ویژگی‌های کیفی روش‌های ایمونواسی تشخیص بیماری‌های عفونی

مرتضی ایزدیار

مدرس ایمونولوژی تشخیصی،کارشناس تضمین کیفیت و سیستم مدیریت کیفیت

mortezaizadyar@hotmail.com

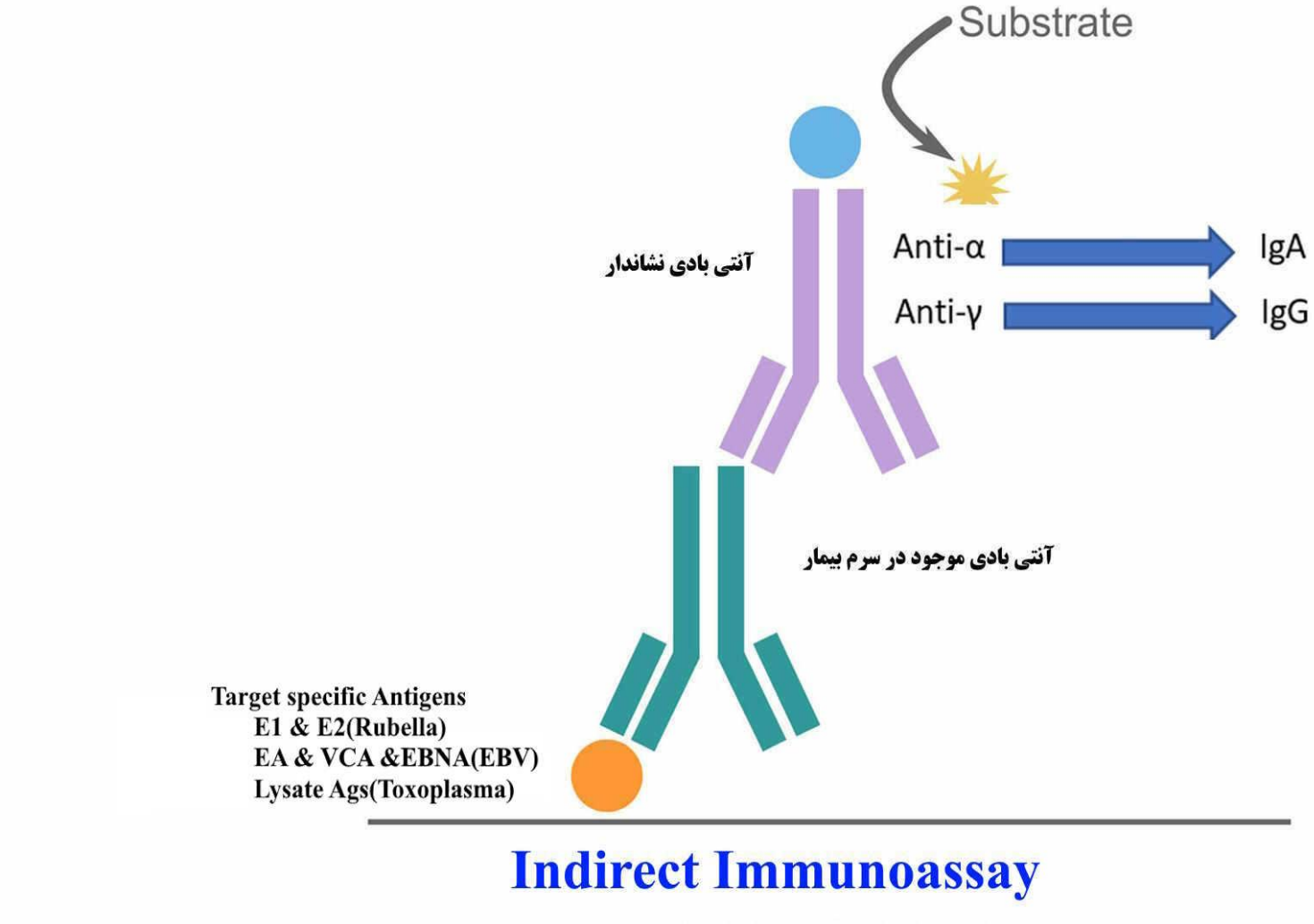
ابزار واکنش‌های ایمونواسی (آنتی‌ژن، آنتی‌بادی)

- **ایمونواسی**
  - **هر روش آزمایشگاهی برای آشکارسازی ماده‌ای به کمک آنتی‌بادیی، که با آن واکنش‌پذیر بوده یا قابل‌اتصال به اندازه‌ده یا مادهٔ موردنظر می‌باشد.**
  - **برای شناسایی یا تعیین مقدار آنتی‌بادی به کمک آنتی‌ژن معلوم**
  - **برای شناسایی یا تعیین مقدار آنتی‌ژن به کمک آنتی‌بادی معلوم**
- **آنتی‌بادی**
  - **آنتی‌بادی به عنوان معرف(مونوکلونال یا پلی‌کلونال)**
  - **آنتی‌بادی به عنوان آنالیت(IgG، IgM، IgA)**

تشخیص بیماری‌های عفونی

- تشخیص مستقیم
  - شناسایی و جداسازی عامل بیماری از نمونه‌های بیولوژیک(کشت و جداسازی و عامل عفونی)
  - شناسایی و جداسازی بخش‌هایی از ماده وراثتی عامل بیماری به کمک روش‌های مولکولی
    - تکثیر اسیدهای نوکلئیک(NAAT)
      - HCV-RNA
      - HIV-RNA
      - HIV-PreDNA
    - سایر روش‌ها(FISH for HPV)
- تشخیص غیرمستقیم
  - شناسایی آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی اختصاصی به کمک واکنش‌های ایمونواسی

فرمت‌های ایمونواسی تشخیص بیماری عفونی



تاریخچه ایمونواسی HIV

- **کیت‌های نسل اول**
  - **مبتنی بر ایمونواسی غیرمستقیم با استفاده از عصاره کشت سلولی به عنوان آنتی‌ژن**
  - **حداقل ۴۰ تا ۵۰ روز بعد از ورود ویروس مثبت می‌شدند.**
  - **فقط قادر به تشخیص HIV-1 بودند.**
- **کیت‌های نسل دوم**
  - **مبتنی بر ایمونواسی غیرمستقیم با استفاده از آنتی‌ژن نوترکیب**
  - **افزایش ویژگی**
  - **۳۳–۳۵ روز بعد از ورود ویروس مثبت می‌گردیدند.**
  - **قادر به تشخیص هر دو HIV-I & II بودند.**
  - **هر دو نسل قابلیت کمی برای تشخیص IgM داشتند.**

تاریخچه ایمونواسی HIV

- **نسل سؤم کیت‌های HIV**
  - **مبتنی بر فرمت آنتی‌ژن مضاعف**
  - **قادر به شناسایی هر دو IgG و IgM اختصاصی علیه هر دو HIV-I & II بودند.**
  - **۲۲–۲۸ روز بعد از ورود ویروس مثبت می‌شدند.**
- **نسل چهارم**
  - **علاوه بر آنتی‌بادی‌های اختصاصی HIV-I & II قادر به تشخیص AgP24 ویروس HIV-I نیزمی‌باشد.**
  - **حتی ۱۴ روز بعد از ورود ویروس می‌تواند مثبت شود.**

