Archive of SID

مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۸۷، دوره ۶۳، شماره ۱، ۱۶-۱۱

استفاده از روش Nested-PCR برای تشخیص آلودگی کشت‌های سلولی به ویروس pestivirus

سید علی قرشی[۱]* مرتضی دلیری جوپاری[۱] دینا مرشدی[۱] ترانه حاجیان[۱] محسن لطفی[۲]

۱) گروه میکروبیولوژی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران - ایران.

۲) موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج - ایران.

(دریافت مقاله: ۱ اردیبهشت ماه ۱۳۸۵، پذیرش نهایی: ۱ آذر ماه ۱۳۸۵)

چکیده

در این مطالعه یک روش Nested-PCR برای تشخیص دو ویروس BVDV ازسویه NADL بهینه‌سازی گردید. درآزمایش RT-PCR، قسمتی ازمنطقه غیرقابل ترجمه ناحیه '۵ ویروس به طول ۲۴۹ جفت باز تکثیرشد. محصول PCR در وکتور pTZ57R/T کلون گردید ونتیجه تعیین ردیف اسیدهای نوکلوتیدی آن اختصاصی بودن آزمایش را تایید نمود. سپس پرایمرهای داخلی انتخاب وآزمایش Nested-PCR انجام گردید ویک قطعه DNA به طول ۱۵۵ جفت باز تکثیرشد. میزان حساسیت آزمایش RT-PCR، $TCID_{50}$ 10^{4} ومیزان حساسیت آزمایش Nested-PCR در تشخیص ویروس BVDV درکشت سلول، $TCID_{50}$ 10^{2} تعیین گردید. تعداد ۷ نمونه ازکشت‌های سلولی باسه روش PCR, ELISA و Nested-PCR موردآزمایش قرارگرفتند. نتایج نشان داد که حساسیت روش‌های مولکولی در تشخیص ویروس در نمونه‌ها نسبت به روش ELISA بیشتر می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: pestivirus، آلودگی کشت سلولی، PCR.

مقدمه

کلیه کشت‌های سلولی که به منظور امور تحقیقاتی یا تولیدی استفاده می‌گردند، عموماً در معرض خطر آلودگی با عوامل مختلف میکروبی و ویروسی هستند. مهمترین عامل ویروسی که از آن به عنوان یک آلوده کننده کشت‌های سلولی نام برده می‌شود ویروس diarrhoea virus (BVDV) bovine viral است (Harasawa, 1994). این ویروس از جنس pestivirus و متعلق به خانواده Flaviviridea می‌باشد (Regenmortel *et al*.,2000 van). این ویروس انتشار جهانی داشته و در تمام نقاط دنیا یافت می‌شود و در گاوها باعث بروز بیماری اسهال می‌گردد. ویروس BVD از نظر ایجاد ضایعات در کشت سلول به ۲ (Biotype) بیوتایپ Non-Cytopathic (NCP) و (CP) Cytopathic تقسیم می‌گردد (Lewis *et al*., 1991). تیپ NCP بسیار شایع بوده و از اهمیت زیادی برخوردار است. این ویروس توانایی عبور از جفت گاو را دارا می‌باشد و می‌تواند جنین گاو را مورد هجوم قرار داده و سبب آلودگی آن گردد. جنین‌هایی که به این طریق به ویروس آلوده می‌شوند، پس از تولد دارای عفونت پایدار persistently infected می‌گردند و بدون نشان دادن علائم کلینیکی ویروس را از خود دفع و محیط را آلوده می‌سازند (Hyndman *et al*., 1998). مهمترین فاکتور رشدی که به منظور رشد و تکثیر سلول در کشت‌های سلولی به کار می‌رود Fetal Bovine Serum (FBS) یا اصطلاحاً Fetal Calf Serum (FCS) گفته می‌شود که سرم جنین گاو است لذا با توجه به انتشار وسیع آلودگی بین گاوها احتمال آلوده بودن سرم جنین گاو به این ویروس زیاد است. از طرفی جمع‌آوری FBS از گوساله‌های تازه متولد شده همیشه خطر ابتلاء سرم آنها به هر دو بیوتیپ BVDV را دارا می‌باشد. وجود چنین آلودگی‌هایی در FBS باعث آلوده شدن کشت‌های سلولی می‌گردد (Reid, 1995). ویروس NCP در این کشت‌ها هیچ ردپایی از نظر Effect) CPE (Cytopathic از خود به جا نمی‌گذارد و در پاساژهای مختلف کشت سلول باقی می‌ماند. گزارش‌هایی از وجود چنین آلودگی‌هایی حتی در واکسن‌های ویروسی انسانی که از رده‌های مختلف سلولی استفاده می‌شود وجود دارد (Harasawa and Tomiyama, 1994) و گزارش‌های محدودی مبنی بر بروز بیماری در انسان هم گزارش شده است (Potts *et al*., 1987; Yolken *et al*., 1989). تشخیص ویروس BVD در کشت‌های سلولی بخصوص در کشت‌های سلولی که به منظور تهیه واکسن زنده در انسان و دام استفاده می‌شوند اهمیت بسزایی دارد. جستجوی ویروس در این گونه واکسن‌ها توسط محققین زیادی بررسی شده است. در یک مطالعه از ۳۶ نمونه کشت سلول که برای تهیه واکسن انسانی استفاده می‌شده است، ۳۳ درصد از نمونه‌ها به ویروس BVD آلوده گزارش شده‌اند (Studer *et al*., 2002). تشخیص ویروس در این نمونه‌ها با روش RT-PCR صورت گرفته و منشاء آلودگی FCS تشخیص داده شده است. در مطالعه دیگری که توسط Audet و همکاران درسال ۲۰۰۰ صورت پذیرفته است نشان داده شده که کشت‌های سلولی در بانک سلولی که منشاء آنها از سلول‌های هامستر یا کلیه خرگوش و یا فیبروبلاست جنین مرغ بوده است در اثر مواد آلوده به ویروس، آلوده گشته‌اند. نوع روش تشخیص آلودگی کشت‌های سلولی به BVD نیز از اهمیت زیادی برخوردار است. بعضی از محققین، روش‌های مولکولی مانند RT-PCR را با جداسازی ویروس بوسیله کشت سلول مقایسه کرده‌اند و تقریباً در تمام این مطالعات بر ارجهیت روش‌های مولکولی تاکید شده است (Given *et al*., 2002; Studer *et al*., 2002; Cornish *et al*., 2005; Makoschey *et al*., 2003). اخیرا استفاده از روش‌های جدیدتری مانند PCR real-time برای تشخیص pestivirus‌ها گزارش شده است

