Archive of SID

طراحی روش ایمونوفلئورسنت اختصاصی جهت تفکیک سویه‌های حاد از واکسن ویروس نیوکاسل

دکتر فرهید همت زاده[1]* دکتر غلامرضا نیکبخت بروجنی[1] دکتر سید فرشاد کاتب[2] دکتر فرشته مختاری[2] دکتر آرزو علی نژاد[2] محمد مهدی غفاری[1]

دریافت مقاله: ۲ تیرماه ۱۳۸۳
پذیرش نهایی: ۹ آذرماه ۱۳۸۳

هدف: تهیه پادتن اختصاصی کنژوگه با فلئورسئین ایزوتیوسیانات جهت تفکیک سویه‌های حاد ویروس نیوکاسل ازسویه‌های واکسن زنده.

طرح: مطالعه تجربی.

حیوانات: ۲۸ راس خرگوش.

روش: پس از تکثیر ۴ سویه حاد و دوسویه واکسینال **B1** و لاسوتا در تخم مرغ جنین دار اقدام به خالص سازی نمونه‌ها به روش اولتراسانتریفیوژ گردید. ویروس‌های خالص‌شده جهت تهیه آنتی‌سرم فوق ایمن، به تفکیک به ۷ گروه ۴ تایی خرگوش تزریق شده و در نهایت حضور پادتن‌های هر گروه توسط روش ژل دیفوزیون مشخص گردیدند. سپس پادتن‌های ضدگروه **B1** و لاسوتا و مخلوط این دو توسط سویه‌های حاد و پادتن‌های سویه‌های حاد یکبار با سویه **B1** یکبار با سویه لاسوتا و یکبار با مخلوط **B1** و لاسوتا جذب‌شده و مجدداً به روش **AGID** مورد آزمایش قرار گرفتند. جذب و خالص‌سازی تا جایی ادامه یافت تا تنها یک خط رسوبی در هر گروه و فقط بر علیه سویه مربوطه حاصل آید. پادتن‌های حاصله با فلئورسین ایزوتیوسیانات کنژوگه شده و روی ۲۸ نمونه ویروس نیوکاسل مختلف ۲ نمونه سوش زنده واکسن و ۱۴ نمونه منفی آزمایش شده و رقت مناسب آنتی‌سرم کنژوگه مشخص گردید.

نتایج: پادتن‌های اختصاصی ضدسوش‌های حاد جذب‌شده با مخلوط سوش‌های **B1** و لاسوتا به عنوان پادتن اختصاصی ضد سوش حاد و پادتن‌های ضد **B1** و ضد لاسوتای جذب‌شده با سوشهای حاد به عنوان پادتن اختصاصی ضدسویه‌های واکسن به دست آمد. پادتن ضد سویه‌های حاد در صد در صد موارد با سویه‌های حاد واکنش نشان داده و در هیچ مورد با سویه‌های واکسن تکثیرشده در مایع الانتوئیک جنین تخم مرغ واکنش نشان نداد.

نتیجه‌گیری: پادن‌های حاصله بخوبی قدرت تفکیک سویه‌های حاد از واکسن زنده را داشته و در مدت زمان بسیار کمتری از روش‌های معمول قدرت‌شناسایی سویه‌های حاد **بیماریزا را دارند.** مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ۱۳۸۴، دوره ۶۰، شماره ۴، ۳۹۹-۳۹۳.

واژه‌های کلیدی: ویروس بیماری نیوکاسل، پادتن اختصاصی، ایمونوفلئورسنت، ژل دیفوزیون، واکسن B1، واکسن لاسوتا.

بیماری نیوکاسل یکی از مهمترین بیماریهای طیور با انتشار جهانی بوده که از زمان ایجاد سیستم‌های با تراکم بالا بر اهمیت آن افزوده شده است. ویروس حاد به طور وسیعی در آسیا از جمله ایران انتشار دارد و باعث تلفات زیاد و همه گیری هایی شده است (۸).

ویروس بیماری نیوکاسل (NDV) متعلق به خانواده پارامیکسوویریده، جنس آوولاویروس می‌باشد. به طور کلی پارامیکسوویروس‌ها دارای یک ویریون پوشینه دار کروی خشن و بزرگ، به قطر ۳۰۰ - ۱۵۰ نانومتر به همراه یک

۱) گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
۲) دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران.
*) نویسنده مسؤول: f hemmat@ut.ac.ir

Designing of a Specific Immunofluorescence Method for Differentiation of Velogenic and Vaccinal Strains of Newcastle Disease Virus

Hemmatzadeh, F.[1], Nikbakht-Brojeni, G. R.[1], Kateb, S.F.[2], Mokhtari,F.[2],Alinejad, A.[2] ,Ghafari,M.M.[1]

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

Objectives: To Prepare of a specific FITC conjugate antibody for differentiation of velogenic and vaccinal strains of Newcastle disease virus.

Design: Experimental study.

Animals: 27 rabbits.

Methods: 4 velogenic strains of Newcastle disease virus were obtained from collection of viruses in Virology Laboratory of Faculty of Veterinary Medicine and two vaccinal strains (B1 and Lasota) were propagated in embryonated eggs and purified by ultra centrifugation. Purified viruses used for immunization of 7 groups of rabbits, each consisting of 4 animals. Each group was immunized by one of the virulent or vaccinal strains and one group by mix of vaccinal strains. The immunization process took about 4 months. Sera samples fro immunized animals after absorption by each of the vaccine and velogenic strains were put in proximity to one another in Agar gel Immunodiffusion test. Specific antibodies conjugated with FITC. 28 velogenic isolates, 2 vaccinal strains and 14 negative samples were tested by using the conjugated specific antibody.

Results: Eventually only one precipitate line was observed. That was indicative of the fact that specific antibody against velogenic and vaccine strains was obtained. The produced specific antibody can detect unique viral antigen and respond against it.

Conclusion: This specific FITC conjugated antibody can differentiate velogenic and vaccinal strains of NDV in shorter time than classic methods. ***J.Fac.Vet.Med. Univ. Tehran. 60,4:393-399,2005.***

Keywords: Newcastle disease virus, specific antibody, immunofluorescence, immunodiffusion, B1 vaccine, Lasota vaccine.

