

تشخیص ویروس زبان آبی توسط روش RT-PCR در گوسفند

سید محمود عظیمی^{۱*}، هادی کیوانفر^۲، همایون مهروانی^۱

(^۱) موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج-ایران.

(^۲) گروه میکرو بیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران-ایران.

(دریافت مقاله: ۲۹ فروردین ماه ۱۳۸۷، پذیرش نهایی: ۲ آذر ماه ۱۳۸۷)

چکیده

طی سال ۸۷-۱۳۸۶ تعداد ۱۲۰ نمونه خون از گوسفندانی که دارای علائم بالینی مشکوک به زبان آبی بودند، اخذ گردید. نمونه‌ها از کانون‌هایی که از نظر سرولوژی یک وجود ویروس در آنها اثبات شده بود جمع‌آوری گردید. پس از جداسازی سرم، توسط الیزای رقابتی آنتی بادی ضد آنتی ژن VP7 در آنها ردیابی گردید. کل ژن S7 بطول ۱۱۵۶bp توسط RT-PCR one step و با استفاده از دو زوج پرایمر اختصاصی مکمل انتهای ۳ و ۵ قطعه مذکور تکثیر یافت. در تعداد قابل توجهی از نمونه‌ها باند ۱۱۵۶bp بشکل ضعیف یا غیر واضح مشاهده شد. برای رفع این مشکل از آزمایش nested-PCR با بکارگیری پرایمرهای داخلی ژن S7 استفاده گردید. باند حاصل قطعه‌ای بطول ۷۶۹bp بود. به این وسیله علاوه بر تایید نتایج PCR اول حساسیت شناسای ویروس افزایش یافت. از بین نمونه‌های مورد آزمایش، ۴۱ مورد (۳۴/۲ درصد) از نظر وجود آنتی بادی ضد گروه سرمی زبان آبی، ۲۳ مورد (۱۹/۲ درصد) از نظر nPCR، ۱۲ مورد (۱۰ درصد) از نظر الیزا و nPCR مثبت و ۵۶ مورد (۴۶/۶ درصد) از نظر الیزا و nPCR منفی تشخیص داده شدند. این مطالعه اولین گزارش در خصوص بکارگیری RT-PCR جهت شناسایی ویروس زبان آبی در ایران است. از RT-PCR و nested PCR به عنوان یک روش بسیار حساس مولکولی جهت شناسایی ویروس زبان آبی در نمونه‌های خون می‌توان بهره برد.

واژه‌های کلیدی: واژه‌های کلیدی - ویروس زبان آبی، RT-PCR، nested-PCR، الیزای رقابتی.

مقدمه

فهرست شده در لیست A بیمارهای عفونی OIE قرار دارد. علت این امر خسارت‌های زیان باری است که این بیماری به اقتصاد دامپروری در سراسر دنیا وارد نموده است. خسارت‌های بیماری ناشی از تلفات (گاهی تا ۵۰ درصد در گوسفند)، کاهش تولید، کاهش باروری، هزینه‌های درمانی و محدودیت‌های تجاری دام و فرآورده‌های بیولوژیک آنها می‌باشد (۲۳). انتقال ویروس تقریباً در تمام موارد توسط گزش پشه کولیکوئیدس اتفاق می‌افتد و در موارد بسیار نادر از مهره دار به مهره دار از طریق اسپرم یا جنین صورت می‌گیرد (۲۰).

BTV ویروسی بیست و جهی با کپسید دو لایه به قطر ۸۰nm و بدون غشاء می‌باشد. ژنوم آن از ۱۰ قطعه رشته dsRNA خطی تشکیل شده است. کپسید بیرونی از پروتئین‌های VP2 و VP5 حاصل گردیده است. VP2 متغییرترین پروتئین پیکر ویروس بوده و ۲۴ سروتیپ موجود در این گونه بواسطه تغییر توالی اسیدهای آمینه این پروتئین بوجود آمده است. VP2 عامل اتصال ویروس به سلول‌های مهره داران می‌باشد. آنتی بادی‌های خنثی کننده علیه این پروتئین تولید می‌شوند. کپسید داخلی (core) دو لایه بوده و قشر سطحی آن از ۷۸۰ مولکول پروتئین VP7 تشکیل شده است. این پروتئین محصول قطعه هفتم ژنوم (ژن S7) بوده و در گروه سرمی زبان آبی حراست شده است. لایه زیرین کپسید داخلی (subcore) حاصل ۱۲۰ مولکول پروتئین VP3 است. core، ژنوم ویروس را احاطه کرده و حاوی پروتئین‌های VP1 (پلی مرز)، VP4 (آنزیم کلاهیک گذاری) و VP6 (آنزیم هلیکاز) می‌باشد. ویروس زبان آبی دارای سه پروتئین غیر ساختمانی به نام‌های NS1، NS2، NS3 است، نقش این پروتئین‌ها عمدتاً در رهایی ویروس از سلول‌های آلوده در حین عفونت می‌باشد (۱۸، ۲۵).

