مجموعه مقالات
چهارمین همایش ملی کاربرد فناوری هسته‌ای در علوم کشاورزی و منابع طبیعی
(۲۹-۳۰ اردیبهشت، ۱۳۹٤، پژوهشکده کشاورزی هسته ای)
The 4th National Congress on Nuclear Technology Application in Agricultural & Natural Resource Sciences (19-20 May, 2015, Nuclear Agriculture Research School)

ارزیابی روش‌های حرارت‌دهی و پرتودهی در تهیه ماده تست توبرکولین (PPD) بیماری سل دامی

غلامرضا شاه حسینی*[۱]، نادر مصوری [۲]، علی اکبر محمدی [۲]، کیوان تدین [۲]، مرتضی یوسفی[۱]
پژوهشکده کشاورزی هسته ای - پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای [۱]، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی[۲]
*نویسنده مسئول: gshahhosseini@nrcam.org

چکیده: در این تحقیق جهت تولید توبرکولین از روش‌های از جمله انتخاب محیط کشت مناسب سویه‌های استاندارد *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* و روش مناسب ترسیب و اندازه‌گیری پروتئین در فرایند تولید توبرکولین مورد بررسی قرار گرفت. علاوه بر این برای کشتن باکتری از حرارت بخار آب ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد (به مدت۳ ساعت) و روش پرتوتابی گاما استفاده گردید. نتایج بدست آمده نشان داد محیط مایع دورس هنلی اصلاح شده بهترین محیط سنتتیک فاقد پروتئین برای رشد باکتری مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می‌باشد. بر طبق این پژوهش مقدار توبرکلوپروتئین حاصله از ترسیب با سولفات آمونیوم بیشتر از ترسیب با تری کلرواستیک اسید می‌باشد این در حالی است که تفاوت معنی‌داری بین قدرت توبرکلوپروتئین‌های حاصله در تست بخش تکثیر و تمایز لنفوسیتی (LTT) مشاهده نشد. علاوه بر این نتایج نشان داد که در بین دزهای مورد استفاده دز ۸ کیلوگری باعث نابودی کامل باکتری و دز ۷ کیلوگری باعث کاهش قابل توجهی از آن گردید. در روش پروتئین سنجی توبرکولوپروتئین روش برادفورد به دلیل حجم بالای پروتئین تولید شده در فرآورده در مقایسه با روش کجلدال مناسب تر می‌باشد. آنتی ژن‌های باسیل‌های زنده سل تهیه شده بروش سونیکاسیون اگر چه از نظر قدرت سنجش پاسخ‌های ایمنی دارای توانایی موثرتری است اما به دلیل حضور احتمالی باسیل‌های زنده سل در آن برای تولید انبوه مناسب نمی-باشد و فقط برای استفاده‌های تحقیقاتی مناسب است.

واژگان کلیدی: *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس*، پرتو گاما، پرتوتابی، تست توبرکولین، حرارت دهی

Evaluation Heat & Irradiation Methods for Preparation of Purified Protein Derivative (PPD) in Animal Tuberculosis

*G. Shahhosseini[1], N. Mosavari [2], A. Mohammadi [2], K. Tadayon[2], M.Yousefi[1]
Agricultural Nuclear Agriculture Research School – Nuclear Science and Technology Research Institute[1], Vaccine & Serum Production Razi Institute[2]
gshahhosseini@nrcam.org

Abstract: This research project was conducted to evaluate different methods currently used for production of PPD Tuberculin. In this project it was tried to choose the most suitable liquid medium, determine the safest method for killing Mycobacteria and find out the best methods for the precipitation of Tuberculoproteins as well as the measurement of proteins. Also, we used of two way for for killing this organism (100 degree celsious steam water during three hours and gamma irradiation). It was concluded that Dorse-Henley was the best synthetic liquid medium. The result showed that steam water in the safest method for killing Mycobacteria and 8 Kilo gray Gamma radiation can kill all of the Mycobacteria but 7 Kilo Gray Gamma radiation can reduce of numerous Mycobacteria. The results also showed that the average Tuberculo-protein product by Ammonium Sulphate was higher than those products by TCA method and precipitation by Ammonium Sulphate was the simplest way to reach such precipitation and Kjeldal method for measuring Tuberculoproteins was more applicable.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, Gamma radiation, Irradiation, Tuberculin Test, Heating.

