DOI: 10.22092/VJ.2020.128741.1670
شماره ۱۳۲ پاییز ۱۴۰۰
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده های بیولوژیک

طراحی سیستم الایزا جهت سنجش پادتن تولید شده در خوکچه هندی ایمن شده با ویروس تب‌برفکی

• مهسا کریمی
گروه زیست شناسی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامي، تهران، ایران
• رسول مدنی (نویسنده مسئول)
گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران و بخش پروتومیکس و بیوشیمی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزي (تات)، کرج، ایران
• فریبا گلچین‌فر
بخش پروتومیکس و بیوشیمی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزي (تات)، کرج، ایران
• تارا امامی
بخش پروتومیکس و بیوشیمی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزي (تات)، کرج، ایران
• پرویز پاکزاد
گروه زیست شناسی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامي، تهران، ایران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۸-۱۰-۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹-۰۲-۰۲
Email: madanirasool@gmail.com

چکیده

تب‌برفکی، بیماری عفونی و کشنده ویروسی است که موجب بیمار شدن حیوانات زوج سم می‌شود. در حال حاضر از روش خنثی‌سازی سرم برای مطالعه این بیماری استفاده می‌شود، اما تست الایزا براساس انواع متمایز با پادگن‌های مختلف و پادتن اختصاصی در زمینه‌هاي مختلف مطالعه بیماري تب‌برفکی برتري دارد و ممکن است این روش در آینده نزدیك جایگزین روش‌های سنتی گردد. این مطالعه به منظور طراحی سیستم الایزا برای اندازه‌گیری پادتن تولید شده در خوکچه‌های هندي ایمن شده با ویروس تب‌برفکی انجام گرفت. ویروس تب‌برفکی تخلیص شده تهیه شد و محلول حاوي ویروس، پروتئین سنجی گردید. ایمن‌سازی پنج خوکچه هندی جهت تهیه سرم مثبت انجام گرفت و سپس از آن‌ها جهت به دست آوردن سرم، خون‌گیری شد. آزمون اکترلونی صورت گرفت و در نهایت اقدام به طراحی سیستم الایزا شد. غلظت پروتئین، mg۵ /Error! Bookmark not defined./ml۳ بدست آمد. با انجام تست اکترلونی، خطوط رسوبی میان سرم و پادگن ویروس تب‌برفکی تشکیل گردید. با استفاده از سیستم الایزای طراحی شده و با بهینه کردن شرایط، مقدار غلظت بهینه پادگن به میزان µg/well ۱ و رقت مناسب سرمی به میزان ۱:۱۰۰ بدست آمد. در سیستم الایزا میزان انحراف معیار ۰/۳۵ و حد آستانه مقدار ۱/۰۳ تعریف شد، به طوری که نمونه‌های بالاتر از جذب نوری ۱/۰۳ نمونه‌های مثبت و نمونه‌های پائین‌تر از جذب نوری ۱/۰۳ نمونه‌های منفی بودند. آزمون الایزای طراحی شده می‌تواند برای سنجش پادتن تولید شده در خوکچه هندی ایمن شده با ویروس تب‌برفکی استفاده گردد که به نوبه خود در درمان با به‌کارگیری روش‌های آزمایشگاهی کم هزینه و مناسب مؤثر است.

کلمات کلیدی: تب برفکی، الایزا، خوکچه هندي، اکترلونی

Veterinary Researches & Biological Products No 132 pp: 13-21

Designing an ELISA system to measure the antibody produced in guinea pigs immunized with FMD virus

By: Karimi, M., Department of Biology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. Madani, R., (Corresponding Author) Department of Microbiology, School of Specialized Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. and Department of Biotechnology, Razi Vaccine and Serum Research institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Gholchinfar, F., Department of Biotechnology, Razi Vaccine and Serum Research institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. Emami, T., Department of Biotechnology, Razi Vaccine and Serum Research institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. and Pakzad, P., Department of Biology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Received: 2019-12-30 **Accepted: 2020-04-21**

Email: madanirasool@gmail.com

Foot-and-mouth (FMD) disease is an infectious and fatal viral disease that affects cloven-hoofed animals. Although different biological and serological approaches are still applied to study this disease, ELISA test based on the distinct format, antigen type and specific antibody reinforce its predominance in different research areas of FMD, and this may replace the traditional methods in the near future. This study was conducted to design an ELISA system to measure the antibody produced in guinea pigs immunized with FMD virus. The purified FMD virus was obtained and then protein concentration of FMD solution was measured. Immunization of 5 guinea pigs was done and then blood sample was taken for obtaining serum. Ouchterlony test was used and finally the ELISA system was designed. Protein concentration was 3.5 mg/ml. By conducting ouchterlony test, the sediment lines between the serum and the antigen of the FMD virus were formed. Using ELISA and optimizing the conditions, the optimal concentration of antigen was 1 µg/well and a serum dilution of 1: 100 was achieved. In the ELISA system, the standard deviation was 0.35 and the cutoff value was 1.03, So that, the samples above absorbance of 1.03 are positive and the samples less than absorbance of 1.03 are negative. The in house ELISA can be used to measure the antibody produced in guinea pigs immunized with FMD virus, which can using for suitable and cost effective laboratory diagnostic tests.

Key words: Foot-and-mouth disease, ELISA, guinea pigs, Ouchterlony

مقدمه

تب برفکی یا بیماری دهان و پا[1] یك بیماری عفونی و گاهی کشنده ویروسی است که موجب بیمار شدن حیوانات زوج سم از جمله گاو اهلی و اعضای خانواده گاوسانان می‌شود. عامل بیماری، ویروسی از خانواده پیکورنا ویریده جنس آفتوویروس است. این بیماری بسیار سریع به حیوانات سالم انتقال می‌یابد و موجب خسارات اقتصادی شدیدی می‌گردد و به همین خاطر در لیست بیماری‌های دامی از لحاظ شیوع، انتقال و مرگ و میر در درجه اول اهمیت قرار گرفته است (۳، ۶، ۱۴).

