آنتی‌ژن‌های سالمونلا آبورتوس اویس و ره‌یابی سرم‌شناسی برای تشخیص موارد آلودگی با کمک آنتی‌ژن‌های اختصاصی

دکتر حسن تاج‌بخش[1] دکتر محمدرضا محزونیه[2]

مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۴، شماره ۲ ، ۴۸ ـ ۴۳، (۱۳۷۸)

جهت بررسی آنتی‌ژن‌های سالمونلا آبورتوس اویس و جستجوی آنتی‌ژن اختصاصی در این باکتری آنتی‌ژن‌های کشته از آن تهیه و به فواصل منظم در طی ۱۱ ماه به طور زیر جلدی به بز و ۷ ماه به خرگوش تزریق تا سرم فوق ایمن تهیه شود. ظهور پادتن‌های رسوبی با روشهای ژل دیفوزیون و ایمونوالکتروفورز و پادتن‌های آگلوتینان با روش آگلوتیناسیون داخل لوله و پاسخ ازدیاد حساسیت تأخیری در تست جلدی در حیوانات تجربی مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین ساختار آنتی‌ژنی این باکتری در مقابل سروتیپ‌های دیگر در عفونت تجربی بررسی و آنتی‌ژن اختصاصی در آن مشخص شد. آنتی بادی ضد باکتری با استفاده از ۳ روش ایمونودیفوزیون و آگلوتیناسیون روی لام و داخل لوله در سرم ۱۷۲۷ رأس گوسفند و بز جستجو و نتایج حاصل از آزمایشات با یکدیگر مقایسه شدند. نتایج نشان می‌دهد ظهور پادتن‌های رسوبی و ازدیاد حساسیت تأخیری توسط آنتی‌ژن حرارت دیده و افزایش پادتن‌های آگلوتیناسیون متعاقب تزریق آنتی‌ژن فرمالینه بیشتر بود. با جذب سرم فوق ایمن با سالمونلا تیفی‌موریوم، می‌توان سرم اختصاصی ضد سالمونلا آبورتوس اویس تهیه کرد. همچنین پادتن اختصاصی را در مورد عفونت تجربی با روش ژل دیفوزیون مشخص نمود. در آزمایش سرم ۱۷۲۷ رأس گوسفند و بز، ۱/۶۷ درصد موارد با روش AGID و ۱/۲ درصد نمونه‌ها با روش SAT مثبت بود. آزمایش آگلوتیناسیون روی لام در ۷۵ درصد موارد مثبت بود که نشان داد نمی‌توان از آن جهت غربالگری مبتلایان استفاده کرد. بین نتایج AGIC (Agar Gel Immunodiffusion Test) و SAT (Serum Agglutination Test) همخوانی وجود داشت.

واژه‌های کلیدی: سالمونلا آبورتوس اویس، آنتی‌ژن، سرولوژی، عفونت

عفونتهای سالمونلایی از مسائل اصلی صنعت دامپروری جهان است که هر ساله خسارات عمده‌ای به سرمایه دامی وارد می‌کند. در حال حاضر بیش از ۲۳۰۰ سروتیپ سالمونلا شناسایی شده که بعضی از آنها به میزبان خاصی عادت کرده‌اند (۱۶). یکی از سروتیپ‌های عادت کرده به گوسفند و بز سالمونلا انتریکا تحت گونه انتریکا و سروتیپ آبورتوس اویس .(Salmonella enterica Subsp enterica Serotype abortus ovis) است که از نظر آنتی ژنی جزء گروه B سالمونلا قرار دارد و فرمول آنتی‌ژنی آن ۶ و ۱ : c : ۱۲ و ۴ می‌باشد (۱۹ و ۱۸، ۱۶). این جرم در ایران و بعضی از کشورهای دیگر از اهمیت خاصی برخوردار است و عامل مهم سقط جنین میشها، اسهال، پنومونی و مرگ و میر بره‌ها و بزغاله‌ها است. در طی ۲۵ سال گذشته تحقیقات گسترده‌ای در شناسایی ابعاد مختلف باکتری‌شناسی و سرم‌شناسی توسط نگارنده صورت گرفته است. در طی این تحقیقات سویه‌های متعددی از این جرم جدا و شناسایی و از تعیین خواص بیوشیمیایی و حساسیت به فاژ در تشخیص روند انتقال و گسترش بیماری بهره گرفته شده است. روشهای سرولوژی مختلف در جستجوی سطح پادتن در جمعیتهای دامی و انسانی ارزیابی و بیماریزایی در گوسفند و بز و گاو مشخص شده که نتایج آن در طی دهها مقاله قبلاً در مجلات و کتب جهانی عرضه شده است (۲۵ - ۲۱ و ۸ - ۲).

تشخیص با کشت و جداسازی جرم از خون، مدفوع، ترشحات مهبلی، جنین و اندامهای داخلی مبتلایان و حاملین و روشهای سرولوژی انجام می‌شود. هدف از این تحقیق تهیه و ارزیابی آنتی‌ژن‌های سالمونلا آبورتوس اویس در ایمنی‌زایی، تهیه سرم اختصاصی، تشخیص آنتی‌ژن اختصاصی و جستجوی پادتن‌های ضد این جرم با روش AGID و آگلوتیناسیون بود.

