

بررسی حساسیت رده‌های سلولی CEF، BT، MDBK و Vero در مقایسه با سلول RBK نسبت به تکثیر ویروس پاراآنفلوانزا گاوی تیپ ۳ (bPI₃V)

• مرزیه سبحانی

گروه زیست‌شناسی، موسسه آموزش عالی ربع رشید، تبریز، ایران

• محسن لطفی (نویسنده مسئول)

استادیار موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات،

آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

• مسعود رضا صیفی آباد شاپوری

استاد دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران

• مهدی قیامی راد

استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی،

اهر، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶-۰۴-۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶-۰۶-۱۴

Email: M.Lotfi@rvsri.ac.ir



چکیده

یکی از متداول‌ترین عوامل ویروسی ایجادکننده کمپلکس بیماری تنفسی گاو، ویروس پاراآنفلوانزا گاوی تیپ ۳ است که متعلق به جنس رسپیروویروس می‌باشد. از آنجایی که رشد و تکثیر این ویروس به منظور تشخیص، تولید واکسن و پروژه‌های تحقیقاتی درکشت‌های سلولی صورت می‌گیرد، تعیین مناسب‌ترین سویه سلولی اهمیت زیادی دارد. مطالعه حاضر به منظور تعیین حساسیت سلول‌های لاین Vero، BT، MDBK و همچنین سلول پرایمری CEF نسبت به تکثیر bPI₃V در مقایسه با رده سلولی RBK انجام شده است. بدین منظور ابتدا مناسب‌ترین میزان MOI برای سویه مورد نظر تعیین، سپس ویروس bPI₃ به هر رده سلولی با MOI معلوم و سه بار تکرار تلقیح گردید. میزان تکثیر با تیتراژ مایع رویی بعد از حداکثر ۹۰ درصد تخریب سلولی به روش کربر برآورد شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با روش آزمون آماری t-test نمونه‌های مستقل و نیز در قالب طرح کاملاً تصادفی با روش LSD (SAS9.4) صورت گرفت. نتایج نشان داد که تفاوت بین میزان رشد ویروس بر روی سلول RBK با سلول‌های MDBK و BT به صورت دو به دو معنی‌دار نبوده، اما نتایج آزمایش در مورد سلول‌های Vero و CEF در مقایسه با سلول RBK به صورت مجزا با ۹۹ درصد اطمینان، معنی‌دار می‌باشند. نتایج آزمون LSD حاکی از عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین سه سلول RBK، MDBK و BT و همچنین بین سلول‌های Vero و CEF می‌باشد، اما میان سلول‌های RBK، MDBK و BT با Vero و CEF با ۹۹ درصد اطمینان، اختلاف معنی‌داری وجود دارد. در مجموع با توجه به حساسیت بالای سلول RBK نسبت به تکثیر ویروس bPI₃، همچنین کشت آسان‌تر و سریع‌تر این سلول، استفاده از آن به عنوان سوپسترا برای bPI₃V ارجحیت دارد.

کلمات کلیدی: حساسیت سلولی، ویروس پاراآنفلوانزا گاوی تیپ ۳، RBK، MDBK، BT، Vero، CEF

• Veterinary Researches & Biological Products No 118 pp: 48-57

Evaluation of MDBK, BT, CEF and Vero cell lines sensitivity for replication of bovine parainfluenza virus type 3 (bPI₃V) in comparison with RBK cell line

By: Sobhani, M., Department of Biology, Higher Education Institute of Rabe-Rashid, Tabriz, Iran. Lotfi, M., (Corresponding Author) Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Seyfi Abad Shapouri, M.R., Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran. and Ghiami Rad, M., Microbiology Department, Faculty of Basic science, Islamic Azad University Ahar branch, Ahar, Iran.

Email: M.Lotfi@rvsri.ac.ir

Received: 2017-07-05 Accepted: 2017-09-05

Bovine parainfluenza virus type 3 (bPI₃V), as one of the most common viral agents causing bovine respiratory disease complex, belongs to the genus Respirovirus. The aim of this study was to compare the sensitivity of RBK, MDBK, BT, Vero cell lines and CEF primary cell for proliferation of bPI₃V. For this purpose, first the best MOI for the selected bPI₃V strain was determined on RBK cell line, and then used for sensitivity assay of each above cell lines. Tests repeated three times in the same condition and data were analyzed with independent samples t-test also as a completely randomized design with LSD method (SAS 9.4). According to the results of the t-test, there is no significant difference between the growth of the bPI₃V on the RBK with MDBK and BT cell lines, whereas the RBK cell line showed a statistically significant difference with respect to Vero and CEF cell lines separately (P-value 0.01). No significant differences were seen between the RBK, MDBK, and BT cell lines as well as between Vero and CEF cells based on LSD test results, but RBK, MDBK and BT in comparison with Vero and CEF are significantly different with 99% confidence. It can be concluded that the RBK cell line, due to its higher sensitivity to bPI₃V, as well as easier and faster cell culturing, is the superior to the other cell lines in this study.

