

موضوع: ایمنولوژی

آزمایشات تشخیصی تب مالت

بروسلا ها باکتری های کوچک گرد یا بیضوی کوکوباسیلی گرم منفی و غیر متحرک می باشند. تولید اسپور و کپسول و فلاژل یا فیمبریا نمی کنند. در بعضی منابع از وجود کپسول بسیار ظریف در باکتری تهیه شده از کشت تازه با رنگ آمیزی مناسب ذکر شده است. (۲) بین ۰۰۵-۰۰۷ میکرومتر عرض و ۰۰۶-۰۰۵ میکرومتر طول دارند. به صورت تک ، دوتایی، زنجیره های کوتاه یا خوشه های کوچک دیده می شوند. (۱ و ۳)

در رنگ آمیزی گرم منفی هستند، معمولا به صورت دو قطبی رنگ نمی گیرند. اسید فست نیستند ولی در برابر رنگ بری با اسید و بازهای ضعیف مقاومت نشان می دهند. یک روش تغییر یافته اسید فست برای رنگ آمیزی جفت و اجزای دیگر سقط طراحی شده است. (۳)

کشت و متابولیسم و فیزیولوژی

به صورت هوازی رشد می کند ولی در بعضی موارد وجود CO₂ باعث افزایش رشد میشود. بیشتر گونه ها بر روی پیتون رشد کمی دارند ولی با اضافه نمودن سرم به این محیط رشد باکتری افزایش می یابد. بروسلا کریوهدرات ها را تخمیر نمی کنند. کاتالاز و اکسیداز مثبت هستند ولی گونه های اکسیداز منفی هم گزارش شده است. (۳)

طبقه بندی بروسلا ها : بروسلا ها توسط آزمون های ذیل به گونه و بیوتیپ های کوچکتر تقسیم می شوند. ۱- نیاز به CO₂ - تولید H₂S 3- ممانعت از رشد توسط رنگ های باکتریواستاتیک

۴- آگلوتیناسیون با سرم های اختصاصی ۵- لیز شدن توسط باکتریوفاژها (۳)

ساختمان آنتی ژنیک

آنتی سرم تهیه شده از حیواناتی که توسط کلنی های تازه باکتری ایمونیزه شده اند قادر است هر سه گونه آبورتوس و ملی تنسیس و وئیس را آگلوتینه کند. (۲)

اگر این آنتی سرم را با گونه ملی تنسیس مجاور کنیم مایع رویی پس از انکوباسیون تنها توانائی واکنش با گونه آبورتوس و سوئیس را دارد. اگر همین آزمایش را با گونه آبورتوس انجام دهیم تنها با ملی تنسیس واکنش نشان میدهد. (۱)

دو شاخص آنتی ژنیک در تست های سرولوژیک مشخص شده است. آنتی ژن A (غالب در گونه

آبورتوس) و آنتی ژن M (غالب در گونه ملی تنسیس) که البته آنتی ژن a در ملی تنسیس و آنتی - ژن m در آبورتوس وجود دارد. این آنتی ژن ها در کمپلکس لیپوپلی ساکارید- پروتئین عرضه میگردند. (۲)

ترکیب ۱۹ کربنی سیکلو پروپان اسید در تمام گونه ها بجز برسلا کانیس وجود دارد. این ترکیب در روش - Gas Liquid - Chromatography قابل تشخیص است و مبنای تست سریع GLC است. (۱)

ساختمان آنتی ژنیک بروسلا با تعدادی از باکتری ها دارای واکنش متقاطع است. مهمترین آنها عبارتند از: ۱- یرسینسا انترکولیتیکا ۲- فرانسیسلا تولارنسیس ۳- سالمونلا ۴- اشرشیا کولی

۵- ویبریو کلرا (۱)

افرادی که واکسن وبا دریافت کرده باشند آزمون رایت در آنها مثبت می شود. (۵)

