

استفاده از آزمایش جلدی برای تشخیص سالمونلوز تجربی در خرگوش

دکتر تقی زهرایی صالحی^۱ دکتر محمدرضا محزونیه^۲

مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۵، شماره ۱، ۸۲-۷۹، (۱۳۷۹)

مواد و روش کار

۱ - انتخاب خرگوش: برای ایجاد سالمونلوز تجربی هشت سر خرگوش

انتخاب و مطابق جدول ۱ شماره گذاری شدند. جهت تلقیح سروتیپ‌های تیفی موریوم، دابلین و آبور توس اویس خرگوشها را به چهار گروه تقسیم نموده و در چهار قفس مجزا و قابل ضدعفونی قرار داده شدند. یک گروه از خرگوشها به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. هیجده ساعت قبل از شروع آزمایش و تلقیح سالمونلاها، غذا و آب خرگوشها قطع گردید.

۲ - تهیه تعلیق باکتریایی: برای تهیه تعلیق مناسب کشت تازه سالمونلا

تیفی موریوم، دابلین و آبور توس اویس را روی ژلوز برین هارت کشت داده و پس از ۲۴ ساعت با سرم فیزیولوژی سوسپانسیون یکنواخت و با کدورت مشخص آماده گردید. به هر سر خرگوش از گروه‌های آزمایش تعداد $10^9 \times 2$ جرم با سرنگ خورانیده شد. بعد از تلقیح آب و غذا در اختیار خرگوشها قرار گرفت (۱۲، ۵، ۲). برای تهیه پادگن سونیکه سالمونلا تیفی موریوم را با حرارت 70°C درجه سانتیگراد کشته و سپس با دستگاه سونیکاتور پادگن مناسب آماده گردید.

۳ - خونگیری: از خرگوشها قبل از تلقیح و همچنین در روزهای ۸، ۱۴،

۲۸ و ۶۳ بعد از آلودگی خونگیری به عمل آمد.

۴ - کشت مدفوع: قبل و ۲۴ ساعت پس از تلقیح از همه خرگوشها و

قفسهای آنها به طور جداگانه کشت داده شد. این کار تا ۸ روز به طور مداوم و بعد از آن هر چند روز یک بار انجام گرفت.

۵ - آزمایش جلدی: برای انجام آزمایش پوستی از پادگن حرارت دیده و

سونیکه سالمونلا تیفی موریوم استفاده گردید. قبل از انجام آزمایش ضخامت پوست پشت گردن خرگوشها که موهای آن قبلاً به طور کامل چیده شده بود با کولیس اندازه گیری شد. سپس به میزان 0.5 میلی لیتر از پادگن فوق به صورت داخل جلدی به خرگوشهای آلوده شده با سالمونلا تیفی موریوم و آبور توس اویس (شماره‌های ۳۲۸، ۳۲۷، ۳۲۳ و ۳۲۲) و شاهد (شماره‌های ۴۷۵ و ۴۷۶) تزریق گردید. قبل از تزریق و در ساعات ۲، ۴، ۲۰ و ۲۴ بعد از تزریق درجه حرارت مقعدی اخذ گردید. ضخامت پوست محل تزریق داخل جلدی در ساعات ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ بعد از تزریق با کولیس مجدداً اندازه گیری شد.

۶ - کالبدگشایی: از اندامهای مختلف (پوست، کبد، کلیه، روده، عقده‌های

لنفوی مزانتریک، کیسه صفرا، قلب، بیضه، ریه و تیموس) خرگوشهای تلف شده در روزهای ۱۷ و ۲۳ بعد از تلقیح با سالمونلا دابلین و همچنین خرگوشهایی که در آخرین خونگیری (۶۳ روز بعد از آلوده شدن) مورد کالبدگشایی قرار گرفتند جهت بررسی آسیب‌شناسی نمونه برداری شد.

نتایج

بعد از تزریق داخل جلدی پادگن سونیکه به خرگوشهای شاهد (سالم) و

آلوده شده تغییرات پوست محل تزریق، درجه حرارت بدن و یافته‌های آسیب‌شناسی ثبت گردید که نتایج آنها به طور جداگانه آورده می‌شود.

