

## طراحی و تعیین اعتبار کیت‌های تشخیصی الیזای غیرمستقیم و رقابتی

### برای تشخیص بروسلوز در انسان

رضا شاپوری<sup>\*</sup> PhD، عباسعلی ایمانی فولادی<sup>۱</sup> PhD.

مهدی رهنما<sup>۲</sup> PhD، مرتضی ایزدی<sup>۳</sup> MD

آدرس مکاتبه: گروه میکروبیولوژی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، ایران

rezashapoury@yahoo.com

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۸/۲/۲۱

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۷/۱۰/۱۵

### چکیده

**اهداف.** هدف این مطالعه طراحی و تعیین اعتبار الیزای غیرمستقیم و الیزای رقابتی برای تشخیص بروسلوز انسانی در مقایسه با سایر روش‌های سرولوژیک معمول بود.

**روش‌ها.** برای تهیه لیپوپلی‌ساکارید (LPS)، از بروسلا/بورتنوس S99 استفاده شد. LPS با روش فنل داغ همراه با هضم آنزیمی استخراج گردید. میکروپلیت‌های الیزا با LPS پوشیده شدند. برای الیزای غیرمستقیم از آنتی‌بادی کونژوگه مونوکلونال IgG1 انسانی و برای الیزای رقابتی از آنتی‌بادی مونوکلونال موشی M84 استفاده شد.

**یافته‌ها.** حد آستانه برای الیزای غیرمستقیم با استفاده از نمونه‌های سرمی منفی برابر با ۲۱/۶۳-۱۷/۹۲٪ مثبت بودن و برای الیزای رقابتی، ۵۳/۲۹-۵۶/۹۱٪ مهار کردن به‌دست آمد. اختصاصیت این روش برای الیزای غیرمستقیم ۹۵/۵٪ و برای رقابتی ۹۹/۵٪ است. حساسیت الیزای غیرمستقیم ۱۰۰٪ و الیزای رقابتی ۹۶/۹۴٪ به‌دست آمد. ارزش اخباری مثبت الیزای غیرمستقیم ۹۳/۳۳٪ و رقابتی ۹۸/۹۶٪ و ارزش اخباری منفی الیزای غیرمستقیم ۱۰۰٪ و رقابتی ۹۸/۵۱٪ بود. هم‌خوانی نتایج این روش برای الیزای غیرمستقیم ۹۶/۹۸٪ و برای رقابتی ۹۸/۶۶٪ بود.

**نتیجه‌گیری.** هر دو روش الیزای غیرمستقیم و به‌ویژه الیزای رقابتی، روش‌هایی حساس، اختصاصی، سریع و آسان برای تشخیص بروسلوز انسانی هستند.

**کلیدواژه‌ها:** بروسلوز، الیزای غیرمستقیم، الیزای رقابتی

## مقدمه

گونه‌های بروسلا، کوکوباسیل‌های گرم منفی هوازی و عامل بیماری بروسلاز در انسان و حیوانات هستند [۱]. بروسلا می‌تواند از راه مخاط و پوست وارد شده و بیماری سیستمیک ایجاد نماید. تظاهرات بالینی بروسلاز در انسان به سه شکل حاد، تحت‌حاد و مزمن تقسیم‌بندی می‌شود [۲].

انسان معمولاً در اثر تماس با حیوانات اهلی آلوده مانند گاو، گوسفند، بز و خوک و یا استفاده از شیر، پنیر، خامه و سایر لبنیات غیراستریل و آلوده دچار عفونت با بروسلا می‌گردد. عفونت اکتسابی از حیوانات دیگر مانند شتر و حیوانات حیات وحش مانند بوفالو و گوزن شمالی نیز دیده می‌شود. شیوع جغرافیایی بروسلاز انسانی، وسیع و تقریباً در تمام نقاط دنیا دیده می‌شود. در ایران نیز بروسلاز از شیوع بالایی برخوردار است [۲، ۳].

LPS مهم‌ترین آنتی‌ژن سطحی بروسلا است که پلی‌ساکارید O اصلی‌ترین ساختار آن محسوب می‌شود [۱، ۴]. تمامی سویه‌های صاف در تست‌های آگلوتیناسیون با آنتی‌بادی تهیه‌شده از کلونی‌های صاف، واکنش متقاطع زیادی نشان می‌دهند. واکنش متقاطع در بین سویه‌های غیرصاف نیز در تست‌های آگلوتیناسیون با آنتی‌بادی تهیه شده بر ضد کلونی‌های غیرصاف وجود دارد [۱].

از تست‌های تشخیصی مهم برای بروسلاز، آزمایشات باکتریولوژی و سرولوژی است. در اشکال تحت‌حاد و مزمن، تشخیص مشکل‌تر است. روش‌های سنجش ایمنی شامل اندازه‌گیری آنتی‌ژن یا آنتی‌ژن‌ها با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی است. برای این منظور از شیوه‌های متعدد همانند رادیوایمنواسی، ایمنوفلورسانس و الایزا استفاده می‌شود. الایزا نسبت به سایر روش‌های ایمنواسی از مزایایی همچون حساسیت بالا، قابلیت اندازه‌گیری همزمان چند نوع آنتی‌ژن، سادگی روش انجام، هزینه کمتر و عدم مخاطره برای پرسنل، برخوردار است [۴-۶].

