

ارزیابی مقاومت نایسریا مننجایتیدیس به عوامل ایمنی طبیعی در شرایط آزمایشگاه: مقایسه روش های سرمی با روش خون کامل

زهرا اسلامی نژاد^۱، نیکو نیک نفس^۲، نصرت ا. سعید عادل^۳

چکیده

سابقه و هدف: سوابق مطالعاتی نشان می دهند مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری ها ممکن است با پایداری آن ها در برابر ایمنی طبیعی مرتبط باشد. در مطالعه قبلی ما، حساسیت آنتی بیوتیکی مننگو کوک های جدا شده از نمونه بیماران کمتر از ایزوله های مربوط به حاملین سالم بود. به منظور ارزیابی رابطه فوق الذکر در نایسریا مننجایتیدیس (مننگو کوک)، در یک مطالعه مورد-شاهدی مقاومت این باکتری در برابر عوامل ایمنی طبیعی در شرایط برون-تنی بررسی شد.

مواد و روش ها: مجموعاً ۱۸ ایزوله مننگو کوک، ۶ ایزوله مقاوم به آنتی بیوتیک در گروه مورد و ۱۲ ایزوله مربوط به ترشحات حلق حاملین سالم در گروه شاهد مورد بررسی قرار گرفتند. پایداری دو گروه در رقت های سریالی سرم های انتخابی و غیر انتخابی با آزمایش های SIC (غلظت سرمی مهار کننده) و SBC (غلظت سرمی کشنده)، SBA (گشندگی سرم رقیق نشده) انجام شد. در آزمایش WBA، تداوم گروه مورد و شاهد در فواصل زمانی مشخص در خون کامل تازه آزمایش شد. به منظور مقایسه، از سویه استاندارد مننگو کوک و دو باکتری دیگر (استافیلوکوک و اشریشیا کلائی) در مقاطع مختلف استفاده گردید.

یافته ها: مقاومت هر دو گروه در برابر سرم های انتخابی در آزمایش های SIC و SBC یکسان بود. میانگین عیار به دست آمده معادل یک دوم بود. رشد گروه مورد در رقت ۱/۵۱۲ و گروه شاهد در رقت ۱/۱۰۲۴ در برابر سرم های غیر انتخابی متوقف شد. در WBA، کاهش جمعیت گروه مورد در مقایسه با گروه شاهد سیر کندتری داشت.

استنتاج: نتایج به دست آمده از بررسی های مربوط به رابطه مقاومت آنتی بیوتیکی و مقاومت در برابر ایمنی طبیعی در باکتری ها، یکسان نبوده است. از میان آزمایش های مورد استفاده در این پژوهش، WBA توانست رابطه فوق را بهتر به نمایش بگذارد.

واژه های کلیدی: نایسریا مننجایتیدیس، مننگو کوک، SIC، SBC، SBA، WBA

مقدمه

بهبود مراقبت های ویژه و فراهم بودن آنتی بیوتیک های موثر، ۴۰-۲۰ درصد بیماران پس از ابتلا به شوک سمی

درسراسر دنیا، مننژیت و سپتی سمی های مننگو کوکی همچنان از موارد مهم بالینی محسوب می شوند. علی رغم

E-mail: eslamie_33333@yahoo.com

مؤلف مسئول: دکتر زهرا اسلامی نژاد - کرمان - انتهای بلوار ۲۲ بهمن، دانشکده پزشکی اور گروه میکروب شناسی

۱. دکتری میکروبیولوژی، استادیار دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمان

۲. پزشک متخصص اطفال دانشگاه علوم پزشکی کرمان

۳. کارشناس میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمان

تاریخ دریافت: ۸۷/۸/۱۴ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۸۷/۹/۱۰ تاریخ تصویب: ۸۷/۱۱/۲۶

متعاقب منژیت، فوت می کنند (۱،۲). انسان تنها میزبان طبیعی نایسریا منتجایتیدیس (مننگو کوک) است. این باکتری قسمتی از جمعیت میکروبی بخش فوقانی دستگاه تنفس را تشکیل می دهد و ممکن است به ندرت به خون و منژ حمله نماید (۳-۶). مننگو کوک هایی که به خون راه می یابند به وسیله آنتی بادی اختصاصی (و تا حدودی غیر اختصاصی) همراه با پروتئین های سیستم کمپلمان آپسونیزه، منهدم و یا فاگوسیت می شوند (۶-۲). لذا فقدان آنتی بادی اختصاصی به ویژه در افراد در معرض خطر، زمینه را برای ابتلا به بیماری های مهلک مننگو کوک فراهم می سازد. واکسن های تهیه شده از آنتی ژن های کپسولی سرو گروه های A و C، اثرات محافظت کننده قابل قبولی در زمینه پیشگیری از منژیت و مننگو کوکسمی نشان داده اند (۲). اما پلی ساکارید کپسولی گروه B، به دلیل شباهت آنتی ژنی با چسباننده های (adhesins) سلول های عصبی - از ایمونوژنیسته کافی برخوردار نیست. به این دلیل بسیاری از واکسن های موجود فاقد آنتی ژن کپسولی B می باشند (۱،۷). واکسن های تهیه شده از پروتئین های خارج سلولی نیز که در معدودی از کشورها استفاده می شوند، به میزان زیادی ویژگی گونه نشان می دهند (۲،۷). از این رو موضوع ایمنی غیر اختصاصی (ایمنی طبیعی) در برابر منژیت مننگو کوک گروه B همچنان از مباحث مورد علاقه محققین می باشد (۲). از سوی دیگر تعدادی از بررسی ها نشان داده است سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک باکتری هایی مانند اشیریشیا کلای، استافیلوکوک، کلبسیلا و سودوموناس، به عوامل ایمنی طبیعی، مقاوم ترند (۸-۱۱).

