

## راهاندازی (DIA) Dot- Immunoassay (الایزای نقطه‌ای) و مقایسه آن با ممانعت از هماگلوتیناسیون (HI) و الایزا (ELISA) در تشخیص سرخ

یوسف یحیی پور.<sup>۱\*</sup> دکتر طلعت مختاری آزاد.<sup>۲</sup> دکتر محمد محمودی.<sup>۳</sup> دکتر پژشکی.<sup>۴</sup> دکتر رخشنده ناطق<sup>۵</sup>

۱- کارشناس ارشد ویروس‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی تهران ۲- دانشیار گروه پاتوبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی تهران  
۳- دانشیار گروه آمار و اپیدمیولوژی دانشکده بهداشت تهران ۴- استاد گروه پاتوبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی تهران

**سابقه و هدف:** سرخ بیماری حاد و مسری در انسان است، که طبق برآورد سازمان بهداشت جهانی (WHO) تا سال ۲۰۱۰ احتمالاً ریشه‌کن خواهد شد. تشخیص سرخ با استفاده از سنجش‌های سریع و حساس برای پیشگیری و کنترل انتشار بیماری از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد.

**مواد و روشها:** روش‌های متعددی برای شناسائی آنتی‌بادی علیه ویروس سرخ بکار گرفته می‌شود، از جمله ممانعت از هماگلوتیناسیون (HI)، آنزیم ایمونواسی (EIA)، کاهش پلاک (PRN)، و روش خنثی سازی (NT) می‌باشد. یکی از روشها، روش (DIA) Dot-Immunoassay است. این روش یک نوع EIA تغییر یافته است که در آن بجای میکروپلیم از کاغذ نیتروسلولز بعنوان قان جامد استفاده مود و معرفه‌ای آن شامل مقار بسیار کمی از آنتی‌ژن سرخ، سرم بیمار (نمونه)، بافرهای شستشو، آنتی‌بادی نشاندرا و محلول سویسترا (برای ایجاد رنگ) می‌باشد.

**یافته‌ها:** نتایج حاصله نشان می‌دهد که DIA در مقایسه با HI به ترتیب دارای ۹۸/۸ و ۹۸/۵ درصد حساسیت و ویژگی است و در مقایسه با EIA به ترتیب از حساسیت و ویژگی معادل ۹۶/۵ و ۹۰ درصد برخوردار می‌باشد.

**نتیجه گیری:** این روش نسبت به سایر روش‌های تشخیص آزمایشگاهی از هزینه کم، عدم نیاز به تجهیزات خاص و گرانقیمت و سرعت عمل بالا برخوردار می‌باشد.

**واژه‌های کلیدی:** الایزای نقطه‌ای، ممانعت از هماگلوتیناسیون، الایزا، سرخ.

### مقدمه

مبلا می‌شوند و این بیماری بیش از یک میلیون نفر (خصوصاً کودکان) را در کشورهای در حال توسعه تلف می‌کند (۱ و ۲). تعدادی روش‌های تشخیصی برای شناسائی آنتی‌بادی ضد ویروس سرخ وجود دارد، از جمله شامل ممانعت از هماگلوتیناسیون (HI) یا الایزا، فیکساسیون کمپلمان (CF)، ایمونوفلورسانس (IF)، تست

سرخ یک بیماری عفونی حاد، بسیار مسری و مهم در انسان می‌باشد که با وجود واکسن زنده ضعیف شده، هنوز عامل اصلی مرگ و میر بچه‌ها در کشورهای در حال توسعه می‌باشد و موجب همه‌گیریهای مداومی در جوامع صنعتی می‌شود (۱). طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی (WHO) سالانه ۷۵ میلیون نفر در سراسر دنیا به سرخ

ژلاتین و ۲ میلی‌لیتر سرم نرمال بزرگ با یک گرم BSA (٪۱) به دیسکهای قرار گرفته در داخل چاهکهای میکروپلیت، اضافه شد.

بعد از یک ساعت محتویات چاهک را خالی نموده و رقت موردنظر سرم (۱/۳۰۰) تهیه شده در بافر NET به میزان ۷۵ میکرولیتر به دیسکها اضافه گردید. بمدت ۹۰ دقیقه در حرارت آزمایشگاه قرار داده و سپس بافر NET جایگزین سرم می‌شود، و بعد از ۱۰ دقیقه با خالی نمودن دوباره NET جدیدی اضافه می‌گردد و بعد از ۵ دقیقه NET را خالی کرده، میزان ۷۵ میکرولیتر از کوتزوگه Anti-Human IgG متصل به پراکسیداز (HRP) (بارقت  $\frac{۱}{۲۰۰}$ ) در NET، به آن اضافه گشته و بمدت یک ساعت در حرارت آزمایشگاه قرار گرفت. کوتزوگه را خالی نموده و مدت ۵ دقیقه با NET شستشو شده، سپس NET را خالی کرده و بافر TBS (NaCl ۱۹gr, Trisbase ۶/۰۵) بمدت ۵ دقیقه جایگزین شد.

