بسمه تعالی

وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی
اداره کل آزمایشگاه مرجع سلامت

روشهای آزمایشگاهی تشخیص تب مالت
(سرولوژی)

تهیه کننده: دکتر سید عباس حسینی تقوی

این جزوه با توجه به توصیه های WHO تدوین شده وهدف از تنظیم این جزوه ارائه یک دستورالعمل استاندارد جهت آزمایش رایت می باشد ضمنا" کوشش شده است که روشهای رایج تشخیص آزمایشگاهی بروسلوز را به شکل یکسان در آورده در حد امکان از گزارشهای متفاوت تیتراسیون یک نمونه واحد جلوگیری به عمل آید.

تب مالت بیماری عفونی است و عوامل ایجاد کننده آن در انسان کوکوباسیل گرم منفی میباشد که شامل:

۱- بروسلا B-Melitensis که بیشتر در بز ،گاو و گوسفند و مسئول اکثر موارد تب مالت در ایران می باشد.

۲- بروسلا B-Abortus در گاو

۳- بروسلاB-Suis در خوک

۴- بروسلا B-Canis در سگ ایجاد بیماری می کند.

آنتی ژنهای بروسلا: آنتی ژنهای MوA به لیپو پلی ساکارید دیواره سلول باکتری مربوط میباشد ضمنا" بروسلا آنتی ژن مشترک با ویبره کلره داشته و واکسیناسیون بر علیه وبا تیتر آنتی بادی بروسلا را بصورت کاذب با بعضی از آنتی ژنهای ساخته شده بالا می برد.

آنتی بادی:

در پاسخ ایمنی هومورال بروسلوز IgG,IgM (IgG۱وIgG۲) IgA, مقدار جزئی IgE تولید گردیده که بویژه IgM , IgG در آزمایشگاههای سرولوژی دخالت دارند ودر عفونت بروسلوز, IgM از روز پنجم تا هفتم ظاهر شده و در طی ۱۳ تا ۲۱ روز پس از ورود باکتری در بدن به میزان نهایی خواهد رسید. IgA نیز به مقدار کم در فاصله بین ظهور دو ایمونوگلوبولین فوق الذکر بوجود می آید.

در حالت بیماری تیتر IgG به مقدار بالا تر رسیده و دوام بیشتری دارد و در بررسی سرولوژی بروسلوز هنگامی که سرم مورد آزمایش قرار می گیرد از ارزش زیادی برخوردار است . بدون تردید

چنانچه سرم هفته اول آلودگی مورد بررسی باشد هیچگونه ایمونو گلوبولینی موجود نبوده و در نتیجه آزمایش منفی خواهد بود. در هفته دوم نقش برتر را IgM خواهد داشت. بین هفته دوم وسوم تشکیل IgG شروع شده و سه هفته پس از آن به اوج خواهد رسید و در حالت عفونت کماکان نقش غالب را خواهد داشت .برای تشخیص سرولوژی بروسلوز انسان ازمایشهای رزبنگال , سرو آگلوتیناسیون رایت , ۲- مر کاپتواتانول , ثبوت عناصر مکمل وآنتی گلوبولین کومبس به روش استاندارد ویا استفاده از روشهای استاندارد شده توسط تولید کننده های داخلی انجام می پذیرد. اکثر بیماران مبتلا به بروسلوز حاد در تمامی آزمایشها واکنش مثبت نشان میدهد معمولا" آزمایشهای رزبنگال و رایت به جهت آنکه هر دو ایمونوگلوبین MوG در آنها دخالت دارند زودتر از دیگر آزمایشها واکنش دارد.

در آزمایشهای ۲- مرکاپتواتانول وثبوت عناصر مکمل , IgG مداخله نموده که از نقطه نظر تفکیک وضعیت ایمنی یا عفونت مفید می باشد.

در مواردی که آنتی بادی هایی وجود داشته باشند و آگلوتیناسیون واضح ایجاد نمی نماید آزمایش کومبس ازارزش خاصی برخوردار است.

