

تفکیک سویه‌های ویروس بیماری بورس عفونی جدا شده از گله‌های طیور ایران به وسیله آنالیز منحنی ذوب با دقت بالا (High Resolution Melt)

مهدی چراغچی باشی^۱ سید مصطفی پیغمبری^{۱*} حسین حسینی^۲

(^۱) گروه بیماری‌های طیور، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران
(^۲) گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، کرج، ایران

(دریافت مقاله: ۱۵ اسفند ماه ۱۳۹۵، پذیرش نهایی: ۷ اردیبهشت ماه ۱۳۹۶)

چکیده

زمینه مطالعه: بیماری بورس عفونی (Infectious bursal disease, IBD) بیماری با واگیری بسیار بالا در طیور جوان است. برای صنعت طیور، تمایز بین جدایه‌های کلاسیک حاد و فوق حاد ویروس IBD اهمیت زیادی دارد تا برنامه مناسبی برای واکسیناسیون اتخاذ شود. تست‌های سرولوژیک و مولکولی معمول بسیار پرزحمت، زمان بر و از نظر حساسیت متغیر می‌باشند. این در حالی است که منحنی ذوب با دقت بالا روشی نسبتاً سریع می‌باشد. هدف: این مطالعه برای تعیین میزان کارائی روش منحنی ذوب با دقت بالا برای تفریق جدایه‌های مختلف بر روی تعدادی از جدایه‌های ایرانی ویروس IBD که قبلاً ماهیت آن‌ها با استفاده از روش آنالیز RT-PCR/RFLP (با استفاده از پرایمرهای پروتئین VP2) و آنالیز سکناس برای ما مشخص بود، طراحی شد. روش کار: در این مطالعه از جدایه‌های ویروس IBD برای آزمون بررسی ذوب با دقت بالا در محدوده دمایی ۸۱ تا ۹۲ پس از انجام استخراج RNA و رونوشت برداری معکوس و Real Time RT-PCR استفاده شد. نتایج: با بررسی منحنی ذوب، ویروس‌های آزمایش شده در چهار گروه A-D دسته بندی شدند. سه سویه واکسینال DVA، Bursa CE و Gumbokal در گروه A، واکسن IBD L در گروه B، سویه واکسینال Bursine ۲ در گروه C و تمامی ویروس‌های فیلد در گروه D قرار گرفتند. آنالیز نتایج منحنی ذوب با دقت بالا پس از نرمال کردن نیز نشان داد که ویروس‌های این مطالعه در چهار گروه ژنوتیپی HRM قرار گرفتند و سه ویروس DVA، Bursa CE و Gumbokal منحنی مشابه هم و غیر قابل تفکیک از هم ایجاد کردند. اما از سایر واکسن‌ها یا سویه‌های فیلد متمایز بودند. همچنین دو سویه IBD L و Bursine ۲ دارای دو منحنی متفاوت و متمایز از سایر ویروس‌ها بودند. نتیجه گیری نهایی: از مطالعه کنونی می‌توان نتیجه گرفت که تکنیک بررسی منحنی real-time RT-PCR HRM روشی مقرون به صرفه و قابل اعتماد در بین روش‌های مورد استفاده در حال حاضر است و به منظور شناسایی حدت جدایه‌های جدید ویروس بورس عفونی می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: بیماری بورس عفونی، آنالیز منحنی ذوب با دقت بالا، Real Time RT-PCR، طیور

مقدمه

است که استفاده از ترکیب RT/PCR دو آنزیم محدود شونده توانایی تشخیص میان سویه‌های حاد کلاسیک و فوق حاد را دارند (۳۷). حضور vvIBDV در ایران در مطالعات بسیار اثبات شده است (۱۰، ۱۷، ۱۸، ۲۱). استفاده از RT-PCR/RFLP بر روی ژن VP2 جهت تشخیص ویروس‌های بیماری بورس عفونی و تشخیص تفریقی ویروس حاد کلاسیک و فوق حاد بیماری بورس عفونی به کار می‌رود. همچنین پروتکل تکثیر ژن VP1 در سال‌های اخیر بیان شده است (۲۵). جهت شناسایی سویه‌های کلاسیک ویروس بیماری بورس عفونی از ویروس بسیار بیماریزا یک آزمون ساده RT-PCR بر مبنی ژن VP1 طراحی شده که در آن هیچ آنزیم محدود کننده‌ای استفاده نشده است (۱). در مطالعات قبلی ما بر روی ژن VP2 بر روی ویروس بیماری بورس عفونی که از نمونه‌های گله‌های آلوده ایران به دست آمده بود، تفریق سویه‌های ویروس کلاسیک حاد و فوق حاد بورس عفونی به واسطه RT-PCR/RFLP انجام شد و نتایج مطالعه اخیر را اثبات نمود (۱۷، ۱۸). سپس ما این نتایج این مطالعه را به واسطه الگوی بسیار بیماریزای ویروس‌های مزرعه بورس عفونی با استفاده از تکثیر ژن VP1 بدون استفاده از آنزیم محدود کننده تأیید نمودیم (۶).

بیماری بورس عفونی (Infectious bursal disease, IBD) یا گامبورو بیماری با واگیری بسیار بالا در طیور جوان است در سراسر دنیا در طیور گسترش یافته است (۵). پروتئین اصلی ایمونوژنیک در ویروس بیماری بورس عفونی VP2 است (۱۶). سویه‌های ویروس بیماری بورس عفونی فوق حاد (very virulent IBD, vvIBDV) که در اواخر دهه ۱۹۸۰ در گله‌های طیور اروپا شناسایی شدند و به تدریج در سراسر دنیا به جز امریکای شمالی و استرالیا گسترش یافتند از لحاظ آنتی ژنی بسیار مشابه سویه‌های کلاسیک می‌باشند ولی بیماری زایی و تلفات بسیار بالاتری در گله‌های آلوده را باعث می‌شوند (۲۶، ۲۰). جهت تعیین برنامه مناسب واکسیناسیون، تشخیص میان ویروس حاد کلاسیک (Classical Virulent) و ویروس فوق حاد (vvIBDV) عامل بیماری بورس عفونی در صنعت طیور بسیار با اهمیت می‌باشد. آزمون‌های آزمایشگاهی سرمی جهت تشخیص تفریقی میان این سویه‌ها وقت گیر بوده و حساسیت بالایی هم ندارند اگر چه آزمون الایزا با استفاده از پانل آنتی بادی‌های مونوکلونال جهت تشخیص میان سویه‌های ویروس سروتیپ ۱ به کار رفته است (۵). نشان داده شده



