ارزیابی طراحی کیت الایزای نقطه ای جهت تشخیص پادتنهای ضدویروس IBR در گاو

دکتر فرهید همت زاده[1]*

دریافت مقاله: ۲۲ اردیبهشت ماه ۱۳۸۲
پذیرش نهایی: ۱۲ شهریور ماه ۱۳۸۲

هدف: این تحقیق با هدف طراحی روشی آسان، سریع و کم هزینه برای تشخیص حضور پادتنهای ضد ویروس IBR در فاصله زمانی تابستان ۱۳۸۰ تا تابستان ۱۳۸۱ به انجام رسید.

روش: در اولین مرحله اقدام به تهیه آنتی گلوبولین گاوی گردید که این کار با ایمن سازی ۱۵ راس خرگوش با گلبولین های سرمی گاوهای سالم، طی یک برنامه ریزی مشخص ۸۳ روزه انجام شده و حضور آنتی گلوبولین های گاوی در سرم خرگوش به روش ژل دیفوزیون به تأیید رسید. پس از تهیه آنتی گلبولین گاوی در خرگوش اقدام به خالص سازی آنتی گلوبولین حاصله گردید و پس از پروتئین سنجی اقدام به کنژوگاسیون آنتی سرم حاصله با استفاده از آنزیم پراکسیداز هورس رادیش شد. پادگن استاندارد به طریق کشت انبوه ویروس IBR در تیره سلولی R-BK و خالص سازی به روش اولترا سانتریفوژ در ۳۰۰۰۰ گرم تهیه گردید.

نتایج: پس از لکه گذاری پادگن حاصله بر روی کاغذ نیتروسلولز و بلوک کردن مجموعه توسط PBS توئین حاوی BSA، رقتهای متفاوتی از ۵۰ نمونه مثبت و ۵۰ نمونه منفی سرم گاو و پادتن کنژوگه جهت دستیابی به پاسخهای دقیقتر تهیه گردید به طوری که رقت ۱:۲۰۰۰ برای آنتی گلوبولین کنژوگه، رقت ۱:۸ برای سرم مشکوک و رقت ۱ برای سوبسترا، بهترین پاسخها را در آزمون الایزای نقطه ای از خود نشان دادند.

تجزیه و تحلیل آماری: آزمون آماری مربع کای.

نتیجه گیری: درمرحله بعد جهت استاندارد کردن کیت اقدام به آزمایش تعداد ۴۸۸ نمونه سرمی اخذ شده از گاو های باسنین و جنسهای مختلف گردید و نتایج آزمایش به روش الایزای نقطه ای و الایزای پلیت با یکدیگر مقایسه گردیدند به طوری که میزان همخوانی آزمون الایزا با روش پلیت و الایزای نقطه ای ۸۸/۹ درصد محاسبه گردید و اختلاف معنی داری نیز بین این دو آزمایش مشاهده نگردید.

مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، (۱۳۸۲)، دوره ۵۸، شماره ۴، ۳۸۷-۳۸۳.

واژه های کلیدی: الایزای نقطه ای، IBR، الیزای غیر مستقیم، هرپس ویروس، پادگن، آنتی گلبولین، پراکسیداز.

بیماری تورم نای و بینی گاو IBR به عنوان یکی از مهمترین بیماریهای مهم صنعت پرورش گاو در دنیا می باشد که انتشار جهانی داشته و تاکنون از اکثر کشورهای قاره آمریکا، اروپا، افریقا، استرالیا و آسیا گزارش شده است (۵،۸).

به دلیل گسترش فزاینده عفونتهای هرپس ویروسی در سراسر جهان و حضور چهره های بسیار متفاوت ناشی از عفونت با این ویروسها در بین حیوانات مختلف، امروزه بویژه در سیستم دامپروری مدرن، برنامه ریزی جهت مبارزه با این بیماریها بویژه IBR در زمره برنامه اصلی مبارزه با بیماریهای عفونی می باشد (۲،۷،۲۴).

در ایران نیز به دنبال انجام برخی تحقیقات محدود گسترش موارد ابتلا به این عفونتها کاملاً مشهود می باشد. وجود دامهای آلوده ای که ویروس را طی دوره بیماری به سایر حیوانات منتقل می نمایند استقرار ویروس در دستگاه اعصاب محیطی و بروز آن به هنگام استرس سهولت انتقال ویروس بویژه به هنگام بروز تراکم و ارتباط چهره بالینی عفونت با جیره های غذایی خاص همگی لزوم به کارگیری روشهای دقیق و سریع را جهت برنامه ریزی برای مبارزه با این بیماری را طلب می کند (۲،۱۲،۲۴).

