ساندویچ

Enzyme Immunoassay

برای گاماانترفرون گاوی و استفاده از آن برای شناسائی سل در گاو

مترجم: دکتر نادر مصوری - موسسه تحقیقاتی رازی

چکیده

روش آزمایشگاهی جدیدی جهت بررسی سلولی برای شناسایی سل گاوی مورد استفاده قرار گرفته است. در این روش گاماانترفرون آزاد شده از روش کشت خون کامل، در پاسخ به آنتی‌ژن اختصاصی شناسایی می‌شود.

در گذشته روش Bio-assay برای شناسایی گاماانترفرون (IFN-δ) گاوی استفاده می‌شد و امروزه ساندویچ EIA[1] را جایگزین آن کرده‌اند که در آن از دو آنتی‌بادی مونوکلنال برای گاماانترفرون گاوی استفاده شده است.

روش EIA کمتر از ۲۵ میلی گرم برمیلی‌لیتر گاماانترفرون گاوی تولید شده را شناسایی می‌کند که برای فعالیت بیولوژیکی گاماانترفرون اختصاصی است. اما آلفایابتاانترفرون گاوی را شناسایی نمی‌کند. گاماانترفرون گوسفند، خوک، گوزن و انسان با این روش تشخیص داده نمی‌شود.

نتیجهٔ بررسی آزمایشگاهی ایمنی با واسطه سلولی اختصاصی عفونت Mycobacterium bovis در گاو، زمانی که از روش EIA گاماانترفرون گاوی به همراه روش کشت خون کامل استفاده می‌شود، ساده، سریع و حساس می‌باشد.

مقدمه

عامل مولد سل گاوی *M. bovis* می‌باشد. روش استاندارد تشخیص سل گاوی تست توبرکولین است که اولین بار توسط M´Fadyean در سال ۱۸۹۹ برای گاو ارائه گردید. این روش به صورت تزریق داخل جلدی توبرکولین می‌باشد، و جهت پیگیری بعد از ۳ روز، محل تزریق از لحاظ تورم مورد معاینه قرار می‌گیرد. این بررسی ممکن است فاقد حساسیت بوده و اختصاصی نیز نباشد، به این دلیل بیشتر محققین سعی بر تکمیل و بهبود روشهای آزمایش در این زمینه را دارند. بیشتر این کوششها در جهت شناسایی آنتی‌بادیها صورت گرفته است. این روشها معمولاً به دلیل واکنشهای متقاطع آنتی‌ژنی بین مایکوباکتریومهایی که بیشتر گونه‌های پستانداران با آن مواجهند و به دلیل اینکه پاسخ ایمنی غالب در طبیعت در اثر عفونت *M. bovis* بیشتر سلولی می‌باشد تا هومورال، دارای حساسیت کمتری بوده و اختصاصی نمی‌باشد.

به طور عملی در آزمایشگاه، فعالیت ایمنی با واسطه سلولی را نسبت به پروتئین خالص مشتق شده از توبرکولین[2] توسط بررسی تزاید لنفوسیتهای حاصل از کشت لنفوسیتهای خالص و یا خون کامل اندازه گیری می‌کنند. هر چند، این قبیل بررسی‌ها برای آزمایش تعداد زیادی حیوان به جهت نیاز به زمان طولانی انکوباسیون اغلب غیر عملی می‌باشد.

اخیراً wood و همکارانش (۱۹۸۹) روش Bio-assay سلولی ساده‌تری را برای سل گاوی در آزمایشگاه شرح داده‌اند. اساس این آزمایش بر روی شناسایی گاماانترفرون در کشت ۲۴ ساعتهٔ خون کامل به همراه PPD می‌باشد. هر چند Bio-assay به ۴ روز وقت نیاز داشته، کار پرزحمتی بوده و برای گاماانترفرون اختصاصی نمی‌باشد.

در حال حاضر تولید آنتی بادیهای مونوکلنال برای گاماانترفرون گاوی اختصاصی بوده و شناسایی گاماانترفرون گاوی را به روش ساندویچ EIA میسر نموده است. این مقاله روش EIA را که اختصاصی برای گاماانترفرون گاوی بوده و استفاده از آن را برای شناسایی عکس‌العمل سلولی نسبت به PPD، در کشت خون کامل گاوهایی که به طور تجربی با *M. bovis* آلوده شده‌اند شرح می‌دهد.

