DOI: 10.22100/jkh.v11i3.1458

مجله دانش و تندرستی، دوره ۱۱، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۵

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شاهرود

مقاله پژوهشی

استفاده از لام کوت شده تیموس گوساله جهت تشخیص آنتی‌بادی ضدهسته در سرم بیماران مبتلابه بیماری لوپوس

سیدزین‌العابدین حسینی[۱]، معصومه معصومی‌کریمی[۲]، مسلم جعفری‌ثانی[۲]، سعدی کاظمی شاهاندشتی[۳]، منصور لکورج[۴]، رمضان غفاری‌چراتی[۵]، عقیل تبارملاحسن[۶*]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل- دانشکده دامپزشکی- دانش‌آموخته.

۲- دانشگاه علوم پزشکی شاهرود- دانشکده پزشکی- گروه علوم پایه.

۳- دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز- دانشکده دامپزشکی- دانش‌آموخته.

۴- دانشگاه آزاد اسلامی واحد چالوس- دانشکده پیراپزشکی- گروه میکروبیولوژی.

۵- دانشگاه علوم پزشکی مازندران- بیمارستان بوعلی.

۶- دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل- دانشکده پیراپزشکی- گروه ایمنی‌شناسی.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱/۲۱، **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۵/۳/۹

چکیده

مقدمه: *آزمون آنتی‌بادی ضدهسته‌ای رایج‌ترین روش جهت شناسایی بیماران مبتلابه لوپوس می‌باشد که متأسفانه به‌دلیل انحصاری بودن آن واردات آن به کشور سخت و هزینه‌بر است. هدف از مطالعه حاضر استفاده از لام کوت شده تیموس گوساله جهت تشخیص لوپوس بود.*

مواد و روش‌ها: *تعداد ۴۸ نمونه سرم (۲۵ منفی و ۲۳ مثبت) اخذ شده از بیماران مظنون به لوپوس جمع‌آوری شد. نمونه تیموس گوساله از کشتارگاه تهیه شد و با استفاده از میکروتوم برش‌هایی به ضخامت ۵ میکرومتری از تیموس تهیه شدند. همچنین لام آماده کبد رت خریداری شد و به موازات آن آزمون استاندارد HEp-2 برای هر نمونه آزمایش گردیدند. جهت تعیین تیتر آنتی‌بادی پنج رقت دو برابر شونده‌ی از سرم (۱:۴۰ تا ۱:۶۴۰) با استفاده از بافر فسفات تهیه شده و آزمایش شدند. لام‌های رنگ شده با میکروسکوپ فلورسانس، با بزرگنمایی ۲۰۰ میکروسکوپ بازبینی شدند و وجود فلورسانس سبز درخشان در هسته‌ی سلول‌ها به‌عنوان نتیجه مثبت تلقی شد.*

نتایج: *نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از سلول‌های تیموس گوساله با حساسیت، ویژگی و دقتی برابر با ۸۲/۶٪ ، ۱۰۰٪ و ۹۱/۷٪ نسبت‌به آزمون استاندارد در تشخیص آنتی‌بادی‌های ضدهسته‌ای (ANA) مفید بود. ارزش پیشگویی منفی و ارزش پیشگویی مثبت لام‌های تیموسی برابر ۸۶/۲٪ و ۱۰۰ ٪ به‌دست آمد.*

نتیجه‌گیری: *به‌عنوان یک آزمون غربالگرانه‌ی ارزان و در دسترس، می‌توان از سلول‌های تیموس گوساله برای شناسایی ANA در سرم بیماران SLE لوپوس اریتماتو سیستمیک استفاده کرد. اگرچه بهینه‌سازی شرایط تهیه و آزمایش و تعیین نقطه Cut off مناسب می‌تواند کارایی آن را به ۱۰۰٪ برساند.*

واژه‌های کلیدی: لوپوس اریتماتوز سیستمیک، بیماری خودایمنی، آزمون آنتی‌بادی آنتی‌نوکلئار، ایمونوفلورسانس غیرمستقیم، تیموس.

***نویسنده مسئول:** دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل، **تلفن:** ۰۹۱۱۱۱۶۹۶۸۲، **نمابر:** ۰۹۱۱۱۱۶۹۶۸۲، **Email:** doctoragheel@yahoo.com

ارجاع: حسینی سیدزین‌العابدین، معصومی کریمی معصومه، جعفری‌ثانی مسلم، کاظمی شاهاندشتی سعدی، لکورج منصور، غفاری‌چراتی رمضان، تبار ملاحسن عقیل. استفاده از لام کوت شده تیموس گوساله جهت تشخیص آنتی‌بادی ضد هسته در سرم بیماران مبتلابه بیماری لوپوس. مجله دانش و تندرستی ۱۳۹۵؛۱۱(۳): ۵۵-۶۲.

