مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی‌ام/شماره ۲۲۰/هفته دوم اسفند ماه ۱۳۹۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۹/۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۱/۱۰

مقایسه‌ی ارزش تشخیصی کیت حاوی پروتئین نوترکیب B و کیت استاندارد Euroimmun در تشخیص اکینوکوکوس گرانولوزوس

مریم مرادی[۱]، دکتر بهزاد حق‌پناه[۲]، دکتر بهرام کاظمی[۳]، انسیه داوودآبادی[۱]، ساناز غلامی[۱]، سحر کفش‌دوز جباری[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: اکینوکوکوس گرانولوزوس عامل بیماری کیستی اکینوکوکوزیس است و به عنوان یکی از مشکلات مهم بهداشت عمومی در مناطق مختلف جهان مطرح می‌باشد. در تشخیص اولیه‌ی این بیماری مشکلاتی وجود دارد که واکنش متقاطع در آزمایشات سرولوژیک با سرم بیمارانی که دارای آلودگی‌های انگلی دیگر هستند، از آن جمله است. استفاده از یک منبع آنتی‌ژنی مناسب بسیار مهم است و در توسعه‌ی روش‌های تشخیص سرولوژیک (مانند ELISA) یک نکته‌ی کلیدی می‌باشد.

روش‌ها: ما آنتی‌ژن B نوترکیب اکینوکوکوس گرانولوزوس را بیان و تخلیص نموده، به عنوان آنتی‌ژن در ELISA مورد استفاده قرار دادیم. نمونه‌های سرم از ۷۳ بیمار با کیست هیداتید، که تشخیص در آن‌ها با عمل جراحی مورد تأیید قرار گرفته بود، و همچنین ۷۳ نمونه‌ی سرم از افراد سالم با استفاده از آنتی‌ژن B و کیت تجاری Euroimmun با روش ELISA مورد بررسی و از نظر ویژگی و حساسیت مورد مقایسه قرار گرفت.

یافته‌ها: حساسیت ۱۰۰ و ویژگی ۹۷/۳۳ درصد با کیت دست‌ساز ما به دست آمد.

نتیجه‌گیری: بر طبق نتایج به دست آمده، پروتئین نوترکیب B برای تشخیص حضور آنتی‌بادی IgG در سرم بیماران مبتلا به هیداتیدوز با روش ELISA دارای ارزش تشخیصی قابل قبولی می‌باشد.

واژگان کلیدی: کیست هیداتید، اکینوکوکوس گرانولوزوس، پروتئین نوترکیب، ELISA، Euroimmun

ارجاع: مرادی مریم، حق‌پناه بهزاد، کاظمی بهرام، داوودآبادی انسیه، غلامی ساناز، جباری سحر. **مقایسه‌ی ارزش تشخیصی کیت حاوی پروتئین نوترکیب B و کیت استاندارد Euroimmun در تشخیص اکینوکوکوس گرانولوزوس.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۱؛ ۳۰ (۲۲۰): ۲۴۴۰-۲۴۳۲

مقدمه

کیست هیداتید عامل هیداتیدوز یک بیماری زئونوز است که توسط مرحله لاروی گونه‌های مختلف سستود اکینوکوک اغلب به صورت کیسه‌های پر از مایع در بافت‌های مختلف بدن ایجاد می‌شود. تشخیص این بیماری در انسان به روش‌های گوناگونی انجام می‌گیرد که یکی از رایج‌ترین آن‌ها، روش‌های سرولوژیک است (۱).

* این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد به شماره‌ی ۳۹۰۴۷۷ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است.

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد انگل شناسی، گروه انگل و قارچ شناسی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- استادیار، گروه انگل و قارچ شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- استاد، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی و گروه بیوتکنولوژی دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران، تهران، ایران
۴- دانشجوی کارشناسی ارشد قارچ شناسی، گروه انگل و قارچ شناسی، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: مریم مرادی
Email: dicentra2003@yahoo.com

Indirect hemagglutination (IHA)، ثبوت مکمل، ایمنوفلورسانس و ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) از روش‌های معمول سرولوژیک برای تشخیص هیداتیدوزیس می‌باشند. مشکلات موجود در تشخیص سرولوژیک بیماری هیداتیدوزیس را می‌توان به وجود نتایج مثبت و منفی کاذب، بروز واکنش متقاطع با سایر بیماری‌های عفونی، عدم استاندارد بودن آنتی‌ژن و یا روش‌های تکنیکی مرتبط دانست (۱). امروزه ELISA به دلیل سهولت انجام و دقت قابل قبول به عنوان یکی از با ارزش‌ترین روش‌های آزمایشگاهی- تحقیقاتی در جهان مطرح می‌باشد. این روش از حساسیت و اختصاصیت بسیار بالایی در تشخیص هیداتیدوزیس برخوردار است (۱).

