Archive of SID

کابرد سنجش اویدیتی IgG اختصاصی سرخجه به روش الایزا در تشخیص افتراقی عفونت اولیه سرخجه از عفونت مجدد

نازنین زهرا شفیعی جندقی[۱*]، دکتر حمیده طباطبائی[۱]، دکتر محبوبه ساریجلو[۱]، دکتر رسول همکار[۱]، دکتر طلعت مختاری آزاد[۱]، دکتر محمود محمودی[۲]، دکتر رخشنده ناطق[۱]

۱- بخش ویروس‌شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران ۲- گروه اپیدمیولوژی و آمار، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

Title: *Application of rubella specific IgG avidity assay EIA format in differential diagnosis of primary rubella infection from Reinfection.*

Authors: *Shafiei NZ,(MSc); Tabatabaei H,(PhD); Sarijloo M,(PhD); Hamkar R,(PhD); Mokhtari-Azad T, (PhD); Mahmoodi M,(PhD); Nategh R,(MD, PhD).*

Introduction: *It is essential for the management of the pregnant patients with a recent rash or in contact with a rubelliform illness that differential diagnosis of primary rubella infection from reinfection could be accomplished. The presence of rubella specific IgM has been taken in the past as a reliable indicator of primary infection, but in some cases the presence of IgM can be due to other causes. In this study, considering the fact that IgG avidity in primary rubella is much lower than in reinfection, the main objective was to use a convenient serological method for rubella IgG Avidity assay.*

Method: *For this purpose 72 serum samples from measles negative exanthematous patients were investigated. These samples were divided in two categories of A and B according to the serological markers (HI test results and IgM detection) and also the age of patients, presence of low avidity IgG for group A and high avidity IgG for group B was expected. An avidity IgG ELISA test was performed by elution method for each group using Radim commercial kit and 6M urea (a mild protein denaturant) and avidity index was calculated.*

Results: *Using Splus software CART method (classification and regression tree), the borderline achieved for separation the high avidity IgG from low avidity one was 47.5% and using Roc curve in SPSS software specificity and sensitivity of the test were calculated.*

Conclusion: *The results show that, this method is suitable for differential diagnosis of primary rubella infection from reinfection.*

Keywords: *Primary rubella infection, reinfection, IgG avidity.*

Hakim 2005; 8(3); 38-44.

*- نویسنده مسؤول: دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، بخش ویروس شناسی تلفن: ۸۸۹۶۲۳۴۳ E-mail: nazaninzahra@yahoo.co.uk

www.SID.ir

Archive of SID

چکیده:

مقدمه: *تصمیم‌گیری در مورد زنان حامله‌ای که دچار راش شده‌اند یا در تماس با بیمار دارای راش‌های سرخجه فرم می‌باشند، ضرورت و اهمیت تشخیص افتراقی عفونت اولیهٔ سرخجه را از عفونت مجدد روشن می‌سازد. در گذشته، برای تشخیص عفونت اولیه اثبات حضور IgM اختصاصی سرخجه در سرم کافی می‌نمود اما گاهی حضور IgM دلایلی غیر از عفونت اولیه سرخجه دارد. در این پژوهش با توجه به این حقیقت که اویدیتی IgG در عفونت اولیه پایین‌تر از اویدیتی آن در عفونت مجدد می‌باشد، کاربرد یک روش سرولوژیک برای سنجش اویدیتی IgG اختصاصی سرخجه بعنوان هدف در نظر گرفته شد.*

روش‌کار: *به این منظور یک مجموعه سرم (panel) ۷۲ تایی از افراد دارای راش که سرخک منفی بودند انتخاب گردید. نمونه‌ها با در نظر گرفتن سن و معیارهای سرولوژیک (نتایج آزمون HI و ردیابی IgM) در دو گروه A (۴۰ نمونه) و B (۳۲ نمونه) قرار گرفتند که برای گروه A وجود IgG با اویدیتی پایین و برای گروه B وجود IgG با اویدیتی بالا مورد انتظار بود. بر روی نمونه‌های فوق IgG avidity assay (EIA format) با استفاده از کیت تجاری Radim و اوره ۶ مولار (دناتوره کننده ضعیف پروتئین) با روش Elution انجام شد و اندکس اویدیتی بدست آمد.*

