ارزیابی روش دات ـ ایمونوبلاتینگ در تشخیص تب مالت و مقایسه آن با سایر روشهای روتین آزمایشگاهی

نویسندگان: آمینا کریمی نیا، [۱] عباس علی یاری، [۲] دکتر احمد مسعود، [۳]
دکتر مینو محرز [۴]، دکتر مهدی آسمار [۵]

خلاصه

علیرغم ریشه کن شدن بروسلوزیس انسانی در غالب کشورهای جهان، این بیماری هنوز یکی از معضلات بهداشتی ایران محسوب می شود. به علت مشکلات تکنیکی و میزان بالای موارد منفی کاذب کشتهای خون و مغز استخوان، آزمایشهای سرولوژیک از اهمیت خاصی در تشخیص این بیماری برخوردار می باشند. با این وجود آزمونهای آگلوتیناسیون نظیر رایت، کومبس ـ رایت و رُزبنگال دارای حساسیت و ویژگی لازم نمی باشند، در حالیکه دات ـ ایمونوبلاتینگ با حساسیت و ویژگی قابل ملاحظه به عنوان روشی با ارزش در تشخیص بیماریهای عفونی معرفی شده است. هدف از این مطالعه اولاً راه اندازی روش دات ـ ایمونوبلاتینگ برای تشخیص بروسلوزیس انسانی و ثانیاً ارزیابی ارزش تشخیصی این روش با سایر روشهای روتین بوده است. برای این منظور صد نمونه خون از بیماران با تظاهرات بالینی بروسلوزیس بستری در بخش عفونی بیمارستان امام خمینی (ره) همراه با سی نمونه خون از افراد سالم تهیه شده و آزمونهای کشت خون، رایت، کومبس ـ رایت و دات ـ بلات بر روی آنها انجام شد. نتایج نشان داد که دات ـ ایمونوبلاتینگ نسبت به سایر روشهای مرسوم دارای برتری بوده چرا که میزان بیشتری از موارد مثبت حقیقی را تشخیص داده است.

($p< 0.001$) بعلاوه حساسیت و ویژگی این آزمون بالاتر از روشهای رایت و کومبس ـ رایت بدست آمد. با توجه به صرف وقت و هزینه کمتر برای انجام دات ـ ایمونوبلاتینگ این آزمون می تواند جایگزین مناسبی برای آزمونهای مرسوم باشد.

کلید واژه: تب مالت، بروسلاآبورتوس، ایمونوبلاتینگ، رایت، کومبس ـ رایت

مقدمه:

بروسلوز یکی از بیماریهای مهم عفونی است که توسط باکتری از جنس بروسلا ایجاد می شود و به علت نداشتن فعالیت متابولیکی بالا، انگل اجباری حیوانات و انسان می باشد. علیرغم ریشه کن شدن بروسلوزیس انسانی در کشورهای پیشرفته، این بیماری هنوز یکی از معضلات بهداشتی در کشورهای در حال توسعه مانند ایران بوده که متأسفانه گزارشات نشان دهنده افزایش میزان آلودگی در کشورمان طی سالهای اخیر می باشد (۱).

تظاهرات بالینی در بروسلوزیس در اغلب موارد غیرتیپیک بوده (۲) و به همین دلیل تشخیص بیماری نیازمند انجام آزمایشات پاراکلینیکی می باشد که به دو گروه عمده: ۱- باکتریولوژیک یعنی کشت اختصاصی و جداسازی عامل بیماری، ۲- سرولوژیک یعنی جستجوی آنتی بادی اختصاصی بروسلا تقسیم می شوند (۱) ولی هر یک از دو مورد ف دارای معایبی هستند. کشت باکتری بسیار ز بر بوده و دارای موارد منفی کاذب زی می باشد. روشهای سرولوژیک مرسوم ک اساس آگلوتیناسیون بنا نهاده شده است نی حساسیت و ویژگی لازم برخوردار نبوده نتیجه دارای موارد منفی و یا مثبت کا فراوانی می باشند. بنابراین هنوز محققان بد روشی هستند که فاقد عیوب ذکر شده باشد.

۱- عضو هیئت علمی، بخش ایمونولوژی، انستیتوپاستور ایران
۲- بخش ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران
۳- استاد گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران
۴- استاد و رئیس بخش عفونی بیمارستان امام خمینی (ره)، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران
۵- دانشیار و رئیس بخش انگل شناسی، انستیتوپاستور ایران

اولین روشی که بکار گرفته شده است، روش رادیوایمونواسی بود (۳). علیرغم حساسیت و ویژگی بالای آن، به علت استفاده از مواد رادیواکتیو و نیاز به دستگاههای ویژه برای خواندن جوابها این روش نتوانست جایگاه خود را در میان روشهای روتین پیدا کند (۳).

