اندازه‌گیری آنتی‌توکسین بتا در سرم گوسفندان با روش ELISA و مقایسهٔ آن با روش SN

● عبدالوهاب فرزان ● رسول مدنی ● محمود اردهالی
● رضا پیله‌چیان لنگردی ● محسن موسوی شوشتری
● فریبا گلچین‌فر ● محمد منصوربخت،
مؤسسه تحقیقات واکسن و سرمسازی رازی

چکیده
روش ELISA به عنوان جایگزین SN برای اندازه‌گیری آنتی‌توکسین بتا در سرم گوسفندان به‌کار گرفته شده است. بدین منظور میکروپلیت با چهار مقدار توکسین بتا یعنی ۱mg/ml, ۰/۷۵mg/ml، ۰/۵mg/ml و ۰/۲mg/ml پوشانیده شد. پس از ۲۴ ساعت نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و شستشوی مناسب به گودی‌های میکروپلیت ۱۵۰ لاندا از رقت‌های $\frac{1}{200}$ و $\frac{1}{100}$ و $\frac{1}{50}$ سرمهای تحت آزمایش و سرم استاندارد اضافه گردید. پس از ۲ ساعت انکوباسیون و شستشوی مجدد آنتی ایمونوگلوبولین گوسفندی کونژوگه با آنزیم پراکسیداز به گودی‌ها اضافه و پس از یکساعت مجدداً میکروپلیت شسته شده و سوبسترا شامل پراکسید هیدروژن و OPD اضافه شد. رنگ زرد ایجاد شده در طول موج ۴۹۰ نانومتر به وسیله ELISA Reader قرائت گردید. با استفاده از جذب نوری سرم استاندارد در رقت‌های مختلف و میزان آنتی‌بتا در این رقت‌ها، منحنی استاندارد مقادیر آنتی‌توکسین در سرمها تعیین شد. نتایج حاصل از ELISA با نتایج به دست آمده از روش SN مقایسه گردید و ارتباط معنی‌دار به خصوص در مورد استفاده از مقادیر ۱mg/ml و ۰/۲mg/ml توکسین بتا مشاهده شد. به طوری که با ضریب همبستگی r=۰/۸۵۶ و r=۰/۹۴۴ به ترتیب می‌توان نتایج را پذیرفت.

مقدمه

Clostridium perfringens به تعداد فراوان در خاک و دستگاه گوارش انسان و حیوانات وجود دارد و علاوه بر بیماریهایی که در انسان ایجاد می‌کند، در دامها نیز باعث بیماریهای آنتروتوکسمی، قلوه نرمی، اسهال عفونی بره‌های نوزاد، استراک و آنتریت هموراژیک می‌گردد.

این باکتری طی مراحل رشد و تکثیر علاوه بر توکسین‌های فرعی چهار توکسین اصلی اپسیلون، بتا، یوتا و الفا نیز تولید می‌کند. تیپ‌های مختلف باکتری براساس نوع و مقدار این توکسین‌ها از یکدیگر تفکیک می‌شوند (جدول ۱).

توکسین بتا یک پروتئین ۲۸ کیلو دالتونی است که به مقدار زیادی توسط تیپ‌های B و C باکتری تولید می‌شود و باعث بیماری اسهال عفونی بره‌های کمتر از دو هفته و استراک در گوسفندان بالغ و همچنین آنتریت هموراژیک بره‌های چند روزه می‌شود. تحت تأثیر عوامل فیزیکی و شیمیایی می‌توان توکسین بتا را به توکسوئید تبدیل کرد. واکسن پلی‌والان ساخت مؤسسه رازی شامل پیکره‌های کشته باکتری و توکسوئیدهای باکتری است که طی دو تزریق به فاصلهٔ دو تا چهار هفته موجب حضور مقادیر محافظت کنندهٔ آنتی‌توکسین در سرم دامها می‌گردد (۲ و ۳).

جهت اطلاع از سطح ایمنیت گله و همچنین ارزیابی اثر واکسن مصرفی باید مقادیر آنتی‌توکسین بتا و آنتی‌توکسین اپسیلون را در سرم دامها اندازه‌گیری کرد. روش متداول برای این‌کار Serum Neutralisation و تزریق به موش است که روشی وقتگیر و پرهزینه است. در مواردی که تعداد زیادی نمونه برای آزمایش مورد نظر باشد و یا در مطالعات اپیدمیولوژیک که استفاده از روش SN عملاً غیر ممکن است. روش ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) می‌تواند جایگزین مناسبی برای SN باشد و اگر بتوان نتایج نزدیک به SN را بدست آورد جبران کندی و هزینهٔ زیاد روش SN میسر خواهد بود. مقاله‌ای که از نظرتان می‌گذرد در برگیرنده روشها و نتایج اندازه‌گیری آنتی‌توکسین بتا در سرم گوسفندان با استفاده از روش ELISA و مقایسهٔ آن با روش SN می‌باشد که در بخش تحقیق و تولید واکسنهای بیهوازی مؤسسه رازی و با همکاری بخش بیوتکنولوژی این مؤسسه انجام گرفته است. هدف از این مطالعه استاندارد کردن روش ELISA برای اندازه‌گیری نمونه‌های متعدد سرم و با دقت کمتر از ۰/۱ می‌باشد.