شناسایی توأمان آنتی‌بادی و آنتی‌ژن

- فاز جامد با ترکیبی از آنتی‌ژن‌های اختصاصی عامل عفونی و آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن هدف پوشیده شده است.
- به روش‌های Combi(Ag& Ab detection combination) نیز معروف هستند.
- روش‌های تشخیص HIV نسل ۴ (تشخیص Ab و آنتی‌ژن P24)

و نسل ۴ HCV(تشخیص Ab و آنتی‌ژن Core –Not FDA Approved)

- این روش‌ها اغلب برای افزایش حساسیت تشخیصی و کاهش زمان Window period طراحی شده‌اند.
- کاهش Window period در HIV از ۱ ماه به ۱۴ روز

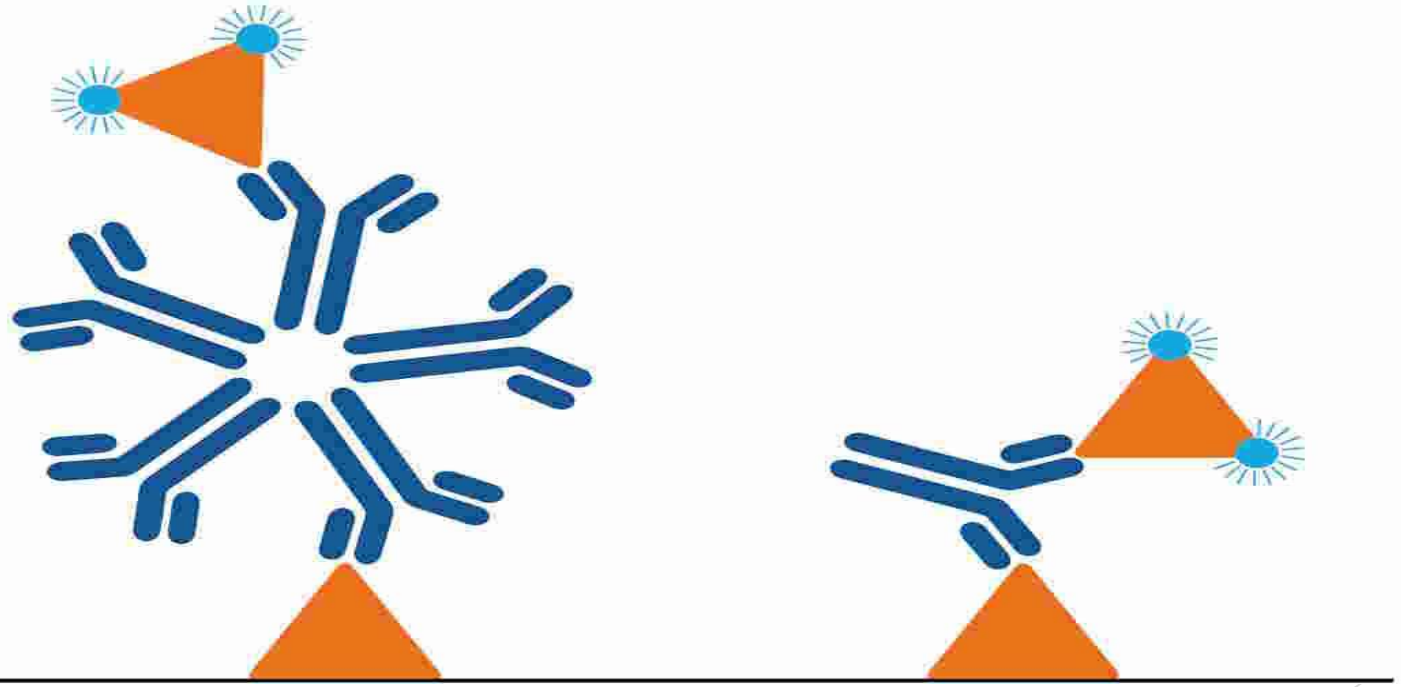
فرمت آنتی‌ژن مضاعف
Double Ag Bridging IA

برای بیماری های‌لاعلاج یا صعب العلاج که تفکیک IgG ازIgM اهمیت ندارد

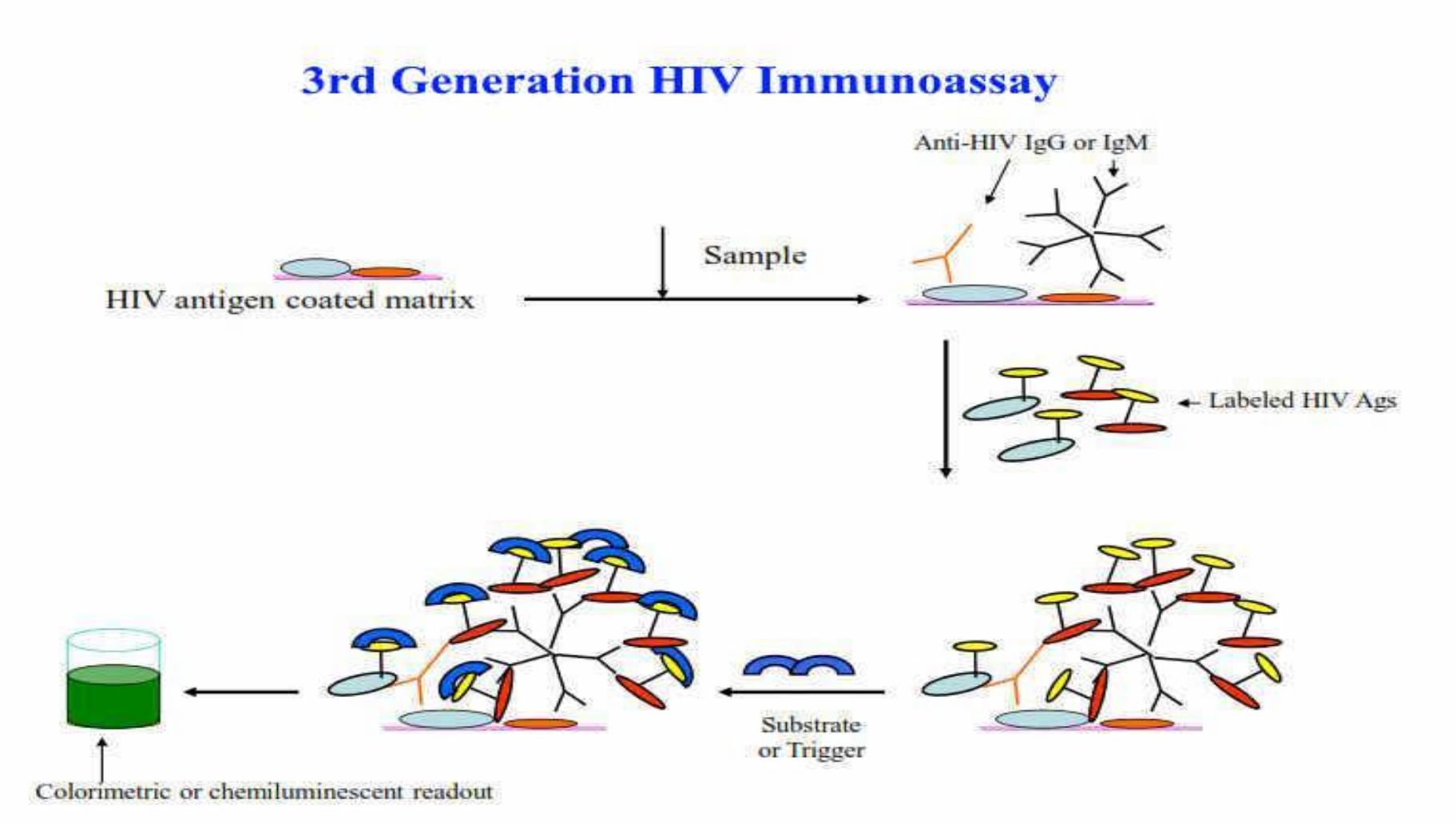
به روش سنجش آنتی بادی های تام نیز موسوم هستند