مقدمه

سازمان بهداشت جهانی (WHO) برآورد کرده است که تقریبا ۳۳٪ جمعیت جهان به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (M.TB) آلوده می‌باشند [۱, ۲]. سالانه بین ۸ تا ۹ میلیون نفر به سل مبتلا شده و ۲ میلیون نفر از سل می‌میرند [۳-۵]. با توجه به گسترش جهانی بیماری ایدز و تاثیر آن بر بیماری سل و نیز ایجاد مقاومت چندگانه آنتی بیوتیکی به باکتری سل، روز به روز بر نگرانی-ها افزوده می شود [۱, ۶]. آزمایش پوستی توبرکولین وسیله قابل اطمینانی برای بررسی عفونت‌های اولیه مایکوباکتریومی است. تفسیر درست این آزمایش به دقت و اطلاعات کافی نیاز دارد. در این آزمایش آنتی ژن مناسب، مشتق پروتئین خالص شده توبرکولین (purified protein derivative - PPD) می‌باشد[۷, ۸].

امروزه از پرتو گاما در پزشکی استفاده‌های زیادی می‌شود. ثابت شده است که از این پرتو در راستای ضعیف ساختن و یا از بین بردن عوامل بیماری‌زا برای دامنه وسیعی از پاتوژن‌ها بطور موفقیت آمیزی استفاده گردیده است [۹]. غیر فعال کردن پاتوژن با پرتودهی قبل از اینکه به مرحله بیماری‌زایی برسد سطح بالایی از ایمنی را ایجاد می کند [۱۰]. واکسن‌های که بوسیله کشته شدن عوامل باکتریایی توسط مواد شیمیایی و یا حرارت تولید می شوند، فاقد ایمنی زایی لازم می‌باشند، بنابراین در این تحقیق تلاش شده است تولید واکسن توبرکولین با بکارگیری پرتو گاما، مورد آزمایش قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

مرحله ۱: سویه‌های مختلف باکتری مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (*Mycobacterium tuberclosis*) (C (ATCC No: 35808, TMC116)، DT (ATCC No: 35810, TMC119)، PN (ATCC No: 35809, TMC117)) در محیط لوانشتین گلیسرین‌دار اصلاح شده ، سوتن اصلاح شده (Modified Sauton) و دورس هنلی اصلاح شده (Modified Dorset Henley) بصورت مجزا ده نوبت کشت گردید. پرگنه‌های میکروبی شناور پس از تشکیل در محیط کشت برداشته شده و به ظروف محتوی محیط کشت مایع انتقال داده شدند.

مرحله ۲: پس از دوره انکوباسیون، دو ارلن کشت شده سویه DT در محیط دورس هنلی انتخاب و یکی از آنها درون اتوکلاو بمدت سه ساعت در معرض بخار آب با دمای ۱۰۰ درجه قرار داده شد و دیگری در بن ماری ۸۰ درجه به مدت یک ساعت قرار گرفت. سپس برای مشخص شدن روش مناسب از بین بردن باکتری از هر ارلن بصورت جداگانه در محیط لوانشتین جانسون گلیسرین دار کشت تهیه گردید. در مرحله بعد تعداد ۴۴ بطری از سویه DT در محیط کشت دورس هنلی در معرض پرتو گاما ساطع شده از کبالت ۶۰ با دزهای ۱ تا ۸ کیلو گری با استفاده از گاماسل (Gamma cell PX-30-ISSIE, Russia) با دز ۰/۲۶ گری برثانیه پرتودهی شد. سپس بمدت ۱۲ ماه تحت مطالعه قرار گرفت و از هر بطری بروش MGIT کشت تهیه گردید تا مشخص شود برای از بین بردن باکتری‌های موجود در هر ظرف چه دزهایی مناسب می‌باشد.

مرحله ۳: ارلن حاوی کشت ۲ ماهه سویه‌های C، DT و PN (از هر سویه یک ارلن) انتخاب و با بخار آزاد ۱۰۰ درجه گرمادهی گردید. سپس عصاره از جرم باکتری توسط فیلتر واتمن ۱ و فیلترهای ۰/۸، ۰/۴۵ و ۰/۲۲ میکرون مجزا شد. بعد از این مرحله عصاره هر سه کشت مخلوط و به دو قسمت مساوی تقسیم گردید. یک قسمت توسط سولفات آمونیوم ترسیب و در یک سوم حجم اولیه با تامپون فسفاته مخلوط و در کیسه دیالیزی استریل ریخته شده و پس از آن در مجاورت آب مقطر

در ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت به نحوی که مگنت به آرامی زیر آن حرکت می‌نمود. در قسمت دیگر توبرکولوپروتئین با اضافه نمودن تری کلرواستیک اسید (TCA) ۰/۴۰ به میزان ۹ به ۱ ترسیب داده شد و سپس محلول رویی دور ریخته و رسوب باقیمانده یکبار با TCA ۰/۱۰ و سه بار با نمک‌های فسفاته شستشو گردید. حجم حاصله از هر دو روش یکسان گردید (۴۹۰ میلی‌لیتر) و به هر دو توبرکولین بدست آمده، جداگانه افزودنی‌های لازم اضافه گردید.

