

بررسی روش میکروآگلوتیناسیون در تعیین تیتر آنتی بادیهای ضد بروسلا در انسان

دکتر احمد مرشدی* - دکتر محمدباقر اسلامی* - حمیده طباطبائی*

سرم بیمارگاهش می‌یابد ولی در بعضی از بیماران آنتی‌بادی از کلاس IgM حتی پس از درمان تا مدت‌ها در سرم خون باقی می‌ماند. دلیل در این بیماری تمایز آنتی‌بادیهایی موجود در سرم از کلاس IgG و IgM مورد توجه است و برای این منظور از آزمون (2ME) 2-Mercapto ethanol استفاده می‌شود. آزمون 2ME فقط پادتن‌های از کلاس IgG را مورد سنجش قرار می‌دهد از این رو مفیدترین آزمایشی است که نشان می‌دهد بیمار درمان شده است یا عفونت هنوز از بیمار ریشه کن نشده است. (۱ و ۲)

در سالهای اخیر بعضی از محققین روش میکرو-آگلوتیناسیون را بواسطه دارا بودن مزایایی برای تعیین پادتن‌های آگلوتینان و غیر آگلوتینان معرفی کرده‌اند. روش میکروآگلوتیناسیون اساساً " مشابه آزمون رایت می‌باشد با این تفاوت که مقادیر بسیار کمی از سرم و آنتی‌ژن در آن بکار می‌رود. در سال ۱۹۸۰ Beaton و Gilbert (۳) آزمون میکروآگلوتیناسیون (MAT) را بجای آزمون‌های STA و AHG بکار بردند سپس در سال ۱۹۸۱ Brown و

بروسلوز (تب مالت) یکی از بیماریهای عفونی شایع در انسان و بعضی از حیوانات اهلی می‌باشد و جستجوی آنتی‌بادی ضد باکتری مولد این بیماری در سرم بیماران برای تایید تشخیص کلینیکی و تعیین خط مشی معالجه و همچنین برای بررسی‌های اپیدمیولوژی حائز اهمیت است.

روش جاری برای تشخیص سرولوژیکی این بیماری استفاده از آزمون رایت Wright است که یک آزمون استاندارد آگلوتیناسیون در لوله (Standard Tube Agglutination) می‌باشد. در موارد منفی کاذب یعنی زمانی که پادتن‌های ناکامل یا غیر آگلوتینان در سرم بیمار وجود دارد و مانع آگلوتیناسیون این باکتری می‌شود آزمون Coombs' wright یا (AHG) Anti Human Globulin test را برای تایید نهایی بکار می‌برند.

پس از ابتلا به این بیماری آنتی‌بادی اختصاصی از کلاس IgG و IgM برضد این باکتری در بدن تولید می‌شود. در صورت درمان بموقع و کامل، آنتی‌بادی از کلاس IgG در

* بخش ایمنولوژی دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی.

نمونه های سرم ابتدا به نسبت $\frac{1}{10}$ در آب نمک فیزیولوژی محتوی ۵/۵ درصد فنل رقیق شد و سپس رقت های دو گانه از $\frac{1}{10}$ تا $\frac{1}{1280}$ در لوله های 12×76 میلیمتر تهیه گردید. بهر لوله ۵/۵ میلی لیتر آنتی ژن که به نسبت $\frac{1}{10}$ در آب نمک فنیکه رقیق شده بود اضافه و پس از تکان دادن بمدت ۱۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد گذاشته و سپس خوانده و ثبت میگردد. کمترین رقتی که ۵۰٪ آگلوتیناسیون در آن دیده می شد بعنوان تیترنهائی سرم گزارش میگردد. تمام سرمهائی که در آزمون رایب آگلوتیناسیون ضعیف (+۱) و یا منفی داشتند در ۲۰۰۰ دور بمدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید و رسوب دوبار با آب نمک فیزیولوژی شستشو داده شد سپس بهر لوله ۵/۵ میلی لیتر سرم آنتی گلوبولین رقیق شده اضافه و پس از تکان دادن بمدت ۱۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد گذاشته شد. کمترین رقتی که در آن ۵۰٪ آگلوتیناسیون ایجاد شد بعنوان تیترومبس رایب گزارش گردید.

