



دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم و فناوری های زیستی، گروه زیست شناسی سلولی  
مولکولی و میکروبیولوژی، آزمایشگاه میکروبیولوژی



# آزمایشگاه ایمونولوژی

جلسه سوم:  
تست رایت  
(Wright Test)

# مقدمه

این آزمایش به صورت گسترده برای تشخیص بیماری تب مالت که یک بیماری عفونی تب زای مشترک بین انسان و دام (Zoonosis) است، استفاده می شود. نام های دیگر این بیماری :

**Brucellosis**

**Malta fever**

**Mediterranean fever**

**Undulant fever**

**Goats milk fever**



## مقدمه

بیماری تب مالت یا بروسلوز که در حیوانات به نام سقط جنین واگیر مرسوم است، یکی از بیماری های عفونی قابل انتقال بین انسان و حیوان می باشد و با نام های دیگری نظیر: تب مواج، تب دیوانه و تب مدیترانه ای نیز نامیده می شود. این بیماری در تمام فصول سال وجود دارد، اما در بهار و پاییز یعنی زمان زایش و شیردهی دام ها بیشتر دیده می شود.

بروسلوز به عنوان یکی از مهمترین بیماری های مشترک انسان و دام محسوب می شود. این بیماری همواره از دو بعد اقتصادی و بهداشتی مورد توجه قرار گرفته است. دام های مبتلا به بروسلوز، معمولاً در اولین دوره آبستنی سقط جنین نموده و در هنگام سقط و تا مدتی پس از آن، با دفع ترشحات به شدت آلوده رحمی، باعث آلودگی محیط، مزارع و مراتع می شوند که این موضوع خود زمینه آلودگی را برای سایر حیوانات گله و نیز انسان فراهم می سازد. دفع دوره ای باکتری عامل بیماری (گونه های باکتری بروسلا) از طریق شیر حیوانات و هم چنین از طریق ترشحات رحمی در دام های فاقد علائم بالینی مخاطرات فراوانی را برای سایر دام ها و نیز انسان در بردارد.

# باکتری بروسلا

- ✓ کوکوباسیل گرم منفی، بسیار کوچک، غیر متحرک، بدون کپسول، در شرایط هوازی رشد کرده و رشد آن به وسیله انکوباسیون در محیط حاوی CO<sub>2</sub> افزایش می یابد.
- ✓ رشد این باکتری با افزودن سرم یا خون بهبود می یابد.
- ✓ بیماری های قابل انتقال از حیوان به انسان از جمله بیماری های عفونی هستند که دارای اثرات نامطلوب قابل توجهی در سلامت جامعه می باشند. در این میان «تب مالت» به عنوان یکی از شایعترین بیماری های زئونوز در کشور که چندین سازمان و نهاد بهداشتی را درگیر ساخته است از اهمیت ویژه ای برخوردار است.

# عامل بیماری تب مالت

از گروه بروسلا: Brucella

تا کنون ۷ گونه بروسلا شناسایی گردیده اند که نام آن ها به همراه میزبان اصلی شان بدین ترتیب می باشد:

- آبورتوس (گاو) B.aburtus (۷ بیوتیپ)
- ملی تنسیس (بز) B.melitensis
- سوئیس (خوک) B.suis (۵ بیوتیپ)
- کانیس (سگ) B.canis
- اوویس (گوسفند) B.Ovis (۳ بیوتیپ)
- نئوتوما (جوندگان) B.neotomae
- ماویس (پستانداران دریایی) B. mavis

نوع غالب بروسلا در ایران ، بروسلا ملی تنسیس می باشد. (مهاجم ترین و بیماریزاترین)

# خصوصیات آنتی ژنی

- به لیپو پلی ساکارید دیواره سلول باکتری مربوط میباشد M و A آنتی ژنهای ضمنا" بروسلا آنتی ژن مشترک با ویبره کلره داشته و واکسیناسیون بر علیه وبا تیترا آنتی بادی بروسلا را بصورت کاذب با بعضی از آنتی ژنهای ساخته شده بالا می برد.

