

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 بزرگمهری فرد^۴

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 ۱۶۷۴ 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 حاد که طی سال‌های ۱۳۸۹ و ۱۳۹۰ در ایران روی داد جدا شد. این همه‌گیری منجر به تلفات بالا در طیور گوشتی، مادری و تخمگذار شد و بافت تولید در گله‌های تخمگذار و مادر نیز همراه بوده است. سکانس اسید آمینه 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 تغییرات 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 بیماری نیوکاسل، آنالیز فیلوژنتیکی

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۲/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۲/۲/۲

مقدمه

ویروس نیوکاسل ویروس تک رشته‌ای RNA دار با قطبیت منفی با مقدار تقریبی ۱۵ کیلو باز می‌باشد که ۶ پروتئین را کد می‌کند. این پروتئین‌ها شامل RNA پلی‌مراز (L)، هماگلوترین - نورآمینداز (HN) - پروتئین اتصال (F) - ماتریکس (M) - فسفو پروتئین (P) - نوکلئوکسپید (NP) که از ناحیه ۵' شروع و به ۳' خاتمه می‌یابد، می‌باشند. ویروس نیوکاسل می‌تواند به ویروس‌های بسیار بیماریزا (ولوژن)، بیماری‌زایی متوسط (مزوژن) و بیماری‌زای کم (لنتوژن) تقسیم می‌گردد. برخی سویه‌های کم بیماریزا به عنوان ویروس‌های غیر بیماری‌زا

سویه‌های غیر بیماری‌زای روده‌ای) در نظر گرفته می‌شوند

(۱۲ و ۸).

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 عفونت‌زا باشد، باید دارای ۴ اسید آمینه بازی در جایگاه ۱۱۶ - ۱۱۲ و یک فنل آلانین در جایگاه ۱۱۷ باشد. حضور اسید آمینه‌های بازی در این موقعیت‌ها بدین معنا است 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 (۱۳، ۱۱، ۱۰، ۳، ۱).

مواد و روش کار

- جدا سازی ویروس

نمونه‌هایی از بافت مغز جوجه‌هایی با علائم 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 ۹-۱۱ روزه تلقیح شد. مایع آلتوتوئیک 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)

۲- بخش بیماری‌های طیور، موسسه تحقیقات و سرم سازی رازی، کرج، ایران

۳- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه علوم درمانگاهی، تهران، ایران

۴- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه علوم درمانگاهی، تهران، ایران

جدول ۱- مشخصات ویروس‌های جداء شده در این مطالعه

سن جوجه‌ها(روز)	نوع پرند	محل جداسازی	تاریخ جداسازی	نام ایزوله
۴۲	گوشتی	یزد	فروردین ۱۳۹۰	۱/۱۰
۳۵	گوشتی	اردبیل	مهرماه ۱۳۹۰	۳۴/۱۰
۳۷	گوشتی	سمنان	مهرماه ۱۳۹۰	۵۲/۱۰
۱۲۶	تخمگذار	اصفهان	مهرماه ۱۳۸۹	۹۴/۰۹
۲۹	گوشتی	ایلام	آذر ۱۳۸۹	۱۴۷/۰۹
۳۸	گوشتی	مازندران	بهمن ۱۳۸۹	۱۹۷/۰۹
۴۹	مادر	مازندران	آبان ۱۳۸۹	۲۱/۰۹
۴۰	گوشتی	اصفهان	شهریور ۱۳۹۰	۱۶/۱۰
۲۶	گوشتی	یزد	خرداد ۱۳۹۰	۱۰۵/۱۰
۳۳	گوشتی	تهران	شهریور ۱۳۹۰	۲۱۳/۱۰

RNAse بود حل گردید و سپس برای استفاده در ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید.
- 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 ۱۶۷۰ جفت باز تولید گردید (جدول ۲) (۶ و ۷).

- استخراج RNA به وسیله کیت High Pure Viral Nucleotic Acid مطابق پروتکل شرکت سازنده (شرکت Roche) انجام گرفت و در نهایت RNA با ۵۰ میکرولیتر بافر جمع آوری و در محلول آب مقطر استریلی که فاقد

جدول ۲- پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

پرایمر	طول قطعه ژن تولیدشده	ناحیه تکثیر
3-CAT CTT CTA CCA GGA TCC A -5	۸۱۰bp	۱۰ - ۸۲۰
3-CCA AGA GTT GAS TCT GTG AGT C - 5		
5-TCA CTC TAT CCG TAG GAT ACA AGA GTC TG-3	۱۳۴۹bp	۳۳۵ - ۱۶۸۴
5- GAT CTA GGG TAT TAT TCC CAA GCCA - 3		

مدت یک دقیقه، ۵۰ درجه به مدت یک دقیقه و ۶۸ درجه به مدت یک دقیقه) و بسط آغازگرها در دمای ۶۸ درجه به مدت ده دقیقه انجام گرفت.

