مجله دانشکده پزشکی تهران
۱۳۵۱ر۲۷۵ر۲۹

نتایج ارزشیابی کارت تست جهت تشخیص سرولوژیك بیماری بروسلوز* در اصفهان - سال ۱۳۴۹

دکتر حیدر امینی** دکتر پل نیکولتی***

کارت تست آزمونی است که برای تشخیص سرولوژی بروسلوز درسالهای اخیر نزدحیوانات اهلی (گاووخوك) آزمایش و ارزشیابی شده و نتایج آن ازنظر بررسیهای همه‌گیری شناسی بسیار درخشان بوده است بطوریکه کلیه مواردکشت خون مثبت درگاوها دارای کارت تست مثبت شده است (نیکولتی سال ۱۹۶۷) .

برای تعمیم این آزمون نزد انسان وبخاطر سهولت انجام آن درشرایط صحرائی برنامه‌ای بمنظور ارزشیابی این آزمون و مقایسه آن باسایر روشهای متداول سرم شناسی (رایت) تهیه شده و در ایستگاه تحقیقات پزشکی اصفهان بمرحله اجرا درآمد .

اصول این آزمایش مانند سایر آزمونهای سروآگلوتیناسیون برپایه مشاهده پادتن IgG قرارگرفته است با این تفاوت که در آزمایش رایت نه تنها وسایل و تجهیزات و نیز دقت و مهارت بیشتری لازم است بلکه زمان زیادی نیز باید بکار برد (حداقل ۲۴ ساعت) درصورتیکه درکارت تست روش کار خیلی ساده است و در چند دقیقه (حداکثر ۱۰ دقیقه) نتیجه آزمون معلوم میگردد .

باید دانست، بطورکلی آزمونهای سرم شناسی که برای تشخیص بروسلوز بکارمیروند بخاطرپدیده‌های مختلف زیرهمیشه نتیجه قاطع ندارد ولی روی هم رفته ازنظرپاراکلینیك کاملا با ارزش میباشند .

۱ـ پدیده ماقبل منطقه
1_ Prezone
۲ـ وجود پادتن‌های بلوکه کننده
2_ Blocking antibodies
۳ـ وجود پادتن‌های غیر اختصاصی
3_ Non_specific antibodies
۴ـ وجود پادتن‌های متقاطع
4_ Cross_reaction antibodies
۵ـ پادتن‌های غیرقابل آگلوتیناسیون
5_ Non_agglutinating antibodies
۶ـ پادتن‌های ناقص
6_ Incomplete antibodies

همچنین مهارت و دقت عمل کارکنان آزمایشگاه و نقص تجهیزات آزمایشگاهی درنتیجه‌گیری دخالت‌دارند .

بررسی نزد ۲۳۸ بیمارمشکوك به تب مالت انجام گردید این بیماران عبارت بودند از :

ـ بیمارانیکه توسط پزشکان ومراکزدرمانی شهراصفهان به‌آزمایشگاه مرکزی بهداشت هدایت‌شده‌اند .

ـ بیماران بستری شده دربیمارستان امین اصفهان .

ـ موارد مشکوك به‌بروسلوزکه در منطقه آلوده اصفهان (قریه رهنان) که توسط گروه مطالعاتی ایستگاه تحقیقات پزشکی تحت بررسی قرارگرفته‌اند (دکتراورنگ وهمکاران ۱۳۴۸) .

---

* ـ این مطالعات با استفاده از طرح عمرانی ۶۱۹۱ دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی در ایستگاه تحقیقات بهداشتی اصفهان انجام شده است .

** ـ اپیدمیولوژیست ـ دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه تهران
*** ـ مشاور سازمان خواربار وکشاورزی جهانی در اداره کل دامپزشکی ایران

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-18]

روش بررسی شامل :

۱ـ نمونه‌برداری ـ ازخون بیماران جهت آزمونهای مختلف سرم شناسی از هر بیمار مشکوك حدود ده سانتیمتر مکعب خون از ورید گرفته شد که حدود ۵ سانتیمتر مکعب آن برای کشت و بقیه برای آزمونهای سرم‌شناسی بکار رفته است .

۲ـ کشت خون :

نمونه خون را با شرایط کاملا استریل داخل محیط کشت بروسلا (Tripticase soy) نموده سپس در مجاورت هوا و در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد بمدت هفت روز نگهداری و جهت تفکیك (Identification) بروسلا ازسایر میکربها ازاین محیط کشت برداشت نموده روی محیط تریپتوز آگار (Tryptose agar) داخل ظرف پتری تجدیدکشت بعمل آمد .