ویروس تب‌برفکي در مجموع ده پروتئین غیرساختمانی کامل دارد. ژنوم ویروس تب‌برفکي کوچک است و سرعت جهش بالا و خودبه‌خودی دارد. در ویروس تب‌برفکي، پروتئین‌های ساختاری متغیر بیش از پروتئین‌های غیرساختاری است. جهش و حذف در پروتئین‌های ساختاری ممکن است به ویروس تب‌برفکي جهت فرار از پاسخ ایمنی تولید شده توسط میزبان کمک کنند (۸).

با توجه به تنوع آنتی‌ژنیکی سویه‌ها، مبارزه و کنترل بیماری مشکل است چرا که بهبودی از آلودگی یا مایه‌کوبی حمایتی علیه یک سروتیپ، آلودگی و عفونت با سایر سروتیپ ها را تضمین نمی‌کند (۱۸ و ۱۷). نکته قابل ذکر در مورد تب برفکی این است که بعد از مرحله حاد ویروس به صورت زنده در غده لنفاوی پشت حلقی باقی مانده و باعث ناقل شدن دام می‌گردد. این حالت در حیوانات رو به بهبود و یا در حیوانات

مایه‌کوبی شده‌ای که ویروس زنده را بروز می‌دهند آشکار می‌شود (۲۸). از جمله خصوصیات ویروس تب‌برفکي تغییرات شدید آنتی‌ژنیکی آن است که همواره در مناطقی که بیماری به فرم بومی حضور دارد، سبب پیدایش گونه‌های جدید و حتی بوجود آمدن تحت تیپ‌های جدید در هر سویه می‌شود. از جمله عوامل بروز این رخداد در مناطق آلوده به ویروس تب‌برفکی یکی ماهیت ویروس و دیگری چرخش ویروس در جمعیت‌های دارای سطوح ایمنی متفاوت ناشی از ناهمگونی و همزمان نبودن زمان مایه‌کوبی در آن‌ها است که شرایط جهش را برای ویروس فراهم می‌سازد (۲۲ و ۵).

در بین سویه‌های هفت‌گانه ویروس بیماری تب‌برفکی، تیپ A بیشترین زمینه تغییرپذیری و ایجاد گونه‌های جدید را از خود نشان داده است. سایر تیپ‌های ویروس از جمله O و Asia۱ تغییرپذیری کمتر و محدودتری دارند (۱۲ و ۷).

RNA تک رشته‌ای ویروس مسئول عفونت‌زایی و پروتئین‌های ساختمانی ۱Vp، ۲Vp، ۳Vp و ۴Vp مسئول ایمنی‌زایی ویروس هستند که در بین آن‌ها ۱Vp نقش مهم‌تری در ایجاد بیماری دارد (۱۵).

بهبودي دام مبتلا به تب برفكي با ايجاد پادتن در ارتباط است. آنتي‌بادي IgM كه در مراحل اوليه عفونت توليد مي‌شود اولين آنتي‌بادي است كه برعليه ويروس تب‌برفكي ايجاد مي‌گردد. اين آنتي‌بادي چهار روز پس از آلودگي قابل تشخيص مي‌باشد. آنتي بادي‌هاي IgM اوليه نوع هومولوگ ويروسي را خنثي مي‌كند، بنابراين ابتلا به يك تيپ ايمني در برابر ساير سروتيپ‌هاي ديگر را ايجاد نمي‌كند ولي از شدت بروز علائم باليني ناشي از ابتلا به ساير سروتيپ‌ها مي‌كاهد. آنتي‌بادي IgG كه در دوره نقاهت بيماري توليد مي‌شود اختصاص تيپ است و با درجات متفاوتي، اختصاصي تحت تيپ نيز مي‌باشد (۱).

در مورد نقش ايمني سلولي در بهبودي از بيماري اطلاعات كمي وجود دارد، اما تصور مي‌شود نقش اندكي در بهبودي دام مبتلا داشته باشد. تعيين دوام ايمني به دنبال عفونت طبيعي مشكل است. گاوهايي كه از بيماري تب‌برفكي بهبود يافته‌اند، معمولاً در برابر عفونت با همان تيپ براي يك سال و يا بيشتر ايمن هستند اما ايمني در برابر بيماري تا آخر عمر دوام ندارد. دام‌هاي بهبود يافته ممكن است به تيپ ديگري مبتلا شوند و علائم بيماري را بروز دهند. توليد آنتي‌بادي IgG در دوران نقاهت بيماري قادر به خنثي كردن تيپ‌هاي ويروسي به طور اختصاصي است و تا حدي هم برعليه تحت تيپ‌ها مؤثراست (۲۰).

انواع مختلف واکسن قابل استفاده است، ولی واکسن ویروس غیرفعال تب‌برفکی که در کنترل و ریشه‌کن‌سازی بیماری تبرفکی در اکثر کشورها و مناطق همه‌گیری[۲] آن به دلیل قدرت حفاظت کامل هنوز هم نقش کلیدی ایفا می‌کند. قدرت حفاظت از مشکلات جدید ناشی از واکسن غیرفعال تب‌برفکی است که برای تمایز حیوانات آلوده واکسینه شده دشوار است (۱۰ و ۹).

در اين راستا و با هدف دستيابي به واكسني با كارايي بالاتر نياز به سيستمي جهت تشخيص ايمني مي‌باشد، لذا بررسی پادتن علیه ویروس تب‌برفكي در خوكچه هندی به عنوان حیوان مدل ضروری است تا آلوده نبودن حیوان به ویروس تب برفكي توسط سيستم الايزا ارزيابي شده و در مراحل بعدی بتوان از آن برای تست واکسن‌های تهیه شده استفاده نمود.

