# طراحی یک روش الیزای توام جهت سنجش فاکتورهای روماتوئیدی IgM و IgA

دکتر قاسم مسیبی [۱]، دکتر کامران مشفقی [۲]، دکتر سید محمد مؤذنی [۳]، دکتر فاضل شکری [۴]


## چکیده

**مقدمه:** به دنبال ورود آنتی ژن به بدن، بر علیه آن آنتی بادی از کلاس‌های مختلف ساخته می شود. شناسایی و سنجش کلاس‌های مختلف آنتی بادی بر علیه یک آنتی ژن از ارزش خاصی برخوردار است. هدف از این تحقیق طراحی یک روش الیزا بر مبنای مهار فعالیت آنزیم کونژوگه شده با استفاده از مهار کننده های غیر رقابتی است. بر این اساس از فاکتور روماتوئید به عنوان یک مدل به منظور سنجش سایر کلاس‌های آنتی بادی بر ضد آنتی ژن استفاده شد.

**روش کار:** در این مطالعه مقطعی تحلیلی از سرم ده بیمار مبتلا به آرتریت روماتوئید که با تست لاتکس مثبت بودند به منظور سنجش فاکتور روماتوئید از کلاسIgM و IgA با روش الیزای توام و الیزای متداول استفاده گردید. در روش الیزای توام پس از اضافه نمودن کونژوگه اختصاصی ضد یک کلاس و سوبسترای مربوطه وثبت نتایج، به جای توقف واکنش با اسید، از سیانید سدیم به عنوان مهار کننده غیر رقابتی استفاده شد و سپس بر روی همین مجموعه، گونژوگه ضد کلاس دیگری اضافه گردید و مجدداً با سنجش جذب نوری، نتایج حاصله با الیزای متداول مورد مقایسه قرار گرفت.

**نتایج:** نتایج به دست آمده نشان داد که هر چند میانگین جذب نوری و غلظت فاکتورهای روماتوئیدی از کلاسIgM وIgA در روش الیزای توام در مقایسه با روش الیزای متداول کمتر است، ولی این اختلاف معنی‌دار نمی‌باشد و تفاوتی بین دو روش جهت سنجش این دو کلاس آنتی بادی وجود ندارد. هم‌چنین همبستگی معنی داری بین دو روش در سنجش این دو ایزوتیپ وجود دارد($r = ۰/۹$ ، $p = ۰/۰۰۱$).

**نتیجه گیری:** به نظر می‌رسد که علت کاهش جذب نوری در روش جدید ناشی از پدیده ممانعت فضایی است که توسط کونژوگه اول ایجاد می‌شود. با توجه به عدم اختلاف معنی‌دار بین دو روش و از طرفی با توجه به این مسئله که در روش مطرح شده نیاز به پوشاندن مجدد پلیت با آنتی ژن و اضافه نمودن سرم نمی‌باشد، بنابراین در روش توام،هم در وقت و هم درمصرف آنتی ژن و پلیت صرفه‌جویی‌خواهد شدو این روش به عنوان جایگزینی‌برای روش الیزای متداول پیشنهادمی‌شود.


**واژگان کلیدی:** الیزای توام، کلاس آنتی بادی، فاکتور روماتوئید

## مقدمه

تولید کلاس‌های مختلف آنتی بادی بر ضد یک آنتی ژن از ویژگی‌های مهم پاسخ ایمنی است. ماهیت پاسخ ایمنی (تنظیم و تعدیل یا تشدید پاسخ)، متأثر از مقدار و نوع کلاس آنتی بادی می‌باشد(۱).

ایزوتیپ آنتی بادی در فاز حاد یا مزمن یک بیماری، متفاوت است(۲). بعضی از کلاس‌های آنتی بادی‌ها در واکنش‌های آلرژیک و بیماری‌های خود ایمن نقش دارند(۳،۴). فاکتور روماتوئید، اتوآنتی بادی است که بر علیه قسمت ثابت مولکول IgG ویژگی دارد. فاکتور روماتوئیدیکی از معیارهای تشخیص آرتریت روماتوئید می‌باشد که در بیش از ۹۰ درصد این بیماران وجود دارد(۵).گزارشات نشان می‌دهدکه تیتروکلاس آنتی-بادی با شدت بیماری ارتباط دارد(۶). در بیمارانی که


۱- استادیارگروه ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک.

