چهارمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران
کرمان مردادماه ۱۳۸٤
International Center For Science & high Technology and Environmental Sciences
The 4th National Biotechnology congress
Islamic Republic of Iran
Kerman august 2005

کاربرد RT-PCR در تشخيص عفونت پايدار ويروس تب برفكي در گاو

دكتر علي اصغر بهاري [1*] ، دكتر سيد علي قرشي [2] ، دكترتقي تقي پور بازرگاني [3] ، دكتر فرهيد همت زاده [4] ، دكتر سعيد بكائي [5] ، ريحانه صالحي تبار

۱) آموزشكده دامپزشكي دانشگاه بوعلي سينا- همدان، ۰۸۱۱-٤۲۲۷۳۵۰، aliasghar.bahari@basu.ac.ir ، ۲)پژوهشگاه ملي تحقيقات مهندسي ژنتيك و فنآوري زيستي- تهران، ۰۲۱-٤۵۸۰۳۸٦، alig@nrcgeb.ac.ir ، ۳)دانشكده دامپزشكي دانشگاه تهران، ۰۲۱-٦۹۲۹۵۳۲، taghipour@vetmed.ut.ac.ir ، ٤)دانشكده دامپزشكي دانشگاه تهران، ۰۲۱-٦۹۲۹۵۳۲، fhemmat@chamran.ut.ac.ir ، ۵)دانشكده دامپزشكي دانشگاه تهران، ۰۲۱-٦۹۲۹۵۳۲، bokaies@vetmed.ut.ac.ir .

چكيده :

ويروس تب برفكي، عضوي از جنس آفتوويروس در خانواده پيكورناويريده، عامل سببي مهمترين بيماري دام هاي زوج سم از نظر اقتصادي در گستره جهاني مي باشد. يكي از موضوع هاي مهم در كنترل بيماري تب برفكي، تشخيص عفونت پايدار اين بيماري در نشخواركنندگان است. اين وضعيت در دوره نقاهت و به همان ترتيب در نشخواركنندگان واكسينه شده بدنبال مواجهه با ويروس عفونت زا ايجاد مي شود. اگرچه ميزان ويروس عفونت زائي كه مي توان از چنين حيواناتي جدا نمود اندك است، اين ويروس در بدن گاو تا سال ها حضور دارد. لذا نقش گاوهاي آلوده به عفونت پايدار را در همه گيري شناسي بيماري تب برفكي نمي توان ناديده انگاشت. در اين بررسي براي اولين بار در ايران از روش RT-PCR براي تشخيص ويروس تب برفكي در گاوهاي به ظاهر سالم كشتارشده در كشتارگاه زياران استفاده شد. ۳۰۱ نمونه لوزه بطور تصادفي برداشت گرديد و پس از استخراج RNA , آزمايش RT-PCR برروی نمونه ها انجام شد. تعداد ۹۹ نمونه در آزمايش RT-PCR مثبت بودند. ازتعداد ۲۹ نمونه كه برروی سلول هاي MDBK كشت داده شدند, فقط دو نمونه CPE ايجاد كردند. اين نتايج با توجه با مقدار اندك ويروس در نمونه ها و يا فعاليت خنثي كنندگي زياد بافت لوزه در دوره عفونت پايدار قابل توجيه است.

واژه هاي كليدي: RT-PCR ، ويروس تب برفكي، عفونت پايدار.

Application of RT-PCR in diagnosis of foot-and-mouth disease persistent infection in cattle

Bahari, A.A.[1*], Ghorashi, S.A.[2], Taghipour-Bazargani, T.[3], Hemmatzadeh, F.[4], Bokaei, S.[5], Salehi Tabar, R.[2]

1. Veterinary school, Bu-Ali Sina University, Hamadan - Iran, +98-811-4227350, aliasghar.bahari@basu.ac.ir , 2. National research Center of Genetic Engineering and Biotecnology, Tehran-Iran, +98-21-4580386, alig@nrcgeb.ac.ir , 3. Faculity of Veterinary medicine. University of Tehran, Tehran – Iran, +98-21-6929532, taghipur@vetmed.ut.ac.ir , 4. Faculity of Veterinary medicine. University of Tehran, Tehran – Iran, +98-21-6929532, fhemmat@chamran.ut.ac.ir , 5. Faculity of Veterinary medicine. University of Tehran, Tehran – Iran, +98-21-6929532, bokaies@vetmed.ut.ac.ir .

