مروری بر تکنیک‌های تشخیصی بروسلوزیس

• داود آقاویردیزاده
کارشناس ارشد بیوشیمی بالینی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل
شبکه بهداشت و درمان شهرستان مشکین شهر

Downloaded from labdiagnosis.ir at 10:05 +0430 on Friday June 22nd 2018

چکیده

بروسلوز با بسیاری از تظاهرات بالینی همراه است که تشخیص آن را کاری دشوار ساخته است. حتی پس از گزارش اولین آزمون سرولوژیکی برای بروسلوز، تکنیک تشخیص قطعی بطور فعال جستجو می‌شود. رایج ترین روش‌های تشخیصی مورد استفاده بر پایه سرولوژی است که توانایی سرم (آنتی بادی) را برای آگلوتیناسیون مقدار استانداردی از Brucella abortus کشته شده (آنتی ژن) دارای زنجیر جانبی-O اندازه‌گیری می‌کنند. این آزمون‌ها به دلیل ایمن بودن به طور وسیعی استفاده می‌شوند. با این حال در این نوع آزمون‌ها به علت وجود باکتری‌های واکنش دهنده متقاطع، نتایج مثبت کاذب زیاد دیده می‌شود علاوه بر آن در شناسایی Brucella canis و Brucella ovis که فاقد زنجیر جانبی- O هستند کارایی ندارند. دیگر آزمون‌های مفید مانند بررسی مستقیم اسمیر که یک روش احتمالی است، شامل ایجاد اسمیر از سواپ واژنی، جفت یا جنین‌های سقط شده و رنگ آمیزی آنها با روش زیل‌نلسون اصلاح یافته است. Coxiella burnetti می‌تواند موجب اشتباه در تشخیص شود بنابراین تایید آن باید از طریق کشت اختصاصی در محیط انتخابی انجام گیرد. کشت و ایزولاسیون ارگانیسم از نمونه‌های خونی یا بافتی تنها روش صحیح اما بدون حساسیت، باقی مانده است و نتایج آن به عمل اختصاصی آزمایشگاه و نحوه پیگیری فعال نتیجه کشت‌ها بستگی دارد. تلقیح حیوانات آزمایشگاهی ابزار مفیدی است اما در معرض تداخل با اسیدهای معده قرار دارد. به تازگی نشان داده شده است که واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) آزمون مفید و بسیار حساسی است اما برای استفاده استاندارد آزمایشگاهی معتبر نیست. این مقاله نمونه‌های مفید و به طور خاصی تفاوت روش مرسوم و تکنیک‌های مولکولی بسیار پیشرفته برای تشخیص بروسلوز را مورد تاکید قرار می‌دهد.

کلمات کلیدی: بروسلوز، تشخیص، تکنیک ها

مقدمه

بروسلوز بیماری عفونی است که به وسیله باکتری‌هایی از جنس بروسلا ایجاد می‌شود. این بیماری بسیاری از گونه‌های پستانداران را تحت تاثیر قرار داده و قابل انتقال به انسان است، بنابراین تاثیر مهم اقتصادی و اجتماعی دارد. تشخیص بروسلوز ممکن است به علت علایم غیراختصاصی و نشانه‌های مشترک با بیماری‌های تب دار، میزان رشد آهسته عوامل سببی در کشت خون و پیچیدگی تشخیص سرولوژیکی آن ها، مشکل باشد. تشخیص احتمالی بروسلوز را می‌توان با استفاده از چندین آزمون سرولوژیکی آنتی بادی‌های بروسلا انجام داد اما روش «استاندارد طلایی» ایزولاسیون و شناسایی باکتری است. ایزولاسیون و شناسایی باکتری نخست توسط Bruce و همکارانش، زمانی که آنها Brucella melitensis را از پرسنل نظامی در جزیره مالت ایزوله کردند، گزارش شد با این حال، بررسی‌های

کشـتی زمان بر، خطرناک و غیر حسـاس هستند. با وجود تلاش شـدید بـرای بیش از یک قرن جهـت ایجاد تکنیک تشـخیصی قطعی، تشخیص باکتری همچنان بر پایه ترکیب چندین آزمون، جهت اجتناب از نتایج منفی کاذب، اسـتوار است.

آزمون آگلوتیناسیون

نخسـتین آزمایش آگلوتیناسیون برای شناسایی آنتی‌بادی عفونـت بروسـلوز توسـط Wright و Smith طی ۱۰۰ سـال پیش گزارش شـده اسـت. در این آزمایش، مخلوط آنتـی ژن‌های سـلول باکتریایی و سـرم فرد بیمـار در یک لوله شیشـه‌ای انکوبه می‌شود. اگر الگوی «پوشش» رسوب سلولی مشاهده شـود به عنوان مثبت در نظر گرفته می‌شود در غیـر این صورت به عنـوان نتیجه منفـی در نظر گرفته می‌شـود. آزمونی که امروزه همچنان اسـتفاده می‌شـود بر همین پایه اسـتوار اسـت به جـز این‌که فقط سـلول‌های Brucella abortus به عنوان آنتی ژن اسـتفاده می‌شوند. از ایـن رو بعدا کار زیادی جهـت بهبود روش‌ها و صحت تشـخیص انجام شـد که سبب تولید سـنجش اتصال اولیه شد. سنجش اتصال اولیه به طور مستقیم میانکش آنتی بادی و آنتـی ژن را اندازه گیری می‌کنـد در حالی که آزمون‌های سـرولوژی مرسـوم مثل آزمون آگلوتیناسـیون اسـیدی یا آزمـون فیکساسـیون کمپلمان (CFT) پدیـده ثانویه مانند آگلوتیناسیون یا فعال سازی کمپلمان را اندازه گیری می‌کنند. ارگانیسم بروسـلا دارای O-پلی ساکارید (OPS) بر روی سطح خود هست که بخشی از لیپوپلی ساکارید (S-LPS) اسـت و از نظر شـیمیایی به عنـوان هموپلیمـر ٦،٤-دی داکسی-٤-فرمامید-آلفا-D-مانوز است که به وسیله پیوند ۲،۱-گلیکوزیدی به همدیگر متصل هستند. Brucella canis و Brucella ovis هیچ OPS قابل اندازه گیری بر روی سطح سلولی خودشـان ندارند. سه گونه اصلی بروسلا به نام‌های B. abortus، B. melitensis و Brucella suis اپـی توپ‌های مشـترکی در S-LPS شـان دارنـد؛ بنابراین آنها را می‌تـوان بـا اسـتفاده از آنتی ژن کامل یا به وسـیله تهیه S-LPS از اسـتخراج شـیمیایی B. abortus تشـخیص داد. آنتـی ژن B. abortus در تشـخیص سـرولوژیکی Brucella neotome موجود در موش چوب و بروسلای حیوانات دریایی استفاده شده است.