مقدمه

بیماری لوپوس جزء بیماری‌های خودایمن می‌باشد و در دسته‌ی سوم بیماری‌های ازدیاد حساسیت (Type III Hypersensitivity) تیپ ۳ قرار می‌گیرد. بدین معنی که در این بیماری انبوهی از کمپلکس‌های متشکل از آنتی‌ژن‌های خودی و آنتی‌بادی‌های خودی ایجاد می‌شود و رسوب این کمپلکس‌ها در بافت‌های مختلف عوارض و ضایعات متعددی را برای بیمار به‌وجود می‌آورد. این بیماری خانم‌های جوان را که در سن باروری هستند ۹ برابر بیشتر از آقایان درگیر می‌کند و دارای سیری مزمن می‌باشد (۱–۳). عوامل اصلی به‌وجود آورنده این بیماری هنوز شناخته نشده‌اند ولی نقش هورمون‌های جنسی (استروژن و اندروژن‌ها)، تابش اشعه فرابنفش (مخصوصاً بخش UVB)، توارث، عوامل میکروبی (مثل ویروس ابشتن بار (EBV) و برخی داروها در ایجاد و تشدید علایم بیماری نشان داده شده‌اند. در واقع، دوقلوهای هموزیگوت همبستگی بین ۴۵ تا ۸۰ درصد در ابتلای به این بیماری نشان می‌دهند که این یافته زمینه‌ی ژنتیکی را به‌عنوان مظنون اولیه و اصلی در ایجاد بیماری مطرح می‌کند. پلی‌مورفیسم در ژن‌های پاسخ ایمنی شامل HLA (Human leukocyte antigen) و اجزای کمپلمان یکی از عوامل زمینه‌ساز برای بروز بیماری محسوب می‌شوند. بروز افزایش یافته مولکول‌های چسبندگی نیز در این بیماران نشان داده شده‌است (۴–۶). پاسخ‌های ایمنی مختل شده منجر به تولید اتوآنتی‌بادی‌های مختلفی از جنس IgG برعلیه اجزا و ترکیبات هسته‌ی سلول می‌شود که این آنتی‌بادی‌ها با هسته‌ی همه‌ی سلول‌های بدن خصوصاً گلبول‌های سفید واکنش می‌دهند. مرگ این سلول‌ها و نارسایی در جمع آوری سلول‌های آپوپتوز شده منجر به تشکیل و رها شدن کمپلکس‌های ایمنی به گردش خون می‌شود و رسوب این کمپلکس‌ها در بافت‌هایی مثل کلیه و مفاصل و سایر بافت‌ها با فعال شدن کمپلمان همراه می‌باشد که می‌تواند به تخریب این بافت‌ها منتهی شود. براساس گزارش مرکز کنترل بیماری‌های رماتیسمی ایران، شیوع این بیماری در میان جمعیت کشورمان برابر ۴۰ نفر در هر ۱۰۰ هزار نفر می‌باشد و نسبت زنان به مردان در این گزارش ۸/۱ به ۱ گزارش شده‌است که این نسبت در محدوده سنین بارداری بالاتر و در دوره‌های سنی دیگر پایین‌تر می‌باشد. میانگین سن بروز بیماری برای زنان در ایران ۲۱/۵ سال ذکر شده‌است. لوپوس بخشی از بیماری‌های اتوایمیون می‌باشد. اگرچه شیوع لوپوس ۴۰ نفر در هر ۱۰۰ هزار نفر می‌باشد اما شیوع اتوآنتی‌بادی‌ها برعلیه ترکیبات هسته ۵۰۰۰ نفر در ۱۰۰ هزار نفر از جمعیت می‌باشد (۷–۱۱).

این یافته بر گستردگی بیماری‌های خودایمنی اشاره دارد و بر این واقعیت تاکید دارد که در مواردی که ارزیابی وجود اتوآنتی‌بادی‌های ضد هسته مثبت می‌شود این یافته بایستی همراه با سایر یافته‌های آزمایشگاهی و بالینی و پس از بررسی سابقه بیماری برای تشخیص بیماری مورد استناد قرار گیرد. تشخیص این بیماری با استفاده از علائم بالینی و آزمون‌های آزمایشگاهی انجام می‌گیرد. براساس توصیه انجمن رماتیسم امریکا (ACR) حداقل چهار مورد از ۱۱ مورد علایم بالینی مربوطبه لوپوس در یک فرد باید وجود داشته باشد تا به‌عنوان بیمار SLE (Systemic lupus erythematous) در نظر گرفته شود. یکی از ۱۱ مورد ذکر شده، مثبت شدن آزمون ANA (Anti-Nuclear Antibody) می‌باشد (اهداف ANA ممکن است شامل آنتی‌ژن‌های Jo-1، Scl-70، La/SSB، Ro/SSA، snRNP، Sm (Smite)، dsDNA (Double Strand DNA) باشند) مخصوصاً وجود اتوآنتی‌بادی‌هایی برعلیه DNA دورشته‌ای و برعلیه Sm ویژگی بالایی برای تشخیص SLE دارد (۱۲). باتوجه به اینکه تیترهای پایین اتوآنتی‌بادی (رقت‌های ۱:۸۰ و ۱:۱۶۰ از سرم) برعلیه ترکیبات هسته در درصدی از افراد سالم نیز مشاهده می‌شود تشخیص قطعی بیماری براساس مجموعه‌ای از علایم بالینی و نتایج آزمون‌های آزمایشگاهی صورت می‌گیرد (۱۳–۱۵).

مهم‌ترین آزمون آزمایشگاهی، که کمک زیادی به تشخیص بیماری می‌کند، ارزیابی وجود اتوآنتی‌بادی‌های سرمی برضد ترکیبات هسته‌ی سلول می‌باشد و آنتی‌بادی‌های ضد dsDNA و Sm ارزش تشخیصی بالایی برای بیماری SLE دارد. روش‌های مختلفی برای ردیابی ANA وجود دارد که برخی از این روش‌ها به‌صورت غربالگرانه و فقط برای تفکیک موارد منفی از موارد مثبت صورت می‌گیرد اما انجام برخی دیگر از این روش‌ها مستلزم تعیین تیتر و تعیین نوع اتوآنتی‌بادی‌ها است (۱۶–۲۳). روش‌هایی مانند الایزا، ایمونوفلورسانس غیرمستقیم، ایمونوبلاتینگ و آزمون اوختر‌لونی برای ردیابی ANA به‌کار برده شده‌اند. الایزا با استفاده از کل ترکیبات سلولی برای غربالگری اولیه برای پی بردن به وجود ANA به‌کار برده شده‌است و از طرفی الایزا با استفاده از ترکیبات تخلیص شده از سلول برای تفکیک آنتی‌بادی‌های مختلف بر ضدترکیبات سلولی به‌کار برده شده‌است. روش ایمونوفلورسانس نیز هم به‌صورت غربالگرانه و هم برای تفکیک نحوه اتصال آنتی‌بادی‌ها به‌کار برده شده است. آزمون ایمونوبلاتینگ و اوختر‌لونی به ندرت در موارد روتین به‌کار برده می‌شوند اما توان تفکیک بالایی برای تعیین هدف اتوآنتی‌بادی‌ها دارند. امروزه روش ایمونوفلورسانس یک روش Gold Standard برای شناسایی ANA می‌باشد. در اوایل برای انجام ایمونوفلورسانس از بافت معده‌ی رت و کبد موش استفاده می‌شد. بدین ترتیب که، برش‌های مناسب از این دو ارگان تهیه شده و بر روی لام میکروسکوپی فیکس می‌شدند و از آن‌ها به‌عنوان منبع آنتی ژن استفاده می‌شد (۱۶، ۱۷، ۲۲ و ۲۳). آنچه که امروز مقبولیت جهانی پیدا کرده استفاده از لام‌های EUROIMMUN

