طراحی کیت اندازه‌گیری IgE اختصاصی آلرژن‌های شیر گاو به‌روش الایزا

غلامعلی کاردر[۱]
زهرا پورپاک[۲*]

۱- دانشجوی دکتری ژنتیک مولکولی
۲- گروه ایمونولوژی

مرکز تحقیقات ایمونولوژی، آسم و آلرژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۰۱/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۰۲/۲۹

چکیده

زمینه و هدف: شایع‌ترین سن بروز آلرژی غذایی در کودکان، کمتر از یک‌سال و آلرژی به شیر گاو شایع‌ترین آلرژی غذایی در این سن می‌باشد. برای تعیین نوع آلرژنی که بیمار به آن حساس است از آزمون‌های متعدد اختصاصی تشخیص آلرژی، که یکی از مهم‌ترین آن‌ها ارزیابی IgE اختصاصی علیه آلرژن می‌باشد، استفاده می‌گردد. در این مطالعه یکی از بهترین روش‌های سنجش IgE اختصاصی که به‌روش الایزا انجام می‌گیرد بر علیه سه نوع پروتیین شیر گاو شامل کازیین، آلفالاکتالبومین و بتالاکتوگلبولین راه‌اندازی شده است. ***روش بررسی:*** ابتدا دیسک‌های حامل آلرژن، طی انکوباسیون کاغذ نیتروسلولزی با هر یک از آلرژن‌های مورد مطالعه تهیه شد. پس از انکوبه کردن سرم‌ها بر روی دیسک‌های آلرژن، کونژوگه آنزیمی آلکالن فسفاتاز برای تست استفاده گردید. پس از بهینه‌سازی کلیه متغیرها، همه آن‌ها در کنار هم به‌شکل یک کیت طراحی شده و نمونه‌های سرم مثبت و منفی با آن همزمان با کیت‌های تجاری استاندارد ارزیابی و مقایسه گردید. ***یافته‌ها:*** نتایج حاصل از ارزیابی IgE اختصاصی در نمونه‌ها با کیت‌های طراحی شده در مقایسه کیت‌های تجارتی نشان دادند که ویژگی کیت‌های طراحی شده در این طرح برای کازیین، آلفالاکتالبومین و بتالاکتوگلبولین به‌ترتیب ۹۳٪، ۸۹/۷٪ و ۸۲/۸٪ و حساسیت آن‌ها به‌ترتیب ۸۶/۳٪، ۸۱/۳٪ و ۸۹/۶٪ بوده و با مقادیر به‌دست آمده از کیت‌های تجاری مشابه بودند (اختلاف معنی‌دار دیده نشد). ***نتیجه‌گیری:*** با توجه به حساسیت و ویژگی بالای کیت‌های طراحی شده و نتایج مشابه با کیت‌های تجاری می‌توان نتیجه‌گیری نمود که این کیت‌ها را می‌توان در داخل با قیمت تمام شده ارزان‌تر تهیه نموده و آن‌ها را به‌عنوان جایگزین کیت‌های تجاری گران‌قیمت جهت امور تشخیصی به‌کار برد.

کلمات کلیدی: آلرژی، شیر گاو، الایزا، راه‌اندازی، IgE اختصاصی.

*نویسنده مسئول: تهران، خیابان دکتر محمد قریب، شماره ۶۲، مرکز طبی کودکان، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، آسم و آلرژی، صندوق پستی: ۸۶۳-۱۴۱۸۵
تلفن: ۶۶۹۳۵۸۵۵
email: pourpakz@sina.tums.ac.ir

