

سرواپیدمیولوژی آنتی‌بادیهای IgM و IgG ضد آنتی‌ژن مایکوباکتریایی A60 در اهداکنندگان خون

دکتر فروزان کریمی^۱، آرزو احضاری^۲، منصور رضایی^۳

Title: A seroepidemiologic survey of serumic IgG and IgM Against A60 antigen in healthy blood donors.

Authors: Karimi F, (PhD); Ehzari A, (MSc); Rezaii M, (MSc).

Abstract: Because of the world wide spread of infectious mycobacteria, awareness of quantity of community contact with this microorganism is a necessity. Serologic assays are one of the major tools for determining the history of contact and contamination of people with mycobacteria.

We used an enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) test to assess serum antibodies IgG and IgM against antigen 60 (anti-A60). These tests were applied to 542 healthy blood donors referring to Kermanshah Blood Bank.

Out of 542 healthy individuals, 280 cases (51.7%) were negative for anti-A60 IgG, 112 cases (20.7%) were suspicious and 150 cases (27.7%) were found positive. Out of 542 healthy individuals, 399 cases (73.6%) were negative for anti-A60 IgM, 58 cases (10.7%) were suspicious and 85 cases (15.7%) were found positive. There was no meaningful correlation between area of living, history of BCG vaccination, level of education, job, financial status, sex and mean rank of serum concentrations of IgG and IgM ($P > 0.05$). There was a meaningful correlation between ages of blood donors and their IgM serum (and not IgG) level ($P < 0.001$). The least seropositive cases (21.18%) were found in the first age group (17-24 years old). In the second age group (25-34 years old), the seropositive cases were greater than the other two groups. Among seropositive cases, 45 persons (52.94%) were in the second group. The least seronegative cases, were found in the third age group (88 cases). These individuals (166 cases) covered 84.7% of population of the third group and 41.6% of seronegative cases. Additionally, the first group included the least suspicious cases (12 cases) and seropositives (18 cases). In general, the most members of each group were seronegatives. Determining the correlation between age and serum IgM, we evaluated the correlation between age and other variations. Among the variations, there was a meaningful relation between age and job; mainly, members of the first age group were soldiers (49 cases-25%), students (45 cases-23%) and unemployed persons (24 cases-12.2%).

We suppose that considerable presence of anti-A60 IgG and IgM antibodies are because of endemicity of mycobacteria in the area. At this situation, a considerable number of people, suffer from inapparent infections and are in a "persistent state". By the way, A number of positive results can be considered as a false positive results (because of community of A60 among mycobacteria and cross-reaction of A60 among mycobacteria). So we recommend changing the serumic dilution and cut-off point of the test before doing the same study in our country. We suggest that the higher number of seronegatives in the first group age may be due to their contact circumstances with mycobacteria and quality of their humoral immunity function.

Keywords: antigen A60, antibody, ELISA test, mycobacteria, IgM, IgG.

۲- بخش دامپزشکی، مرکز تحقیقات کشاورزی کرمانشاه

۳- گروه پزشکی اجتماعی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

چکیده:

گسترش فزاینده مایکوباکتریهای بیماریزا در جهان، ضرورت آگاهی از وضعیت و میزان تماس افراد جامعه با آنها را بیشتر می‌سازد. روشهای سرواپیدمیولوژیک، یکی از روشهای مناسب دستیابی به این اطلاعات محسوب می‌شوند. در این مطالعه، بمنظور بررسی سرواپیدمیولوژیک آنتی‌بادی‌های سرمی IgM و IgG ضد یکی از آنتی‌ژنهای مایکوباکتریایی (آنتی‌ژن A60) در ۵۴۲ فرد ظاهراً سالم اهداکننده خون مراجعه کننده به سازمان انتقال خون کرمانشاه، از تست الایزا استفاده شد.

از نظر حضور IgG، ۲۸۰ نفر (۵۱٪) منفی، ۱۱۲ نفر (۲۰٪) مشکوک و ۱۵۰ نفر (۲۷٪) مثبت بودند. از نظر حضور IgM، ۳۹۹ نفر (۷۳٪) منفی، ۵۸ نفر (۱۰٪) مشکوک و ۸۵ نفر (۱۵٪) مثبت بودند. بین محل زندگی، سابقه واکسیناسیون (با BCG)، سطح تحصیلات، شغل، وضعیت اقتصادی، جنس و میانگین رتبه‌های غلظت سرمی افراد مورد بررسی با سطح سرمی IgG و IgM، ارتباط معنی‌داری وجود نداشت. بین سن افراد مورد بررسی و سطح سرمی IgM آنان، ارتباط معنی‌دار بود ($P < 0.001$) (ولی این ارتباط در مورد IgG مشاهده نشد). در این رابطه، هرچند که بیشترین افراد هر سه گروه سنی را افراد سرم منفی تشکیل می‌دادند، ولی کمترین موارد سرم مثبت، در گروه سنی اول (۱۷ تا ۲۴ سال)، و بیشترین موارد سرم مثبت، در گروه سنی دوم (۲۵ تا ۳۴ سال)، مشاهده شد. بمنظور روشن تر شدن ارتباط بین سن و IgM، ارتباط سن با سایر متغیرها بررسی و ارتباط معنی‌داری بین سن و شغل مشاهده شد ($P < 0.05$). بدین ترتیب که اعضای گروه سنی اول (یعنی گروه دارنده بیشترین موارد سرونگاتیو)، عمدتاً افراد فاقد شغل بودند.

قابل توجه بودن میزان حضور آنتی‌بادیهای IgM و IgG ضد آنتی‌ژن A60 در سرم افراد سالم مورد بررسی (مثبت بودن ۲۷٪ از آنها)، نشانه آندمیک بودن منطقه و لذا افزایش احتمال مواجهه و ابتلا به عفونتهای مکرر و غیرآشکار کلینیکی با مایکوباکتریها، بویژه مایکوباکتریوم توبرکولوزیس است. تعدادی از نتایج مثبت بدست آمده را نیز می‌توان بعلت مشترک بودن آنتی‌ژن A60 در بین گونه‌های مایکوباکتریایی بعنوان نتیجه مثبت کاذب تست تلقی نمود. لذا پیشنهاد می‌شود قبل از انجام سنجشهای سروولوژیک، با تغییر رقت سرمی و عدد آستانه، این تست، بر اساس شرایط منطقه ای و محیطی، تطبیق داده شود. همچنین بیشتر بودن افراد سرونگاتیو در گروه سنی اول را بایستی در نحوه و میزان مواجهه با عامل میکروبی و کیفیت فعالیت سیستم ایمنی هومورال آنان جستجو نمود.