مواد و روش کار

آلوده کردن گاوها: در این تجربه ۱۶ تلیسه ۱۲ تا ۱۵ ماههٔ دورگ هرفورد- شورت هورن از یک گلهٔ عاری از سل مورد استفاده قرار گرفت. گاوها به طور تصادفی در گروههای مختلف تقسیم شدند. سوش مزرعه‌ای از *M. bovis* به نام سوش 86/90 M که از یک گاو سلی در Queensland جدا شده بود، در محیط میدلبروک[3] اصلاح شده 7H11 به مدت ۴۵ روز رشد داده شد. سپس از باکتریهای رشد کرده تراشیده و با محلول نمکی نرمال استریل[4] سوسپانسیون تهیه گردید و حدوداً به میزان 4×10^6 واحد تشکیل دهندهٔ کلنی در هر میلی‌لیتر جهت تلقیح تغلیظ گردید. گاوهایی که قرار بود تلقیح شوند قبلاً با تزریق داخل رگی ۸ تا ۱۰ میلی‌لیتر Xylazine بیهوش می‌شدند. سپس یک کانول استریل از میان یک برش نایی، در ۳۰ سانتی‌متری پس از مدخل سینه‌ای داخل نایچه قرار می‌گرفت. یک میلی‌لیتر از مادهٔ تلقیحی داخل کانول تزریق شده و کانول با ۱/۵ میلی‌لیتر محلول نمکی استریل شسته می‌شود. *M. avium* نوع سرمی ۲ و *M. kansasii* نیز روی محیط میدلبروک اصلاح شده 7H 11 به مدت ۴۵ روز رشد داده شده بود. سپس از باکتریهای رشد کرده فوق تراشیده و با محلول نمکی استریل سوسپانسیون تهیه گردید (۲ میلی‌لیتر). بعد از این مرحله به تعدادی گاو ۰/۵ میلی‌لیتر از این سوسپانسیون در شانهٔ چپ تلقیح شد.

کشت‌های خون کامل

خون وریدی در لوله‌های خلاء حاوی هپارین لیتیم در غلظت نهایی ۱۵ واحد در میلی‌لیتر جمع‌آوری گردید و به میزان ۱/۵ میلی‌لیتر از هر نمونه خون در هر ۳ گوده از یک سینی کشت بافت ۲۴ گوده توزیع گردید. هر قسمت از خون با ۱۰۰ میکرولیتر محلول نمکی بافرفسفات استریل (PBS، بدون آنتی‌ژن کنترل) و PPD گاوی (۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) یا PPD مرغی (۲۰ میکروگرم در میلی لیتر) مخلوط گردید و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه و هوای مرطوب حاوی ۵٪ دی‌اکسیدکربن قرار گرفت. سپس پلیت‌ها در ۵۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد و

پلاسمای آن جدا و در °۲۰- نگهداری گردید.

انترفرونهای تولیدی

انترفرونهای گاوی آلفا، بتا و گاما تولید شده به ترتیب با فعالیتهای اختصاصی $۱/۹\times۱۰^{۸}$، $۴/۳\times۱۰^{۶}$ و $۲/۲\times۱۰^{۶}$ بر میلی‌گرم پروتئین، مورد استفاده قرار گرفتند.

آنتی بادیهای مونوکلنال و پلی‌کلنال گاماانترفرون گاوی

دوآنتی‌بادی مونوکلنال اختصاصی گاماانترفرون گاوی (انترفرون ۲ و ۹)، که برای هر کدام یک اپی‌توپ[5] (عامل یا واحد اختصاصی آنتی‌ژنی) مختلف تشخیص داده شده بود و ۳ آنتی‌سرم خرگوشی پلی‌کلنال برای گاماانترفرون گاوی (3 و 2-RAB 1) که قبلاً به وسیله Wood و همکاران در سال ۱۹۸۹ شرح داده شده بود، مورد استفاده قرار گرفت. جدا نمودن ایمونوگلوبولین روی ستون سفاروز- پروتئین A که قبلاً نیز مورد استفاده قرار گرفته بود، انجام گرفت. همچنین مقداری از هر آنتی‌سرم با هورس رادیش پراکسید از (HRP) به وسیله روشی که Wilson & Nakane ارائه داده بودند، ملحق گردید.

