✓ پژوهش و سازندگی، شماره ۳۹، تابستان ۱۳۷۷

تشخیص آبله گوسفند، آبله بز و اکتیمای مسری با استفاده از روش کوآگلوتیناسیون

● روحانی کارگرمؤخر ● وحید چایچی ● محمد حسامی‌قاجار ● بهروز قابوسی، اعضا هیأت علمی مؤسسه واکسن و سرم‌سازی رازی

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۷۷

چکیده

در این مطالعه امکان بکارگیری روش کوآگلوتیناسیون جهت تشخیص ویروسهای آبله گوسفند، آبله بز و اکتیمای واگیر گوسفند و بز مورد توجه قرار گرفته است. جهت انجام تحقیق ابتدا علیه هر سه ویروس سرم هیپرایمن تهیه گردید. مولکولهای پادتن بر روی سطح باکتری استافیلوکوک طلائی گوان ۱ چسبیده می‌شوند سپس از روش کلاسیک مخلوط پادگن و پادتن بهره برده، چنانچه ویروس با سرم از یک جنس باشند با استفاده از این کیت بخوبی شناسائی می‌شوند. برای تعیین حساسیت و ویژگی روش کوآگلوتیناسیون از تزریق به بره حساس و جداکردن ویروس بر روی کشت سلول به عنوان مارکر استفاده شده و به ترتیب ویژگی و حساسیت کیت تهیه شده علیه ویروس اکتیما در مقایسه با تزریق به بره حساس ۸۵٪ و ۸۲/۴٪ دیده شده است. حساسیت و ویژگی کیت تهیه شده علیه آبله گوسفندی در مقایسه با تزریق به بره حساس ۸۵/۲٪ و ۹۲/۳٪ ملاحظه از نظر آبله بزی به دلیل کمبود نمونه‌های دریافتی حساسیت و ویژگی کیت تهیه شده محاسبه نگردیده است. همچنین در این مطالعه احتمال بکارگیری کیت کوآگلوتیناسیون تهیه شده برای تشخیص پادگن‌های ویروسی در سطح سلولهای آلوده به ویروس مورد مطالعه قرار گرفته است.

✓ Pajouhesh & Sazandegi, No 39, PP: 87-89

Diagnosis of sheep Pox, caprine pox and contagious ecthyma using coagglutination method.

By: Kargar Moakhar R., Chaychi V., Hossami Ghajar M. and Ghaboosi B., Razi Research Institute.

In this study, the possibility of application of coagglutination technique for detection of sheep pox, goat pox and orf viruses is considered. For this purpose, hyperimmune sera were produced against all this three viruses and were exposed with *Staphylococcus aureus* strain Cowan I. This bacterium absorbes antibody molecules on its surface and this antibody molecules can attach to the virus. After mixing the virus suspension with a 2% suspension of bacteria (that is the diagnostic kit), agglutination will ensue. The kit which is for detection of orf virus is named orf kit and the kits which are used for identification of the two other viruses, are named sheep kit and goat kit. 70 orf infection samples that were tested with injection to suseptible lambs and virus isolation in cell culture, were tested with orf kit also and sensitivity, specificity of orf kit were calculated in comparison with injection to lamb and cell culture. Sensitivity and specificity of orf kit in comparison with injection to lamb are 85% and 82.4% respectively. Sensitivity and specificity of orfkit in comparison with cell culture are 94.1% and 89.5% respectively. Sensivity and spcificity of sheep kit are calculated with testing of 40 sheep pox samples and comparison of results with injection to suseptible lambs. They are 85. 2% and 92.3% respectively. There were not enough goatpox samples, so sensitivity, specificity of goat kit were not calculated. Also in this study possibility of the use of the coagglutination kit for detection of viral antigens on the surface of the infected cells Jwas considered and it was successful.

