عنوان دوره آموزشی :

اصول و روش‌های تشخیص آزمایشگاهی بروسلا

بهار ۱۳۹۹

گروههای هدف:

تکنسین ،کاردان ، کارشناس و کارشناس ارشد علوم آزمایشگاه تشخیص طبی

اهداف آموزشی

هدف کلی : افزایش دانش و آگاهی کارکنان آزمایشگاهها در خصوص روش‌های تشخیص آزمایشگاهی بروسلوز

روش و نحوه اجرای آموزشی

کتابخوانی

مدت دوره آموزشی: ۱۰ ساعت

ارزشیابی : در پایان دوره به منظور ارزیابی میزان حصول موفقیت و دستیابی به اهداف آموزشی و بررسی آگاهی، نگرش و عملکرد آموزش‌گیرندگان و بهبود مستمر فرایند یک ارزشیابی از شرکت‌کنندگان به‌صورت آزمایش‌های چهارگزینه‌ای به عمل خواهد آمد.

بسم الله الرحمن الرحیم

فصل اول:

مقدمه و تاریخچه

مقدمه:

بروسلوزیس یا تب مالت بیماری یک بیماری عفونی است که به‌وسیله باکتری‌هایی از جنس بروسلا ایجاد می‌شود. این بیماری بسیاری از گونه‌های پستانداران را تحت تأثیر قرارداد و قابل‌انتقال به انسان است، بنابراین تأثیر مهم اقتصادی و اجتماعی زیادی دارد عفونت در انسان در اثر تماس با حیوانات آلوده یا مصرف فرآورده‌های دامی بخصوص شیر و مواد لبنی غیرپاستوریزه و تماس با لاشه‌ی حیوانات آلوده ایجاد می‌گردد.

بروسلوزیس اساساً بیماری حیوانات(مخصوصاً دام‌های اهلی)است و انسان به‌عنوان میزبان اتفاقی میتواند دچار عفونت با باکتری بروسلا شده و به بیماری تب مالت مبتلا گردد. اصطلاح«تب مالت»برای حیوانات بکار نمی‌رود و انحصاراً اشاره به بروسلوزیس در انسان دارد.

نام دیگر بروسلوزیس در دام‌ها« بیماری سقط‌جنین واگیر» یا «بیماری بانگ» هست (به‌افتخار آقای دکتر بانگ دامپزشک دانمارکی) .

انتقال بیماری از انسان به انسان نادر است، ولی انتقال از راه شیر مادر به نوزاد، پیوند اعضاء و انتقال خون گزارش‌شده است. میزان بروز بیماری در انس آن‌ها نشان‌دهنده گسترش بیماری در حیوانات آن جامعه است یعنی هرچه میزان شیوع بیماری در دام‌ها بیشتر باشد افراد بیشتری دچار آلودگی و بیماری شده و این خود موجب افزایش هزینه‌های درمانی و ناتوان نمودن افرادی مانند دامپروران، دامداران و دامپزشکان می‌گردد.

بیماری توسط کوکوباسیل های گرم منفی، هوازی مطلق و کند رشد ایجاد می‌شود این باکتری‌ها فاقد کپسول و اسپور بوده و بی‌حرکت می‌باشند بروسلاها برای حیوانات اهلی مانند بز، گوسفند، گاو، خوک بیماریزا بوده و در حیوانات آلوده موجب سقط‌جنین و آلودگی غدد شیری حیوان شده و تا سال‌ها از طریق شیر حیوانات منتقل می‌شوند.

بروسلاها باکتری‌های بیماریزایی اختیاری داخل سلولی بوده و پاسخ به بروسلوزیس به‌واسطه‌ی سیستم ایمنی سلولی صورت می‌گیرد و به همین دلیل باکتری می‌تواند از سیستم ایمنی هومورال فرار کند.

باکتری نسبت به سرما مقاومت نسبی داشته و در آب‌وخاک و محل تاریک و مرطوب به مدت ۲ تا ۳ ماه و در ترشحات خشک ناشی از سقط و لاشه‌ی حیوانات و گوشت در یخچال زنده می‌ماند.

بیماری در حیوانات موجب مرگ و سقط‌جنین و کاهش وزن گردیده و زی آن‌های اقتصادی مهمی درزمینهٔ ی تولید گوشت و شیر ایجاد می‌کند همچنین نازایی در حیوانات آلوده شایع هست.

در سطح جهانی، اکثر موارد بروسلوز انسانی درنتیجه بروسلا ملی تنسیس اتفاق افتاده که مهاجم‌ترین و بیماری‌زاترین گونه در بین گونه‌های جنس بروسلا هست.

معمولاً" عفونت ناشی از بروسلا آبورتوس در انسان خفیف‌تر بوده و بروسلا کنیس کمترین تهاجم را از بین چهار گونه برای انسان دارد و بروسلا سوئیس بیماریزایی زیادی داشته و غالباً" عوارض شدیدی چون آبسه‌های بافتی عمقی را موجب می‌گردد.

عفونت‌های انسانی ناشی از باکتریهای بروسلا همیشه بیش از موارد مبتلا با علائم بالینی هست. نسبت موارد بدون علامت به بالینی بروسلوز ممکن است ۸ به ۱ و یا بالاتر باشد .به علت عدم وجود اطلاعات کافی از وقوع بیماری در انسان و حیوانات در بسیاری از کشورها، یا به دلیل فقدان تسهیلات تشخیصی و گزارشی، تخمین دقیق از میزان شیوع بروسلوز در سطح جهانی وجود ندارد .علاوه بر این، بسیاری از موارد بروسلوز در انسان خفیف بوده یا با تظاهرات بالینی غیرمعمول همراهی شده که به‌درستی تشخیص داده نمی‌شود .

اکثر بیماران مبتلابه بروسلوز علائم غیراختصاصی ناراحتی سیستم عصبی، چون سردرد، رخوت، افسردگی نشان می‌دهند. مشخص‌ترین و شناخته‌شده‌ترین سندرم بروسلوز عصبی، مننژیت با و یا بدون تغییر در آگاهی و درنتیجه تهاجم مستقیم بروسلوز به سیستم اعصاب مرکزی(CNS)هست. درگیری مستقیم نخاع شوکی عارضه غیرمتداول بروسلوز است، عوارض دیگر بروسلوز درنتیجه درگیری دیگر بافت ها چون دریچه‌های قلبی، استخوان‌ها و مفاصل اتفاق می‌افتد. بروسلوز انسانی با شکایات غیراختصاصی، چون درد پشت و دردهای مفصلی مشابه تب روماتیسمی مشخص می‌گردد. درگیری کبد در بروسلوز در مراحل ابتدایی وجود دارد و غیرطبیعی بودن نمونه کبد پس از مرگ ثابت‌شده است.

بیماران مبتلابه بروسلوز، باکتری را از طریق ادرار دفع نموده، که ممکن است مدت زیادی بعد از برطرف شدن علائم بالینی طول بکشد. اندوکاردیت عفونت ناشی از بروسلا نادر بوده. اما عارضه بالقوه کشنده‌ای است .

در سال ۱۸۹۷ ، Hughes انتقال بروسلوز را از طریق هوای آلوده با باکتریهای موجود در خاک آغشته به مدفوع حیوانات عفونی پیشنهاد نمود. در زمان شرح اولیه بیماری در انسان، دستگاه گوارش به‌عنوان راه ورود بروسلا شناخته‌شده است. شیر آلوده حیوانات و فرآورده‌های غیرپاستوریزه تهیه‌شده از آن متداول‌ترین منشاء انتقال دهانی بروسلا بوده، هرچند که گوشت خوب پخته نشده نیز به‌عنوان منشاء بالقوه بروسلوز غذایی ذکرشده است. آلودگی از طریق پوست روش متداول عفونت با بروسلا بوده، هرچند که تظاهرات پوستی اتیولوژی و بروسلوز کمیاب هستند. انواع ضایعات چشمی در بیماران مبتلابه بروسلوز توصیف‌شده اما غالباً رابطه آنها با عفونت بروسلا مبهم است.

کنترل بروسلوز به حذف و ریشه‌کنی بیماری به منشاء آن، یعنی حیوانات وابسته است .

سازمان دامپزشکی کشور به‌عنوان متولی اصلی طی سالیان متمادی برنامه مبارزه با بروسلوز را در قالب طرح‌های ملی مبارزه با سل و بروسلوز در دستور کار داشته است. امکانات و منابع موجود برای اجرای مبارزه با بروسلوز دامی در حدی است که تنها می‌توانند با حفظ وضع موجود به فعالیت‌های خود ادامه دهند و امکان توسعه فعالیت‌ها برای هدف حذف و ریشه‌کنی بیماری در حال حاضر میسر نخواهد بود که دلایل آن شامل موارد زیر است:

- ✓ پایین بودن میزان اعتبارات و منابع موردنیاز طرح مبارزه با بروسلوز در اجرای برنامه‌های واکسیناسیون دامی، آزمایش و کشتار و پرداخت غرامت به صاحبان دام .
- ✓ کم‌توجهی به برنامه‌های مبارزه با بیماری‌های قابل‌انتقال بین انسان و حیوان در مجموعه اولویت‌ها و سیاست‌های مسئولین ذیربط.
- ✓ ناکافی بودن همکاری سایر سازمان‌ها در اجرایی شدن اهداف کنترل و پیشگیری بیماری.
- ✓ ناکافی بودن همکاری رسانه‌های همگانی در ارتقاء آگاهی جامعه

تاریخچه:

برای اولین بار در سال ۱۸۶۲ نوکاردیا توانست باکتری را در جنین مرده‌ی گاو نشان دهد در سال ۱۸۶۳ مارستون شرح کاملی از بیماری را در انسان بیان نمود. در سال ۱۸۸۷دیوید بوروس (David Bruce) پزشک انگلیسی باکتری مولد بیماری را از طحال یکی از بیماران که به علت تب مالت درگذشته بود، در جزیره مالت جدا نمود به دلیل اینکه نام قدیمی جزیره‌ی مالت، ملی تین بود او نام باکتری را میکروکوکوس ملی تن سیس M.melitensis نامید.

در سال ۱۸۹۷ بانک (Bang) توانست باکتری را از ترشحات واژن گاوهایی که سقط‌جنین نموده بودند، جدا نماید و آن را به نام بروسلا آبورتوس (B.abortus) نامید. در همین سال هاگز (M.Louis Hughes) این بیماری را به نام تب مواج (Undulant fever) نامید و رایت (Almroth Wright)و همکارانش آزمایش آگلوتیناسیون سرم را توصیف نموده که فرم اصلاح‌شده آن به‌عنوان متداول‌ترین روش برای تشخیص بروسلوز شناخته‌شده است.

در سال ۱۹۰۵ زامیت باکتری را از شیر بزهای جزیره‌ی مالت به دست آورد و ثابت کرد که بیماری از طریق بزهای آلوده به انسان انتقال می‌یابد.

تروم (Traum) در سال ۱۹۱۴ در ایالات‌متحده بروسلا سوئیس B.Suis را از خوک ماده‌ای که سقط‌جنین نموده بود جدا کرد.

در سال ۱۹۲۰ آلیس اوانس (Alice Evans) ثابت نمود که عامل سقط‌جنین خوک و گاو ازنظر خصوصیات بیولوژیکی و سرولوژیکی با ملی تن سیس قرابت دارد .

بین سالهای ۱۹۳۴-۱۹۳۱ تامسن (thomsen) در دانمارک نمونه‌های بروسلا سوئیسی جدا نمود که از برخی جهات به نمونه‌های به‌دست‌آمده از خوک‌ها در امریکا تفاوت داشت. انواع به‌دست‌آمده از کشور امریکا در نقاط مختلف اروپا، برزیل، استرالیا و آرژانتین نیز مشاهده می‌شود.

در سال ۱۹۴۳ ، Forrest Huddleson میکروبیولوژیست دامپزشکی در دانشگاه ایالت میشیگان، بروسلا ملی تنسیس را به‌عنوان کوکوباسیل هوازی، گرم منفی و بدون نیاز به گاز CO_2 جهت جداسازی اولیه توصیف نمود.

در سال ۱۹۵۳ بروسلا اویس (B.ovis) از گوسفند و در سال ۱۹۷۵ بروسلا نئوتومه (B.neotomae) از موش‌های صحرایی و در سال ۱۹۶۸ بروسلا کانیس (B.canis) عامل سقط در سگ شرح داده شد.

در ایران در سال ۱۹۳۲مصادف با ۱۳۱۱ هجری شمسی از کشت خون انسان، بروسلا ملی تنسیس در انستیتو پاستور ایران جداشده است.

در سال ۱۹۴۴(برابر با ۱۳۲۳ هجری شمسی) از جنین گاو بروسلا آبورتوس در مؤسسه تحقیقاتی واکسن و سرم‌سازی رازی جداشده

در سال۱۹۵۰(۱۳۲۹ هجری شمسی) از شیر بز و گوسفند، بروسلا ملی تنسیس در مؤسسه تحقیقاتی واکسن و سرم‌سازی رازی جدا شد .

در سال ۱۹۷۱(۱۳۵۰ هجری شمسی) بروسلا سوئیس از خوک در مؤسسه تحقیقاتی واکسن و سرم‌سازی رازی جداشده.

انتشار جهانی بروسلوز

تخمین شیوع واقعی بروسلوز انسانی در جهان به علت عدم گزارش کامل بیماری در بسیاری از کشورها، غیرممکن است. این وضعیت برای هر دو گروه کشورهای پیشرفته و درحال‌توسعه صادق هست. باوجودی که بروسلوز گاوی در بسیاری از کشورهای پیشرفته ریشه‌کن شده یا تحت کنترل قرارگرفته، لیکن شیوع آن در بسیاری از کشورهای درحال‌توسعه، علیرغم پیشرفت صنایع شیر با حداقل امکانات دامپزشکی، افزایش‌یافته است. وضعیت مشابهی در سطح محدودتر برای بروسلوز گوسفندی، بزی و خوکی اتفاق افتاده است .با توجه به مخاطره بیشتر در دو نوع اخیر نسبت به عفونت بروسلا آبورتوس برای بهداشت انسانی، درنتیجه افزایش تعداد موارد بروسلوز انسانی در سطح جهان قابل‌تصور است. کشورهای عاری از بروسلوز بر اساس آخرین یافته‌ها در کشورها چنین است:

کشور	سال اعلام ریشه‌کنی	کشور	سال اعلام ریشه‌کنی
جزایر مانش	۱۹۳۵	دانمارک	۱۹۶۲
نروژ	۱۹۵۲	سوئیس	۱۹۶۳
سوئد	۱۹۵۷	چک و اسلواکی	۱۹۶۴
فنلاند	۱۹۶۰	انگلستان و ولز	۱۹۸۱
رومانی	۱۹۶۹	هلند، اتریش،لوکزامبورگ، بلغارستان،ژاپن و قبرس	۱۹۸۵
اسکاتلند	۱۹۸۰	جزایر فارکلند	۱۹۹۴

جدول۱- ریشه‌کنی بیماری تب مالت در کشورهای جهان

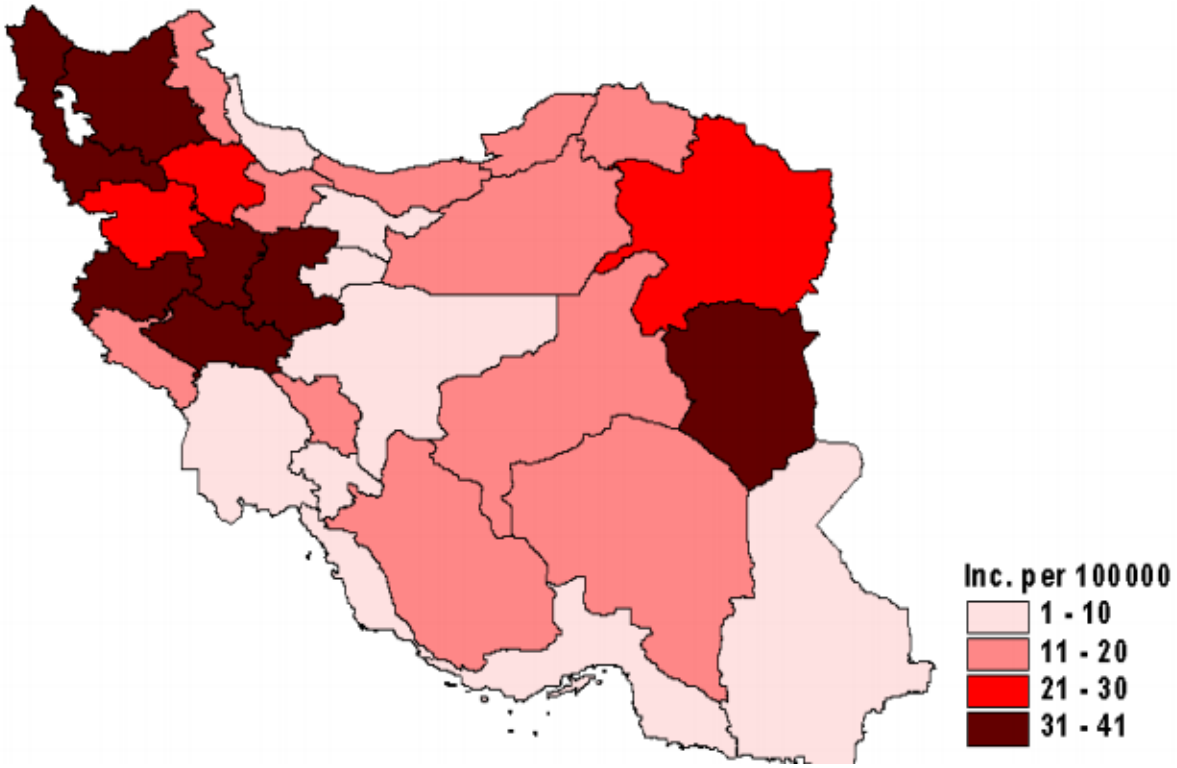
وضعیت بیماری در ایران

تعیین میزان شیوع بیماری تب مالت به دلیل عدم گزارش کامل موارد بیماری مشکل است ولی با وجود سیستم مراقبت، گزارشات جاری می‌تواند مبین روند میزان بروز واقعی بیماری باشد. با بررسی تعداد و میزان بروز بیماری در کشور، بیماری از سال ۱۳۵۹ لغایت ۱۳۶۸ رو به افزایش بوده است و از سال ۱۳۶۸ لغایت ۱۳۸۹ با شروع برنامه‌های اول و دوم توسعه از ۱۷۰ مورد در صد هزار نفر به حدود ۱۵/۹ درصد هزار نفر رسیده است رو به افزایش بیماری از سال ۱۳۷۸ لغایت و به دنبال ارتقاء سیستم مراقبت و گزارش دهی بیماری روند نسبتاً ۱۳۸۴وجود داشته است و از سال ۱۳۸۵ به دنبال موفقیت در افزایش پوشش واکسیناسیون دام‌ها روند بیماری رو به کاهش بوده است .