آزمون ELISA اولین بار در سال ۱۹۷۵، با استفاده از آنتی‌ژن ۵ خالص‌شده، برای تشخیص هیداتیدوزیس به‌کار رفت. این روش حساسیت (Sensitivity) و ویژگی (Specificity) خوبی را از خود نشان داد و نتایج حاصل از آن با نتایج روش IHA قابل مقایسه بود؛ البته واکنش‌های متقاطع آن با سرم مبتلایان به سایر گونه‌های اکینوکوک، تنیاسولیوم، شیستوزوم‌ها، فیلرها و فاسیولا از ویژگی آزمون می‌کاهید (۲).

در مطالعات مختلف حساسیت ELISA با استفاده از آنتی‌ژن خام مایع کیست هیداتیک ۹۰-۸۰ درصد و ویژگی آن بین ۷۵ تا ۹۰ درصد متغیر بوده است (۳). مشکل روش ELISA، همان‌گونه که ذکر شد، داشتن واکنش متقاطع با یک سری از ارگانیسم‌های دیگر است؛ برای کاهش این خطا تلاش شده است تا با تشخیص آنتی‌ژنی که تنها اختصاص به انگل اکینوکوکوس گرانولوزوس داشته باشد و استفاده از آن در تهیه‌ی کیت تشخیصی ELISA به حداکثر حساسیت و ویژگی دست یافته شود (۴). از انواع آنتی‌ژن‌های استفاده شده در کیت ELISA برای تشخیص کیست هیداتیک اکینوکوکوس گرانولوزوس می‌توان به آنتی‌ژن خام (Crude Antigen یا CA) (۵)، (BRAS) B-riched antigen solution (۶)، (HPA) Hydatid protoscoleces antigen، آنتی‌ژن B (۴) و آنتی‌ژن نوترکیب B (۲) اشاره کرد.

با روش Western blot مشخص شده است که آنتی‌بادی اختصاصی علیه اکینوکوکوس گرانولوزوس، مربوط به کوچک‌ترین زیرواحد پروتئین B اکینوکوکوس گرانولوزوس (EgAgB) می‌باشد (۷). با توجه به اهمیت زیرواحد آنتی‌ژن B در تشخیص بیماری اکینوکوکوزیس اکثر تحقیقات به سمت به کار گیری این زیرواحد در روش‌های تشخیصی پیش رفته است (۸). مشکل اصلی در استفاده از روش‌های سرولوژیک برای تشخیص بیماری هیداتیدوزیس، مشکلات موجود در راه استانداردسازی آنتی‌ژن و روش‌های انجام آن است.

کلانتری و همکاران آنتی‌ژن نوترکیب B را تهیه و در آزمون ELISA مورد استفاده قرار دادند (۹). در پژوهشی دیگر نیز برای تهیه‌ی کیت، آنتی‌ژن B بیان و خالص گردید و به عنوان آنتی‌ژن اصلی در چاهک‌های ELISA پوشش داده شد (۱۰).

در تحقیق حاضر تلاش شد تا میزان ویژگی و حساسیت آنتی‌ژن B با کیت‌های موجود در بازار که با آنتی‌ژن‌های قبلی تهیه شده‌اند، مقایسه شود تا در صورتی که از کیفیت و دقت بالایی برخوردار باشد، به عنوان روش تشخیص مناسب‌تر توصیه گردد.

روش‌ها

از آن جایی که هدف ما در این تحقیق، بررسی ارزش تشخیصی کیت حاوی پروتئین نوترکیب B اکینوکوکوس گرانولوزوس با روش ELISA در مقایسه با کیت استاندارد Euroimmun بود، ژن آنتی‌ژن B اکینوکوکوس گرانولوزوس به نام ژن HydI که پیشتر در جایگاه شناسایی آنزیم‌های Sac I و Hind III در وکتور بیانی PET Duet کلون شده بود، در وکتور بیانی Ecoli.BL21 ترانسفورم شد (۱۱) و در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت.

