ORIGINAL ARTICLE

Extracting Excretory-Secretory Antigens from Toxoplasma Gondii in Designing Elisa Avidity Kit

Ehsan Shariat Bahadory[1],
Seyyedeh Somaye Mosavipour[2],
Javid Sadraii[1]

[1] Department of Medical Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modaress University, Tehran, Iran
[2] Department of Nursing, Faculty of Nursing & Midwifery, Tehran Medical University, Tehran, Iran

(Received December 10, 2011 ; Accepted May 20, 2012)

Abstract

Background and purpose: One of the transmission ways of the congenital toxoplasmosis is through the placenta to the fetus, therefore, its diagnosis at early stage is very important. Toxoplasma gondii parasite contains various antigens of which excretory-secretory antigens (E/SA) are used in designing Elisa avidity kit. The aim of this study was to compare the results of commercial kit and designed Elisa avidity kit in mothers with toxoplasmosis. Excretory-secretory antigens of toxoplasma gondii parasite were used in the designed kit.

Materials and methods: In this descriptive study aspirated peritoneal fluid of mice which were IP infected by toxoplasma tachyzoite (10^6 tachyzoites/mL) seven days earlier, were centrifuged at 1000g for 15 minutes. Afterwards, the upper fluid was taken as the main component of E/SA from toxoplasma tachyzoite in order to assess the designed Elisa avidity kit.

Results: The results showed that if fresh E/SA are used in designed Elisa avidity kit to detect toxoplasma IgG, better outcomes may found regarding the quantity and titer of antibody.

Conclusion: The results drawn from the designed kit using E/SA of toxoplasma gondii were more reliable than that of the commercial kit in detecting congenital toxoplasmosis.

Keywords: Toxoplasma gondii, Elisa avidity, IgG antibody, excretory- secretory antigen, congenital toxoplasmosis

J Mazand Univ Med Sci 2012; 22(89): 11-19 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و دوم شماره ۸۹ خرداد سال ۱۳۹۱ (۱۹-۱۱)

استخراج آنتی ژن های دفعی- ترشحی انگل توکسوپلاسما گوندی در طراحی کیت الایزا اویدیتی (Elisa avidity)

احسان شریعت بهادری[۱]
سیده سمیه موسوی پور[۲]
جاوید صدرایی[۱]

چکیده

سابقه و هدف: یکی از راه‌های انتقال بیماری توکسوپلاسموزیس مادرزادی از طریق جفت به جنین می‌باشد که تشخیص این بیماری را در این مرحله بسیار حائز اهمیت می‌نماید. انگل توکسوپلاسما دارای آنتی‌ژن‌های متعددی می‌باشد که از آنتی‌ژن های دفعی- ترشحی آن در طراحی کیت الایزا اویدیتی استفاده می‌شود. هدف از انجام این مطالعه بررسی مقایسه‌ای کیت آماده و طراحی شده الایزا اویدیتی در مادران مبتلا به توکسوپلاسموزیس می‌باشد، که در کیت طراحی شده از آنتی‌ژن‌های دفعی- ترشحی انگل توکسوپلاسما گوندی استفاده گردید.

مواد و روش‌ها: مطالعه حاضر از نوع مطالعه توصیفی بود. مواد مورد آزمایش برای کیت طراحی شده الایزا اویدیتی شامل مایع آسپیره شده صفاق موش‌های سفید کوچک آزمایشگاهی بود، که ۷ روز قبل با تاکی زوئیت‌های انگل توکسوپلاسما گوندی ($۱۰^{۶}$ تاکی زوئیت در هر میلی لیتر) به روش تلقیح داخل صفاقی آلوده شده بودند. مایع فوق با دور g ۱۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و سپس مایع رویی به عنوان ترکیب آنتی‌ژن‌های دفعی ترشحی استخراج گردید.

یافته‌ها: نتیجه این آزمایش نشان داد که اگر جهت تهیه کیت الایزا اویدیتی در تشخیص آنتی بادی IgG انگل توکسوپلاسما گوندی از آنتی‌ژن‌های تازه دفعی- ترشحی استفاده گردد، نتایج این آزمایش از کیت آماده ساخته شده در شرکت‌های مختلف از نظر کمیت و تیتر آنتی‌بادی بهتر خواهد بود.

استنتاج: میانگین نتایج حاصل از الایزا اویدیتی طراحی شده با استفاده از آنتی‌ژن‌های دفعی- ترشحی انگل توکسوپلاسما گوندی، در تشخیص توکسوپلاسموزیس مادرزادی، قابل قبول‌تر از میانگین نتایج حاصل از کیت آماده تجاری بود.