Corresponding author's email: fhemmat@ut.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

نوکلئوکپسید مارپیچی هستند. ژنوم آنها از یک مولکول خطی ssRNA با سنس منفی به‌اندازه ۲۰Kb - ۱۸ تشکیل شده است. پوشینه ویروس، حاوی دو نوع گلیکوپروتئین به اسامی هماگلوتینین - نورآمینیداز و پروتئین امتزاجی (فیوژن) است. پروتئین هماگلوتینین (H) در جذب و جمع کردن گلبول‌های قرمز و القای ایمنی دخالت کرده و پروتئین نورآمینیداز در آزاد شدن ویریون‌ها از سلولهای عفونی در جریان فرآیند جوانه زدن و انهدام مهار کننده‌های موسین دخالت می‌کنند (۱۵، ۱۴، ۴، ۲، ۱).

اساس حدت در ویروس‌های نیوکاسل در تفاوت هایی است که در ردیف آمینواسیدی محل شکافتن پروتئین F و در مواردی پروتئین HN وجود دارد. از آنجایی که چنین اختلافاتی مرتبط با شکافته شدن پروتئین اصلی بعد از روند ترجمه و در آغاز روند دخول ویروس به سلول اتفاق می‌افتد، در ویروس‌های خالص شده قابل مشاهده نبوده و تنها در شرایطی که ویروس در مجاور ترکیباتی شبیه به تریپسین قرار گیرد، پروتئین‌های اصلی مثل پروتئین F0 به تحت واحدهای فعال مانند F1 و F2 تبدیل می‌شود. این تبدیل شرط اصلی بیماریزایی و حدت ویروس در طیور ذکر شده است (۱۹، ۱۷، ۱۳، ۱۰، ۴).

ویروس بیماری نیوکاسل فقط یک سروتیپ دارد و به کمک پادتن‌های مونوکلنال دریافته‌اند که تغییرات آنتی ژنی بسیار محدود است ولی حدت سویه‌های ویروس، فوق العاده متفاوت می‌باشد. در پارامیکسو ویروس‌ها، پپلومرها از نظر پادگنی طی شرایط جغرافیایی مختلف و مرور زمان تا حد زیادی ثابت می‌مانند. پروتئین HN در اتصال به سلول دخالت کرده و پادتن‌های خنثی کننده ضد این پادگن، جذب ویروس به گیرنده‌های سلولی را مهار می‌کنند (۱۸، ۱۶).

از آنجایی که علایم بالینی بیماری نیوکاسل اختصاصی نیستند، تشخیص قطعی بیماری، مستلزم جداسازی ویروس نیوکاسل و انجام آزمایشهای سرولوژی است . ویروس بیماری نیوکاسل را می توان با تزریق نمونه ای از طحال، مغز یا ریه به داخل حفره ی آلانتوئیک تخم مرغ جنین دار ۹-۱۰ روزه جدا کرد و با آزمون‌های سرولوژیکی مانند آزمایشات هماگلوتیناسیون و ممانعت از هماگلوتیناسیون توسط آنتی سرم‌های اختصاصی شناسایی نمود و از ویروسهای دیگر تفریق کرد (۹، ۵) .

جهت برنامه‌ریزی به منظور مبارزه با بیماری می‌بایستی حدت ویروس‌های جدا شده از مرغداریها تعیین گردد، در این زمینه علاوه بر محاسبه ضریب بیماریزایی ویروس و مدت زمان مرگ جنین مرغ، می توان از روش تشکیل پلاک در حضور یا عدم حضور تریپسین در کشت سلول فیبروبلاست مرغ نیز استفاده کرد. در کشورهایی که بیماری نیوکاسل مزمن آندمیک است، آزمون ممانعت از هماگلوتیناسیون برای تشخیص و مراقبت از بیماری به کار میرود . از آزمون‌های رسوبی نیز می توان در تشخیص پادگنی ویروس استفاده نمود در مورد پادتن‌های دخیل در آزمون‌های رسوبی در درجه ی اول، IgY بعد IgM و بعد IgA واجد توانایی رسوب را دارند. هیچ یک از آزمون‌های سرولوژیک متداول قدرت تفکیک سویه‌های حاد (ولوژنیک) از سویه‌های واکسینال را نداشته و از آنجایی که در حال حاضر، هم سویه‌های بیماریزا و هم سویه‌های واکسن (بواسطه تجویز مکرر) در جمعیت طیور مملکت حضور دارند، لذا تفریق این سویه‌ها به روشهای دقیق و سریع از مهمترین اهداف دست اندرکاران صنعت طیور میباشد. این تحقیق تلاشی است در جهت دستیابی به پادتن اختصاصی که توان تفکیک سویه‌های حاد از واکسن را داشته باشد (۲۱، ۱۸، ۱۶، ۱۱).

مواد وروش کار

جداسازی ویروس حاد: نمونه‌های ویروسی مورد استفاده از بین جدایه‌های ویروس نیوکاسل که طی یک دوره ۵ ساله از نمونه‌های مربوط به سراسر ایران به بخش ویروس شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران ارجاع داده شده بودند انتخاب شدند.

پس از کشت ویروس در حفره الانتوئیک جنین مرغ ۷ تا ۹ روزه و بلافاصله پس از تلف شدن جنین اقدام به استخراج مایع الانتوئیک گردید. سپس آزمون هماگلوتیناسیون بر روی کلیه نمونه‌های بدست آمده، انجام شده و حضور ویروس نیوکاسل توسط آزمون ممانعت از هماگلوتیناسیون به تایید رسید. ۴ نمونه از ویروس‌های واجد عیار بالا (۱/۱۰۲۴ و بالاتر) و حدت زیاد که متوسط زمان مرگ کمتری نسبت به بقیه داشتند برای ادامه کار و ایمن سازی انتخاب شدند. علاوه بر این دو نمونه سویه‌های واکسینال B1 و لاسوتا نیز پس از تکثیر در حفره الانتوئیک جنین مرغ استخراج و به همراه سایر نمونه‌ها نگهداری گردیدند. (۱۳، ۷، ۶)

خالص سازی و پروتئین سنجی نمونه‌های ویروسی: برای خالص سازی نمونه‌های ویروسی ابتدا نمونه‌ها را در ۱۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و سپس، مایع رویی به مدت ۹۰ دقیقه در ۵۰۰۰۰g و 4^0C سانتریفوژ شده و رسوب حاصله پس از حل در ۱ml، PBS مجددا روی بالشتک سوکرز ۳۰ درصد قرارداده شد و مطابق روش قبل سانتریفیوژ گردید، رسوب حاصله پس از حل مجدد در PBS و سنجش میزان پروتئین به عنوان منبع آنتی ژنی به کار گرفته شد. به منظور به حداقل رساندن آسیب به نمونه‌های ویروسی، این نمونه‌ها را در لوله‌های اپندورف تقسیم بندی و در سرمای -80^0C نگهداری شد. (۱۱)

ایمن سازی خرگوش‌ها: جهت تهیه پادتن‌های فوق ایمن علیه سویه‌های حاد و واکسینال ویروس نیوکاسل، ۲۸ راس خرگوش جوان و سالم انتخاب و در ۷ گروه ۴تایی تقسیم گردیدند، هر گروه در یک قفس مجزا و با فاصله مناسب از هم قرار گرفته و طبق برنامه ای منظم مورد تلقیح قرار گرفتند. گروههای مورد نظر به شرح زیر جهت ایمن سازی در نظر گرفته شدند:

گروه اول سویه واکسینال B1، گروه دوم سویه واکسینال لاسوتا، گروه سوم مخلوط B1 و لاسوتا، و گروههای چهارم تا هفتم توسط سویه‌های حاد.

