(مقاله پژوهشی)

بررسی سطح ایمنی ناشی از واکسن ب.ث.ژ (BCG) در مقابل بیماری سل با استفاده از تست پوستی توبرکولین و پاسخ لنفوسیت‌ها به آنتی‌ژن‌های ب.ث.ژ در شرایط *In vitro* در دانش آموزان شهر شاوور

سکینه عبدالخانی[1*]، حسن محمودی[2]، عبدالکریم شیخی[3]، محمد رعایایی اردکانی[4]

۱-کارشناس ارشد میکروبیولوژی.
۲-استادیار گروه میکروب شناسی پزشکی.
۳-استاد گروه ایمنولوژی و میکروبیولوژی.
۴-استاد گروه زیست شناسی.

۱-دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد، بروجرد، ایران.
۲-گروه میکروب شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران.
۳-گروه ایمنولوژی و میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی دزفول، دانشکده پزشکی، دزفول، ایران.
۴-گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

*نویسندهٔ مسؤول:
سکینه عبدالخانی؛ دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد، بروجرد، ایران.
تلفن: ۰۰۹۸۹۱۲۰۶۳۰۱۸۸
Email: hasan mamoudi24@gmail.com

چکیده

زمینه و هدف: آزمون جلدی توبرکولین یک تست غربال گری در بیماری سل می باشد. هدف این پژوهش ارزیابی سطح ایمنی ناشی از واکسن ب.ث.ژ با استفاده از اندازه گیری اینترفرون گاما در شرایط آزمایشگاهی می باشد.

روش بررسی: این پژوهش روی ۳۲ نفر از دانش آموزان دختر و پسر مقاطع سه گانه تحصیلی (ابتدایی، متوسطه اول و دوم) انجام گرفت. بعد از نمونه‌گیری خون، سلول های تک هسته‌ای خون محیطی به وسیله محلول فایکول جدا و تعداد ۲×۱۰^{۵} cell/well با مقادیر ۵ یا ۲۰ میکرولیتر واکسن ب.ث.ژ در انکوباتور $Co_{۲}$ ۵ ٪ در دمای $۳۷C^{o}$ به مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت کوکالچر شد و از محلول رویی با روش الایزا میزان اینترفرون گاما اندازه‌گیری شد. برای تجزیه و تحلیل اختلاف بین دو گروه از آزمون t استفاده شد.

یافته‌ها: آنالیز نتایج نشان داد که بین اندازه ایندوراسیون (اندازه سفتی) در سن‌های مختلف ۱۳سال به پایین و ۱۳سال به بالا دارای تفاوت معنی دار بود($P<۰/۰۵$). همچنین بین اندازه ایندوراسیون (اندازه سفتی) در پسران و دختران تفاوت معنی‌دار وجود نداشت($P>۰/۰۵$). در بررسی بین سن، زمان و مقادیر ۵ یا ۲۰ میکرولیتر واکسن ب.ث.ژ استفاده شده با میزان ترشح اینترفرون گاما تفاوت معنادارای وجود داشت($P<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج در شرایط آزمایشگاهی ترشح اینترفرون گاما ارتباط مستقیم با میزان غلظت استفاده شده باکتری و سلول های تک هسته ای خون دانش آموزان و زمان انکوباسیون دارد. همچنین میزان ترشح اینترفرون گاما در سنین بالا کمتر از میزان آن در سنین پایین بود.

واژگان کلیدی: *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس*، اینترفرون گاما، واکسن ب.ث.ژ

دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۱۲/۲۲ **دریافت مقالهٔ اصلاح‌شده: ۱۳۹۸/۴/۱** **اعلام قبولی: ۱۳۹۸/۴/۳**

مقدمه

سل از قدیم‌ترین بیماری‌های عفونی شناخته‌شده بشری است که هنوز هم از علل مهم بروز بیماری و مرگ‌ومیر در جهان می باشد(۱) بیماری سل پس از ایدز شایع‌ترین علت مرگ ناشی از بیماری‌های عفونی در انسان است(۲).

