



در

امور دام و آبزیان شماره ۸۱ زمستان ۱۳۸۷

پژوهش‌سازان

تهیه پادگن اوریون (هماگلوتینین) مورد استفاده در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی و ارزیابی حساسیت و ویژگی آن در مقایسه با نمونه‌های خارجی

- منیژه یقینی
کارشناس ارشد، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی
 - روزبه فلاحی
استادیار پژوهش، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی
 - روحانی کارگر موخر
استاد پژوهش، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی
 - عباس شفیعی
استاد پژوهش، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی
 - علی ساسانی
مربی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی
- تاریخ دریافت: بهمن ماه ۱۳۸۵ تاریخ پذیرش: آبان ماه ۱۳۸۶
Email: r.fallahi@rvsri.ir

چکیده

اوریون عفونت حاد سیستمیک و واگیرداری است که در اکثر مواقع باعث تورم غده پاروتید شده و در مواردی با ایجاد مننژیت و آنسفالیت موجب مرگ و میر می‌گردد. تشخیص سریع بیماری اهمیت زیادی داشته و از درمان‌های نادرست جلوگیری می‌نماید. در این تحقیق پادگن هماگلوتینین اوریون با کیفیت مطلوب تهیه که می‌توان از آن در تشخیص بیماری به روش HI که روشی دقیق، سریع و کم هزینه می‌باشد استفاده کرد. برای تهیه پادگن هماگلوتینین از سویه بومی #۱۲ S استفاده گردید. پس از مشاهده ضایعات سلولی و انجام چندین مرتبه ذوب و انجماد، تیترو و بیروس تعیین که با افزودن تواین-اثر به حد مطلوب رسید و محصول نهایی برای نگه‌داری طولانی مدت لیوفیلیزه گردید. برای فرآورده تهیه شده حساسیت ۱۰۰٪، ویژگی ۹۳/۷٪ و تکرار پذیری ۱۰۰٪ به دست آمد که در مقایسه با نمونه‌های وارداتی که اکثراً بر روی تخم مرغ جنین دار تهیه می‌شوند و دارای پروتئین‌های غیر اختصاصی می‌باشند، بسیار مناسب می‌باشد.

کلمات کلیدی: پادگن، اوریون، هماگلوتینین، حساسیت، ویژگی

Pajouhesh & Sazandegi No 81 pp: 73-77

Preparation of mumps hemagglutinin antigen is used in diagnostic laboratories and evaluation of its sensitivity and specificity compared with imported antigens.

By: M. Yaghini, Razi Vaccine and Serum Research Institute, R. Fallahi, R. Kargar Moakhar, Razi Vaccine and Serum Research Institute, A. Shafiei, Razi Vaccine and Serum Research Institute, A. Sasani, Razi Vaccine and Serum Research Institute

Mumps is one of the acute, contagious and systematic infection that parotitis is one of the typical symptoms. Sometimes meningitis and encephalitis cause death. Accurate and rapid diagnosis of this infection is very important and it can be prevented the inaccurate treatments. In this research the mumps antigen (hemagglutinin) prepared with ideal quality. It is suitable for using in diagnosis of disease by HI test that is one of the accurate, rapid and cheapest laboratory techniques. After preparation of three kinds of cell cultures, they were inoculated by S#12 native strain virus. After observation the cytopathic effect (CPE), the cultures were freeze- thawed for several times. The virus titer was measured and it increased with adding the twine-ether. In order to long storage, the antigen was lyophilized. The reproducibility of prepared antigen and also its sensitivity, specificity were 100% , 93.7% and 100% respectively that are very suitable compared with several kinds of imported antigens, that most of them prepared in embryonated hen's egg, so they eggs proteins cause nonspecific reaction.

Keywords: Ag, Mumps, Hemagglutinine, Sensitivity, Specificity West Azerbaijan

مقدمه

بیماری اوربون یا گوشک^۱ بیماری حاد سیستمیک و واگیرداری است که در اکثر مواقع باعث تورم یک یا هر دو غده پاروتید (بناگوشی) می شود (۲، ۳). عامل ایجاد کننده این بیماری ویروسی از خانواده پارامیکسوویریده^۲ و جنس روبولا ویروس^۳ می باشد. مرگ و میر در اثر ابتلا به اوربون مربوط به درگیری سیستم عصبی مانند مننژیت^۴ و مننگوآسفالیت^۵ و در بعضی موارد اورکیت^۶ می باشد (۲، ۷).