در بررسی گذشته ما، تمام مننگو کوک هایی که از نمونه خون یا مایع نخاع بیماران جدا شده بودند، متعلق به گروه B و اغلب دارای کلنی های خشن بودند (۱۲). حساسیت آن ها به آنتی بیوتیک های ضد مننگو کوک (پنی سیلین، ریفامپیسین و سیپروفلوکساسین) نیز کمتر از ایزوله های به دست آمده از حاملین سالم بود (۱۲). هدف از انجام مطالعه حاضر، بررسی رابطه مقاومت

آنتی بیوتیکی مننگو کوک های مهاجم با مقاومت آن ها به عوامل ایمنی طبیعی بود. به این منظور در یک مطالعه مورد - شاهدی، حساسیت و مقاومت ایزوله های به دست آمده از نمونه بیماران و ایزوله های مربوط به حاملین سالم در برابر سرم و خون کامل انسانی و در شرایط برون - تنی آزمایش و مقایسه شد.

مواد و روش ها

ایزوله های باکتریایی:

شش ایزوله مهاجم مننگو کوک گروه B، که در بررسی گذشته ما از کشت مایع نخاع یا خون بیماران جدا شده بودند، گروه مورد و ۱۲ ایزوله که از ترشحات حلق حاملین سالم جدا شده بودند، گروه شاهد را تشکیل می دادند. ایزوله های مزبور تا قبل از آزمایش در محیط نگاه دارنده TSB + گلیسرول ۱۵ درصد و دمای ۷۰- ذخیره شده بودند. جهت باز یافت نمونه های میکروبی، پس از ذوب ذخیره های منجمد در دمای اتاق، کشت تازه آنها در محیط کشت شکلاتی (دیفکو / BD - آمریکا) و به روش خطی تهیه شد. در زمان آزمایش سوسپانسیونی از کشت تازه باکتریایی در PBS (۷/۲: pH) با کدورت معادل ۰/۵ یا ۱ مک فارلند - بر حسب نوع آزمایش - تهیه شد (۱۳، ۱۴).

سویه استاندارد:

از نایسریا منتجایتیدیس PTCC: ۱۵۰۷ (مرکز پژوهش های علمی صنعتی تهران - ایران) در تمام آزمایش ها استفاده شد.

به منظور ارزیابی کلی روش های آزمایش ها و با انتخاب شخصی، از استافیلوکوک ارئوس یا اشیریشیا کلای (کلکسیون باکتریایی آزمایشگاه) در مقاطعی از آزمایش ها نیز استفاده شد.

نمونه های سرم:

i) سرم های انتخابی افراد واکسینه، از خون شش سرباز مراجعه کننده به درمانگاه ارتش تهیه شد. این افراد سابقه

ابتلا به مننژیت نداشتند. بیش از یک ماه قبل از نمونه‌گیری با واکسن غیر کونژوگه (A+C) مننژوکوکی واکسینه شده بودند و در طول یک ماه قبل از نمونه‌گیری آنتی‌بیوتیک مصرف نکرده بودند.

ii) سرم انتخابی افراد غیر واکسینه از خون شش نفر داوطلب تهیه شد. این افراد از نظر سلامت مشکلی نداشتند و در طول یک ماه قبل از نمونه‌گیری از آنتی‌بیوتیک استفاده نکرده بودند. جهت تهیه سرم، نمونه‌های خون در لوله‌های یک بار مصرف جمع‌آوری شده و پس از انعقاد در دمای اتاق، با سانتریفوژ یخچال دار (۳۰۰۰ rpm، ۴°C، ۱۰ دقیقه) سانتریفوژ گردید.

iii) مجموعه سرمی غیرانتخابی (pooled serum) از باقی مانده سرم تازه افرادی که به آزمایشگاه بالینی بیمارستان دانشگاه مراجعه کرده بودند، برداشت شد. سرم‌های به دست آمده در لوله‌های یک بار مصرف جمع‌آوری و تا زمان آزمایش، در دمای ۲۰- درجه نگهداری شد. در زمان آزمایش هر گروه سرمی i و ii و iii مخلوط و استفاده شد (۱۴).

نمونه خون کامل:

در هر نوبت آزمایش ۱۰ میلی‌لیتر خون هپارینه از یکی از همکاران داوطلب سالم اخذ می‌شد. این افراد حداقل یک ماه قبل از نمونه‌گیری آنتی‌بیوتیک مصرف نکرده بودند. تا قبل از مخلوط کردن خون و باکتری، نمونه‌های خون در حمام یخ نگهداری می‌شدند (۱۷-۱۵).

