خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۴ شماره ۵ زمستان ۸۶ ویژه‌نامه (۳۵۰-۳۴۵)

تشخیص بیماری منونوکلئوز عفونی به روش منواسپات و استفاده از گلبول قرمز گوسفند و تغییرات خونی و جستجوی Anti-i در این بیماران

دکتر عباسعلی پورآذر[۱]، دکتر زهره پسران[۲]

چکیده

سابقه و هدف

اغلب موارد در بیماران منونوکلئوز عفونی **Anti-i** قابل تشخیص می‌باشد که از نوع **IgM** بوده، در حرارت ۴°C تا ۲۲°C واکنش می‌دهد و در تیتر بالا حتی در حرارت ۳۷ °C نیز واکنش می‌دهد. هدف این مطالعه بررسی میزان حساسیت آزمایش‌ها در جهت تعیین آنتی‌بادی از یک سو و تعیین میزان تغییرات خونی و شناسایی آنتی‌بادی **Anti-i** از سویی دیگر جهت شناخت بیماری منونوکلئوز عفونی از جنبه‌های هماتولوژی و سرولوژی می‌باشد.

مواد وروش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع توصیفی بود. در این مطالعه از گلبول قرمز خون اسب(کیت مونوچک) و گلبول قرمز خون گوسفند(کیت پل ـ بونل دیویدسون) جهت تعیین آنتی‌بادی هتروفیل و از خون بند ناف جنین از گروه خون **O** جهت تعیین آنتی‌بادی **Anti-i** استفاده گردید. بدین منظور سوسپانسیون‌های مختلفی جهت انجام آزمایش‌ها تهیه شد. به منظور بررسی‌های سرولوژیکی از روش‌های منواسپات، پل ـ بونل دیویدسون و آگلوتیناسیون و جهت انجام بررسی‌های هماتولوژی از روش‌های دستی شمارش گلبول‌های سفید و روش شمارش افتراقی استفاده گردید.

یافته‌ها

مطالعه بر روی ۹۰ بیمار مبتلا به منونوکلئوز عفونی انجام شد. در حدود ۴۴٪ موارد تیتر آنتی‌بادی کمتر یا مساوی ۱/۴۰ بود که در مقایسه با نمونه کنترل(که حدود ۶٪ می‌باشد) درصد بالایی را نشان داد. نتایج حاصل از آزماش پل ـ بونل دیویدسون نشان دادن که عیار آنتی‌بادی بعد از جذب توسط خوکچه هندی در ۳۴٪ از بیماران بیشتر یا مساوی ۱/۴۰ بود در صورتی که در نمونه کنترل در هیچ کدام از موارد عیار آنتی‌بادی کمتر یا مساوی ۱/۴۰ مشاهده نشد. بعد از جذب آنتی‌بادی‌ها توسط گلبول قرمز گاو در نمونه‌های مبتلایان به بیماری در ۷۶٪ موارد عیار آنتی‌بادی صفر در صورتی که در نمونه‌های کنترل این میزان حدود ۵۵٪ بود. با بررسی شمارش گلبول‌های سفید از بیمارانی که آزمایش پل ـ بونل دیویدسون مثبت داشتند، افزایش بین **cell/l** $۱۰^{۹}$ ـ۱۵×$۱۰^{۹}$ **cell/l** ۱۴ × در غالب موارد مشاهده گردید و بنابراین در سه دامنه سنی مورد آزمایش، تعداد گلبول‌های سفید افزایش قابل توجهی داشتند. در بررسی شمارش نسبی لنفوسیت‌ها لنفوسیتوز در سنین مختلف ۵۰٪ و بررسی لنفوسیت‌های آتیپیک بالای ۱۰٪ بود. بررسی در مورد **Anti-i** و **Anti-I** مؤید این مطلب بود که هیچ گونه آگلوتیناسیون در دمای ۴ °C و ۲۲ °C با استفاده از خون **oi** بند ناف و **OI** گلبول قرمز بالغین ملاحظه نمی‌گردد.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از آزمایش‌های سرولوژیکی بیانگر هم‌خوانی در آزمایش‌های تشخیص افتراقی منواسپات و پل ـ بونل دیویدسون بود. نتایج حاصل از بررسی هماتولوژیکی بر روی نمونه‌هایی که آزمایش پل ـ بونل دیویدسون مثبت داشتند دال بر تغییرات خونی قابل توجهی از نظر تغییر میزان گلبول سفید، افزایش لنفوسیت‌ها و پیدایش لنفوسیت آتیپیک بود. با مجاور نمودن گلبول‌های قرمز بند ناف **oi (cord cell)** به تمام سرم‌های بیماران در درجه حرارت ۴ °C و ۲۲ °C و ۳۷°C آگلوتیناسیون واضح و روشنی مشاهده نشد.

