

تغییرات کمی، غیر کیفی، در سطح آنتی‌بادی Mumps IgG ناشی از سیکل Freez-thaw

مسعود حفیظی^۱ * M.D.، سلیمان خیری^۲ ** M.D.، مرتضی ایزدی^۳ ** M.D.

آدرس مکاتبه: * دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد - دانشکده پزشکی - گروه عفونی - شهرکرد - ایران

** دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد - دانشکده پزشکی - گروه آمار حیاتی

*** دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا... (عج) - دانشکده پزشکی - گروه داخلی عفونی - و مرکز تحقیقات بهداشت نظامی

تاریخ اعلام وصول: ۱۳۸۵/۸/۲۰ تاریخ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۸۶/۳/۱۷ تاریخ اعلام قبولی مقاله: ۱۳۸۶/۳/۲۰

خلاصه

هدف: همیشه، نتیجه تست‌های سرمی بر روی سرم‌هایی که یک یا چند بار ذوب و مجدداً فریز شده‌اند با این سؤال همراه است که این نتایج قابل قبول نیست و آیا با افت نتیجه و منفی کاذب همراه است؟ هدف این مطالعه آزمایشگاهی تعیین تأثیر سیکلهای ذوب شدن - فریز شدن سرم نمونه‌ها، بر سطح آنتی‌بادی اوربون می‌باشد.

مواد و روش کار: این مطالعه شامل ۲۵ نمونه سرم بود که پس از نمونه‌گیری در یخچال و حرارت ۲۰- درجه سانتیگراد فریز شدند. پس از یک هفته ذوب شدند و تحت آزمایش اول قرار گرفتند. پس از آن مجدداً در حرارت ۴+ درجه سانتیگراد فریز شدند. پس از گذشت یک هفته مجدداً ذوب شدند. پس از دومین ذوب شدن، نمونه‌ها تحت همان آزمایش Mumps IgG به روش ELISA قرار گرفتند. نتایج به صورت (Immune Serum Ratio) یا ISR اول و دوم و درصد تغییرات آنها ثبت گردید. مدل رگرسیون خطی برای بررسی درصد تغییرات ISR به کار برده شد و مورد آنالیز قرار گرفت.

نتایج: بر اثر سیکل‌های فریز شدن - ذوب شدن، سه نوع تغییر در سطح آنتی‌بادی اوربون به روش الیزا اتفاق افتاد: در ۴۴٪ موارد سطح ISR ثابت بود. که عمدتاً در جنس مؤنث و سن ۱۳-۸ سال دیده شد. در ۳۲٪ موارد کاهش سطح ISR وجود داشت، که در مردان با ISR اول بیش از ۴ و سن بین ۱۹-۱۴ سال گزارش شد. افزایش سطح ISR در ۲۴٪ موارد در مردان ۱۰-۱۲ ساله‌ای گزارش شد که سطح ISR اول کمترین و بین ۲-۱ بود. با استفاده از مدل رگرسیون، سطح ISR اول یک فاکتور اساسی در درصد تغییرات ISR دوم بود ولی نه جنس و نه سن، اثر قابل توجهی نداشتند.

نتیجه‌گیری و بحث: گرچه سطح آنتی‌بادی که با ISR نشان داده می‌شود، تحت تأثیر سیکل‌های فریز - ذوب شدن قرار می‌گیرد، ولی این تغییرات سبب منفی کاذب تست‌ها نمی‌شوند. به عبارت دیگر تأثیر محدود کمی و نه کیفی دارد.

واژگان کلیدی: اوربون، IgG، الیزا، فریز-ذوب، Freez-thaw، حرارت.