ژن VP۲ تمامی ده ویروس مذکور در گروه vIBD قرار می‌گیرند. از پنج واکسن تجاری موجود در کشور ساخت شرکت‌های مختلف خارجی نیز (Lohmann و Intervet، Ceva، Fort Dodge، Veterina) بعنوان سویه‌های Intermediate Plus و Intermediate استفاده شد. نمونه‌های بورس فابریسیوس از مناطق مختلف ایران و از گله‌های مشکوک به بیماری گامبورو اخذ شده بودند. بخشی از هر نمونه بورس فابریسیوس منجمد شده بطور مجزا درهاون چینی استریل قرار داده و پس از بیرون آمدن از حالت انجماد توسط قیچی به قطعات ریز برش داده شد. پس از له کردن نمونه ریز شده و افزودن ۵ برابر وزن نمونه با بافر TNE (۱۰ mM EDTA، ۱۰۰ mM NaCl، ۱۰۰ mM Tris HCL و محتویات ۱۰ ویال پنی سیلین و استرپتومایسین ۱+۱)، بافت هموزنیزه شده مربوط به هر فارم شماره گذاری شد. سپس یک میلی لیتر آن به میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری عاری از RNAase و DNAase منتقل شد و سه بار در دمای °C ۷۰- تا ۳۷+ به مدت ۱۵ دقیقه، مورد انجماد و ذوب قرار گرفت تا سلول‌های بورس فابریسیوس متلاشی شده و ویروس آزاد گردد. با استفاده از سانتریفیوژ در دمای °C ۴ و ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۲۰ دقیقه، لاشه سلول‌ها رسوب کرده و مایع رویی به میکروتیوب دیگری برای استخراج RNA منتقل شد.

استخراج RNA: برای استخراج RNA ویروسی از High Pure Viral RNA Kit ساخت شرکت Roche آلمان بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده استفاده گردید. همه واکسن‌های مورد استفاده با استفاده از آب تیمار شده با DEPC بمیزان یک میکرولیتر به ازای هر دوز آماده و رقیق شد و سپس RNA طبق دستورالعمل توصیه شده شرکت استخراج گردید.

رونوشت برداری معکوس (Reverse Transcription): بدین منظور از کیت تجاری RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit شرکت Fermentas (کانادا) استفاده شد مراحل انجام کار بدین صورت بود که در ابتدا ۵ μl از RNA استخراجی (غلظت ۳) به همراه ۲/۵ μl از پرایمر معکوس (۵: B۴: TCC TGT TGC CAC-۴) و ۲/۵ μl از آب تیمار شده با DEPC به ۳-TCT TTC (۱۰ pmol/μl) و ۲/۵ μl از آب تیمار شده با DEPC به میکروتیوب ۰/۲ ml اضافه شده و بمدت ۳ دقیقه در حرارت ۱۰۰ درجه قرار داده شده و بلافاصله در مجاورت یخ خنک گردید. سپس ۴ μl از بافر ۵x واکنش RT (۲۵۰ mM Tris-HCl، ۲۵۰ mM KCl، ۵۰ mM MgCl₂) را در میکروتیوب دیگری ریخته و به آن ۲ μl از dNTP mix (۱۰ mM) را در هر کدام) و ۱ μl از آنزیم نسخه برداری معکوس M-MuLV RT (۲۰۰ μl و نیم میکرولیتر از مهارکننده ریبونوکلائز (۲۰ u/μl RNasin) و ۲/۵ μl از آب تیمار شده با DEPC افزوده گردید. این مجموعه یک ساعت در °C ۴۲ و ۵ دقیقه در °C ۸۰ انکوبه شدند، در مجاورت یخ سرد شدند و سپس در °C ۲۰- دخیه شدند. در ساخت cDNA دو کنترل شامل کنترل منفی (فاقد RNA) و دیگری کنترل بدون آنزیم RT قرار داده شد. در ادامه،

بررسی منحنی ذوب با دقت بالا (High resolution melt)، تکنیکی قدرتمند در بیولوژی مولکولی جهت تشخیص موتاسیون، پلی مورفیسم و تفاوت‌های اپی ژنتیکی در نمونه‌های ویروس دو رشته‌ای DNA می‌باشد. استفاده از این روش مقرون به صرفه در مقایسه با سایر روش‌های توالی یابی بوده و تکنیکی مناسب جهت بررسی حجم بسیار زیادی از نمونه‌ها می‌باشد. همچنین استفاده از این روش بسیار ساده بوده و می‌تواند جهت بررسی سریع نمونه‌ها مورد استفاده قرار گیرد.

اگر استاندارد طلایی برای تشخیص جهش ژنی، توالی یابی باشد، از این تکنیک می‌توان برای جستجوی حضور واریانت‌ها و موتاسیون‌ها در قطعات تکثیر شده DNA قبل از توالی یابی استفاده نمود. همان طور که قبلاً هم بیان شد توالی یابی روشی هزینه بر و نیازمند کارهای فشرده می‌باشد که حتماً متعاقب روش‌های شناسایی دو رشته DNA صورت می‌گیرد. در مطالعه‌ای که توسط James و همکاران در سال ۲۰۰۶ (۱۳) انجام شد، توانستند حضور جهش‌های ژنی را در آزمون HRM و توالی یابی DNA ردیابی نمایند. آن‌ها همچنین در مطالعه خود به این نتیجه رسیدند که پروفایل منحنی ذوب محصولات PCR می‌تواند جهت تفریق جهش‌ها و موتانت‌ها مورد استفاده قرار گیرد. مطالعات مشابهی سال بعد توسط Kopyuy و همکاران در سال ۲۰۰۷ (۱۴) انجام شد و نشان دادند که نقاط خاصی از منحنی HRM باید در تشخیص موتانت‌های ویروس ایجاد کننده تومور انسان مورد توجه واقع گردد. هر دو این مطالعات بر این نظریه تأکید کردند که تغییرات ژنی می‌تواند تغییراتی را در دمای ذوب و یا شکل منحنی‌ها ایجاد نمایند.

