مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی‌ام/شماره ۲۰۵/هفته سوم آبان ماه ۱۳۹۱
مقاله پژوهشی
تاریخ دریافت: ۹۱/۳/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۱/۶/۱۲

طراحی کیت ELISA غیر مستقیم به منظور شناسایی هم‌زمان آنتی‌بادی بر علیه بروسلوز در گاو و انسان آلوده

نازنین سمواتی[۱]، دکتر علی میرجلیلی[۲]، دکتر مهدی بوترابی[۳]

چکیده

مقدمه: بروسلوز یک بیماری مشترک بین انسان و دام است که انتشار جهانی دارد و از بیماری‌های آندمیک شناخته شده در ایران است. تشخیص سریع و مناسب این بیماری نقش مؤثری در بهبود بهداشت عمومی دارد. هدف از این تحقیق، طراحی یک کیت Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) غیر مستقیم جهت تشخیص هم‌زمان بروسلوز در انسان یا دام آلوده بود که بتواند به عنوان جایگزینی مناسب جهت SAT و کیت‌های وارد شده از کشورهای خارجی به کار رود.

روش‌ها: در این تحقیق از لیپوپلی‌ساکارید صاف (Smooth lipopolysaccharide یا S-LPS) بروسلا آبورتوس و بروسلا ملی‌تنسیس که به صورت تجاری و با خلوص بالا تهیه شده بودند به عنوان آنتی‌ژن جهت کوت کردن میکروپلیت‌ها استفاده شد. روش ELISA غیر مستقیم بر روی ۱۲۹ نمونه‌ی سرمی شامل ۵۱ نمونه‌ی سرم انسانی (۱۰ نمونه سرم مثبت و ۴۱ نمونه سرم منفی) از بیماران مراجعه‌کننده به آزمایشگاه‌های تشخیصی طبی تهران، ساری، همدان و ۷۸ نمونه سرم دامی(۳۰ نمونه سرم مثبت و ۴۸ نمونه سرم منفی) از نمونه‌های فرستاده شده به آزمایشگاه‌های دامپزشکی در استان البرز صورت گرفت. تمام سرم‌ها با روش آگلوتیناسیون لوله‌ای استاندارد (Serum agglutination test یا SAT) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته‌ها: همه‌ی ۴۰ نمونه‌ی سرم (۱۰ نمونه سرم انسانی و ۳۰ نمونه سرم دامی) که با تست Wright مثبت گزارش شده بودند، با کیت ELISA طراحی شده نیز نتایج مثبتی داشتند. از ۸۹ نمونه‌ی سرم منفی (۴۱ نمونه سرم انسانی و ۴۸ نمونه سرم دامی)، ۸۶ نمونه نتیجه‌ی منفی نشان دادند. در این مطالعه حساسیت و ویژگی برای کیت دامی به ترتیب ۱۰۰ و ۹۵/۸۳ درصد و برای کیت انسانی به ترتیب ۱۰۰ و ۹۷/۵۶ درصد بود. مقدار حساسیت و ویژگی برای کیت ترکیبی طراحی شده ۱۰۰ و ۹۶/۷۳ درصد بود. بر همین اساس میزان حد آستانه یا (Cut off) نیز ۰/۱۳ تعیین گردید.

نتیجه‌گیری: این کیت به دلیل استفاده از دو کونژوگه، توانایی شناسایی بروسلوز در دام یا انسان آلوده را به طور هم‌زمان دارد. دقت، حساسیت و ویژگی بالا به همراه سرعت انجام آزمایش از مزایای این روش در مقایسه با سایر تست‌های سرولوژیکی است.

واژگان کلیدی: بروسلوز، ELISA غیر مستقیم، لیپوپلی‌ساکارید، بروسلا آبورتوس، بروسلا ملی‌تنسیس

مقدمه

بروسلوز یک بیماری مشترک بین انسان و دام (Zoonosis) است که به عنوان یک بیماری بومی در آسیا، آمریکای لاتین و کشورهای سواحل مدیترانه شیوع فراوانی دارد و از مسایل مهم بهداشتی در کشورهای در حال توسعه از جمله کشور ما ایران می‌باشد (۲-۱). تشخیص سریع و مناسب این بیماری نقش مؤثری در بهبود بهداشت عمومی دارد و صدمات اقتصادی این بیماری در دام‌ها منحصر به سقط جنین، کاهش وزن و کمبود شیر نیست، بلکه مانع تجارت بین‌المللی به عنوان یک مسأله‌ی عمده در اقتصاد دولت‌ها به حساب می‌آید (۳). مطالعات مختلف و زیادی جهت رسیدن به روش‌های سریع‌تر و بهتر تشخیصی انجام گرفته است (۴). اگر چه استاندارد

[۱] دانشجوی کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی تحصیلات تکمیلی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، جهرم، ایران
[۲] استادیار، گروه بیوتکنولوژی، مؤسسه‌ی واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج، ایران
[۳] استادیار، گروه میکروبیولوژی، شرکت تولیدی تحقیقاتی پیشتاز طب زمان، تهران، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر علی میرجلیلی
Email: ali_mirjalili@yahoo.com

طلایی تشخیص این بیماری ایزولاسیون باکتری از کشت خون، مغز استخوان یا تجمعات چرکی مشکوک است اما در عمل رسیدن به کشت خون مثبت و به کارگیری این شیوه ی تشخیصی برای بروسلوز، با مشکلات عدیده‌ای از جمله وقت گیر بودن، خطر ابتلای پرسنل، گرفتن جواب های منفی کاذب مواجه است؛ بنابراین انجام تست های سرولوژیکی ضروری است (۸-۵).

