تخلیص و ارزیابی آنتی ژنهای اصلی مایع هیداتیک در تشخیص ایمونولوژیک هیداتیدوز

*دکتر علی هانیلو I
دکتر جعفر مسعود II
دکتر بیژن فرزامی III

چکیده

تهیه و تخلیص آنتی‌ژن مناسب یکی از گامهای اساسی و اولیه در تشخیص سرولوژیک هیداتیدوز محسوب می‌شود. این پژوهش به منظور تهیه، تخلیص و ارزیابی آنتی‌ژنهای اصلی مایع هیداتیک به روش الایزا انجام شده است. در این مقاله از بین روشهای مختلفی که برای تخلیص آنتی‌ژنها معرفی شده‌اند از کروماتوگرافی ژل‌فیلتراسیون، کروماتوگرافی تعویض یونی و روش تخلیص نسبی آنتی‌ژن B استفاده گردید. با تفکیک آنتی‌ژن خام مایع هیداتیک(CHFAg) توسط روشهای کروماتوگرافی، ٤ پیک جداگانه از هر ستون به دست آمد. برای ارزیابی ارزش تشخیصی CHFAg و آنتی‌ژنهای تخلیص شده، در کل ٢٤٢ نمونه سرم شامل ٦٤ نمونه از بیماران مبتلا به کیست هیداتیک، ٥٥ نمونه از بیماران مبتلا به فاسیولیاز و توکسوکاریاز، ٥٠ نمونه از بیماران مبتلا به بدخیمیها و ٧٣ نمونه از افراد سالم با روش الایزا آزمایش شدند. با وجود پایین بودن ویژگی CHFAg-ELISA(٨٣٪)، حساسیت آن بالا بود(٩٤٪) بنابراین، استفاده از این آنتی‌ژن ممکن است در مطالعات سرواپیدمیولوژیک مفید باشد. براساس نتایج به دست آمده، برای مطالعات سرواپیدمیولوژیک ما استفاده از پیک اول آنتی‌ژنیک ژل‌فیلتراسیون(PIG-ELISA) را پیشنهاد می‌کنیم زیرا با داشتن حساسیتی معادل حساسیت CHFAg، از ویژگی نسبتاً بالایی برخوردار است(٨٧٪). در میان آنتی‌ژنهای تخلیص شده، آنتی‌ژن B روش Oriol با ٩٨٪ و پیک دوم آنتی‌ژنیک ژل‌فیلتراسیون(P2G) با ٩٦٪ بیشترین ویژگی را نشان دادند. در نتیجه، PIG-ELISA را که از حساسیت بالایی برخوردار است برای مطالعات غربالگری و AgB-ELISA یا P2G-ELISA را بر حسب امکانات موجود برای آزمایشهای تکمیلی پیشنهاد می‌کنیم.

کلیدواژه‌ها: ١ – هیداتیدوز ٢ – الایزا ٣ – آنتی‌ژن ٤ – تشخیص ایمونولوژیک

مقدمه

امروزه، روشهای ایمونولوژیک در تشخیص هیداتیدوز از اهمیت و اعتبار ویژه‌ای برخوردار هستند.

با این حال با وجود توسعه روشهای نوین تشخیصی در دنیا، پیشرفتهای کمتری در زمینه تشخیص سرولوژیک هیداتیدوز در داخل کشور صورت گرفته است.

اولین گام اساسی در این زمینه، تهیه و تخلیص آنتی‌ژن مناسب است.

مایع هیداتیک که بطور معمول به عنوان آنتی‌ژن مورد استفاده قرار می‌گیرد(١،٢و٣)، دارای اجزا و ترکیبات مختلفی است که بعضی از آنها فاقد ویژگی لازم در تشخیص بیماری می‌باشند.

مطالعات مختلف نه تنها وجود آنتی‌ژنهای مشترک و واکنش متقاطع در آزمایشهای سرولوژیک با بیماریهای کرمی نظیر کیست حبابچه‌ای، سیستی سرکوز،

این مقاله خلاصه‌ای است از پایان‌نامه دکتر علی هانیلو جهت دریافت مدرک دکترای انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی به راهنمایی دکتر جعفر مسعود و مشاوره دکتر بیژن فرزامی سال ١٣٨٠.

I) استادیارگروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی زنجان(*مؤلف مسؤول).
II) استاد گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی،دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تهران.
III) استاد گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تهران.

فاسیولیاز، توکسوکاریاز و بعضی بیماریهای غیرانگلی نظیر بدخیمیها را نشان داده‌اند(۳،۴و۵)، بلکه وجود بعضی ترکیبات سرمی میزبان از قبیل آلبومین و ایمونوگلبولین‌ها در مایع هیداتیک(۶و۷)، کارآیی آن را به عنوان آنتی‌ژن در تشخیص هیداتیدوز محدود می‌سازد.

روشهای مختلفی از جمله روشهای کروماتوگرافی برای تخلیص و جداسازی آنتی‌ژنهای اصلی مایع هیداتیک مورد استفاده قرار گرفته‌اند که ارزیابی سرولوژیک این آنتی‌ژنها در بعضی از کشورها با نتایج متفاوتی همراه بوده است.

