مجله دانشکده پزشکی تهران
آذر و دی ماه ۱۳۶۷ ــ صفحه ۱۱

بررسی روش میکروآگلوتیناسیون در تعیین تیتر آنتی بادیهای ضد بروسلا درانسان

دکتر احمد مرشدی* ــ دکتر محمدباقر اسلامی* ــ حمیده طباطبائی*

بروسلوز (تب مالت) یکی از بیماریهای عفونی‌شایع در انسان وبعضی از حیوانات اهلی می‌باشد وجستجوی آنتی بادی ضد باکتری مولد این بیماری در سرم بیماران برای تایید تشخیص کلینیکی و تعیین خط مشی معالجه و همچنین برای بررسی های اپیدمیولوژی حائز اهمیت است .

روش جاری برای تشخیص سرولوژیکی این بیماری استفاده از آزمون رایت Wright است که یک آزمون استاندارد آگلوتیناسیون در لوله STA= (Standard Tube Agglutination) می‌باشد . در موارد منفی کاذب یعنی زمانی که پادتن های ناکامل یا غیر آگلوتینان در سرم بیمار وجود دارد ومانع آگلوتیناسیون این باکتری میشود آزمون wright 'Coombs یا (AHG) Anti Human Globulin test را برای تایید نهائی بکار میبرند .

پس ازابتلا به این بیماری آنتی بادی اختصاصی از کلاس IgM وIgG برضد این باکتری در بدن تولید می‌شود . در صورت درمان بموقع و کامل ،آنتی بادی از کلاس IgG در سرم بیمارکاهش می‌یابدولی در بعضی از بیماران آنتی‌بادی از کلاس IgM حتی پس از درمان تا مدتهادر سرم خون‌باقی میماندباین دلیل دراین بیماری تمایز آنتی بادیهای موجود در سرم از کلاس IgM وIgG مورد توجه است و برای این منظوراز آزمون 2-Mercapto ethanol (2ME) استفاده میشود . آزمون 2ME فقط پادتن های از کلاس IgG را مورد سنجش قرار میدهد از این رو مفیدترین آزمایشی است که نشان میدهد بیمار درمان شده است یا عفونت هنوز ازبیمار ریشه کن نشده است . (۱و۲)

در سالهای اخیر بعضی از محققین روش‌میکرو ــ آگلوتیناسیون را بواسطه دارا بودن مزایائی برای تعیین پادتن های آگلوتینان و غیر آگلوتینان معرفی کرده اند . روش میکروآگلوتیناسیون اساسا " مشابه آزمون رایت می‌باشد با این تفاوت که مقادیر بسیار کمی از سرم وآنتی ژن درآن بکار میرود . در سال ۱۹۸۰ Beaton و Gilbert (۳) آزمون میکروآگلوتیناسیون (MAT) را بجای آزمون های STA و AHG بکار بردند سپس در سال ۱۹۸۱ Brown و

---

* بخش ایمونولوژی دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی .

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-16]

همکاران (۴) آزمون MAT را با استفاده از پادگن رنگ‌شده‌با سافرانین O برای تعیین پادتن های ضد بروسلا بکار بردند و نتایج خوبی بدست آوردند .

بررسی های این پژوهشگران نشان می‌دهد که روش میکروآگلوتیناسیون فوق العاده حساستر از آزمونهای STA و AHG درلوله بوده و نظربه اینکه روش میکرو میتواند سریع تر انجام شود ، و مقادیر کمتری سرم وآنتی ژن در آن بکـــار میرود از این رو علاوه بر استفاده در تشخیص طبی کاربـــرد جالب توجهی در بررسی های اپیدمیولوژی روی جمعیت‌های انسان ودام پیدا مینماید .

