



## ارزیابی مقایسه‌ای روش‌های ایمونوهیستوشیمیایی در تشخیص بیماری آنفلوآنزای 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

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. آنفلوآنزای 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<sup>۱</sup>) و ایمونوپراکسیداز غیر مستقیم (IIP<sup>۲</sup>) در مقایسه با روش استاندارد جداسازی ویروس در نمونه های بالینی مشکوک به آنفلوآنزا 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 آنفلوآنزا و نیز نمونه های بالینی مشکوک جهت جداسازی ویروس و تهیه مقاطع بافتی منجمد با استفاده از تامپون نگهدارنده OCT<sup>۳</sup> 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 H<sub>۹</sub>N<sub>۲</sub> 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: آنفلوآنزای 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.

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 immunofluorescence (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<sub>9</sub>N<sub>2</sub> 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 °C and then after at -70 °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 substantial 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<sub>9</sub>N<sub>2</sub> 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, Immunofluorescence Assay, Immunoperoxidase Assay



#### مقدمه

در بافت ها به کار می رود. از آنجائی که در مواقع شیوع و ظهور مجدد بیماری، جداسازی ویروس های آنفلوانزا از تمامی موارد وقت گیر می باشد، لذا می توان از روش های تشخیصی ایمنو هیستوشیمیایی برای ردیابی ویروس های آنفلوانزا در بافت های آلوده استفاده نمود (۲۴). حضور پادگن های اختصاصی در نمونه های بافتی تازه منجمد شده یا تعلیق سلولی تثبیت شده را می توان با استفاده از پادتن های اختصاصی متصل به آنزیم ها و رنگ ها تشخیص داد. نیاز اصلی در این تکنیک، در دسترس بودن شناساگر پادتن قابل اطمینانی می باشد که توسط فن آوری پادتن های مونوکلونال یا پلی کلونال بر ضد طیف وسیعی از پادگن ها با ماهیت پروتئینی تا گلیکوپروتئین های سلولی قابل تهیه و تولید انبوه می باشد. در آزمایش های ایمنو هیستوشیمیایی در صورتیکه از نمونه های کنترل مناسب استفاده شود به نتایج مثبت می توان اطمینان بالایی داشت اما نتایج منفی باید با احتیاط مورد ارزیابی قرار گیرند. از آزمایش های ایمنو هیستوشیمیایی می توان به تکنیک های ایمنوفلورسانس و ایمنوپراکسیداز اشاره کرد. با توجه به شیوع بیماری آنفلوانزای طیور در ایران و ضررهای اقتصادی ناشی از آن، تشخیص زود هنگام بیماری از اهمیت خاصی برخوردار می باشد (۳). در این تحقیق، توانایی تکنیک های ایمنو هیستوشیمیایی همچون آزمایش های ایمنوفلورسانس غیر مستقیم (IIF) و ایمنوپراکسیداز غیر مستقیم (IIP) در تشخیص عفونت های آنفلوانزا بررسی و با روش های کلاسیک ویرولوژیکی مانند جداسازی ویروس در تخم مرغهای جنین دار مقایسه شده است.