مثل کیت های نسل سوم HIV یا روش ایمونواسی کووید Roche

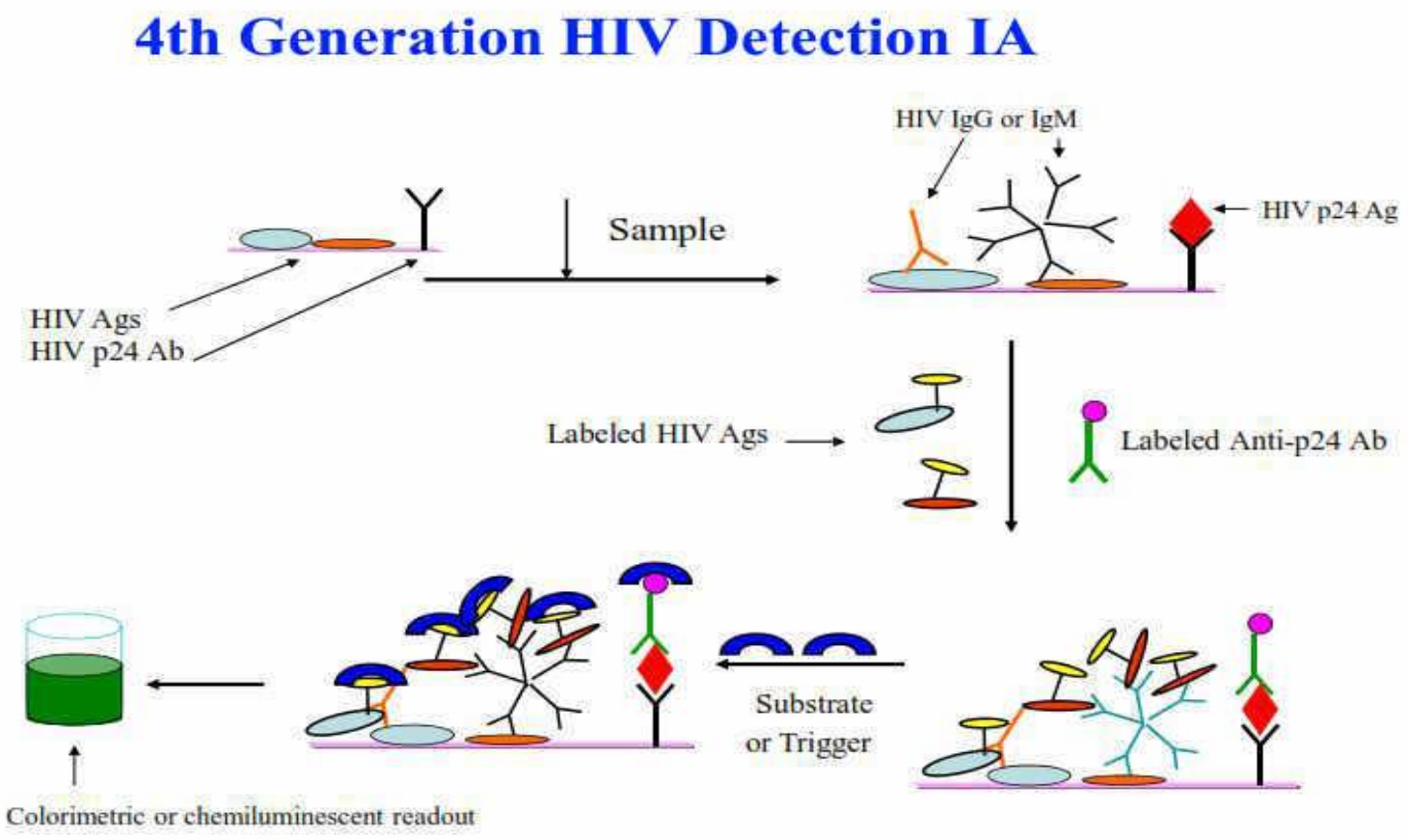
در این روش ها از آنتی ژنی یکسان برای پوشاندن فازجامد و آشکارساز استفاده می شود

