اندازه‌گیری فعالیت آدنوزین د آمیناز سرمی (ADA) و نقش ایزوآنزیمهای آن در تشخیص اولیه و زودرس تب روده‌ای (تیفوئید)

دکتر مهین‌دخت کیهانی، دانشیار بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی ایران

Evaluation of Serum Adenosin Deaminase Activity and It's Isoenzymes in the Early Diagnosis of Enteric Fever

ABSTRACT

In order to achieve a sensitive method in early diagnosis of enteric fever, we have performed a prospective research for assessing the value of ADA (Adenosin deaminese) and it's Isoenzymes.

For this purpose, we have compared the obtained results with those from widal test (tube), blood and stool culture.

Persons under study consisted of 77 patients having enteric fever with positive results of bacteriologic culture and 76 healthy individuals as control group.

In comparing the activity of ADA between above groups, a significant difference was noticed between mean activity of ADA in enteric fever group and control group ($P<0.001$). We decided to extract ADA Isoenzyme by exchange chromatography. The obtained results showed a significant difference between mean ADA1 / ADA2 ratio in enteric fever and control group ($P<0.01$).

By Taking the fallowing sensitivity of blood culture in this research and the average of the days needed to obtain positive results of blood culture (3-9 days) and the low sensitivity of stool culture and the serological widal test (14.3%), we can understand the great importance of measuring ADA activity and it's Isoenzymes in early diagnosis of enteric fever.

Key Words: Adenosin deaminase; ADA Isoenzymes, Enteric fever (Typhoid fever)

چکیده

به منظور دستیابی به یک روش تشخیصی حساس در زمینه تشخیص اولیه و زودرس تب روده‌ای (تیفوئید)، تحقیقی جهت ارزیابی ارزش اندازه‌گیری آدنوزین د آمیناز (ADA) و ایزوآنزیمهای آن انجام شد و نتایج حاصل با نتایج تست ویدال لوله‌ای، کشت خون و کشت مدفوع مورد ارزیابی قرار گرفت.

در این مطالعه که از نوع نیمه تجربی بود، ۷۷ نفر بیمار مبتلا به تب روده‌ای با نتایج کشت مثبت باکتری، ۷۶ نفر به عنوان افراد کنترل طبیعی مورد بررسی قرار گرفتند.

در مقایسه میزان فعالیت ADA در دو گروه بیمار و سالم، اختلاف معنی‌داری بین میانگین میزان فعالیت ADA در بیماران و گروه کنترل طبیعی وجود داشت ($P<0.001$). همچنین ایزوآنزیمهای ADA به روش کروماتوگرافی تعویض یونی در گروههای مزبور استخراج و با گروه کنترل نرمال مورد مقایسه قرار گرفتند. نتایج حاصله دلالت بر وجود اختلافات معنی‌داری بین میانگین میزان نسبت ADA1/ADA2 در مبتلایان به تب روده‌ای و گروه کنترل طبیعی می‌نمود ($P<0.01$).

با در نظر گرفتن حساسیت کشت خون در این تحقیق و

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-11]

میانگین محاسبه شده، روزهای لازم برای حصول به نتایج مثبت کشت خون (۹-۳ روز) و نیز حساسیت کم کشت مدفوع و تست سرولوژیکی ویدال (۱۴/۳ درصد) می‌توان از آزمایش تعیین فعالیت ADA و ایزوآنزیمهای آن در تشخیص اولیه و زودرس تیفوئید کمک گرفت.

مقدمه

تب روده‌ای یا تیفوئید یکی از بیماریهای عفونی خطرناک در کشورهای در حال توسعه محسوب می‌گردد و توسط باکتریهای گروه سالمونلا از طریق انتقال از راه آب و غذا ایجاد شده و اپیدمی‌های آن همه ساله گریبانگیر جوامع انسانی می‌باشد(۱).

گرچه قطعی ترین روش جداسازی باکتری عامل بیماریزا از کشت خون، مدفوع و کشت مغز استخوان است ولی بدلیل مشکلات موجود در مسیر جداسازی باکتری از کشت خون و مدفوع در هفته‌های اول و دوم و به دلیل عدم توصیه کشت مغز استخوان بطور روتین (۲) و با توجه به اهمیت تشخیص سریع و به موقع این بیماری و بخصوص نظر به آندمیک بودن شیوع تب روده‌ای در کشور، ما بر آن شدیم که در جستجوی روشی حساس، سریع، ارزانقیمت با قابلیت انجام آزمایشگاهی تشخیص طبی برآئیم.

