دو فصلنامه
بیوتکنولوژی و میکروبیولوژی کاربردی
سال چهارم، شماره ۳ و ۴، پاییز و زمستان ۱۳۹۴

مقایسه دو روش رنگ سنجی وPCR در تشخیص بیماری گامبورو

شیما عزیزآبادی فراهانی[۱]، پروانه جعفری*[۲]، سید داود حسینی[۳]

[۱] دانش آموخته کارشناسی ارشددانشگاه آزاداسلامی، واحد علوم وتحقیقات، گروه میکروبیولوژی، اراک، ایران
[۲] استادیار، دانشگاه آزاداسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه میکروبیولوژی، اراک، ایران
[۳] استادیار، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه منطقه مرکزی کشور، اراک

چکیده

درعصرکنونی نیاز به تشخیص بیماری‌های بالینی افزایش یافته، از این رو روش‌های تشخیص سریع و اختصاصی یک نیاز اساسی محسوب می‌شود.گر چه روش تکثیر DNA (PCR) در آزمایشگاه‌های تشخیصی مرسوم است ولی برای این روش امکان تکرارپذیری بالا به دلیل نیاز به پرسنل ماهر و تجهیزات گران قیمت وجود ندارد. برای غلبه بر این محدودیت، نانوذرات به عنوان ابزاری برای کشف راه‌های تشخیصی نوین مورد استفاده قرار می‌گیرند. در میان نانو مواد، نانوذرات طلا (AuNPs) به طور عمده به دلیل خواص نوری و توانایی واکنش آن با انواع ملکول‌های زیستی به طور گسترده‌تری استفاده می‌شوند. در این مطالعه سعی شده است روش‌های تشخیصی بیماری گامبورو با استفاده از PCR و نانوذرات طلا صورت گیرد. دراین تحقیق،۲۰ نمونه مجهول ویروسی با روش کیت رنگ سنجی نانو ذره طلا علیه ویروس گامبورو مورد شناسایی قرار گرفت. نتایج حاصله با روش شناسایی PCR با پرایمر اختصاصی گامبورو مقایسه گشت، نتایج نشان داد که کیت رنگ سنجی گامبورودارای صحت ۸۰ درصدی وحساسیت ۸۵/۷۱ درصد می‌باشد. نتایج نمونه‌های مورد آزمون با کیت تشخیصی، بانتایج حاصل از آزمون PCR در اکثر موارد همخوانی داشت و در کل آزمون‌های انجام شده تعدادی موارد مثبت و منفی کاذب مشاهده شد. با توجه به تفاوت‌های قابل ملاحظه در هزینه، مدت زمان، دستگاه‌ها و تجهیزات پیشرفته مورد نیاز برای تشخیص با روش PCR، می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از کیت با نانو ذره طلا با دقت بالای ۸۰ درصد صحت می‌تواند در آزمایشگاه مقرون به صرفه باشد.

مقدمه

تورمبورس فابریسیوس یا همان بیماری گامبورو یا IBD (Infectious bursal disease) از جمله بیماری‌های ویروسی حاد و بسیار مسری در پرندگان جوان در تمام دنیا می‌باشد(۱, ۲)که به وسیله اسهال، نوکزدن به مخرج، لرزش، عدم تعادل و متعاقباً آتروفی (Atrophy) بورس فابریسیوس (Bursa of fabriciuse) و نیز درجات مختلفی از تضعیف سیستم ایمنی، مشخص می‌گردد(۳, ٤). این بیماری عمدتاً جوجه‌های زیر ٦ هفته را به صورت تحت بالینی مبتلا می‌کند(۵). قاره آسیا در اوایل دهه ۹۰ میلادی توسط ویروس فوق مورد تهاجم قرار گرفت و از آن زمان، مشکلات اقتصادی وابسته به تلفات بالا

