Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences and Health Services
Vol. 35, No. 2, Jun. – Jul. 2013, Pages: 18-23

Design and Preparation of ELISA Avidity Kit and Comparing It with Commercial ELISA AVIDITY Kit in Detection of Toxoplasma Gondi Antibody in Serum and Amniotic Fluid Samples

Ehsan Shariat Bahadory[1], Javid Sadraie[1], Vajihe Marsousi[2], Somayyeh Mosavipoor[3]

[1]Department of Parasitology, School of Medicine, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran
[2]Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[3]Department of Nursing, School of Nursing, University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 7 Sep, 2012 Accepted: 8 Dec, 2012

Abstract

Backgrounds and Objectives: Toxoplasmosis is a parasitic disease and its main way of transmission is placenta to fetus pathway. If this transmission occurs in the 3th month of pregnancy consequences such as abortion, central nerve system abnormality and ocular disorder may happen. Because of this issue, the precise detection of Toxoplasma Antibodies such as as IgG and IgM has utmost importance that contains ELISA & ELISA AVIDITY.

Materials and Methods: In this survey the serum and amniotic fluid samples that were collected from 48 pregnant women were collected and measurements were performed by ELISA AVIDITY kit.

Results: The results of this study showed that the ELISA AVIDITY techniques able to detect the toxoplasma infection and its temporal occurrence.

Conclusion: In ELISA technique the only antibody that could be detected precisely is IgM; but in this new technique IgG antibody also is detected, and enable us to better estimate the transmission time during the pregnancy.

Keywords: Toxoplasma gondii, ELIS, ELISA AVIDITY, Amniotic fluid, IgG antibody

*Corresponding author:
E-mail: E_Shari2000@yahoo.com

مقاله پژوهشی

طراحی و تهیه کیت الایزا اویدیتی و مقایسه آن با روش الایزا در تشخیص *توکسوپلاسما گوندی* بر روی نمونه‌های سرمی و مایع آمنیوتیک

احسان شریعت بهادری: گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، تهران، ایران

E-mail: E_Shari2000@yahoo.com

جاوید صدرائی: گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، تهران، ایران
وجیهه مرصوصی: گروه زنان و زایمان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
سمیه موسوی پور: گروه پرستاری، دانشکده پرستاری، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

دریافت: ۹۱/۶/۱۷ پذیرش: ۹۱/۹/۱۸

چکیده

زمینه و اهداف: 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. توکسوپلاسموزیس مادرزادی چنانچه در سه ماهه اول بارداری رخ دهد به سقط جنین و اختلالات اعصاب مرکزی و چشمی منجر می‌شود. لذا روشهای تشخیصی دقیق در بررسی زنان مبتلا به عفونت توکسوپلاسموزیس حائز اهمیت می‌باشد که شامل روشهای سرولوژی مانند الایزا والایزا اویدیتی هستند.

مواد و روش‌ها: در این مورد از طراحی یک روش دستی الایزا اویدیتی و بررسی و مقایسه نتایج آن با روش تجاری الایزا اویدیتی رایج در آزمایشگاه‌های مختلف استفاده گردیده است. نمونه‌های سرمی و مایع آمنیوتیک از ۴۸ مادر بارداری که سابقه سقط جنین داشته‌اند در بیمارستان شریعتی تهران جمع آوری گردید. برای مقایسه، یک روش الایزای اویدیتی به طریق دستی نیز در دانشگاه تربیت مدرس طراحی گردید. بررسی های آماری با نرم افزار Spss نسخه ۱۹ صورت گرفت.

یافته‌ها: نتایج روش الایزا نشان داد که در بیشتر مادران مورد مطالعه، عفونت توکسوپلاسموزیس اخیرا رخ داده است.

نتیجه‌گیری: تفسیر این مقایسه حاکی از آن است که در تشخیص انگل توکسوپلاسما گوندی روش الایزا تنها آنتی بادی IgM را به خوبی اندازه گیری می‌کند اما در روش الایزا اویدیتی هردو آنتی بادی IgM وIgG به درستی قابل اندازه گیری است، همچنین روش الایزا اویدیتی زمان ابتلای مادر به انگل توکسوپلاسما گوندی را تعیین می‌کند.

