بررسی آنتی بادیهای ضدDNA در بیماران مبتلا به لوپوس با استفاده از روش ایمونوفلورسانس غیر مستقیم کریتید یا لوسیلیا .

دکتر طاهره موسوی* - دکتر جواد تاجکی**

*- استادیار ایمونولوژی موسسهٔ سرم سازی حصارك کرج .
**عضو هیت علمی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی استان زنجان .

خلاصه :

****

آنتی بادیها ی ضد DNA اولین بار در سرم بیماران مبتلا به لوپوس اریتماتو منتشر(SLE) شناخته شدند. این آنتی بادیها در بسیاری از بیماریهای خود ایمنی و بافت همبند نیز وجود دارند. با توجه به ناهمگون بودن آنها باید گفت که آنتی- بادیهای ضدDNA دو رشته ای و طبیعی ارتباط بسیار زیادی با بیماری SLE داشته و تیتر (عیار) آنها با فعالیت بیماری مطابقت می کند.

یک منبع مهم برای دستیابی به DNA طبیعی، تاژکداری است بنام Crithidia Luciliae(C.L.) که برای انسان بیماریزا نبوده و به سادگی در محیط کشت رشد می کند. با استفاده از این ارگانیسم بعنوان سوبسترا و با روش فلو رسانس غیر مستقیم می توان آنتی بادیهای ضد DNA را اندازه گیری کرد.

در تحقیقی که با استفاده از این تک یاخته بر روی سرم ۱۲۷ بیمار مبتلا به لوپوس ، ۵۳ بیمار خود ایمنی غیر لوپوس بعنوان کنترل بیمار، و ۸۰ نمونه سالم بعنوان شاهد انجام گرفت نتایج زیر بدست آمد.

۱- کشت تک یاخته در محیط LIT بهتر از محیطهای پیشنهاد شده خارجی بوده و شکل ظاهری تک یاخته تیپیک و تشخیص کینتوپلاست آن بسیار آسان خواهد بود.

۲- استفاده از تکنیک فلورسانس غیر مستقیم برای تشخیص آنتی بادی- ضد DNA در تشخیص بیماری لوپوس با ۴۵٪ حساسیت و ۹۰٪ ویژگی از نظر آماری معتبر بوده و در مقایسه با دو جمعیت شاهد سالم و بیماردارای اختلالات معنی دار می- باشد. بدین ترتیب می توان گفت این روش در تشخیص بیماران لوپوس از سایر بیماران خود ایمنی و افراد سالم. از اعتبار کافی برخوردار است.

۳- افزایش عیار آنتی بادی با درجه فعالیت بیماری مطابقت داشته است.

با توجه به اینکه وجود آنتی بادیهای ضد DNA در بیماران لوپوسی با روشهای مختلف آزمایشگاهی بین ۷۰-۵۰٪ گزارش شده است، نتایج حاصل از تحقیق حاضر قابل مقایسه با آمارهای خارجی بوده و با توجه به سادگی آزمایش ارزانی، و قابل تکرار بودن در اکثر آزمایشگاههای تشخیص طبی، انجام آن را به تمامی آزمایشگاههای داخلی توصیه می کنیم. از این آزمایش می توان به منظور یکی از تستهای آزمایشگاهی متداول جهت تشخیص SLE و آگاهی از درجه فعالیت بیماری و نحوه پاسخگویی به درمان، استفاده کرد .

مقدمه :

****

آنتی بادیهای ضد DNA اولین بار در سرم بیماران مبتلا به لوپوس اریتماتو منتشر (SLE) مورد شناسایی قرار گرفتند و بزودی ارتباط آنها با این بیماری مشخص شد. ملکول DNA شامل اپی توپهای (شاخصها) متعددی است و آنتی بادیهای ضدDNA ممکن است حاوی گروههای نا همگون از ایمنوگلوبولینها باشد که هر یک ویژگی خاصی دارند. احتمالاً شایعترین دسته آنتی بادیها که باDNA واکنش میدهد دسته ای است که به DNA تک رشته ای باند میشود. بهمین دلیل جستجو و شناسایی این آنتی بادیها از ارزش تشخیصی کمی برخوردار است.

