

سنجش آنتی بادی IgG اختصاصی علیه باکتری Brucella به روش الایزا

مقدمه :

بیماری تب مالت یا بروسلاز به عنوان یکی از مهم‌ترین بیماری‌های مشترک انسان و دام محسوب می‌گردد. باکتری بروسلا که ایجاد کننده بیماری است، طیف وسیعی از پستانداران اهلی و وحشی را مبتلا می‌سازد. این بیماری به علت ایجاد سقط جنین در دام، کاهش تولید شیر، عقیمی و نازایی دام‌های مبتلا و همچنین به علت ابتلای انسان به بیماری تب مالت، همواره از دو بعد اقتصادی و بهداشتی مورد توجه قرار می‌گیرد. مصرف شیر، محصولات لبنی (کره، پنیر) و یا محصولات گوشتی حیوانات آلوده موجب سرایت بیماری به انسان می‌شود. کم‌خونی و خیم یا مشکلات معده و سابقه جراحی آن به دلیل کاهش اسید معده امکان بروز بیماری را بالا می‌برد. اسید معده تا حدودی احتمال ابتلا را کاهش می‌دهد. به طور کلی این بیماری در میان افرادی که با حیوانات زیاد در تماس هستند (کشاورزان، دامداران، قصابان، دامپزشکان) و افرادی که به مناطق آلوده سفر می‌کنند شایع‌تر است. در این بیماری نیز مانند سایر بیماری‌ها در اواخر هفته اول و یا دوم مرحله حاد ابتدا بتدریج IgM و سپس IgG اختصاصی علیه شاخص‌های آنتی ژنیک باکتری بالا می‌رود و پس از چند هفته عیار IgG از IgM نیز بیشتر می‌شود. در صورتی که درمان مناسب انجام شود تیتراژ IgM کاهش می‌یابد ولی تغییری در تیتراژ IgG ایجاد نمی‌شود. تشخیص بیماری بر اساس جدا نمودن باکتری از بیمار و کشت آن در محیط‌های مخصوص می‌باشد ولی بدلیل طولانی بودن زمان کشت و پایین بودن حساسیت آن بیشتر از روش‌های تشخیص سرولوژیک در تشخیص استفاده می‌شود. تست‌های سرولوژیک مورد استفاده در بروسلاز را میتوان در دو دسته تست‌های اولیه و تست‌های تاییدی جای داد. تست‌های اولیه که نقش غربالگری دارند همچون تست‌های آگلوتیناسیون (رز بنگال، رایت، کمپس رایت و غیره) از سوسپانسیون باکتری کشته شده با حرارت استفاده می‌شود. برای قابل رویت شدن واکنش از ذراتی مانند رنگ زربنگال استفاده می‌شود. با توجه به مدت زمان طولانی این دسته از آزمایشات، اختصاصیت پایین، همچنین بروز پدیده منطقه ای یا پروزون، عدم قدرت تفکیک نوع آنتی بادی، استفاده از یک نوع از آنتی ژن (تنها بروسلا ابورتوس) در این دسته از آزمایشات که گاهی منجر به از دست دادن واکنش‌های حاصله از بروسلا ملی تنسیس میگردد و همچنین وجود برخی آنتی بادهای بلوکان که منجر به بروز منفی کاذب در آزمایش میشوند امروزه از تست‌های دسته دوم یعنی تست‌های تاییدی بیشتر استفاده میشود. تست الایزا یکی از این دسته از آزمایشات بوده که با حساسیت و ویژگی بسیار بالا همراه است. در این تست پدیده منقطع ای یا آنتی بادی‌های بلوکان دیده نمی‌شود روش آزمایش ساده و کوتاه بوده و از آنتی ژن‌های هر دو نوع بروسلاز شایع ابورتوس و ملی تنسیس در آن استفاده شده و با استفاده از آنتی بادی‌های اختصاصی می‌توان حتی کلاس آنتی بادی موجود در سرم را نیز مشخص نمود.

