نشریه دامپزشکی
در
پژوهش و سازندگی شماره ۱۱۰ بهار ۱۳۹۵
DOI:10.22034/vj.2016.105746

بررسی حساسیت روش Real-time PCR برای تشخیص ویروس بیماری نیوکاسل

• **سمیه ستاری**
دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد دام، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی کرمانشاه
• **محمدحسین بناءبازی (نویسنده مسئول)**
عضو هیات علمی، بخش پژوهشهای بیوتکنولوژی، موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، کرج
• **شیدا ورکوهی**
عضو هیات علمی، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی کرمانشاه
• **میثم طباطبایی**
عضو هیات علمی، تیم تحقیقاتی نانو سیستم‌ها , پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج
تاریخ دریافت: خرداد ۹۴ تاریخ پذیرش: مهر ۹۴
Email: h_banabazi@asri.ir

چکیده

بیماری نیوکاسل یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های ویروسی طیور در سرتاسر جهان است. باتوجه به اینکه روش‌های سنتی قابلیت محدودی در کنترل این بیماری دارند، هدف از انجام این مطالعه استفاده از تکنولوژی‌های نوین برای تشخیص به موقع بیماری جهت کاهش خسارت پیش روی صنعت طیور می‌باشد. در این مطالعه به منظور تشخیص ویروس نیوکاسل، یک روش Real-time-PCR بهینه سازی گردید. استخراج RNA با استفاده از کیت RNease mini (شرکت کیاژن، آمریکا) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. RNA استخراج شده با $۶۸/۲۳\times۱۰^{۹}$ رونوشت اولیه به صورت سری رقت‌های ۱۰۰ µl برای انجام واکنش Real-time PCR تهیه شد. در این آزمایش از سویه B۱ واکسن ویروس استفاده شد. آزمایش Real-time-PCR با استفاده از کیت تجاری ساخت شرکت Genekam Biotechnology کشور آلمان انجام شد. حساسیت واکنش Real-time PCR با توجه به سری رقت‌های تهیه شده ۱×۱۰^{-۳۴} رونوشت/میکرولیتر تعیین گردید. با توجه به اینکه سرعت و دقت تشخیص ویروس نیوکاسل در همه‌گیری‌ها، نقش مهمی در کنترل بیماری دارد. استفاده از این روش به عنوان یک روش تشخیصی با حساسیت بالا توصیه می‌گردد.

کلمات کلیدی: ویروس بیماری نیوکاسل(NDV)، تشخیص، Real-time PCR، حساسیت روش تشخیصی

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 110 pp: 66-71

Assessment of the sensitivity of Real-time PCR for diagnosis of Newcastle disease virus

Sattari, S., M.Sc student of animal genetics and breeding, Faculty of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran. Banabazi, MH., Member of scientific board, Department of Biotechnology, Animal Science Research Institute of Iran (ASRI), Karaj, Iran. Vakoohi, Sh., Member of scientific board, Faculty of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran. Tabatabaei, M. Member of scientific board, Nanosystems Research team, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran.

Received: May 2015 **Accepted: September 2015**

Email: h_banabazi@asri.ir

Newcastle disease is one of the most serious viral diseases in the poultry worldwide. Since the traditional strategies have been not control it well, the aim of this study was to introduce new methods for early and rapid diagnosis of Newcastle. In this study, to detect the virus, a Real-time PCR method was optimized,Viral RNA was extracted from strain B1 using the kit RNease mini (Qiagen, USA), according to the manufacturer's instructions. This sample had 68.23×10^{9}copy numbers of viral RNA per each microliter. Then, a serial dilution as 100-fold was prepare from the initial sample. Then, these dilutions were simultaneously applied in reverse transcription and Realtime PCR using commercial kits (Genekam Biotechnology, Germany) according to the manufacture's instruction. The sensitivity of Real-time PCR reaction was determined based on serial dilutions of 1×10^{-34} copy number per micro liter. Since, speed and accuracy in diagnosis of contagious of Newcastle disease virus plays an important role to control the disease, so adopting this method is recommended as a diagnostic test with high sensitivity.

