

Molecular Detection of Borna Disease Virus in Patients with Schizophrenia in Mazandaran Province

Seyedeh Mahdiah Seyedi¹,
Fatemeh Roodbari²,
Mojtaba Mohseni²,
Seyed Hamzeh Hosseini³,
Omid Reza Alaei⁴

¹MSc in Cell and Molecular Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

² Assistant Professor, Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

³ Professor, Psychiatry and Behavioral Sciences Research Center, Addiction Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ General Practitioner, Mazandran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received January 21, 2015 ; Accepted March 4, 2015)

Abstract

Background and purpose: Borna disease virus (BDV) is a unique RNA virus with wide range of hosts. There are many similarities in behavioral disorders caused by BDV in animals and certain mental disorders in human which suggests possible etiology of these disorders. The purpose of this study was to investigate the relationship between BDV and etiopathogenesis of psychiatric disorders, particularly schizophrenia and its prevalence in this group of patients.

Material and methods: RNA was extracted from blood cell of 30 patients with schizophrenia and 15 healthy volunteers. It was screened for a 391-nucleotide, highly conserved region of the p24 and 447-nucleotideregion of the p40 of BDV, using specific primers and nested RT-PCR.

Results: The mean age of the patients and controls were 36.03 ± 11.28 and 31.86 ± 10.61 years, respectively. BDV RNA was detected in eight patients with schizophrenia, while none of the healthy subjects was found infected with BDV. The prevalence of BDV virus was significantly higher in people with schizophrenia (26.66%) compared to that of the control group ($P < 0.05$).

Conclusion: This study supports previous findings regarding the relationship between BDV and psychiatric disorders, especially schizophrenia. Therefore, this virus could be considered as an environmental factor that can increase the risk of mental illnesses in adults.

Keywords: Borna disease virus, schizophrenia, Nested RT-PCR

تشخیص مولکولی ویروس بیماری برنا در بیماران مبتلا به شیزوفرنی در استان مازندران

سیده مهدیه سیدی^۱
فاطمه رودباری^۲
مجتبی محسنی^۲
سید حمزه حسینی^۳
امیدرضا اعلائی^۴

چکیده

سابقه و هدف: ویروس بیماری برنا (BDV) یک RNA ویروس منحصر به فرد است که با توجه به طیف وسیع میزبان و تشابه اختلالات رفتاری ناشی از آن در حیوانات آلوده با برخی از اختلالات روانی در انسان، به عنوان عامل اتیولوژی احتمالی این اختلالات پیشنهاد شده است. هدف از این مطالعه بررسی ارتباط بین BDV و اختلالات روانی به ویژه شیزوفرنی و بررسی میزان شیوع آن در این گروه از بیماران می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه RNA ویروس از سلول های خونی ۳۰ بیمار شیزوفرنی و ۱۵ فرد سالم استخراج شد. سپس برای یک ناحیه ۳۹۲- نوکلئوتیدی به شدت حفاظت شده از پروتئین p24 و یک ناحیه ۴۴۷- نوکلئوتیدی از پروتئین p40 ویروس بیماری برنا، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و روش Nested RT-PCR غربالگری شد.

یافته ها: میانگین سنی در گروه بیمار و کنترل به ترتیب $36/03 \pm 11/28$ و $31/86 \pm 10/61$ سال بود. در این بررسی BDV RNA در ۸ بیمار شیزوفرنی تشخیص داده شد. این درحالی بود که هیچ یک از افراد سالم بررسی شده در این مطالعه آلوده به ویروس نبودند. بنابراین میزان شیوع ویروس در افراد مبتلا به شیزوفرنی ۲۶/۶۶ درصد بود که به طور معنی داری بالاتر از گروه کنترل ۰ درصد بود ($p < 0/05$).

استنتاج: داده های حاصل از پژوهش ما از نتایج مطالعات قبلی مبنی بر ارتباط احتمالی ویروس بیماری برنا با بیماری های روانی به ویژه شیزوفرنی حمایت می کند. در نتیجه عفونت با این ویروس می تواند به فهرست فاکتورهای محیطی وارد شود که قادرند ریسک بیماری های روانی را در بزرگسالان افزایش دهند.

واژه های کلیدی: ویروس بیماری برنا؛ شیزوفرنی؛ Nested RT-PCR

مقدمه

حمایت می کنند (۵-۱). بسیاری از ویروس ها می توانند سیستم عصبی مرکزی Central Nervous System (CNS) را آلوده کنند و آسیب های قابل توجهی را از

امروزه با گسترش مطالعات، مدارک اپیدمیولوژیک بسیاری وجود دارند که از نقش عوامل عفونی از جمله ویروس ها در ایجاد بیماری های روانی به ویژه شیزوفرنی

E-mail: Roudbari@umz.ac.ir

مؤلف مسئول: فاطمه رودباری - بابلسر: دانشگاه مازندران، دانشکده علوم پایه

۱. کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

۲. استادیار، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

۳. استاد، مرکز تحقیقات روانپزشکی و علوم رفتاری، پژوهشکده اعتیاد، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۴. پزشک عمومی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۱/۱۱ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۳/۱۱/۱۵ تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۱۲/۱۳

در بررسی‌های تشخیصی در vivo و vitro توسط دانشمندان مورد استفاده قرار گیرد (۸). در کنار فسفو پروتئین، نوکلئوپروتئین نیز به واسطه بیان بالای آن در سلول‌های آلوده، از دیگر مارکر مهم ویروسی مورد بررسی در اکثر مطالعات مولکولی می‌باشد (۲۱).

