مجله دنیای میکروب ها
سال دوم، شماره دوم، ۱۳۸۸
صفحات ۸۸-۸۱

Original Article

طراحی کیت سنجش آنتی ژن p24 ویروس HIV با استفاده از آنتی بادی منوکلونال انسانی

معصومه هاشمی*[۱]، دکتر سید مهدی بوترابی[۲]، دکتر رضا حاجی حسینی[۱]، دکتر علی میرجلیلی

[۱]گروه بیوشیمی، دانشگاه پیام نور تهران، [۲]متخصص میکروب شناسی، شرکت پیشتاز طب، [۳]گروه بیوتکنولوژی، انستیتو واکسن وسرم سازی رازی

چکیده

سابقه و هدف: چندین روز پس از عفونت با ویروس HIV و قبل از تغییرات سرمی در مرحله وجود RNA ویروس درخون، آنتی ژن p24 در خون قابل سنجش است. مطالعات نشان می دهد در مراحل اولیه عفونت آنتی ژن p24 بسیار زودتر از آنتی بادی بر علیه ویروس ظاهر می‌شود. بنابراین ارزیابی آنتی ژن p24 ویروس می تواند شاخص مناسبی برای تشخیص عفونت در مراحل اولیه بیماری باشد. هدف از این پژوهش استفاده از روش الایزا برای تشخیص آنتی‌ژن p24 با حساسیت و ویژگی بالا و مقایسه آن با روش های دیگر تشخیصی به منظور تشخیص عفونت در مراحل اولیه می باشد.

مواد و روش ها: ۳۰۰ نمونه خون با کیت نسل سوم تعیین آنتی بادی بر علیه HIV مورد آزمایش قرار گرفت. ۳۰ نمونه مثبت از مرکز تحقیقات ایدز و از بیماران تایید شده با روش ایمونوبلات و NAT جمع آوری شد. تمام نمونه ها با کیت طراحی شده آنتی ژن p24 با روش الیزا مورد بررسی قرار گرفت. برای حذف اثر تداخلی احتمالی وجود آنتی بادی بر علیه آنتی ژن p24، نمونه سرم هایی که تست آنتی بادی آنها مثبت بود با محلول های مختلفی مانند بافر گلیسین ۱/۵ مولار با pH ۲، اسید کلریک ۰/۵ نرمال، ترایتون X-100 با غلظت ۰/۱ درصد، بافر قلیایی شماره ۱ و شماره ۲ مجاور شدند.

نتایج: از ۳۰ نمونه مثبت در ۲۱ مورد تست آنتی ژن در کیت طراحی شده با آنتی بادی منوکلونال انسانی و ۱۸ مورد در کیت طراحی شده با آنتی بادی منوکلونال موشی قبل از مجاورت با محلول گلیسین مثبت شد (حساسیت تشخیصی به ترتیب ۷۰٪ و ۶۰٪). پس از مجاور سازی ۲۸ نمونه در کیت طراحی شده با آنتی بادی منوکلونال انسانی و ۲۷ مورد در کیت طراحی شده با آنتی بادی منوکلونال موشی مثبت شد (حساسیت تشخیصی به ترتیب ۹۳٪ و ۹۰٪). در کیت طراحی شده برای تشخیص آنتی ژن p24 حد مرزی بر مبنای جذب نوری نمونه های منفی ۰/۱۵ (معادل ۲ پیکوگرم در میلی لیتر آنتی ژن p24) تعیین شد. اختلاف بین میانگین جذب نوری نمونه های مثبت و منفی در تست آنتی ژن از نظر آماری با $p<۰/۰۰۵$ قابل توجه بود (جذب نوری ۱/۶ در مقابل ۰/۰۸). حساسیت آنالیتیک سنجش با استفاده از آنتی بادی منوکلونال انسانی و استفاده از آنتی ژن WHO۱ واحد در میلی لیتر و با آنتی ژن نوترکیب ۲ پیکوگرم در میلی لیتر بدست آمد که در استفاده از آنتی بادی منوکلونال موشی این مقدار به ترتیب ۴ و ۸ بود. بر اساس نتایج حاصل از نمونه های منفی اختصاصیت سنجش ۱۰۰٪ محاسبه گردید. مجاور سازی نمونه سرم های مثبت و نمونه هایی از پانل BBI دارای تست‌های مثبت آنتی ژن و آنتی بادی و PCR، بافر گلیسین ۱/۵ مولار با pH ۲ باعث افزایش حساسیت تشخیصی گردید (۷۰٪ در مقابل ۹۳٪).

نتیجه گیری: این تست حساسیت و ویژگی بالا یی برای تشخیص HIV دارد و در مقایسه با روش‌های دیگر تشخیص، ساده، سریع، دقیق و از نظر اقتصادی مقرون به صرفه می باشد. از این تست در غربالگری نوزادان تولد یافته از مادران HIV مثبت و همچنین تعیین تکلیف در مورد افرادی که تست الیزا نسل چهارم مثبت داشته، اما تست وسترن بلات آن را تائید نکرده می‌توان استفاده کرد.