ایمنی شناسی تب مالت

در این بیماری نیز مانند سایر بیماری ها در اواخر هفته اول و یا دوم مرحله حاد ابتدا بتدریج IgM و سپس IgG اختصاصی بر علیه شاخص های آنتی ژنیک باکتری بالا می رود و پس از چند هفته عیار

IgM از IgG نیز بیشتر می شود. در صورتی که درمان مناسب انجام شود تیتراژ IgG کاهش می یابد ولی تغییری در تیتراژ IgM ایجاد نمی شود. حال چنانچه درمان مناسبی انجام نشود بیماری وارد مرحله مزمن شده و تیتراژ مثبت سرم به طور مشخص مربوط به آنتی بادی از کلاس IgG می باشد. (۵)

البته مثبت شدن آنتی بادی در سرم بیمار از باکتریمی یا بازگشت عفونت جلوگیری نمی کند و در محدود کردن بیماری نقشی را ایفاء نمی کند. (۲)

ایمنی سلولی نقش مهمی را در محدود شدن بیماری و فعالیت ماکروفاژها بر علیه میکروب های درون سلولی بازی می کند.(۲)

چنانچه درمان انجام نشود بیماری وارد مرحله تحت مزمن می شود. یعنی میکروب وارد ارگان ها مانند مغز استخوان می شود. در اینحالت معمولاً "آنتی بادی بلوکان از کلاس IgG ناقص و IgA در سرم بیمار تشکیل می گردد.

تشخیص آزمایشگاهی

تشخیص بیماری بر اساس جدا نمودن باکتری از بیمار و کشت آن در محیط های مخصوص می باشد ولی بدلیل طولانی بودن زمان کشت و پائین بودن حساسیت آن بیشتر از روشهای تشخیص سرولوژیک در تشخیص استفاده می شود.

روشهای سرولوژیک:

۱- تست آگلوتیناسیون

در تست های آگلوتیناسیون از سوسپانسیون کشت باکتری که توسط حرارت کشته شده است استفاده می شود.(۴) برای قابل رویت شدن واکنش از ذراتی مانند رنگ رزبنگال برای سوار نمودن ذرات میکروبی روی آن استفاده می شود. برای پایداری آنتی ژن و عدم رشد قارچ یا میکروب های موجود در محیط به آن فنل اضافه می نمایند. از این آنتی ژن فنله برای آزمون های رایت و کومبس رایت استفاده می شود.

۲- آزمون ثبوت مکمل

بر مبنای مصرف کمپلمان در اثر تشکیل کمپلکس آنتی ژن-آنتی بادی استوار است و کاربرد چندانی در آزمایشگاه ندارد.

۳- تست ELISA

حساسیت و ویژگی بسیار بالائی دارد. در این تست پدیده منطقه ای یا آنتی بادی های بلوکان دیده نمی شود. در این روش با استفاده از آنتی بادی های اختصاصی می توان کلاس آنتی بادی موجود در سرم را نیز مشخص نمود.

۴- تست جلدی

با تزریق آنتی ژن بروسلا به صورت داخل جلدی انجام می شود. در بیماران یا افراد یا سابقه برخورد با آنتی ژن به صورت سرخی و سفتی در محل تزریق مشاهده می گردد. معمولاً " قابل اعتماد نیست و تزریق آنتی ژن خود باعث افزایش تیتر آنتی بادی های سرم می شود.

نظر به استفاده وسیع از آزمون راییت در آزمایشگاه ها به شرح تقریباً " کامل آزمون راییت (ابته در حد توان) می پردازیم.

آزمون راییت

آزمون راییت بر اساس آگلوتیناسیون مستقیم است و برای مشخص نمودن کلاس آنتی بادی از مواد احیاء کننده مانند ۲- Mercaptoethanol (2ME) و یا Dithiothiol (DTT) استفاده نمود.

آزمون راییت به دو روش سریع یا اسلایدی و روش بطئی یا لوله ای انجام می شود.