با توجه به این که نیاز به یک روش ایمنی‌شناسی مناسب جهت بررسی خوکچه‌های هندی از جهت بیمار بودن و یا سالم بودن می‌باشد، این تحقیق به بررسی پادتن علیه ویروس تب‌برفکی در خوکچه هندی به روش الایزا، می‌پردازد که با این روش حیوان آزمایشگاهی از نظر بیمار بودن یا نبودن مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. در نهایت، هدف بررسی سیستم ایمنی خوکچه هندی در برابر تب‌برفکی با روش الایزا و تشخیص خوکچه سالم از خوکچه بیمار به عنوان حیوان مدل است چرا که ضروری است تا آلوده نبودن حیوان به ویروس تب برفكي ارزيابي گردد.

مواد و روش‌ها

تهیه ویروس تب‌برفکی

ویروس تب‌برفکی تخلیص شده از بخش واکسن تب برفکی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی دریافت شد.

پروتئین‌سنجی

مقدار پروتئین ویروس تب‌برفکی، با استفاده از پروتئین استاندارد سرم آلبومین گاوی[۳] به روش Lowry، پروتئین سنجی شد (۴).

ایمن‌سازی خوکچه‌های هندی

برای این منظور ویروس تخلیص‌شده تب برفکی به صورت مخلوط شده در تزریق اول با ادجوانت فروند کامل[۴] و دو تزریق بعد با ادجوانت فروند ناقص در چندین مرحله به صورت جداگانه به خوکچه‌ها تزریق گردید. برای تحریک سیستم ایمنی خوکچه‌ها سه مرحله تزریق با فواصل زمانی مشخص انجام گرفت. بدین منظور پنج سر خوکچه هندی نر سفید رنگ با وزن حدود ۴۰۰-۵۰۰ گرم انتخاب شدند و در آزمایشگاه در محل نگهداری حیوانات در یک قفس با برچسب مشخص با ذکر مشخصات خوکچه‌ها، شماره قفس، تاریخ تزریق، نوع ماده تزریق نگهداری گردید و روزانه ظرف غذا و آب خوکچه‌ها بررسی گردید. طي اين مدت از سلامت و روند طبیعی فیزیولوژی خوکچه‌ها اطمینان حاصل شد تا مشکلی از جهت سلامتی و شرایط پس از تزریق برای آن‌ها وجود نداشته باشد. تزریق برای هر خوکچه به صورت ذیل انجام گرفت:

خوکچه ۱: مقدار ۲۵ میکرولیتر ویروس (معادل ۱۰۰ µg) با ۲۷۵ میکرولیتر سالین و ۳۰۰ میکرولیتر ادجوانت.

خوکچه ۲: مقدار ۵۰ میکرولیتر ویروس (معادل ۱۷۵ µg) با ۲۵۰ میکرولیتر سالین و ۳۰۰ میکرولیتر ادجوانت.

خوکچه ۳: مقدار ۱۰۰ میکرولیتر ویروس (معادل ۳۵۰ µg) با ۲۰۰ میکرولیتر سالین و ۳۰۰ میکرولیتر ادجوانت.

خوکچه ۴: مقدار ۱۵۰ میکرولیتر ویروس (معادل ۵۰۰ µg) با ۱۵۰ میکرولیتر سالین و ۳۰۰ میکرولیتر ادجوانت.

خوکچه ۵: ۳۰۰ میکرولیتر ویروس (معادل ۱۰۰۰ µg) با ۳۰۰ میکرولیتر ادجوانت بدون سالین.

طبق روش‌های استاندارد جهت تهیه پادگن محلول تزریقی حاصل چندین بار هم زده شد تا حالت ژلاتینی و یکنواخت پیدا کند و مخلوط همگنی به رنگ سفید و غلیظ به دست آید. حجم نهایی هر ۵ نمونه بعد از مخلوط کردن به ۶۰۰ میکرولیتر رسید. فواصل بین هر مرحله تزریق

دو هفته در نظر گرفته شد و با فاصله ۱۲ روز پس از آخرین تزریق خون‌گیری انجام گرفت.

تزریق با ادجوانت کامل فروند

برای تزریق اول با ادجوانت کامل، ابتدا موضع تزریق (ماهیچه ران خوکچه‌ها) با الکل ضدعفونی شد و سپس به ترتیب به هر خوکچه با توجه به نشانه‌گذاری‌ها دوز مناسب تزریق صورت گرفت.

تزریق پادگن با ادجوانت ناقص

جهت بالا بودن سطح ایمنی، دو مرحله تزریق با ادجوانت ناقص انجام شد. برای تزریق پادگن با ادجوانت ناقص مقادیر مورد استفاده برای تمامی خوکچه‌ها مشابه مرحله تزریق با ادجوانت کامل بود، با این تفاوت که از ادجوانت ناقص در تمامی ۵ مرحله آماده‌سازی استفاده شد تا حجم کلی هر کدام به ۶۰۰ میکرولیتر برسد.

تزریق پادگن با ادجوانت ناقص (بوسترسازی)

تزریقات در عضلات پای حیوان (ران) صورت گرفت که پس از استریل کردن محل تزریق، تزریق انجام شد. مقدار محلول تزریق شده ۶۰۰ میکرولیتر، شامل ویروس، ادجوانت ناقص فروند و سالین بود.

خون‌گیری از خوکچه‌ها

پس از انجام چهار مرحله تزریق، ابتدا با ادجوانت کامل فروند و سپس ادجوانت ناقص، برای انجام آزمایش اکترلونی[۵]، از سرم خوکچه‌های ایمن شده، استفاده شد. برای تهیه سرم، پس از گذشت ۴۰ روز از زمان اولین تزریق (۱۲ روز پس از تزریق ثانویه)، خون‌گیری از قلب خوکچه‌ها توسط ونوجکت و به آرامی انجام گرفت. خون‌ها در لوله‌های استریل با درج مشخصات بر روی هر لوله جمع‌آوری شدند و به مدت ۲۴ ساعت در یخچال قرار گرفت و پس از سانتریفیوژ سرم‌ها جدا گردید. بعد از جداسازی سرم‌ها تا زمان آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

