کومش- جلد ۱۳، شماره ۳ (پیاپی ۴۳)، بهار ۱۳۹۱

طراحی روش الایزا جهت سنجش آنتی‌بادی ضد استرپتولیزین– O بر پایه پروتئین نوترکیب استرپتولیزین– O

قاسم مسیبی [۱](Ph.D)، حمید ابطحی [۱*](Ph.D)، علی قضاوی [۲](M.Sc)، نادر زرین‌فر [۳](M.D)، محسن خاکی [۴](M.Sc)، محمدعلی پایانی [۴](B.S)

۱- دانشگاه علوم پزشکی اراک، دانشکده پزشکی و عضو مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی، گروه میکروب‌شناسی و ایمنی‌شناسی

۲- دانشگاه علوم پزشکی اراک، دانشکده پزشکی و عضو مرکز تحقیقات عفونی، گروه میکروب‌شناسی و ایمنی‌شناسی

۳- دانشگاه علوم پزشکی اراک، دانشکده پزشکی، گروه عفونی

۴- دانشگاه علوم پزشکی اراک، دانشکده پزشکی، گروه میکروب‌شناسی و ایمنی‌شناسی

چکیده

سابقه و هدف: باکتری استرپتوکوک بتا همولیتیک گروه A اصلی‌ترین عامل عفونت‌های گوش و حلق و بینی می‌باشد. عدم درمان یا تاخیر در اقدامات درمانی، منجر به اختلالات جدی مانند تب روماتیسمی حاد و گلومرونفریت می‌شود. اندازه‌گیری آنتی‌بادی ضد استرپتولیزین-O به عنوان یک مارکر در تشخیص این عفونت کاربرد دارد. تهیه استرپتولیزین از محیط کشت باکتری وقت‌گیر و همراه با آلودگی است. در این مطالعه جهت اندازه‌گیری آنتی‌بادی ضد استرپتولیزین-O از استرپتولیزین-O نوترکیب به عنوان آنتی‌ژن در طراحی روش الایزا استفاده شد.

مواد و روش‌ها: ژن استرپتولیزین-O از استرپتوکک پیوژن با روش پلیمراز زنجیره‌ای تکثیر گردید. ژن فوق در ناقل پلاسمیدی pET28a کلون گردید و وارد باکتری اشریشیاکلی سویه BL21-DE3-plySs شد. تولید پروتئین با القا توسط IPTG و بهینه‌سازی شرایط صورت گرفت. پروتئین نوترکیب در غلظت‌های مختلف در میکروپلیت الایزا پوشانده شد. نمونه‌های سرمی بیماران در رقت‌های مختلف اضافه شد. میزان آنتی‌بادی ضد استرپتولیزین با روش آنزیمی الایزا اندازه‌گیری شد. نتایج با روش مهار همولیز مورد مقایسه و تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج حاصل از سنجش آنتی‌بادی ضد استرپتولیزین-O به روش الایزا با روش مهار همولیز نشان داد که هم‌بستگی معنی‌داری بین دو روش وجود دارد (r=۰/۹۷، p=۰/۰۰۰۱). هم‌چنین حساسیت و ویژگی الایزای طراحی شده با پروتئین نوترکیب به ترتیب ۱۰۰ و ۸۳ درصد بود.

نتیجه‌گیری: روش الایزای طراحی شده بر اساس پروتئین نوترکیب دارای حساسیت و ویژگی قابل قبولی است که می‌توان این روش را جای‌گزین روش مهار همولیز کرد.

