Archive of SID

مقاله تحقیقاتی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران
سال پنجم ● شماره ۱ ● صفحات ۱۱۴۱ تا ۱۱۴۹ ● بهار ۱۳۸۶

مقایسه حساسیت دو تکنیک IFA و ELISA با روش PCR در تشخیص انگل توکسوپلاسما گوندی در بین کودکان کمتر از یکسال بستری شده در بیمارستان طالقانی

*معصومه کرمی[۱]، سیدامیرعلی مهبد[۲]، مینو شاددل[۳]

چکیده

سابقه و هدف: درصدی از مرگ و میر کودکان زیر یکسال و همچنین کودکانی با عوارض عصبی مختلف و گرفتاری سایر ارگانها، در ارتباط با آلودگی دوران جنینی آنان به توکسوپلاسما گوندی (از طریق جفت) می‌باشد. هدف از انجام این مطالعه بررسی مقایسه حساسیت دو تکنیک IFA و ELISA با روش PCR در تشخیص انگل توکسوپلاسما گوندی در بین کودکان کمتر از یکسال بستری شده در بیمارستان طالقانی می‌باشد.

مواد و روشها: در این مطالعه توصیفی ـ آینده‌نگر ۱۰۴ نوزاد تازه متولد شده مشکوک به توکسوپلاسموزس مادرزادی یک روزه الی تا قبل از یکسالگی که در بخش نوزادان بیمارستان طالقانی از اردیبهشت ۱۳۷۹ تا ۱۳۸۰ بستری می‌شدند جهت ارزیابی وضعیت آنتی بادیهای اختصاصی کلاس Igm و IgG ضد توکسوپلاسماگوندی به روش‌های ELISA و IFA مورد بررسی قرار گرفته و در عین حال مایع نخاع و نمونه ۱۰۴ در همان فاصله زمانی جهت ردیابی ژنوم این انگل به روش PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند. داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۱/۵ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته‌ها: نتایج آزمایش PCR حکایت از ابتلاء ۶ نوزاد از ۱۱۵ نوزاد تحت بررسی (۵/۲۲ درصد) به توکسوپلاسموزیس مادرزادی داشت. در روش IFA تعداد مبتلایان ۲ نفر از ۱۰۴ نوزاد تحت بررسی (۱/۹۳ درصد) و در روش ELISA، ۶ نفر از ۱۰۶ نوزاد تحت بررسی (۵/۶۶ درصد) بود. از آنجائیکه بر روی سرم هر ۶ نوزاد مثبت از نظر PCR، آزمایشات IFA و ELISA صورت گرفته بود، می‌توان نتایج آزمایشات را بین آنها مقایسه نمود.

نتیجه‌گیری: طبق نتایج حساسیت روش ELISA/IgM بر حسب PCR، ۸۳/۳۳٪ و ویژگی آن ۹۹٪ می‌باشد و حساسیت روش ELISA/IgG بر حسب PCR، ۳۳/۳٪ با ویژگی ۶۴٪ می‌باشد.حساسیت روش IFA/IgG بر حسب PCR در رقت ۱/۱۰۰، ۱۰۰٪ ولی با ویژگی ۴۴/۹٪ می‌باشد و حساسیت روش IFA/IgM بر حسب PCR با رقت ۱/۱۰۰، ۸۳/۳٪ با ویژگی ۱۰۰٪ می‌باشد.

کلمات کلیدی: توکسوپلاسموزیس، کودکان، IFA، ELISA

مقدمه

درصدی از مرگ و میر کودکان زیر یکسال و همچنین کودکانی با عوارض عصبی مختلف و گرفتاری سایر ارگانها، در ارتباط با آلودگی دوران جنینی آنان به توکسوپلاسماگوندی (از طریق جفت) می‌باشد، این مسئله علاوه بر اینکه میتواند منجر به سقط جنین شود، احتمال تلف شدن نوزاد بعد از تولد و قبل از یک سالگی و همچنین باقی گذاشتن علائم بالینی مختلف وجود دارد (۱).

در این بررسی قصد بر این است که مقایسه‌ای بین حساسیت روش

۱ـ مربی، دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران، دانشکده پزشکی،گروه بیوشیمی (*نویسندهٔ مسؤول)
تلفن: ۸۸۰۲۸۳۵۰-۰۲۱
۲ـ دانشیار دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران، دانشکده پزشکی،گروه انگل و قارچ شناسی
۳ـ مربی دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران، دانشکده پزشکی،گروه انگل و قارچ شناسی

www.SID.ir

Archive of SID

IFA(IFA:Immuno Floroscent Assay) (ایمونوفلورنست غیر مستقیم) به منظور تعیین آنتی بادی‌های اختصاصی کلاس IgM و IgG و روش ELISA(Enzyme Linked Immune Sorbet Assay) جهت تشخیص انگل توکسوپلاسما گوندی به عمل آید و پاسخ‌های این دو روش با پاسخ حاصل از روش PCR(Polymerase Chain Reaction) که یک روش مطمئن در این جهت است، مقایسه شود و این خود قدمی بسیار مهم در بهبود روش‌های تشخیص آزمایشگاهی انگل توکسوپلاسما گوندی است. بنابراین روی یک نمونه هر سه روش آزمایش انجام می‌گیرد .انجام IFA نسبتاً ساده و دقت و صداقتش نیز قابل توجه است. در این روش واکنش اختصاصی پادگن-پادتن بوسیله آنتی سرمهای متصل شده به یک ماده فلورسئین شناسائی می‌شود. آنتی سرم فلورسئین می‌تواند به منظور شناسائی IgG و IgM و یا مجموعه ایمنوگلوبولینها استفاده گردد (۲).

