تشخیص ویروس بیماری نیوکاسل با استفاده از روش RT-PCR

عباس اشتری[1]، سید علی پوربخش[2*]، رضا ممیز[2]، فاطمه عشرت آبادی[2]

۱ـ دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار، گرمسار ـ ایران.
۲ـ گروه تحقیق و تشخیص بیماریهای طیور، مؤسسه واکسن و سرم سازی رازی، کرج ـ ایران.
*نویسنده مسئول: A.Pourbakhsh@a-rvsri.ir

چکیده

بیماری نیوکاسل یکی از مهمترین بیماری‌های صنعت پرورش طیور است که تشخیص سریع عامل این بیماری برای کنترل و پیشگیری بیماری یک نیاز حیاتی در صنعت طیور می‌باشد. در این مطالعه با استفاده از روش مولکولی RT-PCR و مقایسه آن با روش جداسازی ویروس در تخم مرغ جنین دار SPF ۱۰-۹ روزه، یک تست آزمایشگاهی برای تشخیص این ویروس راه‌اندازی گردید. ۱۴ نمونه مشکوک به بیماری نیوکاسل دریافت‌شده از استان‌های مختلف کشور و ۴ ویروس واکسن زنده نیوکاسل مورد مصرف در صنعت طیور شامل La Sota و B1, V4, Clone 30 با استفاده از کشت نمونه‌های مشکوک و واکسینال در تخم مرغ‌های جنین دار SPF و نیز روش مولکولی RT-PCR با بهره گیری از دو پرایمر که در برگیرنده جایگاه شکست پروتئین F ویروس بیماری نیوکاسل بودند مورد بررسی قرارگرفتند. از تمام ۱۴ نمونه مشکوک و ۴ نمونه واکسن در هر دو روش جداسازی و RT-PCR، ویروس نیوکاسل مورد شناسایی قرارگرفت. با توجه به تشابه نتایج بدست‌آمده، سرعت بالا، حساسیت و ویژگی مناسب روش RT-PCR، توصیه میشود از این روش جهت تشخیص ویروس نیوکاسل در کنترل و پیشگیری بیماری نیوکاسل استفاده گردد و این روش میتواند جایگزین مناسبی برای روش جداسازی ویروس در تخم مرغ SPF باشد. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار، ۱۳۸۷، دوره ۴، شماره ۲، ۹۳-۸۹.

واژه‌های کلیدی: ویروس بیماری نیوکاسل، تشخیص، F پروتئین، RT-PCR.

Diagnosis of Newcastle Disease by reverse transcriptase - polymerase chine reaction (RT-PCR)

Ashtari, A.[1], Pourbakhsh, S.A.[2*], Momayez, R.[2], Eshratabadi, F.[2]

[1]*Graduated from Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Garmsar Branch, Garmsar - Iran*

[2]*Department of Research and Diagnosis, of Avian Diseases, Razi Vaccine and serum Research Institute, Karaj, Iran*

Abstract

Newcastle Disease (ND) is an important problem in poultry industry and rapid diagnosis of its agent is necessary for controlling and protection from this disease. In this study, a molecular test was set up for detecting of Newcastle Disease virus (NDV) by using reverse transcriptase-polymerase chine reaction (RT-PCR) method and comparing with the isolation by embryonated SPF egg. Fourteen suspected samples to ND received from different provinces of Iran and 4 Live Newcastle Disease Vaccines (La Sota, B1, Clone 30, and V4) studied with isolation of the virus by 10 day-old embryonated SPF egg and detection of the virus RT-PCR method by using two primers for the cleavage site of the F gene protein. Newcastle Disease Virus was recognized in all of samples in both methods. Attending the similarity of results, the RT-PCR method could be recommend for detection of NDV for controlling and protection of Newcastle Disease. This test for rapidity, sensitivity and efficiency can be a suitable substitution instead of isolation by embryonated SPF egg method. ***Vet.J.of Islamic.Azad.Univ., Garmsar Branch. 4,2:89-93,2008.***

