تشخیص سریع سل به روش ایمونودات با استفاده از آنتی ژن ۳۸ کیلودالتونی مایکوباکتریوم توبرکولوزیس

مرتضی ایزدیار[۱]، علیرضا صالحی نوده[۲]*، دکتر سید علیرضا رضوی[۳]،
سیده طاهره شهرستانی[٤]، دکتر عبدالفتاح صراف نژاد[۵]

چکیده

زمینه و هدف : *سل یک بیماری عفونی با انتشار جهانی است. بر طبق آخرین آمار سازمان بهداشت جهانی حدود یک سوم جمعیت جهان به مایکوباکتریوم توبرکولوزیس آلوده می‌باشند. در حال حاضر کماکان روشهای سنتی باکتریولوژیک تنها روشهای تشخیص سل در مراکز بهداشتی می باشند. از مهمترین اهداف برنامه جهانی مبارزه با سل ابداع روشی آسان و قابل اطمینان جهت تشخیص سل است. از جمله روشهای بالقوه ای که ارزش جایگزین شدن به جای روشهای باکتریولوژیک را دارند، روشهایی هستند که بر اساس تعیین پاسخ آنتی بادی اختصاصی علیه آنتی ژنهای مایکوباکتریایی بنا نهاده شده‌اند و این روش بنا به چند دلیل بیش از بقیه روشها مورد توجه محققین بوده است. اول اینکه پاسخ آنتی بادی قوی علیه آنتی ژنهای مایکوباکتریایی فقط در طی سل فعال مشاهده می‌شوند. ثانیاً، روشهای سرولوژیک، ساده، سریع، ارزان و نسبتاً غیر تهاجمی هستند. ثالثاً، این روشها بر خلاف آزمون جلدی PPD توان افتراق بین یک آلودگی بدون علامت و بیماری فعال را دارا می باشند. در این پژوهش یک آزمون غربالگری جهت تشخیص سل به روش ایمونودات با استفاده از یک آنتی ژن ترشحی گلیکوپروتئینی مایکوباکتریوم توبرکولوزیس به نام آنتی ژن ۳۸ کیلودالتونی مورد استفاده قرار گرفت، زیرا در پژوهشهای قبلی، از این آنتی ژن به عنوان یک آنتی ژن اختصاصی گونه که در آزمونهای سرولوژیک ویژگی زیادی از خود نشان داده است یاد شده است.*

روش بررسی: *در این مطالعه نتایج آزمایش ایمونودات بر روی سرم ۳۲ بیمار مبتلا به سل ریوی اسمیر مثبت با نتایج آزمایش سرم ۳۲ فرد سالم به عنوان کنترل مقایسه شد و سپس نتایج آن با نتایج آزمون مشابه با مخلوط پروتئینی فیلترای کشت مورد مقایسه قرار گرفت.*

یافته‌ها: *با استفاده از آنتی ژن ۳۸ کیلودالتونی آزمایش بر روی ۳۲ بیمار منتهی به ۲۹ پاسخ مثبت گردید، در حالیکه با استفاده از مخلوط پروتئین در هر ۲ نمونه سرم هیچ پاسخ مثبتی در سرمهای گروه کنترل مشاهده نشد، ولی با استفاده از مخلوط پروتئین فیلترای کشت، در ۸ نمونه از سرمهای گروه کنترل نیز پاسخ مثبت مشاهده شد(ویژگی انجام آزمون ایمونودات با استفاده از آنتی ژنهای ۳۸ کیلودالتونی و مخلوط پروتئین، به ترتیب ۱۰۰ و ۷۵ درصد محاسبه شد).*

بحث و نتیجه گیری: *نتایج این مطالعه بخوبی بیانگر این نکته است که استفاده از انتی ژن ۳۸ کیلودالتونی در تشخیص سریع توبرکولوزیس به روش ایمونودات بدلیل ویژگی بالای آن و عدم نیاز به تجهیزات پیشرفته و گرانقیمت میتواند بعنوان یک آزمون کارا، دقیق و آسان در مطالعات میدانی مورد استفاده قرار گیرد.*

