

ارزیابی روش الیزا با استفاده از آنتی ژن‌های دفعی - ترش‌چی توکسوپلازما برای تشخیص توکسوپلاسموزیس در موش صحرایی

سیدحسین عبداللہی^{۱*}، عباس محمودزاده^۲، مهران بهادران^۳

پذیرش: ۱۳۸۳/۹/۱۰

بازنگری: ۱۳۸۳/۷/۲۲

دریافت: ۱۳۸۳/۲/۱۹

خلاصه

سابقه و هدف: با توجه به گزارش‌های قبلی، به نظر می‌رسد آنتی‌ژن‌های دفعی - ترش‌چی (E/SA) توکسوپلازما گوندی نشانگرهای مناسبی برای تشخیص توکسوپلاسموزیس با روش‌های سرولوژی باشند. در مطالعات قبلی معمولاً مایع رویی کشت سلولی توکسوپلازما یا محیط کشت RPMI-1640 که تاکی‌زوئیت‌های تک یاخته در آن انکوبه شده بودند، به عنوان ترکیب حاوی E/SA استفاده شده‌اند. این مطالعه به منظور ارزیابی روش الیزا با استفاده از مایع صفاق موش سفید کوچک آزمایشگاهی آلوده به توکسوپلازما (یکی از ترکیبات حاوی آنتی‌ژن‌های دفعی - ترش‌چی توکسوپلازما) به عنوان آنتی‌ژن، برای تشخیص توکسوپلاسموزیس در موش صحرایی صورت گرفت.

مواد و روش‌ها: مایع صفاق موش سفید کوچک آزمایشگاهی که ۳ روز قبل به طریق تزریق داخل صفاقی با تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلازما آلوده شده بود، کشیده شد و با دور $750 \times g$ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید سپس رسوب سولفات آمونیوم اشباع (۳۰٪) (ترکیب حاوی آنتی‌ژن‌های دفعی - ترش‌چی) از مایع رویی آن تهیه شد. ۴۰ سر موش صحرایی نر با سن ۷-۱۰ هفته و غیرآلوده به توکسوپلازما (Dye - Test منفی) انتخاب و به هر کدام 4×10^6 تاکی‌زوئیت توکسوپلازما از طریق داخل صفاقی تزریق گردید. به منظور انتخاب نمونه سرم مناسب از مراحل سیر آلودگی، سرم روزهای ۸، ۱۵، ۲۲ و ۶۰ بعد از آلودگی موش‌های صحرایی تهیه شد در مرحله بعد نمونه‌های سرم روزهای فوق مربوط به ۱۰ سر از آن‌ها به روش dye-test و سرم روزهای ۱۵ و ۶۰ تمام حیوانات بعد از آلودگی نیز به عنوان نمونه‌های مناسب هم به روش dye-test و هم به روش الیزا با استفاده از ترکیب حاوی E/SA تهیه شده به طریق مورد نظر در این مطالعه، آزمایش شدند.

یافته‌ها: با توجه به نتایج آزمایش سرم روزهای مختلف موش‌های صحرایی آلوده، سرم روز ۱۵ و ۶۰ به عنوان نمونه‌های مناسب انتخاب شدند تحت شرایط مورد نظر در این بررسی، Cut-off تست الیزا با ۹۹٪ اطمینان برابر ۰/۳۳ تعیین گردید که میزان جذب نوری تمام نمونه سرم‌های روزهای ۱۵ و ۶۰ آلودگی و هم‌چنین دو مورد از سرم‌های منفی بالاتر از آن بدست آمد. ویژگی و حساسیت آزمون نیز به ترتیب ۹۵٪ و ۱۰۰٪ تعیین شد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که روش الیزا تحت شرایط مورد نظر در این مطالعه و با استفاده از رسوب سولفات آمونیوم اشباع (۳۰٪) مایع صفاق موش سفید کوچک آزمایشگاهی آلوده به توکسوپلازما، آزمون نسبتاً مناسبی برای تشخیص توکسوپلاسموزیس در مدل حیوانی مورد مطالعه می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: توکسوپلاسموزیس، الیزا، آنتی‌ژن‌های دفعی - ترش‌چی، توکسوپلازما گوندی

*- استادیار گروه میکروبیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

تلفن: ۰۳۴۱-۵۲۳۴۰۰۳، فاکس: ۰۳۴۱-۵۲۲۵۲۰۹، پست الکترونیکی: habdollahi38@yahoo.com

۲- دانشیار گروه میکروبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا... تهران

۳- کارشناس ارشد انگل‌شناسی، عضو هیأت علمی گروه میکروبیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

مقدمه

توکسوپلاسموزیس^۱ بیماری شایع در سراسر دنیا است که در اثر آلودگی با تک یاخته توکسوپلاسمائونیدی^۲ متعلق به خانواده اپی کمپلکسا^۳ بروز می کند. انسان از طریق اکتسابی و مادرزادی به این بیماری مبتلا می شود. آلودگی در افراد با سیستم ایمنی سالم معمولاً بدون علامت یا همراه با علائم خفیف می باشد ولی برای کودکانی که در دوران جنینی آلوده شده اند (مادرزادی) و افراد دچار نقص ایمنی ممکن است عوارض شدید و حتی مرگ را به دنبال داشته باشد [۲،۹،۱۱].

تشخیص سریع و دقیق توکسوپلاسموزیس دارای اهمیت زیادی می باشد زیرا با تشخیص به موقع و درمان مناسب، عوارض ناشی از این بیماری به میزان قابل توجهی کاهش پیدا می کند. اگرچه تلفیح نمونه به حیوان حساس، کشت سلولی و مشاهده انگل در برش های بافتی یا گسترش تهیه شده از مایعات بدن برای تشخیص توکسوپلاسموزیس از حساسیت و ویژگی مناسب برخوردار می باشند اما به دلیل نیاز به امکانات خاص، صرف زمان نسبتاً زیاد برای مشخص شدن نتیجه آزمایش و خطر آلودگی افراد و محیط کار (به دلیل کار با انگل زنده) معمولاً در آزمایشگاه های تشخیص طبی مورد استفاده قرار نمی گیرند [۱۰،۱۲،۱۹].