واژگان کلیدی: آزمون الایزا، آنتی ژن p24، سنجش ایمنی، HIV

دریافت مقاله: بهار ۸۸ پذیرش برای چاپ: تابستان ۸۸

*) آدرس برای مکاتبه: تهران، دانشگاه پیام نور، گروه بیوشیمی تلفن: ۹۲۹۴ ۱۲۵ ۰۹۱۹
پست الکترونیک: masoomehhashemi@yahoo.com

مقدمه

ویروس HIV دارای ژنوم RNA تک‌رشته‌ای و حدود ۱۰۰۰۰ نوکلئوتید می‌باشد. ویروس HIV عامل بیماری ایدز است و به‌خوبی مشخص شده که منشا اولیه عفونت، تزریق خون و فراورده‌های خونی آلوده است (۱). روشی که امروزه برای تشخیص افراد آلوده به ویروس HIV پیشنهاد می‌شود، تعیین آنتی‌بادی برعلیه ویروس است. با این حال این تست دارای نتایج مثبت و منفی کاذب می باشد. برای بررسی موارد مثبت کاذب از تست وسترن بلات استفاده می‌شود (۲ و ۳). تشخیص عفونت در مراحل ابتدایی برای جلوگیری از عفونت‌های ثانویه به انتقال خون بسیار مهم است. بنابراین روش تشخیص HIV در مراحل ابتدایی نمونه‌های بالینی، بسیار مورد نیاز و ارزشمند است (۴). استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال یا پلی کلونال در تشخیص آنتی‌ژن‌های ویروس، به ویژه آنتی‌ژن p24 ویروس در حال پیشرفت می‌باشد. استفاده از یک روش الایزا برای تشخیص این آنتی‌ژن با حساسیت و ویژگی بالا و مقایسه آن با روش های دیگر تشخیصی به منظور تشخیص عفونت در مراحل اولیه از اهداف تحقیق حاضر می‌باشد که با توجه به نتایج آن می‌تواند مشکلات تشخیصی ذکر شده را مرتفع نماید.

مواد و روش ها

الف) جمع آوری نمونه: ۳۰۰ نمونه منفی از سرم افراد بدون علامت به صورت تصادفی انتخاب شد. ۳۰ نمونه مثبت از مرکز تحقیقات ایدز و از بیماران تایید شده با روش ایمونوبلات و NAT جمع آوری شد.

ب) آزمایش آنتی بادی بر علیه ویروس *HIV*: با استفاده از کیت شرکت پیشتاز طب زمان تمام ۳۰۰ نمونه جمع‌آوری شده بر طبق روش یاد شده در بروشور کیت مورد آزمایش قرار گرفت. این نمونه ها دارای جذب نوری کمتر از حد Cut off تعیین شده برای کیت مذکور بودند (میانگین جذب نوری کنترل منفی + ۰/۲). در این کیت از آنتی ژن های gp120، gp41 و p24 برای تشخیص آنتی بادی استفاده شده است.

ج) طراحی کیت تشخیصی آنتی ژن *p24* به روش الایزا: از غلظت اولیه آنتی‌بادی منوکلونال انسانی ساخت شرکت Biomaric با شماره کاتالوگ 200.004 و 200.008 و آنتی بادی منوکلونال موشی با شماره کاتالوگ 200.005 و 201.004 با غلظت ۱ و ۲/۵ میکروگرم را در داخل بافر کوتینگ حل کرده و مقدار ۱۰۰µl از این محلول را در داخل هر چاهک ریخته و روی آن پوشانده شد و یک شب در ۴ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. پس از شستشوی پلیت الایزا با بافر فسفات حاوی توئین ۲۰ توسط محلول بلاکر حاوی بووین سرم آلبومین ۱٪ و کربوهیدرات، چاهک‌ها به مدت ۱ ساعت در درجه حرارت اتاق بلاک شدند. سپس محتویات چاهک‌ها تخلیه و به مدت ۶ ساعت در درجه حرارت اتاق برای خشک شدن نگهداری شد. این پلیت‌ها تا زمان آزمایش در درجه حرارت ۸-۲ درجه سانتی‌گراد و در فویل حاوی نم‌گیر نگهداری شدند.

د) آماده سازی کنژوگه: کنژوگه ۱ شامل آنتی بادی مونوکلونال بیوتینه ساخت شرکت Biomaric بود. با توجه به حجم اولیه آنتی‌بادی و حجم نهایی، غلظت آنتی بادی بیوتینه ۰/۱ میکروگرم در میلی لیتر محاسبه شد.