آزمایش (serum inhibition concentration) SIC و

SBC (serum bactericidal concentration):

با استفاده از منابع به دست آمده (۱۸، ۱۷، ۱۴، ۱۳) رقت‌های سریالی از سرم‌های آماده شده در محیط کشت مولر هیتون براث (مرک-آلمان) تهیه شد. شروع رقت‌ها ۱/۴ بود. جهت انجام آزمایش ۲۰ μl از سوسپانسیون تازه باکتریایی - ۰/۵ مک فارلند- به هریک از رقت‌ها اضافه شد. ۴۸-۲۴ ساعت پس از اینکوباسیون در دمای ۳۷°C،

کدورت حاصل از رشد باکتری با چشم غیر مسلح و در مقایسه با شاهد منفی (محیط کشت غیر آلوده به باکتری) ارزیابی و ثبت شد. جهت ارزیابی SBC، نمونه‌ای از لوله قبل از SIC به محیط کشت آگار شکلاتی منتقل و نتیجه پس از ۴۸ ساعت ارزیابی شد. کمترین رقتی از سرم که موجب مهار رشد/ کشته شدن ۹۹/۹ درصد از باکتری شده بود به عنوان SBC /SIC قلمداد می‌شد (۱۴، ۱۹).

آزمایش SBA (Serum bactericidal assay):

رشد گروه‌های مورد و شاهد مننژوکوکی در سرم رقیق نشده افراد واکسینه و افراد غیر واکسینه در فواصل زمانی صفر، ۰/۵، ۱، ۲، ۸ و ۲۴ ساعت سنجیده شد. اما به دلیل سرعت کاهش جمعیت مننژوکوک در ساعات اولیه بررسی، مجدداً آزمایش در فواصل زمانی کوتاه‌تر یعنی صفر، ۱۵، ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه تکرار شد (۱۳، ۱۷، ۲۰). ادامه این آزمایش شبیه WBA بود که متعاقباً شرح داده خواهد شد.

آزمایش WBA (whole blood assay):

با بهره‌گیری از روش‌های استفاده شده توسط Ison، Ahmed و Stoika (۲، ۱۵، ۱۶، ۱۷، ۱۹) به اضافه برخی تغییرات شخصی، به ترتیب زیر انجام شد. ابتدا در حمام یخ ۱۰ ml خون تازه هپارینه (WBC: ~ ۸۰۰۰/mm^۳) به حجم‌های ۰/۵ ml در هر لوله تقسیم شد. به هر یک از لوله‌ها ۵۰ μl سوسپانسیون باکتریایی، تهیه شده از کشت تازه آن، اضافه شده و بلافاصله لوله‌ها در بن‌ماری ۳۷°C قرار داده شد. غلظت سوسپانسیون باکتری مطابق واحد ۱ مک فارلند با جمعیت معادل ۱۰^۸ × ۳ cfu (colony forming unit) انتخاب شد. در این صورت نسبت جمعیت باکتری به گلبول‌های سفید حدوداً ۱:۳۰ بود. تمام لوله‌ها در طول آزمایش یک تا چند بار به آرامی با دست حرکت داده می‌شد دقیقاً در زمان‌های صفر، ۱۵، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه پس از مخلوط کردن باکتری با خون

کامل، ۱۰ ل از هر نمونه به محیط کشت شکلاتی منتقل و کشت داده شد. پلیت‌ها در شرایط آپتیمم (37°C ، ۳۷، ۱۰-۵ درصد CO_2) نگهداری و نتیجه کشت بعد از ۴۸ ساعت با شمارش کلنی‌های شکل گرفته در واحد حجم ارزیابی شد. از آنجا که هر نمونه بیش از یک بار مورد آزمایش قرار می‌گرفت، میانگین تعداد کلنی‌ها به عنوان نتیجه نهایی محاسبه می‌شد. جهت اطمینان از فاگوسیت شدن باکتری‌ها ۱۵ نمونه به صورت تصادفی برداشت شده و گسترش تهیه شد. پس از رنگ آمیزی با روش گیمسا، ورود باکتری به سلول‌ها با میکروسکوپ بررسی گردید (۲۱، ۱۶).

نتایج آزمایش‌های SBA و WBA بر اساس رابطه زیر محاسبه گردید:

$$\text{Cfu در هر فاصله زمانی} \times 100 = \frac{\text{Cfu در زمان صفر}}{\text{باکتری های زنده مانده} \%}$$

محاسبات آماری:

در پایان هر آزمایش، مجموع و میانگین نتایج عددی به دست آمده از گروه‌های مورد یا شاهد محاسبه شد و در تهیه جدول یا رسم نمودار مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها

جدول شماره ۱، SIC و SBC های مربوط به سه مجموعه سرمی را در برابر گروه‌های مورد، شاهد، سوئی

استاندارد مننگو کوک و همچنین باکتری‌های کنترل را نشان می‌دهد. میانگین رقت مهارکننده رشد یا کشته سرم‌های انتخابی (سرم افراد واکسینه و سرم غیر واکسینه) در برابر مننگو کوک، ۱/۲ بود. اما SIC و SBC به دست آمده از مجموعه سرمی غیر انتخابی علیه مننگو کوک‌ها به ترتیب ۱/۵۱۲ و ۱/۱۰۲۴ بود. همین مجموعه سرمی در برابر اشریشیا کلای تا رقت ۱/۱۲۸ و در برابر استافیلوکوک ائروس تا رقت ۱/۲ موثر بود.