Abstract :

Foot-and-mouth disease (FMD) virus, a member of the *Aphthovirus* genus in *Picornaviridae* family, is the causal agent of economically most important cloven-hoofed animal's viral disease worldwide. Persistent infection is an important feature of FMD control in ruminants. This may occur in FMD convalescent period as well as in vaccinated ruminants following exposure to infectious virus. Although, the amount of infectious virus that can be recovered from animals is low, the virus can be present in cattle for years. The role of persistently infected animals cannot be excluded in FMD epizootiology. In this study, RT-PCR was used for detection of FMD viral genomic sequences in clinically normal cattle slaughtered at Zyaran abattoir, Qazvin province-Iran. 301 tonsil tissue samples were collected. Total RNA was extracted from each sample and RT-PCR was conducted. 99 samples were positive by RT-PCR. Only two out of 29 samples showed CPE in MDBK cell culture. Low amounts of virus and/or high neutralizing activity of persistently FMDV infected tonsils can explain the cell culture results.

Key words: RT-PCR, foot- and- mouth disease virus, persistent infection.

مقدمه :

ويروس تب برفكي عضوي از جنس *آفتوويروس* در خانواده *پيكورناويريده* است و عامل سببي مهمترين بيماري ويروسي حيوانات زوج سم از نظر اقتصادي مي باشد. اگرچه ميزان مرگ و مير دام هاي بالغ در تب برفكي معمولا" پائين مي باشد ولي اين بيماري موجب كاهش توليدات دامي مي گردد و كشورهاي درگير اين بيماري نمي توانند در تجارت بين المللي دام و فراورده هاي دامي وارد شوند (۳). عفونت پايدار غيرآشكار يكي از پيامدهاي متداول عفونت درمانگاهي و تحت

RNA ويروس تب برفكي در نمونه هاي جمع آوري شده طي عفونت پايدار به كار گرفته شده است (٤، ٧، ٨). Prato Murphy و همكاران (١٩٩٤) نشان دادند كه RT-PCR بسيار حساس تر از روش استاندارد جداسازي ويروس است و مي توان از آن براي تشخيص سريع ويروس تب برفكي در بافت هاي گاوهاي آلوده به عفونت پايدار با اين ويروس استفاده نمود (٧). در اين مطالعه با هدف تعيين فراواني حامل هاي ويروس تب برفكي براي اولين بار در ايران از روش RT-PCR براي شناسائي توالي ژنومي ويروس تب برفكي در گاوهاي به ظاهر سالم كشتارشده در كشتارگاه زيارن استفاده شد.

مواد و روش كار :

براي نمونه گيري با برگرداندن سر دام ذبح شده و ايجاد شكاف طولي در سطح داخلي استخوان فك پائين، لوزه كامي به سهولت در دسترس قرار مي گرفت. پس از نمونه گيري تلاش مي شد نمونه ها در كوتاه ترين زمان ممكن به پژوهشگاه ملي تحقيقات مهندسي ژنتيك و فنآوري زيستي و آزمايشگاه ويروس شناسي دانشكده دامپزشكي دانشگاه تهران رسانده شوند. نمونه ها تا زمان آزمايش در انجماد عميق نگهداري شدند.

استخراج RNA:

استخراج RNA بر اساس روش گوانيدينيوم- تيوسيانات- فنل- كلروفرم با استفاده از محلول استخراج RNAfast (ساخته شده در پژوهشگاه ملي تحقيقات مهندسي ژنتيك و فنآوري زيستي) انجام شد. RNA محلول بلافاصله در واكنش رونويسي وارونه بكار مي رفت يا تا زمان آزمايش در دماي ٧٠- درجه سانتيگراد نگهداري مي شد. واكنش RT-PCR به روشي كه پيشتر توسط قرشي و همكاران (١٣٨٠) گزارش گرديده است انجام شد. اختصاصي بودن اين واكنش توسط تعيين توالي نوكلئوتيدي و مقايسه آن با ژنوم ويروس تب برفكي تائيد شده است (١). با استفاده از الكتروفورز در ژل آگارز ١% وجود يا عدم وجود محصول PCR مورد ارزيابي قرار مي گرفت. پس از الكتروفورز، ژل به مدت ١٠ دقيقه در محفظهٔ حاوي اتيديوم بروماید (٤µg/ml) رنگ آميزي مي شد و در پايان با دستگاه اشعه UV بررسي مي شد.

