

# مقالات کوتاه

## کلون نمودن ژن پروتئین VP1 ویروس تب برقی سروتیپ O1/Iran جهت دستگیری به واکسن نوترکیب

● دکتر شهید مسعودی و دکتر علی اکبر محمدی، اعضای هیأت علمی مؤسسه رازی

بیماری تب برقی یک بیماری حاد و شدیداً مسری دامهای زوج سم است. بیماری تب برقی موجب خسارات اقتصادی مهمی در صنعت دامداری می‌گردد. واکسیناسیون همه دامهای حساس به ویروس تب برقی اساس تمامی اقدامات بهداشتی برای کنترل و ریشه‌کنی بیماری است. روشهای جاری تولید واکسن با مشکلات چندی همراه است زیرا کشت و دستکاری حجم بالای ویروس حاد هزینه بر بوده و خطر انتشار ویروس حاد را در بر دارد.

ویروسهای عامل بیماری تب برقی جنس آفتو ویروس خانواده پیکوناویروس را تشکیل می‌دهند. مانند سایر پیکوناویروسها ژنوم ویروس RNA تک رشته‌ای با پولاریتی مثبت و حدود ۸۵۰ نوکلئوتید می‌باشد. ژنوم ویروس توسط یک کسپید بیست وجهی که متشکل از ۶۰ کپی از هر یک از چهار پلی پپتید VP1-VP4 احاطه شده است. در بین این پروتئین‌ها VP1 از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، زیرا شاخصهای اصلی پادگنی ویروس را که بر علیه آنها پادگنهای خنثی کننده ساخته می‌شوند در بر دارد. کلون نمودن و بیان VP1 در سیستمهای متفاتی گزارش شده است. نتایج این تحقیقات نشان داده‌اند که VP1 پادگن مؤثری است. این پروژه سنتز cDNA دو رشته‌ای ژن VP1 سروتیپ O1/Iran ویروس تب برقی و کلون نمودن آن را با استفاده از روش RT-PCR گزارش می‌کند.

برای سنتز ds cDNA از وی RNA ویروس ابتدا ویروس را روی سلول BHK-21 کشت داده و سلولهای آلوده به ویروس تا زمان آغاز لیز سلولی در ۲۷ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. سپس سلولهای آلوده با استفاده از تریپسین و سانتریفوژ جمع‌آوری شدند و پس از ۲-۳ بار شستشو با بافر PBS در محلول D (گوانیدین ایزوتیوسیانات، سیترات سدیم، سارکوزیل، و ۲-مرکاپتواتانل) سوسپانسه و لیز شدند. در نهایت total RNA ویروس با استفاده از فنل - کلرفرم ایزواکامیل الکل جدا و ایزوپروپانل رسوب داده شد و پس از شستشو با الکل ۷۵٪ و خشک کردن در آب مقطر دو بار تقطیر استریل عاری از آنزیمهای se RNA حل شد. برای تثبیت سالم بودن RNA خاص شده از ژل الکتروفورز RNA جدا شده در شرایط Denaturing استفاده شد.

برای سنتز cDNA ژن VP1 یک زوج پرایمر (F و R1) طراحی شدند. در مرحله بعد با استفاده از آنزیم Reverse transcriptase و پرایمر R1 (12-18) oligo dT طبق روش استاندارد cDNA تک رشته‌ای ویروس سنتز شد و سپس با روش PCR و دو پرایمر F و R1، cDNA یک رشته‌ای ژن VP1 ساخته و تکثیر شد. آنالیز محصول PCR روی ژل آگارز ۱٪/۱۲۰ در کنار مارکر DNA ladder 100bp انجام شد، وجود باند ۶۶۰ نوکلئوتیدی مثبت بودن واکشن را نشان می‌داد. تأیید ویژگی محصول PCR با استفاده از آنزیم محدود کننده BstEII صورت گرفت. این آنزیم دارای یک جایگاه اختصاصی روی ژن VP1 است و آن را به دو قطعه حدود ۴۲۶ و ۲۰۹ نوکلئوتیدی می‌برد.

Dot blot hybridization با استفاده از محصول PCR سنتز شده با پرایمرهای F و R2 به عنوان Probe انجام شد. Probe مورد استفاده با هاپتن Digoxigenin و با روش labeling random primed نشاندار شد.

برای سهولت کلون نمودن ژن VP1 در انتهای 5' پرایمر (F) forward جایگاه آنزیم محدود کننده NdeI برای اضافه کردن کد شروع سنتز پروتئین، و در انتهای 5' پرایمر reverse (R1) جایگاه آنزیم EcoRI و کد پایان (Stop codon) پیش‌بینی شدند. پلاسمیدی که برای وارد کردن ژن VP1 انتخاب شد + pET-23a بود. برای خالص کردن پلاسمید از باکتری حامل، ابتدا سلول باکتری روی محیط LB که دارای ۱۰۰ میکروگرم / میلی لیتر آمی سیلین بود به مدت یکسب کشت داده شد و سپس پلاسمید با روش alkali lysis خالص گردید.