مواد و روشها

سرم گوسفندان و اکسینه

۵۰ رأس گوسفند که قبلاً هیچ واکسنی دریافت نکرده بودند انتخاب شدند. واکسن پلی‌والان آنتروتوکسمی شامل کشت فرمله شده تیپ‌های C, B, D باکتری در دو نوبت به فاصله چهار هفته به مقدار ۳ میلی‌لیتر به طور زیر جلدی به هر گوسفند تزریق شد. از گوسفندان در سه مرحله، قبل از تزریق اول، دو هفته بعد از تزریق اول و دو هفته بعد از تزریق دوم خونگیری شد. سرم گوسفندان در گروههای ده‌تایی به صورت مخلوط جمع‌آوری شد. تعداد ۷ سرم مربوط به مراحل مختلف خونگیری برای تعیین آنتی‌توکسین بتا انتخاب گردید (جدول ۲).

روش SN

از هر سرم رقت‌های ۰/۱، ۰/۳، ۰/۵، ۰/۷ و ۱ تهیه شد. به هر رقت مقدار ۰/۴mg توکسین بتا، تهیه شده در بخش تحقیق و تولید واکسنهای بیهوازی، مؤسسه رازی، اضافه شد.

رقت‌های مشابه از آنتی توکسین بتا تهیه شده از (Central Veterinary Laboratory, Weybridge) تهیه و به هر رقت ۰/۴mg توکسین بتا اضافه شد. پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در حرارت آزمایشگاه برای هر رقت یک جفت موش سفید ۲۰-۱۸ گرمی انتخاب و به هر یک مقدار ۰/۵cc از طریق داخل وریدی تزریق شد. تلفات در موشها به مدت ۷۲ ساعت کنترل گردید و با مقایسه تعداد موشهای تلف شده در سرمهای تحت آزمایش و استاندارد مقادیر آنتی توکسین بتا محاسبه شد.

روش ELISA

چهار رقت ۱mg/ml، ۰/۷۵mg/ml، ۰/۵mg/ml و ۰/۲mg/ml از توکسین بتا با استفاده از (pH=۷/۲PBS) تهیه گردید. برای هر رقت سه ستون از یک میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای در نظر گرفته شد. در هر گودی ۱۵۰μg از رقت مربوطه ریخته شد و پس از ۲۴ ساعت نگهداری در ۴ درجه سانتی‌گراد با استفاده از PBS (۰/۰۱M. pH=۷/۲) و ۲۰ tween (۰/۰۵٪) پلیت شستشو گردید. از سرمهای تحت آزمایش و سرم استاندارد آنتی‌بتا رقت‌های $\frac{1}{200}$ و $\frac{1}{100}$ و $\frac{1}{50}$ در (pH=۷/۲ PBS و ۰/۰۱M) و ژلاتین ۰/۱٪ تهیه شد. سپس ۱۵۰μ از هر رقت به گودی‌های اضافه شد. به طوریکه برای هر رقت دو چاهک و در هر ستون دو گودی

جدول ۱- نتیجه واکنش پادگنها ۱۰۲۲۵ نمونه سرم گوسفند

	تعدادموارد مثبت در آزمایش رزبنگال	سرواگلوتیناسیون رایت ≥ $\frac{1}{۱۶۰}$	مرکاپتواتانول ≥ $\frac{1}{۱۶۰}$
پادگن رزبنگال با جرم ۵٪	۲۳۲۶	۱۹۲۰	۱۹۲۰
پادگن رزبنگال با جرم ۸٪	۱۹۲۰	۱۹۲۰	۱۹۲۰
تفاوت دوغلظت پادگن	۴۰۶	-	-

آن به صلاح نیست. لذا این بررسی نیز با گزارش دیگر پژوهندگان اتفاق نظر داشته و کاربرد پادگن رزبنگال تهیه شده از سویه *B. abortus* ۱۹ یا ۹۹ را مورد تاکید میدهد (۱، ۴، ۵، ۷، ۱۰، ۱۸، ۲۱ و ۲۲). نتیجه واکنش سرولوژی با پادگنهای ۸٪ و ۵٪ رزبنگال بر روی ۱۰۲۲۵ نمونه سرم گوسفندی در جدول شماره یک نشان داده شده است.

در تحلیل نهایی نتیجه گردید که چنانچه روش تشخیص بر مبنای استفاده توأم از آزمایش‌های سرواگلوتیناسیون و مرکاپتواتانول قرار داده شود، مختصات آزمایش رزبنگال با استفاده از پادگن دارای جرم ۵٪ عبارت است از: حساسیت ۱۰۰٪، ویژگی ۹۵٪، مثبت کاذب ۵٪، منفی کاذب ۰٪، ارزش توافق کلی آزمایش با روشهای تشخیص قطعی ۹۶٪ و ارزش پیشگوئی ۸۳٪ می‌باشد.

