

توالی نوکلئوتیدها در ناحیه متغیر ژن VP2 ویروس های بارس عفونی ایران

• رضا طرقي

بخش تحقیقات دامپزشکی و بیوتکنولوژی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی مشهد

تاریخ دریافت: دی ماه ۸۴ تاریخ پذیرش: تیرماه ۸۷

Email: rezatoroghi@yahoo.com

چکیده

به سویه های بسیار حاد ویروس بارس عفونی در سال ۱۹۹۱ به کشور ما وارد شدند. این ویروس ها آسیب بسیار شدیدی به صنعت طیور کشور وارد نمودند. در مطالعه حاضر تعیین هویت مولکولی این ویروس ها که هنوز هم در فیلد وجود دارند انجام شده است. مجموع ۱۳ ویروس بارس عفونی که در طی سالهای ۸۲-۱۳۸۱ از نقاط مختلف کشور جمع آوری شده بودند مورد استفاده قرار گرفتند. در اکثر این نمونه ها تاریخچه تلفات نسبتاً بالا وجود داشته است. تکنیک بسیار حساس RT-PCR توانست ویروس در نمونه های کلینیکی را ردیابی کند. محصولات PCR به اندازه ۶۴۳ جفت باز حاوی ناحیه بسیار متغیر ژن VP2 ویروس بودند. این محصولات با استفاده از کنترل طول قطعه و روش Nested-PCR مورد تأیید قرار گرفتند. آنالیز توالی اسیدهای آمینه ترجمه شده در ناحیه بسیار متغیر ژن VP2 این ویروس ها که حاوی اپی توپ های خنثی کننده ویروس هستند نشان داد که ویروس های فیلد ایران کاملاً شبیه یکدیگر و کاملاً شبیه ویروس های بسیار حاد بارس عفونی گزارش شده از اروپا و ژاپن می باشند. اگرچه بسیاری از این ویروس ها را میتوان در سطح نوکلئوتیدی از یکدیگر تفریق نمود. از تمامی نوکلئوتیدهایی که در ویروس های ایران تغییر کرده بود چهارتای آنها منجر به تغییر اسیدهای آمینه در موقعیت ۲۲۲ (P به A)، ۲۵۶ (V به I)، ۲۹۴ (L به I) و ۲۹۹ (N به S) شده بودند. هپتاپپتید غنی از سرین SWASASGS که در ویروس های بیماریزای ویروس بارس عفونی بصورت محافظت وجود دارد در نمونه های بررسی شده نیز وجود داشت. هیچیک از ویروس های بررسی شده جزو ویروس های واریانت یا ویروس های غیر تیپیک بسیار حاد قرار نگرفتند. همچنین آنالیز فیلوژنی نشان داد که خاستگاه ویروس های مورد مطالعه با خاستگاه ویروس های بسیار حاد بارس عفونی اروپا و ژاپن یکسان می باشد.

کلمات کلیدی: ویروس بیماری بارس عفونی، آنالیز توالی نوکلئوتیدی، درخت فیلوژنی، VP2

Pajouhesh & Sazandegi No 81 pp: 43-51

Sequence analysis of the VP2 gene hypervariable region of Iranian infectious bursal disease viruses

By: Reza Toroghi, Department of Veterinary Research and Biotechnology, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Mashhad, Iran

Highly virulent strains of infectious bursal disease virus (IBDV) emerged in Iran in 1991, devastating Iranian poultry industry. In the present study, molecular characterization of recent Iranian IBD viruses prevalent in the country was carried out. Total 13 IBDV isolates collected from different parts of the country, mostly with the history of high mortality during 2002 to 2003 were used. Highly sensitive technique of reverse transcription – polymerase chain reaction (RT-PCR) could detect virus in clinical samples. The 643 bp PCR products generated by amplification of VP2 gene variable region were confirmed by their size in Agarose gel and nested –PCR technique. Deduced amino acid sequence analysis of VP2 gene variable region, comprising major virus neutralizing epitopes, revealed Iranian field isolates to be similar to each other and highly virulent IBDV isolates reported from Europe and Japan. However, most of these viruses could be differentiated from each other at nucleotide level. Out of total nucleotide changes found in Iranian field isolates four resulted in amino acid changes at positions 222 (P to A), 256 (V to I), 294 (L to I) and 299 (N to S). Serin rich heptapeptide sequence “SWSASGS” reported to be conserved in pathogenic strains of IBDV was also conserved in Iranian field isolates. None of the field isolates was found to be an antigenically variant or atypical highly virulent IBDV. Phylogenetic analysis revealed that Iranian field isolates originated from the same source as that of European and Japanese highly virulent IBDV isolates.

Key words: Infectious bursal disease virus, Sequence analysis, phylogeny, VP2.

نبودند (۲۷). با استفاده از آزمایش های خنثی سازی ویروس و استفاده از پادتن های منوکلونال می توان این سویه ها را از سویه های کلاسیک متمایز ساخت (۲۹، ۳۰). بر خلاف سویه های کلاسیک، آتروفی شدید بورس فابریسیوس در این سویه ها بدون همراهی واکنش های شدید التهابی است. تاکنون سویه های واریانت تنها از ایالات متحده آمریکا (۳۰) استرالیا (۲۸) و چین (۸) گزارش شده اند.

از سال ۱۹۸۷ سویه های بسیار حاد بیماری بورس عفونی در اروپا ظاهر شدند که قادر به ایجاد تلفات به میزان ۳۰ تا ۱۰۰ درصد بودند (۹، ۳۴). این سویه ها به صورت انفجاری ولی بایک شکل مشترک در بسیاری از کشورهای خاورمیانه، آسیا، آفریقا و آمریکای جنوبی پراکنده شدند (۳۲). این سویه ها از لحاظ آنتی ژنیکی بسیار شبیه سویه های کلاسیک می باشند ولی به راحتی می توانند از سطح ایمنی ایجاد شده توسط ویروس های واکسنی بیماری بورس عفونی عبور کنند. در حالی که همین میزان سطح ایمنی برای سویه های کلاسیک حاد کاملاً محافظت کننده است (۹، ۳۴). به عبارتی دیگر می توان گفت این سویه های جدید پاتوتیپ های جدید ویروس بورس عفونی می باشند و هنوز از لحاظ آنتی ژنیکی آنقدر نسبت به سویه های کلاسیک تغییر نیافته اند که بتوان در گروه مستقلی از نظر آنتی ژنیکی قرارشان داد (۳۲، ۳۴، ۳۵). ژنوم ویروس بورس عفونی دارای دو قطعه A, B است (۶، ۱۰، ۱۳، ۲۲) قطعه بزرگتر (A) که بطور تقریبی ۳۴۰۰ جفت باز و دارای دو ORF^۲ بزرگ و کوچک است.

