اهمیت آزمون های آگلوتیناسیون در مقایسه با الایزا در تشخیص بیماران مبتلا به بروسلوزیس

عبدالرضا اسماعیل زاده[1]، حمید باغچه سرایی[2]
۱- مربی ـ عضو هئیت علمی ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی زنجان
۲- استادیار ـ میکروبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی زنجان

یافته / دوره هفتم / شماره ۱ / بهار ۸۴ / مسلسل ۲۴

چکیده

دریافت مقاله: ۸۳/۱۲/۸، پذیرش مقاله: ۸۴/۳/۸

مقدمه: بروسلوزیس بیماری بومی ایران و مشترک بین انسان و دام است.از آنجایی که تشخیص سریع،درمان به موقع و پیگیری درمان اهمیت دارد، انتخاب و انجام آزمایش حساس و اختصاصی و تشخیص و درمان به موقع برای حل این مشکل اساسی ضروری است، هدف از انجام این مطالعه، مقایسه آزمون رایج سولوژیت موجود در آزمایشگاههای تشخیص طبی با آزمون استاندارد الایزا بود.

مواد و روش ها: در این مطالعه مقایسه ای ۱۷۶ فرد مشکوک به بیماری بروسلوزیس پس از معاینه توسط پزشک متخصص به صورت مستمربه آزمایشگاه ارجاع داده شدند. برای همه بیماران آزمایش‌های معمول تشخیص تب مالت شامل رایت سریع،رایت لوله‌ای استاندارد، کمبس رایت و آزمون انتخابی و استاندارد کمی الایزا انجام شد .

یافته ها: از ۱۷۶ فرد مطالعه شده ۹۲نفر(۵۲/۲۷٪)مرد و۸۴نفر(۴۷/۷۳٪) زن بودند. از ۱۷۶ نفر فوق با روش های رایت سریع، رایت لوله‌ای استاندارد، کمبس رایت، الا یزا توتال به ترتیب۴۵نفر (۲۵/۵۷٪)، ۴۹ نفر (۲۷/۸۴٪)، ۵۸ نفر (۳۲/۹۵٪)، ۷۲ نفر (۴۰/۹۱٪)، مثبت نشان دادند. محدودهٔ سنی افراد بین ۱۵ الی ۶۵ سال بود. از نظر توزیع محل جغرافیایی۷۲/۴٪ مراجعین،روستایی و۲۷/۶٪ را ساکنین شهری بودند.حساسیت وآزمون های فوق در مقایسه با الایزاتوتال به ترتیب۶۲/۵ ، ۶۸ و۸۰ درصد، و ویژگی همه ۱۰۰٪ بود.

نتیجه گیری: آزمون الایزا در مقایسه با سایرآزمون های رایج بالاترین قدرت تشخیص را داراست.بعد از الایزا به ترتیب آزمون کمبس رایت ، رایت لوله ای استانداردو رایت سریع بیشترین قدرت تشخیصی را دارند. با استفاده از نتایج این طرح از بین روش های سرولوژیک آزمون الایزا به دلیل سنجش کمی وتعیین کلاس آنتی بادی ومرحله بیماری به عنوان آزمون استانداردو انتخابی توصیه می شود .