در بررسی سرولوژی بیماری تعیین تفاوت تیتر دو نمونه سرم در حداقل به فاصله دو هفته با ارزش می باشد ضمنا" در افرادی که تماس مکرر با آنتی ژن بروسلا دارند آزمایشهای سرمی مثبت بدون علائم بالینی مشاهده می شود از اینرو نتایج آزمایشهای سرمی در بروسلوز شغلی از اهمیت محدودی برخوردار است.

گاهی اوقات نیز نتایج مثبت کاذب ناشی از واکنش متقاطع سایر آنتی بادیهای باکتریها با آنتی ژن بروسلا مشاهده می گردد. بنا براین به منظور تشخیص بروسلوز بکارگیری روشهای استاندارد آزمایشگاهی توام با اطلاعات کسب شده اپید میولوژی - کلینیکی- آزمایشگاهی مورد نظر میباشد.

روشهای سرولوژی استاندارد:

۱-روش آگلوتیناسیون سریع با آنتی ژن ویژه این روش

(لوازم مورد لزوم):

۱-پلیت شیشه ای مخصوص آزمایش سرولوژی

۲-آنتی ژن قابل مصرف و فاقد اتو آگلوتیناسیون

۳-کنترل مثبت و کنترل منفی

۴-روتاتور واپلیکاتور جهت مخلوط نمودن سرم و آنتی ژن

آنتی ژن رزبنگال به رنگ قرمز و باPH اسیدی برابر ۳/۶۵ و به میزان ۸٪ جرم میکربی بروسلا آبورتوس در دسترس می باشد و بیشتر این روش جهت تشخیص اولیه در برنامه های کنترل و ریشه کنی بروسلوز به عنوان تست غربالی بکار برده می شود و توصیه می شود بعلت احتمال بروز پدیده پروزون و مشاهده پاسخ منفی کاذب ، آزمایش تمامی نمونه های سرم با روش لوله ای انجام شود . در صورت انجام ازمایش به روش سریع و بر روی پلیت ، از یک قطره سرم (حدود ۲۵-۳۰ میکرو لیتر)و یک قطره آنتی ژن (حدود۲۵-۳۰میکرولیتر) استفاده می شود و موارد مثبت به روش لوله تعیین مقدار شود و از تیتراسیون تست با پلیت خودداری گردد و سعی شود که در این آزمایش از کنترل مثبت و منفی استفاده شود و آگلوتیناسیون با نمونه کنترلی منفی و مثبت مقایسه گردد.

۲-آزمون آگلوتیناسیون رایت در لوله:

(لوازم و مواد مورد نیاز):

۱-لوله همولیز

۲-آنتی ژن مخصوص لوله ای ساخت داخل که فاقد اتو آگلوتیناسیون باشد و قابل مصرف طبق تاریخ ساخت می بایستی تا هنگام مصرف دور از نور و در یخچال ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شود.

۳- نمک طعام و فنل

۴-پارافیل جهت بستن درب لوله ها

۵-سرم کنترل مثبت و منفی جهت تهیه شاهد

طرز تهیه سرم فیز یولوژی فنیکه :

۸/۵ گرم کلرور سدیم و ۵ گرم فنل را در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل نمایید. توصیه می شود برای از بین بردن پدیده پروزن بجای ۸/۵ گرم ۵۰ گرم نمک طعام و۵ گرم فنل را در یک لیتر آب حل نمایید.

روش آزمایش :

در یک ردیف لوله همولیز از سرم مورد آزمایش رقت های ۱:۵ , لغایت ۱:۶۴۰یا ۱:۱۲۸۰ به ترتیب ذیل تهیه نمایید :

A: در لوله اول۸/ . میلی لیتر و در لوله های بعدی ۵/ . میلی لیتر سرم فیزیولوژی فنیکه بریزید .

B: ۲/ . میلی لیتر از سرم مورد آزمایش به لوله اول اضافه کرده (رقت ۱:۵) از لوله اول نیم میلی لیتر به لوله دوم اضافه کنید (رقت ۱:۱۰) مخلوط نموده به همین ترتیب تا لوله آخر ادامه داده و از لوله آخر ۵/ . میلی لیتر اضافه را بعد از مخلوط کردن دور بریزید .