ساندویچ EIA برای گاماانترفرون گاوی

آنتی بادیهای مونوکلنال گاماانترفرون گاوی (۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۱۰۰ میکرولیتر در هر گوده) با ۵۰ میلی‌مول بافرکربنات با pH=۹/۶ رقیق شده و به مدت یک شب در پلیت‌های ۹۶گوده‌ای EIA در ۴ درجه سانتیگراد قرار می‌گیرد. سپس روی پلیت‌ها محلول یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر کازئین سدیم در بافرفسفات سالین (PBS, pH = ۷/۲) به میزان ۱۰۰ میکرولیتر در گوده ریخته و به مدت ۱ ساعت در ۲۰ درجه سانتیگراد قرار داده می‌شود. پس از ۴ بار شستن حفره‌ها با بافرفسفات سالین به همراه ۰/۰۵٪ توئین ۲۰[8] (PBST)، نمونه انترفرون به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به گوده‌ها اضافه شده و به مدت یک ساعت در ۲۰ درجه سانتیگراد قرار می‌گیرد. قبل از اضافه نمودن ۱۰۰ میکرولیتر بر گوده از آنتی بادیهای الحاق شده با HRP که با غلظت معینی PBST به همراه ۱٪ کازئین سدیم رقیق شده، پلیت‌ها با PBST ۴ بار شسته می‌شوند. بعد از اینکه پلیت‌ها به مدت یک ساعت در ۲۰ درجه سانتیگراد قرار گرفتند ۴ بار با PBST شسته شده و سپس به هر گوده ۱۰۰ میکرولیتر مادهٔ ترامتیل بنزیدین[9] (TMB) اضافه می‌گردد. واکنش بعد از ۳۰ دقیقه در ۲۰ درجه سانتیگراد، با اضافه نمودن ۵۰ میکرولیتر بر گوده اسید سولفوریک ۰/۵ مولار در هر گوده متوقف شده و با دستگاه جاذب نوری[10] ۴۵۰ نانومتر خوانده می‌شوند.

Bio-assay گاماانترفرون گاوی

به روش Bio-assay که قبلاً توسط Wood و همکاران در سال ۱۹۸۹ شرح داده شده بود، نمونه‌ها جهت فعالیت انترفرون مورد بررسی قرار گرفتند.

ویژگی ساندویچ EIA

گاما، آلفاوبتا انترفرون گاوی تولید شده به وسیله ساندویچ EIA در غلظت‌های فعال بیولوژیکی ۱، ۱۰ و ۱۰۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر مورد بررسی قرار گرفتند. به علاوه انترفرون این نمونه‌ها و یک نمونه پلاسمای حاوی انترفرون گاوی قبل از بررسی با EIA و Bio-assay با دو روش مختلف (pH=۲ به مدت ۵ دقیقه و یا درجه حرارت °۵۶ به مدت یک ساعت) غیرفعال شدند.

ویژگی گونه‌ها

برای تعیین اینکه آیا EIA بین گونه‌های مختلف واکنش متقابل دارد یا خیر، لنفوسیتهای خون محیطی[11] (PBL) از خون هپارینه گاو، گوسفند، بز، گاومیش، گوزن، خوک و انسان توسط سانتریفوژ (۵۰۰دور به مدت ۲۰ دقیقه) در Ficoll-paque جدا گردید. سپس لنفوسیتهای خون محیطی سه بار با محلول شسته شد و دوباره از آن با محیط Dulbecco تغییر یافته از محیط Eagle[24] به همراه ۱۰ میلی‌مول بافر HEPES، ۰/۰۷۵٪ بیکربنات سدیم، ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر گلوتامین، ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر Penicillin، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر Streptomycin و ۱۰ درصد (V/V) سرم جنینی گاوی غیرفعال شده با حرارت، سوسپانسیون شمرده شدند و به میزان ۵×۱۰^{۶} در هر میلی‌لیتر تنظیم گردیدند. سپس لنفوسیتها به مدت ۲۴ ساعت با ۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر کونکاناوالین A[13] در ۳۷ درجه سانتیگراد با رطوبت اتمسفر و ۵٪ دی‌اکسیدکربن در هواکشت داده شدند.

