● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل، سال اول، شمارهٔ ۳، صفحه ۲۴ الی ۲۸ ، تابستان ۱۳۷۸

تهیه آنتی ژن بروسلا جهت تشخیص تب مالت برای اولین بار دراستان خراسان

دکتر مهرانگیز خواجه کرم الدینی [۱] ، دکتر صدیقه فضلی بزاز [۲]

خلاصه

سابقه و هدف: در این تحقیق اقدام به تهیه آنتی ژن بروسلا شد. این آنتی ژن در تست رایت جهت تشخیص بیماری بروسلوز بکار می‌رود.

مواد و روشها: در این تحقیق اقدام به کشت و تکثیر باکتری بروسلا آبورتوس سوش ۱۹ نموده و پس از رشد باکتری، در شرایط کاملاً استریل باکتری را در نرمال سالین (سرم فیزیولوژی ۹ در هزار) حاوی ۰/۵٪ فنل به صورت سوسپانسیون میکروبی در آورده و با سانتریفوژ و افزودن مجدد نرمال سالین حاوی فنل به غلظت ۰/۵٪ با استفاده از لوله شماره ۲ مک فارلند و اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۵۰ نانومتر استاندارد گردید.

یافته‌ها: طی مقایسه‌ای که بین آنتی ژن موجود در بازار، تهیه شده در انستیتو پاستور تهران و آنتی ژن تازه تهیه شده بر روی ۵۰۰ نمونه سرم افراد مشکوک به بروسلا انجام شد، ۴۲۷ نفر آزمون رایت آنها منفی و ۷۳ نفر آزمون رایت آنها با هر دو آنتی ژن (استاندارد و تازه تهیه شده) مثبت گردید و جوابها قابل قبول و دارای آگلوتیناسیون واضح بودند. هیچ تفاوت معنی‌داری بین نتایج بدست آمده از دو آنتی ژن دیده نشد.

نتیجه گیری: تهیه این آنتی ژن برای مصرف روزمره با روش ذکر شده در این تحقیق ، در آزمایشگاه و با حداقل امکانات قابل انجام خواهد بود . بدین ترتیب احتمالاً می‌توان آنتی ژن بروسلا را در آزمایشگاهی با امکانات کم تهیه و برای تست رایت مورد استفاده قرار داد.

واژه‌های کلیدی: بروسلا آبورتوس ۱۹، تهیه آنتی ژن ، تب مالت ، تست رایت .

---

۱ ـ دانشیار و سرپرست بخش ویروس‌شناسی بیمارستان قائم، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

۲ ـ دانشیار میکروبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

[DOR: 20.1001.1.15614107.1378.1.3.4.3]

مقدمه

بروسلوز (تب مالت) با وجود برنامه‌های پیش‌گیری و ریشه‌کنی در حیوانات و سایر اقدامات بهداشتی، هنوز به فراوانی در بسیاری از نقاط کشور ما وجود دارد و این حاکی از این است که عفونت در حیوانات به خوبی تحت کنترل در نیامده است و انتقال آن به انسان به طور مکرر اتفاق می‌افتد و به عنوان یک بیماری مهم انسان باقی مانده است (۱). شباهت بین تظاهرات بالینی بروسلوز و بسیاری از بیماریهای عفونی دیگر از جمله تب روماتیسمی، هپاتیت ویروسی ، سل و بعضی بیماریهای خونی و از طرفی پایین بودن آگاهی‌های فرهنگی مبتلایان که طبعاً باعث مراجعه دیرتر آنها به مراکز درمانی می‌گردد، موجب بروز مشکلات بسیاری در رابطه با این گونه بیماران شده است(۲).

از نظر بهداشت عمومی مشکل، مزمن شدن بیماری در انسان است و تشخیص به موقع، دقیق و سریع بسیار حائز اهمیت می‌باشد(۲). لذا این مسئله پزشکان را موظف می‌نماید تا با دید دقیق‌تر و تشخیص صحیح‌تر اقدام به تجویز دارو نمایند، تا از مقاومت داروئی، اسراف دارو و استفاده بی جا و عوارض جانبی دارو و غیره... جلوگیری شود. برای این منظور پزشک درخواست آزمایش با استفاده از آنتی ژن بروسلا آبورتوس برای بیماران خود می‌نماید، که از این رهگذر هزینه‌ای سنگین به دوش آزمایشگاه و بیمار خواهد گذاشت. در گذشته این آنتی ژن با هزینه گزاف از خارج از کشور تهیه می‌شد. هر چند امروزه بوسیله انستیتو پاستور ایران در تهران ساخته می‌شود ولی هزینه تهیه آن نیز بالاست.

