

مقایسه حساسیت و ویژگی IgG-Enzyme Immunoassay و Hemagglutination Inhibition با روش Neutralization Test برای تشخیص آنتی‌بادی سرخک

دکتر رسول همکار^{۱*}، فرحناز پرده دار^۲، سحر اکبری والا^۲، وحید سلیمی^۳، دکتر کرامت نوری جلیانی^۳ و دکتر طلعت مختاری آزاد^۴

۱. Ph.D. ویروس شناسی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲. دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال

۳. دانشجوی کارشناسی ارشد ویروس شناسی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۴. ویروس شناس، استاد دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

سابقه و هدف: سرخک یکی از بیماری‌های مهم قابل پیشگیری با واکسن می‌باشد. ریشه کنی سرخک از اهداف سازمان بهداشت جهانی است و تا کنون بسیاری از کشورها از جمله ایران در جهت حذف سرخک برنامه واکسیناسیون عمومی را اجرا کرده‌اند. اطلاع از وضعیت ایمنی افراد جامعه نسبت به سرخک از مهمترین پیش نیازهای برنامه‌ریزی‌های ایمن‌سازی جامعه است. روش‌های ممانعت از هماگلوتیناسیون HI و الیزا IgG EIA بطور معمول برای سنجش ایمنی سرخک بکار می‌روند؛ ولی این سؤال مطرح است که آیا این روش‌ها از حساسیت و ویژگی مطلوبی برای اینکار برخوردار هستند.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه با استفاده از ۱۰۵ نمونه سرمی، حساسیت و ویژگی روش‌های فوق با روش استاندارد طلایی NT مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: میزان حساسیت و ویژگی روش IgG-EIA در مقایسه با NT به ترتیب ۹۲/۵۴ و ۹۴/۷۴ درصد می‌باشد در حالیکه حساسیت و ویژگی روش HI در مقایسه با NT به ترتیب ۸۹/۵۵ و ۹۷/۳۷ درصد می‌باشد. این پژوهش نشان می‌دهد که حدود اطمینان دقیق میزان حساسیت و ویژگی هر دو روش IgG-EIA و HI با هم همپوشان هستند و تفاوت بین آنها از نظر آماری معنی‌دار نیست. نتیجه‌گیری: به لحاظ آسان بودن، سرعت و قابلیت دسترسی بیشتر روش IgG-EIA در تشخیص آنتی‌بادی سرخک، استفاده از این روش منطقی‌تر به نظر می‌رسد.

واژگان کلیدی: سرخک، سنجش آنتی‌بادی، تست نوترالیزاسیون، ممانعت هماگلوتیناسیون و الیزا

دریافت مقاله: مرداد هشتاد و چهار پذیرش برای چاپ: مهر هشتاد و چهار

*آدرس برای مکاتبه: تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، گروه پاتوبیولوژی، بخش ویروس شناسی، تلفن ۸۸۹۶۲۳۴۳، فاکس ۸۸۹۵۰۵۹۵ rhamkar@sina.tums.ac.ir

مقدمه

در حال توسعه است. قبل از دستیابی به واکسن سرخک سالانه ۱۳۰ میلیون نفر به این بیماری مبتلا می‌شدند (۱). با شروع واکسیناسیون علیه سرخک در سال ۱۹۶۳ کاهش چشمگیری در میزان ابتلا و مرگ و میر ناشی از آن به وقوع

سرخک یک بیماری حاد و بسیار مسری یوده و انسان تنها مخزن آن است. انتقال این بیماری از طریق هوا و یا تماس مستقیم با ترشحات بینی و گلوئی افراد بیمار صورت می‌پذیرد. این بیماری یکی از عوامل عمده مرگ و میر کودکان به خصوص در کشورهای

مواد و روش‌ها

نمونه‌های سرم

۱۰۵ نمونه سرم از سرم‌هایی که طی برنامه سنجش ایمنی افراد جامعه قبل از واکسیناسیون عمومی سرخک - سرخچه در آذر ماه ۱۳۸۲ از افراد گروه های سنی متفاوت از استان‌های اصفهان، خوزستان، فارس، کردستان و آذربایجان غربی جمع‌آوری شده بود، انتخاب گردید.