بحث

عموماً کنترل بروسلوز براساس آزمایشهای سرولوژی و شناسایی و اعزام حیوانات آلوده به کشتارگاه قرار دارد. نظر به اینکه جداسازی عامل سببی بیماری همیشه امکان پذیر نیست. آزمایشهای سرمی نقش مهمی را در تشخیص روزمره بیماری ایفا می‌نمایند. به طور معمول آزمایشهای رزبنگال، سرواگلوتیناسیون، ۲- مرکاپتواتانول، ثبوت عناصر مکمل و دیگر آزمایشها به روش استاندارد بین‌المللی برای این منظور به کار گرفته می‌شوند. باوجودی که بیشتر این آزمایشها در ابتدا بر روی بروسلوز گاو استاندارد گردیده، لیکن بعداً با تغییرات جزئی در تامپونهای مصرفی برای دیگر حیوانات نیز قابل استفاده می‌باشند (۱، ۶، ۱۵، ۲۱). در بین آزمایشهای فوق‌الذکر، روش رزبنگال نظر به سهولت انجام آزمایش و استفاده از آن در روشهای غربالگری از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۴ و ۱۹). هر چند که ارزش این آزمایش در بررسیهای مکرر پژوهندگان برای گوسفند و هماهنگی آن بویژه با روش ثبوت عناصر مکمل به اثبات رسیده است (۱۲، ۱۴ و ۲۲). لیکن از طرف کمیته کارشناسان بروسلوز سازمان بهداشت جهانی و سازمان خواروبار کشاورزی پژوهش بیشتر در این زمینه توصیه شده است (۱۶). آزمایشهای سرواگلوتیناسیون، ۲- مرکاپتواتانول و ثبوت عناصر مکمل از اعتبار زیادی برخوردار بوده و چنانچه برای هر نمونه سرم امکان پذیر باشند نتایج معتبرتری را نشان می‌دهند (۹ و ۲۲)، اما به جهت آنکه به طور معمول تمامی نمونه‌های سرم در ابتدا بوسیله روشهای غربالگری آزمایش شده و نمونه‌های مثبت با روشهای تکمیلی مورد ارزیابی قرار می‌گیرند (۵)، بررسی روشهای غربالگری دقیقتر بسیار قابل اهمیت می‌باشند. از این رو، پادگنهای مختلف تهیه شده از سویه‌های *B. melitensis* و *B. abortus* با میزان درصد جرم متفاوت و pH اسیدی در این بررسی مورد آزمایش و مقایسه قرار گرفتند. نتایج حاصله موید آن است که تفاوت محسوسی از کاربرد پادگنهای *B. melitensis* و *B. abortus* مشاهده نشد، ضمن اینکه واکنشهای حاصل در آزمایش با پادگن آبورتوس واضح‌تر بود و لذا باردیگر استفاده از پادگن *B. abortus* در آزمایش رزبنگال جهت تشخیص بروسلوز گوسفندی مورد تأکید قرار می‌گیرد و این نتایج با گزارش دیگر پژوهندگان مطابقت دارد (۱، ۴، ۵، ۷، ۱۰، ۱۸، ۲۱ و ۲۲). هر چند که در این بررسی آزمایش رزبنگال با استفاده از پادگن ۵٪ از حساسیت کامل برخوردار بوده (۱۰۰٪) معهذا به دلیل پائین‌تر بودن ویژگی آن (۹۵٪) در مقایسه با روشهای سرواگلوتیناسیون، مرکاپتواتانول و آزمایش رزبنگال با پادگن ۸٪ در نتایج کلی به دست آمده تفاوت چشمگیر مشاهده می‌شود ($P<0/0005$) و با توجه به ارزش پیشگویی به دست آمده (۸۳٪) حدود ۱۷ درصد از گوسفندانی که در آزمایش رزبنگال با پادگن ۵٪ واکنش مثبت نشان می‌دهند راکتورهای مثبت کاذب هستند. بدین ترتیب توصیه می‌گردد که در صورت اجرای روش آزمایش /کشتار به طور مرتب و هر ۴۵ تا ۶۰ روز یکبار با امکان آزمایشهای تکمیلی، استفاده از پادگن رزبنگال ۸٪ و در برنامه آزمایش غربالی تنها یکبار در گله‌ها از پادگن رزبنگال ۵٪ استفاده شود.

سپاسگزاری

با تقدیم صمیمانه‌ترین تشکرات به جناب آقای دکتر عبدالمحمد حسنی طباطبائی استاد محترم دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران که محاسبات آماری را انجام داده‌اند، همکاری بخش پرورش گوسفند ایستگاه تحقیقاتی کردان (وابسته به مؤسسه رازی) مورد سپاسگزاری است.

جادارد از حمایت آقایان دکتر محمدی، دکتر دلیمی، دکتر شوشتری، دکتر مهین‌پور و مهندس جنتی صمیمانه تشکر نماید.

زحمات بیدریغ آقایان رضا فریدونپور، رحمت گلسرخی، محمدعلی‌کیا، محمودامامی، محمودکمالیروستا، محمودصادق کمالی، خلیل محمدی، محمد حسین کمالزارع، حجت‌اله همایی، سیدیعقوب میرتقی، و خانمها زهرا ناصرخاکی، زرین‌تاج بشیر هاشمی، زرین‌تاج کبیری‌فر، خدیجه کباری و اقدس احمدزاده موجب نهایت امتنان است.