تعیین آنتی بادی تولید شده علیه توکسوپلاسم در سرم افراد، روش رایج تشخیص توکسوپلاسموزیس است. آزمایش های موجود برای این منظور با استفاده از آنتی ژن های غشایی یا سیتوپلاسمی انگل طراحی شده اند. وجود برخی مشکلات از جمله پایداری متفاوت ایمونوگلوبولین های قابل شناسایی توسط این آنتی ژن ها، بروز مثبت کاذب در اثر وجود فاکتور روماتوئیدی و آنتی بادی های طبیعی، تفسیر نتایج این آزمایش ها را مشکل می کند و گاهی اعلام نظر قطعی در این رابطه غیر ممکن می باشد [۶،۱۵].

جهت برطرف شدن مشکلات فوق، بررسی های زیادی به منظور شناسایی ترکیباتی از توکسوپلاسم به عنوان آنتی ژن جهت استفاده در سنجش های ایمنی طراحی شده برای تشخیص توکسوپلاسموزیس صورت گرفته است. در این رابطه

توجه پژوهشگران به آنتی ژن های دفعی - ترشحی (E/SA)^۴ انگل جلب شده است. محمودزاده و همکاران (۱۹۹۹) گزارش کردند که روش الایزا نقطه ای^۵ با استفاده از مایع صفاق موش سفید کوچک آزمایشگاهی آلوده شده با سویه RH توکسوپلاسمائونیدی دارای ارزش تشخیصی بالایی برای تشخیص توکسوپلاسموزیس در موش صحرایی می باشد [۱].

مطالعات کازابون و همکاران^۶ (۱۹۹۴) نشان داد که برخی از آنتی ژن های دفعی ترشحی توکسوپلاسم و آنتی بادی های تولید شده علیه آنها تنها زمان خاصی از دوره توکسوپلاسموزیس، در سرم قابل شناسایی می باشند همچنین نوع، میزان و زمان قابل شناسایی بودن ایمونوگلوبولین های IgE, IgM, IgA, IgG تولید شده علیه این آنتی ژن ها در سرم موش های آلوده به سویه های مختلف توکسوپلاسم متفاوت می باشد [۴]. الساندر و همکاران^۷ (۲۰۰۲) گزارش کردند که ترکیب دفعی - ترشحی ۹۷ کیلودالتونی از تاکی زوئیت های توکسوپلاسم، تولید IgM, IgG را در فاز حاد توکسوپلاسموزیس تحریک می کند ولی در مرحله مزمن تنها IgG را شناسایی می کند؛ بنابراین به عنوان یک مارکر مناسب برای استفاده در آزمون های تشخیصی قابل بررسی می باشد [۳]. یاماموتو و همکاران^۸ (۱۹۹۸) گزارش کردند که ترکیبات آنتی ژنی مایع صفاق موش سفید کوچک آزمایشگاهی آلوده به توکسوپلاسمائونیدی، ایمونوگلوبولین های IgM, IgA, IgG علیه توکسوپلاسم در سرم انسان را شناسایی می کنند و به عنوان مارکر برای استفاده در روش های سرولوژی به منظور تشخیص توکسوپلاسموزیس قابل بررسی می باشند [۱۹].

باتوجه به خصوصیات گزارش شده از E/SA این آنتی ژن ها نشانگرهای مناسبی برای استفاده در تست های سرولوژی جهت بهبود ارزش تشخیصی این روش ها برای تشخیص توکسوپلاسموزیس به نظر می رسند [۵،۹،۱۱]. بنابراین از آنجایی که مایع صفاق موش سفید کوچک آزمایشگاهی آلوده به توکسوپلاسم به عنوان یکی از ترکیبات حاوی E/SA گزارش شده است، مطالعه حاضر به منظور ارزیابی روش الایزا

4- Excreted / Secreted Antigens

5- Dot-ELISA

6- Cazabon et al

7- Alessander et al

8- Yamamoto et al

1 - Toxoplasmosis

2- Toxoplasma gondii

3- Apicomplexa

به عنوان یک آزمون حساس و قابل انجام در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی با استفاده از رسوب سولفات آمونیوم اشباع (۳۰٪) این ترکیب، برای تشخیص توکسوپلاسموزیس در موش صحرایی صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

۱- تهیه آنتی‌ژن

مایع صفاق موش‌های سفید کوچک آزمایشگاهی که سه روز قبل با تاکی‌زوئیت‌های سویه RH توکسوپلاسمای گوندی (۱۰^۶ تاکی‌زوئیت در هر میلی‌لیتر) به روش تزریق داخل صفاقی آلوده شده بودند، خارج و با دور ۷۵۰×g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ و مایع رویی به عنوان ترکیب حاوی E/SA جدا شد.

برای تهیه رسوب سولفات آمونیوم اشباع (۳۰٪) پس از تعیین مقدار سولفات آمونیوم مورد نیاز (۱۶۴ میلی‌گرم به ازای هر میلی‌لیتر ترکیب حاوی پروتئین مورد نظر در صفر درجه سانتیگراد)، ترکیب حاوی E/SA در دمای مناسب قرار داده و در حالی که به وسیله همزن مغناطیسی دائماً مخلوط می‌شد، نمک تدریجاً به آن اضافه گردید بعد از افزودن سولفات آمونیوم تعیین شده به ظرف حاوی مایع صفاق موش آلوده، محلول به مدت یک شب در یخچال قرار داده شد. پس از آن به مدت نیم ساعت با دور ۳۰۰×g سانتریفوژ گردید سپس مایع رویی آن خارج و رسوب به مدت ۲۴ ساعت در مقابل بافرتریس اسید کلریدریک ۰/۰۵ مولار با PH=۷/۴ دیالیز (کیسه دیالیز با $10^{KD} < \text{cut-off}$ تهیه شده از شرکت بیوژن ایران) و با قرار دادن کیسه دیالیز در مقابل جریان شدید هوا (کولرگازی) تغلیظ و به روش برادفورد، میزان پروتئین آن محاسبه گردید [۱۹، ۱۳، ۱۱].