از یک شرکت آلمانی است که در آن رده‌ی سلول‌های اپیتلیوم انسانی بر روی لام میکروسکوپی تثبیت شده‌است (۲۴ و ۲۵). استفاده از این لام‌ها به معنی خروج ارز از کشور بوده و هزینه‌ی بالای آن عملاً دسترسی آزمایشگاه‌های داخل کشور را به آن محدود می‌کند. لذا به‌نظر می‌رسد یافتن جایگزینی مناسب برای آن ضروری می‌باشد. تهیه برش‌های بافتی از بافت‌های حیوانات آزمایشگاهی، مثل موش سوری یا رت، شاید برای آزمایشگاه‌های وابسته به مراکز دانشگاهی ممکن‌باشد اما برای سایر آزمایشگاه‌های میدانی مقدور نیست. درعین‌حال، بافت تیموس گوساله به‌آسانی قابل دستیابی است و به‌دلیل تراکم سلولی موجود در این بافت، می‌توان از برش‌های بافتی تهیه شده از آن به‌عنوان منبع آنتی‌ژن استفاده کرد. هدف ما در این تحقیق بررسی کارآیی برش‌های تهیه شده از تیموس گوساله به‌منظور تعین عیار و شناسایی آنتی‌بادی‌های ضدهسته‌ی سلول و تعیین ارزش تشخیصی آن برای بیماران مبتلابه SLE بود.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع کاربردی است که در آن از سلول‌های تیموس گوساله و سلول‌های کبد موش Wistar male rat برای ردیابی و تعیین عیار آنتی‌بادی‌های ضدهسته‌ای (Anti Nuclear Antibody, ANA) موجود در سرم بیماران مبتلابه لوپوس استفاده شد و از لام‌های HEp-2 (Euroimmun, Lübeck, Germany) نیز به‌عنوان روش استاندارد طلایی استفاده شد.

لام حاوی گسترش بافت کبد موش و کیت Hep-2 از شرکت معتبر خریداری شد. پس از تهیه تیموس گوساله از کشتارگاه زیر نظر دامپزشک، سریعاً و تحت دمای ۴ درجه سلسیوس به آزمایشگاه منتقل شدند و قطعاتی از آنها به ابعاد ۲۰ × ۲۰ × ۲۰ میلی‌متر برش داده شده و برای دستگاه کرایوکات آماده شدند. به‌منظور شناسایی آنتی‌ژن مورد نظر در سطح سلول‌های بافت و بررسی به روش ایمونوفلورسانس، برش‌های بافتی به ضخامت ۵ میکرون با استفاده از دستگاه ویژه کرایوسکشن (فرزون سکشن) Reichert Jung Cryocut 1800, Germany از تیموس‌های جمع‌آوری شده تهیه گردید.

مقاطع تهیه شده روی لام قرار گرفتند و چون لام در دمای اتاق قرار داشت برش تهیه شده به‌راحتی به سطح لام می‌چسبید. برای تثبیت برش روی اسلاید از اتانول خالص استفاده گردید و بعد از این مرحله، نمونه‌ها قابل رنگ‌آمیزی با روش ایمونوفلورسانس بودند. بعد از تهیه لام‌های کوت شده، از نمونه سرم‌های بیماران به‌طور همزمان هم برای انجام آزمون استاندارد و هم برای رنگ‌آمیزی لام‌های حاوی برش بافت تیموس یا بافت کبد موش استفاده گردید.

برای رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس برش‌های تهیه شده از تیموس گوساله، کبد موش و لام استاندارد HEp-2، از معرف‌ها و سرم کنترل و مثبت و منفی ارایه شده در داخل کیت استاندارد استفاده گردید.

حجم ۵۰ میکرولیتر از رقت‌های ۱:۴۰ تا ۱:۶۴۰ سرم بیمار بر روی پنج ناحیه دایره‌ای لام که برش‌های بافتی در آنجا قرار داشتند اضافه گردید. به‌طور هم‌زمان از سرم کنترل مثبت و منفی نیز در ۴ ناحیه لام قرار داده شد. لام‌ها پس از نمونه‌گذاری به مدت ۳۰ دقیقه در محیط مرطوب و در دمای اتاق نگهداری شدند. به‌منظور شستشو لام‌ها جهت حذف سرم اضافی و احتمالاً آنتی‌بادی باند نشده، به‌صورت متوالی در دو جار حاوی بافر PBS (Phosphate buffer saline) هر بار به مدت ۴ دقیقه نگداری شدند. سپس حجم ۱۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه (Goat anti-human IgG-FITC, Invitrogen™) با FITC به سطح لام ها اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در محیط مرطوب و تاریک و در دمای اتاق نگهداری شد (این محلول همچنین حاوی رنگ اوانس بلو برای رنگ‌آمیزی زمینه به‌منظور مشخص شدن حاشیه‌ی سلول‌ها در میدان میکروسکوپی می‌باشد). سپس برای از بین بردن آنتی‌بادی نشاندار اضافه، شستشوی اسلاید مجدداً با همان ترتیب قبلی انجام شد. آب اضافی لام با استفاده از دستمال کاغذی گرفته شد و یک قطره بافر گلیسیرینه بر روی آن قرار گرفت. مشاهده با عدسی چشمی ۱۰ و عدسی شیئی ۲۰ میکروسکوپ ایمونوفلورسانس انجام گردید.

حساسیت، ویژگی، ارزش پیشگویی مثبت، ارزش پیشگویی منفی و دقت، پنج پارامتر مهم هستند که در ارزیابی روش‌های تشخیصی به‌کار می‌روند و برای محاسبه این ۵ پارامتر برای سه روش به کار برده شده در این تحقیق از فرمول‌های ۱ تا ۵ استفاده گردید که در آنها Se:Sensitivity یعنی حساسیت روش، Sp:Specificity یعنی ویژگی روش، P:Prevalence یعنی شیوع موارد مثبت، NPV:Negative Predictive Value یعنی ارزش پیشگویی موارد منفی و PPV:Positive Predictive Value یعنی ارزش پیشگویی موارد مثبت می‌باشد که از روی نتایج نمونه‌ها محاسبه گردید. برای مقایسه نتایج کیفی (مثبت و منفی) از مربع کای استفاده شد. برای ارزیابی آماری همخوانی نتایج تعیین تیتر ANA به‌دست آمده از لام‌های تیموس و کبد با نتایج لام استاندارد از آزمون همبستگی و رگرسیون خطی استفاده گردید.