پس‌از اینکه مدت سه‌روز داخل انکوباتور نگهداری‌میشد پرکنه‌های محیط‌کشت را توسط‌تابش نورغیرمستقیم (زاویه‌تابش ۴۵ درجه بوده است) زیر ذره بین بررسی نموده و موارد مثبت جهت تائید به‌آزمایشگاه رفرانس بروسلا (تهران ـ بیمارستان نجات) ارسال میگردید (کلیه‌موارد مثبت مورد تائیدآزمایشگاه مزبور بوده است) و چنانچه ازنظر بروسلا منفی‌بود مدت ۴روز دیگر نگهداری وپس ازبررسی مجدد بدور انداخته می‌شد .

۳ـ آزمون‌رایت :

برای جلوگیری از اشتباه و انحراف این‌آزمایش به سه طریق انجام گرفته‌است شامل :

رایت معمولی (بعد از۲۴ ساعت) ـ رایت با سانتریفوژ ـ رایت سریع

۳-۱ـ رایت معمولی :

آنتی‌ژن این آزمون محصول انستیتورازی حصارك و از کشت بروسلا آبورتوس (B . abortus) می‌باشد کـه با روش Weybridge alton and James, 1967 استاندارد شده‌است، این‌آنتی‌ژن بغلظت ۴٫۵ درصد بوده و در موقع مصرف به‌نسبت یك پنجاهم ($\frac{۱}{۵۰}$) رقیق گردیده است .

روش‌کار ـ شش‌لوله‌آزمایش‌کوچك (لوله‌همولیز) برداشته درلوله اول ۰٫۱ سانتیمتر مکعب سرم بیمار را مخلوط با یك و نه دهم (۱٫۹) سانتیمتر مکعب سرم فیزلوژیك فنل‌دار (۰٫۵ در صد) داخل مینمائیم درپنج لوله بقیه ازسرم فیزیولوژیك فنل‌دار بمقدار ۰٫۵ سانتیمتر مکعب میریزیم از لوله اول پس از آنکه یك سانتیمتر مکعب ازمحلول‌را بدور ریختیم مقدار۰٫۵ سانتیمتر مکعب داخل لوله دوم واز لوله دوم همین مقدار برداشته داخل لوله سوم و تا لوله‌آخر این‌عمل ادامه می‌یابد و درنتیجه‌محلول داخل لوله‌ها به نسبت $\frac{۱}{۲۰}$ و $\frac{۱}{۴۰}$ و $\frac{۱}{۸۰}$ و $\frac{۱}{۱۶۰}$ و $\frac{۱}{۳۲۰}$ و $\frac{۱}{۶۴۰}$ رقیق شده است .

سپس بهریك ازاین لوله‌ها ۰٫۵ سانتیمتر مکعب آنتی‌ژن اضافه‌کرده ولوله‌ها را بمدت ۲۴ ساعت در حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد داخل‌انکوباتور نگهداری ودرصورت‌آگلوتیناسیون تیتر آنرا برحسب رقت محلول میخوانیم .

۳-۲ـ رایت با سانتریفوژ

این‌آزمون مانند رایت معمولی انجام گرفته منتهی بعد از اینکه از انکوباتور خارج نمودیم بمدت ده دقیقه با دور ۳۰۰۰ در دقیقه سانتریفوژ مینمائیم تا درصورتیکه پادتن ازنوع ناقص* یا غیرقابل‌آگلوتیناسیون (Non_agglutinating or incom pete antibodies) باشد تشخیص‌داده شود. با این‌روش اکثراً تیتر آگلوتیناسیون نسبت برایت ساده رقم بالاتری را نشان داده است .

۳-۳ـ رایت‌سریع

این‌آزمون بدون‌گذاردن درانکوباتور همانند آزمونهای بالاانجام گردید .