کنژوگه ۲ شامل استرپتوآویدین HRP ساخت شرکت Sigma با غلظت‌های مختلف بود و از آن برای شناسایی کمپلکس آنتی‌ژن ـ آنتی‌بادی استفاده شد. این کنژوگه در محلول پایدارکننده مخصوص نگهداری HRP شرکت پیشتاز طب رقیق گردید (۵). سپس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه سرم و ۵۰ میکرولیتر از کنژوگه ۱ به هر چاهک اضافه شد. برای کنترل مثبت از آنتی‌ژن p24 ویروس HIV ساخت شرکت RPC روسیه cat No: 90/636 با غلظت ۱۰۰ پیکوگرم در میلی‌لیتر استفاده شد. چاهک‌ها به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در بن‌ماری انکوبه گردید. پس از انکوباسیون چاهک‌ها توسط محلول شستشو حاوی بافر فسفات و توئین ۵ بار شستشو شد و پس از تخلیه کامل محلول شستشو، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از کنژوگه ۲ به هر چاهک اضافه شد و به‌مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. پس از اتمام انکوباسیون چاهک‌ها ۵ بار با بافر شستشو شد و پس از تخلیه کامل به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از محلول کروموژن سوبسترا اضافه گردید (محلول کروموژن سوبسترا حاوی تترا متیل بنزیدین و آب‌اکسیژنه ساخت شرکت پیشتازطب). پس از ۱۵ دقیقه واکنش با ایجاد رنگ آبی مشخص گردید. با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده (اسید کلریدریک ۱ نرمال) واکنش متوقف و تبدیل رنگ آبی به زرد مشاهده شد. جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر در مقابل فیلتر مرجع ۶۳۰ قرائت گردید. برای تعیین Cut off از جذب نوری نمونه‌های منفی میانگین و انحراف معیار گرفته شد و بر اساس فرمول (SD)+۳ میانگین حد مرزی کیت تعیین شد.

برای حذف اثر تداخل احتمالی وجود آنتی‌بادی بر علیه

آنتی‌ژن p24 در نمونه‌ها، نمونه‌های سرم از پانل‌هایی که تست آنتی‌بادی، آنتی ژن و PCR آنها مثبت بود با محلول های مختلفی مانند بافر گلسین با pH ۲، اسید کلریدریک ۰/۵ نرمال، ترایتون X-100 با غلظت ۰/۱ درصد، محلول بافر قلیایی شماره ۱ با محتوای اتانول آمین ۲ مولار، ترایتون X100(۲/۵٪)، NaCl (۰/۱۵M) دارای pH ۱۰ و محلول بافر قلیایی شماره ۲ با محتویات اوره ۴ مولار، Supanin ۱٪، اتانول ۰/۰۲٪ و NaCl (۰/۱۵M) و فسفات سدیم ۰/۰۱M دارای pH ۱۰ مجاور شدند. ۱۰۰ میکرو لیتر از نمونه با ۱۰۰ میکرولیتر از محلول های فوق مخلوط شد و به مدت ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه نگهداری گردید. در مورد دو محلول آخر ۲۰ میکرولیتر از محلول با ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه سرم مخلوط شد. در مورد محلول‌های اسیدی pH نمونه با بافر تریس pH ۱۰/۶ در حدود ۷ تنظیم گردید. به منظور بررسی اثر احتمالی این محلول ها در ایجاد جذب زمینه‌ای چند نمونه منفی نیز به همراه نمونه‌های مثبت مورد بررسی قرار گرفت (۶).

علاوه بر این برای اطمینان از کاهش اثر آنتی‌بادی‌های موجود در سرم بر روی نمونه‌های مجاور شده با محلول های اسیدی و ترایتون، مجددا تست آنتی‌بادی انجام شد و با تیتر آنتی‌بادی در نمونه سرم بدون مجاورت با محلول مقایسه گردید.

به منظور بررسی حساسیت تشخیصی از پانل‌های بین‌المللی BBI، پانل‌های دگرگونی سرمی (Seroconversion) شماره PRB108(M), PRB926 (Mixed titer) انتخاب گردید و با کیت طراحی‌شده مورد بررسی قرار گرفت.

ه) حساسیت آنالیتیک: در این مرحله حساسیت آنالیتیک از دو روش تعیین شد:

حساسیت آنالیتیک سنجش طراحی شده با آنتی بادی منوکلونال انسانی و آنتی بادی منوکلونال موشی با استفاده از رقت سریال آنتی ژن نوترکیب p24 بررسی شد.

حساسیت آنالیتیک سنجش‌ها با استفاده از رقت های سریال آنتی ژن p24 سازمان بهداشت جهانی (WHO) بررسی گردید.

