پنجمين همايش ملي بيوتكنولوژي جمهوري اسلامي ايران
3-5 آذر ماه 1386، سالن اجلاس سران
The 5th National Biotechnology Congress of Iran
24-26 Nov, 2007, Summit Meeting Conference Hall, Tehran- Iran

معرفي يک واکنش زنجيره اي پليمراز بهينه با پرايمرهاي دژنره جهت شناسايي ويروس کم خوني عفوني جوجه در واکسن هاي تجاري طيور

دکتر محمد رضا باسامي، دکتر مجيد جمشيديان مجاور*،دکتر حسام دهقاني، دکتر ابوالفضل غني يي، امير ماهوتي
دانشکده دامپزشکي دانشگاه فردوسي مشهد

يکي از موارد کنترل کيفي مواد بيولوژيک دامپزشکي و بخصوص واکسنها به جهت کسب اجازه مصرف، تست از نظر عدم حضور عوامل خارجي[1] مي باشد. يکي از اين موارد، تست واکسنهاي طيور از لحاظ عدم حضور ويروس کم خوني عفوني جوجه ها[2] مي باشد. اين ويروس موجب ايجاد کم خوني، سرکوب ايمني و مرگ و مير در جوجه هاي جوان مي شود. روشهاي معمول کشف آلودگي مواد بيولوژيک به CIAV وقت گير و پر زحمت مي باشد. در اين بررسي يک واکنش زنجيره اي پليمراز (PCR) بهينه سازي شده با پرايمر هاي دژنره[3] (چهار پرايمر رفت و دو پرايمر برگشت) با شرايط يک ميلي مول يون منيزيوم، pH 9.2 و افزودني گليسرول جهت شناسايي ويروس CIAV توسعه يافت. با spike نمودن واکسن ويروس لارنگوتراکئيت (ILTV) با مقادير مشخص از DNA ويروسCIAV ، محدوديت رهگيري اين تست، ng/µl $3/056 \times 10^{-9}$ تعيين گرديد. ويژگي اين تست براي جستجوي CIAV در حضور ويروس هاي برونشيت، نيوکاسل، گامبورو و لارنگو تراکئيت محک زده شد. اين تست، ممکن است بتواند به عنوان يک روش سريع، ساده با محدوديت رهگيري[4] بالا و ويژگي مطلوب، جهت شناسايي آلودگي به CIAV در واکسنهاي طيور، در راستاي کنترل کيفي واکسنهاي زنده و کشته طيور بکار گرفته شود. براي اعتبار سنجي[5] اين تست مقايسه با ساير روشهاي معتبر و غربالگري نمونه هاي متعددي از واکسن هاي طيور ضروري است.

کلمات کليدی: کنترل کيفي، ويروس کم خوني عفوني جوجه ها (CIAV)، واکسنهاي طيور

مقدمه:

واکسن هاي دامپزشکي اغلب تحت عنوان Biologicals يا محصولات بيولوژيکي[6] طبقه بندي مي شوند. اين نام گذاري به واسطه اين است که اين واکسن ها عمدتا توسط کشت ميکروارگانيسم ها در سلول هاي بافت زنده با منشا حيواني، بعنوان سوبسترا، تهيه مي شوند. محيط کشت نيز غالبا با ترکيبات اختصاصي با منشا حيواني، مشخصا سرم، همراهي مي شوند تا رشد رضايت بخش ميکروارگانيسم ها تضمين گردد. در روند توليد واکسن نيزموادي با منشا حيواني، همانند تريپسين مورد استفاده قرار مي گيرد (1). نتيجتا همواره يک خطر بالقوه براي آلودگي واکسنها با عوامل خارجي وجود دارد.