مطالعات اخیر نشان دادند که ترکیب real time PCR و منحنی HRM روشی مقرون به صرفه تر جهت مطالعات غربالگری روی حجم وسیعی از نمونه‌ها می‌باشد و جایگزینی مناسب برای روش‌های قدیمی تر تعیین توالی ژنی می‌باشد که مطالعات بسیاری بر روی این امر تأکید دارند (۱۸، ۱۷، ۶). HRM روشی جدید است که متعاقب PCR جهت تعیین واریانت‌ها در نمونه‌های PCR مورد استفاده قرار می‌گیرد و به دلیل مقرون به صرفه بودن به سرعت در حال گسترش است. از آن جایی که حضور واریانت‌ها و جهش‌های گوناگون و انتخاب روش‌های کنترلی متناسب با آن اهمیت ویژه‌ای در صنعت طیور دارد، مطالعه اخیر به بررسی سویه‌های ایرانی ویروس بورس عفونی که ماهیت ژنی آن در مطالعات قبلی برای ما مشخص شده بود، با استفاده از تکنیک HRM پرداخته است.

مواد و روش کار

ویروس‌های بورس عفونی: در این مطالعه از پنج نمونه بورس فابریسیوس مربوط به مطالعه قبلی (۱۷) که در فریز °C ۷۰- حفظ شده بودند و همچنین پنج نمونه بورس فابریسیوس از شیوع‌های سال‌های اخیر استفاده گردید (جدول ۱). بر اساس توالی اسید آمینه ناحیه بسیار متغیر



جدول ۱- ویروس‌های بورس عفونی شناسایی شده در ایران که در این مطالعه استفاده شدند.

مشخصه جدایه	نوع گله	سن (هفته)	درصد تلفات	ظاهر بورس	سال جدا سازی	ناحیه جدا شده	شماره بانک ژن	الگوی آنزیمی محدود شونده
JRMP۷IR	گوشتی	۴	۵	همراه با خونریزی	۲۰۰۵	تهران	DQ۷۷۹۹۶۳	بسیار حد
JRMP۱۴IR	گوشتی	۴	۱۰	همراه با خونریزی	۲۰۰۵	آمل	DQ۸۹۹۷۵۰	بسیار حد
JRMP۲۴IR	گوشتی	۴	۳۰	همراه با خونریزی	۲۰۰۵	تهران	DQ۷۸۵۱۷۱	بسیار حد
JRMP۳۰IR	پولت	۵	۲۵	همراه با خونریزی	۲۰۰۵	تهران	DQ۷۸۵۱۷۳	بسیار حد
JRMP۴۲IR	پولت	۵	۲۰	همراه با خونریزی	۲۰۰۶	مشهد	-	بسیار حد
۱۲/IR/H۲۹۷	پولت	۵	۲۰	همراه با خونریزی	۲۰۱۲	قزوین	KR۶۰۴۸۸۲	
۱۳/IR/H۷۷۳	گوشتی	۴	۲۵	همراه با خونریزی	۲۰۱۳	مرکزی	KR۶۰۴۸۸۴	
۱۳/IR/H۷۷۶	گوشتی	۵	۱۵	همراه با خونریزی	۲۰۱۳	گیلان	KR۶۰۴۸۸۵	
۱۴/IR/H۱۰۰۰	گوشتی	۴	۱۵	همراه با خونریزی	۲۰۱۴	اصفهان	KR۶۰۴۸۸۷	
۱۴/IR/H۱۰۹۴	گوشتی	۵	۲۰	همراه با خونریزی	۲۰۱۴	رشت	KR۶۰۴۸۸۸	

جدول ۲. نوع و مقدار مواد استفاده شده در Real Time-PCR.

مواد	مقدار (μl)
بافر	۲/۵
MgCl ₂	۱
dNTP	۲
پرایمر پیشرو	۰/۵
پرایمر معکوس	۰/۵
DNA polymerase	۱ واحد
آب	۱۶/۳
cDNA	۲

واکنش تکثیر روی این کنترل‌ها نیز مانند نمونه‌ها انجام گردید.

Real-Time RT-PCR: مقدار ۲ μl از cDNA به ۲۳ μl مخلوط PCR (سیناژن) افزوده شد تا حجم مخلوط نهایی به ۲۵ μl برسد (جدول ۲). واکنش PCR با استفاده از یک جفت پرایمر B^۳ (۵'-CCC AGA GTC-۳) و B^۴ (۵'-TCC TGT TGC GTC TTT GAA-۳) و (۳'-TAC ACC ATA GCC-۳) صورت گرفت (۷). این جفت پرایمر در دو طرف ناحیه بسیار متغیر ژن VP۲ قرار گرفته و یک قطعه ۴۷۴ جفت بازی را تکثیر می‌نماید. مخلوط در ماشین ترموسایکلر Rotor-Gene™ ۶۰۰۰ ساخت شرکت Corbett Life Science استرالیا قرار داده شد و ۴۵ سیکل بدین شرح اجرا شد: دنا توره کردن آغازین در دمای ۹۴ °C به مدت یک دقیقه، دنا توره کردن در ۹۴ درجه به مدت ۲۰ ثانیه، جداسازی در ۵۷ °C به مدت ۲۰ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ °C به مدت ۳۰ ثانیه و تکثیر نهایی در دمای ۷۲ °C به مدت ۲ دقیقه. بعد از پایان PCR، محصولات تکثیر یافته بلافاصله مورد بررسی منحنی ذوب با دقت بالا قرار گرفتند. نقطه ذوب بین ۷۰ °C تا ۹۰ °C قرار گرفت.