۲- تهیه نمونه‌های سرم

موش‌های صحرایی نر با ۱۰-۷ هفته سن برای این منظور انتخاب شدند [۸] برای اطمینان از عدم آلودگی قبلی آن‌ها به توکسوپلاسمای گوندی از حدقه چشمشان خون‌گیری و سرم آن‌ها به روش رنگ‌سنجی^۱ (تست طلایی برای تشخیص

توکسوپلاسموزیس) به صورت سریال رقت و تک رقتی آزمایش گردید. به طور خلاصه سریال رقت دو برابر از سرم مورد نظر در حفره‌های میکروپلیت مناسب تهیه و به هر حفره حاوی سرم، ۵۰ میکرولیتر کمپلمان و ۲۵ میکرولیتر از سوسپانسیون سرم فیزیولوژی حاوی ۱۰^۵×۷۲ تاکی‌زوئیت توکسوپلاسمای در میلی‌لیتر اضافه و میکروپلیت به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه قرار داده شد. پس از آن ۲۵ میکرولیتر از محلول رنگ متیلن بلو به تمام حفره‌ها اضافه و پس از یک ساعت انکوبه در ۳۷ درجه، میکروپلیت ۱۰ دقیقه در حرارت اطاق قرار گرفت. در پایان به کمک میکروسکوپ اینورت تعداد ۱۰۰ تاکی‌زوئیت از هر حفره شمرده و تعداد رنگ گرفته‌ها تعیین گردید. رقتی از سرم که ۵۰٪ تاکی‌زوئیت‌ها رنگ گرفته بودند (رقت نهایی)^۲ انتخاب و با کنترل (در این مطالعه رقت ۱ به ۲۵۶) مقایسه شد. در روش تک رقت، تنها سرم رقیق نشده به کار می‌رفت و بقیه موارد با روش سریال رقت یکسان بود [۱۲].

۴۰ سر از موش‌های صحرایی که سرم آن‌ها از نظر وجود آنتی‌بادی علیه توکسوپلاسمای منفی بود (نقطه پایان تیتراسیون سرم آن‌ها با روش رنگ‌سنجی به طریق سریال رقت کمتر از ۱ به ۳۲ و به طریق تک رقت حداقل ۹۵٪ تاکی‌زوئیت‌ها رنگ گرفته بودند) انتخاب و به هر کدام ۱۰^۶×۴ تاکی‌زوئیت سویه RH توکسوپلاسمای به طریق داخل صفاقی تزریق گردید [۱۵]. به منظور انتخاب نمونه‌های مناسب سرم از مراحل آلودگی، روزهای ۸، ۱۵، ۲۲ و ۶۰ مانند مرحله قبل از موش‌های صحرایی خونگیری و سرم آن‌ها جدا گردید. در مرحله بعد ۱۰ سر از موش‌های صحرایی آلوده شده به طور تصادفی انتخاب و نمونه‌های سرم روزهای فوق مربوط به آن‌ها با روش رنگ‌سنجی آزمایش شد سپس سرم روزهای ۱۵ و ۶۰ تمام موش‌ها به عنوان نمونه‌های مناسب به روش رنگ‌سنجی آزمایش شدند [۱۶، ۱۲]. نمونه سرم‌های قبل از آلودگی موش‌ها به عنوان نمونه‌های منفی در نظر گرفته شد.

برای اثبات بروز توکسوپلاسموزیس در موش‌ها به دنبال تلقیح تاکی‌زوئیت‌ها و تایید نتایج تست رنگ‌سنجی (عدم آلودگی موش‌ها به توکسوپلاسمای قبل از دریافت تاکی‌زوئیت‌ها

1- Dye-test

2- End-point

پلیت با استفاده از اسپکتروفتومتر چند کانالی در طول موج ۴۹۲ نانومتر تعیین شد.

د - تعیین Cut-off تست

در این قسمت تمام سرم‌های منفی با رقت مناسب آنتی‌ژن، سرم و کونزوگه (به دست آمده از مراحل قبل) به صورت دوتایی در قالب الایزا غیرمستقیم به صورت تک رقتی آزمایش شدند، پس از تعیین میزان جذب نوری حفره‌های پلیت با اسپکتروفتومتر چندکانالی در طول موج ۴۹۲ نانومتر، میانگین رقت‌های دوتایی نمونه‌ها محاسبه و نمودار فراوانی آنها رسم گردید هم‌چنین میانگین و انحراف از معیار میانگین‌ها نیز محاسبه شد [۵].

۴ - انجام الایزا

در این مرحله پس از تعیین رقت مناسب کونزوگه رقت مناسب آنتی‌ژن (رسوب سولفات آمونیوم اشباع (۰.۳۰٪) مایع صفاق موش آلوده شده با تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلاسم)، رقت مناسب سرم (سرم موش‌های آلوده شده با تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلاسم)، cut-off تست محاسبه و نمونه‌های سرم مورد نظر (سرم‌های منفی، سرم روزهای ۱۵ و ۶۰) به روش الایزای غیرمستقیم به صورت تک رقتی آزمایش شدند [۵، ۱۳] و با توجه به نتایج حاصل، ویژگی و حساسیت روش مذکور برای تشخیص توکسوپلاسموزیس در موش صحرائی از روابط زیر محاسبه گردید (مثبت و منفی کاذب و حقیقی سرم‌ها بر اساس مقایسه نتایج تست رنگ‌سنجی با نتایج روش الایزا تعیین شده است).

مثبت حقیقی

$$100 \times \frac{\text{مثبت حقیقی}}{\text{منفی کاذب} + \text{مثبت حقیقی}} = \text{حساسیت}$$

منفی کاذب + مثبت حقیقی

منفی حقیقی

$$100 \times \frac{\text{مثبت کاذب} + \text{منفی حقیقی}}{\text{مثبت کاذب} + \text{منفی حقیقی}} = \text{ویژگی}$$

مثبت کاذب + منفی حقیقی

نتایج

تهیه نمونه‌های سرم مناسب

و مثبت بودن نمونه سرم‌های تهیه شده بعد از آلودگی، سوسپانسیون مغز تمام موش‌های آلوده شده و ۱۰ سر از موش‌های غیر آلوده (علاوه بر ۴۰ سر موش انتخاب شده جهت مطالعه) از طریق داخل صفاقی به موش سفید کوچک آزمایشگاهی تلقیح گردید [۷، ۹].