واژه‌های کلیدی: توکسوپلاسما گوندی، الایزا اویدیتی، آنتی بادی IgG، آنتی ژن های دفعی- ترشحی، توکسوپلاسموزیس مادرزادی

مقدمه

توکسوپلاسما گوندی اولین بار در یک جونده آفریقایی به نام کتینوداکتیلوس گوندی کشف شد. در سال ۱۹۲۳ Jango، کوریو رتینیت توکسوپلاسمایی را توصیف کرد و در سال ۱۹۳۹ Wolf و همکاران انگل را

مولف مسئول: احسان شریعت بهادری- تهران: پل نصر، دانشکده پزشکی تربیت مدرس، گروه انگل شناسی E mail: shari2000@yahoo.com
۱. گروه انگل شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس
۲. گروه پرستاری، دانشکده پرستاری و مامایی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
تاریخ دریافت : ۹۰/۹/۱۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۹۰/۱۰/۱۱ تاریخ تصویب : ۹۱/۲/۳۱

جدا کردند و آن را عامل توکسوپلاسموزیس مادرزادی دانستند. اکنون طیف وسیعی از گونه‌های توکسوپلاسما جدا شده است ولی به نظر می‌رسد فقط یک گونه از آن قادر به بیماری‌زایی در انسان باشد که جنبه‌های مادرزادی توکسوپلاسموزیس در جوامع امروزی حائز اهمیت است. شکل غیر جنسی و با تکثیر فعال انگل در انسان یک انگل داخل سلولی اجباری گلابی شکل و به اندازه تقریبی ۳ تا ۶ میکرون است. این انگل که تاکی زوئیت نامیده می‌شود دارای یک غشای سلولی– هسته و اندامک‌های متعدد است. اجتماع تاکی‌زوئیت‌ها می‌تواند سلول را کاملاً اشغال کرده و با ایجاد یک غشاء در اطراف خود، تبدیل به یک کیست گردد(۱،۲).

تعدادی از آنتی‌ژن‌های سطحی مربوط به تاکی زوئیت‌ها و برادی زوئیت‌ها شناسایی شده اند. دو خانواده اصلی وابسته به SAG2 و SAG1 در طول مرحله حمله اهمیت دارند. بنابراین آنتی بادی علیه SAG1 باعث کاهش حمله (نه به طور کامل) و پیشگیری می‌شود و انگل‌های فاقد این ملکول نمی‌توانند به سلول‌های میزبان حمله کنند. ظاهراً اعضای دیگر خانواده SAG1 یعنی SAG3 و BSR4 (پروتئین‌های SRS1-4)، SAG5، SAG5.1 و SAG5.2 نیز در هنگام حمله آنتی بادی نقش دارند. SAG3 در تاکی زوئیت‌ها و برادی زوئیت‌ها مشترک است. تعدادی از پروتئین‌های موجود در میکرونم، راپتری و گرانول‌های متراکم توکسوپلاسما گوندی شناسایی شده است. بسیاری از پروتئین‌های شناسایی شده MIC ویژگی چسبندگی دارند. MIC2 که در ابتدای فرایند حمله ترشح می‌شود با بخش انتهایی نوک انگل مرتبط است. پروتئین‌های ROP[1] نیز که در اوایل حمله آزاد می‌شوند در فرایند حمله و تشکیل واکوئل پارازیتوفوروس نقش دارند. پروتئینی های ROP نیز حمله انگل را افزایش می‌دهد و تحت عنوان عامل افزایش دهنده نفوذ نامیده می‌شود. ROP نیز درون واکوئل پارازیتوفوروس قرار دارند. گرانول‌های متراکم محتویات خود را ده دقیقه بعد از حمله ترشح می‌کنند(۳،۴).

ESA-F2، ESA-F1 و آنتی ژن TLA از آنتی‌ژن‌های مهم توکسوپلاسما گوندی هستند. آنتی‌ژن‌های دفعی ترشحی باعث تحریک سیستم ایمنی سلولی شده و در موش باعث ایجاد یک حالت محافظتی می‌گردد(۳،۴). در انجام آزمایش الایزا اویدیتی در تشخیص توکسوپلاسموزیس مادرزادی بهتر است از آنتی‌ژن‌های دفعی- ترشحی تهیه شده از صفاق موش استفاده گردد(۴،۵). هدف از این بررسی که در سال ۱۳۹۰ انجام شد، استخراج آنتی‌ژن‌های دفعی- ترشحی انگل توکسوپلاسما گوندی در طراحی کیت الایزا اویدیتی و مقایسه نتایج آن با کیت تجاری (یوروایمیون) خارجی بود.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر ازنوع توصیفی بود. متغیر و شاخص‌های مورد بررسی در آزمایش نتایج حاصل از دو کیت الایزا اویدیتی طراحی شده داخلی و کیت الایزا اویدیتی خارجی تجاری (یوروایمیون) بودند که مقایسه آن‌ها بر روی نمونه‌های سرمی و مایع آمنیوتیک مادران مبتلا به توکسوپلاسموزیس صورت گرفت. مایع صفاق پنج موش سفید کوچک آزمایشگاهی که ۷ روز قبل با تاکی زوئیت‌های انگل توکسوپلاسما گوندی (10^6 تاکی زوئیت در هر میلی‌لیتر) به روش تلقیح داخل صفاقی آلوده شده بودند، آسپیره گردید و با دور g ۱۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و سپس مایع رویی به عنوان ترکیب آنتی ژن‌های دفعی ترشحی استخراج گردید(۶، ۷). گاهی در بعضی موارد به تعداد موش‌های بیشتری نیاز است، اما در این بررسی تعداد ۵ موش، برای استخراج آنتی ژن کافی بود. برای این عمل نمک سولفات آمونیوم به تدریج به ظرف حاوی مایع صفاق موش اضافه گردید. و یک