نتایج: *به کمک نرم افزار Splus با روش CART[1] مرز بین IgG دارای اویدیتی بالا و IgG دارای اویدیتی پایین ۴۷/۵ درصد بدست آمد، بر این اساس به کمک منحنی Roc در نرم افزار SPSS حساسیت و ویژگی این آزمون بترتیب ۰/۹۶۹ و ۰/۹۷۵ محاسبه گردید.*

بحث: *در نهایت نتایج بدست آمده نشان می‌دهد این روش برای تشخیص افتراقی عفونت اولیه سرخجه از عفونت مجدد مناسب می‌باشد.*

گل‌واژگان: *عفونت اولیهٔ سرخجه، عفونت مجدد سرخجه، اویدیتی* IgG.

مقدمه:

عوامل ایجاد کننده برخی از عفونت‌های ویروسی می‌توانند از راه جفت به جنین منتقل شده، باعث سقط یا ناهنجاری جنین شوند. ویروس سرخجه یکی از عواملی است که اگر در ماه‌های اول بارداری (چهار ماه اول) مادر را برای نخستین بار (عفونت اولیه) آلوده کند می تواند از راه جفت عبور کرده و موجب صدمه به جنین شود. اما عفونت مجدد با ویروس سرخجه به ندرت ممکن است در جنین ایجاد نقص کند.

در حال حاضر در آزمایشگاه های تشخیص طبی برای تشخیص سرخجه تست‌های HI[2] برروی جفت سرم‌های دوران حاد و نقاهت و IgM EIA برای شناسایی حضور IgM اختصاصی سرخجه در سرم بیمار انجام می‌پذیرد. در صورت ثابت بودن عیار پادتن در آزمون HI و منفی بودن IgM می‌توان وجود عفونت اولیه سرخجه را رد کرد، اما در صورت مشاهده افزایش تیتر پادتن بر روی جفت سرم و مثبت بودن IgM سرمی، نمی‌توان با قاطعیت عفونت را اولیه دانست، زیرا افزایش تیتر پادتن در آزمون HI فقط می‌تواند نشانه برخورد اخیر با ویروس سرخجه باشد اما عفونت اولیه را از عفونت مجدد افتراق نمی‌دهد. از طرفی پاسخ IgM بعد از عفونت اولیه سرخجه ممکن است تا مدتها، حتی سالها مثبت بماند (۳-۱) یا اینکه در عفونت مجدد سرخجه، IgM دوباره مثبت شود که در این موارد معمولاً عیار IgM پایین است، ولی قابل شناسایی می‌باشد (۴-۲) ضمن اینکه گاهی IgM سرخجه در اثر عوامل غیراختصاصی مانند وجود فاکتورهای روماتویدی، حرارت دیدن سرم، حضور آنتی بادی‌های هتروفیل و تداخل با عفونت پارو ویروسی بصورت کاذب مثبت می‌گردد (۲و۳).

علاوه بر اینها تکیه کردن به مشاهدات بالینی هم کافی به نظر نمی‌رسد زیرا که: علایم بالینی بیماری سرخجه حتی در عفونت اولیه ملایم است و گاهی عفونت اولیه، تحت کلینیکی و بدون نشانه های بالینی روشن می‌باشد (۵). در حالی که در موارد معدودی عفونت مجدد سرخجه ممکن است همراه علامت باشد (۶ و۷). بعلاوه گاهی علایم بالینی سرخجه می‌تواند با سایر

[1]- Classification and regression tree
[2]- Hemagglutination inhibition

www.SID.ir

Archive of SID

بیماری‌هایی که همراه راش هستند، مانند عفونت پارووویروسی اشتباه شود (۵).

یکی از ویژگی‌های پاسخ ثانویه سیستم ایمنی نسبت به یک آنتی‌ژن (مانند پاسخ به عفونت مجدد سرخجه) بالا بودن اویدیتی IgG اختصاصی می‌باشد. بنابر این علاوه بر روشهای فوق، برای تشخیص افتراقی عفونت اولیه سرخجه از عفونت مجدد بررسی اویدیتی IgG اختصاصی سرخجه پیشنهاد می‌شود.

اویدیتی بر مبنای نیروی اتصال بین آنتی ژن و آنتی بادی تعریف می گردد.