آزمون‌هـای سـرولوژیکی با توانایی شناسـایی S-LPS جهـت تشـخیص بروسـلوز در گاو و نشـخوارکنندگان کوچک بسـیار حسـاس می‌باشـد اما اگر حیوانـات قبلا واکسـینه شـده باشـند یا در معرض باکتری‌های گرم منفی با زنجیره های-O مشـابه بروسلا قرار گرفته باشند. ممکن اسـت نتایج مثبت کاذب ایجاد شـود. این باکتری‌ها شامل Vibrio cholerae O1، Escherichia coli O: 157، برخی سویه‌های

Escherichia hermannii
Stenotrophomonas maltophilia
Salmonella group N (O: 30)
Yersinia enterocolitica O: 9
Yersinia enterocolitica O: 9

هسـتند. با این وجود فقط عامل عمده واکنش سـرولوژیکی مثبت کاذب در تشخیص بروسلوز است.

پاسـخ ایمنی بـه B.abortus در گاو، که با جزئیات بیشـتر مطالعه شـده اسـت، ایزوتیپ IgM هسـت. زمان ظهور آنتی بادی‌ها بسـتگی بـه دوز آلوده کننده بروسـلا، مسـیر تماس و وضعیت حیوان میزبان دارد که با تولید ایزوتیپ IgGI و متعاقبا بـا مقادیر کمی از IgG2 و IgA دنبال می‌شـود. پاسـخ ایمنی در نتیجـه دیگر باکتری‌های گرم منفی که دارای LPS با زنجیره های-O مشـابه با بروسلا می‌باشند اساسا ایزوتیپ IgM است. لذا واکنش مثبت کاذب زیاد مشاهده می‌شود که سبب حساسیت پایین سـنجش می‌شود. علاوه بر این ارگانیسم‌های گرم منفی با واکنش متقاطع و آنتی بادی‌های حاصل از واکسن به علت وجود B. abortus S19 قـادر بـه شناسـایی توسـط آزمون‌هـای سـرولوژیکی هسـتند بنابراین منجر به بروز نتیجه مثبت کاذب می‌شوند. این مساله را می‌توان به وسیله واکسیناسیون گوساله‌ها در ۳ تا ۸ ماهگی بررسی کرد. با وجود واکسیناسیون در این سن، برخـی حیوانات در زمان بلوغ نیز مقدار بالای تیتر آنتی بادی را حفظ می‌کنند. این مسـاله سـبب ایجاد آزمون‌های سرولوژیکی بهبـود یافته مانند سـنجش ایمنـی آنزیمی رقابتی و سـنجش فلورسانس پلاریزاسیون می‌شود و واکسن زنده هیچ OPS ندارد که B. abortus RB51، توسط Schurig کسب شده است.

Downloaded from labdiagnosis.ir at 10:05 +0430 on Friday June 22nd 2018

Downloaded from labdiagnosis.ir at 10:05 +0430 on Friday June 22nd 2018

نمونه‌های مفید برای تشخیص بروسلوز

برای تشخیص بروسلوز، ارگانیسم باید از نمونه‌های گوناگون با توجه به علایم بالینی جداسازی شود. در حیوانات، جفت دارای بیشترین غلظت باکتری‌ها است و پس از آن گره‌های لنفی و شیر و خون انسان بیشترین غلظت را دارند. علاوه بر این، دیگر مواد غنی از ارگانیسم‌ها شامل محتویات معده، طحال و ریه جنین‌های سقط شده، سواپ‌های واژنی، منی و مایعات آرتریتی یا هیگروما از حیوانات بزرگسال هستند. از لاشه‌های حیوانی، بافت ترجیحی برای کشت غده پستانی، بخش بالای پستان، ایلیاک میانی و داخلی، پشت حلقی، پاروتید و گره‌های لنفی پری اسکاپولار (پیش کتفی) و طحال هستند. تمام نمونه‌ها باید جداگانه بسته بندی شده، با رعایت زنجیره سرما و در داخل ظرف ضد نشت فورا به آزمایشگاه منتقل شوند. برای انسان، خون جهت کشت نمونه انتخابی است اما نمونه‌ها باید در اوایل بیماری اخذ شوند. نمونه‌ها باید تا زمان کشت فریز شوند. هیچ بافت ایده آلی برای ایزولاسیون بروسلا از پستانداران دریایی وجود ندارد مگر این‌که ضایعات چشمگیر در بافت‌ها یافت شوند. با این حال، بافت پیشنهادی برای بروسلوز در حیوانات دریایی، طحال، غده پستانی، آرواره پایین، معده، ایلیاک داخلی و خارجی و گره‌های لنفی کولورکتال، بیضه‌ها و خون هستند.

