

بکارگیری روش HRM در شناسایی و تفریق جدایه‌های ایرانی ویروس

بیماری نیوکاسل از سویه‌های واکسینال

شهادت دیبازر^۱، نریمان شیخی^{۲*}، فرید همت‌زاده^۲، سعید چرخکار^۱، سیدعلی پوربخش^۳

چکیده

برای کنترل همه‌گیری‌ها لازم است تا حضور ویروس‌های حاد از واکسن در کمترین زمان ممکن و با بیشترین دقت تشخیص داده شود. هدف از این مطالعه، بکارگیری روش HRM (High-Resolution Melting-Curve Analysis) در شناسایی و تفریق جدایه‌های بومی ویروس بیماری نیوکاسل از سویه‌های واکسن بود. در این مطالعه ۵ جدایه حاد NDV همراه با ۶ نمونه از واکسن‌های نیوکاسل موجود در بازار ایران مورد استفاده قرار گرفتند. بر اساس توالی نوکلئوتیدی ژن F، ۸ جفت پرایمر (A-H) برای آنالیز HRM طراحی و ساخته شدند. در مرحله نخست ۲ ویروس واکسن و یک ویروس حاد با هر ۸ جفت پرایمر آنالیز شدند. بر اساس نتایج حاصله، در مرحله بعد ۳ جفت پرایمر از بین آنها انتخاب و تمام ویروس‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. با استفاده از نرم‌افزار، الگوهای بدست آمده از ویروس‌های وحشی با الگوهای حاصل از واکسن مقایسه شدند. با استفاده از جفت پرایمرهای A، B، C، F و H دمای ذوب سویه‌های واکسن بالاتر از جدایه‌های حاد به دست آمد، اما با پرایمرهای D، E و G این حالت دیده نشد. بر اساس آنالیز منحنی‌های HRM در این مطالعه، جفت پرایمرهای B و H توانستند بهتر از سایر جفت پرایمرها سویه‌های واکسن را از یکدیگر و از جدایه حاد تفکیک کنند. براساس یافته‌های حاصل از این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که با استفاده از آنالیز HRM و انتخاب پرایمرهای مناسب می‌توان در مدت زمان کوتاه و با دقت بالا در مقایسه با سایر روش‌های رایج قبلی نظیر انجام آزمایش‌های تعیین شاخص‌های بیماری‌زایی، آزمون RT-PCR و تعیین توالی نوکلئوتیدی اقدام به تفکیک و تعیین حدت ویروس‌های نیوکاسل و تشخیص ویروس‌های حاد از ویروس‌های واکسن کرد.

واژگان کلیدی: آنالیز HRM، ویروس بیماری نیوکاسل، ویروس واکسن، تفکیک، پرایمر

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۲/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۳/۴/۵

مقدمه

بیماری نیوکاسل توسط سروتیپ یک پارامیکسوویروس طیور، متعلق به خانواده پارامیکسوویریده و جنس آوولاویروس

(Avulavirus) ایجاد می‌شود که یک ویروس RNA با ژنوم تک رشته‌ای و دارای اندازه ۱۵۱۸۶ جفت باز است (۶). بر اساس شدت بیماری حاصله از این ویروس، سویه‌های آن را در چهار پاتوتیپ غیربیماری‌زای رودهای، لتوتونیک، مزوتونیک، و ولوتونیک گروه‌بندی کرده‌اند (۴و۳).

به دلیل اجرای برنامه‌های واکسیناسیون در سراسر کشور، در کنترل همه‌گیری‌ها معمولاً جداسازی و تشخیص ویروس بیماری نیوکاسل به تنهایی کفایت نمی‌کند؛ بلکه لازم است تا پاتوتیپ ویروس و حتی گاه میزان بیماری‌زایی آن هم ارزیابی شود (۳). پس از ورود تکنیک‌های مولکولی براساس فن‌آوری اسید نوکلئیک، شناسایی و تعیین پاتوتیپ ویروس هم پیشرفت زیادی کرد (۱۴و۱۰و۵). روش RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) در ظرف ۲۴ ساعت قادر است سویه‌های حاد و غیر حاد NDV موجود در مایع آلتوتونیک تخم‌مرغ‌های آلوده و سویه‌های حاد NDV موجود در نمونه‌های بالینی را به طور مستقیم شناسایی کند (۱۰). به دنبال آن، تکنیک Real Time PCR برای مشاهده بی‌وقفه پیشرفت واکنش PCR در طول زمان راه‌اندازی شد که به کمک آن می‌توان مقادیر تولیدات PCR (DNA, cDNA) یا RNA را نیز اندازه‌گیری کرد. این روش توانایی تشخیص بسط PCR را در مرحله اولیه واکنش دارد در حالی که تشخیص در PCR معمولی در مرحله نهایی واکنش است (۱۶).

امروزه روش‌های مولکولی به‌طور مرتب در حال راه‌اندازی و یا

* ۱- گروه بیماری‌های طیور، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.

pasteurelab78@yahoo.com

۲- بخش ویروس‌شناسی، دانشکده علوم دامپزشکی، دانشگاه آدلاید، آدلاید، استرالیا.

۳- موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی بخش تحقیقات بیماری‌های طیور، کرج، ایران.

تکامل هستند تا با صرفه‌جویی در زمان و هزینه‌ها، جایگزین شیوه‌های سنتی زمان‌بر و پر زحمت شوند (۱۰). در این میان، آزمون بررسی ذوب ماده وراثتی با وضوح بالا (High-Resolution Melting-Curve Analysis = HRM) روشی است که طی آن با کمک دستگاه Real Time PCR می‌توان به تفکیک با وضوح بالا در محصولات PCR مربوط به ژن‌هایی که واجد تنوع ژنتیکی هستند؛ اقدام کرد. با توجه به آنکه این روش از قابلیت و سرعت بالایی در این جهت برخوردار است، می‌توان از آن برای ویروس نیوکاسل نیز استفاده کرد تا در واقع بدین وسیله در هزینه و زمان صرفه‌جویی شود. در سال ۲۰۰۲ برای اولین بار HRM به منظور شناسایی بسیاری از تغییرات ژنتیکی نظیر ارزیابی جهش‌های نقطه‌ای، هم‌خوانی توالی اسیدهای نوکلئیک و ژنوتایپینگ چندگانه (Multiplex) با همکاری دانشگاه یوتا و مؤسسه تکنولوژی آیداهو، ارائه شد (Pham و همکاران در سال ۲۰۰۵، در یکی از اولین مطالعات انجام شده در ارتباط با کاربرد این تکنیک در علوم دامپزشکی، اقدام به بررسی توالی ژن پروتئین F در ویروس بیماری نیوکاسل کردند (۱۲). با توجه به همه‌گیری‌های بیماری نیوکاسل در سال‌های اخیر، این مطالعه با هدف بکارگیری روش HRM جهت سرعت بخشیدن به شناسایی، تعیین پاتوتیپ و تفریق جدایه‌های بومی ویروس بیماری نیوکاسل از سویه‌های واکسن، شکل گرفت.

