



بسته آموزشی

تشخیص میکروارگانیزم های بیماریزا و تفسیر نتایج

تهیه و تنظیم :

دکتر مهدی پارسایی

سال ۱۴۰۴



بسته آموزشی

تشخیص میکروارگانیزم های بیماریزا و تفسیر نتایج

صفحه

فهرست

فصل اول : لیسمانیا

۷

۱ - مقدمه

۸

۲ - چرخه زندگی انگل های لیسمانیا

۱۰

۳ - لیسمانیوز پوستی (سالک)

۱۱

- عامل بیماری
- روشهای انتقال
- اشکال بالینی
- تشخیص آزمایشگاهی
- روشهای نمونه برداری
- روش رنگ آمیزی
- گزارش نتایج
- کشت نمونه

۱۹

۴ - لیسمانیوز احشایی (کالا آزار)

- روش انتقال
- علایم بالینی
- تشخیص آزمایشگاهی
- نمونه برداری از ضایعات احشایی
- الف (روشهای سرولوژی اختصاصی
- روش ایمونوفلوئورسانس
- روش الیزا
- آزمایش آگلوتیناسیون مستقیم
- ب (روشهای سرولوژی غیراختصاصی
- آزمایش فرمول ژل
- ج (روشهای مولکولی

۲۵

۵ - تشخیص لیسمانیوز احشایی در مبتلایان به ایدز

۲۷

فصل دوم : تب مالت

۲۸

۶ - بروسلا

- تاریخچه
- طبقه بندی بروسلاها

	• بروسلا ملی تنسیس • آبورتوس • سوئیس • کانیس • اوویس • نئوتومه • ماریس
۳۱	۷- راههای سرایت بیماری • دوره نهفتگی • علایم بیماری
۳۳	۸- تشخیص آزمایشگاهی • کشت • سروآگلوتیناسیون
۳۶	۹- عوامل موثر بر کاهش میزان بروز بروسلوز
۳۸	۱۰- انتشار بروسلوز در جهان
۳۹	۱۱- وضعیت بیماری در ایران
۴۰	۶- نمونه سوالات
۴۲	۷- منابع

گروه هدف:

دکتری حرفه ای آزمایشگاه – دکترای تخصصی (PhD) رشته های مرتبط علوم آزمایشگاهی و کارشناسی ارشد رشته های بیوشیمی، هماتولوژی، ایمنولوژی، انگل شناسی، ویروس شناسی، میکروب شناسی و کارشناس و کاردان علوم آزمایشگاهی

اهداف آموزشی:

هدف کلی:

افزایش دانش و آگاهی پرسنل آزمایشگاه های شبکه آزمایشگاهی معاونت بهداشت دانشگاه در خصوص تشخیص میکروارگانیزم های بیماریزا و تفسیر نتایج

پس از مطالعه این مجموعه آموزشی انتظاری رود :

- ۱ - روشهای مورد استفاده استاندارد در تشخیص بیماری لیشمانیا را بیان کنند
- ۲ - روشهای استاندارد در تشخیص بیماری تب مالت را ذکر کنند
- ۲ - اهمیت آزمایش صحیح در تشخیص بیماری لیشمانیا و تب مالت را بیان کنند
- ۳ - از کنترل کیفی بخش لیشمانیا و تب مالت آزمایشگاه اطلاع داشته باشند
- ۴ - از روش های نمونه گیری استاندارد برای تشخیص بیماری شناخت داشته باشند

طرح و برنامه درسی:

سرفصل دوره آموزشی:

- لیشمانیوز پوستی (سالک)
- لیشمانیوز احشایی (کالا آزار)
- روشهای انتقال لیشمانیا
- روشهای نمونه برداری از ضایعات مشکوک
- روش رنگ آمیزی
- روشهای سرولوژی
- طبقه بندی بروسلاها
- تشخیص آزمایشگاهی بروسلا

فصل اول :



لیشمانیا

مقدمه

لیشمانیوز ها مجموعه ای از بیماری های انگلی ناشی از گونه هایی از جنس لیشمانیا می باشند که در مناطق گرمسیری امریکا، آفریقا و شبه قاره هند و درنواحی نیمه گرمسیری آسیای جنوب غربی و ناحیه مدیترانه به شکل آندمیک وجود دارند. لیشمانیوزها به اشکال بالینی پوستی (سالک)، مخاطی_ پوستی (اسپوندیا) و احشائی (کالآزار) مشاهده می شوند(شکل شماره ۱). لیشمانیوز احشائی با مرگ و میربالا همراه بوده، اما معمولاً مرگ و میر در بیماری سالک مشاهده نمی شود ولی بدلیل میزان ابتلاء زیاد، ایجاد ضایعات بد شکل پوستی نموده که در برخی موارد تا بیش از یکسال باقی می مانند و معمولاً باعث ایجاد جوشگاه(اسکار) شده که حتی با استفاده از درمان تا آخر عمر بر روی بدن باقی می ماند. از طرف دیگر عفونت های باکتریائی و قارچی ثانویه شامل عفونت های نسوج سطحی و عمقی، آبسه، سپتی سمی، وحتی کزاز از عواض زخم سالک می باشد که ممکن است گاهی موجب ناتوانی و حتی مرگ بیمار گردد.

اگرچه میزان بروز این عوارض ناچیز است ولی با توجه به گستردگی بیماری سالک، تعداد بیمارانی که دچار این عوارض می گردند، قابل توجه خواهند بود.

تخمین زده می شود که بیش از ۱۲ میلیون نفر در دنیا مبتلا به سالک باشند و ۳۵۰ میلیون نفر در مناطقی زندگی می کنند که احتمال ابتلاء آنها وجود دارد و ۱ تا ۲ میلیون نفر به مبتلایان این بیماری اضافه می شوند که متأسفانه بسیاری از آنها ثبت و گزارش نمی شوند. این بیماری در برخی موارد ضایعات / سالانه ۵ متعدد (تا بیش از ۳۰۰ عدد) ایجاد می کند.

گرچه سالانه حدود ۲۰ هزار مورد بیماری لیشمانیوز جلدی در ایران گزارش می شود ولی موارد حقیقی بیماری حدود ۴ تا ۵ برابر این تعداد است. نوع روستائی در اکثر مناطق روستائی نیمی از استان های کشور شایع است و نوع شهری در بسیاری از نقاط شهری کشور به صورت آندمیک وجود دارد. .

میزان بروز لیشمانیوز احشائی در کشور حدود ۲۰۰ تا ۳۰۰ مورد در سال است و این بیماری از تمامی استان های کشور گزارش شده است (شکل شماره ۲)



شکل شماره ۱: اشکال مختلف بالینی لیشرمانیوز ها در انسان

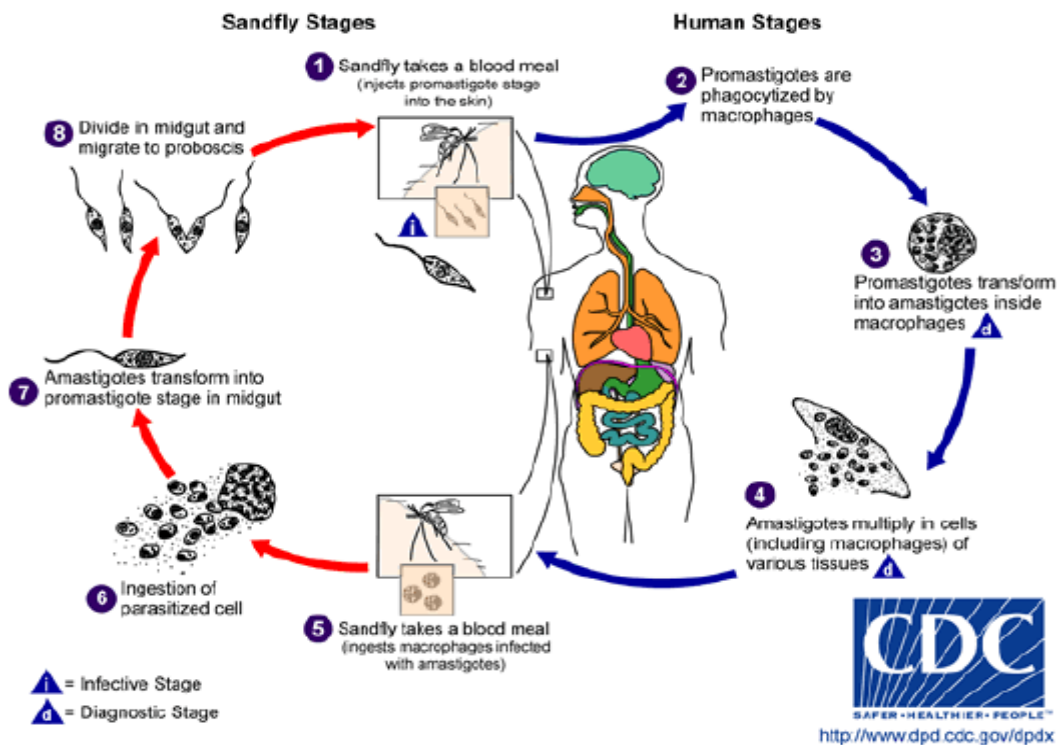


شکل شماره ۲: ریسک بیماری سالک در کشور جمهوری اسلامی ایران

چرخه زندگی انگل در بدن ناقل و میزبان مهره دار

زندگی انگل لیشمانیا حداقل دارای دو مرحله اصلی لیشمانیائی و لپتومونائی می باشد، انگل در مرحله لیشمانیائی (آماستیگوت) بصورت ارگانیسم فاقد تاژک مشاهده می شود (Leishman body). آزاد و دارای بدن گرد یا بیضوی و گاهی دوکی شکل است که در داخل سلولهای بیگانه خوار (ماکروفاژ) پستانداران مرحله لپتومونائی (پروماستیگوت) از تغییر شکل حالت لیشمانیائی ایجاد می شود. انگل در این مرحله در قسمت قدامی دارای یک تاژک است. پروماستیگوت در دستگاه گوارش پشه خاکی و برخی محیط های کشت آزمایشگاهی دیده می شود. پشه خاکی جنس ماده خونخوار است و با مکیدن خون، آماستیگوت را می بلعد. آماستیگوت در دستگاه گوارش پشه به پروماستیگوت تبدیل می شود و تکثیر آن با روش تقسیم غیر جنسی دوتایی انجام می گیرد و بعد از ۴ الی ۱۸ روز، عفونت زائی آن افزایش می یابد به طوری که با گزش پشه خاکی ماده آلوده، پروماستیگوت به انسان سالم منتقل می شود. بطور کلی انگل های لیشمانیا بوسیله انواع پشه خاکی های ماده آلوده به صورت سه چرخه زیر به طور طبیعی می توانند در گردش باشند:

۱-انسان -پشه خاکی -انسان - ۲ حیوان -پشه خاکی -حیوان - ۳ حیوان -پشه خاکی -انسان (شکل شماره ۳)



شکل ۳: چرخه زندگی انگل های لیشمانیا

با توجه به اینکه اشکال پوستی واحشایی جزء شایعترین اشکال بالینی لیشمانیوز در کشور ما به شمار میروند، لذا در این قسمت، خصوصیات مختلف این بیماری ها با تاکید بر روشهای تشخیص آزمایشگاهی آن ها به اختصار شرح داده میشوند.