1. Rho of plants

شب در یخچال و بعد از آن به مدت ۳۰ دقیقه در دور g ۷۵۰ سانتریفیوژ گردید در مرحله بعد مایع رویی خارج و رسوب در مقابل بافر تریس ۰/۰۵مولار دیالیز گردید. سپس کیسه دیالیز را در مقابل جریان شدید هوا قرار داده تا تغلیظ صورت گیرد و میزان پروتئین آن با روش برادفورد (کلریمتری کوماسی بریلیانت بلو) تعیین گردید. آنگاه در ویال‌های درپیچ‌دار تقسیم و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد و در حضور آنتی‌بیوتیک تا زمان استفاده نگهداری گردید. البته بهتر است برای تلقیح از موش‌های BALB/C استفاده کرد زیرا تاکی زوئیت انگل توکسوپلاسما گوندی در این نوع موش راحت‌تر و سریع‌تر بالا می‌آید(۷). در این روش از محلول سرم آلبومین گاوی برای تعیین غلظت پروتئین، از محلول PBS برای پوشش دهی، از بافرPBS، توئین ۸۰ و سرم آلبومین گاوی برای عمل BLOCKING و از محلول NAKCN و Pnpp (پارانیتروفنیل فسفات) در بافر DEA (دی اتانول آمین) برای تعیین Cut off کیت طراحی شده استفاده گردید.

یکی از ابزارهای الایزای اویدیتی کشف مراحل حاد یا مزمن بیماری‌های عفونی مانند توکسوپلاسموزیس است. بعضی مواقع به دلایل مختلف ارزیابی صرفاً IgM برای مراحل حاد توکسوپلاسموزیس مفید نیست که از آن جمله می توان به پاسخ‌های طولانی مدت IgM و تأخیر در تولید این آنتی‌بادی و یا پاسخ‌های غیر اختصاصی پلی کلونال IgM بر علیه عوامل گوناگون نام برد. در سال های اخیر کشف روش الایزا اویدیتی در بررسی عفونت‌های اخیر با انگل توکسوپلاسما گوندی راهکاری مناسب برای این موضوع است که فقط به ارزیابی آنتی‌بادی از کلاس IgG می‌پردازد. در اوایل عفونت مقدار آنتی‌بادی IgG در اتصال به آنتی ژن در حالت Low avidity قرار دارد و با ادامه عفونت تمایل آنتی‌بادی مذکور برای آنتی‌ژن انگل توکسوپلاسما گوندی افزایش یافته، در حالت High avidity قرار می‌گیرد(۸). محتویات کیت مورد آزمایش باید در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد ذخیره سازی شوند و نباید در حالت فریز قرار گیرند. باید حتماً به تاریخ انقضای کیت مورد آزمایش دقت شود. تمامی محتویات کیت مورد آزمایش باید ۳۰ دقیقه قبل از آزمایش در دمای آزمایشگاه یعنی ۱۸ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گیرند. در این کیت کلیه کنترل‌ها، بافر فسفات و بافر اوره آماده برای استفاده می‌باشند و قبل از مصرف باید به آرامی تکان داده شوند. کلیه کنترل‌ها و کالیبراتورهای این روش از نظر تست‌های HIV و HBS مورد آزمایش قرار گرفتند و از این نظر مصون بودند و کلیه نکات ایمنی در هنگام کار کردن با این کیت رعایت شد. نمونه مورد استفاده در این آزمایش سرم خون انسانی و یا پلاسمای تهیه شده با مواد ضد انعقاد مانند Citrate، Heparin، EDTA به دست آمده بود. کلیه نمونه‌ها در این روش فقط تا مدت زمان ۱۴ روز قابل استفاده بودند و نمونه‌های رقیق شده در همان روز مورد آزمایش قرار می‌گرفتند. کیت مورد استفاده در این آزمایش دارای ماده سمی سدیم آزید بود که از تماس مستقیم با پوست خودداری می‌شد. در این روش از ۴۸ نمونه سرم خون و مایع آمنیوتیک مادران مبتلا به توکسوپلاسموزیس که به طور هم زمان تهیه شده بود، استفاده شد. کلیه نمونه‌ها به میزان ۱:۱۰۱ رقیق شدند که شامل ۱۰ لاندا سرم یا مایع آمنیوتیک و ۱ سی سی رقیق کننده تست بود (بافر رقیق کننده) کاملاً مخلوط شده بودند(۹،۱۰). بافر پوشش‌دهی در الایزا عبارت بود از :

