تشخیص ویروس بورس عفونی طیور (گامبورو) در نمونه های بالینی و مقایسه آن با ویروسهای واکسینال با استفاده از روش RT-PCR-RFLP

• **سیدعلی قریشی**- عضو هیات علمی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری
• **ترانه حاجیان** و • **دینا مرشدی**، کارشناسان ارشد پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

تاریخ دریافت: مرداد ماه ۱۳۸۰ تاریخ پذیرش: ابان ماه ۱۳۸۲

چکیده

در دو دهه گذشته همه گیریهای وسیعی از بیماری بورس عفونی طیور در بسیاری از نقاط دنیا گزارش شده است. در ایران نیز بیماری وجود داشته و خسارات اقتصادی زیادی به صنعت طیور کشور وارد آورده است. در این مطالعه روش تشخیص ویروس در نمونه های بالینی با استفاده از آزمایش RT-PCR بهینه سازی گردیده است. در این روش قسمتی از ژن VP2 ویروس به طول ۷۴۳ نوکلئوتید که بیشترین تغییرات ژنتیکی را در بین سویه های مختلف نشان می‌دهد تکثیر گردید. بر روی نمونه هایی که در آزمایش PCR مثبت شده بودند، آزمایش هضم آنزیمی با ۲ آنزیم BstNI و MboI صورت گرفت و نتایج آزمایش هضم ثبت گردید. از نمونه های واکسن های وارداتی نیز آزمایش RT-PCR به‌عمل آمد و محصول PCR با ۲ آنزیم فوق هضم گردید و نتایج آن با نتایج حاصل از نمونه های بالینی مقایسه گردید. براساس نتایج به‌دست آمده، تعداد و اندازه قطعات DNA حاصل از هضم محصولات PCR در نمونه های بالینی و واکسینال با یکدیگر متفاوت می باشد که موید تفاوت ژنتیکی آنها در ژن VP^2ویروس است. با استفاده از این روش می توان بین سویه فیلد و واکسینال تفاوت قائل شد و آنها را از یکدیگر تشخیص داد.

کلمات کلیدی: ویروس بورس عفونی طیور، تشخیص، هضم آنزیمی، RT-PCR

Pajouhesh & Sazandegi No 60 pp:65-69

Detection of infectious bursal disease virus in clinical samples and differentiation from vaccinal strain by RT-PCR- RFLP

By: Ghorashi, S.A., Hajian, T; and morshedi, D. National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology.

In the last two decades, endemic infectious bursal disease (IBD) have been reported worldwide. IBD is also present in Iran and heavy economic loss in poultry industry has been reported. In this study a method of RT-PCR for detection of virus in clinical samples was optimized. A 743 bp fragment of VP2 gene which is genetically variable among IBDV strains was amplified. PCR product of positive samples were digested with two restriction enzymes (RE), (MboI and BstNI) and results were recorded. Three imported vaccine strains were also tested and results showed that RE patterns between field isolates and vaccine strains of IBDV are different. This indicates genetic variation in VP2 region of tested viruses. By using this technique, field isolates can be differentiated from vaccine strains.

Key words: Infections bursal disease virus. Diagnosis RT-PCR

مقدمه

بیماری بورس عفونی طیور یا گامبورو یک بیماری بسیار مسری ویروسی است که باعث کاهش یا نقصان ایمنی در طیور جوان می‌گردد و از این طریق خسارات اقتصادی فراوانی به صنعت طیور دنیا وارد می‌آورد (۱). ویروس عامل بیماری دارای ۲ سروتیپ کاملاً متمایز (سروتیپ ۱ و سروتیپ ۲) می باشد. چندین تحت تیپ مختلف هم در ویروس های سروتیپ ۱ شناسائی گردیده اند (۲، ۳). ویروس‌های سروتیپ ۱ از نظر حدت و آنتی‌ژنیسیته بسیار با یکدیگر متفاوتند (۴). در صورتی که ویروسهای متعلق به سروتیپ ۲ به‌طور طبیعی در مرغها غیر پاتوژن هستند (۵). در ده سال گذشته ویروس های فوق العاده حاد یا HV(Highly Virulent) که به نام (very virulent IBDV) و VVIBVD در دنیا بروز کرده‌اند و باعث بروز کانونهای شدید بیماری و درنتیجه در طیور گوشتی ۳۰٪ و در طیور تخمگذار ۶۰٪ تا ۷۰٪ تلفات ایجاد کرده اند (۶). این سویه‌های فوق حاد ابتدا در سال ۱۹۸۷ از اروپا گزارش گردید و سپس به مناطق خاورمیانه، آفریقا و خاور دور منتشر گردیده است (۷، ۸).