مقدمه

عملکرد تولیدی هر موجود به واسطه اثرات ژنوتیپ، محیط و نیز اثرات متقابل بین این دو تعیین می شود (۱۲). لذا برای بهبود کمیت و کیفیت ابریشم تولیدی دویروس بیماری بورس عفونی عامل یک بیماری بسیار مسری و تضعیف کننده شدید سیستم ایمنی در ماکیان است که سلول های لنفوسیت B نابالغ در بافت بورس فابریسیوس را هدف خود قرار می دهد (۲۰). ویروس عامل بیماری در خانواده بیروناویریده^۱ قرار داشته و دارای ژنوم RNA دو رشته ای و دو قطعه ای است که در داخل یک کپسید بیست وجهی قرار داد (۲۶).

تاکنون دو سروتیپ ۱ و ۲ برای ویروس های بورس عفونی گزارش شده است. ویروس های سروتیپ ۱ برای ماکیان بیماری زا هستند در صورتی که ویروس های سروتیپ ۲ که از بوقلمون جدا شده است برای ماکیان غیر بیماری زا می باشند (۲۰، ۲۱). تمامی ویروس های سروتیپ ۱ که تا قبل از سال ۱۹۸۵ جدا شده اند معروف به ویروس های بورس عفونی کلاسیک می باشند. با استفاده از آزمایش SN^۲ و پادتن های منوکلونال مشخص شده است این ویروس ها از لحاظ آنتی ژنیکی شبیه یکدیگر هستند ولی از حیث حدت متفاوت می باشند. در سال ۱۹۸۳ سویه های واریانت ویروس بورس عفونی در آمریکا ظاهر شدند بطوری که دیگر واکسن های رایج که از سویه های کلاسیک تهیه شده بودند بر علیه این سویه های جدید موثر

بسیاری از مرغداری های کشور حضور دارد و به صورت انفرادی تلفات بالا مشاهده می شود. تاکنون آزمایشات مولکولی برای تشخیص سریع بیماری و شناسایی هویت ویروس های در گردش ایران انجام نشده است. از این رو این مطالعه شکل گرفت تا تست RT-PCR برای تشخیص سریع بیماری بهینه شود و همچنین با مشخص سازی توالی نوکلئوتیدی ناحیه بسیار متغییر ژن VP2 تعیین ژنوتیپ این ویروسها صورت پذیرد.

مواد و روش ها ویروس ها

سیزده نمونه مشکوک به بیماری خیلی حاد بورس عفونی که از نقاط مختلف کشور به موسسه رازی ارسال شده بود در این مطالعه استفاده شد. میزان مرگ و میر در این گله ها از ۱۰ تا ۴۰ درصد متغیر بود. مشخصات کامل این نمونه ها در جدول ۱ آمده است. از بافت بورس فابریسیوس نمونه های دریافت شده با استفاده از PBS^۴ حاوی آنتی بیوتیک سوسپانسیون بافتی ۲۰ درصد تهیه شد.

مواد شیمیایی

مواد شیمیایی و آنزیم های استفاده شده در این مطالعه از شرکت های Roche و Sigma تهیه شده بودند. تمامی وسایل پلاستیکی مورد استفاده برای کار با RNA توسط دی اتیل پیروکربنات ۰/۱ درصد تیمار و سپس اتوکلاو شدند.

جدول ۱: مشخصات گله های مورد مطالعه

ردیف	نام نمونه	محل	نوع مرغداری	سال وقوع
۱	RT283	تهران	گوشتی	۱۳۸۱
۲	RT432A	تهران	گوشتی	۱۳۸۱
۳	RT432B	تهران	گوشتی	۱۳۸۱
۴	RT234	کرج	تخمگذار	۱۳۸۱
۵	RT449	کرج	تخمگذار	۱۳۸۱
۶	RT286	رودسر	گوشتی	۱۳۸۱
۷	RT275	استان مرکزی	گوشتی	۱۳۸۱
۸	RT258	کرج	گوشتی	۱۳۸۲
۹	RT78	کرج	گوشتی	۱۳۸۲
۱۰	RT26	هستگرد	گوشتی	۱۳۸۲
۱۱	RT75A	استان اصفهان	گوشتی	۱۳۸۲
۱۲	RT75C	استان اصفهان	گوشتی	۱۳۸۲
۱۳	RT75D	استان اصفهان	گوشتی	۱۳۸۲

ORF بزرگتر یک پلی پروتئین را کد می کند که این پروتئین خود تحت تاثیر پروتئاز ویروس به پروتئین های VP2، VP3، VP4 تبدیل می شود (۳، ۴، ۱۸، ۲۵). ORF کوچکتر که با ORF بزرگتر مقاداری هم پوشانی دارند پروتئینی کوچکی بنام VP5 را کد می کند (۲۳). قطعه کوچک RNA ویروس بنام قطعه B معروف است که بطور تقریبی حدود ۲۸۰۰ جفت باز طول دارد. این قطعه پروتئین VP1 را کد می کند که در واقع یک RNA پلی مرز ویروسی وابسته به RNA است (۱۷، ۲۴). کسپید ویروس متشکل از دو پروتئین عمده ساختمانی VP2، VP3 است. پروتئین VP2 پادگن اصلی محافظتی ویروس است به طوریکه پادتن های خنثی کننده و اختصاصی سروتیپ مربوط به این پروتئین می باشد (۱۴).

مشخص شده است که محل اتصال تمامی پادتن های منوکلونال خنثی کننده محدود به قسمت میانی پروتئین VP2 است که به نام منطقه بسیار متغیر پروتئین VP2 معروف است این ناحیه بین اسیدهای آمینه ۲۰۶ تا ۳۵۰ محدود شده است (۴، ۵ و ۱۵).

