ارزیابی مقایسه‌ای روش‌های ایمونوهیستوشیمیایی در تشخیص بیماری آنفلوانزای طیور

• مهرداد شمس الدینی بافتی، عضو هیات علمی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، شعبه کرمان، کرمان
• سید علی پوربخش، عضو هیات علمی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، حصارک، کرج
• مهدی وصفی مرندی و• عبدالمحمد حسنی طباطبایی، اعضا، هیات علمی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران

تاریخ دریافت: اسفند ماه ۱۳۸۱ تاریخ پذیرش: فروردین ماه ۱۳۸۳

چکیده

تکنیک های ایمونوهیستوشیمیایی جزء تکنیک های تشخیصی سریع بوده که در اغلب کشورها به عنوان یکی از ابزارهای تشخیصی دقیق بیماریهای ویروسی طیور استفاده می شود. آنفلوانزای طیور یکی از بیماریهای ویروسی خطرناک طیور است که می تواند خسارات هنگفتی به مرغداریهای صنعتی وارد نماید. در این تحقیق آزمایش های ایمونوفلورسانس غیر مستقیم(IIF[1])و ایمونوپراکسیداز غیر مستقیم(IIP[2]) در مقایسه با روش استاندارد جداسازی ویروس در نمونه های بالینی مشکوک به آنفلوانزا و به ظاهر سالم مورد ارزیابی قرار گرفت. در ابتدا این آزمایش ها در جوجه های گوشتی با ایجاد عفونت تجربی استاندارد گردید. بافت های نای، ریه و کلیه جوجه های تلقیح شده با ویروس آنفلوانزا و نیز نمونه های بالینی مشکوک جهت جداسازی ویروس و تهیه مقاطع بافتی منجمد با استفاده از تامپون نگهدارنده OCT[3] در مایع ازت انجام گردید. بعد از تهیه مقاطع بافتی منجمد آزمایش های فوق بر روی این بافت ها انجام گردید. حساسیت و ویژگی آزمایش های IIF و IIP در مقایسه با جداسازی ویروس در نمونه های تهیه شده از موارد بالینی مشکوک به ترتیب معادل ۸۶، ۸۱٪ و ۹۳، ۸۱٪ بدست آمد. همچنین ارزش پیشگویی مثبت و منفی هر کدام از آزمایش های فوق به ترتیب معادل ۷۶، ۸۹ ٪ و ۷۷، ۹۴٪ بود. جهت شناسایی پرندگان آلوده بین جداسازی ویروس با آزمایش های IIF و IIP توافق اساسی وجود داشت. به طوری که آنالیز کاپا (Kappa)به ترتیب معادل ۹۲ و ۹۵٪ بدست آمد. استفاده از آزمایش ایمونوپراکسیداز غیر مستقیم برای تشخیص پادگن های تحت تیپ H9N2 در مقاطع بافتی منجمد برای اولین بار در ایران انجام شده است. با توجه به نتایج بدست آمده جهت بررسی پایش های ایمونوهیستوشیمیایی در گله های طیور استفاده از تکنیک ایمونوپراکسیداز غیر مستقیم بخصوص در مقاطع بافت کلیه توصیه می گردد.

کلمات کلیدی: آنفلوانزای طیور، تشخیص، ایمونوهیستوشیمیایی، ایمونوفلورسانس، ایمونوپراکسیداز

Pajouhesh & Sazandegi No:62 pp: 88-95

Comparative and evaluation of immunohistochemical methods for detection of avian Influenza disease.

By: M. Shamsaddini Bafti, Kerman Branch, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Iran.
A. Pourbakhsh, Razi, Vaccine and Serum Research Institute; M. Vasfi Merandi and A. H. Tabatabayi, Veterinary Faculty of Tehran University, Iran.

Archive of SID
www.SID.ir

The immunohistochemical techniques related to clinical diagnosis tests, has been used for rapid diagnosis of avian viral diseases by the poultry laboratory diagnosticians. Avian influenza (AI) is an important viral disease of poultry worldwide and causes by avian influenza virus (AIV). This disease caused high economic losses in Iranian poultry industry. In this study, the indirect immunoflurescence (IIF) and indirect immunoperoxidase (IIP) assays were compared with the standard virus isolation procedure on tissue samples prepared from chickens experimentally infected as well as clinical specimens. These techniques were optimized in broiler chickens inoculated with local H_9N_2 AI viruses. The trachea, lung and kidney tissue samples from experimentally infected and clinical samples were embedded into OCT (Optimum Cutting Temperature) and put primarily at -196 $^{\circ}C$ and then after at -70 $^{\circ}C$ in order to prepare frozen tissue sections. The IIF and IIP assays carried out on frozen tissue sections. The sensitivity and specificity values of IIF and IIP assays analyzed vis a vis virus isolation were respectively 86, 81 % and 93, 81 % for clinical specimens. The positive and negative predictive values of IIF and IIP assays were 76, 89 % and 77, 94 % respectively. There was a substaintial agreement between virus isolation and IIF, IIP assays for knowing of infection in chickens (by Kappa statistic 92 and 95% respectively). The application of IIP assay for diagnosis of H_9N_2 subtype antigens in frozen tissue sections is for the first time in Iran. According of results, for immunohistochemical monitoring of chicken flocks, the IIP assay particularly in kidney tissue samples has been recommended.

Key words: Avian Influenza, Immunohistochemical Techniques, Immunoflurosence Assay, Immunoperoxidase Assay