$$Sensitivity = \frac{TP}{TP + FN} \quad (۱)$$

$$Specificity = \frac{TN}{TN + FP} \quad (۲)$$

$$Accuracy = \frac{TP + TN}{TP + TN + FP + FN} \quad (۳)$$

$$NPV = \frac{(1-P)\times Sp}{P\times(1-Se)+(1-P)\times Sp} \quad (۴)$$

$$PPV = \frac{P\times Se}{P\times Se+(1-P)\times(1-Sp)} \quad (۵)$$

نتایج

در این تحقیق در مجموع ۴۸ نمونه سرم از بیماران مراجعه‌کننده به آزمایشگاه‌های تشخیص طبی مازندران (ساری) و آزمایشگاه بخارست (تهران) با استفاده از لام‌های استاندارد EUROIMMUN و لام‌های حاوی برش‌های تیموس گوساله و کبد موش مورد ارزیابی قرار گرفتند. همه این بیماران توسط پزشک برای انجام آزمایش ANA به آزمایشگاه ارجاع داده شده بودند. روش به‌کار گرفته شده در این تحقیق ایمونوفلورسانس غیرمستقیم با استفاده از فلوروکروم FITC بود.

همه نمونه‌های مثبت شده با لام‌های استاندارد HEp-2 از نظر الگوی میکروسکوپی از نوع هموژن بودند. بدین معنی که آنتی‌بادی‌های ANA به همه نقاط هسته سلول به‌صورت یکنواخت متصل شده بودند و فلورسانس در همه جای هسته سلول مشاهده می‌شد و آزمایش مجدد نمونه‌ها با HEp-2 در طی این تحقیق نیز این نتایج را تأیید کرد. نتایج آزمون HEp-2 به‌عنوان استاندارد طلایی برای شناسایی ANA در نظر گرفته شد و نتایج حاصل از لام‌های کبد موش و تیموس گوساله با نتایج لام استاندارد مقایسه گردید. اگر تیتر آنتی‌بادی سرمی با استفاده از لام استاندارد برابر ۴۰ بود نمونه منفی تلقی گردید. تیتر ۱:۸۰ مشکوک و تیتر ۱:۱۶۰ مثبت تلقی گردید. پنج رقت ۱:۴۰، ۱:۸۰، ۱:۱۶۰، ۱:۳۲۰ و ۱:۶۴۰ در آزمایش مقدماتی ارزیابی شدند و اگر تیتر ۱:۶۴۰ مثبت بود رقت‌های دو برابر شونده بعدی نیز مورد ارزیابی مجدد قرار گرفتند (شکل ۱).

تفسیر مثبت یا منفی بودن نتایج براساس cut off برابر ۱:۸۰ صورت گرفت بدین معنی که تیتر ANA پایین‌تر از ۱:۸۰ منفی و تیتر سرمی بالاتر از ۱:۸۰ مثبت تلقی شد. تیتر ۱:۸۰ مشکوک در نظر گرفته شد و نیاز به تکرار آزمایش برای رسیدن به نتیجه قطعی را نشان می‌داد. چنانچه داده‌های ارایه شده در جدول نشان می‌دهد از ۴۸ نمونه سرم ارزیابی شده ۲۳ مورد (۱۹+۴) با کیت استاندارد HEp-2 مثبت شده (تیتر بالاتر از ۱:۸۰) و ۲۵ نمونه نتیجه منفی داشته‌اند. در میان نمونه سرم‌های آزمایش شده با لام تیموسی (به‌صورتی هماهنگ با لام کبد موش) همه نمونه‌های منفی شده با HEp-2 با این دو روش نیز نتیجه منفی به بار آورده‌اند درحالی که ۴ نمونه مثبت شده با HEp-2 با استفاده از دو روش دیگر منفی شده‌اند که می‌توان آنها را مشکوک و یا منفی کاذب False Negative (FN) حساب کرد. ۱۹ نمونه سرم مثبت آزمایش شده با سلول‌های تیموسی و کبد موش نیز به‌صورتی هماهنگ با کیت استاندارد نتیجه مثبت به بار آورده‌اند (جدول ۱).

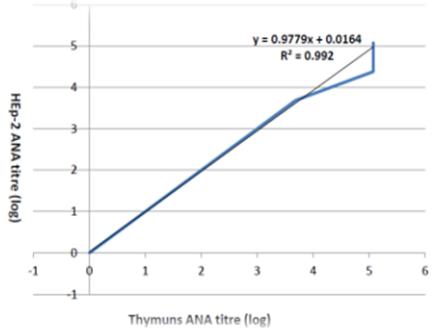
پارامترهای عملکردی سه روش استفاده شده در جدول ۲ ارایه شده‌اند. چنانچه از محتویات جدول برمی‌آید حساسیت و ویژگی و دقت لام‌های تیموسی و کبد موش‌ها با یکدیگر مساوی و به‌ترتیب برابر ۸۲/۶٪، ۱۰۰٪ و ۹۱/۶٪ می‌باشند. چون لام HEp-2 به‌عنوان استاندارد طلایی در نظر گرفته شده‌است حساسیت و ویژگی و دقت آن ۱۰۰٪ محاسبه شده‌است. در جدول ۳، مثبت یا منفی بودن نتایج هر سه روش براساس Cut off توصیه شده برای کیت استاندارد تفسیر شده‌اند.

جدول ۱- توزیع نتایج مثبت و منفی در بین ٤٨ نمونه سرمی

تعداد	Liver	Thymus	HEp-2	کل نمونه
۱۹	+	+	+	۴۸
۴	FN	FN		
۲۵	–	–	–	

FN: False Negative

رگرسیون تیترهای به‌دست آمده از تیموس و کبد در ارتباط با کیت استاندارد در سطح معنی‌داری ۰/۰۰۱ معنی‌دار بود و R^2 محاسبه شده برابر ۰/۹۹۲ بود. این یافته بدین معنی‌است که لام تهیه شده از تیموس با دقتی برابر ۹۹/۲ درصد می‌تواند تیتر ANA به‌دست آمده از کیت استاندارد را تولید کند. این مقدار به‌طور چشمگیری بیشتر از میزان دقتی است که با استفاده از روش کیفی (مثبت و منفی) در جدول ۱ محاسبه شده‌است (AC=۹۱/۶٪). معنی این یافته این است که استفاده از لام‌های تیموس گوساله برای تعیین عیار آنتی‌بادی نتایجی خیلی دقیق‌تری در مقایسه با نتایج کیفی گزارش نتایج که بر Cut off از قبل تعریف شده استوار است به‌دست می‌دهد. به عبارت دیگر برای بالا بردن قدرت لام‌های تیموسی برای پیش‌بینی دقیق‌تر نتایج مثبت و منفی بایستی Cut off مورد استفاده اصلاح شده و بر ۱:۴۰ استوار شود. در این صورت قدرت تشخیصی لام‌های تیموسی نیز به ۱۰۰٪ خواهد رسید (نمودار ۱).



