

## 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 می‌گردد.

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 بین‌المللی انسانی T.B.-C، T.B.-DT و T.B.-PN تهیه می‌گردد 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 اختصاصی‌تر و حساس‌تر باشد. باتوجه باین نظر کوشش بعمل آمد که با استفاده از سویه گاوی میکرب سل (سویه بین‌المللی 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 سیب‌زمینی، 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 پرده‌گیری 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 دورسه‌هنلی 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 عصاره‌گیری میشوند سپس بکمک صافی‌های بوخنر Buchner و سایتز Seitz اجرام میکربی از محیط مجزا میشوند چون محیط اولیه فاقد پروتئین بوده است. طبیعتاً پروتئین‌های تولید شده در محیط به واسطه رشد میکرب سل ایجاد شده و کلاً پروتئین سلی می‌باشند. 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 اندازه‌گیری شده میانگین واکنش در جدول ۲ نشان داده میشود:

| شماره خوکچه |      |    |    |    |    |       |
|-------------|------|----|----|----|----|-------|
| ۱۴          | ۱۶/۵ | ۲۰ | ۲۰ | ۱۸ | ۱۴ | ۵۳/۶۸ |
| ۲۳          | ۱۷   | ۱۵ | ۲۰ | ۲۰ | ۲۴ | ۵۳/۶۹ |
| ۲۲          | ۲۰   | ۱۷ | ۱۸ | ۲۵ | ۲۶ | ۵۳/۷۲ |
| ۱۷          | ۲۵   | ۲۴ | ۱۵ | ۱۵ | ۱۷ | ۵۳/۷۴ |
| ۲۲/۵        | ۲۰   | ۱۸ | ۲۴ | ۱۶ | ۲۰ | ۵۳/۷۶ |
| ۱۹          | ۲۱   | ۲۵ | ۲۲ | ۱۵ | ۲۴ | ۵۳/۷۷ |

مجاور میگردد و مجموع یک شب در ۴ درجه قرار داده میشود. روز بعد مایع روغنی خارج و رسوب تشکیل شده دوبار با اسید تریکلراستیک یک درصد و یکبار با نمک طعام ده درصد شسته هربار نیمساعت 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 اندازه‌گیری میشود.

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

عیارسنجی بیولوژیکی:

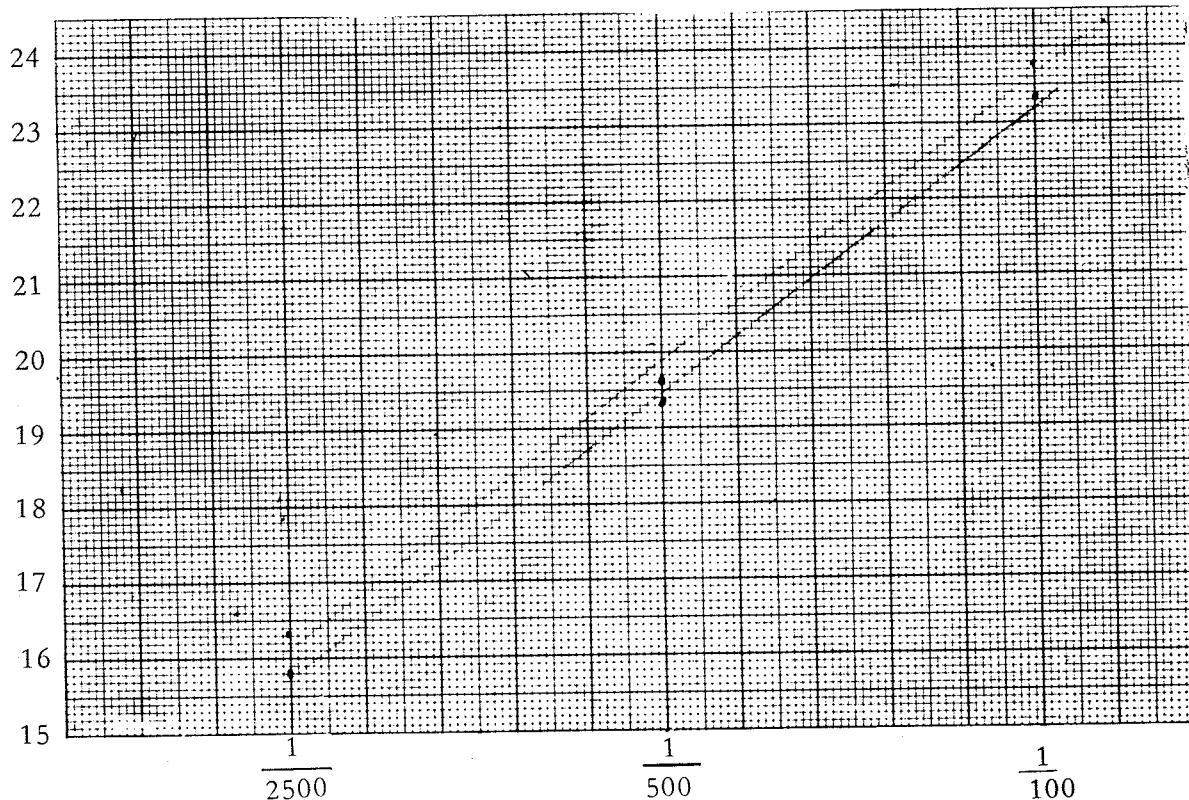
۲۰ سر خوکچه هندی Albinos را انتخاب (۴) و با مخلوط (پودر کشته میکرب سل گاوی و پودر سنگ پا و روغن پارافین استریل) حساس و دو ماه بعد که حساسیت بحد کافی رسید برای آزمایش بکار برده شده‌اند. ده سر از این خوکچه‌ها را موجدینی و شش سر از بهترین آنها انتخاب شده‌اند. توبرکولین رازی تهیه شده را با تامپون فینکه توئین دار به یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر رسانده سپس  $\frac{1}{1000}$  و  $\frac{1}{500}$  و  $\frac{1}{2500}$  رقیق شد. توبرکولین گاوی استاندارد که یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر 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 خوکیجه<br>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 سویه‌های انسانی میکرب سل با سویه‌های سل گاوی این دوسویه میکربی از نظر بعضی از خواص بیوشیمیایی باهم متفاوتند و در حیوانات نیز بیماریزایشان تفاوت می‌کند، به این جهت بنظر می‌آید 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 tuberculin 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.