

مقایسه حساسیت دو روش RT-PCR و RRT-PCR برای تشخیص ویروس بیماری نیوکاسل در طیور

سمیه ستاری^۱ شیدا ورکوهی^{۱*} محمد حسین بنا بازی^۲ میثم طباطبایی پژوه^۳

(۱) گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی، کرمانشاه-ایران

(۲) بخش پژوهش‌های بیوتکنولوژی، موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، کرج-ایران

(۳) پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج-ایران

(دریافت مقاله: ۱۹ اسفند ماه ۱۳۹۳، پذیرش نهایی: ۴ اردیبهشت ماه ۱۳۹۴)

چکیده

زمینه مطالعه: بیماری نیوکاسل یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های ویروسی طیور در سرتاسر جهان است. هدف: با توجه به اینکه روش‌های سنتی قابلیت محدودی در کنترل این بیماری دارند، انجام این مطالعه به منظور استفاده از تکنولوژی‌های نوین برای تشخیص به موقع بیماری جهت کاهش خسارت پیش روی صنعت طیور می‌باشد. **روش کار:** استخراج RNA با استفاده از کیت RNease mini و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. RNA استخراج شده با $10^9 \times 68/23$ رونوشت اولیه به صورت سری رقت‌های 10^0 ، برای انجام واکنش RT-PCR و RRT-PCR تهیه شد. واکنش RT-PCR با استفاده از کیت RNease mini و واکنش RRT-PCR با استفاده از کیت تجاری (شرکت Genekam Biotechnology، آلمان) انجام شد. **نتایج:** برای روش RRT-PCR تا سری رقت تهیه شده 10^{-34} تکثیر صورت گرفت و برای روش RT-PCR تا سری رقت تهیه شده 10^{-20} بر روی ژل آگارز $1/5\%$ باند مشاهده شد. براساس نتایج مشاهده شده روش RRT-PCR قادر به تشخیص $10^3 \times 10^4$ رونوشت و روش RT-PCR قادر به تشخیص $10^{20} \times 10^4$ رونوشت از نمونه اولیه است. **نتیجه‌گیری نهایی:** حساسیت روش RRT-PCR تقریباً دو برابر روش RT-PCR است و در مقایسه با روش RT-PCR، قادر به تشخیص ویروس بیماری نیوکاسل در نمونه‌های آلوده‌ای با 10000 برابر رونوشت کمتر از RNA ویروسی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: ویروس بیماری نیوکاسل، تشخیص، RT-PCR، RRT-PCR، حساسیت

مقدمه

محدود کننده گسترش صنعت طیور مطرح است (۲،۶). برای تشخیص بیماری نیوکاسل در ایران از روش‌های مرسوم سرولوژی و روش جداسازی ویروس استفاده می‌شود که بسیار مشکل و وقت گیر می‌باشند. همچنین این روش‌ها از حساسیت کمتری نسبت به روش‌های مولکولی برخوردار هستند. تشخیص سریع بیماری در کنترل آن نقش مهمی دارد. استفاده از روش‌های مولکولی که از حساسیت بالایی برخوردارند و بسیار اختصاصی عمل می‌کنند می‌تواند در تشخیص سریع ویروس، بکار گرفته شوند (۱).

از آنجایی که واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)، توانایی تشخیص ویروس‌های با ژنوم RNA را ندارد، محققین روش جدیدی به نام روش رونوشت برداری معکوس واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (RT-PCR) را برای تشخیص این ویروس‌ها ابداع کرده‌اند (۲۰). این روش ابتدا یک DNA مکمل از روی RNA ویروسی می‌سازد و سپس مراحل بعدی کار از روی cDNA صورت می‌پذیرد (۱۷).

همانطور که از معنی واژه بر می‌آید؛ مفهوم RRT-PCR؛ مشاهده لحظه به لحظه یک فرایند می‌باشد. مشکلات و نواقص عدیده موجود در قطع PCR عادی در نقطه دلخواه، همراه با نیاز به یک روش تعیین کمی دقیق و با توجه به اینکه استفاده از روش PCR مقادیر زیادی از قطعه مورد نظر را تولید می‌کند، اما جوابگوی بسیاری از نیازهای آزمایشگاهی نبوده و برای مطالعات تکمیلی به ابزاری با حساسیت بالاتر نیاز می‌باشد که زمینه گشایش عرصه‌ای نوین در تکنیک PCR گردیده است (۳۰).