براساس نتایج مطالعات بیش از یک سوم جمعیت جهان با باسیل مولد سل یعنی *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* (*Mycobacterium tuberculosis*) آلوده هستند. از این تعداد سالیانه تقریباً ۹ میلیون نفر به بیماری سل مبتلا می‌گردند که تقریباً بیش از ۲ میلیون نفر آن‌ها در اثر این بیماری دچار مرگ می شوند (۱و۴).

بیماری سل به‌عنوان اصلی‌ترین عامل عفونی مرگ‌ومیر بزرگسالان در کشورهای درحال‌توسعه بحساب می‌آید. تخمین زده شده است که تا سال ۲۰۲۰، باکتری *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* ۱ میلیارد نفر از جمعیت جهان را آلوده نماید که از این تعداد ۱۵۰ میلیون نفر به بیماری سل مبتلا می شوند و ۳۶ میلیون نفر را از بین می‌برد (۵).

راه‌های گوناگونی برای تشخیص عفونت توبرکلوزیس وجود دارد که به دو روش مستقیم و غیرمستقیم قابل انجام است. تست پوستی توبرکولین یک روش تشخیصی غیرمستقیم است که به تست زیرپوستی مانتو (Mantoux test) معروف است. یکی دیگر از راه‌های تشخیصی غیرمستقیم تست آزاد کردن اینترفرون گاما (Interferon gamma) است که روش جدیدی برای تشخیص عفونت نهفته *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* است (۵).

اینترفرون گاما سایتوکاین معروف زیرردہ Th1 می‌باشد که موجب تحریک ماکروفاژها گشته، سطح MHC (MajorHistocompatibility Complex) کلاس II را در آن‌ها افزایش داده، آن‌ها را وادار به ترشح IL-12 (Interleukin-12) می‌کند که موجب القای تمایز سلول‌های Th0 به زیرردہ Th1 می‌گردد. ترشح IFN-γ توسط سلول‌های Th1 همچنین موجب تغییر کلاس آنتی‌بادی به کلاس‌های IgG (IgG2a در موش) (Immunoglobulin) می گردد که در تثبیت کمپلمان و فاگوسیتوز دخالت دارند (۶و۷). بنابراین تشخیص و درمان سریع این بیماری باعث کنترل بهتر و مؤثرتر این باکتری و در نتیجه جلوگیری از انتقال آن به انسان و انتخاب روشی مناسب و مؤثرتر جهت درمان عفونت‌های ناشی از آن می‌شود. هدف این پژوهش ارزیابی سطح ایمنی ناشی از واکسن ب.ث.ژ با استفاده از اندازه گیری اینترفرون گاما در شرایط آزمایشگاهی می باشد.

روش بررسی

نمونه گیری

جامعه آماری در این پژوهش، شامل کلیه دانش آموزان پسر و دختر کلیه مقاطع تحصیلی (ابتدایی، متوسطه اول و دوم) شهر شاوور استان خوزستان بوده، که بر اساس روش نمونه گیری تصادفی ساده ۳۲ نفر برای ادامه مطالعه انتخاب شدند. پس از کسب تایید کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی دزفول (۹۴/۳۰/۱۶۲/ پ) و اخذ رضایت نامه از والدین دانش آموزان، خون گیری از دانش آموزان در مدارس صورت گرفت و مقدار ۵ میلی لیتر خون در یک لوله فالکون ۱۵ میلی لیتری استریل و عاری از آلودگی جمع آوری شد. به منظور جلوگیری از انعقاد خون ۱۰۰ واحد هپارین به ازای هر میلی لیتر خون به لوله ها اضافه گردید و سپس مخلوط شد. کشت سلولی روی خون گرفته شده انجام گرفت.

