

مروری بر تکنیک‌های تشخیصی بروسلوزیس

• داود آقاویردیزاده

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

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 استاندارد 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 زیل نلسون 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 پلیمرز (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، تکنیک‌ها

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 علائم غیراختصاصی و نشانه‌های مشترک با بیماری‌های تب دار، میزان رشد آهسته عوامل سببی در کشت خون و پیچیدگی تشخیص سرولوژیکی آن‌ها، 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



Brucella neotome موجود در موش چوب و بروسلاهی حیوانات دریایی استفاده شده است.

آزمون‌های سرولوژیکی با توانایی شناسایی S-LPS جهت تشخیص بروسلوز در گاو و نشخوارکنندگان کوچک بسیار حساس می‌باشد اما اگر حیوانات قبلاً واکسینه شده باشند یا در معرض باکتری‌های گرم منفی با زنجیره‌های O- مشابه بروسلا قرار گرفته باشند. ممکن است نتایج مثبت کاذب ایجاد شود. 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

هستند. با این وجود فقط *Yersinia enterocolitica* O: 9 عامل عمده واکنش سرولوژیکی مثبت کاذب در تشخیص بروسلوز است.

پاسخ ایمنی به *B. abortus* در گاو، که با جزئیات بیشتر مطالعه شده است، ایزوتیپ IgM هست. زمان ظهور آنتی بادی‌ها بستگی به دوز آلوده کننده بروسلا، مسیر تماس و وضعیت حیوان میزبان دارد که با تولید ایزوتیپ IgGI و متعاقباً با مقادیر کمی از IgG2 و IgA دنبال می‌شود. پاسخ ایمنی در نتیجه دیگر باکتری‌های گرم منفی که دارای LPS با زنجیره‌های O- مشابه با بروسلا می‌باشند اساساً ایزوتیپ IgM است. لذا واکنش مثبت کاذب زیاد مشاهده می‌شود که سبب حساسیت پایین سنجش می‌شود. علاوه بر این ارگانسیم‌های گرم منفی با واکنش متقاطع و آنتی بادی‌های حاصل از واکسن به علت وجود *B. abortus* S19 قادر به شناسایی توسط آزمون‌های سرولوژیکی هستند 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، برخی حیوانات در زمان بلوغ نیز مقدار بالای تیترا آنتی بادی را حفظ می‌کنند. این مساله سبب ایجاد آزمون‌های سرولوژیکی بهبود یافته مانند سنجش ایمنی آنزیمی رقابتی و سنجش فلورسانس پلاریزاسیون می‌شود و واکسن زنده هیچ OPS ندارد که *B. abortus* RB51، توسط Schurig کسب شده است.

کشتی زمان بر، خطرناک و غیر حساس هستند. با وجود تلاش شدید برای بیش از یک قرن جهت ایجاد تکنیک تشخیصی قطعی، تشخیص باکتری همچنان بر پایه ترکیب چندین آزمون، جهت اجتناب از نتایج منفی کاذب، استوار است.

آزمون آگلوتیناسیون

نخستین آزمایش آگلوتیناسیون برای شناسایی آنتی بادی عفونت بروسلوز توسط Wright و Smith طی ۱۰۰ سال پیش گزارش شده است. در این آزمایش، مخلوط آنتی ژن‌های سلول باکتریایی و سرم فرد بیمار در یک لوله شیشه‌ای انکوبه می‌شود. اگر الگوی «پوشش» رسوب سلولی مشاهده شود به عنوان مثبت در نظر گرفته می‌شود در غیر این صورت به عنوان نتیجه منفی در نظر گرفته می‌شود. آزمونی که امروزه همچنان استفاده می‌شود بر همین پایه استوار است به جز این که فقط سلول‌های *Brucella abortus* به عنوان آنتی ژن استفاده می‌شوند. از این رو بعداً کار زیادی جهت بهبود روش‌ها و صحت تشخیص انجام شد که سبب تولید سنجش اتصال اولیه شد. سنجش اتصال اولیه به طور مستقیم میانکشی آنتی بادی و آنتی ژن را اندازه گیری می‌کند در حالی که آزمون‌های سرولوژی مرسوم مثل آزمون آگلوتیناسیون اسیدی یا آزمون فیکساسیون کمپلمان (CFT) پدیده ثانویه مانند آگلوتیناسیون یا فعال سازی کمپلمان را اندازه گیری می‌کنند. ارگانسیم بروسلا دارای O-پلی ساکارید (OPS) بر روی سطح خود هست که بخشی از لیپوپلی ساکارید (S-LPS) است و از نظر شیمیایی به عنوان هموپلیمر ۶،۴-دی داکسی-۴-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 خودشان ندارند. سه گونه اصلی بروسلا به نام‌های *Brucella suis*، *B. abortus*، *B. melitensis* آپی توپ‌های مشترکی در S-LPS شان دارند؛ بنابراین آنها را می‌توان با استفاده از آنتی ژن کامل یا به وسیله تهیه S-LPS از استخراج شیمیایی *B. abortus* تشخیص داد. آنتی ژن *B. abortus* در تشخیص سرولوژیکی