امروزه گرچه آزمایش سرولوژیکی ویدال بطور گسترده برای تشخیص بیماری بکار گرفته می‌شود، ولی بر اساس مطالعات سایر پژوهشگران و یافته‌های ما، این تست نیز در تشخیص زودرس این بیماری در روزهای اول، هفته اول و گاهی حتی در هفته دوم از حساسیت بالایی برخوردار نبوده و به شدت تحت تأثیر مصرف خودسرانه آنتی‌بیوتیک قبل از آزمایش توسط بیمار، قرار می‌گیرد(۳)، لذا در این آزمایش به اهمیت روش حساس و سریع اندازه‌گیری فعالیت پلاسمایی آنزیم آدنوزین دآمیناز (ADA) و بررسی نقش ایزوآنزیمهای آن در تشخیص اولیه و زودرس تب روده‌ای (تیفوئیدی) پی‌برده و ارزش بکارگیری چگونگی انجام آزمایش، حساسیت و ویژگی آنرا از نظر خواهیم گذراند.

آنزیم ADA یک مارکر ایمنی سلولی بوده و دارای دو ایزوآنزیم ADA1, ADA2 است. فعالیت ADA1 در لنفوسیتهای T بمراتب بیشتر از لنفوسیتهای B می‌باشد.

فعالیت پلاسمایی ADA در تیفوئید از حدود روز چهارم به بعد از شروع علائم بیماری افزایش یافته و تا پایان هفته سوم سطح پلاسمایی آن بالا می‌ماند و بعلاوه در هفته‌های اول و دوم بر خلاف آزمایش ویدال و کشت خون به مقدار بسیار جزئی تحت تأثیر آنتی‌بیوتیک تراپی قرار می‌گیرد(۵و۴).

به این ترتیب آزمایش فوق دارای سرعت عمل بیشتر و حساسیت و ویژگی بالایی در تشخیص زودرس و اولیه تب روده‌ای بوده و تکنیک کروماتوگرافی تعویض یونی در کلیه آزمایشهای تشخیص طبی، بخصوص در مناطقی که تب تیفوئید شیوع بسیار زیادی دارد قابل استفاده است.

روش بررسی

۱ـ جامعه مورد نظر

جامعه مورد نظر بیماران مراجعه کننده به بیمارستانهای مختلف و مراکز آزمایشگاهی وابسته به دانشگاههای علوم پزشکی بودند که به علت علائم بالینی خاص مبنی بر تب روده‌ای در بیمارستان بستری و مورد آزمایشات تشخیصی قرار می‌گرفتند.

۲ـ نحوه انتخاب نمونه‌ها و تعداد آنها

الف ـ انتخاب بیماران و تعداد آنها

نمونه‌ها از بیمارانی انتخاب گردید که حتی‌المقدور در مدت کوتاهی پس از بروز علائم بیماری به بیمارستان مراجعه می‌کردند و مشکوک به تب روده‌ای بودند. نمونه‌گیری و انتخاب نمونه‌ها بدون درنظر گرفتن سن و جنس بیماران به شرح زیر انجام گردید:

تکمیل پرسشنامه و نمونه‌گیری از ۱۳۶ بیمار بستری مشکوک به تب روده‌ای در بدو پذیرش که بر اساس روشهای تشخیص کشت خون، مدفوع، مغز استخوان و تیتر بالا و رو به افزایش ویدال، تشخیص بیماری در ۷۷ نفر از آنها مسجل گردید.

ب ـ انتخاب افراد کنترل سالم و تعداد آنها

نمونه‌ها به تعداد ۷۶ مورد از سرم و یا پلاسمای افراد سالمی انتخاب گردیدند که فاقد تب یا هرگونه علائم بالینی و سابقه تیفوئید بودند و به منظور مقایسه و کنترل مورد آزمایش قرار گرفتند.

۳ـ نحوه نمونه‌برداری

با همکاری پزشکان و پرستاران جهت تأیید و تشخیص قطعی بیماری، نمونه‌های کشت خون، کشت مدفوع و خون

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-11]

لخته جهت آزمایشات ویدال گرفته شد . از دو گروه بیمار و کنترل، خون وریدی بر روی ماده ضد انعقاد EDTA در لوله‌های اسیدی (Acid wash) به میزان ۲-۱ میلی‌گرم EDTA به ازای هر میلی‌لیتر خون ریخته شد، پس از گرفتن نمونه خون در یک دوره زمان محدود، نمونه‌ها باید در زمان کوتاهی با استفاده از سانتریفوژ مناسب (که در مدت کار گرم نشود) بمدت ۱۵ دقیقه در دور ۳۰۰۰ سانتریفوژ شوند تا پلاسما بدقت از گلبولهای رسوب داده شده جدا گردد؛ سپس نمونه جدا شده باید تا زمان آزمایش در فریز ۱۰ ـ تا ۲۰- درجه سانتی‌گراد به مدت یک ماه نگهداری شود، این نمونه جهت اندازه‌گیری فعالیت ADA بکار برده شد.

البته تجربه در مورد چند نمونه به ما نشان داد که نتایج حاصل از آزمایش بر روی پلاسما و نمونه‌های سرمی تفاوت چندانی ندارند. نتایج حاصل از آزمایش بر روی نمونه‌هایی که یک شب در مجاورت سلول در یخچال نگهداری شده بودند در مقایسه با نمونه‌های تازه تفاوت چندانی نداشت.