امروزه روشهای بسیار متعددی جهت تشخیص سرمی یا ردیابی پادگنی یا ژنتیکی ویروس IBR در دنیا ابداع گردیده است که به همراه ابزارهای لازم جهت اعمال مدیریت بهداشتی و واکسیناسیون به منظور پیشگیری از بیماری به کار می روند که می توان به آزمونهای SN، الایزا، ایمونوفلورسنت و بعضاً ایمونوپراکسیداز وایمونوبلاتینگ اشاره نموده اما به کارگیری آزمونهای فوق علی رقم دقیق و حساس بودن احتیاج به زمان، هزینه و وسایل خاص خود دارند لذا جهت انجام اعمال تشخیصی، آزمونهای استفاده وسیعتری خواهند داشت که علی رغم برخورداری از حساسیت بالا، ساده، سریع و کم هزینه باشند (۱۰،۱۷،۲۰،۲۴).

روشهای گوناگونی برای آزمون الایزا طراحی شده است که انتخاب هر یک از آنها به نوع نمونه، مواد قابل دسترس و حساسیت مورد انتظار در تشخیص بستگی دارد. از مزیتهای الایزا می توان به سهولت کار کردن با آنزیم، توان نگهداری آنزیم به مدت طولانی و حساسیت بالا یعنی تقریباً مشابه آزمایشات رادیوایمنواسی اشاره نمود (۱۹).

الایزای نقطه ای روش ساده ای از آزمایش الایزا است که اصول آن نیز مانند الایزا بوده ولی در آن به جای استفاده از پلیت های پلی استرین از کاغذهای

[1]) گروه آموزشی میکروبیولوژی و ایمونولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
*) نویسنده مسئول fhemmat@chamran.ut.ac.ir

Evaluation of a dot ELISA system for detection of seroconversion to infectious bovine rhinotracheitis virus

Hemmatzadeh, F.[1]

[1] *Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.*

Objective: The purpose of this study was to designing a simple, sensetive and cheep method based on dot ELISA system for detecting of seroconversion to infectious bovine rhinotracheitis virus (IBRV).

Procedure: In the first step rabbit antibovine immunoglobins was conjugated with horseradish peroxidas and purifide IBR virus was used as coated antigen on nitrocellulose membrane. In order to standardization of the kit, 50 positive and 50 negative sera that tested by comercial ELISA kit (Svanova) and evaluated the best dilution of the materials that used in the test.

Results: The optimum dilution of different compound of the dot ELISA kit were: 1:200 for HRPO conjugated antiglobulin, 1:8 for serum and 1 for tetramethylbenzidin as substrate.

In order to evaluation of correlation of dot ELISA method with comercial ELISA kits, 488 serum samples were tested by two mentioned testes.

Statistical analysis: Chi squire test .

Conclusion: Dot ELISA have revealed 88/9% corrlation with plate ELISA and no significant difference between results of this two tests. *J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran. 58, 4: 383-387, 2003.*

Key words: Dot ELISA, ELISA, IBR, Serology, Herpesvirus, antigen, Antibody, Peroxidase

Corresponding author email:fhemmat@chamran.ut.ac.ir

نیترو سلولز استفاده می شود. در این روش پادگن به سطح کاغذ نیترو سلولز متصل شده و کمپلکس پادگن - پادتن توسط ظهور نقطه رنگی که به وسیله تأثیر آنزیم بر یک سوبسترای رنگی تشکیل می شود ردیابی می گردد (۱۹).

این آزمایش از نظر حساسیت و ویژگی با الایزا قابل مقایسه است. این آزمایش بسیار ساده بوده و در مدت زمان کمی قابل انجام می باشد. همچنین نتایج این آزمایش با چشم قابل مشاهده است. این آزمایش نیاز به هیچ ابزار و وسیله پیچیده ای ندارد. کاغذ نیترو سلولز آماده شده با پادگن تا مدتها بدون هیچ تغییری در یخچال قابل نگهداری می باشد. به وسیله این آزمایش می توان پادگن یا پادتن را در نمونه بالینی ردیابی نمود. هنگام ردیابی پادتن در نمونه سرم یا خون کامل، پادگن را روی کاغذ نیترو سلولز متصل نموده و کاغذها را با نمونه های مورد آزمایش انکوبه می کنند و پس از مراحل شستشو وانکوباسیون کنژوگه ، سوبسترا اضافه می شود که در صورت وجود پادتن ضد پادگن اتصال یافته با نیترو سلولز، لکه رنگی در محل حضور پادگن ظاهر می گردد (۱۹).