آنفلوانزای طیور یکی از مهمترین و خطرناکترین بیماریهای ویروسی می باشد که از سراسر دنیا گزارش شده است. ویروس های آنفلوانزا طیور جزء خانواده ارتومیکسوویریده می باشند و در دستگاههای تنفس، گوارش و اعصاب جایگزین شده که گاهی در طیور مرگ و میر شدیدی ایجاد می کنند. این بیماری در ماکیان و بوقلمون از فرم تحت بالینی یا عفونت خفیف دستگاه تنفس فوقانی تا بیماری حاد و کشنده می تواند متغیر باشد (۲). تشخیص بیماری آنفلوانزای طیور مبتنی بر انجام معاینات بالینی و یافته های کالبدگشایی و همچنین روش های آزمایشگاهی از قبیل آزمایش های ویروس شناسی مانند: جداسازی ویروس، آزمایش همآگلوتیناسیون (Test Hemagglutination)، خنثی سازی ویروس (Virus Neutralization)، میکروسکوپ الکترونی (Electronic Microscope) و آزمایش های سرولوژیکی مانند آزمایش ممانعت کننده از همآگلوتیناسیون (ELISA Hemagglutination Inhibition)، رسوب در ژل آگار (Agar Gel Percipitaion) و آزمایش های مولکولی مانند: آمیخته گری (Hybridization)، PCR و تعیین توالی اسید آمینه و آزمایش های ایمنو هیستوشیمیایی (Immuno Histochemical Techniques) مانند ایمنوفلورسانس (ImmunoFluorescence Assay) یا IF و ایمنوپراکسیداز (ImmunoPeroxidase Assay) یا IP می باشد (۲۴). آزمایش های ایمنو هیستوشیمیایی که جزء تکنیک های ایمنولوژیکی بوده، جهت ردیابی حضور پادگن های ویروسی

## مواد و روش کار

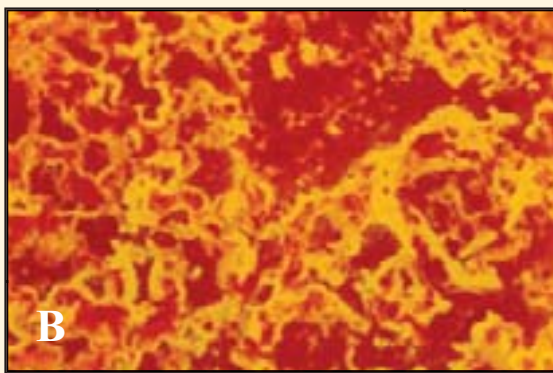
### الف- سویه ویروس و پادتن ها:

سویه ویروسی (H<sub>5</sub>N<sub>1</sub>)<sup>۱۰۳/۱۹۹۹</sup>-A/Chicken/Iran/ZMT-۱۰۳/۱۹۹۹، آنتی سرم اختصاصی تحت تیپ A ویروس آنفلوانزا، آنتی سرم اختصاصی تحت تیپ H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> ویروس آنفلوانزا، پادتن اختصاصی کونژوگه با FITC، پادتن اختصاصی کونژوگه با پراکسیداز، سوبسترا ۳' و ۳'-دی آمینو بنزیدین (DAB)، محلول بلوک کننده حاوی H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>، 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 آزمایش های HI و ELISA از نظر وجود پادتن ضد ویروس آنفلوانزای مرغی منفی بوده انتخاب شدند. به ۸ قطعه به عنوان گروه تحت آزمایش سویه ZMT-۱۰۳ تحت تیپ H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> ویروس آنفلوانزا با تیتراژ ۱۰<sup>۸/۵</sup> بر مبنای ELD<sub>50</sub> 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 از دیگر نمونه ها، برشهای سریالی 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 هیستوشیمیایی 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 پادگن های 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 در نمونه های 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 بافر گلیسرول (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 ویروس های آنفلوانزا استفاده می شد.

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)

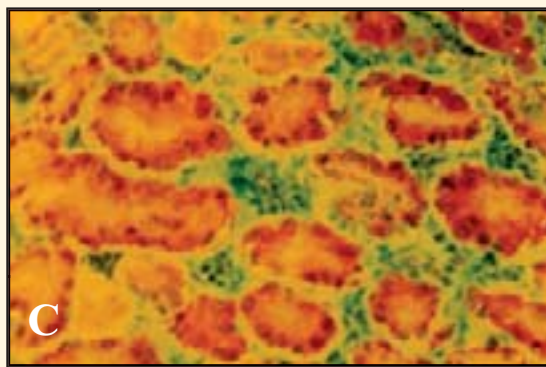
در هر کدام از پرنده های ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ کالبد گشائی شده متعلق به

گله های H, A, B, C, D, E, F, G

Tests		VI	IIF	IIP
جوجه ها ( مزرعه )				
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	-	-	-