# راه های سرایت بیماری

۱ - تماس مستقیم

از راه ملتحمه چشم، از طریق تماس خراش ها و جراحات پوست با ترشحات ، مواد دفعی ، و یا بافت های حیوانات آلوده یا اشیاء آغشته به ترشحات عفونی

۲ - از طریق دستگاه گوارش

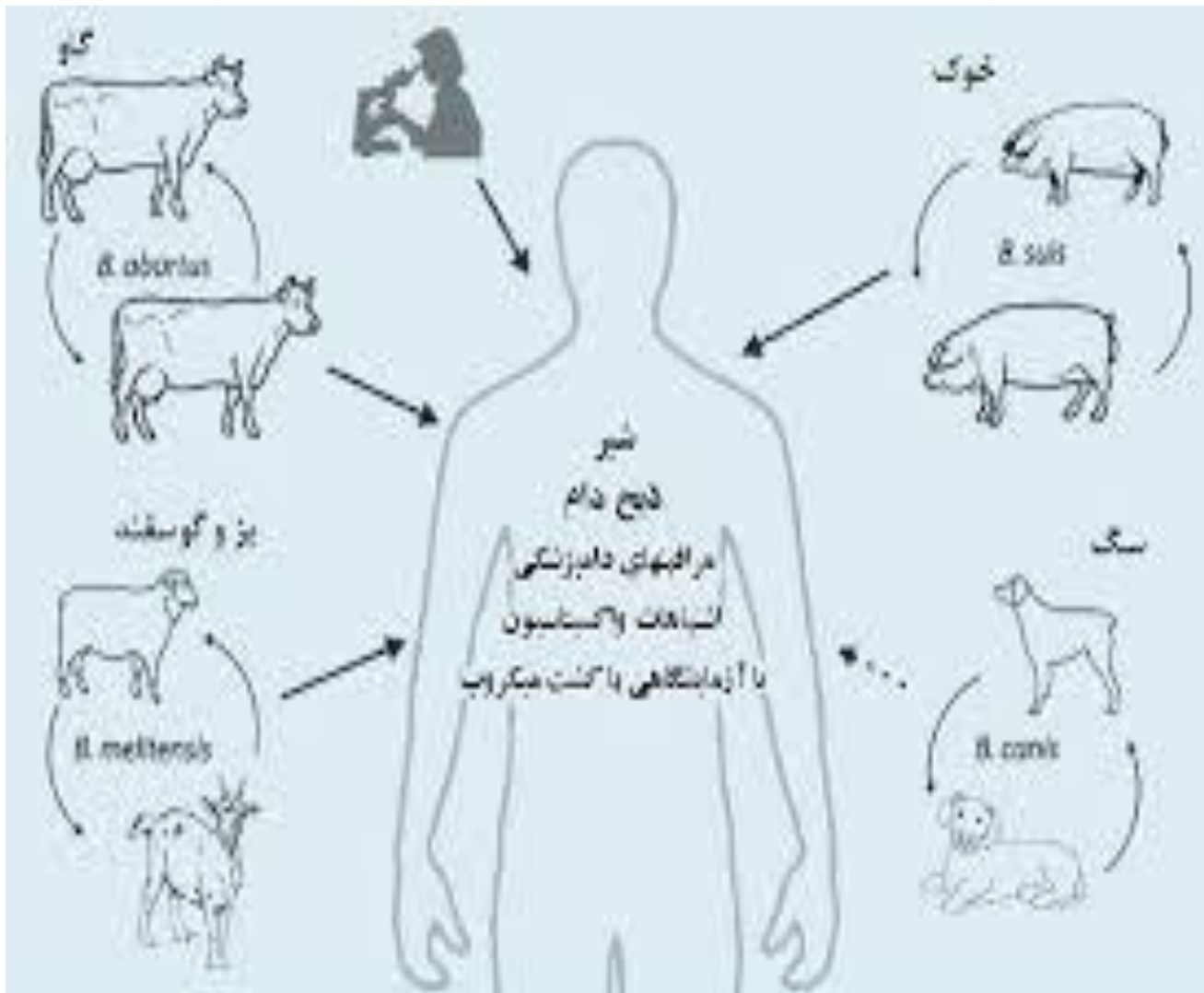
شیر خام فرآورده های لبنی آلوده مثل کره، خامه، بستنی، پنیر به جز ماست

۳ - انتقال تنفسی

از طریق استنشاق ذرات عفونی معلق در آغل و اصطبل و آزمایشگاه

۴ - انتقال انسان به انسان بسیار نادر است .

از طریق تلقیح مصنوعی ، واکسیناسیون و نمونه برداری از خون در برنامه های خون گیری



## افراد با خطر بالا:

- ▶ کشاورزان
- ▶ دامداران
- ▶ دامپزشکان
- ▶ کارکنان کشتارگاه‌ها
- ▶ کارکنان آزمایشگاه‌ها



# دوره کمون

بین ۱ تا ۳ هفته

گاهی بین ۶ تا ۱۷ ماه

# علائم بیماری

بیماری بصورت حاد شروع شده و با تب مداوم یا منظم با دوره متناوب، تعریق فراوان بخصوص در شب، خستگی، بی‌اشتهایی و کاهش وزن، سردرد، درد عضلانی و درد عمومی بدن