ویروس Bluetongue (BTV) گونه‌ای شاخص در بین ۲۱ گونه موجود در جنس Orbivirus بوده و در خانواده Reoviridae قرار دارد. در جنس اربی ویروس ۱۴ گروه سرمی (Serogroup) وجود دارد که مهم‌ترین آنها از نظر دامپزشکی گروه سرمی BTV می‌باشد. تاکنون ۲۴ سروتیپ از این ویروس در سراسر دنیا شناسایی شده است. BTV در اکثر نشخوارکنندگان اهلی و وحشی ایجاد عفونت می‌کند. اما از نظر اقتصادی بیماریزایی مهم آن در نژادهای پشم ظریف گوسفند نظیر مرینوس و Dorset poll می‌باشد. این ویروس برای نشخوارکنندگان وحشی در گونه‌هایی مانند، antelope، white tail deer و desert bighorn sheep، pronghorn بشدت بیماریزاست (۲۶). این ویروس در گاو و بز عموماً علائم بالینی ایجاد نمی‌کند. این دام‌ها مخصوصاً گاو به عنوان مخزن ویروس شناخته شده‌اند (۲۲).

بیماری زبان آبی حدود ۱۱۰ سال پیش در گوسفندان مرینوس که از اروپا به آفریقای جنوبی برده شدند مشاهده گردید. طی سالیان متمادی بیماری محدود به همین کانون جغرافیایی بود. از سال ۱۹۵۶ بتدریج در سایر نقاط دنیا مشاهده گردید. این ویروس در حال حاضر در تمام قاره‌ها بغیر از قطب جنوب گزارش شده است. شیوع زبان آبی عمدتاً در مناطق گرمسیر و نیمه گرمسیر بین طول ۴۰ شمالی و ۲۵ جنوبی می‌باشد. البته در سال‌های اخیر پهنه انتشار ویروس تا طول ۵۳ شمالی یعنی شمال چین، آمریکای شمالی و قزاقستان که برخی از آنها جزء مناطق معتدل دنیای می‌باشد، گسترش یافته است (۳۱، ۳۰). زبان آبی یک بیماری عفونی غیر مسری است. این ویروس توسط گونه‌های خاصی از پشه Culicoides spp. از خانواده Ceratopogonidae بین مهره داران انتقال می‌یابد. در حال حاضر زبان آبی جزء ۱۶ بیماری



نمونه‌ها که شامل خون کامل بود توسط venoject حاوی EDTA اخذ گردیده و در مجاورت یخ سریعاً به مؤسسه رازی انتقال داده شدند. برای افزایش احتمال دست‌یابی به ویروس، نمونه‌ها از گوسفندانی اخذ شد که مشکوک به ابتلا به زبان آبی بودند. عبارت دیگر از دام‌هایی خون‌گیری شد که علائمی از قبیل تب، پرخونی مخاط دهان، ضایعات پتی‌شی در دهان و لنگش داشتند. بعد از دریافت نمونه‌ها، سرم آنها جدا و در ۲۰-درجه سانتیگراد تا زمان انجام تست الیزا نگهداری شدند. از آنجایی که ویروس زبان آبی به سلول‌های خونی مخصوصاً به غشاء گویچه‌های سرخ متصل می‌باشد، از گویچه‌های سرخ و سفید برای استخراج اسید نوکلئیک ویروس استفاده شد. تست الیزا: در این مطالعه، الیزای رقابتی (C-ELISA) برای جستجوی آنتی‌بادی ضد گروه زبان آبی بکار گرفته شد. برای این منظور از کیت تجارتي ID-Vet استفاده گردید. اساس این نوع الیزا بر رقابت بین آنتی‌بادی‌های موجود در سرم با آنتی‌بادی مونوکلونال ضد VP7 استوار است. رقابت بین سرم و آنتی‌بادی مونوکلونال در اتصال به VP7 موجود در کف پلیت، تعیین‌کننده نتیجه تست است.

استخراج Viral RNA: ویروس توسط کیت viral RNA extraction QIAamp (cat.no. ۵۲۹۰۶) از خون استخراج شد. برای این منظور طبق توصیه کیت عمل گردید. بطور خلاصه ۱۴۰ul خون با ۵۶۰ul بافر AVL و ۵۶۰ul اتانل ۹۶ درصد مخلوط نم، سپس ۶۳۰ul از مخلوط حاصل در میکرو تیوب‌های spin column سانتریفیوژ گردید. پس از شستشو با بافرهای AW1 و AW2 توسط ۵۰ul elution buffer RNA استخراج شده استحصال شد. جهت دناتوره کردن RNA زوج رشته ویروس، از حرارت ۱۰۰ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه استفاده گردید.

واکنش RT-PCR: از دوز زوج پرایمر اختصاصی ژن S7 جهت تکثیر این قطعه استفاده شد. اندازه محصول مورد انتظار ۱۱۵۶ باز بود.

Reverse(SZ-2): 5'-gtaagtgttaacttaagaga-3

Forward(SZ-1): 5'-gttaaaaatctatagagatg-3

Forward(SA-1): 5'-gttaaaaatcgtcaagatg-3

Reverse(SA-2): 5'-gtaagtttaaatcgaagacg-3

برای انجام RT-PCR از کیت one step شرکت Qiagen استفاده گردیده و مطابق با روش ارائه شده توسط Wieslaw و همکاران در سال ۲۰۰۷ عمل شد (۳۰).

