مقاله پژوهشی

بررسی انسیدانس آنتی‌بادی‌های ضد سیتوپلاسم نوتروفیلی (ANCA) به روش ایمونوفلورسانس غیر مستقیم[1] (IFA) در بیماری‌های آرتریت روماتوئید (R.A) و لوپوس اریتماتوسیستمیک (SLE)

محسن سعیدی* – دکتر حسن برادران** – دکتر محمدرضا هاتف***

چکیده:

آنتی‌بادی‌های ضد سیتوپلاسم نوتروفیل[2] (ANCA)، علیه اجزای لیزوزومی و گرانول‌های اولیه سلول‌های میلوئیدی (نوتروفیل‌ها و مونوسیتها)، در بعضی بیماری‌های روماتیسمی و نیز در بیماری وگنر به وجود می‌آید.

این آنتی‌بادی‌ها، علاوه بر آن که ممکن است در بروز ضایعات عروقی دخالت داشته باشند، ارزش تشخیصی نیز دارند؛ بطوری که حساسیت و اختصاصی بودن سنجش (ANCA) در بیماری وگنر، در حدود ۹۵-۹۰٪ است. بنابراین با احتمال این که در بیماری‌های SLE[3], R.A[4], W.G[5] نیز این آزمایش از حساسیت و ویژگی بالایی برخوردار می‌باشد، بر روی سرم ۶۵ نفر از بیماران مبتلا به R.A و ۴۲ نفر از بیماران مبتلا به SLE، بررسی‌هایی صورت گرفت.

با استفاده از روش ایمونوفلورسانس غیر مستقیم، دو الگوی رنگ پذیری مشاهده شد: C-(ANCA)[6] یا نوع سیتوپلاسمی که در ۸۸٪ موارد آنتی بادی از نوع Anti -PR3[7] می‌باشد و P-(ANCA)[8] یا حاشیه هسته‌ای که شامل آنتی‌بادی‌های ضد میلوپراکسیداز (MPo)[9]، لاکتوفرین (LF)[10]، وکاتپسین G(CG)[11] و الاستاز (HLE) و لیزوزیم (LZ) هستند. بعلاوه حساسیت (Sensitivity) آن برای بیماران (SLE) در رقت $\frac{1}{128}$، ۸٪ و ویژگی (Specificity) ۸۵/۱٪ و برای بیماران R.A در رقت $\frac{1}{16}$ دارای حساسیت ۳۲/۲٪ و از ویژگی ۸۷/۵٪ می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌بادی‌های ضدسیتوپلاسم نوتروفیل، واگنرگرانولوماتوز، لوپوس اریتماتوز، آرتریت روماتوئید، ایمنوفلورسانس غیرمستقیم، آنتی‌بادی‌های ضدمیلوپراکسیداز، لاکتوفرین، کاتپسین، الاستاز

* – عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی گرگان
** – عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
*** – عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

1-indirect fluorescent assay
2-anti neutrolophil cytoplasmic antibody
3-systemic lupus erythematosus
4-rheumatoid arthritis
5-Wegner's granulomatosis
6-central or classic ANCA
7-Proteinase-3
8-Perinuclear ANCA
9-myeloperoxidase
10-lactoferrin
11-cathepsin G.

مقدمه:

آنتی‌بادی‌های ضد سیتوپلاسم نوتروفیل (ANCA)، رده‌ای از آنتی‌بادی‌ها با ویژگی‌های مختلف علیه اجزاء لیزوزومی و گرانول‌های اولیه سلول‌های میلوئید (نوتروفیل و مونوسیتها) می‌باشند که در بیماری روماتیسمی نسبتاً شایعی مثل: R.A و SLE و نیز بیماری‌های وسکولیتی، از جمله W.G با درجات شیوع مختلف دیده می‌شود. ضمناً تعیین (ANCA) در این بیماران، تأئید کننده این مطلب است که اولاً مکانیسم بیماری، «خودایمنی» می‌باشد (Auto Immune Disease)، ثانیاً می‌توان از آن برای تشخیص بیماری‌های W.G و نیز به عنوان تست کمکی برای بیماران SLE, R.A استفاده کرد.(۱) ضمن این که تست ANCA به روش IFA در حدود بیش از ۹۰٪ ارزش یا حساسیت دارد؛ همچنین از لحاظ قیمت نیز نسبت به تست‌های RIA, elisa، مقرون به صرفه‌تر می‌باشد.