۳- طراحی الایزا

الف: تعیین رقت مناسب کونزوگه

این قسمت در قالب الایزای مستقیم انجام شد. به طور خلاصه در یک میکروپلیت ۹۶ حفره‌ای مخصوص الایزا، سریال رقت دو برابر از کونزوگه (Rabbits-AntiRat نشاندار شده با پراکسیداز، ساخته شرکت DAKO دانمارک)، و سرم تهیه شد (کونزوگه در جهت عمودی و سرم در جهت افقی حفره‌های میکروپلیت رقیق شدند) به طوری که هر رقت از کونزوگه با تمام رقت‌های سرم سنجیده شود. پس از پایان مراحل آزمایش، میزان جذب نوری حفره‌های پلیت با اسپکتروفتومتر چند کانالی (ساخت شرکت Moller - Wede آلمان) در طول موج ۴۹۲ نانومتر تعیین شد.

ب - تعیین رقت مناسب آنتی‌ژن

این مرحله در قالب الایزای غیرمستقیم صورت گرفت. به طور خلاصه در یک میکروپلیت ۹۶ حفره‌ای مخصوص الایزا سریال رقت دو برابر از سرم و آنتی‌ژن تهیه شد (سرم در جهت عمودی و آنتی‌ژن در جهت افقی میکروپلیت رقیق شدند) به طوری که هر کدام از رقت‌های سرم با تمام رقت‌های آنتی‌ژن مقایسه شوند. در پایان مراحل آزمایش، میزان جذب نوری حفره‌های پلیت با اسپکتروفتومتر چند کانالی در طول موج ۴۹۲ نانومتر تعیین گردید.

ج - تعیین رقت مناسب سرم

برای این منظور سه نمونه سرم منفی و سه نمونه سرم مثبت با رقت بالا، متوسط و پایین انتخاب و در قالب الایزای غیر مستقیم آزمایش شدند به طور خلاصه میزان مناسب از آنتی‌ژن به دیواره تمام حفره‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای مخصوص الایزا متصل و سریال رقت دو برابر و دوتایی (در دو ستون کنار هم) از سرم‌های مورد نظر در جهت عمودی این حفره‌های تهیه گردید در پایان میزان جذب نوری حفره‌های

و تحت شرایط این مطالعه رقت کونژوگه ۱ به ۴۰۰۰، رقت مناسب آنتی ژن ۱ به ۳۲ (حاوی ۶/۲۵ میکروگرم پروتئین در میلی لیتر ترکیب حاوی آنتی ژن) و رقت مناسب سرم (آنتی بادی) ۱ به ۲۰۰ بدست آمد.

ب - تعیین Cut-off تست

میانگین وانحراف معیار میزان جذب نوری نمونه سرم‌های منفی به ترتیب ۰/۰۵ و ۰/۱۸ بدست آمد و با توجه به این که منحنی فراوانی OD سرم‌های منفی کشیدگی به سمت راست داشت با ۹۹٪ اطمینان Cut-off تست عبارت است از:

$$\text{Cut-off} = \mu + 3SD = 0/18 + 0/15 = 0/33$$

انجام الیزا

نتایج آزمایش نمونه‌های سرم روز ۱۵ آلودگی، روز ۶۰ آلودگی و سرم‌های منفی به روش الیزا با رسوب سولفات آمونیوم اشباع (۳۰٪) مایع صفاق موش سفید کوچک آزمایشگاهی آلوده با توکسوپلازما به ترتیب در جداول ۲، ۳ و ۴ آمده است (حین مراحل خون‌گیری ۴ سر از موش‌های صحرایی مردند بنابراین نمونه‌های سرم آن‌ها از مطالعه حذف شدند). بررسی داده‌های فوق نشان می‌دهد که میزان جذب نوری (OD) ^۱ تمام نمونه سرم‌های روز ۱۵ آلودگی، روز ۶۰ آلودگی و دو مورد از سرم‌های منفی بیشتر از cut-off تست می‌باشد در نتیجه با توجه به نتایج آزمایش نمونه‌های سرم موش‌ها به روش رنگ‌سنجی، تحت شرایط مورد نظر در این بررسی، حساسیت و ویژگی تست الیزا-غیرمستقیم به روش تک رقتی برای تشخیص آلودگی به توکسوپلازما (وجود آنتی بادی علیه توکسوپلازما در سرم) در مدل حیوانی مورد مطالعه به شرح ذیل می‌باشد.

۳۶

$$= \frac{36}{36+0} \times 100 = 100\% \text{ حساسیت}$$

۳۶+۰

۳۶

$$= \frac{36}{36+2} \times 100 = 95\% \text{ ویژگی}$$

۳۶+۲

نتایج آزمایش رنگ سنجی سرم موش‌های صحرایی که به طور تصادفی به منظور تعیین نمونه سرم‌های مناسب از مراحل سیر توکسوپلاسموزیس انتخاب شدند (۱۰ سر). در جدول ۱ آمده است. داده‌های این جدول نشان می‌دهد که عیار آنتی بادی علیه توکسوپلازما در سرم این موش‌ها در اوایل آلودگی (تا روز ۲۲) سیر صعودی داشته ولی در نمونه سرم‌های تهیه شده از روز ۶۰ آلودگی مساوی یا کمتر از روز ۲۲ می‌باشد. اختلاف عیار آنتی بادی در نمونه‌های سرم این دو روز با $p < 0/01$ معنی دار بود. همچنین گرچه عیار آنتی بادی از روز هشتم آلودگی قابل شناسایی بود ولی تا روز ۱۵ به میزان مناسب افزایش یافت (با توجه به سرم کنترل). این افزایش با $p < 0/005$ معنی دار بود. بنا بر این سرم روز ۱۵ به عنوان سرم اوایل آلودگی و سرم روز ۶۰ به عنوان سرم مرحله مزمن انتخاب شدند.

