Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 23:23 IRST on Saturday February 17th 2018

جداسازی Anti- dsDNA IgG به‌وسیله تست الایزا غیر مستقیم با استفاده از دو منبع مختلف dsDNA اشریشیا کلی و تیموس گوساله

محسن محمدی[۱*]، علی میرجلیلی[۲]
غلام رضا حبیبی[۲]، شیرزاد فلاحی[۳]
عبدالفتاح صراف نژاد[۴]، افشار اعتمادی[۵]
سید مهدی بوترابی[۶]

۱- گروه میکروب‌شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان
۲- گروه بیوتکنولوژی، انستیتو تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی
۳- گروه انگل شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان
۴- گروه ایمنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۵- گروه میکروب شناسی، انستیتو تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی
۶- گروه علوم آزمایشگاهی، شرکت تولیدی تحقیقاتی کیت‌های تجاری پیشتاز طب زمان
* نویسنده مسئول: خرم آباد، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، دانشکده پزشکی، گروه میکروب شناسی
تلفن: ۶۲۰۰۱۶۱-۰۶۶۱
email: mohamadi_77@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۷/۰۵/۰۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۷/۰۸/۱۲

چکیده

زمینه و هدف: آنتی‌بادی‌های علیه dsDNA به‌صورت فراوان در سرم بیماران لوپوس اریتماتوس سیستمیک وجود دارد امروزه کیت‌های تجاری الایزا از DNAها و اتصال‌گرهای مختلف DNA برای جداسازی آنها استفاده می‌کنند. این مطالعه به‌منظور ارزیابی دو منبع مختلف DNA و نیز دو نوع ماده اتصال‌گر مختلف DNA در سنجش الایزا صورت گرفت. ***روش بررسی:*** در این مطالعه DNA اشریشیا کلی (ATCC۲۵۹۲۲) و تیموس گوساله را با درجه خلوص بالا استخراج گردید و به‌عنوان آنتی‌ژن جهت کوتینگ و از دو ماده پلی- ال- لیزین و Methylated- BSA جهت پیش کوتینگ مورد استفاده و ارزیابی قرار گرفتند. جهت تعیین حساسیت و ویژگی از نمونه‌های سرمی از بیماران لوپوس اریتماتوس سیستمیک و افراد سالم اهدا کننده خون در مقایسه با تست ایمنوفلورسانس (IF) و کیت تجاری استفاده گردید با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویراست ۱۵ و آزمون McNemar به‌منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده گردید. ***یافته‌ها:*** نتایج نشان داد که Methylated- BSA واکنش غیر اختصاصی بسیار کمتری نسبت به پلی- ال- لیزین دارد همچنین حساسیت و ویژگی الایزا با DNA تیموس گوساله در مقایسه با تست ایمنوفلورسنس (IF) و کیت تجاری الایزا به‌ترتیب ۸۰٪، ۸۸٪ و ۱۰۰٪، ۹۸٪ به‌دست آمد و الایزا با DNA اشریشیا کلی در مقایسه با تست ایمنوفلورسنس (IF) و کیت تجاری الایزا به‌ترتیب ۷۳٪، ۶۹٪، ۸۵٪ و ۷۹٪ به‌دست آمد. ***نتیجه‌گیری:*** DNA تیموس گوساله بالقوه منبع آنتی‌ژن مفیدی جهت جداسازی آنتی‌بادی‌های علیه dsDNA توسط آزمون الایزا است. همچنین استفاده از Methylated- BSA می‌تواند نقش موثری در کاهش واکنش‌های غیراختصاصی نسبت به پلی- ال- لیزین داشته باشد.

کلمات کلیدی: لوپوس اریتماتوس سیستمیک، آنتی‌بادی‌های علیه DNA، الایزا.

مقدمه

آنتی‌بادی‌های علیه dsDNA به‌طور فراوانی در سرم بیماران لوپوس اریتماتوس سیستمیک Systemic Lupus Erythematosus (SLE) یافت می‌شوند که به‌عنوان علامتی از فعال بودن بیماری می‌باشد[۱و۲] که شناسایی آن یکی از چهار معیار مهم American College of Rheumatology (ACR) در تشخیص SLE است.[۳] این آنتی‌بادی‌ها نه‌تنها به‌عنوان یکی از ابزارهای تشخیصی است بلکه به‌عنوان وسیله‌ای برای پیش‌آگهی بیماری و وخامت آن مطرح می‌باشد.[۴] بر این اساس گزارشات متعدد تغییرات سطح آنتی‌بادی در زمانی که بالا می‌رود حاکی از فعالیت و وخامت بیماری است.[۵و۶] آنتی‌بادی‌های علیه dsDNA در دیگر بیماری‌های خود ایمنی نیز وجود دارد که تیتر بسیار پایینی دارند و ارزش تشخیصی برای آنها ندارد در صورتی که تنها در SLE تیتر بالاتر می‌رود و ارزش تشخیصی دارد.[۷] شناسایی آنتی‌بادی‌های علیه dsDNA از نوع کلاس IgG بسیار با اهمیت‌تر از دیگر کلاس‌ها مثل IgM است چرا که این نوع کلاس در دیگر بیماری‌های روماتوئید، چند بیماری مزمن و حتی افراد طبیعی نیز ممکن است وجود داشته باشد بنابراین اختصاصی نیستند و ارزش تشخیصی ندارند، همچنین آنتی‌بادی‌های IgG علیه ssDNA نیز در این بیماری ممکن وجود داشته باشد اما در شناسایی بیماری SLE اختصاصی نسیتند.[۸و۹] چندین تکنیک برای شناسایی آنتی‌بادی‌های علیه dsDNA وجود دارد که شامل الایزا (ELISA)، رادیو ایمنواسی RIA یا Farr assay و ایمنوفلورسانس IF یا CLIFT هستند که در بین آنها تکنیک الایزا به‌خاطر حساسیت و ویژگی مناسب، انجام سریع و آسان جهت نمونه‌های زیاد (بر خلاف CLIFT)، ارزان بودن، نداشتن

