

Evaluating the Immunogenicity of Avian Influenza Virus Nucleoprotein

Zahra Sadat Khademi Sayed Bonadaki¹, Rasool Madani*², Parviz Pakzad¹, Fariba Golchinfar², Tara Emami²

1. Department of Biochemistry, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Department of Proteomics and Biochemistry, Razi vaccine and serum research institute, Agricultural research education and extension organization (AREEO), Karaj, Iran

[10.30699/ijmm.14.5.643](https://doi.org/10.30699/ijmm.14.5.643)



ABSTRACT

Background: Influenza viruses cause Avian Influenza (AI) is a serious infectious disease belonging to type A Orthomyxovirus. A viral RNA synthesis is due to an interaction of the nucleoprotein (NP) with the viral polymerase. In the present study, we have evaluated the immunogenicity of avian influenza virus nucleoprotein.

Materials & Methods: An Influenza Virus N9H2 subtype A/Chicken Iran/259/2014 was selected. In order to perform electrophoresis and purification of nucleoprotein, the protein concentration of the samples was determined. SDS-PAGE and Native-PAGE electrophoresis on polyacrylamide gel were done and differences in gel bands in two methods were compared. Purification of the virus nucleoprotein performed by electroelution method and purified nucleoprotein were assayed by ELISA to obtain the produced antibody titers. Ouchterlony and western blot tests were used for final approval.

Results: By determining the molecular weight of each polypeptides, the molecular weights of H9N2 proteins were ranged from 30 to 140kDa and the molecular weight of the nucleoprotein was 60kDa. The nucleoprotein was purified by electroelution method. Ouchterlony showed that in serum dilution of 1:2 and 1:4, the sediment lines were formed between the serum and the NP antigen. The NP-ELISA enables rapid serological diagnosis in 1:20. Finally, the western blot test confirmed the 60kDa nucleoprotein band.

Conclusion: The nucleoprotein which was purified by electroelution retained its antigenic property and it could be applied in diagnostic kits.

Keywords: Influenza virus, Avian influenza, Nucleoprotein, Western blot

Received: 2020/05/25;

Accepted: 2020/09/20;

Published Online: 2020/11/10

Corresponding Information:

Rasool Madani, Department of Proteomics and Biochemistry, Razi vaccine and serum research institute, Agricultural research education and extension organization (AREEO), Karaj, Iran. Email: madanirasool@gmail.com



Copyright © 2020, This is an original open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribution of the material just in noncommercial usages with proper citation.

Use your device to scan and read the article online



Khademi Sayed Bonadaki Z S, Madani R, Pakzad P, Golchinfar F, Emami T. Evaluating the Immunogenicity of Avian Influenza Virus Nucleoprotein. Iran J Med Microbiol. 2020; 14 (6) :643-658

Download citation: [BibTeX](#) | [RIS](#) | [EndNote](#) | [Medlars](#) | [ProCite](#) | [Reference Manager](#) | [RefWorks](#)

Send citation to: [Mendeley](#) [Zotero](#) [RefWorks](#)

Introduction

Influenza is a globally important respiratory viral infection in humans that is easily transmitted from person to person with high mortality and morbidity rates and profound economic impact (1). Almost every year, there are epidemics of 3-5 million cases of severe influenza worldwide, that there is an estimate of 250,000-500,000 deaths annually (2).

There are four types of influenza viruses: A, B, C, and D (3). Avian influenza (AI) is caused by the influenza A virus, which belongs to the Orthomyxoviridae family, genus Influenza virus A. It rapidly infects poultry when it breaks out (4). Many species of birds are susceptible to avian influenza virus (AIV). The widespread epidemic of AI in domestic birds increases the likelihood of mutational events and genetic reassortment, threatening a future pandemic of AI. Adequate surveillance, including

serologic detection of antibodies to AIV in birds, as well as other susceptible species, is of great importance in preventing and controlling AI (5).

AIV is an enveloped virus (6). There are three viral proteins on the membrane: the hemagglutinin (HA), neuraminidase (NA), and the M2 proton channel (7,8). AIV bearing 16 antigenic subtypes of HA and 9 antigenic subtypes of NA, which have been isolated from waterfowl and shorebirds. Each virion contains eight segments of negative-sense viral RNA (vRNA) assembled as individual viral ribonucleoproteins. Each viral ribonucleoprotein contains the viral polymerase, which consists of PA, PB1, and PB2 subunits, the nucleoprotein (NP), and a single strand of vRNA (9,10).

NP plays a central role in viral replication. As a structural protein with no intrinsic enzymatic activity, it is the most abundant viral protein in infected cells. NP is a critical component of the vRNA complex, and the recognized functions of NP include but are not limited to, organization of RNA packing, nuclear trafficking (11,12) and vRNA transcription and replication (10).

A filtered and purified influenza A vaccine for humans has been developed, and many countries have stockpiled it to allow a quick administration to the population in the event of an AI pandemic. Researchers reported the discovery of an antibody effective against all types of the influenza A virus (13,14).

Immunization with the whole virus induces mainly humoral immune responses to the viral surface glycoproteins, HA, and NA. However, this immunity is strain-specific and gives little protection against drifted variants of the virus (15). In contrast, immunization with NP induces a wide spectrum of immune responses (16,17). This immunity is cross-reactive and recognizes conserved epitopes within viral proteins (18,19), affording protection against different subtypes of influenza A virus, which contains multiple immunodominant epitopes (20). Most probably, broadly protective influenza vaccines are based on conserved proteins, such as NP. NP is a vaccine target of interest as it has been shown to induce cross-reactive antibody and T cell responses (20). In this study immunogenicity of AIV nucleoprotein was evaluated. Therefore, by identifying the role of NP immunity, it can be used for diagnostic kits.

Materials and Methods

Viruses

The wild-type virus A/Chicken/Iran/259/2014 (N9H2) was obtained from the poultry vaccine research department of the Razi vaccine and serum research institute (RVSRI).

Determination of Protein Concentration

To perform electrophoresis and purification of nucleoprotein, the protein concentration of the samples was determined by Lowry method. Protein concentration was measured by using bovine serum albumin (BSA) as standard (21).

Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) Analysis

Electrophoresis on 10% polyacrylamide gel was performed according to the method of Laemmli (22). Both SDS-PAGE and Native-PAGE electrophoresis were used and the differences in gel bands in the two methods were evaluated. Native-PAGE gel electrophoresis was performed in a 10% resolving gel (23). Gel and reservoir buffer did not contain SDS. The sample was prepared in sample buffer without β -mercaptoethanol, SDS, or heating.

Purification of the Virus Nucleoprotein

Purification of the virus nucleoprotein was performed by the electroelution method (24). In this procedure, an SDS-polyacrylamide gel containing electrophoresed proteins was stained with Coomassie blue, the gel band of interest was excised, and the stained protein was electrophoretically eluted from the minced gel. An elution flow of 10 to 8 mA/tube was performed for 3-5 hours. After the removal of most of the salt and SDS by dialysis, the protein was concentrated with polyethylene glycol (PEG) and then analyzed.

Mouse Immunization

Immunogenicity studies in mice were conducted to evaluate the immunogenic potential of the H9N2 virus and to determine the minimal effective dose that generates protective correlates of immunity. Two sets of immunization experiments were performed using prime/boost strategy. In the first immunization, experimental groups of mice were vaccinated subcutaneously with 40 and 35 μ g of NP antigen (mice A and B) and boosted twice at three-week intervals. Also, other mice were immunized subcutaneously with 27 μ g of the H9N2 virus. Control mice received 70 μ L of PBS subcutaneously. Blood samples were collected seven days after the last injection from the corner of the eye. Mouse sera were collected; the antibody titers were measured by the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

The sera of immunized mice with NP were evaluated by the ELISA method to obtain the produced antibody titers. The ELISA protocol was performed as described previously (4). For this purpose, a checkerboard was designed using NP as an antigen and different dilutions of sera. At each stage, one negative and one positive serum were considered together as control samples.

One negative serum was tested in ELISA to establish endpoint cutoff. The antibody titer for unknown sera was calculated as the reciprocal of the highest dilution of the sera that gave a 450 nm greater than the mean 450 nm of the one negative serum.

Double-Immunodiffusion Assay (Ouchterlony)

Double immunodiffusion is a simple gel-based assay for detecting antigen-specific antibodies. Agar gels prepared in phosphate buffer pH:7 and poured onto plates. Small wells were punched 0.5 to 0.75 cm apart in the analytical gel. Antigen sample (NP) was poured into the central well and serum samples were poured into other wells with different dilutions and allowed to diffuse into the gel for 6 to 48 hr. As antibody and antigen form diffusion gradients that cross each other, a line of immune-precipitation may form between the wells, indicating the presence of specific antibodies. The gel was then stained and destained until precipitin lines are maximally visible (25,26).