بررسی میکروسکوپی مستقیم اسمیر

Marin و همکارانش گزارش کردند که تشخیص باکتریولوژیکی احتمالی بروسلا را می‌توان به وسیله بررسی میکروسکوپی اسمیر از سواپ‌های واژنی، جفت‌ها یا جنین‌های سقط شده و رنگ آمیزی آنها با روش رنگ آمیزی زیل نلسون اصلاح شده به دست آورد. با این حال، میکروارگانیسم‌های مرتبط با مورفولوژی مانند Chlamydophila abortus، Chlamydia psittaci و Coxiella burnetti می‌توانند به علت تشابه سطحی‌شان سبب تشخیص اشتباه شوند. از این رو ایزولاسیون B. melitensis بر اساس محیط کشت اختصاصی مانند محیط انتخابی فارل جهت تشخیص دقیق پیشنهاد می‌شود. سواپ‌های واژنی و نمونه‌های شیر بهترین نمونه‌ها جهت استفاده برای جداسازی B. melitensis از گوسفند و بز است.

جداسازی ارگانیسم از طریق کشت

این روش احتمالا به وسیله کشت بافت‌های بدن یا ترشحاتی مانند خون، شیر و ترشحات واژن انجام می‌شود. حساسیت بالا و کشت سریع تر ممکن است در بیمارانی با مداخله آنتی بیوتیکی قبلی، زمانی که مغز استخوان کشت می‌شود، حصول شود. گونه‌های بروسلا را می‌توان از چرک، مایع مغزی نخاعی و مایعات جنبی، مفصلی و آسیتی (صفاقی) کشت داد. رشد باکتری‌ها در محیط کشت به طور قوی وجود عفونت را ثابت می‌کند. کشت‌های خون فقط در حیوانات دارای باکتریمی، که احتمالا همیشه رخ نمی‌دهد، مفید است. با این حال اغلب در داخل شیر بروسلا توسط آزمون مشاهده می‌شود. نمونه‌هایی مانند گره‌های لنفی، کبد، طحال، پستان و دیگر اندام‌ها پس از مرگ می‌توانند نتایج مثبت کشت با آزمون سرولوژیکی منفی داشته باشند. از این لحاظ آزمون کشت به طور وسیعی در تحقیقات استفاده می‌شود.

شناسایی گونه‌های بروسلا در کشت بستگی به مقدار بزرگی صفات فنوتیپی مانند نیاز به CO_2، تایپینگ فاژ (نوع فاژی که می‌تواند آن را آلوده کند) و آزمایش‌های بیوشیمیایی و در میان مسائل دیگر شامل زمان، ایمنی زیستی، پرسنل آموزش دیده و نتایج نسبتا مبهم دارد. براث یا آگار را می‌توان از پودر برای کشت ارگانیسم بروسلا تهیه کرد. به علت بار کم بروسلا در خون و دیگر مایعات بدن، براث یا محیط دو فازی برای کشت آنها ارجحیت دارد. با این حال برای نمونه‌های دیگر، محیط جامد با ۲٫۵٪ آگار شناسایی کلونی‌ها و تفکیک ضعیف باکتریایی را تسهیل می‌کند. pH بهینه برای رشد بروسلا از ٦٫٦ تا ٧٫٤ متفاوت است و محیط کشت باید بافر کافی با pH حدود ٦٫٨ جهت رشد بهینه داشته باشد. دمای رشد بهینه ۳۸-۳٦ درجه سانتی‌گراد است. با این حال سویه‌های زیادی بین ۲۰ و ٤۰ درجه سانتی گراد رشد می‌کنند.

اکثر سویه‌های بروسلا به‌ویژه B. abortus واریانت 2 و B. ovis در محیط دارای ۱۰-۵٪ سرم استریل (اسبی یا گاوی) عاری از آنتی بادی‌های بروسلا بهتر رشد می‌کنند. جهت اجتناب از رشد آلودگی‌ها که اکثر موارد در زمینه نمونه‌ها وجود دارند، محیط انتخابی باید استفاده شود. محیط انتخابی که به طور بسیار وسیعی استفاده می‌شوند

Kuzdas و Morse و محیط Farrell است. Kuzdas و Morse با آنتی بیوتیک‌های زیر و مقدار به ازای لیتر محیط پایه استفاده می‌شوند: 100mg سیکلوهکزیمید (قارچ زدا)، ۲۵۰۰۰ واحد باسیتراسین (علیه باکتری‌های گرم مثبت فعال است) و ۶۰۰۰ واحد از پلی میکسین B (علیه باکتری‌های گرم منفی فعال است). محیط Farrell با اضافه کردن آنتی‌بیوتیک‌های زیر و مقدار آنها به ازای لیتر از محیط پایه تهیه می‌شود: باسیتراسین (25mg)، پلی میکسین سولفات (5mg)، نالیدیکسیک اسید (5mg)، نیستاتین (۱۰۰۰۰۰ واحد) وانکومایسین (20mg)، ناتامایسین (50mg).

محیط Farrell برای برخی سویه‌های B.melitensis، B.abortus و B.ovis نسبتا مهار کننده است، محیط اصلاح شده Thayer-Martin ممکن است همراه با محیط Farrell جهت افزایش رشد این گونه‌ها استفاده شود. این محیط را می‌توان با محیط GS به عنوان محیط پایه و افزودن ۱٪ هموگلوبین و آنتی بیوتیک‌ها به ازای لیتر از محیط تهیه کرد: کولیستین متان سولفات،(7.5mg) وانکومایسین (3mg)، نیتروفورانتوئین (10mg)، نیستاتین (۱۰۰۰۰۰ واحد) و آمفوتریسین B (2.5mg).

تلقیح به حیوان آزمایشگاهی

موش‌های مدل حیوانی بسیار متداول برای استفاده در تحقیقات بروسلوز گزارش شده است. با این حال گزارش شده است که خوک گینه نیز آسیب پذیر بوده و می‌توان به عنوان مدل حیوانی استفاده کرد. تلقیح حیوانی ممکن است زیر پوستی یا از طریق ساییدن پوست در خوک گینه یا ترجیحا داخل وریدی یا داخل صفاقی یا از طریق مجاری گوارشی یا مسیر بینی (آئروسل) در موش‌ها باشد. طحال موش ۷ روز پس از تلقیح کشت می‌شوند در حالی‌که نمونه‌های سرمی خوک‌های گینه جهت انجام آزمایش‌های اختصاصی ۳ تا ۶ هفته پس از تلقیح کشت می‌شوند با این حال جالب توجه است که اسید معده می‌تواند با آلودگی بروسلا در حیوانات آزمایشگاهی تداخل کند.