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۰۲۱-۴۴۵۸۰۳۸۶ نمابر: ۰۲۱-۴۴۵۸۰۳۹۹ Email:alig@nrcgeb.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

et al., 2006; Willoughby *et al*., 2006; Letellier and Kerkhofs, Hoffmann). با استفاده از این روش، حساسیت آزمایش تا حد تشخیص ۱۰ کپی از RNA ویروس در هر نمونه گزارش شده است (Hoffmann *et al*., 2006). در مطالعه دیگر حساسیت این آزمایش $TCID_{50}$ ۱۰۰-۱۰ از تیتر ویروس گزارش شده است (Baxi *et al*., 2006). از طرفی آلودگی کشت‌های سلولی به این ویروس که برای امور تحقیقاتی استفاده می‌شود می‌تواند بر روی نتایج آزمایش‌ها تاثیر گذارد. لذا تشخیص این ویروس در کشت‌های سلولی از اهمیت فوق العاده‌ای برخوردار می‌باشد.

مواد و روش‌کار

تهیه کشت سلول آلوده به ویروس: کشت سلول مورد استفاده (BT) Bovine Turbinate بود و سویه ویروس BVD که برای تکثیر استفاده گردید سویه استاندارد NADL نام داشت. پس از کشت سلول BT، ویروس BVDV به نسبت Multiplicity of infection (MOI) ۰/۵ به کشت سلول اضافه گردید. محیط کشت MEM (Minimum Essential Medium) همراه با ۱۰درصد FCS (Gibco, Pestivirus and Mycoplasma free) در زمان رشد سلولها و ۲درصد در زمان نگهداری آنها مورد استفاده قرار گرفت. کشت‌های سلولی غیر آلوده و آلوده به‌طور جداگانه در دمای ۳۷درجه سانتیگراد نگهداری شدند. پس از ۴۸-۴۰ ساعت که علائم CPE در ۷۰درصد کشت سلول مشاهده گردید، سلول‌ها جمع‌آوری گردیدند. تعیین تیتر ویروس تکثیر یافته با استفاده از روش Reed and Muench (1938) صورت پذیرفت. در مورد سویه NCP، کشت سلول Vero cell استفاده گردید و پس از آلوده‌سازی با ویروس NCP و انکوباسیون لازم در ۳۷درجه سانتیگراد، وجود BVD بوسیله Indirect Fluorescent Antibody (IFA) به اثبات رسید. در این روش ابتدا سلول‌ها با استفاده از متانل به مدت ۲۰ دقیقه ثابت گردیدند و سپس با آنتی‌بادی اولیه (سرم هیپرایمن خرگوش علیه BVDV) به مدت یک ساعت انکوبه شدند. پس از ۳ بار شستشو، آنتی‌بادی ثانویه که به آن Fluorescein isothiocyanate (FITC) متصل شده بود اضافه گردید و همانند قبل انکوبه و شستشو شدند و نهایتا نتایج ثبت گردید. آنتی‌بادی اولیه مورد استفاده در آزمایش IFA از سرم گاوهای ایمن تهیه شده است. این سلول‌ها نیز جمع‌آوری گردید.

استخراج RNA: استخراج RNA با استفاده از کیت RNAfast (شرکت ژن فناوران-تهران) از مایع کشت سلول به عمل آمد. روش کار براساس دستورالعمل کیت انجام گردید. به طور مختصر، ۳۰۰ ماکرولیتر از مایع کشت سلول به ۱ میلی لیتر از محلول RNAfast اضافه گردید. نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در حرارت آزمایشگاه نگهداری شدند. سپس بوسیله کلروفرم فاز آلی جدا و RNA بوسیله محلول ایزوپروپانل رسوب داده شد. پس از شستشوی رسوب RNA با الکل ۷۵درصد در DEPC - dH_2O، RNA استخراج شده در ۲۰ ماکرولیتر آب مقطر (DEPC - dH_2O) حل گردید و تا زمان آزمایش در درجه حرارت ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