در الایزا غیرمستقیم، سرم رقیق‌شده به فاز جامد پوشیده‌شده با آنتی‌ژن‌ها اضافه می‌گردد. در مرحله بعد، آنتی‌بادی نشاندار ضد آنتی‌بادی اول افزوده می‌شود و در صورت وجود واکنش‌های اختصاصی بین آنتی‌ژن و آنتی‌بادی و تجزیه سوبسترای رنگ‌زا، واکنش رنگی ایجاد می‌شود. حساسیت این روش در مقایسه با روش الایزا مستقیم بیشتر است. اساس الایزا رقابتی، رقابت بین آنتی‌ژن در اتصال به یک آنتی‌بادی است. ممکن است این روش برای رقابت دو آنتی‌بادی در اتصال به یک آنتی‌ژن طراحی گردد. اگر هر دو آنتی‌ژن (یا هر دو آنتی‌بادی، بسته به نوع روش طراحی) با هم اضافه شوند، روش رقابتی بوده و اگر ابتدا آنتی‌ژن غیرنشاندار و سپس آنتی‌ژن نشاندار اضافه شود، روش مهارتی نامیده می‌شود. ویژگی (اختصاصیت) روش الایزا رقابتی و مهارتی بیشتر از الایزا مستقیم است [۴، ۵، ۶].

هدف این تحقیق طراحی روش‌های تشخیصی ساده، سریع، حساس و اختصاصی برای بروسلاز انسانی بر پایه الایزا غیرمستقیم و رقابتی است.

## روش‌ها

سویه مورد استفاده: برای تهیه آنتی‌ژن LPS بروسلا از واریته نوع ۱ *Brucella abortus* S99 استفاده شد. سویه مورد نظر صاف است و برای رشد نیازی به حضور دی‌اکسیدکربن در محیط ندارد.

استخراج LPS: استخراج LPS با استفاده از روش فنل داغ همراه با هضم آنزیمی [۳، ۷] انجام گرفت. به‌طور خلاصه به ۵۰ گرم وزن مرطوب سلولی در ۱۷۰ میلی‌لیتر آب مقطر، ۱۹۰ میلی‌لیتر محلول فنل (v/v) ۹۰٪ افزوده و در حرارت ۶۶°C به مدت ۳۰ دقیقه مخلوط شد. سپس لایه فنلی جدا شده و LPS توسط متانول سرد رسوب داده شد. پس از دیالیز و خارج شدن فنل، در دو مرحله جداگانه برای حذف آلودگی‌های پروتئینی و اسیدهای نوکلئیک، LPS با آنزیم‌های پروتئیناز K، DNase و RNase تیمار شد. در انتها، LPS با افزودن متانول سرد رسوب و به یودر تبدیل گردید (لیوفیلیزه).

آنالیزهای شیمیایی: میزان آلودگی نمونه LPS بروسلا با پروتئین به روش برادفورد و میزان آلودگی با اسیدهای نوکلئیک با اندازه‌گیری در  $A_{260}$  تعیین گردید. همچنین، اندازه‌گیری مقدار کلی کربوهیدرات‌ها با استفاده از روش فنل - اسیدسولفوریک و غلظت LPS در نمونه استخراج شده با کمک معرف DMB محاسبه شد [۳، ۷].

نمونه‌های سرمی: نمونه‌های سرم انسانی شامل ۹۸ نمونه مثبت (نمونه‌های بروسلا جدا شده از کشت خون این افراد)، ۱۰۰ نمونه سرم منفی از افراد ساکن در شهر و ۱۰۰ نمونه سرمی منفی از افراد ساکن در مناطق روستایی بدون سابقه برخورد با بروسلا و یا مصرف فرآورده‌های گوشتی و لبنی مشکوک است.

طراحی الایزا غیرمستقیم: برای به‌دست آوردن رقت مناسب آنتی‌ژن (LPS) جهت تثبیت شدن، رقت‌های مناسب سرم و آنتی‌بادی انسانی مونوکلونال کونژوگه با آنزیم پراکسیداز، از روش جدول متقاطع تیتراسیون استفاده شد [۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲].