تزریقات به صورت زیر جلدی و داخل عضلانی انجام گرفت تزریقات زیر جلدی دو بار به فاصله ۱۵ روز به میزان ۱ میلی لیتر از نمونه ویروسی خالص شده به همراه ادجوانت ناقص فروند در ۱۰ نقطه از پوست ناحیه کمر صورت گرفته و

www.SID.ir

Archive of SID

در ادامه با چهار تزریق عضلانی در عضله ران ادامه یافت. ۱۵ روز بعد از آخرین تزریق عضلانی، برای جداسازی آنتی سرم ابتدا از ورید مارژینال و نهایتاً از قلب خون گیری به عمل آمد.

پس از خونگیری و انعقاد آنها اقدام به جداسازی سرم‌ها با استفاده از سانتریفیوژ با دور پایین شد و سپس جهت غیر فعال سازی به مدت نیم ساعت در بن ماری در $65^{0}C$ قرار گرفتند. نمونه‌های سرمی به دست آمده از مراحل مختلف ایمن سازی جهت تعیین عیار پادتنی مورد آزمایش HI و سپس مورد جذب و آزمون ژل دیفوزیون قرار گرفتند. (۱۱)

آزمون آگارژل دیفوزیون: پس از ایمن سازی خرگوشها با سوش‌های واکسن و حاد و تهیه ی ایمونوگلوبولین‌های ضد سوش‌های مذکور و انجام آزمون HI (در اکثر موارد تیتر آنتی بادی حاصله بالای ۱۰۲۴ بود)، اقدام به انجام آزمون آگارژل دیفوزیون در ژل ۱/۵ درصد، شد. برای انجام چنین آزمایشی با استفاده از ابزار مخصوص، تعداد هفت گوده در پلیت حاوی ژل ایجاد شد. سپس در گوده مرکزی، سرم ضد B1، بدست آمده از گروه خرگوش‌های ایمن شده با سوش B1 را، ریخته و در گوده‌های اطراف به ترتیب، سوش حاد، سوش لاسوتا، سوش B1، مخلوط B1 و لاسوتا، آنتی ژن آنفلوانزا، کنترل منفی سرم فیزیولوژی قرار داده شدند.

در این روش در هیچکدام از موارد، خط رسوبی مستقلی، به عنوان خط رسوبی اختصاصی، قابل تشخیص نبود. پس از این مرحله جهت به دست آوردن خط رسوبی منفرد، جذب آنتی سرم‌های حاصله با سویه‌های مورد آزمایش، انجام گرفت.

جذب سرم‌ها توسط ویروس و واکسن: در این مرحله جذب سرم‌ها توسط سویه‌های مختلف ویروس و واکسن انجام گرفته شد و این مرحله از کار بدین دلیل انجام گرفت که پادتن اختصاصی هر گروه مشخص شده و به منظور تفکیک سویه‌های مختلف به کار گرفته شود. برای انجام این مرحله در ابتدا ۶ میلیلیتر از سرم خرگوش هایی را که با سویه B1 مورد تزریق قرار گرفته بودند (سرم حاوی پادتن ضد B1) با مخلوط ویروس‌های حاد به صورت هم حجم و مساوی (هر کدام به میزان ۱/۵ میلی لیتر) مخلوط کرده و بعد به مدت یک ساعت در انکوباتور $73^{0}C$ قرار گرفت. البته هر ۱۰ دقیقه یک بار، ظرف حاوی سرم و ویروس را به آرامی تکان داده و بعد از اتمام مدت زمان گرمخانه گذاری، آن را به مدت نیم ساعت بدون حرکت باقی گذاشته و بعد از این محتوی لوله‌ها با دور ۵۰۰۰ در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. بعد از اتمام سانتریفیوژ، مایع رویی که انتظار می‌رفت فقط حاوی آنتی سرم ضد B1 باشد را برداشت کرده و جهت استحصال پادتن‌های باقی مانده با استفاده از با سولفات آمونیوم رسوب داده شد. پادتن ضد لاسوتا با سویه‌های حاد، پادتن مخلوط B1 و لاسوتا با سویه‌های حاد، پادتن ضد سویه‌های حاد یکبار با سوش B1 و یکبار با مخلوط B1 لاسوتا و یکبار با سوش لاسوتا به شرح ذکر شده در بالا جذب شده و پادتن خالص جهت انجام آزمونهای بعدی در فریزر ۲۰- نگهداری گردید.

در پایان پادتن‌های به دست آمده عبارت از ایمونوگلبولین ضد سویه‌های حاد، ایمونوگلبولین ضد سویه B1 و ایمونوگلبولین ضد سویه لاسوتا بودند که ایمونوگلبولین‌های حاصله جهت آزمایش ژل دیفوزیون به روش اکترلونی و مشاهده خط رسوبی منفرد مورد استفاده قرار گرفتند.

در این مرحله در گوده وسط پلیت با استفاده از سمپلر، سرم ضد حاد جذب شده با مخلوط B1 و لاسوتا تا حد پر شدن گوده قرار داده شد و در بقیه گوده‌های اطراف گوده مرکزی به ترتیب ذکر شده در بالا قرار داده شدند.

برای حصول غلظت‌های مطلوب آنتی ژن و مشاهده خط رسوبی بهتر، دو بار، به فاصله نیم ساعت، به پر کردن گوده‌های موجود اقدام شده و بعد از حدود ۶-۴ روز، به بررسی و مشاهده خط رسوبی پرداخته شد. در گوده مرکزی سایر پلیت ها، سرم‌های جذب شده ضد سویه های حاد، B1، لاسوتا، مخلوط واکسن و مخلوط سوشهای حاد و د گوده‌های اطافی مشابه روش قید شده در بالا عمل گردید.

