

## ارزیابی و مقایسه ENZYME IMMUNOASSAY (EIA) و رنگ آمیزی اسید فاست با تایید به روش اینتو فلورسنت آنتی بادی جهت تشخیص گونه های کرپتوسپوریدیوم

دکتر داود درستکار مقدم<sup>۱</sup>، مهدی اعظمی<sup>۲</sup>

### چکیده

مقدمه: کرپتوسپوریدیومیزیس بیماری انگلی تک یاخته‌ای شایع در جهان می‌باشد و موجب انواعی از مشکلات از جمله اسهال حاد خود محدود شونده تا موارد مرگ در افراد با نقص اینمی خصوصاً در مبتلایان به ایدز (AIDS) می‌گردد. تشخیص کرپتوسپوریدیوم با نشان دادن اووسیست‌های انگل (Oocysts) در نمونه مذکور مبتلایان که اساساً با رنگ آمیزی اسید فاست (Acid fast staining) که از حساسیت و ویژگی پایینی برخوردار است انجام می‌شود.

روش بردی: در مطالعه حاضر مزایا و فواید کاربرد تشخیصی یک سنجش اینمی آنزیمی (EIA) را به منظور تعیین آنتی ژن اختصاصی کرپتوسپوریدیوم (Cryptosporidium-Specific Antigen (CSA در ۲۰۴ نمونه مذکور فرآوری نشده (بدون ماده نگهدارنده) به دست آمده از بیماران کمتر از سه سال را ارزشیابی و با روش تشخیصی روتین که در این مطالعه بهکار رفته است (نشان دادن اووسیست‌ها با رنگ آمیزی اسید فاست و بررسی میکروسکوپی و تایید نتایج مثبت با (IFA) مقایسه و مشخص شد که از حساسیت و ویژگی ۹۸٪ برخوردار می‌باشد.

نتایج: از ۱۳۹ نمونه منفی با بررسی میکروسکوپی، ۱۳ مورد (۹٪) با روش EIA مثبت بودند و ۱۱ مورد از این تعداد نیز با روش ممانعت با آنتی کر در برابر آنتی ژن اختصاصی کرپتوسپوریدیوم (Cryptosporidium Specific Antigen Inhibition Test (CIA) تایید شدند.

نتیجه گیری: نتایج به دست آمده نشان داد که EIA روش مهمی در تشخیص کرپتوسپوریدیوم در نمونه‌های مذکور است زیرا حساس و اختصاصی بوده، کاربرد آن آسان است و تحت تأثیر حضور مواد نگهدارنده قرار نمی‌گیرد.

**واژه‌های کلیدی:** آنتی ژن اختصاصی کرپتوسپوریدیوم، اینتو فلورسنت آنتی بادی، سنجش اینمی آنزیم، کرپتوسپوریدیوم

### مقدمه

کرپتوسپوریدیوم به عنوان یک عامل Zoonosis و یکی از عوامل مهم ایجاد گاستروآنتریت در نزد افراد خصوصاً کودکان می‌باشد. این انگل انتشار جهانی دارد و موجب انواعی از مشکلات از جمله اسهال حاد خود محدود شونده

شیوع این انگل در کشورهای در حال توسعه ۵ تا ۱۰ درصد و در کشورهای توسعه یافته ۱ تا ۳ درصد می‌باشد.  
کرپتوسپوریدیوم به وضوح با اسهال همراه است زیرا عفونت به طور قابل ملاحظه‌ای در بیماران مبتلا به اسهال بیشتر از افرادی که مبتلا به اسهال نیستند بروز می‌کند<sup>(۶،۷)</sup>، علاوه بر این در کودکان

۱- استادیار گروه انگل شناسی و قارچ شناسی  
۲- کارشناس ارشد انگل شناسی  
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی اصفهان

مطالعه میکروسکوپی پس از رنگ آمیزی با اسید فاست طبق

روش Ma Soave<sup>(11)</sup> و با تغییرات زیر انجام شد:

- برای تعقیط از  $H_2SO_4$  ۶ درصد شرکت Sigma استفاده شد.