جداسازی و شمارش سلولهای مونونوکلئار خون محیطی

بعد از نمونه‌گیری خون هپارینه مقدار ۵ cc محلول PBS استریل اضافه شد سپس در دو لوله فالکون دیگر هرکدام به مقدار ۳cc محلول فایکول ریخته و با پیپت پاستور که قبلاً اتوکلاو شده بود به‌آرامی خون روی آن اضافه کرده به‌طوری‌که خون و محلول فایکول مخلوط

نشود و در دو فاز مجزا قرار گیرند و حجم دو لوله حاوی محلول فایکول و خون- به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت rpm ۲۵۰۰ سانتریفیوژ شد(۸).

کشت سلولی سلولهای مونونوکلئار خون محیطی

در این مرحله گلبولهای قرمز تجمع کرده و ته لوله قرار می گیرند. لنفوسیت ها به صورت لایه ای ابرمانند بالای آن قرار می گیرند که با پیپت پاستور این لایه جمع آوری و به یک لوله فالکون تمیز و استریل منتقل شد. بافی کوت جدا شده در لوله فالکون جهت شستشوی سلول های مونونوکلئار مقدارcc ۵ محلول RPMI 1640 اضافه و مخلوط شد سپس به مدت ۵ دقیقه با سرعت rpm ۲۵۰۰ سانتریفیوژ کرده، محلول رویی دور ریخته شد و به رسوب حاصل که حاوی سلولهای مونونوکلئار بود مقدار ۳cc محلول محیط کشت سلولی CM10 (مخلوط ۱۰۰ cc محلول RPMI 1640 به همراه ۱۰ cc محلول سرم جنین گوسفندی (calf serum fetal) اضافه شد. و در نهایت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد Co_2 انکوبه شد (۹).

شمارش گلبول های مونونوکلئار

شمارش با استفاده از لام نئوبار انجام شد. سپس با رقیق کردن ویال استوک BCG تعداد 1×10^4 Cfu/ml برای غلظت ۵ میکرولیتر و مقدار 4×10^4 Cfu/ml برای غلظت ۲۰ میکرولیتر از واکسن اضافه شد.

مجاور نمودن سلولهای مونونوکلئار با باکتری

مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از محلول سلول ها و محیط کشت CM10 در ۶ چاهک ریخته شد و به ترتیب زیر مقدار ۵ و ۲۰ میکرولیتر باکتری اضافه شد جدول ۱.

جدول ۱: گروه های مورد مطالعه

چاهک	گروه مورد مطالعه
چاهک شماره ۱	گروه کنترل و بدون اضافه کردن باکتری
چاهک شماره ۲	باکتری ضعیف شده *مایکوباکتریوم بوویس* با غلظت ۵ میکرولیتر (1×10^4 Cfu/ml)
چاهک شماره ۳	باکتری ضعیف *شده مایکوباکتریوم بوویس* با غلظت ۲۰ میکرولیتر (4×10^4 Cfu/ml)

** این ۳ چاهک برای مدت زمان های ۴۸و ۷۲ ساعت در انکوباتور ۵٪ کربن دی اکسید و ۹۵٪ اکسیژن انکوبه شدند.

یافته ها

میزان ترشح IFN-γ

نتایج بدست آمده از این مطالعه نشان داد که میانگین ترشح اینترفرون گاما در افراد زیر ۱۳سال و بالای ۱۳سال پس از زمان ۴۸ساعت به ترتیب در غلظت ۵ میکرولیتر (1×10^4 Cfu/ml)، ۳۶۰/۸۷ و ۹۷/۰۹۹۹ پیکو گرم/دسی لیتر و با غلظت ۲۰ میکرولیتر (4×10^4 Cfu/ml) به ترتیب ۴۹۳/۳۵ و ۱۸۱/۹۳ پیکو گرم/دسی لیتر می باشد. همچنین پس از ۷۲ ساعت به ترتیب در در غلظت ۵ میکرولیتر (1×10^4 Cfu/ml) ، ۴۶۱/۸۷ و ۱۴۵/۹۰ پیکو گرم/دسی لیتر و با غلظت ۲۰ میکرولیتر (4×10^4 Cfu/ml) به ترتیب ۵۹۳/۹۲ و ۱۹۵/۸۲ پیکو گرم/دسی لیتر می باشد (جدول ۲).