اکترلونی

برای انجام تست اکترلونی، ۱/۲ گرم آگار در ۱۰۰ میلی لیتر، بافر فسفات (PBS) ریخته شد، سپس با استفاده از گرم کن الکتریکی، آگار به خوبی در محلول حل گردید. در ادامه محلول حاصل در چهار پتری دیش تقسیم شد و پتری دیش‌ها در یخچال قرار گرفت تا آگار سرد گردند. سپس چاهک‌ها در ژل ایجاد شدند. برای انجام آزمایش ابتدا محلول پادگن، محلول خام نمونه‌ها و نیز رقت‌هایی از سرم خوکچه به نسبت‌های ۱:۴، ۱:۵، ۱:۸ و ۱:۱۶ با محلول PBS تهیه شد. پس از خون‌گیری از خوکچه‌ها و جداسازی سرم‌ها، تست اکترلونی انجام گرفت. پادگن در چاهک مرکزی ریخته شد و سرم‌ها با این رقت‌های ذکر شده در چاهک‌های اطراف چاهک مرکزی ریخته شدند. پتری دیش‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور قرار گرفت و سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق قرار گرفتند. پس از ۲۴ ساعت با کوماسی بلو به مدت ۶۰ دقیقه رنگ‌آمیزی و سپس با محلول رنگ بر رنگ‌زدایی شدند. پتری دیش‌ها[۶] پس از رنگ‌بری، از نظر ایجاد رسوب که نشانه برهم‌کنش بین پادگن و پادتن است، بین چاهک‌های مرکزی و رقت‌های پادتن مورد بررسی قرار گرفتند (۱۲ و ۲).

طراحی سیستم الایزا
پلیت متقاطع تیتراسیون (چکر بورد[۷])

پلیت متقاطع تیتراسیون جهت تعیین غلظت ویروس تب‌برفکی (پادگن) و تعیین بهترین رقت سرم (پادتن) انجام شد. برای انجام تست الایزا، نمونه سرم خون به چاهک‌ها افزوده شد که در صورت حضور پادتن در سرم خون کمپلکس پادگن-پادتن تشکیل شده و در مرحله بعدی با اضافه نمودن کونژوگه شامل پادتن ثانویه کوبل شده به آنزیم (Anti guineapic-HRP conjugate) این کمپلکس شناسایی شد. با افزودن سوبسترای اختصاصی آنزیم، واکنش رنگ‌زا صورت می‌گیرد که جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر با الایزا ریدر خوانده شد. در نهایت انحراف معیار نمونه‌ها محاسبه گردید و در مرحله بعد با استفاده از انحراف معیار بدست آمده و میانگین جذب‌ها، بوسیله فرمول:

Cut off = Mean−1/2SD

حد آستانه محاسبه شد (۱۶).

اجرای الایزا

روش اجرا، به صورت الایزای غیر مستقیم انجام گرفت. بافر پوشاننده (کوتینگ[۸] ؛ کربنات و بی‌کربنات) با مخلوط ۰/۰۵ مولار کربنات و ۰/۰۵ مولار بی‌کربنات در pH برابر ۹/۶ ساخته شد. در این بافر، پادگن (ویروس تب‌برفکی) رقیق شد، به طوری که فرایند رقیق‌سازی پادگن با بافر پوشاننده با رقت‌های ۱:۲، ۱:۴، ۱:۸ تا ۱:۱۰۲۴ و با مقدار ۱۰۰ میکرولیتر در هر چاهک انجام شد. پلیت با فویل پوشانده شد و به یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از این فرایند، تمام محتویات داخل پلیت خالی شد و عمل شستشو با PBST (مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از PBS ۱۰ میلی‌مولار با pH برابر ۷/۲، حاوی ۰/۰۵ درصد توئین ۲۰) در سه مرحله انجام گرفت. از پروتئین skim milk ۵٪ جهت مسدود کردن فضاهای خالی بین مولکول‌های پادگن موجود در کف چاهک‌ها استفاده شد و به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. بعد از گذشت زمان فوق، محلول مسدود کننده تخلیه گردید. چهار مرحله شستشوی مجدد بعد از پایان زمان مرحله مسدودکننده صورت گرفت و در مرحله بعد سرم‌ها با رقت‌های ۱:۲۵، ۱:۵۰، ۱:۱۰۰ و ۱:۲۰۰ با بافر رقیق کننده (ترکیبی از PBST و Skim milk ۱٪) تهیه شدند و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از آن در دمای اتاق به مدت ۷۵ دقیقه گرم‌خانه گذاری شد. پس از پایان گرم‌خانه گذاری، پلیت چهار بار شستشو شد و خشک گردید. در ادامه، کنژوگه HRP Rabbit Anti-Guinea pig (IgG) با رقت ۱:۴۰۰۰۰ اضافه شد. بعد از افزودن کنژوگه، به مدت ۷۵ دقیقه گرم‌خانه گذاری انجام گرفت. پس از این مرحله، پنج مرتبه شستشو صورت گرفت و پلیت خشک شد. در ادامه ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترا اختصاصی BM Blue به همه چاهک‌ها اضافه شد و به مدت ۲۰-۳۰ دقیقه در دمای اتاق در تاریکی قرار گرفت. بعد از طی شدن مدت زمان مورد نظر محلول متوقف کننده (۵۰ میکرولیتر از اسید سولفوریک یک نرمال) اضافه شد و بلافاصله جذب نوری توسط دستگاه خوانش جذب نوری الایزا با طول موج ۴۵۰ نانومتر

خوانده شد (۱۶).

تعداد ۳۳ نمونه طی دو الایزای جداگانه مورد سنجش قرار گرفت، که هر مرحله دارای ۳۳ عدد چاهک بود. علاوه بر این تعداد نمونه، در هر مرحله یک سرم منفی و یک سرم مثبت نیز به همراه دو چاهک به عنوان نمونه شاهد در نظر گرفته شد تا در هر مرحله جذب نمونه‌های مجهول با جذب کنترل‌ها مقایسه شود. تمامی مراحل الایزا در این دو مورد مانند هم بودند.