این دسته از آنتی بادیها یعنی گروهی که با DNA تک رشته ای وارد واکنش میشوند در بسیاری از بیماریهای بافت همبند و خود ایمنی وجود دارند. بر عکس آنتی بادیهایی که ترجیحاً با DNA دو رشته ای و طبیعی واکنش میدهند ارتباط بسیار زیادی با بیماریSLE دارند. مطالعات کلینکی متعددی خواص این آنتی بادیها را نشان داده است. یکی از این خواص عبارتست از ویژگی نسبتاً بالا برایSLEو دیگری ارتباط مستقیم سطح آنتی بادی با فعالیت بیماری.

مطالعات عملی برای اندازه گیری آنتی بادیهای ضدDNA منجر به پیشرفت تکنیکهائی برای

سنجش این آنتی بادیهای شده است. اغلب این روشها شامل مخلوط کرد ن سرم تست با n-DNA رادیولیبل و سپس جستجوی رادیواکتیو یتی پس از رسوب دادن کمپلکسهای DNA-anti DNA می‌باشد.

یک منبع مهم برای تهیه DNA طبیعی و استفاده در تستهای تشخیص آنتی بادیهای ضد آن در آزمایشگاه،تاژکداری بنام کریتید یا لوسیلیا است. این ارگانیسم حاوی یک میتوکوندری بزرگ و تغییر شکل یافته بنام کینتوپلاست است که ساختمان آن از مقدار انبوهی از DNA دورشته ای و پایدار حلقوی شکل تشکیل شده است. این DNA عاری از ناخالصیهای RNA و پروتئینهای هسته است. کریتید یا برای انسان بیماریزا نبوده و به سادگی در محیط کشت رشد می کند. بنابراین با استفاده از این ارگانیسم بعنوان سوبسترا، بدون نیاز به خالص سازی و تهیه شیمیائی DNA می توان آنتی بادیهای ضد آن را با روش فلورسانس غیر مستقیم مورد بررسی قرار داد. مزیت دیگر این روش اینست که می توان با استفاده از آنتی سرمهای اختصاصی، کلاس آنتی بادی و قدرت آن را در فعال سازی کمپلمان مورد مطالعه قرار داد. درمورد کاربرد این تست دو کاربرد بالینی عمده وجود دارد. یکی از آنها استفاده در تشخیص بیماری SLE است. تست آنتی DNA ویژگی بسیار بالا و در نتیجه قدرت زیادی برای تأیید تشخیص SLE در بیمارانی که علائم بالینی مشکوک دارند، دارد.

وجود آنتی بادی ضد DNA با تیترهای غیر طبیعی یکی از معیارهای تقسیم بندی و تشخیص SLE است که در سال ۱۹۸۲ تعیین گردید. علاوه بر این، این تست در صورت مثبت بودن در بیمارانی که علائم بالینی ندارند ولی دارای آنتی بادیهای ضد ترکیبات هسته هستند نشان د هنده وجود بیماری بصورت تحت بالینی و بدون علامت است.

با این روش در کمتر از ۲٪ بیماران مبتلا به سایر نارسائیها آنتی DNA مثبت می شود و در بیماران مبتلا به SLE ناشی از دارو جواب منفی است.

دومین کاربرد بالینی از تست آنتی DNA کنترل بالینی بیماران SLE است. تعدادی از محققین ارتباط بسیار نزدیک بین افزایش تیتر این آنتی بادیها و فعالیت بیماری گزارش کرده اند. این تحقیقات نشان میدهد که تیتر های افزایش یافته در ۶۰٪ از موارد فعال بیماری وجود دارد. بطوریکه با این روش در ۹۰-۸۰٪ از بیماران مبتلا به نفریت وجود آنتی -DNA تشخیص داده میشود. بنابر این از تست کریتید یا می توان برای بررسی موفقیت درمان در بیماران مبتلا به SLE استفاده کرد.