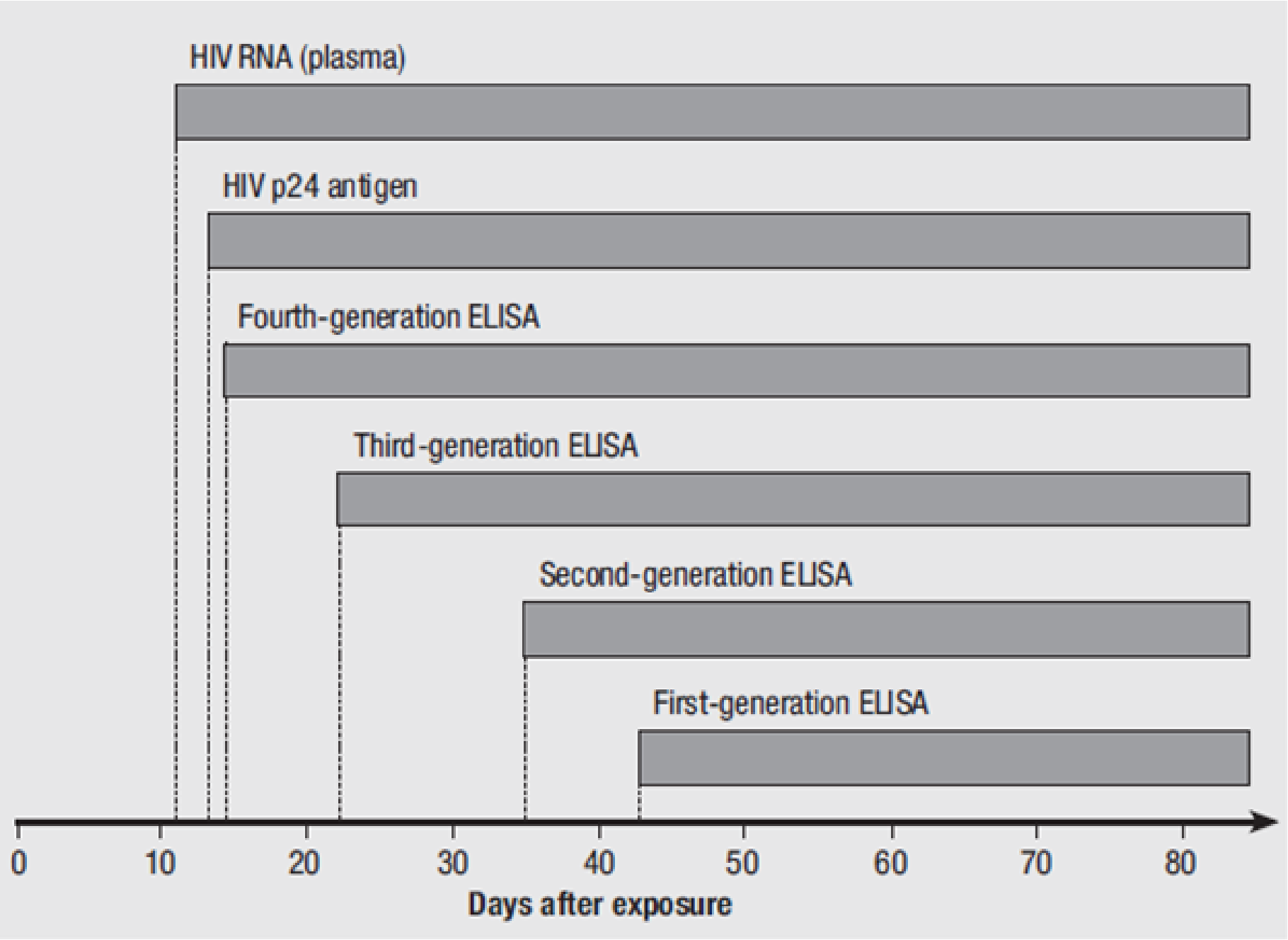


Double Ag Bridging IA



شناسایی توأمان آنتی‌بادی و آنتی‌ژن
Ag/Ab Combination IA





انجمن علمی دکترای علوم آزمایشگاهی تشخیص طبی - ایران
تاسیس ۱۳۸۱
Iranian Scientific Association Of Clinical Laboratory Doctors

فرمت ربایش IgM(IgM capture)