بایستی توجه داشت‌که باآزمون‌کومس رایت ورایت‌سریع با سانتریفوگاسیون وبهتر از اینها باآزمون ایمونوفلوئورسانس نتیجه قاطع‌تری بدست می‌آید زیراکـه این آزمونها اسپسیفیك بوده وموارد آنتی‌کورهای ناکامل وغیرقابل‌آگلوتینه را مشخص مینماید. دراین‌آزمونها سرم مبتلایان بهسل‌وسرطان و مالاریا و روماتیسم حاد مفصلی وسپتی سمی وغیره همیشه منفی بوده است. (مطالعات دکتر نظری سال ۱۳۳۹)

۴ـ کارت تست (Brucellosis card test)

وسائلی‌که جهت این آزمون لازم است در جعبه مقوائـی کوچکی قرار دارد وشامل وسایل زیرمیباشد: شکل (۱)

ـ کارت مخصوص‌جداکردن سرم
ـ آنتی‌ژن
ـ کارت مخصوص‌آگلوتیناسیون
ـ واکسینوستیل استریل
ـ لوله موئینه

۱ ـ اصطلاح آنتی‌کورهای ناقص توسط‌آقای دکتر نظری باصطلاح آنتی‌کورهای ناکامل تصحیح شده‌است .

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-18]

- پوار کوچك مخصوص لوله موئینه

۴-۱- کارت مخصوص جداکردن پلاسما : (شکل ۲)

این کارت بنام Brewer plasma collection slide- نامیده میشود طول این کارت پنج اینچ وعرض آن ۲ اینچ میباشد که توسط کارخانه Section, Dichenson and company ratherford. N. J., U. S. A. ساخته شده‌است. در وسط این کارت گودی مخصوصی قرار دارد که کف آنرا آغشته به‌لاکتین و یا فیتوهم‌آگلوتین (Phytohemagglutine) نموده‌اند .

ابتدا انگشت بیمار راتوسط سوزن (لانست) سوراخ نموده مقدار سه الی پنج قطره خون در وسط فرو رفتگی داخل کارت قرار میدهند سپس با حرکت دورانی کارت ، خون به‌سطح گودی آغشته شده و گلبولهای آگلوتینه شده از پلاسما جدا میشود. پس از قرار دادن کارت بطور مایل (زاویه ۴۵ درجه) پلاسما در انتهای گودی انباشته شده آماده استفاده میگردد .

۴-۲- میکروپیپت (Capillary pipettes) :

لوله موئینه کوچکی‌است که انتهای آن پوار کوچکی قرار میدهند و تا حد مدرج دارای گنجایش یك قطره (قطره اشك) میباشد، سرم با خاصیت لوله‌های موئینه بالاآمده تا خط مدرج سپس با فشار دادن پوار انتهائی روی گودی کارت مخصوص آگلوتیناسیون تخلیه می‌نمائیم .

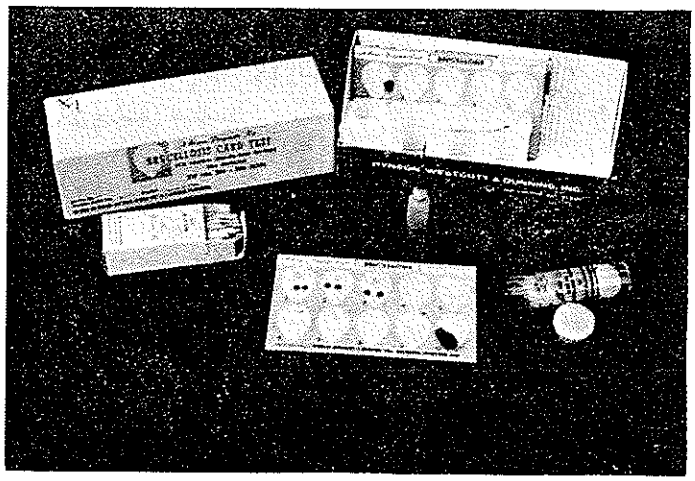
۴-۳- آنتی‌ژن :

آنتی‌ژن در ظرف پلاستیکی ویژه‌ای قرار دارد که انتهای آن به‌لوله فلزی باریکی ختم میشود و با فشار دادن این ظرف بمقدار یك قطره آنتی‌ژن را میتوان خارج نمود .

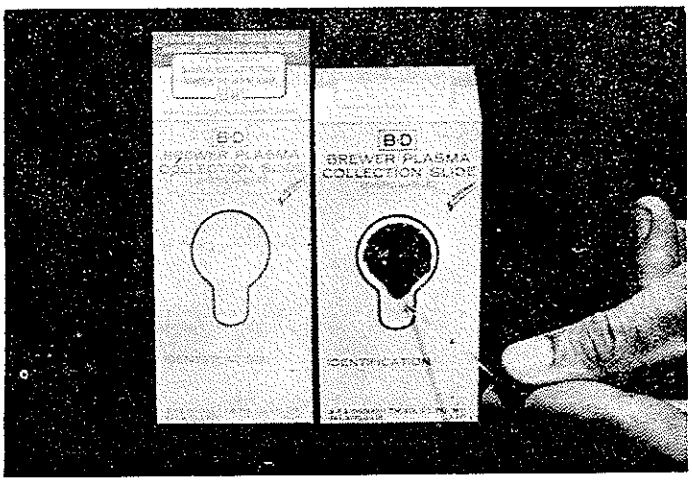
آنتی‌ژن دارای PH اسید و بوسیله روز بنگال (Rose Bengal) برنگ قرمز نارنجی درآمده‌است .

