(مقاله کوتاه)

مقایسه روش‌های الایزا و PCR در تشخیص آزمایشگاهی لوکوز گاوی

دکتر حسن ممتاز[۱*]، دکتر محسن خسروی[۲]، دکتر پوریا قاسمی[۲]

چکیده

ویروس لوسمی گاو(Bovine Leukemia Virus) از جنس دلتا رتروویروس و خانواده رتروویریده واجد سه ۳ ژن ساختمانی اصلی gag,pol,env می‌باشد. به منظور ردیابی پروویروس BLV در گاوهای آلوده به این ویروس و مقایسه دو روش الایزا و PCR در تشخیص آزمایشگاهی بیماری در ایران این مطالعه در دو مرحله روی ۲۰۰ نمونه خون کامل و سرم اخذ شده از گاوهای بالای دو سال در بعضی از نقاط کشور انجام گرفت. در مرحله اول نمونه‌های سرم به روش الایزای غیر مستقیم آزمایش شدند که از ۲۰۰ راس گاو مورد مطالعه تعداد ۷۴ راس واجد پادتن ضد پادگن gp51 ویروس BLV بودند. در مرحله دوم ۳۰ نمونه از دام های سرم مثبت و ۲۰ نمونه از گاوهای به ظاهر سالم (که در آزمایش الایزا پاسخ سرمی منفی نشان داده بودند) به منظور ردیابی پروویروس BLV به روش PCR آزمایش شدند که در این آزمایش تمام نمونه‌های سرم مثبت و ۳ نمونه از گاوهای به ظاهر سالم واجد قطعه ۴۲۷ جفت بازی DNA مربوط به پروویروس BLV بودند.

واژگان کلیدی: *ویروس لوسمی گاو، پروویروس، الایزای غیر مستقیم ، PCR*

The comparison of ELISA and PCR for laboratory diagnostic of bovine leukosis

Momtaz, H. [1*], Khosravi, M.[2], Ghasemi, P. [2]

1- Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran (hamomtaz@ yahoo.com)*

2- Graduated of Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Sharekord, Iran

Bovine leukemia virus (BLV) from deltaretrovirus genus and retrovirus family has three structural genes named gag, pol, env. 200 whole blood and serum samples from affected cattle over two years from different regions of Iran were examined for BLV provirus in two methods. At the first method, samples were detected through indirect ELISA and 74 cases (37%) had antibody against gp51 antigen. The second method, 30 positive serum samples and 20 apparently healthy cattle (negative serum in ELISA) were examined by PCR method for provirus of BLV. In this study, all of positive serum and 3 negative serum samples showed specific 427 bp segment of BLV provirus.

Key words: *Bovine leukemia virus, Provirus, Indirect ELISA, PCR*

مقدمه

بیماری لوکوز انزئوتیک گاو در اثر ویروس لوسمی گاو Bovine Leukemia Virus از جنس دلتا رتروویروس و خانواده رتروویریده ایجاد و به صورت رشد نئوپلاستیک لنفوسیت‌ها که اغلب اعضای بدن را درگیر می‌کند ، اتفاق می‌افتد(۱و۶).

ژنوم رتروویروس‌ها دیپلوئید و هر قطعه هاپلوئیدی آن یک مولکول RNA تک رشته‌ای مثبت با اندازه ۷ تا ۱۱ کیلو باز می‌باشد. رتروویروس‌های کامل واجد سه ۳ ژن اصلی gag که اختصاصی گروه بوده و باعث کد شدن پروتئین‌های هسته مرکزی ویروس می‌شود، pol (پلی مراز) که آنزیم‌های دخیل در تکثیر ویروس یعنی آنزیم رونوشت‌برداری معکوس را کد می‌کند و env (envelope) که باعث کد کردن گلیکوپروتئین‌های غشاء ویروس می‌شود، هستند. این ویروس‌ها قادر به ایجاد پروویروس از جنس DNA در سلول‌های آلوده به خود می‌باشند(۶). در ویروس BLV، پروتئین‌های اصلی هسته مرکزی ویروس، پروتئین‌های p24 , p10 , p12 , p15(1-2) هستند. p24 اولین پروتئین ساختمانی شناخته شده در این ویروس است که به عنوان پادگن داخلی ویروس نامیده شده و وزن مولکولی آن ۲۴۰۰۰ دالتون می‌باشد. گلیکوپروتئین‌های اصلی پوشش خارجی ویروس نیز گلیکوپروتئین‌های gp51 , gp30 , gp64 هستند که وزن مولکولی بیشتری از p24 دارند.

