

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 میکرو بیولوژی، 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 از سویه NADL بهینه سازی گردید. در آزمایش RT-PCR، قسمتی از منطقه غیر قابل ترجمه ناحیه ۵ ویروس به طول ۲۴۹ جفت باز تکثیر شد. محصول PCR در وکتور pTZ57R/T کلون گردید و نتیجه تعیین ردیف اسیدهای نوکلئیدی آن اختصاصی بودن آزمایش را تایید نمود. سپس پرایمرهای داخلی انتخاب و آزمایش Nested-PCR انجام گردید و یک قطعه DNA به طول ۱۵۵ جفت باز تکثیر شد. میزان حساسیت آزمایش RT-PCR، 10^4 TCID₅₀ و میزان حساسیت آزمایش Nested-PCR در تشخیص ویروس BVDV در کشت سلول، 10^2 TCID₅₀ تعیین گردید. تعداد ۷ نمونه از کشت‌های سلولی با سه روش PCR، ELISA و Nested-PCR مورد آزمایش قرار گرفتند. 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.

(Reid, 1995). ویروس NCP در این کشت‌ها هیچ ردیابی 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 زرده‌های 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 در سال ۲۰۰۰ صورت پذیرفته است نشان داده شده که کشت‌های سلولی در بانک سلولی که منشاء آنها از سلول‌های هامستر با کلیه خرگوش و یافیروبلاست جنین مرغ بوده است در اثر مواد آلوده به ویروس، آلوده گشته‌اند. نوع روش تشخیص آلودگی کشت‌های سلولی به BVDV 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 برار جهیت روش‌های مولکولی تاکید شده است (Makoschey *et al.*, 2003; Given *et al.*, 2002; Studer *et al.*, 2002; Cornish *et al.*, 2005). اخیراً استفاده از روش‌های جدیدتری مانند PCR real-time برای تشخیص pestivirusها گزارش شده است (2003).

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 pestivirus است (Harasawa, 1994). این ویروس از جنس Flaviviridae و متعلق به خانواده Regemortel *et al.*, 2000) می‌باشد (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 (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 (FBS) Fetal Bovine Serum 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 بیوتایپ BVDV را دارا می‌باشد. وجود چنین آلودگی‌هایی در FBS باعث آلوده شدن کشت‌های سلولی می‌گردد



واکنش RT-PCR: ساخت اولین رشته cDNA در حجم ۴۰ میکرولیتر و به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انجام گردید. این واکنش حاوی ۴ میکرولیتر از RNA استخراج شده (0.5-2ug)، یک میکرولیتر از پرایمر (ng) Reverse (250)، یک میکرولیتر از مخلوط dNTP (10mM)، ۴۰ واحد Rnase Inhibitor، ۴۰ واحد آنزیم Reverse-Transcriptase و ۸ میکرولیتر از بفر آنزیم RT حاوی 1.5 mM MgCl₂، 7.5 mM KCl، Tris-HCl (pH 8.3)، 1 mM dithiothreitol، 10 mM می باشد. سپس نمونه های 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 ویروس های BVDV، پرایمرهای مورد استفاده از سکانس منطقه غیر قابل ترجمه ناحیه ۵' (non-coding region) ژنوم ویروس بر اساس گزارش های موجود (1994 Harasawa, انتخاب گردیدند به طوری که قادر به شناسایی این ژن در کلیه ویروس های BVDV باشند. پرایمرهای انتخاب شده عبارتند از: AGC-3' و TACAG-3' و Pepsti-F1 5'-ATGCCC(A/T)(C/T)AGTAGGACT شامل ۱۰ میکرولیتر از محصول واکنش RT، بفر PCR حاوی 8.0 mM Tris - HCl، 1.5 mM MgCl₂، 50 mM KCl، 10 mM (pH: dNTP، ۲۵۰ نانوگرم از هر یک از پرایمرهای Forward و Reverse و یک واحد آنزیم Taq DNA Polymerase (سیناژن) می باشد. واکنش با استفاده از دستگاه و با برنامه حرارتی ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴ دقیقه (یک سیکل) و سپس ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه (۳۰ سیکل) و نهایتاً ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه (یک سیکل) آغاز گردید. محصول PCR به روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز گردید 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، کلونینگ و تعیین توالی نوکلئوتیدی محصول PCR: DNA تکثیر شده، از پرایمرها، dNTPها و نمک های 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 نوکلئوتیدی محصول PCR با سکانس های موجود در بانک ژن مقایسه گردید.