خالص‌سازی پروتئین

از پلیت دارای کلونی باکتریایی حاوی پلاسمید نوترکیب یک کلونی برداشته و در محیط Luria-Bertani (LB) حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آمپی‌سیلین کشت داده شد. لوله کشت به مدت یک شب در انکوباتور دارای Shaker در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد و روز بعد استخراج پلاسمید انجام گرفت. تأیید پلاسمید با روش Polymerase chain reaction (PCR) انجام گرفت؛ برای بیان این ژن پلاسمید در سلول‌های BL21 ترانسفورم شد.

بیان ژن

از کلنی‌های باکتریایی ترانسفورم شده یک کلنی برداشته و در لوله‌های حاوی LB مایع و آمپی‌سیلین کشت داده شد و به مدت یک شب در انکوباتور دارای Shaker در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت. روز بعد، در لوله‌ای دیگر مقدار ۴ میلی‌لیتر از محیط LB حاوی آمپی‌سیلین ریخته شد و ۴۰۰ میکرولیتر از کشت شبانه به آن اضافه گردید و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از رسیدن کدورت محیط کشت (OD۶۰۰ یا Optical density at 600 nm) به حدود ۰/۶ (پس از حدود ۲ ساعت)، ابتدا مقدار ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت به عنوان نمونه قبل از القا نگهداری شد؛ سپس، IPTG (Isopropylthio-β-galactoside) به غلظت ۱ میلی‌مولار به محیط اضافه شد و بار دیگر در انکوباتور دارای Shaker قرار گرفت. ۵ ساعت پس از القا، اقدام به نمونه‌گیری از محیط گردید. در هر مرحله، حدود ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت در کنار شعله در داخل لوله‌ی اپندرف ریخته شد. نمونه‌ی جمع‌آوری شده با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد و مایع رویی در لوله‌ای دیگر ریخته و به همراه لوله حاوی رسوب در فریزر نگهداری شد تا به منظور تأیید بیان ژن توسط روش SDS-PAGE مورد استفاده قرار گیرد.

برای خالص سازی پروتئین، کلنی حاوی پلاسمید نوترکیب در محیط LB کشت داده شد؛ سپس، روز بعد در ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت، بار دیگر کشت داده شد تا کدورت محیط (OD۶۰۰) حدود ۰/۶ (پس از حدود ۲ ساعت) برسد. آن گاه، ۱ میلی‌مول IPTG به محیط اضافه گردید و ۵ ساعت پس از القا، اقدام به نمونه‌گیری از محیط شد. نمونه‌ی حاصل با دور ۸۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۵ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید؛ سپس رسوب حاصل با ۵ میلی‌لیتر بافر متوازن کننده (۰/۴ میلی‌مول اوره، ۵۰ میلی‌مول Tris و ۰/۵ میلی‌مول NaCl) سوسپانسون گردید و به مدت ۳۰ دقیقه بر روی یخ قرار داده شد و ۳ مرتبه و هر مرتبه به مدت ۲۰ ثانیه مورد سونیکاسیون قرار گرفت.

نمونه‌ی حاصل از سونیکاسیون با دور ۱۰۰۰۰ به

مدت ۵ دقیقه در دمای ۵ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتیفوژ گردید. سپس در بافر متوازن کننده سوسپانسون شد و بعد از این مرحله، به مدت یک شبانه‌روز در دمای ۵ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردید؛ روز بعد، بار دیگر محلول با دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه در دمای ۵ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید. محلول شفاف روئی جمع آوری گشت و به منظور تخلیص پروتئین مورد استفاده قرار گرفت (۱۲).

تخلیص پروتئین نوترکیب با روش کروماتوگرافی جذبی انجام گرفت که اساس این روش بر پایه‌ی رزین Ni-NTA و اتصال آن به پروتئین‌های دارای توالی His-tag می‌باشد. لیزات سلول از ستون عبور داده شد و پروتئین با بافر شستشو (۴ میلی‌مول اوره، ۵۰ میلی‌مول Tris، ۰/۵ مول NaCl و ۱ میلی‌مول ایمیدازول) تخلیص گردید.

