

Evaluation of a Newly Designed Immunochromatographic Test using Gold Nanoparticles and Recombinant Antigen *gra7* for Rapid Diagnosis of Human Toxoplasmosis

Hassan Morovati Khamsi ¹, Seyyed javad SeyyedTabaei ², Mehrdad Gholamzad ³ *

1. Department of Quality Control, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
2. Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

doi [10.30699/ijmm.14.1.101](https://doi.org/10.30699/ijmm.14.1.101)



ABSTRACT

Background: One of the most important complications of toxoplasmosis is its early diagnosis. It seems that GRA7 protein can be a good candidate for detection of the acute phase in Toxoplasmosis. Accordingly, the present study aimed to diagnose toxoplasmosis via a newly immunochromatographic test using recombinant antigen *gra7*.

Methods: The parasite was cultured in mice and then were used for DNA extraction. The *gra7* gene was amplified by PCR and cloned into the pET-32a (+) plasmid. Thereafter, the recombinant vector was transferred into the *Escherichia coli* Rosetta strain and *gra7* was detected via SDS-PAGE and western blotting. The bacterial lysate was used to purify the protein by Ni-NTA affinity chromatography. Anti-human gold conjugated antibody, test line and control line were injected to conjugate pad and nitrocellulose membrane, respectively, and all the layer were assembled. By using serum of patients and healthy individuals, manufactured kits were evaluated.

Results: Our results indicated that the selected gene was correctly cloned and the protein of interest was produced and purified. The test revealed sensitivity and specificity of 100 and 96.7 percent, respectively. The kit was also shown to be stable over 16 weeks in 37°C.

Conclusion: The choice of antigen based on cellular and clinical features of the parasite, as well as the use of previous outcomes yielded to develop a rapid diagnostic test for toxoplasmosis.

Keywords: Toxoplasmosis, Immunochromatoga, *gra7* antigen, RPD, Gold nanoparticles

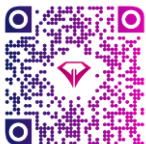
Received: 2019/11/27; Accepted: 2019/12/09; Published Online: 2020/01/01

Corresponding Information: Mehrdad Gholamzad, Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran. Email: mgholamzad@iautmu.ac.ir



Copyright © 2020, This is an original open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribution of the material just in noncommercial usages with proper citation.

Use your device to scan and read the article online



Morovati Khamsi H, SeyyedTabaei SJ, Gholamzad M. Evaluation of a Newly Designed Immunochromatographic Test using Gold Nanoparticles and Recombinant Antigen *gra7* for Rapid Diagnosis of Human Toxoplasmosis. Iran J Med Microbiol. 2020; 14 (1):101-115

Download citation: [BibTeX](#) | [RIS](#) | [EndNote](#) | [Medlars](#) | [ProCite](#) | [Reference Manager](#) | [RefWorks](#)

Send citation to:  [Mendeley](#)  [Zotero](#)  [RefWorks](#)

Introduction

Toxoplasma gondii is a mandatory intracellular parasite that causes toxoplasmosis. About 500 million to one billion people in the world are infected with the parasite, which is mainly caused by eating undercooked meat, fruits, vegetables, or being exposed to soil and water contaminated with the parasite's infected eggs. (1). Manifestations of the disease range from mild flu-like symptoms to lymphadenopathy and Chorioretinitis. Transmission of a primary (acute) infection from a pregnant mother to the fetus is largely asymptomatic and can lead to miscarriage or congenital abnormalities such as hydrocephalus, microcephaly, intracranial calcification, Chorioretinitis, blindness, epilepsy, mental retardation, or problems in motor abilities (2). On the other hand, the activation of a chronic infection in the nervous system following a weakened or impaired immune system in people with AIDS, organ transplants, or in patients with lymphoproliferative diseases can lead to central nervous system damage or complications such as encephalitis for which lack of in time diagnosis and proper treatment can have deadly consequences (3). Early detection of acute and chronic toxoplasmosis, followed by appropriate drug treatment in at-risk individuals, can reduce the severity of symptoms and the occurrence of life-threatening injuries (4). Therefore, the aim of this study was to use recombinant *gra7* protein to design immunochromatographic methods for rapid diagnosis of specific IgG against *T. gondii* in three minutes.

Materials and Methods

Toxoplasma Culture and DNA Extraction

This experimental study was performed in 2017 with 204 serum samples from different laboratories in Tehran using non-probable sampling method. Toxoplasma-induced RH angles were used in frozen form from the Quality Control Department of the Razi Vaccine and Serum Research Institute. To remove the preservative, the parasite was washed once with PBS solution and then cultured twice by successive intracranial passages in the mouse. For the reproduction and maintenance of the parasite, 0.5 mL of peritoneal fluid containing 2×10^5 live parasites was injected into each mouse and 100 μL / mL of penicillin was injected intraperitoneally. After 3 to 4 days, the peritoneal cavity of infected mouse was washed with 5 mL of cold PBS buffer, and the tacos were collected and stored at -20°C . To extract the genomic DNA, the toxoid plasma toxins were extracted from the DNA extraction kit by Synagen (Iran) in the DNG method according to the manufacturer's instructions.

Primer Design for GRA7 Gene and PCR

The *gra7* gene sequence was extracted from the NCBI gene bank and designed with the enzyme sites of BglII

and XhoI. The sequence of primers was confirmed using Gene Runner software.

GRA7 Forward: CAGCCCAGATCTGATGGCACGACACGCAAT

GRA7 Reverse: GTGGTGCTCGAGTTACTGGCGGGCATCCTC

The *gra7* gene was amplified using PCR. The *gra7* gene proliferation timing program using PCR includes initial denaturation for 5 minutes and 96°C , secondary denaturation for 30 seconds and 95°C temperature, Annealing for 30 seconds and 58°C temperature, Extension for 1 minute and temperature 72°C and final extension for 10 minutes at 72°C . In this process, 0.4 μM of each primer, 200 μM of any dNTP type, 1.5 unit / mL of Taq polymerase enzyme, 5 μL PCR buffer containing MgSO_4 and 200 ng of the sample DNA with a final volume of 50 μL were used.

Preparation of Recombinant Plasmid and Cloning

The plasmid pET-32a (+) vector was first cut using BglII and XhoI and added to the purified PCR product. By adding the enzyme T4 ligase, the gene was added to the Recombinant Plasmid.

The recombinant plasmid was transferred to the Competent Cell *Escherichia coli* DH5 α by heat shock. The bacterium was cultured in an LB culture medium containing 100 μg / mL of antibiotic. The recombinant plasmid was extracted using double enzyme digestion on *gra7* -pET-32a (+) and PCR for the *gra7* gene to confirm the accuracy of bacterial transformation.

Expression, Confirmation and Purification of GRA7 Protein

The multiplied recombinant plasmid was transferred to *E. coli* Rosetta (DE3). A colony was removed from the newly transformed plate and cultured in a tube containing liquid LB and ampicillin, and the next day in a 25 mL Erlenmeyer flask. Four, six, and eight hours after induction, the environment was sampled. The collected samples were centrifuged at 6000 rpm and the final precipitate was stored in a freezer at -20°C . The Western blot method was used to confirm the gene expression. In order to purify *gra7* by Ni-NTA method, first the cell sediment was melted at room temperature and the cells were lysed and then the cellular lysates were evaluated directly by SDS-PAGE. Also, the lysates-resin mixture was carefully passed through the Ni-NTA chromatography column and its output was collected.

Blotting Test

At this stage, the antigen *gra7* was cut on the nitrocellulose paper and after the blocking phase with bovine serum albumin, the serum of patients with toxoplasmosis was evaluated with 1:30 dilutions. In this study, 204 serums from different laboratories that were examined and collected by CLIA method were used. There

were 30 serums for people with clinical symptoms, 70 serums with IgM antibodies to *Toxoplasma*, 74 serums with IgG antibodies against *Toxoplasma* and 30 negative serums (no IgG antibodies against *Toxoplasma*). Also, 30 serum samples of people with IgG antibodies against other diseases, all of which were negative for IgM antibodies and IgG antibodies to *Toxoplasma*, were evaluated for Bovine Serum Albumin (BSA). Ventricular leishmaniasis (n = 5), Strongyloidiasis (n = 1), malaria (n = 13), fascioliasis (n = 4), hepatitis (n = 3), hydatid cyst (n = 4) were used.

Immunochromatography Strip

After preparing the colloidal gold and conjugating the Anti-human IgG according to the relevant protocol (18), the tape was designed and tested. The conjugated solution was poured on the conjugation pad. A recombinant *gra7* antigen suspension was added to the test line area. The control line was sampled with antibodies against the mouse antibody. All sheets were cut to a width of 4 mm.

The accelerated method was used to evaluate the kit stability time. The shelf life of the kit was calculated for 24 months.

Results

After DNA extraction from the parasite, the PCR reaction was performed using specific primers on the gene *gra7*. The gene proliferation band was 726 base pair (Figure 1).

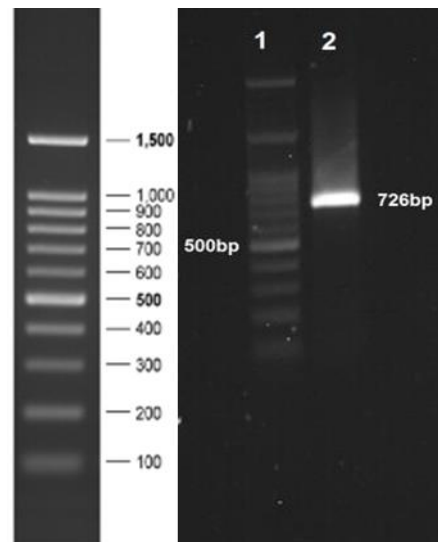


Figure 1. Electrophoresis of *gra7* gene on 1% agarose gel. Column 1: Marker 100 bp, Column 2: Multiplied part of the *gra7* gene

The purified PCR product as well as the purified pET-32a (+) plasmid were cut with *Bgl*III and *Xho*I cutting enzymes and then connected to each other with the same end, and the recombinant pET-32a (+) -GRA7 plasmid was produced. The recombinant plasmid was then transferred to the bacterium and cultured in the presence of the antibiotic ampicillin. At this stage, the initial recombinant colonies were confirmed by specific primers (Figure 2 a, b).

