

شناسائی ویروس‌های فوق حاد بیماری بوریس عفونی به روش RT-PCR بر روی ژن *VPI* و بررسی احتمال حضور ویروس‌های باز آرائی شده

ابوالفضل غنی نی^۱ سید مصطفی پیغمبری^{۱*} جمشید رزم یار^۲

(۱) گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

(۲) گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد - ایران.

(دریافت مقاله: ۲۶ مهر ماه ۱۳۸۹، پذیرش نهایی: ۲۱ فروردین ماه ۱۳۹۰)

چکیده

ژنوم ویروس بیماری بوریس عفونی یک RNA ویروس دو قطعه‌ای است که پنج پروتئین ویروسی را به رمز درمی‌آورد. ضرورت توسعه روشی سریع و آسان برای تفکیک ویروس‌های بیماری بوریس عفونی باعث شد که پژوهشگران بر روی پروتئین‌های مختلف این ویروس به تحقیق بپردازند. در مطالعه حاضر، تلاشی صورت گرفت تا قطعه‌ای باندازه ۷۱۵ جفت باز از ژن *VPI* به روش **Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)-Reverse Transcriptase** نزد ۲۶ جدایه ویروس بیماری بوریس عفونی تکثیر شود. الگوی حدت جدایه‌های مورد مطالعه فوق‌الشاره قبلاً با استفاده از روش **RT-PCR/Restriction Enzyme Analysis (RT-PCR/REA)** بر روی ژن *VP2* برای ما مشخص شده بود. نتایج نشان داد که در ۲۰ جدایه (۷۶ درصد) الگوی حدت (فوق حاد) جدایه‌ها چه در روش **RT-PCR** بر روی ژن *VPI* و چه در روش **RT-PCR/REA** بر روی ژن *VP2* یکسان بودند. اما در شش جدایه باقیمانده، در روش مورد استفاده الگوهای متفاوتی را نشان دادند. با توجه به اطلاعات موجود از فارم‌های مبدأ ویروس‌های این مطالعه که با نتایج آزمایش بر روی *VPI* مطابقت دارد، گمان برده می‌شود که این یافته به دلیل حضور ویروس‌های باز آرائی شده بیماری بوریس عفونی باشد. این نتایج همچنین خاطر نشان می‌کند که *VP2* تنها تعیین کننده حدت ویروس بیماری بوریس عفونی نمی‌باشد.

واژه‌های کلیدی: ویروس بیماری بوریس عفونی، باز آرائی، *VPI*، RT-PCR.

(Very Virulent) تقسیم نمود (۱۷، ۲۲).

این بیماری برای اولین بار در ایران توسط Aghakhan و همکاران گزارش شد (۱). جدایه‌های فوق حاد ویروس بیماری عفونی بوریس نخست در اواخر دهه ۱۹۸۰ از اروپا گزارش شدند و سپس به تمامی نقاط جهان به استثنای استرالیا انتشار یافتند. سویه‌های فوق حاد ویروس بیماری بوریس عفونی از نظر آنتی ژنیک شباهت زیادی با سویه‌های کلاسیک دارند اما حدت آنها افزایش زیادی یافته و تلفات بالایی در گله‌های طیور ایجاد می‌کنند (۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۲، ۲۱، ۲۲).

برای صنعت طیور، تمایز بین جدایه‌های کلاسیک حاد و فوق حاد ویروس بیماری بوریس عفونی اهمیت زیادی دارد تا برنامه مناسبی برای واکسیناسیون اتخاذ شود. تست‌های سرولوژیک پرز حمت، زمان بروز از نظر حساسیت متغیر می‌باشند. اگر چه یک روش الایز برای بدام انداختن آنتی ژن (AC-ELISA) با استفاده از پانلی از آنتی بادی‌های مونوکلونال برای تمایز سویه‌های سروتیپ ۱ بکار رفته است، امروزه گرایش زیادی به استفاده از تکنیک‌های مولکولی برای تمایز سریع جدایه‌های کلاسیک حاد و فوق حاد بیماری بوریس عفونی صورت گرفته است. روش RT-PCR و متعاقباً بکارگیری آنزیم‌های گوناگون محدود کننده اندونوکلیئاز از روش‌هایی بوده که بیشترین کاربرد را در این زمینه داشته است. روش Real time PCR برای تمایز ویروس‌های فوق حاد بیماری عفونی بوریس از ویروس‌های کلاسیک نیز مورد استفاده قرار گرفته است (۱۱، ۱۴). اما

مقدمه

بیماری بوریس عفونی (Infectious bursal disease) بیماری فوق العاده واگیر ماکیان جوان می‌باشد. بیشترین حساسیت به عفونت بالینی در سن ۳-۶ هفته‌گی رخ می‌دهد. هدف اصلی ویروس بیماری عفونی بوریس بافت لنفاوی و بخصوص بوریس فابریسیوس می‌باشد. در ماکیان کوچکتر از ۲ هفته ممکن است عفونت تحت بالینی رخ دهد که منجر به سرکوب ایمنی گردد (۱۷، ۲۲).