تست‌های سرولوژیک متعددی به عنوان پیگیری ردپای عفونت بروسلایی جهت ارزیابی آنتی بادی علیه بروسلا به کار برده شده است که از جمله قدیمی ترین آن‌ها تست آگلوتیناسیون استاندارد لوله‌ای (SAT یا Serum agglutination test) یا تست Wright می‌باشد که توسط Wright و Smit در سال ۱۸۹۷ ابداع شده است (۹). روش‌های Wright Coombs یا آنتی‌گلوبولین انسانی (Anti-human globulin test) فیکساسیون کمپلمان (Complement fixation test یا CFT)، آگلوتیناسیون ۲-مرکاپتواتانول (2-ME)، رزبنگال رینگ تست و آگلوتیناسیون سریع روی لام از دیگر روش های سرولوژیکی در تشخیص بروسلوز می‌باشند (۱۲-۱۰). به کار گیری روش ELISA برای تشخیص بروسلوز به لحاظ تئوریک مزیت هایی بر تست آگلوتیناسیون استاندارد لوله‌ای دارد. روش ELISA از حساسیت و ویژگی بالاتری نسبت به تست استاندار SAT و فیکساسیون کمپلمان برخوردار است و می‌تواند هر دو ایمونوگلوبولین G و M را نشان دهد. این روش جهت بررسی یک کلاس خاص ایمونوگلوبولین هم قابل استفاده می‌باشد. از طرف دیگر، ELISA ضمن نشان دادن کل آنتی بادی هایی که در واکنش با آنتی ژن سطحی بروسلا ایجاد شده اند، می‌تواند از تمام آشفتگی ها و پیچیدگی های ایجاد شده توسط آنتی بادی بلوکان یا ناکامل ممانعت کند. به همین دلیل با این روش به آسانی می‌توان بروسلوز حاد را از مزمن بازشناخت و زمانی که تفسیر تست‌های آگلوتیناسیون با ابهاماتی مواجه می‌شود می‌توان پاسخ را با انجام تست ELISA قطعی نمود (۱۳). با وجود این که SAT روشی با حساسیت به نسبت بالا است، اما نیازمند صرف زمان و زحمت بسیار زیادی است و هنگام خواندن نتایج آزمایش باید دقت و تمرکز زیادی انجام شود؛ اما ELISA یکی از روش های سنجش پاسخ سیستم ایمنی است که در فاز جامد انجام می‌گیرد و به همین دلیل بسیاری از عیوب روش های سنجش ایمنی در فاز مایع از جمله زمان طولانی، آماده سازی اولیه و اتصالات غیر اختصاصی بالا در این روش مشاهده نمی‌شود (۱۳). امروزه کشورهایی مثل آلمان، کوبا، ایالات متحده و چین اقدام به تولید کیت‌های ELISA جهت تشخیص پاسخ ایمنی بر علیه بروسلا در انسان و یا حیوان کرده‌اند. با توجه به پژوهش‌های انجام شده در بسیاری از کیت های ELISA آنتی ایمونوگلوبولین های انسانی IgM یا IgG به تنهایی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۵-۱۴). در تعدادی نیز IgM و IgG به صورت توأم با یکدیگر به عنوان کونژوگه مصرف می شوند؛ در این شرایط این تست قادر به تشخیص بیماری در هر دو مرحله‌ی حاد و مزمن است (۱۷-۱۶). هدف از این تحقیق، طراحی یک کیت ELISA غیر مستقیم جهت تشخیص بروسلوز در گاو و انسان آلوده به طور هم‌زمان بود که بتواند به عنوان جایگزین مناسب جهت SAT و کیت‌های وارد شده از کشورهای خارجی به کار رود.

www.mui.ac.ir

در این تحقیق ما تلاش نمودیم تا با استفاده از لیپوپلی‌ساکارید صاف (Smooth lipopolysaccharide یا S-LPS) باکتری بروسلا و همچنین بهره گیری از انواع کونژوگه ها، کیت ELISA مناسب برای تشخیص نمونه‌های دامی و همچنین نمونه‌های انسانی تهیه کنیم. پس از انجام مراحل اولیه‌ی تعیین غلظت آنتی‌ژن، رقت سرم و کونژوگه، بقیه‌ی مراحل در دو بخش Optimize کردن کیت شامل استفاده از انواع بلوکرها و بافرهای رقیق کننده‌ی نمونه و رقیق‌کننده‌ی کونژوگه و مرحله‌ی Validation یا اعتبارسنجی شامل تست‌های مختلف کنترل کیفی بر روی کیت انجام پذیرفت.

روش‌ها

در این تحقیق از ۴۰ نمونه سرم مثبت شامل ۱۰ نمونه سرم انسانی بیماران مراجعه‌کننده به آزمایشگاه تشخیصی طبی و ۳۰ نمونه سرم دامی از نمونه‌های فرستاده شده به آزمایشگاه‌های دامپزشکی در تهران، ساری، همدان، کرج و ۸۹ نمونه سرم منفی (۴۱ نمونه سرم انسانی، ۴۸ نمونه سرم دامی) استفاده گردید. تمامی سرم‌ها با روش SAT مورد ارزیابی قرار گرفتند. سرم ها در دو گروه مثبت و منفی تا زمان انجام آزمایش ELISA در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند.

آنتی‌ژن‌های مورد استفاده در این تحقیق S-LPS بروسلا ملی تنسیس و بروسلا آبورتوس بودند که به صورت تجاری با خلوص بالا و کیفیت مناسب تهیه شدند. جهت کوت کردن آنتی‌ژن‌های S-LPS بروسلا، از میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای (Biomat) ته صاف و از جنس پلی‌استیرن استفاده شد. جهت طراحی کیت از روش Checker board استفاده گردید. مشخص شد که باید از آنتی ژن های بروسلا آبورتوس و بروسلا ملی‌تنسیس به میزان ۰/۷۵ میکروگرم در میلی‌لیتر از غلظت اولیه در بافر کوت‌کننده حل شود و به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از آن در داخل هر چاهک ریخته شود.