کل واژگان: آنتی‌ژن A60، آنتی‌بادی، تست الایزا، مایکوباکتری، IgM، IgG.**مقدمه:**

آگاهی از وضعیت و میزان تماس افراد جامعه با آنها را بیشتر می‌سازد. اطلاعاتی که بدین منظور و در مطالعات اپیدمیولوژیک بدست می‌آیند، در برنامه‌هایی که برای پیشگیری، تشخیص، درمان و جلوگیری از انتشار آلودگی طراحی می‌گردند، بکار گرفته می‌شوند. به همین دلیل، تشخیص سابقه تماس افراد جامعه با این عامل و غربالگری افراد آلوده به آن، از موضوعات مورد توجه کادرهای بهداشتی و درمانی می‌باشد.

عفونتهای مایکوباکتریایی با عرضه آنتی‌ژنهای مختلف به سیستم دفاعی انسان، موجب برانگیخته شدن واکنشهای ایمنی سلولی و هومورال می‌شوند. هرچند که واکنشهای ایمنی سلولی، در دفاع و ایجاد مصونیت در برابر مایکوباکتریها، نقش کلیدی

تعدادی از مایکوباکتریها، عامل بیماریهای متعددی در انسان و حیوان هستند. از بین این عوامل، شیوع جهانی مایکوباکتریوم توبرکولوزیس، سی میلیون مورد و بروز سالانه عفونتهای ناشی از آن، ده میلیون مورد برآورد شده است. در حال حاضر، مایکوباکتریوم توبرکولوزیس، که از مهمترین مایکوباکتریها محسوب می‌شود، در بیشتر کشورهای صنعتی و توسعه یافته‌ای که با پاندمی ایدز در ارتباطند، در حال افزایش است و در جهان، مشکلات عمده‌ای را در زمینه‌های اجتماعی، اقتصادی و پزشکی ایجاد نموده است (۲۰۱). گسترش فزاینده مایکوباکتریهای بیماریزا در جهان (بویژه مایکوباکتریوم توبرکولوزیس)، ضرورت

شده اند، با هم تناقض دارند (۱۴-۱۲). در هر صورت در حال حاضر، از این تکنیک همراه با روشهای تشخیصی دیگر به عنوان یک تست تکمیلی در تشخیص آلودگی با میکوباکتریوم توبرکولوزیس در بالغین و بررسی وضعیت اپیدمیولوژیک سل استفاده می‌شود (۴). با عنایت به مقبولیت تست الایزا (با استفاده از آنتی‌ژن A60) در تشخیص و تأیید آلودگی میکوباکتریوم توبرکولوزیس و لذا کاربرد آن در سنجش‌های کلینیکی (بعنوان یک تست تکمیلی همراه با روشهای تشخیصی دیگر) (۱۵) و همچنین کاربرد آن در مطالعات اپیدمیولوژیک و با توجه به آندمیک بودن منطقه از نظر عوامل میکوباکتریایی، بویژه میکوباکتریوم توبرکولوزیس و زیاد بودن احتمال تماس مردم منطقه با آنها با ضرورت انجام یک تحقیق مشخص می‌شود. در این مطالعه توصیفی و مقطعی، با سنجش آنتی‌بادیهای IgM و IgG ضد یکی از آنتی‌ژنهای میکوباکتریایی (A60) در تعدادی از افراد سالم که بمنظور اهدای خون، به سازمان انتقال خون کرمانشاه مراجعه نموده‌اند، سابقه قبلی تماس این افراد با این آنتی‌ژن (بعنوان نمادی از سابقه تماس با میکوباکتریوم توبرکولوزیس) را به تفکیک سن، جنس، سابقه واکسیناسیون با BCG، محل زندگی، سطح تحصیلات، سطح اقتصادی و شغل، مورد بررسی قرار دادیم.

روش کار:

در این مطالعه، به منظور بررسی سرواپیدمیولوژیک آنتی‌بادیهای سرمی IgM و IgG ضد آنتی‌ژن A60 در ۵۴۲ فرد سالم اهدا کننده خون مراجعه کننده به سازمان انتقال خون کرمانشاه، از تست الایزا استفاده شد. تعداد نمونه سرمی مورد نیاز، با انجام مطالعه مقدماتی^۲ مشخص گردید. در این تکنیک، میکروپلیتهای پوشیده از آنتی‌ژن A60 و نمونه سرمهای مثبت و منفی مورد استفاده قرار گرفت. هر میکروپلیت، شامل کنترلهای مثبت و منفی مناسب و یک کنترل استاندارد نقطه پایانی بود^۳ (۲). از آنجا که حضور و میزان آنتی‌بادیها، تحت تأثیر سن، جنس، وضعیت اقتصادی و بدنبال آن، وضعیت تغذیه که می‌تواند تعیین کننده نحوه فعالیت سیستم دفاعی باشد، محل جغرافیایی زندگی، سابقه تماس با عامل عفونی که می‌تواند تحت تأثیر نوع اشتغال و سطح تحصیلات قرار بگیرد و سابقه واکسیناسیون، قرار دارد، لذا در این

مهمی را بعهدہ دارند و در این زمینه، ایمنی هومورال از اهمیت کمتری برخوردار بوده و نقش ثانویه‌ای را در دفاع میزبان علیه میکوباکتریها ایفا می‌کند، ولی اکنون اهمیت آن در ارائه اطلاعات ذیقیمی در خصوص وضعیت و روند بیماری سل و همچنین در مطالعات اپیدمیولوژیک، کاملاً تأیید شده است. مطالعات انجام شده نشان داده اند که سنجش میزان آنتی‌بادی، اطلاعات مهمی را درباره وضعیت سیستم دفاعی در برابر میکوباکتری و سابقه تماس با این عامل فراهم می‌سازد (۳ و ۴). بطوری که سطح آنتی‌بادی ضد آنتی‌ژنهای میکوباکتریایی، با شدت آلودگی نسبت مستقیم داشته و در این زمینه ارزش تشخیصی دارد (۳ و ۷). بدلیل همین ارزش تشخیصی، در حال حاضر روشهای سرولوژیکی، برای تشخیص آلودگیها و بیماریهای میکوباکتریایی جزو تستهای مکمل محسوب شده و به این منظور مورد استفاده قرار می‌گیرند. در این بین، تست الایزا^۱ بدلیل حساسیت و دقتی که دارد، از اهمیت خاصی برخوردار است (۱-۳ و ۹).