ویروس بیماری بوریس عفونی از خانواده بیروناویریده است. ژنوم ویروس حاوی ۲ قطعه RNA دورشته‌ای است که ۵ پروتئین ویروس شامل *VP1*، *VP2*، *VP3*، *VP4*، *VP5* و *VP6* را کد می‌کند. *VP2* بعنوان پروتئین اصلی ایمنی زامحسوب می‌شود که حداقل حاوی ۲ محل خنثی کننده است. همچنین محل‌هایی دارد که در تعیین حدت ویروس نقش دارند. تاکنون ۲ سروتیپ مشخص ویروس بوریس عفونی شناخته شده است. سروتیپ ۱ که بیماری زا بوده و در ماکیان عامل بیماری بوریس عفونی می‌باشد. سروتیپ ۲ بیماری ایجاد نمی‌کند و در مقابل سویه‌های بیماری زای سروتیپ ۱ نیز ایمنی ایجاد نمی‌کند. تست خنثی سازی ویروس برای تمایز بین دو سروتیپ بکار می‌رود. جدایه‌های فیلدی پاتوژن سروتیپ ۱ ویروس بیماری بوریس عفونی را می‌توان به جدایه‌های کلاسیک حاد (Classical Virulent)، واریانت (Variant) و فوق حاد



بعد از سانتریفیوژ مایع عبوری دور ریخته می شود. سپس دو بار شستشو با استفاده از بافر شستشو انجام شده و هر بار بعد از سانتریفیوژ، مایع عبوری از لوله فیلتردار دور ریخته می شود. در مرحله آخر از بافر Elution استفاده می شود. بعد از سانتریفیوژ، تیوب حاوی RNA برای انجام مراحل بعدی می باشد. برای بررسی صحت استخراج RNA های استخراجی روی ژل ۰/۸ درصد آگارز برده شده و کیفیت RNA استخراجی مورد بررسی قرار گرفت.

رونوشت برداری معکوس (Reverse Transcription): بدین

منظور از کیت تجاری First Strand cDNA Synthesis Kit شرکت RevertAid™ Fermentas (آلمان) استفاده شد مراحل انجام کار بدین صورت بود که در ابتدا ۵ μl از RNA استخراجی (غلظت ۳ μg) به همراه ۱۲/۵ μl از پرایمر معکوس (AG-R) (۱۰ pmol/μl) و ۲/۵ μl از آب تیمار شده با DEPC به میکروتیوب ۲۰۰ μl اضافه شده و بمدت ۲ دقیقه در حرارت ۱۰۰ درجه قرار داده شده و بلافاصله در مجاورت یخ خنک گردید. سپس ۴ μl از بافر ۵x واکنش RT (حاوی ۲۵۰ mM Tris-HCL و ۲۵۰ mM MKCL و ۲۵۰ mM MgCl₂ و ۱۰ mM DNTP mix و ۱۰۰ μl از آنزیم نسخه برداری معکوس RT u/ml) از آب تیمار شده با DEPC افزوده گردید. این مجموعه ۱ ساعت در ۴۲ درجه سانتیگراد و ۱۰ دقیقه در ۸۰ درجه سانتیگراد انکوبه شده و سپس در ۲۰- درجه سانتیگراد ذخیره گردید. در ساخت cDNA دو کنترل؛ کنترل منفی (فاقد RNA) و دیگری کنترل بدون آنزیم RT قرار داده شد. و در ادامه، واکنش تکثیر روی این کنترل ها نیز مانند نمونه ها انجام گردید. کلیه مواد مصرفی در مرحله رونوشت برداری معکوس از شرکت سیناژن ایران تهیه شدند.

واکنش تکثیری: از آنجایی که در واکنش های تکثیری اولیه انجام

گرفته بر اساس گزارش Ashraf و همکاران (۲) باند غیر اختصاصی ضعیفی علاوه بر باند هدف روی ژل مشاهده گردید، لذا بهینه سازی شرایط واکنش ضروری بود. در ابتدا گراد یانی از درجه حرارت های مختلف آنلینگ از ۴۶- ۶۰ درجه سانتیگراد تنظیم شد و واکنش های PCR انجام پذیرفت. سپس از حجم های متفاوت cDNA (از ۲ تا ۷ ml در حجم ۵۰ ml) در واکنش استفاده گردید. سپس واکنش در شرایط بهینه شده و بدین شرح در حجم ۵۰ ml برای کلیه نمونه ها صورت پذیرفت: ۵ ml از بافر PCR buffer ۱۰x، ۱ ml از مخلوط dNTPs ۱۰ mM، ۱/۵ ml از هر پرایمر (۱۰ pmol/ml)، از ۲/۵ تا ۵/۵ ml از آنزیم Taq DNA polymerase (۵۰ mM) MgCl₂، ۱/۵ ml از آب دیونیزه اضافه گردید. برای واکنش ها کنترل منفی نیز قرار داده شد که در آن به جای cDNA الگوز آب دیونیزه استفاده شده است. میکروتیوب ها در دستگاه ترموسایکلر (Germany Gradient Mastercycler, Eppendorff) با این الگوی حرارتی قرار داده شدند: ۳۵ سیکل ۹۵ درجه سانتیگراد بمدت ۳۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتیگراد

آنالیز RT-PCR/RFA زمان بر بوده و برای ارزیابی تعداد زیادی نمونه مناسب نمی باشد و Real time PCR نیز گران می باشد. لذا توسعه روشی ارزان تر و سریع تر جهت تمایز ویروس های کلاسیک از ویروس های فوق حاد بسیار مورد توجه قرار گرفته است. تاکنون موفق ترین روش در این زمینه توسعه تکنیک RT-PCR ساده با ساخت پرایمرهایی از پروتئین VP1 بوده است (۲). تعیین میزان کارایی و کاربردی نمودن استفاده از این روش با استفاده از جدایه های بومی کشورهای مختلف از ضرورت بالائی برای صنعت طیور برخوردار است.

