

راه اندازی (Dot- Immunoassay (DIA (الایزای نقطه‌ای) و مقایسه آن با ممانعت از هماگلوتیناسیون (HI) و الایزا (ELISA) در تشخیص سرخک

یوسف یحیی پور،^{۱*} دکتر طلعت مختاری آزاد،^۲ دکتر محمود محمودی،^۳ دکتر محمد پزشکی،^۴ دکتر رخشنده ناطق^۴
۱- کارشناس ارشد ویروس‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی تهران ۲- دانشیار گروه پاتوبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی تهران
۳- دانشیار گروه آمار و اپیدمیولوژی دانشکده بهداشت تهران ۴- استاد گروه پاتوبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی تهران

سابقه و هدف: سرخک بیماری حاد و مسری در انسان است، که طبق برآورد سازمان بهداشت جهانی (WHO) تا سال ۲۰۱۰ احتمالاً ریشه‌کن خواهد شد. تشخیص سرخک با استفاده از سنجش‌های سریع و حساس برای پیشگیری و کنترل انتشار بیماری از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد.

مواد و روشها: روش‌های متعددی برای شناسایی آنتی‌بادی علیه ویروس سرخک بکار گرفته می‌شود، از جمله ممانعت از هماگلوتیناسیون (HI)، آنزیم ایمنواسی (EIA)، کاهش پلاک (PRN)، و روش خنثی سازی (NT) می‌باشد. یکی از روش‌ها، روش Dot-Immunoassay (DIA) است. این روش یک نوع EIA تغییر یافته است که در آن بجای میکروپلیت از کاغذ نیتروسلولز بعنوان فاز جامد استفاده مواد و معرف‌های آن شامل مقدار بسیار کمی از آنتی ژن سرخک، سرم بیمار (۹۵ نمونه)، بافرهای شستشو، آنتی بادی نشاندار و محلول سویسترا (برای ایجاد رنگ) می‌باشند.

یافته‌ها: نتایج حاصله نشان می‌دهد که DIA در مقایسه با HI به ترتیب دارای ۹۸/۸ و ۸۵ درصد حساسیت و ویژگی است و در مقایسه با EIA به ترتیب از حساسیت و ویژگی معادل ۹۶/۵ و ۹۰ درصد برخوردار می‌باشد.

نتیجه گیری: این روش نسبت به سایر روش‌های تشخیص آزمایشگاهی از هزینه کم، عدم نیاز به تجهیزات خاص و گرانیقت و سرعت عمل بالا برخوردار می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: الایزای نقطه‌ای، ممانعت از هماگلوتیناسیون، الایزا، سرخک.

مقدمه

سرخک یک بیماری عفونی حاد، بسیار مسری و مهم در انسان می‌باشد که با وجود واکسن زنده ضعیف شده، هنوز عامل اصلی مرگ و میر بچه‌ها در کشورهای در حال توسعه می‌باشد و موجب همه‌گیری‌های مداومی در جوامع صنعتی می‌شود (۱). طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی (WHO) سالانه ۷۵ میلیون نفر در سراسر دنیا به سرخک

مبتلا می‌شوند و این بیماری بیش از یک میلیون نفر (خصوصاً کودکان) را در کشورهای در حال توسعه تلف می‌کند (۲ و ۳). تعدادی روش‌های تشخیصی برای شناسایی آنتی‌بادی ضد ویروس سرخک وجود دارند، از جمله شامل ممانعت از هماگلوتیناسیون (HI) یا الایزا، فیکساسیون کمپلمان (CF)، ایمونوفلورسانس (IF)، تست

ژلاتین و ۲ میلی لیتر سرم نرمال بز با یک گرم BSA ۱٪ به دیسکهای قرار گرفته در داخل چاهکهای میکروپلیت، اضافه شد.

بعد از یک ساعت محتویات چاهک را خالی نموده و رقت مورد نظر سرم (۱/۳۰۰) تهیه شده در بافر NET به میزان ۷۵ میکرولیتر به دیسکها اضافه گردید. بمدت ۹۰ دقیقه در حرارت آزمایشگاه قرار داده و سپس بافر NET جایگزین سرم می شود، و بعد از ۱۰ دقیقه با خالی نمودن NET دوباره NET جدیدی اضافه می گردد و بعد از ۵ دقیقه NET را خالی کرده، میزان ۷۵ میکرولیتر از کونژوگه Anti-Human IgG متصل به پراکسیداز (HRP) با رقت ۱/۴۰۰ در NET، به آن اضافه گشته و بمدت یک ساعت در حرارت آزمایشگاه قرار گرفت. کونژوگه را خالی نموده و مدت ۵ دقیقه با NET شستشو شد، سپس NET را خالی کرده و بافر (۶/۰۵ Trisbase، ۱۹gr NaCl) TBS بمدت ۵ دقیقه جایگزین شد.

