طراحی و تعیین اعتبار الایزای غیر مستقیم برای تشخیص بروسلوزیس در انسان

رضا شاپوری[1*] ، مهدی رهنما [2]

۱. دکترای میکروب شناسی، استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان
۲. دکترای فیزیولوژی، استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان

* نشانی برای مکاتبه: گروه میکروبیولوژی ، دانشکده زیست شناسی ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، تلفن : ۰۲۴۱-۴۲۲۱۰۰۳ ، پست الکترونیکی : rezashapoury@yahoo.com

دریافت مقال: مرداد هشتاد و هفت پذیرش برای چاپ: مهر هشتاد و هفت

چکیده

سابقه و هدف: *بروسلوز در ایران به صورت آندمیک بوده و شناسایی آنتی بادیهای بروسلایی روش مناسبی برای تشخیص بیماری می باشد. هدف این مطالعه طراحی و تعیین اعتبار الایزای غیرمستقیم برای تشخیص بروسلوز انسانی در مقایسه با سایر روشهای سرولوژیکی معمول است.*

روش کار: *برای تهیه لیپوپلی ساکارید (LPS) از بروسلا آبورتوس S99 استفاده شد. LPS با روش فنل داغ همراه با هضم آنزیمی استخراج شد. میکروپلیت های الایزا با LPS کوت شدند. برای الایزای غیرمستقیم از آنتی بادی کونژوگه منوکلونال anti human IgG1 استفاده شد.*

یافته ها: *حد آستانه (cutoff) برابر با ۲۱/۶۳-۱۷/۹۲٪ مثبت بودن (P%) با استفاده از نمونه های سرمی منفی تعیین گردید. اختصاصیت الایزای غیرمستقیم طراحی شده ۹۵/۵٪ محاسبه شد. حساسیت آن ۱۰۰٪ ، ارزش اخباری مثبت ۹۳/۳۳٪ ، ارزش اخباری منفی ۱۰۰٪ و همخوانی نتایج ۹۶/۹۸٪ به دست آمد.*

نتیجه گیری: *الایزای غیرمستقیم طراحی شده ، روشی حساس ، اختصاصی ، سریع و آسان برای تشخیص بروسلوز انسانی می باشد.*

واژگان کلیدی : ***بروسلوز ، الایزای غیرمستقیم ، لیپوپلی ساکارید.***

مقدمه

بروسلاها، کوکوباسیلهای گرم منفی هستند که در انسان و حیوانات ایجاد بیماری می کنند(۱). بروسلاها پس از ورود از راه مخاط یا پوست ، در نزدیکی محل ورود خود بوسیله مونوسیتها یا لکوسیت‌های چند هسته‌ای فاگوسیتوز شده و به دلیل توانایی بقای درون فاگوسیتی با جریان خون در کبد ، طحال و سایر ارگانها مانند قلب، کلیه، مفاصل، سیستم اعصاب مرکزی و دستگاه تناسلی پخش می‌شوند(۲).

دوره کمون ۳-۱ هفته و گاهی تا ۷-۶ ماه نیز به طول می انجامد. در ۵۰-۳۰٪ موارد ، شروع بیماری به صورت حاد و در سایر موارد تدریجی می باشد(۲). بروسلوز در انسان به سه فرم بالینی حاد ، تحت حاد و مزمن دیده می شود(۳و۴).

جداسازی بروسلا قطعی‌ترین راه تشخیص بروسلوز است. برای تشخیص می‌توان ازکشت های خون، غدد لنفاوی و مغز استخوان استفاده نمود. برای گرفتن نتیجه بهتر باید در دوره تب از بیمار نمونه‌گیری کرد. از معایب این روش وقت گیر بودن ، خطر ابتلا پرسنل و گرفتن جواب های منفی کاذب می باشد(۵و۶).

یکی از روشهای سرولوژیکی، سروآگلوتیناسیون یا تست رایت (Wright test) می باشد. تست کومبس رایت (Coombs wright test) در مواردی که تست رایت منفی می‌شود و ممکن است این جواب منفی به علت وجود آنتی بادیهای بلوکه کننده باشد، استفاده می‌گردد. از آزمایش ثبوت مکمل و آنتی بادی فلورسانت نیز برای تشخیص استفاده می‌شود(۵و۷).

