جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و یکم/شماره ۲۳۷/هفته سوم تیر ماه ۱۳۹۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱/۱۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۳/۱۴

بررسی پایداری کیت ELISA آنتی‌ژن B نوترکیب اکینوکوکوس گرانولوزوس با استفاده از روش‌های فیزیکی و باکتریواستاتیک

انسیه داودآبادی[۱]، دکتر بهرام کاظمی[۲]، دکتر بهزاد حق‌پناه[۳]، دکتر مژگان بنده‌پور[۴]، مهران بهادران[۳]، مریم مرادی[۱]، ساناز غلامی[۱]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: کیست هیداتید، عامل هیداتیدوز، یک بیماری زئونوز است که توسط مرحله‌ی 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 می‌گردد که یکی از رایج‌ترین آن‌ها روش ELISA می‌باشد. یکی از ترکیبات اصلی آنتی‌ژنیک مایع کیست هیداتیک اکینوکوکوس گرانولوزوس، آنتی‌ژن B است.

روش‌ها: برای تهیه‌ی کیت، ابتدا ژن کدکننده‌ی آنتی‌ژن B در وکتور بیانی کلون و سپس، بیان و خالص گردید و در انتها، به عنوان آنتی‌ژن اصلی در چاهک‌های ELISA پوشش داده شد. در این مطالعه، با استفاده از روش‌های استاندارد، پایداری فیزیکی و باکتریواستاتیک کیت ELISA آنتی‌ژن نوترکیب مورد بررسی قرار گرفت. سنجش پایداری فیزیکی با استفاده از تست پایداری تسریع شده (نسبت Arrhenius) صورت گرفت. برای انجام، تعداد مشخصی نمونه‌ی مثبت و منفی، ابتدا با کیت مورد نظر سنجش شد؛ سپس، کیت در شرایط دمایی خاص و زمان معین قرار گرفت و بار دیگر، نمونه‌های قبلی با این کیت مورد سنجش قرار گرفت و درصد پایداری آن‌ها مشخص شد. سنجش پایداری باکتریواستاتیک، با استفاده از مواد نگه‌دارنده مانند سدیم آزاید و پروکلین ۳۰۰، در غلظت‌های متفاوت با استفاده از باکتری باسیلوس سوبتیلیس صورت گرفت. برای انجام این مرحله، ابتدا غلظت‌های متفاوت از باکتری و درصدهای متفاوت از مواد نگه‌دارنده را تهیه شد؛ سپس، به محلول‌های داخل کیت اضافه گردید و اثر ضدمیکروبی آن‌ها بررسی شد تا کمترین درصد نگه‌دارنده که بیشترین خاصیت باکتریواستاتیکی را دارد، مشخص گردید.

یافته‌ها: بر اساس تست‌های پایداری فیزیکی، کیت طراحی شده دارای پایداری یک ساله و عدم پایداری دو ساله در دمای ۸-۲ درجه‌ی سانتی‌گراد (یخچال) بود. بر اساس سنجش پایداری باکتریواستاتیک، سدیم آزاید اثر تخریبی بر روی محلول‌های داخل کیت داشت ولی، پروکلین ۳۰۰ با غلظت ۰/۰۵ درصد کمترین اثر تخریبی را دارا بود.

نتیجه‌گیری: مطالعات پایداری فیزیکی و باکتریواستاتیک انجام شده نشان داد که کیت طراحی شده با آنتی‌ژن B نوترکیب و حاوی نگه‌دارنده‌ی پروکلین ۳۰۰ با غلظت ۰/۰۵ درصد، برای مدت زمان یک سال در دمای ۸-۲ سانتی‌گراد پایدار است.

واژگان کلیدی: اکینوکوکوس گرانولوزوس، آنتی‌ژن B نوترکیب، روش‌های فیزیکی، روش‌های باکتریواستاتیک

ارجاع: داودآبادی انسیه، کاظمی بهرام، حق‌پناه بهزاد، بنده‌پور مژگان، بهادران مهران، مرادی مریم، غلامی ساناز. **بررسی پایداری کیت ELISA آنتی‌ژن B نوترکیب اکینوکوکوس گرانولوزوس با استفاده از روش‌های فیزیکی و باکتریواستاتیک.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۲؛ ۳۱ (۲۳۷): ۷۱۱-۷۰۱

* این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد به شماره‌ی ۳۹۰۲۳۹ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است.

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

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

هیداتیدوز یکی از بیماری‌های مشترک بین انسان و دام است که میزبان نهایی آن، سگ و سگ‌سانان و میزبان واسط اصلی آن، علفخواران هستند. انسان به طور اتفاقی، از طریق خوردن آب، سبزیجات، مواد غذایی و حتی لیس زدن سگ یا تماس دست با سگ و آلوده شدن دست و در نهایت، خوردن تخم این انگل آلوده می‌شود. بیماری ایجاد شده در انسان، به شدت آلودگی و محل تشکیل لارو (کیست) در بدن بستگی دارد؛ به طور کلی، کیست‌ها اغلب در کبد و ریه‌ها استقرار می‌یابند اما، اعضای دیگر بدن مانند عضلات، طحال، بافت‌های نرم، مغز استخوان و سایر نواحی هم می‌توانند از محل‌های استقرار لاروها (کیست‌ها) باشند (۲-۱).

