مجله دانشکده پزشکی تهران
سال پنجاه و یکم - فروردین اردیبهشت ۱۳۷۲

استفاده از آنتی ژن های محلول باکتری راه حلی برای تشخیص لیستریوز

دکتر شهناز رفیعی تهرانی[۱]، دکتر عبدالفتاح صراف‌نژاد[۲]، سید علی میر غنی‌زاده[۳]

Using a Bacterial Soluble Antigen, a Tool to Dissolve the Problem of Listeriosis

Abstract

Listeria infection is still a dominant infectious problem in Iran, particularly in abortion. Looking for a paraclinical technique other than bacterial methods(which is not always avialable) lead to serological survey indicating estimation anti listeria antibody by Immunoflouresccent test. Unfortunately the false positive results due to cross reaction between "listeria monocytogenesis" and certain gram positive cocci, made it an unacceptable technique.

Here we performed a test to extract the Listeria M. (Stranin 4a and 1b) soluble antigen and detecting the antigbody by counter immunoelectrophoresis (CEI)

The results indicated that of four bacterial soluble antigen fractions F1 and F3 were signifgicantly positive with patients sera.

We will discuss using the soluble antigen by CEI technique may be helpful to omit the false positive reactions.

مقدمه

لیستریا مونوسیتوژن و آزارهای ناشی از آن نه فقط برای میکربشناسان و پژوهشگران آزمایشگاههای تحقیقاتی جالب توجه بوده بلکه با توجه به مرگ و میر حاصل از بیماری در بین نوزادان و اشخاص پیر و ضعیف و ضایعات مادام‌العمر روانی و جسمانی که از خود باقی میگذارد بعنوان یک خطر جدی مورد بررسی قرار می‌گیرد. انتقال عفونت به جنین و نوزاد از راه جفت که سبب سقط و یا تولد نوزاد مرده می‌گردد، انگیزه‌ای است جهت پی‌گیری و حل این معضل. از آنجاکه عفونت در حیوانات نیز دیده می‌شود (۱، ۲، ۳، ۴) یافتن راهی برای تشخیص و درمان قطعی از دیدگاه اقتصادی نیز مطرح می‌گردد.

تشخیص بیماری بیشتر براساس یافته‌های باکتریولوژیک استوار است، اما مشکل جداسازی باکتری از ضایعات مانع بزرگی بر سر این راه است (۵).

روش سرولوژی یعنی بررسی آنتی‌بادیهای موجود در جریان خون بیماران مبتلا، با استفاده از روش ایمونوفلوئورسانس که سالها در گروه ایمونولوژی دانشکده پزشکی جوابگوی بیماران است راه دیگری است برای کمک به پزشك اما وجود واکنش متقاطع با بعضی باکتریهای گرم مثبت این روش را از ردیف یك امدادگر تشخیص صددرصد خارج می‌کند.

از این رو تفکر جداسازی آنتی‌ژن‌های سطحی باکتری

۱. دانشیار گروه ایمونولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
۲. گروه ایمونولوژی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران
۳. گروه ایمونولوژی دانشکده پزشکی علوم پزشکی یزد (شهید صدوقی)

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-11]

مورد توجه ما قرار گرفت.

اگر بتوانیم آنتی‌ژن اختصاصی باکتری راکه منجر به پاسخ ایمنی در بدن بیمار می‌شود از بقیه ساختمان آن مجزا کرده و در معرض سرم بیمار که حاوی آنتی‌بادی ضد آن است قرار دهیم، در این صورت واکنش متقاطع با سایر میکروارگانیسم‌ها را از بین خواهیم برد (۵، ۶، ۷) انجام این هدف منجر به نتایج آورده شده در بررسی حاضر گردید :

بیماران و روشها :

الف - بیماران :

۶۰ زن مبتلا به سقط مکرر که از مراکز مختلف به گروه ایمونولوژی معرفی شده بودند مورد بررسی قرار گرفتند و برای تاکید اختصاصی بودن نتایج سرم ۱۰۰ زن بظاهر سالم که برای اهداء خون به سازمان انتقال خون مراجعه کرده بودند. هم زمان مورد مطالعه قرار گرفتند. وضعیت تأهل، و حاملگی در افراد سالم در جدول شماره ۱ آمده است.

