

تشخیص جذام به روش ایمونوفلورسانس

مجله نظام پزشکی

سال هفتم، شماره ۱، صفحه ۵۵، ۱۳۵۸

دکتر منوچهر محمدی*

مقدمه:

Cottenot در سال ۱۹۶۴، از باسیل جذام موش بمنوان پادگن استفاده کرد و مشاهده نمود که در سرم خون همه بیماران مبتلا به جذام مورد آزمایش، پادتن جذام موجود است، درحالیکه نتیجه آزمایش سرم خون همه افراد شاهد از این لحاظ منفی است (۵).

بعلت مشکلات تهیه باسیل جذام و در دسترس نبودن باسیل جذام موش و با توجه به قرابت پادگنی موجود بین میکوباکتریها، در این بررسی باسیل Calmette و Guerin (B.C.G.) (۶) مورد استفاده قرار گرفته است.

روش آزمایش: سرم خون ۹۱ بیمار که بوسیله معاینات بالینی و آزمایش‌های میکروب‌شناسی و آسیب‌شناسی درجذامخانه با با باغی تبریز و مرکز بررسی و تحقیق بیماریهای پوستی تهران، مبتلا به جذام تشخیص داده شده بودند، سن و جنس آنها درجدول شماره ۱ نشان داده شده است و به روش F.A.T. مورد مطالعه قرار گرفت.

Coons و Kaplan نخستین بار در سال ۱۹۵۰، روش ایمونو-فلورسانس (Fluorescence Antibody Technique, F.A.T) را برای نشان دادن پادگن و پادتن بکار بردند (۱). در سال ۱۹۵۴، Weller و Coons روش غیرمستقیم این آزمایش را شرح دادند (۲). Morris و همکارانش در سال ۱۹۶۱، روش F.A.T. غیرمستقیم را برای تشخیص جذام مورد استفاده قرار داد و ضمن اثبات قرابت پادگنی موجود بین باسیلهای سل و جذام مشاهده کرد که سرم خون غالب بیماران مبتلا به جذام (نوع Lepromatous) دارای پادتن اختصاصی می‌باشد (۳). در سال ۱۹۶۳، Merklen و همکارانش بجای باسیل جذام، باسیل جذام موش (Mycobacterium lepraemurium) را که تهیه آن آسانتر است بمنوان پادگن بکار برد و مشاهده کرد که قرابت پادگنی و واکنش متقاطع بین این دو باسیل وجود دارد (۴).

جدول شماره ۱- توزیع سن و جنس در ۹۱ بیمار مبتلا به جذام

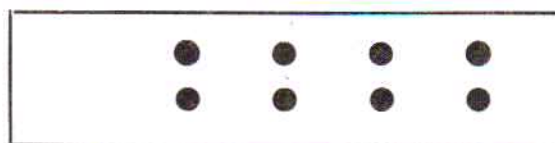
جمع	جذام نوع نامشخص		جذام نوع بینابینی		جذام نوع تو بر کو لوئید		جذام نوع لپرومالو		نوع بیماری / جنس
	مونث	مذکر	مونث	مذکر	مونث	مذکر	مونث	مذکر	
۲	-	۱	-	-	-	-	۱	-	کمتر از ۱۰ سال
۱۹	-	-	-	۱	۱	-	۱	۱۶	۱۰-۱۹
۱۶	-	-	۱	۱	-	۲	۳	۹	۲۰-۲۹
۲۸	-	-	-	-	۲	۶	۱	۱۹	۳۰-۳۹
۱۶	-	-	-	-	۱	-	۲	۱۳	۴۰-۴۹
۱۰	-	-	-	۱	-	۲	-	۷	بیشتر از ۵۰ سال
۹۱	-	۱	۱	۳	۴	۱۰	۸	۶۴	جمع

* تهران - انستیتو پاستور ایران.

جدول شماره ۲- توزیع سن و جنس در گروه شاهد

جمع	گروه تو بر کولین منفی		گروه تو بر کولین مثبت		گروه مبتلا به سل ریوی		نوع بیماری
	مذکر	مونث	مذکر	مونث	مذکر	مونث	
۳	۱	۲	-	-	-	-	کمتر از ۱۰ سال
۳۱	۵	۱۶	۱	۲	۴	۳	۱۰-۱۹
۲۲	۲	۲	۲	۳	۸	۵	۲۰-۲۹
۱۱	۱	۱	۲	۴	۲	۱	۳۰-۳۹
۱۳	-	-	-	۴	۱	۸	۴۰-۴۹
۹	-	-	-	۲	۲	۵	بیشتر از ۵۰ سال
۸۹	۹	۲۱	۵	۱۵	۱۷	۲۲	جمع