واکنش RT-PCR: ساخت اولین رشته cDNA در حجم ۴۰ ماکرولیتر و به مدت یک ساعت در ۳۷درجه سانتیگراد انجام گردید. این واکنش حاوی ۴ ماکرولیتر از RNA استخراج شده (0.5-2ug)، یک ماکرولیتر از پرایمر (ng 250) Reverse، یک ماکرولیتر از مخلوط dNTP (10mM) ها، ۴۰ واحد Rnase Inhibitor، ۴۰ واحد آنزیم Reverse-Transcriptase و ۸ ماکرولیتر از بافر آنزیم RT حاوی Tris-HCl (pH 8.3), 7.5 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, l0mM dithiothreitol, 1.mM می‌باشد. سپس نمونه‌های مورد آزمایش به مدت ۵ دقیقه در ۷۰ درجه سانتیگراد حرارت قرار گرفتند و سپس برای واکنش PCR به کار برده شدند. به منظور تشخیص کلیه ویروس‌های BVDV، پرایمرهای مورد استفاده از سکانس منطقه غیر قابل ترجمه ناحیه '۵ (5' non-coding region) ژنوم ویروس براساس گزارش‌های موجود (1994 ,Harasawa) انتخاب گردیدند به طوری‌که قادر به شناسایی این ژن در کلیه ویروس‌های BVDV باشند. پرایمرهای انتخاب شده عبارتند از: '3-AGC TACAG-3' و Pepsti-F1 5'-ATG CCC (A/T) (C/T) AGT AGG ACT Pepsti-R1 5'-ACT CCA TGT GCC ATG. واکنش PCR شامل ۱۰ ماکرولیتر از محصول واکنش RT، بافر PCR حاوی (8.0 mM Tris - HCl (pH:، 50 mM Kcl10، 1.5 $MgCl_2$ mM و همچنین 2mM از هر یک از dNTP ها، ۲۵۰ نانوگرم از هر یک از پرایمرهای Forward و Reverse و یک واحد آنزیم Taq DNA Polymerase (سیناژن) می‌باشد. واکنش با استفاده از دستگاه و با برنامه حرارتی ۹۴درجه سانتیگراد به مدت ۴ دقیقه (یک سیکل) و سپس ۹۴درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۵درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه (۳۰ سیکل) و نهایتاً ۷۲درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه (یک سیکل) آغاز گردید. محصول PCR به روی ژل آگارز ۱درصد الکتروفوز گردید و پس از رنگ‌آمیزی با محلول اتیدیوم بروماید، نتایج با استفاده از اشعه UV بررسی شد. ضمناً کنترل منفی نیز در هر آزمایش منظور گردید.

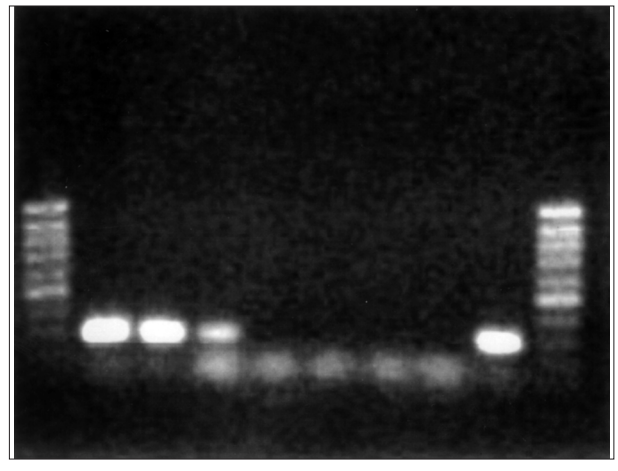
خالص‌سازی، کلونینگ و تعیین توالی نوکلئوتیدی محصول PCR: DNA تکثیر شده، از پرایمرها، dNTPها و نمک‌های موجود در واکنش PCR با استفاده از کیت High Pure PCR Product Purification Kit (Roche، آلمان) جدا گردید. سپس محصول PCR ابتدا در وکتور pTZ57R/T کلون شد و سپس ردیف نوکلئوتیدی آن تعیین گردید و نهایتاً سکانس نوکلوتیدی محصول PCR با سکانس‌های موجود در بانک ژن مقایسه گردید.

تعیین حساسیت آزمایش PCR: برای تعیین حساسیت آزمایش رقت‌های ۱/۱۰ از تیتر ویروس اولیه (10^6) تهیه گردید. (از 10^6 تا 10^1). سپس بر روی هر رقت استخراج RNA و آزمایش RT-PCR صورت پذیرفت.

آزمایش Nested-PCR: آزمایش Nested-PCR با استفاده از پرایمرهای Nested که از روی توالی نوکلئوتیدی محصول PCR طراحی و انتخاب شده بودند و با همان شرائط PCR که در بالا ذکر شد انجام گردید. سکانس پرایمرهای Nested-PCR به صورت '3-T(A/G) GTT CGA C Pepsti-F2 5'-AGT CGT CAG و '3-TGC AGC ACC CTA TCA

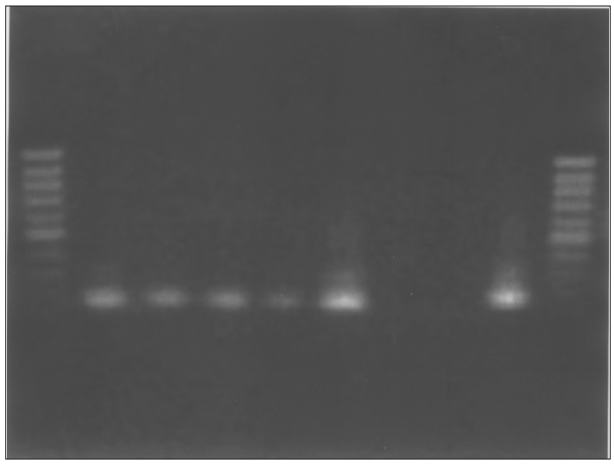
www.SID.ir

Archive of SID



تصویر۱- تعیین حساسیت آزمایش RT-PCR در تشخیص Pestivirus در کشت سلول (تولید قطعه ۲۹۴DNA جفت باز).

