ارزیابی تهیه پادتن فلئوروسنت جهت جستجوی پادگن های پستی ویروسی

دکتر فرهید همت زاده[1] دکتر هادی کیوانفر[1] دکتر مریم بادوام[2]

هدف: این تحقیق باهدف دستیابی به پادتن نشاندار با FITC جهت ردیابی پادگنهای پستی ویروسی و مقایسه با پادتن های استاندارد موجود، در زمستان ۱۳۷۸ شروع ودرپاییز۱۳۸۰به پایان رسید.

طرح: تجربه میدانی.

روش: پس از ایمن سازی ۱۰سرخرگوش با سویهNADL ویروسBVD پادتنهای حاصله پس از عیارسنجی و خالص سازی، باFITC کنژوگه شده و درستون حاوی سفادکسG25پالایش و دیالیز گردید. عیار۱/۲۰ پادتن کنژوگه به عنوان عیارمطلوب به دست آمد.

تجزیه و تحلیل آماری: آزمون مک نمار، مربع کای.

نتایج: ازتعداد ۲۱۰ نمونه کشت سلولی تعداد۱۴۰ لوله با ویروس BVD آلوده گردید و ۷۰ لوله به عنوان شاهددر نظرگرفته شد. نتایج حاصله از به کارگیری آنتی سرم کنژوگه تهیه شده در طرح مقایسه آن روش آنتی سرم استاندارد بیوایکس روی این نمونه ها حاکی از همخوانی ۱۰۰ درصد موارد مورد آزمایش بود. درآزمایش روی ۸۱ نمونه از گاوها و گوسفندان مشکوک به بیماری با هر دو آنتی سرم، تنها در یک مورد علی رغم مثبت بودن نتیجه با FA بیوایکس والیزا، پاسخ منفی با آنتی سرم تهیه FA شده در طرح مشاهده شد.

نتیجه گیری: مقایسه آماری این دوروش حکایت از همخوانی ۹۹/۶ درصد نتایج حاصل از این دوآزمون درتشخیص پادگنهای پستی ویروسی دارد. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، (۱۳۸۱)، دوره ۵۷، شماره ۳، ۳۳-۲۷.

واژه های کلیدی: ایمونوفلورسنت، پستی ویروس، پادگن، عفونت پایدار.

An evaluation of preparation of fluorescent antibody in order to detect pestiviral antigens.

Hemmatzadeh, F.,[1] Keyvanfar, H.,[1] Badavam, M.[2]

[1]*Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran - Iran.* [2]*Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran - Iran.*

Objective: This study was carried out in order to produce FITC conjugated antibody against pestivirus antigens to detect pestiviral infection. This study was begum on Jan. 2000 and it was ended on Oct. 2001.

Design: Field experiment.

Procedure: At first 10 rabbits were immunized with NADL strain of BVDV. The immunoglubulins were conjugated with FITC and were passed on sephadex G25. To obtain a desirable titer of conjugatedsera different dilution of antibody in presence of positive and negative samples a were used.

Statistical analysis: Mcnemar and Chi square tests.

Results: As a result, a titer of 1/20 of conjugate turned out to be desirable .At the last term of study from 210 selected cell culture tube, 140 of them were infected with BVD virus and 70 were kept as control. The results of FA microscopy were indicated a coordination of about %100 between standard (Biox) and our conjugated sera. On 81 fields infected samples examined by 2 antisera, only one sample was negative by our prepared conjugate, although this sample was positive by standard conjugate.

Conclusion: Statistical analysis indicated a correlation of %99.6 between two conjugates. ***J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran. 57, 3: 27-33, 2002.***

Key words: Immunofluorescent, Pestivirus, Persistent infection.

ویروس مولد اسهال ویروسی گاوان متعلق به جنس پستی ویروس از خانواده فلیوی ویریده(Flaviviridae)است. خانواده فلیوی ویریده دارای ۳ جنس فلیوی ویروس (Flavivirus)، پستی ویروس(Pestivirus)و هپاسی ویروس (Hepacivirus)می باشد. اعضای خانواده فلیوی ویریده اگرچه از نظر خواص ژنومی و فیزیکوشیمیایی به هم شباهت دارند ولی از نظر خواص بیولوژیک کاملاً متفاوتند. جنس پستی ویروس شامل ویروس اسهال ویروسی گاوان (Bovine viral diarrhea virus "BVD")، ویروس بیماری بردر (Border disease virus "BD")و ویروس طاعون خوکی (Hog cholera virus "HoCV") بوده که هرکدام از نظر بیماریزایی و مخاطرات اقتصادی اهمیت ویژه ای را در دامپزشکی دارا می باشند (۱۷، ۱۶، ۶).

اسهال ویروس گاو ابتدا در نیویورک در سال ۱۹۴۶ به عنوان یک بیماری جدید در گاو شناخته شد و سپس در دهه ۱۹۵۰ شکل بالینی دیگران یعنی بیماری مخاطی، کشف شد که از بعضی جنبه ها مانند شدت بیماری و الگوی بروز در گله با بیماری قبلی اختلاف داشت. ویروس های جدا شده از هر دو بیماری مشخص کرد که این دو در واقع عامل یکسانی دارند (۱۷).

در سال ۱۹۴۰ بیماری بُردر با علایم مشخص لرزش و مویی شدن پشم (پوشش) گله های گوسفند واقع در مرز کشورهای انگلستان و ولز گزارش شد. مطالعات سرولوژیکی مخصوصاً در سالهای ۱۹۷۰ به بعد در سراسر دنیا نشان داد که بیماری گسترش جهانی دارد (۱۲).

تعیین ردیف ژنوم ویروسی نشان می دهد که ویروس این سه بیماری دارای وابستگی نزدیک هستند. به طریق تجربی نشان داده شد که این ویروس ها یک طیف میزبانی مشترک دارند. ویروس طاعون خوکی می تواند به گاو منتقل شود و ویروس اسهال ویروس گاو می تواند خوک، گوسفند و بز را آلوده کرده و به همان وسعت دیگر سم داران را نیز آلوده نماید (۱۷).

برخی از پستی ویروس ها سایتوپاتیک بوده ولی اکثر آنها در کشتهای سلولی غیر سایتوپاتیک می باشند و حضور این دو نوع ویروس در میزبانهای مختلف به بروز چهره های بالینی و اپیدمیک مختلف منجر می شود (۱۵،۱۷).