مهم ترین اطلاعات ژنتیکی ویروس بخصوص از نظر شناسایی سویه های مختلف در این منطقه قرار دارد. هم چنین بیشترین تعیین توالی نوکلئوتیدی که برای ویروس بورس عفونی گزارش شده است مربوط به این ناحیه است. در ابتدا و انتهای این ناحیه دو پیک به نام های A و B وجود دارد که شدیداً هیدرو فوبیک می باشند. پیک A محدود به اسیدهای آمینه ۲۱۲ تا ۲۲۴ و پیک B محدود به اسیدهای آمینه ۳۱۴ تا ۳۲۴ می باشد. این دو پیک نقش عمده ای را در تشکیل پادتن های منوکلونال خنثی کننده به عهده دارند (۵، ۳۱). هر گونه تغییر اسید آمینه در این دو پیک میتواند مسئول فرار ویروس از پادتن های خنثی کننده ایجاد شده توسط واکسن های کلاسیک باشد (۱۵). به عبارتی با تعیین توالی نوکلئوتیدی ناحیه بسیار متغیر ژن VP2 می توان اطلاعات ارزشمندی از ویروس را بدست آورد. امروزه تعیین توالی نوکلئوتیدی روش بسیار با ارزشی جهت تعیین هویت هر گونه عامل بیماری زا است. در نزدیک پیک B هپتاپتیدی غنی از سرین (SWSASGS) وجود دارد که به نظر می رسد فقط در سویه های حاد ویروس بورس عفونی دیده می شود. یک تا دو اسید آمینه سرین از این هپتاپتید در سویه های واکسنی ویروس بورس عفونی به آرژینین تبدیل شده اند (۱۵، ۱۱).

ویروس های بیماری بورس عفونی در ایران برای اولین بار در سال ۱۹۸۱ جدا شد. این ویروس ها دارای حدت کم تا متوسطی بودند که معمولاً کمتر از ۵ درصد تلفات ایجاد میکردند. عمده خسارات اقتصادی ایجاد شده توسط این ویروس ها به علت ایجاد تضعیف سیستم ایمنی و کاهش رشد بود. در بسیاری موارد اشکال خفیف بیماری حتی غیر قابل تشخیص باقی می ماند (۱). ولی این وضعیت با ورود ویروس های بسیار حاد بورس عفونی به کشور در سال ۱۹۹۱ بطور غیرقابل انتظاری تغییر کرد. میزان مرگ و میر در این شکل بیماری در نیمچه های تخم گذار تا ۷۵ درصد و در جوجه های گوشتی تا ۲۵ درصد افزایش یافت. بیماری ظرف چند ماه تمامی کشور را در بر گرفت و خسارات اقتصادی سنگینی را به صنعت طیور کشور وارد کرد (۲). از آن زمان تاکنون صنعت طیور کشور با این بیماری درگیر میباشد. اگرچه با وارد واکسن های Intermediate ویروس بورس عفونی که نسبت به واکسن های قدیمی دارای حدت بیشتری می باشند از تلفات گسترده بیماری کاسته شده است. ولی هنوز ویروس در

استخراج RNA تام

استخراج RNA تام از سوسپانسیون هموژنیزه بافت بورس فابریسیوس با استفاده از محلول تجاری Tripure (Roche, Germany) براساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت.

روش RT-PCR

با استفاده از دو میکروگرم RNA تام، ۱۰ پیکومول هر یک از پرایمرهای اختصاصی گزارش شده VP2 (۱۹)، ۰/۵ میلی مول dNTPs، ۲۰ واحد آنزیم مهار کننده RNase، ۲۵ واحد آنزیم ترانس کریپتاز معکوس M-MuLV (Roche, Germany) و با اجرای برنامه ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت یک ساعت، cDNA اختصاصی ساخته شد. سپس با استفاده از پرایمرهای اختصاصی Liu و همکاران (۱۹) آزمایش PCR برای تولید قطعه ۶۴۳ جفت بازی انجام گرفت. تکثیر این قطعه در ۵۰ میکرولیتر محلول واکنش PCR که حاوی ۲ میکرولیتر cDNA، ۱۵ پیکومول پرایمر، ۲۰۰ میکرومول dNTPs، ۱/۵ میلی مول منیزیم و یک واحد DNA پلی مزاز Taq (Roche) بود انجام گرفت. واکنش فوق با استفاده از ماشین eppendorf و gradient Mastercycler، PCR و با برنامه ۵۲،۹۴ و ۷۲ درجه سانتیگراد هر یک به مدت یک دقیقه با ۳۰ بار تکرار و در انتها ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. تائید اندازه محصولات PCR به دست آمده با استفاده از جداسازی الکتروفورزی بر روی ژل آگاروز یک درصد همراه مارکر DNA استاندارد ۱۰۰ جفت بازی صورت پذیرفت. واکنش PCR آشیانه ای با استفاده از پرایمرهای اختصاصی گزارش شده (۱۶) و محصولات PCR اولیه و با برنامه واکنش PCR فوق با تفاوت درجه حرارت ۶۰ درجه برای Annealing انجام پذیرفت. اندازه محصول PCR آشیانه ای ۵۵۲ جفت باز بود.

تعیین توالی نوکلئوتیدها و آنالیز نتایج

خالص سازی محصولات PCR اولیه و ویروس ها با استفاده از کیت تجاری خالص سازی محصولات PCR (Roche) براساس دستورالعمل شرکت انجام پذیرفت. تعیین توالی نوکلئوتیدهای این محصولات با استفاده از پرایمرهای PCR آشیانه ای^۵ توسط شرکت MWG-Biotech کشور آلمان انجام گرفت. آنالیز نوکلئوتیدهای بدست آمده و اسیدهای آمینه مربوط به آنها توسط برنامه نرم افزار DNASTAR (version ۵) صورت گرفت. آنالیز فیلوژنی این ویروس ها همراه ۶ ویروس مرجع برای ۴۶۲ نوکلئوتید که معادل ۱۵۴ اسید آمینه بود انجام گرفت.

نتایج

واکنش RT-PCR نمونه های کلینیکی

استخراج RNA از تمامی سوسپانسیون های بافتی باموقعیت انجام گرفت. چون در تمامی موارد واکنش RT-PCR توانست قطعه ۶۴۳ جفت بازی را تولید کند (شکل ۱).