واژه های کلیدی : *تشخیص سل، آنتی ژن ۳۸ کیلو دالتونی، مایکوباکتریوم توبرکولوزیس*

* نویسنده مسئول :
علیرضا صالحی نوده ؛
دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران
Email : arsen51@yahoo.com

- دریافت مقاله : بهمن ۸۷ - پذیرش مقاله : تیر ۸۸

[۱] کارشناس ارشد ایمونولوژی سازمان تامین اجتماعی
[۲] کارشناس ارشد ایمونولوژی بخش ایمونولوژی گروه پاتوبیولوژی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران
[۳] دانشیار ایمونولوژی بخش ایمونولوژی گروه پاتوبیولوژی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران
[٤] کارشناس آزمایشگاه بخش ایمونولوژی گروه پاتوبیولوژی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران
[۵] استاد ایمونولوژی بخش ایمونولوژی گروه پاتوبیولوژی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران

مقدمه

سل عفونتی است کهن که در طول تاریخ همواره جوامع بشری را مورد تهدید قرار داده است. این بیماری بویژه در کشورهای پرجمعیت و در حال توسعه بسیار شایع بوده و هست(۲-۱). طبق برآوردهای سازمان بهداشت جهانی سالیانه سه میلیون نفر بر اثر این بیماری جان خود را از دست می‌دهند و سالیانه هشت میلیون مورد جدید بر تعداد مبتلایان افزوده می‌گردد. تخمین زده می‌شود که حدود یک سوم جمعیت جهان به مایکوباکتریوم توبرکولوزیس آلوده هستند. نقش سل در مرگ و میر افراد بالای ۵ سال در جهان بیش از بیماریهای دیگر نظیر ایدز، مالاریا، اسهال، جذام و مجموع تمام بیماریهای دیگر مناطق حاره است(٤-۳). سازمان بهداشت جهانی بارها اعلام کرده است که در صورت عدم اتخاذ تدابیر فوری برای کنترل سل موارد مرگ و میر ناشی از آن به چهار میلیون نفر در سال افزایش خواهد یافت. خطر جهانی سل باعث شده تا سازمان بهداشت جهانی در سال ۱۹۹۳ سل را یک فوریت جهانی اعلام کند(٤). معضل سل با پیدایش پاندمی عفونتHIV و ایدز و ظهور سویه‌هایی از باسیل سل که به یک یا چند داروی ضدسل مقاوم هستند، چهره خود را بیشتر نمایان کرد. آلودگی به HIV باعث می‌گردد تا احتمال بروز سل پیشرفته در افرادیکه به باسیل سل آلوده هستند بیشتر شده و گسترش بیماری در فرد سریعتر گردد. در حال حاضر هشت تا ده درصد از کل موارد سل در جهان با آلودگی HIV مرتبط می‌باشد. اما این پیوستگی در بسیاری از کشورهای آفریقایی بسیار بیشتر بوده و تا ۲۰ درصد و حتی بیشتر نیز می‌رسد(۵).

در برنامه جهانی مبارزه با سل سه اولویت تشخیص، درمان و پیشگیری بیشتر از سایر جنبه‌های بیماری مطرح گردیده(۵-۳). روشهای رایج تشخیص جـدا از معاینات بالینی، شامل رادیوگرافی قفسه سینه، آزمون پوستی توبرکولینی و روشهای باکتریولوژیک می‌باشد. آزمون پوستی توبرکولیـن از حساسیت و ویژگـی چندانـی برخوردار نیست. رادیوگرافی قفسه سینه نیز با وجود حساسیت بالا از ویژگی بالایی برخوردار نیست(٦). بیش از یک قرن پیش رابرت کخ عامل بیماری سل را از طریق رنگ آمیزی و کشت آن از نمونه‌های بیولوژیک جدا کرده، امروزه نیز روشهای تشخیصی سل تفاوت چندانی با روشهای گذشته ندارد. رنگ آمیزی فلورسنت باعث بهبود حساسیت تشخیص مستقیم میکروسکوپی گردیده است.

