

ارزیابی روش الیزا با استفاده از آنتی ژن های دفعی - ترشحی 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 گزارش های قبلی، به نظر می رسد آنتی ژن های دفعی - ترشحی (E/SA) توکسوپلازما گوندی نشانگرهای مناسبی برای تشخیص توکسوپلاسموزیس با روش های سرولوژی باشند. در مطالعات قبلی معمولاً مایع رویی کشت سلولی توکسوپلازما یا محیط کشت RPMI-1640 که تاکی زوئیت های تک یاخته در آن انکوبه شده بودند، به عنوان ترکیب حاوی E/SA استفاده شده اند. این مطالعه به منظور ارزیابی روش الیزا با استفاده از مایع صفاق موش سفید کوچک آزمایشگاهی آلوده به توکسوپلازما (یکی از ترکیبات حاوی آنتی ژن های دفعی - ترشحی توکسوپلازما) به عنوان آنتی ژن، برای تشخیص توکسوپلاسموزیس در موش صحرایی صورت گرفت.

مواد و روش ها: مایع صفاق موش سفید کوچک آزمایشگاهی که ۳ روز قبل به طریق تزریق داخل صفاقی با تاکی زوئیت های 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 آنتی ژن های دفعی - ترشحی) از مایع رویی آن تهیه شد. ۴۰ سر موش صحرایی نر با سن ۷-۱۰ هفته و غیر آلوده به توکسوپلازما (Dye - Test منفی) انتخاب و به هر کدام 4×10^6 تاکی زوئیت 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 موش های صحرایی تهیه شد در مرحله بعد نمونه های سرم روزهای فوق مربوط به ۱۰ سر از آن ها به روش dye-test و سرم روزهای ۱۵ و ۶۰ تمام حیوانات بعد از آلودگی نیز به عنوان نمونه های 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.

یافته ها: با توجه به نتایج آزمایش سرم روزهای مختلف موش های صحرایی آلوده، سرم روز ۱۵ و ۶۰ به عنوان نمونه های 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 سرم های روزهای ۱۵ و ۶۰ آلودگی و همچنین دو مورد از سرم های منفی بالاتر از آن بدست آمد. ویژگی و حساسیت آزمون نیز به ترتیب ۹۵٪ و ۱۰۰٪ تعیین شد.

نتیجه گیری: 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 می باشد.

واژه های کلیدی: توکسوپلاسموزیس، الیزا، آنتی ژن های دفعی - ترشحی، توکسوپلازما گوندی

*۱- 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 بقیه... تهران

۳- کارشناس ارشد انگل شناسی، 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 توکسوپلازما گوندی^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 تلفیق 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 توکسوپلازما 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 توکسوپلازما 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 توکسوپلازما گوندی 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 توکسوپلازما و آنتی بادی های تولید شده علیه آن ها 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, تولید شده علیه این آنتی ژن ها در سرم موش های آلوده به سویه های مختلف توکسوپلازما متفاوت می باشد [۴]. الساندر و همکاران^۷ (۲۰۰۲) گزارش کردند که ترکیب دفعی - ترشحی ۹۷ کیلودالتونی از تاکیزوئیت های توکسوپلازما، 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 توکسوپلازما گوندی، ایمونوگلوبولین های IgG, IgM, IgA، علیه توکسوپلازما 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 توکسوپلازما 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 (10^6 تاکی‌زوئیت در هر میلی‌لیتر) به روش تزریق داخل صفاقی آلوده شده بودند، خارج و با دور $750 \times g$ 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 $3000 \times g$ سانتریفوژ گردید سپس مایع رویی آن خارج و رسوب به مدت ۲۴ ساعت در مقابل بافر ترنس اسید کلریدریک ۰/۰۵ مولار با $PH=7.4$ دیالیز (کیسه دیالیز با $cut-off < 10^5$ KD 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 حلقه 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 $10^5 \times 72$ تاکی‌زوئیت توکسوپلاسمای 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 $10^6 \times 4$ 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 ازمعیار میانگین‌ها نیز محاسبه شد [۵].

۴ - انجام الایزا

در این مرحله پس از تعیین رقت مناسب گونزوگه رقت مناسب آنتی‌ژن (رسوب سولفات آمونیوم اشباع (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

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

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

$$\text{مثبت کاذب} + \text{منفی حقیقی}$$

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 (Rabbit-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 غیرمستقیم 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 کونزوگه 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 سرم های منفی به ترتیب ۰/۰۵ و ۰/۱۸ بدست آمد و با توجه به این که منحنی فراوانی OD سرم های 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 الایزا

نتایج آزمایش نمونه های سرم روز ۱۵ آلودگی، روز ۶۰ آلودگی و سرم های منفی به روش الایزا 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 خون گیری ۴ سر از موش های صحرایی مردند بنابراین نمونه های سرم آنها از مطالعه حذف شدند). بررسی داده های فوق نشان می دهد که میزان جذب نوری (OD)^۱ تمام نمونه سرم های روز ۱۵ آلودگی، روز ۶۰ آلودگی و دو مورد از سرم های منفی بیشتر از cut-off تست می باشد در نتیجه با توجه به نتایج آزمایش نمونه های سرم موش ها به روش رنگ سنجی، تحت شرایط مورد نظر در این بررسی، حساسیت و ویژگی تست الایزا- 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 می باشد.