روش ELISA یک روش ایمن شیمیائی می‌باشد که با روش‌های مختلف برای اندازه گیری آنتی بادیهای توکسوپلاسماگوندی انجام می‌شود (۳).

روش PCR جهت جستجو کردن ژن اختصاصی کد کننده پروتئین سطحی یا (SSP:Specific-Surface-Protein) که در سویه‌های مختلف توکسوپلاسما گوندی وجود داشته و به تعبیری همان P_{30} می‌باشد، ابداع شده است. در این روش یک جزء غیر تکرار شونده از ژن توکسوپلاسما که پروتئین P_{30} را کد می‌کند شناسائی شده و به نحوی تقویت می‌شود (amplification) که در عرض چند ساعت به تعداد زیادی از آن نسخه برداری گردد. پس از انتقال DNAها به ژل آگارز این ژن آنالیز و قابل شناسائی میشود(۴).

روش PCR یک روش حساس، اختصاصی و سریع جهت تشخیص DNA توکسوپلاسماگوندی در مایع آمینوتیک، خون، نمونه‌های بافتی و مایع مغزی نخاعی می‌باشد. بخصوص زمانی که مقدار نمونه در دسترس خیلی کم باشد، بهترین انتخاب است(۵).

هدف از انجام این مطالعه بررسی مقایسه حساسیت دو تکنیک IFA و ELISA با روش PCR در تشخیص انگل توکسوپلاسماگوندی در بین کودکان کمتر از یکسال بستری شده در بیمارستان طالقانی می‌باشد.

موارد و روشها

در این مطالعه توصیفی ـ آینده‌نگر ۱۰۴ نوزاد تازه متولد شده مشکوک به توکسوپلاسموزس مادرزادی یک روزه تا قبل از یکسالگی که در بخش نوزادان بیمارستان طالقانی از اردیبهشت ۱۳۷۹ تا ۱۳۸۰ بستری می‌شدند جهت ارزیابی وضعیت آنتی بادیهای اختصاصی کلاس Igm و IgG ضد توکسوپلاسماگوندی به روش‌های ELISA و IFA مورد بررسی قرار گرفته و در عین حال مایع نخاع و نمونه ۱۰۴ در همان فاصله زمانی جهت ردیابی ژنوم این انگل به روش PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نمونه‌گیری درشرایط استریل انجام و نمونه مایع نخاع (CSF) و خون گرفته و طبق هماهنگی قبلی، بلافاصله به آزمایشگاه بیمارستان طالقانی منتقل می‌شد. نمونه CSF به فریزر ۷۰- درجه سانتیگراد منتقل و نمونه خون بعد از سانتریفوژ کردن، سرم بدست آمده را به ۲ قسمت کرده و به همراه رسوب خون بدست آمده به فریزر ۷۰- درجه سانتیگراد منتقل می‌شدند.

تکنیک اسمینوفلئورسانس غیر مستقیم (IFA) روی نمونه‌های سرم در آزمایشگاه انگل شناسی دانشکده پزشکی با همکاری گروه ایمونولوژی انجام شد. تکنیک ELISA در آزمایشگاه بیمارستان ۵۰۱ ارتش روی نمونه‌های سرم انجام شد. تکنیک PCR روی نمونه‌های CSF و رسوب خون در بخش بیوتکنولوژی دانشگاه علوم پزشکی ارتش انجام شد. داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۱/۵ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

مواد و روش ایمونو فلئورسانس غیر مستقیم (IFA)

آنتی ژن فیگوره (جسم کامل انگل)ویالهای تجاری انستیتوپاستور ایران و شرکت بهرینگ آلمان که از تاکی زوئیت‌های مایع صفاق موشهای آلوده به سویه RH توکسوپلاسما گوندی استفاده شد. برای تهیه لامهای آنتی ژنی ابتدا تعداد انگل را در محلول آنتی ژنی کنترل نمود. تعداد مناسب انگل هنگامیکه بوسیله میکروسکوپ مطالعه می‌شود در بزرگنمائی ۴۰، ۱۰۰ تا ۱۵۰ ارگانیسم مجزا و تک تک در هر میدان میکروسکوپی می‌باشد و یا در هر ۵ میکرو لیتر از محلول باید ۱۰۰ انگل وجود داشته باشد. بدین منظور محلول آنتی ژن را بوسیله یک سرنگ ۱ یا ۲ میلی لیتری و سرسوزن ۱۹-۲۱ حداقل ۳ بار به آرامی کشیده و درون ویال بر می‌گردانیم تا از بهم چسبیدن تاکی‌زوئیت‌ها جلوگیری شود و محلولی یکنواخت حاصل شود. یک قطره از محلول آنتی ژن

www.SID.ir

Archive of SID

را بین لام و لامل قرار داده با بزرگنمائی ۴۰ میکروسکوپ نوری مطالعه می‌کنیم در صورت تراکم زیاد انگل می‌توان آن را با بافر P.B.S (Buffer- Saline – Phosphate) رقیق نمود. بافر PBS شامل Na_2HPo_4 (۱/۱۵ gr) و KH_2PO_4 (۰/۲ gr) و کلرورپتاسیم ۰/۲ gr و کلرو سدیم ۸gr با آب مقطر به حجم یک لیتر رسانده و PH آن روی ۷/۶ تنظیم گردد (محلول در یخچال ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۲ ماه قابل نگهداری است).