نیروی اتصال (میل ترکیبی) آنتی بادی منووالان و آنتی ژن منووالان یا هاپتن را افینیتی[1] و افینیتی عملکردی[2] را اویدیتی[3] می‌نامند (۸).

افزایش اویدیتی که بازتابی از پدیده بلوغ افینیتی است ناشی از تکامل پاسخ هومورال وابسته به سلول T محسوب می‌گردد (۹) و خود بلوغ افینیتی در اثر تغییر در مخزن ژنی (۱۰) و جهش سوماتیک ژنهای ایمنوگلوبولین پدید می‌آید و به دنبال آن بقای انتخابی سلول های B تولید کننده آنتی بادی با افینیتی بالا مشاهده می‌شود (۹).

IgG ایجاد شده در نخستین مواجهه آنتی ژن با سیستم ایمنی دارای اویدیتی پایین[4] می‌باشد و با گذشت زمان بتدریج اویدیتی IgG افزایش می‌یابد، بصورتیکه حدود یک تا دو ماه بعد IgG با اویدیتی بالا[5] ایجاد می‌ود و در برخوردهای بعدی سیستم ایمنی با همان آنتی ژن، وجود خاطره ایمنی منجر به تولید IgG دارای اویدیتی بالا خواهد شد.

محققین از مدتها قبل کاربرد عوامل دناتوره کننده ملایم پروتیین را در آزمون الایزا برای سنجش اویدیتی IgG نشان داده اند. در تحقیقات مختلف از عوامل دناتوره کننده متفاوت مانند اوره (۲ و ۱۳-۱۱) دی اتیل آمین (۸-۷ و ۱۵-۱۴)، گوانیدین هیدروکلراید (۱۱و۱۶) و ایزوتیوسیانات (۱۲)، با غلظت‌های مختلف استفاده شده است. در همه موارد این عوامل می توانند در صورت پایین بودن قدرت اتصال آنتی بادی با آنتی ژن مانع تشکیل کمپلکس ایمنی شوند و یا در صورت سست بودن اتصال آنتی ژن و آنتی بادی از طریق تخریب پیوند هیدروژنی (۷) به صورت برگشت پذیر، باعث از هم گسستن آن شوند (۱۶).

از این مواد می‌توان در دو مرحله از آزمون الایزا استفاده کرد:

۱- در مرحله رقیق کردن سرم، در بافر diluent اضافه شود. (روش dilution) (۸ و ۱۲و ۱۶-۱۴).

۲- در مرحله شستشو پس از مجاور سازی آنتی بادی (سرم بیمار) با آنتی ژن، به بافر شستشو اضافه شود (روش Elution) این روش بر روش قبلی ترجیح دارد (۲و ۷ و ۱۵-۱۱).

در این پژوهش نظر به اهمیت تشخیص افتراقی عفونت اولیه سرخجه از عفونت مجدد آن و با توجه به این حقیقت که اویدیتی IgG در عفونت اولیه پایینتر از اویدیتی آن در عفونت مجدد می‌باشد، کاربرد یک روش سرولوژیک برای سنجش اویدیتی IgG اختصاصی سرخجه به عنوان هدف در نظر گرفته شد.

روش کار:

انتخاب نمونه:

جفت سرم‌های متعلق به بیماران بثوری که با آزمون ردیابی IgM به روش الیزا از نظر سرخک منفی بودند بعنوان نمونه انتخاب گردیدند. سرم نوبت اول، ۵ تا ۷ روز پس از بروز راش و سرم نوبت دوم، بفاصله حدود ۱۰ روز الی دو هفته پس از نوبت اول گرفته شده بود. آزمون IgM-EIA جهت بررسی وجود IgM اختصاصی سرخجه (توسط کیت بهرینگ) و آزمون HI به منظور عیارسنجی آنتی بادی‌های ضد سرخجه بر روی نمونه‌ها انجام شد. جهت انجام آزمون سنجش اویدیتی IgG به روش الیزا و تعیین حساسیت و ویژگی آن از میان نمونه های فوق براساس نتیجه آزمون HI و بررسی وجود IgM سرمی، همچنین با در نظر گرفتن سن افراد، یک مجموعه سرم (pannel) از سرم های نوبت دوم (نمونه دوره نقاهت بیماری) در دو گروه A (۴۰ نمونه) و B (۳۲ نمونه) انتخاب شد که با در نظر گرفتن مشخصات زیر برای گروه A، IgG با اویدیتی پایین و برای گروه B، IgG با اویدیتی بالا مورد انتظار بود.

