فصل سوم

مواد و روشها

- آزمون رزبنگال (RBPT)

وسایل لازم جهت انجام تست رزبنگال :

۱- پلیت شیشه ای

۲- آنتی ژن قابل مصرف

۳- کنترل مثبت و کنترل منفی

۴- روتاتور و اپلیکاتور جهت مخلوط نمودن نمونه و آنتی ژن

روش انجام آزمون رزبنگال :

آنتی ژن رزبنگال به رنگ قرمز متمایل به صورتی و با PH اسیدی برابر ۳/۶۵ و جرم نهایی ۸ درصد از کلنی های صاف بروسلا که فاکتورهای آنتی ژن مشترکی با دیگر سویه های بروسلا دارند. قبل از انجام آزمایش باید ابتدا آنتی ژن رزبنگال و سرم بیمار را از یخچال خارج کرده و در محیط آزمایشگاه به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه نگهداری نموده تا به دمای آزمایشگاه برسند. سپس روی یک صفحه شیشه ای یا سفید یک قطره معادل ۳۰ میلی لیتر سرم را مجاور یک قطره آنتی ژن قرار داده و با یک میله نازک چوبی یا پلاستیکی، این دو قطره را با هم مخلوط و به اندازه دایره ای به قطر حدود ۲/۵ سانتی متر پخش نمائید. سپس صفحه را در دست یا روی روتاتور بمدت حداکثر چهار دقیقه حرکت داده و نتیجه آگلوتیناسیون را در زیر نور چراغ قرائت نمائید. واکنش مثبت به حالتی گفته می شود که دانه های آگلوتینه بطور مشخص جدا از هم دیده شوند و در موارد منفی، دو قطره مخلوط شده به حالت یکنواختی باقی خواهند ماند. در آزمایش رزبنگال موارد مشکوک دیده نمی شود و نتیجه با قاطعیت مثبت یا منفی می باشد. در تست رزبنگال پس از ۱ تا ۲ دقیقه در صورت پیدایش آلگوتیناسیون الگوتینین تائید می شود .

- آزمون رایت لوله ای (Standard tube Agglutination Test)

مواد لازم جهت انجام آزمایش رایت لوله ای :

۱- لوله همولیز

۲- آنتی ژن مخصوص لوله ای

۳- نمک طعام و فنل

۴- پارافیل جهت بستن درب لوله ها

۵- سرم کنترل مثبت و منفی جهت تهیه شاهد

روش انجام آزمایش رایت لوله ای :

در یک ردیف لوله همولیز از سرم نمونه ازمایش رقت های ۱/۱۰ تا ۱/۶۴۰ و رقت های بالاتر در حد نیاز تهیه می شود . در لوله اول ۰/۹ میلی لیتر و در لوله های بعدی ۰/۵ میلی لیتر سرم فیزیولوژی فنیکه ریخته می شود . ۰/۱ میلی لیتر از سرم مورد آزمایش به لوله اول اضافه کرده و سپس از لوله اول ۰/۵ میلی لیتر به لوله دوم و از لوله دوم به لوله سوم و به این ترتیب تا آخرین لوله ادامه داده و از آخرین لوله ۰/۵ میلی لیتر دور ریخته می شود . آنتی ژن رایت لوله ای به مقدار ۰/۵ میلی لیتر به تمام لوله ها اضافه می شود .

تهیه شاهد مثبت ومنفی برای آزمایش رایت لوله ای :

- تهیه شاهد منفی : ۰/۵ میلی لیتر آنتی ژن رقیق یا آماده مصرف را در یک لوله همولیز ریخته و ۰/۵ میلی لیتر محلول سرم فیزیولوژی فنیکه به آن می افزاییم .
- تهیه شاهد مثبت : یک نمونه سرم مثبت قوی را به صورت ۱/۵ رقیق کرده سپس ۰/۵ میلی لیتر از آن را با ۰/۵ میلی لیتر آنتی ژن در لوله مخلوط می نماییم .

طرز تهیه سرم فیزیولوژی فنیکه :

۸/۵ گرم کلرید سدیم و ۵ گرم فنل را در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر حا نمایید . برای از بین بردن پدیده پروزون از سرم فیزیولوژی غلیظ استفاده شود که در آن بجای ۸/۵ گرم نمک طعام ۵۰ گرم فنل در یک لیتر آب حل شود .