به دلیل نداشتن علایم و نشانه‌های بالینی خاص، جهت تشخیص بیماری نیازمند تکنیک‌های تصویر برداری هستیم؛ البته این روش، بدون تأیید روش‌های سرولوژی فاقد ارزش است. تست‌های سرولوژیک، بنا به دلایلی مانند سهولت در انجام کار، مقرون به صرفه بودن و عدم نیاز به تجهیزات پیچیده، بر روش‌های رادیوگرافی ارجحیت دارند. از طرفی، تشخیص کلینیکی و پارازیتولوژیک بیماری نیز همراه با مشکلات زیادی نظیر پارگی کیست‌ها در حین جراحی و خطر انتشار بیماری هنگام نمونه برداری همراه می‌باشد؛ از آن جایی که، تشخیص سریع و صحیح بیماری در کنترل و درمان آن و جلوگیری از موارد عود ضرورت دارد، استفاده از روش‌های ایمنولوژیک، حایز اهمیت بسیار می‌باشد. از میان تکنیک‌های سرم شناسی، تست‌های ایمنوالکتروفورز، تست پوستی Casoni، IHA (Indirect haemagglutination) و IFA (Immunofluorescence antibody assay)، حساسیت و ویژگی کمتری نسبت به روش‌های ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) و Western blot جهت شناخت آنتی‌بادی‌های انگل اکینوکوکوس گرانولوزوس از خود نشان داده است. از این رو، در بررسی‌های اپیدمیولوژیک مناسب نیستند؛ البته، درستی نتایج این روش‌ها به کیفیت منابع آنتی‌ژن مورد استفاده در آن‌ها نیز بستگی دارد (۵-۳).

آنتی‌ژن B (AgB) یک پروتئین با وزن مولکولی ۱۶۰-۱۲۰ کیلودالتون است که دارای پنج زیرواحد ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۰ و ۲۴ کیلودالتونی و ترکیبی از اولیگومرهای زیرواحد کوچک این Ag با نسبت‌های متفاوت می‌باشد. اگرچه نقش این Ag در بیولوژی انگل به طور کامل مشخص نشده است اما، در فعال سازی پاسخ ایمنی در میزبان نقش به‌سزایی دارد (۶).

AgB به عنوان یک ایمنوژن قوی در بدن انسان عمل می‌کند و عملکرد آن بسیار حایز اهمیت است؛ این Ag اثر مهاری بر فعالیت و عملکرد پلی‌مورفونوکلئرها (Polymorphonuclear یا PMN) دارد و در نتیجه، باعث آسیب و اختلال در پاسخ التهابی اولیه توسط میزبان می‌شود. همچنین، این آنتی‌ژن بر روی بالانس Th1 و Th2 (T-helper) اثر می‌گذارد. در ابتدای استقرار کیست در بافت سلول‌های Th1 با تولید IFN-γ (Interferon gamma) و IL-12 (Interleukin 12) شروع به دفاع از میزبان و آسیب به انگل و تولید آنتی‌ژن می‌نماید؛ این آنتی‌ژن بر روی Th2 اثر گذاشته، در نهایت، باعث آزاد شدن IL-13 و IL-14 می‌شود (۷).

پیشرفت‌های وسیع در خالص سازی و کلونینگ و

www.mui.ac.ir

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

شناخت آنتی‌ژن‌های انگل و استفاده از زیرواحد ۱۶کیلودالتونی آنتی‌ژن B نوترکیب در تست‌های سرولوژیک جهت تشخیص هیداتیدوزیس می‌تواند راه حل مناسبی جهت بالا بردن ویژگی این تست‌ها به حساب آید؛ در ادامه تحقیق انجام‌شده توسط عبدی و همکاران برای شناسایی و تهیه‌ی آنتی‌ژن نوترکیب B جهت به کار گیری در تست ELISA و انجام تحقیقات ابتدایی در راه‌اندازی تست ELISA با آنتی‌ژن فوق (۸)، تحقیق حاضر با هدف بررسی میزان پایداری فیزیکی و باکتریواستاتیک کیت تولید شده انجام شد. این کیت، در صورتی که از پایداری مناسبی برخوردار باشد، به عنوان روش تشخیص مناسب‌تر قابل استفاده خواهد بود.

روش‌ها

ژن آنتی‌ژن B اکینوکوکوس گرانولوزوس، که به نام ژن HydI پیشتر در جایگاه شناسایی آنزیم‌های Sac I و Hind III در وکتور بیانی pET Duet کلون شده بود، در این تحقیق استفاده و در وکتور بیانی E.Coli.BL21 (Escherichia coli BL21) ترانسفورم شد (۸).