كشت ويروس در سلول:

براي كشت سلولي نمونه ها ٢-١ گرم از نمونه پس از شستشو در PBS با اضافه كردن مقداري محيط كشت ويروس RPMI 16/40 به صورت هموژن در مي آمد. سپس به مدت ١٥ دقيقه در ١٥٠٠ تا ٢٠٠٠ دور در دقيقه سانتريفوژ مي شد. در ادامه مايع روئي برداشت و از فيلتر ٠/٢٢ ميكرون (MILLIPORE 0.22µm) عبور داده مي شد. مقدار ٢٠٠ ميكروليتر از نمونه فيلتر شده به ازاء هر پليت ٢٥^{cm2} حاوي كشت سلول MDBK تزريق مي گرديد و يك ساعت در ٣٧ درجه سانتيگراد گرمخانه گذاري مي شد. پس از گذشت اين زمان مايع روئي خارج و حدود ٥ ميلي ليتر از محيط كشت ياد شده حاوي ٣ درصد سرم جنين گاو (ساخت شركت Gibco) به پليت اضافه و دوباره گرمخانه گذاري مي شد. پليت ها روزانه كنترل مي شد و در صورت وجود CPE نمونه كنار گذاشته مي شد. در غير اين صورت كشت ويروس تا پاساژ پنجم ادامه مي يافت. نمونه هائي كه CPE نشان دادند با استفاده از آنتي سرم گاوي ضدويروس تب برفكي تحت آزمون SN قرار گرفتند.

روش آماري:

تجزيه تحليل آماري داده هاي RT-PCR به وسيله نرم افزار SPSS انجام شد. براي مقايسه نتايج كشت ويروس با RT-PCR ضرايب توافق آن محاسبه و آزمون McNemar صورت گرفت.

نتايج و بحث :

از تعداد ٣٠١ نمونه لوزه مربوط به گاوهاي سالم كه به روش RT-PCR آزمايش شد تعداد ٩٩ نمونه از نظر حضور ژنوم ويروس تب برفكي مثبت بود. شكل شماره ١ ژل آگارز مربوط به الكتروفورز تعدادي از نمونه هاي مثبت (باند ١٣١ جفت بازي) را نشان مي دهد. شناسايي نشخواركنندگان اهلي حامل ويروس تب برفكي در مناطقي كه تب برفكي بومي است يك يافته به نسبت متداول مي باشد، اگرچه يافته هاي اندكي درباره ميزان وقوع وضعيت حامل در شرايط طبيعي وجود دارد (٥).
در اين بررسي روي كشت سلولي از ٢٦ نمونه كه نتيجه RT-PCR آن ها مثبت بود، تنها از دو نمونه ويروس جدا گرديد كه در آزمايش SN تائيد گرديد نمونه هاي مثبت ويروس تب برفكي هستند. نتيجه كشت ٣ نمونه اي كه در RT-PCR منفي بودند نيز منفي بود. ضريب توافق نتايج RT-PCR و كشت ويروس، ١٧/٢ % مي باشد. ضريب كاپا (Kappa) محاسبه شده بين ٠ تا ٠/٢ است كه بيانگر توافق ناچيز دو تست مي باشد. آزمون مك نمار نتيجه فوق را تائيد نمود ($P<٠/٠٠١$). در اين ارتباط اگرچه دلايل متعددي ذكر شده ولي فعاليت خنثي كنندگي قوي بافت هاي حامل ويروس تب برفكي به عنوان يكي از عوامل مهم عدم موفقيت جداسازي ويروس معرفي گرديده است (٤). Donn و همكاران (١٩٩٤)