ستون۱ و۱۰: مارکر DNA(ladder 100)- ستون ۲: نمونه کشت سلول حاوی ویروس BVD غلظت $TCID_{50}$ 10^{6}- ستون ۳: نمونه کشت سلول حاوی ویروس BVD غلظت $TCID_{50}$ 10^{5}- ستون ۴: نمونه کشت سلول حاوی ویروس BVD غلظت $TCID_{50}$ 10^{4}- ستون ۵: نمونه کشت سلول حاوی ویروس BVD غلظت $TCID_{50}$ 10^{3}- ستون ۶: نمونه کشت سلول حاوی ویروس BVD غلظت $TCID_{50}$ 10^{2}- ستون ۷: نمونه کشت سلول حاوی ویروس BVD غلظت $TCID_{50}$ 10^{1}- ستون ۸: نمونه کشت سلول بدون ویروس (کنترل منفی) - ستون ۹: نمونه کشت سلول حاوی ویروس BVDV (کنترل مثبت).



تصویر ۲- تعیین حساسیت آزمایش Nested-PCR در تشخیص Pestivirus در کشت سلول (تولید قطعه ۱۵۵DNA جفت باز).

ستون۱ و۱۰: مارکر DNA(ladder 100)- ستون ۲: نمونه کشت سلول حاوی ویروس BVD غلظت $TCID_{50}$ 10^{6}- ستون ۳: نمونه کشت سلول حاوی ویروس BVD غلظت $TCID_{50}$ 10^{5}- ستون ۴: نمونه کشت سلول حاوی ویروس BVD غلظت $TCID_{50}$ 10^{4}- ستون ۵: نمونه کشت سلول حاوی ویروس BVD غلظت $TCID_{50}$ 10^{3}- ستون ۶: نمونه کشت سلول حاوی ویروس BVD غلظت $TCID_{50}$ 10^{2}- ستون ۷: نمونه کشت سلول حاوی ویروس BVD غلظت $TCID_{50}$ 10^{1}- ستون ۸: نمونه کشت سلول بدون ویروس (کنترل منفی) - ستون ۹: نمونه کشت سلول حاوی ویروس BVDV (کنترل مثبت).

Pepsti-R2 5'-CTC می‌باشند.

تعیین حساسیت آزمایش Nested-PCR: برای تعیین حساسیت آزمایش Nested-PCR رقت‌های ۱/۱۰ از تیترویروس اولیه (10^{6}) تهیه گردید. (از 10^{6} تا 10^{1}). سپس بر روی هر رقت استخراج RNA و آزمایش RT-PCR صورت پذیرفت و از محصول هر واکنش PCR به طور جداگانه آزمایش PCR-Nested به عمل آمد نهایتاً تعیین حساسیت روش Nested-PCR با استفاده از همین روش نیز مشخص گردید.

آزمایش کشت سلولهای مختلف با روش PCR و Nested-PCR: به منظور استفادهٔ عملی از آزمایش PCR در تشخیص آلودگی‌های کشت سلولی به pestivirusها، از ۷ نمونه کشت سلول موجود در آزمایشگاه که توسط گروه‌های مختلف پژوهشی مورد استفاده قرار می‌گرفت آزمایش به عمل آمد. اسامی کشت سلول‌های مورد استفاده در جدول ۱ آورده شده است. پس از استخراج RNA، آزمایش RT-PCR بر روی نمونه‌ها انجام گردید. سپس آزمایش Nested-PCR بر روی نمونه‌های PCR انجام شد و نتایج ثبت گردید.

آزمایش کشت سلول‌های مختلف با روش ELISA: به منظور مقایسهٔ روش PCR با روش ELISA، از کیت تجارتی (X Diagnostics, Belgium-BVDV Antigen ELISA kit, Bio) به این منظور استفاده گردید.

این روش قادر به تشخیص ویروس‌های CP (BVDV) و NCP (BVDV) می‌باشد. روش کار بر اساس دستورالعمل کیت انجام گردید. به طور خلاصه، پلیت‌های الیزا که توسط آنتی‌بادی اختصاصی علیه پروتئین‌های ویروسی پوشیده شده بودند مورد استفاده قرار گرفتند. نمونه‌های مورد استفاده که در آزمایش ELISA به‌صورت duplicate استفاده شد در جدول ۱ آورده شده است. آماده‌سازی نمونه براسا س دستورالعمل شرکت سازنده توسط بافر لیز کننده انجام پذیرفت و به همراه نمونه‌های کنترل مثبت و منفی کیت، به داخل گوده‌های پلیت افزوده شد. پس از یک ساعت انکوباسیون و ۳ مرحله شستشو با محلول شستشوی کیت، مقدار ۱۰۰ ماکرولیتر از آنتی‌بادی کونژوگه (biotynylated) اضافه و مجدداً یک ساعت انکوبه و متعاقب آن شستشو انجام پذیرفت. سپس ۱۰۰ ماکرولیتر محلول avidin-peroxidase conjugate به مدت یک ساعت اضافه و مجدداً شستشو انجام گردید. در آخرین مرحله نیز ۱۰۰ ماکرولیتر از محلول سوبسترا اضافه و پس از ۱۰ دقیقه واکنش توسط stopping solution متوقف گردید و نتایج در طول موج ۴۵۰ نانومتر ثبت گردید.