- رنگ آمیزی متقابل با green Counter brilliant ۵ درصد

شرکت Sigma به مدت ۵ دقیقه به جای یک دقیقه انجام شد.

نمونه هایی که اسید فاست مثبت بودند با روش IFA تأیید شدند.

آزمایش IFA با استفاده از کیت :

Merifluor Cryptosporidium/Giardia kit مطابق دستور

شرکت سازنده (Meridian Diagnostics inc. cincinatti. OH)

انجام شد. به طور خلاصه با استفاده از یک قطره از نمونه مدفوع

به موازات یک نمونه کنترل مثبت و یک نمونه کنترل منفی روی

هر یک از چاهک ها گسترش تهیه شد. پس از خشک شدن

نمونه ها (در مدت ۱۵ تا ۳۰ دقیقه) یک قطره معرف تشخیص

(آنتی بادی منوکلونال کریپتوسپوریدیوم) به هر چاهک اضافه

گردید. یک قطره از محلول رنگ آمیزی Counter stain،

LOCH, BEC26008; Meridian Diagnostic inc.) نیز اضافه

شد و این دو قطره با هم مخلوط شدند. این نمونه به مدت

۳۰ دقیقه در یک محفظه مرتبط و در دمای اتاق انکوباسیون شد

و سپس با بافر فسفات سالین شسته شد و پس از موئته کردن و با

استفاده از میکروسکوپ فلورسنت فقط نمونه های تایید شده با

IFAT مثبت تلقی شدند.

تمام نمونه ها بالا فاصله پس از ورود به آزمایشگاه انگل شناسی به

دو قسم تقسیم شدند (هر نمونه به دو قسمت) یک قسمت برای

بررسی میکروسکوپی آماده شد در حالیکه قسمت دوم بالا فاصله

در دمای  $70^{\circ}C$ - منجمد گردید تا در فرآوری بعدی برای

آزمایش EIA آماده شود.

پس از اینکه نمونه های مدفوع به طور کامل امولسیون شدند تمام

نمونه ها به نسبت ۱:۱۰ در محلول بافر (حاوی ۰/۰۲ درصد

تیمروسال و سرم خرگوش) ریقیق شدند. به هر میکروتیتر که با

آنتی بادی های ضد CSA پلی والان خرگوش که به خوبی

پوشانده شده بودند ۲۰۰ میکرولیتر (۰/۰۲ ml) از کنترل منفی،

کنترل مثبت و یا نمونه های ریقیق شده بیماران اضافه شد. پس از

۶۰ دقیقه چاهک ها با بافر (حاوی ۰/۰۱ درصد تیمروسال) سه بار

مبلا به سوء تغذیه شایع تر است.

اهمیت کریپتوسپوریدیوم با مشخص شدن اینکه، این عامل

روههای در تداوم اسهال خصوصاً در کودکان مبتلا به سوء تغذیه

و اسهال شدید و طولانی و یا کشنده در بیماران مبتلا به ایدز که

در آنها ممکن است انگل به بافت های دیگری غیر از دستگاه

گوارش نیز تهاجم یابد همراه است، افزایش یافته است.<sup>(۷)</sup>

تشخیص کریپتوسپوریدیوم با نشان دادن اووسیست های انگل در

نمونه مدفوع مبتلایان که غالباً با روش رنگ آمیزی اسید فاست

که از حساسیت و ویژگی پایینی برخوردار است انجام می شود.<sup>(۸)</sup>

روش حساس تر و اختصاصی تر، روش رنگ آمیزی (IFA)

می باشد<sup>(۹)</sup> ولی این روش نیز وقت گیر بوده و ممکن است با

مشکلات تکیکی روبرو شود و کاربرد آن برای غربالگری تعداد

زیادی از نمونه ها در مطالعات فیلد فوق العاده پر هزینه است.<sup>(۹,۱۰)</sup>.

