مقایسه پادگنهای رزبنگال تهیه شده از *B. abortus* و *B. melitensis*

● اسماعیل ذوقی، عبداله عبادی، علی‌محمد بهروزیخواه و مهران یاراحمدی
عضو هیأت علمی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی

مقدمه

تشخیص سرولوژی بروسلوز مبتنی بر شناسایی پادتن موجود در سرم است. آزمایش رزبنگال ساده‌ترین روشی است که وجود پادتن بروسلا را در کوتاهترین زمان ممکن نشان می‌دهد و سالهاست که مورد استفاده دامپزشکی و پزشکی می‌باشد. این آزمایش به عنوان روش غربالگری بکار گرفته می‌شود و نمونه‌های مثبت در این روش با دیگر آزمایشهای سرمی مورد ارزیابی قرار می‌گیرند (۱۱، ۱۳، ۱۶ و ۱۷). با وجود این، پادگن استاندارد موجود ابتدا بر روی گاو و بروسلوز گاوی بررسی گردیده و بعداً به همان نحو در دیگر حیوانات مورد استفاده قرار گرفته است (۲ و ۳).

کاربرد پادگن جهت تشخیص بروسلوز گوسفند و بز نیز از سالها پیش مورد توجه بوده، ضمن آنکه آزمایشهای تکمیلی دیگری مورد نیاز بوده است (۱۰ و ۲۲). تردیدی نیست که شناسایی حیوانات آلوده به بروسلوز از اهمیت ویژه‌ای در برنامه‌های کنترل بیماری برخوردار بوده، ضمن آنکه اشاعه عفونت به وجود حیوانات آلوده حامل وابسته است. از طرفی دیگر، انتقال بیماری به انسان نیز از چنین حیواناتی امکان پذیر می‌باشد. از این رو، انواع مختلف آزمایشهای سرولوژی جهت شناسایی هر چه سریعتر حیوان آلوده مورد استفاده قرار گرفته، هر چند که هنوز هیچ نوع آزمایش واحدی پاسخ گوی این مشکل نیست. نظر به حساسیت زیاد پادگن رزبنگال و کاربرد سهل و آسان آن در بررسیهای مختلف اپیدمیولوژیکی و تشخیص انفرادی (۷، ۸، ۱۸ و ۲۰)، کمیته مشترک کارشناسان بروسلوز سازمان خواروبار کشاورزی (FAO) و سازمان جهانی بهداشت (WHO) در آخرین نشست خود در سال ۱۹۸۵ بررسی پادگن رزبنگال را به کشورهای درگیر با بروسلوز گوسفندی توصیه نمود (۱۶). لذا با توجه به شیوع بروسلوز گوسفندی در ایران، طرحی جهت این بررسی تنظیم که پس از تصویب به اجرا در آمد.

مواد و روشها

پادگنها

B. abortus سویه ۱۹ یا ۹۹ بر روی محیط سیب‌زمینی کشت شده و پس از ۷۲ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتیگراد با سرم فیزیولوژی ۸/۵ در هزار کلرورسدیم برداشت گردید. سوسپانسیون میکربی در حرارت ۸۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه غیر فعال شده و به نسبت ۵ در هزار فنل به آن اضافه گردید.

سویه *B. melitensis* Rev.1 نیز به طرز مشابهی در محیط بروسلاآگار کشت شده و پس از ۹۶ ساعت با سرم فیزیولوژی برداشت گردید. این سوسپانسیون نیز در حرارت ۸۰ درجه به مدت ۳۰ دقیقه غیرفعال و به نسبت ۵ در هزار فنل به آن افزوده شد.

باکتریهای غیر فعال ۱۵ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شده، جرم خالص به نسبت یک گرم با ۲۲ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی فنله ۸/۵ در هزار نمک و ۵ در هزار فنل مخلوط گردید. محلول رنگ رزبنگال به نسبت یک گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل آماده شده و به نسبت یک میلی‌لیتر به ۳۵ میلی لیتر سوسپانسیون میکروبی محلول در سرم فیزیولوژی فنله افزوده شد.

