موضوع:

شناخت خصوصیات افتراقی و تکنیکهای تشخیص آزمایشگاهی میکروب سل

تهیه وتنظیم

دکترحجت الله جعفری

کارشناس شبکه دامپزشکی شهرستان بم

زمستان۱۳۹۸

مقدمه:

قبل از شروع مبحث اصلی، توضیحاتی درخصوص خصوصیات وقابلیتهای مایکوباکتریومها در مقابل سیستم ایمنی بدن شرح داده می شود:

مایکوباکتریومها ، باکتریهای میله ای اسیدفاست می باشند واین باکتریها هوازی اجباری (**Obligate aerobes**) می باشند این گونه باکتریها بسیار آهسته رشد می کند کلونی آنها به علت هیدروفوبیک لیپیدهایش با هم توده هایی تشکیل می دهند در روند بیماری زایی این باکتری عمدتاً عوامل ذیل سهیم می باشند و قبل از شرح آنها مطلوب است با اصطلاحات ذیل آشنا شویم:

چربیها که شامل:

اسید مایکولیک ومایکوزیدها: اسید مایکولیکها درواقع یک اسید چرب بزرگ می باشند و مایکوزیدها از پیوند یک مایکولیک اسید به یک کربوهیدرات (یک گلیکولیپید) تشکیل شده اند.

فاکتور طنابی: یک مایکوزید است که ازپیوند دو مایکولیک اسید با یک، دی ساکارید ایجاد می شود. این مایکوزید تنها درگونه های بیماری زای مایکوباکتریوم توبرکلوزیس یافت می شود. حضوراین فاکتور سبب رشد موازی باکتری هامی شود و بنابراین باکتریها به صورت طناب هایی مشاهده می گردند.

سولفاتید: مایکوزیدهایی هستند که به علت سولفات متصل به دی ساکاریدبه فاکتور طنابی شباهت دارد سولفاتیدها از ترکیب شدن فاگوزوم با لیزوزوم که حاوی آنزیم های باکتریسیدال هستند ممانعت بعمل می آورند.

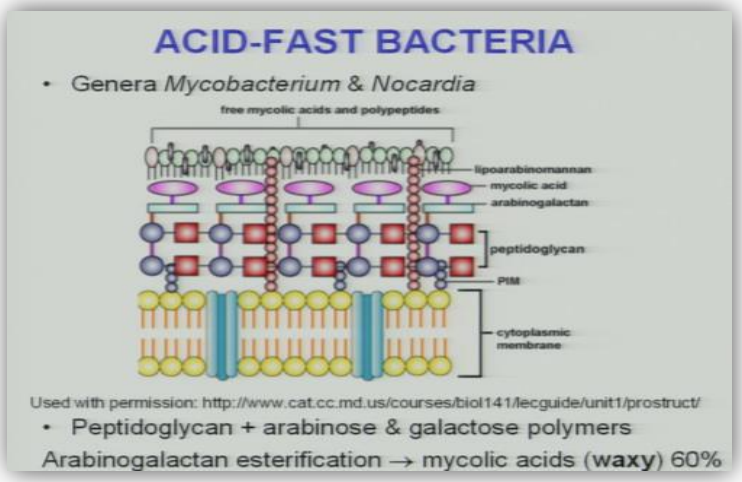
واکسD: یک مایکوزید، پیچیده است که به عنوان یک ادجوانت عمل می کند (موجب افزایش تولید آنتی بادی دربرابر آنتی ژن می شود) وممکن است بخشی از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس باشد که سیستم ایمنی دفاعی سلول رافعال می کند.

فسفولیپیدها در ایجاد نکروز پنیری (caseation necrosis) نقش دارند. فاکتور طنابی (cord factor) توسط سویه های بیماریزای مایکوباکتریوم توبرکلوزیس تولید می شود و باعث می شود باسیل سل به شکل زنجیره های موازی دیده شوند .فاکتور طنابی (ترهالوز دی میکولات) از مهاجرت گلبول های سفید جلوگیری می کند و در ایجاد گرانولوم های مزمن نقش دارد.

پروتئین ها : باکتری سل چند نوع پروتئین تولید می کند. این پروتئین ها در ازدیاد حساسیت تاخیری نقش دارند. آن ها موجب واکنش توبرکولین می شوند. تست پوستی توبرکولین، یکی از روش های تشخیص بالینی سل است .

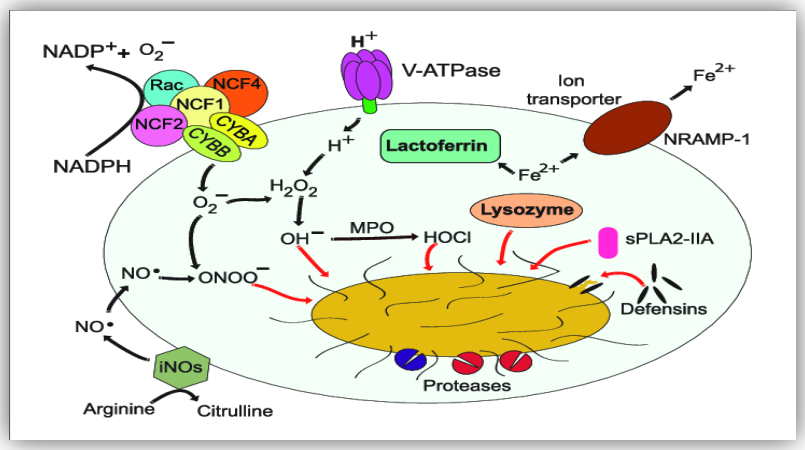
قندها (پلی ساکاریدها : باکتری دارای انواع مختلفی از پلی ساکاریدها است. این پلی ساکاریدها نیز در ازدیاد حساسیت میکروب نقش دارند مانند آرابینوگالاکتان و آرابینومانان.

ساختار دیواره سلولی وغشایی مایکوباکتریوم

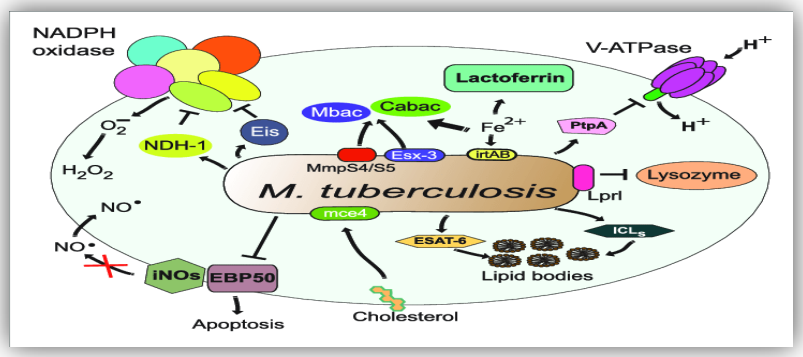


*مایکوباکتریومها مانع از اسیدی شدن فاگوزوم می شوند.آنها این عمل را با جلوگیری از اتصال آنزیمی **ATPase** پمپ پروتونی به غشاء واکائول انجام می دهند.

نحوه مقابله ماکروفاژهابا عوامل بیگانه



نحوه آسیب رسانی ماکروفاژها توسط مایکوباکتریومها (غیرفعالسازی پمپ H/ATP)



*یکی ازمهمترین عوامل ذاتی که درتوفیق شکست تهاجم باکتریها تاثیر دارد سطح آهن مایعات بدن است که بسیاری از باکتریها ازجمله استافیلوکوکوس آرئوس ، اشرشاکلی،پاستورلا مولتوسیدا ومایکوباکتریوم توبرکلوزیس برای رشد نیاز به آن دارند به دنبال تهاجم باکتری جذب روده ای آن متوقف می شود واینترلوکین یک تولید شده از ماکروفاژها، سلولهای کبدی را وادار به ترشح ترانسفرین وهاپتوگلوبین می کندو موجب الحاق زیاد آهن به کبد شده واین امر دسترسی باکتری به آهن را کاهش داده واز تهاجم باکتری جلوگیری می کند. علی رغم این محدودیتها برخی باکتریها مانند **مایکوباکتریوم توبرکلوزیس** واشرشیا کلی به دلیل تولید **پروتئینهای قوی قابل اتصال به آهن** می توانند به بدن حمله کنند،چون توسط آنها آهن از پروتئینهای سرم گرفته وآن ر دراختیار باکتری قرار می دهد. وقتی سطح آهن سرم افزایش می یابد (آنمی همولیتیک) حیوانات به عفونت باکتریها حساس تر می شوند.