محلول آنتی ژن را در داخل اطاقک هموبیل می‌ریزیم. لامها را در امتداد یکدیگر بصورت ردیف می‌چینیم. با قرار دادن حداقل ۵ میکرو لیتر از آنتی ژن بر روی لام ۱۲ پلاک آنتی ژنی در دو ردیف ۶ تایی قرار می‌گیرد. لامها را در جای خود بدون حرکت قرار می‌دهیم تا پلاکهای آنتی ژنی که روی آنها قرار گرفته در جریان هوا بخوبی خشک شوند و انگلها روی لام ثابت شوند.

لامها را دوبدو و پشت به پشت چیده و برای جلوگیری از تاثیر رطوبت هوا آنها را در ورقه کاغذ مومی و پس از آن در داخل ورقه نایلونی در دسته‌های ۶ تا ۸ تایی پیچیده و چسب می‌زنیم. تاریخ تهیه را ثبت و در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد به مدت ۶ماه قابل نگهداری است. آنتی گاما گلوبولین انسانی کنژوگه شده با FITC شرکت تجاری Behring مورد استفاده قرار گرفت. محلول پوشاننده لام شامل ۱۰ میلی لیتر PBS با ۹۰ میلی لیتر گلسیرین مخلوط و مورد استفاده قرار گرفت.

نمونه‌ها را از فریزر خارج تا به دمای محیط برسند. چنانچه کدورت مشاهده شود پیش از انجام تست طبق جدول زیر رقتهای متوالی از سرم مورد آزمایش و سرم کنترل مثبت و منفی در حفرات میکروپلیت تهیه می‌شود (جدول ۱).

جدول ۱- رقت‌های سرم نمونه و سرم مثبت و منفی

شماره	سرم مورد آزمایش	رقت نهایی
۱	۱۸۰ میکرو لیتر PBS+ ۲۰ میکرو لیتر سرم	۱:۱۰
۲	۱۸۰ میکرو لیتر PBS+ ۲۰ میکرو لیتر سرم ۱:۱۰	۱:۱۰۰
۳	۱۰۰ میکرو لیتر PBS+ ۱۰۰ میکرو لیتر سرم ۱:۱۰۰	۱:۲۰۰
۴	۱۰۰ میکرو لیتر PBS+ ۱۰۰ میکرو لیتر سرم ۱:۲۰۰	۱:۴۰۰
۵	۱۰۰ میکرو لیتر PBS+ ۱۰۰ میکرو لیتر سرم ۱:۴۰۰	۱:۸۰۰

مراحل انجام کار:

۱- به مدت ۱۰ دقیقه قبل از گذراندن سرمها روی لامهای آنتی ژن، لامها را از فریزر خارج کرده از پوشش‌های آن بیرون آورده در دسیکاتور قرار می‌دهیم تا رطوبت هوا را به خود جذب نکند.

۲- دور هر پلاک آنتی ژنی ابتدا با قلم الماس و سپس با ماژیک ضد آب دایره‌ای رسم تا از تداخل سرمها در یکدیگر جلوگیری و لامها را شماره گذاری می‌کنیم.

۳- بر روی هر یک از پلاکهای آنتی ژنی یک رقت از سرم مورد آزمایش را به اندازه ۱۰-۵ میکرولیتر قرار می‌دهیم (از غلظت کم به زیاد)

۴- همینکار برای رقت‌های سرم کنترل مثبت و منفی عمل می‌شود.

۵- لامها در جعبه مرطوب در محیط ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه بی حرکت قرار می‌دهیم. در این مرحله آنتی بادی اختصاصی بر علیه توکسو پلاسما گوندی در سرم به آنتی ژنهای سطحی انگل متصل می‌گردد.

۶- لامها را درآورده و روی سطح هر لام را با بافر PBS شستشو می‌دهیم. سپس ۲دو بار این کار تکرار می‌کنیم. در مراحل شستشو سایر پروتئین‌ها و آنتی بادیهای باند نشده به انگل از سطح لام شسته می‌شوند.

۷- لامها را در جریان هوا قرار می‌دهیم ولی نباید کاملاً خشک شود.

۸- از آنتی هیومن گلوبولین کنژوگه با رقت ۱/۲۰ تا ۱/۳۰ حاوی اوانس بلو به میزان ۵ تا ۱۰ میکرولیتر روی هر پلاک قرار می‌دهیم و لامها را در اطاقک مرطوب به مدت ۳۰ دقیقه بی حرکت قرار می‌دهیم. در این مرحله باید اطاقک مرطوب را در تاریکی قرار داد. زیرا ماده کنژو گه در مجاورت نور پایداری خود را بتدریج از دست میدهد.

۹- مراحل ۶ و ۷ را تکرار می‌کنیم.

۱۰- روی لام در سطح هر پلاک یک قطره از محلول پوشاننده لام قرار داده و روی لامها را با لامل می‌پوشانیم.

۱۱- میکروسکوپ فلوئورسانس ۱۵ دقیقه قبل روشن شود.

۱۲- با قرار دادن یک قطره روغن در روی هر پلاک، عدسی شیئی میکروسکوپ در روغن شناور می‌گردد. پس از بررسی سرم

www.SID.ir

Archive of SID

کنترل مثبت و منفی بقیه لامها را بررسی می‌کنیم.

آخرین رقتی را که واکنش مثبت داده است بعنوان تیتر سرم گزارش می‌نمائیم. (منظور از واکنش مثبت زمانی است که سطح انگل بواسطه اتصال آنتی بادی اختصاصی و آنتی هیومن گلوبولین کنژوگه سبز درخشان گردد.)

روش تکنیک ELISA:

یک کیت میکروالیزای ۹۶ تستی ساخت شرکت، twenty جهت اندازه‌گیری IgGضد توکسوپلاسما و یک کیت میکروالیزای ۹۶تستی ساخت شرکت twenty جهت اندازه‌گیری IgM ضد توکسوپلاسما تهیه گردید(۶).

