دکتر علی بیکیان- متخصص آسیب شناسی بالینی و تشریحی

گذری برروش های تشخیص آزمایشگاهی بروسلوز

بیماری بروسلوز یکی از مهمترین بیماری های باکتریایی مشترک بین انسان و جانوران است و با گونه های مختلفی از جنس بروسلا ایجاد می شود. بروسلا یک ارگانیسم کوکوباسیل گرم منفی، داخل سلولی اختیاری و فاقد تاژک، کپسول و اسپور است در میان گونه های آن، B.abortus عامل عفونت در گاو، B. melitensis عامل عفونت در گوسفند و بز، B.suis عامل عفونت در خوک و B.canis عامل عفونت در سگ است. تمام این گونه ها در انسان نیز ایجاد بیماری می کنند که از آن به عنوان بروسلوز انسانی یاد می شود. بهر روی بیماریزاترین این گونه ها در انسان B. melitensis سپس به ترتیب B.abortus، B.suis و B.canis هستند. درگذشته بروسلوز دربخش های جغرافیایی نام های دیگری همچون تب مدیترانه، بروسلوز، تب جبل الطارق و تب قبرس داشت. نام های دیگر نیز برپایه ی تب برآمده از این بیماری همانند تب مواج، تب تیفو- مالاریا و تیفویید نوبه مرسوم بود.

این بیماری با داشتن گستره ی پهنی از نشانگان بالینی و نبود نشانه های بالینی ویژه خود، تشخیص آن را دشوار می نماید. بدین روی تشخیص بیماری، نیاز به تشخیص آزمایشگاهی همزمان با تاریخچه بیماری و نشانه های بالینی دارد.

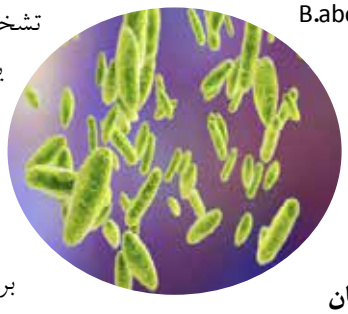
تشخیص بیماری

تاریخچه ابتلا به بیماری و نشانگان بالینی

تاریخچه تماس بیماران با جانوران و نشانگان بالینی مانند تب مواج در تشخیص آغازین بروسلوز انسانی بسیار کمک کننده است. اگر نشانگان اختصاصی نمایان نباشد، چه بسا نتوان به تشخیص رسید و یا اشتباه تشخیص داده شود. بدینروی تشخیص آزمایشگاهی نقش تعیین کننده‌ای دارد.

تشخیص آزمایشگاهی بروسلوز

به طور معمول شمارش کامل خون (CBC) برای ارزیابی همه ی بیماری های عفونی تجویز می شود. لکوسیتوز در بروسلوز نادر است و شمار جشمگیری از بیماران نوتروپنیک هستند. کم خونی در ۷۵٪ بیماران (به ویژه عفونت مزمن)، ترومبوسیتوپنی در ۴۰٪ و پان سیتوپنی در ۶٪ بیماران گزارش شده است.افزایش جزئی در سطح آنزیم های کبدی مبتلایان یافته بسیار رایج است. افزایش بالای این آنزیم ها ممکن است نشان دهنده شدت درگیری کبد باشد واشاره ای به تظاهرات بالینی هپاتومگالی باشد. آزمایش استاندارد برای تشخیص بروسلوز، جداسازی ارگانیسم از خون یا بافت ها (همانند بیوپسی مغز استخوان یا آسپیراسیون کبد) است



کشت و تشخیص باکتریایی

جداسازی از کشت و شناسایی باکتری بروسلوز، برای تشخیص قطعی بیماری همچنان استاندارد طلایی به شمار می آید. می توان گونه های بروسلا را از خون، مغز استخوان، بافتها و مایعات بدن جدا کرد. البته مثبت شدن باکتری بستگی به مرحله بیماری، نوع نمونه و روشهای کشت دارد. جداسازی باکتری از کشت مغز استخوان نسبت به خون در هر مرحله بیماری برتری دارد، ولی به علت دردناک بودن روش اخذ نمونه فقط در شرایط خاص مورد استفاده قرار می گیرد. بلاد آگار، شوکولات آگار، تریپتیکاز سوی آگار و سرم دکستروز آگار برای کشت باکتری مورد استفاده قرار می گیرند. بعضی سویه ها ممکن است برای رشد بهتر نیاز به سرم گاو یا اسب داشته باشند. محیطهای کشت انتخابی مثل s Medium و Ferrell می تواند برای نمونه های بافتی استفاده شود. حساسیت کشت خون با تکنیک های پیشرفته ترمانند استفاده از بطری های

