Archive of SID

ارزیابی دو روش هماگلوتیناسیون غیرمستقیم در تشخیص لیستریوز و مقایسه آنها با روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم

بیژن صدیقی مقدم* (M.Sc)

دانشگاه علوم پزشکی سمنان، دانشکده پزشکی، گروه میکروب شناسی، ایمنی‌شناسی و انگل‌شناسی

خلاصه

سابقه و هدف: باکتریمی با لیستریا منوسیتوژن در زنان حامله می‌تواند به عوارض مختلف در جنین از جمله سقط منجر شود. گرچه تشخیص لیستریوز می‌تواند با کشت نمونه و جداسازی باکتری صورت گیرد ولی به دلیل وقت‌گیر بودن، راندمان پایین ناشی از تعداد کم باکتری و مشکل در تشخیص افتراقی از سایر باکتری‌ها در بسیاری از آزمایشگاه‌ها از این روش به طور معمول استفاده نمی‌شود. در مقابل، روش‌های سرولوژیک مختلفی به علت سرعت، مقرون به صرفه بودن و سهولت در تشخیص لیستریوز به کار گرفته می‌شود. در این مطالعه روش هماگلوتیناسیون غیرمستقیم (IHA) با استفاده از فراکشن I حاصل از ژل کروماتوگرافی آنتی‌ژن خام حاصل از سونیکاسیون پیکر باکتری و هم چنین IHA به روش پاتل طراحی و حساسیت و ویژگی آنها در تشخیص لیستریوز با روش IFA که معمول‌ترین روش در آزمایشگاه‌ها می‌باشد، مقایسه شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، ۲۰۷ زن مشکوک به لیستریوز مراجعه کننده به دانشکده بهداشت دانشگاه تهران که حداقل یک سابقه سقط جنین داشتند از نظر آنتی‌بادی‌های ضدلیستریا مونوسیتوژن به روش IFA تحت بررسی قرار گرفتند.

از بین این افراد دو گروه انتخاب شدند، گروه اول شامل ۹۶ نفر بودند که با روش IHA با آنتی‌ژن محلول در فراکشن I در مقابل ۵۱ فرد نرمال به عنوان شاهد که هیچ سابقه‌ای از لیستریوز نداشتند، تست شدند. گروه دوم شامل ۸۲ نفر بودند که با روش IHA پاتل در مقابل ۵۶ فرد نرمال به عنوان شاهد که هیچ سابقه‌ای از لیستریوز نداشتند، مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: در روش IFA (با حساسیت ۷۰٪ و ویژگی ۵۰٪)، ۸۳/۵٪ افراد مورد مطالعه مثبت بودند. این بررسی نشان داد که آنتی‌ژن خام لیستریا و هیچ یک از سه فراکشن آنتی‌ژن محلول برای انجام تست IHA مناسب نیستند؛ اما با آنتی‌ژن تهیه شده به روش پاتل و روش IHA پاتل تمام افراد تست شده تیترهای مثبت $\frac{1}{4}$ تا $\frac{1}{256}$ را نشان دادند که حساسیت و ویژگی آن نیز به ترتیب ۳۶٪ و ۹۴٪ به دست آمد.

نتیجه‌گیری: تا زمان معمول شدن روش‌های جدیدتر تشخیصی، توصیه می‌کنیم تست IFA و IHA پاتل به دلیل ویژگی بالا به طور هم زمان جهت غربالگری انجام شود.

واژه‌های کلیدی: ایمونوفلورسانس غیرمستقیم، هماگلوتیناسیون غیرمستقیم، لیستریوز

مقدمه

لیستریا منوسیتوژن باکتری گرم مثبت، میله‌ای کوتاه است که انسان و طیف وسیعی از حیوانات اهلی و وحشی را آلوده می‌کند و معمولاً از طریق مواد غذایی

* تلفن: ۰۲۳۱-۳۳۳۲۰۸۰، نمابر: ۰۲۳۱-۳۳۳۱۵۵۱، E-mail:sedighimoghaddami@Yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

آلوده منتقل می‌شود [۱۲]. از آنجا که این باکتری یک پاتوژن داخل سلولی است، بیشتر موارد بیماری در افرادی اتفاق می‌افتد که سیستم ایمنی آنها آسیب دیده است. در زنان حامله باکتریمی می‌تواند از طریق جفت به جنین منتقل و باعث آبسه‌ها و گرانولوماهای منتشر در اندام‌های مختلف، مننژیت یا باکتریمی در جنین، سقط جنین و یا زایمان پیش از موعد شود [۳،۵،۱۲].