۴ـ آزمونها و ابزار اندازه‌گیری

A- روش اندازه‌گیری آدنوزین دآمیناز (ADA)

۱ـ اصول آزمایش: روش پیشنهادی Giusti اصلاح شده روشی است که در هر آزمایشگاه بالینی می‌توان از آن استفاده نمود، ما نیز از این روش در مطالعه خود استفاده نمودیم(۵).

در این روش فعالیت ADA را می‌توان بوسیله مصرف آدنوزین یا تولید اینوزین یا آمونیاک اندازه‌گیری نمود. آنچه معمول است اندازه‌گیری میزان آمونیاک حاصل از واکنش است. آمونیاک تولید شده را می‌توان یا با هیپوکلریت سدیم و فنل در محیط قلیایی برای ایجاد رنگ شدید آبی ایندوفنل (Berthlot Reaction) مجاور نمود (در این واکنش سدیم نیترو پروساید بعنوان کاتالیزور عمل می‌نماید) تا واکنش تجزیه آدنوزین بوسیله ADA پس از گذشت زمان معینی در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد با افزودن فنل نیتروپروساید سدیم متوقف گردد(۷) و یا با جفت کردن آمونیاک آزاد شده با اگزالوگلوتاریک اسید در مجاورت گلوتامات دهیدروژناز اندازه گیری نمود(۸).

۲ـ روش کار: ۱۰ میکرولیتر از نمونه پلاسما را با ۲۰۰ میکرولیتر بافرسوبسترا (آدنوزین ۱۰ میلی‌مول، فسفات بافر ۰/۰۵ مول با pH = ۶/۵) مجاور کرده و بمدت ۴۵ دقیقه در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار می‌دهیم. واکنش آنزیمی را توسط افزودن ۵۰۰ میکرولیتر از محلول فنل (شامل فنل ۱۰۶ میلی‌مول نیتروپروساید سدیم ۰/۱۷ میلی مول) متوقف می‌نمائیم؛ سپس ۵۰۰ میکرولیتر از محلول قلیایی هیپوکلریت سدیم ۱۱ میلی مول و سود ۱۲۵ میلی مول بر روی آن افزوده، بمدت ۳۰ دقیقه آنرا در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم می‌کنیم تا رنگ آبی کمپلکس ایندوفنل ایجاد شود، سپس رنگ را با اسپکتروفتومتر LKB با طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌نمائیم. به همان طریق یک بلانک نمونه (انکوبه بدون آدنوزین) و یک استاندارد آمونیاک آزمایش می‌شوند.

۳ـ محاسبه:

فعالیت ADA بصورت زیر محاسبه می‌گردد (۷):

$$\text{ADA activity} = \frac{A-B}{C} \times 50 \text{ :U/L , 37}$$

A= OD نمونه − OD بلانک نمونه

B= OD بلانک آدنوزین - OD بلانک نمونه

C= OD استاندارد - OD بلانک نمونه

B- اندازه‌گیری فعالیت ایزوآنزیمهای ADA به روش کروماتوگرافی تعویض یونی:

در این مطالعه ایزو آنزیمهای ADA را در مبتلایان به تب روده‌ای که در سطح فعالیت ADA تام پلاسمایی در آنها افزایش نشان می‌دهد را استخراج، اندازه‌گیری، مقایسه و تجزیه و تحلیل نمودیم.

در این بررسی ما از روش کروماتوگرافی تعویض یونی که روش مرجع اندازه‌گیری فعالیت ایزوآنزیمها می‌باشد، استفاده کردیم(۸).

۱ـ اصول آزمایش:

ایزوآنزیمهای ADA در pH = ۸ دارای مقادیر متفاوتی بار منفی بر روی خود می‌باشند، بنابراین با استفاده از یک تعویض کننده آنیونی مانند Sephadex-DEAE-A50 تراتیل آمینو اتیل، در بافر دارای pH = ۸ و کلراید سدیم ۰/۳ مول بر لیتر، ایزوآنزیم ADA1 جذب رزین شده ولی ایزو آنزیم ADA2 که دارای بار منفی کمتری نسبت به ADA1 می‌باشد، نمی‌تواند با یون کلر (CL) موجود بر روی گروههای فعال رزین رقابت نماید و از ستون خارج می‌شود. با افزودن بافر دوم که دارای pH = ۴/۲ کلرید سدیم ۰/۶ مول بر لیتر است، ایزو آنزیم ADA1 از گروههای فعال رزین جدا و از ستون خارج می شود. هر کدام از ایزوآنزیمها در لوله‌های جداگانه‌ای جمع آوری شده

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-11]

و در پایان فعالیت ADA اندازه‌گیری می‌شود(۱۰و۶).

۲ـ معرفهای لازم:

الف ـ رزین تعویض کننده یونی Sephadex-DEAE-A50 یک تعویض کننده آنیونی (Anion Exchanger) می‌باشد.

