# مطالعه اعتبار نتایج الیزای خانگی و به دست آوردن بهترین نقطه برش (Cut off) به منظور بررسی سرواپیدمیولوژیکی لکوز گاوان

رضی‌اله جعفری‌جوزانی[۱]، غلامعلی مقدم[۲]، هادی جباری[۳] و فهیمه باقری[۴]

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۲/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۰/۱۶


## خلاصه

مطالعه حاضر به منظور مقایسه اعتبار یک الیزای خانگی با یک الیزای تجاری برای به دست آوردن بهترین نقطه برش به منظور تشخیص آنتی‌بادی‌های ضد ویروس لکوز گاوی (BLV) صورت گرفت. پروتئین‌های ویروس لکوز گاوی به راحتی از طریق روشی که توسط سازمان مبارزه با بیماری‌های واگیر دام ارائه شده است، استخراج شد. برای طراحی الیزای خانگی از روش چکر بورد استفاده شد. ۴۵۴ سرم از گاوداری‌ها تهیه و در یک الیزای تجاری که در این مطالعه به عنوان آزمایش مرجع در نظر گرفته شده است مورد آزمایش قرار گرفتند و سپس نتایج آن‌ها با نتایج الیزای خانگی مقایسه شدند. تمامی سرم‌های کنترل منفی به جز یکی (سرم استاندارد اروپایی برای پایش پاسخ سرمی به ویروس لکوز گاو، E5) از طریق الیزای تجاری انتخاب شد. تجزیه و تحلیل آماری سرم‌های کنترل منفی نشان از آن دارد که با در نظر گرفتن نقاط برش از ۰/۲۶ تا ۰/۳۰ مقادیر قابل قبولی از حساسیت و ویژگی نسبی به دست می‌آید لذا در این فاصله خطر رخداد موارد مثبت کاذب در الیزای خانگی کاهش می‌یابد. بهترین حساسیت (۸۶ درصد) و ویژگی (۸۸ درصد) نسبی با در نظر گرفتن جذب نوری ۰/۲۷ حاصل می‌گردد. فراوانی پاسخ سرمی مثبت در میان حیوانات مورد آزمایش به ترتیب ۸ درصد و ۱۰ درصد با الیزای خانگی و الیزای تجاری محاسبه گردید.


**کلمات کلیدی:** الیزا، حساسیت نسبی، ویروس لکوز گاوی، ویژگی نسبی

## مقدمه

ویروس لکوز گاو متعلق به جنس دلتا ویروس از خانواده رتروویریده است (۴). این ویروس بسیار وابسته به سلول است و در لنفوسیت‌های B محیطی که در نتیجه عفونت تکثیر یافته‌اند، مستقر می‌گردد (۷). از بین دام‌های مختلف تنها گاو به طور طبیعی به این ویروس آلوده می‌شود، اما به طور تجربی توانسته‌اند ویروس را به گونه‌های مختلفی از حیوانات منتقل کنند. پس از قرار گرفتن گاو در معرض ویروس، ممکن است چهار حالت رخ دهد، ۱- عدم بروز عفونت به دلیل مقاومت ژنتیکی دام در معرض ابتلاء. ۲- بروز عفونت پایدار و تولید آنتی‌بادی قابل ردیابی. ۳- بروز عفونت پایدار، آزمایش سرمی مثبت و لنفوسیتوز پایدار که خوش‌خیم بوده و به لنفوسارکوما تبدیل نمی‌شود. ۴- بروز عفونت پایدار، آزمایش سرمی مثبت همراه یا بدون لنفوسیتوز پایدار و وقوع لنفوسارکوما (۱ و ۸). با توجه به اینکه بیماری در کشور ما، ایران، شکل آندمیک یافته وجود آزمایشاتی که بتوانند وضعیت پاسخ سرمی گاوها را به این ویروس مشخص نمایند، بسیار راهگشا خواهد بود. همواره به منظور مطالعه پاسخ سرمی تعداد زیادی از دام‌ها در برابر ویروس لکوز گاوی نیاز به آزمایش‌هایی است که سریع

[۱] استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز E-mail: rjoozani@tabrizu.ac.ir (نویسنده مسئول)

[۲] استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

[۳] استادیار دانشکده ریاضی، دانشگاه فردوسی مشهد

[۴] دانشجوی دکتری حرفه‌ای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز

و ارزان قیمت باشند. لذا استفاده از الیزا در مطالعه پاسخ سرمی به ویروس لکوز گاوی ارزش فراوانی دارد. در این میان برخی استفاده از انواع الیزای خانگی را بر انواع تجاری آن ترجیح می‌دهند، از عمده‌ترین علل این موضوع می‌توان به صرفه اقتصادی آن علی‌الخصوص با توجه به شرایط کشور اشاره نمود.