در کشور ما تست سنجش ANCA مرسوم نبوده است؛ بنابراین در این پروژه، برای ارزیابی شیوع این نوع آنتی‌بادی‌ها، ضمن مطالعه روش‌های مختلف شناسائی ANCA، تکنیک IFA را نیز مورد استفاده قرار داده‌ایم.

روش بررسی:

A – بطور کلی جامعه آماری مناسب با هدف این پژوهش شامل دو گروه افراد می‌باشد:

۱ – بیماران مبتلا به SLE, R.A.

۲ – گروه کنترل یا شاهد بیمار و شاهد سالم.

B – روش نمونه‌گیری:

الف) بیماران مبتلا به SLE,R.A :

با توجه به علائم بالینی تعریف شده برای SLE,R.A، این بیماران در بخش روماتولوژی بیمارستان امام رضا(ع) در فاصله زمانی اردیبهشت ماه ۱۳۷۶ لغایت آبان ۱۳۷۶ به آزمایشگاه ایمونولوژی بیمارستان مراجعه کردند و از نظر تست ANCA مورد بررسی قرار گرفتند. بنابراین، نمونه‌گیری از نوع غیر احتمالی و آسان می‌باشد؛ براین اساس ۴۲ بیمار SLE و ۶۵ بیمار R.A شناسائی و مورد بررسی قرار گرفتند.

ب) گروه کنترل بیمار یا شاهد بیمار:

ملاک عمل برای این گروه، عدم ابتلا اشخاص به بیماری R.A و SLE بوده است؛ ولی همین گروه نیز در حقیقت جزو بیماری‌های روماتیسمی و وسکولیتی می‌باشند.

براین اساس ۴۰ نفر با میانگین سنی (۵/۱±۳۷) به عنوان کنترل مثبت مورد بررسی قرار گرفتند و تست ANCA در باره آنان انجام شد.

ج) گروه شاهد سالم:

این افراد، کلاً، به هیچ گونه بیماری مبتلا نبودند و از نظر سنی، با میانگین سنی بیماران R.A و SLE مطابقت داشتند؛ بنابر این در این پژوهش ۲۵ نفر برگزیده شدند که تست ANCA در همگی آن‌ها منفی بود.

د) روش تهیه نمونه سرمی برای بررسی ANCA :

پس از خون‌گیری و جداسازی سرم افراد مورد مطالعه، این سرم‌ها جهت انجام آزمایش و تست‌های تأئیدی بعدی در ^{o}C ۲۰- نگهداری شد و سعی بر این بوده است که در اسرع وقت، تست ANCA انجام شود.

C – روش اجرای آزمایش:

پس از بررسی‌های مقدماتی، راجع به انواع روشهای موجود بررسی ANCA، با توجه به حساسیت روش و غربالی بودن تست برای افراد ANCA مثبت و منفی، تست IFA مورد استفاده قرار گرفت. (۲و۱)

مراحل انجام تست: IFA

۱ – سرم‌های مورد آزمایش را با رقت ۱/۲ با بافر فسفات سالین (PBS.PH=7.2) تهیه کردیم.

۲ – ۱۰ μl از سرم‌های رقیق شده روی حفره، به لام‌های مورد آزمایش اضافه گردید.

۳ – نمونه‌ها را در یک پلیت درب دار بزرگ، روی یک عدد گاز پانسمان مرطوب قرار داده؛ درب آن را بستیم. (شرایط مرطوب، برای جلوگیری از تبخیر سرم بوده است.)

۴ – نمونه‌ها را، به مدت ۳۰ دقیقه در حرارت آزمایشگاه قرار دادیم.

۵ – پس از این مدت، لام‌ها را دوبار با PBS شستشو داده (۱۰دقیقه)، سپس خشک نمودیم؛ آنگاه، ۱۰ μl محلول آنتی بادی کونژوگه Total (شرکت VIRGO) را با FITC اضافه نموده، لام‌ها را به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار دادیم.