مرحله ٤: جرم‌های مجزا شده پس از تصفیه توسط دستگاه Sonication با پروبی به قطر دو سانتی‌متر و تقویت (Amplitude) ۱۰۰ الی ۱۵۰ با فاصله زمانی‌های سه دقیقه در مجاورت یخ تخریب و سوسپانسیون حاصله با دور ۱۰۰۰۰ RPM سانتریفوژ گردید و محلول رویی از فیلتر ۰/۸ و ۰/۲۲ میکرون عبور داده شد. سپس پروتئین آن به روش کجلدال اندازه‌گیری گردید (این مرحله یک بار با جرم‌های کشته شده با بخار آب ۱۰۰ درجه و یک بار با جرم زنده انجام شد).

مرحله ٥: توبرکولوپروتئین بدست آمده در مرحله سوم با روشهای کجلدال و برادفورد پروتئین سنجی گردیدند:

تعیین غلظت پروتئین با روش برادفورد: رنگ آمیزی پروتئین به کمک ماده رنگی کوماسی بریلیانت بلو G-250 (Coomassie Brilliant Blue) و به کمک اسپکتروفتومتر با نور مرئی قابل خواندن می‌باشد. در این روش رنگ کوماسی بلو مستقیم با پروتئین‌ها ترکیب و حداکثر جذب نوری آن از ۴۶۵ نانومتر قبل از ترکیب به ۵۹۵ نانومتر بعد از ترکیب با پروتئین تغییر می-کند. در پایان ۲۰ لوله آزمایش برای استاندارد و ۲ لوله برای شاهد و ۲ لوله نیز برای مجهول در نظر گرفته شد. جذب نوری هر لوله طی مدت ۲ دقیقه تا ۱ ساعت در طول موج ۵۹۵ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر خوانده شد. اندازه‌گیری پروتئین با روش کجلدال (Kjeldahl): برای اندازه‌گیری پروتئین ، از روش ذکر شده در AOAC استفاده گردید.

مرحله ٦: حساس سازی خوکچه‌های هندی مورد مطالعه: تعداد یک صد سر خوکچه هندی نر سفید آلبینو بوزن تقریبی ۳۵۰ الی ۵۰۰ گرم انتخاب و تمام آنها با استفاده از سوسپانسیون حساس کننده حساس گردیدند. پس از گذشت دو ماه از دوازده عدد از ۲۵ سر خوکچه هندی که زنده باقی مانده بود (Potency test) خون‌گیری انجام گرفت. تست LTT (Lymphocyte Transformation Test): در انتهای هفته هفتم از خوکچه‌ها خونگیری به روش داخل قلبی انجام و سپس نمونه های خون در لوله‌های استریل محتوی 5 IU/ml هپارین جمع‌آوری گردید و مراحل مختلف روی آن انجام گرفت:

خون کامل به مدت پانزده دقیقه در g ×۳۰۰ سانتریفوژ و پلاسمای آن خارج گردید. ۳ میلی‌لیتر فایکول و یا هیستوپک Sigma H8889 – در داخل لوله‌های ۱۰ میلی‌لیتری استریل Nunc - 342880 ریخته و مقدار ۷ میلی‌لیتر خون به هر کدام اضافه گردید و به مدت ۲۰ دقیقه با دور g ×۲۰۰ سانتریفوژ گردید. منطقه تجمع گلبول‌های سفید منونوکلئر (Buffy Coat) به آرامی جمع-آوری و یک بار با محیط کشت RPMI-1640 (Sigma) و بار دیگر با محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۵ درصد سرم جنین گاوی به مدت پانزده دقیقه در دور g ×۲۵۰ شستشو داده شد. محیط کشت رویی خارج و سلول‌ها شمارش و درصد زنده بودن آنها تعیین گردید. سلول‌ها به تعداد چاهک ^{6} ۱۰×۲ به پلیت‌های کشت سلولی استریل ۹۶ خانه‌ای منتقل شدند و به هر خانه تا ۲۰۰ میکرولیتر از محیط RPMI-1640 با ترکیبات mM/ml ۵ از ۱-گلوتامین، IU/ML ۱۰۰ پنی‌سیلین، µg/ml ۱۰۰ استرپتومایسین و ۰/۲۰ سرم جنین گاوی اضافه گردید. به ردیف‌های اول و دوم به ترتیب g/ml µ۵ و µg/ml ۱۰ از پروتئین رسوبی با TCA، ردیف‌های سوم و چهارم به ترتیب µg/ml ۵ و µg/ml ۱۰ از پروتئین رسوبی با سولفات آمونیوم و ردیف