الف - لیشمانیوز پوستی (سالک)

عامل بیماری لیشمانیوز جلدی (سالک) در ایران :

به تظاهرات بالینی ناشی از انگل لیشمانیا در پوست، لیشمانیوز جلدی یا سالک گفته می شود که دردنیای قدیم از جمله ایران عمدتاً به دلیل لیشمانیا ماژور یا لیشمانیا تروپیکا ایجاد می شود. به لیشمانیوز پوستی ناشی از لیشمانیا تروپیکا، نوع شهری یا نوع خشک گفته می شود که به دلیل ظاهری ضایعه به این نام خوانده می شود و به لیشمانیوز پوستی ناشی از لیشمانیا ماژور؛ نوع روستائی یا نوع مرطوب اطلاق می گردد که بدلیل وجود ترشح در ضایعه می باشد، البته تظاهرات بالینی همیشه با ابتلاء به نوع انگل مطابقت ندارد و تشخیص بیماری براساس شکل ضایعه و محل آن قابل اعتماد نیست.

بیماری ناشی از لیشمانیا ماژور بدلیل داشتن مخزن جونده، بنام نوع زئونوتیک (Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis) و بیماری ناشی از لیشمانیا تروپیکا چون عمدتاً مخزن آن انسان های مبتلای باشند به نام آنترپونوتیک گفته میشود (Anthroponotic Cutaneous Leishmaniasis).

روشهای انتقال :

عمده ترین روش انتقال سالک، گزش پشه خاکی است ولی راه های فرعی دیگری نیز گزارش شده که شامل خاراندن زخم و انتقال مکانیکی توسط سایر بندپایان می باشد که فاقد اهمیت اپیدمیولوژیک می باشند.

اشکال بالینی:

با توجه به عامل بیماری و علائم بالینی عفونت در انسان، لیشمانیوز پوستی به اشکال بالینی خشک (شهری) ، مرطوب (روستائی) ، عودکننده (Recidivans لوپوئید) ، منتشر و اشکال غیرمعمول (اسپوروتریکوئید، زردزخمی، توموری، زگیلی، بادسرخ، محو شونده و...) مشاهده می شود. همچنین لیشمانیوز پوستی ممکن است به اشکال حاد و یا مزمن دیده شود.

تشخیص آزمایشگاهی:

اصولاً پیش از استفاده از روشهای آزمایشگاهی برای تشخیص انواع لیشمانیوزها، بررسی سابقه بیماری و اطلاع از محل سکونت و مسافرت به مناطق بومی این بیماری درکشور و نیز توجه به خصوصیات بالینی بیماری، بسیار مهم و کمک کننده خواهد بود.

در آزمایشگاه سه نمونه (گسترش) از نقاط مختلف ضایعه (ها) جلدی تهیه می شود. بهتراست از بیمارانی که دارای چند ضایعه هستند، چند نمونه از ضایعات مختلف گرفته شود.

نمونه ها بایستی در اسرع وقت مورد بررسی قرار گیرند، در صورتی که یک نمونه منفی باشد، نمونه دوم و سپس نمونه سوم بررسی می شود ولی اگر یک نمونه مثبت باشد نیاز به بررسی نمونه های دوم و سوم نمی باشد.

روش نمونه برداری از ضایعات مشکوک به سالک و بررسی میکروسکوپی:

لبه های ملتهب و متورم ضایعه مهم ترین قسمتی است که بیشترین تراکم آماسیگوت ها را دارند. نکته مهم آنکه هر چه نمونه بیشتری از بافت برداشت شود احتمال مشاهده انگل در نمونه بیشتر است. از آنجایی که ضایعات پوستی ممکن است دچار عفونت های ثانویه باکتریایی و یا قارچی شده باشند، لازم است محلی از ضایعه را که قصد برداشت نمونه از آن وجود دارد، کاملاً تمیز نموده و اگر لازم باشد چندین مرتبه با پنبه الکلی (اتانل ۷۰ درصد) ضد عفونی گردد (شکل شماره ۴)

روش صحیح نمونه برداری و رنگ آمیزی به شرح زیر است:

- ۱- رعایت اصول ایمنی در هنگام نمونه گیری و نیز استفاده از وسایل حفاظتی مانند دستکش و غیره
- ۲- حذف کبره های روی ضایعه و هر گونه چرک روی آن
- ۳- انتخاب محل مناسب برای نمونه برداری شامل لبه خارجی قسمت متورم و ملتهب ضایعه پوستی و اجتناب از نمونه برداری از محل های باز و زخمی ضایعه.
- ۴- استفاده از اتانول ۷۰ درصد برای استریل کردن و شستشوی ضایعه (قبل از نمونه برداری باید صبر کرد که الکلی خشک شود)
- ۵- توجه به عدم استفاده از موادی مانند مرکب و مرکب و روغن (ترکیبات جیوه) در محل ضایعه (زیرا ممکن است باعث تغییر شکل آنها شود) در صورت استفاده از ترکیبات ید دار برای ضد عفونی ضایعه، قبل از نمونه برداری محل ضایعه بایستی به کمک پنبه آغشته به الکلی، از این ماده پاک شود.
- ۶- محلی از ضایعه که برای نمونه برداری در نظر گرفته می شود بایستی توسط دو انگشت شست و سبابه محکم گرفته شده و ثابت گردد.
- ۷- با استفاده از واکسینواستیل استریل (یا لانستی که اطراف آن بریده و باریک شده باشد) و یا یک اسکالپل استریل نوک باریک (کند شده)، شکافی به عمق یک میلی متر در منطقه گرفته شده با انگشتان ایجاد گردد.
- ۸- توسط وسایل فوق از عمق محل شکافته شده به طرف سطح و مرکز ضایعه چند خراش (برای برداشت مقدار مناسب بافت و خونابه) داده شود.
- ۹- وسیله نمونه گیری را بیرون آورده و از ترشحات حاصله بر روی لام گسترش تهیه شود و مشخصات بیمار با قلم الماس روی لام حک گردد. (در صورت نیاز به کشت، در کنار شعله ابتدا نمونه به محیط کشت منتقل شود)

روش رنگ آمیزی گیمسا:

رنگ گیمسا بصورت محلول تجارتي غلیظ به فروش می رسد. این ماده قبل از استفاده باید مورد کنترل کیفیت قرار گیرد. بطور معمول اگر گلبول های سفید و قرمز خون با کیفیت مطلوب رنگ پذیری داشته باشند، رنگ گیمسابرای رنگ پذیری انگل نیز مناسب است.

روش رنگ آمیزی:

- ۱- باید گسترش تهیه شده بدون استفاده از شعله و در هوای اتاق خشک شود.
- ۲- متانول، به مدت ۳۰ تا ۶۰ ثانیه قبل از رنگ آمیزی روی گسترش ریخته شود.
- ۳- گسترش در مجاورت هوا خشک شود.
- ۴- با توجه به نوع گیمسا آنرا به نسبت ۱ به ۱۰ با آب با pH تنظیم شده ۷/۲ رقیق شود (اگر رنگ رسوب کند باید با کاغذ صافی صاف شود)
- ۵ - لام را روی پل رنگ آمیزی قرار داده و به مدت ۳۰ دقیقه بر روی آن محلول گیمسا ی رقیق شده ریخته می شود و یا لام را در ظرف محتوی رنگ با همین مدت زمان قرار می دهیم (باید توجه داشت که در ارتباط با رقت محلول رنگ آمیزی و نوع آن، مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه برای رنگ آمیزی لازم است و هر آزمایشگاه بایستی در حین اجرای برنامه کنترل کیفیت مدت زمان مطلوب را نیز جهت رنگ مورد استفاده، از قبل بدست آورد)
- ۶- لام برای مدت کوتاهی در آب با pH تنظیم شده ۷/۲ فرو برده شده به سرعت خارج شود و در هوا خشک گردد

گزارش نتایج:

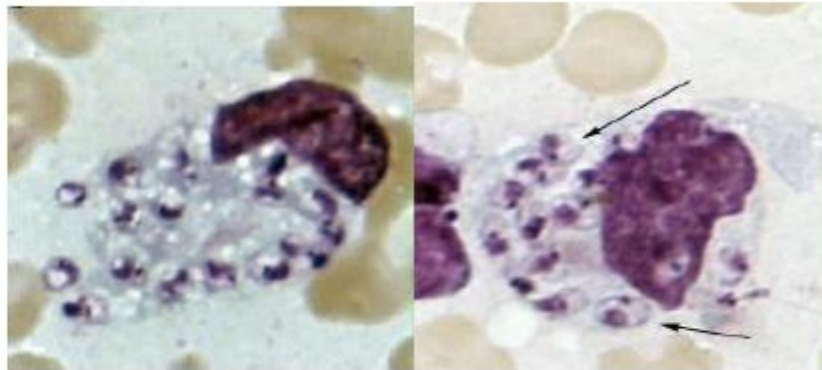
لام (با استفاده از عدسی چشمی ۱۰ و عدسی شیئی ۱۰۰ و روغن ایمرسیون و بدون استفاده از لامل) در زیر میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار می گیرد، تشخیص مثبت، شامل دیدن انگل لیشمانیا بطور واضح می باشد (شکل شماره ۵) . در هر لام تا زمان مشاهده جسم لیشمن باید حداقل ۳۰ ثان مناسب که دارای سلول های ماکروفاژ باشد، بررسی گردد تا شانس مشاهده انگل بیشتر شود و در صورت منفی بودن نمونه، لام دوم و یا سوم مورد

بررسی قرارگیرد، شایان ذکر است که در صورت مشاهده گلبول قرمز فراوان و ندیدن جسم لیشتمن، این نمونه مناسب ارزیابی نبوده و نمونه جدید عاری از خون و حاوی ماکروفاژ بایستی تهیه شود.