تعیین حساسیت آزمایش PCR: برای تعیین حساسیت آزمایش رقت های ۱/۱۰ تا ۱/۱۰۰ از تیترو ویروس اولیه (۱۰^۶) تهیه گردید. (از ۱۰^۶ تا ۱۰^۱). 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 شرایط PCR که در بالا ذکر شد انجام گردید. سکانس پرایمرهای Nested-PCR به صورت 3'-CGA C-3' (A/G) GTT TGC AGC ACC CTA TCA-3' و 5'-AGT CGT CAG

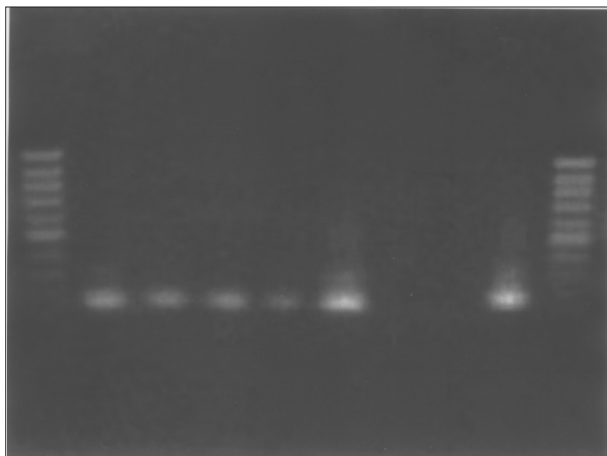
et al., 2006; Willoughby et al., 2006; Letellier and Kerkhofs, (Hoffmann). با استفاده از این روش، حساسیت آزمایش تا حد تشخیص ۱۰ کیپی از RNA ویروس در هر نمونه گزارش شده است (Hoffmann et al., 2006). در مطالعه دیگر حساسیت این آزمایش ۱۰^۶-۱۰^۱ TCID₅₀ از تیترو ویروس گزارش شده است (Baxi et al., 2006). از طرفی آلودگی کشت های سلولی به این ویروس که برای امور تحقیقاتی استفاده می شود می تواند بر روی نتایج آزمایش ها تاثیر گذارد. لذا تشخیص این ویروس در کشت های سلولی از اهمیت فوق العاده ای برخوردار می باشد.

مواد و روش کار

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 ۱۰ درصد FCS (Gibco, Pestivirus and Mycoplasma free) در زمان رشد سلولها و ۲ درصد در زمان نگهداری آنها مورد استفاده قرار گرفت. کشت های سلولی غیر آلوده و آلوده به طور جداگانه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. پس از ۴۸-۴۰ ساعت که علائم CPE در ۷۰ درصد کشت سلول مشاهده گردید، سلول ها جمع آوری گردیدند. تعیین تیترو 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 آلوده سازی با ویروس NCP و انکوباسیون لازم در ۳۷ درجه سانتیگراد، وجود BVD بوسیله Indirect Fluorescent Antibody (IFA) به اثبات رسید. در این روش ابتدا سلول ها با استفاده از متانل به مدت ۲۰ دقیقه ثابت گردیدند و سپس با آنتی بادی اولیه (سرم هیپرایمن خرگوش علیه BVDV) به مدت یک ساعت انکوبه شدند. پس از ۳ بار شستشو، آنتی بادی ثانویه که به آن Fluorescein isothiocyanate (FITC) متصل شده بود اضافه گردید و همانند قبل انکوبه و شستشو شدند و نهایتاً نتایج ثبت گردید. آنتی بادی اولیه مورد استفاده در آزمایش IFA از سرم گاوهای ایمن تهیه شده است. این سلول ها نیز جمع آوری گردید.