Castaneda و با تکنیک لیز سانتریفیوژ بهبود بیشتری بافته است.با استفاده از این روش ها، حساسیت نزدیک به ۶۰ درصداست. البته در بروسلوز چون در سیستم رتیکو اندوتلیال مغز استخوان دارای غلظت بروسلوز بیشتری است،کشت مغز استخوان دارای اعتبار بیشتری است برای تشخیص و نتیجه آن با حساسیت نزدیک به ۸۰ تا ۹۰ در صدخواهد بود. مایعات دیگر(برای نمونه مایع مفصلی، مایع پلور یا مایع مغزی نخاعی [CSF]) قابل کشت است، اما دستاورد کمتری دارند.

محیط های کشت داده را در دمای ۳۵-۳۷ درجه سانتیگراد با اتمسفر حاوی ۵۵ تا ۱۰درصد دی اکسید کربن برای ۳ تا ۵ روز نگه داری می شوند. اما محیط های کشت منفی باید تا ۴هفته همچنان در انکوباتور نگه داری شود، تا ماهیت مشکل پسند بودن باکتری مورد نظارت دقیق و بازبینی قرار گیرد. کلنی های سویه های صاف بروسلا به صورت کشیده، محدب، شفاف، بدون پیگمان و بدون همولیز با اندازه ۰/۵ الی ۱ میلیمتر در پلیت های آگار ظاهر می شود و به صورت میکروسکوپیک، به صورت کوکو باسیل های گرم منفی شبیه شن ریز و از نظر بیوشیمیایی با خصوصیاتی مثل اکسیداز مثبت و اوره آز مثبت مورد شناسایی و تشخیص قرار می گیرند. مرفولوژی کلونی های بروسلاکانیس خشن است و به صورت تیره، مایل به رنگ زرد و مات ظاهر می شود. روش های کشت بخاطر رشد آهسته و حساسیت پایین، ازاهمیت پایینی برخوردار هستند. نمونه ها باید بااحتیاط مناسب و مقتضی در ایمنی زیستی سطح۲ جمع آوری و دستکاری شوند، درحالیکه کشت ها باید در زیست ایمنی سطح۳ آزمایشگاه مورد بررسی قرار بگیرند.

تشخیص سرولوژیکی

آزمایش سرولوژی رایج ترین روش تشخیص بروسلوز است. اگر تیتر اولیه پایین باشد، آزمایش سرولوژی مکرر توصیه می شود.

آزمایش آگلوتیناسیون لوله ای که توسط بروس بنیاد نهاده شد، آنتی بادی ها را علیه لیپوپلی ساکارید صاف (LPS) اندازه گیری می کند و همچنان رایج ترین روش آزمایش

برای تشخیص بروسلوز است. آزمایش ۲ مرکاپتو اتانول، ایمونوگلوبولین (IgG)G را تشخیص می دهد و تیترهای بالاتر از ۱:۸۰ عفونت فعال را مشخص می کند. تیتر آنتی بادی IgG بالا یا تیتری که بعد از درمان بیشتر شود نشان دهنده عفونت یا بازگشت دوباره است. تست های دیگر مانند tray agglutination(TAT) و TAT اصلاح شده نیز معتبرهستند.

تیترهای بالاتر از ۱/۱۶۰ همراه با تظاهرات بالینی، نشان دهنده عفونت است. تیترهای بالاتر از ۱/۳۲۰ ارزش بیشتری در تشخیص دارد، به ویژه در نواحی که بیماری بومی است. از سیر صعودی تیترهای آنتی بادی نیز می توان برای تشخیص بهره جست.

