بسمه تعالی

مرکز بین المللی علوم و تکنولوژی
پیشرفته و علوم محیطی

چهارمین همایش ملی بیوتکنولوژی
جمهوری اسلامی ایران

چهارمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران

۲۴الی ۲۶مرداد ماه سال ۱۳۸٤

گواهی می شود جناب **آقای مسعود طالب خان گروسی**

در چهارمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران که در مرکز بین المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی در کرمان- ماهان برگزار گردید، با ارائه مقاله به صورت پوستر تحت عنوان: « **بررسی مقدماتی وضعیت آلودگی گله های گاوهای شیری به ویروس BVD در نمونه های شیر مخازن (Bulk Milk Samples) با استفاده از روش Nested RT- PCR** » شرکت داشته اند. موفقیت روزافزون ایشان را در عرصه های علمی تحقیقاتی از درگاه خداوند متعال خواستاریم.

با تشکر و آرزوی توفیق الهی

محمد میرزایی

دبیر چهارمین همایش ملی بیوتکنولوژی

جمهوری اسلامی ایران و رئیس مرکز

چهارمین همایش میکروبیولوژی جمهوری اسلامی ایران
کرمان، مرداد ۱۳۸۷

بررسي مقدماتي وضعيت آلودگي گله هاي گاوهاي شيري به ويروس BVD در نمونه هاي شير مخازن (Bulk Milk Samples) با استفاده از روش Nested RT- PCR

مسعود طالب خان گروسي*، مهدي رضا بلسامي* و احسان ا... اشاري صفوي*
*گروه علوم درماگاهي دانشكده دامپزشكي دانشگاه فردوسي مشهد
مشهد، جاده اسديه، جنب مزرعه و گلسرستاري رضوي دانشكده دامپزشكي دانشگاه فردوسي مشهد. كد پستي ۹۱۸۵۷۱۹۵۸۶،
تلفن: ۰۵۱۱-۶۶۲۰۱۰۱-۲، دورنگار: ۰۵۱۱-۶۶۲۰۱۶۶
gsafavssm@ferdowsi.um.ac.irE.mail

Abstract

Bovine viral diarrhea virus (BVDV), a member of the Pestivirus genus, is an important pathogen of dairy cattle which can cause several clinical syndromes ranging from subclinical to sever disease such as early embryonic death, abortion, congenital defect or the birth of persistently infected (PI) calves which are immunotolerant to the agent. The objective of the present pilot study was to detect the presence of BVD virus in somatic cells from bulk milk samples by the use of a nested RT-PCR as a screening test.
In total, the bulk milk of 18 dairy cattle herds in Mashhad suburb of Iran, covering 4105 milking cows were tested for BVD virus presence. None of the herds had been vaccinated against BVDV. RNA was extracted from somatic cells of bulk tank milk samples. Oligonucleotide primers were selected based on the 5' untranslated region BVD virus genome. BVD virus was detected in 2 (11.1%) out of 18 industrial herds representing 742 milking cows.
According to the high sensitivity and specificity of nested RT-PCR test, it is concluded that this invaluable procedure is less complicated and cost effective for detection of BVD virus as a reliable screening test in dairy cattle herds. This study revealed that, at least 11.1% of bulk milk samples examined were BVDV positive, indicating the presence of PI milking cows in dairy cattle herds in Mashhad suburb of Iran.
Keywords: BVDV, Nested RT-PCR, Bulk milk.

