Archive of SID

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره هجدهم شماره ۶۵ مرداد و شهریور سال ۱۳۸۷ (۵۱-۴۲)

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 10:13 +0430 on Wednesday September 20th 2017

ارزیابی جزء دوم حاصل از تفکیک آنتی ژنهای دفعی-ترشحی توکسوپلاسما به روش کروماتوگرافی تعویض یونی برای تشخیص توکسوپلاسموز در موش صحرایی

سید حسین عبدالهی (Ph.D.) * **دکتر مهدی محمودی**(M.D.) **

چکیده

سابقه و هدف: با توجه به گزارشات قبلی، به نظر می‌رسد که آنتی‌ژن‌های دفعی – ترشحی توکسوپلاسماگوندی نشانگرهای مناسبی جهت استفاده در تست‌های سرولوژی برای تشخیص توکسوپلاسموزیس باشند. چون در بررسی‌های قبلی معمولا" این آنتی‌ژن‌ها به صورت ترکیب کامل مورد استفاده قرار گرفته‌اند، این مطالعه به منظور ارزیابی روش الایزا بااستفاده از اجزای آنتی‌ژن‌های دفعی–ترشحی تاکی زوئیت‌های توکسوپلاسما گوندی، برای تشخیص توکسوپلاسموزیس صورت گرفت.

مواد و روش‌ها: ترکیب حاوی آنتی‌ژن‌های دفعی– ترشحی حاصل ار انکوباسیون تاکی زوئیت‌های توکسوپلاسما در محیط کشت غیرسلولی RPMI-1640 به روش کروماتوگرافی تعویض یون تحت شیب pH، تفکیک و به روش الکتروفورز Native- PAGEشناسائی شدند. ۴۰ سرموش صحرایی نر درون زاد (Inbred) با ۱۰–۷ هفته سن و غیرآلوده به توکسوپلاسما (Dye-Test منفی) انتخاب و به هرکدام ۱۰۶×۴ تاکی زوئیت توکسوپلاسما از طریق داخل صفاقی تزریق و سرم روزهای ۶۰،۲۲،۱۵،۸ بعد از آلودگی آنها تهیه شد در مرحله بعد نمونه‌های سرم به روش dye-test آزمایش و باتوجه به نتایج آن، سرم‌های مورد نظر انتخاب و به روش الایزا با استفاده از اجزاء آنتی‌ژن‌های دفعی– ترشحی آزمایش شدند.

یافته‌ها : با توجه به نتایج آزمایش سرم روزهای مختلف رتهای آلوده ،سرم روز ۶۰ و ۱۵ بعنوان نمونه‌های مناسب انتخاب شدند. تحت شرایط مورد نظر در این بررسی، Cut-off تست الایزا با ۹۹ درصد اطمینان برابر ۴۱/.تعیین گردید که میزان جذب نوری (OD) تمام نمونه سرم‌های روز ۱۵ آلودگی ، سه تا از نمونه سرم‌های روز ۶۰ آلودگی و دو مورد از سرم‌های منفی بالاتر از آن بدست آمد. بنابراین تحت شرایط موردنظر در این مطالعه حساسیت و ویژگی روش الایزا با استفاده از جزء دوم کروماتوگرافی تعویض یون برای شناسائی سرم روز ۱۵ بعد از آلودگی به توکسوپلاسما و افتراق آن از روز۶۰ آلودگی به ترتیب ۱۰۰ درصد و ۹۱ درصد می باشد.

استنتاج : باتوجه به یافته‌ها چنین استنباط می شود که جزء دوم کروماتوگرافی تعویض یون تهیه شده تحت شرایط این مطالعه نشانگر مناسبی برای تشخیص و افتراق سرم مراحل مختلف توکسوپلاسموزیس به نظر می رسد.

واژه‌های کلیدی: توکسوپلاسموزیس، الایزا، آنتی‌ژن‌های دفعی– ترشحی، توکسوپلاسما گوندی

+ مولف مسئول:**دکتر سید حسین عبدالهی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، میدان انقلاب، رفسنجان.**
E-mail: habdollahid38@yahoo.com

* استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان.

** دانشیار گروه بیوشیمی و بیوفیزیک، ، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان.

تاریخ دریافت : ۸۶/۱۲/۵ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۸۷/۱/۱۰ تاریخ تصویب: ۸۷/۳/۲۹

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 10:13 +0430 on Wednesday September 20th 2017

مقدمه

توکسوپلا سموزیس (Toxoplasmosis) از جمله عفونت های انگلی شایع در سراسر دنیا است که در اثر آلودگی به تک یاخته توکسوپلاسما گوندی (Toxoplasma gondii) بروز می‌کند. آلودگی در افراد با سیستم ایمنی سالم معمولا بدون علامت یا همراه با علائم خفیف می باشد ولی برای کودکانی که در دوران جنینی آلوده شده‌اند (مادرزادی) و افراد دچار نقص ایمنی ممکن است عوارض شدید و حتی مرگ را به دنبال داشته باشد(۱،۲).

