روشهای آزمایشگاهی استاندارد در تشخیص بروسلوز انسان

گردآوری: دکتر اسماعیل ذوقی، دکتر عبدا...عبادی، دکتر علی‌محمد بهروزی‌خواه و دکتر مهران یاراحمدی- موسسه تحقیقاتی رازی

چکیده

معمولاً تشخیص آزمایشگاهی بروسلوز بر اساس جداسازی عامل بیماری و واکنش‌های سرولوژی انجام می‌پذیرد. کشت عامل مسبب بیماری تنها روش دقیق تشخیص بوده، که متأسفانه همیشه امکان پذیر نیست. از این رو، بررسیهای سرولوژی عملیترین روش شناخته شده، و در واکنش‌های سرمی تعیین عیار پادتن سرم معیار و ملاک تشخیص است. در آزمایشهای سرولوژی نیزکاربرد روشهای استاندارد ارائه شده به وسیله سازمان جهانی بهداشت با استفاده از پادگن‌های استاندارد بین‌المللی مورد تأکید می‌باشد.

عموماً، در عفونت بروسلوز IgM و IgG هر دو تشکیل شده، لیکن مراحل تولید آنها متفاوت است. به فاصله کوتاهی پس از آلودگی، ابتدا IgM ظاهر شده و به مدت چند روز تنها ایمونوگلوبولین موجود در سرم می‌باشد. IgG در مرحله دیرتر تولید گردیده و به تدریج نقش برتر نشان می‌دهد. در آزمایش‌های سرولوژی این ایمونوگلوبولین‌ها جستجو می‌شوند. در بخش بروسلوز مؤسسه تحقیقاتی رازی به طور معمول چهار آزمایش مورد توصیه سازمان جهانی بهداشت شامل: رزبنگال، سروآگلوتیناسیون رایت، ۲ مرکاپتواتانول، و ثبوت عناصر مکمل (CF test) انجام شده وگاهی نیز آزمایش کومبس صورت می‌گیرد. به علاوه، در مورد بیماران تب‌دار کشت خون انجام گرفته و در مواردی کشت مایع مغزی نخاعی، مغز استخوان، مایع مفصلی و غیره از طریق بیمارستان‌ها پذیرفته می‌شود. در بررسی حاضر، نتایج آزمایشهای سرولوژی و باکتریولوژی موارد بروسلوز انسانی در طی ۸ سال ۱۳۶۳ تا ۱۳۷۰ ارائه گردیده است. از بین ۱۲۱۲۵ نمونه سرم خون، ۳۴۸۱ مورد مثبت تعیین گردید. در آزمایش‌های سرمی بروسلوز، زمان آزمایش در ارتباط با مرحله بیماری از اهمیت زیادی برخوردار است. معمولاً، در هفته اول عفونت هیچگونه ایمونوگلوبولینی در سرم موجود نبوده و نتیجه آزمایش منفی می‌باشد. نتایج کشت خون مثبت با آزمایش سرمی منفی یا در عیار ضعیف به کرات برخورد شده است. در هفته دوم عفونت، نقش اساسی با IgM خواهد بود. در خلال روزهای ۱۳ تا ۲۱ IgG ظاهر شده، بعد از ۳ تا ۴ هفته به اوج خود رسیده و در طول عفونت و شکل مزمن بیماری نقش اساسی را خواهد داشت، هر چند که موارد استثنا نیز وجود دارد. عموماً، در تشخیص سرولوژی بروسلوز، تعیین تفاوت عیار دو نمونه سرم حداقل به فاصله ۲ هفته مورد توصیه است.

در بررسی باکتریولوژی از کشت ۱۵۳۳ نمونه خون، مغز استخوان، مایع مغزی-نخاعی و مایع مفصلی ۳۰۰ مورد، از ۲۱ نمونه شیر، ۶ مورد از ۳ نمونه اسپرم ۱ مورد، از ۱ نمونه ادرار ۱ مورد، از ۱۹۴ نمونه جفت ۱ مورد، و از ۲۱ نمونه جنین ۱ مورد باکتری بروسلا جدا گردید. تمامی سویه‌های جدا شده Brucella melitensis بوده‌اند.

مقدمه

تشخیص بروسلوز به تفسیر یافته‌های بالینی و آزمایشگاهی وابسته است. بررسی آزمایشگاهی بر اساس جداسازی عامل بیماری از کشت خون، مغز استخوان، مایع مغزی-نخاعی و در دیگر نمونه‌ها،یا از طریق سرولوژی و تعیین افزایش عیار پادتن‌های اختصاصی بروسلا صورت می‌گیرد. با وجودیکه در ایمنی‌شناسی بروسلوز هر دو پاسخ ایمنی هومورال (H.I.) و ایمنی با واسطه یاخته‌ای (C.M.I.) دخالت دارند. لیکن ایمنی با واسطه یاخته‌ای در بروسلوز به طور کامل بررسی نشده، آزمایش‌های موجود استاندارد نگردیده، و لذا از ارزش تشخیصی دقیق برخوردار نبوده و به تأیید با دیگر روشها نیاز دارد (۹). از این رو، در این مبحث فقط آزمایش‌های باکتریولوژی و سرولوژی مورد توجه خواهند بود.

تشخیص باکتریولوژی بروسلوز انسان

جداسازی و شناسائی بروسلا معتبرترین و دقیقترین روش تشخیصی است. دقت کشت خون بین ۱۷ تا ۸۵/۴٪ گزارش شده است. حداقل چهار عامل در این اختلاف دخالت دارند که عبارتند از:

۱- نتایج حاصله در ارتباط با تعداد موارد کشت متغیر است. بهترین نتیجه از ۳ بار کشت خون در طی ۲۴ ساعت بدست می‌آید. در موارد آندوکاردیت حتی کشت بیشتر توصیه شده است.