نحوه تهیه نمونه از ضایعات پوستی مشکوک به لیشتمانیوز

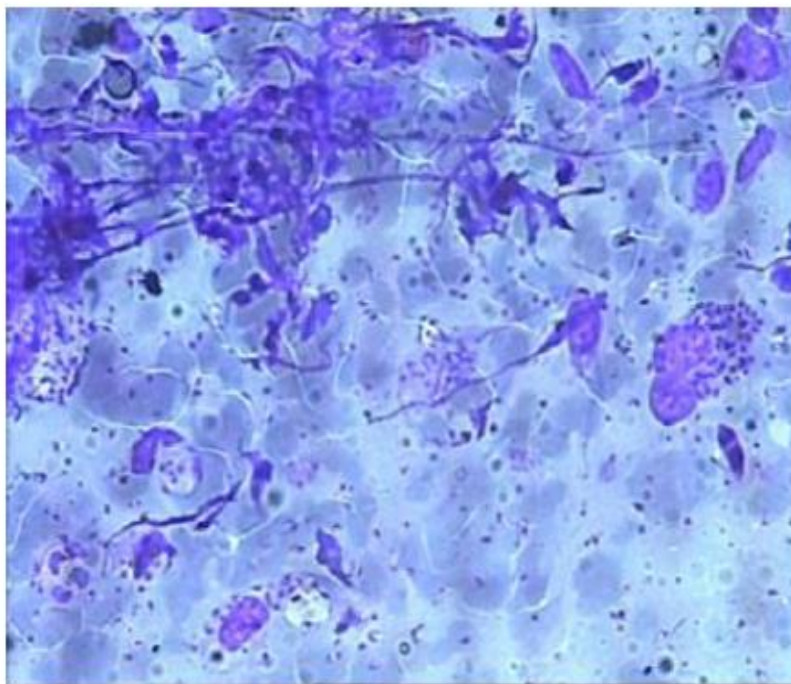


شکل ۴: نحوه تهیه نمونه از ضایعات پوستی لیشتمانیا



شکل ۵: آماستیگوت های مشاهده شده در ماکروفاژ های ضایعات پوستی

جسم لیشمن



کشت نمونه:

در صورتی که سه نمونه گرفته شده منفی باشند ولی شواهد اپیدمیولوژیک و یا وجود سابقه قبلی ابتلا در همان محل ضایعه، احتمال وجود بیماری را افزایش دهد، نمونه لازم برای کشت گرفته می شود و براساس نتایج آزمایشات تکمیلی، بیماری تشخیص داده خواهد شد.

روش تهیه محیط کشت دوفازی (NNN) Novy-Mac Neal-Nicolle :

محیط آگار غذایی:

باکتر آگار ۱۴ گرم

نمک طعام (NaCl) ۶ گرم

آب مقطر ۹۰۰ میلی لیتر

آب را تا دمای جوش حرارت داده و نمک و آگار به مقدار ذکر شده به آن اضافه کنید. آنقدر محلول را بجوشانید تا دانه های آگار حل شود، سپس این محلول را داخل لوله آزمایش در پیچ دار بریزید (حدود یک سوم حجم لوله) در آب آن را بسته و با اتوکلاو (دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه) استریل نمائید. این لوله ها را میتوان تا زمان استفاده در یخچال نگهداری کرد.

هنگام استفاده، لوله را در آب جوش قرار داده تا محیط مایع شود، سپس تا حرارت ۴۰ تا ۵۰ درجه خنک کنید. به هر لوله حدود یک سوم حجم محیط ۱۵٪ خون دفیبرینه خرگوش اضافه کنید، در لوله را ببندید و بین دو کف دست بخوبی بچرخانید تا کاملاً محتویات آن مخلوط شود، پس از آن در درجه حرارت اطلاق بصورت مایل (Slant) قرار دهید تا سفت شود، و آنگاه به یخچال ۴ (تا ۸ درجه) منتقل نمائید، جهت اطمینان از آلوده نبودن؛ یکی از لوله ها را در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار دهید. محیط تهیه شده تا ۴ هفته قابل استفاده می باشد و آماده انتقال نمونه است. بدین ترتیب فاز جامد محیط NNN تهیه می شود (شکل شماره ۶).

فاز مایع معمولاً شامل سرم فیزیولوژی نرمال یا RPMI استریل می باشد که به فاز جامد اضافه می شود و برای ممانعت از رشد باکتریها از پنی سیلین و استرپتومایسین با غلظتهای ۱۰۰ IU/ml و ۱۰۰ g/ml اضافه می شوند. فاز مایع در هنگام کار به فاز جامد اضافه می شود و سطح شیبدار را می پوشاند نمونه های بیوپسی ضایعات، خون محیطی، مغز استخوان، یا نمونه تهیه شده از حاشیه ضایعات و حتی مواد آسپیره شده از بستر ندول را می توان

در این محیط کشت داد. نمونه ها به عمق ۲ میلیمتری از انتهای سطح شیب دار وارد آگار مغذی می شوند، پس از انتقال نمونه، محیط کشت را در دمای ۱۸ تا ۲۵ درجه سانتیگراد (انکوباتور) نگهداری کنید. انگل ها در مایع جمع شده در قسمت شیب دار محیط، رشد می کنند.

لوله ها ۲-۳ روز در میان تا یک ماه مورد بررسی قرار می گیرند (در ارتباط با گونه انگل و شرایط کشت متفاوت می باشد) و در صورت عدم مشاهده انگل با میکروسکوپ فاز کنتراست، کشت منفی در نظر گرفته می شود. اما اگر تعداد انگل کم باشد زمان بیشتری را برای رشد نیاز دارد. در صورت وجود آلودگی با باکتری ها و قارچها، انگل توانائی رشد در محیط را ندارد (شکل شماره ۷).

تذکر ۱:

از آنجائیکه میزان آنتی بادی ایجاد شده در لیشمانیوز پوستی بسیار ناچیز است، لذا استفاده از آزمایشات سرولوژی به علت حساسیت پائین آن جهت تشخیص لیشمانیوز پوستی به جز در موارد خاص توصیه نمی شود.

تذکر ۲:

به علت افزایش حساسیت تاخیری DTH = (Delayed- Type Hypersensitivity) در لیشمانیوز نوع لوپوئید در مواردی که انگل لیشمانیا در ضایعات پوستی دیده نمی شود می توان از تست پوستی لیشمانین (تست مونته نگرو)، کشت و در صورت امکان آزمایش مولکولی PCR بمنظور تایید تشخیص آزمایشگاهی این شکل از بیماری استفاده نمود. ایندوراسیون (سفتی) ایجاد شده با میانگین اندازه ۵ میلی متر و یا بیشتر پس از گذشت ۴۸ تا ۷۲ ساعت از تزریق لیشمانین به عنوان نتیجه مثبت تلقی می گردد.

مورد قطعی تشخیص لیشمانیوز پوستی (سالک) مشروط به موارد زیر است:

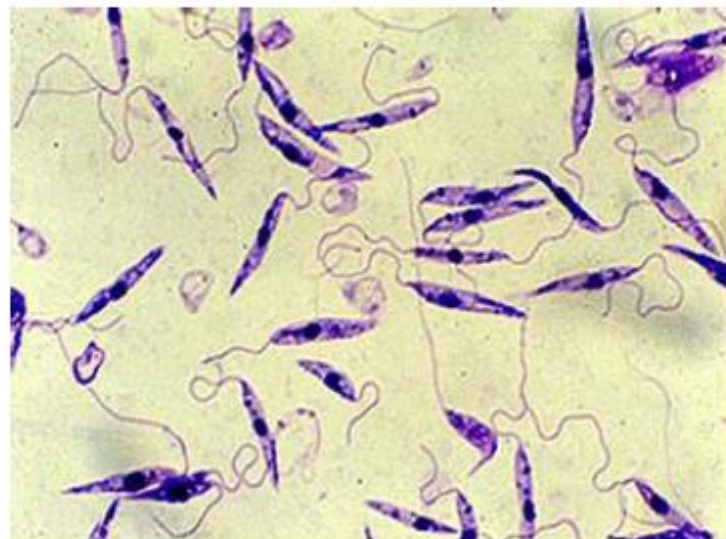
- ۱- دیدن انگل در گسترش تهیه شده از ضایعه پوستی.
- ۲- کشت مثبت انگل یا نتیجه مثبت آزمایشات تخصصی دیگر (مانند PCR و ...) که در آزمایشگاه های تخصصی (رفرانس) انجام شده باشد.