جمع آوری کشت سلولها و باکتری ها

بعد از گذشت زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه در انکوباتور ۵٪ کربن دی اکسید ابتدا پلیت را از انکوباتور خارج و نمونه های چاهک را به میکروتیوپ ۰/۵ cc منتقل و در فریز C º ۷۰ – نگهداری شد.

اندازه گیری اینترفرون گاما به روش الایزا

در این تحقیق از ۳۲ دانش آموز سالم نمونه خون تهیه و بعد از جدا نمودن سلولهای مونونوکلئار با باکتریهای مورد نظر کوکالچر انجام شده و مایع رویی (Supernatant) آنها جدا و در فریزر C º ۷۰ – نگهداری شد. برای مایع رویی نمونه‌ها تست الایزا (روش ساندویچ) برای اندازه گیری سایتوکاین مورد نظر انجام شد (۹). در مرحله اول هر یک از حفره های پلیت ۹۶ خانه ای را با حجم ۱۰۰ میکرولیتر از مونوکلونال آنتی بادی غلیظ (۱۰۰ میکرولیتر از محلول مونوکلونال آنتی بادی غلیظ اینترفرون گاما (Human IFN-gamma Dual-Color ELISpot Kit R & D) به ۱۰ میلی لیتر محلول بافر سالین فسفات اضافه شد (رقت ۱:۱۰۰) پوشانده شدند و مدت ۲۴ ساعت توسط محلول بافر سالین فسفات در دمای آزمایشگاه نگه داشته شدند. سپس بعد از سه مرتبه شستشو با بافر خاص آلبومین سرم گاوی ۵ درصد آنتی بادی موجود در حفره ها بلوکه گردیدند. بعد از شستشوی پلیت ها، نمونه ها، استاندارد و سرم کنترل هر یک در حفره های جداگانه پلیت اضافه گردیدند. بعد از ۲ ساعت انکوباسیون پلیت ها در دمای آزمایشگاه و شستشوی مجدد، آنتی بادی مونوکلونال (رقت ۱:۱۰۰) که بر علیه سایتوکاین خاص انسان(اینترفرون گاما)ساخته شده به هر چاهک پلیت اضافه گردید. بعد از انکوباسیون پلیت ها (به مدت ۲ ساعت) و شستشو، محلول گونژوکه (streptavidin-peroxydase) در حجمی معادل ۱۰۰ میکرولیتر به هر یک از چاهک پلیت اضافه گردید. بعد از انکوباسیون(به مدت ۹۰ دقیقه در حرارت آزمایشگاه) و شستشو، محلول سوبسترای کروموژن (Tetramethyl-benzidine) به هر یک از چاهک پلیت اضافه گردید. واکنش مذکور بعد از ۳۰ دقیقه انکوباسیون پلیت ها در تاریکی متوقف گردید و سپس میزان جذب نور و با طول موج ۴۵۰ نانومتر در چاهک پلیت خوانده شد. میزان سایتوکاین هر نمونه از روی منحنی استاندارد محاسبه گردید. تهیه منحنی استاندارد هم مطابق دستورالعمل فوق و همراه با اندازه گیری نمونه ها انجام شد.

آنالیز آماری

آزمون t مستقل جهت سنجش اختلاف بین دو گروه مورد بررسی، با استفاده از نرم افزار Spss نسخه۲۳ صورت گرفت. مقدار سطح معنی‌دار($P<۰/۰۵$) درنظر گرفته شد.

بررسی ارتباط بین میزان ترشح اینترفرون گاما در گروه های مورد مطالعه در زمان و غلظت های متفاوت

با توجه به نتایج آنالیز آماری در نتیجه بین میزان ترشح اینترفرون گاما در سن‌های مختلف ۱۳ سال به پایین و ۱۳ سال به بالا، در زمان های مختلف و غلظت های مورد مطالعه تفاوت معناداری وجود داشت و درنتیجه سن بر میزان ترشح اینترفرون گاما در زمان های مختلف و غلظت های مورد مطالعه تأثیر داشت($P<۰/۰۵$) (جدول ۳ و۴).

