تشخیص ویروس بیماری تب برفکی وسیلهٔ افزایش آنزیماتیک ژن پلی‌مراز (PCR)

مترجم: دکتر بابك نعمانی - مؤسسه تحقیقاتی رازی

در این مطالعه ویروس تب برفکی با استفاده از تکنیك واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز یاPCR در بافتهای آلوده گاو خوك تشخیص داده می‌شود اول از همه لازم می‌دانم مختصری در مورد خود بیماری تکثیر ویروس تب برفکی بیان شود.

بیماری تب برفکی

بیماری تب برفکی یا FMD[1] یك بیماری با واگیری بسیار بالا برای زوج سمان - cloven) (hoofed می‌باشد که در حال حاضر این بیماری در شمال آمریکا، آمریکای مرکزی، استرالیا، نیوزلند و ژاپن وجود ندارد ضمن اینکه اغلب کشورهای اروپائی در ریشه کن‌کردن آن موفق بوده‌اند ولی هنوز در آفریقا، آسیا و آمریکای جنوبی به صورت آندمیك وجود دارد. هم اکنون در ایران نیز این بیماری یکی از معضلات دامپزشکی است که با وجود ساخت واکسن آن بیماری در مؤسسه رازی، هنوز به علت بیماری تب برفکی واکسینه نکردن گوسفندان و تعدادی از گاوها بکرات مواردی از بیماری در بخش تشخیص مؤسسه رازی مشاهده و تأیید می‌شود.

ویروس FMD و تکثیر آن

عامل FMD، نوعی پیکورنا ویروس از جنس Aphtovirus با ژنوم RNA (+Sense) بار مثبت است که حدود Kb ۸ ظرفیت دارد (شکل ۱).

ویروس به‌دنبال جذب و نفوذ، پوشش خود را از دست می‌دهد و پروتئین Vpg که در انتهای '5 ژنوم است به وسیلهٔ آنزیمهای سلولی از روی ویریون RNA برداشته می‌شود. در این ویروس خود ویرویون RNA عفونت‌زاست و می‌تواند به عنوان mRNA عمل کند و RNA مزبور نخست به یك پلی‌پروتئین ترجمه می‌شود و خود این بعداً به چهار محصول اولیه تبدیل می‌شود که اینها بعداً پروتئینهای کوچکتر را تشکیل می‌دهند. یکی از همین محصولات اولیه به چهار پروتئین ساختمان اولیه تبدیل می‌شود و یکی از آنها پیش‌ساز RNA پلی‌مراز ویرال می‌شود. عمل دو پلی‌پپتید اولیه دیگر هنوز شناخته نشده است. RNA پلی‌مراز یك رشته مکمل با بار منفی را رونویسی می‌کند که خود این در دفعهٔ بعد بعنوان الگو برای سنتز رشته با بار مثبت قرار می‌گیرد. این رشته‌های مثبت بعداً خود نقش mRNAهای اضافی را برای سنتز بیشتر پروتئینهای ویرال بازی می‌کنند و یا در ارتباط با ساختن نسلهای بعدی ویریون قرار می‌گیرند.

پیکورناویروسها تنها RNA ویروسی هستند که امکان نوسازی بین مولکولی ژنتیکی بین سوشهای شناخته شده همان گونه در یك سلول وجود دارد. این موردی است که در مورد تب برفکی و ویروس پولیو (فلج اطفال) مشاهده شده است.

در این ویروس ۷ سروتیپ شناخته شده است و ثابت شده،منطقه ژنومیکی که مسئول کد کردن RNA پلی‌مراز می‌باشد، به طور مطلقاً یکسان در بین ۷ تیپ وجود دارد. خلاصه‌ای از چگونگی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز یا PCR در ذیل آورده می‌شود:

PCR: ازدیاد محصولات PCR به وسیلهٔ پرایمرهای الیگو نوکلئوتید سنتتیك که در اصل مکمل هر یك ازرشته‌های NA مورد هدف است، انجام می‌شود.اندازه تکثیر سکانس کاملاً بستگی به فاصلهٔ بین ۲ پرایمر پیوند شده به زنجیر دارد و تعداد سیکلها نیز در مقدار تولید، سهم به سزائی دارند.