الایزا یکی از روشهای سنجش پاسخ سیستم ایمنی بوده که در فاز جامد انجام می گیرد و به همین دلیل بسیاری از عیوب روشهای سنجش ایمنی در فاز مایع از جمله زمان طولانی روش ، آماده سازی اولیه و اتصالات غیراختصاصی بالا در این روش مشاهده نمی شود(۸و۹).

در الایزای غیر مستقیم سرم به آنتی ژنهای کوت شده در فاز جامد اضافه شده و در مرحله بعد آنتی بادی ضد آنتی بادی اول که نشاندار می باشد افزوده می شود. در صورت وجود واکنشهای اختصاصی بین آنتی ژن و آنتی بادی و تجزیه سوبسترای کروموژن، واکنش رنگی ایجاد می شود. حساسیت این روش در مقایسه با روش الایزای مستقیم بیشتر است(۱۰-۸). هدف این پژوهش طراحی و تعیین اعتبار الایزای غیر مستقیم برای تشخیص بروسلوز در انسان بود.

روش کار

برای تهیه آنتی ژن LPS بروسلا از Brucella abortus biovar 1 S99 استفاده شد. سویه مورد نظر صاف بوده و برای رشد نیازی به حضور دی اکسید کربن در محیط ندارد. باکتری مورد نظر از انستیتو پاستور کرج به صورت لیوفیلیزه تهیه شد. استخراج LPS با استفاده از روش فنل داغ همراه با هضم آنزیمی (۱۴-۱۱) انجام گرفت. به طور خلاصه به ۵۰ گرم وزن مرطوب سلولی در ۱۷۰ میلی لیتر آب مقطر ، ۱۹۰ میلی لیتر محلول فنل ۹۰٪ (v/v) افزوده و در حرارت ۶۶ °C برای ۳۰ دقیقه هم زده می شود. سپس لایه فنلی را جدا کرده و LPS توسط متانول سرد رسوب داده می شود. محلول LPS در برابر آب مقطر دیالیز شده تا فنل از آن خارج گردد. LPS با متانول سرد رسوب داده شده و به آن پروتئیناز K (۵۰ میکرو گرم آنزیم به ازای هر ۱۰ میلی گرم پروتئین محلول) و آنزیمهای DNase و RNase (۵۰ میکرو گرم آنزیم به ازای هر۱ میلی گرم اسید نوکلئیک محلول) در دو مرحله جداگانه برای حذف آلودگی های پروتئینی و اسیدهای نوکلئیک افزوده شد. در انتها LPS با افزودن متانول سرد رسوب داده و فریز درای گردید.میزان آلودگی نمونه LPS بروسلا با پروتئین به روش برادفورد و میزان آلودگی با اسیدهای نوکلئیک با اندازه گیری در A_{260} تعیین گردید. همچنین اندازه گیری مقدار کلی کربوهیدراتها با استفاده از روش فنل-سولفوریک اسید و غلظت LPS در نمونه استخراج شده با کمک معرف DMB (1,9-Dimethyl-Methylene Blue) محاسبه شد (۱۴-۱۱). نمونه های سرم انسانی مورد نیاز برای طراحی الایزای غیر مستقیم (IELISA) شامل ۹۸ نمونه مثبت (نمونه هایی که کشت مثبت بودند و بروسلا در کشت خون این افراد جدا گردید) ،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 بود. برای به دست آوردن رقت مناسب آنتی ژن (LPS) برای کوتینگ در چاهکهای پلیت ، رقتهای مناسب سرمی و همچنین رقت مناسب آنتی IgG1 انسانی مونوکلونال کونژوگه با آنزیم هورس ردیش پراکسیداز از روش جدول متقاطع تیتراسیون (پلیت چکر بورد) استفاده شد(۱۹-۱۵).LPS در بافر کربنات ۰/۰۵ مولار با pH: ۹/۶ با غلظت نهایی یک میکروگرم بر میلی لیتر تهیه و به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک افزوده شد. پلیت به مدت یک شب در دمای ۴ °C قرار داده شد و پس از شستشو (بافر شستشو شامل PBS.