نمونه‌گیری

تعداد نمونه‌ی مورد نیاز بر اساس فرمول حجم نمونه شامل ۷۳ نمونه‌ی سرم مربوط به افراد مبتلا به هیداتیدوز، ۷۳ نمونه‌ی سرم افراد سالم، به عنوان شاهد منفی، ۵ نمونه‌ی سرم بیمار مبتلا به سل، ۳ نمونه‌ی سرم بیمار مبتلا به توکسوپلاسموز، ۵ نمونه‌ی سرم HBs Ag مثبت و ۵ نمونه‌ی سرم HCV Ag مثبت بود؛ این عمل به منظور اطمینان یافتن از عدم هر گونه واکنش متقاطع با سایر آنتی‌بادی‌های سرمی در جریان بیماری‌های عفونی مزمن صورت پذیرفت. کلیه‌ی نمونه‌ها توسط آزمایشات سرولوژی، روش‌های آزمایشگاهی و پاتولوژی تأیید شده بود و در هنگام اجرای این تحقیق، برای اطمینان از درستی این یافته‌ها بار دیگر توسط کیت تجاری مورد تأیید قرار گرفت.

پوشش چاهک‌های پلیت ELISA با آنتی‌ژن

جهت انجام آزمون ELISA، کونژوگه‌ی با رقت ۱/۱۰۰۰۰ و ۱ ساعت انکوباسیون، آنتی‌ژن با غلظت ۲ µg/ml و آنتی‌بادی با رقت ۱/۲۰۰ به عنوان بهترین و مناسب‌ترین غلظت‌ها انتخاب شد (۹).

آنتی‌ژن (آنتی‌ژن نوترکیب B تخلیص‌شده اکینوکوکوس گرانولوزوس) به میزان ۲ µg/ml در بافر کربنات/بی‌کربنات (pH = ۹/۶) رقیق شد و ۱۰۰ میکرولیتر از آن به چاهک‌های میکروپلیت اضافه گردید؛ سپس، به مدت ۱۸-۱۶ ساعت در ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوباسیون انجام گرفت. آن گاه، محتویات پلیت با چند ضربه خالی گردید و پلیت با بافر شستشو و دستگاه ELISA Washing سه مرتبه شستشو داده شد. در مرحله‌ی بعد، ۳۰۰ میکرولیتر محلول Blocking (BSA 0.1%) در تمام چاهک‌ها ریخته شد و به مدت ۱ ساعت و ۳۰ دقیقه در دمای محیط انکوباسیون شد. سپس، سه مرتبه شستشو انجام گرفت.

۷۳ نمونه‌ی سرم مثبت و ۷۳ نمونه‌ی شاهد منفی از یخچال خارج گردید و در حرارت اطاق قرار داده شد. رقت ۱/۴۰۰ سرم‌ها با استفاده از بافر Reagent Diluent تهیه و ۲۰۰ میکرولیتر از رقت‌های تهیه شده به تمام چاهک‌ها افزوده شد. پلیت با استفاده از کاغذ مات پوشانده و به مدت ۱ ساعت در دمای محیط بر روی Shaker انکوبه گردید. سپس، سه بار شستشو انجام گرفت. آن گاه، کونژوگه نشان‌دار شده به مقدار ۱۰ میلی‌لیتر با رقت ۱/۱۰۰۰۰ تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر به تمام چاهک‌ها اضافه گردید.

در مرحله‌ی بعد، پلیت با کاغذ کاملاً مات پوشانده شد و به مدت ۱ ساعت در دمای محیط و فضای

تاریک بر روی Shaker انکوبه گردید. آن گاه، سه بار شستشو انجام گرفت و بار دیگر با ضربه زدن بر روی سطح کاغذی یا پارچه‌ای تمیز، اضافی مایعات به طور کامل خارج گردید. سپس، ۵۰ میکرولیتر اسید سیتریک که در آن TMB (Tetramethyl benzidine) حل شده بود، به همراه ۵۰ میکرولیتر سیترات سدیم به هر چاهک اضافه شد و پلیت در دمای اتاق و محیط تاریک قرارگرفت. پس از ۱۵-۱۰ دقیقه، ۵۰ میکرولیتر از محلول اسید سولفوریک یک مولار به تمامی چاهک‌ها اضافه و پلیت در دستگاه پلیت‌خوان قرار داده شد و در طول موج ۴۵۰ نانومتر، OD چاهک‌ها به دست آمد. سپس، تمام مراحل فوق را برای نمونه‌های سایر بیماری‌ها انجام شد.

تعیین حساسیت و ویژگی

آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL) انجام گرفت.

برای اندازه‌گیری حساسیت آزمون ELISA، تعداد مثبت واقعی بر مجموع تعداد منفی کاذب و مثبت واقعی تقسیم و به صورت درصد بیان شد. برای تعیین ویژگی آزمون نیز تعداد منفی واقعی بر مجموع تعداد مثبت کاذب و منفی واقعی تقسیم و به صورت درصد بیان شد.