در نهایت TBS را خالی کرده و محلول سوپسترا (۴-کلرو-۱-نفتول) به تمام چاهکها اضافه و حدود نیم ساعت در تاریکی قرار داده شد و با ۲-۳ بار شستشو توسط TBS، رنگ آبی پررنگ (ارغوانی) در مرکز دیسک (محل coat کردن آنتی ژن) جلوی نور سفید خوانده شد. در روش HI از آنتی ژن سرخک، سرم بیمار، بافر PBS (محلول بافر فسفات) و گلبول قرمز میمون استفاده گردید. اساس کار این روش بر مبنای کمپلکس آنتی ژن و آنتی بادی است (۲).

مواد و وسایل مورد استفاده از سوی آزمایشگاه دکتر گرگانی و دانشکده بهداشت تهران اهداء شده است. دو روش HI و EIA از روشهای روتین جهت تشخیص برخی عفونتهای ویروسی (مانند سرخک) در بخش ویروس شناسی دانشکده بهداشت می باشد.

یافته‌ها

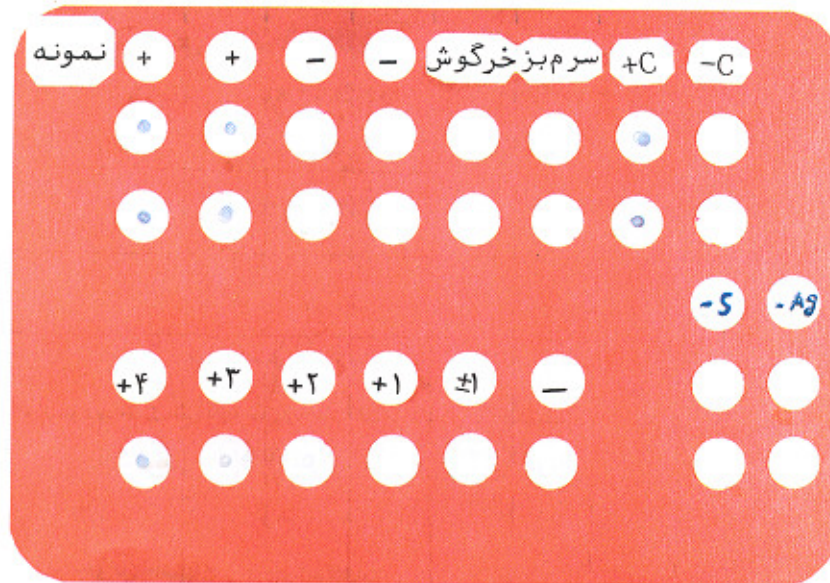
تقسیم بندی رنگ حاصله بر اساس تعیین تیتراژ بر

خنثی سازی (NT)، خنثی سازی کاهش پلاک (PRN) و... می باشند. در بین اینها روش HI بطور وسیع استفاده می شود که از نظر حساسیت و ویژگی برابر یا بیشتر از روش خنثی سازی سرم است و بر طبق گزارشهایی نیز از CF حساستر ولی نسبت به EIA از حساسیت کمتری برخوردار می باشد (۴و۵). آنچه که مسلم است، همه این روشها دارای مزایا و معایبی هستند که عیب اصلی آنها نیاز به تجهیزات آزمایشگاهی پرهزینه و گرانقیمت و نیز عدم کاربرد این روشها در شرایط صحرایی (Field) می باشد (۱). از معایب اصلی روش HI، نیاز به گلبول قرمز میمون می باشد که در همه جا در دسترس نمی باشد و نیز در مورد EIA نیاز به دستگاه گرانقیمتی بنام Elisa Reader می باشد.

روش DIA یک EIA تغییر یافته ای است که برای شناسائی آنتی ژن و آنتی بادهای ویروسی بکار می رود. این روش، روشی ساده، سریع، ارزان، قابل تکرار، قابل اطمینان و با ویژگی خوب می باشد (۱۲-۵). مهمترین مزیت DIA این است که می تواند در شرایط Field استفاده شود و نیازی به تجهیزات آزمایشگاهی نداشته و از نظر اقتصادی از هزینه بسیار کمی برخوردار می باشد، که در آن آنتی ژنها بر روی کاغذ نیتروسلولز قرار می گیرند (۱۴و۱۳و۵).