*** این مقاله نتیجه انجام طرح تحقیقاتی تهیه پادگن رزبنگال اختصاصی جهت تشخیص بروسلوز گوسفند می‌باشد.**

منابع مورد استفاده

1- Agrimi P; Andreani E; and Redini S; 1977. RBPT in the serological diagnosis of brucellosis in sheep. Med. Veterinaria, 30. 109.

2- Alton G.G; Jones L.M; and Pietz D.E; 1975, Laboratory techniques in brucellosis. WHO Monograph Series No. 55, 2nd edition, Geneva.

3- Alton G.G; Jones, L.M; Angus R.D; and Verger J.M; 1988. Techniques for the brucellosis laboratory. INRA, Paris.

4- Badnjevic B., and Bajrovic T., 1982. RBPT in the serological diagnosis of brucellosis in man and animals. Vet. Bulletin, 052, 02857.

5- Brinley Morgan W.J., MacKinnon D.J. and Cullen G.A., 1969, The RBPT in the diagnosis of brucellosis. Vet. Rec. 85, 33, 636.

6- Chernysheva M.I., and Vashkevich R.B., 1975, RBPT for brucellosis in reinder. Moscow Veterinariya, 7, 100.

7- Contini A; Coni V; and Casu A; 1973 RBPT (Card Test) of ovine and caprine brucellosis. Scienze Veterinarie. 27, 640.

8- Corbel M.J., 1972, Identification of the immunoglobulin class active in the RBPT for bovine brucellosis. J. Hygiene. 70, 4, 779.

9- Corbel M.J., 1985, Comparison of *Brucella abortus* and *B. melitensis* antigens for the RBPT on sera from cattle infected with *B. abortus* biovar 5. Vet. Rec. 117, 15, 385.

10- Crowther R.W., Orphanides A., and Polydorou K., 1977, Vaccination of adult sheep with Rev.1 vaccine. Trop. Anim. Hlth. Prod. 9, 85.

11- Cunningham B., 1978, The use of RBPT in animals vaccinated with brucella vaccine. Irish Vet. J. 32, 10, 177.

12- Fensterbank R., and Maquere M., 1978, Eradication of brucellosis from a flock of sheep using the RBPT. Recueil de Medecine Veterinaire. 154, 7/8, 657.

13- Fensterbank R., 1986, Brucellosis in cattle, sheep and goats: diagnosis, control and vaccination. Rev. Sci. Tech. 0.I.E.5,3, 605.

14- Giantzis D., Sarris K., Mpourtzi. Katzopoul E., Kastanidou H., and Papadopulos O., 1985, Relationship between the serological findings and brucella isolation in sheep. Veterinary Medecine, 28, 2, 91.

15- Ivanov M. M., Malakhova T.I., Batko B., Grezer A.M., and Duranov V.S., 1976, Tests with Rose bengal antigen in the diagnosis of brucellosis in animals. Moscow Veterinariya, 9, 87.

16- Joint FAO/WHO Expert Committee on brucellosis 1986. Sixth Report, Technical Series 740, WHO, Geneva.

17- Lisle W.G; and Carmichael L.E; 1978. Development of a RBPT for the rapid diagnosis of *Brucella canis* infection. Cornell Vet. 68, 4, 530.

18- Oomer L.J.A., and Waghela S., 1974, The RBPT in human brucellosis. Trop. Geogr. Med. 26, 3, 300.

19- Papadopoulos O., and Koptopoulos G., 1979. Application of the RBPT in the diagnosis of brucellosis. Vet. Bulletin 049-05076.

20- Strohl A., 1974. Progress in the detection of brucellosis. Prospects for the use of Rose bengal antigen. Rev. Med. Vet. 125, 12, 1453.

21- Trap D., and Gaumont A.J.R., 1976, Serological diagnosis of brucellosis in cattle and sheep by the RBPT. Vet. Bulletin, 60, 5, 301.

22- Unel S., Erden R., Williams C.F., and Stableforth A.W., 1969, Rev.1 vaccine duration of immunity experiments first pregnancy challenge. Res. Vet. Sci. 10, 254.

نتایج تیتر آنتی‌توکسین بتا به روش الیزا

گروه‌های سرم	Elisa ۱mg/ml	Elisa ۰/۷۵ mg/ml	Elisa ۰/۵mg/ml	Elisa ۰/۲mg/ml
۱	۳/۷۵	۲/۱	۲/۱۵	۲/۶۵
۲	۲/۱	۱/۹	۲	۰/۹۵
۳	۱/۸۵	۲	۱/۵۵	۱/۲
۴	۰/۹	۱/۰۵	۰/۷	۰/۴۵
۵	۲/۱۵	۱/۷	۱/۸۵	۱/۷
۶	۰/۵	۱/۳۵	۰/۷۵	۱/۱
۷	۲/۱	۰/۹	۱/۷	۱

جدول شماره ۳- تیتر Elisa افزایش یافته با ۴ غلظت مختلف پادگن (۱mg/ml, ۰/۷۵ mg/ml, ۰/۵ mg/ml and ۰/۲ mg/ml)