در دهه ۱۹۸۰ با معرفی طیف وسیع میزبان این ویروس و تشابه اختلالات رفتاری ناشی از آن در حیوانات آلوده با برخی اختلالات روانی در انسان از جمله اختلال دو قطبی و شیذوفرنی، مطالعاتی با هدف تعیین ارتباط بین BDV و اختلالات روانی در انسان شکل گرفتند (۱۷). از سال ۱۹۸۵، به دنبال اولین گزارش از تشخیص BDV در این بیماران توسط روت و همکاران، بیماران روانی بسیاری با این هدف مورد بررسی قرار گرفتند (۲۲) و به وسیله روش‌های سرولوژیک مختلف برای عفونت با BDV غربالگری شدند. از اواسط دهه ۱۹۹۰ تشخیص رونوشت‌های پروتئین‌های اصلی BDV از جمله نوکلئوپروتئین N و فسفو پروتئین P، چشم‌انداز جدیدی از مطالعات را پیش روی دانشمندان قرار داد و سبب شد تا مطالعات فراگیر و گسترده‌ای به منظور تأیید یا رد این فرضیه و به دنبال آن بررسی شیوع این ویروس در سر تا سر جهان آغاز شود و هم اکنون نیز ادامه داشته باشد (۴، ۱). هدف از مطالعه حاضر بررسی ارتباط بین BDV با ایجاد اختلالات روانی به ویژه شیذوفرنی و میزان شیوع آن در این گروه از بیماران بود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌ها

در این مطالعه ۳۰ بیمار مبتلا به شیذوفرنی بالغ از بیمارستان (بخش روانپزشکی بیمارستان زارع، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران) و ۱۵ فرد سالم از افراد جامعه به عنوان گروه کنترل در طی سال‌های ۱۳۹۰-۱۳۹۱ شرکت کردند. بیماران برای اولین بار در

طریق تخریب و از بین بردن سلول‌های آلوده و/یا از طریق راه‌اندازی یک پاسخ ایمنی قوی سبب شوند (۶). این توانایی ویروس‌ها در ایجاد اختلالات عصبی پیشرونده در CNS که همراه با علائم پاتولوژیک گوناگون هستند موجب گردیده تا ویروس‌ها به عنوان یکی از علت‌های احتمالی بیماری‌های روانی در نظر گرفته شوند (۷). در طی سال‌های متمادی، طیف وسیعی از ویروس‌ها برای این اختلالات در نظر گرفته شده‌اند که یکی از شاخص‌ترین آن‌ها ویروس بیماری برنا است. این ویروس دارای یک ژنوم RNA تک رشته، قطبیت منفی و یکپارچه به طولی حدود ۸/۹ کیلوباز می‌باشد که حاوی حداقل شش قاب خواندن باز است که نوکلئوپروتئین (N, p40)، فسفو پروتئین (P, p24)، پروتئین X (X, p10)، ماتریکس پروتئین (M, gp18)، گلیکوپروتئین (G, gp57) و آنزیم پلی‌مراز (L, pol) را کد می‌کند (۱۶-۸).

BDV یک ویروس عصب دوست و اغلب غیر کشنده است که می‌تواند سلول‌های مغزی را به طور مزمن آلوده کند (۱۷). این ویروس دارای تمایل بالایی جهت آلوده‌سازی نورون‌های سیستم عصبی لیمبیک می‌باشد؛ این بخش از مغز نقش مهمی در تنظیم رفتار، حافظه و احساسات ایفا می‌کند و به نظر می‌رسد دارای یک نقش حیاتی در ایجاد اختلالات روانی می‌باشد (۱۸). فسفو پروتئین P و نوکلئوپروتئین N به واسطه تداخل در شبکه نورترانسسمیتری سیستم عصبی نقش مهمی در پاتورنژ این ویروس بازی می‌کنند (۹). فسفو پروتئین P توسط پروتئین کیناز C فسفریله می‌گردد که در سیستم لیمبیک نیز به فراوانی یافت می‌شود. بنابراین این احتمال وجود دارد که سیستم لیمبیک در گسترش ویروس در سرتاسر CNS نقش داشته باشد؛ هم‌چنین وقایع فسفریلاسیون ممکن است در نوروتروپسم BDV مهم باشند (۱۶، ۱۹، ۲۰). حفاظت شدگی بالای ژنوم ویروس در ناحیه کدکننده این پروتئین نیز موجب گردیده تا رونوشت‌های این پروتئین به عنوان یک هدف مناسب

این مرکز بستری شده و تاکنون دارویی دریافت نکرده بودند و یا حداقل دو هفته قبل از شروع مطالعه مصرف دارو را قطع کرده و به دنبال عود بیماری به این مرکز انتقال داده شده بودند. همه بیماران و افراد سالم شرکت کننده در این بررسی در بهترین شرایط سلامتی و عدم حضور هرگونه عفونت یا واکنش التهابی قرار داشتند و هم چنین اعتیاد به هیچ ماده مخدری اعم از مواد مخدر تدریجی، تزریقی و الکل نداشتند. هیچ یک از بیماران و افراد سالم تماس مستقیمی با اسب، گاو و گوسفند به عنوان میزبان‌های طبیعی این ویروس نداشتند. تشخیص شیذوفرنی در بیماران بر پایه ملاک‌های تشخیصی طبقه‌بندی شده در کتابچه تشخیصی و آماری جامعه روانشناسی آمریکا- ویرایش چهارم DSM-IV صورت پذیرفت. همه بیماران و افراد سالم، بعد از دریافت اطلاعات کافی در رابطه با این تحقیق، با آگاهی و رضایت کامل در این بررسی شرکت کردند. هم‌چنین پروتوکل این مطالعه توسط کمیته اصول اخلاقی دانشگاه علوم پزشکی مازندران مورد تأیید قرار گرفت.