نتایج

کشت سلول و تکثیر ویروس: در کشت سلول‌های BT آلوده به ویروس BVD در مقایسه با کشت سلول عاری از ویروس (کنترل منفی) علائم CPE مشاهده گردید. در سلول‌های Vero پس از ۹۰-۶۰ ساعت هیچ علائمی از CPE در گروه منفی (سلول غیر آلوده) و کنترل مثبت (سلول‌های آلوده به سویه NCP) مشاهده نگردید. تشخیص وجود و یا عدم وجود ویروس NCP در سلول‌های آلوده و در گروه کنترل با استفاده از روش IFT صورت پذیرفت.

تعیین تیتر ویروس: ویروس‌های CP در پلیت ۹۶ خانه‌ای با روش Virus titration تیتر ویروس بر حسب $TCID_{50}$ به روش Reed & Muench محاسبه گردید. تیتر ویروس CP به میزان 10^{6} $TCID_{50}$ بدست آمد.

آزمایش RT-PCR: آزمایش PCR و Nested-PCR بر روی نمونه کشت سلول حاوی ویروس (CP) BVD انجام پذیرفت. در آزمایش PCR با استفاده

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- مقایسه نتایج میزان حساسیت ۳ روش ELISA، PCR و Nested-PCR در تشخیص ویروس BVDV در کشت‌های سلولی.

نمونه کشت سلول	ELISA	RT-PCR	Nested-PCR
کشت سلول حاوی تیتر $10^{6}TCID_{50}$ از ویروس BVDV	+	+	+
کشت سلول حاوی تیتر $10^{5}TCID_{50}$ از ویروس BVDV	+	+	+
کشت سلول حاوی تیتر $10^{4}TCID_{50}$ از ویروس BVDV	-	+	+
کشت سلول حاوی تیتر $10^{3}TCID_{50}$ از ویروس BVDV	-	-	+
کشت سلول حاوی تیتر $10^{2}TCID_{50}$ از ویروس BVDV	-	-	+
کشت سلول حاوی تیتر $10^{1}TCID_{50}$ از ویروس BVDV	-	-	-
HL60	-	-	-
Gelia	-	-	-
Fibroblast	-	-	+
MDBK	-	-	-
BHK-21-1	-	+	+
BHK-21-2	-	+	+
BHK-21-3	-	-	+
کنترل منفی	-	-	-
کنترل مثبت	+	+	+

از پرایمرهای Pesti-F1 و Pesti-R1 یک قطعه DNA به‌اندازه ۲۹۴ جفت باز تولید گردید. در آزمایش Nested-PCR با استفاده از پرایمرهای (Pesti-F2 Nested و Pesti-R2) یک باند DNA به‌اندازه ۱۵۵ جفت بازی تولید شد.

ردیف نوکلوتیدی محصول PCR: پس از تعیین ردیف نوکلوتیدی محصول PCR، نتایج با بانک ژن مقایسه (Blast) گردید. توالی ویروس مورد آزمایش با سکانس ویروس BVDV سویه NADL ۱۰۰درصد مشابهت نشان داد. این توالی در بانک ژن ثبت گردید و با کد AY954693 قابل دسترسی است.

تعیین حساسیت آزمایش RT-PCR در تشخیص ویروس: با استفاده از رقت‌های ۱/۱۰ از ویروس اولیه در آزمایش RT-PCR، حساسیت آزمایش تا رقت 10^{4} ویروس در نمونه تعیین گردید (تصویر۱). در آزمایش Nested-PCR که بر روی محصولات PCR صورت پذیرفت حساسیت تست تا رقت 10^{2} ویروس در ml تعیین گردید (تصویر۲). نتایج نشان می‌دهد که حساسیت آزمایش Nested-PCR در تشخیص ویروس ۱۰۰ برابر بیشتر از حساسیت روش PCR می‌باشد.

آزمایش PCR و Nested-PCR بر روی کشت سلول‌های مختلف: در آزمایش PCR از ۷ نمونه مختلف، آزمایش به عمل آمد. ۳ نمونه از کشت 21-BHK (از منابع مختلف) و همچنین کشت‌های سلولی HL-60، Gelia، Fibroblast، MDBK مورد آزمایش قرار گرفتند. نمونه‌های HL-60، Gelia، Fibroblast و یک نمونه از (BHK-21-3) BHK-21 هیچ‌گونه باندی تولید ننمودند ولی در آزمایش کشت‌های سلولی ۲ نمونه باقیمانده از (BHK-21-1, BHK-21-2) BHK-21 باندی به‌اندازه موردنظر (۲۹۴ جفت باز) مشاهده گردید. در آزمایش Nested-PCR از نمونه‌های فوق، چهار نمونه از کشت‌های سلولی، Fibroblast، BHK-21-1 و BHK-21-3 قطعه DNA با اندازه موردنظر (۱۵۵ جفت باز) تولید نمودند. یک باند ضعیف از این قطعه نیز در نمونه کشت سلول Gelia مشاهده گردید. بقیه نمونه‌ها هیچ‌گونه باندی تولید نکردند. نتایج در جدول ۱ خلاصه شده است.