سرم خون ۸۹ تن دیگر شامل ۳۹ بیمار مبتلا به سل ریوی، ۳۰ تن باتوبر کولین منفی و ۲۰ تن باتوبر کولین مثبت که سن و جنس آنها در جدول شماره ۲ نشان داده شده است، نیز بعنوان شاهد به روش ایمونوفلورسانس مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا روی هر لام میکروسکپی ۸ دایره پادگنی از تعلیق B.C.G. (نیم گرم در سانتیمتر مکعب)، هر یک به قطر تقریبی ۴ تا ۵ میلیمتر مطابق شکل ۱ تهیه و در استن خالص و سرد بمدت ۱۰ دقیقه ثابت گردید.



شکل شماره یک

از هر سرم مورد آزمایش رقت‌های $\frac{1}{8}$ تا $\frac{1}{1024}$ در ظرف هم آگلو-تیناسیون آماده شد. از هر رقت سرم با پیپت پاستور ۲ قطره روی دایره پادگنی انتقال داده شد و مدت نیم ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری و پس از ۱۵ دقیقه شستشو در محلول (P.B.S.) Phosphate Buffered Saline با pH=7.2، به هر دایره پادگنی ۲ تا ۳ قطره سرم ضد گاما گلوبولین انسانی که با ایزوتوسیانات فلورسئین نشاندار شده و قبل از مصرف بمدت یک ساعت روی B.C.G. جذب شده بود، افزوده شد و نیم ساعت در گرمخانه نگهداری گردید. سپس با محلول P.B.S. شستشوداده شد و بوسیله میکروسکپی فلورسانس مورد آزمایش قرار گرفت. مشاهده میکروسکپی دایره‌های پادگنی در هر لام، از دایره مربوط به غلظت بیشتر سرم شروع و به غلظت‌های کمتر ادامه یافت و بدین ترتیب عیار پادتن در سرم معین گردید.

نتایج: میانگین عیار پادتن سرم‌های مورد آزمایش در جدول شماره ۳ و میانگین عیار پادتن در بیماران مبتلا به جذام نوع لپرومی

جدول شماره ۳- میانگین عیار پادتن در گروه مبتلا به جذام و گروه شاهد

گروه شاهد	گروه بیماران مبتلا به جذام								
	جمع	توبر کولین منفی	توبر کولین مثبت	مبتلا به سل ریوی	جمع	نامشخص	بینابینی	توبر کولین مثبت	لپرومی
۸۹	۳۰	۲۰	۳۹	۹۱	۱	۴	۱۴	۷۲	تعداد موارد
۴/۴۷	۳/۰۳	۳/۵۵	۶/۰۵	۸/۹۳	۷	۸	۸/۴۳	۹/۱۱	میانگین عیار پادتن log2
۱/۹۵	۰/۹۱	۱/۴۳	۱/۵۷	۱/۱۵		۰/۷۱	۱/۱۸	۱/۰۹	انحراف معیار log2

بماند و نشانه‌های بالینی جلب توجه نکند. به‌علاوه وجود باسیلهای مقاوم به‌اسید والکل‌غیر بیماریزا در ترشحات بینی بعضی از افراد سالم از ارزش تشخیصی آزمایش‌های میکروب‌شناسی می‌کاهد. از طرفی آزمایش‌های دیگر نظیر تست پوستی‌پرومین(۸)، آزمایش ثبوت مکمل، تغییرات الکتروفورز سرم خون نیز در بیماری جذام ارزش تشخیصی نداشته و Rubino test نیز که تنها آزمایش اختصاصی این بیماری است از حساسیت بسیار کمی برخوردار است (۹).

روش F.A.T. غیرمستقیم با مورد استفاده قرار دادن B.C.G. به‌علت سادگی و عملی بودن آزمایش، سهولت دست‌یابی به‌پادکن، برخورداری از میزان حساسیت و ویژگی زیاد، می‌تواند بعنوان یکی از بهترین روشها برای تایید تشخیص جذام مورد استفاده قرار گیرد و علاوه بر این راهنمای خوبی برای ارزش‌یابی درمان بیماری باشد.