اما آنچه که استفاده گسترده از این گونه از آزمایشات را محدود می‌نماید، این است که در مطالعات مختلف تفسیر نتایج آزمایشات به اشکال گوناگونی ارائه شده است. به ویژه این مساله در مورد تعیین نقطه برش ( Cut Off) مشاهده می‌شود که در مطالعات مختلف سرواپیدمیولوژیکی، اعداد گوناگونی به عنوان نقطه برش گزارش شده‌اند (۱۱ و ۱۳). گذشته از این مورد، مقادیر گوناگون جذب نوری پس زمینه و واکنش‌های متقاطع آنتی‌بادی‌ها جوانب دیگری از پیچیدگی راه‌اندازی یک الیزای خانگی و مقایسه آن را با سایر مطالعات مشخص می‌سازد. هدف از این مطالعه به دست آوردن حساسیت و ویژگی نسبی الیزای خانگی در مقایسه با نوع تجاری به ازای نقاط برش مختلف و در عین حال محاسبه بهترین نقطه برش می‌باشد.

## *مواد و روش کار*

در چهار گاوداری صنعتی نمونه خون از ۴۵۴ گاو اخذ شد و سرم آنها پس از جدا شدن تا زمان انجام آزمایشات در فریزر منفی بیست درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

### الیزای تجاری

از کیت الیزای تجاری (Chekit Leucose IDEXX, US) استفاده و الیزا مطابق توصیه شرکت سازنده انجام شد.

### الیزای خانگی

از الیزای غیر مستقیم غیر رقابتی که در آن آنتی‌ژن در کف حفره‌های پلیت الیزا (Nunc, Denmark) قرار گرفته استفاده شد. روش تهیه آنتی‌ژن مطابق روش توصیه شده توسط سازمان پیشگیری از عفونت‌های دام (OIE) بوده و مقدار یک میکروگرم از آن در هر گوده پوشش داده شد. رقت مناسب از آنتی‌سرم و آنتی‌بادی کونژوگه ( Koma Biotech, S. Korea) توسط چکر بوردهای مختلف تعیین شد. از تترامتیل بنزیدین به عنوان سوبسترا استفاده شد و نتایج توسط دستگاه الیزا ریدر (DANA 3200, Iran) و در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت شد.

برای کاهش جذب نوری پس زمینه برای هر آزمایش یک کنترل فاقد آنتی‌ژن قرار داده شد و جذب نوری هر گوده پس از کسر نتیجه گوده کنترل مورد استفاده قرار گرفت.

به عنوان سرم‌های کنترل مثبت از سرم E5 (سرم استاندارد اروپایی برای پایش پاسخ سرمی به ویروس لکوز گاو) و تعداد ۲۴ سرم کنترل منفی که با آزمون تجاری مورد تایید قرار گرفته بود، استفاده شد.

به منظور بررسی توافق بین دو آزمایش تشخیصی از آماره کاپا استفاده شد. آماره کاپا بین صفر (شانس) و یک (توافق کامل) متغییر می‌باشد، بدین صورت که مقادیر بین صفر و دو دهم معادل توافق جزئی، بین ۰/۲۱ و ۰/۴ معادل توافق اندک، بین ۰/۴۱ و ۰/۶ معادل توافق متوسط، بین ۰/۶۱ و ۰/۸ معادل توافق قابل ملاحظه و بین ۰/۸۱ تا یک معادل توافق بسیار کامل می‌باشد.

### تجزیه و تحلیل آماری

نتایج الیزای خانگی و الیزای تجاری (به عنوان آزمایش مرجع) در نرم افزار آماری SPSS ویرایش شانزدهم مورد مقایسه قرار گرفتند.