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 23:23 IRST on Saturday February 17th 2018

خطر خنثی‌سازی و محدودیت پایداری رادیوایزوتوپ‌ها (برخلاف Farr assay) جایگاه‌ویژه‌ای پیدا کرده است و به‌طور متداول در آزمایشگاه‌های تشخیصی استفاده می‌شود.[۱۰و۱۱] امروزه از منابع مختلف DNA به‌عنوان آنتی‌ژن برای کوتینگ روی چاهک‌های الایزا در ساخت کیت‌های تجاری و یا تحقیقات برای شناسایی بهتر SLE استفاده می‌شود. Janypoon از DNA سلول‌های خونی و باکتری‌ها استفاده کرد[۱۲] و در جایی دیگر Linnemann از DNA ماهی، تیموس گوساله و پلاسمید[۱۳] و همچنین Makowski از DNA باکتریوفاژ و پلاسمید[۱۴] استفاده کردند. Witte از DNA نوترکیبی انسانی به‌عنوان آنتی‌ژن استفاده نمود[۱۵] و مطالعات فراوانی که در این زمینه وجود دارد. از آنجایی‌که ملکول DNA بر خلاف پروتئین‌ها به‌راحتی روی سطح میکروپلیت‌های (چاهک‌ها) الایزا متصل نمی‌شود و ظرفیت اتصال ضعیفی دارد بنابراین نیازمند یک ماده واسط برای ایجاد پل جهت اتصال است.[۱۶] بدین منظور از مواد مختلفی استفاده می‌شود. Emlen از اسرپتواویدین کوت‌شده روی چاهک‌های الایزا به‌منظور پل اتصال گرو dsDNA بیوتینه شده استفاده نمود.[۱۷] در حال حاضر از پلی ال لیزین و پروتامین سولفات به‌خاطر دارا بودن قدرت اتصال زیاد بدین منظور استفاده می‌شود. Hylkema و Brinkmann گزارش‌دادند که پروتامین سولفات و پلی‌ال‌لیزین، ایجاد نتایج مثبت‌کاذب می‌کنند.[۱۸و۱۹] استفاده از این نوع مواد در مطالعات متعددی نشان داده شده‌است ولی استفاده از Methylated- BSA به‌عنوان ماده پیش‌کوتینگ و اتصال‌گر و ارزیابی آن با دیگر مواد تاکنون صورت نگرفته است. این مطالعه به منظور ارزیابی دو منبع مختلف DNA تیموس گوساله (Calf thymus) و *E.coli* به‌عنوان آنتی‌ژن و دو ماده پلی- ال- لیزین و Methylated- BSA به‌عنوان ماده پیش کوتینگ (pre-coating) جهت اتصال DNA جهت ارزیابی تست تشخیصی الایزا Anti-dsDNA IgG می‌باشد.

روش بررسی

این مطالعه از نوع تحقیقی در انستیتو تحقیقات، واکسن و سرم‌سازی رازی کرج و با همکاری شرکت تولیدی- تحقیقاتی تجاری پیشتاز طب زمان تهران انجام گرفت. بدین صورت که ابتدا دو نوع مختلف DNA از باکتری‌اشریشیا کلی و تیموس گوساله به‌عنوان آنتی‌ژن جهت کوتینگ رو میکروپلیت‌های (چاهک‌ها) الایزا استخراج و تخلیص گردید سپس از دو ماده Poly-L-Lysine (Sigma St Louis, USA) و Methylated- BSA، (Sigma St Louis USA) جهت پیش- کوتینگ (Pre-coating) مورد استفاده و ارزیابی قرار گرفتند.

آماده‌سازی DNA (استخراج و تخلیص کردن): پس‌از تهیه تیموس گوساله و کشت دادن باکتری اشریشیا کلی (ATCC۲۵۹۲۲) در محیط کشت Lurina Broth Medium اقدام به‌استخراج و تخلیص DNA شد.

استخراج (Extraction): الف- استخراج DNA تیموس گوساله: بر طبق روش بدون استفاده از فنل (Thomas, Ried's).[۲۰] ب- استخراج DNA اشریشیا کلی (به‌روش CTAB/NaCl طبق روش Frederick.[۲۱]

تخلیص (Purification): پس از استخراج DNA به‌منظور از بین بردن پروتئین‌های اضافی و از بین بردن RNA فرایند تخلیص روی آنها با استفاده از محلول فنل- کلروفرم- ایزوآمیل الکل (۲۵:۲۴:۱) و RNase بر طبق روش (Cavallearo) صورت گرفت.[۲۲]

ارزیابی کیفی و کمی DNA استخراج و تخلیص شده: الف- ارزیابی کیفی: از نظر خرد نشدن و عدم آلودگی با RNA از روش الکتروفورز در ژل آگارز و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید استفاده شد. (۲۰۰۱ Sambrook).[۲۳] ب- ارزیابی کمی: از نظر تعیین مقدار غلظت DNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر Nanodrop (مدل ND1000 USA). در تمامی پروسه کاری از DNA تجاری Calf thymus (Sigma St Louis, USA) به‌عنوان DNA استاندارد استفاده گردید.