LPS در بافر کربنات ۰/۰۵ مولار با pH ۹/۶، غلظت نهایی یک میکروگرم بر میلی‌لیتر و به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک افزوده شد. پلیت به مدت یک شب در دمای ۴°C قرار داده شد و پس از شست‌وشو (PBS ۰/۰۱ مولار با pH ۷/۲ حاوی توئین ۲۰، ۰/۰۵٪)، محلول مهارکننده به مقدار ۳۰۰ میکرولیتر (PBS ۰/۰۱ مولار با pH ۷/۲ حاوی توئین ۲۰، ۰/۰۵٪ به همراه ۱٪ آلبومین سرم گاوی و ۰/۰۵٪ NaN<sub>3</sub>) به چاهک‌ها افزوده شد. پس از شست‌وشو، نمونه‌های سرمی را با رقت ۱/۱۰۰۰ در بافر رقیق‌کننده (PBS ۰/۰۱ مولار با pH ۶/۳ حاوی توئین ۲۰، ۰/۰۵٪، ۷/۵ میلی‌مولار EDTA و ۷/۵ میلی‌مولار EGTA) رقیق کرده و به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به چاهک‌ها اضافه شد. پس از ۳۰ دقیقه چاهک‌ها شسته شده و

ارزش اخباری مثبت، ارزش اخباری منفی و همخوانی نتایج نیز مورد محاسبه قرار گرفت [۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲].

کشت و جداسازی بروسلا از خون: نمونه خون وریدی افراد مشکوک به بروسلوز در محیط کشت دی‌فازیک کاستاندا تلقیح شد. گرم‌خانه‌گذاری در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  و  $5\% \text{CO}_2$  انجام گرفت. نمونه‌های منفی تا ۸ هفته نگهداری و سپس نتیجه گزارش می‌شد. نمونه‌های مثبت از لحاظ آگلوتینه شدن با آنتی‌سرم استاندارد بروسلا (تهیه شده از انستیتو پاستور کرج؛ واحد تولید واکسن‌های باکتریایی) تایید شدند. آزمون‌های مقایسه‌ای: در این تحقیق، اعتبار الایزاهای طراحی شده با نتایج دو روش معمول سرولوژیک مورد استفاده در تشخیص بروسلوز انسانی، تست آگلوتیناسیون لوله‌ای و کومبس رایت مورد مقایسه قرار گرفت. تست آگلوتیناسیون لوله‌ای و کومبس رایت طبق روش استاندارد انجام گرفتند [۱].

## نتایج

استخراج لیپوپلی‌ساکراید بروسلا /آبورتوس: LPS بروسلا /آبورتوس S99 استخراج شده با روش فنل داغ همراه با هضم آنزیمی از لحاظ نسبت LPS به کربوهیدرات  $87\%$  و میزان آلودگی نمونه به پروتئین  $>2$  و اسیدنوکلئیک  $>1$  بعد از تیمار آنزیمی بود.

نتایج طراحی الایزای غیرمستقیم و رقابتی: در جدول ۱ میانگین جذب نوری چاهک‌های بلانک، نمونه‌های سرمی منفی، نمونه‌های سرمی مثبت قوی و نمونه‌های سرمی مورد آزمون مشاهده می‌شود. با توجه به این جدول، حد آستانه برای الایزای غیرمستقیم براساس نمونه‌های منفی تهیه‌شده از ساکنین مناطق شهری برابر با  $17/92$  P% و برای نمونه‌های منفی ساکنین روستایی  $21/63$  P% به‌دست آمد.

جدول ۱) میانگین جذب نوری (OD) نمونه‌ها برای الایزای غیرمستقیم رقابتی

نمونه	جذب نوری برای الایزای غیرمستقیم (mean±SD*)	جذب نوری برای الایزای رقابتی (mean±SD*)
بلانک	$0/08 \pm 0/006$	$0/08 \pm 0/004$
منفی تهیه‌شده از ساکنین مناطق شهری	$0/12 \pm 0/01$	$1/81 \pm 0/24$
منفی تهیه‌شده از ساکنین مناطق روستایی	$0/145 \pm 0/017$	$1/73 \pm 0/11$
مثبت قوی	$1/83 \pm 0/22$	$1/67 \pm 0/15$
نمونه‌های مورد آزمون و کشت مثبت	$0/67 \pm 0/27$	$0/78 \pm 0/09$

\*SD: Standard deviation

آنتی IgG1 انسانی مونوکلونال کونژوگه با منشاء موشی (Rockland) با رقت  $1/10000$  به مقدار  $100$  میکرولیتر به چاهک‌ها اضافه و پلیت برای یک ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. پس از شست‌وشو، محلول سوپسترا به مقدار  $100$  میکرولیتر به هر چاهک اضافه و پلیت برای  $20$  دقیقه در  $37^{\circ}\text{C}$  انکوبه شد. پس از افزودن محلول متوقف‌کننده (محلول  $4\% \text{SDS}$ )، میزان جذب نوری پلیت در طول موج  $450$  نانومتر با دستگاه الایزایدر قرائت شد. لازم به ذکر است که نمونه‌ها به‌صورت سه‌تایی کار شدند [۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲].

طراحی الایزای رقابتی: مراحل تعیین غلظت مناسب آنتی‌ژن تثبیت‌شونده، آنتی IgG1 موشی کونژوگه و محلول‌های مورد استفاده، مشابه با روش الایزای غیرمستقیم است. البته در روش الایزای رقابتی بافر رقیق‌کننده فاقد EGTA است [۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲].