حساسیت و ویژگی نسبی الیزای خانگی مطابق فرمول‌های زیر محاسبه شد:

درصد حساسیت نسبی= (تعداد نمونه‌های مثبت در هر دو روش) / (تعداد نمونه‌های مثبت در هر دو روش+تعداد

نمونه‌های مثبت بـا آزمـایش مرجـع و منفـی بـا آزمـایش الیزای خانگی)×۱۰۰

درصد ویژگی نسبی= (تعداد نمونه‌هـای منفـی بـا هـر دو روش) / (تعداد نمونه‌های منفـی بـا هـر دو روش+تعـداد نمونه‌های منفی با روش مرجـع و مثبـت بـا روش الیـزای خانگی)×۱۰۰

با رسم منحنی (ROC)[1] به طور همزمـان حـساسیت و ویژگی نسبی مورد مقایسه قرار گرفت.

از سوی دیگر با در نظر گـرفتن نقـاط بـرش مختلـف میزان حساسیت و ویژگی نسبی به ازای هـر نقطـه بـرش محاسبه گردید.

## نتایج

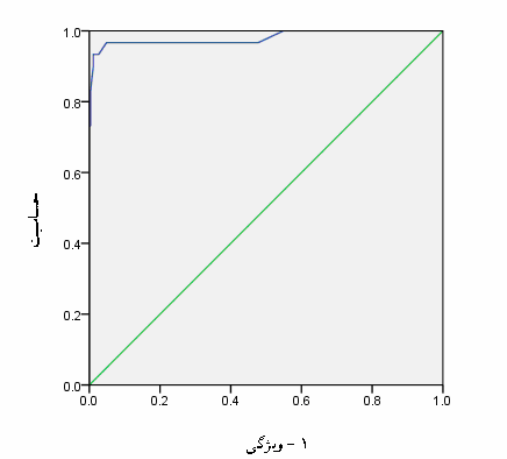
حساسیت‌ها و ویژگی‌هـای نـسبی در آزمـایش الیـزای خانگی در جدول یک ارائه شده است.

همان طور که مشخص است در هر نقطـه بـرش میـان ۰/۲۶۵۰ و ۰/۳۰۵۰ حساسیت و ویژگی نسبی کمتر از۸۰٪ نخواهد بود لذا این منطقه بهترین محل برای انتخاب نقطه برش اصلی در نظر گرفته می‌شود. نتایج مثبت و منفی هر دو الیـزای خـانگی و تجـاری در جـدول دو بـا یکـدیگر مقایسه شده است. دوازده مورد مثبت کاذب و یک مـورد منفی کاذب در نتایج الیزای خانگی وجود دارد.

***جدول ۱: ارزیابی نقاط برش در الیزای خانگی مختلف همراه با حساسیت و ویژگی‌های متناظر (با سطح اطمینان ۹۵ درصد) و مقایسه آن با آزمایش تجاری***

| نقاط برش | حساسیت | ۱- ویژگی | نقاط برش | حساسیت | ۱- ویژگی | نقاط برش | حساسیت | ۱- ویژگی |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0/0000 | 1/000 | 1/000 | 0/1950 | 0/923 | 0/722 | 0/3650 | 0/759 | 0/022 |
| 0/0550 | 1/000 | 0/996 | 0/2050 | 0/904 | 0/649 | 0/3750 | 0/733 | 0/008 |
| 0/0750 | 1/000 | 0/993 | 0/2150 | 0/897 | 0/580 | 0/3850 | 0/667 | 0/000 |
| 0/0850 | 1/000 | 0/990 | 0/2250 | 0/897 | 0/473 | 0/4000 | 0/633 | 0/000 |
| 0/0950 | 1/000 | 0/985 | 0/2350 | 0/897 | 0/419 | 0/4250 | 0/567 | 0/000 |
| 0/1050 | 1/000 | 0/980 | 0/2450 | 0/897 | 0/338 | 0/4350 | 0/533 | 0/000 |
| 0/1150 | 1/000 | 0/976 | 0/2550 | 0/897 | 0/276 | 0/5450 | 0/500 | 0/000 |
| 0/1250 | 1/000 | 0/970 | 0/2650 | 0/864 | 0/167 | 0/4750 | 0/467 | 0/000 |
| 0/1350 | 1/000 | 0/965 | 0/2750 | 0/864 | 0/120 | 0/4850 | 0/433 | 0/000 |
| 0/1450 | 1/000 | 0/951 | 0/2850 | 0/825 | 0/095 | 0/4950 | 0/333 | 0/000 |
| 0/1550 | 1/000 | 0/907 | 0/2950 | 0/825 | 0/081 | 0/5050 | 0/300 | 0/000 |
| 0/1650 | 1/000 | 0/872 | 0/3050 | 0/802 | 0/070 | 0/5250 | 0/200 | 0/000 |
| 0/1750 | 0/967 | 0/833 | 0/3150 | 0/802 | 0/058 | 0/5450 | .133 | 0/000 |
| 0/1850 | 0/967 | 0/765 | 0/3400 | 0/789 | 0/041 | 0/5550 | 0/100 | 0/000 |