- آزمایش کومبس رایت (آزمایش آنتی هیومن گلوبولین)

وسایل لازم جهت انجام آزمایش کومبس رایت

۱- لوله شیشه ای

۲- آنتی ژن

۳- قطره سوسپانسیون

۴- دستگاه انکوباتور

۵- سرم فیزیولوژی

روش انجام آزمایش کومبس رایت :

در یک لوله آزمایش یک قطره سوسپانسیون RBC ۰/۵ می ریزیم . سپس یک قطره آنتی سرم D اضافه می کنیم بعد از ۲ دقیقه آلگوتیناسیون بررسی می شود اگر از لحاظ الگوتیناسیون کامل بودن کنار گذاشته و بقیه بقیه لوله ها را به مدت ده دقیقه با دور ۲۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ نموده مایع رویی را جدا نموده و به رسوب نهایی دو قطره آنتی هیومن گلوبولین اضافه می کنیم و لوله ها را به مدت ۲۴ ساعت داخل انکوبه قرار می دهیم و نتایج را قرائت می کنیم . وبا انگشت دست به آرامی به ته لوله ضربه ملایمی می زنیم و نتیجه آلگوتیناسیون را بررسی می کنیم

- آزمایش ۲-مرکاپتواتانول (2ME)

مواد لازم جهت انجام آزمایش 2ME :

- محلول غلیظ ۲- مرکاپتواتانول
- لوله همولیز
- آنتی ژن لوله ای
- اتوکلاو

روش انجام آزمایش 2ME

روش اول :

به تعداد نمونه های مورد آزمایش لوله همولیز در نظر گرفته و در لوله اول ۰/۹ میلی لیتر بافر 2ME و ۰/۱۰ میلی لیتر سرم بیمار و در لوله های بعدی ۰/۵ میلی لیتر از محلول مرکاپتواتانول (بافر 2ME) اضافه می کنیم . لوله ها را کاملا به هم زده و از لوله اول ۰/۵ میلی لیتر به لوله دوم و از لوله دوم به لوله سوم و الی آخر اضافه کرده و ازلوله آخر ۰/۵ میلی لیتر به بیرون ریخته و بعد به تمام لوله های ۰/۵ میلی لیتر آنتی ژن 2ME اضافه می کنیم . لوله ها را به مدت ۲۴ ساعت در دستگاه اتو در دمای ۳۷ درجه قرار می دهیم و از نظر وجود آگلوتیناسیون بررسی می کنیم .

روش دوم:

به تعداد نمونه های مورد آزمایش لوله همولیز در نظر می گیریم و در هر لوله ۰/۳ میلی لیتر سرم فیزیولوژی و ۰/۲ میلی لیتر سرم نمونه و ۰/۵ میلی لیتر محلول 2ME اضافه می کنیم . لوله ها را به مدت یک ساعت در اتو ۳۷ درجه قرار می دهیم تا محلول 2ME روی IgM اثر کند. لوله ها را از اتو خارج کرده و رقت های سریال تهیه می کنیم . به این ترتیب استثناء لوله اول در بقیه لوله ها ۰/۵ میلی لیتر سرم فیزیولوژی می ریزیم سپس لوله اول ۰/۵ میلی لیتر به لوله دوم و الی آخر ادامه می دهیم . از لوله آخر ۰/۵ میلی لیتر دور می ریزیم و به هر لوله ۰/۵ میلی لیتر آنتی ژن 2ME می ریزیم . و لوله ها را به مدت ۲۴ ساعت در اتو ۳۷ درجه قرار داده و سپس وجود آگلوتیناسیون را بررسی می کنیم . رقت نهایی لوله ها از ۱/۲۰ شروع می شود .

- آزمایش الیزا ELISA

وسایل لازم جهت انجام آزمون الیزا :

- میکروپلیت ریدر

- میکروپلیت واشر
- سمپلر و عوامل پیپت کردن
- انکوباتور برای انکوبه کردن پلیت ها
- آنتی ژن

روش انجام آزمون الیزا :

پایه اساسی آزمایش الیزا واکنش بادی با آنتی ژن می باشد . در این روش آنتی بادی اختصاصی با یک آنتی ژن مشخص واکنش می دهد و سپس به آن ، یک آنتی بادی اتصال یافته با یک آنزیم به عنوان سیستم نشانگر اضافه می شود . در ادامه با افزودن سوبسترای آنزیم آن را تبدیل به یک محصول که یک ماده رنگی می باشد نموده و توسط دستگاه قرائت می کنیم . طول موج رنگ به دست آمده که نشان دهنده وجود یک آنتی بادی و نیز غلظت آن می باشد توسط دستگاه الیزا قرائت و ثبت می گردد.

