

## ردیابی آنتی‌بادی علیه نئوسپورا کانینوم در سرم‌های تجاری جنین گاو (FBS) با استفاده از روش الایزا

• حسن مروتی (نویسنده مسئول)

مدیریت کنترل کیفی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

• وحید نعمان

بخش تحقیقات دامپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان،

سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴-۱۲-۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴-۱۲-۲۸

Email: h\_morovati@yahoo.com



### چکیده

نئوسپورا کانینوم انگلی با انتشار جهانی و عامل سقط جنین در گاو است که منجر به خسارات اقتصادی در صنعت گاوداری می‌شود. در این مطالعه تعداد ۱۰ مجموعه شماره سرم تجاری جنین گاو در دسترس و نیز ۱۶ مجموعه شماره سرم جنین گاو که مراحل تحقیقاتی و تولید اولیه را سپری می‌نمودند، از نظر آلودگی به نئوسپورا کانینوم با استفاده از کیت تشخیص آنتی‌بادی مورد بررسی قرار گرفتند. ۱۰۰ درصد سرم‌های تجاری جنین گاو با منشا خارجی و ۳۷/۵ درصد (۶ نمونه از ۱۶ نمونه) سرم جنین‌های در مرحله تحقیق تهیه شده از منبع داخلی دارای آنتی‌بادی علیه نئوسپورا کانینوم بودند. نتایج بدست آمده نشان دهنده آلودگی بالای سرم‌های تجاری جنین گاو مورد استفاده به نئوسپورا کانینوم می‌باشد.

کلمات کلیدی: نئوسپورا کانینوم، سرم جنین گاو، الایزا

• Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 114 pp: 201-205

Detection of Antibodies against *Neospora caninum* in Commercial Fetal Bovine Serum (FBS) by ELISA

By: Morovati, H., (Corresponding Author) Quality Control Management, Razi Vaccine and Serum Research Institute, AREO, Karaj, Iran. Noaman, V., Veterinary Research Department, Isfahan Agriculture and Natural Resources Research and Education Center, AREO, Isfahan, Iran.

Email: h\_morovati@yahoo.com

Received: 2016-03-02 Accepted: 2016-03-18

*Neospora caninum* is a worldwide distributed pathogen which causes abortions in dairy cattle, leading to economic losses in the cattle industry. In this study ten different available lots of commercial fetal bovine serum samples and sixteen different lots of prototype fetal bovine serum were tested using a commercially available ELISA kit for the presence of total antibody to *N. caninum*. 100% (10/10) of the commercial FBS and 37.5% (6/ 16) of the prototype fetal bovine serum examined in this study were positive for *N. caninum*. This finding showed the high frequency of *N. caninum* infection in used commercial fetal bovine serums.

Key words: *Neospora caninum*, Fetal Bovine Serum, ELISA

#### مقدمه

برای تولید تجاری سرم جنین گاو (FBS) از خون جنین های گاوهای بارداری که به دلایل غیر عفونی مانند لنگش فلج کننده به کشتارگاه فرستاده می شوند و یا از گاو های باردار گوشتی ارسالی به کشتارگاه استفاده می شود. در این موارد خون معمولاً از قلب جنین های با سن حداقل ۳ ماه جمع آوری می شود (۶).

سرم جنین گاو (FBS) به عنوان ماده غذایی مکمل محیط کشت برای تامین فاکتورهای مغذی و رشد به طور وسیعی در کشت سلول، کشت ویروس، کشت انگل و سایر میکروارگانیسم ها و نیز در تولید آنتی بادی منوکلونال (MAb) بکار می رود. همچنین از سرم جنین گاو در کیت های خنثی سازی (Neutralization) و غیرفعال سازی (Inactivation) و در طراحی و ساخت کیت های ایزا و مولکولی به عنوان عامل بلوک کننده (Blocking agent) استفاده می شود (۱۰). در حدود ۱۷ ویروس و تعدادی از باکتری ها و انگل ها در هنگام آبستنی می توانند از جفت عبور کرده و جنین را آلوده کنند (۵). حضور آنتی بادی علیه عوامل بیماری زا در سرم جنین گاو باعث تداخل در ساخت واکسن ها در محیط های آزمایشگاهی خواهد شد و خنثی سازی ذرات ویروس در محیط های کشت در مورد تولید واکسن اسپهال و ویروسی گاوان به اثبات رسیده است (۲ و ۳).