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

$$\text{ویژگی} = \frac{36}{36+2} \times 100 = 94\%$$

1- Optical density

نتایج آزمایش رنگ سنجی سرم موش های صحرایی که به طور تصادفی به منظور تعیین نمونه سرم های مناسب از مراحل سیر توکسوپلاسموزیس انتخاب شدند (۱۰ سر)، در جدول ۱ آمده است. داده های این جدول نشان می دهد که عیار آنتی بادی علیه توکسوپلازما در سرم این موش ها در اوایل آلودگی (تا روز ۲۲) سیر صعودی داشته ولی در نمونه سرم های تهیه شده از روز ۶۰ آلودگی مساوی یا کمتر از روز ۲۲ می باشد. اختلاف عیار آنتی بادی در نمونه های 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 (باتوجه به سرم کنترل). این افزایش با $p < 0.05$ معنی دار بود. بنا براین سرم روز ۱۵ به عنوان سرم اوایل آلودگی و سرم روز ۶۰ به عنوان سرم مرحله مزمن انتخاب شدند.

در صفاق تمام موش های سفید کوچک آزمایشگاهی که سوسپانسیون مغز موش های آلوده شده با تاکی زوئیت های 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 تاکی زوئیت مشاهده گردید ولی در صفاق موش هایی که با سوسپانسیون مغز موش هایی که سرم آنها باروش رنگ سنجی از نظر وجود آنتی بادی علیه توکسوپلازما منفی بود تاکی زوئیت مشاهده نشد.

طراحی الایزا

الف - تعیین رقت مناسب کونزوگه، آنتی ژن و سرم

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

Plateau-height: حفره هایی 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 واکنش های 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 می باشد.

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

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

* 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 صحرایی آلوده شده با توکسوپلاسم) به روش الایزا و استفاده از رسوب سولفات آمونیوم اشباع (۳۰٪) مایع صفاق موش سفید کوچک آزمایشگاهی آلوده شده به توکسوپلاسم.

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

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 توکسوپلازما به روش الایزا و استفاده از رسوب سولفات آمونیوم اشباع (۳۰٪) مایع صفاق موش سفید کوچک آزمایشگاهی آلوده شده به توکسوپلازما.

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

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 توکسوپلازما به روش الایزا و استفاده از رسوب سولفات آمونیوم اشباع (۳۰٪) مایع صفاق موش سفید کوچک آزمایشگاهی آلوده شده به توکسوپلازما.

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

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 بر روی 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 شد 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 ۲ و ۳) 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

می‌کند اما سرم روزهای مختلف را از این نظر تفکیک نمی‌نماید.

در بین تکنیک‌های قابل استفاده برای تشخیص توکسوپلاسموزیس با به کارگیری E/SA، روش الایزا مناسب‌تر به نظر می‌رسد زیرا روش‌هایی مثل ایمونوبلاتینگ و رادیوایمنواسی گرچه از ارزش تشخیصی مناسب برخوردار می‌باشند ولی به خاطر پیچیدگی روش اجرا، به کارگیر آن در اکثر آزمایشگاه‌های تشخیص طبی مقدور نمی‌باشد. با توجه به پایین بودن مقدار آنتی‌ژن‌های دفعی- ترشحي در واحد حجم ترکیب حاوی این آنتی‌ژن‌ها، در تست‌هایی مانند IHA، لاتکس آگلوتیناسیون، عمل ثابت شدن آنتی ژن بر روی گلبول‌های قرمز یا ذرات لاتکس ممکن است به خوبی صورت نگیرد. حساسیت الایزا نسبتاً بالاست به طوری که با ۵-۱

نانوگرم از آنتی‌ژن نیز واکنش صورت می‌گیرد این موضوع در رابطه با آنتی‌ژن‌های دفعی- ترشحي با توجه به کم بودن نسبی میزان آن‌ها در ترکیب کامل نمونه حاوی آنتی‌ژن اهمیت بیشتری دارد [۵،۱۸].

از یافته‌های این مطالعه استنباط می‌شود که روش الایزا با استفاده از رسوب سولفات آمونیوم اشباع (۳۰٪) مایع صفاق موش سفید کوچک آزمایشگاهی آلوده شده به توکسوپلازما (به عنوان آنتی‌ژن)، روش مناسب (ویژگی و حساسیت نسبتاً بالا) برای تشخیص توکسوپلاسموزیس در موش صحرایی به نظر می‌رسد؛ بنابراین موضوع در رابطه با آلودگی انسانی و همچنین میزان محافظت‌کنندگی این ترکیبات در برابر آلودگی به توکسوپلازما در دست مطالعه می‌باشد.

منابع

- [۱] محمودزاده ع، عبداللهی ح، دلیمی ع، زواران ا: ارزیابی Dot-ELISA با استفاده از آنتی‌ژن‌های دفعی ترشحي برای تشخیص توکسوپلاسموزیس. 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 intraperitoneal inoculation (IP) with toxoplasma tachyzoites were collected after 3 days of infection and centrifuged at $750\times g$ 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 tachyzoites 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*