درنهایت TBS را خالی کرده و محلول سوسترا (۴-کلرو-۱-نفتول) به تمام چاهکها اضافه و حدود نیم ساعت در تاریکی قرار داده شد و با ۲-۳ بار شستشو توسط TBS، رنگ آبی پرنگ (ارغوانی) در مرکز دیسک (محل coat کردن آنتی ژن) جلوی نور سفید خوانده شد. در روش HI از آنتی ژن سرخک، سرم بیمار، بافر PBS (محلول بافر فسفات) و گلبول قرمز میمون استفاده گردید. اساس کار این روش بر مبنای کمپلکس آنتی ژن و آنتی بادی است (۲).

مواد و وسایل مورد استفاده از سوی آزمایشگاه دکتر گرگانی و دانشکده بهداشت تهران اهداء شده است.

دو روش HI و EIA از روشهای روتین جهت تشخیص برخی عفونتهای ویروسی (مانند سرخک) در بخش ویروس‌شناسی دانشکده بهداشت می‌باشد.

#### یافته‌ها

تقسیم‌بندی رنگ حاصله بر اساس تعیین تیتر، بر

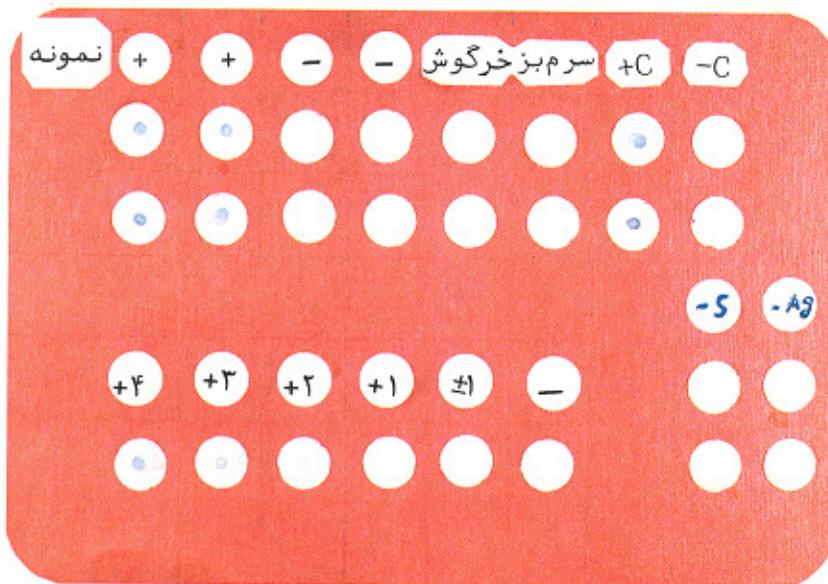
خنثی‌سازی (NT)، خنثی‌سازی کاهاش پلاک (PRN) و می‌باشد. در بین اینها روش HI بطور وسیع استفاده می‌شود که از نظر حساسیت و ویژگی برابر یا بیشتر از روش خنثی‌سازی سرم است و بر طبق گزارش‌های نیز از CF حساستر ولی نسبت به EIA از حساسیت کمتری برخوردار می‌باشد (۴۵). آنچه که مسلم است، همه این روشهای دارای مزايا و معایي هستند که عيب اصلی آنها نياز به تجهيزات آزمایشگاهی پرهزينه و گرانقيمت و نيز عدم كاربرد اين روشهای در شرایط صحرائي (Field) می‌باشد (۱). از معایي اصلی روش HI، نياز به گلبول قرمز میمون می‌باشد که در همه جا در دسترس نمي‌باشد و نيز در مورد EIA نياز به دستگاه گرانقيمتی بنام Elisa Reader می‌باشد.

روش DIA يك EIA تغيير يافته‌اي است که برای شناسائی آنتي ژن و آنتي باديهای ویروسی بكار می‌رود. اين روش، روشي ساده، سريع، ارزان، قابل تكرار، قابل اطمینان و با ویژگی خوب می‌باشد (۱۲-۱۵).

مهمترین مزیت DIA این است که می‌تواند در شرایط Field استفاده شود و نيازی به تجهيزات آزمایشگاهی نداشته و از نظر اقتصادي از هزينه بسيار کمی برخوردار می‌باشد، که در آن آنتي ژنها بر روی کاغذ نيتروسلولز قرار می‌گيرند (۱۳ و ۱۴).