جمع‌آوری نمونه و استخراج RNA

از هر فرد مقدار ۱/۵ میلی‌لیتر خون دریافت شد و پس از آغشته سازی با EDTA به عنوان ماده‌ی ضد انعقاد، برای مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت. استخراج RNA از خون کامل با استفاده از کیت (QIAGEN, USA) QIAamp RNA blood mini kit و بر طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. برای این کار ابتدا اریتروسیت‌های خون در نتیجه یک فشار اسمزی انتخابی، کاملاً لیز شدند و پس از جمع‌آوری لکوسیت‌ها، استخراج RNA از حداقل $10^7 \times 1$ سلول انجام شد. RNA استخراج شده در ۳۰-۵۰ میکرولیتر آب عاری از ریبونوکلاز حل گردید. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

رونویسی معکوس^۱ (RT) و سنتز cDNA

واکنش رونویسی معکوس با استفاده از کیت QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN, USA) و بر طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. مقدار ۱۲-۱۰ میکرولیتر از محلول RNA استخراج شده (معادل ۱ میکروگرم) برای سنتز cDNA مورد استفاده قرار گرفت. در ابتدا و قبل از انجام واکنش رونویسی معکوس، به منظور حذف هرگونه آلودگی با DNA، نمونه RNA برای ۲ دقیقه در 42°C با یک مخلوط حذف‌کننده DNA مجاور شد. این مخلوط شامل RNA استخراج شده (حجم متغیر تا ۱ میکروگرم RNA)، ۲ میکرولیتر 7x gDNA Wipeout buffer و آب عاری از ریبونوکلاز تا حجم ۱۴ میکرولیتر بود. بعد از حذف DNA ژنومی، نمونه RNA در یک مخلوط بهینه از ۱ میکرولیتر آنزیم Quantiscript Reverse Transcriptase، ۱ میکرولیتر پرایمر RT (مخلوط بهینه از راندم هگزامر و oligo dT) و ۴ میکرولیتر Quantiscript RT buffer به cDNA رونویسی گردید. این واکنش در دمای 42°C برای ۳۰ دقیقه انجام شد و سپس جهت غیرفعال کردن آنزیم برای ۳ دقیقه در دمای 95°C قرار گرفت. cDNA های سنتز شده تا زمان استفاده در دمای 70°C - نگهداری شدند.

ارزیابی کیفیت RNA

برای ارزیابی کیفیت RNA استخراج شده و به دنبال آن اطمینان از سنتز درست cDNA، تکثیر mRNA گلیسر آلدهید ۳- فسفات دهیدروژناز (GAPDH) به عنوان کنترل داخلی، با استفاده از روش RT-PCR انجام شد. به این منظور حدود ۳ میکرولیتر از محتوای cDNA (معادل ۰/۱-۱ میکروگرم DNA) به عنوان الگو در یک واکنش PCR استفاده گردید و به کمک پرایمرهای اختصاصی GAPDH (جدول شماره ۱) تکثیر یک قطعه به طول ۳۱۴ جفت باز از این ژن انجام شد. تشخیص

1. Reverse transcription

حضور BDV RNA، واکنش RT-PCR برای همه نمونه‌های مثبت تکرار شد و در برخی موارد نیز حتی RNA مجدداً استخراج گردید. در این بررسی نمونه‌هایی از جهت حضور ویروس مثبت در نظر گرفته شدند که حداقل دو بار در آزمایشات نتایج مثبت را نشان دادند و در کنترل‌های بدون آنزیم ریورس ترانسکریپتاز و بدون RNA الگو همواره منفی بودند.

استخراج پلاسمید

پلاسمیدهای نو ترکیب pcX/P و pcXN2/N که از اینستیتوی تحقیقاتی ویروسی، دانشگاه اوساکا برایمان ارسال شد دارای اسکلت پلاسمیدی و کتور بیانی pcDNA3 بودند که طی فرایند نو ترکیبی به ترتیب ORF I و ORF II ژنوم ویروس بیماری برنا به آنها اضافه گردید. ORF I و ORF II به ترتیب کد کننده پروتئین‌های X/P و N این ویروس هستند. از این پلاسمیدها به عنوان کنترل مثبت برای تأیید یکسانی قطعات در هر آزمایش PCR و ارزیابی حساسیت RT-PCR استفاده شد.

آنالیز آماری

در این مطالعه از نرم افزار SPSS-20 برای آنالیز آماری داده‌ها استفاده شد. برای آنالیز متغیرهای کیفی از آزمون مربع-کای و برای متغیرهای کمی از آزمون T-test استفاده شد.

Nested RT-PCR: BDV p40 RNA و BDV p24 RNA به وسیله

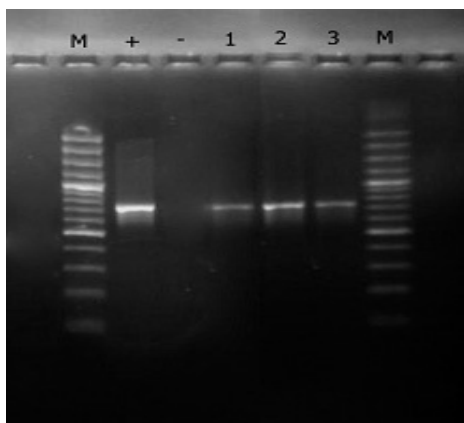
برای ردیابی BDV RNA در نمونه‌های خونی بیماران و افراد سالم از روش Nested RT-PCR استفاده شد و نمونه‌ها برای رونوشت‌های p24 و p40 مورد بررسی قرار گرفتند. پرایمرهای استفاده شده برای Nested PCR شامل پرایمرهای خارجی و داخلی برای هر ژن بودند (جدول شماره ۱) که براساس توالی‌های نوکلئوتیدی منتشر شده از ژنوم BDV (سویه مرجع He/80 با شماره دسترسی در بانک ژنی L27077 و سویه V با شماره دسترسی در بانک ژنی U04608) و با استفاده از نرم افزار 3 Primer و Gene Runner طراحی شدند.

