مجله دانشگاه علوم پزشکي و خدمات بهداشتي - درماني
شهيد صدوقي يزد
سال دوازدهم، شماره چهارم ، زمستان ۱۳۸۳، ص۵۰

ارزیابی و مقایسه ENZYME IMMUNOASSAY (EIA) و رنگ آمیزی اسید فاست با تایید به روش ایمنو فلورسنت آنتی‌بادی جهت تشخیص گونه‌های کریپتوسپوریدیوم

دکتر داود درستکار مقدم [۱]،مهدی اعظمی [۲]

چکیده

مقدمه: کریپتوسپوریدیوزیس 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 ایمنی خصوصاً در مبتلایان به ایدز (AIDS) می گردد. تشخیص کریپتوسپوریدیوم با نشان دادن اووسیست‌های انگل (Oocysts) در نمونه مدفوع مبتلایان که اساساً با رنگ‌آمیزی اسید فاست (Acid fast staining) که از حساسیت و ویژگی پایینی برخوردار است انجام می‌شود.

روش بررسی: در مطالعه حاضر مزایا و فواید کاربرد تشخیصی یک سنجش ایمنی آنزیمی (EIA) را به منظور تعیین آنتی ژن اختصاصی کریپتوسپوریدیوم Cryptosporidium-Specific Antigen (CSA) در ۲۰۴ نمونه مدفوع 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 (۹/۳٪) با روش EIA مثبت بودند و ۱۱ مورد از این تعداد نیز با روش ممانعت با آنتی‌کر در برابر آنتی‌ژن اختصاصی کریپتوسپوریدیوم (Cryptosporidium Specific Antigen Inhibition Test) تایید شدند.

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

واژه‌های کلیدی: آنتی‌ژن اختصاصی کریپتوسپوریدیوم، ایمنوفلورسنت آنتی‌بادی، سنجش ایمنی آنزیم، کریپتوسپوریدیوم

مقدمه

کریپتوسپوریدیوم 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 (Self-limiting Diarrhea) تا موارد مرگ در افراد با نقص ایمنی خصوصاً در مبتلایان به ایدز (AIDS) می باشد[۱،۲،۳].

شیوع این انگل در کشورهای در حال توسعه ۵ تا ۱۰ درصد و در کشورهای توسعه یافته ۱ تا ۳ درصد می‌باشد[۲،۴،۵]. کریپتوسپوریدیوم 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[۴،۶]، علاوه بر این در کودکان

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

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-06-06]

مبتلا به سوء تغذیه شایع‌تر است.

اهمیت کریپتوسپوریدیوم با مشخص شدن اینکه، این عامل روده‌ای 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 بافت‌های دیگری غیر از دستگاه گوارش نیز تهاجم یابد همراه است، افزایش یافته است[۷].

تشخیص کریپتوسپوریدیوم با نشان دادن اووسیست‌های انگل در نمونه مدفوع مبتلایان که غالباً با روش رنگ آمیزی اسید فاست که از حساسیت و ویژگی پایینی برخوردار است انجام می‌شود[۸]. روش حساس‌تر و اختصاصی‌تر، روش رنگ آمیزی (IFA) می‌باشد[۹] ولی این روش نیز وقت‌گیر بوده و ممکن است با مشکلات تکنیکی روبرو شود و کاربرد آن برای غربالگری تعداد زیادی از نمونه‌ها در مطالعات فیلد فوق‌العاده پر هزینه است[۹،۱۰]. بنابراین آزمایشاتی که سریع، ساده و ارزان و در عین حال حساس و اختصاصی می‌باشند 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 میکند، با نتایج به دست آمده از غربالگری نمونه‌های رنگ‌آمیزی شده به روش اسید فاست و تأیید شده با IFA می‌باشد.

روش بررسی

در این مطالعه تعداد ۲۰۴ نمونه مدفوع از کودکان کمتر از سه سال ساکن در اصفهان جمع‌آوری شد. نمونه‌ها به دو گروه تقسیم شدند. گروه A شامل ۱۸۰ نمونه بود که ۱۲۸ نمونه جمع‌آوری شده به صورت تازه و بدون ماده نگهدارنده از کودکان مبتلا به اسهال حاد و ۵۲ نمونه مدفوع جمع‌آوری شده از کودکان کمتر از سه سال با و یا بدون اسهال می‌باشد.

