مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۸۸، دوره ۶۴، شماره ۲، ۱۴۶-۱۴۱

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: ۳ 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 کانون‌هایکه از نظر سرولوژیک وجود ویروس در آنها اثبات‌شده بود جمع‌آوری گردید. پس از جداسازی سرم، توسط الیزای رقابتی آنتی بادی ضدآنتی ژن VP7 در آنها رد یابی گردید. کل ژن S7 بطول ۱۱۵۶bp توسط RT- PCR one step و با استفاده از دو زوج پرایمر اختصاصی مکمل انتهای ۳َ و ۵َ قطعه مذبور تکثیر یافت. در تعدادقابل توجهی از نمونه‌ها باند ۱۱۵۶bp بشکل ضعیف یا غیر واضح مشاهده‌شد. برای رفع این مشکل از آزمایش nested-PCR با بکارگیری پرایمرهای داخلی ژن S7 استفاده‌گردید. باند حاصل قطعه‌ای بطول ۷۶۹bp بود. به این وسیله علاوه بر تایید نتایج PCR اول حساسیت‌شناسای ویروس افزایش یافت. از بین نمونه‌های موردآزمایش، ۴۱ مورد (۳۴/۲ درصد) از نظر وجود آنتی بادی ضدگروه‌سرمی زبان‌آبی، 23مورد(۱۹/۲درصد) از نظر nPCR، ۱۲مورد (۱۰ درصد) از نظر الیزا و nPCR مثبت و ۵۶مورد (۴۶.۶درصد) از نظر الیزا و nPCR منفی تشخیص داده‌شدند. این مطالعه اولین گزارش در خصوص بکارگیری RT-PCR جهت‌شناسایی ویروس زبان‌آبی در ایران است. از RT-PCR و nested PCR به عنوان یک روش بسیار حساس مولکولی جهت شناسایی ویروس زبان‌آبی در نمونه‌های خون می‌توان بهره برد.

واژه‌های کلیدی: واژه‌های کلیدی - ویروس زبان‌آبی، RT - PCR، nested-PCR و الیزای رقابتی.

مقدمه

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 نشخوار کنندگان اهلی و وحشی ایجاد عفونت می‌کند. اما از نظر اقتصادی بیماریزایی مهم آن در نژادهای پشم ظریف گوسفندنظیرمرینوس و Dorset poll می‌باشد. این ویروس برای نشخوارکنند گان وحشی درگونه‌هایی مانند، antelope desert bighorn sheep, pronghom و white tail deer بشدت بیماریزاست (۲۶). این ویروس در گاو و بز عموماً علائم بالینی ایجاد نمی کند. 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 سایرنقاط 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 ۳۵ 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 دنیا می‌باشد، گسترش یافته است(۳۰،۳۱).

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 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 ۵۰درصد 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 وجهی 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 متغییر ترین پروتئین پیکر ویروس بوده و ۲۴ سروتیپ موجود در این گونه بواسطه تغییرتوالی 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 قشرسطحی 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 پروتیین VP3 است. core، ژنوم ویروس را احاطه کرده و حاوی پروتئین‌های VP1 (پلی مراز) VP4 (آنزیم کلاهک گذاری) و VP6 (آنزیم هلیکاز) می‌باشد. ویروس زبان آبی دارای سه پروتئین غیر ساختمانی به نام‌های NS2, NS1, NS3 است، نقش این پروتئین‌ها عمدتاً در رهایی ویروس از سلول‌های آلوده در حین عفونت می‌باشد(۱۸،۲۵).

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۰۲۶۱-۴۵۷۰۰۳۸ نمابر: ۰۲۶۱-۴۵۵۲۱۹۴ Email: azimim@ut.ac.ir

در ۵۰ سال اخیر روش های 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، بکار گیری انواع کشت سلول حشره و پستاندار و استفاده از روش های سرو لوژیک مانند ELISA، AGID و SN. در بین تمام این روش ها، تکنیک های مولکولی مانند RT-PCR انقلابی در زمینه تشخیص و مطالعات اپیدمیولوژیک این ویروس ایجاد نموده است(۱۷).