این تفاوتها نه تنها می‌تواند ناشی از ماهیت و خلوص آنتی‌ژن باشد، بلکه در مواردی به تفاوت ویژگیهای جمعیت بیماران مورد مطالعه از نظر نحوه پاسخهای ایمنی مربوط می‌شود.

علاوه بر آن، تفاوتهای آنتی‌ژنیک بین روشهای مختلف به عنوان منبع تهیه آنتی‌ژن نیز ممکن است در مواردی اعتبار تشخیصی آزمایش مورد نظر را تحت تأثیر قرار دهد(۸).

بنابراین ضرورت دارد که این‌گونه آزمایشها در کشورها و مناطق مختلف با تکیه بر آنتی‌ژنهای بومی ارزیابی گردند تا کارآیی و ارزش تشخیصی هر یک با تکیه بر امکانات موجود در این مراکز مشخص شوند.

با توجه به نکات ذکر شده، این پژوهش با هدف تهیه، تخلیص و ارزیابی آنتی‌ژنهای اصلی مایع هیداتیک برای تشخیص ایمونولوژیک هیداتیدوز طراحی و اجرا گردیده است.

از بین روشهای متفاوتی که برای تخلیص آنتی‌ژنها معرفی شده‌اند، بنا به ضرورت و امکانات موجود از روشهای کروماتوگرافی ژل‌فیلتراسیون، کروماتوگرافی تعویض یونی و روشی موسوم به تخلیص نسبی آنتی‌ژن B، استفاده گردید.

همچنین کارآیی آنتی‌ژنهای خام و تخلیص شده مایع هیداتیک در تشخیص ایمونولوژیک هیداتیدوز، با روش الایزا مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفت.

روش بررسی

الف) تهیه آنتی‌ژن خام مایع هیداتیک(CHFAg):
در این مطالعه مایع کیستهای هیداتیک از کبد و ریه گوسفندان تازه کشتار شده مبتلا جمع‌آوری شد.

برای حذف ناخالصی‌های درشت و پروتواسکولکس‌ها، ابتدا مایع هیداتیک به مدت ۲۰ دقیقه با اعمال نیروی g × ۱۰۰۰ سانتریفوژ شد.

پس از حذف املاح و مولکولهای کوچکتر مایع هیداتیک توسط کیسه دیالیز، در مقابل آب مقطر به مدت یک شب در دمای ۴°C به کمک دستگاه Freez-dryer لیوفیلیز گردید(۹).

پودر حاصل از لیوفیلیز که حاوی انواع پروتئینها و آنتی‌ژنهای مختلف انگل می‌باشد، به عنوان آنتی‌ژن خام مایع هیداتیک(CHFAg) مورد استفاده قرار گرفت.

هنگام نیاز، غلظتهای لازم از آنتی‌ژن در آب مقطر تهیه می‌شد.

ب) کروماتوگرافی ژل‌فیلتراسیون: با رعایت اصول کروماتوگرافی(۱۰)، مقدار ۱۰ میلی‌لیتر محلول CHFAg با غلظت ۸ میلی‌گرم پروتئین در میلی‌لیتر برای هر نوبت آزمایش در ستون کروماتوگرافی (۲۶/۱۰۰ Pharmacia K) حاوی بستر سفادکس G ۲۰۰ نمونه‌گذاری شد.

با جریان دادن بافر فسفاته سالین(PBS,PH=۷/۲) توسط پمپ پریستالتیک به میزان ۱۵ میلی‌لیتر در ساعت، فراکسیون‌های خروجی نمونه در حجمهای مساوی ۳ میلی‌لیتر به ازای هر لوله توسط Fraction collector جمع‌آوری شدند.

با رسم منحنی چگالی نوری فراکسیون‌ها، پیکهای مربوطه تعیین و بطور جداگانه جمع‌آوری گردیدند.

پس از فیلتراسیون با میلی‌پور ۰/۲ میکرون و افزودن سدیم‌ازاید(NaN_3)، ویالهای حاوی پیکهای آنتی‌ژنیک در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند.

برای دستیابی به مقدار کافی از آنتی‌ژنهای هر پیک، کروماتوگرافی چندین نوبت با شرایط یکسان تکرار شد.

ج) کروماتوگرافی تعویض یونی: در این روش نیز با رعایت اصول فنی و عملی(۹)، مقدار ۵ میلی‌لیتر محلول CHFAg با غلظت ٦ میلی‌گرم پروتئین در میلی‌لیتر برای هر نوبت آزمایش، داخل ستون کروماتوگرافی(Pharmacia K ۹/۱۵) حاوی بستر تعویض کننده یونی دی‌اتیل آمینواتیل سلولز(DEAE-Cellulose) نمونه‌گذاری شد.

با جریان دادن بافر تریس ـ HCl ۰/۱ مولار به صورت شیب پلکانی PH (Stepwise) توسط پمپ پریستالتیک به میزان ۱۵ میلی‌لیتر در ساعت، فراکسیون‌های خروجی نمونه در حجمهای مساوی ۲ میلی‌لیتر به ازای هر لوله جمع‌آوری شد.

همانند مرحله ژل فیلتراسیون پیکهای مربوطه تعیین و پس از فیلتراسیون و افزودن سدیم‌ازاید در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند.

