آنالیز فیلوژنتیکی ژن F ویروس‌های نیوکاسل جدا شده در ایران طی سال‌های ۱۳۸۹ و ۱۳۹۰

تقی رستمعلی*[۱]، عبدالحمید شوشتری[۲]، سعید چرخکار[۳]، محمدحسن بزرگمهری‌فرد[٤]

چکیده

بیماری ویروسی نیوکاسل یکی از بیماری‌های مهم طیور میباشد که خسارات فراوانی را به دنبال دارد. باتوسعه روش‌های مولکولی، بیماریزایی ویروس بر اساس سکانس اسید آمینه در ناحیه شکسته شدن ژن F میسر شده است. در این مطالعه سکانس ۱٦۷٤ اسید نوکلئوتید ناحیه شکسته شدن ژن F ویروس نیوکاسل ۱۰ ایزوله جدا شده از طیور مورد بررسی قرار گرفت. این جدایه‌ها از همه‌گیری بیماری نیوکاسل بسیار حادی که طی سال های ۱۳۸۹ و ۱۳۹۰ در ایران روی داد جدا شد. این همه گیری منجر به تلفات بالا در طیور گوشتی، مادری و تخمگذار شد و با افت تولید در گله‌های تخمگذار و مادر نیز همراه بوده است. سکانس اسیدآمینه ویروس‌های جدا شده در این مطالعه با روش RT-PCR با ویروس‌های جدا شده در مطالعات قبلی ایران و همچنین با ویروس‌های موجود در بانک ژن مورد مقایسه قرار گرفت تا تغیرات احتمالی مورد بررسی قرار گیرد. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که این جدایه‌ها از نظر فیلوژنتیکی با ویروس‌های جدا شده ایران در مطالعات قبلی متفاوت بوده و مشابه ویروس‌های جدا شده از طیور کشورهای سرزمین‌های اشغالی فلسطین و چین بوده‌اند.

واژگان کلیدی: ژن فیوژن، ویروس بیماری‌نیوکاسل، آنالیز فیلوژنتیکی

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۲/۱٤ تاریخ پذیرش: ۹۲/۲/۲

مقدمه

ویروس نیوکاسل ویروس تک رشته ای RNA دار با قطبیت منفی با مقدار تقریبی ۱۵ کیلو باز می‌باشد که ٦ پروتئین را کد می‌کند. این پروتئین‌ها شامل RNA پلی‌مراز (L)، هماگلوتنین ـ نورآمینداز (HN) ـ پروتئین اتصال (F) ـ ماتریکس (M) - فسفوپروتئین (P) - نوکلئوکپسید (NP) که از ناحیه ٥′ شروع و به ۳′ خاتمه می‌یابد، می‌باشند. ویروس نیوکاسل می‌تواند به ویروس‌های بسیار بیماریزا (ولوژن)، بیماریزایی متوسط (مـزوژن) و بیماری‌زای کم (لنتوژن) تقسیم می‌گردد. برخـی سویه‌های کم بیماریزا به عنوان ویروس‌های غیر بیمـاری‌زا (سویه‌های غیر بیماری‌زای روده‌ای) در نظر گرفته می‌شوند (۱۲ و ۸، ۳).

بیماریزایی ویروس بر اساس سکانس اسید آمینه در ناحیه شکسته شدن ژن F می‌باشد. ژن F0 به عنوان گلیکوپروتئین آغازین باید شکسته شود و به پلی پتید F1 و F2 تبدیل شود تا بتواند عفونت‌زا باشد. قابلیت شکسته شدن مولکول F0 به طور مستقیم به حدت ویروس بستگی دارد. به نظر می‌رسد برای اینکه ویروس عفونت زا باشد، باید دارای ٤ اسیدآمینه بازی در جایگاه ۱۱٦ ـ ۱۱۲ و یک فنل آلانین در جایگاه ۱۱۷ باشد. حضور اسید آمینه‌های بازی در این موقعیت‌ها بدین معنا ست که شکسته شدن ژن F در ویروس‌های ولوژن می‌تواند با حضور پروتئازهایی که در بسیاری از بافت‌ها و ارگان‌ها یافت می‌شود انجام می‌شود اما برای ویروس‌های لنتوژن، شکسته شدن تنها با پروتئازهایی مانند تریپسین که می‌توانند آرژنین را تشخیص بدهند انجام می‌گیرد(۱۳و۱۱،۱۰،۳،۱).