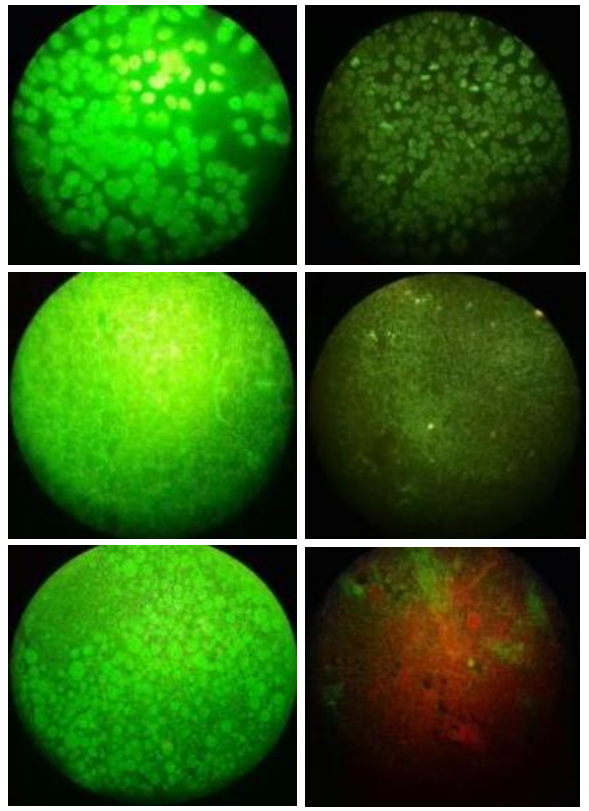
نمودار ۱- نمودار رگرسیون تیتر ANA به‌روش HEp-2 و تیموس که نشان‌دهنده مقدار ۰/۹۹۲ برای R^2 می‌باشد. این مقدار توسط نرم‌افزار اکسل محاسبه شده و دقیقاً با مقدار پیش‌بینی شده توسط نرم‌افزار آماری SPSS برابر است.

جدول ۲- حساسیت، ویژگی، دقت، ارزش پیشگویی مثبت و ارزش پیشگویی منفی برای سه روش

تفسیر	لام تیموس گوساله	لام کبد موش	لام استاندارد HEp-2
مثبت واقعی (TP)	۱۹	۱۹	۲۳
منفی واقعی (TN)	۲۵	۲۵	۲۵
مثبت کاذب (FP)	۰	۰	۰
منفی کاذب (FN)	۴	۴	۰
جمع نمونه	۴۸	۴۸	۴۸
صحت (AC)	٪۹۱/۶	٪۹۱/۶	٪۱۰۰
حساسیت (SE)	٪۸۲/۶	٪۸۲/۶	٪۱۰۰
ویژگی (SP)	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۱۰۰
ارزش پیشگویی مثبت (PPV)	٪۱۰۰	٪۱۰۰	٪۱۰۰
ارزش پیشگویی منفی (NPV)	٪۸۶/۲	٪۸۶/۲	٪۱۰۰

جدول ۳- توزیع فراوانی نمونه‌ها برحسب تیتر ANA

			تیتر اتوآنتی‌بادی ANA			
نوع روش			۱۶۰	۸۰	۴۰	۰
HEp-2			۲۳	۰	۱۲	۱۳
تیموس	۱۹	۴	۱۲		۱۳	
کبد	۱۹	۴	۱۲		۱۳	



شکل ۱- رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس برای نشان دادن ANA با استفاده از سه نوع لام بافتی

. تصویر سمت چپ نمونه‌های ANA منفی و تصویر سمت راست نمونه‌های ANA مثبت را نشان می‌دهند. ردیف بالایی مربوطبه لام استاندارد HEp-2 می‌باشد. ردیف وسطی مربوطبه لام تهیه شده از بافت تیموس گوساله می‌باشد. ردیف پایین مربوطبه لام کبد موش می‌باشد.

بحث

تیموس عضوی است که مملو از لنفوسیت‌ها می‌باشد و در لنفوسیت‌ها هسته قسمت اعظم سلول راتشکیل می‌دهد که می‌تواند هدف مناسبی برای اتصال اتوآنتی‌بادی‌های ضدهسته باشد. از طرفی تیموس گوساله ارزان بوده و به‌راحتی قابل تهیه است. هدف ما در این مطالعه به‌کار گرفتن سلول‌های مشتق از تیموس برای تعیین عیار ANA می‌باشد. برای این منظور برش‌های مناسبی از بافت تیموس گوساله تهیه شد و بر روی اسلاید میکروسکوپی فیکس گردید و به‌صورت مقایسه‌ای همراه با لام‌های تجاری حاوی سلول‌های HEp-2 برای آزمون و تعیین عیار ANA به‌کار برده شد. همانطور که گفته شد آزمون‌های الایزا نیز برای تشخیص آنتی‌بادی ضدهسته‌ای موجود هستند ولی مطالعات نشان داده‌اند که آزمون الیزا از اختصاصیت مورد قبول برای تشخیص برخوردار نیست و لذا آزمون ایمونوفلورسانس غیرمستقیم را توصیه می‌کنند (۲۶-۲۹). از مزایای ایمونوفلورسانس بر الایزا تعیین محل استقرار آنتی‌بادی‌ها در داخل هسته و یا سیتوپلاسم است که در ارتباط با علایم بیماری خواهد بود. (۳۰ و ۳۱).

