

میکروبهای بروسلا (*Brucella*) در انسان بیماری بروسلوز (تب مالت) یا تب موج (*Undulant Fever*) ایجاد می کنند. جایگاه اصلی این میکروبها در حیوانات، بخصوص دامها می باشد و در حیوان ماده، سقط جنین ایجاد می کنند. انسان بیشتر از طریق مصرف لبنیات، مانند شیر نجوشیده، پنیر، بستنی و خامه آلوده، یا تماس مستقیم با حیوانات بیمار، مانند کشاورزان، دامداران، دامپزشکان و کارکنان کشتارگاهها که در تماس با دامها می باشند، به بیماری تب مالت مبتلا می شود. بنابراین بیماری تب مالت، یک بیماری مشترک بین انسان و حیوان (*Zoonosis*) می باشد.

گونه‌های میکروب بروسلا، براساس میزبان طبقه بندی و نامگذاری شده‌اند:

۱) بروسلا آبورتوس (*B. abortus*)، که منبع آن گاو می باشد.

۲) بروسلا ملیتنسیس (*B. melitensis*)، که منبع آن گوسفند و بز می باشد.

۳) بروسلا کانیس (*B. canis*)، که منبع آن سگ می باشد.

۴) بروسلا سویس (*B. suis*)، که منبع آن خوک می باشد.

چهار گونه فوق عامل بیماری تب مالت در انسان می باشند. در ایران، عامل تب مالت بیشتر از نوع گاوی و گوسفندی، بخصوص بروسلا ملیتنسیس می باشد. بیماری تب مالت از نظر بالینی به سه صورت حاد (*Acute*)، تحت حاد (*Subacute*) و مزمن (*Chronic*) دیده می شود.

علائم بالینی

تب موج، ضایعات و دردهای استخوانی مفصلی و پس از آن، اختلالات عصبی.

ایمونولوژی بروسلوز

واکنش دستگاه ایمنی بدن علیه میکروبهای بروسلا به دو صورت ایمنی سلولی یا ازدیاد حساسیت تاخیری (*DTH: Delayed Type Hypersensitivity*) و ایمنی هومورال بصورت تولید آنتی بادی علیه آنتی ژنهای سطحی میکروب (میکروبهای بروسلا فاقد آنتی ژن H (فلاژل) بوده و فقط آنتی ژن O (سوماتیک) را دارند) می باشد. از طرف دیگر، یک بار آلودگی به بروسلوز موجب مصونیت

قطعی نمی شود. پاسخ آنتی بادی علیه میکروب بروسلا، شامل تولید IgM، IgG و مقدار جزئی IgE می باشد، به این ترتیب که:

دراواخر هفته اول و اوایل هفته دوم بتدریج آنتی بادی IgM، در سرم ظاهر می شود و در روزهای ۱۳ تا ۲۱ مقدار آن به حداکثر می رسد.

تولید آنتی بادی IgG اختصاصی (IgG1 و IgG2) از روزهای ۱۴ تا ۲۱ بیماری آغاز شده و پس از چند هفته (هفته چهارم تا هشتم) تیتراژ از IgM نیز بیشتر می شود.

در صورتی که درمان با آنتی بیوتیک مناسب صورت گیرد، تیتراژ IgG کاهش می یابد اما اگر درمان مناسب انجام نشود یا درمان، ناقص انجام شود، بیماری وارد مرحله مزمن شده، که در این حالت تیتراژ مثبت سرم اکثراً مربوط به آنتی بادی IgG می باشد.

تشخیص آزمایشگاهی

بهترین راه قطعی تشخیص بروسلوز، کشت خون، مغز استخوان، مایع مغزی-نخاعی، مایع مفصلی و دیگر نمونه ها و جداسازی باکتری بروسلا می باشد. کشت خون باید در موقعی که تب بالاست، انجام شود. متأسفانه همیشه کشت نمونه و جداسازی باکتری بروسلا، بخصوص در موارد مزمن بیماری باموفقیت همراه نمی باشد، به همین دلیل سازمان بهداشت جهانی برای تشخیص این بیماری، آزمایشهای سرولوژی استاندارد زیر را توصیه نموده است:

۱) آزمایش رزبنگال (Rose engal)

۲) آزمایش رایت (Wright)