۰/۰۱ مولار با pH: 7.2 حاوی توین ۲۰ ، ۰/۰۵٪) ، محلول بلوکه کننده به مقدار ۳۰۰ میکرو لیتر (شامل PBS.۰/۰۱ مولار با pH: 7.2 حاوی توین ۲۰ ، ۰/۰۵٪ به همراه ۱٪ آلبومین سرم گاوی و ۰/۰۵٪ NaN3) به چاهکها افزوده شد. پس از شستشو ، نمونه های سرمی را با رقت ۱/۱۰۰۰ در بافر رقیق کننده (PBS.۰/۰۱ مولار با pH: 6.3 حاوی توین ۲۰ ، ۰/۰۵٪ ، ۷/۵ میلی مولار EDTA و ۷/۵ میلی مولار EGTA) رقیق کرده و با مقادیر ۱۰۰ میکرو لیتر به چاهکها اضافه شد. پس از ۳۰ دقیقه چاهکها شسته شده و آنتی IgG1 انسانی مونوکلونال کونژوگه با آنزیم هورس ردیش پراکسیداز با منشاء موشی (Rockland) با رقت ۱/۱۰۰۰۰ به مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر به چاهکها اضافه و پلیت برای یک ساعت پلیت در دمای اتاق انکوبه شد. پس از شستشو ، محلول سوبسترا به مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر به هر چاهک اضافه و پلیت برای ۲۰ دقیقه در ۳۷ °C انکوبه شد. پس از افزودن محلول متوقف کننده (محلول ۴٪ SDS) میزان جذب نوری پلیت در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر قرائت شد. لازم به ذکر است که نمونه ها به صورت سه تایی (تریپلی کیت) کار شدند (۱۹-۱۵).تعیین حد آستانه (Cutoff) الایزای غیرمستقیم طراحی شده براساس Positivity% (P%) مقدار جذب میانگین نمونه های سرم منفی برابر با آن میزان از درصد مثبت بودن و با فرمول Positivity% (P%)=(mean OD sample/mean OD strong positive) ×100 محاسبه شد(۱۹-۱۵). برای تعیین دقت (Precision) و تکرار پذیری الایزای از سه نمونه سرمی مثبت قوی ، مثبت ضعیف و منفی سنجشهای درون سنجی (Intra assay) و برون سنجی (Inter assay) انجام گرفت. نتایج حاصل از قرائت جذب نمونه ها به صورت میانگین (Mean) ، انحراف از معیار (Standard Deviation or SD) و میزان ضریب تغییرات (Coefficient of variation or CV) محاسبه شد (۱۹-۱۵). همچنین شاخصهای حساسیت (Sensitivity) ، اختصاصیت (ویژگی) (Specificity) ، ارزش اخباری مثبت (Positive Predictive Value) ، ارزش اخباری منفی (Negative Predictive Value) و همخوانی نتایج (Overall Agreement) طبق فرمولهای مربوطه محاسبه شد (۱۹-۱۵).نمونه خون وریدی افراد مشکوک به بروسلوز در محیط کشت دی فازیک کاستاندا تلقیح شد. گرماگذاری در دمای ۳۷ °C و ۵٪ CO2 انجام گرفت. نمونه های منفی تا ۸ هفته نگهداری و سپس نتیجه گزارش می شد. نمونه های مثبت از لحاظ آگلوتینه شدن با آنتی سرم استاندارد بروسلا (تهیه شده از انستیتو پاستور کرج واحد تولید واکسنهای باکتریال) تایید می شدند.در این تحقیق اعتبار الایزای طراحی شده با نتایج دو روش معمول سرولوژیکی مورد استفاده در تشخیص بروسلوز انسانی ، تست آگلوتیناسیون لوله ای (SAT) و تست کومبس رایت مورد مقایسه قرار گرفت. تست آگلوتیناسیون لوله ای (SAT) و تست کومبس رایت طبق روش استاندارد انجام گرفتند(۵).