تصویر ۱: واکنش مثبت پادتن پلی کلونال اختصاصی تیپ A آنفلوآنزا با پادگن های ویروسی در مقاطع بافت های نای (A)، ربه (B) و کلیه (C) منجمد در آزمایش ایمونوفلورسانس غیر مستقیم (IIF)

A



#### 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 (  $pH=7/6$  :  $1/8 \text{ mol/L}$  ) Tris-HCL به مدت ۵ دقیقه قرار داده شدند سپس ۳۰ میکرولیتر از آنتی سرم اختصاصی ضد تیپ A آنفلوآنزا رقیق شده را، روی مقاطع بافتی ریخته و در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت یک ساعت قرار داده شدند. بعد از اتمام آنکوباسیون، 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 سوپسترای DAB و پراکسیداز استفاده گردید. از محلول رنگ



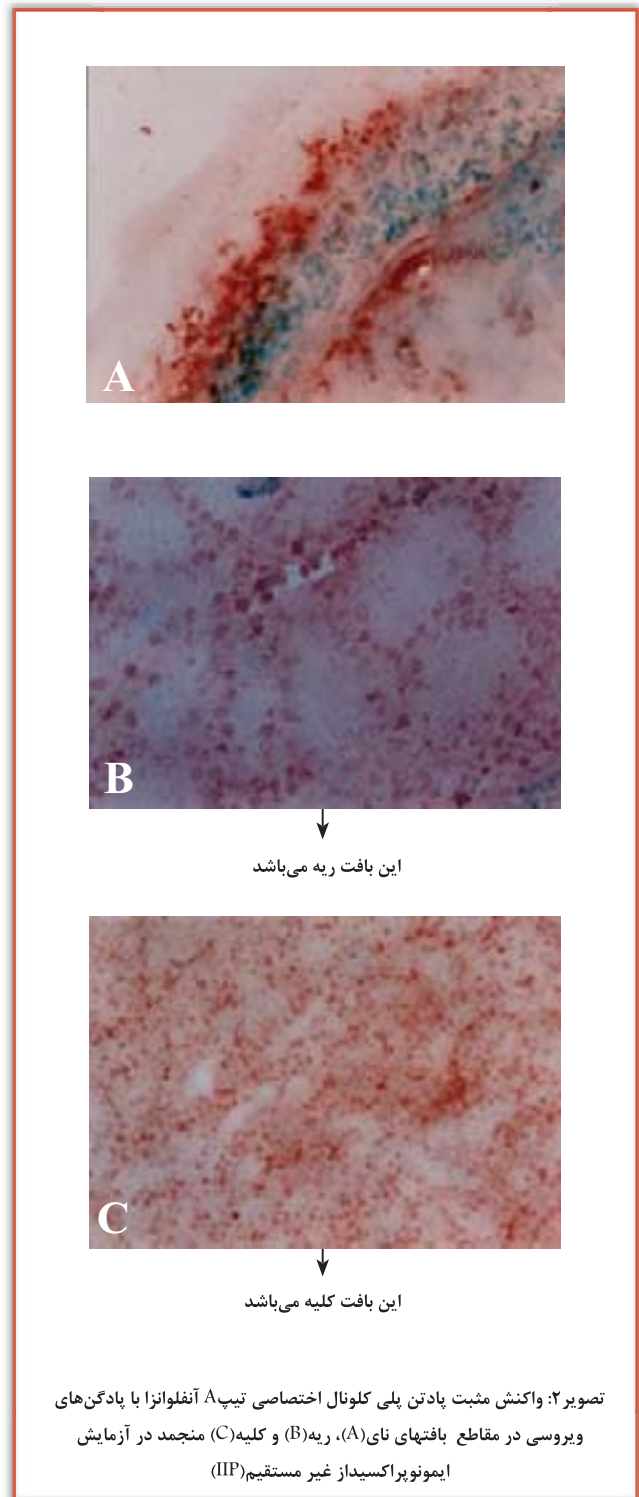
آنتی بیوتیک‌ها در شرایط استریل تهیه و سپس تا زمان تزریق در ۴+ درجه سانتیگراد نگهداری شد. بعد از مشخص کردن محل تزریق در تخم مرغ‌های جنین دار SPF، با تننورید و سپس با الکل اتیلیک کاملاً ضد عفونی گردید و از هر نمونه به میزان ۰/۲ میلی لیتر به داخل حفره آلانتوئیک ۵ عدد تخم مرغ در کنار شعله تزریق گردید. بعد از مسدود نمودن محل تزریق، تخم مرغ‌ها به انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد منتقل شدند و روزانه یک نوبت جهت شناسایی جنین‌های 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، آزمایش‌های هم‌اگلوتیناسیون و HI استفاده گردید. برای نمونه‌های منفی پاساژ سوم مایع آمنیو آلانتوئیک تکرار گردید (۲۴).