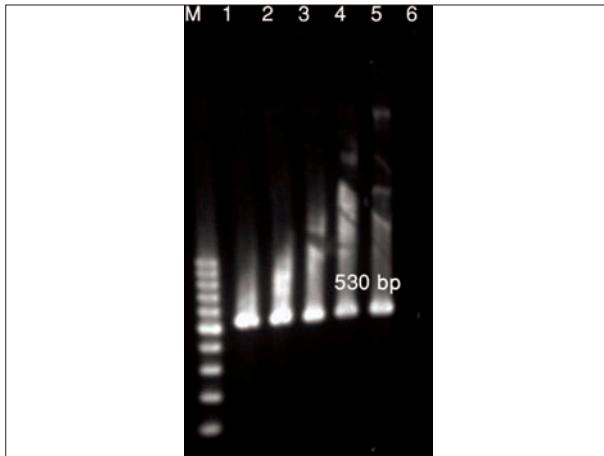
مواد و روش کار

نمونه ها: در این مطالعه از ۲۶ نمونه مربوط به مطالعه قبلی که در فریژر ۷۰- درجه سانتیگراد حفظ شده بودند استفاده گردید (جدول ۱) (۱۸، ۱۹). نمونه ها از مناطق مختلف ایران و از گله های مشکوک به بیماری گامبورو اخذ شده بودند. همچنین تعدادی نمونه هم جهت کنترل از فارم های فاقد علائم ظاهری بیماری بورس عفونی اخذ شدند. بخشی از هر نمونه منجمد شده بطور مجزا در هاون چینی استریل قرار داده و پس از بیرون آمدن از حالت انجماد توسط قیچی به قطعات ریز برش داده شد. سپس با له کردن نمونه ریز شده و افزودن ۵ برابر وزن نمونه از بافر (HCL)/TNE - 1 mM EDTA + 100 mM NaCl + 10 mM Tris + محتویات ۱۰ ویال پنی سیلین و استرپتومایسین (۱+۱)، هموژنیزه بافتی تهیه شد. پس از شماره گذاری هموژنیزه بافتی مربوط به هر فارم، یک سی سی آن به میکروتیوب ۱/۵ سی سی عاری از RNase و DNase منتقل شد و سه بار در دماهای ۷۰- و ۳۷+ درجه سانتیگراد بمدت ۱۵ دقیقه، مورد انجماد و ذوب قرار گرفت تا سلول های بورس متلاشی شده و ویروس آزاد گردد. با سانتریفیوژ (Sigma 1-15K) در دمای ۴ درجه سانتیگراد بمدت ۲۰ دقیقه در ۱۲۰۰ rpm، لاشه سلول ها رسوب کرده و مایع رویی به میکروتیوب دیگری برای استخراج RNA منتقل شد. لازم به ذکر است که ماهیت این جدایه ها بر اساس مطالعه قبلی که با استفاده از پرایمرهای طراحی شده بر روی ژن VP2 و به روش RT-PCR/REA انجام گرفته بود، برای ما مشخص بود (۱۸، ۱۹).

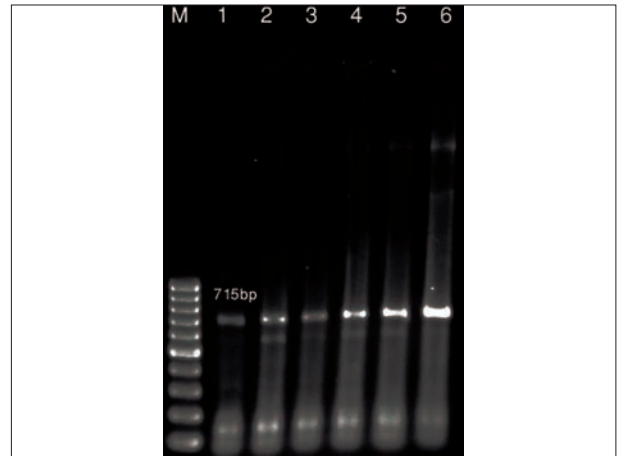
انتخاب پرایمر: پرایمرهای مورد استفاده (AG-F و AG-R) در این مطالعه برای تکثیر قطعه ای باندازه ۷۱۵ جفت باز از ژن VP1 بر اساس گزارش Ashraf و همکاران (۲) با هدف شناسائی جدایه های فوق حاد طراحی شد و در شرکت سیناژن (تهران، ایران) سنتز گردید (جدول ۲).

استخراج RNA: برای استخراج RNA ویروسی از کیت شرکت Roche بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده استفاده گردید (Germany High Pure Viral RNA Kit, Roche). روند انجام کار بصورت خلاصه بدین گونه بود که به هموژنیزه بافتی ۲ برابر حجم آن از بافر متصل شونده اضافه شد که بعد از سانتریفیوژ، مایع عبوری از لوله فیلتردار دور ریخته می شود. در مرحله بعدی از بافر حذف کننده مهارکننده استفاده کرده و





تصویر ۲- نتایج واکنش تکثیر با استفاده از پرایمرهای 12S rRNA بعنوان کنترل داخلی: ستون اول مارکر ۱۰۰ جفت بازی شرکت فرمنتاس (M) و ستون ششم کنترل منفی (به جای الگو از آب دیونیزه استفاده شده است) را نشان می دهد. در سایر ستون ها باند ۵۳۰ جفت بازی هدف مشاهده می شود.



تصویر ۱- بهینه سازی واکنش RT-PCR با استفاده از حجم های مختلف cDNA: ستون اول مارکر ۱۰۰ جفت بازی شرکت فرمنتاس (M)، ستون دوم ۲ μl، ستون سوم ۳ μl، ستون چهارم ۴ μl، ستون پنجم ۵ μl، ستون ششم ۶ μl، ستون هفتم ۷ μl حجم cDNA را در یک واکنش ۵۰ μl نشان می دهد. بهترین وضعیت در حجم ۷ μl بدست آمده است.