واژه های کلیدی: بروسلوزیس، تشخیص سرولوژیک، الایزا، آگلوتیناسیون

آدرس مکاتبه: زنجان، شهرک کارمندان دانشکده پزشکی، گروه ایمونولوژی

مقدمه

بروسلوریس (تب مالت) بیماری بومی کشور ماست وتظاهرات بالینی متنوعی دارد و ویژگی های خاص بالینی، تشخیصی ودرمانی آن ممکن است مشکلاتی در اداره بیماران برای پزشکان ایجاد نماید .از طرف دیگر شرایط جغرافیایی کشور ما ومسئله نیاز به دامپروری وکشاورزی کنترل این بیماری در دام را با مشکل مواجه سازد . سالیانه ۵۰۰ هزار بیمار مبتلا به بروسلوز در دنیا گزارش می‌شود وعده‌ای از مؤلفین حدس می زنند که در ازای هر مورد ثابت شده بروسلا(عامل بیماری) ۲۶ مورد تشخیص داده نشده وجود دارند که گزارش نمی‌شوند (۲،۱) علیرغم بهبود وضعیت بهداشتی مواد غذایی هنوز این بیماری یکی از مشکلات اقتصادی بهداشتی مطرح در بسیاری از نقاط دنیا از جمله خاورمیانه، اسپانیا، یونان، ترکیه، مکزیک، هند، پرو و غیره است (۶،۵،۴،۳). شرایط جغرافیایی ایران، وابستگی غذایی به مواد لبنی غیر پاستوریزه وارتباط شغلی کارگران کشتارگاه‌ها، قصاب‌ها، دامپزشکان، کادر آزمایشگاه وغیره ... بروسلوزیس را به عنوان بیماری شغلی مطرح می‌سازد (۲). بر اساس آمار اداره مبارزه با بیماری‌های واگیردارکشورسالیانه حدود ۵۰ هزار مورد بروسلوزگزارش می‌شود و در اکثر استان‌های کشور آلودگی به درجات مختلف از ۳/۵ تا ۱۰/۵ در هزار متغیر است(۲).

نظر به اهمیت این بیماری روش‌های مختلفی برای تشخیص، درمان و پیگیری درمان ابداع شده است که کشت میکروب راه اصلی و قطعی تشخیص بیماری است. (۷،۲) جدا سازی بروسلا از خون بسته به مرحله بیماری روش کشت به علت دیر رشد بودن ونیاز به محیط استاندارد کاستاندا از ۱۵ تا ۸۰ درصد گزارش شده است و نکته مهم این است که تکرار کشت وکشت مغز استخوان درصد موارد مثبت را افزایش می‌دهد (۹،۸) با گسترش روش‌های مولکولی مثل PCR[1] به خصوص در درگیری منتشر و موارد پیچیده ومزمن بیماری که تعداد میکرو اورگانیسم کمتر است امکان تشخیص بیشتر می‌شود (۱۱،۱۰) از طرفی روش های باکتری شناسی با موارد منفی کاذب فراوان همراه است و تشخیص‌های مولکولی هنوز در همه جا قابلیت انجام ندارد و در مرحله تحقیقاتی و در آزمایشگاه‌های مرجع انجام پذیر است.

ساده‌ترین و ارزان‌ترین راه های تشخیص تب مالت امروزه روش‌های مبتنی بر آزمایش های سرولوژیک هستند (۱۳،۱۲، ۱۴). آزمون های سرولوژیک رایج ، هر یک دارای مزایا و معایبی هستند . در این تحقیق در نظر است تا آزمون‌های رایج سرولوژیک موجود در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی ومراکز آموزشی و درمانی در مقایسه با آزمون استاندارد وانتخابی سرولوژیک الایزا (۱۵،۱۴) روی بیماران مراجعه کننده به آزمایشگاه‌های تشخیص طبی استان زنجان از نظر قدرت تشخیص بیماری در سال ۱۳۸۱ با هم مقایسه شوند. نتایج این تحقیق شاید بتواند راه گشای متخصصان وبیماران در تشخیص سریع ودقیق بیماری ودرمان آن وپیگیری مناسب درمان با استفاده از روش‌های سرولوژیک باشد واز عوارض پیشرفته بیماری که ناشی از فقدان تشخیص سریع است بکاهد.