۶ – پس از طی زمان انکوباسیون، لام‌ها را مجدداً با PBS شستشو داده، بعد خشک نمودیم.

۷ – بر روی نمونه‌ها، یک قطره محلول «مونته گلیسرین» گذاشته و آن را به کمک میکروسکوپ فلورسنت، مورد بررسی قرار دادیم.

۸ – در مواردی که تیتر $\frac{1}{2}$ برای سرم مورد بررسی، مثبت بوده است، مجدداً تست برای سرم مذکور با رقت بالاتر تکرار گردید تا تیتر نهائی، با رقت بیشتری تعیین گردد. (۳و۲)

د) نحوه گردآوری اطلاعات:

۱ – بررسی منابع درسی تخصصی

۲ – جستجوی مقالات و مطالعات انجام شده به کمک سیستم med - line.

۳ – تهیه مقالات در دسترس و موجود در ایران به کمک سیستم Adonis و کتابخانه‌های دانشگاه علوم پزشکی مشهد و علوم پزشکی ایران و شیراز.

۴ – جمع آوری نتایج حاصل از مشاهدات ضمن انجام مراحل آزمایش و پاسخ نهائی که از تست ANCA در مورد هر فرد فراهم شد.

۵ – فرمول‌های آماری، برنامه آماری رایانه.

یافته‌ها:

A – نتایج بدست آمده از آزمایشهای ANCA در بیماران مبتلا به R.A :

۱ – میزان بروز ANCA ، در بیماران R.A :

از ۶۵ بیمار، ۲۳ نفر ANCA مثبت بودند که درصد بروز آن ۳۵/۳٪ تعیین گردید.

۲ – میزان بروز فرم P-ANCA و فرم C-ANCA در بیماران :

از ۲۳ بیمار ANCA مثبت، ۱۷ نفر فرم P و ۶ نفر فرم C-ANCA داشتند. بنابراین ۷۳/۹٪ افراد ANCA مثبت دارای فرم P و ۲۶/۱٪ افراد فرم C-ANCA داشتند (تصویر شماره ۳ و ۲).

۳ – توزیع پراکندگی تیتر ANCA :

درصد بیماران ANCA مثبت در تیترها مختلف به ترتیب ۱٪ = $\frac{۱}{۲}$ و ۱٪ = $\frac{۱}{۴}$ و ۱/۱٪ = $\frac{۱}{۸}$ و ۲/۲٪ = $\frac{۱}{۱۶}$ و ۱۹/۴٪ = $\frac{۱}{۳۲}$ و ۱۰/۶٪ = $\frac{۱}{۶۴}$ بوده است. در حالی که درصد بروز ANCA در افراد کنترل یا شاهد بیمار، در تیترهای مختلف به ترتیب: ۳/۴٪ = $\frac{۱}{۲}$ و ۴/۳٪ = $\frac{۱}{۴}$ و ۳/۶٪ = $\frac{۱}{۸}$ و ۱/۶٪ = $\frac{۱}{۱۶}$ و ۱/۹٪ = $\frac{۱}{۳۲}$ و ۲/۳٪ = $\frac{۱}{۶۴}$ بوده است.

۴ – جدول (۱) تحلیل آماری رابطه سن و بروز ANCA در بیماران R.A را نشان می‌دهد.

۵ – جدول (۲) تحلیل آماری ارتباط جنس و بروز ANCA در بیماران R.A را نشان می‌دهد.

با توجه به نتایج، بین بروز ANCA با جنس، ارتباط معنی داری وجود ندارد.

۶ – در جدول (۳) تحلیل آماری رابطه بروز ANCA و R.F در بیماران R.A را نشان می‌دهد.

با توجه به نتایج، میان بروز ANCA و فاکتور روماتوئید (R.F) ارتباط معنی داری وجود ندارد.

B – نتایج به دست آمده از آزمایش‌های ANCA در بیماران مبتلا به SLE:

۱ – میزان بروز ANCA دربیماران SLE :

از ۴۲ بیمار، ۱۹نفر مثبت بودند که درصد بروز آن ۴۵/۲٪ تعیین گردید.

