دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال بیست و سوم، شماره ۴، صفحه ۳۰۱ - ۲۹۲ (مهر و آبان ۱۳۹۹)

Iran South Med J 2020; 23(4): 292-301

ارزیابی دقت تست الایزای غیرمستقیم تهیه شده از پروتئین نوترکیب ژن Bp26 *بروسلا ملیتنسیس* در تشخیص بروسلوز انسانی

سید داود حسینی (PhD)[1*]، احسان‌الله غزنوی‌راد (PhD)[2]، علی‌اصغر فرازی (MD)[3**]

[1] گروه بیوتکنولوژی مولکولی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم رازی، سازمان آموزش و تحقیقات جهاد کشاورزی، واحد اراک، ایران
[2] گروه میکروب‌شناسی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
[3] گروه بیماری‌های عفونی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

(دریافت مقاله: ۹۸/۳/۲۳- پذیرش مقاله: ۹۹/۳/۱۰)

چکیده

زمینه: با توجه به شیوع بروسلوز در ایران اهمیت تشخیص به‌موقع و سریع آن انتخاب روش آزمایشگاهی اختصاصی و دقیق را ضروری می‌نماید. هدف از این تحقیق، ساخت کیت الایزا غیرمستقیم و بررسی دقت آن جهت تشخیص بروسلوز انسانی بوده تا بتواند به عنوان جایگزینی مناسب برای روش‌های رایج مانند رایت و 2ME و کیت‌های وارداتی به کار رود.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق از پروتئین نوترکیب تولید شده از ژن bp26 (omp28) بروسلا ملیتنسیس به‌عنوان آنتی‌ژن جهت کوت کردن میکروپلیت‌ها استفاده شد. تعداد ۱۲۴ نمونه سرم شامل ۶۲ سرم افراد سالم و ۶۲ نمونه سرم بیماران مبتلا به تب مالت وارد مطالعه شدند. نتایج به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۸ تحلیل گردید.

یافته‌ها: میانگین سنی در گروه بیماران ۱۳/۵±۳۹/۸ سال و در گروه افراد سالم ۱۲/۷±۳۶/۱ سال بود همچنین ۶۶/۱ درصد افراد بیمار مذکر و ۶۲/۹ درصد آن‌ها ساکن روستا بودند و این میزان در گروه افراد سالم به‌ترتیب ۷۱ درصد و ۴۵/۲ درصد بود. میزان حساسیت کیت الایزا به‌کار رفته در این مطالعه ۹۲ درصد و میزان ویژگی این کیت ۸۷ درصد و ارزش اخباری مثبت آن ۸۸ درصد و ارزش اخباری منفی آن ۹۲ درصد و میزان دقت تست ۹۰ درصد تعیین گردید.

نتیجه‌گیری: کیت تشخیصی الایزای تهیه شده با اکثر سرم‌های مثبت انسانی واکنش دارد با اینحال این کیت نیاز به ارزیابی بیشتر در تعداد زیادتری از نمونه‌های بالینی از مناطق مختلف و با اشکال مختلف بالینی بیماری بروسلوز انسانی دارد.

واژگان کلیدی: بروسلوزیس، پروتئین نوترکیب، تست الایزا، ژن bp26

**اراک، گروه بیماری‌های عفونی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

Email: dr.farazi@arakmu.ac.ir
*ORCID: 0000-0002-5423-8618
**ORCID: 0000-0002-9593-6391

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2025-08-23]

[DOI: 10.52547/ismj.23.4.292]

مقدمه

بروسلوز یکی از بیماری‌های مشترک بین انسان و دام شایع در جهان است که بالغ بر نیم میلیون مورد جدید سالانه به آن مبتلا شده و میزان شیوع آن در برخی کشورها، ده مورد در یکصد هزار نفر جمعیت است. مهم‌ترین بیماری صنعت دامپروری بیماری بروسلوز است و خسارت‌های اقتصادی ناشی از این بیماری در ایران نیز قابل توجه می‌باشد. بروسلوز در انسان به صورت حاد و یا بیماری مزمن با تب و انواع علائم ظاهر می‌شو. دوره کمون این بیماری از ۱ الی ۶ هفته و گاهی چند ماه متغیر است .علائم بیماری حاد به صورت تب، لرز، سردرد، درد عضله و مفصل، ضعف، خستگی، تهوع، تعریق شبانه و از دست دادن اشتها می‌باشد (۱ و ۲). بیماری تب مالت می‌تواند مزمن شود و به بیماری‌های گرانولوماتوزی تبدیل شود که هر دستگاهی را آلوده نماید. تشخیص به موقع و درست بروسلوز انسانی به دلیل تظاهرات کلینیکی غیراختصاصی، رشد کند در کشت‌های خون و پیچیدگی تشخیص سرمی، توسط متخصصین بالینی خیلی مهم است (۳ و ۴). تاکنون ۱۰ گونه بروسلا شناسایی شده که ۵ گونه بروسلا شناسایی شده می‌توانند در انسان ایجاد بیماری بکنند و مهاجم‌ترین گونه برای انسان B. Melitensis است (۷-۵).