واژه‌های کلیدی: استرپتوکک پیوژن، استرپتولیزین-O نوترکیب، الایزا، آنتی‌بادی ضد استرپتولیزین-O

مقدمه

استرپتوکک‌های گروه A لانسفیلد عامل بسیاری از عفونت‌های چرکی در انسان می‌باشند. مهم‌ترین عوارض ناشی از این باکتری‌ها در انسان شامل سلولیت، لنفانژیت، گلودرد چرکی، باد سرخ و زرد زخم می‌باشد. این باکتری‌ها هم‌چنین باعث بروز عوارض دیررس غیر چرکی از جمله تب روماتیسمی و گلومرولونفریت در انسان می‌شوند [۲،۱]. تشخیص عفونت‌های استرپتوککی بر دو پایه کشت (جداسازی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۴۱۷۳۵۰۲-۰۸۶۱ نمابر: ۴۱۷۳۵۲۱-۰۸۶۱

Email: habtahi2001@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۱/۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۶/۲۹

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-05-08]

باکتری) و تست‌های سرولوژیک استوار است. یکی از مهم‌ترین آنتی‌ژن‌هایی که در آزمایشات سرولوژیک جهت تشخیص مورد استفاده قرار می‌گیرد استرپتولیزین-O ترشح شده از باکتری است [۳]. سنجش و تعیین تیتر آنتی‌بادی بر علیه استرپتولیزین علاوه بر تشخیص عفونت، به ارزیابی سیر بیماری نیز کمک می‌کند [۴]. روش‌های مختلفی جهت سنجش آنتی‌بادی ضد استرپتولیزین وجود دارد. یکی از روش‌های رایج، روش مهار همولیز است [۵]. در این روش در صورت عدم وجود آنتی‌بادی در سرم بیماران، گلبول قرمز در لوله آزمایش توسط استرپتولیزین لیز می‌شود. این روش هر چند از حساسیت نسبتاً خوبی برخوردار است ولی وقت‌گیر و باعث مصرف زیاد استرپتولیزین می‌گردد. هم‌چنین به خاطر خطاهای پاراکلینیک و لیز گلبول قرمز امکان تداخل در آزمایش وجود دارد. تا کنون تلاش جهت طراحی کیت تشخیص آنتی‌بادی ضد استرپتولیزین-O بر پایه الایزا توسط برخی محققین انجام شده است. در سال ۱۹۸۶ برای اولین بار از روش الایزا (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)جهت سنجش آنتی‌بادی ضد استرپتولیزین-O استفاده شد [۶]. Moscoso و همکاران (۱۹۸۹) نیز از روش ELISA جهت سنجش کمی آنتی‌بادی ضد استرپتولیزین-O استفاده نمودند. بررسی انجام شده بر روی ۱۳۷ نمونه نشان داد که هم‌بستگی خوبی بین این روش و روش استاندارد (مهار همولیز) وجود دارد [۷]. در این مطالعات از پروتئین استرپتولیزین-O به‌دست آمده از کشت باکتری‌ها استفاده گردید. تهیه استرپتولیزین از طریق کشت نیز پرهزینه می‌باشد و در صورتی که پروتئین به خوبی خالص نشود امکان واکنش مثبت کاذب وجود دارد. امروزه جهت تولید پروتئین‌ها از روش‌های مهندسی ژنتیک (نوترکیب) استفاده می‌شود. مقدار و خلوص پوتئین‌های به‌دست آمده از روش نوترکیب در مقایسه با روش‌های خالص‌سازی بهتر می‌باشد. تنها مطالعه‌ای که از استرپتولیزین-O نوترکیب جهت سنجش آنتی‌بادی ضد استرپتولیزین-O استفاده گردید، تحقیقی بود که در سال ۲۰۰۵ توسط Velazquez و همکاران انجام شد [۸]. در این مطالعه از وکتور pGEX-2T حاوی پروتئین الحاقی استفاده شد [۸]. از معایب وکتور حاوی پروتئین الحاقی، اضافه شدن یک پروتئین به پروتئین نوترکیب اصلی است که باعث افزایش وزن مولکولی و ممکن است سبب تغییر در ساختار پروتئین شود. ممکن است این پروتیئن باعث واکنش متقاطع با برخی آنتی‌بادی‌های بدن شود و باعث کاهش حساسیت روش گردد. با توجه به مشکلات و معایب استفاده از استرپتولیزین تخلیص شده از کشت و هم‌چنین معایب وکتورهای حاوی پروتین الحاقی در تولید فرم نوترکیب استرپتولیزین-O، در این مطالعه جهت طراحی الایزا از استرپتولیزین-O نوترکیب به‌دست آمده از وکتور بدون پروتئین الحاقی (ناقل پلاسمیدی pET28a) جهت سنجش آنتی‌بادی ضد استرپتولیزین-O استفاده شد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق با استفاده از ناقل پلاسمیدی pET28a تولید استرپتولیزین-O بدون پروتئین الحاقی تولید گردید [۹]. به طور خلاصه، DNA باکتری استرپتوکوک پیوژن بر اساس روش CTAB/NaCl جدا شد. پرایمرهای اختصاصی جهت ژن استرپتولیزین-O طراحی گردید و پس از تکثیر ژن با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) ژن در دو پلاسمید pSKوpET28a کلون شد و به ترتیب وارد سلول مستعد اشریشیاکلی سویه DH50 و BL21-DE3-plySs گردید. تایید ترادف ژن با روش سنگر (Sanger) توسط شرکت آلمانی MWG صورت گرفت. تولید پروتئین استرپتو لیزین-O توسط اشریشیاکلی سویه BL21-DE3-plySs تراریخت شده با پلاسمید pET28 α-SLO در محیط حاوی IPTG انجام شد. پروتئین استرپتو لیزین-O با استفاده از کیت Ni-NTA خالص و جهت تایید پروتئین از روش وسترن بلات استفاده گردید.