از آنجاکه بررسی های قبلی توسط برخی از محققین نتایج یکسانی که بتوان آزمون را استاندارد شده تلقی نمود بدست نداده است باین جهت تحقیق حاضر با این هدف که بتواند روش مذکور را از نظر کمی و کیفی ارزیابی نمایدانجام گرفت . دراین بررسی روش میکروآگلوتیناسیون همزمـــان با آزمونهای STA و AHG و با استفاده از پادگن رنگی روی ۱۶۰ نمونه سرم که برای تعیین عیار پادتن ضد بروسلا به بخـش ایمونولوژی دانشکده بـهداشت فرستاده شده بودانجام گردید و نتایج بدست آمده مورد مقایسه و ارزیابی قرار می‌گیرد .

مواد و روش کـار :

ســرم : ازخون‌بیمارانی‌که برای تشخیص سرولوژیکی بروسلوز به دانشکده مراجعه میکردندبدست می‌آمد .سرم جدا شده بمدت یکشب در یخچال میماند و روز بعد آزمایشـــات سرولوژی مربوطه روی آن انجام میگرفت .

پادگـن : عبارت‌ازآنتی ژن بروسلا آبورتوس سویه ۱۹ بدون رنگ بود که از موسسه سرم سازی رازی تهیه و در هنگام کار برای روش میکرو به نسبـــت $\frac{1}{10}$ در PBS (Phosphate Buffer Saline) PH: ۷/۲ محتوی ۰/۰۰۵ درصد سافرانین رقیق و مصرف گردید . برای تهیه محلول سافرانین ۰/۰۰۵ درصد ،ابتدا نیم گرم‌پودرسافرانین O را در ۱۰۰میلی لیتر آب مقطر حل کرده و سپس یک میلی لیتر از آنرا به ۹۹ میلی لیتر PBS اضافه میگردد . (۴)

آزمون آگلوتیناسیون در لوله

آزمونهای STA وAHG براساس روشهائی که بوسیلـــه Robertson (۵) در ۱۹۸۰ نوشته شده انجام گرفـــت . نمونه های سرم ابتدا به نسبت $\frac{1}{10}$ درآب نمک فیزیولوژی محتوی ۰/۵ درصد فنل رقیق شد و سپی رقت های دوگانه از $\frac{1}{10}$ تا $\frac{1}{1280}$ در لوله های ۱۲×۷۶ میلیمتر تهیـــه گردید . بهر لوله ۰/۵ میلی لیترآنتی ژن که به نسبت $\frac{1}{10}$ درآب نمک فنیکه رقیق شده بود اضافه و پس از تکان دادن بمدت ۱۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد گذاشته و سپس خوانده و ثبت میگردید .کمترین رقتی‌که ۵۰% آگلوتیناسیون درآن دیده می‌شد بعنوان تیترنهائی سرم‌گزارش میگردید . تمام سرمهائی که درآزمون رایت آگلوتیناسیون ضعیف (+1) و یامنفی داشتند در ۲۰۰۰ دور بمدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید و رسوب دوبار با آب نمک فیزیولوژی شستشو داده شدسپس بهر لوله ۰/۵ میلی لیترسرم آنتی گلوبولین رقیق شده اضافه و پس از تکان دادن بمدت ۱۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد گذاشته شد .کمترین رقتی که درآن ۵۰% آگلوتیناسیون ایجاد شد بعنوان تیترکومبس رایت گزارش گردید .

روش میکرو آگلوتیناسیوی :

از میکروپلیت که ته حفرات آن بشکل V اســـت استفاده گردید . برای هر نمونه سرم یک ردیف ۱۰حفره‌ای در نظر گرفته و روی هر میکروپلیت ۷ نمونه سرم و یک سرم شاهد آزمایش شد . ابتداء سرم مورد آزمایش را به نسبـــت $\frac{1}{10}$ در لوله رقیق نموده و ۰/۱ میلی لیتر از آنرا بـــا میکروپی پت برداشته و به‌حفره اول ریخته و با میکروپی‌پت ۰/۰۵ میلی لیتری رقت های دوگانه را از $\frac{1}{10}$ تا $\frac{1}{1280}$ تهیه نمودیم باین ترتیب در هر حفره ۰/۰۵ میلی لیتـــر باقی ماند . آنتی ژن بروسلا را به نسبت $\frac{1}{10}$ در PBS محتوی ۰/۰۰۵ سافرانین O رقیق کرده و بهر حفره ۰/۰۵ میلی لیتر اضافه نمودیم باین ترتیب رقت سرم در تمـــام حفرات دو برابر شده و در حفره اول رقت $\frac{1}{20}$ گردید . پلیت ها را بوسیله نوار پارافین پوشانیده و بمدت ۲۰ثانیه آنرا تکان داده‌آنگاه ۱۸ ساعت در ۳۷درجه سانتی گراد گذاشته شد . قبل از خواندن نتیجه میکروپلیت را بمدت‌یک دقیقه بحالت شیب ۶۰ درجه نسبت به افق قرار داده‌سپس نتیجه ثبت میگردید . چنانچه دکمه رسوبی ایجاد شده در مرکز حفره بطرف دیواره حفره‌جاری می‌شد ، مساوی عدم آگلوتیناسیون و در صورتیکه دکمه رسوبی وجود نداشته و یا