محیط کشت NNN



شکل ۶: محیط کشت NNN

پروماستیگوت های لیشمانیا در محیط کشت NNN (درشت نمائی ۴۰۰)



شکل ۷: پروماستیگوت های لیشمانیا در محیط کشت NNN

ب: لیشمانیوز احشائی (کالا آزار)

لیشمانیوز احشائی در اثر گونه هایی از مجموعه لیشمانیا دونووانی ایجاد می شود و از نظر اپیدمیولوژی به اشکال هندی، مدیترانه ای ؛ آفریقائی و آمریکائی مشاهده می شود. لیشمانیوز احشایی ایران که نوع مدیترانه ای می باشد یک بیماری زئونوز است که عامل آن لیشمانیا اینفانتوم می باشد و توسط پشه خاکی از سگ و سگ سانان به انسان منتقل میشود. تاکنون لیشمانیوز احشائی از تمامی استان های کشور گزارش شده است. بر اساس مطالعات اپیدمیولوژیک که تا کنون انجام شده است ؛ این بیماری در مناطقی از استان های اردبیل، آذربایجان شرقی، فارس و بوشهر به شکل آندمیک وجود دارد.

روش انتقال:

مهمترین راه انتقال این بیماری از طریق گزش پشه خاکی های آلوده می باشد ولی مواردی از انتقال بیماری از طریق جفت از مادر به جنین، تماس جنسی، وسایل تزریقی آلوده و به طور نادر از طریق خون آلوده گزارش شده است.

علائم بالینی:

لیشمانیوز احشائی ممکن است به اشکال بدون علامت، تحت بالینی، علامت دار، سندرم پوستی پس از کالا آزار، اشکال احشائی تروپیکال و نیز اشکال بالینی آتیپیک در مبتلایان به بیماری ایدز مشاهده شود.

تشخیص آزمایشگاهی:

در حال حاضر معتبرترین روش تشخیصی انواع لیشمانیوزها، استفاده از روشهای انگل شناسی است و ارجح آن است که همه موارد لیشمانیوز توسط مشاهده انگل برای ارزیابی دیگر روشهای تشخیصی نیز استفاده میشود. متأسفانه تهاجمی بودن روش ((استاندارد طلایی)) تأیید گردند. از روش های انگل شناسی به عنوان نمونه برداری برای مطالعات انگل شناسی در مورد این بیماری ، استفاده از این روشها را تا حدود زیادی با محدودیت روبه رو ساخته است.

۱ - نمونه برداری از ضایعات احشایی وانجام آزمایشهای انگل شناسی:

برای مشاهده مستقیم اجسام لیشتن میتوان از سیستم رتیکولوآندوتلیال خصوصاً از طحال، مغزاستخوان، کبد و غدد لنفاوی فرد بیمار نمونه برداری کرد.

براساس گزارش سازمان جهانی بهداشت میزان حساسیت طحال برای مشاهده انگل لیشتانیا، ۹۰ تا ۹۸٪، مغز استخوان ۵۴ تا ۸۶٪، کبد حدود ۶۰٪ و غدد لنفاوی حدود ۶۴٪ است. علیرغم آنکه احتمال مشاهده آماستیگوتها در نمونه تهیه شده از طحال بیمار بسیار زیاد است ولی به علت خطرات و عوارض ناشی از نمونه برداری طحال، در حال حاضر در ایران، از نمونه های تهیه شده از مغزاستخوانهای ایلیاک، استرنوم و تیبا استفاده میشود. حساسیت تشخیص انگل در نمونه ای تهیه شده از مغزاستخوان به نحوه نمونه برداری و تجربه فرد آزمایش کننده بستگی دارد. با توجه به اینکه در برشهای هیستوپاتولوژی اجسام لیشتن تغییر شکل می دهند، استفاده از این روش برای تشخیص قطعی بیماری با محدودیتهایی همراه است. گسترشهای تهیه شده را ابتدا با متانول خالص ۰/۵ تا ۱ دقیقه ثابت نموده و سپس با رنگ گیمسا (۱۰٪) به مدت ۳۰ دقیقه آنها را رنگ آمیزی می نمایند.

پس از شستشوی آنها با آب معمولی، با استفاده از میکروسکوپ نوری و با بزرگترین درشتنمایی (۱۰۰X) به جستجوی اجسام لیشتن میپردازند. اگر پروماستیگوتها در شرایط استاندارد کشت داده شوند این روش حساسیت زیادی دارد، لذا توصیه می شود همراه با آزمایش مستقیم، کشت در محیط های اختصاصی خصوصاً محیط NNN نیز انجام شود.

جهت کشت، مقداری از نمونه های تهیه شده را با رعایت کلیه شرایط آسپتیک به محیط کشت منتقل و در دمای ۲۴-۱۸ درجه سانتیگراد نگهداری میکنند. با توجه به گونه لیشتانیا و خصوصیات محیط کشت مورد استفاده، پس از چند روز تا چند هفته شکل پروماستیگوت انگل در محیط رشد میکند. برای جلوگیری از تاثیر عوامل بازدارنده بر رشد انگل بهتر است مقدار کمی از نمونه (یک یا دو قطره) به محیط کشت منتقل شود. چنانچه پس از دوهفته پروماستیگوت در محیط کشت مشاهده نشد، توصیه میشود مجدداً یک پاساژ کور انجام شود و چنانچه پس از دو هفته دیگر، انگلی در محیط کشت دیده نشد، نتیجه کشت منفی تلقی شود. برای جلوگیری از آلودگیهای باکتریایی و قارچی استفاده از آنتی بیوتیکهای مناسب توصیه می شود.

۲ - روشهای سرولوژی:

در حال حاضر از روشهای سرولوژی به شکل گسترده جهت تشخیص آزمایشگاهی لیشمانیوز احشایی استفاده می شود.

الف - روشهای سرولوژی اختصاصی

در روشهای سرولوژی اختصاصی به میزان کمی سرم یا پلاسمای خون (حدود ۱۰ میکرولیتر) نیاز است که آن را میتوان به وسیله لانت از نوک انگشت و یا پاشنه پای کودکان در لوله های میکروهماتوکریت تهیه کرد. روشهای مختلف سرولوژی برای جستجوی پادتنهای اختصاصی بر علیه لیشمانیا استفاده شده است که از بین آنها با توجه به حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و منفی، کارایی، سهولت انجام آزمایش و صرفه اقتصادی روشهای زیر پیشنهاد می شوند. لازم به یادآوری است در آزمایشهای سرولوژی معمولاً از پروماستیگوتهای کمپلکس لیشمانیا دونوانی خصوصاً لیشمانیا اینفانتوم، که در محیطهای کشت اختصاصی به تولید انبوه رسیده اند، به عنوان آنتی ژن استفاده می شود.

۱- روش ایمونوفلوئورسانس غیرمستقیم (IFA=Indirect Fluorescent Antibody)

کاربرد

حساسیت و ویژگی این روش حدود ۹۰٪ می باشد و در شرایط آزمایشگاهی مناسب است.

اصول آزمایش

در سرم فرد مبتلا به لیشمانیوز احشایی پادتن اختصاصی ایجاد میشود و این پادتن با پادگن لیشمانیا که به صورت دایره هایی به قطر یک سانتیمتر روی لام میکروسکوپی قرارداده شده است، مجموعه پادگن پادتن ایجاد میکند. در صورت افزودن پادتن ضد گلوبولین انسانی که با ماده فلوئورسین ایزوتیوسیانات نشاندار شده است (کنژوگه)، مجموعه حاصله در زیر نور میکروسکوپ فلوئورسنت به رنگ سبز درخشان مشاهده میشود.

تفسیر آزمایش

تعیین عیار مرزی به نوع آنتی ژن تهیه شده، روش انجام آزمایش و حتی فرد قرائت کننده بستگی خواهد داشت و لذا نتایج حاصله در مراکز گوناگون ممکن است با یکدیگر قابل مقایسه نباشند. مطالعات انجام شده در دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران نشان داده اند که عیارهای 1:128 و بالاتر همراه با علایم اختصاصی لیشمانیوز احشایی میتوانند نمایانگر بیماری لیشمانیوز احشایی باشند.

آزمایش IFA ممکن است با انگل ها ویا باکتری هایی مانند مالاریا، تریپانوزوما، سل و حصبه واکنش متقاطع داشته باشد و وجود عامل روماتوئید درخون و نیز پادتنهای ضد هسته سلولها (لوپوس اریتماتوس سیستمیک) ممکن است باعث نتایج مثبت کاذب شوند.

جهت انجام IFA می توان از کیت های تهیه شده داخلی ویا خارجی مورد تایید آزمایشگاه مرجع سلامت وزارت بهداشت و مطابق دستور العمل های مربوطه استفاده نمود.

۲- روش الایزا (ELISA) (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)

کاربرد

حساسیت این روش بین ۸۰ تا ۱۰۰٪ است ولی ویژگی آزمایش به فاکتور های زیادی از جمله نوع آنتی ژن مورد استفاده بستگی دارد.

اصول آزمایش

اصول این روش مشابه ایمونوفلوئورسانس غیرمستقیم است، با این تفاوت که از یک سیستم آنزیمی (آلکالین فسفاتاز و یا پراکسیداز) و سوبستراهای اختصاصی استفاده میشود.

در این روش از پلیتهای ته صاف مخصوص الایزا استفاده می شود و ۱۰۰ میکرولیتر از پادگن تهیه شده در بافر پوشش دهنده (رقت 1:200) به هر چاهک می افزاییم و یک شب دردمای ۴ درجه سانتیگراد و در اتاقک مرطوب نگهداری می کنیم و پس از شستشو با بافر شستشو، هر پلیت را جداگانه در کاغذ آلومینیومی می پیچیم و پس از بسته بندی در کیسه نایلونی در برودت ۷۰- درجه سانتیگراد تا زمان مصرف نگهداری میکنیم. پلیت های مذکور را معمولاً تا مدت ۶ ماه میتوان مورد استفاده قرار داد.

جهت انجام ELISA می توان از کیت های تهیه شده داخلی ویا خارجی مورد تایید آزمایشگاه مرجع سلامت وزارت بهداشت و مطابق دستور العمل های مربوطه استفاده نمود. عیار های مرزی بر اساس دستورالعمل هر کیت و نیز برخی محاسبات آماری خاص در نظر گرفته می شود.