مقدمه

روش کوآگلوتیناسیون، در چند دهه اخیر، به منظور تشخیص پادگن‌ها، باکتریها و ویروسهای زیادی مورد استفاده قرار گرفته است و در اکثر موارد، با موفقیت همراه بوده است. از آن جمله می‌توان به تشخیص باکتریهایی مانند *Vibrio cholerae*، *Niesseria gonorrhoeae*، ویروسهایی مانند نیوکاسل، روتاویروس بوقلمون و همچنین پادگن‌هایی مانند پادگن F_{41} باکتری *E. coli* و پادگن‌های انگل *Toxoplasma gondii* اشاره کرد. اساس این روش به وجود پروتئین A که یکی از پادگنهای مهم باکتری *Staphylococcus aureus* است، بستگی دارد. این پروتئین، قادر است به قسمت Fc ملکول پادتن، به طور غیر اختصاصی متصل شود و قسمت Fab این ملکول را برای اتصال به پادگنها، به طور اختصاصی، آزاد بگذارد. در صورت تهیه سرم هایپرایمیون، علیه یک پادگن خاص، و اتصال آن به این پروتئین موجود در سطح باکتری، می‌توان یک کیت، تشخیصی را برای ردیابی آن پادگن، تهیه کرد.

در این پژوهش، این کار برای تشخیص و ردیابی ویروس آبله گوسفندی، آبله بز و ویروس orf صورت گرفت. این ویروس‌ها عوامل بیماری‌های بسیار مهمی درگوسفند، بز و بره‌های جوان هستند و با وجود اعمال واکسیناسیون، هنوز هم در بسیاری از ممالک، از جمله ایران، این بیماری‌ها موجب مرگ و میر بسیاری از دامهای تولید می‌باشند. بدیهی است که با ارائه روشهای مختلف و صرف هزینه و تشخیص سریع‌تر و کارآمدتر، می‌توان در جلوگیری از گسترش و شیوع این بیماری‌ها گامهای بلندتری برداشت.

مواد و روشها

۱- تهیه سرم هاپیرایمیون

برای این منظور از بز استفاده گردید، زیرا نسبت به سایر حیوانات، میزان بیشتری از ملکول IgG را تولید کرده و IgG آن دارای میل ترکیب بیشتری نسبت به پروتئین A است. در این حالت، برای هر یک از سه ویروس فوق‌الذکر، ۳ بز سالم انتخاب شده و از آنها به منظور اطمینان از فقدان هر گونه پادتن علیه هر یک از ویروسها، خونگیری به عمل آمده و سرمها به منظور بررسی، نگهداری شد.

برای تهیه سرم‌هاپیرایمیون ضد آبله گوسفندی (SPV)، ۱۰ دز واکسن آبله گوسفندی، در ۱۰ نقطه از بدن بز، به صورت بین جلدی تزریق گردید. سپس ۲۰ روز بعد، یک میلی‌لیتر از مایع آبله که مملو از ویروس

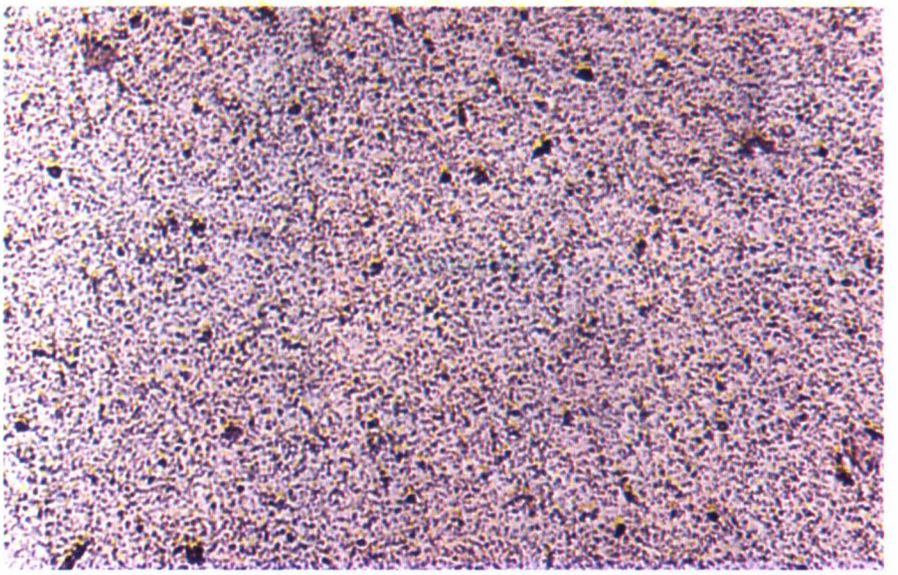
حاد آبله گوسفندی است، به صورت بین جلدی در ۵ نقطه از بدن بز تزریق شده و ۱۴ روز بعد خونگیری به عمل آمد و سرم آن در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. از آنجاکه ویروس قادر است در بدن بز فعالیت نماید، نیازی به استفاده از یاور وجود ندارد.