مقدمه

حساسیت به مواد غذایی شایع‌ترین آلرژی در کودکان زیر یک‌سال می‌باشد، که از میان آن‌ها آلرژی به پروتیین‌های شیر گاو Cow's Milk Allergy (CMA) از همه شایع‌تر است. با وجود این‌که اغلب پروتیین‌های شیر بالقوه آلرژی‌زا هستند ولی کازیین، بتا لاکتوگلبولین و آلفا لاکتالبومین از آلرژن‌های عمده شیر گاو می‌باشند. با توجه به مشکلات تغذیه‌ای و بهداشتی مهمی که این نوع حساسیت‌ها در نوزادان ایجاد می‌کنند، شناسایی نوع ماده آلرژی‌زا به‌منظور حذف آن از رژیم غذایی کودک و جایگزین کردن آن با شیر مناسب در رژیم غذایی بیمار یکی از ضرورت‌های مهم می‌باشد.[۱] به این جهت تست‌های اختصاصی تشخیص آلرژی درخواست می‌شود، که یکی از مهم‌ترین آن‌ها ارزیابی IgE اختصاصی ضد آلرژن است.[۲] در این تست که در حقیقت یک نوع تست Invitro می‌باشد و بر اساس سابقه بیماری فرد و با استفاده از اطلاعات پرسشنامه بیمار، برای تعدادی از آلرژن‌های مشکوک آزمایش انجام می‌شود، و نهایتاً نوع آلرژنی را که فرد به آن حساس است تعیین می‌نماید.[۳و۴] مهمترین روش‌هایی که امروزه برای تعیین میزان IgE اختصاصی در افراد مبتلا به آلرژی انجام می‌گیرد عبارتند از: الف) روش‌های اتوماتیک با دستگاه‌های پیشرفته اتوآنالیزر نظیر ImmunoCAP[۵و۶] و ب) روش‌های معمولی نظیر روش الایزا با استفاده از دیسک‌های آلرژن، که در این مطالعه نیز از این روش استفاده شده است.[۶و۷] البته قابل ذکر است که روش‌های اتوماتیک نیز همچون روش‌های معمولی بر اساس واکنش IgE

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-16]

اختصاصی با عصاره آلرژنی بنا شده‌اند.[۸] استفاده از روش الایزا به‌منظور ردیابی آنتی‌بادی‌های اختصاصی علیه این پروتیین‌ها توسط بسیاری از محققین گزارش شده است.[۹] این روش توسط تعدادی از شرکت‌های تهیه کننده مواد آزمایشگاهی، در تهیه کیت‌های آماده الایزا و در مورد اکثر مواد آلرژن به‌کار رفته و به‌صورت تجاری نیز در اختیار می‌باشد.[۱۰] برخلاف کیت‌های تشخیصی آزمایشگاهی دیگر، کیت‌های تشخیص آلرژی در انحصار چند شرکت محدود در دنیا می‌باشد، به طوری‌که دستیابی به هر یک از انواع کیت‌های فوق مشکل بوده و هزینه زیادی را نیز طلب می‌کند، به‌همین دلیل این آزمون فقط در چند آزمایشگاه معدود انجام می‌گردد. تاکنون تلاشی در زمینه تهیه این چنین کیت‌هایی در ایران انجام نشده است. لذا به‌منظور راه‌اندازی روش اندازه‌گیری IgE اختصاصی علیه آلرژن‌ها خصوصاً جهت کمک به کودکان ایرانی حساس به شیر گاو، در ابتدا در یک مطالعه[۱۱] مهم‌ترین پروتیین‌های شیر گاو یعنی کازیین، آلفالاکتالبومین و بتالاکتوگلوبولین جداسازی گردید و در ادامه با انجام این مطالعه کیت اندازه‌گیری آنتی‌بادی IgE اختصاصی در سرم با روش الایزا تهیه شده و بهینه‌سازی گردید.

روش بررسی

این مطالعه از نوع مطالعات بنیادی کاربردی است که در سال ۱۳۸۴ در مرکز تحقیقات ایمونولوژی آسم و آلرژی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شده است.

