

# تشخیص سریع ویبریوکلره O<sub>1</sub> به روش کوآگلوتیناسیون با استفاده از آنتی بادی منواسپسیفیک

دکتر سید عباس بازرگان، دکترای میکروبیولوژی دانشگاه تربیت مدرس

دکتر بهرام فتح‌اله زاده، دانشیار گروه باتولوژی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تهران

دکتر بهمن تهرانی، استادیار بخش واکسن سازی انستیتو پاستور ایران

دکتر نسیم معظمی، استادیار بخش میکروبیولوژی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران

## RAPID IDENTIFICATION OF VIBRIO-CHOLERAEE O<sub>1</sub> BY COAGGLUTINATION TEST USING MONO-SPECIFIC ANTIBODY ABSTRACT

In our investigation, rabbit hyper-immune serum to *V. cholerae* ogawa was absorbed with *V. cholerae* inaba whole - cells and vice versa. Applying ammonium sulphate precipitation method, mono - specific  $\gamma$  globulins were purified and concentrated from the absorbed whole serum. These antibodies were fixed on staphylococcus cowan 1 NCTC-8325 whole - cells, using different chemical fixatives. It was observed that maximum fixation of  $\gamma$  globulin to protein - A was achieved by 1 - propanol 50% at 3 hours, which revealed through single radial immuno-diffusion technique.

The rectal swab samples were cultured in an enrichment bile-peptone broth. After 5 hours at 37<sup>o</sup>C while agitations, one drop of each sample was mixed with one drop of vibrio-cholerae bivalent mono - specific coagglutination reagent (VBCR). The results were read after 2 to 3 minutes

Finally through statistical analysis sensitivity and specificity of coagglutination test were calculated to be 95.1% and 99.2% respectively, when compared to positive & negative controls and conventional culture methods. Using VBCR, coagglutination test can be therefore considered as a simple, reliable and rapid method to detect *V. cholerae* O<sub>1</sub> in the stool of patients in endemic area and less equipped laboratories.

### چکیده

توسط ویبریوکلرا اینابا و برعکس جذب گردید. با استفاده از روش رسوب با رسولفات آمونیوم، گاماگلوبولینهای منواسپسیفیک

در این مطالعه سرم هیپرایمیون خرگوش علیه ویبره کلرا اوگاوا

آنتی سرم منواسپیسفیک تخلیص شده ویبریولکره ( $O_1$  (VBCR) استفاده گردیده است.

### مواد و روشها

الف - سوشهای استاندارد: دو سویه اوگاوا (Ogawa-NIH41) و اینابا (Inaba-35A3) و استافیلوکوک ارئوس NCTC 8325 جهت تهیه آنتی سرمهای منواسپیسفیک و آنتی ژن کوآگلوتیناسیون مورد استفاده قرار گرفتند.

ب - نگهداری سوشها کلیه سوشهای مورد استفاده در این تحقیق پس از تکثیر در محیطهای  $BHIA^{(1)}$ ،  $CYEA^{(2)}$  جمع آوری و در لوله و مواد محافظ مخصوص به طریقه لئوفیلیزاسیون سریع به صورت استوک دائم نگهداری گردیدند. به علاوه استوک کاری نیز با کشت میکروارگانسیمهای مربوطه به شکل مورب در لوله‌های محتوی "CYEA" و "BHIA" تهیه گردیدند و در ۴ درجه سانتیگراد قرار گرفتند.

ج - حیوانات مورد استفاده: جهت بررسی آگلوتینیتهای طبیعی و تهیه آنتی سرمهای از منواسپیسفیک خرگوشهای نیوزلندی سفید به وزنی حدود ۱/۸ تا ۲ کیلوگرم، جنسیت ماده و سن حدود ۴ ماه استفاده گردید.