تخلیص پروتئین

از پلیت دارای کلونی باکتریایی حاوی پلاسمید نوترکیب در کنار شعله و به کمک آنس، یک کلونی برداشته و در لوله‌های شیشه‌ای حاوی محیط Luria-Bertani (LB) حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آمپی‌سیلین کشت داده شد. لوله‌ی کشت به مدت یک شب در انکوباتور Shakerدار ۳۷ درجه‌ی سانتی گراد انکوبه شد. روز بعد، استخراج پلاسمید انجام گرفت. تأیید پلاسمید با روش PCR (Polymerase chain reaction) انجام گرفت. برای بیان این ژن، پلاسمید در سلول‌های BL21 ترانسفورم شد (۹).

بیان ژن

از کلنی های باکتریایی ترانسفورم شده، یک کلنی برداشته و در لوله‌های حاوی LB مایع حاوی آمپی‌سیلین کشت داده شد و به مدت یک شب، در انکوباتور Shakerدار در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی گراد قرار گرفت. روز بعد، در لوله‌ای دیگر مقدار ۴ ml از محیط LB حاوی آمپی‌سیلین ریخته و ۴۰۰ µl از کشت شبانه به آن اضافه شد و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی گراد انکوبه گردید. پس از رسیدن کدورت محیط کشت به حدود OD = ۰/۶ (Optical density) در طول موج ۶۰۰ نانومتر (حدود ۲ ساعت)، ابتدا مقدار ۱ ml از محیط کشت به عنوان نمونه‌ی قبل از القا، نگهداری شد.

پروموتور ژن با غلظت نهایی ۱ میلی‌مولار IPTG (Isopropyl-beta-D-thiogalactoside) القا شد و بار دیگر، در انکوباتور Shakerدار قرار گرفت. ۵ ساعت پس از القا، اقدام به نمونه گیری از محیط گردید. در هر مرحله، حدود ۱ ml از محیط کشت در کنار شعله در داخل لوله‌ی اپندرف ریخته شد. نمونه‌ی جمع آوری شده، با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد و مایع رویی در لوله‌ای دیگر ریخته و به همراه رسوب، در فریزر نگهداری شد (۱۰).

تأیید بیان ژن با SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) انجام گرفت. نمونه‌ها با استفاده از بافر لیز کننده سوسپانسیون گردید و ۳۰ دقیقه بر روی یخ قرار داده شد. ۵ بار و هر بار، به مدت ۲۰ ثانیه Sonicaid شد.

www.mui.ac.ir

بعد از Sonicasion، به آن ۳ µl از PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride) اضافه شد و مدت ۵ دقیقه، با سرعت ۵۰۰۰ rpm و در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید. مایع رویی در یک لوله دیگر جمع شد و ۵ برابر حجم آن استون اضافه گشت. سپس، به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه در فریزر ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد و ۱۰ دقیقه با سرعت ۹۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. استون تخلیه شد و لوله‌ها ۲۵-۲۰ دقیقه در محیط آزمایشگاه وارونه قرار گرفت. ۲۰ µl آب دیونیزه استریل به رسوب اضافه گردید و در بن ماری ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد. ۲۰ µl از بافر نمونه به آن اضافه و Vortex گردید و نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در آب جوش قرار گرفت (۱۲). توسط سمپلر، ۲۰-۱۵ µl از نمونه‌ها برداشته و سپس، به آهستگی در داخل چاهک‌ها تخلیه شد. آن گاه، دستگاه الکتروفورز به جریان برق متصل گردید و میزان شدت جریان به ازای هر چاهک بارگیری شده، ۳ میلی‌آمپر در نظر گرفته شد. زمانی که رنگ Bromophenol blue دو سوم سطح ژل جدا کننده را طی کرد، جریان برق قطع و با استفاده از سرنگ، بافر تانک بالا و پایین تخلیه شد. ژل الکتروفورز شده از سطح شیشه جدا گردید و جهت رنگ آمیزی و مشاهده‌ی باندهای پروتئینی در داخل ظرف حاوی رنگ Coomassie blue قرار گرفت.

تخلیص پروتئین نوترکیب با روش کروماتوگرافی جذبی انجام گرفت؛ اساس این روش، بر پایه ی رزین Ni-NTA (Nickel-nitrilotriacetic acid) و اتصال آن به پروتئین‌های دارای توالی His-tag (Histidine-tag) می‌باشد. لیزات سلول از ستون عبور داده شد و پروتئین با بافرهای حاوی اوره، Tris Nacl و ایمیدازول خالص گردید (۱۱).

حجم نمونه

با استفاده از فرمول حجم نمونه، اگر درصد پایداری نمونه‌ها بین ۵۰ تا ۱۰۰ درصد نوسان داشته باشد، با فرض توزیع نرمال، حداکثر خطای ۰/۰۳ و ضریب اطمینان ۹۵ درصد، حجم نمونه برابر ۳۰ عدد محاسبه شد. ۱۵ نمونه‌ی مثبت و ۱۵ نمونه‌ی منفی مورد بررسی قرار گرفت.

