تحقیقی

ارزیابی آنتی‌ژن‌های اصلی و B مایع کیست هیداتید در تشخیص سرولوژیک هیداتیدوزیس

دکتر فاطمه ملکی*[1]، سمیه صراف پور[2]

۱- دکتری تخصصی انگل‌شناسی، دانشیار، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران. ۲- کارشناس ارشد انگل‌شناسی.

چکیده

زمینه و هدف : *هیداتیدوزیس بیماری انگلی زئونوز مزمن با انتشار جهانی است که توسط مرحله لاروی کرم اکینوکوکوس ایجاد می‌گردد. این مطالعه به منظور ارزیابی آنتی‌ژن‌های اصلی و B مایع کیست هیداتید برای تشخیص هیداتیدوزیس انسانی با استفاده از روش‌های کانترایمنوالکتروفورز (CIEP)، الایزا (ELISA) و الایزا نقطه‌ای (Dot ELISA) انجام شد.*

روش بررسی : *در این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی مایع کیست و کبدهای آلوده به کیست هیداتید حیوانات جمع‌آوری گردید. مایع کیست تخلیه و صاف شد و رسوب آن با استفاده از سانتریفیوژ یخچال‌دار برای تغلیظ آماده گردید. حساسیت و ویژگی آنتی‌ژن‌های اصلی و B ۶۰ نمونه سرم هیداتیدوزیس، ۵۵ نمونه انگل های کرمی (۳۵ نمونه سرم فاسیولیازیس، ۲۰ نمونه سرم توکسوکاریازیس) و ۳۵ سرم کنترل منفی مورد آزمایش با استفاده از روش‌های کانترایمنوالکتروفورز، الایزا و الایزا نقطه‌ای تعیین گردید.*

یافته‌ها : *آنتی ژن خام مایع هیداتید با روش کانترایمنوالکتروفورز با ویژگی ۶۸/۹درصد، حساسیت ۸۶/۷ درصد بود که پیک دوم حاصل از ژل فیلتراسیون با آنتی ژن خام ویژگی ۸۲/۲درصد و حساسیت ۸۳/۳درصد را نشان دادند. آنتی ژن B با روش کانترایمنوالکتروفورز، ویژگی ۸۷/۸درصد و حساسیت ۸۳/۳درصد داشت. در روش الایزا با آنتی ژن خام مایع هیداتید، ویژگی ۷۶/۷درصد و حساسیت ۹۳/۳درصد بود. محلول آنتی ژن B با روش الایزا دارای ویژگی ۹۶/۷درصد و حساسیت ۸۸/۳درصد از بالاترین ویژگی برخوردار بود. در آزمایش الایزا نقطه‌ای با رقت یک به ۸۰۰ سرم، آنتی‌ژن خام مایع هیداتید ویژگی ۸۳/۳درصد و حساسیت ۱۰۰درصد را نشان داد و آنتی‌ژن B با روش الایزا نقطه‌ای در رقت یک به ۸۰۰ سرم ویژگی ۱۰۰درصد و حساسیت ۹۸/۳درصد را مشخص نمود.*

نتیجه‌گیری : *آنتی‌ژن B با رقت یک به ۸۰۰ سرم با بیشترین ویژگی و حساسیت با استفاده از روش الایزا نقطه‌ای، مناسب‌ترین روش برای تشخیص آلودگی کیست هیداتید است.*

کلید واژه‌ها : *هیداتیدوزیس ، آنتی‌ژن اصلی ، آنتی‌ژن B ، الایزا ، الایزا نقطه‌ای ، کانترایمنوالکتروفورز*

* نویسنده مسؤول : دکتر فاطمه ملکی ، پست الکترونیکی fmaleki332@gmail.com

نشانی : تهران، اتوبان شهیدهمت، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تلفن ۸۷۶۰۴۷۳۳-۰۲۱ ، نمابر ۸۸۶۲۲۵۳۳

وصول مقاله : ۹۱/۹/۸ ، اصلاح نهایی : ۹۲/۲/۳۰ ، پذیرش مقاله : ۹۲/۳/٤

مقدمه

هیداتیدوزیس از جمله بیماری‌های مشترک بین انسان و حیوان با انتشار جهانی است که سالیانه خسارت‌های اقتصادی و بهداشتی سنگینی به کشورهای مختلف جهان، از جمله ایران وارد کرده است (۱). انسان از جمله میزبانان واسط انگل محسوب شده و می تواند به مرحله لاروی انگل (کیست هیداتید) مبتلا شود. این بیماری از زمان اهلی شدن سگ و ارتباط نزدیک آن با انسان به شکل جدی در انسان مطرح بوده است (۲). پراکندگی آن تقریباً از تمامی آسیا (۳)، بخش عمده ای از آفریقا و آمریکا و نیز مناطق وسیعی از استرالیا و اروپا گزارش شده است (۴).

این انگل بیشتر در کبد و ریه ایجاد بیماری کرده و سایر اعضا حتی تخمدان و لوله های رحمی نیز از خطر ابتلا در امان نیستند (۱و۵). اهمیت بیماری از نظر دامپزشکی و اقتصادی نیز حائز اهمیت است (۶).

بالاترین میزان آلودگی به کیست هیداتید در جهان مربوط به منطقه حاشیه دریای مدیترانه است و کشور ما نیز که در این منطقه قرار دارد یکی از مناطق آلوده است (۳). بیماری در تمام مناطقی که ارتباط نزدیک بین انسان و سگ وجود دارد؛ قابل رویت است. در مطالعات انجام شده در ایران بر آورد شده از هر ۱۰۰ هزار نفر بیمار دربیمارستان یک تا ۱۲/۱ نفر مبتلا به هیداتیدوزیس هستند(۷).