در مطالعه ای که توسط تورس و اورنگا در سال ۲۰۰۶ بر روی هفده نمونه تجاری سرم جنین گاو از ۴ شرکت تجاری انجام شد، مشاهده شد که تمامی سرم ها دارای آنتی بادی علیه نئوسپورا کانینوم می باشند (۹). با توجه به اینکه در سال های اخیر کشت آزمایشگاهی نئوسپورا کانینوم در سلول های مختلف جهت تولید آنتی ژن های نئوسپورا کانینوم، بررسی داروهای موثر بر ضد انگل و تولید واکسن مرسوم شده است و در کشت های سلولی مربوطه از سرم جنین گاو استفاده می شود (۷) اطلاع از وجود آنتی

بادی علیه نئوسپورا کانینوم در سرم جنین گاو مورد استفاده، جهت حصول بهترین نتیجه ضروری خواهد بود.

نظر به اینکه در چند سال اخیر تحقیقات گسترده ای در خصوص کشت نئوسپورا جهت تولید آنتی ژن و تولید واکسن در ایران انجام گرفته و در حال انجام است، هدف از این مطالعه بررسی وجود آنتی بادی علیه نئوسپورا کانینوم (آلودگی از نظر نئوسپورا کانینوم) در سرم های تجاری جنین گاو بود تا توجه محققینی که در این زمینه مطالعه می کنند، نسبت به آلودگی های احتمالی که ممکن است نتایج آزمایشات راتحت تاثیر قرار دهد، جلب شود.

#### مواد و روش ها نمونه های مورد آزمایش

تعداد ۹ نمونه سرم جنین گاو (FBS) تجاری با مجموعه شماره های مختلف و یک نمونه سرم گوساله تازه متولد شده (Newborn calf serum)، مجموعاً ۱۰ نمونه متعلق به ۲ کمپانی تولید کننده سرم از آزمایشگاه هایی که بطور روزمره به منظور کشت سلول، میکروارگانیسم ها و کارهای تحقیقاتی مورد استفاده قرار می گرفتند، تهیه شد. منبع تولید سرم ها از گاوهای منطقه استرالیا، آمریکای جنوبی و انگلستان بودند. علاوه بر این تعداد ۱۶ نمونه سرم جنین گاو با مجموعه شماره های مختلف نیز از منابع تولید داخل تهیه شد. لازم به ذکر است که این نمونه ها محصول نهایی نبوده و بصورت خام تهیه شده بودند. تمامی نمونه های دریافتی تا زمان انجام آزمایش در داخل میکروتیوپ در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. یک نمونه سرم تایید شده حاوی آنتی بادی علیه نئوسپورا کانینوم که قبلاً توسط نویسندگان با استفاده از کیت IDEXX آزمایش شده بود، به عنوان کنترل مثبت و اطمینان هرچه بیشتر در صحت آزمایش

مورد استفاده قرار گرفت.

