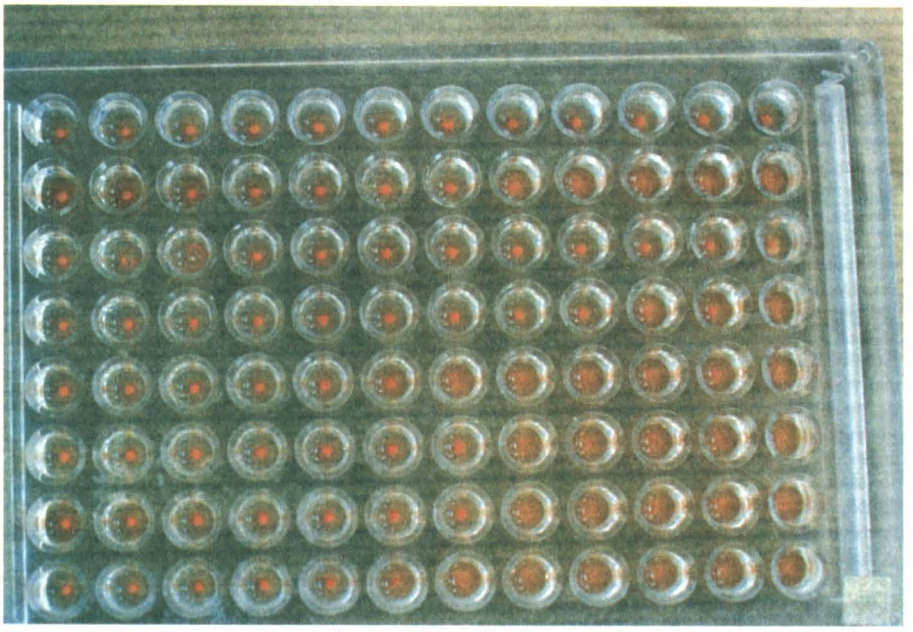
AF ۲۰۰

بررسی در مورد کاربرد آزمایشهای انحراف عناصر مکمل و جلوگیری از جمع شدن گویچه‌های قرمز جهت اندازه‌گیری پادتن ضد طاعون گاوی

●سوسن حقیقی، عضو هیأت علمی مؤسسه تحقیقاتی رازی
●بهروز قابوسی، عضو هیأت علمی مؤسسه تحقیقاتی رازی
●محمد حسامی، عضو هیأت علمی مؤسسه تحقیقاتی رازی



تصویر شماره ۱- آزمایش جلوگیری از جمع شدن گویچه‌های قرمز (HI) در میکروپلیت ۹۶ خانه. عمل جلوگیری از سمت چپ شروع شده است.

چکیده

تعداد ۶۶۸ نمونه سرم از دامهای مایه‌کوبی شده علیه طاعون گاوی تهیه و با دو روش [1] (CF) و [2] (HI) مورد بررسی و حساسیت هر روش در تعیین پادتن ایجاد شده مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج حاصله نشان می‌دهد که هر دو روش دارای حساسیت کافی برای تعیین پادتن بوده و هر یک از این دو روش به تنهایی می‌تواند در بررسیهای اندازه‌گیری پادتن بکار رود. ۸۸٪ از سرمهای آزمایش شده در دو روش دارای پادتن بوده و کاملاً با یکدیگر تطابق دارند، تنها ۱۲٪ از سرمها در هر روش با یکدیگر اختلاف داشته و یا به عبارت دیگر حساسیت کافی نشان نداده است.