بریدن DNA پلاسمید و محصول PCR با دو آنزیم محدود کننده NdeI و EcoRI در ۲۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲-۳ یا ۱۶ ساعت در بن ماری انجام شد. در مرحله بعد DNA پلاسمید و محصول PCR بریده شده روی ژل آگارز با درجه ذوب پائین (low melting point) برده شدند. پس از مشاهده روی ترانسفرمیانتور، باندهای DNA مورد نظر از روی ژل بریده شدند و با استفاده از روش فنل - کلروفورم خالص گردیدند. اتصال حامل و محصول PCR (insert) با آنزیم T4 ligase دمای آزمایشگاهی به مدت ۲-۱ ساعت در شرایط بافری مناسب انجام شد.

در مرحله بعد ملوکول های DNA نوترکیب در باکتری *E. coli* DH5α با روش کلسیم اید ترانسفورم شدن و روی محیط LB آگار حاوی ۱۵۰ میکروگرم / میلی لیتر آمی سیلین کشت داده شدند. شناسایی اولیه کلونهای نوترکیب حامل ژن VP1، ابتدا با روش *Analysis restriction endonuclease* پلاسمیدهای استخراج شده از کشت تمامی کلونهای رشد کرده روی محیط LB آگار با استفاده از آنزیم NdeI یا EcoRI انجام شد. با این روش هشت کلون نوترکیب به دست آمده که روی ژل آگارز ۱٪ در مقایسه با پلاسمید فاقد insert سنگین تر بودند. در مرحله بعد از هر دو آنزیم به طور همزمان برای آنالیز پلاسمیدهای نوترکیب استفاده شد.

همچنین روی پلاسمیدهای خالص شده با دو پرایمر F و PCR، R1 انجام شد و روی ژل آگارز ۱٪/۱۲۰ باند حدود ۶۶۰ نوکلئوتیدی مشاهده شد و در نهایت هویت ژن کلون شده با روش آگارز ۱٪/۱۲۰ باند حدود ۶۶۰ نوکلئوتیدی مشاهده شد و در نهایت هویت ژن کلون شده با روش Dot blot hybridization تأیید شد.

## گزارش یک مورد اکتیمی واگیر شهر مسقط، درگروستند

● محمدرضا اصلانی،

گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد

● احمد رضا موثقی،

گروه بائیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد

● مهرداد مهری،

گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد

● محسن بردار،

دامپزشک آزاد

### مقدمه

اکتیمی واگیر بیماری ویروسی متداول گوسفند و بز است. این بیماری گاهی در گاو، گاو میش، شتر و نشخوارکنندگان وحشی دیده می‌شود و موارد نادر از آن نیز در سگ گزارش شده است (۱ و ۱۰). اکتیمی واگیر اولین بار در سال ۱۸۸۰ توسط Walley توصیف و با نام درماتیت واگیر یارف معرفی گردیده است (۱۱).

اکتیمی واگیر بیماری مشترک بین انسان و دام نیز می‌باشد و ضایعات موضعی آن بر روی دست افرادی که با گوسفندان تماس دارند ممکن است ایجاد گردد (۷). عامل بیماری یک پاراپاکس ویروس از خانواده پاکس ویریده است. این ویروس شدیداً اپیتلیوتروپ می‌باشد و با ویروس عامل تورم پاولی دهان گاو و آبله کاذب گاو شبیه بوده و دارای واکنش ایمنی متقاطع است (۱۰).

دوره نهفتگی بیماری اکتیمی واگیر در گوسفند ۳ تا ۸ روز می‌باشد (۷) و ضایعات آن عمدتاً بر روی لبها، پوزه و تاج سم دیده می‌شود (۸). ضایعات لبها گاهی به مخاط دهان و قسمت‌های پایین‌تر دستگاه گوارش کشیده شده که شکل بدخیم و کشنده بیماری را ایجاد می‌نماید (۲ و ۷). همچنین در موارد نادری ضایعات روی گوشها، مخرج و قسمت‌های خارجی دستگاه تناسلی (۸) و قرنیه (۲) دیده شده است. علاوه بر این ابتلای پوست نواحی پشت و گردن در بز نیز گزارش شده است (۱).