بحث

تاکنون هیچ مقاله‌ای در زمینه اندازه‌گیری آنتی‌توکسین بتا با استفاده از روش ELISA منتشر نشده است. این در حالی است که تعدادی مقالات (از جمله بوسیله نگارنده) در مورد اندازه‌گیری آنتی‌توکسین اپسیلون به چاپ رسیده است (۵). نتایج دیگر نویسندگان در مورد کاربرد ELISA برای اندازه‌گیری آنتی‌توکسین اپسیلون در رقتهای مختلف پادگن، سرم و کونژوگه به دست آمده است. در این مطالعه بهترین نتایج ELISA هنگام استفاده از رقت ۰/۲mg/ml توکسین بتا و رقت $\frac{۱}{۱۰۰}$ سرمها و رقت $\frac{۱}{۳۰۰}$ کونژوگه به دست آمده است. با توجه به اینکه توکسین بتا که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت به وسیله کشت فیلتر شده تیپ c باکتری به دست آمده است (۲) و تیپ c باکتری تنها توکسین بتا همراه با مقدار جزئی توکسین آلفا ترشح می‌کند، نتایج دارای ارزش خاصی می‌باشد. طبعاً در تحقیقات جدیدتری با حذف توکسین آلفا می‌توان روش ELISA در برداشته است و این نشان می‌دهد که استفاده از ELISA در این زمینه می‌تواند جایگزین مناسبی برای SN باشد. جایگزینی با هزینه کمتر به دقت بیشتر و قابل استفاده برای اندازه‌گیری آنتی‌توکسین بتا در مواردی که تعداد نمونه‌های زیاد مدنظر باشد، ابزاری که انجام مطالعات اپیدمیولوژیک در سطح گله و آگاهی از وضعیت سرمی دامها را در این زمینه میسر می‌سازد.

ضریب همبستگی برای نتایج آنتی‌توکسین بتا به وسیله SN و Elisa

ELISA/SN	r	p
۱mg/ml	۰/۸۵۹	< ۰/۰۱
۰/۷۵mg/ml	۰/۶۳۶	۰/۰۵>P> ۰/۱
۰/۵mg/ml	۰/۶۸۱	۰/۰۵>P> ۰/۱
۰/۲mg/ml	۰/۹۴۴	< ۰/۰۰۱

جدول شماره ۴- تیتر Elisa که قطعاً با مقادیر رقیق شده توکسین بتا انجام شده است. ۱mg/ml، ۰/۷۵mg/ml، ۰/۵mg/ml و ۰/۲mg/ml

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از بخش حیوانات آزمایشگاهی مؤسسه رازی برای فراهم‌کردن حیوانات و از آقای سید جلال حسینی برای کمکهای ارزنده ایشان، تشکر وقدر دانی می‌نمایند.

منابع مورد استفاده

1- Webster A.C. and C.L. Frank 1985. Comparison of immune response stimulated in sheep, rabbit and guinea pigs by the adminstration of multi component clostridial vaccines. Australian veterinary journal 62, 4, 112-114.

2- Habeeb A.F.S.A, 1975, Studies on epsilon prototoxin of *Clostridium perfringens* type D, Biochimica at Biophsica Acta 412, 62, 62-66.

3- Blood D.C. and O. M. Radostitis, 1989, Veterinary medicine, Baillier Tindall 612-618.

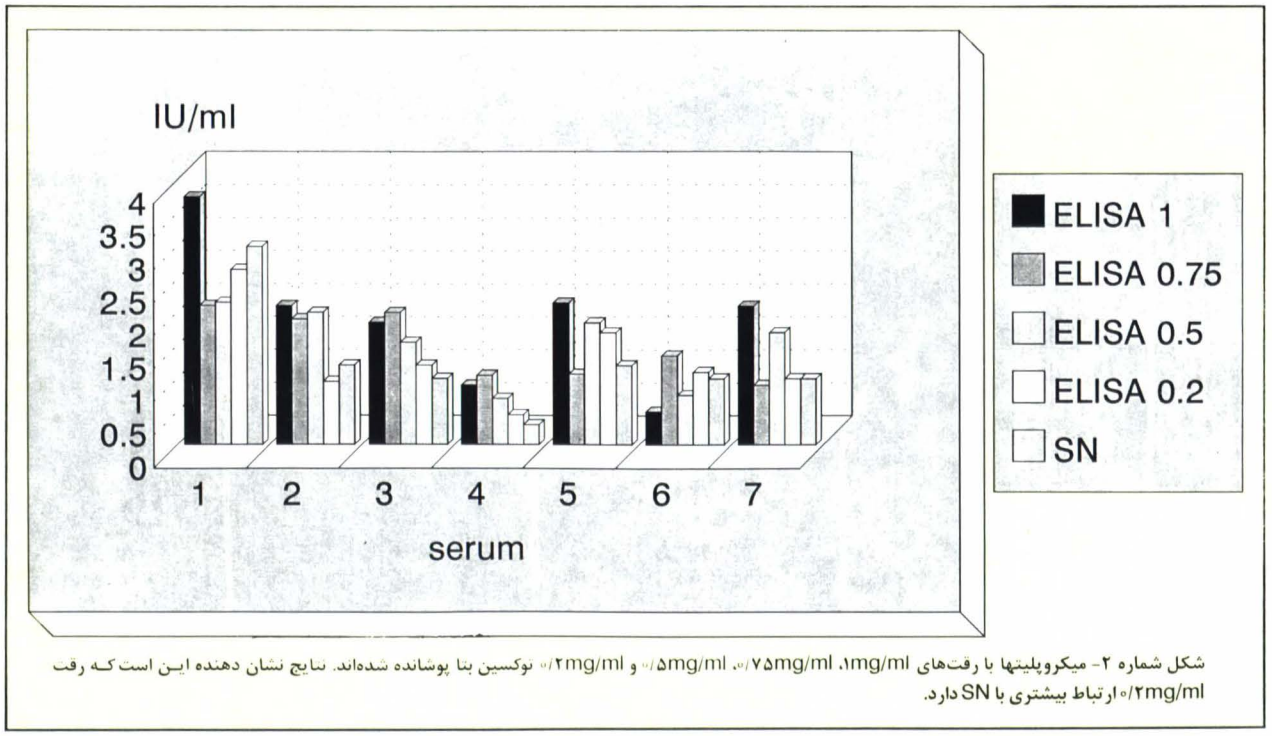
4- Julian L. Rood and Stwart T. Cole, 1991, Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*, Microbiological reviews, Dec. P. 621-648.

