پایه‌ریزی روش الیزا و بررسی قدرت آن در تشخیص افراد حساس به زعفران

اعظم صامعی *، دکتر عبدالرضا وارسته **

خلاصه

سابقه و هدف: با توجه به حساسیت‌زایی زعفران در انسان و عوارض شناخته شده آن، این تحقیق به منظور پایه‌ریزی روش الیزا و تعیین قدرت آن در تشخیص افراد حساس به زعفران در مراجعه کنندگان به مرکز بهداشتی شهرستان گناباد طی سال ۱۳۷۳ انجام گرفت.

مواد و روشها: برای پایه‌ریزی روش الیزا تحقیق به روش توصیفی (Descriptive) از نوع اکتشافی و در مرحله دوم برای تشخیص قدرت آن از روش کارآزمایی بالینی از نوع تشخیصی استفاده گردید. آزمایش پوستی Prick با استفاده از عصارهٔ تام گرده زعفران بر روی ۴۳ بیمار که سابقه حساسیت داشتند صورت پذیرفت. افرادی که نتیجه آزمایش پوستی آنها مثبت بود به عنوان گروه مورد و افرادی که نتیجه آزمایش پوستی آنها منفی می‌باشد به عنوان گروه شاهد تلقی شدند. در این پژوهش، آزمایش الیزا بر روی سرم افراد مذکور انجام گرفت. در صورتی که OD سرم مساوی یا بیشتر از ۰/۳ بود به عنوان نمونه مثبت مد نظر قرار گرفت. حساسیت ، ویژگی ، ارزش اخباری مثبت، منفی و کارآیی کلی آزمایش تعیین گردید.

یافته‌ها: از ۴۳ نفر مورد بررسی، ۲۳ نفر حساس و ۲۰ نفر غیرحساس به گرده زعفران شناسایی شدند. نتایج حاصل از آزمایش الیزا نشان داد که از ۲۳ فرد حساس به زعفران براساس آزمایش پوستی پریک، ۱۸ نفر حساس و ۵ نفر غیرحساس به زعفران می‌باشند. همبستگی دو روش فوق ۷۸ درصد، ویژگی آزمایش الیزا ۱۰۰ درصد و ارزش پیش‌بینی مثبت آن ۱۰۰ درصد بود.

نتیجه گیری: با توجه به قدرت کامل روش توسعه یافته الیزا در تشخیص افراد حساس به زعفران، از این آزمایش می‌توان برای تشخیص افراد حساس به ویژه دست‌اندرکاران تولید و عرضه زعفران استفاده نمود.

کلمات کلیدی: زعفران ، گرده، آلرژی، الیزا

* دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی کاشان ، گروه علوم آزمایشگاهی

** دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی مشهد ، دانشکده پزشکی

مقدمه

آلرژن‌ها، آنتی‌ژن‌هایی هستند که واکنش‌های حساسیت شدید زودرس را برمی‌انگیزند. آنها معمولاً پروتئین‌هایی با وزن مولکولی ۵۰/۰۰۰ - ۵۰۰۰ دالتون هستند (۱). یکی از مشکلات جوامع امروزی آلرژی افراد به آلرژن‌ها می‌باشد. که شیوع آن در جامعه تا ۱۰ درصد گزارش شده است. در افراد اتوپیک، آلرژی پس از تماس با مقادیر اندکی از آلرژن‌های نامحسوس گیاهی مانند) گرده گیاهان (Pollen)، ذرات جدا شده از موی حیوانات یا پرندگان و مایت خانگی تولید می‌گردد (۲).

گرده گیاهان یکی از مهمترین علل آلرژی در جهان می‌باشد که از جمله می‌توان به گرده زعفران اشاره نمود. زعفران یکی از محصولات ارزشمند و استراتژیک کشورمان است که جایگاه ویژه‌ای را در صادرات غیر نفتی به خود اختصاص داده‌است. مطالعات اخیر نشان می‌دهد که آلرژی به زعفران در سطح بالایی به خصوص دست‌اندرکاران کشت و زرع آن وجود دارد (۳). حساسیت به زعفران در اسپانیا نیز گزارش شده‌است (۴). علایم آلرژی به زعفران کونژونکتیویت، عطسه کردن مکرر، آبریزش بینی، گرفتگی بینی و ... می‌باشد. حساسیت‌زایی زعفران در آینده نه چندان دور ممکن است بین افرادجامعه به خصوص‌دست‌اندرکاران‌کشت و زرع آن مشکلات اقتصادی،اجتماعی‌وروانی رابه‌دنبال‌داشته باشد.