ویروس و سلول

برای تکثیر و عیار سنجی ویروس در آزمایش NT از سلول‌های Vero مشتق از سلول‌های کلیه میمون سبز آفریقایی استفاده گردید. ویروس سرخک استفاده شده در این مطالعه، سوش ادمونستون، تهیه شده از بخش ویروس شناسی دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران بود.

عیار سنجی ویروس

عیار ویروس بر مبنای TCID₅₀ در بستر سلول‌های vero تعیین گردید. برای اینکار از سوسپانسیون ویروس سرخک در دوازده ردیف میکروپلیت کشت سلول رقت‌های سریال تهیه گردید و سپس سلول‌های Vero به حفرات میکروپلیت افزوده شد. برای تعیین کمترین رقتی از ویروس که توانسته باشد ۵۰٪ ردیف‌های کشت را آلوده کند از روش read & Muench استفاده گردید. در مراحل بعد TCID₅₀ ۱۰۰ ویروس برای انجام آزمایش NT مورد استفاده گردید (۷).

Neutralization Test یا تست خنثی‌سازی ویروس در کشت سلول (NT): برای انجام آزمایش NT از سرم‌ها رقت‌های سریال ۲ برابر از ۱/۲ تا ۱/۲۵۶ در محیط DMEM فراهم گردید و ۵۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون ویروسی که حاوی TCID₅₀ ۱۰۰ ویروس بود به ۵۰ میکرو لیتر از هر رقت سرم در پلیت مخصوص NT اضافه شد. پس از یک ساعت گرماگذاری در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد ۱۰۰ میکرو لیتر از سلول‌های Vero (۱ ml / سلول ۶-۱۰۴) به هر رقت اضافه گردید و سپس این پلیت در دمای ۳۷

پیوست. ولی به رغم پیشرفتهای قابل ملاحظه در زمینه بیماری سرخک، سازمان بهداشت جهانی در سال ۱۹۸۸ تقریباً ۳۰ میلیون مورد ابتلا به سرخک و ۷۷۷ هزار مرگ ناشی از آن را در جهان گزارش نمود (۲،۳). در سال ۲۰۰۰ میلادی سازمان بهداشت جهانی سرخک را جز اهداف ریشه کنی اعلام نموده و کلیه کشورهای عضو، متعهد ریشه کنی سرخک گردیدند (۴).

در کشورهایی که حذف سرخک بومی را هدف قرار داده‌اند، علاوه بر واکسیناسیون متداول کودکان زیر یکسال (Keep Up) تمام کودکان ۹ ماهه تا ۱۴ ساله را بدون در نظر گرفتن سابقه بیماری یا واکسیناسیون، مجدداً واکسینه می‌نمایند (Catch Up). علاوه بر این هر ۵-۲ سال یکبار، همه کودکانی که بعد از برنامه واکسیناسیون همگانی به دنیا آمده‌اند، واکسینه می‌شوند (Follow Up). برنامه واکسیناسیون همگانی را بسیاری از کشورها، از جمله کشورهای حوزه شرق مدیترانه. مثل اردن، عمان، بحرین و کویت، سوریه و تونس اجرا نموده‌اند. ایران نیز در سال ۲۰۰۳ در سطح بسیار گسترده‌ای این واکسیناسیون را انجام داد و با بیش از سی و سه میلیون دوز واکسن، گروه سنی ۵ تا ۲۵ سال زیر پوشش واکسیناسیون همگانی قرار گرفتند (۵).

