آگلوتیناسیون لوله‌ای رایت باروش استاندارد قادر به ارزیابی صحیح موارد بروسلوز نمیباشد

نویسندگان: دکتر علی جورابچی[۱]، علی‌اکبر مؤمنی[۲]، محمد محمدی[۳]

خلاصه:

تشخیص بیماری بروسلوز به لحاظ صوربالینی متنوع مشکل میباشد. تشخیص قطعی فقط با جدا نمودن بروسلا از نمونه‌های بالینی امکان‌پذیر است. لذا بررسی‌های سرولوژیک بیشترین اقدام تشخیصی در بیماری میباشد. بیماری دارای روشهای تشخیصی متعددی است. آگلوتیناسیون رایت لوله‌ای استاندارد بیشترین کاربرد را دارد.

عوامل متعددی در تعیین نهائی تیتررایت دخیل میباشند و همگی پزشک را با مشکل تشخیصی مواجه میسازند. لذا بایستی عوامل دخیل را در شرایط خاص بتوان بطور نسبی کنترل یا بی‌تأثیر نمود.

برای حصول به این نکته باید نشان داد آزمایش در شرایط مختلف پاسخ‌های متفاوت میدهد. بررسی خود را به دو طریق آغاز نمودیم:

الف: آزمایشات متعدد همزمان برروی نمونه‌های سرمی

ب : آزمایشات متعدد غیرهمزمان برروی نمونه‌های سرمی

در موارد الف و ب جمعاً ۸۰۳ مرتبه آزمایش صورت گرفت

در شرایط آزمایشی فوق مشاهده شد که پاسخ‌ها متفاوت میباشد، در شرایط همزمان و متعدد برای واکنش منفی تماماً منفی (۱۰۰٪)، برای رقت ۱/۲۰ در ۸۰٪ موارد تیتر ثابت و ۲۰٪ یک رقت (تیتر ۱/۴۰) بالاتر نشان داد، در رقتهای ۱/۴۰ تا ۱/۳۲۰ پراکندگی واکنشها متفاوت‌تر در دو جهت تیترها رویت شد. همین حالت برای موارد غیرهمزمان بسیار پراکنده‌تر میباشد.

لذا از آنجائی که حتی همزمان انجام آزمایش رایت میتواند تیترهای مختلفی نسبت به مرتبه‌های قبلی بدست دهد و تغییر تیتر یکی از معیارهای بررسی موارد بالینی و پاسخ درمان مورد نظر و این نکته بخصوص در صور بالینی مزمن و عوارض بیماری حائز اهمیت میباشد و این معیار بررسی خود جای تردید دارد.

۱- متخصص بیماریهای عفونی ۲-کارشناس آزمایشگاه ۳- دانشجوی پزشکی

- آدرس: مرکز آموزشی درمانی ولیعصر(عج) - اراک صندوق‌پستی ۳۸۱۳۵/۱۱۹

Scanned with CamScanner

هدف:

بررسی روشی از انجام آزمایش رایت و محاسبه آن که بتواند پاسخگوی بهتری در جهت تشخیص و روند بیماری باشد.

روش پژوهش:

آزمایشگاهی، تعیین عیار آگلوتیناسیون رایت حاصله از سرمهای مختلف با روش پیشنهادی سازمان جهانی بهداشت

تشخیص بیماری بروسلوز به لحاظ صور بالینی متنوع بخصوص حالات تحت بالینی و مزمن مشکل میباشد. در این راستا تشخیص قطعی فقط با جدا نمودن بروسلا از نمونه‌های بالینی امکان‌پذیر است.