مراحل آماده‌سازی الایزا: الف- آماده‌سازی فاز جامد: بدین منظور از میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای Nunc ساخت دانمارک از نوع ته‌گرد و از جنس پلی‌استیرن (Maxisorb) که نور را با کمترین جذب زمینه‌ای عبور می‌دهند استفاده شد. از آنجایی‌که DNA برای چسبیدن به میکروپلیت‌ها دارای ظرفیت اتصال پایینی بر خلاف پروتئین‌ها است لذا بایستی یک مرحله پیش کوتینگ (Pre-coating) برای اتصال انجام گیرد. بنابراین ما از دو ماده Poly-L-Lysine (۵٪ در PBS) و Methylated- BSA ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آب مقطر استریل) به‌صورت جداگانه جهت این کار استفاده و مورد ارزیابی قرار گرفت سپس به‌مقدار ۵۰ میکرولیتر داخل هر چاهک ریخته و به‌مدت ۴۵- ۳۰ دقیقه در دمای اتاق در حالت حرکات ملایم قرار داده و پس از مرحله شستشو مرحله کوتینگ را با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر DNA در داخل بافر کوتینگ (TBS-EDTA 10mμ) به‌مقدار ۵۰ میکرولیتر در داخل هر چاهک ریخته و به‌مدت یک شب (over night) در دمای چهار درجه انکوبه می‌کنیم سپس شستشو می‌دهیم

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 23:23 IRST on Saturday February 17th 2018

(مرحله بعد از کوتینگ (Post-coating) را در مورد فقط پلی ال لیزین توسط بتا گلوتامات با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در PBS به‌مقدار ۵۰ میکرولیتر در هر چاهک به‌منظور پوشاندن بارهای مثبت اضافی پلی ال لیزین انجام خواهد شد) سپس مرحله بلاکینگ توسط بافر (PBS-3%BSA-FCS5%) با ۱۵۰ میکرولیتر به‌مدت یک ساعت در دمای اتاق انجام داده که این مرحله نیازی به شستشو ندارد.[۱۶]

ب- تهیه رقت مناسب کونژوگه و سرم: با استفاده از جدول متقاطع تیتراسیون (Checher board Titration) رقت مناسب کنژوگه (anti-human IgG Goat Rockland) و سرم تهیه گردید.

ج- به‌منظور ارزیابی و استاندارد کردن پلیت از نمونه‌های استاندارد (کالیبراتور، کنترل مثبت و کنترل منفی) WHO (Wo/80) استفاده‌گردید.

د- از آنجایی‌که کونژوگه آنزیمی مورد استفاده HRP (آنزیم پراکسیداز) بود لذا از سوبسترا TMP (تترامتیل بنزیدین) استفاده گردید. در نهایت با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (Anthos 2020 USA) میزان جذب نوری (OD) در طول موج ۴۵۰ نانومتر و با فیلتر ۶۲۰ نانومتر (رفرنس) نتایج قرائت و ثبت گردید.

ه- تعیین حساسیت (Sensitivity) و ویژگی (Specificity):

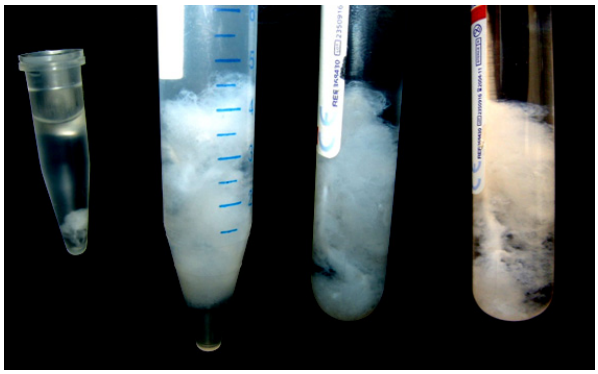
از نمونه‌های‌سرمی‌بیماران SLE (دارای‌حداقل چهار معیار از معیارهای ACR) و افراد سالم اهدا کننده خون در قیاس با تست ایمنوفلورسنس غیرمستقیم (IFA) (IFA MBL kit) و یک کیت تجاری الایزا جهت تعیین حساسیت و ویژگی استفاده شد. از نرم‌افزار SPSS ویراست ۱۵ و آزمون McNemar جهت تجزیه‌و تحلیل داده‌ها استفاده گردید.

یافته‌ها

DNAهای استخراج‌شده تیموس گوساله و اشریشیا کلی (شکل ۱) از نظر کمّی و درجه خلوص بسیار مناسب بودند (۱/۹۸±۰/۰۲ =OD260/280) در مرحله پیش کوتینگ با پلی ال لیزین (ماده Pre-coating) و بتاگلوتامات (ماده Post-coating) باعث جذب ایمنوگلو-بین‌ها و در نتیجه نتایج کاذب و جذب زمینه‌ای (back ground) را به‌همراه داشت. ماده متیل- BSA (Methylated- BSA) بر خلاف پلی ال لیزین دارای کمترین جذب زمینه‌ای بود و نیز اینکه آماده‌سازی راحت‌تر و مقرون به صرفه‌تر بودن داشت به طوری‌که پلیت‌های زیادی را در حجم انبوه پوشش داد. به طوری‌که به‌عنوان کنترل در پلیتی که فاقد DNA بود پس از اضافه کردن سرم مشاهده گردید که دارای اتصال بسیار ضعیف و سست برای ایمنوگلوبین‌ها است و به‌عنوان ماده پیش کوتینگ و ادامه مراحل الایزا انتخاب و به‌کار گرفته شد با استفاده از جدول تیتراسیون رقت مناسب سرم و کونژوگه به‌ترتیب ۱/۱۰۰ و ۱/۴۰۰۰ حاصل گردید. سپس در ادامه پلیت‌ها را به دو صورت کیفی و کمی طراحی گردید.

۱- اندازه‌گیری به‌صورت کیفی: بدین صورت که از سرم‌های منفی (Normal Blood Donors) به تعداد ۵۰ نمونه بر روی پلیت الایزا با در نظر گرفتن فرمول Cut off = Mean + 3DS (میانگین جذب نوری سرم‌های افراد سالم به علاوه سه برابر انحراف معیار آنها) بهترین حد آستانه متمایز کننده نمونه‌های مثبت از منفی OD=۰/۵ حاصل گردید بدین ترتیب نمونه‌های که جذب نوری برابر یا بالاتر از این مقدار را داشتند به‌عنوان مثبت و کمتر از آن منفی قلمداد می‌شدند.