Keywords: Newcastle Disease Virus, Diagnosis, F protein, RT-PCR

مقدمه

بیماری نیوکاسل یک بیماری بسیار مسری و کشنده پرندگان است که بوسیله ویروس بیماری نیوکاسل (NDV) Virus Newcastle Disease یا به عبارتی Avian Parayxovirus ایجاد می‌شود. این ویروس در جنس Rubulavirus از خانواده paramixoviridae می‌باشد. ویروس توزیع جهانی دارد و موجب خسارات اقتصادی قابل توجهی در صنعت پرورش طیور می‌شود(۳،۵،۷). تشخیص این بیماری بوسیله تست‌هایی که اساس سرولوژی دارند مانند: gel precipitation test (AGPT) assay (ELISA) Plaque neutralization (PN), Agar assay (IP), Enzyme-linked immunosorbent Virus neutralizationtest (VN), Immunoperoxidase test (HI), Single radial immunodiffusion test (SRID), Haemagglutination inhibition انجام می‌شود. تمامی این روش‌ها به تناسب زمانی که برای انجامشان صرف می‌شود از حساسیت و ویژگی کافی برخوردار نیستند(۶).

در زمینه تشخیص بیماری نیوکاسل روشهایی که توسط OIE و

RICEST

جدول ۱- توالی نوکلئوتیدی و موقعیت پرایمرهای A و B مورد استفاده در این مطالعه برداشت شده از منبع شماره ۳.

Code	sense	Sequeuce	Location
A	+	۵'-TTG ATG GCA GGC CTC TTGC-۳'	141-159
B	-	۵'-GGA GGA TGT TGG CAG CATT-۳'	503-485

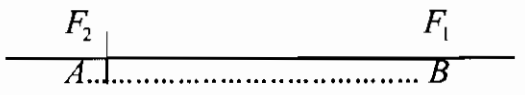
EU Council توصیه شده است شامل جداسازی در تخم مرغ های SPF جنین دار و شناسایی در تست ممانعت از جمع شدن گلبول های قرمز Haemagglutination inhibition test (HI) است. OIE در دستور العمل های خود روشی را نیز که بر اساس بیولوژی مولکولی تنظیم شده معرفی کرده است. روش نسخه برداری معکوس و واکنش زنجیره پلیمراز (RT-PCR) اکنون در بسیاری از آزمایشگاه های دنیا برای تعیین و شناسایی ویروس بیماری نیوکاسل (NDV) پذیرفته شده است (۷).

براساس حدت ویروس نیوکاسل را به چهار پاتو تیپ تقسیم می‌کنند. ۱) گروه ویسروتروپیک نروتروپیک ولوژنیک که میزان تلفات تا ۱۰۰٪ می‌رسد. ۲) گروه مزوژنیک که سبب مشکلات تنفسی و عصبی با مرگ و میر متوسط می‌شود. ۳) گروه لنتوژنیک که تنها در مواردی سبب مشکلات تنفسی می‌شود و گروه چهارم که معمولا بشکل روده ای و بدون علامت می‌باشد(۲،۳).

بیماری زایی جدایه های مختلف ویروس مرتبط با شکست پذیری پروتئین F آن ها است. پروتئین F0 جدایه های حاد بوسیله آنزیم های پروتئاز که در اکثر سلول های بدن پرنده یافت میشود به دو تحت واحد F1 و F2 شکسته میشود, پروتئین F جدایه های بدون حدت تنها در سلول های دارای آنزیمهای شبه تریپسین امکان شکستن دارند. تعیین توالی اسیدهای نوکلئیک ژن پروتئین F مشخص کرده که در جایگاه شکست بین اسیدهای آمینه این دوگروه تفاوت وجود دارد (۴).

RT-PCR یک روش حساس، سریع و قابل اعتماد می‌باشد، از دید تئوریک در RT-PCR می‌توان حتی یک مولکول هدف RNA را هم مورد بررسی قرار داد هر چند در عمل مانند هر تکنیک دیگری حساسیت تست بدلایل متفاوت ممکن است کاهش یابد(۱).

