مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۸۶، دوره ۶۲، شماره ۵، ۲۷۶ - ۲۷۳

تشخیص سروتیپ ماساچوست ویروس برونشیت عفونی طیور با روش RT-PCR

سیدعلی قرشی [1]* ترانه حاجیان [1]

۱) گروه میکروبیولوژی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران - ایران.

(دریافت مقاله: ۱۶ فروردین ماه ۱۳۸۴، پذیرش نهایی: ۹ بهمن ماه ۱۳۸۴)

چکیده

بهینه RT-PCR به منظور تشخیص ویروس برونشیت عفونی طیور و تشخیص سروتیپ ماساچوست، دوآزمایش استفاده‌گردیده است. پس از استخراج S-1 سازی‌گردید. در این آزمایشات از دو جفت پرایمر اختصاصی از ژن از نمونه‌های بافتی طیور واکسینه‌شده و همچنین نمونه‌های بافتی کلینیکی از موارد مشکوک به برونشیت RNA عفونی، ابتدا وجود ژنوم ویروس وسپس سروتیپ ویروس در این نمونه‌ها تشخیص داده‌شد. با تعیین ردیف تکثیر شده مربوط به قسمتی از ژنوم ویروس می‌باشد و DNA نشان داده‌شد که PCR نوکلئوتیدی محصولات لذا اختصاصی بودن آزمایش مورد تایید قرارگرفت. این آزمایش در تشخیص ویروس برونشیت عفونی طیور بسیار اختصاصی عمل می‌نماید. با تعیین سکانس قطعه تکثیر شده یا محصول PCR قادر به شناسایی اختلافات ژنتیکی PCR اختصاصی عمل می‌نماید. با تعیین سکانس قطعه تکثیر شده یا محصول موجود بین تحت تیپ‌های مختلف سروتیپ ماساچوست خواهیم بود.

واژه‌های کلیدی: ویروس برونشیت عفونی طیور- RT-PCR- تشخیص سروتیپ ماساچوست.