۲- استادیارگروه داخلی،دانشکده پزشکی،دانشگاه علوم پزشکی اراک.

۳- دانشیار گروه ایمنی شناسی، دانشکده علوم پزشکی ، دانشگاه تربیت مدرس.

۴- استادگروه ایمنی شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران.

واجد فاکتور روماتوئید از کلاس IgA هستند، شدت بیماری و بروز علائم خارج مفصلی بیشتر می‌باشد(۷). بنابر این سنجش کلاس‌های مختلف آنتی بادی می‌تواند به درک مراحل مختلف بیماری و ایمونوپاتوژنز آن به منظور تبیین استراتژی درمانی مناسب، کمک نماید(۸).

روش الیزا، از جمله روش‌های دقیقی است که جهت سنجش کمی ایزوتیپ‌های مختلف آنتی بادی کاربرد دارد(۱۰،۹). در این روش آنتی ژن به کف پلیت متصل می شود و پس از اضافه کردن نمونه سرم، کونژوگه اختصاصی ضد هر ایزوتیپ به این مجموعه اضافه می شود. برای سنجش هر ایزوتیپ باید تمام مراحل به طور جداگانه انجام شود که از این نظر وقت‌گیر و پر هزینه است. با توجه به این‌که اساس روش بر واکنش آنزیم- سوبسترا استوار است، احتمالاً با استفاده از مهار کننده های غیررقابتی ویژه آنزیم می‌توان فعالیت کونژوگه اول را مهار کردوکونژوگه اختصاصی ضد ایزوتیپ دیگر را اضافه کرد که این امر هم باعث کاهش زمان سنجش وهم کاهش مصرف موادمی‌شود.

در این مطالعه روشی را طراحی کردیم که بتوان بر اساس مهار برگشت ناپذیر فعالیت آنزیم، با اضافه نمودن کونژوگه ضد ایزوتیپ دیگر، کلاس‌های مختلف نیز سنجیده شود. بنابراین در این مطالعه سنجش فاکتور روماتوئید از کلاسIgM و IgA بر علیه قسمت ثابت مولکول IgG به عنوان یک مدل مورد استفاده قرار گرفت.

## روش کار

این یک مطالعه مقطعی تحلیلی است که از ۱۰ بیمار مبتلا به آرتریت روماتوئید دارای تست لاتکس مثبت، خون‌گیری به عمل آمد و سرم آنها برای مقایسه دو روش الیزای متداول و الیزای توام مورد استفاده قرار گرفت.

پلیت‌های الیزا(گیبکو[1])باغلظت ۲۰ میکروگرم در میلی لیتر از IgG انسانی حساس شدند(۱۰). بعد از دو ساعت انکوباسیون در دمای۳۷ درجه، با بافر فسفات حاوی ۰/۰۵ در صد توئین[2] ۲۰ سه بار شستشو انجام شد و نمونه های سرمی با رقت مناسب به صورت دوتایی به حفره ها اضافه گردید و ۱ تا ۱/۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد. از پاراپروتئین تخلیص شده Fr به عنوان استاندارد جهت سنجش فاکتور روماتوئید از کلاس IgM (نمودار۱) و از آنتی بادی منوکلونال B27 به عنوان استاندارد جهت سنجش فاکتور روماتوئیداز کلاس IgA (نمودار۲) استفاده شد(۱۲،۱۱). پس از شستشوی مجدد، کونژوگه اختصاصی ضد یک ایزوتیپ[3] اضافه شد. با اضافه کردن سوبسترای آنزیمی، جذب نوری در طول موج ۴۹۲ نانومتر با استفاده از دستگاه الیزا (لاب سیستم[4]) اندازه گیری شد. فعالیت آنزیمی کونژوگه ضد IgM توسط سیانید سدیم با مولاریته مناسب مهار شد. سپس پلیت را بلافاصله شسته و کونژوگه اختصاصی ضد ایزوتیپ دیگر (IgA) به همان پلیت اضافه گردید و مانند مرحله قبل جذب نوری ثبت گردید. غلظت نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد مربوطه محاسبه گردید (نمودار۱و ۲).

