

## استفاده از آنتی ژن های محلول باکتری راه حلی برای تشخیص لیستریوز

دکتر شهناز رفیعی تهرانی<sup>۱</sup>، دکتر عبدالفتاح صراف نژاد<sup>۲</sup>، سید علی میر غنی زاده<sup>۳</sup>

### Using a Bacterial Soluble Antigen, a Tool to Dissolve the Problem of Listeriosis

#### Abstract

Listeria infection is still a dominant infectious problem in Iran, particularly in abortion. Looking for a paraclinical technique other than bacterial methods (which is not always available) lead to serological survey indicating estimation anti listeria antibody by Immunofluorescent test. Unfortunately the false positive results due to cross reaction between 'listeria monocytogenesis' and certain gram positive cocci, made it an unacceptable technique.

Here we performed a test to extract the Listeria M. (Strain 4a and 1b) soluble antigen and detecting the antibody by counter immunoelectrophoresis (CEI)

The results indicated that of four bacterial soluble antigen fractions F1 and F3 were significantly positive with patients sera.

We will discuss using the soluble antigen by CEI technique may be helpful to omit the false positive reactions.

#### مقدمه

لیستریا مونوسیتوزن و آزارهای ناشی از آن نه فقط برای میکروبیشناسان و پژوهشگران آزمایشگاههای تحقیقاتی جالب توجه بوده بلکه با توجه به مرگ و میر حاصل از بیماری در بین نوزادان و اشخاص پیر و ضعیف و ضایعات مادام العمر روانی و جسمانی که از خود باقی میگذارد بعنوان یک خطر جدی مورد بررسی قرار میگیرد. انتقال عفونت به جنین و نوزاد از راه جفت که سبب سقط و یا تولد نوزاد مرده می‌گردد، انگیزه‌ای است جهت پیگیری و حل این معضل. از آنجا که عفونت در حیوانات نیز دیده می‌شود (۱، ۲، ۳، ۴) یافتن راهی برای تشخیص و درمان قطعی از دیدگاه اقتصادی نیز مطرح می‌گردد.

تشخیص بیماری بیشتر براساس یافته‌های باکتریولوژیک استوار است، اما مشکل جداسازی باکتری از ضایعات مانع بزرگی بر سر این راه است (۵).  
روش سرولوژی یعنی بررسی آنتی‌بادیهای موجود در جریان خون بیماران مبتلا، با استفاده از روش ایمونوفلوئورسانس که سالها در گروه ایمونولوژی دانشکده پزشکی جواگیری بیماران است راه دیگری است برای کمک به پزشک اما وجود واکنش متقاطع با بعضی باکتریهای گرم مثبت این روش را از ردیف یک امدادگر تشخیص صددرصد خارج می‌کند.  
از این رو تفکر جداسازی آنتی‌ژن‌های سطحی باکتری

۱. دانشیار گروه ایمونولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲. گروه ایمونولوژی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران

۳. گروه ایمونولوژی دانشکده پزشکی علوم پزشکی بزد (شهید صدوقی)

مورد توجه ما قرار گرفت.

اگر بتوانیم آنتی ژن اختصاصی باکتری را که منجر به پاسخ ایمنی در بدن بیمار می شود از بقیه ساختمان آن مجزا کرده و در معرض سرم بیمار که حاوی آنتی بادی ضد آن است قرار دهیم، در این صورت واکنش متقاطع با سایر میکروارگانیسم ها را از بین خواهیم برد (۵، ۶، ۷)، انجام این هدف منجر به نتایج آورده شده در بررسی حاضر گردید:

#### بیماران و روشها:

##### الف - بیماران:

۶۰ زن مبتلا به سقط مکرر که از مراکز مختلف به گروه ایمنولوژی معرفی شده بودند مورد بررسی قرار گرفتند و برای تاکید اختصاصی بودن نتایج سرم ۱۰۰ زن بظاهر سالم که برای اهداء خون به سازمان انتقال خون مراجعه کرده بودند. هم زمان مورد مطالعه قرار گرفتند. وضعیت تأهل، و حاملگی در افراد سالم در جدول شماره ۱ آمده است.