Western Blot

After electrophoresis, the gel was cut into two parts. One part of the gel was stained and the other part transferred to nitrocellulose membrane for western blot detection (27). The second part of the gel was placed on a plate containing transfer buffer, at 4°C for 30 min. Then the gel was applied to the nitrocellulose membrane and Western blotting was done for 30 min

at 10 V. Nitrocellulose membrane was withdrawn and placed in a blocking buffer (BSA 3% in PBS) for 90 min. The nitrocellulose membrane was washed three times with washing buffer (PBST). After washing, the antibody (immune sera of injected mouse; 1:15 dilution) was poured on the nitrocellulose membrane and incubated overnight at 4°C. The fixed plate was washed four times with PBS-Tween (PBST) washing buffer and then it was incubated with HRP-IgG (goat anti-mouse immunoglobulin G antibodies conjugated with horseradish peroxidase) diluted at 1:500 for 1 hr. The plate was washed five times with washing buffer. After this step, the membrane was incubated in the precipitant chloronaphthol substrate (18mg chloronaphthol, 6mL methanol and, 9 µL hydrogen peroxide in 24 mL PBS). After 15 min of color development, the nitrocellulose membrane was photographed.

Results

The protein concentration of the H9N2 virus and NP were estimated at 30 and 0.2 mg/mL, respectively, using the linear curve obtained from BSA by Lowry procedures.

The molecular weights of proteins from the H9N2 ranged from 30 to 140 kDa in SDS-PAGE and Native-PAGE (Figure 1). The NP contained a single band with a molecular weight 60 kDa (Figures 1 and 2).

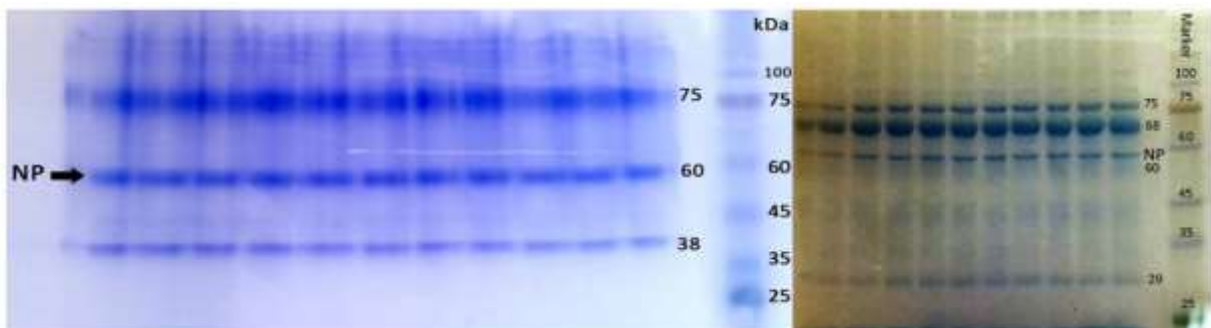


Figure 1. SDS-PAGE (left) and Native-PAGE (right) of N9H2 and its proteins (coomassie blue staining)

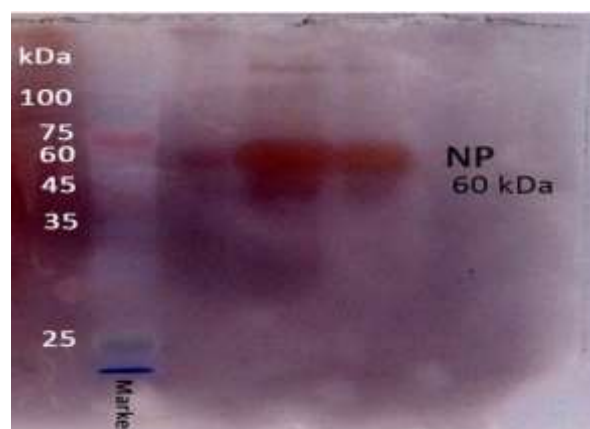


Figure 2. SDS-PAGE of N9H2 and its proteins (silver nitrate staining)

Using the electroelution method, about 3 mL of a solution containing pure nucleoprotein was obtained.

Ouchterlony showed that in serum dilution of 1:2, and 1:4, the sediment lines were formed between the serum and the NP antigen (Figure 3).

By ELISA, the optimal concentration of NP antigen was about 1 µg/mL at a 1:20 dilution. Thus, the NP-ELISA enables rapid serological diagnosis and is suited for influenza A antibody screening (Table 1).

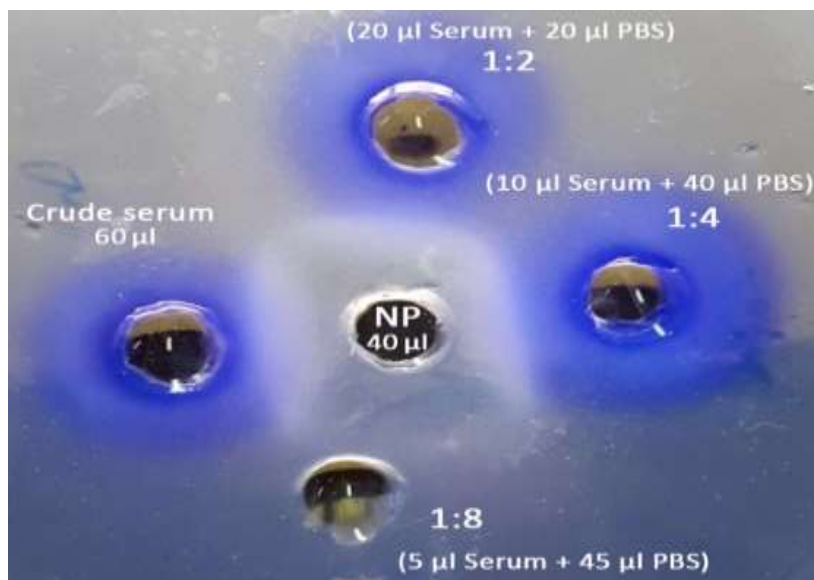


Figure 3. Ouchterlony of NP

Table 1. Absorbance of the samples

Dilution of sera	Serum of mice	NP Ag 0.25 µg/ml	NP Ag 0.5 µg/ml	NP Ag 1 µg/ml	NP Ag 2 µg/ml
1:20	Mice 1	0.532	0.799	0.991	0.968
	Mice 2	0.630	0.854	0.932	1.000
	Control +	1.624	1.813	2.117	2.161
	Control -	0.298	0.308	0.322	0.471
1:40	Mice 1	0.498	0.680	0.736	0.718
	Mice 2	0.574	0.636	0.591	0.593
	Control +	1.010	1.139	1.183	1.217
	Control -	0.251	0.295	0.311	0.425
1:80	Mice 1	0.358	0.407	0.470	0.366
	Mice 2	0.399	0.495	0.588	0.337
	Control +	0.987	0.856	0.900	0.988
	Control -	0.200	0.207	0.229	0.361

According to the results of ELISA, ouchterlony and immunity in the mice, a western blot test was performed. Figure 4 showed the band produced by western blotting of serum of mice, which immunized by 40 and 35 µg of NP. Figure 5 showed the results of western blot bands of the mice serum immunized

with 27 µg of the H9N2 virus. According to the results, mice A and B (immunized with NP), showed an antigen-antibody response only with a band of 60 kDa (Figure 5), and mice C and D (immunized with N9H2), have three NP, HA0 and, HA trimer bands (Figure 5).

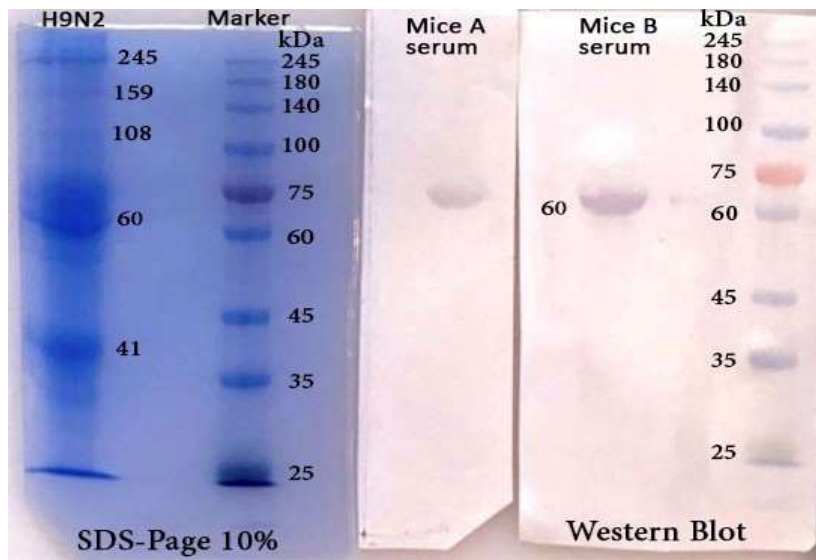


Figure 4. Western blot of NP

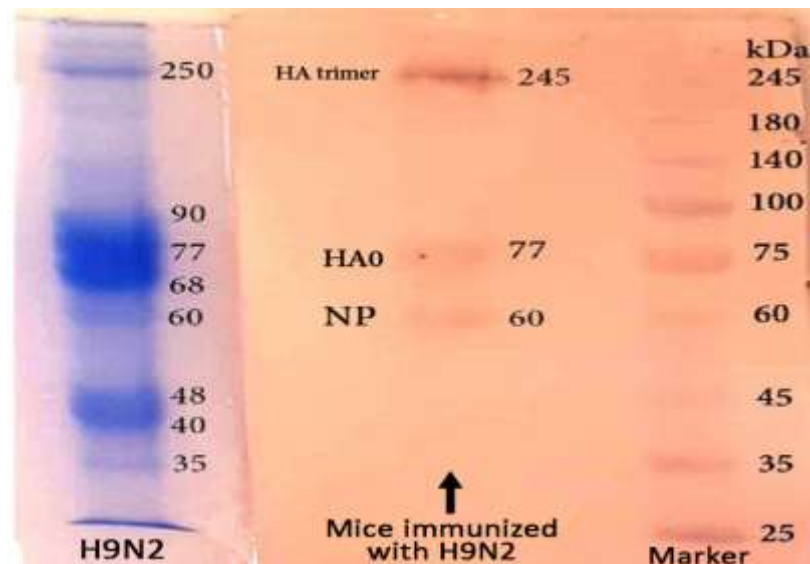


Figure 5. Western blot of N9H2

Discussion

Influenza viruses infect many animal species in addition to humans that infects more than 5 million people each year in the world. Influenza epidemics are estimated to cause approximately 500,000 deaths per year worldwide. In this case, AI is one of the most important viral diseases that is a syndrome of poultry caused by type A influenza virus (2,28).

