

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

دکتر حیدر امینی** دکتر پل نیکولتی***

کارت تست آزمون‌نی است که برای تشخیص سرولوژی بروسلوز در سالهای اخیر نزد حیوانات اهلی (گاو و خوک) آزمایش و ارزشیابی شده و نتایج آن از نظر بررسیهای همه گیری شناسی بسیار درخشان بوده است بطوریکه کلیه موارد کشت خون مثبت در گاوها دارای کارت تست مثبت شده است (نیکولتی سال ۱۹۶۷).

برای تعمیم این آزمون نزد انسان و بخاطر سهولت انجام آن در شرایط صحرائی بر نامه‌ای بمنظور ارزشیابی این آزمون و مقایسه آن با سایر روشهای متداول سرم شناسی (رایت) تهیه شده و در ایستگاه تحقیقات پزشکی اصفهان بمرحله اجرا درآمد. اصول این آزمایش مانند سایر آزمونهای سرو آگلوتیناسیون بر پایه مشاهده پادتن IgG قرار گرفته 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) در صورتیکه در کارت تست روش کار خیلی ساده است و در چند دقیقه (حداکثر ۱۰ دقیقه) نتیجه آزمون معلوم میگردد.

باید دانست، بطور کلی آزمونهای سرم شناسی که برای تشخیص بروسلوز بکار میروند بخاطر پدیده‌های مختلف زیر همیشه نتیجه قاطع ندارد ولی روی هم رفته از نظر پاراکلینیک کاملاً با ارزش میباشد.

۱- پدیده ماقبل منطقه

1- Prezone

۲- وجود پادتن‌های بلو که کننده

2- Blocking antibodies

۳- وجود پادتن‌های غیر اختصاصی

3- Non-specific antibodies

۴- وجود پادتن‌های متقاطع

4- Cross-reaction antibodies

۵- پادتن‌های غیر قابل آگلوتیناسیون

5- Non-agglutinating antibodies

۶- پادتن‌های ناقص

6- Incomplete antibodies

همچنین مهارت و دقت عمل کارکنان آزمایشگاه و نقص

تجهیزات آزمایشگاهی در نتیجه گیری دخالت دارند.

بررسی نزد ۲۳۸ بیمار مشکوک به تب مالت انجام گردید

این بیماران عبارت بودند از:

- بیمارانی که توسط پزشکان و مراکز درمانی شهر اصفهان

به آزمایشگاه مرکزی بهداشت هدایت شده‌اند.

- بیماران بستری شده در بیمارستان امین اصفهان.

- موارد مشکوک به بروسلوز که در منطقه آلوده اصفهان

(قریه رهنان) که توسط گروه مطالعاتی ایستگاه تحقیقات پزشکی

تحت بررسی قرار گرفته‌اند (دکتر اورنگ و همکاران ۱۳۴۸).

*- این مطالعات با استفاده از طرح عمرانی ۶۱۹۱ دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی در ایستگاه تحقیقات

بهداشتی اصفهان انجام شده است.

** - اپیدمیولوژیست - دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه تهران

*** - مشاور سازمان خواربار و کشاورزی جهانی در اداره کل دامپزشکی ایران

روش بررسی شامل:

۱- نمونه برداری - از خون بیماران جهت آزمونهای مختلف سرم شناسی از هر بیمار مشکوک حدود ده سانتیمتر مکعب خون از ورید گرفته شده که حدود ۵ سانتیمتر مکعب آن برای کشت و بقیه برای آزمونهای سرم شناسی بکار رفته است.

۲- کشت خون:

نمونه خون را با شرایط کاملاً استریل داخل محیط کشت بروسلا (Tripticase soy) نموده سپس در مجاورت هوا و در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد بمدت هفت روز نگهداری و جهت تفکیک (Identification) بروسلا از سایر میکروبها از این محیط کشت برداشت نموده روی محیط تریپتوز آگار (Tryptose agar) داخل ظرف پتری تجزید کشت بعمل آمد.

پس از اینکه مدت سه روز داخل انکو با تور نگهداری میشد پرکندههای محیط کشت را توسط تابش نور غیر مستقیم (زاویه تابش ۴۵ درجه بوده است) زیر ذره بین بررسی نموده و موارد مثبت جهت تأیید به آزمایشگاه رفرانس بروسلا (تهران - بیمارستان نجات) ارسال میگردد (کلیه موارد مثبت مورد تأیید آزمایشگاه مزبور بوده است) و چنانچه از نظر بروسلا منفی بود مدت ۴ روز دیگر نگهداری و پس از بررسی مجدد بدور انداخته می شد.