### د - روشهای سرولوژیکی

#### ۱- تهیه آنتی ژنها

۱- آنتی ژن تزریقی: آنتی ژن ویبریولکره اوگاوا و اینابا بعد از کشت در محیط BHIA به کمک سرم فیزیولوژیک فنیکه (۰/۵٪) جمع آوری شد و پس از یک ساعت نگهداری در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد و شستشو با استفاده از سرم فیزیولوژیک، با غلظت  $10^8 \times 9$  سلول در میلی لیتر (اسپکتروفتومتری با طول موج ۵۴۰ نانومتر) تهیه شد.

۲- آنتی ژن تیتراسیون: روشی که برای تهیه آنتی ژن تزریقی به کار گرفته شد، در تهیه آنتی ژن تیتراسیون نیز مورد استفاده قرار گرفت، با این اختلاف که جهت غیرفعال نمودن باکتریها از فرمالدئید (۰/۵٪) استفاده گردید.

۳- آنتی ژن جذب: تعلیق غلیظی از ویبریولکره اوگاوا - اینابا در محلول الکل ۲۰ درجه و فرمالدئید ۰/۵ درصد تهیه شد و پس از یک ساعت نگهداری در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد، شستشو گردید و جهت جذب ایمونوگلوبولینهای ناخواسته مورد استفاده قرار گرفت.

۴- آنتی ژن کوآگلوتیناسیون: استافیلوکوک cowan 1 NCTC-8325 به محیط CYE اگر تلقیح گردید و پس از ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، در حداقل PBS ۰/۱۵ مولار (۷/۲ pH =) جمع آوری شد. سپس جهت افزایش فرکانس تثبیت،

(mono-specific) جذب، تخلیص و تغلیظ شدند. این آنتی بادیها به استافیلوکوک "cowan 1 NCTC-8325" متصل گردیدند.

با استفاده از فیکساتیوهای مختلف شیمیایی، بیشترین چسبندگی گاماگلوبولین به پروتئین A توسط پروپانل (۱/۵۰٪) به مدت ۳ ساعت انجام گرفت. این عمل به وسیله تکنیک ایمونودیفوزیون شعاعی منفرد به اثبات رسید. نمونه‌های سوآب رکتال به محیط پایل پیتون برات تلقیح شدند و ۵ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفتند، سپس یک قطره از هر نمونه با یک قطره از معرف ویبریولکره کوآگلوتیناسیون (VBCR) مخلوط گردید و نتایج آن بعد از ۲ الی ۳ دقیقه خوانده شد و تجزیه آماری، حساسیت و ویژگی آزمایش کوآگلوتیناسیون را به ترتیب ۹۵/۱ و ۹۹/۲ درصد همراه با کنترل مثبت و منفی در مقایسه با روش کشت کلاسیک نشان داد. بنابراین از تست کوآگلوتیناسیون می‌توان به عنوان آزمایشی ساده، قابل دسترس و روشی سریع جهت تشخیص ویبریولکره  $O_1$  در مدفوع بیماران در نواحی اندمیک و آزمایشگاهی با امکانات کم استفاده نمود.

### مقدمه

ویبریولکره هنوز از زمره معضلات بهداشتی در کشورهای در حال توسعه می‌باشد بطوری که اکثر قربانیان آن را کودکان زیر ۶ سال تشکیل می‌دهند. تشخیص سریع عامل اتیولوژیک این بیماری به لحاظ جلوگیری از مرگ و میر چند ساعته مبتلایان و انتشار سریع در مناطق آلوده، از ارزش والایی برخوردار است (۴،۳،۲،۱).

با توجه به آیدمیهای ایجاد شده از سال ۱۸۱۷ تاکنون و عدم رعایت اصول بهداشتی در این مناطق به ویژه در ایران، معمول کلاسیک صرف نظر از اینکه نیازمند به مواد و لوازم مصرفی در دراز مدت می‌باشند، پاسخ مناسبی را هم ایجاد نمی‌کنند، بنابراین آزمایشی سریع و ساده که بتواند حداقل در مدت ۶-۴ ساعت عامل بیماری را مشخص نماید، نقش مهمی در جهت پیشگیری و درمان (به ویژه در دورافتاده ترین نقاط با امکانات کم) خواهد داشت (۵).