د) تهیه و تخلیص آنتی‌ژن ب(AgB): تهیه و تخلیص AgB به عنوان یکی از آنتی‌ژنهای اصلی مایع هیداتیک، براساس روش Oriol و همکارانش(۱۱) و دستورالعمل تکمیلی Craig(۱۲) انجام شد.

در طی فرآیند تخلیص، ابتدا با دیالیز مقدار معینی مایع هیداتیک در مقابل بافر استات ۰/۰۰۵ مولار [PH=۵] و اولتراسانتریفوژ [g × ۵۰۰۰۰] آلبومین موجود در مایع حذف شد. سپس گلبولینها با افزودن سولفات آمونیوم ٤۰٪ اشباع رسوب داده شد. در نهایت با استفاده از حرارت جوش و اولتراسانتریفوژ، AgB که مقاوم به حرارت بود از سایر آنتی‌ژنهای حساس به حرارت جدا گردید.

ه) جمع‌آوری نمونه‌های سرم: در این مطالعه تعداد ٦٤ نمونه از بیماران مبتلا به کیست هیداتیک که ابتلای آنها بعد از عمل جراحی با آزمایش انگل‌شناسی یا بافت‌شناسی ضایعه به اثبات رسیده بود، انتخاب و جمع‌آوری شدند.

برای ارزیابی واکنشهای غیراختصاصی، ۵۵ نمونه سرم از بیماران مبتلا به توکسوکارا و فاسیولا که همگی با آنتی‌ژنهای مربوط به خود در آزمایش IFA واکنش مثبت قوی نشان داده و از نظر بالینی(براساس نظر پزشکان معالج) یا انگل‌شناسی وجود بیماری به تأیید رسیده بود و ۵۰ نمونه سرم از بیماران مبتلا به انواع بدخیمیها(۲۵ مورد سرطان سینه، ۷ مورد تومور کبد و طحال، ٦ مورد انواع لنفوم، تومور استخوان، مغز، آدنوکارسینومای کولون و ۱۲ نمونه CML) تهیه و جمع‌آوری شد.

علاوه بر این ۷۳ نمونه به عنوان سرمهای کنترل و منفی از افراد سالم اخذ و همراه با سرمهای مذکور تا زمان استفاده فریز شدند.

و) الایزا(ELISA): مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌ژنهای خام و تخلیص شده مایع هیداتیک بطور جداگانه با غلظت مناسب ۱۰-۱/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر در بافر کربنات بی‌کربنات ۰/۱ مولار [PH=۹/٦] به هر چاهک میکروپلیت الایزا اضافه و به مدت یک شب در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد کوت شدند.

از آلبومین سرم گاوی(BSA) با غلظت ۱٪ در PBS، به مقدار ۲۰۰ میکرولیتر در هر چاهک به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه به عنوان بافر بلوک کننده و از PBS-T (PBS حاوی ۰/۰۵٪ توین ۲۰) به عنوان بافر رقیق کننده استفاده شد. نمونه‌های سرم با رقت ۲۰۰÷۱ و کونژوگه آنتی‌هیومن ایمونوگلبولین پراکسیداز [BioGen No. BA۱۱٤] با رقت ۸۰۰۰÷۱ هر کدام به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر در هر چاهک به مدت یک ساعت انکوبه شدند.

شستشوی بین مراحل مختلف با PBS ٤ نوبت صورت گرفت. در نهایت به هر چاهک، ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترای

OPD (۵ میلی‌گرم ارتوفنیلن‌دی‌آمین، ۱۲/۵ میلی‌لیتر بافر سیترات فسفات ۰/۲ مولار با PH= ۵، ۱۰ میکرولیتر H_2O_2 ۳۰٪)افزوده شد و بعد از ۱۰ دقیقه، واکنش با اسید سولفوریک ۱ مولار متوقف گردید.

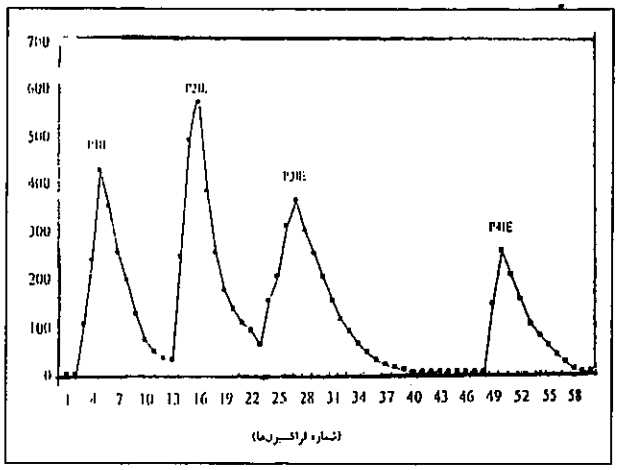
Cut off آزمایش با افزودن ۳ برابر انحراف معیار به میانگین OD ۴۹۲ nm حاصل از نمونه سرمهای منفی محاسبه شد. همچنین غلظت و رقت مطلوب آنتی‌ژنهای مختلف و سرم به روش تیتراسیون متقاطع تعیین گردید(۱۳).