تشخیص لیستریوز می‌تواند با کشت نمونه مواد غذایی و محیطی مشکوک یا نمونه‌های بالینی (خون، مایع نخاع، مدفوع، جفت، ترشحات واژن و...) صورت گیرد. گرچه به دلیل کم بودن تعداد باکتری و مشکل در تشخیص افتراقی از سایر باکتری‌ها در بسیاری از آزمایشگاه‌ها از این روش به طور معمول استفاده نمی‌شود. با این وجود، اضافه کردن برخی آنتی‌بیوتیک‌ها به محیط کشت یا روش‌های اختصاصی تغلیظ، این راندمان را افزایش می‌دهد. ذخیره‌سازی نمونه‌ها نیز در $4^{\circ}C$ به مدت ۸-۲ هفته (Cold enrichment) گرچه راندمان جداسازی توسط کشت را افزایش می‌دهد اما برای نمونه‌های بالینی، وقت‌گیر است [۵]. روش‌های سرولوژیک به علت سرعت، مقرون به صرفه بودن و سهولت با موفقیت نسبی در تشخیص لیستریوز به کار رفته است [۶،۷،۱۰،۱۵]؛ اما تست‌های تثبیت کمپلمان و میکروآگلوتیناسیون به دلیل فقدان حساسیت کافی و واکنش متقاطع با سایر باکتری‌های گرم مثبت از اعتبار چندانی برخوردار نبوده است [۵]. تست IFA در برخی آزمایشگاه‌ها در ایران در حال حاضر انجام می‌شود اما حساسیت و ویژگی نتایج آن از یک آزمایشگاه به آزمایشگاه دیگر متفاوت است.

در این مطالعه فراکشن‌های آنتی‌ژن محلول از طریق ستون کروماتوگرافی جدا و آنتی ژن محلول نیز به روش پاتل تهیه شد. روش هماگلوتیناسیون غیرمستقیم IHA هم با فراکشن I آنتی‌ژن محلول و هم با آنتی‌ژن تهیه شده به روش پاتل، طراحی و سرم بیماران مشکوک به لیستریوز با این دو روش بررسی شدند. هم‌چنین حساسیت و ویژگی این روش‌ها در تشخیص لیستریوز با روش IFA مقایسه شد.

مواد و روش‌ها

بیماران. در این مطالعه ۲۰۷ زن مشکوک به لیستریوز مراجعه کننده به دانشکده بهداشت دانشگاه تهران که حداقل یک سابقه سقط جنین داشتند از نظر آنتی‌بادی‌های ضدلیستریا منوسیتوژن به روش IFA تحت بررسی قرار گرفتند. از بین این افراد دو گروه انتخاب شدند: گروه اول شامل ۹۶ نفر بودند که با روش IHA با آنتی‌ژن محلول در فراکشن I در مقابل ۵۱ فرد نرمال به عنوان شاهد که هیچ سابقه‌ای از لیستریوز نداشتند، تست شدند. گروه دوم شامل ۸۲ نفر بودند که با روش IHA پاتل در مقابل ۵۶ فرد نرمال به عنوان شاهد که هیچ سابقه‌ای از لیستریوز نداشتند، مورد بررسی قرار گرفتند.