یافته ها

LPS بروسلا آبورتوس S99 استخراج شده با روش فنل داغ همراه با هضم آنزیمی از لحاظ نسبت LPS به کربوهیدرات ۸۷٪ و میزان آلودگی نمونه به پروتئین کمتر از دو و اسید نوکلئیک کمتر از یک بعد از تیمار آنزیمی بود.در محاسبه غلظتها و رقتهای مناسب آنتی ژن کوتینگ ، سرم و آنتی ژن کونژوگه به روش جدول متقاطع تیتراسیون (پلیت چکربورد) ، غلظت مناسب آنتی ژن کوتینگ (لیپوپلی ساکارید بروسلا آبورتوس S99) برای کوت کردن ۱ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد. مناسب ترین رقت سرم ۱/۱۰۰۰ محاسبه شد. همچنین بهترین رقت آنتی ژن کونژوگه ۱/۱۰۰۰۰ به دست آمد. در آزمایشات بعدی از رقتهای ذکر شده برای انجام روش الایزای غیرمستقیم استفاده شد.در جدول ۱ میانگین جذب نوری (OD) برای چاهکهای بلانک (چاهک فاقد آنزیم کونژگه) ، نمونه های سرمی منفی ، نمونه های سرمی مثبت قوی و نمونه های سرمی مورد آزمون که (کشت آنها مثبت بود) ارائه شده است. حد آستانه براساس Positivity% (P%) محاسبه گردید. براساس نمونه های منفی تهیه شده از ساکنین مناطق شهری حد آستانه برابر با P% ۱۷/۹۲ و برای نمونه های منفی تهیه شده از ساکنین روستایی حد آستانه P% ۲۱/۶۳ به دست آمد.در جداول ۲ و ۳ به ترتیب نتایج حاصل از قرائت جذب نوری نمونه ها در آزمایش درون سنجی (Intra assay) و برون سنجی (Inter assay) برای الایزای غیرمستقیم با استفاده از نمونه سرمی منفی ، مثبت ضعیف و مثبت قوی ارائه شده است. با توجه به نتایج جداول و اینکه مقدار درصد ضریب تغییرات (CV%) کمتر از ۱۵٪ می باشد ، بنابراین دقت و قابلیت تکرار پذیری این روش اثبات می گردد(۱۹-۱۵).

در جدول ۴ نتایج حاصل از تعیین اعتبار الایزای غیرمستقیم (IELISA) در مقایسه با روشهای آگلوتیناسیون لوله ای (SAT) و آزمایش کومبس رایت (Coombs) ارائه شده است. از ۹۸ مورد نمونه سرمی که کشت خون این افراد مثبت شده است ، در روش الایزای غیرمستقیم همه مثبت و مبتلا به بروسلوز شناخته شدند. این موارد برای روش SAT برابر با ۹۲ و برای روش کومبس ۹۴ مورد مثبت از ۹۸ نمونه کشت مثبت بوده است. بنابراین روش الایزای غیرمستقیم طراحی شده فاقد جواب منفی کاذب می باشد. در حالی که روش کومبس دارای ۴ و روش SAT دارای ۶ منفی کاذب در این بررسی می باشد. 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 بوده و بدون سابقه ابتلا به بروسلوز و مصرف گوشت و فرآورده های لبنی مشکوک بودند ، آزمونهای SAT و کومبس هر دو فاقد جواب مثبت کاذب بودند. اما در الایزای غیرمستقیم ۲ مورد از نمونه سرمی تهیه شده افراد شهری و ۷ مورد از نمونه سرمی افراد روستایی دارای جواب مثبت کاذب بود. بیشترین میزان حساسیت در بین روشهای مورد استفاده ، متعلق به الایزای غیرمستقیم (با حساسیت ۱۰۰٪) بود. روشهای SAT و کومبس دارای اختصاصیت (ویژگی) ۱۰۰٪ در این بررسی بودند. این مورد برای الایزای غیرمستقیم ۹۵/۵٪ به دست آمد. همچنین بیشترین مقدار ارزش اخباری مثبت مربوط به روشهای SATو کومبس (۱۰۰٪) و بیشترین مقدار ارزش اخباری منفی مربوط به روش الایزای غیرمستقیم (۱۰۰٪) بود.

جدول۱. میانگین جذب نوری (OD) نمونه ها برای الایزای غیرمستقیم

نمونه	جذب نوری (mean±SD*)
بلانک	۰/۰۸±۰/۰۰۶
منفی تهیه شده از ساکنین مناطق شهری	۰/۱۲±۰/۰۱
منفی تهیه شده از ساکنین مناطق روستایی	۰/۱۴۵±۰/۰۱۷
مثبت قوی	۱/۸۳±۰/۲۲
نمونه های مورد آزمون و کشت مثبت	۰/۶۷±۰/۲۷

*SD : Standard deviation

جدول ۲. نتایج حاصل از قرائت جذب نوری نمونه ها در آزمایش درون سنجی (Intra assay) برای الایزای غیرمستقیم

سنجش / نمونه	میزان جذب نوری در آزمایش درون سنجی: میانگین (Mean)	انحراف از معیار (SD)	درصد تغییرات (CV%)	ضریب	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 نمونه ها در آزمایش برون سنجی (Inter assay) برای الایزای غیرمستقیم