روش های مولکولی علاوه بر افزایش سرعت تشخیص، از حساسیت و ویژگی بسیار بالا برخوردار می باشند. با بکارگیری پرایمرهای اختصاصی می توان گونه های مختلف اربی ویروس رااز یکدیگر تفکیک نمود(۲۲). تاکنون روش های متنوعی از RT-PCR جهت شناسایی BTV بکار گرفته شده است. معمولا ژن هایی که برای تشخیص گروه سرمی زبان آبی مورد استفاده قرار می گیرند در کلیه سروتیپ ها حراست شده است. این ژن ها شامل قطعات ژنومی تولید کننده پروتیین های core و پروتیین های غیر ساختمانی از قبیل S7,S10,L3,L1 و N6 هستند. در بین ژن های 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 می نمایند. به این طریق علاوه بر تایید تشخیص، حساسیت شناسایی ویروس مورد نظر در نمونه های بالینی افزایش خواهد یافت. طبق بررسی های انجام شده حساسیت PCR دوم (nPCR) نسبت به PCR اول ۱۰۰ الی ۱۰۰۰ برابر می باشد. این روش مخصوصا زمانیکه 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. ضمنا جهت تایید تشخیص PCR اول و افزایش حساسیت ردیابی ویروس از nested-PCR استفاده شد.

مواد وروش کار

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

با توجه به اینکه بیماری زبان آبی یک بیماری فصلی بوده وشیوع آن وابسته به فعالیت پشه های کولیکوئیدس آلوده می باشد. اوج شیوع بیماری از اواسط فصل بهار تا اوایل فصل پاییز است. البته در کانون های مختلف با توجه به شرایط آب و هوایی، زمان شروع و پایان فعالیت پشه کمی متفاوت است. با توجه به ملاحظات فوق نمونه ها طی سال ۸۷-۱۳۸۶ جمع آوری شدند.

نمونه ها که شامل خون کامل بود توسط venoject حاوی EDTA اخذ گردیده ودر مجاورت یخ سریعا به مؤسسه رازی انتقال داده شدند. برای افزایش احتمال دست یابی به ویروس، نمونه ها از گوسفند انی اخذ شد که مشکوک به ابتلا به زبان آبی بودند. بعبارت دیگر از دام هایی خون گیری شد که علائمی از قبیل تب، پرخونی مخاط دهان، ضایعات پتی شی در دهان و لنگش داشتند. بعد از دریافت نمونه ها، سرم آنها جدا و در ۲۰-درجه سانتیگراد تا زمان انجام تست الیزا نگهداری شدند. از آنجایی که ویروس زبان آبی به سلول های خونی مخصوصا به غشاء گویچه های سرخ متصل می باشد، از گویچه های سرخ وسفید برای استخراج اسید نوکلئیک ویروس استفاده شد.

تست الیزا: در این مطالعه، الیزای رقابتی (C-ELISA) برای جستجوی آنتی بادی ضد گروه زبان آبی بکار گرفته شد. برای این منظور از کیت تجارتی ID-Vet استفاده گردید. اساس این نوع الیزا بررقابت بین آنتی بادی های موجود در سرم با آنتی بادی مونوکلونال ضد VP7 استوار است. رقابت بین سرم و آنتی بادی مونوکلونال در اتصال به VP7 موجود درکف پلیت، تعیین کننده نتیجه تست است.

استخراج Viral RNA: RNA ای ویروس توسط کیت viral RNA extraction QIAamp (cat.no.۵۲۹۰۶) از خون استخراج شد. برای این منظور طبق توصیه کیت عمل گردید. بطور خلاص ۱۴۰ul خون با ۵۶۰ul بافر AVL و ۵۶۰ul اتانل ۹۶ درصد مخلوط نم، سپس ۶۳۰ul از مخلوط حاصل درمیکرو تیوب های spin column سانتریفوژ گردید. پس از شستشو با بافرهای AW1 و AW2 توسط 50ul elution buffer، RNA ای 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 دو زوج پرایمر اختصاصی ژن S7 جهت تکثیر این قطعه استفاده شد. اندازه محصول مورد انتظار ۱۱۵۶ باز بود.

