در
امور دام و آبزیان شماره ۸۱ زمستان ۱۳۸۷
پژوهش و سازندگی

تهیه پادگن اوریون (هماگلوتینین) مورد استفاده در آزمایشگاه های تشخیص طبی و ارزیابی حساسیت و ویژگی آن در مقایسه با نمونه های 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 می گردد. تشخیص سریع بیماری اهمیت زیادی داشته و از درمان های نادرست جلوگیری می نماید. در این تحقیق پادگن هماگلوتینین اوریون با کیفیت مطلوب تهیه که می توان از آن در تشخیص بیماری به روش HI که روشی دقیق، سریع و کم هزینه می باشد استفاده کرد. برای تهیه پادگن هماگلوتینین از سویه بومی S#۱۲ استفاده گردید. پس از مشاهده ضایعات سلولی و انجام چندین مرتبه ذوب و انجماد، تیتر ویروس تعیین که با افزودن تواین- اتر به حد مطلوب رسید و محصول نهایی برای نگه داری طولانی مدت لیوفیلیزه گردید. برای فرآورده تهیه شده حساسیت۱۰۰٪ ، ویژگی ۹۳/۷٪ و تکرار پذیری ۱۰۰٪ به دست آمد که در مقایسه با نمونه های وارداتی که اکثراً بر روی تخم مرغ جنین دار تهیه می شوند و دارای پروتئین های غیر اختصاصی می باشند، بسیار مناسب می باشد.

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 inacurate 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 freez- 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, SpecificityWest Azerbaijan

مقدمه

بیماری اوریون یا گوشک[1] بیماری حاد سیستمیک و واگیرداری است که در اکثر مواقع باعث تورم یک یا هر دو غده پاروتید (بناگوشی) می شود(۲، ۳، ۱۲). عامل ایجاد کننده این بیماری ویروسی از خانواده پارامیکسوویریده[2] و جنس روبولا ویروس[3] می باشد. مرگ و میر در اثر ابتلا به اوریون مربوط به درگیری سیستم عصبی مانند منتژیت[4] و منتگوآسنفالیت[5] و در بعضی موارد اورکیت[6] می باشد(۲، ۷).

تشخیص آزمایشگاهی عفونت اوریونی 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 روش‌های سرولوژیک مانند تست ممانعت از هماگلوتیناسیون[7] (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 جنین‌دار تهیه می‌گردند، دارای پروتئین های غیر اختصاصی طیور بوده و به دلیل بروز واکنش‌های 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 درمقایسه با پادگن های مشابه خارجی بدست آمده است.

مواد و روش کار

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

سوش فوق بر روی سلول‌های MRC-۵، BSR و Vero پاساژ داده شد. محیط مورد استفاده BME[8] حاوی ۲٪ آلبومین گاوی بود. سلول های تلقیح شده در انکوباتور ۳۷ سانتی گراد قرار می‌گرفتند. پس از ظهور ضایعات سلولی[9](CPE) ، تعیین تیتر ویروسی با تست HD[10] انجام می گرفت. جهت عادت پذیری[11] سویه ویروسی و نیز رسیدن به تیتر مناسب، عمل پاساژ بر روی سلول های مورد اشاره چندین مرتبه تکرار گردید و مناسب‌ترین پادگن از لحاظ تیتر ویروسی جهت ادامه مراحل کار و بررسی ویژگی‌ها و قابلیت‌های آن انتخاب گردید

استخراج هماگلوتینین به روش تواین- اتر[12]

در حجم معینی از سوسپانسیون ویروسی (۱۰۰ میلی لیتر) بر روی همزن مغناطیسی[13] تواین ۸۰ (به میزان یک قطره) اضافه و پس از حل شدن کامل ، به آن اتر(۵۰ میلی لیتر) اضافه می‌گردید. 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 تیتر HA برای آن انجام می گرفت.

کشت سوش های دیگر اوریون

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

اوریون، 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 تیتر HA هر کدام تعیین گردید.

بررسی تاثیر عوامل مختلف در تیتر HA پادگن

برای این منظور از رقیق‌کننده‌های 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 تیتر انجام و در آخر بهترین نوع مشخص گردید.

لیوفیلیزه [۱۸] کردن پادگن های تخلیص شده و بررسی بهترین شرایط استفاده از آنها

نمونه‌های پادگن در بالاترین تیتر را بصورت لیوفیلیزه در آورده که می توان آنها را به مدت طولانی نگه داری نمود. بررسی تغییرات تیتر پادگن، قبل و بعد از لیوفیلیزاسیون انجام تا تأثیر این حالت نیز در میزان تیتر مشخص گردد. هم چنین بهترین زمان استفاده از پادگن لیوفیلیزه بعد از حل نمودن در آب و نیز مناسب‌ترین 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 تیتر 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 تیتر 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، $CCID_{50}$ و تیتر HA بالاتری ایجاد می کند هر چند که سلول Vero نیز جهت تکثیر آن مناسب است.