Keyword: Newcastle disease virus (NDV), diagnosis, Real-time PCR, Sensitivity

مقدمه

بیماری نیوکاسل عفونت شایع طیور می‌باشد که عموماً به صورت ناراحتی تنفسی و عصبی نشان داده می‌شود. عامل این بیماری ویروس نیوکاسل می‌باشد و در یک دوره شیوع بیماری می‌تواند باعث تلفات بسیاری در طیور شود که از نظر اقتصادی بسیار حائز اهمیت می‌باشد (Alexander ,1991). سال‌هاست که بررسی جوانب مختلف ویروس NDV در کانون توجهات است، ولی از همه مهم‌تر این که به دلیل سرعت بالای گسترش بیماری در گله، تشخیص سریع آن به منظور کنترل بهینه و پیشگیری به هنگام اهمیت فوق‌العاده‌ای دارد. از همین رو در سرتاسر جهان با استفاده از روش‌های گوناگون اعم از کلاسیک و امروزین، 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 (AL-Garib et al ,2003). این بیماری ۲۰۰ گونه از پرندگان از جمله بوقلمون، ماکیان، طوطی سانان، گنجشک سانان، اردک، غاز، مرغ، کبوتر و گونه‌های دیگر را در بر می‌گیرد. ویروس از طریق دستگاه تنفس منتقل می‌شود و می‌تواند در میزبان مرده یا مدفوع زنده بماند (Alexander, 1991). این بیماری به عنوان سروتیپ ۱ پارامیکسوویروس مرغی (APMV-1)[1] شناخته می‌شود (Alexander, 1991). استفاده از روش مولکولی بدلیل سریع بودن، حساس بودن و عدم استفاده از حیوانات آزمایشگاهی در مقایسه با روش‌های مانند جداسازی ویروس و روش‌های سرولوژیکی جهت تشخیص بیماری کاربرد و اهمیت بالاتری دارد (AL-Garib et al, 2003). بر اساس علایم بیماری تشخیص سریع این بیماری در جلوگیری از صدمات اقتصادی ناشی از تلفات بسیار حائز اهمیت می‌باشد. امروزه در اکثر آزمایشگاه‌های دامپزشکی تشخیص از طریق سرولوژی صورت می‌پذیرد. روش مولکولی Real-time PCR که از حساسیت بالایی برخوردار است و می‌تواند در تشخیص سریع بیماری به ما کمک کند و در موارد شیوع یک اپیدمی در جلوگیری از تلفات و ضررهای اقتصادی وارده، موثر باشد. هدف از انجام این مطالعه بهینه سازی روش تشخیص ویروس نیوکاسل با استفاده از تکنیک مولکولی Real-time PCR می‌باشد.

مواد و روش‌ها

ویروس مورد استفاده در این مطالعه، ویروس واکسن نیوکاسل (سویه B1) تولید شده در موسسه رازی بوده است. استخراج RNA با استفاده از پروتکل Purification of Viral RNA (Spin protocol) کیت RNease mini (شرکت کیاژن، آمریکا) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده بعمل آمد. به منظور اطمینان از کیفیت مطلوب RNA استخراج شده و تعیین غلظت آن، با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر نانودراپ ۲۰۰۰ (شرکت Thermo Fisher آمریکا) جذب هر نمونه، در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ خوانده شود. به منظور تعیین حساسیت روش مورد مطالعه پس از استخراج RNA رقت‌های ۱/۱۰۰ به صورت متوالی از تیتر مشخصی از ویروس تهیه

گردید. واکنش‌های ساخت cDNA و PCR در قالب یک واکنش مطابق با شرایط مندرج در جدول ۱ و با استفاده از کیت تجاری تشخیص ویروس نیوکاسل (شرکت Genekam Biotechnology آلمان) و با دستگاه Real-time PCR (شرکت BIORAD، آمریکا) بر روی رقت‌های تهیه شده، انجام شد. کنترل‌های مثبت و منفی نیز در کیت مذکور تعبیه شده و طبق دستور شرکت سازنده آماده گردیدند. در این آزمایش معیار تشخیص حساسیت، حداقل رقت ویروس بیماری در میان سریالی از رقت‌های مختلف تهیه شده از RNA استخراج شده یک نمونه واکسن در نظر گرفته شد. بر این اساس، حداکثر حساسیت مورد مطالعه، حداقل رقتی است که در آن همچنان یک نمودار با سیکل آستانه‌ای کمتر از ۴۰ تشکیل گردد. با تعیین غلظت RNA ویروسی استخراج شده از نمونه اولیه و اطلاع از وزن مولکولی کل RNA تشکیل‌دهنده ژنوم هر تک ویروس، می‌توان تعداد نسخه RNA ویروسی موجود در نمونه اولیه را نیز تعیین و میزان حساسیت را بطور دقیق‌تر و بر اساس حداقل تعداد نسخه RNA ویروسی قابل تشخیص به روش Real-time PCR برآورد و گزارش نمود.