۲- اندازه‌گیری به‌صورت کمّی: از آنجایی‌که روش کیفی نمی‌توانست حالات Borderline، Low positive و High positive را تفکیک کند لذا پلیت را نیز بر اساس استاندارد (کالیبراتور) WHO(Wo/80) با یک غلظت مشخص بر حسب واحد IU/ml و بر اساس آن رنج نمونه‌های کنترل مثبت و منفی را با استفاده از یک نمونه سرمی High positive از نظر anti-dsDNA و سپس رقیق کردن آن با یک پایدارکننده (Preservative) تعریف شد. محدوده منفی توسط ۵۰ نمونه سرم از افراد سالم (blood donor) با میانگین ۶۰IU/ml و انحراف معیار ۲/۴ (Cut off= ۶۰±۲/۴) تعیین شد. محدوده مثبت توسط نمونه‌های سرمی مثبت از نظر anti-dsDNA با تیترهای مختلف (Strong, Medium. Low) که بر اساس آن ۷۵ IU/ml به‌صورت Low تا ۴۵۰IU/ml به‌صورت High تعیین شد. حساسیت و ویژگی dsDNA تیموس گوساله (سلول یوکاریوت) در مقایسه با IF و کیت تجاری



شکل-۱: استخراج DNA (Calf thymus و *E.coli*) در حجم زیاد به‌عنوان آنتی‌ژن

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 23:23 IRST on Saturday February 17th 2018

جدول-۱: حساسیت‌و ویژگی الایزا DNA تیموس‌گوساله در مقایسه با IF

کیت		IFA		مجموع
		مثبت	منفی	
با استفاده DNA ELISA	مثبت	۳۶(٪۸۰)	۱۵(٪۱۲)	۵۱
از تیموس گوساله	منفی	۹(٪۲۰)	۱۱۴(٪۸۸)	۱۲۳
مجموع		۴۵(٪۱۰۰)	۱۲۹(٪۱۰۰)	۱۷۴

حساسیت و ویژگی: ۸۰ و ۸۸ درصد، آزمون McNemar، الایزا با DNA تیموس گوساله در مقایسه با کیت تجاری اختلاف معنی‌داری نداشت (p= ۰/۵).

جدول-۲: حساسیت‌و ویژگی الایزا DNA اشریشیا کلی در مقایسه با IF

کیت		کیت تجاری الایزا		مجموع
		مثبت	منفی	
با استفاده DNA ELISA	مثبت	۶۰(٪۱۰۰)	۲(٪۲)	۶۲
از تیموس گوساله	منفی	۰(٪۰)	۱۲۶(٪۹۸)	۱۲۶
مجموع		۶۰(٪۱۰۰)	۱۲۸(٪۱۰۰)	۱۸۸

حساسیت و ویژگی: ۱۰۰ و ۹۸ درصد، آزمون McNemar، الایزا با DNA تیموس گوساله در مقایسه با کیت تجاری اختلاف معنی‌داری نداشت (p= ۰/۵).

جدول-۳: حساسیت‌و ویژگی الایزا DNA تیموس‌گوساله در مقایسه با کیت الایزا

کیت		IFA		مجموع
		مثبت	منفی	
با استفاده DNA ELISA	مثبت	۳۳(٪۷۳)	۳۹(٪۳۱)	۷۲
از اشریشیا کلی	منفی	۱۲(٪۲۷)	۹۰(٪۶۹)	۱۰۲
مجموع		۴۵(٪۱۰۰)	۱۲۹(٪۱۰۰)	۱۷۴

حساسیت و ویژگی: ۷۳ و ۶۹ درصد، آزمون McNemar، الایزا با DNA اشریشیا کلی در مقایسه با IF اختلاف معنی‌داری داشت (p< ۰/۰۰۱).

جدول-۴: حساسیت‌و ویژگی الایزا DNA اشریشیا کلی در مقایسه با کیت الایزا

کیت		کیت تجاری الایزا		مجموع
		مثبت	منفی	
با استفاده DNA ELISA	مثبت	۵۱(٪۸۵)	۲۶(٪۲۱)	۷۷
از اشریشیا کلی	منفی	۹(٪۱۵)	۱۰۲(٪۷۹)	۱۱۱
مجموع		۶۰(٪۱۰۰)	۱۲۸(٪۱۰۰)	۱۸۸

حساسیت و ویژگی: ۵ و ۷۹ درصد، آزمون McNemar، الایزا با DNA اشریشیا کلی در مقایسه با کیت تجاری اختلاف معنی‌داری داشت (p< ۰/۰۰۱).

الایزا به‌ترتیب ۸۰٪، ۸۸٪ و ۱۰۰٪، ۹۸٪ و dsDNA اشریشیا کلی (سلول پروکاریوت) به‌ترتیب ۷۳٪، ۶۹٪ و ۸۵٪، ۷۹٪ به‌دست آمد (جداول ۴-۱). بین الایزا با DNA تیموس گوساله در مقایسه با ایمنوفلورسانس و کیت تجاری‌الایزا اختلاف معنی‌داری وجود نداشت در نتیجه به یک اندازه مناسب هستند (جداول ۱ و ۲) اما در مورد بین الایزا با DNA اشریشیا کلی در مقایسه با ایمنوفلورسانس و کیت تجاری الایزا اختلاف معنی‌داری وجود داشت در نتیجه به یک اندازه مناسب نیستند. (جداول ۳ و ۴) در نتیجه پلیت طراحی شده با dsDNA باکتری اشریشیا کولی از حساسیت و ویژگی پایین‌تری نسبت به dsDNA تیموس گوساله برخوردار بود. در ادامه پروسه کاری برای ارزیابی دیگر معیارهای استاندارد نظیر دقت و صحت از پلیت‌های با منشاء DNA (Calf thymus) استفاده گردید که بر اساس نتایج حاصله میزان دقت درون سنجی CV=٪۷/۴ و دقت میان سنجی CV=٪۹/۶ با میانگین کل ۸/۵٪ که نشان‌دهنده این است که از دقت بالایی برخوردار است.[۲۴] در نهایت نتایج میزان صحت بر اساس دو پارامتر بازیافت (Recovery) که ۹۵/۲٪ حاصل گردید. با توجه به اینکه مقدار مورد پذیرش برای این پارامتر ۱۰۰-۹۵ درصد است لذا پلیت مورد نظر از بازیافت قابل قبول است.[۲۵] تست خطی بودن (Linearity) که با رقیق کردن دو نمونه سرمی مثبت به‌صورت سریالی از یک تا ۱۰ یک منحنی خطی مستقیم حاصل شد که نشان‌دهنده این است که پلیت مورد نظر با توجه به خط مستقیم بودن یعنی تغییر در غلظت تغییری در صحت ایجاد نمی‌شود.[۲۴]

