بررسی میزان حساسیت و ویژگی فراکسیون‌های ایمونوژن آنتی ژن توکسوپلاسما گوندهای

هانیه پیراهش[۱]، مهدی آسمار*[۲]، ناصر قائمی [۳]، احمدرضا اسماعیلی رستاقی[۴]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی، لاهیجان، ایران، صندوق پستی: ۱۶۱۶

۲*و۴- انستیتو پاستور ایران، گروه انگل شناسی، تهران، ایران، صندوق پستی: ۱۳۱۶۹۴۳۵۵۱

۳- دانشگاه تهران، پردیس علوم، گروه بیوتکنولوژی، تهران، ایران، صندوق پستی: ۶۴۵۵- ۱۴۱۵۵

mehdiassmar@yahoo.com

چکیده

توکسوپلاسموزیس یکی از بیماری‌های مشترک انسان و حیوان (Zoonosis) است که انتشار جهانی دارد و عامل آن تک‌یاخته‌ای درون سلولی اجباری متعلق به شاخه اپی کمپلکسا می‌باشد. تشخیص بیماری به روش‌های مختلف صورت می‌گیرد که از میان آن‌ها روش‌های سرولوژی از اهمیت خاصی برخوردار است، که جهت انجام آن نیاز به تهیه آنتی ژن می‌باشد. خالص‌سازی فراکسیون‌های آنتی ژن توکسوپلاسما، تعیین وزن مولکولی و تعیین میزان آنتی ژنسیته آن می‌تواند در تولید فرآورده‌های بیولوژیکی توکسوپلاسما جهت تشخیص و پیشگیری مؤثر باشد. هدف از این مطالعه و تحقیق، آماده‌سازی و خالص‌سازی فراکسیون‌های مختلف آنتی ژن توکسوپلاسما گونده‌ای، تعیین حساسیت و ویژگی آن‌ها جهت استفاده در تست‌های سرولوژی می‌باشد. مقدار ۰/۲ میلی‌لیتر آنتی ژن توکسوپلاسما گوندی سویه RH با تعداد ۲×۱۰^{۷} تاکی زوئیت، به صفاق ۵۰ سر موش سفید کوچک آزمایشگاهی (موش سوری) تزریق و پس از ۷۲ ساعت مایع صفاق موش‌های آلوده جمع‌آوری شد. پس از مرحله سونیکاسیون، غلظت پروتئین به روش لوری محاسبه گردید. پس از رسوب آنتی ژن با سولفات آمونیوم، با استفاده از کروماتوگرافی تبادل یونی با رزین دی اتیل آمینواتیل سلولز تحت شیب Nacl فراکسیون‌ها تفکیک گردید و وزن مولکولی فراکسیون‌ها با استفاده از الکتروفورز SDS-page مشخص شد. در مرحله آخر فراکسیون‌های بدست آمده از آنتی ژن توکسوپلاسما گوندی را در داخل میکروپلیت الایزا کوت کرده و با آنتی ژن کیت خارجی مورد مقایسه قرار گرفت. از کروماتوگرافی با روش تبادل یونی آنتی ژن‌های خرد شده توکسوپلاسما گوندی، سه فراکسیون با وزن مولکولی پروتئین مشخص بدست آمد. در مقایسه مایع صفاقی موش آلوده به توکسوپلاسموز و فراکسیون‌های بدست آمده از آن با آنتی ژن کیت خارجی، آنتی ژن تام و فراکسیون‌های ۲ و۳ از حساسیت و ویژگی لازم در تشخیص سرولوژیکی توکسوپلاسما برخوردار بوده‌اند. یافته‌های تحقیق نشان می‌دهد که روش الایزا با استفاده از آنتی ژن تام توکسوپلاسما گوندی سویه RH و فراکسیون‌های حاصل از آن برای شناسایی و سنجش آنتی بادی علیه توکسوپلاسما در سرم انسانی روش مناسبی می‌باشد.

کلمات کلیدی: آنتی ژن توکسوپلاسما گونده‌ای،کروماتوگرافی تبادل یونی ، الایزا، الکتروفورز.