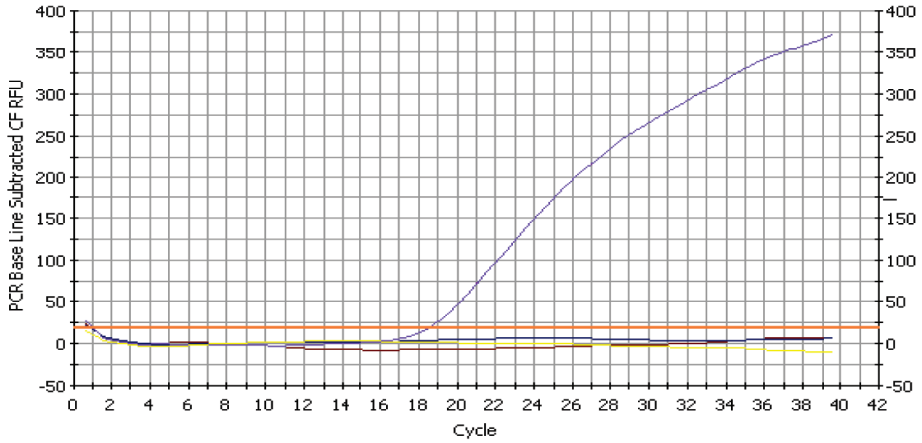
نتایج و بحث

نتایج نشان می‌دهدکه تعداد رونوشت از ویروس بیماریزای نیوکاسل، که از یک نمونه واکسن سویه B1 جدا گردیده بود معادل $۲۳/۶۸\times۱۰^{۹}$ محاسبه گردید و نیز غلظت اولیه نمونه مورد استفاده ۵۳۳/۷ نانوگرم/میکرولیتر بود. همانطور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، تکثیر نمونه کنترل مثبت و کنترل منفی برای آزمایش Real-time PCR طبق دستورالعمل کیت مورد استفاده با موفقیت انجام و سیکل آستانه ۲ برای نمونه کنترل مثبت ۱۸/۵۵ گزارش گردید که این تکثیر می‌تواند نشان‌دهنده موفقیت در تکثیر نمونه‌های مورد آزمایش باشد.

همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، آخرین نمودار تکثیر در رقت $۱۰^{-۳۴}$ با سیکل آستانه‌ای برابر با ۳۸/ ۴۴ نسبت به نمونه RNA استخراج شده با تعداد $۶۸/۲۳\times۱۰۹$ رونوشت/ ماکرولیتر از نمونه ویروس بکار رفته در واکسن سویه B1 تشکیل گردیده است. طبق دستورالعمل کیت سیکل آستانه (ct) کمتر از ۳۶(ct≤۳۶) قابل قبول، سیکل آستانه‌ای بین ۳۶ تا ۴۰ در حد آستانه (۴۰≤ct ≤۳۶) و بالاتر از این سیکل غیرقابل قبول می‌باشد. محاسبه تعداد کپی نامبر در نمونه RNA با استفاده از معادله ۱ محاسبه گردید است. بدین ترتیب، در مطالعه حاضر، حداکثر حساسیت روش Real-time PCR برای تشخیص بیماری نیوکاسل در طیور مبتلا یا به عبارت دیگر کمترین میزان رقت قابل تشخیص از ویروس نیوکاسل در بافت‌ها

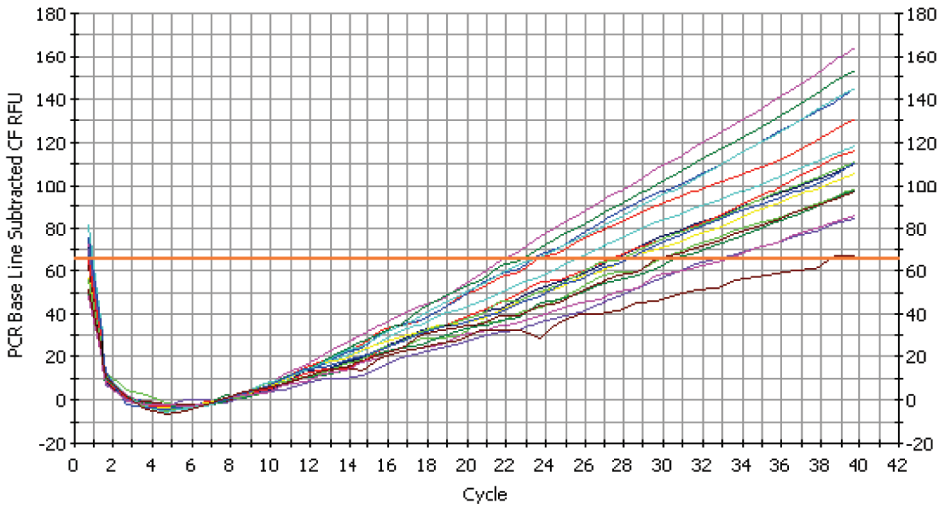
جدول ۱- شرایط دمایی و چرخه‌های آزمون Real-time PCR