مقدمه

ویروس برونشیت عفونی طیور متعلق به خانواده کرونا ویروس‌ها می‌باشد که ژنوم آن به صورت RNA تک رشته‌ای است و اندازه آن تقریباً ۲۷/۶ کیلو باز می‌باشد. ویروس برونشیت عفونی باعث یک بیماری حاد سیستم تنفسی و ادراری - تناسلی شده و فوق العاده مسری است. در اثر آلودگی طیور گوشتی، تخم‌گذار و مرغ‌های مادر به این ویروس خسارات اقتصادی فراوانی به مرغدار و صنعت مرغداری وارد خواهد شد. تنها راه پیشگیری از بیماری اعمال واکسیناسیون با سویه مناسب و رعایت اصول بهداشتی است(King و Cavanagh در سال ۱۹۹۱). ویروس برونشیت عفونی دارای چندین سروتیپ می‌باشد. تاکنون بیشتر از ۲۰ سروتیپ مختلف از این ویروس در دنیا گزارش شده است(Calvin و همکاران در سال ۱۹۹۸). معمولاً واکسیناسیون با یک سروتیپ ایمنیت متقاطع کمی در مقابل سایر سروتیپ‌ها ایجاد می‌نماید(King و Cavanagh در سال ۱۹۹۱). لذا در یک برنامه کنترل بیماری با استفاده از واکسیناسیون، ابتدا باید سروتیپ و یا سروتیپ‌های غالب و تحت تیپ‌های شایع ویروس در فیلد شناسایی و برآن اساس واکسن مناسب تهیه و مصرف گردد. اختلاف در سروتیپ‌های مختلف ویروس به علت تغییراتی است که در توالی اسیدهای آمینه گلیکوپروتئین S(Spike protein) وجود دارد. پروتئین S در سطح پوششی قرار دارد. قسمتی از این پروتئین به نام S-1 مسئول اتصال ویروس به سلول هدف خود می‌باشد و آنتی‌بادی تولید شده بر علیه آن خاصیت خنثی کنندگی ویروس را دارد. قسمتی از ژنوم ویروس که کدکننده پروتئین S-1 است بیشترین تغییرات را در بین سروتیپ‌های مختلف دارا است و دارای یک منطقه بسیار متغیر می‌باشد(Kwon و همکاران در سال ۱۹۹۳، Jackwood و همکاران در سال ۱۹۹۷). از روش‌های مختلف آزمایشگاهی برای تشخیص سروتیپ‌های مختلف ویروس استفاده شده است. آزمایش خنثی کنندگی ویروس یا Virus Neutralization Test بسیار دقیق است ولی مدت زیادی طول خواهد کشید تا نتایج آن قابل دسترسی باشد و به علاوه احتیاج به امکانات کشت سلولی دارد. تشخیص سروتیپ‌ها بوسیله آزمایش Inhibition Hemagglutination (HI) با سرعت بیشتری قابل انجام است اما بروز واکنش‌های متقاطع باعث کاهش اختصاصی بودن این روش می‌گردد(Calvin و همکاران در سال ۱۹۹۸). به علاوه از آنتی‌بادی مونوکلونال و روش RELP-RT-PCR نیز در این ارتباط استفاده شده است(Kwon و همکاران در سال ۱۹۹۳). سروتیپ ویروس برونشیت عفونی طیور در ایران از نوع ماساچوست می‌باشد. واکسن مورد استفاده نیز از همین سروتیپ است(بزرگمهری فرد در سال ۱۳۶۴). بروز کانون‌های متعدد بیماری در دو سال گذشته ممکن است به دلیل بروز تحت تیپ جدیدی از این سروتیپ باشد. جداسازی ویروس برونشیت عفونی طیور از گله‌های صنعتی ایران در تخم مرغ جنین‌دار و شناسایی آن با میکروسکوپ الکترونی و VN نشان داده است که احتمالا واریانت جدیدی از ویروس در اثر بروز موتاسیون ژنتیکی ایجاد شده است(Momayez و همکاران در سال ۲۰۰۲). اخیراً گزارشی از شناسایی سویه ۴/۹۱ این ویروس در مرغداری‌های کشور منتشر شده است(نوری و همکاران در سال ۱۳۸۲). ضمنا در گزارش دیگری با استفاده روش RT-PCR-RFLP، جدایه‌های این ویروس که از مرغداری‌های گوشتی و تخم‌گذار در ایران جدا شده بودند و مقایسه آنها با سویه‌های رفرانس، ویروس B793 شناسایی شده است(اکبری آزاد و همکاران، ۱۳۸۳). در تحقیق حاضر سعی گردیده با استفاده از روش RT-PCR و با به کارگیری پرایمرهای اختصاصی ویروس برونشیت، تشخیص ویروس در نمونه‌های بافتی با سرعت و حساسیت زیاد انجام پذیرد. همچنین با استفاده از همین روش و با به کارگیری پرایمرهای اختصاصی سعی گردیده تا شناسایی سروتیپ ماساچوست ویروس ممکن گردد. در نهایت می‌توان با استفاده از تعیین ردیف نوکلوتیدی ژن S-1 تحت تیپ ویروس فیلد و یا تحت تیپ‌های جدید ویروس را در سروتیپ ماساچوست

*) نویسنده مسؤول: تلفن: ۰۲۱-۴۴۵۸۰۳۸۶ نمابر: ۰۲۱-۴۴۵۸۰۳۹۹ Email:alig@nrcgeb.ac.ir

شناسایی کرد.

مواد و روش کار

ویروس برونشیت: به منظور بهینه‌سازی آزمایش از ویروس H120 واکسن برونشیت طیور ساخت موسسه رازی به عنوان منبع ویروس استفاده گردیده است.

واکسیناسیون طیور با واکسن H120: تعداد ۵ قطعه جوجه SPF ۱۰ روزه از طریق آشامیدنی با واکسن H120 واکسینه گردیدند. دو جوجه SPF نیز به عنوان کنترل به جای واکسن، آب مقطر دریافت نمودند. پس از ۴ روز بافتهای نای و ریه تمامی جوجه‌های مورد آزمایش جمع‌آوری و تا موقع آزمایش در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردید.

استخراج RNA ویروس: بافتهای ریه و نای جوجه‌های واکسینه و غیر واکسینه و همچنین از نمونه‌های بافتی کلینیکی (ریه و نای)، به طور جداگانه در هاون چینی هموژن گردیدند. از ۳۰۰ میکرولیتر بافت هموژن شده و یا واکسن برونشیت به شرح زیر استخراج RNA به عمل آمد. به طور خلاصه، یک میلی لیتر از محلول RNAfast (شرکت ژن فناوران، ایران) به هموژن تهیه شده اضافه گردید. مخلوط حاصل به مدت ۵ دقیقه در درجه حرارت آزمایشگاه نگهداری شد. سپس بوسیله کلروفرم فاز آلی جدا و RNA بوسیله محلول ایزوپروپانل رسوب داده شد. پس از شستشوی رسوب RNA با اتانل ۷۵ درصد رسوب RNA در ۲۰ میکرولیتر آب مقطر ($DEPC\text{-}dH_2O$) حل گردید.