یکی از آنتی‌ژنهای میکوباکتریایی، آنتی‌ژن A60 است. این آنتی‌ژن، به عنوان یک شاخص آنتی‌ژنیک قوی عمل کرده و واکنشهای ایمنی (هومورال و سلولی) را تحریک می‌کند (۲). آنتی‌ژن A60، ترکیبی از پروتئین، پلی‌ساکارید و لیپید بوده (۲ و ۳) و با مقادیر متفاوتی، در سیتوزول میکوباکتریهای تپیک و آتپیک یافت می‌شود. این آنتی‌ژن، نسبت به سایر آنتی‌ژنهای موجود در میکوباکتریها، اختصاصیت بیشتری به نوع بوویس و توبرکولوزیس دارد. لذا در اکثر منابع، بعنوان آنتی‌ژن اختصاصی در این تست، معرفی شده و در نتیجه استفاده از آن، موارد مثبت کاذب چندان گزارش نشده است (۳ و ۴). در سالهای اخیر، برای تشخیص سرولوژیکی سل و آنتی‌بادیهای ضد میکوباکتریوم توبرکولوزیس (از نوع IgG و IgM)، از تست الایزا و آنتی‌ژن A60 استفاده می‌شود (۱ و ۸ و ۱۰). محققین، در گزارشهای خود اعلام داشته‌اند در این روش، اکثر اشخاص سالم، فاقد IgM و IgG ضد A60 بوده و بیماران مبتلا به سل، معمولاً واجد تیتراهای بالایی از این آنتی‌بادیها هستند. بعبارت دیگر، مثبت شدن تست، اساساً در بیماران رخ می‌دهد و نتیجه این تست، در اشخاص سالمی که در سالهای دور با BCG واکسینه شده‌اند نیز منفی است (۲ و ۳). البته نتیجه مطالعات مشابه انجام شده بر روی اطفال و نیز بیمارانی که علاوه بر آلودگی با میکوباکتریوم، با HIV نیز آلوده

^۱enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA)

^۲- pilot study

^۳- کیت‌های مورد استفاده (تحت عنوان anda.TB)، از محصولات Anda Biologicals بودند.

نتیجه منفی: غلظتهای کمتر از ۱۲۵ واحد بر میلی لیتر؛ نتیجه مشکوک: غلظتهای بین ۱۲۵ تا ۲۲۵ واحد بر میلی لیتر؛ نتیجه مثبت (عدد آستانه): غلظتهای بیش از ۲۲۵ واحد بر میلی لیتر

یافته‌ها:

پس از سنجش سرولوژیک سرمهای ۵۴۲ نفر از اهدا کنندگان خون به سازمان انتقال خون کرمانشاه، نتایج زیر بدست آمد: ۸۵ نفر (۱۵/۷٪) از اشخاص مورد بررسی، زن و ۴۵۷ نفر (۸۴/۳٪)، مرد بودند. حداقل سن اهدا کنندگان، ۱۷ و حداکثر ۶۱ سال بود. ۱۹۶ نفر از آنان (۳۶/۲٪) کمتر از ۲۵ سال، ۲۱۴ نفر (۳۹/۵٪) بین ۲۵ تا ۳۴ سال و ۱۳۲ نفر (۲۴/۴٪) بیش از ۳۵ سال سن داشتند. از نظر سطح تحصیلات، ۵۶ نفر (۱۰/۳٪) از آنان بیسواد، ۲۶۹ نفر (۴۹/۶٪) دارای تحصیلات زیردیپلم و ۲۱۷ نفر (۴۰٪) دارای تحصیلات دیپلم و بالاتر بودند. در بازوی ۴۷۰ نفر (۸۶/۷٪) اسکار ناشی از تلقیح واکسن BCG مشاهده می‌شد. ۷۲ نفر بقیه (۱۳/۳٪)، فاقد اسکار در بازو بوده و از سابقه قبلی واکسیناسیون BCG خود اطلاعی نداشتند.

۴۶۵ نفر (۸۵/۸٪) از افراد مورد مطالعه، در شهر و ۷۷ نفر (۱۴/۲٪) از آنان در روستا زندگی می‌کردند. ۱۶ نفر (۳٪) جزو اقشار کم‌درآمد، ۳۸۶ نفر (۷۱/۲٪) جزو اقشار متوسط جامعه و ۱۴۰ نفر (۲۵/۸٪) از آنان پردرآمد بودند. ۱۳۷ نفر (۲۵/۳٪) دارای مشاغل آزاد، ۴۹ نفر (۹٪) کارگر، ۹۰ نفر (۱۶/۶٪) دارای مشاغل اداری، ۷۰ نفر (۱۲/۹٪) خانه‌دار، ۵۰ نفر (۹/۲٪) سرباز، ۳۰ نفر (۵/۵٪) کشاورز و ۲۶ نفر (۴/۸٪) راننده بودند. از نظر حضور IgG، ۲۸۰ نفر (۵۱/۷٪) منفی، ۱۱۲ نفر (۲۰/۷٪) مشکوک و ۱۵۰ نفر (۲۷/۷٪) مثبت بودند. از نظر حضور IgM، ۳۹۹ نفر (۷۳/۶٪) منفی، ۵۸ نفر (۱۰/۷٪) مشکوک و ۸۵ نفر (۱۵/۷٪) مثبت بودند. بین محل زندگی، سابقه واکسیناسیون (با BCG)، سطح تحصیلات، شغل، وضعیت اقتصادی، جنس و میانگین رتبه‌های غلظت سرمی افراد مورد بررسی با سطح سرمی IgG و IgM، ارتباط معنی‌داری وجود نداشت ($P > 0.05$). بین سن افراد مورد بررسی و سطح سرمی IgM آنان، ارتباط معنی‌دار بود ($P < 0.001$) (جدول شماره ۱)؛ ولی این ارتباط در مورد IgG مشاهده نشد.