اگرچه بیماری که توسط سویه های فوق حاد ویروس ایجاد می شود توسط واکسیناسیون‌های چندگانه با واکسن های Intermediate از سروتیپ ۱ ویروس و مراقبت های شدید بهداشتی کنترل شده است، با این حال هنوز بیماری در بسیاری از نقاط دنیا باعث بروز مشکلات فراوان می شود. در سالهای ا خیر از روش RT-PCR و تکنیک RFLP (Restriction Fragment lenght Polymorphism) که براساس وجود یا عدم وجود محل برش آنزیمی در قسمت VP2 ژنوم ویروس و یا در کل قطعه A ژنوم ویروس است، برای تشخیص تفریقی سویه‌های مختلف ویروس استفاده شده است (۹، ۱۰). اکثر محققان مطالعات خود را بر روی ژن VP2ویروس متمرکز کرده اند زیرا این ژن باعث کد شدن اپی‌توپهای مهم ویروسی می‌شود که آنتی بادی برعلیه آنها اثر خنثی کنندگی ویروس را دارد و به‌علاوه این قطعه از ژنوم ویروس در بین سویه‌های مختلف ویروس بسیار متغییر می‌باشد (۱۳, ۱۴, ۱۵).

هدف از این مطالعه اولاً بهینه سازی روش RT-PCR برای تشخیص ویروس در نمونه‌های بالینی و ثانیاً مقایسهٔ الگوی هضم آنزیمی (RFLP) آنها با ویروس سویه واکسنی است.

مواد و روشها

ویروس بورس عفونی

وجود ویروس گامبورو در نمونه‌های بالینی مورد آزمایش ابتدا توسط روش (Antigen-detection ELiSA (TropBio, Australia مورد بررسی قرار گرفت و از نمونه های مثبت استخراج RNA صورت پذیرفت. تعداد ۲ نمونه بالینی شامل نمونه بافتی بورس فابریسیوس طیور بیمار که از کانون‌های آلوده در استان تهران و قزوین جدا شده است و ۳ نمونه ویروس واکسن از واکسن های تجارتی وارداتی (شامل واکسنهای Gumboral, Bur-۷۰۶ و D-۷۸) مورد استفاده قرار گرفت.

جداسازی RNA ویروس

نمونه های بافتی حاوی ویروس ابتدا در آب مقطر هموژن و سپس یک میلی لیتر از محلول استخراج RNA به آن اضافه و محلول حاصل مخلوط گردید. پس از جداسازی فاز آلی، RNA ویروس توسط ایزوپروپانل رسوب داده شد. رسوب RNA توسط الکل اتیلیک ۷۵٪ شستشو و پس از خشک شدن رسوب در ۲۰ ماکرولیتر آب مقطر(DEPC-dH_2o) حل و تا زمان استفاده در ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید.

پرایمرهای مورد استفاده

پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه متعلق به قسمتی از ژن VP2 ویروس است که قبلاً گزارش گردیده است (۱۵).