مواد و روش کار

در این مطالعه ۵ جدایه NDV که در موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی سازی رازی از موارد وقوع بیماری جداسازی و ضریب بیماری‌زایی داخل مغزی (Intracerebral Pathogenicity Index/ICPI) و توالی نوکلئوتیدی بخشی از ژن F آن‌ها مشخص شده بود (۱)، همراه با ۶ نمونه از واکسن‌های نیوکاسل موجود در بازار ایران شامل B۱ (تولیدات موسسه رازی، شرکت وترینا و

شرکت سوا) و لاسوتا (تولیدات موسسه رازی، شرکت لوهمن و شرکت وترینا) مورد استفاده قرار گرفتند. بر اساس توالی نوکلئوتیدی ژن F، ۸ جفت پرایمر برای آنالیز HRM طراحی و ساخته شدند (جدول ۱). RNA همه نمونه‌ها استخراج و پس از ساخت cDNA، در مرحله نخست ۲ ویروس واکسن و یک ویروس حاد با هر ۸ جفت پرایمر آنالیز شدند. بر اساس نتایج به دست‌آمده، در مرحله بعد ۳ جفت پرایمر انتخاب و تمام ویروسها مورد بررسی قرار گرفتند. با استفاده از نرم‌افزار، الگوهای بدست آمده از ویروس‌های وحشی با الگوهای حاصل از واکسن مقایسه شد.

استخراج RNA

در آزمایشگاه واکسن‌ها به صورت یک دز (حداقل ۱۰۶ ذره ویروسی) در حجم یک میکرولیتر حل و ۱۰۰ میکرولیتر (۱۰۰ دز) آن در استخراج RNA به کار گرفته شد. استخراج براساس دستورالعمل کیت Easy-spin (DNA free) total RNA extraction kit به اجرا درآمد. پس از تهیه RNA، ذخیره‌سازی کوتاه مدت آن در ۴ درجه سلسیوس انجام گرفت و در صورت ادامه آزمایش در روز بعد، نمونه‌ها به فریزر منفی ۷۰ درجه سلسیوس انتقال یافت.

مراحل ساخت cDNA

تمام مراحل ساخت cDNA کنار یخ انجام گرفت. در اینجا دو میکس وجود داشت که جمعا به حجم ۲۰ میکرولیتر رسید:

۱- میکس شماره یک به حجم ۱۲/۵ میکرولیتر: ۶/۵ میکرولیتر آب را با ۱ میکرولیتر Random Hexamer مخلوط و سپس ۵ میکرولیتر RNA اضافه شد.

۲- میکس شماره دو به حجم ۷/۵ میکرولیتر: شامل ۴ میکرولیتر بافر، ۲ میکرولیتر dNTP (دی‌اکسی نوکلئوتید تری فسفات)، ۱ میکرولیتر آنزیم Reverse Transcriptase (RT) و ۰/۵ میکرولیتر RNAase inhibitor (Ribolock). بود.

سپس میکس یک و دو با هم مخلوط و نمونه‌ها به دستگاه ترموسایکلر منتقل و برنامه زیر اجرا شد:

الف) ۱۰ دقیقه در ۲۵ درجه سلسیوس (ب) ۶۰ دقیقه در ۴۲ درجه سلسیوس (ج) ۱۰ دقیقه در ۷۰ درجه سلسیوس. همه مراحل فوق یک‌بار انجام شد و محصول نهایی یعنی cDNA به عنوان الگو به منظور انجام واکنش PCR تهیه و بلافاصله به دمای ۲۰- درجه سلسیوس منتقل شد.

جدول ۱- انواع جفت پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه. شماره جایگاه پرایمرها روی ژنوم بر مبنای شماره دسترسی AF۳۰۹۴۱۸ ثبت شده در بانک ژن مشخص شده است.

موقعیت	سکانس	نام	جفت پرایمر
۴۸۳۵-۴۸۵۳	۳'-TCCATCCGTAGGATACAAG-۵'	NDV-A-F	A
۴۹۲۱-۴۹۴۰	۳'-CCGCTGTTGCAACCCCAAGA-۵'	NDV-A-R	A
۴۹۱۹-۴۹۳۵	۳'-GCTCTGGGGTTGCAAC-۵'	NDV-B-F	B
۵۰۷۲-۵۰۹۰	۳'-GCATCTTCCCAACTGCCAC-۵'	NDV-B-R	B
۴۸۲۶-۴۸۴۲	۳'-CTTGGTGACTCCATCCG-۵'	NDV-C1-F	C
۴۹۰۱-۴۹۱۷	۳'-ACACCGCCAATAATGGC-۵'	NDV-C1-R	C
۴۸۲۶-۴۸۴۲	۳'-CTTGGTGATTCTATCCG-۵'	NDV-C2-F	D
۴۹۰۱-۴۹۱۷	۳'-ACACTGCCGATAATGGC-۵'	NDV-C2-R	D
۵۰۶۴-۵۰۸۴	۳'-AACTAGCAGTGGCAGTTGGGA-۵'	NDV-Em-F	E
۵۳۰۸-۵۳۲۸	۳'-GAGCTGAGTTGATTGTCCCT-۵'	NDV-Em-R	E
۴۸۲۶-۴۸۴۲	۳'-CTTGGTGACTCCATCCG-۵'	NDV-C1-F	F
۴۸۲۶-۴۸۴۲	۳'-CTTGGTGATTCTATCCG-۵'	NDV-C2-F	F
۴۹۰۱-۴۹۱۷	۳'-ACACCGCCAATAATGGC-۵'	NDV-C1-R	F
۴۹۰۱-۴۹۱۷	۳'-ACACTGCCGATAATGGC-۵'	NDV-C2-R	F
۴۸۲۶-۴۸۴۲	۳'-CTTGGTGACTCCATCCG-۵'	NDV-C1-F	G
۴۹۰۱-۴۹۱۷	۳'-ACACTGCCGATAATGGC-۵'	NDV-C2-R	G
۴۸۲۶-۴۸۴۲	۳'-CTTGGTGATTCTATCCG-۵'	NDV-C2-F	H
۴۹۰۱-۴۹۱۷	۳'-ACACCGCCAATAATGGC-۵'	NDV-C1-R	H