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

توکسوپلاسما گوندی، انگل اجباری داخل سلولی از شاخه اپی کمپلکسا می‌باشد که عامل آلودگی طیف وسیعی از مهره‌داران خونگرم است (۵و۳۰). این انگل به صورت گسترده و پراکنده در جهان وجود دارد و هیچ‌گونه حد و مرز جغرافیایی ندارد، از این‌رو انسان‌ها در معرض خطر آلودگی به این انگل هستند (۱۴). در حدود ۵۰۰ تا نفر ۱ میلیون از مردم جهان بدون علامت و نشانه بیماری به توکسوپلاسموز مزمن مبتلا هستند (۲۵). سیر این بیماری در بدن انسان شامل ۲ مرحله حاد و مزمن است، اکثر عوارض و علائم و همچنین انتقال انگل از مادر به جنین در مرحله حاد رخ می‌دهد(۸). در طول مرحله حاد بیماری تاکی زوئیت‌ها به صورت سریع تقسیم می‌شوند و در تمام سلول‌های نوکلئوتیدی نفوذ می‌یابند و در شکل واکوئل‌های پارازیتوسفری در می‌آیند. بعد از همانندسازی، سلول میزبان از بین می‌رود و تاکی زوئیت‌ها از طریق کانال‌های خون منتشر می‌شوند و می‌توانند به بسیاری از بافت‌ها مانند سیستم عصبی مرکزی، چشم، اسکلت، ماهیچه قلب، جفت حمله نمایند. تهاجم به سلول‌های اطراف منجر به بروز پاسخ ایمنی می‌شود که باعث تبدیل تاکی زوئیت‌ها به برادی زوئیت می‌شود و فرم کیست را در بافت به وجود می‌آورد و این کیست‌ها به مدت طولانی در میزبان زنده می‌مانند (۱۸و۱۹). در انسان آلودگی به این انگل در دوران بارداری منجر به سقط جنین و نقائص مادرزادی و همچنین باعث بروز آنسفالیت و بیماری‌های چشمی در افراد مبتلا به نقص سیستم ایمنی می‌شود. در حیوانات آلودگی به این انگل با علائم و نشانه‌هایی همراه است که از مهمترین آن‌ها سقط در گوسفندان می‌باشد (۱۷). این انگل در چرخه زندگی خود دارای دو مرحله جنسی و غیرجنسی می‌باشد، مرحله غیرجنسی شامل تاکی زوئیت و برادی زوئیت و مرحله جنسی شامل اووسیت همراه با ۸ اسپوروزوئیت می‌باشد (۲۷). سطح توکسوپلاسما گوندی از (GPI) گلیکوزیل فسفاتیدیل اینوزیتول پوشیده شده است که متصل به پروتئین‌های (SRSs) می‌باشد. پروتئین‌های SRS (SAG1-related sequence)، میانجی اتصال انگل به سلول میزبان و عامل بیماری‌زایی انگل در سلول میزبان و بروز پاسخ ایمنی میزبان می‌باشند (۲۵). آنالیز ژنتیکی توکسوپلاسما گونده‌ای ۱۶۱ واحد از پروتئین SRS را نشان می‌دهد. توکسوپلاسما دارای ساختار پروتئینی آدهین برای ورود به سلول میزبان می‌باشد. این آدهین‌ها بر علیه پاسخ ایمنی میزبان در مرحله تاکی زوئیت عمل می‌کنند و به عنوان عامل بیماری‌زا در بروز عفونت نقش دارند (۶). سطح تاکی زوئیت و برادی زوئیت توکسوپلاسما از آنتی‌ژن‌های متصل به GPI پوشیده شده است، که به آنتی‌ژن‌های سطحی (SAG) معروفند. بیشترین و مهمترین پروتئین توکسوپلاسما که در سطح تاکی زوئیت انگل وجود دارد، پروتئین ۳۰ کیلو دالتونی به نام SAG1 می‌باشد. SAG1 کاندید مناسبی برای تهیه واکسن می‌باشد و همچنین نقش مهمی را در پاتوژنیسیته و ایمنی‌زایی در بدن میزبان دارد (۷و۱۶). بسیاری از این مولکول‌ها اختصاص به مرحله خاصی از چرخه زندگی انگل دارند. عفونت توکسوپلاسما اغلب در شرایط آب و هوائی گرم، ارتفاعات پایین و در نواحی کوهستانی اتفاق می‌افتد. فراوانترین علل آلودگی توکسوپلاسما گوندی خوردن گوشت خام یا نیم پز حاوی کیست‌های بافتی، مصرف آب یا غذای آلوده، تماس با خاک آلوده می‌باشد (۲۱). بر اساس مطالعات انجام شده توسط Tenter و