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-16]

دکمه مختصری درمرکز باکتریهای آگلوتینه شده ایجاد می‌شد ولی در وضعیت شیب به طرف دیواره جاری نمی‌شد مساوی آگلوتیناسیون مثبت تلقی میگردد (۷).

در صورتیکه آگلوتیناسیون منفی می‌شد تست AHG بروش میکرو انجام میگرفت. برای اینکار پلیت را بمدت ۱۵ دقیقه در ۲۰۰۰ دور سانتریفوژ نموده و پس ازیکبار شستشوی رسوب به هر حفره ۰/۰۵ میلی لیتر سرم آنتی گلوبولین رقیق شده اضافه و با نوار پارافین پوشانده می‌شد. پس از ۲۰ ثانیه تکان دادن آنرابمدت ۱۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد گذاشته و مانند قبل نتیجه ثبت میگردید (۷).

شاهـدهـــا:

سرم شاهد اولیه برای آزمون STA یک سرم مثبت گاوی بود که از آزمایشگاه بروسلوز موسسه رازی گرفته شد که بعنوان دومین سرم استاندارد بین المللی W.H.O برای بروسلا آبورتوس شناخته میشود. این سرم محتوی ۱۰۰۰ واحد بین المللی پادتن درمیلی لیتراست و برای استانداردکردن آزمون STA در سراسر دنیا بکار میرود (W.H.O.1979)(۶).

آزمون AHG نیز برای تعیین میزان پادتن ضد بروسلا در انسان بکار میرود بنابراین شاهدهای مناسب برای این روش آنتی سرمهای استاندارد انسان میباشد. ۱۲ نمونه سرم شاهد انسانی از بین سرمهای مورد آزمایش انتخاب گردید. این ۱۲ نمونه بدین علت بعنوان شاهد انتخاب شدند زیرا که آنها تیترهای متنوعی ازمنفی تا مثبت قوی داشته و نیز بمقادیر کافی جهت استفاده در آزمونهای مختلف بعنوان شاهد در دسترس بود (جدول ۱).

نتـایـــج

نتایج آزمون آگلوتیناسیون در لوله و روش میکرو ـ آگلوتیناسیون روی ۱۶۰ نمونه در جدول ۲ برای مقایسه ارائه گردیده است و بطوریکه جدول نشان می‌دهد روش میکرو از حساسیت بیشتری برخوردار است. زیرا که از ۲۹ نمونه سرم که با آزمون STA نتیجه منفی داشتند ۲۵ نمونه آن (۸۶/۲%) با روش MA نیزجواب منفی داشتند (تیتر ۲۰ >) و ۴ نمونه باقیمانده با روش میکرو مثبت شدند (۱۳/۷%) بطوریکه ۲ نمونه دارای تیتر $\frac{1}{80}$ یا بالاتربودند (۶/۸%). ۱۳۱ نمونه از کل سرم هاکه آزمون مثبت داشتند با روش میکرو نیز مثبت شدندبطوریکه ۶۸ مورد آن (۵۱%) با هر دو روش تیتر کاملا" یکسان داشتند و ۱۱۲ مورد آن (۸۵/۴%) با قبول یک رقت بالاتر و یا پائین تر (±1 dilution) در این دو روش با هم توافق داشتند. و ۲۱ مورد (۱۶%) در این دو آزمون اختلاف تیتر بیش از یک رقت نسبت بیکدیگر داشتند ولی بطوریکه جدول نشان میدهداین عدم توافق یا اختلاف تیتر بین دو روش (بجز در یک مورد) بعلت بالاتر بودن دو و یا بیش از دو رقت در تیتر میکروآگلوتیناسیون بوده است. بطور کلی در هر نمونه که بین دو آزمون اختلاف تیتر وجود داشت تیتر بیشتر دراکثر موارد مربوط به آزمون میکرو ـ آگلوتیناسیون بوده است. چنانچه آمار و ارقام فوق را بطور کلی در مورد نمونه های منفی و مثبت یکجا بیان کنیم نتایج زیر بدست میآید:

۱ـ در ۵۷/۵% موارد هر دو روش جواب کاملا" یکسان داشتند.

۲ـ در ۶۸/۲% موارد با قبول اختلاف یک تیتردو روش باهم توافق داشتند.

۳ـ در ۱۳/۷% موارد دو روش با هم اختلاف بیش از یک رقت نشان دادند بعبارت دیگر در ۱۳/۷% موارد دو روش با هم توافق نداشتند.

در جدول ۳ آزمون AHG به روش لوله و میکرو با یکدیگر مقایسه شده است. در اینجا نیز نتایج آزمون AHG به روش میکرو تا اندازه‌ای حساستر از روش لوله می‌باشد. در این مقایسه جمعا" ۷۱ نمونه سرم مورد آزمایش قرارگرفت. از ۲۴ مورد که با آزمون AHG منفی شده بود ۲۳ مورد آن (۹۵/۸%) با روش میکرو AHG نیز منفی گردید و یک نمونه باقیمانده (۴/۱%) با روش میکرو جواب مثبت نشان داد که تیتر آن پائین تر از $\frac{1}{80}$ بود ۴۷۰ نمونه باقیمانده با هر دو روش جواب مثبت داشتند از این تعداد، ۲۸ نمونه (۶۰/۸%) جواب یکسان بدست دادند ولی با قبول اختلاف یک رقت ۴۵ نمونه (۹۵/۷%) با هم توافق داشتند.

در دو نمونه اختلاف بیش از یک رقت بین دوروش وجود داشت بعبارت دیگر در دو نمونه از ۴۷ نمونه (۴/۲%) دو روش با یکدیگر توافق نداشتند. این عدم توافق بعلت بالاتر بودن تیترهای میکرو AHG نسبت به روش لوله بود و فقط در یک نمونه تیتر میکرودو رقت پائین تر از روش لوله بود.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-16]

جدول شماره ۱: مقایسه تیتر سرمهای شاهد در روش میکروواکرو (لوله)

شماره سرم شاهد	روش لوله		روش میکرو	
	AHGT	STAT	MAHGT	MAT
۱	< ۲۰	< ۲۰	< ۲۰	< ۲۰
۲	< ۲۰	< ۲۰	< ۲۰	< ۲۰
۳	< ۲۰	< ۲۰	< ۲۰	< ۲۰
۴	۴۰	< ۲۰	۸۰	۸۰
۵	۲۵۶۰	< ۲۰	۱۲۸۰	۶۴۰
۶	۴۰	۴۰	۸۰	۸۰
۷	۸۰	۴۰	۸۰	۸۰
۸	۸۰	۸۰	۱۶۰	۱۶۰
۹	۱۶۰	۸۰	۱۶۰	۱۶۰
۱۰	۶۴۰	۱۶۰	۶۴۰	۳۲۰
۱۱	۶۴۰	۶۴۰	۱۲۸۰	۶۴۰
۱۲	۲۵۶۰	۱۲۸۰	۲۵۶۰	۲۵۶۰