روش کار. از تمامی افراد، ۵ میلی‌لیتر خون گرفته و پس از جداکردن سرم و جذب آنتی‌بادی‌های هتروفیل به روش IFA و IHA با فراکشن I آنتی‌ژن محلول، IHA پاتل آزمایش شدند. از آنجا که سویه 1a لیستریا منوسیتوژن از سویه‌های اصلی ایجاد عفونت لیستریایی است در این مطالعه برای پیشگیری از خطا در IFA و هر دو روش IHA از این سویه به عنوان آنتی‌ژن استفاده شد. در روش IFA از پیکر باکتری یعنی آنتی‌ژن‌های سطحی استفاده و در نتیجه، آنتی‌بادی‌های علیه این شاخص سطحی ارزیابی گردید ولی در IHA از آنتی‌ژن‌های محلول حاصل از لیز پیکر باکتری استفاده شد.

تست ایمونوفلورسانس غیرمستقیم IFA. این تست براساس روش Biegeleisen انجام شد [۱]. در این روش باکتری لیوفیلیزه لیستریا منوسیتوژن سویه 1a با ۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل، سوسپانسیون شده و بر روی محیط بلاد آگار در $37^{\circ}C$ به مدت ۴۸ ساعت کشت شد. یک کلنی انتخاب و تحت همان شرایط، کشت مجدد داده شد. از کشت اخیر سوسپانسیون تهیه و رقت آن طوری تنظیم گردید که در هر میدان میکروسکوپ با بزرگ‌نمایی هزار تعداد ۴۰ تا ۶۰ باکتری دیده شود. بر

www.SID.ir

Archive of SID

روی هر لام ۱۰ قطره ۲۰ میکرولیتری از این سوسپانسیون میکروبی با فاصله مشخص قرار داده و فیکس شدند تا زمان آزمایش، لام‌ها در $-۷۰^{\circ}C$ ذخیره شد. سرم بیماران به صورت رقت‌های متوالی $\frac{۱}{۱۰۰}$ $\frac{۱}{۲۰۰}$ $\frac{۱}{۴۰۰}$ و.... تهیه و هر رقت به یکی از گسترده‌های میکروبی روی هر لام اضافه شد. پس از ۳۰ دقیقه آنکوباسیون در اتاقک تاریک و مرطوب، لام‌ها دو بار توسط PBS با pH = ۷/۲ هر بار به مدت ۵ دقیقه شستشو شد. سپس آنتی‌هیومن کونژوگه با فلورسئین بر روی لام‌ها اضافه و پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در اتاقک تاریک و مرطوب مانند مرتبه قبل شستشو گردید. لام‌ها با میکروسکوپ فلورسانس مشاهده شدند. آخرین تیتری که حداقل ۵۰٪ باکتری‌ها رنگ سبز درخشان گرفته باشند مثبت تلقی شد.

تهیه آنتی‌ژن محلول برای هماگلوتیناسیون غیرمستقیم IHA. یک کلنی از محیط کشت به ۱۰۰ میلی‌متر محیط BHI broth (Brain Heart infusion) منتقل و ۲۴ ساعت در $۳۷^{\circ}C$ روی روتاری با ۲۵۰ دور در دقیقه قرار داده شد. ۱۰ml از این کشت به ۱۰ لیتر از محیط کشت مایع BHI broth اضافه و انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت با همان شرایط ادامه یافت. سپس ۰/۵٪ (V/V) فنل اضافه و پس از ۲۴ ساعت ۲۰ دقیقه با دور ۴۰۰۰ rpm رسوب‌گیری شد. رسوب باکتریایی، ۳ بار با سرم فیزیولوژی شستشو شد تا مواد اضافی حذف گردد. ۲۰ گرم از رسوب باکتریایی در ۱۰۰ میلی‌لیتر PBS با pH=۷/۲ سوسپانسیون شد. با سونیکاتور با قدرت ۱۰KC و ۲۵۰W و دامنه حرکتی پروب ۲۰-۱۸ میکرون سوسپانسیون فوق ۶۰ دقیقه در ۲۰ KHz هر بار به مدت ۳ دقیقه با فواصل ۱۰ دقیقه در شرایط حمام یخ، سونیکه گردید. مایع حاصل از سونیکاسیون سانتریفیوژ (۴۰ دقیقه، $۴^{\circ}C$، ۱۰۰۰۰ rpm) شده و محلول فوقانی به عنوان آنتی‌ژن محلول استفاده شد. در مرحله بعد این آنتی‌ژن محلول با استفاده از کیسه دیالیز (با Cut off 10) به کمک PEG 6000 در $۴^{\circ}C$ تغلیظ شد. میزان پروتئین محلول نهایی به روش بیوره اندازه‌گیری شد که مقدار آن ۶/۵ mg/ml بود.