استفاده از آزمون‌های سرولوژی در تشخیص بروسلوز

مایعات بدن مانند سرم، ترشحات رحم، موکوس واژن، شیر یا پلاسمای منی از حیوانات مشکوک ممکن است دارای مقادیر مختلفی از آنتی بادی‌های ایزوتیپ M، G1 G2 و A علیه بروسلا باشند. حیوانات آلوده ممکن است همیشه تمام ایزوتیپ‌های آنتی بادی در مقادیر قابل شناسایی تولید نکنند. بنابراین نتایج چندین آزمایش سرولوژیکی باید به عنوان شواهد احتمالی عفونت استفاده شوند. علاوه بر این بسته به حساسیت و ویژگی، آزمایش‌های سرولوژیکی را می‌توان جهت غربالگری یا تایید بروسلوز استفاده کرد.

آزمون‌های غربالگری سنتی ارزان، سریع و بسیار حساس هستند اما بیشتر مواقع فاقد ویژگی هستند. با این حال آزمایش‌های تاییدی برای حساسیت و ویژگی مورد نیاز هستند بنابراین برخی واکنش‌های مثبت کاذب را حذف می‌کنند. بیشتر آزمایش‌های تاییدی برای انجام پیچیده تر و گران تر از آزمایش‌های غربالگری هستند. آزمایش‌های سرولوژیکی رایج مورد استفاده شامل آزمایش حلقه شیر (MRT)، آزمایش آگلوتیناسیون سرم (SAT)، آزمایش استاندارد آگلوتیناسیون پلیت (SPAT)، آزمایش فیکساسیون کمپلمان (CFT)، آزمایش ۲- مرکاپتو اتانول (2-MET)، آزمایش آنتی ژن بافری (BPAT) و آزمایش پلیت رز بنگال (RBPT) هستند، دیگر آزمایش‌های شامل آزمایش ریوانول، آزمایش کومبس، آزمایش ایمونوفلورسنت غیرمستقیم (IFAT)، آزمایش غیرفعال سازی حرارتی (HIT)، آزمایش پوست، سنجش ایمنی و تکنیک بیولوژی مولکولی است.

آزمایش حلقه شیر (MRT)

MRT اساسا آزمون آگلوتیناسیون سریع است که بر روی شیر کامل یا سرشیر انجام می‌شود. سلول‌های بروسلای رنگ آمیزی شده با هماتوکسیلین به شیر کامل اضافه شده و برای رخداد واکنش انکوبه می‌شود. ایمونوگلوبولین‌های موجود در شیر در یک بخش از طریق بخش FC مولکول چربی به گلبول‌های چربی متصل شود. ایمونوگلوبولین‌های شناسایی شده به وسیله، MRT، IgM و IgA هستند. این آزمایش ممکن است برای حیوانات خاص یا برای نمونه‌های مخلوط شیر با استفاده از حجم بزرگی از شیر نسبت به اندازه مخلوط به کار گرفته شود. آزمایش حلقه

Downloaded from labdiagnosis.ir at 10:05 +0430 on Friday June 22nd 2018

شیر مستعد واکنش‌های کاذب ناشی از شیر غیر طبیعی به علت ورم پستان (ماستیت)، وجود آغوز و شیر از دوره شیردهی قبلی شود. منفی کاذب نیز ممکن است در شیر دارای غلظت کم آنتی بادی‌های شیری یا فاقد فاکتورهای خوشه‌بندی- چربی رخ دهد. برخلاف این مشکلات، نشان داده شده MRT فوق العاده موثر است و اغلب روش انتخابی معمول در گله‌های شیر است و ممکن است به عنوان آزمایش غربالگری ارزان در پیوستگی با آزمون‌های دیگر باشد.

آزمایش آگلوتیناسیون سرم

این آزمایش بر پایه واکنش آنتی بادی علیه لیپوپلی‌ساکارید صاف بروسلا است. فزونی آنتی بادی به علت اثر پروزون منجر به واکنش منفی کاذب می‌شود که می‌توان به وسیله تهیه رقت سریالی از ۱:۲ تا ۱:٦٤ نمونه‌های سرمی و بدین طریق افزایش ویژگی آزمون غلبه کرد. آزمایش در PH نزدیک خنثی انجام می‌شود که آن را جهت شناسایی آنتی بادی IgM بسیار موثر می‌سازد. از این رو برای شناسایی عفونت‌های حاد بهترین استفاده را دارد. آن برای IgG به علت ویژگی کم روش، کارآمدی کمتری دارد. به سبب این حقیقت، SAT، با وجود حساس بودن، در حالت کلی به عنوان آزمایش مجزا استفاده نمی‌شود بلکه در ترکیب با آزمایش‌های دیگر استفاده می‌شود. کاستی‌های دیگر آزمون شامل نتایج مثبت کاذب و منفی کاذب است. برای این دلیل آزمایش فقط برای آزمایش گله در مقایسه با آزمایش حیوانات منفرد مناسب است. علاوه بر این وجود آنتی بادی پس از واکسن می‌تواند نتایج را مختل کند. SAT آنتی بادی‌های علیه B.canis و B.ovis را شناسایی نمی‌کند زیرا این سویه‌های خشن ارگانیسم OPS بر روی سطوحشان ندارند.

آزمایش آگلوتیناسیون استاندارد پلیت (SPAT)

SPAT جهت ایجاد نتایج مشابه با SAT در تیتر ۱:۱۰۰(مثبت) استاندارد می‌شود اما از رقت‌های سریالی مشابه SAT استفاده نمی‌کند. Stemshorn و همکارانش گزارش کردند که به علت استفاده از غلظت بالای سالین (۸٪) و غلظت بالای سرم در این آزمایش، که آن را مقاوم به اثر پروزون می‌سازد، این آزمایش می‌تواند نتایج مثبتی به دست بدهد زمانی که نتیجه SAT منفی است.