ایجاد هماهنگی بین بخشی، استاندارد کردن تعاریف بیماری، آموزش جامعه و کارکنان بهداشتی، افزایش گزارش دهی، افزایش کارخانجات تولید فرآورده‌های لبنی پاستوریزه، افزایش پوشش واکسیناسیون دامی از در انسان می‌باشند . عوامل مؤثر در کنترل و پیشگیری بیماری در دام و نهایتاً" در انسان می‌باشند.

پراکندگی بیماری در کشور در سال ۸۹

- استان‌های با آلودگی بسیار بالا (میزان بروز ۴۱-۳۱): آذربایجان شرقی، همدان، لرستان، مرکزی، خراسان جنوبی، آذربایجان غربی و کرمانشاه .
- استان‌های با آلودگی بالا(میزان بروز ۳۰-۲۱): خراسان رضوی، کردستان و زنجان .
- استان‌های با آلودگی متوسط (میزان بروز ۲۰-۱۱): گلستان، ایلام، قزوین، چهارمحال و بختیاری، سمنان، اردبیل، کرمان، مازندران، خراسانشمالی، فارس و یزد .
- استان‌های با آلودگی پایین (میزان بروز ۱۰-۰) : خوزستان، کهگیلویه و بویراحمد، اصفهان، سیستان و بلوچستان، قم، گیلان، هرمزگان، تهران، البرز، بوشهر .



شکل ۱- پراکندگی بیماری در کشور در سال ۸۹

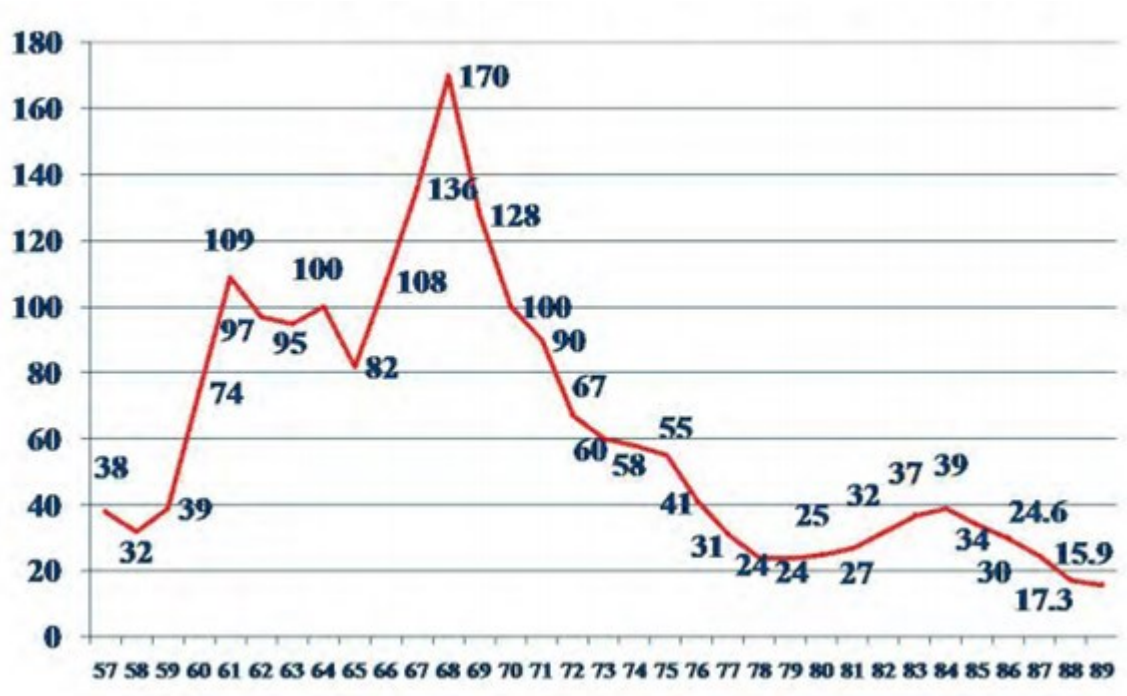
بیماری در تمامی سنین وجود دارد ولی وفور آن در سنین ۳۰-۲۰ سالگی می‌باشد، یعنی نیروی فعال و کارآمد کشور در معرض خطر این بیماری هستند.

بیماری در هر دو جنس دیده می‌شود ولی با اختلاف کمی در جنس مذکر(۵۵/۴ درصد) بیشتر از جنس مؤنث (۴۴/۶ درصد) دیده می‌شود.

بیماری را نمی‌توان انحصاراً یک بیماری شغلی محسوب نمود ولی شغل به‌عنوان یک عامل خطر در ابتلا به بیماری به‌عنوان دامدار و کشاورز مطرح است بخصوص نزد خانم‌های خانه‌دار (خانم‌های خانه‌دار عمدتاً همسرانشان در مناطق روستایی به فعالیت می‌پردازند) ، دامداران و کشاورزان .

بیماری در تمام فصول وجود دارد اما در فصل بهار و تابستان هم‌زمان با فصل زایش و شیردهی دام‌ها بیشتر دیده می‌شود.

بیماری در منطقه روستایی (۷۷ درصد) بیشتر از منطقه شهری (۲۳درصد) می‌باشد که مرتبط با تماس بادام آلوده و استفاده از فرآورده‌های لبنی غیرپاستوریزه در مناطق روستایی هست.



شکل ۲- میزان بروز بیماری تب مالت کشور از سال ۱۳۵۷-۸۹

عامل بیماری:

عاملی بیماری بروسلوزیس (بیماری تب مالت)یک کوکوباسیل گرم منفی از جنس بروسلا هست بروسلاها باسیل‌های گرم منفی، کوچک، هوازی و غیر متحرّکی هستند که فاقد کپسول و اسپور، می‌باشند. رشد آن‌ها کُند است ولی در محیط کشت Brucella Broth در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد وPH =7/6به نحو مطلوبی رشد می‌نمایند. گونه‌های بروسلا در محیط کشت جامد، معمولاً به‌صورت کلنی‌های صاف، شفاف، آبی متمایل به سفید تا کهربائی، رشد می‌کنند. البته رشد بروسلا کنیس و بروسلا اوویس، به‌صورت کلنی‌های خشن و گاهی موکوئیدی می‌باشد.

گونه‌های بروسلا می‌توانند در گوشت یخزده، به مدت سه هفته، در شیر خام به مدت ۱۰ روز، در پنیر تازه تا سه ماه و در بستنی و خامه نیز تا مدتی زنده بمانند و در گوشت نمک‌زده نیز ممکن است تا مدتی مقاومت کنند ولی از طرفی به‌وسیله دود دادن، منجمد کردن و نمک زدن گوشت آلوده، تعداد آن‌ها در عرض چند روز، شدیداً کاهش می‌یابد. این ارگانیسم‌ها در حرارت ۶۰ درجه سانتی‌گراد یا در اثر مجاورت با فنل ۱٪ در عرض ۱۵ دقیقه از بین می‌روند ولی در طبیعت می‌توانند تا مدت‌ها زنده بمانند.

نور آفتاب به‌سرعت، باعث مرگ آنها می‌شود، شیره طبیعی معده در شرایط آزمایشگاهی، باعث کشته شدن بروسلاها می‌گردد و بنابراین بسیاری از بیماران مبتلابه بروسلوز فعال، گروهی هستند که دچار کاهش اسید معده می‌باشند و

یا به علت ابتلاء به زخم معده، از آنتی‌اسیدها استفاده می‌نمایند و لذا کسانی که آنتی‌اسید مصرف می‌کنند بایستی از خوردن شیر خام، پنیر تازه، بستنی غیرپاستوریزه و سایر لبنیات پاستوریزه نشده، خودداری نمایند.

طبقه‌بندی بروسلاها:

بروسلاها بر اساس میزبان طبیعی، احتیاج به Co2 حساسیت به غلظت مختلف رنگ‌های تیونین، فعالیت اوره آزی، تولید H2s و لیز توسط فاژها از همدیگر و سایر باکتری‌ها جدا می‌شوند. این باکتری‌ها از حیث تولید گاز منفی بوده ولی نیترات مثبت هستند و ازنظر مقاومت به اسید و حرارت و پاستوریزاسیون حساس می‌باشند.

باکتری بر اساس فعالیت متابولیکی و آگلوتیناسیون به‌وسیله‌ی آنتی سرمهای اختصاصی به گونه‌های مختلفی تقسیم‌بندی می‌شوند اساس این تقسیم‌بندی توسط هودلسون (Huddleson) صورت گرفته است.

۱. بروسلا ملی تنسیس(Melitensis Brucella): شامل ۳ بیوتیپ هست.

میزبان طبیعی آن بز و گوسفند بوده و این‌گونه عامل اصلی بروسلوزیس در ایران بوده و اکثر موارد بروسلوزیس را شامل می‌شود. اکثر موارد عفونت بروسلا ملی تنسیس در ارتباط با تماس مستقیم و غیرمستقیم با گوسفند یا بز آلوده و یا فرآورده‌های آنها هست. مطابق تعداد موارد گزارش‌شده و همچنین در ارتباط با شدت بیماری، بروسلا ملی تنسیس مهم‌ترین عامل بروسلوز انسان بوده، هرچند انتشار جغرافیایی آن محدودتر از بروسلا آبورتوس است. سرو تایپ ۱ بروسلا ملی تنسیس به‌عنوان تایپ بومی ایران شناخته‌شده است.

۲- بروسلا آبورتوس (Abortus Brucella): میزبان طبیعی آن گاو هست و ۹ بیوتیپ دارد. بروسلا آبورتوس کمتر از بروسلا ملی تنسیس برای انسان بیماریزایی بوده و نسبت بیشتری از عفونت‌ها خفیف یا بدون علامت بوده است. گاو مهم‌ترین منشاء عفونت بوده اما دیگر انواع حیوانات مانند گاومیش، شتر و گاو کوهان‌دار تبتی می‌توانند از اهمیت محلی برخوردار باشند. گاهی موارد شیوع عفونت بروسلا آبورتوس در گله‌های گوسفند درنتیجه تماس با گاوهای آلوده اتفاق می‌افتد. بیوتایپ۳ بروسلا آبورتوس به‌عنوان بیوتایپ بومی ایران شناخته‌شده است.

۳- بروسلا سوئیس (Suis Brucella) : دارای ۵ بیوتایپ بوده میزبان طبیعی آن خوک، گوزن، اسب و جوندگان هست. عفونت بروسلا سوئیس انتشار جغرافیایی محدودتر از بروسلا آبورتوس یا بروسلا ملی تنسیس داشته و هر یک از بیوتایپ های آن خصوصیات ویژه‌ای دارند، اکثر عفونت‌های انسانی منتقله از خوک به‌وسیله بایوتایپ های ۱و۳ بروسلا سوئیس اتفاق می‌افتد.

۴- بروسلا کانیس (Canis Brucella) : میزبان اختصاصی بروسلا کانیس سگ است و بیماریزایی کمی برای انسان دارد. موارد بالینی عفونت تشخیص داده‌شده و بررسی‌های سرولوژی مؤید آن است که عفونت‌های بدون علامت انسان در نواحی که بیماری در سگ شایع است، متداول هست.

۵- بروسلا اوویس (Ovis Brucella) : میزبان اصلی آن گوسفند نیوزیلندی است و بیماریزایی آن برای انسان شناخته‌نشده است.

۶- بروسلا نئوتومه (neotoma Brucella) : :معمولاً در جوندگان بخصوص رت های جنگلی ایجاد بیماری می‌کند در یک منطقه جغرافیایی در آمریکا شناسایی‌شده است.

۷- بروسلا ماریس (Maris Brucella) : از برخی گونه‌های پستانداران دریایی جداشده است. در سال ۱۹۹۴ از لاشه‌های پستانداران دریایی در سواحل اسکاتلند و یک دولفین در کالیفرنیا جدا گردید .شواهد مؤید آن است که این باکتری قادر به ایجاد بیماری در انسان هست ازاین‌رو بایستی به‌عنوان عوامل بالقوه عفونت در بیمارانی با تاریخچه تماس با پستانداران دریایی یا نسوج آنها درنظرگرفته شود.

نکته۱: نوع غالب بروسلا در ایران، بروسلا ملی تنسیس هست.

نکته۲ : به سویه‌های غیرقابل آگلوتیناسیون ملی تن سیس، آبورتوس و سوئیس را تحت عنوان پارا ملی تنسیس ، پاراسوئیس و پاراآبورتوس می‌گویند.

مورفولوژی:

باکتری به شکل کوکو باسیل‌های کوتاه به طول ۰/۶ تا ۱/۵ میکرومتر و عرض حدود ۰/۵ تا ۰/۷ میکرومتر هست. در محیط‌های غنی حاوی خون و سرم اشکال بلندتر باسیل مشاهده می‌شود. در محیط مایع بصورت زنجیره‌های کوتاه دیده می‌شود. ملی تن سیس بیشتر بصورت کوکوباسیل و آبورتوس به شکل باسیل‌های کوتاه‌تر دیده می‌شود. پس از رنگ‌آمیزی با روش گرم باکتری بصورت گرم منفی دیده می‌شود ولی اسیدفست نیست.

در صورت استفاده از روش کوستر Koster باکتری در داخل سلول‌ها به رنگ قرمز قابل‌مشاهده است.

متابولیسم بروسلا:

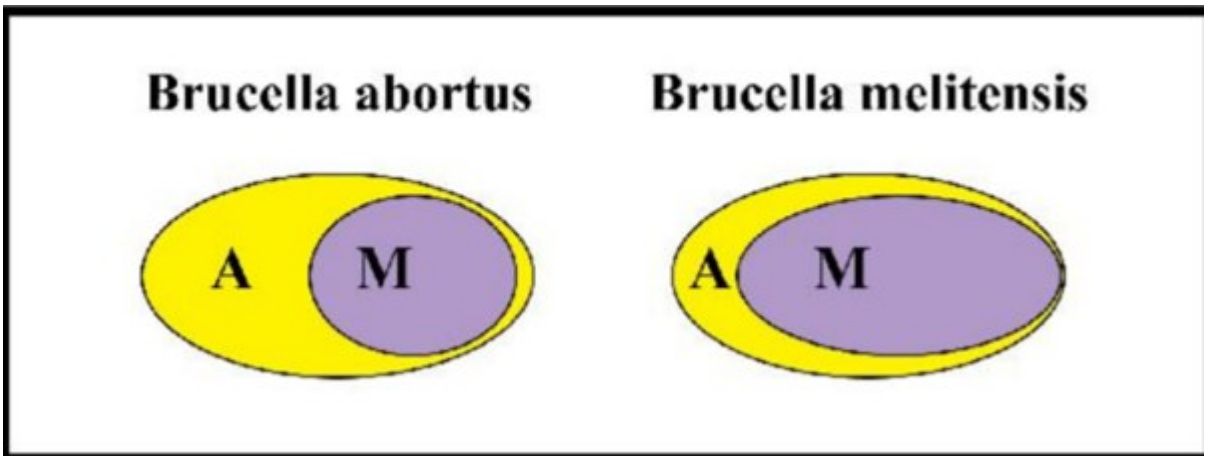
بروسلاها دارای متابولیسم تنفسی بوده و انرژی خود را از راه اکسیداتیو به دست می‌آورند. هوازی مطلق بوده و در غیاب کامل هوا رشد نمی‌کنند. بروسلا آبورتوس و بروسلا اویس برای کشت اولیه‌ی خود احتیاج به وجود ۱۰-۵٪ گاز co2 داشته ولی پس از چند بار کشت این نیاز برطرف می‌شود. باکتری قدرت تخمیری نداشته ولی قادر است برخی از قندها و اسیدآمینه‌ها را اکسیده نماید.

ساختمان آنتی‌ژنتیک:

بر روی سطح بروسلا دو نوع آنتی‌ژن وجود دارد آنتی‌ژن M که قسمت اعظم سطح باکتری در نوع بروسلا ملی تن سیس را می‌پوشاند، در صورتیکه در بروسلا آبورتوس، آنتی زن نوع A در سطح باکتری به مقدار زیاد وجود دارد در نوع بروسلا سوئیس مقدار آنتی‌ژن نوع A بیشتر بوده و به مقدار کمی آنتی زن نوع M نیز دارد.

این شاخص‌های آنتی‌ژنتیکی درواقع قسمتی از کمپلکس لیپوپلی ساکارید و پروتئین دیواره سلولی باکتری است.

توضیح اینکه آنتی‌ژن های M و A در سه گونه اصلی بروسلایی مشترک است به‌طوری‌که در بروسلا آبورتوس، آنتی‌ژن A بیشتر از M هست و در گونه ملی تنسیس آنتی‌ژن M بیشتر از A است. بروسلا سویس نیز ازنظر آنتی‌ژنی شبیه بروسلا آبورتوس است. از طرفی در حال حاضر به‌طورکلی از آنتی‌ژن بروسلا آبورتوس برای تشخیص انواع بروسلوز استفاده می‌شود و غیر از بروسلوز ناشی از گونه آبورتوس در انواع دیگر بروسلوز عیار کمتری را نشان می‌دهد و این در حالی است که اگر از آنتی ژ های اختصاصی گونه‌های دیگر استفاده شود تیترهای بالاتری به دست خواهد آمد.



شکل – ۳ نسبت آنتی‌ژن‌های موجود در سطح بروسلاها

اخیراً نوع دیگری از آنتی‌ژن سطحی دیگر بنام آنتی‌ژن L که مشابه آنتی زن Vi سالمونلا است در بروسلاها نیز یافت شده است. ضمناً در سطح باکتری یک آنتی‌ژن مشترک دیگر بنام (Native Hapten)NH یافت شده و دارای ترکیبات پلی ساکاریدی مانند گلوکز، مانوز و کینوزامین هست.

	AgM	AgA
بروسلا ملی تن سیس	+++	+
بروسلا آبورتوس	+	+++
بروسلا سوئیس	+	++

جدول -۲ نسبت آنتی ژنهای موجود در سطح بروسلا ها

سم(Toxin) :

بروسلاها اگزوتوکسین تولید نمی‌کنند ولی مشابه سایر باکتریهای گرم منفی دارای اندوتوکسین (لیپوپلی ساکارید) می‌باشند. حساسیت فرد نسبت به اندوتوکسین بروسلاها یکی از عوامل مهم در بیماریزایی باکتری است.