ویریون پستی ویروس ها کروی با قطر ۵۰ نانومتر واجد ژنوم RNA تک رشته ای تک ملکولی با سنس مثبت و شامل یک غشأ مستحکم لیپیدی پیچیده، پوشیده از پپلومرهای احاطه کننده نامشخص و یک نوکلئوکپسید کروی با تقارن بیست وجهی می باشد. پستی ویروس ها در محیط بسیار ناپایدار بوده و به وسیله گرما و گندزداهای معمولی سریعاً غیر فعال می شوند (۱۷).

پستی ویروس ها به خوبی در کشتهای سلولی اولیه و ثانویه که ازگونه های میزبان اصلی مشتق شده است تکثیر می یابند. پستی ویروس های جدا شده از حیوانات بیمار به صورت طبیعی اغلب در کشت سلولی غیر سیتوپاتیک بوده ولی طی پاساژهای متوالی واریانت های سیتوپاتیک تولید می نماید (۱۵،۱۷).

۱) گروه آموزشی میکروبیولوژی و ایمونولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
۲) دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

عواقب ناشی از بروز عفونت به عوامل چندی از قبیل رخداد ویرمی، سویه ویروسی، عملکرد دستگاه ایمنی، رخداد عفونت ازطریق جفت، ایجاد تحمل ایمنی و بالاخره چگونگی پاسخ ایمنی بستگی دارد. اغلب ضایعات ناشی از این ویروس به دستگاه تنفس، دستگاه گوارش و دستگاه اعصاب مرکزی محدود می شود (۲۲).

ویروس BVD قادر است که از سد جفت و سد خونی مغزی جنین گذشته و ضایعاتی را در دستگاه اعصاب مرکزی و مغز ایجاد کند. به همین دلیل عفونت قبل از تولد و دوران جنینی با ویروس BVD از اهمیت بالایی برخودار می باشد. در اوایل آبستنی ویروس BVD موجب مرگ جنین و در نتیجه عوارضی چون مومی شدن، سقط و جذب جنین می گردد.

اگر گاو آبستن قبل از تکامل دستگاه ایمنی جنین به ویروسBVDسویه غیر سایتوپاتیک آلوده شود و جنین هم در اثر ویروس از بین نرود، این جنین دارای پاسخ ایمنی نسبت به این ویروس نبوده و پادتنهای خنثی کننده ویروس در بدن جنین تشکیل نمی شود و پس از تولد هم به همین صورت باقی می ماند مگراین که با ویروسBVD سویه سایتوپاتیک عفونت یابد که در این صورت بیماری مخاطی شکل می گیرد (۱۶، ۸).

هر دو ویروس سایتوپاتیک و غیر سایتوپاتیک می توانند موجب انتقال عفونت از طریق جفت و تلفات جنین شوند، اما عفونت سویه غیرسایتوپاتیک رایجتر می باشد و تنهاانتشار جفتی عفونت ویروسBVDسویه غیر سایتوپاتیک می تواند موجب ایجاد تحمل ایمنی در جنین شود. در این زمان ممکن است جنین در اثر ویروس از بین رفته، سقط، جذب یا مومی شدن در آن صورت گیرد و یا ممکن است جنین تا زمان تولد زنده مانده و جنین به دنیا آید که ظاهراً سالم بوده ولی ویروس BVD را در بدن خود حفظ می کنند. عفونت جنینی قبل از روز ۱۲۰ آبستنی منجر به ایجاد تحمل ایمنی می گردند و عده ای معتقدند که عفونت قبل از روز ۱۰۰ آبستنی عفونت پایدار را پدید می آورد. در مراحل اولیه آبستنی جنین به عفونت ویروس BVD بسیارحساس می باشد. ضایعات جنینی اغلب به دلیل اثر ویروس روی ارگانوژنز مشخص می شود (۱۶، ۸).

اگر گوساله ها بین روزهای ۱۵۰-۱۰۰ آبستنی آلوده شوند دارای نواقص مادرزادی خواهند بود. در این زمان تکامل جنینی به مراحل انتهایی ارگانوژنز سیستم عصبی و تکامل سیستم ایمنی جنینی رسیده است که می تواند نسبت به ویروس BVD پاسخ التهابی ایجاد کند. تلیسه های عفونت یافته در حدود روز ۱۵۰ آبستنی گوساله هایی با آتروفی کل شبکیه، کاتاراکت، دژنراسیون شبکیه و هیپوپلازی و التهاب عصب بینایی به دنیا می آورند (۱۶، ۸).

عفونت پایدار هنگامی اتفاق می افتد که جنین بعد از لانه گزینی و قبل از صلاحیتدار شدن دستگاه ایمنی با ویروس آلوده شده باشد، در این هنگام دستگاه ایمنی بدن به جای آن که به عفونت ویروسی پاسخ دهد در مقابل پادگنهای ویروسی تحمل ایمنی پیدا کرده و اگر جنین توسط ویروس از بین نرود نوزادی ظاهراً سالم که ویروس را در تمام اعضای بدن خود دارد، متولد خواهد شد و به طور پیوسته آن را به خارج دفع می کند. در گاو عفونت پایدار هنگامی ایجاد می شود که جنین قبل از ۱۲۵ روزگی یعنی قبل از تکامل دستگاه ایمنی با ویروس آلوده شود که در این هنگام پادتن های خنثی کننده ویروس ایجاد نشده و گوساله ای که دارای تحمل ایمنی به ویروس BVD می باشد حاصل خواهد شد. اگر جنین توسط ویروس از بین نرود، تا هنگام زایمان زنده مانده و گوساله دارای عفونت پایدار، متولد می شود. این تحمل ایمنی بسیار اختصاصی بوده و این حیوانات نسبت به پاگنهای دیگر و سویه های هترولوگ ویروسBVD پاسخ ایمنی مثبت خواهند داشت (۱۷، ۱۶، ۸).

گاوهای ماده PI ، فرزندان PI تولید می کنند و به نظر می رسد که عفونت پایدار مهمترین مکانیسم بقای ویروسBVD در جمعیت گاوها باشد. میزان مرگ و میر گوساله های، در سال اول زندگی به ۵۰ درصد می رسد.

در گوسفندان هم بره هایی با عفونت پایدار بیماری بردر متولد می شوند. این بره ها نیز دارای اندازه کوچکتر و رشد کمتری نسبت به بره های سالم می باشند. احتمالاً وجود این حالت در بره ها به دلیل کاهش هورمونهای تیروئید می باشد (۱۶).