پروتئین‌های غشاء خارجی (OMPs) در باکتری‌ها از پروتئین، لیپید و قند تشکیل شده است. پروتئین‌های اصلی غشاء خارجی گونه‌های بروسلا در سال ۱۹۸۰ به عنوان آنتی ژن‌های قوی ایمونوژن شناسایی شد (۸ و ۹).

با ورود بروسلا به بدن تولید آنتی بادی‌های اختصاصی در میزبان القاء می‌شود ایمونوگلوبولین M یک هفته پس از شروع بیماری ظاهر می‌شود و در ماه سوم به حداکثر رسیده و سپس به تدریج کاهش می‌یابد ایمونوگلوبولین G دو تا سه هفته پس از شروع بیماری ظاهر شده و در هفته ششم به حداکثر می‌رسد و تا وقتی عفونت فعال باشد در حد بالا باقی می‌ماند و در صورت کنترل بیماری عیار IgG پائین آمده و محو می‌شود. با عود بیماری تیتر IgG و IgM هر دو افزایش پیدا می‌کنند. آنتی‌بادی‌های بلوکان در جریان بیماری و پس از آنتی بادی‌های آگلوتینه کننده در سرم پدیدار می‌شوند. این آنتی‌بادی‌ها به حرارت مقاوم بوده و از گروه IgG می‌باشند (۳ و ۴). با توجه به علائم غیراختصاصی بروسلوز و تقلید سایر بیماری‌های تب‌دار و ماهیت خود میکروارگانیسم تشخیص بیماری بروسلوز با دشواری‌هایی همراه است. تشخیص قطعی بروسلوز از طریق جدا کردن باکتری از خون، مایعات یا بافت‌های بدن است اما به دلیل محدودیت‌هایی که این روش دارد به‌عنوان تست تشخیصی معمول در بروسلوز استفاده نمی‌شود. از مشکلات عمده روش کشت رشد آهسته میکرارگانیسم، عدم رشد آن در محیط کشت‌های معمول و احتمال آلودگی کارکنان آزمایشگاه است. حساسیت کشت خون در مطالعات مختلف بین ۱۵ تا ۳۵ درصد گزارش شده است (۱ و ۳). آزمایشات سرولوژیک متنوعی برای تشخیص بروسلا ابداع شده‌اند. تست Standard Agglutination Test(SAT) به‌طور معمول استفاده می‌شود. آنتی‌ژنی که در SAT استفاده می‌شود از بروسلا ابورتوس گرفته می‌شود که با آنتی‌بادی علیه گونه‌های B. Abortus, B. Suis, B. Melitensis واکنش می‌دهد اما با B. Canis واکنش نمی‌دهد. افتراق عفونت فعال و عفونت قبلی درمان شده با SAT امکان‌پذیر نیست. برای این منظور از تست دومرکاپتواتانول استفاده می‌شود. از علل منفی کاذب شدن تست SAT می‌توان وجود آنتی‌بادی‌های بلوکان، پدیده prozone و postzone را نام برد. واکنش متقاطع سرولوژیکی بین گونه‌های بروسلا، یرسینیا، فرانسیلا تولارنسیس، ویبریو کلره و سالمونلا اتفاق می‌افتد (۳). الایزا یک آزمایش سرولوژیک است که به‌طور گسترده به عنوان یک آزمایش

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2025-08-23]

[DOI: 10.52547/ismj.23.4.292]

غربالگری در انسان و حیوانات مورد استفاده قرار می‌گیرد. آنتی ژن‌های ایمونوژن در بروسلا شامل آنتی‌ژن لیپوپلی‌ساکارید صاف (S-LPS)، لیپوپلی‌ساکارید خشن (R-LPS)، پروتئین‌های غشائ خارجی (OMP) و پروتئین‌های پری پلاسمیک و سیتوپلاسمی می‌باشند (۱۰). از سال ۱۹۹۶ تلاش برای جداسازی، بیان ژن‌های مختلف غشاء خارجی و پری‌پلاسمی گونه‌های متفاوت بروسلا و تخلیص این پروتئین‌ها آغاز شد. اقدامات مهم و اساسی در این زمینه صورت گرفت و توالی‌های متفاوتی از این ژن تکثیر و بررسی شد (۱۱).

با توجه به اختلاف‌های موجود میان حساسیت و ویژگی‌های اشاره شده در مطالعات مختلف برای تست الایزا و نتایج ضد و نقیض در آزمایشگاه‌های مختلف از یکسو و همچنین با توجه به اینکه سویه غالب بروسلا در ایران سویه ملیتنسیس می‌باشد و از طرفی نیاز به تولید داخلی کیت آزمایشگاهی برای تشخیص بروسلوز این مطالعه طراحی و انجام شد تـا کیت الایزا مناسب برای تشخیص بروسلوز انسانی تهیه گردد.