تشخیص و تفسیر بالینی هیداتیدوزیس که بیشتر براساس تصاویر رادیولوژیک، سونوگرافی و یا سی‌تی‌اسکن انجام شده؛ با مشکلاتی همراه است (۸). تشخیص پارازیتولوژیک بیماری نیز به خاطر استقرار بافتی کیست‌ها تقریباً غیرممکن است. روش‌های

سرولوژیک در تشخیص هیداتیدوزیس از اهمیت و اعتبار ویژه ای برخوردارند (۹). تقریباً اکثر آزمایشات رایج سرولوژیک از قبیل تست ثبوت مکمل (CFT)، هماگلوتاسیون غیرمستقیم (IHA)، لاتکس آگلوتیناسیون (LA)، ایمنوالکتروفورز (IEP)، کانترایمنوالکتروفورز (Counter Immunoelectrophoresis: CIEP) و الایزا (ELISA) از آغاز تا به امروز برای تشخیص هیداتیدوزیس به کاررفته اند (۱۰).همچنین علاوه بر ELISA، آزمایش الایزای نقطه‌ای (DOT ELISA) نیز به صورت جدی وارد عرصه تشخیص سرولوژیک هیداتیدوزیس شده است (۷).

ارزیابی سرولوژیک این آنتی‌ژن‌ها با نتایج متفاوتی همراه بوده است (۱۰). این تفاوت‌ها نه تنها به ماهیت و خلوص آنتی‌ژن بستگی دارد؛ بلکه در مواردی به تفاوت ویژگی های جمعیت بیماران مورد مطالعه نیز مربوط است (۷). لذا ضرورت دارد که این گونه تست ها در کشورها و مناطق مختلف با تکیه بر آنتی‌ژن‌های بومی، ارزیابی گردند تا کارایی و ارزش تشخیصی هر کدام با تکیه بر امکانات موجود مشخص گردند.

این مطالعه به منظور ارزیابی آنتی‌ژن‌های اصلی و B مایع کیست هیداتید برای تشخیص هیداتیدوزیس انسانی با استفاده از روش‌های کانترایمنوالکتروفورز (CIEP)، الایزا (ELISA) و الایزا نقطه‌ای (Dot ELISA) انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه آزمایشگاهی برای تهیه مایع کیست در نوبت های متعدد به کشتارگاه‌های بزرگ تهران مراجعه و کبدهای آلوده به کیست هیداتید طی سال‌های ۹۱-۱۳۹۰ جمع‌آوری گردید.

برای ارزیابی آنتی‌ژن‌های خالص شده و خام اقدام به تهیه سرم‌های انسانی شد. سرم انسانی آلوده از مراجعین به بیمارستان‌های وابسته به دانشگاه علوم پزشکی ایران و سرم انسانی سالم از بین همکاران و دانشجویان داوطلب دانشگاه علوم پزشکی ایران تهیه گردید.

۶۰ مورد سرم از بیماران مبتلا به کیست هیداتید دریافت شد. ابتلای این بیماران بعد از عمل جراحی با آزمایش انگل‌شناسی و یا بافت‌شناسی ضایعه به اثبات رسیده بود. ۲۰ مورد سرم از بیماران مبتلا به توکسوکارا و ۳۵ مورد از بیماران مبتلا به فاسیولا برای ارزیابی واکنش های متقاطع و غیراختصاصی تهیه شدند. همگی این سرم‌ها با آنتی‌ژن‌های مربوط به خود در آزمایش IFA واکنش مثبت قوی نشان داده بودند و از نظر بالینی (براساس نظر پزشکان معالج) و یا انگل شناسی وجود بیماری قطعی شده بود. ۳۵ مورد سرم از افراد سالم و طبیعی به عنوان سرم منفی و کنترل جمع‌آوری گردید.

همه سرم‌های مذکور بلافاصله بعد از تهیه در ویال‌های کوچک تقسیم و در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

کبدهای آلوده زیر جریان آب در آزمایشگاه دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران شسته شد و مایع کیست ها توسط سرنگ‌های یکبار مصرف با احتیاط آسپیره و در ظروف مخروطی شکل جمع‌آوری گردید (۱۱). ابتدا مایع هیداتید را به مدت ۲۰ دقیقه با اعمال نیروی g×۱۰۰۰ سانتریفوژ کردیم. بعد از حذف رسوبات، مایع شفاف در ظروف استریل جمع آوری و در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۲).

مایع هیداتید ابتدا با استفاده از دکانتور و اتر سرد همراه با تکان دادن های مکرر و قراردادن روی پایه ثابت به مدت ۳ ساعت و تشکیل دو فاز اتر، چربی و فاز مایع هیداتید بدون چربی و خروج مایع هیداتید لپیدزدایی گردید (۱۲). سپس به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی گراد در مقابل آب مقطر دیالیز گردید (۱۳) و آنها را لیوفیلیزه نمودیم و پودرهای حاصل را در ویال های مناسبی جمع‌آوری کرده و از آن به عنوان آنتی‌ژن خام مایع هیداتید (CHFAg) استفاده نمودیم. میزان پروتئین نمونه ها با روش برادفورد اندازه‌گیری وجداسازی اولیه آنتی‌ژن به روش کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون انجام شد (۱۴).

مقدار ۱۰ میلی‌لیتر نمونه مایع هیداتید خام با غلظت ۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در ستون شیشه‌ای کروماتوگرافی با ابعاد ۱۰۰×۲/۶ سانتی متر به آرامی در سطح ژل سفادکس G200 نمونه‌گذاری گردید (۴). اجزا آن را جمع‌آوری نمودیم و پس از رسم منحنی و مشخص شدن پیک های حاصله، اجزای هر پیک بعد از عبور از فیلترهای میلی‌پور ۰/۲ میکرون و افزودن سدیم آزاید به مقدار ۰/۰۲درصد، در ویال‌های یک میلی‌لیتری استریل در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تهیه و خالص‌سازی آنتی‌ژن B (AgB): به عنوان یکی از آنتی‌ژن‌های اصلی مایع هیداتید براساس روش اوریول (۱۵) برای برطرف کردن مشکلات ناشی از آنتی‌ژن خام مایع کیست هیداتید، روش ساده‌ای برای خالص سازی نسبی آنتی‌ژن‌های انگلی مایع هیداتید ابداع شده که در آن دو آنتی‌ژن عمده مایع کیست، فراکشن A و فراکشن B برای روش‌های ایمنولوژیکی به‌کار رفته هستند. این آنتی‌ژن‌ها دارای نسبت برابر لیپید و پروتیئن همراه با مقداری قند هستند که آنتی‌ژن B آن به حرارت مقاوم و قادر به تحمل دمای جوش است. همچنین دارای زیرواحدهای ایمنولوژیک است که کوچک‌ترین ساب‌یونیت آنتی‌ژن B شدیداً ایمنولوژیک و از اختصاصیت بالایی برخوردار است. بعد از طی فرایند خالص سازی ابتدا مایع کیست هیداتید را به مدت یک شب در مقابل بافر استات ۰/۰۰۵ مولار pH=۵ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد دیالیز نمودیم. سپس با استفاده از حرارت جوش (۱۰۰ درجه سانتی‌گراد) آنتی‌ژن‌های گروه B جدا شدند (۴). تقریباً به میزان