بیماری مخاطی (MD) هنگامی رخ می دهد که گاو دارای تحمل ایمنی و PI که قبلاً با سویه غیر سایتوپاتیک آلوده شده، با سویه سایتوپاتیک ویروس BVD آلوده شود. به این ترتیب حضور سویه های سایتوپاتیک و غیر سایتوپاتیک ویروسBVD در یک حیوانPI موجب بیماری مخاطی می شود. منشأ ویروس سایتوپاتیک می تواند خارجی باشد مانند انتقال از دامهای بیمار و PI و یا واکسن های زنده تخفیف حدت یافته و یا دارای منشأ داخلی بوده و در اثر موتاسیون ویروس از سویه غیر سایتوپاتیک داخلی به وجود آمده باشد (۲۲، ۱۷، ۱۶، ۹، ۸).

دو روش استاندارد برای تشخیص بیماری، جدا کردن ویروس و سرولوژی می باشد. اخیراً با پیشرفت تکنیکهای تشخیص مولکولی، روشهای زیادی برای پیدا کردن عفونت ویروس BVD پیدا شده است که یکی از این روش PCRمی باشد (۱۰).

روشهای سریع تشخیص پادگن ویروسBVD در نمونه های بافت، به وسیله روشهای ایمونوهیستوشیمی از قبیل رنگ آمیزی ایمونوفلورسانس و ایمونوآنزیم در مقاطع بافتهای یخ زده امکانپذیر است. آنتی سرمهای پلی کلونال و یا منوکلونال تهیه شده بر علیه ویروس BVD برای کشف پادگن ویروسی استفاده می شود. با استفاده از این روشها تشخیص پادگن ویروس BVD در بافتهای فیکس شده می تواند استفاده شود، بدون این که نیاز به جدا سازی ویروس باشد. تکنیکهایی که روی پادتنهای منوکلونال پایه ریزی می شود، حساستر و اختصاصی تر از تستهایی است که روی پادتنهای پلی کلونال پایه ریزی شده است. همچنین روشهای سنجش ایمنی آنزیم حساستر از آزمون ایمونوفلورسانس است (۲۳، ۱۰).

به هر حال، روش ایمونوفلورسانس مستقیم با پادتن منوکلونال برای سرعت تأیید بیماری مخاطی کلینیکی و تشخیص عفونت پایدار ویروس BVD در گاو، بعد از ناپدید شدن پادتن کلسترومی توصیه می شود. استفاده از این روش به هنگام مواجهه با سندرمهای گوارشی، تنفسی یا تناسلی بسیار مفید می باشد. اگرچه در مواردی از قبیل سقط و بیماری دستگاه تنفسی وقتی که ویروسBVD کشف می شود، اغلب این سئوال وجود دارد که آیا ویروسBVD باید به عنوان پاتوژن اولیه در نظر گرفته شود یا خیر؟ (۱۰،۱۹).

انستیتوهای ویبریج (Weybridge)، مردن (Moredun) و بیوایکس (Biox) در حال حاضر با استفاده از پادتنهای مونوکلونال تهیه شده برعلیه پادگنهای اختصاصی پستی ویروس ها اقدام به تهیه کیتهای ردیابی پادگن نموده اند و میزان حساسیت و ویژگی پادتنهای تولیدی خود را بین ۹۶ تا ۹۸ درصد اعلام نموده اند. فلوسیتومتری(Flow cytometry)به عنوان یک روش در تشخیص مستقیم پادگن ویروس BVD در نمونه های کلینیکی مورد استفاده قرار می گیرد. حساسیت این روش در کل نمونه های خون

برابر با جداسازی ویروس می باشد (۵،۱۰).

روش ایمونوپراکسیداز برای اثبات حضور ویروس BVD در منی گاو جهت تلقیح مصنوعی و اهداف تجاری و همچنین در آزمایشگاههایی که به آزمون ایمونوفلورسانس مجهز نمی باشند، استفاده می شود (۷).

آزمون خنثی سازی ویروس رایجترین روش سرولوژیک است که برای تعیین سطح پادتنهای ویروس BVD استفاده می شود. انجام این آزمایش به ۵-۳ روز وقت نیاز دارد. رایجترین سویه های مرجع که برای این روش مورد استفاده قرار می گیرند، شامل: سویه NADL سایتوپاتیک، سینگر Singer سایتوپاتیک یا سویه $C_{24}V$ سایتوپاتیک می باشند.

مواد و روش کار

مواد مصرفی: تیره سلول R-BK ، محیط کشت سلولی استوکر، سرم جنین گاو، تریپسین ورسن، آنتی بیوتیک های پنی سیلین و استرپتومایسین، نیستاتین، ادجوانت ناقص فروند، سولفات آمونیوم ، سفادکس G_{25} ، بافر کربنات، بافر فسفات سالین، فلوروسین ایزوتیوسیانات، الکل اتانول مطلق، گلیسرین، کیسه دیالیز، آگارنوبل، تریبان بلو، سدیم آزاید و سویه NADL ویروس BVD.

وسایل: ظروف مخصوص کشت سلول، ستون کروماتوگرافی حاوی سفادکس G_{25}، لام های فلورسنت، لوله لیتون Leighton tube، میکروسکوپ معکوس Inverted microscope ،لام های نئوبار، میکروسکوپ فلورسنت، اسپکتروفتومتر، بیوفتومتر، همزن مغناطیسی، اولتراسانتریفوژ و ۱۰ رأس خرگوش جوان و سالم.

آماده سازی و کشت سلول: از آنجایی که پستی ویروسهای نشخوارکنندگان به خوبی در کشتهای سلولی با منشأ گاو و گوسفند تکثیر می یابند و سویه های سایتوپاتیک آنها پس از چند روز CPE واضحی را در کشتهای سلولی ایجاد می نمایند، برای این تحقیق از تیره سلولی Razi Bovine Kidney R-BK استفاده شد. سویه CPE ویروس NADL پس از ۴ روز CPE مناسبی را در این تیره سلولی ایجاد می نماید. محیط کشت مناسب برای این تیره سلولی محیط کشت استوکر می باشد.

تکثیر ویروس: تکثیر ویروس به دو منظور در کشت سلولی انجام گرفت: اول تهیه پادگن جهت تلقیح به حیوانات آزمایشگاهی به منظور تهیه آنتی سرم. دیگر محاسبه عیار و یروس به روش $TCID_{50}$ جهت کاربرد در آزمون SN .

پس از آلوده کردن کشتهای سلولی معمولاً پس از ۴ روز گرمخانه گذاری CPE کامل همه سلولهای موجود در محیط کشت را متأثر کرده و غلظت بسیار بالایی از ویروس در نمونه حاصل گردید.