آزمایش ELISA/IgG:

تمام مواد موجود در کیت و نمونه‌ها باید قبل از شروع کار به دمای اتاق (۲۵°C-۱۲) برسند.

۱ـ چاهکها را به تعداد نمونه‌ها جدا کرده و در قاب قرار می‌دهیم، ۴ خانه جهت کالیبریتور، یک کنترل منفی و دو کنترل مثبت در نظر می‌گیریم.

۲ـ نمونه‌ها، کالیبریتور کنترلها را ۱:۲۱ (۱۰ml نمونه + ۲۰۰ ml رقیق کننده) در لوله‌های آزمایش رقیق می‌کنیم.

۳ـ در هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌ها و کنترلهای رقیق شده را میریزیم و ۱۰۰ ml رقیق کننده در خانه بلانک ریخته، چاهکها را در دمای اتاق به مدت ۲ ±۲۰ دقیقه انکوبه می‌نمائیم.

۴ـ چاهکها را با ۲۵۰ تا ۳۰۰ میکرو لیتر از محلول شستشو رقیق شده ۵ بار دستگاه واش اتوماتیک می‌شوئیم. پس از آخرین شستشو پلیت را روی حوله یا کاغذ جاذب رطوبت چند بار زده تا رطوبت اضافی آن گرفته شود.

۵ـ ۱۰۰ میکرولیتر محلول کنژوگه به تمام چاهکها و چاهک بلانک اضافه می‌کنیم.

۶ـ پلیت به مدت ۲ ±۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه می‌کنیم.

۷ـ مرحله ۴ شستشو را تکرار می‌کنیم.

۸ـ ۱۰۰ میکرولیتر محلول TMB (محلول کروموژن /سوبسترا نوع ا، تتراتیل بنزیدین) آماده مصرف، درب محلول در زمانی که استفاده نمی‌شود باید بسته باشد.)

۹ـ پلیت را به مدت ۲±۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه می‌نمائیم.

۱۰ـ ۱۰۰ میکرو لیتر محلول متوقف کننده (حاوی H_2SO_4یک نرمال آماده مصرف) به همان ترتیبی که TMB را به خانه‌ها اضافه کرده بودیم به چاهکها اضافه می‌کنیم. پلیت را به آرامی تکان داده و حداقل ۵ دقیقه تأمل می‌کنیم.

۱۱ـ رنگ ایجاد شده را توسط دستگاه ELISA Reader در مقابل فیلتر ۴۵۰ نانومتر می‌خوانیم. اگر محلول بلانک بیشتر از ۰/۱۵ خواند آزمایش را تکرار می‌کنیم.

محاسبه نتایج:

۱ـ میانگین کالیبریتورها و کنترل مثبت‌ها را بدست می‌آوریم.

۲ـ Correction Factor عددی است که توسط شرکت سازنده کیت بر روی کالیبریتورها درج شده است و جهت جلوگیری از تغییرات شرایط آزمایش بکار می‌رود.

۳ـ Cut off = CF × OD (Calibrator)

۴ـ مقدار ISR(Immune Status Ratio) برابرست با OD نمونه تقسیم بر مقدار Cut off

آنالیز نتایج:

ISR ≤ ۰/۹ در نتیجه منفی

ISR = ۰/۹-۱/۰۹ نمونه‌ها باید دوباره آزمایش شود.

ISR ≥ ۱/۱ در نتیجه مثبت

آزمایش ELISA/IgM :

طبق بروشورکیت اندازه گیری IgM ضد توکسوپلاسما ساخت شرکت Twinity میکروا لیزای ۹۶ تستی انجام گردید(۶).

محاسبه نتایج

۱ـ جهت هر گونه بیمار، کنترل‌ها و کالیبریتور، باید OD آنتی ژن کنترل (CAg) را از OD (جذب نوری) چاهکهای آنتی ژن کم کنیم.

۲ـ میانگین کالیبریتورها را محاسبه نمائیم.

۳ـ فاکتور تصحیح (Correction Factor):جهت محاسبه تغیراتی که ممکن است در اثر دمای اتاق و یا مدت زمان انکوبه و به اجرای آزمایش پیش بیاید شرکت Twinty عدد فاکتور تصحیح را روی کالیبریتورها ثبت نموده است.

۴ـ Cut off= CF´×OD(Calibrator)

۵ـ مقدار OD برابراست با ISR(Immune Status Ratio)نمونه تقسیم بر مقدار Cut off

www.SID.ir

Archive of SID

آنالیز نتایج

ISR ≤ ۰/۹ در نتیجه منفی

ISR = ۰/۹-۱/۰۹ نمونه‌ها باید دوباره آزمایش شود.

ISR ≥ ۱/۱ در نتیجه مثبت

تکنیک PCR

تکنیک روی نمونه‌های خون و CSF نوزادان بستری در بیمارستان طالقانی انجام گردید. مراحل PCR شامل سه مرحله EXTRACTION، PCR و الکتروفورز می‌باشد.

الف ـ EXTRACTION

۵۰۰ لاندا از نمونه خون و CSF در میکرویتوب ریخته و در سانتریفوژ یخچال دار با سرعت ۴۰۰۰ RPM و دمای ۴°C به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ می‌گردد. محلول رویی دور ریخته و به رسوبات ۲۰ لاندا از پروتئیناز K(۱mg/ml) و ۱۰۰ لاندا از lyses buffer (شامل : Tris Hcl = ۰/۱۵۷۶ gr و Mgcl۲= ۰/۰۳۱ gr و Kcl= ۰/۳۷۳ gr در ۰/۵ درصد tween ۲۰ در ۱۰۰ml) اضافه می‌گردد.