ب - روشها :

نمونه‌های سرم بیماران و افراد سالم به دو روش ایمونو فلوئورسانس غیر مستقیم و کانتر ایمونوالکترفورز مورد آزمایش قرار گرفتند.(Immune flourescent antibody test (IFT

۱ - ایمونو فلوئورسانس غیر مستقیم : در این روش آنتی‌ژن جسم کامل باکتری Listeria monocytogenesis که بر روی اسلاید ثابت شده و سرم بیماران با رقت‌های مختلف به آن افزوده می‌گردد و بر مجموعه آنها آنتی‌بادی ضد ایمن گلوبولین انسانی که به ماده فلوئورسانس پیوسته است (کنژوگه)، اضافه می‌شود (۱۸).

با استفاده از آنتی‌بادی کنژوگه اختصاصی میتوان نوع ایمن گلوبولین در گیر در عفونت بیمار را مشخص کرد بدین ترتیب در این روش آنتی IgG و آنتی IgM هر یک جداگانه بکار برده شدند.

۲ - روش کانتر ایمونوالکتروفورز Counter Immune Electerophoresis (CIE) در این روش آنتی‌ژن اجزاء محلول باکتری است که برای تهیه آن ها مراحل زیر طی شد.

- تهیه سوسپانسیون باکتری : سویه Ia لیستریا مونوسیتوژن در محیط کشت ژلوز خوندار کشت داده شد. سوسپانسیون پس از شست و شو و افزودن فنل مورد استفاده قرار گرفت. این عمل در سطح بسیار وسیعی صورت گرفت تا فرآورده حاصل از شکست جسم باکتری به مقدار قابل توجهی برسد.

- sonication : با استفاده از امواج مافوق صوت با فرکانس بالاتر از 17 KHZ جسم باکتری متلاشی گردید (۸ - ۹ - ۱۰)

۳ - اولتراسانتریفوگاسیون : محلول حاصل از سونیکاسیون به مدت ۴۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰ سانتریفوژ گردید و مایع رویی جدا و مقدار پروتئین آن بروش بیوره تعیین گردید (۱۱)

- دیالیز : پروتئین‌های حاصل در بند ۳ بوسیله Carbowax 2000 که نام تجارتی پلی‌اتیلن گلیکول است (PEG) تغلیظ گردید. کیسه دیالیزی که برای تغلیظ بکار گرفته شد از جنس سلوفان است که دارای منافذ کوچکی است که اجازه عبور ترکیبات با وزن ملکولی کمتر از ۱۰ هزار را می‌دهد و آنچه در کیسه می‌ماند پروتئین غلیظ شده است که در یخچال ۷۰ - نگهداری شدند.

- ژل کروماتوگرافی : برای جداسازی اجزاء مختلف آنتی‌ژنیک باکتری که اینک بصورت پروتئین محلول در آمده‌اند از روش ژل کروماتوگرافی استفاده شد. در این بررسی سفادکس گروه G که پلی مری از دکستران است بکار گرفته شد. سفادکس گروه G خود انواع مختلفی دارد که هر یک برای جداسازی ملکولهایی با وزن مشخص کاربرد دارند. در تحقیق حاضر از سفادکسی G100 استفاده شد که قادر است ملکولهای بین ۴۰۰۰ تا ۱۵۰/۰۰۰ دالتون را تفکیک کند. سفادکس را داخل ستون کروماتوگرافی ریخته و پروتئین‌های حاصل از اولترا سانتریفوگاسیون به آن افزوده شد. با اضافه کردن بافر فسفات با pH = 7.2 ملکولهای پروتئینی برحسب وزن خود به تناوب از انتهای ستون خارج و در لوله‌های جداگانه جمع‌آوری گردیدند (۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۶) چهار فراکسیون از شکستن جسم باکتری بدست آمد که به ترتیب F1 F2 F3 F4 نامگذاری گردیدند.