ELISA

طبق نتایج حاصل از تحقیق، در مورد بررسی کاربرد پروتئین نوترکیب آنتی‌ژن B اکینوکوکوس گرانولوزوس در تست ELISA، کونژوگه با رقت ۱ در ۱۰۰۰۰ و ۱ ساعت انکوباسیون، غلظت ۲ µl/ml آنتی‌ژن و رقت ۱ در ۲۰۰ آنتی‌بادی به عنوان بهترین و مناسب‌ترین غلظت‌ها انتخاب شد. در مرحله کوتینگ، آنتی ژن تخلیص شده به میزان ۲ µl/ml در بافر کربنات بی‌کربنات (pH = ۹/۶) رقیق گردید و ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت مذکور، به تمام چاهک‌های میکروپلیت اضافه شد. پلیت با استفاده از کاغذ شفاف پوشانده و به مدت ۱۸-۱۶ ساعت در ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس، سه بار شستشو انجام گرفت.

در مرحله‌ی Blocking، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول Blocking که حاوی نگه‌دارنده پروتئین تجاری (Blocker BSA Blocking Buffer) از شرکت Thermo بود، با میکروپیپت ۸ شاخه در تمام چاهک‌ها ریخته شد. پلیت با کاغذ شفاف پوشانده و به مدت ۲ ساعت در دمای محیط انکوبه شد. سپس، سه بار شستشو انجام گرفت.

در مرحله‌ی انجام تست‌ها، ۱۵ نمونه‌ی مثبت و ۱۵ نمونه‌ی منفی از یخچال خارج و در حرارت اطاق قرار داده شد. رقت ۱ به ۲۰۰ سرم‌ها در بافر Reagent Diluent تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر از سرم‌ها به چاهک‌ها اضافه شد؛ سپس، پلیت با استفاده از کاغذ مات پوشانده و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی بر روی Shaker با دور ۸۰ rpm انکوبه گردید. سه بار شستشو انجام گرفت .

در مرحله بعد کونژوگه نشاندار شده را با رقت ۱/۱۰۰۰۰۰ تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر به تمام چاهکها اضافه شد.پلیت با کاغذ مات پوشانده شدو به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد در فضای تاریک بر روی Shaker با دور ۸۰ rpm انکوبه شد. آن گاه، سه بار شستشو انجام گرفت و بار دیگر، با ضربه زدن بر روی کاغذ یا پارچه‌ای تمیز، اضافی مایعات به طور کامل خارج گردید. ۵۰ میکرولیتر سیترات سدیم حاوی TMB (۳,۳',۵,۵'-Tetramethylbenzidine) و ۵۰ میکرولیتر اسید سیتریک به تمام چاهک‌ها اضافه شد. پلیت به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه در دمای اتاق و محیط تاریک قرار گرفت. پس از این زمان، ۵۰ میکرولیتر از محلول اسید سولفوریک یک مولار به تمامی چاهک‌ها اضافه گردید و پلیت در دستگاه پلیت خوان قرار گرفت و در طول موج ۴۵۰ نانومتر، OD چاهک‌ها به دست آورده شد.

تخمین Cut-off point

۳۰ عدد سرم منفی و ۳۰ عدد سرم مثبت، که پیشتر با کیت تجاری Euroimmun منفی بودن آنها تأیید شده بود، جهت تعیین Cut-off point، با رقت ۱ به ۲۰۰ استفاده شد. با استفاده از منحنی ROC (Receiver operating characteristic) در نرم‌افزار SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL)، با توجه سطح زیر منحنی، Cut-off point برابر ۰/۱۹۹ با حساسیت ۹۷ و اختصاصیت ۹۰ درصد تخمین زده شد.

بررسی پایداری فیزیکی کیت طراحی شده

به این منظور، به دو روش عمل شد؛ روش اول: ۳۰ نمونه‌ی مثبت و منفی در زمان شروع با کیت طراحی شده اندازه‌گیری وجذب نوری اولیه‌ی آنها ثبت شد. برای تعیین پایداری یک و دو ساله در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، کیت به مدت ۳۰ و ۶۰ روز در دمای ۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت؛ به منظور بررسی پایداری یک و دو ساله در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد نیز کیت به مدت ۷ و ۱۴ روز در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از طی زمان‌های فوق، بار دیگر نمونه‌ها اندازه‌گیری و جذب نوری ثانویه‌ی آنها ثبت شد و با استفاده از فرمول زیر درصد پایداری هر نمونه، کل نمونه‌ها و میزان کاهش پایداری کیت به دست آمد. اگر میزان افت آن تا ۱۰ درصد بود، یعنی ۹۰ درصد ماده‌ی مؤثر اولیه باقی مانده و کیت قابل قبول بود.

$$\text{درصد پایداری هر نمونه} = \frac{\text{جذب نوری ثانویه}}{\text{جذب نوری اولیه}}$$

$$\text{درصد پایداری کل نمونه‌ها} = \frac{\text{میانگین جذب نوری ثانویه}}{\text{میانگین جذب نوری اولیه}}$$