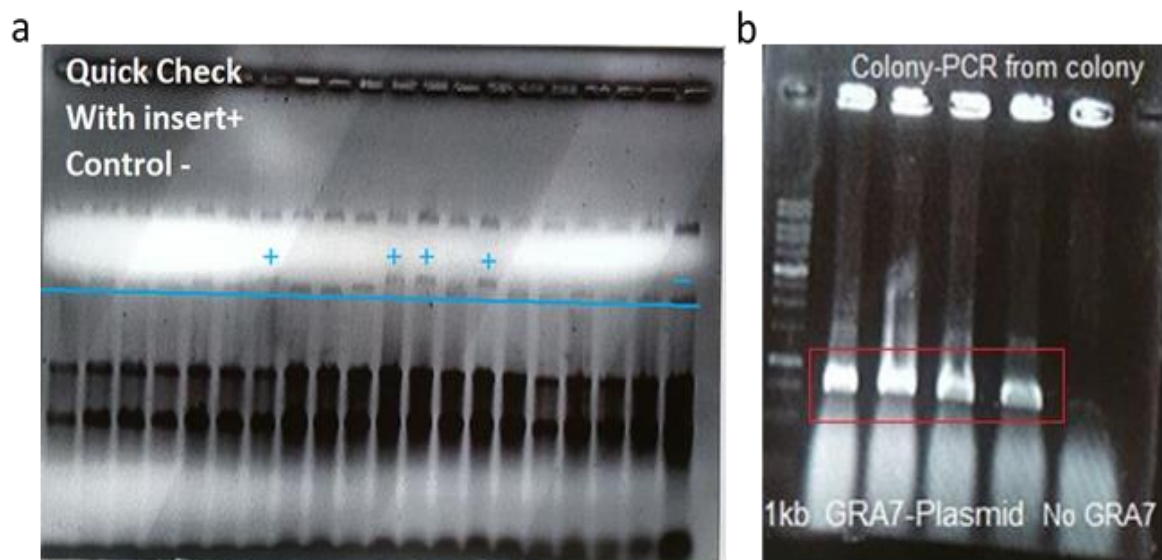


Figure 2. Confirmation of bacterial transformation with recombinant plasmid. a) Quick check test to confirm the presence of recombinant plasmid in bacteria. b) Colony PCR test to confirm *gra7* gene in vector.

DNA was extracted from confirmed colonies and finalized by double enzymatic digestion (Figure 3).

Protein expression was induced in IPTG-stimulated bacteria and then confirmed by SDS-PAGE (Figure 4a).

The dot blot test was performed using human serum with IgG antibody against *Toxoplasma*.

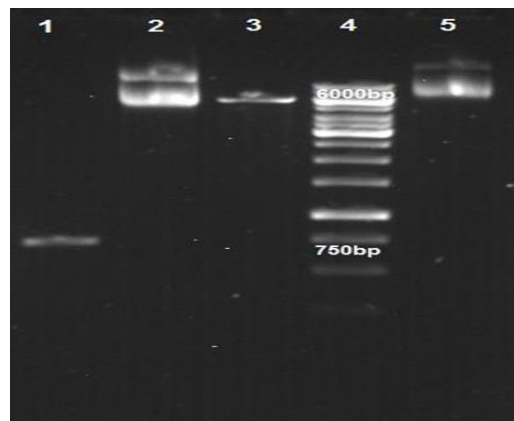


Figure 3. Digestive digestion of pET-32a (+) with XhoI and BglII enzymes and PCR product of G7 toxin gene. Column 1: *gra7* gene, Column 2: Plasmid without *gra7*, Column 3: Plasmid after enzymatic digestion, Column 4: Molecular size index 1 kbp, Column 5: recombinant plasmid plas-32a (+) - *gra7*

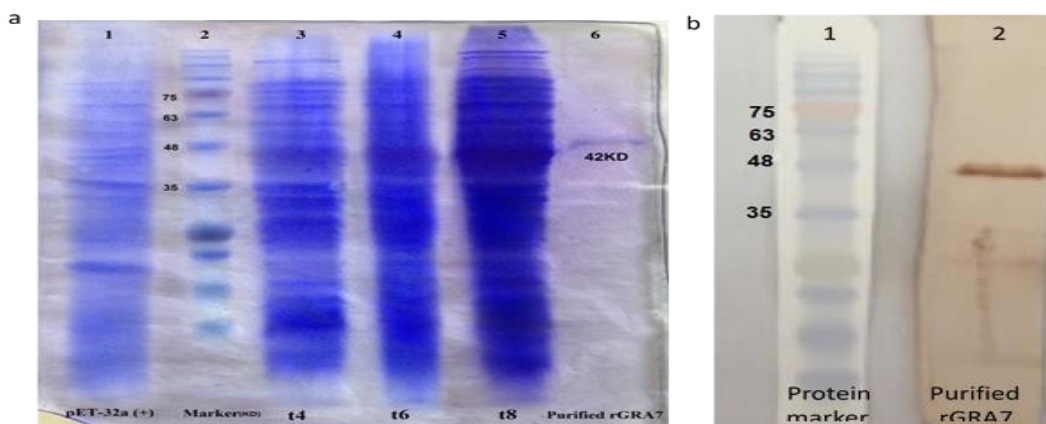


Figure 4. Electrophoresis of lyse bacterial cell with pET-32a (+)-*gra7* plasmid and evaluation of recombinant protein expression r *gra7* on SDS-PAGE gel. a) Column 1: pET-32a vector (+), column 2: molecular weight index, column 3: pET-32a-*gra7* four hours after induction, column 4: pET-32a-*gra7* six hours after induction, column 5 : pET-32a-*gra7* Eight hours after induction, column 6: recombinant purified protein r *gra7*. b) Western blot protein *gra7* recombinant using conjugated Rabbit anti human IgG. Column 1: Protein marker, Column 2: recombinant GRA7 protein.

Strip Test

The strip test in the control line section showed a significant red color. However such a significant color was not observed in the test line section with dilutions higher

than 1: 8 (Figure b5). Therefore, to perform this test, all serum samples were diluted with a 1: 8 dilution with a buffer. The sensitivity and specificity of the strip test were 100% and 96.7%, respectively.

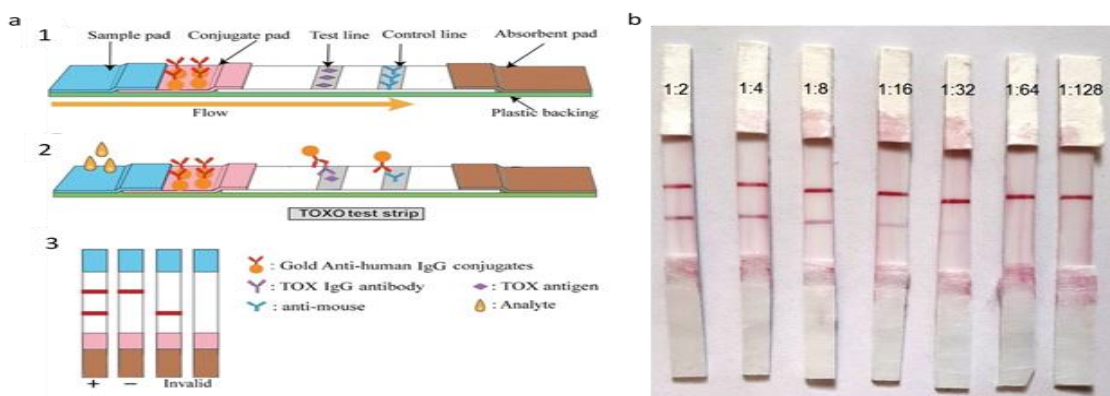


Figure 5. Strip test for rapid detection of Toxoplasma anti-*gra7* antibody. a) Schematic image of preparation of strip test components. b) Initial evaluation with the help of positive serum samples with different dilutions

Stable Kit Strip

Using the accelerated method, the stabilization time of the kit at 37°C was set at 16 months. Using conventional formulas, it is approximately equivalent to 32 months of stability at 4°C.

Discussion

Most diagnostic tests used are immunological methods of antibody tracking, each of which has its drawbacks. On the other hand, identifying the specific antigen of the acute phase of the disease is a key step in designing diagnostic methods. Some studies have used the potential of GRA7 protein to diagnose with the ELISA test and reported an 80% sensitivity and 90% specificity for the test (11). For an accurate, quick and in time diagnosis, the present study, aimed at using *gra7* antigen to design a rapid diagnostic test for toxoplasmosis for the first time, by immunochromatography to eliminate the disadvantages of conventional identification methods as much as possible.

Another group of researchers used SAG2 and ROP2 recombinant antigens to diagnose gonadal toxoplasmosis infection. The suggestion of using the above-mentioned recombinant antigens to make vaccines was emphasized (28). The French researchers also designed the IgG and IgM toxoplasma antibody detection strip in patients' serum and compared it with Abbott's CLIA Automatic Architect method, and the sensitivity and specificity were 97% and 96%, respectively. Another group of researchers designed a dedicated IgG strip test against toxoplasma using a recombinant SAG1 antigen that could replace the ELISA method with natural antigens. This number test helped to identify acute phase patients, and therefore suggested that it be used alongside ELISA for further study at the national level (31).

In 2019, another study aimed to develop a simple, portable, and rapid method for detecting toxoplasmosis serum based on the recombinant protein of *T. gondii* SAG1 (rSAG1) and GRA7 (rGRA7). It was found that IgM rGRA7-Dot-ELISA sensitivity and specificity were 87.5% and 91.1%, respectively (32).