Archive of SID

www.SID.ir

همکاران (۲۸) از میان مردم جهان، شیوع و فراوانی سرم مثبت توکسوپلاسما گوندی در زنان در سنین باروری در کشورهای اروپای مرکزی ۵۸٪، کشورهای آمریکای لاتین ۷۲-۵۱ ٪، کشورهای آفریقای جنوبی ۷۷-۵۴٪ بوده است. فراوانی جنوب غربی آسیا، چین و کره کمتر از ۳۹-۴٪، نواحی سرد آب و هوایی مانند کشورهای اسکاندیناوی ۲۸-۱۱٪ می‌باشد. این میزان در زنان سنین باروری در آمریکا ۱۵٪ می‌باشد (۲۴). پراکندگی سرم مثبت توکسوپلاسما در یک کشور، به جمعیت مردم و نواحی جغرافیایی و شیوع در سطح جهان بستگی دارد (۲۴). توکسوپلاسموزیس شیوع جهانی دارد و این از یک منطقه به منطقه دیگر متفاوت می‌باشد. مطالعات انجام شده آسمار و همکاران (۴) در استان‌های کشور ، بالاترین تیتر آنتی‌بادی از استان مازندران ۲۰/۵٪ در حالی که پایین‌ترین تیتر آنتی‌بادی از استان هرمزگان ۲/۹٪ گزارش شده است. تعیین مقدار تیتر آنتی بادیIgG ،IgA و IgM می‌تواند کمک شایانی را در تشخیص مرحله حاد و مزمن بیماری داشته باشد (۲۳). تشخیص توکسوپلاسموزیس به روش‌های مولکولی، ایمنوبلاتینگ، بیوپسی بافت و سرولوژی شامل Sabin-Feldman dye test،IHA، LA، IFA و ElISA انجام می‌شود که از میان آن‌ها روش الایزا با استفاده از کیت‌های تجاری برای سنجش آنتی‌بادی‌های IgM و IgG در آزمایشگاه‌های سراسر دنیا بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرد. مسئله مهم در مورد بسیاری از این کیت‌ها، نتایج مثبت و منفی کاذب غیرقابل‌قبول می‌باشد. تحقیقات انجام شده نشان می‌دهد، استفاده از آنتی‌ژن مرغوب می‌تواند باعث افزایش حساسیت آزمایش با هزینه پائین‌تر نسبت به کیت‌های تجاری شود (۲۷). جداسازی و شناسایی پروتئین آنتی‌ژن توکسوپلاسما می‌تواند کمک مهمی را در مرحله تشخیص بیماری داشته باشد (۱۲). هدف از این مطالعه و تحقیق، بدست آوردن فراکسیون‌های آنتی ژن توکسوپلاسما گوندی به منظور تشخیص توکسوپلاسموز می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه آنتی ژن: تعداد ۵۰ سر موش سفید آزمایشگاهی با وزن مناسب را انتخاب کرده و مقدار ۰/۲ میلی‌لیتر انگل توکسوپلاسما گوندی سویه RH با تعداد ۲×۱۰^{۷} تاکی زوئیت را به صفاق هر یک از آن‌ها تزریق نمودیم. بعد از گذشت ۷۲ ساعت، جهت جمع‌آوری انگل‌ها، موش‌ها را در شرایط اخلاقی بیجان نمودیم و سپس مقدار ۲ میلی‌لیتر PBS را به داخل صفاق هر موش کشته شده تزریق کرده و بدین صورت انگل‌ها را جمع‌آوری کردیم. پس از جمع‌آوری، انگل را سه بار متوالی با PBS شستشو دادیم. در مرحله بعد به منظور سلول‌گیری، به نسبت ۰/۱ گرم در ۱۰۰ ml آنتی‌ژن، ترپسین اضافه کرده و پس از ۱۵ دقیقه، ۳ بار متوالی با PBS شستشو دادیم و سپس رسوب حاصل از مرحله آخر شستشو که حاوی انگل خالص توکسوپلاسما بود را توسط دستگاه سونیکاتور مدل HP200H شرکت Hielscher آلمان، خرد کردیم تا انگل خرد شده به صورت کاملاً یکنواخت (هموژن) درآید. در مرحله بعد، سانتریفیوژ در دور ۶۰۰۰ به مدت ۶ دقیقه انجام شد و سوپ رویی (مایع‌رویی) حاوی پروتئین محلول توکسوپلاسما جمع‌آوری گردید.

ایمنوالکتروفورز: بعد از تهیه سوسپانسیون آنتی‌ژنی، به منظور تشخیص آنتی‌ژنیسیته آن، تست ایمنو الکتروفورز انجام دادیم. در داخل چاهک‌های

Archive of SID

www.SID.ir

ساخته شده در ژل آگارز، آنتی‌ژن و آنتی‌بادی را در فواصل ۱۰ میلی‌متر از هم به مقدار ۱۰ میکرولیتر ریخته و در داخل دستگاه با ولتاژ ۵۰ میلی‌آمپر به مدت ۹۰ دقیقه قرار دادیم.

اندازه‌گیری غلظت پروتئین: میزان غلظت پروتئین آنتی‌ژن به روش لوری محاسبه شد (۱۶).

تفکیک آنتی‌ژن: پس از رسوب توسط سولفات آمونیوم (۶۰-۳۰)٪ اشباع، دیالیز با بافر Tris-Hcl ۰/۰۵ مولار با ۸ pH انجام شد. کروماتوگرافی تبادل یونی در ستون به ابعاد ۱ در ۵ سانتی‌متر با رزین دی اتیل آمینواتیل سلولز انجام گرفت. و تحت شیب NaCl فراکسیون‌ها تفکیک گردیدند. عمل شستشو با بافر تریس ۰/۰۵ مولار با ۸ pH و عمل الوشن با شیبی از غلظت‌های متفاوت ۰/۵٪، ۲٪، ۴٪ و ۶٪ انجام شد. نمونه بارگذاری شده به ستون ۱/۵ میلی‌لیتر بود.

شناسایی فراکسیون‌های آنتی ژن توکسوپلاسما گوندی

SDS-PAGE: ۲۰ میکرولیتر از هر نمونه (مایع صفاق موش آلوده و فراکشن‌ها) با ۲ میکرولیتر بافر نمونه حاوی ۲- مرکاپتو اتانول و سدیم دودسیل سولفات و گلیسرول مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در بن ماری ۸۶ درجه حرارت داده شده، سپس به کمک سرنگ هامیلتون به حفره‌های تعبیه شده در ژل منتقل گردید. درصد SDS برای ژل متراکم کننده ۵ و برای ژل جداکننده ۱۰ درصد، شدت جریان الکتریکی در زمان عبور نمونه‌ها از هر ژل ۹۰ و ۱۲۰ ولت بود.