کلید واژه ها: توکسوپلاسما گوندی، الایزا، الایزا اویدیتی، مایع آمنیوتیک، آنتی بادی IgG

مقدمه

یکی از روشهای تشخیصی توکسوپلاسموزیس مادرزادی روش الایزا است که با نتایج مثبت کاذبی همراه می‌باشد. امروزه روشی جدیدتر برای تشخیص این بیماری در مادران استفاده می‌شود که روش الایزا اویدیتی نام دارد که هم آنتی بادی علیه انگل و هم زمان ابتلاء به عفونت را مشخص می‌کند (۱,۲). تاکنون طیف وسیعی از گونه‌های توکسوپلاسما جدا شده است ولی به نظر میرسد فقط یک گونه از آن قادر به بیماری زایی در انسان باشد. 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 متعددی است. اجتماع تاکی زوئیت‌ها می‌تواند سلول را کاملا اشغال کرده و با ایجاد یک غشاء در اطراف خود تبدیل به یک کیست گردد (۱,۲). در مرحله کیستی انگل برادی زوئیت نامیده شده و به لحاظ متابولیسم آرام است. شواهد موجود نشان می‌دهند که از لحاظ آنتی ژنی تاکی زوئیت و برادی زوئیت با یکدیگر متفاوت هستند. کیست‌ها محتوی ۵۰ تا چندین هزار برادی زوئیت بوده و قطر آنها از ۱۰ تا ۱۰۰ میکرون متفاوت است. در سلولهای اپی تلیال گربه اشکال متنوعی وجود دارد که سرانجام تبدیل به گامتوسیت‌های نر و ماده می‌شوند. ماکروگامتها بارور رشد کرده و تبدیل به ااسیستهای گرد می‌گردند. ااسیستها سلولهای اپی تلیال گربه را پاره کرده و به هنگام دفع با مدفوع گربه ۱۰ الی ۱۳ میکرون قطر دارند (۱,۲). دیواره ااسیستها دوجداره بوده و محتوی مواد تقسیم نشده است ولی این مواد پس از چند روز از دفع ااسیست تبدیل به ۲ اسپوروسیست می‌شوند. هر اسپوروسیست به نوبه خود دارای ۴ اسپوروزئیت است (۵-۳). به طور کلی روش رایج امروزی برای تشخیص توکسوپلاسموزیس مادرزادی شامل روشهای الایزا و الایزا اویدیتی است که در روش الایزا، آنتی بادی‌های IgG و IgM و در روش الایزا اویدیتی زمان ابتلاء به انگل *توکسوپلاسما گوندی* مشخص می‌گردد (۸-۶).

مواد و روش‌ها

یکی از ابزارهای الایزای اویدیتی کشف مراحل حاد یا مزمن بیماریهای عفونی مانند توکسوپلاسما گوندی است. بعضی مواقع به دلایل مختلف ارزیابی صرفا IgM برای مراحل حاد توکسوپلاسما گوندی مفید نیست که از آن جمله می‌توان به پاسخ‌های طولانی مدت IgM و تاخیر در تولید این آنتی بادی و یا پاسخ‌های غیراختصاصی پلی کلونال IgM علیه فاکتورهای گوناگون نام برد. در سالهای اخیر کشف روش الایزای اویدیتی در بررسی عفونت‌های اخیر با انگل توکسوپلاسما گوندی راهکاری مناسب برای این موضوع است که فقط به ارزیابی آنتی بادی از کلاس IgG می‌پردازد. در اوایل عفونت مقدار آنتی بادی IgG در اتصال به آنتی ژن در حالت LOW AVIDITY قرار دارد و با ادامه عفونت تمایل آنتی بادی مذکور برای آنتی ژن انگل توکسوپلاسما گوندی افزایش یافته و در حالت HIGH AVIDITY قرار می‌گیرد که نشانه عفونت طولانی مدت می‌باشد. محتویات کیت مورد آزمایش باید در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی‌گراد ذخیره سازی شوند و نباید در حالت فریز قرار گیرند. باید حتما به تاریخ انقضای کیت مورد آزمایش دقت شود. تمامی محتویات کیت مورد آزمایش بایستی 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 بایستی به آرامی تکان داده شوند. کلیه کنترل‌ها و کالیبراتورهای این روش از نظر تستهای HIV و HBS مورد آزمایش قرار گرفته‌اند و از این از نظر مصون هستند ولی کلیه نکات ایمنی در هنگام کار کردن با این کیت می‌بایست لحاظ شود. نمونه مورد استفاده در این آزمایش سرم خون انسانی و یا پلاسمای تهیه شده با مواد ضد انعقاد مانند EDTA,HEPARIN,CITRATE بدست آمده است. کلیه نمونه‌ها در این روش فقط تا مدت زمان ۱۴ روز قابل استفاده است و نمونه‌های رقیق شده در همان روز بایستی مورد آزمایش قرار گیرند. کیت مورد استفاده در این آزمایش دارای ماده سمی سدیم آزید است که از تماس مستقیم با پوست جدا باید خود داری شود. در این روش از کلیه نمونه‌هایی که دارای مقادیر کافی آنتی بادی IgG علیه انگل توکسوپلاسما گوندی است می‌توان استفاده کرد که از آن جمله می‌توان مایع آمنیوتیک را نام برد که با روش آمنیوسنتز از مادران باردار دارای سقط جنین مکرر که احتمال وجود آنتی بادی IgG علیه انگل توکسوپلاسما گوندی را دارند بدست می‌آید. کلیه نمونه‌ها بایستی به میزان ۱: ۱۰۱ رقیق شوند که شامل ۱۰ لاندا سرم یا مایع آمنیوتیک و ۱ سی سی رقیق کننده تست می‌باشد (بافر رقیق‌کننده) و باید کاملا مخلوط گردند.