1- Receiver operatin characteristic




***شکل ۱: منحنی ROC، حساسیت و ویژگی‌های محاسبه شده در هر نقطه برش از الیزای خانگی و مقایسه آن با نتایج الیزای تجاری به عنوان آزمایش مرجع***

محاسبه آماره کاپا نشان داد که توافق محکمی (۰/۸۲) میان الیزای خانگی و الیزای تجاری وجود دارد.

فراوانی پاسخ سرمی مثبت با الیزای خانگی تقریباً ۸٪ و با الیزای تجاری ۱۰٪ محاسبه شد.

***جدول ۲ : مقایسه فراوانی موارد مثبت و منفی در الیزای خانگی و مقایسه آن با الیزای تجاری***

| | | | الیزای خانگی | | جمع |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | مثبت | منفی | |
| الیزای تجاری | موارد منفی | تعداد | ۱۲ | ۴۰۷ | ۴۱۹ |
| | | درصد در الیزای تجاری | ٪۲/۹ | ٪۹۷/۱ | ٪۱۰۰/۰ |
| | | درصد در الیزای خانگی | ٪۲۶/۱ | ٪۹۹/۸ | ٪۹۲/۳ |
| | | درصد در تعداد کل | ٪۲/۶ | ٪۸۹/۶ | ٪۹۲/۳ |
| | موارد مثبت | تعداد | ۳۴ | ۱ | ۳۵ |
| | | درصد در الیزای تجاری | ٪۹۷/۱ | ٪۲/۹ | ٪۱۰۰/۰ |
| | | درصد در الیزای خانگی | ٪۷۳/۹ | ٪۰/۲ | ٪۷/۷ |
| | | درصد در تعداد کل | ٪۷/۵ | ٪۰/۲ | ٪۷/۷ |
| جمع | تعداد | | ۴۶ | ۴۰۸ | ۴۵۴ |
| | درصد در الیزای تجاری | | ٪۱۰/۱ | ٪۸۹/۹ | ٪۱۰۰/۰ |
| | درصد در الیزای خانگی | | ٪۱۰۰/۰ | ٪۱۰۰/۰ | ٪۱۰۰/۰ |
| | درصد در تعداد کل | | ٪۱۰/۱ | ٪۸۹/۹ | ٪۱۰۰/۰ |

## بحث

در مطالعه Choi و همکاران (۲۰۰۲) توافق مثبت (Positive Agreement) میان یک تست الیزای خانگی با یک آزمون سرولوژیک، میزان ۰/۷۴ محاسبه شده است که به توافق مثبت در این مطالعه نزدیک است (۲).

در مطالعه van den Heuvel و همکارن (۲۰۰۳) که به منظور بررسی حضور آنتی‌بادی علیه ویروس لکوز گاوی در شیر گاوها صورت گرفت، بدون در نظر گرفتن یک آزمون به عنوان آزمون مرجع میزان حساسیت با خطای ۵٪، ۹۹٪ محاسبه شد. این حساسیت با در نظر گرفتن جذب نوری ۰/۲ به عنوان نقطه برش به دست آمده است (۱۳).

