✓ پژوهش و سازندگی، شماره ۵۳، زمستان ۱۳۸۰

تشخیص ویروس تب برفکی در نمونه‌های کلینیکی به روش RT-PCR

● **سیدعلی قریشی** ● **مرتضی دلیری**، اعضاء هیات علمی مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی
● **ترانه حاجیان** ● **محمد مهدی بانوئی**، کارشناسان ارشد مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی
● **علیرضا الوندی**، معاون فنی اتحادیه تعاونی کشاورزی دامداران استان تهران

تاریخ دریافت: مرداد ماه ۱۳۷۹ تاریخ پذیرش: بهمن ماه ۱۳۸۰

چکیده
به منظور دستیابی به یک روش مطمئن سریع و حساس برای تشخیص ویروس تب برفکی در نمونه های بالینی آزمایش RT-PCR بهینه سازی گردید. با استفاده از این روش تشخیص مستقیم ویروس تب برفکی در نمونه های کشت سلول و نمونه های بافتی دامهای آلوده مورد بررسی قرار گرفت. در این روش RNA ویروس تب برفکی در نمونه آزمایشگاهی بدون در نظر گرفتن سروتیپ ویروس قابل تشخیص است. در این بررسی ۴ سویه واکسنی ویروس از سروتیپ های A, O و Asia1 مورد آزمایش قرار گرفتند و قطعه ای از ناحیه 2B ژنوم ویروس به طول ۱۳۱ جفت‌باز (bp) تکثیر گردید. اختصاصی بودن نتایج بدست آمده با تعیین ردیف نوکلئوتیدی محصول PCR مورد تایید قرار گرفت. این روش سریع تشخیصی مولکولی که بسیار حساس و اختصاصی است درکمتر از ۸ ساعت قادر به شناسائی ویروس تب برفکی در نمونه های بالینی است. لذا در تشخیص به موقع همه گیریهای مشکوک به بیماری تب برفکی این روش از اهمیت فوق العاده‌ای برخوردار است.

کلمات کلیدی: RT-PCR, FMDV، و تشخیص

✓ **Pajouhesh & Sazandegi, No 53 PP:10-12**

Detection of Foot-and-Mouth disease virus in clinical samples by RT-PCR

By: Seyed Ali Ghorashi. Taraneh Hajian, Morteza Daliri, Mohammad Mehdi banuei, National Research center for Genetic engineering and Biotechnology. Alireza Alvandi, union of animal farmers cooperative tehran province.

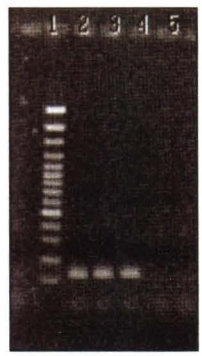
In order to utilize a reliable, fast and sensitive test for detection of Foot-and-Mouth disease virus (FMDV) in clinical samples, a Reverse - Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) method was optimized. This RT-PCR can detect FMD viral RNA in samples regardless of their serotypes. Four vaccine viral strains of types A (two isolates), O and Asia 1 were tested and a 131 bp pcr product from 2B region of FMDV genome was amplified. Thirty-seven clinical samples were also tested. The specificity of results was confirmed by direct sequencing of PCR products. This rapid molecular diagnostic method, which is sensitive and specific, can detect FMDV in clinical samples in less than eight hours. Therefore, it would be valuable for early detection of suspected FMDV outbreaks.

Keywords: RT-PCR, FMDV, detection.

مقدمه

بیماری تب برفکی (FMD) یک بیماری ویروسی بسیار حاد و مسری زوج سمان می‌باشد که گاو، گوسفند، بز، خوک و چندین گونه از حیوانات وحشی را آلوده می‌سازد این بیماری یکی از مهمترین بیماریهای حیوانات اهلی است که خسارات اقتصادی سنگینی را ببار می‌آورد. عامل بیماری (FMDV) متعلق به خانواده Picornaviridae و از جنس Aphthovirus است و دارای ۷ سروتیپ می‌باشد که از نظر آنتی ژنتیکی کاملاً با یکدیگر متفاوت هستند. سروتیپ های ویروس شامل A، O، Asia1، C، SAT-1، SAT2- و SAT3- می‌باشند (۲) و تاکنون سروتیپ های A، O و Asia1 در ایران شناسایی و گزارش شده‌اند(۱).

