

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

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

چکیده

سابقه و هدف: با توجه به گزارشات قبلی، به نظر می‌رسد که آنتی ژنهای دفعی - ترشعی توکسوپلازما گوندی نشانگرهای مناسبی جهت استفاده در تست‌های سرولوژی برای تشخیص توکسوپلاسموزیس باشند. چون در بررسی‌های قبلی معمولاً این آنتی ژن‌ها به صورت ترکیب کامل مورد استفاده قرار گرفته‌اند، این مطالعه به منظور ارزیابی روش الایزا با استفاده از اجزای آنتی ژنهای دفعی-ترشعی تاکی زوئیت‌های توکسوپلازما گوندی، برای تشخیص توکسوپلاسموزیس صورت گرفت.

مواد و روش‌ها: ترکیب حاوی آنتی ژنهای دفعی- ترشعی حاصل از انکوباسیون تاکی زوئیت‌های توکسوپلازما در محیط کشت غیرسلولی RPMI-1640 به روش کروماتوگرافی تعویض یون تحت شیب pH، تفکیک و به روش الکتروفورز Native-PAGE شناسائی شدند. ۴۰ سرموش صحرایی نر درون زاد (Inbred) با ۷-۱۰ هفته سن و غیر آلوده به توکسوپلازما (Dye-Test منفی) انتخاب و به هر کدام ۴×۱۰۶ تاکی زوئیت توکسوپلازما از طریق داخل صفاقی تزریق و سرم روزهای ۸، ۱۵، ۲۲، ۶۰ 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 اجزای آنتی ژنهای دفعی- ترشعی 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 ۰/۴۱ 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 مورد نظر 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 توکسوپلازما و افتراق آن از روز ۶۰ آلودگی به ترتیب ۱۰۰ درصد و ۹۱ درصد می‌باشد.

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

واژه‌های کلیدی: توکسوپلاسموزیس، الایزا، آنتی ژنهای دفعی- ترشعی، توکسوپلازما گوندی

* مولف مسئول: دکتر سید حسین عبدالحی، 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

مقدمه

توکسوپلاسموزیس (Toxoplasmosis) از جمله عفونت های انگلی شایع در سراسر دنیا است که در اثر آلودگی به تک یاخته توکسوپلازما گوندی (*Toxoplasma gondii*) بروز می کند. 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 (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 می کند. گرچه تلقیح نمونه به حیوان حساس، کشت سلولی و مشاهده ارگانیزم در برش های بافتی یا گسترش تهیه شده از مایعات بدن برای تشخیص توکسوپلاسموزیس از حساسیت و ویژگی مناسب برخوردار می باشند ولی 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 (۳،۴).

تعیین آنتی بادی تولید شده علیه توکسوپلازما در سرم افراد، روش رایج تشخیص توکسوپلاسموزیس است. وجود برخی مشکلات از جمله پایداری متفاوت ایمنو گلوبولین های قابل شناسایی توسط آنتی ژن های مورد استفاده در این روش ها، بروز مثبت کاذب در اثر وجود عوامل روماتوئیدی و آنتی بادی های طبیعی، تفسیر نتایج این آزمایشات و اعلام نظر قطعی در این باره را مشکل می کنند. اکثر این مشکلات را به آنتی ژن های مورد استفاده در تست های طراحی شده برای این منظور نسبت می دهند، علاوه بر این، تشخیص

و افتراق فرم مزمن از فرم حاد بیماری با این روش ها، مستلزم چند بار آزمایش سرم با فاصله زمانی می باشد که این موضوع در مورد تشخیص آلودگی در خانم های باردار اهمیت زیاد دارد، زیرا ممکن است در فاصله زمانی تعیین آلودگی، انگل به جنین منتقل شود (۵-۷). بررسی های زیادی به منظور شناسایی ترکیباتی از توکسوپلازما جهت استفاده بعنوان آنتی ژن در تست های سرولوژی طراحی شده برای تشخیص توکسوپلاسموزیس به منظور برطرف شدن مشکلات فوق صورت گرفته است (۸) در این رابطه توجه محققین به آنتی ژن های دفعی - ترشحی (Excreted/Secreted antigens) تاکی زوئیت های توکسوپلازما 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 توکسوپلازما گوندی دارای ارزش تشخیصی بالایی برای تشخیص توکسوپلاسموزیس در موش صحرایی می باشد (۹). مطالعات کازاپون و همکاران (۱۹۹۴) نشان داد که برخی از آنتی ژن های دفعی ترشحی توکسوپلازما و آنتی بادی های تولید شده علیه آنها تنها در زمان خاصی از دوره بیماری قابل شناسایی می باشند همچنین نوع، و زمان قابل شناسایی بودن ایمنو گلوبولین های IgE IgM و IgA و تولید شده علیه این آنتی ژنها در سرم موش های آلوده به سویه های مختلف توکسوپلازما متفاوت می باشد (۱۰). الساندر و همکاران (۲۰۰۲) گزارش کردند که ترکیب دفعی - ترشحی ۹۷ کیلودالتونی از تاکی زوئیت های توکسوپلازما، در فاز حاد توکسوپلاسموزیس، IgG و IgM ولی در مرحله مزمن تنها IgG را شناسایی می کند بنابراین بعنوان یک نشانگر مناسب برای استفاده در تست های تشخیصی قابل