۳-آزمایش آگلوتیناسیون مستقیم DAT (Direct Agglutination Test)

کاربرد

آزمایش آگلوتیناسیون مستقیم روشی ساده برای تشخیص لیشمانیوز احشایی می باشد و مطالعاتی که در مناطق بومی بیماری در ایران و جهان انجام گرفته حساسیت این روش ۹۵-۱۰۰٪ و ویژگی آن ۸۶-۱۰۰٪ تعیین گردیده است.

اصول آزمایش

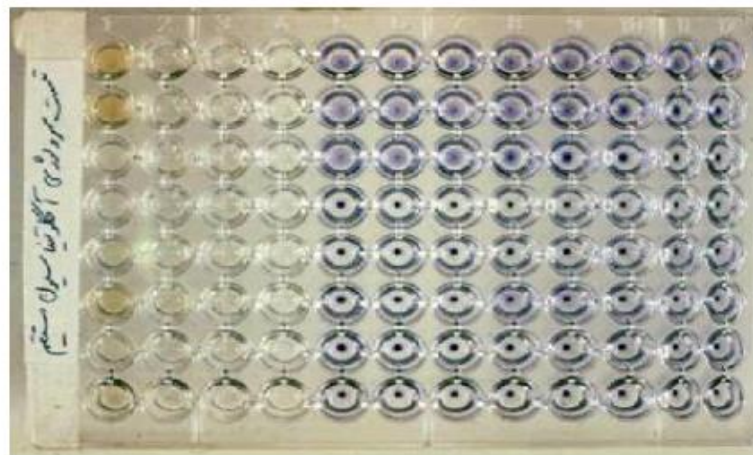
در این روش از فرم تاژکدار انگلهای *لیشمانیا / اینفانتوم* بعنوان آنتی ژن استفاده میشود. آنتی ژن در مجاورت رفتهای گوناگون سرم یا پلاسمای فرد مشکوک به بیماری قرار داده میشوند که در صورت وجود پادتن اختصاصی پدیده آگلوتیناسیون ایجاد میشود (شکل شماره ۸)

تفسیر آزمایش

آخرین حفرهای که در آن حلقه آبی کامل تشکیل شده باشد، به عنوان عیار نهایی در نظر گرفته میشود. طبق مطالعات فراوانی که در واحد تک یاخته شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شده است، عیارهای ۱:۳۲۰ و به بالا همراه با علایم بالینی اختصاصی به عنوان ابتلای فرد به کالآزار تلقی میشود. عیارهای ۱:۸۰۰ و به پایین منفی و عیار ۱:۱۶۰۰ به عنوان عیار مشکوک تلقی میشود که برای تأیید باید یکبار دیگر به فاصله ۲-۳ هفته نمونه برداری انجام شود و چنانچه افزایش قابل توجه عیار پادتن ملاحظه شود و در صورت بروز علایم بالینی اختصاصی، بیماری کالآزار تأیید میشود.

تذکر:

از سال ۱۳۷۵ آنتی ژن آگلوتیناسیون مستقیم (DAT) به طور فعال در آزمایشگاه لیشمانیوز دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران تهیه می شود و به کمک مرکز مدیریت بیماری ها جهت تشخیص آزمایشگاهی و مطالعات سرواپیدمیولوژی در مناطق اندمیک لیشمانیوز احشایی مورد استفاده گسترده قرار می گیرد.



شکل شماره ۸ : نتایج آزمایش سرولوژی آگلوتیناسیون مستقیم بر روی سرم خون افراد مشکوک به کالآزار

با استفاده از آنتی ژن تهیه شده در دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران.

رسوب نقطه ای آنتی ژن در ته چاهک های پلیت = منفی

باز شدن توری مانند آنتی ژن در چاهک های پلیت = مثبت

ب) روشهای سرولوژی غیراختصاصی

این روشها بر پایه افزایش ایمونوگلوبولینهای سرم خون استوار است و به هر دلیلی که میزان پادتن در خون افزایش

یابد، نتایج حاصل از این روشها مثبت خواهند شد، لذا به عنوان روشهای غیراختصاصی تلقی میشوند. یکی از

مهمترین این روشها عبارتند از:

آزمایش فرمل ژل یا ناپیرآلدئید

در این روش یک میلی لیتر از سرم را با یک قطره فرمالین تجارتي (۳۷٪) مخلوط میکنند. چنانچه پس از گذشت

۳ تا ۲۰ دقیقه سرم مورد نظر کدر شد و یا به شکل لخته درآمد، نتیجه حاصله مثبت است و در غیر این صورت

منفی تلقی میشود. این آزمایش غیراختصاصی است و به هر علت که پادتنهای سرم افزایش یابند (مالاریا، حبسه،

تب مالت و غیره) نتیجه این آزمون مثبت میشود.

در مناطق دورافتاده و بومی بیماری، در صورتی که آزمایشهای اختصاصی انگل شناسی و سرم شناسی امکان پذیر نباشد، از این آزمایش اختصاصی میتوان استفاده کرد و در صورت وجود علائم بالینی و شواهد اپیدمیولوژیک، بیمار را میتوان تحت درمان و مراقبت قرار داد. لوکوپنی همراه با افزایش نسبی مونوسیتها و لنفوسیتهای خون محیطی را نیز میتوان به عنوان یک روش غیراختصاصی برای تشخیص کالآزار مد نظر قرار داد.

ج) روشهای مولکولی

در حال حاضر از روشهای مولکولی خصوصاً، PCR برای تعیین گونه انگلهای لیشرمانیا استفاده میشود. در سالهای اخیر از روشهای PCR، Rapid fluorogenic PCR و PCR-ELISA برای تشخیص آزمایشگاهی لیشرمانیوزها استفاده شده است که اکثراً نتایج مطلوبی به همراه داشته اند. در حال حاضر روشهای مولکولی برای تشخیص آزمایشگاهی لیشرمانیوز بیشتر جنبه پژوهشی دارند.

تشخیص لیشرمانیوز احشایی در مبتلایان به ایدز

لیشرمانیوز احشایی به عنوان یک عفونت فرصت طلب مهم در میان افراد آلوده به HIV-1 به شمار میرود. مطالعات اخیر نشان میدهند تعداد سلولهای CD4 در ۹۰٪ مبتلایان کمتر از ۲۰۰ عدد در هر میکرولیتر خون است. پادتن ضد لیشرمانیا ممکن است در این بیماران، قابل ردیابی نباشد، به خصوص اگرابتلا به بیماری ایدز پیش از ابتلای فرد به لیشرمانیوز ایجاد شده باشد.

روشهای سرولوژی اختصاصی در بیماران با عفونت همزمان لیشرمانیوز و ایدز، نسبت به بیماران با سیستم ایمنی سالم حساسیت پایین تری دارد (حساسیت این روش ها در این بیماران حدود ۵۰٪ می باشد در صورتی که حساسیت این روش ها در بیمارانی که به عفونت HIV مبتلا نیستند، بیش از ۹۰٪ می باشد)

اصولاً جستجوی آنتی ژن جهت تشخیص لیشرمانیوز احشایی خصوصاً در مبتلایان به ایدز بسیار اختصاصی تر از جستجوی آنتی بادی است.

یکی از روشهای سریع جهت جستجوی آنتی ژن لیشمانیا روش کاتکس (KAtex) است. آنتی ژن هدف در این روش مولکول کربوهیدراتی است (۲۰-۵ KDa) که جزئی از ساختمان دیواره پروماستیگوت و آماستیگوت انگل است.

در حال حاضر کیت تجاری توسط شرکت Kalon Biological, UK با نام KAtex ساخته شده است. جهت انجام آزمایش، نمونه ادرار فرد مشکوک به لیشمانیوز احشائی را برای حذف موادی که باعث نتایج مثبت کاذب میشوند به مدت ۵ دقیقه در آب جوش قرار داده و پس از سرد شدن یک قطره (۵۰ میکرولیتر) از آن را با یک قطره لاتکس مخلوط نموده که در صورت مثبت بودن نتیجه، واکنش آگلوتیناسیون پس از دو دقیقه ایجاد میشود که با چشم غیر مسلح قابل رؤیت است.

تشخیص آزمایشگاهی لیشمانیوز احشایی در مبتلایان به ایدز از طریق انگل شناسی به کمک نمونه برداریهای غیر تهاجمی مانند آزمایش خون محیطی بیماران، آسان تر و حساس تر است. انگلهای لیشمانیا در اینگونه بیماران معمولا در سیتوپلاسم مونوسیتهای خون یافت میشوند. در گسترش خون محیطی رنگ شده با گیمسا حدود ۵۰ % و در نمونه های رنگ آمیزی شده و یا کشت شده بافی کوت حدود ۷۰ تا ۷۵٪ موارد ممکن است انگلهای لیشمانیا مشاهده شوند. روشهای تهاجمی تشخیص انگل از قبیل پونکسیون مغز استخوان در این قبیل افراد از حساسیت بسیار بالایی برخوردار است، زیرا بار انگلی در این بیماران بسیار بالاست.

فصل دوم :

تب مالت

بروسلا (Brucella)

بروسلا ها باکتری های کوچک ، به شکل کوکئید ، کوکوباسیل و باسیل های کوتاه می باشد . گرم منفی ، بدون اسپر ، بی حرکت و هوازی هستند و در انسان ایجاد بیماری بروسلوز (Brucellosis) یا تب مالت (Malt Fiver) و یا تب موج (Undulant Fiver) را می نمایند .

بروسلوز بیماری مشترک بین انسان و حیوان می باشد . عفونت در انسان موقعی به وجود می آید که با حیوانات آلوده یا فرآورده های آنها تماس داشته باشد . در ضمن بیماری از طریق حمل لاشه حیوانات مبتلا یا مصرف شیر آلوده و فرآورده های آن در انسان ایجاد می گردد ، انتقال از انسان به انسان نادر است .

این باکتری ها برای حیوانات اهلی به خصوص بز ، گوسفند ، گاو و خوک بیماریزا می باشد .

عفونت در حیوانات آلوده باعث سقط جنین گردیده و آلودگی غدد پستان باعث می شود که شیر حیوان برای ماها یا حتی سالها آلوده گردد .

