کلون نمودن ژن پروتئین VP1 ویروس تب برفکی سروتیپ O1/Iran جهت دستیابی به واکسن نوترکیب

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

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

ویروسهای عامل بیماری تب برفکی جنس آفتو ویروس خانواده پیکورناویریده را تشکیل می‌دهند. مانند سایر پیکورناویروسها ژنوم ویروس RNA تک رشته‌ای با پولاریتی مثبت و حدود ۸۵۰۰ نوکلئوئید می‌باشد. ژنوم ویروس توسط یک کپسید بیست وجهی که متشکل از ۶۰کپی 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 راکه بر علیه آنها پادگنهای خنثی کننده ساخته می‌شوند در بر دارد. کلون نمودن و بیان VP1 در سیستمهای متفاوتی 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 برفکی وکلون نمودن آن را با استفاده از روش RT-PCR گزارش می‌کند.

برای سنتز ds cDNA از روی RNA ویروس ابتدا ویروس را روی سلول BHK-21 کشت داده و سلولهای آلوده به ویروس تا زمان آغاز لیز سلولی در ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. سپس سلولهای آلوده با استفاده از تریپسین و سانتریفوژ جمع‌آوری شدند و پس از ۳-۲ بار شستشو با بافر PBS در محلول D (گوانیدین ایزوتیوسیانات، سیترات سدیوم، سارکوزیل، و ۲- مرکاپتواتانل) سوسپانسه و لیز شدند. در نهایت RNA total ویروس با استفاده از فنل -کلرفرم ایزوآمیل 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 RNa se حل شد. برای تائید سالم بودن RNA خالص 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 یا ((Oligo dT(12-18 طبق روش استاندارد cDNA تک رشته‌ای ویروس سنتز شد و سپس با روش PCR و دو پرایمر F و R1، c DNA تک رشته‌ای ژن VP1 ساخته و تکثیر شد. آنالیز محصول PCR روی ژل آگارز ۱/۲٪ در کنار مارکر 100bp DNA ladder انجام شد، وجود باند ۶۶۰ نوکلئوتیدی مثبت بودن واکنش را نشان می‌داد. تأیید ویژگی محصول PCR با استفاده از آنزیم محدودکننده BStEll صورت گرفت. این آنزیم دارای یک جایگاه اختصاصی روی ژن VP1 است و آن را به دو قطعه حدود ۴۳۶ 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 محدودکننده NdeI برای اضافه کردن کد شروع سنتز پروتئین، و در انتهای '5 پرایم reverse (R1) جایگاه آنزیم EcoRI وکد پایان (Stop codon) پیش‌بینی شدند. پلاسمیدی که برای واردکردن 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 آمپی سیلین بود به مدت یکشب کشت داده شد و سپس پلاسمید با روش alkali lysis خالص گردید.

بریدن DNA پلاسمید و محصول PCR با دو آنزیم محدودکننده NdeI و EcoRI در ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد به مدت ۳-۲ 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. و پس از مشاهده روی ترانسلومیناتور، باندهای DNA مورد نظر از روی ژل بریده شدند و با استفاده از روش فنل -کلروفرم خالص گردیدند. اتصال حامل و محصول PCR (insert) با آنزیم T4 ligase در دمای آزمایشگاه به مدت ۲-۱ ساعت در شرایط بافری مناسب انجام شد.

در مرحله بعد ملکول‌های DNA نوترکیب در باکتری *E. coli* نوع DH5α با روش کلسیم اید ترانسفورم شدند و روی محیط LB آگار حاوی ۱۵۰ میکروگرم / میلی لیتر آمپی سیلین. کشت داده شدند. شناسائی اولیه کلونهای نوترکیب حامل ژن VP1، ابتدا با روش Analysis restriction endonuclease پلاسمیدهای استخراج شده ازکشت تمامی کلونی‌های رشدکرده روی محیط LB آگار با استفاده از آنزیم NdeI یا EcoRI انجام شد. با این روش هشت کلون نوترکیب به دست آمد که روی ژل آگارز ۱٪ در مقایسه با پلاسمید فاقد insert سنگین‌تر 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 ۱/۲٪ باند حدود ۶۶۰ نوکلئوتیدی مشاهده شد و در نهایت هویت ژن کلون شده با روش آگارز ۱/۲٪ باند حدود ۶۶۰ نوکلئوتیدی مشاهده شد و در نهایت هویت ژن کلون شده با روش Dot blot hybridization تائید شد.