لازم به ذکر است در طی مراحل کار، اگر بعد از جذب و رسوب دادن، آنتی سرم باقی مانده‌ای که با سوش مربوطه جذب شده باشد و باز هم در آزمون ژل دیفوزیون، خط رسوبی نشان داد، مجدداً عمل به جذب روی آنتی سرم به روش قبل انجام می‌گرفت و سپس کلیه مراحل خالص سازی روی آنتی سرم انجام می‌گرفت، یعنی یا میزان آنتی ژن کم بوده و یا میزان آنتی بادی ها زیادتر از حد ترسیب توسط ویروس بوده‌اند.

اگر آنتی سرم بعد از جذب با سوش مربوط به خود، مثلاً آنتی سرم ضد حاد جذب شده با B1 با سوش‌های حاد جواب نمی‌داد، اقدام به تغلیظ پادتن می‌گردید. به این ترتیب که پس از رسوب دادن با سولفات آمونیوم با مقادیر نصف میزان اولیه بافر، اقدام به حل نمودن رسوب می‌شد. در این حالت غلظت آنتی بادی به دو برابر افزایش می‌یافت. در نهایت پادتن‌های ضد سویه‌های حاد جذب شده با مخلوط B1 و لاسوتا به عنوان پادتن اختصاصی ضد سویه‌های حاد جهت تهیه کنژوکه FITC در نظر گرفته شد.

تهیه پادتن کنژوگه: جهت تهیه پادگن کنژوگه در ابتدا اقدام به ترسیب ایمونوگلبولینها با استفاده از سولفات آمونیوم اشباع دارای pH، ۷/۲ در غلظت نهایی ۴۵ درصد و سپس ۴۰ درصد گردید و سپس اقدام به سنجش میزان پروتئین موجود در آنتی سرم حاصله به روش لوری شده و میزان FITC مورد نیاز به نسبت یک به صد بسته به میزان پروتئین آنتی سرم در نظر گرفته شود (۳،۱۱).

پس از محاسبه FITC مورد نیاز، ایمنوگلبولین‌های 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 گردید. پس از اتمام این مرحله محلول حاصل به مدت ۲ ساعت روی همزن مغناطیسی قرار داده می‌شود تا عمل ترکیب FITC با ایمونوگلبولین‌ها به خوبی صورت گیرد. پس از این مرحله برای جدا کردن پادتن‌های نشاندار از سایر عوامل موجود، مجموعه حاصله از ستون کروماتوگرافی حاوی سفادکس ۵۰ G عبور داده شد (۱۱).

فراکسیون حاوی پادتن‌های نشاندار به شکل یک باند پر رنگ تر از سطح ستون به طرف پایین شروع به حرکت می‌کند. بلافاصله پس از رسیدن باند به

www.SID.ir

Archive of SID

انتهای ستون می‌بایستی اقدام به جمع نمودن محلول حاصله در ویال‌های مختلف به حجم تقریبی نیم میلی‌لیتر نمود. از آنجایی که متعاقب وارد نمودن پادتن کنژوگه به ستون بافر بیکربنات نیز به مجموعه افزوده می‌گردد 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 مجددا پروتئین سنجی شده و بهترین غلظت ایمونوگلبولین‌های نشاندار یاد داشت و در نهایت میزان پروتئین مجموعه مشخص گردد(۱۱).

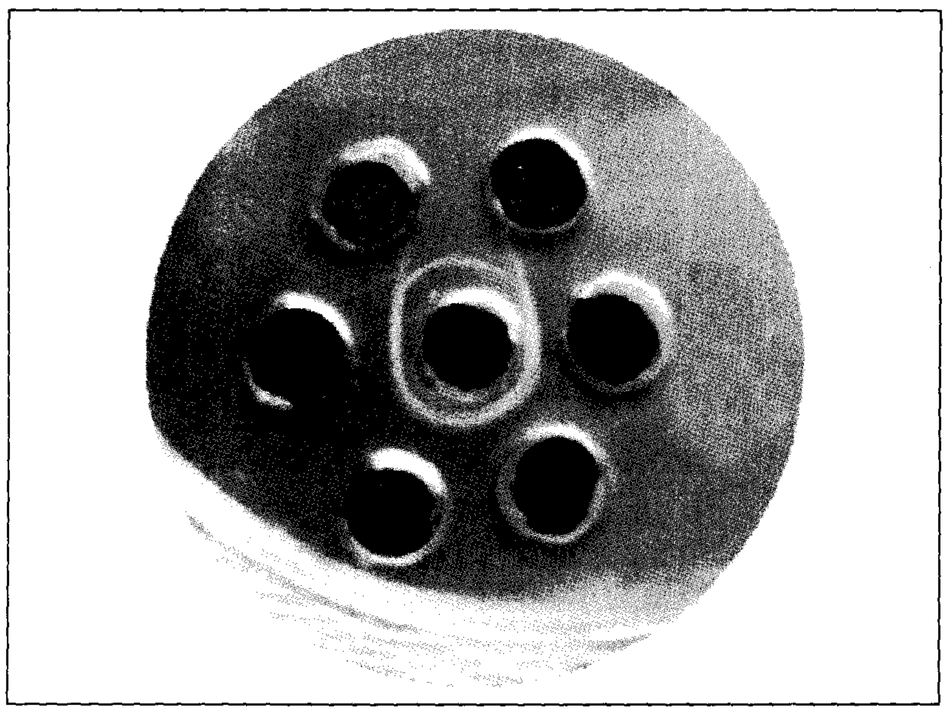
پس از جمع آوری ایمونوگلبولین‌های نشاندار، جهت تخلیص بیشتر آن و خارج نمودن فلوروسین ایزوتیوسیانات‌های آزاد یا املاح باقی مانده از مراحل قبل عمل دیالیز روی نمونه‌ها انجام می‌گیرد. پس از پایان مرحله دیالیز، محلول ایمونوگلبولین‌های نشاندار دیالیز شده، جهت تنظیم میزان پروتئین، پروتئین سنجی می‌گردد. در این مرحله میزان پروتئین نمونه‌های ایمونوگلبولین‌های نشاندار در حد ۲۰mg/dl تنظیم گردد(۱۱).

