

بررسی سرواپیدمیولوژی عفونت توکسوپلاسمایی به روشهای IFA و ELISA در خانم های باردار استان قم

احمد مردانی^۱، دکتر حسین کشاورز^۲

چکیده :

مقدمه و اهداف : توکسوپلاسموز از جمله بیماریهای مشترک انسان و حیوان می باشد که از انتشار وسیعی برخوردار است . این بیماری در اثر آلودگی به تک یاخته انگلی توکسوپلازما گوندیی ایجاد می شود. از مهمترین روشهای تشخیص این بیماری ، تکنیکهای سروولوژیک از جمله روش ایمنونوفلورسانت آنتی بادی غیر مستقیم (IFA) و ELISA می باشد. هدف از انجام این مطالعه تعیین شیوع عفونت توکسوپلاسمایی به روشهای IFA و ELISA در خانم های باردار بوده است. **روش تحقیق:** در این مطالعه توصیفی- مقطعی طی چهار ماه (از مهرماه لغایت دیماه ۱۳۸۰) از ۶۰۰ زن باردار مراجعه کننده به زایشگاههای الزهرا و ایزدی شهر قم نمونه خون تهیه شد. پس از خونگیری و جدا سازی سرم، نمونه های سرم به روشهای IFA و ELISA مورد آزمایش قرار گرفتند. **یافته های پژوهشی :** از تعداد ۶۰۰ نمونه سرم مادران آزمایش شده به روش Antibody Sandwich Elisa تعداد ۲۵۷ نفر (۴۲/۸٪) و با روش IgG-IFA تعداد ۲۴۶ نفر (۴۱٪) دارای آنتی بادی IgG اختصاصی بودند. در این مطالعه عوامل مختلفی که ممکن است در میزان شیوع عفونت توکسوپلاسمایی دخالت داشته باشد ، مورد بررسی قرار گرفت و نتایج بدست آمده نشان دهنده عدم ارتباط معنی دار آماری (آزمون Chi – square) موارد مثبت IgG اختصاصی با سابقه مصرف سبزیجات خام ، سابقه مصرف کباب و گوشت نیم پز ، سابقه تماس با گربه و حیوانات اهلی و شغل می باشد. اما بین سن، میزان تحصیلات، محل سکونت(شهر یا روستا) و سابقه سقط جنین با موارد مثبت IgG ارتباط معنی داری وجود داشت. **نتیجه گیری :** نتایج حاصله نشان میدهد اگرچه انتقال عفونت توکسوپلاسمایی در سرتاسر این استان نیز همانند سایر نقاط جهان و ایران صورت گرفته اما درصد قابل توجهی از زنان باردار (۵۷/۲٪ با روش ELISA و ۵۹٪ با روش IFA) فاقد هرگونه مصونیت اکتسابی در مقابل این عفونت بودند. بنابراین بررسی وضعیت ایمنی و انجام آزمایشهای اختصاصی قبل از ازدواج و نیز آموزش و آگاه نمودن مردم منطقه بویژه زنان باردار به برنامه های آموزش بهداشت و مراقبت های دوران بارداری ضروری بنظر میرسد. **واژه های کلیدی :** عفونت توکسوپلاسمایی ، سرواپیدمیولوژی ، IFA ، ELISA و قم .

مقدمه

آلودگی با توکسوپلازما گوندیی (*Toxoplasma gondii*) یکی از شایعترین عفونتهای انگلی انسان و سایر حیوانات خونگرم با انتشار جهانی است. این تک یاخته درون سلولی اجباری بوده و دارای یک فرم فعال یا تاکی زوئیت (*Tachyzoite*) و دو فرم مقاوم یعنی کیست نسجی (*Tissue cyst*) و او اوسیست (*Oocyst*) می باشد. در چرخه زندگی توکسوپلازما گوندیی گربه و گربه سانان بعنوان میزبان نهایی (*final host*) انسان، پرندگان و سایر پستانداران نقش میزبان واسطه (*Intermediate Host*) را دارند(۱).