۲ – میزان بروز فرم P-ANCA و C-ANCA دربیماران SLE :

از ۱۹ نفر بیمار ANCA مثبت، ۱۸ نفر فرم P-ANCA (۹۴/۷٪) و ۱ نفر فرم C-ANCA (۵/۳٪) داشتند (تصویر شماره ۴ و ۲ و ۱).

۳ – توزیع پراکندگی تیتر ANCA در بیماران SLE :

درصد بیماران ANCA مثبت، درتیترهای مختلف، به ترتیب: ۱/۳٪ = $\frac{۱}{۲}$ و ۰٪ = $\frac{۱}{۴}$ و ۱/۴٪ = $\frac{۱}{۸}$ و ۱۲/۲٪ = $\frac{۱}{۱۶}$ و ۱۲/۵٪ = $\frac{۱}{۳۲}$ و ۹/۸٪ = $\frac{۱}{۶۴}$ و ۸٪ = $\frac{۱}{۱۲۸}$ بوده است. در حالی که درصد بروز ANCA در افراد کنترل، یا شاهد بیمار، در تیترهای مختلف به ترتیب: ۷/۳٪ = $\frac{۱}{۲}$ و ۶/۲٪ = $\frac{۱}{۴}$ و ۴/۳٪ = $\frac{۱}{۸}$ و ۳/۰۱٪ = $\frac{۱}{۱۶}$ و ۲/۴٪ = $\frac{۱}{۳۲}$ و ۲/۲٪ = $\frac{۱}{۶۴}$ و ۱/۱٪ = $\frac{۱}{۱۲۸}$ بوده است.

۴ – جدول (۴) تحلیل آماری رابطه سن و بروز ANCA در بیماران SLE را نشان می‌دهد.

۵ – جدول (۵) تحلیل آماری ارتباط جنس

وبروز ANCA در بیماران SLE را نشان می‌دهد.

با توجه به نتایج، میان جنس و SLE ارتباط معنی داری وجود دارد. (Pv < ۰/۰۵).

۶ - جدول (۶) تحلیل آماری ارتباط ANA و بروز ANCA در بیماران SLE :

با توجه به نتایج، میان بروز ANCA و ANA در این بیماران ارتباط معنی داری وجود ندارد.

جدول (۱) تحلیل آماری رابطه سن و بروز ANCA در بیماران R.A (آنالیز واریانس)

By : variable AGE

variable ANCA

Source	DF	Sum of squares	mean squares	F ratio	F Table
Between groups	۱	۱۲۷/۴	۱۲۷/۴	۲/۶۹	۴/۲۳
within groups	۶۳	۲۹۸۶/۸۵	۴۷/۴۱		
Total	۶۴	۳۱۱۴/۲۵			

فرضیه H_0 در بیماران R.A بروز ANCA با سن، ارتباطی ندارد. چون F.ratio<F.table می‌باشد، پس، فرضیه H_0 برقرار است؛ یعنی بین بروز ANCA با، سن، ارتباط معنی داری وجود ندارد.

جدول (۲): تحلیل آماری ارتباط جنس و بروز ANCAدر بیماران R.A

جنس	ANCA		جمع
	+	-	
زن	۷(۵/۳۱)	۸(۹/۶۹)	۱۵
مرد	۱۶(۱۷/۶۹)	۳۴(۳۲/۳۱)	۵۰
جمع	۲۳	۴۲	۶۳