بافر کربنات با pH = ۹/۶ از کربنات ۵۰ میلی مولار، ۲۰ میلی مولار Tris-Hcl با pH= ۸/۵ و یا ۱۰ میلی مولار PBS با pH= ۷/۲ . در اغلب روش‌های الایزا از یکی از این سه نوع بافر استفاده می‌شود. بافرهایی غیر از موارد فوق هنگامی مورد استفاده قرار می‌گیرند که مشکلی در پوشش‌دهی با بافرهای فوق به‌وجود آمده باشد. از نظر تئوری بهترین بافری که مورد استفاده قرار می‌گیرد بافری است که دارای pH برابر با ۱ تا ۲ واحد بالاتر از (PI) پروتئین اتصالی باشد اما در عمل اندازه‌گیری آن

آسان نمی‌باشد زیرا پروتئین اتصالی (فرضاً آنتی‌ژن) حاوی مخلوطی از پپتیدهای متفاوت می‌باشد. با انجام چند آزمایش الایزا که pHهای متفاوت و قدرت یونی متفاوتی در بافر پوشش‌دهی داشته باشد می‌توانیم اتصال بهتر و مناسب‌تر پروتئین به پلیت را به‌دست آوریم(۱۱). پروتئین‌های با خاصیت اسیدی، احتیاج به یک pH پایین‌تر جهت خنثی نمودن نیروی دافعه بین پروتئین و پلیت دارند. در روش‌های رایج امروزی پوشش دادن با بافر PBS یا کربنات اغلب موفقیت‌آمیز است. بافر پوشش‌دهی در الایزا اویدیتی شامل بافر PBS است و بافر مسدود کننده در الایزا اویدیتی شامل: ۵۰۰ml از PBS، توئین ۲۰ و ۱۵ گرم آلبومین سرم گاوی است که به صورت تجاری در دسترس است. محلول‌های فوق در بافر رقیق‌کننده الایزا اویدیتی نیز موجود می‌باشد و در ساخت کیت الایزا اویدیتی باید مد نظر باشد. بقیه مراحل مانند الایزای ساده است(۱۲،۱۱).

مقدار ۱۰۰ µl از نمونه‌های مورد آزمایش را در چاهک‌های مخصوص مورد آزمایش ریخته، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه ۱۸ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. کیت مورد استفاده به عنوان استاندارد (Golden test) کیت یوروایمیون تجاری بود. سپس سه مرتبه توسط محلول شستشو به میزان ۳۰۰ µl عمل شستشو انجام شد و از آن جایی که این مرحله در نتیجه نهایی آزمایش بسیار تأثیر گذار بود، لذا این مرحله با دقت انجام شد. در آزمایش نیمه کمی در این مرحله ۱۰۰ µl محلول آنزیم کونژوگه را در چاهک‌ها ریخته و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوباسیون شد. مجدداً روش شستشو در این مرحله مانند قبل صورت گرفت و سپس ۱۰۰ µl محلول سوبسترا در چاهک‌های مورد نظر توسط سمپلر ریخته و پلیت به مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط انکوبه شد. بعد از گذشت مدت زمان لازم، ۱۰۰ µl محلول متوقف کننده واکنش را در چاهک‌های مورد نظر ریخته و بعد از حداکثر ۳۰ دقیقه پلیت در طول موج ۴۵۰ لاندا با دستگاه الایزا ریدر قرائت شد. در روش کمی این آزمایش، قبل از اضافه کردن محلول آنزیم کونژوگه یک مرحله اضافه وجود داشته که شامل افزودن ۲۰۰ µl بافر اوره به تعدادی پلیت‌ها و افزودن ۲۰۰ µl محلول فسفات بافر به تعدادی از پلیت دیگر است که در نهایت مقایسه دو پلیت با یکدیگر صورت می‌گیرد.

محاسبه نتایج حاصل از روش نیمه کمی الایزای اویدیتی:

$$\frac{\text{OD حاصل از کنترل یا نمونه های بیماران}}{\text{OD حاصل از کالیبراتور ۲}}$$

که در صورتی که نسبت فوق کمتر از ۰/۸ باشد نتیجه منفی، اگر بین ۰/۸ تا ۱/۱ باشد نتیجه در حد مرز و اگر نتیجه بالاتر از ۱/۱ باشد نتیجه الایزا اویدیتی مثبت است. روش الایزا اویدیتی نیمه کمی در این آزمایشات فقط بر روی نمونه‌های مایع آمنیوتیک صورت گرفت.

محاسبه نتایج با روش کمی الایزا اویدیتی:

$$\frac{\text{OD سرم بیماران در پلیت‌های حاوی بافر اوره}}{\text{OD سرم بیماران در پلیت‌های حاوی بافر فسفات}}$$

که عدد حاصله در عدد ۱۰۰ ضرب می‌شود که نتیجه نهایی به صورت درصد بیان می‌شود که تحت عنوان RIA بیان می‌گردد. اگر RIA کمتر از ۴۰ درصد باشد نشانه Low Avidity Antibody است و اگر RIA بین ۴۰ تا ۶۰ درصد باشد نشانه Intermediate Avidity و اگر بالاتر از ۶۰ درصد باشد نشانه High Avidity Antibody بر علیه انگل توکسوپلاسما گوندی است. محاسبه میانگین نتایج و روش آماری با برنامه SPSS 18 و با استفاده از آزمون t-test انجام شد.