The accurate and prompt diagnosis of AIV infection in birds is a critical component of surveillance and disease control. Given the prevalence of AI subtype H9N2 as an infectious agent in the poultry industry, special attention has been always directed toward the development of vaccine production against this infection. Vaccination would be the best strategy to

control AI with pandemic strains and is used in different countries, such as Iran, China, Pakistan, and Korea (29).

But, it has to be noted that according to the antigenic shift in influenza viruses, prevention by vaccination has always been a problem. The world health organization (WHO) collects information on the prevalence of influenza worldwide every year to introduce a viral strain for vaccine production next year. Inactivated viral vaccines cannot induce local antibodies or stimulate cell-mediated immune responses. Because of culturing selected strains for vaccination in embryonated chicken eggs and the harvest of the virus from allantoic fluid, the presence of egg protein antigens also has side effects for people with a history of allergy to the egg protein. In contrast,

live attenuated viral vaccines can produce neutralizing antibodies and provide cell-mediated immunity, but this vaccine also has limitations, including the need for two doses of vaccine to induce optimal immune responses. This vaccine is not prescribed in children under the age of two years and adults over 51 years of age due to the potential risk of the presence of a live virus. Also, these vaccines are produced during difficult and time-consuming processes, similar to inactivated vaccines (30,31).

Serological detection of AI is still the most important detection test. The standard method for serological detection of AIV infection [such as haemagglutination and neuraminidase inhibition (HI and NI) tests], has been shown to be less sensitive for the detection of antibodies induced by AIVs. Also, the HI assay is limited to various HA subtypes, and biosecurity is a concern when working with a live virus (32). Thus, it is important to develop serological detection assays for specific antibodies to all subtypes of AIV.

Molecular methods, such as polymerase chain reaction (PCR) (33) and ELISA (34), have also been used for AIV diagnosis. Although these methods are rapid, sensitive, and specific, but the test results often need to be confirmed by additional tests, such as Western blot. In the present study, attempts were made to develop Western blot for detecting antibodies against NP of AI viruses. With the high degree of conservation and group-specificity of NP, the western blot with NP developed in this study could detect the H9N2 subtype of AIV, and we believe that it can detect AI antibodies to all subtypes.

Concerns about the pandemic caused by the rearrangement of human viruses and highly acute avian viruses as well as the unexpected pandemics have led the researchers to detect AI using new serological methods based on conserved viral proteins (such as NP). The immune response generated by immunization with conserved proteins is expected to act as the first line of defense and protect society against acute influenza by launching a widespread immunization pending the preparation of a strain-specific vaccine (16).

Recent studies have shown that influenza virus proteins, including NP, can protect animals against different types of influenza by stimulating appropriate immune responses. These findings have set the hope for better detection and development of this type of vaccine against seasonal and pandemic influenza in the near future (35). The results of this study are consistent with the present study so that the western Blot test using NP and its immunodominant test revealed that NP has the potential to stimulate the immune system and can be used to manufacture diagnostic kits.

In addition to the western blot, ELISA in this study is based on NP, which is highly conserved among AI and can be used as a candidate diagnostic antigen because of its group and type specificity. Accordingly, in this work, we developed an indirect ELISA adapted to detect AIV type-specific antibody based on the NP antigen. The NP antigen successfully blotted AI-positive sera. These results indicate that NP antigen had immunological specificity and the NP-ELISA was successful for diagnosis.

This study was planned because little information is available about the efficacy of AIVs NP. The NP is one of the most important internal proteins of the influenza virus, which is one of the specific antigens of the type and is used to detect all kinds of influenza viruses. Studies show that internal proteins, such as NP, are one of the most important determinants of the host spectrum of influenza A viruses. Therefore, it is necessary to examine the internal proteins in AIVs in order to determine the changes made in the world, including Iran.

The present study utilized electrophoresis to detect protein bands from isolated influenza virus. According to the results, the nucleoprotein band had a molecular weight of 60kDa. This molecular weight for the nucleoprotein obtained from the present study is in line with previous studies, in which the molecular weight of nucleoprotein was reported to be about 56 to 61kDa (36,37).

The rapid diagnosis of any avian disease is not as important as acute AI. Different methods are available for the study of AI. Western Blot is one of the most important methods. Several reports have recently been made on the immunization of AI using techniques such as western blot, which indicates the importance of applying these methods (38). Accordingly, the immunodominancy of viral proteins and their immunogenicity was investigated and poultry serums for the presence of AIVs using nucleoprotein was analyzed for use in the development of diagnostic kits. The presence of AIV subtype H9N2 in the examined samples indicates that the poultry farming of the country faces this subtype despite heavy losses in some aviculture units.

According to the results of electrophoresis and western blot, the immunodominant proteins of H9N2 influenza virus were detected. It can be stated that the detection of influenza virus and its virulence determination are of the important priorities of prevention and control of the disease. In general, the efficacy of the western blot technique indicates that this method is effective for the detection of influenza.

In this project, the immunogenic proteins were obtained by receiving inactivated virus and immunedominant NP, producing positive and

negative chicken serums using immunization and virus analysis and achieving the best concentration of NP purified from H9N2 virus as an antigen, which can be used to design and product a kit using the NP. The kit designed with these specifications has a higher diagnostic value and is more cost effective than commercially available kits.

Conclusion

The results of this study highlight the potential of NPs-based AIV antigens for promoting the induction of both systemic and mucosal immune responses against respiratory pathogens. The Western blot with NP provides an alternative, inexpensive and rapid serological diagnostic tool and is suitable for influenza A antibody screening, especially in species that harbour several influenza subtypes. It can be used in the diagnosis and the serological epidemiological investigation of AI, especially in developing and undeveloped countries.

Acknowledgment

The authors thank all those who helped them writing this article.

Ethical considerations

Ethical issues (Including plagiarism, informed consent, misconduct, data fabrication and/or falsification, double publication and/or submission, redundancy, etc.) have been completely observed by the authors.

Funding and support

This research resulted from an independent research without receiving any financial support.

Conflict of Interest

Authors declared no conflict of interests.



ایمونوژنیسیته نوکلئوپروتئین ویروس آنفلوآنزای طیور

زهرا سادات خادمی سید بنادکی^۱، رسول مدنی^{۲*}، پرویز پاکزاد^۱، فریبا گلچین فر^۲، تارا امامی^۲

۱. گروه زیست شناسی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲. بخش پروتومیکس و بیوشیمی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (تات)، کرج، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۹/۰۳/۰۵

پذیرش: ۱۳۹۹/۰۶/۳۰

انتشار آنلاین: ۱۳۹۹/۰۸/۲۰

موضوع:

ویروس شناسی پزشکی

نویسنده مسئول:

رسول مدنی، بخش پروتومیکس و بیوشیمی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (تات)، کرج، ایران

ایمیل:

madanirasool@gmail.com

چکیده

زمینه و اهداف: ویروس آنفلوآنزا، بیماری عفونی جدی آنفلوآنزای مرغی (طیور) را ایجاد می کند که این ویروس متعلق به خانواده ارتومیکیسویریده نوع A است. سنتز RNA ویروسی A با توجه به میان کنش نوکلئوپروتئین (NP) با پلیمرز ویروسی صورت می گیرد. در مطالعه حاضر، ایمونوژنیسیته نوکلئوپروتئین ویروس آنفلوآنزای مرغی بررسی شد.

مواد و روش کار: نمونه ویروسی آنفلوآنزای مرغی سویه A/Chicken/Iran/259/2014/ N2H9 انتخاب گردید. به منظور انجام الکتروفورز و خالص سازی نوکلئوپروتئین، غلظت پروتئین نمونه ها مشخص شد. الکتروفورز SDS-PAGE و Native-PAGE بر روی ژل پلی آکریل آمید انجام گرفت و تفاوت بین باند ژل در دو روش ارزیابی شد. خالص سازی نوکلئوپروتئین ویروس با روش الکتروالون صورت گرفت و نوکلئوپروتئین خالص شده با استفاده از روش الیزا برای به دست آوردن تیتراهای آنتی بادی تولید شده ارزیابی گردید. برای تأیید نهایی از آزمون اشتراکونی و وسترن بلات استفاده شد.