یکی از پیش نیازهای اجرای برنامه‌های واکسیناسیون همگانی، داشتن اطلاعات صحیح از وضعیت ایمنی افراد جامعه در برابر سرخک و ایمنی زایی واکسن‌های مورد استفاده است. برای سنجش ایمنی افراد در برابر سرخک روش‌های متنوعی مانند ممانعت از هم‌آگلوتیناسیون Hemagglutination Inhibition (HI)، IgG Enzyme Immunoassay (IgG-EIA) و تست خنثی‌سازی (NT) Neutralization Test وجود دارند. ولی همواره این سوال مطرح است که آیا اگر فردی در تست HI از نظر وجود پادتن سرخک منفی بود حتماً در برابر سرخک غیر ایمن است و یا منفی HI یک منفی حقیقی نیست و همین سوال در مورد IgG-EIA نیز مطرح است. لذا ضرورت دارد حساسیت و ویژگی این روش‌ها در مقایسه با یک روش استاندارد طلایی مانند NT مورد ارزیابی قرار گیرند (۶). در این مطالعه حساسیت و ویژگی روش‌های تست‌های HI و IgG-EIA در مقایسه با روش NT به عنوان یک روش استاندارد طلایی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

درجه سانتیگراد قرار داده شد و به مدت ۷ روز از نظر وجود اثرات آسیب سلولی CPE مورد بررسی قرار گرفت. بر مبنای این آزمایش سرم‌ها به دو گروه دارای آنتی‌بادی IgG بر علیه سرخک به عنوان پانل افراد ایمن و گروه فاقد آنتی‌بادی IgG سرخک به عنوان پانل افراد غیر ایمن تقسیم‌بندی شدند. در این مطالعه عیار برابر یا بیش از ۸ بر اساس پژوهش‌های تایید شده قبلی برای آزمایش NT به عنوان Cut-off point در نظر گرفته شد؛ یعنی عیار آنتی‌بادی کمتر از ۸ محافظت کننده نبوده و منفی تلقی گردید (۸-۱۰).

روش IgG EIA

بر روی نمونه‌های سرم هر دو پانل آزمایش شناسایی IgG با استفاده از کیت‌های تجاری Enzygnost Anti-measles (virus/IgG (Dade Behring, Marburg, Germany) و طبق راهنمای عملی کیت انجام گرفت.

روش HI

سرم‌ها با روش استاندارد HI مورد آزمایش قرار گرفته است. در این آزمایش از گویچه‌های سرخ میمون رزوس و آنتی ژن ۴ واحدی (تهیه شده از موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی) استفاده گردید و تیترا برابر یا بیش از ۴ مثبت تلقی شد (۱۱).

روش‌های آماری

سرم‌هایی که در آزمایش NT بر علیه سرخک آنتی‌بادی داشتند و مثبت حقیقی تلقی شده بودند، به عنوان پانلی جهت بررسی حساسیت و سرم‌هایی که منفی حقیقی محسوب شده بودند، به عنوان پانلی جهت محاسبه پارامترهای حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و منفی (Positive/Negative Predictive Value) روش‌های HI و IgG-EIA به کار برده شدند. پارامترهای یاد شده با ضریب اعتماد ۹۵٪ محاسبه شدند و با نرم‌افزار SAS (Statistic Analysis System) حدود دقیق اطمینان Upper and Lower Limits تعیین گردید آزمون حدود اطمینان برای بررسی اختلاف میان دو نسبت مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها

در آزمایش پانل افراد ایمن با روش IgG-EIA، ۹۲/۵۳٪ موارد (۶۲ مورد) مثبت و ۷/۴۷٪ (۵ مورد) منفی شدند. این نشان می‌دهد که حساسیت EIA نسبت به NT کمتر می‌باشد. در بررسی پانل افراد غیر ایمن با روش IgG-EIA، ۹۴/۷۴٪ (۳۶ مورد) از نمونه‌ها منفی تشخیص داده شدند، در حالی که ۵/۲۶٪ (فقط ۲ مورد) از این پانل با این روش مثبت ارزیابی گردید که حاکی از دقت کمتر EIA نسبت به NT می‌باشد. در آزمایش پانل افراد ایمن با روش HI، ۸۹/۵۵٪ موارد (۶۰ مورد) مثبت و ۱۰/۴۵٪ (۷ مورد) منفی شدند و این نشان می‌دهد که حساسیت HI از NT کمتر می‌باشد.