#### مواد و روشهای

در روش DIA مقدار يك میکرولیتر از آنتي ژن سرخک با رقت  $\frac{۱}{۸}$  در مرکز دیسکهای کاغذ نيتروسلولز (دیسکها با قطر ۵ میلیمتر توسط دستگاه پانچ تهیه می‌گردد) قرار می‌گيرند. سپس دیسکهای حاوی آنتي ژن بمدت ۱۵ دقیقه در حرارت ۳۷ درجه سانتيگراد قرار گرفته تا خشک شوند. برای اشباع سازی ظرفیتهای خالي نيتروسلولز، ۷۵ میکرولیتر از محلول  $\frac{۱}{۱۷}$  (۵۳gr NaCL + ۱۲/۱gr tris base ۵۰mM + ۰/۰۵ gr NP-40، ۰/۰۵ gr EDTA ۵mM)



شکل ۱: نتایج حاصل از Dot-Immunoassay

سرم خرگوش و سرم بز؛ بعلت فردان IgG انسانی، حتماً باید کاملاً سفید و منفی باشند (کنترل). +C: سرم کنترل مثبت استاندارد که باید باشد رنگ +۴ شکل رسوپ دهد. -C: سرم کنترل منفی استاندارد که باید بدون تشکیل هیچ رسوپی کاملاً سفید و منفی باشد. -S: دیسکی که فاقد سرم بیمار (آنتی بادی IgG) می‌باشد، طبیعتاً باید کاملاً سفید و منفی باشد (کنترل). +Ag: دیسکی که فاقد آنتی زن (ویروس سرخک) می‌باشد، باید کاملاً سفید و منفی باشد (کنترل).

جدول ۱. نتایج بدست آمده از روش‌های HI ، EIA ، DIA بر روی نمونه‌های سرم بیمار مشکوک به سرخک

تعداد نمونه	تیتر حاصل از HI	نتایج حاصل از EIA				نتایج حاصل از DIA			
		منفی	+۱	+۲	+۳	+۴	منفی	ثبت	-
۱	۱:۴	-	۷	۲	-	-	-	۱۰	۱۰
-	۱:۸	۳۷	۱۵	۱۴	۵	۳	-	-	۳۷
-	۱:۱۶	۱۹	۱	۴	۴	۱۰	-	-	۱۹
-	۱:۳۲	۱۱	-	-	۲	۹	-	-	۱۱
-	۱:۶۴	۴	-	-	-	۴	-	-	۴
-	۱:۱۲۸	-	-	-	-	-	-	-	۰
-	۱:۲۵۶	۱	-	-	-	۱	-	-	۱
۱۱	منفی	۳	۱۰	۱	-	-	۱	-	۱۳
۱۲	۹۵	-	۸۵	۱۰	۲۸	۱۱	۲۰	۲۴	۲۴

نیتروسلولز) باقی می‌ماند. براساس شدت رنگ آبی در محل قرارگیری آنتی زن، نتایج از (+1) تا (+4) تقسیم‌بندی می‌گردد. نتیجه منفی با عدم ظهور رنگ در محل قرارگرفتن آنتی زن (کاملاً سفید) و نیز نتایجی

مبناً آخرین تیتر ایجاد کننده رنگ قابل مشاهده با چشم غیرمسلح می‌باشد. رنگ حاصله محدود به قسمت مرکزی (محلی) که آنتی زن در آن coat شده بود) می‌باشد و سایر قسمتهای دیسک به رنگ سفید (رنگ زمینه کاغذ

آنچی‌زنی که برای یک نمونه سرم در روش HI استفاده می‌گردد، می‌توان آنرا برای حداقل ۱۳۰۰ نمونه سرم با روش DIA آزمایش نمود.

- ۴- عدم نیاز به تجهیزات خاص و گرانقیمت و انجام آن در شرایط ساده آزمایشگاهی و نیز در شرایط Fiel
- ۵- انجام آزمایش با استفاده از قطره خون خشک شده بر روی کاغذ نیتروسلولز یا کاغذ صافی.

DIA با داشتن این خصوصیات می‌تواند در موارد مختلفی علاوه بر سرخک در بررسی انواع بیماریهای ویروسی (ایدز، سرخچه، هریس و...) انگلی، قارچی، باکتریایی و همچنین در شناسائی انواع آنتی‌زنها و آنتی‌بادیهای، اسید نوکلئیک و پروتئینهای محلول استفاده گردد (۱۸-۲۹). علاوه بر تشخیص آنتی‌بادیهای DIA برای شناسائی آنتی‌زنها موجود در نمونه بالینی نیز استفاده می‌شود (۱۵ و ۱۳).