در صفاق تمام موش‌های سفید کوچک آزمایشگاهی که سوسپانسیون مغز موش‌های آلوده شده با تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلازما را از طریق تزریق داخل صفاقی دریافت کرده بودند و رقت End-point سرم آن‌ها مساوی یا بیشتر از ۱ به ۲۵۶ (رقت پیشنهادی کنترل مثبت) بود تاکی‌زوئیت مشاهده گردید ولی در صفاق موش‌هایی که با سوسپانسیون مغز موش‌هایی که سرم آن‌ها باروش رنگ سنجی از نظر وجود آنتی بادی علیه توکسوپلازما منفی بود تاکی‌زوئیت مشاهده نشد.

طراحی الیزا

الف - تعیین رقت مناسب کونژوگه، آنتی ژن و سرم

با در نظر گرفتن عوامل زیر در جدول تعیین عیار برای هر

مورد

Plateau-height: حفره‌هایی که در آن‌ها زیادی آنتی ژن

یا آنتی بادی وجود داشت به عبارت دیگر با تغییر رقت آنتی ژن و یا سرم، میزان جذب نوری در آن‌ها تغییر پیدا نکرد.

Background plate: میزان جذب نوری ناشی از

واکنش‌های غیر اختصاصی و بدون ارتباط با فعالیت آنزیم

End-point: آخرین رقتی از آنتی ژن یا سرم که میزان

جذب نوری آن بالاتر از Background می‌باشد.

جدول ۱: تغییرات رقت نهایی (End point) در آزمایش Dye - Test نمونه‌های سرم ده سراز موش‌های صحرائی آلوده شده به توکسوپلازما

رقت End point نمونه‌های سرم					
بعد از آلودگی				قبل از آلودگی	آلودگی
روز ۶۰	روز ۲۲	روز ۱۵	روز ۸		
۱:۵۱۲	۱:۱۰۲۴	۱:۵۱۲	۱:۱۲۸	۱:۴*	۳
۱:۲۵۶	۱:۵۱۲	۱:۲۵۶	۱:۶۴	۱:۴	۵
۱:۵۱۲	۱:۱۰۲۴	۱:۵۱۲	۱:۶۴	۱:۱۶	۸
۱:۵۱۲	۱:۲۰۴۸	۱:۵۱۲	۱:۱۲۸	۱:۴	۱۴
۱:۲۵۶	۱:۵۱۲	۱:۲۵۶	۱:۶۴	۱:۴	۹
۱:۵۱۲	۱:۵۱۲	۱:۲۵۶	۱:۶۴	۱:۱۶	۲۱
۱:۵۱۲	۱:۵۱۲	۱:۲۵۶	۱:۶۴	۱:۴	۱۷
۱:۵۱۲	۱:۵۱۲	۱:۲۵۶	۱:۶۴	۱:۴	۱۹
۱:۵۱۲	۱:۲۰۴۸	۱:۵۱۲	۱:۱۲۸	۱:۱۶	۲۳
۱:۲۵۶	۱:۱۰۲۴	۱:۵۱۲	۱:۶۴	۱:۱۶	۱۵

* اعداد داخل جدول رقت نهایی سرم می‌باشند.

افزایش رقت نهایی سرم‌های روز ۸ بعد از آلودگی نسبت به قبل از آلودگی و سرم‌های روز ۱۵ بعد از آلودگی نسبت به روز ۸ با $p < 0.01$ معنی‌دار می‌باشد.

افزایش رقت نهایی سرم‌های روز ۲۲ بعد از آلودگی نسبت به روز ۱۵ با $p < 0.05$ معنی‌دار می‌باشد.

اختلاف رقت نهایی سرم‌های روز ۶۰ بعد از آلودگی نسبت به روز ۲۲ با $p < 0.1$ معنی‌دار است.

جدول ۲: نتایج آزمایش (OD) نمونه سرم‌های روز ۱۵ (موش‌های صحرائی آلوده شده با توکسوپلازما) به روش الایزا و استفاده از رسوب سولفات آمونیوم اشباع (۳۰٪) مایع صفاق موش سفید کوچک آزمایشگاهی آلوده شده به توکسوپلازما.

OD	شماره نمونه	OD	شماره نمونه	OD	شماره نمونه
۱/۴۰	۲۹	۱/۸۰	۱۵	۲/۰۲	۱
۱/۶۳	۳۰	۱/۹۲	۱۶	۲/۰۱	۲
۰/۹۸	۳۱	۱/۸۸	۱۷	۱/۰۹	۳
۱/۶۴	۳۲	۱/۹۹	۱۸	۲/۱۱	۴
۱/۵۵	۳۳	۲/۰۱	۱۹	۱/۹۵	۵
۱/۹۵	۳۴	۱/۹۹	۲۰	۱/۹۴	۶
۱/۹۹	۳۵	۲/۰۰	۲۱	۱/۸۵	۷
۲/۰۰	۳۶	۱/۹۸	۲۲	۱/۷۷	۸
۰/۱۴	۳۷	۰/۹۲	۲۳	۲/۱۴	۹
۰/۱۵	۳۸	۱/۶۳	۲۴	۲/۰۱	۱۰
۰/۱۴	۳۹	۱/۴۶	۲۵	۱/۹۷	۱۱
۰/۱۳	۴۰	۱/۲۸	۲۶	۱/۸۹	۱۲
۰/۱۵	۴۱	۱/۶۹	۲۷	۱/۸۵	۱۳
۰/۱۲	۴۲	۱/۴۴	۲۸	۱/۸۴	۱۴

شماره‌های ۳۷، ۳۸ و ۳۹ سرم منفی و شماره‌های ۴۰، ۴۱ و ۴۲ بدون آنتی‌ژن بوده‌اند (کنترل منفی)

جدول ۳: نتایج آزمایش (OD) نمونه سرم روز ۶۰ موش‌های صحرایی آلوده شده با توکسوپلاسما به روش الایزا و استفاده از رسوب سولفات آمونیوم اشباع (۳۰٪) مایع صفاق موش سفید کوچک آزمایشگاهی آلوده شده به توکسوپلاسما.