روش میکروآگلوتیناسیوی:

از میکروپلیت که ته حفرات آن بشکل ۱۷ است استفاده گردید. برای هر نمونه سرم یک ردیف ۱۰ حفره ای در نظر گرفته و روی هر میکروپلیت ۷ نمونه سرم و یک سرم شاهد آزمایش شد. ابتداء سرم مورد آزمایش را به نسبت $\frac{1}{10}$ در لوله رقیق نموده و ۱/۰ میلی لیتر از آنرا با میکروپی پت برداشته و به حفره اول ریخته و با میکروپی پت ۵/۰ میلی لیتری رقت های دو گانه را از $\frac{1}{10}$ تا $\frac{1}{1280}$ تهیه نمودیم باین ترتیب در هر حفره ۵/۰ میلی لیتر باقی ماند. آنتی ژن بروسلا را به نسبت $\frac{1}{10}$ در PBS محتوی ۵/۰۵ سافرانین ۵ رقیق کرده و بهر حفره ۵/۰۵ میلی لیتر اضافه نمودیم باین ترتیب رقت سرم در تمام حفرات دو برابر شده و در حفره اول رقت $\frac{1}{40}$ گردید. پلیت ها را بوسیله نوار پارافین پوشانیده و بمدت ۲۰ ثانیه آنرا تکان داده آنگاه ۱۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد گذاشته شد. قبل از خواندن نتیجه میکروپلیت را بمدت یک دقیقه بحالت شیب ۶۰ درجه نسبت به افق قرار داده سپس نتیجه ثبت میگردد. چنانچه دکمه رسوبی ایجاد شده در مرکز حفره بطرف دیواره حفره جاری می شد، مساوی عدم آگلوتیناسیون و در صورتیکه دکمه رسوبی وجود نداشته و یا

همکاران (۴) آزمون MAT را با استفاده از پادگن رنگ شده با سافرانین ۵ برای تعیین پادتن های ضد بروسلا بکار بردند و نتایج خوبی بدست آوردند.

بررسی های این پژوهشگران نشان می دهد که روش میکروآگلوتیناسیون فوق العاده حساستر از آزمونهای STA و AHG در لوله بوده و نظریه اینکه روش میکرو میتواند سریع تر انجام شود، و مقادیر کمتری سرم و آنتی ژن در آن بکسار می رود از این رو علاوه بر استفاده در تشخیص طبی کاربرد جالب توجهی در بررسی های اپیدمیولوژی روی جمعیت های انسان و دام پیدا مینماید.

از آنجا که بررسی های قبلی توسط برخی از محققین نتایج یکسانی که بتوان آزمون را استاندارد شده تلقی نمود بدست نداده است باین جهت تحقیق حاضر با این هدف که بتواند روش مذکور را از نظر کمی و کیفی ارزیابی نماید انجام گرفت. در این بررسی روش میکروآگلوتیناسیون همزمان با آزمونهای STA و AHG و با استفاده از پادگن رنگی روی ۱۶۰ نمونه سرم که برای تعیین عیار پادتن ضد بروسلا به بخش ایمنولوژی دانشکده بهداشت فرستاده شده بود انجام گردید و نتایج بدست آمده مورد مقایسه و ارزیابی قرار می گیرد.

مواد و روش کار:

سرم: از خون بیمارانی که برای تشخیص سرولوژیکی بروسلوز به دانشکده مراجعه میکردند بدست می آمد. سرم جدا شده بمدت یک شب در یخچال میماند و روز بعد آزمایشات سرولوژی مربوطه روی آن انجام میگرفت.