روش کار و مواد لازم:

- بیماران .
- شاهد بیمار .
- شاهد سالم .
- طرز تهیه آنتی ژن .
- روش ایمونوفلورسانس غیر مستقیم .

بیماران:

این افراد مجموعاً ۱۲۷ بیمار مبتلا به لوپوس می باشند که به درمانگاه کلاژنوز بیمارستان دکتر شریعتی به سرپرستی آقای دکتر دواچی مراجعه کرده و تحت درمان می باشند. در بین بیماران فازها ی مختلف بیماری دیده شده و تاریخ شروع بیماری متفاوت است. معیارهای تشخیص بیماری بر طبق روشهای مورد قبول بین المللی وجود چهار معیار از یازده معیار کلینیکی و آزمایشگاهی در این بیماران می باشد.

شاهد بیمار (کنترل):

بعنوان شاهد بیمار از سرم تعداد ۴۳ بیمار مختلف از دسته بیماریهای خود ایمنی استفاده شده است. این گروه نیز از مراجعین به درمانگاه کلاژنوز بیمارستان دکتر شریعتی بوده و تحت درمان قرار داشته اند. انتخاب این افراد بطریق تصادفی و مراجعه راندوم به درمانگاههای مختلف بوده است.

شاهد سالم (کنترل):

جمعیت شاهد سالم بطور تصادفی از بین اهداء کنندگان خون انتخاب شده است. این افراد مجموعاً ۸۰ مورد بوده و همگی سالم می باشند. آزمایشهای پزشکی لازم برای تأیید سلامت این افراد در مرکز انتقال خون زنجان انجام شده است.

طرز تهیه آنتی ژن (سوبسترا):

برای انجام فلورسانس غیر مستقیم، بعنوان

سوبسترا از تک یاخته بخصوصی بنام کریتید یا لوسیلیا استفاده شده است. سوش این تاژکدار را از مخزنی که در دانشکده بهداشت دانشگاه تهران وجود دارد تهیه و پس از انتقال به زنجان در محیط کشت LIT تکثیر نمودیم. روش کشت به ترتیب زیر است:

در هر لوله محتوی محیط کشت استریل حدود۴-۳ قطره از استوك ارگانیسم را بطور استریل افزوده و لوله ها را در حرارت ۲۶° قرار میدهیم. پس از حدود ۷-۴ روز یعنی وقتی که غلظت ارگانیسم به حدود 10/ML X 10-20 رسید می توان کشت را متوقف کرده و از آن برای تهیه اسلاید استفاده کرد.

طرز تهیه اسلاید:

****

- هر لوله کشت را به مدت ۱۵ دقیقه در ۲۰۰۰ دور سانتریفوژ می کنیم.
- مایع رویی لوله را خارج کرده و به ته نشین، 5ML سرم فیزیولوژی افزوده و پس از دوباره سوسپانسیون کردن، آن را بمدت ۱۵ دقیقه دیگر سانتریفوژ می کنیم.
- ارگانیسم را دوبار دیگر با سرم فیزیولوژی شستشو میدهیم.
- بعد از آخرین مرحله رسوب را در 5ML آب مقطر حاوی ۱٪ آلبومین گاوی بحالت سوسپانسیون در می آوریم.
- روی هر لام شیشه ای با مداد الماس دو دایره با قطر تقریبی ۷ میلی متر می کشیم و بر روی هر دایره ۱۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون کریتید یا قرار می دهیم.
- اسلاید را دو ساعت در مجاورت هوا قرار میدهیم تا خشک شود.
- اسلایدهای خشک شده را بمدت ده دقیقه در جار محتوی اتانل ۹۵٪ قرار می دهیم.
- برای خشک شدن اسلایدها، آنها را بمدت یک ساعت در مجاورت هوا قرار می دهیم. این اسلایدها بمدت ۳ ماه در حرارت 20° - قابل نگهداری هستند.

روش ایمونوفلورسانس غیر مستقیم:

طرز انجام آزمایش مشابه سایر آزمایشهای فلورسانس غیر مستقیم است. مراحل کار به ترتیب بقرار زیر است.