جهت بررسی توکسوپلاسموزیس از کیت الایزا اویدیتی طراحی و ساخته شده در آزمایشگاه انگل شناسی و کیت آماده و تجاری الایزا اویدیتی که بر اساس روشهای آنزیماتیک عمل می‌کنند و برای روش الایزا از کیت آماده داخلی استفاده گردید. تعداد ۴۸ نمونه سرم و مایع آمنیوتیک از زنان ۲۰ تا ۴۵ ساله‌ای که دارای آنتی بادی علیه انگل توکسوپلاسما می‌باشند تهیه شد که این نمونه‌ها اکثرا از بیمارستان شریعتی تهران و تعدادی از مرکز ناباروری ابن سینا و آزمایشگاه پاتوبیولوژی مرکزی تهران جمع آوری شدند. روشهای آزمایش شامل روش الایزا و الایزا اویدیتی بود. کیت آماده مورد استفاده در این آزمایشات کیت یوروایمیون نام دارد که بر اساس روشهای آنزیماتیک عمل می‌کند. برای جمع آوری نمونه‌ها ابتدا مادرانی که دارای که دارای سابقه سقط جنین و دارای تیترهای آنتی بادی علیه انگل توکسوپلاسما گوندی بودند شناسایی شده و نمونه مایع آمنیوتیک آنها در بیمارستان توسط متخصص زنان و زایمان جمع آوری و سپس همزمان نمونه خون آنها تهیه شد و هردوی این نمونه‌ها با ثبت تاریخ و مشخصات بیمار از لحاظ سن، تعداد سقط‌های جنین، سابقه تماس با گربه و حتی المقدور منطقه سکونت آنها به صورت پرسشنامه‌ای ساده تهیه شد و نمونه‌ها سرم و مایع آمنیوتیک آنها بلافاصله در یخچال ۲۰ درجه سانتیگراد، فریز گردید. کلیه نمونه‌ها بایستی در عرض حداکثر یک هفته مورد آزمایش قرار می‌گرفتند. بررسی های آماری با نرم افزار spss نسخه ۱۹ صورت گرفت.