در مطالعات بعدی نشان داده شد که روش الیزا دارای حساسیت و ویژگی لازم می باشد (۴) اما این روش نیز هنوز نتوانسته است که جای روشهای روتینی مانند آگلوتیناسیون را بگیرد. زیرا دستگاه خوانش الیزا (ELISA reader) بسیار گران قیمت بوده و بنابراین از این روش تنها در مراکز تحقیقاتی استفاده می شود.

این اشکال در آزمون - Dot Immunoblotting برطرف شده است چرا که در این سیستم نیازی به دستگاه خوانش نبوده و جوابها با چشم خوانده می شوند. این در حالی است که هم سنگ بودن - Dot immunoblotting با RIA و ELISA نشان داده شده است و از آن برای تشخیص بیماریهای عفونی بسیاری نظیر توکسوپلاسموز (۶) و کالا آزار (۵) استفاده می شود. در این روش برای بالا بردن حساسیت از آنتی بادی کونژگه با آنزیم سود جسته و جهت ساده نمودن خواندن جواب آزمایش از سو بسترای نامحلول استفاده می شود تا بتوان پاسخها را به صورت چشمی خواند.

بنابراین ما بر آن شدیم که ضمن راه اندازی این روش برای ردیابی آنتی بادی های اختصاصی بروسلا آبورتوس، کارآیی آن را در مقایسه با سایر روشهای روتین تشخیصی بررسی نماییم.

روش کار:

کلیه مواد از شرکت سیگما تهیه شد که شامل HRP Conjugated human Ig، Bovine serum albumin، Nitrocellulose membrane، 4-Chloro naphtol، Trizma base می باشد، به استثناء آنتی ژن بروسلا آبورتوس که توسط دکتر ذوقی از مؤسسه رازی تهیه شد.

از میان بیماران مراجعه کننده به بخش عفونی بیمارستان امام خمینی (ره)، طبق تشخیص متخصص عفونی صد نفر از بیمارانی که واجد علائم شاخص بروسلوز بودند برای بررسیهای پاراکلینیکی انتخاب شدند. بعلاوه به عنوان شاهد منفی سی نفر افراد سالم نیز به مطالعه افزوده شد.

از هر یک از افراد مورد بررسی نمونه سرم تهیه شده و برای بیماران بستری در بخش عفونی جهت کشت اختصاصی بروسلوزیس نمونه خون نیز تهیه گردید.

طبق استانداردهای بین المللی کشت خون و آزمونهای سرولوژی شامل رایت و کومبس - رایت انجام گرفت.

روش Dot - immunoblotting : در ابتدا آنتی‌ژن بروسلا آبورتوس به میزان ۱۰ میلیون CFU به دیسکهای ۳ میلیمتری نیتروسلولوز انتقال داده شد. پس از خشک شدن، دیسکها را به یک پلیت الیزا منتقل کرده و با بافر نمکی تریس با ph برابر ۷/۲ آنها را شستشو داده و سپس مبادرت به مهار ظرفیتهای آزاد غشای نیتروسلولز نمودیم. بدین ترتیب که به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محلول تریس نمکی واحد ۱٪ آلبومین گاوی اضافه کرده و به مدت یک ساعت در درجه حرارت اتاق نگهداری نموده و پس از پایان انکوباسیون، محلول مهارکننده خارج شد. ۱۰۰ میکرولیتر بافر نمکی تریس واحد پنج صدم درصد detergent twin ۲۰ به هر چاهک افزوده و به مدت ده دقیقه انکوبه نمودیم. این عمل را سه بار تکرار کرده آنگاه از هر رقت سرم ۱۰۰ میکرولیتر به چاهک ها اضافه کردیم. مدت انکوباسیون یک ساعت در درجه حرارت ۳۷ همراه با رطوبت بود. پس از شستشوی پلیتها، آنتی سرم نشاندار با آنزیم پراکسیداز به میزان ۱۰۰ میکرولیتر با رقتی که شرکت سازنده توصیه کرده بود به همه چاهک ها افزودیم. مجدداً انکوباسیون جهت اتصال آنتی سرم انجام شده و سپس مبادرت به شستشو نمودیم. در پایان ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سوبسترا یعنی ۴- کلرو نفتول به هر چاهک افزوده و منتظر ایجاد واکنش شدیم. واکنش به صورت لکه ای آبی تیره رؤیت می شود. برای ساخت محلول سوبسترا طبق راهنمای شرکت سازنده عمل شد.