یافته‌ها

در این مطالعه، EgAgB نوترکیب (۸ کیلو دالتونی) در پلاسمید Pet Duet بیان و تخلیص شد. پروتئین خالص شده در چاهک‌های ELISA پوشش داده شد و با سرم‌های واجد و یا فاقد IgG علیه اکینوکوکوزیس آزمایش شد.

نقطه‌ی برش (Cut-off point) محاسبه شده برابر با ۰/۱۳۱ بود و حساسیت آزمون ۱۰۰ درصد به دست آمد.

تنها ۲ نمونه به عنوان مثبت کاذب توسط کیت تولیدی شناسایی شد و با توجه به فرمول محاسبه ویژگی و تعداد نمونه‌های مثبت کاذب و منفی واقعی، ویژگی کیت جدید و کیت تجاری محاسبه گردید که بر این اساس:

۱- اگر تنها آنتی‌سرم‌های جمع‌آوری شده از افراد سالم واقعی را به عنوان منفی واقعی در نظر بگیریم، ویژگی ۹۷/۳۳ درصد خواهیم داشت.

۲- اگر تنها آنتی‌سرم‌های جمع‌آوری شده از بیماران با علایم مشابه هیداتیدوزیس اما مبتلا به بیماری‌های دیگر را به عنوان منفی واقعی در نظر بگیریم، ویژگی ۸۱/۱ درصدی مشاهده خواهیم نمود.

۳- اگر هر دو گروه افراد سالم و بیماران مبتلا به بیماری‌های دیگر را با هم، به عنوان منفی واقعی در نظر بگیریم، ویژگی ۹۳/۸ درصدی خواهیم داشت.

بحث

در این مطالعه از EgAgB نوترکیب برای آشکار سازی آنتی‌بادی‌های اختصاصی در بیماران مبتلا به هیداتیدوزیس استفاده گردید.

در سایر مطالعات، آنتی‌ژن‌های نوترکیب حساسیتی بین ۷۹ تا ۹۱/۷ درصد برای تشخیص داشته است (۱۴-۱۳). Mamuti و همکاران نشان دادند که EgAg8/1 نوترکیب واکنش مثبتی با ۸۸ درصد (۴۵ از ۵۰) از نمونه‌های سرم‌های بیماران هیداتیدوزیس نشان داده است (۱۵). در مطالعه‌ی ما، فعالیت آنتی‌ژنیک آنتی‌ژن نوترکیب در ELISA، هم‌راستا با مطالعات قبلی، با ۹۱ درصد (۷۰ از ۷۳) از

نمونه‌های سرم‌های بیماران هیداتیدوزیس مثبت گزارش شد.

در سایر مطالعات، EgAgB نوترکیب در روش ELISA حساسیتی در حدود ۶۵ درصد در بیماران هیداتیدوزیس نشان داده است (۱۶) که این مقدار از حساسیت روش ما پایین‌تر است. در تحقیق ما، EgAgB طبیعی موجود در کیت تجاری ELISA، حساسیت بهتری (۱۰۰ درصد) نسبت به پروتئین ترکیبی (۹۲ درصد) نشان داد. حساسیت تشخیصی پایین‌تر EgAgB8/1 نوترکیب ممکن است به دلیل حضور زیرواحدهای دیگر باشد (۱۷، ۱۴). با وجود این اختلافات، یک زیرواحد ۸ کیلودالتونی از آنتی‌ژن B به عنوان آنتی‌ژن اختصاصی اکینوکوکوس گرانولوزوس با مقداری واکنش متقاطع توسط برخی مؤلفان گزارش شده است (۱۸). IgG تام در ELISA تمام ۷۳ نمونه سرمی که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت، با پروتئین نوترکیب واکنش نشان داد.

پازوکی و همکاران دو توالی متوالی متفاوت از آنتی‌ژن B اکینوکوکوس گرانولوزوس را به روش RT-PCR تکثیر کردند. قسمت‌های تکثیر شده به نام HydI و HydII را در وکتور PTZ-57R کلون کرده، در نهایت آن‌ها را وارد یک وکتور بیانی نموده، در آزمایشگاه به صورت فیوژن پروتئین بیان کردند. آن‌ها استفاده از این آنتی‌ژن‌های نوترکیب در آزمون‌های سرولوژیک را توصیه کردند (۱۹).