میکروتیومها ۹۰ دقیقه در بن ماری ۵۵c قرار داده و در این فاصله مرتباً rak بهم زده شود. نمونه‌ها سانتریفوژ و سپس ۱۰ دقیقه در ۹۴°C یا آبجوش قرار داده و سپس سانتریفوژ در ۱۲۰۰۰ دور و دمای ۴°C به مدت ۵ دقیقه انجام و محلول رویی به عنوان نمونه DNA استخراج شده جهت انجام عمل PCR بوده و در دمای ۲۰°C- ذخیره می‌گردد.

ب ـ انجام PCR:

به ازای هر نمونه یک میکرووب مخصوص PCR علامت گذاری شده و ۱ لاندا از DNA نمونه و ۴۹ لاندا از محلول Master Mix (شامل: ۵لاندا= ۱۰x بافر و ۱ لاندا= Mgcl۲ و ۰/۵ لاندا= dNTP و ۱ لاندا = N۱ و ۱لاندا= C۱ و ۰/۴ لاند = Taq پلیمر از که با آب مقطر استریل به حجم ۴۹ لاندا رسانده شود) ریخته و میکروتیوبها در اتاق PCR قرار می‌گیرد.

پس از پایان PCR نمونه‌ها به اتاق الکترفورز منتقل می‌شوند و یا در فریزر ۲۰°C- نگهداری می‌شوند.

الکترفورز:

آماده کردن ژل آگارز با غلظت ۲gr/۱۰۰ که پودر آگارز در بافر ۰/۵X TBE (Tris base, Boric Acid, EDTA) حل شده و سپس حرارت داده تا کاملاً ژل یکدست بدست آید. سپس یک قطره کوچک (به اندازه ۳-۲ لاندا) از محلول اتیدیوم بروماید به آن اضافه نموده (درزیر هود شیمیایی) و آنرا در ظرف الکترفورزکه قبلاً شانه‌های آن تنظیم شده‌اند ریخته می‌شود تا یک ژل یکدست بدست آید.

روش کار

پس از آماده شدن ژل و سفت شدن آن شانه‌هایی را از روی ژل برداشته و کل صفحه ژل را در ظرف اصلی الکترفورز که با بافر ۰/۵x TBE پر شده است، قرار داده می‌شود.۲۵ میکرو لیتر از نمونه مارکر (ladder) را با ۲ میکرو لیتر از محلول آبی رنگ Loading buffer مخلوط کرده و در حفره اول ژل توسط سمپلر Load می‌شود. نمونه مثبت PCR شده و نمونه منفی PCR شده نیز با حجمهای مشابه با Loading buffer مخلوط شده و بداخل حفره‌ها به ترتیب Load می‌گردند. دستگاه الکترفورز را با ولتاژ ۵۰ وشدت جریان ۱۸ تنظیم کرده و مدت یکساعت لازم است تا الکترفورز انجام گردد.پس از اتمام کار ژل الکترفورز را در دستگاه UV transilluminator قرار داده و باندهای بدست آمده را خوانده و از روی ژل عکس گرفته می‌شود.

تجزیه و تحلیل داده‌ها واصول اخلاقی:

بعد از انجام آزمایشها، طبق نتایج بدست آمده ابتدا درصد آلودگی مشخص شد و سپس جهت تعیین حساسیت و ویژگی روشهای آزمایش، طبق فرمول زیر انجام می‌شود(۶و ۷):

$$\text{حساسیت روش (IFA)} = \frac{\text{تعداد موارد مثبت از تکنیک IFA}}{\text{تعداد مواردی که واقعاً مبتلا بوده‌اند (+PCR)}}$$

$$\text{حساسیت روش (ELISA)} = \frac{\text{تعداد موارد مثبت از تکنیک ELISA}}{\text{تعداد مواردی که واقعاً مبتلا بوده‌اند (+PCR)}}$$

$$\text{حساسیت روش (IFA)} = \frac{\text{تعداد موارد منفی از تکنیک IFA}}{\text{تعداد مواردی که واقعاً مبتلا بوده‌اند (−PCR)}}$$

$$\text{حساسیت روش (ELISA)} = \frac{\text{تعداد موارد منفی از تکنیک ELISA}}{\text{تعداد مواردی که واقعاً مبتلا بوده‌اند (−PCR)}}$$

و نمونه‌گیری با کسب اجازه از والدین کودکان و هماهنگی با بخش نوزادان و پزشکان و حفظ اسرار خانوادگی، طبق روش‌های استاندارد، انجام شد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- فراوانی نتایج آنتی‌بادی IgM با روش آزمایشگاهی ELISA برحسب PCR

روش تشخیص PCR	IgM مثبت	منفی	جمع
	تعداد(درصد)	تعداد(درصد)	تعداد(درصد)
مثبت	۵(۸/۸۳)	۱(۱۶/۶۷)	۶(۱۰۰)
منفی	۱(۸)	۹۹(۹۹)	۱۰۰(۱۰۰)
جمع	۶(۳/۲)	۹۰(۹۸/۶)	۱۰۶(۱۰۰)

۸۳/۳۳٪ = حساسیت ۹۹٪ = ویژگی

جدول ۳- فراوانی نتایج آنتی بادی‌های IgG با روش آزمایشگاهی ELISA بر حسب PCR

روش تشخیص PCR	IgM مثبت	منفی	جمع
	تعداد(درصد)	تعداد(درصد)	تعداد(درصد)
مثبت	۲(۳۳/۳)	۴(۶۶/۷)	۶(۱۰۰)
منفی	۲(۳۳/۳)	۶۴(۶۴)	۱۰۰(۱۰۰)
جمع	۳۸(۳۵/۸۵)	۶۸(۶۴/۱۵)	۱۰۶(۱۰۰)

۳۳/۳٪ = حساسیت ۶۴٪ = ویژگی

یافته‌ها

از مجموع ۱۰۶ نوزاد بستری شده که آزمایش ELISA/IgM روی سرم خون آنها انجام شد نتایج در جدول شماره ۲ آورده شده است.