روش دوم: استفاده از نسبت Arrhenius و فرمول نیمه عمر بود که در زیر آمده است.

$$K = Ae^{-Ea/RT}$$

$$\text{نیمه عمر}\ C_{i=}\ C_0\ e^{kjti}$$

$$k_{norm} = e^{(a+\frac{b}{Tnorm})}$$

$$\text{مدت زمان پایداری}\ t_{stab} = -\frac{\ln\left(\frac{c_i}{c_0}\right)}{k_{norm}}$$

در این فرمول‌ها، K نشانه‌ی Degradation rate، A نشانه‌ی Arrhenius factor، Ea به معنی Activation energy بر حسب kcal/mol، R نشانه‌ی Gas constant، T به معنی Temperature بر حسب کلوین، C_i نشانه‌ی Measured content در زمان T_i، C_0 نشانه‌ی Starting measured content در زمان T_0، k_j نشانه‌ی Degration reaction constant در دمای T_j و a و b شیب خط و عرض از مبدأ می‌باشند که با استفاده از منحنی رگرسیون به دست آورده می‌شود؛ T_{norm} هم زمانی است که در آن، مدت زمان پایداری سنجیده می‌شود.

برای استفاده از این نسبت، یکی از نمونه‌ها ابتدای کار با کیت تولید شده، بررسی گردید؛ سپس، با قرار دادن کیت در دماهای مختلف (۳۷، ۴۰ و ۴۲ درجه‌ی سانتی‌گراد) و در روزهای متفاوت (۷، ۱۴ و ۲۱) بار دیگر نمونه بررسی شد و نیمه عمر کیت تولیدی محاسبه شد.

بررسی پایداری باکتریواستاتیک کیت طراحی شده

برای شروع، لازم بود میزان حداقل غلظت مهار کنندگی (Minimum inhibitory concentration یا MIC) نگه‌دارنده‌ها در مقابل باسیلوس سوبتیلیس مشخص شود (۱۲).

ابتدا در ۱۰ لوله‌ی استریل، از هر کدام از نگه‌دارنده‌ها (سدیم آزاید یا پروکلین ۳۰۰) سری رقت از ۰/۴ تا ۰/۰۰۱ تهیه و به همه‌ی لوله‌ها، یک میلی‌لیتر محیط Thioglycollate broth اضافه شد. سپس، از سوسپانسیون میکروبی باسیلوس سوبتیلیس، که حاوی غلظتی معادل McFarland ۰/۵، که برابر $1/5 \times 10^8$ CFU/ml باکتری می‌باشد، به هر لوله یک میلی‌لیتر اضافه گردید. بسته به این که، کدام یک از محلول‌های داخل کیت (Wash، Serum Diluent و Enzyme conjugate) مورد آزمایش باشد، به به تمام لوله‌ها یک میلی‌لیتر از آن محلول اضافه شد. لوله‌ها به مدت ۲۰-۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردید. بعد از طی زمان فوق، لوله‌ها از نظر کدورت بررسی شد. حداقل غلظتی از ماده‌ی نگه‌دارنده که رشد باکتری را مهار کرده بود و لوله‌ی شفاف مشخص گردید و MIC از روی آن محاسبه شد (۱۳).

کمترین غلظت ممکن برای هر دو نگه‌دارنده برای هر سه محلول فوق ۰/۰۵ درصد در نظر گرفته شد. این غلظت از هر دو نگه‌دارنده به محلول‌های داخل کیت اضافه شد و همراه تست‌های پایداری فیزیکی، اثر هر دو نگه‌دارنده بر روی ماده‌ی مؤثر محلول‌های کیت بررسی گردید. در مرحله‌ی شروع، تمام نمونه‌ها با محلول‌های حاوی هر دو نگه‌دارنده بررسی شد؛ بعد از ۷ و ۱۴ روز در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد نیز بار دیگر بررسی انجام گردید. نتایج در سه زمان، با یکدیگر مقایسه و درصد تأثیر آن‌ها بر جواب‌های هر مرحله بررسی شد.

یافته‌ها

پس از طی همه‌ی مراحل برای تعیین پایداری فیزیکی کیت تولید شده به روش اول، نتایج جدول شماره‌ی ۱ حاصل شد.

و با روش دوم و با استفاده از نسبت Arrhenius، مدت زمان محاسبه شده برای دمای ۸-۲ درجه‌ی سانتی‌گراد (یخچال) ۴۱۰ روز و مدت زمان به دست آمده برای دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد (اتاق) ۲۵ روز بود.