مواد و روش کار

الف . تهیه آنتی‌ژن : سویه‌های شماره ۱۲۳۵ ۱۲۶۲، ۱۲۷۰ و ۱۳۹۷ (شماره سویه مربوط به شماره کلکسیون دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران است) سالمونلا آبورتوس اویس که در جریان تحقیقات قبلی ما جدا شده بود برای تهیه آنتی ژن‌ها و تهیه سرمها به کار گرفته شد. خواص شیمیایی باکتری از نظر توانایی تخمیر قندهای مانیتول، مالتوز، سالیسین، ساکارز، گلوکز و لاکتوز، توانایی تولید H_2S، اوره‌آز، تریپتوفاناز و همچنین آزمون MR-VP آزمایش شد. آنتی‌ژن‌های O و H با آنتی‌سرمهای استاندارد (دیفکو) شناسایی شد. سویه‌های مزبور روی آگاربرین-هارت کشت داده شده و پس از ۴۸ ساعت با افزودن ۱۰ - ۵ میلی لیتر سرم فیزیولوژی به صورت شیرابه یکنواخت برداشت می‌گردید (۱۶ و ۲۰). برای تهیه آنتی‌ژن حرارت دیده [HSA (Heated Salmonella Antigen] شیرابه به مدت ۳۰ دقیقه در ۷۰ درجه سانتی گراد غیرفعال شده و موقع مصرف در حد استاندارد رقیق می‌شد. HSA در تزریق به حیوانات آزمایشگاهی و آزمایشهای AGID و آگلوتیناسیون سریع روی لام به کار رفت. با افزودن ۱ درصد فرمالین به سوسپانسیون باکتری پادگن فرمالینه برای تزریقات و با افزودن هم حجم اتانل ۹۶ درجه، آنتی‌ژن O برای آزمایش آگلوتیناسیون داخل لوله تهیه شد (۱۶ و ۲۰). برای تهیه آنتی‌ژن H پس از کشت ۲۴ ساعته باکتری در آبگوشت برین - هارت فرمالین به نسبت ۰/۶ درصد اضافه می‌گردید. جهت تهیه آنتی‌ژن رنگی، HSA را در ۴۰۰۰rpm سانتریفوژ کرده و به ازای هر گرم میکروب وزن شده (رسوب) ۲۲/۵ میلی لیتر آب فنیکه و ۳۵ میلی لیتر محلول ۱ درصد قرمز کنگو اضافه و ۲ ساعت در آزمایشگاه به وسیلهٔ همزن یکنواخت می‌گردید. پس از صاف کردن با فیلتر کاغذی مجدداً ۴۵ دقیقه در ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و از رسوب، محلول ۸ درصد در آب فنیکه تهیه می‌شد.

برای استاندارد کردن آنتی‌ژن‌های کشته از معیار نفلومتری مک فارلند استفاده می‌شد (۹). کدورت آنتی‌ژن‌های تزریقی و آگلوتیناسیون $۶-۹\times۱۰^۸$ و در آزمایشات رسوبی و تست جلدی ۳×۱۰^۹ باکتری در میلی‌لیتر بود.

ب . تهیه آنتی سرمها: چهار رأس بز و ۱۲ سر خرگوش انتخاب شدند. از نمونه مدفوع در محیط سلنیت و سپس در مک کانکی کشت به عمل آمد که سالمونلایی جدا نگردید. نمونه سرم در آزمایشهای آگلوتیناسیون و ایمونودیفوزیون از نظر پادتن ضد O سالمونلا آبورتوس اویس و دابلین و پادتن رسوبی منفی بودند. به ۳ رأس بز آنتی‌ژن حرارت دیده و به یک رأس آنتی‌ژن فرمل‌دار تزریق شد. به ترتیب آنتی‌ژن‌های حرارت دیده ۱۲۳۵، حرارت دیده ۱۲۶۲، مخلوط حرارت دیده‌های ۱۲۷۰، ۱۲۶۲ و ۱۲۳۵ و فرمله ۱۳۹۷ به چهار

۱) گروه آموزشی میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
۲) گروه آموزشی میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد، تهران - ایران.

بز تزریق شد. در طی ۱۱ ماه ۴۱ تزریق زیر جلدی انجام شد که در سه تزریق اول مکمل فروند به نسبت ۱ به ۴ آنتی‌ژن افزوده شد. پس از هر چند تزریق یک هفته استراحت داده شده و سپس خونگیری به عمل می‌آمد. مقدار کل پادگن تزریقی به هر بز ۵۱ میلی‌لیتر بود که حجم تزریق در ۲۰ دفعه اول ۱ و در ۲۱ تزریق بعدی ۱/۵ میلی‌لیتر بود.

جهت تهیه آنتی سرم اختصاصی، سرم فوق ایمن با تعلیق آنتی‌ژن‌های حرارت دیده سروتیپ‌های دابلین، نیوپورت پاراتیفی B و تیفی موریوم جذب گردید. مقادیر ۰/۵، ۱ و ۱/۵ برابر حجم سرم فوق ایمن از سوسپانسیون سروتیپ‌های حرارت دیده با سرم فوق ایمن مخلوط و ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به هم زده می‌شد. سپس یک ساعت در حرارت آزمایشگاه و یک شب در یخچال قرار می‌گرفت و نهایتاً نیم ساعت در ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ می‌گردید. مایع رویی از نظر نوع پاسخ به آنتی‌ژن‌های مختلف مورد آزمایش ایمونودیفوزیون قرار می‌گرفت.

برای انجام آزمایش آگلوتیناسیون داخل لوله، رقتهای دو برابر از سرم تهیه و بر حسب مورد به هر رقت مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر آنتی‌ژن O یا H_1 یا H_2 اضافه می‌شد. به این ترتیب رقتهای ۱:۲۰ الی ۱:۱۲۸۰ تهیه می‌شد. در مورد آگلوتیناسیون H ۲ ساعت در ۴۵ درجه سانتی‌گراد و در مورد O ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده و نهایتاً با توجه به شاهد، آخرین رقت دارای آگلوتیناسیون ۵۰ درصد به بالا قرائت می‌شد (۱).

در آزمایش آگلوتیناسیون سریع روی لام، ۳۰ میکرولیتر از سرم مجهول با ۳۰ میکرولیتر آنتی‌ژن رنگی مخلوط و پس از ۲ دقیقه تکان دادن اگر آگلوتیناسیون مشاهده می‌شد، مثبت قلمداد می‌گردید.

برای آزمایش ایمنودیفوزیون، ژلز ۱/۵ درصد در تامپون و رونال (Sodium Barital ۴۷/۶ و Hcl ۰/۱ N ۵۰ ml + ۴Lit D.W. pH=۸/۲) حاوی ۱ گرم سدیم آزاید تهیه و در هر پلیت ۸ سانتی‌متری ۲۵ میلی لیتر تقسیم می‌گردید (۱). طرح به کار رفته یک گوده در مرکز و ۶ گوده در اطراف بود که پس از بستن ته گود با ژلز مذاب، در هر گوده ۱۰۰ میکرولیتر رآژین یا سوسپانسیون ریخته می‌شد.