In 2020, a study was performed in Japan to diagnose immunocompromised Gondi antibodies in cats by

immunochromatographic imaging based on *gra7* antigen. The results of this study showed that TgGRA7-ICT is a reliable test for anti-T diagnosis (33).

Using a test designed by the French company LDBIO, a group of American scientists tested the IgG and IgM antibodies in serum by simply examining them with 100% sensitivity and specificity.

In this study, for the first time, a strip test was designed using a recombinant *gra7* antigen to diagnose toxoplasmosis.

This study, by selecting the appropriate antigen based on the important cellular and clinical characteristics of the parasite and using the results of previous tests, led to the successful development and evaluation of the rapid diagnosis of toxoplasmosis. Therefore, the results of this study can reduce the detection time by providing a quick screening solution for people suspected of having toxoplasmosis and also make it easier for a wide range of people to interpret the test results.

Conclusion

In this study, selecting the appropriate antigen based on the important cellular and clinical characteristics of the parasite along with the use of the results of previous tests led to the successful construction and evaluation of the rapid diagnosis of toxoplasmosis. Therefore, the results of this study can reduce the detection time by providing a quick screening solution for people suspected of having toxoplasmosis and also make it easier for a wide range of people to interpret the test results.

Acknowledgment

This work has been supported by Shahid Beheshti University of Medical Sciences with the number 265. The authors thank the Vice Chancellor for Research of Shahid Beheshti University of Medical Sciences.

Conflict of Interest

Authors declared no conflict of interests.



ارزیابی تست تشخیص سریع توکسوپلاسموز به روش ایمونوکروماتوگرافی با استفاده از نانو ذرات طلا و آنتی ژن نو ترکیب *gra7*

حسن مروتی خمسی^۱، سید جواد سید طبایی^۲، مهرداد غلامزاد^{۳*}

۱. بخش کنترل کیفی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، کرج، ایران
۲. گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۳. گروه میکروبی شناسی و ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و اهداف: دشواری تشخیص عفونت با انگل توکسوپلاسموز موجب شده این بیماری به عنوان چالشی در سلامت انسان مطرح باشد. از آنجا که پروتئین *gra7* می تواند کاندیدای مناسبی برای تشخیص این بیماری در فاز حاد باشد، مطالعه حاضر با هدف تولید آن در سیستم باکتریایی و استفاده در روش تشخیص سریع مبتنی بر ایمونوکروماتوگرافی انجام گرفت.

مواد و روش کار: پس از تکثیر انگل و استخراج DNA، ژن *gra7* با کمک پرایمرهای اختصاصی PCR و در داخل وکتور بیانی (+) pET-32a کلون گردید. سپس پلاسمید مورد نظر به میزان نهایی (*E. coli Rosetta DE3*) وارد و بیان شد. پروتئین از سلول باکتریایی لیز شده با ستون کروماتوگرافی رزینی Ni-NTA تخلیص شد. آنتی هیومن آنتی بادی متصل به نانوذرات طلا و خط تست و خط کنترل بروی به ترتیب لایه کونژگه و کاغذ نیتروسولوز پاشیده شد و سپس تمامی لایه های آماده شده بروی هم مونتاژ شد و تست نواری مونتاژ شده با استفاده از سرم بیماران و افراد سالم ارزیابی گردید.

یافته ها: نتایج الکتروفورز و وسترن بلاتینگ نشان دهنده بیان مناسب و استخراج موفقیت آمیز پروتئین *gra7* در سیستم پروکاریوتی بود. حساسیت و اختصاصیت تست استریپ در این مطالعه به ترتیب ۱۰۰ درصد و ۹۶/۷ درصد تعیین شد. مدت زمان پایداری کیت در دمای ۳۷°C نیز معادل ۱۶ هفته محاسبه شد.

نتیجه گیری: انتخاب آنتی ژن مناسب براساس شاخصه های مهم سلولی و بالینی انگل همراه با بهره گیری از نتایج آزمون های قبلی منجر به ساخت و ارزیابی موفقیت آمیز تست تشخیص سریع توکسوپلاسموز گردید.

کلید واژه ها: توکسوپلاسموز، نانو ذرات طلا، آنتی ژن *gra7*، ایمونوکروماتوگرافی، تست تشخیص سریع.

کپی رایت © مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران: دسترسی آزاد؛ کپی برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۸/۰۹/۰۶

پذیرش: ۱۳۹۸/۱۰/۰۸

انتشار آنلاین: ۱۳۹۹/۱۰/۱۱

موضوع:

انگل شناسی پزشکی

نویسنده مسئول:

مهرداد غلامزاد، گروه میکروبی شناسی و ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
ایمیل: mgholamzad@iautmu.ac.ir

مقدمه

باردار به جنین عمدتاً فاقد علائم بوده و می تواند سقط جنین و یا ناهنجاری های مادرزادی مثل هیدروسفالی، میکروسفالی، کلسیفیه شدن درون مغزی، کوریورینیت، کوری، صرع، عقب ماندگی ذهنی یا حرکتی را به دنبال داشته باشد (۲). از طرفی، فعال شدن عفونت مزمن نهفته در سیستم عصبی به دنبال ضعف یا نقص ایمنی در مبتلایان به ایدز، افراد تحت پیوند عضو و یا در مبتلایان به بیماری های lymphoproliferative منجر به آسیب سیستم عصبی مرکزی یا عوارضی همانند آنسفالیت می شود که در صورت عدم

توکسوپلاسموز *Toxoplasma gondii* انگل داخل سلولی اجباری و عامل بیماری توکسوپلاسموز است. حدود ۵۰۰ میلیون تا یک میلیارد نفر از جمعیت انسانی در دنیا آلوده به این انگل تلقی می شوند که عمدتاً از طریق خوردن گوشت نیم پخته، میوه، سبزیجات و یا در معرض قرار گرفتن با خاک و آب آلوده با تخم (Oocyte) انگل نسبت به آن آلوده شده اند (۱). تظاهرات این بیماری طیفی از علائم خفیف شبه آنفولانزا تا لنفونوپاتی و کوریورینیت را شامل می شود. انتقال عفونت اولیه (حاد) از مادر

نگهداری در شرایط مختلف و در عین حال حساس و اختصاصی ضروری به نظر می‌رسد.

هدف از این مطالعه استفاده از پروتئین نو ترکیب *gra7* برای طراحی روش ایمنو کروماتوگرافی با استفاده از آنتی هیومن کونژوگه با نانو ذرات طلا برای تشخیص سریع IgG اختصاصی علیه توکسوپلازما گوندی در ۳ دقیقه است.

روش پژوهش

کشت انگل توکسوپلازما و استخراج DNA

این مطالعه تجربی (experimental) در سال ۱۳۹۶ با تعداد ۲۰۴ نمونه سرم از آزمایشگاه‌های مختلف تهران به روش نمونه برداری غیر احتمالی در دسترس انجام شد. تاکی زوئیت‌های سویه RH توکسوپلازما به صورت منجمد از بخش کنترل کیفی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی تهیه شد، مورد استفاده قرار گرفت. جهت حذف ماده نگهدارنده، انگل یکبار با محلول PBS شستشو و سپس با دو بار پاساژ متوالی داخل صفافی در موش سوری احیا شد. برای تکثیر و نگهداری انگل به هر موش ۰/۵ میلی لیتر مایع صفافی حاوی 2×10^5 انگل زنده تلقیح و $100 \mu\text{L}/\text{mL}$ پنی سیلین به طور داخل صفافی تزریق شد. پس از گذشت ۳ الی ۴ روز، حفره صفافی موش‌های آلوده با ۵ میلی لیتر بافر PBS سرد مورد شستشو قرار گرفت و تاکی زوئیت‌ها جمع‌آوری و در -20°C درجه سلسیوس نگهداری شدند. در ادامه برای استخراج DNA ژنومی، تاکی زوئیت‌های توکسوپلازما از کیت استخراج DNA از شرکت سیناژن با روش DNG طبق دستور العمل سازنده انجام گرفت.

طراحی پرایمر برای ژن *gra7* و انجام PCR

برای طراحی پرایمر، توالی ژن *gra7* با شماره دسترسی DQ459443 از بانک ژنی NCBI استخراج شده و با توجه به استراتژی کلونینگ، سایت‌های آنزیمی‌های محدودالایر *BglII* و *XhoI* در طراحی مد نظر قرار گرفت. سپس اختصاصیت توالی پرایمرها با استفاده از نرم‌افزار Gene Runner بررسی و مورد تایید قرار گرفت.

gra7 Forward:

CAGCCAGATCTGATGGCACGACACGCAAT

gra7 Reverse:

GTGGTGCTCGAGTTACTGGCGGGCATCCTC

تشخیص به موقع و درمان مناسب می‌تواند نتایج مرگ‌بار به دنبال داشته باشد (۳). با تشخیص به موقع توکسوپلازما حاد و مزمن و به دنبال آن درمان دارویی مناسب در افراد در معرض خطر، می‌توان از شدت علائم و بروز خسارت‌های جانی کاست (۴).