### آزمون الایزا

برای تشخیص آنتی‌بادی علیه نئوسپورا کانینوم از کیت تجاری (Neospora caninum Antibody Test Kit IDEXX) ساخت کشور آمریکا استفاده شد. آزمایش طبق دستورالعمل سازنده کیت انجام شد. بطور خلاصه، نمونه‌های سرمی به نسبت ۱/۱۰۰ رقیق شدند و سپس با آنتی‌ژن نئوسپورا کانینوم پوشانده شده و در چاهک‌های میکروپلیت انکوبه شدند. پس از انجام چندین مرحله شستشو، آنتی‌بادی کونژوگه به منظور اتصال با کمپلکس ایمنی احتمالی به چاهک اضافه شد. در مرحله بعد به منظور آشکار شدن کمپلکس ایمنی و اثبات حضور آنتی‌بادی، کروموزن اضافه گردید و برای پایان دادن به واکنش، از محلول ارائه شده استفاده شد. با استفاده از دستگاه الایزایدر (DYNEX MRX، چگالی نوری واکنش در طول موج ۶۳۰ نانومتر قرائت شد. بر طبق توصیه سازنده کیت، نتایج به صورت نسبت چگالی نوری نمونه به چگالی نوری کنترل مثبت (S/P ratio) بیان شدند. نمونه‌های با نسبت S/P بیشتر و یا مساوی با ۰/۵ بعنوان مثبت از نظر وجود آنتی‌بادی علیه نئوسپورا کانینوم در نظر گرفته شدند.

### نتایج

تمامی ۹ نمونه سرم جنین گاو و یک نمونه گوساله تازه متولد شده که از منابع خارجی تامین شده بودند، دارای آنتی‌بادی علیه نئوسپورا کانینوم بودند. ۶ نمونه از ۱۶ نمونه (۳۷/۵ درصد) سرم جنین در مرحله تحقیق تهیه شده از منبع داخلی دارای آنتی‌بادی علیه نئوسپورا کانینوم بودند. نمونه کنترل مثبت نیز همچنان مثبت گزارش گردید. (جدول ۱)

### بحث

در بررسی اخیر از ۲۶ نمونه مورد بررسی داخلی و خارجی ۱۶ نمونه (۶۱/۵ درصد) از نظر وجود آنتی‌بادی ضد نئوسپورا کانینوم مثبت بودند که نشان‌دهنده آلودگی بالای سرم‌ها بخصوص سرم‌های خارجی با آنتی‌بادی ضد این ارگانیسیم می‌باشد. در انتقال ایمنی از مادر به فرزند در گاوها با توجه به اینکه نوع جفت در گاو از نوع اپتلیوم کوریونی می‌باشد، لذا آنتی‌بادی‌های مادری به جنین منتقل نمی‌شود. بنابر این حضور آنتی‌بادی‌های ضد نئوسپورا کانینوم قبل از تغذیه با آغوز در جنین یا نوزاد تازه متولد شده نشان‌دهنده آلودگی داخل رحمی جنین یا انتقال عمودی ارگانیسیم از مادر به جنین است (۱ و ۴). علاوه بر این اگر در اثر عفونت‌های میکروبی یا دلایل دیگر ضایعات پاتولوژیک در جفت رخ دهد، ممکن است باعث نشت ایمونوگلوبولین‌های مادر به گردش خون جنین شود (۸). در آزمایشگاه‌ها به منظور تهیه آنتی‌بادی منوکلونال (MAb) از سلول‌های هیبریدوما استفاده می‌شود. با توجه به اینکه اغلب سلول‌های هیبریدوما خوب رشد نمی‌باشند لذا استفاده از مواد مغذی بویژه سرم جنین گاو امری ضروری است. استفاده از سرم‌های دارای آنتی‌بادی علیه نئوسپورا کانینوم می‌تواند بر روی رشد انگل‌های دارای اپی‌توپ‌های مشترک با نئوسپورا کانینوم تاثیر بگذارد. در مراحل تولید آنتی‌بادی منوکلونال در صورت وجود آنتی‌بادی علیه نئوسپورا کانینوم در سرم جنین گاو، آنتی‌بادی مذکور با آنتی‌بادی تولید شده توسط سلول تولید کننده آنتی‌بادی

منوکلونال (هیبریدوما) در سوپرناتانت محیط کشت مخلوط شده و باعث ایجاد نتایج مثبت کاذب و گمراه کننده می‌شود. این امر نه تنها برای تولید آنتی‌بادی منوکلونال علیه انگل نئوسپورا کانینوم اهمیت دارد، بلکه ممکن است در مورد انگل‌هایی که دارای اپی‌توپ‌های مشترک می‌باشند نیز صادق باشد (۹).