ژل فیلتراسیون. به منظور جداسازی فراکشن‌های آنتی‌ژن‌های محلول از ستون ۸۰×۲/۵ cm و سفادکس G100 (فارماسیا) استفاده شد. به طور خلاصه، به ۲۰ گرم پودر سفادکس با مقدار کافی بافر PBS با pH=۷/۲ حاوی سدیم آزاید اضافه شد. پس از متورم شدن ذرات ژل با چند بار شستشو، ذرات شکسته شده حذف گردید. سپس گاز موجود در ژل را با پمپ خلاء خارج و ژل به آرامی وارد ستون گردید تا به طور یک‌نواخت متراکم شود. در نهایت ستون، ۴۸ ساعت با بافر PBS شستشو شد. در نهایت کارآیی ستون به کمک دکستران بلو مشخص گردید.

جداسازی فراکشن‌های محلول لیستریا. ۱۰ml از محلول تغلیظ شده حاصل از سونیکاسیون لیستریا که در مرحله قبل تهیه شده بود بر روی این ستون برده شد. جریان خروجی (Flow rate) ۱۰ ml/h تنظیم و هر ۳ میلی‌لیتر مایع خروجی در یک لوله جمع‌آوری شد. بعد از ۴۸ ساعت جذب نوری، محتوای هر لوله با UV اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۸۰ nm قرائت شد و بر این اساس فراکشن‌های تشکیل دهنده هر پیک تعیین و در یک لوله آزمایش جمع و میزان پروتئین آن به روش بیوره تعیین گردید.

تثبیت آنتی‌ژن محلول بر روی گلبول قرمز گوسفند. محلول آلسیورس شامل ۲۰/۵ گرم دکستروز، ۸ گرم سیترات سدیم، ۰/۵۵ گرم اسید سیتریک، ۴/۲ گرم کلرید سدیم و آب مقطر تا حجم یک لیتر تهیه و pH آن با اسید سیتریک ۱۰٪ بین ۶/۲-۶ تنظیم شد. این محلول با فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر استریل و در $۴^{\circ}C$ نگهداری شد. خون گوسفند را با محلول آلسیورس مخلوط (به نسبت ۱:۱)، ۳ بار با PBS با pH=۷/۲ شستشو و سوسپانسیون ۲/۵٪ از گلبول قرمز گوسفند (sRBC) در PBS تهیه گردید. ۲ میلی‌لیتر از سوسپانسیون ۲/۵٪ sRBC با ۲ میلی‌لیتر اسیدتانیک ۱/۳۰۰۰۰ (W/V) مخلوط و ۳۰ دقیقه در $۳۷^{\circ}C$ انکوبه و سپس سانتریفوژ شد تا اسیدتانیک اضافی خارج شود. گلبول‌های تانه شده ۳ بار با PBS شسته شد و در نهایت با

www.SID.ir

Archive of SID

اضافه کردن ۲ میلی‌لیتر PBS با pH=۷/۲ به حجم اولیه یعنی سوسپانسیون ۲/۵٪ رسانده شد.

۲ میلی‌لیتر از آنتی‌ژن‌های محلول (فراکشن‌های III و II و I) به صورت جداگانه به این سوسپانسیون اضافه و ۳۰ دقیقه در $37^{\circ}C$ قرارگرفت. بعد از این مدت گلبول‌ها ۲ بار با PBS شسته و در مرتبه سوم شستشو با PBS با pH=۷/۲ حاوی ۱٪ سرم دکمپلمان خرگوش پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق انجام و رسوب حاصل به حجم اولیه رسانده شد تا سوسپانسیون ۲/۵٪ به دست آید. جهت کنترل شرایط، تمام مراحل فوق با PBS به جای اسیدتانیک نیز انجام شد.