ب ـ بافر فسفات I (۵۰ میلی مول، pH =۸):

۸/۱۹ گرم K2HPO4 و ۴۰۰ میلی گرم KH2PO4 را در آب مقطر حل نموده و سپس حجم آنرا به یک لیتر می‌رسانیم.

ج ـ بافر فسفات II (۵۰ میل مول pH = ۸ و ۳۰۰ میلی مول کلرور سدیم)

۸/۱۹ گرم K2HPO4 و ۴۰۰ میلی‌گرم KH2PO4 و ۱۷/۵۵ گرم کلرور سدیم را در آب مقطر حل نموده و سپس حجم آنرا به یک لیتر می‌رسانیم.

د ـ بافر فسفات III (۵۰ میلی مول pH = ۴/۲ و ۶۰۰ میلی مول کلرور سدیم)

۲۲ میلی‌گرم K2HPO4 و ۶/۹ گرم KH2PO4 و ۳۵/۱ گرم کلرور سدیم را در آب مقطر حل نموده و سپس حجم آنرا بر یک لیتر می‌رسانیم، pH تمام بافرهای فوق باید توسط pH متر تنظیم شده و در یخچال نگهداری شوند.

ط ـ ستون کروماتوگرافی ۰/۵×۵ سانتیمتر

در این بررسی از پی‌پت‌های پاستور با قطره داخلی به اندازه فوق استفاده شد.

۳ـ روش عمل:

برای جداسازی ایزو آنزیمهای ADA بطور کروماتوگرفی،بر اساس روش Toshiharu که روش اصلاح شده Ma & Fisher است بصورت زیر عمل می‌کنیم(۱۰)

الف ـ آماده ساختن رزین: مقدار ۵ گرم از رزین Sephadex DEAE-A50 - را توزین نموده و به آن یک لیتر بافر فسفات I اضافه نمودیم، با قرار دادن بشر حاوی مواد فوق بر روی همزن مغناطیسی به مدت ۱۰ دقیقه آنرا مخلوط و در حرارت اتاق قرار داده تا ته‌نشین شود. محل رویی را جدا کرده و مجدداً بر روی آن بافر فسفات I ریخته و با همزن مغناطیسی مخلوط می‌نمائیم، در نهایت پس از سه بار شستشوی رزین، مجدداً مقداری از بافر فسفات I را روی آن ریخته و حداقل به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری کرده، بعد از این مدت رزین آماده مصرف می‌باشد. این محلول واجد pH = ۸ است و قبل از تهیه ستون می‌بایستی pH آن کنترل شود.

ب ـ تهیه ستون: مقداری از رزین آماده شده را در یک پی‌پت پاستور که انتهای آن توسط مقداری پشم شیشه پوشیده شده است می‌ریزیم. قطر داخل پی‌پت پاستور باید دقیقاً ۰/۵ سانتیمتر باشد، مقدار رزین اضافه شده به ستون باید آنقدر باشد که ارتفای رزین به ۵ سانتیمتر برسد، سپس با افزودن مقداری از بافر فسفات I به ستون، رزین موجود در ستون را کاملاً فشرده می‌نمائیم. بنابراین در انتهای ستونی داریم که حاوی ۵۰ میلی گرم رزین می‌باشد، محتویات ستون دارای ۵ = pH است.

ج ـ افزودن نمونه: قبل از افزودن نمونه به ستون یکبار دیگر با اضافه کردن مقداری از بافر فسفات I ستون را می‌شوئیم (سرعت جریان داخلی از ستون باید ۰/۵ میلی لیتر در دقیقه باشد) بمحض رسیدن بافر به سطح رزین، ۰/۲۵ میلی‌لیتر از نمونه سرم یا پلاسما را به دقت به سطح ستون می‌افزائیم، سپس ۱۰ میلی لیتر از بافر فسفات I به ستون اضافه می‌نمائیم تا نمونه خوب جذب ستون شود. در این مرحله آنچه از ستون خارج می‌شود فاقد آنزیم است.

د ـ جمع‌آوری مواد استخراجی: در این مرحله ابتدا با افزودن فسفات II به ستون، ۱۰ میلی لیتر مواد استخراجی از ستون را در ۵ لوله جمع‌آوری می‌کنیم (هر لوله به مقدار ۲ میلی‌لیتر) و سپس با افزودن بافر فسفات III، ۱۰ میلی‌لیتر دیگر از مواد استخراج شده از ستون را در ۵ لوله دیگر جمع‌آوری می‌نمائیم (لوله‌های شماره ۶ تا ۱۰). در نهایت فعالیت ADA را در هر لوله به روش ذکر شده اندازه‌گیری می‌نمائیم. همچنین باید فعالیت ADA تام نمونه مورد آزمایش را نیز همزمان اندازه‌گیری نمائیم.