* **مسئول مکاتبات:** farzamisepehr@iau-saveh.ac.irm

و راندمان تولید پایین، در سرتاسر این قاره مشاهده می‌شود(٦). میزان تلفات گله حاصله از این بیماری در جوجه‌های گوشتی ۱۵-۲۰درصد و در جوجه‌های تخم‌گذار ٦٧-۸۰ درصد می‌باشد(۷, ۸). در ایران شیوع این بیماری نسبتاً بالا بوده و هر ساله آسیب‌های فراوانی را به این صنعت وارد می‌نماید.شناسایی اولیه و سریع این بیماری حائز اهمیت بسیار بالایی است. برای شناسایی معمولاً از روش‌های مختلفی همانند مشاهده مستقیم ویروس با میکروسکوپ الکترونی و روش ایمنوفلورسنس به کار برده می‌شود(۹). این روش‌های حساسیت و ویژگی بسیار بالایی داشته ولی به دلیل وقت گیربودن، هزینه بالا و نیاز به تجهیزات تخصصی متداول نمی‌باشند(۱۰). از اینرو نیاز به روشی جدید برپایه فناوری‌های نوین احساس می‌شود تا با آن بتوان این بیماری را در ابتدای آلودگی تشخیص داد. این روش، باید ویژگی مناسبی داشته و از سوی دیگر در مدت زمان کم بتوانند ویروس به صورت مقرون به صرفه شناسایی نمایند. در حال حاضر نانوذرات به عنوان گزینه‌ای مناسب برای تشخیص بیماری‌ها مطرح شده‌اند. این ذرات دارای خصوصیات منحصر به فردی بوده و می‌توانند با ملکول‌های حیاتی واکنش دهند از اینرو می‌توان از آن‌ها در علم پزشکی بهره فراوان برد. امروزه استفاده از نانوذرات و تشخیص بیماری‌های مختلف بسیار مورد توجه قرار گرفته است. در این ارتباط نانوذرات طلا (AuNPs) به واسطه ویژگی‌های خاص خود از اهمیت بالایی برخوردارند. نانوذرات طلا،کروی با قطری در حدود ۵۰nm- ۲بوده و دارای ویژگی منحصر به فرد تشدید پلاسمون سطحی (SPR) می‌باشند که سبب ایجاد رنگ قرمز بسیاری قوی در آن‌ها می‌گردد(۱۱, ۱۲). در پیت جمع این نانوذرات و کاهش غلظت آن‌ها در محلول، رنگ محیط از قرمز به آبی تغییر می‌یابد(۱۳). می‌توان اطراف نانوذرات طلا را با لایه‌ای از ترکیبات با بار منفی همانند سیترات پوشاند که این امر سبب ایجاد بار شدید منفی در نانوذرات طلا می‌شود(١٤). SPR مسئول جذب بالای نور و پراکنش شدید آن است که این شدت می‌تواند ٤ تا ٥ برابر رنگ‌های سنتی متداول باشد(١٥, ١٦). این ویژگی سبب شده که امکان استفاده از نانوذرات طلا، در سنجش‌های رنگ سنجی ساده و سریع مورد توجه قرارگیرد. از اینرو به نظر می‌رسد بتوان از نانوذرات طلا در تشخیص‌های پزشکی به عنوان روشی حساس با ویژگی بالا بهره برد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق ۲۰ نمونه ویروس RNA دار (کنترل مثبت، کنترل منفی، نمونه‌های مشکوک ویروسی) جهت مقایسه روش تشخیصی کیت رنگ سنجی و PCR به کار گرفته شد.

استخراج IBDV RNA

عصاره‌گیری RNA از نمونه‌های کلینیکی از بافت و یا از نمونه واکسن با استفاده از کیت‌های جداسازی RNA همانند QIAamp viral ،kitRNA purification ،RNA kit ،Absolute RNA Miniprep Isolation ،systemSV total صورت گرفت.پس از جدا کردن ژنوم نمونه‌ها با دو روش کیترنگ سنجی و PCR به لحاظ وجود ژنوم گامبورو مورد بررسی قرار گرفتند.