موارد بالای آلودگی جنین به نئوسپورا کانینوم می‌تواند نشان‌دهنده ناتوانی روش‌های تشخیصی موجود و یا لزوم استفاده از روش‌های تشخیصی نامناسب در تشخیص بیماری‌ها در گاو‌داری‌ها باشد.

یافته‌های این تحقیق نشان‌دهنده این است که جنین‌ها با انگل نئوسپورا کانینوم آلوده شده‌اند و یا با این انگل در تماس بوده‌اند. از آنجا که حضور آنتی‌بادی‌های ضد نئوسپورا کانینوم در سرم جنین ممکن است باعث اختلال در تحقیقات آزمایشگاهی این انگل شود، لذا توصیه می‌شود شرکت‌های تولیدکننده سرم‌های تجاری از قبیل سرم جنین گاو، محصولات خود را از نظر آلودگی به انگل نئوسپورا کانینوم مورد ارزیابی قرار دهند و یا در صورت امکان، آزمایشگاه‌ها و مراکز تولید واکسن که در زمینه کشت آزمایشگاهی نئوسپورا کانینوم در سلول‌های مختلف جهت تولید آنتی‌ژن‌های نئوسپورا کانینوم، بررسی داروهای موثر بر ضد انگل و تولید آزمایشگاهی واکسن تحقیق می‌کنند، قبل از استفاده از سرم جنین گاو، آزمایش‌های مورد نیاز را در خصوص عدم آلودگی سرم‌های مورد استفاده انجام دهند.

### تشکر و قدردانی

بدینوسیله از زحمات بیدریغ کارشناسان محترم بخش کنترل کیفی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی و بخش تحقیقات دامپزشکی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان تشکر و قدردانی می‌شود.

### منابع مورد استفاده

- Anderson, M. L., Reynolds, J. P., Rowe, J. D., Sverlow, K. W., Packham, A. E., Barr, B. C., & Conrad, P. A. (1997). Evidence of vertical transmission of Neospora sp infection in dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 210(8), 1169-1172.
- Bolin, S. R., Matthews, P. J., & Ridpath, J. F. (1991). Methods for detection and frequency of contamination of fetal calf serum with bovine viral diarrhoea virus and antibodies against bovine viral diarrhoea virus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 3(3), 199-203.
- Docherty, R. J., Hamilton, A. O., Pattison, N., Mounsey, G., Foster, R., Hodgson, P., & Benny, G. (1994). Low IgG FBS: applications to monoclonal antibody and vaccine production. *Focus*, 16(1), 14-17.
- Dubey, J. P. (2003). Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *The Korean journal of parasitology*, 41(1), 1-16.

جدول ۱- نتایج آزمون سرم های تجاری نسبت به نئوسپورا کانینوم با استفاده از روش الایزا.