5- Wood K.R., 1991, An alternative to the toxin neutralization in mice for the potency testing of the *C. tetani*, *C. septicum*, *C. novyi* type B and *C. perfringens* type D epsilon components of multivalent sheep vaccines. Biologicals 19, 281-286.

6- Max Sterne and Irene Batty, 1975, Pathogenic clostridia, Butterworth and Co. (publishers) Ltd. ISBN 0407 35350X Page 79-123.

7- Walker P.D. and W.H. Foster, 1981, Bacterial vaccine production essays in applied microbiology, John Wiley and Sons Ltd. Page 3-31.

8- Naylor R.D. et al., 1987, Detection of *Clostridium perfringens* beta toxin by ELISA, Research in veterinary science 42, 255-256.



شکل شماره ۲- میکروپلیتها با رقت‌های ۱mg/ml، ۰/۷۵mg/ml، ۰/۵mg/ml و ۰/۲mg/ml توکسین بتا پوشانده شده‌اند. نتایج نشان دهنده این است که رقت ۰/۲mg/ml ارتباط بیشتری با SN دارد.

توکسین‌های اصلی تولید شده به وسیله تیپ‌های مختلف کلستریدیوم

Type	Alpha	Beta	Epsilon	Lota
A	+ + +	-	-	-
B	+	+ +	+	-
C	+	+ +	-	-
D	+	-	+ +	-
E	+	-	-	+

جدول شماره ۱- اپسیلون و یوتا به وسیله آنزیمهای پروتئولیتیک به پروتوتوکسین تبدیل شده و فعال می‌شوند.

به عنوان بلانک در نظر گرفته شد. پس از ۲ ساعت نگهداری در دمای آزمایشگاه به همان روش پلیت شسته شد و به تمام چاهکها ۱۵۰μg آنتی ایمونوگلوبولین گوسفندی کونژوگه با آنزیم پراکسیداز (تهیه شده در موسسه رازی) با رقت $\frac{1}{200}$ اضافه شد.

پس از یک ساعت نگهداری در دمای آزمایشگاه و شستشوی مشابه به هر گودی مقدار ۱۰۰μg سوبسترا شامل پراکسیداز هیدروژن و اورتوفنیلن دیامین اضافه گردید و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه درجای تاریک نگهداری شد. در ادامه جذب نوری رنگ زرد ایجاد شده بوسیله ELISA Reader در طول موج ۴۹۰nm قرائت گردید. میزان جذب نوری متناسب با مقدار آنتی‌توکسین موجود در رقت‌ها بود. ابتدا با استفاده از جذب نوری رقتهای سرم استاندارد آنتی‌بتا و مقادیر آنتی‌توکسین در رقت‌های سه‌گانه منحنی استاندارد رسم گردید و از این منحنی برای محاسبه مقادیر آنتی‌توکسین در رقت‌های سه‌گانه سرمها با توجه به OD آنها استفاده شد.

تجزیه و تحلیل نتایج

نتایج بدست آمده از روش SN با نتایج حاصل از روش ELISA با استفاده از روش ضریب همبستگی مقایسه گردید.

نتایج

نتایج SN

نتایج به دست آمده با استفاده از روش SN (جدول ۲) نشان می‌دهد که مقادیر کمتر از ۰/۱ واحد بین‌المللی در میلی لیتر سرم با این روش قابل اندازه‌گیری نخواهد بود، زیرا رقت‌های تهیه شده از سرمهای تحت آزمایش و سرم استاندارد با اختلاف ۰/۱ تا ۰/۲ تهیه می‌گردد و اندازه‌گیری مقادیر با دقت ۰/۰۱ عملی نمی‌باشد. تفاوت در مقادیر آنتی‌توکسین به علت انواع برنامهٔ واکسیناسیون و واکنش متفاوت دامها به واکسن می‌باشد.

نتایج ELISA

تیتر آنتی‌توکسین بتا در سرمهای گوسفندی به وسیله ELISA در جدول ۳ آمده است. نتایج به دست آمده مربوط به چهار رقت مختلف توکسین بتا می‌باشد. همانطور که مشاهده می‌شود با ELISA مقادیر ۰/۰۱ واحد بین‌المللی آنتی‌توکسین در هر میلی لیتر سرم اندازه‌گیری شده است با توجه به اینکه یک واحد آنتی‌توکسین بتا برابر ۰/۰۱۳۷ میلی‌گرم آنتی‌توکسین است، با یک محاسبه ساده معلوم می‌گردد که با ELISA می‌توان مقادیر نانوگرم آنتی‌توکسین بتا را اندازه گرفت.