of SID

مقدمه

آنفلوانزای طیور یکی از مهمترین و خطرناکترین بیماریهای ویروسی می‌باشد که از سراسر دنیا گزارش شده است. ویروس‌های آنفلوانزا طیور جزء خانواده ارتومیکسوویریده می‌باشند و در دستگاههای تنفس، گوارش و اعصاب جایگزین شده که گاهی در طیور مرگ و میر شدیدی ایجاد می‌کند. این بیماری در ماکیان و بوقلمون از فرم تحت بالینی یا عفونت خفیف دستگاه تنفس فوقانی تا بیماری حاد و کشنده می‌تواند متغیر باشد(۲). تشخیص بیماری آنفلوانزای طیور مبتنی بر انجام معاینات بالینی و یافته‌های کالبدگشایی و همچنین روش‌های آزمایشگاهی از قبیل آزمایش های ویروس شناسی مانند: جداسازی ویروس، آزمایش هماگلوتیناسیون(Test Hemagglutination)، خنثی‌سازی ویروس (Virus Neutralization)، میکروسکوپ الکترونی (Electronic Microscope) و آزمایش های سرولوژیکی مانند آزمایش ممانعت کننده از هماگلوتیناسیون (Hemagglutination Inhibition)، ELISA و رسوب در ژل اگار (Agar Gel Percipitaion) و آزمایش‌های مولکولی مانند: آمیخته گری(Hybridization)، وPCR و تعیین توالی اسید آمینه و آزمایش‌های ایمونوهیستوشیمیایی (Immuno Histochemical Techniques) مانند ایمونوفلورسانس(ImmunoFl uoresence Assay) یا IF و ایمونوپراکسیداز (ImmunoPeroxidase Assay) یا IP می‌باشد (۲۴). آزمایش‌های ایمونوهیستوشیمیایی که جزء تکنیک‌های ایمونولوژیکی بوده، جهت ردیابی حضور پادگن‌های ویروسی در بافت ها به کار می‌رود. از آنجائی که در مواقع شیوع و ظهور مجدد بیماری، جداسازی ویروس‌های آنفلوانزا از تمامی موارد وقت‌گیر می‌باشد، لذا می‌توان از روش‌های تشخیصی ایمونوهیستوشیمیایی برای ردیابی ویروس های آنفلوانزا در بافت های آلوده استفاده نمود (۲۴). حضور پادگن های اختصاصی در نمونه‌های بافتی تازه منجمد شده یا تعلیق سلولی تثبیت شده را می‌توان با استفاده از پادتن‌های اختصاصی متصل به آنزیم ها و رنگ‌ها تشخیص داد. نیاز اصلی در این تکنیک، در دسترس بودن شناساگر پادتن قابل اطمینانی می‌باشد که توسط فن آوری پادتن‌های مونوکلونال یا پلی کلونال بر ضد طیف وسیعی از پادگن‌ها با ماهیت پروتئینی تا گیکوپروتئین‌های سلولی قابل تهیه و تولید انبوه می‌باشد. در آزمایش‌های ایمونوهیستوشیمیایی در صورتیکه از نمونه‌های کنترل مناسب استفاده شود به نتایج مثبت می‌توان اطمینان بالایی داشت اما نتایج منفی باید با احتیاط مورد ارزیابی قرار گیرند. از آزمایش های ایمونوهیستوشیمیایی می‌توان به تکنیک‌های ایمونوفلورسانس و ایمونوپراکسیداز اشاره کرد . با توجه به شیوع بیماری آنفلوانزای طیور در ایران و ضررهای اقتصادی ناشی ازآن، تشخیص زود هنگام بیماری از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشد(۳). در این تحقیق، توانائی تکنیکهای ایمونوهیستوشیمیایی همچون آزمایش‌های ایمونوفلورسانس غیر مستقیم(IIF) و ایمونوپراکسیداز غیر مستقیم (IIP) در تشخیص عفونت‌های آنفلوانزا بررسی و با روش‌های کلاسیک ویرولوژیکی مانند جداسازی ویروس در تخم مرغهای جنین‌دار مقایسه شده است.

www.SID.ir

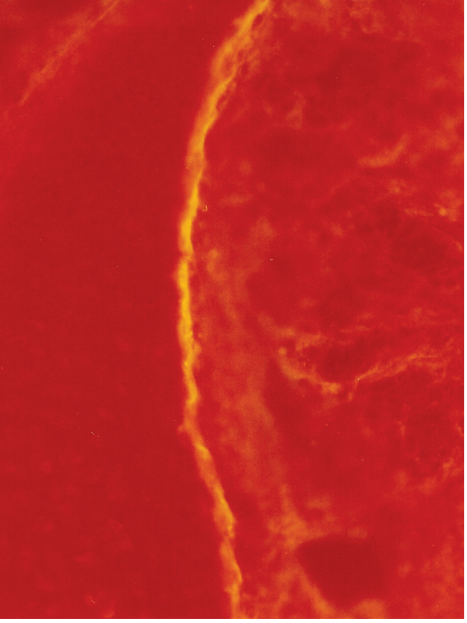
مواد و روش کار

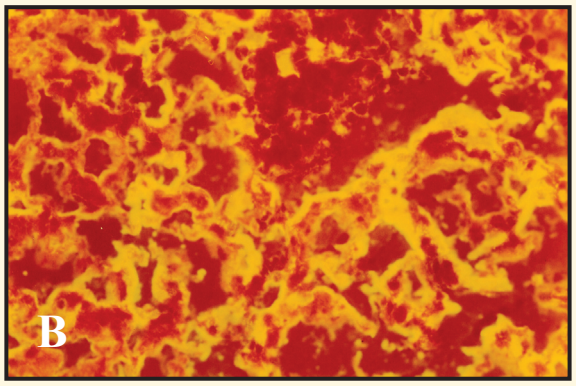
الف- سویه ویروس و پادتن ها:

سویه ویروسی (A/Chicken/Iran/ZMT-۱۰۰۳/۱۹۹۹(H_9N_2)، آنتی سرم اختصاصی تیپ A ویروس آنفلوانزا ، آنتی سرم اختصاصی تحت تیپ H_9N_2 ویروس آنفلوانزا، پادتن اختصاصی کونژوگه با FITC، پادتن اختصاصی کونژوگه با پراکسیداز، سوبسترا ′۳ و ′۳- دی آمینو بنزیدین (DAB)، محلول بلوک کننده حاوی H۲O۲ ، محلول آلسور، گویچه قرمز ۰/۷۵ درصد، تخم مرغ جنین دار SPF ، تامپون نگهدارنده OCT و مایع مونته کانادا بالزام (Canada Balzam Mounting Medium) می باشند. از تجهیزات می توان به میکروسکوپ فلورسانس و دستگاه کریو استات Cryostat Instrument مدل Cry Cut-II اشاره کرد.