آزمایش RT-PCR: در آزمایش RT، ساخت اولین رشته cDNA در حجم ۴۰ میکرولیتر به مدت یکساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انجام گردید. این واکنش حاوی ۴ ماکرولیتر از RNA استخراج شده (۲ـ۵/۰ میکروگرم)، ۲۵۰ نانوگرم از پرایمر Random hexamers، ۱۰ میلی مولار از هر یک از dNTPها، ۴۰ واحد Rnase Inhibitor، ۴۰ واحد آنزیم Reverse Transcriptase (M-MuLV) و ۸ میکرولیتر از بافر آنزیم RT حاوی $3mM\ MgCl_2$, 10mM dithiothreitol, 50mM Tris-HCL (pH=8.3), 75mM KCL می‌باشد. نهایتاً نمونه‌های مورد آزمایش به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۰ درجه سانتیگراد حرارت داده شدند. دو آزمایش مختلف PCR به طور جداگانه و هر یک در حجم ۵۰ میکرولیتر انجام پذیرفت. در آزمایش اول تشخیص ویروس در نمونه و در آزمایش دوم تشخیص سروتیپ ویروس مورد مطالعه قرار گرفت. هر آزمایش حاوی ۵ میکرولیتر از محصول RT، بافر PCR حاوی ۱۰ mM Tris-HCL (pH=8.8), 50mM KCl, 1.5mM MgCl2 و همچنین ۲ میلی مولار از هر یک از dNTPها، ۲۵۰ نانوگرم از هر یک از پرایمرهای دژنراتیو اختصاصی برای تشخیص ویروس (CK4-Forward 5-TCAAAGCTTCANGGNGGNGCNTA-3) و (CK2-Reverse 5-CTCGAATTCCNGTRTTRTAYTGRCA-3) در نمونه و یا پرایمرهای اختصاصی برای تشخیص سروتیپ ماساچوست (Mass-Forward 5- GATGGGTGTCCTATAACTGGCATGC-3) و CK2-Reverse (کلیه این پرایمرها توسط Calvin و همکاران در سال ۱۹۹۸ قبلا گزارش شده است) و ۲/۵ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase می‌باشد. واکنش با استفاده از دستگاه Thermocycler (Corbett Research, Australia) و با برنامه حرارتی ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه (یک سیکل)، ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه، ۵۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه (۳۰ سیکل) و نهایتاً ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه (یک سیکل) انجام گردید. نمونه کنترل منفی (نمونه بافت ریه و نای جوجه SPF) نیز همزمان مورد آزمایش قرار گرفت. در انتهای آزمایش محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز و پس از رنگ آمیزی با محلول اتیدیوم بروماید، نتایج با استفاده از اشعه UV بررسی شد.

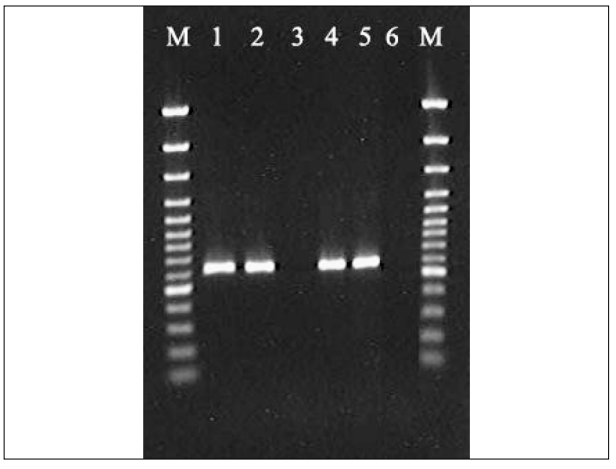
تعیین ردیف نوکلئوتیدی محصول PCR: محصول PCR ابتدا توسط کیت High pure PCR Product Purification Kit (شرکت Roche) از پرایمرها و نمکهای موجود در آن جدا گردید. سپس نمونه خشک و به روش sequencing Direct توسط شرکت MWG-Biotech در آلمان تعیین توالی و در بانک ژن ثبت گردید.