اساس آزمایش :

در این کیت چاهک‌های پلیت توسط آنتی ژن‌های سطحی (SLPS) هر دو گونه شایع باکتری *Brucella abortus & melitensis* پوشانده شده اند (coating). در هنگام آزمایش، نمونه‌های رقیق شده به داخل چاهک‌ها ریخته می‌شوند. در صورت وجود آنتی بادی علیه آنتی ژن‌های *Brucella* این آنتی بادی‌ها به آنتی ژن‌های کف چاهک متصل می‌گردند. سپس با افزودن آنتی بادی ضد IgG که به آنزیم HRP متصل شده، در صورت وجود آنتی بادی‌های ضد *Brucella* از نوع IgG، آنتی هیومن IgG نشاندار شده نیز به آنها متصل می‌گردد. پس از شستشو، محلول رنگزا داخل چاهک‌ها ریخته می‌شود که شدت رنگ آبی، متناسب با کمپلکس ایمنی تشکیل شده در چاهک‌ها است. افزودن محلول متوقف کننده، رنگ آبی را به زرد تبدیل می‌نماید که بهترین جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر دارد.

محتویات کیت :

- ۱) پلیت ۹۶ خانه حاوی چاهک‌های پوشش داده شده با آنتی ژن‌های سطحی باکتری *Brucella* (SLPS).
- ۲) محلول رقیق کننده نمونه (Sample Diluent): ۲ ویال حاوی ۵۰ میلی لیتر محلول جهت رقیق کردن نمونه‌ها.
- ۳) محلول آنزیم کنژوگه آماده مصرف (Enzyme Conjugate): یک ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر آنتی بادی ضد IgG انسانی متصل شده به آنزیم پراکسیداز.
- ۴) سرم کنترل مثبت (Positive Control): یک ویال حاوی ۱/۵ میلی لیتر محلول بافری، دارای پروتئین به عنوان پایدار کننده و ۰/۰۵ کاتن به عنوان ماده محافظ و سرم انسانی غیر فعال شده، حاوی آنتی بادی علیه *Brucella*.
- ۵) سرم کنترل منفی (Negative Control): یک ویال حاوی ۲ میلی لیتر محلول دارای بافر فسفات و ۰/۰۵ کاتن به عنوان ماده محافظ و سرم انسانی منفی از نظر آنتی بادی علیه *Brucella*.
- ۶) محلول رنگزای یک مرحله ای (Chromogen-Substrate): ۱ ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر تترا متیل بنزیدین و آب اکسیژنه (آماده برای مصرف).
- ۷) محلول شستشو (Wash Buffer): دو ویال حاوی ۵۰ میلی لیتر محلول شستشوی غلیظ (۱۰X) دارای محلول بافر فسفات و ۰/۰۵٪ توتین. جهت تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، مقدار مورد نیاز را با آب مقطر به نسبت ۱/۱۰ رقیق نمایید.
- ۸) محلول متوقف کننده (Stop Solution): یک ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر اسید کلرید ریک ۱ نرمال.
- ۹) برچسب مخصوص پلیت.

مواد و وسایل مورد نیاز که در کیت موجود نمی باشند :

- دستگاه الیزاریدر دارای فیلتر ۴۵۰ نانومتر (و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر فرانس).
- سمپلر های دقیق .
- آب مقطر .
- دستگاه انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد .

نکات قابل ذکر برای مصرف کنندگان :

- محتویات این کیت تنها برای مصرف در همین کیت قابل استفاده هستند .
- این کیت صرفاً جهت اندازه گیری Anti Brucella IgG در سرم و پلاسما ی انسانی طراحی و ساخته شده است .
- از مخلوط کردن محتویات کیتها با شماره ساختهای مختلف جداً خودداری نمایید .
- کلیه مواد موجود در کیت که منشاء سرمی دارند از نظر وجود HBSAg و آنتی بادهای HCV و HIV کنترل گردیده اند و فاقد این عوامل می باشند ، جهت احتیاط بهتر است کاربرانی که با کیت کار می کنند از تماس مستقیم با مواد بپرهیزند .