۱*- گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران
hamomtaz@ yahoo.com
۲- دانش آموخته دانشکده دامپزشکی ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

پروتئین p24 و گلیکوپروتئین gp51 دوپادگن اصلی ویروس BLV بوده که اغلب آزمایش‌های سرولوژی بر پایه ردیابی پادتن‌های ضد این دو پادگن استوار است(۱۰). درصدی از دام‌های آلوده به لوکوز از نظر سرمی پاسخ منفی نشان می‌دهند که شناسایی آلودگی در این قبیل گاوها منوط به ردیابی ویروس یا پروویروس BLV در آن‌ها است که در این بین شناسایی پروویروس BLV یا یکی از ژن‌های gag یا env و یا محصولات اصلی آن‌ها یعنی پروتئین p24 و gp51 حائز اهمیت است(۹ و ۱۰). لذا مطالعه حاضر نیز بر پایه ردیابی پروویروس ویروس لوسمی گاو در گلبول‌های سفید خون در گاوهای مبتلا به لوکوز و گاوهای به ظاهر سالم در ایران و مقایسه آن با تشخیص سرمی آلودگی طرح‌ریزی شده است.

مواد و روش کار

۱- *نمونه‌ها*: تعداد ۲۰۰ نمونه خون کامل واجد ماده ضد انعقاد EDTA به حجم ۱۰ میلی لیتر به همراه نمونه سرم از گاوهای مسن تر از ۲ سال از بعضی نقاط کشور خصوصاً استان‌های چهارمحال و بختیاری، اصفهان و آذربایجان شرقی به همراه نمونه ویروس BLV رشد یافته در سلول FLK(Svanova Biotech, Uppsala, Sweden) (به عنوان نمونه کنترل مثبت)، انتخاب شدند.

۲- *آماده‌سازی نمونه‌ها*: نمونه‌های خون فاقد ماده ضد انعقاد اخذ شده به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۵۰۰ rpm سانتریفوژ و سرم هر نمونه جداسازی شد. نمونه‌های خون کامل اخذ شده از هر گاو نیز به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ و لایه بافی کوت (لایه گلبول های سفید خون) از هر نمونه جدا و با افزودن ۴ حجم محلول ۲ درصد استریل Nacl گلبول‌های قرمز لیزو بلافاصله یک حجم محلول استریل ۷/۲ درصد NaCl به هر نمونه لیز شده اضافه و به مدت ۲ دقیقه در ۶۰۰۰ rpm سانتریفوژ و گلبول‌های سفید باقی مانده با افزودن ۱ میلی لیتر سالین بافر فسفات (PBS) شستشو داده شد. بافی کوت جدا شده از هر نمونه در ۱ میلی لیتر PBS به همراه سرم جدا شده از هر نمونه خون تا زمان انجام آزمایش در فریزر ۲۰- درجه نگهداری گردید(۵).

آزمایش سرولوژی: آزمایش نمونه‌های سرم به روش الایزای غیر مستقیم جهت جستجوی پادتن ضد پادگن gp51 ویروس لوکوز گاوی با استفاده از کیت تجاری BLV-gp51-Ab ساخت شرکت Svanova (Svanova Biotech, Uppsala, Sweden) صورت گرفت.

۳- *تخلیص DNA*: جهت تخلیص DNA از بافی کوت مربوط به گاوهای سرم مثبت و تعدادی ازگاوهای سرم منفی از روش فنل ـ کلروفرم استفاده شد(۴).

۵-*انتخاب پرایمر*: از پرایمرهای معرفی شده توسط Rola و Kuzmak که توسط شرکت سیناژن سنتز گردید استفاده شد(۷):

5035: 5`- GTGCCAAGTCTCCCAGAT -3`

5055: 5`- TATAGCACAGTCTGGGAAGGC -3`

۶- *آزمایش PCR*: آزمایش PCR بر اساس دستورالعمل ارائه شده در آزمایشگاه مرکزی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انجام گرفت(۷). در این آزمایش از دستگاه Master cycler gradient (Eppendorf, Germany Co.) استفاده شد.