بنابراین آزمایشاتی که سریع، ساده و ارزان و در عین حال حساس

و اختصاصی می باشند مورد نیاز است.

هدف اصلی در این مطالعه مقایسه نتایج به دست آمده از سنجش

ایمنی آنزیمی (EIA) که آنتی ژن اختصاصی کریپتوسپوریدیوم

(CSA) را در مدفوع غیر فرآوری شده مشخص می کند، با نتایج

به دست آمده از غربالگری نمونه های رنگ آمیزی شده به روش

اسید فاست و تأیید شده با IFA می باشد.

## روش بروزی

در این مطالعه تعداد ۲۰۴ نمونه مدفوع از کودکان کمتر از

سه سال ساکن در اصفهان جمع آوری شد. نمونه ها به دو گروه

تقسیم شدند. گروه A شامل ۱۸۰ نمونه بود که ۱۲۸ نمونه

جمع آوری شده به صورت تازه و بدون ماده نگهدارنده از

کودکان مبتلا به اسهال حد و ۵۲ نمونه مدفوع جمع آوری شده از

کودکان کمتر از سه سال با و یا بدون اسهال می باشد.

گروه B شامل ۲۴ نمونه مدفوع جمع آوری شده (به صورت تازه)

از بیمارانی که عفونت کریپتوسپوریدیوم در آنها ثابت شده و تا

۱۴ روز پس از تشخیص پیگیری شده بودند.

مراحل انجام آزمایش در نمونه های گروه A به صورت زیر انجام

شد:

اسید فاست مثبت بودند که با آزمایش IFA تأیید شدند.<sup>۱۴۹</sup> نمونه با رنگ آمیزی اسید فاست منفی بودند که برای آنها آزمایش IFA انجام نشد.<sup>۷۴</sup> نمونه با روش EIA مثبت و<sup>۱۳۰</sup> نمونه منفی تشخیص داده شد. از ۱۸۰ نمونه گروه A، ۴۱ مورد با رنگ آمیزی به روش اسید فاست کریپتوسپوریدیوم مثبت شد و توسط IFA تأیید شدند و تعداد ۱۳۹ نمونه نتیجه منفی در برداشت. با روش EIA یک نمونه عنوان منفی کاذب تلقی شد (با رنگ آمیزی اسید فاست مثبت و تأیید شده با آزمایش IFA).<sup>۱۳۹</sup> نمونه (۹/۹٪) از ۱۳۹ نمونه با روش رنگ آمیزی اسید فاست منفی و به روش EIA مثبت بودند. بنابراین نمونه های EIA مثبت / اسید فاست منفی متعاقباً با استفاده از آزمایش ممانعت مورد بررسی قرار گرفتند.<sup>۱۱</sup> نمونه از ۱۳ نمونه ممانعت بیشتر از ۵٪ درصد داشتند (در حقیقت تمام نمونه ها بالای ۸۰ درصد ممانعت داشتند) و به عنوان نمونه های مثبت حقیقی تلقی شدند. دو نمونه از آنها دارای ممانعت پایینی بودند (صفرا درصد و ۱۷ درصد) و به عنوان نمونه های مثبت کاذب برای EIA در نظر گرفته شدند. نتایج تحلیلی نشان داد که EIA دارای حساسیت ۹۸٪ و اختصاصیت ۹۸٪ است (بر اساس فرمولهای آماری Specificity =  $\frac{F_p}{F_p + T_N}$  Sensitivity =  $\frac{T_p}{T_p + F_N}$ ) نسبت تشخیص و ردیابی میان نمونه های با مواد نگهدارنده و بدون مواد نگهدارنده تفاوتی نمی کرد.