آزمایش آگلوتیناسیون سرم با اتیلن دی آمینوتترا استیک اسید (SAT-EDTA)

سازگاری SAT که شامل اضافه کردن EDTA است جهت افزایش قابل توجه ویژگی آزمایش به وسیله کاهش احتمال واکنش‌های متقاطع انجام می‌شود، بنابراین می‌توان از آن به عنوان جایگزین برای SAT استفاده کرد. مکانیسمی که به وسیله آن EDTA غیر اختصاصیت را کاهش می‌دهد به خوبی درک نشده است. با این حال فرض می‌شود که اتصال ایمنوگلوبین به دیوار سلولی بروسلا را از طریق قطعه FC محدود می‌کند. اساس این آزمایش بر این استوار است که PH سرم به نقطه ایزو الکتریک IgM تغییر کرده تا از آگلوتیناسیون آن جلوگیری کند.

آزمایش آگلوتیناسیون پلیت بافری (BPAT)

BPAT آزمایش آگلوتیناسیون استاندارد است که ساده و ارزان برای انجام است. این تکنیک از آنتی‌ژن در PH ۳,٦٦ استفاده می‌کند که از سلول‌های کامل Brucella abortus S119.3 و رنگ آمیزی آن با رنگ‌های کریستال ویوله و بریلیانت گرین ساخته شده است. این آزمایش به علت آنتی بادی‌های واکسنی و اثر پروزون مستعد نتایج مثبت کاذب است. مزیت اصلی این آزمایش، کاهش غیر اختصاصیت واکنش‌های آزمایش است. این آزمایش برای سنجش IgG توسعه یافته است.

آزمایش پلیت رز بنگال (RBPT)

RBPT تکنیک آگلوتیناسیون لکه است که به عنوان آزمایش کارد یا آزمایش آنتی ژن بافری بروسلا نیز شناخته می‌شود. این تکنیک از سوسپانسیون سلول‌های صاف B.abortus رنگ آمیزی شده به رنگ رز بنگال و بافری شده در PH ۳,٦٥ استفاده می‌کند. این آزمایش می‌تواند در PH خنثی وجود، IgM، IgG1 و IgG2 را اندازه‌گیری کند. با این وجود به نظر می‌رسد IgM فعال ترین باشد. در

Downloaded from labdiagnosis.ir at 10:05 +0430 on Friday June 22nd 2018

PH بافری ۳،۶۵، RBPT از آگلوتیناسیون IgM جلوگیری کـرده و ظاهرا فقط IgG1 را انـدازه گیری می‌کند. در نظر گرفته شده، در حالی که آزمایش نتایج منفی کاذب به دست می‌دهد آن احتمالا به علت واکنش با IgM حیوانات از پیش واکسینه شـده نتایج مثبت کاذب زیادی نیز حاصل می‌کند. در شرایطی که واکسیناسیون به طور معمول انجام نمی‌شود، اسـتفاده از ایـن آزمایـش می‌تواند یک گـزارش خوب از قرارگیـری حیوانات در معرض ارگانیسـم‌های بروسـلا به دست دهد.

این روش به صورت بین‌المللی برای غربالگری بروسلوز در نشـخوار کنندگان کوچک توصیه شـده اسـت اما فاقد استاندارد سازی آنتی ژن است. PH پایین آنتی ژن، ویژگی آزمایش را افزایش می‌دهد در حالی‌که دمای آنتی ژن و دمای محیطی که آزمایش رخ می‌دهد ممکن اسـت حساسـیت و ویژگی آزمایش را تحت تاثیر قرار دهد. Corbel مشـاهده کرده که حساسـیت آزمایش با اجـزای دارای ایمنوگلبولین IgG بخصوص IgG1 مرتبط است.

آزمایش پلیت ریوانول (RPT)

هـدف آزمایش حذف برخی واکنش‌هـای غیراختصاصی است که بر اساس رسوب گلیکو پروتئین سرم با وزن مولکولی بالا از محلول سرمی است که در این مورد، اساسا IgM است که اکثرا IgG را در سرم باقی می‌گذارد. رنگ آکریدینی مانند ریوانول (۲- اتوکسی-۹،۶- دی آمینواکریدین لاکتات) جهت حصول فرآیند رسوب اسـتفاده می‌شود و پس از آن رسوب به وسیله سـانتریفوژ کردن حذف می‌شود و محلول رویی با اسـتفاده از آزمایش آگلوتیناسیون سریع پلیت با سرم رقیق یا با تیوپ آزمایش با استفاده از رقت‌های ۱:۲۵، ۱:۵۰، ۱:۱۰۰ و ۱:۲۰۰ آزمایش می‌شود. آزمایش‌های رسوب معمولا به علت پروتکل‌های دشوارشان به عنوان آزمایش‌های تاییدی استفاده می‌شـوند. آزمایش توانایی تشخیص بین حیوانات عفونی و واکسـینه و همچنیـن حاملین مزمن را داراسـت. با این‌حال تفسیر آزمایش دشوار است.

آزمایش فیکساسیون کمپلمان (CFT)