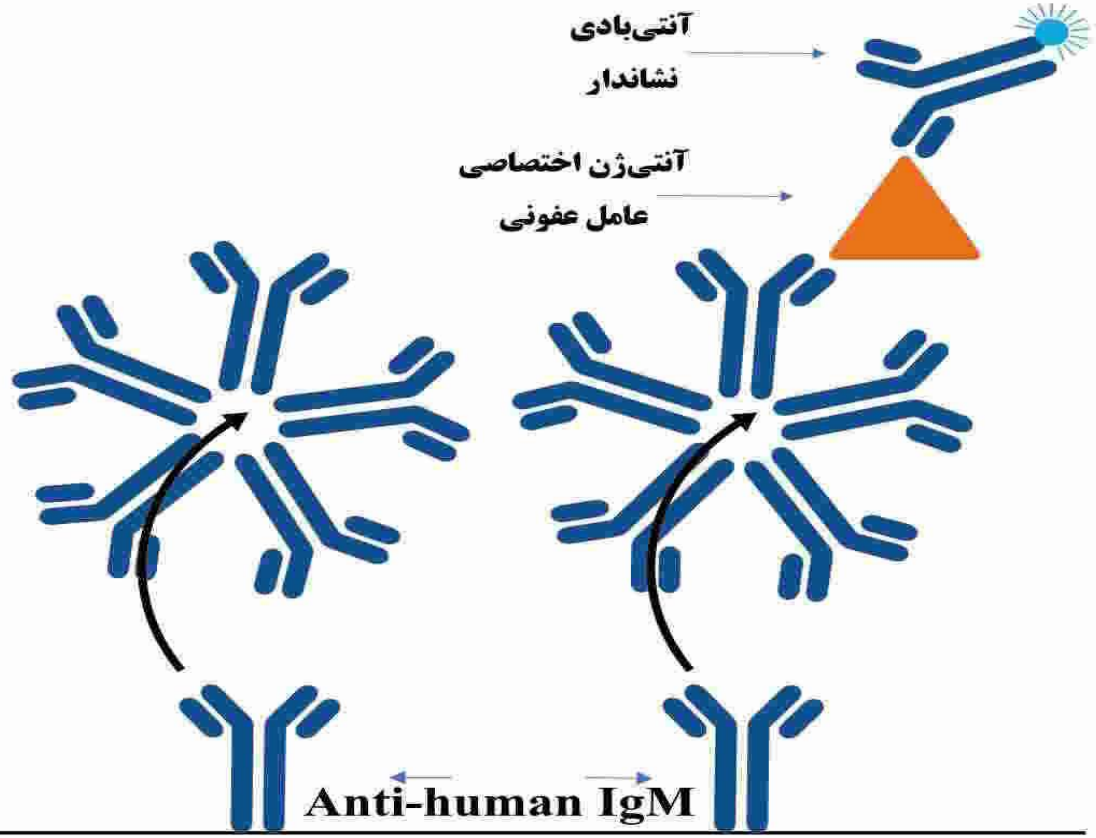
تشخیص سرولوژیک فرم حاد بیماری‌های عفونی

TORCH, Covid-19, Dengue, Listeriosis

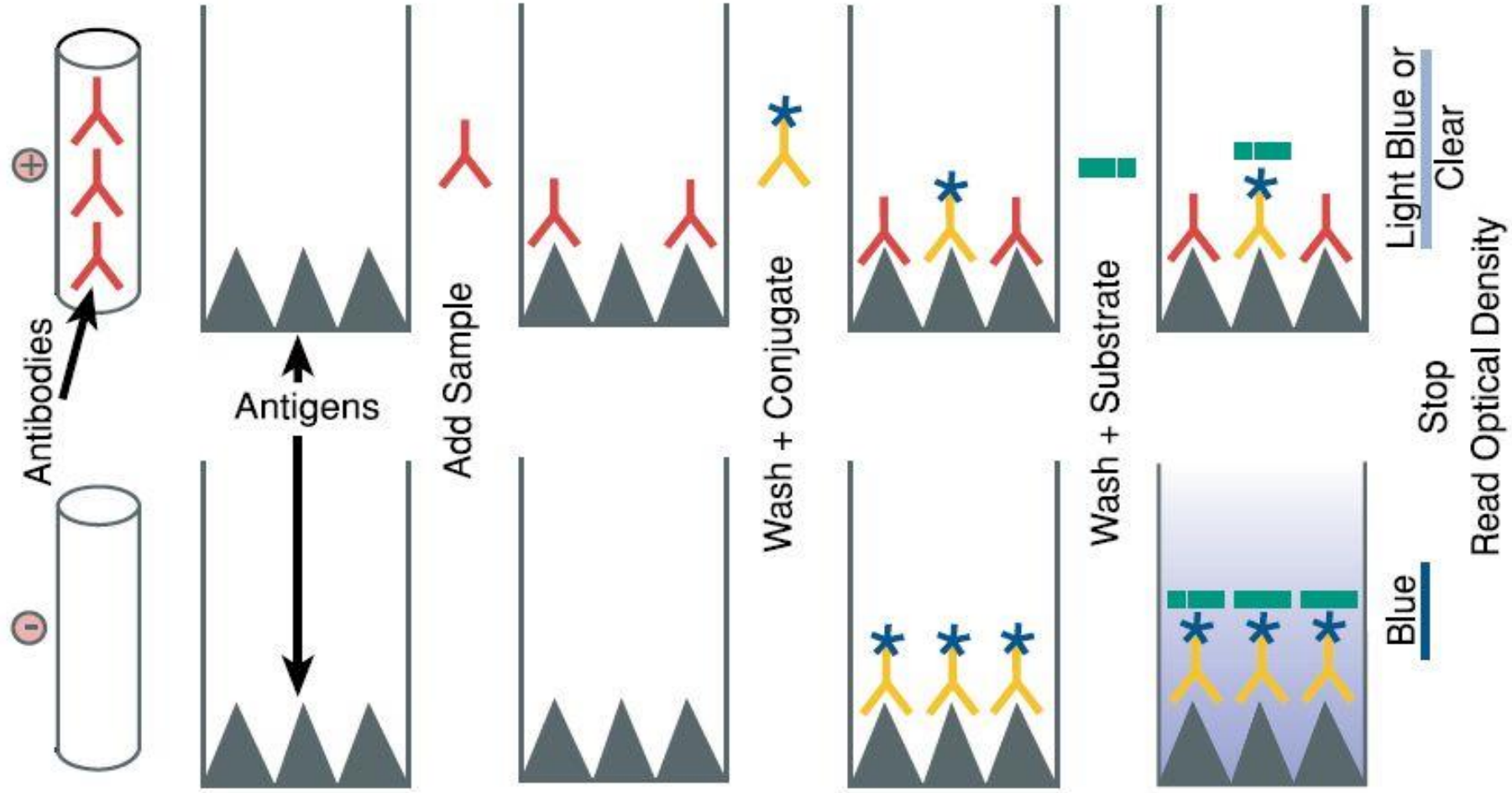
تمامی IgM موجود در سرم صرف‌نظر از ویژگی جذب فاز جامد می‌شوند.

با افزودن آنتی‌ژن اختصاصی و آنتی‌بادی شناساگر واکنش اختصاصی می‌شود.

گاهی اوقات پس از جذب IgG از فرمت ایمونواسی مستقیم برای سنجش IgM اختصاصی استفاده می کنند(جذب به کمک پروتئین S.aureus A)



HBc & e Total AB (Competitive) فرمت رقابتی



ویژگی‌های کیفی آزمون‌های ایمونولوژیک تشخیص بیماری‌های عفونی–حساسیت تشخیصی

- درصدی از موارد واجد شرایط هدف(بر اساس معیارهای صحت تشخیصی)، که نتیجه آزمایش آنها مثبت است
- در متون اروپایی از آن با عنوان حساسیت تشخیصی و در متون آمریکایی حساسیت بالینی نامیده می-شود :

$$Diagnostic\ sensitivity = 100 \times \frac{TP}{TP + FN}$$

- مثال:
- مثال۱: حساسیت تشخیصی یک روش HIV I & II Ab- P24 Ag combi برابر با 100%است، یعنی این روش موارد منفی کاذب ندارد.
  - اغلب مواقع مدعیان نتایج را براساس مطالعه جمعیت محدودی بدست آورده‌اند!!
- مثال۲: حساسیت تشخیصی یک روش Toxo IgM برابر با87.9% است، یعنی از آزمایش با این روش برروی ۱۰۰۰ نمونه سرم بیمار مبتلا به توکسوپلاسموز حاد به ۱۲۱ پاسخ منفی کاذب بر می‌خورریم .

ویژگی‌های آزمون‌های ایمونولوژیک تشخیص بیماری‌های عفونی–اختصاصیت تشخیصی

- درصد موارد فاقد شرایط هدف(براساس معیارهای صحت تشخیصی)، که نتیجه آزمایش آنها منفی است.
- اختصاصیت بالینی نیز نامیده می‌شود.

$$\text{Diagnostic specificity} = 100 \times \frac{TN}{TN+FP}$$

- مثال:
- اختصاصیت یک روش H.pylori Ag in stool برابر با 88% است، یعنی از آزمایش برروی ۱۰۰ فرد غیر آلوده به H.pylori به ۱۲ مورد مثبت کاذب برمی خوریم.
- کارآمدی(efficiency) : مجموع موارد حقیقی(مثبت و منفی) به کل موارد حقیقی و کاذب)

ارزش اخباری مثبت
Positive Predictive Value

- ارزش اخباری مثبت(PPV)درصد موارد با نتیجه مثبت آزمایش کیفی که واجد شرط هدف(که با معیارهای صحت تشخیصی تعیین می‌شوند) هستند.

$$PPV = 100 \times \frac{TP}{TP + FP}$$

- شاخص PPV در پرتو شیوع بیماری تعریف می‌شود.
- هرچه اختصاصیت آزمایشی بیشتر باشد، PPV بالاتری دارد.

ارزش اخباری منفی
Negative Predictive Value

- ارزش اخباری منفی (NPV)در صد موارد فاقد شرط هدف(که بازهم براساس معیارهای صحت تشخیصی تعیین می‌شود) ، است، که نتیجه آزمایش آنها منفی است.

$$NPV = 100 \times \frac{TN}{TN + FN}$$

- شاخص NPV نیز در سایه شیوع بیماری معنی می‌یابد.
- هرچه حساسیت آزمایشی بیشتر باشد،NPV بالاتری نیز دارد.

مثال : ارزش اخباری مثبت و منفی

در صورتی که درصد آلودگی به ویروس HIV در معتادان تزریقی کشور برابر با 4.32% باشد. ارزش اخباری مثبت و منفی یک روش غربالگری HIV I & II Ab- P24 combi که حساسیت و اختصاصیت تشخیصی آن به ترتیب برابر با 99.8% و 98.89% باشد در آزمایش برروی یک گروه آماری یکصدهزار نفری چقدر است؟