برای تهیه سرم هایپرایمیون ضد آبله بز (GPV) نیز از ویروس واکسن آبله بز، به همان روش استفاده گردید. به منظور تهیه سرم هایپرایمیون ضد ویروس orf، از ویروس جدا شده از نمونه‌های مرضی استفاده گردید. این ویروس قبلاً در سلول RBK جداسازی شده و عیار آن در حدود $10^{9/62}$ TCID ۵۰/ml بود. ۲ میلی‌لیتر از این ویروس، به صورت بین جلدی، در چندین نقطه از بدن بز، تزریق گردید. ۱۰ روز بعد، ۲ میلی‌لیتر از ویروس، به همان روش تزریق شد. ۱۰ روز بعد نیز یک میلی‌لیتر و سپس ۱۴ روز بعد، خونگیری به عمل آمده و سرم آن در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

۲- تهیه کیت کوآگلوتیناسیون برای سه ویروس

الف) تهیه و آماده سازی باکتری

۱- باکتری به صورت لیوفیلیزه، از سازمان پژوهشهای علمی - صنعتی کشور تهیه شد. ۲- باکتری در محیط مغذی مایع (Nutrient Broth) کشت داده شد و به منظور تائید باکتری، از محیط‌های افتراقی استفاده شد. پس از تائید باکتری، به منظور فعال‌سازی بیشتر باکتری آن را بر روی محیط جامد بلادآگار (Blood agar) کشت داده شد. ۳- برای تکثیر باکتری، از محیط Trypticase soy broth که توسط عصاره مخمر (به میزان ۵ گرم در لیتر) و پپتون (به میزان ۱۰ گرم در لیتر) غنی شده است، استفاده گردید. کلونی‌های باکتری که در روی بلاد آگار تشکیل شده بودند، توسط سرم فیزیولوژی استریل حل شده و در ۴ لیتر از محیط مایع مذکور وارد و یک شب در گرمخانه ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت. پس از رشد باکتری، این محیط کدر و زرد رنگ می‌شود. ۴- باکتری‌ها توسط سانتریفوژ با دور ۳۰۰۰ rpm و به مدت ۳۰ دقیقه، ته نشین می‌شوند. مایع رویی دور ریخته شده و رسوب ۵ بار توسط PBS حاوی ۰/۵ درصد فرمالین قرار می‌گیرد. سپس باکتری‌ها ۳ بار توسط PBS شسته می‌شوند. پس از آن، سوسپانسیون ۱۰٪ حجم ۲۰ حجم باکتری در PBS و به مدت نیم ساعت در بن ماری ۸۰ درجه سانتیگراد حرارت داده می‌شود. سوسپانسیون ۱۰٪ باکتری را می‌توان تا زمان مصرف در یخچال ۴ درجه سانتیگراد نگهداری کرد.