تائید محصولات PCR

تائید محصولات PCR ۶۴۳ جفت بازی براساس طول قطعه بر روی ژل آگاروز و PCR آشیانه ای صورت گرفت. PCR آشیانه ای انجام شده

بر روی محصولات PCR اولیه توانست قطعه ۵۵۲ جفت بازی رادر تمام نمونه ها تکثیر کند. اندازه محصولات PCR آشیانه ای براساس طول قطعه بر روی ژل آگاروز یک درصد مورد تائید قرار گرفت (شکل ۲).

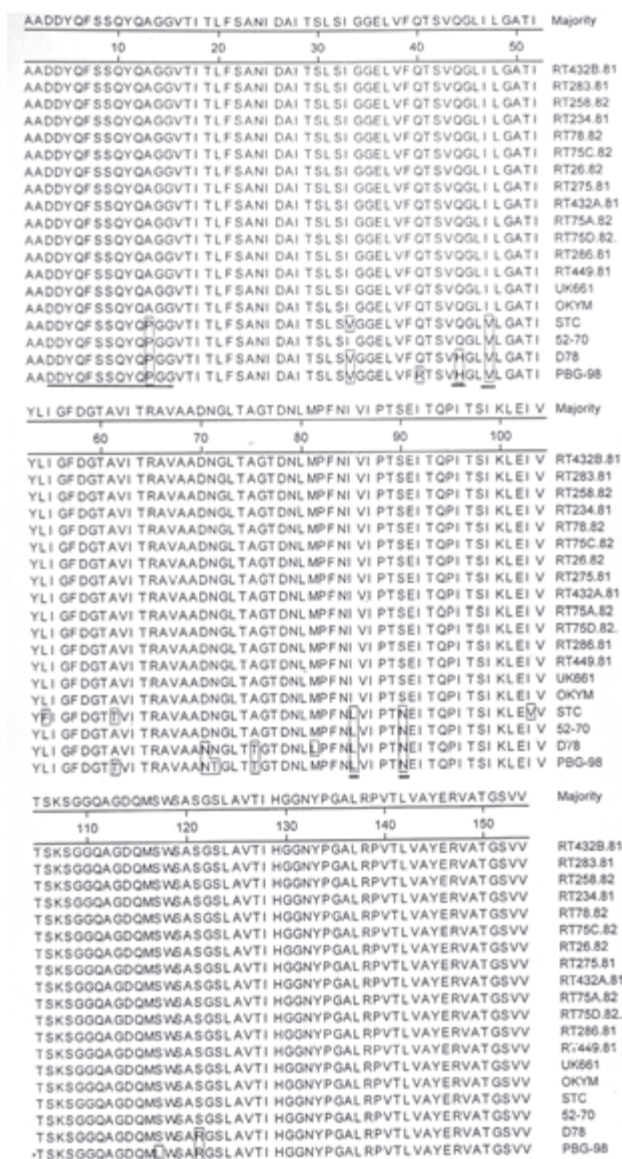
هم ردیفی توالی ها

توالی نوکلئوتیدی ۱۳ ویروس مورد مطالعه به همراه ۶ ویروس مرجع بوسیله روش Clustal برنامه MegaAlign انجام گرفت. ۴۶۲ جفت باز در موقعیت ۷۵۹ تا ۱۲۲۰ در این ویروس ها انتخاب و برای هم ردیفی مورد استفاده قرار گرفتند. سپس توالی نوکلئوتیدها به توالی اسیدهای آمینه ترجمه شد که تمامی ناحیه بسیار متغیر ژن VP2 را پوشش می داد (شکل ۳). موقعیت اسیدهای آمینه ترجمه شده از موقعیت ۲۱۰ تا ۳۶۳ بود. مقایسه توالی نوکلئوتیدها بعد از هم ردیفی نشان داد که ویروس های RT۲۶C، RT۷۵C، RT۲۵A و RT۲۵B شبیه یکدیگر می باشند. مقایسه توالی اسید های آمینه نشان داد که هیچ گونه تفاوتی مابین ویروس های مورد مطالعه و ویروس های بسیار حاد رفرانس (UK۶۶۱، OKYM) وجود ندارد. دامنه شباهت بر اساس نوکلئوتیدها در میان ۱۳ ویروس بررسی شده از ۹۷/۸ تا ۱۰۰ درصد متفاوت بود. در مقایسه ویروس های مورد مطالعه و ویروس های کلاسیک استفاده شده در این مطالعه مشخص شد بیشترین شباهت براساس توالی اسیدهای آمینه با ویروس کلاسیک ۷۰/۵۲ و سپس با STC است. ویروس های مورد مطالعه به همراه ویروس های بسیار حاد OKYM و UK۶۶۱ در مقایسه با ویروس های کلاسیک دارای نوکلئوتیدهای مشترک در موقعیت های ۷۹۵ (G)، ۸۳۳ (C)، ۸۶۶ (A)، ۸۹۷ (A)، ۹۰۵ (T)، ۹۰۸ (T)، ۱۰۱۱ (A) و ۱۰۲۷ (G) بودند. در میان این تغییرات نوکلئوتیدی تغییر چهارتای از آنها (۸۹۷، ۷۹۵، ۱۰۱۱ و ۱۰۲۷) موجب ایجاد اسیدهای آمینه جدید در موقعیت های ۲۲۲ (A)، ۲۵۶ (I)، ۲۹۴ (I) و ۲۹۹ (S) در ویروس های بسیار حاد شده است. این چهار اسید آمینه برای تمام ویروس های بسیار حاد منحصر بفرد هستند. همچنین هیچگونه تغییری در نوکلئوتیدهای پیک A, B و هپتاپتید غنی از سرین ویروس های بسیار حاد مورد مطالعه دیده نشد. تغییر اسیدهای آمینه در موقعیت ۲۷۹ (D به N) و ۲۸۴ (A به T) که شاخص ویروس های تخفیف حدت یافته است فقط در ویروس های واکنشی DVA و PBG-۹۸ دیده شد. اسید آمینه سرین در موقعیت ۲۵۴ که شاخص ویروس های واریانت است در هیچ یک از نمونه ها دیده نشد و مانند ویروسهای غیرواریانت اسید آمینه در این موقعیت اسید آمینه گلیسین بود.