هر واکنش PCR در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر واجد ۲ میلی مولار $MgCl_2$، ۲۰۰ میلی مول dNTP، ۱ واحد آنزیم Taq DNA polymerase (Roche applied science,Germany Co.)، ۲ میکرومول از هر کدام از زوج پرایمرهای Reverse , Forward و ۵ میکرولیتر بافر 10 X PCR Buffer تنظیم و از برنامه حرارتی ۹۵ درجه ۶ دقیقه و ۳۳ مرحله تکراری ۹۴ درجه ۱ دقیقه، ۵۹ درجه ۱ دقیقه و ۷۲ درجه ۴۵ ثانیه و مرحله انتهایی ۷۲ درجه ۱۰ دقیقه استفاده شد. در هر مرحله از DNA تخلیص شده از ویروس BLV رشد کرده

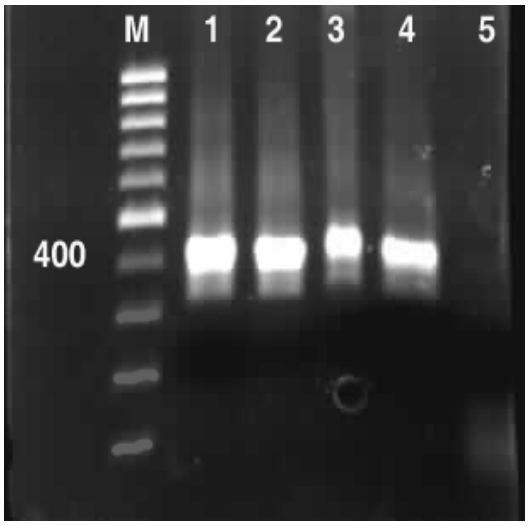
در سلول FLK و آب مقطر بـه عنـوان نمونـه هـای کنتـرل مثبت و منفـی اسـتفاده گردیـد. در پایـان ۱۰ میکرولیتـر از محصول PCR روی ژل ۱ درصـد آگـاروز واجـد اتیـدیوم بروماید در حـضور مـارکر ۱۰۰ جفـت بـازی DNA (Fermentas) الکتروفورز (Bio – Rad) گردید.

نتایج

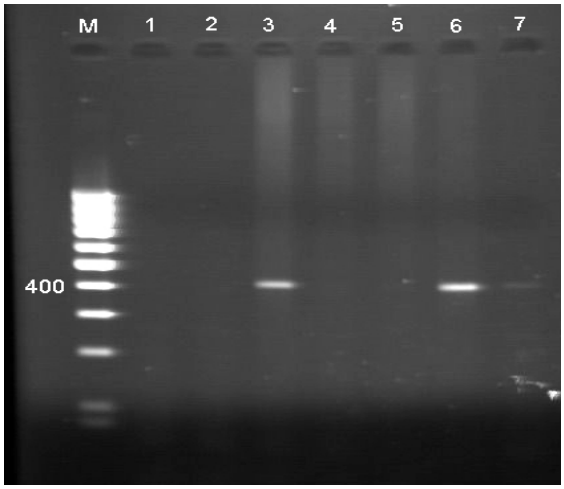
از مجموعه ۲۰۰ راس گاو مورد مطالعه تعداد ۷۴ راس (۳۷ درصد) واجد پادتن ضد پادگن gp51 ویروس BLV بودند که ۳۰ نمونه از این تعداد به همراه ویروس BLV رشد کرده در سلول FLK (به عنوان کنترل مثبت) و۲۰ نمونه از گاوهای به ظاهر سالم (که در آزمایش الایزا پاسخ سرمی منفی نشان داده بودند) موردآزمایش PCR قرار گرفتند که ژل حاصل از نتیجه PCR در نگاره های ۱و۲ و مقایسه نتایج حاصل از انجام آزمایش الایزا با آزمایش PCR در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱- مقایسه نتایج حاصل از آزمایش الایزا و PCR روی تعدادی از نمونه‌های مورد مطالعه

نوع آزمون	PCR مثبت	PCR منفی	جمع کل
الایزا مثبت	۳۰	۰	۳۰
الایزا منفی	۳	۱۷	۲۰
جمع کل	۳۳	۱۷	۵۰