هرسیکل PCR شامل ۳ مرحله است:

۱- دناتوره کردن رشته الگوی NA در دمای ۹۵-۹۰ درجه سانتی‌گراد.

۲- اتصال با دوام پرایمرها (Annealing) به NA هدف که با سرد کردن مخلوط واکنش در دمای ۶۰-۴۰ درجه سانتی‌گراد انجام می‌شود.

۳- بسط و تکثیر و طویل شدن پرایمرها به وسیله آنزیم taq پلی‌مراز در دمای ۷۲-۶۷ درجه سانتی‌گراد.

بنابراین واکنشهای PCR سیکلهای متعددی از دناتوره کردن، پیوند با دوام ایجاد کردن و پلی‌مریزاسیون را شامل می‌شوند. ازدیاد سکانس هدف از روی قطعه‌های جدید سنتز شده که به عنوان الگو قلمداد می‌شوند، انجام پذیر است.

رابطهٔ تئوری بین میزان ازدیاد (y) و تعداد سیکلها (n) بشرح زیر است: $y=2^n$ محصولات PCR به وسیلهٔ الکتروفورز ژل آگارز در حضور شاهد مناسب تجزیه شده و بعد از رنگ‌آمیزی با اتیدیم برماید، به وسیلهٔ فلوئورسانس قابل مشاهده می‌شوند.

بعد از الکتروفورز، ماحصل واکنش به فیلتر نایلون یا مامبران نیتروسلولز انتقال داده می‌شود و با پروب‌های ویژه که اغلب آنها دارای الیگو نوکلئوتیدهای نشاندار هستند، هیبرید می‌گردد. هیبریدیزاسیون، بررسی ویژگی واکنش ازدیاد را تسهیل می‌کند.یك واکنش زنجیره‌ای پلی‌مریزاسیون موفق، توانائی تولید 10^{12} مولکول DNA را در ۰/۱ml از واکنش دارد.

روشهای تشخیص جاری در آزمایشگاهها

روشهای معمول در آزمایشگاهها از جمله جداسازی ویروس از نمونه‌ها، سرولوژی (که خود شامل چند بخش مثل سرونوتریلیزاسیون (SN)، ثبوت عناصر مکمل (CFT) می‌باشد) و تزریق به حیوانات آزمایشگاهی همگی کند کند، خسته کننده، گران و خطرناك هستند. تشخیص با هیبریدیزاسیون اسید نوکلئیك، پیشرفتهائی کرده است ولی به اندازه تکنیك جداسازی ویروس حساس نیست.

لازم به تذکر است که در بخش تشخیص تب برفکی مؤسسه رازی، هم اینك از روش C.F.T و S.N و تزریق به موش شیرخوار استفاده می‌شود که هیچکدام قدرت تشخیص ویروس را در حد کم و جزئی ندارند. در روش PCR و بخصوص در مورد FMDV از یك جفت پرایمر الیگومر و پروبی که از روی سکانسهای به توافق رسیده در ناحیه ژنومیکی ساخته شده و سنتز رشته مکمل یا cDNA به وسیلهٔ آنزیم ترانس کریپتاز معکوس، ویروس را تشخیص می‌دهند. پرایمر الیگومریك یك محصول ۴۵۴ جفت بازی به دست داد که کاملاً قابل تشخیص بود. در نهایت محصولات PCR با الکتروفورز ژل آگارز سایز بندی شده و سپس با پروب الیگومر یك هیبرید شد. در ضمن محصولات PCR بعداً با آنزیمهای هضم کننده و محدود الاثر مثل NCOI آزمایش شد و همان سایت اثر آیزیمهای محدود گر در ژنوم تأیید شد.

این تکنیك بسیار اختصاصی عمل می‌کند، همان طوری که در اینجا به همراه با ویروس تب برفکی، ۱۲ ویروس دیگر نیز همزمان آزمایش شدند (مثل انتروویروسها و دیگر عاملهای بیماریهای وزیکولار) و هیچ نتیجه مثبت کاذبی مشاهده نشد.