بر این اساس، این مهم ما را بر آن داشت تا با تهیه آنتی ژن بروسلا در آزمایشگاه و بکار بردن آن جهت انجام تست رایت با هزینه‌ای بسیار ناچیز برای آزمایشگاه و بیمار قدمی در جهت کاهش هزینه‌های درمانی و احیاناً خودکفایی برداریم.

مواد و روشها

الف) تهیه آنتی ژن: در این تحقیق باکتری بروسلا آبورتوس سوش ۱۹ (انستیتوپاستوررازی مشهد)، ابتدا روی محیط کشت بیون (Caso-Bouillon) کشت داده شد و سپس تکثیر یافت. برای تهیه سوسپانسیون میکروبی، از محیط کشت بروسلا آگار (Brucella Medium Base) استفاده گردید (۴و۳). البته محیط کشت اصلی برای تهیه سوسپانسیون میکروبی، محیط کشت Infusion Agar Liver می‌باشد(۴) که بدلیل عدم دسترسی به آن از محیط کشت بروسلاآگار استفاده گردید که محیط اختصاصی برای این باکتری است(۵). سپس در شرایط کاملاً استریل، باکتری در نرمال سالین حاوی ۰/۵ درصد فنل بصورت یک سوسپانسیون میکروبی در آمده و در سرعت ۳۰۰۰RPM به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. آنگاه مجدداً نرمال سالین و فنل ۰/۵ درصد افزوده و با استفاده از لولهٔ شماره ۲ مک فارلند و اسکترفتومتر فرابنفش در طول موج ۶۵۰ نانومتر استاندارد گردید. تا جهت آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گیرد.

برای مشاهده بهتر واکنش بین آنتی ژن و آنتی بادی بصورت آگلوتیناسیون، و با توجه به اینکه در ساخت آنتی ژن استاندارد از مواد رنگی استفاده شده است، از رنگ ایوانز بلو ۰/۱ درصد استفاده گردید.

ب) تهیه نمونه‌ها و نوع مطالعه: این تحقیق تجربی، آزمایشگاهی بصورت مقایسه‌ای روی ۵۰۰ نمونه سرم مشکوک به بروسلوز انجام گردید. همه سرمها بصورت تازه از بیماران مراجعه کننده به بیمارستانهای قائم (عج)، منتصریه و امام رضا(ع) تهیه گردیدند. تمامی آزمایشات بااستفاده از آنتی ژن تازه تهیه شده و سوسپانسیون آنتی ژن استاندارد بازار (تهیه شده از انستیتوپاستور ایران - تهران) در دوسری بر روی نمونه‌های مثبت انجام گردید. بر روی هر نمونه دو تست رایت، تست سریع یا آگلوتیناسیون اسلایدی (۶و۵و۲) و تست استاندارد لوله‌ای (۱و۶) انجام گردید و سپس داده‌ها با هم مقایسه شدند.

ج) مقایسه داده‌ها: داده‌های بدست آمده بر اساس عیار آنتی ژن و آزمایشات انجام شده، با استفاده از تست Chi-square تحلیل گردیدند و تفاوت کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1378.1.3.4.3]

یافته ها

از ۵۰۰ سرم مشکوک بررسی شده ۷۳ سرم دارای تست رایت مثبت با استفاده از هر دو آنتی ژن بودند. ۵۹/۱۵ درصد این سرم‌های مثبت از مردان و ۴۰/۸۵ درصد از زنان تهیه شد. نتیجه آزمایش تست رایت با استفاده از دو روش سریع و نیز لوله‌ای بر روی سرم‌های مثبت در جدول شماره ۱ به تفکیک دو روش و آنتی ژن‌های مختلف نشان داده‌شده است (جدول ۱).