یافته‌های ما در این تحقیق نشان می‌دهد که اگر پیشکسوتان آزمایشگاهی در سال‌های دور از کبد موش و از سلول‌هایی از منابع غیرانسانی برای شناسایی ANA استفاده می‌کردند اقدام مناسبی بوده‌است. اولاً نتایج گرفته شده از سلول‌های تیموس گوساله دقیقاً برابر با نتایج حاصل از سلول‌های کبدی موش (خریداری شده) بود. به‌طوری که ۴ نمونه سرم با هر دو نوع لام تیتر ۱:۸۰ مثبت تولید کرده بودند. در آزمون‌های سرولوژی که غالباً با تهیه رقت‌های متوالی بالارونده از سرم بیمار همراه هستند برای تفسیر مثبت یا منفی بودن نتایج گرفته شده معمولاً از یک معیار بحرانی یا نقطه عطف استفاده می‌شود. مثلاً در مورد لام‌های HEp-2 توصیه شرکت تولیدکننده این

است که اولین رقت از ۱:۱۰۰ شروع شود و یا اینکه توصیه شده‌است اگر از رقت‌های مرسوم دو برابر شونده استفاده می‌شود، در صورتی که رقت ۱:۸۰ مثبت شود به‌عنوان مشکوک در نظر گرفته شود. مفهوم این توصیه این است که سرم‌هایی که رقت ۱:۸۰ از آنها با لام‌های HEp-2 و به‌روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم نتیجه مثبت نشان داد این آزمایش چند هفته دیگر و با نمونه سرم جدیدتر از بیمار تکرار شود. در این صورت افزایش در عیار آنتی‌بادی سرمی بیمار (پس از گذشت زمان معین) می‌تواند برای تشخیص فعال بودن بیماری کمک‌کننده باشد.

آن دسته از آزمون‌های تشخیصی که برای غربالگری استفاده می‌شوند بایستی حساسیت بالایی داشته باشند بدین معنی که باید قادر به شناسایی همه موارد مثبت واقعی باشند (۲۶-۲۹). حساسیت و ویژگی آزمون‌های تشخیصی با یکدیگر رابطه معکوس دارند. بدین معنی که هرچقدر حساسیت تشخیصی یک روش آزمایش به ۱۰۰٪ نزدیک شود همانقدر ممکن‌است از ویژگی آن کاسته شود. در روش‌های ایمنی تنظیم این محدوده (یعنی انتخاب اینکه آیا حساسیت بالایی لازم است یا ویژگی بالا) از طریق تعیین نقطه عطف مناسب برای تفسیر نتایج آزمون صورت می‌گیرد (۱۶، ۳۲-۳۴).

در این مطالعه لام‌های تهیه شده از سلول‌های تیموس گوساله با حساسیتی برابر ۸۳٪ و ویژگی برابر ۱۰۰٪ و با دقتی برابر ۹۲٪ امکان تفکیک نتایج مثبت ANA از موارد منفی را فراهم آوردند. در حیطه تعیین عیار آنتی‌بادی این دقت به بالاتر از ۹۹ درصد ترقی پیدا کرد. براساس آموزه‌های اساسی سرولوژی با پایین آوردن نقطه عطف آزمون می‌توان این حساسیت ۸۳ درصدی را به ۱۰۰٪ رساند.

مطالعه همبستگی نتایج تعیین عیار ANA با سه روش انجام شده نیز نشان داد که نتایج حاصل از سلول‌های تیموسی ۹۹ درصد با نتایج حاصل از لام استاندارد HEp-2 همخوانی و همبستگی داشت. ارزش پیشگویی مثبت آزمون مبتنی‌بر سلول‌های تیموسی نشان می‌دهد که نتایج مثبت گرفته شده از این آزمون ۱۰۰ درصد با نتایج مثبت واقعی همخوانی دارد و ارزش پیشگویی منفی این آزمون نشان می‌دهد که این آزمون در ۸۶ درصد موارد می‌تواند واقعاً منفی بودن نتیجه آزمون ANA سرمی را اعلام کند.

جواب چهار نمونه سرم با استفاده از سلول‌های تیموس (و سلول‌های کبد موش) با تیتر ۱:۸۰ مثبت شده بود که به‌طور همزمان با سلول‌های HEp-2 تیتر ۱:۱۶۰ اخذ شده بود. اگر براساس Cut off سلول‌های HEp-2 نیز تفسیر کنیم تیتر ۱:۸۰ نتیجه‌ای مشکوک محسوب می‌شود نه نتیجه منفی. بااین‌حال، نتیجه این چهار نمونه با حداکثر محافظه کاری به‌صورت منفی تفسیر و در محاسبات وارد گردید. بنابراین، اگر نقطه عطف آزمون برای سلول‌های تیموس را ۱:۴۰ فرض کنیم در این صورت نتیجه مشکوک هر چهار نمونه فوق تبدیل به نتیجه مثبت می‌شوند و در این صورت حساسیت و ویژگی روش جدید برابر ۱۰۰٪ خواهد شد. توجیه دیگری نیز بر نتیجه حاصل از این چهار نمونه می‌توان تصور کرد. تراکم سلول‌ها در لام‌های HEp-2 کم است به‌طوری که سلول‌ها به وضوح از یکدیگر فاصله دارند درحالی که در برش بافت تهیه شده از تیموس سلول‌ها به هم پیوسته‌اند و بنابراین، اگر تعداد مولکول‌های آنتی‌بادی را به تعداد سلول‌های موجود در روی لام تقسیم کنیم تعداد مولکول‌های آنتی‌بادی که نصیب هر سلول می‌شود در لام تیموس خیلی کمتر از لام HEp-2 خواهد بود. معنی این گفته آن است که اگر به‌جای تهیه برش بافتی با استفاده از کرایوکات، ابتدا سلول‌های تیموس به‌صورت منفرد استخراج شده و تعداد سلول‌های منتقل شده بر روی لام با سلول‌های موجود در لام HEp-2 برابرسازی می‌شد یقیناً نتیجه‌ای مشابه با نتیجه HEp-2 حاصل می‌شد. علت‌یابی دیگر برای کاهش تیتر ANA سرمی برای چهار نمونه ذکر شده می‌تواند این باشد که برش بافت تیموس توسط اتانول به لام شیشه‌ای تثبیت شده بود. تحقیقات بیشتر با استفاده از تثبیت‌کننده‌های دیگر مثل متانول یا استون لازم است تا روشن نماید که آیا استفاده از اتانول به‌عنوان تثبیت‌کننده می‌تواند بخشی از آنتی‌ژن‌های هدف ANA را حل کرده و از بستر سلولی حذف نماید یا خیر.