تشخیص سریع و دقیق توکسوپلاسموزیس دارای اهمیت زیادی می باشد زیرا با تشخیص بموقع و درمان مناسب، عوارض ناشی از این بیماری به میزان قابل توجهی کاهش پیدا می‌کند. گرچه تلقیح نمونه به حیوان حساس، کشت سلولی و مشاهده ارگانیسم در برش های بافتی یا گسترش تهیه شده از مایعات بدن برای تشخیص توکسوپلاسموزیس از حساسیت و ویژگی مناسب برخودار می باشند ولی به دلیل نیاز به امکانات خاص، صرف زمان نسبتا زیاد برای مشخص شدن نتیجه آزمایش و خطر آلودگی افراد و محیط کار(به دلیل کار با انگل زنده) معمولا در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی مورد استفاده قرار نمی گیرند (۳،۴).

تعیین آنتی‌بادی تولید شده علیه توکسوپلاسما در سرم افراد، روش رایج تشخیص توکسوپلاسموزیس است. وجود برخی مشکلات از جمله پایداری متفاوت ایمنو گلبولین‌های قابل شناسایی توسط آنتی‌ژن‌های مورد استفاده در این روش‌ها، بروز مثبت کاذب در اثر وجود عوامل روماتوئیدی و آنتی‌بادی‌های طبیعی، تفسیر نتایج این آزمایشات و اعلام نظر قطعی در این باره را مشکل می کنند. اکثر این مشکلات را به آنتی‌ژن‌های مورد استفاده در تست‌های طراحی شده برای این منظور نسبت می دهند، علاوه براین، تشخیص و افتراق فرم مزمن از فرم حاد بیماری با این روش‌ها، مستلزم چند بار آزمایش سرم با فاصله زمانی می‌باشد که این موضوع در مورد تشخیص آلودگی در خانم‌های باردار اهمیت زیاد دارد، زیرا ممکن است در فاصله زمانی تعیین آلودگی، انگل به جنین منتقل شود (۷-۵).

بررسی‌های زیادی به منظور شناسایی ترکیباتی از توکسوپلاسما جهت استفاده بعنوان آنتی ژن در تست‌های سرولوژی طراحی شده برای تشخیص توکسوپلاسموزیس به منظور برطرف شدن مشکلات فوق صورت گرفته است (۸) در این رابطه توجه محققین به آنتی‌ژن‌های دفعی-ترشحی (Excreted/ Secreted antigens) تاکی زوئیت‌های توکسوپلاسما جلب شده است. محمودزاده و همکاران (۱۹۹۹) گزارش کردند که روش الایزا نقطه ای (Dot-ELISA) با استفاده از مایع صفاق موش سفید کوچک آزمایشگاهی آلوده شده با سویه RH توکسوپلا سما گوندی دارای ارزش تشخیصی بالایی برای تشخیص توکسوپلا سموزیس در موش صحرایی می باشد(۹). مطالعات کازابون و همکاران (۱۹۹۴) نشان داد که برخی از آنتی‌ژن‌های دفعی ترشحی توکسوپلاسما و آنتی‌بادی‌های تولید شده علیه آنها تنها در زمان خاصی از دوره بیماری قابل شناسایی می باشند همچنین نوع ، و زمان قابل شناسایی بودن ایمنوگلبولینهای IgE IgM IgA وIgG تولید شده علیه این آنتی‌ژنها در سرم موش‌های آلوده به سویه‌های مختلف توکسوپلاسما متفاوت میباشد(۱۰). الساندرا و همکاران (۲۰۰۲) گزارش کردند که ترکیب دفعی - ترشحی ۹۷کیلودالتونی از تاکی زوئیت های توکسوپلاسما، در فاز حاد توکسوپلاسموزیس، IgG و IgM ولی در مرحله مزمن تنها IgG را شناسایی می‌کند بنابراین بعنوان یک نشانگر مناسب برای استفاده در تست‌های تشخیصی قابل

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 10:13 +0430 on Wednesday September 20th 2017

بررسی می‌باشد (۱۱). یاماموتو و همکاران (۱۹۹۸) گزارش کردند که ترکیبات آنتی‌ژنی موجود در مایع صفاق موش آلوده به توکسوپلاسما گوندی (رسوب سولفات آمونیوم اشباع ۸۰ درصد- ۳۰ درصد) IgG , IgA , IgM ضد توکسوپلاسما را در سرم انسان شناسایی می‌کنند و کاربرد آنها به عنوان آنتی‌ژن در تست‌های سرولوژی قابل بررسی می باشند (۱۲). در بین تکنیک‌های قابل استفاده برای تعیین آنتی‌بادی ضد توکسوپلاسما در سرم با بکارگیری آنتی‌ژن‌های دفعی- ترشحی، روش الایزا با توجه به سادگی روش اجرا، در دست بودن مواد و وسایل انجام آن به صورت تجاری در قالب کیت‌های آماده، عدم نیاز به دستگاه‌های گران قیمت و حساسیت نسبتا" بالا مناسب‌تر به نظر می‌رسد. روش‌هایی مانند ایمونوبلاتینگ و رادیوایمونواسی گرچه از ارزش تشخیصی مناسب برخوردار می‌باشند اما به علت پیچیدگی روش اجرا، به کارگیری آنها در اکثر آزمایشگاه‌های تشخیص طبی مقدور نمی‌باشد. باتوجه به پایین بودن مقدار آنتی ژن‌های دفعی- ترشحی در واحد حجم، ترکیب حاوی این آنتی ژن‌ها در تست‌هایی مانند IHA ، لاتکس اگلوتیناسیون، عمل ثابت شدن آنتی‌ژن بر روی گلبول قرمز یا ذرات لاتکس ممکن است به خوبی صورت نگیرد، همچنین حساسیت الایزا نسبتا " بالاست به طوری که با ۵-۱ نانوگرم از آنتی‌ژن نیز واکنش صورت میگیرد، این موضوع در رابطه با آنتی‌ژن‌های دفعی- ترشحی با توجه به کم بودن میزان نسبی آنها در ترکیب کامل نمونه‌های آنها اهمیت بیشتر دارد.