$E_{11} = ۵/۳۱ ; E_{12} = ۶/۶۹$

$E_{21} = ۱۷/۶۹; E_{22} = ۳۲/۳۱$

χ^2 catculated = ۱/۰۹

$\chi^2_{۰/۹۵}(۱) = ۳/۸۱$

جدول (۳): تحلیل آماری رابطه بروز ANCA و RF در بیماران R.A

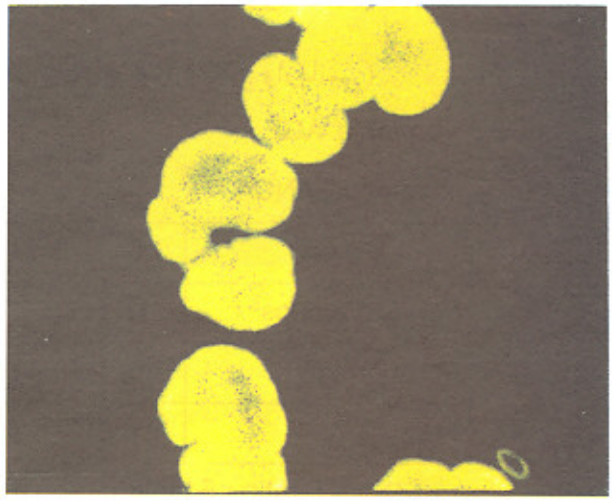
RF	ANCA		جمع
	+	-	
RF^+	۲۰	۱۷	۴۰
RF^-	۲۲	۶	۲۵
جمع	۴۲	۲۳	۶۵

$E_{11} = ۲۸/۸ ; E_{12} = ۱۴/۱$

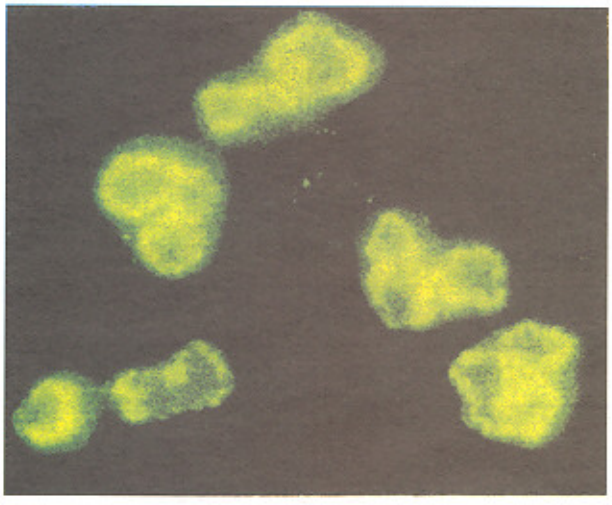
$E_{21} = ۱۶/۱ ; E_{22} = ۸/۸$

$\chi^2 = ۵/۰$

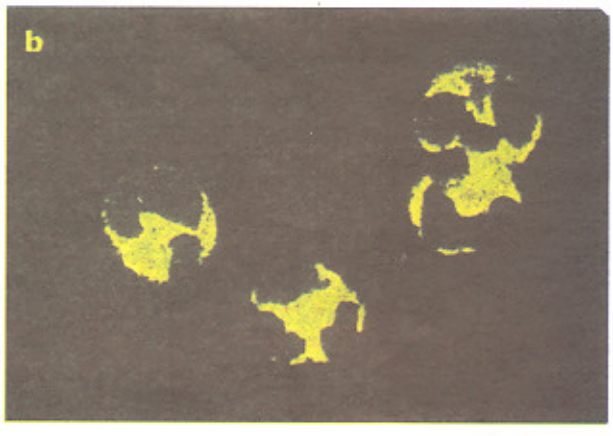
$\chi^2_{۰/۹۵}(۱) = ۳/۸۴$



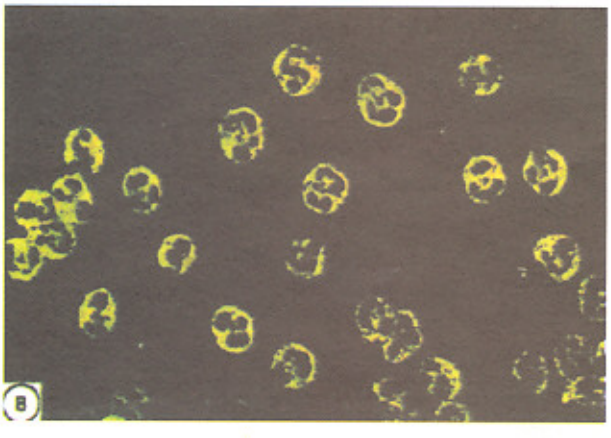
تصویر ۱ : الگوی رنگ آمیزی واقعی
P_ANCA در بیمار مبتلا به WG (۴)



تصویر ۲ : خصوصیات شکل ظاهری
P_ANCA در بیمار مبتلا به R.A
با استفاده از روش IIF (۵)