مواد و روشها

در روش DIA مقدار یک میکرولیتر از آنتی ژن سرخک با رقت ۱/۸ در مرکز دیسکهای کاغذ نیتروسلولز (دیسکها با قطر ۵ میلیمتر توسط دستگاه پانچ تهیه می گردند) قرار می گیرند. سپس دیسکهای حاوی آنتی ژن بمدت ۱۵ دقیقه در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفته تا خشک شوند. برای اشباع سازی ظرفیتهای خالی نیتروسلولز، ۷۵ میکرولیتر از محلول ۱٪ NET-BSA (۱۷/۵۳gr NaCl، ۱۵M+۱۲/۱gr tris base 50mM) ۱۷/۵۳gr EDTA 5mM، ۳/۷ gr، ۱/۰۵٪، ۱ml NP-40، ۵ گرم



شکل ۱: نتایج حاصل از Dot-Immunoassay

سرم خرگوش و سرم بز: به علت فقدان IgG انسانی، حتماً باید کاملاً سفید و منفی باشند (کنترل). +C: سرم کنترل مثبت استاندارد که باید باشد رنگ +4 تشکیل رسوب دهد. -C: سرم کنترل منفی استاندارد که باید بدون تشکیل هیچ رسوبی کاملاً سفید و منفی باشد. S: دیسکی که فاقد سرم بیمار (آنتی بادی IgG) می باشد، طبیعتاً باید کاملاً سفید و منفی باشد (کنترل). Ag: دیسکی که فاقد آنتی ژن (ویروس سرخک) می باشد، باید کاملاً سفید منفی باشد (کنترل).

جدول ۱. نتایج بدست آمده از روشهای HI ، EIA ، DIA بر روی نمونه های سرم بیمار مشکوک به سرخک

تعداد نمونه	تیترا حاصل از HI	نتایج حاصل از EIA		نتایج حاصل از DIA			
		مثبت	منفی	+4	+3	+2	+1
۱۰	۱:۴	۱۰	-	-	-	۲	۷
۳۷	۱:۸	۳۷	-	۳	۵	۱۴	۱۵
۱۹	۱:۱۶	۱۹	-	۱۰	۴	۴	۱
۱۱	۱:۳۲	۱۱	-	۹	۲	-	-
۴	۱:۶۴	۴	-	۴	-	-	-
۰	۱:۱۲۸	-	-	-	-	-	-
۱	۱:۲۵۶	۱	-	۱	-	-	-
۱۳	منفی	۳	۱۰	۱	-	-	۱
۹۵	-	۸۵	۱۰	۲۸	۱۱	۲۰	۲۴

نیتروسولوز) باقی می ماند. براساس شدت رنگ آبی در محل قرارگیری آنتی ژن، نتایج از (+۱) تا (+۴) تقسیم بندی می گردند. نتیجه منفی با عدم ظهور رنگ در محل قرارگرفتن آنتی ژن (کاملاً سفید) و نیز نتایجی

مبنای آخرین تیترا ایجاد کننده رنگ قابل مشاهده با چشم غیر مسلح می باشد. رنگ حاصله محدود به قسمت مرکزی (محلی که آنتی ژن در آن coat شده بود) می باشد و سایر قسمتهای دیسک به رنگ سفید (رنگ زمینه کاغذ

آنتی ژنی که برای یک نمونه سرم در روش HI استفاده می گردد، می توان آنرا برای حداقل ۱۳۰۰ نمونه سرم با روش DIA آزمایش نمود.

۴- عدم نیاز به تجهیزات خاص و گرانی قیمت و انجام آن در شرایط ساده آزمایشگاهی و نیز در شرایط Fiel.

۵- انجام آزمایش با استفاده از قطره خون خشک شده بر روی کاغذ نیتروسلولز یا کاغذ صافی.

DIA با داشتن این خصوصیات می تواند در موارد مختلفی علاوه بر سرخک در بررسی انواع بیماریهای ویروسی (ایدز، سرخچه، هرپس و...) انگلی، قارچی، باکتریایی و همچنین در شناسائی انواع آنتی ژنها و آنتی بادیها، اسید نوکلئیک و پروتئینهای محلول استفاده گردد (۱۸-۹ و ۴). علاوه بر تشخیص آنتی بادیها، DIA برای شناسائی آنتی ژنهای موجود در نمونه بالینی نیز استفاده می شود (۱۵ و ۱۳).