هر یک از اجزاء حاصل با روش کانترایمونوالکتروفورز جداگانه با سرم بیمار و افراد سالم آزمایش شدند. غلظت مناسب برای بکار بردن F1، ۱۰۰ و برای سایر اجزاء ۴۰۰ میکروگرم بود. روش CIE : یا کانترایمونوالکتروفورز است در این روش آنتی‌ژن و آنتی‌بادی در محیط ژل در حفره‌هایی مقابل یکدیگر قرار می‌گیرند و مجموعه آنها تحت تاثیر میدان الکتریکی به حرکت در می‌آیند. اگر آنتی بادی اختصاصی در سرم بیماران موجود باشد برخورد آنها با یکدیگر منجر به ایجاد رسوب و تشکیل خط مشخصی می‌گردد که پس از رنگ‌آمیزی با

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-11]

نفتالین بلاک Black nephtaline قابل رویت می‌گردد (۱۱ و ۱۲ و ۱۵ و ۱۷).

نتایج :

۱ - روش ایمونوفلوئورسانس : نتایج حاصل از روش IF در افراد سالم در جدول شماره (۲) آورده شده است جدول شماره ۳ نموداری است از پاسخ‌های بدست آمده در استفاده از آنتی‌بادی کنژوگه اختصاصی یعنی آنتی IgG و IgM توزیع فراوانی مطلق عیارهای IgM مثبت و IgG منفی و بالعکس و هم‌چنین،مواردی که هر دو منفی بودند در جدول ۴ آمده است.

اگر میانگین هندسی (GMRT) عیارهای مربوط به IgG را در نظر بگیریم برابر با ۵۳۴/۶۵ و GMRT مربوط به IgM برابر با ۲۸/۷۱ خواهد بود.

بعبارت دیگر عیارهای فوق باید طبیعی تلقی شوند.

بررسی سرم بیماران بروش IF در جدول ۵ آمده است بالاترین عیار $\frac{۱}{۱۲۸۰۰}$ بوده است .

۲ - روش کانترایمونوالکتروفورز : در سرم بیماران و افراد شاهد با چهار فراکسیون حاصل از جسم باکتری بروش CIE آزمایش شدند از آنجا که اجزاء F2 و F4 هیچ‌گونه پاسخ حتی در مواردی که عیار IF در سرم بسیار بالا بوده دیده نشد، این دو جزء از دستور کار خارج گردیدند.

نتایج حاصل از CIE در مقایسه با IF در افراد سالم در جدول شماره ۶ و در بیماران در جدول شماره ۵ گزارش شده است.

از ۴۲ بیمار که عیار آنتی‌بادی IF آنها بالاتر از مقدار $\frac{۱}{۵۳۴}$ بوده است. ۲۲ نمونه در روش CIE مثبت و ۲۰ نمونه منفی بوده‌اند.

تمام ۲۲ مورد با F1 و ۱۲ مورد با F3 جواب داده‌اند. در افراد سالم از ۱۰ مورد IF مثبت تنها دو نمونه با F1 و F3 واکنش داده‌اند. هیچ مورد مثبت CIE در غیاب وجود آنتی‌بادی IF دیده نشد.

بحث

با توجه به اهمیتی که تشخیص لیستریوز از نظر سلامت جامعه و اقتصاد آن دارد، جستجوی راههایی برای حل این مشکل ضروری بنظر می‌رسد. روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم تنها آزمایشی است در کشور ما که پایه اصلی تشخیص پزشکان ما را تشکیل می‌دهد (بدلیل مشکلات جداسازی لیستریا مونوسیتوژن). در این مطالعه ۱۰۰ فرد سالم (زن) که از نظر سن و وضعیت تأهل متفاوت بودند مورد بررسی قرار گرفتند.