در ادامه پلیت به مدت یک شب (Overnight) در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از اتمام انکوباسیون نمونه ها خالی شدند و سه بار با بافر شستشو [PBS (Phosphate buffered saline) و ۰/۰۵ درصد Tween ۲۰) شستشو داده شدند. در این تحقیق از دو محلول بلاکینگ Bovine serum albumin (BSA) یک درصد و کازئین یک درصد حل شده در بافر فسفات استفاده شد. عمل بلاکینگ با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر از محلول بلاکر و انکوباسیون در درجه حرارت اتاق به مدت یک ساعت صورت گرفت. پس از یک ساعت محتویات خالی شد و پلیت‌ها به مدت ۴-۲ ساعت در درجه حرارت اتاق قرار داده شدند تا خشک شوند. نمونه‌های سرم به نسبت ۱:۱۰۰ با بافر رقیق‌کننده‌ی سرم، رقیق شد (۲۰-۱۸). در این تحقیق از ۶ نوع بافر رقیق‌کننده‌ی سرم (Serum diluents یا SD) مختلف با ترکیبات زیر استفاده شد:

SD1: کازئین یک درصد، سوکروز ۲/۵ درصد، PBS ۰/۰۱ مولار با pH = ۷/۲، Tween ۲۰، ۱۵ میلی‌مول EDTA، NaOH یک نرمال، Kathon ۰/۲۵ درصد

SD2: Nacl ۸/۶ گرم، Na2HPO4 ۱/۵ گرم، Na2po4 + H_2O یک گرم، BSA یک گرم، Tween ۲۰ ۰/۵ میلی‌لیتر، EDTA ۰/۳۹ گرم، سوربیتول، ۲۵ گرم، کازیین یک درصد، D.W تا ۱۰۰۰ میلی‌لیتر

SD3: کازئین یک درصد، سوکروز ۲/۵ درصد، PBS ۰/۰۱ مولار با pH = ۷/۲، Tween ۲۰

www.mui.ac.ir

۰/۰۵ درصد، Kathon ۰/۲۵ درصد، اوره ۲ مولار

SD4: BSA یک درصد، سوکروز ۲/۵ درصد، PBS ۰/۰۱ مولار با pH = ۷/۲، Tween ۲۰ ۰/۰۵ درصد، Kathon ۰/۲۵ درصد

SD5: کازئین یک درصد، سوکروز ۲/۵ درصد، PBS ۰/۰۱ مولار با pH = ۷/۲، Tween ۲۰ ۰/۰۵ درصد، اوره ۲ مولار، Kathon ۰/۲۵ درصد

SD6: کازئین یک درصد، سوکروز ۲/۵ درصد، PBS ۰/۰۱ مولار با pH = ۷/۲، Tween ۲۰ ۰/۰۵ درصد، اوره یک مولار، NaCl ۱۵۰ میلی‌گرم، NaOH یک نرمال، Kathon ۰/۲۵ درصد

به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از سرم رقیق شده داخل هر چاهک ریخته و ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس پس از خالی کردن نمونه، چاهک‌ها با بافر شستشو پنج مرتبه شستشو داده شد. از آنتی‌ایمونوگلوبولین دامی IgG1 و آنتی‌ایمونوگلوبولین انسانی IgG کونژوگه شده با آنزیم پراکسیداز به نسبت های معین و آزمایش شده به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه شد و مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوباسیون صورت گرفت (۱۸). در ادامه چاهک‌های پلیت پنج مرتبه با بافر شستشو شسته شدند. سپس از سوبسترای تترا متیل بنزیدین (TMB یا Tetramethylbenzidine) به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر در هر چاهک ریخته شد و به مدت ۱۵دقیقه در درجه حرارت اتاق و در تاریکی انکوبه شد و در پایان با اضافه کردن محلول متوقف‌کننده‌ی واکنش (۴۵ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۹۸ درصد در یک لیتر آب مقطر) به میزان ۱۰۰ میکرولیتر در هر چاهک، واکنش متوقف شد.

جذب نوری با دستگاه ELISA reader در طول موج ۴۵۰ نانومتر و با رفرانس فیلتر ۶۳۰ نانومتر اندازه‌گیری و قرائت شد. جهت ارزیابی کیت طراحی شده فاکتورهای مختلفی همچون دقت، حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت، ارزش اخباری منفی و هم خوانی نتایج با تست Wright مورد بررسی قرار گرفت (۲۰-۱۸).

یافته‌ها

بعد از مرحله‌ی کوتینگ آنتی‌ژن‌های S-LPS بروسلا ملی‌تنسیس و آبورتوس در کف میکروپلیت‌ها با استفاده از روش Checker Board، مشخص شد که باید از آنتی‌ژن بروسلا ملی‌تنسیس و آبورتوس میزان ۰/۷۵ میکروگرم در میلی‌لیتر با توجه به بیشتر بودن جذب نوری (Optical density یا OD) سرم مثبت و پایین بودن OD سرم منفی در هر دو سری نمونه‌های انسانی و دامی در بافر کوت کننده استفاده شود (جداول ۱ و ۲).