عکس شماره ۱

ب) پوشاندن باکتری توسط ملکول پادتن

یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون ۱۰٪ باکتری که به روش فوق تهیه شده است با ۰/۵ میلی‌لیتر از سرم هالیپراسیون مواجه می‌شود. این کار به طور جداگانه برای هر سه ویروس صورت می‌گیرد. مخلوط سرم و باکتری، یک ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفته و هر ۱۰ دقیقه یک بار به آرامی تکان داده می‌شود. پس از آن، این مخلوط ۵ بار توسط PBS شسته می‌شود تا پادتن‌های جذب نشده خارج شوند. سپس دوباره غلظت باکتری توسط PBS به ۱۰٪ رسانده شد.

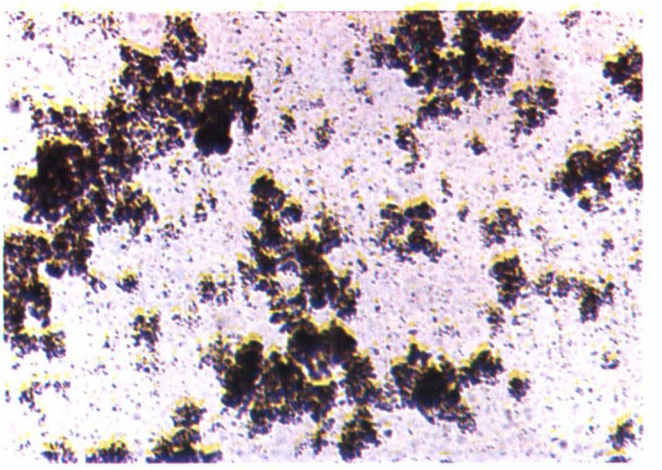
ج) رنگ‌آمیزی باکتریها

به یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون ۱۰٪ باکتری که توسط پادتن حساس شده است، حدود ۰/۵ تا ۱ میلی‌لیتر محلول کریستال ویوله اضافه می‌شود. پس از ۱۰ دقیقه، باکتری‌ها دوبار توسط PBS شسته شده و غلظت آنها به ۱۰٪ می‌رسد. سپس، ۰/۵ تا ۱ میلی‌لیتر محلول لوگل به آن اضافه می‌گردد. پس از ۱۰ دقیقه، باکتریها سه بار کاملاً شسته شده و غلظت آنها به ۲٪ رسانده شده و این سوسپانسیون ۲٪ باکتری، کیت تشخیصی را تشکیل می‌دهد.

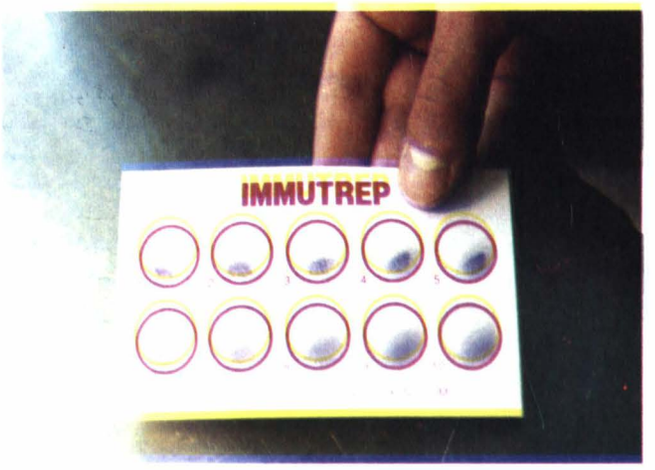
۳- جمع‌آوری نمونه‌های مرضی

نمونه‌های مشکوک به آبله گوسفند، آبله بز واکتیما کونتاجیوزوم (بیماری حاصل از ویروس orf)، به صورت لژیون‌ها و قطعات آسیب دیده پوستی، به آزمایشگاه ارسال می‌شود. این نمونه‌ها کاملاً خرد شده و توسط

عکس شماره ۲



عکس شماره ۳



سرم فیزیولوژی استریل، یک سوسپانسیون ۱۵٪ از آنها تهیه می‌گردد. این سوسپانسیون، به مدت ۲۰ دقیقه، ۲۵۰۰ RPM سانتریفوژ شده و مایع رویی جهت تلقیح به بره حساس استفاده می‌شود. نمونه‌های ارسالی، پس از تلقیح به بره و ثبت نتایج، در فریزر ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری شده تا پس از ساخته شدن کیت‌ها، مورد استفاده قرار گیرند.