##### ب - روشها:

نمونه های سرم بیماران و افراد سالم به دو روش ایمنو فلوئورسانس غیر مستقیم و کانترا ایمنو الکتروفورز مورد آزمایش قرار گرفتند. Immune fluorescent antibody test (IFT)

۱ - ایمنو فلوئورسانس غیر مستقیم: در این روش آنتی ژن جسم کامل باکتری *Listeria monocytogenes* که بر روی اسلاید ثابت شده و سرم بیماران با رقت های مختلف به آن افزوده می گردد و بر مجموعه آنها آنتی بادی ضد ایمن گلوبولین انسانی که به ماده فلوئورسانس پیوسته است (کنژوگه)، اضافه می شود (۱۸).

با استفاده از آنتی بادی کنژوگه اختصاصی میتوان نوع ایمن گلوبولین در گیر در عفونت بیمار را مشخص کرد بدین ترتیب در این روش آنتی IgG و آنتی IgM هر یک جداگانه بکار برده شدند.

۲ - روش کانترا ایمنو الکتروفورز Counter Immune Electrophoresis (CIE) در این روش آنتی ژن اجزاء محلول باکتری است که برای تهیه آن ها مراحل زیر طی شد.

- تهیه سوسپانسیون باکتری: سویه Ia لیستریا مونوسیژوزن در محیط کشت ژلوز خوندار کشت داده شد. سوسپانسیون پس از شست و شو و افزودن قتل مورد استفاده قرار گرفت. این عمل در سطح بسیار وسیعی صورت گرفت تا

فرآورده حاصل از شکست جسم باکتری به مقدار قابل توجهی برسد.

sonication - با استفاده از امواج مافوق صوت با فرکانس بالاتر از 17 KHZ جسم باکتری متلاشی گردید (۸ - ۹ - ۱۰)

۳ - اولتراسانتریفوگاسیون: محلول حاصل از سونیکاسیون به مدت ۴۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ سانتیفریژ گردید و مایع رویی جدا و مقدار پروتئین آن بروش بیوره تعیین گردید (۱۱)

- دیالیز: پروتئین های حاصل در بند ۳ بوسیله Carbowax 2000 که نام تجاری پلی اتیلن گلیکول است (PEG) تغلیظ گردید. کیسه دیالیزی که برای تغلیظ بکار گرفته شد از جنس سلوفان است که دارای منافذ کوچکی است که اجازه عبور ترکیبات با وزن ملکولی کمتر از ۱۰ هزار را می دهد و آنچه در کیسه می ماند پروتئین غلیظ شده است که در یخچال ۷۰ - نگهداری شدند.

- ژل کروماتوگرافی: برای جداسازی اجزاء مختلف آنتی ژنیک باکتری که اینک بصورت پروتئین محلول در آمده اند از روش ژل کروماتوگرافی استفاده شد. در این بررسی سفادکس گروه G که پلی مری از دکستران است بکار گرفته شد. سفادکس گروه G خود انواع مختلفی دارد که هر یک برای جداسازی ملکولهایی با وزن مشخص کاربرد دارند. در تحقیق حاضر از سفادکسی G100 استفاده شد که قادر است ملکولهای بین ۴۰۰۰ تا ۱۵۰/۰۰۰ دالتون را تفکیک کند. سفادکس را داخل ستون کروماتوگرافی ریخته و پروتئین های حاصل از اولترا سانتریفوگاسیون به آن افزوده شد. با اضافه کردن بافر فسفات با pH = 7.2 ملکولهای پروتئینی برحسب وزن خود به تناوب از انتهای ستون خارج و در لوله های جداگانه جمع آوری گردیدند (۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۶) چهار فراکسیون از شکستن جسم باکتری بدست آمد که به ترتیب F1 F2 F3 F4 نامگذاری گردیدند.