تاریخچه بیماری

در سال ۱۸۶۱ Marston انگلیسی در جزیره مالت وجود یک بیماری مخصوص انسان را که علامت مشخصه آن تب موج بود تأیید نمود .

به سال ۱۸۸۷ David Bruce از طحال سربازی که از بیماری مذکور تلف شده بود جدا نموده و آن را به نام میکروکوکوس ملی تنسیس نامید .

در سال ۱۸۹۷ Wright ثابت نمود که ژرم مذکور به وسیله سرم بیماران مبتلا آگلوتینه می شود و این آزمایش سرمی خون برای تشخیص تب مالت مشابه با آزمایش Widal در تشخیص تیفوئید می باشد .

به سال ۱۹۰۵ Zamitt یک مطالعه و بررسی تجربی در جزیره مالت راجع به بیماری انجام و ثابت نمود که آزمایش سرمی Wright در خون اکثر بزهای جزیره مثبت است و همچنین به ثبوت رسید که علائم بیماری در حیوانات ماده است و ژرم مسئول بیماری نیز در ترشحات رحم و مدفوع و ادرار حیوان موجود و دفع می گردد . بزهای مبتلا هیچ وقت از بیماری تلف نمی شوند ولی حامل میکروب بوده و به وسیله شیر و مواد مدفوعه عامل بیماری را منتشر نموده و باعث آلودگی می گردند و از طرف دیگر ورم پستان (Mammite) و عارضه مخفی در کبد و قانقلیون ها نیز دیده می شود .

به طوری که یادآوری شده مطالعه بیماری قبلا در جزیره مالت عملی شد ولی وجود بیماری در بزهای مناطق اطراف دریای مدیترانه ثابت گردید و بنابراین بیماری به نام تب موج مدیترانه نامیده شد .

طبقه بندی بروسلاها

بروسلاها را برحسب میزبان طبیعی ، احتیاج به CO₂ برای رشد ، ایجاد SH₂ ، فعالیت اوره آز ، حساسیت به غلظت های مختلف رنگهای تیونین و فوشین ، لیز به وسیله فاژ های مختلف ، اعمال متابولیک و آگلوتیناسیون به وسیله آنتی سرم های اختصاصی به شش نوع زیر تقسیم نموده اند ، که تشخیص انواع و بیوتیپ آنها از نظر اپیدمیولوژیکی حائز اهمیت است . اساس این طبقه بندی ابتدا به وسیله هودلسون (Huddleson) پیشنهاد گردید که در حال حاضر کامل تر گردیده است .

• بروسلا ملی تنسیس *Brucella Melitensis* (دارای ۳ سروتایپ)

اکثر موارد عفونت بروسلا ملی تنسیس در ارتباط با تماس مستقیم و غیرمستقیم با گوسفند یا بز آلوده و یا فرآورده های آنها می باشد . دیگر انواع میزبانان منجمله گاو و شتر منابع قابل اهمیتی در برخی نواحی بوده اما احتمالاً مسئول تعداد کمی از عفونت ها می باشند . بر طبق تعداد موارد گزارش شده و همچنین در ارتباط با شدت بیماری ، بروسلا ملی تنسیس مهم ترین عامل بروسلوز انسان بوده ، هرچند انتشار جغرافیایی آن محدودتر از بروسلا آبورتوس است .

سروتایپ ۱ بروسلا ملی تنسیس به عنوان تایپ بومی ایران شناخته شده است .

• بروسلا آبورتوس *Brucella Abortus* (دارای ۷ بیوتایپ)

بروسلا آبورتوس کمتر از بروسلا ملی تنسیس برای انسان بیماری زا بوده و نسبت بیشتری از عفونت ها خفیف یا بدون علامت بوده است .

گاو مهم ترین منشا عفونت بوده اما دیگر انواع حیوانات مانند : گاومیش ، شتر ، و گاو کوهان دار تبتی می توانند از اهمیت محلی برخوردار باشند .

گاهی موارد شیوع عفونت بروسلا آبورتوس در گله های گوسفند و در نتیجه تماس با گاوهای آلوده اتفاق می افتد .

بیوتایپ ۳ بروسلا آبورتوس به عنوان تایپ بومی ایران شناخته شده است .

- **بروسلا سوئیس *Brucella Suis* (دارای ۵ بیوتاایپ)**

عامل سقط جنین خوک است . عفونت بروسلا سوئیس انتشار جغرافیایی محدودتر از بروسلا آبورتوس یا بروسلا ملی تنسیس داشته و هر یک از بیوتاایپ های آن خصوصیات ویژه ای دارند ، اکثر عفونت های انسانی منتقله از خوک به وسیله بایوتاایپ های ۱ و ۳ بروسلا سوئیس اتفاق می افتد .

- **بروسلا کانیس *Brucella Canis***

میزبان اختصاصی بروسلا کنیس سگ است و بیماریزایی کمی برای انسان دارد . موارد بالینی عفونت تشخیص داده شده و بررسی های سرولوژی موید آن است که عفونت های بدون علامت انسان در نواحی که بیماری در سگ شایع است ، متداول می باشد .

- **بروسلا اوویس *Brucella Ovis***

در گوسفند ایجاد بیماری کرده و دارای یک بیوتاایپ می باشد . در سال ۱۹۵۳ در نیوزلند از گوسفند به دست آمده است .

- **بروسلا نئوتومه *Brucella Neotoma***

در موش صحرائی (*Neotomae Lepida*) بیماری به وجود می آورد و دارای یک بیوتاایپ است . برای انسان ، گاو ، خوک و گوسفند بیماریزا نیست . این باکتری در سال ۱۹۵۷ در آمریکا از موش صحرائی به دست آمده است .

- **بروسلا ماریس *Brucella Maris***

در سال ۱۹۹۴ از لاشه های پستانداران دریایی در سواحل اسکاتلند و یک دولفین در کالیفرنیا جدا گردید . شواهد موید آن است که این باکتری قادر به ایجاد بیماری در انسان می باشد . از این رو بایستی به عنوان عوامل بالقوه عفونت در بیمارانی با تاریخچه تماس با پستانداران دریایی یا نسوج آنها در نظر گرفته شود .

یادآوری می گردد نوع غالب بروسلا در ایران ، بروسلا ملی تنسیس می باشد .

✓ راه های سرایت بیماری

- ۱- تماس مستقیم از راه ملتحمه چشم (کونژنکتیو) ، یا از طریق تماس خراش ها و جراحات پوست با ترشحات ، مواد دفعی ، بافت های حیوانات آلوده یا اشیا آغشته به ترشحات عفونی
- ۲- مصرف بافت ها ، مواد غذایی یا مایعات حاوی باکتری بروسلا مانند : شیر خام و فرآورده های لبنی آلوده خصوصا پنیر تازه ، خامه و سرشیر ، موارد بروسلوز انسانی ناشی از گوشت و فرآورده های آن کمتر از استفاده از فرآورده های لبنی آلوده می باشد . با این وجود گوشت ، اعضا و خون تمامی انواع حیوانات ممکن است حاوی بروسلا باشد .
- ۳- انتقال تنفسی از طیق استنشاق ذرات عفونی معلق در آغل ، اصطبل و آزمایشگاه

✓ انتقال بروسلوز از انسان به انسان بسیار نادر است . تلقیح مصنوعی ، واکسیناسیون و نمونه برداری از خون در برنامه های خون گیری از گاو به موارد متعدد بروسلوز در بین دامپزشکان و تکنسین ها منجر شده است .

دوره نهفتگی بیماری

وقتی که برخورد با منبع عفونت مستمر باشد ، چه از راه نوشیدن شیر خام و یا تماس شغلی ، تعیین زمان دقیق آلودگی و لذا دوره نهفتگی مشکل خواهد بود . اما در مواردی که عفونت به دنبال یک تماس مشخص باشد ، دوره نهفتگی اغلب بین ۱ تا ۳ هفته می باشد . گاهی اوقات بین ۶ تا ۱۷ ماه گزارش شده است .

علائم بیماری

به طور کلی بیماری به صورت حاد یا موزیانه (Insidious) شروع شده و با تب مداوم یا منظم با دوره های متناوب ، تعریق فراوان به خصوص در شب ، خستگی ، بی اشتها ، کاهش وزن ، سردرد ، درد عضلانی و درد عمومی بدن تظاهر می کند .

علائم بیماری تا حد زیاد وابسته به نوع بروسلا است و براساس شدت بیماری به اشکال حاد ، تحت حاد ، مزمن و موضعی بروز می نماید .

شرح انواع علائم ایجاد شده توسط بروسلا

- ۱- نوع حاد : در این شکل بیمار گرفتار لرز ناگهانی ، درد عمومی بدن به خصوص درد پشت بوده و عرق شدید دارد . بیمار اشتهای خود را از دست داده و از ضعف و سستی شکایت دارد .
 - ۲- نوع تحت حاد : اغلب اوقات حالت تب دار اولیه وجود نداشته و آغاز آن بی سرو صدا می باشد . ولی گاهی به دنبال مرحله تب دار حاد شروع می شود . شکایت اصلی بیمار از ضعف و خستگی است .
 - ۳- نوع مزمن : غالبا علائم بعد از یک دوره تب دار برای سال ها باقی می ماند .
 - ۴- نوع لوکالیزه (موضعی) : باکتری های برسلوز می توانند در اعضای مختلف بدن ایجاد عفونت موضعی نمایند ، شایع ترین اعضای مبتلا شامل استخوان ها ، مفاصل ، سیستم اعصاب مرکزی (CNS) ، قلب ، ریه ، طحال ، بیضه ها ، کبد ، کیسه صفرا ، کلیه ها ، پروستات و پوست می باشند.
- ممکن است عفونت موضعی به طور همزمان در چند محل نیز ایجاد شود ، این شکل بیماری در اغلب موارد در ارتباط با نوع مزمن بیماری است .
- اگرچه به عنوان یکی از عوارض شکل حاد بیماری به دلیل بروسلا ملی تنسیس یا بروسلا سوئیس مطرح است .