مواد و روش‌کار

ـ جدا سازی ویروس

نمونه‌هایی از بافت مغز جوجه‌هایی با علایم عصبی که به موسسه رازی انتقال یافت، جدا شد (جدول ۱). مایع رویی حاصل از سوسپانسیون نمونه‌های مغز پس از سانتریفیوژ آماده و در جنین تخم مرغ عاری از پاتوژن (SPF) با سن ۱۱-۹ روزه تلقیح شد. مایع آلانتوئیک جمع‌آوری و به عنوان منبع RNA ویروسی قبل از مصرف در ۷۰- درجه سانتیگراد ذخیره گردید.

۱*- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دستیار تخصصی بیماریهای طیور، تهران، ایران (rostamali_t@yahoo.com)
۲ـ بخش بیماری‌های طیور موسسه تحقیقات و سرم سازی رازی، کرج، ایران
۳ـ دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه علوم درمانگاهی، تهران، ایران
٤ـ دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه علوم درمانگاهی، تهران، ایران

جدول ۱ـ مشخصات ویروس‌های جداه شده در این مطالعه

سن جوجه‌ها(روز)	نوع پرنده	محل جداسازی	تاریخ جداسازی	نام ایزوله
٤٢	گوشتی	یزد	فروردین ۱۳۹۰	۱/۱۰
۳٥	گوشتی	اردبیل	مهرماه ۱۳۹۰	۳٤/۱۰
۳۷	گوشتی	سمنان	مهرماه ۱۳۹۰	٥۲/۱۰
۱۲٦	تخمگذار	اصفهان	مهرماه۱۳۸۹	۹٤/۰۹
۲۹	گوشتی	ایلام	آذر۱۳۸۹	۱٤۷/۰۹
۳۸	گوشتی	مازندران	بهمن ۱۳۸۹	۱۹۷/۰۹
٤۹	مادر	مازندران	آبان۱۳۸۹	۲۱/۰۹
٤۰	گوشتی	اصفهان	شهریور۱۳۹۰	۱٦/۱۰
۲٦	گوشتی	یزد	خرداد۱۳۹۰	۱۰٥/۱۰
۳۳	گوشتی	تهران	شهریور۱۳۹۰	۲۱۳/۱۰

ـ استخراج RNA

استخراج RNA به وسیله کیت High Pure Viral Nucleotic Acid مطابق پروتکل شرکت سازنده (شرکت Roche) انجام گرفت و در نهایت RNA با ٥۰ میکرولیتر بافر جمع آوری و در محلول آب مقطر استریلی که فاقد RNASe بود حل گردید و سپس برای استفاده در ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید.

ـ آزمایش RT-PCR

در این مطالعه چهارجفت پرایمر برای تکثیر دو قطعه ژنی مورد استفاده قرار گرفت که در نهایت قطعه ژنی به طول تقریبی ۱٦۷۰ جفت باز تولید گردید (جدول ۲) (٦و٤).

جدول ۲ـ پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

	پرایمر	طول قطعه ژن تولیدشده	ناحیه تکثیر
پرایمر فوروارد	3-CAT CTT CTA CCA GGA TCC A –5	۸۱۰bp	۸۲۰- ۱۰
پرایمر ریورس	3-CCA AGA GTT GAS TCT GTG AGT C – 5		
پرایمر فوروارد	5-TCA CTC TAT CCG TAG GAT ACA AGA GTC TG-3	۱۳٤۹bp	۱٦۸٤- ۳۳٥
پرایمر ریورس	5- GAT CTA GGG TAT TAT TCC CAA GCCA – 3		

RT-PCR با استفاده از روش یکطرفه با کیت تیتان ساخت شرکت Roche با پیروی از پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت.