CFT اساسـا آنتی بـادی ایزوتیپ IgG1 را شناسـایی می‌کنـد به طوری‌که ایزوتیپ‌هـای IgM به صورت جزیی طی فرآیند غیر فعال سـازی تخریب می‌شوند. از این رو که آنتـی بادی‌های نوع IgG1 معمولا پـس از آنتی بادی‌های IgM ظاهر می‌شوند کنترل و نظارت این بیماری با CFT و CAT بهتر انجام می‌شود. آزمایش ارتباط بازیابی ارگانیسم بروسـلا از نمونه غیر واقعی یا حیوانـات ذاتا عفونی را به خوبی نشـان می‌دهد. اگر چه آزمایش سـریع و دقیق است ولی قادر به تشـخیص بین آنتی بادی‌ها ناشی از عفونت از آنتی بادی‌های واکسـنی نیست. مشکلات دیگر شامل تعداد زیاد معرف‌ها و کنترل‌های لازم برای انجام آزمایش اسـت؛ بنابرایـن هر زمانی که آزمایش وضع می‌شـود تعداد زیادی تیتراسیون مورد نیاز اسـت و تفسیر نتایج به علت اختلاف در تکنیک‌ها ذهنی اسـت. گاها فعال‌سازی مستقیم کمپلمان به وسیله سرم (فعالیت ضد کمپلمانی) وجود دارد و استفاده آزمایش برای نمونه‌های سرمی همولیز شده، ممکن نیست. طبیعت دشـوار این آزمایش و لازمه پرسـنل بسیار ورزیده و مراکز آزمایشـگاهی مناسـب، CFT جهت اسـتفاده در کشورهای در حال توسعه را نامناسب ساخته است. CFT، زمانی که آنتی بادی‌های نوع IgG2 از فیکساسیون کمپلمان ممانعـت می‌کند نتیجه منفی کاذب نیز ممکن اسـت ایجاد شـود. با وجود این مسائل اساسـی، CFT یک آزمایش با اسـتفاده وسیع است و به عنوان آزمایش سرولوژیکی بسیار اختصاصی و پذیرفته شـده برای تشخیص بروسلوز در نظر گرفته می‌شـود؛ بنابرایـن آزمایش پیشـنهادی برای روش بین‌المللی است.

آزمایش ۲- مرکاپتواتانول

2-MET اقتباسـی از تیتـر SAT اسـت. دو فـرم از ایـن آزمایـش وجـود دارد کـه از ۲- مرکاپتواتانول یا دی تیوتریتول اسـتفاده می‌کنند. دی تیوتریتول به سبب سمیت ۲- مرکاپتواتانـول ارجحیت دارد. آزمایش اساسـا IgG را اندازه می‌گیرد زیرا پل دی سـولفیدی IgM به مولکول‌های مونومری احیا شـده و بنابراین قادر به ایجاد آگلوتیناسـیون نیسـت. با ایـن حال IgG نیز می‌توانـد در این فرآیند احیا شـده و نتایج منفی کاذب حاصل کند. به هر حال در حالت کلـی احیـای IgM ویژگـی را افزایش می‌دهـد. آزمایش

Downloaded from labdiagnosis.ir at 10:05 +0430 on Friday June 22nd 2018

آنتی‌بادی‌های واکسنی را حذف نمی‌کند بنابراین برای روش بین‌المللی پیشنهاد نمی‌شود. با این‌حال 2-MET به طور گسترده‌ای جهت کنترل ملی و یا برنامه‌های ریشه کنی استفاده می‌شود.

آزمایش آنتی گلبولین (کومبس)

آزمایش کومبس برای تایید نتایج SAT حیوانات استفاده می‌شود که پاسخ‌های منفی، غیر قطعی یا مشکوک حاصل می‌کنند. این آزمایش در بررسی اپیدمیولوژی بروسلوز به سبب مزیت شناسایی آنتی بادی‌های ناکامل انواع IgG مفید است که با آنتی ژن‌های سلولی ترکیب شده اند اما ایجاد واکنش آگلوتیناسیون نمی‌دهند. آزمایش برای اجرای پلیت میکرو تیتر جهت حفظ زمان، سازگار شده است. محدودیت اصلی آزمایش این است که برای آزمایش حیوان واکسینه شده پیشنهاد نمی‌شود.

آزمایش غیر فعال سازی حرارتی

در اجرای آزمایشگاهی HIT در مراحل ابتدایی عفونت بسیار حساس است. آزمایش بر پایه مشاهداتی استوار است که دو نوع آگلوتنین بروسلا IgM و IgG یافت شده اند و می‌توان آنها را بر اساس پایداری در دمای ٦٥ درجه سانتی‌گراد به مدت ١٥ دقیقه و سرد کردن تا ١٨ درجه سانتی گراد تمیز داد. آگلوتینین‌هایی که در این دما غیرفعال نمی‌شوند برای بروسلا مثبت در نظر گرفته می‌شوند. آزمایش به طور ویژه‌ای در طول شش روز اول عفونت مهم است.

آزمایش آگلوتیناسیون آب پنیر

این روش در شناسایی حیوانات مشکوک به عفونت پستان یا منفی از نظر سرولوژیکی آزمایش مهمی است. این حیوانات معمولا حیوانات به تازگی آلوده شده یا دارای عفونت مزمن در گله هستند که ریشه کنی بروسلوز در آنها دشوار است.

آزمایش پوست

آزمایش پوست از آنتی ژن پروتئینی مشتق از بروسلا (بروسلرژن یا بروسلین) استفاده می‌کند. بروسلوز قادر به تحریک هر دو پاسخ ایمنی وابسته به آنتی بادی و سلولی در میزبان است؛ بنابراین آزمایش پوستی بروسلین باید در موارد واکنش‌های سرولوژیکی مثبت کاذب در نظر گرفته شود. آزمایش ویژگی بسیار بالایی دارد به طوری که حیوانات پنهان آلوده خالی از آنتی بادی قابل اندازه‌گیری هستند و حیوانات واکسینه نشده راکتورهای مثبت برای این آزمایش هستند و باید به عنوان آلوده در نظر گرفته شوند؛ بنابراین نتایج این آزمایش ممکن است در تفسیر واکنش‌های سرولوژیکی که تصور می‌شوند از نظر سرولوژیکی به علت عفونت با باکتری‌های واکنش دهنده متقاطع به خصوص در مناطق عاری از بروسلوز، مثبت کاذب باشد، کمک کننده باشد. با این حال اخیرا، هر دوی حیوانات واکسینه علیه B. abortus و حیوانات آلوده با میکروارگانیسم‌های واکنش دهنده متقاطع، در یک دوره زمانی به آزمایش‌های پوستی واکنش مثبت می‌دهند. Bercovich گزارش کرده که آزمایش پوستی باید آزمایش انتخابی در کشورهای در حال توسعه باشد به طوری که گاو در این کشورها معمولا برچسب دار نیست. بنابراین نتایج آزمایش سرولوژیکی با حیوان منفرد مرتبط است. آزمایش را می‌توان برای بررسی‌های اپیدمیولوژیکی و نظارتی انجام داد. این آزمایش در مناطق دارای شیوع کم و در مناطقی که عاری از بروسلوز شناخته می‌شوند، اهمیت بیشتری دارد. آزمایش شامل تزریق بروسلین به پهلو یا داخل پلکی و سپس اندازه گیری ضخامت پوست است. تمام حیوانات آلوده واکنش نمی‌دهند بنابراین این آزمون به تنهایی نمی‌تواند به عنوان آزمایش تشخیصی منفرد یا برای هدف‌های تجاری بین‌المللی پیشنهاد شود. به طور مشابه توسط Cutler و همکارانش گزارش شده که ویژگی آزمایش به دنبال واکسیناسیون کاهش می‌یابد و ضرورت بررسی دو پرورشگاه، تاخیر بین تکرار آزمایش و ماهیت ذهنی تفسیر نتایج، این نوع آزمایش را برای تشخیص موثر غیر عملی ساخته است.