برای ایجاد سالمونلوز تجربی، 2×10^9 CFU/ml باکتری به هر خرگوش خورانده می‌شد. از خرگوشهای آلوده هر هفته خونگیری و سرم آنها از نظر حضور پادتن‌های ضد H, O رسوبی و اختصاصی مورد آزمایش قرار می‌گرفت. در ضمن پس از ۳۰ روز با استفاده از تزریق بین جلدی ۰/۲ میلی‌لیتر آنتی‌ژن‌های حرارت دیده سالمونلا آبورتوس اویس تست جلدی شدند. ضخامت پوست پس از ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت باکولیس اندازه‌گیری شد.

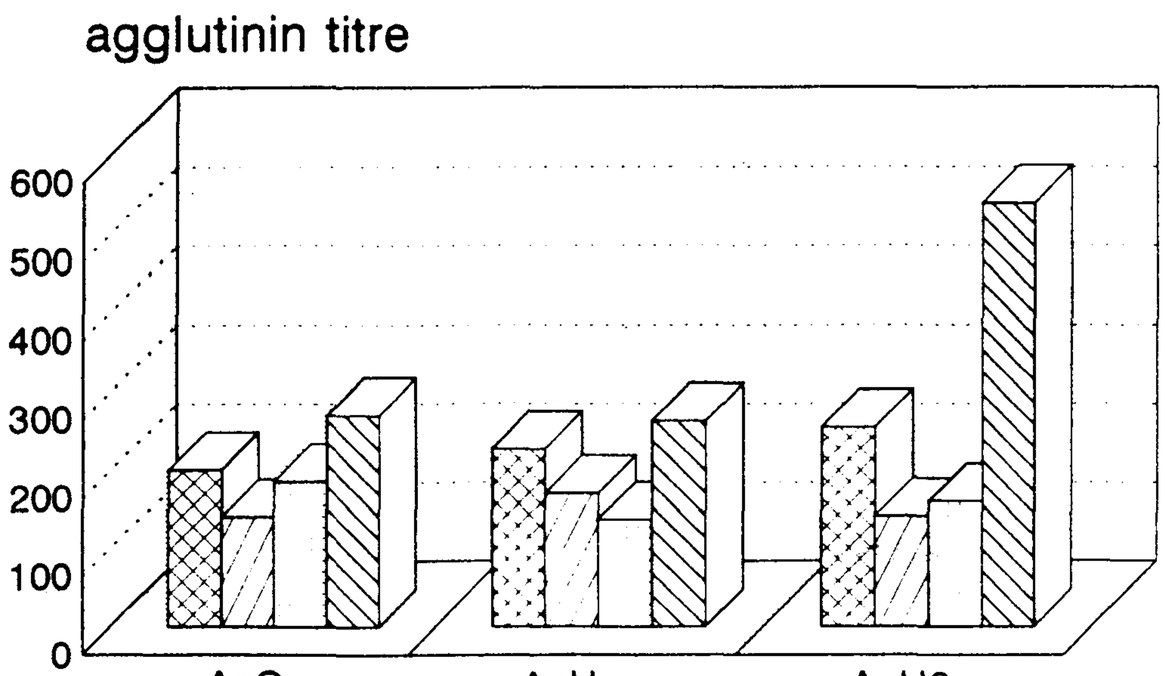
برای تست جلدی بزها، ۰/۴ میلی‌لیتر آنتی‌ژن تزریق شد و پس از ۶، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت ضخامت پوست اندازه‌گیری شد. دو رأس بز نیز به عنوان شاهد انتخاب شدند.

از ۱۷۲۷ رأس گوسفند و بز از استانهای تهران، قزوین و چهار محال و بختیاری خونگیری و سرم آنها، تا موقع آزمایش در ۱۸ - درجه سانتی گراد نگهداری شد.

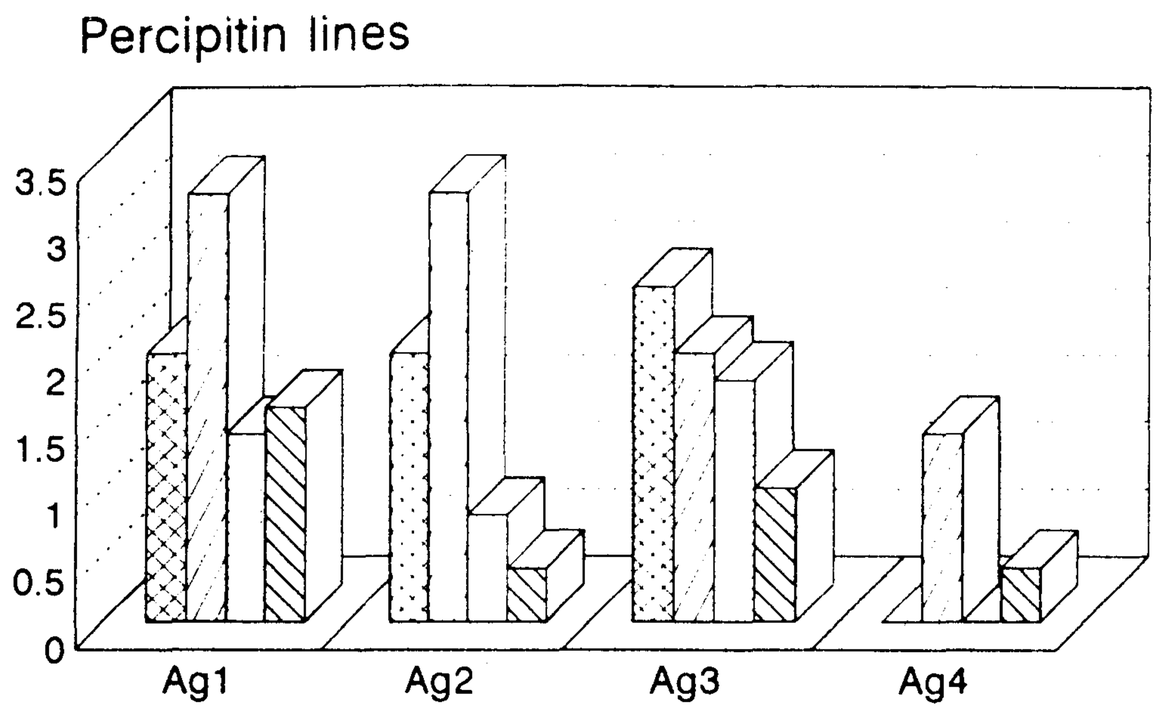
نتایج

سویه‌های سالمونلا آبورتوس اویس از تخمیر گلوکز، مالتوز و مانیتول اسید ایجاد کردند ولی سالیسین و ساکارز را تخمیر نکردند. نتیجه کشت در محیط اوره، اندل، سیمون سیترات و VP منفی و MR و H_2S مثبت بود. سویه‌های ۱۲۳۵ و ۱۲۷۰ دارای آنتی‌ژن H_c و سویه‌های ۱۲۶۲ و ۱۳۹۷ دارای آنتی‌ژن ۶ تاژکی بودند، هر چهار سویه با آنتی سرم ضد گروه B واکنش مثبت نشان دادند.