شناسایی با استفاده از روش PCR

انجام این روش الزامی بود که قبل از انجام کار ژنوم ویروس از RNA به DNA تبدیل شود. بنابراین از روش RT-PCR استفاده شد. برای این منظور به سوسپانسیون حاوی RNA ویروس، Primer، آنزیم (RT)، dNTP، و بافر افزوده شد و سیکل حرارتی زیر مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱).

DNA ژنومی تهیه شده با روش PCR مورد سنجش قرار گرفت.برایاین منظور به سوسپانسیون حاوی DNA ویروس، PCR Buffer، $Mgcl_2$، dNtp، Primers و Taq DNA polymerase، اضافه شد پرایمر استفاده شده کاملاً اختصاصی گامبورو طراحی شد (جدول ۲) و سیکل حرارتی زیر مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۳).

با استفاده از ژل الکتروفورز وجود ژنوم گامبورو در نمونه مورد آزمون تایید شد برای این منظور ژل الکتروفورز درون تانک الکتروفورز حاوی TAE (باغلظتی مشابه غلظت TAE درون ژل) قرار داده شد به گونه‌ای که بافر حدود ۲ میلیمتر روی سطح ژل را بپوشاند. مقداری از نمونه با بافر لودینگ مخلوط وبه آرامی درون چاهک ژل آگارز بار شد. الکترودها را به منبع نیرو به گونه‌ای وصل شد که نمونه‌ها در داخل ژل در سمت الکترود منفی قرار داشته باشند. ولتاژ به صورت ۵-۱/۵ ولت به ازای هر ۱ سانتی متر طول ژل تنظیم شد. معمولاً در ابتدا برای مدت ۵

جدول ۱- سیکل حرارتی واکنش **RT-PCR**

	°Cدما	زمان	تعداد سیکل
واسرشت سازی اولیه	٦٥	١٠	١
فعالیت آنزیم	٤٢	١٠	١
دمای پایانی	٧٢	٦٠	١
اتمام واکنش	٤	برای همیشه	١

جدول ۲- توالی پرایمر

	توالی
F	(5'-AAGATCTATGACAAACCTGCAAGATA-3')
R	(5'-AGAATTCCTACACCCCTTGTCGGCG-3)

جدول ۳- سیکل حرارتی واکنش PCR

	°Cدما	زمان	تعداد سیکل
واسرشت سازی اولیه	٩٥	٣دقیقه	١
واسرشت سازی هر چرخه	٩٥	١دقیقه	٣٥
اتصال اولیه	٦٧	١دقیقه	
طویل شدن	٧٢	١دقیقه و٤٥ثانیه	
طویل شدن نهایی	٧٢	١٠ دقیقه	١