Master Mix شامل: ۱۰ul با فر 5x، ۲ul dNTP (10Mm)، ۰/۵ul (20pmol) از هر پرایمر، ۲ul آنزیم، ۵ul RNA ویروس بود. نهایتاً توسط DEPC حجم نهایی به ۵۰ul رسانده شد. سپس نمونه‌ها به دستگاه thermalcycler انتقال داده و از برنامه ذیل جهت تکثیر ژن مورد نظر استفاده شد:

تولید cDNA طی ۳۰ دقیقه در ۴۵ درجه، غیرفعال سازی آنزیم RT و فعال شدن آنزیم پلی‌مراز طی ۱۵ دقیقه در ۹۵ درجه، تکثیر قطعه هدف بطول ۱۱۵۶bp طی ۴۰ سیکل در دمای ۹۵ درجه به مدت ۱ دقیقه، ۴۵ درجه به مدت

در ۵۰ سال اخیر روش‌های مختلفی برای شناسایی ویروس زبان آبی بکار گرفته شده است. مانند تزریق به کیسه زرده، تزریق به عروق جنین مرغ، تزریق به مغز موش نوزاد، تزریق به گوسفند حساس، آلوده کردن پشه کولیکوئیدس، بکارگیری انواع کشت سلول حشره و پستاندار و استفاده از روش‌های سرو لوژیک مانند ELISA، AGID و SN. در بین تمام این روش‌ها، تکنیک‌های مولکولی مانند RT-PCR انقلابی در زمینه تشخیص و مطالعات اپیدمیولوژیک این ویروس ایجاد نموده است (۱۷).

روش‌های مولکولی علاوه بر افزایش سرعت تشخیص، از حساسیت و ویژگی بسیار بالا برخوردار می‌باشند. با بکارگیری پرایمرهای اختصاصی می‌توان گونه‌های مختلف اربی ویروس را از یکدیگر تفکیک نمود (۲۲). تاکنون روش‌های متنوعی از RT-PCR جهت شناسایی BTV بکار گرفته شده است. معمولاً ژن‌هایی که برای تشخیص گروه سرمی زبان آبی مورد استفاده قرار می‌گیرند در کلیه سروتیپ‌ها حراست شده است. این ژن‌ها شامل قطعات ژنومی تولیدکننده پروتئین‌های core و پروتئین‌های غیر ساختمانی از قبیل S7, S10, L3, L1 و N6 هستند. در بین ژن‌های مذکور بیشتر محققین قطعه S7 را بدلیل اهمیت و ویژگی آن برگزیده اند (۵، ۱۲، ۲۳، ۱۳، ۱۹، ۲۴، ۳۰).

برخی از محققین بمنظور تایید محصول PCR اولیه، اقدام به طراحی nested-PCR می‌نمایند. به این طریق علاوه بر تایید تشخیص، حساسیت شناسایی ویروس مورد نظر در نمونه‌های بالینی افزایش خواهد یافت. طبق بررسی‌های انجام شده حساسیت PCR دوم (nPCR) نسبت به PCR اول ۱۰۰۰ برابر می‌باشد. این روش مخصوصاً زمانی که میزان RNA مورد جستجو کمتر از ۱۰۰fg باشد، بسیار ارزشمند است (۷، ۸).

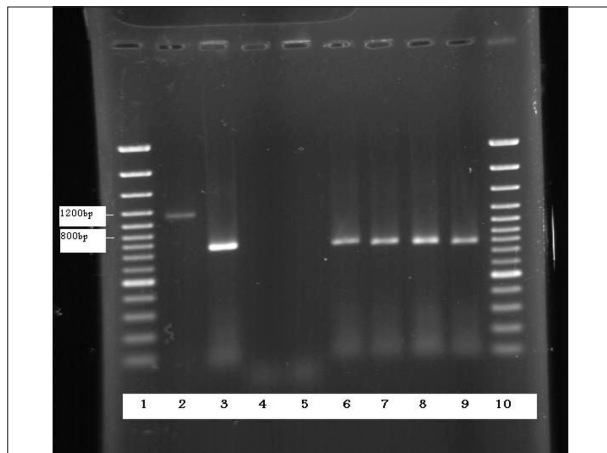
در این مطالعه با بکارگیری پرایمرهای اختصاصی S7 سعی در طراحی RT-PCR ای شد که بتواند ویروس زبان آبی را صرف نظر از سروتیپ آن تشخیص دهد. ضمناً جهت تایید تشخیص PCR اول و افزایش حساسیت ردیابی ویروس از nested-PCR استفاده شد.

مواد و روش کار

طی سال‌های ۸۷-۱۳۸۶ تعداد ۱۲۰ نمونه خون از مناطقی که از نظر سرولوژیک وجود ویروس زبان آبی در آنها تأیید شده بود، جمع‌آوری گردید. برای این منظور از اطلاعات موجود در سازمان دامپزشکی استفاده شد. پس از بررسی آمار سال ۱۳۸۵ کشور از نظر وضعیت سرولوژیک بیماری استان‌های اردبیل، آذربایجان شرقی، کردستان، ایلام، فارس، خوزستان و قم به عنوان مناطق مورد مطالعه انتخاب شدند.

با توجه به اینکه بیماری زبان آبی یک بیماری فصلی بوده و شیوع آن وابسته به فعالیت پشه‌های کولیکوئیدس آلوده می‌باشد. اوج شیوع بیماری از اواسط فصل بهار تا اوایل فصل پاییز است. البته در کانون‌های مختلف با توجه به شرایط آب و هوایی، زمان شروع و پایان فعالیت پشه کمی متفاوت است. با توجه به ملاحظات فوق نمونه‌های طی سال ۸۷-۱۳۸۶ جمع‌آوری شدند.





تصویر ۱- نتایج آزمایش RT-PCR و nested-PCR در تعدادی از نمونه‌های مشکوک به BTV در ژل آگارز ۱٪/۳؛ ستون ۲ و ۳ بترتیب باند ۱۱۵۶bp و ۷۶۹bp در کنترل مثبت (BTV1) - ستون ۴ و ۵ نتیجه واکنش RT-PCR و nested-PCR ویروس FMD type O - ستون‌های ۶ تا ۹ نتیجه nPCR در تعدادی از نمونه‌های مثبت - ستون ۱۰ و ۱۱ مارکر (۱۰۰bp) می‌باشد.