از ۴ رأس بز ایمن شده هر ماه خونگیری به عمل می‌آمد که عیار آگلوتیناسیون O، H_c و H_6 و حضور پادتن‌های رسوبی در آن مشخص می‌گردید. در کل میانگین عیار (Geometric Mean Titre) GMT در آزمایشات آگلوتیناسیون و تعداد خطوط رسوبی در آزمون AGID در نمودارهای ۱ و ۲ به ترتیب خلاصه شده است.



نمودار ۱ - میانگین عیار سرمی ضد پادگن‌های O، H_c و H_6 در بزهای ایمن در طی ۵ خونگیری



goat 1	2	2	2.5	0
goat 2	3.2	3.2	2	1.4
goat 3	1.4	0.8	1.8	0
goat 4	1.6	0.4	1	0.4

نمودار ۲ - میانگین تعداد خطوط رسوبی در چهار رأس بز ایمن در طی ۵ خونگیری

مشخص می‌شود که بیشترین میزان پادتن آگلوتینان در بز ۴ است که با آنتی‌ژن فرمل دار ایمن شده و بیشترین خطوط رسوبی در آزمایش AGID در مقابل آنتی‌ژن حرارت دیده ایجاد گردیده است. تعداد خطوط رسوبی در مورد آنتی‌ژن‌های حرارت دیده ۱ و ۲ بیشترین مقدار و حداکثر ۶ خط و در مورد فرمالینه کمترین حد را دارا است. از این رو دستگاه ایمنی بدن بز شماره ۲ حداقل نسبت به ۶ نوع آنتی‌ژن متفاوت پاسخ داده و بر علیه آن پادتن تولید کرده است. به دلیل توانایی بز ۲ در تولید خطوط رسوبی زیادتر، سرم آن به عنوان سرم فوق ایمن انتخاب و برای کارهای بعدی مورد استفاده قرار گرفت. در کانترایمونوالکتروفورز تنها ۳ آنتی‌ژن مشخص گردید. آنتی‌ژن مورد استفاده در کارهای بعدی آنتی‌ژن حرارت دیده بود چون طبق نمودار ۳، پاسخهای رسوبی آنتی‌ژن فرمالینه به دلیل عدم نفوذ کافی این نوع در ژل مناسب نبود. سرم بز ۳ در مقابل آنتی‌ژن فرمالینه و حرارت دیده سویه ۱۳۹۷ به ترتیب ۲ و ۵ خط رسوبی تشکیل داد محل خطوط رسوبی در مورد آنتی‌ژن فرمالینه نزدیک گودهٔ آنتی‌ژن بود.

برای تعیین ساختار آنتی‌ژنی سالمونلا آبورتوس اویس و سایر سروتیپ‌های سالمونلا، آنتی‌ژن‌های حرارت دیده پاراتیفی B، تیفی موریوم (از گروه B)، سالمونلا نیوپورت (از گروه C_2) و سالمونلا دابلین (از گروه D) تهیه و در مقابل سرم فوق ایمن ضد سالمونلا آبورتوس اویس قرار داده شد که به ترتیب ۲، ۴، ۱ و ۲ خط رسوبی تشکیل داد.بدین ترتیب قرابت آنتی‌ژنی با سالمونلا تیفی موریوم از همه بیشتر و با نیوپورت از همه کمتر است. اگرچه سالمونلا تیفی موریوم و پاراتیفی B هر دو در گروه B قرار دارند ولی قرابت با سالمونلا تیفی موریوم زیادتر است. برای حذف پاسخهای غیر اختصاصی و تهیه سرم اختصاصی که تنها با سالمونلا آبورتوس اویس پاسخ مثبت دهد یا در واقع برای آن اختصاصی باشد، اقدام به جذب سرم توسط سایر سویه‌ها شد. سرم جذب شده با سالمونلاتیفی موریوم برای سالمونلا آبورتوس اویس اختصاصی شد و دیگر با هیچ یک از سروتیپ‌ها خط رسوبی تشکیل نمی‌داد. همچنین سروتیپ‌های دیگر سالمونلا را آگلوتینه نمی‌کرد. بهترین میزان آنتی‌ژن سالمونلاتیفی موریوم برای جذب، مقدار هم حجم از سوسپانسیون 3×10^9 CFU/ml بود. سرم اختصاصی در مقابل سوسپانسیون سویه‌های دیگر آبورتوس اویس که از نقاط مختلف ایران جدا شده بودند ایجاد خط رسوبی کاملاً مشابه می‌کرد و در بعضی موارد اختلافات جزیی داشت.