نتایج مطالعات مختلف نشان می دهد که روش DIA از حساسیت و ویژگی بسیار خوبی برخوردار بوده و می توان از آن برای آزمایشگاههای کوچک و ساده، بویژه برای کشورهای در حال توسعه، استفاده نمود (۱۸ و ۱۵ و ۱۳ و ۸ و ۷ و ۴). برخی از محققین، حساسیت آن را مساوی یا بیشتر از حساسیت روشهای خنثی سازی، ممانعت از همگلوتیناسیون و ایمونوفلورسانس گزارش می دهند (۴). Tantivanich و همکارانش حساسیت و ویژگی این روش را برای شناسایی ویروس سنیسیال تنفسی (RSV) از نمونه های بالینی به ترتیب ۶۵/۶۲ و ۹۳/۹۲ درصد بدست آورده اند (۱۳).

برخی دیگر نشان داده اند که حساسیت DIA از روش الایزا که در آن آنتی ژن به میکروپلیت متصل می شود بیشتر است، که این حساسیت اضافی ممکن است ناشی از اتصال مفیدتر آنتی ژن به غشاء نیتروسلولز باشد (۷ و ۶). پژوهش دیگری توسط آقای Chaicumpa و همکاران صورت گرفته است که بر اساس آن حساسیت و ویژگی روش الایزای نقطه ای را به ترتیب ۱۰۰ و ۹۹/۹۵ درصد

بارنگ بسیار ضعیف و مشکوک (+۱) مشخص می گردد که نهایتاً جزء نتایج منفی بحساب می آیند.

با توجه به جدول بالا، از تعداد کل ۹۵ نمونه سرم، در روش HI، ۸۲ نمونه مثبت (دارای تیتراژ آنتی بادی) و ۱۳ نمونه منفی هستند. همین تعداد نمونه با روش EIA، ۸۵ نمونه مثبت و ۱۰ نمونه دیگر منفی شدند. نهایتاً بررسی همین تعداد نمونه با روش DIA، تعداد ۸۳ نمونه مثبت و ۱۲ نمونه باقی مانده بعنوان نمونه منفی گزارش می شوند. در این بررسی یکبار روش HI و بار دیگر روش EIA به عنوان روشی مرجع برای مقایسه با DIA در نظر گرفته شد، و نهایتاً میزان حساسیت و ویژگی آنها نسبت به همدیگر به ترتیب نسبت به HI برابر با ۹۸/۸ و ۸۵ درصد و همچنین این میزان در مقایسه با روش ELISA به ترتیب معادل با ۹۶/۵ و ۹۰ درصد بدست آمد.

بحث

از آنجائیکه شناسائی وجود آنتی بادی علیه ویروس سرخک یک روش انتخابی برای تشخیص ایمنی علیه این بیماری است، آزمایشهای متعددی برای سنجش آنتی بادی بر ضد ویروس سرخک در افراد بیمار و واکسینه بکار گرفته می شود، که از آن جمله می توان به آزمایشهای کاهش پلاک، آزمایش خنثی سازی، ثبوت مکمل، ممانعت از همگلوتیناسیون، الایزا و... اشاره کرد.

یکی دیگر از روشهایی که در سالهای اخیر برای شناسائی آنتی بادیهای مختلف از جمله آنتی بادی ضد سرخک مورد استفاده قرار گرفته است، روش - Dot (DIA (Elisa می باشد. در این روش که یک الایزای تغییر یافته است، بجای میکروپلیت از کاغذ نیتروسلولز به عنوان فاز جامد استفاده می شود. با توجه به نتایج بدست آمده در این بررسی، DIA دارای مزایای زیر می باشد:

- ۱- حساسیت و ویژگی بالا و قابل توجه.
- ۲- انجام آزمایش در زمان نسبتاً کوتاه (۴-۵ ساعت).
- ۳- مصرف آنتی ژن بسیار کم: در این بررسی، از مقدار

بدست آورده‌اند (۱۷).

نتایج نشان می‌دهند که DIA در مقایسه با روش (HI) از حساسیت و ویژگی خوبی (به ترتیب ۹۸/۸ و ۸۵ درصد) برخوردار است. البته تعداد سرمهای منفی در این مطالعه اندک بود، و چنانچه تعداد بیشتری سرم منفی در دسترس باشد، ویژگی روش DIA نسبت به HI با دقت بیشتری تعیین خواهد شد. همچنین حساسیت و ویژگی DIA در مقایسه با روش (EIA) به ترتیب برابر با ۹۶/۵ و ۹۰ درصد می‌باشد.