هدف از انجام این تحقیق طراحی روش الایزای نقطه ای به منظور تشخیص پادگن های ضد ویروس BVD در گاو می باشد.

مواد و روش کار

مواد و وسایل مورد استفاده: کشت سلولی ("R-BK" Razi - Bovine Kidney)، محیط کشت سلولی استوکر، سرم جنین گاو، تریپسین ورسن، آنتی بیوتیک های پنی سیلین و استرپتومایسین، ادجوانت ناقص فروند، سولفات آمونیوم، آنزیم پراکسیداز، بافر فسفات سالین، ویروس IBR، بطریهای رو، التراسانتریفوژ، انکوباتور، همزن، سمپلر، غشا دیالیز.

تهیه پادگن: اولین مرحله کار تهیه پادگن ویروس IBR بود. بدین منظور از ویروس IBR جدا شده در ایران که در آزمایشگاه موجود بود استفاده گردید. به علت آنکه تعدد سروتیپ در بین ویروسهای IBR وجود نداشته و جدایه های موجود نیز از نظر اختلافات پادگنی همپوشانی بسیار زیادی با هم دارند از سویه جدا شده در ایران به منظور تهیه پادگن استفاده گردید. ابتدا سویه ویروسی مذکور در کشت سلولی R-BK به میزان زیاد تکثیر شده و به روش $TCID_{50}$ عیار سنجی گردید (۲،۳،۴،۶،۹،۱۴).

در مرحله بعد جهت تهیه پادگن، ویروس در کشت سلولی R-BK تکثیر داده شد و سپس خالص سازی آن به روش اولتراسانتریفوژ صورت گرفت. برای این منظور پس از کشت ویروس IBR و کامل شدن CPE در کشت سلولی تک لایه، محتویات هر بطری یکبار در ۱۰۰۰ گرم به مدت ۱۵ دقیقه در درجه حرارت ۴ درجه سانتیگراد به منظور رسوب بقایای سلولی سانتریفوژ شده و سپس به منظور خالص سازی ویروس مایع روی حاصل از سانتریفوژ به مدت ۹۰ دقیقه در ۳۰۰۰۰ گرم در درجه حرارت ۴ درجه سانتیگراد اولتراسانتریفوژگردیده و پس از جدا سازی مایع روی لوله ها ی سانتریفوژ، اقدام به تهیه تعلیق از رسوب حاصل از اولتراسانتریفوژ در PBS حاوی آنتی بیوتیک گردید. سپس تعلیق حاصله به آرامی بر روی بالشتک سوکرز ۳۰ درصد قرارداده شده و مجدداً در ۳۵۰۰۰ گرم به مدت ۶۰ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ گردید. این عمل به منظور تغلیظ ویروس و خارج نمودن پروتئینهای محیط کشت و جهت ممانعت از انجام واکنشهای غیر اختصاصی انجام گرفت. رسوب حاصله در PBS حل شده و میزان پروتئین آنتی ژن حاصله به روش لوری سنجیده شده و نهایتاً میزان آنتی ژن لازم جهت لکه گذاری معادل ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر محاسبه و رقت مورد نظر تهیه گردید (۱،۱۲،۱۵،۱۶).

تهیه آنتی گلوبولین: برای تهیه آنتی گلوبولین در ابتدا گلبولین سرمی مربوط به مجموعه سرم چند گاو و ترسیب شده به روش سولفات آمونیم اشباع و دیالیز شده در حضور PBS به ۱۰ رأس خرگوش جوان و سالم به وزن تقریبی ۱/۵-۱ کیلوگرم طی ۵ مرحله زمانی ۱۵ تا ۲۰ روزه (جمعاً ۶۵ روز) تزریق گردیدند. دو تزریق زیرجلدی به همراه ادجوانت ناقص فروند به فاصله ۱۵ روز در ۱۰ نقطه از پوست کمر در دو طرف ستون مهره ها انجام گرفت و دو تزریق عضلانی نیز بدون ادجوانت در عضله ران به فاصله ۱۵ روز صورت گرفت. تزریق آخر نیز به روش داخل وریدی به میزان یک میلی لیتر انجام شد. ۲۰ روز پس از تزریق پنجم از خرگوشها خونگیری شد و برای تعیین حضور آنتی گلوبولین آزمون ژل دیفوزیون بر روی نمونه های سرم صورت گرفت. چند ساعت پس از خونگیری و انعقاد نمونه های خون با استفاده از سانتریفوژ دور پایین نمونه سرمی از لخته جدا گردید و جهت غیر فعال سازی به مدت نیم ساعت در بن ماری ۵۶ درجه قرار گرفتند. خالص سازی آنتی گلوبولین با استفاده از سولفات آمونیوم اشباع و دیالیز در حضور PBS انجام گرفت(۱۳،۱۴).

