سنجش آنتی بادی IgM اختصاصی علیه باکتری Brucella به روش الایزا

مقدمه :

بیماری تب مالت یا بروسلوز 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 وخیم 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 بیماری ها در اواخر هفته اول ویا دوم مرحله حاد ابتدا بتدریج IgM و سپس IgG و IgA اختصاصی بر علیه شاخص های آنتی ژنیک باکتری بالا می رود و پس از چند هفته عیار IgG از IgM نیز بیشتر می شود. در صورتی که درمان مناسب انجام شود تیتر IgM کاهش می یابد ولی تغییری در تیتر IgGایجاد نمی شود. تشخیص بیماری بر اساس جدا نمودن باکتری از بیمار و کشت آن در محیط های مخصوص می باشد ولی بدلیل طولانی بودن زمان کشت و پایین بودن حساسیت آن بیشتر از روشهای تشخیص سرولوژیک در تشخیص استفاده می شود. تستهای سرولوژیک مورد استفاده در بروسلوز را میتوان در دو دسته تستهای اولیه و تستهای تاییدی جای داد. تستهای اولیه که نقش غربالگری دارند همچون تست های آگلوتیناسیون (رز بنگال، رایت ، کمبس رایت و غیره) از سوسپانسیون باکتری کشته شده با حرارت استفاده می شود. برای قابل رویت شدن واکنش از ذراتی مانند رنگ رزبنگال استفاده می شود 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 ازآنتی ژن (تنها بروسلا ابورتوس) در این دسته از آزمایشات که گاهاً منجر به از دست دادن واکنشهای حاصله از بروسلا ملی تنسیس میگردد و همچنین وجود برخی آنتی بادیهای 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 همراهست. در این تست پدیده منطقه ای یا آنتی بادی های بلوکان دیده نمی شود روش آزمایش ساده و کوتاه بوده و از آنتی ژنهای هر دو نوع بروسلای شایع ابورتوس و ملی تنسیس در آن استفاده شده و با استفاده از آنتی بادی های آختصاصی می توان 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، نمونه های رقیق شده داخل چاهکها ریخته می شوند. در صورت وجود آنتی بادی علیه انتی ژنهای Brucella این آنتی بادی ها به آنتی ژنهای کف چاهک متصل می گردند. سپس با افزودن آنتی بادی ضد IgM که به آنزیم HRP متصل شده، در صورت وجود آنتی بادی های ضد Brucella از نوع IgM، آنتی هیومن IgM نیز به آنها متصل می گردد. پس از شستشو ، محلول رنگزا داخل چاهکها ریخته می شود که شدت رنگ آبی، متناسب با کمپلکس ایمنی تشکیل شده در چاهکها است . افزودن محلول متوقف کننده، رنگ آبی را به زرد تبدیل می نماید که بهترین جذب نوری را در طول موج ۴۵۰ نانومتر دارد .

محتویات کیت :

۱) پلیت ۹۶ خانه حاوی چاهک های پوشش داده شده با آنتی ژنهای سطحی باکتری Brucella (SLPS) .
۲) محلول رقیق کننده نمونه (Sample Diluent) : ۱ ویال حاوی ۵۰ میلی لیتر محلول جهت رقیق کردن نمونه ها .
۳) محلول اسی بافر (Assay Buffer) : ۱ ویال حاوی ۷/۵ میلی لیتر محلول Anti human IgG جهت مهار کردن روماتویید فاکتور و غلظتهای بالای IgG در نمونه ها
۴) محلول آنزیم کنژوگه آماده مصرف (Enzyme Conjugate) : یک ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر آنتی بادی ضد IgM انسانی متصل شده به آنزیم پراکسیداز .
۵) 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 IgM علیه Brucella .
۶) 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 بادیIgM علیه Brucella .
۷) محلول رنگزای یک مرحله ای (Chromogen-Substrate) : ۱ ویال حاوی ۱۲ میلی لیتر تترا متیل بنزیدین و آب اکسیژنه (آماده برای مصرف) .
۸) محلول شستشو (Wash Buffer) : دو ویال حاوی۵۰ میلی لیتر محلول شستشوی غلیظ (۱۰X) دارای محلول بافر فسفات و ۰/۰۵٪ توئین . جهت تهیه محلول شستشوی آماده مصرف، مقدار مورد نیاز را با آب مقطر به نسبت ۱/۱۰ رقیق نمایید .