۳ میلی گرم آنتی ژن B با خلوص نسبی حاصل شد که بعد از دیالیز و تقسیم در ویال های مناسب به عنوان آنتی ژن B مورد استفاده قرار گرفت که با استفاده از الکتروفورز و به کارگیری پلی آکریل آمیدژل الکتروفورز در حضور سدیم دودسیل سولفات SDS-PAGE در ژل ۱۳درصد انجام شد. در مجموع دو نوع آنتی‌ژن حاصله شامل آنتی‌ژن خام و آنتی‌ژن‌های گروه B ارزیابی گردید.

ارزیابی آنتی‌ژن‌ها با روش کانترایمنوالکتروفورز انجام شد (۱۶). آزمایش روی غلظت‌های مختلف آنتی‌ژن و رقت‌های مختلف سرم انسان به‌عمل آمدکه نتایج آن ثبت گردید (۱۳).

برای تعیین وزن مولکولی پروتئین ها از روش دودسیل سولفات پلی‌آکریل آمید ژل الکتروفورز (SDS PAGE) استفاده شد (۱۶). در این مرحله آنتی‌ژن خام وآنتی‌ژن‌هایB مایع هیداتید با روش SDS-PAGE مورد مطالعه قرار گرفتند و نتایج مربوط به هر کدام ثبت و مقایسه گردید.

از روش الایزا برای تشخیص و تیتراسیون آنتی ژن های خام و خالص‌سازی مایع هیداتید استفاده شد (۱۷).

مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌ژن‌های خام و خالص شده مایع هیداتید به‌طور جداگانه با غلظت مناسب یک تا ۵ میکروگرم در میلی لیتر در بافر کربنات بی‌کربنات ۰/۱ مولار و pH= ۹/۶ به هر چاهک میکروپلیت اضافه گردید و به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد آماده شدند (۱۸). از آلبومین سرم گاوی (BSA) با غلظت ۰/۰۱ درصد در PBS به مقدار ۲۰۰ میکرولیتر در هر چاهک به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد به عنوان بافر بلوکه کننده و از T- PBS (بافر حاوی ۰/۳درصد توئین ۲۰ و pH=۷/۴) به عنوان بافر رقیق‌کننده استفاده شد (۱۹).

سرم موردنظر در رقت های لازم به مقدار ۵۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه و پس از یک ساعت انکوباسیون در حرارت آزمایشگاه، عمل شستشو سه مرتبه تکرار شد (۲۰). آنگاه کونژوگه به مقدار ۵۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه شد و مرحله شستشو با بافر انجام گرفت. سپس هیدروژن پراکسیداز به هر چاهک اضافه شد و پلیت ها را در محل تاریک قرار دادیم تا واکنش آنزیم و سوبسترا صورت گرفت و رنگ ظاهر گردید.

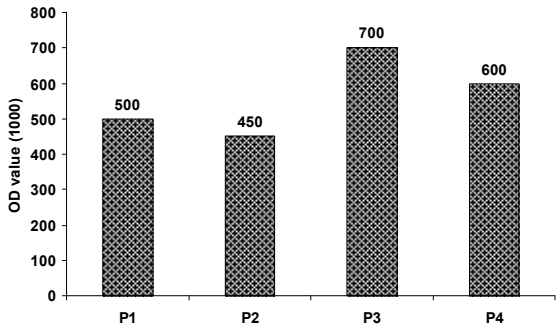
در مرحله پایانی به هر چاهک اسیدسولفوریک ۸ نرمال اضافه نمودیم تا واکنش آنزیم و سوبسترا متوقف و با اسپکتروفتومتر مخصوص دستگاه الایزا و در طول موج ۴۹۲ نانومتر، OD هر چاهک قرائت گردید. هر نمونه که نسبت به NSB (None Specific Binding) و نمونه شاهد تیتر بالاتری داشت و میزان OD آن بیشتر از Cut Off دستگاه بود؛ به‌عنوان نمونه مثبت و با علامت مشخص گردید.