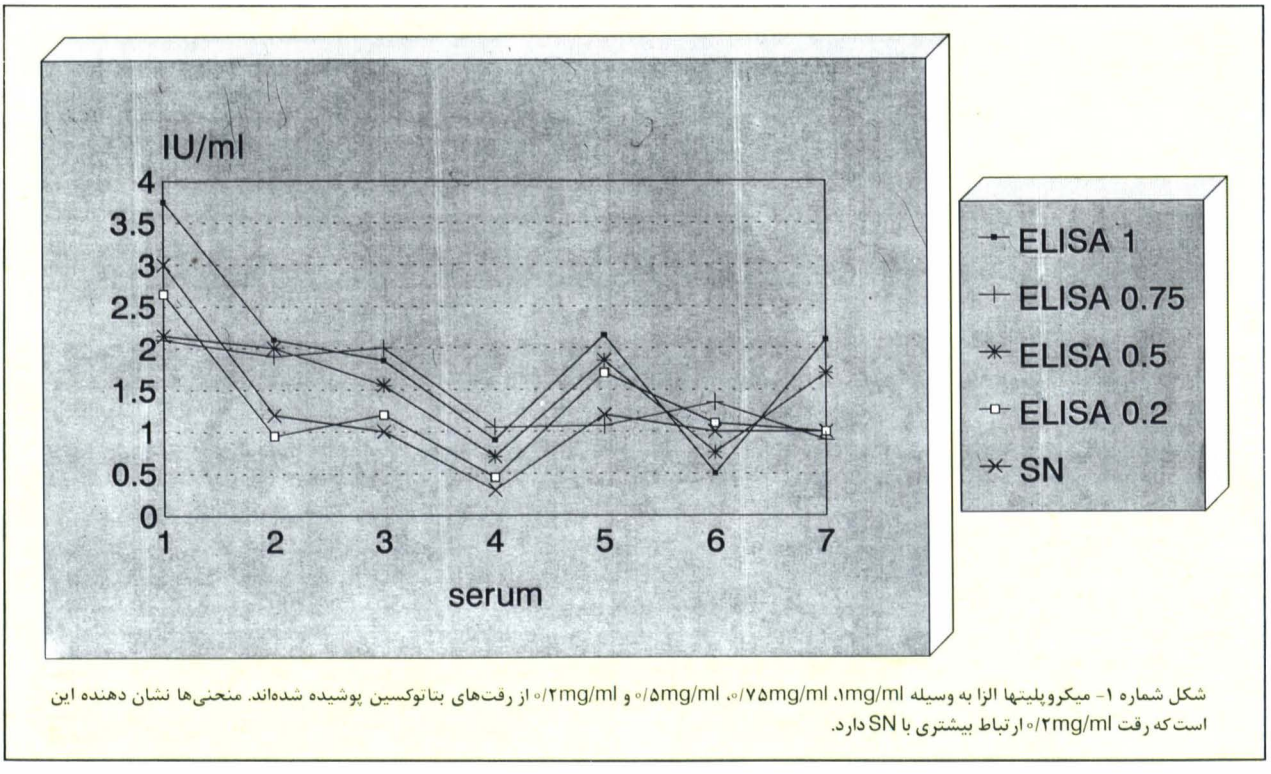
نتایج تیتر آنتی‌توکسین بتا به وسیله آزمایش SN

گروه سرم	خونگیری	تیتر (iu/ml)
۱	بعد از تزریق دوم	۳
۲	بعد از تزریق دوم	۱/۲
۳	بعد از تزریق اول	۱
۴	قبل از تزریق اول	۰/۳
۵	بعد از تزریق دوم	۱/۲
۶	بعد از تزریق دوم	۱
۷	بعد از تزریق اول	۱

جدول شماره ۲- اطلاعات نشان دهنده این است که روش SN به اندازه گیری مقادیر آنتی‌توکسین کمتر از ۰/۱ iu/ml مؤثر نمی‌باشد.

ضرائب همبستگی

نتایج مقایسه مقادیر به دست آمده آنتی‌توکسین با دو روش ELISA و SN در جدول ۴ منعکس شده است. تیترهای حاصل از SN در مورد تمام سرمها به طور جداگانه با نتایج به دست آمده با روش ELISA با استفاده هر یک از رقت‌های ۱ mg/ml، ۰/۷۵mg/ml، ۰/۵mg/ml و ۰/۲ mg/ml مقایسه شده است. این اطلاعات نشان می‌دهد که هنگام استفاده از رقت ۱ mg/ml توکسین بتا نتایج حاصل از ELISA به احتمال ۹۹٪ قابل قبول است (r=۰/۸۵۶) ولی مواردی که از رقتهای ۰/۷۵ mg/ml و ۰/۵mg/ml توکسین بتا استفاده شده است، با توجه به اینکه ۰/۰۱ > p > ۰/۰۵ می‌باشد، نمی‌توان نتایج را پذیرفت (r=۰/۶۳۶ و r=۰/۶۸۱). بهترین نتایج هنگام استفاده رقت ۰/۲mg/ml از پادگن به دست آمده‌است به طوریکه احتمال ۰/۰۰۱ > p نتایج را می‌توان پذیرفت. (r= ۰/۹۴۴) (شکلهای ۲ و ۱).