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 www.pishtazteb.com info@pishtazteb.com
ویرایش اول – مهر ۹۱

۹) محلول متوقف کننده (Stop Solution) : یک ویال حاوی ۱۲میلی لیتر اسید کلریدریک ۱ نرمال .
۱۰) برچسب مخصوص پلیت .

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

۱) دستگاه الایزاریدر دارای فیلتر ۴۵۰ نانومتر (و در صورت امکان ۶۳۰ نانومتر به عنوان فیلتر رفرانس) .
۲) سمپلر های دقیق .
۳) آب مقطر .
۴) دستگاه انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد .

نکات قابل ذکر برای مصرف کنندگان:

۱) محتویات این کیت تنها برای مصرف در همین کیت قابل استفاده هستند .
۲) از مخلوط کردن محتویات کیتها با شماره ساختهای مختلف جداً خودداری نمایید .
۳) این کیت صرفا جهت اندازه گیری Anti Brucella IgM در سرم و پلاسمای انسانی طراحی و ساخته شده است .
۴) کلیه مواد موجود در کیت که منشاء سرمی دارند از نظر وجود HBsAg وآنتی بادیهای 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 :

۱) کیت را در یخچال بین دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری نمایید .
۲) چاهکها را در کیسه مخصوص پلیت همراه با نمگیر نگهداری نمایید . پایداری پلیت پس از باز کردن کیسه آن ۴ ماه میباشد .
۳) پایداری محتویات کیت تا پایان مدت انقضای نوشته شده بر روی هر یک از آنها می باشد .
۴) 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 در جه 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 ۸-۲ 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 ۸ – ۲ 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 :

الف: نمونه ها را با کمک محلول رقیق کننده نمونه به نسبت ۱ به ۵۱ رقیق کنید (۱۰ میکرولیتر نمونه با ۵۰۰ میکرولیتر محلول رقیق کننده نمونه) .
توجه : کنترلهای کیت آماده مصرف بوده و نیازی به رقیق سازی ندارند .
ب : ۷۵ میکرولیتر از نمونه های رقیق شده را داخل لوله دیگری ریخته و ۷۵ میکرولیتر از محلول اسی بافر به آنها اضافه کنید . سپس به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری نمایید ؛ توجه نمایید که نگهداری مدت زمان طولانی تر از ۲۰ دقیقه ممکن است منجربه جذب آنتی بادیهای اختصاصی علیه Brucella گردد.

توضیحات عمومی :

۱) قبل از شروع مراحل آزمایش تمام مواد و نمونه ها باید به درجه حرارت اتاق برسند .
۲) به محض شروع آزمایش کلیه مراحل باید بدون توقف انجام پذیرند .
۳) باید از نوک سمپلر یک بار مصرف برای هر نمونه استفاده شود .

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 www.pishtazteb.com info@pishtazteb.com
ویرایش اول – مهر ۹۱

۴) پس از افزودن محلول متوقف کننده، جذب نوری چاهکها حداکثر تا نیم ساعت قابل قرائت می باشد .
۵) برای کسب نتایج مطلوب باید شستشوی چاهکها بصورت کامل صورت گرفته و آخرین قطرات پس از شستشو از چاهکها تخلیه شوند .
۶) 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 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 الایزاریدر 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 از۰/۰۵ 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 الایزاریدر 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 الایزاریدر 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 .

Cut Off value = میانگین جذبهای نوری کنترل منفی + ۰/۲

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

Cut-off Index(COI) = 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 .