جدول ۱- فراوانی مطلق و نسبی وضعیت حضور آنتی‌بادی IgM در اهداکنندگان خون مراجعه کننده به سازمان انتقال خون کرمانشاه در گروه‌های سنی مختلف در پاییز سال ۱۳۷۹

جمع	IgM			سن (سال)
	مثبت	مشکوک	منفی	
۱۹۶	۱۸	۱۲	۱۶۶	۱۷-۲۴

تحقیق، متغیرهای سن، جنس، شغل، تحصیلات، وضعیت اقتصادی، محل سکونت، سابقه واکسیناسیون با BCG، حضور و میزان آنتی‌بادیهای IgG و IgM ضد آنتی‌ژن A60، مورد بررسی قرار گرفتند. برای جمع‌آوری داده‌ها، از روشهای تکمیل پرسشنامه و سنجش آنتی‌بادیهای سرمی IgG و IgM استفاده شد:

پس از تهیه خون از اهداکنندگان مراجعه کننده به سازمان انتقال خون کرمانشاه (که سلامت آنان با معاینه پزشک و انجام تستهای روتین سازمان انتقال خون تأیید می‌شد) و تکمیل پرسشنامه حاوی سؤالات مربوط به متغیرهای مورد بررسی، سرم جداشده تا زمان انجام تست الایزا در یخچال ۲۰- درجه سانتیگراد قرار داده شد. این سرمها، با استفاده از روش الایزا از نظر آنتی‌بادیهای سرمی IgG و IgM ضد آنتی‌ژن A60 مورد سنجش قرار گرفتند. بمنظور تجزیه و تحلیل داده‌ها، از آمار توصیفی و استنباطی استفاده شد. برای بررسی متغیرهای کمی، از تستهای فیشر و t-test، و برای متغیرهای کیفی و بررسی ارتباط بین متغیرهای IgG و IgM با سایر متغیرها از تست کای اسکوار استفاده گردید. در این مطالعه، سطح معنی‌دار، ۹۵٪ در نظر گرفته شد. برای سنجش آنتی‌بادی‌ها به روش الایزا، نمونه‌های سرمی رقیق شده (به نسبت ۱:۱۰۰)، به حفره‌های پلیت میکروتیتراسیون که با آنتی‌ژن A60 مایکوباکتریوم پوشیده شده بود، اضافه شدند. پس از گذشت مدت زمان لازم برای انکوباسیون در تاریکی، ترکیبات متصل نشده سرم، با شستشو از محیط حذف شدند. سپس به هر حفره میکروپلیت، بسته به نوع آنتی‌بادی مورد سنجش، آنتی‌بادی آنتی‌هیومن ضد IgG و یا IgM نشاندار شده با پراکسیداز اضافه گردید تا با کمپلکسهای آنتی‌ژن - آنتی‌بادی موجود، ترکیب شوند. ترکیبات متصل نشده، با شستشو، از محیط خارج شدند. سپس، سوبسترای پراکسیداز، یعنی تترامتیل بنزیدین (TMB)، به حفرات اضافه شد.

رنگ حاصل از واکنش پراکسیداز با TMB، که متناسب با مقدار آنتی‌بادیهای اختصاصی موجود در نمونه است، در طول موج ۴۵۰ نانومتر و با استفاده از دستگاه کلریمتر، اندازه‌گیری گردید.

محدوده‌های حضور آنتی‌بادی IgM در سرمهای مورد بررسی: نتیجه منفی: غلظتهای کمتر از ۰/۸ واحد بر میلی لیتر؛ نتیجه مشکوک: غلظتهای بین ۰/۸ تا ۱ واحد بر میلی لیتر؛ نتیجه مثبت (عدد آستانه^۱): غلظتهای بیش از ۱ واحد بر میلی لیتر
محدوده‌های حضور آنتی‌بادی IgG در سرمهای مورد بررسی:

^۱ - cut-off

جدول ارتباط سن با شغل، نشان داد که اعضای گروه اول (که بیشترین میزان سرمهای منفی را دربردارد)، عمدتاً شامل ۴۹ نفر (۲۵٪) سرباز و ۴۵ نفر (۲۳٪) محصل و دانشجو و ۲۴ نفر (۱۲٪) افراد بیکار بودند.

بحث و نتیجه گیری:

نتایج این تحقیق در زمینه حضور IgG سرمی ضد آنتی ژن A60، با نتایج تحقیق ساز^۱ و کادری^۲ تشابه دارد (به ترتیب، سرمهای ۲۰/۷ درصد و ۲۴ درصد از افراد سالم مورد بررسی این محققین، از نظر آنتی بادی IgG ضد آنتی ژن A60 مثبت بود) (۱۶ و ۱۷). ولی با نتایج ما با سایر تحقیقات گزارش شده در مورد حضور آنتی بادهای IgG و IgM ضد آنتی ژن A60، اختلاف قابل توجهی دارد:

در مطالعاتی که میز^۳، جوودان^۴، زوو^۵، وانگ^۶، گوپتا^۷، لوح^۸ و همکارانشان در کشورهای هند، فرانسه، چین و تایوان انجام داده اند، بین صفر تا حداکثر ۹/۹ درصد از افراد مورد بررسی، از نظر آنتی بادی IgM سرمی ضد آنتی ژن A60 و بین صفر تا حداکثر ۹/۷ درصد از نظر آنتی بادی IgG سرمی ضد آنتی ژن A60، مثبت و یک نفر، مشکوک گزارش شده اند (۲ و ۴ و ۱۰ و ۱۸-۲۰).