Key words: Cell sensitivity, Bovine parainfluenza virus type 3, RBK, MDBK, BT, Vero, CEF

مقدمه

دامداری و دامپروری از مهم‌ترین صنایع هر کشوری می‌باشند و در این میان پرورش گاوهای شیری و گوشتی از دیرباز مورد توجه بوده و گردش مالی بسیار زیادی در این صنعت وجود دارد. شیوع بیماری‌های واگیر از جمله بیماری تنفسی گاو، مسئول خسارات عمده اقتصادی در تولیدات لبنی و فرآورده‌های گوشتی می‌باشد (۶، ۲۳، ۲۴). بسیاری از بیماری‌هایی که بر دستگاه تنفسی گاو اثر دارند در یک دسته کلی، تحت عنوان کمپلکس بیماری تنفسی گاو (BRD) قرار می‌گیرند (۲، ۳). بررسی‌های اخیر نشان می‌دهند که کمپلکس بیماری تنفسی گاو ناشی از اثرات متقابل ویروس، باکتری و ضعف در فاکتورهای مدیریتی از جمله استرس‌های ناشی از حمل و نقل، عدم وجود تهویه مناسب در دامداری‌ها و نبود تجهیزات لازم برای مقابله با استرس دمایی است (۵، ۸). به نظر می‌رسد ویروس‌ها علت اصلی می‌باشند و با تضعیف پاسخ ایمنی میزبان زمینه تهاجم باکتری‌ها را فراهم می‌کنند (۱۸). رایج‌ترین عوامل ویروسی شرکت‌کننده در BRD، عامل تورم بینی و نای عفونی گاو (IBR)، ویروس پارائنفلوئانزا گاوی تیپ ۳ (bPI₃V)، ویروس اسهال ویروسی گاو (BVDV)، آدنوویروس گاوی و ویروس سین‌سیشیال تنفسی گاو (BRSV) هستند و از عوامل باکتریایی می‌توان مانهمیا همولیتیکا و یاستورلا مولتوسیدا را نام برد (۱، ۲، ۹).

ویروس پارائنفلوئانزا گاوی تیپ ۳ به عنوان یکی از این عوامل ویروسی، متعلق به جنس رسپیروویروس از خانواده پارامیکسوویریده و راسته مونونگاویرالز بوده (۹، ۲۲، ۲۳) و دارای ژنوم RNA تک رشته‌ای پیوسته با پلارایت منفی است (۷). bPI₃V معمولاً سبب بیماری خفیف تا تحت بالینی می‌شود. بیماری ایجاد شده توسط این ویروس در اکثر نقاط دنیا از جمله ایران وجود دارد (۵). ویروس‌ها انگل اجباری سلول‌ها بوده و رشد و تکثیر آن‌ها به منظور تشخیص، تولید واکسن، پروژه‌های تحقیقاتی و توسعه‌ای در کشت‌های سلولی صورت می‌گیرد لذا شناسایی مناسب‌ترین سویه سلولی برای هر ویروس حائز اهمیت می‌باشد. در منابع و مقالات متعدد، سلول‌های MDBK (۱۱، ۱۳، ۱۶، ۲۰، ۲۶، ۲۸)، BT (۱۵)، CEF (۱۷) و Vero (۲۵) به عنوان سویه‌های سلولی مناسب برای رشد bPI₃V معرفی شده‌اند. رده سلولی RBK نخستین بار از سلول‌های اولیه کلیه گوساله نر دو روزه نژاد هلشتاین گرفته شد. حساسیت این رده سلولی برای تکثیر ویروس پارائنفلوئانزا گاوی تیپ ۳ پیش از این به اثبات رسیده است (۱۴) و به نظر می‌رسد این رده سلولی می‌تواند به عنوان سوبسترای بسیار مناسب برای رشد bPI₃V در نظر گرفته شود. لذا در این مطالعه، حساسیت رده‌های سلولی MDBK، BT، CEF و Vero نسبت به تکثیر

bPI₃V در مقایسه با سلول RBK به صورت مجزا تعیین گردید و نیز مقایسه حساسیت بین تمامی سلول‌های مذکور در ارتباط با ویروس پارائنفلوانزا گاوی تیپ ۳ به طور همزمان انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

سلول‌ها

از چهار رده سلولی پیوسته RBK (NCBI code: C541, IRKHBK)، MDBK (ATCC, CCL-22)، BT (ATCC, CRL-1390) و Vero (ATCC, CCL-81) و نیز سلول‌های پرایمری CEF به منظور تعیین حساسیت سلول‌ها نسبت به تکثیر bPI₃V استفاده شد. برای کشت و تکثیر تمامی رده‌های سلولی این تحقیق، محیط DMEM (Sigma) غنی شده با ۱۰ درصد سرم جنین گاو (FBS, Gibco) مورد استفاده قرار گرفت و به منظور بهینه‌سازی شرایط رشد، تمامی سلول‌ها در محیطی با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد دی‌اکسید کربن و ۹۵ درصد رطوبت انکوبه شدند (۲۷، ۱۵، ۱۴، ۴).

ویروس

از سویه ایرانی M13 تهیه شده در موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی که با روش کربر بر روی سلول RBK تیتراژ گردیده بود (10^{7.9} CCID₅₀/ml)، استفاده شد.

تعیین MOI مناسب در سلول RBK

بدین منظور سلول لاین RBK با MOIهای ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳ و ۰/۵ با ویروس bPI₃ سویه M13 تلقیح گردید و سرعت تخریب سلول به واسطه تکثیر ویروس در شرایط یکسان بررسی و تیتز نهایی آن‌ها با یکدیگر مقایسه شدند. در این راستا ابتدا فلاسک‌های ۲۵ سانتی‌متر مربعی سلول RBK تهیه و برای هر MOI، سه فلاسک با شرایط یکسان در نظر گرفته شد. یکی از فلاسک‌ها، برای شمارش سلولی، دیگری برای تلقیح ویروس و یک فلاسک نیز به عنوان کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفت.