بیماریزایی در حیوانات:

گونه‌های بروسلا برای میزبانان اصلی خود نسبت به سایر میزبان‌ها، مسری‌تر می‌باشند. مثلاً بروسلا آبورتوس برای گاوها مسری‌تر است تا نسبت به بزها و انتشار بیماری توسط سایر گونه‌ها کمتر مشاهده می‌شود.

خوکچه‌هندی نسبت به بروسلاها حساسیت بیشتری دارد و تزریق مقدار زیادی باکتری در داخل صفاق موجب مرگ حیوان می‌شود خرگوش حساسیت کمتری نسبت به خوکچه‌هندی داشته و آنتی‌بادی خوبی علیه این باکتری تولید می‌کند. پرندگان به‌طورکلی مقاوم بوده ولی جنین آن‌ها حساس هستند. بروسلا ملی تن سیس برای بز، گوسفند، خوک، شتر و بعضی حیوانات نیمه اهلی دیگر بیماریزایی هست.

بروسلا آبورتوس برای گاو، بوفالو، خوک، اسب، گوسفند، مرغ، خوکچه‌هندی بیماریزایی هست.

بروسلا سوئیس برای گاو، خوک، گوزن شمال، گوز کانادایی، اسب، سگ، مرغ و خروس وحشی بیماریزایی هست ولی برای بز بیماریزایی نیست.

بروسلا کانیس به‌عنوان عامل بیماریزایی مهمی در سگ‌ها شناخته‌شده است.

حیوانات فوق برحسب درجه حساسیت شان به باکتری، علائمی از قبیل تب، بزرگی غدد لنفاوی و سقط‌جنین نشان داده و حتی در برخی موارد هیچ‌گونه علائمی را بروز نمی‌دهند.

راه‌های سرایت بیماری:

انسان به سه طریق بروسلوز را کسب می‌کند:

۱- از طریق مصرف گوشت نپخته، مواد لبنی غیرپاستوریزه

۲- از طریق تماس با بافت ها، خون و سایر مایعات حیوانات آلوده و متعاقب آن ورود ارگانیسم از طریق غشاهای مخاطی، بریدگی و خراش‌ها

۳- استنشاق ارگانیسم بخصوص در هنگام کار در آزمایشگاه

بیماری در میان کسانی که ازنظر شغلی با تهیه گوشت سر و کاردارند مانند قصاب‌ها،دامپروران و دامپزشکان نسبت به سایر افراد بیشتر است.

بیماریزایی:

در داخل بدن باکتری‌ها توسط پلی مورفونوکلئرها (PMN) فاگوسیت شده وزنده می‌مانند لکوسیت ها به‌عنوان حامل عمل کرده و آن‌ها را به بافت های لنفاتیک مختلف مانند کبد، طحال و مغز استخوان منتقل می‌کنند.

نشانه‌ی بارز بروسلوزیس حاد تشکیل گرانولوم ها در داخل بافت های لنفاتیک هست تکثیر باکتری‌ها در داخل ماکروفاژها باعث انباشته شدن و تخریب سلول‌ها می‌گردد و به دنبال آن باکتریمی ایجاد می‌گردد اگر پاسخ ایمنی

سلولی (CMI) برای کنترل بروسلوز کافی نباشد، کبد، طحال و مغز استخوان و ندول های لنفاوی ممکن است به‌طور وسیعی درگیرش‌اند.

در آلودگی به بروسلا سوئیس گرانولوم ها در کلیه ، سیستم اعصاب مرکزی (CNS) بافت های زیر جلدی و بیضه‌ها و تخمدان تشکیل می‌شوند.

علفخواران و نشخوارکنندگان در صورت آلوده شدن اغلب به عفونت جفت مبتلا می‌شوند که باعث سقط سپتیک می‌گردد. درحالی‌که هرگز در عفونت‌های انسانی این حالت مشاهده نمی‌شود . دلیل این امر وجود ماده‌ای بنام اریتریتول است. اریتریتول قندی است که منبع کربن و انرژی برای باکتری‌ها بوده و عامل تسریع‌کننده‌ی رشد و تکثیر باکتری هست. در حالیکه در مایع جفت انسان ماده‌ای بنام اریتروز وجود دارد که برای رشد بروسلاها مناسب نیست.

یافته‌های بالینی:

عفونت با بروسلا ملی تن سیس در اکثر مواقع از بزها کسب‌شده و به سمت عفونت حاد با تظاهرات ناتوان‌کننده بیمار پیش می‌رود. عفونت بروسلا آبورتوس از گاو کسب‌شده و عموماً شدت کمتری نسبت به عفونت‌های بروسلا ملی تن سیس دارد. عفونت بروسلا سوئیس از خوک کسب‌شده و اغلب با تشکیل نکروز پنیری و آبسه‌های متعدد در بافت های لنفاوی مشخص می‌شود.

اشکال بیماری بروسلوزیس:

هرچند دوره‌ی حاد بیماری با نوع گونه‌ی بروسلاهای آلوده‌کننده متفاوت است، ولی در بیشتر از ۸۵٪ بیماران مبتلابه بروسلوزیس، تظاهرات استئوآرتریکولار مانند آرترالژی، آرتریت، اوستئومیلیت، اسپوندیلیت و سارکومیلیت دیده می‌شود.

الف – بروسلوز تحت بالینی (Subclinical): علائم آن شامل خستگی و سردرد بوده و این بیماران سابقه‌ای از تماس با محصولات حیوانی خام یا نشخوارکنندگان دارند.

ب – بروسلوز باکتریمیک : این بیماران یک‌شکل سیستمیک حاد از بیماری را داشته و در اکثر موارد در اثر آلودگی به بروسلا ملی تن سیس بیماری ایجاد می‌گردد. بیماران پس از تماس با حیوانات آلوده بعد از حدود ۳-۲ هفته دچار تب می‌شوند و تب به شکل بالا و پایین‌رونده بوده لذا بنام تب مواج یا Undulant fever نامیده می‌شود.

تظاهرات بیماری شامل سردردهای شدید، استفراغ، ضعف، درد عضلانی شدید و درد در مفصل‌ها، بزرگی طحال و کبد و غدد لنفاوی هست. عفونت‌های چرکی مفصلی و گاها" آسیب کلیه نیز مشاهده می‌گردد.

ج – بروسلوز سرلوژیک: بیمار علائم سیستمیک خفیفی از بروسلوز داشته و فرد دارای سابقه‌ای از مصرف شیر خام یا پنیر تازه غیرپاستوریزه هست.

د – بروسلوز موضعی: در بیشتر موارد در اثر ابتلا به بروسلا ملی تن سیس و سوئیس ایجادشده که شروع علائم بالینی تدریجی بوده و شامل درد عضلات، تب و آرتریت هست.

ه – بروسلوز مزمن: بروسلوز باکتریمیک یا موضعی ممکن است با عود و تشدید بیماری به شکل مزمن درآید که در طی ماه‌ها و سال های متمادی رخ می‌دهد. تظاهرات نوع مزمن بصورت آبسه‌های کبدی، آبسه‌های طحالی، مننژیت، هپاتیت گرانولوماتوز، آندوکاردیت و اولسرهای پوستی مزمن دیده شود.

نکته: بروسلوزیس یک بیماری مشترک بین انسان و حیوان (زئونوز) هست. بروسلا ملی تن سیس نوع حاد و شدید بیماری را ایجاد کرده در حالیکه بروسلا آبورتوس و کنیس بیماری خفیف‌تری ایجاد می‌کنند که بندرت موجب عوارض شدید می‌شود نکروز پنیری و چرک از عوارض بروسلا سوئیس هست.

دوره نهفتگی:

بیماری در عرض ۳۰-۵ روز پس از آلوده شدن فرد ظاهر می‌شود. ولی گاهی به چند ماه نیز می‌رسد در موارد آلودگی به بروسلا آبورتوس به دلیل قدرت تهاجمی کمتر در انسان عفونت با علائم نا آشکار و کمتر به شکل حاد رخ می‌دهد. شروع بیماری بسته به واکنش سیستم ایمنی می‌تواند ناگهانی و یا تدریجی و بدون علائم شدید باشد.

علائم بیماری:

سردرد، درد عمومی بدن بخصوص درد در پشت و ستون مهره‌ها، لرز، عرق‌های شبانه، تب مواج یا متناوب که عصرها بالا رفته و همراه عرق هست گاها در اوج تب دمای بدن به ۴۱ درجه ی سانتی‌گراد نیز می‌رسد.

بی‌خوابی، درد مفصل‌ها و تورم مفاصل، بی‌اشتهایی و ضعف شدید، بزرگی طحال، حساس شدن و بزرگی غدد لنفاوی و کبد، هپاتیت و مشکلات حرکتی در بیمار بخصوص در ناحیه کمر و پاها مشاهده می‌شود.

علائم آزمایشگاهی شامل لکوپنی به همراه کاهش پلی مورفونوکلئرها هست.

اغلب اوقات علائم بیماری پس از درمان با آنتی بیوتیک، تمایل به بازگشت داشته و برای هفته‌ها حتی ماه‌ها نیز ادامه می‌یابد بیماری تمایل به مزمن شدن داشته و حتی تا سال‌ها باقی می‌ماند.

شدت بیماریزایی بروسلاها بستگی به قدرت تهاجم، اندوتوکسین، زندگی و بقا در داخل سلول‌ها و مکانیسم‌های ایمنولوژیکی دارد. باکتری توسط مجاری لنفاوی از محل ورود، خود را به غدد لنفاوی رسانده و بسته به قدرت تهاجمی باکتری و واکنش سیستم ایمنی بدن به‌وسیله پلی مورفونوکلئرها و ماکروفاژها از بین رفته یا در غیر این صورت تکثیر یافته و وارد خون می‌گردد توسط گردش خون به کبد، طحال، مغز استخوان، غدد لنفاوی، ریه و کلیه منتقل‌شده در داخل سلول‌ها می‌تواند زنده بماند.

فصل دوم:

تشخیص

تشخیص بروسلوز به خاطر ماهیت موذیانه و چهره‌های گوناگون بیماری همواره یکی از چالش‌های پزشکی و از جنبه‌های موردعلاقه در تحقیقات بوده است. بعد از ایجاد عفونت در بدن فرد ، باگذشت زمان بیماری چهره‌های متفاوتی پیدا می‌کند و با توجه به مصونیت کوتاه‌مدت ایجادشده امکان بیماری مجدد و با چهره‌های متفاوت وجود دارد .

در مناطقی که آلودگی دام‌ها شیوع بالایی دارد و در مشاغلی که در تماس دائم با باکتری بروسلا هستند، معمولاً بیماری به شکل خفیف تظاهر می‌یابد ، و گاهی آن‌قدر نمای بالینی ملایمی دارد که فرد بیمار تمایلی برای مراجعه به پزشک ندارد و عموماً به‌طور علامتی خوددرمانی می‌نماید.

فرد بیمار با علائمی مانند تب، درد عضلانی و استخوانی، بی‌حالی، ضعف و کاهش اشتها به پزشک مراجعه می‌کند. با انجام آزمایش‌های سرولوژیکی و میکروبیولوژیکی تشخیص قطعی داده می‌شود.

تشخیص آزمایشگاهی:

۱- آزمایش‌های بیوشیمیایی:

اکثر آزمایش‌های بیوشیمیایی در محدوده‌ی نرمال بوده هرچند ممکن است سطح آنزیم‌های کبدی مقداری افزایش نشان دهد. میزان گلبول‌های سفید خون معمولاً پایین‌تر بوده و گاها آنمی وجود دارد میزان CRP, ESR ممکن است افزایش نشان دهد.

۲- آزمایش‌های میکروبیولوژی:

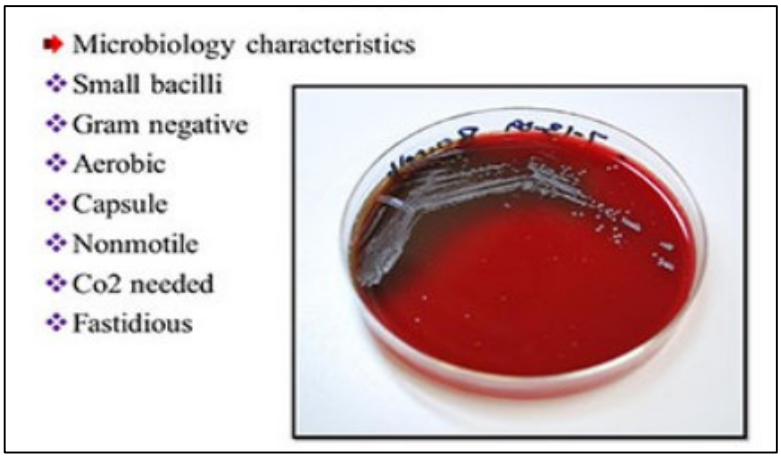
کشت خون:

آزمایش استاندارد طلایی برای تشخیص قطعی آزمایشگاهی این بیماری جدا کردن کوکوباسیل گرم منفی بروسلا از بدن بیمار توسط کشت باکتری (خون یا سایر مایعات و بافت های بدن) است.کشت مغز استخوان نسبت به کشت نمونه خون بخصوص قبل از شروع مصرف آنتی بیوتیک از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در بیماران مبتلابه نوع ملی تن سیس کشت خون در بیشتر از ۷۰٪ موارد و کشت مغز استخوان در بیشتر از ۹۰٪ موارد مثبت می‌گردد. یعنی در شرایطی که کشت خون منفی است، کشت مغز استخوان هنوز می‌تواند مثبت باشد .در حقیقت ازآنجاکه با پیشرفت بیماری، میزان باکتریمی کمتر شده و کشت خون با احتمال بیشتری منفی می‌شود، می‌توان از کشت ارگان‌های رتیکولواندوتلیال داخلی بدن مانند طحال، کبد، گره‌های لنفاوی یا مغز استخوان برای تشخیص قطعی بیماری استفاده نمود که ساده‌ترین آنها کشت مغز استخوان است.

کشت نمونه‌ی خون باید در ۲-۱ هفته‌ی اول بیماری و قبل از شروع مصرف آنتی بیوتیک صورت گیرد. برای رشد باکتری بروسلا ۶ تا ۸ هفته زمان نیاز است و در صورت شک به این بیماری باید حتماً پزشک به مسئول آزمایشگاه

اطلاع دهد، تا برای رشد باکتری نمونه را به مدت طولانی‌تری نگه‌داری نمایند و همچنین در جهت کاهش خطر بیماری در کارکنان آزمایشگاه نکات ایمنی را دقیق‌تر رعایت نمایند. از تمام ترشحات و بافت های ترشحات خلط برای بدن می‌توان نمونه مناسب برای انجام کشت تهیه نمود. معمولاً" ترشحات خلط برای بروسلوز با توجه به شیوع بسیار کم پنومونی در تب مالت منفی خواهد بود .سیستم کشت خونی که توصیه می‌شود.

بروسلا ملی تن سیس نسبتاً راحت‌تر از بروسلا آبورتوس از کشت خون به دست می‌آید.



شکل ٤ - محیط کشت بروسلا آمار

از بهترین محیط‌های کشت خون می‌توان به محیط دی فازیک(biphasic)کاستاندا (Castaneda)اشاره نمود. که محیط دارای بخش‌های جامد و مایع هست و از این طریق نیاز به تهیه کشت های بعدی(subculture) کمتر شده و احتمال آلودگی کارکنان آزمایشگاه کاهش می‌یابد. تغلیظ گلبولهای سفید (به روش سانتریفیوژکردن) و شکستن (لیز) آنها(lysis centrifugation) به افزایش سرعت و حساسیت در مثبت شدن نتیجه کشت کمک می‌کند. جدول زیر مقایسه روش‌های کشت در محیط کاستاندا و روش تغلیظ و شکستن با کشت مغز استخوان آورده شده است.

	Incubation time	Requires blind sub-cultures	Sensitivity (disease stage)
Ruiz-Castañeda	7–21 days	Yes	70–80% (acute); <50% (chronic)
Lysis centrifugation	2–4 days	No	>90% (acute); 70% (chronic)
Bone marrow culture	4–7 days	Depends on method and media used	97% (acute); 90% (subacute); 50% (chronic)

جدول ۳- مقایسه روش‌های کشت در محیط کاستاندا و روش تغلیظ و شکستن با کشت مغز استخوان

از محیط‌های کشت معمولی مانند سرم دکستروز مایع و محیط کشت مایع بروسلا براث نیز می‌توان استفاده نمود. برای تسریع مثبت شدن کشت باکتری امروزه می‌توان از روش‌های کشت باکتری در سیستم‌های رادیومتریک و نیمه اتوماتیک(نظیر Bac/Alert and 9204 BACTEC) استفاده نمود که می‌توان در مدت حدود ۱۰ روز باکتری را در صورت مثبت بودن نمونه به دست آورد. البته در این روش‌های سریع اتوماتیک باید به این نکته دقت نمود که ممکن است باکتری بروسلا به‌اشتباه به‌عنوان باکتری دیگری(Moraxella phenylpyruvica) گزارش گردد.

در انجام کشت خون در محیط دی فازیک کاستاندا باید در شرایط کاملاً استریل از بیمار خون‌گیری نموده و مقدار ۱۰-۸ میلی‌لیتر خون به ظرف محیط کشت کاستاندایا بروسلا براث اضافه نمود. در محیط کشت متعارف کاستاندا، به‌ندرت جواب کشت قبل از چهار روز مثبت می‌شود و معمولاً"باکتری بین روزهای هفتم لغایت بیست و یکم رشد می‌کند .تقریباً ۲ ٪موارد بعد از روز بیست و یکم رشد می‌کنند و ازاین‌رو قبل از اعلام منفی بودن کشت، حداقل باید نمونه را به مدت ۴۵ روز نگه داشت.

در صورت استفاده از محیط کاستاندا نیازی به پاساژهای مکرر نبوده ولی در صورت استفاده از محیط سرم دکستروز یا بروسلا براث باید از روز چهارم به بعد هفته‌ای دو بار کشت در محیط بروسلا آمار یاسرم دکستروز آمار برای به دست آوردن باکتری صورت گیرد. کلنی باکتری بعد از ۳-۲ روزبه‌صورت محدب، صاف، شفاف و فاقد پی‌جویی کردنمان به‌اندازه‌ی حدود ۱-۰/۵ میلی‌متر ظاهر می‌گردد. پس از به دست آوردن کلنی باکتری آزمایش‌های بیوشیمیایی مانند تولید H2S ، اوره آز، نیترات، کاتالاز، اکسیداز، رشد درحضور فوشین بازی و تیونین، عدم تحرک بر روی کلنی‌ها صورت می‌گیرد. و در صورت امکان از آنتی سرم های اختصاصی ضد بروسلا استفاده نمود. در جدول زیر خصوصیات بیوشیمیایی سویه‌های شایع باکتری جنس بروسلا آورده شده است.