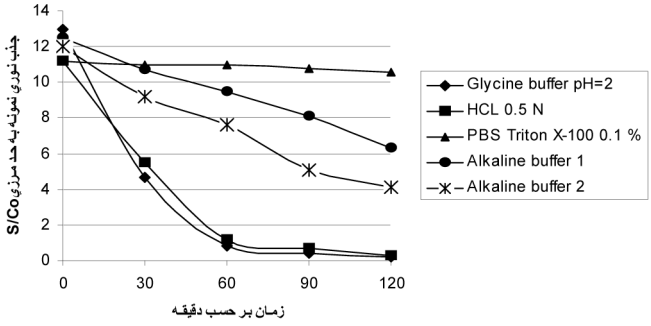
به منظور بررسی دقت سنجش از سه نمونه با غلظت‌های مختلف آنتی ژن استفاده شد که در طی پنج روز مختلف مجموعا در ده سری کاری و هر سری بصورت دو پلیکیت مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

میانگین جذب نوری نمونه‌هایی که تست آنتی‌بادی منفی داشتند ۰/۰۷ با انحراف معیار ۰/۰۲۳ محاسبه گردید. جذب نوری Cut off برای افتراق نمونه‌های منفی از مثبت با استفاده از انحراف معیار (SD) +۳ از میانگین جذب نوری نمونه‌های منفی محاسبه شد که برابر با ۰/۱۵ بود. نمونه‌هایی که جذب نوری بیشتر از ۰/۱۵ داشتند به‌عنوان مثبت در نظر گرفته شد. محدوده جذب نوری نمونه های مثبت از ۰/۳۵ تا ۲/۹۱ با میانگین ۱/۶ بود.

الف) اثر مجاورسازی نمونه سرم با محلول‌های اسیدی، قلیایی و ترایتون *X-100*: تیتر آنتی‌بادی موجود در سرم‌هایی که با اسید مجاور شده بودند در مقایسه با نمونه سرم بدون مجاورت کاهش قابل ملاحظه‌ای داشت. اما در نمونه‌هایی که با ترایتون X-۱۰۰ مجاور شده بودند، کاهش تیتر مشاهده نشد. در نمونه‌های دارای تست آنتی‌ژن منفی و مثبت از نظر وجود آنتی‌بادی، پس از مجاورت با محلول‌های اسیدی، تیتر آنتی‌بادی کاهش قابل ملاحظه‌ای نشان داد (شکل۱).

با توجه به مقایسه جذب نوری نمونه‌های دارای تست آنتی بادی مثبت و تست آنتی‌ژن منفی، مجاورسازی با بافر گلیسین (pH ۲) به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نسبت به مجاورسازی با اسیدکلریدریک نرمال در ۳۷ درجه سانتی‌گراد باعث افزایش جذب نوری گردید. مجاورسازی با تراتیون X-100 و محلول های ۱ و ۲ نیز تاثیری در افزایش جذب نوری نداشت. جذب نوری



شکل ۱: اثر مجاور سازی نمونه های سرم پانل با محلول های مختلف در حذف آنتی بادی.

جدول ۱: بررسی پانل دگرگونی سرمی PRZ926.

HIV Seroconversion panel PRZ 926	HIV Antibody S/Co		HIV p24 Antigen S/Co			Western Blot	PCR
Sample ID	Abbott	Gen.Sys	Abbott Polyclonal	Abbott monoclonal	Design kit	Biorad	Roche
۱	۰/۲	۰/۲	۰/۳	۰/۵	۰/٤	منفی	منفی
۲	۰/۱	۰/۲	۰/۳	۰/۵	۰/۷۳	منفی	مثبت
۳	۰/۱	۰/۱	۱/٦	۲/٤	٤/٤	منفی	مثبت
٤	۰/۲	۰/۲	۱۰/۵	۱۷/۲	۱۷/٦	منفی	مثبت
۵	۱٦/۸<	۲	۰/۵	۱/۳	۱/۷	مثبت	مثبت
٦	۱٦/۸<	۲	۰/۵	۱/۳	۱/۷	مثبت	مثبت

نمونه‌هایی که تست آنتی‌بادی منفی داشتند و به‌عنوان کنترل مورد استفاده قرار گرفت نیز افزایشی نشان نداد که این مساله نشان‌دهنده این است که افزایش جذب نوری در نمونه‌های آنتی‌بادی مثبت پس از مجاورت با محلول اسیدی برای تست آنتی‌ژن یک پدیده اختصاصی است که ناشی از جدا شدن آنتی‌بادی از آنتی‌ژن و تشخیص آنتی‌ژن p24 توسط روش سنجش است. نتایج نشان داد که حساسیت و اختصاصیت تشخیصی سنجش به ترتیب ۹۳٪ و ۱۰۰٪ می باشد.

ارزش مارکرهای مختلف ویروس HIV در نمونه‌های پانل‌های دگرگونی سرمی درکیت های تجاری موجود بررسی شد. این پانل‌ها حاوی گروهی از نمونه‌های سریال است که از یک فرد در زمان های مختلف نمونه‌گیری شده است و نشان دهنده زمان قابل تشخیص بودن آنتی‌بادی در نمونه‌هاست. برای بررسی حساسیت تشخیصی از پانل های بین المللی استفاده شد (جداول ۱ و ۲).