OD	شماره نمونه	OD	شماره نمونه	OD	شماره نمونه
۱/۳۹	۲۹	۱/۹۴	۱۵	۱/۱۷	۱
۱/۶۲	۳۰	۱/۷۷	۱۶	۳۵/۱	۲
۱/۷۸	۳۱	۱/۷۹	۱۷	۰/۹۰	۳
۱/۸۹	۳۲	۱/۷۸	۱۸	۱/۹۲	۴
۱/۸۸	۳۳	۱/۷۷	۱۹	۱/۸۲	۵
۱/۶۴	۳۴	۱/۶۴	۲۰	۱/۸۳	۶
۱/۶۹	۳۵	۱/۸۵	۲۱	۱/۷۷	۷
۱/۶۸	۳۶	۱/۶۲	۲۲	۱/۶۸	۸
۰/۱۳	۳۷	۱/۲۴	۲۳	۱/۵۶	۹
۰/۱۶	۳۸	۲/۰۴	۲۴	۱/۲۷	۱۰
۰/۱۷	۳۹	۱/۵۷	۲۵	۱/۳۷	۱۱
۰/۱۴	۴۰	۱/۶۵	۲۶	۱/۱۶	۱۲
۰/۱۵	۴۱	۱/۶۵	۲۷	۱/۸۸	۱۳
۰/۱۲	۴۲	۱/۶۸	۲۸	۱/۹۲	۱۴

شماره‌های ۳۷، ۳۸ و ۳۹ سرم منفی و شماره‌های ۴۰، ۴۱ و ۴۲ بدون آنتی‌ژن بوده‌اند (کنترل منفی)

جدول ۴: نتایج آزمایش (OD) نمونه سرم منفی موش‌های صحرایی آلوده شده با توکسوپلاسما به روش الایزا و استفاده از رسوب سولفات آمونیوم اشباع (۳۰٪) مایع صفاق موش سفید کوچک آزمایشگاهی آلوده شده به توکسوپلاسما.

OD	شماره نمونه	OD	شماره نمونه	OD	شماره نمونه
۰/۲۲	۲۷	۰/۲۵	۱۴	۰/۲۹	۱
۰/۱۵	۲۸	۰/۱۶	۱۵	۰/۳۴	۲
۰/۱۵	۲۹	۰/۳۵	۱۶	۰/۱۸	۳
۰/۲۳	۳۰	۰/۱۶	۱۷	۰/۱۸	۴
۰/۱۸	۳۱	۰/۱۴	۱۸	۰/۲۶	۵
۰/۱۵	۳۲	۰/۱۴	۱۹	۰/۱۲	۶
۰/۱۸	۳۳	۰/۲۶	۲۰	۰/۲۵	۷
۰/۱۲	۳۴	۰/۱۵	۲۱	۰/۱۶	۸
۰/۱۷	۳۵	۰/۲۱	۲۲	۰/۱۵	۹
۰/۱۴	۳۶	۰/۱۸	۲۳	۰/۱۳	۱۰
۰/۱۷	۳۷	۰/۱۴	۲۴	۱/۳۷	۱۱
۰/۱۷	۳۸	۰/۱۸	۲۵	۰/۱۴	۱۲
۰/۱۴	۳۹	۰/۱۵	۲۶	۰/۳۲	۱۳

شماره‌های ۳۷، ۳۸ و ۳۹ بدون آنتی‌ژن بوده‌اند (کنترل منفی)

بحث

نتایج مطالعات انجام شده به منظور شناسایی ترکیباتی از توکسوپلازما به عنوان نشانگر مناسب جهت بهبود ارزش تشخیصی روش‌های سرولوژی برای تشخیص توکسوپلاسموزیس نشان می‌دهد که آنتی‌ژن‌های دفعی ترشحی تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلازما در این رابطه از اهمیت خاص برخوردار می‌باشند [۱۱، ۱۹].

در مطالعات قبلی معمولاً از مایع رویی کشت سلولی توکسوپلازما و یا محیط کشت RPMI-1640 که تاکی‌زوئیت‌های تک یاخته در آن انکوبه شده بودند به عنوان ترکیب حاوی E/SA استفاده شده است. اگرچه آنتی‌ژن‌های تهیه شده با این روش‌ها از خلوص بیشتری برخوردار هستند ولی انجام آن‌ها نسبتاً مشکل و نیازمند شرایط و امکانات خاص می‌باشد [۱۸، ۱۹].

یاماموتو در سال ۱۹۹۸ گزارش کرد مایع صفاق موش‌های سفید کوچک آزمایشگاهی که از طریق تزریق داخل صفاقی با تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلازما آلوده شده بودند با سرم‌های انسانی حاوی آنتی‌بادی علیه توکسوپلازما واکنش نشان می‌دهد [۱۹]. داده‌های جداول ۲، ۳ و ۴ (نتایج آزمایش نمونه سرم‌های منفی و روزهای ۱۵ و ۶۰ بعد از آلودگی) این مطالعه نیز این مطلب را در رابطه با سرم موش‌ها نشان می‌دهد. این محقق هم‌چنین رسوب سولفات آمونیوم اشباع ۸۰-۳۰ درصد از این ترکیبات را به روش الایزا نقطه‌ای با نمونه سرم‌های فوق آزمایش و گزارش نمود که رسوب سولفات آمونیوم اشباع ۴۰-۳۰ درصد حاوی ترکیبات آنتی‌ژنیک بیشتری نسبت به بقیه اجزاء می‌باشند؛ بنابراین به نظر می‌رسد با تلقیح تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلازما از طریق داخل صفاقی به موش‌های سفید کوچک آزمایشگاهی می‌توان مایع صفاق آن‌ها را به عنوان ترکیب حاوی آنتی‌ژن‌های دفعی - ترشحی به کار برد. تهیه آنتی‌ژن‌های مذکور از این طریق نسبت به روش‌های دیگر آسانتر و ارزانتر خواهد بود و با استفاده از روش‌های تخلیص از جمله رسوب با سولفات آمونیوم اشباع، می‌توان آغشتگی E/SA تهیه شده رانیز بر طرف نمود.