از روش الایزا نقطه‌ای (DOT ELISA) برای تشخیص بیماری هیداتیدوزیس استفاده شد. ابتدا کاغذ نیتروسلولز را در ابعاد ۱/۵×۱/۵ سانتی‌متر آماده و ۴ میکرولیتر از آنتی‌ژن را در وسط کاغذ گذاشتیم. سپس آنها را در حرارت اطاق قرار دادیم تا کاملاً خشک گردید. در کلیه مراحل آزمایش از بافر تریس با توئن (TBST) (Tris Buffered Saline Pluse Tween) استفاده شد و در روش الایزا نقطه ای از آنتی‌هیومن IgG کونژوگه با پراکسیداز به‌کار رفت که سرم انسانی را توسط سولفات آمونیوم رسوب داد. سپس رسوب حاصله را در بافر فسفات حل کردیم و محلول حاصله را دیالیز کردیم تا یون های سولفات از آن جدا شدند (۱۷). مابقی محلول را از ستون سلولز DEAE عبور دادیم که فراکسیون جذب نشده را از پایین ستون برداشت نموده و در طول موج ۲۸۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خواندیم. فراکشنی که بیشترین مقدار OD را نشان داد؛ غنی از IgG بود و پس از انکوباسیون ۲ ساعته در دمای اطاق، محلول آنتی‌هیومن و پراکسیداز را مخلوط کردیم. محلول را به مدت یک ساعت در یخچال در برابر بافر PBS چندین بار دیالیز کرده و محلول نهایی کونژوگه بدین ترتیب آماده شد. از نمونه‌های سرم با بافر TNST رقت‌های ۱/۱۰۰، ۱/۲۰۰، ۱/۴۰۰، ۱/۸۰۰، ۱/۱۶۰۰ و ۱/۳۲۰۰ تهیه گردید و در پلیت‌های کوچک ریخته شد و کاغذهای نیتروسلولز را که قبلاً شماره‌گذاری کرده بودیم را درون پلیت ها ریختیم. برای هر رقت از سرم یک عدد کاغذ نیتروسلولز استفاده شد. پلیت ها را به مدت ۴۵ دقیقه بر روی دستگاه روتاتور در دمای اطاق انکوبه کردیم و مراحل شستشو را انجام دادیم. سپس سوبسترای تازه تهیه شده را بر روی کاغذ های نیتروسلولز غوطه‌ور نموده و آن را در دمای اطاق به مدت ۲۰-۱۰ دقیقه در تاریکی قرار دادیم. بعد از ۱۰ دقیقه بر روی کاغذ نیتروسلولز، در صورت وجود آنتی‌بادی ضدآنتی‌ژن‌های کیست هیداتید در نمونه سرم، به صورت تولید رنگ زرد در زمینه سفید کاغذ مشاهده گردید. رنگ ایجاد شده تا مدت ها پایدار است (۲۱). حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و منفی مایع هیداتید خام و آنتی‌ژن B تعیین گردید.

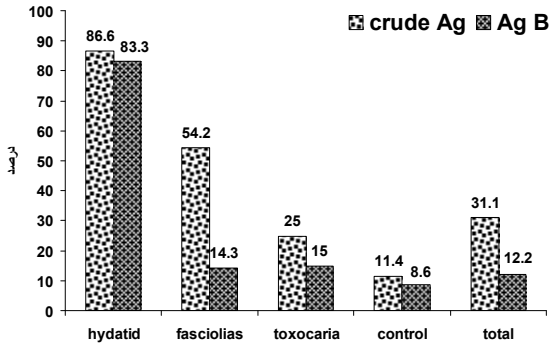
یافته‌ها

در کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون تعدادی اجزاء آنتی ژنیک با روش ژل کروماتوگرافی باسفادکس G200 به دست آمد (نمودار یک).

آنتی ژن خام : معمولاً مایع خام کیست هیداتید حاوی پروتئین، چربی، کربوهیدرات و در مجموع دارای ۲۳ جزء پروتئینی است. قابلیت نفوذ پروتئین های میزبان به داخل کیست باعث مشاهده مقداری آلبومین و گلوبولین در مایع هیداتید گردید. در SDS-PAGE باندهایی با وزن‌های مولکولی از ۸ تا بیش از ۱۵۰ کیلودالتون مشاهده شد. حضور قوی‌ترین باند در ناحیه ۶۷ کیلودالتون نشان‌دهنده وجود باند آلبومین بود.



نمودار ۱ : پیک‌های حاصل از تفکیک مایع هیداتید به روش کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون



نمودار ۲ : نتایج واکنش سرم‌های مورد آزمایش با آنتی‌ژن خام و آنتی‌ژن B مایع هیداتید به روش کانترایمنوالکتروفورز (CIEP)

آنتی‌ژن‌های گروه B : در SDS-PAGE باندهایی با وزن‌های مولکولی ۱۲، ۱۶ و ۲۴ ایجاد نمود.

آنتی‌ژن‌های حاصله با روش‌های سرولوژیک مورد بررسی قرار گرفت. آنتی ژن خام مایع هیداتید در روش کانترایمنوالکتروفورز از مجموع ۶۰ سرم بیماران مبتلا به هیداتیدوزیس، ۵۲ مورد (۸۶/۶درصد) مثبت و از مجموع ۹۰ سرم افراد کنترل شامل مبتلایان به فاسیولیازیس، توکسوکاریازیس و افراد سالم، ۲۸ مورد (۳۱/۱درصد) مثبت کاذب شد. در این میان فاسیولیازیس با ۱۹ مورد (۵۴/۲درصد) بیشترین مورد مثبت کاذب را از خود نشان داد.

آنتی‌ژن B خالص شده در روش کانترایمنوالکتروفورز از مجموع ۶۰ بیمار مبتلا به هیداتیدوزیس، ۵۰ مورد (۸۳/۳درصد) مثبت و از مجموع ۹۰ سرم افراد کنترل، ۱۱ مورد (۱۲/۲درصد) مثبت کاذب بود (نمودار ۲).

در روش کانترایمنوالکتروفورز با استفاده از پیک‌های مختلف کروماتوگرافی با آنتی‌ژن خام مایع هیداتید نتایج متفاوتی حاصل شده که در جدول یک آمده است.

برای تعیین میزان حساسیت روش کانترایمنوالکتروفورز، اقدام به تهیه سریال دوتایی شد. با این روش از رقت ۱:۸ تا ۱:۱۲۸ سرم ها، جواب‌ها مثبت بود. آنتی‌ژن مورد استفاده در این آزمایش اجزا خالص شده آنتی‌ژن B کیست هیداتید بود. البته بهترین قوس رسوبی در رقت ۱:۳۲ به‌دست آمد.

حساسیت و ویژگی آزمایش کانترایمنوالکتروفورز برای هر یک از آنتی‌ژن‌های مختلف به طور جداگانه محاسبه و مورد مقایسه قرار گرفت (جدول یک).

برای ارزیابی آنتی‌ژن خام مایع هیداتید و آنتی‌ژن خالص شده B و پیک‌های حاصل از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون با روش الایزا نتایج متفاوتی حاصل شد (جدول ۲).

آنتی‌ژن خام مایع هیداتید و آنتی‌ژن خالص شده B با رقت‌های مختلف با استفاده از روش الایزای نقطه ای مورد مقایسه قرار گرفت. رقت مناسب برای تشخیص کیست هیداتید، ۱/۸۰۰ سرم، آنتی ژن B با ویژگی ۱۰۰درصد و حساسیت ۹۸/۳درصد بود (جدول ۳).