ب) حساسیت آنالیتیک سنجش: در این مرحله حساسیت آنالیتیک از دو روش، حساسیت آنالیتیک سنجش طراحی شده با آنتی بادی منوکلونال انسانی و آنتی بادی منوکلونال موشی با تهیه

جدول ۲: بررسی پانل دگرگونی سرمی PRM108 Low titer.

HIV Seroconversion panel PRB108	HIV Antibody S/Co		HIV p24 Antigen S/Co			Western Blot	PCR
Sample ID	Abbott	Gen.Sys	Abbott	Coulter	Design kit	Biorad	Roche
۱	۱۰/٤	۳/۹	۰/۵	۰/۹	۰/۷	مثبت	مثبت
۲	۰/۲	۰/۲	۰/۳	۰/۵	۰/۵	منفی	نامشخص
۳	۹/۳	۳/۲	۰/۳	۰/۳	۰/۳	نامشخص	مثبت
٤	۱۵/۷	۸/۱	۰/۸	۱/۸	۱/۷	مثبت	مثبت
۵	٤/۸	٦/۲	۰/۵	۰/٦	۰/۵	مثبت	مثبت
٦	٦/٤	٤/٤	۰/۷	۱/۹	۱/۸	نامشخص	مثبت
۷	۷/۳	۲/۲	۰/۷	۰/٤	۰/۷	مثبت	مثبت
۸	۱۱/۰	۵/۰	۰/۵	۰/٤	۰/٦	مثبت	مثبت
۹	۱۱/۸	۲/۱	۲/۵	۰/۷	۲/۳	مثبت	مثبت
۱۰	۹/٦	۰/۵	۲/٦	۷/۵	۲/۱	نامشخص	مثبت
۱۱	۱۰/۱	۸/۲	۱/٤	۳/۳	۳/۰	مثبت	مثبت
۱۲	۲/۸	۰/۱	٦/٦	۱۹/۳	۱۲/۸	منفی	مثبت
۱۳	۱۳/۱	۰/۳	٦/٦	۱۹/٤	۱۸/٤	نامشخص	مثبت
۱٤	۹/٦	۰/۳	۱۱/۱	۲٦/۷	۲۵/۸	منفی	مثبت
۱۵	۱٦/۲	۷/۷	۱۳/۸	۲٦/٦	۱۹/۸	نامشخص	مثبت

جدول ۳ مقایسه حساسیت آنالیتیک کیت مورد بررسی

جذب نوری آنتی بادی موشی WHO HIV1 p24 Standard	جذب نوری آنتی بادی موشی Recombinant p24	جذب نوری آنتی بادی انسانی WHO HIV1 p24 Standard	جذب نوری آنتی بادی انسانی Recombinant p24	نوع آنتی بادی / غلظت برحسب پیکوگرم یا واحد در میلی لیتر
۰/۲۵	۰/۱۸	۱/۱۹	۰/۳۹	۱۶
۰/۱۹	۰/۱۷	۰/۶۶	۰/۳۰	۸
۰/۱۶	۰/۱۲	۰/۴۳	۰/۱۷	٤
۰/۰۱۲	۰/۰۸	۰/۲۶	۰/۱۶	۲
۰/۰۹	۰/۰۵	۰/۱۸	۰/۱۳	۱
۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۱۵	حد مرزی جذب نوری
٤	۸	۱	۲	حساسیت آنالیتیک

رقت سریال آنتی ژن نوترکیب p24 و حساسیت آنالیتیک سنجش‌ها با رقت های سریال آنتی ژن p24 سازمان بهداشت جهانی (WHO) استفاده گردید (جدول ۳).

با توجه به رقت سریال از آنتی‌ژن نوترکیب p24 در نمونه سرم منفی جهت ارزیابی حساسیت آنالیتیک سنجش و با توجه به حد مرزی تعریف شده برای نمونه‌های منفی، حداقل مقدار قابل تشخیص با این سنجش ۲ پیکوگرم در میلی‌لیتر تعیین گردید.

ج) بررسی اختصاصیت: برای بررسی اختصاصیت ابتدا واکنش متقاطع آنتی بادی‌ها با سایر آنتی ژن‌های ساختمانی ویروس به صورت زیر بررسی شد. در این روش آنتی ژن های gp41 و gp120 با غلظت ۲۰۰ پیکوگرم در میلی لیتر تهیه شد و مطابق روش استاندارد برای شناسایی آنتی ژن p24 مورد ارزیابی قرار گرفت. با همین روش تعداد ۳۰۰ نمونه منفی نیز بررسی شد. از ۳۰ نمونه مثبت در ۲۱ مورد تست آنتی ژن در کیت طراحی شده با آنتی بادی منوکلونال انسانی و ۱۸ مورد در کیت طراحی شده با آنتی بادی منوکلونال موشی قبل از مجاورت با محلول گلیسین مثبت شد (حساسیت تشخیصی به ترتیب ۷۰٪ و ۶۰٪). پس از مجاور سازی ۲۸ نمونه در کیت طراحی شده با آنتی بادی منوکلونال انسانی و ۲۷ مورد در کیت طراحی شده با آنتی بادی منوکلونال موشی مثبت شد (حساسیت تشخیصی به ترتیب ۹۳٪و۹۰٪).