آزمایش کشت سلول‌های مختلف با ELISA: در این آزمایش از نمونه‌های مختلف کشت سلولی، رقت‌های مختلف ویروس BVDV و کنترل‌های مثبت و منفی کیت، آزمایش به عمل آمد. OD بدست آمده برای هر نمونه بر اساس فرمول کیت آنالیز گردید و نتایج به صورت مثبت و منفی ثبت گردید (جدول ۱).

بحث

حضور ویروس BVDV در کشت‌های سلولی و FBS از سال‌ها قبل به خوبی شناخته شده است. همچنین کلیه محققین کشت سلولی کرارا آلودگی‌هایی را در تحقیقات خود مشاهده کرده‌اند. گزارش‌های زیادی از تشخیص این آلودگی‌ها در کشت‌های سلولی وجود دارد. روش‌های تشخیصی در مورد ویروس BVDV عمدتا با روش ایمنوپراکسیداز بوده است که امروزه با روش RT-PCR در حال جایگزینی است. وجود Pestivirus هایی که در کشت سلول هیچ‌گونه ضایعه قابل مشاهده‌ای ایجاد نمی‌کنند بر اهمیت تشخیص آنها با کمک روش‌های جدید مولکولی می‌افزاید. همچنین در کشت‌های سلول‌های هیبریدوما که برای تولید آنتی‌بادی مونوکلونال به کار می‌رود، آلودگی Pestivirus می‌تواند باعث از بین رفتن کلیه نتایج و بروز ضرر و زیان فراوانی گردد. ضمناً کشت‌های سلولی انسانی آلوده به ویروس خطرات احتمالی برای سلامت و بهداشت انسان در پی خواهد داشت به طوری که گزارش‌هایی از عفونت‌های انسانی با منشاء BVDV منتشر شده است. واکسن‌های زنده ویروسی که در انسان نیز مصرف می‌شود می‌تواند به این ویروس آلوده گردد. لذا کنترل کشت‌های سلولی با استفاده از یک روش تشخیصی مطمئن همانند RT-PCR به منظور تشخیص آلودگی‌های Pestivirus به طور یک برنامه زمان‌بندی شده و یا به طور متناوب ضروری به نظر می‌رسد. با توجه به حساسیت آزمایش PCR-Nested و تعیین این حساسیت از این روش برای شناسایی کشت سلول‌های آلوده می‌توان به خوبی استفاده کرد. در این مطالعه استخراج RNA ویروس با استفاده از محلول استخراج RNAfast (شرکت ژن فناوران، تهران) صورت پذیرفت. در آزمایش PCR یک قطعه به طول ۲۹۴ جفت باز تکثیر گردید. سکانس محصول PCR نشان داد که DNA تکثیر شده متعلق به ژنوم ویروس BVDV می‌باشد. از آنجاکه بیشتر آلودگی‌های کشت سلول با ویروس NCP صورت می‌گیرد، این ویروس نیز که در کشت سلول ایجاد CPE نمی‌کند مورد آزمایش قرار گرفت و در آزمایش PCR قطعه ۲۹۴ جفت بازی تکثیر گردید. برای آن که میزان حساسیت آزمایش در تشخیص این ویروس‌ها در کشت سلول مشخص شود، رقت‌های ۱/۱۰ متوالی از ویروس تیتر شده تهیه گردید و از هر کدام استخراج RNA و آزمایش PCR به عمل آمد، حساسیت آزمایش PCR در تشخیص ویروس، $10^{4}TCID_{50}$ بدست آمد. برای افزایش حساسیت آزمایش و تشخیص مقادیر کمتر از $10^{4}TCID_{50}$، آزمایش Nested-PCR