۳- آزمون رایت:

برای جلوگیری از اشتباه و انحراف این آزمایش به سه طریق انجام گرفته است شامل:
رایت معمولی (بعد از ۲۴ ساعت) - رایت با سانتیفریوژ - رایت سریع

۱-۳- رایت معمولی:

آنتیژن این آزمون محصول انستیتورازی حصارک و از کشت بروسلا آبورتوس (B. abortus) می باشد که با روش Weybridge alton and James, 1967 استاندارد شده است، این آنتیژن بنظرت ۴۵ درصد بوده و در موقع مصرف به نسبت يك پنجاهم ($\frac{1}{50}$) رقیق گردیده است.

روش کار - شش لوله آزمایش کوچک (لوله همولیز) برداشته در لوله اول ۱۰ سانتیمتر مکعب سرم بیمار را مخلوط با يك و نه دهم (۱۰۹) سانتیمتر مکعب سرم فیزیولوژیک فنل دار (۵۰۰ در سد) داخل مینمائیم در پنج لوله بقیه از سرم فیزیولوژیک فنل دار بمقدار ۵۰ سانتیمتر مکعب میریزیم از لوله اول پس از آنکه

۱ - اصطلاح آنتی کورهای ناقص توسط آقای دکتر نظری با اصطلاح آنتی کورهای ناکامل تصحیح شده است.

يك سانتیمتر مکعب از محلول را بدور ریختیم مقدار ۵۰۰ سانتیمتر مکعب داخل لوله دوم و از لوله دوم همین مقدار برداشته داخل لوله سوم و تا لوله آخر این عمل ادامه می یابد و در نتیجه محلول داخل لولهها به نسبت $\frac{1}{20}$ و $\frac{1}{40}$ و $\frac{1}{80}$ و $\frac{1}{160}$ و $\frac{1}{320}$ و $\frac{1}{640}$ رقیق شده است.

سپس بهر يك از این لولهها ۰۵ سانتیمتر مکعب آنتیژن اضافه کرده و لولهها را بمدت ۲۴ ساعت در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد داخل انکو با تور نگهداری و در صورت آگلوتیناسیون تیترا آنرا بر حسب رقت محلول میخوانیم.

۳-۲- رایت با سانتیفریوژ

این آزمون مانند رایت معمولی انجام گرفته منتهی بعد از اینکه از انکو با تور خارج نمودیم بمدت ده دقیقه با دور ۳۰۰۰ در دقیقه سانتیفریوژ مینمائیم تا در صورتیکه پادتن از نوع ناقص یا غیر قابل آگلوتیناسیون (Non-agglutinating or incomplete antibodies) باشد تشخیص داده شود. با این روش اکثراً تیترا آگلوتیناسیون نسبت برایت ساده رقم بالاتری را نشان داده است.

۳-۳- رایت سریع

این آزمون بدون گذاردن در انکو با تور همانند آزمونهای بالا انجام گردید.

بایستی توجه داشت که با آزمون کومس رایت و رایت سریع با سانتیفریوگاسیون و بهتر از اینها با آزمون ایمونوفلوئورسانس نتیجه قاطع تری بدست می آید زیرا که این آزمونها اسپسیفیک بوده و موارد آنتی کورهای ناکامل و غیر قابل آگلوتینه را مشخص مینماید. در این آزمونها سرم مبتلایان به سل و سرطان و مالاریا و روماتیسم حاد مفصلی و سپتی سمی و غیره همیشه منفی بوده است. (مطالعات دکتر نظری سال ۱۳۳۹)

۴- کارت تست (Brucellosis card test)

وسائلی که جهت این آزمون لازم است در جمیع مقوایی کوچکی قرار دارد و شامل وسایل زیر میباشد: شکل (۱)