بحث

با توجه به نتایج مطالعه حاضر با این که حساسیت آنتی ژن خام مایع کیست هیداتید با روش الایزا، در تشخیص بیماران مبتلا به کیست هیداتید ۹۳/۳درصد بود؛ ولی به علت وجود واکنش متقاطع با سرم مبتلایان به فاسیولیازیس (۴۶درصد) و توکسوکاریازیس (۱۵درصد) و افراد به ظاهر سالم (۵/۷درصد) و ویژگی کلی آن (۷۶/۷درصد) و اعتبار آزمایش حداکثر ۸۵درصد به‌دست آمد.

جدول ۱ : نتایج سرم‌های مورد آزمایش همراه با ارزش اخباری آنتی‌ژن‌های مختلف با استفاده از روش کانترایمنوالکتروفورز

نوع آنتی‌ژن		سرم‌های مورد آزمایش: هیداتیدوزیس (n=۶۰) مثبت (درصد)	هیداتیدوزیس (n=۶۰) منفی (درصد)	کنترل (n=۹۰) مثبت (درصد)	کنترل (n=۹۰) منفی (درصد)	حساسیت (درصد)	ویژگی (درصد)	اعتبار (درصد)	ارزش اخباری مثبت (درصد)	ارزش اخباری منفی (درصد)
مایع هیداتید خام		۵۲	۸	۲۸	۶۲	۸۶/۷	۶۸/۹	۷۷/۸	۶۵	۸۸/۵
کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون	P1G	۵۴	۶	۲۶	۶۴	۹۰	۷۱/۱	۸۰/۵	۶۷/۵	۹۱/۴
	P2G	۵۰	۱۰	۱۶	۷۴	۸۳/۳	۸۲/۲	۸۲/۷	۷۵/۷	۸۸
	P3G	۴۹	۱۱	۲۵	۶۵	۸۱/۷	۷۲/۲	۷۶/۹	۶۶/۲	۸۵/۵
آنتی ژن B		۵۰	۱۰	۱۱	۷۹	۸۳/۳	۸۷/۸	۸۵/۵	۸۲	۸۸/۸
کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون	P1G	۵۲	۸	۲۷	۶۳	۸۶/۷	۷۰	۷۸/۳	۶۵/۸	۸۸/۷
	P2G	۵۴	۶	۱۸	۷۲	۹۰	۸۰	۸۵	۷۵	۹۱/۱
	P3G	۵۳	۷	۲۲	۶۸	۸۸/۳	۷۵/۵	۸۱/۹	۷۰/۶	۹۰/۶

جدول ۲ : نتایج سرم‌های مورد آزمایش همراه با ارزش اخباری آنتی‌ژن‌های مختلف با استفاده از روش الایزا

نوع آنتی‌ژن		سرم‌های مورد آزمایش: هیداتیدوزیس (n=۶۰) مثبت (درصد)	هیداتیدوزیس (n=۶۰) منفی (درصد)	کنترل (n=۹۰) مثبت (درصد)	کنترل (n=۹۰) منفی (درصد)	حساسیت (درصد)	ویژگی (درصد)	اعتبار (درصد)	ارزش اخباری: مثبت (درصد)	ارزش اخباری: منفی (درصد)
مایع هیداتید خام		۵۶	٤	۲۱	٦۹	۹۳/۳	۷٦/۷	۸۵	۷۲/۷	۹٤/۵
کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون	P1G	۵۷	۳	۲۳	٦۷	۹۵	۷٤/٤	۸٤/۷	۷۱/۲	۹۵/۷
	P2G	۵٤	٦	٦	۸٤	۹۰	۹۸	۹٤	۹۰	۹۳/۳
	P3G	۵۱	۹	٦	۸٤	۸۵	۹۳/۳	۸۹/۱	۸۹/٤	۹۰/۳
آنتی ژن B		۵۳	۷	۳	۸۷	۸۸/۳	۹٦/۷	۹۲/۵	۹٤/٦	۹۲/۵
کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون	P1G	۵۷	۳	۷	۸۳	۹۵	۹۲/۲	۹۳/٦	۸۹	۸۸/۲
	P2G	۵۵	۵	۱۹	۷۱	۹۱/۷	۷۸/۹	۸۵/۳	۷٤/۳	۹۳/٤
	P3G	۵۳	۷	۲۲	٦۸	۸۸/۳	۷۵/۵	۸۱/۹	۷۰/٦	۹۰/٦

جدول ۳: حساسیت و ویژگی آزمایش الایزای نقطه‌ای بر حسب رقت‌های مختلف سرم در بیماران هیداتیدوزیس و غیرهیداتیدوزیس

نوع آنتی‌ژن		سرم‌های مورد آزمایش: هیداتیدوزیس (n=۶۰) مثبت (درصد)	هیداتیدوزیس (n=۶۰) منفی (درصد)	کنترل (n=۹۰) مثبت (درصد)	کنترل (n=۹۰) منفی (درصد)	حساسیت (درصد)	ویژگی (درصد)	اعتبار (درصد)	ارزش اخباری: مثبت (درصد)	ارزش اخباری: منفی (درصد)
مایع هیداتید خام	۱/۱۰۰	٦۰	۰	٦۷	۲۳	۱۰۰	۲۵/۵	٦۲/۷	٤۷/۲	۱۰۰
	۱/۲۰۰	٦۰	۰	٤۰	۵۰	۱۰۰	۵۵/۵	۷۷/۷	٦۰	۱۰۰
	۱/٤۰۰	٦۰	۰	۳۰	٦۰	۱۰۰	٦٦/٦	۸۳/۳	٦٦/٦	۱۰۰
	۱/۸۰۰	٦۰	۰	۱۵	۷۵	۱۰۰	۸۳/۳	۹۱/٦	۸۰	۱۰۰
	۱/۱٦۰۰	۵۰	۱۰	۳۰	٦۰	۸۳/۳	٦٦/٦	۷٤/۹	٦۲/۵	۸۵/۷
	۱/۳۲۰۰	٤۸	۱۲	٤۰	۵۰	۸۰	۵۵/۵	٦۷/۷	۵٤/۵	۸۰/٦
آنتی‌ژن B	۱/۱۰۰	٦۰	۰	۲۰	۷۰	۱۰۰	۷۷/۷	۸۸/۸	۷۵	۱۰۰
	۱/۲۰۰	٦۰	۰	۱۰	۸۰	۱۰۰	۸۸/۸	۹٤/٤	۸۵/۷	۱۰۰
	۱/٤۰۰	٦۰	۰	۳	۸۷	۱۰۰	۹٦/٦	۹۸/۳	۹۵/۲	۱۰۰
	۱/۸۰۰	۵۹	۱	۰	۹۰	۹۸/۳	۱۰۰	۹۹/۱	۱۰۰	۹۸/۹
	۱/۱٦۰۰	۵۲	۸	۰	۹۰	۸٦/٦	۱۰۰	۹۳/۳	۱۰۰	۹۱/۸
	۱/۳۲۰۰	۵۰	۱۰	۰	۹۰	۸۳/۳	۱۰۰	۹۱/٦	۱۰۰	۹۰