**نوع حاد:** لرز ناگهانی، درد عمومی بدن، تعریق شدید، بی‌اشتهایی، ضعف و سستی

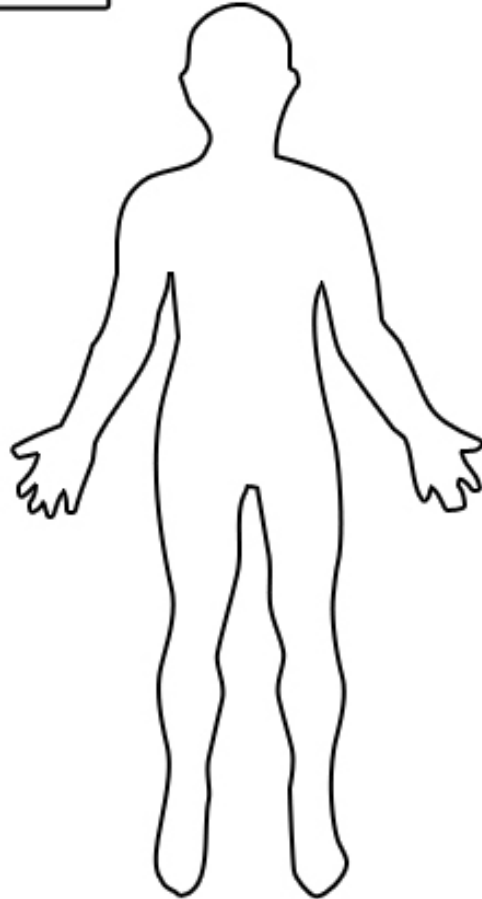
**نوع تحت حاد:** اغلب اوقات حالت تب دار اولیه وجود ندارد، آغاز بی‌سرو صدا، ضعف و خستگی

**نوع مزمن:** بعد از یک دوره تب‌دار برای سالها باقی می‌ماند.

**نوع لوکالیزه (موضعی):** این بیماری می‌تواند در اعضاء مختلف بدن ایجاد عفونت موضعی نماید. شایعترین اعضاء استخوانها، مفاصل، سیستم عصبی مرکزی، قلب، ریه، طحال، بیضه‌ها، کبد، کیسه صفرا، کلیه‌ها، پروستات و پوست

## نشانه های کلینیکی

تب



سر درد

سرفه خشک

لنفادنوپاتی

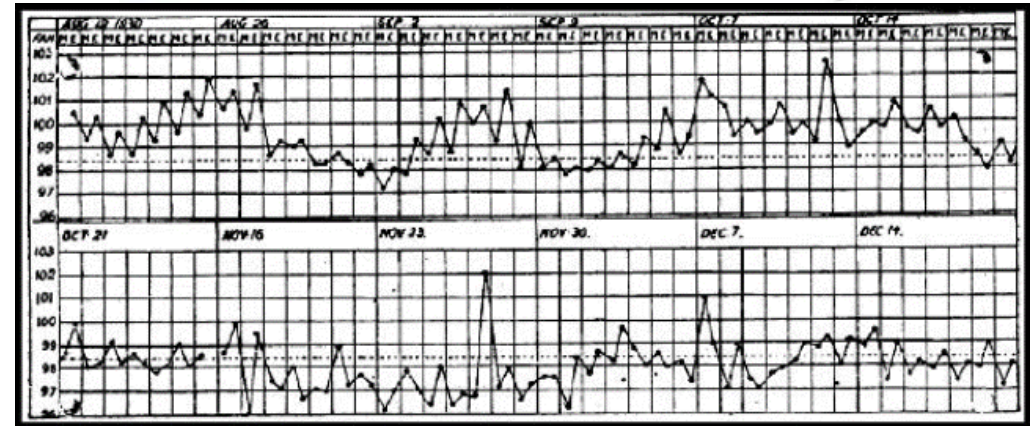
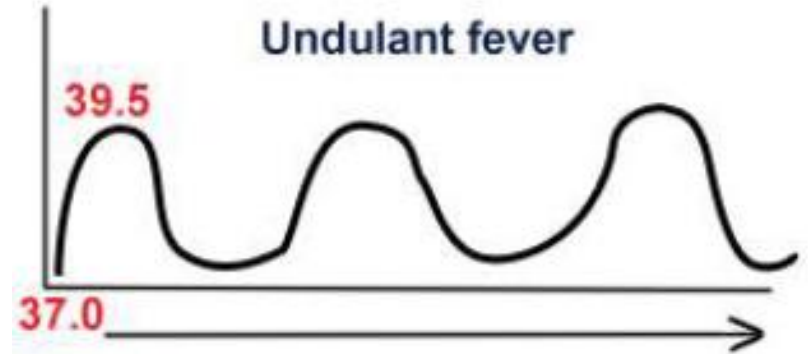
تعریق شبانه

هیپاتواسپلنومگالی

درد عضلانی

درد مفاصل

کاهش وزن



نمودار تب بیمار مبتلا به بروسلوزیس که تشدید و فروکش کردن متناوب درجه حرارت بدن بیمار را نشان می دهد.