استخراج RNA: استخراج RNA با استفاده از کیت RNAfast (شرکت ژن فناوریان-تهران) از مایع کشت سلول به عمل آمد. روش کار بر اساس دستورالعمل کیت انجام گردید. به طور مختصر، ۳۰۰ میکرولیتر از مایع کشت سلول به ۱ میلی لیتر از محلول RNAfast اضافه گردید. نمونه ها 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 ۷۵ درصد در DEPC - dH₂O، RNA استخراج شده در ۲۰ میکرولیتر آب مقطر (DEPC - dH₂O) حل گردید و تا زمان آزمایش در درجه حرارت ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.





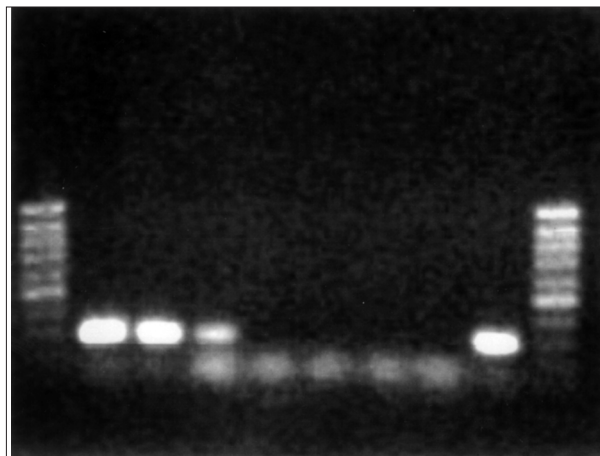
تصویر ۲- تعیین حساسیت آزمایش Nested-PCR در تشخیص Pestivirus در کشت سلول (تولید قطعه DNA ۱۵۵ جفت باز).

ستون ۱ و ۱۰: مارکر DNA (ladder 100) - ستون ۲: نمونه کشت سلول حاوی ویروس BVD غلظت 10^5 TCID₅₀ - ستون ۳: نمونه کشت سلول حاوی ویروس BVD غلظت 10^4 TCID₅₀ - ستون ۴: نمونه کشت سلول حاوی ویروس BVD غلظت 10^3 TCID₅₀ - ستون ۵: نمونه کشت سلول حاوی ویروس BVD غلظت 10^2 TCID₅₀ - ستون ۶: نمونه کشت سلول حاوی ویروس BVD غلظت 10^1 TCID₅₀ - ستون ۷: نمونه کشت سلول حاوی ویروس BVD غلظت 10^0 TCID₅₀ - ستون ۸: نمونه کشت سلول بدون ویروس (کنترل منفی) - ستون ۹: نمونه کشت سلول حاوی ویروس BVDV (کنترل مثبت).