آنهم در بهترین شرایط از نظر مراجعه بیمار و امکانات باکتریولوژیک بین ۱۵ تا ۷۰٪ گزارش شده است (۲۵، ۱۳، ۱۰،۱۲) لذا بررسی‌های سرولوژیک بیشترین اقدام تشخیصی در بیماری میباشد. (۳-۱)

روش‌های تشخیصی متعددی از جمله آگلوتیناسیون سرمی استاندارد (۱۹، ۳-۱)، ۲-مرکاپتواتانول، روزبنگال(۲۱)، ثبوت مکمل (۵)، کومبزرایت (۹، ۳)، ELISA (۲۲، ۱۱، ۶-۵، ۳)، ژل‌پرسی‌پیتاسیون (۳-۴)، لاتکس آگلوتیناسیون (۱۴)، Chemiluminescent Immunoassay(CITA) (۲۳)، بکار گرفته میشوند ولی در این میان آگلوتیناسیون رایت لوله‌ای به لحاظ روش آسان و رایج بیشترین کاربرد را دارد (۳۰، ۲۴، ۲۴، ۳) عوامل متعددی در تعیین نهائی تیتررایت از جمله سوش بکار برده شده جهت تهیه آنتی‌ژن، یکنواختی و کیفیت تولید آنتی‌ژن (۳۰، ۳)، درجه اسیدی - بازی محیط (۲۰)، دقت در انجام آزمایش، تعیین نقطه بحرانی مقدار آگلوتیناسیون در سری لوله‌ها بعنوان حدرقت مثبت (۳) و شرایط سرولوژیک بیمار و ترکیب انواع ایمونوگلوبولین براساس اپی‌توپ‌ها یا تحت کلاسهای آنها (۳۰-۲۷، ۹-۸) و شرکت آنها در واکنش به درجات مختلف در حالات بالینی، همگی فرد را با مشکل تشخیصی از نظر تعیین دقیق تیترآنتی‌بادی در سرم و تطابق آن با حالات بالینی مواجه میسازد.

با توجه به تمام نکات ذکر شده و با تکیه براین موضوع که عوامل متعددی در بررسی سرولوژیک رایت بروش استاندارد دخیل هستند بایستی این عوامل را بتوان در شرایط خاص بطور نسبی کنترل یا بی‌تأثیر نمود.

برای حصول نکته بالا باید نشان داد در آزمایش رایت برروش لوله‌ای با شرایط مختلف پاسخ‌ها میتواند متفاوت باشد و پاسخ‌های مختلف ممکنست با همزمانی یا غیرآن تغییر نماید، برای بررسی چگونگی موضوع فوق به دو طریق تجربه خود را آغاز نمودیم:

الف - آزمایشات متعدد همزمان برروی نمونه‌های سرمی با رقت مشخص

ب - آزمایشات متعدد غیرهمزمان برروی نمونه‌های سرمی با رقت مشخص

روش کار:

الف - تهیه نمونه سرم

نمونه‌های سرمی از بانک سرمی بیماران مبتلا به بروسلوز تهیه شد که نمونه بصورت منجمد در دماهای ۳۰ درجه سانتیگراد نگهداری شده‌اند. عیار و مشخصات فردی و زمانی آن بهنگام منجمد نمودن مشخص شده است.

ب - روش آزمایش براساس دستورالعمل سازمان جهانی بهداشت از مرجع شماره ۳ انجام گردید.

ج - آنتی‌ژن: آنتی‌ژن و محلول‌های بافر از انستیتوپاستور ایران تهیه شد.

در اولین مرحله سرمهای با عیار مشخص از بانک سرمی خارج نموده و هر نمونه سرم با تیتر مشخص را بصورت سریهای ۱۰ بار یکجا آزمایش که هر آزمایش ۱۰ لوله بخود اختصاص داد (۸ لوله آزمایش و ۲ لوله کنترل) انجام و نتایج بعد از نگهداری ۴۸ ساعته لوله‌ها در گرمخانه ۳۷ درجه سانتیگراد جهت تعیین عیار خوانده شدند. و برای تمام رقتها بجز ۱/۲۵۶۰ و ۱/۱۲۸۰ این عمل ۵ (۵۰ آزمایش) بار تکرار گردید تا تعداد مرتبه آزمون افزایش یافته و به نتایج صحیح‌تری نزدیک شویم. برای عیارهای بالا ذکر شده سرم موجود فقط برای ۲۰ بار

Scanned with CamScanner

آزمایش برای ۱/۱۲۸۰ و ۱۰ بار آزمایش برای ۱/۲۵۶۰ وجود داشت.