۴-۴- کارت مخصوص آگلوتیناسیون : (شکل ۳)

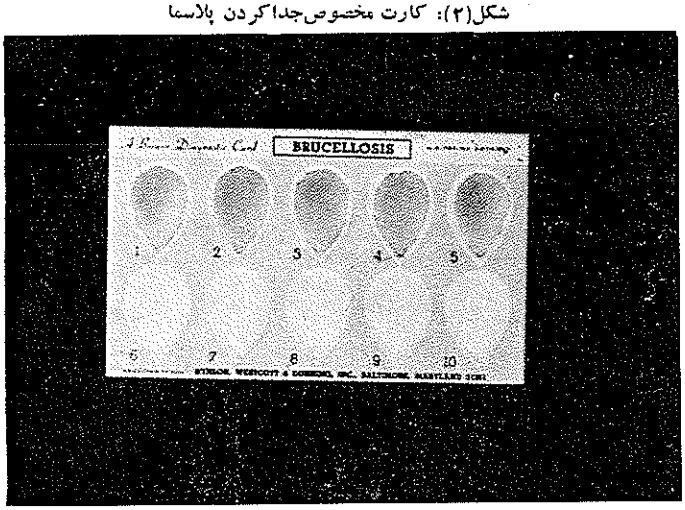
این کارت تعداد دو ردیف هر ردیف پنج محفظه گود دارد که مجموعاً ده آزمایش روی آن میشود انجام داد. سرم جدا شده را بوسیله میکروپیپت باندازه یك قطره اشك روی کارت آگلوتیناسیون قرارداده سپس دوقطره آنتی‌ژن درمجاورت سرم (یا پلاسما) قرار میدهیم توسط سیخك چوبی آنرا مخلوط نموده و حرکت دورانی میدهیم درصورتی که پادتن بحدکافی درپلاسما (یا سرم) باشد آگلوتیناسیون حداکثر پس از ۴ دقیقه صورت خواهدگرفت. (آگلوتیناسیون پس‌ازچهار دقیقه را منفی‌بحساب می‌آورند) .



شکل(۱): وسائل کلی کارت تست



شکل(۲): کارت مخصوص‌جداکردن پلاسما



شکل(۳): کارت مخصوص آگلوتیناسیون

نتیجه :

مجموعاً ۲۳۸ بیمار مشکوك به‌تب مالت بررسی شدند. از این تعداد ۵۷ نفرشان (۵ر۱۰ درصد) در آزمایش رایت ساده دارای‌تیتر آگلوتیناسیون $\frac{۱}{۸۰}$ به بالا مثبت بوده و ۷ نفر که دارای‌تیتر آگلوتیناسیون $\frac{۱}{۴۰}$ بودند جزوموارد مثبت محسوب

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-18]

نگردیدند .

ازموارد مثبت ۲۴ نفر زن (۴۲ درصد) و ۳۳ نفرمرد (۵۸ درصد) میباشند .

از ۵۷ مورد بیمارانی‌که سروآگلوتیناسیون آنها مثبت بودکشت خون ۱۶ نفرمثبت شد (۲۸ درصد) تمام موارد مثبت بروسلا ملیتنسیس (B . melitensis) بوده است [بایستی توجه داشت چون‌کشت در محیط هوای‌آزادآنکوباتور صورت‌گرفته احتمالا این مسئله سبب رشد نکردن سروتیپ‌های دیگرشده است وبسبب طول مدت بیماری واینکه اکثربیماران قبلا آنتی‌بیوتیك مصرف نموده (۷۰ درصد) بودند رقم رشد بروسلا پائین میباشد[۱] .