یافته ها: با تعیین وزن مولکولی هر یک از پلی پپتیدها، وزن مولکولی پروتئین های H9N2 بین ۳۰ تا ۱۴۰ کیلو دالتون و وزن مولکولی نوکلئوپروتئین ۶۰ کیلو دالتون بود. نوکلئوپروتئین با روش الکتروالون خالص شد. اشتراکونی نشان داد که در رقت های سرم خام، ۱:۴ و ۱:۲، خطوط رسوبی بین سرم و آنتی ژن NP ایجاد شده است. NP-الیزا تشخیص سرولوژی سریع را در رقت ۱:۲۰ امکان پذیر کرد. در نهایت، با آزمون وسترن بلات، باند ۶۰ کیلو دالتونی نوکلئوپروتئین تأیید شد.

نتیجه گیری: نوکلئوپروتئین خالص شده با روش الکتروالون قابلیت تحریک سیستم ایمنی را دارد که می توان از آن جهت ساخت کیت های تشخیصی استفاده نمود.

کلید واژه ها: ویروس آنفلوآنزا، آنفلوآنزای مرغی، نوکلئوپروتئین، وسترن بلات

کپی رایت © مجله میکروبیولوژی پزشکی ایران: دسترسی آزاد؛ کپی برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

مقدمه

بسیاری از گونه های پرندگان به ویروس آنفلوآنزای A حساس هستند. شیوع گسترده آنفلوآنزای مرغی در پرندگان خانگی احتمال وقوع جهش و تجدید ژنتیک را افزایش می دهد و منجر به همه گیری آینده آنفلوآنزای مرغی می شود. نظارت کافی از جمله تشخیص سرولوژیکی آنتی بادی های ویروس آنفلوآنزای A در پرندگان و همچنین سایر گونه های حساس، در پیشگیری و کنترل آنفلوآنزای مرغی از اهمیت بالایی برخوردار است (۵).

ویروس آنفلوآنزای A، ۱۶ زیرگروه آنتی ژنی همگلوآنتینین (HA) و ۹ زیرگروه آنتی ژنی نورآمینیداز (NA) دارد و از پرندگان آبی و مرغان ساحلی جدا شده است. ویروس آنفلوآنزای A یک

آنفلوآنزا یک عفونت ویروسی تنفسی مهم در انسان است که به راحتی از فردی به فرد دیگر با نرخ مرگ و میر بالا انتقال می یابد و تأثیرات اقتصادی عمیقی دارد (۱). هر ساله در سراسر جهان همه گیری تقریباً ۳-۵ میلیون مورد آنفلوآنزای شدید وجود دارد که تخمین زده می شود سالانه ۵۰۰۰۰-۲۵۰۰۰۰ مرگ در این زمینه اتفاق بیفتد (۲).

ویروس آنفلوآنزا شامل چهار نوع A، B، C و D است (۳). آنفلوآنزای مرغی توسط ویروس آنفلوآنزای A ایجاد می شود که متعلق به خانواده ارتومیکیسویریده، جنس ویروس آنفلوآنزا A است و با شیوع آن طیور به سرعت آلوده می شوند (۴).

روش پژوهش

ویروس

ویروس نوع وحشی A/Chicken/Iran/259/2014 (N9H2) از بخش تحقیقات واکسن‌های طیور در موسسه تحقیقات واکسن و سرم رازی (RVSRI)، ایران در سال ۱۳۹۶ به دست آمد.

تعیین غلظت پروتئین

برای انجام الکتروفورز و خالص‌سازی نوکلئوپروتئین، غلظت پروتئین نمونه‌ها محاسبه گردید. غلظت پروتئین با استفاده از سرم آلبومین گاوی (BSA) به‌عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد (۲۱).

الکتروفورز ژل پلی‌آکریل آمید سدیم دودسیل

سولفات (SDS-PAGE)

الکتروفورز بر روی ژل ۱۰٪ پلی‌آکریل آمید طبق روش Laemmli انجام شد (۲۲). از الکتروفورز به روش SDS-PAGE و Native-PAGE استفاده شد و اختلاف باندهای ژل در دو روش مورد بررسی قرار گرفت. الکتروفورز Native-PAGE با ژل جداکننده ۱۰٪ انجام گرفت (۲۳). ژل و بافر مخزن حاوی SDS نبود. نمونه در بافر نمونه، بدون β -مرکاپتواتانول، SDS یا حرارت دادن، تهیه شد.

خالص‌سازی نوکلئوپروتئین ویروس

خالص‌سازی نوکلئوپروتئین ویروس با روش الکتروالوژن انجام گرفت (۲۴). در این روش یک ژل SDS-PAGE حاوی پروتئین‌های الکتروفورز شده به‌وسیله رنگ کوماسی بلو رنگ آمیزی شد، سپس باند پروتئینی مورد نظر در ژل برش داده شد و پروتئین جدا شده از ژل با روش الکتروالوژن با جریان شستشوی ۱۰ تا ۸ میلی‌آمپر/لوله به مدت ۳-۵ ساعت خالص‌سازی گردید. پس از حذف نمک و سدیم دودسیل سولفات (SDS) توسط دیالیز، پروتئین‌ها با پلی اتیلن گلیکول (PEG) تغلیظ شدند و مورد بررسی قرار گرفتند.

ایمن‌سازی موش‌ها

مطالعات ایجاد ایمنوژنیسیته در موش‌ها برای ارزیابی پتانسیل ایمنی‌زایی ویروس H9N2 و تعیین حداقل دوز موثر ایجاد کننده ارتباط محافظتی، انجام شد. دو مجموعه آزمایش ایمن‌سازی با استفاده از استراتژی prime/boost صورت گرفت. در اولین واکسیناسیون، گروه‌های آزمایشی موش‌ها (موش‌های A و B) به صورت زیر جلدی با ۴۰ و ۳۵ میکروگرم آنتی ژن NP واکسینه و در فواصل سه هفته‌ای دو بار تقویت شدند. همچنین، سایر موش‌ها با ۲۷ میکروگرم ویروس H9N2 به صورت زیر جلدی ایمن گردیدند. موش‌های شاهد، ۷۰ میکرولیتر PBS به صورت زیر

ویروس پوشش‌دار (غشاء دار) است (۶) و سه پروتئین ویروسی هم‌گلوپروتئین (HA)، نورآمینیداز (NA) و کانال پروتون M2 در غشاء ویروس وجود دارد (۷، ۸). هر ویروس شامل هشت بخش RNA منفی (vRNA)، است که به‌عنوان ریبونوکلئوپروتئین ویروسی منفرد جمع شده‌اند. هر ریبونوکلئوپروتئین ویروسی حاوی پلی‌مرز ویروسی است که از زیر واحدهای PA، PB1 و PB2، نوکلئوپروتئین (NP) و یک رشته منفرد vRNA تشکیل شده است (۹، ۱۰).

نوکلئوپروتئین (NP) نقش اصلی در تکثیر ویروس دارد و به‌عنوان یک پروتئین ساختاری بدون فعالیت آنزیمی ذاتی، فراوان‌ترین پروتئین ویروسی در سلول‌های آلوده است. NP از مؤلفه‌های مهم کمپلکس vRNP است و عملکردهای شناخته‌شده بسیاری مانند سازماندهی بسته‌بندی RNA، تبادل هسته‌ای (۱۱)، رونویسی و همانند سازی vRNA را دارد (۱۰).

واکسن خالص‌شده آنفلوآنزای A برای انسان تولید شده است و بسیاری از کشورها آن را ذخیره کرده‌اند تا در صورت ابتلا به بیماری همه‌گیر آنفلوآنزای مرغی، تجویز سریع را برای مردم انجام دهند. در این راستا، محققان از کشف آنتی‌بادی موثر علیه انواع ویروس آنفلوآنزای A خبر دادند (۱۳، ۱۴).

ایمن‌سازی با کل ویروس باعث پاسخ‌های ایمنی عمدتاً هومورال به گلیکوپروتئین‌های سطح ویروسی، HA و NA می‌شود. با این حال، این ایمنی مختص گونه‌های خاصی است و محافظت کمی در برابر انواع جهش‌یافته ویروس را ایجاد می‌کند (۱۵). در مقابل، ایمن‌سازی با NP باعث ایجاد طیف گسترده‌ای از پاسخ‌های ایمنی می‌گردد (۱۶، ۱۷). این ایمنی واکنش متقاطع دارد و اپی‌توپ‌های محافظت‌شده را در پروتئین‌های ویروسی (۱۸، ۱۹) در انواع مختلف ویروس آنفلوآنزای A که شامل چندین اپی‌توپ ایمنی است، تشخیص می‌دهد (۲۰). به احتمال زیاد، واکنش‌های اختصاصی آنفلوآنزا براساس پروتئین‌های محافظت‌شده مانند NP ساخته شده‌اند. از NP می‌توان به‌عنوان ابزاری در جهت طراحی واکسن استفاده کرد، زیرا نشان داده شده است که واکنش متقاطع آنتی‌بادی و پاسخ سلول T را القاء می‌کند (۲۰). در این مطالعه ایمنوژنیسیته نوکلئوپروتئین ویروس آنفلوآنزای A مورد بررسی قرار گرفت که با شناسایی نقش ایمنی پروتئین NP، می‌توان از آن برای کیت‌های تشخیصی استفاده کرد.