آزمون راییت به روش سریع یا اسلایدی

۱- ابتدا با یک پیپت ۰۰۱ میلی لیتری بر روی یک اسلاید مناسب به ترتیب مقادیر ۰۰۰۸

۰۰۰۴, ۰۰۰۲, ۰۰۰۱, ۰۰۰۵, میلی لیتر از سرم بیمار را می ریزیم.

۲- از یک نمونه سرم مثبت و یک نمونه سرم منفی برای کنترل آگلوتیناسیون استفاده می کنیم.

۳- شیشه حاوی آنتی ژن را قبل از آزمایش از یخچال خارج نموده به حرارت آزمایشگاه می رسانیم.

به تمام سرم ها و سرم های مثبت و منفی یک قطره (در حدود ۰۰۰۳ میلی لیتر) آنتی ژن را که به خوبی مخلوط شده است اضافه می کنیم.

۴- تمام نمونه ها را با آنتی ژن به خوبی توسط اپلیکاتور مخلوط می کنیم.

۵- اسلاید را بر روی روتاتور یا در دست به صورت دورانی به مدت ۳ دقیقه حرکت می دهیم.

۶- نتیجه آگلوتیناسیون هر رقت از سرم را در زیر نور غیر مستقیم چراغ و در بالای یک صفحه تیره

به صورت زیر یادداشت می نمایم.

الف- آگلوتیناسیون ۱۰۰٪ به عنوان +۴

ب- آگلوتیناسیون ۷۵٪ به عنوان +۳

ج- آگلوتیناسیون ۵۰٪ به عنوان +۲

د- آگلوتیناسیون ۲۵٪ به عنوان +۱

ه- آگلوتیناسیون کمتر از ۲۵٪ به عنوان +/-

و- در صورتی که هیچ آگلوتیناسیونی مشاهده نشود به عنوان منی گزارش می شود.

اگر چه روش سریع برای محاسبه عیار سرم بیمار روش دقیقی نیست ولی با آن می توان به صورت تقریبی تیتراژ را مشخص نمود. بالاترین رقتی از سرم که ۵۰٪ (+۲) ایجاد آگلوتیناسیون نماید تیتراژ سرم می باشد.

حجم سرم به طور تقریبی معادل تیتراژهای زیر است:

۱:۲۰ ml۰,۰۰۸

۱:۴۰ ml۰,۰۰۴

۱:۸۰ ml۰,۰۰۲

۱:۱۶۰ ml۰,۰۰۱

۱:۳۲۰ ml۰,۰۰۰۵

روش اسلاید به عنوان روش بیماریابی روش بسیار مناسب است که در صورت مثبت شدن حتماً باید

تیتراژ دقیق سرم توسط روش لوله ای تعیین گردد. البته از این روش نمی توان برای مشخص کردن کلاس آنتی بادی و یا آنتی بادی بلوکان استفاده نمود.

در مواردی که تیتراژ عیار آنتی بادی در سرم بسیار بالا باشد بدلیل پدیده منطفه ای یا پروزون تیتراژهای مورد استفاده در روش اسلاید ممکن است منفی شوند. که جزء نقاط ضعف روش اسلاید میباشد.

در یکسری از تجارب دوستان مشخص شده است که چنانچه تیتراژهای روش اسلایدی را علاوه بر

مشاهده ماکروسکوپی در زیر میکروسکوپ نیز بررسی شود. وجود تجمع های آنتی ژنی در زیر میکروسکوپ می تواند نشانه ای از پدیده منطفه ای باشد.

نکته مهم در روش اسلاید قرائت نتایج در مدت ۳ دقیقه می باشد. در اثر ماندن نمونه آب خود را از دست داده و باعث چسبیدن آنتی ژن ها به هم شده و بطور کاذب آزمون را مثبت می کند.

آزمون راییت به روش لوله ای یا بطئی

۱-۱۱ لوله آزمایش را در جا لوله ای قرار دهید

۲- در لوله اول ۰.۰۹ میلی لیتر و به لوله های بعدی ۰.۰۵ میلی لیتر سرم فیزیولوژی بریزید.