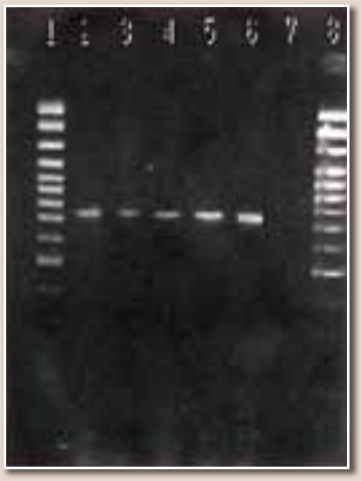
آزمایش RT-PCR

واکنش RT جهت ساخت رشتهٔ cDNA از RNA ویروس در حجم ۴۰ میکرولیتر و به مدت یکساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انجام گردید. این واکنش حاوی ۴ میکرولیتر از RNA استخراج شده (۰/۵ تا ۲ میکروگرم)، ۰/۲ میکروگرم از پرایمر Reverse و ۱۰ میلی مولار از هر یک از dNTPها، ۴۰ واحد آنزیم Reverse Transcriptase (M- MuLV) ۴ میکرولیتر از بافر RTو ۴۰ واحد Rnase inhibitor و به مقدار لازم DEPC-dH_2o می باشد. در انتهای واکنش، نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه، ۷۰ درجه حرارت داده شدند. آزمایش PCR در حجم ۵۰ میکرولیتر صورت پذیرفت. این واکنش حاوی ۱۰ میکرولیتر از محصول واکنش RT، ۲میلی مولار از هر یک از dNTP ها، ۰/۲ میکروگرم از هر یک از پرایمرهای Forward و Reverse، یک واحد آنزیم Taq DNA Polymerase، ۱/۵ میلی مولار $MgCl_2$ و ۵ میکرولیتر بافر آنزیم پلیمراز میباشد. واکنش با استفاده از دستگاه(Corbett Research, Australia) و با برنامه حرارتی ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه (یک سیکل)، ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه، ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه (۳۰ سیکل) و در انتها ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه (یک سیکل) انجام گردید. نمونهٔ کنترل منفی نیز همزمان مورد آزمایش قرار گرفت. بورس فابریسیوس جوجه (Specific Pathogen Free) SPF

به عنوان کنترل منفی بافت استفاده شد. در مورد کنترل منفی ویروس واکسن، از آب مقطر بجای RNA ویروس در آزمایش استفاده گردید. در انتهای آزمایش محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز و پس از رنگ آمیزی با محلول اتیدیوم بروماید، نتایج با استفاده از اشعهٔ UV بررسی شد.

خالص سازی و تعیین ردیف نوکلوتیدی محصول PCR

محصول PCR با استفاده از کیت High pure PCR product purifIcation kit (شرکت Roche) از نمک ها و پرایمرها جدا و سپس



شکل۱: آزمایش RT-PCR بر روی نمونه های کلینیکی و واکسن. تکثیر قطعهٔ ۷۴۳bp از ژنوم ویروس بر روی ژل آگارز ۱٪.

ستون ۱: مارکر (Ladder ۱۰۰)

ستون ۲و۳: نمونه های مختلف بافتی از بورس فابریسیوس طیور بیمار (ویروس فیلد)

ستون ۴: نمونه واکسن Bur-۷۰۶

ستون ۵: نمونه واکسن Gumboral

ستون ۶: نمونه واکسن D-۷۸

ستون ۷: کنترل منفی

ستون ۸: مارکر (Ladder ۱۰۰) DNA

توسط شرکت MWG-Biotech سکانس گردید.

آزمایش هضم آنزیمی (RFLP)

به منظور تشخیص تفریقی بین سویه فیلد و سویه واکسنی ویروس از ۲ آنزیم محدود کننده BstNI و MboI به‌طور جداگانه استفاده شد (۱۴). آزمایش هضم آنزیمی در حجم ۲۰ ماکرولیتر که حاوی ۸ ماکرولیتر از محصول PCR، ۱۰ واحد آنزیم، ۲ ماکرولیتر بافر آنزیم موردنظر و مقدار لازم از آب مقطر بود در ۳۷ درجه سانتیگراد و به مدت یک ساعت انجام پذیرفت. DNA هضم شده بر روی ژل آکریل آمید ۵٪ (PAGE) الکتروفورز و پس از رنگ آمیزی با نیترات نقره نتایج رؤیت گردید.

نتایج

واکنش RT-PCR:

در آزمایش PCR از نمونه های بورس فابریسیوس طیور بیمار و واکسن، قطعه‌ای به طول ۷۴۳ جفت باز (bp) از ژن VP^2 تکثیر گردید (شکل ۱).

آزمایش هضم آنزیمی: نتایج هضم آنزیمی هر یک از نمونه‌ها با ۲ آنزیم BstNI و MboI به‌طور جداگانه ثبت و نتایج نمونه های ویروس فیلد با سویه‌های واکسنی مقایسه گردید. در هضم محصول PCR ویروس سویه‌های واکسنی و براساس گزارشات منتشر شده قبلی، قطعات DNA مورد انتظار بدست آمد ولی هضم محصول PCR ویروس فیلد الگوئی متفاوت را نشان داد که آن را از سویه های واکسن متمایز می سازد. هضم محصول PCR نمونه های ویروس واکسن گامبورو سویه D-۷۸ و Gumboral با آنزیم BstNI قطعات ۱۱۹ ، ۱۵۴ ، ۱۷۲ و۲۰۹ جفت بازی تولید نمود. در این آزمایش با هضم محصول PCR واکسن Bur-۷۰۶ قطعات ۱۱۹ ، ۱۷۲ و ۲۰۹ جفت بازی تولید گردید (شکل ۱).