باتوجه به خصوصیات گزارش شده از آنتی ژن های دفعی-ترشحی توکسوپلاسما، به نظر می‌رسد این آنتی‌ژن‌ها نشانگرهای مناسبی جهت استفاده در تست‌های سرولوژی برای تشخیص توکسوپلاسموزیس باشند (۱۳،۱۴). بنابراین از آنجایی که در مطالعات قبلی ترکیبات حاوی E/SA بصورت ترکیب کامل مورد استفاده قرار گرفته‌اند. مطالعه حاضر به منظور ارزیابی استفاده از اجزاء آنتی‌ژن‌های دفعی – ترشحی تاکی زوئیتهای توکسوپلاسما گوندی برای تشخیص توکسوپلاسموزیس به روش الایزا در موش صحرایی صورت گرفت .

مواد و روش ها

تهیه آنتی ژن

برای این منظور از روش پیشنهادی دارسی به شرح زیر استفاده شد:

دو میلی‌لیتر محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۲×۱۰۸ تاکی زوئیت شسته شده به لوله‌های در پیچدار منتقل و به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد تحت تکان ملایم انکوبه گردید.سپس محتوای هر لوله به مدت ۱۵ دقیقه با دور g×۱۰۰۰ سانتریفوژو مایع رویی آن خارج و پس از دیالیز (کیسه دیالیز با Cut off کمتر از ۱۰کیلودالتون ساخت شرکت بیوژن، ایران)، تغلیظ و به عنوان ترکیب حاوی آنتی‌ژن‌های دفعی – ترشحی در ۲۰ـ درجه سانتیگراد نگهداری گردید (۱۵،۱۶).

ترکیب حاوی E/SA حاصل از انکوباسیون تاکی زوئیت‌های توکسوپلاسما در محیط کشت غیر سلولی RPMI با روش کروماتوگرافی تعویض یون به شرح زیر تفکیک گردید.از دستگاه کروماتوگرافی ساخت شرکت Moller-wede کشور آلمان مجهز به گرادیانت ساز استفاده شد. محلول جدا کننده بافر تریس- اسید کلریدریک با pH های ۳ و ۱۰ در ظروف مربوطه در دستگاه گرادیانت ساز ریخته و سپس به ستون کروماتوگرافی متصل و جریان بافر روی ستون برقرار می‌گردید، در نتیجه با ایجاد شیب pH ، پروتئین‌های متصل به ستون در pH مناسب آزاد (با توجه به pH های

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 10:13 +0430 on Wednesday September 20th 2017

ایزوالتریک متفاوت پروتئین‌های مختلف) و به همراه مایع خروجی در لوله‌ها جمع آوری می‌شد.

ستونی ازژل کربوکسی متیل سفادکس (ساخت شرکت مرک کشور آلمان) با ابعاد ۱×۱۵سانتیمتر استفاده شد. حجم نمونه اضافه شده به ستون ۳ میلی لیتر حاوی ۳ میلی گرم پروتئین و سرعت جریان خروجی ۶۰ میلی‌لیتر در ساعت تعیین گردید. جداسازی تحت شیب pH (طیف۳تا۱۰) صورت گرفت. سه میلی لیتر از مایع خروجی ستون در هر لوله (جمعاً۱۰۰لوله) جمع‌آوری و میزان جذب نوری محتوای هر لوله با استفاده از اسپکتروفوتومتر(ساخت شرکت Moller-wede کشور آلمان) در طول موج ۲۸۰ نانومتر تعیین و منحنی مربوط به آنها رسم گردید. سپس محتوای لوله‌های مربوط به هر پیک با هم مخلوط و به مدت ۲۴ ساعت در برابر بافر تریس اسید کلریدریک ۰۵/ مولار با pH=۷/۴ دیالیز و پس از تغلیظ میزان پروتئین آن به روش براد فورد محاسبه و به عنوان یک جزء محسوب گردید(۱۶،۱۷).

شناسایی اجزاء آنتی ژن های دفعی- ترشحی

برای این منظور از روش Native-PAGE به شرح زیر استفاده شد:

۴۰ میکرو لیتر از هر فراکشن با ۴۰ میکرولیتر بافر نمونه به کمک سرنگ هامیلتون به حفره‌های تعبیه شده در ژل منتقل گردید.در این مطالعه غلظت ژل پلی اکریل آمید ۷/۵ در صدو شدت جریان ۱۲۰ انتخاب شد و به منظور برطرف شدن اثر حرارت روی نتایج الکتروفورز ، درطول مدت الکتروفورز ، آب سرد به طور دایم در اطراف صحفه ژل جریان داشت پس ازرسیدن پروتئین نشانه به خط پایان صفحه الکتروفورز، ژل از صفحه جدا و با رنگ کوماسی بلو رنگ‌آمیزی شد.(۱۸).