از آنجا که جهت تبدیل و استفاده از یک تکنیک آزمایشگاهی به یک روش رایج در کلینیک باید مطالعات بیشتر و همچنین دقیق‌تر با جامعه آماری گسترده‌تر انجام شود و از طرفی روش‌های تشخیصی دیگر این بیماری نیز به‌عنوان مقایسه و تعیین حساسیت و ویژگی واقعی آزمون استفاده شود.

تشکر و قدردانی

بدین ترتیب از کلیه عزیزان که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودن کمال تشکر و قدردانی را به‌عمل می‌آوریم. همچنین از همکاران آزمایشگاه مازندران و بخارست سپاسگزاری می‌شود.

References

1. Sekigawa I, Yamada M, Iida N, Hashimoto H, Ogawa H. Comparison of serum IgE levels between female and male SLE patients, with reference to gender differences in the incidence of SLE. Clin Exp Rheumatol 2004;22:384-5.

2. Hang L, Izui S, Theofilopoulos AN, Dixon FJ. Suppression of transferred BXSB male SLE disease by female spleen cells. J Immunol 1982;128:1805-8.

19. Jiang B, Sun L, Hao S, Li X, Xu Y, Hou Y. Estrogen modulates bone marrow-derived DCs in SLE murine model-(NZB x NZW) F1 female mice. Immunological Investigations 2008;37:227-43. doi: 10.1080/08820130801973328

20. Kim JM, Son CN, Chang HW, Kim SH. Simultaneous presentation of acute disseminated encephalomyelitis (ADEM) and systemic lupus erythematosus (SLE) after enteroviral infection: can ADEM present as the first manifestation of SLE? Lupus 2015;24:633-7. doi: 10.1177/0961203314560426

3. Buccini RV. Childhood SLE--male:female ratio. Hosp Pract 1979;14:21-2.

4. Skeoch S, Haque S, Pemberton P, Bruce IN. Cell adhesion molecules as potential biomarkers of nephritis, damage and accelerated atherosclerosis in patients with SLE. Lupus 2014;23:819-24. doi: 10.1177/0961203314528061

5. Pizarro S, Monarrez Espino J, Ruiz A, Jara LJ, Nava A, Riebeling-Navarro C. Soluble vascular cell adhesion molecule-1 indicates SLE disease activity and specific organ involvement. Rev Alerg Mex 2007;54:189-95.

6. Tas SW, Quartier P, Botto M, Fossati-Jimack L. Macrophages from patients with SLE and rheumatoid arthritis have defective adhesion in vitro, while only SLE macrophages have impaired uptake of apoptotic cells. Ann Rheum Dis 2006;65:216-21. doi: 10.1136/ard.2005.037143

7. Avery TY, van de Cruys M, Austen J, Stals F, Damoiseaux JG. Anti-nuclear antibodies in daily clinical practice: prevalence in primary, secondary, and tertiary care. Journal of Immunology Research 2014;2014:401739. doi: 10.1155/2014/401739

8. Shin JI, Kim KH, Chun JK, Lee TJ, Kim KJ, Kim HS, et al. Prevalence and patterns of anti-nuclear antibodies in Korean children with juvenile idiopathic arthritis according to ILAR criteria. Scandinavian Journal of Rheumatology 2008;37:348-51. doi: 10.1080/03009740801998762

9. Hansen BU, Eriksson S, Lindgren S. High prevalence of autoimmune liver disease in patients with multiple nuclear dot, anti-centromere, and mitotic spindle antibodies. Scandinavian Journal of Gastroenterology 1991;26:707-13. doi: 10.3109/00365529108998588

10. Grennan DM, Parfitt A, Manolios N, Huang Q, Hyland V, Dunckley H, et al. Family and twin studies in systemic lupus erythematosus. Dis Markers 1997;13:93-8.

11. Agnello V. Association of systemic lupus erythematosus and SLE-like syndromes with hereditary and acquired complement deficiency states. Arthritis and Rheumatism 1978;21:S146-52. doi: 10.1002/art.1780210923

12. Kozora E, Ellison MC, West S. Depression, fatigue, and pain in systemic lupus erythematosus (SLE): relationship to the American College of Rheumatology SLE neuropsychological battery. Arthritis and Rheumatism 2006;55:628-35. doi: 10.1002/art.22101

13. Condemi JJ. SLE: idiopathic or drug-induced? Geriatrics 1980;35:81-8.

14. Gastineau DA, Holcomb GR. Lupus anticoagulant in drug-induced systemic lupus erythematosus (SLE). Arch Intern Med 1985;145:1926-7.

15. Schattner A, Sthoeger Z, Geltner D. Effect of acute cytomegalovirus infection on drug-induced SLE. Postgrad Med J 1994;70:738-40. doi: 10.1136/pgmj.70.828.738

16. Cowchock S, Fort JG. Can tests for IgA, IgG, or IgM antibodies to cardiolipin or phosphatidylserine substitute for lupus anticoagulant assays in screening for antiphospholipid antibodies? Autoimmunity 1994;17:119-22. doi: 10.3109/08916939409014666

17. Dhaher YY, Chan K, Greenstein BD, de Fougerolles Nunn E, Khamashta MA, Hughes GR. Impaired estrogen priming of progesterone receptors in uterus of MRL/MP-lpr/lpr mice, a model of systemic lupus erythematosus (SLE). International Journal of Immunopharmacology 2000;22:537-45. doi: 10.1016/S0192-0561(00)00017-5

18. Ghosh K, Patwardhan M, Pradhan V. Mycobacterium tuberculosis infection precipitates SLE in patients from endemic areas. Rheumatology International 2009;29:1047-50. doi: 10.1007/s00296-009-0903-x

21. McAlindon TE, Gulin J, Chen T, Klug T, Lahita R, Nuite M. Indole-3-carbinol in women with SLE: effect on estrogen metabolism and disease activity. Lupus 2001;10:779-83. doi: 10.1177/096120330101001104

22. Ochi S, Kato S, Nakamura-Uchiyama F, Ohnishi K, Saito Y. Pseudo-SLE by human immunodeficiency virus infection. Modern rheumatology / the Japan Rheumatism Association.1-3. doi: 10.3109/14397595.2014.997822

23. Saravana S, James DW, Abourawi F, Gupta PC, Samyukta B. HIV infection mimicking SLE. Clinical Rheumatology 2004;23:562-3. doi: 10.1007/s10067-004-0938-z

24. Jearn LH, Kim DA, Kim TY. Limitations of antinuclear antibody tests (HEp-2) are overcome with the autoimmune target test (IT-1) in systemic lupus erythematosus. The Journal of Rheumatology 2009;36:1833-4. doi: 10.3899/jrheum.090118

25. Perl A, Gonzalez-Cabello R, Lang I, Gergely P. Depressed natural and lectin-dependent cell-mediated cytotoxicity against adherent HEp-2 cells in patients with systemic lupus erythematosus. Immunological Communications 1982;11:431-40. doi: 10.3109/08820138209050740

26. Divate S, Hardikar P, Bichile L, Rajadhyaksha A. Clinical utility of screening for antinuclear antibodies by enzyme immunoassay—a preliminary study. J Assoc Physicians India 2004;52:290-3.

