Archive of SID

مقاله کامل

دوره شانزدهم ـ شماره ۴ ـ زمستان ۱۳۹۹

DOI: 10.22055/ivj.2019.185474.2135

تشخیص و تفسیر آسان، کم‌هزینه و دقیق ویروس نیوکاسل و تفریق سویه حاد از غیرحاد با روش RT-ARMS PCR آشیانه‌ای

مریم محمدی‌دستنائی[۱]، عبدالکریم زمانی‌مقدم[۲] و مصطفی شخصی‌نیائی[۳*]

[۱] دانش‌آموخته‌ی دکترای عمومی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

[۲] استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

[۳] استادیار گروه ژنتیک، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه شهرکرد و پژوهشکده زیست فناوری، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

تاریخ دریافت: ۹۸/۸/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹۹/۵/۸

چکیده

بیماری نیوکاسل، یک بیماری ویروسی ماکیان است که توسط پارامیکسوویروس تیپ ۱ از جنس Avulavirus است ایجاد می‌شود و تشخیص سریع و دقیق آن از اهمیت بالایی برخوردار است. حدت این ویروس به پروتئین اتصالی (F)، یکی از شش پروتئین این ویروس، بستگی دارد که می‌تواند ابرای تشخیص حدت سویه‌های آن استفاده شود. بنابراین، این مطالعه بنا دارد با توجه به پیشرفت‌های علم بیوانفورماتیک، روشی پیشنهاد نماید که برای شناسایی ارزان و آسان ویروس نیوکاسل و تفریق سویه‌های حاد و غیرحاد آن مورد استفاده قرار گیرد. ابتدا توالی کلیه‌ی سویه‌های در دسترس ویروس نیوکاسل از بانک اطلاعاتی NCBI به روش همترازی (BLAST) جمع‌آوری و پس از همردیف‌سازی، پرایمرهای عمومی و اختصاصی سویه‌ها طراحی شدند. در مرحله‌ی بعد تأیید ویروس نیوکاسل با روش PCR و پرایمرهای عمومی روی cDNA نمونه‌ی کنترل مثبت بهینه‌سازی شد. سپس تفریق سویه‌ی غیرحاد از حاد با روش ARMS-PCR (سیستم بازتاب تکثیری جهش) با دو پرایمر فوروارد اختصاصی بهینه‌سازی شد. از آن جایی که روش مورد استفاده در این مطالعه نوعی ARMS-PCR است که بر روی cDNA حاصل از واکنش RT انجام گرفته است و همچنین به علت آن که به منظور افزایش ویژگی از محصول PCR اول به عنوان الگو برای واکنش PCR آشیانه‌ای استفاده شده است "RT-ARMS-PCR آشیانه‌ای" نام‌گذاری شده است. سپس تعدادی از نمونه‌های جمع‌آوری شده از مزارع پروش مرغ گوشتی با این روش و همچنین Real-Time PCR به عنوان تست استاندارد طلایی آزمایش شدند. نتایج نشان داد که حساسیت و ویژگی تشخیص ویروس و سویه‌ی آن در هردو روش با هم مطابقت کامل داشتند. در مجموع این روش در مقایسه با روش Real-Time PCR با صرف زمانی اندکی بیش‌تر ولی هزینه، تجهیزات و پیچیدگی بسیار کم‌تر به عنوان جایگزین مناسبی برای روش Real-Time PCR برای تشخیص ویروس نیوکاسل و تفریق سویه‌های حاد از غیرحاد پیشنهاد می‌گردد.

کلمات کلیدی: نیوکاسل، پروتئینF ،غیرحاد، حاد، روشRT-ARMS-PCR آشیانه‌ای

مقدمه

ویروس بیماری نیوکاسل (APMV-1) از خانواده‌ی Paramyxoviridae، تحت خانواده‌ی Paramyxovirinae و جنس Avulavirus می‌باشد (Alexander, 2003). این ویروس ژنوم RNA تک رشته‌ای دارد و دارای ۱۵۱۸۶

*نویسنده مسئول : مصطفی شخصی‌نیائی، استادیار گروه ژنتیک، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران و پژوهشکده زیست فناوری، دانشگاه شهرکرد، ایران

E-mail: shakhsi-niaei.m@sku.ac.ir

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

www.SID.ir

Archive of SID

جفت باز می‌باشد (Kianizadeh et al., 2002). بر اساس شدت بیماری حاصله از این ویروس، سویه‌های آن را در چهار پاتوتیپ غیربیماری‌زای روده‌ای، غیرحاد، مزوژنیک و حاد گروه‌بندی کرده‌اند (Alexander and Senne 2008). یکی از زواید سطحی ویروس گلیکوپروتئین اتصالی (F) است که مسئول اتصال به سلولی میزبان است (Swayne et al., 1998). جهت انجام فرآیند اتصال، پروتئین پیش‌ساز F0 می‌بایست در محل آمینواسیدهای موقعیت ۱۱۶ از انتهای آمینی شکسته شده و منجر به ایجاد F1 و F2 با اتصال دی‌سولفیدی گردد (Kovics and Horvath 2000). مطالعات انجام شده بر روی توالی آمینواسیدی محل شکست پروتئین اتصالی در سویه‌های بیماری‌زا نشان می‌دهد که در این مکان آمینو اسید بازی وجود دارد. حضور آمینواسیدهای بازی در این محل بدین معنی است که ایجاد شکست تحت تأثیر پروتئاز یا پروتئازها در تعداد زیادی از بافت‌ها و اندام‌های میزبان انجام می‌شود (Pham et al., 2005).