نتایج مربوط به تست جلدی حیوانات ایمن: ۳ ماه پس از آخرین تزریق در حیوانات ایمن، متعاقب تزریق آنتی‌ژن حرارت دیده سالمونلا آبورتوس اویس در تست جلدی، پس از چند ساعت قرمزی، سفتی و افزایش ضخامت پوست ایجاد می‌شد که پس از ۲۴ ساعت به اوج می‌رسید. مقایسه دو گروه ایمن و شاهد غیر ایمن افزایش میانگین را ۳ برابر پس از ۲۴ ساعت، ۵ برابر پس از ۴۸ ساعت و ۴/۳ برابر پس از ۷۲ ساعت نشان داد. میانگین افزایش در طی ۴ روز ۴/۵ برابر بزهای شاهد بود. در خرگوشهایی که به طور تجربی آلوده شده بودند، عیار پادتن ضد O سریعاً ظاهر گشته و در پایان هفته اول پس از عفونت بیشتر از آستانه عیار مثبت قرار داشت. پادتن‌های فاز دوم تازگی نیز زودتر از فاز اول ایجاد شده و عیار آن به حد بالایی رسید که علت آن غالب بودن این فاز در سویه است. از نظر بروز پادتن‌های رسوبی، سرم خرگوش گروه دوم در پایان هفته اول در آزمایش AGID، ۲ خط رسوبی ایجاد کرد. در گروه اول پس از هفته دوم مثبت و پس از هفته سوم ۳ خط رسوبی کاملاً مشخص ایجاد گردید. در تست جلدی پس از ۳۰ روز از عفونت تجربی متعاقب تزریق ۰/۲ میلی‌لیتر آنتی‌ژن حرارت دیده، ۵/۷ میلی‌لیتر بود.

در آزمون AGID، سرم خرگوشهای مبتلا به عفونت تجربی سروتیپ‌های مختلف سالمونلا در مقابل آنتی‌ژن سالمونلا آبورتوس اویس ارزیابی گردید. از چهار پادتن ایجاد شده پس از گذشت یک ماه از عفونت، یک پادتن در همه سویه‌ها مشترک، دو خط روسوبی مشابه با سالمونلا تیفی موریوم و یک خط رسوبی مشابه با دابلین بود در حالی که یک پادتن کاملاً اختصاصی آبورتوس اویس بود که در سرم خرگوشهای مبتلا به سروتیپ‌های دیگر وجود نداشت و به

خط رسوبی سوم اختصاصی در گوده مجاور قرابت کامل داشت. لذا با تشخیص این پادتن اختصاصی، امکان تشخیص سروتیپ عامل بیماری بدون نیاز به جداسازی جرم ممکن گردید. نتایج مربوط به آزمایش سرمی گوسفندان و بزان، از تعداد ۱۷۲۷ نمونه سرم گوسفندی و بزی در مقابل آنتی‌ژن حرارت دیده در AGID، ۲۱ نمونه دارای خط رسوبی بودند که ۱/۶۸ درصد مثبت بود. از ۱۶۳۵ نمونه که با روش SAT نیز آزمایش شدند ۹۷۸ نمونه منفی، ۵۶۵ نمونه عیار ۱:۲۰، ۷۱ نمونه عیار ۱:۴۰ و ۳۱ نمونه عیار ۱:۸۰ یا بالاتر داشت. در کل ۴۰ درصد موارد عیار سرمی ضد O ۱:۲۰ یا بالاتر بود که در این تعداد ۸۶/۳ درصد عیار ۱:۲۰، ۱۰/۸ درصد عیار ۱:۴۰ و ۲/۸ درصد عیار ۱:۸۰ یا بالاتر داشتند.

درصد نسبی (Relative Proportion) نمونه‌های $O \leq 20$ از حداقل ۱۰ درصد در یک دامداری (۹ نمونه از ۸۸) تا ۸۱ درصد (۶۵ مورد از ۸۰ نمونه) متغیر بود. در تمامی گله‌هایی که نمونه‌گیری شد GMT تقریباً نزدیک به هم و میانگین آن ۲۳ بود. فقط در یک دامداری ۴۰ بود.

در آزمون آگلوتیناسیون سریع روی لام، ۷۵ درصد موارد (۱۵۰ مورد از ۲۰۰ نمونه) مثبت بودند که نشان دهنده حضور گسترده پادتن‌های ضد آنتی‌ژن‌های این باکتری بود.

در تمامی مواردی که عیار $O \leq 40$ بود و یا آزمون AGID مثبت شد، آزمون SAT جهت تعیین پادتن‌های ضد H_6, H_c با استفاده از آنتی‌ژن تازکی در داخل لوله انجام شد. همهٔ نمونه‌ها دارای عیار H_c ۱:۲۰ و بالاتر بودند، تعداد ۷۱ نمونه با عیار ضد $O \leq 40$ و ۲۱ نمونه ۸۰ و بالاتر بود.

۸ نمونه از ۹۲ نمونه از نظر H_6 منفی و بقیه دارای عیار بالاتر از ۱:۲۰ بود. میانگین عیار پادتن ضد H_6, H_c در مواردی که عیار پادتن O=۴۰ بود به ترتیب ۶۸ و ۴۳ و در موارد عیار پادتن ضد O = ۸۰، ۱۱۱ و ۹۱ بود.

در ۱۳ نمونه‌ای که دارای خط رسوبی بودند عیار آگلوتینان همزمان به حد آستانه مثبت نرسید. فقط در سه نمونه عیار هر سه (H_6, H_c, O) بالاتر از حد آستانه بود. در هیچ یک از نمونه‌های AGID منفی همراهی سه عیار به این حد نرسید. مقایسه نتایج AGID و Agg در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱ـ مقایسه نتایج ایمونودیفوزیون و آگلوتیناسیون ($O \geq 80$ یا $H \geq 160$)

جمع	ایمونودیفوزیون		آگلوتیناسیون
	−	+	$O \geq 80$ یا $H \geq 160$
۳۶	۱۵	۲۱	+
۶۹	۶۱	۸	−
۱۰۵	۷۶	۲۹	جمع

بر اساس تحلیل آماری مک نمار (Macnemars chi square test) اختلاف این دو روش معنی‌دار نبوده ($\alpha = 0/05$). بدین ترتیب در بین نمونه‌هایی که عیار پادتن آنها $O \geq 40$ بود، ۲۱ نمونه در هر دو روش مثبت و ۶۱ نمونه در هر دو روش منفی است. در این میان ۱۵ نمونه فقط در آگلوتیناسیون و ۸ نمونه در ایمونودیفوزیون مثبت بودند. البته علاوه بر این ۱۰۵ نمونه در ۱۵۳۰ نمونه در هر دو روش منفی بودند.

اگر مبنای مقایسه دو روش فقط آگلوتیناسیون O باشد اختلاف ایمونودیفوزیون با عیار ۴۰ و بالاتر معنی‌دار و با عیار ۸۰ و بالاتر معنی دار نمی‌باشد ($\alpha = 0/05$) (جداول ۲ و ۳).