www.SID.ir

Archive of SID

انجام شد و قطعه ۱۵۵ جفت بازی تکثیر گردید. در آزمایش تعیین حساسیت آزمایش Nested-PCR مشخص گردید که حساسیت آزمایش یکصد برابر افزایش یافت و آخرین رقتی از ویروس که قابل تشخیص بود 10^{2} $TCID_{50}$ بدست آمد. در آزمایش‌های PCR و Nested-PCR کنترل‌های مثبت و منفی منظور شده بود. در آزمایش Nested-PCR، ۲ کنترل منفی که یکی به منظور مشخص نمودن عدم آلودگی در حین کار و دیگری برای نشان دادن عدم آلودگی از آزمایش PCR است منظور گردید. در حال حاضر تنها روش موجود برای آزمایش کشت‌های سلولی برای مشخص کردن آلودگی با pestivirusها استفاده از کیت ELISA تجارتی می‌باشد. برای مقایسه روش PCR، Nested-PCR و ELISA از کیت (Bio-X Diagnostics, Belgium BVDV Antigen ELISA kit,) استفاده گردید و ۷ نمونه کشت سلولی با هر سه روش آزمایش گردید. کشت‌های سلولی مورد آزمایش از نمونه‌های در دسترس و موجود استفاده گردید. ابتدا این نمونه‌ها در آزمایش ELISA تست گردید و OD بدست آمده از هر نمونه در فرمولی که توسط کیت ارائه گردیده بود، محاسبه گردید. کنترل مثبت و منفی کیت هر دو OD مناسب را نشان دادند لذا صحت آزمایش مورد تائید می‌باشد. کلیه نمونه‌های کشت سلولی منفی بودند و فقط تیترهای 10^{5} و 10^{6} $TCID_{50}$ از ویروس BVDV مثبت بود. در آزمایش PCR از این نمونه‌ها، ۲ نمونه از کشت‌های سلولی مثبت (BHK-21-2, BHK-21-1) و ۵ نمونه منفی (HL60، Gelia، Fibroblast، MDBK و BHK-21-3) بودند. در آزمایش Nested-PCR، ۴ نمونه مثبت (Fibroblast، BHK-21-1، BHK-21-2 و BHK-21-3)، ۲ نمونه منفی (HL60و MDBK) و یک مورد مشکوک (Gelia) بود. نمونه مشکوک در آزمایش مجدد منفی بود. همانگونه که ذکر گردید دو نمونه از کشت‌های سلولی (Fibroblast و BHK-21-3) در آزمایش PCR منفی و فقط در آزمایش Nested-PCR مثبت شدند که این امر نشاندهنده میزان بسیار کم ویروس BVDV در این دو نمونه می‌باشد. با توجه به صحت نتایج کنترل مثبت و منفی، احتمال آلوده شدن این نمونه‌ها در حین آزمایش منتفی است. از طرفی چون از کلیه نمونه‌ها به طور همزمان استخراج RNA، PCR و Nested-PCR به عمل آمده است، امکان تخریب مقداری از RNA تنها در دو نمونه مذکور در حین آزمایش بعید به نظر می‌رسد. با توجه به تفاوت حساسیت آزمایش PCR و Nested-PCR، تنها نمونه‌هایی در هر دو آزمایش مثبت خواهند شد که مقدار ویروس در نمونه، در آستانه تشخیص آزمایش PCR قرار داشته باشد. چنانچه میزان ویروس به حدی کم باشد که در PCR تشخیص داده نشود، با توجه به اینکه حساسیت آزمایش PCR-Nested یکصد برابر بیشتر از PCR است، انتظار می‌رود فقط در آزمایش Nested-PCR نتایج مثبت مشاهده گردد. همانگونه که ملاحظه می‌گردد، حساسیت آزمایش Nested-PCR در تشخیص آلودگی کشت سلول به BVDV از سایر روش‌ها بیشتر است. مقایسه روش‌های مختلف تشخیص در مورد pestivirusها نشان داده است که روش PCR حساس‌تر از روش‌های ایمنوفلورسانس، ایمنوپراکسیداز و جداسازی ویروس است (Horner *et al* 1995). در سال‌های اخیر گزارش‌های زیادی از به کارگیری روش‌های جدید مولکولی برای تشخیص ویروس BVD منتشر شده است. استفاده از روش real-time PCR از جمله جدیدترین این روش‌ها است که توسط محققین مختلفی به کار گرفته شده است (Letellier and Kerkhofs, 2003 *et al*., 2006; Willoughby *et al*., 2006; Baxi *et al*., 2006; Hoffmann). حساسیت آزمایش real-time PCR بسته به شرایط آزمایش، نوع پرایمرها و نشانگرهای به کار رفته در آزمایش، متفاوت اما عمدتاً بیشتر از آزمایش RT-PCR معمولی است. Hoffmann و همکاران در سال ۲۰۰۶ حساسیت این روش در تشخیص pestivirusها را ۱۰۰-۱۰ کپی از RNA ویروس در هر نمونه گزارش نمودند. در صورتی‌که Baxi و همکاران در سال ۲۰۰۶ حساسیت آن را بر مبنای تیتر ویروس $TCID_{50}$ ۱۰۰-۱۰ گزارش کرده‌اند. در مطالعه حاضر، حساسیت آزمایش Nested-PCR در تشخیص آلودگی‌های کشت سلولی به BVDV، $TCID_{50}$ ۱۰۰ بوده است که تقریبا کمی کمتر از روش real-time PCR است. با توجه به هزینه زیاد دستگاه و مواد مورد نیاز در آزمایش real-time PCR، به نظر می‌رسد در حال حاضر استفاده از روش Nested-PCR در شرایط ایران بهترین گزینه باشد و لذا با توجه به امکانات موجود در آزمایشگاه‌های تشخیصی، تحقیقاتی و همچنین موسسات واکسن‌سازی کشور، آزمایش Nested-PCR از کارایی بالایی برخوردار خواهد بود. لازم به ذکر است که منشاء این آلودگی‌ها معمولاً از سرم جنین گاو یا FCS است که به کشت سلول راه می‌یابد. استفاده از این روش PCR می‌تواند آلودگی‌های کشت سلول را به pestivirusها مشخص نماید. اما بهترین راه جلوگیری از آلودگی، آزمایش سرم‌های جنین گاو است که به عنوان فاکتور رشد در کشت سلول به کار می‌رود. بنابراین توصیه می‌شود که FCSهای مورد نیاز قبل از استفاده با این روش آزمایش گردند تا از بروز آلودگی جلوگیری شود. ضمناً کشت‌های سلولی موجود را می‌توان متناوباً با این روش آزمایش کرد تا از آلوده بودن یا نبودن آنها مطمئن گردید.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری که هزینه تحقیقاتی این مطالعه (با کد ۱۶۰) را تامین کرده است تشکر و قدردانی می‌گردد. ضمنا از همکاری بخش کنترل کیفی مواد بیولوژیک موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی و به ویژه از جناب آقای کمالی به خاطر همکاری صمیمانه ایشان تقدیر و تشکر می‌شود.