بیماری نیوکاسل عفونتی فوق‌العاده مسری در بسیاری از گونه‌های طیور می‌باشد. برای اولین بار در سال ۱۹۶۰ در جاوه مشاهده گردید. این ویروس پاییز همان سال به انگلستان راه یافت و در منطقه‌ای به نام نیوکاسل تشخیص داده شد و بعدها بیماری فوق در بسیاری از نقاط دنیا نیز مشاهده گردید (Fuller et al., 2007). این بیماری در سر‌تاسر دنیا به عنوان یکی از مهم‌ترین بیماری ماکیان و سایر پرندگان به حساب می‌آید که گاهی باعث مرگ و میر در طیور مبتلا می‌شود. به دلیل این که طبیعت بیماری نیوکاسل حاد و وخیم است و عواقب متعاقب آن خطرناک است، این بیماری از طرف دفتر بین‌المللی همه‌گیری‌ها(OIE) جزء لیست بیماری‌های گروه A گروه‌بندی شده است (OIE 2001). بنابراین شناسایی دقیق و سریع آن در مزارع طیور از اهمیت بالایی برخوردار است. به هرحال، به دلیل اجرای برنامه‌های واکسیناسیون در سراسر کشور، در کنترل همه‌گیری معمولاً جداسازی و تشخیص ویروس بیماری نیوکاسل به تنهایی کفایت نمی‌کند؛ بلکه لازم است تا پاتوتیپ ویروس و حتی گاه میزان بیماری‌زایی آن هم ارزیابی شود (Alexander and Senne, 2008).

پس از ورود روش‌های مولکولی بر اساس فناوری اسیدنوکلئیک، شناسایی و تعیین پاتوتیپ ویروس هم پیشرفت زیادی کرد. روش RT-PCR (Revers Transcription-Plymerase Chain Reaction) در کم‌تر از ۲۴ ساعت قادر است سویه‌های حاد و غیرحاد NDV موجود در مایع آلانتوئیک تخم‌مرغ‌های آلوده و سویه‌های حاد NDV موجود در نمونه‌های بالینی را به طور مستقیم شناسایی کند (Snoeck et al., 2013). به دنبال آن، تکنیک در زمان واقعی (Real Time PCR) برای مشاهده‌ی پیشرفت واکنش PCR در طول انجام واکنش به وجود آمد که به کمک آن می‌توان مقادیر تولید محصولات PCR را نیز در هر مرحله آزمایش اندازه‌گیری کرد. این روش توانایی تشخیص پیشرفت PCR را در مراحل اولیه واکنش دارد در حالی که تشخیص در PCR معمولی در مرحله‌ی نهایی واکنش است (Wise et al., 2003). امروزه روش‌های مولکولی در حال راه‌اندازی و یا تکامل هستند تا با صرفه‌جویی در زمان و هزینه‌ها، جایگزین شیوه‌های سنتی زمان‌بر و پر زحمت شوند (Snoeck et al., 2013). روش مولکولی دیگری که در زمینه‌ی پزشکی مورد استفاده قرار گرفته، روش سیستم بازتاب تکثیری جهش ARMS-PCR (Amplification Refractory Mutation) می‌باشد. ARMS-PCR نخستین بار در سال ۱۹۸۹ توسط Newton و همکارانش و با بررسی نقص‌های ژن $^{\alpha}$1-antitrypsin معرفی شد و به Allele specific PCR نیز معروف می‌باشد (Newton et al., 1989). در این روش دو واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با DNA الگوی مشابه صورت می‌گیرد. در این دو واکنش که به طور موازی انجام می‌شوند، یکی از آغازگرهای مورد استفاده بین دو واکنش مشترک ولی آغازگر دیگر در دو PCR متفاوت است. به طوری که این آغازگرهای متفاوت بر اساس اختلاف در آلل‌ها طراحی می‌شوند. در حقیقت در یک واکنش از آغازگری استفاده می‌شود که قادر به تکثیر یکی از آلل‌ها باشد و در واکنش

www.SID.ir

Archive of SID

موازی دیگر از آغازگری استفاده می‌شود که قادر به تکثیر آلل دیگر باشد. این آغازگرها خاص هر آلل هستند، زیرا نوکلئوتیدهای انتهای ´3 آن‌ها با همدیگر متفاوت است و این انتها مطابق با جایگاه نوکلئوتیدی است که بین آلل‌ها متفاوت است. روش ARMS در بررسی چندشکلی‌ها، بررسی جهش در سلول‌های جنسی و غیرجنسی، بررسی بیماری‌های ارثی و همچنین بررسی بیماری‌های جانبی در طول یا پس از درمان سرطان مورد استفاده قرار می‌گیرد (Naghavi et al., 2013). در سال ۲۰۱۴، Vahidi و همکاران با روشی مشابه اقدام به تشخیص مقاومت باکتری‌ها به افلوکساسین نمودند. آن‌ها روش مولکولی Allele Specific PCR که همان ARMS PCR می‌باشد را برای تشخیص *مایکوباکتریوم توبرکولوزیس* استفاده کردند و از آن جایی که این ارگانیسم باکتری است و ژنوم آن DNA است نیازی به واکنش RT نمی‌باشد. آن‌ها ذکر کردند که این روش به خوبی قادر به تشخیص موتاسیون با تشکیل یا عدم تشکیل باند داخلی می‌شود. نتایج تعیین ترادف، با نتایج روش‌های استفاده شده انطباق داشت (Vahidi et al., 2014). در سال ۲۰۰۳، Baratchi و همکاران اقدام به تشخیص بیماری نیوکاسل و تفریق سویه‌های حاد و غیر حاد ویروس نیوکاسل با پرایمرهای اقتباس شده از مقاله Kant و همکاران ۱۹۹۷ (Kant et al., 1997) پرداختند و یک روش RT-PCR را بهینه‌سازی کردند. آزمایش RT-PCR آن‌ها با استفاده از دو جفت پرایمر اختصاصی ژن F ویروس انجام می‌شود (Baratchi et al., 2003).