جدول۲: شاخص های توصیفی میزان ترشح IFN-γ در دو گروه

گروه مورد مطالعه	زمان	Cfu/ml	میانگین میزان ترشح IFN-γ (پیکو گرم/میلی لیتر)	انحراف استاندارد (Standard deviation)
گروه زیر۱۳سال	۴۸ساعت	غلظت ۵ میکرولیتر (1×10^4 Cfu/ml)	۳۶۰/۸۷	۳۶۶/۲۱۷۰۷
		غلظت ۲۰ میکرولیتر (4×10^4 Cfu/ml)	۴۹۳/۳۵	۴۶۲/۶۶۹۳۳
	۷۲ساعت	غلظت ۵ میکرولیتر (1×10^4 Cfu/ml)	۴۶۱/۸۷	۴۳۲/۵۳۷۴۵
		غلظت ۲۰ میکرولیتر (4×10^4 Cfu/ml)	۵۹۳/۹۲	۴۲۳/۰۵۷۵۹
گروه بالای۱۳سال	۴۸ساعت	غلظت ۵ میکرولیتر (1×10^4 Cfu/ml)	۹۷/۰۹	۱۵۵/۵۱۰۷۴
		غلظت ۲۰ میکرولیتر (4×10^4 Cfu/ml)	۱۸۱/۹۳	۲۸۱/۷۷۵۵۴
	۷۲ساعت	غلظت ۵ میکرولیتر (1×10^4 Cfu/ml)	۱۴۵/۹۰	۲۲۸/۲۹۲۹۳
		غلظت ۲۰ میکرولیتر (4×10^4 Cfu/ml)	۱۹۵/۸۲	۲۸۷/۷۵۰۷۵

جدول ۳: نتایج آزمون t جهت بررسی اختلاف در دو گروه در زمان ها و غلظت های مورد مطالعه

متغیر وابسته	نتایج آزمون لون برای برابری واریانس‌ها		نتایج آزمون t برای برابری میانگین			
	F	سطح معناداری	آماره t	درجه آزادی	سطح معناداری	اختلاف میانگین
میزان ترشح اینترفرون گاما در زمان ۴۸ ساعت و غلظت ۵ میکرولیتر	۱۹/۱۱۹	۰/۰۰۱	۲/۴۷۵	۲۰/۲۸۹	۰/۰۲۲	۲۶۳/۷۶۹۲۳
میزان ترشح اینترفرون گاما در زمان ۴۸ ساعت و غلظت ۲۰ میکرولیتر	۱۳/۰۳۹	۰/۰۰۱	۲/۳۷۶	۲۲/۱۳۳	۰/۰۲۷	۳۱۵/۹۶۹۰۷
میزان ترشح اینترفرون گاما در زمان ۷۲ ساعت و غلظت ۵ میکرولیتر	۱۴/۱۳۳	۰/۰۰۱	۲/۰۹۰	۲۲/۸۹۰	۰/۰۴۸	۳۱۱/۴۲۶۸۷
میزان ترشح اینترفرون گاما در زمان ۷۲ ساعت و غلظت ۵ میکرولیتر	۳/۹۰۰	۰/۰۶۰	۲/۵۹۴	۲۳	۰/۰۱۶	۳۹۸/۰۹۶۹۷

جدول۴: نتایج آزمون t جهت بررسی اختلاف در دو گروه

متغیرها	شاخص‌های تفاوت‌های زوجی				آماره t	سطح معناداری	
	میانگین	انحراف استاندارد	فاصله اطمینان				
			کران بالا	کران پایین			
اینترفرون گاما در زمان ۴۸ اینترفرون گاما در زمان ۷۲	-۸۰/۱۱۷۶۰		۱۸۴/۹۲۶۷۸	-۱۵۶/۴۵۱۶۲	-۳/۷۸۳۵۸	-۲/۱۶۶	۰/۰۴۰