هر یک از اجزاء حاصل با روش کانترا ایمنو الکتروفورز جداگانه با سرم بیمار و افراد سالم آزمایش شدند. غلظت مناسب برای بکار بردن F1، ۱۰۰۰ و برای سایر اجزاء ۴۰۰ میکروگرم بود. روش CIE: یا کانترا ایمنو الکتروفورز است در این روش آنتی ژن و آنتی بادی در محیط ژل در حفره هایی مقابل یکدیگر قرار می گیرند و مجموعه آنها تحت تاثیر میدان الکتریکی به حرکت در می آیند. اگر آنتی بادی اختصاصی در سرم بیماران موجود باشد برخورد آنها با یکدیگر منجر به ایجاد رسوب و تشکیل خط مشخصی می گردد که پس از رنگ آمیزی با

نتالین بلاک Black nephthaline قابل رویت می‌گردد (۱۱) و ۱۲ و ۱۵ و ۱۷).

### نتایج:

۱ - روش ایمونوفلوروسانس: نتایج حاصل از روش IF در افراد سالم در جدول شماره (۲) آورده شده است جدول شماره ۳ نموداری است از پاسخ‌های بدست آمده در استفاده از آنتی‌بادی کتزوگه اختصاصی یعنی آنتی IgG و IgM توزیع فراوانی مطلق عبارهای IgM مثبت و IgG منفی و بالعکس و هم‌چنین مواردی که هر دو منفی بودند در جدول ۴ آمده است. اگر میانگین هندسی (GMRT) عبارهای مربوط به IgG را در نظر بگیریم برابر با ۵۳۴/۶۵ و GMRT مربوط به IgM برابر با ۲۸/۷۱ خواهد بود.

بعبارت دیگر عبارهای فوق باید طبیعی تلقی شوند.

بررسی سرم بیماران بروش IF در جدول ۵ آمده است بالاترین عبار  $\frac{1}{12800}$  بوده است.

۲ - روش کانترایمونوالکتروفورز: در سرم بیماران و افراد شاهد با چهار فراکسیون حاصل از جسم باکتری بروش CIE آزمایش شدند از آنجا که اجزاء F2 و F4 هیچ‌گونه پاسخ حتی در مواردی که عبار IF در سرم بسیار بالا بوده دیده نشد، این دو جزء از دستور کار خارج گردیدند.

نتایج حاصل از CIE در مقایسه با IF در افراد سالم در جدول شماره ۶ و در بیماران در جدول شماره ۵ گزارش شده است.

از ۴۲ بیمار که عبار آنتی‌بادی IF آنها بالاتر از مقدار  $\frac{1}{534}$  بوده است. ۲۲ نمونه در روش CIE مثبت و ۲۰ نمونه منفی بوده‌اند. تمام ۲۲ مورد با F1 و ۱۲ مورد با F3 جواب داده‌اند. در افراد سالم از ۱۰ مورد IF مثبت تنها دو نمونه با F1 و F3 واکنش داده‌اند. هیچ مورد مثبت CIE در غیاب وجود آنتی‌بادی IF دیده نشد.

### بحث

با توجه به اهمیتی که تشخیص لیستریوز از نظر سلامت جامعه و اقتصاد آن دارد، جستجوی راههایی برای حل این مشکل ضروری بنظر می‌رسد. روش ایمونوفلوروسانس غیرمستقیم تنها آزمایشی است در کشور ما که پایه اصلی تشخیص پزشکان ما را تشکیل می‌دهد (بدلیل مشکلات جداسازی لیستریا مونوسیژون). در این مطالعه ۱۰۰ فرد سالم (زن) که از نظر سن و وضعیت ناهل متفاوت بودند مورد بررسی

قرار گرفتند.