۲- کشت خون در زمان تب و از بیماران تب‌دار نتایج بهتری بدست می‌دهد. در بررسی ۳۲۶ بیمار ۶۸/۲٪ از بیماران تب‌دار و ۳۱/۸٪ از بیماران بدون تب باکتری بروسلا جدا گردید (۹).

۳- مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در منفی شدن نتیجه کشت مؤثر است.

۴- گونه شایع بروسلا در ناحیه، که معمولاً کشت مثبت *B. melitensis* بیش از *B. abortus* می‌باشد.

در طی ۴ تا ۶ روز بندرت پاسخ مثبت بدست می‌آید، اکثر موارد در روزهای ۷ تا ۲۱ و ۲٪ موارد بعد از ۲۷ روز نتیجه می‌دهد. نگهداری کشت‌های منفی، و به ویژه در ارتباط با *B. abortus* تا ۴۵ روز توصیه شده است (۹،۴).

علاوه بر کشت خون، کشت مغز استخوان نیز مناسب بوده و در یک تحقیق از ۵۰ بیمار بروسلوزی ۴۶ مورد مثبت مغز استخوان در مقابل ۳۵ مورد مثبت خون گزارش شده است. همچنین بروسلا را می‌توان از مایع مغزی - نخاعی، مایع مفصلی، غدد لنفاوی، طحال، کبد، ادرار، اسپرم، خلط، آبسه‌ها و دیگر نمونه‌ها جدا نمود.

استفاده از محیط کشت مناسب ضروری است. به همین دلیل از محیط استاندارد استفاده می‌گردد، بطریهای استاندارد با سطح کافی از محیط جامد مورد نیاز می‌باشد. فلاکن‌های ۵۰ میلی‌متری موجود که بیش از نیمی از محیط جامد به وسیله محیط مایع پوشیده شده اصلاً مناسب نیست. چنانچه کشت *B. melitensis* مورد نظر بوده، هوای حاوی ۱۰٪ گاز دی‌اکسیدکربن ضروری می‌باشد (۴، ۵، ۹، ۱۵).

روش Lysis Centrifugation که در سالهای اخیر متداول گردیده درصد بالایی از موارد کشت خون را از دست داده و توصیه نمی‌گردد. برای تشخیص با کتریولوژی بروسلوز به کتاب میکروبیولوژی بروسلاها مراجعه شود (۲).

تشخیص سرولوژی بروسلوز انسان

اساس تشخیص آزمایش‌های سرمی مبتنی بر شناسائی آنتی‌بادی در سرم مورد بررسی است. با وجودیکه انواع مختلف آزمایش‌های سرمی جهت تشخیص بروسلوز مورد استفاده قرار گرفته، اما هنوز آزمایش واحدی که به تنهائی قادر به شناسائی عفونت‌های حاد، تحت حاد، و مزمن بوده یا عفونت فعال را از بهبودی متمایز سازد وجود نداشته، و لذا مجموعه‌ای از آزمایش‌ها مورد توجه می‌باشد. با این وجود، می‌بایستی خاطر نشان ساخت که: الف- بروسلاها ساختار پادگنی پیچیده‌ای دارند، ب- ایمنی مشابه به وسیله پادگن‌های مختلف سلول باکتری تحریک نمی‌شود، و ج- پاسخ سرولوژی در ارتباط با مرحله پیشرفت بیماری متفاوت است (۹).

ساختار پادگنی بروسلا

گونه‌های بروسلا از اعضای گروه باکتری‌های گرم منفی بوده و دیواره سلولی آنها از ساختمانی سه لایه شامل غشأ داخلی یا سیتوپلاسمی، فضای پری‌پلاسمی، و غشأ خارجی تشکیل یافته است (۱۰، ۱۴، ۱۷). پادگن‌های سطحی بروسلا در دیواره سلولی و پادگن‌های درونی در داخل سیتوپلاسم قرار گرفته‌اند.

پادگن‌های سطحی

از زمان کشف اپی‌توپ‌های A و M در سلولهای بروسلا بوسیله Wilson و Miles در ۱۹۳۲،

بررسیهای متعددی بر اساس آزمایش‌های مختلف عصاره‌های محلول سویه‌های نرم[1] (S) و زبر[2] (R) بروسلاها انجام پذیرفته و ساختمان پادگنی آنها را وسعت بخشیده است. این بررسیها نشان داده‌اند که آنتی ژنهای A و M به لیپوپلی‌ساکارید دیواره سلولی باکتری مربوط می‌باشند (۵، ۱۴، ۱۷). غشأ خارجی بروسلا حاوی پروتئین (پروتئین‌های غشأ خارجی - OMP)، لیپو پلی‌ساکارید (LPS) و فسفو لیپیدها است. پروتئین‌های غشا خارجی *B. abortus* حاوی ۳ گروه اصلی با وزن مولکولی ۲۷-۲۵، ۳۸-۳۶ و ۴۳ کیلو دالتون و چندین گروه فرعی با وزن مولکولی ۱۰، ۱۵، ۱۶، ۱۶/۵، ۱۹، ۳۴-۳۱، ۷۰-۶۸، و ۹۴-۸۸ کیلو دالتون می‌باشند. گروه پروتئین ۳۸-۳۶ کیلو دالتون به عنوان پورین شناسائی شده و گروه ۲۷-۲۵ کیلو دالتون حاوی کربوئیدراتهاست. سویه‌های *B. melitensis*، *B. canis* و *B. ovis* نیز حاوی دو گروه اصلی اخیر بوده، لیکن نسبت گروه ۲۷-۲۵ کیلودالتون به گروه ۳۸-۳۶ کیلو دالتون بسیار بیشتر از *B. abortus* می‌باشد(۱۷،۸).