یکی از مواردی که می تواند منشأ اختلاف در نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر و مطالعات گزارش شده دیگر باشد، عدد آستانه است. عدد آستانه، عددی است که در توصیف و نتیجه گیری از داده های سرولوژیک، نقش اساسی دارد. این عدد، که از مقایسه نتیجه مطالعه بر روی نمونه های کنترل (افراد سالم و بدون سابقه ابتلا به بیماری مورد نظر) و بیماران مبتلا به بیماری مورد بررسی بدست می آید، بسته به وضعیت فعالیت سیستم دفاعی افراد و تولید آنتی بادی (که بنوبه خود، تحت تأثیر عواملی چون شرایط محیطی و ژنتیک قرار دارند)، عددی است متغیر؛ بطوریکه در مورد یک بیماری خاص، در مناطق جغرافیایی مختلف، می تواند مقادیر متفاوتی را بخود اختصاص دهد.

در مطالعاتی که در کشورهای مختلف، با استفاده از تست الایزای سنجش آنتی بادی ضد آنتی ژن A60 و به منظور محاسبه این عدد انجام شده، مقادیر متفاوتی بدست آمده است (۴). بعنوان

۱۰۰/۰٪	۹/۲٪	۶/۱٪	۸۴/۷٪	
۲۱۴	۴۵	۲۴	۱۴۵	۲۵-۳۴
۱۰۰/۰٪	۲۱٪	۱۱/۲٪	۶۷/۸٪	
۱۳۲	۲۲	۲۲	۸۸	۳۵-۶۱
۱۰۰/۰٪	۱۶/۷٪	۱۶/۷٪	۶۶/۷٪	
۵۴۲	۸۵	۵۸	۳۹۹	کل
۱۰۰/۰٪	۱۵/۷٪	۱۰/۷٪	۷۳/۶٪	

کمترین موارد سرم مثبت، در گروه سنی اول (۱۷ تا ۲۴ سال)،

و به میزان ۲۱/۱۸٪ مشاهده شد. موارد سرم مثبت، در گروه سنی دوم (۲۵ تا ۳۴ سال)، بیشتر از دو گروه دیگر بود. ۴۵ نفر از افراد سرم مثبت (۵۲/۹۴٪) در این گروه قرار داشتند. کمترین موارد سرورنگاتیو، در گروه سنی سوم (۸۸ نفر که ۲۲/۰۶٪ از افراد سرم منفی را تشکیل می دادند) و بیشترین موارد سرم منفی، در گروه سنی اول مشاهده شد (یعنی ۱۶۶ نفر که ۸۴/۷٪ از این گروه سنی و ۴۱/۶٪ از افراد سرم منفی را تشکیل می دادند). بعلاوه، گروه سنی اول، دربردارنده کمترین تعداد موارد مشکوک (۱۲ نفر) و موارد مثبت (۱۸ نفر) نیز بود.

بطور کلی، از نظر IgM، بیشترین افراد هر سه گروه سنی را افراد سرورنگاتیو تشکیل می دادند. بمنظور روشن تر شدن ارتباط بین سن و IgM، ارتباط سن با سایر متغیرها مورد بررسی قرار گرفت و در بین متغیرها، ارتباط معنی داری بین سن و شغل مشاهده شد ($P < 0.05$) (جدول شماره ۲).

جدول ۲- فراوانی مطلق و نسبی مشاغل مختلف در اهداکنندگان خون مراجعه کننده به سازمان انتقال خون کرمانشاه بر حسب گروه سنی در پاییز سال ۱۳۷۹

شغل	گروه سنی			جمع
	۳۵-۶۱	۲۵-۳۴	۱۷-۲۴	
آزاد	۳۰	۶۷	۴۰	۱۳۷
	۲۲/۷٪	۳۱/۳٪	۲۰/۴٪	۲۵/۳٪
کارگر	۱۴	۲۴	۱۱	۴۹
	۱۰/۶٪	۱۱/۲٪	۵/۶٪	۹٪
بیکار	۵	۱۶	۶۹	۹۰
	۳/۸٪	۷/۵٪	۳۵/۲٪	۱۶/۶٪
کارمند	۴۰	۴۴	۶	۹۰
	۳۰/۳٪	۲۰/۶٪	۳/۱٪	۱۶/۶٪
خانه دار	۲۲	۳۴	۱۴	۷۰
	۱۶/۷٪	۱۵/۹٪	۷/۱٪	۱۲/۹٪
سرباز	—	۱	۴۹	۵۰
	—	۵٪	۲۵٪	۹/۲٪
کشاورز	۱۲	۱۲	۶	۳۰
	۹/۱٪	۵/۶٪	۳/۱٪	۵/۵٪
راننده	۹	۱۶	۱	۲۶
	۶/۸٪	۷/۵٪	۰/۵٪	۴/۸٪
کل	۱۳۲	۲۱۴	۱۹۶	۵۴۲
	۱۰۰/۰٪	۱۰۰/۰٪	۱۰۰/۰٪	۱۰۰/۰٪

1 - Saz JV

2 - Qadri SM

3 - Maes RF

4 - Gevadan MJ

5 - Zou YL

6 - Wang FD

7 - Gupta S

8 - Luh KT

بیماری باشد. از سوی دیگر، تعداد افرادی که IgM سرمی منفی داشتند، در گروه دوم کاهش می‌یافت؛ بعبارت دیگر، با افزایش سن، از میزان موارد منفی، کاسته شده و به تعداد موارد مثبت افزوده می‌شد.

برای بررسی وضعیت اعضای گروه‌های سنی و روشن‌تر شدن رابطه آنها با آنتی‌بادی IgM ضد آنتی‌ژن A60، رابطه بین گروه‌های سنی با سایر متغیرها مورد بررسی قرار گرفت. در این میان، رابطه بین سن و شغل، از نظر آماری معنی‌دار بود. با توجه به اینکه در تعدادی از مشاغل، گروه‌های سنی خاصی بیشتر دیده می‌شوند، چنانچه بخواهیم فرض مواجهه کمتر برخی از گروه‌ها با عامل عفونی را مطرح کنیم، چنین بنظر می‌رسد که جوانان مورد بررسی فاقد شغل (که تعداد زیادی از آنان سرباز و محصل بودند)، بعلت محدود بودن میزان مواجهه با سایر افراد جامعه، آنتی‌بادی کمتری ساخته‌اند.