برای تلقیح نمونه ویروسی، مقدار محاسبه شده از ویروس تهیه و به فلاسک کشت سلول اضافه می‌شد و به مدت یک ساعت و نیم در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد جذب داده می‌شد. سپس محیط کشت DMEM و ۳ درصد سرم گوساله به فلاسک مذکور اضافه شده و دوباره در انکوباتور قرار می‌گرفت.

مراحل فوق برای تمامی MOIهای مورد نظر سه بار تکرار شد. پس از اینکه تخریب سلولی به حدود ۹۰ درصد در هر فلاسک می‌رسید، فلاسک مذکور فریز می‌شد؛ سپس از فریز خارج و پس از ذوب، به مدت ۲۰ دقیقه در دور ۲۰۰۰ rpm سانتریفوژ شده و در نهایت نتایج MOIهای مختلف با تیتراژ مایع رویی هر یک با روش کربر بر روی سلول RBK مقایسه می‌شدند.

مقایسه حساسیت سلول‌های مختلف نسبت به سویه M13

رده‌های سلولی MDBK، BT، Vero و CEF که در مطالعات قبلی معرفی شده بودند (۱۱، ۱۳، ۱۵-۱۷، ۲۰، ۲۵، ۲۶، ۲۸) پس از سومین پاساژ بعد از خروج از تانک ازت، برای تعیین حساسیت استفاده شدند. به این منظور سلول‌های فوق با استفاده از مناسب‌ترین MOI بدست

آمده در مرحله قبل روی سلول RBK، با ویروس bPI₃V تلقیح گردیدند. روند و سرعت تخریب سلول به واسطه تکثیر ویروس در آن، طی سه پاساژ ویروس روی سلول مورد نظر در شرایط یکسان بررسی و تجزیه و تحلیل داده‌ها با روش آزمون آماری t-test نمونه‌های مستقل با نرم‌افزار SAS 9.4 انجام شد (P-value ≤ ۰/۰۱).

همچنین با توجه به اینکه آزمایش در شرایط یکسان انجام شده بود به منظور مقایسه میزان رشد bPI₃V بر روی سلول‌های مورد بررسی بطور همزمان، بار دیگر آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با روش LSD (نرم افزار SAS 9.4) نیز آنالیز شد (P-value ≤ ۰/۰۱).

نتایج

سلول‌های RBK تقریباً ۲۴ ساعت پس از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، تک لایه سلولی چسبنده با ظاهر شبه اپی‌تلیالی را ایجاد کردند (شکل ۱ الف) و پس از بررسی ۴۸ ساعته پوشش سلولی کامل مشاهده شد. کمتر از ۲۴ ساعت پس از تلقیح bPI₃V، اثرات سایتوپاتیک بر روی سلول RBK آغاز و سین‌سیشیا و کنده شدن سلول از سطح فلاسک مشاهده گردید و روند جدا شدن سلول از کف فلاسک حداکثر پنج روز پس از کشت ویروس تکمیل شد (شکل ۱ ب و ج).

سلول‌های MDBK نیز ۴۸ ساعت پس از کشت، پوشش سلولی کاملی را ایجاد کردند (شکل ۲ الف) و تقریباً یک روز پس از تلقیح bPI₃V اثرات سایتوپاتیک به صورت تشکیل سین‌سیشیا و سلول‌های غول پیکر مشاهده شد. تقریباً سه تا پنج روز پس از کشت ویروس ۹۹ درصد سلول‌ها از کف فلاسک جدا شده بودند (شکل ۲ ب).

سلول‌های فیروپلاستی BT سلول‌هایی نسبتاً دیر رشد بودند و مدت زمان تقریبی ۷۲ ساعته برای پرکردن کف فلاسک نیاز داشتند (شکل ۳ الف). این سلول‌ها تا ۴۸ ساعت پس از تلقیح bPI₃V اثرات سایتوپاتیک قابل مشاهده‌ای نشان ندادند و تقریباً پس از پنج روز، ۵۰ درصد سلول‌ها از کف فلاسک جدا شده بودند (شکل ۳ ب و ج) و این روند پس از هفت روز تکمیل شد.