تزاید لنفوسیتها به طریق میکروسکوپی توسط حضوربلاست‌ها قبل از خارج کردن مایع فوقانی کشت تعیین گردید. سپس مایع فوقانی کشت توسط دو روش Bio-assay و EIA جهت شناسایی گاماانترفرون مورد بررسی قرار گرفت.

نتیجه

ساندویچ EIA: در آنتی‌بادی مونوکلنال (انترفرون ۲ و ۹) به این صورت که آنتی‌بادیهای موجود در مرحله جامد در تمام ترکیبات به علاوه HRP کونژوگه از سه آنتی سرم (خرگوشی ۱ و ۲ و ۳) و دو آنتی‌بادی مونوکلنال به عنوان دومین آنتی‌بادی با یکدیگر مقایسه شدند. نتایج نشان داد که استفاده از انترفرون ۹ به عنوان آنتی‌بادی مرحله جامد و انترفرون ۲ HRP به عنوان آنتی‌بادی دوم بهترین سیستم حساسیتی را تشکیل می‌دهد (جدول ۱) و از این رو این ترکیب در تمام تجربیات بعدی مورد استفاده قرار گرفت. مشخص شد هنگامی که آزمایشات بین ۲ تا ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر انجام گیرد (سوابق نشان داده نشده است) تغلیظ انترفرون۹ با پوشش بافر اثر کمی بر روی حساسیت EIA دارد. تمام پلیت‌های بعدی با ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر انترفرون ۹ پوشیده شدند.

حساسیت EIA

گاماانترفرون‌های گاوی تولید شده به طور سری رقیق و با EIA آزمایش گردید و مشخص شد که دانسیته نوری[14] (OD) حتی در غلظت پایینتر از ۲۵ پیکوگرم در میلی‌لیتر از غلظت بالای ۰/۲ که برای حلال شاهد به کار گرفته شده، بیشتر است (شکل شماره ۱). و این در حالی که Bio-assay تنها قادر به شناسایی گاماانترفرون گاوی تولید شده با غلظت بیش از ۱۵۰ پیکوگرم بر میلی‌لیتر بود. یک قسمت از پلاسمای گاوی، که از کشت خون کاملی که با PPD گاوی تحریک شده بود به دست آمد توسط Bio-assay و EIA مورد آزمایش قرار گرفت. جدول ۲ نشان

جدول ۱: مقایسهٔ مرحله جامد و آنتی‌بادی ثانویه HRP کونژوگه برای ساندویچ EIA جهت شناسایی گاماانترفرون

	آنتی‌بادی ثانویه HRP *کونژوگه				
مرحله جامد	انترفرون۲ IFN-2	انترفرون-۹ IFN-9	خرگوشی ۱ RAB-1	خرگوشی ۲ RAB-2	خرگوشی ۳ RAB-3
IFN-2 (انترفرون ۲)	۲۵۸†	۱۰۶۱	۲۵۲	۱۶۴	۱۲۷
IFN-9 (انترفرون ۹)	۱۷۶۲	۴۳۲	۲۹۱	۱۹۹	۱۴۰