۴ روشهای انجام تست کوآگلوتیناسیون

۱- روش لازم: یک قطره از کیت و یک قطره از سوسپانسیون ویروس (سوسپانسیون ۱۵٪ نمونه‌ها، روی لام میکروسکوپ قرار داده و توسط یک چوب، یک پیپت پاستور و یا اپلیکاتور پلاستیکی به خوبی مخلوط می‌گردند. سپس به چوب، یک پیپت پاستور ویا اپلیکاتور پلاستیکی به خوبی مخلوط می‌گردند. سپس به لام به مدت ۳ دقیقه، به صورت افقی و دورانی حرکت داده می‌شود تا حالت آگلوتیناسیون، در مدت یک یا دو دقیقه ایجاد شود که به خوبی با چشم غیر مسلح قابل دیدن است. برای اطمینان بیشتر از نتیجه کار، می‌توان یک لامل روی آن قرار داده و با میکروسکوپ و با بزرگنمایی کم باکتریهای متصل به هم و جمع شده را مشاهده کرد.

۲- روش اسلاید پلاستیکی: در این روش می‌توان به جای لام از صفحاتی که در برخی آزمایشات سرولوژی استفاده می‌شود، جهت تشخیص بهره گرفت.

۳- جستجوی پادگن ویروسی توسط باکتری پوشیده شده با پادتن، در کشت سلول: با این روش می‌توان پادگن ویروس را قبل از ظهور با CPE در کشت سلول، ردیابی کرد. برای این کار از سلول RBK که در لایتن تیوب کشت داده شده استفاده گردید. پس از تلقیح ویروس orf، می‌توان قبل از ظهور CPE با خارج کردن سلولها و فیکس کردن آنها توسط استن (به مدت ۱۰ دقیقه)، و اضافه کردن کیت، پادگن‌های ویروسی موجود در سطح سلولها را شناسایی کرد.

نتایج

تمامی نمونه‌های مرضی که جمع‌آوری شده بود و قبلاً به روش تلقیح به حیوان حساس، مثبت و منفی بودن آنها تعیین شده بود، توسط کیت‌های ساخته شده، مورد آزمایش قرار گرفتند و نتایج به دست آمده جهت محاسبه حساسیت، ویژگی و ارزش اخباری مورد استفاده قرار گرفتند. حساسیت ویژگی، ارزش اخباری مثبت و منفی کیت مخصوص تشخیص ویروس SPV به ترتیب برابر ۸۵/۲٪، ۹۲/۳٪، ۹۵/۸، ۷۵٪ برآورد شد و این موارد در مورد کیت مخصوص تشخیص ویروس GPV به علت کمبود نمونه‌های ارسالی محاسبه نشد.

تصویر ۱، باکتری آگلوتینه نشده را با بزرگنمایی x۴۰۰ نشان می‌دهد و تصویر شماره ۲ نیز مربوط به باکتری آگلوتینه شده است. تصویر ۳، یک اسلاید پلاستیکی رانشان می‌دهد، در ردیف بالا، همه نمونه‌ها مثبت و در ردیف پائین، همه نمونه‌ها منفی هستند.

تصویر شماره ۴، سلولهای آلوده به ویروس را نشان می‌دهد که قبل از ظهور CPE، با کیت مواجه شده‌اند، همانگونه که مشاهده می‌شود، باکتریها بر روی سلولها تجمع کرده‌اند در حالیکه این حالت در مورد سلولهای آلوده نشده دیده نمی‌شود.