خالص سازی ویروس: قبل از انجام خالص سازی پادگن، عیارسنجی ویروس با استفاده از روش $TCID_{50}$ انجام گرفت که عیار $10^{6/5}$ به دست آمد. درمرحله بعد جهت تهیه پادگن، ویروس را در کشت سلولی R-BK تکثیر داده و با استفاده از سانتریفوژ دور بالای یخچالدار (Backman Avanti 30) اقدام به رسوب و خالص سازی ویروس گردید. برای این منظور پس از کشت سویه استاندارد NADL ویروس BVD و کامل شدن CPE در کشت سلولی تک لایه، محتویات هر بطری یکبار در g ۱۰۰۰۰ به مدت نیم ساعت در حرارت ۴ درجه سانتیگراد به منظور رسوب بقایای سلولی سانتریفوژ شده و سپس به منظور خالص سازی ویروس مایع روی حاصل سانتریفوژ به مدت ۹۰ دقیقه در g ۸۰۰۰۰ در درجه حرارت ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ گردید. متعاقباً مایع رویی حاصل سانتریفوژ تخلیه شده و رسوب حاصله پس از یکبار شستشو با PBS در PBS حاوی آنتی بیوتیک به حجم ۱/۱۰ مایع تخلیه شده اولیه حل گردید. این عمل به منظور تغلیظ ویروس و خارج نمودن پروتئینهای محیط کشت و جهت ممانعت از ایجاد واکنشهای غیر اختصاصی انجام گرفت (۵).

تهیه آنتی سرم ضد ویروس BVD: ابتدا ۱۰ رأس خرگوش جوان و سالم به وزن تقریبی ۱- ۱/۵ کیلوگرم تهیه کرده و سپس عمل ایمن سازی طبق برنامه ای مشخص آنها انجام گرفت. تزریقات به صورت زیر جلدی و با ویروس همراه ادجوانت ناقص فروند و تزریقات وریدی، عضلانی بدون ادجوانت صورت گرفت. ۸ تزریق با فواصل حدود ۱۵ روزه انجام شد. تزریقات زیر جلدی به همراه مکمل ناقص فروند در ۱۰ نقطه از پوست ناحیه کمر در دو طرف ستون مهره ها (به میزان ۰/۳ میلی لیتر از مخلوط مکمل ناقص فروند و یک میلی لیتر سرم که قبلاً به شدت مخلوط شده و به شکل امولسیون درآمده بود) انجام گرفت. تزریقات داخل عضلانی به میزان یک میلی لیتر از ویروس فاقد مکمل ناقص فروند در عضله ران انجام گرفت. تزریقات داخل وریدی هم بدون مکمل فروند صورت گرفت.

پس از تزریقات ششم و هفتم و هشتم از خرگوشها خونگیری به عمل آمد و جهت تعیین عیار پادتن آزمون SN و ژل دیفوزیون بر روی نمونه های سرم صورت گرفت. خونگیری نهایی از ورید مارژینال گوش و قلب خرگوشها انجام گرفت. چند ساعت پس از خونگیری و انعقاد، نمونه های خون با استفاده از سانتریفوژ دور پایین نمونه سرمی از لخته جدا گردید و جهت غیرفعال سازی حرارتی به مدت نیم ساعت در بن ماری ۵۶ درجه قرار گرفتند.

آزمون SN: روی نمونه های سرمی تهیه شده از خرگوشها آزمون SN به روش ماکرو در لوله در حجم ۱/۵ میلی لیتر و با استفاده از $200\ TCID_{50}$ از سویه NADL ویروس BVD انجام گرفت (۴، ۱۱،۵).

نتایج حاصله نشانگر وجود عیار پادتنی ۱/۱۰۲۴ در اغلب نمونه ها بود. نمونه ها پس از مخلوط شدن با هم تا زمان انجام مراحل بعدی کار در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردید.

آزمون ژل دیفوزیون: جهت ردیابی پادتنهای رسوبی تشکیل شده در سرمهای خرگوشی، آزمون ژل دیفوزیون با استفاده از ژل آگار نوبل ۱/۵ درصد حاوی ۱/۵ گرم در هزار سدیم آزاید، انجام پذیرفت. پلیت ها به مدت حداکثر یک هفته در درجه حرارت آزمایشگاه قرار داده شده و از روز دوم جهت مشاهده هرگونه خط رسوبی در زمینه تیره و نور غیرمستقیم مورد مطالعه قرار گرفتند که خطوط رسوبی مشخص بین پادتن و پادگن کامل ویروس ایجاد گردید (۵).

جذب پادتنهای غیراختصاصی: سرم حاصل از خرگوشهای ایمن شده جهت رفع پادتنهای احتمالی ناشی از اجزای کشت سلولی مورد استفاده جهت تکثیر ویروس به مدت نیم ساعت در ۳۷ درجه با عصاره کشت سلولی RBK حاصل ذوب و انجماد کشت سلولی غیرآلوده به ویروس، گرمخانه گذاری شده و پس از طی این مدت در g ۶۰۰۰ به مدت نیم ساعت سانتریفوژ گردید. مایع روی حاصل از سانتریفوژ به عنوان سرم جذب شده در آزمونهای بعدی مورد استفاده قرار گرفت (۲۳).

ترسیب ایمونوگلبولین: رسوب دادن ایمونوگلبولین با استفاده از سولفات آمونیوم اشباع دارای pH ، ۷/۲ در غلظت نهایی ۴۵درصد و سپس ۴۰درصد به منظور خالص سازی ایمونوگلبولین ها و رفع بقایای پروتئینی مراحل قبل انجام گرفت.

نشاندار کردن: برای محاسبه میزان FITC مورد نیاز جهت نشاندار نمودن ایمونوگلوبولین ها می بایستی میزان پروتئین موجود در نمونه سنجیده شود

که به همین منظور روی گلبولین های خالص شده مرحله قبل پروتئین سنجی به روش لوری(Lowri)انجام گرفت که میزان پروتئین برابر ۱۱۰ میلی گرم در دسی لیتر به دست آمد. میزان FITC مورد نیاز می بایستی به نسبت یک به صد بسته به میزان پروتئین در نظر گرفته شود چون میزان پروتئین ۱۱۰ میلی گرم در دسی لیتر معادل ۱۱ میلی گرم در میلی لیتر به دست آمد. میزان FITC نیز ۰/۱۱ میلی گرم درمیلی لیتر مورد نیاز می باشد که پس از توزین FITC مورد نیاز آن را در بافر بی کربنات (pH = ۹/۵) حل کرده به طوری که حجم بافر می بایستی معادل با حجم نمونه گلبولین مورد استفاده در نظر گرفته شود (۴،۱۵).