نمونه‌های مفید برای تشخیص بروسلاز

برای تشخیص بروسلاز، ارگانسیم باید از نمونه‌های گوناگون با توجه به علائم 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 ارگانسیم‌ها شامل محتویات معده، طحال و ریه جنین‌های سقط شده، سوآپ‌های واژنی، منی و مایعات آرتریتی یا هیگروما از حیوانات بزرگسال هستند. از لاشه‌های حیوانی، بافت ترجیحی برای کشت غده پستانی، بخش بالای پستان، ایلپاک 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 فوراً 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 این که ضایعات چشمگیر در بافت‌ها یافت شوند. با این حال، بافت پیشنهادی برای بروسلاز در حیوانات دریایی، طحال، غده پستانی، آرواره پایین، معده، ایلپاک 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 سوآپ‌های واژنی، جفت‌ها یا جنین‌های سقط شده و رنگ آمیزی آنها با روش رنگ آمیزی زیل نلسون اصلاح شده به دست آورد. با این حال، میکروارگانسیم‌های مرتبط با مورفولوژی مانند *Chlamydia abortus*، *Chlamydia psittaci* و *Coxiella burnetii* 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. سوآپ‌های واژنی و نمونه‌های شیر بهترین نمونه‌ها جهت استفاده برای جداسازی *B. melitensis* از گوسفند و بز است.

جداسازی ارگانسیم از طریق کشت

این روش احتمالاً 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 جنینی، مفصلی و آسیتی (صفافی) کشت داد. رشد باکتری‌ها در محیط کشت به طور قوی وجود عفونت را ثابت می‌کند. کشت‌های خون فقط در حیوانات دارای باکتری‌می، که احتمالاً 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 نسبتاً مبهم دارد. براث یا آگار را می‌توان از پودر برای کشت ارگانسیم 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 ۶٫۶ تا ۷٫۴ متفاوت است و محیط کشت باید بافر کافی با pH حدود ۶٫۸ جهت رشد بهینه داشته باشد. دمای رشد بهینه ۳۸-۳۶ درجه سانتی‌گراد است. با این حال سویه‌های زیادی بین ۲۰ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد 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



شیر یا پلاسما منی از حیوانات مشکوک ممکن است دارای مقادیر مختلفی از آنتی بادی‌های ایزوتیپ $G1$, M و $G2$ 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 سستی 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 اساساً آزمون آگلوتیناسیون سریع است که بر روی شیر کامل یا سرشیر انجام می‌شود. سلول‌های بروسلا رنگ آمیزی شده با هما توکسیلین 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

Kuzdas و Morse و محیط Farrell است. Kuzdas و Morse با آنتی بیوتیک‌های زیر و مقدار به ازای لیتر محیط پایه استفاده می‌شوند: 100mg سیکلو هکزیمید (فارچ 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 آنتی بیوتیک‌های زیر و مقدار آنها به ازای لیتر از محیط پایه تهیه می‌شود: باسیتراسین (25mg)، پلی میکسین سولفات (5mg)، نالیدیکسیک اسید (5mg)، نیستاتین (۱۰۰۰۰۰ واحد) و انکومایسین (20mg)، ناتامایسین (50mg).