کلمات کلیدی: منونوکلئوز عفونی، آنتی‌بادی‌های هتروفیل، گلبول قرمز

تاریخ دریافت : ۸۵/ ۲/۱۲

تاریخ پذیرش : ۸۶/۱۰/۱۹

۱ـ مؤلف مسؤول: PhD ایمونوهماتولوژی ـ استاد دانشگاه علوم پزشکی اصفهان ـ خیابان هزار جریب ـ کدپستی: ۱۷۸-۸۱۷۴۴

۲ـ PhD ایمونولوژی ـ دانشیار دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2024-12-31]

مقدمه

پیشرفت‌های سریع و روزافزون چند دهه اخیر در زمینه مهندسی ژنتیک، بیولوژی مولکولی و ایمونولوژی، دیدگاه‌های جدیدی در مورد پاتوژنز بسیاری از بیماری‌ها ارایه داده است. در طی سال‌هایی که از شناخت کامل ویروس اپشتین بار به عنوان عامل بیماری منونوکلئوز عفونی می‌گذرد، تحقیقات بسیاری برای کشف ناشناخته‌های این بیماری صورت گرفته است(۲، ۱). امروزه نقش این ویروس در بروز بدخیمی‌ها توجه بسیاری از محققین را به خود اختصاص داده است(۳).

اگر چه منونوکلئوز عفونی در اغلب موارد سیر خوش‌خیمی دارد ولی از آن جایی که عوارض این بیماری می‌تواند به شدت خطرناک باشد، شناخت چهره‌های بالینی گوناگون این بیماری و عوارض بالقوه آن برای هر پزشکی که به احتمال زیاد در تجربه شغلی خود با مبتلایان به منونوکلئوز روبرو می‌شود ضروری به نظر می‌رسد. همان طور که گفته شد بیماری منونوکلئوز عفونی بیماری است که با تولید آنتی‌بادی هتروفیل در خون فرد بیمار همراه است و ویروس اپشتین بار که به عنوان عامل بیماری عنوان گردیده، در بعضی موارد با تحریک سیستم ایمنی بدن باعث تغییر در مورفولوژی سلول‌های خونی می‌گردد و از طرف دیگر با تولید آنتی‌بادی‌های اختصاصی در ایجاد آنمی همولیتیک اتوایمیون دخیل می‌باشد(۵، ۴). بررسی حاضر برای تشخیص میزان حساسیت آزمایش‌ها در جهت تعیین آنتی‌بادی از یک سو و تعیین میزان تغییرات خونی و شناسایی آنتی‌بادی Anti-i از سوی دیگر سعی در جهت شناخت بیماری از جنبه‌های هماتولوژی و سرولوژیکی نموده است. اغلب موارد در بیماران منونوکلئوز عفونی، آنتی i قوی قابل تشخیص می‌باشد که از نوع IgM بوده و در حرارت ۴ °C تا ۲۲ °C با خون بند ناف oi واکنش می‌دهد و در تیتر بالا حتی در درجه حرارت ۳۷ °C درجه نیز واکنش می‌دهد(۹-۶).

مواد و روش ها

مطالعه انجام شده از نوع توصیفی بود. تشخیص سرمی منونوکلئوز عفونی(IM) به روش منواسپات بر اساس اصول روش هاف و بوئر بدین صورت است که سرم بیماران مبتلا به منونوکلئوز عفونی شامل آنتی‌بادی‌ها که توسط سلول‌های قرمز اصلاح شده است را با گلوتارآلدئیدآگلوتینه می‌نمایند. گلبول‌های قرمز گوسفند در این آزمون، به میزان کم مثبت کاذب ایجاد می‌کنند. هر کیت برای این روش شامل ۴۰-۱۰ آزمایش می‌باشد.