تهیه آنتی گلوبولین کنژوگه: در این تحقیق برای نشاندار کردن آنتی گلوبولین از آنزیم پراکسید از استفاده گردید. میزان پر اکسیداز مورد نیاز بر اساس میزان پروتئین گلوبولین نمونه می بایستی محاسبه و تنظیم گردد. به همین منظور از روش پروتئین سنجی لوری استفاده گردید که در نهایت میزان پروتئین آنتی گلوبولین برابر ۸ mg/ml تنظیم گردید (۱۵). سپس عمل کنژوگاسیون مطابق روش Hudson در سال ۱۹۸۹ با استفاده از آنزیم پر اکسیداز هورس رادیش در حضور بافر بی کربنات انجام گرفت (۱۴،۱۵).

روش انجام آزمون الایزای نقطه ای: برای شروع کار ابتدا کاغذ نیتروسلولز را به قطعات مساوی ۱/۵ سانتیمتری بریده و بعد از شماره گذاری در گوشه تکه های کاغذ آنها را روی شیشه ای که از قبل با الکل و آب مقطر تمیز شده و عاری از هرگونه چربی یا پروتئین است قرار داده می شوند زیرا وجود هر گونه مواد پروتئینی و چربی روی سطح شیشه و یا حتی روی وسایل کار باعث ایجاد تداخل در انجام کار می شود.

بعد از قرار دادن کاغذهای نیتروسلولز روی شیشه، روی هر کدام ۲۰ میکرولیتر از پادگن تهیه شده در مرحله قبل را به شکلی قرار داده که قطره حاصله تنها در وسط کاغذ مستقر شده و به اطراف پراکنده نگردد و اجازه می دهیم تا لکه پادگن در دمای آزمایشگاه خشک شود. بعد از خشک شدن مجدداً ۲۰ میکرولیتر از پادگن را روی محل لکه قبلی قرارداده و مجدداً اجازه می دهیم تا خشک شود و این کار در مجموع سه مرتبه انجام می گیرد. این عمل باعث اتصال پروتئین پادگن به صفحات نیتروسلولز می شود پس از پایان مرحله سوم کاغذهای لکه گذاری شده سه بار با محلول PBS-T شسته می شوند تا پروتئینهای غیر متصل شسته شده و حذف گردند (۱۵).

بعد از این مرحله هرکدام از تکه های کاغذ را به صورت جداگانه در یک گوده پلیت ۶ خانه قرار داده و میزان ۲ میلی لیتر محلول یک درصد BSA-PBS روی کاغذها ریخته و به مدت یکساعت روی دستگاه تکان دهنده قرار می دهند. این عمل باعث بلوک شدن قسمتهای خالی کاغذ نیترو سلولز با BSA می گردد. بعد از بلوک کردن کاغذها، آنها را سه مرتبه با بافر PBS توئین شستشو داده تا پروتئینهای اضافی و غیر متصل از سطح کاغذ حذف گردند. چنین کاغذ هایی بعد از خشک کردن برای ماهها در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد قابل نگهداری هستند (۱۵).

جهت استاندارد نمودن روش ۵۰ نمونه سرمی مثبت و ۵۰ نمونه سرمی منفی که قبلاً با آزمایش الایزای پلیت آزمایش شده و مشخص گردیده بودند انتخاب شده و رقت های ۱:۴، ۱:۸ و ۱:۱۶ از آنها تهیه گردید و میزان یک میلی لیتر از هر رقت بر روی کاغذ نیتر و سلولز قرار داده شد و شماره کاغذ و شماره سرم و رقت مورد استفاده در آزمایش یادداشت می گردید بعد از قرار دادن سرمها روی کاغذهای مربوطه آنها را به مدت یک و نیم ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد و در شرایط مرطوب گرمخانه گذاری می شدند.

بعد از اتمام این زمان کاغذها را از انکوباتور خارج کرده و برای حذف پادتن های متصل نشده به پادگن، آنها را سه مرتبه و هر مرتبه به مدت ۱۰ دقیقه با PBS توئین شستشو می دهند. مرحله بعد افزودن آنتی گلوبولین کنژوگه با آنزیم پراکسیداز به محل لکه گذاری شده می باشد. به همین منظور ۲۰ میکرولیترآنتی گلوبولین کنژوگه را توسط PBS-T به میزانهای ۱:۱۰۰۰ و ۱:۲۰۰۰ رقیق کرده و هر رقت کنژوگه را به یکی از کاغذهای حاوی رقت های سرمی از قبل تهیه شده اضافه کرده و مجددا در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت یک ساعت قرار می دهند تا در صورت حضور پادتن مربوطه در محیط به پادتن کنژوگه متصل شود.