در سال ۱۹۷۳، Kronvall و همکارانش نشان دادند که روش کوآگلوتیناسیون در تشخیص سریع پنوموکوک مفید می‌باشد (۶) سپس در سال ۱۹۸۷ Rahman و همکارانش این روش را در شناسایی ویبریولکره  $O_1$  با استفاده از آنتی بادیهای پلی‌والان مؤثر دانستند (۳).

در ادامه این بررسیها معین گردید که تست کوآگلوتیناسیون به راحتی می‌تواند در تشخیص سریع آنتی ژنهای ویبریولکره در نمونه‌های کلینیکی، به ویژه در مناطق آلوده مؤثر واقع گردد (۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱). اگر چه روشهای متداول سرولوژیکی در شناخت نوع بیماری و تعیین شدت عفونت کمک فراوانی به پزشک معالج می‌نماید، با این وجود دخالت یک سری واکنشهای سرولوژیکی متقاطع بین باکتریهای گرم منفی خصوصاً ویبریولکره با آنتروباکتریاسه، ارزیابی نتایج حاصل از این روش را با اشکالاتی مواجه می‌سازد (۱۳). بنابراین در این تحقیق، برای این واکنشها از

<sup>-۱</sup> (Brain Heart Infusion Agar)

<sup>-۲</sup> (Casein Yeast Extract Agar)

کیفیت پروتئینها اندازه گیری شد.

۵- اتصال آنتی سرم به استافیلوکوک: به ازای یک میلی لیتر از غلظت ۱۰ درصد (V/V)، استافیلوکوک ارئوس تثبیت شده، ۲/منواسپسیفیک ۰ میلی لیتر آنتی سرم اوگاوا یا اینابا با تیتراژ ۱۶۰ اضافه گردید. بعد از ۳ ساعت در حرارت اطاق بر روی شیکر (۱۲۰ rpm)، شستشو داده شد سپس و با استفاده از PBS ۰/۱۵ مولار حاوی ۰/۱ درصد سدیم آزاید، تعلیق ۲ درصد (V/V) از سلول مربوطه تهیه گردید. سپس تعلیق فوق به عنوان محلول ویروکلرا کوآگلوتیناسیون معین و با حجم مساوی از آنتی سرمهای اوگاوا و منواسپسیفیک اینابا، مخلوط شد و در آزمایشات به صورت بی‌والانت مورد استفاده قرار گرفت و به منظور افزایش ویژگی تست و اشغال محلهای احتمالی خالی در سطح خارجی استافیلوکوک، محلول فوق با گاما گلوبولین خرگوش نرمال به مدت نیم ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید.

روش آزمایش کوآگلوتیناسیون

جهت رشد سریع ویروکلره در نمونه‌ها، سوآب رکتال را در آب پپتونه محتوی ۰/۵ درصد توروکولات سدیم قرار داده شد و به مدت ۵ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری گردید و به دو روش کشت کلاسیک (۱۲) و کوآگلوتیناسیون، مورد آزمایش قرار گرفت. همراه با کنترل‌های منفی و مثبت، بر روی اسلاید پاک و تمیز یک قطره از کشت فوق را با یک قطره محلول VBCR مخلوط کردیم و پس از ۲ تا ۳ دقیقه کوآگلوتیناسیون توسط چشم غیر مسلح و میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت. این تست در صورتی مثبت تلقی می‌شود که کوآگلوتیناسیون در VBCR و کنترل مثبت، مشخص شود و در کنترل‌های منفی هیچگونه واکنشی مشاهده نگردد.