جدول ۱. درصدهای پایداری کیت ELISA تولید شده به روش اول

درصد پایداری کل	درصد پایداری نمونه‌ها	نوع نمونه	دما (درجه‌ی سانتی‌گراد)	زمان (روز)
۹۲/۳	۹۳/۳	۱۵ نمونه‌ی مثبت	۳۷	۷
	۹۱/۳	۱۵ نمونه‌ی منفی		
۵۱/۸	۵۷/۶	۱۵ نمونه‌ی مثبت	۳۷	۱۴
	۴۶/۰	۱۵ نمونه‌ی منفی		
۲۲/۶	۱۴/۲	۱۵ نمونه‌ی مثبت	۵۰	۳۰
	۳۱/۰	۱۵ نمونه‌ی منفی		
۵/۲	۸/۰	۱۵ نمونه‌ی مثبت	۵۰	۶۰
	۲/۳	۱۵ نمونه‌ی منفی		

در تعیین پایداری باکتریواستاتیک در زمان تولید کیت، درصد جواب‌دهی نمونه‌های مثبت با سدیم آزاید برابر ۲۶/۶ و با پروکلین ۳۰۰ برابر ۱۰۰ درصد بود. درصد جواب‌دهی نمونه‌های مثبت بعد از ۷ روز با سدیم آزاید برابر صفر و با پروکلین ۳۰۰ برابر ۹۳ درصد به دست آمد؛ پس از ۱۴ روز هم، درصد جواب‌دهی نمونه‌های مثبت با سدیم آزاید برابر صفر و با پروکلین ۳۰۰ برابر ۶۶ درصد محاسبه شد.

بحث

در این تحقیق، با بیان مجدد AgB نوترکیب (HydI/pET Duet) و تخلیص آن برای تعیین کاربرد این آنتی‌ژن در تشخیص هیداتیدوز به روش ELISA (طبق پروتکل ذکر شده) عمل شد.

با توجه به اهمیت بهداشتی و اقتصادی هیداتیدوز و آسیب‌های قابل توجه آن در هر دو میزبان (انسان میزبان اتفاقی و علف‌خواران میزبان طبیعی) تشخیص سریع و به موقع این بیماری ضروری است (۱۴).

کارایی این تست‌ها، به اختصاصیت آنتی‌ژن‌های انگلی مورد استفاده در آن‌ها بستگی دارد. مطالعات مختلف نشان داده است که تست‌های سرولوژیک با استفاده از آنتی‌ژن B، دارای حساسیت و ویژگی بالایی می‌باشد و یک منبع آنتی‌ژنی مرجع برای تشخیص هیداتیدوز انسانی به شمار می‌رود (۱۶-۱۵).

کلانتری و همکاران توانستند از AgB نوترکیب و تخلیص شده (HydI/pQE-30) با وزن مولکولی ۲۴ کیلودالتون در کیت ELISA استفاده کنند و به حساسیت ۹۱/۶۶ و اختصاصیت ۹۰/۱۶ درصد دست یابند (۱۷).

عبدی و همکاران نیز AgB نوترکیب با وزن مولکولی ۱۶ کیلودالتون را در وکتور pET Duet کلون کرده، به حساسیت ۹۳/۵ و اختصاصیت ۹۵/۶ درصد دست یافتند (۸).

Magari و همکاران به بررسی پایداری محلول شمارش گلبول سفید دستگاه Coulter Hmx پرداختند. آن‌ها با استفاده از تست‌های پایداری تسریع شده و نگهداری محلول مورد نظر در دماهای مختلف و ثبت تغییرات آن و نیز بررسی اطلاعات به دست آمده با استفاده از نسبت Arrhenius و رگرسیون خطی، به این نتیجه رسیدند که مدت زمان پایداری این محلول در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد (اتاق) برابر ۱۶۴ روز و در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد (یخچال) برابر ۳۲۶ روز است؛ در این زمان، ۹۴ درصد ماده‌ی مؤثر محلول باقی مانده بود (۱۸).

در تحقیقی دیگر، De Vore با استفاده از آمار و بیوشیمی در زمینه‌ی استفاده از تست‌های تسریع شده، به این نتیجه رسید که می‌توان مدت زمان استفاده از محلول‌های IVD (In vitro diagnostic) را با این روش به دست آورد (۱۹).

Hornback نیز در مطالعه‌ای که در زمینه‌ی تست‌های پایداری تسریع شده بر روی محلول‌های IVD انجام داد، استفاده از این تست‌ها را برای مشخص شدن زمان انقضای این محلول‌ها در کارخانه‌های تولید کننده مفید و لازم دانست؛ بر اساس این تست‌ها می‌توان به سادگی به زمان انقضای محلول‌ها دست پیدا کرد (۲۰).

در مطالعه‌ای که توسط Morris بر روی محلول‌های دارویی صورت گرفت، تغییرات ماده‌ی مؤثر این محلول‌ها به صورت خطی بود؛ وی با استفاده از این تغییرات خطی و نسبت Arrhenius توانست تاریخ انقضای این محلول‌ها را به دست آورده، کاهش ماده‌ی مؤثر آن‌ها را ۱۵ درصد تخمین زد (۲۱).