بحث

در این مطالعه نتیجه تست رایت ۷۳ مورد از ۵۰۰ سرم مشکوک به بروسلوز با استفاده از هر دو آنتی ژن استاندارد و تازه تهیه نشده، مثبت گردید. این تست با استفاده از هر دو روش سریع و استاندارد لوله‌ای انجام گردید. در این بررسی بین داده‌های بدست آمده از دو آنتی ژن هم در روش اسلایدی (p= ۰/۹۹) و هم در روش لوله‌ای (p= ۰/۹۷) به تفکیک تیترهای مختلف سرمی تفاوت معنی داری دیده نشد (جدول ۱).

در روش اسلایدی چهار نمونه و روش لوله‌ای سه نمونه در مجاورت آنتی ژن تازه تهیه شده تیتر بالاتری را نسبت به آنتی ژن استاندارد نشان دادند و به غیر از این تعداد، بقیه تیتر نظیر آنتی ژن استاندارد داشتند (جدول ۱). د رمورد این تعداد نمونه در دو روش، اگر چه تیتری بالاتر از تیتر آنتی ژن را نشان داده‌اند ولی به هر حال وجود بیماری بروسلوز را در بیمار ارزیابی نموده‌اند. لذا با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان گفت، که آنتی ژن تازه تهیه شده می‌تواند قابل اطمینان و مورد استفاده در سطح آزمایشگاهها باشد.

نکته دیگری که مشاهده می‌شود، این است که

جدول ۱: تعداد و درصد نمونه‌هایی که تیتر سرم آنها با استفاده از آنتی ژنهای مختلف (استاندارد و تازه تهیه شده) به دو روش اسلایدی و لوله‌ای مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج ارزیابی و روش / تیتر سرم	نتیجه ارزیابی با آنتی ژن استاندارد		نتیجه ارزیابی با آنتی ژن تهیه شده	
	روش اسلایدی	روش لوله‌ای	روش اسلایدی	روش لوله‌ای
	تعداد(درصد)	تعداد(درصد)	تعداد (درصد)	تعداد(درصد)
منفی	۴ (۵/۵)	-	۴ (۵/۵)	-
۲۰	۰	۰	۰	۰
۴۰	۳ (۴/۱)	۲ (۲/۷)	۲ (۲/۸)	۲ (۲/۷)
۸۰	۱۴ (۱۹/۲)	۱۱ (۱۵/۱)	۱۳ (۱۷/۸)	۱۱ (۱۳/۷)
۱۶۰	۱۹ (۲۶)	۱۹ (۲۶)	۲۰ (۲۷/۴)	۱۹ (۲۷/۴)
۳۲۰	۳۳ (۴۵/۲)	۲۶ (۳۵/۶)	۳۴ (۴۶/۵)	۲۴ (۳۴/۳)
۶۴۰	-	۱۰ (۱۳/۷)	-	۱۲ (۱۳/۷)
۱۲۸۰	-	۴ (۵/۵)	-	۳ (۵/۵)
۲۵۶۰	-	۱ (۱/۴)	-	۲ (۲/۷)
جمع	۷۳ (۱۰۰)	۷۳ (۱۰۰)	۷۳ (۱۰۰)	۷۳ (۱۰۰)

- داده‌های بدست آمده از تست لوله‌ای از نظر آماری تفاوت معنی داری با هم نداشتند (χ^2 = ۰/۸۳، DF = ۵، P= ۰/۹۷).
- داده‌های بدست آمده از تست اسلایدی از نظر آماری تفاوت معنی داری با هم نداشتند (χ^2 = ۰/۲۷، DF = ۴، P= ۰/۹۹).

[DOR: 20.1001.1.15614107.1378.1.3.4.3]