نمودار شماره ۱ و ۲، نتایج آزمایش SBA (کاهش جمعیت باکتری‌ها در سرم رقیق نشده) را به ترتیب در فاصله زمانی ۱۲۰ دقیقه و ۲۴ ساعت نشان می‌دهند. کاهش جمعیت هر دو گروه مننگو کوکی مورد و شاهد در سرم رقیق نشده، با آهنگی شبیه هم و بسیار سریع صورت گرفت. اما کاهش جمعیت هر دو گروه در سرم گهنه که به صورت اتفاقی یک شب در دمای اتاق مانده بود و در برنامه آزمایش‌ها پیش‌بینی نشده بود، کندتر بود. در این آزمایش نیز حساسیت گروه‌های مورد و شاهد در برابر سرم افراد واکسینه و غیر واکسینه شبیه هم بود.

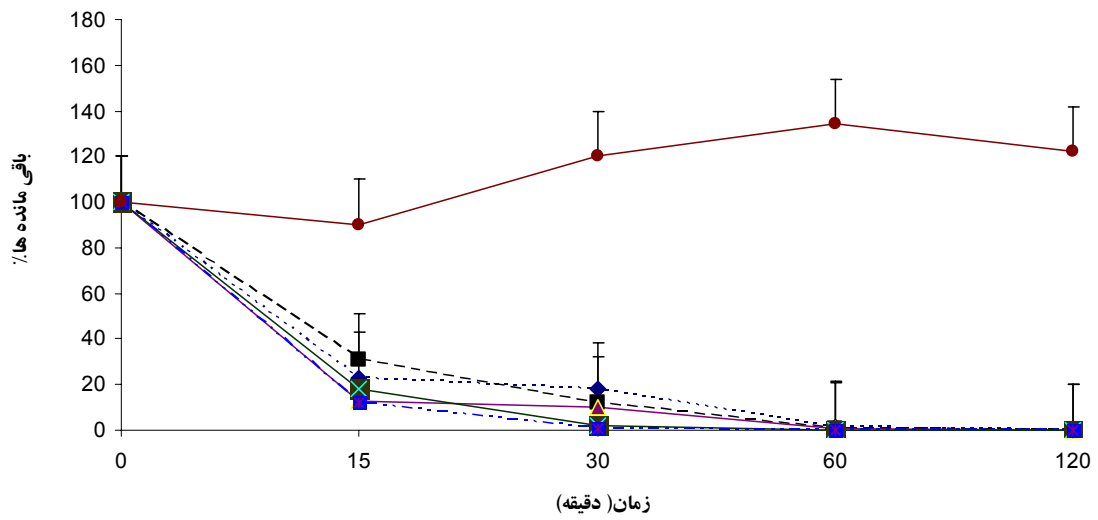
نمودار شماره ۳ کاهش جمعیت مننگو کوک‌های مورد و شاهد را به همراه باکتری‌های کنترل در برابر خون کامل با آزمایش WBA نشان می‌دهد. سیر کاهش جمعیت گروه مورد در این آزمایش آهسته‌تر از گروه شاهد بود. در این آزمایش اشریشیا کلای تا دقیقه ۶۰ مقاومت کرد.

جدول شماره ۱: میانگین SIC و SBC در برابر گروه مورد، شاهد و سوئی استاندارد مننگو کوک