مواد و روش‌ها

طی یک مطالعه توصیفی – تحلیلی و مقطعی کلیه مبتلایان تب مالت در سطح شهرستان اراک که به بیمارستان ولیعصر اراک مراجعه داشتند مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌گیری به‌صورت سرشماری از بیماران علامت‌دار با تشخیص تب مالت حاد و تحت حاد تشخیص داده شده در بیمارستان ولیعصر اراک به عنوان گروه بیمار و افراد سالم فراخوان شده به مطالعه که هیچ‌گونه سابقه ایتلا به بیماری و یا علائم بیماری خاصی را نداشتند به عنوان گروه سالم انجام گردید. به این ترتیب تعداد ۱۲۴ نمونه، شامل ۶۲ نمونه سرم افراد بیمار و ۶۲ نمونه سرم افراد سالم با استفاده از کیت الایزای غیرمستقیم تهیه شده از پروتئین نوترکیب حاصله از ژن bp26 (omp28) سویه‌های شایع بروسلا ملی تنسیس مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به نداشتن استاندارد طلایی جهت تشخیص بیماری بروسلوز در این مطالعه معیارهای ما برای تشخیص بیماری بروسلوز جهت مقایسه و تعیین دقت کیت تشخیصی الایزا ارزیابی پزشک از علائم بالینی همراه با بررسی سابقه تماس با دام و فراورده‌های دامی آلوده به‌علاوه تست رایت لوله‌ای استاندارد انجام شده توسط کیت‌های تشخیصی یکسان و تجهیزات و پرسنل ثابت بوده است.

جمع‌آوری اطلاعات با استفاده از فرم‌های مخصوص ثبت اطلاعات بیماران و نتایج آزمایشات انجام شد و برای رفع خطای تصادفی و سیستماتیک Intra observer bias از یک آزمایشگاه و پرسنل ثابت استفاده گردید. اطلاعات بیماران توسط چک لیست جمع‌آوری و نهایتاً با استفاده از نرم‌افزار آماری Spss ویرایش ۱۳ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت در این مطالعه از اندازه‌گیری میانگین، نسبت، آزمون t-test و مجذور کای برای بیان نتایج استفاده می‌شود و $p<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

این مطالعه توسط شورای اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اراک با کد ۱۴. ۱۳۹۵. IR.ARAKMU.REC تأیید گردید. کلیه اطلاعات بدون درج نام بیمار بوده و از همه افراد برای ورود به مطالعه رضایت آگاهانه مکتوب اخذ گردید و تمام قوانین اخلاق در پژوهش رعایت شد.

تهیه کیت و انجام آزمون

طی تحقیقات قبلی با استفاده از کلون و تکثیر ژن bp26 (omp28) سویه‌های شایع بروسلا ملی تنسیس در ایران پروتئین نوترکیب تهیه گردید (۱۲). سپس از پروتئین نوترکیب تولید شده به عنوان آنتی ژن جهت کوت کردن

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2025-08-23]

[DOI: 10.52547/ismj.23.4.292]

میکروپلیت‌ها استفاده شد. در این آزمون جهت کوت کردن آنتی ژن از میکروپلیت‌های ۹۶ حفره‌ای ته صاف از جنس پلی‌استیرن شرکت Greiner آلمان استفاده شد. پروتئین نوترکیب به عنوان آنتی‌ژن همراه با بافر رقیق کننده به کف میکروپلیت‌ها چسبانده شده که پس از طی دوره انکوباسیون پلیت‌ها توسط بافر شسته شده و غیرباندها با شستشو خارج شدند. پس از خون‌گیری از افراد واجد شرایط ورود به مطالعه جداسازی سرم انجام و سرم‌ها در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیده و سپس در یک زمان مورد آزمایش قرار گرفتند. جهت انجام آزمون در مرحله اول سرم بیمار به نسبت ۱/۲۰۰ با محلول رقیق کننده رقیق گردیده و سپس ۵۰ میکرولیتر از سرم رقیق شده و ۵۰ میکرولیتر از سرم‌های کنترل مثبت و منفی را به حفره میکروپلیت به‌صورت دوتایی اضافه کرده و پس از درپوش گذاشتن روی پلیت‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد و سپس در مرحله دوم شستشوی حفره‌ها انجام گردیده و در مرحله سوم آنتی‌بادی کونژوگه با (HRP) horseradish peroxidase اضافه گردید. پس از اضافه کردن سوبسترای حاوی کروموژن و در نهایت افزودن محلول متوقف کننده تیتر آنتی‌بادی توسط دستگاه ELISA Reader با طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد.