پس از پایان الکتروفورز، ژل با کوماسی بلو، رنگ آمیزی و در مقایسه با پروتئین استاندارد (Protein ladder sinagen.smo661) وزن مولکولی هر جزء (باندهای تشکیل شده) تعیین گردید.

تعیین حساسیت و ویژگی فراکسیون‌ها

آنتی‌ژن تام و فراکسیون‌ها را به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر در داخل هر چاهک از یک میکروپلیت الایزا کوت کرده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری نموده و سپس شستشو انجام شده و نمونه سرم انسانی، با استفاده از (kit) الایزا (DRG آلمان) در این میکروپلیت آزمایش شدند. در این آزمایش کنترل مثبت و منفی کیت الایزا با هر کدام از فراکسیون‌ها مقایسه شدند. روش کار به این صورت انجام شد که ابتدا ا سرم بیمار مبتلا به توکسوپلاسموز را رقیق می‌کنیم. برای رقیق شدن از رقیق‌کننده سرم (محلول رقیق‌کننده سرم داخل کیت) استفاده شد. ۱۰ میکرولیتر از سرم بیمار با cc ۱ محلول رقیق‌کننده مخلوط شد و ۱۵ دقیقه در دمای اتاق گذاشته شد. بعد در داخل هر چاهک که متعلق به ردیف سرم‌ها می‌باشد ۱۰۰ میکرولیتر سرم ریخته شد. در مرحله بعد، ۱۰۰ میکرولیتر از کنترل مثبت و منفی داخل کیت در داخل ردیف‌های مثبت و منفی داخل میکروپلیت ریخته شد. میکروپلیت را در داخل یک کیسه فریزر قرار داده و به مدت ۱ ساعت در داخل انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده شد. پس از ۱ ساعت، ۵ بار متوالی میکروپلیت شستشو داده شد. شستشو با واشینگ بافر موجود در کیت که به نسبت۱/۲۰ با آب مقطر رقیق کرده بودیم انجام شد. پس از شستشو، ۰/۱ میکرولیتر از کانژوگه موجود در کیت را در داخل هر چاهک ریخته و به مدت ۰/۵ ساعت در دمای اتاق گذاشته شد. در هر مرحله برای جلوگیری از آلودگی، میکروپلیت در داخل کیسه

Archive of SID

www.SID.ir

استریل قرار می‌گیرد. بعد از گذشت زمان لازم، مرحله ششتشو همانند مراحل قبل تکرار شد. مقدار ۰/۱میکرولیتر از سوبسترای موجود در کیت را در داخل هر چاهک ریخته و به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی قرار گرفت. روی میکروپلیت را پوشانده تا از رسیدن نور به داخل چاهک‌ها جلوگیری شود. پس از ۱۵ دقیقه از محلول stop solution موجود در کیت به مقدار ۰/۱ میکرولیتر اضافه شد و با استفاده از دستگاه الایزای رنگ‌سنجی، جذب هر کدام از چاهک‌ها خوانده شد. پس از قرائت دستگاه از جذب هر چاهک، عدد خوانده شده را بر روی نمودار استاندارد کیت IgG برده و گزارش نتیجه سرم بیمار و کنترل مثبت و منفی اعلام شد. و در پایان، نتایج بدست آمده با نتایج استاندارد داخل کیت مقایسه شد.

نتایج

ایمنوالکتروفورز: با رنگ آمیزی ژل ایمنو الکتروفورز، آرک (خط رسوبی ناشی از واکنش بین آنتی‌ژن و آنتی‌بادی) حد فاصل آنتی‌ژن و آنتی‌بادی را نشان داد.

تعیین غلظت: غلظت پروتئینی آنتی‌ژن با استفاده از منحنی استاندارد BSA محاسبه و مقدار ۷۵۰۰ ماکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد.

کروماتوگرافی: از کروماتوگرافی تبادل یونی با ستونی از رزین DEAE- Cellulose به ابعاد ۵ در ۱ سانتی‌متر، تحت شیب غیر پیوسته غلظت NaCl، ۳ فراکشن حاصل شد. نتایج نشان می‌دهد که در غلظت ۲ درصد NaCl عمل الوشن بهتر انجام شده و مقدار پروتئین‌های اتصال یافته بیشتری از ستون جدا می‌شود. از این کروماتوگرافی تبادل یونی ۳ فراکشن با ساختار پروتئینی بدست آمد (نمودار ۱)، نتایج نشان می‌دهد که کروماتوگرافی مبادله یونی، روش مناسبی برای تفکیک تاکی زوئیت آنتی‌ژن توکسوپلاسما گوندی می‌باشد، زیرا بدون تغییر در ساختار پروتئین اجزاء با خلوص بالا را نشان می‌دهد.