سنجش / نمونه	میزان جذب نوری در آزمایش برون سنجی: میانگین (Mean)	انحراف از معیار (SD)	درصد تغییرات (CV%)	ضریب	تعداد دفعات تکرار
منفی	۰/۰۹	۰/۰۳	۲/۸۵		۱۰
مثبت ضعیف	۰/۶۷	۰/۱۳	۴/۱		۱۰
مثبت قوی	۱/۸۱	۰/۴۲	۴/۷۲		۱۰

جدول ۴. نتایج حاصل از تعیین اعتبار الایزای غیرمستقیم (IELISA) در مقایسه با روشهای آگلوتیناسیون لوله ای (SAT) و آزمایش کومبس رایت (Coombs)

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

بحث

بروسلوز مشکلی جهانی است. به استثنای تعداد محدودی از کشورهای جهان که عاری از بیماری بوده یا موفق به ریشه کنی شده اند، اکثریت کشورها به این بیماری آلوده اند(۴-۲).

کشت باکتریولوژیک و تستهای سرولوژیکی آگلوتیناسیون بیشترین تستهای مورد استفاده در تشخیص عفونتهای انسانی و حیوانی بروسلوز هستند. امروزه فناوری الایزا به طور چشمگیری توانسته در بسیاری از موارد به عنوان یک روش مناسب تشخیصی جایگزین روشهای قبلی شود. علت این امر سریع ، آسان ، قابلیت طراحی برای انواع آنتی ژنها ، توانایی سنجش تعداد زیاد نمونه به طور همزمان ، خطای کمتر و مقرون به صرفه بودن می باشد (۲۱،۲۰). هدف این پژوهش نیز طراحی روشهای تشخیصی جدید با حساسیت و اختصاصیت بالا ، سادگی و مقرون به صرفه بودن در تشخیص بروسلوز انسانی است.

B.abortus S99 (Weybridge) سویه متداول مورد استفاده در تولید آنتی ژنهای بروسلا برای موارد تشخیصی می باشد ، که دلیل آن پایداری آنتی ژنیکی و عدم تغییر فاز کلونی سویه نامبرده است(۱۲). در این تحقیق نیز از B.abortus S99 برای تهیه LPS استفاده شد. ضمن این که LPS تهیه شده از بروسلا آبورتوس S99 می تواند به عنوان آنتی ژن در تهیه کیت های تشخیصی برای عفونتهای بروسلا ملی تنسیس و سوئیس نیز استفاده شود (۲۱،۲۰).

استفاده از بافر بلوکه کننده برای پر کردن فضاهای خالی موجود در چاهکهای پلیت الایزا و جلوگیری از واکنشهای غیراختصاصی می باشد. بدین منظور از بافر PBS.۰/۰۱ حاوی توین ۲۰ ، ۰/۰۵٪ به همراه ۱٪ آلبومین سرم گاوی (BSA) که بیشترین بافر بلوکه کننده مورد استفاده در تولید انواع کیتهای تجاری الایزا می باشد ، در طراحی الایزای غیرمستقیم و رقابتی استفاده شد (۱۹-۱۵) تا علاوه بر بر پر کردن فضاهای خالی ، به بهترین وجه از بروز واکنشهای غیراختصاصی جلوگیری نماید.

همچنین براساس تحقیقات سایر محققان بر روی انواع بافرهای رقیق کننده (۳۰-۲۳) ، بافر PBS. حاوی توین ۲۰ ، EDTA و EGTA که کارایی بیشتری را در جلوگیری از بروز پدیده پروزون نشان داده بود ، استفاده شد.

فرمولهای متعددی برای محاسبه حد آستانه در انواع روشهای الایزا وجود دارد. امروزه اغلب برای محاسبه حد آستانه الایزای غیرمستقیم از P% استفاده می شود (۱۹-۱۵). در این مطالعه نیز حد آستانه با این روش محاسبه شد.

حد آستانه در صورت استفاده از سرمهای منفی تهیه شده از افراد شهری P% ۱۷/۹۲ و در صورت استفاده از سرم افراد روستایی P% ۲۱/۶۳ به دست آمد. علت استفاده از دو نوع نمونه سرم منفی این بود که حد آستانه افتراق بین نمونه های مثبت و منفی بروسلوزی در بین هر دو جمعیت شهری و روستایی به صورت دقیق تری تعیین شود. زیرا که روستائیان در مقایسه با افراد شهری به دلیل احتمال برخورد و تماس بیشتر با بروسلوز که یک بیماری دامی می باشد ، در سرم خود دارای آنتی بادیهایی هستند که می تواند در تفسیر تست تداخل کرده و جواب کاذب (که معمولا مثبت کاذب می باشد) ایجاد نماید(۱۱،۵). بنابراین در تعیین اعتبار دقیق یک الایزا باید تمامی جوانب را مد نظر قرار داده و بررسی نمود.