در بین بیماری‌های ویروسی در پرندگان بیماری نیوکاسل در صدر اهمیت قرار دارد، به همین جهت است که تحقیقات بسیار گسترده‌ای در مورد روش‌های تشخیص، کنترل و پیشگیری از بیماری انجام گرفته است. بیماری نیوکاسل در هر منطقه بر حسب عوامل مؤثر در بروز و شدت بیماری چهره‌ای متفاوت دارد و با توجه به تشابه علائم کلینیکی و کالبدگشایی با سایر بیماری‌های تنفسی، ویروسی و میکروبی هیچکدام از علائم فوق نمی‌تواند بعنوان یک نشانه اختصاصی بشمار آید، لذا استفاده از آزمایشات پاراکلینیکی که در کمترین زمان ممکن بتواند سبب تشخیص و شناسایی عامل بیماری گردند، از اهمیت بسزائی در جهت کم کردن میزان تلفات و پیشگیری از عواقب بیماری برخوردار است (۳).

ویروس بیماری نیوکاسل در خانواده پارامیکسویریده قرار دارد و پروتئین امتزاجی این ویروس عامل اصلی اتصال غشای ویروس و ورود ویروس به داخل سلول می‌باشد. نیوکاسل که یک عامل بیماری‌زای مسری در طیور بوده، زبان‌های اقتصادی فراوانی را در صنعت مرغداری سبب شده است. گفتنی است که این ویروس تحریک کننده سیستم ایمنی است و فعالیت آنتی توموری دارد (۱۴،۲۰). ویروس این بیماری دارای سوبیه‌های مختلفی است که می‌توانند بیماری را در پرندگان با حدت کم تا زیاد ایجاد کنند. این بیماری در بسیاری از کشورهای جهان به عنوان یک بیماری



کامل ویروسی به طول ۱۵۱۸۶ جفت باز (bp) معادل ۴۶۹۳۱۹۲/۱۷ Da (گرم بر مول) محاسبه گردید. تعداد نسخه RNA ویروسی موجود در نمونه اولیه و رقت مورد نظر، با استفاده از معادله زیر تعیین و میزان حساسیت بطور دقیق تر و براساس حداقل تعداد نسخه RNA ویروسی قابل تشخیص به روش RT-PCR و RRT-PCR برآورد گردید (۱۰).

$$\text{غلظت (}\frac{\text{g}}{\mu\text{L}}\text{)} \times \left(\frac{\text{رونوشت}}{\text{mol}}\right) \times 6 \times 10^{23} = \frac{\text{وزن (}\frac{\text{g}}{\text{mol}}\text{)}}{\text{تعداد (}\mu\text{L/رونوشت)}}$$

نتایج

نتایج نشان می‌دهد که تکثیر قطعه DNA مورد هدف بطول ۲۰۴ جفت باز به روش RT-PCR با موفقیت انجام و آخرین باند قابل تشخیص در رقت 10^{-20} نسبت به نمونه RNA استخراج شده از نمونه ویروس بکار رفته در واکنش سوپه B1 تشکیل گردید (تصویر ۱). همچنین حداقل تعداد رونوشت قابل تشخیص با روش فوق، 1×10^{-20} رونوشت در هر میکرولیتر گزارش شد.

در آزمایش RRT-PCR طبق دستورالعمل کیت مورد استفاده، تکثیر نمونه کنترل مثبت و کنترل منفی با موفقیت انجام و مقدار سیکل آستانه ای نمونه کنترل مثبت ۱۸/۵۵ گزارش گردید (نمودار ۱). همچنین نتایج نشان می‌دهد که آخرین نمودار تکثیر در رقت 10^{-24} با مقدار سیکل

جدول ۱. چرخه دمایی واکنش‌های RT-PCR.

مرحله	تعداد چرخه RT-PCR	دما (°C)	زمان
۱	واکنش رونویسی معکوس	۴۵	۵ دقیقه
	غیرفعال سازی آنزیم نسخه برداری معکوس	۹۴	۵ دقیقه
۴۰	واسرشته سازی	۹۴	۳۰ ثانیه
	اتصال	۵۲	۳۰ ثانیه
	بسط	۷۲	۴۰ ثانیه
۱	بسط نهایی	۷۲	۵ ثانیه

جدول ۲. مواد استفاده شده برای واکنش RT-PCR.