نتایج

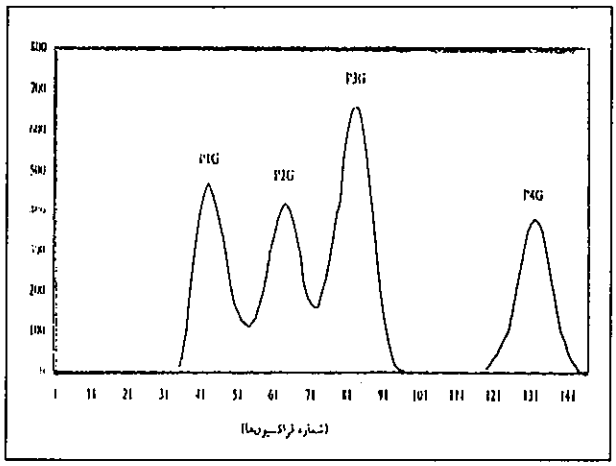
الف) کروماتوگرافی ژل‌فیلتراسیون و تعویض یونی: با عبور دادن ۸۰ میلی‌گرم نمونه CHFAg در ۱۰ میلی‌لیتر بافر PBS از ستون کروماتوگرافی، ٤ پیک مجزا به دست آمد.

که این پیکها به ترتیب خروج با عناوین P1G، P2G، P3G و P4G نام گذاری شدند(نمودار شماره ۱). همچنین با عبور دادن ۳۰ میلی‌گرم CHFAg در ۵ میلی‌لیتر بافر تریس- HC1 از ستون تعویض یونی، ٤ پیک مجزا به دست آمد که این پیکها به ترتیب خروج با عناوین P11E، P21E، P31E و P41E نام گذاری شدند(نمودار شماره ۲).

پیک اول در PH= ۸/۵ و پیکهای بعدی به ترتیب در PH های ۶،۷و٤ خارج شدند.



نمودار شماره ۱- پیکهای حاصل از تفکیک مایع هیداتیک به روش کروماتوگرافی ژل‌فیلتراسیون



نمودار شماره ۲- پیکهای حاصل از تفکیک مایع هیداتیک به روش کروماتوگرافی تعویض یونی

ب) ارزیابی آنتی‌ژنها با روش الایزا: در روش الایزا با آنتی‌ژن خام مایع هیداتیک (CHFAg-ELISA)، از مجموع ٦٤ نمونه سرم بیماران مبتلا به هیداتیدوز، ٦٠ نمونه(٩٤٪) مثبت و از مجموع ۱۷۸ نمونه سرم افراد کنترل شامل مبتلایان به فاسیولیاز (Fasciola hepatica)، توکسوکاریاز(Toxocara spp.)، بدخیمیها و افراد سالم، ۳۰ نمونه(۱٦/۹٪) مثبت کاذب شدند که از بین آنها فاسیولیاز با ۱۸ مورد(٥٤/٥٪) بیشترین موارد مثبت کاذب را تشکیل می‌داد(جدول شماره ۱).

با استفاده از پیکهای آنتی‌ژنیک ژل‌فیلتراسیون نیز نتایج متفاوتی به دست آمد.

در P1G-ELISA، از مجموع ٦٤ نمونه سرم بیماران مبتلا به هیداتیدوز، ٦١ نمونه(٩٥٪) مثبت و از مجموع ۱۷۸ نمونه سرم افراد کنترل، ٢٤ نمونه(۱۳/٥٪) مثبت کاذب شدند.

در P2G-ELISA موارد و درصدهای مذکور به ترتیب ٥٨(٩١٪) و ۷ مورد(٤٪) به دست آمدند(جدول شماره ۱). بطوری که در جدول شماره ۱ مشاهده می‌شود، بیشترین واکنش مثبت کاذب با ۱۸ مورد(٥٤/٥٪) مربوط به سرمهای فاسیولیاز با آنتی‌ژن P1G می‌باشد.

جدول شماره ۱- نتایج ارزیابی سرمها با آنتی‌ژن خام و پیکهای حاصل از کروماتوگرافی ژل‌فیلتراسیون به روش الایزا

سرم‌های مورد آزمایش	تعداد	تعداد(٪) موارد مثبت			
		CHFAg-ELISA	P1G-ELISA	P2G-ELISA	P3G-ELISA
هیداتیدوز	٦٤	٦٠(٩٤)	٦١(٩٥)	٥٨(٩١)	٥٥(٨٦)
فاسیولیاز	٣٣	١٨(٥٤/٥)	١٨(٥٤/٥)	٤(١٢)	٢(٦)
توکسوکاریاز	٢٢	٨(٣٦/٤)	٤(١٨)	١(٤/٥)	٠(٠)
بدخیمی‌ها	٥٠	١(٢)	٠(٠)	١(٢)	٢(٤)
افراد سالم	٧٣	٣(٤)	٢(٢/٧)	١(١/٤)	٣(٤)
تعداد(٪) کل	١٧٨	٣٠(١٦/٩)	٢٤(١٣/٥)	٧(٤)	٧(٤)

با استفاده از آنتی‌ژن خالص شده B(AgB-ELISA)، از مجموع ٦٤ بیمار مبتلا به هیداتیدوز، ٥٧ نمونه(٨٩٪) مثبت و از مجموع ١٧٨ سرم افراد کنترل، فقط ٣ نمونه (١/٧٪) مثبت کاذب شدند(جدول شماره٢). همچنین با استفاده از پیکهای مختلف کروماتوگرافی تعویض یونی نتایج متفاوتی به دست آمد که در جدول مشاهده می‌گردد.