LPS در بافر کربنات تهیه و به چاهک‌ها افزوده شد. پس از شست‌وشو، محلول مهارکننده را افزوده و پس از انکوباسیون و شست‌وشو، مقدار  $50$  میکرولیتر آنتی‌بادی مونوکلونال ضد اپی‌توپ‌های اختصاصی OPS بروسلا (M۸۴) (Jackson Laboratories Inc) با منشاء موشی با رقت  $1/1000$  (طبق توصیه شرکت سازنده) در بافر رقیق‌کننده به هر چاهک اضافه شد. بلافاصله  $50$  میکرولیتر از نمونه سرم با رقت  $1/10$  (رقیق شده در بافر رقیق‌کننده) به چاهک‌ها افزوده و پلیت به مدت  $30$  دقیقه همراه با  $10$  دقیقه شیک کردن در دمای اتاق انکوبه شد. پس از شست‌وشو، آنتی IgG1 موشی کونژوگه با منشاء بزبی با رقت  $1/10000$  (Jackson Laboratories Inc) به مقدار  $100$  میکرولیتر به چاهک‌ها اضافه کرده و بقیه مراحل همانند روش الایزای غیرمستقیم انجام شد [۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲].

تعیین اعتبار الایزاهای طراحی شده: جهت محاسبه حد آستانه، از  $200$  نمونه سرمی بروسلوز منفی در دو گروه صد نفری ساکن در مناطق شهری و روستایی و  $98$  نمونه مثبت استفاده شد. حد آستانه در الایزای غیرمستقیم و الایزای رقابتی طراحی شده از طریق فرمول‌های ذیل محاسبه شد.

برای الایزای غیرمستقیم میزان حد آستانه براساس مقدار جذب میانگین نمونه‌های سرم منفی برابر با آن میزان از درصد مثبت بودن و با فرمول زیر محاسبه شد.

$$\text{Positivity \% (P\%)} = (\text{mean OD sample} / \text{mean OD strong positive}) \times 100$$

برای الایزای رقابتی، میزان حد آستانه براساس مقدار جذب میانگین نمونه‌های سرم منفی برابر با آن میزان از درصد مهار واکنش و با فرمول زیر محاسبه شد.

$$\text{Inhibition \% (I\%)} = 100 - [(\text{mean OD sample} / \text{mean OD strong positive}) \times 100]$$

برای تعیین دقت و تکرارپذیری الایزاهای طراحی شده، از سه نمونه سرمی مثبت قوی، مثبت ضعیف و منفی با دو روش درون‌سنجی و برون‌سنجی استفاده شد. همچنین حساسیت، اختصاصیت (ویژگی)،

**جدول ۵) نتایج حاصل از قرائت جذب نوری نمونه‌ها در آزمایش برون‌سنجی (Inter assay) برای الیزای رقابتی**

میزان جذب نوری در آزمایش درون‌سنجی			
سنجش نمونه ↓	میانگین انحراف از معیار (Mean) (SD)	درصد ضریب تغییرات (CV%)	تعداد دفعات تکرار
منفی	۱/۸۳	۰/۴	۴/۷
مثبت ضعیف	۰/۷۵	۰/۰۹	۴/۱۹۱
مثبت قوی	۰/۵۳	۰/۰۷	۵/۱۲

در جدول ۶ نتایج حاصل از تعیین اعتبار الیزای غیرمستقیم و رقابتی در مقایسه با روش‌های آگلوتیناسیون لوله‌ای و آزمایش کومبس رایت ارائه شده است. با توجه به جدول مشخص می‌شود که از ۹۸ مورد نمونه سرمی با کشت خون مثبت، در روش الیزای غیرمستقیم همه مثبت و مبتلا به بروسولوز شناخته شدند. در حالی که در آزمون الیزای رقابتی ۹۵ مورد مثبت و ۳ مورد از این افراد منفی گزارش شدند. این موارد برای روش لوله‌ای برابر با ۹۲ و برای روش کومبس ۹۴ مورد مثبت از ۹۸ نمونه کشت مثبت بود. بنابراین در این مقایسه مشخص می‌شود که روش الیزای غیرمستقیم طراحی شده فاقد جواب منفی کاذب است. در حالی که در این بررسی، روش الیزای رقابتی دارای ۳، روش کومبس دارای ۴ و روش لوله‌ای دارای ۶ منفی کاذب است.