انجام آزمون روی نمونه‌ها جهت به دست آوردن رقت مناسب: پس از قرار دادن رقت‌های مختلفی از نمونه‌های ویروسی مثبت خالص شده در سطح لام و تثبیت آنها با استفاده از محلول الکل استن سرد و شستشو با محلول PBS حاوی توئین ۲۰ و با استفاده از رقت‌های مختلف آنتی سرم کنژوگه رنگ آمیزی شدند. بدین منظور ۱۵۰ میکرولیتر از آنتی سرم کنژوگه به لام حاوی آنتی ژن مثبت و منفی فیکس شده اضافه شده به مدت یک ساعت در جار مرطوب ۳۷ درجه گرمخانه گزاری گردیدند. سپس با استفاده از PBS توئین بخوبی شستشو داده شده و پس از مونته کردن با تامپون گلیسرین دار با استفاده از میکروسکوپ فلئورسنت مشاهده گردیدند. نهایتاً بهترین پاسخهای به دست آمده رقت در ۱/۲۰ آنتی سرم کنژوگه بود که در این رقت نمونه‌های آلوده به خوبی از نمونه‌های غیرآلوده که مایع الانتوئیک جنین‌های غیرآلوده بودند قابل تشخیص بود(۳).

انجام آزمون روی نمونه‌های مرضی: تعداد ۲۸ نمونه آلوده و ۱۴ نمونه غیرآلوده با اتانل ـ استون به مدت ۵ دقیقه فیکس شدند. پس از شستشو و 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 می‌گرفت. 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 شد.

نتایج

جهت ردیابی پادتن‌های ضد ویروس‌های تلقیح شده به گروه‌های مختلف خرگوش‌ها که در مبحث روش کار بدان اشاره شد، در ابتدا آزمون HI (ممانعت از هماگلوتیناسیون) مورد استفاده قرار گرفت. در اغلب موارد تیتر پادتن بدست آمده، بالای ۱۰۲۴ بود که دال بر پاسخ هومورال بسیار مناسب بر علیه اجرام ویروسی تلقیح شده می‌باشد. لازم به ذکر است که چون جهت ایمن سازی خرگوشها از پادگن‌های ویروس خالص شده به روش



تصویر۱- مجاورسازی آنتی سرم حاد با سویه‌های B1، حاد، لاسوتا، مخلوط لاسوتا و B1و نمونه‌های کنترل منفی.

اولتراسانتریفوژ استفاده شده است، حضور پادتن‌های غیر اختصاصی از جمله پادتن‌های تشکیل شده بر علیه اجزاء مایعات جنینی در حداقل خود بوده و پاسخ ایمنی مطلوب از نظر کیفیت وکمیت در این مرحله حاصل شده بود. متعاقب انجام آزمون HI اقدام به انجام آزمون آگارژل دیفوزیون با استفاده از آگار ۱/۵ درصد گردید.

خطوط رسوبی حاصله حاکی از وجود پادتن‌های بسیار متعدد مشترک بین سویه‌های حاد و واکسن در حضور آنتی سرم‌های ضد هر سویه قبل از جذب می‌باشد. تصویر ۱ خطوط رسوبی متعدد را که ناشی از ایجاد واکنش بین سرم تهیه شده بر علیه سویه ی B1 و آنتی ژنهای سویه های B1ـ لاسوتا و مخلوط سویه‌های حاد می‌باشد را نشان می‌دهد.

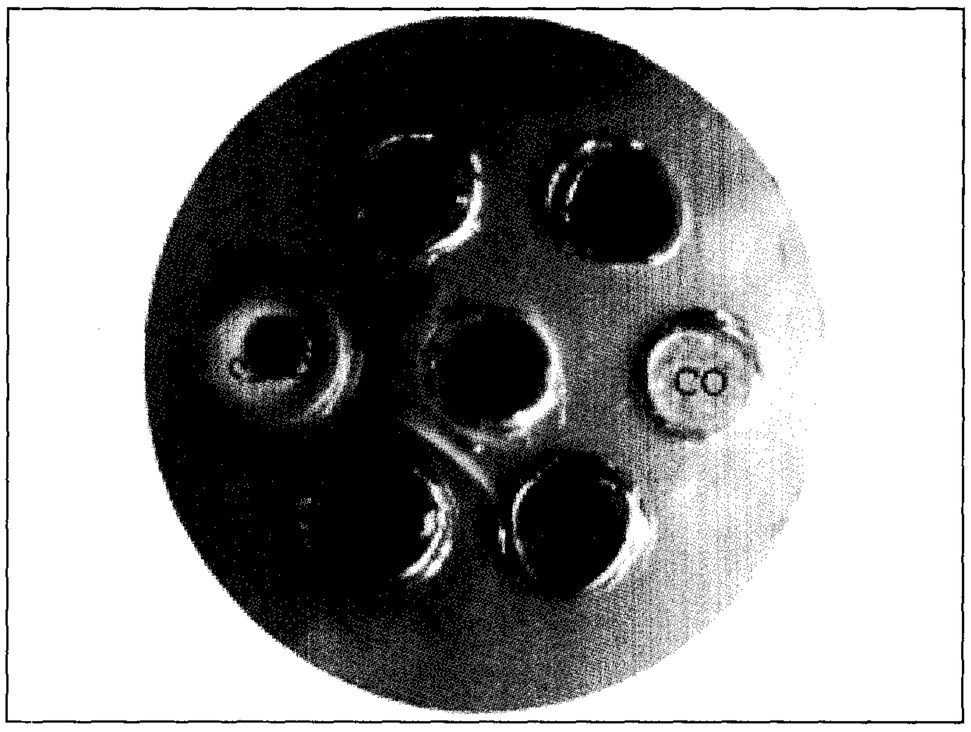
با مطالعه دقیق خطوط رسوبی تشکیل شده می توان پی برد که حداقل ۶ خط رسوبی بین سویه‌های مختلف و آنتی سرم B1 تشکیل شده‌اند و از آن جایی که خطوط مشاهده شده در اکثر موارد به طور کامل بهم ملحق شده‌اند، لذا شباهت پادگنی سویه‌های فوق الذکر مشخص می‌گردد. در این روش در هیچکدام از موارد، خطوط رسوبی مستقل به عنوان خط رسوبی اختصاصی قابل تشخیص نبوده و نشانگر عدم وجود اختلاف پادگنی در بین سویه‌های مورد مطالعه می‌باشد. چنین نتایجی نیز با همین ویژگیها در اثر مجاورت پادتن‌های ضد لاسوتا ـ ضد مخلوط B1 ولاسوتا و ضد سویه‌های حاد با آنتی ژنهای مربوطه مشاهده گردید. البته مشاهده چنین نکاتی اساساً دور از انتظار نبوده و با واقعیت موجود در طبیعت کاملاً انطباق دارد.