در مرحله بعدی سرمها با عیارهای متفاوت بصورت انفرادی و در دفعات انجامی متفاوت انجام شدند تا از این طریق به عوامل مختلف فرصت مداخله بیشتری داده باشیم و از تفاضل دو روش بتوان دخالت آنها را ثابت نمود.

در موارد الف و ب جمعاً ۸۰۳ مرتبه آزمایش در ۶۴۲۴ لوله به غیر از موارد کنترل آنتی‌ژنی صورت گرفت.

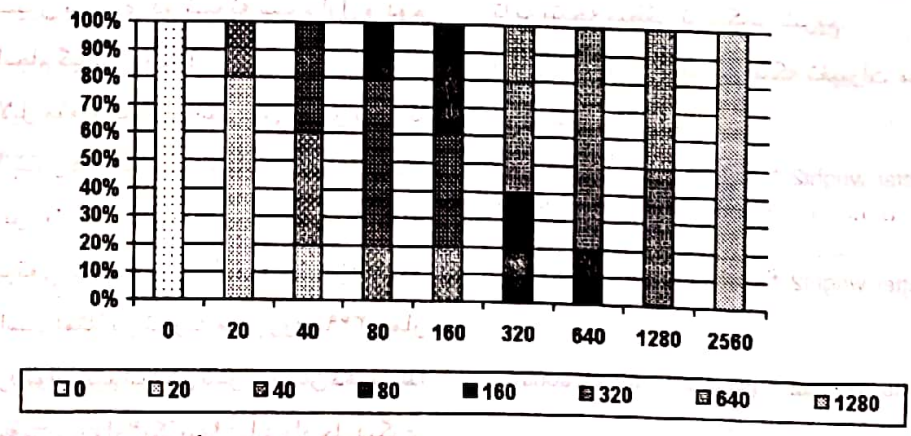
نتایج ۳۸۰ مورد آزمایش مرحله الف در جدول ذیل آمده است (ج - ۱)

جدول ۱- مقایسه آزمایش رایت لوله‌ای بطور هم زمان برروی سرمهای واحد

جمع	۱/۱۲۸۰	۱/۶۴۰	۱/۳۲۰	۱/۱۶۰	۱/۸۰	۱/۴۰	۱/۲۰	۰	تیتر
۵۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۵۰	۰
۵۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱۰	۴۰	۰	۱/۲۰
۵۰	۰	۰	۰	۰	۲۰	۲۰	۱۰	۰	۱/۴۰
۵۰	۰	۰	۰	۱۰	۳۰	۱۰	۰	۰	۱/۸۰
۵۰	۰	۰	۰	۲۰	۲۰	۱۰	۰	۰	۱/۱۶۰
۵۰	۰	۱۰	۲۰	۲۰	۰	۰	۰	۰	۱/۳۲۰
۵۰	۰	۰	۴۰	۱۰	۰	۰	۰	۰	۱/۶۴۰
۲۰	۱۰	۱۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱/۱۲۸۰
۱۰	۱۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱/۲۵۶۰

