✓ پژوهش و سازندگی، شماره ۴۵، زمستان ۱۳۷۸

ارزیابی پادگن‌های گروه ب جهت تشخیص کیست هیداتیک انسانی با روش ELISA

● فاطمه غفاری‌فر، دانشجوی دکترای انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
● عبدالحسین دلیمی‌اصل، دانشیار گروه انگل‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
● احمد زواران حسینی، استادیار گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
تاریخ دریافت: مهرماه ۱۳۷۸

چکیده

به منظور ارزیابی پادگن‌های گروه ب جهت تشخیص کیست هیداتیک در روش ELISA از سرم ۴۰ بیمار که وجود کیست هیداتیک در آنان توسط جراحی قطعی شده است استفاده گردید. از ۲۰ فرد سالم و ۲۰ فرد با بیماریهای انگلی نیز به عنوان گروه شاهد، نمونهٔ سرم تهیه شد. طبق نتایج به دست آمده در تیتر سرم ۱:۸۰۰ حساسیت این روش ۱۰۰٪ بوده است، ویژگی این آزمایش نیز ۹۷/۵ درصد برآورد گردید. نتایج نشان دهنده موارد مثبت کاذب و ایجاد واکنش متقاطع بسیار کم با بعضی آلودگیهای انگلی است.

✓ Pajouhesh & Sazandegi, No 45 PP: 83-85

Evaluation of B-group antigens in the diagnosis of human hydatidosis by ELISA

By: Ghaffari Far F., Ph.D. student of parasitology; Dalimi Asl A., Associate professor and Zavaran Hosseini A.; Assistant professor, medical school, Tarbiat Modarres University.

In this study, B-group antigens isolated from hydatid cyst fluid were evaluated by ELISA test for human cystic hydatid disease diagnosis. 40 sera of clinically confirmed hydatid patients (cases), 20 from non - hydatid patients (control group 1) and 20 from healthy individuals (control group 2) were tested by ELISA using B-group antigens. The result indicated that, ELISA in 1:800 serum titre showed 100% sensitivity and 97.5% specificity in the diagnosis.

مقدمه

کیست هیداتیک یک بیماری زئونوز است و عامل آن سستودی از خانواده تنیده و جنس اکینوکوکوس است. عامل کیست هیداتیک، *Echinococcus granulosus* و میزبان نهایی آن از دسته سگ سانان می‌باشد. میزبانهای واسط حیواناتی نظیر گوسفند، بز و گاو بوده و انسان نیز به آن مبتلا می‌شود. ارزیابی بالینی پیامدهای بیماری مشکل بوده و تکیه بر چند روش تشخیصی مانند استفاده از اشعهٔ X، اولتراسونوگرافی، توموگرافی به همراه تکنیکهای ایمنی‌شناسی مطلوبتر است. از میان تکنیکهای ایمنی‌شناسی، روش ELISA در آشکارسازی پادتن‌های علیه پادگن‌های مایع کیست هیداتیک توانایی بالایی را از خود نشان داده است. به علاوه ثابت شده است که تستهای ایمونوالکتروفورز، کازونی، IHA و IFA نسبت به روش ELISA دارای حساسیت کمتری هستند، لذا جهت بررسیهای سرواپیدمیولوژی مناسب نمی‌باشند (۱۳). اکثر محققین جهت افزایش حساسیت تستها، استفاده از پادگن‌های تخلیص یافته یا نسبتاً تخلیص یافته را توصیه می‌کنند. در روش ELISA نیز به علت حساس بودن و به کار بردن مقادیر کم پادگن، استفاده از پادگن‌های خالص یا نسبتاً خالص از ارزش بیشتری برخوردار است و در مطالعات غربالگری برای کشف موارد نهفتهٔ بیماری مناسب می‌باشد (۷).