ابتلاء انسان به بیماری توکسوپلاسموز ممکن است مادرزادی و یا اکتسابی باشد. در شکل مادرزادی ، عامل بیماری (تاکی زوئیت) از طریق جفت مادر آلوده به جنین منتقل می شود. عفونت اکتسابی در اثر خوردن او اوسیست هایی است که گربه آلوده دفع می کند و یا از

طریق خوردن گوشت خام و نیم پز آلوده (حاوی کیست نسجی) صورت می گیرد(۲).

نظر به اینکه علائم بالینی توکسوپلاسموز متنوع و با بیماریهای دیگر قابل اشتباه است لذا برای تایید تشخیصهای بالینی ، استفاده از روشهای آزمایشگاهی ضروری است . بدین منظور ، برای تشخیص توکسوپلاسموز در موارد خاصی از روشهای پارازیتولوژی (*Parasitological Methods*) و بطور معمول از روشهای سروولوژی (*Serological methods*) استفاده می شود(۱).

در مطالعه حاضر تا زمان زایمان هیچ اطلاعی از وضعیت قبلی مادران از نظر آلودگی به توکسوپلاسموز قبل از بارداری و در حین بارداری در دست نبود. در چنین مواردی باید با بکارگیری روشهای حساس و مناسب سنجش آنتی بادی (مانند ELISA) سرم خون مادران آزمایش گردد.

هدف اصلی از انجام این مطالعه تعیین شیوع عفونت توکسوپلاسمایی به روشهای IFA و ELISA در خانم های باردار بوده و هدف نهایی آن ارتقاء سطح بهداشت و پیشگیری از عفونت در منطقه می باشد.

مواد و روش کار

الف: جمع آوری و آماده نمودن نمونه ها

در این مطالعه توصیفی - مقطعی برای محاسبه حجم نمونه از فرمول $N = z^2 pq / d^2$ با مشخصات $P = 40\%$, $Z = 1.96$, $d = 0.04$ استفاده گردید (توضیح اینکه در این مطالعه تعداد ۶۰۰ نمونه مورد بررسی قرار گرفت).

نمونه برداری بصورت تصادفی چند مرحله ای از زایشگاههای الزهرا (س) و ایزدی شهرستان قم که بزرگترین زایشگاههای دولتی استان هستند و اکثر زایمانها در آنها صورت می گیرد، تقریباً ۴ ماه به طول انجامید. نمونه گیری شامل کلیه خانم هایی می شد که طی این مدت (از مهرماه لغایت دی ماه سال ۱۳۸۰) در این زایشگاهها زایمان کرده بودند. در هنگام زایمان و یا بعد از زایمان ۳-۵ میلی لیتر خون از مادران خونگیری شد و پرسشنامه های مربوطه که محتوی اطلاعات زیر بود، تکمیل گردید:

نام و نام خانوادگی، تاریخ، سن، شغل، میزان تحصیلات، نوع تغذیه، سابقه تماس با گربه و حیوانات اهلی، وضعیت آب آشامیدنی، روستایی یا شهری بودن، تعداد موارد زایمان و سابقه سقط جنین.

نمونه ها هر روز به آزمایشگاه پایگاه منطقه ای انتقال خون استان قم منتقل می شد و بعد از جدا کردن سرم ها، هر نمونه سرم در داخل دو ویال کوچک تقسیم می شد. بعد از بستن در لوله ها با پارافیلیم و اتیکت گذاری آنها در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری می شد تا به تدریج آزمایشات مربوطه پس از اتمام نمونه گیری انجام گیرد. در این مدت ۶۰۰ نمونه سرم جمع آوری گردید. نمونه ها جهت

اندازه گیری و تعیین تیتراژ آنتی بادی IgG به روش Antibody Sandwich ELISA در پایگاه منطقه ای انتقال خون استان قم و سپس در بخش سرولوژی بیماریهای تک یاخته ای گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات

بهداشتی به روش IFA - IgG مورد آزمایش قرار گرفتند. پس از انجام آزمایشات به منظور اخذ نتایج نهایی کلیه اطلاعات به کمک آزمون آماری Chi-square مورد استخراج و آنالیز آماری قرار گرفت.