شرایط برای نسخه برداری معکوس شامل ٤٥ دقیقه حرارت در دمای ٤٥ درجه سانتی گراد و PCR با دناتوراسیون در دمای ۹٤ درجه به مدت ۳ دقیقه و سپس ٤۰ سیکل تکثیر(۹٤ درجه به مدت یک دقیقه، ٥۰ درجه به مدت یک دقیقه و ٦۸ درجه به مدت یک دقیقه) و بسط آغازگرها در دمای ٦۸ درجه به مدت ده دقیقه انجام گرفت.

محصول نهایی رنگ‌آمیزی شده در ژل آگار ۲٪ با اتیدیوم بروماید، در حضور مارکر ۱۰۰bp به مدت ٤٥ دقیقه الکتروفوز شد. محصول PCR با استفاده از روش Comfort Read

Method سکانس شد. سکانس اسیدهای نوکلوتید بوسیله نرم افزار Bio Edit V7.0.0 و روش Clustal W Multiple alignment ویرایش و آنالیز و رسم درخت فیلوژنتیک توسط برنامه MEGA 5 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) با فرمت Neighbor-Joining Algorithm و بوت استراپ ۱۰۰۰ (1000 bootstraps) انجام گرفت (نمودار ۱).

نتایج

ـ علایم بالینی

در سال‌های ۱۳۸۹ و۱۳۹۰ در پی همه‌گیری بیماری نیوکاسل از ده وقوع بیماری در نقاط مختلف کشور نمونه جمع‌آوری و مورد بررسی قرار گرفت. علایم بالینی در این همه‌گیری با غالبیت علایم تنفسی وعصبی شامل افسردگی، بی حالی و کزکردگی، افزایش تعداد تنفس، ادم سر و صورت و در برخی موارد اسهال بود. در کالبد گشایی، التهاب نای همراه با خونریزی، ملتهب و کدر شدن کیسه‌های هوایی، پرخونی و خونریزی در قسمت‌های مختلف دستگاه گوارش شامل خونریزی در راس غدد پیش‌معده، روده باریک و فولیکول‌های لنفاوی در محل دوشاخه شدن روده‌کور دیده شد. در برخی از مزارع تلفات بالا منجر به حذف گله شد.

ـ ناحیه شکسته شدن ژن F و آنالیز فیلوژنتیکی

در این مطالعه قطعه ژنی به طول تقریبی ۱۶۷۰ جفت باز شامل ناحیه شکسته شدن ژن F تکثیر و مورد بررسی قرار گرفت.

آنالیز سکانس اسید آمینه ناحیه شکسته شدن ژن F شامل ٤ اسید آمینه بازی در جایگاه ۱۱۶-۱۱۲ و یک فنل‌آلانین در جایگاه ۱۱۷ می‌باشد. اسید آمینه در ناحیه شکسته شدن ژن F دارای توالی ^{112}RRQKRF^{117} بوده است. همه ایزوله‌هایی که در مطالعات قبلی از کشور ایران جدا شد مورد بررسی قرار گرفت و همگی دارای ردیف اسید آمینه ^{112}RRQKRF^{117} بودند.

میزان شباهت و ردیف بین ایزوله‌های مورد مطالعه ۹۹/۷-۹۸/۳ درصد بوده است. بیشترین شباهت اسیدهای نوکلئوتیدی با ایزوله‌های جداشده از کشورهای چین و سرزمینهای اشغالی فلسطین بود و میزان این شباهت٩٧/٤-٩٥/٩٪ بود. میزان شباهت ایزوله‌های مورد مطالعه در این بررسی با ایزوله‌های جدا شده از کشورمان در مطالعات قبلی ۹۲/۷-۹۱/۲ بود.

مطالعات فیلوژنتیکی انجام شده نشان داد که ویروس‌های جدا شده در مطالعات قبلی در ایران مشابه ویروس‌های جدا شده در کشورهای ایتالیا و روسیه بود.

تمام ویروس‌های جدا شده در این مطالعه براساس سکانس اسیدهای آمینه متعلق به کلاس II و ژنوتیپ VIId می‌باشند در حالی که کلیه ایزوله‌های جدا شده در مطالعات قبلی در ایران که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت متعلق به ژنوتیپ VIIb بوده‌اند.