نتایج

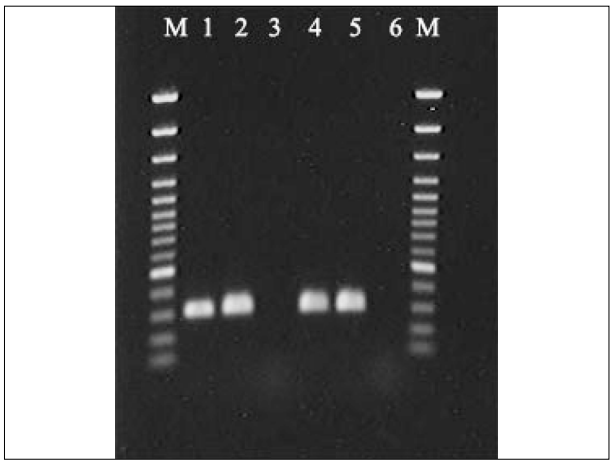
در آزمایش تشخیص ویروس در نمونه بافت ریه و نای و همچنین واکسن، قطعه‌ای به طول ۶۰۰ جفت باز (bp) تکثیر گردید (تصویر ۱). نتیجه سکانس محصول RT-PCR در بانک ژن ثبت گردید که با کد AY954694 قابل دستیابی است و با توجه به سکانس ویروس موجود در بانک ژن، اندازه این قطعه مورد انتظار و صحیح می‌باشد و تکرار آزمایش در دفعات مکرر نشان داد که نتایج تکرار پذیر می‌باشند. در آزمایش PCR مربوط به تشخیص سروتیپ ویروس، یک جفت پرایمر مربوط به سروتیپ ماساچوست مورد استفاده قرار گرفت و قطعه‌ای به طول ۳۵۵ جفت باز (bp) تکثیر گردید (تصویر ۲) که با توجه به سکانس موجود در بانک ژن همان قطعه مورد انتظار می‌باشد. با توجه به آنکه ویروس واکسن H120 مورد استفاده متعلق به سروتیپ ماساچوست است، نتایج آزمایش مورد تائید قرار گرفت. در مورد نمونه‌های کلینیکی نیز در نمونه‌هایی که نتیجه کشت آنها در تخم مرغ جنین دار مثبت بود در آزمایش RT-PCR، باند DNA مورد نظر تکثیر یافت (تصویر ۲).

بحث

تنوع ژنتیکی در بین کرونا ویروس‌های طیور و اهمیت آن در اپیدمیولوژی بیماری برونشیت عفونی از سال ۱۹۵۶ شناخته شده است (Jungherr و همکاران در سال ۱۹۵۶). بروز اختلافات ژنتیکی در ژن S-1 که کدکننده گلیکوپروتئین ویروسی است یک مکانیسم سازگاری ویروس است که در رابطه با فشار انتخابی سیستم ایمنی طیور بوده و آن نیز براثر واکسیناسیون‌های زیاد بوجود آمده است (Gelb و همکاران در سال ۱۹۹۷). به همین دلیل تاکنون بیش از ۲۰ سروتیپ ویروسی شناسایی شده و واریانت‌های جدید هر چند وقت یک بار بروز می‌کنند (Calvin و همکاران در سال ۱۹۹۸). لذا تشخیص دقیق و سریع سروتیپ ویروس عامل مهمی در کنترل بیماری برونشیت عفونی است. در این مطالعه پرایمرهای مورد استفاده برای تشخیص ویروس مربوط به منطقه‌ای از ژن S-1



تصویر ۱- آزمایش RT-PCR برای تشخیص ویروس برونشیت عفونی طیور در نمونه واکسن و بافت وتکثیر قطعه ۶۰۰ جفت بازی در نمونه‌های مثبت (در ژل آگارز ۱درصد).
ستون M: مارکر DNA(Molecular weight marker ladder 100)
ستون ۱: تشخیص ویروس در نمونه واکسن برونشیت عفونی طیور
ستون ۲: تشخیص ویروس در نمونه بافت(ریه ونای) طیور واکسینه
ستون ۳: آزمایش نمونه بافت(ریه ونای) طیور غیر واکسینه(کنترل منفی)
ستون ۴ و۵: تشخیص ویروس در نمونه بافت کلینیکی(ریه ونای)
ستون ۶: آزمایش نمونه بافت(ریه ونای) طیور SPF(کنترل منفی)