یافته‌ها

روش الایزا اویدیتی کمی بر روی نمونه های سرم خون و نمونه های مایع آمینوتیک صورت گرفت. نتایج حاصل از الایزا اویدیتی کمی در جدول شماره ۱ آمده است و همان گونه که در جدول آمده است میانگین

تیتر الایزا اویدیتی کمی بر روی نمونه سرم خون، با استفاده از کیت طراحی شده (۷۹/۷ درصد) به طور معنی داری بیشتر از میانگین (۷۲/۲ درصد) تیتر الایزا اویدیتی کم کیت خارجی بود (p= ۰/۰۰۰).

روش الایزا اویدیتی نیمه کمی بر روی نمونه های مایع آمنیوتیک صورت گرفت و نتایج نشان داد میانگین تیتر الایزا اویدیتی نیمه کمی با استفاده از کیت طراحی شده (۲/۷ درصد) به طور معنی داری (p= ۰/۰۰۰) بیشتر از تیتر الایزا اویدیتی نیمه کمی کیت خارجی (۲/۱ درصد) بود (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۱: نتایج الایزا اویدیتی کمی دو کیت خارجی و طراحی شده در تشخیص توکسوپلاسموزیس

تیتر الایزا اویدیتی کمی	تعداد	انحراف معیار ± میانگین	سطح معنی داری
کیت خارجی (سرم خون)	۴۸	۷۲/۲ ± ۶/۵	۰/۰۰۰
کیت طراحی شده (سرم خون)	۴۸	۵۲/۸ ± ۵/۱	
کیت طراحی شده (مایع آمنیوتیک)	۴۸	۷۹/۷ ± ۷/۹	—

جدول شماره ۲: نتایج الایزا اویدیتی کمی دو کیت خارجی و طراحی شده بر روی نمونه مایع آمنیوتیک در تشخیص توکسوپلاسموزیس

تیتر الایزا اویدیتی کمی	تعداد	انحراف معیار ± میانگین	سطح معنی داری
کیت خارجی	۴۸	۲/۱ ± ۰/۴۸	۰/۰۰۰
کیت طراحی شده	۴۸	۲/۷ ± ۰/۶۹	

بحث

مطالعات انجام شده در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه نشان می‌دهد که شیوع عفونت در زنان باردار از ۰/۷۹ تا ۸۵/۴ درصد متغیر می‌باشد. در این میان زنان باردار کره‌ای با ۰/۷۹ درصد کمترین میزان شیوع و زنان نیجریه‌ای با ۸۵/۴ درصد بیشترین میزان شیوع عفونت توکسوپلاسمایی را به خود اختصاص داده‌اند. همچنین در زنان باردار مناطق مختلف ایران نیز شیوع سرمی آنتی‌بادی‌های ضد توکسوپلاسمایی بسیار متغیر و از ۷ تا ۸۲ درصد گزارش گردیده است(۱۴،۱۳). در بررسی این آزمایش دو محدودیت عمده وجود داشت: اولاً، نگهداری طولانی مدت سرم، باعث افت تیترهای آنتی‌بادی در سرم بیماران می‌گشت و ثانیاً در بعضی از موش‌های مورد مطالعه، یا انگل رشد نمی‌کرد و یا در اثر طولانی شدن زمان نگهداری، موش‌های تلقیح شده تلف می‌شدند. بنابراین عامل زمان در این مطالعه مهم بود. هدف از این مطالعه به طورکلی استخراج آنتی‌ژن‌های دفعی- ترشحی انگل توکسوپلاسما گوندی در طراحی کیت الایزا اویدیتی بودکه میانگین نتایج حاصل از کیت طراحی شده الایزا اویدیتی در تشخیص IgG توکسوپلاسما گوندی دارای نتایج قابل قبول‌تری نسبت به میانگین نتایج حاصل از کیت الایزا اویدیتی تجاری بودند. نتایج قابل قبول (میانگین تیترهای بالاتر)، در این آزمایش به دلیل استفاده از سوش استاندارد توکسوپلاسما و تازه تر بودن آنتی ژن استخراجی بود(۱۳). IgM توکسوپلاسما گوندی در مرحله حاد عفونت توکسوپلاسما گوندی ساخته می‌شود و وجود آن در سرم خون قطعاً وجود انگل توکسوپلاسما گوندی را ثابت می‌کند. چنانچه این آنتی‌بادی با عیار قابل ملاحظه وجود داشته باشد باید روش DYE TEST روی دو نمونه از سرم مادر به فاصله ۳ هفته انجام گیرد، و چنانچه در این دو مورد افزایشی در عیار آنتی بادی ملاحظه نگردد، عفونت قبل از حاملگی اتفاق افتاده است و خطری برای جنین ندارد. در زن بارداری که چند ماه از حاملگی او گذشته و مشکوک به توکسوپلاسموزیس حاد است چند معیار مهم است:

۱- لنفادنوپاتی

۲- یک عیار بالای DYE TEST

۳- وجود آنتی بادی IgM (۱۴،۱۳).