سوسپانسیون رنگی با بهم زن کاملاً مخلوط شده، یک شب در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیده و سپس سانتریفوژ گردید. مدت سانتریفوژ ۱۵ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ بوده و جرم خالص رنگ شده جمع‌آوری شد. جرم رنگ شده به نسبتهای مختلف با تامپون مخصوص پادگن رزبنگال (Brucella buffered antigen diluent-BBAD) مخلوط شده و پس از اندازه‌گیری میزان درصد جرم به مقدار ۸٪، ۶٪ و ۵٪، سرانجام ۶ نوع پادگن رزبنگال شامل: پادگن *B. abortus* ۸٪، ۶٪، ۵٪ و پادگن *B. melitensis* ۸٪، ۶٪ و ۵٪ تهیه گردید. pH پادگنها نیز معادل ۰/۰۵ + ۳/۶ تنظیم گردید. pH اسیدی پادگن رزبنگال از ویژگیهای آن بوده و جذب یا آگلوتیناسیون پادتنهای غیر اختصاصی را مانع می‌گردد.

نمونه‌های سرم

تجربه اول

تعداد ۱۰۰ رأس گوسفند عاری از بروسلوز از ایستگاه تحقیقاتی کردان جهت بررسی واکسن REV.1 تحویل بخش بروسلوز مؤسسه رازی شد که جهت بررسی پادگن مورد استفاده قرار گرفتند. به تعداد ۸۰ رأس از گوسفندان در دوزهای مختلف واکسن تلقیح شده، به طور هفتگی خونگیری شده و نمونه‌های سرم آنها با پادگنهای مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. بعداً این گوسفندان همراه با ۲۰ رأس گروه کنترل با سویه حاد چالش گردیده و تاکشتار حیوانات پس از ۷، ۸ هفته مرتباً هر هفته مورد آزمایش سرمی قرار گرفتند. در مجموع حدود ۱۰۰۰ نمونه سرم مورد آزمایش قرار گرفت. در هر مرحله آزمایش با پادگنهای مختلف رزبنگال، روشهای سروآگلوتیناسیون، ۲- مرکاپتواتانول و ثبوت عناصر مکمل نیز در مورد هر نمونه سرم انجام پذیرفت.

تجربه دوم

تعداد ۱۰۲۲۵ نمونه سرم گوسفندی ارسالی از مراکز دامپزشکی استانهای مختلف جهت تشخیص بروسلوز نیز در این بررسی مورد آزمایش قرار گرفتند. علاوه بر روشهای آزمایش متداول جهت تشخیص بروسلوز، هر نمونه سرم با ۶ نوع پادگن رزبنگال مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفتند.

سرولوژی

آزمایشهای رزبنگال، سروآگلوتیناسیون رایت، ۲- مرکاپتواتانول و ثبوت عناصر مکمل به روش استاندارد توصیه شده به وسیله سازمان جهانی بهداشت انجام پذیرفت. پادگن مورد استفاده در آزمایشهای رایت، مرکاپتواتانول و ثبوت مکمل نیز بر طبق توصیه سازمان جهانی بهداشت تهیه و در مقابل آنتی‌سرم استاندارد بین‌المللی استاندارد گردید (۲، ۳).

باکتریولوژی

تعداد ۱۰۰ رأس گوسفند تجربه اول نهایتاً کشتار شده و تمامی غدد لنفاوی آنها از نظر باکتریولوژی کشت گردید. نتایج آزمایشهای سرولوژی با نتایج باکتریولوژی نیز مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتیجه‌گیری

تجربه اول

تمامی گوسفندان واکسینه در اولین آزمایش سرولوژی پس از یک هفته با تمامی پادگنهای رزبنگال واکنش نشان داده و این واکنشها تاکاهش کامل تیترهای سروآگلوتیناسیون، ۲- مرکاپتواتانول و ثبوت عناصر مکمل ادامه داشت. به عبارت دیگر آزمایشهای رزبنگال پس از بقیه آزمایشها رو به کاهش گذارده و حذف شدند. دوام آزمایشها تا ۱۲ هفته ادامه داشته، ضمن آنکه در ۲ هفته آخر ضمن آنکه پادگن ۸٪ با تمامی آزمایشهای تکمیلی منفی بوده، پادگن ۵٪