#### خ - تهیه نمونه‌های 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، نمونه‌های 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 مراحل بوده که در کار تجربی مورد استفاده قرار گرفته که قبلاً به طور کامل شرح داده شد. همچنین به همین تعداد نمونه‌های بافتی و سرم از پرندگان به ظاهر سالم از گله‌های منفی از نظر آنفلوانزا در آزمایش HI تهیه گردید. آزمایش IIF برای جستجوی پادگن‌های 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 IIP, IIF از فرموله‌های مربوطه استفاده شد. برای ارزیابی همخوانی بین آزمایش‌های جدا سازی ویروس، IIF, IIP از آنالیز کاپا (Kappa Statistic) نیز استفاده گردید (۱۱).

#### نتایج

از نمونه‌های 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 رفته‌رفته تفاوتی از پادتن و کونژوگه FITC نیز در این جوجه‌ها 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



استفاده قرار گرفت.

#### ه - جدا سازی ویروس

ابتدا سوسپانسیون هموزنیزه بافت را با استفاده از محلول PBS و

انتخاب گردید.

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

از تعداد ۱۰۸ مقطع از بافت‌های 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 داده‌های 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 آزمایش‌های جداسازی ویروس و IIF در هر پرنده می‌باشد.

آزمایش‌های IIP و جداسازی ویروس در بافت‌های 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 قهوه‌ای مشاهده گردید که از دیگر سلولها قابل تفکیک می‌باشد (تصویر ۲). شدت واکنش پادتن پلیکلونال اختصاصی تیپ A آنفلوانزا با پادگن‌های ویروسی مشاهده شده در میکروسکوپ نوری در مقاطع بافتی بر اساس گزارش Cruz-coy و همکاران می‌باشد (۹).

از مجموع ۱۰۸ مقطع بافت‌های 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 داده‌های جدول ۳، حساسیت و ویژگی آزمایش IIP در مقایسه با جداسازی ویروس در هر پرنده، به ترتیب معادل ۹۳٪ و ۸۱٪ می‌باشد. 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 آزمایش‌ها می‌باشد.