آب دیونیزه بود. الگوی حرارتی میکروتیوب ها در دستگاه ترموسایکلر شامل یک سیکل ۹۵ درجه سانتیگراد بمدت ۶ دقیقه، ۳۵ سیکل ۹۴ درجه سانتیگراد بمدت ۳۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتیگراد بمدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتیگراد بمدت ۹۰ ثانیه و در نهایت ۱ سیکل ۷۲ درجه سانتیگراد بمدت ۱۰ دقیقه تنظیم و واکنش تکثیر انجام گرفت.

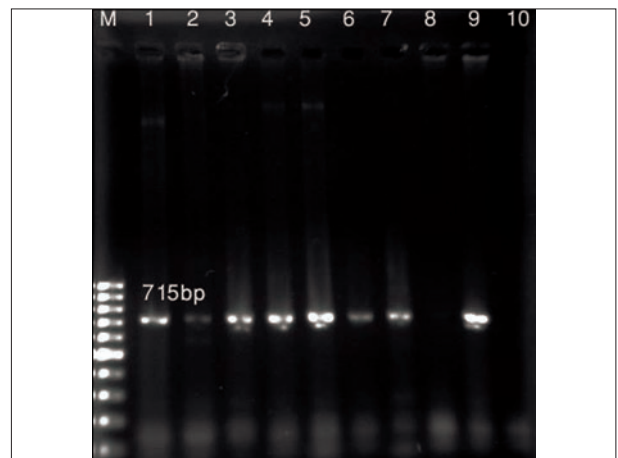
نتیجه

واکنش تکثیر بهینه: در بین دماهای انلینگ مختلف که روی آن ها کار شد، بهترین نتیجه با استفاده از دمای انلینگ ۵۸ درجه سانتیگراد بدست آمد. علاوه بر آن بهترین حجمی که برای cDNA در واکنش ها حاصل شد، ۷ ml بود (تصویر ۱).

نتایج RT-PCR نمونه ها: باند هدف ۵۳۰ جفت بازی در هنگام کار با پرایمر 12S rRNA بعنوان کنترل داخلی مشاهده شد که در کنترل منفی (واکنش تکثیری که در آن به جای الگو از آب دیونیزه استفاده شده است) چنین باندی مشاهده نشد (تصویر ۲). از ۲۶ نمونه مورد بررسی در این مطالعه ۲۰ نمونه با استفاده از پرایمرهای طراحی شده بر اساس ژن VPI مثبت بودند و باند ۷۱۵ جفت بازی هدف بعد از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید، روی ژل آگارز مشاهده شد (تصویر ۳). شش نمونه دیگر نیز باندی را در هنگام تکثیر با استفاده از این پرایمرها نشان ندادند. در هر واکنش کنترل منفی (واکنش تکثیری که به جای الگو از آب دیونیزه استفاده شده است) نیز قرار داده شد. علاوه بر آن ۲ کنترل دیگر نیز در مراحل سنتز cDNA استفاده شد (کنترل منفی فاقد RNA و دیگری کنترل بدون آنزیم RT) که در هیچ یک از این کنترل ها در هنگام تکثیر باندی مشاهده نشد.

بحث

در این مطالعه روی ۲۶ سویه ویروس بورس عفونی جدا شده از نقاط



تصویر ۳- نتایج واکنش تکثیر نمونه ها با استفاده از پرایمرهای ژن VPI: ستون اول مارکر ۱۰۰ جفت بازی شرکت فرمنتاس و ستون دهم کنترل منفی (به جای الگو از آب دیونیزه استفاده شده است) را نشان می دهد. همانگونه که مشاهده می نمایم ۸ نمونه از نظر باند ۷۱۵ جفت بازی هدف مثبت بوده و نمونه ستون هشتم منفی می باشد.

بمدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتیگراد بمدت ۳۰ ثانیه و ۱ سیکل انتهایی در ۷۲ درجه سانتیگراد بمدت ۷ دقیقه قرار داده شدند. کلیه مواد مصرفی از شرکت سیناژن ایران تهیه شدند.

استفاده از پرایمرهای 12S rRNA بعنوان کنترل داخلی: این پرایمر بر مبنای زیر واحد ۱۲s RNA ریوزومی پرنندگان و برای تکثیر قطعه ای باندازه ۵۳۰ جفت بازی طراحی شد (جدول ۲) (۲۰). این منطقه ثابت بوده و از آن بعنوان کنترل داخلی در این مطالعه استفاده گردید. این پرایمرها برای تأیید صحت مراحل انجام واکنش بکار برده شدند. واکنش تکثیری در حجم ۵۰ ml و شامل ۱۵ ml بافر ۱۰x PCR buffer، ۱ ml از مخلوط dNTPs، ۱۰ mM، ۲ ml از هر پرایمر (۱۰ pmol/ml)، ۱ ml از ۵۰ mM MgCl₂، ۱۰/۵ از آنزیم Taq DNA polymerase (۵U/ml)، ۴ ml cDNA و ۳۴/۵ ml



جدول ۱- اطلاعات مربوط به نمونه‌های استفاده شده در این مطالعه. (تلفات پایین = کمتر از ۵٪، تلفات بالا = بیشتر از ۵٪، نرمال = گله فاقد علائم ظاهری بیماری گامبورو).