سویه	مخزن طبیعی	نیاز به Co2	تولید H2S	رنگ فوشین بازی	رنگ تیونین
ملی تن سیس	بز – گوسفند	–	–	+	+
آبورتوس	گاو	+	+	+	–
سوئیس	خوک	–	–	+	+
کانیس	سگ	–	–	–	+

جدول ۴- واکنش‌های بیوشیمیایی در انواع بروسلاها

۳- روش‌های مولکولی:

تکنیک های مولکولی ابزار مهمی برای تشخیص و مطالعات اپیدمیولوژیک هستند، و اطلاعات مربوط به شناسایی گونه‌ها و بیوتایپ های بروسلا را فراهم می‌کنند و امکان تمایز بین گونه‌های سرطانی و واکسن ر فراهم می‌کند تشخیص مولکولی گونه‌های بروسلا می‌تواند به‌طور مستقیم بر روی نمونه‌های بالینی بدون جداسازی قبلی ارگانیسم انجام شود .

PCR

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و انواع مختلف آن ، بر اساس تکثیر توالی ژنومی خاص گونه یا حتی بیوتایپ های .Brucella Spp ، وسیع‌ترین تکنیک مولکولی برای تشخیص بروسلوز است. بیشتر روش‌های تشخیصی مولکولی بروسلوز دارای حساسیت از ۵۰ تا ۱۰۰ درصد و اختصاصیت بین ۶۰ تا ۹۸ درصد است . پروتکل استخراج DNA ، نوع نمونه بالینی و محدودیت‌های تشخیصی هر پروتکل ، عواملی هستند که می‌توانند کار آیی روش را تحت تأثیر قرار دهند.

امروزه متخصصین زیادی پیشنهاد می‌کنند که در آزمایشگاه از PCR به‌جای کشت خون برای تعیین مستقیم باکتری بروسلا استفاده شود و از آن به‌عنوان استاندارد طلایی نام می‌برند، اما تا زمان انجام مطالعات بیشتر ، برای تشخیص بروسلوز هنوز استاندارد طلایی، کشت باکتری بروسلا است. آخرین بررسی‌ها حکایت از حساسیت و ویژگی بسیار بالای این روش دارد .یکی از ژن هایی که مورداستفاده قرارگرفته است ۱۶srRNA است که با بررسی به‌عمل‌آمده در سایر بروسلاها و باکتری‌های دیگر، معلوم شد که هیچ‌کدام از گونه‌های غیر از بروسلا، تکثیر نشدند و این اختصاصی بودن بالای این ژن را برای بررسی نشان می‌دهد. روش‌های PCR گوناگونی وجود دارد، به‌عنوان‌مثال PCR بر پایه ژن کد کننده پروتئین ۳۱ کیلو دالتونی بروسلا آبورتوس (BCSP31) و یا پروتئین غشا خارجی (OMP-2) وجود دارد.

در تشخیص بروسلوزیس سیستم عصبی و سایر موارد کانونی تب مالت ازجمله استئومیلیت بروسلایی که با سایر روش‌ها به تشخیص نرسیده بوده‌اند، PCR ارزش بالای تشخیصی خود را نشان داده است. با تکثیر ژن باکتری بروسلا می‌توان خیلی سریع، وجود بروسلا را در نمونه خون، مایع مغزی نخاعی، ترشحات مخاطی و مغز استخوان مورد اثبات قرارداد.

به‌عنوان‌مثال از کاربرد PCR در تشخیص تب مالت، می‌توان به این بیمار اشاره نمود :

مرد چوپان جوانی با تب (۳۹ درجه سانتی‌گراد) و اختلال تکلم و اختلال تعادل به بیمارستان آورده می‌شود. در سابقه پزشکی او تب خفیف و بی‌اشتهایی و تعریق سرد،درد مفاصل و کاهش وزن تقریبی ۱۰ کیلوگرمی در ۳ ماه قبل از مراجعه وجود داشته است. آزمایش رایت و 2ME و الایزا(IgMو IgG) همگی منفی بوده است و درنهایت بروسلوزیس با مثبت شدن کشت خون و PCR تشخیص داده‌شده و بیمار تحت درمان قرار می‌گیرد.

در بررسی‌های انجام‌شده حساسیت PCR با استفاده از ژن srRNA ۱۶ وL7/L12 به میزان ۱۰۰ درصد بوده است. این بررسی‌ها در فاز حاد بیماری بوده که تعداد باکتری‌ها نیز بالا است. البته درزمانی که شمار باکتری‌ها نیز پائین باشد در صورتیکه، DNA به‌درستی از نمونه سر می، استخراج گردد علی‌رغم تیترهای پائین در روش‌های سرولوژی و تعداد کم باکتری، می‌توان PCR را با حساسیت بالا انجام داد.

عموماً" PCR بر روی نمونه خون، برای تشخیص بروسلوز در فاز حاد مؤثر است چراکه باگذشت زمان میزان باکتریمی کم شده و احتمال مثبت شدن این آزمایش کم می‌شود. ازجمله موارد استفاده از PCR آن چنانکه اشاره شد در بیماران دارای عوارض بروسلوز (عموماً در فازهای بعد از مرحله حاد که کشت خون منفی است)، هست به‌عنوان‌مثال در بیمارانی که کشت ضایعات استخوانی و یا مهره‌های ستون فقرات منفی باشد و شک بالینی بین توبرکلوزیس و بروسلوز باقی‌مانده، با انجام آزمایش PCR مشخص‌شده است که عامل بیماری بروسلا بوده است.

برای بررسی سرم با روش PCR ، ۵ سی‌سی از خون بیمار را در ظرف محتوی EDTAبه آزمایشگاه موردنظر ارسال می‌کنند.

Real –time PCR

Real –time PCR سریع‌تر و حساس‌تر از PCR معمولی است. این تکنیک به مراحل بعد از تکثیر که در PCR معمولی انجام می‌شود. نیازی ندارد بنابراین خطر آلودگی آزمایشگاهی و نتایج مثبت را کاهش می‌دهد. سه روش Real-time PCR جداگانه برای شناسایی اختصاصی هفت بیوار B.abortus ، سه بیوار B.melitensis و بیوار یک B.suis با انتقال انرژی رزونانس فلوئورسانس توسعه داده‌شده است.

روش‌های مبتنی بر چندشکلی طولی قطعات محدودکننده

PCR-RFLP یک رویکرد رایج برای گونه‌های بروسلا است که ابزار خوبی برای مطالعات طبقه‌بندی ، اپیدمیولوژیکی و تشخیص است. این روش به‌ویژه در مطالعات ژن‌های پروتئینی غشای خارجی (OMP) مورداستفاده قرارگرفته است.

٤- آزمایش‌های سرولوژیکی:

به دلیل طولانی بودن پروسه‌ی آزمایش‌های کشت خون یا سایر مایعات بدن، روش‌های سرولوژیکی به دلیل کوتاه بودن زمان انجام آن بیشتر مورداستفاده قرار می‌گیرد. اساس آزمایش‌های سرولوژیکی جستجوی مقدار آنتی‌بادی اختصاصی تولیدشده در بدن بیمار هست.

آنتی‌بادی‌های (ایمونوگلوبین) تولیدشده در بیماری بروسلوز شامل IgG, IgM و به مقدار جزئی IgE بوده، در اوایل بیماری تیتر IgM به مقدار زیادی افزایش‌یافته و برای تشخیص اولیه بیماری دارای ارزش بالایی است معمولاً میزان

IgM از هفته‌ی دوم آلودگی افزایش‌یافته و از هفته‌ی سوم به بعد به‌تدریج میزان IgG در سرم شروع به افزایش می‌کند.

برای تشخیص سرولوژیکی بیماری بروسلوزیس از آزمایش‌های آگلوتیناسیون سریع (Rapid) با روش رز بنگال، آگلوتیناسیون رایت لوله‌ای، 2ME ، آزمایش کومبس رایت استفاده می‌گردد.

نکته: برای آزمایش‌های سرولوژیکی از نمونه‌ی سرم بیمار که عاری از هرگونه همولیز، یرقان و لیپمیک است باید استفاده کرد.

الف - روش آگلوتیناسیون سریع یا روش راپید

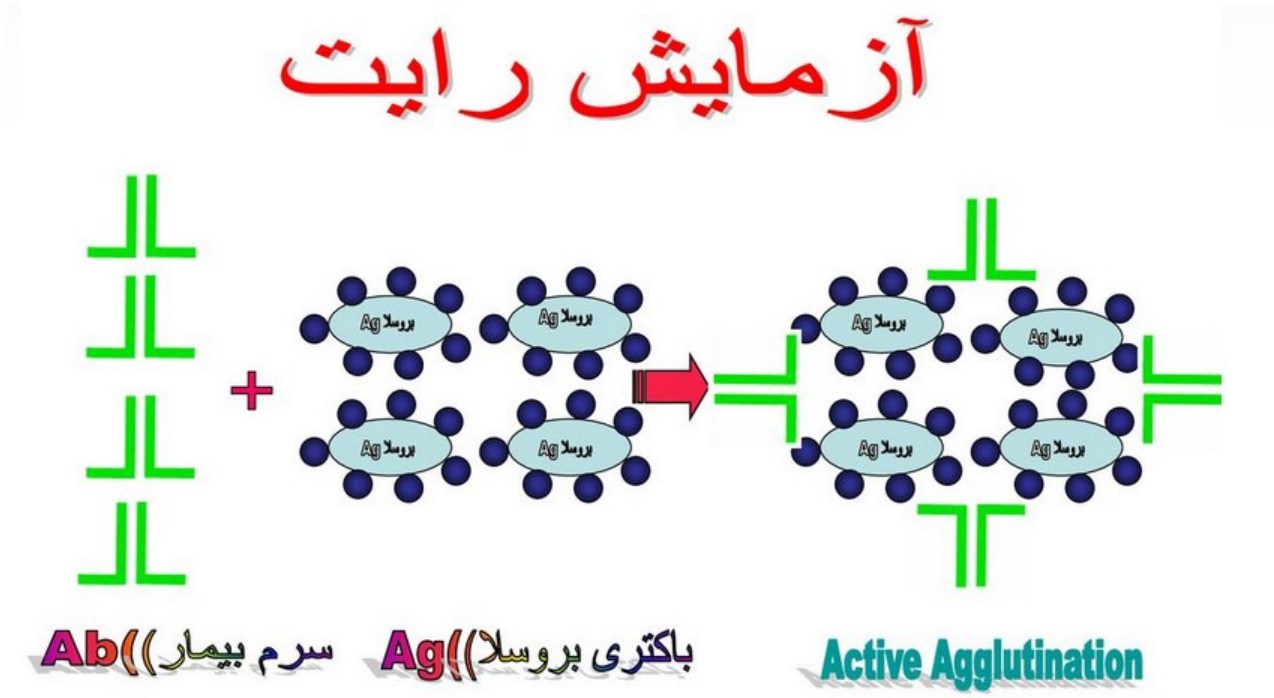
مواد و لوازم موردنیاز :

۱-پلیت شیشه‌ای مخصوص آزمایش سرولوژی

-آنتی‌ژن قابل‌مصرف و فاقد اتو آگلوتیناسیون

۳-کنترل مثبت و کنترل منفی

۴-روتاتور و اپلیکاتور جهت مخلوط نمودن سرم و آنتی‌ژن



شکل-۵- شماتیک آزمایش رایت

روش رز بنگال: (rose Bengal plate agglutination test- RBPT)

این آزمایش از زمانهای قدیم مخصوصا در مناطق محروم دنیا که امکان انجام آزمایش رایت وجود ندارد(برای غربالگری استفاده می‌شده است. در مطالعات مختلف حساسیت و ویژگی متفاوتی از آن را گزارش نموده‌اند .حساسیت بالای این آزمایش باعث شده برای غربالگری از آن به‌عنوان یک آزمایش مناسب استفاده کنند(در حقیقت یک آزمایش غربالگری است نه آزمایش تأییدی.)

این آزمایش زمان کمی در حد چند دقیقه نیاز دارد و نمونه سرم مثبت آن باید با آزمایش‌های سرولوژیک با ویژگی بالاتر و یا کشت تایید شود. یکی از کاربردهای اصلی آن درگذشته برای تایید سریع بروسلوزیس عصبی، آرتریت، اپیدیدیموارکیت، هیدروسل ناشی از تب مالت بود که مایع مغزی نخاعی، سینویال، منی و آسپیراسیون بیضه و مایع

هیدروسل با این آزمایش مثبت می‌گردید .ازآنجاکه ممکن است آنتی‌بادی‌های(آگلوتینین) موجود در سرم فرد آزمایش‌شونده در اثر عفونت‌های باکتریایی دیگری غیر از باکتری بروسلا تولیدشده باشند،
باید دقت کرد که این بروز آگلوتیناسیون و مثبت شدن آزمایش ممکن است ناشی از باکتری بروسلا نباشد. ازاین‌جهت حتماً آزمایش مثبت رز بنگال نیاز دارد که با آزمایش‌های اختصاصی‌تر مورد تایید قرار گیرد.
آنتی‌ژن رز بنگال به رنگ قرمز و با PH اسیدی برابر ۳/۶۵ و به میزان ۸٪ جرم میکروبی سویه ۹۹ بروسلا آبورتوس جهت این آزمایش استفاده می‌شود.
این روش از بهترین آزمایش‌های مقدماتی سرولوژیکی تب مالت هست. روشی است ساده و مطمئن و خیلی زود جواب می‌دهد و بیشتر برای تشخیص اولیه در برنامه‌های کنترل و ریشه‌کنی بروسلوز به‌عنوان آزمایش غربالی بکار برده می‌شود. اما به علت احتمال بروز پدیده پروزون و مشاهده پاسخ منفی کاذب، آزمایش تمام نمونه‌ها باید با روش لوله‌ای نیز انجام شود.

روش آزمایش :

برای انجام آزمایش به روش سریع بر روی پلیت یک قطره سرم حدود ۳۰-۲۵ میکرولیتر و یک قطره آنتی‌ژن به همان مقدار مساوی ریخته و با اپلیکاتور کاملاً به هم می‌زنیم. پلیت را به مدت ۵ دقیقه جهت انجام واکنش آنتی‌ژن و آنتی‌بادی روی روتاتور قرارداد و سپس ازنظر آگلوتیناسیون بررسی می‌شود موارد مثبت باید با روش لوله‌ای تیتر شود و از تیتراسیون آزمایش با پلیت خودداری گردد بهتر است در آزمایش از نمونه‌های کنترل مثبت و منفی جهت مقایسه آگلوتیناسیون استفاده گردد.

شکل ٦- نتیجه آزمایش رز بنگال

ب- آزمایش رایت لوله‌ای یا آزمایش آگلوتیناسیون لوله‌ای (Standard tube Agglutination Test)

مواد و لوازم موردنیاز :

۱-لوله همولیز

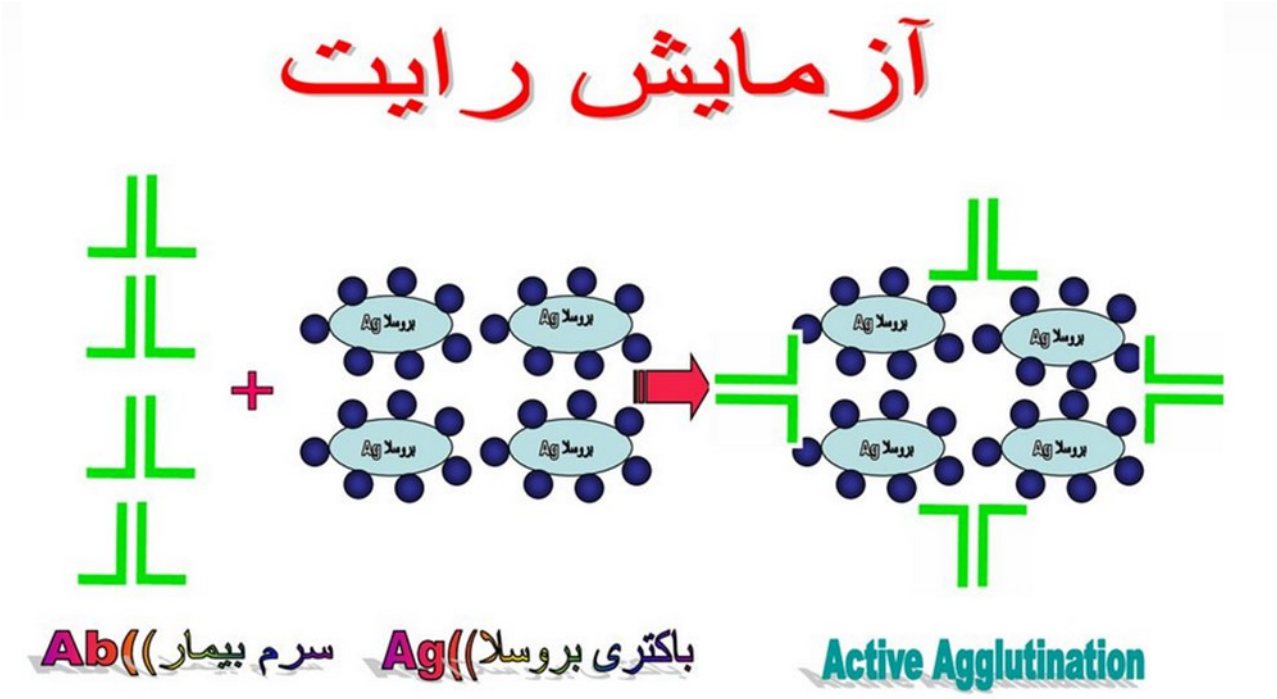
۱- آنتی‌ژن مخصوص لوله‌ای ساخت داخل که فاقد اتو آگلوتیناسیون باشد و قابل‌مصرف طبق تاریخ ساخت می‌بایستی تا هنگام مصرف دور از نور و در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شود.

۳- نمک طعام و فنل

۴-پارافیل جهت بستن درب لوله‌ها

۵-سرم کنترل مثبت و منفی جهت تهیه شاهد

طرز تهیه سرم فیزیولوژی فنیکه: ۸/۵ گرم کلرید سدیم و ۵ گرم فنل را در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل نمایید. توصیه می‌شود برای از بین بردن پدیده‌ی پروزون ازسرم فیزیولوژی غلیظ استفاده شود که در آن بجای ۸/۵ گرم نمک طعام، ۵۰ گرم فنل در یک لیتر آب حل شود.