• نکته کلیدی در خصوص انتقال عامل بروسلا :

قطع حلقه انتقال بیماری از دام به انسان در گروه حل معضل انتقال بروسلا در جوامع بشری است آموزش ، پاستوریزاسیون فرآورده لبنی ، واکسیناسیون گاو و گوساله و معدوم نمودن دام های اهلی آلوده

• تشخیص آزمایشگاهی

✓ کشت

بهترین نمونه برای کشت باکتری مغز استخوان و رایجترین نمونه خون است. با روش رنگ آمیزی کوستر (Coster) باکتری به رنگ قرمز که در داخل سلولهای آبی رنگ هستند، دیده می شوند. محیط های اختصاصی شامل برسلا آگار، سرم دکستروز آگار (SDA)، سرم دکستروز براث (SDB) و محیط اسکایرو (Skirrow) می باشند.

محیط کاستاندا یک محیط دو فازی دارای فاز جامد و فاز مایع است و برای جداسازی مناسب می باشد.

رشد در دمای ۳۷C و وجود ۵ تا ۱۰ درصد CO2 انجام می گیرد.

سایر محیط های کشت شامل بلاد آگار، شکلات آگار، محیط مایع توپرکلوزیس و محیط انفوزیون قلب و مغز است. کشت خون باید در دو هفته اول بیماری و قبل از تجویز آنتی بیوتیک انجام شود. بروسلا ملی تنسیس و سوئیس خیلی آسانتر از بروسلا آبورتوس از کشت خون به دست می آیند چون تعداد بروسلا آبورتوس در خون بسیار کم می باشد. در بروسلاز تحت حاد و مزمن به دست آوردن باکتری مشکل است.

برای انجام کشت خون معمولاً ۱۵ تا ۲۰ سی سی خون می گیرند و آن را به دو قسمت تقسیم می نمایند و هر قسمت را در یک شیشه محتوی آبگوشت جگر یا محیط های دیگر می ریزند و یکی از شیشه ها را در مجاورت ۱۰٪ گاز کربنیک و دیگری را بدون آن در گرمخانه ۳۷ درجه قرار می دهند. چون کشت بروسلاها به کندی انجام می گیرد باید هر ۳ تا ۵ روز یک مرتبه از شیشه های مزبور آزمایش میکروسکوپی به عمل آورد و کشت مجدد در روی محیط جامد داد. کشت میکروب باید مدت ۶ هفته نگهداری شده و پس از این مدت اگر میکروب رشد نکرد جواب را منفی تلقی کرد.

چون محیط کشت را باید مدت زیادی نگهداشت، برای جلوگیری از آلودگی می توان از روش کاستاندا (Castaneda) استفاده نمود. محیط کاستاندا دیفازیک بوده و دارای محیط جامد و مایع می باشد. پس از کشت، از روز چهارم باید هفته ای دو مرتبه شیشه را طوری خم نمایند که قسمت مایع محیط سطح ژلوز را آغشته نماید تا در صورت وجود باکتری در خون، در قسمت جامد محیط پرگنه تشکیل گردد. در این روش احتیاج به کشت مجدد نبوده و امکان آلودگی کمتر است.

در کشت های اولیه که از موارد تحت حاد یا مزمن به عمل می آید. باکتری به ندرت روی محیط جامد رشد می کند و در محیط مایع هم به قدری ضعیف رشد می نماید که حتی کدورتی مشاهده نمی گردد. برای به دست آوردن کشت مثبت در مواردی که باکتری داخل سلولی است و وجود آنتی بادی ها و سایر مواد ممانعت کننده در خون مانع رشد باکتری می گردند باید روش کامل تری به کار برد. Nelson و Pickett روش جالبی ارائه داده اند

و آن بدین طریق است که خون سیترا ته بیمار را با آب مقطر شسته و لیز نموده و سپس سانتریفیوژ می نمایند و از رسوب آن گسترش تهیه نموده و در محیط جامد کشت می دهند . در این روش مواد ممعانت کننده جهت رشد باکتری از بین رفته و بروسلاهای داخل سلولی لیز و آزاد و تغلیظ می گردند.

در مقایسه این روش با محیط های کشت معمولی جواب مثبت سریع تری به دست می آید و به سرعت می توان باکتری را زیر میکروسکوپ مشاهده نمود و یا پس از ۲ تا ۳ روز پرگنه آن را در روی محیط کشت جامد مشاهده کرد.

در بعضی موارد برای تشخیص بیماری از کشت غدد لنفاوی ، مغزاستخوان ، ادرار و صفرا نیز استفاده می شود . پس از به دست آوردن پرگنه خالص باید هویت آن را از روی خواص بیوشیمیک و نوع آن را از روی خواص سرولوژیک بروسلاها و فاژ تایپینگ تعیین کرد .

✓ سروآگلوتیناسیون

در مرحله حاد ، از اواخر هفته دوم بیماری در خون مبتلایان آنتی های آگلوتینان و ثبوت مکمل مشاهده می گردد و به تدریج افزایش می یابد . ابتدا ایموگلوبین با وزن مولکولی بالا IgM و پس از مدتی ایمونوگلوبین با وزن مولکولی کم IgG ظاهر می گردند . پس از بهبودی خواه به دنبال درمان یا بهبودی خودبخود معمولاً هر دو نوع آنتی بادی کاهش می یابد . در ماه ششم اغلب IgG ناپدید می شود ، ولی اگر بیماری درمان نشده باشد و به صورت فعال باقی بماند IgG کاهش نمی یابد ، برعکس IgM ممکن است حتی پس از درمان مناسب هم مدت ها عیارش در خون بالا بماند در حالیکه بیمار کاملاً بهبودی یافته است ، بنابراین تنها داشتن عیار آگلوتینین بالا در آزمایش رایت دلیل قطعی بر وجود بروسلوز فعال نزد بیمار نیست و باید مشخص نمود که عیار بالا مربوط به IgG می باشد . آنتی بادی بلوکان یا جلوگیری کننده IgA در مرحله تحت حاد عفونت ظاهر می شود و می تواند برای سالها صرف نظر از روند بیماری در بدن باقی بماند . آنتی بادی بلوکان یا ناقص در امر آگلوتیناسیون مربوط به IgM و IgG دخالت نموده و باعث منفی شدن آزمایش در رفتهای کم سرم می گردد . این پدیده به نام پروزون (Prozone) نامیده می شود .

برای انجام آزمایش سروآگلوتیناسیون که به نام آزمایش رایت (Wright) موسوم است سرم بیمار را بر اساس یک تصاعد هندسی از $\frac{1}{20}$ تا $\frac{1}{5120}$ رقیق می کنند و در لوله های کوچکی با سوسپانسیون بروسلا آبورتوس مجاور می سازند و ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه نگهداری می کنند . (از روش سانتریفیوژ نمودن لوله ها در مدت ۵ دقیقه بر اساس دستورالعمل دکتر پاکزاد هم می توان استفاده نمود و در زمان کوتاهیتری به جواب رسید) در صورت وجود آنتی بادی در سرم در بعضی از لوله ها آگلوتیناسیون پیدا خواهد شد و جواب آزمایش مثبت است ولی باید توجه داشت در افرادی که مبتلا به وبا یا تولارمی گردیده اند و یا برعلیه وبا واکسینه شده اند، آزمایش رایت مثبت

می گردد. از طرفی چون سرم اشخاص سالم که شیر آلوده می نوشند و یا با حیوانات مبتلا به بروسلوز سرو کار دارند با عیار $\frac{1}{80}$ سبب آگلوتیناسیون بروسلا می گردد، عیا هایی که در این حدود یا کمتر باشد خصوصا در اشخاص مزبور ارزش تشخیصی ندارند مگر آنکه علایم بیماری بروسلوز باشد.

در اشخاصی که شیر خام نمی نوشند و یا با حیوانات سروکار ندارند عیار پایین هم ارزش تشخیصی دارد و عیارهایی که از $\frac{1}{100}$ زیادتر باشد تقریبا همیشه دلیل بر وجود بیماری است.

در آزمایش رایت گاهی اوقات لوله های اول که سرم غلیظ تر می باشد آگلوتیناسیون نشان نمی دهند در صورتیکه در لوله آخر که سرم رقیق تر است آگلوتیناسیون پیدا خواهد شد. این پدیده به نام پروزون خوانده می شود و علت آن عدم تناسب مقدار آنتی ژن و آنتی بادی یا وجود مقدار کمی آنتی بادی ناقص در سرم بیمار می باشد که به آن آنتی بادی نان آگلوتینان یا بلوکان می نامند که به آنتی ژن های بروسلا متصل شده و مانع اتصال آنتی بادی آگلوتینان می گردد. در این قبیل موارد آنتی بادی بلوکان به قدری زیاد است که با رقیق کردن هم از بین نمی رود و برای از بین بردن آن روش های زیر معمولی است.

- ۱- سرم مورد آزمایش را نیم ساعت ۵۶ درجه حرارت دهند.
- ۲- برای تهیه سوسپانسیون میکروب به جای آب نمک ۸/۵ در هزار آب نمک ۵ درصد یا یک ماده پروتئینی مانند سرم خرگوش سالم بکار برد.
- ۳- آزمایش کمبس رلیت ابتدا طبق معمول آزمایش رایت به عمل آورده و پس از مدت لازم لوله ها را سانتریفیوژ نموده و ته نشین آنها را سه مرتبه با سرم فیزیولوژیک می شویند و آنگاه به هر لوله یک قطره سرم خرگوش که بر ضد گلوبولین انسان (A. H. G) مصون شده باشد می افزایند و یک ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه قرار می دهند و سپس روی آن یک سی سی سرم فیزیولوژیک می ریزند و ۲۴ ساعت دیگر در گرمخانه قرار می دهند و نتیجه را می خوانند. این طریق به نام کومبس رایت (Coomb's Wright) موسوم است.

تشخیص قطعی بروسلوز مزمن معمولا مشکل است ولی اگر بیمار بهبودی نیافته باشد IgG بالا باقی می ماند و دلیل فعال بودن بیماری است، به همین جهت برای تشخیص بروسلوز فعال باید مشخص نمود که عیار بالا مربوط به IgG می باشد.