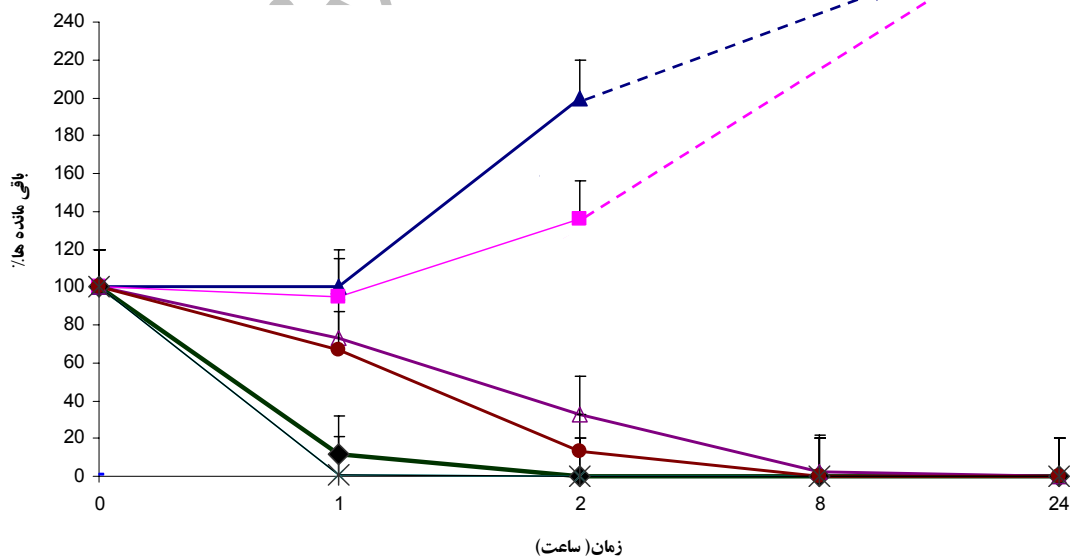
مورد آزمایش	باکتری			غلظت سرمی مهارکننده رشد			غلظت سرمی کشته		
	سرم افراد واکسینه	سرم افراد غیر واکسینه	مجموعه سرم غیر انتخابی	سرم افراد واکسینه	سرم افراد غیر واکسینه	مجموعه سرم غیر انتخابی	سرم افراد واکسینه	سرم افراد غیر واکسینه	مجموعه سرم غیر انتخابی
مننگو کوک های جدا شده از حاملین	۱:۲	۱:۲	۱:۱۰۲۴	۱:۲	۱:۲	۱:۱۰۲۴	۱:۲	۱:۲	۱:۱۰۲۴
مننگو کوک های جدا شده از بیماران	۱:۲	۱:۲	۱:۵۱۲	۱:۲	۱:۲	۱:۵۱۲	۱:۲	۱:۲	۱:۵۱۲
سوئی استاندارد مننگو کوک	۱:۲	۱:۲	۱:۱۰۲۴	۱:۲	۱:۲	۱:۱۰۲۴	۱:۲	۱:۲	۱:۱۰۲۴
استافیلوکوک * ائروس	ND	ND	۱:۲	ND	ND	۱:۲	ND*	ND	۱:۲
اشریشیا کلای †	ND	ND	۱:۳۲	ND	ND	۱:۳۲	ND	ND	۱:۱۲۸

† * باکتری هایی که به عنوان کنترل آزمایش شدند

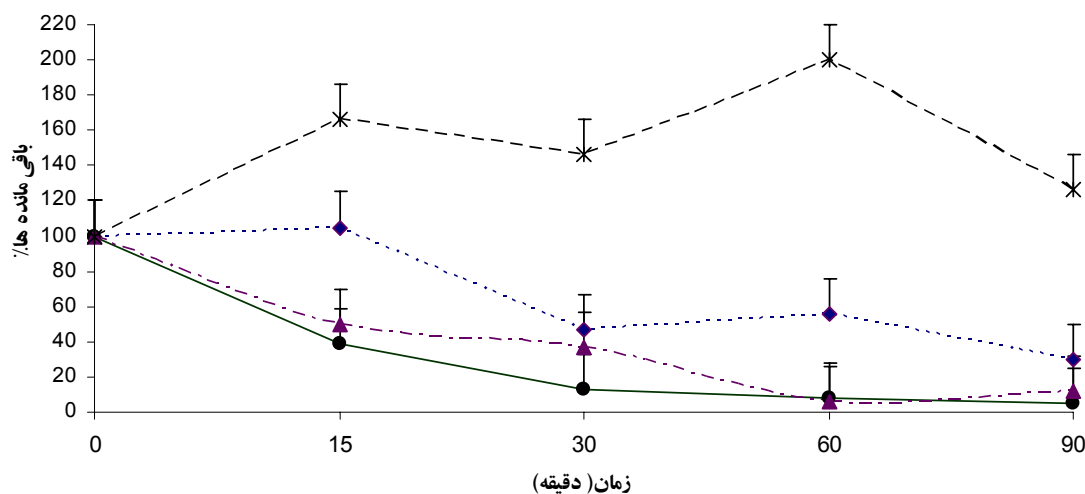
* تعیین نشد



نمودار شماره ۱: میانگین درصد جمعیت ایزوله های باقی مانده در آزمایش SBA ظرف ۱۲۰ دقیقه



نمودار شماره ۲: میانگین درصد جمعیت ایزوله های باقی مانده در آزمایش SBA ظرف ۲۴ دقیقه



نمودار شماره ۳: میانگین درصد جمعیت ایزوله های باقی مانده در آزمایش WBA

بحث

دارو (MDR) و جدا شده از نمونه بیمار بستانی در بخش ICU، در برابر سرم انسانی هم مقاومت بیشتری نشان می دهند (۱۱).