از ۵۷ مورد سروآگلوتیناسیون داخل لوله مثبت (رایت مثبت) ۵۶ نفرشان دارای‌کارت تست مثبت ومنحصراً یك مورد با تیتر ($\frac{۱}{۸۰}$) کارت تست خیلی ضعیف نشان داد (کشت مثبت بود) کلیه مواردیکه تیترآگلوتیناسیون آنها یك چهلم ($\frac{۱}{۴۰}$) بودکارت تست منفی داشتند .

جدول مقایسه نتایج آزمون رایت معمولی با کارت تست

		رایت معمولی		
		مثبت	منفی	جمع
کارت تست	مثبت	۵۶	۰	۵۶
	منفی	۱	۱۸۱	۱۸۲
		۵۷	۱۸۱	۲۳۸

بحث

مقایسه کارت تست و آزمون رایت (جدول بالا) نشان میدهدکه این دوآزمایش نتیجه مشابه داشته است بدین‌ترتیب‌که اگر تست سروآگلوتیناسیون رایت را برای تشخیص بروسلوز استاندارد فرض‌کنیم ضریبهای Validity کارت تست بقرار زیر خواهند بود .

$$\text{Sensitivity} = \frac{۵۶}{۵۷} \times ۱۰۰ = ۰/۰۹۸$$

$$\text{Specificity} = \frac{۱۸۱}{۱۸۱} \times ۱۰۰ = ۰/۰۱۰۰$$

رقم ۹۸ در صد Sensitivity و ۱۰۰ در صد در Specificity نشان میدهدکه این آزمون ازنظر مطالعات اپیدمیولوژیك‌کاملا با ارزش‌میباشد منتهی بایستی‌توجه داشت‌که‌چون تعداد موارد مطالعه شده‌کم است (۲۳۸ نفر) ضریبهای محاسبه شده ممکن است دقت خیلی زیاد نداشته باشد وبا ادامه مطالعات معلوم شودکه ضریبهای Validity این تست مختصری‌کمتر از این ارقام است .

نکته‌قابل‌ذکر این‌است‌که درمواردی‌که‌تیترآگلوتیناسیون یك چهلم ($\frac{۱}{۴۰}$) به‌پائین است‌کارت تست جواب منفی داده و این امر نشان میدهدکه پادتن در خون بایستی بحد معینی باشد ($\frac{۱}{۸۰}$ به‌بالا) تا نتیجه‌کارت تست مثبت‌گردد (علت مقایسه‌کارت‌تست باآزمون رایت معمولی بخاطر اینست‌که در اکثر آزمایشگاهها آزمایش رایت معمولی متداول بوده و هنوز هم ارزش خودرا از دست نداده است) نتایج این بررسی نشان میدهدکه جوابهای بدست‌آمده باکارت تست مشابه سایر آزمونهای سرولوژیك است وضمناً بخاطرسهولت عمل، جهت‌بررسیهای‌اپیدمیولوژیك‌بروسلوز وسیله با ارزشی میباشد .

خلاصه

مقایسه‌کارت تست‌وآزمایش‌رایت‌که روی۲۳۸ بیمارمشکوك به بروسلوز بعمل آمده نشان داده است‌که هردو آزمایش دارای نتایج‌مشابه‌بوده با این‌تفاوت‌که درمواردیکه تیترآگلوتیناسیون ازیك چهلم ($\frac{۱}{۴۰}$) کمتر بوده نتیجه‌کارت تست‌منفی شده است بهر حال بخاطرسهولت عمل‌درمطالعات‌اپیدمیولوژیك بروسلوز، کارت تست، آزمون بسیار با ارزشی میباشد .

۱ - چنانچه عامل بیماری ملیتنسیس باشد احتمال‌رشد بروسلا ازکشت خون دربدو بیماری (مرحله حاد) بیش‌ازمرحله ازمان بیماری است .

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-18]

REFERENCES:

1_ Nicoletti. P. and Amini. H., *Canad. J. Public. Health.*, 62 : 320, 1971 .

2 _ Nicoletti. P. *Amer. J. Veter. Med. Asoc.*, 151 : 1778, 1967.

3 _ Alton. GH. and Jones. *WHO. Monogr. Ser.*, 35 : 43, 1967.

4_ Castaneda. H. *Bull. WHO.*, 24 : 78, 1961.

5_ Orangue. A. Nadim. A. Atlas., Publication of Institute of Public Health Research, Teheran, 1687 1969.

6_ Nazari, G.R. Test book of Serology. 234, Teheran, Iran, 1958.

7_ Nazari. G. R. *Rev. Moyen. Orient.*, 4 : 380, 1963.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-18]