ژنوم ویروس به‌صورت یک مولکول RNA (Positive- sense) یک رشته‌ای است و اندازه آن تقریباً ۸ کیلو باز (kb) می‌باشد و تکثیر آن در سلول با استفاده از آنزیم RNA پلی‌مراز ویروس انجام می‌پذیرد (۶). وجود حیوانات حامل (Carrier) ویروس بدون آنکه علائمی از خود نشان دهند، در نشخوارکنندگان به‌خصوص گاوهای واکسینه شده و یا واکسن نخورده ثابت شده است (۷). در این حیوانات محوطه دهانی حلقی به عنوان منطقه اصلی تکثیر ویروس گزارش گردیده است (۲). حیواناتی که از بیماری بهبود می‌یابند به مدت چند ماه و یا چند سال به‌صورت حامل می‌توانند ویروس را دفع کرده و باعث بروز بیماری در گله گردند (۴). بنابراین برای تشخیص حیوانات عاری از بیماری تب برفکی از حیواناتی که به ظاهر آلوده نیستند ولی به‌صورت حامل، ویروس را در محیط پراکنده می‌سازند و یا حیواناتی که مشکوک به ابتلا به این ویروس می‌باشند، احتیاج به یک روش تشخیص حساس آزمایشگاهی است که با آن بتوان وضعیت یک گله و یا حیواناتی که خریداری و به گله اضافه می‌گردند را از این نظر بررسی و آزمایش نمود. دراین مطالعه تحقیقی حضور ویروس در بافت اپتیلیوم زبان و لثه با استفاده از آزمایش RT-PCR و با تشخیص قسمتی از ژنوم ویروس که کدکننده قسمتی از پروتئین های ساختمانی ویروس است صورت گرفته است.



شکل شماره ۱- آزمایش RT-PCR بر روی نمونه‌های واکسن ویروس تب برفکی و تکثیر قطعه ۱۳۱ bp از ژنوم ویروس بر روی ژل آگارز ۱٪. ستون ۱: مارکر DNA (Ladder 100) ستون ۲: نمونه ویروس واکسن تیپ O ستون ۳: نمونه ویروس واکسن تیپ A ستون ۴: نمونه ویروس واکسن تیپ Asia1 ستون ۵: کنترل منفی

مواد و روشها

سویه های ویروس تب برفکی که در این تحقیق بکار برده شده اند عبارتند از:A2oo، A مردآباد، O و Asia1 که در واکسن کشته تب برفکی تولیدی مؤسسه تحقیقات سرم و واکسن سازی رازی به‌کار می‌روند. همچنین تعداد ۳۷ نمونه بالینی اپتیلیوم زبان و لثه که از سوی سازمان دامپزشکی کشور برای تشخیص به این مرکز ارسال شده است. از بافت آلوده استخراج RNA انجام گردید.

استخراج RNA

استخراج RNA با استفاده از محلول سریع استخراج RNA به نام RNA Fast (تولید شده در مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی) از مایع کشت سلول و یا بافت اپی تلیوم زبان و لثه به‌عمل آمد. روش کار بر اساس دستورالعمل کیت انجام گردید. به‌طور مختصر، ۳۰۰ ماکرولیتر از مایع کشت سلول به یک میلی لیتر از محلول RNA Fast اضافه گردید. در مورد بافتهای آلوده، ۵۰-۱۰۰ میلی گرم از بافت به همراه یک میلی لیتر از محلول فوق در هاون چینی هموژن گردید. نمونه ها به مدت ۵ دقیقه دردرجه 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 ۷۵٪، 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