بنابراین به‌کارگیری آنتی‌ژن خام مایع کیست هیداتید، فقط در غربالگری اولیه ممکن است سودمند باشد و برای تشخیص نهایی و افتراقی هیداتیدوزیس از سایر عوامل انگلی و غیرانگلی که با این بیماری واکنش متقاطع دارند؛ مناسب نیست.

آزمایشات سرولوژی از جمله بهترین روش‌ها برای مطالعه تشخیصی و اپیدمیولوژیکی کیست هیداتید است که در شناسایی سریع بیماری ارزشمند است. گروهی از محققین برای استفاده تشخیصی بعد از عمل بیماران با زیرکلاس های IgG برای تشخیص موارد کیست هیداتید با انتخاب ۲۸ نمونه سرم درمان شده با جراحی و درمان دارویی به طور متوسط ۵/۶ سال سال پیگیری نمودند (۲۲). با روش الایزا و با استفاده از آنتی‌ژن خام مایع کیست هیداتید، تغییرات آنتی بادی با نتایج و علایم رادیولوژی و کلینیکی همبستگی خوبی داشت. غلظت آنتی‌بادی‌های IgG، IgG1 و IgG2 در مقایسه با IgG3 و IgG4 خیلی بالاتر بود و در طول دوره درمان آنتی بادی IgG2 بهترین همبستگی را با فعالیت بیماری نشان داد (۲۳).

محققین با روش الایزا و با استفاده از آنتی‌ژن B و ۵ و آنتی‌بادی IgG به ترتیب به حساسیت و ویژگی ۹۷ درصد و ۹۵/۷ درصد و با همین روش و آنتی‌ژن‌ها، اما با IgM به حساسیت ۳۷/۵ درصد و ویژگی ۱۰۰درصد و با IgA به حساسیت ۴۵/۵درصد و ویژگی ۹۸/۹درصد دست یافتند (۱۹).

با توجه به تشخیص سرولوژیک هیداتیدوزیس به‌طور اختصاصی‌تر؛ بعد از خالص‌سازی و تفکیک پیک‌ها، آنها را در شرایط یکسانی ارزیابی و شاخص‌های تشخیصی هر یک را به‌طور جداگانه محاسبه نمودیم. از بین اجزای مختلفی که مورد ارزیابی قرار گرفت؛ آنتی‌ژن B حاصل از روش اوریول با ۹۶/۷درصد و P1 و P2 حاصل از کروماتوگرافی ژل فیلتراسیون هر کدام با ۹۲/۲ درصد و ۷۸/۹درصد بیشترین ویژگی را در تشخیص اختصاصی هیداتیدوزیس از خود نشان دادند که با احتساب حساسیت تشخیصی ۸۸/۳درصد آنتی‌ژن B و P1 (۹۵ درصد) و حساسیت نسبتاً پایین ۸۸/۳درصد، P3 و آنتی ژن B با ۹۲/۵درصد و P1 با ۹۳/۶ درصد از

بیشترین اعتبار تشخیصی در میان اجزای مختلف برخوردار بودند. کماکان واکنش متقاطع و غیراختصاصی آنتی ژن B با روش الایزا، با سرم های مبتلایان به فاسیولیازیس و افراد سالم به میزان کلی ۳/۳درصد و P1 با روش الایزا با سرم های مبتلایان به فاسیولیازیس و توکسوکاریازیس و افراد سالم به میزان کلی ۷/۷درصد قابل مشاهده است.

در مطالعات مختلف با استفاده از فراکسیون های غنی از آنتی ژن B در روش الایزا، حساسیت و ویژگی های مختلف به‌دست آمده است (۲۴). Rogan و همکاران در یک بررسی به توسط الایزای نقطه‌ای با استفاده از فراکسیون آنتی‌ژن B، حساسیت آزمایش را حدود ۹۸درصد و ویژگی آن را ۹۶/۳درصد گزارش کردند. پایین بودن ویژگی آزمایش به خاطر وجود ۲۸ سرم مربوط به بیماران مبتلا به سیتی‌سرکوز و ۱۰ سرم مربوط به بیماران مبتلا به کیست حبابچه‌ای بود (۲۱). به خاطر نادر و محدود بودن کیست حبابچه‌ای و عدم وجود گزارشی در مورد ابتلا به سیتی سرکوز انسانی در ایران، امکان بروز واکنش متقاطع با دو انگل مذکور بسیار نادر است.

در مطالعه‌ای حساسیت و ویژگی آزمایش الایزا با استفاده از آنتی‌ژن B به ترتیب ۸۹درصد و ۸۵/۷درصد گزارش شده است (۲۵). همچنین واکنش متقاطع قابل توجه با سرم مبتلایان به کیست حبابچه ای (۵۰درصد) و سیتی سرکوز (۱۱درصد) باعث کاهش ویژگی آنتی‌ژن B با روش الایزا شده است (۱۷).