تعیین وزن مولکولی: در این تحقیق، با استفاده از الکتروفورز SDS-PAGE باندهای پروتئینی به وضوح دیده شدند. با مقایسه باندهای پروتئینی بدست آمده با مارکر وزنی، وزن مولکولی پروتئین‌ها تعیین شد. مایع صفاقی آلوده توکسوپلاسما سویه RH تهیه شده، ۴ باند پروتئینی ۹۵ KD، ۸۰ KD، ۶۵ KD، ۴۱KD را نشان می‌دهد. فراکشن ۱ بدست آمده از آنتی‌ژن تاکی زوئیت توکسوپلاسما گوندی سویه RH، ۱ باند پروتئینی ۸۲KD را نشان می‌دهد. فراکشن ۲ بدست آمده از آنتی‌ژن تاکی زوئیت توکسوپلاسما گوندی سویه RH، ۱ باند پروتئینی ۸۳KD را نشان می‌دهد. فراکشن ۳ بدست آمده از آنتی‌ژن تاکی زوئیت توکسوپلاسما گوندی سویه RH، ۱ باند پروتئینی ۷۶KD را نشان می‌دهد (شکل ۱).

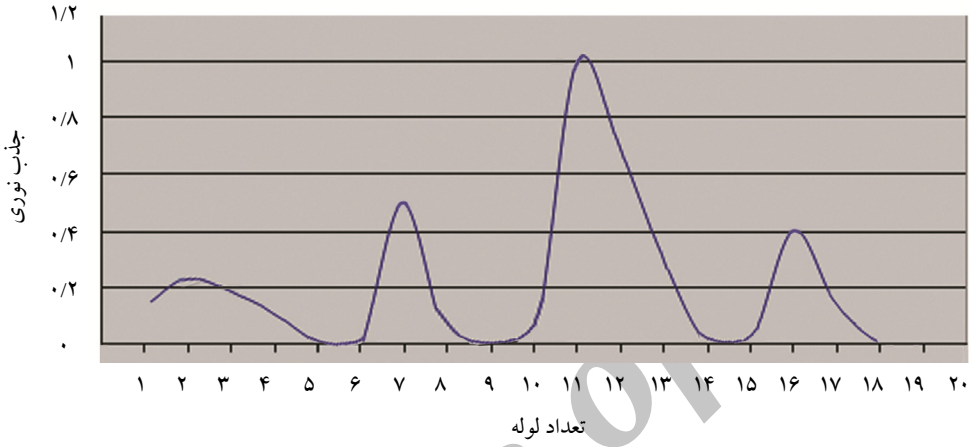
حساسیت و ویژگی فراکسیون‌ها: استاندارد کنترل مثبت داخل کیت= بالاتر از ۶۰ و استاندارد کنترل منفی داخل کیت= کمتر از ۲۰ و نتیجه سرم بیمار با استفاده از آنتی ژن کیت= ۱۳۰ بود، که در آزمایش ما نتایج طبق (جدول‌های ۱و۲) بر اساس منحنی استاندارد کیت بدست آمد. کنترل منفی مایع صفاقی موش آلوده و همه فراکشن‌ها با کنترل منفی استاندارد کیت مطابقت داشت. کنترل مثبت مایع صفاقی موش آلوده و فراکسیون ۲و۳ با کنترل مثبت استاندارد کیت مطابقت داشت. نمونه سرم بیمار در مایع صفاقی موش آلوده و فراکشن ۲ نزدیک به آنتی‌ژن

Archive of SID

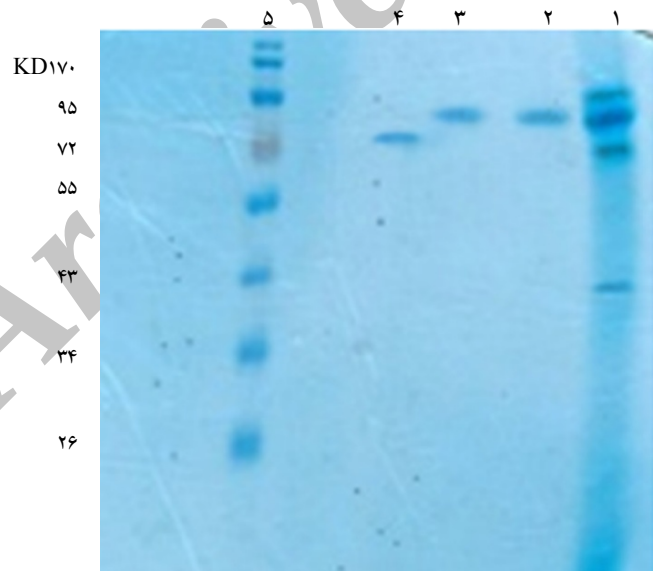
www.SID.ir

کیت، در فراکشن ۳ مطابق با آنتی‌ژن کیت بود. در فراکشن ۱ مطابقت نداشت.

فراکشن های پروتئینی ۲ و ۳ بدست آمده از ستون کروماتوگرافی می‌تواند، علاوه بر مایع صفاق موش آلوده کاندید مناسبی برای شناسایی سرم بیمار مبتلا به توکسوپلاسموزیس باشد. فراکشن ۲و۳ بدست آمده، از حساسیت و ویژگی لازم برای استفاده در آزمایشات سرولوژی به عنوان آنتی‌ژن توکسوپلاسما مفید می‌باشد. و می‌توان با استفاده از این فراکشن‌ها به تشخیص سریع بیماری کمک نمود.