در این مطالعه، با توجه به استانداردهای جهانی و محاسبه‌ی درصد پایداری هر نمونه و مجموع درصد پایداری نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، کیت تولیدی بعد از ۷ روز قرار گرفتن در این دما، ۹۲/۳ درصد پایداری داشت؛ به این معنی که، ۹۲/۳ درصد ماده مؤثر محلول‌های داخل کیت، باقی مانده بود؛ این میزان، معادل یک سال پایداری در دمای یخچال می‌باشد.

کیت تولیدی، در مدت زمان ۱۴ روز نیز ۵۱/۸ درصد پایداری داشت که نشان می‌دهد، این کیت در دمای یخچال برای مدت زمان دو سال پایداری کافی را دارا نمی‌باشد؛ یعنی حدود ۵۰ درصد ماده‌ی مؤثر خود را از دست می‌دهد.

همچنین، با محاسبه‌ی درصد پایداری نمونه‌ها در دمای ۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد در دو زمان متفاوت، کیت تولیدی بعد از ۳۰ روز، ۲۲/۶ درصد و بعد از ۶۰ روز، ۵/۲ درصد پایداری داشت؛ بنابراین، کیت تولیدی در دمای اتاق، برای مدت زمان یک و دو سال پایداری کافی را دارا نمی‌باشد.

در روش دوم، با توجه به محاسبات انجام شده به وسیله‌ی نسبت Arrhenius، کیت تولید شده دارای ۴۱۰ روز پایداری در دمای یخچال و ۳۳ روز پایداری در دمای اتاق بود که تأیید کننده‌ی روش اول می‌باشد.

برای تعیین پایداری باکتریواستاتیک کیت تولیدی، با انجام تست‌ها برای هر دو نگه‌دارنده‌ی مورد سنجش و محاسبه‌ی درصد اثر آن‌ها بر کیت، مشخص شد که سدیم آزاید اثر مخربی بر محلول‌های کیت دارد؛ چرا که، درصد جواب‌دهی کیت با این نگه‌دارنده در زمان شروع تست ۵ درصد بود و در مراحل بعدی به صفر نزول پیدا کرد. به نظر می‌رسد، سدیم آزاید با یکی از ترکیبات موجود در محلول‌های کیت وارد واکنش شده، ماده‌ی مؤثر آن را از بین می برد. ماده اصلی هر سه محلول (شستشو، آنزیم کونژوگه و رقیق کننده‌ی سرم) داخل کیت، PBS است؛ احتمال داده می‌شود که اثر تخریبی سدیم آزاید بر روی این ماده باشد. بنابراین، استفاده از آن توصیه نمی‌شود.

ولی، پروکلین ۳۰۰ با غلظت ۰/۰۵ درصد در زمان شروع تست، جواب‌دهی معادل ۹۳ درصد را دارا بود و در مراحل بعد نیز، این درصد را حفظ کرد؛ بنابراین، برای محلول‌های این کیت، نگه‌دارنده‌ی پروکلین ۳۰۰ با غلظت فوق، قابل قبول خواهد بود.

نتیجه‌گیری

به طور کلی، از مقایسه‌ی نتایج به دست آمده در این تحقیق با مطالعات قبلی انجام شده در زمینه‌ی استفاده از تست‌های پایداری فیزیکی و باکتریواستاتیک بر روی کیت ELISA تولید شده با AgB نوترکیب اکینوکوکوس گرانولوزوس مشخص شد که، این کیت دارای پایداری یک ساله در دمای ۸-۲ درجه‌ی سانتی‌گراد می‌باشد؛ اگر، در مراحل تولید آن دقت بیشتری صورت گیرد، ممکن است این مدت، به دو سال نیز برسد. در صورتی که، به محلول‌های داخل کیت، نگه‌دارنده‌ی پروکلین ۳۰۰ با غلظت ۰/۰۵ درصد اضافه شود، اثر تخریبی آن بر ماده‌ی مؤثر محلول‌ها بسیار کم است و بالای ۹۰ درصد ماده‌ی مؤثر، در طول دوره یک سال، حفظ خواهند شد.