پنجم µg/ml ۵ و µg/ml ۱۰ PPD استاندارد اضافه گردید. روز پنجم به هر چاهک (Well) مقدار µci ۱ تیمیدین رادیواکتیو اضافه و مجددا در انکوباتور قرار داده شد. پس از ۱۶ ساعت پلیت‌های محیط کشت خارج و با استفاده از دستگاه هاروستر (Cell Harvester) و فیلترهای Glass fiber هاروست شدند. فیلترهای محتوی سلول‌های جمع‌آوری شده جهت شمارش آماده گردیدند. سپس توسط دستگاه شمارش‌گر بتا (Pharmacia Wallack B-Counter) میزان پرتو در هر دقیقه برای هر چاهک شمارش گردید.

روش‌های کالیبراسیون توبرکولین‌های بدست آمده در خوکچه‌های هندی

از توبرکولین‌های بدست آمده به کمک روش ترسیب با TCA و سولفات آمونیوم دو محلول به غلظت µg/ml ۲ با استفاده از تامپون فسفاته تهیه گردید. سپس با استفاده از تامپون فسفاته رقت‌های ۱/۲۰۰، ۱/۱۰۰۰ و ۱/۵۰۰۰ فراهم گردید. با افزودن یک میلی‌لیتر آب مقطر به محتویات یک ویال توبرکولین استاندارد (PPD-81 Sub Lot B-1) محلولی به غلظت IU/mL ۵۰۰۰ تهیه و از این محلول سه رقت IU/mL ۵۰۰، IU/mL ۱۰۰ و IU/mL ۲۰ تهیه شد. در مجموع یک محلول تامپون فسفاته بدون توبرکولین به عنوان شاهد و ۹ محلول با رقت‌های مختلف توبرکولین آماده تزریق فراهم گردید.

تزریق رقت‌های مختلف توبرکولین: در پهلوهای هر خوکچه هندی هشت نقطه برای هر تزریق در نظر گرفته شد. محل‌های تزریق به‌ترتیب از قسمت سر به طرف دم حیوان با حروف A، B، C، D در سمت راست و E، F، G و H در سمت چپ مشخص گردیدند. تمام تزریق‌ها سبه‌صورت داخل جلدی و به میزان ۰/۲ میلی‌لیتر انجام شد.

اندازه‌گیری واکنش‌ها: قطر واکنش‌ها ۲۴ ساعت پس از تزریق به کمک پرگار و خط‌کش اندازه‌گیری شد. پس از تعیین موقعیت هر راکسیون که به واسطه قرمزی در اطراف محل تزریق مشخص می‌شد دو قطر عمود بر هم از موضع قرمز شده انتخاب و معدل دو عدد قرائت شده به‌عنوان راکسیون مربوطه ثبت می‌گردید.

ارزیابی قدرت توبرکولین‌ها: با استفاده از جدول ۱، اندازه راکسیون محلول‌های ده گانه شناسایی و مشخص گردید.

جدول ۱: کدهای شناسایی محلول‌های تزریقی

ردیف	محلول تزریقی	کد شناسایی	ردیف	محلول تزریقی	کد شناسایی
۱	T1	۱	۶	SA3	۶
۲	T2	۲	۷	S1	۷
۳	T3	۳	۸	S2	۸
۴	SA1	۴	۹	S3	۹
۵	SA2	۵	۱۰	P	۱۰

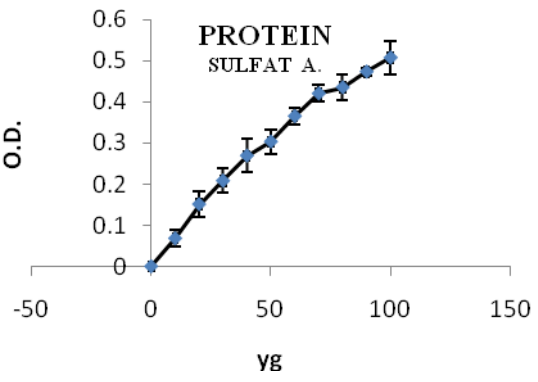
T= Trichloroacetic Acetic Acid; SA= Sulphate Amonium; S= Standard