گر چه هنوز از این روش زیاد در دامپزشکی استفاده نشده است ولی تکنیک ARMS-PCR روشی استاندارد، آسان، سریع و قابل اتکا برای تشخیص جهش‌های نقطه‌ای و پلی‌مورفیسم‌ها و یا حذف‌های کوچک می‌باشد. بنابراین هدف این مطالعه تشخیص ویروس نیوکاسل و تعیین سویه‌ی آن با روش حساس، کم هزینه RT-ARMS-PCR که تفسیرآسانی نیز دارد و معرفی آن برای سایر تشخیص‌های مولکولی دامپزشکی می‌باشد.

مواد و روش کار

در این مطالعه از تعداد ۱۰ مورد cDNA به دست آمده از بافت ریه نمونه‌های مشکوک به بیماری نیوکاسل در جوجه‌های گوشتی مبتلا به کمپلکس تنفسی حاد که در توسط تیم تحقیقاتی تهیه شده بودند استفاده گردید. برای بهینه‌سازی از یک نمونه‌ی مثبت تأیید شده با روش PCR Real-Time و یک نمونه منفی (واکسن B1) به عنوان استاندارد طلایی استفاده شد و در پایان مابقی نمونه‌های فوق‌الذکر نیز با روش Real-Time PCR بررسی شدند تا با نتایج این تحقیق مقایسه گردد.

برای انجام این آزمایش چهار پرایمر فوروارد و یک پرایمر ریورس مشترک طراحی شد و مورد استفاده قرار گرفت. بدین منظور توالی نوکلئوتیدی ژن F که کدکننده‌ی پروتئین اتصالی (F Protein) ویروس نیوکاسل می‌باشد با شماره‌ی دسترسی NC_039223 از پایگاه داده NCBI انتخاب شد و برای یافتن توالی آن در تمام سویه‌های ویروس نیوکاسل موجود در بانک داده NCBI (حدود ۱۵۰ سویه موجود) از روش Blastn استفاده گردید. پس از یافتن توالی‌های مورد نظر به منظور شناسایی مناطق حفاظت شده در تمام سویه‌ها که برای طراحی پرایمر مناسب باشد تمامی آن‌ها با نرم‌افزار Clustal Omega هم‌ردیف‌سازی شدند. سپس نواحی حفاظت‌شده که طولی حدود ۲۰ نوکلئوتید داشتند و برای انتخاب پرایمرها مناسب بودند مشخص شدند. به علت محدود بودن مناطق حفاظت‌شده بین سویه‌های مختلف پرایمرها به صورت دستی از مناطق حفاظت‌شده طراحی شدند. بررسی اختصاصی بودن پرایمرها برای ویروس و سویه‌های مدنظر با استفاده از سرور پرایمر بلاست بررسی و تأیید گردید. از آن جایی که برای پرایمر فوروارد تشخیص دهنده ویروس نیوکاسل ناحیه انتخاب شده در برخی سویه‌ها دارای چند پلی‌مورفیسم بود برای پوشش دادن همه‌ی آن‌ها دو پرایمر فوروارد جداگانه (F1.1, F1.2) طراحی شد که این مشکل مرتفع شود. طول محصول PCR با پرایمرهای فوروارد

www.SID.ir

Archive of SID

عمومی (F1.1, F1.2) و ریورس عمومی (R) که برای تشخیص ویروس نیوکاسل از سایر ویروس‌ها طراحی شده‌اند ۲۰۶ جفت‌باز است. از آن جایی که توالی پروتئین اتصالی در جایگاهی به نام جایگاه شکسته شدن (Cleavage site) تعیین کننده‌ی میزان حدت این ویروس می‌باشد (Mase et al., 2002) و به همین دلیل توالی آن در سویه‌های حاد و غیرحاد با هم متفاوت می‌باشد (Fig. 1)؛ توالی نوکلئوتیدی همین منطقه برای طراحی دو پرایمر فوروارد دیگر F2.1 و F2.2 که به ترتیب در سویه‌های حاد و غیرحاد حفاظت شده هستند طراحی شدند. طول محصول PCR با پرایمر ریورس عمومی و پرایمرهای فوروارد اختصاصی تعیین سویه‌ها F2.1 برای سویه حاد ۱۳۰ جفت باز و F2.2 برای سویه‌ی غیرحاد ۱۲۷ جفت‌باز است. توالی این پرایمرها در Table 1 آمده است.

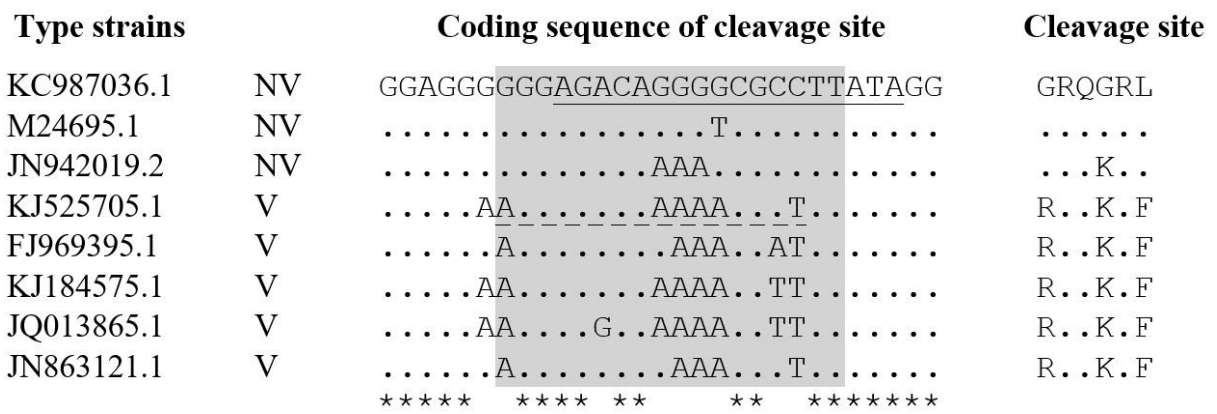

Fig 1. All types of coding sequences of fusion protein cleavage site of Newcastle disease virus obtained from all available strains from from NCBI, continuous underlined sequence indicates specific primer sequence for lentogenic strains and dashed underlined sequence indicates specific primer sequence of velogenic strains. V: Velogenic, NV: Not Velogenic.