تقسیم بندی مایکوباکتریومها

بر اساس طبقه بندی رانیون مایکوباکتریوم ها در دو گروه اصلی تند رشدها و کند رشدها قرار می گیرند .براساس این تقسیم بندی کند رشدها به بیش از ۷ روز زمان برای رشد بر روی محیط جامد نیاز دارند .هم چنین، مایکوباکتریوم ها بر اساس تولید پیگمان رنگی به دو گروه بدون پیگمان (**Non-chromogens**) و دارای پیگمان (زرد تا نارنجی و ندرتا صورتی)تقسیم می شوند.

مایکوباکتریوم هایی که توانایی تولید پیگمان در حضور نور و آنهایی (**Photochromogens**) را دارند، فتوکروموژن که توانایی تولید پیگمان در حضور نور یا تاریکی را دارند اسکوتوکروموژن (**Scotochromogens**)نامیده می شوند.

کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس که شامل مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، مایکوباکتریوم بوویس، مایکوباکتریوم آفریکانوم، مایکوباکتریوم میکروتی و مایکوباکتریوم لپره‌است.

مایکوباکتریوم های غیر از عوامل یاد شده عموماً تحت عنوان مایکوباکتریوم های محیطی، آتپیک یا غیر توبرکلوزیس نامیده می شوند که اغلب به صورت ساپروفیت در منابع محیطی نظیر آب، خاک و ذرات گرد و غبار موجود در هوا آئروسل ها (حضور داشته و بسیاری از آنها باعث ایجاد بیماری در انسان، حیوانات و پرندگان می شوند.

Fig. 1. Mycobacteria classification

Mycobacterium tuberculosis complex	Nontuberculous mycobacteria (NTM)	
M. tuberculosis	**Non-cultivable**	
M. bovis/BCG	*M. leprae*	*M. lepromatosis*
M. africanum	**Slow-growing—nonchromogens**	
M. caprae	*M. avium* complex	*M. haemophilum*
M. canettii	**Slow-growing—photochromogens**	
M. microti	*M. kansasii*	*M. marinum*
M. mungi	**Slow-growing—scotochromogens**	
M. orygis	*M. gordonae*	*M. xenopi*
	Rapid growing	
	M. chelonae	*M. abscessus*
	M. fortuitum	*M. smegmatis*

MTB complex	NTM (slowly growing)	NTM (rapidly growing)
Mycobacterium tuberculosis	*Mycobacterium avium* complex*	*Mycobacterium chelonae*
Mycobacterium bovis	*Mycobacterium ulcerans*	*Mycobacterium abscessus*
Mycobacterium africanum	*Mycobacterium marinum*	*Mycobacterium smegmatis*
Mycobacterium microti	*Mycobacterium kansasii*	*Mycobacterium massiliense*
Mycobacterium canetti	*Mycobacterium gordonae*	*Mycobacterium fortuitum* complex
	Mycobacterium scrofulaceum	

*Comprising *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*.
MTB, *Mycobacterium tuberculosis*; NTM, non-tuberculous mycobacteria.

رنگ آمیزی زیل نلسون

اسید فاست به معنای مقاومت در مقابل رنگ بری با یک رنگ بر اسیدی می باشد. این خاصیت در باکتریها بسیار نادر است و فقط باکتریهای جنس مایکوباکتریوم و بعضی گونه های جنس نوکاردیا ، اسید فاست هستند. استافیلوکوکوس اپیدرمیس را هم می توان جزء باکتریهای اسید فاست دانست.

بطور کلی در دیواره سلولی باکتریهای اسید فاست مقدار چربی بسیار زیاد است (خصوصا در مایکوباکتریومها) و آنها مقادیر نسبتاً زیادی مواد چربی ، مثل اسیدهای چرب ، مومها و چربیهای پیچیده دارند. دیواره سلولی این ارگانیسمها شبیه موم بوده بنابراین نسبتا غیر قابل نفوذ هستند. این نفوذ ناپذیری در برابر مواد ضد عفونی کننده هم به این باکتریها مقاومت بیش از حدی می دهد. همچنین آنها را در برابر خشک شدن مقاوم می کند و برای مدتهای طولانی می توانند در خلط یا دیگر مایعات خشک شده بدن باقی بمانند. ولی باسیل سل توسط پاستوریزاسیون و سترون سازی عادی توسط حرارت با آسانی از بین می رود.

دراین رنگ آمیزی بخاطر وجود دیواره سلولی نفوذ ناپذیر مومی ، برای نفوذ دادن رنگ اولیه که کربول فوشین می باشد انجام اقدامات ویزه ای ضروری میباشد. رنگ اولیه همراه با فنل ۵٪ مایع (اسید کربولیک) تهیه می شود تا نفوذ با یاخته تشدید شود. حرارت هم بعنوان یک عامل نفوذ دهنده در اینجا بکار می رود . همینکه رنگ به دیواره سلولی نفوذ کرد ، سلول باکتری بخاطر خاصیت اسید فاست بودن ، علی رغم بکار بردن رنگ برهای قوی رنگ خود را حفظ می کند . سلولها اسید فاست رنگ اولیه را حفظ می کنند و در زیر میکروسکوپ برنگ قرمز دیده می شوند . در صورتیکه میکروبهای غیر اسید فاست رنگ ثانویه را جذب کرده و به رنگ آبی در می آیند.

۱- یک گسترش ضخیم و یکنواخت از نمونه تهیه و آن را در هوا خشک کرده و سپس توسط شعله فیکس نمایید.

۲- یک کاغذ صافی به ابعاد ۲*۴ سانتی متر یا کمی کوچکتر از لام فراهم کنید.این کاغذ بایستی اسمیر (گسترش) را بپوشاند تا از رسوب رنگ روی جلوگیری کند .

۳- تمام سطح گسترش را با کربول فوشین (رنگ بازی) زیل نلسون بپوشانید و به آرامی از سطح زیرین لام توسط شعله حرارت دهید.در زمان حرارت دادن لام بایستی میزان حرارت آنقدر باشد که سطح لام فقط بخار بلند شود و نبایستی رنگ روی لام بجوشد و یا خشک شود در صورتی که به علت حرارت و بخار شدن رنگ میزان رنگ کاهش یابد می توان مجددا روی لام رنگ اضافه کرد

۴- زمان تأثیر رنگ روی گسترش ۵ دقیقه است بعد از آن کاغذ را برداشته و لام را با آب بشویید .

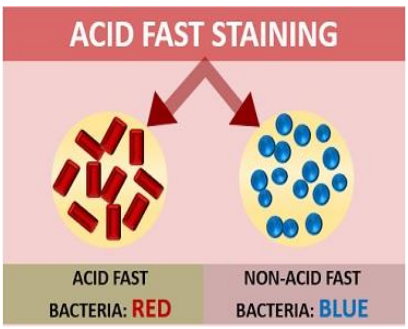
۵- توسط اسید الکل رنگ زدایی کنید یا از محلول مزبور آنقدر روی لام قطره قطره می ریزند تا آخرین قطره خارج شده از روی لام شفاف

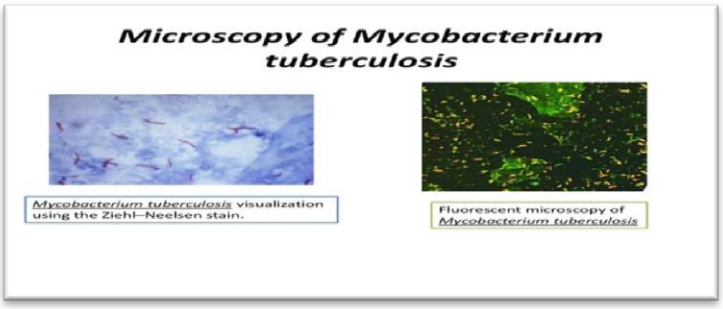
باشد.

۶- از رنگ آبی متیلن به مدت ۳۰ تا ۶۰ ثانیه روی گسترش بریزید.

۷- لام را شسته در هوا خشک کنید و با عدسی روغنی به مطالعه پردازید .

در این رنگ آمیزی باکتری سل به صورت باسیل ظریف و قرمز رنگی در زمینه آبی مشخص می شود.