مطالعه ارائه شده است. در تصویر نتایج حاصل از الکتروفورز محصول PCR و RT-nPCR ژن S7 در تعدادی از نمونه‌ها ارائه شده است.

بحث

در سال‌های اخیر شاهد شیوع ناگهانی و گسترده ویروس‌های منتقله توسط حشرات هستیم. BTV یکی از آرابوویروس‌های (Arthropod borne) مهم دامی است که اخیراً اپیدمی‌های متعددی از آن در سراسر دنیا مشاهده شده است. این موضوع احتمالاً به دلیل تغییر شرایط اقلیمی و تغییر در برخی از فاکتورهای اپیدمیولوژیک، نظیر دخالت یافتن گونه‌های جدید پشه کولیکوئیدس در انتقال ویروس می‌باشد. اپیدمی اخیر زبان آبی در شمال اروپای سال‌های ۲۰۰۶ و ۲۰۰۷ مبین این ادعا است (۴، ۲۳).

حضور ویروس زبان آبی در کشور ما بیش از ۳۰ سال است که اثبات شده است. اولین بار افشار و کیوانفر در سال ۱۹۷۴ وجود Ab ضد این ویروس را توسط AGID در استان‌های تهران و فارس گزارش نمودند (۳). در سال‌های اخیر نیز به استناد شواهد سرولوژیک آلودگی به ویروس در استان‌های مختلف کشور تایید شده است (گزارشات سازمان دامپزشکی). البته بعضاً موارد بالینی مشکوک به زبان آبی در دام‌ها توسط کلینیسین‌ها گزارش شده است. اما متأسفانه بدلیل عدم دسترسی به یک تکنیک معتبر و سریع آزمایشگاهی امکان تأیید یار د آنها وجود نداشته است.

یکی از مشکلات مبارزه و کنترل بیماری‌های عفونی دام‌ها، تشخیص سریع و دقیق آنها است. در مورد زبان آبی این موضوع از چند جهت حائز اهمیت می‌باشد. اولاً تشخیص اولیه بیماری بر پایه مشاهدات بالینی استوار است. باید توجه داشت که چهره بالینی زبان آبی تا توجه به نوع سویه وحدت ویروس، نژاد دام و شرایط محیطی از فوق حاد تا تحت بالینی متفاوت است. ثانیاً علائم بیماری با سایر بیماری‌های مخاطی و ویروسی از قبیل تب برفکی

جدول ۱- وضعیت نتایج الیزا و nPCR به تفکیک استان‌های مورد مطالعه.

استان	تعداد نمونه	تعداد الیزا مثبت	تعداد nPCR مثبت	تعداد nPCR مثبت والیزا مثبت
قم	۲۹	۲	۳	۱
آذربایجان شرقی	۲۶	۱۳	۳	۳
ایلام	۱۳	۷	۴	۱
کردستان	۹	۲	۳	۱
اردبیل	۱۵	۵	۳	۲
فارس	۱۷	۸	۴	۳
خوزستان	۱۱	۴	۴	۱
	۱۲۰	۴۱	۲۳	۱۲

ادقیقه و ۷۲ درجه به مدت ۲ دقیقه صوزت گرفت. در نهایت واکنش PCR با دمای ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه خاتمه یافت.

آزمایش nested-PCR: nPCR با بهینه‌سازی روش ارائه شده توسط Anthony و همکاران در سال ۲۰۰۴ انجام گرفت. مخلوط واکنش در حجم ۵۰ul شامل ۵ul از محصول RT-PCR به عنوان template، dNTPs (10mM) 1ul، MgCl2 (50mM) ۱/۵ul، TaqDNA PCR 10X buffer 5ul و از هر پرایمر (20pmol) 1ul تهیه شد (۵).
توالی پرایمرهای مورد استفاده به شرح ذیل بود:

Forward(IntS7F): 5'-acaactgatgctgcaatga-3

Reverse(IntS7R): 5'-aacccacacccgtgctaagtg-3

برنامه تکثیر قطعه داخلی ژن S7 به طول ۷۶۹bp طبق برنامه زیر صورت گرفت: یک سیکل ۹۵ درجه به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل شامل ۹۴ درجه به مدت ۱ دقیقه، ۵۹ درجه به مدت ۱ دقیقه، ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه و نهایتاً ۱ سیکل ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه. محصول PCR و nPCR در آگارز ۱/۳ درصد با پافر TBE و درولتاژ ۷۵ به مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز شد. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در محلول اتیدیوم بروماید (1ug/ul) رنگ آمیزی شده و در نهایت توسط لامپ uv مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج

در این مطالعه مجموعاً ۱۲۰ نمونه از گوسفندان مشکوک به بیماری زبان آبی از ۱۷ استان کشور توسط PCR، nPCR و الیزای رقابتی مورد بررسی قرار گرفتند. در تعدادی از نمونه‌های مورد آزمایش توسط RT-PCR باند ۱۱۵۶bp بصورت ضعیف و غیر واضح مشاهده گردید. برای رفع این مشکل از nested-PCR استفاده شد. در آزمایش nPCR باند ۷۶۹bp (قطعه داخلی ژن S7) در نمونه‌های مشکوک تکثیر یافت، ضمناً تعداد قابل توجهی نمونه مثبت در این مرحله شناسای شدند. در مجموع ۴۱ نمونه (۳۴/۲ درصد) از نظر الیزا، ۲۳ نمونه (۱۹/۲ درصد) از نظر nPCR و ۱۲ نمونه (۱۰ درصد) از نظر الیزا و nPCR مثبت و ۵۶ نمونه (۴۶/۶ درصد) از نظر الیزا و nPCR منفی تشخیص داده شدند. در جدول ۱ وضعیت نتایج الیزا و nPCR به تفکیک استان‌های مورد