پس از سنتز cDNA، راند اول PCR برای p40 در یک حجم ۲۵ میکرولیتری از مخلوط بهینه PCR (PCR master mix 2x, Fermentas-Termo. Fisher) (Scientific-Maryland USA) پرایمر سنس و آنتی سنس خارجی، cDNA اولیه و آب عاری از DNase انجام شد. راند دوم PCR مشابه راند اول اما در بردارنده پرایمر سنس و آنتی سنس داخلی و محصول PCR اولیه به عنوان الگو بود. برنامه دمایی PCR در جدول شماره ۲ آورده شده است.

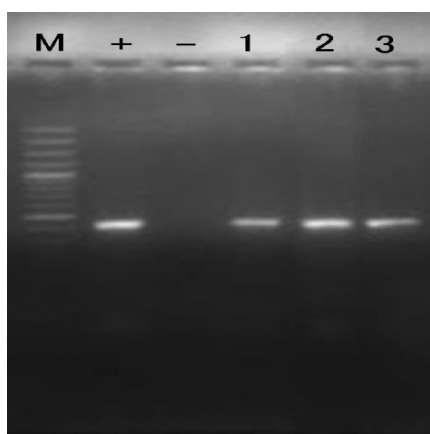
تکثیر P24 در شرایط مشابه با p40 انجام شد با این تفاوت که دمای جفت شدن در راند اول ۵۷°C و در راند دوم ۶۰°C بوده است. محصولات PCR به وسیله الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد و رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید ارزیابی شدند. برای تأیید

جدول شماره ۱: پرایمرهای استفاده شده برای Nested RT-PCR

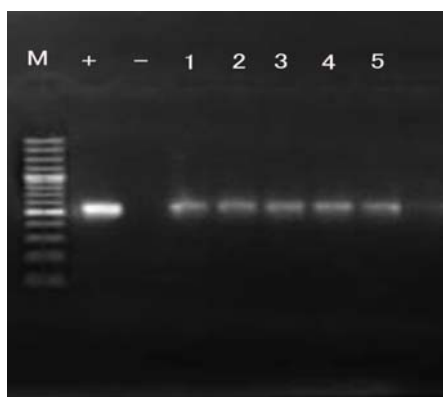
Gene	Primers name	PCR round	Sequence 5' → 3'	Nucleotide position in BDV genom	PCR product length
P40	p40A	1st	5'-GCC TTG TGT TTC TAT GTT TGC TAA TC-3'	۲۷۷-۳۰۲	۷۲۶bp
	p40B		5'-TTG TGG GGT TTT CCT TCT TAC TCC-3'	۹۷۹-۱۰۰۲	
	p40C	2nd	5'-CCT CTA TCT TCA GCC ATT GTT GC-3'	۴۵۴-۴۷۶	۴۴۷bp
	p40D		5'-GAA ACG GGA ACA GGT CAG CAT-3'	۸۰-۹۰۰	
P24	p24A	1st	5' AGA CAC TAC GAC GGG AAC GA -3'	۱۳۲۷-۱۳۴۶	۵۳۹bp
	p24B		5'-GTC CCA TTC ATC CGT TGT C-3	۱۸۴۷-۱۸۶۵	
	p24C	2nd	5-TCA GAC CCA GAC CAG CGA A-3	۱۴۴۳-۱۴۶۱	۳۹۲bp
	p24D		5'-AGC TGG GGA TAA ATG CGC G-3'	۱۸۱۶-۱۸۳۴	
GAPDH	GAPDH-F	1st	5'-AAG GTG AAG GTC GGA GTC AA-3'	۱۸۱-۲۰۰	۳۱۴bp
	GAPDH-R		5'-TTC TCC ATG GTG GTGAAGA-3'	۴۷۵-۴۹۴	



تصویر شماره ۱: نتیجه راند اول PCR پروتئین p40 در نمونه‌های خون بیماران: M مارکر DNA (۱۰۰bp)، + کنترل مثبت، - کنترل منفی و شماره ۱، ۲، ۳ به ترتیب نمونه‌های مربوط به بیماران است



تصویر شماره ۲: نتیجه Nested RT-PCR پروتئین p40 در نمونه خون بیماران: M مارکر DNA (۱۰۰bp)، شماره + کنترل مثبت، - نمونه کنترل منفی و شماره ۱، ۲، ۳ به ترتیب نمونه‌های مربوط به بیماران



تصویر شماره ۳: نتیجه راند اول PCR پروتئین p24 در نمونه‌های خون بیماران: M مارکر DNA (۱۰۰bp)، + کنترل مثبت، - کنترل منفی و شماره ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ به ترتیب نمونه‌های مربوط به بیماران

جدول شماره ۲: برنامه دمایی PCR برای تکثیر پروتئین p40

راند PCR	مرحله	درجه حرارت °C	زمان	تعداد چرخه
راند اول	واسرشنگی	۹۵	۵ دقیقه	۱
	واسرشنگی	۹۵	۴۵ ثانیه	۳۰
	جفت شدن	۵۹	۴۵ ثانیه	
	طولیل شدن	۷۲	۴۵ ثانیه	
	طولیل شدن نهایی	۷۲	۱۰ دقیقه	۱
	واسرشنگی	۹۵	۵ دقیقه	۱
راند دوم	واسرشنگی	۹۵	۴۵ ثانیه	۳۰
	جفت شدن	۵۸	۴۵ ثانیه	
	طولیل شدن	۷۲	۴۵ ثانیه	
	طولیل شدن نهایی	۷۲	۱۰ دقیقه	۱