شماره نمونه	نام جدایه	محل و تاریخ جداسازی	نوع گله	سن گله (هفته)	میزان تلفات گله ^۱	وضعیت بورس
F7	JRMP7IR	تبریز، ۲۰۰۵	گوشتی	۴	بالا	هموراژیک
F10	JRMP10IR	قزوین، ۲۰۰۵	گوشتی	۴	بالا	هموراژیک
F11	JRMP11IR	قزوین، ۲۰۰۵	گوشتی	۴	بالا	هموراژیک
F12	JRMP12IR	تهران، ۲۰۰۵	گوشتی	۳	پایین	آتروفیه
F14	JRMP14IR	آمل، ۲۰۰۵	گوشتی	۴	پایین	هموراژیک
F15	JRMP15IR	آمل، ۲۰۰۵	گوشتی	۳	بالا	هموراژیک
F21	JRMP21IR	زنجان، ۲۰۰۵	گوشتی	۳	نرمال	آتروفیه
F22	JRMP22IR	تهران، ۲۰۰۵	گوشتی	۴	پایین	ادماتوز
F24	JRMP24IR	تهران، ۲۰۰۵	گوشتی	۴	پایین	هموراژیک
F26	JRMP26IR	تهران، ۲۰۰۵	پولت	۸	بالا	هموراژیک
F27	JRMP27IR	تهران، ۲۰۰۵	گوشتی	۴	پایین	هموراژیک
F28	JRMP28IR	قم، ۲۰۰۵	گوشتی	۴	پایین	هموراژیک
F29	JRMP29IR	تبریز، ۲۰۰۶	گوشتی	۴	بالا	هموراژیک
F30	JRMP30IR	تهران، ۲۰۰۵	پولت	۵	بالا	هموراژیک
F32	JRMP32IR	تهران، ۲۰۰۶	گوشتی	۴	پایین	هموراژیک
F33	JRMP33IR	تهران، ۲۰۰۶	پولت	۶	پایین	هموراژیک
F34	JRMP34IR	تهران، ۲۰۰۶	گوشتی	۴	پایین	هموراژیک
F35	JRMP35IR	تهران، ۲۰۰۶	گوشتی	۵	پایین	هموراژیک
F36	JRMP36IR	تهران، ۲۰۰۶	گوشتی	۳	نرمال	هموراژیک
F38	JRMP38IR	تهران، ۲۰۰۶	گوشتی	۴	بالا	هموراژیک
F39	JRMP39IR	تهران، ۲۰۰۵	گوشتی	۵	نرمال	ادماتوز
F40	JRMP40IR	تهران، ۲۰۰۶	گوشتی	۳	نرمال	هموراژیک
F41	JRMP41IR	تهران، ۲۰۰۶	گوشتی	۳	پایین	ادماتوز
F42	JRMP42IR	مشهد، ۲۰۰۶	پولت	۵	بالا	هموراژیک
F43		سبزوار، ۲۰۰۶	گوشتی	۴	پایین	ادماتوز
F44	JRMP44IR	تهران، ۲۰۰۶	گوشتی	۳	پایین	آتروفیه

استفاده از این پرایمر مورد بررسی قرار گرفتند، باند هدف ۵۳۰ جفت بازی را نشان دادند. باند هدف در نمونه کنترل منفی مشاهده نشد.

بازآرایی (Reassortment) به معنای تبادل یک یا چند قطعه از RNA بین ویروس‌هایی با ژنوم قطعه دار است که از لحاظ ژنتیکی به هم مرتبط می‌باشند. چنین تصور می‌شود که بازآرایی ممکن است در ظهور ویروس‌های فوق حاد بیماری بورس عفونی نقش داشته باشد (۲۸، ۲۶، ۲۵، ۱۷، ۵، ۴). ویروس حاصل از بازآرایی خصوصیات ویروس‌های والد خود را دارد. از آنجایی که ویروس بیماری بورس عفونی RNA بوده و نیز دو قطعه‌ای می‌باشد، لذا بروز نوترکیبی (Recombination) و بازآرایی در ژنوم ویروس امکانپذیر می‌باشد (۴).

Wei و همکاران در سال ۲۰۰۶ (۲۴) سویه‌ای از ویروس گامبورو از همه‌گیری‌های شدید فیلدی در گله‌های تجاری واکسینه جدا کردند که آنالیز توالی ژنومی آن نشان داد که قطعه A و B سویه ZJ2000 به ترتیب متعلق به سویه‌های تخفیف حدت یافته و خیلی حاد ویروس بیماری

مختلف ایران کار شد که قبلاً ماهیت آن‌ها با استفاده از پرایمرهای طراحی شده روی ژن VP2 برای ما معلوم شده بود (۱۹، ۱۸). در مطالعه قبلی، محققین از این ۲۶ نمونه ۲۴ مورد را از نظر ویروس گامبورو مثبت معرفی کردند و ۲ نمونه منفی معرفی گردید. در آنالیز هضم آنزیمی قطعه تکثیر شده این ۲۴ نمونه، ۲ نمونه الگوی سویه‌های کلاسیک حاد و ۲۲ نمونه نیز الگوی سویه‌های فوق حاد را نشان دادند (۱۹، ۱۸). در این مطالعه با استفاده از پرایمرهای طراحی شده از ژن VP1، ۲۰ نمونه مثبت و ۶ نمونه منفی بودند. تفاوت‌هایی در پاسخ‌های بدست آمده از این دو پرایمر بدست آمد، که برخی سویه‌ها با استفاده از یک پرایمر بعنوان فوق حاد و با استفاده از پرایمر دیگر بعنوان سویه‌ای غیر فوق حاد معرفی گردیدند.

در این مطالعه از پرایمرهای 12S rRNA بعنوان کنترل داخلی استفاده گردید تا از پاسخ‌های منفی کاذب بواسطه حضور مهارکننده‌های PCR و یاققدان RNA استخراجی جلوگیری کند (۱۹، ۱۳). همچنین این کار تأییدی بر مراحل انجام کار و پیپتینگ بود. تمامی نمونه‌هایی که با



جدول ۲- توالی پرایمرهای VPI و 12S rRNA مورد استفاده در این مطالعه.