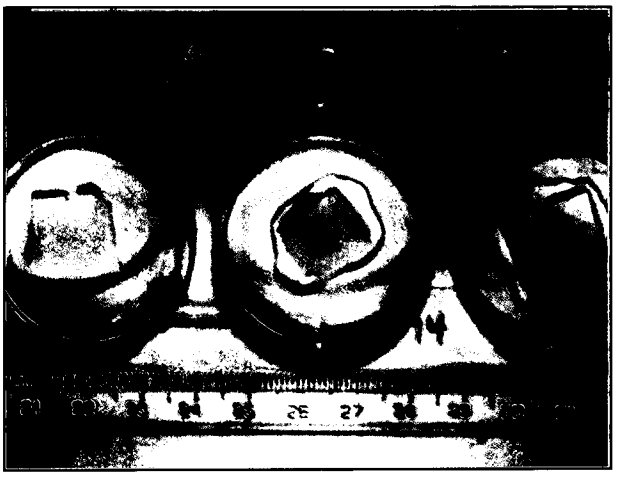
بعد از گذشت این زمان کاغذها را از انکوباتور خارج کرده و مجدداً برای حذف آنتی گلوبولین های کنژوگه متصل نشده به پادتن ها، کاغذها را سه مرتبه با PBS توئین شستشوگردیده و بعد از خشک شدن تقریبی کاغذها به هرکدام از آنها میزان ۱۰ میکرولیتر از سوبسترای رقیق نشده که حاوی تترامتیل بنزیدین و آب اکسیژنه است افزوده شده به طوری که بعد از اضافه کردن سوبسترا این ماده ظرف به مدت ۵ دقیقه با پراکسیداز موجود در محیط واکنش داده و محصول واکنش که یک لکه آبی رنگ است مشاهده می شود بدیهی است که نمونه هایی که طی این مدت رنگ آبی را نشان دهند مثبت قلمداد شده و نمونه هایی که رنگ آبی را نشان ندهند منفی می باشند (تصویر ۱).

البته قابل ذکر است در صورت ماندن نمونه ها برای مدت بیشتر از ۱۵ دقیقه ، سوبسترا خود به خودواکنش داده و کاغذها آبی رنگ می گردند و باعث بروز اشکال در خواندن نتیجه آزمایش می شوند به همین دلیل ضروری است بعد از گذشت ۱۵ دقیقه از زمان افزودن سوبسترا به نمونه ها، با افزودن اسید یا قلیا یا آب مقطر به کاغذها واکنش را متوقف نماییم (۱۳،۱۴).

در این تحقیق به منظور ارزیابی به کارگیری آزمون الایزای نقطه ای در تشخیص سرمی آلودگی گاوها با ویروس IBR با توجه به فرمول $n = \frac{z^2 pq}{d^2}$ از ۴۸۸ رأس گاو در سنین مختلف به طریقه نمونه گیری خوشه ای تصادفی (Cluster random sampling) نمونه سرمی اخذ و با آزمون الایزای پلیت به عنوان آزمون استاندارد آزمایش گردیدند. به منظور تجزیه و تحلیل آماری اطلاعات حاصل از نتایج از نرم افزار آماری Instat و آزمون آماری مربع کای با سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده گردید.

نتایج

همان طورکه در مباحث مربوط به روش کار نیز بیان گردید، می توان نتایج حاصل از این تحقیق را به دو دسته تقسیم نمود. نتایج مرحله اول مربوطه به روش استاندارد نمودن آزمون و به دست آوردن بهترین عیارهای سرمی از حیوانات آزمایشگاهی، بهترین رقت سرمی مربوطه به آنتی سرم های کنژوگه و بهترین غلظت پادگن ویروسی بود.



تصویر ۱- مقایسه یک مورد مثبت (راست) با یک مورد منفی (چپ).