بعلت اهمیت سرعت در تشخیص بیماری جهت کنترل موثر آن در این مطالعه تلاش شد یک تست بر اساس روش مولکولی RT-PCR برای تشخیص ویروس بیماری نیوکاسل استاندارد و راه‌اندازی گردد.



تصویر ۱- جایگاه پرایمرهای A و B که روی جایگاه شکست در ژن پروتئین F قرار می‌گیرند.

مواد و روش کار

در این مطالعه تعداد ۱۴ نمونه مشکوک ارجاع شده به بخش تحقیق و تشخیص بیماری های طیور مؤسسهٔ تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی و نیز چهار واکسن زندهٔ بیماری نیوکاسل شامل واکسن‌های B1, V4, La Sota clone 30, مورد بررسی قرار گرفتند. در تمام مراحل مایع الانتوئیک استریل بعنوان کنترل منفی استفاده شد.

پس از آماده سازی، نمونه‌های دریافتی به حفره الانتوئیک تخم مرغهای جنین دار SPF ۱۰ روزه تزریق شدند. برای هر نمونه ۴ تخم مرغ در نظر گرفته شد و تخم مرغ ها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۵ روز نگهداری گردیدند و روزانه جهت بررسی زنده بودن جنین مورد کنترل قرار گرفتند تلفات ۲۴ ساعت اول حذف و باقی تخم مرغ ها پس از مردن جنین به یخچال منتقل و در روز پنجم همه تخم مرغ‌های باقی مانده به یخچال منتقل گردیدند.

مایع الانتوئیک تخم مرغ ها جمع آوری شده و تحت تست HA (هماگلوتیناسیون گلبول های قرمز) قرار گرفتند. نمونه‌هایی که در این تست مثبت بودند تحت تست HI با آنتی سرم اختصاصی نیوکاسل قرار داده شدند. از میان نمونه های مثبت ۱۴ مورد برای انجام آزمایشات مولکولی انتخاب شدند و مایع آلانتویک آنها توسط تست RT-PCR بررسی شد.

پرایمرهای بکار رفته در این مطالعه توانایی تکثیر قطعه ای از ژنوم ویروس را با اندازهٔ ۳۶۲bp را دارا می‌باشند که این قطعه قسمتی از ژن پروتئین F می‌باشد که جایگاه شکست این پروتئین در آن واقع شده(شکل۱). این دو پرایمر قسمتی از این ژن را از

جدول۲- master mix I مربوط به کیت RT-PCR.

MASTER MIX I		
مقدار	مواد	ردیف
۱۴.۵μl	Strile double dist water	۱
۱μl	dNTPs	۲
۱μl	Downstream primer	۳
۱μl	Upstream primer	۴
۱μl	Template RNA	۵
۲/۵μl	DTT Solution	۶
۰/۲	Proteetor RNase inhibitor	۷

جایگاه ۱۴۱ تا ۵۰۳ را تکثیر می‌کنند که قطعهٔ بدست آمده در بین این دو جایگاه ۳۶۲bp اندازه دارد. جایگاه ۱۴۱ ابتدای پرایمر A و جایگاه ۵۰۳ انتهای پرایمر B می‌باشد (۴) (جدول ۱).

برای استخراج RNA ویروس از کیت استخراج (High pure viral nucleic acid kit) شرکت Roche استفاده شد. با ازاء هر نمونه 4 از محلول Poly(A) با ۱۹۶ از محلول Binding buffer مخلوط شد و به عنوان Working solution مورد مصرف قرار گرفت. ۲۰۰ از نمونه بهمراه ۲۰۰ Working solution و ۵۰ K Proteinase برای مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد قرار گرفت و پس از آن ۱۰۰ Binding buffer اضافه گردید. filter tube High به Collection tube متصل شد و محلول حاوی نمونه در بالای فیلتر تخلیه گردید این دو تیوپ متصل به هم در ۸۰۰۰g بمدت یک دقیقه سانتریفوژ شدند. Filter tube جدا و به یک tube Collection جدید متصل شد و ۵۰ Inhibitor Removal buff به فیلتر اضافه گردید وتیوپ در ۸۰۰۰g برای مدت یک دقیقه سانتریفوژ گردید. Filter tube به یک Collection tube جدید متصل شد.