گزارش یک مورد اکتیمای واگیر شیر سنرل در گوسفند

● محمدرضا اصلانی،
گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد
● احمدرضا موثقی،
گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد
● مهرداد مهری،
گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد
● محسن بردبار،
دامپزشک آزاد

مقدمه

اکتیمای واگیر بیماری ویروسی متداول گوسفند و بز است. این بیماری گاهی در گاو، گاومیش، شتر و نشخوار کنندگان وحشی دیده می‌شود و موارد نادری از آن نیز در سگ گزارش شده است (۱۰ و ۱۱). اکتیمای واگیر اولین بار در سال ۱۸۸۰ توسط Walley توصیف و با نام درماتیت واگیر یا ارف معرفی گردیده است (۱۱).

اکتیمای واگیر بیماری مشترک بین انسان و دام نیز می‌باشد وضایعات موضعی آن بر روی دست افرادیکه باگوسفندان 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 پاپولی دهان گاو و آبله کاذب گاو شبیه بوده و دارای واکنش ایمنی متقاطع است (۱۰).

دوره نهفتگی بیماری اکتیمای واگیر درگوسفند ۳ تا ۸ روز می‌باشد (۷) و ضایعات آن عمدتاً بر روی لبها، پوزه و تاج سم دیده می‌شود (۸). ضایعات لبهاگاهی به مخاط دهان و قسمتهای پایین‌تر دستگاه گوارش کشیده شده که شکل بدخیم وکشنده بیماری را ایجاد می‌نماید (۳ 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 ۴۵۰ رأسی 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 ضایعه‌ای دیده نمی‌شد. ضایعات مشابه لبها بر روی قسمت انتهایی و خارجی لاله گوش راست و تاج سم‌پاهای 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 ۱۰٪ 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، ۳٪ مونوسیت و ۴٪ ائوزینوفیل را نشان می‌داد. همچنین پروتئین تام سرم ۶گرم در دسی‌لیتر و فیبرینوژن پلاسما ۴۰۰ میلی گرم در دسی لیتر اندازه‌گیری شد. در بررسی میکروسکپی نمونه‌های بافتی هیپرکراتوز، دژنرسانس آبکی در سلولهای کراتینوسیت همراه با گنجیدگی‌های ائوزینوفیلیک داخلی سیتوپلاسمی مشاهده گردید. همچنین نفوذ انواع سلولهای آماسی به ویژه نوتروفیلها در بافت همبند درم و در داخل بافت پوششی، پوستولهای داخل اپیدرم و پرخونی عروق بافت همبند از یافته‌های دیگر هیستوپاتولوژی بود (تصویر ۳).

بحث

گستردگی ضایعات جلدی در گوسفند مورد گزارش نشان می‌دهدکه اکتیمای واگیر در شکل جلدی نیز می‌تواند برای حیات دام تهدیدکننده باشد. هر چند رخداد 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 اکتیمای واگیر نسبت به شرایط محیطی مقاومت زیادی دارد به طوریکه 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 (۶ و ۱۱). انتقال ویروس به دنبال تماس مستقیم با دامهای مبتلا، خاک، وسایل، غذا و آبخوریهای آلوده صورت می‌گیرد (۹ و ۱۰). وجود ضایعات تخریبی حاصل از ساقه علوفه خشک و یا خاردار در پوست ناحیه لبها و یا تاج سم شرایط ورود ویروس به بافت را فراهم می‌نمایند (۴، ۹ و ۱۱).

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