هنگامی که محصول PCR دو نمونه ویروس فیلد با آنزیم BstNI هضم گردید قطعات ۱۱۹ ، ۱۷۲ و ۴۲۴ جفت بازی تولید شد و در هضم آنزیمی با MboI دو قطعه ۲۲۹ و ۳۶۲ جفت بازی مشاهده گردید (شکل ۴).

طول قطعات حاصل از هضم آنزیمی MboI در نمونه های واکسنی و نمونه های ویروس فیلد مشابه میباشد ولی طول قطعات حاصل از هضم با آنزیم BstNI در این دو گروه متفاوت است و همین امر موجب تفریق آنها (سویه های واکسنی از سویه فیلد) می‌گردد. اندازه طول قطعات DNA حاصل از هضم آنزیمی نمونه های مختلف واکسن و ویروس فیلد در جدول ۱ نشان داده شده است. تعیین ردیف نوکلوتیدی محصول PCR نشان داد که این قطعه حاصل تکثیر قسمتی از ژن VP2 ویروس گامبورو می باشد.

هضم محصول PCR هر سه نوع واکسن توسط آنزیم MboI دو قطعه به اندازه های ۲۲۹و ۳۶۲ جفت بازی تولید کرد (شکل ۲).

بحث

مقایسه سکانس ژنومی ویروسهای مختلف IBDV نشان داده است که اختلافات ژنتیکی در بین سویه های مختلف وجود دارد (۱۱). در بعضی از این مطالعات به اختلاف در سکانس نوکلئوتیدی و یا اسید آمینه ای ویروس که در بروز اختلافات آنتی ژنیسیته و پاتوژنیسیته نقش دارد اشاره شده است (۱۰). اخیراً از روش RT-PCR-RFLP به منظور تشخیص تفریقی سویه های مختلف ویروس IBDV استفاده شده و ارتباط این اختلافات با نتایج حاصل از آزمایشات پاتوژنیسیته و آنتی ژنیسیته مقایسه گردیده است (۱۲). در این تحقیق آزمایش RT-PCR به منظور تکثیر قطعه ای از ژن VP^2 ویروس به طول ۷۴۳ bp به‌کار گرفته شد تا آزمایشی دقیق و حساس برای تشخیص ویروس در نمونه های بالینی و مشکوک بهینه سازی گردد. سپس به منظور تشخیص تفریقی سویه ویروس فیلد از سویه ویروس‌های واکسنی، هضم محصول PCR با دو آنزیم BstNI و MboI صورت پذیرفت. نتایج حاصل از هضم آنزیمی بر روی نمونه‌ها نشان داد که ویروس فیلد الگوئی متفاوت از سویه‌های ویروس واکسن تولید می‌نماید. این امر به‌علت وجود موتاسیون‌های نقطه‌ای در ژن VP^2 ویروس فیلد نسبت به ویروس‌های واکسن است و همین امر ممکن است باعث بروز اختلاف در سکانس اسید آمینه‌ای ویروس گردد که در نتیجه خواص آنتی ژنتیکی و پاتوژنیسیته آن را تحت تأثیر قرار خواهد داد. با استفاده از روش RT-PCR-RFLP، ویروس‌های مختلف IBDV در ۶ گروه مختلف مولکولی طبقه بندی شده اند (۱۳). نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان می‌دهد که ویروس فیلد مورد آزمایش متعلق به گروه ۶ مولکولی است در صورتی که واکسنهای مورد آزمایش متعلق به گروه ۴ مولکولی هستند. سویه های رفرانس و واکسینال ویروس گامبورو بر اساس اختلافات ژنتیکی که در آزمایش RT-PCR-RFLP از خود نشان می‌دهند به ۶ گروه مختلف طبقه بندی شده اند (۱۴). گروه ۱ شامل سویه‌های واریانت است. گروه ۲ شامل سویه های واریانت موجود در