روش طراحی کیت الایزا اویدیتی

مایع صفاق موش‌های سفید کوچک آزمایشگاهی که ۷ روز قبل با تاکی زوئیت‌های انگل *توکسوپلاسما گوندی* (10^6تاکی زوئیت در هر میلی‌لیتر) به روش تلقیح داخل صفاقی آلوده شده بودند، آسپیره گردید و با دور g۱۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و سپس مایع رویی به عنوان ترکیب آنتی ژن‌های دفعی ترشحی استخراج گردید. برای این عمل نمک سولفات آمونیوم به تدریج به ظرف حاوی مایع صفاق موش اضافه گردید و یک شب در یخچال و بعد از آن به مدت ۳۰ دقیقه در دور g۱۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. سپس 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 تعیین گردید. آنگاه در ویال‌های درپیچ دار تقسیم و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد و در حضور آنتی بیوتیک 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 (۱۳-۹). در روش پوشش‌دهی آنتی ژن‌های انگل از بافر PBS به عنوان بافر پوشش‌دهنده و از بافر PBS و توئین ۸۰ به همراه سرم آلبومین گاوی به عنوان بافر مسدود کننده استفاده گردید. برای تعیین غلظت پروتئین از روش برادفورد با استفاده از رنگ کوماسی بریلینت بلو (کلریمتری) استفاده گردید و با توجه به منحنی استاندارد موجود در کیت مورد آزمایش غلظت پروتئین‌های موجود در سوسپانسیون تهیه شده از صفاق موش، تعیین گردید. برای عمل پوشش دهی نیاز به انکوباسیون ۲۴ ساعته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و برای عمل مسدود کردن نیاز به انکوباسیون ۱ ساعته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بود. برای تعیین نقطه برش (cut off) کیت تهیه شده از بافرهای NAKCN و بافر Pnpp (پارانیتروفنیل فسفات) در دی اتانول آمین استفاده گردید. تست استاندارد مورد استفاده در این آزمایشات روش الایزای ساده بود.

یافته‌ها

محاسبه نتایج حاصل از روش نیمه کمی الایزای اویدیتی (رابطه ۱):

$$\frac{\text{OD حاصل از کنترل یا نمونه‌های بیماران}}{\text{OD حاصل از کالیبراتور ۲ (CAL2)}}$$

در صورتیکه نسبت فوق کمتر از ۰/۸ باشد نتیجه منفی، اگر بین ۰/۸ تا ۱/۱ نتیجه در حد مرز و اگر نتیجه بالاتر از ۱/۱ باشد نتیجه الایزا اویدیتی مثبت است.

محاسبه نتایج با روش کمی الایزا اویدیتی (رابطه ۲):

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

عدد حاصله در عدد ۱۰۰ ضرب می‌شود که نتیجه نهایی به صورت درصد بیان می‌شود و تحت عنوان RIA بیان می‌گردد. اگر RIA کمتر از ۴۰٪ باشد نشانه LOW AVIDITY ANTIBODY است و اگر RIA بین ۴۰٪ تا ۶۰٪ باشد نشانه INTERMEDIATE AVIDITY، و اگر بالاتر از ۶۰٪ باشد نشانه HIGH AVIDITY ANTIBODY علیه انگل توکسوپلاسما گوندی است. روش نیمه کمی الایزا اویدیتی فقط مثبت یا منفی بودن وجود آنتی بادی را بررسی می‌کند و در این آزمایش به علت اینکه نمونه‌های مورد آزمایش همگی تفکیک شده بودند و از لحاظ آنتی بادی IgG علیه *توکسوپلاسما گوندی* مثبت بودند از لحاظ تست نیمه کمی الایزا اویدیتی نیز مثبت می‌باشند، ولی گاهی ممکن است آزمایش الایزای ساده یک بیمار از لحاظ آنتی بادی IgG علیه *توکسوپلاسما* مثبت باشد اما نتیجه اویدیتی وی منفی گردد که به علت نتایج کاذب و مداخله کننده علیه بیماریهای دیگر مانند آرتریت روماتوئید، لوپوس سیستمیک و برخی عفونت‌های دیگر باشد. به عبارت دیگر نتیجه مثبت الایزا اویدیتی نیمه کمی یک مادر باردار قطعا وجود آنتی بادی IgG علیه انگل توکسوپلاسما گوندی را تایید می‌کند. در کلیه مادران مورد بررسی تست الایزای ساده از نظر IgG مثبت بوده و میانگین الایزای اویدیتی نیمه کمی آنها نیز نشان دهنده وجود آنتی بادی IgG حقیقی توکسوپلاسمایی در سرم آنها می‌باشد. در روش الایزا اویدیتی کمی علاوه بر مثبت بودن آزمایش از نظر عفونت توکسوپلاسموزیس، زمان ابتلاء مادر هم مشخص می‌گردد.