۱- ۲۰ میکرولیتر از سرم خالص ورقت 1:10 سرم را که در بافر PBS با PH=7.6 تهیه شده روی هر دایره اسلاید قرار داده و لام را بمدت ۳۰ دقیقه در محفظه مرطوب و حرارت آزمایشگاه قرار می دهیم.

۲- با استفاده از بافر، سرم اضافی را شسته و لامها را بمدت ۱۰ دقیقه در ظروف رنگ آمیزی پر ازPBS و روی شیکر قرار می دهیم. اضافیPBS را روی لام بکمک کاغذ خشک کن می گیریم.

۳- از رقت 1:10 کونژوگه آنتی هیومن سرم (فلورسنت) مقدار ۲۰ میکرولیتر روی هر نمونه ریخته و آن را بمدت ۳۰ دقیقه در محفظه مرطوب قرار میدهیم.

۴- مثل مرحله دوم اسلایدها را بمدت ۱۰ دقیقه شستشو میدهیم.

۵- اضافی بافر را از روی لام خشک کرده و بکمک محلول بافر - گلیسرول روی هر دایره چند قطره مرطوب کننده قرار میدهیم.

۶- اسلایدها را ابتدا با درشتنمایی ۴۰ و سپس با ۱۰۰ زیر میکروسکپ فلورسانس مشاهده می کنیم.

در هر بارآزمایش یک نمونه کنترل مثبت و منفی نیز گذاشته و چگونگی لامها را با این نمونه شاهد مقایسه می کنیم.

با استفاده از سوبسترای بکار رفته شده در تحقیق حاضر، تفکیک نمونه های مثبت و منفی در زیر میکروسکوپ بسیار آسان بوده و با توجه به درخشندگی کینتوپلاست در نمونه های مثبت و عدم درخشش آن در نمونه های منفی، موارد مثبت و منفی تشخیص داده میشود. در نمونه هایی که سرم خالص و 1:10 آنها مثبت بوده اند رقت های دوبل متوالی تهیه شده و با همان روش ذکر شده آخرین تیتر آنتی بادی در سرم تعیین می گردد.

با این تکنیک در موارد دی که تیتر آنتی بادی 1:10 و بیشتر باشد، نمونه مثبت و تیترهای کمتر از1:10 منفی تلقی میشوند.

نتایج

جدول۱- توزیع فراوانی مطلق (F) موارد سالم و بیماریهای خود ایمنی بر حسب عیار آنتی بادی ضد DNA .

Disease	F	۰	۱:۱۰	۱:۲۰	۱:۴۰	۱:۸۰	۱:۱۶۰	۱:۳۲۰
لوپوس	۱۲۷	۱۰	۱۱	۲۲	۶	۱۱	۶	۱
آرتریت روماتوئید	۲۳	۱۸	۴	۱	-	-	-	-
آتروا‌سکلروزیس	۳	۳	-	-	-	-	-	-
اسکلرودرمی	۱۵	۱۲	۱	۲	-	-	-	-
پلی میوز	۲	۲	-	-	-	-	-	-
واسکولیت	۴	۳	-	-	-	-	-	-
درماتومیوزیت	۲	۲	-	-	-	-	-	-
اسپوندیلیت‌انکیلوران	۱	۱	-	-	-	-	-	-
پلی آرتریت	۳	۲	-	-	-	-	-	-
N.Control	۸۰	۷۲	۵	۲	۱	-	-	-

با توجه به اهداف تحقیق گروههای مختلف بیماران را ۲ دسته، SLE و غیرSLE و کنترل شاهد را در یک گروه طبقه بندی کردیم. بدین ترتیب کلیه موارد مورد آزمایش به سه جمعیت لوپوسی (جمعیت تست)، جمعیت کنترل بیمار (Patient Control) و کنترل سالم (Normal Control) تقسیم می شوند. حاصل این دسته بندی در جدول شماره ۲ آمده است.