باتوجه به نتایج به دست آمده، حساسیت و ویژگی آزمایش الایزا برای هریک از آنتی‌ژنهای مختلف بطور جداگانه محاسبه و مورد مقایسه قرار گرفت. بدین ترتیب که آنتی‌ژن P1G و CHFAg به ترتیب با ٩٥٪ و ٩٤٪ بیشترین حساسیت و P3G با ٨٦٪ کمترین حساسیت را در تشخیص بیماری هیداتیدوز نشان دادند. از میان آنتی ژنهای خام و تخلیص شده، AgB ، P2G و P3G هرکدام به ترتیب با ٩٨٪، ٩٦٪ و ٩٦٪ بیشترین ویژگی را در آزمایش الایزا از خود نشان دادند(جدول شماره٣). نتیجه اینکه AgB و آنتی‌ژن P2G هر کدام با ٩٣/٥٪ دارای بیشترین و آنتی‌ژن P3IE با ٨٥٪ دارای کمترین اعتبار در تشخیص بیماران مبتلا به کیست هیداتیک می‌باشند.

جدول شماره ۲- نتایج ارزیابی سرمها با آنتی‌ژن B و پیکهای حاصل از کروماتوگرافی تعویض یونی به روش الایزا

سرم‌های مورد آزمایش	تعداد	تعداد(٪) موارد مثبت			
		AgB-ELISA	P1IE-ELISA	P2IE-ELISA	P3IE-ELISA
هیداتیدوز	٦٤	٥٧(٨٩)	٥٩(٩٢)	٥٩(٩٢)	٥٧(٨٩)
فاسیولیاز	٣٣	١(٣)	٢١(٦٣/٦)	١٩(٥٧/٦)	١٩(٥٧/٦)
توکسوکاریاز	٢٢	٠(٠)	١١(٥٠)	٤(١٨/٢)	١٢(٥٤/٥)
بدخیمی‌ها	٥٠	١(٢)	١(٢)	٠(٠)	٠(٠)
افراد سالم	٧٣	١(١/٤)	٠(٠)	٢(٢/٧)	٢(٢/٧)
تعداد(٪) کل	١٧٨	٣(١/٧)	٣٣(١٨/٥)	٢٥(١٤)	٣٣(١٨/٥)

جدول شماره ۳- حساسیت، ویژگی و اعتبار کلی آنتی‌ژنهای مختلف با روش الایزا

نوع آنتی‌ژن		سرمهای مورد آزمایش(تعداد)				حساسیت (درصد)	ویژگی (درصد)	اعتبار (درصد)
		هیداتیدوز(٦٤)		غیرهیداتیک(١٧٨)				
		مثبت	منفی	مثبت	منفی			
مایع هیداتیک خام(CHFAg)		٦٠	٤	٣٠	١٤٨	٩٤	٨٣	٨٨/٥
کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون	P1G	٦١	٣	٢٤	١٥٤	٩٥	٨٧	٩١
	P2G	٥٨	٦	٧	١٧١	٩١	٩٦	٩٣/٥
	P3G	٥٥	٩	٧	١٧١	٨٦	٩٦	٩١
کروماتوگرافی تعویض یونی	P1IE	٥٩	٥	٣٣	١٤٥	٩٢	٨١/٥	٨٦/٥
	P2IE	٥٩	٥	٢٥	١٥٣	٩٢	٨٦	٨٩
	P3IE	٥٧	٧	٣٣	١٤٥	٨٩	٨١/٥	٨٥
آنتی‌ژن B (AgB)		٥٧	٧	٣	١٧٥	٨٩	٩٨	٩٣/٥

بحث

آنتی‌ژن خام مایع هیداتیک (CHFAg) که به عنوان منبع در دسترس آنتی‌ژن در بیشتر آزمایشهای سرولوژیک بویژه در الایزا از آن استفاده می‌شود، باوجود دارا بودن حساسیت نسبتاً بالا، از ویژگی کمتری برخوردار بوده و بطور غیراختصاصی با تعدادی از بیماریهای انگلی و غیرانگلی واکنش مثبت کاذب می‌دهد که این مسئله باعث کاهش اعتبار کلی این آنتی‌ژن در آزمایشهایی نظیر الایزا می‌شود.

به عنوان مثال در تعدادی از مطالعات حساسیت الایزا با استفاده از آنتی‌ژن خام مایع هیداتیک (CHFAg-ELISA) بین ۸٤٪ تا ۹٦٪ گزارش شده است (۳، ۱٤، ۱۵). در حالی که ویژگی آن در همین مطالعات حداکثر ۸۳٪ بوده است(۱۵).

در مطالعات ما نیز با اینکه حساسیت CHFAg-ELISA در تشخیص بیماران مبتلا به کیست هیداتیک ۹٤٪ بود اما به علت وجود واکنش متقاطع با سرم مبتلایان به فاسیولیاز (٥٤/٥٪)، توکسوکاریاز (۳٦/٤٪) و افراد سالم (٤٪)، ویژگی کلی آن ۸۳٪ و اعتبار آزمایش حداکثر ۸۸/٥٪ به دست آمد.