تهیه آنتی‌ژن به روش پاتل. این روش براساس گزارشات قبلی انجام شد [۱۵]. یک کلنی از باکتری بر روی پلیت حاوی قند (۱/۰٪ گلوکز) به مدت ۲۴ ساعت در $20^{\circ}C$ کشت داده شد. کلنی‌ها از سطح پلیت با ۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی جدا و ۳ بار شستشو گردید و سوسپانسیونی از 10^{6}ـ 10^{5} باکتری در میلی‌متر تهیه و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در $60^{\circ}C$ مانند روش قبل سونیکه شد. مایع حاصل از لیز باکتری‌ها سانتریفیوژ (۱۵۰۰۰ rpm، $4^{\circ}C$، ۴۰ دقیقه) و مایع رویی به عنوان آنتی‌ژن استفاده شد. میزان پروتئین محلول به روش بیوره ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. آنتی‌ژن بر روی sRBC با تراکم ۲/۵٪ بدون استفاده از اسیدتانیک تثبیت و بقیه مراحل مانند روش قبل انجام شد.

هماگلوتیناسیون غیرمستقیم IHA. ۱۰۰ میکرولیتر سرم هر بیمار ابتدا به نسبت ۱:۱ با PBS pH=۷/۲ رقیق و به مدت ۳۰ دقیقه در $56^{\circ}C$ دکمپلمان گردید. سپس به آن از گلبول‌های قرمز شسته شده گوسفند به نسبت ۱:۱ اضافه و ۳۰ دقیقه در $37^{\circ}C$ انکوبه شد تا آنتی‌بادی‌های هتروفیل جذب شوند. پس از سانتریفوژ، سرم رویی جهت تست IHA استفاده شد.

در پلیت‌های ۹۶ حفره‌ای U شکل ۲۵ لامبدا، سرم بیمار با رقت‌های متوالی $\frac{1}{2}$ $\frac{1}{4}$ $\frac{1}{8}$ $\frac{1}{16}$ و بالاتر تهیه شد. به هر حفره ۲۵ میکرولیتر گلبول قرمز گوسفند پوشانده شده با آنتی‌ژن اضافه گردید. از یک سرم مثبت با تیتر مشخص به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. کنترل منفی شامل سرم یک فرد منفی به‌اضافه گلبول قرمز تانه شده و تانه نشده است که در این موارد نباید آگلوتیناسیون بین آنتی‌بادی‌های هتروفیل و گلبول قرمز دیده شود. کنترل‌های آزمایش نیز شامل مجاورت PBS با گلبول قرمز گوسفند تانه شده و تانه نشده است. پلیت‌ها به آرامی و به صورت افقی تکان داده شد تا سرم و گلبول‌های قرمز به طور یکنواخت مخلوط شوند. پلیت‌ها پس از ۲ ساعت انکوباسیون در دمای اتاق و پس از ۲۴ ساعت نگهداری در یخچال، بررسی شدند. برحسب تشکیل توده یکنواختی از RBC تا رسوب کامل گلبول‌های قرمز در مرکز حفره، واکنش به ترتیب از ۴+ تا منفی در نظر گرفته می‌شود.

روش آماری. از آزمون Z در سطح معنی‌داری ۵٪ برای تجزیه و تحلیل استفاده شد.

نتایج

جدول شماره ۱ نتایج ارزیابی آنتی‌بادی به روش IFA را نشان می‌دهد. با این روش ۱۶/۵٪ = $\frac{34}{207}$ افراد مورد مطالعه منفی و ۸۳/۵٪ = $\frac{173}{207}$ آنها تیتر $\frac{1}{200}$ تا $\frac{1}{6400}$ را نشان دادند.