غالباً تشخیص بیماری و تمییز عفونت فاز حاد و مزمن از طریق تست‌های سرولوژیک انجام می‌پذیرد. در این روش، مقدار کمی آنتی‌بادی‌های IgG، IgM و IgA اختصاصی و نیز آویدیتی (Avidity) IgG علیه توکسوپلازما گوندی اندازه‌گیری می‌شود. محققان دریافته‌اند حضور IgM و نیز IgG با آویدیت به پایین نشان از فاز حاد است (۵) و بر همین اساس، ترکیبی از اندازه‌گیری سطح IgM و آویدیتی IgG در مقایسه با دیگر روش‌های سرولوژیک، به عنوان حساس‌ترین و اختصاصی‌ترین روش تشخیص عفونت حاد معرفی شده است (۶،۷). اما نکته قابل تامل در انجام این روش‌ها تهیه مقادیر کافی از آنتی‌ژن اختصاصی انگل است. به طور معمول، مجموعه آنتی‌ژن‌های تاکی زوئیت از مایع صفافی موش آلوده به انگل یا کشت سلولی تهیه و جهت تشخیص به کار می‌رود. در این روش پرهزینه، امکان آلودگی آنتی‌ژن‌ها به اجزای غیر انگلی و در نتیجه تغییر کیفیت مجموعه آنتی‌ژنی وجود دارد که نهایتاً استانداردسازی آن با مشکل مواجه شده است. از این رو، کلون کردن آنتی‌ژن‌ها در میزبان‌های ساده و پیچیده به عنوان جایگزین بالقوه‌ای برای روش‌های قدیمی توصیه شده است (۸،۹). همچنین بررسی‌ها حاکی از آن است که آنتی‌بادی اختصاصی علیه برخی آنتی‌ژن‌های انگل در فاز حاد یا مزمن به صورت معناداری تغییر می‌کند. این آنتی‌ژن‌ها را می‌توان به عنوان مارکر فاز حاد یا مزمن عفونت در نظر گرفت و به سنجش آنتی‌بادی اختصاصی علیه آنها پرداخت (۱۰،۱۱،۱۲). در این بین، مطالعات پیشین *GRA7* را به عنوان یکی از مهمترین پروتئین‌های گرانول متراکم معرفی کرده که عمدتاً در پروتئوم تاکی زوئیت (فاز حاد بیماری) یافت می‌شود. این پروتئین ایمنوژنیسیته بالایی داشته و پاسخ ایمنی ایجاد شده به استعداد ژنتیکی میزبان در ابتلا به عفونت ارتباطی ندارد (۱۲-۱۶). کارایی *gra7* در بسیاری تحقیقات تشخیصی مبتنی بر الایزا اثبات شده است اما با اینحال روش‌های سرولوژیک مبتنی بر Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) و Immunofluorescence Antibody Test (IFAT) و Chemiluminescent Immunoassay (CLIA) نیازمند تجهیزات اختصاصی و افراد باتجربه است. بر همین اساس، طراحی و ارزیابی روش‌های تشخیص سریع، مقرون به صرفه، ساده، با قابلیت

آنزیمی دوگانه (Double Digestion) روی $gra7$ -pET-32a (+) و PCR برای ژن $gra7$ صحت ترانسفورماسیون در باکتری تایید شد. پس از تایید وجود قطعه ژنی $gra7$ در پلاسمید pET-32a (+) با روش‌های فوق‌الذکر، برای اطمینان بیشتر پلاسمید نوترکیب $gra7$ -pET-32a (+) با هدف تعیین توالی از طریق شرکت پیشگام برای شرکت MacroGen کره جنوبی ارسال گردید. اطلاعات حاصل از تعیین توالی اسیدهای نوکلئیک ژن $gra7$ با اطلاعات موجود در GeneBank مقایسه شد.

بیان، تایید و تخلیص پروتئین GRA7

در ادامه پلاسمید نوترکیب تکثیر شده به میزبان بیانی یعنی *E. coli Rosetta (DE3)* مستعد شده انتقال یافت. تمامی این مراحل مشابه انتقال پلاسمید به سویه DH5 α در مرحله قبل انجام پذیرفت. برای بیان پروتئین نوترکیب GRA7، یک کلنی از پلیت تازه ترانسفورم شده برداشته و در لوله حاوی محیط LB مایع و آمپی سیلین کشت داده شد و به مدت یک شب در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفت. روز بعد در یک ارلن ۲۵ میلی‌لیتر محیط LB مایع و یک دهم حجم آن (۲/۵ میلی‌لیتر) از کشت شبانه به آن اضافه شد و تحت شرایط قبلی کشت داده شد. پس از رسیدن کدورت محیط کشت به حدود OD₆₀₀ = ۰/۵ (پس از حدود ۲ ساعت) ابتدا مقدار یک میلی‌لیتر از محیط کشت به‌عنوان نمونه قبل از القاء جمع‌آوری شد. سپس Isopropyl β -d-1-thiogalactopyranoside (IPTG) با غلظت نهایی ۱/۰ mM به محیط کشت اضافه شد و مجدداً در انکوباتور شیکردار قرار گرفت. چهار، شش و هشت ساعت پس از القاء اقدام به نمونه‌گیری از محیط شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند و رسوب نهایی در فریزر در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد.

به‌منظور تایید صحت بیان ژن از روش وسترن بلات استفاده شد. برای این کار، نمونه مورد نظر با انجام SDS-PAGE الکتروفورز و پس از انتقال ژل به روی کاغذ نیتروسولوز، در مجاورت آنتی‌بادی ضد $gra7$ و آنتی‌بادی ثانویه (Goat Anti-human antibody) مورد بررسی قرار گرفت.

جهت تخلیص $gra7$ با روش Ni-NTA ابتدا رسوب سلولی در دمای اتاق ذوب شده و برای لیز کردن سلول‌ها از بافر B فرایند Denaturing (حاوی 8 M urea; 0.1 M NaH₂PO₄; 0.01 M Tris-Cl) استفاده شده و سپس لیزات سلولی مستقیماً توسط SDS-PAGE ارزیابی شد. سپس به ازای هر گرم از وزن مرطوب

در نهایت، ژن $gra7$ با استفاده از PCR شامل دناتوراسیون اولیه به مدت ۵ دقیقه و دمای ۹۶ درجه سلسیوس، دناتوراسیون ثانویه به مدت ۳۰ ثانیه و دمای ۹۵°C، Annealing به مدت ۳۰ ثانیه و دمای ۵۸°C، Extension به مدت ۱ دقیقه و دمای ۷۲°C و Extension نهایی به مدت ۱۰ دقیقه و دمای ۷۲°C انجام گرفت. در این فرایند از ۰/۴ μ M از هر پرایمر، ۲۰۰ μ M از هر نوع dNTP، ۱/۵ unit/mL Taq polymerase، ۵ μ L بافر PCR حاوی ۲۰۰ ng MgSO₄ از DNA الگو با حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر استفاده شد.

پس از انجام آزمایش، محصول حاصل از PCR با استفاده از الکتروفورز در ژل آگارز ۱ درصد و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید زیر نور ماوراء بنفش (UV) بررسی شده و با استفاده از اندازه‌مارکرهای مورد نظر تایید گردید. مراحل خالص‌سازی محصول PCR از داخل ژل، با استفاده از کیت Silica Bead DNA Gel Extraction # K0513 (Fermentas) ساخت کشور کره جنوبی انجام پذیرفت.

تهیه پلاسمید نوترکیب و کلون‌سازی

جهت ساخت DNA نوترکیب، پلاسمید بیانی پروکاریوتی pET-32a (+) ابتدا با کمک آنزیم‌های XhoI و BglIII از شرکت سیناکلون (ایران) بریده شده و به محصول خالص شده PCR اضافه شد. با افزودن آنزیم T4 لیگاز ژن مورد نظر در پلاسمید نوترکیب (Recombinant Plasmid) الحاق گردید. وکتور (+) pET-32a به دلیل داشتن ژن Trx دو جایگاه His.Tag، یک جایگاه S.Tag و ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین بسیار پر کاربرد است و به همین دلیل در این پروژه استفاده شد. پروتئین TrxA دارای ۱۰۹ اسید آمینه بوده که این در اتصال به ترکیبات انکلوژن بادی (Inclusion Bodies) باعث محلول شدن پروتئین می‌شود، وجود His.Tag نیز در این وکتور می‌تواند قدرت ما را در شناسایی پروتئین مورد نظر نسبت به سایر حامل‌ها دو چندان کند (۱۷).

در ادامه برای ترانسفورماسیون باکتری، پلاسمید نوترکیب به روش شوک حرارتی به درون باکتری صلاحیت دار (Competent Cell) شده *Escherichia coli DH5 α* انتقال داده شد. از آنجا که پلاسمید فوق‌الذکر واجد ژن مقاومت به آمپی‌سیلین است، باکتری در محیط کشت LB محتوی ۱۰۰ μ g/mL از آنتی‌بیوتیک کشت داده شد. کلنی‌های ظاهر شده در محیط کشت نشانگر حضور باکتری ترانسفورم شده با پلاسمید بودند. سپس با کمک کیت تجاری Fermentas پلاسمید نوترکیب استخراج و با استفاده از هضم

با انتخاب ۳۰ سرم منفی که فاقد آنتی‌بادی علیه توکسوپلازما بودند Cut off به دست آمد. برای این کار، پس از به دست آوردن OD میانگین و همین طور محاسبه انحراف معیار آن، $x+3SD$ به عنوان Cut off برای سرم‌های مورد مطالعه در نظر گرفته شد.

استریپ ایمونوکروماتوگرافی

بعد از تهیه طلای کلئیدی و کونژوگه کردن Anti-human IgG طبق پروتکل مربوطه (۱۸)، طراحی و ساخت تست نواری صورت پذیرفت. به طور خلاصه، محلول کونژوگه روی پد کونژوگاسیون ریخته شد. با کمک دستگاه Injector روی ناحیه خط تست (Test Line) سوسپانسیون آنتی‌ژن نوترکیب *gra7* به غلظت یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اضافه گردید. ناحیه خط کنترل (Control Line) با یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از آنتی‌بادی علیه آنتی‌بادی موشی نمونه‌گذاری شد. بر روی بستر نگهداری (Backing Plate) لایه‌های مختلف تست شامل لایه نمونه (Sample Pad)، لایه کونژوگه (Conjugate Pad)، کاغذ نیتروسولوز و لایه جاذب (Absorbent Pad) چسبانده شد و برای حفظ بهتر لایه‌های موجود برای آنها چسب قرار گرفت. پس از آماده‌سازی، کلیه صفحات (Sheet) به قسمت برش انتقال یافت و با پهنای ۴ میلی‌متر برش زده شد.

