طب‌نظامی
بهار ۱۳۸۸، دوره ۱۱، شماره ۱
صفحات:۵۶-۵۱

طراحی و تعیین اعتبار کیت‌های تشخیصی الایزای غیرمستقیم و رقابتی برای تشخیص بروسلوز در انسان

رضا شاپوری* PhD، عباسعلی ایمانی فولادی[۱] PhD،
مهدی رهنما[۲] PhD، مرتضی ایزدی[۳] MD

آدرس مکاتبه: گروه میکروبیولوژی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، ایران
rezashapoury@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۷/۱۰/۱۵ **تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۸/۲/۲۱**

چکیده

اهداف. هدف این مطالعه طراحی و تعیین اعتبار الایزای غیرمستقیم و الایزای رقابتی برای تشخیص بروسلوز انسانی در مقایسه با سایر روش‌های سرولوژیک معمول بود.

روش‌ها. برای تهیه لیپوپلی‌ساکارید (LPS)، از *بروسلا آبورتوس* S99 استفاده شد. LPS با روش فنل داغ همراه با هضم آنزیمی استخراج گردید. میکروپلیت‌های الایزا با LPS پوشیده شدند. برای الایزای غیرمستقیم از آنتی‌بادی کونژوگه مونوکلونال IgG1 انسانی و برای الایزای رقابتی از آنتی‌بادی منوکلونال موشی M84 استفاده شد.

یافته‌ها. حد آستانه برای الایزای غیرمستقیم با استفاده از نمونه‌های سرمی منفی برابر با ۲۱/۶۳-۱۷/۹۲٪ مثبت بودن و برای الایزای رقابتی، ۵۶/۹۱-۵۳/۲۹٪ مهار کردن به‌دست آمد. اختصاصیت این روش برای الایزای غیرمستقیم ۹۵/۵٪ و برای رقابتی ۹۹/۵٪ است. حساسیت الایزای غیرمستقیم ۱۰۰٪ و الایزای رقابتی ۹۶/۹۴٪ به‌دست آمد. ارزش اخباری مثبت الایزای غیرمستقیم ۹۳/۳۳٪ و رقابتی ۹۸/۹۶٪ و ارزش اخباری منفی الایزای غیرمستقیم ۱۰۰٪ و رقابتی ۹۸/۵۱٪ بود. هم‌خوانی نتایج این روش برای الایزای غیرمستقیم ۹۶/۹۸٪ و برای رقابتی ۹۸/۶۶٪ بود.

نتیجه‌گیری. هر دو روش الایزای غیرمستقیم و به‌ویژه الایزای رقابتی، روش‌هایی حساس، اختصاصی، سریع و آسان برای تشخیص بروسلوز انسانی هستند.

کلیدواژه‌ها: بروسلوز، الایزای غیرمستقیم، الایزای رقابتی

۱- مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا... (عج)، تهران، ایران
۲- گروه میکروبیولوژی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، ایران
۳- مرکز تحقیقات بهداشت و تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا... (عج)، تهران، ایران

مقدمه

گونه‌های بروسلا، کوکوباسیل‌های گرم منفی هوازی و عامل بیماری بروسلوز در انسان و حیوانات هستند [۱]. بروسلا می‌تواند از راه مخاط و پوست وارد شده و بیماری سیستمیک ایجاد نماید. تظاهرات بالینی بروسلوز در انسان به سه شکل حاد، تحت‌حاد و مزمن تقسیم‌بندی می‌شود [۲].

انسان معمولاً در اثر تماس با حیوانات اهلی آلوده مانند گاو، گوسفند، بز و خوک و یا استفاده از شیر، پنیر، خامه و سایر لبنیات غیراستریل و آلوده دچار عفونت با بروسلا می‌گردد. عفونت اکتسابی از حیوانات دیگر مانند شتر و حیوانات حیات‌وحش مانند بوفالو و گوزن شمالی نیز دیده می‌شود. شیوع جغرافیایی بروسلوز انسانی، وسیع و تقریباً در تمام نقاط دنیا دیده می‌شود. در ایران نیز بروسلوز از شیوع بالایی برخوردار است [۲، ۳].

LPS مهم‌ترین آنتی‌ژن سطحی بروسلا است که پلی‌ساکارید O اصلی‌ترین ساختار آن محسوب می‌شود [۱، ۴]. تمامی سویه‌های صاف در تست‌های آگلوتیناسیون با آنتی‌بادی تهیه‌شده از کلونی‌های صاف، واکنش متقاطع زیادی نشان می‌دهند. واکنش متقاطع در بین سویه‌های غیرصاف نیز در تست‌های آگلوتیناسیون با آنتی‌بادی تهیه شده بر ضد کلونی‌های غیرصاف وجود دارد [۱].