در بررسیهای سرواپیدمیولوژی انجام شده در کنیا، ایتالیا، آرژانتین، اسپانیا و تونس که از روش ELISA به عنوان تست تشخیصی استفاده شده است حساسیتهای به دست آمده متفاوت بوده است (۳، ۵، ۱۰، ۱۴ و ۱۵). هدف از این مطالعه ارزیابی پادگن‌های گروه ب جهت تشخیص کیست هیداتیک انسانی در روش ELISA می‌باشد.

روش کار

الف- تهیهٔ پادگن‌های گروه ب

برای تهیه پادگن‌های گروه ب از روش Oriol و همکاران (۱۱) و Rogan و همکاران (۱۲) استفاده شد بدین ترتیب که پس از جمع‌آوری مایع کیست هیداتیک، آن را به مدت یک ساعت در دور ۱۰۰۰۰ و در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ می‌کنیم در نتیجه تمامی ناخالصی‌ها رسوب کرده و مایع شفافی به دست می‌آید. برای آلبومین‌زدایی و حذف گلوبولینها از روش Oriol و همکاران استفاده شد، بدین ترتیب که ابتدا برای آلبومین‌زدایی مایع به دست آمده را در کیسهٔ دیالیز ریخته و در بافر استات با مولاریته ۰/۰۰۵ و pH=۵ به مدت یک هفته در دمای چهار درجهٔ سانتی‌گراد دیالیز می‌کنیم برای حذف گلوبولینها نیز از سولفات آمونیوم ۴۰٪ اشباع استفاده شد (۱۱). برای تهیهٔ پادگن‌های گروب ب، محلول پادگنی فاقد آلبومین و گلوبولین را به مدت ۱۵ دقیقه در بن‌ماری ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار می‌دهیم سپس در دور ۱۰۰۰۰ به مدت نیم ساعت و در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ می‌کنیم. جوشاندن باعث دناتوره شدن پروتئین‌های حساس به حرارت می‌شود و سانتریفوژ باعث رسوب آنها می‌گردد ولی پادگن‌های گروه ب که مقاوم به حرارت می‌باشند به صورت محلول باقی می‌مانند (۹). برای تعیین میزان پروتئین موجود در این محلول از روش برادفورد استفاده گردید (۶).

ب - تهیه نمونه سرم

برای تهیه سرم مثبت از ۴۰ بیمار مبتلا به کیست هیداتیک که بیماری آنها توسط عمل جراحی تأیید شده است، نمونه سرم تهیه گردید. برای گروه شاهد از ۲۰ فرد سالم و ۲۰ فرد با آلودگی انگلی نمونه تهیه شد (۴ مورد ژیاردیا، ۳ مورد *Fasciola hepatica* ۳ مورد اسکاریس، ۳ مورد استرونژیلوئیدس، ۴ مورد *H. nana* و ۳ مورد *(Taenia saginata)*. این سرمها تا زمان بررسی در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

ج - تعیین غلظت مناسب پادگن

برای تعیین غلظت مناسب پادگن از چکر بورد استفاده شد، بدین ترتیب که پادگن با غلظت ۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر که در بافر کربنات، بیکربنات ۰/۱ مولار و pH=۹/۶ را تهیه کرده و به مقدار ۲۰۰ میکرولیتر در چاهکهای ستون اول پلیت اضافه می‌کنیم و در سایر چاهکها فقط بافر کربنات، بیکربنات به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه می‌کنیم سپس با استفاده از پادگن‌های موجود در چاهکهای ستون اول رقت‌سازی را انجام داده و تا ستون هفتم پیش می‌رویم سپس ۱۰۰ میکرولیتر اضافی را دور می‌ریزیم، در ستون هشتم فقط بافر کربنات بیکربنات بدون پادگن را اضافه می‌کنیم و پلیت را به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده پس از این مدت آن را با بافر TBST (تریس بافر

