

پایه‌ریزی روش الیزا و بررسی قدرت آن در تشخیص افراد حساس به زعفران

اعظم صامعی* ، دکتر عبدالرضا وارسته**

خلاصه

سابقه و هدف: با توجه به حساسیت‌زایی زعفران در انسان و عوارض شناخته شده آن، این تحقیق به منظور پایه‌ریزی روش الیزا و تعیین قدرت آن در تشخیص افراد حساس به زعفران در مراجعه‌کنندگان به مرکز بهداشتی شهرستان گناباد طی سال ۱۳۷۳ انجام گرفت.

مواد و روشها: برای پایه‌ریزی روش الیزا تحقیق به روش توصیفی (Descriptive) از نوع اکتشافی و در مرحله دوم برای تشخیص قدرت آن از روش کارآزمایی بالینی از نوع تشخیصی استفاده گردید. آزمایش پوستی Prick با استفاده از عصاره تام‌گرده زعفران بر روی ۴۳ بیمار که سابقه حساسیت داشتند صورت پذیرفت. افرادی که نتیجه آزمایش پوستی آنها مثبت بود به عنوان گروه مورد و افرادی که نتیجه آزمایش پوستی آنها منفی می‌باشد به عنوان گروه شاهد تلقی شدند. در این پژوهش، آزمایش الیزا بر روی سرم افراد مذکور انجام گرفت. در صورتی که OD سرم مساوی یا بیشتر از ۰/۳ بود به عنوان نمونه مثبت مد نظر قرار گرفت. حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت، منفی و کارایی کلی آزمایش تعیین گردید.

یافته‌ها: از ۴۳ نفر مورد بررسی، ۲۳ نفر حساس و ۲۰ نفر غیرحساس به گرده زعفران شناسایی شدند. نتایج حاصل از آزمایش الیزا نشان داد که از ۲۳ فرد حساس به زعفران براساس آزمایش پوستی پریک، ۱۸ نفر حساس و ۵ نفر غیرحساس به زعفران می‌باشند. همبستگی دو روش فوق ۷۸ درصد، ویژگی آزمایش الیزا ۱۰۰ درصد و ارزش پیش‌بینی مثبت آن ۱۰۰ درصد بود.

نتیجه‌گیری: با توجه به قدرت کامل روش توسعه یافته الیزا در تشخیص افراد حساس به زعفران، از این آزمایش می‌توان برای تشخیص افراد حساس به ویژه دست‌اندرکاران تولید و عرضه زعفران استفاده نمود.

کلمات کلیدی: زعفران، گرده، آلرژی، الیزا

* دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی کاشان، گروه علوم آزمایشگاهی

** دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی مشهد، دانشکده پزشکی

مقدمه

می‌رود. علاوه بر آن، یکی از روش‌های تشخیص سرولوژیک جهت سنجش IgE اختصاصی، روش الیزا است. این روش یکی از روشهای سنجش ایمنی با استفاده از آنتی‌ژن‌ها می‌باشد که در عین سادگی و با صرفه بودن، از حساسیت و ویژگی بالایی نیز برخوردار می‌باشد (۵). با توجه به اهمیت موضوع و نیز با تکیه بر امکانات موجود، این تحقیق جهت طراحی روش الیزا و تعیین قدرت آن در تشخیص افراد حساس مراجعه‌کننده به مرکز بهداشتی شهر گناباد طی سال ۱۳۷۳ انجام گرفت.

مواد و روشها

برای پایه‌ریزی روش الیزا جهت تشخیص افراد حساس به زعفران، تحقیق به روش توصیفی از نوع اکتشافی و برای تعیین قدرت روش مذکور، تحقیق به روش کارآزمایی بالینی از نوع تشخیصی صورت پذیرفت. در ماه آبان که زمان گل‌دهی زعفران است به شهر گناباد مراجعه شد. افرادی که هنگام گل‌دهی زعفران و کار با آن، دچار ناراحتی‌هایی مانند عطسه و سرفه‌های مکرر، آبریزش بینی، گرفتگی و خارش بینی می‌شدند به عنوان گروه مورد مطالعه انتخاب و توسط پزشکان مستقر در مرکز بهداشت شهرستان گناباد مورد معاینه‌های بالینی قرار گرفتند. آزمایش پوستی Prick روی آنها انجام شد و اطلاعات مربوط به افراد و نتیجه آزمایش پوستی در پرسش‌نامه مربوط ثبت شد.