در بررسی گذشته ما حساسیت آنتی بیوتیکی مننگو کک های جدا شده از نمونه بیمار در مجموع کمتر از ایزوله های به دست آمده از حاملین بود (۱۲)، اما در پژوهش حاضر، میانگین عیار به دست آمده از سرم های انتخابی (افراد واکسینه یا غیر واکسینه) در برابر هر دو گروه یکسان و به اندازه ۱/۲ بود. در مورد عیار به دست آمده از سرم های مورد آزمایش ما، اگر چه براساس آزمایش SIC/SBC، حداقل عیار سرمی محافظت کننده را برای افراد غیر واکسینه، ۱/۴ تا ۱/۸ و برای افراد واکسینه بیش از ۱/۸ تعیین نموده اند (۱۴، ۱۶، ۱۷، ۱۹)، اما ظاهراً ممکن است نتایج آزمایشگاه ها بدون دلیل با هم متفاوت باشد زیرا در بریتانیا یک نمونه سرم را در چند آزمایشگاه مرجع مننگو کک مورد آزمایش قرار داده اند و عیارهای متفاوتی از آن به دست

Ward در سال ۱۹۸۷ نشان داد علی رغم آنکه مننگو کک های مقاوم به سولفونامید گروه B بیش از سایر گروه ها از نمونه بیمار جدا می شوند، اما در شرایط آزمایشگاه، حساسیت و مقاومت آن ها در برابر سلول های بیگانه خوار به مقاومت دارویی شان ارتباطی ندارد (۲۲). مقاومت سرمی اشریشا کلای های عامل عفونت ادراری (UTI) نیز ارتباط قابل توجهی با مقاومت آنتی بیوتیکی آن ها ندارد (۸). در حالیکه آزمایش ها نشان داده است، استافیلوکوک های حساس به متی سیلین، به سلول های بیگانه خوار حساس ترند (۹). حساسیت سرمی کلبسیلا نومونیه و کلبسیلا کسی موراها می محیطی بیشتر از گونه های جدا شده از مدفوع بوده است (۲۳). اما Sahly در سال ۲۰۰۴ رابطه ای بین وجود بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBL) و مقاومت سرمی در کلبسیلا نومونیه به دست نیاورد (۱۰). در شانزدهمین کنگره میکروب شناسی بالینی اروپا در سال ۲۰۰۶ مطرح شد که سودوموناس های مقاوم به چند

آورده‌اند (۱۴). علاوه بر این، تمام آزمایش‌های سرمی این بررسی با سرم محافظت شده در دمای زیر صفر و بدون اضافه کردن کمپلمان انجام شد. بر اساس گزارش‌های به دست آمده، استفاده از کمپلمان سرمی یا پلاسمایی می‌تواند عیار SIC/SBC را تا دو رقت تغییر دهد (۲۴). اگر چه انتظار می‌رود بعد از واکناسیون عیار SIC/SBC، ۴ مرتبه افزایش یابد (۲۵)، اما در آزمایش‌های ما عیار به دست آمده از سرم افراد واکناسینه (با واکنس A+C) در برابر هر دو گروه مننگوکوکی مورد و شاهد، بیش از عیار سرم افراد غیر واکناسینه نبود. Ison در سال ۲۰۰۳ و در جریان یک مطالعه وسیع نشان داد عیار پایین SBC معرف ایمنی ضعیف نیست (۷). مقاومت مننگوکوک‌های گروه مورد در برابر سرم غیرانتخابی تا رقت ۱/۵۱۲ و گروه شاهد تا رقت ۱/۱۰۲۴ بود. در حالیکه استافیلوکوک آرتوس به رقت ۱/۲ و اشریشیاکلای به رقت ۱/۱۶ حساس بودند. سرم غیرانتخابی، مخلوطی از باقی مانده سرم بیماران مراجعه کننده به آزمایشگاه بیمارستان دانشگاه بود. احتمالاً برخی از سرم‌های مجموعه فوق، حاوی آنتی‌بیوتیک بوده‌اند و تفاوت قابل توجه بین نتایج مربوط به مننگوکوک و باکتری‌های کنترل، می‌تواند معرف حساسیت فوق‌العاده مننگوکوک‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها باشد.

تمام رقت‌های سریالی در محیط کشت مولر هینتون براث تهیه شد. شایان ذکر آنکه با بررسی رشد باکتری‌ها با روش شمارش کلنی‌ها ملاحظه شد در ۸۰ درصد موارد شدت رشد مننگوکوک در لوله‌های کنترل (بدون سرم)، ۸۰-۲۰ درصد کمتر از لوله‌های تست بود (سوابق نشان داده نشده است). این مشاهدات کشمکش عوامل حمایت کننده و مهار کننده مننگوکوک را در خون انسان، در شرایط آزمایشگاه نشان می‌داد. در آزمایش SBA، کاهش جمعیت گروه مورد و شاهد بسیار سریع اتفاق افتاد (نمودار شماره ۲). ایزوله‌های تحت آزمایش در پژوهش حاضر چند بار تجدید کشت شده بودند. در

مورد نایسریا گونوره آ (گونوکوک) مشاهده شده است که گونوکوک‌های جدا شده از نمونه مجرا در مقایسه با ایزوله‌هایی که چند بار پاساژ داده می‌شوند، در برابر اثر کشنده سرم مقاومت‌ترند (۲۶).