برای اعتباردهی به نتایج آزمون میانگین جذب نوری کنترل منفی باید کمتر از ۰/۱۸ و تفاضل میانگین کنترل منفی و کنترل مثبت بزرگ‌تر از ۰/۱۵ باشد. و جهت تفسیر نتایج عدد به دست آمده از نتایج (OD) Optical Density به شرح ذیل تفسیر گردید:

۰/۱۸<OD<۰/۲۱ یعنی نتیجه آزمون نمونه سرم مشکوک است.

OD≥۰/۲۱ یعنی نمونه سرم دارای آنتی‌بادی ضدبروسلا بوده و مثبت می‌باشد.

OD≤۰/۱۸ یعنی نمونه سرم فاقد آنتی‌بادی ضد بروسلا بوده و منفی می‌باشد.

کنترل مثبت به نحوی استاندارد شد که نمایانگر مقدار شاخص آنتی‌بادی ضدبروسلا در سرم انسان باشد. بنابراین مقادیر نسبی آنتی‌بادی‌ها در نمونه‌های سرم می‌تواند با ارجاع به مقادیر کنترل مثبت محاسبه شود و این ارتباط تحت عنوان (S/P)Ratio sample/positive بیان می‌شود:

S/P = متوسط جذب سرم کنترل منفی – جذب نمونه

متوسط جذب سرم کنترل منفی – متوسط جذب سرم کنترل مثبت

و با استفاده از رابطه زیر میزان تیتر آنتی‌بادی محاسبه گردید:

$$\text{Log10 Titre} = 1.07\text{Log10 S/P} + 3.2$$

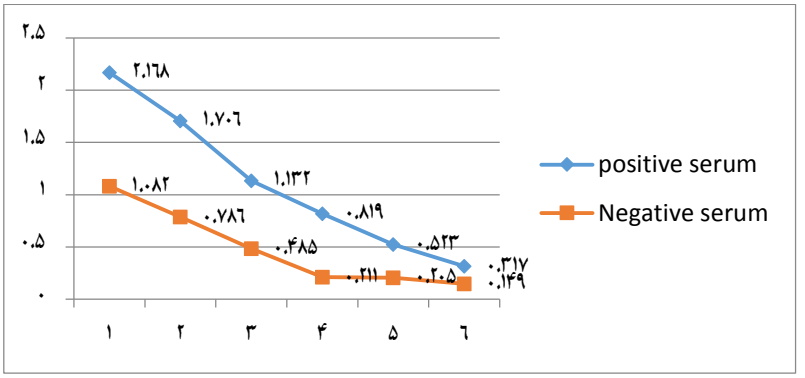
جهت تعیین غلظت مناسب آنتی‌ژن در مرحله کوتینگ آنتی‌ژن Bp26 تخلیص شده در کف میکروپلیت‌ها و انجام روش غلظت‌های سریالی و با توجه به بیشتر بودن سیگنال مثبت به منفی مشخص شد که غلظت مناسب آنتی‌ژن ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر می‌باشد (جدول ۱ و نمودار ۱).

جدول ۱) تعین میزان جذب نوری غلظت متفاوت آنتی‌ژن الصاق به کف حفره‌های میکروپلیت

غلظت آنتی‌ژن / نمونه با غلظت ثابت ۱/۲۰۰	۰/۱۲ میکروگرم در میلی‌لیتر	۰/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر	۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر	۰/۷۵ میکروگرم در میلی‌لیتر	۱ میکروگرم در میلی‌لیتر	۱/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر
مثبت	۰/۳۱۷	۰/۵۲۳	۰/۸۱۹	۱/۱۳۲	۱/۷۰۶	۲/۱۶۸
منفی	۰/۱۴۹	۰/۲۰۵	۰/۲۱۱	۰/۴۸۵	۰/۷۸۶	۱/۰۸۲
منفی/مثبت	۲/۱۲۷۵۱۷	۲/۵۵۱۲۲	۳/۸۸۱۵۱۷	۲/۳۳۴۰۲۱	۲/۱۷۰۴۸۳	۲/۰۰۳۶۹۷

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2025-08-23]

[DOI: 10.52547/ismj.23.4.292]



نمودار ۱) تعیین غلظت مناسب آنتی‌ژن مورد نیاز برای پوشش میکروپلیت، بیشترین نسبت جذب مثبت به منفی

Fig 1) Determining the appropriate concentration of antigen required to coating the microplate, the highest positive to negative adsorption ratio

برای انتخاب بهترین بافر رقیق کننده سرم چندین بافر رقیق کننده ساخته و مورد استفاده قرار گرفت که با توجه به نتایج بافر رقیق کننده شماره دو چون بالاترین نسبت جذب نوری را برای سرم‌های مثبت و کمترین جذب زمینه‌ای را دارا بود انتخاب شد. (جدول ۲).