مواد و روش کار

تهیه نمونه‌های بافتی و تخلیص نوکلئیك اسید ویروس

نمونه‌های اپی‌تلیوم زبان جمع‌آوری شده باید در دمای ۷۰°C- نگهداری شود. برای شاهد همان مقدار بافت از بافتهای سالم جمع‌آوری شد. با استفاده از محیط Eagle یك سری رقت از بافتها تهیه شد. اولین رقت را سانتریوفوژ کرده و بقیهٔ رقتها با کمك مایع بالائی اولین رقت تهیه شد.

به ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون ویروس، همین حجم بافر لیز کننده که شامل ۰/۵٪ SDS در ۵۰ میلی

مول Tris-Hcl (با pH=۸)، ۱۰۰ میلی‌مول Nacl، ۱۰ میلی‌مول EDTA است، اضافه شد. به این مواد، ترکیبی از فنل-کلروفرم-ایزوآمیل الکل اضافه شده و در اتانل ۱۰۰٪ رسوب داده شدند. این رسوب با اتانل ۷۰٪ شسته شده، خشک شده و دوبار در ۱۰۰ میکرولیتر آب ۲ بار تقطیر شده، معلق شده و با استفاده از میکروسانتریوفوژ، حجم این مواد را به ۱ میکرولیتر رساندیم برای حصول اطمینان از اختصاصی بودن PCR برای ویروس FMD، اسید نوکلئیک استخراج شده از دیگر پیکورنا ویروسهای وابسته شامل آنتروویروس - ۳-گاوی، آنتروویروس - ۱ - خوکی، ویروس آنسفالومیوکاردیت و ویروس بیماری وزیکولار خوکی، در کشت سلولی تزاید داده شدند. دیگر ویروسهائی که در این مطالعه تست شدند شامل ویروس وزیکولاراستوماتیت، ویروس خوکی وزیکولارگزانتما، ویروس شیرهای دریائی سن میگوئل، Lumpy skin، ویروس Bluetongue، ویروس ایباراکی، رینوتراکئیت عفونی گاوان، BVD و MCF بودند که جملگی اینها از نظر درمانگاهی قابل اشتباه با بیماری تب برفکی بودند.

تیتراژ ویروس:

برای مقایسه نتیجهٔ PCR با تکنیک جداسازی ویروس، بافتهای آلوده بروش TCID50 تیتربندی شدند.

پرایمر الیگونوکلئوتید سنتتیک

آنالیز ردیف ژنوتیپی ژن پلی‌مراز ویروس FMD نمایانگر حضور سه ناحیه کاملاً مطلق در محل ۴۵۴ جفت باز مربوطه بوده است، ۲ ردیف جانبی (20-mer) بعنوان پرایمرهای PCR و ردیف داخلی بعنوان پروب (22-mer) برای هیبریدیزاسیون با محصولات PCR انتخاب شدند پرایمراهای الیگومریك و پروب همانند سنتز رشتهٔ منفرد DNA، تهیه شدند.

ترانس‌کریپتاز معکوس، PCR

سنتز رشتهٔ منفرد و مکمل cDNA در ۱۰۰ میکرولیتر مخلوط واکنش شامل مواد زیر انجام شد: ۲ میکرولیتر از بافر PCR، ۱۰ بار غلیظ شده (که شامل ۵۰۰ میلی‌مول Kcl، ۱۰۰ میلی‌مول Tris-Hcl با pH=۸/۳، ۱۵ میلی مول کلرورمنیزیم و ۰/۰۱ W/V ژلاتین می‌باشد)، ۱ میلی از هر dNTP ۱ واحد از RNAsin، ۱۰۰ pmol از هگزامر، ۱ میکرولیتر از نمونه RNA ویروس FMD، ۲۰۰ واحد از ترانس کریپتاز معکوس Moloney Mulv.

مخلوط واکنش به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و سپس ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد.قبل از شروع واکنش PCR،باید cDNA را به مدت ۱۰ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد حرارت داد.

مخلوط واکنش PCR شامل اقلام زیر است:

۸ میکرولیتر از بافر PCR ۱۰ بار کنسانتره، ۳۰pmol از هر پرایمر (1^{US},1^{DS})، ۰/۵ واحد از Taq DNA پلی‌مراز و ddH_2O.