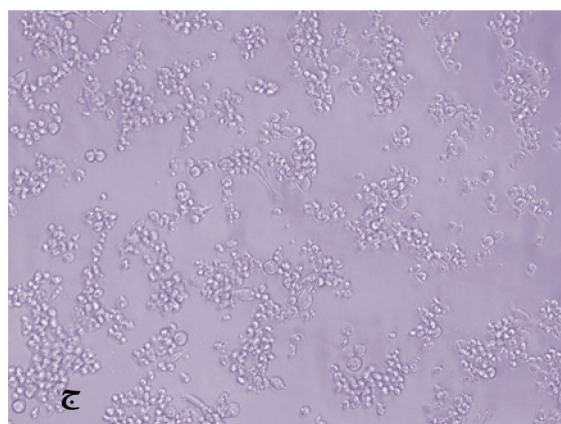
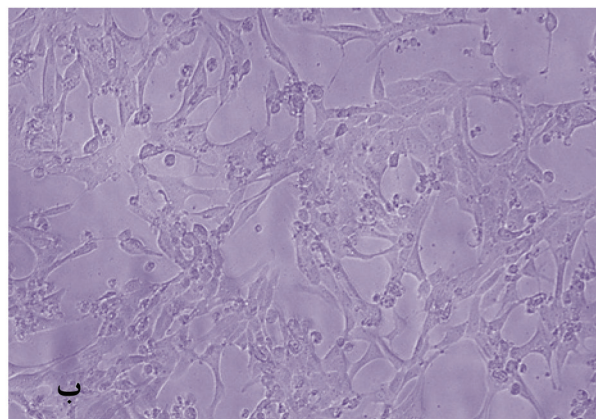
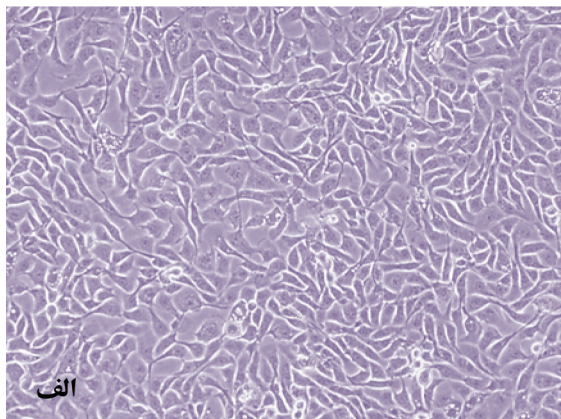
سلول‌های CEF پس از کشت ویروس اثرات سایتوپاتیک قابل مشاهده‌ای نشان ندادند و پس از گذشت مدتی به دلیل کهنه شدن سلول‌ها، مرز بین سلول‌ها قابل تشخیص نبود و پس از زمان تقریبی ۱۰ روز بدون جدا شدن سلول‌ها از کف فلاسک فریز شدند (شکل ۴).

نتایج کشت سلول Vero بسیار متغیر بود، تقریباً یک روز پس از کشت ویروس، سین‌سیشیا مشاهده می‌شد اما در برخی موارد حتی پس از گذشت مدت زمان حدود ۱۰ روز هم مقدار سلول‌های جدا شده از کف فلاسک قابل توجه نبود و به همان صورت فریز شدند (شکل ۵).

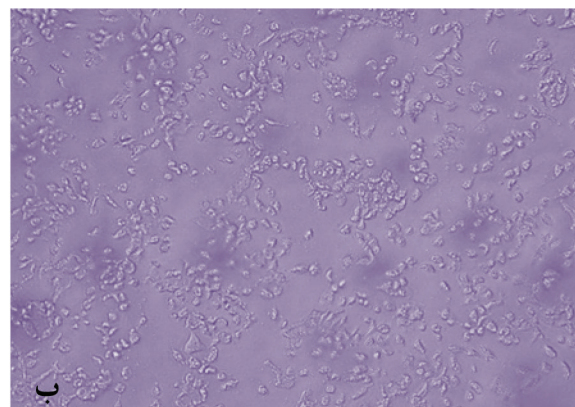
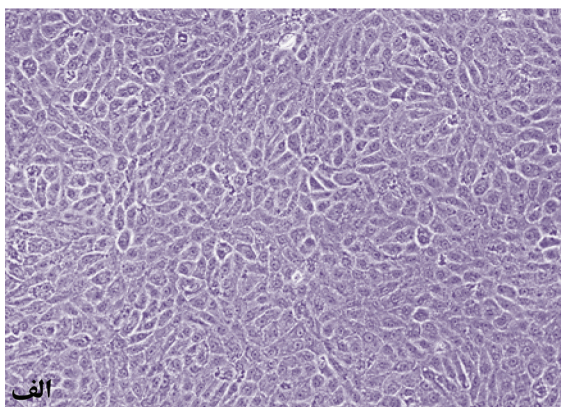
تیتز bPI₃V بر اساس CCID₅₀/ml بر روی سلول RBK، با سه بار تکرار با MOIهای مختلف حاصل شد. با توجه به نتایج فوق، از میان MOIهای بررسی شده، MOI = ۰/۲ برای ادامه کار بر روی سلول‌های منتخب در نظر گرفته شد (نمودار ۱). نتایج حاصل از رشد bPI₃V بر روی سلول‌های مورد نظر در جدول ۱ ذکر شده است.

سپس نتایج فوق با استفاده از آزمون t نمونه‌های مستقل (نرم افزار SAS 9.4) آنالیز شدند (جداول ۲ تا ۵).