تشخیص آزمایشگاهی عفونت اوربونی بر اساس جدا سازی ویروس، آزمایشات سرولوژی و مولکولی استوار است. برای جداسازی ویروس می توان از سلولهای مختلفی استفاده کرد که نیازمند امکانات، تجهیزات و صرف زمان زیادی خواهد بود. جهت تشخیص سریع بیماری می توان از روش های سرولوژیک مانند تست ممانعت از هماگلوتیناسیون^۷ (HI) استفاده نمود که علاوه بر سرعت عمل و سادگی روش انجام، بسیار دقیق می باشد. برای انجام این تست به پادگن هماگلوتینین ویروس احتیاج می باشد. پادگن های وارداتی به دلیل اینکه از روی تخم مرغ جنین دار تهیه می گردند، دارای پروتئین های غیر اختصاصی طیور بوده و به دلیل بروز واکنش های ازدیاد حساسیت باعث ایجاد آلرژی در افراد حساس می گردند. (۲، ۳، ۷، ۱۱) در این تحقیق با استخراج و تهیه پادگن هماگلوتینین از سویه بومی S#۱۲ با استفاده از کشت های سلولی، نقیصه فوق رفع گردیده، هم چنین می تواند با صرفه جویی قابل توجهی همراه باشد. این نتایج پس از تعیین میزان تکرار پذیری، حساسیت و ویژگی فرآورده تهیه شده در مقایسه با پادگن های مشابه خارجی بدست آمده است.

مواد و روش کار

انتخاب سویه S#۱۲ ویروس اوربون و تکثیر آن بوسیله کشت سلولی

سوش فوق بر روی سلول های BSR-5، Vero و پاساژ داده شد. محیط مورد استفاده BME^۸ حاوی ۲٪ آلبومین گاوی بود. سلول های تلقیح شده در انکوباتور ۳۷ سانتی گراد قرار می گرفتند. پس از ظهور ضایعات سلولی^۹ (CPE)، تعیین تیترو ویروسی با تست HD^{۱۰} انجام می گرفت. جهت عادت پذیری^{۱۱} سویه ویروسی و نیز رسیدن به تیترو مناسب، عمل پاساژ بر روی سلول های مورد اشاره چندین مرتبه تکرار گردید و مناسب ترین پادگن از لحاظ تیترو ویروسی جهت ادامه مراحل کار و بررسی ویژگی ها و قابلیت های آن انتخاب گردید

استخراج هماگلوتینین به روش تواین- اتر^{۱۲}

در حجم معینی از سوسپانسیون ویروسی (۱۰۰ میلی لیتر) بر روی همزن مغناطیسی^{۱۳} تواین ۸۰ (به میزان یک قطره) اضافه و پس از حل شدن کامل، به آن اتر (۵۰ میلی لیتر) اضافه می گردید. مخلوط بدست آمده پس از سانتریفوژ (۲۰ دقیقه در ۲۰۰۰ دور) دارای دو فاز جداگانه بود که قسمت رویی حاوی اتر و مواد لیپیدی و در زیر آن پادگن ویروسی قرار داشت که آنرا استخراج و سپس تعیین تیترو HA برای آن انجام می گرفت.

کشت سوش های دیگر اوربون

به منظور مقایسه کیفیت و تیترو پادگن S#۱۲ با سایر سوش های

قابل توجهی نسبت به میزان اولیه نشان داد. (۱:۱۲۸-۱:۶۴ در مقایسه با ۱:۱۶)

نتایج حاصل از کشت سوش های دیگر اوربون

پادگن HA تهیه شده از سویه S#۱۲ در مقایسه با سوش های خارجی Hoshino, Mano, Sasazaki در شرایط یکسان، تیتراژی را ایجاد نمود. (۱:۱۶ در مقایسه با ۱:۲ و حتی کمتر از آن)

نتایج بررسی تأثیر عوامل مختلف در تیتراژ پادگن HA

در تست های HA و HI مشخص گردید استفاده از رقیق کننده PBS به همراه آلبومین ۱٪ و گلبول قرمز خوکچه هندی بهترین پاسخ را ارائه میدهد. (۱:۱۶ در مقایسه با ۱:۸)

نتایج حاصل از لیوفیلیزه کردن پادگن های تخلیص شده و بررسی بهترین شرایط استفاده از آنها