تصویر ۲- آزمایش RT-PCR برای تشخیص سروتیپ ماساچوست در نمونه واکسن و بافت وتکثیر قطعه ۳۵۵ جفت بازی در نمونه‌های مثبت (در ژل آگارز ۱درصد).
ستون M: مارکر DNA(Molecular weight marker ladder 100)
ستون ۱: تشخیص سروتیپ ویروس در نمونه واکسن برونشیت عفونی طیور
ستون ۲: تشخیص سروتیپ ویروس در نمونه بافت(ریه ونای) طیور واکسینه
ستون ۳: آزمایش نمونه بافت(ریه ونای) طیور غیر واکسینه(کنترل منفی)
ستون ۴ و۵: تشخیص سروتیپ ویروس در نمونه بافت کلینیکی(ریه ونای)
ستون ۶: آزمایش نمونه بافت(ریه ونای) طیور SPF(کنترل منفی)

است که توالی نوکلوتیدی آن در بین سروتیپ‌های مختلف ویروس مشابه است(Calvin وهمکاران درسال ۱۹۹۸). لذا شناسایی ویروس از هرنوع سروتیپ شناخته شده را ممکن می‌سازد. پرایمرهای مورد استفاده در تشخیص هر سروتیپ خاص نیز مربوط به منطقه‌ای از ژن S-1 می‌باشند(Calvin وهمکاران درسال ۱۹۹۸) که با سروتیپ‌های دیگر مختلف بوده و اختصاصاً مربوط به همان سروتیپ می‌باشند و لذا این پرایمرها تفریق سروتیپ ماساچوست ویروس را امکان پذیر می‌نماید. امکان تفریق تحت تیپ‌های ویروس برونشیت با استفاده از روش هضم آنزیمی نیز وجود دارد(اکبری آزاد و همکاران در سال ۱۳۸۳، Moscoso و همکاران در سال ۲۰۰۵، Lee و همکاران در سال ۲۰۰۴). تشخیص ویروس برونشیت عفونی طیور با روش RT-PCR این امکان را فراهم می‌آورد تا با سرعت و دقت بیشتری بتوان عامل بیماری را در نمونه‌های بافتی مشکوک تشخیص داد. به علاوه با تشخیص سروتیپ یا سروتیپ‌های شایع در کانون‌های بیماری می‌توان از واکسنی که از سروتیپ مناسب ویروس باشد استفاده نمود و یا موسسات واکسن سازی می‌توانند در جهت ساخت واکسن از واریانت‌های جدید اقدام نمایند. مهم‌ترین قابلیت این روش آن است که با تعیین توالی نوکلوتیدی محصول PCR می‌توان به اختلافات ویروسهای یک سروتیپ خاص نیز پی برد. در آزمایشات تکمیلی از نمونه‌های بافتی کلینیکی، تشخیص ژنوم ویروس برونشیت عفونی طیور در ریه و نای طیور آلوده تشخیص داده شد. در این نمونه‌ها حضور ویروس در ۳ کشت ویروس در تخم مرغ جنین‌دار هم مثبت شده است. از طرفی باید دقت نمود که تهیه و ارسال نمونه در تشخیص ژنوم ویروس نقش مهمی دارد زیرا به علت تک رشته‌ای بودن RNA ویروس، ژنوم آن در مقابل عوامل محیطی بسیار حساس می‌باشد. تاخیر در ارسال و یا شرایط بد نگهداری نمونه باعث لیز شدن سلولهای بافتی، تخریب RNA ویروس و نهایتاً تاثیر منفی در خالص‌سازی RNA ویروس خواهد داشت. با توجه به حساسیت زیاد روشهای مولکولی در تشخیص ویروسها، از روش RT-PCR می‌توان در شناسایی ویروس برونشیت عفونی طیور استفاده نمود. به علاوه با تعیین سکانس محصول PCR و مقایسه آن با اطلاعات موجود در بانک ژن اختلافات ژنتیکی موجود بین سویه‌های مختلف مشخص خواهد شد.