منبع	باند هدف (جفت باز)	توالی پرایمر	پرایمر	ژن
۲	۷۱۵	5'-CCG-AGG-CCA-CAG-ATA-ACC-TTA-A-<A>-3'	AG-F	VPI
		5'-CCT-CTA-AAC-GGG-TTG-AA-<C>-3'	AG-R	
۲۲	۵۳۰	5'-AAA-CTG-GGA-TTA-GAT-ACC-CCA-CTA-<T>-3'	12S-F	12S rRNA
		5'-CTT-CCG-GTA-CAC-TTA-CCT-TGT-TAC-GA-<C>-3'	12S-R	

از هضم آنزیمی روی قطعه تکثیر یافته تاخیری را در مقایسه با سویه های تخفیف حدت یافته نشان داد هر چند این سویه، برای جوجه های عاری از پاتوژن خاص (SPF) و جنین های ماکیان بیماری زا بود. همانند سویه های استاندارد حاد گامبورو، سویه ZI2000 منجر به تلفات ۲۶/۷ درصد و واگیری ۱۰۰ درصد گردید و هم در کالبدگشایی و نیز در هیستوپاتولوژی ضایعات شدید بورس ایجاد کرد (۲۴). نتایج این محققین تأییدی بر بروز بازآرایی در مورد ویروس بیماری بورس عفونی در طبیعت بود. علاوه بر آن این تحقیق نشان داد که VPI نیز نقش مهمی در بروز حدت در ویروس گامبورو ایفا می کند (۲۴). بروز بازآرایی بصورت طبیعی در ویروس نشان داد که استفاده از واکسن های زنده بعنوان یک منبع ویروس، می تواند در بروز و تشدید بازآرایی در طبیعت موثر باشند. محققین عنوان می کنند که در گله های واکسینه که آلودگی با سویه های فوق حاد ویروس نیز وجود دارد، ویروس حاصل از بازآرایی این دو ویروس، یک قطعه خود را از ویروس فوق حاد گرفته و قطعه دیگر را نیز می تواند از ویروس واکسن دریافت کند. لذا واکسن های مصرفی می توانند بعنوان دهنده قطعه به ویروس بازآرایی شده عمل نمایند (۲۴). Le Nouen و همکاران در سال ۲۰۰۶ (۱۵) برای مقایسه اپیدمیولوژی مولکولی ویروس بورس عفونی، بخشی از ژنوم قطعات A و B مربوط به ۵۰ سویه واکسینال و سویه های موجود در طبیعت که طی سال های ۱۹۷۲ تا ۲۰۰۲ در ۱۷ کشور جدا شده بود را توالی یابی نمودند و بر اساس آن درخت ژنی ترسیم نمودند. اکثر سویه ها ارتباط ژنتیکی مشابهی را با استفاده از قطعات A و B نشان دادند، اما در ۲۶ درصد موارد، رابطه فیلوژنتیکی متفاوتی بدست آمد که وابسته به این بود که کدام قطعه مبنای آنالیز قرار گرفته است. آنها این مساله را دلیلی بر بروز بازآرایی ژنتیکی در طبیعت عنوان می کنند. محققین هر دو قطعه سویه ای را که در آن قطعه A مشابه ویروس های فوق حاد و قطعه B به ویروس کلاسیک بورس عفونی شبیه بود، بطور کامل توالی یابی نمودند و تست های مربوط به پاتوژن سیتی را روی آن انجام دادند. این سویه تلفات کمتری را در مقایسه با سویه های تیپیک فوق حاد نشان داد، اما از نظر ضایعات بورس، پاسخ آنتی بادی پس از عفونت یا تولید ویروس در بورس مشابه ویروس های تیپیک فوق حاد بورس عفونی بود (۱۵).

از هضم آنزیمی روی قطعه تکثیر یافته VP2 مشخص شده بود (۱۸، ۱۹). اما نتایج کار با پرایمرهای طراحی شده بر اساس ژن VPI در ۶ مورد متفاوت بود. ذکر این نکته ضروری است که در روش هضم آنزیمی روی قطعه VP2 جدایه های مثبت ۲ الگوی سویه های کلاسیک و فوق حاد را نشان می دادند اما در روش بکاررفته در این مطالعه سویه هایی باند هدف را نشان می دادند که فوق حاد باشند، لذا سویه های کلاسیک و ویروس بیماری بورس عفونی در کنار نمونه های منفی از نظر این ویروس، باندی را نشان نمی دادند.

دو نمونه ۲۹ و ۳۹ قبلاً بعنوان سویه های کلاسیک معرفی شده بودند، اما کار با استفاده از پرایمرهای VPI آن ها را بعنوان فوق حاد شناسائی نمود. نکته قابل توجه در این زمینه اشاره خاصی است که محققین در مطالعه قبلی به نمونه ۲۹ داشته اند و با توجه به رفتار این نمونه که تلفات بالا ایجاد کرده و در کالبدگشایی نیز بورس ها هموراژیک بوده اند، آن را بیشتر به سویه های فوق حاد شبیه دانسته اند (۱۸، ۱۹). نمونه ۳۹ نیز نمونه ای بود که تلفات آن در گله در حد معمولی بوده و ظاهر بورس ها نیز در زمان نمونه برداری ادماتوز بوده اند. چهار نمونه ۳۲، ۳۳، ۳۴ و ۴۰ نمونه هایی بوده اند که قبلاً بعنوان فوق حاد مطرح شده بودند. نمونه ۳۲ مربوط به گله ای با تلفات پائین که بورس ها هموراژیک بوده اند، نمونه ۳۳ از گله ای با تلفات بالا دارای بورس های هموراژیک، نمونه ۳۴ از گله ای با تلفات پائین و بورس هموراژیک و نمونه ۴۰ از گله ای با تلفات طبیعی و بورس هموراژیک جدا شده اند. اما تمامی این ۴ نمونه در آزمایشات انجام گرفته در این مطالعه بعنوان منفی مطرح شده اند. ذکر این نکته ضروری است که منفی بودن این نمونه ها صرفاً فوق حاد بودن آن ها را با استفاده از این پرایمرها رد می کند. برای تأیید صحت آزمایش و جلوگیری از پاسخ منفی کاذب، این ۴ نمونه با پرایمرهای 12S rRNA نیز تست شدند که هر ۴ نمونه باند هدف ۵۳۰ جفت بازی را نشان دادند. با این وجود برای تأیید نتایج می توان این ۴ نمونه را با پرایمرهای طراحی شده برای شناسایی سویه های کلاسیک نیز تست نمود، که منفی بودن سویه های مورد آزمایش با این پرایمرها غیر فوق حاد بودن این سویه ها را تأیید می کند. همانگونه که در مطالعات ذکر شده در بالا نیز آمده (۴، ۱۵، ۱۷، ۲۴، ۲۵، ۲۶، ۲۸) بروز پدیده بازآرایی ژنتیکی در ویروس های



