● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل، سال سوم ، شمارهٔ ۲ (پی‌درپی ۱۰) ، صفحه ۱۲ الی ۱۷ ، بهار ۱۳۸۰

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

یوسف یحیی پور،[1*] دکتر طلعت مختاری‌آزاد[2]، دکتر محمود محمودی[3]، دکتر محمد پزشکی[2]، دکتر رخشنده ناطق[4]
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 بیماریی 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 شناسائی آنتی‌بادی علیه ویروس سرخک بکار گرفته می‌شود، از جمله ممانعت از هماگلوتیناسیون (HI)، آنزیم ایمونواسی (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 سوبسترا (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 گرانقیمت 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 ومیر 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 درحال توسعه تلف می‌کند (۳و۲). تعدادی روشهای تشخیصی برای شناسائی آنتی‌بادی ضد ویروس سرخک وجود دارند، از جمله شامل ممانعت ازهماگلوتیناسیون (HI) یا الایزا، فیکساسیون کمپلمان (CF)، ایمونوفلورسانس (IF)، تست

[DOR: 20.1001.1.15614107.1380.3.2.2.3]

خنثی سازی (NT)، خنثی‌سازی کاهش پلاک (PRN) و.. می‌باشند. در بین اینها روش HI بطور وسیع استفاده می‌شود که از نظر حساسیت و ویژگی برابر یا بیشتر از روش خنثی‌سازی سرم است و بر طبق گزارشهائی نیز از CF حساستر ولی نسبت به EIA از حساسیت کمتری برخوردار می‌باشد (۵و۴). 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 صحرائی (Field) می‌باشد (۱). ازمعایب اصلی روش HI، نیاز به گلبول قرمز میمون می‌باشد که در همه جا در دسترس نمی‌باشد و نیز در مورد EIA نیاز به دستگاه گرانقیمتی بنام Elisa Reader می‌باشد.

روش DIA یک EIA تغییر یافته‌ای است که برای شناسائی آنتی‌ژن و آنتی‌بادیهای ویروسی بکار می‌رود. این روش، روشی ساده، سریع، ارزان، قابل تکرار، قابل اطمینان و با ویژگی خوب می‌باشد (۱۲-۵).

مهمترین مزیت DIA این است که می‌تواند در شرایط Field استفاده شود و نیازی به تجهیزات آزمایشگاهی نداشته و از نظر اقتصادی از هزینه بسیارکمی برخوردار می‌باشد، که در آن آنتی‌ژنها بر روی کاغذ نیتروسلولز قرار می‌گیرند (۱۴و۱۳و۵).

مواد و روشها

در روش DIA مقدار یک میکرولیتر از آنتی‌ژن سرخک با رقت $\frac{1}{8}$ در مرکز دیسکهای کاغذ نیتروسلولز (دیسکها با قطر ۵ میلیمتر توسط دستگاه پانچ تهیه می‌گردند) قرار می‌گیرند. سپس دیسکهای حاوی آنتی‌ژن بمدت ۱۵ دقیقه در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفته تا خشک شوند. برای اشباع‌سازی ظرفیتهای خالی نیتروسلولز، ۷۵ میکرولیتر از محلول ۱٪ NET-BSA (۱۷/۵۳gr NaCL۰/۱۵M+۱۲/۱gr tris base 50mM 1ml NP-40،٪۰/۰۵ ، ۳/۷ gr EDTA 5mM، ۵ گرم ژلاتین و ۲ میلی‌لیتر 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 موردنظر 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 می‌شود، و بعد از ۱۰ دقیقه با خالی نمودن NET دوباره NET جدیدی اضافه می‌گردد و بعد از ۵ دقیقه NET را خالی کرده، میزان ۷۵ میکرولیتر از کونژوگه Anti-Human IgG متصل به پراکسیداز (HRP) با رقت $\frac{1}{200}$ 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 TBS (NaCl ۱۹gr,Trisbase ۶/۰۵) بمدت ۵ دقیقه جایگزین شد.