جدول ۲- نوع و مقدار مواد به کار رفته در واکنش Real Time RT-PCR

مقدار	مواد لازم
۲/۵ میکرولیتر	بافر جهت HRM حاوی رنگ Cyto۹ با غلظت ۵ میکرومولار
یک میکرولیتر (غلظت نهایی ۲ میلی مول)	۵۰ MgCl ₂ میلی مولار
۲ میکرولیتر	dNTP با غلظت ۱/۲۵ مولار
۰/۵ میکرولیتر	Forward primer با غلظت ۱۰ میلی مولار
۰/۵ میکرولیتر	Reverse primer با غلظت ۱۰ میلی مولار
یک واحد معادل ۰/۲ میکرولیتر	DNA polymerase
۱/۳ میکرولیتر	آب تا رساندن حجم میکس PCR به ۲۳ میکرولیتر
۲ میکرولیتر	cDNA به عنوان الگو

مخلوط حاصل در دستگاه ترموسایکلر Rotor- Gene Q (Corbett Life Science) قرار داده و با استفاده از کانال قرمز (Red Channel) و با نسبت شناسایی / برانگیزش شد. (جدول ۳)

جدول ۳- برنامه دمایی مورد استفاده در دستگاه ترموسایکلر

مرحله	دما	زمان
تقلیب اولیه (Initial Denaturation)	۹۴ درجه سلسیوس	۱ دقیقه
تقلیب (Denaturation)	۹۴ درجه سلسیوس	۲۰ ثانیه
اتصال پرایمر (Annealing)	۵۷ درجه سلسیوس	۲۰ ثانیه
طولیل سازی (Extension)	۷۲ درجه سلسیوس	۳۰ ثانیه
طولیل سازی نهایی (Final Extension)	۷۲ درجه سلسیوس	۲ دقیقه

نتایج

همان گونه که در جدول ۴ و نمودارهای ۱ و ۲ دیده می‌شود، در مرحله نخست مطالعه، نمودارهای ذوب (Melting) و طبیعی شده ۲ و ویروس واکسن (لاسوتا-رازای و لاسوتا-ترینا) و یک ویروس حاد (NR_۱۴) با هر ۸ جفت پرایمر تجزیه، ترسیم و مقایسه شدند.

پس از پایان برنامه تکثیر قطعات مورد نظر و تولید محصولات PCR، بدون قطع روند فوق، دستگاه بطور خودکار مرحله ذوب (Melt) و ترسیم منحنی HRM را انجام داد. مرحله ذوب (Melt) در بازه‌های دمایی ۷۰ تا ۹۰ درجه سلسیوس، با رمپ ۰/۳ (درجه افزایش دما در هر مرحله=Ramp)، با ۴۰ تکرار در یک چرخه (Cycle) انجام شد.

جدول ۱- تغییرات دمای ذوب به ازای هر جفت از پرایمرهای هشت گانه

نوع پرایمر	ویروس	بیشینه تغییرات دمای ذوب (درجه سلسیوس)
جفت پرایمر A	واکسن لاسوتا رازی	۸۵/۵۷
جفت پرایمر A	واکسن لاسوتا وترینا	۸۵/۵۵
جفت پرایمر A	NR-۱۴	۸۳/۹۵
جفت پرایمر B	واکسن لاسوتا رازی	۸۷/۰۲
جفت پرایمر B	واکسن لاسوتا وترینا	۸۸/۶۵
جفت پرایمر B	NR-۱۴	۸۵/۷۰
جفت پرایمر C	واکسن لاسوتا رازی	۸۳/۹۰
جفت پرایمر C	واکسن لاسوتا وترینا	۸۳/۹۰
جفت پرایمر C	NR-۱۴	۸۲/۷۵
جفت پرایمر D	واکسن لاسوتا رازی	۷۱/۹۳
جفت پرایمر D	واکسن لاسوتا وترینا	۷۲/۰۰
جفت پرایمر D	NR-۱۴	۸۲/۰۵
جفت پرایمر E	واکسن لاسوتا رازی	۸۲/۶۵
جفت پرایمر E	واکسن لاسوتا وترینا	۸۲/۹۰
جفت پرایمر E	NR-۱۴	۸۳/۵۲
جفت پرایمر F	واکسن لاسوتا رازی	۸۲/۶۰
جفت پرایمر F	واکسن لاسوتا وترینا	۸۲/۶۵
جفت پرایمر F	NR-۱۴	۸۱/۷۳
جفت پرایمر G	واکسن لاسوتا رازی	۸۳/۸۲
جفت پرایمر G	واکسن لاسوتا وترینا	۸۲/۶۰
جفت پرایمر G	NR-۱۴	۸۲/۸۵
جفت پرایمر H	واکسن لاسوتا رازی	۸۳/۱۰
جفت پرایمر H	واکسن لاسوتا وترینا	۸۳/۱۵
جفت پرایمر H	NR-۱۴	۸۲/۱۲

■ جفت پرایمر A: در حالی که همه نمونه‌ها پیک کوتاه‌ای داشتند، پیک واکسن‌های لاسوتا روی هم منطبق و اندکی کوتاهتر از NR-۱۴ بود. دمای ذوب واکسن‌های لاسوتا نیز مشابه (حدود ۸۵/۵ درجه سلسیوس) و بیشتر از NR-۱۴ (درجه سلسیوس) بود.

■ جفت پرایمر B: همه نمونه‌ها پیک نسبتاً کوتاه ولی بلندتر از پیک‌های جفت پرایمر A داشتند. پیک واکسن‌های لاسوتا هم‌خوانی داشت و اندکی کوتاهتر از NR-۱۴ بود. دمای ذوب

■ جفت پرایمر C: هر ۳ نمونه پیک کوتاهی داشتند. پیک واکسن‌های لاسوتا روی هم منطبق و بلندتر از NR-۱۴ بود. دمای ذوب هر دو واکسن لاسوتا، مشابه (۸۳/۹۰ درجه سلسیوس) و بیشتر از NR-۱۴ (درجه سلسیوس) بود.