پادگن: عبارت از آنتی ژن بروسلا آبورتوس سویه ۱۹ بدون رنگ بود که از موسسه سرم سازی رازی تهیه و در هنگام کار برای روش میکرو به نسبت $\frac{1}{10}$ در PBS (Phosphate Buffer Saline) ۷/۲: PH محتوی ۵/۰۰۵ درصد سافرانین رقیق و مصرف گردید. برای تهیه محلول سافرانین ۵/۰۰۵ درصد، ابتدا نیم گرم پودر سافرانین ۵ را در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل کرده و سپس یک میلی لیتر از آنرا به ۹۹ میلی لیتر PBS اضافه میگردد. (۴)

آزمون آگلوتیناسیون در لوله

آزمونهای STA و AHG بر اساس روشهائی که بوسیله Robertson (۵) در ۱۹۸۰ نوشته شده انجام گرفت.

شدند بطوریکه ۶۸ مورد آن (۵۱٪) با هر دو روش تیتتر کاملاً یکسان داشتند و ۱۱۲ مورد آن (۸۵/۴٪) با قبول یک رقت بالاتر و یا پائین تر (± 1 dilution) در این دو روش با هم توافق داشتند. و ۲۱ مورد (۱۶٪) در این دو آزمون اختلاف تیتتر بیش از یک رقت نسبت بیکدیگر داشتند ولی بطوریکه جدول نشان می‌دهد این عدم توافق یا اختلاف تیتتر بین دو روش (بجز در یک مورد) بعلت بالاتر بودن دو و یا بیش از دو رقت در تیتتر میکروآگلوتیناسیون بوده است. بطور کلی در هر نمونه که بین دو آزمون اختلاف تیتتر وجود داشت تیتتر بیشتر در اکثر موارد مربوط به آزمون میکرو-آگلوتیناسیون بوده است. چنانچه آمار و ارقام فوق را بطور کلی در مورد نمونه های منفی و مثبت یکجا بیان کنیم نتایج زیر بدست می‌آید:

۱- در ۵۷/۵٪ موارد هر دو روش جواب کاملاً یکسان داشتند.

۲- در ۶۸/۲٪ موارد با قبول اختلاف یک تیترو روش با هم توافق داشتند.

۳- در ۱۳/۷٪ موارد دو روش با هم اختلاف بیش از یک رقت نشان دادند عبارت دیگر در ۱۳/۷٪ موارد دو روش با هم توافق نداشتند.

در جدول ۳ آزمون AHG به روش لوله و میکرو یا یکدیگر مقایسه شده است. در اینجا نیز نتایج آزمون AHG به روش میکرو تا اندازه‌ای حساستر از روش لوله می‌باشد. در این مقایسه جمعاً ۷۱ نمونه سرم مورد آزمایش قرار گرفت. از ۲۴ مورد که با آزمون AHG منفی شده بود ۲۳ مورد آن (۹۵/۸٪) با روش میکرو AHG نیز منفی گردید و یک نمونه باقیمانده (۴/۱٪) با روش میکرو جواب مثبت نشان داد که تیتتر آن پائین تر از $\frac{1}{80}$ بود ۴۷۰ نمونه باقیمانده با هر دو روش جواب مثبت داشتند از این تعداد، ۲۸ نمونه (۶۰/۸٪) جواب یکسان بدست دادند ولی با قبول اختلاف یک رقت ۴۵ نمونه (۹۵/۷٪) با هم توافق داشتند.

در دو نمونه اختلاف بیش از یک رقت بین دو روش وجود داشت عبارت دیگر در دو نمونه از ۴۷۰ نمونه (۴/۲٪) دو روش با یکدیگر توافق نداشتند. این عدم توافق بعلت بالاتر بودن تیتترهای میکرو AHG نسبت به روش لوله بود و فقط در یک نمونه تیتتر میکرو دو رقت پائین تر از روش لوله بود.

دکمه مختصری در مرکز باکتریهای آگلوتینه شده ایجاد می‌شد ولی در وضعیت شیب به طرف دیواره جاری نمی‌شد مساوی آگلوتیناسیون مثبت تلقی میگردد (۷).