محیط Farrell برای برخی سویه‌های *B. ovis*، *B. abortus*، *B. melitensis* نسبتاً 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) و انکومایسین (3mg)، نیترو فورانتوئین (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 ترجیحاً داخل وریدی یا داخل صفاقی یا از طریق مجاری گوارشی یا مسیر بینی (آنروسل) در موش‌ها باشد. طحال موش ۷ روز پس از تلقیح کشت می‌شوند در حالی که 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 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 لیپوپلی ساکارید 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 ۱:۶۴ 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 ارگانیزم OPS بر روی سطوحشان ندارند.

آزمایش آگلوتیناسیون استاندارد پلیت (SPAT)

SPAT جهت ایجاد نتایج مشابه با SAT در تیتراژ 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 سالی

(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 آنتی ژن در PH ۳,۶۶ 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 واکنشی 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 ۳,۶۵ استفاده می‌کند. این آزمایش می‌تواند در PH خنثی وجود، IgM، IgG1 و IgG2 را اندازه‌گیری کند. با این وجود به نظر می‌رسد IgM فعال‌ترین باشد. در



PH بافری ۳،۶۵، RBPT از آگلوتیناسیون IgM جلوگیری کرده و ظاهراً فقط IgG1 را اندازه گیری می کند. در نظر گرفته شده، در حالی که آزمایش نتایج منفی کاذب به دست می دهد آن احتمالاً به علت واکنش با IgM حیوانات از پیش واکسینه شده نتایج مثبت کاذب زیادی نیز حاصل می کند. در شرایطی که واکسیناسیون به طور معمول انجام نمی شود، استفاده از این آزمایش می تواند یک گزارش خوب از قرارگیری حیوانات در معرض ارگانسیم های بروسلا به دست دهد.

این روش به صورت بین المللی برای غربالگری بروسلوز در نشخوار کنندگان کوچک توصیه شده است اما فاقد استاندارد سازی آنتی ژن است. PH پایین آنتی ژن، ویژگی آزمایش را افزایش می دهد در حالی که دمای آنتی ژن و دمای محیطی که آزمایش رخ می دهد ممکن است حساسیت و ویژگی آزمایش را تحت تاثیر قرار دهد. Corbel مشاهده کرده که حساسیت آزمایش با اجزای دارای ایموگلوبولین IgG بخصوص IgG1 مرتبط است.

آزمایش پلیت ریوانول (RPT)

هدف آزمایش حذف برخی واکنش های غیراختصاصی است که بر اساس رسوب گلیکو پروتئین سرم با وزن مولکولی بالا از محلول سرمی است که در این مورد، اساساً IgM است که اکثراً IgG را در سرم باقی می گذارد. رنگ آکریدینی مانند ریوانول (۲- اتوکسی-۹،۶- دی آمینواکریدین لاکتات) جهت حصول فرآیند رسوب استفاده می شود و پس از آن رسوب به وسیله سانتریفوژ کردن حذف می شود و محلول رویی با استفاده از آزمایش آگلوتیناسیون سریع پلیت با سرم رقیق یا با تیوپ آزمایش با استفاده از رقت های ۱:۲۵، ۱:۵۰، ۱:۱۰۰ و ۱:۲۰۰ آزمایش می شود. آزمایش های رسوب معمولاً به علت پروتکل های دشوارشان به عنوان آزمایش های تاییدی استفاده می شوند. آزمایش توانایی تشخیص بین حیوانات عفونی و واکسینه و همچنین حاملین مزمن را داراست. با این حال تفسیر آزمایش دشوار است.

آزمایش فیکساسیون کمپلمان (CFT)