مجموع فعالیت ADA اندازه‌گیری شده در لوله‌های ۱ تا ۴ (در اثر افزودن فسفات II) فعالیت ایزوآنزیم ADA2 را در نمونه نشان می‌دهد و لوله ۵ فاقد فعالیت آنزیمی است و مجموع فعالیت ADA اندازه‌گیری شده در ۵ لوله بعدی (در اثر بافر فسفات III) فعالیت ایزوآنزیم ADA1 را در لوله‌های ۶ تا ۹ اندازه‌گیری می‌نمائیم. در این میان فعالیت آنزیم در لوله‌های ۵ تا ۱۰ جهت بررسی احتمال حضور ایزوآنزیمهای مربوطه سنجیده می‌شود(۱۰).

یافته‌ها

با توجه به هدف از این تحقیق که سعی در یافتن روشی حساس، دقیق و قابل اجرا در تمام آزمایشگاهها به منظور

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-11]

تشخیص اولیه و زودرس تب روده‌ای دارد، با اندازه‌گیری فعالیت پلاسمایی آنزیم ADA و ایزوآنزیمهای آن (ADA1,ADA2) در بیماران مبتلا به تب روده‌ای در تشخیص افتراقی تب تیفوئید و یک گروه از افراد کنترل نرمال، قابلیت این آزمایش در تشخیص زودرس تب روده‌ای به شرح زیر ارزیابی گردید:

I ـ اطلاعات مربوط به حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت (PPV)، ارزش اخباری منفی (NPV) و کارآیی اندازه‌گیری ویدال لوله‌ای و ADA تام پلاسمایی در تشخیص اولیه و زودرس تب روده‌ای (تیفوئیدی) جدول (۹) نشانگر این مطلب است.

II ـ اطلاعات مربوط به مقایسه فراوانی نسبی فعالیت ADA و عیار تست لوله‌ای ویدال در سه هفته اول بیماری قبل از شروع درمان در جدول (۱۱) نشان داده شده است.

III ـ اطلاعات مربوط به نتایج آزمون t-student و معنادار بودن اختلاف بین گروههای مورد تحقیق و افراد نرمال در جدول (۸) ارائه گردیده است.

IV ـ اطلاعات مربوط به معنا دار بودن یا نبودن اختلاف میانگین نسبت ایزوآنزیمها ADA1/ADA2 و ADA تام (T-ADA) در دو گروه مورد مطالعه (مبتلایان به تب روده‌ای و گروه کنترل نرمال) در جدول (۴) نشان داده شده است.

جدول ۱ـ حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و منفی، کارایی و نقش ایزوآنزیمهای ADA و نسبت آنها در تشخیص اولیه و زودرس تب روده‌ای

متغیرها وضعیت تست	حساسیت	ویژگی	ارزش اخباری مثبت (PPV)	ارزش اخباری منفی (NPV)	کارآیی
ADA > ۸۰ U/L	٪۹۴/۸	٪۹۵/۴	٪۸۹/۰۲	٪۹۷/۹	٪۹۵/۲
ADA1 > ۸۰ U/L	٪۹۴/۸	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۹۸	٪۹۸/۵
ویدال > ۱/۸۰	٪۳۷/۷	٪۹۸/۷	٪۹۶/۷	٪۶۱	٪۶۸
ویدال > ۱/۸۰	٪۱۴/۳	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۵۳/۵	٪۵۶/۸

جدول ۲ـ مقایسه فراوانی تعداد افراد دارای فعالیت سرمی ۸۰ > ADA و عیار ویدال بیشتر از ۱/۸۰ در سه هفته اول بیماری در ۷۲ نفر از مبتلایان به تب روده‌ای قبل از شروع درمان

فراوانی مقدار فعالیت ADA ≥ ۸۰ U/L	فراوانی مقدار فعالیت ADA ≤ ۸۰ U/L	فراوانی عیار ویدال ≥ ۱/۸۰	فراوانی عیار ویدال ≤ ۱/۸۰	تعداد روزهای بعد از شروع بیماری
۳۰	۱	۰	۳۱	۳-۹
۳۱	۳	۸	۲۶	۱۰-۱۵
۷		۱	۶	۱۶-۲۱
۶۸	۴	۹	۶۳	تعداد کل

جدول ۳ـ نتایج آزمون t-student و معنی‌دار بودن اختلاف میانگین بین گروه تحقیق و کنترل نرمال

گروه‌ها	تعداد نفرات	میانگین و انحراف معیار ADA واحد بر لیتر (U/L)	نتیجه تست: مقدار t	نتیجه تست: سطح معنی‌داری تفاوت میانگین دو جمعیت	Pvalue
مورد (مبتلایان تب روده‌ای)	۷۷	۱۲۶/۶ ± ۴۰/۳	۲۳/۶	معنی‌دار است	< ۰/۰۰۱
کنترل	۷۶	۱۷ ± ۵/۹	۲۳/۶	معنی‌دار است	< ۰/۰۰۱

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-11]