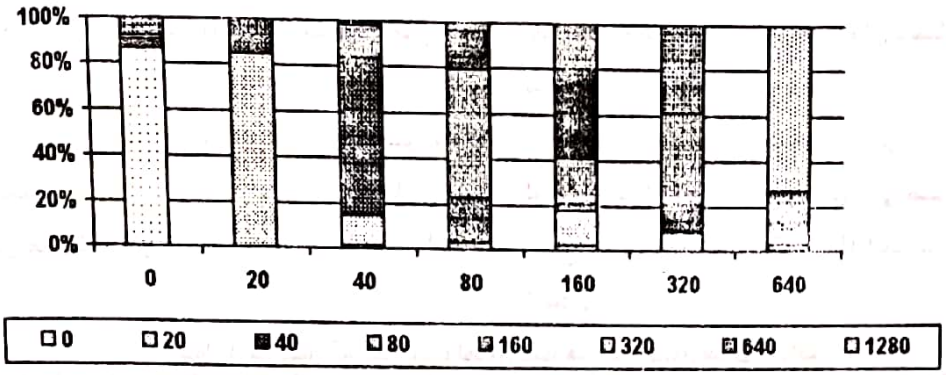
در مورد بخش ب آزمایش تعیین رقت برروی نمونه سرمی مشخص در دفعات متعدد و در زمانهای مختلف انجام شده است که نتایج آن در جدول شماره ۲ آمده است.

جمع	۶۴۰	۳۲۰	۱۶۰	۸۰	۴۰	۲۰	۰	تیتر
۷۲	۰	۰	۳	۲	۱	۰	۶۶	۰
۸	۰	۱	۲	۰	۱	۴	۰	۲۰
۲۲	۰	۰	۱	۴	۱۴	۲	۱	۴۰
۶۹	۰	۱	۳۲	۳۵	۹	۰	۱	۸۰
۱۴۷	۱	۲۷	۴۳	۲۳	۳	۰	۰	۱۶۰
۹۲	۳	۵۶	۳۰	۳	۰	۰	۰	۳۲۰
۱۱	۴	۷	۰	۰	۰	۰	۰	۶۴۰
۱	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱۲۸۰



نمودار ۱ - مقایسه تیترهای مختلف در شرایط آزمایش همزمان و برمسب درصد

Scanned with CamScanner



نمودار ۲ ـ مقایسه تیترهای مختلف شرایط آزمایش غیرهمزمان و برحسب درصد

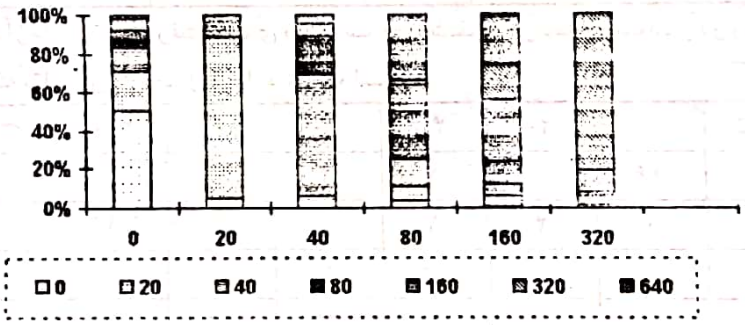
نتایج مقدماتی:

الف ـ جواب حاصل از آزمایشات در دفعات مختلف متفاوت است

ب – در مواردی که آزمایشات بطور غیرهمزمان و غیر دسته‌جمعی انجام می‌شود پراکندگی تیتر بیشتر است.

ج ـ در تمام مواردی که سری آزمایشات از نظر زمانی یکجا انجام شدند تماماً جواب واحدی بدست دادند، ولی احتمال تفاوت تیتر قبلی آن مطابق بقیه موارد است.

د ـ با احتمال اینکه نیمه عمر گلوبولینی (IgG, IgM) و شرایط نگهداری ممکنست در نتیجه حاصله دخالت داشته باشد همین بررسی با روش ۲ـ مرکاپتواتانول بروی ۴۴۲ نمونه سرم انجام شد که جواب حاصله با موارد رایت لوله‌ای غیرهمزمان مطابقت داشت (نمودار ۳).