جدول ۲ــ میزان پراکندگی تیترهای STA و MA نسبت به‌یکدیگر

تیترهای MA \ تیترهای STA	۲۰	۲۰	۴۰	۸۰	۱۶۰	۳۲۰	۶۴۰	۱۲۸۰	۲۵۶۰	۵۱۲۰	جمع
۴								۱	۱	۲	۴
۸						۱	۳	۲	۲		۸
۱۶					۲	۳	۷	۴			۱۶
۲۳	۱				۲	۹	۱۱				۲۳
۲۴			۱	۳	۴	۱۴	۲				۲۴
۲۶			۲	۴	۱۷	۳					۲۶
۱۳	۱		۵	۶		۱					۱۳
۱۴	۱	۲	۸	۳							۱۴
۷	۱	۴	۲								۷
۲۵	۲۵										۲۵
جمع	۲۹	۶	۱۸	۱۶	۲۵	۳۱	۲۳	۷	۳	۲	۱۶۰

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-16]

جدول ۳ـ وضعیت پراکندگی تیترهای TAHG و میکرو AHG نسبت به یکدیگـــــــــر

تیترهای MAHG	تیترهای TAHG										
	<۲۰	۲۰	۴۰	۸۰	۱۶۰	۳۲۰	۶۴۰	۱۲۸۰	۲۵۶۰	>۵۱۲۰	جمع
>۵۱۲۰										۲	۲
۲۵۶۰								۲	۲		۴
۱۲۸۰						۱	۱	۳	۱		۶
۶۴۰						۳	۶	۱			۱۰
۳۲۰					۱	۴	۲	۱			۸
۱۶۰				۱	۴	۱					۶
۸۰			۲	۲	۱						۵
۴۰	۱		۳	۰							۴
<۲۰	۰	۲	۱								۳
۲۰	۲۳										۲۳
جمع	۲۴	۲	۶	۳	۶	۹	۹	۷	۳	۲	۷۱

جدول ۴ـ مقایسه نتایج چهار آزمون مختلف روی ۴ نمونه سرم که در منفی ولـــی با روش مثبت شده اند .

آزمونهـــا				تعداد سرم
MAHG	TAHG	MA	STA	
۸۰	۴۰	۸۰	< ۲۰	۱
۱۲۸۰	۲۵۶۰	۶۴۰	< ۲۰	۱
۲۰	۴۰	۲۰	< ۲۰	۱
۴۰	< ۲۰	۴۰	< ۲۰	۱
< ۲۰	< ۲۰	< ۲۰	< ۲۰	۲ (شاهد)

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-16]

مقایسه از نتایج چهار آزمون مورد بررسی (جدول ۴) نشان میدهد ۴ نمونه سرمی که در آزمون STA منفی ولی با روش MA مثبت شده بودند همگی بجز یک نمونه در میکرو AHG نیز مثبت بودند این نتایج حاکی از آنست که آزمون MA قادر است سرم هائی را که با آزمون STA منفی کاذب تلقی می‌شدند مشخص نموده و جواب صحیح بدست دهد .

قابلیت تکرار (Reproducibility) روش MA ومیکروAHG با ۱۲ نمونه سرم های شاهد انجام گردید (جدول ۱)و نشان داد با نظر گرفتن اینکه اختلاف یک رقت را بپذیریم روش MA و میکرو AHG ۱۰۰% قابل تکرار است .

بحث :