پروتئین استرپتو لیزین-O در غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در بافر فسفات سالین با حجم ۱۰۰ میکرولیتر به حفره‌های پلیت الایزا (Nunc, Maxsorb, Denmark) اضافه شد. پلیت پوشیده شده با پروتئین نوترکیب استرپتو لیزین-O به مدت یک شب

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-05-08]

در دمای ۴ درجه انکوبه شد. و سپس سه بار با بافر شستشو (بافر فسفات سالین حاوی ۰/۵ درصد (Tween20) شسته شد. جهت بلوکه کردن از فسفات سالین حاوی ۱ درصد آلبومین گاوی (BSA) استفاده شد. حجم ۲۰۰ میکرولیتر از این بافر به هر حفره اضافه و سپس یک ساعت در دمای آزمایشگاه انکوبه گردید. مجدداً پلیت سه بار با بافر شستشو، شسته شد و نمونه‌های سرمی با رقت‌های ۱به ۱۰، ۱ به ۱۰۰ و ۱ به ۱۰۰۰ در حجم ۱۰۰ میکرولیتر به هر حفره اضافه و پلیت به مدت ۲ ساعت در دمای آزمایشگاه انکوبه گردید. پس از شستشوی پلیت مانند مرحله قبل، آنتی‌بادی اختصاصی ضد آنتی‌بادی‌های انسانی کونژوکه شده با آنزیم پراکسیداز با رقت ۱ به ۱۰۰۰ به تمامی حفره‌ها اضافه و به مدت ۲ ساعت انکوبه گردید. مجدداً پلیت شستشو و با کاغذ جاذب رطوبت‌گیری شد. سوبسترای اختصاصی آنزیم ارتو-فنیلن دیامین (OPD) طبق دستورالعمل به حفره‌ها اضافه گردید. شدت رنگ (OD) در طول موج ۴۹۲ نانومتر با استفاده از دستگاه الایزا ریدر مدل Stat Fax-2100 ثبت گردید. از روی منحنی استاندارد غلظت آنتی‌بادی ضد استرپتولیزین-O مورد اندازه‌گیری قرار گرفت.

روش مهار همولیز: نمونه‌های سرمی مورد مطالعه در این تحقیق از نظر میزان آنتی‌بادی ضد استرپتولیزین-O توسط روش مهار همولیز مورد سنجش قرار گرفتند و از نمونه‌هایی که در این روش دارای غلظت مشخص از آنتی‌بادی ضد استرپتولیزین-O بودند به عنوان استاندارد در روش الایزا استفاده شد.