سالین و توئین ۲۰ شستشو می‌دهیم و ۲۰۰ میکرولیتر محلول بلوکه کننده (بافر TBST و ۱٪ آلبومین سرم گاوی) به همه چاهکها اضافه می‌کنیم و به مدت یکساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه می‌کنیم، پس از این مدت پلیت را مانند مرحلهٔ قبل شستشو داده و در ردیف اول سرم رقیق شده در بافر بلوکه کننده با رقت $\frac{1}{50}$ به مقدار ۲۰۰ میکرولیتر اضافه می‌کنیم و در سایر ردیفها ۱۰۰ میکرولیتر بافر بلوکه کننده اضافه می‌کنیم، سپس رقت‌سازی را انجام داده و پلیت را به مدت یکساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار می‌دهیم، پس از این مدت پلیت را شستشو داده و ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌هیومن کونژوگه شده با پراکسیداز (تهیه شده از سیگما) با رقت ۱/۱۰۰۰۰ اضافه و یک ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه می‌کنیم سپس پلیت را شستشو داده و در مرحلهٔ آخر به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترای OPD[1] تهیه شده در بافر سیترات، فسفات ۰/۲ مولار و pH=۵ و ۰/۰۵درصد H_2O_2 ۳۰ درصد اضافه می‌کنیم و به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه می‌نمائیم. پس از این مدت به هر چاهک ۵۰میکرولیتر محلول متوقف کننده یعنی اسید سولفوریک ۱/۲۵ مولار اضافه کرده و میزان جذب نوری پلیت و در طول موج ۴۹۲ نانومتر با دستگاه ELISA Raeder قرائت می‌گردد (۸ و ۹).

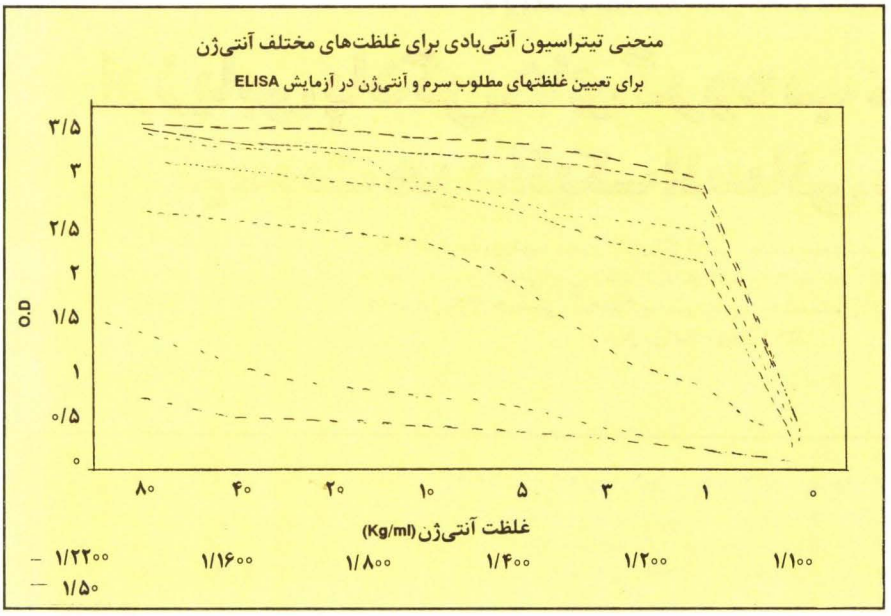
د- آزمایش ELISA

پس از یافتن غلظت اپتیمم پادگن، محلول حاوی پادگن‌های گروه ب را با غلظت ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر رسانده و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به همهٔ چاهکها اضافه شد. برای رقیق کردن محلول پادگنی از بافر کربنات بیکربنات ۰/۱ مولار و pH= ۹/۶ استفاده گردید. پلیت مورد استفاده برای کار پلیت ۹۶ چاهکی از جنس پلی استیرن تهیه شده از شرکت نانک بوده است. بعد از اضافه کردن پادگن به پلیت آن را به مدت یک شب در ۴ درجه سانتی‌گراد قرار می‌دهیم. سپس پلیت را سه بار با بافر TBST شستشو می‌دهیم. بقیهٔ مراحل یعنی اضافه کردن بلوکه کننده، سرم، آنتی‌سرم کونژوگه، شستشوها، اضافه کردن سوبسترا و محلول متوقف کننده و نیز خواندن با دستگاه ELISA ریدر مشابه مراحل انجام شده در چکر بورد بوده است با این تفاوت که در اینجا ۶ رقت سرم یعنی از ۱/۱۰۰ تا ۱/۳۲۰۰ به کار برده شد.