الف: افراد مورد مطالعه این پژوهش که برای ارزیابی حساسیت (Sensitivity) و ویژگی (Specificity) کیت‌های طراحی شده مورد بررسی قرار گرفتند شامل: ۲۹ کودک سالم که سابقه بیماری آلرژی به شیر گاو نداشتند و از بین بیمارانی که برای انجام جراحی‌های سرپایی نظیر ختنه به مرکز طبی مراجعه کرده بودند و سلامتی آن‌ها نیز تایید شده بود انتخاب شدند و از نمونه اضافی آزمایشات روتین آن‌ها جهت انجام آزمون‌های این تحقیق استفاده گردید (نمونه کنترل منفی) و ۱۵۳ کودک مبتلا به آلرژی به شیر گاو که حساسیت آن‌ها به شیر گاو بر اساس شرح حال، آزمون تست پوستی و آزمون RAST تأیید شده است (نمونه کنترل مثبت).

ب) برای مقایسه نتایج کیت‌های طراحی شده در این مطالعه با روش‌های استاندارد از دو گروه کیت استاندارد مشابه از دو شرکت معتبر به نام‌های Allergopharma Co. Italy و Allergen Basic Test, Biocheme Immune Systeme Ltd. Germany استفاده گردید.

ج) تعیین بهترین فیلتر برای کوت کردن آلرژن‌ها: برای تهیه دیسک آلرژن ابتدا می‌بایستی نوع فاز ثابت یعنی نوع دیسکی که باید آلرژن‌ها روی آن کوت شوند (Coating) انتخاب گردد، از بین چند نوع کاغذ و فیلتر موجود در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی شامل: فیلترهای استات سلولز، نیتروسلولز، کاغذ واتمن یک و کاغذ خشک‌کن (Filtrak) برای انتخاب بهترین فیلتر استفاده گردید. در آزمون‌های این مرحله دیسک‌هایی به قطر شش میلی‌متر تهیه شد.

د) تعیین بهترین غلظت آلرژن برای کوت کردن روی فیلتر: پس از انتخاب فاز ثابت می‌بایستی غلظت مناسب آلرژن‌های تخلیص شده[۱۱] برای کوت کردن روی فیلتر تعیین گردد. لذا غلظت‌های سریال از ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تا غلظت ۳/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر برای تعیین غلظت مناسب برروی دیسک‌ها کوت گردید. سپس اجازه داده شد در دمای آزمایشگاه دیسک‌ها خشک شده و پس از آن با محلول بلوکه کننده (محلول‌های ۳٪ سرم آلبومین گاوی در بافر فسفات سالین) سطوح خالی دیسک طی دو ساعت در دمای اتاق بلوکه گردید و در ادامه آن‌ها را شستشو داده و در شرایط مرطوب در یخچال تا زمان انجام آزمون نگهداری گردید.[۱۲و۱۳]

ه) تعیین بهترین آنزیم برای تهیه کونژوگه: در کیت‌های تجاری سنجش IgE اختصاصی، معمولاً از آلکالن فسفاتاز به‌عنوان آنزیم کونژوگه استفاده می‌گردد. در این مطالعه ابتدا دو آنزیم رایج در کیت‌های الایزا یعنی آلکالن فسفاتاز و پراکسیداز ضد IgE انسانی (Allergopharma Co.) با هم مقایسه شدند. برای کونژوگاسیون آنتی IgE آنتی‌بادی با آلکالن فسفاتاز، ۰/۵ میلی‌گرم آنتی‌بادی ضد IgE انسانی (RαhIgE, specific ε chain, Dako) با یک میلی‌گرم آنزیم آلکالن فسفاتاز (Phosphatase Alkaline 7500 U, Roche) مخلوط گردیده و یک شب در شرایط بافر PBS (PH 7.4) در چهار درجه دیالیز گردید و به این مخلوط ۰/۲٪ محلول گلوتارآلدئید افزوده شد و پس از مخلوط کردن در شرایط آزمایشگاه دو ساعت انکوبه گردیده و به هم حجم آن محلول ۱۰۰ میلی‌مولار اتانول آمین افزوده شد و پس از دو ساعت انکوباسیون در شرایط آزمایشگاه، در شرایط PBS یک شب دیالیز گردید. پس از آن محلول دیالیز شده با دور RPM ۲۰۰۰۰ به‌مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ گردید و محلول رویی واجد

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-16]

آنتی‌بادی‌های کونژوگه شده جدا گردید و پس از افزودن ۱٪ سرم آلبومین گاوی، پنج میلی‌مولار کلرید منیزیم و ۰/۲٪ سدیم آزاید در چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.[۱۰و۱۴و۱۵]

و) تعیین زمان پایداری دیسک‌های آلرژن و آنزیم: برای این منظور دیسک آلرژن و آنزیم تایید شده در فواصل زمانی ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ روز مجدداً ارزیابی‌شده تا حداکثر زمان ماندگاری آن‌ها محاسبه گردد.