ساخت اولین رشته cDNA در حجم ۴۰ ماکرولیتر و به مدت یکساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انجام گردید. این واکنش حاوی ۴ ماکرولیتر از RNA استخراج شده (۲ -۰/۵ میکرو گرم)، یک ماکروگرم از پرایمر Reverse، ۱۰ میلی مولار از هر یک از dNTPها، ۴۰ واحد Rnase Inhibitor، ۴۰ واحد آنزیم Reverse- Transcriptase و ۸ ماکرولیتر از بافر آنزیم ۵۰ RT حاوی $3mM\ Mgcl_2$، ۷۵mM Kcl، ۵۰ mM Tris-Hcl (pH=۸/۳) و ۱۰ mM dithiothreitol می‌باشد. نمونه‌های مورد آزمایش به مدت ۵ دقیقه، ۷۰ درجه حرارت داده و سپس برای واکنش ژن PCR بکار برده شدند. پرایمرهای مورد استفاده از سکانس ناحیه توالی 2Bویروس می‌باشند که نوکلوتیدی آن در بین سروتیپ‌های مختلف ویروس یکسان بوده و قادر به شناسائی این ژن در کلیه ویروس‌های تب برفکی بدون در نظر گرفتن سروتیپ آن می‌باشند. توالی نوکلوتیدی پرایمر و Reverse به‌صورت 5´- AGCTTGTACCAGGGTTTGGC-3´, توالی نوکلوتیدی پرایمر Forward به‌صورت 5´-CAGATGCAGGAGGACATGTC-3´ می‌باشد.

واکنش PCR

واکنش PCR شامل ۱۰ ماکرولیتر از محصول واکنش RT، بافر PCR، ۲mM از هر یک از dNTPها، ۰/۵ ماکروگرم از هر یک از پرایمرهای Forward و Reverse و همچنین ۵ واحد از آنزیم Taq DNA Polymeras می‌باشد. واکنش با استفاده از دستگاه Thermocycler و با برنامه حرارتی ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴ دقیقه (یک سیکل) و سپس ۹۴ درجه سانتیگراد به‌مدت یک دقیقه، ۵۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه (۳۰ سیکل) و نهایتاً ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه (یک سیکل) آغاز گردید. محصول PCR به روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز و پس از رنگ آمیزی با محلول اتیدیوم بروماید، نتایج با استفاده از اشعه UV بررسی شد. ضمناً کنترل منفی نیز در هر آزمایش منظور گردید.

خالص سازی و تعیین ترتیب نوکلئوتیدهای محصول PCR

DNA تکثیر شده از پرایمرها، dNTPها و نمکهای موجود در واکنش PCR با استفاده از کیت High Pure PCR Product Purification Kit جدا گردید. سپس برای مشخص نمودن اختصاصی بودن محصول PCRبا استفاده از تعیین ترتیب نوکلوتیدی به روش مستقیم سکانس نوکلوتیدی محصول PCR تعیین و با سکانس‌های موجود دربانک ژن مقایسه گردید.

```
1 cagatgcagg aggacatgtc gacaaaacac ggactcgact tcacccggtt

51 ggtctccgcg tttgaggaat tggccacggg agtcaaagcc atcaggaccg

101 gtctcgacga ggccaaaccc tggtacaagc t
```

شکل شماره ۲- ردیف نوکلئوتیدی محصول PCRشامل ۱۳۱ باز از ژن ویروس تب برفکی

تعیین حساسیت آزمایش PCR

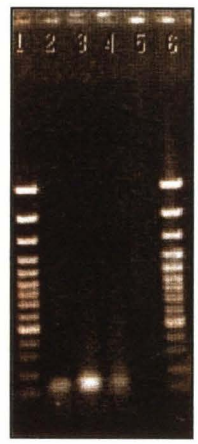
به منظور تعیین حساسیت آزمایش، ۳۰۰ ماکرو ۳ لیتر از نمونه تیپ o ویروس با غلظت 10^6x که در کشت سلول تکثیر شده بود انتخاب گردید. رقت‌های ۱/۱۰ به‌صورت متوالی از ویروس تهیه گردید. سپس استخراج RNA بر روی هر رقت ویروس انجام پذیرفت و RNA جدا شده در آزمایش RT-PCR بکار برده شد.