در صورتیکه آگلوتیناسیون منفی می‌شد تست AHG بروش میکرو انجام میگرفت. برای اینکار پلیت را بعدت ۱۵ دقیقه در ۲۰۰۰ دور سانتریفوژ نموده و پس از یکبار شستشوی رسوب به هر حفره ۰/۰۵ میلی لیتر سرم آنتی گلوبولین رقیق شده اضافه و با نوار پارافین پوشانده می‌شد. پس از ۲۰ ثانیه تکان دادن آنرا بعدت ۱۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد گذاشته و مانند قبل نتیجه ثبت میگردد (۷).

شاهد ها:

سرم شاهد اولیه برای آزمون STA یک سرم مثبت گاوی بود که از آزمایشگاه بروسلوز موسسه رازی گرفته شد که بعنوان دومین سرم استاندارد بین المللی W.H.O برای بروسلا آبورتوس شناخته میشود. این سرم محتوی ۱۰۰۰ واحد بین المللی پادتن در میلی لیتر است و برای استاندارد کردن آزمون STA در سراسر دنیا بکار میرود (W.H.O. 1979) (۶). آزمون AHG نیز برای تعیین میزان پادتن ضد بروسلا در انسان بکار میرود بنابراین شاهد های مناسب برای این روش آنتی سرمهای استاندارد انسان میباشد. ۱۲ نمونه سرم شاهد انسانی از بین سرمهای مورد آزمایش انتخاب گردید. این ۱۲ نمونه بدین علت بعنوان شاهد انتخاب شدند زیرا که آنها تیتترهای متنوعی از منفی تا مثبت قوی داشته و نیز بمقادیر کافی جهت استفاده در آزمونهای مختلف بعنوان شاهد در دسترس بود (جدول ۱).

نتایج

نتایج آزموی آگلوتیناسیون در لوله و روش میکرو-آگلوتیناسیون روی ۱۶۰ نمونه در جدول ۲ برای مقایسه ارائه گردیده است و بطوریکه جدول نشان می‌دهد روش میکرو از حساسیت بیشتری برخوردار است. زیرا که از ۲۹ نمونه سرم که با آزمون STA نتیجه منفی داشتند ۲۵ نمونه آن (۸۶/۲٪) با روش MA نیز جواب منفی داشتند (تیتتر < 20) و ۴ نمونه باقیمانده با روش میکرو مثبت شدند (۱۳/۷٪) بطوریکه ۲ نمونه دارای تیتتر $\frac{1}{80}$ یا بالاتر بودند (۶/۸٪). ۱۳۱ نمونه از کل سرم ها که آزمون مثبت داشتند با روش میکرو نیز مثبت

جدول شماره ۱: مقایسه تیتراژهای شاهد در روش میکروووماکرو (لوله)

شماره سرم شاهد	روش لوله		روش میکرو	
	STAT	AHGT	MAHGT	MAT
۱	< ۲۰	< ۲۰	< ۲۰	< ۲۰
۲	< ۲۰	< ۲۰	< ۲۰	< ۲۰
۳	< ۲۰	< ۲۰	< ۲۰	< ۲۰
۴	۴۰	۴۰	۸۰	۸۰
۵	۲۵۶۰	۲۵۶۰	۱۲۸۰	۶۴۰
۶	۴۰	۴۰	۸۰	۸۰
۷	۸۰	۸۰	۸۰	۸۰
۸	۸۰	۸۰	۱۶۰	۱۶۰
۹	۱۶۰	۱۶۰	۱۶۰	۱۶۰
۱۰	۶۴۰	۶۴۰	۶۴۰	۳۲۰
۱۱	۶۴۰	۶۴۰	۱۲۸۰	۶۴۰
۱۲	۲۵۶۰	۲۵۶۰	۱۲۸۰	۲۵۶۰