## بحث

تست کوآگلوتیناسیون در تشخیص ویروکلره O<sub>1</sub> از ارزش بالایی برخوردار است، زیرا صرفاً در عرض ۵ ساعت نتایج آن قابل حصول خواهد بود. همچنین می‌توان حساسیت و ویژگی تست را بمنواسپسیفیک استفاده از آنتی سرمهای تخلیص شده افزایش داد. بدین منظور، در تحقیقات حاضر جهت حذف آنتی‌بادیهای ناخواسته علیه شاخصهای آنتی‌ژنیک موجود (در فلازلا، پورینها، پپلی و غیره) از آنتی‌بادیهای پای‌والان و سوش هترولوگ استفاده شده است. به علاوه جهت افزایش حساسیت و ویژگی، IgG مربوط به روش پرسبیبتاسیون سولفات آمونیوم تخلیص گردید بطوریکه متحینهای ۱، ۲، ۳، ۴ الکتروفورز موید این مطلب می‌باشند. بنابراین تست قابل ملاحظه‌ای از آنتی‌بادی به منواسپسیفیک دست آمد که در بررسی فوق جهت اتصال آن به استافیلوکوک NCTC - 8325 از تیتراژ معادل ۱۶۰ استفاده شده است. در بررسی بیشتر به منظور افزایش راندمان اتصال IgG به استافیلوکوک NCTC - 8325 عوامل شیمیائی متعددی نظیر فرمالدئید، گلو تار آلدئید و پروپانل ۱ در غلظت و زمانهای مختلف به کار گرفته شد بطوریکه پروپانل ۱ در غلظت ۵۰ درصد و زمان ۳

فیکسائیوهای مختلفی نظیر فرمالدئید ۵/۰ درصد، گلو تار آلدئید ۵/۰ درصد و پروپانل ۱ (۵۰ درصد) در زمانهای ۳۰ و ۱۸۰ دقیقه در حرارت آزمایشگاه به تعلیق فوق اضافه نمودیم و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد بر روی روتاری شیکر قرار دادیم. پس از سه بار شستشو به کمک لوله‌های کینز، تعلیقی برابر ۱۰ درصد حجم سلولی در PBS (pH = ۷/۲) از سوش فوق‌الذکر تهیه و برای رویت واضحتر آگلوتیناسیون از متیلن بلو ۱ درصد و لوگل، جهت رنگ آمیزی استفاده گردیدند.

۵- کنترل منفی: تعلیق ۲ درصد استافیلوکوک cowan 1 NCTC-8325 تثبیت شده با پروپانل ۱ درصد و حرارت که گاما گلوبولین نرمال خرگوش به آن متصل گردیده بود، به عنوان اولین کنترل منفی و تعلیق ۲ درصد استافیلوکوک ارئوس NCTC-8325 تثبیت شده با پروپانل (۵۰ درصد) و حرارت به عنوان دومین کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفت.

۶- کنترل مثبت: تعلیقی از ۵×۱۰<sup>۱۰</sup> ویروکلرا اینابا و اوگاوا کلاسیک، به صورت بی‌والانت به عنوان کنترل مثبت تهیه شد.

II- تهیه آنتی سرمها

قبل از ایمونیزاسیون، سرم خرگوشها برای احتمال وجود آنتی‌بادی علیه ویروها و استافیلوکوک ارئوس به وسیله آگلوتیناسیون لوله، غربالگری گردیدند و صرفاً خرگوشهایی که تیتراژ کمتر از ۱/۴۰ از خود نشان دادند، جهت تهیه آنتی سرم مورد استفاده قرار گرفتند.

۱- برنامه تزریق: در روزهای اول، سوم، پنجم و هفتم به ترتیب ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ میلی لیتر و به غلظت ۹×۱۰<sup>۸</sup> سلول در میلی لیتر از آنتی‌ژنهای مربوط از طریق رگ مارژینال گوش، به خرگوشهای انتخابی تزریق شد و سپس در روزهای چهاردهم و شانزدهم، ۲/۵ و ۳ میلی لیتر از آنتی‌ژنهای فوق به عنوان دوز یادآور مورد استفاده قرار گرفت. پس از ده روز استراحت از کلیه خرگوش‌ها خونگیری شد و سپس سرم آنها نیز تهیه گردید. سرمهایی که تیتراژ بالای ۶۴۰ از خود نشان دادند، به صورت سرم ذخیره (Pool) در ۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

۲- جذب آنتی‌بادیهای ناخواسته: ابتدا توده‌ای از جسم سلولی و ویروکلره اوگاوا و اینابا را به صورت جداگانه با سرمهای ذخیره هترولوگ مخلوط نموده، به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد (بر روی شیکر ۱۴۰rpm) و ۱۶ ساعت در ۴ درجه سانتیگراد قرار دادیم و پس از سانتریفوژ، سرم منواسپسیفیک تهیه شده مورد استفاده واقع گردید.