بهترین عیار سرمی آنتی گلوبولین در بدن خرگوش با توجه به نتایج حاصل از آزمون ژل دیفوزیون در بیست روز بعداز تزریق داخل وریدی در خرگوشها به دست آمد که در همین زمان نیز از خرگوشها خونگیری به عمل آمده و اقدام به جداسازی سرم گردید. بهترین غلظت پادگن ویروس معمولاً غلظتی است که از رسوب حاصل از اولتراسانتریفوژ در ۱:۱۰۰حجم اولیه نمونه ویروسی با عیار اولیه 10^5 تا $10^{5/5}$ $TCID_{50}$ تهیه گردد. بعداز آن با دست یافتن به تمام اجزای آزمایش که شامل پادگن ویروسی نمونه های سرمی مربوط به گاوها آنتی گلبولین کنژوگه و سوبسترا می باشد برای به دست آوردن بهترین رقت از این اجزا، رقتهای مختلفی از آنها تهیه و با استفاده از ۱۰۰ نمونه سرمی از قبل آزمایش شده مورد آزمایش قرار گرفت به طوری که از آنتی گلوبولین کنژوگه رقتهای۱:۱۰۰۰، ۱:۲۰۰۰ و ۱:۵۰۰۰ از سرم رقتهای ۱:۴ ۱:۸ و ۱:۱۶ و از سوبسترا رقت اولیه تهیه شده و اقدام به انجام آزمایش گردید که با بررسی نتایج به دست آمده مشخص گردید که بهترین رقت آنتی گلوبولین کنژوگه۱:۲۰۰۰ می باشد که به همراه سرم با رقت ۱:۸ و سوبسترای رقیق نشده بهترین همخوانی را با نتایج مرحله قبل دارند. پایان این مرحله اولین قدم استاندارد نمودن روش الایزای نقطه ای جهت تشخیص IBR می باشد.

در مرحله بعدی ۴۸۸ نمونه سرمی مورد ارزیابی قرار گرفته به طوری که در ابتدا کلیه نمونه ها با استفاده از آنها با آزمون الایزا به روش پلیت ساخت شرکت Svanova مورد آزمایش قرار گرفت و سپس این نمونه ها طی چند تکرار با استفاده از آزمون الایزای نقطه ای مورد آزمایش قرار گرفتند و نتایج آنها ثبت گردید. انجام تکرارها جهت مطالعه چگونگی تکرار پذیری آزمایش در زمانهای مختلف بود (۱۵).

از تعداد ۴۸۸ نمونه آزمایش شده با آزمون الایزا به روش پلیت تعداد ۴۰۸ نمونه از نظر حضور پادتن ضد ویروس IBR مثبت و ۸۰ نمونه منفی ثبت شد که بیانگر ۸۳/۶ درصد مثبت و ۱۶/۴ درصد منفی می باشد همچنین از تعداد ۴۸۸ نمونه آزمایش شده با روش الایزای نقطه ای با استفاده از کیت تهیه شده در مجموع ۳۹۸ نمونه از نظر حضور پادتن های ضد ویروس IBR مثبت و ۹۰ نمونه منفی گزارش گردیدند که این بیانگر ۸۱/۵ درصد موارد مثبت و ۱۸/۶ درصد موارد منفی می باشد. انجام آزمون کای اسکوار حاکی از وجود ارتباط معنی دار بین پاسخهای حاصله از این دو آزمون بوده و میزان همخوانی این دو روش جهت انجام آزمون سرولوژیک برابر ۸۸/۹ درصد و حساسیت آزمون الایزای نقطه ای در حدود ۹۳ درصد محاسبه گردید.

جدول ۳ - توزیع نتایج دو آزمون Dot ELISA و Plate ELISA.

	+Dot ELISA	-Dot ELISA	موارد منفی
+ELISA (Plate)	۳۷۶	۲۲	۳۹۸
-ELISA (Plate)	۳۲	۵۸	۹۰
	۴۰۸	۸۰	۴۸۸

بحث

وفور بیماری IBR در ایران و اهمیت فوق العاده آن بویژه در سیستمهای پرورش گاو صنعتی لزوم اجرای برنامه های مدیریت بهداشتی را در جمعیت گاوها را دوچندان کرده است . در حال حاضر تقریباً هیچ گونه برنامه کنترلی برای IBR در ایران انجام نمی گیرد و منهای موارد انگشت شمار، قدمی در جهت تشخیص و تعیین وضعیت آلودگی در کشور برداشته نمی شود. لذا در مورد بیماری IBR همانند سایر بیماریهای عفونی اولین قدم شناسایی وضعیت موجود چه در جمعیتها به شکل کلی و چه در مبتلایان به شکل جزیی می باشد. در شرایط کنونی در ایران از روشهای SN و ELISA در دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران و مؤسسه رازی جهت تشخیص سرولوژیک بیماری و همچنین از روش کشت سلولی برای جداسازی ویروس استفاده می شود (۲۱).

