تشخیص جذام به روش ایمونوفلورسانس

مجله نظام پزشکی
سال هفتم ، شماره ۱ ، صفحه ۵۵ ، ۱۳۵۸

دکتر منوچهر محمدی*

مقدمه :

Kaplan و Coons نخستین‌بار درسال ۱۹۵۰ ، روش ایمونو-فلورسانس(Fluorescence Antibody Technique, F.A.T) را برای نشان دادن پادگن و پادتن بکار بردند (۱). در سال ۱۹۵۴، Coons و Weller روش غیرمستقیم این آزمایش‌را شرح دادند (۲). Morris وهمکارانش درسال۱۹۶۱، روش F.A.T. غیرمستقیم را برای تشخیص جذام مورد استفاده قرار داد وضمن اثبات قرابت پادگنی موجود بین باسیلهای سل وجذام مشاهده کرد که سرم خون غالب بیماران مبتلا به جذام (نوع Lepromatous) دارای پادتن اختصاصی می‌باشد (۳). در سال ۱۹۶۳، Merklen و همکارانش بجای باسیل‌جذام ، باسیل‌جذام موش (Mycobacterium lepraemurium) را که تهیه آن آسانتر است بعنوان پادگن بکار برد و مشاهده کرد که قرابت پادگنی و واکنش متقاطع بین این دو باسیل وجود دارد (۴).

Cottenot درسال ۱۹۶۴، از باسیل جذام موش بعنوان پادگن استفاده کرد و مشاهده نمودکه در سرم خون همه بیماران مبتلا به‌جذام 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 ودر دسترس نبودن باسیل جذام موش وباتوجه به‌قرابت پادگنی موجود بین میکوباکتریها ، در این بررسی باسیل Guerin وCalmette (B.C.G.)(۶) مورد استفاده قرارگرفته است .

روش آزمایش : سرم خون۹۱ بیمارکه بوسیله معاینات بالینی و آزمایش‌های میکرب شناسی‌وآسیب‌شناسی درجذامخانه بابا باغی تبریز ومرکز بررسی وتحقیق بیماریهای پوستی تهران ، مبتلا به‌جذام تشخیص داده شده بودند، سن وجنس‌آنها درجدول‌شماره ۱ نشان داده‌شده‌است وبه‌روشF.A.T مورد مطالعه قرارگرفت.

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

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

* تهران ـ انستیتوپاستور ایران.

سرم خون ۸۹ تن دیگر شامل ۳۹ بیمار مبتلا به‌سل ریوی، ۳۰ تن باتوبرکولین منفی و ۲۰ تن باتوبرکولین مثبت که سن وجنس آنها در جدول شماره ۲ نشان داده شده‌است، نیز بعنوان شاهد به روش ایمونوفلورسانس مورد بررسی قرار گرفت.

ابتدا روی هرلام میکرسکپی ۸ دایره پادگنی ازتعلیق B.C.G. (نیم‌گرم درسانتیمترمکعب)، هریك به‌قطر تقریبی ۴تا۵ میلیمتر مطابق شکل ۱ تهیه ودراستن خالص وسرد بمدت ۱۰ دقیقه‌ثابت گردید.



شکل شماره یك

از هرسرم مورد آزمایش رقت‌های $\frac{1}{8}$ تا $\frac{1}{1024}$ درظرف هم‌آگلوتیناسیون آماده شد. از هررقت سرم باپی‌پت پاستور ۲ قطره روی دایره پادگنی انتقال داده شد ومدت نیمساعت درگرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری و پس از ۱۵ دقیقه شستشو در محلول Phosphate Buffered Saline (P.B.S.) باpH=7.2، به‌هردایره پادگنی ۲ تا ۳ قطره سرم ضدگاماگلوبولین انسانی که با ایزوتیوسیانات فلورسئین نشان‌دار شده و قبل از مصرف بمدت یکساعت روی B.C.G. جذب شده‌بود، افزوده‌شد ونیمساعت درگرمخانه نگهداری گردید. سپس بامحلول P.B.S. شستشوداده شد وبوسیله میکرسکپ فلورسانس مورد آزمایش قرار گرفت. مشاهده میکرسکپی‌دایره‌های پادگنی درهرلام، از دایره‌مربوط به‌غلظت بیشتر سرم شروع وبه‌غلظت‌های کمتر ادامه یافت وبدین ترتیب عیار پادتن درسرم معین گردید.

نتایج : میانگین عیار پادتن سرمهای مورد آزمایش در جدول شماره۳ ومیانگین‌عیار پادتن دربیماران مبتلابه‌جذام نوع‌لپرومی

جدول شماره ۲- توزیع سن وجنس درگروه شاهد

گروه سنی / نوع بیماری / جنس	گروه مبتلا به‌سل‌ریوی		گروه توبرکولین مثبت		گروه توبرکولین منفی		جمع
	مذکر	مونث	مذکر	مونث	مذکر	مونث	
کمتراز ۱۰سال	–	–	–	–	۲	۱	۳
۱۰–۱۹	۳	۴	۲	۱	۱۶	۵	۳۱
۲۰–۲۹	۵	۸	۳	۲	۲	۲	۲۲
۳۰–۳۹	۱	۲	۴	۲	۱	۱	۱۱
۴۰–۴۹	۸	۱	۴	–	–	–	۱۳
بیشتراز ۵۰ سال	۵	۲	۲	–	–	–	۹
جمع	۲۲	۱۷	۱۵	۵	۲۱	۹	۸۹

درمان شده ودرمان نشده درجدول شماره ۴ خلاصه‌شده است.