مشخص گردید با لیوفیلیزه کردن پادگن، کاهش تیتراژی معادل ۳-۲ برابر ایجاد می گردد. (۱:۱۶ در مقایسه با ۱:۱۲۸-۱:۶۴) و بهترین زمان استفاده از پادگن لیوفیلیزه ۲۴ ساعت بعد از حل کردن در آب مقطر می باشد. هم چنین مناسب ترین دما جهت نگهداری پادگن حل شده یخچال ۴ درجه می باشد. با افزایش نگهداری در یخچال ۴ درجه تیتراژ HA افزایش و گاهی به ۳-۴ برابر میزان اولیه می رسد.

نتایج حاصل از مقایسه پادگن S#۱۲ با نمونه های خارجی

مشخص گردید پادگن S#۱۲ وضوح بهتری در مقایسه با نمونه های خارجی داشته و تیتراژ بدست آمده از آن افزایش قابل توجهی نسبت به آنها نشان می دهد (۱:۱۶ در مقایسه با ۱:۸-۱:۲). در بررسی تکرار پذیر بودن پادگن S#۱۲، میزان ۱۰۰٪ را نشان داد که بسیار قابل توجه می باشد. در بررسی میزان حساسیت و ویژگی پادگن S#۱۲ مقادیر ۱۰۰٪ و ۹۳/۷٪ محاسبه که در مقایسه با نمونه های وارداتی (۵۰٪ و ۹۱/۳٪) بسیار مناسب می باشد.

HI \ SN	+	-	جمع
+	۴۵	۰	۴۵
-	۳	۲	۵
جمع	۴۸	۲	۵۰

۴۵ = مثبت حقیقی
۰ = مثبت کاذب
۲ = منفی حقیقی
۳ = منفی کاذب

بررسی حساسیت و ویژگی پادگن تهیه شده S#12

اوربون، از سوش های Mano, Sasazaki و Hoshino استفاده گردید. سوش Mano شش مرتبه، Sasazaki دو مرتبه و Hoshino چهار مرتبه بر روی سلول Vero کشت داده شدند و بعد از برداشت تیتراژ HA هر کدام تعیین گردید.

بررسی تأثیر عوامل مختلف در تیتراژ پادگن

برای این منظور از رقیق کننده های مختلف (PBS^{۱۴}، DGV^{۱۵} و محلول Kolmer)، مقادیر مختلف آلبومین^{۱۶} (۱٪ و ۲٪)، انواع گلبول قرمز (خوکچه هندی، جوجه و میمون)، درجات مختلف سونیکیشن^{۱۷} استفاده و برای هر عامل تعیین تیتراژ انجام و در آخر بهترین نوع مشخص گردید.

لیوفیلیزه^{۱۸} کردن پادگن های تخلیص شده و بررسی بهترین شرایط استفاده از آنها

نمونه های پادگن در بالاترین تیتراژ را بصورت لیوفیلیزه در آورده که می توان آنها را به مدت طولانی نگه داری نمود. بررسی تغییرات تیتراژ پادگن، قبل و بعد از لیوفیلیزاسیون انجام تا تأثیر این حالت نیز در میزان تیتراژ مشخص گردد. هم چنین بهترین زمان استفاده از پادگن لیوفیلیزه بعد از حل نمودن در آب و نیز مناسب ترین دما جهت نگهداری آن مورد بررسی قرار گرفت.

مقایسه پادگن S#۱۲ با نمونه های خارجی

در این مقایسه وضوح پادگنی، تکرار پذیری^{۱۹} آزمایشات، میزان حساسیت^{۲۰} و ویژگی^{۲۱} پادگن S#۱۲ با سه نمونه پادگن خارجی (CF-Meryland، CF-Behring و HI-Ginsberg) مورد ارزیابی قرار گرفت. برای تعیین حساسیت و ویژگی از روش SN^{۲۲} بر روی سرم هایی که تیتراژ آنها با روش HI و استفاده از پادگن محاسبه شده بود استفاده گردید. این کار یک مرتبه در مورد پادگن S#۱۲ و یک مرتبه برای پادگن های وارداتی انجام شد. در روش SN، تعیین تیتراژ مد نظر نبوده و تنها تعیین مثبت یا منفی بودن نمونه ها برای محاسبه حساسیت و ویژگی کافی است.