۵ نفر از نوزادان در هر دو روش مثبت بوده و یک مورد با وجود مثبت بودن نتیجه آزمایش PCR دارای ELISA/IgM منفی می‌باشد.

حساسیت روش ۸۳/۳۳٪ و ویژگی برابر ۹۹٪ می‌باشد.

از ۱۰۶ سرم نوزاد بستری شده که آزمایش ELISA/IgG انجام شد نتایج بدست آمده بر حسب PCR در جدول شماره ۳ آورده شده است.

دو نفر از ۶ نوزاد PCR مثبت(۳۳/۳٪) از نظر ELISA/IgG مثبت و ۴ نفر(۶۶/۷٪) منفی بوده‌اند. حساسیت این آزمایش ۳۳/۳٪ و ویژگی آن ۶۴٪ می‌باشد

فراوانی نتایج آنتی بادی‌های توتال (Total Ab) با روش IFA بر حسب PCR در جدول ۴ آورده شده است.

رقت‌های ۱/۴۰۰ و ۱/۸۰۰ به ترتیب ۵(۸۳/۳۳٪)و ۴(۶۶/۶۷٪) می‌باشد. حساسیت و ویژگی رقت‌های ۱/۴۰۰ و ۱/۸۰۰ به ترتیب ۸۳/۳٪،۸۲/۶۵٪،۶۶/۶۷٪ و ۹۸٪ می‌باشد.

فراوانی نتایج آنتی بادی‌های IgG با روش IFA بر حسب PCR در جدول شماره ۵ آورده شده است.

جدول ۴- فراوانی نتایج آنتی بادی‌های توتال (Total Ab) با روش آزمایشگاهی IFA بر حسب PCR

روش تشخیص PCR	TotalAb رقت ۱/۸۰۰ مثبت	منفی	رقت ۱/۴۰۰ مثبت	منفی	جمع
	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)
مثبت	۴ (۶۶/۶۷)	۲ (۳۳/۳۳)	۵ (۸۳/۳۳)	۱ (۱۶/۶۷)	۶ (۱۰۰)
منفی	۰ (۸۸/۴)	۹۸ (۹۸)	۱۷ (۱۷/۳۵)	۸۱ (۸۲/۶۵)	۹۸ (۱۰۰)
جمع	۴	۱۰۰	۲۲	۸۲	۱۰۴

۹۸٪ = ویژگی ۶۶/۶٪ = حساسیت ۸۲/۶۵٪= ویژگی ۸۳/۳٪= حساسیت

جدول ۵- فراوانی نتایج آنتی بادی‌های IgG با روش IFA بر حسب PCR

روش تشخیص PCR	آنتی بادیIgG رقت ۱/۱۰۰ مثبت	منفی	جمع	رقت ۱/۲۰۰ مثبت	منفی	جمع	رقت ۱/۴۰۰ مثبت	منفی	جمع
	تعداد(درصد)	تعداد(درصد)	تعداد(درصد)	تعداد(درصد)	تعداد(درصد)	تعداد(درصد)	تعداد(درصد)	تعداد(درصد)	تعداد(درصد)
مثبت	۶(۱۰۰)	۰(۰)	۶(۱۰۰)	۳(۵۰)	۳(۵۰)	۶(۱۰۰)	۲(۳۳/۳)	۴(۶۶/۷)	۶(۱۰۰)
منفی	۵۴(۵۵/۱)	۴۴(۴۴/۹)	۹۸(۱۰۰)	۶۰(۶۱/)	۳۸(۳۸/۸)	۹۸(۱۰۰)	۱۵(۱۵/۳)	۸۳(۸۴/۷)	۹۸(۱۰۰)
جمع	۶۰	۴۴	۱۰۴	۶۳	۴۱	۱۰۴	۱۷	۸۷	۱۰۴

۴۴/۹٪ = ویژگی
۱۰۰٪= حساسیت

۶۱/۲٪ = ویژگی
۵۰٪= حساسیت

۸۴/۷٪ = ویژگی
۳۳/۳٪= حساسیت

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۶- فراوانی نتایج آنتی بادی‌های IgM باروش IFA بر حسب PCR

آنتی بادی IgM	رقت ۱/۱۰۰		جمع	رقت ۱/۲۰۰		جمع
	مثبت	منفی		مثبت	منفی	
روش تشخیص PCR	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)
مثبت	۵ (۸۳/۳)	۱ (۱۶/۷)	۶ (۱۰۰)	۲ (۳۳/۳)	۴ (۶۶/۷)	۶ (۱۰۰)
منفی	۰ (۰)	۹۸ (۱۰۰)	۹۸ (۱۰۰)	۰ (۰)	۹۸ (۰)	۹۸ (۱۰۰)
جمع	۵	۹۹	۱۰۴	۲	۱۰۲	۱۰۴

۱۰۰٪ = ویژگی ۸۳/۳٪ = حساسیت ۱۰۰٪= ویژگی ۳۳/۳٪= حساسیت

آنتی بادی IgG مثبت در رقت‌های ۱/۱۰۰ و ۱/۲۰۰ و ۱/۴۰۰ بر حسب PCR به تر تیب: ۶(۱۰۰٪)،۳(۵۰٪)،۲(۳۳/۳٪) می‌باشد. حساسیت روش در رقت‌های ۱/۱۰۰،۱/۲۰۰ و ۱/۴۰۰ به ترتیب ۱۰۰٪، ۵۰ ٪ و ۳۳/۳٪ می‌باشد و ویژگی روش در این رقت‌ها به ترتیب ۴۴/۹٪،۶۱/۲٪ و ۸۴/۷٪ می‌باشد.