این مخلوط سپس به ۲۰ میکرولیتر حجم نهائی واکنش cDNA افزوده شده و در ۱۰۰ میکرولیتر روغن معدنی استریل قرار داده شد. سپس عمل مخلوط کردن تا ۳۰ سیکل تکرار شد که بترتیب دماهای زیر را شامل می‌شد: ۹۵°C، اتصال با دوام در ۵۵°C و پلی مریزاسیون در ۷۲°C برای مدت ۳۰ ثانیه.

برای افزایش محصول، دور دوم از ۲۷ سیکل (سیکل ۱: ۹۴°C در ۵ دقیقه، ۳۷°C در ۲ دقیقه، ۷۲°C در ۲ دقیقه سیکلهای ۲۶-۲: ۹۴°C در ۱ دقیقه، ۳۷°C در ۱ دقیقه، ۷۲°C در ۲ دقیقه و سیکل ۲۷: ۹۴°C در یک دقیقه، ۳۷°C در ۱ دقیقه، ۷۲°C در ۵ دقیقه) با برداشت ۱ میکرولیتر از مخلوط اولین دور و اضافه کردن آن به مخلوط واکنش‌که شامل ۱ میکرولیتر از بافر PCR ۱۰ با کنسانتره، ۱/۲۵ میلی مول از هر dNTP، ۵۰ pmol از هر پرایمر ۰/۵ واحد از Taq پلی‌مراز بود که در نهایت حجم نهائی به وسیله ddH_2O به ۱۰۰ میکرولیتر رسانده شده بود، انجام شد.

الکتروفورز در ۱/۸٪ ژل آگارز برای هویداکردن محصول PCR انتخاب شد.

رنگ اتیدیم برماید برای نمونه شاهد و اصلی از ۴۵۴ جفت باز مثبت بود.

اثبات اختصاصی بودن محصول بوسیله تأثیر آنزیم محدود الاثر (که در اینجا از NcoI استفاده شد) انجام شد که لازم به ذکر است که این آنزیم در FMDV، محل پیش‌بینی شده را به ۲ قسمت ۱۲۴ و ۳۳۰ جفت باز تقسیم می‌کند.

آشکارسازی محصول PCR با پروب نشاندار شده یا Digoxigenin

الیگونوکلئوتید ۲۲ بازی که به عنوان پروب هم برای Slot blot و هم برای هیبریدیزاسیون روش Southern blot استفاده می‌شود در انتهای '۳ خود با dutp-Digoxi (با استفاده از دزوکسی ترانسفراز انتهائی) نشاندار شد.

محصول PCR در ۳ مول NaOH در دمای ۶۰°C دناتوره شده و فوراً در روی یخ سرد شده و به لایه‌های نایلونی هیبریدیزاسیون جذب شدند. مامبرانها بعد از ۳۰ دقیقه حرارت دادن در دمای ۸۰°C پرهیبرید شدند که‌واکنش در یک محلول شامل ۰/۱۵ میلی مول Nacl، ۰/۰۱۵ مول سیترات سدیم با pH=۷ بوده است. به دنبال پرهیبرید شدن، برای هیبرید کردن مامبرانها از همان محلول که ۱۰pmol از پروب نشاندار هم به آن اضافه شده بود استفاده شد (۱۲ ساعت در ۴۲°C). مامبرانها ۲ بار در محلول بالائی که شامل ۰/۱٪ SDS هم بود، در دمای اتاق شسته شده و ۲ بار هم دردمای ۴۰°C در ۰/۱ برابر از محلول بالا شسته شدند. بعداً این مامبرانها بطور مختصری با ۱۰۰ میلی‌مول از Tris-Hcl با pH=۷/۵ که شامل ۱۵۰ میلی‌مول Nacl هم بود، شسته شدند و این عمل با انکوباسیون این مامبرانها (با استفاده از ۰/۵٪ پروتئین شیر تغییر داده شده) در دمای اتاق ادامه داده شد. سپس اینها در بافر Tris-Hcl ۲ بار شسته شده و بعد برای مدت ۳۰ دقیقه با پلی‌کلونال