جدول ۲) میزان جذب نوری دو سرم مثبت و منفی در بافر رقیق کننده‌های مختلف

بافر / سرم	۱	۲	۳	۴	۵	۶
منفی	۰/۱۶۸	۰/۱۵۲	۰/۱۷۸	۰/۱۶۸	۰/۲۷۲	۰/۲
مثبت	۰/۹۴۴	۱/۶۰۸	۱/۴۶۸	۰/۹۷۲	۱/۰۷۲	۱/۳۷۲

یافته‌ها

تعیین حد آستانه و نقطه پایانی

جهت تعیین حد آستانه بعد از انجام چند سری آزمایش کامل الایزا متوسط جذب نوری به‌دست آمده با سرم‌های منفی را محاسبه کرده و برای اطمینان بیشتر و مرتفع کردن خطاهای احتمالی تکنیکی به‌علاوه ۲ برابر انحراف معیار آن‌ها لحاظ گردید.

حد آستانه= متوسط کنترل‌های منفی+(انحراف معیار×۲)

نمونه‌های سرمی مثبت بالای این حد آستانه قرار می‌گیرند. بعد از تعیین حد آستانه آخرین تیتری از سرم که جذب نوری بیشتر از حد آستانه دارد به‌عنوان نقطه پایانی انتخاب شده است.با بررسی ۲۲ نمونه سرم منفی مشخص شد که متوسط جذب نوری سرم‌های منفی برابر ۰/۱۶۸ و حد آستانه برابر ۰/۲۱ می‌باشد.

بررسی دقت درون‌سنجی (Intra assay) و برون‌سنجی (Inter assay)

برای محاسبه دقت برون سنجی نمونه‌های مورد بررسی (سرم‌های مثبت و منفی) در روزهای مختلف مورد آزمایش قرار گرفتند که نتایج آن نشان دهنده دقت بالای

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2025-08-23]

[DOI: 10.52547/ismj.23.4.292]

سنجش بود. همچنین برای محاسبه دقت درون‌سنجی نمونه‌های مورد آزمایش (مثبت و منفی) در چاهک‌های مختلف در یک پلیت مورد آزمایش و بررسی قرار گرفت در هر دو حالت میانگین و ضریب تغییرات نمونه‌های تست شده محاسبه شدند (هر چه مقدار cv پایین‌تر باشد آزمایش از دقت بیشتری برخوردار است) که درصد ضریب تغییرات ($CV\% = \frac{SD}{Mean}$) به‌دست آمده از حداقل ۰/۸ تا حداکثر ۸/۲ درصد نوسان داشت.

بررسی پایداری الایزای طراحی شده

این آزمایش در یک بازه زمانی یکساله در شرایط ۸-۲ درجه سانتی‌گراد و در زمان‌های مختلف انجام شد. نتایج نشان داد که کیت در مدت حداقل یکسال به‌خوبی نمونه‌های مثبت را از نمونه‌های منفی متمایز و تفکیک می‌کند و مؤید پایداری مناسب کیت می‌باشد.

بررسی روی سرم بیماران

پس از اماده شدن کیت الایزا تعداد ۱۲۴ نمونه سرم شامل ۶۲ سرم افراد سالم و ۶۲ نمونه سرم بیماران مبتلا به تب مالت حاد که با تست‌های STA و 2 ME و سایر آزمایشات عدم ابتلا و یا ابتلا آن‌ها به تب مالت قطعی و مشخص گردیده بود وارد مطالعه شدند.

جدول ۳) مقایسه مشخصات دموگرافی بیماران و افراد سالم

متغیر		گروه بیماران	گروه افراد سالم	P-value
سن (میانگین ± انحراف معیار)		۳۹/۸±۱۳/۵	۳۶/۱±۱۲/۷	۰/۱۱۹
جنس	مذکر	(٪ ۶۶/۱)۴۱	(٪ ۷۱)۴۴	۰/۵۵۸
	مونث	(٪ ۳۳/۹)۲۱	(٪ ۲۹)۱۸	
محل زندگی	شهر	(٪ ۳۷/۱)۲۳	(٪ ۵۴/۸)۳۴	۰/۰۴۹
	روستا	(٪ ۶۲/۹)۳۹	(٪ ۴۵/۲)۲۸	

جدول ۴) مقایسه نتایج ۱۲۴ نمونه سرمی با کیت الایزا طراحی شده و تست رایت

	نتیجه تست رایت			نتیجه تست الایزا		
	مثبت(٪)	منفی(٪)	مشکوک(٪)	مثبت(٪)	منفی(٪)	مشکوک(٪)
گروه سالم	۰	(٪۱۰۰)۶۲	۰	(٪ ۶/۵)۴	(٪ ۸۷) ۵۴	(٪ ۶/۵)۴
گروه بیمار	(٪۱۰۰)۶۲	.	۰	(٪۹۲) ۵۷	(٪۳/۲) ۲	(٪۴/۸) ۳