سنجش اتصال اولیه

روش‌های سنتی تشخیص بروسلوز محدودیت‌هایی دارند که سبب توسعه تکنیک‌های سنجش اتصال اولیه شده است. این آزمایش‌ها قادر به شناسایی سریع و دقیق آنتی بادی‌های

Downloaded from labdiagnosis.ir at 10:05 +0430 on Friday June 22nd 2018

هومورال علیه برسلوز هستند. آنتی بادی القا شده به وسیله واکسیناسیون به علت زمان کوتاه قرارگیری در معرض آنتی‌ژن در نتیجه حذف آنتی ژن به وسیله سیستم ایمنی تمایل کمی دارند. به طور جایگزین، آنتی بادی تولید شده در پاسخ به عفونت طبیعی تمایل بالایی دارد زیرا آنتی ژن سریعا توسط سیستم ایمنی حذف نشده و بنابراین مدت زمان زیادی پایدار است. بنابراین سنجش جذب ایمنی وابسته به آنزیم رقابتی (cELISA) و سنجش پلاریزاسیون فلورسنت جهت غلبه بر این مشکل توسعه یافتند. این آزمایش‌ها توانایی تمیز حیوانات واکسینه شده یا حیوانات عفونی با ارگانیسم‌های واکنش دهنده متقاطع مانند Salmonella urbana O: 30 Escherichia coli O: 116 و Yersinia enterocolitica O:157 سروتیپ ۹ را از حیوانات دارای عفونت ذاتی را دارا هستند. این قابلیت آزمایش تعداد واکنش‌های مثبت کاذب و اثرات بعدی آن یا کشتار حیوانات در جمعیت سالم یا منفی را کاهش می‌دهد.

سنجش جریان جانبی (LFA)

LFA یک ELISA ساده برای شناسایی کیفی آنتی‌بادی‌های اختصاصی آنتی ژن در سرم، شیر یا نمونه‌های خون کامل است. سنجش بر پایه اتصال آنتی‌بادی‌های اختصاصی به آنتی ژن‌های ثابت شده بر روی نوار (ماتریکس سلولزی غشا) آزمایش است. این تکنیک شناسایی IgM اختصاصی به علاوه آنتی بادی‌های IgG اختصاصی را امکان پذیر می‌سازد و از نظر حساسیت برای تمام مراحل بیماری قابل اطمینان است. استفاده از روش به تخصص، تجهیزات یا برق نیاز ندارد و کیت آزمایش ممکن است، بدون نیاز به فریزر نگه داشته شود، بنابراین انجام آزمایش برای کشورهای با منابع فقیر مانند اکثر کشورهای آفریقایی و گله‌های گروه مهاجر بسیار مفید است. با این حال تفسیر بسته به تشکیل خط رنگی قابل رویت واکنش ذهنی است و خود آزمایش گران است زیرا دارای چندین ترکیب و اجزا است.

سنجش پلاریزاسیون فلورسنت (FPA)

FPA بر پایه این حقیقت استوار است که زمانی که نور پلاریزه مولکول‌های فلورسنت را تحریک می‌کند آنها نور پلاریزه نشر خواهند کرد. در محلول، پلاریزاسیون نور نشری نسبت معکوس با سرعت چرخش مولکول دارد که به وسیله ویسکوزیته، دمای مطلق، حجم مولکولی و ثابت گازها تحت تاثیر قرار می‌گیرد. در سرولوژی بروسلوز، زیر واحد با وزن مولکولی پایین OPS به وسیله فلورسین ایزوتیوسیانات نشاندار شده و به عنوان آنتی ژن استفاده می‌شود. در زمان آزمایش سرم، خون یا شیر، اگر آنتی بادی علیه OPS وجود داشته باشد، سرعت چرخش آنتی ژن نشان دار در سرعتی کاهش خواهد یافت که متناسب با مقدار آنتی ژن موجود است. FPA بسیار دقیق است و حساسیت/ ویژگی را می‌تواند با تغییر مقدار محدوده (cutoff) بین واکنش‌های منفی و مثبت جهت ارائه آزمایش غربالگری با حساسیت بالا و همچنین آزمایش تاییدی با ویژگی بالا چندین برابر کند. FPA می‌تواند آنتی بادی واکسنی را در اکثر حیوانات واکسینه شده تمیز دهد و آن می‌تواند به خوبی واکنش برخی آنتی بادی‌های واکنش دهنده متقاطع را حذف کند.