# علائم بیماری

معمولاً شدت بیماری در کسانی که به دفعات با دام‌ها در تماس هستند و بطور دائمی با باکتری بروسلا تماس دارند خفیف و ملایم است.

در بیمارانی که تب مالت از شدت بیشتری برخوردار است و به پزشک مراجعه می‌کنند، در تقریباً ۵۰ درصد آنها، شروع بیماری به صورت حاد و ناگهانی است و در طی چند روز شدت می‌یابد و در ۵۰ درصد از بیماران تب مالت به صورت تدریجی و در طی چند هفته و گاهی چند ماه و به آرامی بروز می‌یابد. معمولاً بیمار در ابتدای صبح حال بهتری دارد و احساس می‌کند خوب شده است اما در طی روز به تدریج علائم بیماری تشدید می‌شوند و در بعدازظهر ناخوشی و علائم بیماری افزایش می‌یابد.

تب: در این بیماری مانند بسیاری از بیماری‌های عفونی بعدازظهرها تشدید شده و در طی روز کمتر است. در بعضی افراد ممکن است درجه حرارت بدن در سیر بیماری به حد نرمال هم برسد درحالی‌که در برخی دیگر از بیماران درجه حرارت بیمار در طی روز کم شده اما هیچگاه به درجه حرارت بدن به حد نرمال نمی‌رسد.

معمولاً به همراه تب علائم دیگری مثل لرز، سردرد، درد در مفاصل، ضعف شدید و یا تعریق فراوان نیز گریبانگیر بیماران می‌شود.

در برخی بیماران هرچند روز یا هفته یکبار تب بیمار تشدید و تخفیف می‌یابد و نمای بالینی مشابه مالاریا و تیفوئید ممکن است ایجاد شود.

# عوامل موثر بر کاهش بروز و شیوع تب مالت در انسان

- حرارت جوش (استریلیزاسیون) به مدت یک دقیقه و یا پاستوریزاسیون ( ۶۸ درجه سانتیگراد ) به مدت ۱۵ دقیقه میکروکوکوس ملی تنسیس، در شیر آلوده را نابود می کند(برای اطمینان بیشتر شیر را به مدت ۵ دقیقه در حرارت جوش قرار دهید)
- رابطه مستقیمی بین شیوع بروسلور در حیوانات اهلی و بروز عفونت انسان وجود دارد، در بررسیهای اپیدمیولوژیک نشان داده شده که در این رابطه حداقل سه فاکتور ذیل موثر می باشد :

روشهای پرورش دام

استانداردهای بهداشتی

عادات مصرف غذایی

# عوامل موثر بر کاهش بروز و شیوع تب مالت در انسان

بقای بروسلاز در فرآورده های غذایی بستگی به نوع ماده غذایی، میزان رطوبت، حرارت، تغییرات pH، عمل بیولوژیکی دیگر باکتریهای موجود و مدت زمان نگهداری فرآورده دارد .

در شیر با حرارت صفر درجه تا ۱۸ ماه

در شیر با حرارت ۲۵-۳۷ درجه تا ۲۴ ماه

در شیر با حرارت ۳۸ درجه کمتر از ۹ ساعت

در خامه با حرارت ۴ درجه ۴-۶ هفته

در بستنی با حرارت صفر درجه ۳۰ روز

در کره با حرارت ۸ درجه ۱۴۲ روز

در انواع پنیر نمک زده ۷۵ تا ۱۰۰ روز

# درمان

## بزرگسالان

- ۱- روزانه ۹۰۰ - ۶۰۰ میلی گرم ریفامپیسین دوز واحد یا منقسم ۱۲-۸ ساعت به اضافه داکسی سایکلین ۱۰۰ میلی گرم ۲ بار در روز برای حداقل ۸ هفته
- ۲ - داکسی سایکلین با همان مقدار یا تتراسایکلین ( ۵۰۰ میلی گرم) هر ۶ ساعت برای ۸ هفته به همراه جنتامایسین ( ۳ - ۵ میلی گرم به ازاء هر کیلوگرم) روزانه عضلانی یا استرپتومایسین ( ۱ گرم عضلانی ) برای دو هفته
- ۳ - ریفامپیسین با همان مقدار به همراه کوتریموکسازول بالغین ( ۲۶ قرص در ۲ یا ۳ دوز منقسم) به مدت حداقل ۸ هفته