نتایج

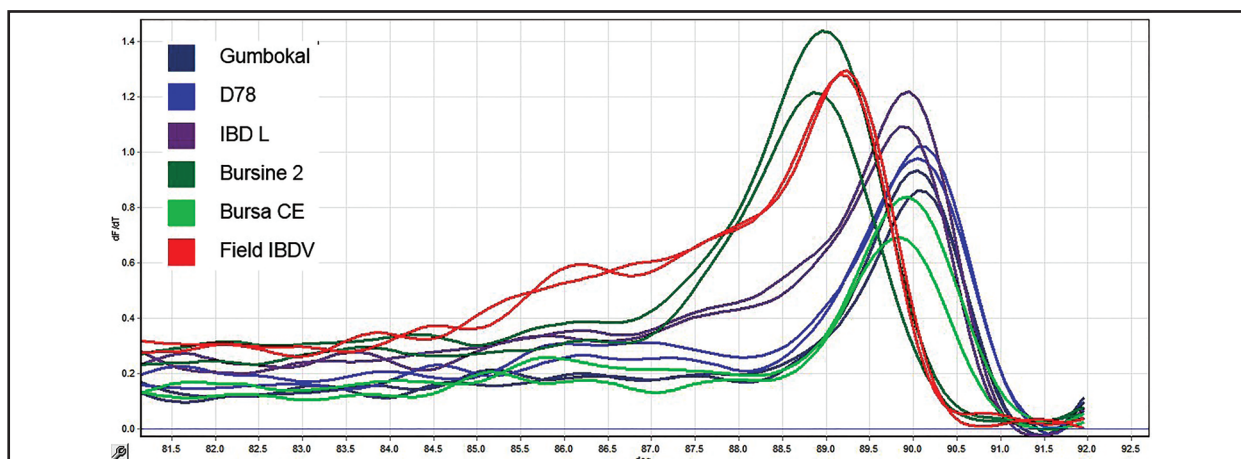
بر اساس سکانس ژن VP۲ دو پرایمر B^۳ و B^۴ در دو طرف ناحیه بسیار متغییر این ژن قرار گرفته و یک قطعه ۴۷۴ جفت بازی را تولید می‌کند. محصول نهایی Real Time PCR پس از الکتروفورز بر روی ژل آگاروز بررسی شد و در تمامی نمونه‌ها قطعه مورد نظر شناسایی شد. پس از انجام Real time PCR تمامی نمونه‌ها جهت بررسی منحنی ذوب در معرض افزایش دمای تدریجی قرار گرفتند. بر اساس نتایج حاصله مشخص شد که افزایش دمای تدریجی بمیزان ۰/۳ °C در ثانیه بهترین امکان تفکیک سویه‌های مختلف این مطالعه را میسر می‌سازد. بدین ترتیب و با بررسی منحنی ذوب مرسوم ویروس‌های آزمایش شده در چهار گروه متمایز از یکدیگر تحت نام‌های A-D دسته بندی شدند. تکرار آزمایش بر روی این ویروس‌ها، تغییری در دسته بندی ایجاد نکرد. بر اساس نتایج منحنی ذوب سه سویه واکسینال D۷۸، Gumbokal و Bursa CE در گروه A قرار گرفتند و دارای یک پیک اصلی در محدوده دمایی ۹۰/۰۲ ± ۰/۱۵ بودند همچنین این سویه‌ها واجد یک ناحیه Shoulder قبل از نقطه پیک ذوب بودند. واکسن IBD L به تنهایی در گروه B قرار گرفت این سویه واجد

بررسی منحنی ذوب با دقت بالا (HRM): بررسی منحنی HRM در ترموسایکلر Rotor-Gene™ ۶۰۰۰ انجام گرفت. به منظور تفکیک سویه‌های ویروس بورس عفونی، در پایان واکنش PCR، محصول نهایی در معرض دمای افزایشی، در سه مرحله مجزا و بصورت پلکانی با افزایش



جدول ۳. درصد تشابه بین توالی اسید نوکلئیک ناحیه بسیار متغییر ژن VP2 سویه‌های مختلف ویروس بورس عفونی.

	IR/H13/773	IR/H13/776	IR/H14/872	IR/H14/1000	IR/H14/1094	JRMP13IR	JRMP14IR	JRMP24IR	JRMP30IR	Bursine 2	D78	Bursa CE	IBD L
IR/H13/773													
IR/H13/776	100												
IR/H14/872	98/8	98/8											
IR/H14/1000	99/8	99/8	99										
IR/H14/1094	99/8	99/8	99	100									
JRMP13IR	99	99	98/8	99/3	99/3								
JRMP14IR	99	99	99/3	99/3	99/3	99							
JRMP24IR	99	99	98/8	99/3	99/3	100	99						
JRMP30IR	99/3	99/3	99	99/5	99/5	99/3	99/3	99/3					
Bursine 2	91/9	91/9	91/6	91/6	91/6	91/9	91/9	91/9	91/9				
D78	92/8	92/8	92/6	92/6	92/6	92/8	92/8	92/8	92/6	94/7			
Bursa CE	92/6	92/6	92/4	92/4	92/4	92/6	92/6	92/6	92/4	94/5	99/5		
IBD L	92/8	92/8	92/6	92/6	92/6	92/8	92/8	92/8	92/6	95	96/2	95/9	
Gumbokal	92/8	92/8	92/6	92/6	92/6	92/8	92/8	92/8	92/6	94/5	99/5	99	96/2