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

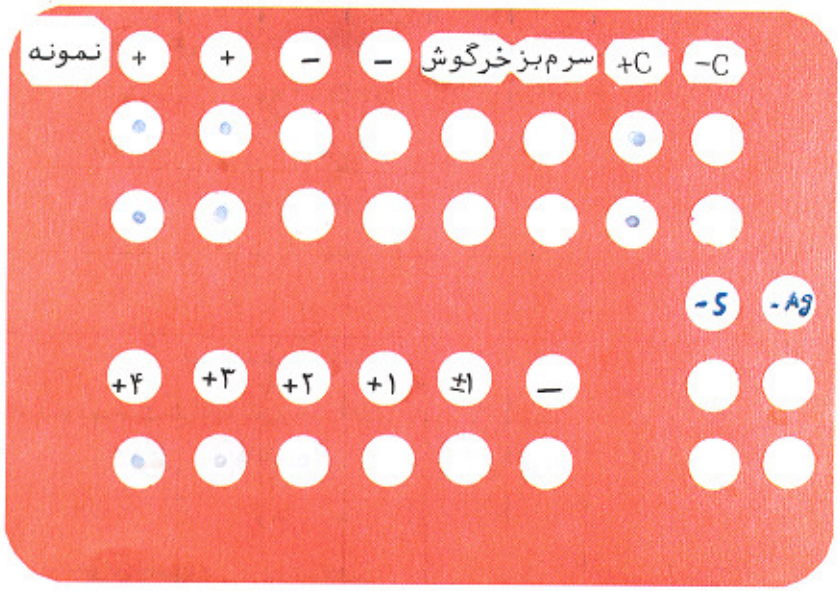
مواد و وسایل مورد استفاده از سوی آزمایشگاه دکتر گرگانی و دانشکده بهداشت تهران اهداء شده‌است.

دو روش HI و EIA از روشهای روتین جهت تشخیص برخی عفونتهای ویروسی (مانند سرخک) در بخش ویروس‌شناسی دانشکده بهداشت می‌باشد.

یافته‌ها

تقسیم‌بندی رنگ حاصله بر اساس تعیین تیتر، بر

[DOR: 20.1001.1.15614107.1380.3.2.2.3]



شکل ۱: نتایج حاصل از Dot-Immunoassay

سرم خرگوش وسرم بز: بعلت فقدان IgG انسانی، حتماً باید کاملاً سفید و منفی باشند (کنترل). C+: سرم کنترل مثبت استاندارد که باید با شدت رنگ ۴+ 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 (آنتی‌بادی IgG) می‌باشد، طبیعتاً باید کاملاً سفیدومنفی باشد(کنترل). Ag-: دیسکی که فاقد آنتی‌ژن (ویروس سرخک) می‌باشد، باید کاملاً سفید منفی باشد (کنترل).

جدول ۱. نتایج بدست آمده از روشهای HI , EIA , DIA بر روی نمونه‌های سرم بیمار مشکوک به سرخک

تعداد نمونه	تیتر حاصل از HI	نتایج حاصل از EIA		نتایج حاصل از DIA				
		مثبت	منفی	۴+	۳+	۲+	۱+	منفی
۱۰	۱:۴	۱۰	–	–	–	۲	۷	۱
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	۱۱
۹۵	–	۸۵	۱۰	۲۸	۱۱	۲۰	۲۴	۱۲

مبنای آخرین تیتر ایجاد کننده رنگ قابل مشاهده با چشم غیرمسلح می‌باشد. رنگ حاصله محدود به قسمت مرکزی (محلی که آنتی‌ژن در آن coat شده بود) می‌باشد و سایر قسمتهای دیسک به رنگ سفید (رنگ زمینه کاغذ نیتروسلولز) باقی می‌ماند. براساس شدت رنگ آبی در محل قرارگیری آنتی‌ژن، نتایج از (+۱) تا (+۴) تقسیم‌بندی می‌گردند. نتیجه منفی با عدم ظهور رنگ درمحل قرارگرفتن آنتی ژن (کاملاً سفید) و نیز نتایجی

[DOR: 20.1001.1.15614107.1380.3.2.2.3]

بارنگ بسیار ضعیف ومشکوک (+۱) مشخص می‌گردد که نهایتاً جزء نتایج منفی بحساب می‌آیند.