نتایج

واکنش RT-PCR

از آنجا که پرایمرهای واکنش استفاده شده PCR مربوط به قطعه ای از ژنوم ویروسی است که ردیف نوکلوتیدی آن در سروتیپ های مختلف ویروس یکسان است، در واکنش PCR، قطعه ای به طول ۱۳۱ جفت باز (bp) در هر ۳ سروتیپ مورد آزمایش مشاهده گردید که نمایانگر وجود ژنوم ویروس در نمونه است (شکل ۱). در این واکنش یک باند DNA اختصاصی برای هر نمونه تکثیر گشت و هیچ باند غیراختصاصی مشاهده نگردید. به‌علاوه در نمونه کنترل منفی نیز باند DNA مشابه نمونه های مثبت تولید نگردید.

از آزمایش تعیین ردیف نوکلوتیدی محصول PCR برای اطمینان از صحت نتایج به‌دست آمده استفاده گردید. اختصاصی بودن قطعه DNA تولید شده در نمونه های دارای ویروس تب برفکی در واکنش PCR با انجام تعیین ردیف نوکلوتیدی این قطعه به روش مستقیم مشخص نمود که قطعه DNA تکثیر شده مربوط به ژن ویروس تب برفکی می‌باشد (شکل ۲).



شکل شماره ۳- آزمایش RT-PCR بر روی نمونه های رقیق شده ویروس تب برفکی و تکثیر قطعهٔ ۱۳۱ bp از ژنوم ویروس بر روی ژل آگارز ۱٪. ستون ۱:مارکر DNA (Ladder 100) ستون ۲: رقت 10^{-1} ویروس ستون ۳: رقت 10^{-2} ویروس ستون ۴: رقت 10^{-3} ویروس ستون ۵: رقت 10^{-4} ویروس ستون ۶: مارکر DNA (Ladder 100).

از بین ۳۷ نمونه بافتی مورد آزمایش تعداد ۳۰ نمونه در آزمایش PCR تولید باند اختصاصی نمودند که نشانگر وجود ژنوم ویروس در نمونه میباشد (نتایج نشان داده نشده است).

میزان حساسیت آزمایش PCR

نتایج آزمایش تعیین حساسیت نشان داد که واکنش RT-PCR قادر به تشخیص ویروس تا رقت 10^{-3} می‌باشد (شکل ۳).

بحث

در این مطالعه، پرایمرهای مورد استفاده مربوط به ناحیه 2B ژنوم ویروس هستند که مسئول کد کردن پروتئین ویروسی است. در این ناحیه از ژن، از نظر توالی نوکلوتیدی اختلافی بین سروتیپ‌های مختلف ویروس وجود ندارد. لذا این امر باعث می‌شود که بتوان از این آزمایش برای تشخیص ویروس درهمه سروتیپ ها استفاده نمود. با توجه به آنکه تشخیص تفریقی بیماری تب برفکی از سایر بیماریهایی که علائم بالینی مشابهی ایجاد می‌نمایند اهمیت فوق العاده ای دارد، از این آزمایش که بسیار اختصاصی بوده و از حساسیت بالایی برخوردار است می‌توان به این منظور استفاده نمود.

یکی از مهمترین مسائلی که در مبارزه با بیماری تب برفکی نقش دارد، تشخیص سریع ویروس در واگیریها است. به‌علت واگیری شدید این بیماری در گله های دامی، سرعت در تشخیص صحیح می‌تواند از بروز خسارات اقتصادی زیادی جلوگیری نماید. در تشخیص و شناسائی ویروس تب برفکی از روشهای مختلف آزمایشگاهی استفاده می‌شود. از آن جمله آزمایش ثبوت عناصر مکمل (CFT) است که در عرض چند ساعت قابل انجام است اما از حساسیت کافی برخوردار نمی باشد زیرا در این آزمایش مقادیر زیاد ویروس باید در نمونه وجود داشته باشد تا ویروس قابل تشخیص گردد (۵). به‌علاوه برای انجام آن احتیاج به پادگن ویروس و پادتن بر علیه ویروس می‌باشد.