گروه B شامل ۲۴ نمونه مدفوع جمع‌آوری 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:

مطالعه میکروسکوپی پس از رنگ آمیزی با اسید فاست طبق روش Ma و Soave[۱۱] و با تغییرات زیر انجام شد:

- برای تغلیظ از So_4H_2 ۶ درصد شرکت Sigma استفاده شد.
- رنگ آمیزی متقابل با Counter brilliant green ۵ درصد شرکت Sigma به مدت ۵ دقیقه به جای یک دقیقه انجام شد.

نمونه‌هایی 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. cinncinati. 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 چاهک‌ها گسترش تهیه شد. پس از خشک شدن نمونه‌ها (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 مرطوب و در دمای اتاق انکوباسیون شد و سپس با بافر فسفات سالین شسته شد و پس از مونته کردن و با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت فقط نمونه‌های تایید شده با IFA مثبت تلقی شدند.

تمام نمونه‌ها بلافاصله پس از ورود به آزمایشگاه انگل شناسی به دو قسمت تقسیم شدند (هر نمونه به دو قسمت) یک قسمت برای بررسی میکروسکوپی آماده شد در حالیکه قسمت دوم بلافاصله در دمای $-۷۰^{o}C$ منجمد گردید تا در فرآوری بعدی برای آزمایش EIA آماده شود.

پس از اینکه نمونه های مدفوع به طور کامل امولسیون شدند تمام نمونه‌ها به نسبت ۱:۱۰ در محلول بافر (حاوی ۰/۰۲ درصد تیمروسال و سرم خرگوش) رقیق شدند. به هر میکروتیتر که با آنتی‌بادی‌های ضد CSA پلی والان خرگوش که به خوبی پوشانده شده بودند ۲۰۰ میکرولیتر (۲۰۰µl) از کنترل منفی، کنترل مثبت و یا نمونه‌های رقیق شده بیماران اضافه شد. پس از ۶۰ دقیقه چاهک‌ها با بافر (حاوی ۰/۰۱ درصد تیمروسال) سه بار

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-06-06]

شسته شدند و به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر از آنزیم کنژوگه: Peroxidase- labeled rabit anti CSF in a protein matrix) (containg bovin serum and 0.01% thimerosal ساخت شرکت(Alexon inc. sunnyvale CA) اضافه شد. پس از ۳۰ دقیقه چاهکها مجدداً شسته شدند و سپس ۲۰۰ میکرو لیتر از سوبسترای رنگی به هر چاهک اضافه شد. (3,3', 5,5' Tetra methyl benzidine in buffer) و پلیت مجدداً به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد که در این مدت ۵۰ میلی لیتر از محلول متوقف کننده (اسید هیدروکلریک ۰/۵ نرمال) به هر چاهک افزوده شد. نتایج ۱۰ دقیقه پس از این‌که واکنش متوقف شد با استفاده از اسپکتروفتومتر (۴۵۰ نانومتر) خوانده شد. نتایج مشاهده شده به صورت مستقیم در صورت وجود رنگ، مثبت و در صورت عدم رنگ، منفی تلقی می‌شدند. تمام نمونه‌های مثبت به دست آمده با روش EIA و نمونه‌های منفی حاصل از روش رنگ‌آمیزی‌اسید فاست با روش Cryptosporidium-Specific Antigen Inhibition Test مورد آزمایش قرار گرفته تا نتایج مثبت معتبر شود.

به طور خلاصه آزمایش به صورت زیر اجرا شد: نمونه‌های مدفوع 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 ۱۳۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. ممانعت به صورت زیر محاسبه شد[۱۵]:

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

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

نتایج

از مجموع۲۰۴ نمونه آزمایش شده،۵۵ نمونه‌با رنگ‌آمیزی اسید فاست مثبت بودند که با آزمایش IFA تأیید شدند. ۱۴۹ نمونه با رنگ آمیزی اسید فاست منفی بودند که برای آنها آزمایش IFA انجام نشد. ۷۴ نمونه با روش EIA مثبت و ۱۳۰ 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 بعنوان منفی کاذب تلقی شد (با رنگ آمیزی اسید فاست مثبت و تأیید شده با آزمایش IFA) . ۱۳ نمونه (۹/۴٪ از ۱۳۹ نمونه با روش رنگ آمیزی اسید فاست منفی) و به روش EIA مثبت بودند. بنابراین نمونه‌های EIA مثبت / اسید فاست منفی متعاقباً با استفاده از آزمایش ممانعت CSA مورد بررسی قرارگرفتند. ۱۱ نمونه از ۱۳ نمونه ممانعت بیشتر از ۵۰ درصد داشتند (در حقیقت تمام نمونه‌ها بالای ۸۰ درصد ممانعت داشتند) و به عنوان نمونه‌های مثبت حقیقی تلقی شدند. دو نمونه از آنها دارای ممانعت پایینی بودند (صفر درصد و ۱۷ درصد) و به عنوان نمونه‌های 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

$$\text{Sensitivity} = \frac{T_p}{T_p+F_N} \qquad (\text{Specificity} = \frac{F_p}{F_p+T_N}$$