عیار آنتی‌بادی ضد لیستریا در آنها بروش IF اندازه‌گیری شد و کلاسهای آن یعنی مقدار IgM و IgG آنها تعیین گردید. متوسط عیار قابل قبول در حدود $\frac{۱}{۵۴۳}$ برای IgG و $\frac{۱}{۲۸}$ برای IgM است و مقادیر بالاتر از آن را می‌توان دال بر عفونت مشخص بیمار به لیستریا توجیه کرد. اما از آنجا که گاه آنتی‌بادی را در افراد سالمی که هیچ‌گونه سابقه به عفونت را نشان نمی‌دهند میتوان یافت (۵)، ممکن است بالا بودن تیتر آنتی‌بادی در افراد به ظاهر سالم دال بر عفونت پنهان باشد (۸). گزارشات دیگر عیار قابل قبول IgG را $\frac{۱}{۳۲۰}$ می‌پذیرد (۲). اما بعلت شباهت آنتی‌ژنیک لیستریا با سایر باکتریها بهتر است که عیارهای بالاتر مورد قبول قرار گیرد. از طرف دیگر بیمار مبتلا به لیستریا فاقد عیار بالای آنتی‌بادی می‌باشد (۹، ۱۰) و این امر در تشخیص اختلال ایجاد می‌کند به همه دلائل ذکر شده روش کانتر ایمونوالکترفورز را که بسیار اختصاصی است انتخاب کردیم و فراکسیون‌های حاصل از متلاشی شدن جسم باکتری را بعنوان آنتی‌ژن بکار گرفتیم. اجزاء F2 و F4 بعلت عدم پاسخ با سرم بیماران و یا افراد شاهد از برنامه‌کار خارج شدند و احتمالاً این دو جزء فاقد خاصیت ایمنی‌زایی هستند.

اما جزء F1 شدیداً سبب تحریک سیستم ایمنی می‌گردد. آنتی‌ژنهای سطحی لیستریا اولین‌بار در سال ۱۹۷۹ توسط گروه Delvaller (۹) با سویه 4b مورد استفاده قرار گرفتند و سه جزء از آن جدا کردند که جزء II آنها بیشترین پاسخ را در انسان و خرگوش ایجاد می‌کرد وزن ملکولی این آنتی‌ژن ۱۶۰/۰۰۰ دالتون بوده است.آنچه که ما از ستون کروماتوگرافی در قسمت اول جداسازی بدست آوردیم،وزن ملکولی نسبتاً نزدیکی با این فراکسیون (II) دارد و بنظر می‌رسد که شبیه باشد به آنچه که گروه فوق بدست آورده‌اند.استفاده از فراکسیون‌های آنتی‌ژنیک لیستریا،امکان اشتباه بعلت واکنش متقاطع را بحداقل می‌رساند. ۸۰٪ افراد سالم که عیار آنتی بادی IF آنها در حد بالایی بوده در روش کانتر منفی گزارش شدند. که خود دلیلی بر حذف واکنش‌های متقاطع در این روش است.

از آنجا که حساسیت روش IF بالاتر از CIE است در نتیجه کمترین تشابه آنتی‌ژنیک میتواند باعث نتیجه مثبت گردد. اما ویژگی روش کانترایمونوالکتروفورز بسی بالاتر از ایمونوفلورسانس است که این خود در حذف واکنش‌های متقاطع که با باکتریهای دیگر از جمله استافیلوکک که عفونت رایجی است موثر خواهد بود.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-11]

امید است که این بررسی در مقیاسی بزرگتر ادامه یافته و امکان استفاده از اجزاء آنتی‌ژنیک باکتری در تمام آزمایشگاههای تشخیص طبی فراهم و در نتیجه یاریگر پزشکان گردد.

