

تهیه توبرکولین گاوی در ایران

دکتر هادی هدایتی - دکتر مرتضی صدری - ابوالفضل نیک بین

مقدمه:

توبرکولین ماده پروتئینی است که در اثر رشد میکرب سل در محیط تولید می گردد.

برای اولین بار ربرت کخ بآن پی برد و معتقد باثرات درمانی این ماده بود ولی امروزه برای تشخیص آلرژی سلی و نشان دادن تماس قبلی بدن با میکرب سل بکار میرود. در ایران تاکنون توبرکولین از سه سویه بین المللی انسانی T.B.-C، T.B.-DT و T.B.-PN تهیه می گردد و برای تعیین حساسیت به میکرب سل در انسان و انجام برنامه مبارزه با سل گاوی بکار میرود. بنظر میرسد چنانچه توبرکولین از سویه گاوی تهیه گردد برای تشخیص سل گاوی و جستجوی اثر واکسن B.C.G در انسان و دام اختصاصی تر و حساس تر باشد. باتوجه باین نظر کوشش بعمل آمد که با استفاده از سویه گاوی میکرب سل (سویه بین المللی T.B.-AN5) توبرکولین تهیه گردد و کار بردن آن در تشخیص سل گاوی در گاو و آلرژی سلی در انسان ارزش یابی گردد. مقاله زیر خلاصه کوشش مزبور را عرضه میدارد:

مواد مورد نیاز:

سویه گاوی سل، محیط استون برنیک، محیط لوانشتن جانسون مدیفیه، محیط سیب زمینی، محیط سنتیک مایع

دورسه هنلی، خوکچه هندی، توبرکولین گاوی استاندارد انگلستان (۱ و ۲ و ۳ و ۴).

روش کار:

ابتدا میکرب سل گاوی در محیط جامد مدیفیه لوانشتن جانسون و محیط اختصاصی Stonebrink (۱) با دو پاساژ بفاصله ۴۵ روز تکثیر گردیده سپس در محیط سیب زمینی دارای محیط Watson-Reid (۲) بمدت یکماه پرده گیری شده است. پرده حاصله در محیط سنتیک مایع دورسه هنلی گاوی (۳) تکثیر و بمدت ۲/۵ ماه در اتو ۳۷ درجه قرار داده شده است. محیط دورسه هنلی فاقد پروتئین میباشد و کشت میکرب سل گاوی در آن پس از ۲/۵ ماه بحد اکثر رشد خود میرسد. در اثر اتولیز میکرب پروتئین سلی که آندوتوکسین میکربی است بداخل محیط منتشر میگردد. پس از رشد کامل میکربها با حرارت دادن ظروف کشت بمدت سه ساعت در بخار ۹۶ درجه کشته و عصاره گیری میشوند سپس بکمک صافی های بوخنر Buchner و سائیز Seitz اجرام میکربی از محیط مجزا میشوند چون محیط اولیه فاقد پروتئین بوده است. طبیعتاً پروتئین های تولید شده در محیط به واسطه رشد میکرب سل ایجاد شده و کلاً پروتئین سلی میباشد. مایع صاف شده با اسید تریکلراستیک ۴۰ درصد به نسبت ۱ و ۹

کد:

۱ = $\frac{1}{1000}$	توبرکولین گاوی استاندارد انگلستان		
۲ = $1/500$	"	"	"
۳ = $1/2500$	"	"	"
۴ = $1/100$	گاوی رازی	"	"
۵ = $1/500$	"	"	"
۶ = $1/2500$	"	"	"

جدول تزریق:

چپ			راست			شماره خوکچه
۲	۳	۴	۱	۵	۶	۵۳/۶۸
۴	۶	۳	۵	۲	۱	۵۳/۶۹
۲	۵	۳	۶	۴	۱	۵۳/۷۲
۵	۱	۴	۳	۶	۲	۵۳/۷۴
۱	۲	۳	۴	۶	۵	۵۳/۷۶
۳	۵	۱	۲	۶	۴	۵۳/۷۷

نتیجه:

پس از ۲۴ ساعت قرمزی حاصله در اثر تزریق را بررسی و قطر طولی و عرضی آن اندازه گیری شده میانگین واکنش در جدول ۲ نشان داده میشود:

شماره خوکچه					
۱۴	۱۶/۵	۲۰	۲۰	۱۸	۱۴
۲۳	۱۷	۱۵	۲۰	۲۰	۲۴
۲۲	۲۰	۱۷	۱۸	۲۵	۲۶
۱۷	۲۵	۲۴	۱۵	۱۵	۱۷
۲۲/۵	۲۰	۱۸	۲۴	۱۶	۲۰
۱۹	۲۱	۲۵	۲۲	۱۵	۲۴