نتایج مطالعات مختلف نشان می‌دهد که روش DIA از حساسیت و ویژگی بسیار خوبی برخوردار بوده و می‌توان از آن برای آزمایشگاههای کوچک و ساده، بویژه برای کشورهای در حال توسعه، استفاده نمود (۱۸ و ۱۵ و ۸ و ۷ و ۴). برخی از محققین، حساسیت آن را مساوی یا بیشتر از حساسیت روش‌های خنثی‌سازی، ممانت از هماگلوتیناسیون و ایمونوفلورسانس گزارش می‌دهند (۴). Tantivanich و همکارانش حساسیت و ویژگی این روش را برای شناسایی ویروس سین سی شیال تنفسی (RSV) از نمونه‌های بالینی به ترتیب ۶۲/۶۵ و ۹۲/۹۳ درصد بدست آوردند (۱۳).

برخی دیگر نشان داده‌اند که حساسیت DIA از روش الایزایکه در آن آنتی‌زن به میکروپلیت متصل می‌شود بیشتر است، که این حساسیت اضافی ممکن است ناشی از اتصال مفیدتر آنتی‌زن به غشاء نیتروسلولز باشد (۷ و ۶). پژوهش دیگری توسط آقای Chaicumpa و همکاران صورت گرفته است که بر اساس آن حساسیت و ویژگی روش الایزای نقطه‌ای را به ترتیب ۱۰۰ و ۹۵/۹۹ درصد

بارنگ بسیار ضعیف و مشکوک (+) مشخص می‌گردد که نهایتاً جزء نتایج منفی بحساب می‌آیند. با توجه به جدول بالا، از تعداد کل ۹۵ نمونه سرم، در روش HI، ۸۲ نمونه مثبت (دارای تیتر آنتی‌بادی) و ۱۳ نمونه منفی هستند. همین تعداد نمونه با روش EIA نمونه مثبت و ۱۰ نمونه دیگر منفی شدند. نهایتاً بررسی همین تعداد نمونه با روش DIA، تعداد ۸۳ نمونه مثبت و ۱۲ نمونه باقی مانده بعنوان نمونه منفی گزارش می‌شوند. در این بررسی یکبار روش HI و بار دیگر روش A به عنوان روشی مرجع برای مقایسه با DIA در نظر گرفته شد، و نهایتاً میزان حساسیت و ویژگی آنها نسبت به هم‌دیگر به ترتیب نسبت به HI برابر با ۸/۸ و ۸۵ درصد و همچنین این میزان در مقایسه با روش ELISA بترتیب معادل با ۹۶/۵ و ۹۰ درصد بدست آمد.

## بحث

از آنجاییکه شناسائی وجود آنتی‌بادی علیه ویروس سرخک یک روش انتخابی برای تشخیص اینمی علیه این بیماری است، آزمایشها متعددی برای سنجش آنتی‌بادی ضد ویروس سرخک در افراد بیمار و واکسینه بکار گرفته می‌شود، که از آن جمله می‌توان به آزمایشها کاهش پلاک، آزمایش خنثی‌سازی، ثبت مکمل، ممانت از هماگلوتیناسیون، الایزا و... اشاره کرد.

یکی دیگر از روش‌هایی که در سالهای اخیر برای شناسائی آنتی‌بادیهای مختلف از جمله آنتی‌بادی ضد DIA سرخک مورد استفاده قرار گرفته است، روش - (Dot Elisa) می‌باشد. در این روش که یک الایزای تغییر یافته است، بجای میکروپلیت از کاغذ نیتروسلولز به عنوان فاز جامد استفاده می‌شود. با توجه به نتایج بدست آمده در این بررسی، DIA دارای مزایای زیر می‌باشد:

- ۱- حساسیت و ویژگی بالا و قابل توجه.
- ۲- انجام آزمایش در زمان نسبتاً کوتاه (۴-۵ ساعت).
- ۳- مصرف آنتی‌زن بسیار کم: در این بررسی، از مقدار

شناسائی آنی بادیهای (IgG) بر ضد ویروسهای مختلف استفاده شود (۱۶ و ۱۵ و ۱۳ و ۱۱ و ۴).