نتایج

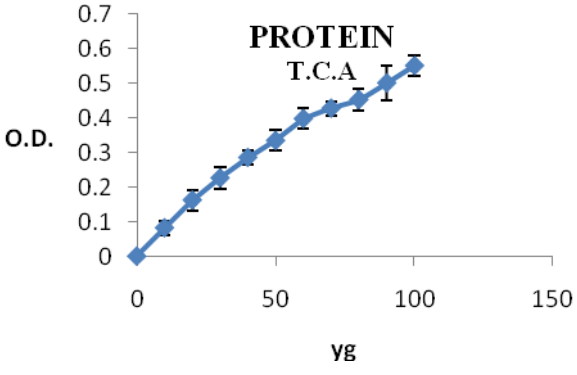
مرحله اول نشان داد که برای رشد سویه‌های استاندارد *M. tuberculosis* بصورت انبوه در محیط مایع، محیط کشت دورس هنلی تغییر یافته مناسب‌تر ازمحیط کشت سوتن می‌باشد و کشت مستقیم از محیط کشت لوانشتین جانسون به محیط دورس هنلی به آرامی و دقت امکان پذیر است و با استفاده از این روش برای تولید انبوه دو ماه صرفه‌جویی می گردد.

از بین بردن باکتری توسط حرارت این نتیجه به‌دست آمد که استفاده از سه ساعت حرارت ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد مطمئن‌تر است و در قسمت از بین بردن توسط پرتو مشخص گردید که تابش ۱، ۱/۵ و ۷ کیلو گری به‌میزان زیادی از تعداد باکتری می-کاهد و تابش ۸ کیلوگری باعث از بین رفتن تمام باکتری‌ها می‌گردد. همچنین تایج نشان داد که پس از فیلتر نهایی، توبرکلوپروتئین بدست آمده از ترسیب توسط سولفات آمونیم بیشتر از ترسیب توسط تری کلرو استیک اسید می‌باشد ولی پروتئین استحصالی قبل از فیلتر نهایی در روش ترسیب با TCA بیشتر از ترسیب با سولفات آمونیوم می‌باشد. در روش ترسیب با سولفات آمونیوم پروتئین کلی ۰/۷۵ و پروتئین خالص ۰/۱۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و در روش ترسیب با TCA پروتئین کلی ۱ و خالص ۰/۱۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بدست آمد. پس از اضافه نمودن افزودنی‌های مورد نیاز به توبرکولین‌ها و عبور مجدد آنه از فیلتر ۰/۲۲ میکرون، در روش ترسیب با سولفات آمونیوم پروتئین کلی ۲/۷۸ و پروتئین خالص ۰/۴۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و در روش ترسیب با TCA پروتئین کلی ۱/۷۸ و خالص ۰/۲۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعیین گردید. در روش کشتن باکتری‌ها توسط حرارت، کل پروتئین بدست آمده ۵ mg/ml، پروتئین محلول فیلتر شده بدون جرم ۱/۸۷ mg/ml و پروتئین حاصل از جرم باسیل سونیکه شده به تنهایی ۰/۳۴ mg/ml بدست آمد. در روش دوم (بدون کشتن باکتری)، پروتئین بدست آمده از جروهای سونیکه شده ۰/۸ mg/ml و پروتئین محلول فیلتر شده ۰/۹ mg/ml بدست آمد. که نشان داد استفاده از این روش برای تولید مقادیر زیاد توبرکلوپروتئین مناسب نمی‌باشد.در این مرحله مشخص شد که بدلیل غلظت بالای پروتئین استحصالی، روش کجلدال جهت پروتئین سنجی مناسب‌تر از روش برادفورد (نمودار ۱و۲) می‌باشد.