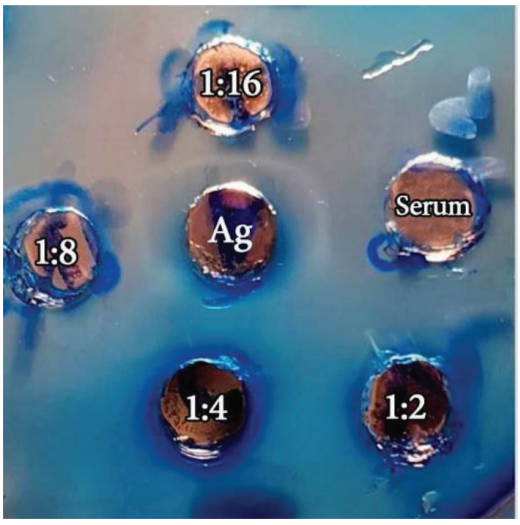
نتایج

سنجش میزان پروتئین

پس از اندازه‌گیری جذب نوری هر یک از محلول‌ها در طول موج ۷۵۰ نانومتر، غلظت پروتئین نهایی، ۳/۵ ml/mg تعیین شد.

تست اکترلونی

تست اکترلونی جهت بررسی واکنش ایمنی‌زایی پادگن‌ها با رقت‌های ۱:۲، ۱:۴، ۱:۸ و ۱:۱۶ برای سرم‌ها انجام گرفت. با لود شدن نمونه‌ها داخل چاهک‌ها به صورتی که در مرکز، پادگن ویروس تب‌برفکی و در خانه اول کناری سرم بدون رقت و در چاهک‌های دیگر سرم رقیق شده ریخته شد، خطوط رسوبی میان سرم و پادگن ویروس تب‌برفکی تشکیل گردید. واکنش ترسیب ناشی از برهم کنش پادگن و پادتن تا تیتر ۱/۴ پاسخ مثبت داشتند که در شکل ۲ نمایش داده شده است.



شکل ۱- اکترلونی سرم‌ها.

چکر بورد

غلظت بهینه پادگن ویروس تب برفکی ۱۰ µg/well و رقت آنتی‌بادی ۱:۱۰۰ بدست آمد (جدول ۱).

الایزا

با انجام الایزای غیرمستقیم، تشکیل کمپلکس پادگن-پادتن براي پادگن کوت‌شده و پادتن ردیابی شده، صورت گرفت. از تعداد ۳۳ نمونه تست شده با توجه به میزان حد آستانه (۱/۰۳)، تعداد ۱۷ سرم مثبت و تعداد ۱۶ سرم منفی بدست آمد. با بدست آوردن انحراف معیار ۱/۰۳ براي نمونه‌هاي مثبت، مشخص شد که نمونه‌های بالاتر از جذب نوری ۱/۰۳ نمونه‌های مثبت هستند و نمونه‌های پائین تر از جذب نوری ۱/۰۳ نمونه‌های منفی هستند.

سنجش Inter برای نمونه‌های کنترل با حد بالا و پایین مطابق جدول ۲ بدست آمد. میانگین، انحراف معیار و ضریب تغییرات برای حد بالا به ترتیب برابر ۱/۴۶، ۰/۶۷ و ۰/۴۶ و برای حد پایین نیز به ترتیب برابر ۰/۲۷۶، ۰/۲۰۳ و ۰/۷۳۵ بدست آمد. در نهایت میانگین حد بالا و پایین برای ضریب تغییرات کنترل مقدار ۰/۳۱ محاسبه شد.

الایزا

سنجش Intra برای نمونه‌های کنترل با حد بالا و پایین مطابق جدول ۳ بدست آمد. میانگین، انحراف معیار و ضریب تغییرات برای حد بالا به ترتیب برابر ۱/۳۳۹، ۰/۰۴۶۸ و ۰/۰۳۵ و برای حد پایین نیز به ترتیب برابر ۰/۱۳۴۵، ۰/۰۰۹ و ۰/۰۶۷ بدست آمد. در نهایت میانگین حد بالا و پایین برای ضریب تغییرات کنترل مقدار ۰/۰۵۱ محاسبه شد

در سنجش Intra، مقدار CV حاصل ۰/۰۵۱ درصد و در سنجش Inter، مقدار CV حاصل ۰/۵۹ درصد بدست آمد. در نتیجه می‌توان اظهار داشت که تست الایزای حاصل از دقت بالایی برخوردار است و ماندگاری بالایی دارد و جهت استفاده در آزمایشات معمول کاملاً مناسب می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیري

بیماری تب‌برفکی یکی از مهم‌ترین بیماری‌های ویروسی و واگیردار دام‌های اهلی و وحشی است که به آسانی منتشر می‌گردد و خسارات قابل توجهی به بخش دامداری و دام‌پروری کشورها وارد می‌کند. تب‌برفکی در کشور ایران بیماری بومی محسوب می‌شود و گاهی همه‌گیری‌های آن باعث خسارات سنگینی می‌گردد. تشخیص ویروس تب‌برفکی با توجه به سرعت انتشار آن بسیار با اهمیت است چرا که اگر این تشخیص دیرتر از حد معمول انجام پذیرد ویروس مناطق وسیعی را اشغال می‌کند و سبب خسارات اقتصادی بیشتری می‌گردد، همچنین مبارزه با آن هزینه زیادی در بر خواهد داشت (۱۹).

از آزمایش‌های مهم تشخیصی که هم اکنون در آزمایشگاه‌های مرجع انجام می‌گیرد آزمایش الایزا است. برای انجام آزمایش از الایزای غیرمستقیم استفاده می‌گردد که در این آزمایش از پادتن‌های اختصاصی سروتیپ‌های ویروس تب‌برفکی استفاده می‌شود. این پادتن‌ها در خرگوش و خوکچه هندی تهیه می‌گردد. از خصوصیات پادتن‌های تهیه شده این است که علاوه بر خالص‌بودن، اختصاصی برای تعیین سروتیپ می‌باشند (۲۳).