■ جفت پرایمر D: واکسن لاسوتا - رازی (۸۷/۰۲ درجه سلسیوس) بیشتر از NR-۱۴ (حدود ۸۵/۷۰ درجه سلسیوس) و کمتر از واکسن لاسوتا - وترینا (۸۸/۶۵ درجه سلسیوس) بود.

■ جفت پرایمر A: در حالی که همه نمونه‌ها پیک کوتاه‌ای داشتند، پیک واکسن‌های لاسوتا روی هم منطبق و اندکی کوتاهتر از NR-۱۴ بود. دمای ذوب واکسن‌های لاسوتا نیز مشابه (حدود ۸۵/۵ درجه سلسیوس) و بیشتر از NR-۱۴ (درجه سلسیوس) بود.

■ جفت پرایمر B: همه نمونه‌ها پیک نسبتاً کوتاه ولی بلندتر از پیک‌های جفت پرایمر A داشتند. پیک واکسن‌های لاسوتا هم‌خوانی داشت و اندکی کوتاهتر از NR-۱۴ بود. دمای ذوب

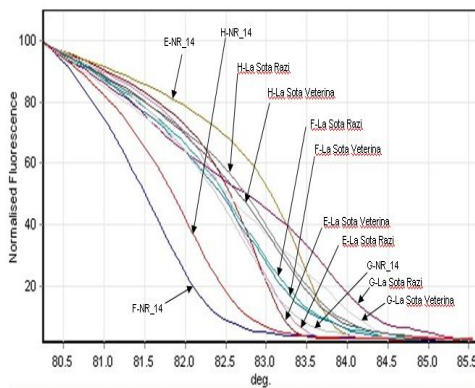
■ جفت پرایمر C: هر ۳ نمونه پیک کوتاهی داشتند. پیک واکسن‌های لاسوتا روی هم منطبق و بلندتر از NR-۱۴ بود. دمای ذوب هر دو واکسن لاسوتا، مشابه (۸۳/۹۰ درجه سلسیوس) و بیشتر از NR-۱۴ (درجه سلسیوس) بود.

■ جفت پرایمر D: واکسن لاسوتا - رازی (۸۷/۰۲ درجه سلسیوس) بیشتر از NR-۱۴ (حدود ۸۵/۷۰ درجه سلسیوس) و کمتر از واکسن لاسوتا - وترینا (۸۸/۶۵ درجه سلسیوس) بود.

دو واکسن لاسوتا مشابه (۸۲/۶) درجه سلسیوس) و بیشتر از NR-۱۴ (۸۱/۷۳) درجه سلسیوس) بود.

■ جفت پرایمر G: واکسن لاسوتا وترینا فاقد پیک و پیک نمودار ذوب NR_۱۴ از دو ویروس دیگر بلندتر بود. دمای ذوب واکسن لاسوتا - رازی (۸۳/۸۲) درجه سلسیوس) بیشتر از NR-۱۴ (۸۲/۸۵) درجه سلسیوس) بود.

■ جفت پرایمر H: پیک واکسن‌های لاسوتا منطبق و کوتاه‌تر از NR-۱۴ بود. دمای ذوب واکسن‌های لاسوتا نزدیک به هم (۸۳/۱۰ vs. ۸۳/۱۵) درجه سلسیوس) و برای NR-۱۴، کمتر (حدود ۸۲/۱۲ درجه سلسیوس) بود.



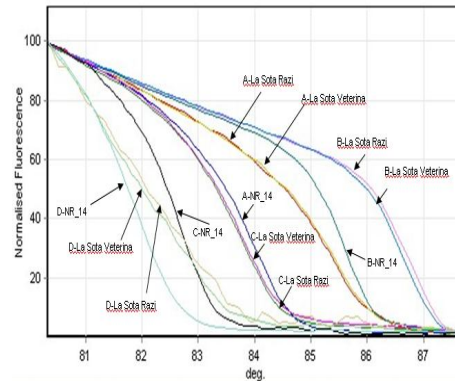
LaSota Vac. (Razi Co.)	جفت پرایمر E
LaSota Vac. (Veterina)	
Wild Isolate (NR_14)	
LaSota Vac. (Razi Co.)	جفت پرایمر F
LaSota Vac. (Veterina)	
Wild Isolate (NR_14)	
LaSota Vac. (Razi Co.)	جفت پرایمر G
LaSota Vac. (Veterina)	
Wild Isolate (NR_14)	
LaSota Vac. (Razi Co.)	جفت پرایمر H
LaSota Vac. (Veterina)	
Wild Isolate (NR_14)	

نمودار ۲- مقایسه منحنی‌های همطراز شده HRM برای دو نمونه واکسن لاسوتا و یک ویروس حاد با استفاده از جفت پرایمرهای E, F, G و H

در مرحله دوم، همان طور که از جدول ۵ و نمودارهای ۳ تا ۵ بر می‌آید، کلیه ویروس‌های مورد بررسی شامل ۶ ویروس واکسن و ۵ ویروس حاد با سه جفت پرایمر E, B و H آنالیز شدند:

■ جفت پرایمر B: در نمودار طبیعی شده ویروس‌های واکسن کاملاً از ویروس‌های حاد جدا بودند. در بین واکسن‌ها، واکسن‌های B۱ رازی و وترینا در ابتدا روند ذوب منطبق داشتند

■ جفت پرایمر D: نمودار ذوب هر ۲ نمونه واکسن فاقد پیک بود؛ ولی ویروس NR-۱۴ پیک کوتاهی داشت. دمای ذوب واکسن‌های لاسوتا نزدیک به هم بود و با دمای ذوب NR-۱۴ (۸۲/۰۵) درجه سلسیوس) فاصله داشت.