۲- استادیار - دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد

۱- استادیار - دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد -

۳- استادیار - دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا... (عج) - نویسنده مسئول

مقدمه

سنجش آنتی‌بادی‌های سرم گاهی با نمونه‌هایی صورت می‌گیرد که بیش از یک بار Freez-thaw (FT) می‌شوند برای اطمینان از حداقل ارزش پیشگویی تأثیر FT، لازم است که مشخص کرد آیا سنجش آنتی‌بادی، تحت تأثیر سیکل‌های FT قرار می‌گیرند؟ به دلیل اینکه آنتی‌بادی‌ها، از جنس پروتئین هستند، همیشه چنین موضوعی مورد سؤال بوده است.

مطالعاتی که قبلاً صورت گرفته، تأثیر سیکل‌های FT را بر روی آپولیوپروتئین E [۱] یا هورمونهای جنسی [۲] و یا تأثیر حرارت، FT و شرایط نگهداری سرم‌ها بر روی سطح پروتئین‌ها [۳] را مورد ارزیابی قرار داده است. نتایج آنها حاکی از تأثیر قابل توجه و معنی‌داری نبوده است. هر چند مطالعات دیگری چنین تأثیری را به صورت تغییرات کمی قابل چشم‌پوشی، بر روی HBV-DNA [۴] و یا افزایش مارکرهای مادر برای غربالگری سندرم داون [۵] و یا افزایش غیر قابل پیش‌بینی در CSF-GABA [۶] گزارش کرده‌اند.

با هدف روشن شدن اثر سیکل‌های FT در نتایج سطح آنتی‌بادی، این مطالعه طراحی گردید تا تأثیر دو سیکل FT و نیز شرایط درجه حرارت ذخیره‌سازی بر آنتی‌بادی IgG اوریون به روش ELISA، مشخص گردد.

مواد و روش کار

در جریان یک بررسی اپیدمیولوژیک سروپروولانس مربوط به اوریون [۷]، پس از نمونه‌گیری از ۳۳۸ نفر، سرم‌ها جدا شده و در درجه حرارت ۲۰- سانتیگراد نگهداری شدند. هنگام انجام آزمایش، شرایط به گونه‌ای بود که برای تعدادی (حدود ۲۷۲ سرم با یک بار FT) کیت آزمایش موجود بود و برای بقیه (۶۴ نفر) کیت وجود نداشت. این تعداد ۶۴ سرم آزمایش نشده، پس از نگهداری در حرارت ۴+ درجه سانتیگراد و با گذشت زمان یک هفته، با همان تست، در همان آزمایشگاه و توسط همان دستگاه، همان شخص و همان روش کیت اول، مجدداً آزمایش شده [۷] و نتایج ثبت گردید.

این ۶۴ سرم، ۲ بار تحت شرایط FT قرار گرفتند. با توجه به اینکه برای مسئولین، بحث تشکیک و تأثیر گذاری FT در اندازه سطح آنتی‌بادی سرم‌ها، مطرح شد، لذا بر آن شدیم در این مطالعه موضوع را مورد بررسی قرار دهیم. به این ترتیب به عنوان شاهد، از گروه یک بار FT شده، تعداد ۲۵ نمونه سرم به صورت اتفاقی انتخاب شدند. اینها سرم‌هایی بودند که تحت دو بار ذوب شدن و تحت دو حرارت ۲۰- و ۴+ درجه سانتیگراد نگهداری شده بودند. این نمونه‌ها در همان آزمایشگاه و توسط یک دستگاه، یک شخص و به روش کیت اول، مجدداً آزمایش شد [۷]. کنترل منفی و مثبت بر اساس توصیه‌های بروشور کیت بود و نتایج بر اساس فرمول Immune Serum Ratio، (ISR) دوم، ثبت گردید. فرضیه این بود که اگر سیکل FT و حرارت فوق بر روی ۲۵ سرم دو بار FT شده این مطالعه، تأثیر داشته است، گروه دو بار فریز شده مورد تشکیک نیز، دارای نتایج مشکوک هستند. به عبارت دیگر اگر نتایج ISR اول و دوم ۲۵ نمونه از نظر کیفی تفاوتی نداشت، نتایج گروه مورد تشکیک نیز قابل قبول خواهد بود.