نسبت تشخیص و ردیابی میان نمونه‌های با مواد نگهدارنده و بدون مواد نگهدارنده تفاوتی نمی‌کرد.

جهت آزمایش بیشتر در مورد کاربرد بالقوه EIA، ۲۴ 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 رنگ‌آمیزی اسید فاست مثبت بودند و بنابراین ردیابی را به میزان ۴۱٪ بهبود بخشید. هماهنگی بین میزان ۱۰۰٪ بین اسپکتروفتومتریک و مشاهدات به دست آمده پدید آمد یعنی تمام نمونه‌های مثبت با نتیجه خوانی مشاهده‌ای نیز مثبت بودند و تمام نمونه‌های منفی به دست آمده از طریق مشاهده برای اسپکتروفتومتریک نیز منفی بودند.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-06-06]

بحث

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

۹/۴ درصد از نمونه‌های مثبت شده با EIA و منفی با اسید فاست تا حدی می‌تواند 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 نمونه‌های 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 می‌توان ثابت نمود که فقط ۹/۴٪ از نمونه‌های اسید فاست منفی در گروه A، در آزمایش EIA مثبت بودند که در مقایسه این تعداد برای گروه B، ۷۰٪ بود. از آنجایی که نمونه‌های گروه B از بیمارانی جمع‌آوری شده بود که عفونت کریپتوسپوریدیوم در آنها اثبات شده بودند و اووسیستهای انگل را به طور متناوب دفع میکردند می‌توان انتظار داشت که CSA حتی موقعی که اووسیست‌ها را نمی‌توان با میکروسکوپ دید، وجود داشته باشد. اگرچه آزمایش IFA حساس‌تر از سایر روش‌های رنگ آمیزی در ارزیابی میکروسکوپی می‌باشد، هزینه و زمان لازم برای انجام چنین آزمایشی با تعداد زیاد نمونه‌های مورد آزمایش مانع از انجام آن می‌شود، علاوه بر این آزمایش IFA ممکن است موجب بروز مشکلات اتفاقی در تشخیص افتراقی اووسیست ها در نمونه فلورسنت غیر اختصاصی شود.

گزارش‌هایی در مورد نمونه‌های 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 نمی‌توان برای نمونه‌های مدفوع عرضه شده در ماده نگهدارنده به کار برد [۵].

Anusz و همکاران با استفاده از آنتی بادی منوکلونال آن را با نمونه‌های مدفوع گاوی آزمایش کردند این روش EIA حساس‌تر از رنگ آمیزی اسید فاست بود ولی نسبت به آزمایش IFA از حساسیت کمتری برخوردار بود [۱۲].

اخیراً Rosenblatt و Sloan گزارش کردند که EIA قابل دسترس تجارتی در مقایسه با رنگ آمیزی اسید فاست و روش IFA ۹۳٪ حساس و ۹۹٪ اختصاصی بوده است [۱۳]. 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 می‌رسد [۱۰].

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

گرچه تغییرات آنتی ژنیک بین ایزوله‌های کریپتوسپوریدیوم از نمونه‌های انسانی بزرگ نیستند ولی هنوز باید تفاوت‌هایی را بین ایزوله‌های زیادی ردیابی کرد. با این حال بعضی از آنتی ژن‌ها برای اکثریت نمونه‌های جدا شده انسانی مشترک به نظرمی‌رسند هر چند که تمام آنها را شامل نمی‌شوند [۱۴،۴].

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

References

1- Dillingham. R.A., Lima A.A. and Guerrant R.L., ***Cryptosporidiosis:epidemiology and impact.*** ***Microbes. Infect.*** (2002), 4:1059-1066.

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

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-06-06]

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., Lelievere 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 sensivity 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 proracted 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 cryptosporidium is 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.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2026-06-06]