ب - عفونت تجربی

تعداد ۱۶ قطعه جوجه گوشتی ۶ هفته نژاد آریان که سرم آنها در آزماش های HI وELISA از نظر وجود پادتن ضد ویروس آنفلوانزای مرغی منفی بوده انتخاب شدند. به ۸ قطعه به عنوان گروه تحت آزمایش سویه ZMT-۱۰۰۳تحت تیپ H_9N_2 ویروس آنفلوانزا با تیتر $۱۰^{۸/۵}$ بر مبنای ELD۵۰ به طریق داخل نائی و داخل وریدی تزریق گردید. ۸ قطعه مرغ به عنوان گروه شاهد تحت تلقیح با محلول استریل PBS به جای ویروس قرار گرفتند. در روزهای ۲، ۳، ۴ و ۱۰، تعداد ۲ قطعه جوجه از هر دو گروه تحت آزمایش و شاهد انتخاب و با استفاده از محلول پنتول باربیتال سدیم (۱۰۰ mg/kg) به روش بدون درد کشته شدند(۲۴). در کالبد گشایی بافتهای نای، ریه و کلیه جوجه ها را در شرایط استریل جدا نموده و هر کدام را به ۲ قطعه تقسیم و در ظروف جداگانه ای قرار داده شدند. به طوری که یک قطعه را بلافاصله در کرایوتیوپ به همراه OCT در تانک ازت یعنی در ۱۹۶- درجه سانتیگراد منجمد نموده و بعد از ۱۰ دقیقه به فریزر ۷۰- درجه سانتیگراد منتقل شدند. قطعه دوم، برای جداسازی ویروس در برودت ۷۰ - درجه سانتیگراد نگهداری گردید. نمونه های بافتی که به طور مستقیم در کرایوتیوپ محتوی OCT منجمد شده جهت تهیه مقاطع منجمد بافتی به شرح زیر مورد استفاده قرار گرفت : قبل از شروع آزمایش می بایست دستگاه کریواستات (CRY-II) برودتش به ۳۵- درجه سانتیگراد برسد. به همین علت در اولین ساعات شروع کار فریزر دستگاه روشن می گردید. بعد از مدت زمان حدود ۳-۲ ساعت، نمونه ها را از فریزر ۷۰- درجه به فریزر داخل کریواستات منتقل می شدند. سپس هر کدام از بافت ها را روی پایک های خاص قرار داده و به آرامی با نزدیک کردن تیغه دستگاه برش های سریالی از بافت تهیه گردید. با توجه به وسعت هر نمونه، ۳ تا ۴ برش، روی یک لام قرار داده می شد. به همین ترتیب ازدیگر نمونه ها، برشهای سریال تهیه گردید. هر کدام از لامها را به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه در حرارت آزمایشگاه خشک نموده و سپس با استفاده از استون سرد شده، مقاطع بافتها به مدت ۲۰ دقیقه تثبیت می گردید. بعد از خشک کردن لامها، فویل آلومینیوم را دور لامها پیچانده و در برودت ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. لامهای تهیه شده، در آزمایش های ایمونوهیستوشیمیایی استفاده شدند. آزمایش های ایمونوفلورسانس غیر مستقیم و ایمونوپراکسیداز غیر مستقیم که جزء تکنیک های ایمونو هیستو شیمیایی بوده بر روی هر کدام از این برشهای بافتی منجمد به شرح زیر انجام گردید.

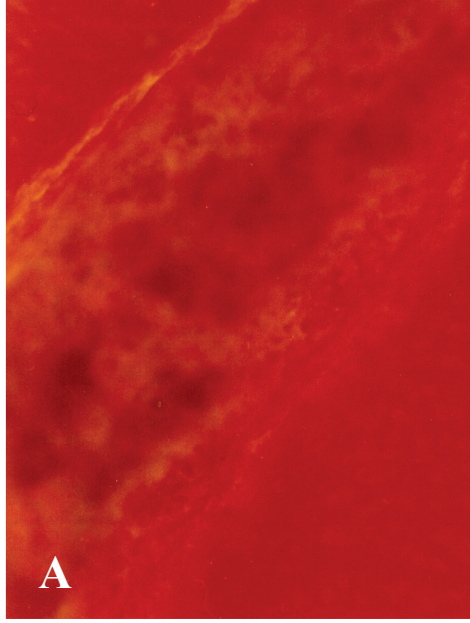




ج -آزمایش ایمونوفلورسانس غیر مستقیم

در این تحقیق از روش ایمونوفلورسانس غیر مستقیم (IIF) جهت تشخیص پادگن‌های ویروس آنفلوانزا در مقاطع بافت‌ها استفاده گردید. ابتدا لامهایی که در ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری شده بودند از فریزر خارج نموده و به مدت ۱ ساعت در حرارت آزمایشگاه قرار داده شدند. در این مدت زمان با تنظیف اطراف مقاطع بافتی را پاک نموده تا حاشیه بافت ها کاملاً تمیز گردد. بعد از آن پادتن اولیه که مستقیماً ضد ویروس های آنفلوانزای تیپ A بوده را روی مقاطع بافتی مورد آزمایش به میزان ۳۰ میکرولیتر اضافه گردید. البته درنمونه‌های کنترل، به همان میزان از آنتی سرم کنترل منفی و یا PBS روی مقاطع اضافه گردید. سپس لامها در گرمخانه مرطوب ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ دقیقه قرار داده شدند. بعد از این مدت، لامها در محلول PBS سه دفعه و هر بار به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شدند. سپس لامها را سریع خشک نموده و پادتن نشان دار ثانویه به میزان ۳۰ میکرولیتر اضافه نموده و بلافاصله لامها در گرمخانه مرطوب ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند. بعد از اتمام انکوباسیون، لامها را در محلول PBS سه دفعه و هر بار به مدت ۵ دقیقه شستشو داده و یک قطره بافرگلیسرول (گلیسرول ۹ قسمت و محلول PBS یک قسمت) را روی نمونه بافتی ریخته و سپس به آرامی یک لامل روی آن قرار داده شد. لامها در محفظه مرطوب و تاریک در ۴ درجه سانتیگراد جهت مشاهده با میکروسکوپ فلورسانس نگهداری شدند. در هر نوبت رنگ آمیزی از نمونه های بافتی مثبت و منفی از نظر وجود ویروس‌های آنفلوانزا استفاده می شد.

www.SID.ir

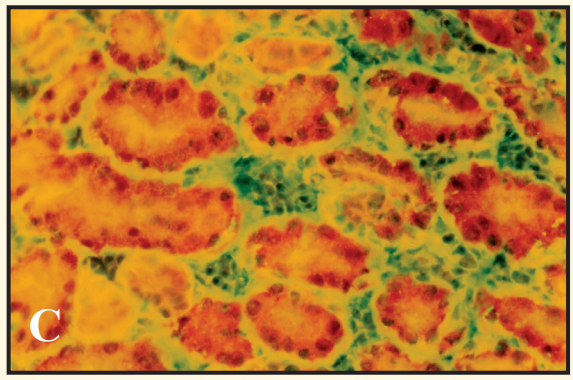


تصویر۱: واکنش مثبت پادتن پلی کلونال اختصاصی تیپA آنفلوانزا با پادگن های ویروسی در مقاطع بافتهای نای(A)، ریه(B) و کلیه(C) منجمد در آزمایش ایمونوفلورسانس غیر مستقیم(IIF)