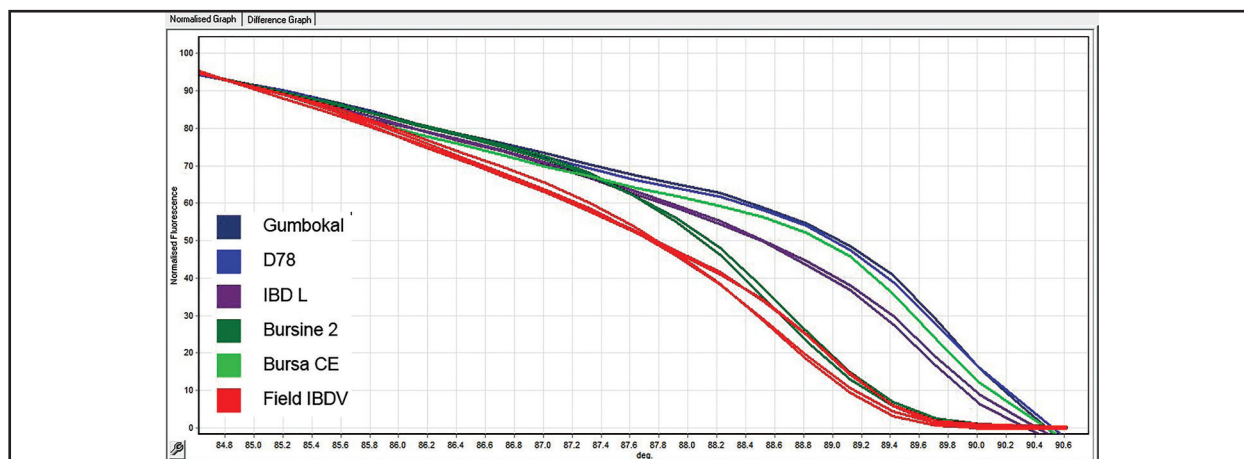
تصویر ۱. آنالیز منحنی ذوب متداول فراورده Real-time PCR ناحیه بسیار متغییر ژن VP2 سویه‌های واکسن و سویه‌های فیلد ایران.

تفکیک از هم ایجاد کردند. اما از سایر واکسن‌ها یا سویه‌های فیلد متمایز بودند. همچنین دو سویه IBD L و Bursine 2 دارای دو منحنی متفاوت و متمایز از سایر ویروس‌ها بودند.

ارتباط منحنی ذوب با سکانس ژن VP2: نتایج درصد تشابه بین اسید نوکلئیک ژن VP2 ویروس‌های مطالعه شده در جدول شماره ۳ ارائه شده است. براساس این نتایج ویروس‌هایی که تفاوت نوکلئوتیدی $\geq 1\%$ دارند در یک گروه ژنوتیپی HRM قرار گرفته اند و ویروس‌هایی که تفاوت نوکلئوتیدی $\leq 3/8\%$ دارند در گروه‌های ژنوتیپی متفاوتی از HRM قرار گرفته اند. بیشترین تفاوت بین گروه C و گروه D با متوسط $8/24\%$ و کمترین تفاوت بین گروه A و B با میانگین $3/9\%$ می‌باشد. شکل ۳ ارتباط بین درخت فیلوژنی و گروه‌های ژنوتیپی HRM را نشان می‌دهد.

یک پیک در محدوده دمایی $89/93 \pm 0/10$ و فاقد ناحیه Shoulder بود. همچنین سویه واکسینال Bursine 2 دارای یک پیک اصلی در محدوده دمایی $88/82 \pm 0/2$ و ناحیه Shoulder قبل از آن بوده و در گروه C قرار گرفت. تمامی ویروس‌های فیلد آزمایش شده در این مطالعه که در مقطع زمانی ده ساله و بین سال‌های ۲۰۰۵ تا ۲۰۱۴ جمع آوری شده بودند در گروه D قرار گرفتند. این ویروس‌ها واجد پیک اصلی در محدوده دمایی $90/25 \pm 0/25$ بودند (تصویر ۱). بهرحال تفاوت جزئی در قسمت Shoulder بین سویه‌های فیلد ایران قابل مشاهده بود اما با ضریب اطمینان بالا ($< 90\%$) همه این ویروس‌ها در یک گروه ژنوتیپی HRM قرار گرفتند. آنالیز نتایج منحنی ذوب با دقت بالا پس از نرمال کردن نیز نشان داد که ویروس‌های این مطالعه در چهار گروه ژنوتیپی HRM قرار گرفتند (تصویر ۲) و سه ویروس D78، Bursa CE و Gumbokal منحنی مشابه هم و غیر قابل

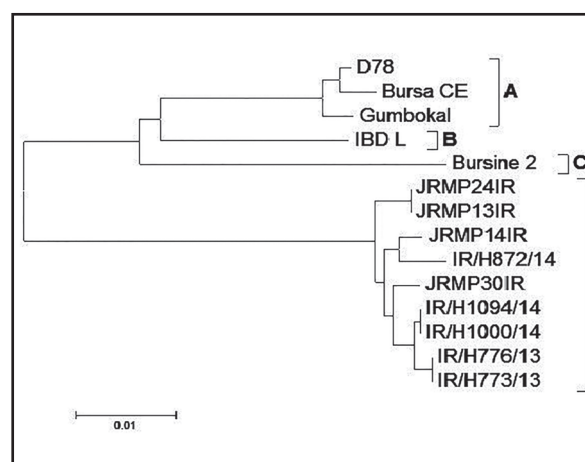




تصویر ۲. آنالیز منحنی ذوب نرمال شده فراورده Real-time PCR ناحیه بسیار متغییر ژن VP۲ سویه‌های واکسن و سویه‌های فیلد ایران.

