Sudan University of Science and Technology

College of Graduate Studies

Evaluation of RT-PCR for Rapid Detection of Vaccine Strains Of Rift Valley Fever Virus

تقييم تقنية التفاعل التسلسلي التبلمري العكسي للكشف السريع عن فيروسات لقاح حمي الوادي المتصدع

A dissertation Submitted in Partial Fulfillment for the Requirement of M.Sc. degree in Medical Microbiology

Submitted by

Eiman Elfaki Mohamed Khalifa

Supervisor: Prof. Imadeldin E. Aradaib

May, 2010

بِسْمِ اللّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

قال الله تعالى

(قَالُواْ سُبْحَانَكَ لاَ عِلْمَ لَنَا إِلاَّ مَا عَلَّمْتَنَا إِنَّكَ أَنتَ الْعَلِيمُ الْحَكِيمُ)

صدق الله العظيم

سورة البقرة - الآية (32)

Dedication

I dedicate to my parent

for their love and understanding …

For my sisters and brothers,

who illuminate my path to success..

To my lovely husband

who taught me

patience and success..

ACKNOWLEDGMENT

First, all thanks be to Allah. I would like to express my sincere thanks to my supervisor Professor Imadeldin Aradaib for his time, patience, encouragement, and for providing space in his laboratory to conduct this piece of work. His experience and materials from his well established laboratory, is well appreciated. Without this initial assistance this work could have never been completed successfully. Special thanks to the Dean of the collage of medical laboratory science Dr. Humodi Ahmed Saeed and Dr. Mogahid Mohamed Alhasan head of the Department of microbiology for their support and encouragement. Great thanks to my family for their support and dedicating them self to encourage me to complete this work. With all love to my father and my mother for heir stand with me in the tough time. Thanks to my brothers and sisters for their support during the course of this study.

Last, but not least, I would like to thanks all my friends and colleagues every where who contributed toward an extra curricular existence.

ABSTRACT

A single-tube conventional gel-based reverse transcriptase (RT) polymerase chain reaction (RT-PCR) assay, for rapid detection of Rift Valley fever (RVF) virus (RVFV) was developed. The RT-PCR assay was evaluated for detection of vaccine (Smith burn) strain of the virus in cell culture. Two pairs of primers (RV1 and RV2), selected from the medium (M) RNA segment of RVFV, were used as a target for RT-PCR amplification. The outer pair of primers (RV1 and RV2) resulted in amplification of a primary 848 base pair (bp) PCR product. Application of this RT-PCR-based assay to the South African vaccine strains (Smith burn) resulted in direct detection of RVFV RNAs in Vero cell culture.

Sensitivity test has confirmed that this technique could be used to detect 1 picogram from the viral genome in vero cells, this degree of sensitivity could be compared with virus detection through virus isolation.

Amplification products were not detected when the RT-PCR-based assay was applied to RNA from other haemorrhagic fevers viruses including Crimean Congo hemorrhagic fever virus (CCHFV), dengue virus; Yellow fever virus, total nucleic acid extracts from uninfected Vero cells. The RT-PCR provides a rapid, sensitive and specific assay for detection of RVFV in cell culture. The assay could be recommended for inclusion during an outbreak of the disease among susceptible populations.

الخلاصة

في هذة الدراسة أستخدمت تقنية التفاعل التسلسلي التبلمري العكسي للكشف عن جينوم فيروس حمي الوادي المتصدع في خلايا كلي القرد الاخضر الافريقي (الفيرو).
أستخدمت عترة فيروس سميث بيرن (جنوب أفريقيا) و المستخدم حاليا كلقاح لهذا المرض كضابط تجريبي حيث تمت عدوي خلايا أحادية الطبقة للحصول علي التأثير الممرض لهذا الفيروس في خلايا الفيرو. تم إستخلاص الحمض النووي الرايبوزي للفيروس من خلايا الفيرو المصابة وذلك بواسطة مستخلصات معملية تجارية. في هذه التقنية أستخدم زوجان من المبدئات تم تصميمهما من الجين الأوسط للفيروس لتكبير جزء من الجينوم بطول 848 زوج قاعدي لفيروس حمي الوادي المتصدع.
أثبتت تجارب الحساسية أن هذة التقنية يمكن أن يستفاد منها في الكشف عن 1 بيكو جرام من جينوم الفيروس في خلايا الفيرو وهذه الدرجة من الحساسية يمكن مقارنتها مع تشخيص الفيروس بواسطة عزل الفيروس. أثبتت تجارب الخصوصية أن هذه التقنية يمكنها التمييز بين فيروسات الحمي النزفية الاخري حيث إن الحمض النووي الرايبوزي المستخلص من فيروسات الحمي النزفية الاخري مثل حمي الكنغو النزفية, وحمي الضنك لم يتم تكبيره بهذه التقنية إضافة الي أن الحمض النووي المستخلص من خلايا الفيرو وخلايا الدم من غير المصابين لم يتم تكبيره بهذه البتقنية المستخدم فيها هذا النوع من التفاعل التسلسلي التبلمري العكسي.
يستخلص من هذه الدراسة أن هذه التقنية يمكن أن تستخدم في الكشف عن جينوم فيروس حمي الوادي المتصدع في خلايا الفيرو باستهداف مبدئات من الجين الأوسط للفيروس.

LIST OF CONTENT

List of Plates