مقدمه

ويروس BVD يك RNA ويروس متعلق به جنس Pestivirus و از خانواده Flaviviridea مي باشد. اين ويروس باعث بروز خسارات اقتصادي سنگيني در صنعت دامپروري بسياري از نقاط دنيا مي گردد. خسارات ناشي از ابتلاء به اين بيماري شامل: اختلالات توليد مثلي، ناباروري، مرگ زودرس جنين، سقط، ناهنجاريهاي مادرزايي، تلفات و در نهايت حلف زودرس دامهاي مبتلا مي باشد. مهمترين منبع دفع و انتشار ويروس، دامهايي با عفونت پايدار (PI) (Persistence infection) مي باشد. دامهاي PI، گاوهايي هستند كه در دوران قبل از روز ۱۲۵ جنيني، يعني قبل از تكامل سيستم ايمني جنين، به ويروس BVD آلوده شده و نسبت به اين ويروس داراي تحمل ايمني هستند (Smith. B. P., 2002.). بنابراين شناسايي دامهاي PI در گله ها، مهمترين قدم در جهت مقابله با اين بيماري است. لذا به منظور شناسايي حضور اينگونه دامها در سطح دامپروريها، انجام يك تست غربالگري(Screening test) معتبر، ضروري است. هدف از انجام اين بررسي، غربالگري و جستجوي ويروس BVD با استفاده از آزمون Nested Rt- PCR در شير مخازن گله هاي گاوهاي شيري اطراف مشهد است.

مواد و روش كار

در اين بررسي از شير مخازن ۱۸ گله گاو شيري نژاد هلشتاين اطراف مشهد بطور تصادفي، نمونه برداري شد. تعداد دامهاي دوشا گله هاي تحت بررسي بين ۳۲ الي ۶۸۰ رأس بودند. مجموعا ۴۱۰۵ رأس گاو شيري دوشا به منظور تعيين حضور ويروس BVD مورد بررسي قرار گرفتند. در اين بررسي گله ها از نظر جمعيتي به ۳ گروه : گله هاي كوچك با جمعيت ۳۰- ۱۰۰ رأس، گله هاي متوسط با جمعيت ۱۰۱- ۲۵۰ رأس و گله هاي بزرگ با جمعيت بيش از ۲۵۰ رأس دام دوشا تقسيم شدند. مجموع دامهاي دوشا در ۸ گله كوچك ۵۴۷ رأس، در ٤ گله متوسط ۶۲۸ رأس و در ۶ گله بزرگ ۲۹۳۰ رأس بود. حجم شيرهاي نمونه برداري شده هر دامپروري، حدود ۵۰۰ ميلي ليتر بود. ظروف استريل نمونه برداري در كنار يخ به آزمايشگاه دانشكده دامپزشكي دانشگاه فردوسي مشهد منتقل گرديد.سلولهاي سوماتيك شير در سانتريفوژ يخچالدار در دماي ٤ °C با نور ۳۵۰۰xg به مدت ۱۵ دقيقه جدا گرديد. پس از استخراج RNA تام از سلولهاي سوماتيك استخراج شد. نمونه ها در ۷۰°C- نگه داري شد. كليه نمونه هاي شير به منظور ارزيابي كيفيت و كميت RNA استخراج شده بر روي ژل اگاروز، الكتروفورز شدند و سپس در زير اشعة UV مورد بررسي قرار گرفتند كه باندهاي مورد مشاهده داراي خصوصيات يك محصول Total RNA مطلوب بودند كه نمايانگر يكپارچگي و غلظت مناسب RNA بود. نمونه هاي كشت سلولي سويه NADL ويروس BVD به عنوان كنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت. پس

RNA و رونوشت برداري معكوس، محصولات cDNA حاصله به ترتيب جهت انجام PCR و بنديل آن Nested-PCR پروسس گرديدند. محصولات تكثير شده نهايي Nested-PCR از نظر حضور يك باند ۱۵۸ قطعه اي با استفاده از آگاروزژل الكتروفورز ارزيابي گرديدند.

نتايج و بحث

در اين مطالعه مشخص گرديد كه ويروس BVD در (۱۱/۱%)۲ گله از ۱۸ گله تحت بررسي، حضور دارد. يكي از گله هاي آلوده در گروه گله هاي كوچك با ۶۲ راس گاو نوشا و ديگري در دسته گله هاي بزرگ با ۶۸۰ راس دام نوشا بودند (جدول شماره يك).