نتایج

با توجه به نتایج به دست آمده از جذب نوری برای غلظتهای مختلف پادگن و رقتهای سرم در چکر بورد (جدول شماره ۲ و نمودار شماره ۱) این نتایج قابل تفسیر می‌باشد. در ردیفهای اول و دومی افقی پادتن بیش از اندازه زیاد بوده به طوریکه در ردیفهای ۱ تا ۴ عمودی علی رغم کاهش غلظت پادگن، کاهش جذب مشاهده نشد که این حالت نشان دهندهٔ اتصالات غیراختصاصی است. از طرف دیگر، در دو ردیف آخر افقی حتی در چاهکهایی که غلظت پادگن بالاست میزان جذب پایین بوده است، بنابراین استفاده از دو رقت سرمی ۱:۱۶۰۰ و ۱:۳۲۰۰ باعث کاهش حساسیت آزمایش می‌شود، لذا نتایج به دست آمده در دو رقت سرمی ۱:۴۰۰ و ۱:۸۰۰ ملطوبتر بوده و از این میان ستونی که دارای غلظت پادگنی ۵ میکروگرم در میلی لیتر می‌باشد چون اختلاف جذب بیشتری را با خانه‌های مجاور نشان می‌دهد به عنوان غلظت مطلوب پادگن پذیرفته شد.

برای تعیین مرز مثبت و منفی بودن نمونه‌ها از فرمول میانگین نمونه‌های منفی به اضافهٔ سه انحراف معیار استفاده شد که مقادیر مساوی یا بیشتر به عنوان نمونهٔ مثبت در نظر گرفته شد که طبق این روش بهترین تیتر ۱/۸۰۰ در نظر گرفته شد. در این تیتر میانگین OD نمونه‌های منفی ۰/۰۸ و انحراف معیار آن ۰/۰۱۶ به دست آمد و مرز مثبت و منفی ۰/۱۲۸ محاسبه گردید و OD مساوی یا بیشتر به عنوان مثبت در نظر گرفته شد. در این تیتر حساسیت ۱۰۰٪ به دست آمد. در مورد افراد سالم، نتیجهٔ کلیهٔ این افراد منفی بود اما در مورد افراد با آلودگیهای انگلی تا تیتر ۱/۴۰۰ دو مورد مثبت کاذب (یک مورد بیمار مبتلا به *T. saginata* و یک مورد بیمار مبتلا به *F. hepatica*) و در تیترهای ۱/۸۰۰ و ۱/۱۶۰۰ فقط یک مورد مثبت کاذب دیده شد. با توجه به نتایج به دست آمده ویژگی این تست در تیتر ۱/۸۰۰، ۹۷/۵ درصد و در چنین تیتری ارزش اخباری مثبت ۹۷/۵ درصد و ارزش اخباری منفی ۱۰۰٪ محاسبه گردید (جدول شماره ۱).