تهیه آنتی سرم S#۱۲ در خوکچه هندی و انجام تست HI

از سوش حاد S#۱۲ به مقدار توصیه شده در چهار مرحله (به فاصله ۱۵ روز) به ۶ سر خوکچه هندی نر جوان و سالم تزریق (داخل صفاقی) و بعد از گذشت یک هفته از آخرین تزریق، از آنها خون گیری به عمل آورده، بعد از سانتریفوژ و جدا نمودن سرمها، تست HI انجام گرفت.

نتایج

نتایج حاصل از تلقیح سوش S#۱۲ در کشت سلولی

با کشت ویروس بر روی انواع سلول های مختلف مشخص گردید که رشد سویه S#۱۲ روی سلول BSR، CCID_{۵۰} و تیتراژ HA بالاتری ایجاد می کند هر چند که سلول Vero نیز جهت تکثیر آن مناسب است.

نتایج حاصل از استخراج همآگلوتینین به روش تواین-اثر

در تخلیص پادگن با استفاده از تواین-اثر تیتراژ پادگن HA افزایش

(۱، ۵).

در این تحقیق با تهیه پادگن همآگلوتینین علاوه بر صرفه جویی قابل توجه و عدم نیاز به پادگن‌های وارداتی، از کیفیت بسیار مطلوبی برخوردار می‌باشد. اکثر پادگن‌های وارداتی که از روی تخم مرغ جنین دار تهیه می‌شوند به دلیل دارا بودن پروتئین‌های غیر اختصاصی طیور و ایجاد واکنش‌های ازدیاد حساسیت باعث بروز آلرژی در افراد حساس می‌شوند که این نقیصه در این پادگن که در کشت‌های سلولی تهیه شده است، بر طرف گردیده است. پادگن تهیه شده در مقایسه با نمونه‌های وارداتی علاوه بر هزینه بسیار کمتر، تیترا بالاتری ایجاد نموده و از کیفیت بهتری نسبت به آنها برخوردار می‌باشد. پادگن در یخچال ۴ درجه به مدت ۲-۳ هفته قابل نگهداری بوده و با لیوفیلیزه کردن آن می‌توان سال‌ها آن را نگه‌داری نمود. در بررسی تست تکرار پذیری این آنتی ژن رقم ۱۰۰٪ بدست آمد که بسیار قابل توجه می‌باشد. در بررسی حساسیت و ویژگی پادگن تهیه شده ارقام ۱۰۰٪ و ۹۳/۷٪ بدست آمد که در مقایسه با پادگن مشابه خارجی که ویژگی ۵۰٪ و حساسیت ۹۱/۳٪ داشت از ویژگی عالی و حساسیت خوبی برخوردار است.

پاورقی‌ها

- 1-Mumps
- 2-Paramyxoviridae
- 3-Rubula virus
- 4-Meningitis
- 5-Encephalitis
- 6-Orchitis
- 7-Hemagglutination Inhibition
- 8-Basal Medium Eagle
- 9-Cytopathic Effect
- 10- Hemadsorption
- 11- Adaptation
- 12- Tween – Ether
- 13-Magnetic stirrer
- 14- Phosphate buffer saline
- 15-Dextrose Gelatin Veronal
- 16-Albumin
- 17- Sonication
- 18- Lyophilization
- 19- Reproducibility
- 20- Sensitivity
- 21- Specificity
- 22-Serum neutralization

منابع مورد استفاده

- 1-Albrecht, P. and Klutch, M., (1981) Sensitivity Hemagglutination Inhibition Test for Mumps Antibody, Journal of Clinical Microbiology, 13: 870-876

$$\text{ویژگی منفی حقیقی} = \frac{\text{منفی حقیقی} + \text{مثبت کاذب}}{\text{منفی حقیقی}} \times 100$$

$$\text{حساسیت مثبت حقیقی} = \frac{\text{مثبت حقیقی}}{\text{منفی کاذب} + \text{مثبت حقیقی}} \times 100$$