هزینه‌های پیشگیری و درمان‌های کمکی بیماری تب برفکی زیاد است و برای خرید واکسن سالانه میلیاردها تومان هزینه صرف می‌شود. بنابراین طراحی آزمایشات مفید (از جمله الایزا) جهت سنجش فاکتورهای مختلف مانند پادتن‌های تولیدشده با ویروس تب‌برفکی می‌تواند ارزشمند باشد و

هزینه‌های پیشگیری و درمان را کاهش دهد.
برای حرکت در مسیر کنترل و ریشه‌کنی بیماری، باید تشخیص بیماری به موقع و درست انجام گیرد. امروزه با وجود امکانات آزمایشگاهی متنوع می‌توان این امر را محقق ساخت. با طرح‌ریزی تحقیقات مانند پژوهش حاضر می‌توان راه‌کارهای مناسبی را جهت شناخت بیماری تب‌برفکی و بسط اطلاعات در زمینه این بیماری فراهم ساخت.
برای تشخیص بیماری نشان دادن وجود پادگن ویروس در نمونه‌ها کافی است. برای این منظور می‌توان از آزمایش ثبوت مکمل استفاده کرد که یک آزمایش قدیمی است و امروزه در بیشتر آزمایشگاه‌ها، آزمایش الایزا جایگزین آن شده است. در نتیجه در این تحقیق نیز از الایزا استفاده شد. به دلیل اینکه حساسیت و اختصاصیت الایزا بیشتر از آزمایش ثبوت مکمل است و تحت تاثیر عوامل دخیل در ثبوت مکمل نیز قرار نمی‌گیرد (۱۸).
استفاده از آزمون الایزا زمانی مهم می‌شود که برای تشخیص بیماری به علت خفیف‌بودن بیماری یا قدیمی بودن آن نمی‌توان از بافت اپی‌تلیوم یا مایعات تاولی استفاده کرد و نشان دادن وجود پادتن خاص بیماری، می‌تواند راه تشخیص باشد. با این وجود در حیواناتی که واکسن خورده‌اند و یا قبلاً با عفونت مواجه شده‌اند این نوع تشخیص با مشکل مواجه است، زیرا در این حالت وجود پادتن نمی‌تواند نشانگر وجود بیماری باشد.

جدول ۱- جذب نمونه‌های پلیت متقاطع تیتراسیون ویروس تب برفکی .

غلظت آنتی ژن (µg/well) / رقت سرم‌ها	۱ µg/well -	۱ µg/well +	۱۰ µg/well -	۱۰ µg/well +	۲۰ µg/well -	۲۰ µg/well +
۱:۲۵	۰/۶۲۲	۱/۱۷۴	۰/۵۸۳	۱/۵۰۰	۰/۵۳۰	۱/۸۸۵
۱:۵۰	۰/۶۳۵	۱/۰۶۸	۰/۶۳۵	۱/۳۲۳	۰/۵۶۰	۱/۶۴۳
۱:۱۰۰	۰/۶۱۱	۱/۰۰۴	۰/۵۳۷	۱/۲۱۲	۰/۵۰۵	۱/۶۵۶
۱:۲۰۰	۰/۶۴۹	۱/۹۱۷	۰/۶۱۸	۱/۱۳۲	۰/۵۷۶	۱/۵۳۶

جدول ۲- نتایج سنجش Inter برای نمونه‌های کنترل با حد بالا و پایین.

میانگین	شماره پلیت	نتیجه ۲	نتیجه ۱	کنترل
۱/۰۸۶	۱	۰/۹۹۳	۱/۱۸۰	بالا
۰/۹۴۱	۲	۰/۹۱۸	۰/۹۶۴	بالا
۱/۳۸۳	۳	۱/۳۳۰	۱/۴۳۶	بالا
۲/۴۳۲	۴	۲/۳۵۲	۲/۵۱۷	بالا
۰/۲۸۰	۱	۰/۲۶۵	۰/۲۹۶	پایین
۰/۲۰۶	۲	۰/۱۹۴	۰/۲۱۸	پایین
۰/۳۷۱	۳	۰/۳۵۱	۰/۳۹۱	پایین
۰/۴۹۷	۴	۰/۴۸۶	۰/۵۰۹	پایین

Inter assay = average of high and low control CV = 0.46 + 0.735/ 2 = 0.41
Inter assay %CVs of less than 15 are generally acceptable

مزیت دیگر آزمایش الایزا سریع‌بودن آن و وابسته نبودن آن به کشت سلولی است. این نوع الایزا را می‌توان با استفاده از پادگن کشته نیز انجام داد (۲۳).

در سال‌های اخیر با معرفی واکسن‌های خالص که پروتئین‌های غیرساختاری در آنها موجود نیز یا مقدار آن کم است امکان جداسازی ایمنی حاصل از واکسیناسیون و آلودگی طبیعی فراهم شده است. بنابراین اگر در این سرم‌ها ایمنی در مقابل پروتئین‌های غیرساختاری وجود داشت، ایمنی به آلودگی طبیعی مربوط می‌شود و در غیر این صورت ایمنی مربوط به واکسن می‌گردد. امروزه مطالعات زیادی در زمینه پروتئین‌های تب برفکی و کارایی آنها در جهت ساخت واکسن‌های جدید انجام گرفته است، در مواردی با بررسی غالب پروتئین تب برفکی، راه‌کارهایی در جهت ایجاد واکسن اتخاذ شده است (۲۶ و ۲۵).

همانند بسیاری از بیماری‌ها، استفاده از واکسن و واکسیناسیون دام‌های حساس یکی از راه‌های پیشگیری و کنترل بیماری تب برفکی است. با این همه کنترل بیماری با استفاده از واکسن پیچیدگی‌های خاص خود را دارد به دلیل اینکه واکسنی که با استفاده از یک سروتیپ ساخته می‌شود، نمی‌تواند در مورد سروتیپ دیگر موثر باشد و همچنین در داخل هر یک از سروتیپ‌های ویروس، سویه‌هایی از آنها یافت می‌شود که از نظر ایمنی‌زایی یا پادگنی از سایر سویه‌های آن سروتیپ کاملاً متفاوت است (۱۰ و ۵).