C: آنتی ژن را به مقدار مورد نیاز تهیه (در صورت نیاز به رقیق شدن بر حسب دستور العمل رقیق گردد) و به هر لوله ۵/ . میلی لیتر اضافه نمایید در نتیجه رقت های نهایی با احتساب حجم آنتی ژن ۱:۱۰ , ۱:۲۰ , ۱:۸۰ و ... الی آخر بدست آید .

D: تهیه شاهد منفی و مثبت:

(۱) برای تهیه شاهد منفی ۵/ . میلی لیتر آنتی ژن رقیق شده یا آماده مصرف را در یک لوله همولیز ریخته و نیم میلی لیتر محلول سرم فیزیولوژی فنیکه به آن می افزاییم .

(۲) برای تهیه شاهد مثبت یک نمونه سرم مثبت قوی را به صورت ۱:۵ رقیق نمایید .

(۱۰۰ میکرولیتر سرم + ۴۰۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی فنیکه) سپس ۵/ . میلی لیتر از آن را با ۵/ . میلی لیتر آنتی ژن آماده مصرف در یک لوله ریخته و مخلوط نمایید .

E: محتوی لوله ها را کاملا" مخلوط و درب لوله ها را با پارافیلم بسته و به مدت ۲۰ تا ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده و به ترتیب نتیجه را قرائت می کنیم .

قرائت نتایج :

بر مبنای میزان شفافیت مایع فوقانی (با مقایسه لوله شاهد) و آگلوتیناسیون ایجاد شده نتایج بر حسب تیتر لوله ها (رقت لوله ها) گزارش می گردد و با بیشترین رقت لوله ای که نسبت به لوله شاهد منفی ، ۵۰ درصد شفافیت یا آگلو تیناسیون را نشان می دهد تیتر نهایی آزمایش بدست می دهد . ضمنا" در مورد تفسیر آزمایش رایت وتعیین تیتر آلودگی هنوز اتفاق نظر وجود ندارد . در کتب و مقالات پزشکی غربی به علت اینکه بیماری شیوع چندانی ندارد و تعداد مبتلایان اندک می باشد و فقط بیماری یک بیماری شغلی محسوب شده و به وسیله بروسلا آبورتوس و سوئیس با تماس مکرر بوجود می آید و آلودگی با بروسلا ملی تنسیس رواج ندارد، تیتر قابل ارزش برای درمان ۱:۱۶۰ میباشد، ولی در ایران بیشتر آلودگی با بروسلا ملیتنسیس گزارش شده و شیوع بیشتری دارد و تیتر ۱:۸۰ به بالا برای درمان ارزش بیشتری دارد لیکن تیتر های پایین تر و بویژه در ارتباط با بیماریهای غیر شغلی نبایستی کم اهمیت در نظر گرفته شود، مگر در صورتیکه از نظر کلینیکی تظاهرات وجود نداشته ، تیتر آزمایش دو هفته بعد رو به افزایش نبوده ، کشت خون منفی بوده ، یا در آزمایش ۲ME , IgG فعال وجود نداشته باشد .

آزمایش ۲- مرکاپتواتانول: ۲-Mercaptoethanol(۲ME)Brucella Agglutination Test

تستهای معمول آگلوتیناسیون برای تشخیص بروسلوز تنها وجودیا عدم آگلوتینین های ضد آنتی ژن بروسلا را در سرم بیمار مشخص می نماید. بدون آن که قادر به افتراق نوع آگلو تینین های موجود یعنیIgM از IgG باشند . آزمایش ۲ME برای تعیین ماهیت ایمونوگلوبولین موجود در سرمی که سبب اگلوتیناسیون می شود انجام میگیرد . ۲- مرکاپتواتانول ماده احیاء