مواد و روش ها

این مطالعه از نوع کاربردی و مقایسه آزمون هاست. در این تحقیق بیماران بعد از معاینه و شرح حال گیری توسط پزشک متخصص در صورت مشکوک بودن به تب مالت برای ارزیابی آزمایشگاهی به طریقه سرولوژیک به آزمایشگاه ارجاع داده شدند. از ۱۷۶ نفر از مراجعین به صورت مستمر[2] ۵ سی‌سی خون اخذ وتا یک ساعت بعد از نمونه گیری، سرم از خون جدا وتا زمان انجام آزمایش در ۳ لوله مجزا برای انجام آزمایش‌های مورد نظر طرح فریز شد. آزمون معیار[3] در این مطالعه آزمون الایزا بود. این آزمون از نوع واکنشهای اولیه آنتی ژن و آنتی بادی است و در مقایسه با آزمون های رایج

1. polymerase chain reaction 2. Sequential
3. $\frac{s\tan dard}{Gold} \Rightarrow Gold \quad s\tan dard$

سرولوژیک که از نوع واکنش های ثانویه آنتی ژن و آنتی بادی است، حساسیت و ویژگی بالایی دارد. نتایج آزمون های رایت سریع، رایت لوله‌ای استاندارد،کمبس رایت (با آنتی ژن انستیتوپاستورایران)و الایزا *IgM* و *IgG* اختصاصی بروسلا آنتی ژن *W99* (از شرکت *IBL*) به صورت *Duplicate* برای افزایش صحت و دقت نتایج، انجام و ازنظر قدرت تشخیصی باهم مقایسه گردید. هر یک از آزمایش ها به تنهایی، به صورت یک سوکور و بدون اطلاع از نتایج آزمون‌های قبلی به روش استاندارد (*WHO*) آزمایش گردید. آزمایش‌های الایزا توسط دستگاه خوانش الایزا[1] شرکت *Awareness* آمریکا بعد از راه‌اندازی وحصول اطمینان انجام شد. نتایج آزمون بعد از اتمام با هم مقایسه و تحلیل گردید.

یافته ها

از۱۷۶ نفر مورد مطالعه شده ۹۲ نفر (۵۲/۲۷٪) مرد و ۸۴ نفر (۴۷/۷۳٪) زن بودند. از ۱۷۶ نفر فوق با روش های رایت سریع، رایت لوله‌ای استاندارد، کمبس رایت و الایزا توتال به ترتیب ۴۵ نفر (۲۵/۵۷٪)، ۴۹ نفر (۲۷/۸۴٪)، ۵۸ نفر (۳۲/۹۵ ٪) و۷۲ نفر (۴۰/۹۱٪) مثبت نشان دادند. محدوده سنی افراد مورد مطالعه بین ۱۵ الی ۶۵ سال بودکه بیشتر افراد در گروه سنی بین ۱۸ الی ۴۰ سال بودند. از نظر توزیع محل جغرافیایی ۷۲/۴ درصد مراجعین روستایی و۲۷/۶ درصد موارد را ساکنین شهری بودند.

مطابق جدول شماره ۱ حساسیت، ویژگی ارزش پیش بینی مثبت *(PPV)*[2] و پیش بینی منفی *(NPV)*[3] رایت سریع در مقایسه با آزمون استاندارد توتال *(Elisa)*[4] به ترتیب عبارت است از :۶۲/۵و۱۰۰و۱۰۰و۷۹/۳ درصد.

جدول شماره ۱ـ تعیین ارزش تشخیصی تست رایت سریع در مقایسه با الایزا توتال در بیماری بروسلوز

الیزا توتال	+	ـ	توتال
رایت سریع			
+	۴۵	ـ	۴۵
ـ	۲۷	۱۰۴	۱۳۱
توتال	۷۲	۱۰۴	۱۷۶
ppv = ۱۰۰			[5]*Sens* =۶۲/۵
npv= ۷۹/۳			[6]*Spec*= ۱۰۰

مطابق جدول شماره ۲ حساسیت ،ویژگی ، *PPV* و *NPV* رایت لوله ای در مقایسه با آزمون استاندارد توتال *Elisa* به ترتیب : ۶۸/۰، ۱۰۰،۱۰۰، ۸۱/۸ درصد است .