گروه A (اویدیتی پایین):

۱- تغییر سرمی یا افزایش چهار برابر و بیشتر عیار آنتی بادی اختصاصی سرخجه در آزمون HI.

۲- مثبت بودن IgM سرمی در آزمون EIA.

۳- سن ۸ سال و پایین‌تر.

گروه B (اویدیتی بالا):

۱- ثابت بودن عیار آنتی بادی اختصاصی سرخجه در آزمون HI.

۲- منفی بودن IgM سرمی در آزمون EIA

---

[1] - Affinity
[2] - Functional affinity
[3] - Avidity
[4] - Low avidity
[5] - High avidity IgG

www.SID.ir

Archive of SID

۳- سن ۱۱ سال و بالاتر.

سنجش اویدیتی:

برروی دو گروه فوق آزمون IgG avidity assay (EIA format) با استفاده از کیت تجاری Rubella IgG EIA, Radim (Italy, cat # k2RG) و اورهٔ ۶ مولار به روش Elution، انجام شد. برای هر نمونه دو چاهک میکروپلیت اختصاص داده شد، در مرحلهٔ پس از اتصال آنتی ژن و آنتی بادی، یکی از چاهک‌ها با بافر شستشو کیت حاوی اوره و دیگری با Diluent در دو نوبت و هر بار به مدت ۵ دقیقه مجاور گردید. بقیه مراحل بطور معمول و مطابق دستور العمل کیت انجام شد.

میکروپلیت در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد. برای نمونه‌هایی که بر مبنای cut-off از نظر وجود IgG مثبت تلقی شد، اندکس اویدیتی[1] (AI) محاسبه گردید (۱۶ و ۱۲ و ۷ و ۲).

$$AI = \frac{OD \text{ چاهک دارای اوره}}{OD \text{ چاهک فاقد اوره}} * ۱۰۰$$

روش تحلیل و تجزیه نتایج:

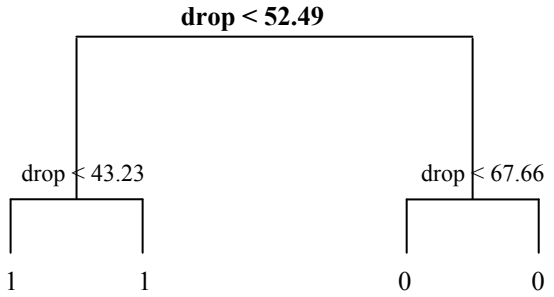
اعداد بدست آمده بعنوان AI برای نمونه‌های هر دو گروه در نرم افزار Splus با روش CART، مورد بررسی قرار گرفت تا مرز بین IgG با اویدیتی بالا و IgG با اویدیتی پایین بدست آید. سپس با توجه به عدد بدست آمده بعنوان cut point، ۷۲ نمونه مورد بررسی مجدداً در دو گروه IgG اویدیتی پایین و بالا قرار گرفتند. در نرم افزار SPSS توسط آزمون MC Nemar اویدیتی مورد انتظار با آنچه مشاهده شد مقایسه گردید و میزان همگرایی با تست کاپا مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت توسط منحنی ROC حساسیت و ویژگی آزمون بررسی شد.

یافته‌ها:

در مجموع ۷۲ جفت سرم متعلق به بیماران بثوری سرخک منفی که قبلاً توسط نتایج آزمونهای IgM EIA, HI و همچنین سن افراد، در دو گروه A و B قرار داده شده بود از نظر اویدیتی IgG مورد بررسی قرار گرفت.

برای تجزیه وتحلیل نتایج این پژوهش؛ در آزمون HI عیار پادتن هر دو نوبت نمونه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت تا افزایش عیار پادتن نشانه برخورد اخیر با ویروس سرخجه و ثابت ماندن آن نشانه وجود ایمنی در اثر عفونت قبلی باشد. اما در ردیابی IgM سرمی به روش الایزا فقط نمونه های نوبت دوم مورد بررسی قرار گرفت زیرا مثبت بودن IgM سرمی نوبت دوم برای نشان دادن وجود پاسخ IgM در برخورد سیستم ایمنی با ویروس سرخجه کافی می‌باشد.