ب: روش ساندویچ آنتی بادی الایزا (Antibody Sandwich) (ELISA Method)

برای اندازه گیری و تعیین تیتراژ آنتی بادی IgG سرم های مادران، کیت تشخیصی IgG توکسوپلازما ساخت شرکت Equipar ایتالیا که بر اساس روش ساندویچ آنتی بادی طراحی شده است، مورد استفاده قرار گرفت. در این روش آنتی ژن های اختصاصی توکسوپلازما گوندی را به حفره های میکروپلیت متصل می کنند. سپس با اضافه کردن نمونه سرم، در صورت وجود آنتی بادی ضد توکسوپلازما گوندی به آنتی ژن متصل می گردد. پس از انجام شستشو به مجموعه فوق آنتی هیومن IgG (IgG کونژوگه) که با آنزیم HRP (Horserdich peroxidase) نشاندار شده است، افزوده می شود. در ادامه پس از افزودن محلول سوبسترا - کروموزن مناسب، در صورت وجود آنتی بادی اختصاصی تغییر رنگ حاصل می گردد که نشانه مثبت بودن واکنش می باشد.

ج: آزمایش ایمونوفلورسانت آنتی بادی غیر مستقیم (IFA)

برای اندازه گیری و تعیین تیتراژ آنتی بادی IgG سرمهای مادران روش IFA - IgG مورد استفاده قرار گرفت. در این روش ابتدا آنتی ژن فیگوره (تولید انستیتو پاستور ایران) توکسوپلازما گوندی (تاکی زوئیت) را به فاز ثابت (لام) متصل می کنند. در مرحله بعد با افزودن رقت های مختلف تهیه شده از سرم (رقت های ۱/۲۰، ۱/۱۰۰ و ۱/۲۰۰) در صورت وجود آنتی بادیهای اختصاصی در سرم به آنتی ژن فیکس شده روی لام باند می شود. پس از انکوباسیون و انجام شستشو، آنتی هیومن آنتی بادی (Anti-IgG) محصول شرکت حاب تک (نشاندار شده با ماده فلوروسئین افزوده می شود. در ادامه پس از طی شدن مرحله دوم انکوباسیون و انجام شستشو، در صورت اتصال آنتی هیومن آنتی بادی نشاندار شده با فلوروسئین به آنتی بادی باند شده به آنتی ژن فیگوره، در زیر میکروسکوپ

رنگ فلورسانس رویت خواهد شد که نشانه مثبت بودن آزمایش می‌باشد.

نتایج

الف: نتایج آزمایش نمونه سرم زنان زایمان کرده به روش

IgG-ELISA

از تعداد ۶۰۰ نمونه سرم آزمایش شده به روش IgG-ELISA تعداد ۲۵۷ نفر (۴۲/۸٪) دارای آنتی بادی IgG ضد توکسوپلازما گوندی بودند و تعداد ۳۴۳ نفر (۵۷/۲٪) فاقد آنتی بادی اختصاصی (IU/ML ۵۰) بودند. در جدول ۱ توزیع فراوانی آنتی بادی IgG ضد توکسوپلازما گوندی به روش IgG-ELISA در زنان زایمان کرده بر حسب سن و مقدار آنتی بادی به تفکیک مشخص گردیده است.

ب: نتایج آزمایش نمونه سرم زنان زایمان کرده به روش IgG-

IFA

از مجموع ۶۰۰ نمونه سرم آزمایش شده به روش IgG-IFA تعداد ۲۴۶ نفر (۴۱٪) دارای آنتی بادی IgG ضد توکسوپلازما گوندی و تعداد ۳۵۴ نفر (۵۹٪) فاقد آنتی بادی IgG اختصاصی (باتیتر ۱:۲۰) بودند. در جدول ۲ توزیع فراوانی آنتی بادی IgG ضد توکسوپلازما گوندی به روش IgG-IFA در زنان زایمان کرده بر حسب سن و تیتراژ آنتی بادی مشخص شده است.