References

1. Aghakhan, S. M., Fereidoni, S. R., Abshar, N., Marunesi, C., Sami, Z. (1996) Characterization of a highly virulent infectious bursal disease virus. Arch. Razi Inst. 46/47: 55-63.
2. Ashraf, S., Tang, Y., Saif, Y.M. (2007) Development of differential RT-PCR assays and molecular characterization of the complete VP1 gene of 5 strains of very virulent infectious bursal disease virus. Avian Dis. 51: 935-941.
3. Boot, H. J., ter Huurne, A. A., Hoekman, A., Peeters, B., Gielkens, A. (2000) Rescue of very virulent and mosaic infectious bursal disease virus from cloned cDNA: VP2 is not the sole determinant of the very virulent phenotype. J. Virol. 74: 6701-6711.
4. Brown, M. D., Skinner, M. A. (1996) Coding sequence of both genome segments of a European very virulent infectious bursal disease virus. Virus Res. 40: 1-15.
5. Hon, C., Lam, T., Drummond, A., Rambaut, A., Lee, Y., Yip, C., Zeng, F., Lam, P., Ng, P., Leung, F. (2006) Phylogenetic analysis reveals a correlation between the expansion of very virulent infectious bursal disease virus and reassortment of its genome segment B. J. Virol. 80: 8503-8509.
6. Hoque, M., Omar, A., Chong, L., Hair-Bejo, M., Aini, I. (2001) Pathogenicity of SspI-positive infectious bursal disease virus and molecular characterization of the VP2 hypervariable region. Avian Pathol. 30: 369-380.
7. Hosseini, S. D., Omar, A. R., Aini, I. (2004) Molecular characterization of an infectious bursal disease virus isolate from Iran. Acta Virol. 48: 79-83.
8. Jackwood, D. J., Sommer, S. E. (1998) Genetic heterogeneity in the VP2 gene of infectious bursal disease detected in commercially reared chickens. Avian Dis. 42: 321-339.
9. Jackwood, D. J., Sommer, S. E. (2005) Molecular studies on suspect very virulent infectious bursal disease virus genomic RNA samples. Avian Dis. 49: 246-251.
10. Jackwood, D. J., Sommer-Wagner, S. E., Stoute, S.

گامبور در طبیعت پدیده ای معمول و تأیید شده می باشد. بنظر می رسد که دلیل توجیهی برای این تناقضات در تعیین هویت جدایه های ویروس عمدتاً بازآرایی ژنتیکی باشد که یک قطعه آن متعلق به ویروس های فوق حاد و قطعه دیگر متعلق به ویروس ها غیر فوق حاد باشد. شاخص ترین نمونه در بین این ۶ جدایه مربوط به شماره ۲۹ می باشد، که در مطالعه قبلی نیز به این موضوع اشاره شده بود. اما برای این که هویت فوق حاد این ویروس ها تأیید یا رد گردد، ضروری است که در کنار توجه به بیماریزایی ویروس در شرایط فیلد، تست های پاتوژنسیته در شرایط آزمایشگاهی نیز انجام گیرد (۶، ۱۵، ۲۲، ۲۴). بیماری زایی ویروس در فارم و بروز تلفات در گله وابسته به فاکتورهای متعددی از جمله وضعیت ایمنی گله، وضعیت بهداشتی و مدیریتی مزرعه، حضور عوامل استرس زا و عوامل دیگری است که پاسخ پرنده را نسبت به عامل آسیب رسان تحت تاثیر قرار می دهند (۲۲، ۲۳). لذا تست های آزمایشگاهی تعیین پاتوژنسیته معرف دقیق تری از هویت ویروس می باشند. این تناقضات تأکید مجدد بر روی این مساله است که VP2 تنها عامل تعیین کننده حدت در ویروس گامبور نمی باشد و مارک های دیگر روی پروتئین های دیگر نیز در حدت ویروس نقش دارند. تحقیقات متعددی که بخشی از آن ها نیز در این مطالعه ذکر شده نشان داده اند که VP1 نیز مارک هایی دارد که در بروز حدت در ویروس نقش دارند (۳، ۱۶، ۲۴، ۲۷).

در مجموع می توان چنین نتیجه گیری نمود که بروز پدیده بازآرایی در ویروس های بورس عفونی پدیده ای طبیعی بوده که می تواند زمینه ساز پیدایش ویروس های فوق حاد در طبیعت باشد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با استفاده از اعتبارات پژوهشی شورای پژوهشی دانشگاه تهران (۷۵۰۸۰۰۷/۶/۹) انجام شده است.