کننده ایست که درغلظت معین باندهای دی سولفید (IgM (disulphide bond را شکسته وباعث از بین رفتن خاصیت آگلو تیناسیون IgM می شود . اگر سرم بیمار قدرت آگلوتیناسیون خود را پس از مجاورت با ۲ME از دست بدهد نشاندهنده اینست که آگلوتینین موجود IgM بوده است ولی اگر قدرت آگلوتیناسیون سرم پس از تاثیر ۲ME باقی بماند دلیل بر وجود آگلوتینین IgG و تیتر بدست آمده همان تیتر IgG میباشد . آزمایش ۲ME به همان روش آگلوتیناسیون لوله ای رایت (Wright) انجام می گیرد با این تفاوت که رقتهای سرم ، در سرم فیزیولوژی حاوی ۲ME تهیه می گردد. می توان بجای ۲MEاز ماده دیگری بنام Dithiothrietol(محلولی با غلظت ۰/۰۰۵ مولکول گرم) استفاده کرد .

ضمنا به سبب قابلیت اکسید شدن بیش از حد ۲MEدر رقتهای بالا اعتقاد بر این است که باید از بافر تازه تهیه شده ۲MEبرای تعیین طبیعت آنتی بادی موجود در سرم بیمار استفاده گرددو پیشنهاد می نماید که برای این هدف بهتر است ماده احیاء کننده را تازه و روزانه و با سرم مورد آزمایش مخلوط نموده و سپس آزمون آگلوتیناسیون را ا نجام داد .

روش انجام آزمایش :

مواد مورد لزوم :

۱- محلول غلیظ۲- مرکاپتو اتانول

۲- لوله همولیز

۳- آنتی ژن لوله ای انستیتو پاستوریا انستیتو رازی که اتو آگلو تیناسیون نداشته و یکنواخت و هموژن باشد .

A- ابتدا محلول ۰/۲ ملکول گرم در لیتر ۲ME در آب مقطر تهیه می کنیم (۰/۶۸ میلی لیتر مرکاپتو اتانول در ۰ ۵ میلی لیتر آب مقطر)

سپس به تعداد نمونه های سرم مورد آزمایش لوله همولیز در نظر گرفته ودر هر لوله ۰/۳ ملی لیتر سرم فیزیولوژی + ۰/۲ میلی لیتر سرم بیمار + ۰/۵ میلی لیتر محلول مرکاپتو اتانول می ریزیم .

B- لوله را بمدت یکساعت در اتو ۳۷ درجه قرار میدهیم تا مرکاپتو اتانول بر روی IgM اثر نماید.

C- لوله هارا از اتو خارج ساخته و برای هر نمونه سرم به مانند سرو آگلوتیناسیون در لوله تعداد مورد نیاز لوله همولیز در نظر می گیریم و رقتهای سریال (serial dilution) تهیه می کنیم بدین ترتیب که به استثنا لوله اول (که لوله حاوی سرم و مرکاپتواتانول می باشد) در تمام لوله ها ۰/۵ میلی لیتر سرم فیزیولوژی می ریزیم سپس از محتوی لوله اول ۰/۵ میلی لیتر به لوله دوم می ریزیم و پس از مخلوط کردن از لوله دوم ۰/۵ میلی لیتر به لوله سوم انتقال می دهیم. این عمل را تا لوله ما قبل آخر ادامه می دهیم و از این لوله۰/۵ میلی لیتر دور ریخته می شود. (لوله آخر به عنوان کنترل است که فقط حاوی سرم فیزیولوژی وآنتی ژن خواهد بود)رقت های نهایی از ۱:۱۰تا ۱:۵۱۲۰ خواهد بود .

D- به هر لوله مقدار ۰/۵ میلی لیتر از همان آنتی ژن سرو آگلو تیناسیون لوله ای می ریزیم (یا آنتی ژن مخصوص ۲ME ساخت انستیتو پاستور)

E-لوله هارا به مدت ۲۴-۲۰ ساعت در اتو ۳۷ درجه قرار می دهیم و سپس لوله هارا از نظر وجود آگلو تیناسیون بررسی می کنیم.