پس از محاسبه FITC مورد نیاز، ایمنوگلبولین های تخلیص شده در مرحله قبلی را روی همزن مغناطیسی قرار داده و محلول FITC قطره قطره و به آرامی در مدت ۱۵ دقیقه به آن اضافه می گردد. پس از اتمام این مرحله محلول حاصل به مدت ۲ ساعت روی همزن مغناطیسی قرار داده می شود تا عمل ترکیب FITC با ایمونوگلبولین ها به خوبی صورت گیرد. پس از این مرحله برای جدا کردن پادتنهای نشاندار از سایر عوامل موجود، مجموعه حاصله از ستون کروماتوگرافی حاوی سفادکس G۲۵ عبور داده می شود(۱۵).

پالایش پادتنهای نشاندار با استفاده از ستون سفادکس: جهت جدا کردن پادتنهای نشاندار با FITC از فلورسین ایزوتیوسیانات های آزاد و پادتنهای احتمالی غیر نشاندار، محلول حاصل از مرحله قبل را از ستون کروماتوگرافی حاوی سفادکس G۲۵ عبور داده می شود. محصول مرحله قبل را روی ستون فوق برده و بافر PBS از روی آن عبور داده می شود تا رنگ اضافه FITC گرفته شده و فقط پادتن نشاندار باقی بماند.

به این منظور بایستی سفادکس مورد نیاز از قبل آماده شده و در ستون مربوطه فشرده(Pack)شود. ارتفاع سفادکس موجود در ستون حداقل ۱۴ سانتیمتر می بایستی انتخاب گردد که در اینجا از ستونی به قطر ۵/۱ سانتیمتر و حاوی ۲۰ سانتیمتر سفادکس (حجم نهایی ۳۰ میلی لیتر سفادکس فشرده) استفاده گردید. حجم محلول وارد شده به ستون معادل ۵ میلی لیتر(یک ششم حجم ستون) در نظر گرفته شد (۱۵).

فراکسیون حاوی پادتنهای نشاندار به شکل یک باند پررنگتر از سطح ستون به طرف پایین شروع به حرکت می کند. (تصویر ۱) بلافاصله پس از رسیدن باند به انتهای ستون می بایستی اقدام به جمع نمودن محلول حاصله در ویالهای مختلف به حجم تقریبی نیم میلی لیتر نمود. از آنجایی که متعاقب وارد نمودن پادتن کنژوگه به ستون بافر بیکربنات نیز به مجموعه افزوده می گردد لذا حجم پادتن خارج شده از ستون نیز ممکن است به علت رقیق شدن تغییر یابد به همین منظور میزان پروتئین محتویات هر ویال میبایستی مجدداً پروتئین سنجی شده و بهترین غلظت ایمونوگلبولین های نشاندار یاد داشت و در نهایت میزان پرونئین مجموعه مشخص گردد. در پایان مرحله پالایش ۱۲ میلی لیتر پادتن نشاندار در ۲۴ و یال نیم میلی لیتری و واجد غلظت پروتئینی حد اقل ۲۰ و حد اکثر ۵۵mg/dl بودند (۱۵).

دیالیز: پس از جمع آوری ایمونوگلبولین های نشاندار، جهت تخلیص بیشتر آن و خارج نمودن فلوروسین ایزوتیوسیانات های آزاد یا املاح باقی مانده از مراحل قبل عمل دیالیز روی نمونه ها انجام می گیرد. پس از پایان مرحله دیالیز، محلول ایمونوگلبولین های نشاندار دیالیز شده، جهت تنظیم میزان پروتئین، پروتئین سنجی می گردد. در این مرحله میزان پروتئین نمونه های ایمونوگلبولین های نشاندار روی حداقل ۲۰mg/dl تنظیم گردد (۱۵).

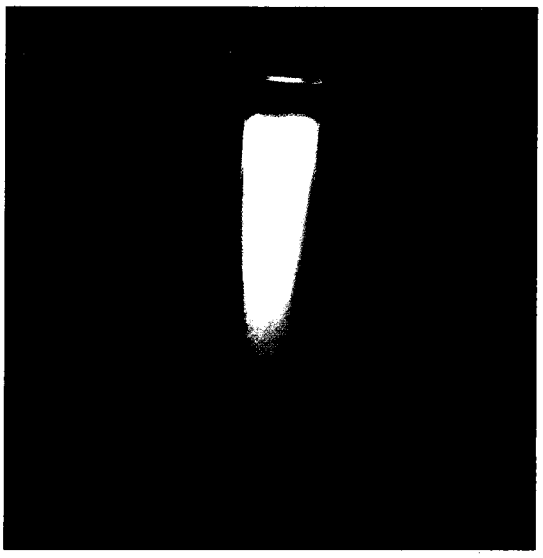
انجام آزمون روی نمونه ها جهت به دست آوردن رقت مناسب: پس از جهت رنگ آمیزی نمونه های مثبت و منفی با رقتهای مختلف آنتی سرم کنژوگه بهترین پاسخهای به دست آمده رقت در ۱/۲۰ بود که در این رقت نمونه های آلوده رنگ آمیزی شده به خوبی از نمونه های غیرآلوده قابل تشخیص بودند.

انجام آزمون روی کشتهای سلولی و نمونه های بافتی: ابتدا تیره سلولی R-BK طی چند نوبت در تعدادی لوله لیتون استریل و حاوی لامل کشت داده شد. ۲ الی ۳ روز بعد، پس از تشکیل لایه سلولی، تعداد ۲۱۰ کشت سلولی مناسب و با کیفیت انتخاب گردید. لوله ها به دو گروه ۱۴۰ و ۷۰ تایی تقسیم شدند. تعداد ۷۰ لوله به عنوان شاهد که با ویروس آلوده نشد و ۱۴۰ لوله باقیمانده با ویروس آلوده شدند. روز آلوده شدن روز صفر در نظر گرفته شد. در روز یک، تعداد ۲۸ نمونه آلوده و ۱۴ نمونه سالم با الکل اتانل - استون به مدت ۵ دقیقه فیکس شدند. جهت نگهداری نمونه ها نیز از ترکیب الکل - استون به نسبت ۵۰ به ۵۰ استفاده گردید. این عمل فیکس کردن در روزهای ۲، ۳، ۴ و ۵ روی نمونه های باقیمانده به همین ترتیب ذکر شده در بالا صورت گرفت. در روز ۶ لاملها از وسط به دو نیم تقسیم شد. نیمی از آن با پادتن ایمنوفلئورسانس ساخته شده در این تحقیق و نیم دیگر آن با پادتن ایمنوفلورسانس استاندارد مربوط به شرکت بیوایکس Biox، در شرایط مشخص رنگ آمیزی شدند.