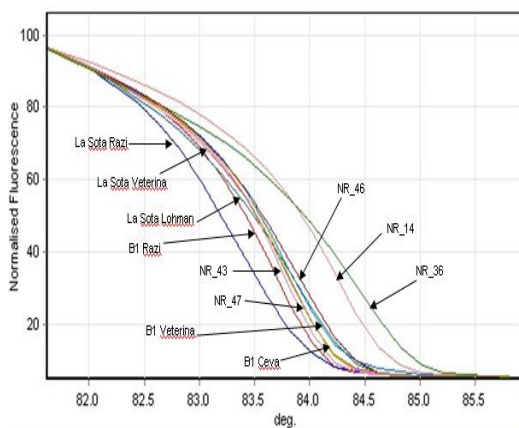
LaSota Vac. (Razi Co.)	جفت پرایمر A
LaSota Vac. (Veterina)	
Wild Isolate (NR_14)	
LaSota Vac. (Razi Co.)	جفت پرایمر B
LaSota Vac. (Veterina)	
Wild Isolate (NR_14)	
LaSota Vac. (Razi Co.)	جفت پرایمر C
LaSota Vac. (Veterina)	
Wild Isolate (NR_14)	
LaSota Vac. (Razi Co.)	جفت پرایمر D
LaSota Vac. (Veterina)	
Wild Isolate (NR_14)	

نمودار ۱- مقایسه منحنی‌های همطراز شده HRM برای دو نمونه واکسن لاسوتا و یک ویروس حاد با استفاده از جفت پرایمرهای A, B, C و D.

■ جفت پرایمر E: هر ۳ نمونه پیک بلندی داشتند. پیک واکسن‌های لاسوتا تا حدودی روی هم منطبق می‌شد اما پیک لاسوتا - وترینا بلندتر از لاسوتا- رازی بود. پیک نمودار ذوب NR-۱۴ از دو ویروس دیگر بلندتر بود. دمای ذوب واکسن لاسوتا-رازی نزدیک به لاسوتا - وترینا (۸۲/۹۰ vs. ۸۲/۶۵) درجه سلسیوس) و کمتر از NR-۱۴ (۸۳/۵۲) درجه سلسیوس) بود.

■ جفت پرایمر F: تمام نمونه‌ها پیک بسیار کوتاه داشتند. پیک واکسن‌های لاسوتا روی هم منطبق؛ اما پیک نمودار ذوب NR-۱۴ از دو ویروس دیگر متفاوت و کمی بلندتر بود. دمای ذوب

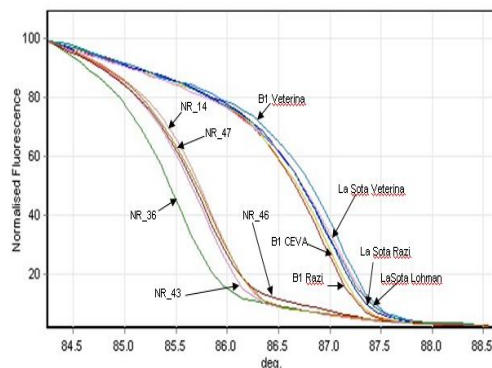
■ جفت پرایمر E: در نمودار طبیعی شده، واکسن B1 و لاسوتا رازی، NR-۱۴ و NR-۳۶ از یکدیگر و از بقیه ویروس‌ها کاملاً متمایز بودند. هفت ویروس باقی‌مانده با هم تشابه بیشتری نشان دادند. در میان سه واکسن B1، روند ذوب واکسن‌های وترینا و سوا در ابتدا منطبق و در انتها از هم جدا بود. ویروس‌های NR-۴۳، NR-۴۶ و NR-۴۷ در ابتدا مشابهت زیادی داشتند و در نهایت NR-۴۶، از دو ویروس دیگر تمایز بیشتری یافت.



■	B1 Vaccine (Razi Co.)
■	B1 Vaccine (CEVA Co.)
■	LaSota Vaccine (Razi Co.)
■	LaSota Vaccine (Veterina Co.)
■	B1 Vaccine (Veterina Co.)
■	LaSota Vaccine (Lohman Co.)
■	NR_14 (wild isolate)
■	NR_36 (wild isolate)
■	NR_43 (wild isolate)
■	NR_46 (wild isolate)
■	NR_47 (wild isolate)

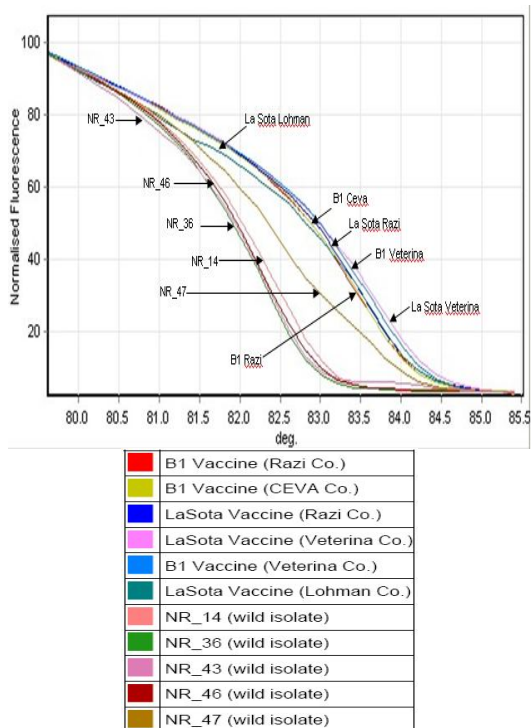
نمودار ۴- مقایسه منحنی‌های همطراز شده HRM برای شش نمونه واکسن و پنج نمونه ویروس حاد با استفاده از جفت پرایمر E ویروس‌های B1 سوا، NR-۱۴ و NR-۴۳ منحنی ذوب با پیک بالاتری از بقیه داشتند. ویروس‌های B1 رازی، لاسوتا و ترینا، NR-۴۶ و NR-۴۷ پیک ذوب متوسط و بقیه پیک ذوب کوتاهتری داشتند. دمای ذوب بجز در لاسوتا رازی (۸۳/۵۰) درجه سلسیوس)، در بقیه گروه واکسن تقریباً به هم نزدیک بود (۸۳/۹۴±۰/۱) در بین گروه حاد، دمای ذوب

و سپس از هم متمایز شدند. واکسن B1 سوا در ابتدا مشابه دو واکسن B1 دیگر بود و پس از تمایز آنها، بر واکسن B1 رازی منطبق شد. هر سه واکسن لاسوتا در ابتدا از هم متمایز بودند و در اواخر نمودار بر هم منطبق شدند. از میان جدایه‌های وحشی ویروس‌های NR-۴۳، NR-۴۶ و NR-۴۷ در ابتدا کاملاً بر هم منطبق بودند که سپس NR-۴۳، و در اواخر NR-۴۷ با کمی اختلاف متمایز شدند. نسبت به این ۳ ویروس فوق، NR-۱۴ در ابتدا کمی اختلاف نشان داد و سپس بر آنها منطبق شد. NR-۳۶ نیز به‌وضوح از بقیه ویروس‌های حاد مجزا بود.