از آزمون t برای تعیین تفاوت بین گروه ها با اطمینان ۹۵٪ استفاده شد و از آنالیز واریانس یک طرفه برای تعیین تفاوت بین میانگین هندسی رقت سرمهای بدست آمده با روشهای مورد مطالعه سود بردیم.

نتایج:

همانگونه که قبلاً نیز اشاره شد به منظور تعیین حساسیت و ویژگی روشهای سرولوژیک دات - بلات، کومبس - رایت و رایت، ۱۰۰ نمونه بالینی مورد بررسی کشت خون قرار گرفت که از میان این ۱۰۰ نمونه بررسی شده ۳۰ مورد کشت مثبت و ۷۰ مورد کشت منفی بدست آمد (جدول شماره ۱).

آزمایشهای سرولوژیک نیز برای نمونه های بالینی ذکر شده به طور همزمان صورت گرفت و از میان ۳ مورد کشت خون مثبت تمام آنها با روش دات - بلات مثبت شدند. در حالیکه ۲۳ مورد با روش کومبس - رایت و ۲۲ مورد با روش رایت شناسایی گردید (جدول شماره ۱). لازم به ذکر است که حضور لکه واکنش بر روی غشای نیتروسلولوز در روش دات - بلات، مثبت تلقی شده زیرا از میان ۳۰ مورد افراد سالم که

بعنوان شاهد منفی انتخاب شده بودند، تنها ۴ مورد با روش دات ـ بلات، ۳ مورد با روش کومبز ـ رایت و ۱ مورد با روش رایت مثبت گزارش شد (جدول شماره ۱) که با مراجعه به سابقه افراد مشخص گردید که همگی قبلاً با میکروب بروسلا برخورد داشته اند.

در میان ۷۰ مورد کشت منفی، ۵۹ مورد با روش دات ـ بلات، ۵۰ مورد با روش کومبس رایت و ۴۲ مورد با روش رایت مثبت شدند (جدول شماره ۱). علیرغم کشت خون منفی در گروه فوق، به علت پاسخ به آنتی بیوتیک درمانی، نتایج سرولوژی مورد تأیید قرار گرفت.

با معیار قرار دادن روش کشت خون میزان حساسیت روش دات ـ بلات ۱۰۰٪ و ویژگی آن ۸۴٪ تعیین گردید. در حالی که کومبس ـ رایت و رایت به ترتیب حساسیت و ویژگی ۷۶٪-۷۱٪ و ۷۳٪-۶۰٪ را داشتند.

به دلیل همخوانی ۱۰۰٪ جوابهای کشت خون با روش دات ـ بلات در تشخیص افراد آلوده، این روش را معیار قرار داده و حساسیت، ویژگی و نسبت درصد همخوانی روشهای کومبس ـ رایت و رایت با روش دات ـ بلات محاسبه شد و نشان داده شد که روش کومبس ـ رایت از همخوانی بیشتری نسبت به روش رایت برخوردار می باشد.

در پایان نیز میانگین هندسی عکس رقت سرم GMRT برای روشهای دات ـ بلات، کومبس ـ رایت و رایت تعیین گردید و به ترتیب GMRT برای دات ـ بلات ۱:۶۴۰، برای کومبس ـ رایت ۱:۳۲۰ و برای رایت ۱:۱۶۰ بدست آمد. به لحاظ آماری و به کمک آنالیز واریانس یک طرفه ($p<0/05$) اختلاف معنی دار بین روشهای مختلف سرولوژیک مورد بررسی بدست آمد، بدین مفهوم که بیشترین میزان میانگین عیار آنتی بادی ضد بروسلایی در روش دات ـ بلات دیده شد و سپس در روش کومبس ـ رایت و بالاخره کمترین میانگین آنتی بادی ضد بروسلایی به روش رایت اختصاص داشت.