همچنین تقی پور و همکاران نیز قطعه‌ی HydI را در وکتور بیانی PQE-30 ساب‌کلون و در باکتری اشریشیاکلی بیان کردند و با ستون Ni-NTA Affinity chromatography تخلیص نمودند و سپس با دیفیوژن دوگانه‌ی (DD یا Dot-blot و Western blot (Double diffusion وجود این پروتئین را تأیید کردند (۱۲).

Rott و همکاران دو زیرواحد آنتی‌ژن B (AgB8/1 و AgB8/2) اکینوکوکوس گرانولوزوس را شناسایی و ساختمان آن‌ها را با یکدیگر مقایسه کردند. آنان حساسیت و ویژگی آنتی‌ژن B طبیعی را به ترتیب ۷۷/۴۱ و ۸۱/۹ درصد تخمین زدند؛ این در حالی بود که برای AgB8/1 حساسیت ۵۴/۸۴ و ویژگی ۸۰/۱۷ درصدی و برای rAgB8/2 حساسیت ۸۳/۸۷ و ویژگی ۹۸/۲۸ درصد تخمین زده شد (۱۷). با مقایسه‌ی این نتایج با یافته‌های به دست آمده در این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت که قطعه‌ی HydI کلون شده در وکتور بیانی Pet Duet (به عنوان یکی از آنتی‌ژن‌های نوترکیب اکینوکوکوس گرانولوزوس) با حساسیت و ویژگی ۱۰۰ و ۹۷/۳۳ درصد گزینه‌ی مناسبی جهت تشخیص هیداتیدوزیس انسانی با روش ELISA می‌باشد.

Virginio و همکاران از ۶ آنتی‌ژن نوترکیب Eg CaBp2، Eg AFFpr، Ag B8/1، Ag B8/2، Eg AFFpt و Eg cMDH که در اشریشیاکلی بیان شده بود، جهت تشخیص IgG اختصاصی در روش ELISA استفاده کردند. در مطالعه‌ی آنان، بالاترین حساسیت (۹۳/۱ درصد) و ویژگی (۹۹/۵ درصد) مربوط به AgB 8/2 بود. سایر آنتی‌ژن‌های نوترکیب حساسیت بین ۵۸/۶ تا ۸۹/۷ درصد را نشان دادند. از بین کلاس‌های IgG نیز IgG4 به همه‌ی آنتی‌ژن‌های مورد بررسی جواب داد (۱۴).

با استناد به مطالعه‌ی حاضر، اگر چه آنتی‌ژن B نوترکیب به دست آمده در این تحقیق از ویژگی کمتری نسبت به Ag B8/2 برخوردار است، اما در

مقایسه با سایر آنتی‌ژن‌های نوترکیب بررسی شده در آزمون ELISA، با حساسیت ۱۰۰ و ویژگی ۹۷/۳۳ درصد جهت تشخیص هیداتیدوزیس اهمیت ویژه‌ای دارد.

بعضی از مؤلفین اظهار کرده‌اند که می‌توان تشخیص سرولوژیک هیداتیدوزیس را با استفاده از زیرواحدهای متفاوت IgG بهبود بخشید؛ آنان معتقدند که مشکل حساسیت پایین در ارتباط با واکنش متقاطع با سرم‌های بیماران مبتلا به بیماری‌های دیگر با استفاده از زیرواحدهای IgG کاهش خواهد یافت (۲۰، ۴). به دلیل پاسخ اختصاصی به آنتی‌ژن اکینوکوکوس گرانولوزوس، IgG4 می‌تواند زیرواحد انتخابی برای تشخیص سرولوژیک آزمایشات مقدار مکمل در ارتباط با سنجش IgG تام باشد (۲۱). بنا بر نتایجی که ما به دست آوردیم، EgAgB نوترکیب (HydI) استفاده شده در کیت ELISA برای تشخیص آنتی‌بادی‌های موجود در سرم‌های بیماران مبتلا به هیداتیدوزیس (IgG تام) خوب عمل کردند.

نتیجه‌گیری

ارزش تشخیصی پروتئین نوترکیب B اکینوکوکوس گرانولوزوس بالاترین حساسیت (۹۳/۱ درصد) و ویژگی (۹۹/۵ درصد) مربوط به AgB/2 بود و می‌توان ادعا کرد که AgB نوترکیب و تخلیص شده (HydI, Pet Duet) در این تحقیق با حساسیت ۱۰۰ و ویژگی ۹۷/۳۳ درصد، نسبت به سایر آنتی‌ژن‌های نوترکیب Ag B8/2، Ag B8/1، Eg AFFpr، Eg AFFpt، Eg cMDH، Eg CaBp2، AgB8/2 و AgB8/1 که حساسیت بین ۵۸/۶ تا ۸۷/۶ درصد را نشان داده‌اند، ارزش تشخیصی قابل ملاحظه‌ای دارد.