در عفونت مزمن توکسوپلاسموزیس بررسی IgG توکسوپلاسما گوندی حائز اهمیت است اما در بعضی از روش‌های آزمایشگاهی مثبت بودن آنتی‌بادی IgG ضد توکسوپلاسما گوندی فقط دال بر مثبت بودن آزمایش نیست و نیاز به آزمایشات تکمیلی مانند الایزا اویدیتی مشاهده می‌گردد. البته روش الایزا اویدیتی چندین مزیت دارد که اولاً مثبت بودن آن دلیل قطعی

بر وجود آنتی‌بادی علیه انگل توکسوپلاسما گوندی است و ثانیاً زمان ابتلای مادر باردار به این انگل را نیز تا حدود زیادی مشخص می کند(۱۳).

پوشش‌دهی در الایزا و الایزا اویدیتی یکی از مهم‌ترین مراحل آزمون الایزا می‌باشد عبارت است از اتصال پروتئین آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی بر روی پلیت درون چاهک‌های یک پلیت ۹۶ خانه‌ای، که عمدتاً براساس واکنش‌های آب‌گریز مابین ماتریکس پلاستیکی و پروتئین می‌باشد. بنابراین هر پروتئین یک ثابت اتصال متفاوتی با پلیت‌ها دارد. این واکنش بستگی به بار خالص پروتئین ندارد(۱۳،۱۵). بنابراین افزودن هیدروفوبیسیتهٔ واکنش پروتئین- پلیت موجب بروز این نواحی هیدروفوب در پروتئین‌ها شده و واکنش بین پلیت و پروتئین را مستحکم‌تر می‌نماید. این دناتوره نمودن جزیی پروتئین‌ها توسط قراردادن پروتئین در معرض دترژنت‌های ملایم و مواد دارای pH پایین حاصل می‌شود که بعد از این مجاورت می‌توان با استفاده از یک روش دیالیز مناسب، بافر پوشش‌دهی را با این مواد دناتوره کننده تعویض نمود. عمل پوشش‌دهی به عوامل زیر بستگی دارد:

الف) مدت زمان پوشش‌دهی

ب) دما

ج) غلظت پروتئین‌هایی که باید پوشش داده شوند

د) نسبت سطح چاهک‌ها به حجم محلول پوشش‌دهی

هـ) ضریب انتشار مولکول‌های پروتئینی درون محلول پوشش‌دهی درون چاهک‌ها.

عوامل فوق یکپارچه بوده و از یکدیگر جدا نیستند. یکی از مهم‌ترین موارد به‌دست آوردن غلظت مناسب از پروتئین برای اتصال مناسب به پلیت می‌باشد که از طریق تیتراسیون پروتئین به‌دست می‌آید.

محدودهٔ ۱۰-۱ µg/ml در حجم ۵۰ µl راهنمای خوبی برای به‌دست آوردن غلظت مناسب اغلب پروتئین‌ها جهت اتصال خوب به پلیت می‌باشد البته این محدوده وابستگی به خلوص نسبی پروتئین مورد نظر جهت پوشش‌دهی دارد بنابراین غلظت یک پروتئین جهت پوشش‌دهی وابسته به فعالیت آن پروتئین می‌باشد. به طور مشخص در یک محلول پروتئینی با غلظت کم مقدار اتصال پروتئین به پلیت برطبق نسبت حضور آن پروتئین در محلول کم می‌باشد و ناخالصی‌های موجود در محلول پروتئینی سطوحی را که باید پروتئین مورد نظر در اختیار داشته باشد اشغال می‌نمایند که در نهایت منجر به یک اندازه‌گیری ضعیف می‌شود(۱۱). با استفاده از چند تست الایزا که در آن‌ها غلظت پروتئین مورد نظر برای پوشش‌دهی متفاوت است می‌توان به یک غلظت مناسب از پروتئین جهت پوشش دادن دست یافت. توجه به این مطلب مهم است که دانسیتهٔ اتصال پروتئین به پلیت در نتیجهٔ نهایی بسیار مهم است. اتصال با دانسیتهٔ بالا حتی ممکن است برخلاف انتظار ما به نتایج ضعیف منجر شود زیرا این دانسیتهٔ بالا می‌تواند از نظر فضایی اجازهٔ نزدیک شدن پروتئین دوم (آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی) را به پروتئین پوشش داده شده ندهد. در حقیقت مولکول‌های پروتئین پوشش داده شده آن‌قدر با شدت و استحکام بالایی (و بینابین یکدیگر) به سطح چاهک متصل شده‌اند که حتی جایگاه‌های اتصالشان در دسترس اتصال به پروتئین دوم (فرضاً آنتی‌بادی) نمی‌باشد.