آمیزی زمینه (متیل گرین) به میزان ۳۰ میکرولیتر روی مقاطع ریخته و سپس با اضافه کردن الکل ایزوپروپیل، رنگهای اضافی را حذف کرده و لامها را پس از خشک شدن با گذاشتن یک قطره از مایع مونته کانادا بالزام و لامل مونته کرده و برای بررسی با میکروسکوپ نوری مورد

جدول ۱ : مقایسه نتایج آزمایش های جداسازی ویروس(VI)، ایمونوفلورسانس غیر مستقیم(IIF) و ایمونوپراکسیداز غیر مستقیم(IIP) درهر کدام از پرنده های ۱، ۲، ۳، ۴ و۵ کالبد گشائی شده متعلق به گله‌های A، B، C، D، E، F، G و H.

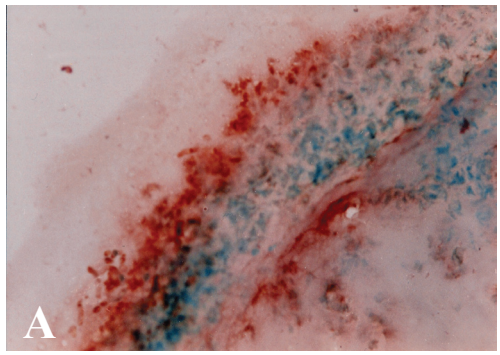
Tests جوجه ها (مزرعه)		VI	IIF	IIP
A	۱	+	+	+
	۲	+	+	+
	۳	+	+	+
	۴	+	+	+
	۵	+	+	+
B	۱	+	+	+
	۲	+	+	+
	۳	+	+	+
	۴	+	+	+
	۵	+	–	–
C	۱	+	+	+
	۲	+	+	+
	۳	+	+	+
	۴	–	+	+
	۵	+	–	+
D	۱	–	+	+
	۲	–	+	+
	۳	–	+	–
	۴	–	+	+
	۵	–	–	+
E	۱	–	+	–
	۲	–	+	–
	۳	–	–	–
	۴	–	–	–
F	۱	–	–	–
	۲	–	–	–
	۳	–	–	–
	۴	–	–	–
G	۱	–	–	–
	۲	–	–	–
	۳	–	–	–
	۴	–	–	–
H	۱	–	–	–
	۲	–	–	–
	۳	–	–	–
	۴	–	–	–

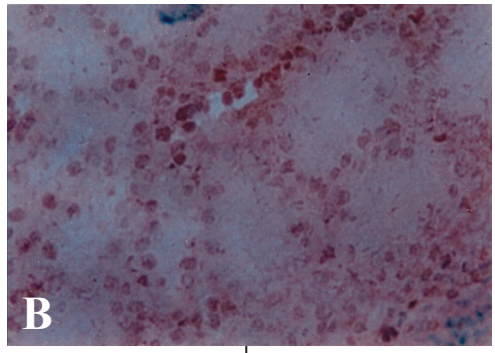


د – آزمایش ایمونوپراکسیداز غیر مستقیم

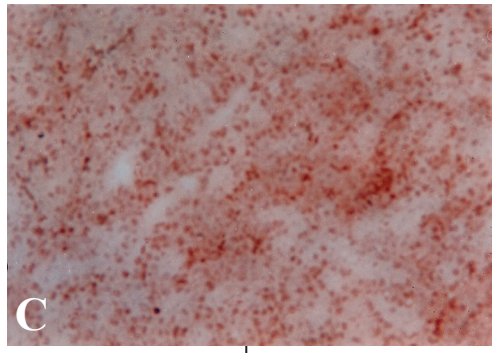
آزمایش ایمونوپراکسیداز غیر مستقیم (IIP) بر اساس دستور العمل Naqi و همکاران با کمی تغییرات به شرح زیر مورد استفاده قرار گرفت (۱۹). ابتدا مقاطع بافتی منجمد که در فریزر ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری شده بودند را از فریزر خارج و در حرارت آزمایشگاه به مدت یک ساعت قرار داده شدند. تمام معرف های مورد استفاده، قبل از شروع آزمایش حداقل ۴۵ دقیقه در حرارت آزمایشگاه قرار داده می شدند. از معرف بلوک کننده فعالیت اکسیداز داخلی که حاوی H_2O_2 بوده به میزان ۳۰ میکرولیتر بر روی مقاطع بافتی ریخته و بعد از ۴۵ ثانیه با آب دی یونیزه شستشو داده و سپس در محلول (pH=۷/۶ :۰/۱ mol/L Tris-HCL) به مدت ۵ دقیقه قرار داده شدند سپس ۳۰ میکرولیتر از آنتی سرم اختصاصی ضد تیپ A آنفلوانزا رقیق شده را، روی مقاطع بافتی ریخته و در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت یک ساعت قرار داده شدند. بعد از اتمام انکوباسیون، لامها را سه بار و هر بار ۵ دقیقه در محلول Tris-HCl شستشو داده شدند. سپس لامها را از محلول خارج و بعد از گرفتن رطوبت بافتها با کاغذ خشک کن، ۳۰ میکرولیتر از پادتن رقیق شده کونژوگه به HRP ضد مرغی تهیه شده در بز را روی مقاطع بافتی ریخته و در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ دقیقه قرار داده شد. سپس لامها را سه بار و هر بار ۵ دقیقه در محلول Tris-HCl شستشو شدند. برای نمایان کردن واکنش بین پادگن و پادتن در این آزمایش از محلول سوبسترای DAB و پراکسیداز استفاده گردید. از محلول رنگ

www.SID.ir





این بافت ریه می‌باشد



این بافت کلیه می‌باشد

تصویر۲: واکنش مثبت پادتن پلی کلونال اختصاصی تیپA آنفلوانزا با پادگن‌های ویروسی در مقاطع بافتهای نای(A)، ریه(B) و کلیه(C) منجمد در آزمایش ایمونوپراکسیداز غیر مستقیم(IIP)

استفاده قرار گرفت.