لذا با توجه به بررسی انجام شده، چنین به نظر می‌رسد که تکنیک DIA با داشتن حساسیت و ویژگی نسبتاً خوب، هزینه بسیار کم، زمان کوتاهتر، عدم نیاز به تجهیزات آزمایشگاهی و سادگی در انجام آزمایش نسبت به روش‌های HI و DIA برای ارزیابی تعداد زیاد نمونه سرم، جهت تعیین سطح ایمنی جامعه در مقابل بیماری سرخک بسیار مناسب باشد. همچنین ارزیابی نمونه‌ها برای تعیین فاز حاد بیماری (شناسائی IgM) در یک نمونه سرم قابل تحقیق و بررسی می‌باشد.

بدست آورده‌اند (۱۷).

نتایج نشان می‌دهند که DIA در مقایسه با روش (HI) از حساسیت و ویژگی خوبی (به ترتیب ۹۸/۸ و ۸۰ درصد) برخوردار است. البته تعداد سرمهای منفی در این مطالعه اندک بود، و چنانچه تعداد بیشتری سرم منفی در دسترس باشد، ویژگی روش DIA نسبت به HI با دقت بیشتری تعیین خواهد شد. همچنین حساسیت و ویژگی DIA در مقایسه با روش (EIA) به ترتیب برابر با ۹۶/۵ و ۹۰ درصد می‌باشد.

اطلاعاتی که از گزارشات مختلف بدست آمده نشان می‌دهد که Dot-Elisa (DIA) می‌تواند بطور واقعی برای

\*\*\*\*\*

#### References

1. Griffin DE, Bellini WJ. Fields virology, 3rd ed, New York. Lippincott Raven 1996; pP: 1267-96.
2. Lennette EH, Lennette DdA, Lennette ET. Diagnostic procedures for viral, Rickettsial, and Chlamydial infections, 7th ed, 1995; 129-130, 155, 451-45.
3. Meilen V, Billeter MA. Measles virus. CTIM. Springer, 1995: 191-7.
4. Heberling RL, Kalter SS. Rapid dot- immunobinding assay on nitrocellulose for viral antibodies. J Clin Microbiol 1986; 23(1): 109-13.
5. Kalter SS, Heberling RL, Barry JD. Detection and titration of measles virus antibody by hemmagglutination inhibition and by dotimmunobinding assay. J Clin Microbiol 1991; 29(1): 202-4.
6. Condorelli F, Ziegler T. Dot - immunobinding assay for simultaneous detection of specific immunoglobulin G antibody to measles virus, Mumps virus, and Rubella virus. J Clin Microbiol 1993; 717-19.
7. Heberling RI, Kalter SS, et al. Serodiagnosis of rabies by dot - immunobinding assay. J Clin Microbiol 1987; 25: 1262-64.
8. Heberling RL, Kalter SS, et al. Dot immunobinding assay compared with enzyme linked immunosorbent assay for rapid and specific detection of retrovirus antibody induced by human or simian acquired immunodeficiency syndrome . J Clin Microbiol 1988; 26(4): 765-67.
9. Stott DI. Immunoblotting and dot blotting . J Immunol Meth, 1989; 119: 153-87.
10. Tolbot RJ, Knobler MA, et al. Western and dot immunoblotting analysis of viral antigens and antibodies; application of murine hepatitis virus. J Immunol Meth 1984; 43:177-88.

11. Towbin H, Gordon J. Immunoblotting and dot immunobinding current status and outlook. *J Immunol Meth* 1984; 72: 313-34.
۱۲. محمدزاده حاجی پیرلوح. راه اندازی تکنیک Dot- Elisa و استفاده از آن در تشخیص و بررسی سرو اپیدمیولوژیک کالازار. پایان نامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد دانشکده بهداشت ۸۷۳-۷۴.
13. Tantivanich S, Klongkamnuankarn K, Desakorn V. Simplified rapid diagnosis of respiratory syncytial virus form clinical specimens. *Asian pac Allergy Immunol* 1997; 15(2): 99-103.
14. Vercammen F, Berkvens D, Brandt J, Vansteenkiste W. A sensitive and specific 30 min dot - Elisa for the detection of anti- leishmania antibodies in the dog. *Vet - Parasitol* 1998; 79(3): 221-8.
15. Hawkes R, Niday E, Gordon J A. Dot- immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. *Anal Biochem* 1982; 119: 142-7.
16. Linda EM, Harry RL, et.al. Manual of laboratory immunology. 2nd ed, 1991; pp: 156-58.
17. Chaicumpa W, Sriamanote P, et al. Rapid diagnosis of cholera caused by vibrio cholera 0139. *J Clin Microbiol* 1998; 36(12): 3595-600.
18. Eliades P, Karagouni E, Stergiatou I, Miras K. A simple method for the serodiagnosis of human hydatid disease based on a protein A/Colloidal dye conjugate. *J Immunol Methods* 1998; 218(1-2): 123-32.