جدول ۲ـ مقایسه نتایج ایمونودیفوزیون و آگلوتیناسیون ($O \geq 40$)

جمع	ایمونودیفوزیون		آگلوتیناسیون
	−	+	$O \geq 40$
۹۲	۶۶	۱۶	+
۱۵۷۱	۱۵۵۸	۱۳	−
۱۶۷۳	۱۶۲۴	۲۹	جمع

جدول ۳ـ مقایسه نتایج ایمونودیفوزیون و آگلوتیناسیون ($O \geq 80$)

جمع	ایمونودیفوزیون		آگلوتیناسیون
	−	+	$O \geq 80$
۲۱	۱۰	۱۱	+
۱۶۵۲	۱۶۱۴	۱۸	−
۱۶۷۳	۱۶۲۴	۲۹	جمع

بحث

در طی دوره عفونت یا موقع تجویز جرم کامل، پاسخ پادتنی بر ضد اجزاء مختلف باکتری ایجاد می‌شود که جستجوی آنها می‌تواند ارزش تشخیصی و اپیدمیولوژیک داشته باشد (۱۷). در تحقیق حاضر آنتی‌ژن‌های حرارت دیده و فرمله از نظر خواص ایمنی زایی و در ارتباط با ظهور پادتن‌های رسوبی مورد ارزیابی قرار گرفتند. پادگن فرمله بهترین نتایج را در تولید پادتن‌های جمع‌کننده و پادگن حرارت دیده بهترین نتایج را در تولید پادتن‌های رسوبی دارد. تولید پادتن‌های رسوبی در اثر تزریق آنتی‌ژن حرارت دیده متفاوت بود که احتمالاً ناشی از تفاوت بین سویه‌های به‌کار رفته و یا خصوصیات فردی حیوانات است. در عین حال مشخص شد که حداکثر ۶ نوع آنتی‌ژن با روش AGID و ۳ آنتی‌ژن با کانتر ایمونو الکتروفورز قابل تشخیص است که با روش حساستر ممکن است بیشتر شود. تجویز آنتی‌ژن حاصل از مخلوط ۳ سویه که تعداد جرم هر سویه $\frac{1}{3}$ میزان به کار رفته در آنتی‌ژن حاصل از یک سویه بود نیز تحریک کمتری ایجاد کرد.

نتایج به دست آمده با نتایج تاج بخش و تووی همخوانی داشت. نتایج واکسن حرارت دیده در آزمایشات CF و رسوبی بهتر از فرمالینه متعاقب سه تزریق جلدی یافتند (۲۶). مقاومت میشهای واکسینه با آنتی‌ژن حرارت دیده در مواجهه با جرم حاد بهتر از میشهای واکسینه با آنتی‌ژن فرمالینه بود (۲۵). حضور آنتی‌ژن اختصاصی در سالمونلا آبورتوس اویس به اثبات رسید. پادتن ضد این آنتی‌ژن اختصاصی در سرمهای خرگوشهای آلوده به سالمونلا پاراتیفی B تیفی موریوم (از گروه B)، نیوپورت (از گروه C) و دابلین (از گروه D) وجود نداشت. قرابت آنتی‌ژنی با تیفی موریوم از همه بیشتر و با نیوپورت از همه کمتر بود. هولم و ادیبو (Holm & Edebo) (۱۹۶۵) با استفاده از پادگن سونیکه،

حرارت دیده و فرمله سالمونلا تیفی موریوم، انتریتیدیس (S. enteritidis) و بونارینسیس (S. bonariensis) آنتی‌ژن‌های اختصاصی و غیر اختصاصی را مشخص کردند. آنها حداکثر به ۶ خط رسوبی رسیدند که سه خط برای تیفی موریوم اختصاصی بود. نامبردگان ارتباطی را بین عیار پادتن رسوبی و آگلوتینان نیافتند (۱۵).

تاج‌بخش و زهرایی روش فوق را در مورد سالمونلا تیفی موریوم به‌کار بردند و با جذب سرم فوق ایمن بر علیه سالمونلا تیفی موریوم با سالمونلا دابلین یا پاراتیفی B، ۲ پادتن رسوبی برای تیفی موریوم مشخص کردند (۱۶).

نتایج تست جلدی برای تعیین DTH با نتایج بروز پادتن‌های رسوبی همخوانی داشت یعنی بزی که بیشترین میزان پادتن رسوبی را ایجاد کرده بود، بیشترین میزان افزایش ضخامت جلدی را نشان داد. اختلاف میانگین گروه ایمن و گروه شاهد کاملاً معنی‌دار بود (t = ۰/۹۷۵). بیشترین میزان افزایش ۴۸ ساعت پس از تزریق مشاهده گردید. تاج‌بخش و زهرایی نتایج مشابهی را در مورد سالمونلا تیفی موریوم گزارش کردند (۱۰).

آرخانگلوسکی (Arkhangl'skii) و همکاران (۱۹۸۰) در ۷۷ - ۴۱ درصد موارد مثبت آزمون جلدی آگلوتیناسیون مثبت مشاهده کردند (۱۴ و ۱۳). عفونت تجربی در خرگوش پاسخ پادتنی شدیدتری نسبت به آنتی‌ژن‌های کشته ایجاد کرد و در هفته دوم به حد بالایی رسید. علت آن می‌تواند تخریب آنتی‌ژن‌ها حین غیر فعال کردن و عدم قدرت تکثیر جرم باشد. نکته دیگر این است که عیار پادتن H به فاز غالب در آنتی‌ژن‌های تازگی در سویهٔ عفونت‌زا بستگی دارد و چون سویه‌های به‌کار رفته در فاز دوم بودند مقدار پادتن ضد فاز دوم بالاتر بود. لذا موقع تفسیر نتایج سرمی باید به آن توجه نمود. این موضوع با نتایج زیریکونوف و تاج‌بخش و همکاران همخوانی دارد (۲۵ و ۱۹، ۱۷).