لیپو پلی‌ساکارید موجود در غشا خارجی از دو قسمت R-LPS و S-LPS تشکیل یافته است. لیپو پلی‌ساکارید زبر (R-LPS) در نتیجه هیدرولیز اسیدی به پلی‌ساکارید زبر (R-PS) و لیپید A تبدیل می‌شود. لیپو پلی‌ساکارید صاف (S-LPS) نیز در نتیجه اتوکلاو در محیط اسیدی ضعیف به پلی‌ساکارید صاف (S-PS) و لیپید A تجزیه می‌گردد (۷، ۱۷). S-PS از زنجیره Q پلی‌ساکارید و R-PS تشکیل یافته است . زنجیره Q پلی‌ساکارید *B. abortus* صاف حاوی ترکیب ۶۴، دی دئوکسی ۴- فورمامیدو -α- D- مانوبیرانوزیل بوده که به وسیله اتم‌های کربن ۱ و ۲ به الیگوساکاریدهای مرکزی شامل گلوکز، مانوز، کینووزامین، ۲-کتو- ۳ دئوکسی اوکتونات (KDO) و گلوکز آمین اتصال می‌یابد (۶، ۷، ۱۴، ۱۷). زنجیر Q پلی‌ساکارید *B. melitensis* نیز مشابه *B. abortus* بوده، جز آنکه به وسیله اتم‌های کربن ۱ و ۳، به عوض ۱ و۲، به الیگو ساکاریدهای مرکزی ارتباط می‌یابد.

لیپید A از اسیدهای چرب تشکیل یافته و حاوی ۵۰٪ اسیدپالمتیک، ۱۰٪ اسید استآریک، و کمتر از ۵٪ اسید ئیدروکسی‌لات است (۱۴).

پلی‌ساکارید زبر (R-PS) فاقد زنجیر Q صاف بوده و به استثنای کینووزامین، دیگر قندهای S-PS را دارا می‌باشد (۱۴، ۱۷). اسیدهای چرب R-LPS نیز مشابه اسیدهای چرب S-LPS است (۱۴).

ترکیب شیمیائی لایه پپتید وگلیکان فضای پری پلاسمی شامل گلوکزآمین، اسید مورامیک، آلانین اسید گلوتامین، و اسید دی آمینو پی‌میلیک می‌باشد (۱۴). غشا داخلی یا سیتوپلاسمی بروسلا نیز حاوی S-LPS است. به علاوه دو پلی ساکارید، هاپتن اصلی (NH) و پلی‌ساکارید ب (Poly B) نیز در آن گزارش شده، هر چند که بررسیهای تازه‌تر نقش آن‌ها را به S-LPS نسبت داده و به منظور اجتناب از اشتباه در نامگذاری اجزا ترکیب ساختمانی بر اساس عملکرد آنها، حذف نام این دو پلی‌ساکارید به وسیله Zygmunt و همکاران در ۱۹۹۱ پیشنهاد شده است (۱۶، ۱۷).

پادگن‌های درونی

پادگن‌های درونی یا سیتوپلاسمی بروسلاها از حداقل ۲۰ پروتئین تشکیل یافته است. پادگن A2 از پروتئین‌های مقاوم به حرارت داخل سیتوپلاسمی با وزن مولکولی زیاد می‌باشد (۱۷). عصاره نمکی سلولهای *B. melitensis* R ۱۱۵ به نام بروسلین- INRA حاوی ۲۰ پروتئین بوده و از پادگنهای سیتوپلاسمی است (۱۲).

پادگن‌های تشخیصی

پروتئین‌های اصلی غشا خارجی در روشهای تشخیص مربوط به ایمنی با واسطه یاخته‌ای (C.M.I) مانند واکنش ازدیاد حساسیت داخل جلدی و آزمایش لنفوبلاستیک دخالت دارند. پروتئین‌های فرعی و به ویژه پروتئین‌های با وزن مولکولی ۱۰، ۱۹، ۸۹ کیلو دالتون در آزمایش‌های سرولوژی واکنش نشان می‌دهند.

لیپو پلی‌ساکارید صاف (S-LPS) پادگن اصلی در آزمایش‌های سرمی استاندارد مانند رزبنگال، سرواگلوتیناسیون رایت، ثبوت عناصر مکمل، ۲ مرکاپتواتانول، ریوانل، کومبس و غیره می‌باشد. بروسلین- INRA تهیه شده از پروتئین‌های داخلی بروسلا در روش آلرژیک پوستی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