بررسی می‌باشد (۱۱). یاماموتو و همکاران (۱۹۹۸) گزارش کردند که ترکیبات آنتی‌ژنی موجود در مایع صفاق موش آلوده به توکسوپلازما گوندی (رسوب سولفات آمونیوم اشباع ۸۰ درصد - ۳۰ درصد) IgG, IgM, IgA ضد توکسوپلازما را در سرم انسان شناسایی می‌کنند و کاربرد آنها به عنوان آنتی‌ژن در تست‌های سرولوژی قابل بررسی می‌باشند (۱۲). در بین تکنیک‌های قابل استفاده برای تعیین آنتی‌بادی ضد توکسوپلازما در سرم با بکارگیری آنتی‌ژن‌های دفعی - ترشچی، 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 نسبتاً 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. با توجه به پایین بودن مقدار آنتی‌ژن‌های دفعی - ترشچی در واحد حجم، ترکیب حاوی این آنتی‌ژن‌ها 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 نسبتاً بالا است به طوری که با ۵-۱۰ نانوگرم از آنتی‌ژن نیز واکنش صورت می‌گیرد، این موضوع در رابطه با آنتی‌ژن‌های دفعی - ترشچی با توجه به کم بودن میزان نسبی آنها در ترکیب کامل نمونه‌های آنها اهمیت بیشتر دارد. با توجه به خصوصیات گزارش شده از آنتی‌ژن‌های دفعی - ترشچی توکسوپلازما، 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 - ترشچی تاکی زوئیت‌های توکسوپلازما گوندی برای تشخیص توکسوپلاسموزیس به روش الایزا در موش صحرایی صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه آنتی‌ژن

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

دو میلی‌لیتر محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰۸×۲ 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 ۱۰۰۰×g سانتریفوژ و مایع رویی آن خارج و پس از دیالیز (کیسه دیالیز با Cut off کمتر از ۱۰ کیلودالتون ساخت شرکت بیوژن، ایران)، تغلیظ و به عنوان ترکیب حاوی آنتی‌ژن‌های دفعی - ترشچی در ۲۰ درجه سانتیگراد نگهداری گردید (۱۵، ۱۶).

ترکیب حاوی E/SA حاصل از انکوباسیون تاکی زوئیت‌های توکسوپلازما 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 گرادینت ساز استفاده شد. محلول جدا کننده بافر تریس - اسید کلریدریک با pH های ۳ و ۱۰ در ظروف مربوطه در دستگاه گرادینت 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

ایزوالتریک متفاوت پروتئین های مختلف) و به همراه مایع خروجی در لوله ها جمع آوری می شد.

ستونی از ژل کربوکسی متیل سفادکس (ساخت شرکت مرک کشور آلمان) با ابعاد 15×1 سانتیمتر استفاده شد. حجم نمونه اضافه شده به ستون ۳ میلی لیتر حاوی ۳ میلی گرم پروتئین و سرعت جریان خروجی ۶۰ میلی لیتر در ساعت تعیین گردید. جداسازی تحت شیب pH (طیف تا ۱۰) صورت گرفت. سه میلی لیتر از مایع خروجی ستون در هر لوله (جمعاً ۱۰ لوله) جمع آوری و میزان جذب نوری محتوای هر لوله با استفاده از اسپکتروفتومتر (ساخت شرکت Moller-wede کشور آلمان) در طول موج ۲۸۰ نانومتر تعیین و منحنی مربوط به آنها رسم گردید. سپس محتوای لوله های مربوط به هر پیک با هم مخلوط و به مدت ۲۴ ساعت در برابر بافر تریس اسید کلریدریک ۰۵/مولار با $pH=7.4$ دیالیز و پس از تغلیظ میزان پروتئین آن به روش برادفورد محاسبه و به عنوان یک جزء محسوب گردید (۱۶،۱۷).