■	B1 Vaccine (Razi Co.)
■	B1 Vaccine (CEVA Co.)
■	LaSota Vaccine (Razi Co.)
■	LaSota Vaccine (Veterina Co.)
■	B1 Vaccine (Veterina Co.)
■	LaSota Vaccine (Lohman Co.)
■	NR_14 (wild isolate)
■	NR_36 (wild isolate)
■	NR_43 (wild isolate)
■	NR_46 (wild isolate)
■	NR_47 (wild isolate)

نمودار ۳- مقایسه منحنی‌های همطراز شده HRM برای شش نمونه واکسن و پنج نمونه ویروس حاد با استفاده از جفت پرایمر B به طور کلی، ویروس‌های واکسن نسبت به ویروس‌های حاد منحنی‌های ذوب با پیک مشخصاً کوتاهتر و دمای ذوب بالاتری داشتند. دمای ذوب برای واکسن‌ها در حدود ۸۷ درجه سلسیوس و برای ویروس‌های حاد تقریباً ۸۵/۸۸ درجه سلسیوس بود؛ به استثنای NR-۳۶ که دمای ذوب به ۸۵/۵۷ درجه سلسیوس رسید. در میان ویروس‌های حاد، NR_۱۴ بلندترین و NR-۳۶ کوتاهترین پیک منحنی ذوب را داشتند.



نمودار ۵: مقایسه منحنی‌های همطراز شده HRM برای شش نمونه واکسینال و

پنج نمونه ویروس حاد با استفاده از جفت پرایمر H

برای NR-۱۴ و NR-۳۶ بیشتر و برای سایرین تقریباً مشابه بیشتر ویروس‌های گروه واکسن بود.

■ جفت پرایمر H: در نمودار طبیعی شده، گروه واکسن با هم مشابهت داشتند. واکسن B1 و ترینا از دو B1 دیگر تا حدودی متمایز بود. در بین واکسن‌های لاسوتا، لاسوتا رازی در ابتدا بر لاسوتا و ترینا و در انتها بر لاسوتا لوهمن منطبق بود. در بین ویروس‌های حاد، NR-۱۴ و NR-۴۷ از سه‌تای دیگر به طور مشخص متفاوت بودند.

ویروس‌های NR-۱۴، NR-۴۶ و NR-۳۶ به ترتیب منحنی ذوب با پیک بالاتری از بقیه داشتند. دمای ذوب در گروه واکسن بالاتر از گروه حاد بود. در میان گروه واکسن، B1 رازی دمای ذوب کمتری (۸۳/۵۶ درجه سلسیوس) داشت و در بقیه این دما به هم نزدیک بود (۸۳/۸۰±۰/۱ درجه سلسیوس).

جدول ۵- تغییرات دمای ذوب به ازای هر جفت از پرایمرهای سه گانه به کار رفته در مرحله دوم مطالعه.

بیشینه تغییرات دمای ذوب (درجه سلسیوس)			
ICPI	جفت پرایمر B	جفت پرایمر E	جفت پرایمر H
۰/۲	۸۷/۰۰	۸۳/۸۴	۸۳/۵۶
۰/۲	۸۲/۰۲	۸۳/۹۶	۸۳/۷۰
۰/۴	۸۷/۱۰	۸۳/۵۰	۸۳/۷۰
۰/۴	۸۷/۱۰	۸۳/۹۶	۸۳/۹۰
۰/۲	۸۷/۱۳	۸۳/۹۴	۸۳/۹۰
۰/۴	۸۷/۰۲	۸۴/۰۴	۸۳/۸۰
۱/۹۱	۸۵/۸۸	۸۴/۴۰	۸۲/۶۰
۱/۸۱	۸۵/۵۷	۸۴/۶۰	۸۲/۵۰
۱/۸۶	۸۵/۸۵	۸۳/۹۰	۸۲/۵۴
۱/۸۶	۸۵/۸۵	۸۴/۰۴	۸۲/۴۰
۱/۸۱	۸۵/۹۰	۸۳/۹۶	۸۲/۶۶

بحث

دقت و حساسیت بالای آن به همراه زمانبری اندک، بسیار مناسب تشخیص داده شد (۸،۹،۱۱ و ۱۵).

از میان بیماری‌های ویروسی مهم در صنعت پرورش پرندگان، بیماری نیوکاسل نه تنها در ایران بلکه در تمام جهان، از گذشته تا حال در جرگه زیان‌بارترین بیماری‌های طیور و از جمله نگرانی‌های عمده صنعت پرورش طیور بوده‌است. با وجود چهره‌های متفاوت بیماری در هر منطقه، تلفات بالا، حذف لاشه‌ها در کشتارگاه، کاهش میزان تولید تخم‌مرغ و کاهش کیفیت تخم‌مرغ از جمله موارد خسارات اقتصادی رایج آن هستند که می‌توانند به‌همراه سایر بیماری‌های میکروبی یا ویروسی تشدید شوند. سال‌هاست که بررسی جوانب مختلف ویروس NDV در کانون توجهات است؛ ولی از همه مهم‌تر این‌که به‌دلیل سرعت بالای گسترش بیماری در گله، تشخیص سریع آن به‌منظور کنترل بهینه و پیشگیری به‌هنگام، اهمیت فوق‌العاده‌ای دارد. از همین رو در سرتاسر جهان با استفاده از روش‌های گوناگون اعم از کلاسیک و امروزی، تحقیقات بسیار گسترده‌ای در مورد روش‌های تشخیص سریع‌تر و دقیق‌تر، تعیین پاتوتیپ، ویژگی‌های مولکولی و خاستگاه اصلی ویروس و در نهایت رسیدن به کنترل و پیشگیری مطلوب این بیماری انجام گرفته است و همچنان ادامه دارد (۲ و ۱۷).