References

1. Akbari Azad, G., Vasfi Marandi, M., Keyvani,H.(2004) Isolation and molecular characterization of infectious bronchitis virus in Iranian poultry farms. J. Fac. of Vet. Med. Univ. Tehran. 59:259-264.
2. Bozorgmehrifard, M.H.(1985) Poultry Diseases, Nutritional disorders, Bacterial and Viral Infectious Diseases, First Ed., Jahad Daneshgahi publications. pp.333-346.
3. Calvin, L., Keeler, Jr., Karen, L., Reed, W., Nix, A., and Gelb, J.Jr.(1998) Serotype identification of avian infectious bronchitis virus by RT-PCR of the peplomer(S-1) gene. Avian Diseases 42:275-284.
4. Gelb, J., Jr., C.L. Keeler.Jr., Nix, W.A, Rosenberger,

J.K., and Cloud, S.S.(1997) Antigenic and S-1 genomic characterization of the Delaware variant serotype of infectious bronchitis virus. Avian Diseases. 41:661-669.

5. Jackwood, M.W., Yousef, N.M.H., Hilt, D.A.(1997) Further development and use of a molecular serotype identification test for infectious bronchitis virus. Avian Diseases. 41:105-110.
6. Jungherr, E.L., Chomiak, T.W., Luginbuhl, R.E.(1956) Immunological differences in strains of infectious bronchitis virus. In: Proceedings of the 60th U.S.Livestock Sanitary Association, Chicago, IL.pp.203-209.
7. King, D.J., Cavanagh, D.(1991) Infectious Bronchitis. In: Diseases of Poultry, 9 th ed. B. W. Calnek, H. J. Barens, C.W. Beard, W.M. Reid and H.W.Yoder, Jr.,eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa. pp.471-481.
8. Kwon, H.M., Jackwood, M.W., Gelb, J.Jr.(1993) Differentiation of infectious bronchitis virus serotypes using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. Avian Diseases. 37:194-202.
9. Lee, S.K., Sung, H.W., Kwon, H.M.(2004) S1 glycoprotein gene analysis of infectious bronchitis viruses isolated in Korea. Arch Virol. 149:481-494.
10. Momayez, R., Pourbakhsh, S.A., Khodashenas, M., Banani, M.(2002) Isolation and identification of infectious bronchitis virus from commercial chickens. Arch. Razi. 53: 1-10
11. Moscoso, H., Raybon, E.O., Thayer, S.G., Hofacre, C.L.(2005) Molecular detection and serotyping of infectious bronchitis virus from FTA filter paper. Avian Diseases. 49: 24-29.
12. Nouri, A., Assasi, K., Seyfi-abad Shapouri, M.R.(2003) Field study of infectious bronchitis virus in broiler using type-specific RT-PCR. Arch. Razi. 55: 1-9.

J.Vet.Res. 62,5:273-276,2007

DETECTION OF AVIAN INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS AND MASSACHUSETTS SEROTYPE BY RT-PCR

Ghorashi, S.A.[1]*, Hajian, T.[1]

[1]*Department of Microbiology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran-Iran.*

(Received 5 April 2005 , Accepted 29 January 2006)

Abstract:

The aim of the present study was using RT-PCR for the diagnosis of avian infectious bronchitis virus and Massachusetts serotype in tissue samples. Optimization of a molecular diagnostic method for the detection of avian bronchitis virus and identification of Massachusetts serotype was investigated. In order to detect infectious bronchitis virus (IBV) in tissue samples, an RT-PCR was optimized. Specific primers from conserved region of all known IBV serotypes were used in the first PCR assay. Specific primers for the identification of Massachusetts serotype were selected from S-1 gene of the virus in the second PCR reaction. The S-1 gene is a hypervariable region among IBV serotypes; therefore, the amplification of this region is important for serotype identification. Viral RNA was extracted from vaccine and tissue samples from vaccinated and clinical tissue samples of suspected birds. After construction of cDNA, two PCR assays were performed. In the first RT-PCR, detection of virus in test samples was investigated and in the second PCR, Massachusetts serotype was identified. To identify the specificity of the test, PCR amplicons were sequenced. In the first reaction, the IBV was detected in the samples and a 600 bp fragment was amplified. In the second PCR, a 355 bp fragment was amplified from S-1 gene, which confirmed the detection of Massachusetts serotype. In clinical samples, the IBV was also detected. The specificity of the test was confirmed by sequencing of PCR products. Sequence data were submitted to the GenBank which could be accessible by AY954694 number. The RT-PCR is a specific assay for the detection of IBV. Detection of IBV and identification of genetic differences among IBV subtypes in Massachusetts serotype would be possible by sequencing of amplified products.

Key words: infectious bronchitis virus, RT-PCR, Massachusetts serotype detection.

***Corresponding author's email: alig@nrcgeb.ac.ir, Tel: 021-44580386, Fax: 021-44580399**