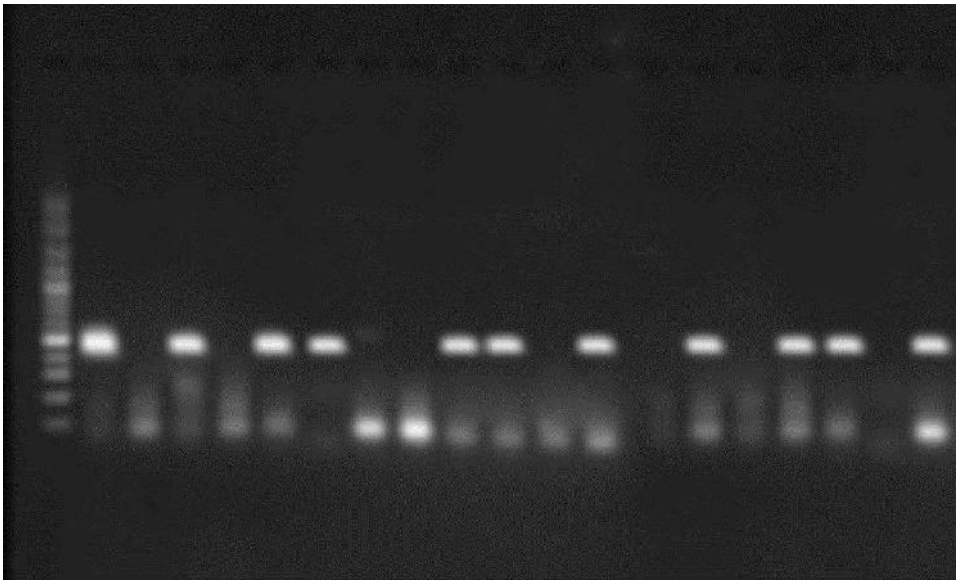
دقیقه ولتاژ روی ۱۲۰ ولت قرار داده می‌شد تا نمونه‌ها به سرعت وارد ژل شوند در نتیجه فرصتی برای خارج شدن از چاهک نداشته باشند. پس ازآن ولتاژ روی ۸۰ تا ۹۰ ولت قرارداده می‌شد. زمانیکه رنگ به سه چهارم طول ژل رسید، جریان برق قطع و ژل به دستگاه Uvitech منتقل گردید. برای عکس گرفتن از ژل‌ها از دستگاه Geldocumentation (Uvitech) استفاده شد. ژل زیر نورماورائبنفش (UV) قرار داده شد. با تابش پرتو ماوراء بنفش به ژل، نوارهای DNA قابل مشاهده بودند.

تشخیص با استفاده ازکیت رنگ سنجی

در این آزمون از کیت رنگ سنجی نانو ذرات طلا که علیه بیماری گامبورو که در موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه اراک ساخته شد استفاده گردید. کیت مذکور توانایی تغییر رنگ به هنگام اتصال به RNA ویروس گامبورو را دارا می‌باشد. ۲۰ نمونه مورد آزمون به لحاظ وجود ژنوم ویروس گامبورو توسط این کیت مورد بررسی قرار گرفتند. سوسپانسیون نمونه ویروسی به چاهک‌های کیت اضافه شد پس از گرماخانه گذاری به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری ٦۰ درجه ایجاد تغییر رنگ نشان دهنده وجود ژنوم ویروس گامبورو در نمونه مورد آزمایش بود.

نتایج

در این آزمون نمونه‌های ویروسی مورد بررسی قرار گرفت (کنترل مثبت، کنترل منفی، نمونه‌های مشکوک بالینی).. این بخش از تست جهت تأیید ماهیت ژنوم (تشخیص مولکولی گامبورو در نمونه) مورد استفاده قرار گرفت. نتایج حاصله از تکثیر ژنوم با استفاده از پرایمر اختصاصی گامبورو نشان داد که از ۲۰ نمونه مورد بررسی ۱۲ نمونه به عنوان نمونه مثبت برای ژنx viral protein (VPX) به عنوان گامبورو شناسایی.شد.محصول PCR روی ژل الکترفورز برده شده و نتیجه آن با کمک دستگاه ژل داک مورد بررسی قرار گرفت(شکل ۱).



شکل۱- نمونه‌های مثبت گامبورو از ۲۰ نمونه مشکوک

مقایسه روش رنگ سنجی و PCR

جهت مقایسه روش رنگ سنجی و PCR نمونه‌های مشکوک مورد بررسی قرار گرفتند و نتایج حاصله در جدول شماره۱ تنظیم شد و میزان حساسیت و اختصاصیت و صحت آن طبق فرمول‌های زیر اندازه‌گیری شد.