افرادی که آزمایش پوستی آنها نسبت به عصاره گرده زعفران در مقایسه با شاهد منفی (محلول PBS) به شدت مثبت بود، انتخاب شدند و از هر یک ۵ سی‌سی خون وریدی جهت تهیه سرم از بیماران گرفته شد و سرم تا زمان انجام آزمایش‌های لازم در فریزر ۲۰- درجه

آلرژن‌ها، آنتی‌ژن‌هایی هستند که واکنش‌های حساسیت شدید زودرس را برمی‌انگیزند. آنها معمولاً پروتئین‌هایی با وزن مولکولی ۵۰/۰۰۰ - ۵۰۰۰ دالتون هستند (۱). یکی از مشکلات جوامع امروزی آلرژی افراد به آلرژن‌ها می‌باشد. که شیوع آن در جامعه تا ۱۰ درصد گزارش شده است. در افراد اتوپیک، آلرژی پس از تماس با مقادیر اندکی از آلرژن‌های نامحسوس گیاهی مانند (گرده گیاهان (Pollen)، ذرات جدا شده از موی حیوانات یا پرندگان و مایت خانگی تولید می‌گردد (۲).

گرده گیاهان یکی از مهمترین علل آلرژی در جهان می‌باشد که از جمله می‌توان به گرده زعفران اشاره نمود. زعفران یکی از محصولات ارزشمند و استراتژیک کشورمان است که جایگاه ویژه‌ای را در صادرات غیر نفتی به خود اختصاص داده است. مطالعات اخیر نشان می‌دهد که آلرژی به زعفران در سطح بالایی به خصوص دست‌اندرکاران کشت و زرع آن وجود دارد (۳). حساسیت به زعفران در اسپانیا نیز گزارش شده است (۴). علائم آلرژی به زعفران کونژونکتیویت، عطسه کردن مکرر، آبریزش بینی، گرفتگی بینی و ... می‌باشد. حساسیت‌زایی زعفران در آینده نه چندان دور ممکن است بین افراد جامعه به خصوص دست‌اندرکاران کشت و زرع آن مشکلات اقتصادی، اجتماعی و روانی رابه‌دنبال داشته باشد.

در حال حاضر اقدامات تشخیصی و پیش‌گیری افراد حساس به زعفران انجام نمی‌گیرد و در صورت مواجهه با بیمار، فقط اقدامات لازم درمانی صورت می‌پذیرد. بنابراین، اولین اقدام برای کاهش مشکل مذکور، تشخیص به موقع افراد حساس می‌باشد. روش آزمایش پریک (in vivo) برای تشخیص افراد حساس به کار

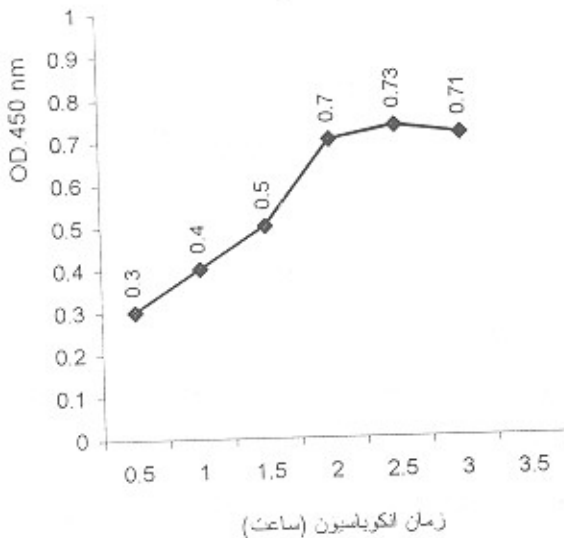
سانتی‌گراد نگهداری شد و افراد مراجعه کننده به کلینیک آلرژی مشهد که به مواد دیگری مانند گرده‌های گل، گرد و خاک منزل و ... حساسیت داشتند ولی آزمایش پوستی آنها به عصاره تام‌گرده زعفران منفی بود به عنوان گروه شاهد تلقی و از آنان نیز مطابق افراد مورد خون‌گیری به عمل آمد. تعداد افراد شاهد ۲۰ نفر بود که از لحاظ سنی و جنسی شبیه افراد مورد بودند. به منظور تهیه عصاره تام، گرده زعفران رادربافر PBS (۱۲۵ میلی‌مولار، $\text{pH}=7/2-7/4$) به مدت ۴۸ - ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد روی میکسر قرار داده و سپس به مدت نیم‌ساعت، با دور ۴۰۰۰ سانتریفوژ گردید (۶). عصاره تهیه شده از چند مرحله فیلتراسیون گذشته، سپس در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری و پروتئین تام این عصاره به روش Bradford اندازه‌گیری شد (۷) که مقدار آن $3 \pm 0/2 \text{ mg/ml}$ بود. برای انجام آزمایش پوستی، عصاره تام با گلیسرول به نسبت ۱:۱ مخلوط شد.