Reverse(SZ-2):5 -gtaagtgtaatctaagaga-3

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

Forward(SA-1):5 -gttaaaaaatcgttcaagatg-3

Reverse(SA-2):5 -gtaagtttaaatcgcaagacg-3

برای انجام RT- PCR از کیت one step شرکت Qiagen استفاده گردیده ومطابق با روش ارایه شده توسط Wieslaw وهمکاران در سال ۲۰۰۷ عمل شد(۳۰).

MasterMix شامل: ۱۰ul با فر 5x، ۲ul (10Mm) dNTP، ۰/۵ul (20pmol) از هر پرایمر، ۲ul آنزیم، ۵ul RNA ای ویروس بود. نهایتاً توسط DEPC حجم نهایی به ۵۰uL رسانده شد. سپس نمونه ها 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 پلی مراز 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

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

استان	تعداد نمونه	تعداد الیزا مثبت	تعداد nPCR مثبت	تعداد nPCR والیزا مثبت
قم	۲۹	۲	3	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

۱دقیقه 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 بهینه سازی روش ارایه شده توسط Anthony و همکاران در سال ۲۰۰۴ انجام گرفت. مخلوط واکنش در حجم ۵۰ul شامل ۵ul از محصول RT-PCR به عنوان template، ۱/۵ul MgCl2(50mM)، 1ul dNTPs(10mM)، 2/5U polymerase، TaqDNA ۵ul، PCR 10X buffer ۵ul و از هر پرایمر (20pmol) 1ul تهیه شد(۵). توالی پرایمرهای مورد استفاده به شرح ذیل بود:

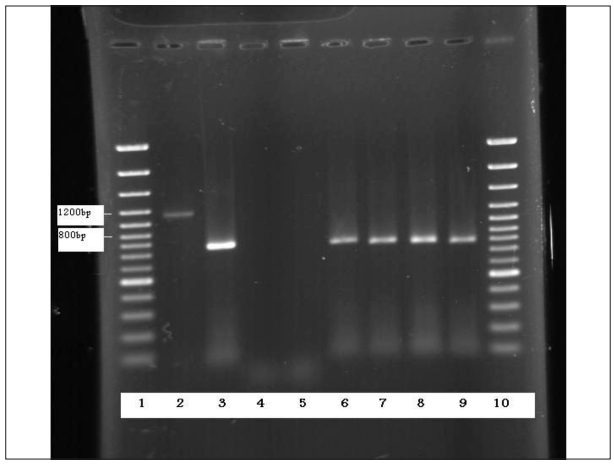
Forward(IntS7F):5 -acaactgatgctgcgaatga-3

Reverse(IntS7R):5 -aacccacacccgtgctaagtgg-3

برنامه تکثیر قطعه داخلی ژن S7 به طول ۷۶۹bp طبق برنامه زیر صورت گرفت: یک سیکل ۹۵درجه به مدت ۵دقیقه، ۳۰ سیکل شامل ۹۴ درجه به مدت ۱ دقیقه، ۵۹درجه به مدت ۱ دقیقه، ۷۲درجه به مدت ۱ دقیقه و نهایتا ۱ سیکل ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه. محصول PCR و nPCR در آگارز ۱/۳ درصد با بافر TBE و در ولتاژ 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 ۷ 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، ضمنا 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 مطالعه ارائه شده است. در تصویر ۱ نتایج حاصل از الکتروفورز محصول PCR-RT و nPCR ژن S7 در تعدادی از نمونه‌ها ارائه شده است.



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 در ویروس FMD type O- ستون‌های ۶ تا ۹ نتیجه nPCR در تعدادی از نمونه‌های مثبت - ستون ۱ و ۱۰ مارکر (۱۰۰bp) می‌باشد.