$$Infected\ people = 100000 * 4.32\% = 4320$$

$$TP = 4320 * 99.8\% \cong 4311$$

$$FN = 4320 - 4311 = 9$$

$$Not - infected = 100000 - 4320 = 95680$$

$$TN = 95680 * 98.89\% \cong 94618$$

$$FP = 95680 - 94618 = 1062$$

$$NPV = 100 \times \frac{94618}{94618 + 9} \cong 100\%$$

$$PPV = 100 \times \frac{4311}{4311 + 1062} \cong 80\%$$

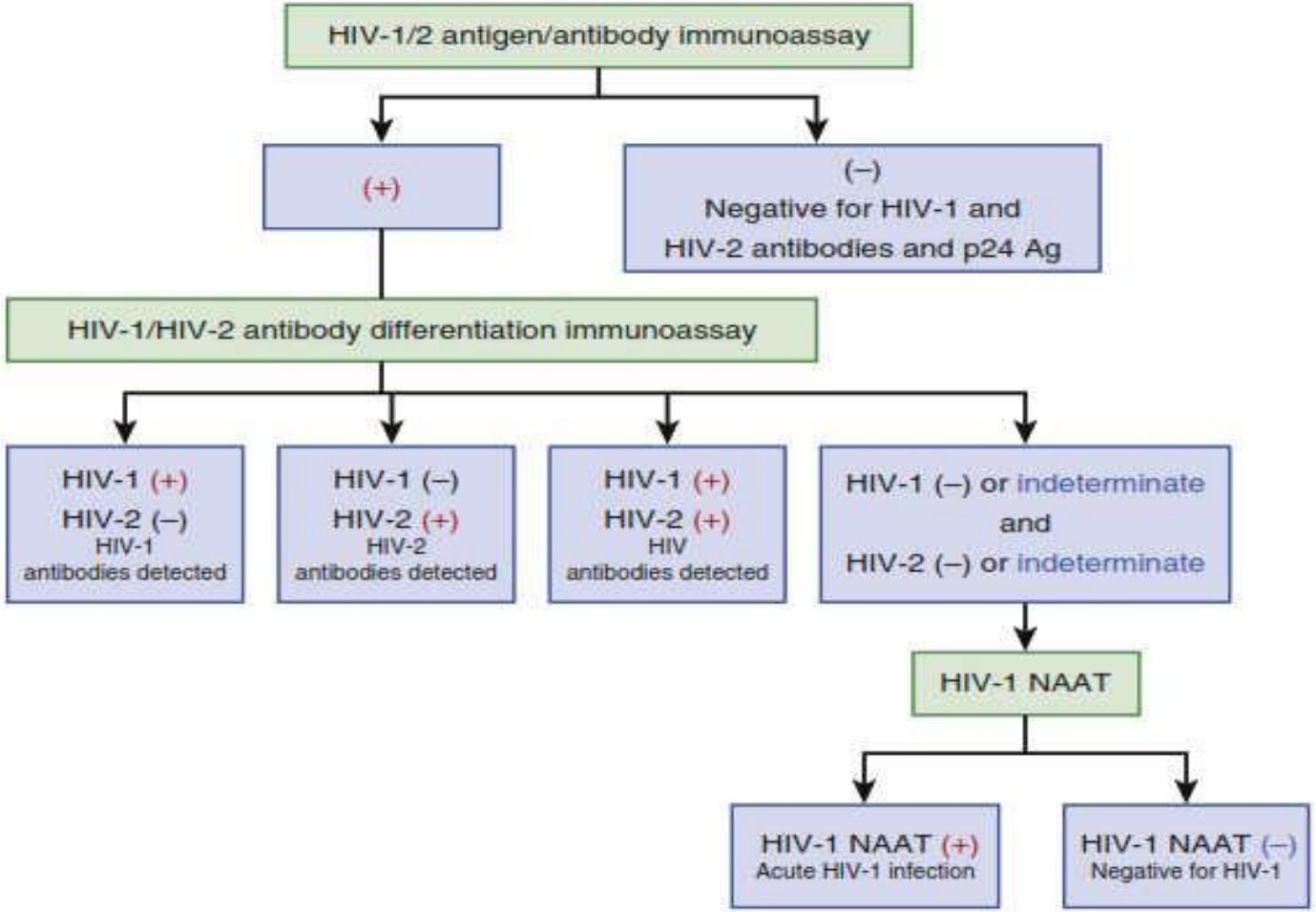
انواع آزمون‌های سنجش آنتی‌ژن و آنتی‌بادی

- **آزمون‌های غربالگری(Screening):**
  - **برای غربالگری جمعیت نسبتاً زیادی استفاده می‌شوند.**
  - **اغلب آزمایش‌های ایمونواسی به دلیل سهولت کاربرد و قابلیت اتوماسیون غربالگری نیز، هستند.**
- **آزمون‌های تشخیصی (Diagnostic)**
  - **ارزیابی افراد مشکوک به داشتن ویژگی خاص.**
  - **اغلب آزمون‌های ایمونولوژیک بیماری‌های عفونی. مثل** HCV Ab
  - **اگر برای درمان یا پیش‌آگهی بیماری مهمی استفاده شود، باید حتی‌الامکان از حساسیت بالایی برخوردار باشد.**
  - **اگر آزمون تأییدی خوبی در دسترس باشد اختصاصیت بالا لازم نیست.**

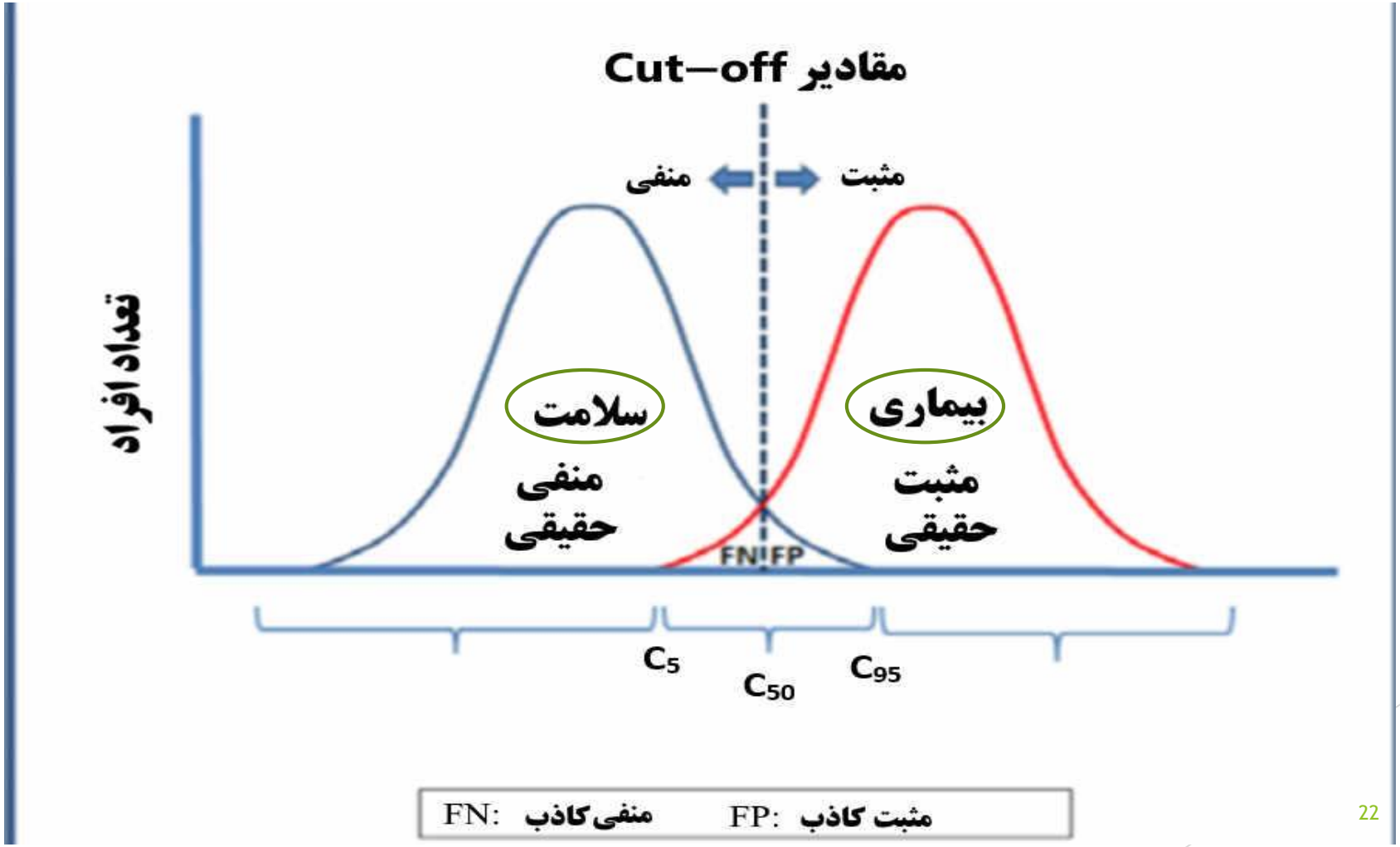
انواع آزمون‌های سنجش آنتی‌ژن و آنتی‌بادی