آنتی‌بادی کونژوگه پراکسیداز و سوبسترای آن از شرکت سیگما و میکروپلیت‌های ۹۶ حفره‌ای (8×12) از جنس پلی کشور استیرن از شرکت Nunc دانمارک تهیه و به کار گرفته شد.

برای انجام آزمایش الیزا ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره تام‌گرده‌های زعفران به خانه‌های میکروپلیت اضافه گردید. میکروپلیت در اتاقک مرطوب و ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. سپس میکروپلیت ۳ بار و هر بار به مدت دو دقیقه به کمک بافر ($20 \text{ Tween } 20 + 0/05 \text{ PB}$) شسته شده، آب اضافی درون میکروپلیت با برگردان آنها بر روی صفحه کاغذ صافی و زدن ضربات نسبتاً شدید خارج گردیدند. آن‌گاه محلول اشباع کننده (BSA) ۱ درصد در بافر فسفات سالین) به مقدار

۱۵۰ میکرولیتر به منظور مسدود کردن فضاهای خالی میکروپلیت به آن افزوده، به مدت ۳۰ دقیقه در اتاقک مرطوب و ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. دوباره ۳ بار شستشو، مطابق روش بالا انجام گرفت. از سرم بیماران و سرم شاهد به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به هر خانه اضافه گردید. میکروپلیت به مدت ۲ ساعت در اتاقک مرطوب و ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. شستشو ۴ بار دیگر صورت پذیرفت. آن‌گاه از محلول کونژوگه (anti-human IgE - HRP) به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به خانه‌های میکروپلیت اضافه شد و مدت یک ساعت در اتاقک مرطوب و ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. شستشو (۵ مرتبه $\times 2$ دقیقه) انجام گرفت. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوبسترای آنزیم ($\text{TMB} - \text{H}_2\text{O}_2$) به خانه‌های میکروپلیت اضافه و میکروپلیت به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه و مکان تاریک نگهداری شد. آن‌گاه ۵۰ میکرولیتر اسیدکلریدریک ۲ نرمال به منظور توقف واکنش به خانه‌های میکروپلیت اضافه شد و میزان جذب خانه‌های میکروپلیت در طول موج ۴۵۰ نانومتر توسط دستگاه خواندن نتایج (ELISA Reader) قرائت گردید. برای تعیین Cut-off، میانگین چگالی نوری در ۴ شاهد منفی محاسبه شد و سپس Cut-off با استفاده از افزودن ضریب ثابت ۲SD به میانگین چگالی نوری به دست آمد ($\text{Cut-off} = \bar{A} \text{ negative} + 2 \text{ SD}$).

در صورتی که OD سرم کمتر از حد Cut-off بود به عنوان فرد سالم و OD بالاتر از حد Cut-off به عنوان فرد حساس به زعفران تلقی شد. میزان حساسیت، ویژگی، ارزش پیش‌بینی مثبت و منفی روش پایه‌ریزی گردیده الیزا در تشخیص افراد حساس به زعفران تعیین شد.



نمودار ۲- اثر زمان انکوباسیون سرم در روش ELISA

نتایج حاصل از انکوباسیون کونژوگه (- anti human IgE - HRP) در زمان‌های مختلف نشان داد که یک ساعت مناسب است.