ه – جدا سازی ویروس

ابتدا سوسپانسیون هموژنیزه بافت را با استفاده از محلول PBS و آنتی بیوتیک ها در شرایط استریل تهیه و سپس تا زمان تزریق در ۴+ درجه سانتیگراد نگهداری شد. بعد از مشخص کردن محل تزریق در تخم مرغ های جنین دار SPF، با تنتورید و سپس با الکل اتیلیک کاملاً ضد عفونی گردید و از هر نمونه به میزان ۰/۲ میلی لیتر به داخل حفره آلانتوئیک ۵ عدد تخم مرغ در کنار شعله تزریق گردید. بعد از مسدود نمودن محل تزریق، تخم مرغ ها به انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد منتقل شدند و روزانه یک نوبت جهت شناسایی جنین های تلف شده مورد بازدید قرار می گرفت. عدم تحرک، جمع شدگی و از بین رفتن عروق خونی نشان دهنده مرگ جنین است. تخم مرغهایی که در آنها مرگ جنین رخ داده بود از انکوباتور خارج کرده و در یخچال ۴+ درجه سانتیگراد به مدت ۱۲ ساعت قرار داده شد. سپس پوسته تخم مرغ را به کمک قیچی استریل برداشت نموده و بعد از کنار زدن پرده کوریوآلانتوئیک، مایع آمنیو آلانتوئیک با سرنگ برداشت می شد. جهت اطمینان از تکثیر ویروس، آزمایش های هماگلوتیناسیون وHI استفاده گردید. برای نمونه های منفی پاساژ سوم مایع آمنیو آلانتوئیک تکرار گردید(۲۴).

خ – تهیه نمونه های بالینی

نمونه‌های بالینی از ۸ گله اخذ گردید. بعد از ثبت علائم بالینی در نمونه‌های زنده و اخذ نمونه خون و تهیه سرم و همچنین ثبت مشاهدات ماکروسکوپی بعد از کالبدگشایی، نمونه های بافتی ریه، نای و کلیه را در شرایط استریل برداشت نموده و برای جداسازی ویروس و تهیه مقاطع منجمد بافتی مورد استفاده قرار گرفت. مراحل فوق مشابه مراحلی بوده که در کار تجربی مورد استفاده قرار گرفته که قبلاً به طور کامل شرح داده شد. همچنین به همین تعداد نمونه های بافتی و سرم از پرندگان به ظاهر سالم از گله های منفی از نظر آنفلوانزا در آزمایش HI تهیه گردید. آزمایش IIF برای جستجوی پادگن های تیپ A در نمونه‌های بافتی منجمد تهیه شده از موارد بالینی انجام گردید. این آزمایش مشابه آزمایش مورد استفاده در نمونه‌های تجربی می‌باشد. در اینجا از غلظت‌های ۱:۵۰ برای پادتن پلی کلونال اختصاصی و ۱:۷۰ برای پادتن اختصاصی کونژوگه با FITC تهیه شده در بز استفاده گردید. آزمایش IIP برای جستجوی پادگن‌های تیپ A در نمونه‌های بافتی منجمد تهیه شده از موارد بالینی انجام گردید. این آزمایش نیز مشابه آزمایش مورد استفاده در نمونه‌های تجربی می‌باشد. غلظت‌های ۱:۱۰۰ برای پادتن پلی کلونال اختصاصی و ۱:۷۰ برای پادتن اختصاصی کونژوگه به پراکسیداز تهیه شده در بز استفاده گردید. جهت تعیین حساسیت، ویژگی، ارزش پیشگویی مثبت و منفی آزمایش‌های IIF , IIP از فرمولهای مربوطه استفاده شد. برای ارزیابی همخوانی بین آزمایش‌های جدا سازی ویروس، IIF , IIP از آنالیز کاپا (Kappa Statistic) نیز استفاده گردید(۱۱).

نتایج

از نمونه های بافتی در روزهای ۲، ۳ و ۴ بعد از تلقیح ویروس جدا گردید که در آزمایش IIF سلولهای آلوده در زیر میکروسکوپ فلوروسانس به رنگ سبز درخشان متمایل به زرد مشاهده گردید(تصویر ۱). با توجه به اینکه رقتهای متفاوتی از پادتن و کونژوگه FITC نیز در این جوجه ها مورد آزمایش قرار گرفت، رقت ۱:۵۰ و ۱:۷۰ به ترتیب برای پادتن اولیه و کونژوگه در آزمایش IIF در موارد مشکوک کلینیکی آنفلوانزای طیور

Archive of SID
www.SID.ir

انتخاب گردید.

آنالیز یافته های ایمونوهیستوشیمیایی بر روی مقاطع بافتی به شرح زیر انجام گرفت:

از تعداد ۱۰۸ مقطع از بافت های نای، ریه و کلیه، ۳۷ مقطع معادل ۳۴٪ در جداسازی مثبت بوده، که در آزمایش IIF، ۳۱ مورد معادل ۸۳٪ مثبت و ۶ مورد معادل ۱۷٪ منفی تشخیص داده شد.

با توجه به داده های فوق، حساسیت و ویژگی آزمایش IIF، در مقایسه با جداسازی ویروس در هر پرنده به ترتیب معادل ۸۶٪ و ۸۱٪ میباشد. همچنین میزان ارزش پیشگویی مثبت و منفی آزمایش IIF به ترتیب ۷۶٪ و ۸۹٪ به دست آمد. آنالیز کاپا(Kappa) معادل ۰/۹۲ بدست آمد که نشان دهنده توافق اساسی بین آزمایش های جداسازی ویروس و IIF در هر پرنده می باشد.

آزمایش‌های IIP و جداسازی ویروس در بافت های نای، ریه و کلیه تهیه شده در عفونت تجربی نیز مقایسه شده است. سلولهای آلوده به ویروس آنفلوانزا در زیر میکروسکوپ به رنگ نارنجی متمایل به قهوه ای مشاهده گردید که از دیگر سلولها قابل تفکیک میباشد(تصویر ۲). شدت واکنش پادتن پلیکلونال اختصاصی تیپ A آنفلوانزا با پادگن های ویروسی مشاهده شده در میکروسکوپ نوری در مقاطع بافتی بر اساس گزارش Cruz-coy و همکاران می باشد(۹).