واکنش متقاطع آنتی‌ژن A60 استخراج شده از مایکوباکتریوم بوویس با آنتی‌ژن‌های مشابه، به مثبت شدن نتیجه تست الایزا با ارگانیس‌های مشابه منجر می‌شود. هر چند که در چنین مواردی انتظار داریم تیتراژ آنتی‌بادی‌های موجود، بسیار اندک باشد، ولی عملاً میزان موارد مثبت کاذب و مواردی که بدلیل سابقه مواجهه مکرر و مداوم با منبع مایکوباکتریوم‌های آنتی‌ژن‌های ایجاد می‌کنند، گاهی بیش از حد مورد انتظار گزارش شده است (۳ و ۵ و ۸ و ۱۴ و ۲۶). به این ترتیب، بنظر می‌رسد بدلیل آندمیک بودن منطقه، بایستی با مطالعه‌ای که بر روی سرم‌های افراد سالم و بیماران آلوده به مایکوباکتریوم توبرکولوزیس ساکن منطقه صورت می‌گیرد، عدد آستانه خاص منطقه تعیین گردد. این عدد، احتمالاً بزرگتر از عدد آستانه مورد استفاده در این تحقیق خواهد بود. تعدادی از سرم‌های مثبت از نظر IgM را نیز می‌توان به آلودگی اخیر (تماس برای اولین بار و یا برخورد مجدد) افراد مورد مطالعه مربوط دانست (۱۳ و ۱۶). بررسی کامل و همه‌جانبه بالینی افراد سرم مثبت، می‌تواند افرادی که در آغاز عفونت و یا در مرحله استقرار بیماری هستند را، شناسایی کند.

در تحقیق حاضر، با توجه به تیتراژ بالای IgG در تعداد قابل توجهی از سرم‌های مورد بررسی، می‌توان تعدادی از نتایج سنجش IgM ضد آنتی‌ژن A60 را نتیجه تداخل IgG و بعنوان نتایج مثبت کاذب قلمداد نمود. با اینکه افراد مورد بررسی در این مطالعه، همگی فاقد سابقه بیماری‌های التهابی مفصلی در خود یا اعضای خانواده بودند ولی با توجه به اینکه فاکتور روماتوئید می‌تواند بدون مشاهده عارضه، در تیتراژ بالا نیز در سرم افراد، موجود باشد، بخشی از نتایج IgM سرمی مثبت بدست آمده در

مثال، در کشور تایوان، عدد ۲۰۰ و در جزایر قناری، عدد ۲۴۰ واحد سرمی^۱ (۲۱ و ۲۲)، در اسپانیا، عدد ۳۵۰ واحد سرمی و در تحقیق دیگر، عدد ۲۰۰ واحد سرمی برای بالغین و عدد ۱۰۰ واحد سرمی برای اطفال پیشنهاد گردیده است (۱۰ و ۲۳). میز و همکارانش (در سال ۱۹۸۹ در بمبئی هندوستان)، عدد آستانه را معادل ۱۲۵ واحد سرمی اعلام نموده‌اند ولی برای مناطقی که شیوع بیماری بالایی دارند، عدد ۱۶۰ را پیشنهاد کرده‌اند (۸).

زوو و همکارانش معتقدند که این اختلافات، از موارد زیر منشأ می‌گیرند:

- دانسیته و انتشار غیریکنواخت جمعیت‌های میکروبی موجود در محیط‌های مختلف

- واکنش متقاطع آنتی‌ژن A60 بدست آمده از مایکوباکتریوم بوویس با آنتی‌ژن‌های ماکرومولکولی مقاوم به حرارت موجود در سایر انواع مایکوباکتریومها.

- مواجهه اخیر (افراد مورد بررسی) با عامل عفونی و در نتیجه، فعالیت سیستم دفاعی آنان در برابر این عامل (۴).

بیسواس^۲، کادری و ابوزید^۳ نیز معتقدند شیوع انواع مایکوباکتریومها در محیط و مواجهه مکرر و آلودگی اخیر با آنها نیز می‌تواند نتیجه تست الایزا را مثبت نماید (۱۳ و ۱۶ و ۲۴).

به این ترتیب می‌توان انتظار داشت عواملی چون نوع اشتغال و شرایط زیست محیطی، با فراهم ساختن زمینه تماس افراد با منبع مایکوباکتری، تأثیر زیادی در افزایش گذرای IgM سرمی ضد آنتی‌ژن A60 داشته باشند. آندمیک بودن منطقه از نظر آلودگی با مایکوباکتریوم توبرکولوزیس و زیاد بودن احتمال تماس ساکنین آن با این عامل، سیستم ایمنی افراد (بی‌ویژه افرادی که وضعیت زندگی و اشتغال آنان، زمینه ساز تماس با این عامل می‌باشد) را بطور مستمر در حال پاسخگویی و واکنش نسبت به حضور این عوامل نگاه می‌دارد. در این شرایط، حضور آنتی‌بادی‌های ضد آنتی‌ژن A60 (از نوع IgM و IgG) در سرم افراد و حتی وجود عفونت‌های مایکوباکتریایی فعال غیرآشکار، امری کاملاً قابل انتظار است (۲۵). وجود ارتباط معنی‌دار بین سن و آنتی‌بادی IgM نیز تأییدی بر این موضوع است: در بین افراد مورد بررسی، افرادی که IgM سرمی منفی داشتند، عمدتاً عضو گروه سنی اول (یعنی افراد ۱۷ تا ۲۴ ساله) بودند. این موضوع می‌تواند به علت کمتر بودن سابقه مواجهه این افراد با عامل

¹ - serounits

² - Biswas J

³ - Abou-Zeid C

افراد ظاهراً سالم، یا بایستی رقت سرمها، چهار الی پنج برابر بزرگتر از رقت مورد استفاده در اروپا باشد؛ یا عدد آستانه بزرگتری برای بررسی آنها در نظر گرفته شود و یا هر دو مورد، بطور همزمان لحاظ گردند. این محققین، همچنین معتقدند که تعداد افراد مبتلا به عفونتهای مخفی در کشورهای در حال توسعه، با کشورهای توسعه یافته متفاوت است (۱۵).