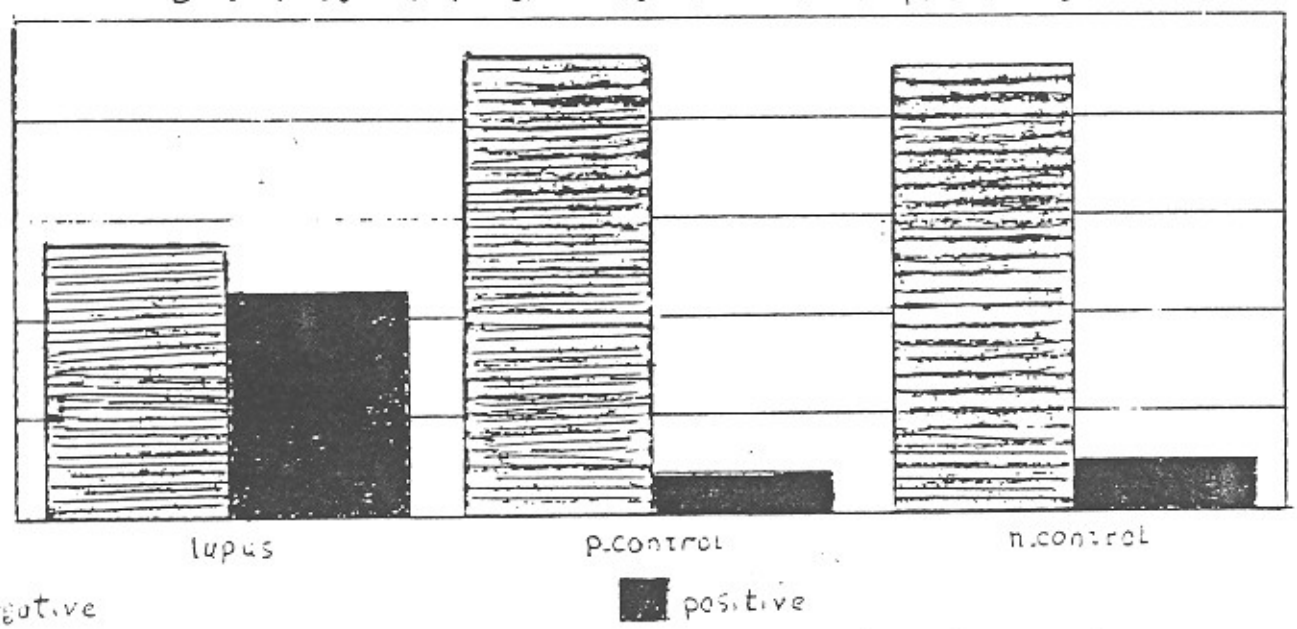
جدول ۲- توزیع فراوانی مطلق SLE، کنترل بیمار و کنترل سالم بر حسب عیار آنتی بادی ضد DNA .

Antibody end point	Patient	P.control	N.control
0	70	43	72
1:10	11	6	5
10:20	22	4	2
1:40	6	4	1
1:80	11	0	0
1:160	6	0	0
1:320	1	0	0
Total	127	53	80