سپس یک سوسپانسیون ۵٪ گلبول قرمز اسب جهت آزمایش منواسپات تهیه گردیده و به روش هاف و بوئر همانند کیت تجارتی جهت آزمایش به کار گرفته می‌شود. در این تحقیق نیز دقیقاً منواسپات تهیه گردیده و به روش هاف و بوئر همانند کیت تجارتی جهت آزمایش به کار گرفته شد و کیت تهیه شده با استانداردهای بین‌المللی مقایسه گردید. همین کار با گلبول‌های قرمز گوسفند و انسان نیز انجام گرفت. دقیقاً به میزان کمتر گلبول قرمز مصرف شد که برای مدت زیادی بدون تغییر قابل نگهداری باشد. سپس به ترتیب یک قطره سرم بیمار، یک قطره کنترل مثبت و یک قطره کنترل منفی، در سه محل و بعد یک قطره از گلبول قرمز اسب کنار هر سرم قرار داده شد و به وسیله میله مخصوص به خوبی مخلوط گردید. بعد از ۲ دقیقه آگلوتیناسیون به دقت مشاهده شد و با کنترل مثبت و منفی مقایسه گردید. سپس جذب افتراقی بر اساس روش پل ـ بونل دیویدسون انجام شد(۱۰، ۴). بعد از ساختن رقت‌های مختلف از ۳ سری لوله سرم، آنتی‌ژن خوکچه هندی و آنتی‌ژن گاو، آن‌ها را خوب مخلوط کرده و به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷°C قرار دادیم. سپس برای خواندن نتایج لوله‌ها را به مدت ۳۰ ثانیه در دور ۱۵۰۰ سانتریفوژ کرده و سپس لوله‌ها از نظر آگلوتیناسیون مورد بررسی قرار گرفت.

جمع‌آوری نمونه‌های خونی به این علت که بیمارستان امین اصفهان مهم‌ترین مرکز پزشکی از نظر میزان پذیرش بیماران عفونی است، از مرکز مذکور انجام شد. نمونه‌های تهیه شده جهت آزمایش‌ها به آزمایشگاه ایمونولوژی دانشگاه اصفهان منتقل گردید. هم چنین نمونه‌های نرمال مورد بررسی جهت مقایسه نتایج، از افرادی که جهت اهدای خون به پایگاه انتقال خون اصفهان مراجعه نموده

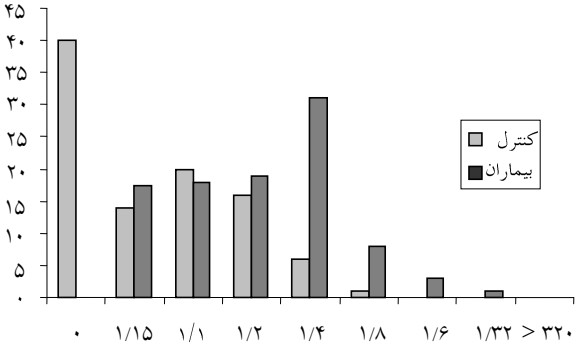
[Downloaded from bloodjournal.ir on 2024-12-31]

بودند تهیه و جهت آزمایش‌ها به بخش ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انتقال یافتند(لازم به تذکر است که جهت تهیه نمونه سعی گردید از افراد جوان برای انجام آزمایش‌ها استفاده گردد).

یافته ها

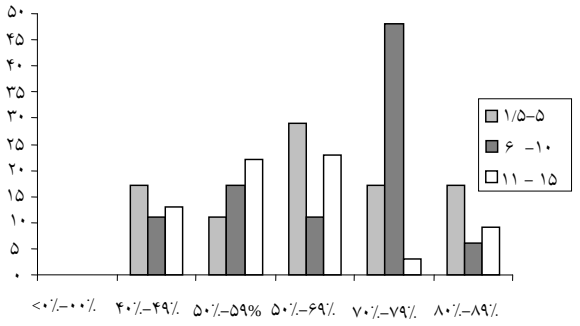
نتایج حاصل از آزمایش منواسپات و اسلایدی نشان داد که در حدود ۳۳٪(۳۰ نفر) از نمونه‌های مبتلا به بیماری منونوکلئوز، مثبت می‌باشند و بقیه(۶۷٪) منواسپات منفی دارند اما در مورد نمونه‌های کنترل هیچ گونه مورد مثبت مشاهده نگردید.