سامارتینو و همکارانش (۱۵) در طراحی الایزای غیرمستقیم خود برای بروسلوز کاوی حد آستانه را برابر با P% ۴۰ گزارش کردند.

استفاده از آنتی ژنهای کونژوگه پلی کلونال سبب ارزان تمام شدن قیمت نهایی محصول می شود. اما از ضعفهای مهم این نوع آنتی ژنها وجود مقدار بالای جذب نوری زمینه ای است که باعث کاهش اختصاصیت روش می شود (۱۱-۸). سامارتینو و همکاران (۱۵) از آنتی ژن کونژوگه منوکلونال علیه IgG1 استفاده کردند. طبق نتایج ایشان استفاده از این آنتی ژن به جای آنتی ژن پلی کلونال سبب بهبود اختصاصیت روش تشخیصی می شود. زیرا که در این حالت احتمال انجام واکنشهای متقاطع بین لیپوپلی ساکارید بروسلا با آنتی بادیهای موجود در سرم افراد علیه برخی از باکتریهای دارای واکنش متقاطع با لیپو پلی ساکارید بروسلا از جمله یرسینیا اینتروکولیتیکا O:9 و ایجاد جواب مثبت کاذب بسیار کم می شود. در تحقیق حاضر نیز از آنتی ژن کونژوگه منوکلونال علیه IgG1 برای همین هدف استفاده گردید.

در مقایسه نتایج حاصل از تعیین اعتبار الایزاهای طراحی شده با روش SATو روش کومبس (جدول ۴) مشخص می شود که الایزای غیرمستقیم حداکثر حساسیت (۱۰۰٪) را دارا می باشد. در شاخص اختصاصیت (ویژگی) دو روش SAT و کومبس دارای حداکثر (۱۰۰٪) بودند. برای الایزای غیرمستقیم این شاخص ۹۵/۵٪ محاسبه شد.

سامارتینو و همکاران (۱۵) اقدام به طراحی دو روش الایزای غیرمستقیم و رقابتی برای تشخیص بروسلوز گاوی کردند. طبق گزارش ایشان در گوساله اختصاصیت روش رقابتی ۹۹/۸٪ و روش غیرمستقیم ۹۸/۶٪ بود. 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 ایشان گزارش کردند که سایر روشهای سرولوژیکی تشخیصی بروسلوز مقایسه شده با دو روش الایزا ، اختصاصیت بسیار کمتری را نشان دادند (۱۵).

ساگرمن و همکاران (۱۷) در طراحی الایزای غیرمستقیم برای بروسلوز گاوی از دو آنتی ژن کونژوگه منوکلونال اختصاصی علیه IgG1 و IgG2 استفاده کردند. اختصاصیت روش برای IgG2 ، ۹۹/۶۳-۹۸/۳۲٪ و برای IgG1 ، ۹۸/۲۶-۹۶/۰۸٪ محاسبه شد. اما در حساسیت هر دو مشابه بودند.

ارج و همکارانش (۲۲) در طراحی الایزای غیرمستقیم برای بروسلوز انسانی با استفاده از آنتی ژنهای پلی کلونال علیه IgG و IgM نتیجه گرفتند حساسیت روش IgG ۹۱٪ و روش IgM ۱۰۰٪ است. شاخص اختصاصیت برای هر دو الایزا ۱۰۰٪ گزارش شد.

ارتک و همکارانش (۲۳) روش الایزای غیرمستقیم خود را با استفاده از آنتی ژنهای کونژوگه پلی کلونال علیه IgG و IgM برای بروسلوز انسانی طراحی کردند. 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.