از تست‌های تشخیصی مهم برای بروسلوز، آزمایشات باکتریولوژی و سرولوژی است. در اشکال تحت‌حاد و مزمن، تشخیص مشکل‌تر است. روش‌های سنجش ایمنی شامل اندازه‌گیری آنتی‌ژن یا آنتی‌ژن‌ها با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی است. برای این منظور از شیوه‌های متعدد همانند رادیوایمنواسی، ایمنوفلورسانس و الایزا استفاده می‌شود. الایزا نسبت به سایر روش‌های ایمنواسی از مزایایی همچون حساسیت بالا، قابلیت اندازه‌گیری همزمان چند نوع آنتی‌ژن، سادگی روش انجام، هزینه کمتر و عدم مخاطره برای پرسنل، برخوردار است [۶-۴].

در الایزای غیرمستقیم، سرم رقیق‌شده به فاز جامد پوشیده‌شده با آنتی‌ژن‌ها اضافه می‌گردد. در مرحله بعد، آنتی‌بادی نشاندار ضد آنتی‌بادی اول افزوده می‌شود و در صورت وجود واکنش‌های اختصاصی بین آنتی‌ژن و آنتی‌بادی و تجزیه سوبسترای رنگ‌زا، واکنش رنگی ایجاد می‌شود. حساسیت این روش در مقایسه با روش الایزای مستقیم بیشتر است. اساس الایزای رقابتی، رقابت بین آنتی‌ژن در اتصال به یک آنتی‌بادی است. ممکن است این روش برای رقابت دو آنتی‌بادی در اتصال به یک آنتی‌ژن طراحی گردد. اگر هر دو آنتی‌ژن (یا هر دو آنتی‌بادی، بسته به نوع روش طراحی) با هم اضافه شوند، روش رقابتی بوده و اگر ابتدا آنتی‌ژن غیرنشاندار و سپس آنتی‌ژن نشاندار اضافه شود، روش مهاری نامیده می‌شود. ویژگی (اختصاصیت) روش الایزای رقابتی و مهاری بیشتر از الایزای مستقیم است [۴، ۵، ۶].

هدف این تحقیق طراحی روش‌های تشخیصی ساده، سریع، حساس و اختصاصی برای بروسلوز انسانی بر پایه الایزای غیرمستقیم و رقابتی است.

روش‌ها

سویه مورد استفاده: برای تهیه آنتی‌ژن LPS بروسلا از واریته نوع ۱ *Brucella abortus* S99 استفاده شد. سویه مورد نظر صاف است و برای رشد نیازی به حضور دی‌اکسیدکربن در محیط ندارد.

استخراج LPS: استخراج LPS با استفاده از روش فنل داغ همراه با هضم آنزیمی [۳، ۷] انجام گرفت. به‌طور خلاصه به ۵۰ گرم وزن مرطوب سلولی در ۱۷۰ میلی‌لیتر آب مقطر، ۱۹۰ میلی‌لیتر محلول فنل (v/v) ۹۰٪ افزوده و در حرارت 66^{oC} به مدت ۳۰ دقیقه مخلوط شد. سپس لایه فنلی جدا شده و LPS توسط متانول سرد رسوب داده شد. پس از دیالیز و خارج شدن فنل، در دو مرحله جداگانه برای حذف آلودگی‌های پروتئینی و اسیدهای نوکلئیک، LPS با آنزیم‌های پروتئیناز K، DNase و RNase تیمار شد. در انتها، LPS با افزودن متانول سرد رسوب و به پودر تبدیل گردید (لیوفیلیزه).

آنالیزهای شیمیایی: میزان آلودگی نمونه LPS بروسلا با پروتئین به روش برادفورد و میزان آلودگی با اسیدهای‌نوکلئیک با اندازه‌گیری در A_{260} تعیین گردید. همچنین، اندازه‌گیری مقدار کلی کربوهیدرات‌ها با استفاده از روش فنل- اسیدسولفوریک و غلظت LPS در نمونه استخراج شده با کمک معرف DMB محاسبه شد [۳، ۷].

نمونه‌های سرمی: نمونه‌های سرم انسانی شامل ۹۸ نمونه مثبت (نمونه‌های بروسلا جدا شده از کشت خون این افراد)، ۱۰۰ نمونه سرم منفی از افراد ساکن در شهر و ۱۰۰ نمونه سرمی منفی از افراد ساکن در مناطق روستایی بدون سابقه برخورد با بروسلا و یا مصرف فرآورده های گوشتی و لبنی مشکوک است.

طراحی الایزای غیرمستقیم: برای به‌دست آوردن رقت مناسب آنتی‌ژن (LPS) جهت تثبیت شدن، رقت‌های مناسب سرم و آنتی IgG1 انسانی مونوکلونال کونژوگه با آنزیم پراکسیداز، از روش جدول متقاطع تیتراسیون استفاده شد [۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲].