جهت مقایسه زوجی داده ها در دو روش مطرح شده از روش‌های غیرپارامتریک (آزمون رتبه‌ای علامت‌دار ویکاکسون) استفاده گردید. جهت ارتباط بین دو روش از آزمون همبستگی دو طرفه رو- اسپیرمن استفاده شد.

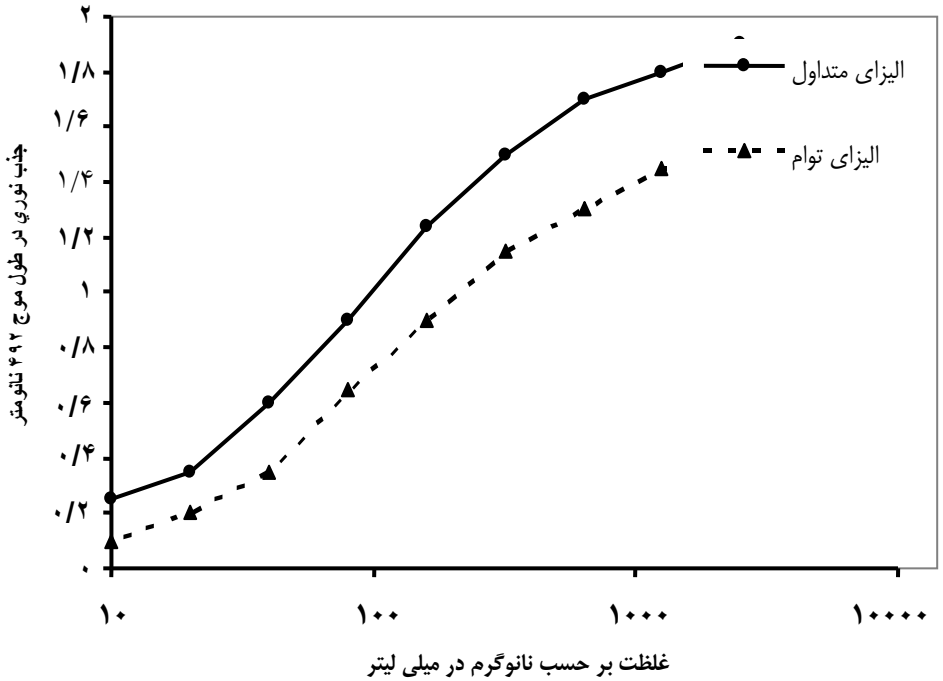
1 - Gibco.
2 - Tween20.
3 - HRP-Anti IgM.
4 - Labsystem.

## نتایج

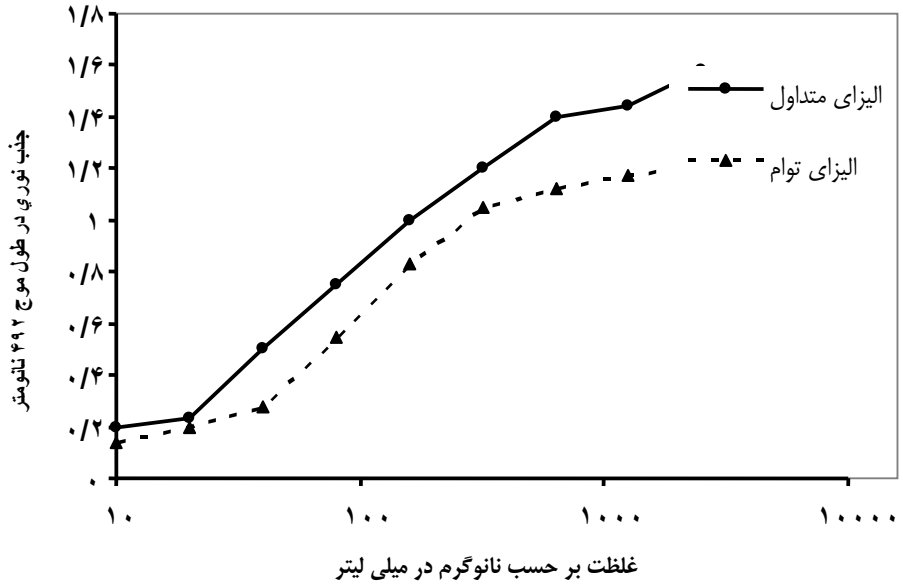
بـه منظـور تعیـین مولاریتـه سـیانید سـدیم، تیتراسیون مهار کننده از مولاریته ۰/۱ شروع شد و رقت مناسبی از کونژوگه به مجموعه اضافه شـد. نتـایج نـشان داد که حداقل مولاریته که مـی توانـد فعالیـت آنـزیم را مهار کند ۰/۰۲ مولار مـی‌باشـد و ۲ دقیقـه زمـان جهـت مهار کامل آنزیم لازم است.