مدت زمان تشخیص بروسلوز با استفاده از الایزا در حدود ۳-۲ ساعت می باشد و می توان تعداد زیادی از نمونه ها را همزمان آزمایش نمود. در مقایسه با سایر روشهای سرولوژیکی و کشت بروسلا روش الایزا اگر حساسیت و اختصاصیت قابل قبولی در مقایسه سایر روشهای تشخیصی داشته باشد ، می تواند به عنوان یک تست مناسب ، نیاز کم به نمونه ، سهولت انجام ، مقرون به صرفه ، حساس ، سریع و با کارایی بالا در تشخیص بروسلوز جایگزین روشهای روتین شود(۵،۱۱،۱۲). این موارد با نتایج حاصل از این بررسی کاملا تایید گردید. همچنین جداول ۳-۲ و ۳-۳ نشان دادند که ضریب تغییرات در بررسی های درون سنجی و برون سنجی کمتر از ۱۵٪ بوده و لذا تکرار پذیری نتایج تایید می شود.

امروزه استفاده از فناوری الایزا در تشخیص بسیاری از بیماریهای عفونی و غیرعفونی در ایران به تدریج رایج شده و می توان به همه گیر شدن استفاده از این روش در آزمایشگاههای تشخیص طبی امیدوار بود.

REFERENCES

1. Giambartolomei GH, Delpino MV, Cahanovich ME, Wallach JC, Baldi PC, Velikovsky A, Fossati CA. Diminished production of T Helper 1 cytokines correlates with T Cell unresponsiveness to Brucella cytoplasmic proteins in chornic human brucellosis. J Infect Dis; 2002; 186:252-259.

2. Moreno E. Brucellosis in centrall America. Vet Microbio; 2002; 90:31-38.

3. Refai M. Incidence and control of brucellosis in the near east region. Vet Microbio; 2002; 90: 81-110.

4. Ragan VE. The animal and plant health inspection service (APHIS) brucellosis eradication program in the United states. Vet Microbio; 2002; 90: 11-18.

5. Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM. Techniques for the brucellosis laboratory. Institut national de la recherche agronomique, Paris: France; 1988.

6. Attas RA. Evaluation of PCR , Culture and serology for the diagnosis of human brucellosis. Ann Saudi Med; 2000; 20: 224-228.

7. Brions G. Brucella abortus Cyclic β-1, 2- Glucan mutants have reduced virulence in mice and are defective in intracellular replication in hela cells . Infect Immun; 2001; 69: 4528-4535.

8. Deshpande SS. Enzyme immunoassay from concept to product development. Chapman and hall. New York. 1996.

9. Crowther JR. The ELISA guide book. Humana press. New Jersey. 2001.

10. Maggio ET. Enzyme Immunoassay. CRC Press, Boca Raton, Fla. 1981.

11. Hendry DFD, Corbel MJ, Bell RA, Stack JA. Brucella antigen production and standardization. Booklet 2499. Ministry of agriculture, fisheries and food, Lion House, Alwick, Northumberland: UK; 1985.

12. Corbel MJ, Hendry DFD. Methods for the identification of Brucella. Booklet 2085. Ministry of agriculture, fisheries and food, Lion House Alnwick, Northumberland: UK; 1983.

13. Morrison DC, Leive L. Fractions of lipopolysaccharide from E.coli O111:B4 prepared by two extraction procedures. J Biol Chem; 1978; 250: 2911-19.

14. Phillips M, Pugh G, Deyoe B. Chemical and protective properties of Brucella lipopolysaccharide obtained by butanol extraction. Am J Vet Res; 1989; 50: 311-

15. Samartino L, Gall D, Gregoret R, Nielsen K. Validation of enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of bovine brucellosis. Vet Microbio; 1999; 70: 193-200.

16. Nielsen K, 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.

17. 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.

18. 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. Preven Vet Med; 2006; 75: 189-205.

19. Minas A, Stournara A, Christodoulopoulos G, Katsoulos PD. Validation of a competitive ELISA for diagnosis of Brucella melitensis infection in sheep and goats. Vet J; 2007; 65: 753-760.

20. Bricker BJ. Diagnostic strategies used for the identification of Brucella. Vet Microbiol; 2002; 90: 433-434.

21. Nielsen K. Diagnosis of brucellosis by serology. Vet Microbiol; 2002; 90: 447-459.

22. Araj GF, Kattar MM, Fattouh LG, Bajakian KO, Kobeissi SA. Evaluation of the PANBIO Brucella immunoglobulin G (IgG) andIgM enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of human brucellosis. Clin Diag Lab Immunol; 2005; 12: 1334-1335.

23. Ertek M, Yazgi H, Zkurti 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.Turkey J Med Sci; 2006; 36:159-163.