۳- به لوله اول ۰.۰۱ میلی لیتر سرم اضافه کرده خوب مخلوط کنید و ۰.۰۵ سی سی از لوله اول را به لوله دوم و همینطور تا لوله دهم رقت متوالی تهیه میکنیم و از لوله دهم ۰.۰۵ سی سی را دور میریزیم

۴- لوله یازدهم به عنوان کنترل آنتی ژن بوده و فاقد سرم است.

۵- برای سرم کنترل های مثبت و منفی هم عیناً همین کار را انجام میدهم.

۶- به تمام لوله ها ۰.۰۵ سی سی آنتی ژن بروسلا لوله ای اضافه میکنیم. (در صورت لزوم آن را طبق دستور سازنده با سرم فیزیولوژی رقیق یا به صورت غلیظ استفاده کنید)

۷- لوله ها را مخلوط کرده و در بن ماری ۳۷ درجه بمدت ۴۸ ساعت نگهداری نموده و سپس نتایج را به صورت ذیل قرائت میکنیم.

ابتدا لوله های شاهد آنتی ژن و کنترل سرم و سپس لوله های بیماران را در بالای یک صفحه تیره و نور غیر مستقیم چراغ مورد بررسی قرار می دهیم.

الف- چنانکه تمام آنتی ژن آگلوتینه شود و مایع رویی شفاف باشد جواب را بصورت ۴+ یادداشت کنید

ب- اگر ۷۵٪ آنتی ژن آگلوتینه شود مایع رویی نسبتاً کدر باشد جواب را بصورت ۳+ یادداشت کنید

ج- اگر ۵۰٪ آنتی ژن آگلوتینه شود مایع رویی نسبتاً کدر باشد جواب را بصورت ۲+ یادداشت کنید

د- اگر ۲۵٪ آنتی ژن آگلوتینه شود مایع رویی کدر باشد جواب را بصورت ۱+ یادداشت کنید

ه- اگر رسوبی دیده نشود و مانند لوله شاهد آنتی ژن کدر باشد منفی گزارش می شود.

تیتراژی نهایی رقتی از سرم است که حداقل جواب ۲+ داده باشد.

آزمون کومبس – رایت

۱- ابتدا آزمایش رایت لوله ای را انجام می دهیم

۲- لوله ها را سانتریفیوژ کرده و مایع رویی را دور ریخته و رسوب را سه بار با سرم فیزیولوژی بشوئید.

۳- به هر لوله یک قطره آنتی گلبولین انسانی (سرم کومبس) اضافه کنید.

۴- لوله ها را یک ساعت در بن ماری ۳۷ درجه قرار دهید.

۵- به لوله ها آنقدر سرم فیزیولوژی بریزید تا حجم نهائی لوله ها به یک سی سی برسد.

۶- لوله ها را تا روز بعد در ۳۷ درجه قرار دهید.

۷- لوله ها را مانند دستور رایت قرائت کنید.

تشخیص کلاس آنتی بادی ضد بروسلا یا آزمایش ME –Wright test

این آزمایش بدنبال مثبت شدن آزمایش رایت انجام می شود. مهمترین کاربرد آن افتراق بین بروسلوز فعال از غیر فعال در فردی که علایم بالینی بیماری را دارد ولی کشت خون او استریل است و تیتراژ آزمایش رایت او نیز پائین است. بعلاوه با انجام این آزمایش می توان تاثیر آنتی بیوتیک مناسب را در درمان بیماری تحت بررسی قرار داد.

محلول های لازم:

۱- محلول ۲ (ME)-Mercaptoethanol ویا (DTT) Dithiotheiol

۲- آنتی ژن بروسلا.

لازم به تذکر است آنتی ژن سرم وسایر محلول هایی که استفاده می شود فاقد فنل باشد زیرا فنل مانع از عملکرد مواد ایاء کننده می شود. در صورتی که آنتی ژن فنله باشد باید قبل از آزمایش چند بار آنرا با بافر فسفات نمکی شستشو داد.