غلظت فاکتورهای روماتوئید از کلاسIgM وIgA با دو روش ذکر شده به ترتیب با استفاده از منحنی استاندارد ۱ و ۲ بدست آمد (جدول-۱).

نتایج نشان داد که میانگین غلظت فاکتور روماتوئید از کلاس IgM در روش الیزای توام، (۱۶۱±۲۲۴ نانوگرم در میلی لیتر) در مقایسه با روش الیزای متداول (۱۸۱± ۲۴۵ نانوگرم در میلی لیتر) کمتر بود. هم‌چنین میانگین غلظت فاکتور روماتوئید از کلاسIgA در روش الیزای توام و الیزای متداول به ترتیب ۱۰۱±۱۴۸ و ۱۱۰±۱۵۹ نانوگرم در میلی لیتر بود. به هر حال جذب نوری و غلظت نمونه ها در روش جدید الیزای توام در مقایسه با روش الیزای متداول مقداری کمتر می‌باشد، ولی این تفاوت معنی دار نمی‌باشد (جدول۱). با مقایسه دو روش مشخص گردید که یک ارتباط مثبت و معنی دار بین این دو روش وجود دارد($r = ۰/۹$ ، $p = ۰/۰۰۱$).




نمودار۱. منحنی استاندار جهت سنجش فاکتور روماتوئید از کلاس IgM در دو روش الیزای متداول و الیزای توام




نمودار۲. منحنی استاندار جهت سنجش فاکتور روماتوئید از کلاس IgA در دو روش الیزای متداول و الیزای توام

**جدول۱. مقایسه جذب نوری و غلظت فاکتورهای روماتوئید از کلاس IgM و IgA در دو روش الیزای متداول و الیزای توام**

| نمونه | الیزای توام | | | | الیزای متداول | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | IgARF | | IgMRF | | IgARF*** | | IgMRF | |
| | غلظت* | جذب نوری** | غلظت | جذب نوری | غلظت | جذب نوری | غلظت | جذب نوری |
| ۱ | ۱۵۰ | ۰/۸۳ | ۴۰۰ | ۱/۲ | ۱۶۰ | ۰/۹۹ | ۴۶۵ | ۱/۶۱ |
| ۲ | ۲۷۰ | ۱ | ۳۰۰ | ۱/۱۳ | ۳۱۰ | ۱/۲ | ۳۱۰ | ۱/۵ |
| ۳ | ۱۵۵ | ۰/۸۶ | ۲۵۰ | ۱/۰۷ | ۱۶۰ | ۱ | ۲۷۰ | ۱/۴۸ |
| ۴ | ۹۰ | ۰/۶ | ۱۴۵ | ۰/۸۵ | ۹۰ | ۰/۸ | ۱۵۰ | ۱/۲ |
| ۵ | ۲۴۳ | ۰/۹ | ۴۲۰ | ۱/۲۳ | ۲۵۰ | ۱/۱۴ | ۴۶۰ | ۱/۶ |
| ۶ | ۵۸ | ۰/۴ | ۱۰۰ | ۰/۷۵ | ۶۰ | ۰/۶۶ | ۱۰۰ | ۱/۰۸ |
| ۷ | ۱۵۴ | ۰/۸۵ | ۱۱۰ | ۰/۸ | ۱۶۰ | ۱ | ۱۲۰ | ۱/۱ |
| ۸ | ۴۰ | ۰/۲۵ | ۵۰ | ۰/۴۳ | ۴۰ | ۰/۵ | ۵۵ | ۰/۷ |
| ۹ | ۱۰ | /۱ | ۲۰ | ۰/۲ | ۲۵ | ۰/۳ | ۲۵ | ۰/۴ |
| ۱۰ | ۳۱۰ | ۱/۱ | ۴۵۰ | ۱/۲۵ | ۳۴۰ | ۱/۲۵ | ۵۰۰ | ۱/۶۸ |