جدول ۱- ویروسهای بدست آمده از نمونه بافتی حیوانات آلوده با FMDV

تیپ ویروس	حیوان	نوع بافت	تیتر
A_5 (Westerwald)	گاوی	اپیتلیوم بین‌انگشتی	10^5
A_5 (Westerwald)	گاوی	زبان	10^6
A_5 (Westerwald)	خوکی	زبان	10^9
C_1 (Dutch)	خوکی	اپیتلیوم بین‌انگشتی	10^8
C_1 (Dutch)	خوکی	زبان	10^4
Asia-1/1 (Pakistan)	گاوی	زبان	10^5
Asia-1/1 (Pakistan)	گاوی	اپیتلیوم بین‌انگشتی	10^9
O_1 (Kaufbeuren)	گاوی	زبان	10^8
SAT-1/2 (Rhodesia)	گاوی	زبان	10^7
SAT-2 (Rhodesia)	گاوی	زبان	10^5
SAT-3 (Rhodesia)	گاوی	زبان	10^6

جدول ۲- دیگر روشهائی که برای ویژگی عمل PCP برای FMD آزمایش شده‌اند.

خانواده	جنس	نام بیماری
Rabdoviridae	*Vesiculovirus*	Vesicular stomatitis
Togaviridae	*Pestiviridae*	Bovine viral diarrhea
Poxviridae	*Capripoxvirus*	Lumpy skin disease
Calciviridae	*Calcivirus*	Vesicular exanthema of swine (A48)
Calciviridae	*Calcivirus*	San Miguel sea lion virus
Reoviridae	*Orbivirus*	Blutongue
Reoviridae	*Orbivirus*	Ibaraki
Picornaviridae	*Enterovirus*	Bovine enterovirus
Picornaviridae	*Enterovirus*	Porcine enterovirus
Picornaviridae	*Enterovirus*	Swine vesicular disease virus
Picornaviridae	*Cardiovirus*	Ecephalomyocarditis virus
Herpesviridae		
Alphaherpesvirinae	Bovine herpesvirus	Infectious bovine rhinotracheitis
Gammaherpesvirinae	Alcelaphine herpesvirus	Malignant catarrhal fever

Fab آنتی‌دیگوکسی‌ژنین که کونژگه شده با قسمت فسفاتاز بود، انکوبه شد. آنتی‌بادیهای باند نشده به وسیله بافر Tris-Hcl رانده شدند. ماممبرانها در بافری محتوی ۱۰۰ میلی‌مول Tris-Hcl، ۱۰۰ میلی مول Nacl، ۵۰ میلی‌مول $Mgcl_2$ با pH=۹/۵ حال تعادل در آمده و در سوبسترای نمک تولوئیدن و نیتروبلوتترازولیوم فسفات قرار داده شده و برای شکل گرفتن پدیدهٔ رنگی شدن، در تاریکی جای داده شدند.

نتیجه

آنالیز ردیفهای ژنومیکی RNA ویروس تب برفکی برای سروتیپهای اصلی نشانگر این مطلب بوده است که سه منطقهٔ کاملاً مطلق در داخل ژن پلی‌مراز ویروس FMD در ناحیه ۳ انتهائی است. ۲ ردیف جانبی به عنوان پرایمر برای PCR انتخاب شدند. پرایمر 1us[۲] مکمل آنتی‌ژنومیک RNA در موقعیت 6519-6538 و پرایمر 1DS مکمل در موقعیت 6953-6972 بوده است. یک ردیف 1p، به عنوان پروب برای آشکار کردن محصولات PCR در مورد FMDV انتخاب شد. (ردیف 1p مکمل‌ژنومیک ردیف 6793-6814 است).

با تکنیک استاندارد جدا سازی ویروس، تیتر ویروس در آلودگی تجربی نمونه‌ها حدود TCID50 10^{9}-10^{4} در هر ۰/۲ میلی بوده است (جدول ۱).