مشخصات دموگرافیک افراد شرکت کننده در مطالعه و نتایج ازمایش رایت و الایزا در جدول ۳ و ۴ نشان داده شده است. در این بررسی میزان حساسیت کیت طراحی شده ۹۲ درصد (CI=٪ ۸۲/۲ –٪ ۹۷/۳) و میزان ویژگی این کیت ۸۷ درصد و ارزش اخباری مثبت آن ۸۸ درصد (CI=٪ ۷۶/۲ –٪ ۹۴/۳) و ارزش اخباری منفی آن ۹۲ درصد (CI=٪ ۷۸/۸ –٪ ۹۳/۲) و میزان دقت تست ۹۰ درصد (CI=٪ ۸۲/۷ –٪ ۹۴/۳)تعیین گردید. همچنین Liklihood ratio for positive test result برابر ۷/۱ (CI= ۳/۷ – ۱۳/۷) و Liklihood ratio for negative test result برابر ۰/۰۹ (CI= ۰/۰۴ – ۰/۲۲) به‌دست آمد.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2025-08-23]

[DOI: 10.52547/ismj.23.4.292]

بحث

در مطالعه حاضر نتایج به‌دست آمده از ارزیابی و بررسی دقت درون‌سنجی و برون‌سنجی کیت طراحی شده حاکی از آنست که کیت مذکور مطابق استانداردهای جهانی از دقت و قابلیت تکرارپذیری مناسبی برخوردار است. ضریب تغییرپذیری (CV%) کمتر از ۱۵ درصد می‌تواند یکی از دلایل مناسب بودن کیت طراحی شده باشد. در این بررسی میزان حساسیت کیت ۹۲ درصد و میزان اختصاصیت این کیت به‌ترتیب ۸۷ درصد و ارزش اخباری مثبت آن ۸۸ درصد و ارزش اخباری منفی آن ۹۲ درصد و میزان دقت تست ۹۰ درصد تعیین گردید. چادری و همکاران، از پروتئین نوترکیب ۲۸ کیلو دالتونی غشاء خارجی (OMP28) بروسلا ملی تنسیس به‌عنوان آنتی ژن استفاده کردند این آنتی ژن توانایی القای سیستم ایمنی گاو، گوسفند، بز و سگ را داراست. حساسیت و ویژگی ناشی شده از این آنتی ژن نو ترکیب به ترتیب برابر با ۸۸/۷ درصد و ۹۳ درصد در تشخیص بروسلوز در گاوها بود (۱۳).

کاستارو و همکاران (Cassataro) بر روی واکنش آنتی‌بادی برعلیه پروتئین omp31 تهیه شده از B. melitensis در انسان و حیوان تحقیق کردند. نتایج تحقیق نشان داد که تست ELISA تهیه شده از omp31 تخلیص شده حاصل از B.melitensis می‌تواند در تشخیص بروسلوز در انسان و حیوان استفاده شود (۱۴).

در مطالعات مختلف در کشور ما و سایر کشورها حساسیت و ویژگی تست‌های سرولوژیک با ارزش‌های متفاوتی آورده شده است. در مطالعه فرازی و همکاران، حساسیت تست الایزا توتال در مقایسه با روش فیکساسیون کمپلمان و در مقایسه با رایت لوله‌ای تفاوت معنی‌داری نداشت اما در مقایسه با روش رزبنگال و دو مرکاپتواتانول به‌طور معنی‌داری بیشتر بود. همچنین در این مطالعه ویژگی تست الایزا توتال در مقایسه با تست فیکساسیون کمپلمان و در مقایسه با تست رایت لوله‌ای و دو مرکاپتو اتانول تفاوت معنی‌داری نداشت اما در مقایسه با روش رزبنگال به‌طور معنی‌داری بیشتر بود. در این مطالعه تست الایزا بیشترین حساسیت را در تشخیص بیماری داشت و ویژگی هم در الایزا از بقیه تست‌ها بیشتر بود (۱۵).

مطالعه داودی و همکاران، نشان داد که تست رایت در مقایسه با تست الایزا حساسیت بیش‌تر، ویژگی کمتر، ارزش اخباری مثبت تقریباً برابر، ارزش اخباری منفی بیش‌تر و در مجموع دقت کلی بالاتری دارد. بین دو تست الایزا IgM و IgG، به غیر از ویژگی، در سایر موارد الایزا IgG از IgM برتر بود (۱۶).

در مطالعه میرجلیلی و همکاران، طراحی کیت ELISA غیرمستقیم با استفاده از لیپوپلی‌ساکارید صاف به منظور شناسایی هم زمان آنتی‌بادی بر علیه بروسلوز در گاو و انسان آلوده انجام شد که حساسیت و ویژگی برای کیت دامی به‌ترتیب ۱۰۰ و ۹۵/۸۳ درصد و برای کیت انسانی به‌ترتیب ۱۰۰ و ۹۷/۵۶ درصد بود (۱۷).