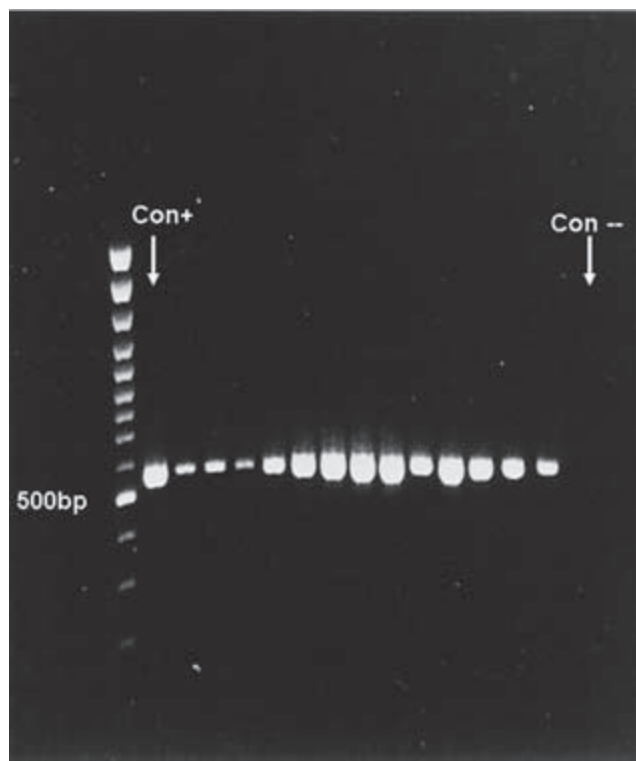
آنالیز فیلوژنی

درخت فیلوژنی براساس ۴۶۲ جفت باز نوکلئوتید (شکل ۴) و ۱۵۴ اسید آمینه (شکل ۵) برای ۱۹ ویروس بورس عفونی که شامل ۱۳ ویروس تعیین توالی شده در این مطالعه و ۶ ویروس رفرانس بود رسم شد. درخت فیلوژنی بر اساس نوکلئوتیدها به دو شاخه اصلی تقسیم شد. در شاخه اول تمامی ویروس های بسیار حاد بورس عفونی قرار گرفتند. در این شاخه ویروس های RT۲۸A، RT۷۵A، RT۴۴۹، RT۴۳۲A، RT۷۵۰ و RT۲۷۵ به همراه ویروس های رفرانس UK۶۶۱ و OKYM در یک زیر شاخه قرار گرفتند. در صورتی که سایر ویروس های بسیار حاد در زیر شاخه دوم قرار گرفت. در شاخه اصلی دوم تمامی ویروس های DVA،

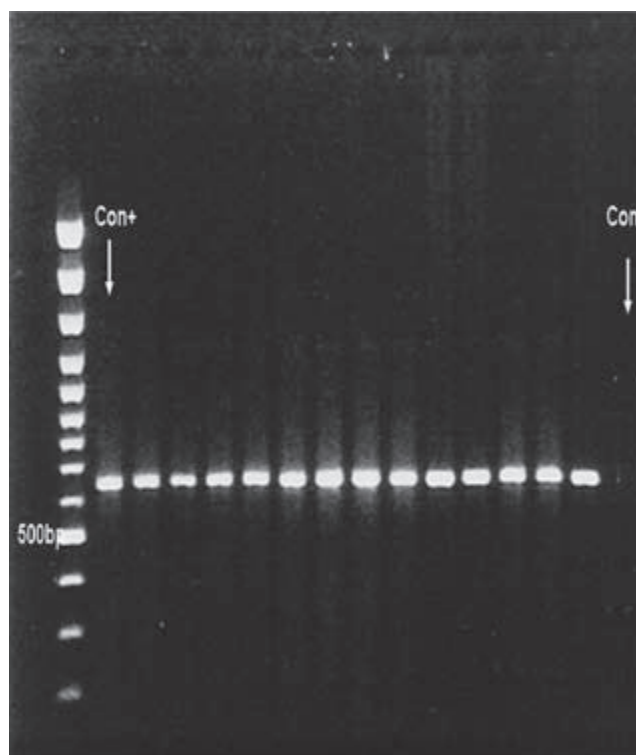
STC و ۹۸-PBG در یک زیر شاخه مستقل قرار گرفتند در صورتی که ویروس ۷۰/۵۲ به صورت مستقل در زیر شاخه دوم قرار گرفت. ویروس ۷۰/۵۲ نزدیک ترین ویروس کلاسیک به ویروسهای بسیار حاد بود. درخت فیلوژنی بر اساس توالی اسیدهای آمینه دو شاخه اصلی را نشان داد که در شاخه اول تمامی ویروس های بسیار حاد بدون وجود هیچ گونه تفاوتی قرار گرفتند. در شاخه دوم ویروس های کلاسیک قرار گرفتند که مجدداً ویروس کلاسیک اروپائی ۷۰/۵۲ بیشترین قرابت با ویروس های بسیار حاد را نشان داد ویروس واکسنی ۹۸-PBG کمترین قرابت با ویروس های بسیار حاد را نشان داد.



شکل ۳: مقایسه توالی اسیدهای آمینه ناحیه بسیار متغیر VP۲ در ویروس های مطالعه شده به همراه ۶ ویروس رفرانس بورس عفونی. اسیدهای آمینه متفاوت با Majority داخل کادر مشخص شده اند. محل پیک های A و B و اسیدهای آمینه ۲۹۴، ۲۵۶، ۲۲۲ و ۲۹۹ با خط کشی مشخص شده است.



شکل ۱: نتایج واکنش RT-PCR در ۱۳ گله مرغ گوشتی و تخمگذار مشکوک به بیماری بورس عفونی M: مارکر DNA ۱۰۰ جفت بازی

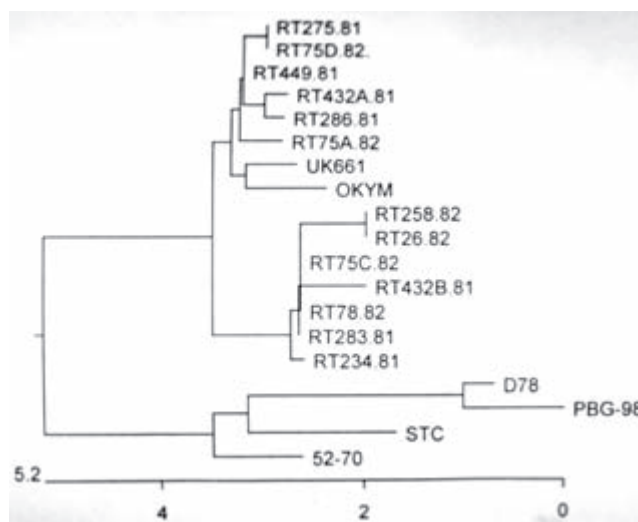


شکل ۲: نتایج واکنش PCR اشیانه ای در نمونه های مطالعه شده M: مارکر DNA ۱۰۰ جفت بازی