کشف محیطهای کشت جدید و استفاده از روشهای رادیومتریک به عنوان ابزاری برای تشخیص سریع رشد مایکوباکتریوم توبرکولوزیس زمان تشخیص را کوتاهتر کرده است. اما با وجود همه این تدابیر هنوز هم روشهای باکتریولوژیک محدودیتهای فراوانی دارند.

آزمون میکروسکوپی خلط برای تشخیص وجود باسیلهای اسید- فست (acid-fast bacilli) حساسیت تشخیص کمی دارد. این مسئله هنگامیکه حجم نمونه‌های ارسالی بیش از توان آزمایشگاه باشد نمود بیشتر پیدا می‌کند. کشت خلط حساسیت بالایی دارد ولی به چندین هفته وقت نیاز دارد. مشکل زمان طولانی کشت خلط بویژه هنگامیکه نیاز به آزمون‌های حساسیت دارویی نیز وجود داشته باشد، محدودیتهای این روش را دو چندان کرده است.

سیستم‌های خودکاری که امکان تشخیص سریع سل را فراهم می‌کند درحال حاضر وجود دارد ولی قیمت بالای آن مانع از استفاده متداول آنها در مراکز تشخیص و درمان سل گردیده است. علاوه بر همه این موارد امکان لانه گزینی باسیل سل در کانون‌هایی غیر از ریه محدودیت روش‌های باکتریولوژیک را

بیشتر کرده است(۷). بنا به دلایلی که تاکنون ذکر شد، جایگزینی آزمایشهایی که بر اساس تعیین پاسخ‌های ایمونولوژیک علیه سل، طراحی شده‌اند به جای روشهای جاری تشخیص سل از دیرباز مورد توجه محققین بوده است، زیرا این سنجش ها نیاز به تعیین مایکوباکتریوم در نمونه بیولوژیک نداشته و خطرات ناشی از کار برروی این دسته از نمونه‌ها را در پی ندارد. در میان آزمایشهای ایمونولوژیک روشهایی که بر اساس تشخیص آنتی بادیهای موجود در سرم یا سایر مایعات بیولوژیک، استوارند به چند دلیل در اولویت قرار دارند: اول اینکه در مبتلایان به سل فعال پاسخ آنتی بادی قوی ایجاد می‌شود که این یافته اساس دیدگاههای سرولوژیک برای تشخیص سل را تشکیل می‌دهد. دوم اینکه روش‌های سرولوژیک، ساده، سریع، ارزان و نسبتاً غیر تهاجمی هستند و سوم اینکه بر خلاف آزمون جلدی PPD بالقوه توان افتراق بین بیماری فعال و آلودگیهای بدون علامت را دارند زیرا پاسخ آنتی بادی اختصاصی بندرت در افراد بدون علامت که آزمونPPD آنها مثبت است، دیده می‌شود. اولین روش برای تشخیص سرمی سل توسط Arloing در سال ۱۸۹۸ ابداع شد(۷). از آن سال به بعد تاکنون گزارشهای متعددی از ابداع روشهای جدید تشخیص سرولوژیک سل منتشر شده است ولی هیچکدام از این روشها مورد قبول عام قرار نگرفته است. تکرار پذیری کم و عدم ویژگی از خصوصیات اغلب این روشهاست و نیز کارایی هیچکدام از آنها به اندازه دید مستقیم و کشت برای تعیین مایکوباکتریوم توبرکولوزیس نبوده است. یکی از بزرگترین موانع بر سر راه تشخیص سرمی سل یافتن آنتی ژن مناسب جهت بکارگیری در روشهای سرولوژیک بوده است. مایکوباکتریومها دارای ساختمان آنتی ژنیک بسیار پیچیده‌ای هستند، ولی متاسفانه علیرغم تفاوتهای فاحش در بیماریزایی بین گونه‌های مختلف مایکوباکتریایی، تعداد آنتی ژنهای اختصاصی گونه (Specis-Specific) در آنها بسیار کم است این امر دلیل ویژگی کم در اغلب روش‌های ابداع شده سرولوژیکی تشخیص سل بوده است(۸). در بین آنتی ژنهای مایکوباکتریوم توبرکولوزیس آنتی ژن ۳۸ کیلودالتونی مدتهاست نظر محققین را به جهت کاربرد این آنتی ژن در تشخیص سرمی سل به خود معطوف کرده است این آنتی ژن فقط در گروه کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکولوزیس Bovis وجود دارد، و از آنجائیکه میزان آن در مایکوباکتریوم توبرکولوزیس به مراتب بیش از مایکوباکتریوم Bovis است، لذا از نظر کمی این آنتی ژن در مایکوباکتریوم توبرکولوزیس اختصاص است(۱۰-۹). این مطالعه روش آسان و سریع را برای غربالگری بیماری سل با استفاده از آنتی ژن ۳۸ کیلودالتونی شرح می‌دهد.