الف - درجه حرارت: در اثر تزریق داخل جلدی پادگن افزایش درجه

در این مطالعه استفاده از واکنش ازدیاد حساسیت تأخیری (آزمایش پوستی (Skin test)) برای تشخیص سالمونلوز تجربی در خرگوش مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین ترتیب که ۸ سر خرگوش را به چهار گروه تقسیم نموده و به سه گروه از آنها از راه دهان تعداد $10^9 \times 2$ سالمونلا دابلین، سالمونلا آبور توس اویس و سالمونلا تیفی موریوم خورانیده شد و یک گروه نیز به عنوان شاهد انتخاب گردید. قبل از ایجاد سالمونلوز همه خرگوشها در کشت مدفوع و آزمایشهای سرمی منفی بودند. آزمایش پوستی با تزریق داخل جلدی پادگن سونیکه سالمونلا تیفی موریوم انجام شد. ضخامت پوست محل تزریق قبل از تزریق و در ساعات ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ بعد از تزریق با کولیس اندازه گیری شد که در خرگوشهای آلوده شده بعد از ۲۴ تا ۴۸ ساعت افزایشی معادل $2 - 1/5$ برابر مشاهده گردید.

واژه‌های کلیدی: آزمایش جلدی، سالمونلوز، خرگوش.

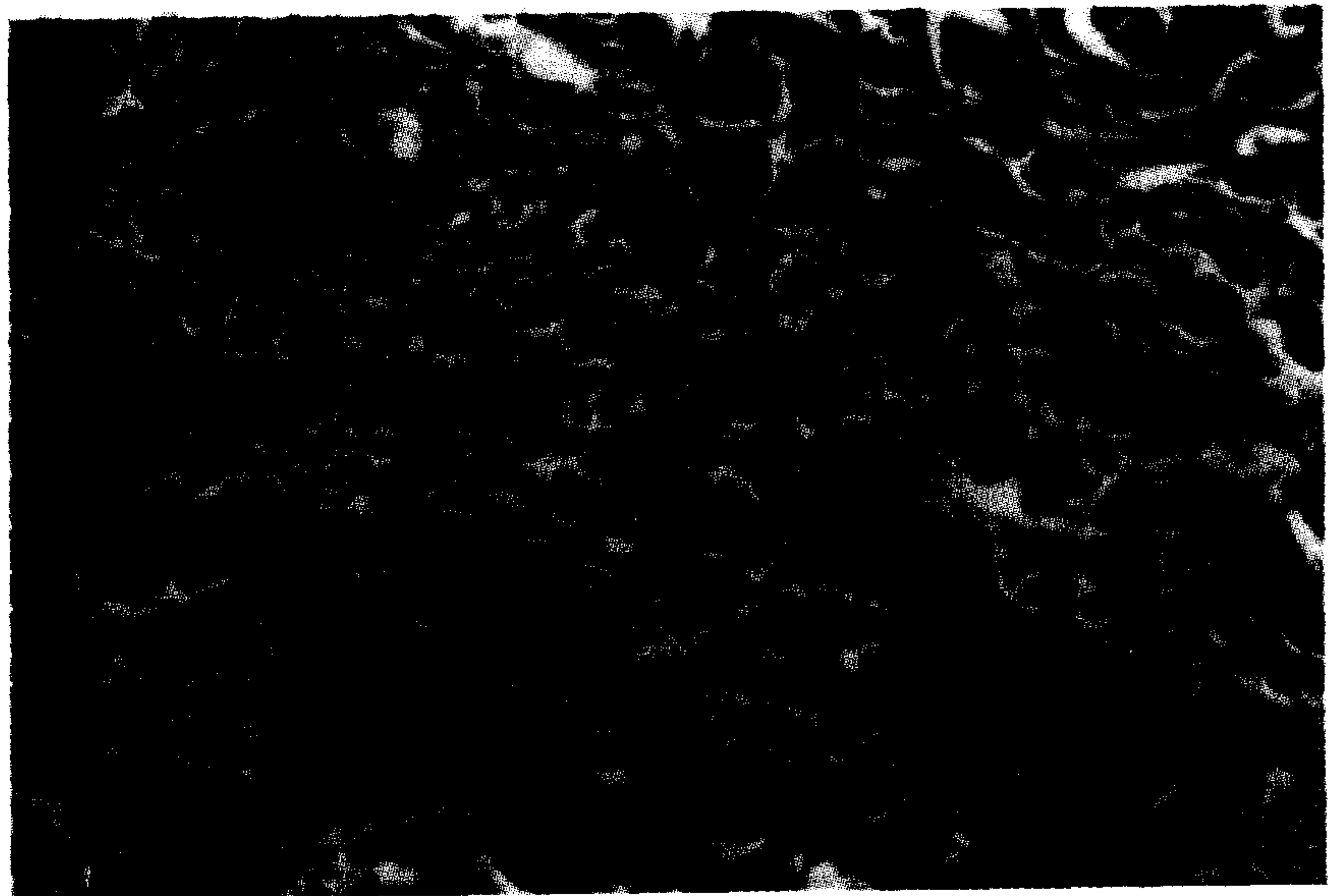
برای تشخیص سالمونلوز از روشهای مختلفی استفاده شده است که آنها را می‌توان در دو دسته عمده روشهای باکتری‌شناسی و سرم‌شناسی تقسیم نمود. جداسازی سالمونلاها بهترین روش تشخیصی است لیکن در همه موارد بیماری و یا حالت حامل باکتری جدا نمی‌شود. لذا معمولاً از روشهای دیگر بویژه آزمایش آگلوتیناسیون برای تشخیص حصبه، شبه حصبه و سالمونلوز در انسان و حیوانات استفاده می‌گردد. با توجه به اینکه در جنس سالمونلا بیش از 2450 سروتیپ وجود دارد که آنها را براساس پادگن‌های پیکری (O) به گروه‌های متعددی تقسیم می‌کنند برای انجام آزمایشهای سرمی نیاز به تهیه تعلیقات زیادی از این سروتیپها و گروهها برای افزایش حساسیت و ویژگی این آزمایشها است (۱ و ۱۳).