مقادیر مواد	مواد شرکت کننده در واکنش
۵ μL	مستر میکس
۲ μL	تهیه شده RNA سری رقت
۱۸ μL	DNase/RNase-free water
۲۵ μL	حجم نهایی

جدول ۳. چرخه دمایی واکنش‌های RRT-PCR.

دما (°C)	زمان (ثانیه)	چرخه
۴۲	۳۶۰۰	۱ چرخه
۷۰	۶۰۰	
۹۵	۱۵	۲ چرخه
۵۲	۶۰ ثانیه	

در RT-PCR، واکنش‌ها سریعتر اتفاق می‌افتد و به زمان کمتری نیاز دارند. به دلیل اینکه روند این نوع PCR قابل مشاهده است، در صورت عدم تکثیر می‌توان به راحتی به واکنش خاتمه داد و از اتلاف وقت و انرژی پرهیز نمود. واکنش زنجیره ای پلیمرز در لحظه (Real-time PCR) یکی از جدیدترین روش‌های تشخیصی مورد استفاده در آزمایشگاه‌های دامی است. در این روش از میزان تداخل بین نمونه ای کاسته شده است و نیاز به استفاده از ژل برای دیدن نتایج از بین رفته می‌باشد (۳۰). هدف از انجام این مطالعه بررسی حساسیت روش RT-PCR و RRT-PCR و مقایسه حساسیت این دو روش، برای تشخیص سریع بیماری نیوکاسل می‌باشد.

مواد و روش کار

استخراج RNA: ویروس مورد استفاده در این مطالعه، ویروس واکنس نیوکاسل (سوپه B1) تولید شده در موسسه رازی بوده و استخراج RNA با استفاده از کیت RNease mini (شرکت کپاژن، آمریکا) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. نمونه‌های RNA با دستگاه نانودراپ (۲۰۰۰، کمپانی، Thermo Fisher، آمریکا) غلظت سنتجی شدند و سپس RNA استخراج شده با غلظت اولیه ۵۳۳/۷ ng/ μL و تعداد رونوشت اولیه معادل $6.8/23 \times 10^9$ به صورت سریالی و به نسبت ۱ به ۱۰۰ رقیق گردید.

واکنش RT-PCR: واکنش‌های ساخت cDNA و PCR در قالب یک واکنش، مطابق با شرایط مندرج در جدول ۱ و با استفاده از کیت تشخیص ویروس نیوکاسل VeTeK (شرکت اینترون بیوتکنولوژی، کره جنوبی) و با یک جفت آغازگر اختصاصی در حجم ۲۵ μL مطابق جدول ۲ انجام شد، سپس محصولات PCR به همراه نمونه شاهد مثبت، بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ الکتروفورز گردید. و نمایان سازی باندها تحت نور ماوراء بنفش دستگاه ژل داگ (BIO RAD، کشور آمریکا) انجام شد.

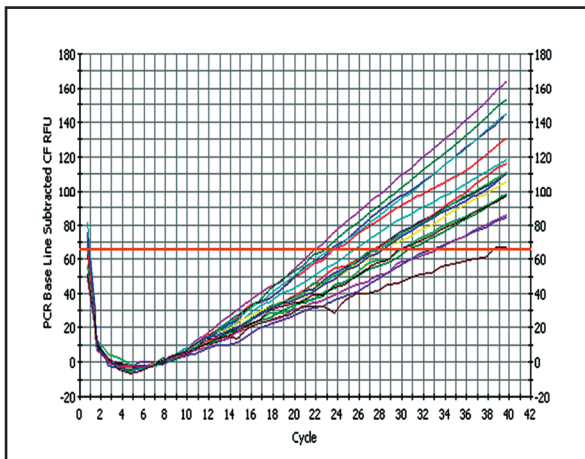
واکنش: RRT-PCR و واکنش RT-PCR مطابق با شرایط مندرج در جدول ۳ و با استفاده از کیت تجاری تشخیص ویروس نیوکاسل ساخت شرکت Genekam Biotechnology کشور آلمان و با دستگاه RRT-PCR (شرکت BIO RAD، آمریکا) انجام شد.