بنابراین به کارگیری CHFAg-ELISA، فقط در غربالگری اولیه بیماری ممکن است سودمند باشد و جهت تشخیص نهایی و افتراقی هیداتیدوز از سایر عوامل انگلی و غیرانگلی که با این بیماری واکنش متقاطع دارند مناسب نمی‌باشد.

البته براساس این پژوهش، جهت غربالگری‌های اولیه و مطالعات سرواپیدمیولوژیک یا تشخیص اولیه آزمایشگاهی بیماری، آنتی‌ژن PIG را توصیه می‌کنیم. زیرا با داشتن حساسیتی معادل حساسیت CHFAg نسبت به آن از ویژگی بالاتری (۸۷٪) برخوردار است.

با در نظر گرفتن مطالب فوق و نیاز به تشخیص سرولوژیک هیداتیدوز بطور اختصاصی‌تر، بعد از تخلیص و تفکیک CHFAg با ۳ روش مختلف، پیکها و فراکسیون‌های به دست آمده با روش الایزا در شرایط یکسان ارزیابی و شاخصهای تشخیصی هر یک از اجزا بطور جداگانه محاسبه گردید(جدول شماره۳) از بین اجزای مختلفی که مورد ارزیابی قرار گرفتند، AgB حاصل از روش Oriol و همکارانش با ۹۸٪ و آنتی‌ژنهای P2G و P3G حاصل از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون هر کدام با ۹٦٪ بیشترین ویژگی را در تشخیص اختصاصی هیداتیدوز از خود نشان دادند که با در نظر گرفتن حساسیت تشخیصی هریک از آنها، آنتی‌ژنهایB و P2G هر کدام با ۹۳/٥٪ از بیشترین اعتبار تشخیصی در میان اجزای مختلف برخوردار بودند.

کماکان واکنش متقاطع و غیراختصاصی AgB-ELISA با سرم مبتلایان به فاسیولیاز، بدخیمیها و افراد سالم به میزان کلی ۱/۷٪ و P2G-ELISA با سرم مبتلایان به فاسیولیاز، توکسوکاریاز، بدخیمیها و افراد سالم به میزان کلی ۱٦/۹٪ دیده می‌شود.

در مطالعات مختلف با استفاده از فراکسیون‌های غنی از آنتی‌ژن B در روش الایزا، حساسیت و ویژگیهای مختلفی به دست آمده است. Rogan و همکارانش در سال ۱۹۹۱(۱٦) در یک بررسی توسط Dot-ELISA با استفاده از فراکسیون آنتی‌ژن B ، حساسیت آزمایش را حدود ۹٤٪ و ویژگی آن را ۹۰/۳٪ گزارش کردند که پایین بودن ویژگی آزمایش به خاطر وجود ۲۸ سرم مربوط به بیماران مبتلا به سیستی سرکوز و ۱۰ سرم مربوط به بیماران مبتلا به کیست حبابچه‌ای بوده است.

خوشبختانه به علت نادر بودن و محدود بودن کیست حبابچه‌ای به استان اردبیل(۱۷) و عدم وجود گزارشی در مورد ابتلا به سیستی سرکوز انسانی در ایران، امکان بروز واکنش متقاطع با انگلهای مذکور بسیار نادر است.

Wen & Craig در سال ۱۹۹٤(۱۸)، حساسیت و ویژگی آزمایش الایزا را با استفاده از آنتی‌ژن B به ترتیب ۸۹٪ و ۸٥/۷٪ گزارش کردند که در این مطالعه نیز واکنش متقاطع قابل توجه با سرم مبتلایان به کیست حبابچه‌ای (٥۰٪) و سیستی‌سرکوز (۱۱٪)، باعث کاهش ویژگی AgB-ELISA شده بود.

Ioppolo و همکارانش در سال ۱۹۹۶(۱۹) با تهیه و تخلیص فراکسیون خالص‌تر آنتی‌ژن B توسط الکتروالوشن و ارزیابی آن با روش الایزا، حساسیت ۶۳٪ و ویژگی ۱۰۰٪ را گزارش کردند.

ویژگی بسیار بالای به دست آمده در این مطالعه صرف‌نظر از اینکه می‌تواند ناشی از تعداد کم و نوع سرمهای کنترل (۱۲ نمونه سرم از مبتلایان به سایر بیماریهای انگلی شامل ۸ نمونه شیستوزومیاز، ٤ نمونه فیلاریاز و لیشمانیوز) باشد، بیشتر معلول کیفیت و درجه خلوص آنتی‌ژن B است که توسط الکتروالوشن تهیه و تخلیص شده است.

به هرحال نکته اساسی در گزارشهای مذکور و سایر مطالعات مشابه نظیر مطالعه Shambesh و همکارانش(۲۰) که حساسیت و ویژگی AgB-ELISA را در مبتلایان به کیست هیداتیک کبدی به ترتیب ۸۵٪ و ۹۸٪ به دست آورده‌اند، این است که تاکنون دستیابی همزمان و توأم به حساسیت و ویژگی بسیار بالا توسط AgB-ELISA یا هر آنتی‌ژن دیگر کیست هیداتیک بسیار مشکل بوده و یکی از چالشها و تلاشهای اصلی این گونه مطالعات رسیدن به این هدف مهم بوده است.