برای بررسی زمان پایداری کیت از روش تسریع شده استفاده شد. بدین صورت که مدت زمان پایداری کیت در دمای ۳۷ درجه محاسبه شد. با توجه به روابط ریاضی موجود به طور خلاصه هر یک هفته پایداری در ۳۷ درجه معادل حدوداً دو ماه پایداری در ۴ درجه است.

یافته‌ها

پس از کشت فرم تاکی‌زوئیت سویه RH توکسوپلازما در صفای موش و استخراج DNA از انگل، واکنش PCR با کمک پرایمرهای اختصاصی بر روی ژن *gra7* انجام گرفت. باند مربوط به تکثیر ژن بر روی ژل آگارز ۱٪ مشاهده و سائز آن که برابر ۷۲۶ جفت باز بود از روی مقایسه با مارکر ۱۰۰ جفت بازی تایید شد (شکل ۱).

محصول خالص شده PCR و نیز پلاسمید خالص شده pET-32a (+) با آنزیم‌های برش دهنده BglII و XhoI بریده و سپس با انتهای مشابه به یکدیگر متصل شد و پلاسمید نوترکیب (+)-pET-32a GRA7 تولید شد. در مرحله بعد پلاسمید نوترکیب به درون باکتری منتقل شد و در حضور آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین کشت داده شد. بنابراین صرفاً باکتری‌های حاوی وکتور pET-32a(+) توانستند در

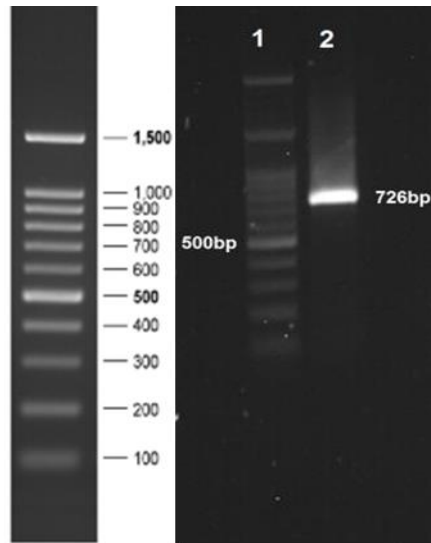
رسوب اولیه، ۵ میلی‌لیتر بافر A (محتوی 0.1 M Gu-HCl; 6 M NaH₂PO₄; 0.01 M Tris-Cl) اضافه شد. مخلوط با ورتکس شدن شفاف گردید. سلولها با دور ۱۰۰۰۰ g برای ۲۰ تا ۳۰ دقیقه در دمای اتاق به منظور رسوب اجزای سلولی سانتریفوژ شدند و مایع رویی نگهداری شد. در ادامه مقدار یک میلی‌لیتر Ni-NTA ۵۰٪ به ۴ میلی‌لیتر از لیزات اضافه و مخلوط شد. سپس مخلوط مورد نظر به مدت ۱۵ تا ۶۰ دقیقه روی شیکر با دور ۲۰۰ rpm در دمای اتاق قرار گرفت. مخلوط لیزات-رزین با احتیاط از ستون کروماتوگرافی Ni-NTA عبور داده شده و خروجی آن به طور جداگانه در ویال های مختلفی جمع‌آوری شدند. هم‌زمان مقداری از جریان مایع برای آنالیز SDS-PAGE به کار رفت. سپس با کمک اوره ۸ مولار و ایجاد شیب pH پروتئین نوترکیب تخلیص شد. پروتئین Trx-*gra7* حاصل از مرحله تخلیص در بافر کربنات-بی کربنات (۰/۰۵ مولار، pH = ۹/۶) به مدت دو ساعت به همراه مگنت شیک شده و سپس به روش برادفورد غلظت آن را به دست آمد.

آزمایش بلاکینگ

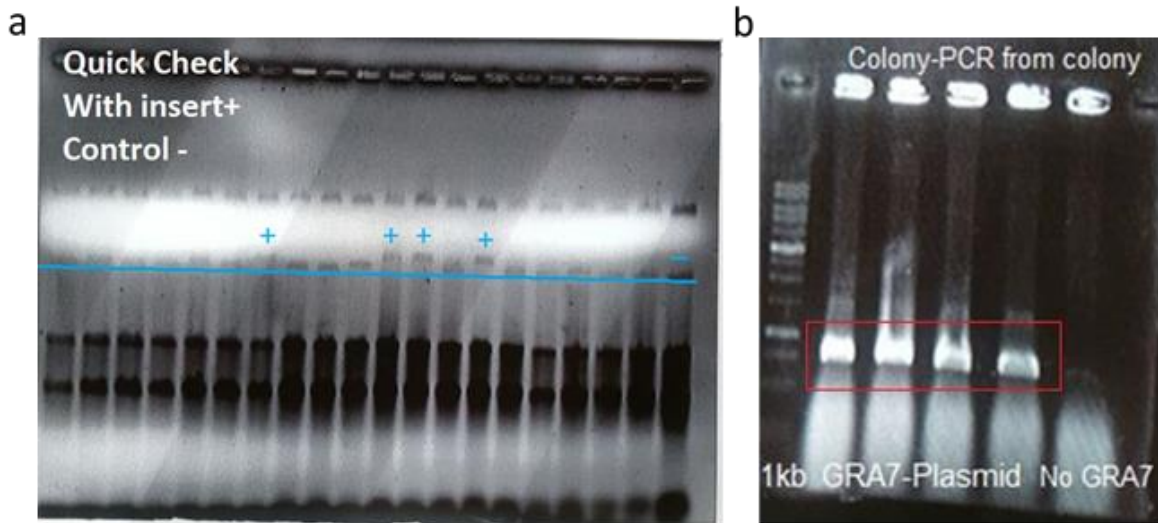
در این مرحله آنتی‌ژن *gra7* روی کاغذ نیتروسولوز کوت شده و پس از انجام مرحله بلاکینگ با آلبومین سرم گاوی (Bovine Serum Albumin (BSA)) ۱ درصد، با رقت‌های ۱ به ۳۰ از سرم بیماران مبتلا به توکسوپلازما جهت بررسی کارایی آنتی‌ژن بیان شده ارزیابی شد. علاوه بر این، غلظت بهینه استفاده از آنتی‌ژن و نیز رقت مناسب سرم با کمک تست الیزا تعیین گردید. در این بررسی ۲۰۴ سرم از آزمایشگاه‌های مختلف تهران به روش CLIA جمع‌آوری شد که از این میان ۳۰ سرم مربوط به افراد واجد علائم بالینی مثل تب و بزرگی غدد لنفاوی، ۷۰ سرم دارای آنتی‌بادی IgM ضد توکسوپلازما، ۷۴ سرم دارای آنتی‌بادی IgG ضد توکسوپلازما گوندی و ۳۰ سرم منفی (فاقد آنتی‌بادی IgG ضد توکسوپلازما گوندی) بود. همچنین تعداد ۳۰ نمونه سرم افراد دارای آنتی‌بادی IgG علیه بیماری‌های دیگر که همگی از نظر وجود آنتی‌بادی IgM و IgG ضد توکسوپلازما منفی بودند برای ارزیابی واکنش متقاطع (Bovine Serum Albumin (BSA)) مورد بررسی قرار گرفتند. لیشمانیازیس احشائی (n=5)، استرونیلیوئید یازیس (n=1)، مالاریا (n=13)، فاسیولوزیس (n=4)، هپاتیت (n=3) کیست هیداتیک (n=4) استفاده گردید. تمام نمونه‌ها در زمان انجام آزمایش برای اطمینان از درستی یافته‌ها مجدداً توسط کیت تجاری Trinity ساخت کشور USA، بررسی شدند. در نهایت نمونه‌هایی که در هر دو مرحله مثبت یا منفی بودند انتخاب شده و در سیستم طراحی شده از آنها استفاده شد.

و Colony PCR توسط پرایمرهای اختصاصی طراحی شده برای تکثیر کردن ژن تایید شد (شکل ۲ a, b).

محیط کشت دارای آنتی بیوتیک آمپی سیلین رشد کنند. در این مرحله کلونی های نو ترکیب اولیه ابتدا با استفاده از روش های Quick Check



شکل ۱. الکتروفورز ژن *gra7* بر روی ژل آگارز یک درصد. ستون ۱: مارکر ۱۰۰ bp وزن مولکولی، ستون ۲: قطعه تکثیر شده ژن *gra7* با پرایمرهای اختصاصی (۷۲۶ جفت باز)



شکل ۲. تایید ترانسفورماسیون باکتری با پلاسمید نو ترکیب. (a) تست Quick check به منظور تایید حضور پلاسمید نو ترکیب در باکتری. (b) تست Colony PCR به منظور تایید ژن *gra7* در وکتور. ستون چپ: شاخص اندازه مولکولی ۱kbp. ستون راست: محصول PCR بر روی کلنی های باکتریایی تکثیر یافته در حضور آنتی بیوتیک.

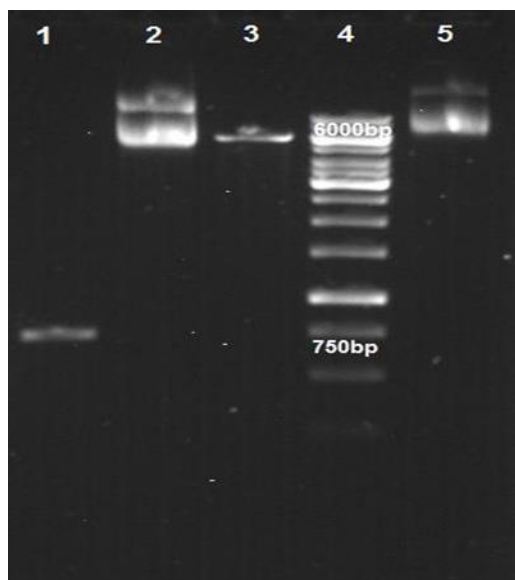
32a(+). برای تعیین توالی از طریق شرکت پیشگام برای شرکت Macrogen کره جنوبی ارسال گردید.