۴۵۰ از محلول wash buffer روی فیلتر ریخته شد و تیوپ در ۸۰۰۰g برای مدت یک دقیقه سانتریفوژ گردید. Filter tube به یک Collection tube جدید وصل شد و دوباره ۴۵۰ از محلول buffer Wash روی tube High filter ریخته شد و در ۸۰۰۰g برای مدت یک دقیقه سانتریفوژ گردید پس از این مرحله دوباره همان تیوپ در ۱۳۰۰۰g برای مدت ۱۰ ثانیه سانتیریفوژ گردید. Filter tube از tube Collection جدا شد و این بار Filter tube به یک تیوپ free ml ۱/۵RNase متصل گردید و ۵۰ Elution buffer اضافه شد و در ۸۰۰۰g برای مدت یک دقیقه سانتر یفوژ گردید در این مرحله

جدول ۳- master mix II مربوط به کیت RT-PCR.

MASTER MIX II		
مقدار	مواد	ردیف
۱۲	Strile double dist water	۱
۱۰	5X RT-PCR buffer	۲
۱	Enzyme mix	۳

RNAویروس بوسیلهٔ این بافر از فیلتر جدا و وارد تیوپ زیرین گشت.

برای انجام RT-PCR در این تحقیق از کیت one tub Roche RT-PCR system Titan استفاده شد که دو mix master برای این منظور تهیه شد:

دو master mix تهیه شده در یک تیوپ free PCR 200 µl RNase بایکدیگر بخوبی مخلوط شدند. تیوپ‌ها به دستگاه Thermocycler منتقل شدند و تحت برنامه ای به شرح ذیل قرار گرفتند: ۵۶ درجه سانتیگراد ۳۰ دقیقه، ۹۴ درجه سانتیگراد ۲ دقیقه و پس از آن ۳۵ سیکل شامل ۹۴ درجه سانتیگراد دمای Denaturation یک دقیقه و ۵۸ درجه سانتیگراد دمای Annealing یک دقیقه و ۶۸ درجهٔ سانتیگراد دمای Elongation یک دقیقه وپس از سپری شدن این ۳۵ سیکل , یک سیکل Prolonged Elongation در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد به مدت ۷ دقیقه پایان بخش مراحل PCR بود(۴).

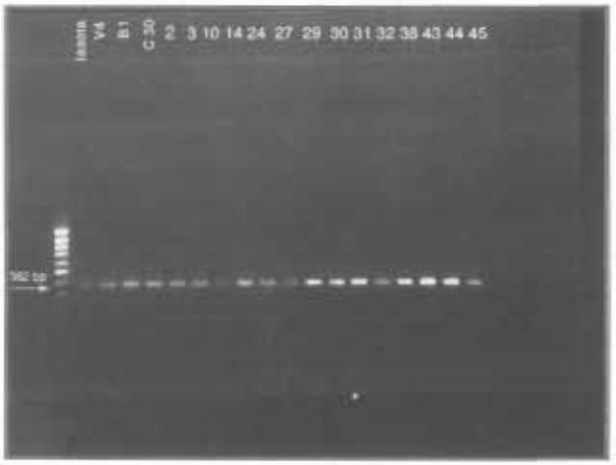
برای بررسی محصول RT-PCR ژل آگارز ٪۱ با استفاده از بافر TAE تهیه شد و نمونه‌ها در کنار Ladder 100 تحت تأثیر اختلاف پتانسیل الکتریکی معادل ۹۵V قرار گرفتند و پس از گذشت زمان ۶۰ دقیقه ژل مورد عکس برداری قرار گرفت.