بر اساس تعریف، تغییر ISR دوم کمتر یا مساوی ۳۰٪ ارزش ISR اول غیر معنی‌دار ولی تغییرات بیش از ۳۱٪، معنی‌دار در نظر گرفته شده بود. آزمون آماری با استفاده از مدل رگرسیون خطی با نرم افزار SPSS و نسخه ۱۱/۵ صورت گرفت و سطح $P < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج سطح ISR اول و دوم در جدول ۱ ثبت گردیده است. این جدول درصد تغییرات ISR و معنی‌دار یا غیر معنی‌دار بودن (بر اساس تعریف موجود در کیت) را نیز نشان می‌دهد. بر اساس نتایج موجود در جدول ۱، افراد به سه گروه طبقه‌بندی می‌گردند (جدول یک). گروه افزایشی - تغییرات افزایش یابنده در نمونه‌های (با سطح ISR برابر با ۱-۲ در تست اول) اتفاق افتاده است. گروه کاهش - تغییرات کاهش یابنده در نمونه‌های (با سطح ISR برابر با بیش از ۴ در تست اول) اتفاق افتاده است.

جدول ۱: نتایج تغییرات ISR براساس جنس، سن، ISR اولیه، ثانویه

Age	Gender	ISR* of first test	ISR* of Second test	% Change of ISR*	Significance	Group
10	M	1.80	2.12	+ 18	NV ý	Increase
14	M	1.58	1.97	+ 25	NV	Increase
10	M	1.79	2.28	+ 27	NV	Increase
11	M	1.53	2.07	+ 35	V §	Increase
12	F	1.67	2.55	+ 53	V	Increase
12	M	1.08	1.72	+ 59	V	Increase
6	M	18.07	1.55	- 91	V	Decrease
19	M	13.8	1.64	- 88	V	Decrease
18	M	12.2	2.47	- 80	V	Decrease
14	M	8.33	2.73	- 67	V	Decrease
14	M	2.52	1.22	- 52	V	Decrease
7	F	5.02	2.76	- 45	V	Decrease
7	F	2.45	1.55	- 37	V	Decrease
17	M	4.11	2.80	- 32	V	Decrease
13	F	3.85	2.70	- 30	NV	No change
13	F	3.80	2.72	- 28	NV	No change
13	F	3.80	2.73	- 28	NV	No change
8	F	3.60	2.70	- 25	NV	No change
13	F	3.42	2.63	- 23	NV	No change
8	F	3.43	2.74	- 20	NV	No change
10	M	3.35	2.71	- 19	NV	No change
11	M	3.31	2.67	- 19	NV	No change
9	M	3.31	2.76	- 17	NV	No change
11	M	3.01	2.50	- 17	NV	No change
9	F	3.00	2.63	- 12	NV	No change

- * ISR= Immune Status Ratio
- ý = Non Valuable
- § =Valuable

جدول ۲: خلاصه مدل رگرسیون خطی برای لگاریتم طبیعی درصد تغییرات ISR

Variables	Non-standardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Significant
	B	Std. Error	Beta		
(Constant)	3.234	.247		13.092	.000
First ISR	.069	.019	.510	3.571	.002
GENDER	-.261	.139	-.231	-1.874	.076
AGE	.033	.019	.195	1.740	.098
DUMMY1	-.683	.167	-.613	-4.082	.001
DUMMY2	.022	.207	.018	.105	.917

بر اساس تست Kolmogorov – Smirnov، لگاریتم طبیعی درصد تغییرات در ارزش ISR به صورت طبیعی پراکنده شده بودند

گروه ثابت - تمام تستهای با ISR در سطح ۳-۴، با تغییرات ثابت (کمتر از ۳۰٪) روبرو شدند (به استثناء دو عدد).