از مجموع ۱۰۸ مقطع بافت های نای، ریه و کلیه منجمد متعلق به ۳۶ قطعه پرنده، ۳۷ مورد ویروس جدا شده بود که در آزمایش IIP، ۲۹ مورد مثبت و ۸ مورد منفی تشخیص داده شد. همچنین از ۷۱ نمونه ای که ویروسی جدا نشده بود، در آزمایش IIP، ۷ مورد مثبت و ۶۴ مورد منفی تشخیص داده شد. از مجموع ۳۶ قطعه پرنده آزمایش شده(جدول ۱)، از ۱۵ قطعه ویروس آنفلوانزا جدا که در آزمایش IIP، ۱۴ مورد مثبت و ۱ مورد منفی تشخیص داده شد. همچنین از ۲۱ قطعه ای که ویروسی جدا نشده بود، در آزمایش IIP، ۴ مورد مثبت و ۱۷ مورد منفی تشخیص داده شد.

با توجه به داده های جدول ۳، حساسیت و ویژگی آزمایش IIP در مقایسه با جداسازی ویروس در هر پرنده، به ترتیب معادل ۹۳ و ۸۱٪ می باشد. همچنین میزان ارزش پیشگویی مثبت و منفی آزمایش IIP به ترتیب ۷۷ و ۹۴٪ به دست آمد. بین جداسازی ویروس و آزمایش IIP در هر پرنده، آنالیز کاپا(Kappa) معادل ۰/۹۵ بوده که نشان‌دهنده توافق اساسی بین این آزمایش ها می باشد.

بحث

تشخیص زود هنگام بیماری در مرغداری ها از جمله مواردی است که در راستای برنامه های کنترلی بیماری آنفلوانزای طیور مفید بوده و می‌تواند از شیوع بیماری جلوگیری نماید. لذا روش های تشخیص سریع ویروس‌های آنفلوانزا در سراسر دنیا در حال تغییر و پیشرفت می باشد. تکنیک‌های ایمونوهیستوشیمیایی جزء تکنیک‌های تشخیصی سریع بوده که گسترش زیاد پیدا کرده و هم اکنون در تشخیص سریع پادگن های بیماریهای ویروسی طیور از جمله آنفلوانزا به طور وسیعی استفاده می گردد. استفاده از این تکنیک ها در مطالعات گذشته نگر، یکی دیگر از مزایای آن بوده که برای بررسی بیماریهای یک منطقه با استفاده از مقاطع منجمد بافتی و یا نمونه‌های نگهداری شده در پارافین امکان‌پذیر می‌باشد (۱۵).

در این بررسی برای تشخیص ویروس های آنفلوانزای طیور، آزمایش‌های ایمونوهیستوشیمیایی مانند IIF و IIP در مقاطع بافتی منجمد به منظور ارزیابی توانائی این تکنیک ها در مقایسه با جدا سازی و همچنین جهت بررسی امکان استفاده از این تکنیک‌ها در پایش‌های ایمونوهیستوشیمیایی مورد استفاده قرار گرفت. در آزمایش‌های ایمونوهیستوشیمیایی، بافت‌های مورد آزمایش بایستی در یک ماده ثبوتی مناسب نگهداری شوند تا در نتایج آزمایش‌ها ایجاد اشکال نکند. Smyth و همکاران گزارش نمودند که بهترین نتیجه را از ماده ثبوتی گرفتند که فاقد فرمالین بوده و یا بافر فرمالینه‌ای که حداکثر برای ۶ ساعت از آن استفاده شده است. همچنین این محققین اشاره می کنند در محلول‌هائی که حاوی اسید فرمیک هستند، حذف کلسیم باعث افزایش واکنش بین پادتنها و پادگن‌ها می‌گردد (۲۲). تامپون نگهدارنده OCT یک ترکیب ثبوتی بافت بوده که قادر است پادگن های سطحی موجود در سطح سلولها را حفظ نماید. بر همین اساس محققین مختلفی از این ترکیب در آزمایش‌های ایمونوهیستوشیمیایی استفاده کرده‌اند. به همین جهت در این بررسی از OCT به عنوان ماده ثبوت بافتی استفاده گردید (۵، ۶، ۱۴، ۲۱).

برای تشخیص سریع آنفلوانزا محققین مختلفی از آزمایش IF استفاده کرده‌اند. محققین ایرلندی آزمایش IF را برای تشخیص پادگن های ویروسی های آنفلوانزا به کار بردند. آنها طی مطالعه ای، این روش را بر روی نمونه های بافتی انجام دادند و آن را ساده ، سریع، ارزان و حساس برای تشخیص ویروس های آنفلوانزای طیور معرفی نمودند. آزمایش IF را می توان در گسترش بافتی با سلولهای مایع آلانتوئیک جنینهای آلوده، جهت تشخیص مستقیم ویروس به کار برد. این آزمایش در مقایسه با جداسازی حساسیت خوبی داشته و به علاوه تشخیص ویروس را در کمتر از سه ساعت میسر می سازد (۱۰، ۱۲، ۱۳). آزمایش IF مستقیم بر روی نمونه های بافتی حاصله از طیور گوشتی آلوده به سویه های غیر حاد و حاد ویروس های آنفلوانزا استفاده و مقایسه شده است. در مواردی که جداسازی ویروس به علت حضور پادتنها و یا شروع اتولیز با شکست مواجه می گردید، تشخیص پادگن از طریق آزمایش IF میسر بود (۷،۱). آزمایش IF برای تشخیص سریع ویروس آنفلوانزا به خصوص برای سویه های بسیار حاد استفاده زیادی شده است، این روش هم به صورت مستقیم و هم به صورت غیر مستقیم در بافتهای منجمد شده یا فرمالینه انجام می شود. تشخیص پادگن در کلیه به وسیله آزمایش IF وقتی تیتر ویروس 10^5 بر مبنای ELD ۵۰ و یا بالاتر در هرگرم بافت باشد قابل تشخیص است. البته این میزان ویروس در مراحل ابتدایی عفونت در نای و ریه وجود دارد. با توجه به حساسیت بالاتر روش غیر مستقیم در مقایسه با روش مستقیم در این مطالعه از روش غیر مستقیم استفاده گردید(۴، ۱۰). در آزمایش IF با استفاده از نمونه های کنترل مناسب می توان به نتایج مثبت اطمینان بالایی داشت اما نتایج منفی باید با احتیاط ارزیابی شود (۲۴).