نتایج حاصل از آزمایش پل ـ بونل که بر روی ۹۰ بیمار مبتلا به منونوکلئوز عفونی انجام گرفت نشان داد در حدود ۴۴٪ موارد، تیتر آنتی‌بادیشان کمتر یا مساوی ۱/۴۰ بوده که در مقایسه با نمونه‌های کنترل(که حدود ۶٪ می‌باشد) درصد بالایی را نشان می‌دهد. نتایج حاصل از آزمایش پل ـ بونل دیویدسون نشان داد که عیار آنتی‌بادی بعد از جذب توسط سلول‌های خوکچه هندی در ۳۴٪ از بیماران بزرگ‌تر یا مساوی ۱/۴۰ می‌باشد حال آن که در نمونه‌های کنترل در هیچ کدام از موارد عیار آنتی‌بادی بیشتر یا مساوی ۱/۴۰ مشاهده نگردید(جذب آنتی‌بادی‌های متفرقه توسط سلول‌های خوکچه هندی، نمودار ۱). نتایج حاصل بعد از جذب توسط گلبول‌های قرمز گاو نشان داد که در نمونه‌های مبتلایان به بیماری، ۷۶٪ موارد عیار آنتی‌بادی صفر بوده (جذب صورت



نمودار ۱: عیار آنتی‌بادی هتروفیل در ۹۰ بیمار مبتلا به منونوکلئوز عفونی و مقایسه آن با نمونه‌های نرمال با استفاده تست پل ـ بونل(Pual-Bunnel Test)

گرفت) حال آن که در مورد نمونه‌های کنترل این میزان در حدود ۵۵٪ می‌باشد. نتایج حاصل از بررسی شمارش گلبول‌های سفید که بر روی ۴۵ بیمار با آزمایش پل ـ بونل دیویدسون مثبت صورت گرفت نشان داد که گلبول‌های سفید بیماران در سنین مورد مطالعه یک افزایش بین $10^9 \times 14$ cell/L تا $10^9 \times 15$ cell/L در غالب موارد پیدا کرده‌اند و به عبارت دیگر در ۳ دامنه سنی مورد آزمایش تعداد گلبول‌های سفید افزایش قابل توجهی یافته‌اند. نتایج حاصل از شمارش نسبی لنفوسیت ها نشان داد که لنفوسیتوز در حدود ۸۰٪ موارد در سنین مختلف مورد مطالعه ۵۰٪ می‌باشد و بیشترین لنفوسیتوز در سنین بین ۶ تا ۱۵ سال مشاهده می‌گردد(نمودار ۲). نتایج حاصل از شمارش لنفوسیت‌ها نشان داد بیش از ۵۰٪ آن‌ها را لنفوسیت‌های آتیپیک تشکیل داده‌اند.



نمودار ۲: نتایج حاصل از شمارش لنفوسیت‌های نسبی در رده‌های سنی مختلف

نتایج حاصل از تشخیص Anti-i ، Anti-I مؤید این مطلب بود که هیچ گونه آگلوتیناسیون در دمای ۴ °C و ۲۲ °C در ۹۰ نمونه با استفاده از oi خون بند ناف و OI گلبول قرمز بالغین مثبت صورت نگرفت و نتایج آگلوتیناسیون منفی بود. بنابراین نمونه‌های فوق‌الذکر فاقد آنتی‌بادی Anti-i و Anti-I گزارش گردیدند.

بحث

با توجه به این که در آزمایش پل ـ بونل دیویدسون، عیار آنتی‌بادی کمتر یا مساوی ۱/۴۰ به دست آمد و نیز مواردی که تیتر بیشتر یا مساوی ۱/۴۰ داشتند دارای آزمایش منواسپات مثبت بوده و علایم بالینی دال بر وجود

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2024-12-31]

بیماری دارند، می‌توان در ایران تیتر ۱/۴۰ را به عنوان تشخیص قطعی بیماری منونوکلئوز عفونی گزارش نمود. نتایج حاصل از عیار آنتی‌بادی هتروفیل بعد از جذب توسط گلبول‌های قرمز گاو مشخص نمود که در ۸۶٪ نمونه مورد بررسی این عیار صفر می‌باشد. این مطلب نشان می‌دهد که آنتی‌بادی‌ها از نوع فورسمن نبوده و آنتی‌بادی اختصاصی بیماری منونوکلئوز عفونی می‌باشند.