۳) آزمایش ۲-مرکاپتو اتانل-رایت (2ME-Wright)

۴) آزمایش کومبس رایت (Coombs-Wright)

آزمایش رزبنگال (Rose engal)

سریعترین آزمایش سرولوژی اولیه یا غربالی (Screening Test) برای تشخیص تب مالت می باشد. اساس این آزمایش آگلوتیناسیون مستقیم (Direct Agglutination) می باشد که در عرض چند

دقیقه می توان سرمهای مثبت (افراد مبتلا به تب مالت) را از منفی (افراد سالم) جدا کرده، سپس با آزمایش رایت لوله ای تیتراژ بادی ضد بروسلا را تعیین کرد. به آزمایش رزبنگال، آزمایش پلیت تست، کارد تست (Card Test) و آزمون سریع (Rapid Test) نیز می گویند.

روش انجام آزمایش

بر روی یک صفحه سفید رنگ (بهتر است از کاشی استفاده شود) یک قطره (معادل ۵۰ لاندایا میکرولیتر) سرم بیمار بریزید. و سپس به آن، یک قطره از سوسپانسیون حاوی آنتی ژن رزبنگال اضافه نمایید. با استفاده از اپلیکاتور، دو قطره را مخلوط کرده (به اندازه دایره ای به قطر دو سانتی متر پخش نمایید)، به مدت چهار دقیقه در دست یا بر روی روتاتور حرکت دورانی دهید و پس از این مدت جواب را از نظر آگلوتیناسیون بررسی نمایید. سرمهای مثبت (واکنش آگلوتیناسیون در آنها مشاهده شده است) را جدا کرده با انجام آزمایش رایت لوله ای، تیتراژ بادی موجود در سرم را بدست آورید. در آزمایش رزبنگال موارد مشکوک دیده نمی شود و نتیجه با قاطعیت مثبت یا منفی می باشد.

آزمایش رایت (Wright) لوله ای

ده عدد لوله آزمایش تمیز، را انتخاب کرده و پس از شماره گذاری در جا لوله ای قرار دهید. در لوله اول ۰/۹ سی سی، و به لوله های شماره ۲ تا ۱۰، ۰/۵ سی سی سرم فیزیولوژی اضافه نمایید. سپس به لوله شماره ۱، ۰/۱ سی سی سرم بیمار اضافه کرده، محتویات داخل لوله را، با تکان دادن لوله مخلوط نمایید. از لوله شماره ۱، ۰/۵ سی سی برداشته، به لوله شماره ۲، اضافه نمایید. محتویات داخل لوله را، با تکان دادن لوله مخلوط نمایید. سپس از لوله شماره ۲، ۰/۵ سی سی برداشته و به لوله شماره ۳ اضافه نمایید. این کار را تا لوله شماره ۱۰، ادامه دهید. و از لوله شماره ۱۰، ۰/۵ سی سی برداشته، بیرون بریزید (جدول ۱). ۰/۵ سی سی از آنتی ژن بروسلا را به لوله های ۱ تا ۱۰، اضافه نمایید. محتویات داخل لوله ها را، با تکان دادن لوله ها مخلوط نمایید.

لوله ها را به مدت ۵ دقیقه، در دور ۲۵۰۰ rpm سانتریفوژ نمایید.

لوله ها را به آرامی از سانتریفوژ درآورده، به ترتیب از لوله شماره ۱ تا ۱۰، از نظر آگلوتیناسیون بررسی نمایید.

نتیجه آزمایش را در تک تک لوله ها بصورت زیر خوانده و یادداشت نمایید.

تمام آنتی ژن موجود در لوله آزمایش، آگلوتینه شده و مایع بالای رسوب شفاف است: ++++(۴+)

تقریبا ۷۵ درصد آنتی ژن موجود در لوله آزمایش، آگلوتینه شده و مایع بالای نسبتا کدر است: +++(۳+)

تقریبا ۵۰ درصد آنتی ژن موجود در لوله آزمایش، آگلوتینه شده و مایع بالای رسوب نسبتا کدر است: ++
(۲+)

تقریبا ۲۵ درصد آنتی ژن موجود در لوله آزمایش، آگلوتینه شده و مایع بالای رسوب کدر است: +(۱+)

آگلوتیناسیون دیده نمی شود و سوسپانسیون داخل لوله، کاملا کدر است: - (منفی)

در نهایت، آخرین رقتی از سرم را که در لوله مربوط به آن، ۵۰ درصد (۲+) آگلوتینه مشاهده می شود،

بعنوان تیر نهایی آنتی بادی گزارش نمایید.