عبار آنتی‌بادی ضد لیستریا در آنها بروش IF اندازه‌گیری

شد و کلاسهای آن یعنی مقدار IgM و IgG آنها تعیین گردید. متوسط عبار قابل قبول در حدود  $\frac{1}{543}$  برای IgG و  $\frac{1}{28}$  برای IgM است و مقادیر بالاتر از آن را می‌توان دال بر عفونت مشخص بیمار به لیستریا توجیه کرد. اما از آنجا که گاه آنتی‌بادی را در افراد سالمی که هیچ‌گونه سابقه به عفونت را نشان نمی‌دهند میتوان یافت (۵)، ممکن است بالا بودن تیتراژ آنتی‌بادی در افراد به ظاهر سالم دال بر عفونت پنهان باشد (۸). گزارشات دیگر عبار قابل قبول IgG را  $\frac{1}{320}$  می‌پذیرد (۲). اما بعلت شباهت آنتی‌ژنیک لیستریا با سایر باکتریها بهتر است که عبارهای بالاتر مورد قبول قرار گیرد. از طرف دیگر بیمار مبتلا به لیستریا فاقد عبار بالای آنتی‌بادی می‌باشد (۹، ۱۰) و این امر در تشخیص اختلال ایجاد می‌کند به همه دلائل ذکر شده روش کانترایمونوالکتروفورز را که بسیار اختصاصی است انتخاب کردیم و فراکسیون‌های حاصل از متلاشی شدن جسم باکتری را بعنوان آنتی‌ژن بکار گرفتیم. اجزاء F2 و F4 بعلت عدم پاسخ با سرم بیماران و با افراد شاهد از برنامه کار خارج شدند و احتمالاً این دو جزء فاقد خاصیت ایمنی‌زایی هستند.

اما جزء F1 شدیداً سبب تحریک سیستم ایمنی می‌گردد. آنتی‌ژنهای سطحی لیستریا اولین‌بار در سال ۱۹۷۹ توسط گروه Delvaller (۹) با سویه 4b مورد استفاده قرار گرفتند و سه جزء از آن جدا کردند که جزء II آنها بیشترین پاسخ را در انسان و خرگوش ایجاد می‌کرد وزن ملکولی این آنتی‌ژن ۱۶۰/۰۰۰ دالتون بوده است. آنچه که ما از ستون کروماتوگرافی در قسمت اول جداسازی بدست آوردیم، وزن ملکولی نسبتاً نزدیکی با این فراکسیون (II) دارد و بنظر می‌رسد که شبیه باشد به آنچه که گروه فوق بدست آورده‌اند. استفاده از فراکسیون‌های آنتی‌ژنیک لیستریا، امکان اشتباه بعلت واکنش متقاطع را بحداقل می‌رساند. ۸۰٪ افراد سالم که عبار آنتی‌بادی IF آنها در حد بالایی بوده در روش کانتر منفی گزارش شدند. که خود دلیلی بر حذف واکنش‌های متقاطع در این روش است.

از آنجا که حساسیت روش IF بالاتر از CIE است در نتیجه کمترین تشابه آنتی‌ژنیک میتواند باعث نتیجه مثبت گردد. اما ویژگی روش کانترایمونوالکتروفورز بسی بالاتر از ایمونوفلوروسانس است که این خود در حذف واکنش‌های متقاطع که با باکتریهای دیگر از جمله استافیلوکوک که عفونت رایجی است موثر خواهد بود.

امید است که این بررسی در مقیاسی بزرگتر ادامه یافته و امکان استفاده از اجزاء آنتی ژنیک باکتری در تمام آزمایشگاههای تشخیص طبی فراهم و در نتیجه یاریگر پزشکان گردد.

جدول شماره (۱) - نمونه گیری از افراد مختلف

نوع افرادی که نمونه آنها مورد آزمایش واقع شده است	تعداد	موارد مثبت
Multipa	۴۰	۱۱
متاهل	۳۴	۱۴
مجرد	۲۶	۱۸

جدول ۲ - جمعیت به ظاهر سالم از نظر آزمون IFT هم در مقابل کونزوگه آنتی IgG و هم آنتی IgM

نتایج آزمایش با کونزوگه آنتی IgG		نتایج آزمایش با کونزوگه آنتی IgM	
عبار	فراوانی	عبار	فراوانی
۱:۴۰۰	۲۹	۱:۲۰	۲۷
۱:۸۰۰	۱۰	۱:۴۰	۱۴
۱:۱۶۰۰	۴	۱:۸۰	۵
Neg	۵۷	Neg	۵۴
جمع	۱۰۰	جمع	۱۰۰

جدول ۳ - توزیع فراوانی مطلق عبارهای مختلف IgG و IgM با هم در افراد بظاهر سالم.