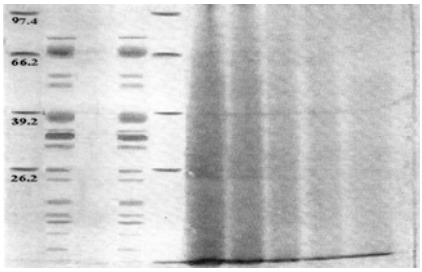
روش بررسی

برای تهیه آنتی ژن ۳۸ کیلودالتونی از محلول غلیظ PPD که از کشت سوشهای DT،C4،PN مایکوباکتریوم توبرکولوزیس بر روی محیط کشت مایع در سه هنله (Dorsett Henlle) بدست آمده استفاده شد. به این ترتیب که آنتی ژن یاد شده با استفاده از SDS-PAGE-electrophores از محلول غلیظ PPD جدا شده و پس از تخلیص و جداسازی به روش Electroelution برای استفاده در آزمون ایمونودات آماده گردید. سرم ۳۲ بیمار مبتلا به سل ریوی که اسمیر خلط آنها از نظر وجود باسیلهای اسیدفست مثبت بود از بیمارستان مسیح دانشوری و با رعایت اصول ایمنی اخذ و تا زمان آزمایش در فریزر ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. از معیارهایی نظیر عدم وجود سرفه مولد، عدم وجود خلط خونی، نداشتن تب و عرق شبانه، بی اشتهایی و رادیوگرافی

طبیعی قفسه سینه به عنوان ملاک سلامت در افراد گروه کنترل استفاده شد.

یافته ها

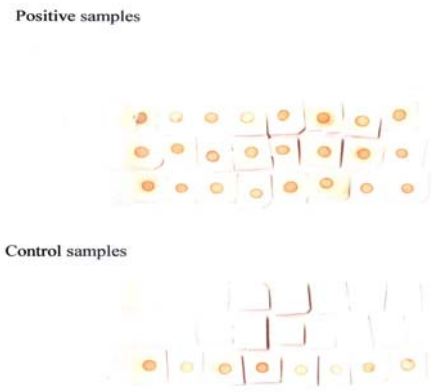
الکتروفورز فیلترای کشت که از کشت مایکوباکتریوم توبرکولوزیس سوش H37Rr بدست آمده بود حدود ۱۵ خط رسوبی مختلف را نشان داد که خطوط ٦٦،٣٨،٣١،٢٦ کیلودالتونی بسیار برجسته تر و واضحتر از بقیه خطوط بودند(شکل ۱).



شکل ۱- الکترفورز پروتئین های PPD تهیه شده از فیلترهای کشت ٦ هفته ای مایکوباکتریوم توبرکولوزیس

سنجش ایمونودات یک بار با استفاده از آنتی ژن ۳۸ کیلودالتونی (شکل ۲) و بار دیگر با استفاده از مخلوط فیلترای کشت (شکل ۳) به عنوان آنتی ژن بر روی ۳۲ نمونه بیمار و ۳۲ نمونه کنترل انجام شد. نتایج این سنجشها در (جدول ۱) آورده شده است.