بحث

فعال شدن راه‌های التهابی، شامل شبکه ی سایتوکینی به عنوان عاملی مهم در پاتوژنز سل مطرح است. افزایش سطح در سرم افراد مبتلا به سل نشان سایتوکین‌های IFN-γ و IL-10 می دهد که این دسته از سایتوکین‌ها ، در این بیماری در انسان از اهمیت فوق العاده ای برخوردار هستند (۲و۱۰). ارزیابی تولید سایتوکاین ها به‌ویژه اینترلوکین-۱۰، اینترلوکین-۱۲، اینترفرون گاما و TNF-α ابزار مهمی در بررسی پاسخ‌های ایمنی در برابر محرک‌هایی نظیر عوامل بیماری‌زا است. در این بررسی از آنجایی که رابطه بین سن و میزان ترشح اینترفرون گاما را مورد بررسی قرار دادیم نتایج اختلاف میانگین به وضوح نشان داد که میزان ترشح اینترفرون گاما در سن بالا کمتر است (P<۰/۰۵). در مطالعه ای Bazrafkan و همکاران در سال ۱۳۹۱ که با هدف بررسی میزان عفونت سل نهفته در کادر درمانی بیمارستان های آموزشی شیراز به روش IFN-γ ELISPOT assay انجام شد. ارتباط خاصی میان واکنش به آنتی‌ژن‌ها براساس سن یا طول مدت اشتغال در بیمارستان و سابقه واکسیناسیون علیه سل در افراد مورد مطالعه بود. که با نتایج مطالعه کنونی مطابقت داشت (۸). در مطالعه‌ای حاجی عبدالباقی و همکاران که با بررسی مقایسه‌ای الگوی سایتوکاین های Th1 و Th2 در مبتلایان به بیماری سل ریوی خلط مثبت و افراد سالم PPD مثبت انجام شد، میانگین سطح اینترفرون – گاما در سرم افراد مبتلابه سل ریوی به‌طور معنی‌دار ازنظر آماری بالاتر از میانگین سطح آن در افراد سالم PPD مثبت بود. نتایج این مطالعه برعکس مطالعه حاضر بود، بطوری که سن و جنس بر تغییرات سایتوکاین ها قبل از درمان و حین درمان تأثیری نداشته است. نتایج حاصله از اندازه‌گیری سایتوکاین های Th1 و Th2 در سرم بیماران مبتلابه سل ریه با نتایج حاصله از مطالعات انجام‌گرفته در محیط کشت سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی تحریک‌شده با آنتی‌ژن‌های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* متفاوت است. نتایج این بررسی با نتایج حاجی عبدالباقی و همکاران اختلاف دارد (۱۱).

در بررسی بین میزان ترشح اینترفرون گاما و زمان (در ۴۸ و ۷۲ ساعت)، در غلظت های ۵ و۲۰ میکرولیتر تفاوت معناداری وجود داشت (P<۰/۰۵). علت افزایش سطح سرمی IFN-γ تماس بدن با آنتی ژن های باکتری می باشد، زیرا اینترفرون گاما باعث تحریک ماکروفاژ ، جهت فعالیت ضد باکتریایی می گردد.