جدول ۱. تعیین غلظت آنتی‌ژن مورد نیاز جهت ELISA در سرم‌های انسانی

نمونه‌های انسانی (تیترهای تست Wright)	غلظت ۰/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر	غلظت ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر	غلظت ۰/۷۵ میکروگرم در میلی‌لیتر	غلظت ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر
۱:۲۰	۰/۰۵۱	۰/۰۳۶	۰/۰۳۹	۰/۰۴۰
۱:۸۰	۰/۴۴۸	۰/۳۹۹	۰/۵۰۹	۰/۴۴۰
۱:۱۶۰	۱/۴۰۰	۱/۳۰۳	۱/۴۶۷	۱/۴۴۰

جدول ۲. تعیین غلظت آنتی‌ژن مورد نیاز جهت ELISA در سرم‌های دامی

نمونه‌های دامی (تیترهای تست Wright)	غلظت ۰/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر	غلظت ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر	غلظت ۰/۷۵ میکروگرم در میلی‌لیتر	غلظت ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر
۱:۲۰	۰/۰۴۶	۰/۰۳۳	۰/۰۳۶	۰/۰۴۱
۱:۸۰	۰/۳۲۲	۰/۲۹۲	۰/۵۲۶	۰/۴۲۰
۱:۱۶۰	۱/۰۲	۱/۳۰۰	۱/۴۹۵	۱/۴۸۰

جدول ۳. نتایج حاصل از به کارگیری دو نوع بافر بلاکینگ مختلف

	جذب نوری	
نمونه	BSA ۱ درصد	کازئین ۱ درصد
BLANK	۰/۰۳۴	۰/۰۱۱
سرم منفی	۰/۱۲۷	۰/۱۶۱
سرم منفی	۰/۰۹۴	۰/۰۷۷
سرم منفی	۰/۱۱۹	۰/۱۶۴
۱:۲۰ Wright	۰/۳۲۱	۰/۱۸۱
۱:۳۲۰ Wright	۲/۳۸۱	۱/۸۱۲
۱:۱۲۸۰ Wright	۲/۹۴۳	۲/۱۷۹

BSA: Bovine serum albumin

جهت انتخاب مناسب ترین نوع بافر بلاک کننده از دو محلول بلاکر حاوی کازئین و همچنین محلول حاوی سرم آلبومین گاوی استفاده شد. در نهایت BSA یک درصد به علت کاهش جذب زمینه‌ای و دارا بودن بیشترین OD در نمونه‌های مثبت و جلوگیری از اتصالات غیر اختصاصی به عنوان بافر بلاک‌کننده به کار برده شد (جدول ۳).

از ۶ بافر رقیق‌کننده‌ی سرم (SD) ساخته شده در شرکت پیشتاز که شامل SD1، SD2، SD3، SD4، SD5 و SD6 بودند، استفاده شد. با توجه به نتایج جداول ۴ و ۵ بافر رقیق کننده ی SD2 چون بالاترین نسبت OD را برای سرم های مثبت و کمترین جذب زمینه‌ای را دارا بود، به عنوان بهترین بافر رقیق‌کننده‌ی سرم در تحقیق انتخاب شد.

غلظت های مختلف کونژوگه مورد آزمایش قرار گرفت (جدول ۶).

جدول ۴. انتخاب بهترین بافر رقیق‌کننده‌ی سرم انسانی

	جذب نوری					
نمونه‌های انسانی	SD1	SD2	SD3	SD4	SD5	SD6
منفی	۰/۰۴۵	۰/۰۲۷	۰/۰۲۸	۰/۰۳۷	۰/۰۵۰	۰/۰۴۰
مثبت	۰/۲۵۳	۰/۳۲۹	۰/۳۲۲	۰/۲۲۸	۰/۳۲۵	۰/۳۲۴

www.mui.ac.ir

جدول ۵. انتخاب بهترین بافر رقیق‌کننده‌ی سرم دامی

	جذب نوری					
نمونه‌های دامی	SD1	SD2	SD3	SD4	SD5	SD6
منفی	۰/۰۴۲	۰/۰۲۸	۰/۰۳۲	۰/۰۴۲	۰/۰۶۸	۰/۰۵۰
مثبت	۰/۲۳۶	۰/۴۰۲	۰/۳۶۷	۰/۲۴۳	۰/۲۸۶	۰/۳۴۳

جدول ۶. مخلوط آنتی IgG انسانی و آنتی IgG1 گاوی به عنوان کونژوگه در نمونه‌های انسانی و دامی

نمونه	آنتی IgG انسانی ۱/۱۳۰۰۰۰ آنتی IgG1 گاوی ۱/۱۳۰۰۰
نمونه‌های انسانی	
Wright ۱:۴۰	۰/۰۲۳
Wright ۱:۸۰	۰/۴۱۰
Wright ۱:۱۶۰	۲/۹۵۷
Wright ۱:۳۲۰	۳/۱۳۵
نمونه‌ی دامی	
Wright ۱:۴۰	۰/۰۳۳
Wright ۱:۸۰	۰/۳۰۶
Wright ۱:۱۶۰	۱/۴۶۸
Wright ۱:۳۲۰	۲/۳۴۵

در نهایت رقت ۱/۱۳۰۰۰۰ برای آنتی IgG انسانی و رقت ۱/۱۷۰۰۰ برای آنتی IgG1 گاوی انتخاب شد (جدول ۷).

حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و منفی، OA (Overall agreement) و نقطه‌ی برش برای هر یک از کیت‌ها تعیین شد. نتایج محاسبه شده در جداول ۱۰–۸ نشان داده شده است.

در بررسی‌های انجام شده بعد از بهینه کردن آزمایش و انجام آزمایش بر روی تعداد ۸۹ نمونه سرم شاهد منفی میانگین جذب نوری سرم‌های منفی ۰/۰۳ به دست آمد (۱۸). و بر همین اساس نقطه‌ی برش ۰/۱۳ تعیین گردید.