در خون به اوج خود رسیده و از حداقل ۵ روز تا ۱۲۸ الی ۵۴ روز پس از آغاز عفونت نتیجه PCR مثبت شده و گاهی تا ۶ ماه قابل ردیابی است (۱۰،۱۱).

مطالعه محققین قبلی حساسیت بالای ۷۸٪ در تشخیص ویروس زبان آبی به روش PCR را نشان داده است (۴،۱۰). از طرف دیگر حراست شده بودن ژن مذکور در تمام سروتیپ‌ها و توپوتیپ‌ها (topotype) آنرا کاندیدای مناسب جهت استفاده در PCR نموده است (۴،۵).

در این مطالعه با توجه به اینکه سروتیپ‌های رایج BTV در کشور هنوز مشخص نیست از RT-PCR duplex استفاده شد. یعنی از دو زوج پرایمر مکمل انتهای ۳ و ۵ ژن S7 استفاده گردید. در حال حاضر مشخص شده است که نواحی غیر کد کننده انتهایی قطعه S7 در سروتیپ‌های ۱۵،۷ و ۱۹ مشابه یکدیگر بوده و با سایر سروتیپ‌ها کمی متفاوت است. لذا با بکارگیری دو زوج پرایمر هر یک از ۲۴ سروتیپ ویروس زبان آبی قابل شناسایی می‌باشد (۴). ضمناً در این تحقیق از تکنیک one step RT-PCR استفاده شد. مزیت این روش علاوه بر کاهش زمان آزمایش نسبت به two step RT-PCR، کاهش موارد مثبت کاذب بدلیل حذف دستکاری‌های حین سنتز cDNA می‌باشد. nested-PCR یکی از ساده‌ترین، سریع‌ترین و در عین حال حساس‌ترین روش‌ها جهت تایید قطعات تکثیر یافته درواکنش PCR است. Aradibe و همکاران در سال ۲۰۰۵ نشان دادند که حساسیت این روش بحدی است که حتی قادر به شناسای ۱۰/۱fg از ژنوم ویروس (معادل ۵ مولکول ژنوم BTV) در کشت سلول می‌باشد (۶).

نکته قابل تامل در مورد استفاده از RT-PCR جهت تشخیص BTV این است که اکثر محققین این تکنیک را بر اساس نمونه‌های تجربی (تزریق به گوسفند حساس) و یا کشت سلول تلقیح شده با ویروس استاندارد طراحی و نتایج آنرا گزارش نموده‌اند. اما کارایی روش خود را در نمونه‌های بالینی ارزیابی نکرده‌اند. Billinis و Tiawari اذعان نموده‌اند علی‌رغم وضوح بالای RT-PCR در نمونه‌های که rRNA استخراج شده آنها از کمیت بالا برخوردار است (نمونه‌های تجربی و کشت سلول آلوده شده به ویروس)، در نمونه‌های بالینی پاسخ PCR اول معمولاً از کیفیت مطلوب برخوردار نیست. این افراد برای رفع این نقیصه استفاده از nPCR را توصیه نموده‌اند (۲۸،۷). در این مطالعه مشابه با تجربه محققین فوق‌الذکر نتایج حاصل از PCR اول در اکثر نمونه‌ها ضعیف یا غیر واضح بود. حال آنکه نتیجه تکثیر ژن S7 در واکنش one step RT-PCR در نمونه کنترل مثبت (سروتیپ BTV1 تهیه شده از انستیتو Pirbright) کاملاً واضح و مطلوب بود. این موضوع احتمالاً بدلیل پائین بودن مقدار ویروس یا rRNA استخراج شده آن بود. در هر حال پس از بکارگیری nPCR، با تولید باند قوی و اختصاصی ۷۶۹bp مشکل مورد اشاره مرتفع گردید. ضمن اینکه تعداد قابل توجهی نمونه مثبت شناسایی شد که در PCR اول قابل تشخیص نبودند. این موضوع قطعاً بدلیل افزایش حساسیت آزمایش بوده است. شایان ذکر است که در کلیه واکنش‌های RT-PCR و nPCR علاوه بر کنترل مثبت، نمونه کنترل منفی (ویروس تب برفکی یا آب DEPC) مورد استفاده قرار گرفت.

قابل اشتباه است. نکته دیگر اینکه در کشور ما مانند اکثر نقاط دنیا، زبان آبی یک بیماری اندمیک است. لذا عمدتاً علائم مشخص بالینی از این بیماری در گوسفند مشاهده نمی‌شود. ضمناً برخی از گوسفندان بومی نسبت به گوسفندان اصلاح نژاد شده مخصوصاً نژادهای دارای پشم ظریف، به BTV مقاوم‌تر بوده و علائم مشخص بالینی نشان نمی‌دهند (۱۶،۲۰). به این ترتیب لزوم بکارگیری روش‌های آزمایشگاهی مناسب جهت تشخیص قطعی و تفریقی زبان آبی در کشور مشخص می‌گردد.