جهت آزمایش بیشتر در مورد کاربرد بالقوه EIA،<sup>۲۴</sup> نمونه از گروه B به دست آمده از بیمارانی که ابتلا به کریپتوسپوریدیوم آنها ثابت شده بود را بررسی نمودیم. ۱۰ نمونه (۵۳٪) از ۱۹ نمونه به دست آمده (بزرگتر یا مساوی) به دنبال تشخیص اولیه در رنگ آمیزی اسید فاست مثبت بودند و بنابراین ردیابی را به میزان ۴۱٪ بهبود بخشید. هماهنگی به میزان ۱۰۰٪ بین اسپکترو فوتومتریک و مشاهدات به دست آمده پذیرآمد یعنی تمام نمونه های مثبت با نتیجه خوانی مشاهده ای نیز مثبت بودند و تمام نمونه های منفی به دست آمده از طریق مشاهده برای اسپکترو فوتومتریک نیز منفی بودند.

شسته شدند و به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر از آنزیم کثروگه: Peroxidase- labeled rabbit anti CSF in a protein matrix (containing bovin serum and 0.01% thimerosal شرکت (Alexon inc. sunnyvale CA) اضافه شد. پس از ۳۰ دقیقه چاهکها مجدداً شسته شدند و سپس ۲۰۰ میکرولیتر از سوبسترا ای رنگی به هر چاهک اضافه شد. (3,3', 5,5' Tetra methyl benzidine in buffer) به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد که در این مدت ۵۰ میلی لیتر از محلول متوقف کننده (اسید هیدروکلریک ۵٪ نرمال) به هر چاهک افزوده شد. نتایج ۱۰ دقیقه پس از این که واکنش متوقف شد با استفاده از اسپکترو فوتومتر (۴۵۰ نانومتر) خوانده شد. نتایج مشاهده شده به صورت مستقیم در صورت وجود رنگ، مثبت و در صورت عدم رنگ، منفی تلقی می شدند. تمام نمونه های مثبت به دست آمده با روش EIA و نمونه های منفی حاصل از روش رنگ آمیزی اسید فاست با روش Cryptosporidium-Specific Antigen Inhibition Test آزمایش قرار گرفته تا نتایج مثبت معترض شود.

به طور خلاصه آزمایش به صورت زیر اجرا شد: نمونه های مدفع به نسبت ۱:۱۰ در بافر رقیق شدند (محلول بافر حاوی ۰/۰۲ درصد thimerosal است). یک میلی لیتر از نمونه رقیق شده به دو ویال وارد شد. به ویال اولی ۱۰۰ میکرو گرم آنتی بادی ضد CSA پلیکلونال خرگوش و به ویال دیگر ۱۰۰ میکرو گرم IgG نرمال خرگوشی اضافه شد و هر دو ویال در دمای ۳۷°C به مدت ۱ ساعت انکوبه شدند. ویالها سپس با سرعت ۱۳۰۰۰ g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. ممانعت به صورت زیر محاسبه شد:

$$\text{Precent inhibition} = \frac{\text{OD without anti CSA} - \text{OD with anti CSA}}{\text{OD without CSA}}$$

نتیجه وقتی مثبت تلقی می شد که ممانعت در مقایسه با (OD Anti-CSA / Optical Density بدون Anti-CSA) به طور همزمان بیش از ۵۰٪ باشد.

## نتایج

از مجموع ۲۰۴ نمونه آزمایش شده، ۵۵ نمونه با رنگ آمیزی

## بحث

نتایج مطالعات حاضر نشان داد که EIA به وضوح نسبت به رنگ آمیزی اسید فاست برتری دارد. در این مطالعه از آنجایی که تمام نمونه های اسید فاست مثبت با IFA تأیید شده بودند می توان گفت که هیچ نمونه مثبت کاذبی در بین نمونه های اسید فاست مثبت نبوده است.