جدول ۷. رقت مناسب برای مخلوط کونژوگه‌ی آنتی IgG انسانی و آنتی IgG1 گاوی

	جذب نوری
نمونه‌های دامی	کونژوگه‌ی آنتی IgG انسانی ۱/۱۳۰۰۰۰ + آنتی IgG1 گاوی ۱/۱۷۰۰۰
Wright ۱:۴۰	۰/۰۹۴
Wright ۱:۴۰	۰/۰۸۵
Wright ۱:۳۲۰	۱/۶۲

جدول ۸. نتایج حاصل از روش ELISA و تست Wright جهت بررسی حساسیت و ویژگی کیت انسانی

SAT + ELISA +	SAT + ELISA –	SAT – ELISA +	SAT – ELISA –
۱۰	۰	۱	۴۰
حساسیت درصد	**ویژگی (درصد)**	**ارزش اخباری مثبت (درصد)**	**ارزش اخباری منفی (درصد)**	**OA (درصد)**
۱۰۰	۹۰/۵۶	۹۰/۹۰	۱۰۰	۹۸/۰۳

برای محاسبه‌ی دقت بـرون سـنجی (Inter assay) نمونه‌های مورد آزمایش (سرم‌های به کار رفته در سـه فاز منفی، مثبت ضعیف و مثبت قوی انتخاب شـدند)، طی سه روز متوالی و در هر روز دو بار و با فاصـله‌ی دو ساعت در RUNهای مختلف مـورد بررسـی قـرار گرفتند. نتایج به دست آمده در جـداول ۱۴-۱۱ نشـان داده شده است که نشان‌دهنده‌ی دقـت بـالای سـنجش است.

جدول ۹. نتایج حاصل از روش **ELISA** و تست **Wright** جهت بررسی حساسیت و ویژگی کیت دامی

SAT + ELISA +	SAT + ELISA –	SAT – ELISA +	SAT – ELISA –
۳۰	۰	۲	۴۶

حساسیت (درصد)	ویژگی (درصد)	ارزش اخباری مثبت (درصد)	ارزش اخباری منفی (درصد)	OA (درصد)
۱۰۰	۹۵/۸۳	۹۳/۷۵	۱۰۰	۹۷/۴۳

جدول ۱۰. نتایج حاصل از روش **ELISA** و تست **Wright** جهت بررسی حساسیت و ویژگی کیت طراحی شده

SAT+ ELISA+	SAT + ELISA –	SAT – ELISA +	SAT – ELISA –
۴۰	۰	۳	۸۶

حساسیت (درصد)	ویژگی (درصد)	ارزش اخباری مثبت (درصد)	ارزش اخباری منفی (درصد)	OA (درصد)
۱۰۰	۹۶/۷۳	۹۳/۰۲	۱۰۰	۹۷/۷۲

جدول ۱۱. محاسبه‌ی دقت درون‌سنجی در سرم‌های انسانی

سرم انسانی	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	میانگین	انحراف معیار	CV درصد
۱	۰/۰۸۴	۰/۰۸۲	۰/۰۸۱	۰/۰۸۴	۰/۰۸۵	۰/۰۸۲	۰/۰۸۶	۰/۰۸۲	۰/۰۸	۰/۰۰۱	۱/۹۷
۲	۰/۷۷۶	۰/۷۵۹	۰/۷۷۵	۰/۷۷۹	۰/۷۶۸	۰/۸	۰/۷۷۹	۰/۷۷۲	۰/۷۷	۰/۰۱۱	۱/۴۲
۳	۲/۷۴۴	۲/۷۰۶	۲/۹۵۷	۲/۸۹۷	۲/۹۵۷	۲/۹۵۴	۲/۹۲۴	۲/۷۰۹	۲/۸۵	۰/۱۰۷	۳/۷۷

جدول ۱۲. محاسبه‌ی دقت برون‌سنجی در سرم‌های انسانی

روز تکرار	روز اول				روز دوم				روز سوم			میانگین	CV درصد	انحراف معیار
	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱			
سرم منفی	۰/۰۶۲	۰/۰۵۷	۰/۰۵۴	۰/۰۵۳	۰/۰۵۶	۰/۰۴۸	۰/۰۵	۰/۰۵۵	۰/۰۵۱	۰/۰۴۸	۰/۰۵۳	۰/۰۵۳	۷/۴۲	۰/۰۰۴
سرم مثبت ضعیف	۰/۷۷۲	۰/۷۶۹	۰/۷۷۰	۰/۷۷۱	۰/۷۶۸	۰/۷۶۸	۰/۷۷۰	۰/۷۷۲	۰/۷۶۹	۰/۷۷۵	۰/۷۷۱	۰/۷۷	۰/۲۶	۰/۰۰۲
سرم مثبت قوی	۲/۷۴۴	۲/۹۲۴	۲/۷۰۹	۲/۹۵۴	۲/۹۵۷	۲/۸۹۷	۲/۹۵۷	۲/۷۰۶	۲/۸۹۵	۲/۷۴۴	۲/۷۰۹	۲/۸۴	۳/۸۷	۰/۱۱

www.mui.ac.ir

جدول ۱۳. محاسبه‌ی دقت درون‌سنجی در سرم‌های دامی

سرم دامی	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	میانگین	انحراف معیار	CV درصد
۱	۰/۰۵	۰/۰۵۲	۰/۰۵۴	۰/۰۵۸	۰/۰۵۲	۰/۰۵۹	۰/۰۵۴	۰/۰۶	۰/۰۵	۰/۰۰۳	۶/۲۷
۲	۰/۷۷۶	۰/۷۵۵	۰/۷۷۹	۰/۷۶۸	۰/۷۷۹	۰/۸	۰/۷۷۹	۰/۷۹۶	۰/۷۷	۰/۰۱۳	۱/۷۲
۳	۱/۷۱۷	۱/۷۱۵	۱/۷۰۶	۱/۶۹۷	۱/۶۸۵	۱/۷۴۴	۱/۷۲۴	۱/۷۰۹	۱/۷۱	۰/۰۱۶	۰/۹۶