جدول ٤ـ نتایج بررسی معنی‌دار بودن یا نبودن اختلاف میانگین ADA تام (T-ADA) و نسبت ایزوآنزیم‌های ADA1/ADA2 در ۵ مورد از افراد گروه تحقیق و گروه کنترل طبیعی

گروهها	تعداد نفرات	میانگین و انحراف معیار نسبت ADA1/ADA2	ملاک آزمون t	Pvalue	T-ADA U/L	ADA1 U/L	ADA2 U/L
مورد (مبتلایان تب روده‌ای)	۵	۱۰/۲۴ ± ۱/۷۶	۱۲/۳	< ۰/۰۱	۱۶۱/۱±۵۶	۶۴۶/۶±۵۳	۱۴/۴±۴
کنترل	۵	۰/۵۱۲ ± ۰/۰۸	۱۲/۳	< ۰/۰۱	۱۳/۸۷± ۳/۲	۴/۷± ۱/۸	۹/۲±۲/۴

نتیجه : تفاوت معنی‌داری مابین میانگین ADA1/ADA2 در جامعه وجود دارد

بحث

بیماری تب روده‌ای (تیفوئید) یکی از مهمترین بیماریهای است که دارای طیف وسیع و متنوعی از علائم بالینی بوده و همیشه یک تصویر کلینیکی واضح و روشنی را ارائه نمی‌دهد. عدم تشخیص به موقع و درمان مناسب بیماری، منجر به گرفتاریها و عوارض بعدی و حتی مرگ و میر تا حدود ۲۰ـ۱۰ درصد می‌شود(۱۲). مبادرت به یافتن روشهای کلینیکی و پاراکلینیکی برای کمک به تشخیص این بیماری از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

اگرچه مجزا نمودن میکروارگانیسم از کشت خون بیماران، بعنوان یک روش پاراکلینیکی قاطع در تشخیص زودرس بیماری تیفوئید مطرح است ولی از آنجایی که این تأیید با تأخیر چندین روزه همراه می‌باشد و نسبت به زمان نمونه‌گیری و مصرف خودسرانه قبلی و یا تجویز آنتی بیوتیک و مسکن تحت تأثیر قرار می‌گیرد، ممکن است پس از سه هفته نیز جواب مثبت به دست نیاید.

مصرف قبلی آنتی بیوتیک نیز درصد موارد مثبت جداسازی سالمونلا را از کشت خون تا ۴۰ درصد کاهش می‌دهد(۶). پس زمان کم و بیش طولانی برای دستیابی به نتایج کشت خون باعث می‌شود که پزشک مدت طولانی بدون تشخیص بماند و اغلب در شرایطی که به تشخیص اولیه خود بر اساس علائم بالینی اطمینان نداشته باشد، شروع به درمان می‌کند.

جداسازی سالمونلا از کشت مدفوع نیز تابع زمان نمونه‌گیری بوده و در هفته دوم و سوم بیماری مثبت می‌شود. در این تحقیق ۲۲ درصد از مدفوع بیماران با سیل سالمونلا جدا شد. کشت مدفوع مستلزم ۳ـ۲ روز زمان برای حصول به نتایج مثبت است که از حساسیت چندانی برخوردار نمی‌باشد. کشت مدفوع به تنهایی از ویژگی و حساسیت کمتری در تشخیص تب روده‌ای برخوردار است.

در مطالعه ما از ۱۳۶ بیمار مشکوک به تیفوئید تنها ۷۷ نفر نتایج مثبت باکتریولوژیکی را نشان دادند. در حال حاضر روش سرولوژیکی ویدال بعنوان متداولترین روش تشخیصی سریع تب روده‌ای در کلیه آزمایشگاهها مورد استفاده قرار می‌گیرد، اما این تست نیز از نارسائیهای زیادی برخوردار بوده و از حساسیت چندانی در تشخیص اولیه و زودرس تیفوئید برخوردار نیست.

بر اساس جدول (۳) مورد مطالعه ما، چنانچه عیار مثبت ویدال لوله‌ای را مساوی یا بیشتر از ۱/۸۰ در نظر بگیریم فراوانی نسبی بیماران قابل شناسایی توسط این تست درصد ۳۷/۳ خواهد بود و چنانچه عیار مثبت ویدال لوله‌ای را بیشتر از ۱/۸۰ در نظر بگیریم این فراوانی به درصد ۱۴/۳ کاهش خواهد یافت و این در حالی است که هیچ یک از ۷۷ نفر از بیماران مورد مطالعه قبل از انجام آزمایشات پاراکلینیکی خود، آنتی‌بیوتیک مصرف نکرده بودند. از جمله عللی که توجیه کننده کاهش حساسیت تست ویدال است، می‌توان به زمان نمونه‌گیری در هفته اول و اوایل هفته دوم که عیار آگلوتینین (O) کم و یا منفی است و همچنین پوشیده شدن جسم سلولی باکتری توسط آنتی‌ژن (Vi) و یا مصرف قبلی آنتی‌بیوتیک اشاره نمود.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-11]