آزمون سنجش اویدیتی IgG برروی نمونه‌های هر دو نوبت انجام شد و مشخص گردید که اویدیتی IgG در سرم نوبت دوم کمی بالاتر از نوبت اول می‌باشد ولی از نظر قرار گرفتن در دو گروه A و B با سرم نوبت اول تفاوتی ندارد. بنابر این نتایج سنجش اویدیتی IgG نوبت دوم نمونه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.



نمودار ۱- روش CART که مرز بین IgG با اویدیتی پایین (گروه صفر) و IgG با اویدیتی بالا (گروه یک) را بر اساس افت OD (100-AI) محاسبه نموده است.

اندکس اویدیتی بدست آمده برای سرم‌های هر دو گروه با استفاده از روش CART مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتیجه ۵۲/۵ درصد افت OD بود که با کم کردن آن از ۱۰۰، ۴۷/۵ درصد بعنوان مرز بین IgG دارای اویدیتی بالا و IgG با اویدیتی پایین محاسبه شد (نمودار ۱). بر این اساس مواردی که اندکس اویدیتی آنها کوچکتر یا مساوی ۴۷/۵ درصد بود به عنوان IgG با اویدیتی پایین و مواردی که ایندکس اویدیتی آنها بزرگتر از ۴۷/۵ درصد بود به عنوان IgG با اویدیتی بالا در نظر گرفته شد.

جدول ۱- مقایسه اویدیتی مشاهده شده در دو گروه Low و High با اویدیتی بالا و پایین

اویدیتی مورد انتظار		اویدیتی مشاهده شده		مجموع
		پایین	بالا	
پایین	تعداد	۳۹	۱	۴۰
	درصد	۹۷/۵	۲/۵	۱۰۰
بالا	تعداد	۱	۳۱	۳۲
	درصد	۳/۱	۹۶/۹	۱۰۰

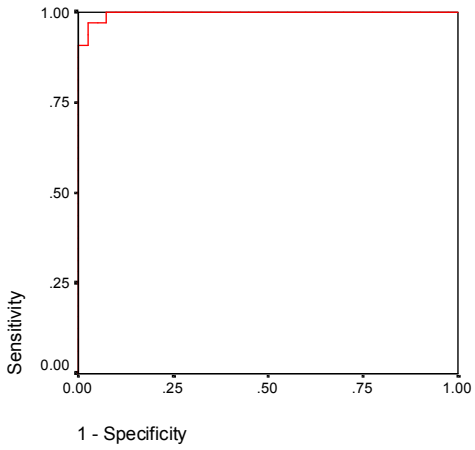
McNemar test P = 1 Kappa = 0.944

[1] - Avidity index

www.SID.ir

Archive of SID

آزمون McNemar در ارتباط با مقایسه وضعیت اویدیتی IgG مشاهده شده و آنچه در دو گروه A و B مورد انتظار بود معنی‌دار نبود (P=1) و میزان همگرایی یا ضریب کاپا برابر با ۰/۹۴۴ بود که نشانهٔ توافق بالای نتایج بدست آمده با آنچه انتظار می‌رفت می‌باشد (جدول ۱).



شکل ۱- منحنی ROC محور عمودی "حساسیت" و محور افقی "ویژگی - ۱" را نشان می‌دهد

حساسیت و ویژگی این آزمون بروش ROC-curve (شکل ۱) در SPSS بررسی شد و مشخص گردید در صورت پذیرفتن ۴۷/۵ درصد بعنوان مرز بین IgG دارای اویدیتی بالا و پایین حساسیت این آزمون ۰/۹۶۹ و ویژگی آن ۰/۹۷۵ می‌باشد. (جدول ۲). به این ترتیب هر دو روش آماری ROC-curve و CART به یک نتیجه منجر شد.