شناسایی اجزاء آنتی ژن های دفعی - ترششی

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

۴۰ میکرو لیتر از هر فراکشن با ۴۰ میکرو لیتر بافر نمونه به کمک سرنگ هاملتون به حفره های 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، در طول مدت الکتروفورز، آب سرد به طور دایم در اطراف صفحه ژل جریان داشت پس از رسیدن پروتئین نشانه به خط پایان صفحه الکتروفورز، ژل از صفحه جدا و با رنگ کوماسی بلو رنگ آمیزی شد. (۱۸).

تهیه نمونه های سرم:

۴۰ سر موش صحرایی نر درون زاد (Inbred) که سرم آنها از نظر وجود آنتی بادی علیه توکسوپلازما منفی بود (نقطه پایان تیتراسیون سرم آنها با روش رنگ سنجی به طریق سریال رقت کمتر از $1:32$ و به طریق تک حفره ای حداقل ۹۵ درصد تاکی زوئیت ها رنگ گرفته بودند) انتخاب و به هر کدام 4×10^6 تاکی زوئیت سویه RH توکسوپلازما به طریق داخل صفاقی تلقیح و روزهای ۸، ۱۵، ۲۲، ۶۰ از آنها خونگیری و سرم آن جدا گردید. 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 الیزا با استفاده از ترکیب حاوی E/SA (فراکشن دوم کروماتوگرافی) تهیه شده در این مطالعه آزمایش شدند (۱۲، ۱۶). نمونه سرم های قبل از آلودگی رت ها بعنوان نمونه های منفی در نظر گرفته شد. (۱۹، ۲۲).

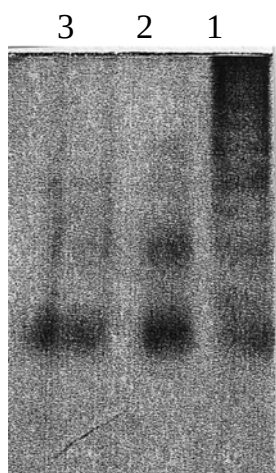
طراحی الیزا

الف: تعیین رقت مناسب کونژوگه و آنتی ژن

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

ب - تعیین رقت مناسب سرم

با روش مورد استفاده در این مطالعه از هر 2×10^8 تاکی زوئیت حدود ۱۵ میکروگرم E/SA بدست آمد و جمعاً ۱۵ میلی گرم آنتی ژن تهیه گردید. تفکیک و شناسایی آنتی ژن های دفعی - ترشحي : از کروماتوگرافی تعویض یون آنتی ژن های دفعی - ترشحي 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: الکتروفورز Native-PAGE فراکشن های 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 $1/4000$ ، رقت مناسب آنتی ژن $1/32$

(حاوی $6/25$ میکروگرم پروتئین در میلی لیتر ترکیب حاوی آنتی ژن) و رقت مناسب سرم (آنتی بادی) $1/200$ بدست آمد.

برای این منظور، سه نمونه سرم منفی و سه نمونه سرم مثبت بارقت بالا، متوسط، و پایین انتخاب و در 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 کنار هم) از سرم های مورد نظر در جهت عمودی حفره های میکروپلیت تهیه گردید در پایان میزان جذب نوری حفره های پلیت با استفاده از اسپکتروفتومتر چندکانالی در طول موج 492 نانومتر تعیین شد.

ج - تعیین Cut-off تست

در این قسمت تمام سرم های منفی (40 تا) 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 شدند پس از تعیین میزان جذب نوری حفره های پلیت با اسپکتروفتومتر چندکانالی در طول موج 492 نانومتر میانگین رقت های دوتایی نمونه محاسبه و نمودار فراوانی آنهارسم گردید همچنین میانگین و انحراف از معیار میانگین هائیز محاسبه شد ($21, 22$).