کمپلمان نقش تعیین کننده‌ای در پاسخ سیستم ایمنی در برابر بیماری‌های سیستمیک مننگوکوکی (SMD) دارد (۲۴، ۲۵). در پژوهش حاضر نیز مشاهده شد. سرم کهنه (سرم‌هایی که بر حسب تصادف به مدت یک شب در آزمایشگاه مانده بودند) دارای اثر ضد مننگوکوکی کمتری از سرم تازه است (نمودار شماره ۲). در WBA، روند کاهش جمعیت گروه مورد آهسته‌تر از گروه شاهد بود. اگر چه در پایان زمان آزمایش (دقیقه ۹۰) جمعیت هر دو گروه به هم نزدیک بود. در این آزمایش جمعیت اشریشیاکلای تا ۶۰ دقیقه کاهش نیافت (نمودار شماره ۳). بررسی میکروسکوپی نشان داد در پایان زمان در نظر گرفته شده ۱/۲ تا ۴/۵ گلبول‌های سفید حدود ۴-۱ زوج مننگوکوک را فاگوسیت کرده بودند. آزمایش‌های Ison نشان داده است خون کامل بسیاری از افراد بالغ در شرایط آزمایشگاه بر مننگوکوک‌های گروه B اثر کشنده دارد (۱).

از آزمایش‌های سرمی SIC/SBC در موارد مختلف استفاده می‌شود (۲۷، ۲۸). اما نتایج بررسی حاضر نشان داد روش WBA بهتر از آزمایش‌های سرمی می‌تواند تفاوت مقاومت مننگوکوک‌های مهاجم را با ایزوله‌های غیر مهاجم، در برابر عوامل ایمنی طبیعی به نمایش بگذارد. در WBA باکتری در برابر تمام اجزای ایمنی غیر اختصاصی قرار می‌گیرد (۱). این آزمایش ساده اگر چه ۸۰ سال قبل ابداع شده است (۲، ۲۹) اما همچنان در زمینه‌های مختلف مورد استفاده محققین قرار می‌گیرد (۳۰، ۳۱).

بر اساس نتایج به دست آمده، مقاومت سرمی دو گروه مننگوکوکی مهاجم و غیر مهاجم یکسان بود اما

۴ و ۶ در گروه مورد، شبیه ایزوله‌های شاهد بودند در مقابل ایزوله شماره ۶ گروه شاهد بیشتر شبیه منگوکوک‌های مهاجم در گروه مورد بود.

منگوکوک‌های مهاجم گروه B، در مقایسه با منگوکوک‌های غیر مهاجم در برابر اثر کشندگی خون کامل، مقاومت بیشتری نشان دادند. نکته قابل ذکر آنکه بر اساس مشخصات فنوتیپی مقاومت، ایزوله‌های شماره

References

1. Ison CA, Anwar N, Cole M J, Heyderman GRS, Klein NJ, et al. Assessment of immune response to meningococcal disease: Comparison of a whole-blood assay and the serum bactericidal assay. *Microbiol Pathogenesis* 1999; 27(4): 207-214.
2. Jordens JZ, Williams JN, Jones GR, Christodoulides M and Heckels JE. Development of immunity to serogroup B meningococci during carriage of *Neisseria meningitidis* in a cohort of university students. *Infect Immun* 2004; 72(11): 6503-6510.
3. Troncoso G, Sanchez S, Criado M.T, Ferreira C. M. Analysis of *Neisseria lactamica* in acquisition of natural immunity to *Neisseria meningitidis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2002; 34: 9-15.
4. Oliver K J, Reddin K M, Bracegirdle P, Hudson M J, Borrow R. *Neisseria lactamica* Protects against experimental meningococcal infection. *Infect Immun* 2002; 70: 3621-3626.
5. Gorringe AR. Can *Neisseria lactamica* antigens provide an effective vaccine to prevent meningococcal disease? *Expert Rev Vaccines* 2005; 4(3): 373-379.
6. Stollenwerk N, Maiden M.CJ, Jansen V AA. Diversity can cause outbreaks of meningococcal disease. *PNAS* 2004; 101(27):10229-10234.
7. Ison CA, Anwar N, Cole MJ, Pollard AJ, Morley SL, et al. Age dependence of in vitro survival of meningococci in whole blood during childhood. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22: 868-873.
8. Hughes C, Philips R, Roberts A P. Serum Resistance among *Escherichia coli* strain causing urinary tract infection in relation to O type and the carriage of hemolysin, colicin, and antibiotic resistance determinants. *Infect Immune* 1982; 35(1): 270-275.
9. Vaudaux P, Waldvogel FA. Methicillin resistant stains of *Staphylococcus aureus*: relation between expression of resistance and phagocytosis by polymorphonuclear leukocytes. *Acta Paediatr* 2002; 91(6): 626-31.
10. Sahly H, Aucken H, Benedi V J, Forestier C, Fussing V, Hansen DS, et al. Increased serum resistance in *Klebsiella pneumonia* strains producing extended-spectrum β -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother* 2004; 48(9): 3477-3482.
11. Vitkauskienė A, Dudzevicius V, Adukauskienė D, Braziulyte J, Sabaniauskaite R, Sakalauškas R, et al. Influence of serum- resistance properties and multidrug- resistance of *Pseudomonas aeruginosa* on mortality and duration of mechanical ventilation in patients with *Pseudomonas aeruginosa pneumonia*. 16th ESCMID. 2006; Abstract number: p1264
12. Eslami Nejad Z, Esmaili M, Adeli N S, Iranmanesh Z, Honarvar Sh. *Neisseria meningitidis*. carrier rate among military recruits in Kerman, southeast of Iran. *Arch Iranian Med* 2005; 8(4): 304-310.
13. Martin D, McCallum L, Glennie A, Ruijne N, Blatchford P, et al. Validation of the serum