همچنین، در مقایسه‌ی ارزش تشخیصی آنتی‌ژن‌های نوترکیب و آنتی‌ژن‌های طبیعی مایع کیست، چنانچه در مطالعات گذشته اذعان شده است، آنتی‌ژن‌های نوترکیب از حساسیت و ویژگی بالاتری نسبت به آنتی‌ژن‌های طبیعی برخوردارند؛ بنابراین، با استناد به نتایج به دست آمده در این تحقیق می‌توان ادعا کرد که این مطالعه با مطالعات پیشین هم‌راستا می‌باشد. البته، با اجرای پژوهش بر روی تعداد نمونه‌های بیشتر و انجام مطالعات وسیع‌تر می‌توان نتایج ارزشمندتری به دست آورد و جهت استفاده از سیستم ELISA طراحی شده در این تحقیق برای تشخیص اکینوکوکوزیس قاطع‌تر و مستدل‌تر عمل کرد.

تشکر و قدردانی

مؤلفین از همکاری صمیمانه‌ی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، که در جهت انجام این تحقیق کمال همکاری را مبذول داشتند، تشکر و قدردانی می‌نماید.

References

1. Gadea I, Ayala G, Diago MT, Cunat A, Garcia de LJ. Immunological diagnosis of human hydatid cyst relapse: utility of the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot and discriminant analysis. Clin Diagn Lab Immunol 2000; 7(4): 549-52.
2. Carmena D, Benito A, Eraso E. Antigens for the immunodiagnosis of Echinococcus granulosus infection: An update. Acta Trop 2006; 98(1): 74-86.
3. Kagan IG. A review of serological tests for the diagnosis of hydatid disease. Bull World Health

Organ 1968; 39(1): 25-37.
4. Ioppolo S, Notargiacomo S, Profumo E, Franchi C, Ortona E, Rigano R, et al. Immunological responses to antigen B from Echinococcus granulosus cyst fluid in hydatid patients. Parasite Immunol 1996; 18(11): 571-8.
5. Yarzabal LA, Bout DT, Naquira FR, Capron AR. Further observations on the specificity of antigen 5 of Echinococcus granulosus. J Parasitol 1977; 63(3): 495-9.
6. Ightowlers MW, Gottstein B. Echinococcosis/hydatidosis: antigens, immunological and molecular diagnosis. In: Thompson RCA, Lymbery AJ, editors. Echinococcus and Hydatid Disease.Wallingford, UK: CABI; 1995. p. 335-410.
7. Moro P, Schantz PM. Echinococcosis: a review. Int J Infect Dis 2009; 13(2): 125-33.
8. Rigano R, Buttari B, Profumo E, Ortona E, Delunardo F, Margutti P, et al. Echinococcus granulosus antigen B impairs human dendritic cell differentiation and polarizes immature dendritic cell maturation towards a Th2 cell response. Infect Immun 2007; 75(4): 1667-78.
9. Kalantari E, Bandehpour M, Pazoki R, Taghipoor-Lailabadi N, Khazan H, Mosaffa N, et al. Application of recombinant Echinococcus granulosus antigen B to ELISA kits for diagnosing hydatidosis. Parasitol Res 2010; 106(4): 847-51.
10. Bandehpour M, Seyed N, Shadnoosh M, Pakzad P, Kazemi B. Using recombinant Chlamydia Major Outer Membrane Protein(MOMP) in ELISA diagnostic kit. Iran J Biotechnol (IJB) 2006; 4(4): 239-44.
11. Abdi J, Kazemi B, Mohebali M, Bandehpour M, Rahimi MT, Rokni MB. Gene cloning, expression and serological evaluation of the 12-kDa antigen-B subunit from Echinococcus granulosus. Ann Trop Med Parasitol 2010; 104(5): 399-407.
12. Taghipour N, Bandepour M, Pazoki R, Haghighi A, Nazari Pour MR, Kazemi B. Subcloning and expression of recombinant Echinococcus granulosus AntigenB, in pqe-30 expression. Iranian J Parasitol 2009; 4(4): 1-9.
13. Ortona E, Rigano R, Margutti P, Notargiacomo S, Ioppolo S, Vaccari S, et al. Native and recombinant antigens in the immunodiagnosis of human cystic echinococcosis. Parasite Immunol 2000; 22(11): 553-9.
14. Virginio VG, Hernandez A, Rott MB, Monteiro KM, Zandonai AF, Nieto A, et al. A set of recombinant antigens from Echinococcus granulosus with potential for use in the immunodiagnosis of human cystic hydatid disease. Clin Exp Immunol 2003; 132(2): 309-15.
15. Mamuti W, Yamasaki H, Sako Y, Nakao M, Xiao N, Nakaya K, et al. Molecular cloning, expression, and serological evaluation of an 8-kilodalton subunit of antigen B from Echinococcus multilocularis. J Clin Microbiol 2004; 42(3): 1082-8.
16. McVie A, Ersfeld K, Rogan MT, Craig PS. Expression and immunological characterisation of Echinococcus granulosus recombinant antigen B for IgG4 subclass detection in human cystic echinococcosis. Acta Trop 1997; 67(1-2): 19-35.
17. Rott MB, Fernandez V, Farias S, Ceni J, Ferreira HB, Haag KL, et al. Comparative analysis of two different subunits of antigen B from Echinococcus granulosus: gene sequences, expression in Escherichia coli and serological evaluation. Acta Trop 2000; 75(3): 331-40.
18. Ferreira HB, Zaha A. Analysis of different antigen sources in the diagnosis of human hydatid disease by immunoblot Montevidéo. Biology of Parasitism Ediciones Trilce 1990; 186-201.
19. Pzazoki R, Kazemi B, Nazari MR, Masoud J, Akbari MR. Cloning and expression of two genes encoding subunits of Echinococcus granulosus antigen. Pak J Biol Sci 2006; 9(3): 350-4.
20. Grimm F, Maly FE, Lu J, Llano R. Analysis of specific immunoglobulin G subclass antibodies for serological diagnosis of Echinococcosis by a standard enzyme-linked immunosorbent assay. Clin Diagn Lab Immunol 1998; 5(5): 613-6.
21. Wen H, Craig PS. Immunoglobulin G subclass responses in human cystic and alveolar echinococcosis. Am J Trop Med Hyg 1994; 51(6): 741-8.