استفاده از پادتنهای مونوکلونال ضد نوکلئوپروتئین ویروس آنفلوانزا ممکن است هم حساسیت و ویژگی آزمایش ایمونوفلورسانس را در مشاهده پادگن های ویروس های آنفلوانزا در مقاطع بافتی منجمد افزایش دهد. در تعدادی از بافت ها علیرغم حضور پادگن ویروسی در آزمایش IF از نظر جداسازی ویروس منفی بودند که این مسئله ممکن است ناشی از اتوفلوروسانس بافتی و یا افزایش عیار پادتن پرنده باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

جـدول۲ : آنالیز آماری آزمایش ایموفلورسـانس غیر مسـتقیم (IIF) در مقایسه با جدا سازی ویروس (VI) درپرنده ها(بر اساس داده های جدول ۱ محاسبه شده است)

		IIF		جمع کل
		+	-	
VI	+	۱۳	۲	۱۵
	-	۴	۱۷	۲۱
جمع کل		۱۷	۱۹	۳۶

Hopper و همکاران گزارش کردند که تشـخیص سریع و گذشته نگر بیماری آنفلوآنزای طیور بر روی بافتهای تثبیت شـده، با اسـتفاده از روش ایمونوپراکسیداز برروی بافتهای پانکراس، مغز و کلیه امکان پذیر است(۱۶). آنها گزارش کردند در عفونتهای ناشی از ویروسهای با حدت بالا [۴](HPAI)، بهترین بافت انتخابی، پانکراس می باشد، در حالی که در مواردی که حدت ویـروس کمتر بوده [۵](nHPAI)بهترین بافت، کلیه می باشـد (۱۶). Mo و همکاران با اسـتفاده از روش هـای IP، ضایعات حاصل از تزریق ویروس هـای HPAI و ویروس های آنفلوانـزا با بیماری زایی ملایم [۶](MPAI) را مورد مقایسـه قرار دادند. به طوری که با اسـتفاده از این آزمایش در جوجه هائـی که با ویروس های HPAI آلوده شـده بودند، وجود ویروس ها را در بافـت های قلب، ریه، مغز، کلیه و پانکراس به دفعات مشـاهده کردند. ولی در جوجه هائی که با ویروسـهای MPAI تلقیح شـده بودند فقط ویروس را در نـای و ریه تشـخیص دادند (۱۸). Mo وجود ویـروس H_5N_2 را با روشIP مورد ارزیابی قرار داده و گزارش نمودند که این روش در تشخیص بیماری آنفلوانزا بسـیار مناسـب می باشـد (۱۷). Shalaby و همکاران در ارزیابی تحت تیپ H_5N_2 ویروس آنفلوانزا از این روش در تشخیص ویروس هـا در بافتها اسـتفاده کردند (۲۱). Cruz-coy و همکاران در مشـاهدات میکروسکوپی در آزمایش ایمونوپراکسیداز نحوه گزارش و درجه بندی نتایج را تقسیم بندی کرده است (۹).

مشـاهده پادگنهای ویروسـی آنفلوانزا در بافت کلیه علـی رغم اینکه سـویه ویروس آنفلوانزای شناخته شـده در ایران جزء ویروس های آنفلوانزا با حدت کم [۷](LPAI) بوده، بسـیار جالب توجه اسـت و ممکن است علت تلفات ناشـی از ویروس های آنفلوانزای طیور ایران به علت بقاء ویروس در بافت کلیه باشـد به همین جهت توصیه می شـود تحقیقات تکمیلی جهت اثبات این قضیـه انجام گردد. Hooper و همـکاران (۱۹۹۵) معتقدند که آزمایش IP یک روش تشخیصی مطمئن برای شناسایی سویه های ویروس آنفلوانـزا با حدت کم می باشـد (۱۶). همچنیـن Selmons وSwayne گزارش کردند که جراحات بافت کلیه در جوجه های تلقیح شده با ویروس های آنفلوانزا با حدت کم، بسـیار شدید می باشـد (۲۶). محققین دیگری مدعی هسـتند که بین دفعات جداسـازی ویروس از بافت کلیه و سـوآب کلواکـی و همچنیـن تیتر ویروس در بافت کلیه در مقایسـه با دیگر بافتها اختلاف معنا داری وجود دارد (۲۳، ۲۵). اسـتفاده از پادتنهای مونوکلونال ضـد نوکلئوپروتئین ویـروس آنفلوانزا ممکن اسـت هم حساسـیت و هم ویژگی آزمایش ایمونوپراکسـیداز را در مشـاهده پادگن های ویروس های آنفلوانزا در مقاطع بافتی منجمد افزایش دهد. لذا اسـتفاده از آزمایش های تشـخیصی ایمونوهیستوشیمیایی از جمله آزمایش های ایمونوفلورسانس و ایمونوپراکسیداز به همراه آزمایش های ویرولوژیکی، سرولوژیکی و مولکولی در مراحل اولیه بررسـی شیوع بیماری در یک منطقه توصیه می شود.علاوه بر آن اسـتفاده از تکنیک هـای ایمونو هیستوشـیمیایی در آزمایش های غربالگری یا پایش های ایمونوهیستوشیمیایی به منظور ردیابی پادگن های آنفلوانزا در بافت ها به ویژه بافت کلیه توصیه می شـود. همچنین اسـتفاده از تکنیک های تشـخیصی ایمونوهیستوشیمیایی برای آزمایشگاه هایی که امکانات انجام جداسازی ویروس را ندارند و بر عکس مجهز به تکنیک های هیستو پاتولوژی هستند، توصیه می گردد.

تشکر و قدردانی

از مسـئولین و کارکنان محترم موسسه تحقیقات واکسن وسرم سازی رازی بویژه بخش تشـخیص بیماریهای طیور و آسـیب شناسی و دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران که در انجام این تحقیق ما را یاری نمودند تشکر و قدردانی می شـود. این تحقیق با همکاری و مساعدت مالی معاونت آموزش و تحقیقات جهاد کشاورزی انجام گردیده است.