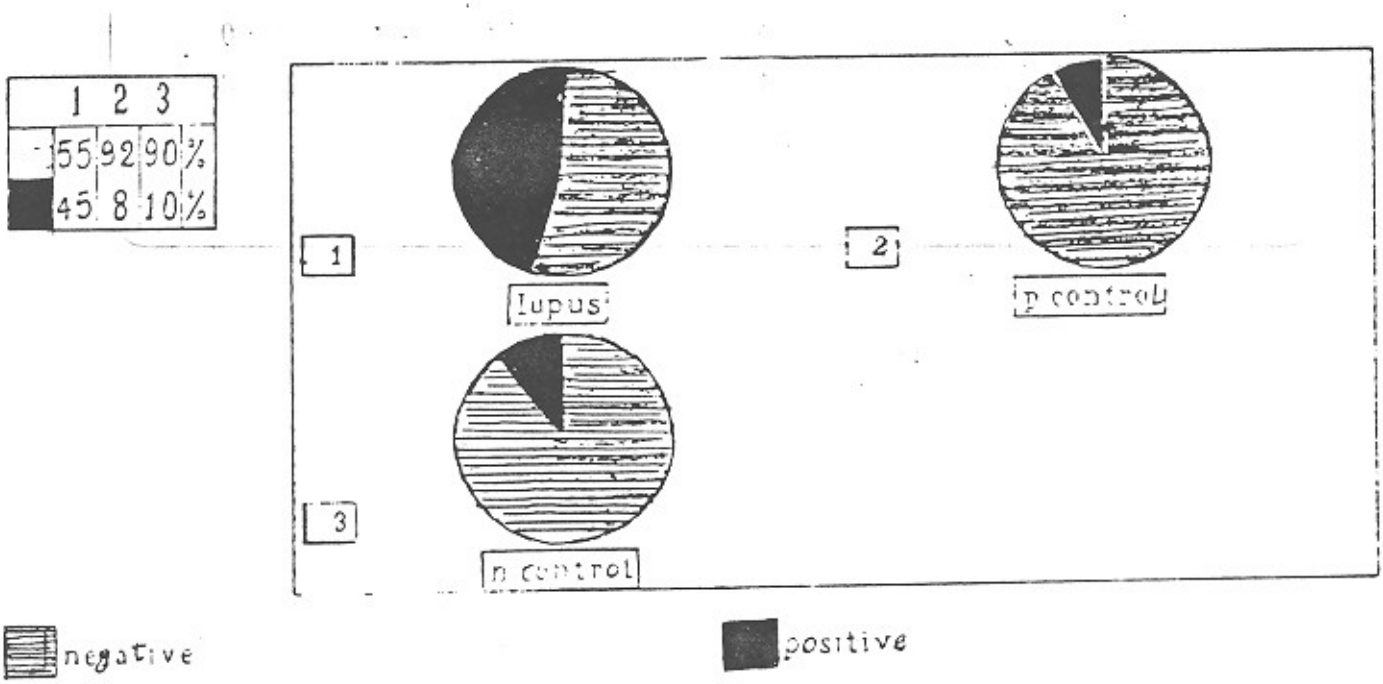
با توجه به جدول فوق و فراوانی هر یک از گروهها بر حسب آخرین تیتر آنتی بادی میانگین هندسی عیار آنتی بادی در بیماران SLE(GMRT) مساوی با ۱:۳۲ درجمعیت کنترل بیمار= ۱:۱۸ ودر جمعیت کنترل سالم = ۱:۱۴ می باشد.

Geomtric mean of Reciprocal Titer = (GMRT)

شکل ۱- هیستوگرام مقایسه ای سه جمعیت مورد مطالعه بر حسب درصد موارد مثبت و منفی



شکل۲- هیستوگرام جداگانه از هر یک ازسه جمعیت مورد مطالعه و مقایسه درصد موارد مثبت و منفی در هر یک از این سه گروه.



بحث و نتیجه گیری:

****

لوپوس اریتماتو منتشر بیماری مزمنی است که تظاهرات آن را می توان در تمامی اعضاء و نسوج شخص مبتلا مشاهده کرد. شیوع این بیماری هرچند در ایران بسیار زیاد نیست، ولی به علت مشکلاتی که در تشخیص اولیه آن وجود دارد و عوارض متعددی که ممکن است برای بیماران بوجود آید، همچنین سیر مزمن بیماری که احتیاج به مراقبت دائمی از بیمار دارد، باعث شده که در اغلب مراکز درمانی و دانشگاهی کشور بخش ویژه ای جهت بررسی و درمان این بیماران تاسیس شود.

با توجه به نقش مهمی که اتروآنتی بادیها در بیماریزایی و تشخیص این بیماری دارند، امروزه اندازه گیری آنتی بادیها ی ضدDNA در بیماران مبتلا بهSLE و کسانی که مشکوك به این بیماری هستند بصورت یک آزمایش تثبیت شده در آمده است. ویژگی نسبتاً بالای این آنتی بادیها برای تأیید بیماری بالینی و ارتباط تیتر آنتی بادی با درجه فعالیت بیماری وسیله خوبی را برای کنترل بیماران فراهم کرده است.