پادگن A2 جهت روشهای تشخیص پرسیپیتاسیون (رسوبی)، ایمونو دیفیوزیون، ایمونو الکتروفورز، رادیو ایمونواسی (RIA)، الیزا (ELISA) و وسترن‌بلات مورد استفاده می‌باشد (۶، ۱۲، ۱۴، ۱۷) بنابراین بر اساس ساختار پادگنی بروسلا، آزمایش‌های سرمی را می‌توان به دو دسته تقسیم نمود: الف- آزمایش‌هائی که تمامی پیکر باکتری به عنوان پادگن استفاده می‌شود و ب- آزمایش‌هائی که توان قسمت‌هایی از پیکر باکتری به عنوان پادگن استفاده می‌گردد. آزمایش‌های مورد اول، پادتن در برابر پادگن‌های سطح سلولی را آشکار ساخته که مهمترین آنها LPS بوده و روش‌های رزبنگال، سرو آگلوتیناسیون رایت، ۲- مرکاپتواتانول، ریوانل، ثبوت عناصر مکمل، کومبس و ایمونوفلورسانس از آن جمله‌اند. در مورد دوم پادتن در مقابل قسمتی از LPS به وسیله رادیو ایمونواسی، الیزا، ژل پرسیپیتاسیون، پادتن در مقابل زنجیر O به وسیله رادیال ایمیونودیفوزیون و پادتن در مقابل پادگنهای سیتوپلاسمی با ژل پرسیپیتاسیون، الیزا، وسترن بلات و غیره آشکار می‌گردد. در این بررسی آزمایشهای اول مورد توجه خواهند بود.

در پاسخ ایمنی هومورال بروسلوز IgA, IgM, IgG(IgG2, IgG1) و مقدار جزئی IgE تولید گردیده، که به ویژه IgG, IgM در آزمایش‌های سرولوژی دخالت دارند. به دنبال واکسیناسیون یا عفونت بروسلوز، اغلب IgM از روز پنجم تا هفتم ظاهر شده و در طی ۱۳ تا ۲۱ روز به اوج خود می‌رسد. تولید IgG از روز ۱۴ تا ۲۱ شروع شده و در خلال ۲۸ تا ۴۲ روز پس از بروز باکتری در بدن به میزان نهایی خواهد رسید.

IgA نیز به مقدار کم در فاصله بین دو ایمیونوگلوبولین فوق تشکیل می‌گردد. در واکسیناسیون عیار IgG به تدریج و زودتر از IgM کاهش یافته، در صورتیکه در حالت ابتلا به بیماری عیار IgG و به ویژه IgG1 به حد بالاتری رسیده و دوام بیشتری دارد، به طوریکه در شکل‌های مزمن بروسلوز ممکن است فقط IgG موجود باشد.

در بررسی سرولوژی بروسلوز، زمانی که سرم مورد آزمایش قرار می‌گیرد از ارزش زیادی برخوردار است . بدون تردید چنانچه سرم هفته اول آلودگی مورد بررسی باشد هیچگونه ایمیونوگلوبولینی موجود نبوده و نتیجه آزمایش منفی خواهد بود. در هفته دوم نقش اساسی را IgM خواهد داشت. بین هفته دوم و سوم تشکیل IgG شروع شده و ۳ هفته پس از آن به اوج خود رسیده و در حالت عفونت ایمیونوگلوبولین اصلی خواهد بود. مسلماً در ارتباط با سرم‌هائی بدون تاریخچه مشخص از آلودگی، تفسیر مشکل بوده لیکن با بررسی دو نمونه سرم در فاصلهٔ حداقل دو هفته و تعیین تفاوت نوع ایمیونوگلوبولین اصلی موجود در سرم تا حدی راه گشا خواهد بود. از طرفی دیگر، دخالت ایمیونوگلوبولین‌ها در آزمایشهای سرمی نیز تا حدی تعیین کننده بوده و به ویژه در مواردی که فقط یک نمونه سرم مورد آزمایش قرار می‌گیرد این ارزش بیشتر می‌شود. برای تشخیص سرولوژی بروسلوز انسان آزمایشهای رزبنگال، سرواگلوتیناسیون رایت، ۲- مرکاپتواتانول، ثبوت عناصر مکمل و آنتی‌گلوبولین کومبس به روش استاندارد و با استفاده از پادگنهای استاندارد مورد توصیه سازمان جهانی بهداشت (W.H.O) می‌باشد. اکثر بیماران مبتلا به بروسلوز حاد در تمامی آزمایشها واکنش مثبت نشان می‌دهند. معمولاً آزمایشهای رزبنگال و رایت‌به جهت آنکه هر دو IgM و IgG در آنها دخالت دارند، زودتر از دیگر آزمایشها ایجاد واکنش می‌کنند. در آزمایشهای ۲- مرکاپتواتانول و ثبوت عناصر مکمل IgG مداخله نموده که از نقطه نظر تفکیک وضعیت ایمنی یا عفونت مفید می‌باشند. در موارد وجود پادتنهای ناقص، آزمایش کومبس نیز ارزشمند خواهد بود. در برخی از موارد استثنایی و حتی در بیمارانی با تأیید باکتریولوژی عفونت، آزمایشهای سرمی منفی باقی می‌مانند.

در بررسی سرولوژی بیماری، تعیین تفاوت عیار دو نمونه سرم به فاصله حداقل ۲ هفته بسیار با ارزش بوده که متأسفانه این امکان همیشه موجود نیست. غالباً در افرادیکه تماس مکرر با پادگن بروسلا دارند، آزمایشهای سرمی مثبت بدون وجود علائم بالینی مشاهده می‌شود ازاین رو نتایج آزمایشهای سرمی در بروسلوز شغلی از ارزش محدودی برخوردار است. گاهی اوقات نیز واکنش‌های مثبت کاذب ناشی از پادتن‌های دیگر باکتریها که با پادگن بروسلا قرابت پادگنی دارند. ایجاد می‌گردد. بنابراین، ضمن آنکه استفاده از روشهای آزمایشگاهی استاندارد مورد توصیه بوده است، در تشخیص بروسلوز در نظر گرفتن اطلاعات

توام همه گیری‌شناسی، درمانگاهی و آزمایشگاهی ضروری است (۴، ۵، ۹، ۳).