حساسیت= مثبت کیت/ کل مثبت‌ها × ۱۰۰

اختصاصیت= منفی کیت/ کل منفی‌ها × ۱۰۰

صحت= جمع مثبت و منفی کیت/ تعداد کل نمونه‌ها × ۱۰۰

بحث

درطول تاریخ بشر از زمانی یونان باستان دانشمندان بر این باور بودند که می‌توان مواد را آن قدر به اجزا کوچک تقسیم کرد تا به حد ذرات خرد نشدنی برسند که این ذرات، بنیان مواد را تشکیل می‌دهند(۱۷). در اواخر دهه ۷۰ اریک درکسلر(Eric drexler) ایده‌های مربوط به فناوری نانو مولکولی را بسط داد(۱۸). Li و همکارانش پایه گذار روش سنجش کمی وکیفی ویروس‌های RNAدار در نمونه‌های بالینی با استفاده از نانوذرات طلا بودند. آنان با به کارگیری ویژگی تشدید پلاسمون سطحی و تغییر رنگ محلول حاوی نانوذره طلا توانستند به وجود RNA هدف در نمونه‌های بالینی پی ببرند(۱۹). رابرت (Robert l.letsinger) و همکارانش در سال ۲۰۰۱، در ایالت متحده آمریکا بر روی اتصال پلی‌اولیگونوکلئوتیدها (oligonucleotides) به نانوذرات طلا در تشخیص توالی DNA کار کردند. در این تست کانژوگیشن در محیط آبی کلوئیدی انجام می‌شود(۲۰).

پادماواتیبک تاوات سالام (Padmavathybakthavathsalam) و همکارانش در سال ۲۰۱۲، بر روی تشخیص مستقیم ژنوم DNA *اشریشیاکلی*(*Escherichia coli*) با استفاده از نانوذرات طلا کار کردند(۲۱). در حال حاضر نانوذرات به عنوان گزینه‌ای مناسب برای تشخیص بیماری‌ها مطرح شده‌اند. این ذرات دارای خصوصیات منحصر به فردی بوده و می‌توانند با ملکول‌های حیاتی واکنش دهند از اینرو می‌توان از آن‌ها در علم پزشکی بهره فراوان برد. امروزه استفاده از نانوذرات در تشخیص بیماری‌های مختلف بسیار مورد توجه قرار گرفته است. در این ارتباط نانوذرات

جدول -۱- نتایج حاصل از رنگ سنجی و PCR

		PCR		کل
کیت رنگ سنجی	مثبت	مثبت ۱۲	منفی ۲	۱٤ ٦
	منفی	۲	٤	
		۱٤	٦	۲۰

حساسیت=۱۲/۱٤×۱۰۰=۸۵,۷۱٪

اختصاصیت=٤/٦×۱۰۰=٦٦,٦٦٪

صحت=۱۲+٤/۲۰×۱۰۰=۸۰٪

طلا (AuNPs) به واسطه ویژگی‌های خاص خود از اهمیت بالایی برخوردارند. در این تحقیق از کیت رنگ سنجی از قبل ساخته شده استفاده شد که به کارگیری آن بسیار ساده و مقرون به هزینه است و نیاز به تجهیزات اختصاصی و مواد شیمیایی گران قیمت ندارد و روش کار آن ساده است، نیاز به تجربه و مهارت لازم برای انجام PCR را هم ندارد به طوری که تنها با اضافه کردن نمونه بالینی مشکوک به ویروس گامبورو و گرماخانه‌گذاری به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری ٦٠ درجه سانتی‌گراد امکان تشخیص سریع ویروس وجود دارد. از سوی دیگر این کیت دارای صحتی بالای ۸۰ درصد است که با بهینه سازی امکان بهبود آن وجود دارد بنابراین با استفاده از این کیت حتی در مرغداری‌ها امکان تشخیص سریع و به موقع شیوع عفونت امکان پذیر است بنابراین می‌توان در چنین شرایطی از ضررهای اقتصادی جبران ناپذیر و گسترش بیماری ممانعت نمود.