نتایج تست LTT نشان داد که ضریب تحریک گروه‌هایی که آنتی ژنهای حاصل از ترسیب با سولفات آمونیوم به آنها اضافه



نمودار ۱



نمودار ۲

شد در مقایسه با فیتوهماگلوتنین A (PHA) و PPD استاندارد و PPD حاصل از ترسیب با TCA دارای اختلاف قابل توجهی نمی‌باشند. اگرچه بالاترین مقدار اندیکس تحریکی مربوط به گروهی است که آنتی‌ژن‌های ترسیب شده با TCA و همچنین PPD-S به آن اضافه شده است (SI=2) ولی از نظر آماری معنی‌دار نبود. از نظر تست Potency بر روی خوکچه هندی نیز با اینکه واکنش‌های حاصل از PPD-S و PPD بدست آمده از ترسیب با TCA بیشتر از واکنش‌های حاصل از PPD بدست آمده از ترسیب با سولفات آمونیوم بود ولی از نظر آماری اختلاف معنی‌دار نبود.

ارزیابی قدرت (Potency) توبرکولین‌ها

با بررسی مقایسه‌ای نتایج بدست آمده از کالیبراسیون توبرکلوپروتئین‌های حاصل از TCA و سولفات آمونیوم با توبرکولین استاندارد در خوکچه‌های حساس، مشخص شد که قدرت توبرکلوپروتئین حاصل از ترسیب به روش TCA کاملاً با نمونه استاندارد هم‌خوانی دارد و توبرکلوپروتئین حاصل از ترسیب به روش سولفات آمونیوم از نظر قدرت در محدوده استاندارد نمی‌باشد. به کمک جدول ۲ اندازه راکسیون مربوط به محلول‌های ده‌گانه شناسایی و مشخص گردید.

جدول ۲: خلاصه نتایج راکسیون‌های مربوط به انواع توبرکولین‌های تزریقی در دوازده سر خوکچه هندی

ردیف	محلول تزریقی	تری کلرواستیک			سولفات آمونیوم			استاندارد		
	شماره خوکچه	T1	T2	T3	SA1	SA2	SA3	S1	S2	S3
۱	۶۹۹۰	۱۸/۵	۱۰	–	–	۱۰	–	۲۰/۵	۷	۶
۲	۴۶۰۱	۱۲/۵	–	–	–	۱۰	۱۰	۲۴	۱۷	۸/۵
۳	۴۶۰۳	۹/۵	۹	۱۱	۴/۵	–	۸/۵	۱۰	۹	–
۴	۴۶۰۴	–	۱۳/۵	۱۶	۱۱/۵	۱۱/۵	۱۰/۵	۱۹	۱۰/۵	۱۱/۵
۵	۴۶۰۵	۱۱	۹/۵	–	۱۰/۵	–	۹	۱۵/۵	۱۰	۹/۵
۶	۴۶۰۶	۱۳/۵	–	۱۰/۵	۹/۵	۱۱/۵	۹	–	۱۰	۸
۷	۴۶۰۷	۱۳	–	۸/۵	۱۴/۵	۸	۱۰/۵	–	۹/۵	۱۰
۸	۴۶۰۸	–	۱۰	۹	۱۹	۱۱/۵	۱۲	۱۵	۹/۵	۸/۵
۹	۴۶۰۹	–	۱۴/۵	۹	۲۰/۵	۱۱	۹/۵	۱۲/۵	۱۰/۵	–
۱۰	۴۶۱۰	۱۰/۵	۱۰/۵	۶/۵	۱۰	۱۰	۹/۵	۱۴	–	–
۱۱	۴۶۱۱	۲۰/۵	۱۲/۵	۱۰	۱۵	۹	–	–	۱۲	۹/۵
۱۲	۴۶۱۲	۱۷	۱۱	۱۴	۱۴/۵	۱۰	–	۲۱	–	۱۲
مجموع		۱۲۶	۱۰۰/۵	۹۴/۵	۱۲۵	۹۴/۵	۸۸/۵	۱۵۱/۵	۹۸	۸۳/۵
میانگین		۱۴	۱۱/۱۶	۱۰/۵	۱۳/۸۹	۱۰/۵	۹/۸۳	۱۶/۸۳	۱۰/۸۹	۹/۲۷
Total (T)		۳۲۱			–	–	–	–	–	–
Total (SA)		–	–	–	۳۰۸			–	–	–
Total (S)		–	–	–	–	–	–	۳۲۳		