جدول ۲- میزان پراکندگی تیتراژهای STA و MA نسبت به یکدیگر

تیتراژهای											
جمع	۵۱۲۰	۲۵۶۰	۱۲۸۰	۶۴۰	۳۲۰	۱۶۰	۸۰	۴۰	۲۰	۲۰	۲۰
۴	۲	۱	۱								
۸		۲	۲	۳	۱						
۱۶			۴	۷	۳	۲					
۲۳				۱۱	۹	۲			۱		
۲۴				۲	۱۴	۴	۳	۱			
۲۶					۳	۱۷	۴	۲			
۱۳					۱		۶	۵	۱		
۱۴							۳	۸	۲	۱	
۷								۲	۴	۱	
۲۵									۲۵	۲۰	
۱۶۰	۲	۳	۷	۲۳	۳۱	۲۵	۱۶	۱۸	۶	۲۹	جمع

تیتراژهای

جدول ۳- وضعیت پراکندگی تیتراهای TAHG و میکرو AHG نسبت به یکدیگر

		تیتراهای TAHG										
		<۲۰	۲۰	۴۰	۸۰	۱۶۰	۳۲۰	۶۴۰	۱۲۸۰	۲۵۶۰	>۵۱۲۰	جمع
تیتراهای میکرو AHG	>۵۱۲۰										۲	۲
	۲۵۶۰								۲	۲		۴
	۱۲۸۰						۱	۱	۳	۱		۶
	۶۴۰						۳	۶	۱			۱۰
	۳۲۰					۱	۴	۲	۱			۸
	۱۶۰				۱	۴	۱					۶
	۸۰			۲	۲	۱						۵
	۴۰	۱		۳	۰							۴
	<۲۰	۰	۲	۱								۳
	۲۰	۲۳										۲۳
	جمع	۲۴	۲	۶	۳	۶	۹	۹	۷	۳	۲	۷۱

جدول ۴- مقایسه نتایج چهار آزمون مختلف روی ۴ نمونه سرم که در منفی و لسی با روش مثبت شده اند.

تعداد سرم	آزمونها			
	STA	MA	TAHG	MAHG
۱	< ۲۰	۸۰	۴۰	۸۰
۱	< ۲۰	۶۴۰	۲۵۶۰	۱۲۸۰
۱	< ۲۰	۲۰	۴۰	۲۰
۱	< ۲۰	۴۰	< ۲۰	۴۰
۲ (شاهد)	< ۲۰	< ۲۰	< ۲۰	< ۲۰

میکرو هیچگونه نتیجه منفی کاذب بدست نیامد (جدول ۲ و ۳) ولی یک نمونه از ۲۹ نمونه سرم که بروش لوله منفی بود یا روش های میکرو با تیتراژ کمتر از $\frac{1}{80}$ مثبت گردید، این یافته را چنین میتوان تفسیر نمود که: مثبت شدن این نمونه سرم بخاطر حساسیت زیاد روش میکرو می باشد و یا اینکه واکنش متقاطع باعث پیدایش این نتیجه مثبت گردیده است. از طرفی بعنوان مقایسه از ۲۹ سرم که آزمون STA منفی داشتند ۳ نمونه (۳/۱۰٪) منفی کاذب بودند (جدول ۲) زیرا این سه نمونه در آزمونهای MA و AHG در لوله و میکرو مثبت گردیدند (جدول ۴) بطوریکه دو نمونه آن تیتراژ $\frac{1}{80}$ و بالاتر داشتند. در خاتمه اینطور میتوان نتیجه گرفت که روش های میکروآگلوتیناسیون چه در کارهای تشخیصی و چه در بررسی های اپیدمیولوژی برای تعیین تیتراژ آنتی-بادیهای بروسلا دقیق و حساس است زیرا در تحقیق حاضر نشان داده شد که بروش میکرو می توان تمام سرمهای را که بروش لوله در آزمونهای STA و AHG مثبت میگردند تعیین نمود.