خطوط رسوبی متعدد که ناشی از ایجاد واکنش بین سرم تهیه شده بر علیه سویه‌های B1، حاد، لاسوتا آنتی ژنهای سویه‌های B1، لاسوتا و مخلوط سویه‌های حاد می‌باشد، خطوط مشاهده شده در اکثر موارد به طور کامل بهم ملحق شده‌اند. لذا شباهت پادگنی سویه‌های فوق اذکر مورد تاکید مجدد قرار می‌گیرد.

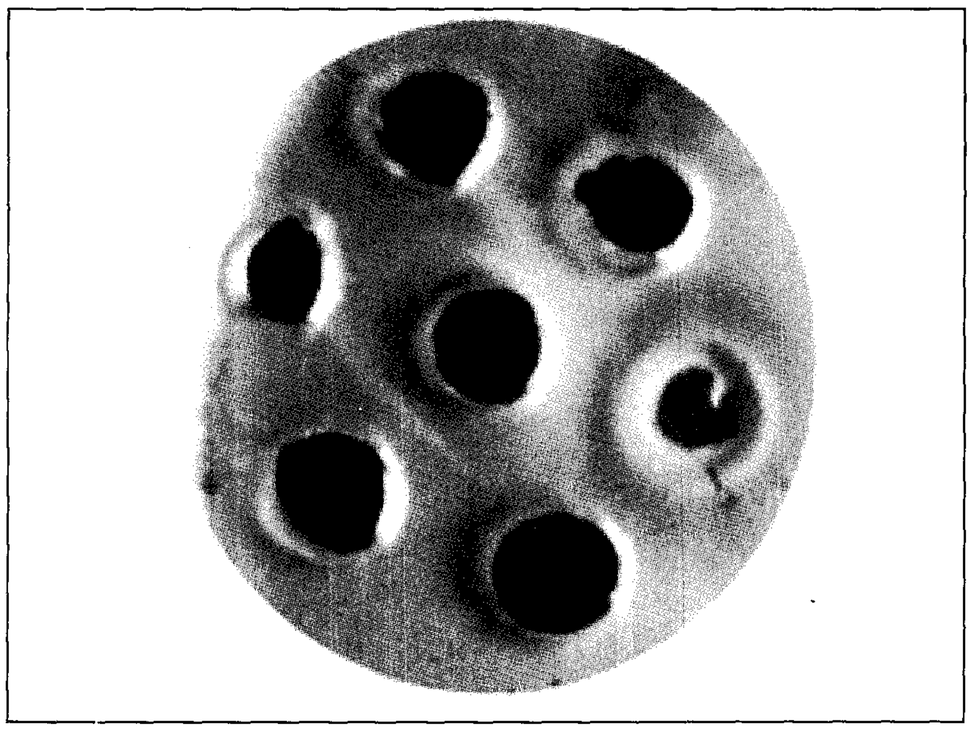
متعاقب انجام این آزمون‌ها اقدام به جذب آنتی سرم‌های حاصله با سویه‌های مورد آزمایش گردید که روش انجام آزمون در مبحث روش کار ذکر

www.SID.ir

Archive of SID



تصویر ۲ - مجاورسازی آنتی سرم جذب شده ضدلاسوتا در گوده وسط و آنتی ژنهای حاد، B1، لاسوتا، مخلوط لاسوتا ـ B1 وسویه های کنترل منفی در اطراف.



تصویر ۳ - مجاورسازی آنتی سرم جذب شده ضدسویه های حاد در گوده وسط و آنتی ژنهای حاد، B1، لاسوتا، مخلوط لاسوتا ـ B1 وسویه های کنترل منفی در اطراف.

شده است. در این روش پادتن های تشکیل شده برعلیه سویه های واکسینال با آنتی ژنهای سویه های حاد و پادتن های جذب شده، برعلیه سویه های حادبا آنتی ژنهای سویه های واکسینال به شکل متقاطع جذب گردیدند.

جهت حذف بقایای احتمالی آنتی ژنی، مجدداً عمل ترسیب و خالص سازی پادتن های باقیمانده انجام گرفته است. لازم به ذکر است که مراحل مختلف جذب و خالص سازی با مقادیر مختلفی از آنتی ژن به شکلی انجام گرفته که احتمال باقی ماندن پادتن های غیر اختصاصی جذب نشده به حداقل ممکن برسد. یعنی اگر بعد از جذب و ترسیب، آنتی سرم باقی مانده‌ای که با سوش مربوطه جذب شده باشد، باز هم در آزمون ژل دیفوزیون با همان سوش خط رسوبی ایجاد نماید، مجدداً عمل جذب با مقادیر بیشتر آنتی ژن انجام شده ومجدداً همین آزمون تا به دست آوردن نتیجه منفی از آزمون ژل دیفوزیون بین آنتی ژن و آنتی سرم مربوطه انجام می‌گرفت. درنهایت آنتی سرم جذب شده حاصله در مجاور سویه های متفاوت در آزمون ژل دیفوزیون آزمایش شده و نتایج ثبت می‌گردید.

همان گونه که در تصاویر ۲،۳ مشاهده می شود، تنها یک خط رسوبی و آن هم برعلیه سویه های اختصاصی در آزمون ژل دیفوزیون مشاهده می‌گردید.

تصویر شماره ۳ که آنتی سرم جذب شده ضدمخلوط سویه های حاد در وسط وآنتی ژنهای لاسوتا ـ مخلوط لاسوتا و B1-B1 و سویه های حاد وکنترل منفی در اطراف آن ریخته شده‌اند. در این نمونه نیز تنها بین گوده حاوی آنتی ژنهای حاد با گوده وسطی تنها یک خط رسوبی تشکیل شده که دال بر حضور یک آنتی سرم اختصاصی ضد آنتی ژنهای سویه های حاد می‌باشد.

آنتی سرم‌کنژوگه FITC اختصاصی ضد سویه های حاد پس از استفاده برای تشخیص و تفریق سویه های حاد و مقایسه نتایج با روش کشت و جداسازی ویروس در مورد ویروس های حاد مشابهت صددرصدی نتایج را نشان داد در حالی که هیچ نمونه واکسن یا نمونه منفی با استفاده از آنتی سرم کنژوگه اختصاصی ضد سویه های حاد پاسخ مثبتی را حاصل ننمود (تصویر ۴).