LPS در بافر کربنات ۰/۰۵ مولار با pH ۹/۶، غلظت نهایی یک میکروگرم بر میلی‌لیتر و به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک افزوده شد. پلیت به مدت یک شب در دمای 4^{oC} قرار داده شد و پس از شست‌وشو (PBS ۰/۰۱ مولار با pH۷/۲ حاوی توئین ۲۰، ۰/۰۵٪)، محلول مهارکننده به مقدار ۳۰۰ میکرولیتر (PBS ۰/۰۱ مولار با pH۷/۲ حاوی توین ۲۰، ۰/۰۵٪ به همراه ۱٪ آلبومین سرم گاوی و ۰/۰۵٪ NaN3) به چاهک‌ها افزوده شد. پس از شست‌وشو، نمونه‌های سرمی را با رقت ۱/۱۰۰۰ در بافر رقیق‌کننده (PBS ۰/۰۱ مولار با pH ۶/۳ حاوی توئین ۲۰، ۰/۰۵٪، ۷/۵ میلی‌مولار EDTA و ۷/۵ میلی‌مولار EGTA) رقیق کرده و به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به چاهک‌ها اضافه شد. پس از ۳۰ دقیقه چاهک‌ها شسته شده و

آنتی IgG1 انسانی مونوکلونال کونژوگه با منشاء موشی (Rockland) با رقت ۱/۱۰۰۰۰ به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به چاهک‌ها اضافه و پلیت برای یک ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. پس از شست‌وشو، محلول سوبسترا به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه و پلیت برای ۲۰ دقیقه در 37^{oC} انکوبه شد. پس از افزودن محلول متوقف‌کننده (محلول ۴٪ SDS)، میزان جذب نوری پلیت در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر قرائت شد. لازم به ذکر است که نمونه‌ها به‌صورت سه‌تایی کار شدند [۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲].

طراحی الایزای رقابتی: مراحل تعیین غلظت مناسب آنتی‌ژن تثبیت‌شونده، آنتی IgG1 موشی کونژوگه و محلول‌های مورد استفاده، مشابه با روش الایزای غیرمستقیم است. البته در روش الایزای رقابتی بافر رقیق‌کننده فاقد EGTA است [۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲].

LPS در بافر کربنات تهیه و به چاهک‌ها افزوده شد. پس از شست‌وشو، محلول مهارکننده را افزوده و پس از انکوباسیون و شستشو، مقدار ۵۰ میکرولیتر آنتی‌بادی مونوکلونال ضد اپی‌توپ‌های اختصاصی OPS بروسلا (M۸۴) (Jackson Laboratories Inc) با منشاء موشی با رقت ۱/۱۰۰۰ (طبق توصیه شرکت سازنده) در بافر رقیق‌کننده به هر چاهک اضافه شد. بلافاصله ۵۰ میکرولیتر از نمونه سرم با رقت ۱/۱۰ (رقیق شده در بافر رقیق‌کننده) به چاهک‌ها افزوده و پلیت به‌مدت ۳۰ دقیقه همراه با ۱۰ دقیقه شیک کردن در دمای اتاق انکوبه شد. پس از شستشو، آنتی IgG1 موشی کونژوگه با منشاء بزی با رقت ۱/۱۰۰۰۰ (Jackson Laboratories Inc) به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به چاهک‌ها اضافه کرده و بقیه مراحل همانند روش الایزای غیرمستقیم انجام شد [۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲].

تعیین اعتبار الایزاهای طراحی شده: جهت محاسبه حد آستانه، از ۲۰۰ نمونه سرمی بروسلوز منفی در دو گروه صد نفری ساکن در مناطق شهری و روستایی و ۹۸ نمونه مثبت استفاده شد. حد آستانه در الایزای غیرمستقیم و الایزای رقابتی طراحی شده از طریق فرمول‌های ذیل محاسبه شد.

برای الایزای غیرمستقیم میزان حد آستانه براساس مقدار جذب میانگین نمونه‌های سرم منفی برابر با آن میزان از درصد مثبت بودن و با فرمول زیر محاسبه شد.

Positivity % (P%)=(mean OD sample/mean OD strong positive) ×100

برای الایزای رقابتی، میزان حد آستانه براساس مقدار جذب میانگین نمونه‌های سرم منفی برابر با آن میزان از درصد مهار واکنش و با فرمول زیر محاسبه شد.

Inhibition% (I%)=100-[(mean OD sample/mean OD strong positive) ×100]

برای تعیین دقت و تکرارپذیری الایزاهای طراحی شده، از سه نمونه سرمی مثبت قوی، مثبت ضعیف و منفی با دو روش درون‌سنجی و برون‌سنجی استفاده شد. همچنین حساسیت، اختصاصیت (ویژگی)، ارزش اخباری مثبت، ارزش اخباری منفی و همخوانی نتایج نیز مورد محاسبه قرار گرفت [۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲].

کشت و جداسازی بروسلا از خون: نمونه خون وریدی افراد مشکوک به بروسلوز در محیط کشت دی‌فازیک کاستاندا تلقیح شد. گرم‌خانه‌گذاری در دمای 37^{oC} و CO_2 ۵٪ انجام گرفت. نمونه‌های منفی تا ۸ هفته نگهداری و سپس نتیجه گزارش می‌شد. نمونه‌های مثبت از لحاظ آگلوتینه شدن با آنتی‌سرم استاندارد بروسلا (تهیه شده از انستیتو پاستور کرج؛ واحد تولید واکسن‌های باکتریایی) تایید شدند.