استفاده شد در جدول ۱ آورده شده است. آماده سازی نمونه براساس دستورالعمل شرکت سازنده توسط بافر لیز کننده انجام پذیرفت و به همراه نمونه های کنترل مثبت و منفی کیت، به داخل گودده های پلیت افزوده شد. پس از یک ساعت انکوباسیون و ۳ مرحله شستشو با محلول شستشوی کیت، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی بادی کوئوگه (biotynylated) اضافه و مجدداً یک ساعت انکوبه و متعاقب آن شستشو انجام پذیرفت. سپس ۱۰۰ میکرولیتر محلول avidin-peroxidase conjugate به مدت یک ساعت اضافه و مجدداً شستشو انجام گردید. در آخرین مرحله نیز ۱۰۰ میکرولیتر 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 سلول های BT آلوده به ویروس BVD در مقایسه با کشت سلول عاری از ویروس (کنترل منفی) علائم CPE مشاهده گردید. در سلول های Vero پس از ۶۰-۹۰ ساعت هیچ علائمی از CPE در گروه منفی (سلول غیر آلوده) و کنترل مثبت (سلول های آلوده به سویه NCP) مشاهده نگردید. تشخیص وجود و یا عدم وجود ویروس NCP در سلول های آلوده و در گروه کنترل با استفاده از روش IFT صورت پذیرفت. **تعیین تیترو ویروس:** ویروس های CP در پلیت ۹۶ خانه ای با روش Virus titration Reed & Muench بر حسب TCID₅₀ به روش محاسبه گردید. تیترو ویروس CP به میزان 10^6 TCID₅₀ 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



تصویر ۱- تعیین حساسیت آزمایش RT-PCR در تشخیص Pestivirus در کشت سلول (تولید قطعه DNA ۲۹۴ جفت باز).

ستون ۱ و ۱۰: مارکر DNA (ladder 100) - ستون ۲: نمونه کشت سلول حاوی ویروس BVD غلظت 10^5 TCID₅₀ - ستون ۳: نمونه کشت سلول حاوی ویروس BVD غلظت 10^4 TCID₅₀ - ستون ۴: نمونه کشت سلول حاوی ویروس BVD غلظت 10^3 TCID₅₀ - ستون ۵: نمونه کشت سلول حاوی ویروس BVD غلظت 10^2 TCID₅₀ - ستون ۶: نمونه کشت سلول حاوی ویروس BVD غلظت 10^1 TCID₅₀ - ستون ۷: نمونه کشت سلول حاوی ویروس BVD غلظت 10^0 TCID₅₀ - ستون ۸: نمونه کشت سلول بدون ویروس (کنترل منفی) - ستون ۹: نمونه کشت سلول حاوی ویروس BVDV (کنترل مثبت).

Pepsti-R2 5'-CTC می باشند.

تعیین حساسیت آزمایش Nested-PCR: برای تعیین حساسیت آزمایش Nested-PCR رقت های ۱/۱۰ تا ۱/۱۰۰ تیترو ویروس اولیه (10^6) تهیه گردید. (از 10^6 تا 10^0). 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 سلول های مختلف با روش PCR و Nested-PCR: به منظور استفاده عملی از آزمایش PCR در تشخیص آلودگی های کشت سلولی به pestivirusها، از ۷ نمونه کشت سلول موجود در آزمایشگاه که توسط گروه های مختلف پژوهشی مورد استفاده قرار می گرفت آزمایش به عمل آمد. اسامی کشت سلول های مورد استفاده در جدول ۱ آورده شده است. پس از استخراج RNA، آزمایش RT-PCR بر روی نمونه ها انجام گردید. سپس آزمایش Nested-PCR بر روی نمونه های PCR انجام شد و نتایج ثبت گردید.

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

این روش قادر به تشخیص ویروس های CP (BVDV) و NCP (BVDV) می باشد. روش کار بر اساس دستورالعمل کیت انجام گردید. به طور خلاصه، پلیت های الیزا که توسط آنتی بادی اختصاصی علیه پروتئین های ویروسی پوشیده شده بودند مورد استفاده قرار گرفتند. نمونه های مورد استفاده که در آزمایش ELISA به صورت duplicate



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 عمدتاً با روش ایمنوپراکسیداز بوده است که امروزه با روش RT-PCR در حال جایگزینی است. وجود Pestivirus‌هایی 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 روزیان 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 منشأ BVDV منتشر شده است. واکنش‌های 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 RNA fast (شرکت ژن فناوری، 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 آنجا که 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 باز تکثیر گردید. برای آن که میزان حساسیت آزمایش در تشخیص این ویروس‌ها در کشت سلول مشخص شود، رقت‌های ۱/۱۰ متوالی از ویروس تیترا شده تهیه گردید و از هر کدام استخراج RNA و آزمایش PCR به عمل آمد، حساسیت آزمایش PCR در تشخیص ویروس، 10^4 TCID₅₀ بدست آمد. برای افزایش حساسیت آزمایش و تشخیص مقادیر کمتر از 10^4 TCID₅₀، آزمایش PCR-Nested