تکنیک تحریک پذیری لنفوسیتها:

قبل از شرح این تکنیک مطلوب است درابتدا با سلولهای ، خاطره ای آشنا شویم:

هنگامی که سلولهای ، با تولید سلولهای عمل کننده به آنتی زن پاسخ می دهند سلولهای خاطره ای ایجاد می شوند. وجوه تمایز سلولهای ، خاطره با سلولهایی که قبلاً با آنتی ژن برخورد نداشتند شامل:

۱- **وجود مولکولهای مختلف سطح آن**

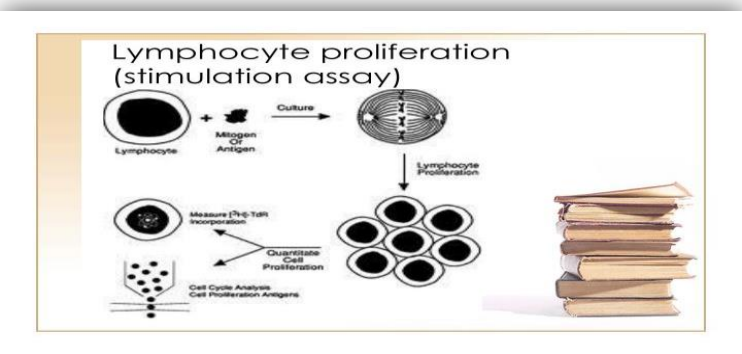
۲- **ترشح تعدادی از سیتوکینهای خاص واختلافاتی است که درنیاز آنها برای فعال شدن وجود دارد.**

ماهیت سلولهای ، خاطره ای هنوز مورد بحث است. براساس یک نظریه ، سلولهای ، خاطره ای، سلولهای با عمر طولانی هستند که درغیاب آنتی ژن به صورت تقسیم نشده باقی می مانند.وبراساس نظریه دیگری خاطره طولانی مدت ، نتیجه تحریک مداوم سلولهای T توسط آنتی ژن پایدار است.

می دانیم که درپاسخ های سلول T به دنبال مواجهه با آنتی ژن، تعداد سلولهای T اختصاصی آنتی ژن ۵ تا۱۰۰ برابر افزایش می یابد. سلولهای Tخاطره ای ازنظر کیفیت نیز برترند. برای مثال آنها مقادیر بیشتری مولکولهای چسبندگی ایجاد می کنند و محکم تر به سلولهای عرضه کننده آنتی ژن می چسبند. سلولهای Tخاطره ای، اینترلوکین چهار واینترفرون گاما بیشتری تولید کرده وبه نظر می رسد که به تحریک TCR پاسخ قویتری می دهند.وپاسخ های برتر به علت حضور رسپتورهای اینترلوکین دو با تمایل بیشتراست.

*برای اندازه گیری تکثیر سلولهای T درپاسخ به یک آنتی ژن، تعلیقی از لنفوسیتهای خالص خون محیطی حیوان را با آنتی ژن مخلوط کرده وبه مدت ۴۸تا۹۶ ساعت کشت می دهند. دوازده ساعت پیش از برداشت سلولها، تیمیدین نشان دار شده با ایزوتوپ رادیواکتیو تری تیوم به محیط کشت اضافه می شود . لنفوسیتهای طبیعی که درحال تقسیم نیستند تیمیدین را جذب نمی کنند اما سلولهای درحال تقسیم به علت آنکه فعالانه درحال ساختن DNA هستند آن را جذب می نمایند. حال اگر سلولها درحال تکثیر باشند، تیمیدین فوق را جذب کرده ودرنتیجه میزان رادیواکتیویتی سلولهای شسته شده میزان تکثیر رانشان خواهد داد. هرچه پاسخ سلولها به آنتی ژن بیشتر باشد، میزان رادیواکتیویتی بیشترخواهد بود. نسبت رادیواکتیویتی درکشت تحریک یافته به رادیواکتیویتی در کشت شاهد، شاخص تحریک نامیده می شود.

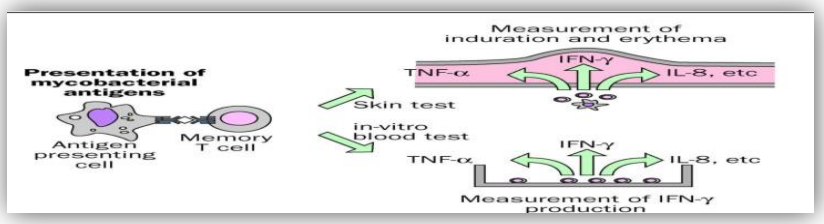
دربرخی موارد از سنجش آنزیمی رنگ سنجی ساده به جای کاربرد تری تیوم رادیواکتیو استفاده شده است. متیل تیازول دی فنیل تترازولیوم بروميد(MTT) سوبسترای آنزیم میتوکندریایی فعال است. درچنین واکنشی رنگ آن از زرد روشن به آبی تیره تغییر می یابد.

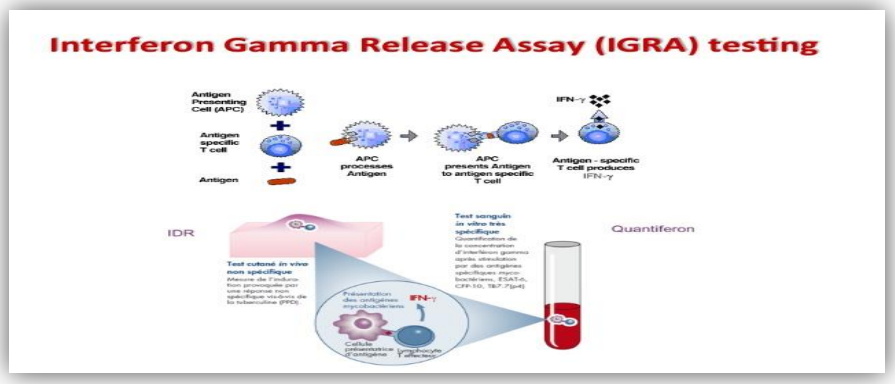


تست سنجش اینترفرون گاما:

دراین روش اندازه گیری سایتوکینهای آزاد شده توسط سلولهای T است. دریکی ازاین تکنیکها میزان آزادی اینترفرون گاما توسط لنفوسیتهای خون محیطی هنگام مواجهه با توبرکولین اندازه گیری می شود واین تکنیک به عنوان جایگزینی برای آزمایش توبرکولین به منظور تشخیص سل در گاو تکوین یافته است . دراین روش ، توبرکولین (P.P.D) به خون هپارینه اضافه شده ومخلوط ۲۴ تا۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری می شود. سپس پلاسما را جداکرده وحضور اینترفرون درآن سنجیده می شود. برای این کار از یک سنجش پیولوژیک ساده ویا ترجیحاً از یک روش ساندویچ الایزا با استفاده از آنتی بادیهای مونوکلنال استفاده می کنند علاوه بر شاهد منفی (بدون آنتی ژن) ، از **PPD** مایکوباکتریوم بویس و **PPD** مایکوباکتریوم آویوم به عنوان شاهد مثبت استفاده می کنند. **PPD** مرغی برای تشخیص واکنشهای متقاطع که سبب ایجاد مثبت کاذب می گردند، استفاده می شود.

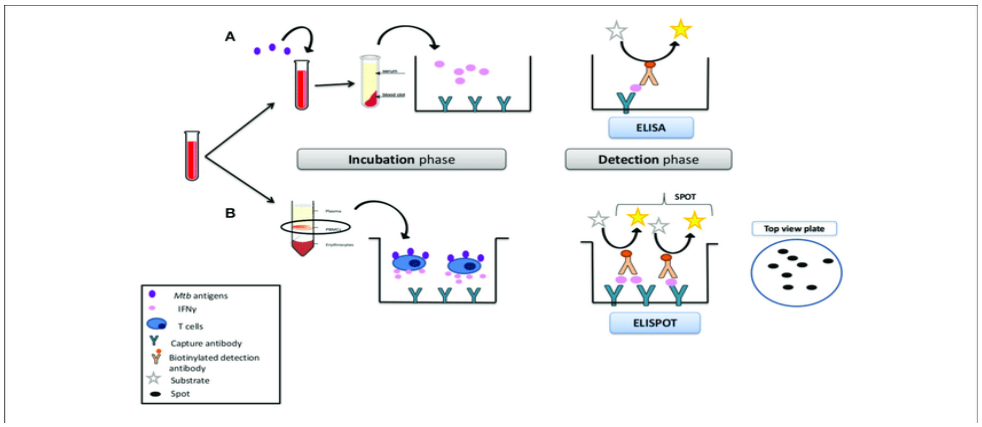
این تکنیک نسبت به آزمایش توبرکولین معمول ترجیحاتی دارد ازجمله آنکه وضعیت ایمنی میزبان مورد آزمایش با تزریق آنتی ژن دچار مخاطره نمی شود. علاوه بر این مجبور نیستیم جهت قرائت نتایج آزمایش حیوان را چند روز نگه داریم. همچنین این روش از دیگر سنجشهای آزمایشگاهی ایمنی سلولی تر، ساده تراست حساسیت این روش حداقل به اندازه آزمایش واحد داخل جلدی(**SID**) است.واز ویژگی بالایی نیز برخوردار است.