اطلاعاتی که از گزارشات مختلف بدست آمده نشان می‌دهد که Dot-Elisa (DIA) می‌تواند بطور واقعی برای

شناسائی آنتی‌بادیهای (IgG) بر ضد ویروسهای مختلف استفاده شود (۱۶ و ۱۵ و ۱۳ و ۱۱ و ۴).

لذا با توجه به بررسی انجام شده، چنین به نظر می‌رسد که تکنیک DIA با داشتن حساسیت و ویژگی نسبتاً خوب، هزینه بسیار کم، زمان کوتاه‌تر، عدم نیاز به تجهیزات آزمایشگاهی و سادگی در انجام آزمایش نسبت به روشهای HI و DIA برای ارزیابی تعداد زیاد نمونه سرم، جهت تعیین سطح ایمنی جامعه در مقابل بیماری سرخک بسیار مناسب باشد. همچنین ارزیابی نمونه‌ها برای تعیین فاز حاد بیماری (شناسائی IgM) در یک نمونه سرم قابل تحقیق و بررسی می‌باشد.

References

1. Griffin DE, Bellini WJ. Fields virology, 3rd ed, New York. Lippincott Raven 1996; pP: 1267-96.
2. Lennette EH, Lennette DA, Lennette ET. Diagnostic procedures for viral, Rickettsial, and Chlamydial infections, 7th ed, 1995; 129-130, 155, 451-45.
3. Meilen V, Billeter MA. Measles virus. CTIM. Springer, 1995: 191-7.
4. Heberling RL, Kalter SS. Rapid dot- immunobinding assay on nitrocellulose for viral antibodies. J Clin Microbiol 1986; 23(1): 109-13.
5. Kalter SS, Heberling RL, Barry JD. Detection and titration of measles virus antibody by hemmagglutination inhibition and by dotimmunobinding assay. J Clin Microbiol 1991; 29(1): 202-4.
6. Condorelli F, Ziegler T. Dot - immunobinding assay for simultaneous detection of specific immunoglobulin G antibody to measles virus, Mumps virus, and Rubella virus. J Clin Microbiol 1993; 717-19.
7. Heberling RL, Kalter SS, et al. Serodiagnosis of rabies by dot - immunobinding assay. J Clin Microbiol 1987; 25: 1262-64.
8. Heberling RL, Kalter SS, et al. Dot immunobinding assay compared with enzyme linked immunosorbent assay for rapid and specific detection of retrovirus antibody induced by human or simian acquired immunodeficiency syndrome. J Clin Microbiol 1988; 26(4): 765-67.
9. Stott DI. Immunoblotting and dot blotting. J Immunol Meth, 1989; 119: 153-87.
10. Tolbot RJ, Knobler MA, et al. Western and dot immunoblotting analysis of viral antigens and antibodies; application of murine hepatitis virus. J Immunol Meth 1984; 43:177-88.

11. Towbin H, Gordon J. Immunoblotting and dot immunobinding current status and outlook. *J Immunol Meth* 1984; 72: 313-34.
۱۲. محمدزاده حاجی پیرلو ح. راه اندازی تکنیک Dot- Elisa و استفاده از آن در تشخیص و بررسی سرواپیدمیولوژیک کالازار. پایان نامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد دانشکده بهداشت ۷۴-۱۳۷۳.
13. Tantivanich S, Klongkamnuankarn K, Desakorn V. Simplified rapid diagnosis of respiratory syncytial virus form clinical specimens. *Asian pac Allergy Immunol* 1997; 15(2): 99-103.
14. Vercammen F, Berkvens D, Brandt J, Vansteenkiste W. A sensitive and specific 30 min dot - Elisa for the detection of anti- leishmania antibodies in the dog. *Vet - Parasitol* 1998; 79(3): 221-8.
15. Hawkes R, Niday E, Gordon J A. Dot- immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. *Anal Biochem* 1982; 119: 142-7.
16. Linda EM, Harry RL, et.al. *Manual of laboratory immunology*. 2nd ed, 1991; pp: 156-58.
17. Chaicumpa W, Srimanote P, et al. Rapid diagnosis of cholera caused by vibrio cholera 0139. *J Clin Microbiol* 1998; 36(12): 3595-600.
18. Eliades P, Karagouni E, Stergiatou I, Miras K. A simple method for the serodiagnosis of human hydatid disease based on a protein A/Colloidal dye conjugate. *J Immunol Methods* 1998; 218(1-2): 123-32.