مقدمه

ویروسهای طاعون گاوی (Rinderpest)، سرخک انسان، ویروس بیماری سگهای جوان (Distemper) و ویروس نشخوارکنندگان کوچک (PPR) همگی در جنس Morbilivirus از خانواده Paramyxoviridae قرار می‌گیرند، چهار ویروس ذکر شده برای انسان و دام بیماریزا بوده و دارای قرابت پادگنی می‌باشند. طی بررسی‌های جداگانه‌ای که قبلاً انجام گرفته سرم تعدادی گاو که واکسن طاعون گاوی دریافت کرده‌اند با دو روش SN[3] و HI و با استفاده از پادگن سرخک مورد مقایسه قرار گرفته و کارآئی هر دو روش در جستجوی پادتن ایجاد شده در سرم گوساله‌ها مورد اثبات قرار گرفته‌است. در اجرای این طرح، هدف مقایسه دو روش سرولوژیکی دیگر یعنی انحراف عناصر مکمل و جلوگیری از جمع‌شدن گویچه‌های قرمز می‌باشد و در نهایت می‌توان این سه روش متداول سرولوژی راکه برای جستجوی پادتنهای ضد بیماری ویروس به طور گسترده‌ای استفاده می‌شود مقایسه نموده و حساسیت هر یک را نسبت به تشخیص ردیابی پادتن تعیین نمود.

در این طرح تعدادی سرم گوساله از دامهای مایه‌کوبی شده که قبلاً بوسیله HI اندازه‌گیری شده با روش انحراف عناصر مکمل نیز مورد مقایسه قرار می‌گیرد و نتایج این دو روش روی ۶۶۸ نمونه سرم گاو و گوساله که توسط سازمان دامپزشکی کل کشور از نقاط مختلف کشور جمع‌آوری و به مؤسسه رازی ارسال شده مورد مقایسه قرار گرفته‌اند.

مواد و روش‌های آزمایش

مواد مورد آزمایش CF

الف - تهیه پادگن: برای تهیه پادگن ویروس تخفیف حدت یافته طاعون گاوی روی تیره سلول [4](BK) برده شد و پس از ظهور CPE کامل در برودت زیر صفر نگهداری شد، سپس ویروس نگهداری شده به منظور خروج ویروس‌های داخل سلولی چند بار متوالی منجمد و ذوب گردید و پس از سانتریفوژ کردن (در دور ۱۵۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه)، مایع رو به عنوان پادگن استفاده گردید. پادگن تهیه شده به علت رقیق بودن قادر به فیکس کردن کمپلمان نبوده و برای این منظور پادگن مجدداً در دور RPM ۳۰۰۰۰ به مدت ۱۲۰ دقیقه اولتراسانتریفوژ گردید و رسوب حاصله که در حقیقت ویروس می‌باشد به عنوان پادگن بکار رفته و قادر به فیکسه نمودن کمپلمان در حضور سرم ضد گردید. برای انجام آزمایش جمعاً سه سری پادگن به طریق ذکر شده تهیه و مورد استفاده قرار گرفت.

ب - تهیه کمپلمان: برای تهیه کمپلمان مورد نیاز آزمایش، از خوکچه هندی سالم استفاده گردید. خوکچه‌های انتخاب شده به مدت ۲۴ ساعت بدون غذا نگهداری شدند و به منظور خونگیری از هالوتان به مقدار ۲۸ میلی‌گرم برای هر کیلوگرم وزن بدن برای بیهوش نمودن و خونگیری از قلب استفاده شد. خونهای گرفته شده را در لوله سانتریفوژ ریخته به مدت ۱۵ الی ۳۰ دقیقه با دور ۱۵۰۰ سانتریفوژ کردند، مایع روئی که سرم خون خوکچه هندی می‌باشد به عنوان کمپلمان جدا گردید سپس این سرم با مایع ویت (Witt) مخلوط و پس از تقسیم در شیشه‌های ۸ سانتی‌متر مکعبی در فریزر

۷۰- درجه سانتی‌گراد به مدت طولانی نگهداری گردید.

ح - تهیه سرم همولیزین: گلبول قرمز گوسفند به نسبت مساوی با محلول آلسور تهیه و سپس به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شده، سه بار گلبولها را شسته و سپس به نسبت ۵۰٪ در سرم فیزیولوژی مخلوط و در زمانهای مختلف و مقادیر متفاوت در ورید گوش خرگوش تزریق شد. ده روز پس از آخرین تزریق خونگیری نهایی انجام شد که افزایش عیار همولیزین مشاهده نگردید سرم همولیزین تهیه شده در فلاکنهای ۸ میلی‌لیتر تقسیم و در برودت ۷۵- درجه سانتی‌گراد نگهداری و از آن برای تهیه سیستم همولیتیک استفاده گردید.