توضیحات: تکنیک ایمونواسپات:

این آزمون درسال ۲۰۰۸ میلادی توسط FDA مورد تایید قرار گرفت این تست اندکی پیچیده تر از روش قبلی است. برای انجام این آزمون درابتدا سلولهای تک هسته ای ازخون محیطی با روش سانتریفیوژگرادیان جداشده سپس شسته وشمارش می شوند ودرپلیتهای ۹۶ خانه ای با آنتی ژم مربوط مثلا درسل انسانی(ESAT-۶ و CFP-۱۰ و RV۳۸۹۷c) برای ۱۶ تا ۲۰ ساعت انکوبه می شوند. در صورتیکه اینترفرون گامادر پاسخ به این آنتی ژن ترشح شود توسط anti IFN-gamma که درکف پلیت وجود دارد به دام می افتد. درمرحله بعد anti IFN-gamma دوم که وصل به یک آنزیم است به مجموعه اضافه می شودودرحقیقت اینترفرون گاماتولید شده توسط سلولهای T بین دو anti IFN-gamma به دام می افتد.سپس توسط آنزیم متصل به آنتی بادی دوم واکنش رنگی صورت می گیرد ونقطه های قابل رویت ایجاد می شود که توسط دستگاه خوانشELISPOT یا لنز بزرگنمایی شمارش می شود وهرنقطه سیاه به منزله یک سلول T ضد مایکوباکتریوم توبرکلوزیس است زمانی که اختلاف تعداد نقطه ها درنمونه بیمار با نمونه کنترل منفی از تعداد خاصی بیشتر باشد نتجه آزمون مثبت درنظر گرفته می شود وقالبل ذکراست حساسیت این روش اندکی از روش کوآنتی فرون بیشتر است.



Interferon-gamma-based in vitro assays (IGRA). (A) Mycobacterium tuberculosis IFN-γ-release assay. In the ELISA method (QuantiFERON®-TB Gold In-Tube Test; Quest Diagnostics, USA), whole blood is stimulated with M. tuberculosis antigens, and the amount of IFN-γ secreted into the supernatant is quantified by ELISA. (B) In the ELISPOT method (T-SPOT.TB; Oxford Immunotec, UK), PBMCs are prepared by density gradient centrifugation (Ficoll method). A defined number of cells is then stimulated with M. tuberculosis antigens for ۲۴ h on plates coated with anti-IFN-γ antibodies. Antigen-responsive cells secrete IFN-γ, which binds to these antibodies. After removal of the cells, antigens are detected by a second labeled anti-IFN-γ antibody. The number of spots on the plate corresponds to the number of IFN-γ+ cells in the sample

منابع:

۱- **کتاب ایمنی شناسی تیزارد**

۲- **بررسی توانایی تست کواینترفرون گاما درتشخیص سل نهفته: دکترهاشمی شهری وهمکاران**

۳- **مروری بر روشهای تشخیص ایمونولوژیک عفونت سل: مهسا جعفری ورضا منصوری**

تکنیک رادیومتری:

در سی سال گذشته بسیاری از شرکتها ، به منظور بهبود کیفیت کشت خون، اقدام به تهیه انواع مختلف سیستمهای اتوماتیک کشت خون کرده اند. دراین سیستمها به دلیل استفاده ازمحیط کشتهای اختصاصی، حساسیت افزایش یافته وعوامل پاتوژن حتی در تعداد کم نیز قابل شناسایی هستند. انواع گوناگونی از این سیستمهای اتوماتیک به اختصار توضیح داده می شود.

دراولین سیستم اتوماتیک کشت خون است که پیش سازهای متابولیکی نشان دار شده با کربن ۱۴ دراتمسفر محیط کشت استفاده می گردد. با رشد میکروارگانسمها، CO_2 نشاندار با کربن۱۴ دراتمسفر محیط کشت آزاد شده وبصورت دوره ای اندازه گیری می شود.وسپس بطری های

کشت خون که افزایش مقدار CO_2 نشاندار رانشان دهند برای رنگ آمیزی گرم وپاساژ روی محیط های مناسب وشناسایی عامل میکروبی مورد آزمایش قرار می گیرند. مدل ۴۶۰ این سیستم بصورت گسترده ای برای جداسازی مایکوباکتریوم مورد استفاده قرار گرفته است.

در برخی سیستمهای این تکنیک یک سنسور درکف هر بطری کشت خون وجود دارد که توسط یک غشای نیمه تراوا ازمحیط کشت جدا می شود. این غشاء نسبت به اکثر یونها ازجمله یون هیدروژن وترکیبات محیط کشت وخون واجزای آن غیر قابل نفوذ است اما به CO_2 اجازه عبور می دهد. با رشد میکروارگانیسمها ، CO_2 تولید می شود که باعبور ازاین غشاء با آبی که درسنسور است ایجاد H_2CO_3 وتولید یونهای هیدروژن می کند. و با ایجاد یونهای هیدروژن وکاهش PH سنسور تغییر رنگ داده وآبی- سبز می شود وباعث افزایش بازتاب نور قرمز می گردد واین نور توسط یک دیود تولید وتوسط یک فتودیود جذب ویک سیگنال ولتاژی ایجاد می شود که این سیگنالها پس ازفیلتر توسط یک میکرو کامپیوتر آنالیز می گردند.

تکنیک الیزا و آنتی بادی مونوکلونال:

قبل از شروع بحث اصلی با برخی آنتی ژن های اصلی مایکوباکتریوم بویس آشنا شویم:

***پروتئین های شوک حرارتی:** پروتئین زیادی در اثر استرس هایی نظیر افزایش درجه حرارت، گرسنگی، برخورد با رادیکال های اکسیژن توکسینهایی مثل فلزات سنگین، مهارکننده های ساخت پروتئین وعفونت ویروسی درسلول تولید می شوند.

پروتئین های شوک حرارتی شناخته شده ترین این پروتئین های جدید است در درجه حرارت معمولی مقدار بسیار کمی از HSP ها در همه ارگانیسم ها وجود دارد. استرس متوسط نظیر تب مختصر تولید HSP و افزایش قابل توجه مقدار آن می شود.

عمدتاً سه پروتئین شوک حرارتی اصلی در باکتری ها وجود دارد : HSP۹۰، HSP۷۰ و HSP۶۰

وقتی یک باکتری درسلول های بیگانه خوار و درنوتروفیل ها وارد ودر نوتروفیل ها با انفجار تنفسی روبرو شد. استرس موجب تولیدHSP باکتری می شود. HSP۶۰ درعفونت با مایکوباکتریوم ها، کوکسیلا بورنتی، لژیونلا، تریپونما وبورلیا ایجاد می شود. این HSP ها آنتی ژن غالب بوده و به شدیداً قدرت آنتی ژنی دارند. یکی از اپی توپهای مشهور درمایکوباکتریوم بویس HSP۶۵ است که این آنتی ژن جز اصلی آنتی ژنیک PPD است که در تست حساسیت پوستی از آن استفاده می شود.

*** پروتئین MPB۷۰ :** درسل گاوی ، اکثریت حیوانات دارای پادتن ضد پادگن **MPB۷۰** هستند. این پادگن یک پروتئین ۴۶ کیلودالتونی است که به وفور درکشت مایکوباکتریوم بویس وجود دارد.

پادتنهای ضد، **MPB۷۰** ، پنج ماه پس از آلوده کردن آزمایشی گاوها به مایکوباکتریوم بویس، ظاهر می شوند. (درصورتی که درپاسخ به M.avian وM.paratuberclosis ظاهر نمی شوند) و سطح این پادتن ها بدنبال تست پوستی با PPD که حاوی پادگن MPB۷۰ است بوضوح افزایش می یابد.