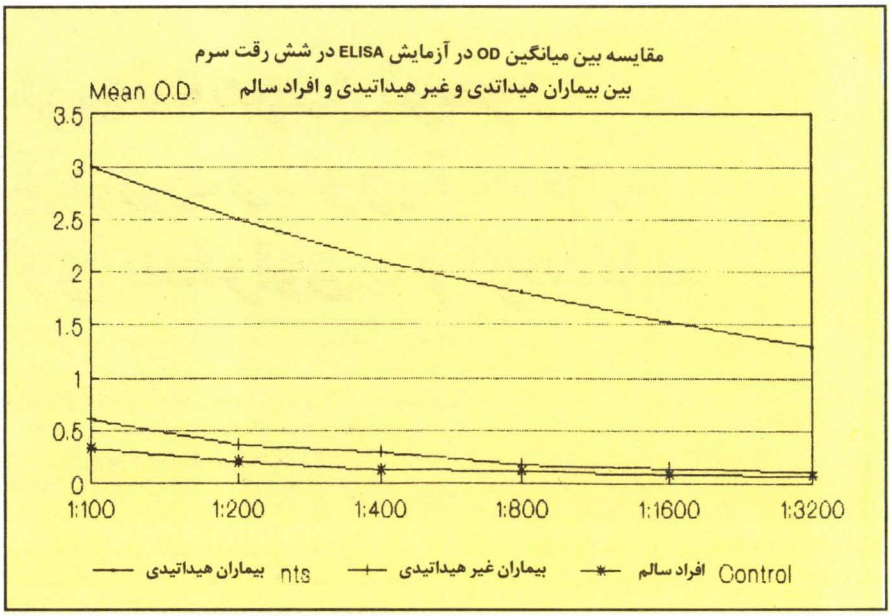


جدول شماره ۱- حساسیت و ویژگی آزمایش ELISA با استفاده از پادگن‌های گروه ب برحسب تیترهای مختلف سرم

گروههای تحت مطالعه	موارد	تیتر سرم					
	مثبت	۱:۱۰۰	۱:۲۰۰	۱:۴۰۰	۱:۸۰۰	۱:۱۶۰۰	۱:۳۲۰۰
بیماران هیداتیدی	تعداد	۴۰	۴۰	۴۰	۴۰	۳۹	۳۸
(۴۰ نفر)	درصد	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۹۷/۵	۹۵
بیماران غیرهیداتیدی	تعداد	۲	۲	۲	۱	۱	۰
(۲۰ نفر)	درصد	۱۰	۱۰	۱۰	۵	۵	۰
افراد سالم	تعداد	۰	۰	۰	۰	۰	۰
(۲۰ نفر)	درصد	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	حساسیت	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۹۷/۵	۹۵
	ویژگی	۹۵	۹۵	۹۵	۹۷/۵	۹۷/۵	۱۰۰

بحث

نتایج به‌دست آمده از این مطالعه نشان می‌دهد که آزمایش ELISA در تیتر سرمی ۱/۸۰۰ برای تشخیص کیست هیداتیک از حساسیت خوبی برخوردار است (۱۰۰٪). طبق مطالعهٔ Aure و همکاران (۱۹۸۸) که از پادگن خام مایع کیست استفاده کرده است حساسیت IHA برای کیست کبدی ۸۹٪ و برای کیست ریوی فقط ۵۹٪ بوده است(۲). حساسیت و ویژگی آزمایش ELISA در مطالعه سایر محققین در جهان دارای ارقام متفاوتی بوده است. در مطالعه Wattal و همکاران (۱۹۸۸) که از پادگن‌های خام مایع کیست هیداتیک انسانی و همچنین پادگن محلول اسکولکس با غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر و رقت سرمی ۱/۱۶۰۰ استفاده شده بود حساسیت و ویژگی ۱۰۰ درصد گزارش شده بود (۱۵). علت بدست آمدن ویژگی ۱۰۰ درصد در مطالعه Wattal و همکاران این بود که افراد بیمار غیر هیداتیدی انتخاب شده هیچکدام دارای آلودگی انگلی نبودند تا واکنش متقاطع با پادگن‌های کیست هیداتیک پیدا شود. در مطالعهٔ Verastegui و همکاران (۱۹۹۲) با استفاده از پادگن خام با غلظت ۱ میکروگرم در میلی لیتر و رقت سرمی $\frac{1}{100}$ حساسیت به دست آمده برای کیست کبدی ۸۰٪ و برای کیست ریوی ۵۶٪ گزارش گردید (۱۴). در