جدول ۲- محاسبات متعلق به منحنی ROC

ویژگی	حساسیت	اندکس اویدیتی
۰/۹۰	۱	۳۹/۰۲
۰/۹۲۵	۱	۴۴/۳۳
۰/۹۲۵	۰/۹۶۹	۴۵/۳۳
۰/۹۵۰	۰/۹۶۹	۴۵/۹۷
۰/۹۷۵	۰/۹۶۹	۴۷/۵۱
۰/۹۷۵	۰/۹۲۸	۵۰/۲۵
۰/۹۷۵	۰/۹۰۶	۵۲/۴۰
۱	۰/۹۰۶	۵۳/۴۱

بحث:

پایین بودن اویدیتی IgG اختصاصی سرخجه در عفونت اولیه و بالا بودن آن در عفونت مجدد و همچنین فرد ایمن موجب گردید تا از مدتها قبل آزمون سنجش اویدیتی IgG اختصاصی سرخجه برای تشخیص افتراقی عفونت اولیه از عفونت مجدد بکار گرفته شود.

Inouje و همکارانش تغییرات در اویدیتی IgG را بدنبال عفونت سرخجه بررسی نمودند آنان با روش EIA و با استفاده از کیت Behring که گوانیدین هیدروکلراید ۰/۱ و ۰/۵ مولار در بافر رقیق کننده سرم آن اضافه شده بود (روش Dilution)، نشان دادند که اویدیتی IgG اختصاصی سرخجه با گذشت زمان افزایش می‌یابد (۱۶).

Enders و Knotek نقش اویدیتی total IgG و زیر کلاسهای آن را در افتراق عفونت اولیه سرخجه از عفونت مجدد بررسی نمودند. آنها از روش Elution با اوره ۸ مولار استفاده کردند. در این مطالعه اندکس اویدیتی زیر ۳۰٪ بعنوان IgG با اویدیتی پایین و بالای ۵۰٪ بعنوان IgG با اویدیتی بالا در نظر گرفته شد و مشخص گردید که بلوغ اویدیتی IgG1 و IgG3 با IgG تام در ارتباط است. در ۵-۴ هفته اول پس از عفونت طبیعی و حدود ۱۰ هفته پس از واکسیناسیون اویدیتی پایین می باشد و پس از آن افزایش می‌یابد (۷).

در مطالعه دیگری بلوغ اویدیتی IgG اختصاصی سرخجه پس از واکسیناسیون بررسی شده است. در این مطالعه اوره ۸ مولار به روش Elution مورد استفاده قرار گرفت و کمپلکس آنتی ژن-آنتی بادی در سه نوبت به مدت ۵ دقیقه با اوره ۸ مولار مجاور گردید. پس از محاسبه اندکس اویدیتی، در صورتی که اندکس اویدیتی زیر ۳۰٪ بود بعنوان IgG با اویدیتی پایین در نظر گرفته شد و مشخص گردید که اویدیتی IgG پس از واکسیناسیون با ویروس ضعیف شده سرخجه در ۶ ماه اول به سرعت افزایش می‌یابد. ولی بعد از آن به مدت یکسال اویدیتی به کندی افزایش می‌یابد و در نهایت IgG با اویدیتی بالا باقی می‌ماند (۲).

در سال ۱۹۹۴ Polanec و همکارانش عملکرد دناتوره کننده‌های مختلف پروتیین را در آزمون EIA برای سنجش اویدیتی IgG سرخجه بررسی کردند. آنان به هر دو روش Dilution و Elution با عوامل مختلف دناتوره کننده پروتیین مانند اوره (۴ تا ۸ مولار)، دی اتیل آمین و گوانیدین در غلظت‌های مختلف و تیوسیانات در غلظت‌ها و pH های متفاوت بر روی سرم‌های مخلوط (pool) و سرم های تک[1] کار کردند و به این نتیجه رسیدند که در تفکیک عفونت اولیه سرخجه از عفونت مجدد روش Elution بهتر از Dilution عمل می‌کند. ضمن اینکه

[1] - Individual

www.SID.ir

Archive of SID

در روش Elution در مقایسه با Dilution غلظت بیشتری از دناتورکننده لازم است. آنان غلظت ۶ مولار اوره را برای روش Elution جهت سنجش اویدیتی IgG اختصاصی سرخجه بر روی سرم‌های تک مناسب دانستند (۱۲).

در این پژوهش برای نشان دادن کاربرد (EIA format) سنجش اویدیتی IgG در تشخیص عفونت اولیه سرخجه از عفونت مجدد با استفاده از اوره ۶ مولار و کیت تجاری Radim، تعدادی نمونه IgG با اویدیتی پایین و تعدادی IgG با اویدیتی بالا مورد بررسی قرار گرفت.