شکل ۲- نتایج سنجش ایمونودات با استفاده از آنتی ژن ۳۸ کیلودالتونی



شکل ۳- نتایج سنجش ایمونودات با استفاده از فیلترای کشت

جدول ۱ : نتایج مربوط به سنجش ایمونودات بر روی نمونه های بیمار و کنترل

	گروه بیمار		گروه کنترل		حساسیت	ویژگی
	+	−	+	−		
سنجش با استفاده از مخلوط فیلترای کشت	۳ ۲	−	۸	۲٤	٪۱۰۰	٪۷۵
سنجش با استفاده از آنتی ژن ۳۸ کیلودالتونی	۲ ۹	۳	−	۳۲	٪۹۰/٦	٪۱۰۰

بحث و نتیجه گیری

همانطور که نتایج این پژوهش نشان می‌دهد استفاده از آنتی ژن ۳۸ کیلودالتونی روشی آسان و سریع برای غربالگری بیماری سل است. نتایج منفی بدست آمده در گروه بیماران به احتمال زیاد ناشی از فقدان پاسخ آنتی بادیست تا پاسخهای منفی کاذب. این یافته در پژوهش مشابهی که قبلاً صورت گرفته نیز مشاهده شـده اسـت(۳-۲). نکته قابل توجه عدم پاسخ مثبت کاذب در افراد گروه کنترل می‌باشد. آزمون فوق نیاز به تجهیزات خاص ندارد، لذا آزمونی بسیار مناسب برای پژوهشهای میدانی و غربالگری سریع سل در جمعیتهای زیاد است. درجدول ۲ مقایسه‌ای بین نتایج بدست آمده در پژوهش حاضر و نتایج بدست آمده از پژوهشهای قبلی آورده شده است(۱۳-۱۱).

جدول ۲ : مقایسه نتایج مطالعه حاضر با سایر مطالعات سرولوژیک تشخیص سل در دیگر نقاط جهان

روش بکاررفته	آنتی ژن استفاده شده	روش بکار رفته برای خالص سازی آنتی ژن	منطقه جغرافیایی	ویژگی	حساسیت
الیزا	38KD	Affinity Purification	مناطق با شیوع بالای تست PPD مثبت	٪۸۰	٪۹٤
الیزا	38KD	Affinity Purification	مناطق با شیوع بالای تست PPD مثبت	٪۹٦	٪۸٤
الیزا	38KD	Affinity Purification	آرژانتین	٪۹۳	٪۸۱
الیزا	crudeAg	Affinity Purification	آرژانتین	٪۵۵	٪۸۱
الیزا	38KD	Affinity Purification	چین	٪۸۸	٪٤۹
الیزا	38KD	Affinity Purification	آمریکا	٪۹۸	٪۸۹
الیزا	38KD	روشهای فیزیکو شیمیایی	مکزیک	٪۹٦	٪٦۸
الیزا	Clycolipid Ags	روشهای فیزیکو شیمیایی	ترکیه	٪۹۱	٪۹٦
ایمونودات (مطالعه حاضر)	38KD	روشهای فیزیکو شیمیایی	ایران	۱۰۰٪	٪۹۰/٦

پیرامون پژوهش اخیر ذکر نکاتی چند و توصیه‌هایی به سایر کسانیکه مایل به مطالعه در این زمینه می‌باشند، ضروری است. پژوهش حاضر با گزینش تصادفی بخشی از افراد بیمار صورت گرفته است، لذا مقادیر بدست آمده برای حساسیت و ویژگی آزمون نمی‌تواند کاملاً توانایی این آزمون را در تشخیص کلیه مبتلایان به سل برآورده کند. راه بهتر برای ارزیابی توان آزمون استفاده از کمیتی بنام "ارزش پیش بینی موارد مثبت" (Positive Predicative Value) (PPV) است، که برای محاسبه آن نیاز به دانستنی شیوع بیماری در جمعیت تحت بررسی می‌باشد.