محققین با تهیه و خالص‌سازی فراکسیون خالص‌تر آنتی‌ژن B توسط الکتروالوشن و ارزیابی آن با روش الایزا، حساسیت ۶۳درصد و ویژگی ۱۰۰درصد را گزارش کرده‌اند. ویژگی بسیار بالای حاصله صرف‌نظر از این که می‌تواند ناشی از تعداد کم و نوع سرم های کنترل (مجموعا ۱۲ مورد از مبتلایان به سایر بیماری های انگلی شامل ۸ مورد شیستوزومیاز، ۴ مورد فیلاریاز و لیشمانیوز) باشد؛ بیشتر معلول کیفیت و درجه خلوص آنتی ژن B است که توسط الکتروالوشن تهیه و خالص‌سازی شده است (۱۳).

به‌هرحال نکته اساسی در مطالعات انجام شد (۱و۲و۱۵و۲۴) و نیز مطالعه Shambesh و همکاران که حساسیت و ویژگی آنتی‌ژن B را با تست الایزا در مبتلایان به کیست هیداتید کبدی به ترتیب ۸۵درصد و ۹۸درصد به‌دست آورده (۲۶)؛ این است که تاکنون دستیابی همزمان و توام به حساسیت و ویژگی بسیار بالا توسط آنتی‌ژن B با روش الایزا و یا هر آنتی‌ژن دیگر کیست هیداتید تقریباً ناممکن بوده و یکی از تلاش های اصلی این گونه مطالعات رسیدن به این هدف مهم بوده است. از این جهت نتایج منتشر شده دو مطالعه جداگانه در خصوص ارزیابی آنتی‌ژن B مایع هیداتید با همان روش‌های معمول الایزای نقطه‌ای و الایزای معمولی بدون ارایه روش و فن‌آوری جدید؛ توسط یکی از دانشمندان، حساسیت و ویژگی آنتی‌ژن B با روش الایزای نقطه‌ای به ترتیب ۱۰۰درصد و ۹۹/۵درصد و در دیگری شاخص‌های مذکور با آنتی‌ژن B در روش الایزا، به ترتیب ۱۰۰درصد و ۹۷/۵درصد گزارش شده است (۲۲).

در مطالعه‌ای آزمایش الایزای نقطه‌ای برای تشخیص سرولوژیکی بیماری هیداتید انسانی و با استفاده از آنتی‌ژن های تخلیصی فاسیولاهپاتیکا مورد ارزیابی قرار گرفت و حساسیت، ویژگی و ارزش اخباری مثبت و منفی به ترتیب ۹۷/۱درصد، ۹۸/۵درصد، ۹۷/۱درصد و ۹۸/۵درصد تعیین گردید (۱۵).

در مطالعه حاضر حساسیت و ویژگی روش الایزای نقطه‌ای در تشخیص کیست هیداتید با رقت ۱/۸۰۰ سرم به ترتیب برابر ۹۸/۳ درصد و ۱۰۰ درصد حاصل شد و در رقت‌های بالاتر از حساسیت آن کاسته شد.

آنتی‌ژن‌های گروه B در تست‌های سرولوژیکی از حساسیت و ویژگی بالایی برخوردارند. به‌علاوه به‌دست آوردن آنتی‌ژن نیز آسان بوده و نیازی به روش‌های پیچیده خالص‌سازی و حتی لیپیدزدایی نیست. لذا این آنتی‌ژن در آزمون‌های تشخیصی هیداتیدوزیس به خوبی قابل استفاده است. همچنین آنتی‌ژن‌های گروه B در آزمون الایزای نقطه‌ای از حساسیت و ویژگی بالا برخوردارند (۱۵و۲۴). نتایج حاصل از مطالعه ما نیز تایید کننده موارد فوق است.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که آنتی‌ژن B با رقت یک به ۸۰۰ سرم با بیشترین ویژگی برابر ۱۰۰ درصد و حساسیت برابر ۹۸/۳ درصد برای تشخیص آلودگی کیست هیداتید در روش الایزای نقطه‌ای مناسب است.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مصوب (۳۲/م) دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران بود و با حمایت مالی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه به انجام رسید. بدین‌وسیله از دکتر فاطمه طباطبائی و خانم فریبا درستکار به خاطر همکاری صمیمانه در اجرای مطالعه تشکر می‌نماییم.

References

1. Sadaghat Gohar H. [The epidemiologic and seroepidemiologic study of hydatid cyst in human and animal Shahriar region]. MSc Thesis in Medical Parasitology. Tehran University of Medical Sciences. 1998. [Persian]

2. Mobedi I, Dalimi Asl AH. [Hydatid cyst, epidemiology internationally and in Iran]. 1st. Tehran: Moghaddam Publication. 1993; pp: 45-64. [Persian]

3. Schantz PM, Chai J, Craig PS, Eckert J, Jenkins DJ, Macpherson CNL, et al. Epidemiology and control of hydatid disease. In: Thompson RCA, Lymbery AJ (Eds). Echinococcus

and Hydatid Disease. Wallingford: CAB International. 1995; pp: 232-47.

4. Schwartz SI, shire GT. Principles of surgery. 6th. New York: Mc Graw-Hill. 1994; pp: 1332-7.

5. Sharifi N, Ghafarzadegan K. [Hydatidosis: A rare case of bilateral tubo voavrian hydatid cyst]. J Gorgan Uni Med Sci. 2002-2003;4(10): 60-65. [Article in Persian]

6. Thompson RC. Biology and systematic of Echinococcusis and hydatid disease. Wallingford: CAB international. 1995; pp: 1-50.

7. Maleki F. [Human and parasitic Diseases]. 1st. Tehran: Iran University of Medical Sciences. 2011; pp: 127-47. [Persian]

8. Gottstein B, Reichen J. Echinococcusis / Hydatidosis. In: Cook G. Manson's Tropical disease. 20th. New York: W.B. Saunders. 1996; pp: 1486-508.

9. Biava MF, Dao A, Fortier B. Laboratory diagnosis of cystic hydatic disease. World J Surg. 2001 Jan;25(1):10-4.

10. Reiter-Owona I, Grüner B, Frosch M, Hoerauf A, Kern P, Tappe D. Serological confirmatory testing of alveolar and cystic echinococcosis in clinical practice: results of a comparative study with commercialized and in-house assays. Clin Lab. 2009; 55(1-2):41-8.