آنالیز آماری: ارتباط بین روش الایزا با روش همولیز مهاری با آزمون هم‌بستگی (Correlation) مورد بررسی قرار گرفت. هم‌چنین حساسیت و ویژگی روش الایزا به طریق زیر به‌دست آمد:

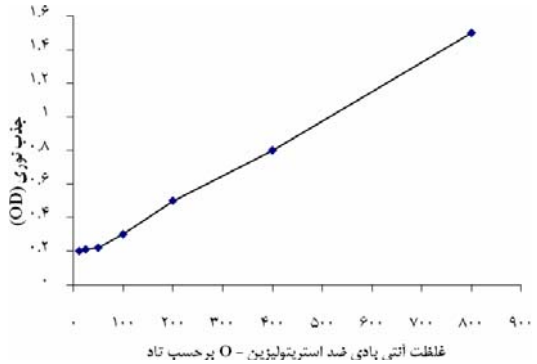
حساسیت = [موارد مثبت حقیقی÷ موارد منفی کاذب+ موارد مثبت حقیقی] × ۱۰۰

ویژگی = [موارد منفی حقیقی÷ موارد مثبت کاذب + موارد منفی حقیقی] × ۱۰۰.

نتایج

تیتر آنتی‌بادی ضد استرپتولیزین-O با روش الایزا و همولیز مهاری. نتایج نشان داد که غلظت ۱۰ میکروگرم پروتئین نوترکیب بهترین غلظت جهت Coating می‌باشد و در این غلظت حداقل رنگ زمینه‌ای وجود دارد.

از نمونه‌های سرم استاندارد با رقت‌های ۱ به ۱۰ تا ۱ به ۱۳۲۰ به صورت سریالی با حجم ۱۰۰ میکرولیتر اضافه و در مرحله آخر با اضافه کردن کونژوگه میزان جذب نوری، بر اساس پروتکل توضیح داده شده در فصل روش‌ها، با کمک دستگاه الایزا ثبت گردید (شکل۱). رقت مناسب برای اضافه کردن سرم که حداقل رنگ زمینه‌ای را ایجاد کند و در این رقت اکثر نمونه‌ها را پوشش دهد رقت ۱ به ۱۰ می‌باشد.



شکل ۱. میزان جذب نوری بر حسب غلظت آنتی بادی ضد استرپتولیزین-O (منحنی استاندارد)

میزان آنتی‌بادی ضد استرپتولیزین بر اساس جذب نوری (OD) و منحنی استاندارد اندازه‌گیری شد و با نتایج به‌دست آمده از روش مهار همولیز مقایسه شد (جدول۱). آنالیز آماری نشان داد که یک هم‌بستگی معنی‌داری بین دو روش وجود دارد (۰/۹۹- CI=۰/۹۵ ٪ ۹۵ ، p =۰/۰۰۰۱).

تعیین حساسیت روش الایزا طراحی شده. جهت تعیین حساسیت تست الایزا، نمونه‌هایی که بر اساس روش مهار همولیز مثبت بودند و تیتر آنتی‌بادی ضد استرپتولیزین-O آن‌ها بیش تر از ۲۵۰ تاد بود به عنوان نمونه مثبت انتخاب شد. میزان آنتی‌بادی ضد استرپتولیزین-O این نمونه‌ها با روش

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-05-08]

الایزا اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که تمام نمونه‌ها نیز در روش الایزا مثبت هستند و بنابراین حساسیت روش ۱۰۰ درصد می‌باشد.