در مطالعه تقوی و همکاران که سطح سرمی اینترفرون گاما در بیماری‌های ناشی از *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* و غیر توبرکلوزیس با هدف بررسی میزان تولید اینترفرون گاما در بیماران مبتلا به عفونت‌های مایکوباکتریومی و اعم از توبرکلوزیس و غیر توبرکلوزیس در مقایسه با کنترل سالم انجام شد، نتایج آنها نشان داد که سطح IFN-γ در افراد مبتلا به عفونت *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* و *مایکوباکتریوم غیر توبرکلوزیس* به‌طور معنی‌داری بیشتر از افراد کنترل به دست آمد. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه، تصور می‌شود افزایش مقادیر سطح سرمی اینترفرون گاما با پیشرفت بیماری مرتبط باشد. که این نتایج، یافته های مطالعه کنونی را تایید کرد (۲). با توجه به آزمون‌های انجام‌شده، در بررسی بین میزان ترشح اینترفرون گاما و غلظت، غلظت‌های مختلف بر میزان ترشح اینترفرون گاما مؤثر است. نتایج اختلاف میانگین و نمودار مربوطه به‌وضوح نشان می‌دهد که میزان ترشح اینترفرون گاما در غلظت ۵ کمتر است. نتایج این بررسی با نتایج پژوهش تقوی و همکاران مطابقت داشته و با نتایج پژوهش حاجی عبدالباقی و همکاران اختلاف دارد (۲ و ۱۱).

نتیجه‌گیری

ترشح اینترفرون گاما ارتباط مستقیم با میزان غلظت های استفاده شده باکتری دارد. ترشح اینترفرون گاما ارتباط مستقیم با زمان انکوباسیون دارد، یعنی در بیش‌تر موارد

زمان ۷۲ ساعت انکوباسیون باعث تحریک بیش‌تر سلول‌ها برای ترشح سایتوکاین موردنظر نسبت به زمان ۴۸ ساعت انکوباسیون شد.همچنین میزان ترشح اینترفرون گاما در سنین بالا کم‌تر از میزان آن در سنین پایین بود.

قدردانی

برخود لازم می دانیم از همکاری صمیمانه پرسنل شبکه بهداشت و درمان شهرستان شوش و همچنین مدیران مقاطع سه گانه (ابتدایی، متوسطه اول و دوم) واحدهای آموزشی شهر شاوور تشکر نماییم. نتایج این مقاله از پایان نامه کارشناسی ارشد با موضوع "بررسی سطح ایمنی ناشی از واکسن ب.ث.ژ در مقابل بیماری سل با استفاده از تست پوستی توبرکولین و پاسخ لنفوسیت‌ها به آنتی‌ژن‌های ب.ث.ژ در *In vitro* در دانش آموزان شهر شاوور (۱۸-۶ سال سن)" دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد استخراج شده است.

منابع

1-Ghaemi E, Vakili MA, Khodabakhshi B, Bakhshandeh Nosrat S, Aghapoor S, Naeimi Tabiei M, et al. Tuberculin reaction in 4.5 months babies and 7 years old children, vaccinated with BCG at birth. Journal of Gorgan University of Medical Science. 2004; 2:26-31.

2-Taghavi K, Farnia P, Anooshe S, Bayat M, Kazempoor M, Masjedi MR, et al. Comparison of Serum TNF-A, Interleukin-10, Interferon Gamma and Interleukin-12 Levels in Mycobacterium Tuberculosis and Non-Tuberculosis Patients. The Iournal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciense. 2010; 18:355-60.

3-Shaarrawy H, Zeidan M, Nasr N, Nouh M. Assessment of the role of high resolution computed tomography in the diagnosis of suspected sputum smear negative active pulmonary TB. Egyptian Journal of Chest Diseases and Tuberculosis. 2013; 62:263-8.

4-Cantalice Filho, J. P., Bóia, M. N., & SantAnna, C. C. Analysis of the treatment of pulmonary tuberculosis in elderly patients at a university hospital in Rio de Janeiro, Brazil. Jornal Brasileiro de Pneumologia, 2007; 33(6), 691-698.

5-Molicotti P, Bua A, Zanetti S. Cost-effectiveness in the diagnosis of tuberculosis: choices in developing countries. The Journal of Infection in Developing Countries. 2014; 8(01):024-38.

6-Kindt, Goldsby, Osborne. Imonology. Tehran: Tehran University of Medical University; 2011.

7-Khalilullah SA, Harapan H, Hasan NA, Winardi W, Ichsan I, Mulyadi M. Host genome polymorphisms and tuberculosis infection: What we have to say? Egyptian Journal of Chest Diseases and Tuberculosis. 2014; 63(1):173-85.