در گزارش دیگری که توسط Juliarena و همکاران (۲۰۰۷) منتشر شده است اعداد گوناگونی به عنوان نقطه برش برای الیزای خانگی راه‌اندازی شده در نظر گرفته شده است. ایشان معتقدند که جذب نوری ۰/۲ موجب برابری حساسیت و ویژگی آزمایش الیزای خانگی در حد ۹۶٪ می‌گردد. بررسی‌های آماری بر روی نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که با در نظر گرفتن نقطه برش معادل ۰/۱۶ حساسیت آزمون خانگی در مقایسه با آزمون تجاری و با درنظر گرفتن نقطه برش معادل ۰/۴۸ ویژگی آزمون خانگی در مقایسه با آزمون تجاری به شکل کامل (۱۰۰٪) خواهد بود (۶).

یکی از مزایای الیزای خانگی، سهولت و سرعت تهیه آنتی‌ژن می‌باشد. خلوص آنتی‌ژن مورد استفاده در الیزای غیر مستقیم از جذب نوری پس زمینه می‌کاهد اما در مقابل موجب افزایش هزینه‌ها و زمان مورد نیاز برای انجام آزمایش می‌گردد (۳).

از آنجایی که برقراری یک نقطه برش بستگی به استراتژی محققین دارد می‌توان با کاهش جذب نوری نقطه برش از میزان رخداد منفی کاذب کاست و از سوی دیگر با افزایش آن می‌توان از هزینه تحمیل شده بر اثر موارد مثبت کاذب جلوگیری نمود یا آن را کاهش داد. در واقع تعیین نقطه برش یک امر دینامیک است که با توجه به هدف آزمایش و جمعیت مورد آزمایش برقرار می‌گردد (۱۰ و ۱۲).

به اشکال گوناگونی می‌توان نتایج این مطالعه را در بررسی گله‌ها به کار برد. به نظر می‌رسد که در مورد گله‌هایی که حضور یا عدم حضور پاتوژن در آنها هنوز مشخص نیست بهترین کار این است که حتی به میزان اندک جذب نوری (۰/۱۸ تا ۰/۲۰) نیز توجه گردد و در صورت وجود این میزان از جذب نوری در برنامه مشخصی اقدام به انجام نمونه‌گیری‌های دوره‌ای و ادامه بررسی‌ها گردد. اما در صورتی که حضور پاتوژن و پاسخ سرمی به آن در یک گله محرز است بهتر است نقطه برش را معادل جذب نوری ۰/۲۶ تا ۰/۳۰ قرار داد. زمانی که هدف حذف می‌باشد می‌توان با توجه به استراتژی مورد نظر از نقطه برش با جذب نوری بالا و از نقطه برش با جذب نوری پایین استفاده نمود، بدین صورت که در مورد گاوهای ارزشمند می‌توان از جذب نوری بالاتر ۰/۳۵ تا ۰/۴۰ و در مورد بقیه گله از جذب نوری ۰/۲۶ تا ۰/۳۰ استفاده کرد.

در مطالعه دیگری که توسط Monti و همکاران (۲۰۰۵) انجام شده است بهترین حد مرزی ۰/۲۶۱ در نظر گرفته شده است. در این مطالعه از کیت تجاری IDEXX، به عنوان تست مرجع استفاده شده است. مقایسه‌های آماری نشان می‌دهد که حساسیت و ویژگی این الیزای تجاری که برای استفاده از شیر گاوها سازگار شده است در مقایسه با الیزای سرمی ۹۰٪ می‌باشد. با این حال ایشان اعلام کردند که این الیزای خانگی تعداد بیشتری از گاوهای سقط کرده را در مقایسه با الیزای تجاری مثبت تشخیص داده است (۹).

از آنجایی که آزمایش مرجع مورد استفاده در مطالعه Gonzalez و همکاران (۱۹۹۹) با مطالعه حاضر یکی است می‌توان به نزدیک بودن حد مرزی به دست آمده در مطالعه ایشان و تحقیق حاضر اشاره نمود. در مطالعه حاضر بالاترین حساسیت و ویژگی در حد مرزی ۰/۲۷ به دست می‌آید بدین صورت که در این مقطع حساسیت ۸۶٪ و ویژگی ۸۸٪ محاسبه گردیده است (۵).

در این مطالعه از تعداد بسیار زیادی از نمونه‌ها (۷۹۱ مورد) استفاده شده است و زمانی که حد مرزی ۰/۶۳ در نظر گرفته شد، ویژگی نسبی ۱۰۰٪ و حساسیت ۷۹٪ به دست آمد.