۳- تخلیص گاما گلوبولینهای منواسپسیفیک: ابتدا به کمک سولفات آمونیوم ۴۵ درصد، گاما گلوبولینهای از منواسپسیفیک سرمهای فوق تخلیص و پس از سانتریفوژ، رسوب مربوط را در حداقل حجم (۷/۲PBS) حل و یونهای موجود توسط کیسه دیالیز خارج گردید.

۴- اندازه‌گیری میزان پروتئینها: با استفاده از روش بیوره و الکتروفورز استات سلولز (Helena france 95320) میزان کمی و

آلفا ۱، آلفا ۲، بتا و گاما گلوبولین می‌باشند، حال آنکه در منحنیهای ۲ و ۴ پس از تخلیص، پیکهای آلبومین، آلفا ۱ و آلفا ۲ از بین رفته‌اند. همچنین میزان گاما گلوبولین در منحنیهای مذکور به ترتیب معادل ۶/۶۷٪ و ۳/۷۱٪ می‌باشد.

جهت تهیه VBCR و بالا بردن راندمان اتصال استافیلوکوک - C 8325 منواسپیسفیک NCT با آنتی‌سرمهای از فیکساتیوهای مختلف نظیر: فرمالدئید ۵/۵ درصد، گلو تارالدئید ۵/۵ درصد و پروپانل ۱، ۵۰/۵۰) استفاده گردید.

چنانچه در جدول ۱ مشاهده می‌گردد، بیشترین اتصال توسط پروپانل ۱ (۵۰٪)، دردمای آزمایشگاه به مدت ۳ ساعت بر روی شیکر (۱۲۰rpm)، مشخص شد و درصد چسبندگی IgG در سرم منواسپیسفیک محتوی آنتی‌بادیهای اوگاو و اینابا با استفاده از تکنیک SRID به روش مانسینی به ترتیب بیش از ۸۳ و ۸۲/۸ درصد گزارش گردید.

همچنین غلظتهای مختلف ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ درصد از تعلیق (VBCR) تهیه و آزمایش کوآگلوتیناسیون با ویبریکلره استاندارد انجام شد که در نهایت غلظت ۲ درصد از تعلیق فوق به عنوان بهترین معرف (reagent) مورد استفاده قرار گرفت.

تعداد ۲۱۹ نمونه سوآب رکنال جمع‌آوری شده از ۴ مرکز معتبر بهداشتی - درمانی با بایل پیتون براث تلقیح شد و پس از ۵ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد به دو روش کشت کلاسیک و کوآگلوتیناسیون مورد آزمایش قرار گرفتند.

چنانچه در جداول ۲ و ۳ ملاحظه می‌گردد، از ۱۰۴ مورد مثبت (۴۷٪) و ۱۲۵ مورد منفی در روش کشت کلاسیک، فقط یک مورد مثبت کاذب (ویژگی<sup>(۱)</sup>) و ۵ مورد منفی کاذب (حساسیت<sup>(۲)</sup>) به روش کوآگلوتیناسیون مشاهده گردید، بنابراین ضریب اطمینان این آزمایش معادل ۹۹/۲ درصد ویژگی و ۹۵/۱ درصد حساسیت رانشان می‌دهد، و نتایج این تست نه تنها در مدت زمان کوتاهی قابل دسترسی است، بلکه روشی قابل اطمینان و تقریباً معادل روش کشت کلاسیک و ویبریکلره می‌باشد.