شدن زمان فوق، کاغذ که باندها به آن منتقل شده است، به مدت ۹۰ دقیقه درون بافر مسدود کننده (۳٪ BSA در PBS)، قرار گرفت. در ادامه غشاء نیتروسولوز با بافر شستشو، ۳-۴ مرتبه شستشو داده شد. پس از انجام شستشو، غشاء نیتروسولوز درون پلیت گذاشته شد. سرم به همراه بافر رقت با رقت ۱:۱۵ روی غشاء ریخته شد و به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سلسیوس قرار گرفت. روز بعد کاغذ چهار مرتبه با بافر فسفات-توبین (PBST) شستشو گردید و سپس روی غشاء با کنژوگه HRP-IgG با رقت ۱:۵۰۰ پوشانده شد. غشاء و کنژوگه به مدت یک ساعت روی شیکر قرار گرفت و پس از طی زمان مربوطه پنج مرتبه به دقت شستشو داده شد. پس از انجام مراحل فوق، سوبسترای تهیه شده (۱۸ میلی گرم کلرومفتول و ۶ میلی لیتر متانول، ۹ میکرولیتر آب اکسیژنه در ۲۴ میلی لیتر PBS) روی کاغذ بلات ریخته شد و در تاریکی، پس از ۱۵ دقیقه باندهایی که با سوبسترای واکنش داده اند ظهور پیدا می کنند.

یافته‌ها

غلظت پروتئین ویروس H9N2 و NP با استفاده از منحنی خطی به دست آمده از BSA با روش لوری به ترتیب ۳۰ و ۰/۲ میلی گرم در میلی لیتر برآورد شد.

وزن مولکولی پروتئین‌های H9N2 از ۳۰ تا ۱۴۰ کیلو دالتون در SDS-PAGE و Native-PAGE متغیر بود (شکل ۱). NP حاوی یک باند منفرد با وزن مولکولی ۶۰ کیلو دالتون بود (شکل ۱ و ۲). با استفاده از روش الکتروالوژن، حدود ۳ میلی لیتر از محلول حاوی نوکلئوپروتئین خالص به دست آمد.

اشترلونی نشان داد که در رقت سرم خام، ۱:۲ و ۱:۴، خطوط رسوبی بین سرم و آنتی ژن NP تشکیل شده است (شکل ۳).

توسط الیزا، غلظت مطلوب آنتی ژن NP در رقت ۱:۲۰ در حدود ۱ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد. بنابراین، NP-الیزا تشخیص سریع سرولوژی را فراهم می کند و برای غربالگری آنتی بادی آنفلوانزا A مناسب است (جدول ۱).

جلدی دریافت کردند. نمونه خون، هفت روز پس از آخرین تزریق از گوشه چشم جمع آوری و سرم موش‌ها تهیه شد. تیتراژ آنتی بادی با روش الیزا به دست آمد.

سنجش ایمونوسوربنت متصل به آنزیم (الیزا)

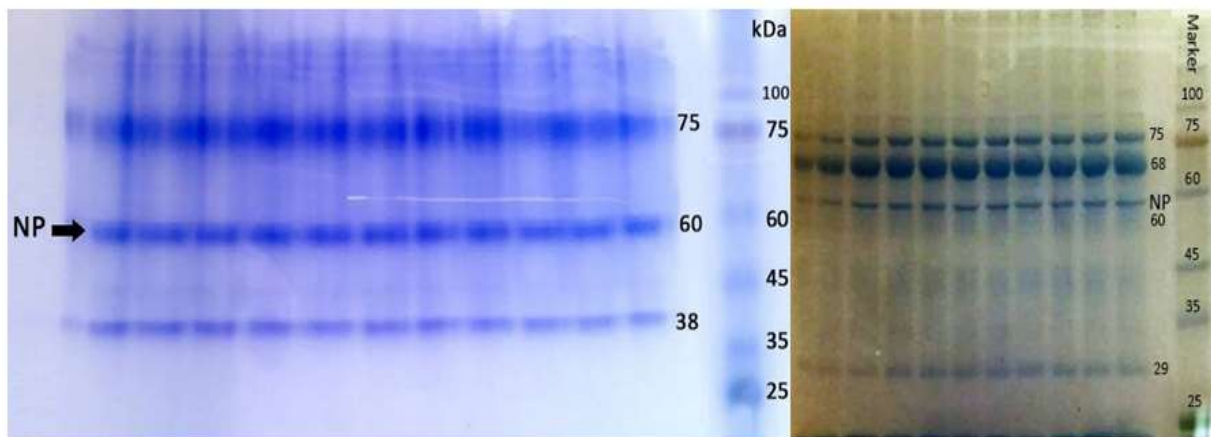
سرم موش‌های ایمن شده با پروتئین NP با استفاده از روش الیزا مورد بررسی قرار گرفت و تیتراژهای آنتی بادی تولید شده به دست آمد. روش الیزا به صورتی که قبلاً توضیح داده شده بود، انجام گرفت (۴). برای این منظور، چکربرد با استفاده از NP به عنوان آنتی ژن و رقت‌های مختلف سرم طراحی شد. در هر مرحله، یک سرم منفی و یک مثبت با هم به عنوان نمونه شاهد در نظر گرفته شدند. با استفاده از یک سرم منفی کاتاف نقطه پایانی الیزا به دست آمد. دستگاه روی طول موج ۴۵۰ نانومتر تنظیم و جذب نمونه‌ها قرائت شد.

سنجش ایمونودیفیوژن دوگانه (اشترلونی)

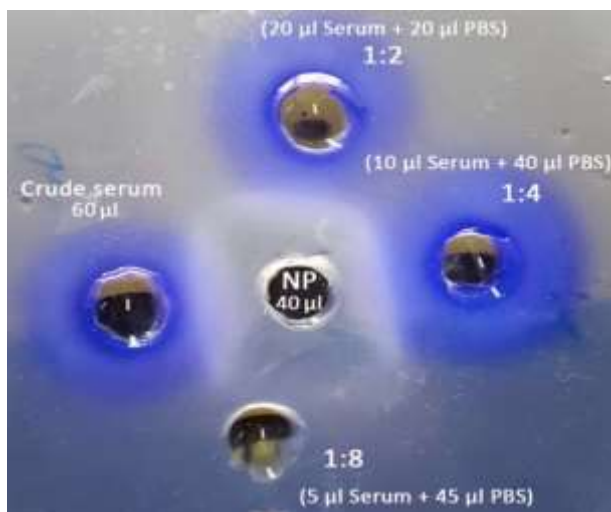
ایمونودیفیوژن دوگانه یک روش ساده مبتنی بر ژل برای تشخیص آنتی ژن و آنتی بادی اختصاصی است. ژل آگار در بافر فسفات با pH برابر با ۷ تهیه و درون پلیت‌ها ریخته شد. چاهک‌های کوچک به فاصله ۰/۵ تا ۰/۷۵ سانتی متر از هم در ژل پانچ شدند. نمونه آنتی ژن (NP) در چاهک مرکزی و نمونه‌های سرمی داخل چاهک‌های دیگر با رقت‌های مختلف ریخته شد و اجازه داده شد که به مدت ۶ تا ۴۸ ساعت در ژل پخش گردند. آنتی بادی و آنتی ژن بر اساس شیب انتشار ممکن است یک خط رسوب ایمنی بین چاهک‌ها تشکیل دهند، که نشان دهنده وجود آنتی بادی‌های اختصاصی است. سپس ژل رنگ آمیزی و رنگ‌بری شد تا زمانی که خطوط رسوبی به وضوح قابل مشاهده باشند (۲۵، ۲۶).

وسترن بلات

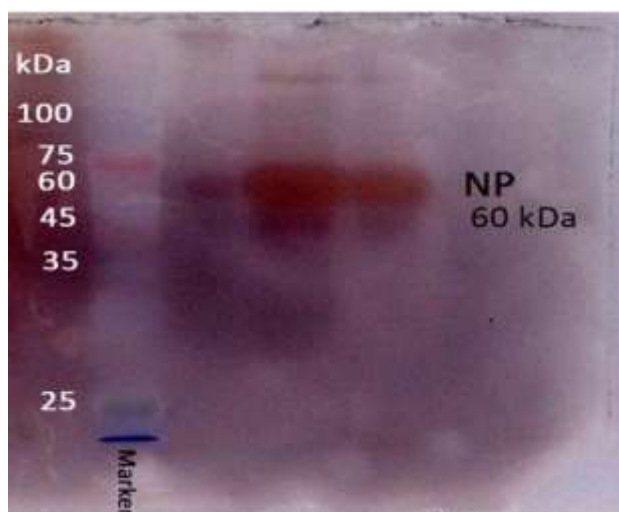
پس از الکتروفورز، ژل به دو قسمت برش داده شد. یک قسمت از ژل رنگ آمیزی گردید و قسمت دیگر برای تشخیص با وسترن بلات به غشاء نیتروسولوز انتقال یافت (۲۷). قسمت دوم ژل در یک پلیت حاوی ترانسفر بافر، در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه گذاشته شد. سپس ژل روی غشاء نیتروسولوز قرار گرفت و وسترن بلات به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۰ ولت انجام گرفت. بعد از سپری



شکل ۱. SDS-PAGE (چپ) و Native-PAGE (راست) N9H2 و پروتئین‌های آن (رنگ‌آمیزی کوماسی بلو)