بطور کلی می توان چنین نتیجه گرفت که بدلیل مواجهه بیشتر ساکنین مناطق مختلف آندمیک، تعداد افراد سرم مثبت، بیشتر و سطح آنتی بادی های سرمی آنها، بیش از ساکنین سایر مناطق است (۱۹ و ۱۲ و ۲۵).

این افراد، از یک سو، در معرض عفونت های مکرر و غیر آشکار کلینیکی قرار داشته و از سوی دیگر، از آنجا که آنتی ژن A60، یک نوع آنتی ژن مشترک بین گونه های است، لذا هرگونه آلودگی مکرر و شدید مایکوباکتریایی می تواند منشأ افزایش سطح این آنتی بادی ها بوده و به مثبت شدن نتیجه تست، منجر شود (۸ و ۱۶).

بنابر این بنظر می رسد باید با تغییر رقت و عدد آستانه، این تست را بر اساس شرایط منطقه ای و محیطی، تطبیق داده و سازگار نمود. ضمناً، عدم وجود ارتباط معنی دار در بین صاحبان مشاغل مورد بررسی، سطح تحصیلات، جنس، محل زندگی و سطح درآمد با آنتی بادی های مورد بررسی را می توان با تکرار این تحقیق، به نحوی که در هر گروه از متغیرها، تعداد بیشتری از نمونه ها قرار داده شوند، مجدداً مورد بررسی و ارزیابی قرارداد.

ما در این مطالعه، در هنگام انجام تست های آماری، سه گروه مثبت، منفی و مشکوک را لحاظ نمودیم. توصیه می شود این تست یک بار دیگر با گروه دیگری از اهدا کنندگان خون تکرار شود با این شرایط که برای دهندگان خونی که نتیجه تست آنها مشکوک می شود، چند هفته بعد مجدداً تست را تکرار نموده، مثبت یا منفی بودن نتیجه تست آنان مشخص شود و تست های آماری را بر روی دو گروه مثبت و منفی انجام دهند.

تشکر و قدردانی:

بدین وسیله از سرکار خانمها فریبا مؤذن، میترا محمدی و مینا محمدی که در انجام تستها همکاری نموده اند و همچنین جناب آقای محمود علی پورحیدری عضو محترم هیأت علمی آمارحیاتی دانشگاه علوم پزشکی قزوین، تشکر و قدردانی می نمایم.

این تحقیق، می تواند نتیجه مداخله این فاکتور محسوب گردد (۱۶). احتمال کسب نتایج مثبت کاذب در تست مورد استفاده در این مطالعه، در اکثر مطالعات یادشده، مورد تأکید قرار گرفته است. اویدیتی^۱ آنتی بادی های موجود در سرمهای مورد بررسی نیز می تواند منشأ اختلاف بین اعداد و ارقام بدست آمده در تحقیق های مختلف باشد. بعبارت دیگر، موارد مثبت بدون علائم بالینی در بیماران و در افراد سالم مستقر در نواحی با آندمی بالا^۲، ممکن است بعنوان مثبت کاذب و در بیماران، بعنوان منفی کاذب قلمداد شوند. این امر، احتمالاً نتیجه تماس با عامل عفونی یا تفاوت بسیار زیاد در اویدیتی سرمها می باشد (۱۵).

هر چند که فاصله زمانی کوتاه بین واکسیناسیون (با BCG) و مطالعه سرولوژیک نیز، با افزایش گذرای سطح آنتی بادی های سرمی، موجب مثبت شدن موقت نتیجه تست می شود (۸ و ۲۷)، ولی بایستی توجه داشت که در مطالعه حاضر، افراد واکسینه شده مورد بررسی، سابقه اخیر واکسیناسیون با BCG را نداشتند. عدم ملاحظه اختلاف معنی دار آماری بین آنتی بادی های IgG و IgM سرمی با دو گروه واکسن زده و واکسن نزده مورد بررسی در این تحقیق نیز، تأثیر واکسیناسیون قدیم (با BCG) در نتیجه تست الایزا را رد می کند.

بعبارت دیگر، وجود سابقه واکسیناسیون (با BCG) در سالهای دور و یا عدم وجود سابقه واکسیناسیون، تأثیری بر نتایج این تست ندارد. زوو و روتا در سال ۱۹۹۴، نشان دادند که چنانچه افراد مورد بررسی، سابقه اخیر واکسیناسیون با BCG را داشته باشند، بسته به زمان واکسیناسیون، تیترا آنتی بادی IgG، IgM و یا هر دو آنها، در دو گروه واکسن زده و واکسن نزده متفاوت خواهد بود (۲۷ و ۴). از سوی دیگر، در سال ۱۹۹۲، جوودان و همکارانش در ایتالیا، در بررسی مشابهی نشان دادند که این تست، در افراد سالم با سابقه قدیم واکسیناسیون و افراد بهبود یافته از عفونت سلی، منفی می گردد (۲).