آزمون‌های مقایسه‌ای: در این تحقیق، اعتبار الایزاهای طراحی‌شده با نتایج دو روش معمول سرولوژیک مورد استفاده در تشخیص بروسلوز انسانی، تست آگلوتیناسیون لوله‌ای و کومبس رایت مورد مقایسه قرار گرفت. تست آگلوتیناسیون لوله‌ای و کومبس رایت طبق روش استاندارد انجام گرفتند [۱].

نتایج

استخراج لیپوپلی‌ساکارید *بروسلا آبورتوس*: LPS *بروسلا آبورتوس* S99 استخراج‌شده با روش فنل داغ همراه با هضم آنزیمی از لحاظ نسبت LPS به کربوهیدرات ۸۷٪ و میزان آلودگی نمونه به پروتئین >۲ و اسیدنوکلئیک <۱ بعد از تیمار آنزیمی بود.

نتایج طراحی الایزای غیرمستقیم و رقابتی: در جدول ۱ میانگین جذب نوری چاهک‌های بلانک، نمونه‌های سرمی منفی، نمونه‌های سرمی مثبت قوی و نمونه‌های سرمی مورد آزمون مشاهده می‌شود. با توجه به این جدول، حد آستانه برای الایزای غیرمستقیم براساس نمونه‌های منفی تهیه‌شده از ساکنین مناطق شهری برابر با ۱۷/۹۲ P% و برای نمونه‌های منفی ساکنین روستایی ۲۱/۶۳ P% به‌دست آمد.

جدول ۱) میانگین جذب نوری (OD) نمونه‌ها برای الایزای غیرمستقیم رقابتی

نمونه	جذب نوری برای الایزای غیرمستقیم (mean±SD*)	جذب نوری برای الایزای رقابتی (mean±SD*)
بلانک	۰/۰۸±۰/۰۰۶	۰/۰۸±۰/۰۰۴
منفی تهیه‌شده از ساکنین مناطق شهری	۰/۱۲±۰/۰۱	۱/۸۱±۰/۲۴
منفی تهیه‌شده از ساکنین مناطق روستایی	۰/۱۴۵±۰/۰۱۷	۱/۷۳±۰/۱۱
مثبت قوی	۱/۸۳±۰/۲۲	۱/۶۷±۰/۱۵
نمونه‌های مورد آزمون و کشت مثبت	۰/۶۷±۰/۲۷	۰/۷۸±۰/۰۹

*SD: Standard deviation

برای الایزای رقابتی، محاسبه حد آستانه براساس "I%" است. محاسبه براساس میانگین جذب نوری بافر کنترل (تنها آنتی‌بادی مونوکلونال ضد OPS در بافر رقیق‌کننده) انجام شد که عدد حد آستانه برابر با I% ۵۶/۹۱، در حالت استفاده از نمونه‌های منفی ساکنین مناطق شهری حد آستانه I% ۵۴/۹۱ و با جاگذاری میانگین جذب نوری نمونه‌های منفی روستایی برابر با I% ۵۳/۲۹ به‌دست آمد.

در جداول ۲ و ۳ به‌ترتیب نتایج حاصل از قرائت جذب نوری نمونه‌ها در آزمایش درون‌سنجی و برون‌سنجی برای الایزای غیرمستقیم ارائه شده است. با توجه به اینکه مقدار درصد ضریب تغییرات کمتر از ۱۵٪ است، بنابراین در ۱۰ بار تکرار آزمایش الایزای غیرمستقیم طراحی شده، دقت و قابلیت تکرارپذیری این روش اثبات شد.

جدول ۲) نتایج حاصل از قرائت جذب نوری نمونه‌ها در آزمایش درون‌سنجی (Intra assay) برای الایزای غیرمستقیم

سنجش← / نمونه↓	میزان جذب نوری در آزمایش درون‌سنجی: میانگین (Mean)	انحراف از معیار (SD)	درصد ضریب تغییرات (CV%)	تعداد دفعات تکرار
منفی	۰/۱	۰/۰۲	۲/۳۱	۱۰
مثبت ضعیف	۰/۶۵	۰/۱۵	۳/۰۴	۱۰
مثبت قوی	۱/۸۵	۰/۳۱	۳/۳۱	۱۰

جدول ۳) نتایج حاصل از قرائت جذب نوری نمونه‌ها در آزمایش برون‌سنجی (Inter assay) برای الایزای غیرمستقیم

سنجش← / نمونه↓	میزان جذب نوری در آزمایش درون‌سنجی: میانگین (Mean)	انحراف از معیار (SD)	درصد ضریب تغییرات (CV%)	تعداد دفعات تکرار
منفی	۰/۰۹	۰/۰۳	۲/۸۵	۱۰
مثبت ضعیف	۰/۶۷	۰/۰۳	۴/۱	۱۰
مثبت قوی	۱/۸۱	۰/۴۲	۴/۷۲	۱۰

نتایج حاصل از قرائت جذب نوری نمونه‌ها در آزمایش درون‌سنجی و برون‌سنجی برای الایزای رقابتی به ترتیب در جداول ۴ و ۵ آمده است. برای این روش نیز همانند الایزای غیرمستقیم، مقدار درصد ضریب تغییرات کمتر از ۱۵٪ بود و در ۱۰ بار تکرار الایزای رقابتی طراحی شده، دقت و قابلیت تکرارپذیری این روش نیز اثبات گردید.