بطور کلی دو روش مستقیم و غیر مستقیم جهت تشخیص ویروس زبان آبی وجود دارد. در روش مستقیم آنتی ژن یا اسید نوکلئیک ویروس مورد شناسایی قرار می‌گیرد. در این دسته می‌توان به تکنیک‌هایی از قبیل تزریق به عروق پرده کوریو آلتوتوئید جنین مرغ، پاساژ بر روی سلول‌های حساس، ELISA و Ag capture RT-PCR اشاره نمود.

در روش تشخیص مستقیم عموماً به این صورت عمل می‌شود که ابتدا نمونه خون حیوان مشکوک به بیماری به عروق جنین مرغ ۱۰ الی ۱۲ روزه تزریق می‌شود. در صورت تلف شدن جنین طی ۷ روز و نشان دادن علائم هموراژی، عصاره بافت‌های آن بر روی سلول‌های حساس مانند BHK، vero یا سلول لاین حشرات پاساژ داده می‌شود. BTV در سلول پستانداران ایجاد CPE می‌نماید. اما جهت تأیید قطعی باید از Ag capture ELISA، ایمونوپراکسیداز و یا SN استفاده کرد. طی این مراحل صرف نظر از هزینه بالا، ۳ الی ۴ هفته زمان نیاز دارد. مضاف بر اینکه این روش همواره موفقیت آمیز نیست. به دلیل اینکه معمولاً زمانی نمونه‌های بالینی اخذ می‌شوند که دام مرحله تب و ویرمی را سپری نموده است. نتیجتاً عیار ویروس در بافت‌های آزرده و خون بشدت کاهش یافته و مقدار آن به زیر آستانه حساسیت تست‌های مذکور رسیده است (۴،۵،۱۲).

در مطالعه‌ای که توسط Breard و همکاران در سال ۲۰۰۵ انجام گرفت از کلیه نمونه‌های خون دام‌های مشکوک به زبان آبی فقط یک مورد جداسازی ویروس به روش فوق امکان پذیر شد. در حالیکه تمام نمونه‌های مورد بررسی از نظر PCR مثبت بودند (۱۹). همچنین در مطالعه‌ای که توسط Maclachlan و همکاران در سال ۱۹۹۴ صورت گرفت حساسیت تزریق به عروق جنین مرغ با PCR و خوردن به پشه‌های کولیکوئیدس با یکدیگر مقایسه گردید. تحقیق آنها نشان داد که در روش آلوده کردن پشه کولیکوئیدس، حدود ۲ هفته، تزریق به عروق جنین ۱۲ الی ۸ هفته و در روش PCR بین ۱۱ الی ۲۰ هفته پس از آغاز عفونت امکان تشخیص ویروس در خون وجود دارد (۲۱).

بطور کلی در ارزیابی ویروس‌ها RT-PCR از بالاترین سطح حساسیت و ویژگی در بین کلیه تست‌های تشخیصی برخوردار است. با این روش می‌توان RNA ویروس را مستقیماً در نمونه‌های مختلف بالینی جستجو نمود. Biteau-coroller و همکاران در سال ۲۰۰۶ و Afshar در سال ۱۹۹۴ در بررسی‌های خود این روش را به عنوان test golden تشخیص BTV معرفی نمودند. در گوسفند ۴ الی ۸ روز پس از گزش توسط پشه ناقل ویروس، عیار آن



می باشد (۱۱،۲۷). لذا درصدی از دام‌ها ی آلوده که در این فاز زمانی نمونه‌گیری می‌شوند، منفی تشخیص داده خواهند شد. جهت رفع این نقیصه استفاده از PCR توصیه می‌شود.

References

1. Afshar, A. (1994) Bluetongue: Laboratory diagnosis. *Com. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 17:221-242.
2. Afshar, A., Dulac, G.C., Riva, J. (1992) Comparison of blocking dot ELISA and competitive ELISA ,using a monoclonal antibody for detection of bluetongue virus antibodies in cattle. *Vet. Microbiol.* 31:33-39.
3. Afshar, A., Keyvanfar, H. (1974) Occurrence of precipitating antibodies to bluetongue virus in sera of farm animal in Iran. *Vet. Rec.* 94:233-235.
4. Anthony, S., Jones, H., Darpel, K.E., Elliott, H., Maan, S. (2007) A duplex RT-PCR assay for detection of genome segment 7 (VP7) from 24 BTV serotypes. *J. Virol. Method.* 141:188-197.
5. Anthony, S., Maan, S., Samuel, A.R., Mellor, P.S., Mertens, P.P.C. (2004) Differential diagnosis of bluetongue virus using a reverse transcriptase-polymerase chain reaction for genome segment 7. *Vet. Ital.* 40:546-551.
6. Aradaib, I.E., Mohamed, M.E.H., Abdalla, T.M., Sarr, J., Abdalla, M.A., Yosef, M.A.M., Hassan, Y.A., Karrar, A.R.E. (2005) Serotyping of United State and some African serotypes of Bluetongue virus using RT-PCR. *Vet. Microbiol.* 111:145-150.
7. Aradaib, I.E., Schore, C.E., Cullor, J.S., Osburn, B.I. (1998) A nested PCR for detection of North American isolate of bluetongue virus based on NS1 genome sequence analysis of BTV-17. *Vet. Microbiol.* 59:99-108.
8. Aradaib, I.E., Smith, W.L., Osburn, B.I., Cullor, J.S. (2003) A multiplex PCR for simultaneously detection and differentiation of North American serotypes of bluetongue and epizootic haemorrhagic disease viruses. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 26:77-87.
9. Batten, C.A., Bachanek-Bankowska, K., Bin-Tarif, A., Kogosana, L., Swain, A.J. (2007) bluetongue virus: European Community inter-laboratory