از ۳۰۰ نمونه تصادفی با استفاده از هر دو نوع آنتی بادی نتایج مشابهی حاصل شد که با هر دو روش اختصاصیت کیت ۱۰۰ درصد

جدول ۴ مقایسه حساسیت آنالیتیک کیت طراحی شده با سایر کیت ها

نام کیت	آنتی بادی کوتینگ	آنتی بادی کنژوگه	حساسیت آنالیتیک	روش جداسازی کمپلکس ایمنی	CV%
Perkin elmer	منوکلونال موشی	پلی کلونال	۱۷/۱ پیکوگرم	اسید - حرارت	۱۳/۲-۲۲/۷
Biochain	منوکلونال موشی	منوکلونال موشی	۱/۷ پیکوگرم	بافر لیز کننده	٤/۵-۱۱/٤
Diapro	منوکلونال موشی	منوکلونال موشی	----------	بافر لیز کننده	٤-۱۵
Coulter	منوکلونال موشی	منوکلونال انسانی	۲ پیکوگرم	اسید - حرارت	٤-۱۳
Diaproph	منوکلونال موشی	پلی کلونال	۵ پیکوگرم	بافر لیز کننده	٤/۳-۱٤
Design kit	منوکلونال انسانی	منوکلونال انسانی	۲ پیکوگرم	اسید	٤/۲-۱۲/۸

بود و واکنش مثبت‌کاذب مشاهده نشد. با توجه به نتایج حساسیت و اختصاصیت تشخیصی سنجش آنتی بادی منوکلونال انسانی قبل از مجاور سازی به ترتیب ۷۰ و ۱۰۰درصد محاسبه گردید. اما پس از مجاور سازی نمونه ها به بافر گلیسین ۱/۵ مولار حساسیت و اختصاصیت به‌ترتیب ۹۳ و ۱۰۰در صد محاسبه شد.

د) تست دقت: نتایج دقت برون سنجی حاصل از سه نمونه با غلظت های مختلف آنتی ژن نشان داد که کیت طراحی شده از دقت مناسبی در محدوده های مختلف آنتی ژن برخوردار است. میزان عدم دقت سنجش بر مبنای ضریب تغییرات %CV از ۴/۲ تا ۱۲/۸ محاسبه گردید.

بحث

روش الایزا برای تشخیص آنتی‌ژن p24 ویروس HIV با استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی قابل استفاده است. اگرچه تشخیص RNA ویروس به عنوان استاندارد طلایی در تشخیص عفونت HIV شناخته شده است، اما مطالعات نشان می‌هد که آنتی‌ژن p24 ویروس با فاصله‌ای یک‌روزه بعد از پدیدار شدن RNA قابل شناسایی است (۷ و ۸).

برای شناسایی آنتی ژن p24 از آنتی بادی‌های منوکلونال موشی و یا پلی کلونال استفاده می شود (۹ و ۱۰). در این پژوهش مقایسه دو آنتی بادی منوکلونال موشی و انسانی نشان داد که حساسیت آنالیتیک سنجش که پارامتر مهمی در تعیین حساسیت تشخیصی نیز می باشد در مورد آنتی بادی انسانی مناسب‌تر است.

جداسازی کمپلکس آنتی ژن و آنتی بادی نیز با روش‌های مختلفی در تحقیقات گوناگون انجام شده است (۱۱). Rodrigues و همکاران در سال ۲۰۰۳، آنتی ژن p24 را در ۵۵۴ سرم (۵۰۹ سرم از افراد HIV مثبت و ۴۵ سرم از کنترل های HIV منفی) شناسایی کردند. آنها برای جدا کردن کمپلکس آنتی ژن p24 و آنتی بادی ضد آن از روش تیمار اسیدی استفاده کردند. در افراد بدون علائم بالینی افزایش قابل توجهی در تشخیص آنتی ژن p24 به وجود آمد (۴۸/۲٪ در مقابل ۸/۴٪) نتایج مشابهی هم در افراد بیمار رخ داد (۸۵/۷٪ در مقابل ۳۷/۱٪) که نشان دهنده افزایش حساسیت تکنیک در تشخیص آنتی ژن p24 بوسیله تیمار اسیدی است (۱۲).

در این پژوهش با توجه به نتایج بدست آمده مشخص گردید که مجاور سازی نمونه‌ها قبل از سنجش با بافر گلیسین موجب افزایش حساسیت تشخیصی هر دو سنجش می شود (۷۰ درصد قبل از مجاورت در مقابل ۹۳ درصد پس از مجاورت). افزایش محدود حساسیت سنجش پس از مجاور سازی نمونه با بافر گلایسین ۱/۵ مولار نشان دهنده حذف اثر تداخل آنتی بادی ضد آنتی ژن p24 موجود در سرم می باشد. این آنتی بادی‌ها با تشکیل کمپلکس با آنتی ژن و پوشاندن اپی توپ آنتی ژنیک از اتصال آنتی‌ژن به آنتی بادی‌های به دام اندازنده در سنجش ممانعت می‌نمایند (۱۳ و ۱۴).