# درمان

## اطفال

۱- ریفامپیسین ۲۰-۱۰ میلی گرم به ازاء هر کیلوگرم وزن (در هر قطره ریفامپیسین اطفال ۵ میلی گرم) صبح ناشتا به اضافه کوتریموکسازول ۸ میلی گرم تری متوپریم برای هر کیلوگرم وزن بدن منقسم در دو مقدار، صبح و عصر به مدت حداقل ۸ هفته

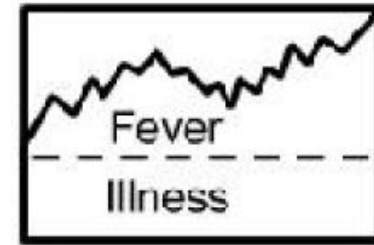
۲- ترکیب کوتریموکسازول به همراه جنتامایسین



## تشخیص بوسلوز نیاز به شرح دقیق و بررسی های آزمایشگاهی دارد

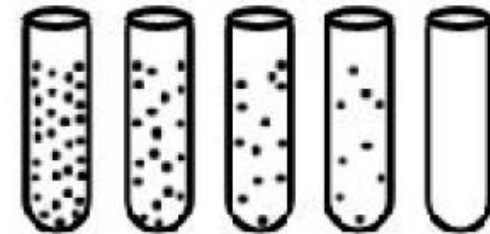
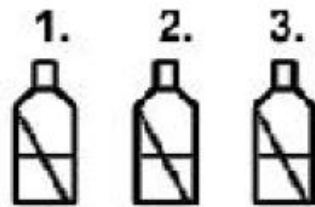
سابقه مصرف شیر ،  
پنیر و سایر لبنیات  
غیر پاستوریزه .  
شغل های دارای خطر  
اكتساب بیماری و  
بررسی سایر ریسک  
فاکتور های بیماری .  
بررسی دقیق علائم  
و نشانه های بیماری .

سیر علائم بالینی



اطلاع به آزمایشگاه  
و کشت باکتری

روش های سرولوژیکی



# تشخیص آزمایشگاهی

کشت:

تنها شاهد قطعی عفونت بروسلوزیس و تست استاندارد طلایی برای تشخیص قطعی آزمایشگاهی این بیماری جداکردن کوکوباسیل گرم منفی بروسلا از بدن بیمار توسط کشت باکتری (خون یا سایر مایعات و بافتهای بدن) است.