27. Greidinger EL, Hoffman RW. Antinuclear antibody testing: Methods, indications, and interpretation. Laboratory Medicine 2003;34:113-7. doi: 10.1309/VUB90VTPMEWV3W0F

28. Gniewek RA, Stites DP, Mchugh TM, Hilton JF, Nakagawa M. Comparison of antinuclear antibody testing methods: immunofluorescence assay versus enzyme immunoassay. Clin Diagn Lab Immunol 1997;4:185-8.

29. Tozzoli R, Bizzaro N, Tonutti E, Villalta D, Bassetti D, Manoni F, et al. Guidelines for the laboratory use of autoantibody tests in the diagnosis and monitoring of autoimmune rheumatic diseases. American Journal of Clinical Pathology 2002;117:316-24. doi: 10.1309/Y5VF-C3DM-L8XV-U053

30. Meroni PL, Schur PH. ANA screening: an old test with new recommendations. Ann Rheum Dis 2010;69:1420-2. doi: 10.1136/ard.2009.127100

31. Angel J, Thomas M, Appalaraju B. Evaluation of ELISA and indirect immunofluorescence in the diagnosis of autoimmune diseases and their interpretation in the clinical situation. Journal of The Academy of Clinical Microbiologists 2015;17:7-11. doi: 10.4103/0972-1282.158776

32. Jacobsen EM, Wisloff F. False negative screening tests for lupus anticoagulants--an unrecognized problem? Thrombosis Research 1996;82:445-51. doi: 10.1016/0049-3848(96)00094-1

33. Forastiero RR, Falcon CR, Carreras LO. Comparison of various screening and confirmatory tests for the detection of the lupus anticoagulant. Haemostasis 1990;20:208-14. doi: 10.1159/000216129

34. Follea G, Ffrench P, Trzeciak MC, Dechavanne M. [Lupus anticoagulant screening: comparison of 5 tests (author's transl)]. Nouv Rev Fr Hematologie 1981;23:203-7.

Journal of Knowledge & Health 2016; Vol 11, No 3
Shahroud University of Medical Sciences

DOI: 10.22100/jkh.v11i3.1458

Original Article

Diagnosis of Anti-Nuclear Antibody Using Calf Thymus Coated Glass in Patient with Lupus

Seyed Zeynolabedin Hosseini (M.Sc.)[1], Masoomeh Masoomikarimi (M.Sc.)[2], Moslem Jafarisani (M.Sc.)[2], Sady Kazemi Shahandashti (DVM)[3], Mansour Lakourj (M.Sc.)[4], Ramezan GHafaricherati (M.Sc.)[5], Aghil Tabar Molahasan (Ph.D.)[6*]

1- School of Veterinary, Islamic Azad University, Babol Branch, Babol, Iran.
2- Dept. of Basic Sciences, School of Medicine, Shahroud University of Medical Science, Shahroud, Iran.
3- School of Veterinary, Islamic Azad University, Tabriz Branch, Tabriz, Iran.
4- Dept. of Microbiology, School of Pyrapzshky, Islamic Azad University, Chalous Branch, Chalous, Iran.
5- Laboratory Technologist, Bouali Hospital, Mazandaran University of Medical Science, Sari, Iran.
6- Dept. of Immunology, School of Pyrapzshky, Islamic Azad University, Babol Branch, Babol, Iran.

Received: 9 April 2016**, Accepted:** 29 May 2016

Abstract:

Introduction: *Indirect immunofluorescence test is a most common test for the detection of Systemic Lupus Erythematosis (SLE), however, it is very expensive and is not easily available for all field laboratories. We aimed to evaluate the diagnostic performance of five micrometer thick sections prepared from bovine thymus for the detection of SLE patients.*
Methods: *Totally 48 serum samples (25 negative and 23 positive) were drained from SLE suspected patients. Bovine thymus was purchased from the slaughterhouses. Five micrometer thick sections prepared from bovine thymus. Also rat liver was prepared through the laboratory animal dissection, and assayed in parallel with HEp-2 tests. Two fold serial dilutions (1:40 to 1:640) were prepared for each serum sample using phosphate buffer solution and assayed for ANA. Immunostained cells were observed using a blue filter equiped fluorescent microscope with 200x magnification and any bright green fluorescence accumulation in the cell nucleus was considered as positive for the presence of ANA.*
Results: *Our findings showed sections prepared from thymus cells can be used for the detection of ANA in patient samples and the calculated sensitivity, specificity and accuracy of the test were 82.6%, 100% and 91.7%, respectively. Positive predictive value and negative predictive value of the test were 100% and 86.2%, respectively.*
Conclusion: *We concluded that thymic cells can be easily prepared and used for detection of ANA in SLE patients. However, minor improvements in section preparation and assay conditions as well as determination of a new cut off point is necessary to gain 100% efficiency of the assay.*

Keywords: Systemic lupus erythematosis, Autoimmune disease, Anti-nuclear antibody test, Indirect immunofluorescent assay, Thymus.

Conflict of Interest: No
***Corresponding author:** A. Tabar Molahasan**, Email:** doctoragheel@yahoo.com*

Citation: Hosseini SZ, Masoomikarimi M, Jafarisani M, Kazemi Shahandashti S, Lakourj M, GHafaricherati R, Tabar Molahasan A. Diagnosis of anti-nuclear antibody using calf thymus coated glass in patient with lupus. Journal of Knowledge & Health 2016;11(3):55-62.