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 www.pishtazteb.com info@pishtazteb.com
ویرایش اول – مهر ۹۱

بررسی نتایج :

– جواب منفی نشان دهنده عدم وجود آنتی بادی IgM 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 درمراحل شستشو و یا نمونه برداری باشد .

شاخصهای اجرایی :

۱) حساسیت : ۱۶۲۰ عدد سرم مثبت تایید شده با روش رایت، 2ME رایت، کمی لومینسانس والایزای مرجع با این کیت آزمایش شدند که ۱۶۱۹ موردمثبت بودند . با توجه به نتایج بدست آمده حساسیت کیت جهت اندازه گیری آنتی بادیIgM علیه Brucella، ۹۹/۹۳ درصد بوده و با کیتها و روشهای تاییدی معتبر قابل مقایسه می باشد .

۲) اختصاصیت : ۷۸ عدد سرم منفی به طور همزمان با این کیت و روش کمی لومینسانس آزمایش شدند که با روش این کیت ۷۷ نمونه منفی بودند. بر اساس نتایج بدست آمده اختصاصیت این کیت ۹۸/۷۱درصد 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 زیر آمده است .

– آزمون دقت درون سنجی (Intra- assay) :

	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین جذب نوری	SD	CV%
کنترل مثبت	۲۰	۱/۳۲	۰/۰۵	۳/۸
کنترل منفی	۲۰	۰/۰۲۳	۰/۰۰۲	۸/۷
نمونه مثبت ضعیف ۱	۲۰	۰/۲۸	۰/۰۲۴	۸/۶
نمونه مثبت ضعیف ۲	۲۰	۰/۳	۰/۰۲	۶/۷
نمونه مثبت ضعیف ۳	۲۰	۰/۵۳۳	۰/۰۲۷	۵/۱

– آزمون دقت میان سنجی (Inter- assay) :

	تعداد دفعات تکرار تست	میانگین جذب نوری	SD	CV%
کنترل مثبت	۱۰	۱/۳۵	۰/۰۵۲	۳/۸
کنترل منفی	۱۰	۰/۰۲۵	۰/۰۰۲۳	۹/۲
نمونه مثبت ضعیف ۱	۱۰	۰/۲۸۸	۰/۰۲۵	۸/۷
نمونه مثبت ضعیف ۲	۱۰	۰/۳۲۷	۰/۰۲۲	۶/۷
نمونه مثبت ضعیف ۳	۱۰	۰/۵۴۲	۰/۰۲۹	۵/۳

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

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 www.pishtazteb.com info@pishtazteb.com
ویرایش اول – مهر ۹۱

References:

1) "Brucellosis" in the American Heritage Dictionary

2) Maltese Fever by wrongdiagnosis.com, last Update: 25 February 2009 (12:01), retrieved 2009-02-26

3) "Diagnosis and Management of Acute Brucellosis in Primary Care". Brucella Subgroup of the Northern Ireland Regional Zoo noses Group. August 2004. http://www.dhsspsni.gov.uk/brucellosis-pathway.pdf.

4) Wilkinson, Lise (1993). ""Brucellosis"". In Kiple, Kenneth F. (ed.). The Cambridge World History of Human Disease. Cambridge University Press).

5) 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.IgM به صورت شماتیک

* نمونه ها را با کمک محلول رقیق کننده نمونه به نسبت ۱ به ۵۱ رقیق کنید . سپس ۷۵ میکرولیتر از نمونه های رقیق شده را با ۷۵ میکرولیتر از محلول اسی بافر مخلوط کرده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق قرار دهید .

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 .			

تهران، شهرک گلستان، بلوار گلها، خیابان یاس سوم، نبش خیابان یاسمن، پلاک۱، کد پستی ۱۴۹۴۷۳۴۴۶۳
تلفن ۴۲۱۹۷۰۰۰ فکس ۴۲۱۹۷۰۰۷
sms 300071402 www.pishtazteb.com info@pishtazteb.com