در مطالعه‌ای با ساخت ناقل حاوي غالب اپي‌توپ‌هاي سرم‌شناسی ویروس تب‌برفکي که توالي‌هاي آمينواسيدي $VP1_{141-160}$ و $VP1_{200-213}$ بوده باعث القاء پاسخ پادتن خنثي کننده در خوکچه‌هاي هندي و برخي از گوساله‌ها شدند (۲۵). در تحقیق حاضر نیز غالب پروتئین تب‌برفکی باعث القاء پاسخ آنتي‌بادي در خوکچه‌هاي هندي شد.

تاکودا و همکارانش جهت شناسايي ميزان پادتن‌های تولید شده علیه ویروس تب‌برفکی از تست هماگلوتیناسیون با گلوتار آلدئید استفاده کردند. در اين آزمايش از خوکچه هندي، گوسفند، گاو و خوك استفاده شد. بيشترين ميزان توليد پادتن در سرم خوکچه هندي مشاهده گرديد که نشان‌دهنده اين موضوع است که خوکچه هندي بهترين حيوان آزمايشگاهي است که مي‌تواند پادتن اختصاصي عليه ويروس تب‌برفکي توليد نمايد و بدين ترتيب يک مدل حيوانی بسيار مناسب جهت انجام تحقيقات تب‌برفکی معرفی شد (۲۷). در این مطالعه نیز از خوکچه هندی استفاده شد تا بیشترین میزان تولید آنتي‌بادي در سرم بدست بیاید. بررسی‌های گسترده در حیوانات کوچک آزمایشگاهی برای استفاده در تحقیقات تب‌برفکی در اوایل قرن ۲۰ آغاز شد و محققین در سال ۱۹۲۰ با تلقیح بین پوستی در کف پای خوکچه هندی دریافتند که این گونه حساس می‌باشد. به علاوه خوکچه هندی می‌تواند به تعداد زیاد مورد استفاده قرار گیرد که از نظر آماری نتایج قابل قبولی را بدست می‌دهد (۲۴).

لیانا در سال ۲۰۱۱ با بررسی تکنیک الایزا و RT-PCR براي ويروس تب‌برفکي نشان داد که در تمام شکل‌های الایزا برای ویروس تب‌برفکی، الایزای رقابتی دارای خاصیت بالایی هستند و دو تکنیک RT-PCR و الایزا به دلیل حساسیت بالا بهترین روش‌ها برای تشخیص بیماری تب‌برفکی هستند (۲۱).

فنگ و همکارانش در سال ۲۰۱۶، از پادگن ویروس تب‌برفکی سروتیپ O۱۴۶S برای تولید واکسن با استفاده از الایزای ساندویچ استفاده کردند. آنها نشان دادند که این روش می‌تواند برای تعیین عملکرد پادگن موثر در واکسن‌های غیرفعال شده استفاده شود و بدین ترتیب نشان‌دهنده

جدول ۳- نتایج سنجش **Intra** برای نمونه‌های کنترل با حد بالا و پایین

میانگین	شماره پلیت	نتیجه ۲	نتیجه ۱	کنترل
۱/۳۱۷	۱	۱/۲۳۳	۱/۴۰۰	بالا
۱/۳۲۲	۲	۱/۰۱۲	۱/۶۳۲	بالا
۱/۴۰۹	۳	۱/۸۵۹	۱/۹۵۹	بالا
۱/۳۰۹	۴	۰/۹۳۴	۱/۶۸۴	بالا
۰/۱۳۸	۱	۰/۱۲۳	۰/۱۵۳	پایین
۰/۱۳۱	۲	۰/۱۳۳	۰/۱۲۹	پایین
۰/۱۴۵۵	۳	۰/۱۳۲	۰/۱۵۹	پایین
۰/۱۲۳۵	۴	۰/۱۲۴	۰/۱۲۳	پایین

Intra assay = average of high and lowcontrol CV = 0.035 + 0.067 / 2 = 0.051

Intra assay % CVs of less than 10 are generally acceptable

جایگزینی برای ارزیابی قدرت واکسن‌های ساخته شده در آزمایشگاه باشد (۱۱).

در تحقیقی که توسط وانگ و همکارانش انجام گرفت، حفاظت در برابر ویروس تب‌برفکي در خوکچه هندی از طریق استفاده از پروتئین VP۱ بیان شده را بررسی کردند. با بدست آمدن نتایج مشخص شد که پروتئین نوترکیب pSIP۴۱۱-VP۱ به طور قابل ملاحظه ایمنی محافظت در مقابل ویروس تب برفکی را در خوکچه‌های هندی بهبود می‌بخشد (۲۸).

پاورقی ها

1 - Foot-and-Mouth Disease; FMD.
2 - Epidemic.
3 - Bovine serum albumin; BSA.
4 - Freund's Complete Adjuvant.
5 - Ouchterlony.
6 - Petri dish.
7 - Checkerboard.
8 - Coating buffer.

منابع مورد استفاده

1.Abu Elzein, E. M. and J. R. Crowther. 1981. Detection and quantification of IgM, IgA, IgG1 and IgG2 antibodies against foot-and-mouth disease virus from bovine sera using an enzyme-linked immunosorbent assay. *J Hyg* 86(1): 79-85.

2.Alizadeh, H., R. Madani, M. Babaie, N. Kavid, F. Golchinfar, and T. Emami. 2012. Preparation and purification of polyclonal antibodies against Mycobacterium avium paratuberculosis antigens in rabbit. *J Fasa Univ Med Sci* 2(3):168-173.

3.Azimi, S. M., H. Mahravani and M. Lotfi. 2020. Genetic and Antigenic Evaluation of Foot-and-mouth Disease Virus Type A in the Endemic Area of Iran within 2014-2015. *Archives of Razi Institute*. 75: 349-357.