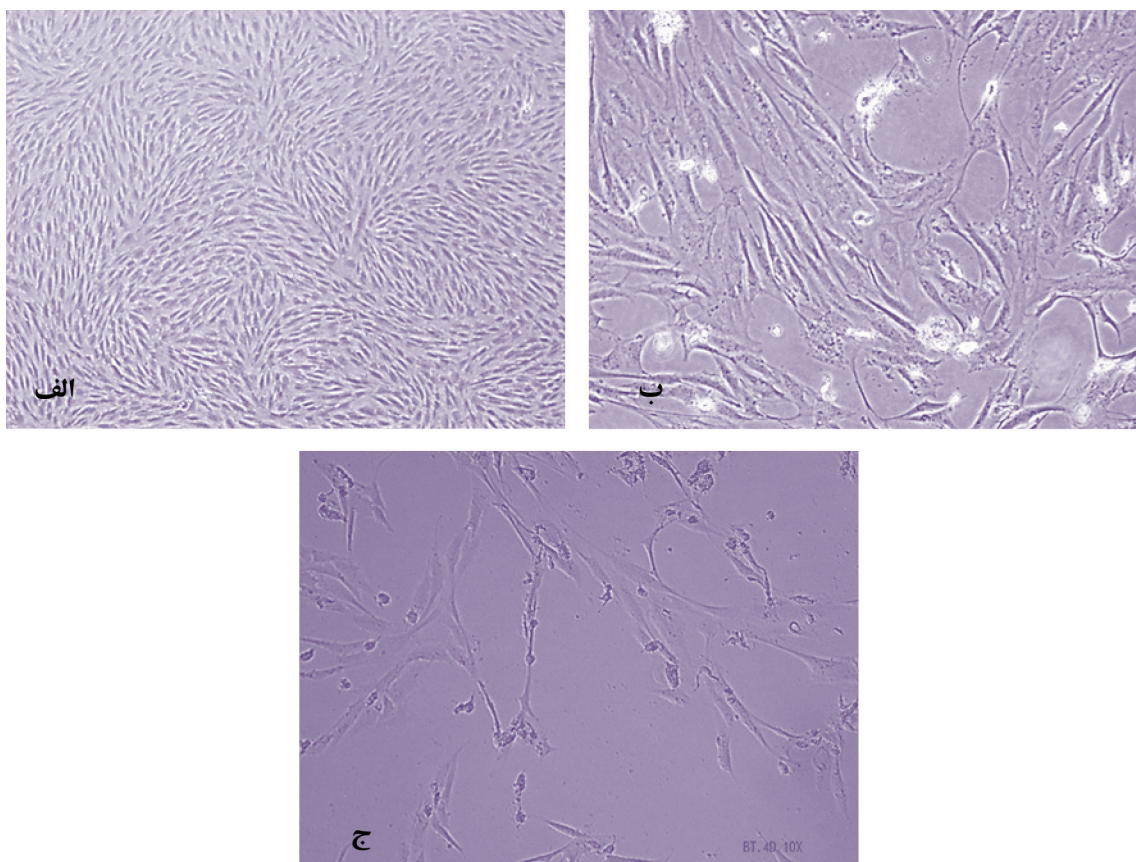
نتایج مقایسه میانگین با روش LSD نیز در قالب نمودار ۲ آمده است.



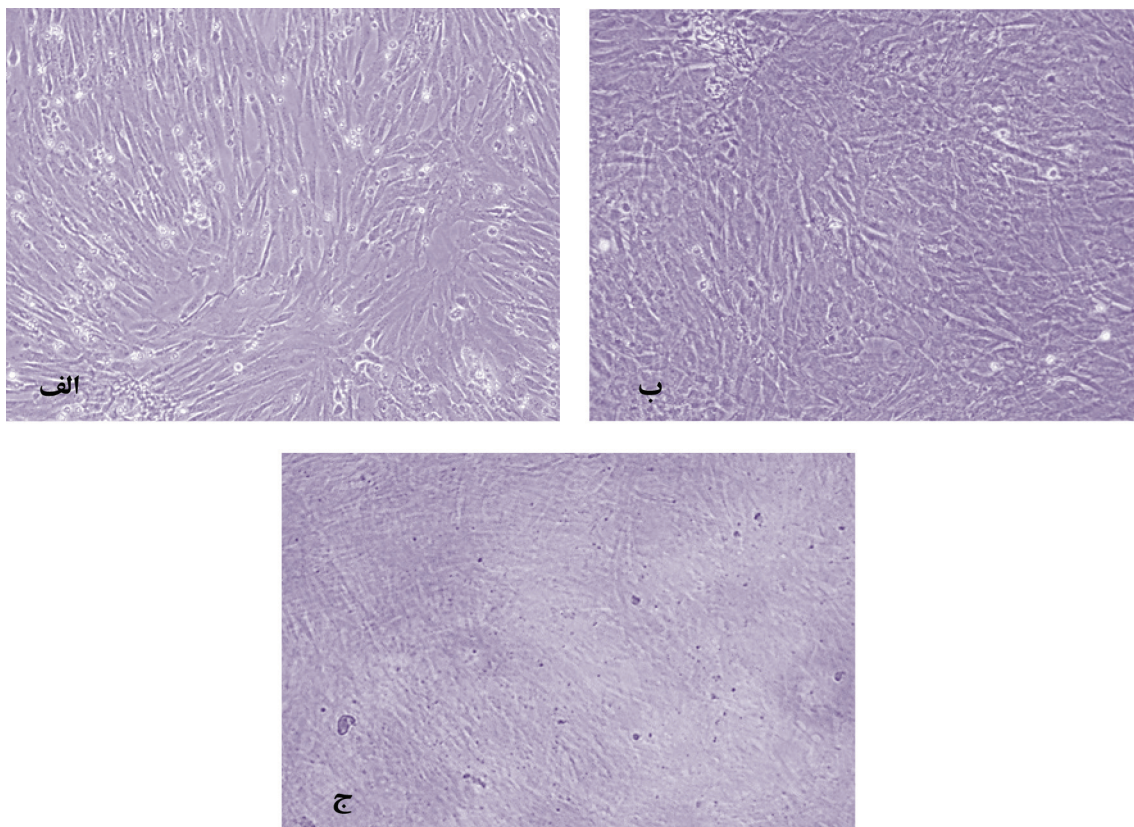
شکل ۱- الف) کشت ۲۴ ساعته سلول شبه اپی تلیال RBK با بزرگنمایی $\times 100$
ب و ج) ضایعات سایتوپاتیک ناشی از تکثیر ویروس bPI₃ در سلول RBK پس از چهار روز با بزرگنمایی $\times 100$