مطالب فوق براساس مقاله: آزمایشات سرولوژیکی برای تشخیص سل وجذام : ترجمه: دکترهمایون شمس(عضو هیات علمی موسسه تحقیقاتی رازی)

نکته مهم: مقاله ذیل درخصوص روش الیزا با آنتی ژنهای مایکوباکتریوم بویس می باشد:

ELISA using a recombinant chimera of ESAT-٦/MPB٧٠/MPB٨٣ for Mycobacterium bovis diagnosis in naturally infected cattle

***پروتئین ۳۸KDa :** این پروتئین به عنوان ایمنی زاترین پادگن دربیماران مبتلا به سل ریوی وهمچنین مبتلایان به سل غیر ریوی که کشت خلط آنها مثبت است، شناخته شده است. قابل ذکراست ردیفهای این آنتی ژن مشابه ژن PHOS در باکتری E.Coli می باشد.

به عنوان برجسته ترین پادگن ایمنی زا درتشخیص سرمی سل انسانی در تست الیزا محسوب می شود.

مطالب فوق براساس مقاله: آزمایشات سرولوژیکی برای تشخیص سل وجذام : ترجمه: دکترهمایون شمس(عضو هیات علمی موسسه تحقیقاتی رازی)

***نکته ای خارج از مطلب اما جالب:** واکسن سویه BCG(باسیل کالمت وگرن) مایکوباکتریوم بویس، با ۱۳ سال کشت روی محیط غنی از صفرا حدت خود را از دست داده است. این سویه جهت ساخت واکسن انسانی به کار می رود. (**براساس کتاب ایمنی شناسی تیزارد**)

تکنیک ساخت آنتی بادی مونوکلونال:

در محیط کشت‌خارج از بدن به‌طور طبیعی لنفوسیت‌های B (تولیدکننده پادتن‌ها) در طی چند هفته می‌میرند. به همین علت این لنفوسیتهای B با سلول‌های B توموری که سلول‌های میلوم نامیده می‌شوند، ادغام می‌شوند. این سلول‌های میلوم مانند بقیه سلول‌های سرطانی قادر هستند که نامحدود تقسیم شوند و به سلول‌های نامیرا معروف گردند. این رده سلولی نامیرا که ادغامی از لنفوسیتهای B و سلول‌های میلوم هست، یک رده سلولی هیبریدی نامیده می‌شود که خصوصیات هر دو سلول ادغام شده را داراست .

هیبریدی قادر هستند که خارج از بدن In vitro نامحدود تکثیر و پادتن تولید کنند .برای اینکه پادتن‌های تک تیره تولید شوند، باید یک حیوان (به‌طور معمول موش) با آنتی ژن مورد نظر در تماس قرار گیرد و بدن جاندار شروع به ایمن‌سازی کند. در طی چند هفته متوالی سلول‌های B اختصاصی آنتی ژن شروع به تکثیر و ترشح پادتن‌های اختصاصی می‌کنند. بافت طحال که مملو از لنفوسیتهای B است از موش استخراج شده و لنفوسیت‌های B جدا شده با سلول‌های میلوم ادغام می‌شوند .

با وجودی که بسیاری از سلول‌ها در محیط کشت قادر به ادغام شدن و تکثیر هستند، تنها میزان بسیار کمی ار آن‌ها (سلولهای هیبریدی تولیدکننده پادتن) قادر به بقا هستند. روش تشخیص سلول‌های هیبریدی از سلول‌های دیگر به این صورت است که به محیط کشت هیپوکسانتین، آمینوپترین و تیمیدین (HAT) افزوده می‌شود. این محیط کشت اختصاصی از رشد سلول‌های میلوم ادغام نشده جلوگیری می‌کند چرا که این سلول‌ها قادر نیستند از هیپوگزانتین و تیمیدین به خاطر آمینوپترین که یک بلوک‌کننده متابولیکی است، استفاده کنند .

پادتن‌های تک‌تیره معمولاً از سلول‌های لقاح شده میلوما با طحال موش که توسط آنتی ژن مورد نظر امیونیزه شده‌است، ساخته می‌شود. به هر حال پیشرفت‌های اخیر سبب استفاده سلول‌های B خرگوش برای تولید هیبریدومای خرگوش نیز گردیده‌است .

پلی اتیلن گلیکول برای لقاح غشاهای پلاسمایی مجاور به هم استفاده می‌شده، اما حاصل این روش کم بوده بنابراین یک محیط انتخابی که فقط سلول‌های لقاح شده بتوانند در آن رشد کنند مورد استفاده قرار می‌گیرد. این کار امکان‌پذیر است چون سلول‌های میلوما قادر به سنتز هیپوگزانتین گوانین فسفوریل ترانسفراز(تبدیل هیپوگزانتین به اینوزین) وتیمیدین کیناز (تبدیل تیمیدین ۵ فسفات به تیمدین وسپس تحت تاثیر آنزیم تیمدین فسفوریلاز به تیمین مبدل می شود) نیستند وناچارا باید ازمسیری جایگزین استفاده کنند تا اوریدین را به نوکلئوتید مبدل کنند (تبدیل اوریدین به تیمیدین)که آمینوپتریدین با مکانیسم ذیل این مسیر را نیز، مهر می کند.

با قرار دادن سلول‌ها در معرض آمینوپترین (یک آنالوگ فولیک اسیدDHFR، که دهیدروفولات ردوکتاز را مهار می‌کند. آن‌ها دیگر نمی‌توانند از مسیر de novo استفاده کرده و نسبت به اسیدهای نوکلئیک کاملاً اوکسوتروفیک می‌شوند که برای زنده ماندن نیاز به مکمل غذایی خواهند داشت.

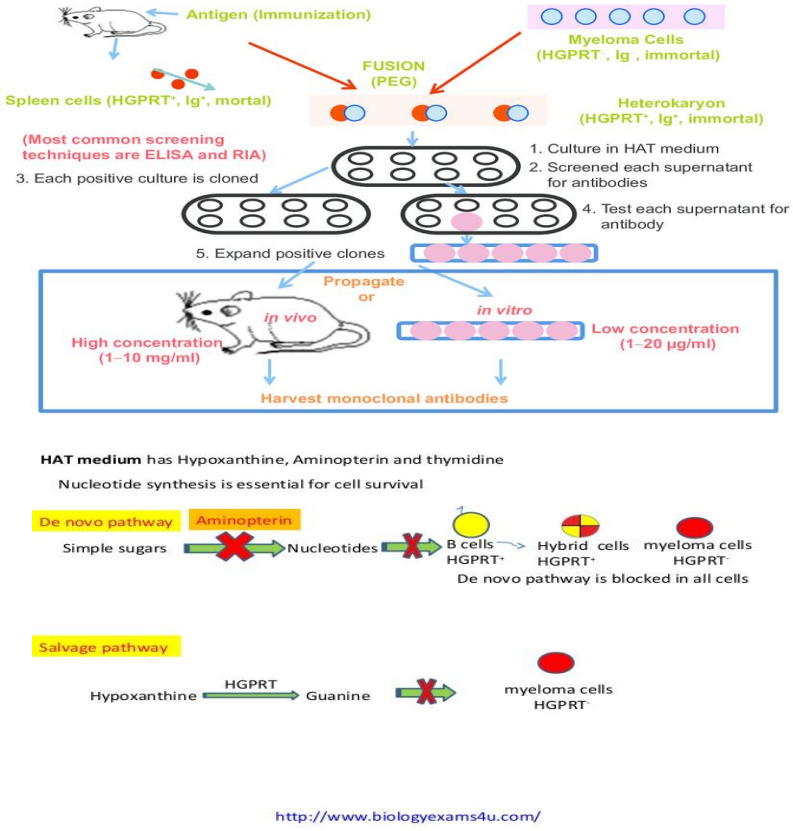
این محیط انتخابی HAT نامیده می‌شود زیرا آن حاوی هیپوگزانتین، آمینوپترین و تیمیدین است. این محیط برای سلول‌های هیبریدوما انتخابی است. سلول‌های میلومای لقاح نشده به دلیل فقدان HGPRT نمی‌توانند رشد کنند، و بنابراین نمی‌توانند DNA را همانند سازی نمایند. سلول‌های لقاح نیافته به دلیل چرخه زندگی کوتاه خود نمی‌توانند به‌طور نامحدود زندگی کنند. فقط سلول‌های هیبرید (هیبریدوما) در این

محیط قادر به زندگی هستند چون سلول طحالی همراه آن HGPRT را تأمین کرده و سلول میلوما ویژگی‌هایی دارد که آن را نامیرا می‌نماید (مثل یک سلول سرطانی).