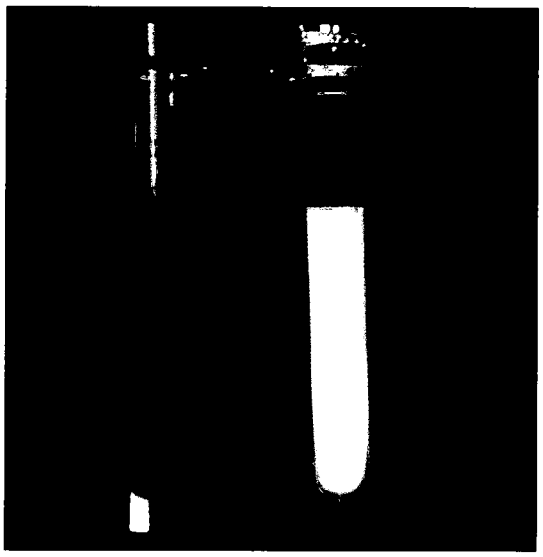
جهت رنگ آمیزی ۵۰ میکرولیتر پادتن نشاندار روی نمونه ریخته و سپس در جار مرطوب در گرمخانه ۳۷ درجه به مدت ۳۰ الی ۴۵ دقیقه قرار می گرفت. پس از خارج کردن از گرمخانه، با PBS چندین بار شستشو داده شده و سپس با استفاده از محلول تامپون گلیسیرین دار مونته گردیده و با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت بررسی می شد. این آزمون جهت حصول اطمینان از صحت روش کار و همچنین تکرار پذیری آزمون ۳ مرتبه بر روی حداقل ۲۱۰ نمونه مثبت و منفی که واجد درجات متفاوتی از عفونت بودند، انجام گرفت. همچنین تعداد۸۱ نمونه از بافتها و بافی کوت گوسفندان و گاوهای واجد علایم و یا به ظاهرسالم گسترش نازک تهیه شده و مطابق روش بالا رنگ آمیزی گردید. لازم به ذکر است که از هر نمونه بافت چهار گسترش مشابه تهیه می شد و دو مورد با پادتن نشاندار استاندارد و دو مورد بعدی با پادتن نشاندار تهیه شده در این تحقیق رنگ آمیزی گردید. پس از مشاهده نمونه ها و مقایسه آن با نمونه های رنگ آمیزی شده با پادتن نشاندار، پاسخهای حاصل از این دو نوع پادتن نشاندار در نمونه های کشت سلولی صددرصد با یکدیگر مطابقت می کردند. در نمونه های مختلف مرضی تهیه شده نیز از ۸۱ نمونه آزمایش شده با آنتی سرم تهیه شده در این طرح تنها یک مورد بافت مغز گوساله مبتلا به MD پاسخ منفی نشان داد در حالی که این نمونه درآزمون الیزا و ایمونوفلئورسنت با آنتی سرم استاندارد پاسخ مثبت نشان داده بود.

جدول ۱- مقایسه آماری نتایج حاصل از آزمون FA به وسیله پادتن فلورسنت استاندارد (بیوایکس) و پادتن فلورسنت ساخته شده در طرح در کل نمونه های مورد آزمایش.

استاندارد	طرح		جمع
	+	-	
+	۱۴۹	۱	۱۵۰
-	۰	۱۴۱	۱۴۱
جمع	۱۴۹	۱۴۲	۲۹۱

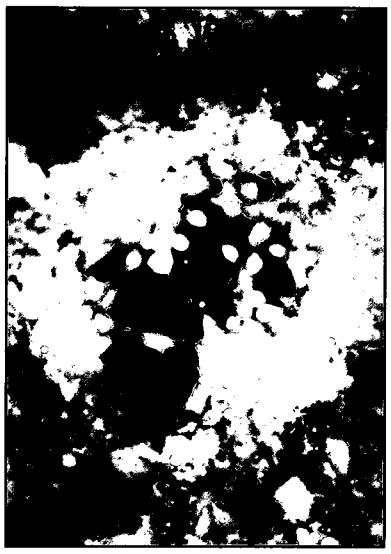


تصویر ۱- جداشدن باند ایمونوگلبولین های نشاندار در ابتدای ستون سفادکس.



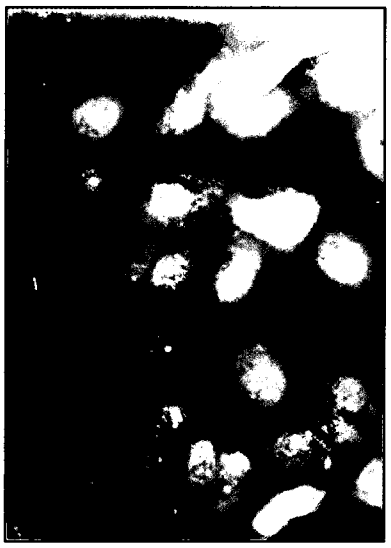
تصویر ۲- جداشدن باند ایمونوگلبولین های نشاندار در انتهای ستون سفادکس.

تصویر ۳- نمونه مثبت در کشت سلول، CPE کامل.



تصویر ۴- نمونه مثبت در کشت سلول، آغازCPE.

تصویر ۵- نمونه مثبت در کشت سلول، پیش از آغاز CPE.



تصویر ۶- نمونه منفی در کشت سلول.

تفاوت دیگری که در اینجا مشاهده شد، فلورسنت زمینه ای نمونه های رنگ آمیزی شده با پادتن نشاندار تهیه شده بود که دلیل آن پلی کلونال بودن این پادتن در مقایسه با پادتن منوکلونال استاندارد می باشد. گرچه حضور فلورسانس زمینه ای در کلیه موارد تداخلی با تشخیص موارد مثبت و منفی از خود نشان نمی داد و به سهولت موارد مثبت و منفی در هر دو آزمون قابل تشخیص و تفریق از یکدیگر بودند. تصاویر ۳،۲و ۴ موارد مثبت و منفی کشت سلولی را در آزمون ایمونوفلورسنت با انتی سرمهای مختلف را نشان می دهد.

مقایسه آماری نتایج حاصله از این دو آزمون به روش مک نمار حاکی از آن است ضریب Z مربوط به مقایسه این دو آزمون معادل ۸۳ درصد بوده و علاوه بر نداشتن اختلاف معنی دار آماری هیچ کدام بر دیگری ارجحیت نداشته و تا ۹۹/۶درصد با هم همخوانی دارند.