در مطالعه شاپوری و همکاران، با هدف طراحی و تعیین اعتبار الایزای غیرمستقیم و الایزای رقابتی برای تشخیص بروسلوز انسانی حساسیت الایزای غیرمستقیم ۱۰۰ درصد و الایزای رقابتی ۹۶/۹۴ درصد به‌دست آمد. ارزش اخباری مثبت الایزای غیرمستقیم ۹۳/۳۳ درصد و رقابتی ۹۸/۹۶ درصد و ارزش اخباری منفی الایزای غیرمستقیم ۱۰۰ درصد و رقابتی ۹۸/۵۱ درصد بود. همخوانی نتایج این روش برای الایزای غیرمستقیم ۹۶/۹۸ درصد و برای رقابتی ۹۸/۶۶ درصد بود (۱۸).

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2025-08-23]

[DOI: 10.52547/ismj.23.4.292]

نتیجه‌گیری

امروزه گام‌هایی برای توسعه کیت‌های الایزا بر پایه پروتئین‌های نوترکیب برداشته شده است؛ این مطالعه نشان می‌دهد کیت تشخیصی الایزای تهیه شده از پروتئین نوترکیب ژن Bp26 بروسلا ملیتنسیس به عنوان یک آنتی ژن بومی با اکثر سرم‌های مثبت انسانی واکنش دارد که بیانگر ایمونوژن بودن این پروتئین می‌باشد. این کیت طراحی شده برای شناسایی آنتی‌بادی نیاز به ارزیابی بیشتر در تعداد زیادتری از نمونه‌های بالینی از مناطق مختلف و با اشکال مختلف بالینی بیماری بروسلوز انسانی دارد. همچنین لازم است در مطالعات دیگری این کیت با بعضی از کیت‌های تجاری الایزا موجود در بازار مقایسه شوند. همچنین نیاز به ساده‌سازی بیشتر این کیت در خصوص نحوه انجام کار با آن و اندازه‌گیری تیتر آنتی‌بادی بیماران وجود دارد.

سپاس و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی اراک و مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم رازی شعبه اراک انجام شده است. نویسندگان مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک و مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی شعبه اراک و همچنین از بیماران شرکت کننده در این مطالعه تقدیر و تشکر می‌نمایند.

تضاد منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

References:

1. De Figueiredo P, Ficht TA, Rice-Ficht A, et al. Pathogenesis And Immunobiology Of Brucellosis: Review Of Brucella–Host Interactions. Am J Pathol 2015; 185(6): 1505-17.
2. Farazi AA, Sofian M, Ghazisaeedi M. Laboratory features of patients with Brucellosis and its association with titer of Wright agglutination test. Iran South Med J 2014; 17(5): 860-6.
3. Avijgan M, Rostamnezhad M, Jahanbani-Ardakani H. Clinical And Serological Approach To Patients With Brucellosis: A Common Diagnostic Dilemma And A Worldwide Perspective. Microb Pathog 2019; 129: 125-30.
4. Abernethy DA, Moscard-Costello J, Dickson E, et al. Epidemiology And Management Of A Bovine Brucellosis Cluster In Northern Ireland. Prev Vet Med 2011; 98(4): 223-9.
5. Amjadi O, Rafiei A, Mardani M, et al. A Review Of The Immunopathogenesis Of Brucellosis. Infect Dis (Lond) 2019; 51(5): 321-33.
6. Gopalakrishnan A, Dimri U, Saminathan M, et al. Virulance Factors Intracellular Survuvability And Mechanism Of Evasion From Host Immune Response By Brucella: An Overview. Anim Plant Sci 2016; 26(6): 1542-55.
7. Ica T, Aydin F, Gümüşsoy KS, et al. Conventional And Molecular Biotyping Of Brucella Strains Isolated From Cattle, Sheep And Human. J Vet Faculty Ankara Univ 2012; 59(4): 259-64.
8. Tomaso H, Kattar M, Eickhoff M, et al. Comparlison Of Commercial DNA Prepration Kits For The Detection Of Brucellae In Tissue Using Quantitative Real-Time PCR. BMC Infect Dis 2010; 10: 100.
9. Gall D, Nielsen K. Serological Diagnosis Of Bovine Brucellosis: A Review Of Test Performance And Cost Comparison. Rev Sci Tech 2004; 23(3): 989-1002.
10. Cassataro J, Velikovsky CA, Bruno L, et al. Improved Immunogenicity Of A Vaccination Regimen Combining A DNA Vaccine Encoding Brucella Melitensis Outer Membrane Protein 31 (Omp31) And Recombinant Omp31 Boosting. Clin Vaccine Immunol 2007; 14(7): 869-74.
11. Cloeckaert A, Vizcaíno N, Paquet JY, et al. Major Outer Membrane Proteins Of Brucella spp:

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2025-08-23]

[DOI: 10.52547/ismj.23.4.292]

Past, Present And Future. Vet Microbiol 2002; 90(1-4): 229-47.