در ژل کروماتوگرافی با ستون حاوی سفادکس G100 سه پیک آنتی‌ژنیک (شکل ۱) به دست آمد که پس از یکی کردن و تغلیظ هر فراکشن میزان پروتئین آنها اندازه‌گیری شد. مقدار پروتئین برای فراکشن‌های I، II، III به ترتیب ۱/۸، ۰/۳، ۰/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. جهت تعیین غلظت مناسب هر آنتی‌ژن در یک سری آزمایشات مقدماتی مقدار مناسبی از آنتی‌ژن خام و رقت‌های متوالی Twofold از هر فراکشن روی گلبول قرمز گوسفند تثبیت شد و با سرم ۲۴ بیماری که تیتر مثبت با IFA داشتند تست شد. بهترین غلظت برای فراکشن I، ۲۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر و برای فراکشن‌های II و III به ترتیب همان غلظت اولیه ۳۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. آنتی‌ژن خام نیز به دلیل ایجاد همولیز ناشی از لیستریولیزین برای انجام این

www.SID.ir

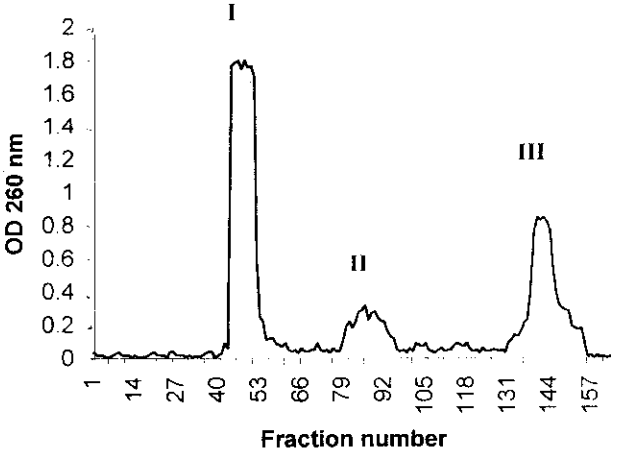
Archive of SID

جدول ۱. فراوانی تیتر آنتی بادی در تست ایمونوفلورسانس غیر مستقیم در خانم‌های مشکوک به لیستریوز با حداقل یک سابقه سقط جنین

تیتر آنتی بادی	منفی	۱/۲۰۰	۱/۴۰۰	۱/۸۰۰	۱/۱۶۰۰	۱/۳۲۰۰	۱/۶۴۰۰
تعداد افراد مشکوک به لیستریوز N=۲۰۷	۳۴	۳۱	۴۱	۳۶	۴۲	۲۰	۳

جدول ۲. فراوانی تیتر آنتی‌بادی در تست هماگلوتیناسیون غیرمستقیم با آنتی‌ژن محلول فراکشن I و روش پاتل در خانم‌های مشکوک به لیستریوز با حداقل یک سابقه سقط جنین

	تیتر آنتی بادی	منفی	۱/۴	۱/۸	۱/۱۶	۱/۳۲	۱/۶۴	۱/۱۲۸	۱/۲۵۶
IHA با فراکشن I	افراد مشکوک به لیستریوز n=۹۶	۲	۴	۲۵	۱۳	۳۵	۱۶	۱	۰
	گروه شاهد n=۵۱	۵	۲	۲	۱۳	۲۳	۶	۰	۰
IHA پاتل	افراد مشکوک به لیستریوز n=۸۲	۰	۳	۱۱	۱۷	۲۱	۱۳	۱۶	۱
	گروه شاهد n=۵۶	۶	۱۳	۱۲	۱۷	۵	۳	۰	۰



شکل ۱. ژل فیلتراسیون با استفاده از ستون سفادکس G100 و فراکشن‌های به دست آمده از آنتی‌ژن خام پیکره لیستریا منوسیتوژن

تست مناسب نبود. فراکشن‌های II و III به دلیل این که با سرم بیمارانی که با IFA مثبت بودند تیتر منفی یا پایین نشان دادند، از مطالعه کنار گذاشته شدند و با گلبول‌های کوت شده با فراکشن I، مطالعه ادامه داده شد.