Singer و همکاران در سال ۱۹۹۸ و Bread و همکاران در سال ۲۰۰۵ در مطالعات خود نشان دادند که نتایج PCR و C-ELISA در مطالعات میدانی ارتباط مستقیم با یکدیگر ندارند (۱۴،۲۷). در مطالعه حاضر نیز مشابه با نتایج فوق تعداد موارد PCR مثبت با الیزا یکسان نبود. در توجیه علت فزونی نمونه‌های سرولوژیک مثبت نسبت به PCR باید افزود که پس از سرو کنورسیون تا مدت‌های طولانی (گاهی تا سال‌ها) سطح آنتی بادی در خون بالا می‌ماند. به اعتقاد Dahich و Clavijo یکی از دلایل طولانی بودن مدت پاسخ سرولوژیک در عفونت با BTV تحریک مداوم سیستم ایمنی دام به دلیل اتصال ویروس به غشا RBC ها و باقیماندن با آنها تا پایان عمر سلول‌ها می‌باشد (۱۵،۱۶،۲۷). قطعاً این گونه دام‌ها از نظر PCR نیز مثبت هستند و بمحض حذف RBC های آلوده از خون محیطی از این حیث منفی خواهند شد، اما از نظر سرولوژیک همچنان مثبت باقی خواهند ماند. در واقع PCR در شناسایی دام‌هایی که به تازگی دچار عفونت شده و هنوز در آنها سروکنورسیون اتفاق نیفتاده است بسیار ارزشمند است.

در این مطالعه مشابه مطالعات قبلی، تعدادی از نمونه‌ها هم از نظر PCR و هم از نظر ELISA مثبت بودند. در تفسیر این مسئله باید گفت که سرم مثبت بودن دام منافاتی با حضور ویروس در خون آن ندارد. عبارت دیگر علی‌رغم تولید آنتی بادی حضور ویروس در خون استمرار می‌یابد. البته این موضوع می‌تواند بدلیل آلودگی مجدد دام‌های سرم مثبت با سروتیپ‌های هترولوگ ویروس زبان آبی نیز باشد (۱۰،۱۴،۲۷).

در این تحقیق از الیزای رقابتی با هدف جستجوی آنتی بادی ضد BTV استفاده شد. در مطالعات سرولوژیک (روش‌های تشخیصی غیر مستقیم)، آنتی ژن هدف عمدتاً VP7 است. بدلیل اینکه پروتئین مذکور یکی از ایمیو نوژن‌ترین ساختارهای پروتئینی ویروس زبان آبی می‌باشد. یکی از نقاط ضعف تست‌های سرولوژیک وجود واکنش‌های متقاطع بین گروه‌های سرمی در جنس اربی ویروس می‌باشد. این مشکل در مورد تست AGID بیشتر خودنمایی می‌کند. برای رفع این نقیصه توصیه می‌شود از آنتی بادی مونوکلونال بجای آنتی سرم پلی کلونال استفاده گردد. امروزه کیت‌های تجاری C-ELISA بدلیل استفاده از آنتی بادی مونوکلونال بر علیه VP7 این مشکل را حل نموده است و به عنوان یک روش معتبر در تشخیص بیماری زبان آبی بکار می‌رود (۲۰،۱۶،۲۹).

در مطالعه حاضر جهت بررسی وجود آنتی بادی ضد BTV از کیت Vet-ID استفاده شد. بر اساس نتایج حاصل از مطالعاتی که توسط Batten و همکاران در سال ۲۰۰۷ در سطح آزمایشگاه‌های رفرانس زبان آبی در اروپا صورت گرفته است، کارایی این کیت از نظر سرعت عمل بسیار بالا بوده و ویژگی آن ۱۰۰ درصد می‌باشد. این کیت قادر است کلیه ۲۴ سروتیپ ویروس زبان آبی را شناسایی نماید. تنها نقطه ضعف C-ELISA حساسیت محدود آن می‌باشد (۹). علت این امر تاخیر در تشکیل آنتی بادی است. این زمان حدود ۷ الی ۲۸ روز پس از آغاز عفونت می‌باشد. طبیعتاً در این دوره حساسیت تست پائین است اما بعد از دوره مذکور حساسیت تست در حد ۱۰۰ درصد