روش‌اسلایدی چهار نمونه آزمون رایت آنها با هر دو آنتی ژن (تازه تهیه شده و استاندارد) منفی بوده ولی همین نمونه‌ها در روش لوله‌ای مثبت و دارای تیتر مشخصی بودند. علت این امر پدیده‌ای بنام پروزون می‌باشد. یکی از موارد منفی کاذب تستهایی که بر اساس فعل و انفعالات آنتی ژن آنتی بادی انجام می‌شود واکنشهای منطقه‌ای است (۷). به این ترتیب که در اینگونه آزمونها بایستی مقادیر مناسبی از آنتی ژن و آنتی بادی با هم مجاور گردند. نتایج حاصله می‌تواند به صورت واکنش ضعیف یا منفی جلوه‌گر شد در واقع پاسخ کاذبی به بار آورد و بر اساس این حقایق در صورت که طی انجام چنین آزمایشاتی نمونه مورد بررسی به اندازه کافی رقیق نشد مقادیر زیادی آنتی بادی در آن وجود خواهد داشت و با آنتی ژنی که جهت تشخیص آن به کار برده می‌شود واکنش قابل رؤیتی ایجاد نخواهد شد و این حالت را واکنش با پدیده پروزون می‌نامند. از طرفی در صورت زیاد بودن مقدار آنتی ژن مصرفی نیز این حالت ایجاد می‌گردد و طبعاً با رقیق نمودن آنتی ژن بر طرف می‌شود و به واکنش پست زون (postozone) موسوم می‌باشد.

معمولاً تشخیص آزمایشگاهی بروسلوز بر اساس جداسازی عامل بیماری و واکنش‌های سرولوژی انجام می‌پذیرد. کشت عامل مسبب بیماری تنها روش دقیق تشخیص بوده که متاسفانه همیشه امکان‌پذیر نیست. از این رو، بررسیهای سرولوژی عملیترین روش شناخته شده و در واکنش‌های سرمی تعیین تیتر آنتی بادی سرم معیار و ملاک تشخیص است. در آزمایش‌های سرولوژی نیز کاربرد روشهای استاندارد ارائه شده بوسیله سازمان جهانی بهداشت با استفاده از آنتی ژن‌های استاندارد بین المللی مورد تاکید می‌باشد(۲).

متداولترین تستی که در میان تستهای سرولوژیکی برای تشخیص بروسلوز مورد استفاده قرار می‌گیرد، تست رایت می‌باشد حدود ۹۷٪ موارد بروسلوزی که از طریق‌کشت به اثبات رسیده است بوسیله این تست عیار افزاینده چهار برابر بیشتر را نشان می‌دهد. آنتی ژنی که در این تست استفاده می‌شود از بروسلا آبورتوس تهیه می‌شود، زیرا این آنتی ژن با آنتی بادیهای ضد بروسلاآبورتوس، ملی تنسیس و سوئیس واکنش نشان می‌دهد ولی قادر به ایجاد واکنش باآنتی بادیهای ضد بروسلاکانیس نمی‌باشد، فلذا وجود بروسلاکانیس باید ازتست‌های سرولوژیک ویژه این بروسلا استفاده شود (۸و۵).

استفاده از آنتی ژن بروسلا آبورتوس در آزمایشات سرولوژیک بنظر می‌رسد در صورت وجود علایم بالینی منطبق بر بروسلوز، عیارهای پائین‌تر هم با ارزش باشد زیرا هیچگاه نمی‌توان انتظار داشت با آنتی ژن بروسلا آبورتوس، عیار واقعی آنتی کرهای ضد بروسلا ملی تنسیس سنجیده شود. توضیح اینکه آنتی ژنهای M و A در سه گونه اصلی بروسلا مشترک می‌باشد بطوریکه در بروسلا آبورتوس، آنتی ژن A بیشتر از M و در بروسلا ملی تنسیس آنتی ژن M بیشتر از A می‌باشد و در بروسلا سوئیس از نظرآنتی ژنی، نظیر بروسلا آبورتوس است.

از طرفی در حال حاضر بطور کلی از آنتی ژن بروسلا آبورتوس برای تشخیص انواع بروسلوز استفاده می‌شود، ولی غیر از بروسلوز ناشی از گونه آبورتوس انواع دیگر بروسلوز، عیار کمتری را نشان می‌دهد و در صورتیکه از آنتی ژنهای اختصاصی استفاده شود، عیار آگلوتینین بالاتری را نشان خواهد داد. لذا در کشورهایی نظیر ایران که گاهی تمام موارد بروسلوز انسانی، ناشی از گونه ملی تنسیس است، جهت سنجش عیارها می‌توان در کنار آنتی ژن بروسلا آبورتوس، از آنتی ژن بروسلا ملی تنسیس استفاده نمود تا هم عیار واقعی سرم و هم نوع باکتری که شخص را آلوده نموده مشخص شود. نوع ملی تنسیس از انواع دیگر باکتری، شدیدترین بیماری حاد را بوجود می‌آورد که ممکن است با نشانه‌های ناتوان کننده همراه باشد. لذا با تشخیص نوع باکتری از طریق آنتی ژن بروسلا ملی تنسیس می‌توان درمان را به طور گسترده‌تری برای بیمار انجام داد (۵و۱).