سنجش ایمنی رقابتی

سنجش ایمنی آنزیمی رقابتی به منظور حذف برخی ولی نه همه مشکلات ناشی از آنتی بادی واکسنی و ناشی از آنتی‌بادی‌های واکنش دهنده متقاطع توسعه یافته است. آزمایش به وسیله انتخاب آنتی بادی مونوکلونال با اندکی تمایل بالا برای آنتی ژن در مقایسه با اکثر آنتی بادی واکسنی و واکنش دهنده متقاطع اما با تمایل پایین تر نسبت به آنتی‌بادی‌های ناشی از عفونت انجام می‌شود. ویژگی سنجش ایمنی آنزیمی رقابتی بسیار بالا بوده و قادر به شناسایی همه ایزوتیپ‌های آنتی بادی (IgM، IgG1 و IgG2 و IgA) است. با این حال این آزمون اندکی حساسیت پایینی نسبت به سنجش ایمنی آنزیمی غیر مستقیم دارد. این آزمایش روش تاییدی برجسته برای تشخیص بروسلوز در اکثر گونه‌های پستانداران است.

تکنیک‌های بیولوژی مولکولی

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) تکنیک اخیر و نوید

Downloaded from labdiagnosis.ir at 10:05 +0430 on Friday June 22nd 2018

بخش اســت که تشخیص دقیق و ســریع بروسلوز را بدون محدودیت متدولوژی مرســوم امکان‌پذیر می‌سازد. چندین سیســتم PCR مختص گونه با اســتفاده از جفت پرایمرها توسعه یافته اند که توالی‌های 16SRNA و ژن‌های مختلف پروتئین‌های غشــای خارجی را هدف قرار می‌دهند. اولین آزمایــش مبتنی بر PCR بروســلوز در ســال ۱۹۹۰ معرفی شده اســت. اولین PCR چند گانه (مولتی پلکس) مختص گونــه، روش Abortus-Melitensis-Ovis-Suis (AMOS-PCR) نامیده شــد که جهت شناسایی و تمایز واریانت‌هــای B. abortus 1, 2 و B. melitensis 4 B. ovis و واریانت B. suis 1 اســتفاده شده است. PCR بر پایه، پلی مورفیسم ناشــی از لوکالیزاسیون مختص گونه توالی درجی IS711 در کروموزوم بروســلا اســتوار است. این تکنیک PCR یک عیب دارد و آن این است که قادر به شناسایی برخی گونه‌هایی مانند B.canis و B.neotome نیست.

علاوه بر ایــن برخی واریانت‌ها در داخــل گونه‌ها نتایج منفــی می‌دهنــد. روش PCR چندگانه بــروث نردبان نیز بــرای شناســایی و تمایز گونه‌های بروســلا و ســویه‌های واکســن در مرحله منفرد توســعه یافته است. PCR جهت شناسایی سویه‌هایی مانند B. microti و B. inopinata نیز عملکرد افزایش یافته‌ای داشــته اســت. بــا این حال در ســطح واریانت یا پایین‌تــر از آن را نمی‌تواند تمیز دهد. به تازگی روش PCR چند گانــه (نردبان suis) جهت تمایز بین واریانت‌های ۱ تا ۵ B. suis توسعه یافته است.

آزمایش‌های دیگر برای تشخیص بروسلوز

آنالیز ادرار ممکن است پیوری استریل مشابه توبرکلوز را نشــان دهد در حالی که آرتروسنتز را می‌توان برای آرتریت ســپتیک انجام داد. آســپیره مفصل می‌تواند مایع ترشحی را همراه با تعداد کمی ســلول و غالبا سلول‌های تک هسته‌ای نشان دهد. ارزیابی رادیو گرافیک در حیوانات آلوده شواهدی مانند لپتومننژیت بروســلایی حاد یا مزمــن، هموراژی زیر عنکبوتیه یا آبســه مغزی به دنبــال رادیوگرافی جمجمه‌ای را آشــکار می‌سازند. به طور مشــابه از اکوکاردیوگرافی نیز می‌توان جهت ارزیابی اندوکاردیت احتمالی اســتفاده کرد. آنوریســم میوتیک آئورت یا کاروتیدهــا نیز با آرتریوگرافی قابل مشــاهده اســت. علاوه بر این بیوپسی مغز استخوان و بیوپســی کبد نیز ممکن است جهت تشــخیص به ویژه در طول فاز حاد بیماری انجام شود.

نتیجه گیری

تشــخیص قطعی بروســلوز همچنان کار دشواری است. تنها تشــخیص محدود که اســتاندارد طلایی است بازیابی عامل ســببی از میزبان است. با این حال با برخی مشکلات همراه است: حساسیت پایین، هزینه و خطر به علت آلودگی پرســنل آزمایشگاهی. آزمایش غیر مســتقیم آنتی بادی‌های ضد گونه بروسلا در سرم، شیر و دیگر نمونه بالینی به طور معمول در کنترل بروســلوز و برنامه‌های ریشه کنی استفاده می‌شــوند. با ایــن حال وجود این آزمایش‌های نشــان داده شــده غیر قطعی هستند و منجر به کشــتار حیوانات عاری از بروســلا و باعث زیــان اقتصادی متعاقب آن می‌شــوند. این برنامه ریشــه‌کنی کامل را کار مشکلی می‌سازد؛ بنابراین ویژگــی آزمایش به کار گرفته شــده مهــم ترین اهمیت را دارد. به احتمال زیاد حل مشکلات با تشخیص دقیق شامل چندین آزمایش بــرای عملکردهای مختلف پاســخ ایمنی اســت. بیولوژی مولکولی با پرایمرهای انتخابی یا تصادفی به عنوان ابزار تشخیصی با نتایج نوید بخش درحال توسعه است و ممکن است به زودی در نقطه جایگزینی ایزولاسیون باکتری واقعی قرار بگیرند. این تکنیک تشــخیصی، سریع، ایمــن و مقرون به صرفه اســت تنها مشــکل واقعی وجود برخــی عدم قطعیــت در رابطه با ویژگی اســت. از این رو استانداردسازی و ارزیابی بیشتر، به خصوص در موارد مزمن لازم است.

References

1- Kaltungo B.Y, Saidu S.N.A, Sackey A.K.B, Kazeem H.M: A review on diagnostic techniques for brucellosis. African Journal of Biotechnology:(13):(1):2014.

Downloaded from labdiagnosis.ir at 10:05 +0430 on Friday June 22nd 2018