سرم ۹۶ فرد مشکوک و ۵۱ فرد نرمال به روش هماگلوتیناسیون غیرمستقیم با فراکشن I بررسی شد. نتایج بررسی نشان می‌دهد در بین افراد مشکوک به لیستریوز، ۲/۱٪ منفی و ۹۷/۹٪ دارای تیترهای $\frac{1}{4}$ تا $\frac{1}{128}$ بودند. این در حالی است که افراد سالم (n=۵۱) نیز ۹/۸٪ تیتر منفی و ۹۰/۲٪ تیترهای $\frac{1}{4}$ تا $\frac{1}{64}$ را نشان دادند. آزمون آماری نشان داد که اختلاف بین گروه سالم و مشکوک به بیماری از نظر آماری معنی‌دار نیست.

سرم ۸۲ فرد مشکوک و ۵۶ فرد نرمال به روش هماگلوتیناسیون غیرمستقیم پاتل بررسی شد. نتایج بررسی نشان داد کلیه افراد مشکوک به لیستریوز، تیترهای $\frac{1}{4}$ تا $\frac{1}{128}$ دارند. در بین افراد سالم (n=۵۶) نیز ۱۰٪ = $\frac{6}{56}$ تیتر منفی و ۹۰٪ = $\frac{50}{56}$ تیترهای $\frac{1}{4}$ تا $\frac{1}{64}$ را نشان دادند. آزمون Z با دامنه اطمینان ۹۵٪ نشان داد که این اختلاف بین گروه سالم و مشکوک به بیماری معنی‌دار است ($P<0/05$).

بحث

در IHA با فراکشن I افراد مشکوک و سالم به ترتیب ۹۷/۹٪ و ۹۰/۲٪ تیترهای $\frac{1}{4}$ تا $\frac{1}{128}$ را نشان دادند از نظر آماری اختلاف معنی‌داری بین دو گروه مشاهده نشد. این امر به دلیل شاخص‌های آگلوتیناسیون دهنده موجود در فراکشن I است که آنتی‌ژن‌هایی را شامل می‌شود که واکنش‌های متقاطع را در بر می‌گیرد. بنابراین فراکشن I در تشخیص، قابلیت بالایی ندارد.

در IHA انجام شده با آنتی‌ژن روش پاتل بین گروه

www.SID.ir

Archive of SID

بیماران مشکوک به لیستریوز و افراد سالم اختلاف آماری معنی‌داری وجود داشت. این امر نشان می‌دهد که شرایط کشت و روش تهیه آنتی‌ژن محلول در ترکیب آنتی‌ژنیک مؤثر است. تغییر در شرایط کشت و تهیه آنتی‌ژن باعث کاهش در شاخص‌هایی شده است که در فراکشن I روی گلبول‌ها کوت شده بودند و ترکیبات آنتی‌ژنیک دیگری به ویژه شاخص‌های دارای پلی‌ساکارید دخالت می‌کنند زیرا در روش پاتل بدون نیاز به اسیدتانیک این آنتی‌ژن‌ها مستقیماً روی گلبول تثبیت شدند و اختلاف معنی‌دار بین IHA فراکشن I و IHA پاتل نیز وجود آنتی‌ژن‌های متفاوت از هم را در این دو روش تأیید می‌کند. عدم همبستگی بین IFA با IHA فراکشن I و IHA پاتل نیز مؤید تفاوت در ماهیت آنتی‌ژنیک در هر کدام از این تست‌هاست. این عدم همبستگی قبلاً توسط Sceliger در تفسیر تست‌های تثبیت کمپلمان و آگلوتیناسیون در تشخیص لیستریوز گزارش شده است. در این مطالعه حساسیت و ویژگی IFA به ترتیب ۷۰٪ و ۵۰٪ بود در حالی که حساسیت IHA پاتل ۳۶٪ و ویژگی آن بالا و ۹۴٪ است.

در ضمن آنتی‌ژن خام Crude lysate برای انجام تست هماگلوتیناسیون مناسب نیست. این امر به دلیل غلظت نسبتاً بالای لیستریولیزین موجود است که در هنگام کوت کردن آنتی‌ژن باعث لیز گلبول قرمز می‌شود.