PCR و RFLP و بررسی فیلوژنیک نیز بهره جستند و ماهیت ویروس‌های مورد مطالعه خود را بسیار بیماریزا توصیف کردند (۲). Razmyar و Peighambari در سال ۲۰۰۸ (۱۶) با هدف بررسی خصوصیات جدایه‌های IBDV از بورس فابریسیویس، نمونه‌های جمع آوری شده از گله‌های طیور طی سال‌های ۲۰۰۵ تا ۲۰۰۶ از نقاط مختلف ایران، را مورد بررسی قرار دادند. از ۴۹ نمونه جدا شده مزرعه، ۳۷ نمونه در RT-PCR از نظر IBDV مثبت بودند. الگوهای مشابه سویه‌های کلاسیک و فوق حاد IBDV به ترتیب در ۳ و ۳۴ نمونه مثبت نشان داده شد. هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های *BspMI* و *SacI* انجام گرفت. آن‌ها در نهایت روش بکار رفته در این مطالعه را روشی مفید برای تفکیک سریع بین جدایه‌های کلاسیک و فوق حاد IBDV عنوان کردند (۱۷، ۱۸). در مطالعه‌ای دیگر، Kusk و همکاران در سال ۲۰۰۵ روشی سریع و نسبتاً ارزان قیمت را برای ویروس IBD مبتنی بر روش‌های مولکولی به نام روش مختص به سویه multiplex RT-PCR ارائه کردند که در آن امکان تفکیک حتی سویه‌های واکسینال با حدت بیماری‌زایی بالا را از ویروس‌های مزرعه فراهم می‌آورد (۱۵).

در مطالعه حاضر، روشی قابل اعتماد و تشخیصی تشریح شده است که برای تفکیک سویه‌ها/جدایه‌های ویروس IBD استفاده می‌شود. بروز جدایه‌های جدید IBD و حضور واریانت‌ها و سویه‌های متعدد واکسینال همگی نیازمند تشخیص سریع سویه‌های موجود در مزرعه می‌باشد. گزارش شده است که جوجه‌ها با میزان تیترا آنتی بادی بالای مادری در برابر سویه‌های کلاسیک، می‌توانند به سویه‌های واریانت و *vIBDV* مبتلا شوند (۱۲) و بر این نکته تأکید می‌نماید که ویروس‌های IBD به گروه‌های پروتوتیپ گوناگونی تعلق دارند. در نتیجه تشخیص سویه‌های ویروس کلاسیک، واریانت و بسیار بیماریزای ویروس IBD ضروری می‌باشد. تشخیص جدایه‌ها/سویه‌های IBDV به واسطه آزمون‌های *real-time RT-PCR* و غیره صورت گرفته است (۱۱). روش *real-time RT-PCR* با استفاده از پروب‌های نشاندار متعدد محدود به شناسایی موتاسیون‌ها



تصویر ۳. درخت فیلوژنی براساس قطعه ۴۷۴ جفت بازی از ناحیه بسیار متغییر ژن VP۲ و دسته بندی منطبق با گروه‌های ژنوتیپی HRM.

بحث

بیماری بورس عفونی یکی از بیماری‌های ویروسی مهم طیور در ایران و سراسر جهان است که در حال حاضر واکسیناسیون گله‌های طیور راهکار کلی مقابله با این بیماری است. برای انتخاب واکسن مناسب، توجه به ویروس‌های درگیر کننده در منطقه ضروری به نظر می‌رسد. روش‌های مختلفی برای تمایز و شناسایی جدایه‌های ویروس IBD بیان شده اند که در مقدمه توضیح داده شده اند (۵). در مطالعات Tamiru به اهمیت ظهور سویه‌های جدید به واسطه پدیده باز آرایبی و استفاده گسترده از سویه‌های واکسینال اشاره شده است و بیان می‌دارد که این تغییرات بسیار گسترده بوده و نیازمند روش‌هایی دقیق برای تعیین سویه‌های موجود در مزرعه می‌باشیم (۲۳). Bahmaninejad و همکاران در سال ۲۰۰۸ به منظور شناسایی حدت سه سویه IBD از مجموع روش‌های تست رسوب در ژل (AGPT)، رنگ آمیزی ایمنو پراکسیداز، روش‌های میکروسکپ الکترونی، تلقیح به داخل جنین تخم مرغ و فیبروبلاست جنین جهت تعیین حدت ویروس‌ها استفاده کردند. آن‌ها در مطالعه خود در ادامه از روش‌های RT-



نشان دهنده فوق حد بودن (vIBDV) سویه‌های مورد مطالعه بود که با نتایج مطالعات قبلی بر روی این جدایه‌ها همخوانی داشت. باید بیان داشت که نتایج این مطالعه در تأیید نتایج مقاله قبلی انجام شده توسط Ghorashi و همکاران در سال ۲۰۱۱ (۷) بود با این تفاوت که در این مطالعه ما بر روی سویه‌های ایرانی و در ایران برای اولین بار روی ویروس بیماری بورس عفونی مطالعه را انجام دادیم و همچنین Ghorashi و همکاران در سال ۲۰۱۱ بر خلاف این مطالعه که بر روی سویه‌های vIBD بررسی داشته است، بر روی ویروس‌های با حدت بالا مطالعه‌ای منتشر شده را ارائه نکردند.

تکنیک جدید بررسی منحنی RT-PCR HRM real-time روشی مقرون به صرفه و قابل اعتماد تر از سایر روش‌های مورد استفاده در حال حاضر است و به منظور شناسایی حدت جدایه‌های جدید ویروس بورس عفونی می‌تواند مورد استفاده قرار بگیرد. این روش نسبتاً سریع بوده و نتایج می‌تواند طی ۸ ساعت حاصل آید و در نتیجه به منظور بررسی‌های سریع برای همه گیری‌ها بسیار مناسب است. این روش برای اولین بار به منظور بررسی سویه‌های IBDV در ایران صورت گرفت که نتایج بسیار جالبی را در پی داشت.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با استفاده از اعتبارات پژوهشی شورای پژوهشی دانشگاه تهران (به شماره ۷۵۰۸۰۰۷/۶/۱۴) انجام شده است.