روشهای سرولوژی استاندارد

همانطوریکه ذکر گردیده آزمایش‌های رزبنگال، سروآگلوتیناسیون رایت، ۲- مرکاپتواتانول، ثبوت عناصر مکمل و کومبس به‌روش استاندارد جهت تشخیص بروسلوز انسان بوسیله کمیته کارشناسان بروسلوز FAO/WHO توصیه شده (۴، ۱۱، ۱۳، ۱۴)، هرچند که در سالهای اخیر آزمایش کومبس از اعتبار کمتری برخوردار است (۹). به منظور جلوگیری از اطاله کلام به شرح مختصر سه آزمایش رایج‌تر رزبنگال، سروآگلوتیناسیون و ۲- مرکاپتواتانول اکتفا شده و از توصیف آزمایشهای ثبوت عناصر مکمل و آنتی‌گلوبولین کومبس خودداری شده است.

آزمایش رزبنگال

این آزمایش در منابع مختلف به اسامی آزمایش رزبنگال پلیت (R.B.P.T.) آزمایش کارد (Card T.) آزمایش اسید پلیت (A.P.T) آزمایش بافر پلیت آگلوتیناسیون (B.P.A.T) و آزمایش پلیت (P.T) نامیده شده‌است و از سال ۱۹۷۰ و به دنبال منسوخ شدن تیتراژ بر روی صفحه جایگزین آزمایش را پید (R.T) یا آزمایش سریع روی لام (R.S.T) گردیده است (۹، ۱۳، ۱).

آنتی‌ژن رزبنگال با pH اسیدی برابر با ۳/۶±۵٪ و به جرم نهائی ۸٪ سویه صاف *B.abortus* ۹۹ یا ۱۹ که فاکتورهای پادگنی مشترک با دیگر سویه‌های صاف بروسلا دارند طبق روش استاندارد بین‌المللی در موسسه رازی تهیه شده است. این پادگن جهت آزمایش مقدماتی بروسلوز استفاده می‌شود. پادگن در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت زمان طولانی ثابت مانده و تا زمانی که اتو آگلوتینه نشده قابل مصرف می‌باشد (۴، ۵).

جهت انجام آزمایش یک قطره معادل ۰/۰۳ میلی لیتر سرم را با قطره مساوی پادگن بر روی صفحه‌ای مناسب قرار داده، با میله نازک چوبی یا شیشه‌ای کاملاً مخلوط نموده، به مدت حداکثر چهار دقیقه حرکت داده و نتیجه قرائت می‌شود.

در این آزمایش نتیجه مثبت یا منفی است. واکنش مثبت در حالتی است که آگلوتیناسیون صورت گرفته و در موارد منفی دو قطره مخلوط شده به حالت یکنواخت باقی خواهد ماند. در بررسیهای اخیر این آزمایش به عنوان حساسترین روش و نزدیک به الیزا شناخته شده است. به علاوه واکنش متقاطع با تولارمی و *Vibrio cholera* ندارد. پادگن باید تا هنگام مصرف دور از نور و در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شود. ضروری است نمونه سرم و مقدار مورد نیاز پادگن را به مدت نیم تا یکساعت در دمای آزمایشگاه قرار داده و سپس آزمایش انجام گیرد.

آزمایش سروآگلوتیناسیون (رایت)

این آزمایش در منابع مختلف ممکن است به اسامی آزمایش آگلوتیناسیون لوله‌ای استاندارد (S.T.A.T.)، آزمایش آگلوتیناسیون سرم (S.A.T)، آزمایش آگلوتیناسیون به روش کند یا (slow A.T.)، آزمایش آگلوتیناسیون لوله‌ای (T.A.T.) تیوب تست (T.T.)، آزمایش رایت (wright T.) آزمایش آگلوتیناسیون استاندارد (stand.A.T.) نامیده شود، متداولترین آزمایشی است که جهت تشخیص بروسلوز بکار گرفته می‌شود.

جدول ۱- نتایج مقایسه‌ای مواردی از کشت مثبت خون با عیارهای متفاوت آزمایش‌های سرمی

شماره نمونه	نتیجه کشت خون	R.B.P.T	S.A.T عیارانتهایی	C.F.T عیارانتهایی	2-ME.T عیارانتهایی
۱	+	+	۱/۲۰	۱/۱۰	۱/۱۰
۲	+	+	۱/۴۰	۱/۴۰	۱/۴۰
۳	+	+	۱/۱۶۰	۱/۴۰	۱/۴۰
۴	+	+	۱/۳۲۰	۱/۱۶۰	۱/۳۲۰
۵	+	+	۱/۱۲۸۰	--	--
۶	+	+	۱/۴۰	--	--
۷	+	+	۱/۱۰	--	--

پادگن از سویه ۹۹ یا ۱۹ *B.abortus* با عوامل پادگنی مشترک دیگر سویه‌های صاف بروسلا بر طبق روش ارائه شده سازمان جهانی بهداشت در موسسه رازی تهیه شده و با سرم استاندارد بین‌المللی مقابله و استاندارد گردیده است (۴، ۵). پادگن با غلظت ۱۰ برابرتوزیع شده و در زمان مصرف باید به نسبت $\frac{1}{10}$ رقیق گردد. تامپون مصرفی برای نمونه‌های سرم انسانی از آب نمک ۵٪ درصد حاوی ۰/۵ درصد فنل تشکیل شده است. برای رقیق کردن سرم بیمار نیز از همین تامپون استفاده می‌شود. با استفاده از این محلول پادگن استاندارد، پدیده پروزون (prozone) نادر است. جهت انجام آزمایش، در یک سری لوله‌های هموليز از سرم مورد آزمایش رقتهای $\frac{1}{5}$، $\frac{1}{10}$، $\frac{1}{20}$، $\frac{1}{40}$، و الی آخر به ترتیب زیر تهیه می‌شود:

۱- در لوله اول ۰/۰۸ میلی لیتر و در لوله‌های بعدی ۰/۰۵ میلی لیتر آب نمک ۵ درصد حاوی ۰/۵ درصد فنل ریخته می‌شود.