ز) پس از تعیین بهترین متغیرها می‌بایستی همه متغیرها در کنار هم به‌شکل یک کیت قرار گرفته و نمونه‌های مثبت و منفی با آن ارزیابی گردد و همزمان تست در کیت تجاری نیز انجام شده و نتایج مقایسه گردد. شرایط آزمایش و روش انجام آزمون مانند زمان‌های انکوباسیون، میزان نمونه‌گذاری و شستشو با بافر فسفات سالین واجد ۰/۰۵٪ توین ۲۰ (PBS/T)، مشابه کیت تجاری در نظر گرفته شد. ابتدا به تعداد نمونه‌های سرم مثبت و منفی، دیسک آلرژن در ته چاهک میکروپلیت ته صاف قرار داده شد و همزمان از دیسک‌های استاندارد کیت تجاری برای رسم منحنی استفاده شد، سپس ۵۰µl نمونه سرم روی هر دیسک اضافه و در دمای ۳۷ درجه یک‌ساعت انکوبه گردید. پس از آن چاهک‌ها سه بار با بافر PBS/T شستشو شده و پس از دور ریختن بافر اضافی به هر وِل ۵۰ میکرولیتر از رقت ۱/۱۰۰ از کونژوگه آلکالن فسفاتاز اضافه گردید. پس از سه ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه، چاهک‌ها را با PBS/T سه بار شستشو داده و به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر سوبسترا- محلول یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر 4-Nitrophenol Phosphate (Roche) اضافه گردید. پس از یک‌ساعت انکوباسیون پلیت در دمای ۳۷ درجه و دور از نور، واکنش آنزیمی با محلول سود یک نرمال متوقف گردید. برای خواندن OD جذب، ۲۰۰ میکرولیتر از هر ول برداشته و به میکروپلیت جدیدی منتقل گردیده و با دستگاه ELISA Reader در طول موج ۴۰۵ نانومتر خوانده شد. با مقایسه نتایج با OD استانداردها، نمونه‌ها از نظر منفی یا مثبت بودن نسبت به هر آلرژن بررسی گردیدند.[۱۶] نهایتاً با مقایسه نتایج حاصل از آزمون‌های همزمان نمونه‌های مثبت و منفی در کیت تجاری و کیت طراحی شده، درصد حساسیت و ویژگی کیت‌ها محاسبه گردید.