11. Khuroo MS. Hydatid disease: current status and recent advances. Ann Saudi Med. 2002 Jan-Mar;22(1-2):56-64.

12. González-Sapienza G1, Cachau RE. Identification of critical residues of an immunodominant region of Echinococcus granulosus antigen B. J Biol Chem. 2003 May;278(22):20179-84.

13. Yamano K, Goto A, Miyoshi M, Furuya K, Sawada Y, Sato N. Diagnosis of alveolar echinococcosis using immunoblotting with plural low molecular weight antigens. J Helminthol. 2009 Mar;83(1):57-61.

14. Larrieu E, Del Carpio M, Salvitti JC, Mercapide C, Sustersic J, Panomarenko H, et al. Ultrasonographic diagnosis and medical treatment of human cystic echinococcosis in asymptomatic school age carriers: 5 years of follow-up. Acta Trop. 2004 Jun;91(1):5-13.

15. Hadighi R, Mirhadi F, Rokin MB. Evaluation of a dot-ELISA for the serodiagnosis and human hydatid disease. Pak J Med Sci. 2003; 19(4): 268-71.

16. 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 hydatidpatients. Parasite Immunol. 1996 Nov;18(11):571-8.

17. Eris FN, Akisu C, Aksoy U. Evaluation of two ELISA and two indirect hemagglutination tests for serodiagnosis of pulmonaryhydatid disease. Korean J Parasitol. 2009 Dec;47(4):427-9.

18. Kemp C, Roberts A. Infectious diseases: echinococcosis (hydatid disease). J Am Acad Nurse Pract. 2001 Aug;13(8):346-7.

19. Doiz O, Benito R, Gil J, Rojas A, Rubio MC, Osuna A. Pre- and postsurgical detection of IgG, IgM, and IgA specific to hydatidosis by ELISA with purified antigen enriched with the 5/B antigen complex. J Clin Lab Anal. 2002;16(6):295-8.

20. El-Shazly AM, Saad RM, Belal US, Sakr T, Zakae HA. Evaluation of ELISA and IHAT in serological diagnosis of proven cases of human hydatidosis. J Egypt Soc Parasitol. 2010 Aug;40(2):531-8.

21. Rogan MT, Craig PS, Zeyhle E, Romig T, Lubano GM, Deshan L. Evaluation of a rapid dot-ELISA as a field test for the diagnosis of cystic hydatid disease. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1991 Nov-Dec;85(6):773-7.

22. Lawn SD, Bligh J, Craig PS, Chiodini PL. Human cystic echinococcosis: evaluation of post-treatment serologic follow-up by IgG subclassantibody detection. Am J Trop Med Hyg. 2004 Mar;70(3):329-35.

23. Golassa L, Abebe T, Hailu A. Evaluation of crude hydatid cyst fluid antigens for the serological diagnosis of hydatidosis incattle. J Helminthol. 2011 Mar;85(1):100-8.

24. Sedaghat F, Sadjjadi SM, Hosseini SV, Kazemian S, Sarkari B. Evaluation of a simple Dot-ELISA in comparison with countercurrent immunoelectrophoresis fordiagnosis of human hydatidosis. Clin Lab. 2011;57(3-4):201-5.

25. Wen H, Craig PS. Immunoglobulin G subclass responses in human cystic and alveolar echinococcosis. Am J Trop Med Hyg. 1994 Dec;51(6):741-8.

26. Shambesh MK, Craig PS, Wen H, Rogan MT, Paolillo E. IgG1 and IgG4 serum antibody responses in asymptomatic and clinically expressed cystic echinococcosis patients. Acta Trop. 1997 Apr;64(1-2):53-63.

Original Paper

Assessment of pure and B hydatid cyst fluid antigens for the diagnosis of hydatidosis

Maleki F (Ph.D)*[1], Sarafpoor S (M.Sc)[2]

[1]Associate Professor, Department of Parasitology, Paramedical Faculty, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. [2]M.Sc in Parasitology.

Abstract

Background and Objective: Hydatidosis is a chronic, zoonotic worldwide infection which induced by larval stage of Echinococcus worm. This study was done to assessment the pure and B hydatid cyst fluid antigens for the serological diagnosis of human hydatidosis.

Methods: In this descriptive laboratory study, infected liver with Hydatid cyst were obtained from Tehran's slaughterhouses to prepare cyst fluid in different stages. After draining and purifying the cyst fluid, it was centrifuged and subsequently concentrated. Specificity and sensitivity of sera samples including hydatidosis (n=60), worm parasites (n=55), fascioliasis (n=35), toxocariasissera (n=20) and negative control (n=35) were tested by Counter Immunoelectrophoresis (CIEP), ELISA and Dot ELISA methods.

Results: Specificity and sensitivity of pure antigen of hydatid cyst using CIEP method was 68.9% and 86.7%, respectively. Specificity and sensitivity of B-antigen using CIEP method was 87.8% and 83.3%, respectively. Specificity and sensitivity of pure antigen of hydatid cyst using ELISA method was 76.7%, and 93.3%, respectively. Specificity and sensitivity of B-antigen using ELISA method was 96.7% and 88.3%, respectively. Specificity and sensitivity of pure antigen of hydatid cyst using Dot ELISA method was 83.3% and 100%, respectively. Specificity and sensitivity of B-antigen using Dot ELISA method was 100% and 98.3%, respectively.

Conclusion: B-antigen using Dot ELISA method is the most suitable serological test for the diagnoses of hydatid test.

Keywords: Hydatidosis, Pure antigen, B-antigen, ELISA, Dot ELISA, Counter Immunoelectrophoresis

*** Corresponding Author: Maleki F (Ph.D), E-mail: fmaleki332@gmail.com**

Received 28 Nov 2012 **Revised** 20 May 2013 **Accepted** 25 May 2013

This paper should be cited as: Maleki F, Sarafpoor S. [Assessment of pure and B hydatid cyst fluid antigens for the diagnosis of hydatidosis]. J Gorgan Uni Med Sci. 2014; 16(2): 74-81. [Article in Persian]