خلاصه: سرم خون ۹۱ بیمار مبتلا به جذام و ۸۹ فرد شاهد به روش ایمونوفلورسانس مورد مطالعه قرار گرفت و از باسیل کالمت و گرن (B.C.G.) بعنوان پادکن استفاده شد. نتایج حاصل از این بررسی نشان می‌دهد که روش ایمونوفلورسانس روش خوبی برای تایید تشخیص جذام بوده و برای ارزش‌یابی اثرات درمان جذام نیز می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری: از دکتر فرخ‌مدبر که علاوه بر راهنمایی‌های علمی بسیار ارزنده، تسهیلات لازم را نیز برای استفاده از وسایل و امکاناتی که از اعتبارات طرح جذام شورای پژوهشی دانشگاه تهران تهیه شده، فراهم کرده‌اند و همچنین از مساعدتهای دکتر ناصر علی‌سیادت صمیمانه سپاسگزاری می‌نماید.

جدول شماره ۵- مقایسه نتیجه آزمایش F.A.T. در گروه بیماران درمان نشده و گروه شاهد

گروه شاهد				گروه مبتلا به جذام					جمع
جمع	توبرکولین منفی	توبرکولین مثبت	مبتلا به سل ریوی	جمع	نامشخص	بینا بینی	توبرکولین مثبت	پرومی	
۵	-	-	۵	۲۶	-	۱	۴	۲۱	F.A.T. مثبت
۸۴	۳۰	۲۰	۳۴	۱	۱	-	-	-	F.A.T. منفی
۸۹	۳۰	۲۰	۳۹	۲۷	۱	۱	۴	۲۱	جمع

جدول شماره ۴ نشان می‌دهد که عیار پادتن در بیماران مبتلا به نوع لپرومی پس از درمان کاهش می‌یابد.

جدول شماره ۴- میانگین عیار پادتن در بیماران مبتلا به جذام لپرومی درمان شده و درمان نشده

تعداد موارد	جذام لپرومی درمان نشده	جذام لپرومی درمان شده
۲۱	۵۱	
میانگین عیار پادتن log ₂	۹/۹	۸/۲۵
انحراف معیار log ₂	۰/۹۹	۰/۸۷

میزان حساسیت روش F.A.T. برای تشخیص موارد مثبت حقیقی جذام در بیماران درمان نشده خیلی زیاد و قابل توجه است (جدول شماره ۵)، بطوریکه از ۲۷ بیمار مبتلا به جذام درمان نشده فقط سرم خون یک بیمار مبتلا به نوع بینا بینی واکنش منفی کاذب نشان داده است، لذا میزان حساسیت آزمایش بیش از ۹۶ درصد است. جدول شماره ۵ همچنین نشان می‌دهد که میزان ویژگی (Specificity rate) روش F.A.T. برای تشخیص موارد منفی حقیقی نیز کاملاً رضایت بخش است. بطوریکه از میان ۸۹ سرم شاهد فقط سرم خون ۵ بیمار مبتلا به سل فعال ریوی، واکنش مثبت کاذب نشان داده است، بدین ترتیب روش F.A.T. از میزان ویژگی بیش از ۹۴ درصد برخوردار است. میدانیم که بیماری جذام در مراحل اولیه ممکن است سالها ناشناخته

REFERENCES:

- 1- Coons, A.H. and Kaplan, M.H: Localization of antigen in tissue cell: Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. J. Exp. Med. 91: 1-3, 1950.
- 2- Weller, T.H. and Coons, A.H: Fluorescent antibody studies with the agent of varicella and herpes zoster propagated in vitro., Proc. Exp. Biol. Med. 86: 780-794, 1954.
- 3- Morris. J.A., et al: Fluorescent antibody study of the human leprosy bacillus. Bac.Proc. 61: 123, 1961.
- 4- Merklen, F.P., et al: Anticorps mis en évidence par immunofluorescence dans les serums de lepre humaine., C.R. Acad. Sci. 257: 2212, 1963.
- 5- Cottenot, F: Appreciation quantitative sur le bacille de la lepre murine d' anticorps sérique décelables dans la lepre humaine. C.R. Soc. Biol. 158: 1004-1005, 1964.
- 6- Memoranda: Immunological problems in leprosy research., WHO. Bull, 45: 483-491, 1973.
- 7- Merklen, F.P., and Cottenot, F: Application de l'immunofluorescence sur bacille de Stefansky au diagnostic serologique de la lèpre humaine. Bull. Soc. Pathol. Exot, 58: 332-335, 1965.
- 8- Cecil, Russel La Fayette, Cecil-Leob. Textbook of Medicine, Edited by Paul Beeson and walsh McDermott 13 th edi., 1971 W.B. Saunders company, Philadelphia, pp. 653-4.
- 9- Oliveira de Almeida, J. Serology in leprosy WHO. Bull. 42: 673-702, 1970.