یافته‌ها

برای تهیه کیت کامل با توجه به متغیرهای زیاد مطالعه در ابتدا می‌بایستی هر یک از متغیرها به‌تنهایی مورد بررسی قرار می‌گرفت و نهایتاً در کنار هم یک کیت طراحی می‌گردید. برای این منظور از یک کیت استاندارد تجاری استفاده گردید. به طوری‌که در هر مرحله یکی از اجزا با کیت تجاری که آن جزء آن جایگزین شده است بر روی نمونه‌های مثبت و منفی انجام گردید، به‌عنوان مثال در مرحله اول طرح یعنی تعیین بهترین فیلتر برای تهیه دیسک آلرژن، پس از تهیه چند نوع دیسک، سرم‌های مثبت و منفی با کیت تجاری- که از دیسک‌های تهیه شده در این مطالعه جایگزین شد- ارزیابی گردیدند و مورد مقایسه به کیت تجاری معادل آن و دیسک‌های تجاری قرار گرفتند. با توجه به نتایج به‌دست آمده، فیلتر نیتروسلولزی به‌دلیل داشتن حداکثر OD در نمونه‌های مثبت و کمترین OD را برای نمونه منفی نشان داده است، بهترین انتخاب برای تهیه دیسک آلرژن بوده است. نتایج آزمون‌های به‌عمل آمده بر روی غلظت‌های مختلف آلرژن‌ها جهت تهیه دیسک آلرژن نشان داد که غلظت ۱mg/ml، حداقل غلظت از آلرژن که بیشترین OD را داده است، برای تهیه دیسک در این آلرژن‌ها کافی است. همچنین نتایج حاصل از اکتیویتی دیسک‌های آلرژن نشان داد که این دیسک‌ها تا ۴۵ روز در یخچال قابل نگهداری بوده و حساسیت لازم را دارا می‌باشند. آزمون‌های اولیه برای انتخاب نوع آنزیم جهت استفاده در کیت نشان داد که به‌دلیل بیشتر بودن حساسیت آلکالن فسفاتاز در این سیستم و واکنش غیر اختصاصی آنزیم پراکسیداز با فیلتر، آلکالن فسفاتاز انتخاب شده و کونژوگه گردید. پس از تهیه کونژوگه آنزیمی، در یک سری تست پایلوت، رقت مناسب برای کونژوگه جهت انجام آزمون‌های نهایی به‌دست آمد. رقت به‌دست آمده کونژوگه، نسبت یک به ۱۰۰ با محلول بلوکه‌کننده، رقیق شده و استفاده گردید و از آنجا که کونژوگه تهیه شده فاقد پایدار کننده بود، در شرایط یخچال فقط یک‌ماه فعالیت لازم را برای انجام آزمون داشته است. پس از بهینه‌سازی کیت‌های طراحی شده، مقادیر IgE اختصاصی ضد آلرژن‌های کازیین، آلفا لاکتالبومین، بتا لاکتوگلبولین در نمونه‌های مثبت و منفی و در هر یک از کیت‌های تجاری و طراحی شده ارزیابی و نتایج مقایسه شد (جدول ۱). با کمک فرمول‌های ارزیابی حساسیت و ویژگی و نتایج مندرج در جدول ۱، حساسیت و ویژگی هر یک از کیت‌های سنجش IgE اختصاصی علیه سه آلرژن مطالعه شده در طرح به‌دست آمده است که به‌طور خلاصه در جدول ۲ با مقادیر گزارش شده در بروشور کیت‌های تجاری مقایسه گردیده است.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-16]

جدول-۱: مقایسه نتایج به‌دست آمده از آزمون‌های انجام شده با کیت طراحی شده و کیت تجاری (Allergopharma Co.)

آلرژن	نمونه مثبت (n=۱۵۳)			نمونه منفی (n=۲۹)		
	کیت تجارتی	کیت طرح	منفی کاذب	کیت تجارتی	کیت طرح	مثبت کاذب
کازیین	۷۲	۶۳	۱۰	۲۹	۲۷	۲
آلفالاکتالبومین	۴۸	۳۹	۹	۲۹	۲۶	۳
بتا لاکتوگلبولین	۶۴	۶۰	۷	۲۹	۲۴	۵

جدول-۲: مقایسه حساسیت و ویژگی کیت‌های تجارتی و کیت طراحی‌شده در این طرح

کیت	حساسیت (درصد)			ویژگی (درصد)		
	کازیین	آلفا لاکتالبومین	بتا لاکتوگلبولین	کازیین	آلفا لاکتالبومین	بتا لاکتوگلبولین
کیت تجارتی*	>۹۰	>۹۰	>۹۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
کیت تجارتی**	۶۵	۶۵	۶۵	۹۹	۹۹	۹۹
کیت طرح	۸۶/۳	۸۱/۳	۸۹/۶	۹۳/۱	۸۹/۷	۸۲/۸

* ELISA: Allergopharma Co. Italy، (سیستم الایزا با دیسک‌های آلرژن) ** ELISA: Allergen Basic Test, Biocheme Immune Systeme Ltd. Germany (الایزا با سیستم بیوتین- اویدین)