۹/۴ درصد از نمونه های مثبت شده با EIA و منفی با اسید فاست تا حدی می تواند مرتبط و صحیح باشد. با این حال ممانعت و بازداری مشخص با Anti-CSA در ۱۱ نمونه از ۱۳ نمونه باعث اطمینان بیشتر بوده و به احتمال قوی نشان دهنده این است که ۱۱ نمونه مثبت کاذب با Anti-CSA در حقیقت معرف نمونه های مثبت حقیقی است که با روش اسید فاست ردیابی شده بودند که به ترتیب اختصاصیت و حساسیت به دست آمده ۹۸٪ محاسبه گردید.

دلالت بیشتر اختصاصی بودن EIA را با این حقیقت می توان ثابت نمود که فقط ۹/۴٪ از نمونه های اسید فاست منفی در گروه A، در آزمایش EIA مثبت بودند که در مقایسه این تعداد برای گروه B، ۷۰٪ بود. از آنجایی که نمونه های گروه B از بیمارانی جمع آوری شده بود که عفونت کرپتوسپوریدیوم در آنها اثبات شده بودند و اووسیستهای انگل را به طور متناسب دفع میکردند می توان انتظار داشت که CSA حتی موقعی که اووسیسته ها را نمی توان با میکروسکوپ دید، وجود داشته باشد. اگرچه آزمایش IFA حساس تر از سایر روش های رنگ آمیزی در ارزیابی میکروسکوپی می باشد، هزینه و زمان لازم برای انجام چنین آزمایشی با تعداد زیاد نمونه های مورد آزمایش مانع از انجام آن می شود، علاوه بر این آزمایش IFA ممکن است موجب بروز مشکلات اتفاقی در تشخیص افتراقی اووسیست ها در نمونه فلورست غیر اختصاصی شود.

گزارش هایی در مورد نمونه های متفاوتی از EIA منتشر شده است از جمله Ungar در سال ۱۹۹۰ در مطالعات خود نشان داد که با

## استفاده از یک (Double poly clonal antibody EIA) در

مقایسه با روش رنگ آمیزی اسید فاست و آزمایش IFA حساسیتی معادل ۸۲٪ را به دست آورده است که با این حال این آزمایش را نمی توان برای نمونه های مدفوع عرضه شده در ماده نگهدارنده به کار برد.<sup>(۵)</sup>

Anusz و همکاران با استفاده از آنتی بادی منوکلونال آن را با نمونه های مدفوع گاوی آزمایش کردند این روش EIA حساس تر از رنگ آمیزی اسید فاست بود ولی نسبت به آزمایش IFA از حساسیت کمتری برخوردار بود.<sup>(۱۲)</sup>

اخیراً Rosenblatt و Sloan گزارش کردند که EIA قابل دسترس تجاری در مقایسه با رنگ آمیزی اسید فاست و روش IFA ۹۳٪ حساس و ۹۹٪ اختصاصی بوده است.<sup>(۱۳)</sup> کیت EIA تجاری دیگری نیز اخیراً ارزشیابی شده است و مشخص شده که این کیت اختصاصی است ولی حساسیت آن به ویژه برای مطالعات اپیدمیولوژیکی محدود به نظر می رسد.<sup>(۱۰)</sup>

بنابراین، اگرچه در بررسی ما EIA حساس و اختصاصی است ولی باید در آینده با سایر کیت های EIA مقایسه شود تا حساسیت نسبی آن مورد ارزشیابی قرار گیرد.

گرچه تغییرات آنتی ژنیک بین ایزوله های کرپتوسپوریدیوم از نمونه های انسانی بزرگ نیستند ولی هنوز باید تفاوت هایی را بین ایزوله های زیادی ردیابی کرد. با این حال بعضی از آنتی ژن ها برای اکثریت نمونه های جدا شده انسانی مشترک به نظر می رستند هر چند که تمام آنها را شامل نمی شوند.<sup>(۱۴,۱۵)</sup>

به طور خلاصه، مطالعه حاضر را می توان به عنوان ابزار مهمی در ارزیابی کرپتوسپوریدیوم در نمونه های مدفوع در نظر گرفت. این آزمایش به نظر حساس، اختصاصی و آسان برای اجرا بوده و تحت تأثیر حضور مواد نگهدارنده قرار نمی گیرد ولی مطالعات بیشتری باید برای ارزیابی بیشتر توانایی بالقوه سایر بیماران (بیماران دچار ضعف ایمنی) در نقاط مختلف و تحت شرایط بالینی مختلف صورت گیرد.