جدول ۱: نتایج حاصل از آزمایش هضم آنزیمی (RFLP) محصول PCR سویه های مورد مطالعه ویروس بورس عفونی طیور (IBDV)

نمونهٔ ویروس	آنزیم MboI		آنزیم BstNI			
واکسن Bur-706	۲۲۹	۳۶۲	۱۱۹	۱۷۲	۲۰۹	
واکسن Gumboral	۲۲۹	۳۶۲	۱۱۹	۱۵۴	۱۷۲	۲۰۹
واکسن D-78	۲۲۹	۳۶۲	۱۱۹	۱۵۴	۱۷۲	۲۰۹
سویهٔ فیلد	۲۲۹	۳۶۲	۱۱۹	۱۷۲	۴۲۴	

امریکا می‌باشـد. گروه ۳ و ۴ حاوی ویروس‌های کلاسیک هستند. بسیاری از واکسن‌های موجود که از نظر حدت Intermediate می باشند در گروه ۴ قرار دارند. گروه ۵ اصطلاحاً به ویروس های سـویه Lukert معروف هستند و در گروه ۶ سویه واکسـن RS593 متعلق به شرکت Intervet قرار دارد. مطالعـه اخیر نشـان داد که بـا اسـتفاده از روش RT-PCR-RFLP می توان ویروسـهای گامبورو را ازنظر ژنتیکی از یکدیگـر متمایز نمود. تفریق این ویروسـها از طریق روشهای کلاسیک ویروس شناسی بسیار وقت گیر و مشـکل می باشـد و روش حاضر می تواند علاوه بر تشخیص دقیق و سریع ویروس در نمونه، بر اسـاس طبقه بندی موجود، وضعیت ژنتیکی ویروس را از نقطه نظر ژن VP2 مشخص نماید.

منابع مورد استفاده

1-Brown, M. D., and M. A. Skinner. 1996. Coding sequences of both genome segments of an European very virulent infectious bursal disease virus. Virus Res. 40: 1-15.

2-Chettle, N. J., J. C. Stuart, and

virulent infectious bursal disease in east Anglia. Vet. Rec. 125: 271- 272..

3-Dybing. J. K., and D. Jackwood. 1996. Restriction analysis of the MD infectious bursal disease virus strain.

Avian Diseases. 40: 931- 937.

4-Ismail, N. M., and Y. M. Saif. 1988. Lack of pathogenicity of five serotype 2 infectious bursal disease viruses in chickens. Avian Diseases. 32: 757-759.

5-Jackwood, D. H., and Y. M. Saif. 1987. Antigenic diversity of infectious bursal disease viruses. Avian Diseases. 31: 766- 770.

6-Jackwood, D. J., and R. J. Jackwood. 1994. Infectious bursal disease viruses: Molecular differentiation of antigenic subtypes among serotype 1 viruses. Avian Diseases. 38: 531- 537.

7-Jackwood, D. J., and R. J. Jackwood. 1997. Molecular identification of infectious bursal disease virus strains. Avian Diseases. 41: 64- 71.

8-Jackwood, D. J., and Sommer, S. E. 1998. Genetic heterogeneity in the VP2 gene of infectious bursal disease viruses detected in commercially reared chickens. Avian Diseases. 42: 321- 339.

9-Jackwood, D.J., Y.M. Saif, and J. H. Hughes. 1982. Characteristics and serologic studies of two serotypes of infectious bursal disease virus in turkeys. Avian Diseases. 26: 871-882.

10-Lukert, P.D., and Y.M. Saif. 1991. Infectious bursal disease. In: Diseases of poultry, 9 th ed. B.W. Calnek, C. W. Beard, W. M. Reid, and H.W. Yoder, Jr, eds. Iowa State University press, Ames, IA. pp. 648-663.

11-McFerran, J. B., M. S. McNulty, E. Mckillop, T. J. Corner, R. M. McCracken, D. S. Collins and G. M. Allan. 1980. Isolation and serological studies with infectious bursal disease viruses from fowl, turkeys and ducks. Demonstration of a second serotype. Avian pathology. 9: 395-404.

12-Tsai, H. J., and Y. S. Lu. 1993. Epidemiology of infectious bursal disease in Taiwan in 1992. J. Chin. Soc. Vet. Sci. 19: 249-258.