جدول شماره (۱) - نمونه‌گیری از افراد مختلف

موارد مثبت	تعداد	نوع افرادی که نمونه آنها مورد آزمایش واقع شده است
۱۱	۴۰	Multipa
۱۴	۳۴	متاهل
۱۸	۲۶	مجرد

جدول ۲ - جمعیت به ظاهر سالم از نظر آزمون IFT هم در مقابل کونژوگه آنتی IgG و هم آنتی IgM

نتایج آزمایش با کونژوگه آنتی IgM		نتایج آزمایش با کونژوگه آنتی IgG	
فراوانی	عیار	فراوانی	عیار
۲۷	۱:۲۰	۲۹	۱:۴۰۰
۱۴	۱:۴۰	۱۰	۱:۸۰۰
۵	۱:۸۰	۴	۱:۱۶۰۰
۵۴	Neg	۵۷	Neg
۱۰۰	جمع	۱۰۰	جمع

جدول ۳ - توزیع فراوانی مطلق عیارهای مختلف IgM و IgG با هم در افراد بظاهر سالم.

فراوانی	عیار		فراوانی	عیار		فراوانی	عیار	
	IgM	IgG		IgM	IgG		IgM	IgG
۲	۸۰	۴۰۰	۳	۴۰	۴۰۰	۲۲	۲۰	۴۰۰
۲	۸۰	۸۰۰	۲	۳۰۰	۸۰۰	۱	۲۰	۸۰۰
-	۸۰	۱۶۰۰	۲	۴۰	۱۶۰۰	۳	۲۰	۱۶۰۰

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-11]

جدول ۴ - توزیع فراوانی مطلق عیارهای IgM و مثبت و IgG منفی و بالعکس و همچنین هر دو منفی

عیار		تعداد
IgM^{+}, IgG	۱:۲۰	۱۱
	۱:۴۰	۸
	۱:۸۰	۱
IgG^{+}, IgM^{-}	۱:۴۰۰	۱۲
	۱:۸۰۰	۴
	۱:۱۶۰۰	۱
IgG^{-}, IgM^{-}	-	
	-	۳۵
	-	

حال اگر* GMRT با میانگین هندسی عیارهای مربوط به IgG را بگیریم برابر با ۵۳۴/۶۵ خواهد بود.
و GMRT مربوط به IgM برابر با ۲۸/۷۱ خواهد بود.

* Geometric mean of Reciprocal titers among serum positive cases

که GMRT از فرمول :

$$GMRT = \text{Anti log}\frac{(\text{Log titer 1} \times f1) + (\text{Log t2} \times f2) + (\log t3 \times f3)}{n = (f1 + f2 + f3 + \ldots.)}$$

توزیع عیارهای آنتی‌بادی مثبت LFT در اشخاص به ظاهر سالم برحسب نوع واکنش با F1 و F3 در کانتر

واکنش با F3	واکنش با F1	عیار در IFT	شماره نمونه	واکنش با F3	واکنش با F1	عیار در IFT	شماره نمونه	واکنش با F3	واکنش با F1	عیاردر IFT	شماره نمونه
-	-	-	۱۵	-	-	۱۶۰۰	۸	+	+	۸۰۰	۱
-	-	-	۱۶	-	-	۱۶۰۰	۹	+	+	۸۰۰	۲
-	-	-	۱۷	-	-	۱۶۰۰	۱۰	-	-	۸۰۰	۳
-	-	-	۱۸	-	-	-	۱۱	-	-	۸۰۰	۴
-	-	-	۱۹	-	-	-	۱۲	-	-	۸۰۰	۵
-	-	-	۲۰	-	-	-	۱۳	-	-	۱۶۰۰	۶
				-	-	۱۴	-	-	۱۶۰۰	۷	

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-11]

توزیع عیارهای آنتی بادی مثبت ایمونوفلورسنت برحسب نوع واکنش با F1 و F3 در روش کانتر