در گروه A که بعنوان IgG با اویدیتی پایین انتخاب گردید، سرم‌های IgM مثبتی که در آزمون HI بر روی جفت سرم، تغییر سرمی (۲۹ مورد) و یا افزایش تیتر پادتن (۱۱ مورد) داشتند قرار می‌گرفتند. ضمن اینکه سرم ها متعلق به افراد ۸ سال و پایین‌تر بودند تا شانس ابتلای آنها به عفونت مجدد پایین‌تر باشد. میانگین سن در گروه A ۶/۴ سال بود.

در گروه B که بعنوان IgG با اویدیتی بالا انتخاب گردید، سرم‌ها از نظر IgM منفی بودند و در آزمون HI عیار مناسبی از پادتن ضد سرخجه داشتند که این عیار در سرم دو نوبت ثابت مانده بود. بنابراین نشان می‌داد که آنتی بادی موجود از نوع IgG و متعلق به عفونت سرخجه در گذشته می‌باشد. با توجه به اینکه IgM سرمی حدوداً تا سه ماه پس از شروع عفونت مثبت است و اویدیتی IgG در طول ۵-۴ هفته پس از عفونت طبیعی و حدود ۱۰ هفته پس از واکسیناسیون به تدریج افزایش می‌یابد و پس از این مدت به حالت اویدیتی بالا باقی می‌ماند، بالا بودن اویدیتی IgG این نمونه ها قطعی بود. ضمن اینکه بعنوان یک عامل جنبی نمونه‌های این گروه به افراد مسن‌تر تعلق داشتند تا احتمال برخورد قبلی با ویروس سرخجه در آنها نسبت به گروه A بیشتر باشد، به این ترتیب افراد ۱۱ ساله و بالاتر در این گروه قرار گرفتند و میانگین سن در آنها ۱۹/۵ سال بود.

بعد از انجام آزمون سنجش اویدیتی با استفاده از روش CART بر مبنای افت OD در اثر مجاورت با اوره (OD drop) مناسب ترین عدد مرزی افتراق دهنده دو گروه اویدیتی بالا و پایین که بالاترین حساسیت و ویژگی را داشته باشد، مشخص گردید.

حاصل این تحلیل ۵۲/۴۹٪ افت OD یعنی ۴۷/۵٪ اندکس اویدیتی بود. (نمودار ۱). براساس این معیار مجدداً گروه بندی انجام گرفت و نمونه هایی که $AI \leq 47.5\%$ داشتند در گروه اویدیتی پایین و آنهایی که $AI > 47.5\%$ داشتند در گروه اویدیتی بالا قرار گرفتند.

در این مطالعه استفاده از غلظت کمتر اوره (۶ مولار بجای ۸ مولار) نسبت به اغلب مطالعات دیگر و همچنین متفاوت بودن کیت الایزای استفاده شده باعث گردید تا ۴۷/۵٪ بعنوان نقطه برش انتخاب شود.

با استفاده از نرم افزار SPSS جدول مقایسه‌ای بین آنچه انتظار می‌رفت و آنچه دیده شد ترسیم گردید، (جدول ۱) و با وجودی که دو مورد طبقه بندی ناصحیح[1] (یکی در گروه low و دیگری در گروه high) دیده شد، با تست مک‌نمار اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید. ضمن اینکه بالا بودن ضریب همگرایی در تست کاپا توافق بالای نتایج را نشان داد.

برای ارزیابی حساسیت و ویژگی آزمون، از ROC curve استفاده شد (شکل ۱).

محاسبات مرتبط با Roc curve (جدول ۲) نشان می‌دهد که بهترین حساسیت (۰/۹۶۹) و ویژگی (۰/۹۷۵) این آزمون زمانی برقرار است که ۴۷/۵ درصد بعنوان معیار افتراق بالا و پایین بودن اویدیتی در نظر گرفته شود و در صورت تغییر این عدد از میزان ویژگی و یا حساسیت آزمون کاسته می‌شود.