از بين ۴۱۰۵ راس دام نوشا تحت بررسي، تعداد (۸۱/۹۲%) ۳۳۶۳ راس در ۱۶ دامپروري صنعتي، فاقد ويروس BVD قابل جستجو بوده در حاليكه در بين ۷۴۲ راس دام نوشا در ۲ گله مثبت، به ازاء هر گله حداقل يك دام نوشا با الودگي پايدار (PI) وجود دارد.

در گذشته، شناسايي دامهاي PI براساس آزمايشات جداسازي ويروس ، در دام آلوده (بصورت انفرادي) در بين جمعيت دامي گله بوده كه بسياري از موارد ، بهمراه آزمايشات سرولوژيك انجام مي شود. وجود آنتي بادي ضد BVDV در بين جمعيت گله ها، الزاما به معني حضور دام PI نمي باشد زيرا آنتي بادي ضد ويروس BVD حتي پس از گذشت سالها از حذف دامهاي PI در سطح گله باقي مي ماند (Sandvik T. 1999).

تست RT-PCR آزمون حساس و ويژه اي در مورد غربالگري نمونه هاي شير تانكر هاي دامپروريها از نظر شناسايي و تعيين حضور ويروس BVD است.در اين راستاء تست RT- PCR در شناسايي ويروس BVD در بافتها و كشت سلولي نيز مورد استفاده قرار مي گيرد. اخيرا از اين تست به منظور جستجوي ويروس و شناسايي دام (هاي) PI با استفاده از شير مخازن جمع آوري شده استفاده مي شود(Drew. T و همكاران ،۱۹۹۹ Dubovi E. J. و Sung. G. K ،۲۰۰۳).

اثبات وجود ويروس BVD به روش Nested RT-PCR در نمونه هاي شير تانكر هاي دامپروريها، تصديق خوبي براي لزوم انجام آزمايشات بيشتر در بين گاوهاي صنعتي و سنتي است تا بدين ترتيب مديريت بهتر و قويتري را در شناسايي دامهاي PI و در نهايت مبارزه بر عليه اين بيماري مهم كه باعث بروز خسارات اقتصادي زيادي ميگردند، اعمال گردد.

نتايج حاصله از اين مطالعه، نشانگر حضور حدي و معني دار گاوهاي PI در گله هاي گاوهاي شيري اطراف مشهد مي باشد. انجام اين تست (Nested RT-PCR) غربالگري جهت بررسي صنعت پرورش گاو كشور از نظر حضور گاوهاي PI بعنوان مهمترين منبع انتشار بيماري توصيه مي شود.

جدول شماره يك: توزيع ميزان آلودگي به ويروس BVD در نمونه هاي مخازن شير بر اساس آزمون Neasted RT-PCR در دامپروريهاي صنعتي

حضور ويروس BVD	جمعيت گله (راس)			جمع
	۳۰-۱۰۰ (%)	۱۰۱-۲۵۰ (%)	>۲۵۰ (%)	
+	۱ (۱۲/۵)	-	۱ (۱۶/۶)	۲
-	۷ (۸۷/۵)	۴ (%۱۰۰)	۵ (۸۳/۳۳)	۱۶
جمع	۸	۴	۶	۱۸

References:

1. Drew. T. W, Yapp. F, and Paton. J. D. (1999) The detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk samples by the use of a single- tube RT- PCR. Veterinary Microbiolgy. Vol. 64. No: 2-3. P: 145- 154.
2. Sandvik T. (1999). Laboratory diagnostic investigation for bovine viral diarrhoea virus infections in cattle. Veterinary Microbiolgy. 64. 2-3. P: 123- 134.
3. Smith. B. P., (2002). Large animal internal medicine. The 3rd edition. Mosby .P: 707-714.
4. Sung. G. K and Dubovi E. J. (2003). A novel simple one- step single- tube RT- duplex PCR method with an internal control for detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk, blood, and follicular fluid samples. Biologicals. 31. 2. P:103- 106.