فراوانی نتایج مثبت آنتی بادی‌های IgM با روش IFA بر حسب PCR در رقت‌های ۱/۱۰۰ و ۱/۲۰۰ به ترتیب ۵(۸۳/۳٪) و ۲(۳۳/۳٪) می‌باشد.حساسیت این روش در رقت‌های ۱/۱۰۰ و ۱/۲۰۰ به ترتیب ۸۳/۳٪ و ۳۳/۳٪ می‌باشد،ویژگی این روش به ترتیب ۱۰۰٪ و ۱۰۰٪ می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

در این بررسی سرم ۱۰۶و ۱۰۴ نوزاد تازه متولد شده ۱ روزه الی ۱ ماهه بترتیب جهت ارزیابی وضعیت آنتی بادیهای اختصاصی کلاس‌های IgM و IgG ضد توکسو پلاسما گوندی به روش‌های ELISA و IFA مورد بررسی قرار گرفت. در عین حال مایع نخاع، خون و یا هر دو نمونه ۱۱۵ نوزاد جهت ردیابی ژنوم توکسو پلاسما نیز به روش PCR مورد آزمایش قرار گرفتند.

معیار ما جهت ابتلاء به توکسوپلاسموزیس، مثبت شدن آزمایش PCR یکی از نمونه‌های خون، مایع نخاع و یا هر دو (۱۲-۸) و در عین حال بالا بودن عیار آنتی بادیهای اختصاصی کلاس IgM به یکی از دو روش ELISA و IFA بود(۱۳و۱۴).

مشاهده عیار بالای آنتی بادیهای اختصاصی کلاس IgG و یا بالا بودن عیار توتال آنتی بادی به تنهایی و بدون افزایش آنتی بادیهای کلاس IgM در سرم نوزادان، در این بررسی به منزله ابتلاء مادران به توکسوپلاسموزیس در دوران غیر از بارداری اخیر و انتقال غیر فعال آنتی بادی به نوزادان در دوران جنینی تلقی گردید(۱۴).

حداقل عیار لازم جهت آنتی بادیهای کلاس IgM در روش IFA جهت مثبت در نظر گرفتن آزمایش ۱/۱۰۰ و در روش ELISA بالاتر بودن جذب نوری از عدد Cut off ارائه شده توسط شرکت سازنده کیت بود.

جدول شماره ۲ مقایسه‌ای دارد بین نتایج به دست آمده از PCR به عنوان GoldStandard (۹) با نتایج به دست آمده ازاندازه گیری مقادیر آنتی بادیهای اختصاصی کلاس IgM به روش ELISA.

همانطور که مشخص است در ۵ نفر از نوزادان هر دوآزمایش به طور توام مثبت بوده‌اند. در یک مورد با وجود مثبت بودن نتیجه آزمایش PCR، نتیجه آزمایش ELISA از نظر آنتی بادیهای کلاس IgM منفی بوده و در مورد دیگری بر عکس، با وجود منفی بودن نتیجه آزمایش PCR، آزمایش ELISA از نظر آنتی بادیهای کلاس IgM مثبت بوده است.آزمایشات آماری صورت گرفته نشان داده‌اند که در مقایسه با نتایج بدست آمده از PCR به عنوان بهترین و حساس ترین واختصاصی ترین آزمایش، بررسی آنتی بادیهای کلاس IgM به روش ELISA در تشخیص توکسوپلاسموزیس در نوزادان دارای حساسیتی معادل ۸/۳۳ ٪ و دارای ویژگی برابر ۹۹ درصد می‌باشد.

همانطور که از قبل نیز انتظار آن را داشتیم و تنها جهت اثبات مجدد آن که نمی‌توان از روی نتایج بدست آمده از بررسی آنتی بادیهای کلاس IgG با روش ELISA پی به بروز توکسوپلاسموزیس حاد برد، جدول شماره ۳ ارائه گردیده است. همانطور که در این مشاهده می‌گردد، در هنگام بررسی تنها ۲ نفر از ۶ نوزاد PCR مثبت (۳۳/۳٪) از نظر آنتی بادیهای کلاس IgG با روش ELISA مثبت بوده و ۴ نفر از آنها (معادل ۶۶/۷٪) منفی بوده‌اند. بنابراین حساسیت

www.SID.ir

Archive of SID

این آزمایش ناچیز و حدود ۳۳/۳ ٪ خواهد بود. از طرف دیگر از آنجائیکه نتیجه PCR ۴ نفر از ۶۸ نوزاد IgG منفی مثبت بوده است (۵/۸۸٪) بنابراین منفی بودن این آزمایش نمی‌تواند منتفی کننده عفونت باشد. با توجه به منفی بودن نتایج PCR ۶۴ نوزاد از ۶۸ نوزاد تحت بررسی IgG منفی می‌توان چنین نتیجه گیری نمود که ویژگی آزمایش ردیابی آنتی بادیهای کلاس IgG به روش ELISA جهت ردیابی توکس. پلاسموزیس حاد حدود ۶۴ درصد است.