بحث

آنتی‌بادی‌هایی که علیه DNA واکنش می‌دهند اولین بار در بیماران SLE شناسایی شد که از دو نوع IgG و IgM هستند اما نشان داده شده که کلاس IgG بر خلاف IgM به‌صورت اختصاصی در این بیماران یافت می‌شود و لذا ارزش تشخیصی دارند در حالی‌که IgM علاوه در این بیماران در دیگر بیماری‌های روماتوئید و عفونت‌های مزمن و نیز برخی افراد سالم یافت می‌شود.[۲۶] در مطالعات زیادی که در این زمینه صورت گرفته از اهمیت کلاس IgG نسبت به IgM پرداختند.[۳۰-۲۷] به طوری‌که پلیت طراحی شده در این مطالعه بر مبنای جداسازی IgG است. متداول‌ترین تکنیک‌هایی که در جداسازی آنتی‌بادی‌های علیه dsDNA استفاده می‌شود شامل الایزا (ELISA)، ایمنوفلورسانس (IF یا CLIFT) و رادیو ایمنواسی (RIA یا Farr assay) است که سنجش الایزا دارای بیشترین حساسیت نسبت به آنها می‌باشد که در آن آنتی بادی‌های علیه dsDNA را حتی در مقدار و تمایل (Affinity) و اویدیتی (Avidity) کم شناسایی می‌کند. در این سیستم بر خلاف CLIFT که نیازمند غلظت بالای آنتی‌ژن و دست و پاگیر بودن برای تعداد نمونه‌های زیاد است و نیز Farr assay که نیازمند غلظت بالای

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 23:23 IRST on Saturday February 17th 2018

نمک و خطر مواد رادیو اکتیو و گرانی وسایل را به‌همراه دارند این مشکلات وجود ندارد و به‌عنوان یک تست سریع و آسان برای تعداد نمونه‌های زیاد کاربرد وسیع دارد.[۳۱-۳۳] مباحث مهمی که در این مطالعه برای طراحی این پلیت وجود دارد اول تهیه DNA مناسب از نظر کیفی (بدون شکستگی و آلودگی از نظر RNA، پروتئین و دیگر ترکیبات آروماتیک مثل فنل و غیره و درجه خلوص بالا) و کمی (حجم زیاد DNA) بود. دوم انتخاب یک ماده پیش کوتینگ مناسب برای به حداقل رساندن واکنش‌های غیر اختصاصی و نیز مقرون به صرفه بودن آن در بین Methylated- BSA و Poly-L-Lysine و سوم اینکه انتخاب DNA مناسب در بین Calf thymus (یوکاریوت) و *E.coli* (پروکاریوت) برای سنجش بود. در مطالعه Brinkmann نشان داده شد که پلی ال لیزین و پروتامین سولفات برای پیش کوتینگ دارای شارژ یونی زیاد بار مثبت هستند می‌توانند ایمنوگلوبین‌ها و کمپلکس‌های ایمنی را که دارای بار منفی هستند را به خود متصل و ایجاد نتایج مثبت کاذب نمایند.[۱۹] در مطالعه‌ای که به‌منظور ارزیابی ماده پیش کوتینگ توسط Hylkema انجام شد از استرپتو اویدین به‌عنوان ماده پیش کوتینگ و از DNA فوتوبیوتینه برای الایزا خود استفاده کردند به گفته آنها پلی ال لیزین باعث ایجاد نتایج مثبت کاذب می‌شود.[۱۸] در مطالعه مشابه دیگر توسط Emlen نیز در این زمینه از ایجاد نتایج مثبت کاذب پلی ال لیزین دارد.[۱۷] کما اینکه در مطالعه ما پس از استفاده از پلی ال لیزین به‌عنوان ماده پیش کوتینگ این نتایج را به‌دنبال داشت که در ادامه از Methylated- BSA به‌عنوان ماده پیش کوتینگ استفاده گردید که این ماده هم آماده‌سازی راحت‌تر و مقرون به صرفه‌تر بود و می‌توانست پلیت‌های زیادی را پوشش دهد و هم اینکه ایجاد واکنش‌های غیر اختصاصی نمی‌کرد. امروزه از DNAهای مختلف سلول یوکاریوت و پرو کاریوت و حتی ویروس‌ها (باکتریوفاژها) به‌عنوان منبع آنتی‌ژنی برای شناسایی آنتی‌بادی‌های علیه dsDNA استفاده می‌شود که بسته به هر منبع حساسیت‌ها و ویژگی‌های مختلفی را برای شناسایی به‌دنبال دارد. در مطالعه Janypoon از DNAهای مختلف یوکاریوت (سلول خونی) و پروکاریوت (فلاووباکتریوم مننگوسپتیکوم، پروتئوس ولگاریس، سراشیا مارسه سنس، استرپتوکوک پیوژنز و سالمونلا تیفی موریوم) در جهت جداسازی آنتی‌بادی‌های علیه dsDNA در قالب تست الایزا در مقایسه با کیت تجاری الایزا صورت گرفته بود گزارش کرد که DNA سلول‌های خونی و فلاووباکتریوم مننگوسپتیکوم نتایج بهتری را نسبت به دیگر DNAها داشت و حساسیت این دو به ترتیب ۸۲٪ و ۷۵٪ و ویژگی ۹۱٪ و ۹۱٪ بود.[۱۲] در مطالعه Linnemann به‌منظور بررسی سه کیت تجاری الایزا با منابع مختلف آنتی‌ژنی (ماهی قزل آلا، تیموس گوساله و پلاسمید) در مقایسه با تست CLIFT پرداخته بود گزارش کرد که کیت‌های با منبع DNA تیموس گوساله و ماهی قزل آلا نتایج نسبتاً بهتری داشتند[۱۳] و در مطالعه Wigand و همکاران به‌منظور ارزیابی الایزا طراحی شده آنها با استفاده از DNA ژنوم نوترکیب شده انسانی در مقایسه با دو کیت تجاری با منبع DNA ماهی و پلاسمید و تست IF جهت تعیین حساسیت و ویژگی روی نمونه‌های سرمی انجام گرفته بود میزان حساسیت و ویژگی تست IF به‌ترتیب ۵۷٪ و ۹۸٪ بوده است آنها گزارش کردند که الایزا آنها حساسیت بیشتری نسبت به IF و ویژگی بیشتری نسبت به دو کیت تجاری الایزا دارد.[۳۴] از طرف دیگر مطالعه ما نشان داد که حساسیت و ویژگی پلیت طراحی شده با منبع DNA اشریشیا کلی پایین‌تر از تیموس گوساله است. پس از اینکه حساسیت و ویژگی به‌دست آمد بایستی پلیت طراحی شده از نظر دیگر پارامترهای مربوط به استاندارد بودن بررسی شود که در ادامه از پلیت‌های با منبع DNA تیموس گوساله استفاده شد که بر اساس نتایج به‌دست آمده دقت درون سنجی CV=٪۷/۴ و دقت میان‌سنجی CV=٪۹/۶ با میانگین دو پارامتر که ۸/۵٪ نشان‌دهنده دقت مناسب پلیت طراحی شده است و در مورد صحت که از دو پارامتر بازیافت Recovery که ۹۵/۲٪ (معیار پذیرش ۱۰۵-۹۵ درصد است) حاصل شد و تست خطی بودن Linearity که منحنی به‌صورت خط مستقیم به‌دست آمد نشان‌دهنده صحت خوب پلیت طراحی شده ما می‌باشد. به طوری‌که در مطالعه‌ای که توسط Mohan برای ارزیابی روش الایزا صورت گرفته بود میزان دقت درون سنجی را ۷/۵٪ و دقت میان‌سنجی ۹/۷٪ و میزان درصد بازیافت را بین ۱۰۴-۸۹ را مورد قبول برای سنجش الایزا گزارش کردند.[۳۵] امروزه تکنیک الایزا توانسته جایگاه مناسبی را در میان تکنیک‌های تشخیص anti- dsDNA پیدا کند و به عنوان یک تست مهم غربال‌گری برای نمونه‌های با تعداد زیاد و با حساسیت بالا و ویژگی مناسب، روش انجام آسان و سهولت دسترسی نسبت به دیگر روش‌ها دارد دیگر تکنیک‌ها دارای فشردگی، پیچیدگی آزمون بوده و نیازمند تفسیر شخصی توسط افراد مجرب است و برای نمونه‌های زیاد