References

1. Ashraf, S. T. (2007) Development of differential RT-PCR assays and molecular characterization of the complete VP1 gene of five strains of very virulent infectious bursal disease virus. *Avian Dis.* 51: 935-941.
2. Bahmaninejad, M.A., Hair-Bejo, M., Omar, A.R., Aini, I., Toroghi, R. (2008) Characterization of three infectious bursal disease virus isolates obtained from layer chickens in Iran. *Acta Virol.* 52: 167-74.
3. Bozorgmehri-Fard, M.H., Charkhkar. S., Hosseini, H. (2013) Detection of the Chinese Genotype of Infectious Bronchitis Virus (QX-type) in Iran. *Iran J Virol.* 7: 57-60.
4. Dibazar, S.H., Sheikhi. N., Hemmatzadeh. F., Charkhkar. S., Pourbakhsh, A. (2014) Differentiation between Vaccinal and Iranian Virulent Isolates of Newcastle Disease Virus based on

بوسیله پروب‌ها می‌باشد ولی تکنیک بررسی منحنی HRM تفکیک جدایه‌ها بر اساس تنوع تمامی سکانس نوکلئوتیدی قطعه تکثیر یافته است. امروزه استفاده از روش آنالیز منحنی ذوب با دقت بالا در تشخیص نوع پاتوتیپ عوامل بیماری‌زای طیور به جهت زمان اندک مورد نیاز در حال تبدیل شدن به روشی مرسوم است بطوریکه این روش برای تعیین پاتوتیپ عوامل بیماری‌های برونشیت عفونی (۳)، بیماری نیوکاسل (۴)، مایکوپلاسموز (۸)، کلامیدوز (۱۹) و آدنو ویروس‌های مولد IBH (۲۲) مورد بررسی قرار گرفته است. Ghorashi و همکاران در سال ۲۰۱۱ در مطالعه خود به کارایی روش RT-PCR/RFLP و Real time PCR (۶) در مطالعات قبلی اشاره کرده اند. اما در عین حال اذعان نمودند که RT-PCR/RFLP روشی وقت گیر بوده که مناسب ارزیابی تعداد زیادی نمونه نمی‌باشد و همچنین Real time PCR را نیز روشی گران دانستند. آن‌ها در مطالعه خود، روشی توأم از PCR و تکنیک منحنی ذوب با تفکیک پذیری بالا را توصیه کردند که توانایی تفریق بین سویه‌های مختلف را با هزینه و زمان کمتر امکان پذیر می‌سازد.

در مطالعه حاضر که از متد توصیه شده توسط Ghorashi و همکاران در سال ۲۰۱۱ (۷) استفاده شد، جدایه‌هایی از IBDV مورد بهره برداری قرار گرفت که ماهیت ژنی آن‌ها در مطالعات قبلی برای ما مشخص بود (۱۷) و لذا بررسی این جدایه‌ها با تکنیک منحنی HRM با استفاده از قطعات VP۲ بود. نتایج توالی نوکلئوتیدی سویه‌های ویروس IBD در این مطالعه همخوانی کاملی با نتایج قبلی مطالعات در این زمینه داشت. به منظور افزایش قدرت تشخیصی منحنی HRM ضروری است تا واکنش PCR را برای تکثیر محصولات تنظیم نمود. در این مطالعه واکنش‌های شرکت لوهمن (Avipro Vibursa CE) و سوا (IBDL) به عنوان مدلی جهت تعیین میزان حدت و صحت آزمون مورد استفاده قرار گرفتند. بعد از بهینه سازی کیفیت الگوهای cDNA، تمامی نمونه‌های مزرعه دارای نقطه پیک در نقطه $۸۹/۳ \pm ۰/۲۵$ بودند در حالی که سویه‌های واکنش دارای طیف وسیع تری از نظر پیک دمایی (۹۰/۱۷ - ۸۸/۶۲) بودند. این بیان می‌دارد که، زمانی که قطعات cDNA مورد استفاده قرار می‌گیرد، کیفیت قطعات تأثیر زیادی بر روی شکل کلی نمودارها ندارد. قابل توجه است که HRM ابزاری است برای تشخیص و یا بیان میزان ارتباط سویه‌های ناشناخته از دیگر سویه‌ها ولی با این وجود در نهایت نیاز به تعیین توالی ژنی می‌باشد. اگر چه می‌توان به واسطه روش‌هایی میزان ارتباط سویه‌های مختلف را با یکدیگر مقایسه نمود ولی چنین امکانی باید در برنامه‌های نرم افزاری آنالیز HRM وجود داشته باشد. در بررسی منحنی HRM باید توجه داشت که تفاوت در نقاط توالی نوکلئوتیدی بررسی می‌شود و الزاماً تفاوت‌ها را در توالی اسید آمینه بیان نمی‌کنند و در تفسیر نتایج آزمون این را باید در نظر داشت. در مطالعه ما، میزان نقطه ذوب برای اولین منحنی از ویروس‌های مورد آزمایش به طور واضح متفاوت با سویه‌های واکنش بود. نتایج این آزمون