مجاور سازی با بافرهای خاص در کیت های Perkinelmer، Abbott و Coulter نیز به‌کار رفته است. Fedyuk و همکاران در سال ۱۹۹۳، برای شناسایی آنتی ژن p24 از تست الایزا استفاده کردند. محققین یاد شده ۹۷ سرم از بیماران دارای عفونت HIV را مورد بررسی قرار دادند. آنها اثر تشکیل کمپلکس آنتی ژن p24 با آنتی بادی ضد آن را در تشخیص و شناسایی آنتی ژن p24 مورد بررسی قرار دادند که نشان داد این کمپلکس شناسایی آنتی ژن را دچار اختلال می‌کند. پس از تیمار با اسید، ۵۰٪ از نمونه‌های سرمی مثبت شد در حالی که قبل از تیمار تعداد نمونه های مثبت ۵۰٪ بود (۱۵).

حساسیت و ویژگی سنجش مورد مطالعه پس از مجاورت با محلول گلایسین ۱/۵ مولار به ترتیب ۹۳ درصد و ۱۰۰ درصد بود که در مقایسه با نتایج سایر مطالعات از حساسیت و ویژگی مطلوبی برخوردار است. حساسیت آنالیتیک سنجش در استفاده از آنتی‌بادی منوکلونال انسانی و با استفاده از استاندارد سازمان بهداشت جهانی ۱ واحد در میلی لیتر بود. در حالی که با استفاده از آنتی بادی منوکلونال موشی ۴ واحد در میلی لیتر بود. این اختلاف نشان دهنده بهتر بودن حساسیت آنالیتیک آنتی بادی منوکلونال انسانی است که به دلیل افینیتی و آویدیتی بالای آنتی بادی انسانی به آنتی‌ژن می باشد. میزان حساسیت آنالیتیک در این سنجش و مقایسه آن با سایر کیت های تشخیص آنتی ژن p24 در جدول ۴ آمده است. با توجه به نتایج پانل های دگرگونی سرم از شرکت BBI که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت، استفاده از تعیین آنتی ژن p24 با کاهش قابل توجه در دوره پنجره سرولوژیک همراه است (۱۶).

نتیجه گیری

روش الایزا برای تعیین آنتی ژن p24 یک روش مستقیم برای تشخیص عفونت HIV است که به راحتی در اغلب آزمایشگاه ها قابل انجام بوده و مقرون به صرفه است و نیاز به پرسنل آموزش دیده تخصصی ندارد. مشکلات آلودگی متقاطع در PCR نیز وجود ندارد و نگهداری نمونه به دلیل پایداری بیشتر آنتی ژن نسبت به RNA آسان تر است.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با هزینه شرکت تولیدی تحقیقاتی پیشتاز طب انجام شده است. نویسندگان این مقاله از مدیریت محترم شرکت آقای بهروز حاجیان تهرانی و تمامی پرسنل بخش تحقیق و توسعه شرکت کمال امتنان را دارند.

References

1. Clavel J, Guetard D, Burn-Vezinet F, et al. Isolation of a new human retrovirus from west African patients with AIDS. Science,1986; 233:343-46.
2. Storch G.A. 2000, Essentials of diagnostic virology.1th edition; USA, Churchill Churchill Livingstone.
3. Knipe D.M, Howley P.M, 2001, Fields virology, 4 th edition, USA, Lippincott Williams&Wilkins,Vol 2.
4. Scarlatti G, Lombardi V, Plebani A, et al. Polymerase Chain Reaction, virus isolation and antigen assay in HIV-1 antibody positive mothers and their children. AIDS, 1991; 5:1173-1178.
5. Crowther J R. 2006. The ELISA Guide book. Humana press, Newjersey.
6. Jill T and Greg W. Interferences in Immonoassay . Clin Biochem Rev, 2004, 25: 105-120
7. Sutthent R, Gaudart N, Chokpaibulkit K, et al. P24 antigen detection assay modified with a booster step for diagnosis and monitoring of human immunodeficiency virus type-1 infection. J Clin Microbiol, 2003;41:1016-1022.
8. Schupbach J, Tomasik Z, Nadal D, et al. Use of HIV-1 p24 as a sensitive, precise and in expensive marker for infection, disease progression and treatment failure.Int J Antimicrob Agents,2008;16:441-445.
9. Henrard DR, Philips J, Windor J, et al. Detection of human immunodeficiency virus type-1 p24 antigen and plasma RNA relevance to indeterminant serologic tests. Transfusion, 2005; 43:376-380.
10. Ly TD, Edlinger C, Vabert A, et al. Contribution of ombineddetection assay of p24 antigen and anti-human immunodeficiency virus antibody in diagnosis of primary HIV infection by routine testing. J Clin Microbiol, 2002; 40:1938-1946.
11. Goudsmit J, Lange D, Paul D, et al. Antigenemia and antibody titers to core and envelope antigen in AIDS, AIDS-related complex and subclinical human immunodeficiency virus infection. J Infect Dis, 2003; 155:558-560.
12. Rodriguez-Iglesias, Alvarez J.ZR, Vergara A, et al.Improved Detection of HIV p24 Antigen in serum after Acid pretreatment. 2007; 11:849-851.
13. Gallarda JL, Henrard DR, Liu D, Harrington S, Stramer SL. Early detection of antibody to human immunodeficiency virus type-1 by using an antigen conjugate immunoassay correlates with the presence of immunoglobulin M antibody. J Clin Microbiol. 1992; 30:2379-2384.
14. Schupbach J. Measurment of HIV-1 p24 antigen by signal-amplification boosted ELISA of heat denatured plasma is a simple and inexpensive alternative to test for viral RNA. AIDS Rev, 2002; 4; 83-92.