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 23:23 IRST on Saturday February 17th 2018

محدودیت دارند و بیشتر به‌عنوان تست استاندارد طلایی و یا تست‌های تکمیلی یا تائیدی و یا تحقیقی در نظر گرفته می‌شوند. Takeuchi به مقایسه دو سنجش ELISA و Farr assay که به‌عنوان تست روتین در ژاپن استفاده وسیعی دارد برای جداسازی آنتی‌بادی‌های علیه dsDNA در شناسایی SLE به این نتیجه رسید که اگر چه هر دو تکنیک می‌تواند تقریباً به‌طور مشابه این آنتی‌بادی‌ها را جدا و شناسایی کند اما تکنیک الایزا حساسیت بیشتری نسبت به رادیوایمنو اسی Farr assay دارد و پیشنهاد دادند که ترجیحاً از تکنیک الایزا به‌خاطر سادگی و انجام سریع و آسان استفاده شود.[۳۶] بر اساس گزارش Mohan نتایج الایزا در مقایسه با CLIFT به‌علت حساسیت بالاتر و اینکه قادر است نمونه‌های بینابینی (border line) را بر خلاف CLIFT شناسایی کند و تعداد نمونه‌های زیادی به‌طور همزمان مناسب‌تر است.[۳۵] در یک مطالعه مقایسه‌ای روی ۲۰۰۰ بیمار SLE توسط Werle نشان داد بیماران فوق توسط الایزا مثبت اما در تست RIA (Farr assay) منفی بودند آنها نتیجه گرفتند در آنها آنتی‌بادی‌های با اویدیتی (avidity) پایین وجود داشته که توسط الایزا شناسایی شده‌اند.[۲۸] امروزه پیشنهاد می‌شود که نتایج مثبت الایزا بهتر است با دیگر سنجش‌ها برای تائید بیشتر صورت گیرد بدین صورت در مطالعات Wong با مقایسه دو روش الایزا و IF (CLIFT) برای اندازه‌گیری آنتی‌بادی‌های علیه dsDNA گزارش کردند که تکنیک الایزا به‌عنوان یک تست مناسب برای غربال‌گری است و نمونه‌های جدا شده توسط آن‌را می‌توان برای تائید بیشتر با دیگر متدها نظیر رادیو ایمنواسی (Farr assay) انجام داد.[۳۷] این مطالعه به‌همراه دیگر مطالعات نشان می‌دهد که DNAهای مختلف یوکاریوتی و پروکاریوتی نتایج مختلفی را در شناسایی آنتی‌بادی‌های علیه dsDNA دارند که در مطالعه ما DNA با منبع Calf thymus حساسیت و ویژگی بالاتری نسبت به *E.coli* دارد و نیز اینکه استفاده از Methylated-BSA به‌عنوان ماده پیش کوتینگ به خاطر دارا بودن کمترین واکنش‌های غیر اختصاصی و نیز مقرون به صرفه بودن و آماده‌سازی آسان‌تر مناسب‌تر از Poly-L-Lysine است و مطالعات بیشتر را برای مقایسه الایزا با منبع DNA ژنومی Calf thymus در مقایسه با رادیوایمنو اسی Farr assay برای جداسازی anti-dsDNA پیشنهاد می‌شود. در نهایت از آنجایی‌که کیت‌های تشخیصی anti-dsDNA مورد استفاده در داخل کشور وارداتی هستند و هر ساله هزینه زیادی برای خریداری آن صرف می‌شود در حالی‌که پروسه طراحی، ساخت و استاندارد کردن آن پیچیده و غیر ممکن نمی‌باشد و توانایی ساخت آن وجود دارد به طوری‌که توانایی پروسه طراحی ساخت و استاندارد کردن مراحل اولیه آن در این مطالعه با موفقیت انجام شد و لذا برای تولید به‌صورت انبوه به‌صورت یک کیت تجاری نیازمند انجام آزمایشات کنترل کیفی بیشتر و طولانی‌مدت در این زمینه است.