8-Bazrafkan H. Determining the latent tuberculosis infection by IFN-gamma ELISPOT assay in healthcare workers from university hospitals of Shiraz, South west of Iran. Shiraz: Shiraz University of Medical Sciences; 2012.

9-Johanna M. Gostner et al. Antimalarial drug chloroquine counteracts activation of indoleamine (2, 3)-dioxygenase activity in human PBMC. FEBS Open Bio. 2012; 241–245.

10-Mirzaei A, Mahmoudi H. Evaluation of TNF-α cytokine production in patients with tuberculosis compared to healthy people. GMS Hygiene and Infection Control 2018; 13:1-5.

11-Hajiabdolbaghi M, Amirzargar AA, Khaledi M, Khosravi F, Rasoolinejad M, Ahmadinejad Z, et al. Comparative Study Of The Profiles Of Th1 And Th2 Cytokines In Patients With Sputum Smear- Positive Pulmonary Tuberculosis And PPD–Positive Healthy Persons And Their Changes During Treatment Tehran University Medical. 2006; 64(2):141-8.

Evaluation of Immunity Level of B.C.G Vaccine Against Tuberculosis Using Skin Test for Tuberculin and *in Vitro* Response of Lymphocytes to B.C.G Antigens in Shavoor City Students

Sakineh Abdolkhani[1*], Hassan Mahmoudi[2], Abdolkarim Sheikhi[3], Mohammad Roayaei Ardakani[4]

1-Master of Microbiology.
2-Assistant Professor of Medical Microbiology.
3-Professor of Immunology and Microbiology.
4-Professor of Biology.

1-Islamic Azad University of Boroujerd, Boroujerd, Iran.
2-Department of Medical Microbiology, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran.
3-Department of Immunology and Microbiology, Dezful University of Medical Sciences, Dezful, Iran.
4-Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

**Corresponding author:*
Sakineh Abdolkhani; Islamic Azad University of Boroujerd, Boroujerd, Iran.
Tel:+989120630188
Email: hasan mamoudi24@gmail.com

Abstract

Background and Objectives: Tuberculin skin test is a screening test for tuberculosis. The aim of this investigation studied in vitro the immunity level out of *Bacillus Calmette–Guerin* (BCG) vaccine, through measurement of interferon gamma (IFN γ) in growth medium, in the students of Shavoor city.

Subjects and Methods: This research is an experimental study that was performed on 32 male and female students of the three educational levels. After blood sampling, the peripheral blood mononuclear cells were isolated by Ficoll solution and 2×10^5 Cell/Wells with 5 or 20 µl B.C.G vaccine were co-cultured in CO_2 incubator in 37°C for 48 and 72 hours, and IFN γ level measured by the ELIZA method. For statistical analyses, independent t-test was used to analyze the differences between the two groups using SPSS software version 23.

Results: Analysis of the results showed that there was a significant difference between the size of the induration at different ages of 13 years old ($P<0.05$). Also, there was no significant difference between the size of the induration in boys and girls ($P>0.05$). There was a significant difference between the age, time, and amounts of the bacterium 5 or 20 µL of the B.C.G vaccine used with the level of IFN γ secretion in the two groups ($P <0.05$).

Conclusion: With regard to the results, IFN γ secretion is directly related to the dose of bacteria used and the monocular blood cells of the students and incubation time. Also, the level of IFN γ secretion at younger ages was lower than that at an early age.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, Interferon gamma, BCG vaccine.

►*Please cite this paper as:*
Abdolkhani S, Mahmoudi H, Sheikhi Ak, Roayaei Ardakani M . Evaluation of Immunity Level of B.C.G Vaccine Against Tuberculosis Using Skin Test for Tuberculin and in Vitro Response of Lymphocytes to B.C.G Antigens in Shavoor City Students. Jundishapur Sci Med J 2019; 18(2):205-213

Received: Mar 13, 2019 **Revised: June 22, 2019** **Accepted: June 24, 2019**