RNA هر ۷ سروتیپ به طور آنزیمی افزایش داده شدند (طبق اعمال بالا) پس از ۳۰ سیکل از محصول PCR، می‌توان پی به ۴۵۴ جفت باز در طول ردیف برد. توالی اصلی در این آزمایش که مورد تکثیر و تزاید قرار گرفت، محلی (Site) را برای عملکرد آنزیم محدود الاثری بنام NcoI که نوعی آندونوکلئاز می‌باشد، دارد. تجزیه محصول PCR با آنزیم فوق‌الذکر، ۲ قسمت ۱۲۴ و ۳۳۰ جفت باز به دست داد که ویژگی آزمایش و تکنیک PCR را تأئید می‌کند.

نوکلئیک اسید استخراج شده از رقیق شدهٔ بافتهای آلوده به ویروس به طور آنزیمی افزایش داده شده و برای ویژگی محصول سنجیده شد. محصول PCR با قدرتی معادل 10^{3} $TCID_{50}$ در آزمایش ژل مستقیم آشکار شد. حساسیت این آشکارسازی با استفاده از دور دوم تزاید که خود نشأت گرفته از دور اول بود، افزایش داده شد، که در حدود $10TCID_{50}$ بود.

اطمینان از محصول PCR به وسیله روش Southern blot هیبریدیزاسیون پروب الیگومریک انترنال (داخلی) انجام شد. روش هیبریدیزاسیون Slot blot هم با دور اول و هم با دور دوم محصول PCR حساسیتی معادل $0/1TCID_{50}$ را نتیجه داد.

در آزمایش PCR با استفاده از همان روشهای گفته شده در بالا، جفت پرایمرها و پروب بکار گرفته شده برای ویروسهای نامبرده شده در جدول ۲، هیچکدام باند ۴۵۴ جفت بازی را نه در روش الکتروفورز و نه در روش هیبریدیزاسیون ندادند. دور دوم تزاید باعث شدکه هیچگونه نتیجه کاذب در روشها و ویروس شاهد و کلاً نتایج به دست نیاید.

بحث

پرایمریهای PCR که در این مطالعه به کار گرفته شده بودند در ارتباط با منطقهٔ ژنومی FMDV بودند. منطقه‌ای که مسئول کد کردن RNA پلی‌مراز ویروس تب برفکی است، حداقل اختلاف را بین سروتیپهای مختلف (از نظر توالی بازها) نشان می‌دهد.

همین موضوع کمک شایانی برای استفاده از پروب کلون شده از این ناحیه را برای هیبرید کردن به تمام سروتیپها کرده بود. بنابراین منطقهٔ مزبور می‌تواند رسماً به عنوان محل عمل تکنیک PCR برای آشکار سازی ویروس FMD می‌تواند شناخته شود.

تکنیک PCR در رابطه با پیکورنا ویروسها و دیگر عاملهایی ویروسی بیماری‌های وزیکولار و دیگر عاملهائی که می‌توانند از نظر کلینیکی ما را به اشتباه بیاندازند، می‌تواند بسیار با دقت و اختصاصی عمل کند. وقتی که محصول با هیبریدیزاسیون به پروب الیگومریک آشکار می‌شد. تکنیک، حساسیتی معادل $0/1TCID_{50}$ پیدا می‌کرد.

تشخیص سریع و قطعی شیوع بیماری تب برفکی خیلی حیاتی است چراکه این بیماری بسیار واگیر است می‌باشد.

تأخیر در تشخیص یا تشخیص غلط ممکن است باعث یک افزایش لگاریتمی در شیوع شود که خود موجب به بار آمدن بیلیونها دلار خسارت اقتصادی می‌شود. اگر ویروس به اندازهٔ کافی باشد، تست ثبوت عناصر مکمل می‌تواند در عرض چند ساعت کارساز باشد، EIA نیز به کارگرفته شده است.