CFT اساساً آنتی بادی ایزوتیپ IgG1 را شناسایی

می کند به طوری که ایزوتیپ های IgM به صورت جزئی طی فرآیند غیر فعال سازی تخریب می شوند. از این رو که آنتی بادی های نوع IgG1 معمولاً پس از آنتی بادی های IgM ظاهر می شوند کنترل و نظارت این بیماری با CFT و CAT بهتر انجام می شود. آزمایش ارتباط بازیابی ارگانسیم بروسلا از نمونه غیر واقعی یا حیوانات ذاتا عفونی را به خوبی نشان می دهد. اگر چه آزمایش سریع و دقیق است ولی قادر به تشخیص بین آنتی بادی ها ناشی از عفونت از آنتی بادی های واکسینی نیست. مشکلات دیگر شامل تعداد زیاد معرف ها و کنترل های لازم برای انجام آزمایش است؛ بنابراین هر زمانی که آزمایش وضع می شود تعداد زیادی تیتراسیون مورد نیاز است و تفسیر نتایج به علت اختلاف در تکنیک ها ذهنی است. گاهی فعال سازی مستقیم کمپلمان به وسیله سرم (فعالیت ضد کمپلمانی) وجود دارد و استفاده آزمایش برای نمونه های سرمی همولیز شده، ممکن نیست. طبیعت دشوار این آزمایش و لازمه پرسنل بسیار ورزیده و مراکز آزمایشگاهی مناسب، CFT جهت استفاده در کشورهای در حال توسعه را نامناسب ساخته است. CFT، زمانی که آنتی بادی های نوع IgG2 از فیکساسیون کمپلمان ممانعت می کند نتیجه منفی کاذب نیز ممکن است ایجاد شود. با وجود این مسائل اساسی، CFT یک آزمایش با استفاده وسیع است و به عنوان آزمایش سرولوژیکی بسیار اختصاصی و پذیرفته شده برای تشخیص بروسلوز در نظر گرفته می شود؛ بنابراین آزمایش پیشنهادی برای روش بین المللی است.

آزمایش ۲- مرکاپتواتانول

2-MET-2 اکتباسی از تیترا SAT است. دو فرم از این آزمایش وجود دارد که از ۲- مرکاپتواتانول یا دی تیوتریتول استفاده می کنند. دی تیوتریتول به سبب سمیت ۲- مرکاپتواتانول ارجحیت دارد. آزمایش اساساً IgG را اندازه می گیرد زیرا پل دی سولفیدی IgM به مولکول های مونومری احیا شده و بنابراین قادر به ایجاد آگلوتیناسیون نیست. با این حال IgG نیز می تواند در این فرآیند احیا شده و نتایج منفی کاذب حاصل کند. به هر حال در حالت کلی احیای IgM ویژگی را افزایش می دهد. آزمایش

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

آزمایش آنتی گلوبلین (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 آنتی‌بادی‌های ناکامل انواع IgG مفید است که با آنتی‌ژن‌های سلولی ترکیب شده اند اما ایجاد واکنش آگلوتیناسیون نمی‌دهند. آزمایش برای اجرای پلیت میکرو تیترا 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 آگلوتینین بروسلا IgM و IgG یافت شده اند و می‌توان آنها را بر اساس پایداری در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه و سرد کردن تا ۱۸ درجه سانتی‌گراد 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 معمولاً حیوانات به تازگی آلوده شده یا دارای عفونت مزمن در گله هستند که ریشه‌کنی 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 آنتی‌بادی 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 آنتی‌بادی 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 اخیراً، هر دوی حیوانات واکسینه علیه B. abortus و حیوانات آلوده با میکروارگانیزم‌های 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 معمولاً 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 پهلوی یا داخل پلکی و سپس اندازه‌گیری 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 آنتی‌بادی‌های



هومورال علیه برسولوز هستند. آنتی بادی القا شده به وسیله واکسیناسیون به علت زمان کوتاه قرارگیری در معرض آنتی ژن 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 سریعاً 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 ارگانیزم‌های واکنش دهنده متقاطع مانند *Salmonella urbana* O: 30 و *Yersinia enterocolitica* O: 157 و *Escherichia coli* O: 116 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 آنتی‌بادی‌های 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 بروسولوز، 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 واکسینی را در اکثر حیوانات واکسینه شده تمیز دهد و آن می‌تواند به خوبی واکنش برخی آنتی‌بادی‌های 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 واکسینی 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 واکسینی 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 (IgA و IgG2 و IgG1 و IgM) است. با این حال این آزمون اندکی حساسیت پایینی نسبت به سنجش ایمنی آنزیمی غیر مستقیم دارد. این آزمایش روش تاییدی برجسته برای تشخیص بروسولوز در اکثر گونه‌های پستانداران است.