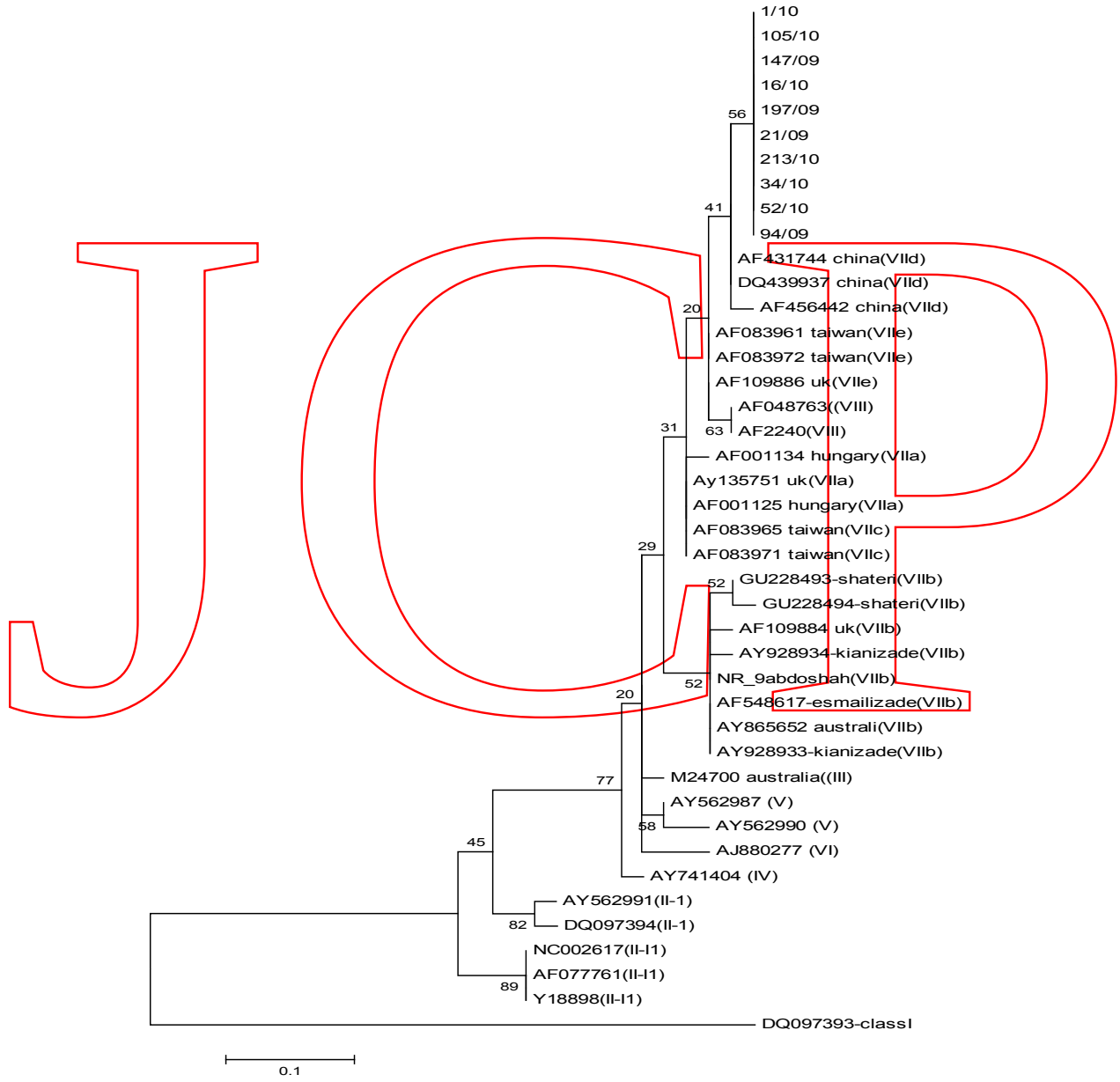
سکانس ۱۰ ایزوله ی مورد مطالعه با سویه‌های واکسینال B1 و Lasota مورد مقایسه قرار گرفتند. درصد تفاوت فیلوژنتیکی بین آنها حدود۱۹ -۱۷/۵٪ بود.