Table 1. Ssequences of utilized primers for nested RT-ARMS PCR

Primer Name	Primer Sequence	Primer Size	TM	%GC	No. of Target Sequence
F1.1	AACACTGACTACTCTGCTC	19	53.85	46.37	4806–4825
F1.2	GACATTGACCACTTTGCTC	19	54.32	47.37	4806–4825
F2.1	AGGAGACAAAAACGCTTT	18	52.25	38.89	4883–4900
F2.2	AGACAGGGGCGCCTTATA	18	57.28	55.56	4886–4903
R	TAAGTCGGAGGATGTTGG	18	53.19	50.00	4995–5012

Positions of primers are indicated according to JSD0812 with accession no. NC-039223.

روش ارائه شده در این مطالعه شامل دو مرحله PCR می‌باشد. در مرحله‌ی اول PCR با پرایمرهای F1.1 و F1.2 و R انجام می‌شود. در مرحله‌ی دوم PCR آشیانه‌ای با پرایمرهای اختصاصی آلل F2.1 و F2.2 به طور جداگانه روی محصول مرحله‌ی اول (به عنوان الگو) استفاده گردید تا افزایش حساسیت کیت را به همراه داشته باشد. یعنی در مرحله‌ی دوم یک بار با پرایمر F2.1 و R و یک بار با پرایمر F2.2 و R، PCR روی محصول مرحله‌ی اول انجام شد، که

www.SID.ir

Archive of SID

در صورت حاد بودن سویه باید PCR با پرایمرهای F2.1 و R باند بدهد ولی با پرایمرهای F2.2 و R باندی دیده نشود و بالعکس (Table 1).

برای واکنش PCR از کیت شرکت Genall استفاده گردید. برای واکنش PCR مرحله‌ی اول به طور خلاصه ۶ میکرولیتر از مخلوط اصلی (Master mix)، ۶ میکرولیتر آب مقطر، ۰/۳ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای فوروارد عمومی (F2.1 و F2.2) و همچنین پرایمر ریورس عمومی (R) استفاده گردید. برنامه‌ی دمایی دستگاه ترموسایکلر به ترتیب ۵ دقیقه در ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به منظور دناتوره کردن اولیه و سپس ۳۰ سیکل شامل: ۴۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه (دناتوره کردن)، ۴۰ ثانیه در دمای اتصال پرایمرها به رشته‌ی الگو و ۴۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه (سنتز رشته‌های جدید) و بعد از ۳۰ سیکل به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه (به منظور تکمیل سنتزهای احتمالی تکمیل نشده)؛ تنظیم گردید.

بنابراین ابتدا کار تنظیم دمایی واکنش PCR بر اساس پرایمرهای عمومی (F1.1، F1.2 و R) تأیید کننده ویروس نیوکاسل بر روی نمونه‌های مثبت و منفی صورت گرفت. سپس تنظیم دمایی واکنش PCR برای نمونه کنترل سویه حاد (T1) و سویه غیرحاد (واکسن B1) در دماهای ۵۵، ۵۸، ۶۰، ۶۲، ۶۴ صورت گرفت. به صورتی که دمایی مشخص شود که سویه‌ی حاد با پرایمرهای اختصاصی تأییدکننده‌ی سویه‌ی غیرحاد باندی ندهد و بالعکس (Table 2).

محصولات PCR روی ژل آگارز ۲ درصد به مدت ۴۰ دقیقه الکتروفورز گردید. Green viewer برای نمایان سازی محصول PCR در تهیه‌ی ژل مورد استفاده قرار گرفت و در پایان باندها زیر نور UVمورد ارزیابی قرار گرفت و عکس‌برداری انجام شد (Fig 2).

نتایج

تنظیم دمایی واکنش PCR

نتیجه‌ی PCR در دماهای مختلف در Table 2 نشان داده شده است. نتایج تنظیم دمایی واکنش PCR بر روی نمونه‌ی T1 را نشان می‌دهد. با توجه به جدول زیر دمای ۶۰ درجه به عنوان دمایی که نتیجه‌ی مورد انتظار همه‌ی واکنش‌های PCR در آن محقق می‌گردد برای بقیه‌ی نمونه‌ها انتخاب شد. لازم به ذکر است این دماها روی دستگاه‌های ترموسایکلر متفاوت اختلافات جزئی نشان می‌دهند. لذا بهینه‌سازی نهایی و بررسی نتایج روی یک دستگاه انجام شد به صورتی که فقط یکی از محصولات PCR با پرایمرهای اختصاصی سویه مشاهده گردید (Fig. 1).

Table 2. Results of PCR optimization by annealing temperatures on B1 and T1 isolates

Sample	Primer/Temperature	55	58	60	62	64
T1	R ،F1.2 ،F1.1	+	+	+	−	−
	R ،F2.1	NA	+	+	+	−
	R ،F2.2	+	+	−	−	−
B1	R ،F1.2 ،F1.1	+	+	+	−	−
	R ،F2.1	NA	+	−	−	−
	R ،F2.2	+	+	+	+	−

www.SID.ir

Archive of SID

نتیجه الکتروفورز

تصویر ژل الکتروفورز تعیین ویروس نیوکاسل تعیین سویه‌ی نمونه‌ی کنترل مثبت (T1) و کنترل منفی (B1) پس از PCR آشیانه‌ای با پرایمرهای اختصاصی آلل در Fig. 1 نشان داده شده است. در PCR نمونه‌های T1 و B1 با پرایمر فوروارد F2.1 و ریورس R، باند ۱۳۰ جفت باز نشان‌دهنده‌ی سویه‌ی حاد است. در PCR نمونه‌های T1 و B1 با پرایمر فوروارد F2.2 و ریورس R باند ۱۲۷ جفت باز نشان‌دهنده‌ی سویه‌ی غیرحاد است. باند ۲۰۶ جفت بازی تأییدکننده‌ی ویروس نیوکاسل می‌باشد که پرایمرهای آن از PCR اول به PCR آشیانه‌ای راه یافته است. باند کوچک‌تر از ۱۰۰ جفت باز غیراختصاصی است و در تفسیر نتایج نقشی ندارد و خللی نیز به آن وارد نمی‌کند.