- comparison tests to evaluate ELISA and RT-PCR detection methods. *Vet. Microbiol.* 11:1-9.
10. Billinis, C., Koumbati, M., Spyrou, V., Nomikou, K., Mangana, O. (2001) Bluetongue virus diagnosis of clinical cases by a duplex reverse transcription -PCR: a comparison with conventional methods. *J. Virol. Method.* 98:77-89.
 11. Biteau-Coroller, F., Gerbier, G., Stark, K.D.C., Grillet, C. (2006) Performance evaluation of competitive ELISA test used for bluetongue antibody detection in France, a recent infected area. *Vet. Microbiol.* 118:57-66.
 12. Breard, E., Hamblin, C., Hammoumi, S., Sailleau, C., Dauphin, G., Zientara, S. (2004) The epidemiology and diagnosis of bluetongue with particular reference to Corsica. *Res. Vet. Sci.* 77:1-8.
 13. Breard, E., Sailleau, C., Coupier, H., Mure-Ravaud, K. (2003) Comparison of genome segments 2, 7 and 10 of bluetongue viruses serotype 2 for differentiation between field isolates and the vaccine strain. *Vet. Res.* 34:777-789.
 14. Breard, E., Sailleau, C., Hamblin, C., Zintara, S. (2005) Bluetongue virus in the French Island of Reunion. *Vet. Microbiol.* 106:157-165.
 15. Clavijo, A., Heckert, R.A., Dulac, G.C., Afrshar, A. (2000) Isolation and identification of bluetongue virus. *J. Virol. Method.* 87:13-23.
 16. Dahich, H. (2004) Bluetongue :an overview of recent trends in diagnosis. *Vet. Ital.* 40:564-566.
 17. Eaton, B.T, White, J.R. (2004) Developing new Orbivirus diagnosis platforms. *Vet. Ital.* 40:525-530.
 18. Girmes, J., M., Jakana, J., Ghosh, M., Basak, A., Roy, P., Stuart, D. (1997) An atomic model of the outer layer of the bluetongue virus core derived from X-ray crystallography and electron cryomicroscopy. *Structure.* 5.7:885-893.
 19. Heidner, H.W., Iezzi, L.G., Osburn, B.I. (1991) Genetic variation and evolutionary relationships amongst bluetongue viruses endemic in the United States. *Virus Res.* 21:91-109.
 20. Maclachlan, N.J. (2004) Bluetongue: Pathogenesis and duration of viremia. *Vet. Ital.* 40:462-467.
 21. MaLachlan, N.J., Nunamker, R.A., Katz, J.B., Swayer, M.M., Akita, G.Y. (1994) Detection of bluetongue virus in blood of inoculated calves: comparison of virus isolation, PCR, assay and in vitro feeding *Culicoides varipennis*. *Arch. Virol.* 136:1-8.
 22. McColl, K.A., Gould, A.R. (1991) Detection and characterisation of bluetongue virus using the polymerase chain reaction. *Virus Res.* 21:19-34.
 23. Mertens, P.P.C., Maan, N.S., Prasad, G., Samuel, A.R., Shaw, A.E. (2007) Design of primers and use of RT-PCR assays for typing European bluetongue virus isolate : differentiation of field and vaccine strains. *J. General Virol.* 88:2811-2823.
 24. Parsonson, I.M., McColl, K.A. (1995) Retrospective diagnosis of bluetongue virus in stored frozen and fixed tissue samples using PCR. *Vet. Microbiol.* 46:143-149.
 25. Roy, P. (1989) Bluetongue virus genetic and genome structure. *Virus Res.* 13:179-206.
 26. Shad, G., Wilson, W.C., Mecham, J.O., Evermann, J.F. (1997) Bluetongue virus detection: a safer reverse-transcriptase polymerase chain reaction for prediction of viremia in sheep. *J. Vet. Diag. Inves.* 9:118-124.
 27. Singer, R.S., Boyce, W.M., Gardner, I.A., Johnson, W.O., Fisher, A.S. (1998) Evaluation of bluetongue virus diagnostic in free-ranging bighorn sheep. *Prev. Vet. Med.* 35:265-282.
 28. Tiawari, A.K., Kataria, R.S., Desai, G., Butchaiah, G., Bandyopahyay, S. K. (2000) Characterization of Indian Bluetongue virus Isolate by RT-PCR and restriction enzyme analysis of VP7 gene sequence. *Vet. Res. Commun.* 24:401-407.
 29. Wade-Evans, A.M., Mertens, P.P.C, Bostock, C.J. (1990) Development of polymerase chain reaction for the detection of bluetongue virus in tissue samples. *J. Virol. Method.* 30:15-24.
 30. Wieslaw, N. (2007) Detection of bluetongue virus in blood samples of infected ruminant by RT-PCR for genome segment S7. *Bull. Vet. Inst. Pulawy.* 51:199-201.
 31. Zientara, S., Breard, E., Sailleu, C. (2004) Bluetongue diagnosis by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Vet. Ital.* 40:531-537.



BLUETONGUE VIRUS DETECTION IN SHEEP BY RT-PCR

Azimi, S.M.^{1*}, Kayvanfar, H.², Mahravani, H.¹

¹Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj-Iran.

²Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran-Iran.

(Received 17 April 2008 , Accepted 23 November 2008)

Abstract:

During 1387-86, total number of 120 blood samples gathered from sheep with bluetongue-like clinical sign. The samples collected from seropositive regions. After separating serum, they were evaluated by competitive ELISA for detecting Ab against VP7 antigen. The full length of S7 gene (1156 bp) amplified by one step RT-PCR. In this method two sets specific primers, targeting 3' and 5' ends of S7 segment, were applied. For confirmation of PCR products in first amplification, nested-PCR was used. By using internal primers the most samples which displayed weak S7 band, produced a sharp and specific internal band (769 bp). By this method the sensitivity of virus detection dramatically increased. Among the blood samples, the number of BTV serogroup positive, nPCR positive, both BTV serogroup and nPCR positive and both BTV serogroup and nPCR negative cases were determined, 41(34.8%), 23(19.2%), 12(10%) and 56(46.6%) respectively. This is the first report about using RT-PCR for BTV detection in Iran. RT-PCR and nPCR molecular technique can be used as a very sensitive and reliable method for BTV detection in blood samples.

Key words: Bluetongue virus, RT-PCR, nested PCR, C-ELISA.

*Corresponding author's email: azimim@ut.ac.ir, Tel: 0261-4570038, Fax: 02614552194