جدول شماره ۲ـ تعیین ارزش تشخیص تست رایت لوله ای در مقایسه با الایزا توتال در بیماری بروسلوز

الیزا توتال	+	ـ	توتال
رایت لوله ای			
+	۴۹	ـ	۴۹
ـ	۲۳	۱۰۴	۱۲۷
توتال	۷۲	۱۰۴	۱۷۶
ppv = ۱۰۰			*Sens* = ۶۸
npv= ۸۱/۸			*Spec*= ۱۰۰

مطابق جدول شماره۳حساسیت اختصاصی بودن ، *PPV* و *NPV* تست کمبس رایت در مقایسه با آزمون استاندارد توتال الایزا به ترتیب ۸۰/۰، ۱،۱۰۰،۱۰۰ ۸۸ درصد است.

1. Elisa Reader
2. Positive predictive value
3. Negative predictive value
4. Engyme linked Immono sorbert Assay
5. Sensitivity
6. Specificity

جدول شماره ۳ـ تعیین ارزش تشخیص آزمون کمبس در مقایسه با الایزا در بیماری بروسلوز

الیزل توتال / کمبس رایت	+	ـ	توتال
+	۵۸	ـ	۵۸
ـ	۱۴	۱۰۴	۱۱۸
توتال	۷۲	۱۰۴	۱۷۶
Sens = ۸۰		*ppv* = ۱۰۰	
Spec= ۱۰۰		*npv*= ۸۱/۸	

بحث

مطابق یافته‌های به دست آمده از این طرح، از بین روش‌های سرولوژیکی تشخیص بروسلوزیس آزمون الایزا با ۷۲ مورد مثبت (۴۰/۹۱٪) در مقایسه با سایر آزمایش های رایج تشخیصی بالاترین قدرت تشخیص را دارا است واین نتیجه با یافته های حاصل از تحقیقات اراج[1] و همکاران او در سال ۱۹۸۶ (۱۵)، گد[2] و همکاران او در سال ۱۹۹۸ (۳) و اراج از دانشگاه آمریکایی بیروت در ۱۹۹۹(۱۴) همخوانی دارد.

مطابق یافته های ما آزمون الایزا توانسته است ۷۲ مورد (۴۰/۹۱٪) و افراد مبتلا را تشخیص دهد در حالیکه آزمون کمبس رایت فقط ۵۸ نفر (۳۲/۹۵٪) افراد را شناسایی کرده است واین یافته با نتایج تحقیق اراج در سال۱۹۹۹(۱۴) که قدرت تشخیص الایزا را ۷ درصد بیشتر از کمبس رایت می داند مطابقت دارد.

طبق یافته های ما قدرت تشخیصی آزمون کمبس رایت بیشتر ازآزمایش های آگلوتیناسیون رایت سریع و لوله ای است. این نتایج با یافته های کریمی نیا از انستیتو پاستور ایران(۱۷) و ابدولا[3] و دب دوب[4] در سال ۲۰۰۰(۱۶) کاملا مطابقت دارد.

طبق یافته‌های حاصل از این تحقیق قدرت تشخیص آزمون های الایزا، کمبس رایت، رایت استاندارد لوله‌ای و رایت سریع به ترتیب کم می‌شود و این نتایج مطابق با یافته‌های تحقیق اراج در سال ۱۹۹۹(۱۴) است.

نتیجه گیری

همچنان که از یافته‌ها طرح مشهود است از آنجایی که روش کشت بروسلا دارای مشکلات فنی است و روش های مولکولی هنوز جایگاه خود را در تشخیص بالینی باز نکرده است ازبین روش های سرولوژیک آزمون *Elisa* به دلیل سرعت، زمان کوتاه، سنجش کمی تیتر آنتی‌بادی، تعیین ایزوتیپ آنتی‌بادی وکمک درتشخیص مرحله حاد ومزمن بیماری، حساسیت و اختصاصیت بالا نسبت به سایر آزمایش های معمول ترجیح داده می‌شود و انجام آن را در مراکز تشخیصی و درمانی برای تشخیص بیماری و پیگیری موفقیت درمان به عنوان آزمون انتخابی توصیه می‌کنیم.