**جدول ۶) نتایج حاصل از تعیین اعتبار الیزای غیرمستقیم و رقابتی در مقایسه با روش‌های آگلوتیناسیون لوله‌ای (SAT) و آزمایش کومبس رایت (Coombs)**

شاخص ←			
آزمون ↓			
+	-	+	-
۳	۹۵	۰	۹۸
۴	۹۴	۶	۹۲
۱۰۰	۰	۹۸	۲
۱۰۰	۰	۱۰۰	۰
۹۹	۱	۹۳	۷
۹۳/۸۸	۹۵/۹۲	۱۰۰	۹۶/۹۴
(%)			
۱۰۰	۱۰۰	۹۵/۵	۹۹/۵
(%)			
۱۰۰	۱۰۰	۹۳/۳۳	۹۸/۹۶
(%)			
۹۷/۰۹	۹۸/۰۴	۱۰۰	۹۸/۵۱
(%)			
۹۷/۹۹	۹۸/۶۶	۹۶/۹۸	۹۸/۶۶
(%)			

از ۲۰۰ نمونه سرمی منفی تهیه شده از ساکنین مناطق شهری (۱۰۰ نمونه) و روستایی (۱۰۰ نمونه) که کشت خون آنها از لحاظ بروسلا منفی و بدون سابقه ابتلا به بروسولوز و مصرف گوشت و فرآورده‌های لبنی مشکوک بودند، آزمون‌های لوله‌ای و کومبس هر دو فاقد جواب مثبت کاذب هستند. اما در الیزای غیرمستقیم ۲ مورد از نمونه سرم افراد شهری و ۷ مورد از نمونه سرم افراد روستایی دارای جواب مثبت کاذب است. در روش الیزای رقابتی در نمونه‌های افراد شهری هیچ جواب مثبت کاذبی مشاهده نمی‌شود و در نمونه‌های سرمی افراد روستایی تنها یک مورد دارای جواب مثبت کاذب است.

برای الیزای رقابتی، محاسبه حد آستانه براساس "I%" است. محاسبه براساس میانگین جذب نوری بافر کنترل (تنها آنتی‌بادی مونوکلونال ضد OPS در بافر رقیق‌کننده) انجام شد که عدد حد آستانه برابر با ۵۶/۹۱%، در حالت استفاده از نمونه‌های منفی ساکنین مناطق شهری حد آستانه ۵۴/۹۱% I و با جاگذاری میانگین جذب نوری نمونه‌های منفی روستایی برابر با ۵۳/۲۹% I به دست آمد.

در جداول ۲ و ۳ به ترتیب نتایج حاصل از قرائت جذب نوری نمونه‌ها در آزمایش درون‌سنجی و برون‌سنجی برای الیزای غیرمستقیم ارائه شده است. با توجه به اینکه مقدار درصد ضریب تغییرات کمتر از ۱۵٪ است، بنابراین در ۱۰ بار تکرار آزمایش الیزای غیرمستقیم طراحی شده، دقت و قابلیت تکرارپذیری این روش اثبات شد.

**جدول ۲) نتایج حاصل از قرائت جذب نوری نمونه‌ها در آزمایش درون‌سنجی (Intra assay) برای الیزای غیرمستقیم**

میزان جذب نوری در آزمایش درون‌سنجی			
سنجش نمونه ↓	میانگین انحراف از معیار (Mean) (SD)	درصد ضریب تغییرات (CV%)	تعداد دفعات تکرار
منفی	۰/۱	۰/۰۲	۲/۳۱
مثبت ضعیف	۰/۶۵	۰/۱۵	۳/۰۴
مثبت قوی	۱/۸۵	۰/۳۱	۳/۳۱

**جدول ۳) نتایج حاصل از قرائت جذب نوری نمونه‌ها در آزمایش برون‌سنجی (Inter assay) برای الیزای غیرمستقیم**

میزان جذب نوری در آزمایش درون‌سنجی			
سنجش نمونه ↓	میانگین انحراف از معیار (Mean) (SD)	درصد ضریب تغییرات (CV%)	تعداد دفعات تکرار
منفی	۰/۰۹	۰/۰۳	۲/۸۵
مثبت ضعیف	۰/۶۷	۰/۰۳	۴/۱
مثبت قوی	۱/۸۱	۰/۴۲	۴/۷۲

نتایج حاصل از قرائت جذب نوری نمونه‌ها در آزمایش درون‌سنجی و برون‌سنجی برای الیزای رقابتی به ترتیب در جداول ۴ و ۵ آمده است. برای این روش نیز همانند الیزای غیرمستقیم، مقدار درصد ضریب تغییرات کمتر از ۱۵٪ بود و در ۱۰ بار تکرار الیزای رقابتی طراحی شده، دقت و قابلیت تکرارپذیری این روش نیز اثبات گردید.

**جدول ۴) نتایج حاصل از قرائت جذب نوری نمونه‌ها در آزمایش درون‌سنجی (Intra assay) برای الیزای رقابتی**

میزان جذب نوری در آزمایش درون‌سنجی			
سنجش نمونه ↓	میانگین انحراف از معیار (Mean) (SD)	درصد ضریب تغییرات (CV%)	تعداد دفعات تکرار
منفی	۱/۷۲	۰/۲۳	۳/۵۴
مثبت ضعیف	۰/۷۸	۰/۰۷	۴/۲۵
مثبت قوی	۰/۵۱	۰/۰۴	۴/۳۴