نتیجه‌گیری:

با توجه به پژوهش انجام شده استفاده از کیت الایزا Rubella IgG Radim و اوره ۶ مولار با روشی که ارایه گردید جهت سنجش اویدیتی IgG اختصاصی سرخجه مناسب می‌باشد.

ضمن اینکه با توجه به تجربیات و مشاهدات حین انجام پژوهش و بررسی مطالعات دیگران، پیشنهاد می‌شود در صورت استفاده از Reagent های مختلف مانند کیت‌های EIA و عوامل دناتوره کننده دیگر، نقطه مرزی بین اویدیتی پایین و بالا مجدداً محاسبه گردد.

تشکر و قدردانی:

نگارندگان این مقاله از زحمات کلیه پرسنل و دانشجویان بخش ویروس شناسی دانشکده بهداشت سپاسگذاری می‌نمایند و یاد شادروان خانم سیده آمنه بی نیاز را که متاسفانه در مراحل پایانی پژوهش ما را تنها گذاشتند گرامی می‌دارند. از راهنمایی بی‌دریغ سرکار خانم افروز نیکبخت صمیمانه تشکر می‌شود. بودجه این پژوهش توسط دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی تامین گردید، حمایتشان قابل تقدیر است.

[1] - Misclassification

www.SID.ir

Archive of SID

References:

1- Pattison JR, Dane DS, Mace E. Persistence of specific IgM after natural infection with rubella virus. The Lancet. 1975; 25: 185-7.

2- Hedman K, Hietala J, Tilikainen A, et al, Maturation of immunoglobolin G avidily after rubella vaccination studied by an Enzyme linked Immunosorbent Assay (Avidity-ELISA) and by Haemolysis typing. J Med Virol 1989; 27: 293-8.

3- Thomas HIJ, Morgan-Capner P. The avidity of specific IgM detected in primary rubella and reinfection. Epidemiol Infect 1990; 104: 489-97.

4- Morgan-Capner P, Hambling MH, Coleman TJ, et al. Detection of rubella – specific IgM in subclinical rubella reinfection in pregnancy. The lancet 1985; 2: 244-6.

5- Chantler J, Wolinky JS, Tingle A. Rubella virus. In: Knipe DM, Howley PM, eds. Fields Virology. 4th ed Philadelphia: Lippincott Williams and wilkins; 2001; 964-83.

6- Strannegard O, Holm SE, Hermodsson S, et al. Case of apparent reinfection with Rubella. The lancet 1970; 31: 240-1.

7- Enders G, Knotek F. Rubella IgG total antibody avidity and IgG subclass-specific antibody avidity assay and their role in the differentiation between primary rubella and rubella reinfection. Infection 1989; 17: 218-26.

8- Thomas HIJ, Morgan- Capner P. Rubella- specific IgG subclass avidity ELISA and its role in the differentiation between primary rubella and rubella reinfection. Epidemiol Infect 1988; 101: 591-8.

9- B cell activation and antibody production. In: Schmitt W, ed. Cellular and Molecular Immunology. 4th ed. hiladelphia, Pennsyl vania: Sanders Company; 2000: 182-207.

10- Berek C, Ziegner M. The maturation of the immune response. Immunol Today. 1993; 14: 400-4.

11- Mauracher CA, Mitchell LA, Tingle AJ. Differential IgG avidity to rubella virus structural proteins. J Med Virol 1992; 36: 202-8.

12- Polanc J, Seppala I, Rousseau S, et al. Evaluation of protein-denaturing immunoassay for avidity of Immunoglobulin G to rubella virus. J Clin Labor Analysis 1994; 8: 16-21.

13- Nedelykovic J, Jovanovic T, Oker-Blom C. Maturation of IgG avidity to individual rubella virus structural proteins. J Clin Virol 2001; 22: 47-54.

14- Thomas HIJ, Morgan-Capner P. Rubella-specific IgG1 avidity a comparison of methods. J Virol Methods 1991; 31: 219-28.

15- Thomas HIJ, Morgan-Capner P, Enders G. Persistence of specific IgM and low avidity specific IgG1 following primary rubella. J Virol Methods 1992; 39: 149-55.

16- Inouge S, Hasegawa A, Matsuno S, et al. changes in antibody avidity after virus Infections: Detection by an immunosorbent assay in which a mild protein-denaturing agent is employed. J Clin Microbiol 1984; 525-9.

www.SID.ir