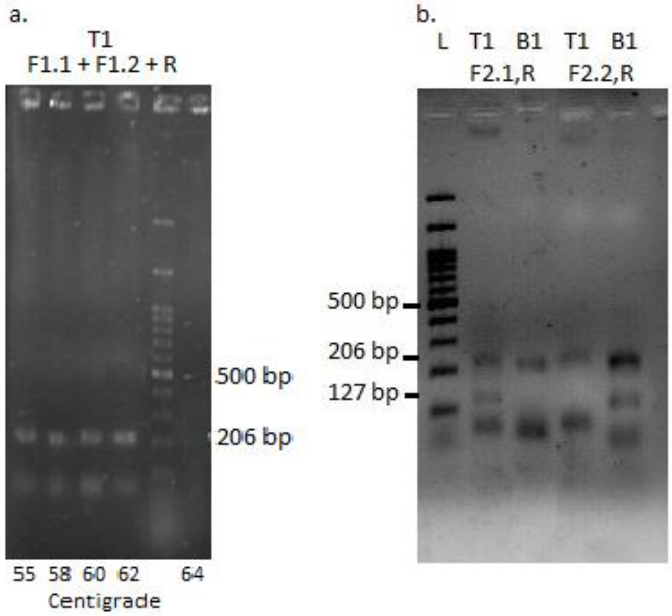

Fig 2. Electrophoresis pictures of NDV and its strain identification: a. Confirmation of NDV (206 bp), velogenic sample (T1) and lentogenic sample (B1) after nested PCR by general reverse primer (R) and allele specific primers of F2.1 (PCR product size: 130bp) and b. (PCR product size: 127bp). L: DNA ladder,

نتیجه‌ی تست نمونه‌های مشکوک

نتیجه‌ی تست نمونه‌های مشکوک به نیوکاسل در نمونه‌ها با روش RT-ARMS PCR در مقایسه با روش Real-Time PCR در آزمایشگاه دامپزشکی صدرا در Fig.3 آمده است. با توجه به نتایج به دست آمده از نمونه‌های مورد بررس حساسیت و ویژگی تشخیص سویه‌ی نیوکاسل صد در صد می‌باشد و عدم مطابقتی مشاهده نگردید.

پرایمرهای F2.1 و F2.2 برای تأیید غیرحاد و حاد بودن نمونه‌ها می‌باشند. به این صورت که پرایمر فوروارد F2.1 تخصصی تأیید نمونه‌های حاد و پرایمر F2.2 تخصصی تأیید نمونه‌های غیرحاد می‌باشند. لازم به ذکر است در هر آزمایش از پرایمر ریورس استفاده شده است. در تشخیص بیماری نیوکاسل باید باند ۲۰۶ جفت باز و در تعیین حدت ویروس باند ۱۳۰ و ۱۲۷ جفت باز به ترتیب برای سویه‌ی حاد و غیرحاد ایجاد شود.

پرایمرهای F1.1 و F1.2 برای تأیید بیماری نیوکاسل است. اگر نمونه‌ای با این دو پرایمر باند دهد نشان‌دهنده‌ی این است که نمونه‌ی حامل ویروس نیوکاسل بوده و باند ۲۰۶ با این دو پرایمر ایجاد می‌کند (Table 3). با این که نمونه‌ی شماره ۴ با این دو پرایمر عمومی باند قابل مشاهده‌ای نداده است ولی با پرایمر اختصاصی F2.1 که

www.SID.ir

Archive of SID

نشان‌دهنده‌ی حاد بودن نمونه است باند داده است که با نتیجه‌ی Real-Time PCR آن مطابقت دارد. علت این قضیه می‌تواند به تکثیر ناکافی PCR مرحله‌ی اول به علت کیفیت پایین cDNA باشد در حالی که همان تعداد کم در PCR مرحله‌ی دوم برای تکثیر و ایجاد باند کافی بوده است. بنابراین دو مرحله‌ای بودن واکنش می‌تواند مشکلات احتمالی هر یک از مراحل را مشخص و یا برطرف نماید.

Table 3. Results of suspected samples to VDV infection by two methods of RT-ARMS PCR and Real-Time PCR

Samples	F1.1+F1.2+R	F2.1+R	F2.2+R	Interpretation	Real-time PCR results
(Velogenic strain) T1	+	+	-	V	V
T2	+	+	-	V	V
1	+	+	-	V	V
2	+	-	+	NV	NV
3	+	-	+	NV	NV
4	-	+	-	V	V
5	-	-	-	N	N
6	-	-	-	N	N
(Lentogenic strain)B1	+	-	+	NV	NV
(Lentogenic strain) Lasota	+	-	+	NV	NV