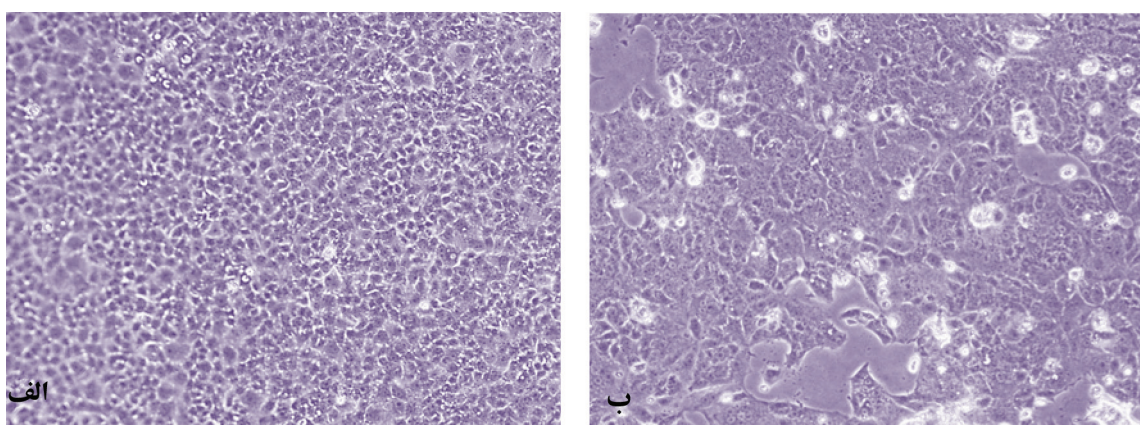
شکل ۲- الف) کشت ۷۲ ساعته سلول شبه اپی تلیال MDBK با بزرگنمایی $\times 100$ (ب) ضایعات سایتوپاتیک ناشی از تکثیر ویروس bPI₃ در سلول MDBK پس از پنج روز با بزرگنمایی $\times 100$



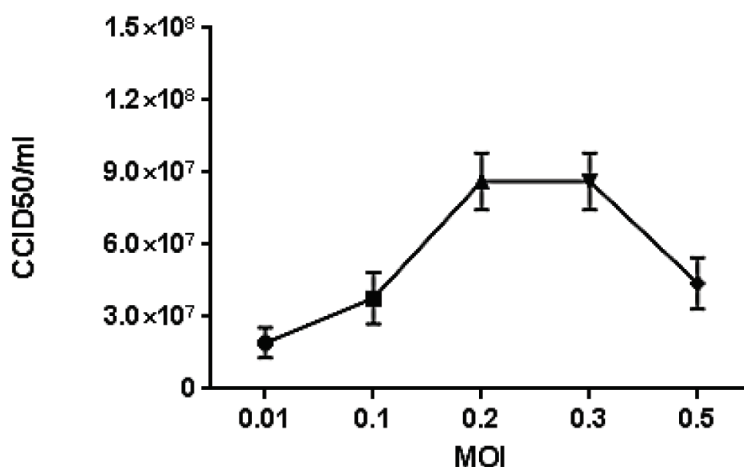
شکل ۳- الف) کشت پنج روزه سلول فیروپلاستی BT بزرگنمایی ۴۰× ب و ج) ضایعات سایتوپاتیک ناشی از تکثیر ویروس bPI3 در سلول BT پس از چهار روز با بزرگنمایی ۱۰۰×



شکل ۴- الف) کشت ۲۴ ساعته سلول فیروبلاستی CEF بزرگنمایی ۱۰۰×، ب و ج) سلول CEF به ترتیب پس از دو روز و چهار روز تلقیح ویروس bPI₃ با بزرگنمایی ۱۰۰×

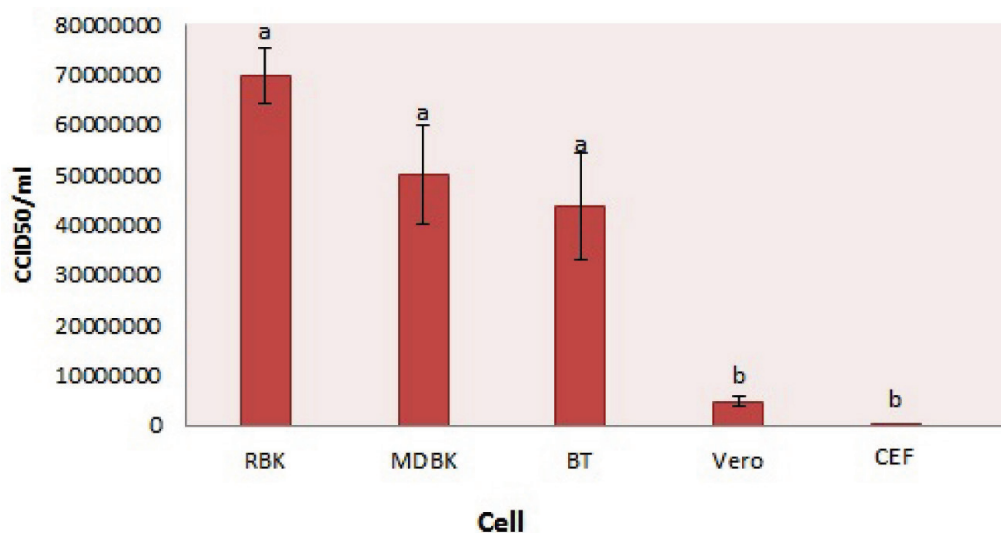


شکل ۵- الف) کشت ۴۸ ساعته سلول شبه اپی تلیالی Vero با بزرگنمایی ۴۰× (ب) ضایعات سایتوپاتیک ناشی از تکثیر ویروس bPI₃ در سلول Vero پس از سه روز با بزرگنمایی ۱۰۰×