شکل- ٦ شماتیک آزمایش رایت

روش آزمایش رایت لوله‌ای:

در یک ردیف لوله‌ی همولیز ازسرم بیمار رقت‌های ۱/۱۰ تا ۱/۶۴۰ و رقت‌های بالاتر در حد نیاز تهیه می‌شود.

الف – در لوله‌ی اول ۰/۹ میلی‌لیتر و در لوله‌های بعدی ۰/۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی فنیکه ریخته می‌شود.

ب – ۰/۱ میلی‌لیتر ازسرم مورد آزمایش به لوله‌ی اول اضافه کرده و سپس از لوله‌ی اول ۰/۵ میلی‌لیتر به لوله‌ی دوم و از لوله دوم به لوله‌ی سوم و به‌این‌ترتیب تا آخرین لوله ادامه داده و از آخرین لوله ۰/۵ میلی‌لیتر دور ریخته می‌شود.

ج – آنتی‌ژن رایت لوله‌ای به مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر به تمام لوله‌ها اضافه می‌شود.

رقت نهایی لوله‌ها از ۱/۲۰ شروع‌شده و به ترتیب ۱/۴۰ و ۱/۸۰ و ۱/۱۶۰ و .... ادامه می‌یابد.

لوله‌ها را کاملاً به هم زده و درب لوله‌ها را با پارافیلم بسته و مدت ۲۴ ساعت در اتو ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شود و سپس نتایج قرائت می‌شود.

آزمایش رایت لوله اي(کامل)

شماره لوله	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱
سرم فیزیولوژی (میلی لیتر)	۰/۹	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵
سرم بیمار (میلی لیتر)	۰/۱ →	۰/۵ →	۰/۵ →	۰/۵ →	۰/۵ →	۰/۵ →	۰/۵ →	۰/۵ →	۰/۵ →	۰/۵ دور بریزید →	—
آنتی ژن (میلی لیتر)	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵
رقت یا تیتر نهائی سرم	۱/۲۰	۱/۴۰	۱/۸۰	۱/۱۶۰	۱/۳۲۰	۱/۶۴۰	۱/۱۲۸۰	۱/۲۵۶۰	۱/۵۱۲۰	۱/۱۰۲۴۰	—

شکل ۷- نحوه تهیه رقت سرم و انجام آزمایش رایت لوله‌ای

قرائت نتایج:

بر مبنای میزان شفافیت مایع فوقانی لوله‌ها (با مقایسه لوله شاهد) و آگلوتیناسیون ایجادشده، نتایج گزارش می‌شود. وجود شفافیت دلیل بر آگلوتیناسیون مثبت و عدم شفافیت نشان‌دهنده‌ی عدم آگلوتیناسیون هست. بیشترین رقت لوله‌ای که نسبت به لوله‌ی شاهد منفی، ۵۰ درصد شفافیت یا آگلوتیناسیون را نشان دهد، تیتر نهایی آزمایش هست.

در مورد تفسیر آزمایش رایت و تعیین تیتر آلودگی اتفاق‌نظر وجود ندارد. در کشورهای غربی به علت اینکه بیماری شیوع چندانی ندارد و تعداد بیماران اندک است و فقط یک بیماری شغلی محسوب می‌شود، آلودگی با بروسلا آبورتوس و سوئیس با تماس مکرر به وجود می‌آید و آلودگی با بروسلا ملی تن سیس رواج ندارد، لذا تیتر قابل ارزش برای درمان ۱/۱۶۰ هست. ولی در ایران که بیشترین آلودگی با بروسلا ملی تن سیس گزارش گردیده تیتر ۱/۸۰ به بالا برای درمان ارزش بیشتری دارد. اما تیترهای پایین‌تر به‌ویژه در ارتباط با بیماری‌های غیر شغلی نبایستی کم‌اهمیت در نظر گرفته شود مگر در مواردی که علائم کلینیکی وجود نداشته باشد.

در این موارد آزمایش دو هفته بعد تکرار می‌شود در صورت عدم افزایش تیتر و منفی بودن 2ME پاسخ منفی تلقی می‌گردد.

تهیه‌ی شاهد مثبت و منفی برای آزمایش رایت لوله‌ای:

۱- تهیه شاهد منفی: ۰/۵ میلی‌لیتر آنتی‌ژن رقیق یا آماده‌ی مصرف را در یک لوله‌ی همولیز ریخته و ۰/۵ میلی‌لیتر محلول سرم فیزیولوژی فنیکه به آن می‌افزاییم.

۲- تهیه‌ی شاهد مثبت: یک نمونه سرم مثبت قوی را به‌صورت ۱/۵ رقیق کرده (۱۰۰ میکرولیتر سرم + ۴۰۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی) سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از آن را با ۰/۵ میلی‌لیتر آنتی‌ژن در لوله مخلوط می‌نماییم.

موارد مثبت کاذب آزمایش رایت:

۱- ابتلا به وبا

۲- ابتلا به تولارمی

۳- عفونت ناشی از یرسینیا آنتروکولیتیکا

تماس با واکسن‌های حاوی ویبریوکولرا، فرانسیسلا و یرسینیا

۴- عفونت‌های ناشی از گونه‌های سالمونلا، پسودوموناما لتوفیلا و اشریشیای ۰۱۱۶

۵- انجام آزمایش بروسلین

موارد منفی کاذب آزمایش رایت:

۱- سرم بیماران مبتلابه بروسلوز ناشی از گونه کانیس که معمولاً آنتی‌ژن استاندارد بروسلا کانیس را آگلوتینه نمی‌کند و جهت تشخیص این نوع بروسلا، باید از آزمایش‌های اختصاصی استفاده نمود.

۲- زمانیکه سرم بیمار تا بیش از ۱/۳۲۰ رقیق نشود، به علت احتمال بروز واکنش پروزون، ممکن است نتیجه بصورت منفی کاذب گزارش گردد.

۳- در موارد مزمن بیماری به علت پایین بودن میزان IgM یا عدم وجود آن و دخالت ایمنوگلوبولین های ناقص در واکنش و اشغال گیرنده‌های آنتی‌ژنی به‌وسیله‌ی آن‌ها ممکن است واکنش آگلوتیناسیون صورت نگیرد، هرچند در چنین مواردی با توسل به آزمایش کومبس رایت و استفاده از آنتی هیومن گلوبولین می‌توان از بروز چنین واکنشی جلوگیری کرد.

۴- در موارد نقص سیستم ایمنی و کمبود گاماگلوبولین ها

۵- در صورتیکه قبل از تشکیل آنتی‌بادی کافی (مثلاً اوایل بیماری حاد) آزمایش رایت، انجام شود به دلیل عدم تولید آنتی‌بادی‌های اختصاصی نتیجه‌ی منفی خواهیم داشت.

واکنش پروزون (Prozone) :

یکی از موارد منفی کاذب آزمایش خایی که بر اساس فعل‌وانفعالات آنتی‌ژن – آنتی‌بادی انجام می‌شود پدیده منطقه‌ای یا پروزون است.

در این‌گونه آزمایش‌های بایستی مقادیر متناسبی از آنتی‌ژن و آنتی‌بادی، وجود داشته باشد تا واکنش کاملی صورت گیرد و در صورت وجود مقادیر زیادی آنتی‌ژن و آنتی‌بادی، نتایج حاصله می‌تواند بصورت واکنش ضعیف یا منفی جلوه‌گر شده و پاسخ کاذب به بازآورد در انجام این آزمایش‌های هرگاه نمونه‌ی مورد آزمایش به‌اندازه‌ی کافی رقیق نشود مقادیر زیادی آنتی‌بادی وجود خواهد داشت و واکنش قابل‌رؤیت ایجاد نخواهد شد این حالت را پدیده‌ی پروزون می‌نامند.

در صورت زیاد بودن مقدار آنتی‌ژن مصرفی (در اثر اشتباه آزمایشگاهی) نیز این حالت ایجاد می‌گردد که با رقیق کردن آنتی‌ژن برطرف می‌شود و به آن واکنش پست زون (Post zone) می‌گویند.

قابل تأکید است که برای از بین بردن واکنش پروزون لازم است سرم بیماران تا عیار ۱/۱۲۸۰ رقیق شود.

آزمایش کومبس رایت:

در بروسلوز مزمن و طول کشیده ممکن است آنتی‌بادی تولید نشود و به‌جای زیر کلاس‌های G2, G1 که بیش از ۸۰٪ IgG موجود را تشکیل می‌دهند، بیشتر IgA, G4, G3 تشکیل می‌شوند که ازنظر کمی و کیفی ضعیف‌تر از IgM, G2, G1 هستند.

این آنتی‌بادی‌ها در آزمایش رایت نتیجه‌ی منفی کاذب به وجود می‌آورند ولی در صورت افزودن آنتی هیومن گلوبولین و انجام آزمایش کومبس رایت نتیجه مثبت خواهد شد.

در آزمایش کومبس رایت تیتر بالاتر از ۱/۴۰ ارزش تشخیص داشته و وجود علائم بالینی نتیجه را باارزش می‌کند.

روش آزمایش :

۱- مطابق آزمایش رایت لوله‌ای رقت‌های موردنیاز را تهیه‌کرده و همان مراحل را انجام داده ولوله‌ها را به مدت ۲۴ ساعت در اتو ۳۷ درجه قرار می‌دهیم.

۲- وجود آگلوتیناسیون را در لوله‌ها بررسی کرده ولوله خایی که دارای آگلوتیناسیون کامل یا جزئی باشند کنار می‌گذاریم.

۳- بقیه‌ی لوله‌ها را به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۲۰۰۰ سانتریفیوژ می‌کنیم. مایع رویی را دور ریخته و رسوب را سه مرتبه با یک میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی مخلوط و مجدداً سانتریفیوژ می‌کنیم (مرحله‌ی شستشو)

۴- رسوب نهایی را با ۰/۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی و ۰/۱ میلی‌لیتر آنتی هیومن گلوبولین مخلوط کرده و به مدت ۲۴ ساعت در اتو ۳۷ درجه قرار می‌دهیم.

۵- لوله‌ها را ازنظر وجود آگلوتیناسیون بررسی می‌کنیم.

آزمایش کومبس رایت و آزمایش ایمونوکاپچر-آگلوتیناسیون در تشخیص مراحل اولیه تب مالت و همچنین در موارد عفونت مجدد و یا عود از حساسیت و ویژگی تشخیصی بیشتری برخوردارند.

در مراحل طول کشیده بیماری (مزمن) و افرادی که دچار عود بیماری می‌شوند و تشخیص سرم شناختی بیماری دشوار می‌شود از آزمایش کومبس رایت و آزمایش ایمونوکاپچر-آگلوتیناسیون استفاده می‌شود.

آزمایش ۲- مرکاپتواتانول (2-Mercaptoethanel (2ME :

آزمایش‌های معمول آگلوتیناسیون برای تشخیص بروسلوز تنها وجود یا عدم وجود آگلوتینین های ضد آنتی‌ژن بروسلا را در سرم بیمار مشخص می‌کند اما نوع آگلوتینین های موجود یعنی IgM, IgG را افتراق نمی‌دهد.

آزمایش 2ME برای تعیین ماهیت ایمنوگلوبولین موجود در سرم هست مرکاپتواتانول ماده‌ی احیاکننده‌ای است که سبب شکسته شدن باندهای دی سولفید IgM شده و باعث از بین رفتن آن و نهایتاً از بین رفتن آگلوتیناسیون می‌شود هرگاه سرم بیمار پس از مجاورت با 2ME آگلوتیناسیون نشان ندهد، دلیل بر وجود آگلوتینین IgM بوده ولی اگر قدرت آگلوتیناسیون سرم باقی بماند دلیل بر وجود آگلوتینین IgG بوده و تیتر به‌دست‌آمده همان تیتر IgG هست.

روش اول آزمایش:

آزمایش 2ME به همان روش آگلوتیناسیون رایت لوله‌ای انجام می‌شود با این تفاوت که رقت‌های سرم بجای سرم فیزیولوژی با بافر 2ME تهیه می‌گردد.

۱- به تعداد نمونه‌های مورد آزمایش لوله‌ی همولیز در نظر گرفته و در لوله اول ۰/۹ میلی‌لیتر بافر 2ME و ۰/۱۰ میلی‌لیتر سرم بیمار و در لوله‌های بعدی ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول مرکاپتواتانول (بافر 2ME) اضافه می‌کنیم.

۲- لوله‌ها را کاملاً به هم زده و از لوله‌ی اول ۰/۵ میلی‌لیتر به لوله‌ی دوم و از لوله‌ی دوم به لوله‌ی سوم و الی‌آخر اضافه کرده و از لوله‌ی آخر ۰/۵ میلی‌لیتر به بیرون ریخته و بعد به تمام لوله‌های ۰/۵ میلی‌لیتر آنتی‌ژن 2ME اضافه می‌کنیم.

۳- لوله‌ها را به مدت ۲۴ ساعت در اتو ۳۷ درجه قرارداد و سپس ازنظر وجود آگلوتیناسیون بررسی می‌کنیم.

روش دوم آزمایش 2ME :

۱- به تعداد نمونه‌های مورد آزمایش لوله‌ی همولیز در نظر گرفته و در هر لوله ۰/۳ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی و ۰/۲ میلی‌لیتر سرم بیمار و ۰/۵ میلی‌لیتر محلول 2ME اضافه می‌کنیم.

۲- لوله‌ها را به مدت یک ساعت در اتو ۳۷ درجه قرار می‌دهیم تا محلول 2ME روی IgM اثر کند.

۳- لوله‌ها را از اتو خارج کرده و برای هر نمونه مانند روش رایت لوله‌ای به تعداد موردنیاز لوله‌ی همولیز در نظر می‌گیریم و رقت‌های سریال تهیه می‌کنیم. به‌این‌ترتیب که به‌استثناء لوله‌ی اول در بقیه‌ی لوله‌ها ۰/۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی می‌ریزیم سپس از محتوی لوله‌ی اول ۰/۵ میلی‌لیتر به لوله‌ی دوم و از لوله‌ی دوم به لوله‌ی سوم تا لوله‌ی آخر ادامه می‌دهیم. از لوله‌ی آخر ۰/۵ میلی‌لیتر دور ریخته می‌شود.

۴- به هر لوله ۰/۵ میلی‌لیتر آنتی‌ژن 2ME می‌ریزیم.

۵- لوله‌ها را به مدت ۲۴ ساعت در اتو ۳۷ درجه قرارداد و سپس وجود آگلوتیناسیون را بررسی می‌کنیم.

رقت نهایی لوله‌ها از ۱/۲۰ شروع می‌شود.

تفسیر آزمایش 2ME :

در صورتیکه سرم بیمار حاوی آنتی‌بادی IgM باشد در اثر تأثیر بافر 2ME از بین می‌رود و نتیجه‌ی آگلوتیناسیون منفی هست. در مراحل حاد بیماری این حالت مشاهده می‌شود.

هرگاه بیمار در مراحل مزمن بوده و آنتی‌بادی IgG در سرم موجود باشد بعد از آزمایش 2ME ، وجود IgG باعث مشاهده‌ی آگلوتیناسیون خواهد شد.

تیتر ۱/۴۰ به بالا در آزمایش 2ME مثبت تلقی می‌شود. ضمن اینکه تیتر ۱/۲۰ می‌تواند نشانه‌ای از آلودگی باشد.

موارد کاربرد آزمایش 2ME :به‌عنوان یک آزمایش تکمیلی برای تفکیک بروسلوز حاد از مزمن، و یا تماس قبلی با آنتی‌ژن بروسلا به کار می‌رود. چراکه در موارد درمان شده بیماری، مقدار آن در عرض ۶ ماه به حداقل می‌رسد و یا کاملاً محو می‌شود. عیار ۱/۱۶۰ یا بالاتر این آزمایش که به مدت بیش از یک سال پس از شروع بیماری ادامه یابد، حاکی از عدم بهبود بروسلوز ابورتوس هست و از طرفی عیار کمتر از ۱/۱۶۰ در آزمایش **2ME** که به فاصله بیش از یک سال پس از شروع بیماری انجام‌شده باشد، تشخیص بروسلوز مزمن ناشی از بروسلا ابورتوس را تا حد زیادی منتفی می‌سازد.

در بروسلوز مزمن، در صورت عدم‌تغییر در عیار آزمایش رایت و ثابت ماندن عیار قبلی، بهترین چیزی که می‌تواند به نفع وجود عفونت فعلی باشد، اندازه‌گیری عیار آزمایش **2ME** است. اگرچه عیار ۱/۱۶۰ یا بالاتر آزمایش رایت، حاکی از تماس قبلی با بروسلا ابورتوس یا آنتی‌ژن های مشابه آن)واکنش متقاطع(هست، وجود یک عیار ۱/۱۶۰ یا بالاتر در آزمایش **2ME** حاکی از وجود عفونت فعلی با بروسلا ابورتوس است.

سودمندترین آزمون بررسی پاسخ درمانی در بروسلوز، اندازه‌گیری عیار آزمایش **2ME** است و لذا بدین منظور نیز به کار می‌رود.

زمان مثبت شدن آزمایش 2ME: در طول هفته‌های اول و دوم بیماری، IgM افزایش می‌یابد و ۲ تا۳ هفته پس از شروع بیماری به مقدار IgG نیز افزوده می‌شود. با تشخیص به‌موقع و درمان مناسب و کافی بروسلوز، بعد از ۶ تا ۱۲ ماه میزان IgG بسیار کاهش‌یافته و محو می‌شود ولی اگر بیماری تشخیص داده نشده و درمان مناسب انجام نشود سیر بیماری ادامه یافته و تیتر IgG در سطح بالایی باقی می‌ماند، درحالی‌که بالا ماندن IgM در بیماران مبتلابه بروسلوز ممکن است امری عادی باشد. بطوریکه در عده زیادی از مبتلایان به بروسلوز حتی بعد از درمان کامل بیماری، عیار ایمونوگلوبولین IgM و درنتیجه عیار آزمایش رایت به مدت چندین سال مثبت باقی می‌ماند. همچنین عیار ۱/۱۶۰ در آزمایش رایت کارگران کشتارگاه که برخورد طولانی‌مدت با آنتی‌ژن بروسلا ابورتوس داشته‌اند امری شایع است و با اضافه کردن ۲مرکاپتواتانل و حذف IgM در آزمایش **2ME** می‌توان به این امر پی برد.