شماره	نوع نمونه	شرکت سازنده	کشور تولیدکننده	شماره مجموعه	*S/P ratio	نتیجه
۱	سرم جنین گاو	Biosera	آمریکای جنوبی	۵۰۵۶۴۶۵۱۸۹۰	۱,۲	+
۲	سرم جنین گاو	Gibco Invitrogen	آمریکا	۴۱G۹۸۶۳K	۰,۹	+
۳	سرم جنین گاو	Gibco Invitrogen	آمریکا	۴۱F۶۶۵۲K	۱,۴	+
۴	سرم جنین گاو	Gibco Invitrogen	آمریکا	۴۱G۹۸۴۳K	۱,۵	+
۵	سرم جنین گاو	Gibco Invitrogen	آمریکا	۴۱G۹۸۷۵K	۱,۳	+
۶	سرم گوساله تازه متولد	Gibco Invitrogen	انگلستان	۱۰۶۸۴۹۲	۱,۴	+
۷	سرم جنین گاو	Gibco Invitrogen	انگلستان	۱۰۲۷۰	۱,۶	+
۸	سرم جنین گاو	Gibco Invitrogen	استرالیا	۶۳۳۳۹۲۶Y	۲,۲	+
۹	سرم جنین گاو	Gibco Invitrogen	انگلستان	۴۱F۷۵۷۵K	۱,۵	+
۱۰	سرم جنین گاو	Embryomax	آمریکای جنوبی	۶G۰۵۴۱	۰,۷	+
۱۱	سرم جنین گاو	جهاد دانشگاهی	ایران	۸۷-A	۰,۰۳	-
۱۲	سرم جنین گاو	جهاد دانشگاهی	ایران	۸۷-B	۰,۰۱>	-
۱۳	سرم جنین گاو	جهاد دانشگاهی	ایران	۸۷-C	۰,۰۲	-
۱۴	سرم جنین گاو	جهاد دانشگاهی	ایران	۸۷-D	۰,۰۱>	-
۱۵	سرم جنین گاو	جهاد دانشگاهی	ایران	۸۷-E	۰,۰۱>	-
۱۶	سرم جنین گاو	جهاد دانشگاهی	ایران	۸۷-F	۰,۰۱>	-
۱۷	سرم جنین گاو	جهاد دانشگاهی	ایران	۸۷-G	۰,۱۱	-
۱۸	سرم جنین گاو	جهاد دانشگاهی	ایران	۸۷-H	۰,۰۱>	-
۱۹	سرم جنین گاو	جهاد دانشگاهی	ایران	۸۷-I	۰,۰۳	-
۲۰	سرم جنین گاو	جهاد دانشگاهی	ایران	۸۷-J	۰,۳	-
۲۱	سرم جنین گاو	جهاد دانشگاهی	ایران	۸۷-K	۳,۰	+
۲۲	سرم جنین گاو	جهاد دانشگاهی	ایران	۸۷-L	۲,۴	+
۲۳	سرم جنین گاو	جهاد دانشگاهی	ایران	۸۷-M	۲,۸	+
۲۴	سرم جنین گاو	جهاد دانشگاهی	ایران	۸۷-N	۲,۸	+
۲۵	سرم جنین گاو	جهاد دانشگاهی	ایران	۸۷-O	۱,۲	+
۲۶	سرم جنین گاو	جهاد دانشگاهی	ایران	۸۷-P	۲,۴	+
۲۷	سرم مثبت گاو	کنترل مثبت			۲,۸	+

\*نسبت چگالی نوری نمونه به چگالی نوری کنترل مثبت (مقادیر پایینتر از ۵,۰ به عنوان منفی در نظر گرفته شد).

5. Hochfeld, W. L. (2006). Producing biomolecular substances with fermenters, bioreactors, and biomolecular synthesizers. CRC Press, 100-104.
6. Jochems, C. E., van der Valk, J. B., Stafleu, F. R., & Baumans, V. (2002). The use of fetal bovine serum: ethical or scientific problem? *Atla-Nottingham*, 30(2), 219-228.
7. Lv, Q., Li, J., Gong, P., Xing, S., & Zhang, X. (2010). *Neospora caninum*: In vitro culture of tachyzoites in MCF-7 human breast carcinoma cells. *Experimental parasitology*, 126(4), 536-539.
8. Schultz, R. D., Dunne, H. W., & Heist, C. E. (1973). Ontogeny of the bovine immune response. *Infection and immunity*, 7(6), 981-991.
9. Torres, M. P., & Ortega, Y. R. (2006). *Neospora caninum* antibodies in commercial fetal bovine serum. *Veterinary parasitology*, 140(3), 352-355.
10. Zabal, O., Kobrak, A. L., Lager, I. A., Schudel, A. A., & Weber, E. L. (1999). [Contamination of bovine fetal serum with bovine viral diarrhea virus]. *Revista Argentina de microbiologia*, 32(1), 27-32.