نتایج

مایع آلانتوئیک جمع آوری شده از تمامی تخم مرغ های SPF مربوط به نمونه‌های مشکوک و واکسن در تست HA مثبت بود. پس از آن درتست HI با آنتی سرم اختصاصی نیوکاسل بعنوان ویروس بیماری نیوکاسل مورد شناسایی قرارگرفتند.

تمامی ۱۴ نمونه برداشت شده از مایع آلانتوئیک و ۴ نمونه واکسن نیوکاسل مورد آزمایش با استفاده از روش RT-PCR باندی به اندازه ۳۶۲bp بر روی ژل آگارز آشکار نمودند که بنابر این تمامی نمونه‌ها حاوی ویروس نیوکاسل تشخیص داده شدند.

RICEST



تصویر ۲- در این تصویر در اولین ستون ladder 100 bp DNA قرار گرفته در ستون دوم تا پنجم به ترتیب،

واکسن‌های La Sota, V4, B1, Clone 30 قراردارند و پس از آن نمونه‌های مورد آزمایش به ترتیب شماره‌هایشان قرار گرفته‌اند ودرستون آخر مایع آلانتوئیک استریل که بعنوان کنترل منفی (-) مورد استفاده بود قرار گرفته است.

بحث و نتیجه‌گیری

باتوجه به نتایج تست مولکولی و مقایسه آن با نتایج جداسازی ویروس مشخص است که تست RT-PCR با حساسیت بالا موفقبه ردیابی ویروس نیوکاسل شده است.

در مطالعه ای که فتحی و همکاران در سال ۸۵ انجام دادند در مقایسه سه روش سرولوژی، تلقیح به تخم مرغ و RT-PCR مشخص شد که در روش سرولوژی ۸۴/۶ درصد، در تلقیح به تخم مرغ ۴۶/۱درصد ودر RT-PCR در ۱۰۰ درصد موارد ویروس نیوکاسل مورد ردیابی قرار گرفته است (۲).

در تحقیقی که A.Kant و همکاران در سال ۱۹۹۷ انجام دادند دیگر ویروس‌های خانواده پارامیکسوویریده در کنار ویروس‌های نیوکاسل در آزمایش مشابهی قرار داده شدند که با منفی شدن نتیجه آزمایش دیگر ویروس‌های خانواده پارامیکسو ویریده وویروس‌های خانواده‌های مشابه ویژگی پرایمرهای استفاده شده در تحقیق اثبات گردید(۴). ما نیز در این پژوهش از همان پرایمرها بهره بردیم.

Krzisztof و همکارانش در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۵ برروی نمونه‌های تجربی انجام دادند نشان دادند که نتایج RT-PCR و جداسازی ویروس در مورد جدایه‌های La Sota; Italy ۹۳درصد و در مورد جدایه Roakin ۱۰۰درصد تطابق دارند (۷). K. Singh و همکارانش در سال ۲۰۰۵ با استفاده از ۳۰ نمونه گرفته شده از مزارع

جدول۴- مقایسه نتایج جداسازی ویروس در تخم مرغ و تست RT-PCR

ردیف	شماره نمونه	استان	نتیجه جداسازی در تخم مرغ SPF	نتیجه RT-PCR
۱	La Sota	-	+	+
۲	V4	-	+	+
۳	B1	-	+	+
۴	Clone 30	-	+	+
۵	NR2	آذربایجان غربی	+	+
۶	NR3	آذربایجان شرقی	+	+
۷	NR10	آذربایجان شرقی	+	+
۸	NR14	اصفهان	+	+
۹	NR24	خراسان	+	+
۱۰	NR27	خراسان	+	+
۱۱	NR29	خراسان	+	+
۱۲	NR30	خراسان	+	+
۱۳	NR31	خراسان	+	+
۱۴	NR32	خراسان	+	+
۱۵	NR38	قزوین	+	+
۱۶	NR43	قم	+	+
۱۷	NR44	قم	+	+
۱۸	NR45	قم	+	+
	۱۹	-کنترل (-)	-	-

پرورش پرندگان در هند و شش نمونه واکسن تحقیق مشابهی انجام دادند که در آن ۸ مورد از نمونه‌های مشکوک و ۶ نمونه واکسن بوسیله روش RT-PCR از نظر وجود ویروس نیوکاسل مثبت ارزیابی شدند (۶).