جدول شماره ۲- میزان جذب پلیت چکربورد در طول موج ۴۹۲ نانومتر جهت تعیین رقت سرم و غلظت مطلوب پادگن در آزمایش ELISA

غلظت پادگن (ug/ml) / رقت سرم	۰ O.D	۱/۲۵ O.D	۲/۵ O.D	۵ O.D	۱۰ O.D	۲۰ O.D	۴۰ O.D	۸۰ O.D
۱:۵۰	۰/۴۲	۲/۸۰	۳/۰۰	۳/۱۵	۳/۲۰	۳/۲۸	۳/۳۰	۳/۳۴
۱:۱۰۰	۰/۴۰	۲/۷۰	۲/۹۰	۳/۰۰	۳/۰۵	۳/۱۱	۳/۱۵	۳/۳۰
۱:۲۰۰	۰/۲۴	۲/۳۰	۲/۴۰	۲/۶۰	۲/۸۰	۳/۰۷	۳/۰۹	۳/۲۰
۱:۴۰۰	۰/۱۸	۲/۰۰	۲/۲۳	۲/۵۰	۲/۸۳	۲/۸۱	۲/۸۹	۳/۰۰
۱:۸۰۰	۰/۱۵	۰/۸۰	۱/۱۰	۱/۸۰	۲/۲۸	۲/۳۲	۲/۴۰	۲/۵۰
۱:۱۶۰۰	۰/۱۰	۰/۴۰	۰/۴۱	۰/۶۳	۰/۷۰	۰/۸۰	۱/۰۰	۱/۴۲
۱:۳۲۰۰	۰/۰۸	۰/۲۰	۰/۳۰	۰/۳۷	۰/۴۳	۰/۴۸	۰/۵۱	۰/۷۰

مطالعهٔ Babba و همکاران (۱۹۹۴) با استفاده از پادگن آرک ۵ حساسیت این آزمایش برای کیست کبدی ۸۹/۲ و برای کیست ریوی ۷۷/۹ به دست آمده بود (۳). در مطالعه Lacona و همکاران (۱۹۸۰) با بکار بردن پادگن با غلظت ۱۲ میکروگرم در میلی لیتر و رقت سرمی $\frac{1}{1000}$ حساسیت ELISA برای تشخیص کیست کبدی ۷۰/۵٪ و حساسیت IHA ۶۳/۶٪ بوده است به علاوه برای تشخیص کیست ریوی حساسیت ELISA ۴۸/۵٪ و حساسیت IHA ۳۹/۴٪ و برای تشخیص کیست در چند انواع به صورت توأم حساسیت روش ELISA ۷۸/۶٪، حساسیت IHA ۶۴/۳٪ و در مجموع حساسیت روش ELISA ۶۳/۷٪ و برای IHA ۵۵٪ بوده است (۱۰). در مطالعهٔ Iacona چون حساسیت هر دو روش پایین‌تر از حداقل گزارش شده می‌باشد لذا ممکن است علت آن نحوه تهیه پادگن ب باشد. طبق آخرین مطالعه انجام شده در کشور ما که توسط سلامی و همکاران (۱۳۷۷) انجام شده است، با استفاده از پادگن خام مایع کیست هیداتیک حساسیت و ویژگی تست ELISA نقطه‌ای به ترتیب ۱۰۰٪ و ۶۰/۱٪ و با استفاده از پادگن‌های گروه ب ۱۰۰٪ و ۹۹/۵٪ بوده است (۱).

علت اختلاف در حساسیت و ویژگی به دست آمده در مطالعات مختلف وجود تنوع آلودگیهای انگلی است که باکیست هیداتیک واکنش متقاطع نشان می‌دهند. از جمله آلودگیهای انگلی که باکیست هیداتیک واکنش متقاطع نشان می‌دهند آلودگی سیستی سرکوزیسی در انسان است که خوشبختانه این آلودگی تاکنون در ایران گزارش نشده است به همین جهت با استفاده از پادگن‌های گروه ب در ایران حساسیت و ویژگی تستهایی نظیر ELISA بسیار بالا می‌باشد.

