

تهیه آنتی ژن بروسلا جهت تشخیص تب مالت برای اولین بار در استان 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 بروسلاز 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 ۵/۰٪ فنل به صورت سوسپانسیون میکروبی در آورده و با سانتریفوژ و افزودن مجدد نرمال سالین حاوی فنل به غلظت ۵/۰٪ 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 معنی داری 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 - دانشیار و سرپرست بخش ویروس‌شناسی بیمارستان قائم، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

۲ - دانشیار میکروبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

مقدمه

بروسلوز (تب مالت) با وجود برنامه‌های پیش‌گیری و ریشه‌کشی 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 دارویی، 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 (انستیتو پاستور رازی 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 (۳ و ۴). البته محیط کشت اصلی برای تهیه سوسپانسیون میکروبی، محیط کشت Infusion Agar Liver می‌باشد (۴) که بدلیل عدم دسترسی به آن از محیط کشت بروسلا آگار 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 ۳۰۰۰ RPM به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. آنگاه مجدداً نرمال سالین و فنل ۰/۵ درصد افزوده و با استفاده از لوله شماره ۲ مک فارلند و اسکرتفومتر 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 با استفاده از آنتی ژن تازه تهیه شده و سوسپانسیون آنتی ژن استاندارد بازار (تهیه شده از انستیتو پاستور ایران - تهران) در دوسری بر روی نمونه‌های مثبت انجام گردید. بر روی هر نمونه دو تست رایت، تست سریع یا آگلوتیناسیون اسلایدی (۶ و ۷) و تست استاندارد لوله‌ای (۸ و ۹) 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.

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 داده شده 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 ($P=0/99$) و هم در روش لوله‌ای ($P=0/97$) 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 تیترا بالاتری را نسبت به آنتی ژن استاندارد نشان دادند و به غیر از این تعداد، بقیه تیترا نظیر آنتی ژن استاندارد داشتند (جدول ۱). در مورد این تعداد نمونه در دو روش، اگر چه تیترا بالاتر از تیترا 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 تیترا 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		نتیجه ارزیابی با آنتی ژن استاندارد		نتیجه ارزیابی با آنتی ژن تهیه شده	
تیترا سرم	روش	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)	۳۳(۴۶/۵)	۲۴(۳۳/۳)
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 ($\chi^2=0/83$, $DF=5$, $P=0/97$).
 - داده‌های بدست آمده از تست اسلایدی از نظر آماری تفاوت معنی داری با هم نداشتند ($\chi^2=0/27$, $DF=4$, $P=0/99$).

بیشتر را نشان می‌دهد. آنتی ژنی که در این تست استفاده می‌شود از بروسلا آبورتوس تهیه می‌شود، زیرا این آنتی ژن با آنتی بادهای ضد بروسلا آبورتوس، ملی تنسیس و سوئیس واکنش نشان می‌دهد ولی قادر به ایجاد واکنش با آنتی بادهای ضد بروسلا کانیس نمی‌باشد، فلذا وجود بروسلا کانیس باید از تست‌های سرولوژیک ویژه این بروسلا استفاده شود (۵ و ۸).

استفاده از آنتی ژن بروسلا آبورتوس در آزمایشات سرولوژیک بنظر می‌رسد در صورت وجود علایم بالینی منطبق بر بروسلاز، 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 نظر آنتی ژنی، نظیر بروسلا آبورتوس است.

از طرفی در حال حاضر بطور کلی از آنتی ژن بروسلا آبورتوس برای تشخیص انواع بروسلاز استفاده می‌شود، ولی غیر از بروسلاز ناشی از گونه آبورتوس انواع دیگر بروسلاز، 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 بروسلاز 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 (۱ و ۵).

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

روش اسلایدی 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 تیتراژ 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 بروسلاز بر اساس جداسازی عامل بیماری و واکنش‌های سرولوژی انجام می‌پذیرد. کشت عامل مسبب بیماری تنها روش دقیق تشخیص بوده که متأسفانه همیشه امکان‌پذیر نیست. از این رو، بررسیهای سرولوژی عملی‌ترین روش شناخته شده و در واکنش‌های سرمی تعیین تیتراژ 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 بروسلاز مورد استفاده قرار می‌گیرد، تست رایت می‌باشد. حدود ۹۷٪ موارد بروسلازی که از طریق کشت به اثبات رسیده است بوسیله این تست عیار افزاینده چهار برابر

منابع

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

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.

پیشنهادهات

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

۱- تهیه این آنتی ژن در آزمایشگاههای بیمارستان قائم (عج) و امام رضا (ع) که از مراکز دانشگاه 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 سوشهای 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 بوسيله اسید استیک ۱/۰ نرمال می‌باشد. برای حصول درجه تخلیص مناسب و حذف جزئی 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 و دانشجویان عزیز به تهیه بعضی از معرفها و محیطهای کشت آزمایشگاهی و سایر موارد که با استفاده از امکانات و محیط مناسب آزمایشگاهها امکان پذیر است.