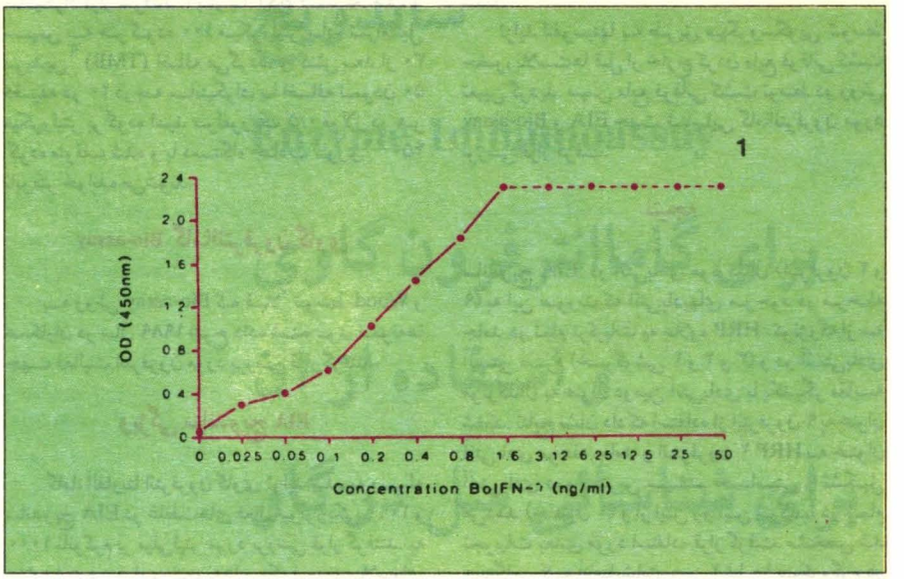
* برای گاماانترفرون گاوی، آنتی‌بادیهای انترفرون ۲ و ۹ مونوکلنال، و خرگوشی ۱ و۲ و۳ پلی‌کلنال هستند.

† ارزش بیان شده براساس دانسیتهٔ نوری $X\ (OD)\ ۱۰^{۳}$ برای ۵۰ نانوگرم در میلی‌لیتر از گاماانترفرون تولیدی می‌باشد.

جدول ۲: مقایسه حساسیت Bio-assay و EIA در شناسایی گاماانترفرون *

Bio-assay نیتر	EIA
۰	۵۳
۰	۲۵
۰	۳۹
۲	۵۶۱
۲	۷۳۳
۴	۱۵۳۴
۸	۱۷۴۷
۱۶	۲۵۹۱
۶۴	۲۵۷۱
۱۲۸	>۲۸۰۰
۲۵۶	>۲۸۰۰

* نتایج Bio-assay ارائه شده به نحوی است که نمونه‌ها با حمایت کننده‌های ضد ویروسی به میزان ۵۰٪ رقیق شده‌اند. نتایج EIA با دانسیتهٔ نوری $X\ ۱۰^{۳}$ ارائه گردیده است.



شکل ۱- تیتر کردن گاما انترفرون (IFN-δ) گاوی تولید شده به روش ساندویچ EIA گاماانترفرون گاوی با استفاده از انترفرون ۹ به عنوان آنتی‌بادی فاز جامد و انترفرون ۲-HRP به عنوان دومین آنتی‌بادی. مقادیری که به وسیلهٔ خطوط نقطه چین بهم وصل شده‌اند در دانسیته نوری بالای ۲/۸ هستند.

می‌دهد که وابستگی خوبی بین EIA و Bio-assay در شناسایی گاماانترفرون گاوی نمونه‌های پلاسما وجود دارد با این وجود که EIA حساسیت آزمایش را تا حد زیادی بهبود می‌بخشد.

ویژگی ساندویچ EIA

به آلفا، بتا و گاما انترفرون گاوی تولید شده و یک نمونه پلاسمای مثبت گاما انترفرون گاوی طبیعی، جهت غیرفعال نمودن فعالیت ضد ویروسیشان حرارت و pH اسیدی داده شد. سپس این نمونه‌ها به همراه نمونه‌های دست نخورده شاهد (حرارت و pH اسیدی ندیده) توسط دو روش EIA و Bio-assay مورد بررسی قرار گرفتند. جدول ۳ نشان می‌دهد که EIA انترفرون آلفا و بتا را شناسایی نمی‌کند در حالی که Bio-assay هر سه نوع انترفرون (آلفا و بتا و گاما) را شناسایی می‌کند. در مقایسه با نمونه‌های کنترلی که حرارت و pH اسیدی ندیده بودند، گاماانترفرون گاوی در نمونه‌های غیرفعال (با حرارت و pH اسیدی) با این که خیلی کاهش یافته بود، توسط هر دو آزمایش شناسایی گردید (جدول ۳).