تعیین حساسیت روش‌ها: معیار تشخیص حساسیت، حداقل رقت ویروس بیماری در میان سریالی از رقت‌های مختلف تهیه شده از RNA استخراج شده یک نمونه واکنس در نظر گرفته شد. بر این اساس، حداکثر حساسیت روش مورد مطالعه، حداقل رقتی است که در آن همچنان یک باند واضح، قابل تشخیص و با شدت مناسب از فرآورده PCR بر روی ژل آگارز تشکیل گردد و برای روش RRT-PCR حداکثر حساسیت مورد مطالعه، حداقل رقتی است که در آن یک نمودار با سیکل آستانه ای (Ct) کمتر از ۴۰ تشکیل گردد. با تعیین غلظت RNA ویروسی استخراج شده از نمونه اولیه و اطلاع از وزن مولکولی کل RNA تشکیل دهنده ژنوم هر ویروس، وزن مولکولی برای crRNA از روی توالی نوکلئوتیدی crRNA

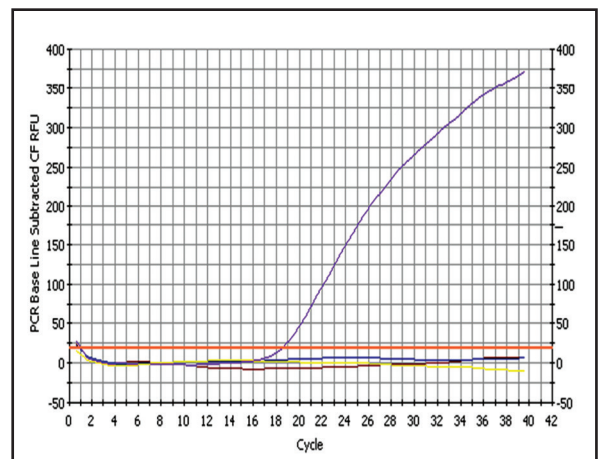




تصویر ۱. نتایج تشخیص ویروس بیماری نیوکاسل در رفتهای سریالی ۱۰ برابری تهیه شده از نمونه RNA اولیه استخراج شده از یک نمونه واکنس سویه B۱ به روش RT-PCR. قطعه ۲۰۴ جفت بازی اختصاصی نوع بیماریزای ویروس تا رقت ۲۰-۱۰ برابری بر روی ژل قابل مشاهده و تشخیص است (معرف میزان حساسیت تشخیص بیماری توسط روش RT-PCR).



نمودار ۲. نمودار تکثیر سری رفتهای تهیه شده از RNA استخراج شده از واکنس سویه B۱.



نمودار ۱. نمودار تکثیر نمونه کنترل مثبت و منفی با دستگاه Real-time PCR.

بحث

روش RT-PCR: در مطالعه حاضر، حداکثر حساسیت روش RT-PCR برای تشخیص بیماری نیوکاسل در طیور مبتلا یا بعبارت دیگر کمترین میزان رقت قابل تشخیص از ویروس نیوکاسل در بافتها و مایعات پرنده به روش RT-PCR، 10^{-20} برابر بود، که نشان می‌دهد، در مجموع، روش RT-PCR از حساسیت کافی و نیز سهولت، سرعت و دقت مناسبی برای تشخیص ویروس برخوردار است و استفاده از آن به عنوان یک روش تشخیصی با حساسیت بالا مناسب است. نتایج بدست آمده برای این روش در راستای نتایج مطالعات Semitanka و همکاران در سال ۲۰۰۵ و Majed و همکاران در سال ۲۰۱۳ می‌باشد (۱۷، ۲۴). بر اساس مطالعات قبلی حساسیت روش RT-PCR برای تشخیص ویروس بیماری نیوکاسل در طیور توسط Liu و همکاران در سال ۲۰۱۱ برابر با 10^{-4} EID₅₀، توسط Wang و همکاران در سال ۲۰۰۱، ۵-۱۰ HA از مایع آلتوتویک و Soares و همکاران در سال ۲۰۰۵، 10^{-2} UHA برای ویروس بیماری

آستانه ای $38/44$ نسبت به نمونه RNA استخراج شده از نمونه ویروس بکار رفته در واکنس سویه B۱ تشکیل شده است (نمودار ۲). بدین ترتیب، در مطالعه حاضر، حداکثر حساسیت روش RRT-PCR برای تشخیص بیماری نیوکاسل در طیور مبتلا یا به عبارت دیگر کمترین میزان رقت قابل تشخیص از ویروس نیوکاسل در بافتها و مایعات پرنده به روش RRT-PCR، 10^{-24} برابر بوده، همچنین حداقل تعداد رونوشت قابل تشخیص با روش فوق، 10^{-24} رونوشت در هر میکرولیتر گزارش شد.

