مجله دانشکده پزشکی ـ دانشگاه ملی ایران
سال چهارم ـ شماره دوم صفحه ۱۵۵ ـ ۱۵۷

متد ایمنوفلـور سانس بـرای تشخیص ویـروس آنفلوآنزای بیمـاریزا از غیر بیماریزا

دکتر محمد نایبی ✿

مقـدمه :

متدهای کلاسیك سرولوژی فرق‌بین آنفلوآنزای‌بیماریزا از غیر بیماریزا را دقیقاً نشان‌نمیدهند .

متد ایمنوفلورسانس برای حساسیتی‌که دارد مورد استفاده قرارمیگیرد تابطوردقیق وسریع‌این دو دسته از ویروسـها را از همدیگر جدا کرده و به تشـخیص فوری بیماری آنفلـوآنزا کمك نماید .

درسال ۱۹۶۲ تاتنو (Tateno) ضمـن گزارشی ، حساسیت متدایمنوفلورسانس‌را درتشخیص ویروس آنفلوآنزاتائید کرده‌است . یورکوئی (Yorkoui) درسال ۱۹۶۳ تاکید نمود که‌برای تشخیص بیماری آنفلوآنزا ، متدایمنوفلورسانس همراه باسایر متدها مورداستفاده قرارگیرد .

منظوراز این‌مطالعه‌وتحقیق این‌است که‌بتوان‌برای‌تشخیص تیپ بیماریزائی ویروس آنفلوآنـزا از متد ایمنوفلورسانس به‌تنهائی‌استفاده‌کرد تادراسرع‌وقت نوع اپیدمی‌ویروس‌آنفلوآنزا را تشخیص داده ازهمه‌گیری آن بموقع جلوگیری‌نمود.

متد ومواد لازم

تهیه آنتی سرم :

ویروس غیر بیماریزای نوع (B) وویروس بیماریـزای نوع (D) ازبخش اپیدمیولوژی دانشگاه میشیگان اخذ وبرای این‌کار مورداستفاده قرارگرفت .

خرگوش‌سفید نوع نئوزیلاندی برای‌انجام این‌کارانتخاب گردیدوبرای اولین‌بار به‌هرحیوان، ۲میلی‌لیتر ازمحلول‌ویروس محتوی $\frac{۷}{۱۰}$ در یك میلی‌لیتر ازطریق (IV) و ۳ میلی‌لیتر از طریق صفاقی تزریق گردید ومجموعاً ۱۰میلی لیتر بفواصل ۷ روز ازآنتی‌ژن خرگوش تزریق‌شد .

قبل از تزریق آنتی‌ژنها وبعداز آنکه تیتر آنتی‌کور به حداقل قابل قبول رسید از حیوانات خون گرفته شد تاتیتر آنتی‌کورها معلوم‌گردد .

تیتراژ آنتی سرمها

از خرگوشها ۷ روز بعداز آخرین تزریق آنتی‌ژن‌خون گرفته‌شد وبا متد متوقف شدن هموآگلوتیناسیون (HAI) ، تیتر سرمها معلوم‌گردید . تیترآنتی‌کور برای ویروس‌بیماریزا وغیر بیماریزا ۶۴۰ بود .

تهیه نسجهای آلوده

بوای این منظور تعدادی موش سفید به وزن تقریبی۱۰۰ تا ۱۵۰ گرم انتخاب شدند . ازراه دماغ با ۰/۰۳ میلی لیتر محلـول ویـروس به‌غلظت $\frac{۱}{۱۰}$ آلـوده گـردیدنـد وبعـد از ۶ ـ ۱۰ ـ ۲۴ ـ ۴۸ و ۷۲ ساعت در هرمرتبه دوتا از موشها اتوپسی گردیده وازریه آنها نمونه هائی بقطر چهار میکـرون باطریقه فرروزن سکشن (Frozen Section) تهیه‌وبرای آزمایش دریخچال نگهداری شد . کنترل این بافتها شش‌حیوان غیر آلوده بود .

نشاندارکردن آنتی سرمها

تمام سرمهای تهیه‌شده از خرگوشها بااستفاده از متد ـ فیلتراسیون استریل گردید . گلبولین آنها بوسیله اضافه‌کردن $\frac{۱}{۲}$ حجم سرمها ازمحلول سولفات آمونیم اشباع‌شده در PH = ۷ رسوب گردید . به‌رسوبها باندازه $\frac{۱}{۲}$ حجم اولیه‌شان سـرم فیزیولوژی ۸/۵ درهزار اضافه‌شد . گلبولین بدست آمده‌برضد بافرفسفاته PH = ۷ درچهار درجه حرارت بمدت ۴۸ ساعت دیالیز گردید .

و در این مدت چندین مرتبه بافر تعویض‌شد تا زیـادی

✿ آزمایشگاه مرکز پزشکی‌آموزشی ودرمانی‌جرجانی.

سولفات آمونیوم ازمحیط خارج شود . بعداً بامتدبیوره گورنال (Gornall, A.G.) پروتئین سرمها اندازه گرفتهشدوسرمها طوریرقیق گردیدند که یك میلیلیتر محلول سرمی، ۱۰میلی گرم پروتئین و۱۰درصد بافرکربنات بیکربنات بامولاریته۰/۵ و PH=۹ داشت . درجه حرارت سرمها به ۴ درجه تقلیل یافت وبهمیلی گرمپروتئین۰/۰۲۵ میلی گرم ایزوتیوسیانات اضافه شد (Marshall, 1958) . بعداز اینکه مخلوط بمدت ۲۴ساعت دریخچال نگهداری گردید ، بمدت دوروز برضد بافر فسفات بامولاریته ۰/۰۱ و PH=۶/۳ دیالیز شد تازیادیرنگ ازبینرفت . برای بدست آوردن گاماگلبولین خالص از متد ریگز (Riggs, 1960) استفاده شد . آزمایش مستقیم ایمنوفلورسانس بااستفاده از گاما گلبولین نشاندارشده ونسج موشهای آلوده وکنترل انجام گردید .