مقایسه از نتایج چهار آزمون مورد بررسی (جدول ۴) نشان میدهد ۴ نمونه سرمی که در آزمون STA منفی ولی با روش MA مثبت شده بودند همگی بجز یک نمونه در میکرو AHG نیز مثبت بودند این نتایج حاکی از آنست که آزمون MA قادر است سرم هایی را که با آزمون STA منفی کاذب تلقی می شدند مشخص نموده و جواب صحیح بدست دهد. قابلیت تکرار (Reproducibility) روش MA و میکرو AHG با ۱۲ نمونه سرم های شاهد انجام گردید (جدول ۱) و نشان داد با نظر گرفتن اینکه اختلاف یک رقت را بپذیریم روش MA و میکرو AHG ۱۰۰٪ قابل تکرار است.

بحث:

در بررسی که بوسیله Brown و همکاران (۴) در سال ۱۹۸۱ روی روش های MA و STA بروسلا صورت گرفت آنها برای سرم های با تیتراژ پائین تر از $\frac{1}{160}$ و بالاتر ۷۲٪ توافق بین دو روش مشاهده کردند و در مطالعه ای که بوسیله Bettelheim و همکاران (۷) در سال ۱۹۸۱ انجام شد آنها در مورد سرم های پائین تر از $\frac{1}{160}$ با نیبول ± 1 رقت ۵۸٪ توافق و برای سرم های $\frac{1}{160}$ و بالاتر ۱۰/۶٪ توافق بین دو روش بدست آوردند. در تحقیق حاضر برای سرم های پائین تر از $\frac{1}{160}$ با نیبول ± 1 رقت ۸۶/۹٪ و برای سرم های $\frac{1}{160}$ و بالاتر ۸۵/۷٪ توافق بین دو روش بدست آمد. ولی جائیکه یک اختلاف بیش از ± 1 رقت وجود دارد تیتراژهای بدست آمده از آزمون MA در اکثریت موارد (۹۵/۴٪) بالاتر از آزمون STA می باشد. بنابراین اگرچه اختلافاتی بین تیتراژهای بدست آمده در آزمون STA و AHG با روش های لوله و میکرو وجود دارد، این نکته قابل اهمیت است که در روش های

SUMMARY

We compared the standard tube agglutination test (STA) with a micro agglutination method (MA) for detection of human anti-brucella antibodies on 160 serum samples. Also the tube anti-human globulin test (TAHG) was performed by micro method (MAHG). In this study, the tube and microagglutination titres agreed within ± 1 dilution step with 138 (86.2%) of the 160 sera. There were 22 (13.7%) serum specimens whose MA and STA titers did not agree within ± 1 dilution step. The MAHG method provided results very similar to those obtained with the TAHG test, but where discrepancies occurred, these were due to the MAHG method being more sensitive.

The microagglutination method had a number of advantages including it required less time to perform, was more sensitive, and used less antigen.

In conclusion it is considered that the MA and MAHG methods are adequate for detecting serum anti-brucella antibody levels in suspected cases of human brucellosis, since it was demonstrated here that it detects all those sera which by the tube method (STA or AHGT) give positive result.

REFERENCES

- 1- Petersdorf, et al. Harrison's principles of internal medicine 10th edition, McGraw-Hill company, 1985.
- 2- Wingaeden and Smith. Cecil Textbook of Medicine, Sanders publisher. 17th edition, 1985.
- 3- Gilbert, G.L, et al. An epidemiological survey of human brucellosis. The Medical Journal of Australia (10), 482-286, 1980.
- 4- Brown, S.L. et al. Safranin-O-Stained antigen MAT for detection of Brucella antibodies, Journal of Clinical Microbiology 13(2), 398-400, 1981.
- 5- Robertson, L. et al. Bench book on Brucella, Public Health Laboratory Service Monograph series, 14. London: H.M.S.O. 1980.
- 6- World Health organization. Biological substances, International Standards, Reference preparations and Reference Reagents. Geneva: W.H.O.
- 7- Bettelheim K.A. et al. comparison of standard tube and microagglutination techniques for determining Brucella antibodies J. Hyg. Camb. 90, 33-39, 1983.
- 8- Otero J.R. et al. Microtiter-adapted method that facilitates the coombs test for Brucellosis. Journal of clinical Microbiology, 16(4), 737-738, Oct. 1982.