جدول ۲ مدل رگرسیون برای لگاریتم طبیعی درصد تغییرات را مشخص می‌کند و نشان می‌دهد که ISR اول و دوم گروه مورد تست، فاکتورهای مهم در تعیین تغییرات ISR هستند ($P=0/05$). ولی نه جنس و نه سن تأثیری معنی‌دار بر آن ندارند. بر اساس Dummy1 و Dummy2، گروه ثابت، نسبت به دیگر گروهها، تأثیر متفاوتی بر تغییر ISR دارد ($P=0/05$). گروه ثابت که دارای اولین حدود ۳-۴ هستند، کمترین تغییرات ISR را دارند. هر چند که گروه کاهشی که اولین ISR بیش از ۴ دارد با کاهش ISR و گروه افزایشی که اولین ISR بین ۲-۱ را دارد با افزایش سطح ISR همراه بوده‌اند. شکل ۱ نشان می‌دهد که هر چه ISR اول بیشتر باشد (بویژه وقتی که بیش از ۶ باشد) با تغییرات بیشتری در دومین ISR همراه است.

بحث

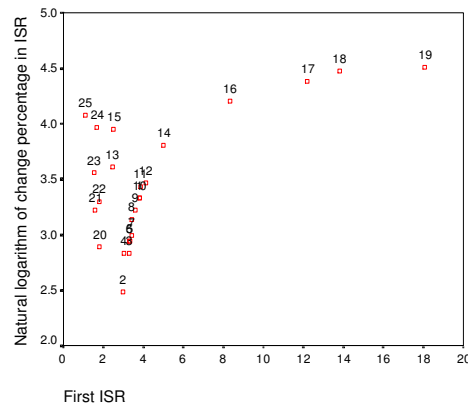
مهمترین یافته مطالعه این است که دو عدد سیکل FT و نیز درجه حرارت متفاوت نگه‌داری سرم اثر کیفی بر نتیجه تست نداشت اگر چه اثر کمیتی را نشان داد. این اثر کیفی به سه صورت، افزایشی در ۲۴٪، کاهشی در ۳۲٪ و ثابت در ۴۴٪ نشان داده شد. اثر کمیتی افزایش در ۲۴٪، گر چه یک واکنش نامعمول است، ولی در عمل قبلاً نیز گزارش شده است. یک مطالعه، پس از ۵ سیکل FT، گزارش کرد که Free B-HCG با افزایش ۵/۵٪ روبرو خواهد شد، گرچه این تغییرات، تأثیر محدودی در تست غربالگری داشته است [۵]. همچنین در مطالعه ای سیکل‌های متعدد FT یک اثر نامنظم و غیر قابل پیش‌بینی افزایشی بر روی CSF GABA گزارش کرده است [۶].

همچنین در یک مطالعه سرم‌های heat-inactivated، که HIV مثبت بودند، به سرم‌های منفی تبدیل شدند که سبب پاسخ مثبت کاذب به میزان ۸٪ گردید ولی موارد مثبت کاذب در تست‌های بعدی مورد تأیید قرار نگرفتند [۸]. در مطالعه حاضر موارد افزایش، در نمونه سرم‌هایی اتفاق افتاد که سطح ISR حدود ۱-۲ (Low concentration) داشتند، چنین اتفاقی در یک مطالعه بر روی HCV RNA نیز گزارش شده است [۴].

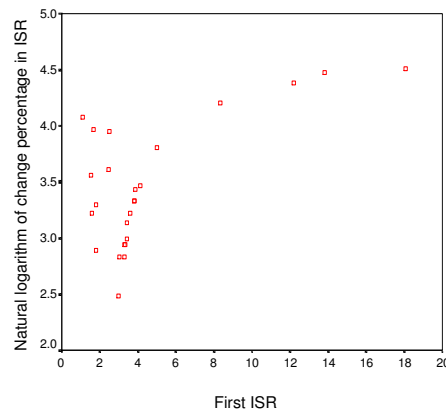
بر اساس تعریف کیت آزمایشگاهی این مطالعه، اگر تغییرات در