- کارت مخصوص جدا کردن سرم

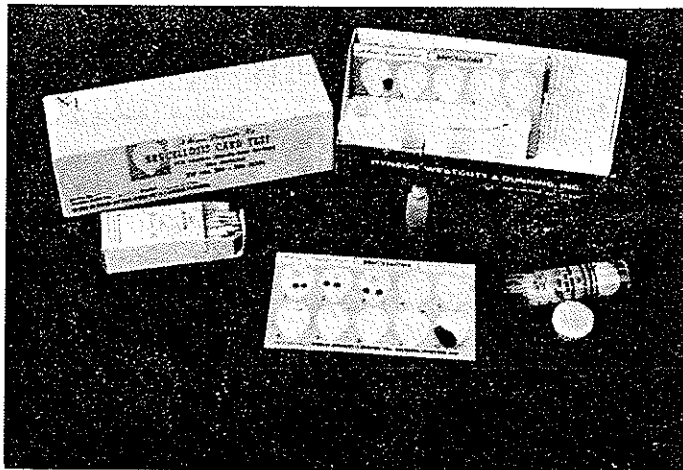
- آنتیژن

- کارت مخصوص آگلوتیناسیون

- واکسینوستیل استریل

- لوله مؤئینه

پوار کوچک مخصوص لوله موئینه



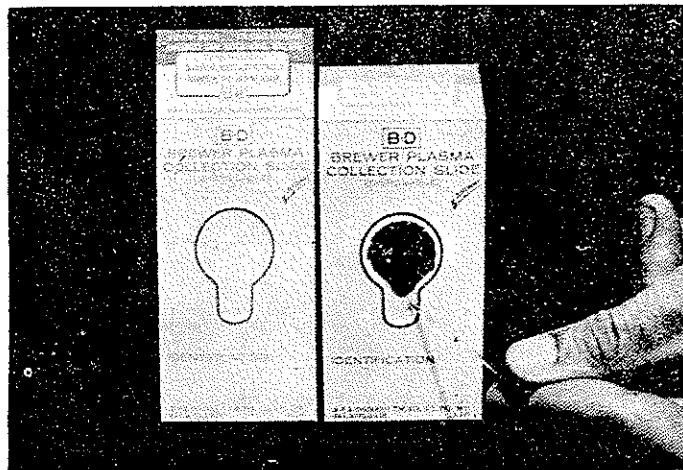
شکل (۱): وسایل کلی کارت تست

۴-۱- کارت مخصوص جدا کردن پلاسما (شکل ۲)

این کارت بنام Brewer plasma collection slide نامیده میشود طول این کارت پنج اینچ و عرض آن ۱/۲ اینچ میباشد که توسط کارخانه Section, Dichenson and company ratherford. N. J., U. S. A. ساخته شده است. در وسط این کارت گودی مخصوصی قرار دارد که کف آنرا آغشته به لاکتین و یا فیتوهم آگلوتین (Phytohemagglutine) نموده اند. ابتدا انگشت بیمار را توسط سوزن (لانست) سوراخ نموده مقدار سه الی پنج قطره خون در وسط فرو رفتگی داخل کارت قرار میدهند سپس با حرکت دورانی کارت، خون به سطح 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 کوچکی است که انتهای آن پوار کوچکی قرار میدهند و تا حد مدرج دارای گنجایش یک قطره (قطره اشک) میباشد، سرم با خاصیت لوله‌های موئینه بالاآمده تا خط مدرج سپس با فشار دادن پوار انتهایی روی گودی کارت مخصوص آگلوتیناسیون تخلیه می‌نمایم.



شکل (۲): کارت مخصوص جدا کردن پلاسما

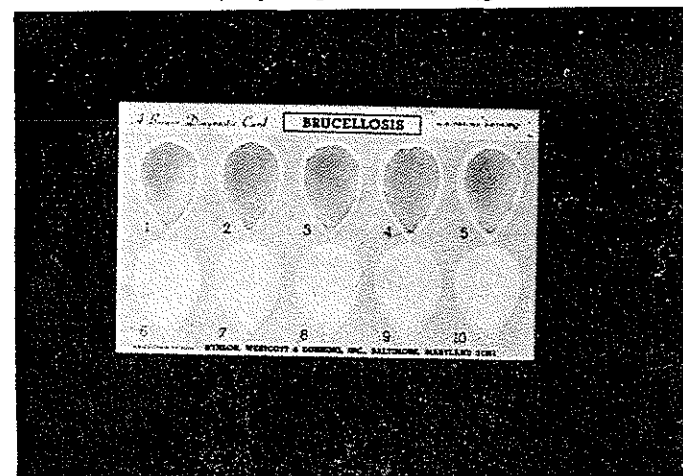
۴-۳- آنتی‌ژن:

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

آنتی‌ژن دارای PH اسید و بوسپله روز بنگال (Rose Bengal) برنگ قرمز نارنجی درآمده است.

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 بانسازده یک قطره اشک روی کارت آگلوتیناسیون قرار داده سپس دو قطره آنتی‌ژن در مجاورت سرم (یا پلاسما) قرار میدهم توسط سیخک چوبی آنرا مخلوط نموده و حرکت دورانی میدهم در صورتی که پادتن بحد کافی در پلاسما (یا سرم) باشد آگلوتیناسیون حداکثر پس از ۴ دقیقه صورت خواهد گرفت. (آگلوتیناسیون پس از چهار دقیقه را منفی بحساب می‌آورند).



شکل (۳): کارت مخصوص آگلوتیناسیون

نتیجه:

مجموعاً ۲۳۸ بیمار مشکوک به تب مالت بررسی شدند. از این تعداد ۵۷ نفرشان (۲۳٫۵ درصد) در آزمایش رایت ساده دارای تیترا آگلوتیناسیون $\frac{1}{80}$ به بالا مثبت بوده و ۷ نفر که دارای تیترا آگلوتیناسیون $\frac{1}{40}$ بودند جز موارد مثبت محسوب

نگردیدند .