ه - انجام الایزا

در این مرحله پس از تعیین رقت مناسب کونژوگه، آنتی ژن رقت مناسب سرم، cut-off تست محاسبه و نمونه های سرم مورد نظر (سرمهای منفی، سرم روزهای 15 و 60) به روش الایزا غیر مستقیم بصورت تک رقتی آزمایش شدند (21) و باتوجه به نتایج حاصل، ویژگی و حساسیت روش مذکور برای تشخیص توکسوپلاسموزیس در موش صحرایی محاسبه گردید.

نتایج

تهیه آنتی ژن های دفعی - ترشحي

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 ۹۹ درصد اطمینان Cut-off تست عبارت است از (۲۱):

$$\text{Cut-off} = \mu + 3SD = 0/20 + 0/21 = 0/41$$

آزمایش نمونه های سرم

نتایج آزمایش نمونه های سرم روز ۱۵ آلودگی، روز ۶۰ آلودگی و سرمهای منفی به روش الیزا با استفاده از فراکشن دوم کروماتوگرافی (آنتی ژن انتخاب شده) به ترتیب در جداول ۱، ۲، ۳ آمده 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 ۱۵ آلودگی، بیشتر از cut-off تست می باشد در نتیجه با شرایط مورد نظر در این بررسی، حساسیت تست الیزا- غیرمستقیم برای تشخیص توکسوپلاسموزیس در روز ۱۵ آلودگی ۱۰۰ درصد 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 روز ۶۰ آلودگی به توکسوپلازما در مدل حیوانی مورد مطالعه ۹۱ درصد می باشد.

بحث

استفاده از آنتی ژن های غشائی و سیتوپلاسمی توکسوپلازما 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 آنتی ژن های دفعی- ترشعی توکسوپلازما 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 توکسوپلازما و یا مایع صفاق موش سفید آزمایشگاهی آلوده شده به این انگل از طریق داخل صفاقی بعنوان E/SA استفاده شده است (۱۱، ۱۲) ولی آغشته بودن آنتی ژن های دفعی- ترشعی 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 توکسوپلازما در محیط کشت غیر سلولی RPMI-1640 که توسط داری و همکاران در سال ۱۹۸۸ پیشنهاد شد استفاده کردیم زیرا علاوه بر برطرف شدن مشکل آغشتگی، زمان مورد نیاز برای تهیه آنتی ژن های دفعی- ترشعی به میزان قابل توجهی کاهش پیدا می کند (۱۵، ۱۶).

در سال ۱۹۸۷ یاسوهیروسوزوکی گزارش کرد که آنتی بادی های تولید شده علیه آنتی ژن های گردشی توکسوپلازما از روز دهم آلودگی قابل شناسایی بوده و در روز هفدهم به بالاترین میزان می رسند (۲۳). کازابون و همکاران (۱۹۹۴) این آنتی بادی ها را از روز ۱۳-۱۷ بعد از 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

تهیه نمونه سرم از اوایل آلودگی به توکسوپلازما برای مطالعه در رابطه با آنتی ژنهای دفعی ترشچی پیشنهاد کردند (۱۰). همچنین مطالعات قبلی نشان داده اند که برخی از آنتی ژنهای دفعی ترشچی توکسوپلازما 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 آیا روش الایزا تحت شرایط مورد نظر در این مطالعه با استفاده از اجزاء آنتی ژن های دفعی ترشچی قابلیت افتراق سرم مراحل مختلف توکسوپلاسموزیس را دارد، سرم روز ۱۵ بعنوان 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 ترشچی (فراکشن دوم کروماتوگرافی تعویض یون) با سرم روز ۱۵ آلودگی واکنش نشان داد ولی سرم روز ۶۰ آلودگی را شناسایی نکرد این حالت (یعنی واکنش اختصاصی فراکشنی از E/SA با سرم مرحله خاصی از توکسوپلاسموزیس) در مطالعات قبلی بندرت گزارش شده است دلایل مختلف را برای بروز این حالت می توان ذکر کرد از جمله نحوه تهیه نمونه های سرم از مراحل مختلف توکسوپلاسموزیس زیرا در بررسی های قبلی معمولاً حضور یا عدم حضور IgG و IgM اساس انتخاب سرم مراحل مختلف توکسوپلاسموزیس قرار گرفته است همانطور که قبلاً بیان شد این ایمنوگلوبولینها بخاطر پایداری متفاوت به تنهایی معیار مناسبی برای این منظور