ضمناً جهت سنجش پایداری VBCR، تعلیق فوق در زمانهای ۱ و ۲ و ۳ و ۴ و ۵ ماهه در دمای ۴ درجه سانتیگراد مورد آزمایش قرار گرفت و در شرایط مذکور اتوآگلوتیناسیون و کاهش تیتراژ ملاحظه نگردید.

### تشکر و قدردانی

از کلکسیون باکتریهای استاندارد بخش واکنشهای باکتریایی و تهیه آنتی‌ژن انستیتو پاستور ایران (CSBPI) به جهت اهداء دو سویه ویبریکلره (اوگاو و اینابا) و آقای تهرانی عضو هیئت علمی گروه بیوشیمی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس که سوش استافیلوکوک ارتوس کان ۱ را در اختیار قرار دادند و همچنین اساتید راهنما و مشاور قدردانی می‌گردد.

ساعت به عنوان مناسبترین فیکساتیو، انتخاب شد و توسط تفکیک ایمنو دیفوزیون منفرد شعاعی (SRID) مورد ارزیابی قرار گرفت.

از عواملی که ممکن است در ارزیابی نتایج حاصل شده اختلال ایجاد نماید، احتمال وجود نواحی خالی باقی مانده در پروتئین A می‌باشد که توسط IgG منواسپیسفیک اشغال نگردیده باشد. که در این صورت واکنش مثبت کاذب توسط کوپور و آنتی‌بادیهای طبیعی ایجاد خواهد شد. بنابراین مجدداً VBCR در معرض سرم نرمال خرگوش قرار گرفته، سپس عدم آگلوتیناسیون تعلیق فوق به کمک گلوبول قرمز گوسفند حساس شده با IgG تأیید گردید.

با توجه به اینکه زمان انجام آزمایش کوآگلوتیناسیون کوتاه است و حساسیت (۹۵/۱٪) و ویژگی (۹۹/۲٪) تست به روش کلاسیک کشت نزدیک می‌باشد، بنابراین تست مذکور به روش کلاسیک کشت برتری خواهد داشت زیرا از تعداد ۱۲۵ مورد منفی در کشت کلاسیک که ۲۳ نمونه آن ویبریکلره O<sub>1</sub> - non شناسائی شدند، با تست کوآگلوتیناسیون نیز نتیجه منفی تشخیص داده شد و تنها در یک مورد (اثرس ئیدروفیلا) نتیجه تست فوق مثبت بود. بطوریکه پس از حرارت دادن تعلیق میکروبی (۷۵ درجه سانتیگراد، ۵ دقیقه) واکنش متقاطع برطرف گردید. همچنین از ۱۰۴ مورد مثبت در کشت کلاسیک به روش آگلوتیناسیون صرفاً ۵ مورد منفی کاذب مشاهده شد. بررسیهای فوق نشان می‌دهد که با استفاده منواسپیسفیک از آنتی‌بادیهای ویبریکلره O<sub>1</sub>، فیکساتیو مناسب (پروپانل ۱ و ۵۰٪)، اشغال نواحی خالی پروتئین A با سرم نرمال خرگوش و نهایتاً با حرارت دادن تعلیق میکروبی کشت ۵ ساعته در موارد مثبت کاذب، می‌توان حساسیت و ویژگی تست را به ترتیب تا ۹۵/۱٪ و ۹۹/۲٪ افزایش داد.