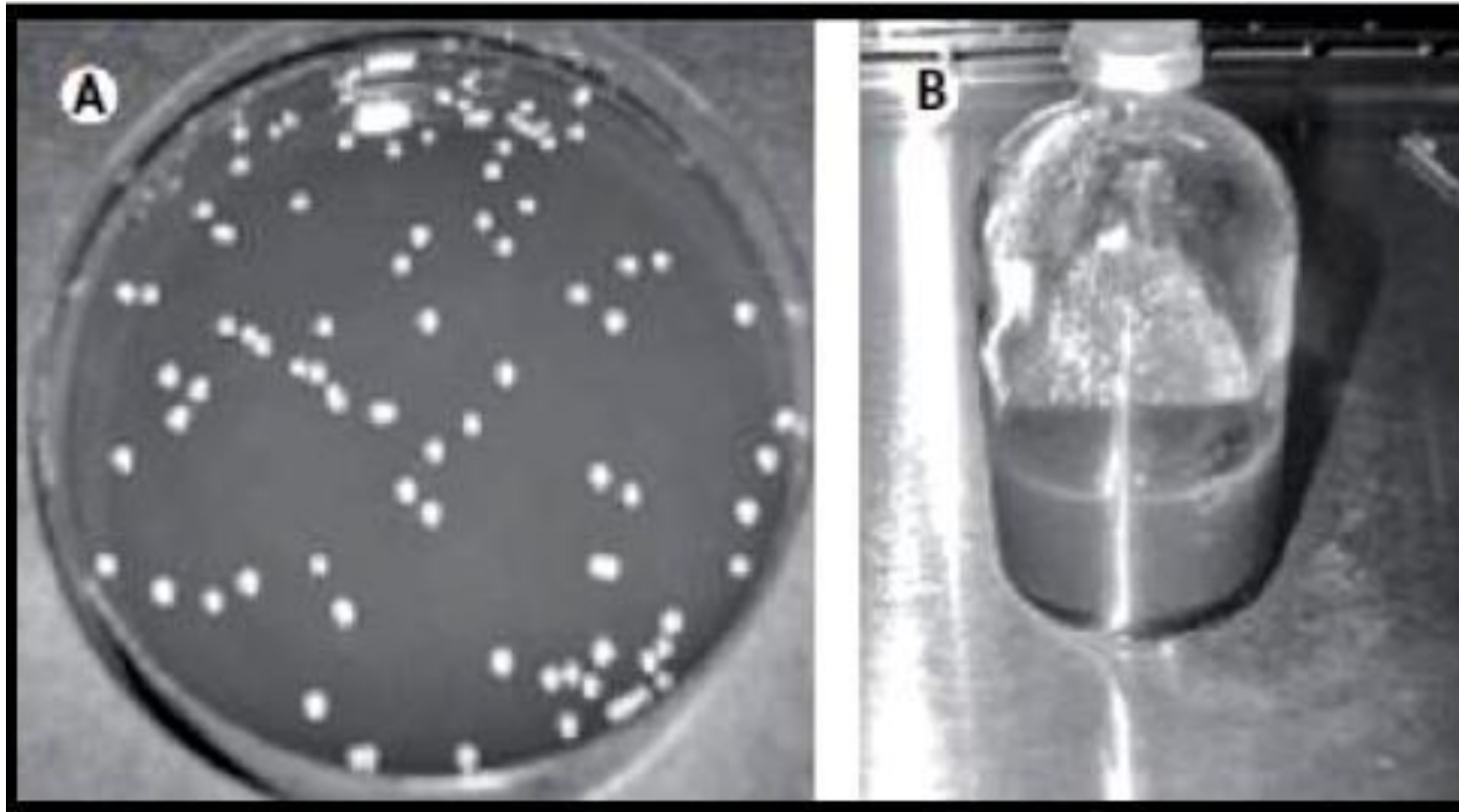
معمولاً از خون بیمار برای کشت و رسیدن به تشخیص استفاده می شود، هرچند می توان از مغز استخوان، مایع مغزی نخاعی، چرک و ترشحات زخم نیز برای کشت باکتری استفاده نمود.

متأسفانه میزان مثبت شدن کشت خون چندان رضایت بخش نیست از ۱۰ تا ۷۰ درصد موارد. معمولاً پاسخ کشت در بیماران تب دار بیشتر مثبت می شود و احتمال مثبت شدن کشت خون در بیمارانی که تب خفیف دارند و یا بدون تب هستند کمتر است.

# تشخیص آزمایشگاهی

در شرایطی که کشت خون منفی است، کشت مغز استخوان هنوز می تواند مثبت باشد.

در حقیقت از آنجا که با پیشرفت بیماری، میزان باکتری کمی کمتر شده و کشت خون با احتمال بیشتری منفی می شود، می توان از کشت ارگانهای رتیکولاندوتلیال داخلی بدن مانند طحال، کبد، لنفونودها و یا مغز استخوان برای تشخیص قطعی بیماری استفاده نمود که ساده ترین آنها کشت مغز استخوان است. برای رشد باکتری بروسلا ۶ تا ۸ هفته زمان نیاز است و در صورت شک به این بیماری باید حتما پزشک به مسئول آزمایشگاه اطلاع دهد، تا برای رشد باکتری نمونه را به مدت طولانی تری نگه داری نمایند و همچنین در جهت کاهش خطر بیماری در پرسنل آزمایشگاه نکات ایمنی را دقیق تر رعایت نمایند. از تمام ترشحات و بافت های بدن می توان نمونه مناسب برای انجام کشت تهیه نمود. معمولاً ترشحات خلط برای بروسلا با توجه به شیوع بسیار کم پنومونی در تب مالت منفی خواهد بود.



در سمت راست محیط کشت متعارف کاستانیدا و در سمت چپ محیط کشت بعد از تغلیظ و شکستن گلبول های سفید انجام شده است.

# روش های مولکولی

همچنین اگر روش تعیین مولکولی مناسبی مانند PCR در دسترس باشد میتوان در تشخیص بروسلا از آن استفاده نمود. گونه مشکوک بروسلا باید برای آزمایشگاه معتبر مرکزی ارسال گردد تا از نظر زیرگونه و biovar تعیین سطح گردد و از این راه اطلاعات بسیار ارزش اپیدمیولوژیکی به دست آید. امروزه متخصصین زیادی پیشنهاد می کنند که در آزمایشگاه از PCR به جای کشت خون برای تعیین مستقیم باکتری بروسلا استفاده شود و از آن به عنوان استاندارد طلایی نام می برند، اما تا زمان انجام مطالعات بیشتر، برای تشخیص بروسلا هنوز استاندارد طلایی، کشت باکتری بروسلا است.