در حال حاضر اقدامات تشخیصی و پیش‌گیری افراد حساس به زعفران انجام نمی‌گیرد و در صورت مواجه با بیمار، فقط اقدامات لازم درمانی صورت می‌پذیرد. بنابراین، اولین اقدام برای کاهش مشکل مذکور، تشخیص به موقع افراد حساس می‌باشد. روش آزمایش پریک (in vivo) برای تشخیص افراد حساس به کار می‌رود. علاوه بر آن، یکی از روش‌های تشخیص سرولوژیک جهت سنجش IgE اختصاصی، روش الیزا است. این روش یکی از روشهای سنجش ایمنی با استفاده از آنزیم‌ها می‌باشد که در عین سادگی و با صرفه بودن، از حساسیت و ویژگی بالایی نیز برخوردار می‌باشد (۵). با توجه به اهمیت موضوع و نیز با تکیه بر امکانات موجود، این تحقیق جهت طراحی روش الیزا و تعیین قدرت آن در تشخیص افراد حساس مراجعه کننده به مرکز بهداشتی شهر گناباد طی سال ۱۳۷۳ انجام گرفت.

مواد و روشها

برای پایه‌ریزی روش الیزا جهت تشخیص افراد حساس به زعفران، تحقیق به روش توصیفی از نوع اکتشافی و برای تعیین قدرت روش مذکور، تحقیق به روش کارآزمایی بالینی از نوع تشخیصی صورت پذیرفت. در ماه آبان که زمان گل‌دهی زعفران است به شهر گناباد مراجعه شد. افرادی که هنگام گل‌دهی زعفران و کار با آن، دچار ناراحتی‌هایی مانند عطسه و سرفه‌های مکرر، آب‌ریزش بینی، گرفتگی و خارش بینی می‌شدند به عنوان گروه مورد مطالعه انتخاب و توسط پزشکان مستقر در مرکز بهداشت شهرستان گناباد مورد معاینه‌های بالینی قرار گرفتند. آزمایش پوستی Prick روی آنها انجام شد و اطلاعات مربوط به افراد و نتیجه آزمایش پوستی در پرسش‌نامه مربوط ثبت شد.

افرادی که آزمایش پوستی آنها نسبت به عصاره گرده زعفران در مقایسه با شاهد منفی (محلول PBS) به شدت مثبت بود، انتخاب شدند و از هر یک ۵ سی‌سی خون وریدی جهت تهیه سرم از بیماران گرفته شد و سرم تا زمان انجام آزمایش‌های لازم در فریزر ۲۰- درجه

سانتی‌گراد نگه‌داری شد و افراد مراجعه کننده به کلینیک آلرژی مشهد که به مواد دیگری مانند گرده‌های گل، گرد و خاک منزل و ... حساسیت داشتند ولی آزمایش پوستی آنها به عصاره تام گرده زعفران منفی بود به عنوان گروه شاهد تلقی و از آنان نیز مطابق افراد مورد خون‌گیری به عمل آمد. تعداد افراد شاهد ۲۰ نفر بود که از لحاظ سنی و جنسی شبیه افراد مورد بودند. به منظور تهیه عصاره تام، گرده زعفران رادربافر PBS (۱۲۵ میلی‌مولار، ۷/۴ - ۷/۲ =pH) به مدت ۴۸ - ۲۴ ساعت در دمای ۴درجه سانتی‌گراد روی میکسر قرار داده و سپس به مدت نیم‌ساعت، با دور ۴۰۰۰ سانتریفوژ گردید (۶). عصاره تهیه شده از چند مرحله فیلتراسیون گذشته، سپس در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری و پروتئین تام این عصاره به روش bradford اندازه‌گیری شد (۷) که مقدار آن ۳±۰/۲mg/ml بود. برای انجام آزمایش پوستی، عصاره تام با گلیسرول به نسبت ۱:۱ مخلوط شد.

آنتی‌بادی کونژوگه پراکسید از و سوبسترای آن از شرکت سیگما و میکروپلیت‌های ۹۶ حفره‌ای (۱۲×۸) از جنس پلی کشور استیرن از شرکت Nunc دانمارک تهیه و به کار گرفته شد.