$$\text{ویژگی پادگن S\#12} = 2/0 + 2 \times 100 = 100\%$$

$$\text{حساسیت پادگن S\#12} = 45/45 + 2 \times 100 = 93/7\%$$

HI \ SN	+	-	جمع
+	۴۲	۲	۴۴
-	۴	۲	۶
جمع	۴۶	۴	۵۰

۴۲ = مثبت حقیقی
۲ = مثبت کاذب
۲ = منفی حقیقی
۴ = منفی کاذب

بررسی حساسیت و ویژگی پادگن مشابه وارداتی

$$\text{ویژگی پادگن وارداتی} = 2/2 + 2 \times 100 = 50\%$$

$$\text{حساسیت پادگن وارداتی} = 42/42 + 2 \times 100 = 91/3\%$$

پادگن	حساسیت	ویژگی
وارداتی	۹۱/۳٪	۵۰٪
تهیه شده	۹۳/۷٪	۱۰۰٪

مقایسه حساسیت و ویژگی پادگن تهیه شده با پادگن مشابه وارداتی

نتایج حاصل از تهیه آنتی سرم #۱۲ S در خوکچه هندی و انجام تست HI

آنتی سرم تهیه شده از خوکچه هندی تیترا ۱:۱۲۸ داشته که به عنوان کنترل مثبت می‌توان در تست‌های HI از آن استفاده کرد. ضمناً این آنتی سرم با نمونه کنترل مثبت تجارتي (ایمونوگلوبولین Mumps) مقایسه گردید که تیترا بالاتری نسبت به آن نشان داد.

بحث:

با انتخاب روش‌های سریع، دقیق و قابل اجرا در آزمایشگاه‌های تشخیصی می‌توان نسبت به شناسایی به موقع بیماری‌ها اقدام کرد. (۳، ۷، ۱۲، ۱۹) استفاده از تست HI یکی از روش‌های تشخیص سریع برای بیماری اوریون می‌باشد که طی سالیان متمادی در کشورهای مختلف استفاده می‌گردد.

tion. CABI.

12-Merz, D.C., (1983) Biosynthesis of Mumps virus glycoprotein, Journal of Virology, 64: 1457-1467

13- Mohammadi, A., (1994) Preparation of a double – purpose Antigen for HI and CF tests, Archive of Razi Institute, 44/45: 73-78

14-Mountcastel, W. E., Compans, R.W., Lackland, H., Choppin, P.W., (1974) Proteolytic clivage of subunit of nucleocapsid of the paramyxovirus, Journal Virology, 14: 1253-1267

15-Sato, H., Albrecht, J., Hicks, B. C., Ennis A. F., (1978) Sensitive Nuetralization test for virus antibody, Archive of Virology, 58: 301-311

16-Stephen, R., Preblud, M.D., (1978) Mumps surveillance, Center for Disease Control.

17-Tanabayashi, K., Takeuchi, K., Yamada, M., (1994) Effect on fusion induction of point mutation introduced into the F protein of Mumps virus, Virology Journal Artick, 13: 851-853

18-Tolpin, M.D., and Schouf, T., (1992) Textbook of Human Virology. Second Edition. CABI.

19-Warren, E., Levingson, H. and Javets, E., (1992) Medical Microbiology and Immunology. Appleton and Lange.

20-White, D.O. and Fener, F., (1985) Medical Virology, third edition. CABI.

2-Andzhaparidze, O.G., (1982) Mumps virus persistently infected cell culture release defective interfering virus particles, Journal of Virology 63: 499-50

3-Bernard, D., Herner, N., (1990) Ginsberg Microbiology, J. B. Lippincott.

4-Buynak, E.B., (1967) Comparison of neutralization and hemagglutination Inhibition techniques for measuring mumps antibody Proceeding Society of Expanded Medical Biology, 234-239

5-Colke, G.J, Duguid, A.G., (1990) Practical Medical Microbiology Thirteen Edition. CABI.

6-Edwin, H., and Lennette, A., (1985) Manual of Clinical Microbiology. Forth edition. Academic Press.

7-Fener, F.J., (1992) Veterinary virology. The John Curtin School of Medical Research.

8-Grillner, L., and Blomberg, J., (1970) Hemolysis in Gel and neutralization test for determination of antibodies to Mumps virus. Journal of Clinical Microbiology, 14:11-15

9-Helen, G, and Deinhardt, F., (1955) Propagation and primary isolation of mumps virus in tissue culture, Proceeding Society of Expanded Medical Biology. 89: 556-560

10-Horvath, S., (1975) Estimation of Hemagglutination Inhibition Titer Archive of Virology, 49: 199-205

11-Jay, A., Levy, H. F., Robert, A., (1994) Virology, Third Edi-