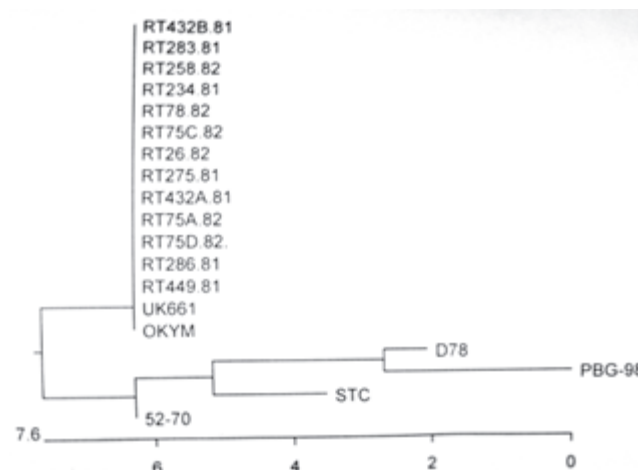
PCR برای دستیابی به یک روش مولکولی برای تشخیص سریع بیماری بروس عفونی بر روی نمونه های کلینیکی شد. از تمامی ۱۳ نمونه فیلد دریافت شده محصول PCR ۶۴۳ جفت باز بدست آمد. تأیید صحت این محصولات با استفاده از اندازه آنها و هم چنین PCR آشیانه ای که توانست قطعه ۵۵۲ جفت بازی را تکثیر کند صورت گرفت. انجام واکنش RT-PCR بر روی بروس فابریسیوس غیرآلوده هیچ گونه محصولی را تولید ننمود. روش RT-PCR تکنیکی بسیار سریع است که حداکثر در یک روز کاری می توان به نتیجه رسید. هم چنین محصولات PCR به دست آمده را می توان برای تعیین توالی نوکلئوتیدی استفاده کرد. به خصوص اینکه محصول PCR بدست آمده حاوی تمامی ناحیه بسیار متغیر ژن VP2 ویروس باشد. مطالعات قبلی ثابت کرده است که آنتی ژن عمده حفاظتی ویروس بروس عفونی مربوط به VP2 به خصوص ناحیه حد فاصل بین اسیدهای آمینه ۲۰۶ تا ۳۵۰ می باشد (۵). عمده پادتن های مولکولال خنثی کننده ویروس در این ناحیه عمل می کند به خصوص در دو پیک A, B که در دو انتهای این ناحیه قرار دارند. تغییر یک یا دو اسید آمینه در این پیک ها کافی است تا این توانائی را به ویروس بدهد که از ایمنی القا شده توسط واکنشها بگریزد (۱۵). مقایسه توالی نوکلئوتیدهای مورد مطالعه نشان داد که قرابت این ویروس ها با یکدیگر بسیار زیاد می باشد (۹۷/۸ تا ۱۰۰ درصد). بطوری که دو نمونه RT۲۷۵ و RT۷۵D و هم چنین سه نمونه RT۲۶C, RT۷۵C, RT۲۵۸ کاملاً شبیه یکدیگر می باشند. شاید شباهت زیاد به این علت باشد که ۸ نمونه از ۱۳ نمونه مورد بررسی مربوط به استان تهران می باشد. چون اساس نمونه برداری در این مطالعه متکی بر نمونه های دریافت شده در موسسه رازی بود این نمونه ها از پراکندگی استانی خوبی برخوردار نبودند. به نظر می رسد چنانچه نمونه های بیشتری از استان های مختلف کشور مورد بررسی قرار گیرند اختلاف بیشتری در نمونه ها ملاحظه شود. جالب توجه اینکه هیچیک از این تغییرات نوکلئوتیدی منجر به تغییر اسید آمینه نشدند. مقایسه اسیدهای آمینه این ویروس ها با اسیدهای آمینه دو ویروس بسیار حاد فرانس (OKYM, UK۶۶۱) نشان داد که هیچ گونه تفاوتی در سطح اسیدهای آمینه وجود ندارد. به عبارتی دیگر از نظر آنتی ژنتیکی تفاوتی مابین ویروس های بسیار حاد فیلد کشور ما و ویروس های بسیار حاد اروپا و ژاپن وجود ندارد. پس می توان گفت ویروس های بسیار حاد بروس عفونی در چهار استان کشور با یکدیگر از نظر آنتی ژنتیکی تفاوتی ندارند.

حضور اسیدهای آمینه ۲۲۲ (A), ۲۵۶ (I) و ۲۹۴ (I) که شاخص ویروس های بسیار حاد می باشند (۷, ۸) در ۱۳ ویروس فیلد بررسی شده مورد تأیید قرار گرفت. حداقل می توان اظهار داشت از نظر شاخص های مولکولی تمامی ویروس های مورد مطالعه در گروه ویروس های بسیار حاد قرار دارند. اسیدهای آمینه پیک A و B این ویروس های کاملاً شبیه اسیدهای آمینه این نواحی در ویروس های فرانس (OKYM, UK۶۶۱) بود.

اخیراً تغییرات جدید اسیدهای آمینه در پیک A, B ویروس های بسیار حاد گزارش شده است که موید احتمال وجود تحولات جدید آنتی ژنتیکی در میان ویروس های بسیار حاد است. به نظر می رسد پیچیدگی ویروس بروس عفونی در آینده بیشتر خواهد بود. اگر چه موتانت های جدید



شکل ۴: درخت فیلوژنی براساس نوکلئوتیدهای ناحیه بسیار متغیر ژن VP2 در ۱۳ ویروس بروس عفونی ایران به همراه ۶ ویروس فرانس بروس عفونی. فاصله شاخه ها معرف میزان تفاوت توالی هاست.



شکل ۵: درخت فیلوژنی براساس اسیدهای آمینه ناحیه بسیار متغیر VP2 در ۱۳ ویروس بروس عفونی ایران به همراه ۶ ویروس فرانس بروس عفونی. فاصله شاخه ها معرف میزان تفاوت توالی هاست.