همانگونه که در جدول ۱ و ۲ مشاهده می‌گردد میانگین تیتر اویدیتی در هر دو حالت کمی و نیمه کمی با افزایش تعداد سقط جنین در مادران باردار افزایش می‌یابد. به طور مثال در جدول ۱ میانگین تیتر اویدیتی نیمه کمی مادران با سابقه ۱ بار سقط جنین ۱/۸۷ و همین میانگین در مادران با سابقه ۴ بار سقط جنین به ۲/۷۸ می‌رسد یا به طور مثال در جدول ۲ میانگین تیتر اویدیتی کمی مادران با سابقه ۱ بار سقط جنین ۴۵٪ است در حالیکه همین میانگین در مادران با سابقه ۴ بار سقط جنین به ۶۷٪ می‌رسد که نشان می‌دهد تیتر IgG آنتی بادی علیه انگل توکسوپلاسما با افزایش تعداد سقط جنین، سیر صعودی دارد. تمامی این میانگین‌های تیترهای اویدیتی در زمانی که کیت مورد نظر به صورت دستی در آزمایشگاه طراحی می‌گردد، افزایش محسوسی را نشان می‌دهد که می‌تواند به علت تازگی آنتی ژن انگلی تهیه شده در آزمایشگاه یا به علت سوش RH استاندارد انگل توکسوپلاسما باشد. به طور مثال میانگین تیتر اویدیتی نیمه کمی در مادران با سابقه ۱ بار سقط جنین با کیت خارجی ۱/۸۷ است در صورتیکه همین میانگین با کیت طراحی شده داخلی ۱/۹۸ می‌باشد. نمونه‌های مورد بررسی فوق، مایع آمنیوتیک بودند.

جدول ۱: مقایسه میانگین‌های نتایج اویدیتی نیمه کمی مایع آمنیوتیک در زنان دارای سقط جنین مبتلا به توکسوپلاسموزیس

تعداد سقط جنین	میانگین تیتر اویدیتی نیمه کمی مایع امنیوتیک با کیت خارجی	میانگین تیتر اویدیتی نیمه کمی مایع امنیوتیک با کیت
۱ بار	۱/۸۷	۱/۹۸
۲ بار	۱/۹۵	۲/۱۱
۳ بار	۲/۲۷	۲/۴۶
۴ بار	۲/۷۸	۲/۹۶

جدول ۲: مقایسه میانگین‌های نتایج اویدیتی کمی مایع آمنیوتیک در زنان دارای سقط جنین مبتلا به توکسوپلاسموزیس

تعداد سقط جنین	میانگین تیتر اویدیتی کمی مایع امنیوتیک با کیت خارجی	میانگین تیتر اویدیتی کمی مایع امنیوتیک با کیت طراحی شده
۱بار	٪۴۵	٪۴۸
۲بار	٪۵۲	٪۵۸
۳بار	٪۵۹	٪۶۴
۴بار	٪۶۷	٪۷۱

جدول ۳: مقایسه میانگین‌های نتایج اویدیتی نیمه کمی سرم در زنان دارای سقط جنین مبتلا به توکسوپلاسموزیس

تعداد سقط جنین	میانگین تیتر اویدیتی نیمه کمی سرم با کیت خارجی	میانگین تیتر اویدیتی نیمه کمی سرم با کیت طراحی شده
۱بار	۲/۳۵	۲/۵۶
۲بار	۲/۹۲	۳/۲۳
۳بار	۳/۱۳	۳/۵۴
۴بار	۳/۴۵	۳/۹۳

جدول ۴: مقایسه میانگین‌های نتایج اویدیتی کمی سرم در زنان دارای سقط جنین مبتلا به توکسوپلاسموزیس

تعداد سقط جنین	میانگین تیتر اویدیتی کمی سرم با کیت خارجی	میانگین تیتر اویدیتی کمی سرم با کیت طراحی شده
۱بار	٪۶۵	٪۶۸
۲بار	٪۶۷	٪۶۹
۳بار	٪۶۹	٪۷۳
۴بار	٪۷۲	٪۷۸

همانگونه که جداول ۳ و ۴ نشان می‌دهند میانگین تیتر اویدیتی نیمه کمی و کمی در مادران مبتلا به توکسوپلاسموزیس با افزایش سقط جنین، مشابه دو جدول قبلی، افزایش می‌یابد. در این دو جدول، نمونه مورد بررسی، نمونه سرم خون مادران مبتلا به توکسوپلاسموزیس است. در جدول ۳ که میانگین‌های اویدیتی نیمه کمی را نشان می‌دهد، در مادران با سابقه ۱ بار سقط جنین میانگین اویدیتی نیمه کمی ۲/۳۵، در حالیکه در همین جدول میانگین اویدیتی نیمه کمی مادران با سابقه ۴ بار سقط جنین۳/۴۵ می‌باشد، یا به طور مثال میانگین اویدیتی کمی (جدول۴) در مادران