د- سرمهای مورد مصرف: سرم هیپرایمن ضد طاعون گاوی که توسط مؤسسه Pirbright انگلستان روی خرگوش تهیه و بوسیله مؤسسه رازی خریداری شده بود به عنوان سرم استاندارد و کنترل مثبت در تمام مراحل آزمایش بکار رفت.

روشهای آزمایش

الف - آزمایش HI

این آزمایش طبق روش متداول بخش مربوطه انجام گرفته که در آن سوش حاد ویروس سرخک (Edmonston) روی تیره سلول کلیه میمون (Vero) کشت داده شد و هماگلوتینین مورد آزمایش پس از کامل شدن CPE[5] با استفاده از Tween 80 و اتر به روش Norrby تهیه گردید.

برای از بین‌بردن واکنش‌های غیر اختصاصی از کائولن ۲۵٪ استفاده شد و موکوپروتئینها که مانعی در راه ایجاد واکنش هستند جذب کائولن شده و ته نشین می‌گردند. کلیه آزمایشها در میکروپلیت V شکل انجام و نتایج آزمایش با استفاده از آئینه مخصوص قرائت و یادداشت گردید.

ب - آزمایش CF

آزمایش CF به طریق ۱۰۰٪ همولیز و به روش Osler انجام گرفت. کمپلمان تهیه شده ابتدا عیارسنجی شده و دو واحد از آن در تمام آزمایشها بکار رفت. در هر سری آزمایش کنترلهای لازم از قبیل کنترل سرم مثبت، کنترل سرم منفی، کنترل کمپلمان و کنترل پادگن بکار برده شده به منظور صرفه‌جویی در موارد مصرفی بجای مقدار ۰/۲۵ میلی‌لیتر از هر ماده مورد مصرف مقدار ۰/۱۲۵ میلی‌لیتر بکار برده شد. زمان لازم برای فیکسه شدن کمپلمان به پادتن و پادگن به جای ۳۰ دقیقه ۱۲۰ دقیقه انتخاب گردید که این زمان بعد از چند بار تجربه بدست آمد.

نتیجه

در این بررسی ۶۶۸ نمونه سرم گاو و گوساله ارسالی سازمان دامپزشکی به طریق CF و HI مورد آزمایش قرار گرفت. روش HI توسط بخش تحقیق و تولید واکسنهای ویروسی مصرف پزشکی انجام شده و در طول مدت آزمایش CF هیچ گونه اطلاعی از جواب HI در دست نبود و سرمها تحت شماره یاکد، مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج بررسی مقایسه‌ای دو روش آزمایش در جدول ۱ ارائه شده‌است چنانچه ملاحظه می‌گردد در این بررسی و در آزمایش CF ۸۸٪ و در HI ۸۹٪ سرمها دارای پادتن ضد بیماری طاعون گاوی بوده‌اند.

تطابق دو آزمایش CF و HI با یکدیگر

در این بررسی نتایج حاصله از دو روش روی ۶۶۸ نمونه سرم مورد آزمایش با هم تطبیق داده شده‌اند و در ۱۲٪ موارد نتایج حاصله با هم مطابقت نداشته که در جدول شماره ۲ موارد تطابق و عدم تطابق دو آزمایش مورد بحث خلاصه شده است. چنانچه در جدول شماره ۲ ملاحظه می‌گردد در دو آزمایش مورد بحث ۸۳٪ سرمها در هر دو آزمایش واجد پادتن ضد طاعون گاوی و ۵٪ آنها فاقد پادتن می‌باشند به عبارت دیگر در مجموع ۸۸٪ موارد نتایج با هم منطبق بوده و در ۱۲٪ نتایج حاصله با هم تطبق نمی‌نمایند.