عبار		فراوانی		عبار		فراوانی		عبار		فراوانی	
IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM
۴۰۰	۲۰	۲۲	۴۰۰	۴۰	۳	۴۰۰	۸۰	۲	۴۰۰	۸۰	۲
۸۰۰	۲۰	۱	۸۰۰	۳۰۰	۲	۸۰۰	۸۰	۲	۸۰۰	۸۰	۲
۱۶۰۰	۲۰	۳	۱۶۰۰	۴۰	۲	۱۶۰۰	۸۰	-	۱۶۰۰	۸۰	-

جدول ۴ - توزیع فراوانی مطلق عبارهای IgM مثبت و IgG منفی و بالعکس و همچنین هر دو منفی

عبار	تعداد	
IgM <sup>+</sup> , IgG	۱:۲۰	۱۱
	۱:۴۰	۸
	۱:۸۰	۱
IgG <sup>+</sup> , IgM <sup>-</sup>	۱:۴۰۰	۱۲
	۱:۸۰۰	۴
	۱:۱۶۰۰	۱
IgG <sup>-</sup> , IgM <sup>-</sup>	-	۳۵
	-	-
	-	-

حال اگر GMRT با میانگین هندسی عبارهای مربوط به IgG را بگیریم برابر با ۵۳۴/۶۵ خواهد بود. و GMRT مربوط به IgM برابر با ۲۸/۷۱ خواهد بود.

\* Geometric mean of Reciprocal titers among serum positive cases

که GMRT از فرمول:

$$GMRT = \text{Anti log} \frac{(\text{Log titer 1} \times f_1) + (\text{Log t2} \times f_2) + (\text{log t3} \times f_3)}{n = (f_1 + f_2 + f_3 + \dots)}$$

توزیع عبارهای آنتی بادی مثبت LFT در اشخاص به ظاهر سالم برحسب نوع واکنش با F1 و F3 در کانتز

شماره نمونه	عبار در IFT	واکنش با F1	شماره نمونه	واکنش با F3	عبار در IFT	واکنش با F1	شماره نمونه	واکنش با F3	عبار در IFT	واکنش با F1	واکنش با F3
۱	۸۰۰	+	۸	۱۶۰۰	-	-	۱۵	-	-	-	-
۲	۸۰۰	+	۹	۱۶۰۰	-	-	۱۶	-	-	-	-
۳	۸۰۰	-	۱۰	۱۶۰۰	-	-	۱۷	-	-	-	-
۴	۸۰۰	-	۱۱	-	-	-	۱۸	-	-	-	-
۵	۸۰۰	-	۱۲	-	-	-	۱۹	-	-	-	-
۶	۱۶۰۰	-	۱۳	-	-	-	۲۰	-	-	-	-
۷	۱۶۰۰	-	-	۱۴	-	-	-	-	-	-	-