بحث

طبق نتایج به‌دست آمده در این طرح، مشاهده می‌گردد که حساسیت کیت‌های طراحی شده در مقایسه با کیت‌های تجاری Allergopharma مشابه بوده است و اختلاف چشمگیر ندارند به طوری‌که به‌جز کیت آلفالاکتالبومین که پایین‌تر است، در بقیه موارد اختلاف کمی وجود دارد. البته این حساسیت نسبت به کیت تجاری دوم که آن هم به‌روش الایزا با سیستم بیوتین- اویدین می‌باشد و در جدول ۳ مقایسه شده است، بیشتر است. همان‌طور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود ویژگی کیت‌های طراحی شده در این طرح اگر چه برای کازیین ۹۳٪، برای آلفالاکتالبومین ۸۹/۷٪ و برای بتالاکتوگلبولین ۸۲/۸٪ که بسیار خوب است ولی به‌طور کلی کمتر از ویژگی هر یک از دو کیت تجاری است. مقادیر حساسیت و ویژگی هر یک از کیت‌های تجاری بر اساس بروشور یا Data Sheet کمپانی که در آن مشخصات کیت درج گردیده است استخراج و در جدول جهت مقایسه درج گردیده است. احتمالاً پایین بودن نسبی ویژگی کیت‌های طرح در مقایسه کیت‌های تجاری می‌تواند به‌دلیل عدم استفاده از پایدارکننده‌ها باشد. به طوری‌که ممکن است طی مراحل نگهداری، به‌خصوص نگهداری دیسک‌های آلرژن در یخچال، ماهیت آلرژن‌ها تغییر کرده و در نتیجه در حساسیت و ویژگی کیت نقش مهمی می‌تواند داشته باشد.[۳و۸] همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود علاوه بر جواب‌های منفی کاذب در کیت‌های این مطالعه که در اندازه‌گیری حساسیت محاسبه شده‌اند، در چند مورد از نمونه‌های مثبت، جواب با کیت‌های این مطالعه مثبت بوده ولی در کیت‌های تجاری جواب منفی بوده است- مجموع تعداد منفی کاذب و تعداد مثبت مساوی تعداد مثبت تجاری نیست- که طبق موارد زیر آنالیز گردیدند: نمونه‌هایی که مثبت بودن آن‌ها با شرح حال، تست پوستی و چالش تائید گردید به‌عنوان مثبت واقعی در فرمول حساسیت در نظر گرفته شده است (برای کیت تجاری منفی کاذب تلقی می‌شود) و نمونه‌هایی که مثبت بودن آن‌ها مورد تائید تست پوستی و چالش نبوده است به‌عنوان مثبت کاذب در فرمول ویژگی در نظر گرفته شده‌اند.[۵و۱۷] روش‌های اتوماتیک جدید برای تشخیص بیماران آلرژیک همچنان بر پایه واکنش IgE اختصاصی با عصاره آلرژن بنا نهاده شده‌اند. به‌عنوان مثال روش اتوماتیک ImmunoCAP که امروزه بسیاری از مراکز تشخیصی جهان از آن استفاده می‌نمایند بر همین اساس استوار است. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۹ توسط Lee بر روی سرم بیماران مبتلا به آلرژی انجام شد دو روش ImmunoCAP و Immulite مقایسه گردید. نتایج این مطالعه نشان داد روش اخیر که یک روش ایمونواسی کمی لومینسانس است از حساسیت و ویژگی مشابه‌ای با روش ImmunoCAP برخوردار است. همچنین در مطالعه

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-16]