بحث

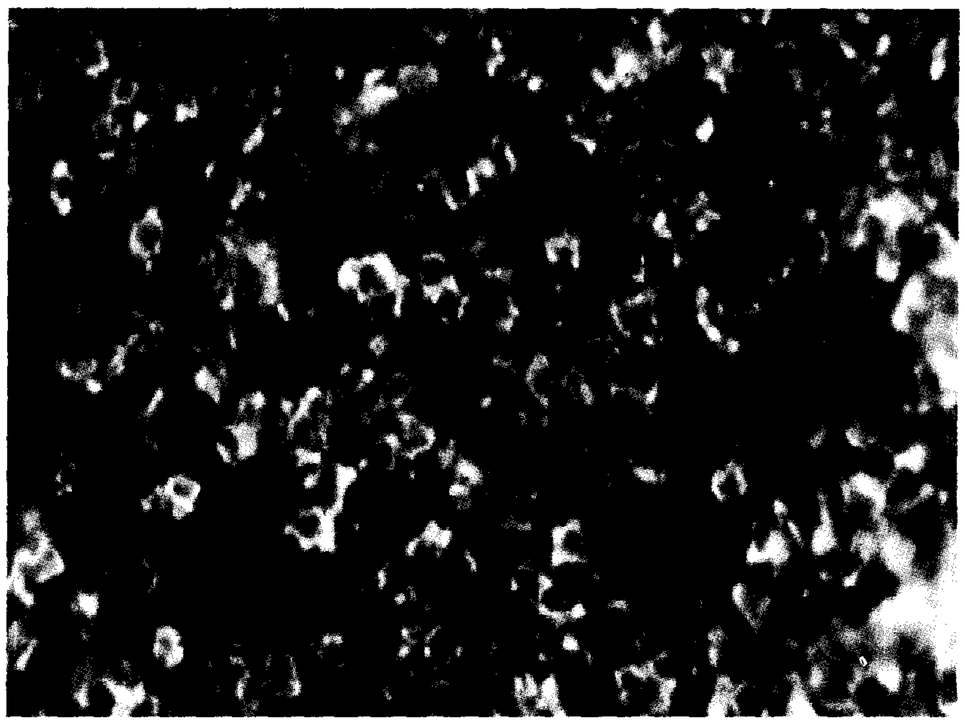
آنتی ژنهای پروتئینی ویروسهای نیوکاسل بسته به محل استقرار (غشاء و نوکلئیک اسید) از ویژگیهای فیزیکی و شیمیایی و فعالیت های بیولوژیکی خاص برخوردار هستند که چنین ویژگی هایی توسط محققین مختلف مورد مطالعه قرار گرفته است. مطالعات مختلف نشانگر حضور شش تا ده پروتئین متفاوت در ساختار شیمیایی ویروسهای مختلف نیوکاسل در دنیا می‌باشد. طی مطالعه همت زاده وهمکاران که برروی سویه های حاد مورد استفاده در این تحقیق انجام گرفته بود، نشانگر حضور هشت باند پروتئینی مختلف در ویروسهای نیوکاسل ایران و همچنین سویه های واکسن زنده به روش SDS-PAGE می‌باشد. جالب توجه آنکه در این مطالعه تفاوتی از نظر الگوی SDS-PAGE سویه های حاد و واکسینال با هم مشاهده نشده است. یعنی با توسل به این روش نمی توان سویه های حاد و واکسن را ازهم تفریق نمود (۱۸، ۱۴، ۱۲، ۴).

در تحقیق حاضر، بدون توجه به نوع آنتی ژن، درصدد یافتن آنتی بادی اختصاصی سویه های حاد بوده‌ایم. همان‌گونه که در نتایج نیز ذکر شده است، در این تحقیق موفق به تهیه ومعرفی پادتنهای ویژه‌ای که بتوانند به‌طور اختصاصی با هر کدام از سویه های واکسینال وسویه های حاد پاسخ دهند، شده‌ایم. تاکنون با توسل به پادتن های پلی کلونال موفق به تفکیک سویه های حاد از واکسینال نشده‌اند و تنها پادتنهای منوکلونال که شاخص های پادگنی ویژه‌ای را در پروتئین های F یا HN شناسایی می‌کنند تهیه و معرفی شده‌اند به‌طوری که این تحقیق در نوع خود منحصر به فرد می‌باشد. (۱۸)

امروزه تشخیص سریع و دقیق بیماری نیوکاسل درگله های مختلف طیور ازدغدغه های فکری عمده دست اندرکاران این صنعت می‌باشد. تشخیص و تشخیص تفریقی کلاسیک بیماری، براساس کشت و جداسازی ویروس و

www.SID.ir

Archive of SID



تصویر ۴- نمونه مثبت مایع الانتونیک آلوده به سویه حاد در آزمون ایمونوفلنورسانس مستقیم با استفاده از آنتی سرم اختصاصی.

سنجش پاتوژنیسیته آن می‌باشد که روشی است گرچه بسیار دقیق ولی بسیار وقت گیر به طوری که در بسیاری شرایط، به طور متوسط ۱۲ روز زمان برای این کار لازم است که تحت چنین شرایطی به هیچ عنوان نمی توان تا زمان تشخیص قطعی بیماری، مدیر بهداشتی فارم را منتظر پاسخ گذاشت. به همین دلیل طراحی روشهایی که بتوانند پادگن‌های سویه‌های حاد را از سویه‌های واکسن در مدت زمان کوتاهی تفریق نماید، همواره مد نظر بوده است. این تحقیق به عنوان یک تحقیق اولیه جهت نیل به آن هدف به اجرا در آمده است. (۱۶، ۱۴)

همان‌گونه که در تصاویر ۲ و ۳ نشان داده شده است، پادتن‌های اختصاصی تهیه شده به روش جذب و ترسیب، توان واکنش با سویه‌های خاص خود را داشته و واکنش متقاطع بین سویه‌ای در این میان مشاهده نگردیده است، یعنی می توان با بکار گیری این پادتن‌ها به تفکیک اولیه سویه‌های حاد از سویه‌های واکسن نائل شد. البته اینکه پادتن تهیه شده با کدامیک از پادگن‌های ویروسی واکنش نشان داده است، نیاز به مطالعه بیشتری دارد که جزو برنامه‌های تحقیقاتی آینده محققین است. اما همین یافته‌های فعلی از ارزش ویژه‌ای جهت تشخیص بیماری برخوردارند.