IgM نسبت به ۲- مرکاپتواتانول (2-Mercapto Ethanol – 2 ME) حساس و IgG مقاوم است. با اضافه کردن 2ME به مخلوط آنتی ژن و آنتی بادی IgM تخریب می شود. بنابراین اگر پس از افزودن 2ME عیار آنتی بادی باز هم بالا بود به علت IgG است و حاکی از آلودگی فعال بروسلوز است.

✓ انترا درمو راکسیون بورنه (Burnet)

اگر ۰/۱ سی سی کشت صاف شده بروسلا را در لای پوست اشخاص مبتلا به بروسلوز یا کسانیکه در اثر تماس با بروسلاها حالت آلرژی پیدا کرده اند تزریق کنند پس از ۶ ساعت لکه قرمزی به قطر ۲ تا ۶ سانتیمتر پیدا می شود که با تورم همراه است . این واکنش ۴۸ ساعت و گاهی چند روز باقی می ماند و به تدریج برطرف می گردد . انترا درمو راکسیون بورنه در هفته اول بیماری منفی است و معمولا از اوایل هفته چهارم به بعد مثبت می گردد و چندین ماه و گاهی تا چند سال پس از بهبودی هم مثبت باقی می ماند . به همین جهت مثبت بودن آن دلیل حتمی بر وجود بروسلوز حاد نیست و ممکن است دلیل ابتلا قبلی باشد ولی منفی بودن آن تشخیص را رد می کند .

عوامل موثر بر کاهش میزان بروز و شیوع بروسلوز (تب مالت) در انسان

حرارت جوش (استریلیزاسیون) به مدت ۱ دقیقه یا پاستوریزاسیون (۶۸ درجه سانتیگراد) به مدت ۱۵ دقیقه میکروکوکوس ملی تنسیس در شیر آلوده را نابود می کند ولی برای اینکه اطمینان از حرارت جوش (خصوصا در مناطق روستایی و عشایری) حاصل شود ، توصیه براین است که شیر به مدت ۵ دقیقه در حرارت جوش قرار گیرد .

بقای بروسلا در فرآورده های غذایی بستگی به نوع ماده غذایی ، میزان رطوبت ، حرارت ، تغییرات PH ، عمل بیولوژیکی دیگر باکتری های موجود و مدت زمان نگهداری فرآورده دارد .

- در شیر با حرارت صفر درجه سانتیگراد تا ۱۸ ماه
- در شیر با حرارت ۳۷ - ۲۵ درجه سانتیگراد تا ۲۴ ساعت
- در شیر با حرارت ۳۸ درجه سانتیگراد کمتر از ۹ ساعت
- در خامه با حرارت ۴ درجه سانتی گراد ۶ - ۴ هفته
- در بستنی با حرارت صفر درجه سانتی گراد ۳۰ روز
- در انواع پنیر نمک زده ۷۵ تا ۱۰۰ روز

در بسیاری از جوامع ، شیر به صورت خام مصرف شده و پنیر تازه از سیر حرارت ندیده تولید می گردد عموما مدت زمان ۳ ماهه برای نگهداری پنیر در نظر گرفته شده است .

در درجان دمای پایین ، بروسلا قادر است برای مدت ۱۰ هفته در خاک و تا ۲/۵ سال در کود مایع دوام یابد .

در لاشه های منجمد ، ارگانیزم تا چند سال زنده است .

رابطه مستقیمی بین شیوع بروسلوز حیوانات اهلی و بروز عفونت انسانی وجود دارد ، در بررسی های اپیدمیولوژیکی نشان داده شده که در این رابطه حداقل ۳ فاکتور شامل :

- ۱- روش پرورش دام
- ۲- استاندارد های بهداشتی
- ۳- عادات مصرف غذایی

موثر می باشد . روش های پرورش دام و بهداشت قابل اصلاح بوده هرچند که تغییر عادات مردم به ویژه در ارتباط با تهیه و مصرف مواد غذایی ، بسیار مشکل است .

چند توصیه مهم

- ✓ تاریخچه بیماری از اهمیت زیادی در تشخیص بروسلوز و به ویژه در افرادی با تماس حیوانات ، برخوردار است .
- ✓ دوره های کوتاه درمان با دارو های ضد بروسلا ممکن است به محو موقتی نشانه های بیماری منجر شده ، اما برای درمان کامل بیماری کافی نیستند ، درمان ناقص یکی از فاکتور های منتهی به توسعه بروسلوز مزمن می باشد .
- ✓ در نقل و انتقال خون های آلوده در آزمایشگاه شرط احتیاط ضروریست .
- ✓ حیوانات وحشی ممکن است با بروسلا آلوده شده و منشا بالقوه انتقال عفونت به حیوانات اهلی (گاو ، گوسفند و بز) را تشکیل دهند .

انتشار بروسلوز در جهان

تخمین شیوع واقعی بروسلوز انسانی در جهان به علت عدم گزارش کامل بیماری در بسیاری از کشورها ، غیر ممکن است . این وضعیت برای هر دو گروه کشورهای پیشرفته و در حال توسعه صادق می باشد . با وجودی که بروسلوز گاوی در بسیاری از کشورهای پیشرفته ریشه کن شده یا تحت کنترل قرار گرفته ، لیکن شیوع آن در بسیاری از کشور های در حال توسعه ، علیرغم پیشرفت صنایع شیر با حداقل امکانات دامپزشکی ، افزایش یافته است . وضعیت مشابهی در سطح محدودتر برای بروسلوز گوسفندی ، بز و خوک اتفاق افتاده است .

با توجه به مخاطره بیشتر در دو نوع اخیر نسبت به عفونت بروسلا آبورتوس برای بهداشت انسانی ، نیجتا افزایش تعداد موارد بروسلوز انسانی در سطح جهان قابل تصور است . کشورهای عاری از بروسلوز بر اساس آخرین یافته ها در کشور ها چنین است :

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

وضعیت بیماری در ایران

تعیین میزان شیوع بیماری تب مالت به دلیل عدم گزارش کامل موارد بیماری مشکل است ولی با وجود سیستم مراقبت، گزارش های جاری می تواند 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 ۱۳۷۸ با شروع برنامه های اول و دوم توسعه از ۱۷۰ مورد در صد هزار نفر به حدود ۲۴ در صد هزار نفر رسیده است و به دنبال ارتقا سیستم مراقبت و گزارش دهی بیماری روند نسبتا رو به افزایش بیماری از سال ۷۸ لغایت ۸۴ وجود داشته است و از سال ۱۳۸۵ به دنبال موفقیت در افزایش پوشش واکسیناسیون دامها روند بیماری رو به کاهش بوده است، اما در طی سال های اخیر و منتهی به سال ۱۴۰۳ و بررسی آمار سه ماه اول سال ۱۴۰۴ آمار مبتلایان با شیب ملایم در حال افزایش می باشد که بدلائل مختلف مانند تغییر عادات اجتماعی از استفاده شیر پاستوریزه به شیر محلی و استفاده از بستنی های سنتی و ... می باشد.

ایجاد هماهنگی بین بخشی، استاندارد کردن تعاریف بیماری، آموزش جامعه و کارکنان بهداشتی، افزایش

گزارش دهی، افزایش کارخانجات تولید فرآورده های لبنی پاستوریزه، افزایش پوشش واکسیناسیون دامی از عوامل موثر در کنترل و پیشگیری بیماری در دام و نهایتا در انسان می باشد.

بیماری را نمی توان انحصارا یک بیماری شغلی محسوب نمود ولی شغل به عنوان یک عامل خطر در ابتلا به بیماری مطرح است به خصوص نزد خانم های خانه دار که عمدتا به عنوان دامدار و کشاورز دوشادوش همسرانشان در مناطق روستایی به فعالیت می پردازند ، دامداران و کشاورزان .

بیماری در تمام فصول وجود دارد اما در فصل بهار و تابستان همزمان با فصل زایش و شیردهی دام ها بیشتر دیده می شود .

بیماری در منطقه روستایی (۷۰ درصد) بیشتر از منطقه شهری (۳۰ درصد) می باشد که مرتبط با تماس با دام آلوده و استفاده از فرآورده های لبنی غیرپاستوریزه در مناطق روستایی می باشد .

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

بیماری در هر دو جنس دیده می شود ولی با اختلاف کمی در جنس مذکر (۵۶/۶ درصد) بیشتر از جنس مونث (۴۳/۴ درصد) دیده می شود .

منابع:

- ۱- دکتر مهدی محبعلی "روش های تشخیص آزمایشگاهی لیشمانیوز ها در انسان" در کتاب انگل لیشمانیا و لیشمانیوزها تألیف دکتر ابوالحسن ندیم انتشارات مرکز نشر دانشگاهی
- ۲- دکتر مهدی محبعلی "تاژکداران خون و نسج" در کتاب " تک یاخته شناسی پزشکی تألیف دکتر غلامحسین ادریسیان انتشارات دانشگاه علوم پزشکی تهران
- ۳ - میکروبیولوژی جامع پزشکی - امید عزیزی ، دکتر محمد مهدی اصلانی دانشیار بخش میکروب شناسی انستیتو پاستور ایران چاپ مهر ۸۹
- ۴ - انتشارات رویان پژوه با همکاری نشر خسروی اول مهر ۸۹
- ۵ - دکتر پرویز ادیب فر چاپ شرکت بهمن
- ۶ - اصول باکتریولوژی پزشکی تألیف Robert Fasquelle ترجمه دکتر ف . ب علیزاده انتشارات چهر
- ۷ - World Health Organization. *Control of leishmaniasis*, Technical report series 793 of WHO Expert Committee, Geneva. 1990.
- ۷-جزوه اصول تشخیص و نمونه برداری لیشمانیوز پوستی و کالآزار، تألیف دکتر مهدی پارسایی، دکتر نازیلا سرافزار، انتشارات مرکز نشر دانشگاهی - چاپ مهر ۱۴۰۲