- bactericidal assay for measurement of functional antibodies against group B meningococci associated with vaccine trials. *Vaccine* 2005; 23: 2218-2221.
14. Klein RD, Edberg SC. Application, significance of, and method for the measurement of antimicrobial concentration in body fluid. In: Lorian V. (editor). *Antibiotics in laboratory Medicine*. 5th edition. Lippincott Williams & Wilkins. 2005; Chap 8: 309.
 15. ORPEGEN Pharma. PHAGOTEST. Test kit for the quantification of phagocytic activity of monocytes and granulocytes in heparinized whole blood. 1996; Available at: www.orpegen.com/work/en/products/diagnostics/phagotest.php
 16. Stoika R, Kaskchak N, Lutsik-kordovsky M, Boyco M, Barska M. In vitro response of phagocytic cell to immuno-modulating agents. *Med Sci Monit* 2001; 7(4): 652-658.
 17. Ahmed H J, Johansson C, Svensson L A, Ahlman K K, Verdrengh M, et al. In vitro and in vivo interactions of *Haemophilus ducreyi* with host phagocytes. *Infect Immun* 2002; 70(2): 899-908.
 18. Martin DR, Glennie A, Ruijter N, McCallum L, Blatchford P, et al. Standardization and validation of the serum bactericidal assay for measurement of immune responses to serogroup B *Neisseria meningitidis* Clin Diagn Lab Immunol 2005; 12(8): 970-976.
 19. Amsterdam D. Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media. In: Lorian V. (editor). In: *Antibiotics in Laboratory Medicine*. 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins. 1996; p: 52-111.
 20. Occhionero M, Usai G, Di Martino M, Le Moli S, Stroffolini T, Mastrantonio P. Serum antibodies to capsular polysaccharide vaccine of group A and C *Neisseria meningitidis* in military recruits in Italy. (abs) *Allergol Immunopathol (Madr)* 1991; 19(1): 39-41.
 21. Muniz-Junqueira MI, Pecanha LMF, Saliva-Filho VL, Cardoso MCA, Tosta CE. Novel microtechnique for assessment of postnatal maturation of the phagocytic function of neutrophils and monocytes. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003; 10(6): 1096-1102.
 22. Ward KN, Fleer A, Verhoef J, Jones DM. Opsonisation and phagocytosis of group B meningococci by polymorphonuclear leucocytes: comparison of sulphonamide sensitive and resistant strains. *J Clin Pathol* 1987; 40(4): 361-367.
 23. Podschun R, Teske E, Ullmann U. Serum resistance properties of *Klebsiella pneumoniae* and *K. oxytoca* isolated from different sources. (abs) *Zentralbl Hyg Umweltmed* 1991; 192(3): 279-285.
 24. Santose GF, Deck RR, Donnelly J, Blackwelder W and Granoff D M. Importance of complement source in measuring meningococcal bactericidal titer. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001; 8(3): 616-623.
 25. Borrow R, Balmer P, Miller E. Meningococcal surrogate of protection- serum bactericidal antibody activity. *Vaccine* 2005; 23: 2222-2227.
 26. Parson NJ, Patel PV, Martin PM, Tan EL, Nairn CA, et al. Gonococci in vivo and in vitro. Further studies on the host and bacterial determinants of gonococcal resistance to killing by human serum, and by phagocytes. (abs). *Antonie Van Leeuwenhoek* 1987; 53(6): 551-55.
 27. Beninati C, Midiri A, Mancuso G, Biondo C, Arigò M, Gerace E, et al. Anti-idiotypic DNA vaccination induces serum bactericidal activity and protection against group B meningococci. *JEM* 2006; 203(1): 111-118.

28. Rezaei N, Aghamohammadi A, Seyed Davar S, Nejati M, Ahmadi H, et al. Serum bactericidal antibody response to serogroup C polysaccharide meningococcal vaccination in children with primary antibody deficiencies. *Vaccine* 2007; 25(29): 5308-5314.
29. Kaneee J M, Jhonson DW, Anderson RK, Moscoplat CC. Comparison of sensitivity and specificity of purified lymphocyte and whole-blood in vitro lymphocyte stimulation assays in detection of *Brucella abortus* infection in cattle. (abs). *J Clin Microbial* 1987; 8(4): 396- 401.
30. Shankey TV, Forman M, Scibell. Optimized whole-blood assay for measurement of ZAP-70 protein expression. *Curr Protoc Cytom* 2007; chap 9.
31. Gorski K, Ferbas J, Tsuji W. A Whole Blood Assay for evaluation of natural killer cell functional activity.(abs).*Clin Immunol* 2008; 127(Suppl 1):S150.Available at:doi:10.1016/j.clim.2008.03.431

Archive of SID