تعیین ویژگی روش الایزا. جهت تعیین ویژگی از دو روش استفاده شد. نمونه‌هایی که غلظت ASO آن‌ها بر اساس روش مهاری کم‌تر از ۵۰ واحد بود انتخاب و این نمونه‌ها با رقت‌های ۱ به ۱۰۰ در روش الایزا مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که از ۶۰ نمونه تنها ۱۰ نمونه در این روش مثبت می‌باشند. در روش دوم نمونه‌ها ابتدا با استرپتولیزین-O تجارتی مخلوط شده که این عمل باعث جذب و حذف آنتی‌بادی ضد استرپتولیزین-O می‌گردد. از این نمونه‌ها به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. در این روش نیز ۵ نمونه دارای جذب نوری بالاتر از حد نقطه برش (Cut off) بودند. بر این اساس، ویژگی روش الایزا در روش اول ۸۳ درصد و در روش دوم ۹۰ درصد می‌باشد.

تکرارپذیری روش الایزا طراحی شده. جهت تکرارپذیری روش تعداد ۱۶ نمونه با غلظت‌های مختلف انتخاب شده و این نمونه‌ها در سه مرحله با روش الایزا مورد سنجش قرار گرفتند. نتایج نشان داد که تغییرات معنی‌داری در میزان جذب نوری نمونه‌ها با تکرار آزمایش مشاهده نمی‌شود (جدول۲).

جدول ۱. میزان جذب نوری در نمونه‌های سرمی با روش الایزا

شماره بیمار	تیتر ASO	جذب نوری	شماره بیمار	تیتر ASO	جذب نوری	شماره بیمار	تیتر ASO	جذب نوری
۱	۵۰	۰/۱۵	۴۲	۵۰	./۱۸	۶۲	۵۰	۰/۲
۴	۴۰۰	۰/۹۱	۴۳	۵۰	۰/۱۵	۶۳	۱۰۰	۰/۳۵
۸	۱۰۰	۰/۲	۴۴	۵۰	۰/۱۵	۶۴	۵۰	۰/۲۳
۹	۲۰۰	۰/۴۸	۴۵	۱۰۰	۰/۲۲	۶۵	۵۰	۰/۲۱
۱۱	۵۰	۰/۲	۴۶	۲۵	۰/۱	۶۶	۴۰۰	۰/۹۸
۱۲	۱۰۰	./۲۷	۴۷	۱۰۰	۰/۳	۶۷	۳۲۰۰	>۳
۲۶	۱۰۰	./۲۷	۴۸	۲۰۰	۰/۵	۶۸	۵۰	۰/۱۹
۲۹	۵۰	./۱۸	۴۹	۲۵	۰/۱۲	۶۹	۵۰	۰/۲۱
۳۰	۵۰	۰/۲	۵۰	۵۰	۰/۲۵	۷۰	۲۵	۰/۱۲
۳۱	۲۵	۰/۱	۵۱	۵۰	۰/۲۵	۷۱	۲۵	۰/۱۴
۳۲	۱۰۰	۰/۳	۵۲	۲۵	۰/۱	۷۲	۱۰۰	۰/۳۶
۳۳	۲۰۰	۰/۳۵	۵۳	۱۰۰	۰/۳۳	۷۴	۵۰	۰/۲
۳۴	۲۵	۰/۱	۵۴	۲۵	۰/۱	۷۵	۵۰	./۱۸
۳۵	۱۰۰	۰/۲۵	۵۵	۲۵	۰/۱۲	۷۶	۵۰	./۱۸
۳۶	۱۰	۰/۱	۵۶	۱۰۰	۰/۲۹	۷۷	۲۰۰	۰/۵۳
۳۷	۵۰	./۱۸	۵۷	۲۵	۰/۱	۷۸	۲۵	۰/۱۵
۳۸	۲۰۰	۰/۴۵	۵۸	۵۰	۰/۲	۷۹	۵۰	۰/۲
۴۰	۵۰	۰/۱۵	۵۹	۲۵	۰/۱۱	۸۰	۱۰۰	۰/۳۴
۴۱	۱۰۰	۰/۲۵	۶۰	۵۰	۰/۲۲	۸۵	۵۰	۰/۲
۸۶	۴۰۰	۱	۸۷	۲۰۰	۰/۵۱	۸۸	۵۰	۰/۲