نمودار ۳ـ مقایسه تیترهای مختلف در آزمایش ۲ـ مرکاپتواتانول در شرایط غیرهمزمانی و برحسب درصد

با توجه به نکات ذکر و حاصل شده در تجربه و آزمون بصورت مختلف و ذکر این نکته که توصیه میشود برای انجام آگلوتیناسیون برروی دو نمونه سرم اول و دوم بطور همزمان انجام گیرد. (۳۰ـ۲)

و در عمل و بدلایل متعدد نمیتوان بحد کافی صبر نمود تا هر دو نمونه را بطور همزمان انجام داد و تیترهای بالا رونده را شاهد بود یا تغییرات تیتر در جهت‌های مختلف و اینکه بیماران موقعی مراجعه می‌نمایند که تیترها بحد کافی بالا رفته است (مثلاً در تجربه ما برروی ۳۶۹ بیمار فقط در ۹٪ موارد توانستیم افزایش تیتر را نشان دهیم)، لذا برای تعیین وضعیت سرولوژیک بیمار باید راه حل دیگری بصورت دیگری انتخاب شود و آن از طریق بدست آوردن ضریبی موقتی برای هر بیمار در شرایط آزمایشگاه است تا به نتیجه منطقی نزدیک‌تر شویم.

بر این اساس و با فرض اینکه تغییرات مؤثر برجمع است لذا فرمول ذیل فرض شد:

Stable Titter = titter wright2 * (wright 1 / wright control) = titter wright 1

Stable Titter = titter wright2 * (wright 1 / wright control) > titter wright 1

Stable Titter = titter wright2 * (wright 1 / wright control) < titter wright 1

Scanned with CamScanner

که در این جا منظور از رایت کنترل تیتر حاصله از آزمایش رایت برروی نمونه اول است که در شرایط منهای ۳۰ درجه نگهداری شده است و بطور همزمان با آزمایش نوبت بعدی انجام میگردد میباشد.

نتیجه:

از ۸۰۳ بار آزمایش آگلوتیناسیون رایت استاندارد در شرایط آزمایشی متفاوت که در حالات:

۱ـ همزمانی و متعدد و ۲ـ غیرهمزمانی و متعدد انجام پذیرفت دریافت پاسخ‌ها متفاوت میباشند، بصورتی که در شرایط همزمانی و متعدد برای راکسیون منفی تماماً منفی شدند (۱۰۰٪) برای رقت ۱/۲۰ در ۸۰٪ موارد تیتر ثابت و ۲۰٪ یک رقت (تیتر ۱/۴۰) بالاتر را نشان داد، در رقتهای ۱/۴۰ تا ۱/۳۲۰ پراکندگی واکنشها متفاوت‌تر در دو جهت تیترها رویت شد بطوریکه برای رقت ۱/۴۰ برای تیترهای ۱/۲۰، ۱/۴۰، ۱/۸۰ بترتیب ۲۰٪، ۴۰٪ و ۴۰٪ موارد بخود اختصاص داد همانطوریکه ملاحظه میگردد افزایش تیتر در مقابل کاهش ۵۰٪ بیشتر میباشد و بیشتر تمایل به افزایش تیتر است تا کاهش تیتر در حالیکه تغییر تیتر در تمام موارد رویت میشود و برای تیترها از ۱/۲۰ تا ۱/۲۵۶۰ مشاهده میگردد و این احتمال بترتیب عبارتست از ۲۰٪، ۶۰٪، ۴۰٪، ۶۰٪، ۶۰٪، ۱۰۰٪ و ۱۰۰٪ برای تیتر ۱/۲۵۶۰ میباشد.

روند تغییر تیتر نیز خود جالب توجه است. تا رقت ۱/۱۶۰ تغییر تیتر بیشتر در جهت افزایش است در حالیکه از رقت ۱/۳۲۰ به بالا بیشتر بطرف کاهش بوده بطوریکه در رقتهای ۱/۶۴۰ تا ۱/۲۵۶۰ همه موارد (۱۰۰٪) در تیترهای پائین‌تر رخ داده است.