شکل ۲ – هضم محصول PCR نمونه های ویروس واکسن گامبورو با آنزیم BstNI در ژل اکریل آمید (PAGE) پس از رنگ آمیزی نقره

ستون ۱ – مارکر (DNA ۱۰۰) DNA weight Molecular Marker – Ladder

ستون ۲ – هضم محصول PCR نمونه ویروس واکسن گامبورو سویه Bur-۷۰۶ (قطعات ۱۱۹ ، ۱۷۲ و ۲۰۹ جفت بازی)

ستون ۳ – هضم محصول PCR نمونه ویروس واکسن گامبورو سویه D-۷۸ (قطعات ۱۱۹ ، ۱۵۴ ، ۱۷۲ و ۲۰۹ جفت بازی)

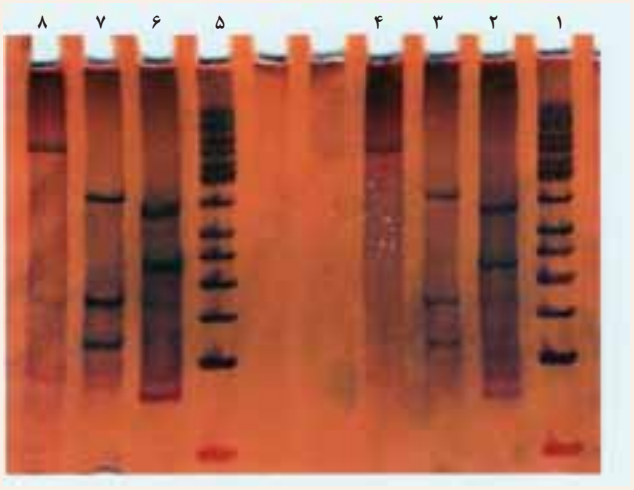
ستون ۴ – هضم محصول PCR نمونه ویروس واکسن گامبورو سویه Gumboral (قطعات ۱۱۹، ۱۵۴ ، ۱۷۲ و ۲۰۹ جفت بازی)

شکل ۳ – هضم محصول PCR نمونه های ویروس واکسن گامبورو با آنزیم MboI در ژل آکریل آمید (PAGE) پس از رنگ آمیزی نقره
ستون ۱ – ماکرر (DNA ۱۰۰ DNA weight Molecular Marker – Ladder)
ستون ۲ - هضم محصول PCR نمونه ویروس واکسن گامبورو سویه۷۰۶-Bur (قطعات ۲۲۹ و ۳۶۲ جفت بازی)
ستون ۳ - هضم محصول PCR نمونه ویروس واکسن گامبورو سویه۷۸-D (قطعات ۲۲۹ و ۳۶۲ جفت بازی)
ستون ۴ - هضم محصول PCR نمونه ویروس واکسن گامبورو سویهGumboral (قطعات ۲۲۹ و ۳۶۲ جفت بازی)

13-Van den Berg, T. P., M. Gonze, and G. Meulemans. 1991. Acute infectious bursal disease in poultry. 1: isolation and characterization of a highly virulent strain. Avian Pathology. 20: 133- 143.

14-Jackwood, D.J., and sommer S.E. 1999. Restriction fragment length polymorphisms in the VP2 gene of infectious bursal disease viruses from outside the United States. Avian Diseases 43:310-314

15-Jackwood, D.J., and sommer S.E. 1997. Restriction fragment length polymorphisms in the VP2 gene of infectious bursal disease viruses. Avian Diseases 41:627-637



شکل ۴– هضم محصول PCR نمونه هـای ویروس فیلد گامبـورو با آنزیمهای MboI و BstNI در ژل اکریل آمید (PAGE) پس از رنگ آمیزی نقره
ستون ۱ و ۵ – مارکـر (۵۰ DNA weight Molecular Marker – Ladder DNA)
ستون ۲ و ۶ - هضم محصول PCR با آنزیـم MboI (قطعات ۲۲۹ و ۳۶۲ جفت بازی)
ستون ۳ و ۷ - هضـم محصول PCR با آنزیـم BstNI (قطعات ۱۱۹، ۱۷۲ و۴۲۴ جفت بازی)
ستون ۴ و ۸ - محصول PCR قبل از هضم آنزیمی (قطعه ۷۴۳ جفت بازی)