جدول ۴) نتایج حاصل از قرائت جذب نوری نمونه‌ها در آزمایش درون‌سنجی (Intra assay) برای الایزای رقابتی

سنجش← / نمونه↓	میزان جذب نوری در آزمایش درون‌سنجی: میانگین (Mean)	انحراف از معیار (SD)	درصد ضریب تغییرات (CV%)	تعداد دفعات تکرار
منفی	۱/۷۲	۰/۲۳	۳/۵۴	۱۰
مثبت ضعیف	۰/۷۸	۰/۰۷	۴/۲۵	۱۰
مثبت قوی	۰/۵۱	۰/۰۴	۴/۳۴	۱۰

جدول ۵) نتایج حاصل از قرائت جذب نوری نمونه‌ها در آزمایش برون‌سنجی (Inter assay) برای الایزای رقابتی

سنجش← / نمونه↓	میزان جذب نوری در آزمایش درون‌سنجی: میانگین (Mean)	انحراف از معیار (SD)	درصد ضریب تغییرات (CV%)	تعداد دفعات تکرار
منفی	۱/۸۳	۰/۴	۴/۷	۱۰
مثبت ضعیف	۰/۷۵	۰/۰۹	۴/۱۹۱	۱۰
مثبت قوی	۰/۵۳	۰/۰۷	۵/۱۲	۱۰

در جدول ۶ نتایج حاصل از تعیین اعتبار الایزای غیرمستقیم و رقابتی در مقایسه با روش‌های آگلوتیناسیون لوله‌ای و آزمایش کومبس رایت ارائه شده است. با توجه به جدول مشخص می‌شود که از ۹۸ مورد نمونه سرمی با کشت خون مثبت، در روش الایزای غیرمستقیم همه مثبت و مبتلا به بروسلوز شناخته شدند. درحالی که در آزمون الایزای رقابتی ۹۵ مورد مثبت و ۳ مورد از این افراد منفی گزارش شدند. این موارد برای روش لوله‌ای برابر با ۹۲ و برای روش کومبس ۹۴ مورد مثبت از ۹۸ نمونه کشت مثبت بود. بنابراین در این مقایسه مشخص می‌شود که روش الایزای غیرمستقیم طراحی شده فاقد جواب منفی کاذب است. درحالی که در این بررسی، روش الایزای رقابتی دارای ۳، روش کومبس دارای ۴ و روش لوله‌ای دارای ۶ منفی کاذب است.

جدول ۶) نتایج حاصل از تعیین اعتبار الایزای غیرمستقیم و رقابتی در مقایسه با روش‌های آگلوتیناسیون لوله‌ای (SAT) و آزمایش کومبس رایت (Coombs)

شاخص← / آزمون↓	SAT		Coombs		IELISA		CELISA	
	+	−	+	−	+	−	+	−
نمونه‌های مثبت در کشت (۹۸ مورد)	۹۲	۶	۹۴	۴	۹۸	۰	۹۵	۳
نمونه‌های منفی از ساکنین مناطق شهری (۱۰۰ مورد)	۰	۱۰۰	۰	۱۰۰	۲	۹۸	۰	۱۰۰
نمونه‌های منفی از ساکنین مناطق روستایی(۱۰۰ مورد)	۰	۱۰۰	۰	۱۰۰	۷	۹۳	۱	۹۹
حساسیت (٪)	۹۳/۸۸		۹۵/۹۲		۱۰۰		۹۶/۹۴	
اختصاصیت (ویژگی) (٪)	۱۰۰		۱۰۰		۹۵/۵		۹۹/۵	
ارزش اخباری مثبت (٪)	۱۰۰		۱۰۰		۹۳/۳۳		۹۸/۹۶	
ارزش اخباری منفی (٪)	۹۷/۰۹		۹۸/۰۴		۱۰۰		۹۸/۵۱	
همخوانی نتایج (٪)	۹۷/۹۹		۹۸/۶۶		۹۶/۹۸		۹۸/۶۶	

از ۲۰۰ نمونه سرمی منفی تهیه شده از ساکنین مناطق شهری (۱۰۰ نمونه) و روستایی (۱۰۰ نمونه) که کشت خون آنها از لحاظ بروسلا منفی و بدون سابقه ابتلا به بروسلوز و مصرف گوشت و فرآورده‌های لبنی مشکوک بودند، آزمون‌های لوله‌ای و کومبس هر دو فاقد جواب مثبت کاذب هستند. اما در الایزای غیرمستقیم ۲ مورد از نمونه سرم افراد شهری و ۷ مورد از نمونه سرم افراد روستایی دارای جواب مثبت کاذب است. در روش الایزای رقابتی در نمونه‌های افراد شهری هیچ جواب مثبت کاذبی مشاهده نمی‌شود و در نمونه‌های سرمی افراد روستایی تنها یک مورد دارای جواب مثبت کاذب است.