لذا از آنجائی که حتی همزمانی انجام آزمایش رایت میتواند تیترهای مختلفی نسبت به مرتبه‌های قبلی بدست دهد که تغییر تیتر یکی از معیارهای بررسی موارد بالینی و پاسخ درمان مورد نظر و این نکته بخصوص در صورت بالینی مزمن و عوارض بیماری حائز اهمیت میباشد و این معیار بررسی خود جای تردید دارد. فرض ما اینست که میتوان با نگهداری سرم موارد بصورت یخ زده در شرایط مطلوب و تأثیر دادن تیتر سرمی اول انجام شده در مرتبه دوم در نتیجه‌های بعدی از دخالت عوامل متعدد در نتیجه آزمایشات کاست. لذا توصیه مینمائیم طرحی بمنظور بررسی موارد سرولوژیک بصورت فرموله ارائه شده همراه با کشت خون بعنوان تست مورد اطمینان انجام گردد تا بتوان به نتایج واقعی دست یافت.

References :

1- Mikiich. DJ. Boyce. JM: Brucellosis speeles, in Principles and Practice of Infectious Diseases. 4th ed. GL Mandell et al (eds). New Yourk. Churchill livingston, 1995

2- Donald Key Brucellosis, in Harrison,s principles of internal medicine 12th ed. Jean D. Wilson et al (eds). McGraew-Hill, 1991

3- M. Ruiz Castaneda Laboratory Diagnosis of Brucellosis in Man Bull. Wld Hlth Org. 1961, 24: 73-84

4- Eomparision of an agar - ged immunodiffusion test with other serological methods differentiating Brueella infeeted from vaceinated cattle. Mc Mahon, Mj, can.j.comp.

5- Comparative study among complement fixation, -serum agglutination and Rose Begal Plate test in the serodiagnosis of bovian brucellosis. Mathias-LA; Pinto -AA- Int - J - Zoonoses. 1983 Jun; 10 (1): 1-6

6- Comparison of the enzyme - linked immunosorbent assay and complement fixation test fordetecting Brucella ovis antibodies in sheep. Rahaley - RS; Dennis - SM; Smeltzer - MS Vet - Rec. 1983 Nov 12; 113 (20): 467-70

7- An indirect enzyme - linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to Brucella abortus in procine sera. Brewer - RA; Sturat - FA; Corbel - MJ Br - Vet - J/ 1983 Nov - Dec; 139 (6): 495-500 - Bonilla - J; Naranjo - lopez-Y Bol - Med - Hospinfant - mex. 1982 Jan; 39 (1): 33-6

8- Diagnosis of brucellosis from laboratory parametres and their relation to the clinical picture Seijo

9- Comparative study of different serological tests for the diagnosis of brucellosis Daza - RM; Damaso - D; Mreno - M Med - Clin - Barc. 1981 Jan 25; 76(2) 57-60.

10- A rapid sensitive method for the identification of brucella species with a monoclonal antibody Vixcaino - N; Fernandez - Lago - L Res - microbiol. 1992 Jun; 143 (5): 513-8

11- Antibody response to brucella outer membrane proteins in bovine brucellosis: immunoblot analysis and

Scanned with CamScanner

Keness-Y Isr-J-Med-Sci. 1992 Nov; 28(11): 806-7.

13- Faster islation of Brucella spp. from blood by isolator compared with BACTEC NR. Navas-E; Guerrero-A; Cobo-J; Loza-E Diagn-Microbiol-Infect-Dis. 1993 Jan; 16 (1): 79-81.

14- A carboxylated latex agglutination test for the serological diagnosis of human and animal brucellosis Lu-Q Chung - Hua - liu - Hsing - Tsa - Chih. 1992 Oct; 13 (5): 291-3.