با سابقه ۱ بار سقط جنین ۶۵٪ در حالیکه همین میانگین اویدیتی کمی در مادران با سابقه ۴ بار سقط جنین به ۷۲٪ میرسد. در هر دو جدول این مطلب مهم است که میانگین‌های تیتر اویدیتی نیمه کمی و کمی در زمانی که کیت مورد آزمایش به طور دستی در آزمایشگاه طراحی می‌گردد، افزایش محسوسی را نشان می‌دهند که علل این امر یا به علت استفاده سوش RH انگل و یا به علت تازگی آنتی ژن مورد بررسی (آنتی ژن توکسوپلاسما) می‌باشد.

بحث

در تشخیص توکسوپلاسما گوندی روشهای مختلف برای اهداف متنوعی استفاده می‌شوند.

۱-یافتن روش تشخیصی مطمئن با دقت بالا در عفونت با توکسوپلاسما گوندی.

۲- بررسی مقایسه‌ای روش الایزا اویدیتی و الایزا از نظر تشخیص توکسوپلاسما گوندی.

۳- بررسی مقایسه‌ای کیت الایزا اویدیتی تهیه شده به روش دستی و کیت آماده الایزا اویدیتی در تشخیص توکسوپلاسموزیس (۱۶-۱۴).

۴-یافتن نمونه مناسب برای تشخیص انگل *توکسوپلاسما گوندی*.

در تشخیص توکسوپلاسموزیس مادرزادی یافتن آنتی بادی با تیتر مناسب برای عملکرد درمانی مهم است. چه بسا بسیاری از آزمایشگاه‌های تشخیص بالینی جواب بیماران را برای این بیماری به پزشک مربوطه گزارش می‌کنند، لیکن بسیاری از این نتایج قابل اعتماد نبوده و پزشک یا درمانگر را مجبور به استفاده از روشهای پاتولوژی یا رادیولوژی برای تایید نهایی بیماری می‌نماید (۱۸-۱۶).

۵- یافتن زمان مناسب برای ابتلای جنین به انگل *توکسوپلاسما گوندی* که این زمان در درمان نوزاد به دنیا آمده با علائم توکسوپلاسموزیس بسیار مفید است.

مثلا ابتلای جنین در سه ماهه اول ممکن است نوزاد را به علائم میکروسفالی یا هیدرو سفالی مبتلا کند اما ابتلای جنین در سه ماهه سوم بارداری بیشتر با اختلالات چشمی و کوریورتینیت همراه است و این نکته فقط در روش الایزای اویدیتی لحاظ می‌گردد.

۶-زمان ابتلای مادر به انگل *توکسوپلاسما گوندی* در روش الایزای اویدیتی تا حدود زیادی تعیین می‌گردد.

در حالتهای اویدیتی پایین ابتلای مادر در زمانهای خیلی دور است اما در حالت اویدیتی بالا ابتلای مادر در همین اواخر می‌باشد.

۷- تفسیر آزمایش در الایزای اویدیتی برای پزشک راحت‌تر است، زیرا نتایج الایزای اویدیتی نتایج با حدود اطمینان ۹۰ درصد برای آنتی بادی علیه انگل *توکسوپلاسما گوندی* است.

۸-در روش الایزای ساده در تشخیص توکسوپلاسموزیس نتایج مثبت کاذب فراوان است مانند آنتی بادی در بیماران سیستمیک لوپوس و یا آرتریت روماتوئید اما در الایزای اویدیتی این موضوع مرتفع شده است و نتایج مثبت کاذب وجود ندارد (۱۸).

اگر در بررسی انگل *توکسوپلاسما گوندی*، نمونه سرمی مد نظر است این مقایسه نشان داد که روش ELISA و ترجیحا ELISA AVIDITY از دقت بالایی برخوردار می‌باشد. در نمونه‌های مایع آمنیوتیک، روش PCR از دقت بالایی برخوردار است (۱۸-۱۶).