غلظت‌های بالای پروتئینی که باید پوشش داده شود نیز منجر به‌همین مسئله می‌شود. رابطه غلظت یک آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی با چگالی نوری (OD) به‌دست آمده در مرحلهٔ نهایی تست الایزا یک رابطهٔ خطی صرف نمی‌باشد و برای هر پروتئینی بسته به فرم فضایی و نیز در هر محدوده‌ای از غلظت‌های مختلف آن متفاوت می‌باشد.

میزان هیدروفوبیسیتهٔ واکنش پروتئین- پلیت وابسته به دما نیز می‌باشد افزایش دما موجب افزایش این هیدروفوبیسیته می‌شود و این افزایش منجر به اتصال مستحکم‌تر پروتئین به پلیت می‌شود یکی از رایج‌ترین روش‌های پوشش‌دهی از نظر دما، در مجاورت قراردادن پلیت با پروتئین در دمای $37\ c^0$ می‌باشد که در این دما زمان بین ۱ تا ۳ ساعت برای اغلب پروتئین‌ها مناسب می‌باشد در مرحله بعد می‌توان روش پوشش‌دهی در طول شب

در $4c^0$ و یا ترکیبی از این‌دو را به‌کار برد. بسته به ماهیت پروتئین‌ها، گاهی اوقات پوشش‌دهی در دمای آزمایشگاه با مدت زمان طولانی‌تر مورد نظر قرار می‌گیرد(۱۱). البته مشخص است که افزایش دما در مدت زمان طولانی ممکن است باعث تغییراتی در ساختار پروتئین مورد نظر جهت اتصال به پلیت شود. تکان دادن یکنواخت، آرام و منظم پلیت نیز می‌تواند با افزایش میزان برخورد و در نتیجه اتصال پروتئین به پلیت، زمان مورد نظر برای پوشش‌دهی را کاهش دهد. به طور کلی اگر انجام الایزا اویدیتی بر روی نمونه سرم خون مادران مبتلا به توکسوپلاسموزیس مورد نظر است، بهتر است در طراحی این روش از آنتی ژن‌های دفعی- ترشحی انگل توکسوپلاسما گوندی استفاده شود تا نتایج قابل قبول تری از نظر کیفیت و کمیت مقادیر آنتی بادی IgG حاصل شود که علت آن تازگی آنتی‌ژن‌های استخراج شده دفعی ترشحی تاکی زوئیت توکسوپلاسما گوندی در طراحی این کیت می‌باشد. اگر در بررسی انگل توکسوپلاسما گوندی نمونه سرمی در اختیار باشد براساس این آزمایش روش الایزا و ترجیحاً الایزا اویدیتی از دقت بالایی برخوردار می باشد(۱۷،۱۶). در ایران در کلیه روش‌های الایزا اویدیتی که در آزمایشگاه‌های مختلف صورت می‌گیرد تمامی کیت‌های مورد استفاده از شرکت‌های خارجی تهیه شده و به صورت تجاری در اختیار آنان قرار می‌گیرد. به همین منظور برای رفع نواقص کیت‌های خارجی و هزینه زیاد و مقرون به صرفه نبودن این روش برای بسیاری از آزمایشگاه‌ها تلاش بر ساخت این کیت‌ها به صورت دستی و مقایسه نتایج حاصل از کیت‌های تجاری با کیت‌های تولید شده در داخل شده است.

روش ساخت کیت الایزای اویدیتی به صورت دستی شامل تهیه آنتی‌ژن تاکی زوئیت توکسوپلاسما گوندی از موش و تلقیح مجدد به موش برای تکثیر بیشتر تاکی زوئیت‌ها می‌باشد. به طور کلی روش تشخیص انگل توکسوپلاسما گوندی شامل روش‌های الایزا و الایزای اویدیتی می‌باشد و در بحث نمونه‌های مورد آزمایش نمونه سرمی تازه به‌دست آمده از زنانی که دارای سابقه سقط مکرر جنین دارند ابتدا با روش الایزا و سپس در صورت مثبت بودن با روش الایزای اویدیتی در تشخیص زمان ابتلاء به عفونت مهم است و اگر این کیت آزمایش به روش دستی طراحی گردد، مقدار آنتی‌بادی از غلظت بالاتری برخوردار خواهد بود. در طراحی کیت الایزا اویدیتی در تشخیص توکسوپلاسما گوندی این نکته مهم است که از آنتی‌ژن‌های دفعی- ترشحی بدست آمده ازمایع صفاق موش سفید آزمایشگاهی یا موش BALB/C استفاده گردد. ورود انگل توکسوپلاسما به بدن انسان باعث افزایش یک‌سری از آنتی‌بادی‌های مهم از جمله IgG و IgM می‌گردد.

نتیجه این آزمایش نشان داد که اگر در تهیه کیت الایزا اویدیتی در تشخیص آنتی بادی IgG انگل توکسوپلاسما گوندی، از آنتی‌ژن‌های تازه دفعی- ترشحی استفاده شود، نتایج این آزمایش از کیت‌های تجاری آماده ساخته شده در شرکت‌های مختلف، از نظر کمیت و تیتر آنتی بادی بهتر خواهد بود(۲۰-۱۸).