در بررسی پانل افراد غیر ایمن با روش HI ۹۷/۳۷٪ (۳۷ مورد) نمونه هامنفی تشخیص داده شدند و فقط ۲/۶٪ (۱ مورد) پانل افراد غیر ایمن، مثبت ارزیابی گردید؛ این نتایج نشان‌دهنده دقت کمتر HI نسبت به NT می‌باشد (جدول ۱).

برای محاسبه حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و منفی روش‌های HI و IgG-EIA در مقایسه با NT به ترتیب از پانلهای افراد ایمن (مثبت واقعی) و غیر ایمن (منفی واقعی) استفاده گردید (جدول ۲، ۳). در واقع حساسیت یک روش به معنی قدرت تشخیص موارد مثبت حقیقی می‌باشد و به احتمال مثبت بودن تست به شرطی که نمونه مثبت باشد، گفته می‌شود.

ویژگی نیز به قدرت تشخیص منفی واقعی تست یا احتمال منفی شدن تست به شرطی که نمونه منفی واقعی باشد گفته می‌شود. ارزش اخباری مثبت و منفی یک تست به ترتیب قدرت پیش بینی موارد مثبت و منفی است یعنی احتمال مثبت واقعی بودن به شرطی که تست مثبت باشد، ارزش اخباری مثبت و احتمال منفی واقعی بودن مورد به شرط منفی بودن تست، ارزش اخباری منفی تست قلمداد می‌گردند. همانطوری که در جدول ۱ مشاهده می‌شود حساسیت و ویژگی روش IgG-EIA در مقایسه با NT به ترتیب برابر با ۹۲/۵۴ و ۹۴/۷۴ درصد می‌باشد که با ضریب

اعتماد ۹۵٪ برای شناسایی آنتی‌بادی سرخک تقریباً قابل اعتماد است. ارزش اخباری مثبت و منفی IgG-EIA به ترتیب ۹۶/۸۸ و ۸۷/۸۰ درصد می‌باشد یعنی این روش قدرت نسبتاً خوبی در شناسایی موارد مثبت دارد اما در شناسایی موارد منفی قابلیت اعتماد کمتری دارد.

در جدول شماره ۳ نیز پارامترهای یاد شده برای روش HI در مقایسه با NT آورده شده است. همانطوری که مشاهده می‌گردد حساسیت و ویژگی آن به ترتیب ۸۹/۵۵٪ و ۹۷/۳۷٪ می‌باشد که نشان دهنده حساسیت و دقت کمتر HI نسبت به NT می‌باشد. ارزش اخباری مثبت و منفی این تست به ترتیب ۹۸/۳۶ و ۸۷/۸۰ درصد می‌باشد. روش HI نیز همانند روش IgG-EIA در شناسایی موارد منفی ضعیف عمل می‌کند. تفاوت‌های مشاهده شده بین پارامترهای ارزیابی کننده حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و منفی روش‌های HI و IgG-EIA از نظر آماری معنی‌دار نیست، زیرا حدود اطمینان دقیق هر دو روش در همه پارامترها باهم همپوشانی کامل دارند ($P < 0.05$).

بحث

در روش‌هایی مانند IgG-EIA و HI هدف اصلی تست شناسایی موارد منفی است و معمولاً برای سنجش ایمنی افراد بکار می‌روند. در زمانی که ریشه کنی سرخک مد نظر است و جامعه در مرحله حذف ویروس سرخک قرار دارد، شناسایی افراد سرخک منفی اهمیت بسیار زیادی پیدا می‌کند. باید این مساله را نیز اضافه نمود که در جوامعی که واکسیناسیون پوشش بیشتری پیدا می‌کند و موارد بیماری در جامعه کاهش بسیار زیادی پیدا می‌کنند افراد واکسینه به مرور زمان ایمنی خود را از دست می‌دهند. این افراد که در برابر سرخک حساس هستند، در اثر ابتلا به سرخک می‌توانند ویروس را در جامعه پخش کنند. بنابراین شناسایی و واکسیناسیون این افراد در هدف ریشه کنی جزء موارد دارای اولویت درجه یک می‌باشد. ولی یک مساله را نباید از نظر دور داشت؛ کدام تست قادر است منفی واقعی سرخک را مشخص کند؟ در بسیاری از پژوهش‌ها این امر مورد بررسی قرار گرفته است و روش NT به دلیل داشتن حساسیت و