بیان پروتئین در باکتری های تحریک شده با ۱.۰ mM IPTG القا و سپس از طریق SDS-PAGE استخراج شد (شکل ۴a). پروتئین نو ترکیب GRA7 در محدوده وزنی پیش بینی شده (۴۲ kDa) مشاهده شد و سپس با تست وسترن بلات صحت بیان تایید گردید (شکل ۴b). زمان مناسب برای القا توسط IPTG برای بالاترین میزان بیان پروتئین برابر ۸ ساعت بود.

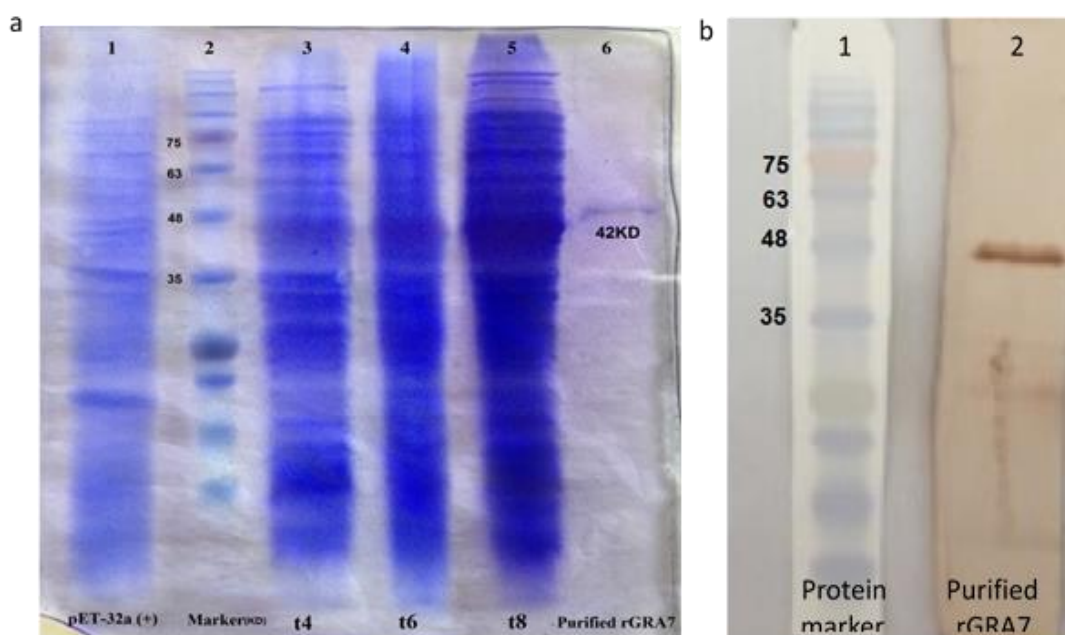
از کلونی های تایید شده، استخراج DNA انجام شد و توسط هضم آنزیمی دو تایی مورد تایید نهایی قرار گرفتند. پس از تایید نهایی، پلاسمید آماده انتقال به سویه بیانی شد. از آنجایی که جایگاه برش دو آنزیم در دو طرف قطعه *gra7* است انتظار می رفت که طی هضم پلاسمید، قطعه *gra7* جدا شود. محصول این هضم دو آنزیمی باند به طول ۷۲۶ جفت باز بوده و جدا از باند مربوط به پلاسمید خطی روی ژل آگارز قرار گرفت (شکل ۳). همچنین برای اطمینان بیشتر پلاسمید نو ترکیب -pET-*gra7*

تست دات بلات با سرم انسانی دارای آنتی بادی IgG علیه توکسوپلازما برای تایید ایمونوژنسیستی پروتئین نوترکیب انجام و نتایج دال بر تایید آن است. همچنین نتایج حاصل از الایزا غلظت مناسب آنتی ژن را برابر ۵ میکروگرم و رقت مناسب سرم ۱/۱۰۰ نشان داد.

پروتئین نوترکیب فوق با روش کروماتوگرافی تمایلی تخلیص شده و به وسیله SDS-PAGE بررسی شد.



شکل ۳. هضم آنزیمی با pET-32a (+) با آنزیم های XhoI و BglIII و محصول PCR ژن GRA7 توکسوپلازما گوندی. ستون ۱: ژن GRA7. ستون ۲: پلاسمید بدون GRA7. ستون ۳: پلاسمید پس از هضم آنزیمی، ستون ۴: شاخص اندازه مولکولی ۱ kbp. ستون ۵: پلاسمید نوترکیب pET-32a (+)-GRA7



شکل ۴. الکتروفورز لیز سلول باکتریایی واجد پلاسمید pET-32a (+)-GRA7 و ارزیابی بیان پروتئین نوترکیب rGRA7 بر روی ژل SDS-PAGE. (a) ستون ۱: وکتور pET-32a (+). ستون ۲: شاخص وزن مولکولی، ستون ۳: pET-32a-GRA7 چهار ساعت بعد از القا، ستون ۴: pET-32a-GRA7 شش ساعت بعد از القا، ستون ۵: pET-32a-GRA7 هشت ساعت بعد از القا، ستون ۶: پروتئین تخلیص شده نوترکیب rGRA7. (b) وسترن بلات پروتئین نوترکیب GRA7 با استفاده از کونژوگه Rabbit anti human IgG. ستون ۱: مارکر پروتئینی، ستون ۲: پروتئین GRA7 نوترکیب.

تست استریپ

برای ساخت کیت نواری لازم بود کونژگه تولید شده در لایه مخصوص به خود (Conjugat Pad) قرار گرفته و خشک شود. همچنین آنتی ژن نو ترکیب *gra7* در خط تست (test line) و آنتی بادی ضد آنتی بادی موش در خط کنترل نمونه گذاری شد.

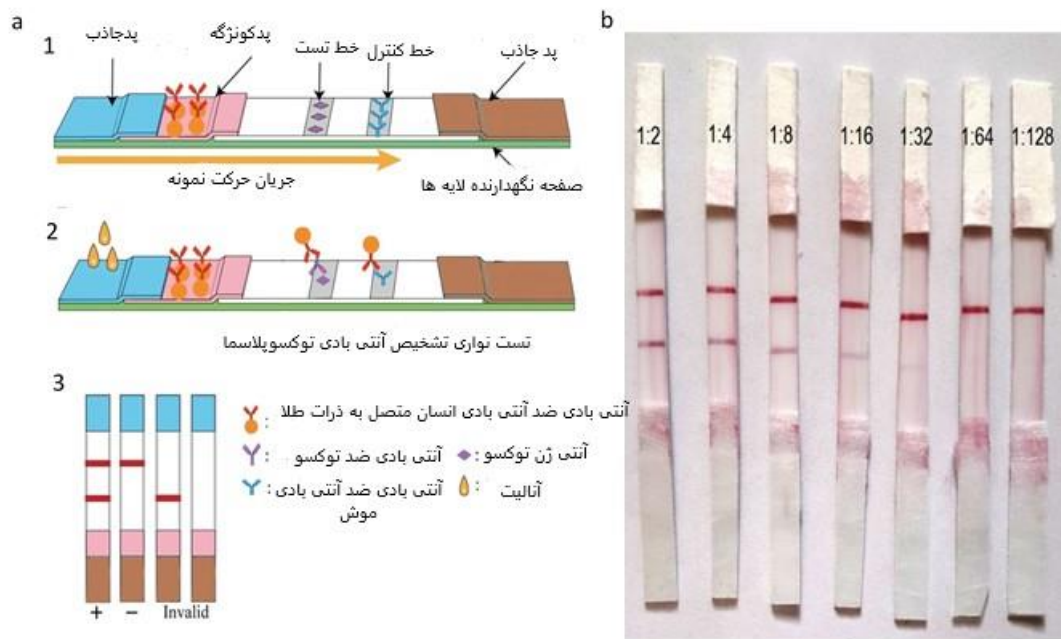
پس از انجام این مرحله از کار برای افزایش طول عمر مواد موجود در لایه های کونژگه و بستر آزمایش، این دو لایه در حرارت ۳۷ درجه سلسیوس خشک شدند. باقی مراحل کار شامل اتصال لایه های نمونه و جاذب و همچنین چسبها بر روی صفحه نگهدارنده به صورت دستی انجام گرفت و در نهایت صفحه تست (Sheet) آماده شده و در اندازه دلخواه برش زده شد (شکل ۵a).

برای متعادل کردن نانوذرات طلا، pH بهینه مورد نیاز برای جذب آنتی بادی برابر ۹ تعیین شد. در این pH حداقل غلظت بهینه

آنتی بادی برای کونژگه شدن با نانوذرات طلا، ۱۵ $\mu\text{g/mL}$ تعیین شد. این میزان حداقل غلظت آنتی بادی است که هیچ گونه تغییر رنگی پس از اضافه نمودن NaCl ندارد.

بهینه سازی کونژگاسیون آنتی بادی ضد انسانی با نانوذرات طلا

مشاهده دو خط قرمز نشانه تست مثبت و یک خط قرمز نتیجه منفی را تایید می کند. تست استریپ در بخش خط کنترل، رنگ قرمز قابل توجهی را نشان داد. در صورتی که چنین رنگ قابل ملاحظه ای در بخش خط تست با رقت های بالاتر از ۱:۸ مشاهده نشد (شکل ۵b). بنابراین برای انجام این تست، همه نمونه های سرمی با رقت ۱:۸ با بافر رقیق سازی شدند. حساسیت و اختصاصیت تست استریپ به ترتیب ۱۰۰ درصد و ۹۶/۷ درصد (فقط با یک نمونه مثبت کاذب) تعیین شد.