۲- ۰/۲ میلی لیتر از سرم مورد آزمایش در لوله اول ریخته که رقت $\frac{1}{5}$ تهیه شده و سپس از لوله اول ۰/۵ میلی لیتر به لوله دوم (رقت $\frac{1}{10}$) و به همین ترتیب تا لوله آخر ادامه داده و از لوله آخر ۰/۵ میلی لیتر اضافی دور ریخته می‌شود.

۳- پادگن به مقدار مورد نیاز رقیق شده و به هر لوله ۰/۵ میلی لیتر افزوده شد که در نتیجه به ترتیب رقتهای $\frac{1}{10}$، $\frac{1}{20}$، $\frac{1}{40}$، و الی آخر بدست می‌آید.

۴- محتوی لوله‌ها را کاملا مخلوط نموده و برای مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرارداده و پس‌ازآن‌نتیجه قرائت می‌شود.

آگلوتیناسیون ۱۰۰٪ معرف +۴، ۷۵٪ معرف +۳، ۵۰٪ معرف +۲، ۲۵٪ معرف +۱، و صفر درصد معرف منفی می‌باشد: آنتی‌ژن باید تا هنگام مصرف دور از نور و در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شود. در مورد تفسیر آزمایش رایت و تعیین عیار آلودگی هنوز اتفاق نظر وجود ندارد. در کتب درسی غربی عیار $\frac{1}{160}$ به بالا به عنوان عفونت در نظر گرفته شده است. اما باید خاطر نشان ساخت که اولا در غرب و به ویژه ایالات متحده آلودگی *B.melitensis* مهم نبوده و بروسلوز ناشی از *B.abortus* و *B.suis* مطرح می‌باشد و ثانیاً بیماری صرفا در ارتباط با شغل اتفاق افتاده و ضرورتاً بعنوان بیماری شغلی و در افرادی با تماس مکرر در نظر گرفته می‌شود. عفونت *B.melitensis* بیشتر مشکل خاورمیانه و کشورهای حوزه مدیترانه است. پژوهندگان اسپانیائی در موردی از بررسی ۲۸۳ نمونه سرم خاطر نشان ساخته‌اند که چنانچه عیار $\frac{1}{80}$ به بالا به عنوان مثبت در نظر گرفته شود، ۲۹/۲٪ موارد مثبت از دست خواهد رفت. در همین بررسی ۳/۴٪ از موارد مثبت در تیتر $\frac{1}{10}$ > بوده‌اند. با این وجود، در اسپانیا عیار $\frac{1}{80}$ برای جمعیت شهری (بیماری غیر شغلی) و عیار $\frac{1}{320}$ برای جمعیت روستائی (بروسلوز شغلی) پیشنهاد گردیده است. از طرفی دیگر، پژوهندگان انستیتو مریو فرانسه عیار $\frac{1}{40}$ به بالا را ملاک عفونت تعیین نموده‌اند. طبیعی است این عیارها در ارتباط با پادگن‌هائی مشابه کیفیت آنتی‌ژن موسسه رازی مطرح می‌باشد (۹).

در تجربیات ما ضمن آنکه عیار قبل از درمان در حد $\frac{1}{80}$ به بالا مثبت تلقی شده، لیکن عیارهای پائین‌تر به ویژه در ارتباط با بیماری غیر شغلی نباید کم اهمیت در نظر گرفته شود مگر آنکه خلاف آن ثابت شود و بدین معنی که از نظر درمانگاهی تظاهراتی وجود نداشته و عیار آزمایش ۲ هفته بعد افزایش نیابد و کشت خون منفی بوده، یا در آزمایش ۲- مرکاپتواتانول IgG فعال موجود نباشد. همانطوریکه قبلاً ذکر شده مراحل تشکیل پادتن متفاوت است. عموماً در اوایل بیماری پادتن در سطح بالا وجود ندارد. موارد کشت مثبت خون با نتایج ضعیف عیار سرمی یا حتی منفی برخورد شده است. مواردی از نمونه‌های کشت مثبت خون عیارهای متفاوت سرولوژی به عنوان مثال نشان داده شده است. از این رو، ضمن آنکه عیار پیش از درمان $\frac{1}{80}$ به بالا نشانه‌ای از عفونت بوده، عیارهای پائین‌تر به ویژه در حد $\frac{1}{20}$ و $\frac{1}{40}$ می‌باید مشکوک تلقی شده تا خلاف آن به ثبوت رسد. البته تردیدی نیست که این تفسیر تنها در ارتباط با روش و پادگن استاندارد فوق الذکر صادق است.