فراوانی حیوانات با پاسخ سرمی مثبت در این مطالعه بیش از ۷٪ به دست آمده است و از آنجایی که مطالعه‌ای در این سطح تا کنون در منطقه انجام نشده است می‌توان این میزان را به عنوان مبنا برای مطالعات بعدی استفاده نمود.

## تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه تبریز که از این مطالعه حمایت مالی نمودند تشکر و قدردانی می‌گردد (پژوهانه شماره ۱۲-۲۷/۳۲۹۰/د) و همین طور از جناب آقای دکتر والکمپ از انستیتو لوفلر آلمان که "سرم استاندارد اروپایی برای پایش پاسخ سرمی به ویروس لکوز گاو (E5)" را فراهم کردند، سپاسگزاری می‌گردد.

## منابع

1- Buzała E. and Dereń W. (2003). Comparison of PLA with AGID and ELISA results in serology diagnosis of bovine leukosis. Polish Journal of Veterinary Sciences, 6: 9-11.

2- Choi K.Y., Liu R.B. and Buehring G.C. (2002). Relative sensitivity and specificity of agar gel immunodiffusion, enzyme immunosorbent assay, and immunoblotting for detection of anti-bovine leukemia virus antibodies in cattle. Journal of Virological Methods, 104: 33-9.

3- De Giuseppe A.F., Feliziani D. and Mia G.M. (2004). Expression of the bovine leukemia virus envelope glycoprotein (gp51) by recombinant baculovirus and its use in an enzyme-linked immunosorbent assay. Clinical Diagnostics and Laboratory Immunology, 11: 147-51.

4- Domenech A.J., Goyache L., Llames M.J., Paya G. and Gomez-Lucia E. (2000). In vitro infection of cells of the monocyte / macrophage lineage by bovine leukemia virus (BLV). Journal of General Virology, 81: 109-118.

5- Gonzalez T., Bonzo E.B., Echeverria M.G., Licursi M. and Etcheverrigaray M. (1999). Enzootic bovine leukosis: development of an indirect enzyme linked immunosorbent assay (I-ELISA) in seroepidemiologic studies. Revista De Microbiologia., 30: 37-42.

6- Juliarena M., Gutierrez S. and Ceriani C. (2007). Chicken antibodies: a useful tool for antigen capture ELISA to detect bovine leukaemia virus without cross-reaction with other mammalian antibodies. Veterinary Research Communication, 31: 43-51.

7- Kettmann R., Burny A., Callebaut I., Droogmans L., Mammerickx M., Willems L. and et al. (1994). Bovine leukemia virus. In: Levy, JA. (eds.), The retroviridae. Plenum Press, New york. pp: 39-81.

8- Kittelberger R., Laybourn B.J., Diack D.S., Penrose M.E., Reichel M.P., Motha J. and et al. (1996). Evaluation of electrophoretic immunoblotting for the detection of antibodies against the bovine leukosis virus in cattle. Journal of Virological Methods, 61: 7-22.

9- Monti G.E., Frankena K., Engel B., Buist W., Tarabla H.D. and De jong M.C. (2005). Evaluation of a new antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine leukemia virus infection in dairy cattle. Journal of Veterinary Diagnostics Investigations, 17: 451-7.

10- Naif H.M. and Daniel R. (1992). Early detection of bovine leukemia virus by using an enzyme-linked assay for polymerase chain reaction-amplified proviral DNA in experimentally infected cattle. Journal of Clinical Microbiology, 30:675-679.

11- Simard C., Richardson S., Dixon P., Bélanger C. and Maxwell P. (2000). Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine leukosis: comparison with the agar gel immunodiffusion test approved by the Canadian Food Inspection Agency. Canadian Journal of Veterinary Research, 64: 101-6.

12- Trono K.G., Pérez-Filgueira D.M., Duffy S., Borca M.V. and Carrillo C. (2001). Seroprevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: comparison of sensitivity and specificity of different detection methods. Veterinary Microbiology, 83: 235-48.

13- Van den Heuvel M., Portetelle D., Jefferson B. and Jacobs R.M. (2003). Adaptation of a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay to determine the concentration of bovine leukemia virus p24 and optimal conditions for p24 expression in short-term cultures of peripheral blood mononuclear cells. Journal of Virological Methods, 111: 61-7.