شناسایی عفونت مایکوباکتریایی

نمونه‌های خون ۹ گاو آلوده (۴ گاو با *M. bovis* ۳ گاو با *M. avium* و ۲ گاو با *M. kansasii*) و ۲ گاو شاهد به مدت ۲۴ ساعت با PBS (بدون آنتی‌ژن)، PPD گاوی و PPD مرغی در انکوباتور قرار گرفت. سپس نمونه‌های پلاسما جمع‌آوری شد و به روش EIA برای وجود گاماانترفرون گاوی مورد بررسی قرار گرفت. جدول ۴ نشان می‌دهد که استفاده از سیستم بررسی انترفرون برای تشخیص تفریقی بین عفونتهای مختلف مایکوباکتریایی که در بالا ذکر شده عملی می‌باشد.

حیواناتی که با *M. bovis* آلوده شده بودند همگی در مقابل PPD گاوی پاسخ مثبتی نشان دادند ولی نسبت به PPD مرغی به میزان کمتری پاسخ دادند و بالعکس گاوهایی که با *M.avium* و *M. kansasii* آلوده شده بودند در مقایسه با PPD گاوی به میزان بیشتر و شدیدتری نسبت به PPD مرغی واکنش نشان دادند و گاوهایی که با *M. kansasii* تلقیح شده بودند پاسخ کمتری نیز به PPD مرغی نشان دادند. حیوانات شاهد عکس‌العمل بسیار کمی نسبت به تمامی آنتی‌ژنها نشان دادند.

ویژگی گونه‌ای

مایع فوقانی کشت‌های لنفوسیتهای خون محیطی (PBL) که با کونکاناوالین A تحریک شده بودند با دو روش Bio-assay و EIA مورد آزمایش قرار گرفت. انترفرون گاو، گوسفند، گاومیش و بز در هر دو روش مورد شناسایی قرار گرفت، تنها انترفرون گوزن در Bio-assay شناسایی شد و انترفرون خوک و انسان در هیچیک از دو روش فوق شناسایی نگردید (جدول ۵).

بحث

این مقاله برای اولین بار ساندویچ EIA مخصوص گاماانترفرون گاوی را شرح می‌دهد. تست EIA مقدار کمتر از ۲۵ پیکوگرم بر میلی‌لیتر گاماانترفرون گاوی اختصاصی است و آلفا و بتا انترفرون و یا گاماانترفرون گاوی تولید شده را شناسایی می‌کند و برای فعالیت بیولوژیکی گاما انترفرون گاوی طبیعی غیرفعال را شناسایی نمی‌کند. بیشتر بررسیهای ایمنی ایجاد شده بر روی گاماانترفرون انسان همگی برای فرم فعال بیولوژیکی اختصاصی می‌باشند. هر چند حساسیت این روشها در مقایسه با EIA گاماانترفرون گاوی که این جا شرح داده شده پایین می‌باشد (کمتر از ۰/۲ نانوگرم در میلی‌لیتر)، به جز یک مورد بررسی ایمونورادیومتریک[15] که به وسیله Chang و همکاران در سال ۱۹۸۴ شرح داده شد، و دارای روش مشابهی در تشخیص ابتدایی است.

روش معمول آزمایشگاهی برای بررسی فعالیت ایمنی سلولی براساس افزایش لنفوسیتها استوار می‌باشد، اخیراً نشان داده‌اند تولید گاماانترفرون مخصوص ایمنی، به افزایش لنفوسیتها بستگی دارد و یا به بیان بهتر نشان داده‌اند که اندازه گیری گاماانترفرون تولیدی می‌تواند سیستم بررسی حساستری نسبت به افزایش لنفوسیتها باشد. کشت خون کامل و سیستم EIA برای شناسایی گاماانترفرون گاوی در این مقاله شرح داده شد و مشخص گردید که انجام حساسیت با واسطه سلولی بدون در نظر گرفتن نحوهٔ تولید بسیار سریعتر و راحت‌تر می‌باشد و همچنین نشان داده شد که حساسیت بیشتری نیز نسبت به روش افزایش لنفوسیتها دارد. جدا از فعالیت ضد ویروسی، گاماانترفرون یک تنظیم کنندهٔ مهم تغییرات وسیع پاسخ ایمنی نیز می‌باشد. با دسترسی به گاماانترفرون گاوی تولیدی مطالعهٔ اثرات این مولکول بر روی سلولهای مختلف گاوی نیز امکان‌پذیر می‌باشد. بررسیهایی جهت استفاده از گاماانترفرون انسانی برای مطالعه آزمایشگاهی حساسیت لنفوسیتها نسبت به آنتی‌ژنهای مایکوباکتریایی صورت گرفته است. آزاد شدن گاماانترفرون توسط سلولهای T در پاسخ به آنتی‌ژن اختصاصی نیز یک روش مفید برای اندازه گیری پاسخ سلولی در گوساله‌ها می‌باشد. EIA گاماانترفرون گاوی در این مقاله شرح داده شده است که جدا از نحوهٔ تولید آن، یک ابزار حساس جهت اندازه گیری ایمنی سلولی در آزمایشگاه بر روی گونه‌های مختلف حیوانات بوده