روش ایمونوفلورسانس غیر مستقیم با استفاده از تاژکدار کریتید یا لوسیلیا در ردیف بهترین روشهای مورد قبول آزمایشگاهی برای شنجش آنتی - DNA می باشد. این موضوع بعلت ویژگی ایمونو شیمیائی آنتی بادیهای ضدDNA دو رشته ای، سهولت انجام آزمایش و قیمت کم آن می باشد.

این آزمایش به سادگی در تمام آزمایشگاههایی که قدرت انجام آزمایشهای ایمونوفلورسانس را دارند، قابل انجام است. در تحقیق حاضر که جهت ارزیابی ارزش تشخیصی این تست آزمایشگاهی در بین بیماران ایرانی و مقایسه آن با استاندارد های جهانی انجام گرفته است، نتایج نشان میدهد که این آزمایش اعتباری در ردیف سایر قسمتهای مورد قبول آزمایشگاهی داشته و بعلت ارزانی، سادگی، و قابل تکرار بودن، انجام آن در آزمایشگاههای ایران ارجح است.

با توجه به نتایج حاصل از انجام آزمایش آنتی- DNA بر روی بیماران لوپوسی ایران و در مقایسه با جمعیت شاهد بیمار و شاهد سالم، و با توجه به نتایج آماری بدست آمده از این تحقیقات می توان پیشنهاد کرد که در آزمایشگاههای داخلی این روش بسیار ساده، ارزان، قابل اعتبار و قابل دسترسی و تقریباً راحت تر از سایر روشهای سنجش آنتی -DNA می باشد.

از طرف دیگر امکان کشت سوش تک یاخته در ایران با استفاده از محیطهای کشت ساده و تهیه ارزان سوبسترا، مزیت دیگر این روش می باشد که آزمایشگاهها را از وابستگی به کیتهای خارجی بی نیاز می کند.

رفرانسها:

N Englmed:311: 1984, 491 -495

1. Banfa E.et al. Immuno blot analisis of IgG subclasses of multiplt auto antibodies jour of Immunology 7: 1988, 2231- 2236.

2)Beutner et al. ,prospects of problems in the definition of standardization of Immunofluorscence. Present levels of reproducibility∞ desease specifity of antiunclear antibody tests,

Ann Ny Acad sci , 240, 1983: 28-25.

3) Coons A.H, Creech H.j, Jones ,R

,Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group.,

pro sec, exp Biolo , New york, 47:200, 1941

4) Crowe william Kushner Irving.

.An Immunofluorscent method using CL tc deteit Aatibodies to dable stranded DNA,

Arthri. ∞. Rhca Vol 20. No3 1977. 811- 814.

5) Deng jua . Shyong Sontneimen et, al, the binding of antihistone Antibodies to crithidia luciliae Kinet o — plasts in griwth cycle - Dependant,.

Ann of phouma . 28, No 2. 1985, 163 - 170.

6)Dmbois E.L. lupus Erythemato Sous, Secondedition.