بحث

گسترش تکنیک های تشخیص مولکولی این امکان را فراهم آورده است تا بتوانیم ویروس های بسیار پاتوژن را تشخیص بدهیم. تعیین توالی اسید های آمینه در ناحیه شکسته شدن ژن F با استفاده از روش RT-PCR می‌تواند روشی برای تشخیص ویروس‌های حاد بیماری نیوکاسل باشد(۹).

همه‌گیری اخیر بیماری نیوکاسل در ایران ابتدا در مرکز کشور گزارش شد و سپس به سرعت در سایر نقاط کشور گسترش یافت. مطالعات فیلوژنتیکی ایزوله های جدا شده در کشور طی سال‌های ۱۳۸۹ و ۱۳۹۰ نشان داد که ویروس‌هایی که عامل همه‌گیری در کشور بوده‌اند ویروس‌هایی هستند که با ویروس‌هایی که در مطالعات قبلی مورد بررسی قرار گرفتند متفاوت می‌باشند. سکانس اسیدهای آمینه ویروس‌های مورد بررسی در این مطالعه دارای ردیف اسیدهای آمینه ^{112}RRQKRF^{117} در ناحیه شکسته شدن ژن F بودند. این در

حالی است که همه ویروس‌های مورد مطالعه در بررسی‌های گذشته دارای ردیف اسیدهای آمینه ^{112}RRQKRF^{117} در ناحیه شکسته شدن ژن F بوده‌اند و میزان شباهت ایزوله‌های مورد مطالعه با این ویروس‌ها ۹۲/۷-۹۱/۲٪ بوده است که این تفاوت در ناحیه شکسته شدن، در حدت ویروس تاثیری نداردا‌ما می‌تواند ناشی از موتاسیون و یا ورود ویروس از کشورهای دیگر باشد(٦و٥).



نمودار ۱ـ درخت فیلوژنتیک جدایه‌های NDV بر اساس سکانس قطعه ۱٦۷٤ نوکلئوتیدی از ژنF. درخت فوق براساس روش Neighbor-Joining و 1000 Bootstrapsرسم شده است.

تقسیم‌بندی‌های متفاوتی از نظر ژنتیکی برای ویروس‌های نیوکاسل وجود دارد که درمهمترین آنها دو کلاس اصلی ویروس‌های بیماری نیوکاسل وجود دارند که شامل کلاسI و کلاسII می‌باشند. کلاس I به نه ژنوتیپ و کلاس II به ده ژنوتیپ تقسیم می‌شود(۱۰و۲). در مطالعات انجام شده نشان داده شد که ویروس‌های مورد مطالعه در این بررسی در کلاس II و ژنوتیپ VIId قرر دارند و شباهت آنها با ویروس‌های جدا شده در کشورهای چین و سرزمین‌های اشغالی فلسطین بوده است. ویروس‌های این ژنوتیپ در بسیاری از کشورهای خاور دور از جمله چین، کره، اندونزی و هنگ کنگ گزارش شده‌اند. در حالیکه ویروس‌های بررسی شده در مطالعات قبلی در ژنوتیپ VIIb قرار داشته و مشابه ویروس‌های جدا شده در ایتالیا و روسیه بوده‌اند. ویروس‌های این ژنوتیپ شامل ایزوله‌هایی از کشورهای اروپایی، آفریقای جنوبی و موزابیک هستند که اولین گزارشات آن مربوط به اواخر دهه ۸۰ واوایل دهه ۹۰ بود(۱۵ و ۱٤، ۷، ٦).