موارد متعددي از آلودگي واکسن هاي مورد مصرف در انسان، دام و طيور با عوامل خارجي گزارش شده است(2و3). ميزان اين آلودگي ها در واکسن هاي طيور بيشتر از ديگر واکسن ها مي باشد. علت آن هم گستردگي صنعت طيور و جهاني تر بودن آن در مقايسه با ديگر گونه هاي دامي مي باشد. رابطه مستقيمي بين آلودگي تخم مرغ هاي جنين دار و آلودگي واکسن ها وجود دارد. در سال 2003 شدت آلودگي در تخم مرغ هاي نطفه دار عاري از پاتوژن هاي خاص به حدي فراگير بود که اين سال را به عنوان سال آلودگي[7] ناميدند(4). در اين راستا سه توليد کننده معظم تخم مرغ

[1] extraneous agents
[2] Chicken infectious anemia virus(CIAV)
[3] Degenerate
[4] limit of detection
[5] Validation
[6] Biological products
[7] 2003, the year of contamination

عاري از پاتوژن هاي خاص[8] به يک يا چند ويروس لکوز لنفوئيد، آدنوويروس پرندگان، و رئوويروس پرندگان آلوده بودند (5). در خلال سالیان توسعه صنعت طيور در گستره جهاني حرکت فرامرزي واکسن هاي دامپزشکي افزايش يافته و به طور فزاينده اي در حال گسترش بيشتر نيز مي باشد. تست هاي هماهنگ تعيين عدم حضور عوامل خارجي بعنوان يک موضوع اصلي در عرصه بين المللي براي واکسن هاي دامپزشکي مطرح مي باشد.

هدف از اين بررسي، معرفي يک واکنش زنجيره اي پليمراز بهينه جهت شناسايي ويروس کم خوني عفوني جوجه در واکسن هاي تجاري طيور مي باشد.

مواد و روش کار:

انتخاب پرايمر: در اولين مرحله يک جفت پرايمر بر اساس منابع موجود انتخاب شد و سپس توالي پرايمرهاي انتخاب شده با استفاده از برنامه جستجوگر BLAST در بانک هاي اطلاعات ژني براي يافتن هموLوژي با توالي ساير سويه ها مورد ارزيابي قرار گرفت. بر اساس نتايج حاصله، Degeneracy لازم در توالي پرايمرها اعمال گرديد. توالي پرايمر رفت و برگشت به شرح ذيل نهايي گرديد:

Forward : 5'-GAC TGT RAG ATG GMA AGA CGA GCT C-3'
Reverse : 5'-GRC TGA AGG ATC CCT CAT TC-3'

استخراج DNA: DNA نمونه هاي واکسن با استفاده از روش فنل- کلروفرم انجام شد.

انجام مراحل PCR : براي انجام PCR، در هر واکنش موادي با غلظت نهايي: بافر 1X PCR، dNTP از هريک0.2mM ، کلريد منيزيوم 1mM، از هر يک از آغازگرهاي رفت و برگشت 0.4 pM/µl و آنزيم تک 1 واحد به DNA و آب اضافه گرديد. برنامه چرخه اي واکنش زنجيره اي پليمراز شامل واسرشته سازي 94 درجه بمدت 30 ثانيه، 30 ثانيه در 58 درجه براي ذوب و 60ثانيه در 72 درجه براي اتصال بود.

کنترل داخلي: جهت اثبات صحت انجام مراحل تا انجام واکنش PCR و کنترل کينتيک واکنش از پرايمرهاي ژن 12srRNA استفاده شد.

تعيين شرايط بهينه براي انجام PCR: جهت تعيين شرايط بهينه در ابتدا علاوه بر تعيين دماي اتصال مطلوب، ترکيبي متشکل از چهار غلظت $MgCl_2$ (1و1.5و2 و2.5ميلي مولار) و چهار pH متفاوت (8.3 و8.6 و8.9 و9.2) شانزده حالت مختلف بررسي گرديد. در مرحله بعد تاثير سه افزودني گليسرول، ژلاتين و DMSO مورد آزمون قرار گرفت (PCR Optimization Kit). امپليکون حاصل از PCR جهت تعيين توالي ارسال گرديد (Bioneer, South Korea).