نمونه سرم منفی، تعیین افتراق بین حد آستانه نمونه‌های مثبت و منفی بروسلوز در بین هر دو جمعیت شهری و روستایی است. زیرا که روستاییان در مقایسه با افراد شهری به دلیل احتمال برخورد و تماس بیشتر با بروسلوز که یک بیماری دامی می‌باشد، در سرم خود دارای آنتی‌بادی‌هایی هستند که می‌تواند در تفسیر نتایج آزمون تداخل و جواب کاذب ایجاد نماید [۱۵، ۱۷، ۱۸]. بنابراین در تعیین اعتبار دقیق

یک الایزا بایستی تمام جوانب را مدنظر قرار داد و بررسی نمود. استفاده از آنتی‌ژن‌های کونژوگه پلی‌کلونال در تشخیص بروسلوز سبب کاهش قیمت نهایی محصول می‌شود. اما از ضعف‌های مهم این نوع آنتی‌ژن‌ها وجود مقادیر بالای جذب نوری زمینه‌ای است که باعث کاهش اختصاصیت روش می‌شود [۴، ۵، ۶]. به همین دلیل در این مطالعه در طراحی الایزای غیرمستقیم از آنتی‌ژن کونژوگه منوکلونال استفاده شد که تنها IgG1 را مورد شناسایی قرار می‌دهد تا از این طریق، میزان جذب نوری زمینه کاهش و اختصاصیت روش بیشتر شود.

حد آستانه الایزای رقابتی در حالت استفاده از کنترل بافر ۵۶/۹۱٪ I، استفاده از نمونه‌های منفی افراد شهری ۵۴/۹۱٪ I و برای نمونه‌های منفی افراد روستایی ۵۳/۲۹٪ I به‌دست آمد.

در بررسی‌های دیگر [۸] جهت طراحی الایزای رقابتی، برای بروسلوز گاوی حد آستانه را ۴۰٪ I گزارش کردند. در بررسی دیگری [۱۲] در طراحی الایزای رقابتی، حد آستانه کیت را برای بروسلوز گوسفندی ۲۳/۶٪ I، بز ۲۱/۸٪ I و برای مجموع دو حیوان (با هم) ۲۵٪ I گزارش کردند. در مطالعه دیگری [۱۹] در طراحی الایزای رقابتی برای تشخیص بروسلوز انسانی از دو نمونه مختلف سرم منفی افراد شهری و روستایی استفاده کردند و ارزش I را برای افراد شهری ۱۲/۰۹ و برای افراد روستایی ۱۲/۶۳ گزارش کردند. اما در تعیین حد آستانه، هر دو نمونه سرمی حد آستانه یکسان و ۲۸٪ I را نشان دادند. معمولاً روش الایزای رقابتی نسبت به روش الایزای غیرمستقیم دارای اختصاصیت بیشتری است ولی حساسیت روش الایزای غیرمستقیم بیش از رقابتی است [۵]. در این مطالعه نیز حساسیت روش الایزای غیرمستقیم بیشتر از رقابتی (۳/۰۶٪ بیشتر) است و اختصاصیت در روش رقابتی کارایی بیشتری (۴٪ بیشتر) نشان داد. اگرچه ارزش اخباری مثبت و ارزش اخباری منفی الایزای رقابتی حداکثر نیست ولی در مجموع، نسبت به روش غیرمستقیم که تنها در ارزش اخباری منفی کارایی بالایی دارد، در هر دو ارزش اخباری مثبت و منفی از کارایی بالایی برخوردار است. این مطلب در مورد شاخص هم‌خوانی نتایج بهتر نمایان است.

در هم‌خوانی نتایج، دو روش کومبس و الایزای رقابتی بیشترین میزان (۹۸/۶۶٪) را نشان می‌دهند. جالب این که در این شاخص، روش لوله‌ای بیشتر از الایزای غیرمستقیم (۱/۰۱٪) شده است. بنابراین با توجه به مطالب فوق و مقدار شاخص هم‌خوانی نتایج، می‌توان اظهار داشت که در تشخیص بروسلوز، الایزای رقابتی در مجموع مناسب‌تر از الایزای غیرمستقیم است.

بیشترین میزان حساسیت در بین روش‌های مورد استفاده مربوط به الایزای غیرمستقیم (با حساسیت ۱۰۰٪) است و حساسیت روش الایزای رقابتی (۹۶/۹۴٪) نیز بیشتر از روش‌های لوله‌ای و کومبس است. در این بررسی، اختصاصیت (ویژگی) ۱۰۰٪ برای روش‌های لوله‌ای و کومبس و ۹۹/۵٪ برای الایزای رقابتی و ۹۵/۵٪ برای الایزای غیرمستقیم به‌دست آمد.

بیشترین مقدار ارزش اخباری مثبت مربوط به روش‌های لوله‌ای و کومبس (۱۰۰٪) و بیشترین مقدار ارزش اخباری منفی مربوط به روش الایزای غیرمستقیم (۱۰۰٪) است. در مجموع، دو روش الایزای رقابتی و روش کومبس رایت دارای بیشترین میزان نتیجه هم‌خوانی (۹۸/۶۶٪) هستند.