15. Fedyuk N, Polrovsky A, Garaev M, International Conference on AIDS. Detection of HIV-1 p24 antigen in sera of HIV-infected patients from Russian federation. 2006; 9:260-63.
16. Courouce A.M, Barin F, Maniez C, et al. effectiveness of assay for antibodes to HIV and p24 antigen to detect very recent HIV infection in blood donors. AIDS, 2002; 6:1548-50.

Journal of Microbial World
Volume 2, No. 2, 2009

Designing of HIV P24 Antigen assay kit using human monoclonal Antibody

Masoomeh Hashemi[1], Seyed-Mehdi Butorabi[2], Reza Haji-Hoeini[1], Ali Mir-Jalili[3]

[1]Department of Biochemistry, Payam-noor University, Tehran Branch, Tehran, Iran
[2]Pishtaz-Teb Company, Tehran, Iran
[3]Department of Biotechnology, Razi vaccine and serum research institute, Tehran branch, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objective: Several days after infection with HIV and before serum changes in the stage that there is RNA HIV in the blood, the antigen p24 of the HIV is measurable in the blood. The studies done show that in the primary stages of the infection, antigen p24 appears sooner than antibody; therefore, the evaluation of antigen p24 can be an appropriate index for diagnosing the infection in the first stages of the disease.

Materials and Methods: 300 negative samples from blood donor were tested with the third-generation kit for determining the antibody against HIV. 30 positive samples were collected from the AIDS Research Center and the patients confirmed with Immunoblot and NAT methods. All the samples were investigated with the designed kit for antigen p24 in ELISA method. From among the samples, the samples of serums the antibody test of which were positive, pretreatment with different solutions including 1.5 molars of Buffer Glycin with pH 2, hydrochloric acid 0.5 N, Trition X-100 with a concentration of 0.1% , alkaline buffer No.1 and 2 for removing the probable interventional effect of antibody against antigen p24.

Result: From among 30 positive samples, 21samples of antigen tests were positive in the kit designed by human monoclonal and 18 cases in the kit designed by mouse monoclonal antibody before pretreatment samples with Glycin (the diagnostic sensitivity is 70% and 60% respectively). After pretreatment, 28 samples in the kit designed by human monoclonal antibody and 27 samples in the kit designed by mouse monoclonal were positive.(the diagnostic sensitivity were 93% and 90% respectively). In the kit designed for detecting antigen p24, the cut off was determined on the basis of optical density of the negative samples 0.15(equal to 2 pg/ml of antigen p24). The difference between the average of optical density of the positive and negative samples in antigen test was significant statistically($p<0.005$).(1.6 optical density against 0.08). By using human monoclonal antibody,1 unit in per milliliter of WHO antigen, and 2 picograms in per milliliter of recombinant antigen, the analytic sensitivity of measurement was obtained. If the mouse monoclonal antibody is used, these values are 4 and 8 respectively. According to results gained from the negative samples, the measurement specificity is 100%. In pretreatment the samples of serum positive and the samples of BBI panels for which the antigen, antibody, and PCR tests were positive; the glycin buffer of 1.5 molar and pH 2 increased the diagnostic sensitivity(70% against 93%).

Conclusion: This test has high sensitivity and specificity in diagnosing HIV and is more simple, fast, accurate, and economical in comparison with other diagnostic methods. This test may be used for screening newborns from the mothers with positive HIV and the taking decision about the cases for whom the fourth-generation of ELISA Tests are positive but Western Blot Test has not confirmed it.

Keywords: ELISA Test, antigen p24, Immunity Measurement, HIV

Correspondence to: Masoomeh Hashemi
Tel: (+98)919 125 9294
Email: masoomehhashemi@yahoo.com
Journal of Microbial world 2009, 2(2), 81-88