بحث

در سال‌های اخیر شاهد شیوع ناگهانی و گسترده ویروس‌های منتقله توسط حشرات هستیم. BTV یکی از آربوویروس‌های (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 اروپا طی 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 بعضا موارد بالینی مشکوک به زبان آبی در دام‌ها توسط کلینیسین‌ها گزارش شده است. اما متاسفانه بدلیل عدم دسترسی به یک تکنیک معتبر و سریع آزمایشگاهی امکان تائید یا رد آنها وجود نداشته است.

یکی از مشکلات مبارزه و کنترل بیماری‌های عفونی دام‌ها، تشخیص سریع و دقیق آنها است. درمورد 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 با توجه به نوع سویه و حدت ویروس، نژاد دام و شرایط محیطی از فوق حاد تا تحت بالینی متفاوت است. ثانیاً علائم بیماری با سایر بیماری‌های مخاطی ویروسی از قبیل تب برفکی

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 نمی شود. 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 نمی دهند(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 می توان به تکنیک‌هایی از قبیل تزریق به عروق پرده کوریو آلانتوئید جنین مرغ، پاساژ بر روی سلول‌های حساس، Ag capture ELISA و 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 ۱۰الی ۱۲روزه تزریق می‌شود. درصورت تلف شدن جنین طی ۷ روز ونشان دادن علایم هموراژی، عصاره بافت‌های آن برروی سلول‌های حساس مانند vero، BHK یا سلول لاین حشرات پاساژداده می‌شود. BTV در سلول پستانداران ایجاد CPE می‌نماید. اما جهت تأ ئید قطعی باید از Ag capture ELISA، ایمونوپراکسیداز و یا SN استفاده کرد. طی این مراحل صرف نظر از هزینه بالا، ۳الی 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 وویرمی را سپری نموده است. نتیجتاً عیارویروس 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 وهمکاران در سال ۲۰۰۵انجام گرفت از کلیهٔ نمونه‌های خون دام‌های مشکوک به زبان آبی فقط یک مورد جدا سازی ویروس به روش فوق امکان پذیر شد. درحالیکه تمام نمونه‌های مورد بررسی ازنظر 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 وخوراندن به پشه‌های کولیکوییدس با یکدیگرمقایسه گردید. تحقیق آنها نشان داد که در روش آلوده کردن پشه کولیکوییدس، حدود۲ هفته، تزریق به عروق جنین۲الی۸ هفته و در روش PCR بین ۱۶الی ۲۰هفته پس از آغاز عفونت امکان تشخیص ویروس در خون وجود دارد(۲۱).

بطور کلی در اربی ویروس‌ها RT-PCR از بالاترین سطح حساسیت و ویژگی در بین کلیه تست‌های تشخیصی برخوردار است. با این روش می توان RNA ویروس را مستقیماً در نمونه‌ها ی مختلف بالینی جستجو نمود. Biteau-coroller و همکاران در سال ۲۰۰۶وAfshar در سال ۱۹۹۴در بررسی‌های خود این روش را به عنوان test golden تشخیص BTV معرفی نمودند. درگوسفند۴الی ۸ روز پس از گزش توسط پشه ناقل ویروس، عیار آن در خون به اوج خود رسیده و از حداقل ۵ روز تا ۳۸الی ۵۴روز پس از آغاز عفونت نتیجه PCR مثبت شده و گاهی تا ۶ ماه قابل ردیابی است (۱،۱۱).

مطالعه محققین قبلی حساسیت بالای ژن S7 در تشخیص ویروس زبان آبی به روش PCR را نشان داده است(۴،۱۰). از طرف دیگر حراست شده بودن ژن مذبور 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 ۳و۵ژن S7 استفاده گردید. در حال حاضر مشخص شده است که نواحی غیر کد کننده انتهایی قطعه S7 در سروتیپ‌های ۷،۱۵و 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). ضمنا 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 می باشد.