استاندارد فرض کنیم ضریبهای Validity کارت تست بقرار زیر خواهند بود .

$$\text{Sensitivity} = \frac{56}{57} \times 100 = 98.4\%$$

$$\text{Specificity} = \frac{181}{182} \times 100 = 99.45\%$$

رقم ۹۸ درصد Sensitivity و ۱۰۰ درصد در Specifcity نشان میدهد که این آزمون از نظر مطالعات اپیدمیولوژیک کاملاً با ارزش میباشد منتهی بایستی توجه داشت که چون تعداد موارد مطالعه شده کم است (۲۳۸ نفر) ضریبهای محاسبه شده ممکن است دقت خیلی زیاد نداشته باشد و با ادامه مطالعات معلوم شود که ضریبهای Validity این تست مختصری کمتر از این ارقام است .

نکته قابل ذکر این است که در مواردی که تیتراژ آگلوتیناسیون یک چهارم ($\frac{1}{4}$) به پایین است کارت تست جواب منفی داده و این امر نشان میدهد که پادتن در خون بایستی بحد معینی باشد ($\frac{1}{8}$ به بالا) تا نتیجه کارت تست مثبت گردد (علت مقایسه کارت تست با آزمون رایت معمولی بخاطر اینست که در اکثر آزمایشگاهها آزمایش رایت معمولی متداول بوده و هنوز هم ارزش خود را از دست نداده است) نتایج این بررسی نشان میدهد که جوابهای بدست آمده با کارت تست مشابه سایر آزمونهای سرولوژیک است و ضمناً بخاطر سهولت عمل، جهت بررسیهای اپیدمیولوژیک بروسلوز وسیله با ارزشی میباشد .

خلاصه

مقایسه کارت تست و آزمایش رایت که روی ۲۳۸ بیمار مشکوک به بروسلوز بعمل آمده نشان داده است که هر دو آزمایش دارای نتایج مشابه بوده با این تفاوت که در مواردیکه تیتراژ آگلوتیناسیون از یک چهارم ($\frac{1}{4}$) کمتر بوده نتیجه کارت تست منفی شده است بهر حال بخاطر سهولت عمل در مطالعات اپیدمیولوژیک بروسلوز، کارت تست، آزمون بسیار با ارزشی میباشد .

از موارد مثبت ۲۴ نفر زن (۴۲ درصد) و ۳۳ نفر مرد (۵۸ درصد) میباشد .

از ۵۷ مورد بیماری که سروآگلوتیناسیون آنها مثبت بود کشت خون ۱۶ نفر مثبت شد (۲۸ درصد) تمام موارد مثبت بروسلا ملیتینسیس (*B. melitensis*) بوده است [بایستی توجه داشت چون کشت در محیط هوای آزاد آنکو با تور صورت گرفته احتمالاً این مسئله سبب رشد نکردن سروتیپهای دیگر شده است و بسبب طول مدت بیماری و اینکه اکثر بیماران قبلاً آنتی بیوتیک مصرف نموده (۷۰ درصد) بودند رقم رشد بروسلا پائین میباشد].

از ۵۷ مورد سروآگلوتیناسیون داخل لوله مثبت (رایت مثبت) ۵۶ نفرشان دارای کارت تست مثبت و منحصرأ یک مورد با تیتراژ ($\frac{1}{80}$) کارت تست خیلی ضعیف نشان داد (کشت مثبت بود) کلیه مواردیکه تیتراژ آگلوتیناسیون آنها یک چهارم ($\frac{1}{4}$) بود کارت تست منفی داشتند .

جدول مقایسه نتایج آزمون رایت معمولی با کارت تست

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

بحث

مقایسه کارت تست و آزمون رایت (جدول بالا) نشان میدهد که این دو آزمایش نتیجه مشابه داشته است بدین ترتیب که اگر تست سروآگلوتیناسیون رایت را برای تشخیص بروسلوز

۱ - چنانچه عامل بیماری ملیتینسیس باشد احتمال رشد بروسلا از کشت خون در بدو بیماری (مرحله حاد) بیش از مرحله اذمان بیماری است .

REFERENCES:

- 1- Nicoletti. P. and Amini. H., *Canad. J. Public. Health.*, 62 , 320, 1971 .
- 2 - Nicoletti. P. *Amer. J. Veter. Med. Assoc.*, 151 : 1778, 1967.
- 3 - Alton. GH. and Jones. *WHO. Monogr. Ser.*, 35 : 43, 1967.
- 4- Castaneda. H. *Bull. WHO.*, 24 : 78, 1961.
- 5- Oranguc. 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.