شکل ۳. اشتراونی NP

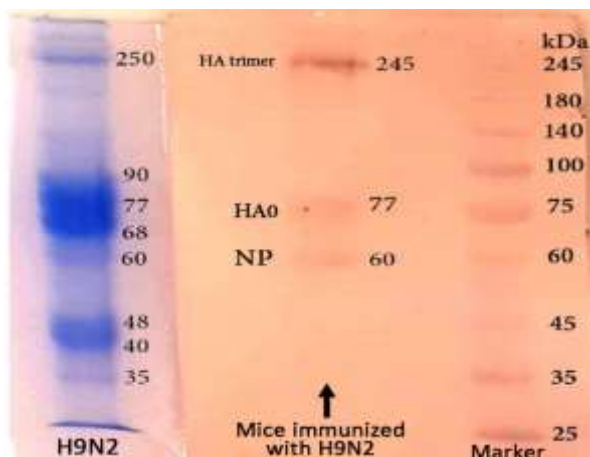


شکل ۴. SDS-PAGE برای N9H2 و پروتئین‌های آن (رنگ‌آمیزی نیترا ت نقره)

جدول ۱. میزان جذب نمونه‌ها

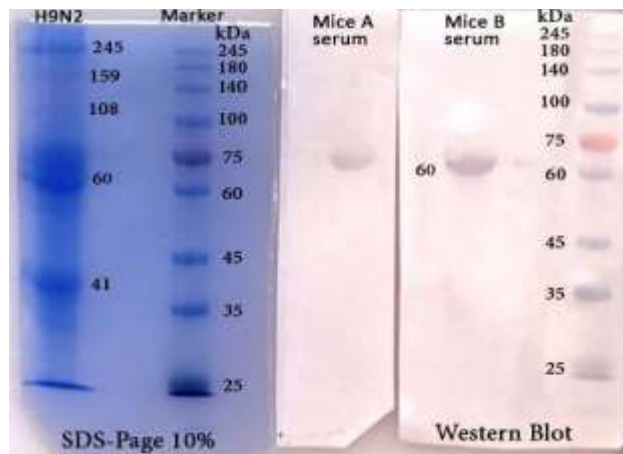
رقت‌های سرم	سرم‌های موش	آنتی‌ژن NP ۰/۲۵ µg/ml	آنتی‌ژن NP ۰/۵ µg/ml	آنتی‌ژن NP ۱ µg/ml	آنتی‌ژن NP ۲ µg/ml
۱:۲۰	موش ۱	۰/۵۳۲	۰/۷۹۹	۰/۹۹۱	۰/۹۶۸
	موش ۲	۰/۶۳۰	۰/۸۵۴	۰/۹۳۲	۱/۰۰۰
	کنترل +	۱/۶۲۴	۱/۸۱۳	۲/۱۱۷	۱/۱۶۱
	کنترل -	۰/۲۹۸	۰/۳۰۸	۰/۳۲۲	۰/۴۷۱
۱:۴۰	موش ۱	۰/۴۹۸	۰/۶۸۰	۰/۷۳۶	۰/۷۱۸
	موش ۲	۰/۵۷۴	۰/۶۳۶	۰/۵۹۱	۰/۵۹۳
	کنترل +	۱/۰۱۰	۱/۱۳۹	۱/۱۸۳	۱/۲۱۷
	کنترل -	۰/۲۵۱	۰/۲۹۵	۰/۳۱۱	۰/۴۲۵
۱:۸۰	موش ۱	۰/۳۵۸	۰/۴۰۷	۰/۴۷۰	۰/۳۶۶
	موش ۲	۰/۳۹۹	۰/۴۹۵	۰/۵۸۸	۰/۳۳۷
	کنترل +	۰/۹۸۷	۰/۸۵۶	۰/۹۰۰	۰/۹۸۸
	کنترل -	۰/۲۰۰	۰/۲۰۷	۰/۲۲۹	۰/۳۶۱

H9N2 ایمن سازی شده‌اند، را نشان می‌دهد. طبق نتایج، موش‌های A و B (واکسینه شده با NP)، یک پاسخ آنتی‌ژن-آنتی‌بادی فقط با باند ۶۰ کیلو دالتون نشان دادند (شکل ۵) و موش‌های C و D (ایمن سازی شده با N9H2) سه باند NP ، HA0 و HA ترایمر دارند (شکل ۵).



شکل ۶. وسترن بلات برای N9H2

با توجه به نتایج الیزا، اشتراکونی و ایمنی در موش‌ها، آزمایش وسترن بلات انجام شد. شکل ۴، باند تولیدشده توسط وسترن بلات سرم موش‌هایی را نشان می‌دهد که با ۳۵ و ۴۰ میکروگرم NP ایمن سازی شده‌اند. شکل ۵، نتایج وسترن بلات سرم موش‌هایی را که با ۲۷ میکروگرم ویروس



شکل ۵. وسترن بلات برای NP

بحث

می‌کند و با استفاده از آن، سویه ویروسی برای ساخت واکسن در سال آتی را معرفی می‌کند. واکسن‌های غیر فعال ویروس نمی‌توانند آنتی‌بادی‌های موضعی را القاء کنند یا پاسخ‌های ایمنی سلولی را تحریک نمایند. همچنین به علت اینکه نژادهای منتخب برای واکسن، در تخم مرغ جنین دار کشت داده شده و ویروس نیز از مایع آلتوتویک برداشت می‌شود، وجود آنتی‌ژن‌های پروتئینی تخم مرغ عوارضی را برای افراد با سابقه آلرژی به پروتئین موجود در تخم مرغ، به همراه دارد. در مقابل، واکسن‌های ویروسی زنده ضعیف شده توانایی تولید آنتی‌بادی خنثی‌کننده و ایجاد پاسخ ایمنی سلولی را دارد. اما این واکسن نیز دارای محدودیت‌هایی است، از جمله اینکه برای ایجاد پاسخ‌های ایمنی مطلوب دو نوبت تجویز واکسن لازم است. این واکسن به دلیل خطر احتمالی وجود ویروس زنده در کودکان زیر دو سال و بزرگسالان بالای ۵۱ سال تجویز نمی‌شود. همچنین، این واکسن‌ها در فرآیندهای دشوار و زمان‌بر، مشابه واکسن‌های غیرفعال تولید می‌شوند (۳۰، ۳۱).

تشخیص سرولوژیکی آنفلوانزای مرغی هنوز مهمترین آزمایش تشخیصی است. نشان داده شده است که روش استاندارد برای تشخیص سرولوژیک عفونت ویروس آنفلوانزای مرغی (مانند

ویروس‌های آنفلوانزا سالانه بیش از ۵ میلیون نفر را در جهان آلوده و علاوه بر انسان بسیاری از گونه‌های جانوری را نیز درگیر خود می‌کنند. تخمین زده می‌شود که همه‌گیری‌های آنفلوانزا سالانه ۵۰۰۰۰۰ مرگ در سراسر جهان داشته باشد. در این حال، آنفلوانزای مرغی یکی از مهمترین بیماری‌های ویروسی و سندرم طیور است که به علت ویروس آنفلوانزا نوع A ایجاد می‌شود (۲).

تشخیص دقیق و سریع عفونت آنفلوانزای مرغی در پرندگان یکی از مؤلفه‌های مهم نظارت و استراتژی کنترل بیماری است. با توجه به شیوع آنفلوانزای مرغی H9N2 به‌عنوان یک عامل عفونی در صنعت طیور، توجه ویژه برای توسعه تولید واکسن علیه این عفونت ایجاد شده است. واکسیناسیون بهترین راه‌کار برای کنترل آنفلوانزای مرغی با سویه‌های همه‌گیر است و در کشورهای مختلفی مانند ایران، چین، پاکستان و کره استفاده می‌شود (۲۹).

اما، با توجه به ویژگی تغییرات آنتی‌ژنی در ویروس‌های آنفلوانزا، امر پیشگیری با روش واکسیناسیون همواره با مشکل روبرو بوده است. هر ساله سازمان بهداشت جهانی (WHO) اطلاعات مربوط به شیوع آنفلوانزا در سراسر جهان را گردآوری

در این مطالعه، علاوه بر وسترن بلات، مشخص شد که الیزا بر اساس NP که در ویروس آنفلوانزا بسیار محافظت شده است و به دلیل اختصاصی بودن گروه و نوع آن می‌تواند به‌عنوان یک آنتی‌ژن تشخیصی مورد استفاده قرار گیرد.

بر این اساس، در این پژوهش یک الیزای غیر مستقیم طراحی شد که برای تشخیص آنتی‌بادی‌های اختصاصی ویروس آنفلوانزای مرغی بر اساس آنتی‌ژن NP بهینه گردید. نتایج نشان می‌دهد که NP-الیزا دارای ویژگی مناسبی است و به‌کارگیری تست الیزا با آنتی‌ژن NP برای تشخیص موفقیت‌آمیز بود.