## بحث

امروزه بروسلوز مشکلی جهانی است و ایران یکی از مناطق اندمیک با شیوع بالا برای بروسلوز دامی و انسانی محسوب می‌شود [۱، ۲، ۳]. زیان‌های اقتصادی ناشی از بروسلوز در ایران هزینه‌های گزافی را تحمیل می‌کند که می‌توان با هزینه‌های کمتری برنامه پیشگیری، ریشه‌کنی و کنترل بیماری را انجام داد.

امروزه فناوری الایزا به طور چشمگیری توانسته در بسیاری از موارد خود را به‌عنوان یک روش مناسب تشخیصی معرفی کرده و جایگزین روش‌های قبلی شود. علت این امر این است که الایزا سریع و آسان بوده و برای انواع آنتی‌ژن‌ها قابل طراحی است. همچنین، توانایی سنجش تعداد زیادی نمونه به‌طور هم‌زمان، خطای کمتر و مقرون به‌صرفه بودن نیز از مزایای دیگر آن است [۱۳، ۱۴]. بر همین اساس، اهداف این پژوهش طراحی روش‌های تشخیصی جدید با حساسیت و اختصاصیت بالا و سادگی در تشخیص بروسلوز انسانی و تعیین اعتبار این روش‌ها در ایران است.

*B. abortus* S99 به دلیل پایداری آنتی‌ژنیکی، سوبه متداول مورد استفاده در تولید آنتی‌ژن‌های بروسلا برای موارد تشخیصی است [۱۵]. در این تحقیق نیز از S99 برای تولید آنتی‌ژن‌های LPS استفاده شد. ضمن این که آنتی‌ژن تهیه شده از بروسلا/آبورتوس S99 می‌تواند در تهیه کیت‌های تشخیصی عفونت‌های بروسلا/ملی‌تنسیس و سوئیس نیز استفاده شود [۱۴، ۱۶].

برای پر کردن فضاهای خالی موجود در چاهک‌های پلیت الایزا و جلوگیری از واکنش‌های غیراختصاصی، از بافر بلوک‌کننده استفاده می‌شود. به‌این منظور، از بافر PBS ۰/۰۱ حاوی توین ۲۰، ۰/۰۵٪ به همراه ۱٪ آلبومین سرم گاوی که (فراوان‌ترین بافر بلوک‌کننده مورد استفاده در تولید انواع کیت‌های تجاری الایزا) استفاده شد. تا به بهترین وجه از بروز واکنش‌های غیراختصاصی جلوگیری به‌عمل آید. در الایزای غیرمستقیم، حد آستانه در صورت استفاده از سرم‌های منفی تهیه‌شده از افراد شهری ۱۷/۹۲٪ P و در صورت استفاده از سرم افراد روستایی ۲۱/۶۳٪ P به‌دست آمد. علت استفاده از دو نوع

- 4- Dudley RA, Edwards P, Ekins RP, Finney DJ, McKenzie IG, Raab GM, et al. Guidelines for immunoassay data processing. *Clinical Chemistry*. 1985;31(8):1264-71.
- 5- Crowther JR. The ELISA guidebook. New Jersey: Humana Press; 2001.
- 6- Maggio ET. Enzyme Immunoassay. CRC Press; 1981.
- 7- Al-Attas RA, Al-Khalifa M, Al-Qurashi AR, Badawy M, Al-Gualy N. Evaluation of PCR, culture and serology for the diagnosis of acute human brucellosis. *Annals of Saudi Medicine*. 2000;20(3/4):224-8.
- 8- Samartino L, Gall D, Gregoret R, Nielsen K. Validation of enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of bovine brucellosis. *Veterinary Microbiology*. 1999;70(3-4):193-200.
- 9- Nielsen KH, Kwok A. Reuse of polystyrene 96 well plates for indirect enzyme immunoassay for detection of antibody to *Brucella abortus*. *Arch Med Vet*. 1995;27:39-43.
- 10- Saegerman C, De Waele L, Gilson D, Godfroid J, Thiange P, Michel P, Limbourg B, O Vo TK, Limet J, Letesson JJ, Berkvens D. Evaluation of three serum i-ELISA using monoclonal antibodies and protein G as peroxidase conjugate for the diagnosis of bovine brucellosis. *Vet Microbio*. 2004;100:91-105.
- 11- Fosgate GT, Adesiyun AA, Hird DW, Hietala SK. Likelihood ratio estimation without a gold standard: A case study evaluating a brucellosis c-ELISA in cattle and water buffalo of Trinidad. *Preventive veterinary medicine*. 2006;75(3-4):189-205.
- 12- Minas A, Stournara A, Christodoulouopoulos G, Katsoulos PD. Validation of a competitive ELISA for diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. *The Veterinary Journal*. 2008;177(3):411-7.
- 13- Nielsen K. Diagnosis of brucellosis by serology. *Vet Microbio*. 2002;90(1-4):447-59.
- 14- Bricker BJ. Diagnostic strategies used for the identification of *Brucella*. *Vet Microbio*. 2002;90(1-4):433-4.
- 15- Corbel MJ, Bracewell CD, Thomas EL, Gill KPW. Techniques in the identification of *Brucella* species. *Identification Methods for Microbiologists*. 2nd ed. Skinner FA, Lovelock DW, editors. Academic Press; 1979. p. 86-9.
- 16- Weissbach A, Hurwitz J. The formation of 2-keto-3-deoxyheptonic acid in extracts of *Escherichia coli* B. I. Identification. *J Biol Chem*. 1959;234(4):705-9.
- 17- Hendry D, Corbel MJ, Bell RA, Stack JA. *Brucella* antigen production and standardization. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Central Veterinary Laboratory, New Haw: Weybridge; 1985. p. 1-96.
- 18- Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM. Techniques for the brucellosis laboratory. Paris: INRA Publications; 1988.
- 19- Lucero NE, Foglia L, Ayala SM, Gall D, Nielsen K. Competitive enzyme immunoassay for diagnosis of human brucellosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999;37(10):3245-8.
- 20- Araj GF, Kattar MM, Fattouh LG, Bajakian KO, Kobeissi SA. Evaluation of the PANBIO *Brucella* immunoglobulin G (IgG) and IgM enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of human brucellosis. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2005;12(11):1334-5.
- 21- Ertek M, Yazgi H, Ozkurt Z, Ayyildiz A, Parlak M. Comparison of the diagnostic value of the standard tube agglutination test and the ELISA IgG and IgM in patients with Brucellosis. *Turkish Journal of Medical Sciences*. 2006;36(3):159-63.