تهیه نمونه های سرم:

۴۰ سر موش صحرایی نر درون زاد (Inbred) که سرم آنها از نظر وجود آنتی‌بادی علیه توکسوپلاسما منفی بود (نقطه پایان تیتراسیون سرم آنها با روش رنگ سنجی به طریق سریال رقت کمتر از ۳۲ : ۱ و به طریق تک حفره‌ایی حداقل ۹۵ درصد تاکی زوئیت‌ها رنگ گرفته بودند) انتخاب و به هرکدام ۱۰۶×۴ تاکی زوئیت سویه RH توکسوپلاسما به طریق داخل صفاقی تلقیح و روزهای ۶۰،۲۲،۱۵،۸ از آنها خونگیری و سرم آن جداگردید. در مرحله بعد، نمونه های سرم روزهای فوق مربوط به آنها با روش رنگ سنجی آزمایش شد و با توجه به نتایج آن، سرم روزهای ۱۵ و ۶۰ به روش الایزا با استفاده از ترکیب حاوی E/SA (فراکشن دوم کروماتوگرافی) تهیه شده در این مطالعه آزمایش شدند (۱۲،۱۶). نمونه سرم‌های قبل از آلودگی رتها بعنوان نمونه‌های منفی در نظرگرفته شد.(۱۹،۲۲).

طراحی الایزا

الف :تعیین رقت مناسب کونژوگه و آنتی ژن

این قسمت در قالب الایزا مستقیم انجام شد .به این ترتیب که در یک میکروپلیت ۹۶ حفره ای مخصوص الایزا ، کونژوگه (Rabbite-AntiArt نشاندار شده باپراکسید از،ساخته شرکت DAKO دانمارک) درجهت عمودی (ستون ها) و سرم درجهت افقی (ردیف ها) و در میکروپلیت دیگر آنتی ژن (فراکشن دوم حاصل از کروماتوگرافی تعویض یون) در جهت افقی و سرم در جهت عمودی حفره های میکروپلیت بصورت سریال رقت دوبرابر رقیق شد بطوری که واکنش هر رقت از کونژوگه وآنتی ژن بطورجداگانه با تمام رقتهای سرم سنجیده شود.پس از پایان مراحل الایزا ،میزان جذب نوری حفرههای پلیت ها با اسپکتروفتومتر چند کانالی در طول موج ۴۹۲ نانومتر تعیین شد.

ب ـ تعیین رقت مناسب سرم

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 10:13 +0430 on Wednesday September 20th 2017

برای این منظور،سه نمونه سرم منفی و سه نمونه سرم مثبت بارقت بالا ، متوسط ،و پایین انتخاب ودر قالب الایزا غیر مستقیم آزمایش شدند بطور خلاصه میزان مناسب از آنتی ژن به تمام حفره های میکروپلیت ۹۶ خانه ای مخصوص الایزا جذب و سریال رقت دو برابر و دوتایی (در دو ستون کنارهم)از سرم های مورد نظر در جهت عمودی حفره های میکروپلیت تهیه گردید در پایان میزان جذب نوری حفره های پلیت بااستفاده از اسپکتروفتومتر چندکانالی در طول موج ۴۹۲ نانومتر تعیین شد.

ج ـ تعیین Cut-off تست

در این قسمت تمام سرم های منفی (۴۰تا) با رقت مناسب (بدست آمده از مراحل بالا) آنتی ژن، سرم و کونژوگه بصورت دوتایی در قالب الایزا غیر مستقیم بصورت تک حفره ای آزمایش شدندپس از تعیین میزان جذب نوری حفره های پلیت با اسپکتروفتومتر چندکانالی در طول موج ۴۹۲ نانومتر میانگین رقت های دوتایی نمونه محاسبه و نمودار فراوانی آنهارسم گردید همچنین میانگین و انحراف ازمعیار میانگین هانیز محاسبه شد(۲۱،۲۲).

ه ـ انجام الایزا

دراین مرحله پس از تعیین رقت مناسب گونژوگه ، آنتی ژن رقت مناسب سرم ، cut-off تست محاسبه و نمونه های سرم مورد نظر(سرمهای منفی،سرم روزهای ۶۰و۱۵)به روش الایزا غیر مستقیم بصورت تک رقتی آزمایش شدند(۲۱) وباتوجه به نتایج حاصل، ویژگی و حساسیت روش مذکور برای تشخیص توکسوپلاسموزیس در موش صحرایی محاسبه گردید.

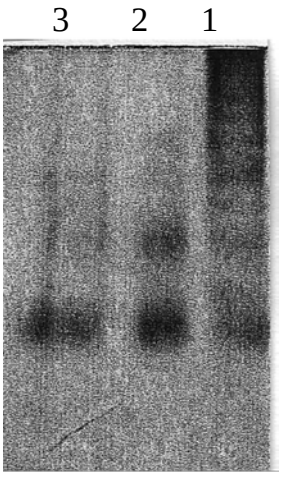
نتایج

تهیه آنتی ژن های دفعی- ترشحی

با روش مورد استفاده در این مطالعه از هر ۱۰۸×۲تاکی زوئیت حدود ۱۵ میکروگرم E/SA بدست آمد و جمعاً ۱۵ میلی گرم آنتی ژن تهیه گردید.