# تست های سرو لوژی

سرو آگلوتیناسیون رایت (اسلاید)

**Rose Bengal** رزبنگال

**Tube Wright** رایت لوله ای

**(2ME Wright)** مرکاپتواتانول رایت

**Anti Human globulin or coombs wright** آنتی هیومن یا کومبس رایت

# روشهای سرولوژی

## روش آگلوتیناسیون سریع با آنتی ژن ویژه



لوازم مورد نیاز:

۱ - پلیت شیشه ای مخصوص آزمایش سرولوژی

۲ - آنتی ژن قابل مصرف و فاقد اتو آگلوتیناسیون

۳ - کنترل مثبت و کنترل منفی

۴ - روتاتور واپلیکاتور جهت مخلوط نمودن سرم و آنتی ژن

سعی شود که در این آزمایش از کنترل مثبت و منفی استفاده شود و آگلوتیناسیون با

نمونه کنترلی منفی و مثبت مقایسه گردد.

# رزبنگال

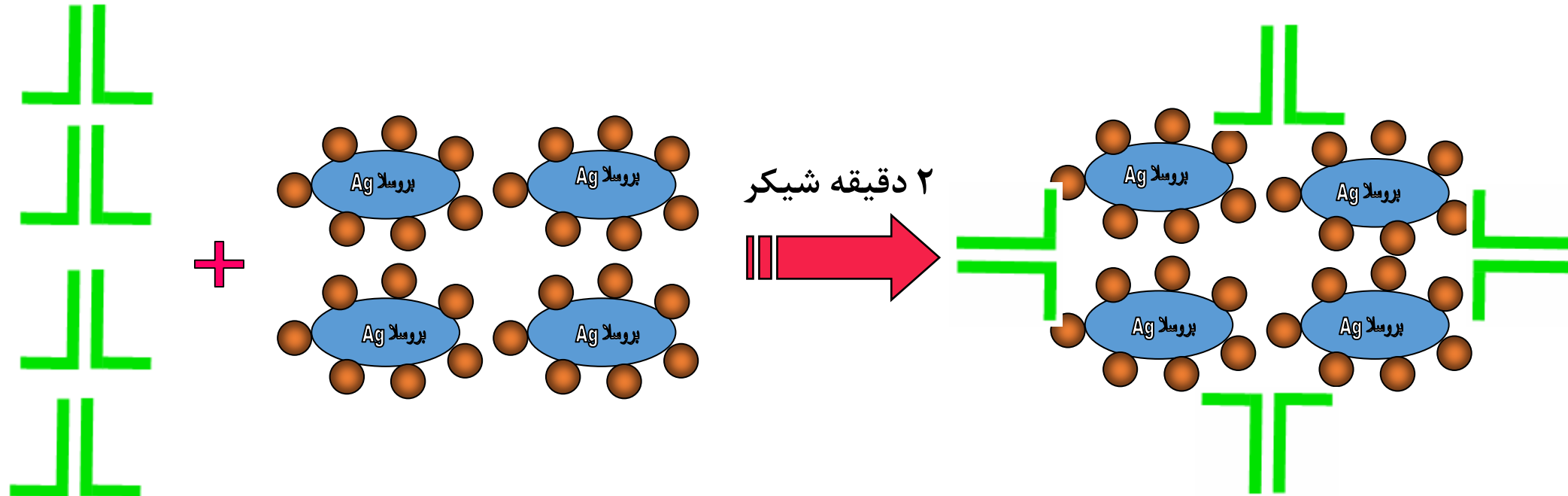


- PH: ۳.۶۵
- Ag: بروسلا آبورتوس
- جهت تشخیص اولیه بیماری، بعنوان تست غربالی
- احتمال پدیده پروزون (منفی کاذب)
- انجام آزمایش فقط با روش اسلاید
- موارد مثبت با روش لوله



# روش انجام آزمایش رایت

Rapid



Ab (سرم بیمار)

Ag (باکتری بروسلا)