در پژوهشی [۸] جهت طراحی دو روش الایزای غیرمستقیم و رقابتی برای تشخیص بروسلوز گاوی نتایج نشان داد که در گوساله اختصاصیت روش رقابتی ۹۹/۸٪ و روش غیرمستقیم ۹۸/۶٪ است. در گاو این شاخص به ترتیب ۹۷/۵٪ برای روش رقابتی و ۹۵/۸٪ برای روش غیرمستقیم به دست آمد. برای شاخص حساسیت (در گوساله و گاو) روش الایزای غیرمستقیم برابر با ۹۸/۲٪ و روش رقابتی ۹۷/۵٪ محاسبه گردید. همچنین این بررسی نشان داد که سایر روش‌های سرولوژیکی تشخیصی بروسلوز در مقایسه با این دو روش الایزای، اختصاصیت بسیار کمتری دارند.

در مطالعه‌ای [۱۲] جهت طراحی الایزای رقابتی برای تشخیص بروسلوز، حساسیت این روش را برای گوسفند ۹۱/۱٪ و برای بز ۷۶/۵٪ و اختصاصیت را در گوسفند ۹۷/۴٪ و در بز ۹۴/۳٪ اعلام کردند. این تحقیق در مقایسه با الایزای غیرمستقیم، اختصاصیت و حساسیت بیشتری را گزارش کرد.

در پژوهشی دیگر [۲۰] جهت اقدام به طراحی الایزای غیرمستقیم برای بروسلوز انسانی با استفاده از آنتی‌ژن‌های پلی‌کلونال علیه IgG و IgM، نشان داد که حساسیت الایزای IgG ۹۱٪ و الایزای IgM ۱۰۰٪ است و شاخص اختصاصیت برای هر دو الایزای ۱۰۰٪ است.

در بررسی دیگری [۲۱] با استفاده از آنتی‌ژن‌های کونژوگه پلی‌کلونال علیه IgG و IgM، روش الایزای غیرمستقیم برای بروسلوز انسانی طراحی شد. حساسیت برای الایزای IgG ۸۱/۳٪، الایزای IgM ۹۳/۸٪ و الایزای IgG+IgM ۷۵٪ بود. اختصاصیت برای الایزای IgG ۹۵٪، الایزای IgM ۸۵٪ و الایزای IgG+IgM ۹۴/۴٪ گزارش شد.

## نتیجه‌گیری

بررسی‌ها نشان داده است که الایزای روش بسیار مناسبی برای تشخیص اشکال مزمن بیماری است. بدیهی است که هیچ‌کدام از روش‌های تشخیصی دارای تمامی مزیت‌های یک سنجش قطعی و کامل نیست. با افزایش حساسیت روش تشخیصی، احتمال کاهش اختصاصیت آن وجود دارد. امروزه استفاده از فناوری الایزای در تشخیص بسیاری از بیماری‌های عفونی و غیرعفونی در ایران به تدریج رایج شده و می‌توان به گسترش استفاده از این روش در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی امیدوار بود.

## منابع

- 1- Collier L. Topley & Wilson's Microbiology and microbial infections. Vol 2. 9th ed. Arnold pub; 1998. p. 829.
- 2- Collier L. Topley & Wilson's Microbiology and microbial infections. Vol 3. 9th ed. Arnold pub; 1998. p. 819.
- 3- Refai M. Incidence and control of brucellosis in the Near East region. *Vet Microbio*. 2002;90(1-4):81-110.