نمونه سرم مادرانیکه در آزمایش IgG-IFA دارای تیتراژ ۱:۸۰۰ بودند از نظر آنتی بادی IgM اختصاصی (بروش IgG-IFA) مورد آزمایش قرار گرفتند که مشخص شد هر سه نمونه فاقد IgM ضد توکسوپلازما گوندی (باتیتر ۱:۱۰) می‌باشند. همچنین از نظر آماری (آزمون Chi - square) ارتباط معنی داری بین موارد مثبت IgG با سابقه مصرف سبزیجات خام ($p = ۰/۰۹۲$)، سابقه مصرف کباب و گوشت نیم پز ($p = ۰/۰۱۵۱$)، سابقه تماس با گربه و حیوانات اهلی ($p = ۰/۰۹۹$) و شغل ($p = ۰/۲۶۲$) دیده نشد، در حالیکه بین سن ($p = ۰/۰۰۰۱$)، میزان تحصیلات ($p = ۰/۰۰۰۱$)، محل سکونت ($p = ۰/۰۰۰۱$) و سابقه سن جنین ($p = ۰/۰۰۰۱$) با موارد مثبت IgG، ارتباط معنی دار آماری وجود داشت.

بحث

یکی از متداولترین بیماریهای انگلی انسان و سایر مهره‌داران خونگرم آلودگی با توکسوپلازما گوندی می‌باشد. اگرچه آلودگی معمولاً در افراد بالغ خوش‌خیم است ولی در دوران بارداری ممکن است علائم جدی و متنوعی از جمله عقب ماندگی ذهنی یا عوارض شدید عصبی و چشمی در جنین ایجاد نماید (۱).

بعلت طیف وسیع آلودگی جوامع انسانی به عفونت توکسوپلازمایی خصوصاً آلودگی بدون علائم آن در زنان باردار که منجر به عفونت توکسوپلازموز مادرزادی می‌گردد، تعیین شیوع آنتی‌بادیهای اختصاصی در زنان باردار و مشخص نمودن عوامل موثر در افزایش میزان شیوع از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

در مطالعاتی که در کشورهای مختلف جهان انجام شده است، نتایج نشان می‌دهد در اسپانیا ۳۰٪ زنان باردار، بلژیک ۵۰٪ و رم ۱۶/۳٪ دارای آنتی بادی ضد توکسوپلازمایی بودند (۶۰۷،۸). کشاورز و همکاران در سال ۱۳۷۷ تعداد ۲۰۱۷ نمونه سرم خون را جهت تعیین شیوع آلودگی به توکسوپلازما گوندی در شهرستان کرج به روش IFA مورد بررسی قرار دادند که میزان شیوع ۴۵/۵٪ (۹۱۷ نفر) تعیین گردید (۴). فولادوند و جعفری در سال ۱۳۷۸ تعداد ۳۶۵ نمونه سرم خون زنان حامله شهر بوشهر را جهت تعیین تیتراژ آنتی‌بادیهای اختصاصی ضد توکسوپلازما گوندی به روش ELISA مورد ارزیابی قرار دادند که ۴۳/۶٪ (۱۵۹ نمونه) دارای تیتراژ مثبت آنتی بادی بودند (۳). همانطور که گفته شد نتایج حاصله حاکی از ارتباط معنی دار آماری بین سن، سابقه سقط جنین، شهری یا روستایی بودن با میزان آلودگی به توکسوپلازماست. مطابق نمودار ۱ با افزایش سن درصد موارد مثبت سرولوژی (SPR) نیز افزایش می‌یابد. از آنجائیکه با افزایش سن، احتمال آلودگی افراد بیشتر می‌شود لذا نتایج حاصله قابل توجهی می‌باشد. از طرفی بدلیل ساکن بودن ۹۲/۸٪ جمعیت استان در مناطق شهری (۵) عدم نگهداری گربه و حیوانات اهلی در مناطق شهری، مساعد نبودن شرایط آب

و هوایی شهرهای استان جهت اسپورولاسیون او اوسیست‌ها، ارتقاء سطح بهداشت عمومی و افزایش میزان تحصیلات افراد بویژه خانم‌ها نتایج بدست آمده قابل توجه است.