اکثر سالمونلاها باکتریهای داخل یاخته‌ای اختیاری هستند و علاوه بر تحریک ایمنی همورال، ایمنی با واسطه یاخته‌ای (Cell Mediated Immunity, CMI) را نیز تحریک می‌کنند. حتی محققین بر این باورند که در سالمونلوز اهمیت ایمنی با واسطه یاخته‌ای بیشتر از ایمنی همورال می‌باشد (۱۸، ۱۷ و ۱۶). به همین دلیل از واکنش ازدیاد حساسیت تأخیری (Delayed Type Hypersensitivity, DTH) که نمودی از ایمنی با واسطه یاخته‌ای است علاوه بر روشهای ذکر شده در تشخیص سالمونلوز و شناسایی حاملین باکتری در انسان و حیوانات استفاده شده است. در سال ۱۹۸۴ مریت و همکاران (Merritt, et al) با استفاده از آزمایش پوستی توانسته‌اند ۹۰ درصد گاوهای آلوده به سالمونلا دابلین را تشخیص دهند. ری (Wray) در سال ۱۹۷۲ دریافت که آندوتوکسین تهیه شده از سالمونلا گالیناروم واکنش جلدی شدیدی در گوساله‌ها ایجاد می‌کند. همچنین رابرتسون و همکاران (Robertsson, et al) در سال ۱۹۸۲ واکنش پوستی را در عفونت گوساله‌ها به سالمونلا تیفی موریوم با استفاده از پلی ساکارید زنجیر اختصاصی O مورد بررسی و ارزیابی قرار دادند. در مطالعه حاضر نیز آزمایش جلدی در خرگوش و در سالمونلوز تجربی مورد ارزیابی قرار گرفت تا مقدمه‌ای باشد بر تحقیق میدانی که در گاو در نظر است انجام گیرد.

۱ گروه آموزشی میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

۲ گروه آموزشی پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد، شهرکرد - ایران.





تصویر ۲ - ندول تیفوئید در کبد.