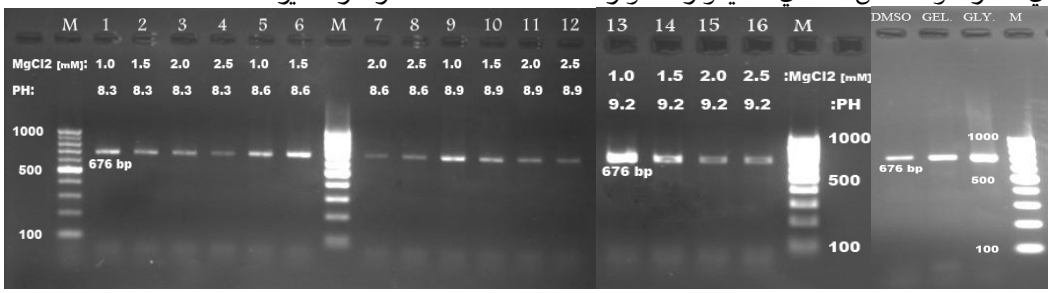
تعيين دامنه حساسيت تست (Limit of Detection): به منظور تعيين دامنه حساسيت تست، ميزان محصول PCR به روش اسپکتروفتومتري سنجش گرديد. سپس از اين محصول براي spike نمودن و تهيه 12 رقت متوالي (10^{1} - 10^{12}) استفاده گرديد آنگاه از هر رقت 2µl در واکنش PCR، Spike گرديد.

تعيين ويژگي پرايمرها: به منظور محک زدن ويژگي پرايمرهاي مورد استفاده در اين تست، شناسايي DNA ويروس CIAV در حضور ژنوم ويروس هاي برونشيت، نيوکاسل، گامبورو و لارنگو تراکئيت ارزيابي گرديد.

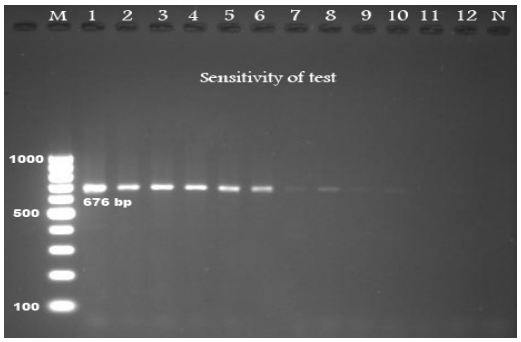
نتايج و بحث:

[8] Specific pathogen free (SPF)

صحت استخراج DNA در روي ژل آگاروز تاييد شد. محصول PCR مربوط به كنترل داخلي تكثير شده با پرايمرهاي ژنrRNA 12S، به صورت باندي به اندازه530 جفت باز نيز پس از الكتروفورز بر روي ژل آگاروز مشاهده گرديد. محصول PCR مورد انتظار با پرايمرهايCIAV، با اندازه 676 جفت باز نيز پس از الكتروفورز رويت گرديد. هويت محصول PCR پس از آناليز توالي ها تاييد گرديد. با توجه به اينكه باندهاي حاصله، در اين مرحله، از نظر ميزان محصول از كميت و كيفيت مناسبي برخوردار نبود، شرايط فوق الذكر براي بهينه سازي تست بكار گرفته شد و محصولات مربوط به هر مرحله از بهينه سازي بر روي ژل آگارز مشاهده شد (شكل1). در مرحله اول بهينه سازي، $MgCl_2$ با غلظت 1ميلي مولار، pH 9/2 و دماي اتصال 58 درجه سانتي گراد به عنوان بهترين شرايط تعيين گرديد. در مرحله دوم بهينه سازي كه با منظور نمودن افزودني هاي(Additives) DMSO (5%)، ژلاتين (0/05%)، گليسرول (10%) انجام گرفت، واكنش حاوي گليسرول بهترين نتيجه را بدنبال داشت (شكل1). در آزموني كه براي تعيين دامنه حساسيت تست به انجام رسيد، مشخص گرديد كه تست توسعه يافته قادر به شناسايي مولكول هدف با غلظت$3/056\times10^{-9}$ng/µl مي باشد (شكل2). اين تست قادر بود كه در حضور ويروسهاي هاي برونشيت عفوني (IBV)، نيوكاسل (NDV)، گامبورو (IBDV) و لارنگو تراكئيت عفوني (ILTV) صرفا مولكول هدف يعني ويروس CIAV را شناسايي نمايد. اين پاسخ مي تواند نمايانگر نسبي ويژگي پرايمر هاي انتخاب شده باشد. اين تست، ممكن است بتواند به عنوان يك روش سريع، ساده با محدوديت رهگيري بالا و ويژگي مطلوب، جهت شناسايي آلودگي به CIAV در واكسنهاي طيور، در راستاي كنترل كيفي واكسنهاي زنده و كشته طيور بكار گرفته شود. براي اعتبار سنجي اين تست (Validation) لازم است، اين روش با ساير روشهاي معتبر، و بر روي نمونه هاي متعددي از واكسن هاي طيور مورد استفاده قرار گيرد.