نگاره ۱- محصول PCR نمونه‌های مورد مطالعه (ستون M = مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA، ستون‌های ۱ تا ۴= نمونه‌های مورد مطالعه، ستون ۵= نمونه کنترل منفی)



نگاره ۲- محصول PCR نمونه‌های مورد مطالعه (ستون M = مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA،
ستون ۱= نمونه کنترل منفی، ستون‌های ۲ تا ۷= نمونه‌های مورد مطالعه)

بحث

تشخیص ومطالعه عفونت‌های رتروویروسی از جهات مختلفی می‌تواند مورد توجه قرار گیرد. نتایج مطالعات زیادی که بر روی ویروس نقصان ایمنی انسان (HIV) انجام گرفته، زمینه بسیار وسیعی را پیرامون مطالعه تنوع ژنتیکی، چگونگی تشخیص، مطالعات اپیدمیولوژیک و نهایتاً راه کارهای مناسب برای پیشگیری از عفونت‌های رتروویروسی فراهم آورده است. در بین عفونت‌های رتروویروسی دام، لوکوز انزئوتیک گاوها، در صدر اهمیت قرار دارد و از همین رو است که تحقیقات بسیار گسترده‌ای در مورد روش‌های تشخیص، کنترل و پیشگیری از این بیماری با استفاده از روش‌های سرمی و بیولوژی مولکولی انجام گرفته و می‌گیرد(۱۰). به واسطه خصلت طبیعی رتروویروس‌ها که ناشی از رونوشت‌برداری معکوس از ژنوم آن‌ها است وقوع موتاسیون و در نتیجه تنوع ژنوتیپی و فنوتیپی آن‌ها از وفور بالایی برخوردار است و همین خصلت است که ارزش تشخیصی بسیاری از آزمون‌های آزمایشگاهی را زیر سوال می‌برد. مقالات زیادی را می‌توان یافت که به اعداد و ارقام خاصی تحت عنوان حساسیت و ویژگی در تست‌های تشخیصی اشاره نموده‌اند. تکرار همین آزمون‌ها توسط محققین دیگر معمولاً با نتایج متفاوتی همراه بوده است که علت این مسئله را می‌توان در تنوع ژنتیکی این ویروس‌ها جستجو نمود(۶). در گاو آلودگی با ویروسBLV یک آلودگی دائمی است و بهبودی خودبه‌خود تاکنون مشاهده نشده است. این امر احتمالاً بدان جهت است که ویروس در داخل لنفوسیت‌ها موضعی شده و محبوس بودن آن موجب می‌گردد که نتواند پادتن تولید کند تا باعث متوقف ساختن عفونت گردد. بدین جهت حیوان آلوده به مدت زیاد و احتمالاً در تمام عمر منشاء عفونت است بدون این که بدن حیوان تحت تأثیر ویروس جهت تولید پادتن قرار گیرد که تشخیص آلودگی در این قبیل دام‌ها از نظر سرمی غیر ممکن است(۲و۹). آزمایش PCR به عنوان یک روش دقیق و حساس در تشخیص عفونت با BLV به کار برده می‌شود . این روش آسان‌تر و سریع‌تر از دیگر تست‌های تشخیصی ویروس است. PCR که برای تشخیص مقادیر ناچیز آلودگی با BLV در گاوهای آلوده به کار می‌رود به عنوان یک روش مکمل در فاز نهایی برنامه ریشه‌کنی لوکوز گاوی و همچنین در مواقعی که حضور آلودگی در آزمون‌های سرمی نامشخص است طرح‌ریزی شده است(۲). با توجه به این که آلودگی با