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-05-08]

جدول ۲. نتایج حاصل از تکرار آزمایش الایزا بر روی نمونه‌ها

شماره بیمار	تیتر ASO	جذب نوری	جذب نوری (تکرار دوم)	جذب نوری (تکرار سوم)
۱	۵۰	۰/۱۵	۰/۱۷	۰/۱۷
۴	۴۰۰	۰/۹۱	1	۰/۹۵
۸	۱۰۰	۰/۲	۰/۲۱	۰/۲
۹	۲۰۰	۰/۴۸	۰/۵	۰/۵۲
۶۶	۴۰۰	۰/۹۸	۰/۹۵	۰/۹۶
۶۷	۳۲۰۰	۳	۳	۳
۷۷	۲۰۰	۰/۵۳	۰/۵	۰/۵۱
۸۰	۱۰۰	۰/۳۴	۰/۳۶	۰/۳۶

بحث و نتیجه‌گیری

استاندارد طلایی جهت تشخیص عفونت‌های ناشی از باکتری‌های استرپتوکوک گروه A جداسازی از بافت یا اندام آلوده است. ولی بررسی روند پیش‌رفت بیماری یا موفقیت درمان بر پایه ردیابی و تعیین تیتر آنتی‌بادی بر علیه آنتی‌ژن‌های مهم باکتری از جمله استرپتولیزین-O می‌باشد.

در روش متداول جهت تعیین آنتی‌بادی علیه استرپتولیزین-O از پروتئین طبیعی تهیه شده از استرپتوکک پیوژن استفاده می‌شود. از پروتیین نوترکیب استرپتولیزین می‌توان جهت تشخیص آنتی‌بادی اختصاصی استفاده کرد. در این تحقیق با استفاده از ناقل پلاسمیدی pET28a تولید استرپتولیزین-O بدون پروتئین الحاقی تولید گردید. جهت مقایسه آنتی‌ژنیسیته پروتئین نوترکیب تولید شده در این طرح با استرپتولیزین-O تجارتی از آزمون وسترن بلات استفاده گردید. نتایج نشان داد که پروتئین تولید شده دارای خاصیت آنتی‌ژنیک بوده و قادر به شناسایی با آنتی‌بادی‌های ضد استرپتولیزین-O می‌باشد.

نتایج این مطالعه نشان داد که غلظت ۵ تا ۱۰ میکروگرم از پروتئین نوترکیب استرپتولیزین-O جهت پوشاندن (Coating) پلت الایزا مناسب است. مقایسه غلظت استرپتولیزین-O در روش مهاری با روش الایزا نشان داد که یک هم‌بستگی و ارتباط مثبت و معنی‌داری بین دو روش وجود دارد. بر اساس منحنی استاندارد تهیه شده، نمونه‌های که تیتر آنتی‌بادی ضد استرپتولیزین-O آن‌ها در روش مهاری کم‌تر از ۵۰ واحد تاد باشد، در روش الیزا کم‌ترین میزان جذب را دارند و نمونه‌هایی که میزان جذب نوری آن‌ها در روش الیزا بیش‌تر از ۰/۵ می‌باشد در روش مهاری نیز دارای تیتر بالاتر از ۲۵۰ واحد تاد بوده و مثبت تلقی می‌شود. از این جهت نقطه برش الایزا را می‌توان بر حسب جذب نوری برابر ۰/۵ در نظر گرفت و نمونه‌های کم‌تر از آن را به عنوان منفی و نمونه‌های بیش‌تر از آن را مثبت تلقی کرد.