در سال ۱۹۸۷ یاسوهیروسوزکی^۱ گزارش کرد که آنتی‌بادی‌های تولید شده علیه آنتی‌ژن‌های گردشی توکسوپلازما از روز دهم آلودگی در سرم قابل شناسایی بوده و تا روز هفدهم به بالاترین میزان می‌رسند [۱۷]. کازابون و همکاران (۱۹۹۴) این آنتی‌بادی‌ها را از روز ۱۵-۱۳ بعد از آلودگی شناسایی کردند؛ بنابراین هفته دوم آلودگی را زمان مناسب برای تهیه نمونه سرم از اوایل آلودگی به توکسوپلاسموزیس برای مطالعه در رابطه با آنتی‌ژن‌های دفعی ترشحی پیشنهاد کردند [۴]. در مطالعه حاضر (جدول ۱) آنتی‌بادی علیه توکسوپلازما در سرم موش‌ها در روز هشتم قابل شناسایی بود، تا روز ۲۲ سیر صعودی داشت ولی در روز ۶۰ ثابت بود یا کاهش پیدا کرد این موضوع بروز توکسوپلاسموزیس حاد بدنبال تلقیح تاکی‌زوئیت‌های توکسوپلازما در اوایل آلودگی و تغییر فاز سیر بیماری در روز ۶۰ را در مدل حیوانی مورد مطالعه نشان می‌دهد [۱۴، ۱۸].

مطالعات قبلی نشان داده‌اند که برخی از آنتی‌ژن‌های دفعی ترشحی توکسوپلازما تنها در زمان خاصی از دوره بیماری در سرم قابل شناسایی می‌باشند هم‌چنین آنتی‌بادی‌های تولید شده علیه اجزاء مختلف این آنتی‌ژن‌ها از نظر نوع و زمان قابل شناسایی در سرم مراحل توکسوپلاسموزیس متفاوتند [۳، ۹]؛ بنابراین در مطالعه حاضر به منظور بررسی این موضوع که آیا با روش الایزا تحت شرایط مورد نظر می‌توان این تفاوت را نشان داد سرم روز ۱۵ به عنوان نمونه سرم اوایل آلودگی و سرم روز ۶۰ به عنوان نمونه سرم فاز مزمن انتخاب و آزمایش شدند [۹، ۱۴].

یافته‌های این مطالعه (جدول ۳ و ۲) نشان می‌دهد که رسوب سولفات آمونیوم اشباع (۳۰٪) مایع صفاق موش سفید کوچک آزمایشگاهی آلوده شده به توکسوپلازما حاوی ترکیبات آنتی‌ژنیک می‌باشد که هم با سرم حاوی آنتی‌بادی تولید شده در اوایل ابتلا به توکسوپلاسموزیس (روز ۱۵) و هم با سرم مرحله مزمن (روز ۶۰) این بیماری واکنش می‌دهند. به عبارت دیگر روش پیشنهادی در این مطالعه وجود آنتی‌بادی علیه توکسوپلازما را در سرم مدل حیوانی مورد مطالعه تعیین

نانوگرم از آنتی ژن نیز واکنش صورت می گیرد این موضوع در رابطه با آنتی ژن های دفعی- ترشحي با توجه به کم بودن نسبی میزان آن ها در ترکیب کامل نمونه حاوی آنتی ژن اهمیت بیشتری دارد [۵،۱۸].

از یافته های این مطالعه استنباط می شود که روش الیزا با استفاده از رسوب سولفات آمونیوم اشباع (۳۰٪) مایع صفاق موش سفید کوچک آزمایشگاهی آلوده شده به توکسوپلازما (به عنوان آنتی ژن)، روش مناسب (ویژگی و حساسیت نسبتاً بالا) برای تشخیص توکسوپلازموزیس در موش صحرائی به نظر می رسد؛ بنابراین موضوع در رابطه با آلودگی انسانی و هم چنین میزان محافظت کنندگی این ترکیبات در برابر آلودگی به توکسوپلازما در دست مطالعه می باشد.

می کند اما سرم روزهای مختلف را از این نظر تفکیک نمی نماید.

در بین تکنیک های قابل استفاده برای تشخیص توکسوپلازموزیس با به کارگیری E/SA، روش الیزا مناسب تر به نظر می رسد زیرا روش هایی مثل ایمنوبلاتینگ و رادیوایمنواسی گرچه از ارزش تشخیصی مناسب برخوردار می باشند ولی به خاطر پیچیدگی روش اجرا، به کارگیر آن در اکثر آزمایشگاه های تشخیص طبی مقدور نمی باشد. با توجه به پایین بودن مقدار آنتی ژن های دفعی- ترشحي در واحد حجم ترکیب حاوی این آنتی ژن ها، در تست هایی مانند IHA، لاتکس آگلوتیناسیون، عمل ثابت شدن آنتی ژن بر روی گلبول های قرمز یا ذرات لاتکس ممکن است به خوبی صورت نگیرد. حساسیت الیزا نسبتاً بالاست به طوری که با ۵-۱