در این مطالعه از دو روش سرولوژی ELISA و IFA جهت شناسایی و اندازه‌گیری آنتی بادی IgG ضد توکسوپلاسمایی استفاده شد. در روش ELISA همانطور که انتظار میرفت نتایج حاصله با نتایج بدست آمده از روش IFA تقریباً مطابقت داشت (جدول ۳). با توجه به معایب روش IFA (هزینه بالا و وقت گیر بودن) و از طرفی بدلیل مشابه بودن نتایج حاصله از روش ELISA با روش IFA، به نظر میرسد روش ELISA برای غربالگری عفونت توکسوپلاسمایی ارجح تر باشد.

در مجموع بعلت انتشار وسیع و متنوع بودن راههای انتقال آلودگی نمی‌توان یک یا دو فاکتور را عامل آلودگی در نظر گرفت. از آنجائیکه عوامل متعددی از قبیل موقعیت جغرافیایی، سن، عادت غذایی، سابقه تماس با خاک، استفاده از گوشت‌های آلوده به صورت

منابع :

خام و نیم پز، سطح بهداشت و فراوانی گربه در شیوع عفونت توکسوپلاسمایی دخیل هستند. بنابراین نمی‌توان میزان آلودگی در این استان را فقط به یک یا دو عامل مرتبط دانست.

پیشنهادات :

۱- اندازه‌گیری آنتی بادی IgG ضد توکسوپلاسمایی در دختران

در شرف ازدواج به روش ELISA

۲- آموزش و آگاه نمودن مردم منطقه بویژه گروه‌های در معرض

خطر (زنان باردار) نسبت به راههای پیشگیری

۳- تعیین شیوع عفونت توکسوپلاسمایی سایر گروه‌ها در سطح

استان

تقدیر و تشکر

با سپاس از همکاری پرسنل محترم بخش سرولوژی بیماریهی تک

یاخته‌ای گروه انگل شناسی پزشکی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم

پزشکی تهران و همکاران محترم آزمایشگاههای پایگاه منطقه‌ای

انتقال خون استان قم

۱- اورمزدی، ه. (۱۳۷۲). انگل شناسی پزشکی، جلد اول، تک یاخته شناسی پزشکی، موسسه انتشارات جهاد دانشگاهی .

۲- غروی. م.ج. (۱۳۷۸). کتاب جامع تک یاخته شناسی پزشکی، موسسه فرهنگی انتشاراتی تیمورزاده- نشر طبیب.

۳- فولادوند، ج. جعفری، م. (۱۳۷۸). شیوع آنتی بادیهای ضد توکسوپلاسمای گوندیدی در زنان حامله بوشهر. خلاصه مقالات سومین کنگره سراسری انگل شناسی پزشکی ایران، ساری اسفند ماه ۱۳۷۹.

۴- کشاورز، ح. و همکاران (۱۳۷۷). بررسی سرواپیدمیولوژی توکسوپلاسموز در شهرستان کرج. خلاصه مقالات سومین کنگره سراسری انگل شناسی پزشکی ایران، ساری اسفند ماه ۱۳۷۹.

۵- گزارش اقتصادی - اجتماعی استان قم (۱۳۷۹). معاونت اقتصادی و برنامه ریزی سازمان مدیریت استان قم.

6- Gutierrez J. Maraoto MC. Roldan C. Seroprevalence of human toxoplasmosis. Microbios 1996; 85:73-75.

7- Luyasu V. Robert A. Lissenko D. et al. A seroepidemiological study on toxoplasmosis. Acta Clin Belg 1997; 52:3-8.

8- Leone F. Allori B. Antognoli. Et al. Toxoplasmosis in pregnancy: research on 2295 women in Rome and its province. Riv Eui Sci Med Farmaco 1996; IR:191-195.