با توجه به منحنی استاندارد لازم بود از رقت‌هایی از سرم استفاده شود که در آن رقت، اکثر نمونه‌ها در محدوده منحنی استاندارد قرار گیرد. بنابراین نمونه‌ها با چهار رقت ۱به ۱۰، ۱ به ۱۰۰، ۱ به ۵۰۰ و ۱ به ۱۰۰۰ مورد سنجش قرار گرفتند. نتایج نشان داد که ۹۵ درصد نمونه‌ها با رقت ۱ به ۱۰۰ در محدوده منحنی استاندارد قرار می‌گیرند و بنابراین در آزمایشگاه نیز برای استفاده از این کیت در تشخیص می‌توان نمونه‌های سرم را با رقت مربوطه استفاده کرد و این رقت ۹۵ درصد نمونه‌ها را پوشش می‌دهد.

نتایج حاصل از تعیین حساسیت و ویژگی نیز نشان داد که حساسیت این روش ۱۰۰ درصد می‌باشد. در خصوص نمونه‌هایی که تیتر آنتی‌بادی ضد استرپتولیزین-O آن‌ها در روش مهاری کم‌تر از ۲۵۰ واحد تاد بود این حساسیت کم‌تر می‌باشد. ویژگی این روش بین ۸۳ تا ۹۰ درصد بود.

در سال ۱۹۸۶ ریتانو (Reitano) و همکاران با استفاده از پروتئین استرپتولیزین به‌دست آمده از کشت باکتری یک روش الایزا جهت سنجش آنتی‌بادی ضد استرپتولیزین-O طراحی کردند [۶]. آن‌ها نشان دادند که بین روش الایزا و روش مهار همولیز یک ارتباط معنی‌داری وجود دارد (r=۰/۷۰۷). در حالی که در مطالعه حاضر این ارتباط نزدیک به یک می‌باشد (r=۰/۹۷). در مطالعه دیگر نشان داده شد که بین روش الایزا و روش مهاری جهت سنجش آنتی‌بادی ضد استرپتولیزین-O یک ارتباط مثبت و معنی‌داری (r=۰/۸۶) وجود دارد. در این تحقیق حساسیت و ویژگی روش به ترتیب ۹۱ درصد و ۹۳

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-05-08]

درصد بود [۷]. در این مطالعات از پروتئین استرپتولیزین به‌دست آمده از کشت باکتری به عنوان آنتی‌ژن استفاده شده است در حالی که در تحقیق حاضر از پروتئین نوترکیب به عنوان آنتی‌ژن استفاده شد. حساسیت بالای الایزا در مطالعه حاضر ممکن است به‌دلیل استفاده از پروتئین نوترکیب باشد. در هر حال تحقیق انجام شده توسط Velazquez و همکاران (۲۰۰۵) نیز نشان داد که از پروتئین نوترکیب استرپتولیزین می‌توان در تشخیص عفونت استفاده کرد [۸]. در این مطالعه از وکتور pGEX-2T حاوی پروتئین الحاقی استفاده شد [۹]. پروتیئین‌های الحاقی می‌تواند باعث تغییر در شاخص آنتی‌ژنیک و افزایش واکنش‌های متقاطع گردد، در حالی که در پژوهش حاضر از وکتور بدون پروتیئن الحاقی جهت تولید استرپتولیزین استفاده گردید که این امر باعث افزایش حساسیت روش می‌گردد.

در مجموع روش الایزای طراحی شده بر مبنای استفاده از پروتئین نوترکیب استرپتولیزین-O از حساسیت و ویژگی قابل قبولی بر خوردار است و هم‌خوانی و ارتباط مثبتی با روش مهار همولیز دارد. استفاده از این روش باعث صرفه‌جویی در وقت، افزایش دقت و اندازه‌گیری ایزوتیپ‌های مختلف آنتی‌بادی می‌شود.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و آموزش دانشگاه علوم پزشکی اراک جهت تامین هزینه مالی این طرح تحقیقاتی تشکر می‌گردد.

منابع

[1] Koshi G, Mammen A, Feldman DB, Bhakthaviziam C, Myers RM. A preliminary report on beta-hemolytic Streptococci and anti-streptolysin O (ASO) titres in pyogenic skin ifections in children, with a case report of acute glomerulonephritis following repeated skin infections. Indian J Med Res 1967; 55: 920-929.