سپس مخلوط سلول‌ها رقیق شده و کلون‌ها از سلول‌های تک والد روی چاهک‌های میکروتیتر رشد می‌کنند. پس از آن پادتن‌های ترشح شده با کلون‌های مختلف از جهت تواناییشان برای اتصال به آنتی ژن مورد بررسی قرار می‌گیرند (توسط روش **ELISA** یا آنتی ژن میکروارای یا ایمونو دات بلات). سپس کارآمدترین و پایدارترین کلون برای استفاده مورد استفاده قرار می‌گیرد.

هیبریدوما می‌تواند به‌طور نامحدود در محیط کشت مناسب رشد کند. حال سلول را می‌توان به موش تزریق نمود (در حفره پریتوئن). آنجا، این سلول‌ها ترشحی غنی از پادتن به نام آسیت ایجاد می‌کنند.

محیط کشت باید در طی انتخاب آزمایشگاهی غنی شود تا هیبریدوما به‌طور ایده‌آل رشد کند. این عمل را می‌توان با استفاده از یک لایه سلول تغذیه‌کننده فیبروسیت یا محیط مغذی بریکلون (**Briclone**) انجام داد. محیط کشت متعادل شده با ماکروفاژها نیز قابل استفاده‌است.



درخصوص تکنیک آنتی بادی های مونوکلونال مقاله ذیل جالب می باشد:

مقاله :تهیه و تخلیص آنتی‌بادی منوکلونال علیه آنتی‌ژن لیپوآرابینومان مانوزیله مایکوباکتریوم بویس

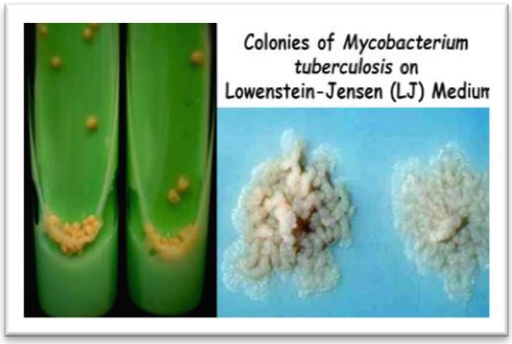
درصفحه اول مقاله فوق درقسمت مقدمه: با توجه به دفع برخی آنتی ژنها از راه ادرار ، استفاده کاربردی از آنتی بادیهای مونوکلنال (درقالب کیتهای طراحی شده دراین خصوص) برای شناسایی بیماری سل از راه ادرار اشاره شده است.

کشت وتستهای بیوشیمیایی:

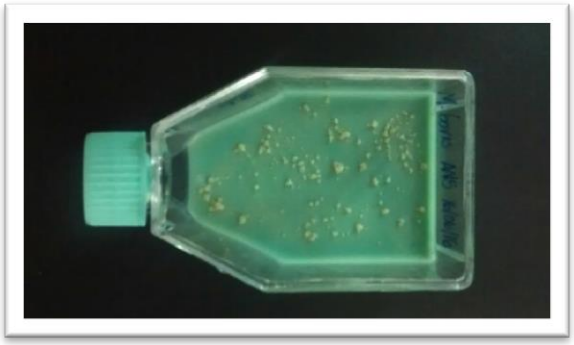
قبل از شروع به کشت نمونه های مشکوک به مایکوباکتریوم بویس یا سایر مایکوباکتریومهای کند رشد، نمونه ها بایستی آماده سازی شوند که برحسب مورد، هضم یا ذوب مخاط وغلیظ کردن نمونه با روش سانتریفیوژکردن را می توان نام برد. به منظور آلوده زایی نمونه از سایر اجرام از اسید اکزالیک ۵ درصد ویا سود ۲درصد استفاده می شود. معمولترین محیط های کشت مایکوباکتریومها محیط لونشتین جنسن واستون برینکز است. اگرچه گلیسرول برای مایکوباکتریوم بویس ممانعت کننده می باشد ولی برای رشد مایکوباکتریوم توبر کلوزیس، اویوم

ومایکوباکتریومهای غیر شاخص لازم است. باتوجه به اینکه پیروات سدیم (۰/۴درصد) رشد بویس را افزایش می دهد. لذا محیط کرچنر که حاوی این ماده وفاقدگلیسرول است استفاده می گردد.

تصاویری ازمحیط های کشت



محیط کشت Lowenstein-Jensen



محیط کشت Stonebrink

Culture

Lowenstein Jensen medium egg medium
malachit green (selective)
cycloheximide (inhibit fungus)
lincomycin (antibiotic)
glycerol (inhance growth of MTB)
sod. Pyruvate (, of M.bovis)
incubate up to 8 weeks

zutalaba.com

Diff. on culture and biochemical tests

	growth type	growth time	glycerol	Na. Pyrovate	Niacin	pyraz-inamidase	Urease	Nitrate
MTB	eugonic	3-8 week	+	–	+	+	+	+
M.bovis	dysgonic	3-8 week	–	+	–	–	+	–
M.avium	eugonic	2-6 week	+	–	–	+	–	–

TABLE 41-2 Differential features of various strains of *Mycobacterium tuberculosis*

Properties	Human	Bovine	Asian	African
Oxygen requirement	Aerobic	Microaerophilic	Aerobic	Microaerophilic
Growth in thiophene-2-carboxylic acid hydrazide (TCH) (5 mg/L)	+	–	–	–
Niacin	+	–	+	Variable
Nitrate reduction	+	–	+	Variable
Phage type	A, B, C	A	I	A

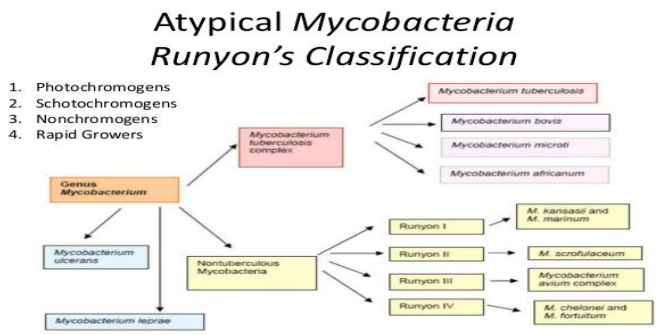
مقاله: Mycobacterium tuberculosis: Properties of the Bacteria

سرعت ودمای رشد انواع مایکوباکتریومها درمحیط کشت:

خاصیت/گونه	مایکوباکتریوم توبرکلوزیس	مایکوباکتریوم بویس	کمپلکس مایکوباکتریوم آویوم	مایکوباکتریوم آویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس
سرعت رشد	آهسته (۳ تا۸ هفته)	آهسته (۳ تا۸ هفته)	آهسته (۲ تا۶ هفته)	خیلی آهسته(تا۱۶هفته)
دمای رشد	۳۷ درجه سانتی گراد	۳۷ درجه سانتی گراد	۴۳-۳۷ درجه سانتی گراد	۳۷ درجه سانتی گراد

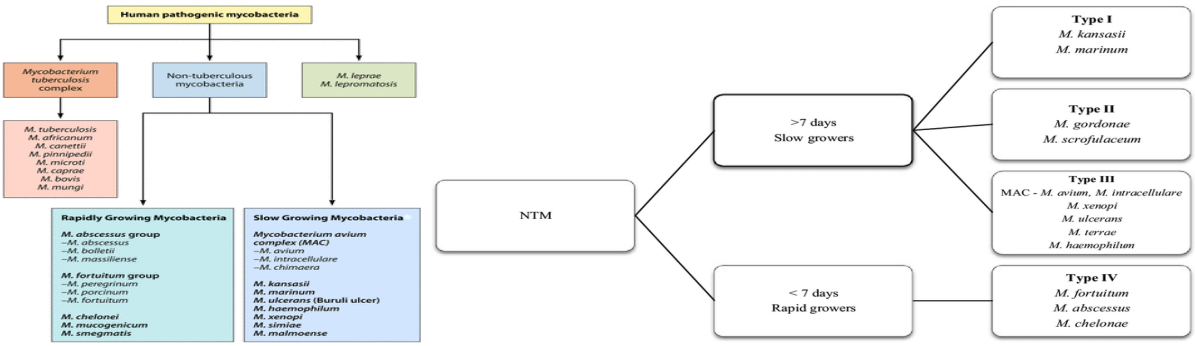
تست تولید پیگمان

انواع گونه های مایکوباکتریومها ، دارای قدرت تولید پیگمان کارتنوئید در مقادیر و انواع مختلف می باشند براین اساس مایکوباکتریومها به سه دسته **فتوکروموژن**: ((تولید پیگمان درحضور نور))، **اسکوتوکروموژن** :((تولید پیگمان در تاریکی وحضور نور)) و **غیرکروموژن**:((عدم تولید پیگمان)) تقسیم میشوند که با انجام این تست میتوان ایزوله مورد بررسی را در یکی از گروههای فوق دسته بندی نمود.