همچنین بر اساس جدول (۵) هیچ یک از ۳۱ بیماریکه سابقه شروع علائم بالینی خود را در ۹-۳ روز قبل ذکر می‌کردند، عیار ویدال لوله‌ای بیش از ۱/۸۰ را نشان ندادند، ولی یافته‌های ما بر اساس همین جدول بیانگر آن است که فراوانی مقدار فعالیت ADA پلاسمایی در ۳۰ نفر بیش از ۸۰ واحد و یک نفر کمتر از ۸۰ واحد بود و در تمام ۳۱ بیماریکه سابقه شروع علائم بالینی خود را در ۱۵-۱۰ روز قبل از نمونه‌گیری ذکر می‌کردند فراوانی مقدار فعالیت ADA پلاسمایی در تمام آنها بیش از ۸۰ بود در حالی که ۸ نفر واجد عیار لوله‌ای ویدال بیش از ۱/۸۰ بودند و افرادیکه شروع علائم بالینی خود را در ۲۱-۱۶ روز قبل از نمونه‌گیری ذکر می‌کردند، ۷ نفر واجد فراوانی مقدار فعالیت ADA بیش از ۸۰ بودند در حالی که یک نفر واجد عیار لوله‌ای بیش از ۱/۸۰ بود، پس تعیین فعالیت ADA پلاسمایی یک روش تشخیصی برخوردار از حساسیت، ویژگی بالا در تشخیص اولیه و زودرس تب روده‌ای (تیفوئید) است.

شروع افزایش فعالیت ADA پلاسمایی همگام با تحریک تکثیر و بلوغ لنفوسیتها در حین هفته اول و پاسخ لنفوسیتی در هفته‌های بعد می‌باشد، این افزایش زمانی که فعالیت ADA پلاسمایی بیش از U/L ۸۰ باشد، با توجه به علائم بالینی بیمار، تشخیص تب روده‌ای را مطرح می‌کند. گرچه مقادیر ADA کمتر از U/L ۸۰ تشخیص تیفوئید را مطرح نمی‌سازد، ولی باید در موارد مشکوک دو تا چهار روز بعد، مجدداً فعالیت ADA را اندازه‌گیری نمود، بنابراین از نظر اطلاع از پیش آگهی بیماری، اندازه‌گیری فعالیت ADA در چند نوبت بسیار مفید می‌باشد. در ۷۷ نفر از بیماران تیفوئیدی مورد مطالعه، ۴ نفر (٪۵/۱) فعالیت کمتر از ۸۰ واحد در لیتر را در ابتدای پذیرش نشان دادند که از این تعداد ۳ نفر (٪۳/۹) چهار روز بعد، علیرغم شروع درمان، افزایش فعالیت ADA را در بیش از U/L ۸۰ نشان دادند و در یک نفر دیگر که فعالیت آنزیمها افزایش نیافته بود (ADA=۴۹/۴U/L) طول دوره بستری و در بیمارستان به بیش از ۲۸ روز کشید و پس از چند روز فروکش نمودن علائم و ترخیص از بیمارستان مجدداً بدلیل عود بیماری در بخش بستری گردید.

بر این اساس چنین می‌توان اذعان داشت که ADA یک مارکر نشاندهنده فعالیت T-Cell ها بوده و از آنجایی که بهبودی از بیماری تب روده‌ای در رابطه با پاسخ تب ایمنی سلول است، از نظر اطلاع از پیش آگهی بیماری، اندازه‌گیری فعالیت ADA در چند نوبت بسیار مفید می‌باشد. در بیماران تیفوئیدی که به شدت بدحال هستند و فعالیت ADA آنها در بدو پذیرش پائین است و مدت بستری بیمار نیز در سطح پائین قرار دارد، پیش‌آگهی خوبی نداشته و شانس ابتلا آنها به عوارض بیماری، بالا بوده و طول دوره بیماری در آنها بیشتر است. این امر مستقیماً و یا بطور غیر مستقیم بیانگر اندوتوکسمی شدید بیماری است که می‌تواند مربوط به خاصیت سرکوب کنندگی فعالیت سلولهای T توسط لیپوپلی ساکاریدهای دیواره سلولی باکتری باشد(۱۰). بنابراین نه تنها افزایش فعالیت ADA در حد بیشتر از U/L ۸۰ در تشخیص اولیه و زودرس تب روده‌ای اهمیت دارد، بلکه در مواردیکه فعالیت ADA کاهش داشته باشد و تشخیص بیماری با تست پاراکلینیکی دیگری مسجل شود، گویای پیش‌آگهی نه چندان خوب سیر بیماری بوده و بیانگر جدی‌تر تلقی نمودن درمان بصورت آنتی‌بیوتیک درمانی توأم و احتمالاً با دوز بالا می‌باشد.