تکنیک‌های بیولوژی مولکولی

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) تکنیک اخیر و نوید

مانند لپتومننژیت بروسلائی حاد یا مزمن، هموراژی زیر عنکبوتیه یا آبسه مغزی به دنبال رادیوگرافی جمجمه‌ای را آشکار می‌سازند. به طور مشابه از اکوکاردیوگرافی نیز می‌توان جهت ارزیابی اندوکاردیت احتمالی استفاده کرد. آنوریسم میوتیک آئورت یا کاروتیدها نیز با آرتریوگرافی قابل مشاهده است. علاوه بر این بیوپسی مغز استخوان و بیوپسی کبد نیز ممکن است جهت تشخیص به ویژه در طول فاز حاد بیماری انجام شود.

نتیجه گیری

تشخیص قطعی بروسلوز همچنان کار دشواری است. تنها تشخیص محدود که استاندارد طلایی است بازایی عامل سببی از میزبان است. با این حال با برخی مشکلات همراه است: حساسیت پایین، هزینه و خطر به علت آلودگی پرسنل آزمایشگاهی. آزمایش غیر مستقیم آنتی بادی‌های ضد گونه بروسلا در سرم، شیر و دیگر نمونه بالینی به طور معمول در کنترل بروسلوز و برنامه‌های ریشه کنی استفاده می‌شوند. با این حال وجود این آزمایش‌های نشان داده شده غیر قطعی هستند و منجر به کشتار حیوانات عاری از بروسلا و باعث زیان اقتصادی متعاقب آن می‌شوند. این برنامه ریشه‌کنی کامل را کار مشکلی می‌سازد؛ بنابراین ویژگی آزمایش به کار گرفته شده مهم ترین اهمیت را دارد. به احتمال زیاد حل مشکلات با تشخیص دقیق شامل چندین آزمایش برای عملکردهای مختلف پاسخ ایمنی است. بیولوژی مولکولی با پرایمرهای انتخابی یا تصادفی به عنوان ابزار تشخیصی با نتایج نوید بخش در حال توسعه است و ممکن است به زودی در نقطه جایگزینی ایزولاسیون باکتری واقعی قرار بگیرند. این تکنیک تشخیصی، سریع، ایمن و مقرون به صرفه است تنها مشکل واقعی وجود برخی عدم قطعیت در رابطه با ویژگی است. 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.

بخش است که تشخیص دقیق و سریع بروسلوز را بدون محدودیت متدولوژی مرسوم امکان‌پذیر می‌سازد. چندین سیستم PCR مختص گونه با استفاده از جفت پرایمرها توسعه یافته اند که توالی‌های 16SRNA و ژن‌های مختلف پروتئین‌های غشای خارجی را هدف قرار می‌دهند. اولین آزمایش مبتنی بر PCR بروسلوز در سال ۱۹۹۰ معرفی شده است. اولین PCR چند گانه (مولتی پلکس) مختص گونه، روش Abortus-Melitensis-Ovis-Suis (AMOS-PCR) نامیده شد که جهت شناسایی و تمایز واریانت‌های 1, 2 B. abortus و 4 B. melitensis و B. ovis و واریانت 1 B. suis استفاده شده است. PCR بر پایه، پلی مورفسم ناشی از لوکالیزاسیون مختص گونه توالی در جی IS711 در کروموزوم بروسلا استوار 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 این برخی واریانت‌ها در داخل گونه‌ها نتایج منفی می‌دهند. روش PCR چندگانه بروث نردبان نیز برای شناسایی و تمایز گونه‌های بروسلا و سویه‌های واکسن در مرحله منفرد توسعه یافته است. PCR جهت شناسایی سویه‌هایی مانند B. microti و B. inopinata نیز عملکرد افزایش یافته‌ای داشته است. با این حال در سطح واریانت یا پایین تر از آن را نمی‌تواند تمیز دهد. به تازگی روش PCR چند گانه (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 توپرکلوز را نشان دهد در حالی که آرتروستز را می‌توان برای آرتريت سپتیک انجام داد. آسپیره مفصل می‌تواند مایع ترشحات را همراه با تعداد کمی سلول و غالباً سلول‌های تک هسته‌ای نشان دهد. ارزیابی رادیو گرافیک در حیوانات آلوده شواهدی