تفکیک و شناسایی آنتی ژن های دفعی- ترشحی :

از کروماتوگرافی تعویض یون آنتی ژن های دفعی- ترشحی تهیه شده در این مطالعه دو پیک حاصل شد(شکل یک)که در الکتروفورز فراکشن اول سه و فراکشن دوم یک باند تشکیل دادند بنا بر این فراکشن دوم بعنوان آنتی ژن انتخاب گردید.



شکل شماره ۱: الکتروفوز Native-PAGE فراکشن‌های بدست آمده از کروماتوگرافی تعویض یون ELSA

۱ - ترکیب کامل

۲ - فراکشن اول

۳ - فراکشن دوم

تعیین رقت مناسب کونژوگه، آنتی ژن و سرم

در جدول تعیین عیار، تحت شرایط این مطالعه رقت کونژوگه ۱/۴۰۰۰، رقت مناسب آنتی ژن ۱/۳۲

(حاوی ۶/۲۵ میکروگرم پروتئین در میلی لیتر ترکیب حاوی آنتی ژن)و رقت مناسب سرم (آنتی بادی) ۱/۲۰۰ بدست آمد.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 10:13 +0430 on Wednesday September 20th 2017

تعیین Cut-off تست

میانگین وانحراف از معیار میزان جذب نوری (OD) نمونه سرم های منفی به ترتیب ۰/۲۰ و ۰/۰۷ بدست آمد و با توجه به اینکه منحنی فراوانی سرم های منفی کشیدگی به سمت راست داشت با ۹۹درصد اطمینان Cut-off تست عبارت است از (۲۱):

Cut-off = μ + 3SD= ۰/۲۰+ ۰/۲۱= ۰/۴۱

آزمایش نمونه های سرم

نتایج آزمایش نمونه های سرم روز ۱۵آلودگی ، روز ۶۰ آلودگی وسرمهای منفی به روش الایزا با استفاده از فراکشن دوم کروماتوگرافی(آنتی ژن انتخاب شده) به ترتیب در جداول ۱،۲،۳آمده است (حین مراحل خونگیری ۴ سر از رت ها مردند بنابر این نمونه های سرم آنها از مطالعه حذف شدند). بررسی دادهای مذکور نشان می دهد که میزان جذب نوری تمام نمونه سرمهای روز ۱۵آلودگی ، بیشتر از cut-off تست می باشد در نتیجه با شرایط مورد نظر در این بررسی ، حساسیت تست الایزا- غیرمستقیم برای تشخیص توکسوپلاسموزیس در روز ۱۵ آلودگی ۱۰۰درصد می باشد.

جدول شماره ۲ نشان می دهد که میزان جذب نوری سه تا از نمونه سرم های روز ۶۰ بالا تر از cut-off می باشد در نتیجه اختصاصیت تست برای افتراق سرم روز ۱۵ از روز۶۰ آلودگی به توکسوپلاسما در مدل حیوانی مورد مطالعه ۹۱ درصد می باشد.

بحث

استفاده از آنتی ژن های غشائی و سیتوپلاسمی توکسوپلاسما در تست های سرولوژی به منظور تشخیص دقیق و افتراق فرم حاد از مزمن توکسوپلاسموزیس مشکلاتی را به دنبال دارد. بررسی ها نشان داده است در صورتیکه آنتی‌ژن‌های دفعی- ترشحی توکسوپلاسما به طریق مناسب تهیه و تخلیص شوند ترکیبات آنتی ژنیک مفیدی برای استفاده در روش های سرولوژی به منظور برطرف شدن این مشکلات به نظر می رسند(۵،۱۲).

در مطالعات قبلی معمولاً از مایع رویی کشت سلولی تاکی زوئیت های توکسوپلاسما و یا مایع صفاق موش سفید آزمایشگاهی آلوده شده به این انگل از طریق داخل صفاقی بعنوان E/SAاستفاده شده است (۱۱،۱۲) ولی آغشته بودن آنتی‌ژن‌های دفعی – ترشحی تهیه شده از این طریق به پروتئین های صفاق موش و مواد حاصل از کشت سلولی ، مشکلاتی را به دنبال داشته است بنابر این ما از روش انکوباسیون تاکی زوئیت های توکسوپلاسما در محیط کشت غیر سلولی RPMI-1640 که توسط دارسی و همکاران در سال ۱۹۸۸ پیشنهاد شداستفاده کردیم زیرا علاوه بر برطرف شدن مشکل آغشتگی ، زمان مورد نیاز برای تهیه آنتی ژن های دفعی- ترشحی به میزان قابل توجهی کاهش پیدا می‌کند (۱۵،۱۶).