جدول ۱۴. محاسبه‌ی دقت برون‌سنجی در سرم‌های دامی

روز	روز اول					روز دوم				روز سوم			میانگین	CV	انحراف
تکرار	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱			درصد	معیار
سرم منفی	۰/۰۴۹	۰/۰۵	۰/۰۵۴	۰/۰۵۲	۰/۰۴۸	۰/۰۵۶	۰/۰۵	۰/۰۵۵	۰/۰۴۸	۰/۰۵۱	۰/۰۵۳		۰/۰۵	۵/۱۳	۰/۰۰۲
سرم مثبت ضعیف	۰/۵۴۳	۰/۵۵۴	۰/۴۸۱	۰/۵۰۴	۰/۵۰۷	۰/۵۴۰	۰/۵۱	۰/۵۰۸	۰/۴۹۸	۰/۵۲۰	۰/۵۴۰		۰/۵۲	۴/۲۳	۰/۰۲۲
سرم مثبت قوی	۱/۲۵۰	۱/۲۵۳	۱/۲۸۳	۱/۲۲	۱/۳۰۰	۱/۳۱۰	۱/۳۶	۱/۲۹	۱/۲۲۰	۱/۳۵۰	۱/۲۷۰		۱/۲۸۲	۳/۴۵٪	۰/۰۴۴

در هر دو حالت میانگین و ضریب تغییرات نمونه های تست شده محاسبه شدند ضریب تغییرات (CV) به دست آمده قابل قبول بود (هر چه مقدار CV پایین تر باشد آزمایش از دقت بیشتری برخوردار است) (۱۸).

بحث

بروسلوز انسانی و گاوی هنوز هم یک بیماری اندمیک در آسیا، آمریکای لاتین و کشورهای مدیترانه‌ای می‌باشد. با وجود این که این بیماری در برخی از کشورها ریشه کن شده است ولی همچنان انتشار جهانی دارد و در کشورهای جهان سوم از جمله ایران، عامل مهمی برای تهدید سلامتی انسان به شمار می‌رود (۲۱). به طور کلی بر اساس معیارهای جهانی، میزان شیوع تب مالت در هر کشوری بستگی بسیار نزدیکی با میزان شیوع بروسلوز حیوانات در آن کشور دارد. این موضوع اهمیت کنترل و ریشه‌کنی بیماری را در جمعیت دامی کشور دو چندان می‌کند. بیماری در مرحله‌ی حاد و مزمن بر اساس آنتی‌بادی‌های تولید شده در پاسخ به S-LPS سویه های بروسلا قابل تشخیص است (۲۲).

Araj و همکاران تست SAT و روش ELISA مقایسه کردند و ELISA را تست انتخابی در بیمارانی که از نظر کلینیکی مشکوک به بروسلوز می‌باشند، معرفی نمودند (۲۳).

Chaudhuri و همکاران از پروتئین نوترکیب ۲۸ کیلودالتونی غشای خارجی (OMP28) بروسلا ملی‌تنسیس به عنوان آنتی‌ژن استفاده کردند. این آنتی ژن توانایی القای سیستم ایمنی گاو، گوسفند، بز و سگ را دارد. حساسیت و ویژگی ناشی از این آنتی‌ژن

www.mui.ac.ir

نو ترکیب به ترتیب برابر با ۸۸/۷ درصد و ۹۳ درصد بود که در مقایسه با آنتی‌ژن SLPS استفاده شده در این بررسی، از حساسیت و ویژگی کمتری برخوردار بود (۲۴).

در یک مطالعه در کویت، انجام ELISA برای IgG در بیماران مبتلا به بروسلوز حاد یا مزمن، از حساسیت و ویژگی ۹۸ درصد برخوردار بود. محققان این مطالعه بیان داشتند که تست ELISA در تشخیص باکتری‌های بروسلا در انسان، یک روش سریع، حساس و اختصاصی می‌باشد؛ مشروط بر این که نمایی از کلاس‌های ایمونوگلوبولین در تشخیص بروسلوز حاد و مزمن تهیه شود. در نتیجه می‌توان روش ELISA را یک روش منتخب برای تشخیص سرولوژیکی این بیماری نامید (۱۶).

مطالعات و تحقیقات انجام شده نشان می دهد که ELISA، به خصوص زمانی که دیگر تست‌ها نتیجه‌ی منفی داشته باشند، روش کاملی جهت تشخیص بروسلوز مزمن می‌باشد. به علاوه این روش تمام ایمونوگلوبولین‌های اختصاصی منحصر به فرد موجود در سرم مورد آزمایش را با سرعت و دقت زیاد آشکار می‌سازد (۱۷-۱۶). در سال‌های اخیر ELISA غیر مستقیم بسیار پیشرفت نموده است و در اکثر آزمایشات انجام شده از مقدار متغیری S-LPS خالص شده به عنوان آنتی‌ژن استفاده شده است (۱۶).

استفاده از BSA یک درصد در این تحقیق به علت کاهش جذب زمینه‌ای، توانایی زیادی در جلوگیری از اتصالات غیر اختصاصی و دارا بودن بیشترین OD در نمونه‌های مثبت به عنوان بافر بلاک‌کننده، بسیار مفید بود (۱۲). استفاده از ۲ کونژوگه‌ی آنتی IgG انسانی و آنتی IgG1 گاوی به طور هم‌زمان در این تحقیق این امکان را فراهم ساخت که بتوان به طور هم‌زمان بروسلوز را در گاو و انسان آلوده تشخیص داد. استفاده ی هم‌زمان از این ۲ کونژوگه کار جدیدی است که تاکنون در ایران انجام نشده و مقاله‌ای نیز در این زمینه در ایران یافت نشده است. با توجه به این که ترکیب این ۲ کونژوگه می‌تواند مقدار OD بالاتری بدهد و به علاوه کیت‌های تجاری خارجی گران قیمت هستند و آزمایشگاه‌های دامپزشکی و تشخیصی هزینه‌ی آن‌ها را تقبل نمی‌کنند و همچنین با توجه به این که این کیت به دلیل استفاده‌ی هم‌زمان دو کونژوگه توانایی شناسایی بروسلوز در دام و انسان آلوده را دارد، می‌توان از این کیت هم برای مصارف دامپزشکی و هم در آزمایشگاه‌های تشخیصی استفاده کرد.