منابع

1- Müller, H., M.D.R. Islam, and R. Raue, *Research on infectious bursal disease—the past, the present and the future.* Veterinary microbiology, 2003. **97**(1): p. 153-165.
2- Mundt, E., H. Lütticken, and A. Van Loon, *Recombinant birnavirus vaccine*, 2003, EP Patent 0,887,412.
3- Hosseini, S., et al., *Diagnostic potential of recombinant protein of hexahistidine tag and infectious bursal disease virus VPX expressed in Escherichia coli.* Acta Veterinaria Hungarica, 2007. **55**(3): p. 405-415.
4- Velhner, M., *Infectious bursal disease (Gumboro disease).* Arhiv veterinarske medicine, 2008. **1**.
5- Mymensingh, B., *Effect of maternally derived antibody on vaccination against infectious bursal disease (Gumboro) with live vaccine in broiler.* International Journal of Poultry Science, 2002. **1**(4): p. 98-101.
6- Gough, R., et al., *Isolation of birnavirus and reovirus-like agents from penguins in the United Kingdom.* Veterinary record, 2002. **151**(14): p. 422-424.
7- Al-Mayah, A.A.S. and M.A.S.A. Tabeekh, *Investigation on Bursa Fabricius and Body Weights in Broiler and Local Chicks Vaccinated with Two Types of Infectious Bursal Disease Vaccines.* International Journal of Poultry Science, 2010. **9**(5): p. 464-467.
8- Sharma, J.M., *Avian vaccine effective against infectious bursal diseasevirus*, 2004, Google Patents.
9- Rodríguez-Lecompte, J.C., et al., *Infectious bursal disease virus (IBDV) induces apoptosis in chicken B cells.* Comparative immunology, microbiology and infectious diseases, 2005. **28**(4): p. 321-337.
10- Eterradossi, N. andY. Saif, *Infectious bursal disease.* Diseases of Poultry, 2008. **10**: p. 185-208.
11- Kim, Y., R.C. Johnson, and J.T. Hupp, *Gold nanoparticle-based sensing of "spectroscopically silent" heavy metal ions.* Nano Letters, 2001. **1**(4): p. 165-167.
12- Thaxton, C.S ,.D.G. Georganopoulou, and C.A. Mirkin, *Gold nanoparticle probes for the detection of nucleic acid targets.* Clinica Chimica Acta, 2006. **363**(1): p. 120-126.
13- Lee, J.S., *Multiplexed detection of oligonucleotides with biobarcoded gold nanoparticle probes*.Methods in molecular biology (Clifton, NJ), 2011. **726**: p. 17.
14- Agasti, S.S., et al., *Nanoparticles for detection and diagnosis.* Advanced drug delivery reviews, 2010. **62**(3): p. 316-328.
15- Porter, A.L., et al., *Refining search terms for nanotechnology.* Journal of Nanoparticle Research, 2008. **10**(5): p. 715-728.
16- Storhoff, J.J., et al., *One-pot colorimetric differentiation of polynucleotides with single base imperfections using gold nanoparticle probes.* Journal of the American Chemical Society, 1998 .**120** (9): p. 1959-1964.

17- Choi, H. and C. Mody, *The Long History of Molecular Electronics Microelectronics Origins of Nanotechnology.* Social Studies of Science, 2009. **39** (1): p. 11-50.
18- Drexler, K. E., *Machine-phase nanotechnology.* Scientific American , 2001 .**285** (3) :p. 66-7.
19- Wilson, R., *The use of gold nanoparticles in diagnostics and detection.* Chem. Soc. Rev., 2008. **37**(9): p. 2028-2045.
20- Letsinger, R. L., et al. *Poly (oligonucleotide) conjugates: Applications in assembling nanoparticles and indetecting DNA sequences*. in *Nucleic acids symposium series*. 2001. Oxford Univ Press.
21- Bakthavathsalam, P., V.K. Rajendran, and J.A.B. Mohammed, *A direct detection of Escherichia coli genomic DNA using gold nanoprobes.* 2012.