شرایط نگهداری :

- کیت را در یخچال بین دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری نمایید .
- چاهکها را در کیسه مخصوص پلیت همراه با نمگیر نگهداری نمایید . پایداری پلیت پس از باز کردن کیسه آن ۴ ماه میباشد .
- پایداری محتویات کیت تا پایان مدت انقضای نوشته شده بر روی هر یک از آنها می باشد .
- ممکن است در محلول شستشوی غلیظ کریستال تشکیل شود که این امر مشکلی را ایجاد نمی نماید . قبل از تهیه محلول شستشوی کار، برای حل شدن کریستالها ، ویال را در ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید . محلول شستشو را به نسبت ۱/۱۰ با آب مقطر رقیق نمایید ؛ این محلول (آماده مصرف) به مدت یک هفته در شرایط ۲-۸ درجه سانتیگراد قابل نگهداری و مصرف می باشد .

جمع آوری و آماده سازی نمونه :

سرم یا پلاسما را می توان پس از جدا نمودن از سلولهای خون استفاده نمود ، نمونه میتواند برای مدت دو روز در دمای ۲-۸ درجه سانتی گراد نگهداری شود ولی برای نگهداری بیش از مدت دو روز باید از دمای ۲۰- درجه سانتی گراد استفاده گردد (در ضمن باید از Freeze-thaw نمودن نمونه پرهیز شود). از نمونه های مشکوک به آلودگی میکروبی جهت انجام آزمایش استفاده نشود.

آماده سازی اولیه نمونه ها :

نمونه ها را با کمک محلول رقیق کننده نمونه به نسبت ۱ به ۱۰۱ رقیق کنید (۱۰ میکرولیتر نمونه با ۱۰۰۰ میکرولیتر محلول رقیق کننده نمونه) .
توجه : کنترلهای کیت آماده مصرف بوده و نیازی به رقیق سازی ندارند .

توضیحات عمومی :

- قبل از شروع مراحل آزمایش تمام مواد و نمونه ها باید به درجه حرارت اتاق برسند .
- به محض شروع آزمایش کلیه مراحل باید بدون توقف انجام پذیرند .
- باید از نوک سمپلر یک بار مصرف برای هر نمونه استفاده شود .
- پس از افزودن محلول متوقف کننده، جذب نوری چاهکها حداکثر تا نیم ساعت قابل قرائت می باشد .
- برای کسب نتایج مطلوب باید شستشوی چاهکها بصورت کامل صورت گرفته و آخرین قطرات پس از شستشو از چاهکها تخلیه شوند .
- از مهمترین فاکتورها در حصول نتیجه مطلوب ، زمان انکوباسیون مناسب می باشد . بنابراین پیشنهاد می گردد قبل از شروع آزمایش تمام مواد و محلولهای مورد نیاز را آماده نموده و درب آنها را باز کنید ، این عمل با کاهش فاصله زمانی بین مراحل سمپلینگ باعث نتایج دقیق تر می شود .

مراحل انجام آزمایش :

- ۱) تعداد چاهکهای مورد نظر را انتخاب کرده و سایر چاهکها را به همراه نمگیر درون کیسه مخصوص نگهداری پلیت قرار داده و درب آن را ببندید .
- ۲) ۱۰۰ میکرولیتر از کنترل ها و ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه های آماده شده را طبق دستور زیر در چاهک ها بریزید، دو چاهک اول را برای بلانک و کنترل مثبت در نظر بگیرید. کنترل منفی را به صورت دوپلیکیت ریخته و سایر چاهک ها را برای نمونه ها استفاده کنید، پس از پوشاندن چاهکها توسط برچسب مخصوص پلیت، چاهکها را برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید .
- ۳) محتویات چاهکها را خالی کرده و چاهکها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید. برای شستشو چنانچه دستگاه واشر اتوماتیک در دسترس نباشد می توان از سمپلر ۸ کاناله و یا سرنگ استفاده نمود ولی باید مواظب بود که محلول شستشو از یک چاهک به چاهک دیگر وارد نشود زیرا می تواند موجب ایجاد خطا در نتیجه آزمایش گردد . در هر دفعه شستشو حدود ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو در هر چاهک ریخته و سپس چاهک ها را با وارونه کردن و تکاندن خالی نمایید و در انتهای عملیات شستشو ، چاهکها را در حالت وارونه و با ضربات ملایم بر روی یک پارچه یا کاغذ نمگیر بکوبید تا قطرات اضافی خارج شوند .
- ۴) ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنزیم کنژوگه آماده مصرف را به داخل چاهکها به استثنای چاهک بلانک بریزید، پس از پوشاندن چاهکها توسط برچسب مخصوص پلیت، چاهکها را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دهید .
- ۵) محتویات چاهکها را خالی کرده و چاهکها را ۵ بار با محلول شستشوی آماده مصرف بشویید. (همانند بند ۳)
- ۶) ۱۰۰ میکرولیتر محلول رنگزا (Chromogen-Substrate) به همه چاهکها اضافه نمایید، چاهکها را به مدت ۱۵ دقیقه در درجه حرارت اتاق و در تاریکی قرار دهید .
- ۷) با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده (Stop Solution) به هر چاهک، واکنشهای آنزیمی را متوقف نمایید. برای سنجش جذب نوری هر چاهک از دستگاه الیزا ریدر با فیلتر ۴۵۰ nm استفاده نموده و جذب نوری چاهکها را قرائت نمایید. توصیه میشود از فیلتر ۶۳۰ nm به عنوان فیلتر رفرانس استفاده گردد .