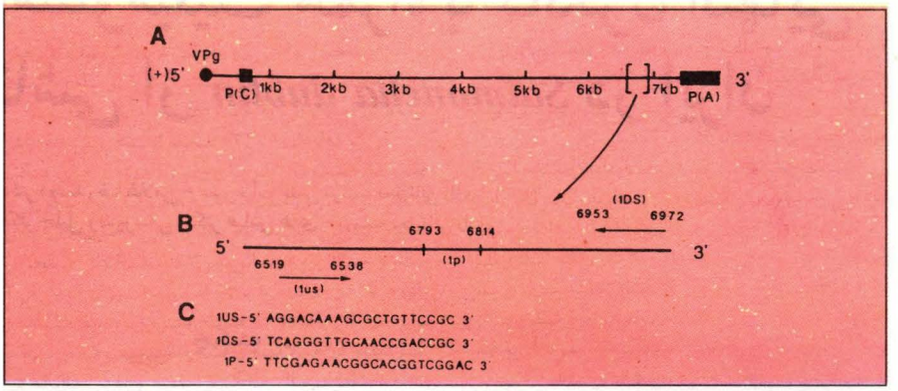
اما این تستها نیازمند داشتن آنتی‌ژن ویروس تب برفکی در حد زیاد و همین طور آنتی‌بادی دارد که خود مسئله ساز بسیاری از مشکلات خواهد بود در ضمن، حساسیت آنها نیز حدود $1000TCID_{50}$ است.

جدا سازی ویروس از نمونه بافت آلوده و یا تلقیح ویروس به حیوانات حساس روشهای خوبی بوده که برای آشکارسازی ویروس FMD به کار می‌رفته و یا می‌رود (هم چنان که اکنون در مؤسسه رازی از این روشها استفاده می‌شود) که باز متأسفانه هر ۲ روش نیازمند تکثیر ویروس و مشاهده اثر پاتوژنی ویروس روی سلول اولیه است که نتیجهٔ کاذب می‌تواندره‌آوردراین روشها باشد چراکه CPE مشاهده شده رامطلقاً و چشم بسته نمی‌توان تنهابه ویروس FMDربط داد. ضمناً سیستم کشت نیاز به استفاده از سلولهای اولیه برای ادامهٔ تکثیر دارد.

بعد از تکثیر ویروس، باید ویروس را با روشهای EIA,CF و SN که هر کدام بسیار وقت‌گیر هستند، تشخیص داد. بعلاوه برای اینکه اثبات شود نتیجه منفی است، باید زمانی را معادل حداقل ۱۴ روز برای نگهداشتن نمونهٔ برداشت شده صرف کرد.

قدرت PCR، در ارائه نتیجه مثبت یا منفی در طول ۱ یا ۲ روز یکی از مزایای مهم آن است. بعلاوه نیاز نداشتن به محصولات و فرآورده‌های بیولوژی دیگر و عدم مبادلهٔ این مواد بین کشورها بر اهمیت آن می‌افزاید.

در ضمن گاهی اتفاق می‌افتد که نمونه ارسالی به آزمایشگاه کم است و این برای تستهای SN,CF و غیره کافی نیست و این مهم با PCR قابل انجام است (چه بسا که بارها در خود بخش تب برفکی، بعلت کمبود نمونه، قادر به انجام آزمایش نشده‌ایم). این طور که به نظر می‌رسد، این روش می‌تواند یک جایگزین خیلی خوب و مؤثر برای روشهای آزمایشگاهی جاری در رابطه با تشخیص بیماریهای ویروس و میکروبی، باشد.



شکل ۱- تصویر شماتیک ژنوم FMDV-RNA و ناحیه قرار گرفتن کدهای پلی‌مراز ویروسی که برای افزایش آنزیماتیک بوسیله PCR نشاندار شده‌اند. بزرگ شدن ناحیه شکسته ژنوم نشاندهنده محل ۲۰ نوکلئوتید در پرایمر بالا می‌باشد.(1US) و پرایمر پایین (1DS) و ۲۲ نوکلئوتید پروب (IP) (B)، توالی نوکلئوتیدهای پرایمر و پروب (C). پرایمر 1US دارای بار مثبت، پرایمر 1DS و پروب دارای بار منفی در ارتباط با ژنوم ویروسی هستند. پروتئین ویروسی =vpg، Kb=kilobases، باقیمانده پلی‌آدنوزین=P(A)، باقیمانده پلی‌سیتوزین=P(C).

منبع مورد استفاده

R. F. Meyer, C. C. Brown, C. House, J. A. House and T. W. Molitor, 1991, Rapid and sensitive detection of foot-and-mouth disease virus in tissues by enzymatic RNA amplification of the polymerase gene, Journal of virological methods, 34 161-172