4.Babaie, M., H. Zolfagharian, S. Jamili, and M. Zolfaghari. 2019. Biochemical, Hematological effects and complications of Pseudosynanceia melanostigma envenoming. *J Pharmacopuncture* 22(3): 7-11.

5.Bari, F.D., S. Parida, T. Tekleghiorghis, A. Dekker, A. Sangula, R. Reeve and et al. 2014. Genetic and antigenic characterisation of serotype A FMD viruses from East Africa to select new vaccine strains. *Vaccine* 32(44): 5794-5800.

6.Barnett, P. V. and S. J. Cox. 1999. The role of small ruminants in the epidemiology and transmission of foot-and-mouth disease. *Vet J* 158: 6-13.

7.Brito, B., S. J. Pauszek, M. Stenfeldt, C. Eschbaumer, H. C. de Carvalho Ferreira, L. T. Vu and et al. 2017. Phylodynamics of Foot-and-mouth disease virus O/PanAsia in Vietnam 2010-2014. *Vet Res* 48(1): 24-36.

8.Carrillo, C., Z. Lu, M. V. Borca, A. Vagnozzi, G. F. Kutish and D. L. Rock. 2007. Genetic and phenotypic variation of Foot-and-mouth disease Virus during serial passages in a natural host. *J Virol* 81(20): 11341-11351.

9.Di Giacomo, S., B. P. Brito, A. M. Perez, D. Bucafusco, J. Pega, L. Rodríguez and et al. 2015. Heterogeneity in the antibody response to Foot-and-mouth disease primo-vaccinated calves. *Transbound Emerg Dis* 62(3): 280-287.

10.Doel, T. R., L. Williams and P. V. Barnett. 1994. Emergency vaccination against foot-and-mouth disease: rate of development of immunity and its implications for the carrier state. *Vaccine* 12(7): 592-600.

11.Feng, X., J. W. Ma, S. Q. Sun, H. C. Guo, Y. M. Yang, Y. Jin and et al. 2016. Quantitative detection of the Foot-and-mouth disease virus serotype O 146S antigen for vaccine production using a double-antibody sandwich ELISA and nonlinear standard curves. *PLoS One* 11(3): 1-9.

12.Gao, Y., S. Sun and H. Guo. 2016. Biological function of Foot-and-mouth disease virus non-structural proteins and non-coding elements. *Virology J* 13: 107-117.

13.Hornbeck, P. 2017. Double-immunodiffusion assay for detecting specific antibodies (ouchterlony). *Curr Protoc Immunol.* 116: 1-8.

14.Hughes, G. J., V. Mioulet, R. P. Kitching, M. E. Woolhouse, A. I. Alexanderson. 2002. Foot-and-mouth disease virus infection of sheep: implications for diagnosis and control. *Vet Rec* 150: 724-727.

15.Jamal, S. M., G. J. Belsham. 2018. Molecular epidemiology, evolution and phylogeny of foot-and-mouth disease virus. *Infect Genet Evol* 59: 84-98.

16.Jin, M., G. Wang, R. Zhang, S. Zhao, H. Li, Y. Tan and et al. 2004. Development of enzyme-linked immunosorbent assay with nucleoprotein as antigen for detection of antibodies to avian influenza virus. *Avian Dis* 48(4): 870-878.

17.Kitching, R. P. 1998. A recent history of Foot-and-mouth disease. *J Comp Pathol* 118: 89-108.

18.Kitching, R. P., N. J. Knowles, A. R. Samuel, A. I. Donaldson. 1989. Development of Foot-and-mouth disease virus strain characterisiation-a review. *Trop Anim Health Prod* 21: 153-166.

19.Knight-Jonesa, T. J. D. and J. Rushton. 2013. The economic impacts of foot and mouth disease- What are they, how big are they and where do they occur? *Prev Vet Med* 112(3-4): 161-173.

20.Li, G., W. Chen, W. Yan, K. Zhao, M. Liu, J. Zhang and et al. 2004. Comparison of immune responses against Foot-and-mouth

disease virus induced by fusion proteins using the swine IgG heavy chain constant region or beta-galactosidase as a carrier of immunogenic epitopes. *Virol* 328(2): 274-281.

21.Li-na, M., J. Zhang, H. Chen, J. Zhou, Y. Ding and Y. Liu. 2011. An overview on ELISA techniques for FMD. *Virol J.* 8: 419-510.

22.Lloyd-Jones, K., M. Mahapatra, S. Upadhyaya, D. J. Paton, A. Babu, G. Hutchings and et al. 2017. Genetic and antigenic characterization of serotype O FMD viruses from East Africa for the selection of suitable vaccine strain. *Vaccine* 35(49): 6842-6849.

23.Longjam, N., R. Deb, A. K. Sarmah, T. Tayo, V. B. Awachat, V. K. Saxena. 2011. A brief review on diagnosis of Foot-and-mouth disease of livestock: Conventional to molecular tools. *Vet Med Int* 2011: 1-8.

24.Paton, D. J., K. J. Sumption and B. Charleston. 2009. Options for control of Foot-and-mouth disease: knowledge, capability and policy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364(1530): 2657-2667.

25.Rodríguez-Calvo, T., F. Díaz-San Segundo, M. Sanz-Ramos, N. Sevilla. 2011. A replication analysis of Foot-and-mouth disease virus in swine lymphoid tissue might indicate a putative carrier stage in pigs. *Vet Res* 42(1): 22-31.

26.Salt, J. S. 1993. The carrier state in foot and mouth disease-an immunological review. *Br Vet J* 149(3): 207-223.

27.Tukuda, G. and R. E. Warrington. 1970. Detection of foot and mouth disease virus antibodies. *American Soc Microbiol* 8: 35-39.

28.Van Bekkum, J. G., H. S. Frenkel, H. H. J. Frederisk and S. Frenkel. 1959. Observation on the carrier state of cattle exposed to Foot-and-mouth disease virus. *Bulletin de Office international des Epizooties* 51: 917-922.