نمودار ۱: منحنی فراکشن‌های حاصل از کروماتوگرافی تبادل یونی



شکل ۱: تصویر ژل ایمنوالکتروفورز SDS-page

ردیف۱) مایع صفاق موش آلوده، ردیف ۲) فراکسیون یک، ردیف۳) فراکسیون دوم، ردیف۴) فراکسیون سوم، ردیف۵) پروتئین استاندارد

Archive of SID

www.SID.ir

جدول۱: نتایج آزمایش(OD) نمونه سرمی، کنترل مثبت و کنترل منفی به روش الایزا با استفاده از آنتی ژن تام و فراکسیون‌های ۱،۲،۳

نمونه / آنتی ژن	سرم بیمار(رفرانس)	کنترل منفی	کنترل مثبت
آنتی ژن تام	۱۰۱/۸	۷	۱۶۳/۵
F1	۴۲	۷	۷/۵۵
F2	۸۸/۹	۶	۸۷/۳
F3	۱۰۶/۸	۶	۹۱/۸

جدول ۲: نتایج بدست آمده از منحنی استاندارد IgG با استفاده از آنتی‌ژن تام و فراکسیون‌های ۱،۲،۳

نمونه / آنتی ژن	سرم بیمار (رفرانس)	کنترل منفی	کنترل مثبت
آنتی ژن تام	۱۲۵	-	۲۰۰
F1	۳۵	-	۵۰
F2	۱۰۴/۵	-	۱۰۴
F3	۱۳۰	-	۱۱۰

بحث

در این تحقیق، پروتئین‌هائی به وزن مولکولی KD ۹۵، ۸۰ KD ۶۵ KD و ۴۱KD از مایع صفاق موش آلوده به سویه RH تاکی زوئیت توکسوپلاسما گوندی بدست آمد. مطالعات میونگ و همکاران، ۱۱۲ KD ، ۷۶ KD، ۷۰KD ، ۵۳ KD، ۴۶KD ، ۴۴ KD، ۴۱KD ، ۳۵ KD را در آنتی ژن توکسوپلاسما گوندی نشان می دهد(۲۰).

وزن مولکولی فراکسیون۱ ،۲،۳ در این تحقیق به ترتیب ۸۲ KD ، ۸۳ KD و ۷۶ KD تعیین گردید. Myoung و همکاران (۲۰) وزن مولکولی فراکسیون ۱ را ۳۵ KD، ۴۵ KD و وزن مولکولی فراکسیون ۲ را ۵۳ و ۳۵ گزارش نمودند.

مطالعات انجام شده توسط عبداللهی (۳)، نشان می‌دهد که کروماتوگرافی مبادله یونی، روشی مناسب برای تفکیک E/SA تاکی زوئیت توکسوپلاسما گوندی می‌باشد، زیرا بدون تغییر ساختار مولکولی پروتئین، اجزائی با درجه خلوص بالا و به میزان نسبتاً زیادی حاصل می‌شود (۳).

مطالعه انجام شده در این تحقیق، نشان می‌دهد که کروماتوگرافی تبادل یونی، روش مناسبی برای تفکیک آنتی ژن تاکی زوئیت توکسوپلاسما گوندی سویه RH می‌باشد.

تشخیص سریع و دقیق توکسوپلاسموزیس از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد، زیرا با تشخیص به موقع و درمان مناسب، عوارض ناشی از این بیماری به

Archive of SID

www.SID.ir

میزان قابل توجهی کاهش پیدا می‌کند.گرچه تلقیح نمونه به حیوان حساس، کشت سلولی و مشاهده ارگانیسم در برش‌های بافتی یا گسترش تهیه شده از مایعات بدن برای تشخیص توکسوپلاسموزیس از حساسیت و ویژگی مناسب برخوردار می‌باشند 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 آزمایشگاه‌های تشخیص طبی مناسب مورد استفاده قرار نمی‌گیرند. تعیین آنتی‌بادی تولید شده علیه توکسوپلاسما در سرم افراد، روش رایج تشخیص توکسوپلاسموزیس است (۹و۱۰).

بررسی‌های زیادی به منظور شناسایی ترکیباتی از توکسوپلاسما جهت استفاده به عنوان آنتی‌ژن در تست‌های سرولوژی طراحی شده برای تشخیص توکسوپلاسموزیس به منظور برطرف شدن مشکلات فوق صورت گرفته است. Yamamoto و همکاران (۳۱) گزارش کردند که ترکیبات آنتی‌ژنی موجود در مایع صفاقی موش آلوده به توکسوپلاسما گوندی، IgG، IgM و IgA ضد توکسوپلاسما را در سرم انسان شناسایی می‌کنند و کاربرد آن‌ها به عنوان آنتی‌ژن در تست‌های سرولوژی قابل بررسی می‌باشند.