بحث:

برای دست یابی به روشی ایده آل جهت تشخیص می بایست خصوصیات زیر در نظر گرفته شود: سادگی در انجام آزمایش، ارزان بودن، زمان بری کم، حساسیت و ویژگی بالا. روشی که دارای تمامی خصوصیات فوق است، روش دات ـ بلات می باشد. از این روش برای تشخیص بیماریهای عفونی مختلف نظیر توکسوپلاسموز (۶) و کالا آزار (۵) استفاده شده است و هم سنگ بودن آن با روشهای الیزا و رادیوایمونواسی نشان داده شده است. در ایران هنوز گزارشی در مورد ارزیابی این روش در تشخیص تب مالت وجود ندارد و به همین دلیل ما بر آن شدیم که مطالعه حاضر را انجام دهیم. بر اساس نتایج بدست آمده، روش دات ـ بلات نشان داد که با معیار قرار دادن کشت خون از حساسیت بیشتری (۱۰۰٪) نسبت به سایر روشهای سرولوژی یعنی کومبس ـ رایت ۷۶٪ و رایت ۷۳٪ برخوردار است. چرا که از میان ۳۰ مورد کشت خون مثبت همگی موارد با روش دات ـ بلات مثبت شده در حالیکه کومبس ـ رایت ۲۳ مورد و رایت ۲۲ مورد را توانستند تشخیص دهند. این مسئله به علت استفاده از آنتیزم برای بالا بردن شدت واکنش می باشد. اما در روشهای آگلوتیناسیون تشکیل شبکه آنتی ژن و آنتی بادی که به صورت رسوب مشاهده می شود، معرف حضور آنتی بادی می باشد که طبیعتاً از حساسیت کمتری برخوردار است. مطالعه مشابهی در عربستان سعودی انجام شده است و در این تحقیق کارآیی روش الیزا با سایر روشهای روتین مقایسه گردید (۸). در تحقیق مذکور از ۳۰ مورد کشت مثبت تمامی موارد با روش الیزا مثبت گزارش شدند، در حالیکه با روش آگلوتیناسیون ۲۷ مورد مثبت بدست آمد. این نتایج با مطالعه ما همخوانی خوبی را نشان می دهد. چرا که روش دات ـ بلات ۱۰۰٪ موارد کشت مثبت را مانند الیزا توانسته است تشخیص دهد. در حالیکه روشهای آگلوتیناسیون در مطالعه ما و عربستان با درصد بالایی منفی، حساسیت پایین تری را عرضه داشته اند.

منفی شدن ۷۰ مورد از بیماران بستری نشان دهنده عدم کارآیی کشت خون بوده، زیرا افرادی که با روشهای دات ـ بلات (۵۹ مورد)، کومبس

جدول شماره ۱ - توزیع فراوانی مطلق آزمایشات سرولوژیک بیماری بروسلوزیس برحسب کشت خون و وضعیت بالینی

وضعیت بالینی / کشت خون	با علائم بالینی					بدون علائم بالینی				
	موارد مثبت		موارد منفی		جمع	موارد مثبت		موارد منفی		جمع
	۳۰		۷۰		۱۰۰	۰		۳۰		۳۰
نوع آزمایش	+	-	+	-		+	-	+	-	
Dot-blotting	۳۰	۰	۵۹	۱۱	۱۰۰	۰	۰	۴	۲۶	۳۰
coombs wright	۲۳	۷	۵۰	۲۰	۱۰۰	۰	۰	۳	۲۷	۳۰
wright	۲۲	۸	۴۲	۲۸	۱۰۰	۰	۰	۱	۲۹	۳۰

* - با توجه به افراد کنترل منفی که هیچ لکه‌ای (اثر واکنش) بر روی نمونه آزمایشی آنها در آزمایش Dot دیده نشده، Dot مثبت وجود لکه بر روی نمونه آزمایشی در نظر گرفته شده است که برابر با تیتر $\frac{1}{20}$ است.

رایت (۵۰ مورد) و رایت (۴۲ مورد) به عنوان بیمار تشخیص داده شده بودند به دارو درمانی بخوبی پاسخ داده و بنابراین بیماری تب مالت آنان تأیید شد. مشکلات تکنیکی در کشت خون باعث ناتوانی این روش در تشخیص تب مالت است که در گزارشات متعدد دیگر بیان شده است (۷). در این ارتباط نشان داده شده است که در هفته های اول بعد از عفونت اولین آزمونی که مثبت می شود آزمون سرولوژیک می باشد زیرا در مقایسه با مقادیر لازم برای مثبت شدن کشت خون، مقادیر بسیار پایین تری از میکروب برای تحریک تولید آنتی بادی لازم می باشد (۷). با توجه به حساسیت بالای روش دات ـ بلات و تیتر پایین آنتی بادی در هفته اول بعد از عفونت، کارآیی بیشتر این روش مشخص می گردد. زیرا روش دات ـ بلات توانست ۱۶ مورد بیمار را بیش از روشهای کومبس ـ رایت و رایت تشخیص دهد. نتایج مذکور همخوانی خوبی با مطالعه انجام شده در عربستان سعودی دارد (۸). چرا که از ۱۳۵ مورد با علائم بالینی ۹۰ مورد آگلوتیناسیون و الیزا مثبت، ۴۵ مورد آگلوتیناسیون منفی، در حالکیه ۳۹ مورد الیزا مثبت بدست آمده است.