در بین روشهای فوق آزمون SN آزمونی دقیق و با ارزش است به طوری که حساسیت و ویژگی آن را به ترتیب ۹۴و ۹۶ درصد ذکر نموده اند اما این آزمون بسیار وقت گیر و انجام آن نیازمند داشتن تجهیزات کافی و دانش فنی خاصی بویژه در اختیار داشتن کشت سلولی و سویه استاندارد ویروس می باشد. لذا انجام این آزمایش تنها به مراکز خاصی در مملکت محدود شده است. آزمون الایزا گرچه از نظر تکنیکی سهلتر بوده و حساسیت و ویژگی مطلوبی را نیز داراست ولی نیازمند داشتن دستگاه قرائت کننده الایزا و خروج ارز برای واردات کیت از کشورهای اروپایی می باشد و به همین دلایل آزمونی گران قیمت محسوب می گردد. به هر ترتیب با توجه به آنکه در شرایط فعلی برنامه واکسیناسیون مدونی برای مبارزه با IBR در مملکت انجام نمی گیرد و مشاهده هرگونه عیار سرمی دال بر آلودگی قبلی دام با ویروس عامل بیماری می باشد و به علت طبیعت خاص هرپس ویروس ها به دنبال یک‌بار آلودگی ویروس در بدن حیوان، بویژه در عقده های عصبی مستقر شده و به دنبال بروز استرس منجر به ظهور مجدد بیماری و همچنین انتقال جرم به سایر حیوانات می گردد یعنی ردیابی پادتن های ضد ویروس در بدن هر حیوان دال بر حضور آلودگی دائمی حیوان به ویروس می باشد. با علم به این قضیه اهمیت تشخیص سرولوژیک بیماری بویژه در مقیاسهای وسیع و خاصه در شرایط مناسب در هرکجای مملکت بیش از پیش احساس می گردد (۱،۷،۱۱،۱۷،۲۰).

در این تحقیق با در نظر گرفتن اهداف فوق سعی شد تا آزمونی طراحی گردد تا در شرایط ایران حتی بدون نیاز به وسایل یا تجهیزات خاص بتواند به انجام برسد. لذا بعد از طراحی و استاندارد کردن کیت مذکور نتایج این آزمون با آزمون الایزا به روش پلیت مقایسه شده و همخوانی ۸۸/۹ درصدی آزمون الایزای نقطه ای با الایزا به روش پلیت مشخص گردید. همچنین نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آماری نتایج دو آزمون نشان داد که بین آزمون الایزا به روش پلیت و الایزا به روش نقطه ای اختلاف معنی داری وجود ندارد ($P<0/0004$) و این در شرایطی است که سادگی روش الایزای نقطه ای به مراتب بیشتر از آزمون الایزا به روش پلیت می باشد و امکانات وسیعی نیاز نداشته به طوری که در صورت بسته بندی و ارایه مطلوب حتی امکان انجام آزمون در سطح دامداری با امکانات اولیه را خواهد داشت. از طرف دیگر اقتصادی بودن کیت تولید شده بسیاربالا بوده به طوری که هزینه آزمایش هر نمونه سرم با آزمون الایزای نقطه ای در حدود ۳۰ درصد آزمایش الایزا به روش پلیت می باشد و همچنین با توجه به به کارگیری رقتهای مختلف آنتی گلوبولین کنژوگه، سرم و سوبسترا در این کیت و انتخاب بهترین رقت از این مواد پیشنهاد می گردد برای افزایش میزان همخوانی آزمون الایزای نقطه ای با آزمون الایزا به روش پلیت و افزایش حساسیت و ویژگی کیت اقدام به هرچه خالص تر کردن پادگن و یا به کار گیری پادگن نوترکیب گردد (۶،۱۸،۲۶).

تشکر و قدردانی

این طرح با استفاده از بودجه طرح پژوهشی مصوب دانشگاه تهران به انجام رسیده است که بدین وسیله نگارنده از معاونت محترم پژوهشی تشکر و قدردانی می نماید.

References

۱. همت زاده، ف. (۱۳۸۰): به کارگیری آزمون ایمونو فلئورسانت غیر مستقیم جهت تشخیص پادتن های ضد ویروس IBR. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، شماره ۵۶، صفحه: ۷۱-۶۵.