نتایج نشان می‌دهد که در تست IFA گرچه حساسیت بالاست اما ویژگی آن پایین است و روش IHA پاتل با وجود ویژگی بالا حساسیت چندانی در تشخیص لیستریوز ندارد. این امر نشان می‌دهد که با وجود این که در ایران تست IFA در تشخیص به کار می‌رود به نظر می‌رسد روش‌های دقیق‌تری برای تشخیص این بیماری باید به کار رود. در حال حاضر مطالعات وسیعی برای استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز [۴،۸،۱۱]، PCR-الیزا [۱۳]، استفاده از آنتی‌بادی منوکلونال [۱۴]، الیزا [۲] و DNA هیبریداسیون [۹] در حال انجام است. قابل پیش‌بینی است که روش‌های فوق به تدریج جایگزین روش‌های قراردادی باکتریولوژیک و سرولوژیک خواهند شد. با این وجود تا زمان معمول شدن روش‌های نوین تشخیصی توصیه می‌شود تست IFA به دلیل حساسیت بالاتر جهت غربالگری و IHA پاتل به دلیل ویژگی بالا جهت تأیید به طور هم زمان انجام شود. این امر گرچه نیاز به تبحر بیشتر در تفسیر نتایج سرولوژی دارد، اما می‌تواند به تشخیص دقیق‌تر بیماری منجر شود.

تقدیر و تشکر

این تحقیق با حمایت مادی و علمی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران و دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

منابع

[1] Biegeleisen, J.Z., Immunoflurecence technique in the retrospective diagnosis, J. Bacteriol., 87 (1964) 1257-58.

[2] Bourry, A., Cochard, T. and Poutrel, B., Serological diagnosis of bovin, caprin, and ovin mastitis caused by Listeria monocytogenes by using an enzyme-linked immunosorbent assay, J. Clin. Microbiol., 35 (1998) 1606-1608.

[3] Bruce, G., Listeriosis, JAMA, 261 (1989) 1313-1330.

[4] Chen, W., Li, D., Paulus, B., Wilson, I. and Chadwick, V.S., Detection of Listeria monocytogenes by polymerase chain reaction in intestinal mucosal biopsies from patients with inflamatory bowel disease and controls, J. Gastroentrol. Hepatol., 15 (2000) 1145-1150.

[5] Davis, B.D., Dulbecco, R., Eisen, H.N. and Ginsberg, H.S., Microbiology, 4th Edition, Lippencott Co., Philadelphia, 1990, pp.

www.SID.ir

Archive of SID

716-721.

[6] Delvallez, M., Purification of a surface-specific soluble antigen from Listeria monocytogenesis, Infect. Immun., 25 (1979) 971-973.

[7] Grad, W., Clinical laboratory methods and diagnosis, 8th edition, Mosby, New York, 1980.

[8] Jaton, K., Sahli, R. and Bille, J., Development of polymerase chain reaction assay for detection of Listeria monocytogenes in clinical cerebrospinal fluid samples, J. Clin. Microbiol., 30 (1992) 1931-1936.

[9] Kerdahi, K.F. and Istefanson, P.F., Rapid determination of Listeria monocytogenes by automated enzyme-linked immunoassay and nonradioactive DNA probe, J. AOAC. Int., 83 (2000) 86-88.

[10] Khan M.A., Immunoflurecent identification of Listeria monocytogenes, Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr, Hygi Abta., 239 (1977) 62-69.

[11] Krasovskii, V.V., Pokhil, S.L., Limanskii, O.I. and Timchenko, E.N., Development and approbation of polymerase chain reaction for detection of pathogen in Listeria infection, Klin. Lab. Diagn., 6 (2000) 37-41.

[12] Robert, E., Presence and persistence of Listeria monocytogenes in food and water, Food Technol., April (1988) 162-164.

[13] Scheu, P., Gasch, A. and Bergouf, K., Rapid detection of Listeria monocytogenes by PCR-ELISA, Applied Microbiol., 26 (1999) 416-420.

[14] Solve, M., Boel, J., and Norrung, B., Evaluation of a monoclonal antibody able to detect live Listeria monocytogenes and Listeria innocula, Int. J. Food Microbiol., 57 (2000) 219-224.

[15] Tripolitova, A.A., Indirect heamaglotination test for demonestrating antibodies to Listeria, J. Veterinary, 26 (1955) 74-77.

www.SID.ir