Journal of Isfahan Medical School Received: 22.11.2012

Vol. 30, No. 220, 2nd Week, March 2013 Accepted: 29.01.2013

Diagnostic Value of Echinococcus Granulosus Recombinant Protein B-Containing Kit in Comparison with the Euroimmun Kit

Maryam Moradi[1], Behzad Hagh-Panah MD[2], Bahram Kazemi PhD[3], Ensieh Davoudabadi[1], Sanaz Gholami[1], Sahar Kafshdooz-e-Jabari[4]

Original Article

Abstract

Background: Echinococcus granulosus causes human cystic echinococcusis (hydatid cyst) as an important public health problem in many regions of the world. Serologic tests are the main methods for diagnosis of the disease nowadays and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is the most routine and common method for diagnosis. There are some problems in primary diagnosis such as cross-reaction with sera from patients with other parasitic disease in serological tests. Using an appropriate source of antigenic material is a very important and crucial point in improvement of ELISA method.

Methods: Recombinant AgB Echinococcus granulosus were applied as a new antigen in ELISA and sensitivity and specificity of new kit were compared with Euroimmun hydatid kit. 73 sera from patients with hydatid cyst (confirmed by surgical operation) and 73 healthy individuals' sera were tested by recombinant AgB kit.

Findings: The sensitivity of 100% and specificity of 97.33% were determined by homemade kit.

Conclusion: According to our results, recombinant EgAgB has good performance in total IgG ELISA for detection of sera antibodies from patients with hydatid cyst.

Keywords: Hydatid cyst, Echinococcus granulosus, Recombinant protein, ELISA, Euroimmun

Citation: Moradi M, HaghPanah B, Kazemi B, Davoudabadi E, Gholami S, Kafshdooz-e-Jabari S. **Diagnostic Value of Echinococcus Granulosus Recombinant Protein B-Containing Kit in Comparison with the Euroimmun Kit.** J Isfahan Med Sch 2013; 30(220): 2432-40

* This paper is derived from a MSc thesis No. 390477 in Isfahan University of Medical Sciences.

1- MSc Student of Parasitology, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Assistant Professor, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- Professor, Cellular and Molecular Biology Research Center AND Department of Biotechnology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4- MSc Student of Mycology, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Maryam Moradi, Email: dicentra2003@yahoo.com