جدول ۱: توزیع فراوانی آنتی بادی IgG توکسوپلازما گوندیی به روش ELISA در زنان زایمان کرده بر حسب سن و مقدار آنتی بادی (استان قم ۱۳۸۰/۸۱)

گروه سنی (سال)	موارد مثبت سرولوژیک و مقدار آنتی بادی (IU/ML)													
	جمع		۳۰۰-۳۶۲		۲۲۵-۲۷۸		۱۵۷-۲۱۰		۱۰۷-۱۴۱		۶۶-۹۳		موارد منفی سرولوژیک	
	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد
۱۴-۱۸	۱۰۰/۰	۴۳	۲/۳	۱	۴/۶۵	۲	۴/۶۵	۲	۷/۰	۳	۹/۳	۴	۷۲/۱	۳۱
۱۹-۲۳	۱۰۰/۰	۱۹۹	۱/۰	۲	۱/۰	۲	۸/۵	۱۷	۱۶/۱	۳۲	۵/۱	۱۰	۶۸/۳	۱۳۶
۲۴-۲۸	۱۰۰/۰	۱۸۱	۰/۶	۱	۴/۴	۸	۸/۳	۱۵	۱۳/۳	۲۴	۲۰/۴	۳۷	۵۳/۰	۹۶
۲۹-۳۳	۱۰۰/۰	۱۰۸	---	---	۶/۵	۷	۸/۳	۹	۱۲/۰	۱۳	۲۰/۴	۲۲	۵۲/۸	۵۷
۳۴-۳۸	۱۰۰/۰	۶۱	---	---	---	---	۱/۶	۱	۱۱/۵	۷	۵۲/۵	۳۲	۳۴/۴	۲۱
۳۹>	۱۰۰/۰	۸	---	---	---	---	---	---	---	---	۷۵/۰	۶	۲۵/۰	۲
جمع	۱۰۰/۰	۶۰۰	۰/۶	۴	۳/۲	۱۹	۷/۳	۴۴	۱۳/۲	۷۹	۱۸/۵	۱۱۱	۵۷/۲	۳۴۳

جدول ۲: توزیع فراوانی آنتی بادی IgG ضد توکسوپلازما گوندیی به روش IFA در زنان زایمان کرده بر حسب سن و تیتراژ آنتی بادی (استان قم ۱۳۸۰-۸۱)

گروه سنی (سال)	موارد مثبت سرولوژیک و مقدار آنتی بادی (IU/ML)													
	جمع												موارد منفی سرولوژیک	
	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد
۱۴-۱۸	۱۰۰/۰	۴۳	---	---	۲/۳	۱	۴/۷	۲	۹/۳	۴	---	---	۸۳/۷	۳۶
۱۹-۲۳	۱۰۰/۰	۱۹۹	۱/۰	۲	۲/۵	۵	۹/۰	۱۸	۱۵/۱	۳۰	۲/۰	۴	۷۰/۴	۱۴۰
۲۴-۲۸	۱۰۰/۰	۱۸۱	---	---	۳/۳	۶	۸/۸	۱۶	۱۰/۵	۱۹	۲۲/۷	۴۱	۵۴/۷	۹۹
۲۹-۳۳	۱۰۰/۰	۱۰۸	۰/۹	۱	۵/۶	۶	۹/۳	۱۰	۱۰/۲	۱۱	۲۲/۲	۲۴	۵۱/۸	۵۶
۳۴-۳۸	۱۰۰/۰	۶۱	---	---	---	---	۳/۳	۲	۱۱/۵	۷	۵۰/۸	۳۱	۳۴/۴	۲۱
۳۹>	۱۰۰/۰	۸	---	---	---	---	---	---	---	---	۷۵/۰	۶	۲۵/۰	۲
جمع	۱۰۰/۰	۶۰۰	۰/۵	۳	۳/۰	۱۸	۸/۰	۴۸	۱۱/۸	۷۱	۱۷/۷	۱۰۶	۵۹/۰	۳۵۴

جدول ۳: میزان همخوانی آنتی بادی IgG ضد توکسوپلاسما گوندیمی به روشهای IFA و ELISA بر حسب نوع آزمایش سرولوژی (استان قم ۸۱-۱۳۸۰)

جمع		موارد منفی سرولوژیک		موارد مثبت سرولوژیک		نوع آزمایش سرولوژی
درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	
۱۰۰/۰	۶۰۰	۵۹/۰	۳۵۴	۴۱/۰	۲۴۶	آزمایش IFA
۱۰۰/۰	۶۰۰	۵۷/۲	۳۴۳	۴۲/۸	۲۵۷	آزمایش ELISA

Archive of SID