رشد مایکوباکتریوم ها در دماهای مختلف

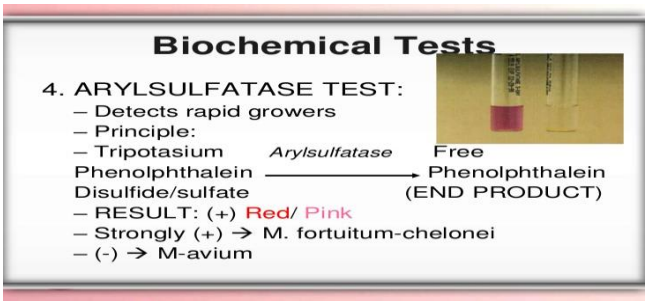
مایکوباکتریوم ها از نظر دمای رشد با یکدیگر متفاوت هستند. اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم در دماهای ۳۵-۳۷ درجه سانتی گراد به راحتی رشد می کنند ولی مایکوباکتریوم زنوپای فقط در دماهای ۴۲-۴۴ درجه سانتی گراد رشد می کند. بهترین دمای رشد مایکوباکتریوم مارینوم ۳۰ درجه سانتی گراد و در دماهای بالاتر از ۳۳ درجه سانتی گراد رشد نمی کند .مایکوباکتریوم فورچیتوم در دماهای ۴۲-۲۵ درجه سانتی گراد به خوبی رشد می کند. همچنین مایکوباکتریوم اسکروفولاسئوم در دماهای ۲۵ درجه سانتی گراد به آهستگی رشد می نماید. برای تعیین دمای رشد سوش مورد نظر را در محیط لون اشتاین جانسون تلقیح کرده و در دماهای ۴۵ ،۴۰ ، ۳۷ ،۳۳ ، ۳۰ ، ۲۵درجه سانتی گراد انکوبه می کنند.



تست نیاسین: نیاسین به عنوان یک محصول متابولیک توسط همه مایکوباکتریومها ایجاد میشود، ولی غالب مایکوباکتریومها دارای آنزیمی هستند که نیاسین را به نیاسین ریبونوکلئوتید تبدیل میکند .یکی از مایکوباکتریومهای فاقد این آنزیم مایکوباکتریوم توبرکلوزیس است و لذا نیاسین در محیط کشت آن تجمع پیدا میکند، که مقدار آن با تعداد پرگنه ها و عمر کشت ارتباط دارد .در آزمایش شیمیایی برای تجسس وجود نیاسین، این ماده در حضور یک آمین اولیه مانند آنیلین با برومورسیانوژن تشکیل یک ماده زرد رنگ میدهد

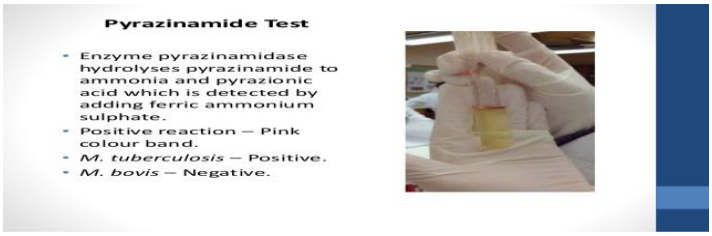
تست آریل سولفاتاز:

آنزیم آریل سولفاتاز ، موجب تجزیه فنل فتالئین دی سولفات شده و آن را به فنل فتالئین تبدیل می کند که در حضور بیکربنات سدیم رنگ قرمز تولید می کند.دربعضی از جمله مایکوباکتریوم زنوپای ، مایکوباکتریوم آزیاتیکوم، مایکوباکتریوم فورچیتوم، مایکوباکتریوم مارینوم، مایکوباکتریوم زولگایی، مایکوباکتریوم فلاوسنس آنزیم آریل سولفاتاز وجود دارد.

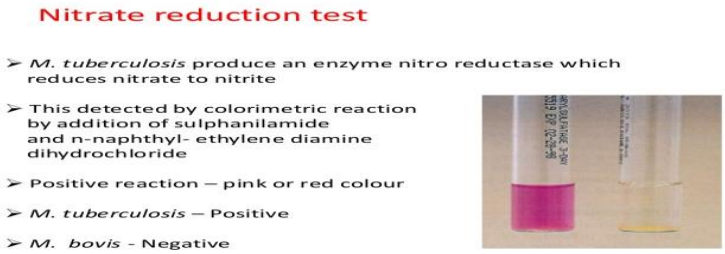


تست پیرازین آمیداز

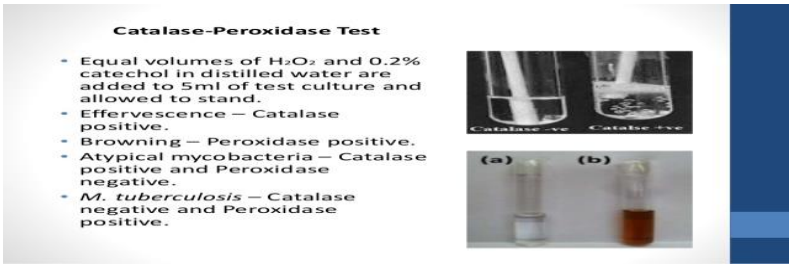
مایکوباکتریوم بویس، دارای مقاومت ذاتی نسبت به پیرازینامیداز است. گونه هایی که نسبت به پیرازینامیداز حساس هستند با آنزیم پیرازینامیداز ، آن را تبدیل به اسید پیرازینوئیک تبدیل میکنند.



تست نیترات:



تست کاتالاز:

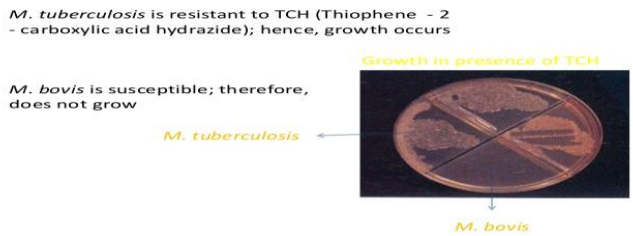


تست تحمل نمک

توانایی رشد مایکوباکتریوم ها در حضور نمک طعام ٪۵ یا تحمل آن متفاوت است. مایکوباکتریوم های تند رشد به جز M mucogenicum. در محیط کشت حاوی نمک طعام ٪۵ می توانند رشد کنند. همچنین اغلب سوش های مایکوباکتریوم کلنی قادر به رشد دراین محیط می باشند.

تستT.C.H (حساسیت به تیوفن کربوکسیلاز هیدرازید)

به منظور تفکیک مایکوباکتریوم بویس از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و سایر مایکوباکتریوم های غیر فتوکروموژن ها کند رشد ، از این تست استفاده می شود .اغلب سوش های مایکوباکتریوم بویس در غلظت های۱-۵L/mg نسبت به TCH حساس می شوند. سویه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و مایکوباکتریوم آفریکانوم در غلظت های ۵L/mg نسبت به TCH مقاوم هستند.



تست هیدرولیز توئین ۸۰ : هیدرولیز آنزیمی توئین ۸۰ توسط مایکوباکتریوم ها باعث تخریب این ماده می گردد. درنتیجه نوترال رد کمپلکس شده به توئین را آزاد کرده که منجر به تغییر رنگ سوبسترا آزمایش می شود این تغییررنگ به دلیل هیدرولیز توئین می باشد. این آزمایش درتشخیص مایکوباکتریومهای اسکوتوکروموژن وغیر کروموژن مفید است.