نمودار ۳ منحنی استاندارد تهیه شده با استفاده از واکنش PCR از تکثیر سری رفتهای تهیه شده می‌باشد. همانطور که در شکل مشاهده می‌شود 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 Tefvik Dorak در سال ۲۰۰۶، منحنی استاندارد خوب است که شیب آن بین $3/3$ تا $3/6$ باشد و کارایی آن بین ۹۰ تا ۱۰۰٪ باشد (۲۸).



پرداختند و حساسیت روش فوق را بررسی کردند (۲۲، ۲۱، ۱۰).

مقایسه حساسیت روش‌های مورد مطالعه: براساس نتایج فوق،

می‌توان گفت حساسیت روش RRT-PCR تقریباً دو برابر روش RT-PCR است و در مقایسه با روش RT-PCR، قادر به تشخیص ویروس بیماریزای نیوکاسل در نمونه‌های آلوده‌ای با ۱۰۰۰۰ برابر رونوشت کمتر از RNA ویروسی می‌باشد. نتایج این مطالعه در راستای نتایج مطالعات Enders و همکاران در سال ۲۰۰۵، Hairul و همکاران در سال ۲۰۰۴ و Sharawi و همکاران در سال ۲۰۱۳ می‌باشد که با مقایسه روش‌های مختلف تشخیص ویروس بیماری نیوکاسل مانند روش تست آنتی ژنی، nested RT-PCR و RRT-PCR حساسیت روش RRT-PCR را ۱۰۰ برابر بیشتر از روش‌های تشخیصی دیگر معرفی کردند (۲۵، ۱۱، ۷).

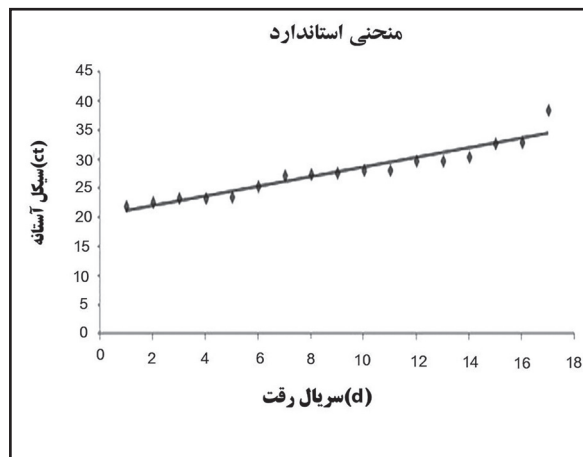
استفاده از روش‌های مولکولی بدلیل سرعت، حساسیت و عدم استفاده از حیوانات آزمایشگاهی در مقایسه با روش‌هایی مانند جداسازی ویروس و روش‌های سرولوژیکی جهت تشخیص بیماری کاربرد و اهمیت بالاتری دارد. به علت واگیری زیاد این بیماری و سرعت انتشار آن، تشخیص سریع و دقیق عامل بیماری نقش مهمی در اجرای اقدامات بهداشتی و پیشگیری خواهد داشت. از میان روش‌های مولکولی، روش RRT-PCR دارای حساسیت بالاتری در تشخیص ویروس بیماریزای طیور می‌باشد و بدین ترتیب می‌توان این تست را جایگزینی با حساسیت و سرعت بالا بر روش‌های سرولوژی و ویروس شناسی رایج دانست، به شکلی که تشخیص، حتی در زمانی که کمترین میزان تیترا ویروس در بدن ایجاد شده باشد، امکان پذیر می‌باشد و روش RRT-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 (۱۱، ۷).

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان این مقاله مراتب سپاسگزاری خود را از کارکنان آزمایشگاه میکروبیولوژی و بخش ژنومیکس پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران اعلام می‌دارند.