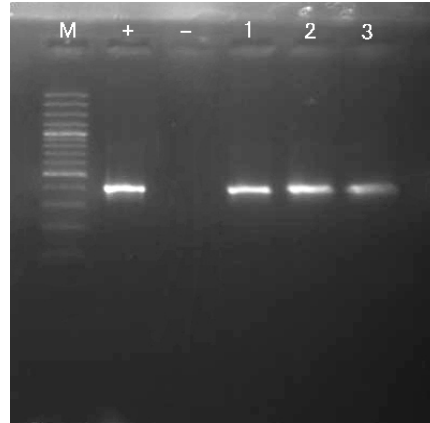
یافته‌ها

در این مطالعه ۳۰ بیمار مبتلا به شیخوفرنی بالغ (۱۶ مرد و ۱۴ زن) و ۱۵ فرد سالم (۸ مرد و ۷ زن) به عنوان گروه کنترل شرکت کردند. میانگین سنی در گروه بیمار ۳۶/۰۳ ± ۱۱/۲۸ سال و گروه کنترل ۳۱/۸۶ ± ۱۰/۶۱ سال بود. هیچ تفاوت معنی‌داری در سن و جنس بین گروه بیمار و کنترل مشاهده نشد. هم‌چنین هیچ تفاوت معنی‌داری از لحاظ دوره‌ی بیماری، جنس و سن بیماران آلوده به ویروس و غیر آلوده مشاهده نشد ($p > 0.05$). در این مطالعه جهت ردیابی BDV RNA به کمک روش Nested RT-PCR، در سلول‌های خون محیطی افراد، مارکرهای BDV p40 RNA و BDV p24 RNA به عنوان اهداف بررسی انتخاب شدند. به دنبال انجام Nested RT-PCR با پرایمرهای اختصاصی قطعه p40، یک قطعه‌ی DNA به طول ۷۲۶ جفت باز، به عنوان محصول راند اول و یک قطعه ۴۴۷ جفت باز به عنوان محصول راند دوم (Nested) مشاهده شد (به ترتیب تصاویر شماره ۱ و ۲). در نتیجه انجام Nested RT-PCR با پرایمرهای اختصاصی قطعه p24، نیز یک قطعه DNA به طول ۵۳۹ جفت باز به عنوان محصول راند اول و یک قطعه ۳۹۲ جفت باز به عنوان محصول راند دوم مشاهده شد (به ترتیب تصاویر شماره ۳ و ۴).

در این بررسی BDV RNA در ۸ بیمار شیخوفرنی تشخیص داده شد. RNA مربوط به قطعه p40 در سه بیمار و RNA مربوط به قطعه p24 در پنج بیمار تشخیص داده شد. هیچ یک از بیماران برای هر دو پروتئین مثبت

ویروسی، از حساسیت کمتری برخوردارند. به همین دلیل روش‌های مولکولی به عنوان روش‌های مکمل، برای بررسی حضور این ویروس در سرتاسر جهان مورد توجه قرار گرفتند. در این بین روش Nested RT-PCR با توجه به حساسیت بالای آن فراوان‌ترین روش مورد استفاده برای تشخیص BDV RNA در سلول‌های خونی بوده است. در مطالعه‌ی حاضر از ۳۰ بیمار شیوزوفرنی BDV RNA مورد بررسی، ۸ مورد (۲۶/۶۶ درصد) BDV RNA تشخیص داده شد. این در حالی بود که هیچ یک از افراد سالم بررسی شده در این مطالعه آلوده به ویروس نبودند. نتایج به دست آمده در مطالعه‌ی ما نزدیک به یافته‌های حاصل از پژوهش‌های سایر دانشمندان سرتاسر جهان بوده است. برای مثال سائودر^۱ و همکاران در سال ۱۹۹۶ در ۱۳ بیمار از ۲۶ بیمار شیوزوفرنی (۵۰ درصد) (۵)، ایواهایشی^۲ و همکاران در سال ۱۹۹۷ در ۶ مورد از ۶۷ بیمار شیوزوفرنی (۸/۹ درصد) (۲۴)، چن^۳ و همکاران در سال ۱۹۹۹ در ۱۰ بیمار از ۷۴ بیمار شیوزوفرنی (۱۴ درصد) (۲۵)، سلتن^۴ و همکاران در سال ۲۰۰۰ در ۴ بیمار از ۲۹ بیمار شیوزوفرنی (۱۳/۸ درصد) (۲۶) و در نهایت نانس^۵ و همکاران در سال ۲۰۰۸ در ۱۲ مورد از ۲۷ بیمار (۴۴ درصد) مورد بررسی BDV RNA را تشخیص دادند (۲۷). بنابراین داده‌های حاصل از پژوهش ما از نتایج مطالعات قبلی مبنی بر ارتباط ویروس بیماری برنا با بیماری‌های روانی به ویژه شیوزوفرنی حمایت کرده است. بر خلاف این مطالعات، برخی گروه‌های تحقیقاتی در طی بررسی‌های خود نتوانستند BDV RNA را در بیماران روانی تشخیص دهند (۳، ۱۰، ۳۲).