جدول ۳: ویژگی انترفرون در Bio-assay و EIA

نوع کارانجام شده برای نمونه	روش بررسی	انترفرون †			
		آلفاتولیدی	بتاتولیدی	گاماتولیدی	با طبیعی
هیچ	EIA	۲۷	۵۱	>۲۸۰۰	>۲۸
هیچ	Bio-assay	۱۲۸	>۲۵۶	۱۶	۱۶
حرارت (۵۶ به مدت ۱ ساعت)	EIA	۱۶	۵۱	۶۴۸	۱۲
حرارت (۵۶ به مدت ۱ ساعت)	Bio-assay	۳۲	۱۶	۴	۰
pH=۲ (به مدت ۵ دقیقه)	EIA	۱۷	۷۲	۴۰۵	۱۸
pH=۲ (به مدت ۵ دقیقه)	Bio-assay	۳۲	۲۵۶	۴	۰

*نتایج Bio-assay در حالی که با مایع حفاظتی ضد ویروس به صورت ۵۰٪ رقیق شده بیان گردیده است. نتایج EIA با دانسیته نوری $\times 10^{-3}$ بیان گردیده است. پلاسمای کنترل بدون گاماانترفرون با دانسیته نوری $\times 10^{-3}$ از ۴۸ بیان گردیده است.

†تولیدی و طبیعی

و می‌تواند مطالعات را جهت عملکرد گاماانترفرونی در مکانیسمهای مختلف ایمنی راحت‌تر کند. در گزارش‌هایی ذکر شده که گاماانترفرون از نظر گونه‌ای اختصاصی می‌باشد. بیشتر این مطالعات بر روی حیواناتی با تکامل نژادهای مختلف صورت گرفته است به طور مثال می‌توان مطالعه Czarniecki و همکاران را در سال ۱۹۸۶ ذکر نمود. این مطالعه چنین پیشنهاد می‌کند که عکس‌العمل گاماانترفرون از نظر خانواده اختصاصی می‌باشد. بنابراین گاو، گاومیش، گوسفند و بز (راسته Artiodactyla، زیر راسته نشخوارکنندگان، خانواده گاوسانان) با یکدیگر واکنش متقاطع دارند در حالی که با گوزن (با خانواده مجزا) و خوک (با زیر راستهٔ مجزا) واکنش متقاطع ندارند. عکس‌العمل انترفرون گوزن در Bio-assay ممکن است که وجود الفا و یا بتا انترفرون را در مایع رویی کشت نشان دهد همچنین برای هیچکدام از انترفرونهای فوق اختصاصات گونه‌ای گزارش نشده است. رسیدن به جواب در آزمایش توبرکولین پوستی متداول برای گاوهای سلی، احتیاج به سه روز وقت دارد. تزریق داخل جلدی توبرکولین حداقل برای ۶۰ روز موجب غیر حساس شدن حیوان در آزمایش مجدد می‌شود. بررسی گاماانترفرون خون کامل به وسیله Wood و همکاران در سال ۱۹۸۹ شرح داده شد که در آن از Bio-assay جهت کمیت انترفرون تولید شده استفاده شده بود. این سیستم بررسی با اینکه برای اندازه گیری ایمنی سلولی مؤثر است ولی برای استفاده در تعداد زیادی گاو غیر عملی می‌باشد.زیرا به کار آزمایشگاهی پرزحمتی نیاز داشته و جواب آزمایش حداقل تا ۴ روز بعد آماده نمی‌گردد. همچنین Bio-assay برای گاماانترفرون اختصاصی نبوده و بتا انترفرونی را که در گاوهای شاهد وجود داشت، شناسایی نمود و در ضمن آلفا انترفرون در پاسخ به برخی از آنتی‌ژنهای غیرمایکوباکتریایی نیز آزاد می‌شود. نتیجهٔ بررسی آزمایشگاهی ایمنی اختصاصی با واسطه سلولی در مقابل عفونت *M.bovis* در گاو زمانی که از روش EIA گاماانترفرون گاوی به همراه سیستم کشت خون کامل استفاده می‌شود، ساده، سریع و حساس است. در این روش به دلیل به کار نبردن آنتی‌ژن، وضعیت ایمنی حیوان مختل نشده و نتیجه پس از ۲۴ ساعت حاصل می‌شود و EIA برای گاماانترفرون اختصاصی حساسیت و ویژگی سیستم بررسی گاماانترفرون خون کامل نسبت به آزمایش توبرکولین می‌باشد. در این بررسی ۳۰۰۰۰ گاو و گاومیش از گله‌های آلوده به سل در استرالیا مورد آزمایش قرار می‌گیرند این آزمایش در نیوزلند، جمهوری ایرلند و ایرلند شمالی انجام می‌شود.