با توجه به جدول بالا، از تعداد کل ۹۵ نمونه سرم، در روش HI، ۸۲ نمونه مثبت (دارای تیتر آنتی‌بادی) 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 می‌شوند.

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 بترتیب معادل با ۹۶/۵ و ۹۰ درصد بدست آمد.

بحث

از آنجائیکه شناسائی وجود آنتی‌بادی علیه ویروس سرخک یک روش انتخابی برای تشخیص ایمنی علیه این بیماری است، آزمایشهای متعددی برای سنجش آنتی‌بادی بر ضد ویروس سرخک در افراد بیمار و واکسینه بکار گرفته می‌شود، که از آن جمله می‌توان به آزمایشهای کاهش پلاک، آزمایش خنثی‌سازی، ثبوت مکمل، ممانعت از هماگلوتیناسیون، الایزا و... اشاره کرد.

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

۱- حساسیت و ویژگی بالا و قابل توجه .

۲- انجام آزمایش در زمان نسبتاً کوتاه (۵-۴ ساعت).

۳- مصرف آنتی‌ژن بسیار کم: در این بررسی، از مقدار آنتی‌ژنی که برای یک نمونه سرم در روش HI استفاده می‌گردد، می‌توان آنرا برای حداقل ۱۳۰۰ نمونه سرم با روش DIA آزمایش نمود.

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

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

DIA با داشتن این خصوصیات می‌تواند در موارد مختلفی علاوه بر سرخک در بررسی انواع بیماریهای ویروسی (ایدز، سرخجه، هرپس و...) انگلی، قارچی، باکتریایی و همچنین در شناسائی انواع آنتی‌ژنها و آنتی‌بادیها، اسید نوکلئیک و پروتئینهای محلول استفاده گردد (۱۸-۹و۴). علاوه بر تشخیص آنتی‌بادیها، DIA برای شناسائی آنتی‌ژنهای موجود در نمونهٔ بالینی نیز استفاده می‌شود (۱۵و۱۳).

نتایج مطالعات مختلف نشان می‌دهد که روش DIA از حساسیت و ویژگی بسیار خوبی برخوردار بوده و می‌توان از آن برای آزمایشگاههای کوچک و ساده، بویژه برای کشورهای در حال توسعه، استفاده نمود (۱۸و۱۵و۱۳و۸و۷و۴). برخی از محققین، حساسیت آن را مساوی یا بیشتر از حساسیت روشهای خنثی‌سازی، ممانعت از هماگلوتیناسیون و ایمونوفلورسانس گزارش می‌دهند (۴). Tantivanich و همکارانش حساسیت و ویژگی این روش را برای شناسایی ویروس سن‌سی‌شیال تنفسی (RSV) از نمونه‌های بالینی به ترتیب ۶۵/۶۲ و ۹۳/۹۲ درصد بدست آورده‌اند (۱۳).

برخی دیگر نشان داده‌اند که حساسیت DIA از روش الایزا که در آن آنتی‌ژن به میکروپلیت متصل می‌شود بیشتر است، که این حساسیت اضافی ممکن است ناشی از اتصال مفیدتر آنتی‌ژن به غشاء نیتروسلولز باشد (۷و۶).

پژوهش دیگری توسط آقای Chaicumpa و همکاران صورت گرفته است که بر اساس آن حساسیت و ویژگی روش الایزای نقطه‌ای را به ترتیب ۱۰۰ و ۹۹/۹۵ درصد

[DOR: 20.1001.1.15614107.1380.3.2.2.3]

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 (۱۶و۱۵و۱۳و۱۱و۴).

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. Grriffin DE, Bellini WJ. Fields virology, 3rd ed, New York. Lippincott Raven 1996; pP: 1267-96.

2. Lennette EH, Lennentte DdA, 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. Sprinfer, 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 titeration 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 Glin Microbiol 1993; 717-19.

7. Heberling RI, 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 acuqired 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 murne hepatitis virus. J Immunol Meth 1984; 43:177-88.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1380.3.2.2.3]

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. راه‌اندازی 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.

* آدرس نویسنده مسئول: انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران، واحد بابل، تلفن: ۰۱۱۱-۲۲۵۲۰۵۰.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1380.3.2.2.3]