V: Velogenic, NV: Not Velogenic, N: Negative

بحث

تحقیقات چندی در خصوص مقایسه‌ی روش‌های تشخیص ویروس نیوکاسل و تعیین حدت و توالی توسط محققین مختلف انجام شده است. برخی از این روش‌های دقیق‌تر ولی نیازمند امکانات بیش‌تر و برخی نیاز به وقت و یا هزینه‌ی زیاد هستند. در سال ۱۹۹۰ Jestin و Jestin با استفاده از روش RFLP به کمک روش PCR و آنزیم‌های محدودالاثر اقدام به شناسایی ویروس بیماری نیوکاسل در مایع آلانتوئیک عفونی شده با روش PCR کردند. توالی انتخاب شده برای تکثیر شامل ۲۳۸ نوکلئوتید بود که در توالی کدکننده‌ی ژن فیوژن قرار داشت. به عنوان آغازگر یک جفت الیگونوکلئوتید ۱۸ و ۱۹ نوکلئوتیدی استفاده شد. پس از استخراج RNA و سنتز cDNA محصول واکنش PCR با الکتروفورز و رنگ‌آمیزی اتیدیم بروماید با استفاده از آنزیم‌های محدودالاثر HaeIII، MboII و NatI تجزیه و تحلیل شد. واکنش PCR بر روی cDNA مربوط به ۳۰ سویه A-PMV1 و ۳ سویه‌ی دیگر A-PMV2، A-PMV3 و A-PMV4 انجام شد. به این ترتیب نشان داده شد که توالی انتخاب شده بسیار اختصاصی و ثابت بوده است. مزایای این تکنیک، به عنوان گام اول در ارزیابی ویروسی با استفاده از زیست‌شناسی مولکولی، مورد توجه قرار گرفته است (Veronique and Jestin 1990). همچنین در سال ۲۰۰۲ Julie و همکاران با روش RFLP اقدام به تشخیص و تمایز سروتیپ ۱ پارامیکسو ویروس پرندگان از موارد مزمن با استفاده از یک مرحله‌ی واکنش RT-PCR کردند. آن‌ها تکمیل و کاربرد یک آزمون RT-PCR یک مرحله‌ای همراه با آنزیم‌های محدودالاثر به عنوان یک روش سریع و اختصاصی برای تشخیص و تایپ APMV-1 از نمونه‌های فیلد گزارش کردند (Pham et al., 2005). از آن جایی که روش RFLP نیازمند استفاده از آنزیم‌های نسبتاً گران قیمتی هستند و مخصوصاً این که چند مورد از این آنزیم‌ها برای تأیید مورد نیازند و همچنین انجام واکنش و تفسیر نتایج آن‌ها مستلزم دقت بالایی است، استفاده از آن‌ها چندان مرسوم نشده است.

روش دقیق و حساس دیگری که امروزه نسبتاً رایج می‌باشد روش Real-Time PCR می‌باشد. در سال ۲۰۰۳ Mark و همکاران یک Real-Time RT PCR را برای

www.SID.ir

Archive of SID

تشخیص RNA ویروس بیماری نیوکاسل از نمونه‌های بالینی بهینه کردند. این آزمایش با استفاده از پروب‌های هیدرولیز شونده فلورسانت انجام شد. آزمایش برای بررسی نمونه‌های بالینی از جوجه‌های آزمایشگاهی آلوده به یک سویه بیماری‌زا نیوکاسل در جنوب غربی ایالات متحده مورد استفاده قرار گرفت. در مجموع، یک رابطه‌ی مثبت بین نتایج RT-PCR و ویروس‌های جدا شده از نمونه‌های بالینی گزارش شد (Wise et al., 2003). در تحقیق حاضر با روش RT-ARMS PCR ویروس نیوکاسل تشخیص و همچنین تعیین سویه شد. پس از مقایسه‌ی نتایج با روش Real-Time PCR، که روشی پر هزینه و به مراتب پیچیده است نتیجه‌ی متفاوتی نشان نداد. گر چه روش پیشنهادی در این تحقیق دارای دو مرحله PCR می‌باشد و احتمال خطاهای آزمایش و زمان آزمایش را اندکی بیش‌تر می‌نماید ولی در کنار نیاز به مواد و مخصوصاً تجهیزات ارزان‌تر روش اجرای آن پیچیدگی‌های انجام و تفسیر Real-Time PCR را ندارد. با توجه به نتایج به دست آمده از نمونه‌های مورد بررسی حساسیت و ویژگی تشخیص سویه‌ی نیوکاسل در مقایسه با روش Real-Time PCR صد در صد می‌باشد و عدم مطابقتی مشاهده نگردید. بنابراین می‌توان این روش را برای تشخیص ویروس نیوکاسل و تعیین سویه‌های آن پیشنهاد نمود. مخصوصاً زمانی که نیاز به مقایسه‌ی میزان ویروس در دو نمونه مورد بررسی مدنظر نباشد زیرا این قابلیت از شاخص‌های ویژه روش Real-Time PCR می‌باشد که قابلیت تشخیص محصولات PCR در هر چرخه واکنش PCR را دارد و به همین منظور طراحی و معرفی شده است.