12.Azizpour M, Hosseini D, Akbary N, et al. Amplification, Cloning, And Expression Of Brucella Melitensis bp26 Gene Isolated From Markazi Province In Order To Produce BP26 Recombinant Protein. J Arak Uni Med Sci 2013; 16(3): 62-70. (Persian)

13.Chaudhuri P, Prasad R, Kumar V. Recombinant OMP28 Antigen Based Indirect ELISA For Serodiagnosis Of Bovine Brucellosis. Mol Cell Probes 2010; 24(3): 142-5.

14.Cassataro J, Pasquevich K, Bruno L, et al. Antibody Reactivity To Omp31 From Brucella Melitensis In Human And Animal Infections By Smooth And Rough Brucellae. Clin Diagn Lab Immunol 2004; 11(1): 111-4.

15.Farazi A, Hosseini SD. Diagnostic Validity Of The Conventional Brucellosis Serological Tests In. J Arak Uni Med Sci 2012; 14(7): 71-7. (Persian)

16.Najafi N, Davoodi L, Fazli M, et al. Diagnostic Value Of Elisa Versus Wright In Human Brucellosis With Positive PCR. J Mazandaran Univ Med Sci 2014; 23(1): 21-8. (Persian)

17.Samavati N, Mirjalili A, Boutorabi M. An Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay To Detect Antibodies Against Brucellosis In Cattle Or Humans. J Isfahan Med Sch 2012; 30(205): 1403-14. (Persian)

18.Shapoury R, Imani Fooladi AA, Rahnama M, et al. Designing And Validation Of Indirect And Competitive ELISA For Diagnosis Of Brucellosis In Human. J Mil Med 2009; 11(1): 51-6. (Persian).

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2025-08-23]

[DOI: 10.52547/ismj.23.4.292]

Iran South Med J 2020; 23(4): 292-301

Original Article

Accuracy of Indirect ELISA Prepared from Recombinant Bp26 Gene of *Brucella melitensis* in Diagnosis of Human Brucellosis

SD. Hoseini (PhD)[1*], E. Ghaznavirad (PhD)[2], AA. Farazi (MD)[3**]

[1] Department of Molecular Biotechnology, Razi Vaccine and Serum Research Instutute, Agricultural, Research Education and Extension Organization (AREEO), Arak Branch, Arak
[2] Department of Clinical Microbiology, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
[3]Department of Infectious Diseases, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

(Received 13 Jun, 2019 Accepted 30 May, 2020)

Abstract

Background: Considering the prevalence of brucellosis in Iran, it is necessary to choose a specific and sensitive laboratory method to diagnose it in a rapid and timely manner. The aim of this study was to assess the accuracy of indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting brucellosis in humans in order to have an appropriate alternative to conventional tests such as Wright, 2ME, and commercial ELISA kits.

Materials and Methods: In this study, the recombinant protein produced from the gene (omp28) bp26 Brucella melitensis was used as an antigen for coating microplate wells. A total of 124 serum samples of normal healthy individuals (n=62) and patients with acute brucellosis (n=62) approved by STA and 2 ME tests were entered into the study. The data were analyzed in SPSS (ver.18).

Results: The mean age was 39.8±13.5 years in the patient group and 36.1±12.7 years in the healthy group. Furthermore, 66.1% of the patients were male and 62.9% lived in rural regions, while these figures were respectively 71% and 45.2% in the healthy group. The sensitivity of 92% and specificity of 87% and a positive predictive value of 88% and a negative predictive value of 92% and an accuracy of 90% were determined for ELISA kit used in this study.

Conclusion: The ELISA diagnostic kit reacted to most of the positive human sera. However, this kit needs to be further evaluated with a larger sample size of clinical specimens from different regions and with various clinical forms of human brucellosis.

Keywords: Brucellosis, Recombinant proteins, ELISA, bp26 gene

©Iran South Med J.All right sreserved

Cite this article as: Hoseini SD, Ghaznavirad E, Farazi AA. Accuracy of Indirect ELISA Prepared from Recombinant Bp26 Gene of Brucella melitensis in Diagnosis of Human Brucellosis.Iran South Med J 2020; 23(4): 292-301

Copyright © 2020 Hoseini, et al This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-non-commercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

[**]*Address for correspondence*: Department of Infectious Diseases, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran. Email: Email: dr.farazi@arakmu.ac.ir
*ORCID: 0000-0002-5423-8618
**ORCID: 0000-0002-9593-6391

Website: http://bpums.ac.ir
Journal Address: http://ismj.bpums.ac.ir

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2025-08-23]

[DOI: 10.52547/ismj.23.4.292]