در مورد پاسخ ازدیاد حساسیت تأخیری جلدی نیز نتایج مشابهی اخذ شد. در خرگوشهای فوق ایمن علی رغم تزریقات مکرر واکسنهای حرارت دیده، میانگین افزایش ضخامت جلد متعاقب تزریق ۰/۲ میلی‌لیتر آنتی‌ژن حرارت دیده سالمونلا آبورتوس اویس ۲ برابر گروه شاهد در حالی که در گروه آلوده با جرم حاد ۳۰ روز پس از تزریق ۳ برابر گروه شاهد بود. تاج‌بخش و زهرایی در تست جلدی اختلاف معنی‌داری بین DTH ناشی از تزریق بین جلدی سالمونلا آبورتوس اویس و تیفی موریوم در خرگوشهای آلوده با تیفی موریوم نیافتند (۱۰).

AGID در هفته دوم بعد از عفونت تجربی در خرگوشهای آلوده مثبت شده و در عین حال حضور پادتن اختصاصی با سرم جذب شده اثبات گردید.

در آزمون AGID سرم ۱۷۲۷ رأس گوسفند و بز ۱/۶۸ درصد مثبت بودند و ۴۰ درصد نمونه‌های آزمایش شده (۱۶۳۵ نمونه) دارای عیار ۴۰ <O بودند که میانگین عیار GMT، ۲۳ بود. این نکته اندمیک بودن جرم را در سطح آزمایش شده نشان می‌دهد. در بعضی مناطق تحت شرایط خاص بیماری به صورت اپیدمی با سقط فراوان مشاهده می‌شود. آگلوتیناسیون سریع در ۷۵ درصد موارد مثبت شد که به علت حساسیت زیاد به نظر نمی‌رسد در مطالعات غربالگری چندان ارزشی داشته باشد و نمی‌توان از آن مانند تست رزبنگال برای بیماریابی استفاده کرد. نتایج AGID و SAT الزاماً یکی نبود ولی در مواردی که عیار بالا بود، موارد مثبت نیز زیادتر بود. وقتی دو روش مقایسه می‌شوند در صورتی که مثبت بودن هر یک از عیارهای ضد O یا H را به تنهایی مثبت در نظر بگیریم، اختلاف دو روش معنی‌دار نیست.

تاج‌بخش، دلین و حجازی (۱۳۵۱) روی ۷۱۱ نمونه سرم از گله‌های با سابقه سقط و ۲۰۰ نمونه از گوسفندان به ظاهر سالم به ترتیب ۸۰/۵ و ۳۹/۵ درصد عیار بالاتر از ۲۰ را نشان دادند و ۸/۵ و ۱/۵ درصد مثبت بودند. نتایج AGID روی ۱۰۰ نمونه مثبت باO = ۴۸۰، فقط ۱۵ مورد بود (۲۱).

تاج‌بخش و گاتل (۱۳۵۱) ۱/۵ درصد ۹۸۷ نمونه گوسفند، ۴ درصد ۶۲۴ نمونه بزی و ۱۰/۸ درصد ۹۹۵ نمونه گاوی را در حد مثبت یافتند. در نمونه‌های خوکی و اسبی عیار مثبت مشاهده نشد. معیار مثبت بودن برای O, H_c , H_6 به ترتیب ۴۰، ۳۲۰ و ۸۰ بود (۲۲). تاج‌بخش و ژیله (۱۹۷۳) از نمونه‌های مربوط به ورامین ۲۶/۴ درصد را از نظر سرمی مثبت یافتند. عیار مثبت به ترتیب ۴۰، ۱۶۰ و ۳۲۰ بود (۲۳).

در پایان می‌توان اظهار نظر کرد که با توجه به سهولت، قیمت پایین مواد مصرفی و عدم نیاز و وابستگی به محصولات شرکتهای تجارتی می‌توان از روش AGID برای شناسایی سرمی گله گوسفندان و بزان آلوده به سالمونلا بالاخص سالمونلا آبورتوس اویس استفاده کرد و از بررسیهای طولانی و پر زحمت جدا سازی جرم و استفاده از روش کوفمن وایت در تشخیص و یا روشهای سرولوژی مثل آگلوتیناسیون که دارای زحمت زیاد است اجتناب کرد. همچنین از سرم جذب شده اختصاصی به منظور تشخیص سریع نمونه‌های بالینی جدا شده به روش آگلوتیناسیون روی لام بهره گرفت.

منابع

۱. تاج‌بخش، ح. ایمنی‌شناسی بنیادی، چاپ پنجم، انتشارات دانشگاه تهران، (۱۳۷۰).

۲. تاج‌بخش، ح. تحقیقات مربوط به سقط جنین‌های ناشی از سالمونلا آبورتوس اویس در ایران. پنجمین کنگره دامپزشکی، تهران ۳۱۱ - ۳۰۶، (۱۳۵۲).

۳. تاج‌بخش، ح.، تحقیقات مربوط به سقط جنین‌های واگیر ناشی از سالمونلا آبورتوس اویس در استان خراسان. هفتمین سمینار منطقه‌ای سازمان دامپزشکی کشور، مشهد ۱۷۸ - ۱۷۲، (۱۳۵۲).

۴. تاج‌بخش، ح.، حسینیون، م. و نادعلیان، م.ق. عفونت تجربی ناشی از سالمونلا آبورتوس اویس در ماده گاو. پژوهنده، شماره مخصوص سال ۱۳۵۲ (۶) ۸۸ - ۸۱، انتشارات وزارت علوم و آموزش عالی، (۱۳۵۲).

۵. تاج‌بخش، ح.، حسینیون، م. و نادعلیان، م.ق. (۱۳۵۲) عفونت تجربی ناشی از سالمونلا آبورتوس اویس در بز. پژوهنده، شماره مخصوص سال ۱۳۵۲ (۶) ۹۸ - ۸۹، انتشارات وزارت علوم و آموزش عالی، (۱۳۵۲).

۶. تاج‌بخش، ح. بررسی سرولوژیک آلودگی گوسفندان ایران به بروسلوز و سالمونلا (سالمونلا آبورتوس اویس). پژوهنده، سال ۱۳۵۵ (۱۳)، پزشکی ۲، ۱۱۳ - ۱۰۷، انتشارات وزارت علوم و آموزش عالی، (۱۳۵۵).

۷. تاج‌بخش، ح. و نادعلیان، م.ق. ایمنی تجربی ناشی از سالمونلا آبورتوس اویس در گوسفندان. پژوهنده سال ۱۳۵۷ (۲۳)، علوم پزشکی (۵)، ۲۲۷ ـ ۲۱۴، انتشارات وزارت علوم و آموزش عالی، (۱۳۵۷).