بیشترین میزان حساسیت در بین روش‌های مورد استفاده مربوط به الایزای غیرمستقیم (با حساسیت ۱۰۰٪) است و حساسیت روش الایزای رقابتی (۹۶/۹۴٪) نیز بیشتر از روش‌های لوله‌ای و کومبس است. در این بررسی، اختصاصیت (ویژگی) ۱۰۰٪ برای روش‌های لوله‌ای و کومبس و ۹۹/۵٪ برای الایزای رقابتی و ۹۵/۵٪ برای الایزای غیرمستقیم به‌دست آمد.

بیشترین مقدار ارزش اخباری مثبت مربوط به روش‌های لوله‌ای و کومبس (۱۰۰٪) و بیشترین مقدار ارزش اخباری منفی مربوط به روش الایزای غیرمستقیم (۱۰۰٪) است. در مجموع، دو روش الایزای رقابتی و روش کومبس رایت دارای بیشترین میزان نتیجه هم‌خوانی (۹۸/۶۶٪) هستند.

بحث

امروزه بروسلوز مشکلی جهانی است و ایران یکی از مناطق اندمیک با شیوع بالا برای بروسلوز دامی و انسانی محسوب می‌شود [۱، ۲، ۳]. زیان‌های اقتصادی ناشی از بروسلوز در ایران هزینه‌های گزافی را تحمیل می‌کند که می‌توان با هزینه‌های کمتری برنامه پیشگیری، ریشه‌کنی و کنترل بیماری را انجام داد.

امروزه فنّاوری الایزا به طور چشمگیری توانسته در بسیاری از موارد خود را به‌عنوان یک روش مناسب تشخیصی معرفی کرده و جایگزین روش‌های قبلی شود. علت این امر این است که الایزا سریع و آسان بوده و برای انواع آنتی‌ژن‌ها قابل طراحی است. همچنین، توانایی سنجش تعداد زیادی نمونه به‌طور همزمان، خطای کمتر و مقرون به‌صرفه بودن نیز از مزایای دیگر آن است [۱۳، ۱۴]. بر همین اساس، اهداف این پژوهش طراحی روش‌های تشخیصی جدید با حساسیت و اختصاصیت بالا و سادگی در تشخیص بروسلوز انسانی و تعیین اعتبار این روش‌ها در ایران است.

B. abortus S99 به دلیل پایداری آنتی‌ژنیکی، سویه متداول مورد استفاده در تولید آنتی‌ژن‌های بروسلا برای موارد تشخیصی است [۱۵]. در این تحقیق نیز از S99 برای تولید آنتی‌ژن‌های LPS استفاده شد. ضمن این که آنتی‌ژن تهیه شده از *بروسلا آبورتوس* S99 می‌تواند در تهیه کیت‌های تشخیصی عفونت‌های *بروسلا ملی‌تنسیس* و *سوئیس* نیز استفاده شود [۱۴، ۱۶].

برای پر کردن فضاهای خالی موجود در چاهک‌های پلیت الایزا و جلوگیری از واکنش‌های غیراختصاصی، از بافر بلوک‌کننده استفاده می‌شود. به‌این منظور، از بافر PBS ۰/۰۱ حاوی توین ۲۰، ۰/۰۵٪ به همراه ۱٪ آلبومین سرم گاوی که (فراوان‌ترین بافر بلوک‌کننده مورد استفاده در تولید انواع کیت‌های تجاری الایزا) استفاده شد. تا به بهترین وجه از بروز واکنش‌های غیراختصاصی جلوگیری به‌عمل آید. در الایزای غیرمستقیم، حد آستانه در صورت استفاده از سرم‌های منفی تهیه‌شده از افراد شهری ۱۷/۹۲ P% و در صورت استفاده از سرم افراد روستایی ۲۱/۶۳ P% به‌دست آمد. علت استفاده از دو نوع نمونه سرم منفی، تعیین افتراق بین حد آستانه نمونه‌های مثبت و منفی بروسلوز در بین هر دو جمعیت شهری و روستایی است. زیرا که روستاییان در مقایسه با افراد شهری به دلیل احتمال برخورد و تماس بیشتر با بروسلوز که یک بیماری دامی می‌باشد، در سرم خود دارای آنتی‌بادی‌هایی هستند که می‌تواند در تفسیر نتایج آزمون تداخل و جواب کاذب ایجاد نماید [۱۵، ۱۷، ۱۸]. بنابراین در تعیین اعتبار دقیق یک الایزا بایستی تمام جوانب را مدنظر قرار داد و بررسی نمود.

استفاده از آنتی‌ژن‌های کونژوگه پلی‌کلونال در تشخیص بروسلوز سبب کاهش قیمت نهایی محصول می‌شود. اما از ضعف‌های مهم این نوع آنتی‌ژن‌ها وجود مقادیر بالای جذب نوری زمینه‌ای است که باعث کاهش اختصاصیت روش می‌شود [۴، ۵، ۶]. به همین دلیل در این مطالعه در طراحی الایزای غیرمستقیم از آنتی‌ژن کونژوگه منوکلونال استفاده شد که تنها IgG1 را مورد شناسایی قرار می‌دهد تا از این طریق، میزان جذب نوری زمینه کاهش و اختصاصیت روش بیشتر شود.