به طور کلی روش تشخیص انگل *توکسوپلاسما گوندی* شامل روش‌های الایزا و الایزای اویدیتی می‌باشد و در بحث نمونه‌های مورد آزمایش، نمونه سرمی تازه بدست آمده از زنانی که دارای سابقه سقط مکرر جنین می‌باشند، ابتدا با روش الایزا و سپس در صورت مثبت بودن، با روش الایزای اویدیتی در تشخیص زمان ابتلای به عفونت مهم است و اگر این کیت آزمایش به روش دستی طراحی گردد، این مقدار آنتی بادی از غلظت بالاتری برخوردار خواهد بود.

ورود انگل *توکسوپلاسما* به بدن انسان باعث افزایش یکسری از آنتی بادی‌های مهم از جمله IgG و IgM می‌شود (۱۸-۱۶).

آنتی بادی IgM *توکسوپلاسما گوندی* در مرحله حاد عفونت ساخته می‌شود و وجود آن در سرم خون قطعا وجود انگل را ثابت می‌کند. چنانچه این آنتی بادی با عیار قابل ملاحظه وجود داشته باشد باید روش DYE TEST روی دو نمونه از سرم مادر به فاصله ۳ هفته انجام گردد، 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- عیار بالای DYE TEST ۳- وجود آنتی بادی IgM.

در عفونت مزمن توکسوپلاسموزیس بررسی IgG *توکسوپلاسما گوندی* حائز اهمیت است در بعضی از روشهای آزمایشگاهی مثبت بودن این آنتی بادی IgG ضد *توکسوپلاسما گوندی* فقط دال بر مثبت بودن آزمایش نیست و نیاز به آزمایشات تکمیلی مانند الایزا اویدیتی می‌باشد (۱۷). البته روش الایزا اویدیتی چندین مزیت دارد که اولا مثبت بودن آن دلیل قطعی بر وجود آنتی بادی علیه انگل *توکسوپلاسما گوندی* است و ثانیا زمان ابتلای مادر باردار به این انگل را نیز تا حدود زیادی مشخص می‌کند (۲۱-۱۹).

نتیجه‌گیری

در این مطالعه نشان داده شد برای تشخیص IgG *توکسوپلاسما گوندی* به روش الایزا اویدیتی، نمونه سرم خون بیماران نسبت به مایع آمنیوتیک ارجحیت دارد که علت آن مقدار و کمیت بالاتر آنتی بادی ضد انگل *توکسوپلاسما گوندی* در نمونه سرم می‌باشد. چنانچه به ناچار برای تشخیص توکسوپلاسموزیس مادرزادی، نمونه ارسالی به آزمایشگاه فقط نمونه مایع آمنیوتیک باشد می‌توان از روشهای مولکولی مانند PCR استفاده کرد، که این یک روش متداول برای تشخیص توکسوپلاسموزیس مادرزادی نمی‌باشد. یکی دیگر از روشهای تشخیص آنتی بادی *توکسوپلاسما گوندی* روش IFA است که روشی رایج می‌باشد. روشهای الایزای ساده و ایمنوفلورسانس برای تشخیص توکسوپلاسموزیس مادرزادی با نتایج مثبت کاذبی همراه است که در بیماریهایی مانند آرتریت روماتوئید و لوپوس سیستمیک دیده می‌شود که برای حذف این نتایج کاذب از

روشهای الایزا اویدیتی استفاده می‌شود. پس نتیجه گیری می‌شود که روش الایزا اویدیتی در تشخیص توکسوپلاسموزیس مادرزادی روش مناسب‌تری نسبت به الایزای ساده است که علت آن حذف نتایج مثبت کاذب در الایزا اویدیتی می‌باشد و همچنین نتایج این آزمایش با کیت طراحی شده داخلی نسبت به کیت آماده خارجی، نتایج قابل قبول‌تری بود که علت آن اولا به دلیل تازگی آنتی ژنهای انگل *توکسوپلاسما* و ثانیا به دلیل داخلی و ایرانی بودن سوش مورد استفاده در این بررسی بود.

پیشنهادات

پیشنهاد می‌گردد برای دستیابی به نتایج بهتر در تشخیص توکسوپلاسموزیس مادرزادی از روش الایزا اویدیتی استفاده گردد.

تقدیر و تشکر

از کلیه کارکنان بخش سونوگرافی بیمارستان شریعتی تهران، آزمایشگاه ابن سینا و مدیریت محترم گروه انگل شناسی دانشگاه تربیت مدرس جناب آقای دکتر صدرائی، تشکر و قدردانی می‌نمایم.