References

1. Aghakhan, S.M., Abshar, N., Fereidouni, S.R., Marunesi, C., Khodashenas, M. (1994) Studies on avian viral infectious in Iran. Arch Razi Inst. 44: 1-5.
2. Alexander, D.J. (2003) Newcastle disease, other avian paramyxoviruses, and pneumovirus infections In: Diseases of Poultry. B.W. Calnek, H.J., Barnes, C.W., Beard, W. M., Reid and H. W.,



نمودار ۳. منحنی استاندارد بدست آمده از سری رقت تکثیر شده.

$$Ct = 0.8259d + 20.43$$

$$R^2 = 0.9148$$

نیوکاسل گزارش شده است (۳۰، ۲۷، ۱۵). نتایج تحقیقات نشان داده است که به دلیل بالا بودن سرعت و دقت روش RT-PCR، می‌توان از آن برای شناسایی عامل بیماری نیوکاسل در بافت‌های آلوده و یا مشکوک به آلودگی استفاده کرد (۲۳، ۱۳، ۱۲، ۵)، همچنین با استفاده از این روش می‌توان به ردیابی ویروس در دو واکسن زنده B1 و لاسوتا پرداخت (۲۶).

روش RRT-PCR: تکثیر نمونه کنترل مثبت و کنترل منفی و مقدار سیکل آستانه ای نمونه کنترل مثبت می‌تواند نشان دهنده موفقیت در تکثیر نمونه‌های مورد آزمایش باشد. طبق دستورالعمل کیت، سیکل آستانه‌ای کمتر از ۳۶ قابل قبول، سیکل آستانه‌ای بین ۳۶ تا ۴۰ در حد آستانه و بالاتر از این سیکل غیرقابل قبول می‌باشد. حساسیت بیان شده برای روش RRT-PCR توسط Nidzworski و همکاران در سال ۲۰۱۰، ۲×۱۰^۲ کپی پلازمید یا EID50 ۱۰^۲ برای سویه ولوژنیک و EID50 ۱۰^۲ برای سویه لتوژنیک، توسط Pham و همکاران در سال ۲۰۰۵، ۹×۱۰^۲ کپی پلازمید، توسط گوان و همکاران در سال ۲۰۰۶، ۳۶ کپی/ماکرولیتر و توسط Michelle و همکاران در سال ۲۰۰۵، ۳×۱۰^۲ کپی از الگوی ژنومی برای نمونه کلاسیک، ۳×۱۰^۲ کپی از الگوی ژنومی برای نمونه ویروسی و ۲×۱۰^۲ کپی از الگوی ژنومی برای نمونه خیلی ویروسی گزارش شده است (۲۲، ۲۱، ۱۹)، که اختلاف در نتایج بدست آمده از مطالعات مختلف می‌تواند به علت اختلاف در شرایط دمایی و چرخه‌های آزمون RRT-PCR، تفاوت در نمونه مورد آزمایش و مدت زمان آلوده شدن بافت یا نمونه مورد آزمایش به ویروس بیماری باشد. همچنان که Michelle و همکاران در سال ۲۰۰۵ در مطالعات خود بیان کردند حساسیت روش RRT-PCR می‌تواند بر اساس زمان آزمایش و سویه مورد مطالعه متفاوت باشد (۱۹). Nidzworski و همکاران در سال ۲۰۱۰، از روش Pham، RRT-PCR و همکاران در سال ۲۰۰۵، بر پایه آنالیز منحنی ذوب سایبرگرین RRT-PCR با توجه به ژن کد کننده پروتئین (F) و Guan و همکاران در سال ۲۰۰۶، با استفاده از روش RRT LC RT-PCR به تشخیص ویروس بیماری نیوکاسل در طیور