برخی دانشمندان معتقدند آن چه به عنوان نتایج مثبت، توسط آزمایشگاه‌های مختلف ارائه شده است تنها نتایج مثبت کاذب بوده و به وسیله‌ی آلودگی‌های آزمایشگاهی القا شده است. این تحقیق در آزمایشگاهی



تصویر شماره ۴: نتیجه Nested RT-PCR پروتئین p24 در نمونه‌های خون بیماران: M مارکر DNA (۱۰۰bp)، + کنترل مثبت، - کنترل منفی و شماره ۱، ۲، ۳ به ترتیب نمونه‌های مربوط به بیماران

نبودند. در مقابل هیچ یک از افراد سالم نیز آلوده به این ویروس تشخیص داده نشدند در حالی که قطعه ۳۱۴ جفت‌بازی از GAPDH به عنوان کنترل داخلی در همه نمونه‌های مورد آنالیز تشخیص داده شد. اختصاصیت و ویژگی هر واکنش از طریق تشابه اندازه محصول PCR هر نمونه با محصول PCR پلاسمید استفاده شده به عنوان کنترل مثبت تأیید گردید. بنابراین در این بررسی شیوع BDV RNA در بیماران شیوزوفرنی مورد بررسی ۲۶/۶۶ درصد گزارش گردید که به طور معنی‌داری بالاتر از شیوع آن در افراد سالم (۰ درصد) بوده است ($p < 0.05$).

بحث

امروزه طیف وسیعی از ویروس‌ها به عنوان فاکتور یا کوفاکتور پاتوژن اختلالات روانی پیشنهاد می‌شوند که یکی از جالب توجه‌ترین آن‌ها ویروس بیماری برنا می‌باشد (۲۳). تاکنون چندین روش برای تشخیص این ویروس در انسان توصیف شده است. اما آنچه که در انتخاب یک روش درست و صحیح برای تشخیص ویروس اهمیت دارد، میزان حساسیت و اختصاصیت روش انتخاب شده جهت تشخیص پارامترهای ویروسی است. روش‌های سرولوژیک به دلیل سطح پایین آنتی‌بادی‌های BDV و یا تمایل پایین این آنتی‌بادی‌ها برای اجزای

1. Sauder
2. Iwahashi
3. Chen
4. Selten
5. Nunse

انجام شد که هیچ سابقه قبلی از کار با سویه های BDV نداشته است. با این حال برای جلوگیری از این شبهه، تمام دستورالعمل های ایمنی بین المللی که برای جلوگیری از مشکل آلودگی نمونه ها در طول سنجش RT-PCR پیشنهاد می شوند به طور جدی در این بررسی مورد توجه قرار گرفتند. با توجه به گونه و زمان جداسازی، بیش تر ایزوله های BDV علی رغم تفاوتی که در شیوع دارند شباهت قابل توجهی را با یکدیگر، هم در سطح توالی های نوکلئوتیدی و هم در سطح توالی های آمینو اسیدی نشان می دهند (۲۸). بنابراین دانشمندان برای تشخیص آن ها از معرف های یونیورسالی مانند توالی های پرایمری برای قطعات حفاظت شده استفاده می نمایند. در مطالعه حاضر، از الیگونوکلئوتیدهای حفاظت شده ی p40 و p24 BDV به عنوان پرایمر، برای تشخیص سویه های مرجع He/80 و V در خون بیماران و افراد سالم استفاده شد. اگرچه جفت های پرایمری مورد استفاده قادرند برخی سویه های دیگر BDV را با توجه به شباهت های ذکر شده تشخیص دهند، اما قادر به تشخیص یک وارته بسیار متفاوت نیستند. بنابراین ممکن است میزان شیوع ویروس بیش تر بوده و یا در موارد منفی ویروس وجود داشته باشد، اما چون یک سویه جدید است نتوان آن را با پرایمرهای معمول شناسایی کرد. همان طور که در مورد یک سویه ی اتریشی به نام No/98 روی داد. این ویروس در ناحیه ی غیربومی و از یک اسب در اتریش جداسازی شد. تفاوت این سویه با سایر سویه های شناسایی شده به حدی بود که پرایمرهای استاندارد ی که برای تشخیص عفونت با استفاده از روش PCR استفاده می شدند در تشخیص آن ناموفق بودند. بنابراین لازم است تا در مطالعات بعدی پرایمرهایی طراحی شوند که بتوانند سویه های بیش تری، به ویژه وارته هایی که به تازگی توصیف شده اند را نیز شناسایی نمایند.

برخی دانشمندان معتقدند تفاوت در شیوع BDV RNA در بین پژوهش های مختلف ممکن است به واسطه ی تفاوت در معیارهای در نظر گرفته شده برای

نتایج مثبت و هم چنین فقدان کنترل های استاندارد برای ارزیابی سنجش های RT-PCR مورد استفاده باشد. در این بررسی، نمونه ای به عنوان مثبت در نظر گرفته شد که حداقل دوبار در آزمایش Nested RT-PCR با پرایمرهای اختصاصی (p40 یا p24) نتیجه ی مثبت را نشان دهد.

در مطالعه ای که توسط ناکامورا و همکارانش در سال ۲۰۰۰ انجام شد. آن ها توانستند یک ارتباط اتیولوژیک بین BDV و شیذوفرنی را پس از جداسازی BDV و تشخیص آنتی ژن ها و ژنوم آن در بافت های مغزی پس از مرگ یک بیمار شیذوفرنی جوان سرم مثبت را اثبات کنند. اما نتوانستند BDV RNA را در خون همان فرد تشخیص دهند (۲۹). این نتایج نشان می دهند که بافت های مغزی انسان می توانند حتی در غیاب ژنوم در خون، آلوده به ویروس باشند و لزوماً تشخیص BDV RNA در خون بازتاب بار ویروس در مغز نیست. دلایل مهم دیگری را که می توان برای عدم جداسازی ژنوم ویروس از خون برشمرده عبارتند از: حساسیت سنجش های RT-PCR به کار گرفته شده، حجم خون مورد بررسی، روش استفاده شده برای جداسازی گلبول های سفید خون و تعداد سلول های خونی استفاده شده برای استخراج RNA و متعاقب آن مقدار RNA به کار گرفته شده برای سنجش RT-PCR تعداد لکوسیت های خونی استفاده شده برای تهیه ی ذخایر RNA، به ویژه تعداد گرانولوسیت ها موجود در آن، دارای اثر حیاتی بر روی بازدهی RT-PCR است. در حال حاضر تعداد گلبول های سفید در برگیرنده BDV RNA در انسان های آلوده به این ویروس ناشناخته است. اما مدارک به یک شیوع بسیار پایین در حدود یک یا دو سلول در $10^6 * 5$ سلول اشاره دارند مانند آن چه که در رت های آلوده شده به طور مزمن تخمین زده شده است (۳۰). با توجه به این نکته، در این بررسی میزان ۱/۵ میلی لیتر از خون کامل معادل $10^7 * 7/5$ گلبول سفید مورد بررسی قرار گرفت تا در برگیرنده تعداد مناسب سلول های آلوده باشد.