بحث

با ظهور و ابداع روشهای مدرن سرولوژی در طی سالیان اخیر مانند روش الیزا بررسی‌های سرمی ظاهراً خیلی سریعتر انجام و حساسیت بیشتری را نسبت به روشهای قدیمی نشان می‌دهد. اینگونه روشها با وجود اینکه دارای حساسیت بیشتری نسبت به روشهای قدیمی می‌باشند ولی در مواردی جواب‌های غیر اختصاصی نشان داده و از این نظر دارای نقطه ضعف می‌باشند. با توجه به نکاتی که ذکر گردید هنوز روشهای قدیمی دارای ضریب اطمینان بیشتری بوده و به طور معمول مورد استفاده قرار می‌گیرند. روشهای HI، CF، SN که هنوز هم به طور گسترده مورد استفاده می‌باشند اساس آزمایش‌های سرولوژی را تشکیل می‌دهند.

جدول شماره ۱- نتیجه کلی دو آزمایش HI, CF

کل موارد آزمایش شده	CF		HI	
	(+)*	(-)**	(-)*	(+)**
۶۶۸	۵۹۴	۷۴	۵۹۸	۷۰
٪	٪۸۸	٪۱۱/۵	٪۸۹	٪۱۰/۵

*: واجد پادتن ضد طاعون گاوی در آزمایش مربوطه

**: فاقد پادتن ضد طاعون گاوی در آزمایش مربوطه

جدول شماره ۲- تطابق یا عدم تطابق نتایج دو آزمایش HI, CF

کل موارد آزمایش شده	تطابق		عدم تطابق	
	CF	HI	CF	HI
	(+)<a>(+)	(-)<b>(-)	(+)<c>(-)	(-)<d>(+)
۶۶۸	۵۵۶	۳۲	۴۲	۳۸
٪	٪۸۳	٪۵	٪۶/۵	٪۵/۵

<a> CF(+) (+) HI: واجد پادتن ضد طاعون گاوی در هر دو آزمایش

<b> CF(-) (-) HI: فاقد پادتن ضد طاعون گاوی در هر دو آزمایش

<c> CF(-) (+) HI: فاقد پادتن ضد طاعون گاوی در CF و واجد پادتن ضد طاعون گاوی در HI

<d> CF(+) (-) HI: واجد پادتن ضد طاعون گاوی در آزمایش CF و فاقد پادتن ضد طاعون گاوی در آزمایش HI

در این طرح حساسیت دو روش HI و CF مورد مقایسه قرار گرفته و در نهایت نتایج حاصله با روش SN مورد ارزشیابی قرار می‌گیرند همچنانکه نتیجه بررسی نشان می‌دهد دو روش HI و CF دارای حساسیت کافی بوده و تنها در ۱۲٪ از موارد عدم تطابق وجود دارد.

حال اگر سه روش را با هم مورد مقایسه قرار دهیم نتایج این بررسی و بررسیهای که در قبل انجام گرفته مؤید این نکته است که استفاده از روشهای سرولوژی متداول که در این بررسیها بکار رفته به اندازه کافی حساس بوده و می‌توان از آنها در سنجش پادتنهای موجود در سرم استفاده نمود.

پاورقی

1- Complement fixation
2- Hemagglutination inhibation
3- Sero neutralization
4- Bovine kidney
5- Cytopathic effect

منابع مورد استفاده

1- Downie, A.W., and A.MAC Donald, 1950: A study of the pox viruses by complement fixation and inhibition of complement fixation method. j. path. and Bact. 62, 389-401.

2- Scott, G.R., W.P. Taylor and P.B Rossiler 1986. Manual of the diagnosis of rinderpest. F.A.O.

3- Plowright W., and Taylor W.P. 1967. long-term studies of the immunity in east African cattle following in oculation with rinderpest culture vaccine research in veterinary sciencs., Vol, 8, No1 pp. 118-128

4- Plowright w., J, 1984. The duration of rinderpest cell culture vaccine hgy., camb., 32, pp 258-296.

5- Rice, C.E., and J.B. Brooksby, 1953: Studies of the complement. Fixation reaction in virus systems. j. immunol 71, 300-310.

6- Traub, E., M. Hessami and A. Shafyi: 1968. indirect complement fixation in foot-and - mouth disease. I. study of antibody response in cattle and sheep. zbi. vet. Med.