- **آزمون‌های تأییدی**(Confirmatory)
  - **آزمون‌هایی که متعاقب مثبت شدن آزمون غربالگری یا آزمون تشخیصی، انجام می‌شوند.**
  - **واجد اختصاصیت(بیش از** 98%) **و ارزش اخباری مثبت بالا**
  - **مثل وسترن‌ایمونوبلاتینگ متعاقب مثبت شدن آزمایش ایمونواسی** HIV
  - **آزمایش** RPR **متعاقب مثبت شدن آزمایش‌های آنتی‌ژن اختصاصی** TP**(معکوس به علت سهولت کاربری)**
  - **الزاماً ایمونولوژیک نیستند.**
  - HCV RNA **متعاقب مثبت شدن** HCV Ab
  - **اغلب نتایج مثبت ضعیف نیاز به آزمایش تأییدی دارند**(HIV, HCV, HBsAg)
  - S/Co>3.8 **برای روش‌های الایزا و**S/Co>8.0 **برای روش‌های کمیلومینسانس** HCV **براساس گایدلاین** CDC**. ممکن است کشورها الزامات خاص خود را داشته باشند(الزامات ایران متفاوت است)**

ارزیابی آزمایشگاهی HIV(CDC guideline)



تعیین نقطه Cut-off آزمون‌های کیفی



تعیین نقطه Cut-off آزمون‌های کیفی

- **برای تعیین Cut-off یک آزمایش کیفی لازم است با مفاهیم زیر آشنا باشید:**
- **نقطه C_5: نقطه‌ای از غلظت آنالیت هدف، که تکرار آزمایش در آن نقطه به 95% پاسخ منفی و 5% پاسخ مثبت منجر می‌شود.**
- **نقطه C_{95}: نقطه‌ای از غلظت آنالیت هدف، که تکرار آزمایش در آن نقطه به 95% پاسخ مثبت و 5% پاسخ منفی منجر می‌شود.**
- **بازه $C_5 - C_{95}$ ($C_5 - C_{95}\ interval$) : محدوده ای از غلظت آنالیت حول نقطه مرزی یا Cut-off که نتایج مشاهده‌شده خارج از این دامنه یا مستمراً منفی (غلظت‌های کمتر از C_5) یا مستمراً مثبت (غلظت های بالاتر از C_{95})می باشند.**
- **یادآوری: نتایج مشاهده‌شده در این ناحیه به دلیل عدم دقت از ثبات کافی برخوردار نیستند، و تفاسیر متفاوتی(مثبت یا منفی) ممکن است داشته باشند، لذا به عنوان مشکوک Doubtful، منطقه خاکستری Gray zone یا منطقه دوپهلو Equivocal تلقی می شوند.**
- **نقطه C_{50}: نقطه نزدیک به cut-off که در صورت تکرار نمونه‌ای واحد در این غلظت ، به 50% نتایج مثبت و 50% نتایج منفی منجر می شود.**

تعیین نقطه Cut-off آزمون‌های کیفی

- نقطه C_5:

$$C_5 = \bar{X}_{NC} + t_{0.995,df}.SD_{NC}$$

- نقطه C_{95} :

$$C_{95} = \bar{X}_{PC} - t_{0.995,df}.SD_{PC}$$
$$df = n - 1$$

- $\bar{X}_{NC}$ میانگین خوانده‌های جذب نوری نمونه‌های کنترل منفی
- $\bar{X}_{PC}$ میانگین خوانده‌های جذب نوری نمونه‌های کنترل مثبت
- t ضریب انتشار t است، باتوجه به احتمال موردنظر مطلوب و درجه آزادی(df) قابل دریافت از کتب آماری یا صفحه گسترده‌ها مثل Excel(به مثال موجود در اسلاید بعد توجه کنید)
- SD_{NC} و SD_{PC} به ترتیب انحراف استاندارد خوانده‌های نمونه‌های کنترل منفی و کنترل مثبت می باشد.

مثالی از تعیین Cut-off

دانشجویی برای پایان‌نامهٔ خویش یک روش الایزا غیرمستقیم برای سنجش آنتی-بادی اختصاصی علیه بروسلا آبورتوس از کلاس IgG، با کمک پلیتی که با سونیکه تخلیص شده کشت باکتری پوشانیده شده بود، طراحی کرد. میانگین جذب ۶۴ سرم مثبت که مثبت بودن آن به کمک یک روش میدانی که عرفاً واجد حساسیت و اختصاصیت تشخیصی مطلوبی شناخته گردیده بود معادل 0.2797 و انحراف معیار خوانده‌ها معادل 0.0764 بدست آمد. میانگین جذب ۳۲ سرم منفی 0.0534 و انحراف معیار آن 0.0198 بدست آمد. مطلوب است، محاسبه جذب نوری منطقه خاکستری یا : $C_5 - C_{95}$

$$C_5 = \bar{X}_{NC} + t_{0.995,df}.SD_{NC} = 0.0534 + 2.744 \times 0.0198 \cong 0.11$$

برای بدست آوردن ضریب انتشار t کافی است در یک خانه(سلول) صفحه گسترده Excel عبارت "=T.inv(0.995,31)" **را تایپ کنید. (df=32-1=31)**

$$C_{95} = \bar{X}_{PC} - t_{0.995,df}.SD_{PC} = 0.2797 - 2.656 \times 0.0764 \cong 0.077$$

با توجه به مقادیر بدست‌آمده نمونه های با جذب نوری مابین *0.077* **تا** *0.11* **مشکوک یا** *Borderline* **محسوب شده و نمونه‌های با جذب بیش از** *0.11* **مثبت و نمونه‌های باجذب کمتر از** *0.077* **منفی تفسیر می گردند. نقطه** *cut-off* **در منطقه-ای بین** *0.077* **و** *0.11* **درنظر گرفته می شود.**