در بین تکنیک‌های قابل استفاده برای تشخیص توکسوپلاسموزیس، بکارگیری روش الایزا مناسب‌تر به نظر می‌رسد. زیرا روش‌هایی مثل پاک شدن ایمنی (Immunobloting) و سنجش پروب ایمنی (Radioimmuno assay) گرچه از ارزش تشخیصی مناسب برخوردار می‌باشند، بکارگیری آن‌ها به خاطر پیچیدگی روش اجرا، در اکثر آزمایشگاه‌های تشخیص طبی مقدور نمی‌باشد. با توجه به استفاده مقدار خیلی کم آنتی‌ژن در آزمون‌هایی مانند IHA، لاتکس آگلوتیناسیون و عمل ثابت شدن آنتی‌ژن بر روی گلبول‌های قرمز یا ذرات لاتکس ممکن است به خوبی صورت نگیرد. حساسیت الایزا نسبتاً بالا است، به طوری که با ۵-۱ نانوگرم از آنتی‌ژن نیز واکنش صورت می‌گیرد (۱۱و۲۹).

بیشتر مشکلات در رابطه با استفاده از آزمون‌های سرولوژی برای تشخیص توکسوپلاسموزیس را به آنتی‌ژن‌های به کار رفته در این آزمون‌ها نسبت می‌دهند (۲۲).

مطالعات عبداللهی و همکاران (۲) نشان داد که مایع صفاق موش آلوده به توکسوپلاسما می‌تواند ترکیب مناسبی جهت به دست آوردن آنتی‌ژنهای دفعی-ترشحی برای استفاده در روش‌های تشخیص سرولوژی توکسوپلاسموزیس باشد.

یافته‌های تحقیق ما نشان می‌دهد که روش الایزا با استفاده از مایع صفاق موش سفید آزمایشگاهی آلوده شده به آنتی‌ژن توکسوپلاسما گوندی سویه RH برای شناسایی IgG علیه توکسوپلاسما در سرم انسانی روش مناسبی می‌باشد.

عبداللهی و همکاران (۱) نشان دادند، که جزء دوم کروماتوگرافی تعویض یونی، نشانگر مناسبی برای تشخیص و افتراق سرم مراحل مختلف توکسوپلاسموزیس می‌باشد.

Shaapan و همکاران (۲۷) نشان دادند، روش الایزا با استفاده از آنتی‌ژن بومی از حساسیت بالاتری نسبت به آنتی ژن کیت‌های تجاری برخوردار می‌باشد.

مطالعات انجام شده در این تحقیق، فراکسیون‌های ۲و۳ بدست آمده از کروماتوگرافی تبادل یونی را

Archive of SID

www.SID.ir

نشانگر مناسبی برای تشخیص سرم توکسوپلاسما نشان می‌دهد.

در مطالعه انجام شده، از مایع صفاق موش سفید آزمایشگاهی آلوده، به عنوان آنتی‌ژن استفاده شد و میزان دقت و حساسیت پلیت الایزای کوت شده با این آنتی‌ژن‌ها با کیت مورد استفاده در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی مقایسه گردید.

در این تحقیق نشان داده شد که آنتی‌ژن تام توکسوپلاسما گوندی و فراکسیون‌های بدست آمده از آن دارای ساختار پروتئینی با آنتی‌ژنیسیته بالا بوده، که می‌تواند در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی، به منظور شناسایی توکسوپلاسموزیس و تعیین تیتر آنتی‌بادی در سرم بیماران به کار رود.

سپاسگزاری

بدینوسیله از کلیه کسانی که ما را در مراحل مختلف این تحقیق یاری نموده‌اند، صمیمانه سپاسگزاریم.

منابع

۱. عبداللهی، س.ح. و محمودی، م.، ۱۳۷۸. ارزیابی جزء دوم حاصل از تفکیک آنتی‌ژن‌های دفعی- ترشحی توکسوپلاسما به روش کروماتوگرافی تعویض یونی برای تشخیص توکسوپلاسموز در موش صحرایی. مجله علوم پزشکی دانشگاه مازندران. شماره۶۵، ص ۴۲-۵۱.

۲. عبداللهی، س.ح.و عرب‌آبادی، م.ک.، ۱۳۸۶. طراحی کیت لایزا جهت تعیین IgG علیه توکسوپلاسما در سرم انسان با استفاده از آنتی‌ژن‌های دفعی- ترشحی و بررسی قدرت تشخیص آن. مجله علوم پزشکی مازندران. شماره ۱۶، ص ۱۴-۲۰.

۳. عبداللهی، س.ح.، ۱۳۸۲. تهیه و تخلیص و شناسایی اجزاء آنتی‌ژن‌های دفعی - ترشحی تاکی زوئیت‌های توکسوپلاسما گوندی سویه RH. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان. شماره ۱. ص ۱-۹ .