شكل1) تصوير ژل آگارز مراحل اول و دوم بهينه سازي شرايط تستPCR



شكل2) تصوير ژل آگارز مرحله تعيين حساسيت(Limit of Detection) تست

منابع:

1.British Pharmacopoeia (2007) British Pharmacopoeia (Veterinary)Appendices, Appendix XV J (Vet) 2. Substances of Animal Origin for the Production of veterinary Vaccines.
2. McRearden B(2003) What is coming through that needle? Sources of Pathogenic Vaccine Contamination.Townsend Letters to Doctors, the Examiners of Alternative Medicines 243 (Oct.) issue, p. 80-89
3. Strickler HD, Rosenberg PS, Devesa SS, Hertel J, Fraumeni JF, Goedert JJ (1998) Contamination of Poliovirus Vaccines With Simian Virus 40 (1955-1963) and Subsequent Cancer Rates. JAMA 279:292-295.
4.Murray G (2003) Global SPF Supplies. AVPA Scientific Meeting, Melbourne 12-13 November.
5.Nicholas RA, Westbury B, Goddard RD, Luff PR (1989) Survey of vaccines and SPF flocks for contamination with chick anaemia agent. Vet Rec. 18; 124 (7) 170-1.

Summary:

An Optimized Degenerate Polymerase Chain Reaction (PCR) for the Detection of Chicken Infectious Anemia Virus (CIAV) in Commercial Poultry Vaccines

For quality control of biologicals of veterinary use, the absence of extraneous agents needs to be certified. one of the Requirements for quality control of avian viral vaccines is to demonstrate freedom from extraneous and adventitious agents, including Chicken Infectious anemia virus (CIAV). Chicken Infectious Anemia Virus can cause anemia, immunosuppression, and mortality in young chickens. To date the methods to detect CIAV in biologicals are time consuming and laborious. In this assay, an optimized degenerate polymerase chain reaction (PCR) for the detection of chicken infectious anemia virus (CIAV) was developed. The optimum concentration of $MgCl_2$ and pH was 1.0 Mm and 9.2 and glyserol was used as an additive. After spiking of an ILTV vaccine with DNA of CIAV, the sensitivity of the PCR assay or the limit of detection for the primers and test was 3.056×10^{-9} ng/µl. In the presence of different viruses, including IBV, NDV, IBDV and ILTV, the primers and the test was able to amplify CIAV.The test described here may provide a rapid, sensitive and specific method for the detection of contamination of poultry vaccines with CIAV, and may be applied for quality control of live and killed vaccines. However, to validate this assay it has to be employed on a vast number of vaccine samples, while it is compared with other conventional methods.

Key words: quality control, chicken infectious anemia virus (CIAV), poultry vaccines