تصویر ۱ - تغییرات میکروسکوپی ایجاد شده در اثر تزریق داخل جلدی پادگن حرارت دیده و سونیکه سالمونلا تیفی موربوم، هفت روز پس از آزمایش پوستی.

از جاد خرگوشهای شماره ۳۲۷ و ۳۲۸ واضحتر و شدیدتر از خرگوشهای شماره ۳۲۲ و ۳۲۳ بود. علاوه بر پوست از اندامهای دیگر از جمله کبد نیز مقاطع بافتی تهیه گردید که در مقطع کبد ندولهای تیفوئیدی به ویژه در کبد خرگوشهای آلوده شده با سالمونلا دابلین و تیفی موربوم دیده شد (تصویر ۲).

حرارت در تمامی خرگوشها، چه شاهد و چه آلوده مشاهده گردید. بدین ترتیب که در خرگوشهای شماره ۳۲۷ و ۳۲۸ (آلوده شده با سالمونلا تیفی موربوم تفاوت درجه حرارت قبل از تزریق و بالاترین درجه حرارت بعد از تزریق به ترتیب ۰/۹ و ۱/۱ بود که از تفاوت درجه حرارت قبل و بعد از تزریق خرگوشهای شماره ۳۲۳، ۳۲۲ (آلوده شده با سالمونلا آبور توس اویس) و شاهد (شماره های ۴۷۵ و ۴۷۶) که به ترتیب ۱/۲، ۱، ۱/۷ و ۱/۱ می باشد کمتر است. این اختلاف بویژه در یکی از خرگوشهای شاهد (شماره ۴۷۵) برجسته تر از بقیه می باشد (جدول ۱). این موضوع نشان می دهد که خرگوشهای شاهد نسبت به تزریق پادگن سالمونلا تیفی موربوم حساس تر از خرگوشهای آلوده می باشند.

بحث

محققان مختلف از موش و خرگوش به طور گسترده ای جهت مطالعه جنبه های مختلف سالمونلوز استفاده کرده اند. در سال ۱۹۷۵ ریچاردسون و پارک (Richardson & Park) در آزمایش جلدی از عصاره ریبوزومی باکتری بمعنوان پادگن برای شناسایی عفونت نهفته سالمونلا دابلین در گوساله ها استفاده نمودند. رابرتسون (Robertsson) در سال ۱۹۸۲ از پلی ساکارید زنجیر اختصاصی O سالمونلا تیفی موربوم در آزمایش جلدی برای تشخیص سالمونلوز در گوساله ها استفاده نمود. در سال ۱۹۹۰ Duglic - Vandic و همکاران در یک مطالعه تجربی برای تشخیص سالمونلوز در خرگوش از آزمایش آلرژی پوستی (Cutaneous allergic test) استفاده کردند.

ب - ضخامت پوست: در خرگوشهای شماره ۳۲۷، ۳۲۸، ۳۲۳ و ۳۲۲ تفاوت ضخامت پوست قبل و ۲۴ ساعت بعد از تزریق به ترتیب ۱/۷، ۱/۸، ۱/۶ و ۱/۸ و ۲ بود. بعد از ۴۸ ساعت این مقادیر به ۰/۸، ۱/۷، ۱/۷ و ۱/۵ میلی متر تغییر پیدا کرد که به استثنای یک مورد کاهش ضخامت پوست را نشان می داد. در خرگوشهای شاهد اختلاف معنی دار و قابل توجهی بین ضخامت پوست قبل و بعد از تزریق وجود نداشت (جدول ۲).

مشخص شده است که پروتئینهای حاصله از پرده بیرونی (پرین) سالمونلاها صرف نظر از سروتیپ سالمونلایی که گوساله به آن آلوده است واکنش پوستی ایجاد می کند ولی لیپوپلی ساکارید (LPS) واکنش اختصاصی گروه را بر می انگیزد. پلی ساکارید اختصاصی O خالص شده سالمونلا تیفی موربوم (O4,12) و

ج - آسیب شناسی: در مقاطع هیستوپاتولوژیک تهیه شده از محل تزریق داخل جلدی پادگن درماتیت و تجمع یاخته های آماسی تک هسته ای در درم همراه با تجمع و ارتشاح آستینی وار یاخته های آماسی تک هسته ای در اطراف عروق و بویژه ونولها مشاهده گردید (تصویر ۱). این تغییرات در مقاطع تهیه شده

جدول ۱ - میزان تزریق پادگن حرارت دیده و سونیکه سالمونلا تیفی موربوم و درجه حرارت بدن قبل و بعد از تزریق (آزمایش پوستی).