شکل شماره ۱- میکروپلیتها الزا به وسیله ۱mg/ml، ۰/۷۵mg/ml، ۰/۵mg/ml و ۰/۲mg/ml از رقت‌های بتاتوکسین پوشیده شده‌اند. منحنی‌ها نشان دهنده این است که رقت ۰/۲mg/ml ارتباط بیشتری با SN دارد.

در بررسی انجام یافته از ۵۸ مورد جنین که فقط از نظر کشت بروسلا مثبت بودند تعداد ۱۸ مورد هپاتیت، ۷ مورد پنومونی، ۱۶ مورد مننژیت مشاهده گردید. در مواردی در یک نمونه جنین هر سه اندام (کبد، ریه، مغز) و در مواردی هم ممکن است یک یا دو اندام ذکر شده دچار ضایعه بودند. در بعضی موارد ضایعه در هیچیک از اندام‌های ذکر شده مشاهده نگردید.

بحث

در مطالعات انجام یافته به دلایلی موفق به نمونه‌برداری از همه ارگانها نگردید اما با توجه به ضایعات مشاهده شده نشان می‌دهد که باکتری از سد جفت عبور کرده و سبب ضایعاتی در اندامهای جنین می‌شوند، گرچه نمونه‌های زیادی مورد کالبدگشائی قرار گرفت اما تنها ۵۸ مورد فقط از نظر بروسلا مثبت و از نظر سایر عوامل منفی و نمونه آن کاملاً مناسب برای آزمایش هیستوپاتولوژی بود. بنابراین ضایعات ایجاد شده را کاملاً می‌توان به باکتری بروسلا نسبت داد.

مطالعات انجام یافته توسط محققین مختلف (۱۶، ۱۱ و ۹) ضایعات بروسلا در جنین گوسفند را شامل پنومونی، هپاتیت، نفریت بینابینی و ضایعات گرانولوماتوزی در کلیه، کبد و طحال ذکر می‌نمایند.

با توجه به اینکه بیماری‌زائی باکتری بروسلا با گونه‌های متفاوت به طور قابل ملاحظه‌ای مشابه یکدیگر می‌باشند در جدیدترین منبع Veterinary (۱۹۹۵ medicine) ضایعات برونکوپنومونی، پنومونی بینابینی و همچنین مننژیت را در جنین گاو در اثر *B. abortus* ذکر می‌نمایند. در آزمایش تجربی با تزریق *B. abortus* در بز نیز توانستند ضایعه پنومونی بینابینی را در جنین آن مشاهده نمایند.

در مورد ضایعه مننژیت ناشی از عفونت بروسلا در جنین گوسفند در هیچیک از منابع موجود در ایران یافت نگردیده است. ضایعه مننژیت در موارد زیادی در اثر ابتلاء به تب مالت در انسان گزارش گردید. با توجه به اینکه اندامهای مختلف جنین بخصوص سلولهای دفاعی به بلوغ کامل نرسیده‌اند در بعضی موارد قضاوت در مورد چگونگی واکنش التهابی در یک اندام مشکل می‌باشد اما موارد ذکر شده در این تحقیق شامل نمونه‌هائی است که ضایعات آن کاملاً مشخص و قطعی می‌باشد.

تشکر و قدردانی

باتشکر از معاونت محترم تشخیص و درمان و همکاران سازمان دامپزشکی کشور و شبکه‌های دامپزشکی استانها و همکاران بخش پاتولوژی مؤسسه رازی آقایان جعفر فیروزبخت، علی ناصری‌راد، قادر فاتح، حبیب‌اله کمال‌زارع، علی کرمی و خانم طاهره کشاورز

منابع مورد استفاده

1- Ackermann, M.R., Cheville. N.F. and Deyoe, 1986, Bovine. lieal dome lymphoepithelial cells endocytosis and transport of *Brucella abortus* strain 19. Vet Path, 25: 226-37.

2- Anderson. T.D. and Cheville. N.F., 1986, Ultrastructural morphometric analysis of *Brucella abortus* infected trophoblasts in experimental placentitis. Am Path 124: 226-37.

3- Bibersttein E.L. et al, 1966, Epididymitis of ram. Antibody in lambs. Cornell Vet 56: 54-66.

4- Doyle. T.M., 1939, *B. abortus* infection of goats. J. Comp Pathol. 52:89-115.

5- Gillespie H.J. Timoney, J.F., 1981, Hagan and Bruner, Infectious disease of domestic animals, P. 127, Cornell University Press, Ithaca, London.

6- Hallman. E.T. 1924, The pathology of *B. abortus* infection in the bovine uterus. Cornell Vet: 14-262-275.

۱

۲

عکس شماره ۱
کالبد گشائی جنین و نمونه‌برداری
بخش‌های مختلف از نظر تعیین
عوامل سقط جنین

عکس شماره ۲
تورم کبد و پوشش فیبرین در سطوح
ریه، کبد و مژانتر