### تاریخچه و نشانه‌های درمانگاهی

در خرداد ماه ۱۳۷۸ یک رأس بره ماده از نژاد کردی به سن ۲/۵ ماه به علت ابتلای پوست به ضایعات توموری شکل به درمانگاه دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد ارجاع داده شد. این بره در یک گله ۲۵ راسی در یکی از روستاهای اطراف مشهد نگهداری و در شرایط مرتع تغذیه می‌شد. ضایعات بیماری ۲۰ روز قبل از مراجعه بر روی لبها و در مراحل بعدی بر روی تاج سم و قسمت‌های دیگر بدن ظاهر شده بود. صاحب دام برای درمان از اسپری اکسی تتراسیکلین استفاده کرده بود.

در معاینه، ضایعات پرولیفراتیو و دلمهای بر روی لبها و پوست نواحی مجاور روی صورت وجود داشت. همچنین ضایعاتی به صورت زخم شدگی، سطوح داخلی لبها را مبتلا کرده بود ولی در سایر قسمت‌های محوطه دهان ضایعاتی دیده نمی‌شد. ضایعات مشابه لبها بر روی قسمت انتهایی و خارجی لاله گوش راست و تاج سم پایای خلفی وجود داشت. علاوه بر اینها در زیر دنبه ضایعات گسترده و شبیه گل کلم وجود داشت و دنبه بالاتر از محل طبیعی قرار گرفته بود (تصویر ۱). این ضایعات در اطراف مقعد و فرج، اطراف دنبه، ناحیه پرینه و نواحی خلفی رانها دیده می‌شدند و به طرف پستان و پوست زیر شکم کشیده شده بود (تصویر ۲).

درجه حرارت بدن دام ۳۹/۵ سانتیگراد و تعداد تنفس و ضربان قلب آن به ترتیب ۷۰ و ۱۸۰ در دقیقه بود. به منظور انجام آزمایشی هماتولوژی، نمونه خون وریدی همراه ماده ضد انعقاد از دام اخذ گردید. همچنین جهت آزمایش هیستوپاتولوژی نمونه‌های بافتی به روش بیوپسی از نواحی ضایعه‌دار تهیه و در فرمالین ۱٪ برای ثبوت قرار داده شدند.

### یافته‌های آزمایشگاهی و نتایج هیستوپاتولوژی

میزان هماتوکریت ۲۰٪ و تعداد گلبولهای سفید ۲۲۵۰۰ در میلی لیتر بود و شمارش تفریقی گلبولهای سفید با ۴۹٪ نوتروفیل، ۴۵٪ لمفوسیت، ۲٪ مونوسیت و ۴٪ آنوزیوفیل را نشان می‌داد. همچنین پروتئین تام سرم ۶ گرم در دسی‌لیتر و فیبرینوژن پلاسما ۴۰۰ میلی گرم در دسی‌لیتر اندازه‌گیری شد. در بررسی میکروسکوپی نمونه‌های بافتی هیپرکراتوز، دژنراسانس آبکی در سلولهای کراتینوسیت همراه با گانجیدگی‌های آنوزیوفیلیک داخلی سیتوپلاسمی مشاهده گردید. همچنین نفوذ انواع سلولهای آمایی به ویژه نوتروفیلها در بافت همبند درم و در داخل بافت پوششی، پوستولهای داخل اپیدرم فرخونی عروق بافت همبند از یافته‌های دیگر هیستوپاتولوژی بود (تصویر ۳).

### بحث

گسترده‌گی ضایعات جلدی در گوسفند مورد گزارش نشان می‌دهد که اکتیمی واگیر در شکل جلدی نیز می‌تواند برای حیات دام تهدید کننده باشد. هر چند خداداد چنین شکلی از بیماری معمول نیست ولی با توجه به روش انتشار ویروس عامل بیماری و بیماریزایی آن امکان شکل‌گیری چنین مواردی در هنگام شیوع بیماری در گله وجود دارد. ویروس پاراپاکس عامل اکتیمی واگیر نسبت به شرایط محیطی مقاومت زیادی دارد به طوری که در درجه حرارت ۷ درجه سانتیگراد محیط ۲۳ سال عفونت‌زایی خود را حفظ می‌کند (۹). در شرایط طبیعی در مرتع نیز مدت دوام ویروس به چندین سال می‌رسد (۶ و ۱۰). علاوه بر این، دامهایی که به شکل مزمن و یا تحت درمانگاهی بیماری مبتلا هستند نیز از عوامل دوام و انتشار ویروس شناخته شده‌اند (۱۱ و ۱۶). انتقال ویروس به دنبال تماس مستقیم با دامهای مبتلا، خاک، وسایل، غذا و آبخورهای آلوده صورت می‌گیرد (۹ و ۱۰). وجود ضایعات تخریشی حاصل از ساقه علوفه خشک و یا خاردار در پوست ناحیه لبها و یا تاج سم شرایط ورود ویروس به بافت را فراهم می‌نماید (۹، ۴ و ۱۱).



تصویر شماره ۲- ضایعات اکتیمی واگیر در پوست ناحیه زیر دنبه، پرینه و بین اندامهای خلفی.