روش الیزا جهت جستجوی IgE اختصاصی انجام گرفت. از ۲۳ نفر که آزمایش پوستی آنها نسبت به عصاره زعفران مثبت بود، ۱۸ نفر OD بالاتر از حد Cut - off داشتند.

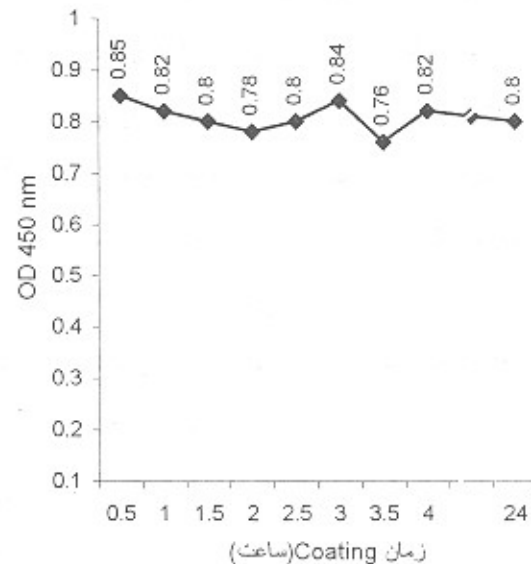
در جدول (۱) قدرت روش پایه‌ریزی شده در تشخیص افراد حساس به زعفران آرایه گردیده است و نشان می‌دهد که اگر روش پیشنهادی، فردی را حساس به زعفران تشخیص دهد به احتمال ۱۰۰ درصد به زعفران آلرژی دارد و اگر روش پیشنهادی نشان دهد که فرد فاقد حساسیت می‌باشد به احتمال ۸۰ درصد به زعفران حساسیت نخواهد داشت.

میزان حساسیت روش پیشنهادی برابر با ۷۸/۳ درصد، میزان ویژگی ۱۰۰ درصد، ارزش پیش‌بینی مثبت و منفی به ترتیب ۱۰۰ و ۸۰ درصد و کارایی کلی آن ۸۸ درصد بود.

یافته‌ها

از ۲۳ نفر حساس به زعفران، ۱۴ نفر (۶۰/۹ درصد) زن و ۹ نفر (۳۹/۱ درصد) مرد بودند. محدوده سنی بیماران ۱۰ تا ۷۰ سال و بیشتر آنها (۵۲ درصد) در گروه سنی ۳۰ - ۱۰ سال قرار داشتند. مهم‌ترین علامت شکایت بیماران، رینیت (۹۵/۶ درصد)، کهیر و آسم (هر یک ۹ درصد) در مرحله بعدی بود.

نتایج آزمایش‌های با زمان‌های مختلف انکوباسیون عصاره تام‌گرده زعفران نشان داد که انکوباسیون ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای اتصال آلرژن‌ها به فاز جامد کافی می‌باشد (نمودار ۱).



نمودار ۱- اثر زمان Coating در روش ELISA

انکوباسیون سرم در زمان‌های مختلف بیانگر آن است که دو ساعت برای اتصال ماکزیم IgG اختصاصی به آلرژن‌های زعفران مناسب است (نمودار ۲).

جدول ۱- قدرت روش پایه ریزی شده الیزا در تشخیص افراد حساس به زعفران

جمع	غیرحساس	حساس	تشخیص قطعی براساس آزمایش پوستی Prick
			تشخیص با روش الیزا
۱۸ (۴۱/۹)	۰	۱۸	حساس
۲۵ (۵۸/۱)	۲۰	۵	غیرحساس
۴۳ (۱۰۰)	۲۰ (۴۶/۵)	۲۳ (۵۳/۵)	جمع

بحث

میزان ویژگی و ارزش پیش بینی مثبت آن ۱۰۰ درصد است. همان گونه که ذکر گردید این روش طراحی شده برای اولین بار در تشخیص افراد حساس به زعفران به کار رفته است و در نتیجه دارای پیشینه ای نیست که بحث با آنها انجام گیرد. به علت این که نتایج مثبت واقعی بالا است، آزمایش به اندازه کافی ارزش دارد.