برنامه‌ریزی پژوهش حاضر به این دلیل بود که اطلاعات اندکی در مورد کارایی NP ویروس آنفلوانزای پرندگان در دسترس می‌باشد. این در حالی است که نوکلئوپروتئین جزء مهم‌ترین پروتئین‌های داخلی ویروس آنفلوانزا است به‌طوری‌که یکی از آنتی‌ژن‌های اختصاصی تیپ است و در تشخیص نوع ویروس‌های آنفلوانزا به کار می‌رود. مطالعات نشان می‌دهد پروتئین‌های داخلی مانند پروتئین NP جزء مهم‌ترین عوامل تعیین‌کننده طیف میزبانی ویروس‌های آنفلوانزای A هستند، بنابراین بررسی پروتئین داخلی در ویروس‌های آنفلوانزای پرندگان در راستای تعیین تغییرات ایجاد شده در جهان و همچنین ایران لازم و ضروری به نظر می‌رسد.

در مطالعه حاضر برای مشاهده باندهای پروتئین ویروس آنفلوانزای جدا شده، الکتروفورز انجام گردید. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده باند حاصل از نوکلئوپروتئین، دارای وزن مولکولی ۶۰ کیلودالتون بود. این وزن مولکولی برای نوکلئوپروتئین در تحقیق حاضر مطابق تحقیقات انجام شده گذشته است که در آنها وزن نوکلئوپروتئین در حدود ۵۶ تا ۶۱ کیلودالتون گزارش شده است (۳۶، ۳۷).

در هیچ یک از بیماری‌های پرندگان سرعت در تشخیص به آن اندازه‌ای اهمیت ندارد که در بیماری آنفلوانزای پرندگان فوق حاد مطرح است. روش‌های متفاوتی برای بررسی آنفلوانزای پرندگان مطرح است که وسترن بلات یکی از مهم‌ترین روش‌ها محسوب می‌شود. اخیراً گزارشات متعددی در خصوص بررسی ایمنی‌زایی آنفلوانزای پرندگان با استفاده از روش‌هایی مانند وسترن بلات مطرح شده است که بیانگر اهمیت استفاده از این روش‌هاست (۳۸). بر همین اساس، با بررسی غالب ایمنی پروتئین‌های ویروس و همچنین بررسی ایمنی‌زایی آن، سرم‌های طیور از نظر آنفلوانزای پرندگان با استفاده از نوکلئوپروتئین بررسی شد تا از آن برای ساخت کیت‌های تشخیصی بهره‌جست.

آزمایشات HI و NI برای تشخیص آنتی‌بادی‌های القاء شده توسط ویروس آنفلوانزای مرغی حساسیت کمتری دارد. همچنین، روش HI محدود به انواع مختلف زیر گروه‌های HA است و امنیت زیستی هنگام کار با ویروس زنده نیز نگران‌کننده است (۳۲). بنابراین، مهم است که روش‌های تشخیص سرولوژی برای آنتی‌بادی‌های اختصاصی برای همه زیرگروه‌های ویروس آنفلوانزای مرغی تعیین گردد. از روش‌های مولکولی، مانند PCR (۳۳) و الیزا (۳۴)، نیز برای تشخیص ویروس آنفلوانزای مرغی استفاده شده است. اگرچه این روش‌ها سریع، حساس و اختصاصی هستند، اما نتایج آزمایش اغلب نیاز به تأیید آزمایش‌های اضافی مانند وسترن بلات دارند.

در مطالعه حاضر، تلاش شده است تا با استفاده و توسعه تست وسترن بلات، آنتی‌بادی علیه پروتئین NP ویروس‌های آنفلوانزای مرغی، شناسایی گردد. انجام وسترن بلات با NP در این مطالعه می‌تواند زیر گروه H9N2 ویروس‌های آنفلوانزای مرغی را تشخیص دهد و ما معتقدیم که می‌تواند آنتی‌بادی‌های آنفلوانزای مرغی را برای همه تحت تیپ‌ها شناسایی کند.

نگرانی ناشی از بروز پاندمی حاصل از بازآرایی ژن‌های ویروس انسانی و ویروس فوق حاد پرندگان و همچنین موارد همه گیر غیر منتظره، محققین را بر آن داشته است تا با استفاده از روش‌های سرولوژی جدید مبتنی بر پروتئین‌های حفاظت شده ویروس (مانند نوکلئوپروتئین) آنفلوانزای مرغی را تشخیص دهند. انتظار می‌رود ایمنی ایجاد شده به‌واسطه واکسیناسیون با پروتئین‌های فوق به‌عنوان اولین سد دفاعی عمل کند و با راه اندازی ایمنی وسیع الطیف تا آماده شدن واکسن ویژه سویه، جامعه را در برابر بیماری حاد آنفلوانزا محافظت نماید (۱۶).

مطالعات اخیر نشان داده است که پروتئین‌های ویروس آنفلوانزا از جمله نوکلئوپروتئین می‌تواند با تحریک پاسخ‌های ایمنی مناسب، حیوانات مورد مطالعه را در مقابل تیپ‌های مختلف آنفلوانزا محافظت نماید. این نتایج امیدهایی را در زمینه توسعه بیشتر این نوع واکسن برای مقابله با آنفلوانزای فصلی و پاندمیک، در آینده نزدیک ایجاد کرده است (۳۵). نتایج حاصل از این تحقیقات با مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد به‌طوری‌که با انجام آزمون وسترن بلات با استفاده از نوکلئوپروتئین و همچنین بررسی غالب ایمنی آن، مشخص شد که نوکلئوپروتئین قابلیت تحریک سیستم ایمنی را دارد که می‌توان از آن جهت ساخت کیت‌های تشخیصی استفاده نمود.

می‌کند. وسترن بلات با NP یک ابزار تشخیصی سرولوژیکی جایگزین، ارزان و سریع فراهم می‌آورد که برای غربال‌گری آنتی‌بادی آنفلوانزا A، به‌ویژه در گونه‌هایی که چندین زیرگروه آنفلوانزا دارند، مناسب است. این تست می‌تواند در تشخیص و بررسی همه‌گیری آنفلوانزای مرغی به‌خصوص در کشورهای در حال توسعه و توسعه‌نیافته استفاده گردد.

سیاسگزاری

نویسندگان از تمامی کسانی که در انجام این تحقیق آنها را یاری کردند، تشکر و قدردانی می‌کنند.

تعارض در منافع

این مقاله پژوهشی مستقل است که بدون حمایت مالی سازمانی انجام شده است. در انجام مطالعه حاضر، نویسندگان هیچ‌گونه تضاد منافی نداشته‌اند.

Referance

1. Rekstin A, Isakova-Sivak I, Petukhova G, Korenkov D, Losev I, Smolonogina T, et al. Immuno-genicity and cross protection in mice afforded by pandemic H1N1 live attenuated influenza vaccine containing wild-type nucleoprotein. *Biomed Res Int* 2017; 2017: 1-11. [DOI:10.1155/2017/9359276] [PMID] [PMCID]
2. Isakova-Sivak I, Korenkov D, Smolonogina T, Tretiak T, Donina S, Rekstin A, et al. Comparative studies of infectivity, immunogenicity and cross-protective efficacy of live attenuated influenza vaccines containing nucleoprotein from cold-adapted or wild-type influenza virus in a mouse model. *Virology* 2017; 500: 209-17. [DOI:10.1016/j.virol.2016.10.027] [PMID] [PMCID]
3. Ghebrehewet S, MacPherson P, Ho A. *Influenza*. *BMJ* 2016; 355: 1-8. [DOI:10.1136/bmj.i6258] [PMID] [PMCID]
4. Jin M, Wang G, Zhang R, Zhao S, Li H, Tan Y, Chen H. Development of enzyme-linked immunosorbent assay with nucleoprotein as antigen for detection of antibodies to avian influenza virus. *Avian Dis* 2004; 48(4): 870-8. [DOI:10.1637/7226-062204r] [PMID]
5. Wahlgren J. *Influenza A viruses: an ecology review*. *Infect Ecol Epidemiol* 2011; 1: 1-7. [DOI:10.3402/iee.v1i0.6004] [PMID] [PMCID]
6. Wang X, Zeng Z, Zhang Z, Zheng Y, Li B, Su G, et al. The appropriate combination of hemagglutinin and neuraminidase prompts the predominant H5N6 highly pathogenic avian influenza virus in birds. *Front Microbiol* 2018; 9: 1-11. [DOI:10.3389/fmicb.2018.01088] [PMID] [PMCID]

وجود ساب تایپ H9N2 آنفلوانزا در نمونه‌های بررسی شده بیانگر این است که با وجود تلفات سنگین در برخی از مرغ‌داری‌ها، صنعت طیور کشور ما با این ساب تایپ مواجه شده است. با توجه به نتایج حاصل از الکتروفورز و وسترن بلات، پروتئین‌های ایمنودومیننت ویروس آنفلوانزای H9N2 ردیابی شد. می‌توان اظهار داشت که ردیابی و تشخیص ویروس آنفلوانزا و تعیین حدت آن یکی از اولویت‌های مهم پیشگیری و مبارزه علیه این بیماری محسوب می‌شود. به‌طور کلی کارایی روش وسترن بلات نشانگر کارآمد بودن این روش به‌عنوان یک روش مناسب، جهت تشخیص آنفلوانزا است.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه، پتانسیل آنتی‌ژن‌های ویروس آنفلوانزای مرغی مبتنی بر NP را برای تقویت القای پاسخ‌های ایمنی سیستمی و مخاطی در برابر عوامل بیماری‌زای تنفسی برجسته