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

Nested-PCR	RT-PCR	ELISA	نمونه کشت سلول
+	+	+	کشت سلول حاوی تیترا 10^6 TCID ₅₀ از ویروس BVDV
+	+	+	کشت سلول حاوی تیترا 10^5 TCID ₅₀ از ویروس BVDV
+	+	-	کشت سلول حاوی تیترا 10^4 TCID ₅₀ از ویروس BVDV
+	-	-	کشت سلول حاوی تیترا 10^3 TCID ₅₀ از ویروس BVDV
+	-	-	کشت سلول حاوی تیترا 10^2 TCID ₅₀ از ویروس BVDV
-	-	-	کشت سلول حاوی تیترا 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-R1 و Pesti-F1 یک قطعه DNA به اندازه ۲۹۴ جفت باز تولید گردید. در آزمایش Nested-PCR با استفاده از پرایمرهای Pesti-F2 و Nested (Pesti-R2) یک باند DNA به اندازه ۱۵۵ جفت باز تولید شد.

ردیف نوکلئوتیدی محصول PCR: پس از تعیین ردیف نوکلئوتیدی محصول PCR، نتایج با بانک ژن مقایسه (Blast) گردید. توالی ویروس مورد آزمایش با سکانس ویروس BVDV سویه NADL ۱۰۰ درصد 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 (تصویر ۱). در آزمایش PCR-Nested که بر روی محصولات PCR صورت پذیرفت حساسیت تست تا رقت 10^2 ویروس در ml تعیین گردید (تصویر ۲). نتایج نشان می‌دهد که حساسیت آزمایش PCR-Nested 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، MDBK، Fibroblast مورد آزمایش قرار گرفتند. نمونه‌های HL-60، Fibroblast، Gelia و یک نمونه از (BHK-21-3) (BHK-21) هیچ‌گونه باندی تولید نمودند ولی در آزمایش کشت‌های سلولی ۲ نمونه باقیمانده از (21-1-BHK، BHK-21-2، BHK-21) باندی به اندازه مورد نظر (۲۹۴ جفت باز) مشاهده گردید. در آزمایش PCR-Nested از نمونه‌های فوق، چهار نمونه از کشت‌های سلولی، Fibroblast، BHK-21-1 و BHK-21-3 یک قطعه DNA با اندازه مورد نظر (۱۵۵ جفت باز) تولید نمودند. یک باند ضعیف از این قطعه نیز