در HRM اساس کار پیدا کردن تفاوت‌ها در یک توالی اسید نوکلئیکی و یا به عبارتی ژنوتایپینگ است. در این خصوص در ایران مطالعات اندکی صورت گرفته‌است و در این مطالعه برای نخستین بار جدایه‌های ایرانی NDV با این روش بررسی شدند. بدین ترتیب تعدادی از ویروس‌های حاد نیوکاسل که به روش‌های سنتی و نیز مولکولی به خوبی شناسایی شده و شاخص‌های بیماری‌زایی داخل مغزی آنها (به عنوان استاندارد طلایی) تعیین شده بود به همراه سویه‌های واکسن تجاری متعلق به شرکت‌های مختلف که در مزارع صنعتی پرورش طیور کشور به مصرف می‌رسند، به روش HRM مورد بررسی قرار گرفتند. در این مطالعه جفت پرایمرهای مختلفی مورد آزمایش

در این مطالعه نشان داده‌شد که با بکارگیری روش HRM و آنالیز نتایج آن می‌توان جدایه‌های بومی حاد ویروس بیماری نیوکاسل را از سویه‌های واکسن تشخیص داد و نظر به پرهزینه و زمان بر بودن تعیین شاخص‌های بیماری‌زایی و خطرات زیست محیطی مواد به کار رفته در ژل‌الکتروفورز، با استفاده از این تکنیک و طراحی یا انتخاب پرایمرهای مناسب، فاصله زمانی تشخیص تا آغاز اقدامات کنترلی را به‌شدت کاهش داد.

در سال ۲۰۰۲ برای اولین بار آزمون بررسی ذوب ماده وراثتی با وضوح بالا (High Resolution Melting) (HRM) به منظور شناسایی بسیاری از تغییرات ژنتیکی نظیر ارزیابی جهش‌های نقطه ای، هم‌خوانی توالی اسیدهای نوکلئیک و ژنوتایپینگ چندگانه (Multiplex) با همکاری دانشگاه یوتا و مؤسسه تکنولوژی آیداهو، ارائه شد (۷ و ۱۳). Pham و همکاران در سال ۲۰۰۵، در یکی از اولین مطالعات انجام شده در ارتباط با کاربرد تکنیک HRM در علوم دامپزشکی، اقدام به بررسی توالی ژن پروتئین F در ویروس بیماری نیوکاسل کردند. بر اساس نتایج این پژوهش، میزان حساسیت این روش ۱۰۰ برابر روش‌های مولکولی رایج نظیر PCR، عنوان شد و از آنجایی که محققین این مطالعه، زمان اجرای آزمایش فوق را کمتر از ۱ ساعت اعلام کردند، لذا از آن به عنوان تکنیکی دقیق، حساس و سریع نام برده شد که می‌تواند در آزمون‌های غربالگری بیماری نیوکاسل استفاده شود (۱۲). در مطالعات دیگر، این روش برای بررسی توالی ناحیه متغیر ژن vIhA جدایه‌های مایکوپلازما سینویه (Jeffery و همکاران، ۲۰۰۷)، شناسایی ۱۲ تحت تیپ ویروس آنفلوآنزای A بر اساس توالی ژن ماتریکس (Lin و همکاران، ۲۰۰۸)، بررسی ۱۲ سروتیپ آدنوویروس پرندگان بر اساس توالی سه ناحیه ژن هگزون (Steer و همکاران، ۲۰۰۹)، تفکیک سویه‌های مختلف ویروس گامبورو بر پایه توالی ناحیه بسیار متغیر ژن VP۲ (قریشی و همکاران، ۲۰۱۱) با توجه به

قرار گرفتند تا از میان آنها مناسب‌ترین‌شان جهت تشخیص ویروس‌های حاد ایران و تمایز آنها از سویه‌های واکسن شناخته شود و بتوان از این به بعد در سطوح وسیع از این تکنیک بهره جست. بدین منظور قسمتی از ژن F₀ (مقداری از F₁ و بخشی از F₂) مورد بررسی قرار گرفت. بر مبنای تفاوت‌های نوکلئوتیدی، رفتار بازشدن رشته‌ها فرق داشت و جداشدن دو رشته cdNA از هم در یک نمونه آرام‌تر یا سریعتر از نمونه‌های دیگر بود که منجر به ایجاد نمودارهای متفاوتی شد.

با استفاده از جفت پرایمرهای A, B, C, F و H دمای ذوب سویه‌های واکسینال بالاتر از جدایه‌های حاد به دست آمد، اما با پرایمرهای D, E و G این حالت دیده نشد؛ به‌ویژه این که در جفت پرایمر D، این اختلاف فاحش بود و واکسن‌ها دمای ذوبی حدود ۱۰ درجه سلسیوس کمتر از ویروس حاد داشتند. بر اساس آنالیز منحنی های HRM در این مطالعه، جفت پرایمرهای B, E و H در مرحله اول توانستند ضمن ایجاد پیک‌های نسبتاً بلندتر و مشخص، بهتر از سایر جفت پرایمرها سویه‌های واکسینال را از یکدیگر و از جدایه حاد تفکیک کنند. به همین دلیل در مرحله دوم مطالعه، تمام ویروس‌های مورد آزمایش با این ۳ جفت پرایمر بررسی شدند.

در مطالعه حاضر استفاده از جفت پرایمر B نشان داد که HRM قادر است ویروسی مثل NR_{۳۶} را از NR_{۱۴} و NR_{۴۶} با بیش از ۹۹ درصد شباهت تفکیک کند. این جفت پرایمر تا حدودی توانست یک واکسن مشابه اما محصول دو شرکت مختلف (B₁ رازی و B₁ وترینا) را از هم تفکیک کند و نشان داد که B₁ رازی انطباق بیشتری با B₁ سوا دارد.

در نمودار طبیعی شده حاصل از تجزیه با جفت پرایمر E، واکسن B₁ و لاسوتا رازی، NR_{۱۴} و NR_{۳۶} از یکدیگر و از بقیه ویروس‌ها کاملاً متمایز بودند. هفت ویروس باقی‌مانده تشابه زیادی نشان دادند که شاید این عدم تفکیک ویروس‌های حاد از واکسن مانعی بر سر راه استفاده از این جفت پرایمر

باشد که همچنین دمای ذوب ویروس‌های حاد را بالاتر از سویه‌های واکسن نشان می‌داد.