در سال ۲۰۰۳، Baratchi و همکاران اقدام به تشخیص بیماری نیوکاسل و تفریق سویه‌های حاد و غیرحاد ویروس نیوکاسل با پرایمرهای اقتباس شده از اولین مقاله در این مورد (Kant et al., 1997) پرداختند و یک روش RT-PCR را بهینه‌سازی کردند. آزمایش RT-PCR با استفاده از دو جفت پرایمر اختصاصی ژن F ویروس انجام می‌شد. در آزمایش آن‌ها ویروس‌های حاد نیوکاسل با هر دو پرایمر فوروارد در واکنش‌های جداگانه با پرایمرهای ریورس، قطعه‌ای به طول ۲۵۵ جفت باز تکثیر می‌کند در حالی که ویروس غیرحاد، فقط با یکی از پرایمرهای فوروارد قطعه‌ای به این طول را تکثیر می‌کند(Baratchi et al., 2003). از آن جایی که در حال حاضر نسبت به سال ۱۹۹۷ اطلاعات جامع‌تری در مورد سویه‌های مختلف ویروس نیوکاسل وجود دارد و امکان بلاست و همردیف‌سازی چندگانه دقیق‌تری برای طراحی پرایمر در مناطق حفاظت شده وجود دارد. لذا انتظار می‌رود روش پیشنهاد شده در مطالعه‌ی حاضر در مقایسه با روش Baratchi و همکاران از حساسیت و دقت بالاتری برخوردار باشد زیرا اولاً بر خلاف کار آن‌ها سویه‌ی حاد و غیرحاد در دو واکنش مجزا فقط در یکی از واکنش‌ها باعث تکثیر محصول PCR و تولید باند ۱۲۷ و ۱۳۰ جفت باز به ترتیب برای سویه‌ی غیرحاد و حاد می‌شود که از نظر اندازه بسیار نزدیک به هم هستند و تفریق آن‌ها روی ژل آگارز دشوار است. این در حالی است که با بررسی جایگاه اتصال پرایمرهای مقاله Kant و همکاران ۱۹۹۷ با اطلاعات جدید جمع‌آوری شده از سویه‌های مختلف گزارش شده در بانک اطلاعاتی NCBI مشاهده می‌شود که ناهمخوانی‌های متعددی وجود دارد که ممکن است باعث حساسیت و ویژگی پایین‌تر آن‌ها در تشخیص سویه‌های این ویروس گردد. همچنین دو مرحله‌ای بودن پروتکل در مطالعه‌ی حاضر باعث تأیید معتبرتری نسبت به تأیید تک مرحله‌ای Baratchi و همکاران می‌باشد. بدین معنی که در تحقیق حاضر استفاده از پرایمرهایی که به صورت آشیانه‌ای روی محصول PCR اول تأیید ویروس قرار می‌گیرند باعث افزایش ویژگی روش می‌شود. از آن جایی که از محصول PCR اول برای PCR دوم در دو واکنش جداگانه با پرایمرهای اختصاصی تعیین سویه‌ی حاد (R+F2.1) و سویه‌ی غیرحاد (R+F2.2) استفاده می‌گردد یک کنترل کیفی داخلی برای تشخیص سویه‌ی می‌باشد زیرا دو واکنش PCR آشیانه‌ای که خود حساسیت واکنش را بالا می‌برد در کنار هم در تفسیر سویه و کیفیت واکنش‌های PCR مورد استفاده قرار می‌گیرند و

www.SID.ir

Archive of SID

ویژگی تست را افزایش می‌دهند. به عنوان مثال باید فقط یکی از واکنش‌های تعیین سویه‌ی مثبت باشد و در صورت اختلال در دستگاه یا هر یک از واکنش‌های PCR وجود مشکل مشخص می‌گردد.

در این مطالعه از روش RT-ARMS PCR که استفاده از روش ARMS-PCR بر روی cDNA حاصل از واکنش RT روی ژنوم RNA ویروس است؛ بهره گرفته شده است. این روش گرچه اندکی زمان بیش‌تری (به اندازه‌ی دوبار PCR) می‌برد ولی برخلاف روش Real-Time PCR (که به اندازه‌ی یک بار PCR زمان می‌برد) ارزان‌تر و پیچیدگی کم‌تری در اجرا و تفسیر دارد. با بررسی‌های انجام شده روی ۱۰ نمونه تأیید شده با Real-time PCR حساسیت و ویژگی این روش صد در صد بود. گر چه روش Real-time PCR در کنار هزینه‌ی مواد مصرفی بالا و تجهیزات گران قیمت حساسیت بسیار بالایی دارد ولی روش ارائه شده که مواد و وسایل در حد یک واکنش RT و PCR معمولی بوده و نیازی به رنگ فلورسانت گران قیمت روش Real-time (مانند Cyber Green) ندارد، باعث صرفه‌جویی قابل ملاحظه‌ای در هزینه می‌گردد و تفاوت خاصی نیز در حساسیت و ویژگی ندارد. لذا می‌توان استفاده از روش RT-ARMS PCR را برای تشخیص بیماری ویروسی نیوکاسل و یا سایر میکروارگانیسم‌های مهم دامپزشکی پیشنهاد نمود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از سرکار خانم پرستو طبائیان به خاطر همکاری در انجام بهینه‌سازی‌های آزمایشگاهی و از آزمایشگاه تشخیص دامپزشکی صدرا بابت همکاری در تأمین نمونه‌ها و برخی از تست‌های تأییدی تشکر و قدردانی می‌نمائیم.

تعارض منافع

نویسندگان هر نوع تعارض منافعی را نفی می‌نمایند.

منابع مالی

قسمتی از هزینه‌های این تحقیق با گرنت شماره ۱۴۱/۳۴۹ معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه شهرکرد حمایت شده است.

منابع

Alexander, D.J. (2003). *Newcastle disease. In: Disease of poultry* (1st ed). Iowashate university press. Iowa, Pp: 64-87.

Alexander, D.J., & Senne D.A. (2008). *Newcastle disease,other Avain paramyxoviruses, and pneumovirus infection* (12th ed., pp:75-115). Blackwell, Ames, Iowa.

Baratchi, S., Ghorashi, S.A., Hosseini, M., & Pourbakhsh S.A. (2003). Differentiation of virulent and non-virulent Newcastle disease virus isolates using RT-PCR. *Iranian Journal of Biotechnology*, *4*(1), 61-63.

Fuller, C.M., Collins, M.S., Easton, A.J., & Alexander, D.J. (2007). Partial characterization of five cloned viruses differing in pathogenicity, obtained from a single isolate of pigeon paramyxovirus type1 (PPMV-1) following passage in fowls eggs. *Archives of Virology*, *152*(8), 1575-82.