در مطالعه میز و همکارانش، اکثر سرمهای اهدا کنندگان خون، زمانی که با رقت ۱:۱۰۰ تست می شدند، از نظر آنتی بادی IgM ضد آنتی ژن A60، مثبت بودند ولی از میزان موارد مثبت کاذب همین سرمها، هنگامی که تا حد ۱:۴۰۰ رقیق شدند، به میزان بسیار زیادی کاسته شد و فقط دو مورد از آنها، مثبت باقی ماند. این محقق، چنین نتیجه گیری می کند که در مناطق اندمیک، بمنظور اجتناب از حصول نتایج مثبت (کاذب) در سرم

¹ - avidity

² - high endemic

References:

- 1- Al hajjaj MS, Gad-el-Rab MO, al Orainey IO, et al. Improved sensitivity for detection of tuberculosis cases by a modified Anda-TB ELISA test. *Tuber Lung Dis* 1999; 79(3):181-5.
- 2- Gevaudan MJ, Bollet C, Charpin D, et al. Serological response of tuberculosis patients to antigen 60 of BCG. *Eur J Epidemiol* 1992; 8(5):666-76.
- 3- Cocito CG. Properties of the mycobacterial antigen complex A60 and its applications to the diagnosis and prognosis of tuberculosis. *Chest* 1991; 100(6):1687-93.
- 4- Zou YL, Zhang JD, Chen MH, et al. Serological analysis of pulmonary and extrapulmonary tuberculosis with enzyme-linked immunosorbent assays for anti- A60 immunoglobulins. *Clin Infect Dis* 1994; 19(6): 1084-91.
- 5- Delacourt C, Gobin J, Gaillard JL, et al. Value of ELISA using antigen 60 for the diagnosis of tuberculosis in children. *Chest* 1993; 104(2): 393-8.
- 6- Schluger NW, Rom WN. Current approaches to the diagnosis of active pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149(1): 264-7.
- 7- Sieminska A, Wolska-Goszka L, Slominski JM. Evaluation of the correlation between the level of IgG antibodies against mycobacterial A60-antigen and tuberculin reactivity in persons without a history of tuberculosis and in active pulmonary tuberculosis patients. *Pol Arch Med Wewn* 1998; 100(5):426-430.
- 8- Maes R, Homasson JP, Kubin M, et al. Development of an enzyme immunoassay for the serodiagnostic of tuberculosis and mycobacterioses. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 1989; 178(6): 323-35.
- 9- Sieminska A, Wolska-Goszka L, Slominski JM. Humoral immune response against A60 antigen from tuberculosis expectoration and the clinical and radiologic state of patients with with pulmonary tuberculosis. *Pneumonol Alergol Pol* 1999; 67(1-2): 28-37.
- 10- Wang FD, Su WJ, Jang TN, et al. Serological evaluation for tuberculosis by antigen 60 IgG ELISA test. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)* 1994; 54(5): 300-5.
- 11- Kardjito T, Handoyo I, Grange JM. Diagnosis of active tuberculosis by immunological methods. 1. The effect of tuberculin reactivity and previous BCG vaccination on the antibody levels determined by ELISA. *Tubercle* 1982; 63(4): 269-74.
- 12- Balestrino EA, Daniel TM, de Latini MD, et al. Serodiagnosis of pulmonary tuberculosis in Argentina by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of IgG antibody to Mycobacterium tuberculosis antigen 5 and tuberculin purified protein derivative. *Bull World Health Organ* 1984; 62(5): 755-61.
- 13- Biswas J, Narain S, Roy S, et al. Evaluation of lymphocyte proliferation assay to purified protein derivative, enzyme linked immunosorbant assay, and tuberculin hypersensitivity in Eales' disease. *Indian J Ophthalmol* 1997; 45(2): 93-7.
- 14- Bogers WM, Stad RK, van Es LA, et al. Immunoglobulin A: interaction with complement, phagocytic cells and endothelial cells. *Complement Inflamm* 1991; 8(5-6): 347-58.
- 15- Maes R. Clinical usefulness of serological measurements obtained by antigen 60 in mycobacterial infections: development of a new concept. *Klin Wochenschr* 1991; 69 (15): 696-709.
- 16- Qadri SM, Smith KK. Nonspecificity of the Anda A60-tb ELISA test for serodiagnosis of mycobacterial disease. *Can J Microbiol* 1992; 38(8): 804-6.
- 17- Saz JV, Ladron de Guevara MC. [IgG against A60 antigen and the tuberculin test in healthy individuals and tubercular patients]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1992; 10(8): 477-80.
- 18- Gupta S, Kumari S, Banwalikar JN, et al. Diagnostic utility of the estimation of mycobacterial Antigen A60 specific immunoglobulins IgM, IgA and IgG in the sera of cases of adult human tuberculosis. *Tuber Lung Dis* 1995; 76(5): 418-24.
- 19- Gupta S, Bhatia R, Datta KK. Serological diagnosis of childhood tuberculosis by estimation of mycobacterial antigen 60-specific immunoglobulins in the serum. *Tuber Lung Dis* 1997; 78(1): 21-7.
- 20- Luh KT, Yu CJ, Yang PC, et al. Tuberculosis antigen A60 serodiagnosis in tuberculous infection: application in extrapulmonary and smear-negative pulmonary tuberculosis. *Respirology* 1996; 1(2): 145-51.
- 21- Perez JA, Moreno JJ, Aguyo A, et al. Evaluation in our milieu of an ELISA method (ANDA-Tb) for the serological diagnosis of tuberculosis]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1990; 8(5): 289-92.
- 22- Sieminska A, Wolska-Goszka L, Slominski JM. Measuring of the level of IGG antibodies against mycobacterial A60 antigen in the differential diagnosis of lung tumors. *Pol Merkuriusz Lek* 2000; 7(43): 31-3.
- 23- Gutierrez FJ, Alados Arboledas JC, Garcia GF, et al. IgG antibody levels to mycobacterial antigen 60 in a healthy population of the province of Granada. *Rev Clin Esp* 1990; 187(8): 381-2.
- 24- Abou-Zeid C, Harboe M, Sundsten B, et al. Cross-reactivity of antigens from the cytoplasm and cell walls of some corynebacteria and mycobacteria. *J Infect Dis* 1985; 151(1): 170-8.
- 25- Maes R. Incidence of inapparent active mycobacterial infections in France detected by an IgG serological test based on antigen 60. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 1989; 178(6): 315-21.
- 26- Chiang IH, Suo J, Bai KJ, et al. Serodiagnosis of tuberculosis. A study comparing three specific mycobacterial antigens. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156(3 Pt 1): 906-11.
- 27- Rota S, Beyazova U, Karstligil T, et al. Humoral immune response against antigen 60 in BCG-vaccinated infants. *Eur J Epidemiol* 1994; 10(6): 713-8.