سپاسگزاری

از همکاری کلیه پرسنل گروه انگل شناسی دانشگاه تربیت مدرس تهران تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1. Saebi A. Protozoan diseases in IRAN: a laboratory manual. 2nd ed. Tehran: AIIJ press; 2010. p. 247-291 (Persian).
2. Hide G, Morley EK, Hughes JM, Gerwash O, Elmahaishi MS, Elmahaishi KH, et al. Evidence for high levels of vertical transmission in Toxoplasma gondii. Parasitology 2009; 136(14): 1877-1885.

3. Daryani A, Zavaran Hosseini A, Sharif M, Dalimi A, Dehghan MH, Ziaei H. Protective Role of Antigens from Peritoneal Exudates of Infected Mice against Toxoplasmosis. Int J Mol Med 2006; 2(2): 138-143.
4. Daryani A, Zavaran Hosseiny A, Dalimi A. Immune responses against excreted / secreted antigens of Toxoplasma gondii tachyzoitesin the murine model. Vet Parasitol 2003; 113(2): 123-134.
5. Lefevre-Pettazzoni M, Bissery A, Wallon M, Cozon G, Peyron F, Rabilloud M. Impact of spiramycin treatment and gestational age on maturation of Toxoplasma gondii immunoglobulin G avidity in pregnant women. Clin Vaccine Immunol 2007; 14(3): 239-243.
6. Shin EH, Chun YS, Kim WH, Kim JL, Pyo KH, Chai JY Immune responses of mice intraduodenally infected with Toxoplasma gondii KI-1 tachyzoites. Korean J Parasitol 2011; 49(2): 115-123.
7. Abdollahi SH, Kazemi M. Designing of ELISA kit for diagnosis of anti-Toxoplasma specific IgG, using exerted/secreted antigens and its. J Mazand Univ Med Sci 2008; 17(62): 14-20 (Persian).
8. Reis MM, Tessaro MM, D'Azevedo PA. Toxoplasma-IgM and IgG-avidity in single samples from areas with a high infection rate can determine the risk of mother-to-child transmission. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2006; 48(2): 93-98.
9. Horiuchi K, Yabe I, Tajima Y, Kondo T, Takizawa Y, Yamada H, et al. Case of toxoplasma encephalopathy with specific MRI findings, diagnosed by IgG avidity index and nested PCR. Rinsho Shinkeigaku 2010; 50(4): 252-256.
10. Shin EH, Kim DH, Lin A, Lee JW, Kim HJ, Ahn MH, et al. Evaluation of the Korean isolate-1 tachyzoite antigen for serodiagnosis of toxoplasmosis. Korean J Parasitol 2008; 46(1): 45-48.
11. Walraven V. Avidity ELISA. Biomedical Primate Research Centre. November 29, 2010. p. 1-3.
12. Yasodhara P, Ramalakshmi BA, Sarma MK. A new approach to differentiate recent vs chronic Toxoplasma infection: avidity ELISA in Toxoplasma serology. Indian J Med Microbiol 2001; 19(3): 145-148.
13. Borkakoty BJ, Borthakur AK, Gohain M. Prevalence of Toxoplasma gondii infection amongst pregnant women in Assam, India. Indian J Med Microbiol 2007; 25(4): 431-432.
14. Shin DW, Cha DY, Hua QJ, Cha GH, Lee YH. Seroprevalence of Toxoplasma gondii infection and characteristics of seropositive patients in general hospitals in Daejeon, Korea. Korean J Parasitol 2009; 47(2): 125-130.
15. Marcinek P, Nowakowska D, Szaflik K, Spiewak E, Małafiej E, Wilczyński J. Analysis of complications during pregnancy in women with serological features of acute toxoplasmosis or acute parvovirosis. Ginekol Pol 2008; 79(3): 186-191.
16. Crouch CF. Enzyme immunoassays for IgG and IgM antibodies to Toxoplasma gondii base on enhanced chemiluminescence. J Clin Pathol 2010; 48(7): 652-657.
17. Assmar M, Yassaei F, Terhovanesian A, Esmaeili AR, Hassan N, Farzanehnezhaad Z, et al. Prenatal Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis: Validity of PCR Using Amniotic Fluid against Indirect Fluorescent

Antibody Assay in Mothers. Iranian J Publ Health 2004; 33(1): 1-4.

18. Kravetz JD, Federman DG. Toxoplasmosis in pregnancy. Am J Med 2005; 118(3): 212-216.
19. Khurana S, Bagga R, Aggarwal A, Lyngdoh V, Shivapriya, Diddi K, et al. Serological screening for antenatal toxoplasma infection in India. Indian J Med Microbiol 2010; 28(2): 143-146.
20. Kumar A, Arora V, Mathur M. Toxoplasma antibody levels in females with habitual or sporadic abortions and normal pregnancies. Indian J Med Microbiol 2004; 22(4): 276-277.