* جذب نوری در طول موج ۴۹۲ نانومتر

** غلظت بر حسب میکروگرم در میلی لیتر

*** Rheumatoid factor

## بحث

آنتی بادی‌ها نقش مهمی را در پاسخ‌های ایمنی ایفاء می کنند. این مولکول ها علاوه بر اینکه در خنثی کردن آنتی ژن نقش دارند، بر حسب نوع کلاس، فعالیت‌های بیولوژیک خاصی را در بدن ایفا می کنند(۱۳). سنجش آنتی بادی بر ضد یک آنتی ژن می تواند هم تاییدی بر وجود آنتی ژن در بدن و هم بیان کننده روند و ماهیت پاسخ ایمنی باشد. در برخی از بیماری‌های خود ایمن تولید آنتی بادی از کلاس‌های مختلف بر علیه پروتئین های خودی(اتوآنتی بادی) در پاتوژنز بیماری موثر است(۱۴). برخی مطالعات نشان می‌دهد که در بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید که واجد فاکتور روماتوئید از کلاس IgA هستند، امکان ابتلاء به علائم خارج مفصلی بیشتر است(۷، ۱۵).

روش رایج در کشور ما جهت سنجش فاکتور روماتوئید، روش لاتکس است که به صورت کیفی و آن هم فقط توانایی سنجش فاکتور روماتوئید از کلاس IgM را دارد. در روش الیزای متداول که امروزه برای سنجش مقدار و کلاس آنتی بادی‌ها کاربرد دارد، هر کلاس آنتی بادی به طور مجزا با استفاده از کونژوگه اختصاصی ضد ایزوتیپ سنجیده می شود(۹). از معایب این روش، وقت گیر بودن و پر هزینه بودن آن است، زیرا برای سنجش هر ایزوتیپ اختصاصی باید تمام مراحل پوشاندن پلیت با آنتی ژن و اضافه نمودن نمونه به طور مجزا در پلیت جداگانه انجام شود. در روش مطرح شده در این تحقیق می‌توان بر روی یک پلیت، تنها با اضافه کردن کونژوگه‌های مربوطه، هر کلاس آنتی بادی را سنجید. اساس روشی که در این تحقیق استفاده شد، مهار فعالیت آنزیم کونژوگه با استفاده از یک مهار کننده غیر رقابتی است. چون کونژوگه مورد استفاده پراکسیداز بود، ما از سدیم سیانید به عنوان مهار کننده آنزیمی استفاده کردیم.

همان طور که در نتایج به آن اشاره شد، مولاریته مناسب از مهار کننده جهت مهار فعالیت آنزیم ۰/۰۲ مولار می‌باشد .غلظت مهار کننده نباید زیاد یا کمتر از حد اپتیموم باشد. زیرا در غلظت های زیاد ممکن است بر ساختار لایه های زیرین تاثیر بگذارد و باعث تغییر ساختار پروتئین شود. در غلظت کم نیز میزان رنگ زمینه ای بالا می‌باشد و قادر نیست به طور کامل فعالیت آنزیم را در مدت زمان مورد نظر مهار کند.