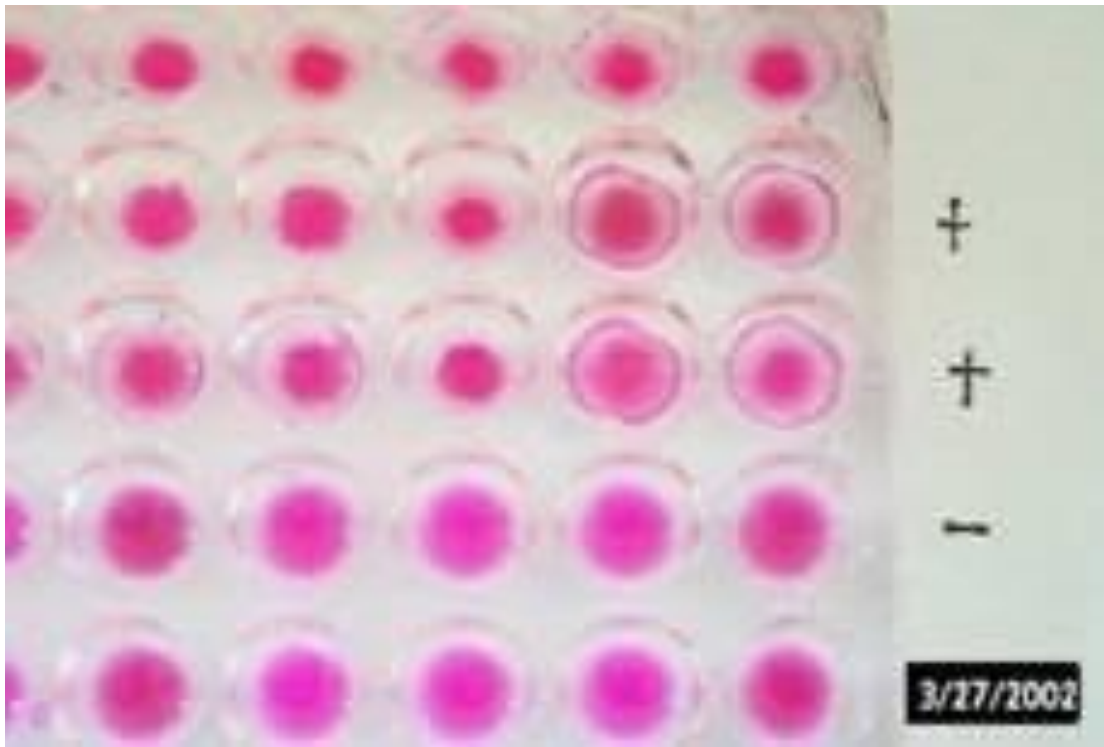
*Active Agglutination*



# روش انجام آزمایش رایت

## Semi quantitative

روی اسلاید زمینه سفیدی با کمک سمپلر مقدار های ۰.۰۰۸ - ۰.۰۰۴ - ۰.۰۰۲ - ۰.۰۰۱ - ۰.۰۰۰۵ میلی لیتر سرم بیمار قرار می دهیم . سپس به هر کدام از این ها یک قطره محلول انتی ژن بروسلا بورتوس و ۳ تا ۵ دقیقه هم می زنیم اگر جواب + باشد اگلوتینه ایجاد میشود.



# گزارش نتیجه

وجود آگلوتیناسیون :

- فقط با ۸۰ لاندا  
نتیجه: 1/20 Pos.
- با ۸۰ و ۴۰ لاندا  
نتیجه: 1/40 Pos.
- با ۸۰ و ۴۰ و ۲۰ لاندا  
نتیجه: 1/80 Pos.
- عدم وجود آگلوتیناسیون:  
Neg.

# خطاهای آزمایشگاهی

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

# موارد منفی و کاذب تست رایت

- ۱- تست رایت در عفونت ناشی از بروسلا کنیس منفی می شود که بدلیل عدم تشابه آنتی ژنی بروسلا *canis* با آنتی ژن مورد استفاده در آزمایش رایت است.
- ۲- برخی موارد منفی کاذب در مواقعی رخ می دهد که نمونه سرم در آزمایشگاه بیشتر از ۳۲۰ / ۱ رقیق نشود و آنتی بادی بیش از حد وجود داشته باشد (پدیده پروزون). باید توجه داشت که در این مواقع، در تیترهای بالاتر (رقت های بالاتر)، تست رایت مثبت می شود.
- ۳- در اوائل بیماری و در زمانی که آنتی بادی تولید نشده باشد نیز تست SAT منفی کاذب گزارش می گردد.
- ۴- در بیماران با نقص ایمنی *humoral* و هایپوگاماگلوبولینمی ها نیز بدلیل کمبود گاماگلوبولین ها نتیجه منفی کاذب می شود.
- ۵- وجود آنتی بادی های بلوک کننده در سرم می تواند باعث گزارش منفی کاذب تست رایت گردد، که این پدیده بیشتر در موارد مزمن و طول کشیده بیماری مشاهده می گردد و با انجام آزمایش کومبس می توان این مشکل را رفع نمود. در این موارد تیتر کومبس بسیار بیشتر از تیت رایت است.



# با تشکر از حسن توجه شما