عیار باارزش آزمایش 2ME :

عیار ۱/۱۶۰و بیشتر در آزمایش 2MEبدون علائم بالینی نمایانگر »عفونت بدون علامت فعلی« و در صورت وجود علائم بالینی، نشان‌دهنده عفونت فعال فعلی هست ولی عیارهای ۱/۸۰ و ۱/۴۰به‌ندرت ممکن است نشان‌دهنده عفونت‌های مهم اخیر باشد و بالاخره در بیمارانی که پس از گذشت ۳ هفته، هنوز 2MEکمتر یا مساوی ۱/۲۰ داشته باشند، احتمال دخالت بروسلا به‌عنوان عامل مولد بیماری تا حدود زیادی نفی می‌گردد .این تفاسیر ممکن است در مورد بیماران مبتلابه بروسلوز ناشی از گونه ابورتوس صدق کند ولی در مبتلایان به بروسلوز ناشی از گونه ملی تنسیس به دلیل کثرت آنتی‌ژن M و کم بودن آنتی‌ژن A برخلاف گونه ابورتوس و از طرفی استفاده از آنتی‌ژن ابورتوس در آزمایش‌های سرولوژیک، به نظر می‌رسد در صورت وجود علائم بالینی منطبق بر بروسلوز، عیارهای پایین‌تر در بروسلوز ملی تنسیس دارای ارزش تشخیصی باشند. زیرا هیچ‌گاه نمی‌توان انتظار داشت با آنتی‌ژن بروسلا ابورتوس، عیار واقعی آنتی‌کرهای ضد بروسلا ملی تنسیس را بتوان سنجید .از طرفی اگر بتوان در کشورهایی مانند ایران که اغلب موارد انسانی ناشی از گونه ملی تنسیس است، جهت سنجش عیارها از آنتی‌ژن ملی تنسیس استفاده کنیم، در این صورت تفسیرهای فوق و عیار ۱/۱۶۰ در کشور ما هم ممکن است صحیح باشد.

- در ایران حداقل تیتر برای رایت ۱/۸۰و برای 2MEنیز ۱/۴۰ در نظر گرفته‌شده است. آزمایش کومبس رایت با تیتر ۱/۴۰و تیتر فیکساسیون کمپلمان(CF) با تیتر ۱/۱۶باارزش تلقی می‌شوند.

آزمایش Immunocapture یا روش میکرو آگلوتیناسیون

این آزمایش آگلوتیناسیون تقریباً شبیه آن چیزی است که در آزمایش کومبس انجام داده می‌شود. سوسپانسیون آنتی‌ژن، از باکتری «بروسلا ملی تنسیس » کشته‌شده با فرمالدئید تهیه‌شده است و به ظروف آزمایش اضافه می‌شود. ظرف حاوی آنتی‌ژن ها و آنتی‌بادی‌ها را به مدت ۲۴ ساعت در محفظه تاریک و مرطوب در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگه می‌دارند و سپس نتیجه آگلوتیناسیون خوانده می‌شود. در بعضی مطالعات انجام‌شده حساسیت تشخیصی کومبس و آزمایش ایمونو کاپچر تقریباً مشابه و حدود ۹۵ تا ۱۰۰ درصد گزارش‌شده است.

همان‌گونه که ذکر شد، این روش از حساسیت و اختصاصیت بالای ترخورداراست که توسط CDC نیز مورد تایید واقع‌شده است. از مهم‌ترین مزایای این تکنیک ارزشمند می‌توان به موارد ذیل اشاره نمود:

- حساسیت و ویژگی بالا
- کیفیت بالای محلول‌ها و مواد مورداستفاده در قیاس با روش‌های معمول همچون رایت و رز بنگال
- تطابق نتایج با روش کومبس رایت
- قابلیت ردیابی آنتی‌بادی‌های ناقص و آگلوتینین های ضعیف

با توجه به آنچه گفته شد، استفاده از روش میکرو آگلوتیناسیون، نه‌تنها حساسیت تشخیصی را افزایش می‌دهد، بلکه نیاز به انجام آزمایش‌های تکمیلی همچون کومبس را برطرف می‌کند.

آزمایش ثبوت مکمل Complement Fixation test :

آزمایش ثبوت مکمل یکی از آزمایش‌های باارزشی است که اگر با آزمایش رایت لوله‌ای همراه شود نتیجه‌ی کاملاً روشنی به دست می‌آید.

آزمایش ثبوت مکمل اولین بار در سال ۱۸۹۴ توسط پفیفر (Pfeiffer) کشف شد. به این دلیل آن را پدیده‌ی پفیفر یا باکتریولیز نامیدند.

بعدها مچنیکف (Mechnikoff) نشان داد که این پدیده در لوله‌آزمایش قابل انجام است.

مدتی بعد واسرمن و همکارانش این آزمایش را در تشخیص سیفلیس بکار بردند و از آن به بعد بنام آزمایش واسرمن معروف شد.

آزمایش ثبوت مکمل از دو مرحله تشکیل می‌شود:

در مرحله اول، در لوله‌ی آزمایش مقدار مشخصی آنتی‌ژن ریخته، سپس سرم بیمار را به آن اضافه می‌کنیم. بعد به مجموعه‌ی فوق مقدار معینی کمپلمان اضافه می‌کنیم. هرگاه سرم حاوی آنتی‌بادی اختصاصی باشد با آنتی‌ژن واکنش داده و کمپلکس ایمنی تشکیل می‌شود و کمپلمان جذب این کمپلکس می‌گردد.

در مرحله‌ی دوم گلبول قرمز حساس شده (گلبول قرمز پوشیده از آنتی‌بادی) و همولیز ین به لوله‌ی آزمایش اضافه می‌شود. اگر در محیط کمپلمان وجود نداشته باشد، همولیز مشاهده نخواهد شد اما در صورت عدم وجود آنتی‌بادی و نهایتاً آزاد ماندن کمپلمان، همولیز مشاهده خواهد شد. بنابراین در آزمایش CFT مشاهده‌ی همولیز دلیل به رعدم وجود آنتی‌بادی و منفی بودن آزمایش و عدم مشاهده‌ی همولیز دلیل بر وجود آنتی‌بادی در سرم و مثبت بودن آزمایش است.

این آزمایش بسیار حساس بوده و به‌وسیله‌ی آن می‌توان غلظت‌های بسیار کم آنتی‌بادی را نیز اندازه‌گیری کرد.

از این آزمایش می‌توان در تشخیص بیماری‌های عفونی نظیر فلج اطفال، آبله، آنفلوانزا، تب مالت، اوریون، سرخک؛ سیفلیس و سوزاک نیز استفاده کرد.

آزمایش ثبوت مکمل هرچند آزمایش تشخیصی مفیدی است اما ازآنجاکه پیچیدگی‌های انجام این آزمایش و ملزومات استانداردسازی آن، از الایزا و رایت بیشتر است، معمولاً استفاده روتین از آن برای تشخیص تب مالت توصیه نمی‌شود . بر اساس مطالعات موجود بعد از ۴ ماه از شروع بیماری تیتر فیکساسیون کمپلمان از تیتر رایت بالاتر است .همچنین در۵ درصد افرادی که تیتر رایت مثبت دارند ممکن است تیتر CF منفی گزارش گردد که بیشتر در روزها و هفته‌های اوّل بیماری رخ می‌دهد .در برخی بیماران(کمتر از ۵ % بیماران)ممکن است علی‌رغم تیتر منفی آزمایش رایت،

تیتر CF بالا باشد که بیشتر در بیمارانی رخ می‌دهد که در فاز مزمن بیماری هستند و یا در افرادی که از بیماری بهبودیافته‌اند.

در بیماری تب مالت، آزمایش ثبوت مکمل در مرحله‌ی بیماری مثبت است اما کمکی به تشخیص نمی‌کند زیرا در این زمان آنتی‌ژن رایت لوله‌ای نیز مثبت است . معمولاً شش ماه پس از بهبودی این آزمایش منفی می‌شود.

در موارد مزمن بیماری یک آزمون کومبس رایت مثبت و ثبوت مکمل به مقدار ۱/۱۶ یا بیشتر شواهدی بر ادامه‌ی بیماری هست. در دامپزشکان و کسانیکه بادام‌ها سروکار دارند کومبس و ثبوت مکمل مثبت الزاماً نشانگر بیماری فعال نخواهد بود.

آزمایش‌های اختصاصی برای تشخیص بروسلاها:

۱- فعالیت اوره آز :

یک لوپ از سوسپانسیون کدر میکروبی یا از محیط کشت مایع حاوی باکتری را در محیط افتراقی اوره کشت داده ، سپس محیط را سریعاً در اتو ۳۷ درجه حاوی ۱۰٪ گازکربنیک گذاشته و تغییر رنگ سطح محیط را بررسی می‌کنیم. فعالیت اوره آزی با تغییر رنگ محیط از زرد به صورتی یا صورتی مایل به ارغوانی تایید می‌گردد.

۲- تولید هیدروژن‌سولفوره (H2S):

برای انجام آزمایش از نوارهای کاغذی مخصوص آزمایش که با محلول۱۰٪استات سرب آغشته می‌گردند استفاده می‌شود. این لوله‌ها سفیدرنگ می‌باشند و چنانچه در معرض گازSH2 قرار بگیرند رنگشان تیره می‌شود و میزان تغییر رنگ از + تا +++ گزارش می‌شود.

۳- رشد درحضور مواد رنگی:

این آزمایش برای بررسی رشد باکتری در خصوص مواد رنگی مثل فوشین بازی و تیونین انجام می‌گیرد. ۰/۱ گرم از هرکدام از رنگ خایی که می‌خواهیم رشد باکتری را درحضور آن بررسی کنیم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده و می‌جوشانیم سپس ۲ میلی‌لیتر از آن را به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت مثل بروسلا آمار قبل از تقسیم محیط به پلیت ها اضافه می‌کنیم. باکتری موردنظر را در این محیط کشت می‌دهیم. رشد باکتری دلیل بر مقاومت باکتری به ماده‌ی رنگی است.

آزمایش الایزا : (Enzyme-linked immunosorbent Assay - ELISA)

روش الایزا **یک** روش آزمایشگاهی بیوشیمیایی ساده با حساسیت بسیار بالا است که امکان آنالیز تعداد زیادی نمونه را به‌صورت هم‌زمان فراهم می‌کند. این روش در ایمونولوژی برای تشخیص وجود یک آنتی‌بادی یا آنتی‌ژن در نمونه مورد آزمایش استفاده می‌شود که عموماً به‌عنوان ابزاری تشخیصی در پزشکی و پاتولوژی و همچنین آزمایش کنترل کیفیت در بسیاری از صنایع کاربرد دارد.

مراحل آزمایش الایزا:

۱ - مرحله کوتینگ:(Coating)

شامل Coating آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی اختصاصی در کف چاهک‌ها است که توسط کارخانه سازنده کیت انجام می‌شود.

۲ -مرحله بلاکینگ:(Blocking)

در این مرحله فضاهای خالی بین آنتی‌ژن‌ها یا آنتی‌بادی‌های coat شده در کف چاهک، با یک پروتئین خنثی پر می‌شود .که توسط تولیدکننده کیت انجام می‌گیرد. آلبومین سری گاوی از رایج‌ترین بلاک کننده‌ها هست .

۳ - مرحله سمپلینگ:(Sampeling)

این مرحله از آزمایش الایزا سرم بیمار و یا معرف‌های دیگر نظیر استانداردها و کنترل‌ها، درون چاهک‌ها ریخته می‌شود.

۴ -انکوباسیون:(Incubation)

انکوباسیون به معنای مدت‌زمان مشخص در درجه حرارت مشخص می‌باشد. معمولاً در دمای ۲۵ یا ۳۷ درجه صورت می‌گیرد. در این فرآیند آنتی‌ژن‌ها و آنتی‌بادی‌های موجود در چاهک‌ها باهم واکنش نشان دهند.

۵ -اضافه کردن معرف نشان‌دار:(Conjugate)

این مرحله معرف نشان‌دار شده با آنزیم که به کنژوگه معروف است به‌منظور نشان‌دار کردن واکنش‌های آنتی‌ژن و آنتی‌بادی افزوده می‌شود.

۶ -شستشو چاهک‌ها:(Washing)

در این مرحله با محلول شستشوی کیت، درون چاهک‌ها شستشو داده می‌شود. تا آنتی‌ژن‌ها و آنتی‌بادی‌های غیراختصاصی که در واکنش شرکت نکرده آمد و OD کاذب ایجاد می‌کنند، از محیط چاهک‌ها تخلیه شوند. این مرحله توسط دستگاه الایزا واشر صورت می‌پذیرد .

۷ -اضافه کردن سوبسترا:(TMB-Substrate)

در این مرحله از آزمایش الایزا یک معرف دیگر به چاهک‌ها اضافه می‌شود که سوبسترا نام دارد. سوبسترا با کنژوگه واکنش نشان داده و سبب تشکیل رنگ درون چاهک‌ها می‌گردد .

۸ -اضافه کردن محلول استاپ: (Stop)

در ادامه آزمایش الایزا یک معرف دیگر به نام Stop به چاهک‌ها اضافه می‌شود. این معرف سبب متوقف کردن واکنش آنزیمی و درنتیجه جلوگیری از افزایش رنگ درون چاهک‌ها می‌گردد.

۹ -مرحله خوانش:(Read)

در این مرحله میزان جذب محتوای چاهک‌ها به کمک دستگاه الایزا ریدر در طول‌موج‌های مشخص اندازه‌گیری می‌شود.

حساسیت روش الایزا برای تشخیص تب مالت نسبت به روش‌های رایت لوله‌ای و فیکساسیون کمپلمان بیشتر است در این روش آنتی‌بادی‌های ضد بروسلایی قابل‌سنجش است علاوه بر آن می‌توان کلاس آنتی‌بادی IgM, IgG را هم مورد تشخیص قرارداد. درنتیجه برای افتراق مرحله‌ی حاد از مزمن تب مالت می‌توان از این روش استفاده کرد. برای ارزیابی IgG الایزا روش مناسبی بوده و الایزا غیرمستقیم با آنتی‌ژن S-LPS می‌تواند جای کومبس را در این مورد بگیرد .البته اشکال الایزا آنجاست که کیفیت reagent های تجاری متنوع است و مقایسه نتایج راکمی دشوار می‌کند و نیاز دارد تا مواد مرجع استاندارد تهیه شود تا بتوان تفسیر دقیق‌تری را انجام داد.

الایزا یک روش آزمایشگاهی خوب برای غربالگری جمعیت‌های بزرگ برای آنتی‌بادی‌های بروسلا و برای تمایز بین فازهای حاد و مزمن بیماری است . این آزمایش انتخابی برای موارد پیچیده ، موضعی یا مزمن است به‌خصوص زمانی مورد ازلحاظ بالینی مشکوک است و سایر آزمایش‌ها منفی است .

الایزا در تشخیص بروسلوزیس حساسیت و ویژگی بیشتر از آزمایش SATدارد و می‌تواند هم‌زمان IgAو IgMو IgGرا اندازه‌گیری نموده و وضعیت بالینی را بهتر روشن نماید. همچنین بررسی‌ها نشان می‌دهد که الایزا در تشخیص بروسلوزیس عصبی حساس‌ترین آزمایش است.

CDCپیشنهاد می‌کند که نتایج مثبت ازنظر IgG و یا IgM درروش الایزا ، با استفاده از روش استاندارد آگلوتیناسیون (SAT) تایید شوند. نتایج مثبت به روش الایزا که توسط SAT تایید نشده‌اند، ممکن است نشان‌دهنده نتایج مثبت کاذب باشند. اما اگر همچنان شک به بیماری بروسلوز بود، آزمایش باید ۷ تا ۱۴ روز بعد مجدد تکرار شود.

ابتلا به بروسلوز در آزمایشگاه

بروسلوز را به‌عنوان شایع‌ترین بیماری باکتریال اکتسابی در آزمایشگاه می‌شناسند. شاید یکی از دلایل این موضوع، آن باشد که نمونه معمولاً با تشخیص نامعلوم به آزمایشگاه ارسال می‌شود. از طرفی دوز عفونی کننده این باکتری پائین است و به‌راحتی بیماری ایجاد می‌کند، و این موضوع در کنار قابلیت ایجاد ریز ذرات (آئروسل) ، ریسک ابتلا به این بیماری را در آزمایشگاه افزایش می‌دهد.

از راه‌های معمول که باعث انتقال این باکتری به کارمندان آزمایشگاه می‌شود، به استنشاق کشت های باکتریولوژیک، تماس مستقیم پوستی، تلقیح تصادفی به بدن، تماس دهان با پیپت (mouth pipetting) و پاشیده شدن مواد آلوده به چشم، دهان و بینی کارمند آزمایشگاه، می‌توان اشاره نمود

معمولاً کار با محیط کشت بروسلا بدون وسایل محافظتی، می‌تواند باعث بیمار شدن کارمند آزمایشگاه و افرادیکه در فاصله یک و نیم متری از او هستند، گردد. اگر به طریقی ایجاد آئروسل گردد (سانتریفوژ کردن نمونه آلوده، هنگام آزمایش کاتالاز، ...).تمام افراد حاضر در آزمایشگاه در معرض آلوده شدن قرار می‌گیرند و ممکن است به بروسلوزیس آلوده شوند. این افراد گروه پرخطر(High risk) را تشکیل می‌دهند. سایر افراد یکه در آزمایشگاه حضور دارند اما در گروه پرخطر قرار نمی‌گیرند را ، کم‌خطر یا Low riskمی‌گویند.

اقدامات پیشگیرانه بعد از برخورد تصادفی در آزمایشگاه :

مراقبت از زخم و تجویز توکسوئید کزاز در صورت نیاز و پروفیلاکسی بعد از برخورد(post-exposureprophylaxis) با باکتری بروسلا، تجویز ۶ هفته داکسی‌سیکلین به‌تنهایی است.

در موارد آلوده شدن ملتحمه، ۶ هفته رژیم خوراکی ترکیبی داکسی سایکلین (۱۰۰میلیگرم هر ۱۲ساعت) به همراه ریفامپین (۶۰۰میلیگرم یکبار در روز) لازم است.

بعد از یک تماس تصادفی آزمایشگاهی تمام افراد که در گروه پرخطر قرار می‌گیرند باید درمان پیشگیرانه PEP شش‌هفته‌ای قرار بگیرند. برای افراد low risk بهتر است قبل از تجویز داروی پیشگیری‌کننده، فواید و عوارض درمان توضیح داده شود و از رژیم درمانی ۳ تا ۶ هفته استفاده نمود. در مورد زنان باردار بهتراست با پزشک متخصص زنان در مورد لزوم شروع رژیم پیشگیرانه مشاوره انجام شود.