15- The effect of heparin treatment on the rose bengal test for Brucella Zacada - Diaz - de - Entre - Sotos - F; Perez - Aloe - Mejias - Mt; Roldan - Montaud - A; Gomez - Pastor - AM Rev - Clin - Esp. 1993 Mar; 192 (5): 240-4.

16- Comparison of results from five serologic methods used for detecting Brucella abortus antlbody activity in coyote sera Williams - JD; Heck - FC; Davis - DS; Adams - LG Vet - Immunol - Immunopathol. 1992 Aug; 29 (1-2); 79-87.

17- The use of the latex agglutination reaction for the diagnosis of a Brucella infection Opaleichuk- IS; Umnova - NS; Zheludkov - MM; Pavlova - IP Zh - Mikrobiol - Epidemiol - Immunobiol. 1991 Jul (7): 61-3.

18- Efficiency of the fluorescence method in theserodiagnosis of cattle and swine brucellosis Hajdu-S Arch - Exp - Veterinarmed. 1966 Apr; 20 (2): 293-306.

19- Annex I. New agglutination methods of brucellosis using Stained antigens flek - p; Vazy - L An - Microbiol - Rio - de - J. 1966-67; 14: 127-31.

20- The influence of the PH values on the results of the brucellosis serum slow agglutination reaction Kotsche - W Monatsh - Veterinarmed. 1967 Jan 1; 22 (1); 14-9.

21- The rosbengal plate agglutination test in the diagnosis of brucellosis Morgan - WJ; Mackinnon - DJ; Lawson - JR; Cullen -GA Vet - Rec. 1969 Dec 6; 85 (23); 636-41.

competitive enzyme - linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies Cloeckaert - A; Kerkhofs - P; Limet - JN J-Clin - Microbiol. 1992 Dec; 30 (12): 3168-74.

12- The ability of Brucella melitensis to grow on loewenstein-Jensen-egg medium: presentation of a case with Brucella meningitis Friedrich-I; Schonfeld-S;

22- Comparetive performance of the enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA) and conventional assays in the diagnosis of bovine brucellosis Argentina Saravi - MA; Wright - PF; Gregoret - RJ; Gall - DF Vet - Immunol - Immunopathol. 1995 Jul; 47 (1-2): 93-9.

23- Chemiluminescent immunoassay (CLIA) for the detection of brucellosis and tularaemia antigens Vidziunaite - R; Mikjulskis - P; Kulys-J J- Vet - Dign - Invest. 1995 Oct; 7 (4): 473-5.

25- Isolatlon of Brucella organisms from the milk of seronegative cows Zowghi-E; Ebadi-A; Mohseni-B Rev - Sci - Tech. 1990 Dec; 9 (4): 1175-8.

26- Human Brucellosis, in the state of World Health The World Health Report; 1996 Worlk Health Organisation, Geneva.

27- Brucellosis with atypical initiation associated with the existence of a monoclonal IgM - type gammapathy Curia - F; Formiguera - S; Faig-J Med - Clin - Barc. 1982 Mar 1-15; 78 (5); 210

28- Transitory IgA monoclonal gammapathy and brucellosis Martinex - Luengas - Uribe - F; Montejo - Baranda - M; Inclan - G; Baroja - Bengoechea - A; et. al Med - Clin - Barc. 1982 Jun 1; 79(1): 48.

29- IgG subclasses in chronic brucellosis patients Kichiva - BN; Chernysheva - MI; Zheludkov - MM Zh - Mikrobiol - Epidemiol - Immunobiol. 1983 May (5): 75-8

منبع فارسی:

۳۰- دکتر اسماعیل ذوقی، دکتر گیتی ثمر "تفسیر آزمایشهای سرمی بروسلوز (تب مالت)" ماهنامه پزشکی نبض - سال ششم، شماره ششم، اسفند ۱۳۷۵ - شماره مسلسل ۶۶ - ص ۳۰-۲۶.

Scanned with CamScanner