نتایج این تحقیق هم در روش تست سریع یا اسلایدی و هم

[DOR: 20.1001.1.15614107.1378.1.3.4.3]

در روش تست استاندارد لوله‌ای که بر روی ۵۰۰ نمونه انجام گرفت، نشان داد که آنتی ژنهای تازه تهیه شده در مقایسه با آنتی ژنهای خریداری شده تقریباً مقرون به صرفه می‌باشد و دارای جواب سریع، مناسب و آگلوتیناسیون واضح می‌باشد.

پیشنهادات

در ادامه این تحقیق انگیزه‌هایی برای انجام کارها و تحقیقات گوناگون ایجاد می‌گردد که تعدادی از آنها را به ترتیب زیر پیشنهاد می‌نمائیم:

۱- تهیه این آنتی ژن در آزمایشگاههای بیمارستان قائم (عج) وامام رضا (ع) که از مراکزدانشگاه علوم پزشکی مشهد می‌باشند، و واگذار نمودن به سایر آزمایشگاههای تحت پوشش تا از این طرق کمک به هزینه دانشگاهها و قدمی در جهت خودکفایی انجام شود.

۲- واکسن بروسلا با استفاده از سوشهایی نظیر بروسلا آبورتوس 19BA و بروسلا آبورتوس 104M تهیه شود .واکسن تهیه شده از این باکتریها عبارت از ترکیب پروتئین پلی ساکارید استخراج شده از دیواره سلولی بروسلا بوسیله اسید استیک ۰/۱ نرمال می‌باشد. برای حصول درجه تخلیص مناسب و حذف‌جزیی سمیت این آنتی ژن اشعه گاما بکار رود (۷).

۳- تحقیق و تهیه آنتی ژنهای سالمونلا جهت انجام تست ویدال با روشی مشابه به روش تهیه آنتی ژن بروسلا .

۴- تشوق و ترغیب دانش پژوهان ودانشجویان عزیز به تهیه بعضی از معرف‌ها و محیط‌های کشت آزمایشگاهی و سایر موارد که بااستفاده از امکانات و محیط مناسب آزمایشگاهها امکان‌پذیر است.

****

منابع

۱ - سازمان بهداشت جهانی؛ تشخیص، درمان و پیشگیری بروسلوز، دکتر ذوقی (مترجم)، انتشارات دانش پژوه، تهران ۱۳۶۵؛ ۳۴-۲۸ و ۱۹۸-۱۶۹ .

2. Gotuzzo E, An evaluation of diagnostic methods for brucellosis, J Infect Dis 1989, 153(1) : 122-125.

3. Diaz E, Marin C, Evaluation of serological tests for diagnosis of brucella melitensis infection of goats, J Clin Microb 1994, 32(5) : 1159-1165.

4. Dubrary G, Zygmunt SM, Demonstration of peptidoglycan - associated Brucella outer-membrance proteins by use of monoclonal antibodies, J Microb 1992, 138(7): 1543-1550.

5. Gazapo E, Change in IgM and IgG antibody concentration in Brucellosis over time, J Infect Dis 1989, 159(2): 219-225.

6. Limet NJ, Cloeckaret A, Immunogenic properties of Brucella melitensis cell wall fractions in BALB/C mice, J Med Microb 1995, 42(3): 200-208.

7. Cloeckaert A, Zygmunt SM , Dubray G. Characterization of polysoccharide specific monoclonal antibodies derived from mice infected with the rough Brucella melitensis B115. J General Microb, 1993, 139(7): 1551-1556.

8. Stevens GM, Hennager GS. Cheville FN, Serologic responses in diagnostic test for Brucellosis in cattle vaccinated with Brucella abortus 19 or RB51. J Clin Microb 1994, 32(4): 1060-1066.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1378.1.3.4.3]