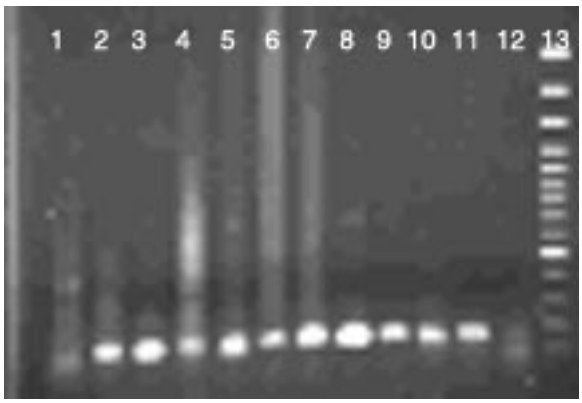
RT-PCR روشي سريع و ساده براي
شناسائي عفونت پايدار با ويروس تب برفكي در گاو است زيرا وجود فعاليت خنثي كنندگي تاثيري در كارآمدي آن ندارد بنابر اين بويژه براي شناسائي وضعيت حامل در بافت ها پس از مرگ قابل اعتماد مي باشد (٤). ضمن آن كه بايد به حساسيت بالاتر RT-PCR در ارتباط با مقدار اندك ويروس موجود در دام هاي حامل نيز توجه داشت (٤، ٨). بنابر اين مي توان كم بودن موارد جداسازي ويروس و توافق ناچيز كشت ويروس با RT-PCR را در نمونه هاي لوزه قابل توجيه دانست.

تشكر و قدرداني:

بدينوسيله از حمايت هاي مالي قطب علمي علوم درمانگاهي دانشكده دامپزشكي دانشگاه تهران و سازمان دامپزشكي كشور براي انجام اين پژوهش قدرداني مي نمايد.

منابع :

۱- قرشي، س ع، دليري، م، حاجيان، ت، بانويي، م و ع، الوندي، ۱۳۸۰ . تشخيص ويروس تب برفكي در نمونه هاي كلينيكي به روش RT-PCR . مجله پژوهش و سازندگي. شماره ۵۳ زمستان ۱۳۸۰ (از ۱۰ تا ۱۲)، تهران.
2. Alexandersen, S., Zhang, Z. and A. I. Donaldson, 2002. Aspect of the persistence of foot-and-mouth disease virus in animals-the carrier problem. Microbes and Infect. 4: 1099-1110.
3. Domingo, E., Baranowski, E., Escarmís, C. and F. Sobrino, 2002. Foot-and-mouth disease virus. Comp. Immuno. Microbiol. Infect. Dis. 25: 297-308.
4. Donn, A., Martin, L.A and A. I. Donaldson, 1994. Improved detection of persistent foot-and-mouth disease infection in cattle by polymerase chain reaction. J. Virol. Method. 49: 179-186.
5. Hedger, R.S. (1968). The isolation and characterization of foot-and-mouth disease from clinically normal herds of cattle in Botswana. J. Hyg., Camb. 66: 27-36.
6. Kitching, R. P., 2002. Identification of foot and mouth disease virus carrier and subclinically infected animals and differentiation from vaccinated animals. Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz., 21(3): 531-538.
7. Prato Murphy, M.L., Meyer, R.F., Mebus, C., Schudel, A.A. and M. Rodriguez, 1994. Analysis of sites of foot-and-mouth disease virus persistence in carrier cattle via the polymerase chain reaction. Arch. Virol. 136: 299-307.
8. Rossi, M.S., Sadir, A.M., Schudel, A.A. and Palma, E.L. (1988). Detection of foot-and-mouth disease virus with DNA probes in bovine esophageal-pharingeal fluids. Arch. Virol. 99: 67-74.
9. Salt, J. S., 1993. The carrier satate in foot and mouth disease-An immunological review. Br. Vet. J. 149: 207-223.



شكل شماره ۱: محصول PCR (باند ۱۳۱ جفت باز) الكتروفورز شده روي ژل آگارز ۱% مربوط به تعدادي از نمونه هاي لوزه را نشان مي دهد. ستون ۱ نمونه لوزه منفي، ستون هاي ۲-۱۱ نمونه هاي لوزه مثبت، ستون ۱۲ كنترل منفي و ستون ۱۳ ماركر مولكولي (Ladder 100) مي باشد.