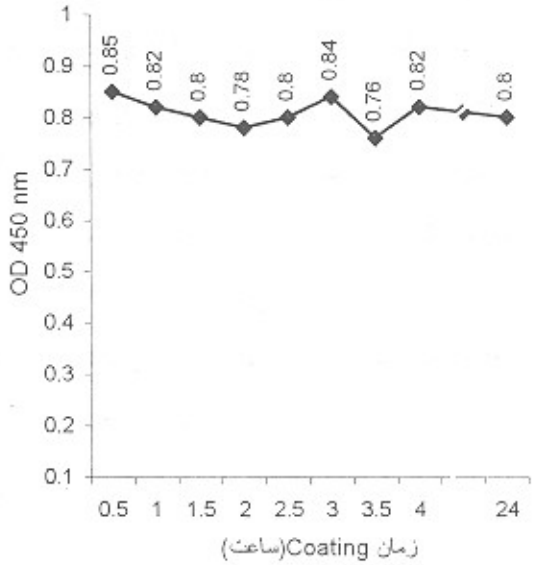
برای انجام آزمایش الیزا ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره تام گرده‌های زعفران به خانه‌های میکروپلیت اضافه گردید. میکروپلیت در اتاقک مرطوب و ۳۷درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰دقیقه قرار داده شد. سپس میکروپلیت ۳ بار و هر بار به مدت دو دقیقه به کمک بافر (PB + ۰/۰۵ Tween ۲۰) شسته شده، آب اضافی درون میکروپلیت با برگردان آنها بر روی صفحه کاغذ صافی و زدن ضربات نسبتاً شدید خارج گردیدند. آن گاه محلول اشباع کننده (BSA ۱درصد در بافر فسفات سالین) به مقدار ۱۵۰میکرولیتر به منظور مسدود کردن فضاهای خالی میکروپلیت به آن افزوده، به مدت ۳۰دقیقه در اتاقک مرطوب و ۳۷درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. دوباره ۳بار شستشو، مطابق روش بالا انجام گرفت. از سرم بیماران و سرم شاهد به مقدار ۱۰۰میکرولیتر به هر خانه اضافه گردید. میکروپلیت به مدت ۲ساعت در اتاقک مرطوب و ۳۷درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. شستشو ۴ بار دیگر صورت پذیرفت. آن گاه از محلول کونژوگه (anti -human IgE - HRP) به میزان ۱۰۰میکرولیتر به خانه‌های میکروپلیت اضافه شد و مدت یک ساعت در اتاقک مرطوب و ۳۷درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. شستشو (۵مرتبه × ۲دقیقه) انجام گرفت. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوبسترای آنزیم (TMB - H2O2) به خانه‌های میکروپلیت اضافه ومیکروپلیت به مدت ۳۰دقیقه در دمای آزمایشگاه و مکان تاریک نگه‌داری شد. آن گاه ۵۰ میکرولیتر اسیدکلریدریک ۲نرمال به منظور توقف واکنش به خانه‌های میکروپلیت اضافه شد و میزان جذب خانه‌های میکروپلیت در طول موج ۴۵۰نانومتر توسط دستگاه خواندن نتایج (ELISA Reader) قرائت گردید. برای تعیین Cut - off، میانگین چگالی نوری در ۴ شاهد منفی محاسبه شد و سپس Cut - off با استفاده از افزودن ضریب ثابت ۲SD به میانگین چگالی نوری به دست آمد ($\text{Cut - off} = \bar{A}\ \text{negative} + 2\ SD$).

در صورتی که OD سرم کمتر از حد Cut - off بود به عنوان فرد سالم و OD بالاتر از حد Cut - off به عنوان فرد حساس به زعفران تلقی شد. میزان حساسیت، ویژگی ، ارزش پیش‌بینی مثبت و منفی روش پایه‌ریزی گردیده الیزا در تشخیص افراد حساس به زعفران تعیین شد.