نمودار ۱- میانگین تیتراژ bPI₃V با سه بار تکرار روی سلول RBK با MOIهای مختلف براساس

CCID50/ml (GraphPad Prism 6.07)



نمودار ۲- مقایسه میانگین تیتراژ bPI₃V با MOI=۰/۲ بر روی سلول‌های RBK، MDBK، BT، Vero و CEF با آزمون LSD

جدول ۱- نتایج حاصل از رشد bPI₃V با MOI=۰/۲ بر روی سلول‌های منتخب با سه بار تکرار و تیتراژ آن‌ها بر روی

سلول RBK براساس CCID50/ml

سلول	تکرار ۱	تکرار ۲	تکرار ۳	میانگین
RBK	۱۰ ^{۷/۷}	۱۰ ^{۷/۹}	۱۰ ^{۷/۹}	۱۰ ^{۷/۸۴}
MDBK	۱۰ ^{۷/۳}	۱۰ ^{۷/۷}	۱۰ ^{۷/۹}	۱۰ ^{۷/۶۹}
BT	۱۰ ^{۷/۹}	۱۰ ^{۷/۳}	۱۰ ^{۷/۵}	۱۰ ^{۷/۶۴}
Vero	۱۰ ^{۶/۱}	۱۰ ^{۶/۹}	۱۰ ^{۶/۷}	۱۰ ^{۶/۶۷}
CEF	۱۰ ^{۱/۷}	۰	۱۰ ^{۲/۳}	۱۰ ^{۱/۹۲}

جدول ۲- مقایسه میانگین تیتراژ bPI_3V با $MOI = 0.2$ دو سلول MDBK و RBK با آزمون t نمونه‌های مستقل (ns: فاقد اختلاف معنی‌دار)

سلول	میانگین CCID50/ml
RBK	۱۰.۷/۸۴
MDBK	۱۰.۷/۶۹
t Value	۱ ^{ns}
t(۴, ۰/۹۹)	۳/۷۴۷

جدول ۳- مقایسه میانگین تیتراژ bPI_3V با $MOI = 0.2$ دو سلول RBK و BT با آزمون t نمونه‌های مستقل (ns: فاقد اختلاف معنی‌دار)

سلول	میانگین CCID50/ml
RBK	۱۰.۷/۸۴
BT	۱۰.۷/۶۴
t Value	۱/۲۶ ^{ns}
t(۴, ۰/۹۹)	۳/۷۴۷

جدول ۴- مقایسه میانگین تیتراژ bPI_3V با $MOI = 0.2$ دو سلول RBK و Vero با آزمون t نمونه‌های مستقل (**: دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد)

سلول	میانگین CCID50/ml
RBK	۱۰.۷/۸۴
Vero	۱۰.۶/۶۷
t Value	**۶/۵۲
t(۴, ۰/۹۹)	۳/۷۴۷

جدول ۵- مقایسه میانگین تیتراژ bPI_3V با $MOI = 0.2$ دو سلول RBK و CEF با آزمون t نمونه‌های مستقل (**: دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد)

سلول	میانگین CCID50/ml
RBK	۱۰.۷/۸۴
CEF	۱۰.۱/۹۲
t Value	**۷/۱۳
t(۴, ۰/۹۹)	۳/۷۴۷

سلول چسبنده RBK مانند حساسیت بالا نسبت به این ویروس و تیتراژ بالای ویروس تکثیر شده در آن، همچنین کشت آسان‌تر و سریع‌تر این سلول، استفاده از آن به عنوان سوبسترا ارجحیت دارد.

تشکر و قدردانی

از کارکنان محترم بخش کنترل کیفی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج و دیگر عزیزانی که در طول این پژوهش از مساعدت و همکاری صمیمانه‌شان برخوردار بوده‌ایم تشکر و قدردانی می‌نمایم.

منابع مورد استفاده

1. Andrews, AH. 2004. Bovine medicine: diseases and husbandry of cattle. Blackwell Science, Hoboken.
2. Apley, M. 2006. Bovine respiratory disease: pathogenesis, clinical signs, and treatment in lightweight calves. *The Veterinary clinics of North America: Food animal practice*. 22:399-411.
3. Baker, JC., Ellis, JA., Clark, EG. 1997. Bovine Respiratory Syncytial Virus. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 13:425-454.
4. Breker-Klassen, MM., Yoo, D., Babiuk, LA. 1996. Comparisons of the F and HN gene sequences of different strains of bovine parainfluenza virus type 3: relationship to phenotype and pathogenicity. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 60:228-236.
5. Bryson, DG. 1985. Calf pneumonia. *The Veterinary clinics of North America Food animal practice*. 1:237-257.
6. Carriere, PD., Maxie, MG., Wilkie, BN., Savan, M., Valli, VE., Johnson, JA. 1983. Exposure of calves to aerosols of parainfluenza-3 virus and *Pasteurella haemolytica*. *Canadian journal of comparative medicine*. 47:422-432.
7. Lamb, Robert A., Parks, Griffith D. 2013. Paramyxoviridae. 967-990. Knipe, DM., Howley, PM. *Fields' Virology*: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
8. Gale, C. 1970. Role of Parainfluenza-3 in Cattle. *Journal of Dairy Science*. 53:621-625.
9. Horwood, P., Gravel, J., Mahony, T. 2008. Identification of two distinct bovine parainfluenza virus type 3 genotypes. *The Journal of general virology*. 89:1643 - 1648.
10. Kojouri, G., Hemmatzadeh, F., Taghadosi, C. 2011. Serological survey on bovine parainfluenza type 3 in Shahrekord district (Iran). *Comparative Clinical Pathology*. 20:201-204.
11. Konishi, M., Ohkura, T., Shimizu, M., Akiyama, M., Kameyama, K., Takeuchi, K. 2014. Complete Genome Sequence of the First Isolate of Genotype C Bovine Parainfluenza Virus Type 3 in Japan. *Genome Announcements*. 2:1-2.
12. Lotfi, M., Kamalzadeh, M., Navidpour, S., Javadi, S. 2016. Se-