شماره لوله	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰
سرم فیزیولوژی (میلی لیتر)	۰/۹	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵
سرم بیمار	۰/۱									
سرم رقیق شده (میلی لیتر)	→ ۰/۵	→ ۰/۵	→ ۰/۵	→ ۰/۵	→ ۰/۵	→ ۰/۵	→ ۰/۵	→ ۰/۵	→ ۰/۵	→ ۰/۵
آنتی ژن (میلی لیتر)	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵
رقت (نهایی)	۱/۲۰	۱/۴۰	۱/۸۰	۱/۱۶۰	۱/۳۲۰	۱/۶۴۰	۱/۱۲۸۰	۱/۲۵۶۰	۱/۵۱۲۰	۱/۱۰۲۴۰

جدول ۱: روش لوله ای آزمایش رایت

- (۱) شیشه های حاوی آنتی ژن را حداقل ۱۵ دقیقه قبل از شروع آزمایش، از یخچال بیرون آورده تا به دمای محیط برسند، و به مقدار نیاز، مطابق دستور شرکت سازنده رقیق نمایید.
- (۲) از آنجا که میکروبهای بروسلا آبورتوس، سویس و ملیتنسیس با یکدیگر آنتی ژنهای مشترکی دارند، بنابراین برای آزمایش رایت، معمولاً از کلنی های صاف باکتری بروسلا آبورتوس سویه ۹۹ یا ۱۹، یا ملیتنسیس بعنوان آنتی ژن استفاده می شود.
- (۳) حداقل تیترا قابل قبول در آزمایش رایت، برای کشورهای مختلف، متفاوت است. در ایران، تیترا ۱/۸۰ به بالا، با در نظر گرفتن علائم بالینی و شرایط شغلی بعنوان مثبت در نظر گرفته می شود.
- (۴) مشکل عمده آزمایش رایت اینست که بعد از درمان تا مدتها در تیترا قابل قبول مثبت باقی می ماند. در اینگونه موارد در صورتی که تیترا آنتی بادی در مقایسه با آزمونهای قبلی، سیر نزولی داشته باشد یا آزمایش 2ME-Wright منفی شود، دلالت بر تاثیر درمان و بهبودی می باشد.
- (۵) میکروبهای بروسلا با میکروبهای فرانسیسلا تولارنسیس (*Francisella Tularensis*)، ویریو کلرا (*Vibrio Cholerae*) و واکسن آنها و همچنین یرسینیا انتروکولیتیکا (*Yersinia Enterocolitica*) ساختمان آنتی ژنی مشترک دارد، بنابراین عفونت با این میکروبها می تواند سبب افزایش تیترا آنتی بادیهای ضد بروسلا در آزمایش رایت شود.
- (۶) گاهی به دلیل شرایط شغلی (دامداران، دامپزشکان و کارکنان کشتارگاهها که در تماس با دامها می باشند) ممکن است بدون وجود بیماری بروسلوز، تیترا ۱/۳۲۰ یا بالاتر، آزمایش رایت مثبت شود. بنابراین در تفسیر جوابهای آزمایش رایت، می بایست شرایط شغلی شخص را نیز در نظر داشت.
- (۷) آنتی بادی ضد بروسلا از کلاس IgG می باشد، و می تواند از طریق جفت، از مادر مبتلا به تب مالت به جنین و بالطبع نوزاد، منتقل شده، آزمایشهای سرولوژی نوزاد را مثبت نماید. در اینگونه موارد، برای اثبات بیماری تب مالت در نوزاد، می بایست نتایج آزمایش

2ME-Wright با رایت لوله ای مقایسه شود. اگر تیتراژ آزمایش 2ME-Wright از رایت لوله

ای کمتر باشد، احتمالاً این کاهش تیتراژ مربوط به IgM می باشد که در مجاورت ۲-

مرکاپتواتانول از بین رفته است. اثبات وجود آنتی بادی IgM در سرم نوزاد دلالت بر بیماری

تب مالت دارد. در صورتی که جواب دو آزمایش مذکور یکسان باشد، نوزاد مبتلا به تب مالت

نمی باشد و علت مثبت شدن این دو آزمایش در نوزاد، آنتی بادی IgG ای مادری می باشد.