پس از تاثیر ۲ME بر روی سرم آگلوتینین های با ماهیت IgM حذف می شوند و چون آگلوتیناسیون مورد مشاهده تنها ناشی از وجود IgG است لذا تیتر IgG موجود در سرم را نشان می دهد . ضمنا توصیه می شود که محلول رقیق شده ۲ME در روز مصرف تهیه شود و تامپون مصرفی بدون فنل مورد استفاده قرار گیرد .

بطور معمول تیتر قبل از درمان ۱:۴۰ به بالا در آزمایش۲- مرکاپتو اتانول مثبت تلقی شده ضمن آنکه هر تیتری در این آزمایش و بویژه تیتر ۱:۲۰ می تواند نشانه ای از آلودگی بوده مگر این که خلاف آن ثابت شود .

آزمایش آنتی هیو من گلو بو لین ((کومبس رایت)):

روش آزمایش : به منظور انجام این آزمایش به ترتیب زیر عمل می شود :

۱- رقتهای سرم مورد آزمایش مشابه روش سرو گلوتیناسیون در لوله با سرم فیولوژی یا بافر فسفات با PH = ۷/۲ به حجم ۰/۵ میلی لیتر تهیه شود .

۲- آنتی ژن رایت به نسبت توصیه سازنده با سرم فیزیولوژی رقیق شود و سپس به حجم ۰/۵ میلی لیتر به هر لوله اضافه گردد.

۳- لوله ها را به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده و پس از این مدت نتیجه را قرائت نمایید .

۴- پس از ثبت نتایج ، تمام لوله ها ئیکه دارای آگلو تیناسیون کامل یا جزیی باشند کنار گذاشته شود.

۵- بقیه لوله ها را به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۰۰۰ در دقیقه سانتریفوژ نموده و مایع رویی را با دقت جدا نموده و دور بریزید و رسوب را با یک میلی لیتر بافر فسفات یا سرم فیزیولوژی مخلوط و مجددا سانتریفوژ کنید .

۶- مرحله سانتریفوژ را ۳ مرتبه تکرار نمایید .

۷- رسوب نهایی را با ۰/۹ میلی لیتر بافر فسفات یا سرم فیزیولوژی و ۰/۱ میلی لیتر آنتی هیومن گلوبولین مخلوط و به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه قرار دهید .

۸- پس از انقضای زمان مذکور نتایج واکنش را قرائت کنید .

در بروسلوز مزمن و طولانی ممکن است IgM دیگر تولید نشوند و آنتی بادی IgG و کلاس های IgG۱ و IgG۲ که بیش از ۸۰٪ IgG موجود را تشکیل می دهد نیز سنتز

نگردد. و تنها آنتی بادی ضد بروسلایی موجود شامل IgG۳ و IgG۴ باشد که از نظر کمی و کیفی خیلی ضعیفتر از IgG۱ و IgG۲ و IgM ضد بروسلایی واکنش می دهند . توضیح اینکه این آنتی بادی ها در تست رایت نتیجه منفی کاذب بوجود می آورند ولی در صورت افزودن آنتی هیومن گلوبولین و انجام تست کومبس رایت نتیجه مثبت حاصل خواهد شد و در تست کومبس رایت تیتر قابل ارزش ۱/۴۰ به بالا می باشد و اگر علامتی از نظر بیماری نیز مشاهده شود نتیجه را با ارزش تر می نماید.

((طرز تهیه بافر فسفات با PH=۷/۲ و غلظت ده برابر بدین ترتیب است))

۱- فسفات مونو سدیک با دو ملکول آب = ۲/۰۳ g

۲- فسفات دی سدیک بدون آب = ۱۲/۳۶ g

۳- نمک طعام = ۸۰ g

را در یک ظرف یک لیتری ریخته و حجم می رسانیم و در موقع مصرف ۱:۱۰ رقیق می کنیم .

لازم به توضیح است برای تشخیص آزمایشگاهی بروسلوز آزمایشهای مختلفی با حساسیتهای گوناگون به نامهای آزمون ثبوت مکمل ، آزمون هماگلوتیناسیون غیر مستقیم، آزمونهای ایمونواسی و روش الکتروفورز counter-current (CIEP) نیز انجام می گیرد.