نقش ایزوآنزیمهای ADA و نسبت آنها در تشخیص زودرس تب تیفوئیدی گویای این مطلب است که فعالیت ADA1 در مبتلایان به تب روده‌ای بیش از U/L ۸۰ درنظر گرفته شود، حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت (PPV)، ارزش اخباری منفی (NPV) و کارایی تست به ترتیب ٪۹۴/۸، ٪۱۰۰، ٪۱۰۰، ٪۹۸، ٪۵، ۹۸/۵ خواهد بود ولی زمانی که عیار ویدال لوله‌ای مساوی و یا بیش از ۱/۸۰ درنظر گرفته شود، حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و منفی و کارایی تست به ترتیب ٪۳/۳۷، ٪۹۸/۷، ٪۹۶/۷، ٪۶۱،و ٪۶۸ خواهد بود(جدول ۱). علت افزایش ADA1 (ایزوآنزیم لنفوسیتی) در تب روده‌ای جلوگیری از انباشته شدن متابولیتهای سمی در جریان فعالیت ایمنی سلول است. در تب روده‌ای فعالیت ADA1 ده برابر بیشتر از ADA2 است، درحالیکه فعالیت ADA در افراد کنترل طبیعی مربوط به ADA1 میباشد که منشأ لنفوسیتی دارد(۱۳و۱۱و۱). به این ترتیب زمانی که ADA1/ADA2 مساوی یا بیشتر از ۷/۶ فرض گردد، حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت (PPV)، ارزش اخباری منفی (NPV) و کارایی آن به ٪۱۰۰ خواهد رسید.

براساس مندرجات جدول (۹) با استفاده از آزمون t-test رابطه معناداری بین اختلاف میانگین فعالیت ADA پلاسمایی مبتلایان به تب روده‌ای با گروه افراد طبیعی بدست

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-11]

آمد($p<0.01$). جدول (۴) بیانگر این مسأله است. بنابراین روش کروماتوگرافی تعویض یونی در مورد جداسازی ایزوآنزیمهای ADA به منظور افزایش حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت (PPV) و ارزش اخباری منفی (NPV) و کارایی تست و بدست آوردن اندکس ADA1/ADA2 بعنوان یک روش بسیار مطلوب و کاربردی و برخوردار از حساسیت و ویژگی بسیار بالا، در تشخیص اولیه و زودرس تب روده‌ای معرفی می‌گردد.

منابع

1- Keusch G, Thea DM. Envasive and Tissue damaging Enteric bacterial patogens: Bloody diarrhea and dysentery. In: Schaechler M, Medoff G, Eisenstein BI, editors. Mechanisms of microbial disease. Williams & Wilkins International edition 1993;272-277.

2- Samuel I, Miller Elizabeth L, David A pegues. Salmonella (Including Salmonella Typhi). In: Mandell G, Bennety J, Dolin R editors. Principles and practice of Infectious Diseases. 4 red edition Churchill Livingstone, International Edition 1995;P: 2013-2032.

3- Aquino RI, Lansang MA, et al. Evaluation of single widal test in diagnosis of enteric fever. Souteast Asian J Trop Med Public Health Sep 1991;22(3):375-9.

4- Galanti B, Nardiello S, Russo M. Increased lymphocyte ADA in Typhoid fever. Scand J Infect Dis 1981;13(1):47-50.

5- Casanueva VE, ximena CIDC, Cavicchioli B, et al. Serum ADA in the early diagnosis of typhoid fever. Pediatr Infect Dis J;11 1998;(10):828-830.

6- Gilman R, Terminal M, Levine MM, et al. Relative efficacy of blood, Urin rectal swab, bone marrow and rose-spot cultures for recovery of salmonella typhi in Thyphoid fever. The Lancet, May 31 1975: 1211.

7- Helmi S, Wilfried K, Wolfgan R. Adenosine Deaminase Activity in plasma and blood cells of patients with haematological and autoimmune diseases. Acta haemat 1981; 65:183-188.

8- Muraoka T, Katsurmaki T, Shiraishi H, et al. Automated enzymatic Measurement of ADA Isoenzyme activities in serum. Anal Biochem 187 1990;20:268-272.

9- Donald W, Moss DW, Henderson AR, Kachmar JF. Enzymes. In: Tietz NW, editors. Textbook of clinical chemistry. Saunders WB company international edition. 1986: 144-145, 686-7.

10- Khosla, Dinesh K, Singh V, Lymphocytic ADA activity in Typhoid fever. Postgrad Med J 1992;68:268-271.

11- Ocana I, Martinez J, et al. ADA in pleural fluids. Chest May 1983;84(1):51-53.

12- Slaats EH, et al. Acontinou method for the estimation of ADA. J Clin Chem Clin Biochem. 1985;23(10): 677-682.

13- Zwadyk P. Enterobacteriaceae: Salmonella and Shigella, Intestinal pathogens. In: Jokilink WK, Willet HP, Amos B, Wilfert CM, editors. Zinsser microbiology 20th edition, Printed in the United States of America 1992: 556-565.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2025-04-11]