در گروه شاهد منفی ۴ مورد با روش دات ـ بلات، ۳ مورد با روش کومبس ـ رایت و ۱ مورد با روش رایت مثبت شدند. با مراجعه به سابقه افراد مشخص شد که همگی موارد فوق قبلاً با عامل بیماری برخورد داشته اند. بنابراین توجه به تابلوی بیمار از نظر علائم بالینی مشخصه بروسلوز در تشخیص نهایی اهمیت بسزایی دارد.

در مجموع، با توجه به حساسیت خوب روش دات و عدم نیاز آن به دستگاههای گران قیمت خوانش می توان از آن به عنوان روشی ایده آل و جایگزینی مناسب برای روشهای آگلوتیناسیون و الیزا نام برد. در پایان پیشنهاد می شود که مطالعه مذکور در سطحی بسیار گسترده و با مشارکت چند مرکز بهداشتی ـ درمانی مورد بررسی عمیق تری قرار گیرد.

REFERENCES:

1- Moriyon D.R., Brucellosis: Clinical and diagnostic aspects. CRC Press. NewYork. 1989. 73-78.

2- Young E., Brucellosis: Clinical and diagnostic aspects, CRC Press, 1989,. 97-100.

3- Parratt D., Radioimmunoassay of IgM, IgG and IgA Brucella antibodies, *Lancet, 1977,* 1:1077-80.

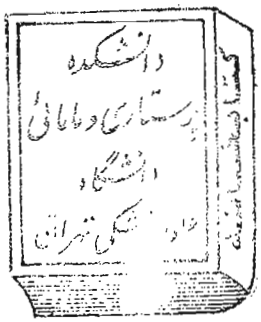
4- Deklerk E., Comparitive evaluation of the ELISA in the laboratory diagnosis of Brucellosis, *J. Clin Microbiol.,* 1985, 21: 381.

5- Pappas M. G., Reduced false positive reactions in the Dot-ELISA for Human visceral Leishmaniasis, *Clin. Immunol. Immunopathol.,* 1985, 34:392-5.

6- Pappas M.G., Determination of IgM and IgG antibodies to Toxoplasma using the IFA test, ELISA and Dot-ELISA Procedures, *Vet Parasitol,* 1989, 20:31-5.

7- Grammont Cupillard M., Brucellosis from sniffing bacteriological cultures. *Lancet,* 1996, 348:1733-4.

8- Gad El-Reb, M. O., Kamal A..M., Evaluation of a Brucella ELISA in comparison with bacteriological culture and agglutination, *J. Infection,* 1998, 36:197-210.



Abstract

Evaluation of a Dot-ELISA test for routine diagnosis of human brucellosis

Amina Kariminia [1], Abbass Aliyari [2], Mehdi Assmar [1], Ahmad Massoud [2], Minoo Mohraz [3]

Despite eradication of human brucellosis in most parts of the world, it is still a health-threatening problem in Iran. Due to technical difficulties and high negative results with bone marrow and blood cultures, serologic techniques are the method of choice. Nevertheless standard serologic tests (e.g. Wright, Coomb's - Wright and Rose Bengal) have a low sensitivity and specificity. It has been shown that Dot-ELISA is a valuable method for diagnosis of infectious diseases because of its high sensitivity, specificity and ease of performance. The aim of the present study is to evaluate the diagnostic value of Dot-ELISA in comparison with conventional serologic methods. A hundred clinical cases of confirmed brucellosis (positive blood culture) and a hundred healthy individuals were analyzed by Dot-ELISA, Coomb's Wright, and Wright for the presence of specific antibody. We demonstrated that Dot-ELISA was superior to the conventional tests since significantly more true-positive results were obtained ($p<0.001$). and its sensitivity and specificity were higher than Coomb's Wright and Wright.

key words: Brucellosis, Brucella abortus, Dot-ELISA wright - coombs wright

1- Dept. of Parasitology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

2- Dept. of Immunology, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

3- Dept. of Infectious Disease, Imam Khomeini Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.