می توان به این نتیجه رسید که تست RT-PCR با حساسیت بالا می تواند نمونه‌های حاوی ویروس نیوکاسل را مثبت ارزیابی کند و با توجه به این که با استفاده از روش مولکولی در زمانی کمتر از ۲۴ ساعت امکان دستیابی به نتیجه وجود دارد توسعه بهره‌برداری از این تست در آزمایشگاه‌ها امری موجه بنظر می رسد.

برخی از نمونه‌های ارسال شده به بخش تشخیص بیماری‌های طیور موسسه رازی که در این مطالعه مورد بررسی قرارگفته‌اند براساس سابقه گله‌هایی که نمونه از آن جداشده تحت واکسیناسیون با واکسن زنده نیوکاسل قرار گرفته‌اند بنابراین، این احتمال وجود دارد که مثبت ارزیابی شدن برخی از نمونه‌ها بخاطر وجود ویروس واکسن درون نمونه‌ها باشد. درمطالعات Toyoda, Glickman (1988) (1987) مشخص شده که در جایگاه شکست پروتئین F ویروس‌های حاد و ویروس‌های کم حدت از نظر توالی ژنی تفاوت وجود دارد که می توان از این تفاوت توالی جهت تفریق

جدایه‌های حاد از جدایه‌های کم حدت استفاده کرد (۴). در این زمینه تحقیقاتی با استفاده از دیگر روش‌ها چون استفاده از Probe انجام شده وحتی برخی چون Y.P.Li (2004) اقدام به تفریق پاتوتایپ‌های بیماری نیوکاسل نموده‌اند. باتوجه به این نکته می‌توان این پژوهش را جهت دست یابی به روشی سریع برای تفریق ویروس‌های وحشی از ویروس‌های واکسینال بوسیله روش RT-PCR و تکمیل نتایج ادامه داد.

منابع

۱. شاه حسینی، م. ج. (۱۳۸۴) مبانی تشخیص مولکولی- انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی.

۲. فتحی هفشجانی، ع. ا. (۱۳۸۶) -جداسازی ویروس عامل بیماری نیوکاسل با استفاده از روش‌های سرولوژی ویروس شناسی و مولکولی در مرغداری‌های گوشتی استان چهارمحال و بختیاری. رساله دکتری تخصصی رشته بیماریهای طیور دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات.

3. Alexander, D.J. (2008) Newcastle disease and other paramixoviridae infections. Diseases of poultry. 12th ed. Iowa State University Press: PP: 75-100.

4. Kant, A., Koch, G., Van Roozelaar, D.J., Balk, F., Terhuurne, A. (1997) Differntiation of virulent and non-virulent strains of Newcastle disease. Avian Pathology, **26**:837-849.

5. Li, Y. P., Zhang, M. F. (2004) Rapid pathotyping of Newcastle disease virus from allantoic fluid and organs of experimentally infected chickens using two novel probes. Archives of Virology, **194**:1231-1243.

6. Singh, K., Jidal, N., Gupta, S.L., Gupta, A.K., Mittal, D.(2005) Detection of Newcastle disease Virus Genom from the Field Outbreaks in poultry by Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction. International Journal of Poultry Science, **4**(7): 472-475.

7. Smietanka. K., Minta, Z., Domanska-Blicharz, K.(2006) Detection of Newcastle Disease virus in infected chicken embryos and chicken tissues by RT-PCR. Bull vet inst pulawy, **50**:3-7.

RICEST