بحث

به خاطر گسترش فزاینده عفونتهای پستی ویروس در سراسر جهان و حضور چهره های بسیار متفاوت ناشی از عفونت با این ویروسها در بین حیوانات مختلف، امروزه بویژه در سیستم دامپروری مدرن، برنامه ریزی جهت مبارزه با این بیماریها بویژه BVD در زمره برنامه های اصلی مبارزه با بیماریهای عفونی می باشد (۳، ۲).

در ایران نیز به دنبال انجام برخی تحقیقات محدود، گستردگی موارد ابتلا به این عفونتها کاملاً مشهود می باشد. امکان انتقال گسترده ویروس در بین جمعیتها و رخداد چهره بالینی بیماری BVD، انتقال از مادر به جنین و حضور دامهای مبتلا به عفونت پایدار و شکل گیری موارد بیماری مخاطی (MD) از یک طرف و حضور سروتیپها و پاتوتیپهای متفاوت جرم از طرف دیگر، وضعیت پیچیده ای را از جهت برنامه ریزی به منظور شناخت و مبارزه با این بیماری ایجاد می نماید به طوری که در یک جمعیت می توان چهار حالت مختلف از نظر حضور دامهای پادتن مثبت و پادگن منفی، پادتن مثبت و پادگن مثبت، پادتن منفی و پادگن مثبت و پادتن منفی و پادگن منفی را متصور شد و به همین دلیل است که بسیاری از محققین به کارگیری توأمان آزمونهای ردیابی پادگن و ردیابی پادتن را جهت تشخیص وضعیت عفونتهای پستی ویروسی اکیداً توصیه نموده اند. ناگفته نماند برخی از فرآورده های بیولوژیک مثل سرمهای جنینی، واکسنهای تهیه شده در کشتهای سلولی و اسپرم های تهیه شده در مراکز تولید اسپرم نیز امکان آلودگی پستی ویروس را داشته و هر کدام می توانند به گسترش عفونتها دامن بزنند (۶، ۵، ۲).

در مواردی آلودگی واکسنهای تهیه شده در کشت سلولی مثل طاعون گاوی و اُرف (Orf) که زمینه ساز بروز عفونتهای پستی ویروسی بوده اند، گزارش شده است. یکی از راههای تشخیص معمول و ردیابی پادگنهای پستی ویروسی در نمونه های مرضی یا فرآورده های بیولوژیک، استفاده از آزمون ایمونوفلورسنت مستقیم می باشد. سایر روشها که به طور معمول در دنیا مورد استفاده قرار می گیرد شامل آزمونهای ایمونوفلورسنت مستقیم، الایزای تسخیری Immuno capture ELISA ایمونوبلاتینگ، PCR و در حد محدودی ژل دیفوزیون می باشد (۲۰، ۴).

در بین این روشها، روش FA هم از قدمت و هم از اعتبار زیادی برخوردار می باشد. در حال حاضر چند موسسه معتبر، پادتنهای ضد پستی ویروس نشاندار با FITC را جهت تشخیص پادگنهای پستی ویروسی تولید می نمایند که می توان به انستیتو وی بریج، انستیتو مردن و بیوایکس اشاره نمود که هر کدام حساسیت و ویژگی روشهای خود را بین ۹۵ تا ۹۸ درصد ذکر نموده اند.

در این تحقیق نیز با خالص سازی پادگنهای پستی ویروس استخراج شده از سویهNADL ویروسBVD ، اقدام به تهیه پادتن پلی کلونال در بدن خرگوش گردید. سویه ویروسNADL به علت داشتن بیشترین گستردگی بروز شاخصهای پادگنی پستی ویروسهای نشخوارکنندگان به عنوان پادگن استاندارد در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت (۳۰، ۱۷، ۶).

چون اکثر گاوها و گوسفندان مملکت به نحوی با واکسنهای تهیه شده در کشتهای سلولی واکسینه شده اند، احتمال تولید پادتنهای ضد اجزاء کشت سلول در بدن آنها وجود دارد و این نکته می تواند به بروز پاسخ های مثبت کاذب در آزمایشات نهایی منجر شود. لذا جذب پادتنهای احتمالی ایجاد شده در خرگوشهای ایمن شده، قدمی در جهت افزایش ویژگی پادتن نشاندار می باشد (۲۳).

نکته مهم دیگری که در آزمونهای ردیابی پادگن ازجمله آزمونFA می بایستی مورد توجه قرار گیرد، رخداد پاسخهای منفی کاذب به دلیل حضور پادتنهای مادری می باشد. پادتنهای مادری با پوشاندن پادگنهای ویروسی به ویژه در حیوانات PI زیر سه ماه، اکثریت مواردواکنشهای منفی کاذب را تشکیل می دهند. به همین منظور توصیه اکید سازندگان کیتهای تشخیصی ردیابی پادگنهای پستی ویروسی بر انجام آزمون در دامهای بالاتر از سه ماه و توأم نمودن آزمونهای ردیابی پادتن و ردیابی پادگن با هم می باشد که این نکته در تهیه نمونه های مربوطه جهت آزمون FA نیز رعایت گردیده است.

یافته دیگر این تحقیق که در کشتهای سلولی آلوده به پستی ویروس حاصل آمده آن است که پادگنهای پستی ویروس را می توان از یک روز بعد از آلودگی در کشتهای سلولی به صورت کانونهایی از سلولهای آلوده مشخص نمود (۲۰).

قدرت تشخیص کانونهای سلولی آلوده حتی قبل از شکل گیری CPEامتیازی است که می توان از آن در مدت کوتاهی و حتی بدون نیاز به انجام آزمونهای تأیید تشخیص دیگر بهره برد. در ثانی حدود ۹۵درصد از پستی ویروسهای نشخوارکنندگان غیر سایتوپاتیک بوده و اصولاً در کشتهای سلولی قابل تشخیص نمی باشند. با به کارگیری این روش می توان به راحتی حضور پستی ویروسهای غیر سایتوپاتوژن را نیز تشخیص داد، چون سویه NADL واجد اکثریت پادگنهای مشترک بین انواع پستی ویروسها می باشد. همخوانی صددرصدی پادتن FA تهیه شده در این طرح با پادتن منوکلونال بیوکس در تشخیص کشتهای سلولی آلوده و غیر آلوده و هم خوانی ۹۸/۷ درصد این دو پادتن در نمونه های مرضی آلوده و در کل همخوانی ۹۹/۶ درصد این دو پادتن در تشخیص پادگن های پستی ویروسی در نمونه های کشت سلولی و مرضی، قدرت بالای این آنتی سرم در تشخیص موارد مثبت و تفریق از موارد منفی را نشان می دهد. از آنجایی که پادتن تهیه شده توسط بیوایکس ازحساسیت ۹۸ و ویژگی ۹۶درصد درتشخیص پادتنهای پستی ویروسی برخورداراست و پادتن تهیه شده در این طرح نیز بجز در یک مورد، از ۲۹۱مورد آزمایش شده به هردو روش، هماهنگی وجود داشت .لذا به نظرمی رسد این پادتن نیز ازحساسیت و ویژگی معادل پادتن بیوکس برخوردارباشد (۲۹).