حد آستانه الایزای رقابتی در حالت استفاده از کنترل بافر ۵۶/۹۱ I%، استفاده از نمونه‌های منفی افراد شهری ۵۴/۹۱ I% و برای نمونه‌های منفی افراد روستایی ۵۳/۲۹ I% به‌دست آمد.

در بررسی‌های دیگر [۸] جهت طراحی الایزای رقابتی، برای بروسلوز گاوی حد آستانه را ۴۰ I% گزارش کردند. در بررسی دیگری [۱۲] در طراحی الایزای رقابتی، حد آستانه کیت را برای بروسلوز گوسفندی ۲۳/۶ I%، بزی ۲۱/۸ I% و برای مجموع دو حیوان (با هم) ۲۵ I% گزارش کردند. در مطالعه دیگری [۱۹] در طراحی الایزای رقابتی برای تشخیص بروسلوز انسانی از دو نمونه مختلف سرم منفی افراد شهری و روستایی استفاده کردند و ارزش I% را برای افراد شهری ۱۲/۰۹ و برای افراد روستایی ۱۲/۶۳ گزارش کردند. اما در تعیین حد آستانه، هر دو نمونه سرمی حد آستانه یکسان و ۲۸ I% را نشان دادند.

معمولا روش الایزای رقابتی نسبت به روش الایزای غیرمستقیم دارای اختصاصیت بیشتری است ولی حساسیت روش الایزای غیرمستقیم بیش از رقابتی است [۵]. در این مطالعه نیز حساسیت روش الایزای غیرمستقیم بیشتر از رقابتی (۳/۰۶٪ بیشتر) است و اختصاصیت در روش رقابتی کارآیی بیشتری (۴٪ بیشتر) نشان داد. اگرچه ارزش اخباری مثبت و ارزش اخباری منفی الایزای رقابتی حداکثر نیست ولی در مجموع، نسبت به روش غیرمستقیم که تنها در ارزش اخباری منفی کارایی بالایی دارد، در هر دو ارزش اخباری مثبت و منفی از کارآیی بالایی برخوردار است. این مطلب در مورد شاخص هم‌خوانی نتایج بهتر نمایان است.

در هم‌خوانی نتایج، دو روش کومبس و الایزای رقابتی بیشترین میزان (۹۸/۶۶٪) را نشان می‌دهند. جالب این که در این شاخص، روش لوله‌ای بیشتر از الایزای غیرمستقیم (۱/۰۱٪) شده است. بنابراین با توجه به مطالب فوق و مقدار شاخص همخوانی نتایج، می‌توان اظهار داشت که در تشخیص بروسلوز، الایزای رقابتی در مجموع مناسب‌تر از الایزای غیرمستقیم است.

در پژوهشی [۸] جهت طراحی دو روش الایزای غیرمستقیم و رقابتی برای تشخیص بروسلوز گاوی نتایج نشان داد که در گوساله اختصاصیت روش رقابتی ۹۹/۸٪ و روش غیرمستقیم ۹۸/۶٪ است. در گاو این شاخص به ترتیب ۹۷/۵٪ برای روش رقابتی و ۹۵/۸٪ برای روش غیرمستقیم به دست آمد. برای شاخص حساسیت (در گوساله و گاو) روش الایزای غیرمستقیم برابر با ۹۸/۲٪ و روش رقابتی ۹۷/۵٪ محاسبه گردید. همچنین این بررسی نشان داد که سایر روش‌های سرولوژیکی تشخیصی بروسلوز در مقایسه با این دو روش الایزا، اختصاصیت بسیار کمتری دارند.

در مطالعه‌ای [۱۲] جهت طراحی الایزای رقابتی برای تشخیص بروسلوز، حساسیت این روش را برای گوسفند ۹۱/۱٪ و برای بز ۷۶/۵٪ و اختصاصیت را در گوسفند ۹۷/۴٪ و در بز ۹۴/۳٪ اعلام کردند. این تحقیق در مقایسه با الایزای غیرمستقیم، اختصاصیت و حساسیت بیشتری را گزارش کرد.

در پژوهشی دیگر [۲۰] جهت اقدام به طراحی الایزای غیرمستقیم برای بروسلوز انسانی با استفاده از آنتی‌ژن‌های پلی‌کلونال علیه IgG و IgM، نشان داد که حساسیت الایزای IgG ۹۱٪ و الایزای IgM ۱۰۰٪ است و شاخص اختصاصیت برای هر دو الایزا ۱۰۰٪ است.

در بررسی دیگری [۲۱] با استفاده از آنتی‌ژن‌های کونژوگه پلی‌کلونال علیه IgG و IgM، روش الایزای غیرمستقیم برای بروسلوز انسانی طراحی شد. حساسیت برای الایزای IgG ۸۱/۳٪، الایزای IgM ۹۳/۸٪ و الایزای IgG+IgM ۷۵٪ بود. اختصاصیت برای الایزای IgG ۹۵٪، الایزای IgM ۸۵٪ و الایزای IgG+IgM ۹۴/۴٪ گزارش شد.