4. Assmar, M.; Amirkhany, A.; Piazak, N. and et al., 1997. Toxoplasmosis in Iran.Result of a seriepidemiological study. Bull Soc Pathol Exoth. 90:19-21.
5. Black, M.W. and Boothroyd, J.C., 2000. Lytic cycle of *Toxoplasm gondii*. Microbiol Mol Biol Rev. 64:230-601.
6. Boothroyd, J.C.; Hehl, A.; Knoli, L.J. and Manger, I.D., 1998. Int. *The surface Toxoplasma gondii*: more and less. J. Parasitol. 28: 3-9.
7. Burg, J.L.; Perelmam, D.; Kasper, L. and et al., 1998. Molecular analysis of the gene encoding The mojor surface antigen of *Toxoplasmoa gondii*.Joournal of Immunology. 141:3584-3593.
8. Dubey, J.P.A., 1998. Dvances in life cycle of *Toxoplasma gondii*. Inter J. Parasitol. 28 (7): 1019-1024.
9. Funtes, I.; Rodricuez, M. and et al., 1996. Urin sample used for congenital Toxoplasmosis diagnosis by PCR.J clin Microbial. 34: 368-710.
10. Gulie, D.J. and Richard, E.H., 1996. Toxoplasmosis in medical parasitology. A Practical approach. 33-59.
11. Hassan, M.M.; Mansour,S.A.; Atta, M. and et al., 1997. The importance of detecting *Toxoplasma gondii* antigen in human cases. J. Egypt. soc. Parasitol. 27 (1); 27-34.
12. Ho-Ken Do, Joss., 1992. Human Toxoplasmosis. Oxford Medical Publication. 204 -31.
13. Jones, J.L.; Kruszon Moran, D.; Wilson, M. and et al., 2001. *Toxoplasma gondii* infection in the united states; Serprevalance and risk factors.AMJ Epidemiol.154:357-365.

Archive of SID

www.SID.ir

14. Joiner, K. and Dubermetz, J.F., 1993. *Toxoplasma gondii*: a parasite for the nineties.infect.Immun. 61: 1169-1172.
15. Kasper, L.H. and Crab, J.H., 1983. Purification of a major membrane protein of *Toxoplasma gondii* by Immuno adsorption with a mono clonal Antibady. Journal of Immunology. 130: 2407-2412.
16. Lowry, O.; Rosebrough, H. and et al., 1951. Protein measurmant with folin-phenol reagent.J.Biol Chem.193:265-275.
17. Meredith, T. and et al., 2003. Identificaton and partial characterization of a second kazal inhibitor in *Toxoplasma gondii*. Molecular & Biochemical Parasitology. 128: 1220.
18. Montoya, J.G. and Liesenfied, O., 2004. Toxoplasmosis. Lancet. 363: 65-67.
19. Montoya, J.G.; Monroy, F.; Regina, M.L. and et al., 2001. Acute Toxoplasmosis lead to lethal over production of Th2 cytokines. J Immmuno. 45: 74-84.
20. Myoung, H.E.; Keun-Hee, H. and et al., 1997. Partially Purified *Toxoplasma gondii* antigen by immunoaffinity chromatography. The Korean Journal of Parasitology. 35 (4): 251-258.
21. Nazan, D., 2008. Congenital *Toxoplasma gondii* infection. Marma medical Journal. 21 (1)89-101.
22. Neguyen, M.; Kesed, G. and et al., 1996. Detection of *Toxoplasma gondii* Tachyzoits and Bradyzoitesin blood,Uri nana Brains of Infected Mice, Clin Diaglab Immunol. 635-639.
23. Patricia, L. and Lloyd, H., 1987. Strain – Specific Antigens of *Toxoplasma gondii*. Infection and Immunity. 778-783.
24. Rorman, E.; Zamir, C.S.; Rilkis, I. and Ben-Devid, H., 2006. Congenital Toxoplasmosis-Prenated aspects of *Toxoplasma gondii* infection-Reported Toxical. 21: 458-172.
25. Sarva, D., 1992. Molecular and cell Biology of opportunistic infections in AIDS. Toxoplasma. 163-185.
26. Seng, S.; Yakoyama, M.; Suzuki, R. and et al., 2000. Expresion of SAG1 *Toxoplasma gondii* in transgenic mice. Parasitol. Res. 86:263-269.
27. Shaapan, R.M. and Hassanain, A., 2007. Comparison of Horse Derived *Toxoplasma gondii* as Antigen with a Commerical Available ELISA Kit for the Detection of IgG Antibodies in human sera.Global Veterinaria. 1(1):31-35.
28. Tenter, A.M.; Heckeroth, A.R. and Weiss, L.M., 2000. *Toxoplasma gondii:*from animals to humams. Int J Parasitol. 30:58-1217.
29. Wilson, M. and Mcaunley, J.B., 1991. Labratory diagnosis of Toxoplasmosis.Clin laboratory.Medicine. 11(4):38-923.
30. Xiao-lin, H.; Michael, E.; John, C. and et al., 2002. Structure of the immunodominant surface antigen from the Toxoplasma gondii SRS superfamily. Nature Structural Biology. 9(8):606.
31. Yamamoto, K.L.; Mineo, J.R.; Meneghiss, C.S. and Kawaraba, K.M., 1998. Detection in human sera of IgM,IgG and IgA to excreted-Secreted antigen *Toxoplasma gondii* by use of Dot-elisa and Immunoblot assay. Ann Trop Med Parasitol. 92(1):3-23.

Archive of SID

www.SID.ir