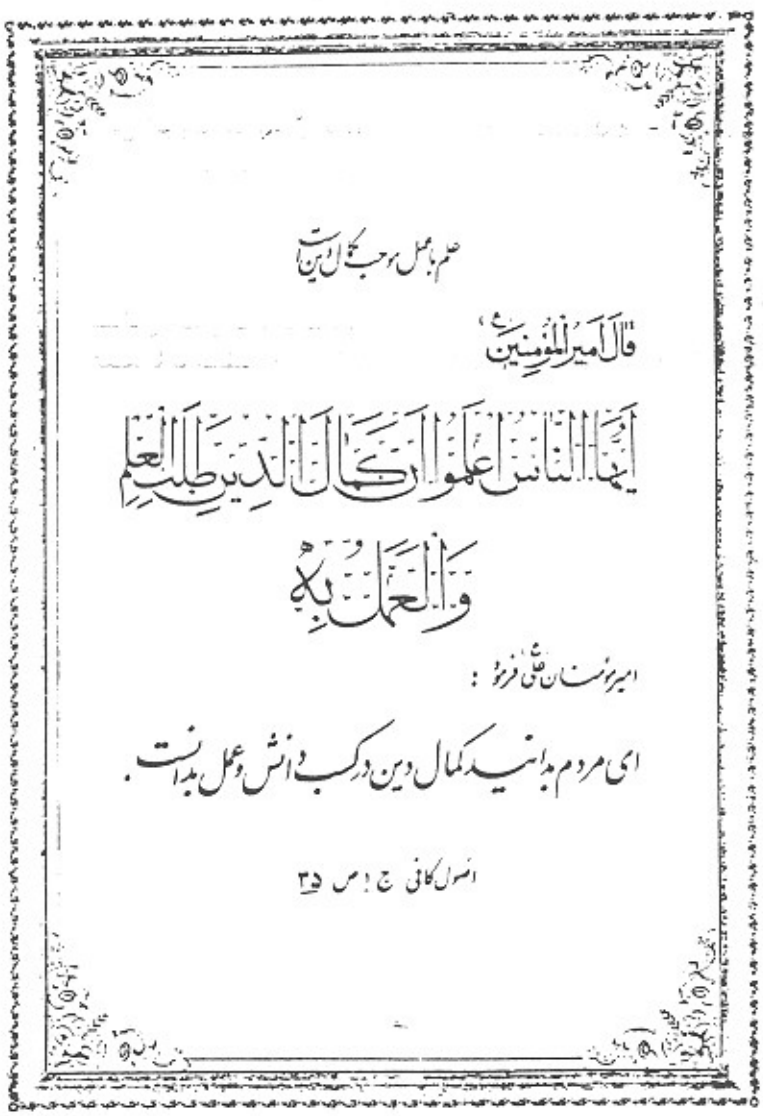
7)Harrison ,S principles of internal Medicine (1987) Ch. ystemic lupus

Erythematosus P.1418

8)Nakamura, Rubin, Molden, Tan(1986) auto antibodies to nuclear antigens .(ANA) se cond Edition.

9)Rose R.Et al (1986) manual of clinical Laboratory immunology third edition P.150.

باتشکر از همکاری:
آقای دکتر صراف نژاد
آقای دکتر نورالدین موسوی نسب
آقای مصطفی شفقتیان



جدول ۴- مقایسه موارد مثبت و منفی جمعیت لرپوسی و سالم مورد مطالعه از نظر نتایج حاصل از آزمون آنتی DNA سرمی

	Patient	N.Control	Total
Negative	70	72	142
Positive	57	8	65
Total	127	80	207

Sensitivity = %44.8 %45

Specificity= %90

X^2= 88.258 (P<0.0001)

با توجه به آزمونهای آماری انجام شده بین جمعیت بیمار و شاهد سالم اختلاف معنی دار وجود دارد و انجام تست سنجش آنتی DNA با روش پیشنهاد شده برای تشخیص بیماران لرپوسی از افراد سالم دارای حساسیت ۴۵٪ و ویژگی ۹۰٪ میباشد.

جدول ۳ - مقایسه موارد مثبت و منفی جمعیت لوپوسی و شاهد بیمار از نظر نتایج حاصل از آزمون آنتی DNA سرمی

	Patient	Control	Total
Negative	70	43	113
Positive	57	10	67
Total	127	53	180

Sensitivity = %44.8 %45

Specificity= %81

X^2= 85.56 (P<0.0001)

با توجه به آزمونهای آماری انجام شده بین دو جمعیت فوق اختلاف معنی دار بین نتایج حاصله دیده میشود و انجام تست سنجش آنتی DNA با زوش کریتید یا برای تشخیص افتراقی بیماران لوپوسی از سایر بیماران خود ایمنی از حساسیت ۴۵٪ و ویژگی ۸۱٪ برخوردار است.