در سال ۱۹۸۷یاسوهیروسوزوکی گزارش کرد که آنتی بادی های تولید شده علیه آنتی ژن های گردشی توکسوپلاسما از روز دهم آلودگی قابل شناسا یی بوده و در روز هفدهم به بالاترین میزان می‌رسند (۲۳).کازابون و همکاران (۱۹۹۴) این آنتی بادی ها را از روز۱۳-۱۷ بعداز آلودگی به توکسوپلاسماشناسایی و گزارش کردند که IgM قابل شناسایی با E/SA هفته اول آلودگی ظاهر می شوند در حالی که IgG پس از هفته دوم قابل شناسایی می باشد بنا بر این هفته دوم آلودگی به توکسوپلاسموزیس را زمان مناسب برای

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 10:13 +0430 on Wednesday September 20th 2017

تهیه نمونه سرم از اوایل آلودگی به توکسوپلاسما برای مطالعه در رابطه با آنتی ژنهای دفعی ترشحی پیشنهاد کردند (۱۰). همچنین مطالعات قبلی نشان داده اند که برخی از آنتی ژنهای دفعی ترشحی توکسوپلاسما تنها در زمان خاصی از دوره بیماری در سرم قابل شناسایی می باشند همچنین آنتی بادی های تولید شد علیه این آنتی ژنها از نظر نوع و زمان قابل شناسایی در سرم مراحل توکسوپلاسموزیس متفاوتند(۱۱،۱۴،۲۴) بنابر این در مطالعه حاضر بمنظور بررسی این موضوع که ایا روش الایزا تحت شرایط مورد نظر در این مطالعه با استفاده از اجزاء آنتی ژن های دفعی ترشحی قابلیت افتراق سرم مراحل مختلف توکسوپلاسموزیس را دارد، سرم روز ۱۵بعنوان نمونه سرم اوایل آلودگی و سرم روز ۶۰ بعنوان نمونه سرم مرحله مزمن انتخاب و آزمایش شدند.

در مطالعه حاضر فراکشن بدست آمد از تفکیک آنتی ژن های دفعی ترشحی (فراکشن دوم کروماتوگرافی تعویض یون) با سرم روز ۱۵ آلودگی واکنش نشان داد ولی سرم روز ۶۰آلودگی را شناسایی نکرد این حالت (یعنی واکنش اختصاصی فراکشنی از E/SAبا سرم مرحله خاصی از توکسوپلاسموزیس) در مطالعات قبلی بندرت گزارش شده است دلایل مختلف را برای بروزاین حالت می توان ذکر کرد از جمله نحوه تهیه نمونه های سرم از مراحل مختلف توکسوپلاسموزیس زیرا در بررسی های قبلی معمولاحضور یا عدم حضور IgG و IgM اساس انتخاب سرم مراحل مختلف توکسوپلاسموزیس قرار گرفته است همانطور که قبلا بیان شد این ایمنوگلبولینها بخاطر پایداری متفاوت به تنهایی معیارمناسبی برای این منظور نیستند بنابر این ما نمونه های سرم را با توجه به زمان پس از آلودگی و تغییرات تیتر آنتی بادی در سرم انتخاب کردیم البته این کار در رابطه با موارد انسانی مشکل تر و مستلزم صرف زمان بیشتر ی می باشد (۶،۵). به نظر می رسد روش مورد استفاده برای تفکیک اجزا E/SA نیز در بروز واکنش مورد نظر موثر بوده است زیرا در اکثرمطالعات قبلی برای تخلیص E/SA از روش های دیگر از جمله رسوب سولفات آمونیوم با درجات اشباع مختلف استفاده شده است در نتیجه، فراکشن های حاصل، از خلوص کافی برخودار نبوده اند و محققین نیز از آن بعنوان یکی از علل عدم بروز واکنش اختصاصی بین سرم یکی از مراحل توکسوپلاسموزیس با فراکشن خاصی از E/SA ذکر نموده اند و استفاده از روشهای مناسبتر را برای این منظور پیشنهاد کرده اند (۱۵،۱۲) بنابر این ما روش کروماتوگرافی تعویض یون را که قدرت تفکیک مناسبی دارد برای این منظور بکار بردیم. روش تهیه آنتی ژن های دفعی- ترشحی بکار رفته در این مطالعه نیز در بروز واکنش اختصاصی بین سرم با فراکشن دوم حاصل از کروماتوگرافی موثر می‌باشد زیرا E/SA حاصل عاری از آغشتگی به پروتئین های مایع صفاق موش ویا مواد حاصل از کشت سلولی می باشد (۱۵،۱۶)

از یافته های این مطالعه استنباط می شود که روش الایزا بااستفاده از آنتی ژن های دفعی ترشحی تهیه شده با روش مورد نظر(فراکشن دوم بدست آمد از کروماتوگرافی تعویض یون E/SAحاصل از انکوباسیون تاکی زویت های توکسوپلاسما در محیط غیر سلولی RPMI-1640) در این مطالعه روش مناسب (ویژگی و حساسیت نسبتابالا) برای افتراق سرم روز ۱۵

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 10:13 +0430 on Wednesday September 20th 2017

از روز ۶۰ آلودگی به توکسوپلاسموزیس در موش صحرایی به نظر می رسد و ممکن است در رابطه با تشخیص فرم حاد از مزمن توکسوپلاسموزیس مفید باشد. بنابراین لازم است موضوع از جنبه های مختلف و همچنین در رابطه با موارد انسانی مورد بررسی قرار گیرد.