بحث

بیماری تنفسی گاو یکی از بیماری‌هایی است که سالانه خسارات اقتصادی فراوانی را به صنعت دامداری و دامپروری کشورهای پرورش‌دهنده گاو وارد می‌کند (۶، ۲۳، ۲۴). در این میان با وجود نقش بسیار مهم ویروس پارائفلوانزا گاو تیپ ۳ به عنوان یکی از اصلی‌ترین عوامل ویروسی ایجادکننده کمپلکس بیماری تنفسی گاو، مطالعات انجام شده در مورد آن محدود می‌باشد و به نوعی می‌توان آن را یک بیماری فراموش شده تلقی کرد. در ایران میزان شیوع این ویروس براساس مطالعات سرواپیدمیولوژیک، در چند شهر تعیین شده که به شرح زیر می‌باشند: کرمان ۱۰۰ درصد (۲۱)، مشهد ۹۰ درصد (۱۹)، شهرکرد ۲۹/۷۵ درصد (۱۰)، اصفهان ۸۴/۴ درصد (۲۳) و خوزستان ۴۵/۲ درصد (۱۲).

رشد و تکثیر ویروس‌ها چه به عنوان جداسازی ویروس (روش استاندارد طلایی در تشخیص) و یا در تولید واکسن و پروژه‌های تحقیقاتی به نوعی با کشت سلول مرتبط هستند، لذا شناسایی مناسب‌ترین سویه سلولی برای هر ویروس حائز اهمیت می‌باشد. در مطالعاتی که بر روی bPI₃V صورت گرفته از سلول‌های مختلفی استفاده شده است (۱۱، ۱۳، ۱۵-۱۷، ۲۰، ۲۵، ۲۶، ۲۸) اما حساس‌ترین سلول نسبت به این ویروس تاکنون تعیین نشده بود.

به منظور دستیابی به شرایط بهینه تکثیر ویروس، تلقیح ویروس بذر با MOI‌های مشخص تعیین کننده است. در مطالعه حاضر طی بررسی MOI‌های مختلف، نتایج روی سلول حساس RBK بدست آمد که این نتایج نشان دادند بالاترین تیتراژ ویروسی بدست آمده در MOI=۰/۲ می‌باشد و با افزایش نسبت ویروس بذر به سلول، تغییری در افزایش تیتراژ حاصل نشد بلکه رو به کاهش نیز نهاد (مودار ۱). بنابراین برای تکثیر ویروس از MOI=۰/۲ استفاده شد. سپس به منظور مقایسه حساسیت سلول RBK با سلول‌های Vero، CEF، BT، MDBK و CEF تلقیح ویروس به همه این سلول‌ها با سه دفعه تکرار انجام شد.

با توجه به نتایج تیتراژ حاصل شده برای هر سلول، تفاوت بین میزان رشد ویروس بر روی سلول RBK با سلول‌های MDBK و BT به صورت دو به دو معنی‌دار نبود اما نتایج، در مورد میزان رشد ویروس بر روی سلول RBK در مقایسه با دو سلول Vero و CEF به صورت مجزا، با ۹۹ درصد اطمینان، معنی‌دار می‌باشند (P-value ≤ ۰/۰۱) (جدول ۲ تا ۵).

با توجه به اینکه آزمایش در شرایط یکسان انجام شده بود به منظور مقایسه میزان رشد bPI₃V بر روی سلول‌های مورد بررسی بطور همزمان، بار دیگر آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با روش LSD (نرم افزار SAS 9.4) نیز آنالیز شد. نتایج این آزمون حاکی از عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین سه سلول RBK، MDBK و BT و همچنین بین سلول‌های Vero و CEF می‌باشد، اما میان سلول‌های RBK، MDBK و BT با Vero و CEF به لحاظ آماری با ۹۹ درصد اطمینان اختلاف معنی‌داری وجود دارد یعنی تفاوت چشم‌گیری میان حساسیت دو گروه سلول فوق برای رشد bPI₃V می‌باشد (P-value ≤ ۰/۰۱).

علی‌رغم نتایج آماری حاصل شده بین سلول‌های RBK، MDBK و BT که بیانگر این موضوع هستند که تمامی سلول‌های مذکور سوبسترای مناسب برای رشد bPI₃V هستند اما با نگاه کلی به خصوصیات ویژه‌ی

- CC BY-NC-SA