دما	زمان	چرخه	
۴۲ درجه سانتی‌گراد	۳۶۰۰ ثانیه	۱چرخه	۱
۷۰ درجه سانتی‌گراد	۶۰۰ ثانیه		
۹۵ درجه سانتی‌گراد	۱۵ ثانیه	۴۰چرخه	۲
۵۲ درجه سانتی‌گراد	۶۰ ثانیه		

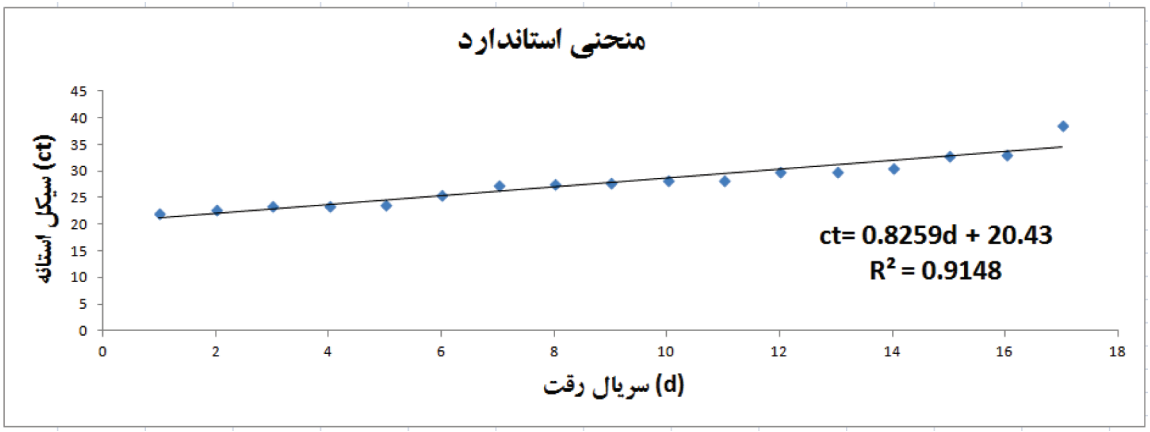


شکل ۱- نمودار تکثیر نمونه کنترل مثبت و منفی با دستگاه Real-time PCR. تکثیر نمونه کنترل مثبت و کنترل منفی برای آزمایش Real-time PCR طبق دستورالعمل کیت مورد استفاده با موفقیت انجام و مقدار سیکل آستانه‌ای نمونه کنترل مثبت ۱۸/۵۵ گزارش گردید، که این تکثیر می‌تواند نشان دهنده موفقیت در تکثیر نمونه‌های مورد آزمایش باشد.

و مایعات پرنـــده بـــه روش Real-time PCR، 10^{-34} برابر بوده، همچنین حداقل تعداد رونوشـــت قابل تشخیص با روش فوق، 1×10^{-34} رونوشت در هر میکرولیتر گزارش شد. در مجموع، روش Real-time PCR از حساسیت کافی(قابلیت تشـــخیص بیماری تا رقت 10^{-34} برابـــر از RNA موجود در نمونه اولیه) و نیز ســـهولت، سرعت و دقت مناسبی برای تشخیص ویروس برخوردار است واستفاده ازآن به عنوان یک روش تشخیصی با حساسیت بالا توصیه می‌گردد. شـــکل ۳ منحنی استاندارد تهیه شده با استفاده از واکنش PCR از تکثیر ســـری رقت‌های تهیه شـــده می‌باشد. همانطور که در شکل مشـــاهده می‌شـــود ضریب تبیین(R^2) این نمودار برابر با ۹۱٪ می‌باشد که نشان دهنده برازش مطلوب منحنی بر نقاط پراکنش مربوط و پوشش دادن مناسب همه نقاط می‌باشد. طبق مطالعات TevfikDorak (۲۰۰۶)، منحنی اســـتانداردی خوب است که شیب آن بین (۳/۳-) تا (۳/۶-) باشد و کارایی