محصول نهایی رنگ آمیزی شده در ژل آگار ۲٪ با اتیدیوم بروماید، در حضور مارکر ۱۰۰bp به مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز شد. محصول PCR با استفاده از روش Comfort Read

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 ۴۵ دقیقه حرارت در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد و PCR با داناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه به مدت ۳ دقیقه و سپس ۴۰ سیکل تکثیر (۹۴ درجه به

ایزوله‌های جدا شده از کشورهای چین و سرزمینهای اشغالی فلسطین بود و میزان این شباهت ۹۷/۴-۹۵/۹٪ 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 VIIId 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 ایزوله‌ی مورد مطالعه با سویه‌های واکسینال B1 و Lasota مورد مقایسه قرار گرفتند. درصد تفاوت فیلوژنتیکی بین آنها حدود ۱۹-۱۷/۵٪ بود.

بحث

گسترش تکنیک‌های تشخیص مولکولی این امکان را فراهم آورده است تا بتوانیم ویروس‌های بسیار پاتوژن را تشخیص بدهیم. تعیین توالی اسیدهای 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 ایزوله‌های 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 $^{117}RRQKRF^{112}$ در ناحیه شکسته شدن ژن F بودند. این در

Method سکانس شد. سکانس اسیدهای نوکلئوتید 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 استرپ ۱۰۰۰ (1000 bootstraps) انجام گرفت (نمودار ۱).

نتایج

- علایم بالینی

در سال‌های ۱۳۸۹ و ۱۳۹۰ 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 و عصبی شامل افسردگی، بی‌حالی 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 پیش‌معدده، روده باریک و فولیکول‌های لنفوی در محل دوشاخه شدن روده‌کور دیده شد. در برخی از مزارع تلفات بالا منجر به حذف گله شد.

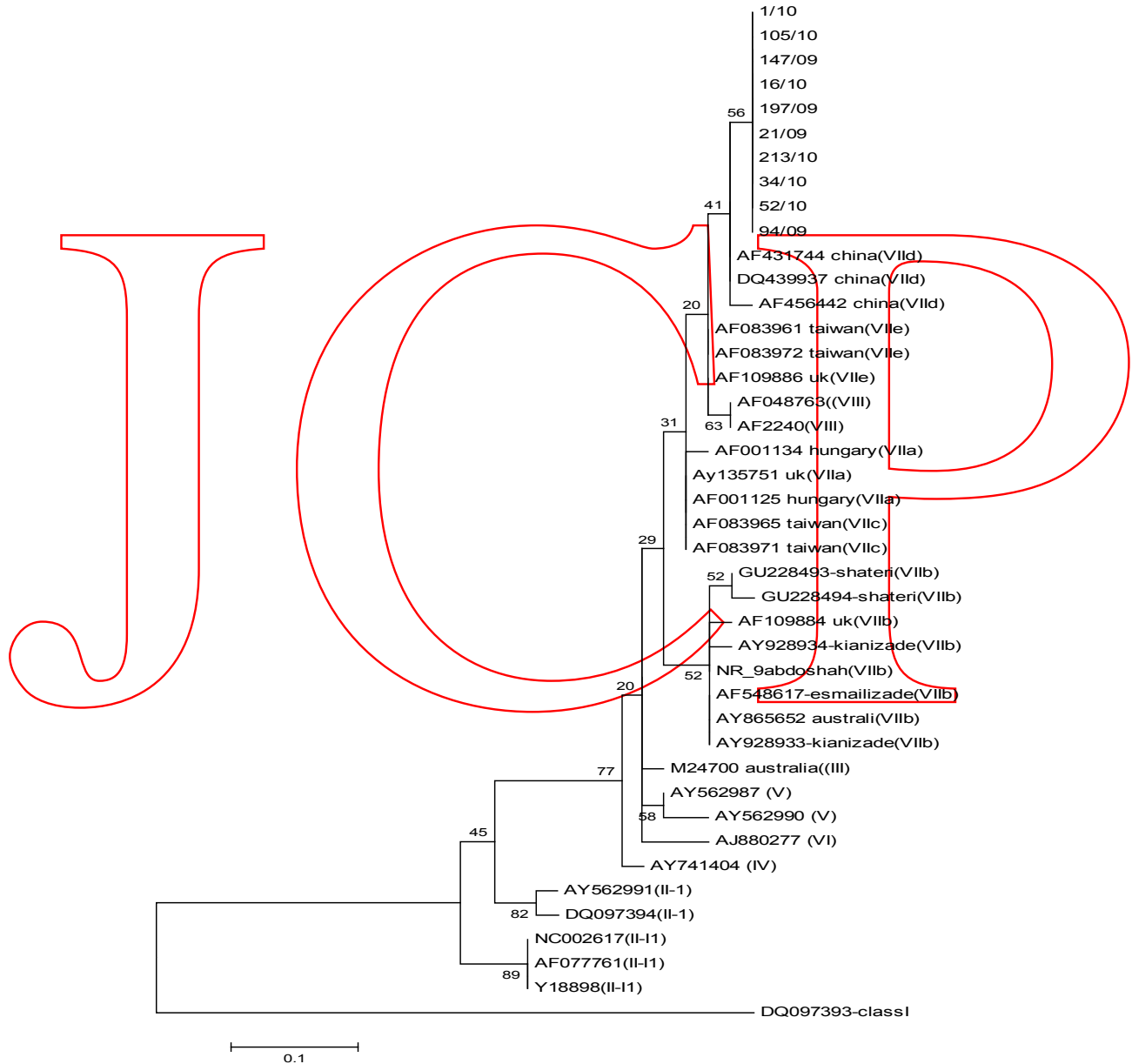
- ناحیه شکسته شدن ژن F و آنالیز فیلوژنتیکی