همبستگی این روش با آزمایش پوستی V_8 prick درصد به دست آمد. مطالعات دیگر نشان می دهد که بین روش الیزا و آزمایش پوستی prick همبستگی کامل ندارد (۱۱، ۱۰). عدم همبستگی کامل ممکن است به این دلیل باشد که افراد به طور موضعی تحریک شده اند و میزان IgE اختصاصی در سرم بالا نرفته است. بدین صورت که IgE های اختصاصی در سطح مخاطی و پوست قرار گرفته اند که در محل های مذکور به گیرنده های با میزان تمایل بالا (high affinity) خود در سطح ماستوسیت ها متصل گشته و نیمه عمر آن افزایش می یابد.

از طرف دیگر، امکان رقابت سایر ایمونوگلوبولین ها (به صورت عمده IgG) با IgE برای اتصال به آلرژن بوده، این پدیده سبب کاستن اتصال IgE به آلرژن و یک کمبود کاذب IgE اختصاصی در سرم می شود (۲).

روش الیزا از جمله آزمایش هایی است که برای نشان دادن و اندازه گیری عیار آنتی بادی IgE بر علیه آلرژن ها مورد استفاده قرار می گیرد، بسیاری از عوامل در راه اندازی و به کارگیری روش الیزا مؤثر و تعیین کننده می باشند که باید با روش های مناسب نسبت به استاندارد کردن آنها اقدام نمود (۸).

با استفاده از آزمایش الیزا می توان تعداد زیادی نمونه سرم را در زمان کوتاهی مورد ارزیابی قرار داد. حساسیت روش الیزا مشابه رادیوایمونواسی است. با این مزیت که با استفاده از آزمایش الیزا از خطرات ناشی از مواد رادیواکتیو مصونیت وجود دارد. الیزا سریع و تکرار پذیر است. عوامل شیمیایی (Reagents) به کار رفته در روش الیزا بدون خطر و نسبتاً ارزان بوده و می توان آنها را برای مدت تقریباً طولانی نگه داری کرد (۹). مراحل انجام آزمایش ساده بوده و شامل تهیه رقت، انکوباسیون و شستشو می باشد. با توجه به مزیت های روش الیزا در این تحقیق به ارزیابی دقت و حساسیت آن در تشخیص افراد حساس به زعفران پرداخته شد.

این تحقیق نشان داد که روش پایه ریزی شده الیزا قادر به تشخیص افراد حساس به زعفران می باشد، زیرا

تشکر و قدردانی

داشتند قدردانی و تشکر می‌شود. از کارکنان گروه ایمنولوژی و افراد مورد مطالعه نیز تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی مشهد به خاطر تأمین هزینه‌های مورد نیاز و همکاری که در اجرای طرح

References:

1. Mygind N. Essential allergy. 2nd ed. Philadelphia: Black well scientific; 1996 : 81.
2. Roitt I. Essential immunology. 9th ed. Philadelphia: Black well scientific; 1997: 330-331.
- 3 - فریدحسینی ر. گزارش اولیه آلرژی به زعفران از ایران: نشریه گشتگ. ۱۳۷۲؛ ۱ (۱): ۴۴.
4. Feo F. Martinez J. occupational allergy in saffron workers. Allergy. 1997; 52: 633-641.
5. Kemeny DM. Challacombe SJ. ELISA and other solid phase immunoassays. 2nd ed. Newyork: John wiley and sons; 1988: 1-3.
- 6 - اسکویی م. اثبات آلرژن‌سیته زعفران. پایان نامه جهت اخذ دکترای علوم آزمایشگاهی. دانشگاه علوم پزشکی مشهد؛ ۱۳۷۳: ۴۸-۳۷.
7. Walker JM. Methods in molecular biology. 1st ed. Vol 2. Sr Louis: Humana; 1988: 25-28.
8. Kemeny DM. A practical guide to ELISA. 1st ed. Philadelphia; Pergamon; 1991: 69-79.
9. Henry JB. Clinical diagnosis and management by laboratory methods. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders; 1991: 862-863.
10. Kim YJ. Park HS. Skin reactivity and specific IgE antibody to two nonbiting midges in Korean respiratory allergy patients. J Korean Med Sci. 1994; 99: 21-28.
11. Kelly KJ. Kurup V. Zacharisen M. Skin and serologic testing in the diagnosis of latex allergy. J Allergy Clin Immunol. 1993; 91: 1140-1145.