شماره	مقدار تزریق پادگن (میلی لیتر)	درجه حرارت بدن قبل از تزریق پادگن	درجه حرارت بدن ۲ ساعت بعد از تزریق پادگن	درجه حرارت بدن ۴ ساعت بعد از تزریق پادگن	درجه حرارت بدن ۲۰ ساعت بعد از تزریق پادگن	درجه حرارت بدن ۲۴ ساعت بعد از تزریق پادگن
۳۲۷	۰/۰۵	۳۹ درجه سانتیگراد	۳۹/۷ درجه سانتیگراد	۳۹/۹ درجه سانتیگراد	۳۹/۱ درجه سانتیگراد	۳۹/۵ درجه سانتیگراد
۳۲۸	۰/۰۵	۳۹ درجه سانتیگراد	۳۹/۹ درجه سانتیگراد	۴۰/۱ درجه سانتیگراد	۳۹/۷ درجه سانتیگراد	۳۹/۶ درجه سانتیگراد
۳۲۲	۰/۰۵	۳۹/۵ درجه سانتیگراد	۴۰/۷ درجه سانتیگراد	۴۰/۴ درجه سانتیگراد	۳۹/۷ درجه سانتیگراد	۳۹/۷ درجه سانتیگراد
۳۲۳	۰/۰۵	۳۹/۷ درجه سانتیگراد	۴۰/۷ درجه سانتیگراد	۴۰/۱ درجه سانتیگراد	۳۹/۶ درجه سانتیگراد	۳۹/۵ درجه سانتیگراد
۴۷۵ (شاهد)	۰/۰۵	۳۹/۵ درجه سانتیگراد	۴۱ درجه سانتیگراد	۴۱/۲ درجه سانتیگراد	۳۹/۲ درجه سانتیگراد	۳۸/۶ درجه سانتیگراد
۴۷۶ (شاهد)	۰/۰۵	۳۹/۸ درجه سانتیگراد	۴۰/۶ درجه سانتیگراد	۴۰/۹ درجه سانتیگراد	۳۹/۴ درجه سانتیگراد	۳۹/۲ درجه سانتیگراد



جدول ۲ - مقایسه افزایش ضخامت پوست در اثر تزریق پادگن حرارت دیده و سونیکه سالمونلا تیفی موریوم در خرگوشهای سالم (شاهد) و آلوده

شماره	ضخامت پوست قبل از تزریق پادگن	ضخامت پوست ۲۴ ساعت بعد از تزریق پادگن	ضخامت پوست ۴۸ ساعت بعد از تزریق پادگن	ضخامت پوست ۷۲ ساعت بعد از تزریق پادگن	ضخامت پوست ۹۶ ساعت بعد از تزریق پادگن
۳۲۷	۲/۶ میلی متر	۴/۳ میلی متر	۴/۱ میلی متر	۴ میلی متر	۴ میلی متر
۳۲۸	۲/۶ میلی متر	۴/۲ میلی متر	۴/۳ میلی متر	۳/۸ میلی متر	۳/۶ میلی متر
۳۲۲	۲/۴ میلی متر	۴/۲ میلی متر	۴/۱ میلی متر	۳/۶ میلی متر	۳/۶ میلی متر
۳۲۳	۲/۴ میلی متر	۴/۴ میلی متر	۳/۲ میلی متر	۳/۱ میلی متر	۲/۸ میلی متر
۴۷۵ (شاهد)	۲/۳ میلی متر	۲/۴ میلی متر	۲/۲ میلی متر	۲/۳ میلی متر	۲/۲ میلی متر
۴۷۶ (شاهد)	۲/۲ میلی متر	۲/۲ میلی متر	۲/۲ میلی متر	۲/۲ میلی متر	۲/۲ میلی متر