آزمایش ۲-مرکاپتواتانول-رایت (2ME-Wright)

این آزمایش پس از مثبت شدن آزمایش رایت لوله ای و به منظور تعیین کلاس آنتی بادی انجام می شود.

در این آزمایش آنتی بادی IgM به علت تاثیر ماده احیاکننده 2-ME بر آن، از بین می رود، در حالی

که آنتی بادی IgG به ماده 2-ME مقاوم بوده و از بین نمی رود. مهمترین کاربرد این آزمایش،

تشخیص افتراقی بین بروسلاز فعال (آنتی بادی موجود در سرم اکثراً از کلاس IgG می باشد) از غیر فعال

(آنتی بادی موجود در سرم اکثراً از کلاس IgM می باشد) می باشد.

روش انجام آزمایش

روش انجام آزمایش 2-ME Wright مشابه رایت لوله ای بوده با این تفاوت که در لوله اول بجای سرم

فیزیولوژی، مقدار ۰/۹ سی سی بافر نمکی حاوی ماده احیاکننده 2-ME اضافه نمایید. لوله اول را به

مدت یکساعت در دمای اتاق قرار دهید و سپس رقیق سازی سرم و بقیه کارها را انجام دهید (جدول ۲).

شماره لوله	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰
بافر نمکی حاوی 2- ME	۰/۹	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵
سرم بیمار (میلی لیتر)	۰/۱									
لوله اول را به مدت یک ساعت در دمای اتاق قرار دهید و سپس رقیق سازی را انجام دهید										
سرم رقیق شده (میلی لیتر)	→ ۰/۵	→ ۰/۵	→ ۰/۵	→ ۰/۵	→ ۰/۵	→ ۰/۵	→ ۰/۵	→ ۰/۵	→ ۰/۵	→ ۰/۵
آنتی ژن بروسلایی مخصوص آزمایش 2- ME (میلی لیتر)	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵
رقت (تیترو نهایی)	۱/۲۰	۱/۴۰	۱/۸۰	۱/۱۶۰	۱/۳۲۰	۱/۶۴۰	۱/۱۲۸۰	۱/۲۵۶۰	۱/۵۱۲۰	۱/۱۰۲۴۰

جدول ۲: آزمایش 2-ME Wright

آزمایش کومبس رایت (Coombs-Wright)

این آزمایش برای تشخیص آنتی بادیهای ناقص (Incomplete) یا مسدود کننده (Blocking)

خصوصا در موارد رجعت بروسلوز یا مرحله مزمن بیماری می باشد.

آنتی بادیهای ناقص بیشتر از کلاس IgG (IgG3 و IgG4) و IgA می باشند.

روش انجام آزمایش

ابتدا آزمایش رایت لوله ای را مطابق دستوری که قبلا گفته شد انجام داده، نتایج را یادداشت نمایید.

سپس به تمام لوله ها سرم فیزیولوژی تمیز اضافه نموده، لوله ها را در دور ۲۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ نمایید. پس از این مدت لوله ها را به آرامی از سانتریفوژ درآورده، مایع رویی را دور بریزید. عمل شستشو را برای دو بار دیگر تکرار نمایید.

پس از اتمام شستشو و خارج کردن حتی آخرین قطره سرم فیزیولوژی داخل لوله بر روی دستمال کاغذی، به رسوب داخل هر لوله یک قطره آنتی هیومن (معرف کومبس) اضافه نمایید.

لوله ها را به مدت نیم تا یکساعت در بن ماری ۳۷ درجه سانتیگراد قرار دهید.

سپس لوله ها را به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۲۰۰۰ سانتریفوژ نمایید.

لوله ها را به آرامی از سانتریفوژ درآورده، از نظر آگلوتیناسیون بررسی نمایید و آخرین رقتی را که در لوله مربوط به آن، آگلوتیناسیون مشاهده می شود بعنوان تیتراژ آنتی بادی گزارش نمایید.

مطالب این قسمت با همکاری خانمها نکتہ ارشدی و حمیده احمدی تهیه شده است.