باتوجه به‌حداقل وحداکثر عیارپادتن در سرمهای آزمایش شده عیار ۸ log2 ($\frac{1}{256}$) و بیشتر عیار مثبت و مشخص بیماری جذام تلقی گردید ونتایج آزمایش در گروه بیمار وشاهد درجدول‌شماره ۵ مقایسه گردیده است.

بحث : بااستفاده از Student's-t est برای ارزشیابی آماری نتایج‌بدست‌آمده، مشاهده میشودکه میانگین عیارپادتن‌در بیماران جذامی باضریب اطمینان ۹۹/۹ درصد بیشتر از عیار پادتن در گروه شاهد است (جدول شماره ۳). علاوه براین میانگین عیار پادتن دربیماران مبتلا به‌جذام نوع لپرومی‌بیشترازعیارپادتن در بیماران مبتلا به‌نوع توبرکولوئیداست‌که مشاهدات قبلی را نیز درباره میزان پادتن‌دراین‌دونوع مختلف‌جذام تایید میکند(۷).

جدول شماره ۳- میانگین عیار پادتن درگروه مبتلا به‌جذام وگروه شاهد

	گروه بیماران مبتلا به‌جذام					گروه شاهد			
	لپرومی	توبرکولوئید	بینابینی	نامشخص	جمع	مبتلا به‌سل ریوی	توبرکولین مثبت	توبرکولین منفی	جمع
تعداد موارد	۷۲	۱۴	۴	۱	۹۱	۳۹	۲۰	۳۰	۸۹
میانگین عیار پادتن log2	۹/۱۱	۸/۴۳	۸	۷	۸/۹۳	۶/۰۵	۳/۵۵	۳/۰۳	۴/۴۷
انحراف‌معیارlog2	۱/۰۹	۱/۱۸	۰/۷۱		۱/۱۵	۱/۵۷	۱/۴۳	۰/۹۱	۱/۹۵

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 ودرمان نشده

	جذام لپرومی درمان نشده	جذام لپرومی درمان شده
تعداد موارد	۲۱	۵۱
میانگین عیار پادتن log2	۹/۹	۸/۷۵
انحراف معیار log2	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 شماره۵)، بطوریکه از۲۷ بیمار مبتلا به‌جذام درمان‌نشده فقط سرم خون یك بیمار مبتلا به نوع بینابینی واکنش منفی کاذب نشان‌داده‌است، لذا میزان‌حساسیت‌آزمایش بیش‌از ۹۶درصد است . جدول شماره ۵ همچنین نشان میدهد که میزان ویژگی (Specificity rate) روش F.A.T. برای تشخیص موارد منفی حقیقی نیز کاملا رضایت بخش است . بطوریکه از میان ۸۹ سرم شاهد فقط سرم خون ۵ بیمار مبتلا به سل فعال ریوی ، واکنش مثبت کاذب‌نشان داده است ، بدین‌ترتیب روش F.A.T. ازمیزان ویژگی بیش از ۹۴ درصد برخوردار است .

میدانیم که‌بیماری جذام‌درمراحل‌اولیه ممکن‌است سالها ناشناخته بماند ونشانه‌های بالینی جلب توجه نکند. بعلاوه وجود باسیلهای مقاوم به‌اسید والکل‌غیر بیماریزا در ترشحات بینی بعضی‌ازافراد سالم از ارزش‌تشخیصی آزمایش‌هایمیکروب‌شناسی‌میکاهد. ازطرفی آزمایش‌های دیگر نظیر تست پوستی‌لپرومین(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. بعلت سادگی وعملی بودن‌آزمایش ، سهولت دست یابی‌به‌پادگن، برخورداری ازمیزان حساسیت و ویژگی زیاد ، میتواندبعنوان یکی از بهترین روشها برای تایید تشخیص جذام مورد استفاده قرارگیرد وعلاوه براین راهنمای خوبی برای ارزش‌یابی‌درمان بیماری باشد .

خلاصه: سرم‌خون۹۱ بیمار مبتلا به‌جذام و۸۹ فرد شاهدبه‌روش ایمونوفلورسانس‌مورد مطالعه‌قرارگرفت وازباسیل کالمت‌وگرن (B.C.G.) بعنوان‌پادگن‌استفاده شد. نتایج حاصل‌ازاین‌بررسی نشان میدهدکه روش ایمونوفلورسانس روش خوبی برای تایید تشخیص جذام بوده و برای ارزشیابی اثرات درمان جذام نیز میتواند مورد استفاده قرارگیرد .

سپاسگزاری: از دکترفرخ مدبر که علاوه برراهنمائی‌های علمی بسیار ارزنده ، تسهیلات لازم را نیز برای استفاده از وسایل و امکاناتی‌که از اعتبارات طرح جذام شورای پژوهشی دانشگاه تهران تهیه شده ، فراهم کرده‌اند و همچنین از مساعدتهای دکتر ناصر علی سیادت صمیمانه سپاسگزاری می‌نماید .

جدول شماره ۵- مقایسه نتیجه آزمایش F.A.T. درگروه بیماران درمان نشده وگروه شاهد

	گروه مبتلا به جذام					گروه شاهد			
	لپرومی	توبرکولوئید	بینابینی	نامشخص	جمع	مبتلا به‌سل ریوی	توبرکولین مثبت	توبرکولین منفی	جمع
F.A.T. مثبت	۲۱	۴	۱	–	۲۶	۵	–	–	۵
F.A.T. منفی	–	–	–	۱	۱	۳۴	۲۰	۳۰	۸۴
جمع	۲۱	۴	۱	۱	۲۷	۳۹	۲۰	۳۰	۸۹

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 Almeidia, J. Serology in leprosy WHO. Bull. 42: 673-702, 1970.