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 TCID₅₀ بدست آمد. در آزمایش های PCR و Nested-PCR کنترل های 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 کشت های سلولی برای مشخص کردن آلودگی با pestivirusها استفاده از کیت ELISA تجارتمی باشد. برای مقایسه روش PCR، Nested-PCR و ELISA از کیت (Bio-X Diagnostics, Belgium) استفاده گردید و ۷ نمونه کشت سلولی با هر سه روش آزمایش گردید. کشت های سلولی مورد آزمایش از نمونه های در دسترس و موجود استفاده گردید. ابتدا این نمونه ها 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 تأیید می باشد. کلیه نمونه های کشت سلولی منفی بودند و فقط تیتراهای 10^5 و 10^6 TCID₅₀ از ویروس BVDV مثبت بود. در آزمایش PCR از این نمونه ها، ۲ نمونه از کشت های سلولی مثبت (BHK-21-1، BHK-21-2) و ۵ نمونه منفی (Gelina، HL60)، MDBK، Fibroblast و BHK-21-3 بودند. در آزمایش Nested-PCR، ۲ نمونه مثبت (Fibroblast، BHK-21-1، BHK-21-2 و BHK-21-3)، ۲ نمونه منفی (HL60 و MDBK) و یک مورد مشکوک (Gelina) بود. نمونه مشکوک در آزمایش مجدد منفی بود. همانگونه که ذکر گردید دو نمونه از کشت های سلولی (Fibroblast و BHK-21-3) در آزمایش PCR منفی و فقط در آزمایش Nested-PCR مثبت شدند که این امر نشان دهنده میزان بسیار کم ویروس BVDV در این دو نمونه می باشد. با توجه به صحت نتایج کنترل مثبت و منفی، احتمال آلوده شدن این نمونه ها در حین آزمایش منتفی است. از طرفی چون از کلیه نمونه ها 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 می رسد. با توجه به تفاوت حساسیت آزمایش PCR و Nested-PCR، تنها نمونه هایی 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 Nested-PCR یکصد برابر بیشتر از PCR است، انتظار می رود فقط در آزمایش Nested-PCR نتایج مثبت مشاهده گردد. همانگونه که ملاحظه می گردد، حساسیت آزمایش Nested-PCR در تشخیص آلودگی کشت سلول به BVDV از سایر روش ها بیشتر است. مقایسه روش های مختلف تشخیص در مورد pestivirusها نشان داده است که روش PCR حساس تر از روش های ایمنوفلورسانس، ایمنوپراکسیداز و جداسازی ویروس است (et al 1995)

در سال های اخیر گزارش های زیادی از به کارگیری روش های جدید مولکولی برای تشخیص ویروس BVD منتشر شده است. استفاده از روش real-time PCR از جمله جدیدترین این روش ها است که توسط محققین مختلفی به کار گرفته شده است (Letellier and Kerkhofs, 2003; Hoffmann et al., 2006; Willoughby et al., 2006; Baxi et al., 2006;). 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 10^1-10^2 کپی از RNA ویروس در هر نمونه گزارش نمودند. در صورتی که Baxi و همکاران در سال ۲۰۰۶ حساسیت آن را بر مبنای تیترو ویروس 10^2-10^3 TCID₅₀ گزارش کرده اند. در مطالعه حاضر، حساسیت آزمایش Nested-PCR در تشخیص آلودگی های کشت سلولی به BVDV، 10^2 TCID₅₀ بوده است که تقریباً 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 می رسد در حال حاضر استفاده از روش Nested-PCR در شرایط ایران بهترین گزینه باشد و لذا با توجه به امکانات موجود در آزمایشگاه های تشخیصی، تحقیقاتی و همچنین موسسات واکسن سازی کشور، آزمایش Nested-PCR از کارایی بالایی برخوردار خواهد بود. لازم به ذکر است که منشأ این آلودگی ها معمولاً از سرم جنین گاو یا FCS است که به کشت سلول راه می یابد. استفاده از این روش PCR می تواند آلودگی های کشت سلول را به pestivirusها مشخص نماید. اما بهترین راه جلوگیری از آلودگی، آزمایش سرم های جنین گاو است که به عنوان فاکتور رشد در کشت سلول به کار می رود. بنابراین توصیه می شود که FCS های مورد نیاز قبل از استفاده با این روش آزمایش گردند تا از بروز آلودگی جلوگیری شود. ضمناً کشت های سلولی موجود را می توان 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 زیست فناوری که هزینه تحقیقاتی این مطالعه (با کد ۱۶۰) را تأمین کرده است تشکر و قدردانی می گردد. ضمناً 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 می شود.



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., Schirrneier, 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. *J. Virol.* 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., Almeida-Hill, J., Santosham, M. (1989) Infantile gastroenteritis associated with excretion of pestivirus antigens. *Lancet.* 11: 517-520.



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

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

²Razi 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 TCID₅₀ and 10^2 TCID₅₀, 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