در بررسی که بوسیله Brown و همکاران (۴) در سال ۱۹۸۱ روی روش های MA وSTA بروسلا صورت گرفت آنها برای سرم های با تیتر پائین تر از $\frac{1}{160}$ و بالاتر ۷۲% توافق بین دو روش مشاهده کردند و در مطالعه ای که بوسیله Bettelheim و همکاران (۷) در سال ۱۹۸۱ انجام شدآنها در مورد سرم های پائین تر از $\frac{1}{160}$ بانبول ۱± رقت ۵۸% توافق وبرای سرم های $\frac{1}{160}$ و بالاتر ۱۰/۶% توافق بین دو روش بدست آوردند . در تحقیق حاضر برای سرم های پائین تراز $\frac{1}{160}$ با قبول ۱± رقت ۸۶/۹% و برای سرم های $\frac{1}{160}$ و بالاتر ۸۵/۷% توافق بین د روش بدست آمد . ولی جائیکه یک اختلاف بیش از ۱± رقت وجود دارد تیترهای بدست آمده ازآزمون MA در اکثریت موارد (۹۵/۴%) بالاتر از آزمون STA می‌باشد .بنابراین اگرچه اختلافاتی بین تیترهای بدست آمده در آزمون STA وAHG با روش های لوله و میکرو وجود دارد ،این نکته قابل اهمیت است که درروش‌های میکرو هیچگونه نتیجه منفی کاذب بدست نیامد (جداول ۲و۳) ولی یک نمونه از ۲۹ نمونه سرم که بروش لوله منفی بود با روش های میکرو با تیتر کمتر از $\frac{1}{80}$ مثبت گردید ، این یافته را چنین میتوان تفسیر نمود که : مثبت شدن این نمونه سرم بخاطر حساسیت زیاد روش میکرو می‌باشد و یا اینکه واکنش متقاطع باعث پیدایش این نتیجه مثبت گردیده است . از طرفی بعنوان مقایسه از ۲۹/ سرم که آزمون STA منفی داشتند ۳ نمونه (۱۰/۳%) منفی کاذب بودند (جدول ۲) زیرا این سه نمونه در آزمونهای MA و AHG در لوله و میکرو AHG مثبت گردیدند (جدول ۴) بطوریکه دو نمونه آن تیتر $\frac{1}{80}$ و بالاتر داشتند . در خاتمه اینطور میتوان نتیجه گرفت که روش‌های میکروآگلوتیناسیون چه درکارهای تشخیصی و چه در بررسی های اپیدمیولوژی برای تعیین تیترآنتی‌بادیهای بروسلا دقیق و حساس است زیرا در تحقیق حاضر نشان داده شد که بروش میکرو می‌توان تمام سرمهائی را که بروش لوله درآزمونهای STA وAHG مثبت میگردند تعیین نمود .

SUMMARY

We compared the standard tube agglutination test(STA) with a micro agglutination method(MA) for detection of human antibrucella antibodies on 160 serum samples. Also the tube antihuman glubolin test (TAHG) was performed by micromethod (MAHG). In this study, the tube and microagglutination titres agreed within±1 dilution step with 138 (86.2%) of the 160 sera. There were 22(13.7%) serum specimens whose MA and STA titers didnot agree within ±1 dilution step. The MAHG method provided results very similar to those obstained with the TAHG test, but showed where discrepancies occurred, these were due to the MAHG method being more sensitive.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-16]

The microagglutination method had a number of advantages including it required lesstime to performe, was more sensitive, and used less antigen.

In conclusion it is conisdered that the MA and MAHG methods are adequate for detecting serum antibrucella antibody levels in suspected cases of human brucellosis, since it was demonstrated here that it detects all those sera which by the tube method (STA or AHGT) give positive result.

REFERENCES

1- Petersdorf, etal. Harrison,s principles of internal medicine 10th edition, Mc Graw-Hill company, 1985.

2- Wingaeden and Smith. Cecil Textbook of Medicine, sanders publisher. 17th edition, 1985.

3- Gilbert, G.L, etal. An epidemiological survey of human brucellosis. The Medical Journal of Australia (10), 482-286, 1980.

4- Brown, S.L. etal. Safranin-O-Stained antigen MAT for detection of Brucella antibodies, Journal of Clinica Microbiology 13(2), 398-400, 1981.

5- Robertson, L.etal. Bench book on Brucella, Public Health Laboratory Service Monograph series, 14.London: H.M.S.O. 1980.

6- World Health organization. Biological subtances, International Standards, Reference preparations and Reference Regeants.
Geneva: W.H.O.....

7- Bettelheim K.A. etal. comparison of standard tube and microagglutination techniques for dtermining Brucella antibodies J.Hyg. Camb. 90, 33-39, 1983.

8- Otero J.R. etal. Microtiter-adapted method that facilitates the coombs test for Brucellosis. Journal of clinical Microbiology, 16(4), 737-738, Oct. 1982.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-16]