### نتایج

در تحقیقات حاضر، ابتدا آنتی‌ژنهای تزریقی، پس از جذب و سنجش عیار از سوشهای اوگاو (Ogawa - NIH - 41) و اینابا (Inaba - 35 - A3) و آنتی‌ژن کوآگلوتیناسیون از سویه استافیلوکوک 8325 - NCTC آماده شد و براساس برنامه تزریقی استاندارد، آنتی‌بادی پلی‌والان ویبریکلره تهیه گردید. آنتی‌بادی پلی‌والان قبل از جذب علیه آنتی‌ژنهای اوگاو و اینابا به ترتیب تیتراژ معادل ۱/۲۵۶۰ و ۱/۶۴۰ از خود نشان دادند که پس از جذب با آنتی‌ژن اینابا تیتراژ مذکور علیه سوش هومولوگ و هتروولوگ به ترتیب معادل ۱/۱۲۸۰ و صفر به دست آمد و بطور متشابهی نیز روش فوق منواسپیسفیک جهت تهیه آنتی‌سرم اینابا انجام گرفت و پس از جذب با آنتی‌ژن اوگاو سنجش عیار علیه سوشهای هومولوگ و هتروولوگ به ترتیب معادل ۱/۶۴۰ و صفر ارزیابی گردید که نشان دهنده جذب کامل آنتی‌بادیهای ناخواسته می‌باشد. سپس به روش رسوب با سولفات آمونیوم (۴۵ درصد)، دو آنتی‌سرم منواسپیسفیک فوق تخلیص و تغلیظ شد. همانطوریکه در منحنیهای ۱ و ۳ مشاهده می‌شود، سرم منواسپیسفیک قبل از تخلیص ۵ پیک از خود نشان می‌دهد که به ترتیب شامل: آلبومین،

۱ - درصد منفی های واقعی تست کوآگلوتیناسیون که پرورش کشت کلاسیک منفی گزارش شد.

۲ - درصد مثبت‌های واقعی تست کوآگلوتیناسیون که پرورش کشت کلاسیک مثبت گزارش شد.

جدول (۱) درصد چسبندگی IgG به استاینتوکوک NCTC - 8325 با استفاده از فیکساتیو در زمانهای مختلف

فیکساتیو	زمان برحسب ساعت	درصد چسبندگی آنتی سرم منواسپیسفیک اوگادرا	درصد چسبندگی آنتی سرم منواسپیسفیک اپنایا
پروبانل (۱/۵۰)	۰/۵	ND <sup>(۱)</sup>	۷۸/۵
	۳	ND	۸۲/۸
گلو تار آلدئید (۱/۵)	۰/۵	۵۷	۷۳/۱۷
	۳	۵۹/۲۵	۷۳/۷
فرمالدئید (۱/۵)	۰/۵	ND	۷۸/۳
	۳	ND	۷۵/۵

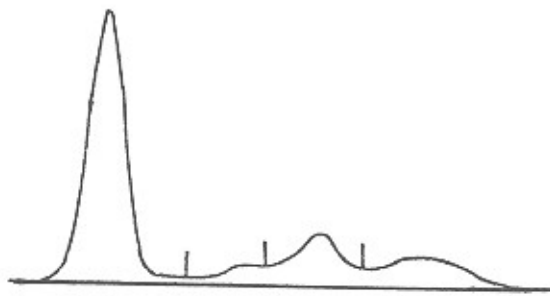
(۱) Non Detectable

جدول (۲) نتایج کشت کلاسیک و کوآگلوتیناسیون

روش	تعداد نمونه‌ها	
	مثبت	منفی
کشت کلاسیک	۱۰۴	۱۲۵
کوآگلوتیناسیون	۹۹	۱۳۰

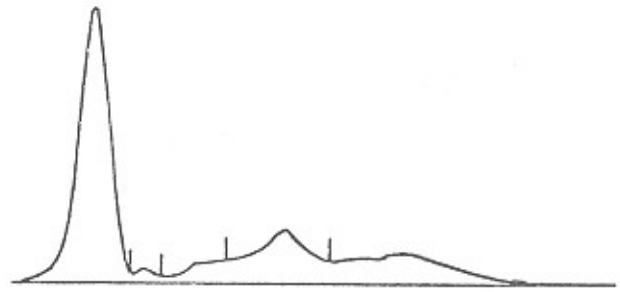
جدول (۳) مقایسه نتایج کوآگلوتیناسیون با کشت کلاسیک در تشخیص ویبریکلره O<sub>1</sub>