7. Blijleven JS, Boonstra S, Onck PR, van der Giessen E, van Oijten AM. Mechanisms of influenza viral membrane fusion. *Semin Cell Dev Biol* 2016; 60: 78-88. [DOI:10.1016/j.semcdb.2016.07.007] [PMID]
8. Chlanda P, Schraidt O, Kummer S, Riches J, Oberwinkler H, Prinz S, et al. Structural analysis of the roles of influenza A virus membrane-associated proteins in assembly and morphology. *J Virol* 2015; 89(17): 8957-66. [DOI:10.1128/JVI.00592-15] [PMID] [PMCID]
9. Noda T, Kawaoka Y. Structure of influenza virus ribonucleoprotein complexes and their packaging into virions. *Rev Med Virol* 2010; 20(6): 380-91. [DOI:10.1002/rmv.666] [PMID] [PMCID]
10. Biswas SK, Boutz PL, Nayak DP. Influenza virus nucleoprotein interacts with influenza virus polymerase proteins. *J Virol* 1998; 72(7): 5493-501. [DOI:10.1128/JVI.72.7.5493-5501.1998] [PMID] [PMCID]
11. Chang C, Chen C, Wu C, Chen S, Shih S, Kuo R. Cellular hnRNP A2/B1 interacts with the NP of influenza A virus and impacts viral replication. *PLoS One* 2017; 12(11): 1-6. [DOI:10.1371/journal.pone.0188214] [PMID] [PMCID]
12. Vreede FT, Ng AK, Shaw PC, Fodor E. Stabilization of influenza virus replication intermediates is dependent on the RNA-binding but not the homo-oligomerization activity of the viral nucleoprotein. *J Virol* 2011; 85(22): 12073-8. [DOI:10.1128/JVI.00695-11] [PMID] [PMCID]
13. Tseng YF, Weng TC, Lai CC, Chen PL, Lee MS, Hu AY. A fast and efficient purification platform for cell-based influenza viruses by flow-through chromatography.

- Vaccine 2018; 36(22): 3146-52. [DOI:10.1016/j.vaccine.2017.03.016] [PMID]
14. Kon TC, Onu A, Berbecila L, Lupulescu E, Ghiorgisor A, Kersten GF, et al. Influenza vaccine manufacturing: effect of inactivation, splitting and site of manufacturing. Comparison of influenza vaccine production processes. PLoS One 2016; 11(3): 1-6. [DOI:10.1371/journal.pone.0150700] [PMID] [PMCID]
 15. Iwasaki A, Pillai PS. Innate immunity to influenza virus infection. Nat Rev Immunol 2014; 14(5): 315-28. [DOI:10.1038/nri3665] [PMID] [PMCID]
 16. Altstein AD, Gitelman AK, Smirnov YA, Piskareva LM, Zakharova LG, Pashvykina GV, et al. Immunization with influenza A NP-expressing vaccinia virus recombinant protects mice against experimental infection with human and avian influenza viruses. Arch Virol 2006; 151(5): 921-31. [DOI:10.1007/s00705-005-0676-9] [PMID]
 17. Wang W, Li R, Deng Y, Lu N, Chen H, Meng X, et al. Protective efficacy of the conserved NP, PB1, and M1 proteins as immunogens in DNA- and vaccinia virus-based universal influenza A virus vaccines in mice. Clin Vaccine Immunol 2015; 22(6): 618-30. [DOI:10.1128/CVI.00091-15] [PMID] [PMCID]
 18. Chen X, Liu S, Goraya M, Maarouf M, Huang S, Chen JL. Host immune response to influenza A virus infection. Front Immunol 2018; 9: 320-8. [DOI:10.3389/fimmu.2018.00320] [PMID] [PMCID]
 19. Laurie KL, Horman W, Carolan LA, Chan KF, Layton D, Bean A. Evidence for viral interference and cross-reactive protective immunity between influenza B virus lineages. J Infect Dis 2018; 217(4): 548-59. [DOI:10.1093/infdis/jix509] [PMID] [PMCID]
 20. Grant E, Wu C, Chan KF, Eckle S, Bharadwaj M, Zou QM, et al. Nucleoprotein of influenza A virus is a major target of immunodominant CD8+ T-cell responses. Immunol Cell Biol 2013; 91(2): 184-94. [DOI:10.1038/icb.2012.78] [PMID]
 21. Babaie M, Zolfagharian H, Jamili S, Zolfaghari M. Biochemical, Hematological effects and complications of Pseudosynanceia melanostigma envenoming. J Pharmacopuncture 2019; 22(3): 7-11.
 22. Babaie M, Ghaempanah A, Mehrabi Z, Mollaei A, Khalilifard Brojeni S. Partial purification and characterization of antimicrobial effect from snake (Echis carinatus), scorpion (Mesosobothus epues) and bee (Apis mellifera) venoms. Iran J Med Microbiol. 2020; 14 (4): 108-124. [DOI:10.30699/ijmm.14.5.460]
 23. Nowakowski AB, Wobig WJ, Petering DH. Native SDS-PAGE: High resolution electrophoretic separation of proteins with retention of native properties including bound metal ions. Metallomics 2014; 6(5): 1068-78. [DOI:10.1039/C4MT00033A] [PMID] [PMCID]
 24. Vázquez-Iglesias L, Estefanell-Ucha B, Barcia-Castro L, Páez de la Cadena M, Álvarez-Chaver P, Ayude-Vázquez D, et al. A simple electroelution method for rapid protein purification: isolation and antibody production of alpha toxin from Clostridium septicum. Peer J 2017; 5: 1-16. [DOI:10.7717/peerj.3407] [PMID] [PMCID]
 25. Hornbeck P. Double-immunodiffusion assay for detecting specific antibodies (ouchterlony). Curr Protoc Immunol. 2017; 116: 1-8. [DOI:10.1002/epim.18] [PMID]
 26. Alizadeh H, Madani R, Babaie M, Kavid N, Golchinfar F, Emami T. Preparation and purification of polyclonal antibodies against Mycobacterium avium paratuberculosis antigens in rabbit. J Fasa Univ Med Sci 2012; 2(3): 168-73.
 27. Wolkerstorfer A, Katinger D, Romanova J. Factors affecting the immunogenicity of the live attenuated influenza vaccine produced in continuous cell line. Microbiol Ind Resh J 2016; 3(1): 13-24. [DOI:10.18527/2500-2236-2016-3-1-13-24]
 28. Lang PO, Samaras D, Samaras N, Govind S, Aspinall R. Influenza vaccination in the face of immune exhaustion: Is herd immunity effective for protecting the elderly? Influenza Res Treat 2011; 419216: 1-6. [DOI:10.1155/2011/419216] [PMID] [PMCID]
 29. Nazari A, Samianifard M, Khalili I. Immunogenicity of concentrated and purified inactivated avian influenza vaccine formulation. Arch Razi Inst 2018; 73(4): 319-24.
 30. Du L, Zhou Y, Jiang S. Research and development of universal influenza vaccines. Microb Infec. 2010; 12:280-6. [DOI:10.1016/j.micinf.2010.01.001] [PMID]
 31. Ellebedy AH, Webby RJ. Influenza vaccines. Vaccine. 2009; 27: 65-68. [DOI:10.1016/j.vaccine.2009.08.038] [PMID] [PMCID]
 32. Comin A, Toft N, Stegeman A, Klinkenberg D, Marangon S. Serological diagnosis of avian influenza in poultry: is the haemagglutination inhibition test really the gold standard? Influenza Other Respir Viruses 2013; 7(3): 257-64. [DOI:10.1111/j.1750-2659.2012.00391.x] [PMID] [PMCID]
 33. Sapachova M. Comparative analysis of methods of molecular detection of avian influenza virus. Online J Public Health Inform 2017; 9(1): 1-8. [DOI:10.5210/ojphi.v9i1.7739] [PMCID]
 34. Jensen TH, Ajjouri G, Handberg KJ, Slomka MJ, Coward VJ, Cherbonnel M, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of avian influenza virus subtypes H5 and H7 antibodies. Acta Vet Scand 2013; 55(1): 84-91. [DOI:10.1186/1751-0147-55-84] [PMID] [PMCID]
 35. Lee YT, Kim KH, Ko EJ, Lee YN, Kim MC, Kwon YM. New vaccines against influenza virus. Clin Exp Vaccine Res 2014; 3(1): 12-28. [DOI:10.7774/cevr.2014.3.1.12] [PMID] [PMCID]
 36. Londo DR, Davis AR, Nayak DP. Complete nucleotide sequence of the nucleoprotein gene of influenza B virus. J

Virology 1983; 47(3): 642-8. [[DOI:10.1128/JVI.47.3.642-648.1983](https://doi.org/10.1128/JVI.47.3.642-648.1983)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)]

37. Panahi Y, Farahmand B, Soleimani-Stiar R, Saghiri R, Fattahi SH, Tabatabaeian M, et al. Characterization of nucleoprotein extracted from human influenza A virus cultured in two different cell lines. Iranian J Virol 2013; 7(1&2): 51-6. [[DOI:10.21859/ISV.7.1.2.51](https://doi.org/10.21859/ISV.7.1.2.51)]
38. Qiu D, Tannock GA, Barry RD, Jackson DC. Western blot analysis of antibody responses to influenza virion proteins. Immunol Cell Biol 1992; 70(3): 181-91. [[DOI:10.1038/icb.1992.23](https://doi.org/10.1038/icb.1992.23)] [[PMID](#)]