بحث

برای تشخیص بیماری بروس عفونی در ایران از روش های مرسوم سرولوژیکی و روش جداسازی ویروس استفاده می شود که بسیار مشکل و وقت گیر می باشند (۱). هم چنین این روش ها از حساسیت کمتری نسبت به روش های مولکولی برخوردار هستند. در این مطالعه روش RT-

5- Nested - PCR

منابع مورد استفاده

- 1- Aghakhan, S.M., Abshar, N., Fereidouni, S.R., Marunesi, C. and Khodashenas, M., 1994, Studies on avian viral infectious in Iran. Arch. Razi. Inst. 44/45:1-5.
- 2- Aghakhan, S.M., S.R. Fereidouni, N. Abshar, C. Marunesi, , and Z. Sami., 1996, Characterization of a highly virulent infectious bursal disease virus, Arch. Razi. Inst. 46/47: 55-63.
- 3- Azad A.A., S.A. Barrett, and KJ. Fahey., 1985, The characterization and molecular cloning of the double-stranded RNA genome of an Australian strain of infectious bursal disease virus, Virology, 143:35-44.
- 4- Azad A.A., M.N. Jagdish, M.A. Brown and P.J. Hudson., 1987, Deletion mapping and expression in E. coli of the large genomic segment of a birnavirus, Virology, 161: 145-152.
- 5- Bayliss C.D., U. Spies, K. Shaw, R.W. Peters, A. Papageorgio, H. Muller and M. Boussnell ., 1990, A comparison of the sequences of segment A of four infectious bursal disease virus strains and identification of variable region in VP2, Journal General Virology, 71: 1303-1312.
- 6- Becht H., 1980, Infectious bursal disease virus, Current Tropical Microbiology and Immunology, 90: 107-121.
- 7- Brown, M., D., Green, P. and Skinner, M.A., 1994, VP2 sequences of recent European very virulent isolate of infectious bursal disease virus are closely related to each other but are distinctive from those of classical strains. J.Gen.Virol. 75:675-680.
- 8- Cao Y.C., W.S. Yeung, M. Law, Y.Z. Bi, F.C. leung and B.L. lin., 1998, Molecular characterization of seven Chinese isolates of infectious bursal disease virus: classical, very virulent, and variant strain, Avian Disease, 42: 340-351.
- 9- Chettle N., J.C. Stuart and P.J. Wyeth., 1989, Outbreaks of virulent infectious bursal disease in East Anglia, Veterinay Record, 125: 271-272.
- 10- Dobos P., B.J. Hill, R. Hallett, D.T. Kells, H. Becht, and D. Teninges., 1979, Biophysical and biochemical characterization of five animal viruses with bisegmented double stranded RNA genomes, Journal of Virology, 32: 593-605.
- 11- Dormitorio, T.V., Giambone, J.J. and Duck, L.W., 1997, Sequence comparisons of the variable VP2 regions of eight infectious bursal disease virus isolates. Avian Dis. 41: 36-44.
- 12- Etteradossi N., C. Arnauld, F. Tekaiia, D. Toquin, H. LeCoque, G. Rivallan, M. Guittet, J. Domenech, T.P. Van den Berg, and M.A. Skinner., 1999, Antigenic and genetic relationship between

ویروس های بسیار حاد تاکنون نتوانسته اند جایگزین ویروس های بسیار حاد قبلی در سطح فیلد شوند (۸ و ۱۲). موتیف SWSASGS که در ویروس های حاد بورس عفونی به صورت حفاظت شده وجود دارد (۱۵) در تمامی ویروس های مورد مطالعه حضور داشت. اگرچه وجود این موتیف در دو ویروس بسیار حاد بورس عفونی که تخفیف حدت داده شده اند و بعضی ویروس های تخفیف حدت داده شده نشان دهنده این مهم است که وجود این موتیف یک مارکر ثابت برای حدت بالا نیست (۳۷).

اسید آمینه سرین در موقعیت ۲۵۴ که شاخص ویروس های واریانت می باشد (۲۸) در هیچ یک از ویروس ها مورد مطالعه دیده نشد. درخت فیلوژنی براساس نوکلئوتیدها، ویروس های مورد مطالعه را در دو گروه جداگانه قرار داد بطوری که دو ویروس فرانس بسیار حاد در گروه اول قرار گرفت. هیچ گونه هم بستگی مکانی یا زمانی برای ویروسهای این دو گروه بدست نیامد. به نظر می رسد ویروس های بیشتری بایستی تعیین توالی شوند تا بتوان اظهار نظر قطعی تری انجام داد. با وجود اینکه این ویروس ها در سطح نوکلئوتیدی دو گروه مستقل را تشکیل دادند ولی در سطح اسیدهای آمینه تمامی آنها بدون وجود اختلاف در یک گروه قرار گرفتند. این امر تاکید بر این دارد که ویروس های بسیار حاد بورس عفونی ایران از لحاظ آنتی ژنیک تفاوتی با یکدیگر ندارند و عدم موفقیت در واکنش‌های ویروس در این مناطق را نمی توان مربوط به وجود تغییرات آنتی ژنیک در ویروس های این مناطق دانست. بیشترین قرابت آنتی ژنیک ویروس های مورد مطالعه در مقایسه با سایر ویروس های کلاسیک مربوط به ویروس فیلد کلاسیک ۷۰/۵۲ می باشد. این امر در مورد سایر ویروس های بسیار حاد گزارش شده نیز صدق می کند (۸ و ۳۶). بر اساس شواهد فوق می توان اظهار داشت که ویروس های بورس عفونی فیلد ایران از نوع ویروس های بسیار حاد می باشند که دچار تغییر آنتی ژنیک نسبت به سایر ویروس های بسیار حاد گزارش شده نشده اند. هم چنین سویه های واریانت یا سویه های غیر تیپیک بسیار حاد ویروس بورس عفونی در کشور ما وجود ندارد مگر اینکه خلاف آن ثابت شود. عدم وجود سویه های واریانت یا غیر تیپیک بسیار حاد ویروس در این مطالعه بدان معنی نیست که این ویروس ها قطعاً در ایران وجود ندارد یا اینکه در آینده وجود نخواهد داشت. برای اظهار نظر قطعی تر بایستی نظارت مستمر در تمامی نقاط کشور اعمال شود تا در صورت بروز سویه های جدید بتوان بطور سریع واکنش مناسب را به اجرا گذاشت. استمرار این نظارت ها به خصوص اگر با روش های مولکولی همراه باشد در مدت کوتاهی می تواند منجر به تشکیل بانک ژنی ویروس در کشور شود. بدیهی است این امر می تواند کمک بسزائی در تعیین خط مشی های کنترل بیماری داشته باشد.