نیستند بنابر این ما نمونه های سرم را با توجه به زمان پس از آلودگی و تغییرات تیتراژ آنتی بادی در سرم انتخاب کردیم البته این کار در رابطه با موارد انسانی مشکل تر و مستلزم صرف زمان بیشتری می باشد (۵،۶). به نظر می رسد روش مورد استفاده برای تفکیک اجزاء E/SA نیز در بروز واکنش مورد نظر موثر بوده است زیرا در اکثر مطالعات 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 برخوردار 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 (۱۲،۱۵) بنابر این ما روش کروماتوگرافی تعویض یون را که قدرت تفکیک مناسبی دارد برای این منظور بکار بردیم. روش تهیه آنتی ژن های دفعی - ترشچی بکار رفته در این مطالعه نیز در بروز واکنش اختصاصی بین سرم با فراکشن دوم حاصل از کروماتوگرافی موثر می باشد زیرا E/SA حاصل عاری از آغشتگی به پروتئین های مایع صفاق موش و یا مواد حاصل از کشت سلولی می باشد (۱۶،۱۵)

از یافته های این مطالعه استنباط می شود که روش الایزا با استفاده از آنتی ژن های دفعی ترشچی تهیه شده با روش مورد نظر (فراکشن دوم بدست آمد از کروماتوگرافی تعویض یون E/SA حاصل از انکوباسیون تاکی زوییت های توکسوپلازما در محیط غیر سلولی RPMI-1640) در این مطالعه روش مناسب (ویژگی و حساسیت نسبتاً بالا) برای افتراق سرم روز ۱۵

جدول شماره ۲: نتایج آزمایش (OD) نمونه سرم روز ۶۰ (رت های آلوده شده با توکسوپلازما) به روش الایزا با استفاده از جزء دوم کروماتوگرافی تعویض یون آنتی ژنهای دفعی-ترشمی

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

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

جدول شماره ۳: نتایج آزمایش (OD) نمونه سرم های منفی (رت های آلوده شده با توکسوپلازما) به روش الایزا با استفاده از جزء دوم کروماتوگرافی تعویض یون آنتی ژنهای دفعی-ترشیمی

شماره نمونه	OD	شماره نمونه	OD	شماره نمونه	OD
۱	۰/۲۹	۱۲	۰/۲۱	۲۳	۰/۲۲
۲	۰/۳۴	۱۳	۰/۱۳	۲۴	۰/۱۹
۳	۰/۱۸	۱۴	۰/۲۱	۲۵	۰/۱۵
۴	۰/۱۸	۱۵	۰/۲۱	۲۶	۰/۱۸
۵	۰/۲۶	۱۶	۰/۱۸	۲۷	۰/۱۲
۶	۰/۱۲	۱۷	۰/۱۸	۲۸	۰/۴۳
۷	۰/۲۵	۱۸	۰/۳۲	۲۹	۰/۳۴
۸	۰/۱۶	۱۹	۰/۱۴	۳۰	۰/۲۷
۹	۰/۱۵	۲۰	۰/۲۳	۳۱	۰/۱۵
۱۰	۰/۱۳	۲۱	۰/۱۹	۳۲	۰/۱۵
۱۱	۰/۱۷	۲۲	۰/۱۶	۳۳	۰/۱۲

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

از روز ۶۰ آلودگی به توکسوپلازموزیس در موش صحرایی به نظر می رسد و ممکن است در رابطه با تشخیص فرم حاد از مزمن توکسوپلازموزیس 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 سرم های روز ۱۵ (رت های آلوده شده با توکسوپلازما) به روش الایزا با استفاده از جزء دوم کروماتوگرافی تعویض یون آنتی ژن های دفعی - ترشیمی

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 ۴۰، ۴۱، ۴۲ بدون آنتی ژن بوده اند (کنترل منفی)

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 importance 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 Zavarani 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: Kinetics 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.
- 11-Alessandra C, Maria A, Jose R. Detection of antibodies to the 97KDa component of toxoplasma gondii in samples of human serum. *Mem Inst Oswaldo*. Cruz, Rio. De Janeiro, 2002, 97(7): 1009-1013.
- 12- Yamamoto YL., Mineo JR., Meneghiss CS. and Kwaraba 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 characterization 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.

- 15-Darcy F., Deslee D., Santoro F., Decoster A., Duquesne 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 tachizites. **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- Mostafae A: Theoretical 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., Aspöck 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 approach**. Cllespie SH., Hawkey PM. Oxford 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.