با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیق و مقایسه آن با سایر مطالعات انجام شده می‌توان گفت که‌برای تشخیص هیداتیدوزیس، آزمایش ELISA در میان سایر تستهای سرولوژی به کار رفته حساستر و کاربردی‌تر است و به عنوان یک تست تشخیصی برای بیماری کیست هیداتیک در آزمایشگاهها پیشنهاد می‌شود. همچنین با توجه به حساسیت بالای به دست آمده برای این آزمایش، می‌توان از آن در مطالعات سرواپیدمیولوژی به خصوص برای یافتن موارد نهفتهٔ بیماری در مناطق آندمیک استفاده کرد.

منابع مورد استفاده

۱- سلامی، شهاب؛ دلیمی اصل، عبدالحسین و مدنی، رسول، ۱۳۷۸. راه‌اندازی و ارزیابی آزمایش ELISA نقطه‌ای برای تشخیص هیداتیدوزیس انسانی. مجله دانشور - سال ششم شماره ۲۴- ص ۳۸-۴۲.

2- Auer H., Picher O. and Aspock H., 1988. Combind application of enzyme linked immuno sorbent assay (ELISA) and indirect haemag glutination test (IHA) as a useful tool for the diagnosis and post-operative surveillance of human alveolar and cystic echinococcosis. Zentrablott for bacteriologic 270: 313-25.

3- Babba H., Messedi A., Masmoudi S., 1994. Diagnosis of human hydatidosis comparison between immagery and six serologic techniques. Am. J. Trop. Med. Hyg. 50(1) 64-68.

4- Barbieri M., Severim. A., Pirez M.I., 1994. Use of spesific antibody and circulating antigen serum levels in the hydatid immunodiagnosis of asymptomatic population. International journal for parasitology Vol 24 No 7.

5- Bchir A., Laruuze B., Soltani M., Hamdi A., 1991. Echotomographic and serological population - based study of hydatidosis in central Tunisia, Acta tropica, Vol 49: 149-153.

6- Bradford M.M., 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye hinding Analytical biochemistry 72: 248-254.

7- Coltorti E., 1986. Standardization and evaluation of an enzyme immunoassay as a screening test for the seroepidemilogy of human hydatidosis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 35(5): 1000-1005.

8- Crowther J.R., 1995. ELISA theory and practic. Human press.

9- Gillespie S.H. and Hawkey P.M, 1995. Medical parasitology A Practical approch. Oxford university press.

10- Iacona A., Pini C., Vicari G., 1980. Enzyme linked immuno sorbent assay (ELISA) in the serodiagnosis of hydatid disease. Am. J. Trop. Med. Hyg. 29(1): 95-102.

11- Oriol R., Williams J.F., Esandi M.V.P. and Oriol C., 1971. Purification antigens of *Enchinococcus granulosus* from sheep hydatid fluid. Am. J. Trop. Med. Hyg. 20: 569-574.

12- Rogan M.T., Craig P.S., Zeyhle E., et al. 1991. Evaluation of arapid dot ELISA as a field test for the diagnosis of cystic hydatid disease. Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene. 85: 773-7.

13- Thompson R.C.A. and Lymbery A.J., 1995. Echinococcus and hydatid disease. CAB international P: 411-463.

14- Verastegui M., Moro P., Guevara A., 1992. Enzyme linked immuno electrotransfer blot test for diagnosis of human hydatid disease. Journal of clinical microbiology, Bol. 30 No. 6: 1557-1561.

15- Wattal C., Malla N., Ahmad Khan I. and Agarwal S.C., 1986. Comparative evaluation of enzyme - Linked immuno sorbent assay for the diagnosis of pulmunary echinococcusis. Journal of clinical microbiology. Vol. 24 No. 1: 40-46.