پارامیکسوویروس پرندگان دارای ۹ سروتیپ می‌باشد(PMV1-9). با توجه به اینکه ویروس‌های نیوکاسل طیور متعلق به سروتیپ I (PMV1) می‌باشند، به طور طبیعی واکسن‌ها باید در برابر بیماری محافظت ایجاد نماید. مقایسه توالی اسیدهای نوکلئوتید ده ایزوله مورد مطالعه با واکسن‌های شایع در صنعت طیور شامل B1 و Lasota شباهت ۸۲/۵ – ۸۱ ٪ را نشان می‌دهند. واکسن‌های فوق در ژنوتیپ II و کلاس II قرار دارند و از نظر ژنتیکی فاصله زیادی را با ایزوله‌های مورد مطالعه نشان می‌دهند. درک این موضوع ممکن است نیاز به تولید واکسن‌هایی که دارای قرابت ژنتیکی بیشتری با ویروس‌های فیلدی باشند را ترغیب نماید(۱۰).

این مطالعه نشان داد که اپیدمی بیماری نیوکاسل که در سال ۱۳۸۹ و ۱۳۹۰در کشور روی داد توسط ویروس‌هایی متفاوت از ویروس‌های گزارش شده در بررسی‌های گذشته بود و به احتمال فراوان این ویروس اخیرا وارد کشور (اگزوتیک) شده است. از این رو با توجه به اینکه کشورمان، کشوری وارد کننده بسیاری از فروردهها با مرزهای جغرافیایی وسیع است نظارت و مراقبت و کنترل بیشتر در این امر ضروری است.

REFERENCES

1. Aldous, E.W., Alexander, D.J. (2001): Detection and differentiation of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus type 1). Avian Pathol. 30: 117– 128.
2. Aldous, E. W. (2003): A molecular epidemiological study of avian paramyxiovirus 1(Newcastle disease virus) isolates by phylogenetic analysis of partial nucleotide sequence of the fusion protein gene. Avian pathology .32:239-257
3. Alexander, D.J. (2003): Newcastle Disease. In: Saif, Y.M et al. Diseases of Poultry, 11th ed., Iowa State Press. Ames, Iowa. pp : 64-87.
4. Capua, I., Alexander, D.J. (2009): Avian Influenza and Newcastle Disease: A Field and Laboratory Guide. 1st ed. Springer-verlag. p: 19-46.
5. Kianizadeh, M. (1999): Biological and molecular characterization of NDV isolated from Iran. Arch. Razi Inst. 50.
6. Kianizadeh, M., Aini, I., Omar, A.R., Yusoff, K.S.M., Kargar, R. (2002): Sequence and phylogenetic analysis of the fusion protein cleavage site of Newcastle disease virus field isolates from Iran. Acta Virol. 46:247-251.
7. Madani, R., Golchinfar, F., Pourbakhsh, S., Kianizadeh, A., Frozandeh, M.M. (2002): Preparation of monoclonal antibody to fusion glycoprotein of Newcastle disease virus isolated from Iran. 53:87
8. Naresh, J. (2009): Phylogenetic analysis of Newcastle disease viruses isolated from waterful in the upper Midwest region of the united states. Virology journal. 6:191.
9. OIE, A. (2008): Newcastle disease. In: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals: OIE Terrestrial Manual.
10. Patti, J.M. (2007): Antigenic differences among Newcastle disease virus strains of different genotypes used in vaccine formulation affect viral shedding after avirulent challange. Vaccine 25:7238-7246.

11. Patti, J.M. (2010): Newcastle disease, evolution of genotypes and related diagnostic challenges. Infection, genetic and evolution. 10:26-35
12. Perozo, F. (2008): Biological and phylogenetic characterization of virulent Newcastle disease virus circulating in Mexico. Avian diseases. 52:472-479
13. Yu, L. (2001): Characterization of newly emerging Newcastle disease virus isolates from the People's Republic of China and Taiwan. J. Clin. Microbiol. 39:3512–351
14. Yong, J.L. (2004): Molecular epidemiology of Newcastle disease viruses isolated in south Korea using sequencing of the fusion protein cleavage site region and phylogenetic relationships. Avian Pathology.33(5):482-491
15. Rui, Z. (2010): Phylogenetic characterization of Newcastle disease virus in the mainland of China during (2001-2009):Veterinary Microbiology.141:246-257.

JCP