جداسازی ویروس بر روی کشت سلول و همچنین آزمایش خنثی سازی ویروس (VN) از روشهای حساس آزمایشگاهی می‌باشند اما دراین روشها احتیاج به آزمایشگاه مجهز به تجهیزات لازم برای کشت سلول است و به‌علاوه انجام این آزمایشات مشکل بوده و احتیاج به صرف وقت و هزینه زیاد دارد. اگر چه در دنیا کیت های مختلف ELISA برای تشخیص ویروس وجود دارد ولی استفاده ازآن مستلزم ورود آن از خارج از کشور است به‌علاوه حساسیت ELISA نسبت به PCR در تشخیص ویروس بسیار کمتر است (۳).

آزمایش RT-PCR برای تشخیص ویروس نسبت به روشهای ذکر شده از حساسیت بیشتری برخوردار بوده و بسیار اختصاصی است. در این روش حجم نمونه مورد نیاز نسبت به سایر روشهای آزمایشگاهی بسیار کمتر است و به‌علاوه در عرض چند ساعت قابل انجام بوده و از این نظر برای اعلام نتیجه قطعی ازسرعت کافی برخوردار است. لذا به نظر می‌رسد آزمایشگاههای تشخیصی و آزمایشگاه رفرانس دامپزشکی ازاین روش آزمایشگاهی برای تشخیص سریع و دقیق ویروس تب برفکی در نمونه های بالینی می‌توانند استفاده نمایند و از سایر روشهای ویروس شناسی برای تکمیل مطالعات بهره گیرند. در حال حاضر تحقیق برای شناسائی سروتیپ های مختلف ویروس تب برفکی در نمونه های بالینی از طریق آزمایش RT-PCR در مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی ادامه دارد. همچنین درنظر است تا با تعیین توالی نوکلوتیدی ژن VP1 ویروس بتوان اختلافات ژنتیکی بین سویه های مختلف در یک سروتیپ ویروس را نیز مشخص کرد.

سپاسگزاری

هزینه این طرح از طرف اتحادیه تعاونی کشاورزی دامداران استان تهران تأمین گردیده است لذا از همکاری صمیمانه آقای نجفیان رئیس هیأت مدیره و آقای مهندس نعمتی مدیر عامل این تعاونی تشکر و قدردانی می‌گردد. ضمناً از آقایان دکتر طالب شوشتری قائم مقام مؤسسه رازی و دکتر مهروانی عضو هیأت علمی این مؤسسه به‌خاطر همکاری صمیمانه و در اختیار گذاشتن سویه‌های ویروس تب برفکی قدردانی می‌گردد. همچنین از همکاری و مساعدت های آقای دکتر سعید چرخکار معاونت بهداشتی و پیشگیری سازمان دامپزشکی در ارسال نمونه های آزمایشگاهی سپاسگزاری می‌گردد.

منابع مورد استفاده

۱- طالب شوشتری، عبدالمحمد، ۱۳۷۴. بیماری تب برفکی و ۲۹ (FMD) وضعیت آن در ایران. مجله پژوهش و سازندگی. شماره زمستان ۱۳۷۴ ص۸۲-۸۵.

2- Burrows R. 1966. Studies on the carrier state of the cattle exposed to food - and-mouth disease virus. J Hyg. 64, 81-90

3- Ferris ND, Dawson M 1988. Routine application of enzyme - Linked immunosorbent assay in comparison with complement fixation for the diagnosis of food - and - mouth and swine vesicular diseases. Vet. Microbiol. 16, 201-209.

4- Lubroth J, Brown F. 1995. Identification of native food - and - mouth disease virus non - structural protein 2c as a serological indicator to differentiate infected from vaccinated livestock. Res. Vet. Sci. 59, 70-78.

5- Meyer RF, Brown CC, House C, and Molitor TW. 1991. Rapid and sensitive detection of foot - and - mouth disease virus in tissues by enzymatic RNA amplification of the polymerase gene. J. Virol. Meth. 34: 161-172.

6- Polatnick J. Arlinghaus RB, 1967. Food - and - Mouth disease virus induced ribonucleic acid polymerase in baby hamster kidney cells. Virology 31, 601-608.

7- Salt JS. Samuel AR. Kitching RP. 1996. Antigenic analysis of type O foot - and - mouth disease virus in the persistently infected bovine. Arch. Virol. 141, 1407-1421.

8- Sanger, DV; 1979. The replication of picornaviruses. J. Gen. Virol. 45, 1-13.