پاورقی

1- Optimum Cutting Temperature
2- Indirect Immunoflurescence
3- Indirect Immunoperoxidase
4- Highly Pathogenic Avian Influenza
5- non Highly Pathogenic Avian Influenza
6- Middly Pathogenic Avian Influenza
7- Low Pathogenic Avian Influenza

منابع مورد استفاده

۱ - رفیعی- س. ع. ۱۳۷۸. آنفلوانزای طیور، انتشارات نوربخش، صفحات ۵۸-۲۰

جـدول ۳ : آنالیـز آماری آزمایـش ایمونوپراکسـیداز غیر مسـتقیم (IIP) در مقایسـه با جدا سـازی ویروس (VI) در پرنده ها(بر اساس داده های جدول ۱ محاسبه شده است)

		IIP		جمع کل
		+	-	
VI	+	۱۴	۱	۱۵
	-	۴	۱۷	۲۱
جمع کل		۱۸	۱۸	۳۶

Archive of SID
www.SID.ir

۲ -زمانی مقدم- ع. ۱۳۷۹،بررسی تجربی ایمنی‌زایی چند واکسن کشته آنفلوانزای تحت تیپ H_9N_2 در جوجه های گوشتی، پایان نامه دکترای تخصصی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران (شماره ثبت ۱۱۶).

۳ - وصفی مرندی. م. و بزرگمهری فرد. م. ح. ۱۳۷۸،عفونت های ناشی از ویروس‌های آنفلوانزا یا اورتومیکسوویروس ها در طیور، دامها و انسان، مجله چکاوک شماره ۳۷

4-Allan, G. M. and Mcnulty, M. S. 1985 ,A direct immunofluorescence test for the rapid detection of avian influenza virus antigen in tissue impression smear", Avian Pathol. 14:449-460

5-Arenas, A.; Carranza, J.; Perea, A.; Miranda, A.; Maldonado, A. and Hermoso, M. 1990 , Type A influenza viruses in birds in southern spain: serological survey by enzyme linked immunosorbent assay and haemagglutination inhibition tests, Avian Pathol. 19:539-546

6-Brandtzaey, P.; Halstensen, T. S.; Huitfeldt, H. S. and Valnes, K. N.1997,Immunofluorescence and immunoenzyme histochemistry in Immunochemistry a practical approch by Johnstone, A. P. and Turner, M. W.; Oxford University Press, Inc, NY, Vol:2, PP:71-130 & 146-175

7-Capua, I.; Mutinelli, F.; Bozza, M. A.; Terregino, C. and Cattoli, G. 2000, Highly pathogenic avian influenza (H_7N_1) in ostriches, Avian Pathol. 29:643-646

8-Chauhan, R. S. 1995, Text book of veterinary clinical and laboratory diagnosis"; first edition, Jaypee Brothers Medical Publishers, Ltd; PP:205-250

9-Cruz-Coy, J. S.; Giambrone, J. J. and Hoerr, F. J. 1993,Immunohistochemical detection of infectious bursal disease virus in formalin –fixed ,paraffin-embedded chicken tissues using monoclonal antibody, Avian Dis. 37:577-581

10-Davison, S.; Ziegler, A. F. and Eckroade, R. J.1998, Comparison of an antigen-cuptuer enzyme immunoassay with virus isolation for avian influenza from field samples; Avian Dis. 42:791-795

11-Dhinakar Raj, G.; Jayakumar, V.; Thangavelu, A.; Koteeswaran, A. and Venugopalan, A. T. 1998, Immunorheophoresis for the diagnosis of infectious bursal disease Avian Dis. 42:388-392

12-Esterday, B. C.; Hinshaw, V. S. and Halvorson, A. 1997, Infuenza in Diseases of poultry by Calnek, B. W.; Barnes, J.; Reid, W. M. and Yoder, H. W.;10th edition, Iowa state university ames; PP:563-603

13-Fenner F.; Bachmman, P. A.; Gibbs, E. P. J.; Murphy, F. A.; Studdert, M. J. and White, D. O. 1992, Veterinary Virology, American Press, Inc, UK, Academic Press, PP: 473-484

14-Fitzgerald, S. D. and Richard, A.1995,Comparison of four fixatives for routine splenic histology and immunohistochemical staining for group II avian adenovirus, Avain Dis.39:425-431

15-Fitzgerald, S. D.; Reed, W. M. and Burnstein, T. 1992, Detection of type II avian adenoviral antigen intissue sections using immunohistochemical staining; Avian Dis. 36:341-347

16-Hooper, P. T.; Russell, P. W.; Selleck, P. W. and Stanislawek W. l. 1995,Observation on the relationship in chickens between the virulence of some avian influenza viruses and their pathogenicity for various organs, Avian Dis. 39:458-464

17-Mo, I. P. 1988, Immunohistocheical localization of avian influenza viral antigen (H_5N_2) in chickens, JAVMA 192 (12) 1788

18-Mo, I. P.; Brugh, M.; Fletcher, O. J.; Rowland, G. N. and Swayne, D. E. 1997, Comparative pathology of chickens experimentally inoculated with avian influenza viruses of low and high pathogenicity"; Avain Dis. 41:125-136

19-Naqi, S. A. 1990,A monoclonal antibody-based immunperoxiase procedure for rapid detection of infectious bronchitis virus ininfected tissues, Avian Dis. 34:893-898

20-Ormerod, M. G. and Imrie, S. F. 1999,Immunohistochemistry in Light microscopy in biology, a practical approch by Lacey , A. J.; second edition , Oxford University Press, PP:185-220

21-Shalaby, A. A.; Slemons, R. D. and Swayne, D. E.1994, Pathological studies of A/chicken/alabama/7395/75(H_4N_8) influenza virus in specific pathogen free laying hens, Avian Dis. 38: 22-32

22-Smyth, J. A.; Moffett, D. A.; McNulty, M. S.; Todd, D. and Mackie, D. P.1993,A sequential histopatholgic and immunocytochemical study of chickenanemia virus infection at one day of age, Avian Dis. 37:324-338

23-Swayne, D. E and Selmons, R. D. 1990, Renal pathology in specific-pathogen-free chickens inoculated with a waterfowl-origin type A influenza virus, Avian Dis. 34:285-294

24-Swayne, D. E.; Glisson, J. R.; Jackwood, M. W.; Pearson, J. E. and Reed, W. M. 1998, A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens; Forth edition, American Association of Avian Pathologists, Inc, Kennett square, Pennsylvania; PP:150-155 & 233-277

25-Swayne, D. E and Selmons, R. D. 1995, Comparative pathology of intravenously inoculated wild duck and turkey-origin tpye A influenza viruses in chickens, Avian Dis.39:74-84

26-Swayne, D. E. and Selmons, R. D. 1992, Evalution of the kidney as a potential site of avian influenza virus persistence in chickens, Avain Dis. 36:937-944

Archive of SID

www.SID.ir