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

میزان شباهت و ردیف بین ایزوله‌های مورد مطالعه ۹۸/۳-۹۹/۷ درصد بوده است. بیشترین شباهت اسیدهای نوکلئوتیدی با

تفاوت در ناحیه شکسته شدن، در حدت ویروس تأثیری ندارد اما می‌تواند ناشی از موتاسیون و یا ورود ویروس از کشورهای دیگر باشد (۶ و ۵).

حالی است که همه ویروس‌های مورد مطالعه در بررسی‌های گذشته دارای ردیف اسیدهای آمینه $^{117}RRQKR^{112}$ در ناحیه شکسته شدن ژن F بوده‌اند و میزان شباهت ایزوله‌های مورد مطالعه با این ویروس‌ها ۹۲/۷-۹۱/۲٪ بوده است که این



نمودار ۱- درخت فیلوژنتیک جدایه‌های NDV بر اساس سکانس قطعه ۱۶۷۴ نوکلئوتیدی از ژن F. درخت فوق براساس روش Neighbor-Joining و 1000 Bootstraps رسم شده است.

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 paramyxovirus 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., Pournabksh, 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 waterfowl 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 challenge. *Vaccine* 25:7238-7246.

تقسیم‌بندی‌های متفاوتی از نظر ژنتیکی برای ویروس‌های نیوکاسل وجود دارد که درمهمترین آنها دو کلاس اصلی ویروس‌های بیماری نیوکاسل وجود دارند که شامل کلاس I و کلاس II می‌باشند. کلاس I به نه ژنوتیپ و کلاس II به ده ژنوتیپ تقسیم می‌شود (۲۰۱۰). در مطالعات انجام شده نشان داده شد که ویروس‌های مورد مطالعه در این بررسی در کلاس II و ژنوتیپ VIIId قرار 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 موزامبیک هستند که اولین گزارشات آن مربوط به اواخر دهه ۸۰ و اوایل دهه ۹۰ بود (۱۵ و ۱۶، ۶).

پارامیکسوویروس پرندگان دارای ۹ سروتیپ می‌باشد (PMV1-9). با توجه به اینکه ویروس‌های نیوکاسل طيور متعلق به سروتیپ I (PMV1) می‌باشند، به طور طبیعی واکنش‌ها باید در برابر بیماری محافظت ایجاد نماید. مقایسه توالی اسیدهای نوکلئوتید ده ایزوله مورد مطالعه با واکنش‌های شایع در صنعت طيور شامل B1 و Lasota شباهت ۸۲/۵ - ۸۱٪ را نشان می‌دهند. واکنش‌های 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 واکنش‌هایی 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 ۱۳۹۰ در کشور روی داد توسط ویروس‌هایی متفاوت از ویروس‌های گزارش شده در بررسی‌های گذشته بود و به احتمال فراوان این ویروس اخیراً وارد کشور (اگزوتیک) شده

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.

JCIP