nested-PCR یکی از ساده ترین، سریع ترین ودرعین حال حساسترین روش‌ها جهت تایید قطعات تکثیر یافته درواکنش PCR است. Aradibe و همکاران در سال ۲۰۰۵نشان دادند که حساسیت این روش بحدی است که حتی قادر به شناسای ۰/۱fg از ژنوم ویروس (معادل ۵مولکول ژنوم BTV) در کشت سلول می باشد(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 نموده اند. اما کارایی روش خود را در نمونه‌های بالینی ارزیابی نکرده اند. Billinis و Tiawari اذعان نموده اند علی رغم وضوح بالای RT-PCR در نمونه‌های که RNAی استخراج شده آنها از کمیت بالا برخوردار است (نمونه‌های تجربی و کشت سلول آلوده شده به ویروس)، در نمونه‌های بالینی پاسخ PCR اول معمولا از کیفیت مطلوب برخوردار نیست. این افراد برای رفع این نقیصه استفاده از nPCR را توصیه نموده اند(۷،۲۸). در این مطالعه مشابه با تجربه محققین فوق الذکر 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) کاملا واضح و مطلوب بود. این موضوع احتمالا بدلیل پائین بودن مقدار ویروس یا RNA 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 شناسای شد که در PCR اول قابل تشخیص نبودند. این موضوع قطعا 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.

Singerو همکاران در سال ۱۹۹۸وBreadوهمکاران در سال ۲۰۰۵در مطالعات خود نشان دادند که نتایج PCRوC-ELISA در مطالعات میدانی ارتباط مستقیم با یکدیگر ندارند(۱۴،۲۷). درمطالعه حاضر نیزمشابه با نتایج فوق تعداد موارد PCRمثبت 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 تاسال‌ها) سطح آنتی بادی در خون بالا می‌ماند. به اعتقاد Dahichو Clavijo یکی از دلایل طولانی بودن مدت پاسخ سرولوژیک در عفونت با BTV تحریک مداوم سیستم ایمنی دام به دلیل اتصال ویروس به غشا RBCها و با قیماندن با آنها تا پایان عمرسلول‌ها ی مذبور می‌باشد(۱۵،۱۶،۲۷). قطعا این گونه دام‌ها از نظر PCR نیزمثبت هستند و بمحض حذف RBCهای آلوده از خون محیطی ازاین حیث منفی خواهند شد، اما از نظر سرولوژیک همچنان مثبت باقی خواهند ماند. درواقع PCRدر شناسایی دام‌هایکه به تازگی دچار عفونت شده و هنوز در آنها سروکنورسیون اتفاق نیافتاده است بسیار ارزشمند است.

دراین مطالعه مشابه مطالعات قبلی، تعدادی از نمونه‌ها هم از نظر PCR وهم از نظر ELISA مثبت بودند. در تفسیر این مسئله باید گفت که سرم مثبت بودن دام منافاتی با حضور ویروس در خون آن ندارد. بعبارت دیگر علی رغم 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).

دراین تحقیق ازالیزای 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 مذبور یکی از ایمو نوژن ترین 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 خود نمایی 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 برعلیه VP7 این مشکل را حل نموده است و به عنوان یک روش معتبر در تشخیص بیماری زبان آبی بکار می‌رود(۲،۱۰،۱۶،۲۹).

درمطالعه حاضر جهت بررسی وجود آنتی بادی ضد BTV از کیت Vet-ID استفاده شد. بر اساس نتایج حاصل از مطالعاتی که توسط Battenو همکاران در سال ۲۰۰۷ در سطح آزمایشگاه‌های رفرانس زبان آبی در اروپا صورت گرفته است،کارآیی این کیت از نظر سرعت عمل بسیار بالا بوده و ویژگی آن ۱۰۰درصد 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 تأ خیر در تشکیل آنتی بادی است. این زمان حدود ۷الی ۲۸ روز پس از آغاز عفونت می‌باشد. طبیعتاًدر این دوره حساسیت تست پائین است اما بعد از دوره مذکورحساسیت تست در حد ۱۰۰درصد می‌باشد(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 PCRتوصیه 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. Infec. 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

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 2,7and 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 cryomiroscopy. 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. Merttens, 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 VP7gene 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.

J.Vet.Res. 64,2:141-146,2009

BLUETONGUE VIRUS DETECTION IN SHEEP BY RT-PCR

Azimi,S.M.[1]*, Kayvanfar,H.[2], Mahravani, H.[1]

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

[2] *Department 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**