2. Ackermann, M., Weber, H. and Welyer, R. (1990): Aspects of IBR eradication programmes in a fattening cattle farm, Preventive Veterinary Medicine 9:2. PP:121-130.
3. Anthony, E. and Castra, B. (1992): Veterinary Diagnostic Virology. PP:134-136.
4. Babiuk, L.A, Van Drunen, S. and Tikoo, S.K. (1996): Immunology of Bovine Herpes Virus, Veterinary Microbiology. 53. PP:31-34.
5. Blood, D.C. and Radostitis, D.M (1992): Veterinary Medicine 8th ed. Bailler Tindal, PP:899-906.
6. Eric, B. and Gtinther, K. (1991): Stractural and functional analysis of BHV-1 major glycoproteins,Veterinary Microbiology. 27: 81-101.
7. Espuna, E.,Vendrell, j. and Artigas, G. (1988): IBR in dairy Cattle: serological study;Journal of Veterinary Medicine. 5:10: 499-505.
8. Ettinger, S.j. and Feldman, E.C. (1995): Veterinary Internal Medicine 4th ed. Mosby Company. PP:754,1169-1184.
9. Ferankenak, Franken P. (1997): Probaility of detecting antibodies to BHV-1 in bulk milk after production of a positive animal on to negative farm, J. Vet. Rec. 140: 90-92.
10. Graham, D.A., McShane, J., Mawhinney, K.A., McLaren, IE., Adair, B.M. and Merza, M. (1998): Evaluation of a single dilution ELISA system for detection of seroconversion to bovine viral diarrhea virus, bovine respiratory syncytial virus, parainfluenza-

3 virus, and infectious bovine rhinotracheitis virus: comparison with testing by virus neutralization and hemagglutination inhibition. J. Vet. Diagn Invest 1998. 10, 1:43-8.

11. Graham, D.A., Mawhinney, K.A., McShane, J., Connor, T.J., Adair, B.M. and Merza, M. (1997): Standardization of enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) for quantitative estimation of antibodies specific for infectious bovine rhinotracheitis virus, respiratory syncytial virus, parainfluenza-3 virus, and bovine viral diarrhea virus.J Vet Diagn Invest 1997. 9, 1:24-31.

12. Granutova, M. and Psikal, I. (1989): Cell mediated immunity in calves immunized or infected with IBR, J. Vet. Med. 34:7: 385-394.

13. Hanna, U.,Waron, and Alexander, A. (1989): IgM indirect ELISA and involvement of IgM rhumatoid factor in the serodingnostic of BHV-1 infect. Vet. Microbiol. 26: 35-43.

14. Harlow, E. and Lane, D. (1991): Antibodies, A labratory manual, PP:105-110 Cold Spring Horbor press.

15. Hudson, L. and Hay, F.C. (1989): Practical Immunology, 3th ed. Blackwell scientific publication. PP:1-12.

16. Jackson, P. and Blythe, D. (1993): Immunolabelling techniques forlight microscropy in:Immunocytochemistry. A practical approach. PP:15-42.

17. Juhas, T. and Kucsra, L. (1991): An ELISA test for the demonstration of IBR antibodies, 46:3. PP:151-154.

18. Karshoek, M.J., Rijsew, J.K. and Vanairschat, J.T. (1996): Persistant of antibodies against BHV-1 and virus reactivation two to three years after infection.Vet. Microbiol. 53:103-110.

19. Kemeny, D.M., (1991): A Practical guide to ELISA, pergamon press, UK, BP. CC wheaten LTD.

20. Kit, S.,Ootsuka, H. and Kit, M. (1992): Blocking ELISA for distingiushing IBR Viruses infected animals from those vaccinated with gene deleted marker vaccine;Journal of Virology Methods 40:45-56

21. Lucas, M.H.,Westcott, D.G. and Edwards, S. (1986): Immunoflurescence and cell culture techniques in the diagnosis of viral infection of abortive fetus, J. Vet. Rec. 114:242-243

22. Martin, S.W. and Mathius, A.M. (1996): Molecular virology of ruminant herpes viuses.Vet. Microbiol. 53:17-29.

23. Moniko, E. and Ackermann, M. (1996): Pathogenesis of ruminant herpes virus infection, Vet. Microbiol. 53:3-15.

24. Murphy, F.A., Gibbs, E.P.J., Horzinek, M.C. and Studdert, M.J. (1999): Vet. Virol. 3rd ed. Academic Pres Ink.

25. Nettleton, P.F., Herring, J.A. and Herring, A.J. (1983): Evaluation of an immunofluorescent test for the rapid diagnosis of field infections of IBR. J. Vet. Rec. 112: 293-300.

26. Rosskop, F.M, Staub, E. and Ackermann, M. (1994): Comparison of two ELISA systems for detection of antibodies against IBR/IPV. J. Vet. Rec.124:58-67.

27. Timoney, F.J., Gillespie, H .J., Scott, F.W. and Barlough, J.E. (1992): Hagan and Bruner's microbiology and infectious disease of domestic animals,8th ed. Comstock Publishing Association. PP:591-594.