References

1. Horiuchi K, Yabe I, Tajima Y, Kondo T, Takizawa Y. A case of toxoplasma encephalopathy with specific MRI findings diagnosed by IgG avidity index and nested PCR. *Parasites & Vector Journal* 2010; **50**(4): 252-256.
2. Webster JP. Review of "Toxoplasmosis of Animals and Humans. *Parasites & Vector Journal* 2010; **112**(3): 1-2.
3. Song KJ, Shin JC, Shin JH, Nam HW. Seroprevalence of toxoplasmosis in Korean pregnant women. *KJP* 2005; **43**(2): 69-71.
4. 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. *KJP* 2009; **47**(2): 125-130.
5. Borkakoty BJ, Borthakur AK, Gohain M. prevalence of Toxoplasma gondii amongst pregnant women in Assam India. *Indian Journal of Medical Microbiology* 2007; **25**(4): 431-432.
6. Sanad MM, Al olayan EM. Toxoplasma gondii strategy for intracellular survival; is it still enigmatic. *Research Journal Parasitology* 2011; **1**(1): 1-14.
7. Quan JH, Hassan HA, Cha GH, Shin DW, Lee YH. Antigenemia and Specific IgM and IgG Antibody Responses in Rabbits Infected with Toxoplasma gondii. *KJP* 2009; **47**(4): 409-412.
8. Hide G, Morley EK, Hughes JM, Gerwash O, Elmahaishi MS. Evidence for high levels of vertical transmission in Toxoplasma gondii. *Parasitology Journal of Cambridge University* 2009; **136**: 1877-1885.
9. Yasodhara P, Ramalakshmi BA, Sarma MKJ. A new approach to differentiate recent vs chronic toxoplasma infection Avidity ELISA in toxoplasma serology. *Indian Journal of Medical Microbiology* 2001; **19**(3): 145-148.
10. Shin EH, Chun YS, Kim WH. Immune Responses of Mice Intraduodenally Infected with Toxoplasma gondii KI-1 Tachyzoites. *KJP* 2011; **49**(2): 115-123.
11. Daryani A, Zavaran Hosseiny A, Dalimi A. Immune responses against excreted/secreted antigens of Toxoplasma gondii tachyzoitesin the murine model. *Veterinary Parasitology* 2003; **113**: 123-134.
12. Abdolahi SH, Mohammad Kazemi AA. Design of ELISA against toxoplasma gondii IgG in human serum. *Journal of medical science in mazandaran* 2007; **62**(17): 14-20.
13. 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. *SID Journal* 2006; **3**(2): 78-85.
14. Choi SH, Kim TY, Park SG, Cha GH, Shin DW. Proteomic Analysis of Toxoplasma gondii KI-1 Tachyzoites. KJP 2010; **48**(3): 195-201.
15. Shin EH, Kim DH, Lin A, Lee JWY, Kim HJ. Evaluation of the Korean Isolate-1 Tachyzoite Antigen for Serodiagnosis of Toxoplasmosis. *Korean Journal Parasitology* 2008; **46**(1): 45-48.
16. Lin A, Shin EH, Kim TY, Park JH. Genetic characteristics of the Korean isolate KI-1 of Toxoplasma gondii. *KJP* 2005; **43**(1): 27-32.
17. Ghaemian M, Maraghi SH, Saki J, Pedram M. Determination of Antibodies (IgG, IgM) against Toxoplasma gondii in Patients with Cancer. *Iranian J Parasitology* 2007; **4**(2): 1-6.
18. Kim WH, Shin EH, Kim JL. Suppression of CD4+ T-Cells in the Spleen of Mice Infected with Toxoplasma gondii KI-1 Tachyzoites. *KJP* 2010; **48**(4): 325-329.
19. Kravetz JD, Federman DJ. Toxoplasmosis in pregnancy. *The American Journal of Medicine* 2005; **118**: 212-216.
20. Morussi Reis M, Madelena Tessaro MD, 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* 2006; **48**(2): 93-94.
21. Peyron F, Lefevre-Pettazzoni M, Wallon M, Cozon F, Bissery A. Delayed maturation of toxoplasma immunoglobulin G avidity in pregnant women impact of spiramycin treatment and gestational age. ESCMID 2007; **1**(1): 1733-1751.