شاهد به علت عدم تماس قبلی آنها با پادگن (آندوتوکسین) برجسته تر از خرگوشهای آلوده شده می باشد (به جدول ۱ مراجعه شود). محققان مختلف به مساله حضور آندوتوکسین در این نوع تعلیقها اشاره نموده و آن را به عنوان عیب آزمایش جلدی مطرح کرده اند. ولی با توجه به مقدار کم پادگن تزریقی و همچنین افزایش کوتاه مدت درجه حرارت بدن بعید به نظر می رسد که مشکل خاصی در بدن ایجاد نماید (۱۵ و ۱۴، ۱۱، ۱۰).

با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیق و بررسی نتایج تحقیقات مشابه مشخص گردید که معیار اصلی در آزمایش جلدی افزایش ضخامت پوست پس از تزریق پادگن می باشد. با توجه به جدول ۲ افزایش ضخامت پوست در خرگوشهای آلوده در مقایسه با خرگوشهای شاهد آنچنان واضح است که جای هیچ گونه شک و شبه نیست. از این رو می توان نتیجه گیری نمود که افزایش ۱/۵ - ۲ برابر ضخامت پوست تا ۴۸ ساعت پس از تزریق پادگن می تواند معیار مناسبی برای تشخیص سالمونلوز باشد. در مقاطع تهیه شده از محل تزریق پادگن نیز یافته های دخیل در واکنش از دیاد حساسیت تأخیری مشاهده گردید.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از زحمات جناب آقای دکتر مرجانمهر به خاطر تهیه مقاطع هیستوپاتولوژیک تشکر و قدردانی می شود.

منابع

۱. زهرایی صالحی، ت. سالمونلا. انتشارات دانشگاه تهران، ص ۲۰۴ - ۲۰۵، (۱۳۷۸).
۲. زهرایی صالحی، ت. استفاده از تست جلدی (Skin Test) برای تشخیص سالمونلوز. دومین کنگره سراسری میکروبیولوژی، یزد، (۱۳۷۵).
3. Baron, E.J. and Finegold, S.M., Baily and Scott's Diagnostic Microbiology, 8th ed. PP: 83,92,363,385, (1990).
4. Davis, B.D.; Dulbecco, R. et al Microbiology 4th ed. PP: 576-579 J.B. Lipponcott company, (1990).
5. Duglic - Vandic, N. and Markovic, B. Experimental studies on a Principles of Bacteriology, Virolocutaneous allergic test for salmonellosis. Vet. Bul 60(12). Abs 8030, (1990).
6. Gyles, C.L. and Thoen, C.O. Pathogenesis of Bacterial Infectious in Animals p.95-109. Iowa state university press, (1988).
7. Jubb, K.F.; Kennedy P.C. and Palmer, N. Pathology of Domestic Animals. 4th ed. Vol. 2, p.213-227. Academic press, (1993).
8. Kampelmacher, E.H.; Guinee, P.A.M. et al. Artificial salmonella

سالمونلا انتریتیدیس (O9,12) که عاری از لیپید A باشند قادر به برانگیختن واکنش جلدی نیستند. نشان داده شده که حداقل دو ترکیب به طور مستقیم در از دیاد حساسیت تأخیری در سالمونلوز دخالت می کنند که یکی LPS و دیگری پرینها می باشد. البته واکنشهای متقاطع نیز در آزمایش جلدی مشاهده میشود به طوری که لیپوپلی ساکارید تهیه شده از سالمونلا انتریتیدیس در گاوهای آلوده به سالمونلا تیفی موریوم نیز واکنش جلدی منتهی خفیف تر ایجاد می کند (۱۵ و ۱۱، ۹، ۸، ۵). در این تحقیق نیز واکنش متقاطع جلدی مشاهده گردید بدین ترتیب که خرگوشهای آلوده شده با سالمونلا آبور توس اویس نسبت به پادگن سالمونلا تیفی موریوم واکنش نشان دادند (به جدول ۲ مراجعه شود). این مساله علاوه بر اینکه در بین سروتیپهای داخل یک گروه اتفاق می افتد در بین سروتیپهای خارج گروه نیز دیده شده است. با توجه به کثرت زیاد سروتیپهای سالمونلا وجود واکنش متقاطع در این آزمایش می تواند مفید باشد چرا که با استفاده از پادگن یک سروتیپ می توان آلودگی به سروتیپهای شایع دیگر را نیز تشخیص داد.