آزمایش ۲- مرکاپتواتانول

به طور معمول در عفونت فعال بروسلوز نقش برتر را IgG ایفا می‌نماید. مولکولهای IgM در اثر ترکیباتی چون سیستئین، دی‌تیوتریتول، و ۲-مرکاپتواتانول تجزیه شده و خاصیت خود را از دست می‌دهد، در حالیکه مواد فوق برروی IgG تأثیری ندادند. از این رو، آزمایش مرکاپتواتانول اختصاصاً IgG سرم را نشان داده و در تشخیص عفونت فعال و هم‌چنین در موارد مزمن بیماری که حد IgG و به ویژه IgG1 بالاتر از IgM بوده و گاهی تنهاایمونوگلوبولین موجود درسرم بوده، مفید است.

از طرف دیگر، بدنبال درمان مؤثر بیماری عیار IgG به سرعت کاهش یافته، در حالیکه عیار IgM از ۶ ماه تا ۲ سال ممکن است دوام داشته و به طور معمول هر ۳ ماه یک رقت کاهش می‌یابد. از این رو،

بررسی دو نمونه سرم دوران بیماری و نقاهت، و تعیین تفاوت عیار پادتن روش مؤثر درمان را مشخص خواهد ساخت.

جهت انجام آزمایش ابتدا محلول ۰/۲ مولکول گرم در لیتر مرکاپتواتانول در سرم فیزیولوژی ۸/۵ در هزار نمک تهیه نموده (۰/۲ مولکول گرم در لیتر = ۱/۳۶ میلی لیتر مرکاپتواتانل در ۱۰۰ میلی لیتر سرم فیزیولوژی) و سپس به ترتیب زیر عمل می‌شود.

۱- به تعداد سرم‌های مورد آزمایش لوله هموليز در نظر گرفته شده و برای هر نمونه سرم مواد زیر در لوله ریخته می‌شود: ۰/۳ میلی لیتر سرم فیزیولوژی ۸/۵ در هزار نمک + ۰/۲ میلی لیتر سرم خون مورد آزمایش + ۰/۵ میلی لیتر محلول ۰/۲ مولکول گرم در لیتر مرکاپتواتانول

۲- به مدت یکساعت لوله‌ها را در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده تا اینکه مرکاپتواتانول بر روی سرم تأثیر نماید.

۳- پس از انقضای مدت لوله‌ها را از گرمخانه خارج و برای هر نمونه سرم تعداد مورد نیاز لوله در نظر گرفته، همانند روش سروآ گلوتیناسیون برای تعیین رقت عمل می‌شود. بدین ترتیب که ۰/۵ میلی لیتر سرم فیزیولوژی در تمامی لوله‌ها به استثنای لوله اول ریخته و بعد ۰/۵ میلی لیتر از لوله اول به لوله‌دوم انتقال داده، مخلوط نموده، از لوله دوم به سوم و الی آخر ادامه داده می‌شود.

۴- پس از تعیین رقت به هر لوله ۰/۵ میلی لیتر از همان آنتی‌ژن سروآ گلوتیناسیون که با سرم فیزیولوژی بدون فنل رقیق شده، اضافه می‌شود.

۵- لوله‌ها به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه قرار داده شده و پس از آن نتیجه همانند سروآ گلوتیناسیون رایت قرائت می‌گردد.

به طور معمول عیار از درمان $\frac{1}{40}$ به بالا در آزمایش مرکاپتواتانول مثبت تلقی شده، ضمن آنکه هر عیاری در این آزمایش به ویژه عیار $\frac{1}{20}$ می‌تواند نشانه‌ای ازآلودگی بوده مگر خلاف‌آن ثابت شود.

لازم به یادآوری است که تامپون مصرفی برای رقیق کردن سرم و آنتی‌ژن سرم فیزیولوژی بدون فنل بوده و مرکاپتواتانول باید در روز آزمایش‌آماده شود.

آزمایش ثبوت عناصر مکمل (C.F.T) نیز در تشخیص بروسلوزازارزش زیادی‌برخوردار بوده و دربررسیهای‌مقایسه‌ای‌نتایج‌زیر حاصل‌شده‌است(۹).

الف - نتایج S.A.T. و C.F.T. در ۹۱/۷٪ موارد مثبت هستند، ب - طی ۴ تا ۵ هفته بعد از شروع بیماری عیار C.F.T بالاتر از S.A.T است، ج - در روزهای اول بیماری، نتیجه منفی C.F.T عیار قابل اهمیت S.A.T در ۴/۶٪ موارد اتفاق می‌افتد و د - عیار منفی S.A.T با عیار مثبت C.F.T گزارش شده است.

نتیجه

۱- در تشخیص بروسلوز اطلاعات همه گیری شناسی، بالینی و آزمایشگاهی به طور توام در نظر گرفته شود.

۲- تا حد امکان کشت خون، مغز استخوان و .... انجام شود.

۳- با هر نوع آنتی‌ژن تیتراژ بر روی صفحه صورت نگیرد و از آزمایش رزبنگال فقط به عنوان روش مقدماتی سریع استفاده شده و نمونه‌های مثبت در روش لوله‌ای استاندارد تیتراژ شود.

۴- چنانچه فقط از آزمایش سروآ گلوتیناسیون لوله‌ای (رایت) جهت تعیین عیار استفاده شود، عیار قبل از درمان در حد $\frac{1}{80}$ به بالا مثبت تلقی شده، ضمن آنکه عیارهای پائین‌تر و به ویژه در حد $\frac{1}{20}$ و $\frac{1}{40}$ مشکوک در نظر گرفته شده تا خلاف آن ثابت شود (عیار رو به افزایش در ۲ هفته بعد وجود نداشته باشد).