بحث

نتایج بدست آمده در پایان مرحله اول تحقیق جهت کوتاه کردن پروسه طولانی کشت باکتری‌های استاندارد م.توبرکولوزیس نشان داد که باکتری‌های مذکور در محیط دورس هنلی اصلاح شده بهتر از محیط سوتن اصلاح شده رشد می‌کنند که این ممکن است به دلیل برآورده نمودن بهتر نیازهای باکتری م.توبرکولوزیس در محیط دورس هنلی تغییر یافته باشد. در قسمت دوم تحقیق سعی گردید تا حد امکان بنحوی باکتری‌ها را از بین برد تا سایت‌های آنتی ژنیکی دست نخورده باقی بماند و شکل فضایی آنتی‌ژنها بخاطر حرارت زیاد از بین نرود. مشخص شد زمانیکه از حرارت ۸۰ درجه سانتی‌گراد استفاده می‌شود بدلیل اینکه احتمال نرسیدن حرارت به عمق باکتری‌ها زنده باقی می‌مانند و این برای افرادی که دخیل در تولید توبرکولین و مصرف کننده خطرناک است. همچنین مشخص گردید که دز ۸ کیلوگری باعث نابودی کامل باکتری می‌گردد ولی اولاً بدلیل اینکه در این مرحله تنها از کشت‌های کوچک پرتو داده استفاده می‌شد بدست آوردن توبرکولین از این بطری‌های کوچک امکان پذیر نبود و ثانیاً بدلیل اینکه در اینجا مسئله اقتصادی بودن مطرح نبود، باید در طرحی جامعتر دو توبرکولین حاصله از پرتو و حرارت را از نظر اقتصادی با یکدیگر مقایسه نمود. در تحقیقی که توسط گارسیا و همکاران [۱۱, ۱۲] انجام شد دزهای ۱، ۱/۵ و ۷ کیلوگری و در تحقیقی دیگر[۱۳] دز پایین‌تر از ۱ کیلوگری برای از بین بردن باکتری م.توبرکلوزیس مناسب تشخیص داده شد. ولی در این تحقیق بدلیل استفاده از دزهای متعدد رشد باکتری و استفاده از دو جمعیت متفاوت باکتری مشخص گردید که دزهائی که محققان دیگر در زمانی است که تعداد باکتری‌ها زیاد و کشت قدیمی می‌گردد این باعث کاهش تعداد باکتری‌ها می‌گردد و در ادامه روند تولید توبرکولین کار با این محصول خطرناک است و نباید از دز پایین‌تر از ۸ کیلوگری برای از بین بردن باکتری استفاده نمود.

در مرحله سوم همان‌طور که محققان دیگر نیز گزارش کردند در مرحله اول ترسیب، پروتئین بدست آمده با استفاده از ترسیب با TCA بیشتر از SA است ولی پس از فیلتر نهایی با EKS ۰/۲۲ میکرون پروتئین استحصالی از SA بیشتر است. یعنی در فیلتر نهایی مقدار زیادی از پروتئین بدست آمده توسط روش TCA جذب فیلتر می‌گردد [۳, ۱۴, ۱۵].

در مرحله چهارم مشخص گردید که توبرکلوپروتئین استحصالی با استفاده از سونیکاسیون وقت‌گیر و در صورت سونیکاسیون باسیل زنده خطرناک است. پروتئین‌های بدست آمده از سونیکاسیون باسیل‌های زنده در روش لاتکس آگلوتیناسیون با آنتی-ژن بیماران مسلول جواب به مراتب بهتری را نسبت به پروتئین‌های PPD ارائه داد، ولی این روش بسیار خطرناک و رد تهیه آن با حجم بالا بسیار وقت‌گیر بوده و از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نمی‌باشد [۳]. در مرحله سنجش پروتئین با روش‌های متفاوت روش برادفورد بدلیل غلظت بالای پروتئین استحصالی و جواب‌های غیر دقیق مشخص گردید که روش کجلدال با اینکه یک روش قدیمی و وقت‌گیر است ولی دارای کارایی مناسب و قابل اطمینان است.

در خاتمه با ارزیابی که با روش LTT روی خوکچه هندی حساس پس از هم اندازه نمودن پروتئین هر دو توبرکولین استحصالی بدست آمد، مشخص گردید با وجود اینکه توبرکولین حاصله از TCA جواب‌های بهتری ارائه داده است. در تست Potency نیز توبرکلوپروتئین حاصله از ترسیب با TCA در محدوده مجاز مصرف قرار گرفته است (۱۳۰٪) و برای قابل مصرف بودن توبرکلوپروتئین حاصل از روش ترسیب با SA (۱۶۷٪) لازم است تا با بکار بردن فاکتورهای تصحیح و اصلاح