- T., Woolcock, P. R., Crossley, B. M., Hietala, S. K., Charlton, B. R. (2009) Characteristics of a very virulent infectious bursal disease virus from California. *Avian Dis.* 53: 592-600.
11. Jackwood, D. J., Spalding, B. D., Sommer, S. E. (2003) Real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction detection and analysis of nucleotide sequences coding for a neutralizing epitope on infectious bursal disease viruses. *Avian Dis.* 47: 738-744.
12. Kataria, R. S., Tiwari, A. K., Butchaiah, G., Kataria, J. M., Skinner, M. A. (2001) Sequence analysis of the VP2 gene hypervariable region of infectious bursal disease viruses from India. *Avian Pathol.* 30: 501-507.
13. Kocher, T. D., Thomas, W. K., Meyer, A., Edwards, S. V., Paabo, S., Villablanca, F. X., Wilson, A. C. (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolutionary in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 6196-6200.
14. Kong, L. L., Omar, A. R., Bejo, M. H., Ideris, A., Tan, S. W. (2009) Development of SYBR green I based one-step real-time RT-PCR assay for the detection and differentiation of very virulent and classical strains of infectious bursal disease virus. *J. Virol. Methods.* 161: 271-279.
15. Le Nouen, C., Rivallan, G., Toquin, D., Darlu, P., Morin, Y., Beven, V., de Boisseson, C., Cazaban, C., Comte, S., Gardin, Y., Etteradossi, N. (2006) Very virulent infectious bursal disease virus: reduced pathogenicity in a rare natural segment-B reassorted isolate. *J. Gen. Virol.* 87: 209-216.
16. Liu, M., Vakharia, V. N. (2004) VP1 protein of infectious bursal disease virus modulates the virulence in vivo. *Virology.* 330: 62-73.
17. Müller, H., Islam, M., Raue, R. (2003) Research on infectious bursal disease -the past, the present and the future. *Vet. Microbiol.* 97: 153-165.
18. Razmyar, J., Peighambari, S. M. (2008) Molecular characterization of Iranian infectious bursal disease viruses. *Avian Dis.* 52: 665-669.
19. Razmyar, J., Peighambari, S. M. (2008) Rapid differentiation between very virulent and classical infectious bursal disease viruses isolated in Iran by RT-PCR/REA. *Int. J. Vet. Res.* 2: 111-117.
20. Ritchie, P. A., Anderson, I. L., Lambert, D. M. (2003) Evidence for specificity of psittacine beak and feather disease viruses among avian hosts. *Virology.* 306: 109-115.
21. Sapats, S. I., Ignjatovic, J. (2002) Restriction fragment length polymorphism analysis of the VP2 gene of Australian strains of infectious bursal disease virus. *Avian Pathol.* 31: 559-566.
22. van den Berg, T. P. (2000) Acute infectious bursal disease in poultry: a review. *Avian Pathol.* 29: 175-194.
23. van den Berg, T. P. (2008) Birnaviridae. In *Poultry Diseases*. Edited by M Pattison, P McMullin, J Bradbury, and DJ Alexander. (6th ed.) Elsevier Publication, Philadelphia, USA. p. 359-366.
24. Wei, Y., Li, J., Zheng, J., Xu, H., Li, L., Yu, L. (2006) Genetic reassortment of infectious bursal disease virus in nature. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 350: 277-287.
25. Wei, Y., Yu, X., Zheng, J., Chu, W., Xu, H., Yu, X., Yu, L. (2008) Reassortant infectious bursal disease virus isolated in China. *Virus Res.* 131: 279-282.
26. Yamaguchi, T., Ogawa, M., Miyoshi, M., Inoshima, Y., Fukushi, H., Hirai, K. (1997) Sequence and phylogenetic analyses of highly virulent infectious bursal disease virus. *Arch. Virol.* 142:1441-1458.
27. Yu, F., Qi, X., Yuwen, Y., Wang, Y., Gao, H., Gao, Y., Qin, L., Wang, X. (2010) Molecular characteristics of segment B of seven very virulent infectious bursal disease viruses isolated in china. *Virus Genes.* 41: 246-249.
28. Zierenberg, K., Raue, R., Nieper, H., Islam, M., Etteradossi, N., Toquin, D., Müller, H. (2004) Generation of serotype 1/serotype 2 reassortant viruses of the infectious bursal disease virus and their investigation in vitro and in vivo. *Virus Res.* 105: 23-34.



IDENTIFICATION OF VERY VIRULENT INFECTIOUS BURSAL DISEASE VIRUSES BY RT-PCR OF *VP1* GENE AND SPECULATION ABOUT THE POSSIBLE PRESENCE OF REASSORTANT VIRUSES

Ghaniei, A.¹, Peighambari, S.M.^{1*}, Razmyar, J.²

¹Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.

²Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

(Received 18 October 2010 , Accepted 10 April 2011)

Abstract:

Infectious bursal disease virus (IBDV) genome is a bi-segmented RNA virus that encodes five viral proteins. The need for the development of a simple and rapid method to differentiate the IBDVs has prompted researchers to work on different viral proteins of these viruses. At the present study, an attempt was made to amplify a 715 bp fragment of *VP1* gene by RT-PCR of 26 IBDV isolates that their virulence pattern had been previously determined by RT-PCR/REA of *VP2* gene. The results showed that in 20 (76%) IBDV isolates, the virulence pattern (very virulent IBDV) were found to be identical using either RT-PCR of *VP1* or RT-PCR/REA of *VP2*. However, in the remaining six IBDV isolates the results were different. Considering the available farm data from the viruses of this study which are in accordance with results on *VP1*, it is speculated that this finding may be due to the presence of reassortant IBDVs. These findings also indicate that the *VP2* is not the sole determinant for the virulence in IBDV.

Key words: Infectious bursal disease virus, reassortant, *VP1*, RT-PCR.

*Corresponding author's email: mpeigham@ut.ac.ir, Tel: 021-61117150, Fax: 021-66933222