Hamilton که در سال اخیر انجام شده است IgE اختصاصی ضد آلرژن‌های شیر گاو با سه روش اتوماتیک ارزیابی گردیده و نتایج با روش جدید میکرواری مقایسه گردیدند. نتایج آن مطالعه نشان داد با وجود پیشرفت‌های چشمگیر در طراحی و ساخت دستگاه‌های اتوماتیک سنجش سریع IgE اختصاصی، حساسیت این روش‌ها افزایش چشمگیری نداشته است به طوری‌که حساسیت روش‌های فوق در محدوده ۹۵-۹۰٪ می‌باشد که در مقایسه با روشی که در این مطالعه بهینه گردید ترقی چشمگیری نشان نمی‌دهند.[۱۸و۸و۵] بنابراین با وجود روش‌های نوین و اتوماتیک سنجش IgE اختصاصی، روش‌های معمولی و ساده‌تر نظیر روشی که در این مطالعه بهینه‌سازی شده است همچنان مورد اعتماد و قابل استفاده می‌باشند. این در حالی است که روش‌های معمولی احتیاجی به دستگاه‌های پیشرفته و گران‌قیمت نداشته و تنها با امکانات ساده و یک دستگاه الایزا ریدر قابل انجام می‌باشند. یکی از محدودیت‌های مطالعه پایدار نبودن کونژوگه آنزیمی به‌علت نداشتن پایدار کننده (Stabilizer) بوده است که مصرف آن‌را در دراز مدت با مشکل مواجه می‌کند به طوری‌که نمی‌توان آن‌را به شکل تجاری تهیه کرد و می‌بایستی در مطالعات بیشتر فرمول تهیه آن‌را به‌دست آورده و برای این کیت و کیت‌های مشابه به کار برده شوند. همچنین دیسک‌های آلرژن تهیه شده نیز تنها تا ۴۵ روز برای انجام تست قابل استفاده هستند که این نیز از محدودیت‌های مطالعه می‌باشد.[۱۶] در نهایت با در نظر گرفتن امکانات موجود و همچنین انجام چنین طرحی برای اولین بار در کشور، نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که می‌توان چنین کیت‌های تشخیصی را در داخل تولید کرد و ضمن عدم وابستگی به خارج، هزینه‌های آزمایشگاهی را در این بیماران کاهش داد.

سپاسگزاری: این مطالعه با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران، در قالب یک طرح تحقیقاتی در مرکز تحقیقات ایمونولوژی، آسم و آلرژی انجام شده است.

References

1. Sampson HA. Adverse reactions to foods. In: Adkinson NF, Yunginger JW, Busse WW, Bochner BS, Holgate ST, Simons FER. Middleton's Allergy Principles and Practice. 6th ed. Elsevier Co. 2003.
2. Nolte H, DuBuske LM. Performance characteristics of a new automated enzyme immunoassay for the measurement of allergen-specific IgE. Summary of the probability outcomes comparing results of allergen skin testing to results obtained with the HYTEC system and CAP system. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1997;79(1):27-34.
3. Yang AC, Arruda LK, Santos AB, Barbosa MC, Chapman MD, Galvão CE, et al. Measurement of IgE antibodies to shrimp tropomyosin is superior to skin prick testing with commercial extract and measurement of IgE to shrimp for predicting clinically relevant allergic reactions after shrimp ingestion. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125(4):872-8.
4. Poulsen LK, Weeke B. Aluminium hydroxide adsorbed allergens used in modified RAST. *Allergy* 1985;40(6):405-16.
5. Hamilton RG. Clinical laboratory assessment of immediate-type hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125(2 Suppl 2):S284-96.
6. Ewan PW, Coote D. Evaluation of a capsulated hydrophilic carrier polymer (the ImmunoCAP) for measurement of specific IgE antibodies. *Allergy* 1990;45(1):22-9.
7. Bousquet J, Chanez P, Chanal I, Michel FB. Comparison between RAST and Pharmacia CAP system: a new automated specific IgE assay. *J Allergy Clin Immunol* 1990;85(6):1039-43.
8. Mazur G, Pethran A. Detection of specific IgE in isocyanate and phthalic anhydride exposed workers: comparison of RAST RIA, Immuno CAP System FEIA, and Magic Lite SQ. *Allergy* 1993;48(8):627-30.
9. Bernard H, Créminon C, Yvon M, Wal JM. Specificity of the human IgE response to the different purified caseins in allergy to cow's milk proteins. *Int Arch Allergy Immunol* 1998;115(3):235-44.
10. Harlow ED, Lone D. Using Antibodies: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
11. Pourpak Z, Mostafaie A, Hasan Z, Kardar GA, Mahmoudi M. A laboratory method for purification of major cow's milk allergens. *J Immunoassay Immunochem* 2004;25(4):385-97.
12. Walsh BJ, Sutton R, Wrigley CW, Baldo BA. Allergen discs prepared from nitrocellulose: detection of IgE binding to soluble and insoluble allergens. *J Immunol Methods* 1984;73(1):139-45.
13. Walsh BJ, Wrigley CW, Baldo BA. Simultaneous detection of IgE binding to several allergens using a nitrocellulose 'polydisc'. *J Immunol Methods* 1984;66(1):99-102.
14. Bierer B, Coligan JE, Margulies DH, Shevach EM, Strober W. Current Protocol in Immunology. New York: John Wiley and Sons Inc; 2004.
15. Hay FC, Westwood OMR. Practical Immunology. 4th ed. Oxford: Blackwell Science; 2002.
16. Singh BP, Sridhara S, Malhotra M, Tulsani NB, Gangal SV. Development of allergen-coated paper discs for allergy diagnosis by ELISA. *Biotechnol Appl Biochem* 2000;32 (Pt 1):15-9.
17. Gavrović-Jankulović M, Cirković T, Burazer L, Vucković O, Jankov RM. IgE cross-reactivity between meadow fescue pollen and kiwi fruit in patients' sera with sensitivity to both extracts. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2002;12(4):279-86.
18. Lee YW, Sohn JH, Lee JH, Hong CS, Park JW. Allergen-specific IgE measurement with the IMMULITE 2000 system: intermethod comparison of detection performance for allergen-specific IgE antibodies from Korean allergic patients. *Clin Chim Acta* 2009;401(1-2):25-32.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-16]