همان‌گونه که اشاره شد بعد از آنتی‌ژن B، از میان پیکهای مختلف آنتی‌ژنیک، آنتی‌ژن P2G با ویژگی ۹۶٪ مناسبترین آنتی‌ژن برای تشخیص اختصاصی هیداتیدوز با روش الایزا شناخته شد.

در نهایت اینکه با کروماتوگرافی تعویض یونی تفکیک مناسبی صورت نگرفت و در ارزیابی با روش الایزا هیچیک از پیکها ویژگی بالایی از خود نشان ندادند.

بنابر تصور ما عدم تفکیک مناسب آنتی‌ژنها در این روش احتمالاً ناشی از محدوده باریک نقطه ایزوالکتریک آنتی‌ژنهای انگل می‌باشد که در مطالعه Oriol و همکارانش(۱۱)، این محدوده ۵/۵-۵ به دست آمده بود.

بنابراین در کروماتوگرافی تعویض یونی قسمت اعظم آنتی‌ژنهای انگل در محدوده این pH، بار خنثی پیدا کرده و تقریباً بطور همزمان از ستون خارج می‌شوند.

بر اساس مطالب فوق برای تشخیص نهایی و تکمیلی هیداتیدوز به عنوان یک استراتژی مورد تأکید(۱۲و۲۱) به ترتیب اولویت روشهای AgB-ELISA و P2G-ELISA را توصیه و پیشنهاد می‌کنیم.

البته ما در پژوهش دیگری(۲۲) روش ایمونوبلاتینگ براساس زیرواحدهای کوچکتر آنتی‌ژن B را به عنوان اولویت اول در تشخیص تکمیلی هیداتیدوز معرفی و تاکید کرده‌ایم، اما طولانی بودن روش، پیچیدگی، هزینه بالا و نیاز به پرسنل کارآزموده در عمل، استفاده از ایمونوبلاتینگ را در بسیاری از مراکز تشخیصی محدود می‌کند.

بنابراین به نظر می‌رسد استفاده از روشهای AgB-ELISA یا P2G-ELISA به عنوان روشهای آسانتر و جایگزین در جهت تشخیص تکمیلی هیداتیدوز مناسب باشد.

تقدیر و تشکر

در پایان از زحمات کارکنان بخشهای سرولوژی کرم‌شناسی دانشکده بهداشت و بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران به خاطر همکاری خوب و همچنین از آقای حمید امینی کارشناس ارشد آزمایشگاه بیمارستان امام خمینی به خاطر اهدای سرم بیماران مبتلا به بدخیمیها صمیمانه سپاسگزارم.

منابع

1- Farag H., bout D., Capron A., Specific immunodiagnosis of human hydatidosis by the ELISA, Biomedicine, 1975, 23: 276-8.

2- Iacona A., Pini C., Vicari G., ELISA in the serodiagnosis of hydatid disease, Am. J. Trop. Med. Hyg. 1980, 29: 95-102.

3- Poreti D., Felleisen E., Grimm F., et al., Differential immunodiagnosis between cystic hydatic disease and other cross-reactive pathologies, Am. J. Trop. Med. Hyg., 1999, 60: 193-8.

4- Schantz PM., Shanks D., Wilson M., Serologic cross-reactions with sera from patients with echinococcosis and cysticerosis, Am. J. Trop. Med. Hyg., 1980, 29: 609-12.

5- Varela Diaz VM., Coltorti EA., D'Alessandre A., Immunoelectrophoresis tests showing echinococcus granulosus arc 5 in human cases of echinococcus vogeli and cysticercosis and multiple myeloma, Am. J. Trop. Med. Hyg, 1978, 27: 554-7.

6- Coltorti EA., Varela-Diaz VM., IgG levels and host specificity in hydatid cyst fluid, Journal of Parasitology, 1972, 58: 753-6.

7- Shapiro SZ., Bahr GM., Hira PR., Analysis of host components in hydatid cyst fluid and immunoblot diagnosis of human echinococcus granulosus infection, Am. Trop. Med. Parasitol., 1992, 86: 503-9.

8- Thompson RCA., Epidemiological aspects of cystic echinococcosis In: Archivos Internationales de la Hidatidosis, 1997, 32: 40-43.

9- Boyer RF., Modern experimental biochemistry, Redwoodcity california USA, The benjamin/Cumings publishing company INC., 1993, PP: 42-50.

10- Pharmacia LKB Biotechnology, Gel filtration: Theory and practice, First edition, printed in sweden by rahmsi lund, 1989, March, PP: 35-65.

11- Oriol R., Williams JF., Perez-Esandi MV., et al., Purification of lipoprotein antigens of echinococcus granulosus from sheep hydatid fluid, Am. J. Trop. Med. Hyg, 1971, 20: 569-74.

12- Craig Ps., Rogan MT., Allan JC., Hydatidosis and cysticercosis larval cestods In: gillespie SH and Hawkey PM., (eds): Medical parasitology, Newyork, Oxford university, 1995, 209-237.