ویژگی بسیار بالا، برای بررسی وجود آنتی‌بادی و میزان آن علیه ویروس سرخک به عنوان استاندارد طلایی در نظر گرفته می‌شود (۱۵-۱۲). آزمایش NT که آنتی‌بادی‌های خنثی کننده عفونت زایی ویروسی را اندازه‌گیری می‌کند همچنین برای اندازه‌گیری و سنجش میزان ایمنی القا شده توسط واکسن نیز، یک روش استاندارد به شمار می‌آید (۱۶، ۱۷). در مراحل نهایی ریشه کنی بسیار مطلوب خواهد بود که موارد منفی و مثبت سرخک که با روش‌های متداول مشخص می‌شوند حتماً با این تست مورد تایید قرار گیرند.

با توجه به اینکه در روش NT کشت سلول و ویروس مورد نیاز است؛ در اغلب آزمایشگاه‌ها امکانپذیر نیست و باید روش‌های ساده‌تری که قابلیت اجرا در آزمایشگاه‌های ساده تر را داشته باشند و در عین حال در محدوده قابل اعتمادی نیز قرار داشته باشند جایگزین آن شوند. یکی از روش‌های متداول برای شناسایی بررسی وجود آنتی‌بادی علیه ویروس سرخک و اندازه‌گیری میزان آن روش ممانعت از هماگلوتینا سیون یا روش HI می‌باشد. از عمده‌ترین محدودیت‌های تست HI نیاز به گویچه سرخ خون تازه میمون سبز آفریقایی، مشکلات تهیه آنتی‌ژن مناسب و احتمال حضور ممانعت کننده‌های غیر اختصاصی سرم نظیر بتا لیپو پروتئین‌ها با آگلوتینین دهنده‌های غیر اختصاصی سرم می‌باشد (۱۲ و ۱۱). در عین حال این روش دارای حساسیت و ویژگی کمتری نسبت به روش NT می‌باشد (۱۸). روش دیگری که متداول تر از HI است و بسیار آسان‌تر و امکان‌پذیرتر از آن نیز می‌باشد روش IgG-EIA است و در بیشتر آزمایشگاه‌ها تشخیص طبی نیز قابل انجام است و در مقایسه با روش‌های HI و Complement Fixation (CF) دارای حساسیت و ویژگی بیشتری می‌باشد.

در این پژوهش روش‌های IgG-EIA و HI در مقایسه با NT مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان می‌دهند که هر دو روش حساسیت و ویژگی تقریباً مشابهی دارند و ارزش اخباری مثبت و منفی هر دو در یک بازه اطمینان قرار دارند و تفاوت‌های اندکی که در مقادیر آنها مشاهده می‌گردد از نظر آماری معنی‌دار نیست. این دو روش را می‌توان در مراحل ابتدایی بیماریابی و یا سنجش

بنابراین حتماً لازم است این موارد به تایید تست NT نیز برسند. اگر بعد از یک برنامه واکسیناسیون با هدف سنجش ایمنی یکی از این دو روش بکار گرفته شود و بر مبنای نتایج آن روی پوشش ایمنی واکسن قضاوت شود خیلی صحیح نخواهد بود و بهتر است که موارد منفی با تست NT نیز ارزیابی گردند.

ایمنی بکار گرفت ولی در مراحل حذف بیماری نباید نتایج آنها اکتفا نمود. قدرت پیش‌بینی موارد مثبت هر دو روش نسبتاً مطلوب هستن و در این مرحله نیز به موارد مثبت آن می‌توان اعتماد نمود ولی قدرت پیش‌بینی موارد منفی در هر دو روش پایین است و هر دو روش در شناسایی موارد منفی ضعف دارند.