۵- ضمن آنکه عیار قبل از درمان $\frac{1}{40}$ به بالا در آزمایش مرکاپتواتانول به عنوان مثبت تلقی شده، لیکن هر عیاری در این آزمایش و به ویژه در حد $\frac{1}{20}$ میتواند نشانه‌ای از آلودگی بوده مگر اینکه خلاف آن ثابت شود.

۶- در صورت امکان از بیماران مظنون به بروسلوز با کشت خون منفی و عیار رایت ضعیف آزمایش‌های تکمیلی ثبوت عناصر مکمل، کومبس، ایمیونو الکتروفورز و الیزا انجام شود.

۷- کاربرد صحیح آزمایش‌ها به روش استاندارد و پادگن‌های استاندارد ملاک تشخیص بوده و مورد توصیه است.

نتیجه گیری:

بالاخره، در بررسی سرولوژی نمونه‌های انسانی طی ۸ سال ۱۳۶۳ تا ۱۳۷۰ در موسسه رازی نتایج زیر بدست آمده است: در بررسیهای سرولوژی به طور معمول آزمایش‌های رزبنگال سروآ گلوتیناسیون رایت، ۲- مرکاپتواتانول و ثبوت عناصر مکمل انجام می‌شود. نتیجه سرولوژی در مرحله بیماری از اهمیت خاصی برخوردار بوده و موارد کشت خون مثبت ذکر شده در جدول ۱ با نتایج متفاوت سرولوژی نمونه‌ای از بسیار موارد است. در بررسی حاضر، از بین ۱۲۱۲۵ نمونه سرم خون، ۳۴۸۱ مورد مثبت تعیین گردید. در تشخیص باکتریولوژی از کشت ۱۵۳۳ نمونه خون، مغز استخوان، مایع مغزی - نخاعی و مایع مفصلی ۳۰۰ مورد،از ۲۱ نمونه شیر ۶ مورد،از ۳ نمونه اسپرم ۱ مورد،از ۱ نمونه ادرار ۱ مورد،از ۱۹۴ نمونه جفت ۱ مورد، واز ۲۱ نمونه جنین ۱ مورد باکتری بروسلا جدا گردید. تمامی سویه‌های جدا شده تعیین تیپ گردیده و *B.melitensis* بیوتایپ یک، ۲۴۷ مورد، *B.melitensis* بیوتایپ دو ۵۸ مورد و *B.melitensis* بیوتایپ سه، مورد بوده‌اند.

منابع مورد استفاده:

۱- دسته گلی - کامران و منیری - رضوان: ۱۳۷۱ بروسلوز (ام. منیر. مادکور)- چاپ و نشر بنیاد

۲- ذوقی - اسماعیل: ۱۳۶۹، میکروبیولوژی بروسلاها، سازمان تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی

۳- ذوقی - اسماعیل: ۱۳۶۹، تحقیقاتی درباره بروسلوز ، سازمان تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی.

4- Alton G.G., Jones L.M, and Piotz D.E., 1975, Laboratory techniques in brucellosis. Geneva, W.H.O.

5- Alton G.G., Jones L.M.,1988, Angus R.D.,and Verger J.M., Techniques for the Brucella Laboratory. Paris, INRA.

6- Bundle D.P.,Cherwonogrodsky J.W., Carrof M., and Perry M.B., 1987, The Lipopolysacharides of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*. Ann. Inst. Pasteur Microbiol, 138:92-98.

7- Caroff M., Bundle D.R.,perry M.B., cherwonogrodsky J.W., and Duncan J.R.,1984 -Antigenic S-type lipopolysacharide of *Brucella abortus* 1119-3. Lnfect. Immun. 46:384-388.

8- Charmichael L.E., Loubert J.G., and Jones.L., 1987, Characterization of *Brucella canis* protein antigens and polypeptide antibody response of infected dogs. Vet. Microbiol. 19:373-378.

9- Diaz R., and Morion I., 1990, Laboratory techniques in the diagnosis of human brucellosis. In: brucellosis: clinical and laboratory aspects. Edited by Young E.J., and Corbel J., CrC press.

10- Dubray G., 1976, Localization cellulaire des polyosides des bacteries des genre Brucella et Escherichia en phase lisse (s)ourugueuse (R). Ann. Microbiol. Paris, 1275:133-149

11- Elberg S.S., 1983 -A guide to the diagnosis, treatment and prevention of human brucellosis. Geneva VPH 81, 31 Rev.

12- Fenesterbank R., and Dubray G.,1980 Brucellin, an allergen used in diagnosing brucellosis. W.H.O.

13- Joint FAO/WHO Expert Committe on Brucellosis. Fifth Report, Technical Report Series 464. W.H.O Geneva, 1970

14- Joint FAO/WHO Expert Committe on Brucellosis. Sixth Report, Technical Report Series 740, W.H.O., Geneva, 1986.

15- Zowghi E., and Ebadi A.,1986 A survey on human brucellosis (Malta fever) in Iran. Arch. Inst. Razi. 36,37.

16- Zygmunt M.S., Dubray G., Bundle D.R., and Perry M.B.1988., Purified native haptens of *Brucella abortus* B.19 and *Brucella melitensis* 16M reveal the lipopolysacharide origin of the antigens. Ann. Inst. Pasteur Microbiol. 139:421-433.

17- Zygmunt M.S., Dubray G., Limet J.N., Cloeckaert A., Jacques J., and TK-o V.O., Antigenic structure of Brucella: Protective and diagnostic antigens. Symposium on Brucella and Brucellosis in Man and Animals. 24-26 Sept.1991, Izmir, Turkey.

پاورقی

1- Smooth 2- Rough