همیشه نخستین اقدام در جهت تأیید یک کیت جدید به دست آوردن نتایج قابل تکرار از آن می‌باشد. به همین منظور برای کنترل شاخص‌های اجرایی دقت آزمایش با دو روش درون‌سنجی و برون‌سنجی مطابق استاندارد انجام شد و نتایج قابل قبولی در ارزیابی سرم‌های شاهد منفی و مثبت ضعیف به دست آمد. درصد ضریب تغییرپذیری (درصد CV) کمتر از ۱۵ می‌تواند یکی از دلایل مناسب بودن کیت طراحی شده باشد (۱۸).

از مزایای روش ELISA و کیت طراحی شده در تشخیص بروسلوز انسانی و دامی، استفاده از میزان بسیار کم سرم بیمار است. علاوه بر این سرعت بالا، دقت زیاد، سهولت در انجام آزمایش، حساسیت بالا، قابلیت تشخیص بیماری در مرحله‌ی حاد و مزمن از مزایای دیگر ELISA هستند. نکته‌ی دیگر این که زمان تشخیص بروسلوز به در روش ELISA نسبت به روش SAT از ۲۴ ساعت ۷۵ دقیقه کاهش می‌یابد

www.mui.ac.ir

و این مسأله امکان انجام تست تشخیصی برای تعداد زیادی نمونه را در این محدوده‌ی زمانی مقدور می‌سازد. در یک اندازه‌گیری کیفی در روش ELISA حد تفکیک نمونه‌ی مثبت از منفی یا به عبارتی ارزش حد آستانه برای تست تشخیصی بروسلا ملی تنسیس و آبورتوس در انسان و حیوان ۰/۱۳ تعیین گردید. بر همین اساس چنان چه میزان جذب نوری خوانده شده در نمونه های سرمی از ۰/۱۳ کمتر باشد نتایج منفی هستند و اگر جذب نوری از این حد آستانه بیشتر باشد نمونه مثبت تلقی می‌شود. با توجه به مقایسه‌ی نتایج حاصل از روش ELISA غیر مستقیم و تست Wright، میزان حساسیت ۱۰۰ درصد، ویژگی ۹۳/۷۳ درصد، ارزش اخباری مثبت ۹۳/۰۲ درصد، ارزش اخباری منفی ۱۰۰ درصد و میزان هماهنگی کیت ELISA طراحی شده با روش آگلوتیناسیون لوله‌ای استاندارد ۹۷/۷۲ درصد به دست آمد. این نتایج در مقایسه با سایر مطالعات نتایج قابل قبولی بود (۱۸).

نتیجه‌گیری

با گسترش سریع و کارامد شناسایی بیماری‌ها و با توجه به این که بیماری بروسلوز همچنان انتشار جهانی دارد و در کشورهای جهان سوم از جمله کشور ما عامل مهمی برای تهدید سلامت انسان و دام به شمار می‌آید، می‌توان برای تسریع تشخیص و درمان بروسلوز به جای صرف زمان طولانی و استفاده از کیت های تجاری خارجی گران قیمت جهت انجام آزمایش‌های معمول از روش ELISA در آزمایشگاه‌ها استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از شرکت پیشتاز طب زمان و بخصوص از جناب آقای بهروز حاجیان تهرانی مدیر عامل محترم شرکت قدردانی و تشکر می نماییم.

References

1. Clavijo E, Diaz R, Anguita A, Garcia A, Pinedo A, Smits HL. Comparison of a dipstick assay for detection of Brucella-specific immunoglobulin M antibodies with other tests for serodiagnosis of human brucellosis. Clin Diagn Lab Immunol 2003; 10(4): 612-5.
2. Hadadi A, Rasoulinejad M, HajiAbdolbaghi M, Mohraz M, Khashayar P. Clinical profile and management of brucellosis in Tehran - Iran. Acta Clin Belg 2009; 64(1): 11-5.
3. Carvalho Neta AV, Mol JP, Xavier MN, Paixao TA, Lage AP, Santos RL. Pathogenesis of bovine brucellosis. Vet J 2010; 184(2): 146-55.
4. Gad El-Rab MO, Kambal AM. Evaluation of a Brucella enzyme immunoassay test (ELISA) in comparison with bacteriological culture and agglutination. J Infect 1998; 36(2): 197-201.
5. Ariza J, Corredoira J, Pallares R, Viladrich PF, Rufi G, Pujol M, et al. Characteristics of and risk factors for relapse of brucellosis in humans. Clin Infect Dis 1995; 20(5): 1241-9.
6. Buchanan TM, Faber LC, Feldman RA. Brucellosis in the United States, 1960-1972. An abattoir-associated disease. Part I. Clinical features and therapy. Medicine (Baltimore) 1974; 53(6): 403-13.
7. Kiel FW, Khan MY. Analysis of 506 consecutive positive serologic tests for brucellosis in Saudi Arabia. J Clin Microbiol 1987; 25(8): 1384-7.
8. Young EJ. Serologic diagnosis of human brucellosis: analysis of 214 cases by agglutination tests and review of the literature. Rev Infect Dis 1991; 13(3): 359-72.
9. Corbel MJ, Beeching NJ. Brucellosis. In: Longo D, Fauci A, Kasper D, Hauser S, Jameson J, Loscalzo J, editors. Harrison's principles of Internal Medicine.New York, NY: McGraw-Hill; 2011. p. 914-7.
10. Ariza J, Pellicer T, Pallares R, Foz A, Gudiol F. Specific antibody profile in human brucellosis. Clin Infect Dis 1992; 14(1): 131-40.
11. Gazapo E, Gonzalez LJ, Subiza JL, Baquero M, Gil J, de la Concha EG. Changes in IgM and IgG antibody concentrations in brucellosis over time: importance for diagnosis and follow-up. J Infect Dis 1989; 159(2): 219-25.
12. Araj GF, Lulu AR, Mustafa MY, Khateeb MI. Evaluation of ELISA in the diagnosis of acute