در کل نتایج منفی در انجام آزمایش پل ـ بونل یا منواسپات برای تشخیص بیماری منونوکلئوز عفونی را، می‌توان یا مربوط به اشتباهاتی که در تشخیص کلینیکی داده می‌شود دانسته و یا احتمالاً در ناچیز بودن تیتر آنتی‌بادی‌های هتروفیل که نتیجه آزمایش را منفی می‌کند قلمداد کرد. در بسیاری از موارد پی‌گیری بیماران بعد از چند هفته و یا پی‌گیری بیمارانی که نتیجه آزمایش‌های آن‌ها منفی بوده ممکن است این مشکل را حل نماید. لنفوسیتوز بالای ۵۰٪ در ۸۰٪ موارد، خود معیاری است که در بسیاری از موارد در تشخیص بیماری منونوکلئوز عفونی بیان می‌گردد(۱۰، ۵، ۴). هم چنین در محدوده سنی مورد مطالعه، حدود ۸۰٪ موارد لنفوسیت آتیپیک بالای ۱۰٪ دیده می‌شود که خود یکی از ملاک‌های تشخیص در منونوکلئوز عفونی محسوب می‌گردد. همان طور که در قسمت روش کار آمده است آنتی‌بادی هتروفیل از نمونه‌های مورد آزمایش گسترش پیدا نکرده و نتیجه آزمایش منفی بود. این مساله خلاف مطالبی است که در مقاله‌ها آمده زیرا در بعضی از آن‌ها، بین ۸۰٪-۷۰٪ وجود آنتی‌بادی i را گزارش نموده‌اند و وجود Anti-i را در بیماران منونوکلئوز اختصاصی می‌دانند(۱۱، ۷، ۶).

نتیجه‌گیری

۱- نظر به یکسان بودن نتایج حاصل از آزمایش منواسپات و پل ـ بونل دیویدسون، منطقی به نظر می‌رسد که از نظر زمانی و از نظر اقتصادی، آزمایش ساده و منواسپات استفاده گردد.

۲- نتایج حاصل از بررسی نشان می‌دهد که بیشتر موارد آتیپیک بیماری در سنین پایین اتفاق می‌افتد و در صورت وجود فرم آتیپیک بیماری در مناطقی که امکان ارزیابی اختصاصی چند ویروس وجود ندارد(مثل اصفهان)، اغلب تشخیص منونوکلئوز عفونی وابسته به رد سایر علل و توجه به سیر بالینی بیمار است. بنابراین ضروری است که در مراجعه به بیماری که از تب و گلو درد شاکی است، صرفاً معاینه به حلق و گلو محدود نشده و برای هر بیماری معاینه سیستمیک لازمه انجام پذیرد.

۳- در مواردی که از نظر بالینی به بیمار مشکوک هستیم به نظر می‌رسد بررسی هم زمان آزمایش‌های سرولوژی و یافته‌های هماتولوژی کمک عمده‌ای در تشخیص قطعی بیماری نماید، بدین علت در مواردی که بیماری به فرم آتیپیک می‌باشد، استفاده از آزمایش‌های اختصاصی ویروس اجتناب ناپذیر است(۱۴-۱۲).

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2024-12-31]

References :