یافته‌ها

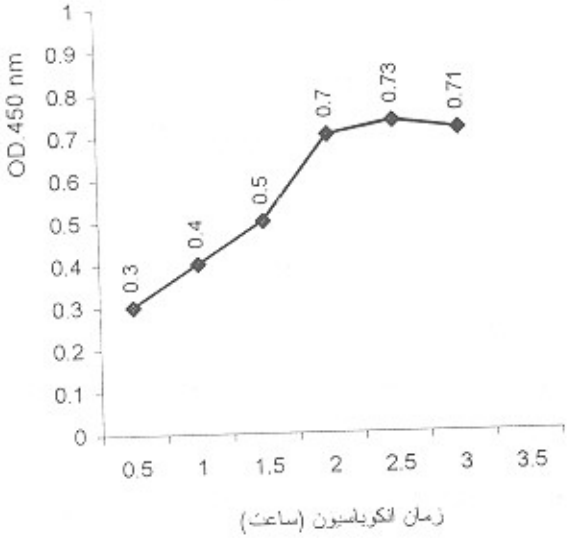
از ۲۳ نفر حساس به زعفران، ۱۴ نفر (۶۰/۹درصد) زن و ۹ نفر (۳۹/۱درصد) مرد بودند. محدوده سنی بیماران ۱۰ تا ۷۰ سال و بیشتر آنها (۵۲درصد) در گروه سنی ۳۰ - ۱۰ سال قرار داشتند. مهم‌ترین علامت شکایت بیماران، رینیت (۹۵/۶ درصد)، کهیر و آسم (هر یک ۹ درصد) در مرحله بعدی بود.

نتایج آزمایش‌های با زمان‌های مختلف انکوباسیون عصاره تام گرده زعفران نشان داد که انکوباسیون ۳۰دقیقه در ۳۷درجه سانتی‌گراد برای اتصال آلرژن‌ها به فاز جامد کافی می‌باشد (نمودار ۱).



نمودار ۱ـ اثر زمان Coating در روش ELISA

انکوباسیون سرم در زمان‌های مختلف بیانگر آن است که دو ساعت برای اتصال ماکزیمم IgG اختصاصی به آلرژن‌های زعفران مناسب است (نمودار ۲).



نمودار ۲ـ اثر زمان انکوباسیون سرم در روش ELISA

نتایج حاصل از انکوباسیون کونژوگه (anti - human IgE - HRP)در زمان‌های مختلف نشان داد که یک ساعت مناسب است.

روش‌الیزاجهت جستجوی IgE اختصاصی‌انجام گرفت. از ۲۳ نفر که آزمایش پوستی آنها نسبت به عصاره زعفران مثبت بود، ۱۸نفر OD بالاتر از حد Cut - off داشتند.

در جدول (۱) قدرت روش پایه‌ریزی شده در تشخیص افراد حساس به زعفران ارایه گردیده است و نشان می‌دهد که اگر روش پیشنهادی، فردی را حساس به زعفران تشخیص دهد به احتمال ۱۰۰درصد به زعفران آلرژی دارد و اگر روش پیشنهادی نشان دهد که فرد فاقد حساسیت می‌باشد به احتمال ۸۰ درصد به زعفران حساسیت نخواهد داشت.

میزان حساسیت روش پیشنهادی برابر با ۷۸/۳ درصد، میزان ویژگی ۱۰۰ درصد، ارزش پیش‌بینی مثبت و منفی به ترتیب ۱۰۰ و ۸۰ درصد و کارآیی کلی آن ۸۸ درصد بود.

جدول ۱ـ قدرت روش پایه‌ریزی شده الیزا در تشخیص افراد حساس به زعفران

تشخیص قطعی براساس آزمایش پوستی Prick / تشخیص با روش الیزا	حساس	غیرحساس	جمع
حساس	۱۸	۰	۱۸ (۴۱/۹)
غیرحساس	۵	۲۰	۲۵ (۵۸/۱)
جمع	۲۳ (۵۳/۵)	۲۰ (۴۶/۵)	۴۳ (۱۰۰)

بحث

روش الیزا از جمله آزمایش‌هایی است که برای نشان دادن و اندازه‌گیری عیار آنتی‌بادی IgE بر علیه آلرژن‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد، بسیاری از عوامل در راه‌اندازی و به کارگیری روش الیزا مؤثر و تعیین کننده می‌باشند که باید با روش‌های مناسب نسبت به استاندارد کردن آنها اقدام نمود (۸).