## توزیع عیارهای آنتی بادی مثبت ایمونوفلورسنت برحسب نوع واکنش با F1 و F3 در روش کانتر

شماره نمونه	عیار سرم در روش IFT	واکنش با F1	واکنش با F3	شماره در روش نمونه IFT	عیار سرم در روش IFT	واکنش با F1	واکنش با F3	شماره نمونه	عیار سرم در روش D4	واکنش با F1	واکنش با F3
۱	۴۰۰	-	-	۲۲	۸۰۰	-	-	۲۳	۶۴۰۰	+	-
۲	۴۰۰	+	-	۲۳	۸۰۰	+	-	۲۴	۶۴۰۰	+	-
۳	۴۰۰	+	+	۲۴	۱۶۰۰	-	-	۲۵	۶۴۰۰	-	-
۴	۲۰۰	+	+	۲۵	۱۶۰۰	+	+	۲۶	۶۴۰۰	-	-
۵	۴۰۰	+	-	۲۶	۱۶۰۰	-	-	۲۷	۶۴۰۰	+	+
۶	۴۰۰	-	-	۲۷	۱۶۰۰	+	+	۲۸	۶۴۰۰	+	+
۷	۲۰۰	-	-	۲۸	۱۶۰۰	+	+	۲۹	۶۴۰۰	-	-
۸	۴۰۰	+	+	۲۹	۱۶۰۰	+	-	۵۰	۶۴۰۰	-	-
۹	۴۰۰	+	+	۳۰	۱۶۰۰	+	-	۵۱	۶۴۰۰	-	-
۱۰	۴۰۰	+	+	۳۱	۱۶۰۰	+	-	۵۲	۱۲۸۰۰	+	+
۱۱	۴۰۰	+	+	۳۲	۱۶۰۰	+	+	۵۳	۱۲۸۰۰	-	-
۱۲	۴۰۰	-	-	۳۳	۳۲۰۰	+	+	۵۴	۱۲۸۰۰	-	-
۱۳	۴۰۰	-	-	۳۴	۳۲۰۰	+	+	۵۵	۱۲۸۰۰	-	-
۱۴	۸۰۰	-	-	۳۵	۳۲۰۰	-	-	۵۶	-	+	+
۱۵	۸۰۰	-	-	۳۶	۳۲۰۰	-	-	۵۷	-	+	+
۱۶	۸۰۰	+	+	۳۷	۳۲۰۰	-	-	۵۸	-	+	-
۱۷	۸۰۰	-	-	۳۸	۳۲۰۰	-	-	۵۹	-	+	-
۱۸	۸۰۰	-	-	۳۹	۳۲۰۰	+	-	۶۰	-	+	-
۱۹	۸۰۰	+	+	۴۰	۶۴۰۰	+	+				
۲۰	۸۰۰	+	-	۴۱	۶۴۰۰	-	-				
۲۱	۸۰۰	+	-	۴۲	۶۴۰۰	-	-				

## References

- 1) Braude A.I. *Microbiology*, Chapter 26, 306 - 310, 1989.
- 2) Seeliger H.; Serovariant of listeria Monocytogenesis. *Acta Microbial. Acad Sci Hung.* 22 : 179 - 181 , 1975.
- 3) Saebii S.; *Infectious disease in Iran.* 633 - 648, 1986.
- 4) Harison's *Principles of Internal Medicine.* 12th Edition 573, 1991.
- 5) Wolfgangk joklik, *Zinsser Microbiology* 18th edition : 527 - 533, 1984.
- 6) Kohn J. A simple method for concentrating fluid containing protein. *Nature*, 10 : 183 - 1055 , 1959.
- 7) Nahmias A : *Immunology of Human infection*, 201 - 218. 1981.
- 8) Rose Noel : *Immune Response to listeria* 4 : 402 - 407, 1986.
- 9) Delvallez M. : *Pruification of surface specific soluble antigen from L.M. Infec. Immunology* 25 : 971 - 977, 1979.

- 10) Bekow R. : The Merck Manual of Diagnosos and therapy, 1987.
- 11) Sainsbory D. Dictionary of Microbiology, 1980.
- 12) Savory J : Purification of MPA form L.M. infect and Immunology 500 - 509, 1977.
- 13) Sworthy S.B. : Measurement for preoteins in biologic fluid. clinical lab . Methods and Diagnosis., 1980.
- 14) Fahey J. L. : Ion exchange chromatography and gelfiltration chapeter even. Text book of experimental immunology, 1973.
- 15) Sother L : The separation and purification of Bacterial antigen Hanbook of Experimental Immun, 1982,
- 16) Gel chromatography : Bio Rod Laboratorie, 1971.
- 17) Counter Immunoelcterophoresis system. Millipore Biomedical Ca. No LPM , 1975.
- 18) Warren C. : Demonstration of Listeria Monocytogenes in direct examination of S.F. by Fluorescent Antib Technique, 1963.