- Yoder, Jr. (eds.). (11th ed.) Iowa State University Press. p. 63-99.
3. Alexander, D.J., Senne, D.A. (2008) Newcastle Disease, Other Avian Paramyxoviruses and Pneumovirus Infections. In: Diseases of Poultry. Saif, Y.M. (ed.). (12th ed.). Blackwell, Ames, Iowa, USA. p. 75-115.
 4. AL-Garib, S.O., Gielkens, A.L.J., Gruys, E., Koch, G. (2003) Review of Newcastle disease virus with particular references to immunity and vaccination. *J World's Poult Res.* 59: 185-200.
 5. Ballagi, Wehmann, A., Herczeg, E., Belak, J., Lomniczi, S.B. (1997) The structure of the fusion glycoprotein of Newcastle disease virus suggests a novel paradigm for the molecular mechanism of membrane fusion. *Arch Virol.* 141: 243-261.
 6. Beard, C.W., Wilkes, W.J. (1985) A comparison of Newcastle disease haemagglutination test results from diagnostic laboratories in the southeastern United States. *Avian Dis.* 29: 1048-1056.
 7. Enders, K.O.N., Peter, K.C.C., Antia, Y.Y.N., Hoang, T.L., Wilina, W.L.L. (2005) Influenza AH5N1 detection". *EmerInf Dis.* 11: 1303-1305.
 8. Ferrira, L., Villar, E., Munoz-Barroso, I. (2004) Conformational changes of Newcastle disease virus envelope glycoproteins triggered by gangliosides. *Eur J Biochem.* 271: 581-588.
 9. Gravel, K.A., Morrison, T.G. (2003) Interacting domains of the hemagglutinin-neuraminidase and fusion proteins of newcastle disease virus. *J Virol Method.* 77: 11040-11049.
 10. Guan, M.K., Cheng, H.L., Liang, Y.K., Wen, T.J., Chulu, J.L., Liao, M.H., Chang, T.J., Liu, H.J. (2006) Development of a quantitative Light Cycler real-time RT-PCR for detection of avian reovirus. *J Virol Method.* 133: 6-13.
 11. Hairul, A.H., Omar, A.R., Mohd Hair-Bejo, Ideris, A. (2004) Comparison of SybrGreen I, ELISA and conventional agarose gel-based PCR in the detection of infectiousbursal disease virus. *Microbiol Res.* 163: 556-63.
 12. Kant, A., Koch, G., VanRooselaar, D.J., Balk, F., TerHuurne, A. (1997) Differentintion of virulent and non- virulent strain of Newcastle Disease virus within 24 hours polymerase chain reaction. *Avian Pathology.* 26: 837-849.
 13. Kho, C.L., Mohd, M.L., Arshad, S.S., Yusoff, K. (2000) performance of an RT-nested PCR – ELISA for detection of Newcastle disease virus. *J Virol Method.* 86: 71-83.
 14. Kovics, S., Horvath, J. (2000) Newcastle disease virus (NDV): brief history of its oncolytic strains. *J ClinVirol.* 16: 1-15.
 15. Liu, H., Zhao, Y., Zheng, D., Lv, Y., Zhang, W., Xu, T., Li, J., Wang, Z. (2011) Multiplex RT-PCR for rapid detection and differentiation of class I and class II Newcastle disease viruses. *J Virol Method.* 171: 149-155.
 16. Lu, B.L.W. (1982) Failure to detect hemagglutinationinhibiting antibodies with intact avian influenza virions. *Infect Immunlogi J Annals Internal Med.* 38: 530-535.
 17. Majed, H.M., AbdelAmeer, H.Z., Kadhim, L.I., Hasoon, M.F. (2013) Conventional and Molecular Detection of Newcastle Disease and Infectious Bursal Disease in Chickens. *J World's Poult. Res.* 3: 5-12.
 18. Mass, R., Komen, M., Diepenvan, M., Oei, H.L., Classen, I.J.M. (2003) Correlation of haemagglutinininneraminidase and fusion protein content with protective antibody response after immunization with inactivated Newcastle disease vaccines. *Vaccine Journal Virology.* 21: 3137-3142.
 19. Michelle, A., Lin, T.L., Wu, C.C. (2005) Real-timeRT-PCR differentiation and quantitation of infectious bursal disease virus strains using dual-labeled fluorescent probes. *J Virological Method.* 127: 87-95.
 20. Munir, M., Linde, A.M., Zohari, S., Stahl, K., Baule, C., Engstrom, B. (2011) Whole genomesequencing and characterization of a virulent Newcastle disease virus isolated from an outbreak in Sweden. *Virus Genes.* 43: 261-271.
 21. Nidzworski, D., Rabalski, L., Gramadzka, B. (2010) Detection and differentiation of virulent and avirulent strains of Newcastle disease virus by real-time PCR. *J Virological Method.* 173: 144-149.
 22. 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. *J Arch Virol.* 150: 2429-2438.
23. Seal, B.S., King, D.J., Locke, D.P., Senne, D.A., Jackwood, M.W. (1998) Phylogenetic relationships among highly virulent Newcastle disease virus isolates obtained from exotic birds and poultry from 1989 to 1996. *Clinical Microbol.* 36: 1141-1145.
24. Semitanka, K., Minta, Z., Domanska, B.K. (2005) Detection of Newcastle Disease Virus in infected chicken embryos and chicken Tissues by RT-PCR. *Bulletin Veterinary Institute in puawy.* 50: 3-7.
25. Sharawi, S., Al-Habeeb, M.A., 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. *J Vet World.* 10: 239-243.
26. Stauber, N., Brechtbuhl, K., Brechner, L., Hofmann, M.A. (1995) Detection of Newcastle disease virus in poultry vaccines using the polymerase chain reaction and direct sequencing of amplified cDNA. *J Clinical Virol.* 13: 360-364.
27. Soares, P.B.M., Demetrio, C., Sanfilippo, L., Kawanoto, A.H.N., Brentano, L., Durigon, E.L. (2005) Standardization of a duplex RT-PCR for the detection of Influenza A and Newcastle disease viruses in migratory birds. *J Virol Method.* 123: 125-130.
28. Tevfik Dorak, M. (2006) Real-time PCR. Taylor & Francis e-Library New york, NY, USA. p. 333.
29. Wang, X.J., Bai, Y.D., Zhang, G.Z., Zhao, J.X. (2005) Structure and Function Study of Paramyxovirus Fusion Protein Heptad Repeat Peptides. *Arch Biochem Biophys.* 436: 316-322.
30. 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. J Vet Res.* 68: 131-134.