[2] Jeng A, Beheshti M, Li J, Nathan R. The role of beta-hemolytic streptococci in causing diffuse, nonculturable cellulitis: a prospective investigation. Medicine 2010; 89: 217-226.

[3] Tiesler E, Trinks U. The production of streptolysin O by beta-hemolytic streptococci of group A. Zentralbl Bakteriol Orig A 1979; 245: 17-24.

[4] Blyth CC, Robertson PW. Anti-streptococcal antibodies in the diagnosis of acute and post-streptococcal disease: streptokinase versus streptolysin O and deoxyribonuclease B. Pathology 2006; 38: 152-156.

[5] Rantz LA, Spink WW, Boisvert PJ. Hemolytic streptococcus sore throat; detailed study of the simultaneous infection of a large number of men by a single type. Arch Intern Med 1945; 76: 278-283.

[6] Reitano M, Pisano MA, Eriquez LA, D'Amato RF. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of streptolysin O antibodies. J clin microbiol 1986; 23: 62-65.

[7] Moscoso del Prado J, Serrano C. An ELISA method for the quantification of anti-streptolysin-O antibodies. J Immunol Methods 1989; 124: 219-223.

[8] Velazquez B, Massaldi H, Battistoni J, Chabalgoity JA. Construction and expression of recombinant streptolysin-o and preevaluation of its use in immunoassays. Clin Diagn Lab Immunol 2005; 12: 683-684.

[9] Abtahi H, Mosayebi G, Salmanian AH. Expression of recombinant streptolysin O by escherichia coli. J Arak Univ Med Sci (AMUJ) 2007; 3: 1-8. (Persian).

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-05-08]

Design of enzyme-linked immunosorbent assay method for detection of anti-streptolysin-O antibodies on base of recombinant streptolysin-O

Ghasem Mosayebi (Ph.D)[1], Hameid Abtahi (Ph.D)[1*], Ali Ghazavi (M.Sc)[1], Nader Zareinfar (M.D)[2], Mohsen Khaki (M.Sc)[1] , Mohammad Ali Payani (B.S)[1]

1 - Molecular and Medicine Research Center and Department of Immunology and Microbiology, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

2 - Department of Infection diseases, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

(Received: 8 Feb 2011 Accepted: 20 Sep 2011)

Introduction: Group A, β hemolytic streptococci are among the major causative agents of otorhinolaryngology infections. Inadequate treatment of disease may lead to serious disorders such as acute rheumatic fever and glomerulonephritis. Anti-streptolysin-O (ASO) is commonly used as a marker in the diagnosis of infection. Purification of native streptolysin-O has several difficulties and its industrial production process is time consuming with very low yield and the risk of biological contamination. In this study, we used a recombinant streptolysin-O protein as an antigen to detect ASO antibodies in enzymes-linked immunosorbent assay (ELISA).

Materials and Methods: We amplified streptolysin-O gene by polymerase chain reaction (PCR) method and subcloned in prokaryotic expression vector PET28a. E.coli. BL21-DE3-plySs strain was transformed with PET28a-streptolysin-O and gene expression was induced by IPTG. ELISA microplates were coated with different concentration of streptolysin-O protein. Level of ASO antibodies were detected by ELISA method. The results obtained from ELISA method were compared with inhibition of hemolysis assay as a standard method.

Results: The results showed that there is a positive significant correlation between the ELISA and inhibition of hemolysis method($r=0.97$, $p=0.0001$). The sensitivity and specificity of ELISA for detection of ASO anti bodies were 100% and 83%, respectively.

Conclusion: ELISA developed with recombinant streptolysine O showed a good sensitivity for detection of ASO antibodies. It is suggested that this method could be suitable for immunoassays.

Keywords: Streptococci pyogene, Recombinant streptolysin-O, Anti-streptolysin-O antibodies, Enzyme-linked immunosorbent assay

* Corresponding author: Fax: +98 861 4173521; Tel: +98 861 4173502
habtahi2001@yahoo.com

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-05-08]