با استفاده از آزمایش الیزا می‌توان تعداد زیادی نمونه سرم را در زمان کوتاهی مورد ارزیابی قرار داد. حساسیت روش الیزا مشابه رادیوایمونواسی است. با این مزیت که با استفاده از آزمایش الیزا از خطرات ناشی از مواد رادیواکتیو مصونیت وجود دارد. الیزا سریع و تکرارپذیر است. عوامل شیمیایی (Reagents) به کار رفته در روش الیزا بدون خطر و نسبتاً ارزان بوده و می‌توان آنها را برای مدت تقریباً طولانی نگه‌داری کرد (۹). مراحل انجام آزمایش ساده بوده و شامل تهیه رقت، انکوباسیون و شستشو می‌باشد. با توجه به مزیت‌های روش الیزا در این تحقیق به ارزیابی دقت و حساسیت آن در تشخیص افراد حساس به زعفران پرداخته شد.

این تحقیق نشان داد که روش پایه‌ریزی شده الیزا قادر به تشخیص افراد حساس به زعفران می‌باشد، زیرا میزان ویژگی و ارزش پیش‌بینی مثبت آن ۱۰۰درصد است. همان گونه که ذکر گردید این روش طراحی شده برای اولین بار در تشخیص افراد حساس به زعفران به کار رفته است و در نتیجه دارای پیشینه‌ای نیست که بحث با آنها انجام گیرد. به علت این که نتایج مثبت واقعی بالا است، آزمایش به اندازه کافی ارزش دارد.

همبستگی این روش با آزمایش پوستی prick ۷۸ درصد به دست آمد. مطالعات دیگر نشان می‌دهد که بین روش الیزا و آزمایشپوستی prick همبستگی کامل ندارد (۱۱، ۱۰). عدم همبستگی کامل ممکن است به این دلیل باشد که افراد به طور موضعی تحریک شده‌اند و میزان IgE اختصاصی در سرم بالا نرفته‌است. بدین صورت که IgEهای اختصاصی در سطح مخاطی و پوست قرار گرفته‌اند که در محل‌های مذکور به گیرنده‌های با میزان تمایل بالا (high affinity) خود در سطح ماستوسیت‌ها متصل گشته و نیمه عمر آن افزایش می‌یابد.

از طرف دیگر، امکان رقابت سایر ایمونوگلوبولین‌ها (به صورت عمده IgG) با IgE برای اتصال به آلرژن بوده، این پدیده سبب کاستن اتصال IgE به آلرژن و یک کمبود کاذب IgE اختصاصی در سرم می‌شود (۲).

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی مشهد به خاطر تأمین هزینه‌های مورد نیاز و همکاری که در اجرای طرح داشتند قدردانی و تشکّر می‌شود. از کارکنان گروه ایمونولوژی و افراد مورد مطالعه نیز تشکّر و قدردانی به عمل می‌آید.

References:

1. Mygind N. Essential allergy. 2nd ed. Philadelphia: Black well scientific; 1996 : 81.
2. Roitt I. Essential immunology. 9th ed. Philadelphia: Black well scientific; 1997: 330-331.
۳ - فریدحسینی ر . گزارش اولیه آلرژی به زعفران از از ایران : نشریه گشتگ. ۱۳۷۲؛ ۱ (۱): ۴۴.
4. Feo F. Martinez J. occupational allergy in saffron workers. Allergy. 1997; 52: 633-641.
5. Kemeny DM. Challacombe SJ. ELISA and other solid phase immunoassays. 2nd ed. Newyork: John wiley and sons; 1988: 1-3.
۶ - اسکویی م. اثبات آلرژنیسیته زعفران. پایان نامه جهت اخذ دکترای علوم آزمایشگاهی. دانشگاه علوم پزشکی مشهد؛ ۱۳۷۳: ۴۸-۳۷.
7. Walker JM. Methods in molecular biology. 1st ed. Vol 2. Sr Louis: Humana; 1988: 25-28.
8. Kemeny DM. A practical guide to ELISA. 1st ed. Philadelphia; Pergamon; 1991: 69-79.
9. Henry JB. Clinical diagnosis and management by laboratory methods. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders; 1991: 862-863.
10. Kim YJ. Park HS. Skin reactivity and specific IgE antibody to two nonbiting midges in Korean respiratory allergy patients. J Korean Med Sci. 1994; 99: 21-28.
11. Kelly KJ. Kurup V. Zacharisen M. Skin and serologic testing in the diagnosis of latex allergy. J Allergy Clin Immunol. 1993; 91: 1140-1145.