ارزشیابی آزمایش :

- این آزمایش با داشتن شرایط زیر ارزشمند و قابل گزارش تلقی می گردد :
- جذب نوری کمتر از ۰/۰۵ برای بلانک، در صورت بیشتر بودن جذب نوری بلانک احتمالاً محلول رنگزا آلوده شده است .
 - جذب نوری کمتر از ۰/۱ برای کنترل منفی، در صورت بیشتر بودن این جذب نوری، احتمالاً شستشو به طور صحیح صورت نگرفته است، آزمایش را دوباره انجام داده و در مراحل شستشو دقت کنید .
 - جذب نوری بیشتر از ۰/۶ برای کنترل مثبت .

محاسبه نتایج :

- از هر دستگاه الیزاریدر با قابلیت سنجش جذب نوری در طول موج ۴۵۰ nm می توان استفاده نمود .
- ۱) جذب نوری کنترلها و نمونه ها را به کمک دستگاه الیزاریدر در طول موج ۴۵۰nm و در صورت امکان در مقابل فیلتر رفرانس ۶۳۰nm بخوانید .
 - ۲) جذب نوری بلانک را از کنترلها و نمونه ها کم کنید .
 - ۳) مقدار Cut Off را طبق فرمول زیر بدست آورید .

$$\text{Cut Off value} = 0.15 + \text{میانگین جذبهای نوری کنترل منفی}$$

۴) برای تعیین جوابهای مثبت و منفی، مقدار ایندکس را از تقسیم جذب نوری نمونه بر مقدار Cut-off بدست آورید :

$$\text{Cut-off Index(COI)} = \text{OD of sample/Cut-off value}$$

بر اساس این فرمول مقادیر بالاتر از ۱/۱ مثبت و پایین تر از ۰/۹ منفی قلمداد می شوند. نمونه هایی که مقدار ایندکس آنها بین ۱/۱ - ۰/۹ می باشد مشکوک بوده و باید پس از مدتی با استفاده از سرم یا پلاسمای تازه مجدداً آزمایش شوند .

بررسی نتایج :

- جواب منفی نشان دهنده عدم وجود آنتی بادی IgG علیه Brucella می باشد .
- جوابهای مثبت باید مجدداً تکرار شوند . نمونه های مثبتی که در تکرار مجدد منفی میشوند ، باید منفی گزارش گردند. مثبت شدن آزمایش در مرتبه اول می تواند به علت خطای کاری در مراحل شستشو و یا نمونه برداری باشد .