اگر چه آزمایش های سرولوژی ابزار نیرومندی است در تشخیص، امابه علت وجود واکنش متقاطع با سایر باکتریها مثل یرسینیا آنتروکولیتیکاO:9، سالمونلا اوربانا گروپN، ویبریو کلرا، E.coli :O157 و سایر باکتری ها، ویژگی این روش از حد پایینی برخوردار است. تشخیص آزمایشگاهی بروسلا کانیس به علت عدم وجود S-LPS ممکن نیست، زیرا این گونه دارای کلنی های خشن است.

تست های سرولوژی سریع و دارای ریسک پایینی از نظر کسب عفونت در آزمایشگاه بوده و بسیار حساستر از روش های کشت هستند. کاستی دیگر آزمایش سرولوژی پدیده پروزون است. پروزون زمانی روی می دهد که اندازه آنتی ژنها در سرم زیاد باشدو می تواند به جواب منفی کاذب بیانجامد. بدینروی به طور روزمره رقیق کردن

سرم ها (بیشتر از ۱/۳۲۰) برای جلوگیری از این چالش ضروری است.

- **تست Rose Bengal:** به طور وسیعی در نواحی آندمیک برای غربالگری سریع جمعیت مورد استفاده قرار می گیرد. این تست کیفی است و در آن پدیده پروزون دیده نمی شود.
- **Coombs:** تست آگلوتیناسیون دیگری است که در موارد مزمن و عودکننده، جایی که نتیجه تست آگلوتیناسیون سرمی منفی یا مشکوک است انجام می شود.
- **Brucellacapt:** یک تست آگلوتیناسیون یک مرحله ای است که برای شناسایی آنتی بادی های توتال(آگلوتینین و غیرآگلوتینین) علیه بروسلااستفاده می شود و به عنوان یک جانشین مناسب برای تست Coombs پیشنهاد می شود. این تست می تواند در هر مرحله از بیماری استفاده شود و تیترهای آنتی بادی در نمونه های عودکننده به کندی کاهش یافته ولی در موارد درمان آنتی بیوتیکی موفقیت آمیز به سرعت کاهش می یابند.

Enzyme linked immunosorbent assays (ELISA)

در این روش آنتی بادی های موجود در نمونه های مورد آزمایش را با استفاده از گیرنده های سلول باکتریایی یا آنتی گلوبولین نشاندار شده با ایزوتوپ ها، فلوروکروم ها یا آنزیم ها به عنوان مولکول های نشانگر مورد شناسایی قرار می دهند. این روش در سال ۱۹۹۸ توسط Shamady و Wright به عنوان گزینه قابل قبول بجای کشت خون برای تشخیص بیماری بروسلوز معرفی و بکار گرفته شده است.

در ELISA از پروتئین های سیتوپلاسمی به عنوان آنتی ژن استفاده می شود و IgG ، IgM و IgA را اندازه گیری می کند و تفسیر بهتری را امکان پذیر می کند، به ویژه در موارد عود بروسلوز.

علاوه بر روش های بالا، روش های متنوع دیگری برای تشخیص سرولوژیکی بروسلوز توسط Nielsen و Yu در سال ۲۰۱۰ مورد استفاده قرار گرفته اند که عبارتند از:

- **سنجش پولاریزاسیون فلورسانس fluorescence (polarization assay)= FPA**
- سنجش ایمونولوژیکی فلورسانس با استفاده از تکنیک به دام اندازی و شستشو
- سنجش هایChemi–luminescence

تشخیص مولکولی

آزمایش زنجیره ای پلیمراز(PCR) برای شناسایی و تشخیص سریع گونه های بروسلا در نمونه های خون انسان ایجاد شده است. دو هدف ژنتیکی عمده عبارتنداز ژن Brucella BCSP31 و اپرون rRNA 16S-23S. اپرون rRNA 16S-23S دارای حساسیت قابل اعتمادتری است، اما هنوز در کار بالینی به طور گسترده مورد استفاده قرار نگرفته و به استانداردسازی بیشتری نیاز دارد. کاربردهای احتمالی شامل ارزیابی موارد عود و نظارت بر پاسخ به درمان است.

آزمایش امیدوارکننده دیگر شامل PCR Real time، PCR Nested و PCR–ELISA است، اما رل تشخیص بالینی آنها هنوز نیاز به کار بیشتر است.

منبع:

https://emedicine.medscape.com/article/213430-workup#c6