واکنش با F3	واکنش با F1	عیار سرم در روش D4	شماره نمونه	واکنش با F3	واکنش با F1	عیار سرم در روش IFT	شماره نمونه	واکنش با F3	واکنش با F1	عیار سرم در روش IFT	شماره نمونه
-	+	۶۴۰۰	۴۳	-	-	۸۰۰	۲۲	-	-	۴۰۰	۱
-	+	۶۴۰۰	۴۴	-	+	۸۰۰	۲۳	-	+	۴۰۰	۲
-	-	۶۴۰۰	۴۵	-	-	۱۶۰۰	۲۴	+	+	۴۰۰	۳
-	-	۶۴۰۰	۴۶	+	+	۱۶۰۰	۲۵	+	+	۴۰۰	۴
+	+	۶۴۰۰	۴۷	-	-	۱۶۰۰	۲۶	-	+	۴۰۰	۵
+	+	۶۴۰۰	۴۸	+	+	۱۶۰۰	۲۷	-	-	۴۰۰	۶
-	-	۶۴۰۰	۴۹	+	+	۱۶۰۰	۲۸	-	-	۴۰۰	۷
-	-	۶۴۰۰	۵۰	-	+	۱۶۰۰	۲۹	+	+	۴۰۰	۸
-	-	۶۴۰۰	۵۱	-	+	۱۶۰۰	۳۰	+	+	۴۰۰	۹
+	+	۱۲۸۰۰	۵۲	-	+	۱۶۰۰	۳۱	+	+	۴۰۰	۱۰
-	-	۱۲۸۰۰	۵۳	+	+	۱۶۰۰	۳۲	+	+	۴۰۰	۱۱
-	-	۱۲۸۰۰	۵۴	+	+	۳۲۰۰	۳۳	-	-	۴۰۰	۱۲
-	-	۱۲۸۰۰	۵۵	+	+	۳۲۰۰	۳۴	-	-	۴۰۰	۱۳
+	+	-	۵۶	-	-	۳۲۰۰	۳۵	-	-	۸۰۰	۱۴
+	+	-	۵۷	-	-	۳۲۰۰	۳۶	-	-	۸۰۰	۱۵
-	+	-	۵۸	-	-	۳۲۰۰	۳۷	+	+	۸۰۰	۱۶
-	+	-	۵۹	-	-	۳۲۰۰	۳۸	-	-	۸۰۰	۱۷
-	+	-	۶۰	+	-	۳۲۰۰	۳۹	-	-	۸۰۰	۱۸
				+	+	۶۴۰۰	۴۰	+	+	۸۰۰	۱۹
				-	-	۶۴۰۰	۴۱	-	+	۸۰۰	۲۰
				-	-	۶۴۰۰	۴۲	-	+	۸۰۰	۲۱

References

1) Braude A.I. Microbiology, Chapeter 26, 306 - 310, 1989.

2) Seeliger H.; Serovariant of listeria Monocytogenesis. Acta Microbial. Acated Sei Hang.22 : 179 - 181 , 1975.

3) Saebii S.; Infectious disease in Iran. 633 - 648, 1986.

4) Harison's Principles of Internal Medicine. 12th Edition 573, 1991.

5) Wolfgangk joklik, Zinsser Microbiology 18th edition : 527 - 533, 1984.

6) Kohn J. A simple method for concentrating fluid containing protein. Nature, 10 : 183 - 1055 , 1959.

7) Nahmias A : Immunology of Human infection,201 - 218. 1981.

8) Rose Noel : Immune Response to listeria 4 : 402 - 407, 1986.

9) Delvallez M. : Pruification of surface specific soluble antigen from L.M. Infec. Immunology 25 : 971 - 977, 1979.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-11]

10) Bekow R. : The Merck Manual of Diagnosos and therapy, 1987.

11) Sainsbory D. Dictionary of Microbiology, 1980.

12) Savory J : Purification of MPA form L.M. infect and Immunology 500 - 509.,1977.

13) Sworthy S.B. : Measurement for preoteins in biologic fluid. clinical lab . Methods and Diagnosis., 1980.

14) Fahey J. L. : Ion exchange chromatography and gelfiltration chapeter even. Text book of experimental immunology, 1973.

15) Sother L : The separation and purification of Bacterial antigen Hanbook of Experimental Immun, 1982.

16) Gel chromatography : Bio Rod Laboratorie, 1971.

17) Counter Immunoelecterophoresis system. Millipore Biomedical Ca. No LPM , 1975.

18) Warren C. : Demonstration of Listeria Monocytogenes in direct examination of S.F. by Fluorescent Antib Technique, 1963.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-09-11]