($P=0/86$)، لذا از یک مدل رگرسیون خطی و لگاریتم طبیعی برای آنالیز و تجزیه و تحلیل این تغییرات استفاده شد. با استفاده از مدل متغیر dummy، متغیر گروهی را در تجزیه و تحلیل بکار بردیم. متغیر dummy، یک نمای عددی برای متغیرهای گروهی در یک مدل رگرسیون است. در این آنالیز، گروه، یک متغیر گروهی سه سطحی است. بنابراین دو متغیر dummy برای معرفی این متغیرهای گروهی باید تعریف گردد. D_1 برابر یک است اگر مشاهدات به گروه ثابت تعلق دارد ولی برابر صفر است اگر به دیگر گروه‌ها متعلق است. D_2 برابر یک است اگر مشاهدات به گروه کاهشی تعلق دارد ولی برابر صفر است اگر به دیگر گروه‌ها متعلق است. لذا اگر D_1 و D_2 برابر صفر باشند، این مشاهدات به گروه افزایشی تعلق دارد.

شکل ۱: ارتباط بین سطح ISR اولیه و لگاریتم طبیعی درصد تغییرات ISR ثانویه



شکل ۲: ارتباط بین سطح ISR اولیه و لگاریتم طبیعی درصد ISR ثانویه



آقای جعفر شوشتری پور که در انجام مطالعه و آزمایش تست‌های این مطالعه همکاری صمیمانه داشتند و نیز از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد که تأمین مالی طرح اصلی را بر عهده داشتند، کمال تشکر و امتنان را دارم.

منابع

- 1- Schiele F, Vincent-Very M, Herbert B, Vivifies A, Siesta G. Effect of short- and long-term storage on human serum and recombinant apolipoprotein E concentration. *Clint Chem. Lab Med* 2000; 38(6): 525-8.
- 2- Reyna R, Traynor KD, Hines G, Boots LR, Azziz R. Repeated freezing and thawing does not generally alter assay results for several commonly studied reproductive hormones. *Fertil Steril* 2001; 76(4): 823-5.
- 3- Kenis G, Teunissen C, De Jongh R, Bosmans E, Steinbusch H, Maes M. Stability of interleukin 6, soluble interleukin 6 receptor, interleukin 10 and CC16 in human serum. *Cytokine* 2002; 19(5):228-35.
- 4- Krajden M, Minor JM, Rifkin O, Comanor L. Effect of multiple freeze-thaw cycles on hepatitis B virus DNA and hepatitis C virus RNA quantification as measured with branched-DNA technology. *J Clin Microbiol* 1999; 37(6): 1683-6.
- 5- Masse J, Forest JC, Moutquin JM, Degrandpre P. Effect of repeated freeze-thaw cycles on maternal serum biological markers for the detection of fetal trisomies. *Clin Biochem.* 1997; 30(7): 527-30.
- 6- Abbott RJ, Keidan J, Pye IF, Nahorski SR. Effect of freezing on gamma-aminobutyric acid levels in human cerebrospinal fluid. *J Neurochem* 1981; 37(4):1042-4.

دومین ISR، کمتر یا مساوی ۳۰٪ ISR اول باشد، این تغییرات غیر قابل توجه (No significant) بوده که در ۴۴٪ موارد نمونه سرمها، چنین گزارش شده است. حالت مشابهی در مطالعات قبلی بر روی HBV DNA [۹]، HCV RNA [۴]، هورمونهای درون ریز [۱۰]، گلوبولینهای پیوندی با هورمونهای جنسی [۳] و آنتی‌بادی HIV [۱۱-۱۳] گزارش شده است. تا ۱۰ سیکل FT بر روی نتیجه HBV DNA [۹]، تا ۸ سیکل FT بر روی HCV RNA [۴] و چندین سیکل FT و شرایط حرارت نگه‌داری سرمها بر روی گلوبولینهای پیوندی با هورمونهای جنسی [۳] بی‌تأثیر بوده است. در مطالعاتی، شرایط متفاوت حرارت نگه‌داری، ۲۵ درجه، ۳۷ درجه، ۵۶ درجه، ۶۵ درجه سانتیگراد با مدت زمان متفاوت، بر روی آنتی‌بادی HIV نیز بی‌تأثیر بوده است [۱۲، ۱۳]. در مطالعه ما نمونه سرمهایی که سطح ISR بین ۳-۴ داشتند، تغییرات Stable را نشان دادند.