Tehran University Medical Journal; Vol. 68, No. 3, Jun 2010: 147-152

The design of a "specific- IgE ELISA assay kit" for major cow's milk allergens

Gholam Ali Kardar M.Sc.[1]
Zahra Pourpak M.D., Ph.D.[2*]

1- Ph.D. Student in Molecular Genetic
2- Department of Immunology

Immunology, Asthma & Allergy Research Institute, Children's Medical Center, Tehran University of Medical Sciences

Received: April 10, 2010 Accepted: May 19, 2010

Abstract

Background: The hypersensitivity to cow's milk allergens is the most common allergies in children at the first year of life. The specific IgE evaluation is one of the important methods in diagnosis of allergic disease. The aim of this study was development of a sensitive and credible procedure for detection of cow's milk allergens specific IgE.

Methods: The allergen discs were prepared by coating of allergens on nitrocellulose paper. After incubation of allergen discs with patients serum, anti-human IgE conjugated were used. In following optimization of any step of ELISAs test, a complete kit was designed. Efficiency of designed kits were evaluated by determination of specific IgE in normal (n= 29) and patient (n= 153) children serum samples and compared with commercial kits.

Results: The specific IgE against three allergrns involving casein, α-lactalbumin and β-lactoglobulin were measured on normal and patient children serum with designed and commercial ELISA kits. Results were demonstrated specificity of 93%, 89.7% & 82.8% and sensitivity of 86.3%, 81.3% & 89.6% respectively for casein, α-lactalbumin and β-lactoglobulin specific kits and these results were similar and comparable with commercial kits.

Conclusion: The Designed kits in comparison with the commercial kits were showed equivalent sensitivity and specificity. The designed kit stability was ultimately one month, probably due to don't using of stabilizers for prepared allergen discs. We suggest these kits for commercial product in Iran and we hope be helpful for easier accesses for Cow's milk allergy diagnosis and extend that for other allergens.

Keywords: Allergy, cow's milk, ELISA, specific IgE.

* Corresponding author: Immunology, Asthma & Allergy Research Institute, Children's Medical Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran 14194; Iran.
Tel: +98-21-66935855
email: pourpakz@sina.tums.ac.ir

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-16]