شکل۲- نمودار تکثیر سری رقت‌های تهیه شده از RNA استخراج شده از واکسن سویه B1. آخرین نمودار تکثیر در رقت 10^{-34} با مقدار سیکل آستانه‌ای ۴۴/۳۸ نسبت به نمونه RNA استخراج شده از نمونه ویروس بکار رفته در واکسن سویه B1 تشکیل شده است. طبق دستورالعمل کیت سیکل آستانه‌ای کمتر از ۳۶ قابل قبول، سیکل آستانه‌ای بین ۳۳ تا ۴۰ در حد آستانه و بالاتر از این سیکل غیرقابل قبول می‌باشد.



شکل ۳- منحنی استاندارد تهیه شده با استفاده از واکنش PCR از تکثیر سری رقت‌های تهیه شده. ضریب تبیین (R^2) این نمودار برابر با ۹۱٪ می‌باشد که نشان دهنده برازش مطلوب منحنی بر نقاط پراکنش مربوط و پوشش دادن مناسب همه نقاط می‌باشد.

آن بین ۹۰ تا ۱۰۰٪ باشد.

$$\text{تعداد رونوشت (نسخه/میکرولیتر)} = \frac{(\frac{\text{گرم}}{\text{میکرولیتر}}) \text{غلظت} \times 6 \times 10^{23} \left(\frac{\text{رونوشت}}{\text{مول}}\right)}{(\frac{\text{گرم}}{\text{مول}}) \text{جرم مولکولی}}$$

معادله ۱ (Guan et al , ۲۰۰۶)

از مراجع موجود و قابل دسترسی که در آن‌ها تشخیص آلودگی به ویروس بیماری نیوکاسل با استفاده از روش Real-time PCR انجام گرفته و بدلیل سهولت کار و در دسترس بودن امکانات، امکان انجام مطالعات مشابه امکان‌پذیر بوده است، می‌توان به روش‌های مورد مطالعه توسط Nidzworski et al (۲۰۱۰) و Pham et al, (۲۰۰۵) اشاره نمود که نتایج این تحقیق به علت تفاوت در شرایط دمایی و چرخه‌های آزمون Real-time PCR با نتایج دو تحقیق مذکور همخوانی نداشت. تفاوت در نمونه مورد آزمایش می‌تواند دلیل تفاوت در حساسیت روش مورد مطالعه با گزارشات قبلی باشد. همچنین حساسیت روش Real-time RT-PCR می‌تواند بر اساس زمان آزمایش و سویه مورد مطالعه متفاوت باشد Michelle et al (۲۰۰۵). نتایج این تحقیق در راستای نتایج تحقیق Sharawi et al (۲۰۱۳) بوده که روش Real-time PCR را به عنوان یک روش با حساسیت بالا در تشخیص سویه ویروس بیماری نیوکاسل با حداقل زمان مورد نیاز برای انجام آزمایش معرفی می‌کند. روش Real-time PCR دارای حساسیت بالایی در تشخیص ویروس بیماری‌زای طیور می‌باشد و بدین ترتیب می‌توان این تست را جایگزینی با حساسیت و سرعت بالا بر روش‌های سرولوژی و ویروس‌شناسی رایج دانست و همچنین روش Real-time PCR قادر به تشخیص عفونت‌های بافتی بدون نیاز به مرحله الکتروفورز، برای آنالیز محصولات PCR و استفاده از اتیدیوم بروماید (به دلیل سمی بودن) است که نتایج این تحقیق در راستای تحقیقات Enders et al (۲۰۰۵); Hairul et al (۲۰۰۴) است که با مقایسه روش‌های مختلف برای تشخیص ویروس بیماری، روش Real-time PCR را به عنوان یک روش با حساسیت بالاتر معرفی کردند، زیرا تشخیص حتی در زمانی که کمترین میزان تیتر ویروس در بدن ایجاد شده باشد امکان‌پذیر می‌باشد. Liu et al (۲۰۱۱) Wang et al (۲۰۰۱) در مطالعات خود تعداد کپی‌نامبر قابل تشخیص به روشReal-time PCR را کمتر از نتایج این مطالعه گزارش نمودند، اختلاف در نتایج را می‌توان به علت نمونه مورد مطالعه دانست. برای تشخیص بیماری نیوکاسل در ایران از روش‌های مرسوم سرولوژی و روش جداسازی ویروس استفاده می‌شود که بسیار مشکل و وقت‌گیر می‌باشند. هم‌چنین این روش‌ها از حساسیت کمتری نسبت به روش‌های مولکولی برخوردار هستند (Aghakhan et al, 1994). در این مطالعه روش Real-time PCR برای دستیابی به یک روش مولکولی، برای تشخیص سریع بیماری نیوکاسل بهینه سازی گردید. روش Real-time PCR تکنیکی بسیار سریع است که حداکثر در یک روز کاری می‌توان به نتیجه رسید. تشخیص این ویروس‌ها از طریق روش‌های کلاسیک ویروس‌شناسی بسیار وقت‌گیر و مشکل می‌باشد و با روش حاضر می‌توان ویروس را در زمان کمتری تشخیص داده و از ضررهای اقتصادی احتمالی جلوگیری نمود. و همچنین روش Real-time PCR قادر به تشخیص عفونت‌های بافتی بدون نیاز به مرحله الکتروفورز برای آنالیز محصولات PCR و استفاده از اتیدیوم بروماید (به دلیل سمی بودن) است.