۸. تاج‌بخش، ح. و محزونیه، م.ر. تهیه سرم فوق ایمن علیه سالمونلاهای گروه B و کاربرد آن در تشخیص عفونتها با استفاده از سالمونلا آبورتوس اویس سومین کنگره ملی بیماریهای قابل انتقال بین انسان و حیوان - مشهد ۱۰۹ - ۱۰۸، (۱۳۷۵).

۹. تاج‌بخش، ح. وضعیت سالمونلوزهای دامی در ایران. هشتمین کنگره دامپزشکی ایران، دانشکده پزشکی، خلاصه مقالات ۱۶ - ۱۵، (۱۳۶۵).

۱۰. زهرایی‌صالحی، ت. بررسی ساختار آنتی‌ژنی سالمونلا تیفی موریوم و استفاده از آن جهت تشخیص و ردیابی عفونتهای ناشی از این باکتری. پایان نامه

دکتری تخصصی میکروبیولوژی شماره ۱۵ به راهنمایی دکتر حسن تاج‌بخش، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، (۱۳۷۳).

۱۱. طاهری، م.ر. تشخیص حصبه با روش (CTE)، کانترایمونو الکتروفوروز پایان نامه فوق لیسانس علوم بهداشتی و رشته میکروب‌شناسی، شماره ۱۵۳۵، دانشکده بهداشت دانشگاه تهران، (۱۳۶۶).

۱۲. کیهانی، م. و تاج‌بخش، ح. لیزوتیپی سویه‌های سالمونلا آبورتوس اویس جدا شده از سقط جنین گوسفندان. نامه دانشکده دامپزشکی سال ۱۳۵۱، جلد ۲۸ (۱)، ۱۸ - ۱۱، (۱۳۵۱).

13 . Arkhangl'skii, I.I., Sidrchok, A.A., Cheboksarova, T.T. and Radshabov, M.D. Sensitivity and specificity of an intradermal allergic test for salmonellosis in sheep. V.B. (1980) 59-2632, (1989).

14 . Arkhangel'skii, I.I., Sidrchok, A.A. and Radzhabof, M.D. Allergens for the diagnosis of salmonellosis in sheep. Vetemarya Moscow, USSR, (1):64-65, (1980).

15 . Holme T. and Edibo L. Studies of Salmonella antigens by agar gel percipitin test. Acta pathology et microbiology, Scandinavia, 65, 289-294, (1965).

16 . Kauffmann, F. Serological of diagnosis of Salmonella species Kauffmann- White schema 9-125, (1971).

17 . Makela P.H. and Mayer, H., Enterobacterial common antigen, Bac. Rev. 40: 491-532, (1976).

18 . Nicholas, A., Pestre-Alexandre, M., Delahaye, J., Chauchef, S., Mountier, M., and Ferial, M.L. Oral immunization of sheep against salmonella abortus ovis, 2th communication, Revue de medicine veterinaire 1979, (130):6,891-895,902, (1980).

19 . O.I.E., Manual of standards for diagnosis tests and vaccines. 408-425, (1992).

20 . Sonnewith A.C. and Jarret, L., Cradwohl's clinical laboratory methods and diagnonsis, 8th ed. Vol:2 P. 335-336, 1794-1776, 1824. the C.V. Mosby company, (1980).

21 . Tadjebakhche, H., Hosseinion, M. and Nadalian, M.G. Experimental infection of (pregnant) goats with Salmonlla abortus ovis. Revue de medecine veterinaire. 1974, (125)5:711-718, (1974).

22 . Tadjebakhche, H. and Nadalian, M.C., Immunity induced experimentally in ewes by Salmonella abortus ovis. Revue de medecine veterinaire, (131) 3:247 -250, (1980).

23 . Tadjebakhche, H. and Gillet, R.Y. Epizootologie dun nouveau foyer d'avortements causes par salmonella abortus ovis a'varamine, province de tehran. Bull. soc. sci. vet, et med. compree, Lyon. (75) 4:241-246, (1973).

24 . Tadjebakhche, H. and Touvay, G. Development of antibodies in ewes immunized against Salmonella abortus ovis with killed vaccines. Revue de medecine veterinaire, 1979 (130) 12:1635-1348, (1979).

25 . Tadjebakhche, H., Desliens, M. and Hedjazi, M., Serological study of an outbreaks of abortions due to Salmonella abortus ovis in Iran. Rec. Med. Vet. 967-978, (1971).

26 . Tadjbakhche, H. and Gatel, A. Serological survay of antibodies to Salmonella abortusovis in domestic animals in Iran. Recueil de medecine veterinaire, (148), 9: 1027-1030, (1972).

Determining of Salmonella abortus ovis antigens and developing a serological method for diagnosis of infection by specific antigens

Tadjbakhche H.[1], Mahzonieh M.R.[2]

[1]*Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine University of Tehran, Tehran- Iran.*
[2]*Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran- Iran.*

Heated and formalinized antigens of salmonella abortus ovis strains were injected subcutaneo usly to goats and rabbits. The immunization period was taken 11 months for goat and 9 months for rabbit. Precipitinin, agglutinin antibodies and delayed type hypersensitivi ty responses were evaluated by agar gel immunodiffusion, Immunoelectrophoresis, serum agglutination and skin tests. Six nonspecific and one specific antigens of S. abortus ovis were found in AGID test, we found specific antibody in experimental infected rabbits sera, as well. Theses test's revealed that heated antigens elicit precipitinins and DTH reaction more than formalinized antigen, but the latter produced agglutinins titre more than heated antigen. Absorbed hyperimmun serum with, S. typhimurium only reacted with S. abortus ovis antigens. To detect anti S.abortus ovis antibodies, We examined 1727 sera of sheep and goats by SAT and AGID tests. 1.2 and 1.68% of them were positive in SAT and AGID test , respectively. Rapid agglutination test wasn't a proper screening test, since , 75% of 200 sera were positive. There is no significant difference between AGID and SAT tests ($\alpha = 0.05$).

Key words: Salmonella abortus ovis, Antigens ,Serology, Infection.