تصویر ۳ : الگوی رنگ آمیزی واقعی
C_ANCA (۱)



تصویر ۳ : الگوی رنگ آمیزی واقعی
C_ANCA (۴)

جدول (۴) تحلیل آماری رابطه سن و بروز ANCA در بیماران SLE (آنالیز واریانس)

Source	DF	Sum of squares	mean squares	F ratio
Between groups	۱	۲۶/۸۸	۲۶/۸۸	۰/۹۹
within groups	۴۰	۱۸۳/۱۴	۲۷/۱	
Total	۴۱	۱۱۱۰/۰۲		

فرضیه H_0 در بیماران SLE، بروز ANCA با سن، ارتباطی ندارد؛ چون $F\ ratio \leq 1$ می‌باشد؛ پس، فرضیه H_0 برقرار است؛ یعنی بین بروز ANCA با، سن، ارتباط معنی داری وجود ندارد.

جدول (۵): تحلیل آماری ارتباط جنس و بروز ANCAدر بیماران SLE

جنس	ANCA		جمع
	+	−	
زن	۱۸	۲۳	۴۱
مرد	۱	۰	۱
جمع	۱۹	۲۳	۴۲

$E_{11} = ۱۸/۵۵ ; E_{12} = ۲۲/۴۵$

$E_{21} = ۰/۴۵ ; E_{22} = ۰/۵۵$

جدول (۶): تحلیل آماری رابطه بروز ANCA و ANAدر بیماران SLE

ANA	ANCA		جمع
	+	−	
ANA^+	۲۰	۱۰	۳۰
ANA^-	۳	۹	۱۲
جمع	۲۳	۱۹	۴۲

$E_{11} = ۱۶/۴ ; E_{12} = ۱۳/۶$

$E_{21} = ۶/۶ ; E_{22} = ۵/۴$

$\chi^2 = ۶/۱$

$\chi^2_{۰/۹۵(۱)} = ۳/۸۴$

بحث:

با توجه به مطالعات و آزمایش‌های انجام شده، مشخص گردیده است که بیماری‌های SLE, R.A بر اساس یک مکانیزم خودایمنی ایجاد می‌شوند و آنتی‌بادی‌های ضدسیتوپلاسم نوتروفیل‌ها ANCA در این بیماران با روش IFA قابل ردیابی هستند؛ همچنین ثابت شده است که تیتر ANCA، اندیکاسیون باارزشی برای فعالیت بیماری در بیماران گرانولوماتوز وگنر (WG) می‌باشد. در اکثر این بیماران تیتر ANCA در طول درمان موثر، سرکوب ایمنی، کاهش می‌یابد.

هم‌چنین، بیمارانی که در آن‌ها، تیتر ANCA با کاهش علائم کلینیکی، ثابت باقی می‌ماند، نسبت به بیمارانی که ANCA در آن‌ها کاملاً حذف شده است، بیشتر در معرض خطر ابتلا و عود بیماری قرار دارند. (۸ و ۷ و ۶)

بر اساس یک مطالعه آماری که برروی ۱۱۴ بیمار مبتلا به SLE صورت گرفته، با استفاده از روش IFA، نتایج زیر به دست آمده است:

در ۴۲/۲٪ بیماران ANCA مثبت بوده و در دو الگوی P-ANCA و C-ANCA به ترتیب: ۳۶/۹٪ و ۵/۵٪ آن‌ها مثبت بودند. هم چنین، تیتر ANCA از $\frac{1}{2}$ تا $\frac{1}{160}$ متغیر بوده و در ۵۸/۶ بیماران، ارزش تشخیصی ($\frac{1}{64}$) وجود داشته است. (۹)

در مطالعه دیگری که در باره ۴۷ بیمار مبتلا به R.A، انجام شد تست ANCA در ۲۱ نفر مثبت بود و همگی نیز الگوی P-ANCA داشتند؛ مطالعات in vitro نشان می‌دهد که تیتر ANCA با فعالیت بیماری در ارتباط بوده و وجود ANCA در آسیب رساندن نوتروفیل‌ها به سلول‌های اندوتلیال نیز مورد اشاره قرارگرفته است. (۷)