روش کار

۱- تعدادی از لوله های آزمایش را در جا لوله ای قرار دهید

۲- مقدار ۰.۰۵ سی سی از محلول احیاء کننده (۲ ME یا DTT) را در لوله اول بریزید.

۳- مقدار ۰.۰۵ سی سی از سرم بیمار را به لوله اول اضافه کنید.

۴-لوله اول را یک ساعت در دمی اتاق فرار دهید تا مواد احیاء کننده باعث غیر فعال شدن Igm گردد.

گردد.

۵-به سایر لوله ها ۰.۵ سی سی از محلول احیاء کننده اضافه کنید.

۶-پس از یک ساعت مقدار ۰.۵ سی سی از لوله اول برداشته و به لوله دوم منتقل کرده و همینطور تا آخرین لوله رقت متوالی تهیه میکنیم. از لوله دهم ۰.۵ سی سی را دور بریزید.

۷-به تمام لوله ها ۰.۵ سی سی آنتی ژن بروسلا فاقد فتل اضافه کنید.

۸-لوله ها را ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه انکوبه کنید و سپس مانند روش رایت لوله ای قرائت نمائید

روش انجام رایت سانتریفوژ

در این روش سرم را طبق روش رایت معمولی سرم را اقیق کرده و به آنها آنتی ژن بروسلا اضافه میکنیمو بلافاصله با سرعت ۲۵۰۰ دور در دقیقه بمدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ کرده و قرائت می کنیم

در این روش علاوه بر افزایش سرعت عمل اکثرا" پدیده منطقه ای نیز از بین می رود. این روش جایگزین مناسبی برای روش سنتی رایت است و به خوبی از آن میتوان در انجام تست کومبس رایت

نیز استفاده نمود.

توصیه میگردد که دور سانتریفوژ حتما" بررسی شود تا خیلی زیاد یا کم نباشدو ایجاد مثبت کاذب یا منفی کاذب ننماید. البته برای قرائت نتایج در روش های کلاسیک انجام آزمون های رایت نیز سانتریفوژ کردن لوله ها توصیه می گردد.

تفسیر نتایج آزمایشات سرو لوژیک تب مالت

سرم افراد طبیعی به نسبت ۱:۱۰ و بندرت ۱:۲۰ آنتی ژن بروسلا ملی تنسیس را آگلوتینه می نماید.

تیتتر سرم افراد نرمال در مناطق مختلف ایران متفاوت میباشد مثلا" در مناطقی که دامداری رواج دارد

تیتتر سرم افراد ممکن است تا ۱:۱۶۰ هم برسد ولی بیماری وجود نداشته باشد.

مانند تمام روش های سرولوژیک افزایش تیتتر آنتی بادی در سرم فرد دارای ارزش زیادی می باشد.

ولی چنانچه تیتتر سرم ثابت باشد (مثلا" ۱:۸۰) بیمار مبتلا نمی باشد.

بطور کلی وقتی تیتر آنتی بادی بالا باشد می توان گفت بیمار مبتلا به بروسلوز است و بیماری در حال پیشرفت است. در بعضی از حالات در کودکان کشت خون مثبت میشود و بیمار مبتلا به بروسلوز است ولی تا مدت مدیدی به علت وضعیت خاص سیستم ایمنی تست راییت منفی است و یا تا

مدت ها ۱:۲۰ تا ۱:۴۰ مثبت باقی می ماند. بنابراین وقتی تست راییت منفی باشد نمی توان بطور قاطع بروسلوز را رد نمود. کسانی که شیر بز مصرف می کنند تیتر سرم آنها ممکن است به ۱:۲۰ تا

۱:۴۰ مثبت می شود. اشخاصی که واکسن وبا دریافت کرده اند تست راییت ممکن است ۱:۸۰ مثبت باشد