## بحث

تشخیص زود هنگام بیماری در مرغداری‌ها از جمله مواردی است که در راستای برنامه‌های کنترلی بیماری آنفلوانزای طیور مفید بوده و می‌تواند از شیوع بیماری جلوگیری نماید. لذا روش‌های تشخیص سریع ویروس‌های آنفلوانزا در سراسر دنیا در حال تغییر و پیشرفت می‌باشد. تکنیک‌های ایمونوهیستوشیمیایی جزء تکنیک‌های تشخیصی سریع بوده که گسترش زیاد پیدا کرده و هم اکنون در تشخیص سریع پادگن‌های بیماری‌های ویروسی طیور از جمله آنفلوانزا به طور وسیعی استفاده می‌گردد. استفاده از این تکنیک‌ها 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 ویروس‌های آنفلوانزای طیور، آزمایش‌های ایمونوهیستوشیمیایی مانند IIF و IIP در مقاطع بافتی منجمد به منظور ارزیابی توانایی این تکنیک‌ها 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 می‌کنند در محلول‌هایی 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 پادگن‌های 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 پادگن‌های ویروسی‌های آنفلوانزا به کار بردند. آنها طی مطالعه‌ای، این روش را بر روی نمونه‌های بافتی انجام دادند و آن را ساده، سریع، ارزان و حساس برای تشخیص ویروس‌های آنفلوانزای طیور معرفی نمودند. آزمایش IF را می‌توان در گسترش بافتی با سلولهای مایع آلانوتیک 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 می‌سازد (۱۰، ۱۲، ۱۳). آزمایش IF مستقیم بر روی نمونه‌های بافتی حاصله از طیور گوشتی آلوده به سویه‌های غیر حاد و حاد ویروس‌های آنفلوانزا استفاده و مقایسه شده است. در مواردی که جداسازی ویروس به علت حضور پادتنها و یا شروع اتولیز با شکست مواجه می‌گردید، تشخیص پادگن از طریق آزمایش IF میسر بود (۷، ۱). آزمایش IF برای تشخیص سریع ویروس آنفلوانزا به خصوص برای سویه‌های 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 می‌شود. تشخیص پادگن در کلیه به وسیله آزمایش IF وقتی تیترو ویروس ۱۰<sup>۵</sup> بر مبنای ELD ۵۰ و یا بالاتر در هر گرم 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 نمونه‌های کنترل مناسب می‌توان 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 پادگن‌های ویروس‌های آنفلوانزا در مقاطع بافتی منجمد افزایش دهد. در تعدادی از بافت‌ها علی‌رغم حضور پادگن ویروسی در آزمایش IF از نظر جداسازی ویروس منفی بودند که این مسئله ممکن است ناشی از اتوفلورسانس بافتی و یا افزایش عیار پادتن پرنده باشد.

جدول ۲: آنالیز آماری آزمایش ایمنوفلورسانس غیر مستقیم (IIF) در مقایسه با جدا سازی ویروس (VI) در پرند ها( بر اساس داده های جدول ۱ محاسبه شده است)

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

ضد نوکلئوپروتئین ویروس آنفلوانزا ممکن است هم حساسیت و هم ویژگی آزمایش ایمنوپراکسیداز را در مشاهده پادگن های ویروس های آنفلوانزا در مقاطع بافتی منجمد افزایش دهد. لذا استفاده از آزمایش های تشخیصی ایمنوهیستوشیمیایی از جمله آزمایش های ایمنوفلورسانس و ایمنوپراکسیداز به همراه آزمایش های ویروژیک، سرولوژیکی و مولکولی در مراحل اولیه بررسی شیوع بیماری در یک منطقه توصیه می شود. علاوه بر آن استفاده از تکنیک های ایمنو هیستوشیمیایی در آزمایش های غربالگری یا پایش های ایمنوهیستوشیمیایی به منظور ردیابی پادگن های آنفلوانزا در بافت ها به ویژه بافت کلیه توصیه می شود. همچنین استفاده از تکنیک های تشخیصی ایمنوهیستوشیمیایی برای آزمایشگاه هایی که امکانات انجام جداسازی ویروس را ندارند و بر عکس مجهز به تکنیک های هیستوپاتولوژی هستند، توصیه می گردد.

### تشکر و قدردانی

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

### پاورقی

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

### منابع مورد استفاده

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

جدول ۳: آنالیز آماری آزمایش ایمنوپراکسیداز غیر مستقیم (IIP) در

مقایسه با جدا سازی ویروس (VI) در پرند ها( بر اساس داده های جدول ۱

محاسبه شده است)