منابع

- [۱] محمودزاده ع، عبداللهی ح، دلیمی ع، زواران ا: ارزیابی Dot-ELISA با استفاده از آنتی ژن های دفعی ترشحي برای تشخیص توکسوپلازموزیس. مجله علوم پزشکی مدرس، ۱۳۷۹، دوره ۳، شماره یک، صفحات: ۴۷-۵۳.
- [2] Allain JP, Palmer CR, Pearson G: Epidemiological study of latent and recent infection by *Toxoplasma gondii* in pregnant women from a regional population in the U.K. *J Infect Dis.*, 1998; 36(2): 189-96.
- [3] Carla A, Almedia R, Susa M Jose R : Detection of antibodies to the 97KD of *toxoplasma gondii* in sample of human serum. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.*, 2002; 97(7): 1009-1013.
- [4] Cazabon P, Bessieres MH, Seguela JP: Kintics study and characterization of target excreted secreted antigens of immunoglobulin G, M.A and E antibodies from mice infected with different strains of *toxoplasma gondii*. *parasitol. Res.*, 1994; 80(1):58-63.
- [5] Crowther JR: ELISA: Theory and practice. 8th edition, Humana press, Totowa, New jersey, 1996.
- [6] Dao A, Azzouz N, Eloundou N, ga C, Dubremetz JF, Schwarz RT, Frotier B: Unspecific reactivity of IgM directed against the low-molecular-weight antigen of *Toxoplasma gondii*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, 2003; 22(7): 418-21.
- [7] Daryani A, Hosseini AZ, Dalimi A : Immune responses against excreted / secreted antigens of *Toxoplasma gondii* tachyzoites in the murine model. *Vet Parasitol.*, 2003; 113(2):123-34.
- [8] Dubey JP, Frenkel JK : *Toxoplasmosis of rats: A review, with considerations of their value as an animal model and their possible role in epidemiology.* *Vet Parasitol.*, 1998; 77(1): 1-32.
- [9] Edward KM, David TJ: *Medical parasitology.* 8th edition, W.B Saunders company, 1999; 5th chapter, pp: 161-171.
- [10] Fuentes I, Rodricuez M, et al: Urine sample used for congenital toxoplasmosis diagnosis by PCR. *J Clin Microbiol.*, 1996; 34(10): 2368-71.

- [11] Garcia L.S: Diagnostic medical parasitology. 4th edition, ASM Press, Washington, 2001; chapter 6, pp: 132-204.
- [12] Gulie DJ and Richard EH: Toxoplasmosis in: Medical parasitology. A practical approach. Cllespie SH., Hawkey PM. Oxford university, 1996; pp: 33-59.
- [13] Johnstons A., Thorpe R: Immunochemistry in practice. 3th edition, Blackwell science, London, 1996; chapter 1, pp: 1-33
- [14] Jenum PA, Stray-p B, Gundersen AG: Improved diagnosis of primary Toxoplasma gondii infection in early pregnancy by determination of anti Toxoplasma immunoglobulin G- avidity. *J Clin Microbiol.*, 1997; 35(8): 1972-7.
- [15] liesenfeld O, Cynthia P, Jose GM, Raj G, Judih l: False positive results in immunoglobulin M(IgM) toxoplasma antibody tests and importanc of confirmatory testing: the Platelia Toxo IgM test. *J Clin Microbiol.*, 1998; 35(1): 174-178.
- [16] Reiter-Owona I, Peterson E, Joynson D, Aspock H, Dade ML, et al: The past and present role of the Sabin-Feldman dye-test in the serodiagnosis of toxoplasmosis. *Bulletin WHO.* 1999; 77(11): 929-934.
- [17] Susuki Y, Kobayashi A: Presence of high concentration of circulating Toxoplasma antigens during acute Toxoplasma infection in athymic nude mice. *Immun.*, 1987; 55(4): 1017-18.
- [18] Wilson M, McAuley JB: Laboratory diagnosis of toxoplasmosis. *Clinics Laboratory Medicine*, 1991; 11(4): 923-38.
- [19] Yamamoto YL, Mineo JR, Meneghiss CS, Kawaraba YM: Detection in human sera of IgM, IgG and IgA to excreted – secreted antigens toxoplasma gondii by use of Dot-ELISA and immunoblot assay. *Ann Trop Med Parasitol.*, 1998; 92(1): 23-30.

Evaluation of ELISA Method Using the Excreted / Secreted Antigens of Toxoplasma for Toxoplasmosis Serodiagnosis in Rat

SH. Abdollahi PhD^{1*}, A.Mahmoudzadeh PhD², M. Bahadoran MSc³

1 Assistant Professor, Dept. of Microbiology, Faculty of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran

2- Associated Professor, Dept. of Microbiology, Faculty of Medicine, Baghiatallah University, Tehran, Iran

3- Academic Member, Dept of Microbiology, Faculty of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran

Background: Many studies have reported that *Toxoplasma gondii* excreted/secreted antigens (E/SA) appear to be a suitable marker for toxoplasmosis serodiagnosis. Most of those studies have used E/SA obtained from supernatant of toxoplasma cell culture, or by incubating tachyzoites in cell free media (RPMI- 1640). The present study, evaluated the ELISA method, using the components of peritoneal fluid of infected mice (as another source of E/SA), for toxoplasmosis diagnosis in rat.

Materials and Methods: Peritoneal fluids of infected mice by interaperitoneal inoculation (IP) with toxoplasma tachyzoits were collected after 3 days of infection and centrifuged at 750×g for 15 min, then the supernatant was precipitated with ammonium sulphate solution (30% saturated)

Forty noninfected (male) rats (7-10 weeks old) were injected with 4×10^6 toxoplasma tachyzoits IP and their serum samples were collected at 8, 15, 22 and 60 days after the infection. Then 10 samples from each day were tested by Dye- test. The sera of 15 and 60 days after infection of all animals were selected as suitable samples. Then the sera of these days were tested by the dye-test and ELISA using E/SA.

Results: The cut-off point of ELISA with 99% confidence was found to be 0.33 and optical density (OD) of all the sera samples of 15 and 60 days after infection and 2 negative sera were over than test cut-off. Moreover, sensitivity and specificity of the method were determined to be 100% and 95%, respectively.

Conclusion: Our findings showed that ELISA in the condition of using ammonium sulphate precipitation has a good enough sensitivity and specificity for toxoplasmosis diagnosis in rat.

Key words: Toxoplasmosis, Excreted/Secreted Antigens, ELISA, *Toxoplasma Gondii*

**Corresponding author Tel: (0391) 5234003, Fax:(0391)5225209, E-mail:habdollahi38@yahoo.com*

Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences and Health Services, 2004, 3(4):232-242