آزمون TMB-ELISA

وسایل لازم جهت انجام آزمایش TMB-ELISA

۱- شستشوی اولیه پلیت

۲- استفاده از یک توزیع کننده مایع (دیسپنسر) یا پیپت ها چندکاناله

۳- انکوباتور

۴- محلول شستشو دهنده ها (میکروپلیت واشر)

شستشوی اولیه پلیت ها

روش انجام کار با آزمون TMB-ELISA

نمونه های مورد آزمایش پلیت های ۸ ستونی همراه با ۱۲ دریف که در مجموع ۹۶ چاهک را تشکیل می دهند . (افزایش تعداد چاهک ها به منظور کاهش مقدار مصرف معرف ها و نمونه ها است). چاهک های

موجود در پلیت ها با آنتی بادی ها و آنتی ژن ها پوشیده می شوند . در این مرحله فضای بین آنتی بادیها و آنتی ژنها در کف چاهک ها با پروتئین Ig پر می شود . سپس نمونه یا سرم درون چاهک ها ریخته می شود و آنتی ژن ها و آنتی بادیها ی موجود در چاهک ها با هم واکنش می دهند . در طول انکوباسیون بسته به حضور یا عدم حضور مقدار آنتی ژن یا آنتی بادی ، آنتی ژن نمونه با آنتی بادی موجود در پلیت باند می شوندو آنتی ژن یا آنتی بادی های آزاد با محلول PBS ۴ ال ۵ مرتبه شستشو داده می شود .سپس معرف نشاندار شده با آنزیم یعنی آنتی بادی ثانویه به منظور نشاندار کردن واکنشهای آنتی بادی و آنتی ژن افزوده می شود . در ادامه با محلول PBS درون چاهک ها ۵ الی ۶ مرتبه شستشو داده می شوند تا آنتی ژنها و آنتی بادیهای غیر اختصاصی که در واکنش شرکت نکرده و OD کاذب ایجاد میکنند از چاهک تخلیه شوند. در مرحله بعد یک معرف TMB که سوبسترا نام دارد به چاهک ها اضافه می شوند ، TMB با آنتی ژن ثانویه واکنش نشان می دهد و سبب تشکیل رنگ درون چاهک ها میگردد. در ادامه تست الایزا یک معرف دیگر به نام STP(۲HCL درصد) به چاهک ها اضافه می شود این معرف سبب متوقف شدن واکنش می شود . مرحله اخر میزان جذب محتوای چاهک ها و نتایج به کمک دستگاه Elisa reader درطول موج ۴۹۰ قرائت می شود .

آبی کم رنگ ⟵ زرد کم رنگ

ابی پررنگ ⟵ زرد پررنگ

✓ مزایای تست الایزا :

۱- سهولت نشاندارسازی

۲- افزایش ویژگی

۳- افزایش حساسیت

۴- کاهش زمان انکوباسیون

۵- افزایش محدوده عملکرد

- ✓ معایب تست الایزا

۱- آسیب سوبسترا یا کروموژن

۲- عدم کیفیت نوک سمپلر

۳- کالیبر نمودن سمپلر

۴- زمان انکوباسیون نامناسب

۵- دمای انکوباسیون نامناسب

۶- نگهداری نامناسب میکروپلیت

۷- آلودگی چاهک به چاهک

- ✓ حساسیت و ویژگی آزمون الیزا :

آزمون الیزا می تواند کاملا پیچیده باشد و از چندین مرحله اضافه کردن آنتی بادی ها و آنزیم ها در آن استفاده شود، به ویژه هنگام اندازه گیری غلظت پروتئین در نمونه های ناهمگن مانند خون مراحل مختلفی برای انجام آزمون الیزا مورد انجام قرار می گیرد. پیچیده ترین و متفاوت ترین مرحله در روند کلی آزمون ، مرحله تشخیص است که در آن می توان از چندین لایه آنتی بادی برای تقویت سیگنال استفاده کرد .