نتیجه آزمایشهای انجام شده

نمونه های متعدد از ریه موش های آلوده باویروس آنفلوآنزای بیماریزا وغیر بیماریزا بامصرف گاماگلبولین های نشاندار شده رنگ آمیزی گردیدند . برای این آزمایش از محلول رقیقنشده گاماگلبولینها استفادهشد . نتایجاین آزمایشها در **تابلو شماره (۱)** خلاصه شدهاست . ازمطالعه نتایج بدست آمده چنین برداشت میشود که متد ایمنوفلورسانس میتواند یك متددقیق وسریعبرای پیداکردن ریشه اپیدمی بیماریآنفلوآنرا باشد .

بحث

درسال ۱۹۶۷ (Maassab, H.F.) در دانشگاه میشیگان تفاوت بین ویروسهای آنفلوآنزای بیماریزا وغیر-بیماریزا رابامتد کشت دربافتهایزنده گزارشنمود .

متدمستقیم ایمنوفلورسانس فرقایندودسته از ویروسها را درترشحات دماغی نشاندادهاست .

دراینکار ، ما سعی کردیم آنتیسرم برضدویروس بیماریزا وغیربیماریزا را تهیهونشاندار کرده ومستقیماً تفاوت دو گروه ویروسهای بیماریزا وغیرپاتوژنرا در نسج ریه گزارشکنیم . همانطوریکه در **تابلو شماره (۱)** گزارش شده است ، این آزمایشها باموفقیت انجام گردیده وبهمسئلهای که در این کار برخوردشد رنگآمیزیغیراختصاصی نسجهایریه بودکه سرمهای نشاندار شده قبلازمصرف باپودر ریهسالم مخلوط گردیدتاآنتی-کورهای غیراختصاصی ازمحیط خارجشوند .

تابلوی شماره (۱)

نتایج آزمایشهای استفاده از متد ایمنوفلورسانس مستقیم برای تشخیص ویروس آنفلوآنزای بیماریزا از غیر بیماریزا .

نمونه	ویروس بیماریزا	ویروس غیر بیماریزا
کنترل غیر عفونی	—	—
نمونه ۶ ساعته	++++ (تعداد زیادی سلول رنگ شده)	—
نمونه ۱۰ ساعته	++++ (تعداد زیادی سلول رنگ شده)	—
نمونه ۲۴ ساعته	++ (تعداد کمی سلول رنگ شده)	+
نمونه ۴۸ ساعته	++ (تعداد کمی سلول رنگ شده)	+
نمونه ۷۲ ساعته	++ (تعداد کمی سلول رنگ شده)	—

خلاصه

۱ــ متد ایمنوفلورسانس مستقیم برای گزارشتفاوت بین ویروسهای آنفلوآنزای بیماریزا ازغیر بیماریزا مورد استفاده قرار گرفت .

۲ــ قسمت اعظم ازسلولهای ریه حیوانات آلوده باآنفلوآنزای بیماریزافلورسانس گردید که نشاندهندهوجود آنفلوآنزای بیماریزا درنسجهای ریهبود درصورتیکهسلولهای ریه موشهای آلودهشده با ویروس غیربیماریزا کمترین فلورسانسرا نشانداد .

۳ــ از راکسیونهای غیراختصاصی بوسیله جذبسرمها باپودر ریه سالم ، جلوگیری بعملآمد .

SUMMARY

The direct F.A. Method has been used for differentiation of virulent and avirulent lines of influenza viruses. A positive fluorescence was obtained indicating the level of virus in the tissues, sorbing with dried mouse powder helped to reduce non-specific staining. The virulent line showed the greatest number of fluorescent cells with the peak at 10 hours. the non-virulent lines showed a gradual rise in a number of fluorescent cells with the peak at 72 hours.

REFERENCES

1. Gornall, A.G., Bardawill, C.J. & David, M.M. (1949). Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. Journal of Biological Chemistry, **177,** 751.
2. Marshall, J.D., Eveland, W.C. & Smith, C.W. (1958). Superiority of Fluorescein isothiocyanate for fluorescent antibody technique with a modification of its application. Proceeding Society of Experimental Biology and Medicine. **98,** 898.
3. Maassab, H.F. (1967). Adaptation and growth characteristics of Influenza virus at 25C. Nature, Vol. 213, No. 5076, pp. 612.
4. Nairn, R.C. (1967). Fluorescent protein tracing. 2nd Ed.
5. Riggs, J.L., Loh, P.C. & Eveland, W.C. (1960). A simple fractination method for preparation of fluorescein labeled gamma globulin. Proceeding Society of Experimental Biology and Medicine. **105,** 655.
6. Tateno, I., Shigeto, S., Akryoski, Jr. K., Hosaku, K., Nobuo, K., Yuzo, A., Akira, S.
7. Yoruki, A. & Matao, N. (1962). Diagnosis of influenza virus by means of fluorescent antibody technique. Japanese Journal of Experimental Medicine. **32,** 531.

نگارنده‌وظیفه خود می‌داند از آقایان دکتر محسن‌ضیائی رئیس دانشکده علوم تندرستی ، دکتر نظری مدیر گروه میکروبیولژی وایمنولوژی دانشگاه تهران و پروفسور ایولنـــدرئیس علوم آزمایشگاهی دانشگاه میشیگان‌آمریکا بخاطر راهنمائیهای ثمربخشی که در تدوین این مقاله مبذول داشته‌اند ،صمیمانه سپاسگزاری نماید .