جدول ۵: انترفرون آزاد شده در لنفوسیتهای خون محیطی *(PBL) از گونه‌های مختلف حیوانات که با کونکاناوالین A تحریک شده‌اند.

منبع لنفوسیتهای خون محیطی	Bio-assay	EIA
گاو	۳۲	>۲۸۰۰
گوسفند	۳۲	۱۵۳۲
گاومیش	۸	۹۷۹
بز	۱۶	۱۰۳۴
گوزن	۳۲	۶۷
خوک	۰	۴۷
انسان	۰	۳۹

* لنفوسیتهای محیطی

†نتایج Bio-assay در رقت ۵۰٪ با حمایت کنندهٔ ضد ویروسی بیان گردیده است. نتایج EIA با دانسیته نوری $\times 10^{-3}$ بیان گردیده است.

جدول ۴: تحریک کننده‌های آنتی‌ژنی آزاد کننده انترفرون در کشت خون کامل گاوهای عفونی

شماره حیوان	نوع عفونت	آنتی‌ژن		
		بدون آنتی‌ژن	*PPD مرغی	PPD گاوی
۱	شاهد	۴۲†	۵۹	۵۰
۲	شاهد	۳۹	۳۱	۳۴
۳	*M.bovis*	۳۳	۱۳۴	۷۰۵
۴	*M.bovis*	۳۸	۶۳۸	>۲۸۰۰
۵	*M.bovis*	۴۶	۴۹۳	۲۷۹۵
۶	*M.bovis*	۶۵	۱۲۹	۱۱۹۸
۷	*M. avium*	۴۴	۳۶۰	۱۰۹
۸	*M. avium*	۴۱	۵۸۱	۹۹
۹	*M. avium*	۴۹	۲۱۸	۷۱
۱۰	*M. kansasii*	۴۴	۲۹۵	۱۲۸
۱۱	*M. kansasii*	۴۰	۱۴۷	۱۰۵

* پروتئین خالص مشتق شده از توبرکولین

†ارزیابی EIA با دانسیته نوری $\times 10^{-3}$

پاورقی

1. Enzyme Immunoassay = EIA
2. purified protein derivative = PPD
3. Middlebrook
4. Sterile Normal saline= SNS
5. Epitope
6. Sepharose protein A column
7. Horseradish peroxidase
8. Tween 20
9. Tetramethylbenzidine
10. Absorbance
11. Peripheral blood lymphocytes= PBL
12. Trypan blue
13. Concanavalin A
14. Optical density= OD
15. Emmuno radiometric

منبع مورد استفاده

Rothel Js., Janes Sl., Corner LA., Cox Jc., Wood PR.; 1990, A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon-δ and its use for the detection of tuberculosis in cattle. Aust. vet. J. 67: PP: 134-134.