG	200 GTATTATTGG GGG	209 TGGTGATC - G	219 TGTTGTTAAT	227 GCTTCTT - - C AC	237 TATAGCTATG
CONN I-37	247 ACGGCACCGC	257 AACAAAGGTAT	267 GGGTTGGTCT A C	277 AGCAGACAG T	287 TTTGTACTGC	297 ACACTGTAAC C
CONN I-37	307 TTTTCAGATA	317 TTACAGTGTT C	327 TGTTACACAT N	337 TGTTATAAAC	347 ATAATGGGTG - - - A	357 TCCTATAACT
CONN I-37	367 GGCTCCATTC	376 CAC-AGCATT A	386 CTATACGTGT	396 TCTGCTATG	406 AAAAAAGGCC	416 GGCTTTTCTA
CONN I-37	426 TAATTTAACA	436 GTTAGTGTA	446 ATAAGTACCC	456 TACTTTTAAA	466 TCATTTTCACT	476 GTGTTAATAA
CONN I-37	486 TTTTACATCC	496 GTATATTTAA	506 ATGGTGATCT	516 TGTTTACACC	526 TCTAATGAGA	536 CCACAGATGT
CONN I-37	546 TACATCTGCA	556 GGTGTTTATT	566 TTAATGCTGG	576 TGGACCTATA	586 ACTATAAAG	596 TTATGAGAGA
CONN I-37	606 AGTTAAAGCC	616 CTGGCTTATT	626 TTGTAAATGG A	636 TACTGCACAA	646 GACGTTATTT	656 TGTGTGATGG
CONN I-37	666 ATCACCTAGA G T CCAC	676 GGCTTGTTAG A G GC	678 CA TT			

Gambar 2. Sekuen nukleotida HVR subunit gen S-1 I-37 dibandingkan dengan Connecticut 46

- Location of antigenic sites defined by neutralizing monoclonal antibodies on the S1 avian infectious bronchitis virus glycopeptide. *J Gen Virol.* 73: 591 – 596
- KEELER, C.L., K.L. REED, R.W. NIX, and J.G. GELB. 1998. Serotype identification of avian infectious bronchitis virus by RT-PCR of peplomer (S-1) gene. *Avian Dis.* 42: 275-284.
- KINGHAM, B.F., C.L. KELLER, W.A. NIX, B.S. LADMAN, and J. GELB. 2000. Identification of avian infectious bronchitis virus by direct automated cycle sequencing of the S1-gen. *Avian Dis.* 44: 325 - 335.
- KOCH, G., L. HARTOG, A. KANT and D.J. VAN ROOZELAAR. 1990. Antigenic domain on the peplomer protein of avian infectious bronchitis virus: correlation with biological functions. *J. Gen. Virol.* 71 : 1929 - 1935.
- KUSTERS, J. G., H.G.N. NIESTERS, J.A. LENSTRA, M.C. HORZINEK and B.A.M. VAN DER ZEIJST. Phylogeny of antigenic variant of avian coronavirus IBV. *Virology.* 169: 217-221.
- NIESTERS, H., P.N. BLEUMINK, A. OSTERHAUS, M.C. HORZINEK and B.A.M. VAN DER ZEIJST. 1989. Epitopes on the peplomer protein of infectious bronchitis coronavirus M41 as defined by monoclonal antibodies. *Virology.* 161: 511-519.
- WANG, X and KHAN, M.I. 2000. Use of reverse transcriptase-polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism to examine the interaction between infectious bronchitis virus strain Massachusetts 41 and JMK in ovo. *Avian Pathol.* 49: 441-448