غلظت پروتئین، قدرت توبرکولین فوق در محدوده مجاز مصرف (۸۵٪ - ۱۳۵٪) قرار بگیرد. همچنین مشخص گردید که پروتئین حاصله در ترسیب با SA بیشتر از ترسیب با TCA می‌باشد بنحوی که اگر قرار بود هر دو پروتئین استحصالی را بدون در نظر گرفتن غلظت آنها بررسی کنیم احتمالا جواب حاصله در مورد SA بمراتب بهتر از روش TCA می‌بود. ظمنا روش ترسیب با SA روش کاملا بی‌خطری است چون تنها با نمک سولفات آمونیوم پروتئین بدست آمده ترسیب می‌گردد و مواد زائدی تولید نمی‌گردد در صورتی‌که که روش TCA فوق العاده خطرناک بوده و بخارات حاصل از اسید تری کلرواستیک اسید سرطان‌زا بوده و برای سلامتی زیان‌آور است. همچنین در روش TCA احتمال وجود اسید هسته‌ای در محصول نهایی به مراتب بیشتر از SA می‌باشد [۱۶]. توبرکولین‌های بدست آمده و توبرکولین‌های استاندارد با الکتروفورز مورد ارزیابی قرارگرفت که همه دارای طیف پروتئینی مشخصی در محدوده ۱۸ تا ۶۸ کیلو دالتون می‌باشند.

References

١.Corbett, E.L., C.J. Watt, and N. Walker, *The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic.* Arch Intern Med, 2003. **163**: p. 1009-1021.

٢.Dye, C., et al., *onsensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country.* WHO Global Surveillance and Monitoring Project, 1999. **282**: p. 677-686.

٣.Arend, S.M., et al., *Tuberculin skin testing compared with T-cell responses to Mycobacterium tuberculosis-specific and nonspecific antigens for detection of latent infection in persons with recent tuberculosis contact.* Clin Diagn Lab Immunol, 2001. **8**: p. 1089-1096.

٤ .Pai, M., R. Joshi, and S. Dogra, *Persistently elevated T cell interferon-gamma responses after treatment for latent tuberculosis infection among health care workers in India: a preliminary report.* J Occup Med Toxicol, 2006. **23**: p. 1-7.

٥.Organization, W.H., *Global tuberculosis control. Surveillance, planning, financing*, in *WHO Report, Geneva* 2005. p. 1-247.

٦.Sterling, T.R., H.P. Lehmann, and T.R. Frieden, *Impact of DOTS compared with DOTS-plus on multidrug resistant tuberculosis and tuberculosis deaths: decision analysis.* BMJ, 2003. **326**: p. 571-574.

٧.Flor, M., et al., *Nelson's Textbook of pediatrics*2004, Philadelphia: Saunders Company.

٨.Hall, B., et al., eds. *Nelson's essentials of pediatrics*. 2006, Saunders Company. 567-688.

٩.Wales, A. and J.R. Kusel, *Biochemistry of irradiated parasites vaccines: suggested models for their mode of action.* Parasitol Today, 19 :٨ .٩٢p. 358–63.

١٠.Demicheli, M.C., A. Miranda Goes, and A.S.R. Andrade, *Ultrastructural changes in Paracoccidioides brasiliensis yeast cells attenuated by gamma irradiation.* Mycoses, 2007. **50**: p. 397-402.

١١.Silliker, J.H. and R.P. Elliott, *Factor affecting growth and death micro-organisms: ionizing irradiationInternational commission on Microbiological specifications for foods, Academic PressOrlando, Santiego, Newyork.* 1980: p. 46-69.

١٢.Garcia, M.M., et al., *Evaluation of gamma radiation levels for reducing pathogenic bacteria and fungi in animal sewage and laboratory effluents.* Can J Vet Res, 1987. **51**: p. 285-289.

١٣.Zack, M.B., et al., *Effect of radiation on microbiologic carachteristics of mycobacterium Tuberculosis rays.* Chest Chicago, 1974 :٦٦ .p. 240–243.

١٤.Abou-zeid, C., et al., *The secreted antigens of Mycobacterium tuberculosis and their relationship to those recognized by the available antibodies.* J. Gen. Microbiol, 1988. **134**: p. 531-538.

١٥.Daniel, T.M., R.C. Good, and B.W. Janicki ,*Immunoelectrophoresis of Mycobacterium tuberculosis antigens. Comparative analysis of cell extract and culture filtrate antigens.* Am. Rev. Respir. Dis, 1975. **112**: p. 639-643.

١٦.Bendinelli, M. and H. Friedman, *Mycobacterium tuberculosis: interaction with the immune system*1998, New York and London: Plenum Press.