ویژگیهای آزمون الیزا

۱- با تقویت فعالیت آنزیمی حساسیت سنجش قابل افزایش است

۲- معرف ها دارای زمان نگهداری طولانی تری می باشند

۳- سنجشهای همزمان چندگانه قابل انجام است .

۴- طیف وسیعی از سنجشها می تواند صورت گیرد.

۵- دستگاهها و ابزار لازم به طور گسترده ای در دسترس است

۶- خطر اشعه در جریان نشاندار کردن ، انجام آزمایش و دفع پسماندهای آنها وجود ندارد

- آزمایش رینگ تست (MRT)

وسایل لازم جهت انجام آزمایش رینگ تست :

۱- لوله شیشه ای

۲- آنتی ژن

۳- شیکر

۴- انکوباتور

ابتدا داخل لوله همولیز ا سی سی شیر چربی نگرفته + یک قطره آنتی ژن (رنگ شده با هماتوکسین یا ائوزین) بروسلا به آن اضافه می کنیم و پس از شیکر کامل به مدت ۳۰ الی ۶۰ دقیقه در حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد قرار می دهیم . اگر در شیر مورد آزمایش آنتی بادی وجود داشته باشد موجب جمع شدن میکروبهای رنگین می شود که همراه با چربی موجود در شیر به سطح شیر می آید . در صورتیکه آزمایش منفی باشد تمام ستون شیر بطور یکنواخت رنگی باقی می ماند ولی اگر قسمت پایین شیری رنگ و در سطح شیر حلقه رنگی مشاهده شود واکنش کاملا مثبت است . اگر قسمت پایین شیر کاملا زایل نشود ودر ضمن حلقه تشکیل شده در سطح کمرنگ به نظر می رسد که واکنش می توان حدواسط فرض نمود.

این آزمایش را معمولا هر ۶ ماه یکبار می توان در گاوداریها انجام داد و در صورت آلودگی به بروسلوز با انجام آزمایش خون گاوهای مبتلا را شناسایی و از گله خارج نمود. این آزمایش را روی آغوز یا شیر بدون چربی و یا هموژنیزه شده نمی توان انجام داد.

- آزمون ویدال (Widal Agglutination Test)

وسایل مورد نیاز جهت انجام آزمون ویدال

- سرم بیمار : سرم باید فاقد هر گونه ذرات و همولیز باشد .

-آنتی ژن : این آنتی ژن ها رنگی می باشد و از مواد رنگی کریستال (کریستال بنفش) . سبز درخشان استفاده شده است. این آنتی ژن دارای مواد ضد میکروبی فنل فرمالین هستند .

برای آزمایش ویدال از آنتی ژن های سوماتیک O,H میکروبهای زیر استفاده می شود :

۱- سالمونلا تیفی گروه D

۲- سالمونلا پاراتیفی گروه A

۳- سالمونلاپاراتیفی گروه B

۴- سالمونلا پاراتیفی گروه C

روش انجام کار آزمایش ویدال :

ابتدا از سرم نمونه ۰/۱ سی سی ازسمت چپ به طرف راست به ترتیب در هریک از مربع های روی صفحه شیشه ای ردیف اول و دوم مقادیر ۰/۵، ۰/۲ ، ۰/۴ سی سی ریخته می شود و همین مقدار از سرم مثبت را ردیف های سوم و چهارم و از سرم منفی در ردیف های پنجم و ششم می ریزیم . سرم هر نمونه باید حداقل با آنتی ژنهای O,H و سه میکروب سالمونلا گروه A,B,C, آزمایش شود . در ردیفهای یک و سه و پنج یک قطره آنتی ژن O و در ردیفهای دو و چهارم و ششم یک قطره آنتی ژن H میریزیم و با اپلیکاتور مخلوط می کنیم و به مدت سه دقیقه روی روتاتور قرار می دهیم و ازنظر آلگوتیناسیون بررسی می کنیم . نتیجه آلگوتیناسیون را سریع می خوانیم زیرا به علت خشک شدن آنتی ژن و آنتی بادی و بهم چسبیدن آنتی ژن ممکن است به طور کاذب آزمایش مثبت شود .