13- Crowther JR., ELISA: Theory and practice, Totowa, Newjersy, UK, Humana Press Inc, first ed., 1995, 131-60.

14- Barbieri M., Fernandez V., Gonzalez G., et al., Diagnostic evaluation of a synthetic peptide drived from a novel antigen B Subunit as related to orther available peptides and native antigens used for serology of cystic hydatidosis, Parasite Immunology, 1998, 20: 51-61.

15- Kabiri M., Nadjafi-pour S., A comparative study of current serologic tests for human hydatid disease with reverse single radial immunodiffuion In: Archivos Internacionales de la Hidatidosis, 1997, 32: 222.

16- Rogan MT., Craig PS., Zeghle E., et al., Evaluation of a rapid dot-ELISA as a field test for the diagnosis of cystic hydatid disease, Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 1991, 85: 773-7.

۱۷- موبدی - ایرج، دلیمی‌اصل - عبدالحسین، کیست هیداتید، اپیدمیولوژی کیست هیداتید در جهان و ایران، چاپ اول، تهران، چاپخانه مقدم، ۱۳۷۳، صفحه ۱۸۰-۱۸۵.

18- Wen H., Craig PS., Imminoglobulin G subclass responses in human cystic and alveolar echinococcosis, Am. J. Trop. Med. Hyg, 1994, 51: 741-8.

19- Ioppolo S., Notargiacomo S., Profumo E., et al., Immunological responses to antigen B from Echinococcus anulosus cyst fluid in hydatid patients, Parasite immunology, 1996, 18: 571-8.

20- Shambesh MK., Craig PS., Wen H., et al., IgG1 and IgG4 serum antibody responses in asymptomatic and clinically expressed cystic echinococcosis patients, Acta Tropica, 1997, 64: 53-63.

21- Lightowlers MW., Gottstien B., Echinococcosis / Hydatidosis: antigens, immunological and molecular diagnosis In: Thompson RCA and Lymbery AJ(eds) Echinococcus and Hydatid Disease, CAB International, Wallingford, UK, 1995, PP: 355-410.

۲۲- هانیلو ـ علی، مسعود ـ جعفر، پزشکی ـ محمد، ارزیابی و مقایسه روش‌های ایمونوبلاتینگ و الایزا با استفاده از آنتی‌ژن B تخلیص شده در تشخیص امونولوژیک هیداتیدوز، مجله بیماریهای عفونی و گرمسیری، ۱۳۸۰، شماره ۱٤: ۳۲-۲۸.

PARAFICATION AND EVALUATION OF MAJOR HYDATID CYST FLUID ANTIGENS IN IMMUNODIAGNOSIS OF HYDATIDOSIS

*A. Haniloo Ph.D[I] J. Masoud, Ph.D[II] B. Farzami, Ph.D[III]

ABSTRACT

Regarding remarkable prevalence of human hydatidosis and despite introduction of novel sensitive techniques such as ELISA for immunodiagnosis of disease in the word, there has not been much progress in that field in Iran. Preparation and purification of suitable antigens is the basic and first step in serodiagnosis of this disease. The present study, thus, is designed and carried out for preparation, purification and evaluation of major hydatid fluid antigens in immunodiagnosis of hydatidosis. Among the various methods for pirification of antigens, we used gel filtration chromatography, anion exchange chromatography and partial purification of antigen B procedure. Elution of crude hydatid fluid antigen (CHFAg) sample through gel filtration and anion exchange columns resulted in four separately peaks from each of columns. To evaluate the diagnostic value of CHFAg and purified antigens by ELISA, we tested 64 sera from patients who had hydatid cyst disease, 55 sera from patients with fascioliasis and toxocariasis, 50 sera from various malignancies and 73 sera from healthy controls. Despite low specificity of the CHFAg-ELISA(83%) owing to non specific reactions with some cases of non-hydatid sera, its sensitivity was relatively high (94%). Although, CHFAg-ELISA may be useful for primary screening in seroepidemiological studies, but we suggest ELISA using the first antigenic peak of gel filtration(PlG-ELISA), which exhibits nearly equal sensitivity wich CHFAg, and relatively high specificity of 87% Among the purified antigens, Antigen B of Oriol procedure and second antigenic peak of gel filtration (P2G) showed the highest specificity of 98% and 96% respectively. In conclusion, we suggest that the P1G-ELISA, which exhibits a relatively high sensitivity, be convenient for primary screening test and AgB-ELISA or P2G-ELISA can be considered as confirmatory tests for specific immunodiagnosis of hydatidosis.

Key Words: 1) Hydatidosis 2) ELISA 3) Antigen 4) Immunodiagnosis

This article is the summary of the thesis of A.Haniloo,Ph.D under supervision of J.Masoud,Ph.d and consultant with B.Farzami,Ph.D.

*I) Assistant professor of parasitology and mycology, Faculty of medicine, Zanjan University of medical sciences and health services, Zanjan, Iran(*Corresponding author).*

II) Professor of parasitology and mycology, Faculty of Health, Tehran University of medical sciences and health services, Tehran, Iran.

III) Professor of biochemistry, Faculty of medicine, Tehran University of medical sciences and health services, Tehran, Iran.