پاورقی ها

- 1- Brinaviridae
- 2- Serum neutralization
- 3- Open Reading Frame
- 4- Phosphate buffered saline

cells, *Journal of General Virology* 76: 437–443.

24- Muller H., and R. Nitsche., 1987, The two segments of the infectious bursal disease virus genome are circularized by a 90,000-Da protein, *Virology*, 157: 174–177.

25- Musketi J.C., I.G. Hopkins, K.R. Edwards and D.H. Thornton., 1979, Comparison of two infectious bursal disease vaccine strains: Efficacy and potential hazards in susceptible and maternally immune birds, *Veterinary Record*, 104: 332–334.

26- Nagarajan M.M. and F.S.B. Kibenge .,1997, Infectious bursal disease virus: A review of molecular basis for variations in antigenicity and virulence. *Canadian Journal Veterinary Research*, 61:81-88.

27- Rosales, A.G., P. Villegas, P.D. Lukert, O.J. Fletcher, M.A. Mohamad and J. Brown., 1989, Isolation, identification, and pathogenicity of two field strains of infectious bursal disease virus, *Avian Disease*, 33: 35-41.

28- Sapats, S.I. and Ignjatovic, Y., 2000, Antigenic and sequence heterogeneity of infectious bursal disease virus strains isolated in Australia, *Arch. Virol.*, 145:773-783.

29- Snyder, D.B., D.P. Lana, B.R. Cho and W.W. Marquardt., 1988, Group and strain-specific neutralization sites of infectious bursal disease virus defined with monoclonal antibodies, *Avian Disease*, 32: 527-534.

30- Snyder D.B., F.S. Yancey and P.K. Savage., 1992, A monoclonal antibody-based agar precipitin test for antigenic assessment of infectious bursal disease viruses, *Avian pathology*, 21: 153–157.

31- Vakharia, V.N., He, J., Ahamed, B. and Snyder, D.B., 1994, Molecular basis of antigenic variation in infectious bursal disease virus. *Virus Res.* 31: 265-273.

32- Van den Berg T.P., 2000, Acute infectious bursal disease in poultry: A review, *Avian pathology*, 20: 175–194.

33- Van den Berg I.P., N., Etteradossi D. Toquin and G. Meulemans., 2000, infectious bursal disease, *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 19(2): 527–543.

34- Van den Berg T.P., M. Gonze and, G. Meulemans .,1991, “Acute infectious bursal disease in poultry: Isolation and characterization of a highly virulent strain”, *Avian Pathology*, 20: 133–143.

35- Yamaguchi T., M. Ogawa, Y. Miyoshi, M. Inoshima, H. Fukushi, and K. Hirai., 1997, Sequence and phylogenetic analyses of highly virulent infectious bursal disease virus, *Archive of Virology*, 142: 1441–1458.

36- Zierenberg, K., Raue, R. and Müller, H., 2001, Rapid identification of very virulent strains of infectious bursal disease

European very virulent infectious bursal disease viruses and an early West–African isolate, *Avian Pathology*, 28: 36–46.

13- Etteradossi N., C. Arnauld, D. Toquin, G. Rivallan., 1998, Critical amino acid changes in VP2 variable domain are associated with typical and atypical antigenicity in very virulent infectious bursal viruses, *Archive of Virology*, 143: 1627–1636.

14- Fahey U.J., U. Emy and J. Crooks., 1989, A conformational immunogen on VP2 of infectious bursal disease virus that induces virus neutralizing antibodies that passively protect chickens, *Journal of General Virology*, 70: 1473–1481.

15- Heine, H.G., Haritou, M., Failla, P., Fahey, K. and Azad, A.A., 1991, Sequence analysis and expression of the host-protective immunogen VP2 of a variant strain of infectious bursal disease virus, which can circumvent vaccination with standard type I strains. *J. Gen. Virol.* 72: 1835-1843.

16- Kataria R.S., A.K., Tiwari, S.K. Bandyopadhyay, J.M. Kataria and G. Batchaiah., 1998, “Detection of infectious bursal disease virus of poultry in clinical samples by RT-PCR, *Biochem. Molec. Biol. Inter.*, 45: 315-322.

17- Kibenge F.S.B., M.M. Nagarajan and B. Qian., 1996, Determination of the 5 and 3 terminal noncoding sequences of the bisegmented gen map of the avibirnavirus infectious bursal disease virus, *Archive of Virology*, 141: 1133–1141.

18- Kibenge F.S.B., B. Qian, J.R. Cleghorn and C.K. Martin., 1997, Infectious bursal disease virus polyprotein processing does not involve cellular proteases, *Archive of Virology.*, 142: 2401–2419.

19- Liu H.J., J.J. Giambone and T. Dormitorio., 1994, Detection of genetic variations in serotype I isolates of infectious bursal disease virus using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis, *Journal Virological Methods*, 48: 281–291.

20- Lukert P.D, and Y.M. Saif .,1997, Infectious bursal disease. In *Disease of poultry*, tenth Ed. (B.W. Calnek with H.J. Barnes, C.W. Beard, L.R. McDougald and Y.M. Saif, eds). Iowa state University Press, Ames, pp:721–738.

21- McFerran J.B. M.S. McNulty, E.R. McKillop, T.J. Conner., 1980, Isolation and serological studies with infectious bursal disease viruses from fowl turkey and ducks: Demonstration of second serotype, *Avian Pathology*, 9: 345–404.

22- Muller H., C. Scholtissek, and Becht H., 1979, The genome of infectious bursal disease virus consists of two segments of double-stranded RNA, *Journal of Virology*, 31: 584–589.

23- Mundt E., J. Beyer and H. Muller., 1995, Identification of a novel viral protein in infectious bursal disease virus-infectious

Fukushi, H., Hirai, K. ,1996, Identification of sequence changes responsible for the attenuation of highly virulent infectious bursal disease virus. Virology. 223:219-223.

virus by reverse transcription-polymerase chain reaction combined with restriction enzyme analysis. Avian Pathol. 30:55-62.
37- Yamaguchi, T., Ogawa, M., Inoshima, Y., Miyoshil, M.,