پاورقی‌ها

1- Avian paramixo virus

2 - Threshold Cycle(ct)

منابع مورد استفاده

1- Alexander, D. J. (1991). Newcastle diseas and other paramixovirus infections. In B W Diseases of poultry Iowa State University Press, PP 497-519.

2- Aghakhan, S. M., Abshar, N., Fereidouni, S. R., Marunesi, C., & Khodashenas, M. (1994). Studies on avian viral infectious in Iran. Arch. Razi. Inst,Vol,44, No, 45. PP: 1-5.

3- AL-Garib, S. O., Gielkens, A. L. J., Gruys, E., and Koch, G. (2003). Review of Newcastle disease virus with particular references to immunity and vaccination worlds poultry science journal-Vol.59. pp: 185-200.

4- Enders, K. O., P K.Cheng, Antia, Y. Y., Hoang, T. L., & L. Wilina, W. (2005). Influenza A H5N1 Detection. The 5th Annual Seminar of National Science Fellowship PP: 1303-1305.

5- Guan, M. K., Cheng, H. L., Liang, Y. K., Wen, T. J., Chulu, J. L., Liao, M. H., et al. (2006). Development of a quantitative Light Cycler real-time RT- PCR for detection of avian reovirus. Journal of Virological Methods. Vol 133. PP: 6-13.

6- Hairul, A. H., Omar, A. R., Mohd Hair-Bejo, and Ideris, A. (2004). [BIO24] Detection of infectious bursal disease virus using SYBR Green 1 based realtime polymerase chain reaction The 4th Annual Seminar of National Science Fellowship, pp: 119-125.

7-Liu, H., Zhao, Y., Zheng, D., Lv, Y., Zhang, W., Xu, T., et al. (2011). Multiplex RT-PCR for rapid detection and differentiation of class I and class II Newcastle disease viruses.Journal of Virological Methods, Vol, 171. PP: 149-155.

8- Michelle, A., Lin, T. L., & Wu, C. C. (2005). Real-time RT-PCR differentiation and quantitation of infectious bursal disease virus strains using dual –labeled fluorescent probes. Journal of virological method.Vol, 127. PP: 8-95.

9- Nidzworski, D., Rabalski, L., & Gramadzka, B. (2010). Detection and differentiation of virulent and avirulent strains of Newcastle disease virus by real-timePCR.Journal of Virological Methods, Vol, 173. PP: 144-149.

10- Pham, H. M., Konnai, S., Usui, T., Chang, K. S., Murata, S.,

Mase, M., et al. (2005). Rapid detection and differentiation of Newcastle disease virus real-time PCR with melting-curve analysis. Journal of Arch Virological.Vol, 150, No, 12. PP: 2429-2438.

11- Sharawi, S., Al-Habeeb, M. A., and Mohamed, M. H. A. (2013). Detection and characterization of Newcastle disease virus in clinical samples using real time RT-PCR and melting curve analysis based on matrix and fusion genes amplification. Journal of Veterinaryworld.Vol, 10, PP: 239-243.

12- TevfikDorak, M. (2006). Real-time PCR.Taylor & Francis e-Library , New York, NY, USA. pp: 333.

13- Wang, Z., Vreede, F. T., Mitchell, J. O., & Viljoen, G. J. (2001). Rapid detection and differentiation of Newcastle disease virus isolates by a triple one-step RT-PCR. Onderstepoort Journal of Veterinary Research, Vol 68, No, 2. PP: 131-134.