تغییری که در گزارش، دیده می‌شود و در مطالعات قبلی، گزارش نشده است، یک تغییر کاهشی است. در ۳۲٪ موارد، سطح ISR در دومین تست نسبت به اولین ISR با کاهش بیش از ۳۱٪ همراه بود که طبق تعریف کیت، یک تغییر قابل توجه (Significant) می‌باشد. این نوع تغییر، عمدتاً در مردان در سن ۱۸-۱۴ سال اتفاق افتاد که سطح اولین ISR آنها بیش از ۴ بوده است. گره نه جنس و نه سن رابطه آماری معنی‌داری را نشان ندادند.

نتیجه‌گیری

بر اساس یافته‌های این مطالعه، ۲ سیکل FT و نیز حرارت 20°C و 4°C تأثیری بر نتیجه تست آنتی‌بادی IgG اوربیون به روش ELISA ندارد. گرچه تأثیری در حد تغییرات کمیتی دارد و لی کیفیت تست بی‌تأثیر ماند. همچنین این مطالعه، کاهش کمی آنتی‌بادی را که قبلاً گزارش نشده است، نشان می‌دهد.

تقدیر و تشکر. بدینوسیله از آقای دکتر مجید آویژگان که اطلاعات مربوطه را به این جانب دادند، سرکار خانم شاکریان، دکتر رویا حبیبیان، دکتر فاطمه لله گانی، دکتر مهدی سعادت و

- 7- Avijgan M, Habibia H, Kheiri S. Seroprevalence of Mumps among 3-18 year old children as a base for Mumps vaccination in Iranian EPI. (Eastern Meditteranean Journal of Health (In the list of publishing) (ISSN:1020-3397).
- 8- Fipps DR, Damato JJ, Burke DS. Effects of heat inactivation on HIV antibody screening and confirmatory test systems. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1988; 10(2): 103-7.
- 9- Sanlidag T, Akcali S, Ozbakkaloglu B. Serum hepatitis B DNA: stability in relation to multiple freeze-thaw procedures. *Virology Methods* 2005; 123(1): 49-52.
- 10- Livesey JH, Hodgkinson SC, Roud HR, Donald RA. Effect of time, temperature and freezing on the stability of immunoreactive LH, FSH, TSH, growth hormone, prolactin and insulin in plasma. *Clin Biochem*. 1980; 13(4):151-5.
- 11- Markowski MA, Coard JG, Griffith B, Mayo DR. Effect of 10 minutes heat treatment on HIV antibody testing from alternate testing sites. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1988; 9(4): 225-30.
- 12- Wang GR, Yang JY, Lin TL, Chen HY, Horng CB. Temperature effect on the sensitivity of ELISA, PA and WB to detect anti-HIV-1 antibody and infectivity of HIV-1. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)* 1997; 59(6): 325-33.
- 13- Fipps DR, Damato JJ, Brandt B, Burke DS. Effects of multiple freeze thaws and various temperatures on the reactivity of human immunodeficiency virus antibody using three detection assays. *J Virol Methods* 1988; 20(2): 127-32.
- 14- Pinsky NA, Huddleston JM, Jacobson RM, Wollan PC, Poland GA. Effect of multiple freeze-thaw cycles on detection of measles, mumps, and rubella virus antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003; 10(1): 19-21.