سپاسگزاری: بدین‌وسیله کمال تشکر و قدردانی خود را از شرکت تولیدی تحقیقاتی پیشتاز طب زمان سازنده کیت‌های تجاری الایزا در تهران به‌خاطر حمایت‌های مالی بی‌دریغ خود در به انجام رساندن این پروژه ابراز می‌دارم. همچنین از موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج بخش‌های مختلف بیوتکنولوژی، بیوشیمی و میکروب شناسی در جهت همکاری با این پروژه تشکر کرده و نیز از بخش روماتولوژی بیمارستان امام‌خمینی تهران، آزمایشگاه نور، پارس و بهار تهران نیز تشکر و قدردانی می‌نمایم.

References

1. López-Hoyos M, Cabeza R, Martínez-Taboada VM, Crespo J, SanSegundo D, Blanco R, et al. Clinical disease activity and titers of anti-dsDNA antibodies measured by an automated immunofluorescence assay in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2005; 14: 505-9.
2. Riboldi P, Gerosa M, Moroni G, Radice A, Allegri F, Sinico A, et al. Anti-DNA antibodies: a diagnostic and prognostic tool for systemic lupus erythematosus? *Autoimmunity* 2005; 38: 39-45.
3. Isenberg D. Anti-dsDNA antibodies: still a useful criterion for patients with systemic lupus erythematosus? *Lupus* 2004; 13: 881-5.
4. Arbuckle MR, James JA, Kohlhase KF, Rubertone MV, Dennis GJ, Harley JB. Development of anti-dsDNA autoantibodies prior to clinical diagnosis of systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol* 2001; 54: 211-9.
5. Chrétien P, Dauvin M, Hélin P, Ocwieja T, Absalon YB, Johanet C. Comparison of indirect immunofluorescence on Crithidia luciliae of Farr test, and immunoenzymatic methods for the screening of anti-native DNA autoantibodies. *Ann Biol Clin (Paris)* 1994; 52: 645-50.
6. Pisetsky DS. Anti-DNA antibodies in systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin North Am* 1992; 18: 437-54.
7. Sheth KV, Alkaff MA, Bahabri SA, El Ramahi KM, Al-Sedairy S, Al-Dalaan AA. Evaluation of anti-ds DNA antibody measurement by using commercial kits for use in a clinical laboratory. *Ann Saudi Med* 1995; 15: 327-32.
8. Hahn BH. Antibodies to DNA. *N Engl J Med* 1998; 338: 1359-68.
9. Harris ED, Budd RC, Genovese MC. Kelley's Textbook of Rheumatology. 7th ed. Philadelphia: Elsevier, Saunders; 2005.
10. Enger W. The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE. *Clin Pathol* 2000; 53: 424-32.
11. Smeenk RJ, van den Brink HG, Brinkman K, Termaat RM, Berden JH, Swaak AJ. Anti-dsDNA: choice of assay in relation to clinical value. *Rheumatol Int* 1991; 11: 101-7.

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 23:23 IRST on Saturday February 17th 2018