تشکر و قدردانی

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

References

1. Athari A, Ansari N, Ourmazdi H, Bijan H, Janbakhsh B, Haghighi A. Essential of medical helminthology-manifestation and treatment of the diseases. 1st ed. Tehran, Iran: Noor Danesh Publication; 2003. [In Persian].
2. Arfaa F. Medical helmintology. 5th ed. Tehran, Iran: Keshavarz Publication; 2002. [In Persian].
3. Ghafarifar F, Dalimi-Asl A, Jalosian F. Evaluation of DIG-ELISA for diagnosis of human hydatidosis. Journal of Medical Science: Pathobioligy 2001; 4(3-4): 145-56. [In Persian].
4. Salami SH, Dalimi A, Madani R. Invention and evaluation of dot ELISA for human hydatidosis diagnosis. Daneshvar Med 1999; 6(24): 37-40. [In Persian].
5. Thompson RC, Lymbery AJ. Echinococcus and hydatid disease. New York, NY: CABI; 1995. p. 411-63.
6. 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.
7. Rigano R, Profumo E, Bruschi F, Carulli G, Azzara A, Ioppolo S, et al. Modulation of human immune response by Echinococcus granulosus antigen B and its possible role in evading host defenses. Infect Immun 2001; 69(1): 288-96.
8. 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.
9. Sambrook JJ, Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. Long Island, NY: CSHL Press; 2001. p. 1-3.
10. Promega. Instructions for use of product p2211 and 2551. Technical Bulleint No.253 [Online] 2006. Available from: URL: http://www.yrgene.com/sites/default/files/documents/vector/tb253.pdf
11. Bandehpour M, Seyed N, Shadnoush M, Pakzad P, Kazemi B. Using recombinant Chlamydia major outer membrane protein (MOMP) in ELISA diagnostic kit. Iran J Biotech 2006; 4(4): 239-44.
12. Wang Y, Schwarz S, Shen Z, Zhang W, Qi J, Liu Y, et al. Co-location of the multiresistance gene cfr and the novel streptomycin resistance gene aadY on a small plasmid in a porcine Bacillus strain. J Antimicrob Chemother 2012; 67(6): 1547-9.
13. Vasanthakumari R. Textbook of microbiology. In: Baron EJ, Peterson LR, Finegold SM, Editors. Bailey and Scott's diagnostic microbiology. New Delhi, DL: BI Publications Pvt Ltd; 2007.
14. Müller R. Worms and human disease. Uganda, Africa: CABI; 2002. p. 85-93.
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. Sarkari B, Sadjjadi SM, Abidi H, Izadpanah A, Kazemian S, Rafati A. Application of Western Blotting Using Native Antigen B for Serodiagnosis of Human Cystic Echinococcosis. Iranian Journal of Parasitology 2007; 2(3): 7-12.

17. 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.

18. Magari RT, Murphy KP, Fernandez T. Accelerated stability model for predicting shelf-life. J Clin Lab Anal 2002; 16(5): 221-6.

19. De Vore K. Have more confidence in your stability data: two points to consider. J Pharm Biomed Anal 2006; 41(1): 293-8.

20. Hornback LA. Stability testing for IVDs [Online] 2004; Available from: URL: http://www.ivdtechnology.com/article/stability-testing-ivds/

21. Morris JW. A comparison of linear and exponential models for drug expiry estimation. J Biopharm Stat 1992; 2(1): 83-90.

Journal of Isfahan Medical School Received: 08.04.2013

Vol. 31, No. 237, 3rd Week, July 2013 Accepted: 04.06.2013

Stability Determination of Recombinant Echinococcus Granulosus Antigen B Kit by Physical and Bacteriostatical Methods

Ensiyeh Davoudabadi[1], Bahram Kazemi PhD[2], Behzad Hagh-Panah MD[3], Mojgan Bandehpour PhD[4], Mehran Bahadoran MSc[3], Maryam Moradi[1], Sanaz Gholami[1]

Original Article

Abstract

Background: Cystic hydatidosis disease (CHD) is a common disease of human and animal caused by contamination with the metacestode stage of echinococcus granulosus. The disease causes cyst in tissue body of patients. Antigen B is one of the important antigens in liquid cyst.

Methods: Expressed and purified recombinant antigen of echinococcus granulosus was used as antigen in ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) method. The handmade kit was studied with physical and bacteriostatical methods. Physical stability was assessed with accelerated stability test (Arrhenius equation). First, numeral negative and positive samples were evaluated; then, the kit was exposed in special temperatures and times; afterwards, the samples were evaluated again and compared with the first evaluation. Proclin300, Soduim azide and Bacillus subtilis were chosen in bacteriostatic method. Different concentration of bacillus and different percents of preservatives were added to solutions of the kit. Growth of bacteria was evaluated and the least percent of preservatives that had the most effect of bacteriostatic was determinated.

Findings: According to stability test, the handmade kit had one-year stability and do not have stability for two years in the 2-8°C tempreture. Sodium azide had destructive effect on solutions of the kit; but, proclin300 with the concentration of 0.05% was appropriate for solutions.

Conclusion: Stability and bacteriostatic methods showed that the handmade kit can be maintained in 2-8°C with significant activity.

Keywords: Echinococcus granulosus, Enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa), Recombinant antigen B, Physical methods, Bacteriostatic methods

Citation: Davoudabadi E, Kazemi B, Hagh-Panah B, Bandehpour M, Bahadoran M, Moradi M, et al. **Stability Determination of Recombinant Echinococcus Granulosus Antigen B Kit by Physical and Bacteriostatical Methods.** J Isfahan Med Sch 2013; 31(237): 701-11

* This paper is derived from a MSc thesis No. 390239 in Isfahan University of Medical Sciences.

1- MSc Student, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Professor, Cellular and Molecular Biology Research Center AND Department of Biotechnology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3- Assistant Professor, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
4- Assistant Professor, Cellular and Molecular Biology Research Center AND Department of Biotechnology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Corresponding Author: Ensiyeh Davoudabadi, Email: davoudiensiyeh@yahoo.com