www.SID.ir

Archive of SID

References

1. Audet, S.A., Crim, R.L., Beeler, J. (2000) Evaluation of vaccines, interferons and cell substrates for pestivirus contamination. Biol. 28:41-46.
2. Baxi, M., McRae, D., Baxi, S., Greiser-Wilke, I., Vilcek, S., Amoako, K., Deregt, D. (2006) A one-step multiplex real-time RT-PCR for detection and typing of bovine viral diarrhea viruses. Vet. Microbiol. 116:37-44.
3. Cornish, T.E., van Olphen, A.L., Cavender, J.L., Edwards, J.M., Jaeger, P.T., Vieyra, L.L., Woodard, L.F., Miller, D.R., O'Toole, D. (2005) Comparison of ear notch immunohistochemistry, ear notch antigen-capture ELISA, and buffy coat virus isolation for detection of calves persistently infected with bovine viral diarrhea virus. J. Vet .Diagn Invest. 17:110-117.
4. Given, M.D., Riddell, K.P., Galik, P.K., Stringfellow, D.A., Brock, K.V., Loskutoff, N.M. (2002) Diagnostic dilemma encountered when detecting bovine viral diarrhea virus in IVF embryo production. Theriogenol. 58:1399-1407.
5. Harasawa, R. (1994) Adventitious pestivirus RNA in live virus vaccines against bovine and swine diseases. Vaccine. 13: 100-103.
6. Harasawa, R., Tomiyama, T.(1994) Evidence of pestivirus RNA in human virus vaccines. J. Clin. Microbiol. 32: 1604-1605.
7. Hoffmann, B., Depner, K., Schirrmeier, H., Beer, M. (2006) A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses. J. Virol. Methods. 136:200-209.
8. Horner, G. W., Tham, K. M., Orr, D., Ralston, J., Rowe, S., Houghton, T.(1995) Comparison of an antigen capture enzyme-linked assay with reverse transcription-polymerase chain reaction and cell culture immunoperoxidase tests for the diagnosis of ruminant pestivirus infections. Vet. Microbiol. 43: 75-84.
9. Hyndman, L., Vilcek, S., Conner, J., Nettleton, P.F. (1998) A novel nested reverse transcription PCR detects bovine viral diarrhea virus in fluids from aborted bovine fetuses. 71: 69-76.
10. Letellier, C., Kerkhofs, P. (2003) Real-time PCR for simultaneous detection and genotyping of bovine viral diarrhea virus. J. Virol. Methods. 114:21-27.
11. Lewis, T. L., Ridpath, J. F., Bolin, S. R., Berry, E. S. (1991) Detection of BVD viruses using synthetic oligonucleotides. Arch. Virol. 117: 269-278.
12. Mahlum, C.E., Haugerud, S., Shivers, J.L., Rossow, K.D., Goyal, S.M., Collins, J.E., Faaberg, K.S. (2002) Detection of bovine viral diarrhea virus by TaqMan reverse transcription polymerase chain reaction. J. Vet. Diagn Invest. 14: 120-125.
13. Makoschey, B., van Gelder, P.T., Keijsers, V., Goovaerts, D.(2003) Bovine viral diarrhoea virus antigen in foetal calf serum batches and consequences of such contamination for vaccine production. Biol. 31:203-208.
14. Potts, B.J., Sever, J.L., Tzan, N.R., Huddleston, D., Elder, G.A. (1987) Possible role of pestiviruses in microcephaly. Lancet. 25: 972-973.
15. Reed, L.J., Muench, H. (1938) A simple method of estimating 50% endpoints. Am. J. Hyg. 27: 493-497.
16. Reid, H.W. (1995) Ruminant pestivirus infections-advances in research bring prospects for their control. Br. Vet. J. 151: 597-598.
17. Studer, E., Bertoni, G., Candrian, U. (2002) Detection and characterization of pestivirus contaminations in human live viral vaccines.Biol.30:289-296.
18. van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L. (2000) Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego-San-Francisco-New York-Boston-London-Sydney-Tokyo.
19. Yolken, R., Dubovi, E., Leister, F., Reid, R., Almeido-Hill, J., Santosham, M. (1989) Infantile gastroenteritis associated with excretion of pestivirus antigens. Lancet. 11: 517-520.

www.SID.ir

Archive of SID

J.Vet.Res. 63,1:11-16,2008

DETECTION OF PESTIVIRUS CONTAMINATION IN CELL CULTURES BY NESTED-PCR

Ghorashi, S.A.[1]*, Daliri Joupari, M.[1], Morshedi, D.[1], Hajian, T.[1], Lotfi, M.[2]

[1]*Department of Microbiology, National Institute for Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran-Iran.*

[2]*Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj-Iran.*

(Received 20 April 2006 , Accepted 21 November 2006)

Abstract:

In this study a nested-PCR assay was optimized for detection of two BVDV biotype of NADL strain. A part of 5' non-coding region of virus, 249 bp in size, was amplified in RT-PCR. PCR product was cloned in a pTZ57R/T vector and sequencing results confirmed the specificity of the test. Internal primers were designed and a 155 bp DNA fragment was amplified in nested-PCR. The sensitivity of RT-PCR and nested-PCR for detection of virus in cell culture were found to be 10^4 $TCID_{50}$ and 10^2 $TCID_{50}$, respectively. Seven cell cultures were tested for BVDV contamination using ELISA, RT-PCR and nested-PCR. Results indicate that sensitivity of molecular tests for detection of virus in cell culture samples is higher than ELISA.

Key words: Pestivirus, cell culture contamination, PCR.

***Corresponding author's email: alig@nrcgeb.ac.ir, Tel: 021-44580386, Fax: 021-44580399**

www.SID.ir