با علم به این قضیه که منشأ تمامی تفاوت‌های جدایه‌های مختلف ویروس نیوکاسل، ریشه در تفاوت‌های ژنتیکی آنها داشته واین تفاوتهای ژنتیکی نمود پروتئینی دارند، پس به نظر می‌رسد دراین تحقیق، پادتن اختصاصی تهیه شده، توان ردیابی و انجام واکنش با پروتئین ویژه‌ای را در ویروس دارد که اختصاصی و منحصر به فرد است. البته اثبات قطعی چنین ادعایی نیاز به انجام مطالعات مولکولی به ویژه انجام SDS-PAGE یا PAGE وایمونوبلاتینگ دارد. لذا پیشنهاد می‌گردد پادتن‌های طراحی شده دراین تحقیق به روش ایمونوبلاتینگ در حضور آنتی ژنهای ویروس آزمایش شده تا آنتی ژن اختصاصی نیز معرفی گردد. (۲۰، ۱۹)

البته اینکه روش پیشنهادی نگارندگان بتواند در سطح تشخیص عملی کاربرد پیدا کند، هنوز روشن و قطعی نیست، چرا که این روش برای آنتی ژنهای ویروس خالص و تغلیظ شده انجام گرفته که با آنچه در طبیعت و در بالین طیور اتفاق می‌افتد، می‌تواند متفاوت باشد. دیگر آنکه پاتوتیپ‌های حد واسط دیگر مثل سویه‌های مزوژنیک و لنتوژنیک در این تحقیق مورد استفاده قرار نگرفته‌اند در حالی که این سویه‌ها نیز در جمعیت‌های طیور در حال گردش و ایجاد عفونت بوده و تفکیک آنها به این روش مطالعه وسیعتر و عمیقتری را طلب می‌نماید.

References

۱. کیوانفر، ه.، همت زاده، ف.، محمودیان، ع. (۱۳۸۰): ویروس شناسی دامپزشکی (بیولوژی ویروس ها): انتشارات دانشگاه تهران. صفحه: ۸۲، ۸۰، ۶۵، ۶۱، ۵۷، ۴۳.

۲. کیوانفر، ه.، کریمی، ن. (۱۳۷۶): ویروس شناسی دامپزشکی (بخش بیماریها) - انتشارات دانشگاه تهران. صفحه: ۲۱۹، ۲۱۷، ۲۱۶، ۲۱۴، ۲۰۷.

۳. 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.

۴. همت زاده، ف.، علی نژاد، آ. (۱۳۸۲): مقایسه الگوی الکتروفورتیک پروتینی ویروس های حاد نیوکاسل جداشده در ایران با سویه‌های واکسن زنده - مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران. (۵۸) ۱. صفحه: ۶۷-۶۱.

4. Alexander, D.J. (1990): Avian Paramyxviridae: Recent development. Vet. Mic. 23, PP: 103-114

5. Alexander, D.J. (2000): Newcastle disease in. Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. 4th Ed, chapter 2. PP:221-223.

6. Brian, WJ.M., Hillar, O.K. (1996): Virology Methods Manual, PP: 30-33,41,54-56.

7. Burleson, FG., Chambers, TM and Wiedbrauk, LD. (1992): Virology, A laboratory manual. Academic Press Inc pp: 123-128.

8. Calnek, B.W., Barnes, .H.J., Beard,C.W., Mc-Dougald, I. R. and Saif, Y.M. (1997): Diseases of poultry.10 th Ed,PP:541-562.

9. Castro, A. E., Heuschele, W. P. (1992):Veterinary diagnostic virology ,PP:54-57.

10. Heller, E.D., Levy, A.M., Vaiman, R. and Schwartsburd, B. (1997): Chicken-embryo fibroblasts produce two types of interferon upon stimulation with Newcastle disease virus.Vet. Imm. Immunopath..57:3-4, PP:289-303.

www.SID.ir

Archive of SID

11. Hudson, L.,Hay,F.C.(1989): Practical Immunology, Black well Scientific publication, PP:4-7.
12. Kianizadeh, M., Ideris, A., Shahrabadi, S., Kargar, R., Pourbakhsh, S.A., Omar, S. and Yusoffi, A. (1999): Biological and Molecular characterization of Newcastle disease virus Isolated from Iran. Archive of Razi Institute. No:50.PP: 1-10.
13. Mass, R.A., Komen, M., van Diepen, M., Oei, H.L. and Classen, I.J.T.M. (2003): Correlation of haemagglutinin-neraminidase and fusion protein content with protective antibody response after immunization with inactivated Newcastle disease vaccines. Vaccine. 21 (2003): 3137-3142
14. Mayo, A.M.(2002) Summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. Arch. Virol. 2002 147(8) 1655-6
15. Murphy, F. A., Gibbs, E. P. J., Horzine, K.M.C. and Studdert, M. J. (1999): Veterinary virology. Academic press.3rd ED ,PP:411-428.
16. Ong HKA, Ali AM, Omar, AR. Yusoff, K. (2000): Cloning and expression of the HN gene from the velogenic viscerotropic Newcastle disease virus strain AF 2240 in Sf, insect cells. Cytotechnology. 32:3,PP:243-251.
17. Panda. A., Hung, Z., Elankumaran, S., Rockmann, D.D., Samal, S.K. (2004): Role of fusion protein cleavage site in the virulence of Newcastle disease virys. Icrob. Pathogen. 36(2004): 1-10
18. Panshin, A., Shihamanter, E., Weisman, Y., Orvell, C., Kydyromanov, A., Asanov, N., Daulbaeva, K., Sayatov, M., Lipkind, M. (2000): Antigenic characterization of the nucleocapsid protein of Newcastle disease virus by neans of a new panel of monoclonal antibodies. Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. 23. PP:209-220.
19. Slosaris, M., Levy, B., Katz, E., Levy, R., Zakay, R.Z. (1989): Elevated virulence of Newcastle disease virus strains following Serial Passages in Kidney cells in vitro. Avi. Dise.33:2,PP:248-253.
20. Swain, P., Verma, K.C., Kataria, J.M. (1997): Characterization of structural polypeptides of velogenic Newcastle diseas virus. Indian J. Com. Mic.Imm. Infec. Dis.18:2,PP:125-129.
21. Timoney, J.F., Gillespie, J.H., Scott, F.W., Barlough, J.E. (1994):Hagan and Burner' s Microbiology and infections diseases of domestic animals.9 th Ed, PP:813-818.
22. Tseung, H.B., Lai, C.K., Lin, D.T., Lin, Y.L., Chen, C.W., Lian, W.C., Chen, W.F. (1993): Purification of envelope glycoproteins of the Newcastle disease virus. J. Chine. Soci. Vet. Scie.19:1,PP:11-18.
23. Versteeg,J.(1985): A Colour Atlas of virology. Medical wolf publication .PP:45-49.

www.SID.ir