نتیجه کوآگلوتیناسیون	تعداد کشت‌ها	
	مثبت	منفی
مثبت	۹۹	۱
منفی	۵	۱۲۴



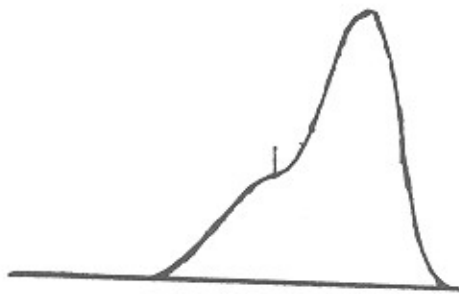
G/DL	درصد	
۳/۸	۶۲/۸	۱
۰/۳	۳/۹	۲
۱	۱۷/۲	۳
۰/۹	۱۵/۱	۴
۶		مجموع

شکل (۳) منحنی پروتئین‌های عمده سرم خرگوش تزریق شده با آنتی ژن ایندیا پس از جذب با آنتی ژن اوگارا



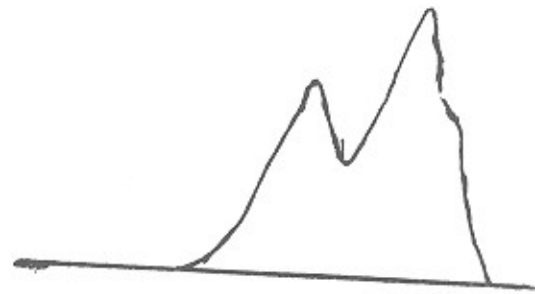
G/DL	درصد	
۳	۵۵/۷	آلبومین
۰/۱	۱/۵	آلفا ۱
۰/۳	۵/۳	آلفا ۲
۱	۱۹/۱	بتا
۱	۱۸/۲	گاما
۵/۲		مجموع

شکل (۴) منحنی پروتئین‌های عمده سرم خرگوش تزریق شده با آنتی ژن اوگارا پس از جذب با آنتی ژن ایندیا



G/DL	درصد	
۱/۳	۲۸/۷	۱
۳/۱	۷۱/۳	۲
۲/۳		مجموع

شکل (۵) منحنی گلوبولین‌های مونواسپسیفیک ایندیا پس از تجزیه



G/DL	درصد	
۱	۳۲/۲	۱
۲/۲	۶۷/۶	۲
۳/۲		مجموع

شکل (۶) منحنی گلوبولین‌های مونواسپسیفیک اوگارا پس از تجزیه

## مراجع

- 1 - Laliha M K, Sridharan G , Mercy. Indian J Pediatr. 1989; 56 327.
- 2 - Jesudason. MV, Thangavelu CP, Lalitha M. J. Clin Microbiol.1984; 712.
- 3 - Rahman, Sack DA, Saleh Mahmood, adn Anawat Hossein. J Clin Microbiol 1987; 11 : 2204.
- 4 - Rahman M, Sack D A Wadood. A, Yasmin. M and A. J Med Microbiol 1989;28 : 39.
- 5 - Lesmana M, Rockhill D. Sutanti, Asutomo. J Trop Med 1982. 13 : 377.
- 6 - Kronvall G.J Med Microbito. 1973; 6 : 187.
- 7 - Edwards E A, Hildebrand RL. J. Clin Microbiol. 1976; 3 : 339.
- 8 - Hay FC. Practical Immunology 2, Third Edition , 1989.
- 9 - Gray LD, Fedorko DP. J clin Microbiol Rev. 1992; S(2): 130.
- 10 - Aboott SL, Yand JM. J Infact Dis. 1993; 188 : 707 .
- 11 - Dhanlakshmi D, Mallika, Kumaravle MBhabani, Lakshminarayanacs. Idian J Pathol Microbiol 1984 ; 27 : 33.
- 12 - Koneman et al. Diagnostic Microbiol third ed. 1988 : 211.
- 13 - Winkle S, Refai M Rohde R. Ann Inst pasteur. 1972:123 : 775
- 14 - Hassan JA, Hal A, Tamplin ML, Siebeling RG, Collwell RR. J clin Microbiol. 1994; 32 : 24.
- 15 - Jagannath, Sehgl S.J of Immunological Methods. 1989 ; 124 : 251.