تفاوت‌های مشاهده شده در شیوع p24 و p40 بین بیماران مختلف بازتابی از تفاوت فاز بیماری آن‌ها می‌باشد.

Schenieder و همکارانش در طی بررسی‌های خود نشان دادند که سطح نوکلئوپروتئین ویروسی در فاز حاد بیش‌تر است. در حالی که در فاز مزمن بیماری، سطح فسفو پروتئین بالاتر خواهد بود. این حالت، در این بررسی نیز تأیید گردید و رونوشت‌های نوکلئوپروتئین غالباً در افرادی تشخیص داده شد که در فاز حاد بیماری به سر می‌بردند و چون تعدادشان کمتر از بیماران مزمن بوده BDV p40 RNA در مقایسه با BDV p24 RNA شیوع بسیار پایین‌تری را نشان داد (۳۱). از آن‌جا که حضور BDV RNA همیشه با نمونه‌های سرم مثبت و بالعکس همراه نیست. پیشنهاد می‌گردد در مطالعات بعدی هم روش‌های سرولوژیکی و هم روش‌های مولکولی هر دو برای ارزیابی عفونت BDV در انسان استفاده شوند.

سپاسگزاری

با نهایت قدردانی از پروفیسور Kazuyoshi Ikuta از انیستیتوی تحقیقاتی ویروسی، دانشگاه اوساکا که با محبت فراوان پلاسמיד pc X/P و pc XN2-N را همراه با نقشه‌ی ژنومیک آن، بر روی کاغذ و اتمن اهدا نمودند. از جناب آقای دکتر میرزا خلیل بهمنی از مرکز HIV/AIDS دانشگاه علوم پزشکی شیراز نیز برای زحماتی که در راستای معرفی و ارتباط نویسنده‌گان با پروفیسور Kazuyoshi Ikuta کشیدند، صمیمانه تشکر می‌نمایم.

سیارا هونینگمان و همکارانش در طی مطالعاتی که بر روی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی رت‌های آلوده به BDV انجام دادند PBMCها را به عنوان یکی از منابع این ویروس در خون معرفی کردند (۳۱). بود و همکارانش در اواسط دهه ۱۹۹۰ BDV RNA را برای اولین بار در PBMCهای بیماران روانی تشخیص دادند (۳۲). به دنبال این گزارش مطالعات بسیاری به بررسی حضور BDV RNA در گلبول‌های سفیدخون پرداخته شد. آن‌ها طی بررسی‌های خود PBMCها را به روش سانتریفیوژ گرادیان غلظتی با محلول فایکول جداسازی کردند. اما در سال ۱۹۹۶ پلانز و همکارانش گرانولوسیت‌ها را نیز به عنوان منبع احتمالی دیگر این ویروس معرفی کردند و عدم در نظر گرفتن گرانولوسیت‌ها را یک دلیل احتمالی منفی بودن برخی نتایج برشمردند. چون در روش جداسازی سلول‌ها با سانتریفیوژ گرادیان غلظتی فایکول گرانولوسیت‌ها از محیط حذف می‌گردند متعاقباً میزان شیوع هم کم‌تر اعلام خواهد شد. آن‌ها در طی بررسی‌هایشان در سه بیمار روانی نشان دادند که چنان‌چه درصد گرانولوسیت‌ها در بین جمعیت گلبول‌های سفید مورد بررسی کم‌تر از ۲۰ درصد باشد هیچ BDV RNA ای تشخیص داده نمی‌شود (۹). در این مطالعه به منظور دسترسی به هر دو منبع ویروس در خون یعنی سلول‌های تک هسته‌ای و گرانولوسیت‌ها از کیتی برای استخراج RNA از خون کامل استفاده شد تا در برگیرنده‌ی هر دو گروه از سلول‌ها باشد.

References

- Schwemmler M. Borna disease virus infection in psychiatric patients: are we on the right track? *Lancet Infect Dis* 2001; 1(1): 46-52.
- Rackova S, Janu L. Borna Disease Virus and Psychiatric Disorders: Can Viruses Influence Psychiatric Disorders? *Psychiatric Disorders-World wide Advances* 2011: 245-253.
- Kim YK, Kim SH, Choi S-H, Ko Y-H, Kim L, Lee MS, et al. Failure to demonstrate Borna disease virus genome in peripheral blood mononuclear cells from psychiatric patients in Korea. *J Neurovirol* 1999; 5(2): 196-199.
- Bode L, Ludwig H. Borna disease virus