دوم اینکه نمونه های سرم بیماران از افرادی اخذ شده بود که اسمیر خلط آنها مثبت بود. به نظر می‌رسد اندازه گیری کمیت‌های حساسیت و ویژگی آزمون ایمونودات با استفاده از آنتی ژن ۳۸ کیلودالتونی در افراد مبتلا به سل اسمیر منفی جهت برآورد دقیق تر ارزش این آزمون ضروری به نظر می‌رسد.

سوم اینکه متاسفانه جمع آوری اطلاعات مربوط به شدت بیماری، واکسیناسیون BCG و واکنش پوستی به توبرکولین در پژوهش اخیر میسر نشد. لذا انجام پژوهشهای مشابه با در نظر گرفتن اطلاعات فوق یافته‌های دقیق‌تری را بدست خواهد آورد و بالاخره اینکه روشهایی که در پژوهش اخیر جهت استخراج آنتی ژن ۳۸ کیلودالتونی به کار رفته است قابل استفاده جهت تولید مقادیر زیاد آنتی ژن برای بکارگیری در بررسی‌های روزمره آزمایشگاههای تشخیص طبی نمی‌باشد، لذا انجام پژوهشهایی برای یافتن راههای ساده و ارزانتر که به کسب مقادیر زیاد آنتی ژن بیانجامد، ضروری به نظر می‌رسد.

منابع

1. Okada M, Kobayashi K. Recent progress in mycobacteriology. Kekkaku 2007; 82(10): 783-99.

2. Tabbara KF. Tuberculosis. Curr opin ophtalmol 2007;18(6): 493- 501.

3. Ellner JJ. The immune response in human tuberculosis implication for tuberculosis control. J Infect Dis 1997; 17(6): 1351-9.

4. SJhre M, Chambers ST. The scent of Mycobacterium Tuberculosis. Tuberculosis 2008 jul; 88(4): 317-23.

5. Zumla A, Grange J. Tuberculosis. BMJ 1998; 31(6): 1962- 4.

6. Steingart KR, Ramsaj A, Pai M. Commercial Serological tests for the diagnosis of Tuberculosis: do they work? Furture Micrbiol 2007; 2: 355-9.

7. Thomas MD. Antibody and antigen detection for the immunodiagnostic of Tuberculosis: why not? What more is needed? Where do we stand today? J Infect Dis 1988:15(8): 678-80.

8. Cascante J, Pascal I, Eguia V, Hueto J. Diagnosis of tuberculosis infection. An Sist Sanit Navar 2007; 30(2): 49-65.

9. Negi SS, Anand R, Pasha ST, Gupta S, Basir SF, Khare S, et al. Diagnostic potential of IS6110, 38KDa, 65kDa and 85B sequence-based polymerase chain reaction in diagnosis of Mycobacterium tuberculosis in clinical Samples. Indian J Med Microbiol 2007; 25(1): 43-9.

10. Senol G, Ever OF, Yalcin YA, Coskun M, Gunduz AT, Bicmen C, et al. Humoral immune response against 38 KDa and 16KDa Mycobacterial antigens in tuberculosis. Eur Respir J 2007; 29(1): 143-8.

11. Harboe M, Wiker HG. The 38-KDa Protein of Mycobacterium tuberculosis review. J Infect Dis 1992; 166(4): 874-84.

12. Wilkinson RJ, Haslov K, Rappuoli R, Giovannoni F, Narayanan PR, Desai CR, et al. Evaluation of the recombinant 38-kilodalton antigen of Mycobacterium tuberculosis as a potential immunodiagnostic reagent. J Clin Microbiol 1997; 35(3): 553- 7.

13. Dogan UB, Aksu HS. Serodiagnostic value of ELISA in pulmonary tuberculosis in Turky where tuberculosis is highly prevalent. Respiration 1997; 64(1): 73-5.