1- Silverstein A, Steinberg G, Nathanson M. Nervous system involvement in infectious mononucleosis. The heralding and-or major manifestation. Arch Neurol 1972;26:353-8.
2- Schooly RT, Dolion R. Epstein - Barr virus infectious mononucleosis in mandell G.L.L (ED). Principles and Practice of Infections Disease 1979;2:1324-41.
3- Henle G, Henle W, Diehl V. Relation of Burkitt's tumor associated herpes type virus of infection mononucleosis. Proc Nath Sci USA 1968;59:94.
4- Bannel PJ. The presence of heterophil antibody in infectious mononucleosis. Rev Infect Dis 1982;4: 1062-68.
5- Tamir D, Benderly A, Levy J, Ben-Porath E, Vonsover A. Infectious mononucleosis and Epstein – Barr virus in childhood. Pediatrics 1974;53:330-5.
6- Dividson I. Serologic diagnosis of infectious mononucleosis. JAMA 1937;108:289.
7- Reese RE, Robber TF, Betts R. A practical approach to infections diseases. 3rd edition 1991;17:504-90.
8- Feizi T. The blood group Ii system. A Carbohydrate antigen system defined by nuturally monoclonal or oligoclonal autoantibodies of man. Immunol Common 1981;10:127-56.
9- Brecher ME. Technical manual. 15th editioin American Association of Blood Bank;2005:306-7.
10- Mollison Pl, Engelfriet CP, Contreras M. Blood transfusion in clinical medicine. 10th edition. 1997:141-2.
11- Main waring CJ, walewska R, snowdenj, Winfield DA, chan-lam D, Nolan B, *et al*. Fetal cold anti-i antoimmune hemolytic aniemia hairy cell leukemia. Br J haemotal 2000;709(3):647-3.
12- Rolcke D, Konig Ai, Seyferin ut, Pereira A. Coexisting anti I.i plus Anti p.cold agglutinins in individual sera. Infusions transfusions med 2000;27(3):749-153.
13- Cauerhff A, Braden Bc, Carvalho JC Aparicior, Polikarpov I, Heoni J, Gold baum FA. Three-dimensional structure of the fab from human IgM cold agglutinin. J Immunol 2000;165(11):6422-80.
14- Sally V Rudmann. Blood Banking and Transfusion Medicine. 2nd edition. 2005:94-5.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2024-12-31]

Infectious mononucleosis detection through monospot and Paul-Bunnel Davidson tests

Pour Azar A.A.[1](PhD), Pesaran Z.[1](PhD)

[1]Isfahan University of Medical Sciences

Abstract

Background and Objectives

In most of cases, Ig-M anti-I antibody is detectable in infectious mononucleosis patients both through agglutination in 4-22°C and in high titre of antibody at 37°C. Our objective in this study both to evaluate the sensitivity of some serological tests and detect anti-I antibodies in diagnosis of infectious mononucleosis.

Materials and Methods

In this descriptive study, red blood cells of horses and sheep were used to determine heterophil antibody; monocheck kit was used for the former and Paul-Bunnell Davidson kit for the latter. Fetal OI group from umbilical cord blood was also used to determine anti-I antibody. For this purpose, we prepared different suspensions for different laboratory examinations. For serological evaluations, monospot, Paul-Bunnell Davidson, and agglutination tests were performed; moreover, manual WBC counting was performed for hematological evaluations.

Results

90 patients with infectious mononucleosis were included in this study. 44% of the patients had antibody titre of more than 1/40 that was significantly more than that of the 6% of the control group. The results of the Paul–Bunnell Davidson test showed that antibody absorbtion level was more than 1/40 in 34% of the patients. In the control group, none of the subjects had antibody titre of more than 1/40. The results of the absorption of antibodies by cow RBCs showed that in 76% of cases antibody titre was zero compared to 55% in the control group. WBC counting in the majority of the patients with positive Paul-Bunnell Davidson showed an increase up to $(14\text{-}15)\times10^9$ cell/L. Lymphocytosis of more than 50% and atypical lymphocyte formation of more than 10% were also seen in the majority of these cases. Evaluation of the anti-I and anti-i antibodies showed no evidence of agglutination at the temperature of 4°C and 22°C using oi blood group of umbilical cord and OI blood group of mature red blood cells.

Conclusions

The results showed very good correlation between monospot and Paul-Bunnell Davidson test. Hematological results of positive Paul-Bunnel Davidson showed remarkable changes in WBC count, lymphocytosis, and atypical lymphocyte formation. With the exposure of oi cord blood RBC to patients' plasma showed no evidence of agglutination at the temperature of 4°C, 22°C, and 37°C.

Key words: Mononucleosis infection, Hetrophil antibody, Red blood cell

SJIBTO 2008; 4(5): 345-350

Received: 2 May 2006
Accepted: 9 Jan 2008

Correspondence: Pour Azar A.A., PhD of Immunology. Isfahan University of Medical Sciences. P.O.Box:81744-176, Isfahan, Iran. Tel: (+98311)7922431; Fax : (+98311)6688597
E-mail: *pourazar@med.mui.ac.ir*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2024-12-31]