تست احیاء تلوریت پتاسیم: احیاء تلوریت پتاسیم بدون رنگ به تلوریت فلزی سیاه رنگ ظرف ۳تا ۴ روز ویژگی مشخص کننده مایکوباکتریوم اووم کمپلکس می باشد. مایکوباکتریومهای تند رشد نیز ظرف این مدت دارای واکنش مثبت هستند.

تست جذب آهن: درآزمایش جذب آهن، تنها تند رشدهایی مانند مایکوباکتریوم فورچیتوم ومایکوباکتریوم فله ای مثبت هستند زیرا که توانایی جذب محلول نمک آهن را از محیط کشت حاوی نمک آهن دارند.

کاتالاز۶۸ درجه سلسیوس: تعداد کمی ازمایکوباکتریومها بعد ازحرارت محیط کشت در۶۸ درجه سانتی گراد به مدت بیست دقیقه (کاتالاز مقاوم به حرارت) دارای واکنش مثبت هستند.

چهار مورد اخیر از مقاله:

نقش آزمایشگاه در تشخیص بیماری سل – داوود آزادی، حسن شجاعی - مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

تکنیک کروماتوگرافی گاز- مایع:

یکی از جدیدترین و حساس ترین این روشها، انجام کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (HPLC) بر روی مشتق فناسیل اسیدهای مایکولیک مایکوباکتریومها برای شناسایی سریعتر باکتری بعد از کشت اولیه می باشد. که روند انجام این تست درمقاله ارزشمند ذیل، شرح داده شده است.

مقاله:

شناسایی سریع مایکوباکتریوم توبرکولوزیس کمپلکس؛ استفاده از آنالیز شیمیایی اسیدهای مایکولیک دیواره سلولی توسط کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (HPLC)؛ تالیف؛ سید اصغر هوایی وهمکاران

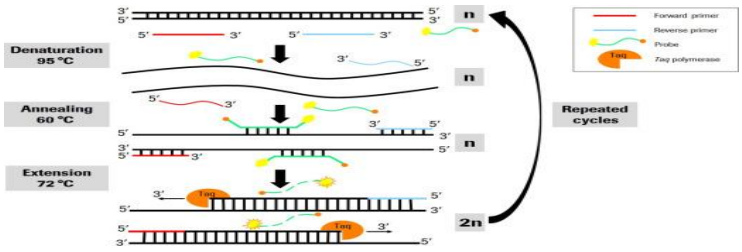
روشهای مولکولی:

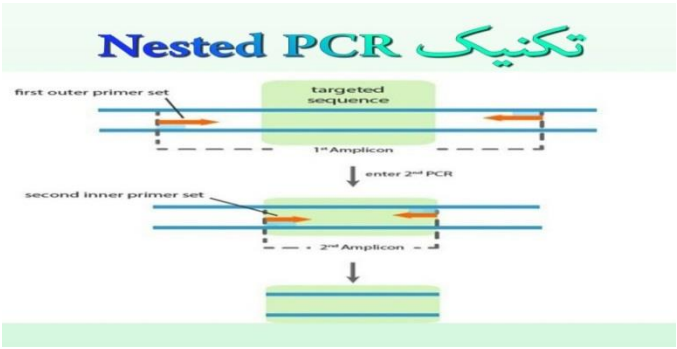
PCR مبتنی بر توالی یکی از موثرترین روش ها برای شناسایی مایکوباکتریوم است . این روش شامل تقویت DNA با پرایمرهای اختصاصی جنس است. در این روش ، توالی نوکلئوتیدی ارگانیسم با توالی های مرجع مقایسه و شناسایی می شود. این روش شناسایی گونه هایی که توانایی رشد در محیط های آزمایشگاهی امکان پذیر می شود. امروزه با استفاده از این تکنیک چندین گونه جدید شناسایی شده است. توالی مورد استفاده ژن کدگذاری S rRNA۱۶می بوده که این توالی در تمام گونه های باکتری موجود است و حاوی هر دو منطقه محافظت شده و متغیر است، همچنین یک هدف ایده آل برای طبقه بندی می باشد.در جنس مایکوباکتریوم توالی ۱۶ S rRNA بسیار محافظت شده ودر بین تمامی اعضا این جنس مشترک می باشد با وجود این ، مناطق متغیر موجود در این توالی می تواند به خوبی برای افتراق گونه های مایکوباکتریوم به کار رود. با به دست آوردن توالی ۱۶ S rRNAمربوط به هر مایکوباکتریوم و مقایسه آن با توالی های ذخیره شده در بانک های اطلاعاتی موجود ، می توان به گونه مایکوباکتریوم پی برد. بزرگترین چالش استفاده از ژن ۱۶ S rRNAبرای شناسایی گونه ها، وجود هترو ژنیسیتی های کوچکی بین اپرون های مختلف rrm در ژنوم یک ایزوله می باشد که این پدیده می تواند آنالیز اطلاعات را بسیار گیج کننده و پیچیده نماید. البته استفاده از این ژن محدودیت هایی دارد به عنوان مثال، مایکوباکتریوم کانزاسی دارای یک

توالی است که مشابه گونه های غیر پاتوژن مایکوباکتریوم گاستری است HSP۶۵ .یکی از ژن های مرسوم خانه دار کد کننده پروتئین شوک حرارتی ۶۵ کیلو دالتونی در سلول ها می باشد که با دیگر ژن های مشابه از لحاظ عملکردی ، در کنترل عملکرد سلول در زمان شوک حرارتی و دیگر استرس های محیطی نقش دارد. پروتئین شوک حرارتی یکی از مهم ترین اجزای آنتی ژن های سطحی در تعدادی از باکتری های بیماری زا از جمله مایکوباکتریوم باشد. گونه های مایکوباکتریوم دارای یک کپی از ژن مذکور می باشند.این ژن در جنس مایکوباکتریوم بسیار محافظت شده است.

گونه های مایکوباکتریوم به ویژه انواع تند رشد دارای شباهت بسیار بالایی در سطح توالی ژن ۱۶S rRNA می باشند لذا شناسایی مولکولی آنها در مواردی همانند گونه های متعلق به کمپلکس مایکوباکتریوم فورچیتوم کار دشواری می باشد. ژن rpoB دارای طولی بیش از ۳۰۰ جفت باز می باشد و دارای هفت ناحیه متغیر می باشد که دارای ارزش بالایی در شناسایی گونه های باکتری از جمله مایکوباکتریوم ها می باشد dnaK ، rpoBC، glpK، murCنیز از دیگر ژن های کاربردی برای برای شناسایی گونه های مایکوباکتریوم به کار می روند.

نکته: با توجه به دقت، سرعت، حساسیت و پتانسیل بالای Real Time PCR از این روش برای تشخیص سریع باکتری و مقاومت دارویی مایکوباکتریوم در نمونه های بالینی استفاده می شود. پروب های متفاوت مانند پروبTaqMan ، پروب های bioprobes fluorescence (FRET) resonance energy استفاده می شود. مزایای اصلی استفاده از این تکنیک سرعت آزمون و خطرآلودگی کمتر است. اما تجهیزات گران قیمت و نیاز به پرسنل فنی ماهر نیز از معایب این تکنیک می باشند.





مقاله:

۱- **Evaluation of a Nested-Pcr for *Mycobacterium Tuberculosis* Detection in Blood and Urine Samples**

۲- **مقایسه روش PCR-RFLP با روش های بیوشیمیایی در تشخیص عوامل سل ریوی انسانی**

علاوه بر مقالات ذکر شده در هرموضوع منابع عمده مطالب، به شرح ذیل می باشد:

منابع:

۱- مروری برروش های تشخیص ایمونولوژیک عفونت سل: مهسا جعفری،رضا منصوری

۲- کتاب ایمنی شناسی: ایان تیزارد- تالیف دکتر ربانی ودکترمحزونیه

۳- کتاب میکروب شناسی دامپزشکی وبیماریهای میکروبی تالیف کویین وهمکاران- ترجمه دکتر تقی زهرایی صالحی ودکتر شایق

۴- کتاب بیماریهای باکتریایی دام: تالیف دکتر حسنی طباطبایی، دکتر فیروزی

۵- کتاب میکروب شناسی پزشکی جاوتز: ترجمه جهاندیده

۶- کتاب ایمنی شناسی پزشکی: تالیف دکتر ایزد وهمکاران

۷- کتاب باکتری شناسی عمومی: تالیف دکتر تاجبخش