افزایش درجه حرارت در خرگوشها بعد از تزریق داخل جلدی پادگن سونیکه سالمونلا تیفی موریوم ممکن است ناشی از حضور آندوتوکسین در تعلیق باشد که به عنوان عامل تبزا عمل کرده و با تأثیر بر روی مرکز تنظیم درجه حرارت در هیپوتالاموس باعث افزایش آن می گردد. افزایش درجه حرارت در خرگوشهای

infection specific - pathogen - free rats of different ages. Vet. Bul, 40(6). Abs. 2713, (1970).

9. Merritt, F.F. et al. Relationship of cutaneous delayed hypersensitivity to protection from challenge exposure with salmonella typhimurium in calves. Am. J. Vet. Res. 45(6), 1081-1085, (1984).

10. Parker, M.T.; Duerden, B.I. Topley & Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and immunology and 8th ed, Vol. 2 pp: 470-493, (1990).

11. Parama, A.E.; Cerone, S. et al Immune response in rabbits injected with salmonella typhimurium. Vet. Bul. 51(11) Abs. 7030, (1981).

12. Polostsky, Y.E.; Fremove, V.E. et al. Protection from virulent salmonella, group - B and group - D, after oral immunization of chickens with the hybrid of salmonella typhimurium and salmonella dublin. Zhurnal. Mikrobiologii Epidemiologii Immunobiologii. Vet.



Bul 9-10, Abs, 5057, (1992).

13. Popoff, M.J. et al Supplement (n.39) to the kauffmann - white scheme. Res. in Microbiology 147: 765-769, (1996).

14. Richardson, A. and parke, J.A.C. A skin test to identify latent S. dublin infection in calves Vet. Bul. 45(11). Abs. 6076, (1975).

15. Robertsson, J.A. et al. Salmonella typhimurium infection in calves: Delayed specific skin reactions directed against the O-antigenic polysceharide chain. Infec. Immun. 37(2), 137-148, (1982).

16. Timoney, J.F. et al. Hagan and Bruner's Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals, 8th ed. pp.74-88. Comstock publishing Associates, (1988).

17. Tizard, I. Veterinary Immunology, 4th ed pp. 278, 170, 173, 174, 283, (1992).

18. Zahraei Salehi, T., Rabani, M. and Mahzounieh. M.R. A skin test for diagnosis of salmonellosis. XV International symposium (W.A.V.M.I) on salmonellosis and brucellosis. Feb. 16-21. Cyprus, (1997).

19. Wray, C. Is Salmonella still a serious problem in veterinary practice?. Vet. Rec. 116: 485-489, (1985).

A skin test for diagnosis of experimental salmonellosis in rabbit

Zahraei Salehi, T.¹, Mahzounieh, M.R.²

¹Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Theran - Iran.

²Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Shahrekord, Shahrekord - Iran.

In this study delayed type hypersensitivity reaction (DTH, skin test) was investigated in experimentally infected rabbit for diagnosis of Salmonellosis. Eight conventional rabbits were placed into 4 groups and they were infected orally with 2×10^9 C.F.U. of S.typhimurium, S.dublin, S.abortus ovis and non infected group. In feces culture and serological tests all rabbits were negative before experimentally infection. Skin testing was performed by intradermal injection of sonicated S.typhimurium as antigen. Double skin fold thickness and visual assessment were recorded before injection and at 24,48,72 & 96 hours after injection of antigen. Histopathological examination of skin from injection site of rabbits at the end of the experiment revealed the cellular infiltrations. Non infected rabbits were negative both in skin test and also histopathological studies.

Key words: Skin Test, Rabbit, Salmonellosis.