آنالیز با جفت پرایمر H توانست واکسن B₁ وترینا را تا حدودی از دو B₁ دیگر متمایز سازد. در بین واکسن‌های لاسوتا هم، لاسوتا وترینا مقداری از دو لاسوتای دیگر تمایز نشان داد. در گروه ویروس‌های حاد، NR_{۱۴} علی‌رغم بیش از ۹۹٪ شباهت با NR_{۳۶} و NR_{۴۶}، از دیگران به طور مشخص متمایز شد.

براساس یافته‌های حاصل از این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که با استفاده از آنالیز HRM و انتخاب پرایمرهای مناسب می‌توان در مدت زمان کوتاه و با دقت بالا در مقایسه با سایر روش‌های رایج قبلی نظیر انجام آزمایش‌های تعیین شاخص‌های بیماری‌زایی، آزمون RT-PCR و تعیین توالی نوکلئوتیدی اقدام به تفکیک و تعیین حدت ویروس‌های نیوکاسل و تشخیص ویروس‌های حاد از ویروس‌های واکسن کرد. شناسایی سویه‌های غالب در همه‌گیری‌های این عفونت در سطح کشور، با کمک به روشن‌تر شدن اپیدمیولوژی بیماری، سبب می‌شود تا بتوان مناسب‌ترین راهکارها را در زمینه کنترل و پیشگیری انتخاب کرد. پیشنهاد می‌شود با انجام مطالعات تکمیلی، امکان استفاده بهتر و بیشتر از این تکنیک در تفریق بین سویه‌های واکسن از وحشی و نیز شناسایی و تمایز ویروس‌های حاد دخیل در واگیری‌های ایران از یکدیگر بررسی شود.

تشکر و سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از مدیریت و پرسنل آزمایشگاه دامپزشکی پاستور تهران خصوصاً جناب آقای دکتر سید مهدی امام و سرکار خانم شبنم هاشمی به‌خاطر همکاری صمیمانه و راهنمایی‌های سودمند در اجرای این پژوهش، و نیز از جناب آقای دکتر محمد عبدالشاه بابت هم‌فکری خالصانه و در اختیار گذاشتن جدایه‌های بومی حاد اعلام می‌دارند.

فهرست منابع

1. عبدالشاه، م.، پوربخش، س.ع.، پیغمبری، س.م.، شجاع‌دوست، ب.، ممیز، ر.، مجاهدی، ز. (۱۳۹۱): مطالعه شاخص‌های بیماری‌زایی ویروس‌های بیماری نیوکاسل جداشده از مرغداری‌های صنعتی ایران، مجله تحقیقات دامپزشکی، ۶۷ (۲)، شماره پیاپی ۲۷۰؛ ۱۶۴-۱۵۹.
2. Al-Garib, S.O., Gielkens, A.L.J., Gruys, E., Koch, G. (2003): Review of newcastle disease virus with particular references to immunity and vaccination. *World's Poult. Sci. J.* 59:185-200.
3. Aldous, E. W., Alexander, D. J. (2001): Detection and differentiation of newcastle disease virus (avian paramyxovirus type 1). *Avian Pathol.* 30: 117– 128.
4. Alexander, D. J. (2003): Newcastle Disease. In: *Diseases of poultry*. 11th edition (ed. Saif, Y.M., Bams, H.J., Fadly, A. M., Glisson, J. R., McDougald, L. R., Swayne, D. E.). Iowa State University Press: Iowa; 64-87.
5. Baratchi, S. Ghorashi, S.A., Hosseini, M., Pourbakhsh, S.A. (2006): Differentiation of virulent and non-virulent NDV isolates using RT-PCR. *Iranian J. Biotech.* 4(1):61-63.
6. De Leeuw, O., Peeters, B. (1999): Complete nucleotide sequence of newcastle disease virus: evidence for the existence of a new genus within the subfamily paramyxovirinae. *J. Gen. Virol.* 80: 131–136.
7. Farrar, J.S., Reed, G.H., Wittwer, C.T. (2010): High-resolution melting curve analysis for molecular diagnostics. In: *Molecular diagnostics*, 2nd edition. (ed. Patrino, G. P., Ansong, W. J.). Elsevier Ltd.: Amsterdam; 229-245.
8. 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. Methods.* 171(1): 264-271.
9. Jeffery, N., Gesser, R.B., Steer P.A., Noormohammadi A.H. (2007): Classification of mycoplasma *sy noviae* strains using single-strand conformation polymorphism and high-resolution melting-curve analysis of *vlha* gene single-copy region. *Microbiol.* 153:2679-2688.
10. Kant, A., Koch, G., van Roozelaar, D.J., Balk, F., Ter Huurne A. (1997): Differentiation of virulent and non-virulent strains of newcastle disease virus within 24 hours by polymerase chain reaction. *Avian Pathol.* 26:837-849.
11. Lin, J.H., Tseng, C.P., Chen, Y.J., Lin, C.Y., Chang, S.S., Wu, H.S., Cheng, J.C. (2008): Rapid differentiation of influenza A virus subtypes and genetic screening for virus variants by high-resolution melting analysis, *J. Clin. Microbiol.* Mar.: 1090-1097.
12. Pham, H.M., Konnai, S., Usui, T., Chang, K.S., Murata, S., Mase, M., Ohashi, K., Onuma, M. (2005): Rapid detection and differentiation of newcastle disease virus by real-time PCR with melting-curve analysis. *Arch. Virol.* 150: 2429-2438.
13. Reed, G.H., Kent, J.O., Wittwer, C.T. (2007): High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics.* 8(6): 597-608.
14. Seal, B. S., King, D. J., Bennett J. D. (1995): Characterization of newcastle disease virus isolates by reverse transcription per coupled to direct nucleotide sequencing and development of sequence database for pathotype prediction and molecular epidemiological analysis. *J. Clin. Microbiol.* 33:2624–2630.
15. Steer, P.A., Kirkpatrick, N.C., O'Rourke, D., Noormohammadi, A.H. (2009): Classification of fowl adenovirus serotypes by use of high-resolution melting-curve analysis of hexon gene region. *J. Clin. Microbiol.* 47(2): 311-321.
16. Tefvik Dorak, M. (2006): *Real-time PCR*, 1st Ed., Tylor & Francis Group, New York: 3-16.
17. Zorman-Rojs, U.O., Krapez, J., Grom, D., Barlic, M. (2002): Molecular detection and pathotyping of paramyxovirus type 1 isolates (newcastle disease virus). *Slov. Vet. Res.* 39(1): 39-45.