REFERENCES

1. Souza, V.A.U.F., C.S.Pannuti, L.M. Sumita, and P. Albrecht. 1991; Enzyme-linked immunosorbant assay (ELIZA) for measles antibody. A comparison with hemagglutination inhibition, Immunofluorescence and plaque neutralization test. Rev. Inst. Med. Trop Sao Paulo 33: 32-6.
2. Field B.N, Knipe D.M., Howeley P.M, 2000; Fields Virology: Chapters 27, 29, 40 and 43, Third Edition, Philadelphia, Lippincott, Raven press
۳. مرکز مدیریت بیماریها، بررسی وضعیت همه گیری شناسی سرخک در جمهوری اسلامی ایران در سال ۱۳۷۸، انتشارات وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی
۴. مختاری آزاد طلعت، محمودی محمود، همکار رسول، آزموده محمد، سالار آملی مسعود، موسوی اشرف ورخشنده ناطق: سیمای اپیدمیولوژیک سرخک در ایران، مجله حکیم، شماره ۱، دوره ۳، بهار ۷۹، ۱۹-۲۶.
5. WHO, 1998; Measles weekly Epidemiological Record, 73(50):389-396.
6. H. K Hartter, R.L de swart F. Hanes, H. W Vos, F. B Bouche, A. D.M. E. Osterhouse, et al, 2000; Evaluation of different measles IgG assay based on recombinant Proteins using a panel of low titer sera, Journal of Virology Method, 84:191-200.
7. M.Khodabandeh Loo, F.sabahi, H.Soleimanjahi, A.Kazemnejad and H. Roustai, 2003; Seroprevalence of neutralizing antibodies to measles virus in vaccinated population in iran, 1998. European Journal of Epidemiology, 18:1085 - 1089.
8. M.J.Cox, R.S. Azevedo, E.Massad, et al, 1998; Measles antibody level in a vaccinated population in Brazil, Trans RS Trop Med Hygiene; 92; 227.
9. S.S. Katter, R.L. Herberling, D.J.Barry, et al, 1997; Detection and titration of measles virus antibody by hemagglutination inhibition and by dot immunobinding. J Clin Microbiol 29(1):202-204.
10. P.W.Neumann, J.M.Weber, A.G.Jessamine, et al, 1985; Comparison of measles antihemolysin test, enzymelinked immunosorbent assay, and hemagglutination Inhibition test with neutralization test for determination of immune status. J Clin Microbiol; 22(2):296-298.
11. H.Edwin. Diagnostic procedures lennett, 1995; Diagnostic procedures for viral, Rickettsial and chlamydial infections. American public health association ; 447-454.
12. S.Ratnam, G.V.Gada, R.West, et al, 1995; Comparison of commercial enzyme immunoassay kits with plaque reduction neutralization test for detection of measles virus antibody. J Clin Microbiol; 33:811-5.
13. P.lbreht, K.Hermann, and G.R.Burns, 1981; Role of virus strain in conventional and enhanced measles plaque neutralization test. J Virol Methods 3:251-260.
14. Canada communicable Disease Report. 1993; Consensus conference on measles. CCDDR 19:72-79.
15. R.T.Chen, E.Markowitz, P. Albrecht, J.A Stewart, L.M.Mofenson, S.R.Preblud, and W.A.Orenstain, 1990; Measles antibody: reevaluation of protective titres. J.Infect. Dis. 162:1036-1042.
16. R.B.Belshe. Text book of Human virology, 1990; Second Edition, St. Louis: Mosby year Book Inc., chapter : (13),
17. M.S., Lee, Nokes, H.M., Lu CF, 2000; Protective titres of measles neutralizing antibody. J Med Virol; 62:511-7
۱۸. صفویه زهرا السادات: بررسی تیتر آنتی بادی ضد سرخک در خانمهای حامله زمان زایمان در شهرستان کرج .. پایان نامه برای دریافت درجه کارشناس ارشد در رشته ویروس شناسی پزشکی، ۷۹-۱۳۷۸