شکل ۵. تست استریپ تشخیص سریع آنتی بادی ضد *gra7* توکسوپلاسماسما. (a) تصویر شماتیک مراحل آماده سازی اجزای تست استریپ. (b) ارزیابی اولیه با کمک نمونه های مثبت سرمی با رقت های مختلف که در نهایت رقت ۱:۸ به عنوان Limit of detection تست تعیین شد.

بحث

تشخیص به موقع و دقیق توکسوپلاسموز از جمله مهمترین عوامل موثر برای جلوگیری از بروز آسیب های جانی و مالی جبران ناپذیر به ویژه در افراد در معرض خطر که علائم بالینی عفونت را بروز نمی دهند، است (۱۹،۲۰). اندازه گیری آویدیتی IgG اختصاصی که

پایداری کیت استریپ

با استفاده از روش تسریع شده مدت زمان پایداری کیت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس معادل ۱۶ ماه تعیین شد. که با استفاده از فرمول های مرسوم حدودا معادل ۳۲ ماه پایداری در ۴ درجه سلسیوس است.

فرانسوی با همکاری شرکت LDBIO در سال ۲۰۱۷، تست استریپ تشخیص آنتی‌بادی IgG و IgM توکسوپلازما در سرم بیماران را طراحی و آن را با روش CLIA اتوماتیک Architect شرکت Abbott مقایسه و حساسیت و ویژگی به ترتیب ۹۷٪ و ۹۶٪ به دست آمد. این تست را روشی مطمئن برای غربالگری توکسوپلازموزیس در خانم‌های باردار گزارش نمودند (۲۹). در ادامه مطالعه این گروه، تست استریپ را بر روی نمونه‌های سرمی اخذ شده از بیماران بیمارستان ماری و سنت تین فرانسه آزمایش و نتایج با روش Architect شرکت Abbott مقایسه شد. تست مرجع، روش وسترن بلات IgG شرکت LDBIO برای تایید نتایج IgG به کار رفت. تست استریپ حساسیت ۱۰۰٪ و تست Architect حساسیت ۹۲/۱٪ و اختصاصیت ۹۸/۷٪ برای تست استریپ و ۹۹/۸٪ برای Architect به دست آمد (۳۰). گروه دیگری از محققین، تست استریپ IgG اختصاصی علیه توکسوپلازما با استفاده از آنتی‌ژن نوترکیب SAG1 را طراحی نمودند که بتواند جایگزین روش الایزا با آنتی‌ژن‌های طبیعی باشد. این آزمون تعداد به شناسایی بیماران فاز حاد کمک شایانی کرد و بر همین اساس پیشنهاد استفاده از آن کنار الایزا برای مطالعه بیشتر در سطح ملی صورت گرفت (۳۱).

در سال ۲۰۱۹ مطالعه دیگری انجام شد که هدف آن، تهیه یک روش ساده، قابل حمل و سریع برای تشخیص سرمی توکسوپلازموزیس بر اساس پروتئین نوترکیب توکسوپلازما گوندی (T. SAG1 (rSAG1) و gondii) GRA7 (rGRA7) بود. مشخص شد که حساسیت و اختصاصیت IgM rGRA7-Dot-ELISA به ترتیب ۸۷/۵٪ و ۹۱/۱٪ است (۳۲).

سال ۲۰۲۰ در کشور ژاپن مطالعه‌ای برای تشخیص آنتی‌بادی ضد توکسوپلازما گوندی در گربه‌ها به روش ایمونوکروماتوگرافیک بر پایه آنتی‌ژن GRA7 صورت گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که TgGRA7-ICT یک تست قابل اعتماد برای تشخیص ضد T است (۳۳).

در راستای اهمیت و ضرورت انجام تست‌های غربالگری دوران بارداری در آمریکا و به منظور تشخیص زودهنگام و در نتیجه درمان توکسوپلازموزیس مادرزادی گروهی از دانشمندان با استفاده از تست طراحی شده شرکت LDBIO فرانسه آنتی‌بادی IgG و IgM در سرم افراد را به سادگی با حساسیت و اختصاصیت ۱۰۰٪ مورد بررسی قرار دادند. این روش قابل اعتماد و برای بیماران هزینه‌های کمتری را دربرداشت. نتیجه این تحقیق سبب شد که از این تست به عنوان یک روش تشخیصی POC در ایالات متحده آمریکا به کار گرفته و

در فاز حاد پایین بوده و با گذر زمان افزایش می‌یابد از معمول‌ترین روش‌های تشخیص عفونت حاد است (۲۱) ولی در زنان باردار و افرادی که تا بیش از سه ماه پس از عفونت حاد مورد آزمون قرار می‌گیرند کارایی ندارد (۲۲،۲۰). به همین دلیل سنجش هم‌زمان غلظت IgM و آویدیتی IgG اختصاصی بیشترین حساسیت و اختصاصیت را برای تشخیص عفونت حاد در پی دارد (۱۰). اکثر تست‌های تشخیصی مورد استفاده، روش‌های ایمونولوژیکی ردیابی آنتی‌بادی و هر کدام واجد معایبی هستند. از طرفی شناسایی آنتی‌ژن اختصاصی فاز حاد بیماری مرحله کلیدی در طراحی روش‌های تشخیصی است. برخی مطالعات از پتانسیل پروتئین *gra7* برای تشخیص با آزمون الایزا بهره برده و حساسیت ۸۰ درصد و ویژگی ۹۰ درصد را برای تست گزارش کردند (۱۱). به منظور تشخیص دقیق، سریع و زودهنگام بیماری مطالعه حاضر، برای اولین بار، با هدف استفاده از آنتی‌ژن *gra7* برای طراحی تست تشخیص سریع توکسوپلازموزیس به روش ایمونوکروماتوگرافی صورت پذیرفت تا معایب روش‌های معمول شناسایی را تا حد امکان برطرف سازد.

تهیه این پروتئین از پیکره انگل نیاز به کشت انبوه آن و جداسازی و تخلیص دارد که فرایندی دشوار و خطر آفرین است (۲۳-۲۵). علاوه بر این، میزان پروتئین به دست آمده در این روش توجیه اقتصادی ندارد. در نتیجه، روش‌های مولکولی برای تولید *gra7* مورد استفاده قرار گرفت تا میزان بالایی از آن در شرایط آزمایشگاهی تولید شود. از طرفی، استفاده از نانو ذرات طلا (Gold Nanoparticle) یا طلای کلوئیدی (Colloidal Gold) جهت نشان دار کردن آنتی‌ژن‌ها به عنوان یکی از معمول‌ترین روش‌های موجود در طراحی تست‌های تشخیص زودهنگام و به خصوص تست‌های نواری کاربرد دارد. از جمله مزیت‌های مهم این ماده پایداری نسبتاً بالای آن است (۲۶).

در سال ۲۰۱۱، Wang Yh و همکاران، تست استریپ تشخیص آنتی‌ژن‌های در گردش خون حیوانات در طی مرحله حاد توکسوپلازموزیس را طراحی نمودند. حساسیت و ویژگی تست استریپ در مقایسه با روش الایزا توافق ۱۰۰ درصدی را به دست آورد. در آلودگی تجربی در حیوانات، با استفاده از این تست استریپ در روز دوم آلودگی، آنتی‌ژن‌های در گردش خون شناسایی شدند (۲۷). گروه دیگری از محققان نیز از آنتی‌ژن‌های نوترکیب SAG2 و ROP2 برای تشخیص آلودگی توکسوپلازما گوندی و استفاده کردند. در نهایت پیشنهاد استفاده از آنتی‌ژن‌های نوترکیب مذکور برای ساخت واکسن مورد تاکید قرار گرفت (۲۸). همچنین محققین

قبلی منجر به ساخت و ارزیابی موفقیت آمیز تست تشخیص سریع توکسوپلاسموز گردید. بنابراین نتایج این تحقیق می تواند با تامین راهکار غربالگری سریع افراد مشکوک به بیماری توکسوپلاسموز سبب کاهش زمان تشخیص شده و نیز تفسیر نتایج حاصل از تست را برای قشر وسیعی از افراد آسان کند.

سپاسگزاری

این اثر توسط دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی با شماره ۲۶۵ پشتیبانی شده است. نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تشکر می کنند.

تعارض در منافع

این مقاله پژوهشی مستقل است که بدون حمایت مالی سازمانی انجام شده است. در انجام مطالعه حاضر، نویسندگان هیچ گونه تضاد منافی نداشته اند.

Referance

- Dubey JP. The history of *Toxoplasma gondii*-the first 100 years. *J Eukaryot Microbiol* 2008;55(6):467-75. [DOI:10.1111/j.1550-7408.2008.00345.x] [PMID]
- Wolf A, Cowen D, Paige B. Human toxoplasmosis: occurrence in infants as an encephalomyelitis verification by transmission to animals. *Science (Washington)*. 1939;89(2306). [DOI:10.1126/science.89.2306.226] [PMID]
- Mamidi A, DeSimone JA, Pomerantz RJ. Central nervous system infections in individuals with HIV-1 infection. *J Neurovirol*. 2002;8(3):158-67. [DOI:10.1080/13550280290049723] [PMID]
- Gross U, Holpert M, Goebel S. Impact of stage differentiation on diagnosis of toxoplasmosis. *Ann Ist Super Sanita*. 2004;40(1):65-70.
- Prince HE, Wilson M. Simplified assay for measuring *Toxoplasma gondii* immunoglobulin G avidity. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2001;8(5):904-8. [DOI:10.1128/CDLI.8.5.904-908.2001] [PMID] [PMCID]
- Pfreppe K-I, Enders G, Gohl M, Krczal D, Hlobil H, Wassenberg D, et al. Seroreactivity to and avidity for recombinant antigens in toxoplasmosis. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2005;12(8):977-82. [DOI:10.1128/CDLI.12.8.977-982.2005] [PMID] [PMCID]
- Roberts A, Hedman K, Luyasu V, Zufferey J, Bessières M-H, Blatz R-M, et al. Multicenter evaluation of strategies for serodiagnosis of primary infection with *Toxoplasma gondii*. *Clin Microbiol Infect*. 2001;20(7):467-74. [DOI:10.1007/PL00011289] [PMID]

باعث پیشگیری از سقط جنین، هزینه های گزاف ناشی از عقب ماندگی های ذهنی و اجتماعی شود (۳۴).