- F Region Genotyping by HRM Analysis. *Intl J Anim Vet Adv.* 6: 150-155.
5. Etteradossi, N., Saif, Y.M. (2008) Infectious bursal disease. In: *Disease of Poultry.* Saif, Y.M., Fadly, A.M., Glisson, J.R., McDougald, L.R., Nolan, L.K., and Swayne, D.E (eds.). (12th ed.) Blackwell Publishing Professionals. Ames, Iowa, USA. p. 185-208.
 6. Ghaniei, A., Peighambari, S.M., Razmyar, J. (2014) Sequence analysis of the vp1 gene in three very virulent Iranian infectious bursal disease virus strains. *Int J Vet Res.* 48: 218-222.
 7. Ghorashi, S.A., O'Rourke, D., Ignjatovic, J., Noormohammadi, A.H. (2011) Differentiation of infectious bursal disease virus strains using real-time RT-PCR and high resolution melt curve analysis. *J Virol Meth.* 171: 264-271.
 8. Ghorashi, S., Noormohammadi, A.H., Markham, P. (2010) Differentiation of *Mycoplasma gallisepticum* strains using PCR and high-resolution melting curve analysis. *Microbiol.* 156: 1019-1029.
 9. Hewson, K., Noormohammadi, A.H., Devlin, J.M., Mardani, K., Ignjatovic, J. (2009) Rapid detection and non-subjective characterisation of infectious bronchitis virus isolates using high-resolution melt curve analysis and a mathematical model. *J Arch Virol.* 154: 649-660.
 10. 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.
 11. Jackwood, D.J. (2004) Recent trends in the molecular diagnosis of infectious bursal disease viruses. *Anim Health Res Rev.* 5: 313-316.
 12. Jackwood, D.J., Saif, Y.M., Hughes, J.H. (1982) Characteristics and serologic studies of two serotypes of infectious bursal disease virus in turkeys. *Avian Dis.* 26: 871-882.
 13. James, P., Doherty, R., Harris, M., Bickol, N., Milner, A., Young, M. (2006) Optimal selection of individuals for BRCA mutation testing: A comparison of available methods. *J Clin Onco.* 24: 707-715.
 14. Krypuy, M., Ashour, A., Etemadmoghadam, D., Hyland, S., defazio, A., Fox, S., Brenton, J., Bowtell, D., Dobrovic, A. (2007) High resolution melting for mutation scanning of TP53 exons 5-8. *BMC Can.* 7: 167-179.
 15. Kusk, M., Kabell, S., Jørgensen, P., Handberg, K. (2005) Differentiation of five strains of infectious bursal disease virus: Development of a strain-specific multiplex PCR. *Vet Microbiol.* 109: 159-167.
 16. Muller, H., Islam, M.R., Raue, R. (2003) Research on infectious bursal disease - the past, the present and the future. *Vet Microbiol.* 97: 153-165.
 17. Razmyar, J., Peighambari, S.M. (2008) Molecular characterization of Iranian infectious bursal disease viruses. *Avian Dis.* 52: 665-669.
 18. 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.
 19. Robertson, T., Bibby, S., O'Rourke, D., Belfiore, T., Lambie, H., Noormohammadi, A.H. (2009) Characterization of Chlamydiaceae species using PCR and high resolution melt curve analysis of the 16S rRNA gene. *J Appl Microbiol.* 107: 2017-2028.
 20. Sapats, S.I., Ignjatovic, J. (2000) Antigenic and sequence heterogeneity of infectious bursal disease virus strains isolated in Australia. *Arch Virol.* 145: 773-785.
 21. Shamsara, M., Ghorashi, S.A., Ahmadian, G. (2006) Cloning and nucleotide analysis of the vp2 gene of a very virulent infectious bursal disease virus isolate from Iran. *Acta Virol.* 50: 229-234.
 22. Steer, P.A., O'Rourke, D., Ghorashi, S.A., Noormohammadi, A.H. (2011) Application of high-resolution melting curve analysis for typing of fowl adenoviruses in field cases of inclusion body hepatitis. *Aust Vet J.* 89: 184-192.
 23. Tamiru, N.A., Silke, R. (2016) Infectious bursal disease virus in poultry: current status and future prospects. *Vet Med.* 7: 9-18.
 24. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. (2013) MEGA6: Molecular Evolu-



- tionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol.* 30: 2725-2729.
25. Tiwari, A.K., Kataria, R.S., Prasad, N., Gupta, R. (2003) Differentiation of Infectious bursal disease viruses by restriction enzyme analysis of RT-PCR amplified vp1 gene sequence. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 26: 47-53.
26. Van den Berg, T.P. (2000) Acute infectious bursal disease in poultry: A review. *Avian Pathol.* 29: 175-194.
27. Zierenberg, K., Raue, R., Muller, H. (2001) Rapid identification of "very virulent" strains of Infectious bursal disease virus by reverse transcription-polymerase chain reaction combined with restriction enzyme analysis. *Avian Pathol.* 37: 315-323.



Differentiation of Infectious bursal disease viruses isolated from Iranian poultry flocks using real-time RT-PCR and high resolution melt curve analysis

Cheraghchibashi, M.¹, Peighambari, S.M.^{1*}, Hosseini, H.²

¹Department of Avian Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

²Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Karaj branch, Karaj, Iran

(Received 5 March 2017, Accepted 27 April 2017)

Abstract:

BACKGROUND: Infectious bursal disease (IBD) is a highly contagious disease of young birds. Differentiation between classical virulent and very virulent IBDV (vvIBDV) isolate is very important for the poultry industry to choose the right vaccination program. Molecular and serological tests are time consuming and have variable sensitivity. However, the melting curve analysis is a relatively fast method with high precision. **OBJECTIVES:** This study was designed to evaluate the efficacy of the melting curve analysis for differentiation of some Iranian IBDVs whose identity had been previously determined by RT-PCR/RFLP analysis. **METHODS:** In this study, after RNA extraction and reverse transcription and Real Time RT-PCR of IBDVs, high melting resolution at temperatures ranging from 81 to 92 °C were performed. **RESULTS:** The findings of this study showed that in the high resolution melting curve analysis, the viruses were classified from A to D. Three vaccine strains of D78, Gumbokal, Bursa CE; IBD L; Bursine 2; and all field viruses were placed in groups A, B, C, and D, respectively. High resolution melting curve analysis after normalization also showed all viruses of this study were placed in 4 HRM genotypic group. Three strains, D78, Gumbokal, Bursa CE, produced similar and non-differentiable curve but were different from other vaccine and field strains. Two other vaccine strains, IBD L and Bursine 2, were different from each other and other viruses. **CONCLUSIONS:** We concluded that the real-time RT-PCR HRM technique is cost-effective and reliable among the currently used methods and can be used for differentiation of IBDV isolates.

Keyword: infectious bursal disease, high resolution melt curve analysis, real time RT-PCR poultry

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Infectious bursal disease viruses that were used in this study.

Table 2. Materials used in Real-time PCR.

Table 3. Percentages of identity among nucleic acid sequence of VP2 gene hypervariable region of different Infectious bursal disease viruses.

Figure 1. Conventional melt curves analysis of real-time RT-PCR products of the hypervariable VP2 gene region from vaccine and field IBDV strains.

Figure 2. Normalised melt curves analysis of real-time RT-PCR products of the hypervariable VP2 gene region from vaccine and field IBDV strains.

Figure 3. Phylogenetic tree based on 474 bp segment of the hypervariable VP2 gene region and classification according to HRM genotypic groups.



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

J. Vet. Res. 72, 3, 2017