معیارهای انتخاب Cut-off

- بیشترین حساسیت در خصوص بیماری‌های جدی اما قابل‌درمان
  - پاسخ‌های مثبت کاذب آسیب اقتصادی یاضایعات روانی، از خود برجای نمی‌گذارد و درمان نامناسب نتایج سوء حداقلی دارد، مثال آزمایش راپید GAS
- بیشترین اختصاصیت برای مواردی که بیماری جدی و لاعلاج است، عدم وجود بیماری ازنظر روانی و سلامت ارزشمند است، و پاسخ مثبت کاذب، آسیب روانی و اقتصادی بالایی از خود برجای می‌گذارد مثل آزمایش‌های تأییدی برای آنتی‌بادی علیه HIV
- بیشترین ارزش‌اخباری ، در خصوص بیماری‌های که درمان نابجا، عواقب جدی برجای می‌گذارد، موردنیاز است مثلاً سقط درمانی متعاقب پاسخ مثبت Rubella-IgM
- بالاترین کارآمدی(efficiency) برای مواقعی که بیماری جدی و قابل درمان بوده و پاسخ‌های مثبت و منفی کاذب به یک نسبت خطرناکند، مثلاً آزمایش‌های تجسس آنتی‌ژن قارچی در مایع مغزی–نخاعی در مننژیت‌های قارچی

معیارهای انتخاب Cut-off

- سازندگان روش باید :
- بین حساسیت و ویژگی تعادل مطلوب را برقرار کنند.
- تعیین نقطه Cut-off باید از مطالعه بر روی سه جمعیت بدست آید:
  - گروه با بیماری مدنظر
  - گروه فاقد بیماری
  - گروه فاقد بیماری موردنظر، اما مبتلا به سایر بیماری‌ها(وجود افرادی مبتلا به آنفلونزا در گروه فاقد بیماری، اگر میخواهیم Cut-off آزمایشی را برای تشخیص Covid-19 تعیین کنیم)

معیارهای توصیه برای ارزیابی اضافی

- **مطلوب است، سازنده روش یا آزمایشگاه ارزش پیش‌بینی مقادیر مثبت یا منفی نزدیک به** Cut-off **را مشخص نمایند.**
- **معمولاً** ±10 or 20% cut-off **نقاط خاکستری یا** Borderline **هستند.**
- **تعیین معیارهایی برای آزمایش پیگیری**
  - **آزمایش با روشی دیگر با اختصاصیت یا حساسیت بیشتر**
  - **آزمایش بر روی نمونه ثانویه**
  - **تکرار آزمایش چند هفته بعد**
  - **مثبت مرزی** Borrelia burgdorferi**در مقابل مثبت مرزی** HIV I & II Ab &Ag

آزمایش‌های موازی (Parallel Testing)

- نتیجه یک آزمایش هنگامی مثبت است که نتیجه حداقل یکی از دو آزمایش مثبت باشد.
- باعث بهبود ارزش پیش بینی منفی می‌گردد.
- مثال :
  - حساسیت تشخیصی آزمایش SARS-CoV-2 rt-PCR برروی ترشحات نازوفارنکس حدود ۷۰٪ و حساسیت تشخیصی Anti-SARS-CoV-2 IgM از روز پنجم بعد از شروع علائم حدود ۵۰٪ است.
  - آزمایش توأم rtPCR و Anti-SARS-CoV-2 IgM از روز پنجم بعد از شروع علائم می تواند باعث ارتقاء حساسیت تشخیصی از حدود ۷۰٪ به بیش از ۹۰٪ گردد.

آزمایش‌های متوالی (Serial Testing)

- طبق این راهبرد نتایج منفی به قدر کفایت واجد ارزش برای رد بیماری (Ruling out) هستند.
- اما،کلیه نتایج مثبت آزمایش A باید توسط آزمایش دومی B تأیید شوند.
- در این راهبرد دو آزمایش باید یا از اصول متفاوتی برخوردار باشند، یا آنتی‌ژن/آنتی‌بادی متفاوتی را شناسایی کنند.
- مثلاً فرد هنگامی مبتلا به هپاتیت C درنظر گرفته می‌شود، که ابتدا آزمون ایمونولوژیک HCV Ab و سپس HCV RNA RT-PCR وی مثبت باشد.
- راهبرد آزمایش متوالی(Serial testing) برای بهبود ویژگی تشخیصی و ارزش اخباری مثبت (PPV).
- در این راهبرد ارزش اخباری مثبت (PPV) آزمایش اول برای آزمایش دوم معادل شیوع محسوب میشود.

مثال از راهبرد آزمایش متوالی

- حساسیت و اختصاصیت تشخیصی نوعی روش الایزا غیر مستقیم برای HCV AB به ترتیب برابر با 96.6% و 97.6% می‌باشد. در صورتی که میزان شیوع بیماری در کل جمعیت شهر تهران برابر با 0.3% باشد، ارزش اخباری مثبت و منفی را در غربالگری یک جمعیت یکصدهزار نفری فرضی از شهر تهران حساب نمایید.

$$Infected\ people = 100000 \times 0.3\% = 300$$

$$TP = 300 \times 96.6\% \cong 290$$

$$FN = 300 - 290 = 10$$

$$Non - infected = 100000 - 300 = 99700$$

$$TN = 99700 \times 97.6\% \cong 97307$$

$$FP = 99700 - 97307 = 2393$$

مثال از راهبرد آزمایش متوالی– ادامه

$$NPV = 100 \times \frac{97307}{97307 + 10} \cong 100\%$$

$$PPV = 100 \times \frac{290}{290 + 2393} \cong 11\%$$

- **نتیجه‌گیری: آزمایش ایمونواسی** HCV AB **به روش الایزای غیرمستقیم فوق برای رد بیماری از ارزش کافی برخوردار است. ولی اثبات بیماری نیاز به تأیید توسط آزمایش دیگری(** HCV RNA RT-PCR**) دارد.**

مثال از راهبرد آزمایش متوالی– ادامه

- **اگر کلیه موارد** HCV Ab **مثبت به روش الایزای غیرمستقیم در مثال قبلی به کمک آزمایش** HCV RNA RT-PCR **با حساسیت و اختصاصیت به ترتیب** 95% **و** 99.99% **، تأیید شوند، میزان ارزش اخباری مثبت را حساب کنید:**

همانطور که گفته شد ارزش پیش بینی مثبت در آزمایش غربالگری معادل شیوع بیماری برای آزمایش تأییدی محسوب می‌شود:

$$Infectef\ People = 100000 \times 11\% = 11000$$
$$TP = 11000 \times 95\% = 10450$$
$$\mathrm{FN} = 11000 - 10450 = 550$$
$$Not - infected = 100000 - 11000 = 89000$$
$$TN = 89000 \times 99.99 = 88991$$
$$FP = 89000 - 88991 = 9$$
$$PPV = 100 \times \frac{10450}{10450 + 9} \cong 100\%$$

مثال از راهبرد آزمایش متوالی– ادامه

- **نتیجه‌گیری: با راهبرد آزمایش متوالی تأیید نتایج مثبت** HCV Ab **با** HCV RNA-RT-PCR **به هر دو ارزش اخباری مثبت و منفی** 100% **برای بیماریِ بسیار جدی هپاتیت** C **دست می‌یابیم.**
- **چنین راهبردی در خصوص سایر بیماری‌های عفونی بسیاری جدی نظیر** HIV **نیز صادق است.**

با تشکر از همراهی شما