and chronic brucellosis in human beings. J Hyg (Lond) 1986; 97(3): 457-69.
13. Peraza C, Valdes O, Fonseca N, Izquierdo L, Garcia M, Alvarez M. Use of an indirect ELISA for brucella abortus diagnosis in cuba. [Online]. 2004. Available from: http://www-naweb.iaea.org/nafa/aph/public/peraza-indirect-1055.pdf
14. Ferreira AC, Cardoso R, Travassos D, I, Mariano I, Belo A, Rolao P, I, et al. Evaluation of a modified Rose Bengal test and an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of Brucella melitensis infection in sheep. Vet Res 2003; 34(3): 297-305.
15. Hajia M, Rahbar M. Isolation of Brucella from blood culture of hospitalized brucellosis patients. Iranian Jaurnal of Clinical Infectious Diseases 2006; 1(2): 5-10.
16. Ertek M, Yazgi H, Ozkurt Z, parlak M. Comparison of the diagnostic value of the standard tube agglutination test and the ELISA IgG and IgM patient with Brucellosis. Turk J Med Sci 2006; 36(3): 159-63.
17. Smits HL, Abdoel TH, Solera J, Clavijo E, Diaz R. Immunochromatographic Brucella-specific immunoglobulin M and G lateral flow assays for rapid serodiagnosis of human brucellosis. Clin Diagn Lab Immunol 2003; 10(6): 1141-6.
18. Hajian Tehrani B, Mir Jalili A, Butorabi SM. ELISA. Tehran, Iran: Mirmah Publications; 2005. p. 96-185.
19. Sanchez-Villalobos A, Urdaneta-Fernandez M, Rubio-Fuenmayor E, Molero-Saras G, Luzardo-Charris C, Corona-Mengual C. Development and evaluation of a serological protocol of fluorescence polarization for the preliminary study of Brucella spp antibodies in humans. Invest Clin 2011; 52(1): 48-57. [In Spanish]
20. Nielsen K, Smith P, Yu WL, Elmgren C, Nicoletti P, Perez B, et al. Second generation competitive enzyme immunoassay for detection of bovine antibody to Brucella abortus. Vet Microbiol 2007; 124(1-2): 173-7.
21. Jokik W. Zinsser's microbiology. Trans. Rahimi M. Tehran, Iran. Ayeezh Publications; 2003.
22. Nilson K, Dunkan R. Brucellosis in veterinary. Trans. Zoghi A. Tehran, Iran: Parto Vaghee; 2003.
23. 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. Clin Diagn Lab Immunol 2005; 12(11): 1334-5.
24. Chaudhuri P, Prasad R, Kumar V, Basavarajappa AG. Recombinant OMP28 antigen-based indirect ELISA for serodiagnosis of bovine brucellosis. Mol Cell Probes 2010; 24(3): 142-5.

Journal of Isfahan Medical School Original Article

Vol. 30, No. 205, 3rd week, November 2012 Received: 4.6.2012 Accepted: 2.9.2012

An Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to Detect Antibodies against Brucellosis in Cattle or Humans

Nazanin Samavati[1], Ali Mirjalili PhD[2], Mehdi Boutorabi PhD[3]

Abstract

Background: Brucellosis is a zoonotic disease with global spread. It is also a well-known endemic infectious disease in Iran. Therefore, its appropriate and rapid diagnosis has a critical role in public health improvement. The purpose of this research was to design an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit for detection of brucellosis in humans or animals. Such a kit can replace serum agglutination test (SAT) and kits imported from foreign countries.

Methods: Smooth lipopolysaccharide (S-LPS) of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* were used as antigens to coat ELISA microplates. Indirect ELISA was performed on 51 human serum samples (10 positive and 41 negative samples) from patients who had referred to laboratories in Tehran, Sari and Hamadan (Iran). It was also performed on 78 bovine serum samples (30 positive and 48 negative samples) that had been sent to veterinary laboratories in Alborz Province (Iran). All samples were also evaluated by SAT.

Findings: The designed ELISA kit could detect all 40 positive serum samples (10 human and 30 bovine samples) as positive and all 89 negative serum samples (41 human and 48 bovine samples) as negative. The sensitivity and specificity of the bovine kit were thus determined as 100% and 95.83%, respectively. The corresponding values for the human kit were 100% and 97.56%. On the other hand, the combined kit had a sensitivity of 100% and a specificity of 96.73%. The estimated cutoff point was calculated as 0.13.

Conclusion: The designed ELISA kit uses two conjugates and is hence able to detect brucellosis in animals or humans at the same time. In general, high sensitivity and specificity and shorter required time are among the superiorities of our kit over similar ELISA kits.

Keywords: Brucellosis, Indirect enzyme-linked immunosorbent assay, Smooth lipopolysaccharide, Brucella abortus, Brucella melitensis

[1] MSc Student, Department of Microbiology, School of Postgraduate Education, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Biotechnology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Microbiology, Pishtaz Teb Zaman Co., Tehran, Iran
Corresponding Author: Ali Mirjalali PhD, Email: ali_mirjalili@yahoo.com