ویروس BLV به آلودگی مادام العمر لنفوسیت‌ها می‌انجامد لذا هر گونه پاسخ سرولوژیک دال بر حضور ویروس در بدن گاو تلقی می‌شود بر همین مبنا است که تمام موارد سرمی در آزمایش PCR مثبت شده‌اند(۱۰۰٪). عدم شکل‌گیری پاسخ‌های سرولوژیک در موارد پیشرفته بیماری به علت آنرژی یا تغییرات آنتی ژنیک وسیع ویروس می‌تواند به عدم ردیابی سرمی موارد در ۳ مورد از موارد الایزا منفی بیانجامد. جالب این جاست که در برخی موارد پیشرفته بیماری خاصه در بافت های توموری با منشاء بافت‌های پارانشیماتوز حتی حضور ویروس هم مشاهده نمی‌شود و تنها گسترش پرولیفراتیو این بافت‌ها را باعث می‌شود. در چنین شرایطی علیرغم حضور تومورهای گسترده امکان ردیابی پادتن فراهم نمی‌شود. در یک بررسی مقایسه‌ای تفاوت مشهودی بین حضور ویروس در بافت‌های توموری با لنفوسیت‌های جریانی وجود داشته که موید گسترش پرولیفراتیو بافت‌های توموری بدون حضور ویروس در دام‌های آلوده می‌باشد(۳). تشخیص آلودگی در این قبیل دام‌ها با روش مولکولی جهت اثبات حضور ویروس امکان پذیر است. مطالعه حاضر نیزبا هدف ردیابی پروویروس BLV در بافی کوت گاوهای آلوده و به ظاهر سالم ومقایسه آن با روش الایزا برای اولین بار در ایران انجام گرفت. تطابق بین نتایج آزمایش‌های سرمی و مولکولی در تشخیص لوکوزگاوها در مطالعات زیادی مورد توجه قرار گرفته است(۱۰). در مطالعه حاضر تطابق بین آزمایش الایزا و PCR معادل ۹۴ درصد با حساسیت و ویژگی ۹۱ و ۱۰۰ درصد برآورد گردید. در مطالعه‌ای در برزیل مطابقت بین نتایج آزمایش AGID و PCR در تشخیص این ویروس ۷۳/۸۰ درصد اما در بعضی مطالعات معادل ۱۰۰ درصد تعیین شده است(۲). در مجموع با توجه به حساسیت و دقت بالای PCR در تشخیص بیماری حتی با مقادیر کم ویروس و وفور نسبتاً زیاد آلودگی در کشور به‌کارگیری روش‌های مولکولی در برنامه‌های کنترل لوکوز گاوی توصیه می‌گردد.

فهرست منابع

۱- ممتاز. ح و همت زاده. ف (۱۳۸۲): بررسی سرولوژیک آلودگی با ویروس BLV در گاوداری های استان چهارمحال و بختیاری ، مجله تحقیقات دامپزشکی ایران، دانشگاه شیراز، ۴ (۱): ۴۴-۳۷.

2. Camargos, M.F., Stancek, D., Lessa, L.M., Reis, J.K.P., Rocha, M.A. and Leite, R.C. (2003): Development of a polymerase chain reaction and its comparison with agar immunodiffusion test in the detection of bovine leukemia virus infection. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 40 (5): 75-78.
3. Hemmatzadeh, F., Keyvanfar, K., Rohani, M., Momtaz, H., Raza Tofighi, E. and Rahmani, F. (2008): Investigation of env gene of BLV in lymph node and white blood cells of infected cows.Indian Vet. J., In Press.
4. Laird, P.W.(1991): Simplified mammalian DNA isolation protocol. Nucleic Acid Research. 19: 4293.
5. Müller-Doblies, U.U., Li, H., Hauser, B., Adler, H. and Ackermann, M.(1998): Field validation of laboratory tests for the clinical diagnosis of sheep-associated malignant catarrhal fever. J. Clin. Microbiol. 36:2970-2972.
6. Murphy, F.A., Gibbs., E.P.J., Horzinek, M.C. and Studdert, M.J. (1999): Veterinary virology. 3th edition. Academic press. San Diego. Pp: 411 – 428, 363 – 391.
7. Rola , M. and Kuzmak , J.(2002): The detection of bovine leukemia virus proviral DNA by PCR – ELISA. J. Virol . Methods.99:33- 40.
8. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989): Molecular Cloning: A Laboratory Manual. vol. 1. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. Pp: 485-487 & 702-704.

9. Van den Heuvel, M.J., Jefferson, B.J. and Jacobs, R.M.(2005): Purified bovine plasma blocking factor decreases Bovine leukemia virus p24 expression while increasing protein synthesis and transcriptional activity of peripheral blood mononuclear cells in short-term culture. Canadian J. Vet. Res. 69:186–192.
10. Van den Heuvel, M., Portetelle, D., Jefferson, B. and Jacobs, R.M. (2003): Adaptation of a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay to determine the concentration of bovine leukemia virus p24 and optimal conditions for p24 expression in short-term cultures of peripheral blood mononuclear cells. J. Virol. Methods. 111:61–67.