جدول شماره ۱: نتایج آزمایش (OD) نمونه سرم‌های روز ۱۵ (رت های آلوده شده با توکسوپلاسما) به روش الایزا با استفاده از جزء دوم کروماتوگرافی تعویض یون آنتی ژن های دفعی- ترشحی

شماره نمونه	OD	شماره نمونه	OD	شماره نمونه	OD
۱	۲/۰۰	۱۵	۱/۷۴	۲۹	۱/۶۴
۲	۱/۹۲	۱۶	۱/۵۵	۳۰	۱/۷۶
۳	۱/۶۶	۱۷	۱/۵۹	۳۱	۱/۸۲
۴	۱/۷۰	۱۸	۱/۰۴	۳۲	۱/۶۴
۵	۱/۶۷	۱۹	۱/۳۹	۳۳	۰/۹۴
۶	۱/۶۸	۲۰	۱/۶۷	۳۴	۱/۵۴
۷	۱/۶۸	۲۱	۰/۹۲	۳۵	۱/۳۹
۸	۰/۹۵	۲۲	۱/۳۹	۳۶	۱/۳۹
۹	۱/۳۳	۲۳	۱/۵۰	۳۷	۰/۱۴
۱۰	۲/۰۴	۲۴	۱/۷۵	۳۸	۰/۱۵
۱۱	۱/۰۹	۲۵	۱/۷۰	۳۹	۰/۱۴
۱۲	۱/۴۷	۲۶	۱/۹۳	۴۰	۰/۱۳
۱۳	۱/۵۷	۲۷	۱/۵۴	۴۱	۰/۱۵
۱۴	۱/۵۴	۲۸	۲/۲۰	۴۲	۰/۱۶

◄ شماره های ۳۷،۳۸،۳۹ سرم منفی و شماره های ۴۲، ۴۱،۴۰ بدون آنتی ژن بوده اند (کنترل منفی)

جدول شماره۲: نتایج آزمایش (OD) نمونه سرم روز ۶۰ (رت های آلوده شده با توکسوپلاسما) به روش‌الایزابا استفاده از جزء دوم کروماتوگرافی تعویض یون آنتی‌ژن‌های دفعی-ترشحی

شماره نمونه	OD	شماره نمونه	OD	شماره نمونه	OD
۱	۰/۱۸	۱۵	۰/۱۷	۲۹	۰/۲۵
۲	۰/۱۶	۱۶	۰/۱۵	۳۰	۰/۱۹
۳	۰/۳۲	۱۷	۰/۳۳	۳۱	۰/۱۵
۴	۰/۲۳	۱۸	۰/۳۴	۳۲	۰/۲۳
۵	۰/۱۷	۱۹	۰/۱۵	۳۳	۰/۱۴
۶	۰/۲۶	۲۰	۰/۲۷	۳۴	۰/۱۸
۷	۰/۳۳	۲۱	۰/۳۴	۳۵	۰/۱۴
۸	۰/۱۴	۲۲	۰/۶۷	۳۶	۰/۲۳
۹	۰/۵۹	۲۳	۰/۱۹	۳۷	۰/۱۳
۱۰	۰/۲۸	۲۴	۰./۲۰	۳۸	۰/۱۶
۱۱	۰/۱۲	۲۵	۰/۷۹	۳۹	۰/۱۷
۱۲	۰/۲۳	۲۶	۰/۲۵	۴۰	۰/۲۲
۱۳	۰/۱۵	۲۷	۰/۱۸	۴۱	۰/۱۸
۱۴	۰/۱۵	۲۸	۰/۱۵	۴۲	۰/۲۵

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

جدول شماره۳: نتایج آزمایش (OD) نمونه سرم های منفی (رت‌های آلوده شده با توکسوپلاسما) به روش الایزا و استفاده از جزء دوم کروماتوگرافی تعویض یون آنتی‌ژن‌های دفعی-ترشحیس

شماره نمونه	OD	شماره نمونه	OD	شماره نمونه	OD	شماره نمونه	OD
۱	۰/۲۹	۱۲	۰/۲۱	۲۳	۰/۲۲	۳۴	۰/۱۱
۲	۰/۳۴	۱۳	۰/۱۳	۲۴	۰/۱۹	۳۵	۰/۱۳
۳	۰/۱۸	۱۴	۰/۲۱	۲۵	۰/۱۵	۳۶	۰/۲۵
۴	۰/۱۸	۱۵	۰/۲۱	۲۶	۰/۱۸	۳۷	۰/۱۴
۵	۰/۲۶	۱۶	۰/۱۸	۲۷	۰/۱۲	۳۸	۰/۱۴
۶	۰/۱۲	۱۷	۰/۱۸	۲۸	۰/۴۳	۳۹	۰/۱۵
۷	۰/۲۵	۱۸	۰/۳۲	۲۹	۰/۳۴	۴۰	۰/۱۷
۸	۰/۱۶	۱۹	۰/۱۴	۳۰	۰/۲۷	۴۱	۰/۱۶
۹	۰/۱۵	۲۰	۰/۲۳	۳۱	۰/۱۵	۴۲	۰/۱۴
۱۰	۰/۱۳	۲۱	۰/۱۹	۳۲	۰/۱۵	۴۳	۱/۶۴
۱۱	۰/۱۷	۲۲	۰/۱۶	۳۳	۰/۱۲	۴۴	۱/۷۶

◄ شماره های ۳۷،۳۸،۳۹سرم منفی و شماره های ۴۲، ۴۱،۴۰ بدون آنتی ژن بوده اند(کنترل منفی)

www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 10:13 +0430 on Wednesday September 20th 2017

References

1–Hill DE,Chirukaudoth S,Dubey JP. Biology and epidemiology of toxoplasma gondii in man and animals. ***Anim Health Res Rew***, 2005, 6: 41-61.

2– Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. ***Lancet***, 2004, 363: 1965-76.

3–Piergili Fioretti D. Problems and limitation of conventional and innovative method for the diagnosis of toxoplasmosis in human and animals. ***Parasitologia,*** 2004, 46(1-2): 177-81.

4-Garcia L.S: ***Diagnostic medical parasitology.*** 4th edition, ASM Press , Washington, 2001, chapter 6, pp: 132-204.

5–Montoya JG; Laboratory diagnosis of toxoplasma gondii infection and toxoplasmosis. ***J Infect Dis., 2002***, 185: 73 – 82.

6– Lisandra A. Suzuki, Rosangela J, Rocha and Claudio L.Rossi: Evaluation of serological markers for the immunodiagnosis of acute acquired toxoplasmosis. ***J Med Microbiol.,*** 2001, 50 : 62-70.

7- Liesenfeld O., Cynthia P., Jose GM., Raj G. and 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.

8– Ahn NH., Son HJ., Leem MH., and Min DY: Antigen analysis of Toxoplasma gondii Lysate and excretory – secretory materials by enzyme–linked immunoelectrotransfer blot. ***Korean J parasito.,*** 1994, 32(4): 249 – 57.

9- Mahmoodzadeh A., Abdollahi H., Dalimi A and Zavaran A: Dot-ELISA assay, using excreted-secreted antigens for diagnosis of Toxoplasmosis. ***Modarres Medical Sciences Journal*** (Persian)., 2000, 3(1): 47-53.

10-Cazabon P., Bessieres M H and Seguela JP: Kintics study and characterization of target excreted secreted antigens of immunoglobulin ***G, M, A*** and E antibadies from mice infected with different strains of toxoplasma gondii. *parasitol*. *Res*., 1994; 80(1): 58-63.

11–Alessandra C, Maria A, Jose R. Detection of antibodies to the 97KDa component of toxoplasma gondii in sampels of human serum. ***Mem Inst Oswaldo***. Cruz, Rio. De Janeiro, 2002, 97(7): 1009-1013.

12- Yamamoto YL., Mineo JR., Meneghiss CS. and 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.

13–Eui-Sun SON and Ho–Woo NAM: Detection and characterizition of excretory/secretory proteins from Toxoplasma gondii by monoclonal antibodies. ***K J parasitol.,*** 2001, 39(1): 49-56.

14– Hassan MM., Mansour SA., Atta M., Shalaby MM., Sekksaka MA., and Awad A: The importance of detecting Toxoplasma gondii antigens in human cases. ***J. Egypt. Soc. Parasitol***., 1997, 27(1): 27-34.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 10:13 +0430 on Wednesday September 20th 2017

15-Darcy F., Deslee D., Santoro F., Decoster A., Duqesne et al: Induction of a protective antibody–dependent respons against toxoplasmosis by in vitro excreted/secreted antigens from toxoplasma gondii. ***Parasite Immunol,*** 1998,10(5):553- 567.

16- Abdollahi H: Preparation, purification and identification of excreted/secreted antigens of toxoplasma gondii tachiziotes.***J Raf Univ Med Sci*** (Persian)., Winter 2002, Vol. 2(1): 1-9.

17-Johnstons A., Thorpe R: ***Immunochemistry in practice.*** 3rd edition, Blackwell science, London, 1996, chapter 1, pp: 1-33.

18- Mostafaee A: Theoritical and Practical guidelnes of gel protein electrophoresis. ***Tazkieh publication***, Tehran, first Edition, 1999.

19- Dubey JP. and Frenkel JK: Toxoplasmosis of rats. ***A review with consideration of their value as an animal model and their possible role in epidemiology.*** Vet. Parasitol., 1998; 77(1): 1-32.

20- 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

21-Gulie DJ and Richard EH : Toxoplasmosis in *:* ***Medical parasitology. A practical approch.*** Cllespie SH., Hawkey PM. Oxfored university, 1996, pp:33-59.

22- Crowther JR: Elisa: Theory and Practice., Traslated by Abdollahi H., ***Raf Univ Med Sci Publication.*** First Edition 2004.

23- Susuki Y. and Kobayashi A: Presence of high concentration of circulating toxoplasma antigens during acute toxoplasma infection in athymic nude mice. ***Immun.,*** 1987, 55(4): 1017-18.

24- Daryani A., Hosseini AZ., and Dalimi A: Immune responses against excreted / secreted antigens of tosoplasma gondii tachyzoites in the murine model. ***Vet Parasitol,*** 2003; 113(2):123-134.

www.SID.ir