بحث

در این پژوهش سعی گردید از روش کوآگلوتیناسیون در تشخیص ویروسهای آبله گوسفندی، آبله‌بزی واکتیمای واگیر در نمونه‌های مرضی ارسالی استفاده شود. این روش برای اولین بار برای تشخیص آبله گوسفندی و اکتیما بکار گرفته شده است. سالها است که برای تشخیص ویروسهای آبله گوسفند و اکتیمای واگیر و آبله‌بزی از تزریق و عمل خراش دادن (Scasification) به بره حساس و همچنین بزغاله حساس استفاده می‌شود. روش انجام شده اگر چه درصد تشخیص بالائی دارد ولی غالباً حساس نبودن دام تزریق شده یا امکان آلوده شدن نمونه ارسالی با عوامل باکتریائی یا قارچی موجب واکنشهای مثبت و یا منفی کاذب می‌گردد. به همین دلیل میزان حساسیت و ویژگی روش کوآگلوتیناسیون هنگامیکه با روش تزریق به بره مقایسه می‌شود، چندان رقم بالائی را نشان نمی‌دهد. علت آن عدم قابلیت کوآگلوتیناسیون نمی‌باشد. بلکه عدم کفایت کامل روش تزریق به حیوان دلیل آن است. در حالیکه مقایسه میزان حساسیت و ویژگی کوآگلوتیناسیون با روش کشت سلول ارقام قابل قبول را نشان می‌دهد.

نکته مهم دیگر صرفه اقتصادی و مدت زمان آزمایش در روش کوآگلوتیناسیون است که این پاسخ به موقع و سریع می‌تواند جهت برنامه‌ریزی در امر پیشگیری و کنترل بیماری حائز اهمیت باشد.

منابع مورد استفاده

1- Chen W.F., et al., 1981. A rapid slide agglutination method for identification of Newcastle disease virus isolates with protein a containing *Staphylococcvs aureus* coated with specific antibody. Journal of the chinese society of veterinary science, 7: 1/P.55-66/.

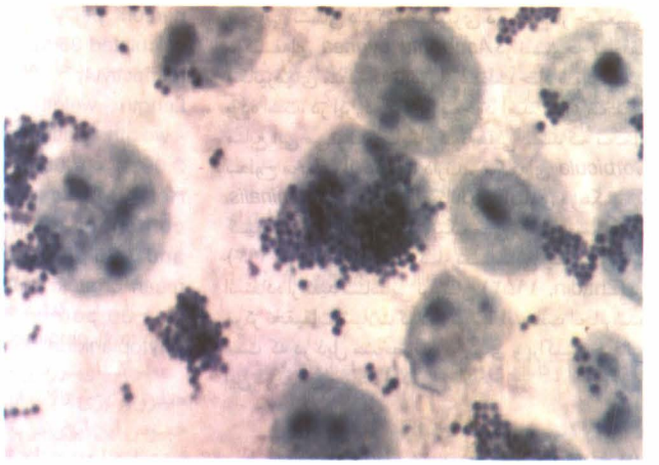
2- Hovanec D.L. et al., 1980. Coagglutination as a expedient for grouping *E. coli* associated with urinary tract infections. J. Clin. Microbiol. 11/P/41/.

3- Lalitha M.K., 1991. Rapid identification of clinically important bacteroides by coagglutination method. Indian Journal of Medica Research, 93/P. 98-102, 1991.

4- Hellmsan E., 1994. The identification of *Bacillus cereus, Bacillus lichenformis* and *Bacillus subtilis* strains using the coagglutination reaction. Berl Munch Tievarstl Wochenschr, 197 (9), P. 308-13, 1994.

5- Qudri F., 1994. Development and evalution of rapid monoclonal antibody based coagglutination test for direct *Vibroio cholerae O139* synonym Bergat in stool samples. J. Clin Microbiol / 32 (6) P.1589 - 90 / 1994.

عکس شماره ۴



عکس شماره ۵