بعد از تماس آزمایشگاهی با بروسلا، توصیه می‌شود هرچه زودتر یک نمونه اولیه (نمونه پایه) سرم فرد آسیب‌دیده تهیه گردد. نمونه‌های متعدد سرم به‌طور سریالی باید در هفته‌های ۲ ،۴ ،۶ و ۲۴ بعد از برخورد تهیه و بررسی شوند

فصل سوم

ایمنی و اپیدمیولوژی

ایمنی:

بیشتر عفونت‌های بروسلایی در انسان توسط مکانیسم‌های ایمنی مهارشده و میزان عفونت‌های بدون علامت ۱۰ برابر بیشتر از عفونت‌های دارای علائم بالینی است.

تعدادی از دامپزشکان و قصابان بدون وجود علائم بالینی عیارهای بالایی از آنتی‌بادی دارند. تقریباً ۹۵-۹۰ درصد از بیماران پس از یک‌بار ابتلا نسبت به عفونت بعدی مصونیت پیدا می‌کنند البته این مصونیت موقتی هست.

در بروسلوز هم ایمنی هورمون و هم ایمنی سلولی دخالت دارند بروسلاها انگل داخل سلولی هستند و عامل مهم مصونیت در بروسلوز، مقاومت سلول‌های بیگانه‌خوار هست زیرا ماکروفاژها در حیوان ایمن باعث از بین رفتن ارگانیسم‌های داخل سلولی شده و از انتشار عفونت در میزبان جلوگیری می‌کند.

نقش آنتی‌بادی‌ها در ایجاد مصونیت فقط در خصوص باکتری‌های خارج سلولی مؤثر است و این آنتی‌بادی‌ها برای بروسلاهای داخل سلولی اثری ندارند.

به دنبال تهاجم باکتری یک حساسیت تأخیری اختصاصی نسبت به آنتی‌ژن بروسلا حاصل می‌شود که این واکنش به‌طور مشخص به میزان تکثیر ارگانیسم‌های زنده بستگی دارد و برای ایجاد مصونیت ضروری است. زیرا اجزاء ارگانیسم کند شده بندرت باعث بروز این حساسیت می‌شود. پس از شروع عفونت به فاصله کوتاهی آنتی‌بادی‌های اختصاصی از نوع IgM و پس‌ازآن از نوع IgG تشکیل می‌گردد. حضور آنتی‌بادی اختصاصی که به‌عنوان اپسونین عمل می‌کند باعث تسریع فاگوسیتوز میکروب‌ها توسط گلبول‌های سفید چند هسته ای و فاگوسیت ها می‌گردد.

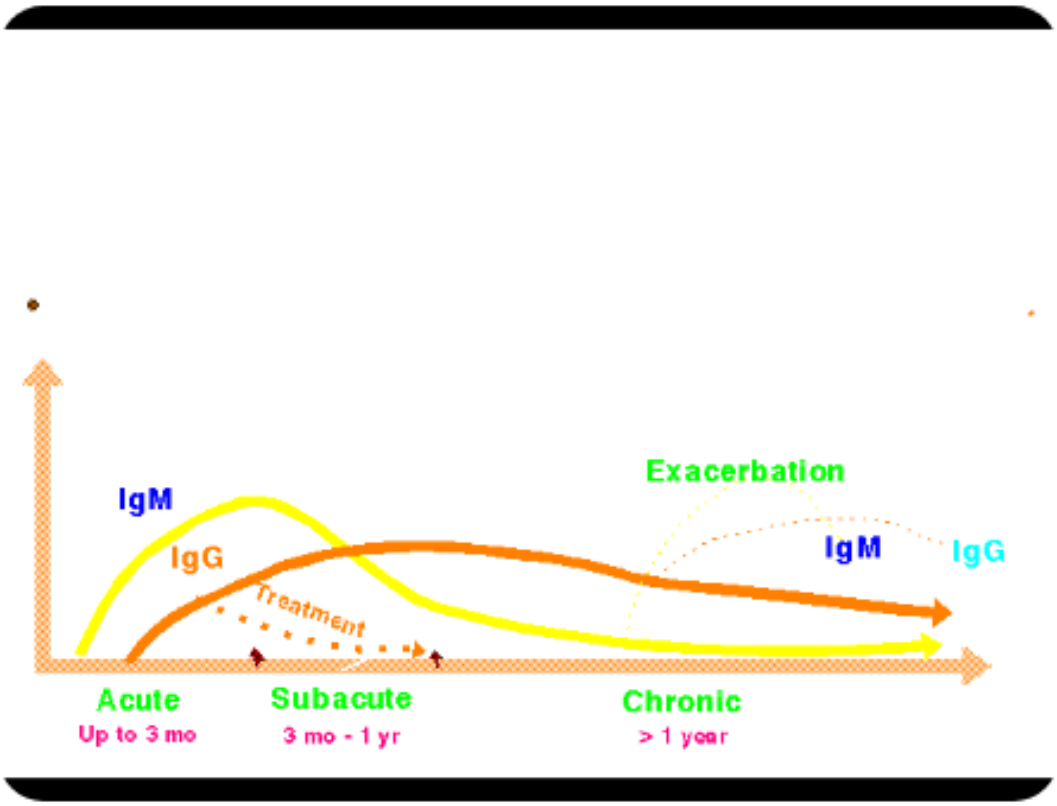
در عفونت‌های مزمن یک عامل مهارکننده‌ی اختصاصی ظاهر می‌شود، که از فعالیت ضد میکروبی سیستم کمپلمان جلوگیری می‌کند.

روند تغییر آنتی‌بادی‌ها و تفسیر سرم شناختی آنها:

بعد از هفته اول بیماری، تیتر IgM بالا می‌رود و قابل‌اندازه‌گیری می‌گردد .تیتر IgG هم مدتی بعد و معمولاً بعد از هفته دوم افزایش می‌یابد .بعد از تقریباً یک ماه به بیشترین مقدار خود می‌رسند .میزان IgM در خون با سرعت بیشتری نسبت به IgGکاهش می‌یابد و در فاز تحت حاد استفاده از آن برای تشخیص ممکن است به‌اشتباه تشخیصی منجر شود درحالی‌که IgG هنوز تیتر بالایی دارد و می‌توان برای رسیدن به تشخیص از آن کمک گرفت.

در بیماری‌های عفونی معمولاً IgM نشانگر فاز حاد بیماری و IgG نشانگر مراحل مزمن(مراحل بعدی که علائم بیماری پایان‌یافته و زمان گذشته است)، هست .برخلاف اغلب بیماری‌های عفونی، در بیماری تب مالت این‌گونه نیست وIgG با علامت‌دار بودن و فعال بودن بیماری همراهی بیشتری دارد تا IgM ، و برای همین از IgG برای تشخیص فاز فعال بیماری استفاده می‌شود .به‌عنوان‌مثال در

کارگران کشتارگاه که دائماً با باکتری بروسلا تماس دارند دیگر انتظار نمی‌رود که IgMتیتر بالایی داشته باشد(چون از مراحل اول بیماری زمان زیادی گذشته است) و برای تشخیص تب مالت از IgG کمک می‌گیرند .کاهش زودهنگام تیتر IgM و از طرفی بالا ماندن آن در برخی بیماران حتی بعد از درمان ، باعث شده است تا از آن به‌عنوان شاخص فعال بودن بیماری استفاده نکنند و در عوض IgG را که حساسیت بیشتری برای تشخیص فعال بودن بیماری دارد برای تشخیص بیماری فعال و پاسخ به درمان انتخاب نمایند.



شکل- ۸ روند تغییر آنتی‌بادی‌ها در بدن بیمار در طول بیمار

در اغلب مواردی که درمان مناسب انجام‌شده و بهبود کلینیکی حاصل گردد، بعد از ۱۲ ماه، تیتر IgG قابل‌توجه نخواهد بود .با بررسی IgM و IgG توسط الایزا مشخص‌شده است که پس از درمان مناسب، تیتر IgM و IgG به‌سرعت کاهش می‌یابد و معمولاً تیتر IgM سریع‌تر از IgG کاهش می‌یابد .ممکن است IgM وIgA تا مدت‌ها بعد از درمان موفق همچنان در سرم(با تیتر پایین)قابل‌اندازه‌گیری بمانند.

معمولاً اگر درمان انجام شود تیتر IgG شش ماه تا یک سال بعد کمتر از حد تشخیصی خواهد شد، و این غالباً نشانه درمان موفق است، درحالی‌که علی‌رغم درمان موفق ممکن است IgM بعد از یک سال نیز در برخی بیماران بالا بماند و ازاین‌جهت برای پیگیری وضعیت بهبود بیماران از IgG استفاده می‌شود که با آزمایش 2ME می‌توان آن را اندازه‌گیری نمود.

بدون درمان معمولاً همچنانکه بروسلوز به سمت مزمن شدن می‌رودIgM ناپدید می‌شود اما کماکان IgG بالا می‌ماند و به همین دلیل از IgG برای تشخیص بروسلوز مزمن استفاده می‌شود.

آزمایش الایزا برای اندازه‌گیری ایزوتوپ های آگلوتینین ها ترجیح داده می‌شود. الایزا علاوه بر آگلوتینین ها می‌تواند IgGهای غیر آگلوتینین را هم‌اندازه بگیرد و این‌یکی از تفاوت‌های آن با 2ME است .برای تطبیق تیتر آنتی‌بادی با سیر کلینیکی بروسلا باید به کلاس آنتی‌بادی که توسط یک آزمایش خاص اندازه‌گیری می‌گردد توجه نمود .آزمایش رایت مجموع آنتی‌بادی‌ها را اندازه می‌گیرد و آزمایش 2ME تیتر IgGرا نشان می‌دهد.

ازلحاظ تئوریک ایمونوگلوبولین اولیه واصلی در بروسلوزیس حاد IgM است .به‌تدریج و مخصوصاً در کسانی که درمان مناسب و به‌موقع انجام نگیرد ساختنIgM باگذشت زمان به سمت ساخت IgG تغییر پیدا می‌کند و از میزان IgM کاسته می‌شود.

در بیمارانی که شروع آرام و آهسته‌تری از بیماری را تجربه می‌کنند ، همچنین در بیمارانی که **در مراحل دیرتر** از بیماری به پزشک مراجعه نموده‌اند و در بیمارانی که دچار عود بیماری شده‌اند ممکن است افزایش چشمگیر IgM اولیه را مشاهده نکنیم.

هر سه گروه ایمونوگلوبولین هاIgM ،IgG ، IgA باید بعد از درمان موفق کاهش یابند، در غیر این صورت باید برای بیمار ارزیابی‌های بیشتری در جهت تشخیص بروز عود و همچنین مزمن شدن تب مالت(ناشی از درگیری موضعی بافتها)انجام گیرد .در صورت بروز عود تیتر IgG و IgA افزایش می‌یابد.

در برخی بیماران (۲۵تا ۵۰ ٪) ممکن است تا یک سال بعد از درمان مناسب و بهبودی بالینی هنوز هم تیتر IgM قابل‌اندازه‌گیری باشد .در اغلب این بیماران تیتر IgG نیز گاهی تا ۱۸ ماه بعد از درمان در حدی مثبت می‌ماند(البته این واقعه کمتر از IgMارخ می‌دهد و تیتر IgG بعد از یک سال از درمان قابل‌اعتمادتر است و برای تشخیص پاسخ به درمان استفاده می‌شود.)

اگر بعد از بهبودی بالینی کامل ، عود بیماری رخ دهد تیتر IgG افزایش مجدد نشان می‌دهد ولی تیتر IgM افزایش ندارد .برای تشخیص عود تب مالت و فعال بودن بیماری نیز از IgG استفاده می‌شود.

تیتر تشخیصی برای آزمایش آگلوتیناسیون استاندارد داخل لوله‌ای SAT (یا همان آزمایش رایت)۱/۱۶۰ است ولی در مناطق اندمیک تیترهای بالاتری را برای افزایش ویژگی آزمایش در نظر می‌گیرند .

تیتر ۱/۱۶۰ در اغلب منابع به‌عنوان تیتر مثبت مطرح است که در ایران به دلیل اینکه اغلب بیماران دچار عفونت بروسلا ملی تنسیس هستند(ولی از طرفی در آزمایش رایت از آنتی‌ژن بروسلا ابورتوس استفاده‌شده است)تیترهای پایین‌تر (۱/۸۰)نیز مثبت تلقی می‌شوند.

آنچه بیش از تیتر منفرد اهمیت دارد افزایش تیتر بعد از دو هفته به میزان ۴ برابر است .تیتر منفرد مثبت می‌تواند در اثر تماس قبلی و یا جدید ایجادشده باشد .همچنین در برخی باکتری‌ها گرم منفی نیز تیتر رایت به‌طور کاذب مثبت (هرچند با تیترهای نسبتاً پایین)می‌شود که ازجمله آنها می‌توان به سالمونلا، یرسینیا آنتروکولیتیکا، عامل تولارمی(فرانسیسلا تولارنسیس)، عامل وبا(ویبریوکلرا) و اشریشیا کولی O157 اشاره نمود.

در ایران حداقل تیتر برای رایت ۱/۸۰ 1 و برای 2ME نیز ۱/۴۰ در نظر گرفته‌شده است .آزمایش کومبس رایت با تیتر ۱/۴۰ و تیتر فیکساسیون کمپلمان (CF) با تیتر ۱/۱۶ باارزش تلقی می‌شوند.

آزمایش کومبس رایت و آزمایش ایمونوکاپچر-آگلوتیناسیون در تشخیص مراحل اولیه تب مالت و همچنین در موارد عفونت مجدد و یا عود از حساسیت و ویژگی تشخیصی بیشتری برخوردارند. در مراحل طول کشیده بیماری(مزمن) و افرادی که دچار عود بیماری

می‌شوند و تشخیص سرم شناختی بیماری دشوار می‌شود از آزمایش کومبس رایت و آزمایش ایمونوکاپچر-آگلوتیناسیون استفاده می‌شود.

اپیدمیولوژی :

باآنکه بروسلوز در برخی از کشورهای پیشرفته جهان تقریباً ریشه‌کن شده است اما این بیماری همچنان از تمام نقاط دنیا گزارش می‌شود (جدول ۴). حتی میزان بروز بیماری حیوانی و انسانی در بسیاری از نقاط دنیا افزایش‌یافته است. در حال حاضر بروسلوز انسانی به تعداد قابل ملاحظه از روسیه، آفریقا، خاورمیانه، هند، اروپا و آمریکا گزارش می‌گردد و طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی (WHO) سالیانه حدود ۵۰۰,۰۰۰ مورد بروسلوز ثبت‌شده، به این سازمان گزارش می‌شود البته موارد بروسلوزی که در سطح جهان، بروز می‌نماید خیلی بیشتر از نیم میلیون موردی است که همه‌ساله به سازمان بهداشت جهانی گزارش می‌گردد. به‌طوری‌که تخمین زده می‌شود تنها ۴ درصد موارد بروسلوز، تشخیص داده‌شده و تحت درمان قرار می‌گیرند.

طبق گزارش مرکز بهداشت استان آذربایجان شرقی میزان بروز بروسلوز در استان در سال ۱۳۸۴ نسبت به سال ۱۳۸۳ تقریباً دو برابر شده است. گونه ملی تنسیس، شایع‌ترین گونه بروسلا در سراسر دنیا هست.

در کشورهای پیشرفته صنعتی نسبت ابتلاء مزدان به زنان در حدود ۵ به ۱ تا ۶ به ۱ و میزان گرفتاری در کودکان، خیلی کمتر از بزرگ‌سالان گزارش گردیده است ولی در کشورهای در حال پیشرفته، این نسبت‌ها به‌هیچ‌وجه صدق نمی‌کند و تنها به دلیل رابطه شغلی مزدان (مثل سلاخی و قصابی) تا حدودی در این جنس بیشتر دیده

می‌شود. بر اساس بررسی‌های اخیر در نقاط مختلف ایران، گروه سنی ۱۹-۱۵ ساله بیشتر از سایر گروه‌های سنی در معرض خطر مبتلابه بروسلوز قرار داشته و نسبت ابتلاء به بروسلوز در کودکان برخلاف گزارش‌های خارجی چندان کمتر از بزرگ‌سالان نیست و اختلاف فاحشی در توزیع جنسی بیماری نیز به چشم نمی‌خورد.

گونه‌های بروسلا	میزان طبیعی	محل انتشار
بروسلا آبورتوس تیپ ۶-۱ و ۹	گاو	در تمام نقاط دنیا به‌استثناء نقاطی که بیماری را ریشه‌کن نموده‌اند نظیر ایرلند شمالی، بلژیک، دانمارک، نروژ، سوئد ... ضمناً در انگلستان، آمریکا، کانادا، استرالیا و نیوزلند، اقدامات وسیعی در این زمینه انجام‌شده است.
بروسلا ملی تنسیس	بز و گوسفند	ایران، ترکیه، هند، سایر کشورهای آسیایی و آفریقائی، کشورهای حوزه مدیترانه، آمریکای مرکزی و جنوبی
بروسلا سوئیس تیپ ۳و ۱	خوک	ایالات غربی آمریکا، آمریکای شمالی و مرکزی
تیپ ۲	خوک و خرگوش	دانمارک ، بخش هائی از اروپای مرکزی
تیپ ۴	گوزن	روسیه، آمریکای شمالی
تیپ ۵	جوندگان	شوروی سابق
بروسلا کانیس	سگ	آمریکا، ژاپن، آلمان، چکسلواکی سابق
بروسلا اویس	گوسفند	استرالیا، جنوب آفریقا، بخش هائی از آمریکای جنوبی، قسمت هائی از اروپای مرکزی
بروسلا نئوتومه	موش جنگلی	ایالات‌متحده آمریکا

جدول شماره ٤- پراکندگی جغرافیایی بروسلوز، در بین حیوانات

توسعه اخیر صنایع دامپروری بدون استفاده از روش‌های استاندارد و علمی و تداوم روش‌های دامپروری سنتی، عادت های تغذیه سنتی به‌خصوص در مورد لبنیات ازجمله عواملی هستند که در شیوع بیشتر بیماری نقش دارند. بروسلاها در شیر، ادرار، فضولات و بافت های حیوانات مبتلا وجود دارند. شایع‌ترین راه انتقال بیماری به انسان انتقال، از راه دستگاه گوارش از طریق مصرف شیر آلوده و یا فرآورده‌های خام و غیرپاستوریزه آن مثل پنیر تازه هست.

بروسلوز بیشتر در کسانی که شیر و لبنیات غیرپاستوریزه مصرف می‌کنند و یا با حیوانات سروکاردارند مانند کشاورزان، دامداران، چوپانها، دباغها، دامپزشکان، قصاب‌ها، کارکنان آزمایشگاه ها و صنایع بسته بندی دامی و کارگران کشتارگاهها مشاهده می‌شود.