قدردانی

از معاونت محترم پژوهشی و شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی زنجان به خاطر تصویب طرح ، جناب آقای دکتر نورالدین موسوی نسب مشاور محترم آمار ، جناب آقای مصطفی شفقتیان کارشناس محترم آزمایشگاه و جناب آقای دکترحمید رضا امیرمقدم به خاطر انجام بخشی از آزمایش ها تقدیر و تشکر می شود .

1. Araj
2. Gad
3. Abdulla
4. Dabdoob

References

۱- عبدالرضا اسماعیل زاده ،مهری قاسمی. دات – ایمونوبلاتینگ. روشی سریع و حساس برای تشخیص بروسلوزیس در مناطق محروم .خلاصه مقالات اولین کنگره بیولوژی سلولی-مولکولی ایران-اهواز ۹-۸ اسفند ۱۳۸۱ ص: ۱۸۱

۲- باغچه سرایی حمید، اسماعیل زاده عبدالرضا ،بررسی مقایسه ای قدرت تشخیصی آزمون روزبنگال در بروسلوزیس حاد و مزمن ،مجله علمی -پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی زنجان. بهار۱۳۸۲ :سال ۱۱ :شماره۴۲ : صص: ۲۵الی۲۹

3. Gad MO, Rad EL , Kambel AM. Evaluation of Brucella Enzyme Immunoassay test (Elisa) in comparison with Bacteriological culture and Agglutinatio.J Infec 1998; 36: 197-201
4. Hall WH. Modern chemotherapy for Brucellosis in Human. Rev of Infect Dis 1990; 12(6): 87-9
5. Sadler WW. Present evidence on the role of Meta in the epidemiology of Human brucellosis. Am J Public Health 1960; 50: 540-4
6. Hall WH. Brucellosis. In: Evans AS and feldman HA. Bacterial Infection of Human Epidemiology and Control . New York: Plenum, 1982: 156-9
7. Young EJ . Serologic Diagnosis of human brucellosis: Analysis of 214 cases by agglutination test and review of the Literature. Rev of Infect Dis 1991;13: 359 – 72
8. Gotuzzo E, Carrillo C, Guerra J, Liosa L. An evaluation of diagnostic methods for brucellosis: The value of bone marrow culture. J infect Dis 1986; 153: 122-5
9. Yaqupsky P, peled N, press J, Abramson O, Abu-Rashid M. Camparison of Bactec 9240 peds puls medium and isolator on 1.5 microbial tube for detection of Brucella melitensis from blood culture.J Clin Microbiol 1997; 35(6): 1382-4
10. Matar FM, Khreissir IA, Abdonnor AM. Rapid laboratory of a target sequence on the 31 kD Brucella antigen DNA. J Clin Microbiol 1996; 34: 477-8
11. Navarro EF. PCR assay for diagnosis of human brucellosis. J Clin Microbiol 1999; 35(5): 1654-5
12. Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. Medical Microbiology. London, Appelton & Lange, 1991: 244-7

۱۳-ادیب‌فر پرویز، میکروب‌شناسی پزشکی. تهران: ناشر مؤلف، چاپ بهمن ۱۳۶۸: ۴۱-۶۳۹.

14. Araj GF. Human Brucellosis : a classical infectious Disease with persistent Diagnostic challenges. Clin Lab Sci 1999; 12(4): 207 – 12
15. Araj GF, Lulu AR, Mustafa My, khateeb MI. Evaluation of Elisa in the diagnosis of acute and chronic brucellosis in human beings. J HyG (lond) 1986; 97(3): 457-69
16. Dabdoob WA, Abdulla ZA. A panel of eight tests in the serodiagnosis and Immunological evaluation of acute brucellosis. Eastern meditarranean Health journal 2000; 6(2/3): 304-312

۱۷-کریمی‌نیا، آمینا: «دات ایمونوبلاتینگ: امیدی تازه برای تشخیص تب مالت» مجله علمی پژوهشی تشخیص آزمایشگاهی۱۳۷۷ .سال اول، شماره ۳، صص ۳۱-۲۹.