هم‌چنین شناسائی ANCA اهمیت بسزائی در شناخت اولیه و تنظیم و monitoring اختلالات وسکولیتی دارد. (۱)

در مورد بیماران مبتلاء به R.A و SLE که در این طرح مورد مطالعه قرارگرفتند - تست ANCA علی رغم ویژگی ۸۵/۱٪ و حساسیت ۸٪ در رقّت $\frac{1}{128}$ برای بیماران مبتلاء به SLE و همچنین ویژگی ۸۷/۵٪ و حساسیت ۳۲/۲٪ در رقّت $\frac{1}{16}$ برای بیماران مبتلاء به R.A نمی‌تواند در تشخیص یا تایید این بیماران مورد استفاده قرار گیرد؛ بلکه به خاطر اختصاصیت نسبتاً زیاد این تست در رقت‌های ذکر شده، فقط می‌توان از این تست به عنوان تست کمکی همراه با علائم بالینی، در بیماران، استفاده کرد و به تشخیص قطعی بیماری توسط پزشک کمک نمود.

البته اگر این تست در رقت‌های ذکر شده، مثبت شود، می‌تواند به طور مشخص، بیماری R.A و SLE را توجیه کند؛ البته منفی شدن این تست، دلیلی بر رد دو بیماری فوق نمی‌باشد. در نهایت نیز هیچ‌گونه ارتباط معنی داری بین سن و جنس فاکتور روماتوئید R.A و بروز ANCA وجود نداشت؛ هم‌چنین ارتباط معنی داری بین سن و و وجود ANA و بروز ANCA در بیماران SLE مشاهده نشد.

همان طور که گفته شد، تست غربالی، برای پیدا کردن ANCA، روش IFA می‌باشد که از نوتروفیل تخلیص شده به عنوان پیش ماده استفاده می‌شود؛(۱۰) بنابر این با این روش نسبتاً ساده و ارزان و قابل اعتماد، می‌توان این تست را در دیگر بیماری‌های بافت همبند و وسکولیت‌ها (بخصوص بیماری وگنر) نیز انجام داد و برای شناسائی و درمان این بیماری‌ها، از آن استفاده نمود.

REFFERENCES:

1-Schnabel A, Hauschild S. Anti-neutrophil cytoplasmic Antibodis in Generalized Anti immune disease. In T Arch Allergy Immunol .1996; 109: 201-206.

2-Inamura K, Fulkase S. Detection of Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) using the immunoperoxidase method. Acta otolaryngologic, supplement. 1994 Feb;(3):218-220.

3-Michele Schinella M.D. Improved neutrophil separation from Anti - D-treated Rh (D) - Positive whole blood by a discontinuous gradient method. AM J clin. Pathol. 1991; 96 : 391-393.

4-Gerdbran M,Csernok E. incidency target antigen, and clinical implication of Anti-neutrophil cytoplasmic Antibodies in Rheumatoid Arthrtitis. The journal of Rheumatology. 1996; 23 (5): 826-830.

5-Braun M.G, Csernok E. incidence and specificity of P-ANCA in Rheumatic Disease .Advances in Experimental Medicine Biology.1993 Feb; 336(4): 371-374

6-Pauzner R, Gladman D. Anti-neutrophil cytoplasm Antibodies in systemic Lupus Erythematous. The Journal of Rheumatology .1994; 21: 1670-1673

7-Steuer A, palmer A. A patient with Rheumatoid Arthritis and Microscopic poly arthritis. British Journal of Rheumatology. 1995; 34 : 1185 - 1189.

8-Schnabel A, Csernok E, David A. Anti-neutrophil Cytoplasmic Antibodies in systemic lupus Erythematosus. Arthritis and Rheumatism. 1995 May; 38 (5) : 633-637.

9-Csernok E, Gron W.L. Anti-neutrophil Cytoplasmic Antibodies (ANCA) in inflammatoy rheumatic disease. Zeitschirft fur Rheumatologic. 1995 Feb; 54(13): 26-38.

10-Segelmark M, Baslund B. Some patients with anti-myeloperoxidase antibodis have a C-ANCA pattern. Clin, Exp. Immunol 1994; 96: 458-465.