نهایتاً جهت به چالش گذاشتن حساسیت و ویژگی این پادتن و مقایسه آن با سایر روشهای ردیابی پادگنهای پستی ویروس توصیه می گردد با به کارگیری وسیع این آزمون و مقایسه پاسخهای حاصله با روش الایزا و همچنین پادتنهای استاندارد شده مورد مصرف در جهان مثل پادتن وی بریج و مردن و بیوایکس، حساسیت و ویژگی این آزمون به ویژه ازطریق خالص سازی حداکثر، تعیین رقت دقیق پادتن و حذف حداکثر فلئورسانس

زمینه ای، قدمی در جهت به کار گیری روتین این پادتن در آزمایشگاههای مراکز تشخیص دامپزشکی مملکت برداشته شود.

جهت حذف فلئورسانس زمینه ای، دو روش پیشنهاد می گردد: یکی افزایش خلوص پادگن مورد استفاده جهت ایمن سازی و در صورت امکان تهیه آن از طریق مهندسی ژنتیک و دیگر خالص سازی حداکثر پادتن که آن هم ازطریق تهیه پادتن منوکلونال امکانپذیر خواهد بود.

References

۱. تاج بخش، ا. (۱۳۷۸): ارزیابی ایمنوفلورسنت جهت تشخیص موارد سرمی آلودگی به ویروس IBR ، پایان نامه دوره کارشناسی ارشد میکروبیولوژی. صفحه: ۵۴-۴۴.

۲. صدیقی نژاد، ص. (۱۳۷۵): بررسی اسهال ویروسی گاو /بیماری مخاطی در ایران. پژوهشی و سازندگی. (۳۰) ب ۷۵، صفحه: ۱۲۷.

۳. کیوانفر، ه، همت زاده، ف و محمودیان، ع. (۱۳۸۰): ویروس شناسی دامپزشکی (بیولوژی ویروسها). انتشارات دانشگاه تهران. شماره ۲۴۹۳. صفحه: ۶۳،۴۲،۴۱.

۴. همت زاده، ف. (۱۳۸۰): ارزیابی به کارگیری آزمون ایمنوفلورسانت غیرمستقیم جهت تشخیص سرمی بیماری IBR، مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران. (۵۶) ۲. صفحه: ۷۱-۶۵.

۵. همت زاده، ف. (۱۳۸۰): ارزیابی به کارگیری آزمون ژل دیفوزیون در تشخیص سرمی اسهال ویروسی گاوان، مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران. (۵۶) ۱، صفحه: ۲۶و۲۷.

۶. همت زاده، ف. (۱۳۷۶): بررسی سرولوژیک بیماری بردر در ایران و مطالعه تجربی بیماری، پایان نامه دوره دکترای تخصصی میکروبیولوژی، شماره ثبت: ۵۹.

7. Afshar, A., Dulac, G.C., Dubuc, C., Howard, TH. (1991): Comparative evaluation of the flourescent antibody test and microtiter immunoperoxidase assay for detecting of bovine viral diarrhea virus from bull semen. Canadian Journal of Veterinary Research. 55: 1, PP: 91-93.

8. Baker, J.C. (1995) The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice. 11.3, PP: 425-445.

9. Bolin, S.R. (1995): Pathogenesis of Mucosal disease, Veterinary Clinics of North America: Food Animal practice, 11.3, PP: 489-499.

10. Both, PJ., Strevens, DA., Collins, ME., Brownlie, J. (1995): Detection of bovine viral diarrhea virus antigen and RNA in oviduct and granulosa cells of persistently infected cattle. Journal of Reproduction and Fertility. 105: 1, PP: 17-24.

11. Burleson, FG., Chambers, TM., Wiedbrauk, LD. (1992): Virology, A Laboratory Manual. Academic Press Inc PP: 123-128.

12. Brock, K. V. (1995) Diagnosis of bovine viral diarrhea virus infection. Veterinary Clinics of North America: Food Animal practice. Vol 11.3, PP: 549-561.

13. Deng, R., Brock, K.V. (1992): Molecular cloning and nucleotid sequence of pesti virus genom noncytopathic BVD strain SD1 virology. 191-868.

14. Fenton, A., Entrican, G., Herring, JA., Nettleton, PF. (1990): An ELISA for detecting pestivirus antigen in blood of sheep persistently infected with Border disease virus. Journal of Virological Methods . (27) 3. 253.

15. Hanel, V. (1993): A comparison two diagnostic methods for bovine virus diarrhoea infection. Tieraztle Umschau. (48) 339-343.

16. Houe, H. (1995): Epidemiology of bovine viral diarrhea virus. Veterinary Clinics of North America: Food Animal practice. Vol 11.3, PP: 521-547.

17. Hudson Land Hay, F.C. (1991): Practical Immunology, Black well scientific publication, PP: 281-290.

18. Moennig, V. (1990): Pestiviruses: a review, Veterinary Microbiology, 23, PP: 35-54.

19. Moening, V., Liess, B. (1995): Pathogenesis of intrauterine infections with bovine viral diarrhea virus, Veterinary clinics of North America: Food Animal practice, Vol 11.3, PP: 477-487.

20. Murphy, F.A., Gibbs, E. P. J., Horzine, K. M. C., Studdert, M.J. (1999): Veterinary Virology. Academic press. pp: 555-569.

21. Paton, D.J. (1995): Pestivirus diversity. J. Com. Path. (112) PP: 215.

22. Pistle, J., Wolf, G., Wolf Meyer, A., Beer, M., Pichler, J., Kaaden, OR. (1997): Rapid detection of bovine viral diarrhea virus-P80/125 in blood leukocytes of viremic cattle with immunofluoresecence microscopy. Floria - Veterinaria, 41: 1-2, PP: 21-24.

23. Potgieter, L.N.D. (1995): Immunology of bovine viral diarrhea virus. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice. (11).3, PP: 501-520.

24. Radstits, O.M., Blood, D.C., Gay, C.C. (1994): Veterinary Medicine, Bailliere Tindall, PP: 993-1008.

25. Werdin, RE., Ames, TR., Goyal, SM., Devris, BP. (1989): Diagnostic investigation of bovine viral diarrhea infection in a minnesota dairy herd. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 1:1, PP: 57-61.