-
- infection, a human mental-health risk. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16(3): 534-545.
5. Sauder C, Müller A, Cubitt B, Mayer J, Steinmetz J, Trabert W, et al. Detection of Borna disease virus (BDV) antibodies and BDV RNA in psychiatric patients: evidence for high sequence conservation of human blood-derived BDV RNA. *J Virol* 1996; 70(11): 7713-7724.
 6. Schwemmle M, Heimrich B. Viral interference with neuronal integrity: what can we learn from the Borna disease virus? *Cell Tissue Res* 2011; 344(1): 13-16.
 7. Tomonaga K. Virus-induced neurobehavioral disorders: mechanisms and implications. *Trends Mol Med* 2004; 10(2): 71-77.
 8. Mizutani T, Ogino M, Nishino Y, Kimura T, Kariwa H, Tsujimura K, et al. A single-tube RT-PCR method for the detection of Borna disease viral genomic RNA. *JPN J Vet Res* 1998; 46(2-3): 73-81.
 9. Planz O, Rentzsch C, Batra A, Batra A, Winkler T, Büttner M, et al. Pathogenesis of Borna disease virus: granulocyte fractions of psychiatric patients harbor infectious virus in the absence of antiviral antibodies. *J Virol* 1999; 73(8): 6251-6256.
 10. Na K-S, Tae S-H, Song J-w, Kim Y-K. Failure to detect borna disease virus antibody and RNA from peripheral blood mononuclear cells of psychiatric patients. *Psychiatry Investig* 2009; 6(4): 306-312.
 11. Briese T, Schneemann A, Lewis AJ, Park Y-S, Kim S, Ludwig H, et al. Genomic organization of Borna disease virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(10): 4362-4366.
 12. Dauphin G, Legay V, Pitel P-H, Zientara S. Borna disease: current knowledge and virus detection in France. *Vet Res* 2002; 33(2): 127-138.
 13. Jordan I, Lipkin WI. Borna disease virus. *Reviews in Medical Virology* 2001; 11(1): 37-57.
 14. Staeheli P, Sauder C, Hausmann J, Ehrensperger F, Schwemmle M. Epidemiology of Borna disease virus. *J Gen Virol* 2000; 81(pt 9): 2123-2135.
 15. Carbone KM. Borna disease virus and human disease. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14(3): 513-527.
 16. Ikuta K, Ibrahim MS, Kobayashi T, Tomonaga K. Borna disease virus and infection in humans. *Frontiers in bioscience. A Journal and Virtual Library* 2002; 7: d470-495.
 17. Taieb O, Baleyte J, Mazet P, Fillet A. Borna disease virus and psychiatry. *European Psychiatry* 2001; 16(1): 3-10.
 18. Bode L. Human bornavirus infection—towards a valid diagnostic system. *Apmis Suppl* 2008; 116(s124): 21-39.
 19. Saito N, Itouji A, Totani Y, Osawa I, Koide H, Fujisawa N, et al. Cellular and intracellular localization of ϵ -subspecies of protein kinase C in the rat brain; presynaptic localization of the ϵ -subspecies. *Brain Res* 1993; 607(1): 241-248.
 20. De la Torre JC. Molecular biology of borna disease virus: prototype of a new group of animal viruses. *J virol* 1994;68(12): 7669-7675.
 21. Mizutani T, Nishino Y, Kariwa H, Takashima I. Reverse transcription-nested polymerase chain reaction for detecting p40 RNA of Borna disease virus, without risk of plasmid contamination. *J Vet Med Sci* 1999; 61(1): 77-80.
 22. Rott R, Herzog S, Fleischer B, Winokur A, Amsterdam J, Dyson W, et al. Detection of serum antibodies to Borna disease virus in
-

- patients with psychiatric disorders. *Science* 1985; 228(4700): 755-756.
23. Karakose A, Yuksel P, Turan N, Ziver T, Saribaş S, Nihat A, et al. Does borna disease virus (BDV) have a role in the etiopathogenesis of schizophrenia? *Afr J Microbiol Res* 2011; 5(9): 1062-1069.
24. Iwahashi K, Watanabe M, Nakamura K, Suwaki H, Nakaya T, Nakamura Y, et al. Clinical investigation of the relationship between Borna disease virus (BDV) infection and schizophrenia in 67 patients in Japan. *Acta Psychiatr Scand* 1997; 96(6): 412-415.
25. Chen C, Chiu Y, Shaw C, Tsai M, Hwang A, Hsiao K. Detection of Borna disease virus RNA from peripheral blood cells in schizophrenic patients and mental health workers. *Mol Psychiatry* 1999; 4(6): 566-571.
26. Seltén J-P, van Vliet K, Pleyte W, Herzog S, Hoek HW, van Loon AM. Borna disease virus and schizophrenia in Surinamese immigrants to the Netherlands. *Med Microbiol Immunol* 2000; 189(2): 55-57.
27. Nunes SOV, Itano EN, Amarante MK, Reiche EMV, Miranda HC, de Oliveira CEC, et al. RNA from Borna disease virus in patients with schizophrenia, schizoaffective patients, and in their biological relatives. *J Clin Lab Anal* 2008; 22(4): 314-320.
28. Schwemmler M, Jehle C, Shoemaker T, Lipkin WI. Characterization of the major nuclear localization signal of the Borna disease virus phosphoprotein. *J Gen Virol* 1999; 80(pt 1): 97-100.
29. Nakamura Y, Takahashi H, Shoya Y, Nakaya T, Watanabe M, Tomonaga K, et al. Isolation of Borna disease virus from human brain tissue. *J Virol* 2000; 74(10): 4601-4611.
30. Sauder C, de la Torre JC. Sensitivity and reproducibility of RT-PCR to detect Borna disease virus (BDV) RNA in blood: implications for BDV epidemiology. *J Virol Methods* 1998; 71(2): 229-245.
31. Schneider U, Naegele M, Staeheli P, Schwemmler M. Active Borna disease virus polymerase complex requires a distinct nucleoprotein-to-phosphoprotein ratio but no viral X protein. *J Virol* 2003; 77(21): 11781-11789.