12. Janyapoon K, Jivakanont P, Surbrsing R, Siriprapapan W, Tachawuttiwat T, Korbsrisate S. Detection of anti-dsDNA by ELISA using different sources of antigens. *Pathology* 2005; 37: 63-8.
13. Linnemann M, Geisen C, Menn S, Herzberg C, Dinser R, Wielckens K. Comparison of three dsDNA-ELISAs with regard to their efficiency in the diagnosis of systemic lupus erythematosus. *Clin Lab* 2002; 48: 45-52.
14. Makowski GS, Ramsby ML. Selective detection of autoimmune antibodies to single- and double-stranded DNA by enzyme immunoassay. *Ann Clin Lab Sci* 2003; 33: 142-8.
15. Witte T, Hartung K, Sachse C, Matthias T, Fricke M, Deicher H, et al. IgM anti-dsDNA antibodies in systemic lupus erythematosus: negative association with nephritis. SLE Study Group. *Rheumatol Int* 1998; 18: 85-91.
16. Porstmann T, Kiessig ST. Enzyme immunoassay techniques. An overview. *J Immunol Methods* 1992; 150: 5-21.
17. Emlen W, Jarusiripipat P, Burdick G. A new ELISA for the detection of double-stranded DNA antibodies. *J Immunol Methods* 1990; 132: 91-101.
18. Hylkema MN, Huygen H, Kramers C, vd Wal TJ, de Jong J, van Bruggen MC, et al. Clinical evaluation of a modified ELISA, using photobiotinylated DNA, for the detection of anti-DNA antibodies. *J Immunol Methods* 1994; 170: 93-102.
19. Brinkman, K. termaat, R. Van den Brink, H . The Specificity of anti-dsDNA ELISA. *J Immunol Methods* 1992; 139: 91-100
20. Ried T. Thomas Ried's Lab, NCI Standard protocol for DNA extraction from cultured adherent cells. 2004; Available from: [http://www.riedlab.nci.nih.gov/publications/2437.2337_DNA_Prep_Adherent_cells.pdf].
21. Ausubel FM. Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology. 5th ed. New York: Wiley & Sons; 2002.
22. Cavallearo JJ, Brinkman K, Termaat R, Vanden H. Laboratory methods for detection of antinuclear antibodies. CDC Press, 1987.
23. Sambrook J, Russell D. Molecular cloning. A Laboratory Manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
24. Patel D, Milford WA. MDA Evaluation Report: SIGMA anti-dsDNA IgG ELISA, 2002.
25. Westgard JO, Elsa F. Methods Validation The Interference and Recovery Experiments, 2004. Westgard QC, Inc. Available from: [http://www.westgard.com/lesson27.htm].
26. Tzioufas AG, Manoussakis MN, Drosos AA, Silis G, Gharavi AE, Moutsopoulos HM. Enzyme immunoassays for the detection of IgG and IgM anti-dsDNA antibodies: clinical significance and specificity. *Clin Exp Rheumatol* 1987; 5: 247-53.
27. Okamura M, Kanayama Y, Amastu K, Negoro N, Kohda S, Takeda T, et al. Significance of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies to double stranded and single stranded DNA in patients with lupus nephritis: correlation with severity of renal histology. *Ann Rheum Dis* 1993; 52: 14-20.
28. Werle E, Blazek M, Fiehn W. The clinical significance of measuring different anti-dsDNA antibodies by using the Farr assay, an enzyme immunoassay and a Crithidia luciliae immunofluorescence test. *Lupus* 1992; 1: 369-77.
29. Smeenk R, Hylkema M. Detection of antibodies to DNA: a technical assessment. *Mol Biol Rep* 1992; 17: 71-9.
30. Krippner H, Merle S, Pirlet K. Enzyme immunoassay for IgG and IgM antibodies against dsDNA and ssDNA. *Z Rheumatol* 1983; 42: 256-60.
31. Enger W. The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE. *Clin Pathol* 2000; 53: 424-32.
32. Rauterberg EW, Raghunath M, Bride S. The Crithidia luciliae immunofluoresencence (CLIF). Diagnostic Sensitivity and Specificity new commercial CLIF- kits. *Lab Med* 1998; 13: 287-95.
33. Smeenk RJ, van den Brink HG, Brinkman K, Termaat RM, Berden JH, Swaak AJ. Anti-dsDNA: choice of assay in relation to clinical value. *Rheumatol Int* 1991; 11: 101-7.
34. Wigand R, Gottschalk R, Falkenbach A, Matthias T, Kaltwasser JP, Hoelzer D. [Detection of dsDNA antibodies in diagnosis of systemic lupus erythematosus--comparative studies of diagnostic effectiveness of 3 ELISA methods with different antigens and a Crithidia luciliae immunofluorescence test. *Z Rheumatol* 1997; 56: 53-62.
35. Mohan TC, Jalil HA, Nadarajah M, Sng EH. Evaluation of an ELISA method for the measurement of antibodies to dsDNA. *Singapore Med J* 1989; 30: 242-5.
36. Takeuchi Y, Ishikawa O, Miyachi Y. The comparative study of anti-double stranded DNA antibody levels measured by radioimmunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay in systemic lupus erythematosus. *J Dermatol* 1997; 24: 297-300.
37. Wong KH, Lawton JW, Cheng SK, Lee SS, Lau CS. Measurement of anti-dsDNA: a comparative study of two ELISA and the Crithidia assay. *Pathology* 1998; 30: 57-61.

Tehran University Medical Journal; Vol. 67, No. 1, Apr 2009: 25-32

Detection of anti- dsDNA by IgG ELISA test using two different sources of antigens: calf thymus and E.coli

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 23:23 IRST on Saturday February 17th 2018

Mohammadi M.[1*]
Mirjalili A.[2]
Habibi Gh.[2]
Falahi Sh.[3]
Sarafnejad A.[4]
Eatemadi A.[5]
Boutorabi S M.[6]

1- Department of Microbiology, Lorestan University of Medical Sciences
2- Department of Biotechnology, Razi Vaccine & Serum Research Institute
3- Department of Parasitology, Lorestan University of Medical Sciences
4- Department of Immunology, Tehran University of Medical Sciences
5- Department of Microbiology, Razi Vaccine & Serum Research Institute
6- Pishtaz teb zaman commercial kit producing company

[*] Corresponding author: Dept. of Microbiology, Lorestan University of Medical Sciences, Khoramabad, IRAN
Tel: +98-661-6200161
email: mohamadi_77@yahoo.com

Received: July 22, 2008 Accepted: November 02, 2008

Abstract

Background: Anti-dsDNA antibodies frequently found in the sera Systemic Lupus Erythematosus patients, particularly in active disease stage. Nowadays exploit different eukaryotic and prokaryotic dsDNA as antigen source and different reagents as binder. The aim of this study to compared two dsDNA different sources and tow different kinds of reagents for binder in ELISA test.
Methods: In this study bacterial genomic DNA from E.coli (ATCC 25922) and genomic DNA from calf thymus extracted with high purity and were used as antigens for IgG anti-dsDNA detection by ELISA. To coat dsDNA in microtiter wells, tow different kinds of reagents including methylated –BSA and poly-l-lysine (for pre-coating) are used. Sera from systemic lupus erythematosus patients and from normal blood donors are used to assess sensitivity and specificity of our ELISA test in compared with IF test and commercial kits.
Results: Our results displayed pre-coating of microtiter plates with methylated –BSA reduce nonspecific binding reaction and the relative sensitivity and specificity of ELISA increased when calf thymus DNA is employed as antigenic source in compared with IF test and commercial kits 80%, 88% and 100%, 98% respectively, but when E.coli DNA is used 73%, 69% and 85%, 79%, respectively.
Conclusion: The genomic DNA from calf thymus is a potentially useful source of antigen for detection of anti-dsDNA by ELISA. Also the use of methylatted- BSA could have an effective role in reducing of nonspecific binding reactions.

Keywords: Systemic lupus erythematosus; anti-DNA antibodies; ELISA.