در ضمن در فصول بهار و تابستان که در واقع فصول باروری و زایمان دام‌ها است در اثر تماس مردم با بافت های آلوده دامی مثل جفت های سقط شده حیوانی و تولید و مصرف بیشتر لبنیات تازه میزان بروز بیماری بیشتر است. در حال حاضر بروسلوز انسانی، در کشورهای صنعتی، بیشتر در کارگران کشتارگاهها و قصاب‌ها مشاهده می‌شود در کشور ایران بیشترین میزان بروز بیماری در کشاورزان، دامداران و افرادی که از فرآورده‌های دامی غیرپاستوریزه استفاده می‌کنند مشاهده می‌شود . عامل بیماری برای انسان در ایران معمولاً گونه ملی تنسیس است ولی با توجه

به اینکه بروسلا آبورتوس نیز به فراوانی از گاوها در نقاط مختلف کشور جدا شده است بعید نیست که مواردی از بروسلوز ناشی از گونه آبورتوس نیز در بین ایرانیان بروز نماید که به علت اشکالات تکنیکی آزمایشگاهی تشخیص داده نشده و یا به علت خفیف بودن علائم بالینی چندان جلب توجه نمی‌کند.

گونه‌های های مختلف بروسلا در بین حیوانات ایران:

بر اساس مطالعاتی که طی سالهای ۵۹-۱۳۵۰ در بخش بروسلوز انستیتورازی حصارک صورت گرفته نتایج زیر، حاصل شده است:

۱) بروسلا آبورتوس جدا شده از حیوانات ایران، از بیوتیپ های ۱ و ۲ و ۳و ۴و ۵ و ۶ و ۹ تشکیل شده به‌طوری‌که بیوتیپ ۳ حالت آندمیک داشته و بعد از آن بیوتیپ های ۵ و ۹ از وفور بیشتری دارند.
۲) بروسلا ملی تنسیس بیوتیپ ۱ و ۲ در موارد زیادی از گوسفندان و بزها و حتی از گاو و شتر نیز جدا شده است.
۳) بروسلا سوئیس قبلاً در خوک‌های ایران یافته می شد که عمدتاً از بیوتیپ ۱ و چند نمونه از بیوتیپ ۲ بوده ولی در حال حاضر، مواردی مشاهده نمی‌شود.
۴) بروسلا کانیس و اوویس تاکنون در ایران گزارش نشده است.

فصل چهارم:

پیشگیری و درمان : (فقط برای مطالعه)

پیشگیری:

۱) راه اساسی پیشگیری بروسلوز در انسان ریشه‌کن نمودن بیماری در دام‌ها است برای این کار بایستی حیوانات آلوده را با استفاده از آزمایش‌های سرمی و جلدی شناسایی و از حیوانات سالم جدا نمود.

واکسیناسیون حیوانات واجد شرایط: به‌طورکلی اگر شیوع عفونت در حیوانات یک منطقه حدود ۵٪ باشد تنها واکسیناسیون توصیه می‌شود در صورتیکه شیوع کمتر از ۱٪ باشد احتمالاً اجرای یک برنامه ریشه‌کنی کوتاه‌مدت روش مناسبی باشد معمول‌ترین واکسنی که برای ایمن‌سازی گاوها بکار می‌رود سوش زنده ضعیف شده بروسلا آبورتوس است یک تزریق واکسن حداقل برای ۷ سال حیوان را محافظت می‌کند. برای ایجاد ایمنی در بز و گوسفند از واکسن تهیه‌شده از بروسلا ملی تنسیس ضعیف شده (موتان Rev-1) استفاده می‌شود واکسن‌های Sev-1 و S19 در صورت تلقیح تصادفی، قادر به ایجاد عفونت در انسان هستند.

واکسن انسانی:

در سالهای اخیر فعالیت‌های جهت تهیه واکسن انسانی انجام‌یافته و در حال حاضر سوشهای خاصی از بروسلای زنده ضعیف شده به دلیل مطمئن بودن، ثبات و ایمنی‌زایی جهت واکسیناسیون در انسان بکار می‌روند. با توجه به ایمنی متقاطع بین گونه‌های مختلف بروسلا و به دلیل آنکه بیماریزایی بروسلا آبورتوس در انسان کمتر از گونه ملی تنسیس است. سوشهای ضعیف شده‌ای از واریته های بروسلا آبورتوس (S19) و در برخی موارد سایر سوشهای آن انتخاب‌شده است.

در جمهوری‌های شوروی سابق، واکسیناسیون انسان با واکسن زنده بروسلا از سال ۱۹۵۲ در گروه‌های خاص از کارگران در معرض خطر (با آزمایش‌های سرولوژی و آزمون جلدی منفی) از طریق خراش پوستی یا تزریق زیر جلدی استفاده‌شده است. یک دوز واکسن (۱۰ سلول باکتری) ایمن زا بوده و فرد را برای یک سال محافظت می‌کند در مناطقی که افراد واکسینه شده بودند میزان بروز بروسلوز انسانی ۶۰٪ کاهش نشان داد. در مراحل بعدی می‌توان جهت تکرار واکسن از واکسن با دوز ضعیف (نصف دوز قبلی) استفاده شود لازم به یادآوری است که تلقیح مکرر واکسن زنده باعث بروز حساسیت می‌گردد. تاکنون حداقل دو نوع کمپلکس استخراجی از دیواره سلولی باکتری بروسلاها به‌عنوان آنتی‌ژن حفاظتی در انسان استفاده‌شده است که یکی آنتی‌ژن محافظت‌کننده بروسلوز (BPA)و دیگری کمپلکس غیرمحلول در فنل (PIF) هست.

واکسن BPA را با استفاده از اسید استیک یک‌دهم نرمال استخراج نموده و برای خالص نمودن بیشتر و حذف بافیمانده آندوتوکسین باکتری از اشعه گاما استفاده می‌شود. همچنین در این واکسن، پلی وینیل پیرولیدون به‌عنوان محرک ایمنی با اجونت بکار برده شده است.

واکسن BIF، عصاره‌ای از بروسلا آبورتوس S19 فاقد لیپید است که توسط سومارکوف و همکارانش تهیه‌شده است که کمپلکس غیررسمی بوده و در آزمایش‌های تجربی برای خوکچه‌هندی و موش محافظت‌کننده بوده است.

۲) آموزش کلیاتی درباره بیماری و راه های پیشگیری از آن به افراد در معرض خطر و در مناطق آندمیک به عموم مردم
۳) پاستوریزه‌کردن شیر، فرآورده‌های لبنی و بستنی
۴) عدم استفاده از محصولات دامی خام، خودداری از دست زدن به لاشه حیوانات آلوده، استفاده از وسایل محافظتی نظیر دستکش و عینک در تماس‌های شغلی
۵) آموزش روحانیون و معلمین محلی و اخذ کمک از آنها به‌منظور ارتقاء آگاهی‌های افراد بومی نسبت به عوارض بیماری و راه‌های پیشگیری از آن
۶) بیمه کردن دام‌های روستائیان و دامداران و تحویل دام‌های سالم در مقابل اخذ دام‌های آلوده آنها یا پرداخت غرامت متناسب به آنان
۷) تشخیص و درمان به‌موقع بیماران به‌منظور جلوگیری از بروز عوارض جدی و مزمن شدن بیماری
۸) در صورت بروز عوارض خطیری مانند گرفتاری ستون مهره‌ها، استئومیلیت بایستی با دارودرمانی یا انجام جراحی مناسب، از پیشرفت بیماری و بروز عوارض زمین‌گیر کننده جلوگیری نمود.
۹) در موارد بروز طغیان یا همه‌گیری باید کانون آلودگی را شناسایی و آن را از بین برد.

درمان:

اهداف اصلی درمان ضدمیکروبی در بروسلوز شامل درمان عفونت فعلی و بهبود علائم آن و نیز جلوگیری از عود بیماری است. بیماری موضعی ممکن است به مداخلات جراحی (مثل تعویض دریچه قلبی، درناژ آبسه و جایگزینی مفصل است) و درمان آنتی بیوتیکی طولانی‌مدت تر نیاز داشته باشد. بعلاوه، سل باید همیشه رد شود یا رژیم‌درمانی به نحوی انتخاب شود که از درمان تک دارویی با عوامل فعال علیه سل (مانند ریفامپین) جلوگیری شود یا یک رژیم ضد سلی کامل تجویز شود.

بیماران مبتلابه بروسلوز، تا زمانی که تب‌دارند باید در بستر استراحت کنند و در صورت وخامت بیماری لازم است در بیمارستان بستری گردند ولی در غیر این صورت می‌توان آنها را به‌طور سرپایی تحت درمان قرارداد. در صورت وجود سوءتغذیه بایستی کربوهیدرات و ویتامین‌های بیشتری در رژیم غذایی آنها گنجانده شود ولی به‌طوری کلی، رژیم غذایی در این بیماران، آزاد هست.

در صورت وجود دهیدراتاسیون باید از مایعات و الکترولیت‌های وریدی مناسبی استفاده نمود و ضمناً باید به بیماران و خانواده آنها اطمینان داد که بروسلوز بیماری قابل درمانی است و بهبودی بالینی و باکتریولوژیک، حاصل خواهد شد.

به‌منظور تسکین سردرد، کمردرد و دردهای عمومی ناشی از بروسلوز، مصرف داروهای مسکن بلامانع است و تجویز ملین در موارد وجود یبوست شدید و داروهای آرام‌بخش در موارد بی‌خوابی و بی‌قراری و امثال آن منع نشده است (برخلاف تیفوئید).

بروسلاها پاتوژن های داخل سلولی هستند و داروهایی که در خارج بدن به‌خوبی بر آنها مؤثر واقع می‌شود ممکن است در بدن به نحو مطلوبی با آنها تماس پیدا نکند و بنابراین جهت ریشه‌کن نمودن این ارگانیسم‌ها باید به درمان درازمدت، اقدام نمود.

بیمارانی که به‌وسیله یک دارو به‌تنهایی نظیر تتراسیکلین، استرپتومایسین، ریفامپیسین یا کوتریموکسازول درمان شده‌اند در ۴۰-۱۰٪ موارد دچار عود بروسلوز، گردیده‌اند و لذا نظر بسیاری از محققین بر این است که بروسلوز را باید با ترکیبی از چند آنتی بیوتیک، درمان نمود. در برخی مطالعه‌های ذکرشده است که افرادی که به عفونت بدون گرفتاری CNS یا آندوکاردیت مبتلا شده‌اند درمان حاوی استرپتومایسین عود کمتری نشان داده است.

قبلاً سازمان جهانی بهداشت، تتراسایکلین ۲ گرم در روز بمدت ۶ هفته + استرپتومایسین ۱ گرم در روزبه مدت ۳ هفته را توصیه می‌نمود و هنوز بعضی از منابع، آن را رژیم انتخابی، معرفی نموده تأثیر داکسی‌سیکلین به مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم در ۱۲ ساعت را همانند تتراسایکلین، دانسته‌اند. این داروها در سطح وسیعی مورداستفاده قرارگرفته و میزان عود ناشی از آن‌ها در سطح پائینی قرار دارد ولی تزریق عضلانی استرپتومایسین، استفاده از این رژیم‌درمانی را در بعضی از موارد مشکل می‌نماید و لذا در حال حاضر Doxycycline به مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم در روز + ریفامیسین

۶۰۰ میلی‌گرم در روز به مدت شش هفته به‌وسیله WHO به‌عنوان رژیم دارویی انتخابی، معرفی‌شده است و برخی از محققین متعقدند که درمان فوق در صورت وجود عوارض چرکی ، به مدت بیش از شش هفته تجویز گردد.
رژیم هائی که به‌منظور درمان بروسلوز حاد بدون عارضه مورداستفاده قرار می‌گیرد ممکن است در مبتلایان به گرفتاری CNS به خاطر پائین بودن سطح تتراسیکلین و استرپتومایسین، در مایع نخاع، منجر به عود بیماری گردند و لذا ترکیبی از ریفامپیسین به‌اضافه سفالوسپورین های نسل سوم را می‌توان در این بیماران تجویز نمود. زیرا این داروها در مایع نخاع از سطح خوبی برخوردار می‌باشند. همچنین برخی از محققین، ترکیب تتراسیکلین یا داکسی‌سیکلین به‌اضافه ریفامپیسین را مناسب دانسته‌اند ولی تجارب بسیار اندکی در رابط با مصرف این داروها وجود دارد و اینکه آیا مصرف آنها در مبتلایان به بروسلوز عصبی، موارد عود کمتری به دنبال خواهد داشت یا نه نیازمند بررسی بیشتری هست.
آندوکاردیت بروسلائی را می‌توان با سه داروی باکتریسید نظیر استرپتومایسین، کوتریموکسازول و ریفامپسین بنحوی که در مورد مننژیت بروسلائی ذکر شد درمان نمود.
البته مبتلایان به آندوکاردیت بروسلائی تقریباً همیشه نیاز به درمان آنتی بیوتیکی همراه با تعویض دریچه دارند و در مورد تأثیر درمان آنتی بیوتیکی به تنهائی و دوره درمانی، نظر واحدی وجود ندارد ولی درمان با ترکیب تتراسایکلین، استرپتومایسین و کوتریموکسازول، به مدت شش هفته یا ریفامپیسین و کوتریموکسازول به مدت ۶-۹ ماه، با موفقیت، مورداستفاده قرارگرفته است.

درمان بروسلوز در زنان حامله:

با توجه به اینکه طی بیماری بروسلوز، ممکن است سقط با زایمان زودرس ناشی از شدت بیماری یا هر علت دیگری عارض شود در زنان حامله حتی هنگامی‌که بیماری با علائم مختصری تظاهر نموده است باید به‌سرعت و به نحو مؤثری آن را تحت کنترل درآورد. البته گرچه اثرات سوء تتراسایکلین در حاملگی به اثبات رسیده است و مصرف استرپتومایسین نیز ممنوع هست ولی شواهدی دال بر اثرات سوء کوتریموکسازول و ریفامپیسین، در جنین انسان، موجود نیست بنابراین می‌توان این داروها را در دوره حاملگی، تجویز نمود. قابل ذکر است که با توجه به اثرات ثابت‌شده سولفامیدها طی چند روز آخر باردار که بر خطر بروز Kernicterus می‌افزاید صلاح است در ۲-۳ هفته آخر حاملگی از مصرف این دارو نیز خودداری شود و تا آخر حاملگی از ترکیب ریفامپیسین و جنتامایسین با مقادیر ذکرشده قبلی استفاده گردد و سپس رژیم مناسبی نظیر کوتریموکسازول و ریفامپیسین جایگزین آن شود.

درمان بروسلوز در اطفال:

در درمان بروسلوز اطفال، تتراسیکلین به مقدار ۲۰-۴۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در روز و داکسی سایکلین به مقدار ۲-۴ میلی کرم و به مدت شش هفته مؤثر واقع می‌شود ولی در کودکان کمتر از ۹ ساله به دلیل رنگی شدن غیرقابل‌برگشت دندان‌های شیری نباید از این داروها استفاده شود. ضمناً طی مطالعه‌ای مشخص‌شده است که ترکیب تتراسیکلین و استرپتومایسین، در بروسلاها خاصیت باکتریسید داشته در حالیکه هر یک از آنها به تنهائی دارای خاصیت باکتریواستاتیک بوده است و جنتامایسین یا توبرامایسین، مؤثرتر از استرپتومایسین، ذکرشده است.

کوتریموکسازول را می‌توان در کودکان به مقدار ۸-۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن برحسب تریمتوپریم تجویز نمود و به مدت شش هفته ادامه داد و از ریفامپیسین و سایر آنتی بیوتیکهای مؤثر بر بروسلاها نیز با موفقیت استفاده‌شده و توصیه گردیده است درصورتی‌که با تجویز استرپتومایسین به‌اضافه تتراسیکلین یا کوتریموکسازول، پاسخ ضعیفی دریافت شود استفاده کرد و همچنین در مننژیت و آندوکاردیت، بروسلائی، ریفامپیسین نیز به داروهای مزبور، افزوده گردد.

به‌منظور جلوگیری از عود بروسلوز ناشی از گونه ملی تنسیس، پیشنهاد می‌شود از ترکیب ریفامپیسین و کوتریموکسازول و در سنین بالاتر از ۹ سالگی از همان رژیم های درمانی بزرگسالان با دوز اطفال، استفاده نمائیم.

آنتی بیوتیک خایی که مصرف آنها در درمان بروسلوز، توصیه نشده است:

بررسی‌های آزمایشگاهی، حاکی از آن است که بروسلاها معمولاً نسبت به مواد دیگری نظیر Imipenem و Ciprofloxacin نیز حساس‌اند ولی مصرف داروهایی نظیر پنی سیلین، سفالوسپورین ها، کلرامفنیکل، تووبیوسین، سیکلوسپورین، اریترومایسین، پلی میگزین ها و سولفانامیدها توصیه نشده است درمان باترانسفوزیون خون، سرم ایمنی دهنده (Serum immune) واکسن‌های بروسلا و فاژهای بروسلا و لوامیزول و سایر موادی که ادعاشده است باعث افزایش پاسخ ایمنی، می‌گردد قابل توصیه نیست و ازآنجاکه تجویز سیپروفلوکساسین، به نحو شایعی منجر به عود، شده است مصرف این دارو نیز توصیه نمی‌شود.

منابع:

۱- پاکزاد پ ، اصول و تفسیر آزمایش‌های سرولوژی بالینی، نور دانش ، تهران ، ۱۳۸۶

۲- شیرزادی م . ر، رضایی ف و همکاران : درمان و تشخیص بروسلوزیس (تب مالت)، نگاه آرمانی ، تهران ، ۱۳۹۲

۳- زینلی محمد، شیرزادی م . ر و همکاران: راهنمای کشوری مبارزه با بروسلوز ، راز نهان ، ۱۳۹۱ ، تهران

۴- ادیبی مطلق ب ، توسلی ف و همکاران : ایمنی زیستی در آزمایشگاه ، سازمان انتقال خون ایران ، تهران ، ۱۳۸۶

۵- بنکدار اصفهانی ش، گویا م.م : آموزش پیشگیری، کنترل و درمان بیماری تب مالت (بروسلوز)، مدل جامع سیستماتیک آموزش و ارتقاء سلامت ، تهران ، ۱۳۹۴

۶- شفیع مجددی م ، سرولوژی و ایمنولوژی عملی ، ارسطو ، تهران ، ۱۳۹۴