## References

- Dillingham. R.A., Lima A.A. and Guerrant R.L., *Cryptosporidiosis:epidemiology and impact.*

*Microbes. Infect.* (2002), 4:1059-1066.

- Kosek M., Alcantara C., Lima A.A. and

- Guerrant R.L., Cryptosporidiosis: *an update.* *Lancet Infect. Dis.* (2001), 1:262-269.
- 3- Hunter P.R. and Nichols G., *Epidemiology and clinical features of cryptosporidium infection in immunocompromised patients.* *Clin. Microbiol. Rev.* (2002), 15:145-154.
- 4- Carrey C.M. and Lee H., *Biology, persistence and detection of cryptosporidium parvum and hominis oocyst.* *Water research.* (2004), 38(4):818-869.
- 5- Ungar B.L.P., Enzyme - *linked immunoassay for detection of cryptosporidium antigen in fecal specimens.* *Clin. Microbiol.* (1990), 28:2491-2495.
- 6- Peng M.M., Meshnick S.R., Cunliffe N.A., Thindwa B.P., Hart C.A., Xiao L., *Molecular epidemiology of cryptosporidiosis in children Malawi.* *J.Eukaryot.Microbiol.* (2003), 50:557-559.
- 7- Guyot K., Follet-Dumoulin A., Lelievre E., Sarfati C., Rabodonirina M., Nevez G., Cailiez J.C., Camus D. and Dei-Cas E., *Molecular characterization of cryptosporidium isolates obtained from humans in France.* *J.Clin.Microbiol.* (2001), 39(10): 3472-3480.
- 8- Ward L.A., Wang Y., *Rapid methods to isolate cryptosporidium DNA from frozen feces for PCR.* *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* (2001), 41:37-42.
- 9- Weber R., Bryan R.T., Bishop H.S., Wahlquist S.P., Sullivan J.J., Juranek D.D., *Threshold of detection of cryptosporidium oocysts in human stool specimens: evidence for sensitivity of current diagnostic methods.* *J.Clin.Microbiol.* (1991), 29:1323-1337.
- 10- Newman R.D., Jaeger K.L., Wuhib T., Lima A.A., Guerrant R.L., Seras C.L., *Evaluation of antigen capture enzyme linked immunoassay for cryptosporidium oocysts.* *J.Clin.Microbiol.* (1993), 31:2080-2084.
- 11- Ma P., Soave R., *Three step stool examination for cryptosporidiosis in ten homosexual men with protracted watery diarrhea.* *J.Infect.Dis.* (1983), 47:824- 828.
- 12- Anusz K.S., Mason P.H., Riggs M.W., Perryman L.E., *Detection of cryptosporidium parvum oocysts in bovin feces by monoclonal antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay.* *J.Clin.Microbiol.* (1999), 28:2770-2774.
- 13- Rosenblatt J.E., Sloan L.M., *Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of cryptosporidium spp. In stool specimens.* *J.Clin.Microbiol.* (1993), 31:1468-1471.
- 14- Siddons C.A., Chapman P.A., Rush B.A., *Evaluation of an enzyme immunoassay kit for detection of cryptosporidium in fecal and environmental samples.* *J.Clin.Pathol.* (1992), 45:479-482.
- 15- Kooijman S.A.L.M., Hanstveit A.O., Nyholm N., *No-effect concentration in algal growth inhibition test.* *Water Research.* (1996), 30: 1625-1632.