نتیجه‌گیری

بررسی‌ها نشان داده است که الایزا روش بسیار مناسبی برای تشخیص اَشکال مزمن بیماری است. بدیهی است که هیچ‌کدام از روش‌های تشخیصی دارای تمامی مزیت‌های یک سنجش قطعی و کامل نیست. با افزایش حساسیت روش تشخیصی، احتمال کاهش اختصاصیت آن وجود دارد. امروزه استفاده از فنّاوری الایزا در تشخیص بسیاری از بیماری‌های عفونی و غیرعفونی در ایران به تدریج رایج شده و می‌توان به گسترش استفاده از این روش در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی امیدوار بود.

منابع

1- Collier L. Topley & Wilson's Microbiology and microbial infections. Vol 2. 9th ed. Arnold pub; 1998. p. 829.
2- Collier L. Topley & Wilson's Microbiology and microbial infections. Vol 3. 9th ed. Arnold pub; 1998. p. 819.
3- Refai M. Incidence and control of brucellosis in the Near East region. Vet Microbio. 2002;90(1-4):81-110.
4- Dudley RA, Edwards P, Ekins RP, Finney DJ, McKenzie IG, Raab GM, et al. Guidelines for immunoassay data processing. Clinical Chemistry. 1985;31(8):1264-71.
5- Crowther JR. The ELISA guidebook. New Jersey: Humana Press; 2001.
6. Maggio ET. Enzyme Immunoassay. CRC Press; 1981.
7- Al-Attas RA, Al-Khalifa M, Al-Qurashi AR, Badawy M, Al-Gualy N. Evaluation of PCR, culture and serology for the diagnosis of acute human brucellosis. Annals of Saudi Medicine. 2000;20(3/4):224-8.
8- Samartino L, Gall D, Gregoret R, Nielsen K. Validation of enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of bovine brucellosis. Veterinary Microbiology. 1999;70(3-4):193-200.
9- Nielsen KH, Kwok A. Reuse of polystyrene 96 well plates for indirect enzyme immunoassay for detection of antibody to Brucella abortus. Arch Med Vet. 1995;27:39-43.
10- Saegerman C, De Waele L, Gilson D, Godfroid J, Thiange P, Michel P, Limbourg B, O Vo TK, Limet J, Letesson JJ, Berkvens D. Evaluation of three serum i-ELISA using monoclonal antibodies and protein G as peroxidase conjugate for the diagnosis of bovine brucellosis. Vet Microbio. 2004;100:91-105.
11- Fosgate GT, Adesiyun AA, Hird DW, Hietala SK. Likelihood ratio estimation without a gold standard: A case study evaluating a brucellosis c-ELISA in cattle and water buffalo of Trinidad. Preventive veterinary medicine. 2006;75(3-4):189-205.
12- Minas A, Stournara A, Christodoulopoulos G, Katsoulos PD. Validation of a competitive ELISA for diagnosis of Brucella melitensis infection in sheep and goats. The Veterinary Journal. 2008;177(3):411-7.
13- Nielsen K. Diagnosis of brucellosis by serology. Vet Microbio. 2002;90(1-4):447-59.
14- Bricker BJ. Diagnostic strategies used for the identification of Brucella. Vet Microbio. 2002;90(1-4):433-4.
15- Corbel MJ, Bracewell CD, Thomas EL, Gill KPW. Techniques in the identification of Brucella species. Identification Methods for Microbiologists. 2nd ed. Skinner FA, Lovelock DW, editors. Academic Press;1979. p. 86-9.
16 -Weissbach A, Hurwitz J. The formation of 2-keto-3-deoxyheptonic acid in extracts of Escherichia coli B. I. Identification. J Biol Chem. 1959;234(4):705-9.
17- Hendry D, Corbel MJ, Bell RA, Stack JA. Brucella antigen production and standardization. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Central Veterinary Laboratory, New Haw: Weybridge; 1985. p. 1-96.
18- Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM. Techniques for the brucellosis laboratory. Paris: INRA Publications; 1988.
19- Lucero NE, Foglia L, Ayala SM, Gall D, Nielsen K. Competitive enzyme immunoassay for diagnosis of human brucellosis. Journal of Clinical Microbiology. 1999;37(10): 3245-8.
20- Araj GF, Kattar MM, Fattouh LG, Bajakian KO, Kobeissi SA. Evaluation of the PANBIO Brucella immunoglobulin G (IgG) and IgM enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of human brucellosis. Clinical and Vaccine Immunology. 2005;12(11):1334-5.
21- Ertek M, Yazgi H, Ozkurt Z, Ayyildiz A, Parlak M. Comparison of the diagnostic value of the standard tube agglutination test and the ELISA IgG and IgM in patients with Brucellosis. Turkish Journal of Medical Sciences. 2006;36(3):159-63.