A comparison of sensitivity analysis of RRT-PCR and RT-PCR techniques for diagnosis of avian Newcastle disease virus

Satari, S.¹, Varkoohi, S.^{1*}, Banabazi, M. H.², Tabatabaei, M.³

¹Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Razi University, Kermanshah-Iran

²Biotechnology Research Center, Research Institute of Animal Sciences, Karaj-Iran

³Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Karaj-Iran

(Received 10 March 2015, Accepted 24 April 2015)

Abstract:

BACKGROUND: Newcastle disease is one of the most serious viral diseases in the poultry worldwide. **OBJECTIVES:** Since the traditional strategies have been hardly effective in controlling the disease, the purpose of this study was to introduce new methods for early and rapid diagnosis of Newcastle. The present study helps to reduce further damage to the poultry industry. **METHODS:** RNA extraction was performed, using RNease mini kit, according to the manufacturer's instructions. Extracted RNA with 68.23×10^9 copy numbers was prepared as serial dilutions of 100 μ L for RT-PCR and RRT-PCR reactions. RRT-PCR and RT-PCR were performed, using commercial kit and RNease mini kit, respectively. **RESULTS:** Results showed that amplification was done according to prepared dilution equal 10^{-34} for RRT-PCR reaction and a visible band observed on 1.5% Agarose gel up to 10^{-20} for RT-PCR reaction. Based on the results observed, RRT-PCR and RT-PCR reactions are able to detect 10^{-34} and 10^{-20} copy numbers of primary sample, respectively. **CONCLUSIONS:** The sensitivity of RRT-PCR reaction is almost twice compared with RT-PCR reaction, also RRT-PCR reaction is able to diagnose Newcastle disease virus in infected samples with 10,000 copy numbers of the RNA virus less than RT-PCR.

Keyword: diagnosis, Newcastle disease virus (NDV), RRT-PCR, RT-PCR, sensitivity

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Reaction temperature cycle RT-PCR.

Table 2. The materials used in RT-PCR reaction.

Table 3. Reaction temperature cycle RRT-PCR.

Figure 1. Detection of Newcastle disease virus in 10-fold serial dilutions of extracted sample RNA from a sample of B1 vaccine strain by RT-PCR.

Graph 1. Amplification diagram of positive and negative control samples by RRT-PCR.

Graph 2. Amplification diagram of prepared dilutions series of extracted RNA from the B1 vaccine strains.

Graph 3. Obtained standard curve of amplified dilution series.