نتایج حاصله نشان می‌دهد هر چند جذب نوری و غلظت آنتی بادی در روش الیزای توام کمتر از روش قبلی است ولی این تفاوت معنی دار نمی‌باشد. از دلایل کاهش غلظت و جذب نوری نمونه در روش الیزای توام ممکن است پدیده ممانعت فضایی کونژوگه قبلی باشد که تا حدودی از اتصال کونژوگه دوم جلوگیری می کند.

در مجموع با توجه به عدم تفاوت روش مطرح شده با روش قبلی و هم‌چنین کاهش مصرف مواد و کاهش زمان جهت سنجش ایزوتیپ‌های مختلف آنتی بادی بر ضد یک آنتی ژن، می توان از این روش برای سنجش ایزوتیپ های مختلف بر علیه یک آنتی-ژن در یک پلیت استفاده کرد.

## تشکر و قدردانی

بدین وسیله استاد ارجمند جناب آقای دکتر فرقانی زاده استاد روماتولوژی علوم پزشکی ایران که در تشخیص بیماری و تهیه برخی نمونه‌ها نهایت همکاری را عنایت فرمودند سپاس گذاری می نماییم.

## منابع


1. Heyman B. Functions of antibodies in the regulation of B cell responses in vivo. Springer Semin Immunopathol 2001; 23 (4): 421-32.
2. Bachmann MF, Kopf M. The role of B cells in acute and chronic infections. Curr Opin Immunol 1999; 11(3): 332-9.
3. Mitsunobu F, Ashida K, Hosaki Y,et al. Influence of long-term cigarette smoking on immunoglobulin E-mediated allergy, pulmonary function, and high-resolution computed tomography lung densitometry in elderly patients with asthma. Clin Exp Allergy 2004; 34(1): 59-64.
4.Lawley TJ, Frank MM. Immune complex diseases. In: Wilson JD, Braunwald E, Fauci AS, et al, editors. Harrison's Principles of Internal Medicine. 12th ed. New York: McGraw-Hill; 1991. p 1428.
5. Newkirk MM. Rheumatoid factors: what do they tell us? J Rheumatol 2002; 29(10): 2034-40.
6.Rantapaa-Dahlqvist S, DeJong BA,et al. Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 2003;48(10):2741-9.
7. Pai S, Pai L, Birkenfeldt R.Correlation of serum IgA rheumatoid factor levels with disease severity in rheumatoid arthritis. Scand J Rheumatol 1998 ; 27 (4) : 252 -6.
8. Jonsson T, Steinsson K, Jonsson H,et al. Combined elevation of IgM and IgA rheumatoid factor has high diagnostic specificity for rheumatoid arthritis.Rheumatol Int 1998;18(3):119-22.
9.Carpenter AB. Enzyme - linked immunoassys. In: Rose NR, et al, editors. Manual of clinical laboratory immunology. 4th ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1997.p.20 - 29.
10.Mosayebi G, Shokri F. Comparative measurement of RF in serum and synovial fluid of rheumatoid arthritis patients by ELISA and Latex-aggluthnation test. Iranian Biomedical journal 2000; 4(2&3): 63 -67.
11. Shokri F, Mageed RA, Kitas GD,et al. Quantification of cross-reactive idiotype-positive rheumatoid factor produced in autoimmune rheumatic diseases. An indicator of clonality and B cell proliferative mechanisms. Clin Exp Immunol 1991; 85(1): 20-7.
12. Mierau R, Gause A, Kuppers R,et al. A human monoclonal IgA rheumatoid factor using the VkIV light chain gene. Rheumatol Int 1992; 12(1): 23-31.
13. Bengten E, Wilson M, Miller N,et al. Immunoglobulin isotypes: structure, function, and genetics. Curr Top Microbiol Immunol 2000;248:189-219.
14. Nielsen CH, Hegedus L, Leslie RG. Autoantibodies in autoimmune thyroid disease promote immune complex formation with self antigens and increase B cell and CD4+ T cell proliferation in response to self antigens. Eur J Immunol 2004 ; 34(1): 263-72.
15. DeRycke L, Peene I, Hoffman IE, et al. Rheumatoid factor and anticitrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: diagnostic value, associations with radiological progression rate, and extra-articular manifestations. Ann Rheum Dis 2004; 63(12): 1587-93.