در این تحقیق برای اولین بار تست استریپ با استفاده از آنتی ژن نو ترکیب *gra7* برای تشخیص توکسوپلاسموز طراحی شد. این تست بسیار ساده و سریع عملکردی با اختصاصیت بالا نشان داد که می تواند به عنوان یک روش تشخیصی (POCT) Point of care و نیز در ارزیابی های در سطح وسیع بالینی کاربرد زیادی داشته باشد. با این وجود، کنترل کیفی استریپ و ارزیابی آن بر روی جامعه آماری بالاتر شواهد کامل تری بر اثرات مثبت آن در تشخیص بیماری توکسوپلاسموز خواهد داشت. بر همین اساس تحقیقات بیشتر برای ارتقا و بهینه سازی مطالعه حاضر توصیه می شود.

نتیجه گیری

در این مطالعه انتخاب آنتی ژن مناسب بر اساس شاخصه های مهم سلولی و بالینی انگل همراه با بهره گیری از نتایج آزمون های

- Abdizadeh R, Maraghi S, Ghadiri AA, Tavalla M, Shojae S. Cloning and Expression of Major Surface Antigen 1 Gene of *Toxoplasma gondii* RH Strain Using the Expression Vector pVAX1 in Chinese Hamster Ovary Cells. *Jundishapur J Microbiol*. 2015;8(3):e22570. [DOI:10.5812/jjm.22570]
- Grzybowski MM, Dziadek B, Dziadek J, Gatkowska J, Dzitko K, Dlugonska H. *Toxoplasma gondii*: cloning, expression and immunoreactivity of recombinant ROP5 and ROP18 antigens. *Exp. Parasitol*. 2015;150:1-6. [DOI:10.1016/j.exppara.2015.01.006] [PMID]
- Kotresha D, Noordin R. Recombinant proteins in the diagnosis of toxoplasmosis. *Apmis*. 2010;118(8):529-42. [DOI:10.1111/j.1600-0463.2010.02629.x] [PMID]
- Araújo PRB, Ferreira AW. High diagnostic efficiency of IgM-ELISA with the use of multiple antigen peptides (MAP1) from *T. gondii* ESA (SAG-1, GRA-1 and GRA-7), in acute toxoplasmosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2010;52(2):63-8. [DOI:10.1590/S0036-46652010000200001] [PMID]
- Dunn JD, Ravindran S, Kim S-K, Boothroyd JC. The *Toxoplasma gondii* dense granule protein GRA7 is phosphorylated upon invasion and forms an unexpected association with the rhoptry proteins ROP2 and ROP4. *Infect Immun*. 2008;76(12):5853-61. [DOI:10.1128/IAI.01667-07] [PMID] [PMCID]
- Igarashi M, Kano F, Tamekuni K, Kawasaki P, Navarro I, Vidotto O, et al. *Toxoplasma gondii*: cloning, sequencing, expression, and antigenic characterization of ROP2, GRA5 and GRA7. *Genet Mol Res*. 2008;305-13. [DOI:10.4238/vol7-2gmr423] [PMID]
- Sun X, Wang Z, Li J, Wei F, Liu Q. Evaluation of an indirect ELISA using recombinant granule antigen GRA1,

- GRA7 and soluble antigens for serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in chickens. *Res Vet Sci*. 2015;100:161-4. [DOI:10.1016/j.rvsc.2015.04.011] [PMID]
15. Wang Z, Ge W, Huang S-Y, Li J, Zhu X-Q, Liu Q. Evaluation of recombinant granule antigens GRA1 and GRA7 for serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in dogs. *BMC Vet Res*. 2014;10(1):158. [DOI:10.1186/1746-6148-10-158] [PMID] [PMCID]
16. Wang Z, Ge W, Li J, Song M, Sun H, Wei F, et al. Production and evaluation of recombinant granule antigen protein GRA7 for serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in cattle. *Foodborne Pathog Dis*. 2014;11(9):734-9. [DOI:10.1089/fpd.2014.1749] [PMID]
17. Gopal GJ, Kumar A. Strategies for the production of recombinant protein in *Escherichia coli*. *Protein J*. 2013;32(6):419-25. [DOI:10.1007/s10930-013-9502-5] [PMID]
18. Wang Y, Wang L, Zhang J, Wang G, Chen W, Chen L, et al. Preparation of colloidal gold immunochromatographic strip for detection of *Paragonimiasis skrjabini*. *PLoS one*. 2014;9(3):e92034. [DOI:10.1371/journal.pone.0092034] [PMID] [PMCID]
19. Ferreira MS, Borges AS. Some aspects of protozoan infections in immunocompromised patients- a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002;97(4):443-57. [DOI:10.1590/S0074-02762002000400001] [PMID]
20. Wallon M, Peyron F. Congenital Toxoplasmosis: A Plea for a Neglected Disease. *PLoS Pathog*. 2018;7(1):25. [DOI:10.3390/pathogens7010025] [PMID] [PMCID]
21. Beghetto E, Buffolano W, Spadoni A, Del Pezzo M, Di Cristina M, Minenkova O, et al. Use of an immunoglobulin G avidity assay based on recombinant antigens for diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. *Clin Microbiol Rev*. 2003;41(12):5414-8. [DOI:10.1128/JCM.41.12.5414-5418.2003] [PMID] [PMCID]
22. Dubey J, Jones J. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *Int J Parasitol Parasites Wildl*. 2008;38(11):1257-78. [DOI:10.1016/j.ijpara.2008.03.007] [PMID]
23. Hiszczyńska-Sawicka Eb, Brillowska-Dąbrowska A, Dąbrowski S, Pietkiewicz H, Myjak P, Kur J. High yield expression and single-step purification of *Toxoplasma gondii* SAG1, GRA1, and GRA7 antigens in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*. 2003;27(1):150-7. [DOI:10.1016/S1046-5928(02)00593-4]
24. Babaie J, Miri M, Sadeghiani G, Zare M, Khalili G, Golkar M. Expression and Single-step Purification of GRA8 Antigen of *Toxoplasma gondii* in *Escherichia coli*. *Avicenna J Med Biotechnol*. 2011;3(2):67-77.
25. Walls D, Loughran ST. Tagging recombinant proteins to enhance solubility and aid purification. *Methods Mol Biol (Clifton, NJ)*. 2011;681:151-75. [DOI:10.1007/978-1-60761-913-0_9] [PMID]
26. Wong RC, Tse HY. *Lateral flow immunoassay*. New York: Springer; 2009. [DOI:10.1007/978-1-59745-240-3]
27. Wang Y-H, Li X-R, Wang G-X, Yin H, Cai X-P, Fu B-Q, et al. Development of an immunochromatographic strip for the rapid detection of *Toxoplasma gondii* circulating antigens. *Parasitol Int*. 2011;60(1):105-7. [DOI:10.1016/j.parint.2010.11.002] [PMID]
28. Yan H, Yan H, Tao Y, Chen H, Li G, Gong W, et al. Application and expression of *Toxoplasma gondii* surface antigen 2 (SAG2) and rhostry protein 2 (ROP2) from recombinant *Escherichia coli* strain. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2012;106(6):356-62. [DOI:10.1016/j.trstmh.2012.02.008] [PMID]
29. Chapey E, Wallon M, Peyron F. Evaluation of the LDBIO point of care test for the combined detection of toxoplasmic IgG and IgM. *Clin Chim Acta*. 2017;464:200-1. [DOI:10.1016/j.cca.2016.10.023] [PMID]
30. Mahinc C, Flori P, Delaunay E, Guillerme C, Charaoui S, Raberin H, et al. Evaluation of a new ICT test (LDBIO Diagnostics) to detect toxoplasma IgG and IgM: comparison with the routine Architect technique. *J Clin Microbiol*. 2017;JCM. 01106-17. [DOI:10.1128/JCM.01106-17] [PMID] [PMCID]
31. Kim YH, hoo Lee J, kyu Ahn S, Kim T-S, Hong S-J, Chong C-K, et al. Seroprevalence of Toxoplasmosis with ELISA and Rapid Diagnostic Test among Residents in Gyodong-do, Incheon city, Korea: A Four-Year Follow-up. *Korean J Parasitol*. 2017;55(3):247. [DOI:10.3347/kjp.2017.55.3.247] [PMID] [PMCID]
32. Teimouri A, Modarressi MH, Shojaee S, Mohebbali M, Rezaian M, Keshavarz H. Development, optimization, and validation of an in-house Dot-ELISA rapid test based on SAG1 and GRA7 proteins for serological detection of *Toxoplasma gondii* infections. *J Glob Antimicrob Resist*. 2019; 12:2657. [DOI:10.2147/IDR.S219281] [PMID] [PMCID]
33. YBAÑEZ RH, KYAN H, NISHIKAWA Y. Detection of antibodies against *Toxoplasma gondii* in cats using an immunochromatographic test based on GRA7 antigen. *J Vet Med Sci*. 2020;19-0654. [DOI:10.1292/jvms.19-0654] [PMID]
34. Begeman IJ, Lykins J, Zhou Y, Lai BS, Levigne P, El Bissati K, et al. Point-of-care testing for *Toxoplasma gondii* IgG/IgM using *Toxoplasma* ICT IgG-IgM test with sera from the United States and implications for developing countries. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(6):e0005670. [DOI:10.1371/journal.pntd.0005670] [PMID] [PMCID]