مجاور میگردد و مجموع یک شب در ۴ درجه قرار داده میشود. روز بعد مایع روئی خارج و رسوب تشکیل شده دوبار با اسید تریکلراستیک یک درصد و یکبار با نمک طعام ده درصد شسته هربار نیم ساعت در سه هزار دور سانتریفوژ و رسوب توبرکولین مجزا میگردد. رسوب حاصله در مایع زیر حل و به یک دهم حجم اولیه رسانده میشود:

فسفات دی سدیک	$M/15$	۶ سانتیمتر مکعب
"	$M/3$	۸/۸
گلیسرین	۵۰ درصد	۲۰
فنل	۵	۱۰
نمک طعام	۱۰	۵
آب مقطر	تا	۱۰۰

مقدار پروتئین در محلول حاصل با دستگاه کجلدال اندازه گیری میشود.

برای کنترل سترونی توبرکولین تولید شده در محیطهای عادی هوازی و بی هوازی و محیط تیوگلیکولات سدیم کشت داده میشود و تا دو هفته در اتو ۳۷ درجه نگهداری میشود. از نظر آزمایش بی ضرری مقدار نیم سانتیمتر مکعب زیر جلدی و یک سانتیمتر مکعب داخل صفاقی به دو خوکچه تزریق میگردد که تا یکماه تحت کنترل و سالم بوده اند.

عیارسنجی بیولوژیکی:

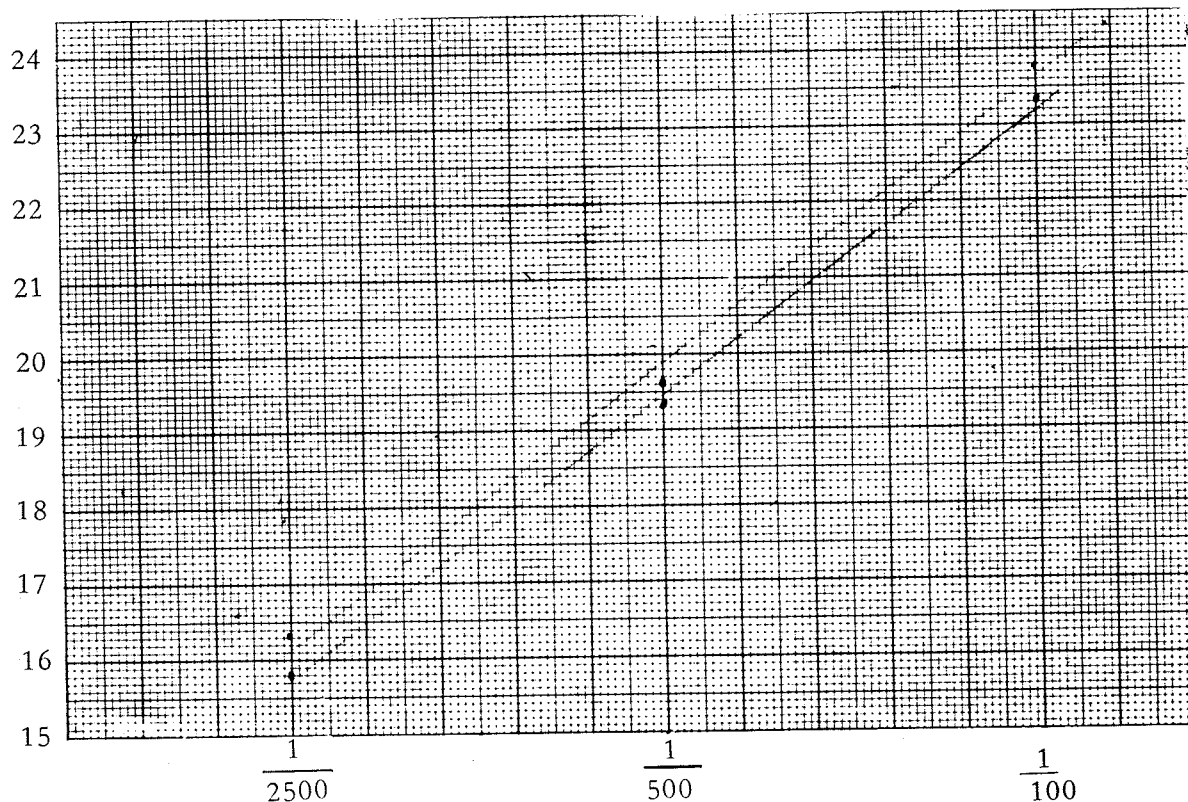
۲۰ سر خوکچه هندی Albinos را انتخاب (۴) و با مخلوط (پودر کشته میکرب سل گاوی و پودر سنگ پا و روغن پارافین استریل) حساس و دو ماه بعد که حساسیت بحد کافی رسید برای آزمایش بکار برده شده اند. ده سر از این خوکچه ها را موجینی و شش سر از بهترین آنها انتخاب شده اند. توبرکولین رازی تهیه شده را با تامپون فینکه توئین دار به یک میلی گرم در میلی لیتر رسانده سپس $\frac{1}{1000}$ و $\frac{1}{500}$ و $\frac{1}{2500}$ رقیق شد. توبرکولین گاوی استاندارد که یک میلی گرم در میلی لیتر بود با همین تامپون برقتهای فوق درآورده طبق کد و جدول زیر بهر خوکچه ۰/۱ سانتیمتر مکعب از راه بین جلدی در شش نقطه تزریق گردید:

جدول شماره ۳ مرتب شده جهت مقایسه با استاندارد و محاسبات آماری:

گاوی رازی			گاوی انگلستان			ماده بکار رفته
۶	۵	۴	۳	۲	۱	کد
۱/۲۵۰۰	۱/۵۰۰	۱/۱۰۰	۱/۲۵۰۰	۱/۵۰۰	۱/۱۰۰	شماره خوکچه رقت
۱۴	۱۸	۲۰	۱۴	۱۶/۵	۲۰	۵۳/۶۸
۱۷	۲۰	۲۳	۱۵	۲۰	۲۴	۵۳/۶۹
۱۸	۲۰	۲۵	۱۷	۲۲	۲۶	۵۳/۷۲
۱۵	۱۷	۲۴	۱۵	۱۷	۲۵	۵۳/۷۴
۱۶	۲۰	۲۴	۱۸	۲۰	۲۲/۵	۵۳/۷۶
۱۵	۲۱	۲۴	۱۹	۲۲	۲۵	۵۳/۷۷
۹۵	۱۱۶	۱۴۰	۹۸	۱۱۷/۵	۱۴۲/۵	جمع
۱۵/۸۳	۱۹/۳۳	۲۳/۳۳	۱۶/۳۳	۱۹/۵۸	۲۳/۷۵	میانگین
۳۵۱			۳۵۸			جمع واکنش

پس از انجام محاسبات آماری (۵) قدرت نسبی Relatif potency ۱۱۸٪ نسبت با استاندارد بدست آمده

منحنی مقایسه توبرکولین گاوی استاندارد و توبرکولین گاوی رازی



بحث:

(توبرکولین رازی) از لحاظ قدرت معادل توبرکولین گاوی استاندارد بوده میتوان آنرا در انجام آزمایشات آلرژی مورد استفاده قرار داد.

تشکر:

از آقای D.B.Lee رئیس دپارتمان تهیه توبرکولین در انگلستان بعلت در اختیار گذاشتن سوش گاوی و توبرکولین استاندارد و آقایان زالی، خدیوی و میرهاشمی بواسطه کمکهای تکنیکی تشکر می گردد.

با وجود شباهت زیاد سویه های انسانی میکرب سل با سویه های سل گاوی این دوسویه میکربی از نظر بعضی از خواص بیوشیمیائی باهم متفاوتند و در حیوانات نیز بیماریزائیشان تفاوت می کند، به این جهت بنظر می آید که توبرکولین تهیه شده از سویه گاوی آلودگی حیوانات و انسانرا باین میکرب بهتر نشان میدهد. برای بررسی دقیق این مطلب احتیاج به تهیه توبرکولین گاوی بود که طبق گزارش فوق عملی گردیده است. بطوریکه مقایسه دو منحنی بدست آمده و محاسبات آماری نشان میدهد توبرکولین گاوی تهیه شده در ایران

References

1. Lesslie, I.W. (1959) J. comp. Path. 69, 1-10
2. Watson E.A. Canad. Publ. hlth. J. 26, 268, 1935

3. Preparation of Weybridge bovine tuberculine central Veterinary Laboratory Weybridge England 1974
4. Method of assay of tuberculin in guinea pigs
5. Statistical method in biological assay by D. J. Finney 301, 1971.