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

Hopper و همکاران گزارش کردند که تشخیص سریع و گذشته نگر بیماری آنفلوانزای طیور بر روی بافتهای تثبیت شده، با استفاده از روش ایمنوپراکسیداز بر روی بافتهای پانکراس، مغز و کلیه امکان پذیر است (۱۶). آنها گزارش کردند در عفونتهای ناشی از ویروسهای با حدت بالا<sup>۴</sup> (HPAI)، بهترین بافت انتخابی، پانکراس می باشد، در حالی که در مواردی که حدت ویروس کمتر بوده<sup>۵</sup> (nHPAI) بهترین بافت، کلیه می باشد (۱۶). Mo و همکاران با استفاده از روش های IP، ضایعات حاصل از تزریق ویروس های HPAI و ویروس های آنفلوانزا با بیماری زایی ملایم<sup>۶</sup> (MPAI) را مورد مقایسه قرار دادند. به طوری که با استفاده از این آزمایش در جوجه هائی که با ویروس های HPAI آلوده شده بودند، وجود ویروس ها را در بافت های قلب، ریه، مغز، کلیه و پانکراس به دفعات مشاهده کردند. ولی در جوجه هائی که با ویروسهای MPAI تلقیح شده بودند فقط ویروس را در نای و ریه تشخیص دادند (۱۸). Mo وجود ویروس H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> را با روش IP مورد ارزیابی قرار داده و گزارش نمودند که این روش در تشخیص بیماری آنفلوانزا بسیار مناسب می باشد (۱۷). Shalaby و همکاران در ارزیابی تحت تیپ H<sub>5</sub>N<sub>2</sub> ویروس آنفلوانزا از این روش در تشخیص ویروس ها در بافتهای استفاده کردند (۲۱). Cruz-coy و همکاران در مشاهدات میکروسکوپی در آزمایش ایمنوپراکسیداز نحوه گزارش و درجه بندی نتایج را تقسیم بندی کرده است (۹).

مشاهده پادگنهای ویروسی آنفلوانزا در بافت کلیه علی رغم اینکه سویه ویروس آنفلوانزای شناخته شده در ایران جزء ویروس های آنفلوانزا با حدت کم<sup>۷</sup> (LPAI) بوده، بسیار جالب توجه است و ممکن است علت تلفات ناشی از ویروس های آنفلوانزای طیور ایران به علت بقاء ویروس در بافت کلیه باشد به همین جهت توصیه می شود تحقیقات تکمیلی جهت اثبات این قضیه انجام گردد. Hooper و همکاران (۱۹۹۵) معتقدند که آزمایش IP یک روش تشخیصی مطمئن برای شناسایی سویه های ویروس آنفلوانزا با حدت کم می باشد (۱۶). همچنین Selmons و Swayne گزارش کردند که جراحات بافت کلیه در جوجه های تلقیح شده با ویروس های آنفلوانزا با حدت کم، بسیار شدید می باشد (۲۶). محققین دیگری مدعی هستند که بین دفعات جداسازی ویروس از بافت کلیه و سوآب کلوآکی و همچنین تیترو ویروس در بافت کلیه در مقایسه با دیگر بافتهای اختلاف معنا داری وجود دارد (۲۳، ۲۵). استفاده از پادتنهای مونوکلونال

- 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. I. 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<sub>3</sub>N<sub>2</sub>) 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 immunoperoxias 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.; Slemmons, R. D. and Swayne, D. E. 1994, Pathological studies of A/chicken/alabama/7395/75(H<sub>4</sub>N<sub>8</sub>) 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 histopathologic and immunocytochemical study of chicken anemia 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 tpe A influenza viruses in chickens, Avian Dis. 39:74-84
- 26-Swayne, D. E. and Selmons, R. D. 1992, Evaluation of the kidney as a potential site of avian influenza virus persistence in chickens, Avain Dis. 36:937-944
- ۲-زمانی مقدم-ع. ۱۳۷۹، بررسی تجربی ایمنی‌زایی چند واکسن کشته آنفلوآنزای تحت تیپ H<sub>9</sub>N<sub>۲</sub> 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 ویروس های آنفلوآنزا 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<sub>7</sub>N<sub>1</sub>) 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, Immunorheoporesis 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,