شاخصهای اجرایی :

- (۱) **حساسیت :** ۱۶۵ عدد سرم مثبت تایید شده با روش رایت، 2ME رایت، کمی لومینسانس والایزای مرجع با این کیت آزمایش شدند که ۱۶۴ مورد مثبت بودند. با توجه به نتایج بدست آمده حساسیت کیت جهت اندازه گیری آنتی بادی IgG علیه Brucella ۹۹/۴ درصد بوده و با کیتها و روشهای تاییدی معتبر قابل مقایسه می باشد .
- (۲) **اختصاصیت :** ۱۳۷۴ عدد سرم منفی به طور هم زمان با این کیت و روش کمی لومینسانس آزمایش شدند که با روش این کیت ۱۳۷۲ نمونه منفی بودند . بر اساس نتایج بدست آمده اختصاصیت این کیت ۹۹/۸۵ درصد می باشد .
- (۳) **دقت آزمایش :** جهت بررسی تکرار پذیری کیت ، آزمون های دقت درون سنجی (در یک کیت) و میان سنجی (بین چند کیت از یک سری ساخت) بوسیله کنترل منفی و مثبت و یک نمونه سرمی مثبت ضعیف انجام شد که نتایج آن در جداول صفحه بعد آمده است .

- آزمون دقت درون سنجی (Intra- assay) :

CV %	SD	میانگین جذب نوری	تعداد دفعات تکرار تست	
۲/۷	۰/۰۳۸	۱/۴۱	۲۰	کنترل مثبت
۷/۴	۰/۰۰۲	۰/۰۲۷	۲۰	کنترل منفی
۸/۱	۰/۰۲	۰/۳۴۷	۲۰	نمونه مثبت ضعیف ۱
۶/۶۶	۰/۰۲	۰/۳	۲۰	نمونه مثبت ضعیف ۲
۴/۹۷	۰/۰۳۲	۰/۶۴۳	۲۰	نمونه مثبت ضعیف ۳

- آزمون دقت میان سنجی (Inter- assay) :

CV %	SD	میانگین جذب نوری	تعداد دفعات تکرار تست	
۲/۸۴	۰/۰۴	۱/۴۱	۱۰	کنترل مثبت
۸/۴۶	۰/۰۰۲۲	۰/۰۲۶	۱۰	کنترل منفی
۹/۰۵	۰/۰۲۳	۰/۲۵۴	۱۰	نمونه مثبت ضعیف ۱
۷/۱۶	۰/۰۲۳	۰/۳۲۱	۱۰	نمونه مثبت ضعیف ۲
۵/۳۸	۰/۰۳۵	۰/۶۵	۱۰	نمونه مثبت ضعیف ۳

*هر سری آزمایش ، به صورت دوپلیکیت انجام شده است .

References:

- "Brucellosis" in the American Heritage Dictionary
- Maltese Fever by wrongdiagnosis.com, last Update: 25 February 2009 (12:01), retrieved 2009-02-26
- "Diagnosis and Management of Acute Brucellosis in Primary Care". Brucella Subgroup of the Northern Ireland Regional Zoonoses Group. August 2004. <http://www.dhsspsni.gov.uk/brucellosis-pathway.pdf>.
- Wilkinson, Lise (1993). "Brucellosis". In Kiple, Kenneth F. (ed.). The Cambridge World History of Human Disease. Cambridge University Press).
- Malhotra, Ravi (2004). "Saudi Arabia". Practical Neurology 4 (3): 184–185. doi:10.1111/j.1474-7766.2004.03-225.x.

روش انجام تست Brucella.IgG به صورت شماتیک

نمونه ها را با کمک محلول رقیق کننده نمونه به نسبت ۱ به ۱۰۱ رقیق کنید .

چاهکهای کوت شده با آنتی ژن های اختصاصی Brucella			
محلولها	بلانک	کنترل ها	نمونه
کنترل ها	-	۱۰۰ میکرولیتر	-
نمونه آماده شده	-	-	۱۰۰ میکرولیتر
دهانه چاهک ها را با چسب مخصوص پلیت بپوشانید و آن را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه نمایید . برچسب پلیت را برداشته و محتویات چاهکها را خالی کنید . طبق دستور شستشو ، ۵ بار چاهکها را بشویید .			
آنزیم کنژوگه	-	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
دهانه چاهک ها را با چسب مخصوص پلیت بپوشانید و آن را به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه نمایید . برچسب پلیت را برداشته و محتویات چاهکها را خالی کنید . طبق دستور شستشو ، ۵ بار چاهکها را بشویید .			
محلول رنگزا	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
پلیت را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی قرار دهید .			
محلول متوقف کننده	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر
جذب نوری چاهکها را در مقابل بلانک و در طول موج ۴۵۰ نانومتر (و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس) قرائت کنید .			