نتایج حاصل از استخراج هماگلوتینین به روش تواین- اتر

در تخلیص پادگن با استفاده از تواین- اتر تیتر پادگن HA افزایش قابل توجهی نسبت به میزان اولیه نشان داد. (۱:۱۲۸-۱:۶۴ در مقایسه با ۱:۱۶)

نتایج حاصل از کشت سوش های دیگر اوریون

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

نتایج بررسی تأثیر عوامل مختلف در تیتر 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 تیتری 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 می‌باشد. هم‌چنین مناسب‌ترین دما جهت نگهداری پادگن حل شده یخچال ۴ درجه می باشد. با افزایش نگهداری در یخچال ۴ درجه تیتر HA افزایش و گاهی به ۴-۳ برابر میزان اولیه می‌رسد.

نتایج حاصل از مقایسه پادگن S #۱۲ با نمونه‌های خارجی

مشخص گردید پادگن S #۱۲ وضوح بهتری در مقایسه با نمونه‌های خارجی داشته و تیتر 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 می‌باشد.

SN \ HI	+	-	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

$$\text{ویژگی} = \frac{\text{منفی حقیقی}}{\text{منفی حقیقی + مثبت کاذب}} \times ۱۰۰$$

$$\text{حساسیت} = \frac{\text{مثبت حقیقی}}{\text{منفی کاذب + مثبت حقیقی}} \times ۱۰۰$$

ویژگی پادگن S#12 = ۲/۰+۲X۱۰۰ = ٪۱۰۰

حساسیت پادگن S#12 = ۴۵/۴۵+۳X۱۰۰ = ٪۹۳/۷

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

ویژگی پادگن وارداتی = ۲/۲+X۲ ۱۰۰ = ٪۵۰

حساسیت پادگن وارداتی = ۴۲/۴۲+X۴ ۱۰۰ = ٪۹۱/۳

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 تستHI

آنتی سرم تهیه شده از خوکچه هندی تیتر ۱:۱۲۸ داشته که به عنوان کنترل مثبت می توان در تست های HI از آن استفاده کرد. ضمناً این آنتی سرم با نمونه کنترل مثبت تجارتی (ایمونوگلوبولین Mumps) مقایسه گردید که تیتر بالاتری نسبت به آن نشان داد.

بحث:

با انتخاب روش های سریع، دقیق و قابل اجرا در آزمایشگاه های تشخیصی می‌توان نسبت به شناسایی به موقع بیماری‌ها اقدام کرد. (۳، ۷، ۱۲، ۱۹) استفاده از تست HI یکی از روش های تشخیص سریع برای بیماری اوریون می‌باشد که طی سالیان متمادی در کشورهای مختلف استفاده می‌گردد. (۱، ۵).

در این تحقیق با تهیه پادگن هماگلوتینین علاوه بر صرفه جویی قابل توجه و عدم نیاز به پادگن‌های وارداتی، از کیفیت بسیار مطلوبی برخوردار می باشد. اکثر پادگن های وارداتی که از روی تخم مرغ جنین دار تهیه می شوند به دلیل دارا بودن پروتئین های غیر اختصاصی طیور و ایجاد واکنش های ازدیاد حساسیت باعث بروز آلرژی در افراد حساس می شوند که این نقیصه در این پادگن که در کشت های سلولی تهیه شده است، بر طرف گردیده است. پادگن تهیه شده در مقاسیه با نمونه های وارداتی علاوه بر هزینه بسیار کمتر، تیتر بالاتری ایجاد نموده و از کیفیت بهتری نسبت به آنها برخوردار می باشد. پادگن در یخچال ۴ درجه به مدت ۳-۲ هفته قابل نگه‌داری بوده و با لیوفیلیزه کردن آن می توان سال ها آن را نگه داری نمود.

در بررسی تست تکرار پذیری این آنتی ژن رقم ۱۰۰٪ بدست آمد که بسیار قابل توجه می باشد. 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.

پاورقی ها

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

2-Andzhaparidze, O.G., (1982) Mumps virus persistently infected cell culture relase 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 hemagglutintion Inhibition techniques for measuring mumps antibody Proceeding Society of Expansed 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 Expansed 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 Edition. 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) Proteolitic 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.