Pham, H.M., Konnai, S., Usui, T., Chang, K.S., Murata, S. Mase, M., Ohashi, K., & Onuma, M. (2005). Rapid detection and differentiation of Newcastle disease virus by Real-Time PCR with melting curve analysis. *Archives of Virology*, *150*(12), 2429-2438.

www.SID.ir

Archive of SID

Kant, A., Koch, G., Van Roozelaar, D.J., Balk F., & Ter Huurne, A. (1997). Differentiation of virulent and non-virulent strains of Newcastle disease virus within 24 hours by polymerase chain reaction, *Avian Pathology*, *26*(4), 837-849.

Kianizadeh, M., Aini, I., Omar, A.R., Yusoff, K., & Sahrabadi, M. (2002). Sequence and phylogenetic analysis of the fusion protein cleavage site of Newcastle disease virus field isolates from Iran, *Acta virologica*, *46*(4), 247-51.

Kovics, S., & Horvath, J. (2000). Newcastle disease virus (NDV): brief history of its oncolytic strains, *Journal of Clinical Virology*, *16*(1), 1-15.

Mase, M., Imai, K., Sanada, Y., Sanada, N., Yuasa, N., Imada, T., Tsukamoto, K., & Yamaguchi, S. (2002). Phylogenetic analysis of Newcastle Disease Virus Genotypes Isolated in Japan, *Journal of Clinical Virology*, *40*(10), 3826–3830.

Wise, M.G., Suarez, D.L., Seal, B.S., Pedersen, J.C., Senne, D.A., King, D.J., Kapczynski, D.R., & Spackman, E. (2003). Development of a Real-Time Reverse Transcription PCR for Detection of Newcastle disease virus RNA in clinical Samples, *Journal of Clinical Microbiology*, *42*(1), 329-38.

Naghavi, M. R., Gharehyazi, B., & Hosseini-Salcadeh, G.H. (2013). *Molecular Markers* (4th ed). Tehran University press. Iran, Pp:160.

Newton, C.R., Graham, A., Heptinstall, L.E., Powell, S.J., Summers, C., Kalsheker, N., Smith, J.C., & Markham, A.F. (1989). Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res*, *17*(7), 2503–2516.

Office International des Epizooties. (2001). *Newcastle disease. Manual of standards for diagnostic tests and vaccines* (4th ed), Paris: OLG.

Snoeck, C.J., Owoade, A.A., Hymann, E.C., Alkali, B.R., Okwen, M.P., Adeyanju, A.T., Komoyo, G.F., Nakouné, E., Le Faou, A., & Muller, C.P. (2013). High genetic diversity of Newcastle disease virus in poultry in west and central Africa: Cocirculation of genotype XIV and newly definded genotypes XVII and XVIII. *Journal of Clinical Microbiology*, *51*(7), 2250-60.

Swayne, D.E., Glisson, J.R., & Jackwood, M.W. (1998). *A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens* (4th ed). Pennsylvania, Pennsylvania University Press, US. Pp:1563-1630.

Vahidi, V., Zolfaghari, M., Ahmadi, A., shojapour, M., Moaddab, S.R., & Arjomandzadegan, M. (2014). Detecion of opioxacin resistance by rapid Molecular Method of Allele Specific PCR in Mycobacterium tuberculosis. *Biological Journal of Microorganisms*, *3*(9), 21-34.

Veronique, J., & Jestin, A. (1990). Detection of Newcastle disease virus RNA in infected allantoic fluids by in vitro enzymatic amplification (PCR), *Archives Virology*, *118*,151-161.

www.SID.ir

Archive of SID

Vol. 16, No. 4, Winter, 2021 **Original Article**

DOI: 10.22055/ivj.2019.185474.2135

Easy, low cost, and precise Identification and interpretation of Newcastle virus and differentiation of its velogenic from lentogenic strains by using the nested RT-ARMS PCR

Maryam Mohammadi Dastenaei[1], Abdolkarim Zamani Moghaddam[2] and Mostafa Shakhsi-Niaei[3*]

[1] DVM Graduated, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
[2] Professor, Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Genetics, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord University, and Research Institute of Biotechnology, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

Received: 13.11.2019 Accepted: 29.07.2020

Abstract

Newcastle disease is a viral disease of poultry that is caused by type 1 paramyxovirus, from the Avulavirus genus and its fast and precise diagnosis is of high importance. Virulence of this virus depends on Fusion protein (F), one of six proteins of this virus, which can be used for detection of the virus virulence. So, this study aims to design new primers according to bioinformatics science progression and suggest a cheaper and easier method for the identification of Newcastle virus (NDV) as well as distinguish lentogenic from velogenic strains with higher sensitivity and specificity. First, all available strains of Newcastle viruses were collected from NCBI data bank using Blast tool and after multiple alignments, universal and specific primers were designed. In the next step, identification of NDV was set up using universal primers by PCR on cDNA of the control positive sample. Then differentiation of lentogenic from velogenic strains set up by ARMS (Amplification Refractory mutation system)-PCR (Polymerase chain reaction) using specific primers. Because the method was performed on cDNA obtained from reverse transcription reaction (RT), and because the PCR product of the first PCR reaction was used as a template for nested second PCR reaction it is called “nested RT-ARMS PCR”. Afterward, some samples from broiler farms were tested by this method and then compared by Real-Time PCR as a golden standard test. The results showed that sensitivity and specificity of identification of the virus and its strains were fully compatible in both methods. To sum up, this method which consumes a little bit more time but lower expenses, equipment and complexity in comparison with Real-Time PCR, can be suggested as a suitable substitution for the detection of NDV and distinguishing its velogenic from lentogenic strains.

Keywords: Newcastle, F protein, Velogenic, Lentogenic, Nested RT-ARMS PCR

* **Corresponding Author**: Mostafa Shakhsi-Niaei, Department of Genetics, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord, Iran, and Research Institute of Biotechnology, Shahrekord University, Shahrekord, Iran,
E-mail: shakhsi-niaei.m@sku.ac.ir

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

www.SID.ir