در جدول شماره ۴ مقایسه‌ای شده بین نتایج به دست آمده از عیار ۱/۴۰۰ توتال آنتی بادی به روش IFA با نتایج به دست آمده از PCR. همانطور که مشاهده می‌گردد در حالیکه ۵ نفر از ۶ نوزاد PCR مثبت (۸/۳۳ درصد ازآنها) دارای توتال آنتی بادی اختصاصی در عیار ۱/۴۰۰ بوده‌اند، نتیجه آزمایش یک نفر از آنها (۱۶/۷ ٪) منفی بوده که این امر نشان دهنده این مهم است که حساسیت این آزمایش در مقایسه با PCR حدود ۸۳/۳ ٪ می‌باشد. اما از آنجائیکه ۱۷ نفر از ۹۸ نفر PCR منفی نیز دارای توتال آنتی بادی اختصاصی مثبت در این رقت بوده‌اند، ویژگی این آزمایش تنها حدود ۸۲/۶۵ ٪ به دست آمداز جدول شماره ۴ مشخص می‌گردد که اگر رقت ۱/۸۰۰ را نا نشانه مثبت بودن آزمایش توتال آنتی بادی به روش IFA در نظر بگیریم، از آنجائیکه ۴ نفر از ۶ نوزاد PCR مثبت دارای نتیجه آزمایش مثبت بوده‌اند از میزان حساسیت آزمایش کاسته شده ولی در عوض بر میزان ویژگی آن افزوده خواهد شد.

حساسیت آزمایش به رقم ۶۶/۶۷ ٪ کاهش یافته ولی ویژگی آن ۹۸ ٪ افزایش خواهد یافت.

همانطور که از جدول شماره ۵ مشخص و در کلیه تحقیقات صورت گرفته قبلی نیز ذکر شده است، هیچ یک از رقت‌های موسوم در آزمایش ارزیابی مقادیر IgG اختصاصی ضد توکسوپلاسما سرم نوزادان تحت بررسی نمی‌توانند دارای تخصص (ویژگی) و حساسیت کافی برای تأیید توکسوپلاسموزیس حاد باشند. در حالیکه حساسیت آزمایش در رقت ۱/۱۰۰ بسیار بالا و ۱۰۰ درصد است، ویژگی آن ناچیز و حدود ۴۴/۹ ٪ می‌باشد. با افزایش عیار مورد قبول نیز گرچه بر مقادیر ویژگی آزمایش افزوده شده و به حدود ۶۱/۲ ٪ میرسد، اما به همان میزان از حساسیت آزمایش کاسته شده، مقادیر حساسیت به ۵۰ درصد و سپس ۳۳/۳ ٪ نقصان خواهد یافت.

جدول شماره ۶ به بررسی مقایسه‌ای بین نتایج آنتی بادیهای کلاس IgM سرم نوزادان و نتایج PCR پرداخته است. همانطور که مشاهده می‌شود بررسی عیار آنتی بادیهای اختصاصی از کلاس IgM در رقت ۱/۱۰۰ و به روش IFA دارای یکی از بهترین نتایج در مقایسه با PCR در این بررسی بوده است. در حالیکه حساسیت روش در این عیار ۸۳/۳ ٪ است، ویژگی آن بسیار عالی و ۱۰۰ درصد است. با وجود این افزایش عیار نیز قادر به افزایش حساسیت روش آزمایش نبوده و با وجودیکه ویژگی آزمایش در حد ایده آل ۱۰۰ درصد باقی می‌ماند اما از شدت حساسیت آزمایش کاسته شده و به حد ۳۳/۳٪ نقصان خواهد یافت.

تشکر و قدردانی

در انتها لازم است مراتب قدردانی و سپاس خود را از افراد زیر اعلان نمایم

ریاست محترم ومسئولین محترم آموزشی و پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارتش، فوق تخصص زنان و نازائی (انکولوژی) آقای دکتر حفیظی، فوق تخصص نوزادان پرسنل محترم اتاق نوزادان بیمارستان طالقانی سرکار خانم‌ها مهرنوش حاتمی، فاطمه شیخ الاسلام، ناهید جلال لو، امیری، رمضان خوانی جهت همکاری در انجام آزمایشات و واحد آماری. آقایان دکتر محمود شریفیان، خدایار قربان جهت مشاوره علمی آقای محمد جلال وند و خوبان، جهت آماده سازی وسایل لازم آزمایشات PCR،IFA آقای علی افشار جهت زحمات ایشان در امر ویراستاری،تایپ و تکثیر و صحافی جناب آقای عظیمی و محمدزاده جهت تهیه و خرید وسایل، مواد لازم جهت انجام آزمایشات.

References

۱ـ صائبی اسماعیل، بیماریهای انگلی در ایران. جلد اول، چاپ سوم، انتشارات روزبهان ۱۳۶۹، ص ۱۲۶–۱۲۸.

2- PALMER D.F; CA V ALLARO. K. Wo Serology of toxoplasmosis. Immunology Series No.7 Procedural guides. V.S Department of Heauth, Education and Welfare. Public Health Service, Center for Disease Control. Atlanta. 1976.

www.SID.ir

Archive of SID

۳ـ غروی محمد جواد. بررسی سرولوژیک و پارازیتولوژیک توکسوپلاسموز مادرزادی. پایان نامه جهت اخذ درجه دکتری تخصصی انگل شناسی. دانشگاه تربیت مدرس ۱۳۷۱

4- Dupouy C. PCR (Letter). The lancet 1990; 339:1018.

5- Greg.S,lames Vitali. Comparison of Cell culture. Mouse Inoculation and PCR for detection of Toxoplasma gondii. .I- Clin- Microbial 1996; 34(6):1572-75.

۶ـ مهبد سید امیر علی،بررسی سرواپیدمیولوژی.مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارتش.۱۳۸۴، ۳:۳-۶۴۶

۷ـ ملک افضلی حسین، اصول اپیدمیولوژی.انتشارات مرکز نشردانشگاهی، چاپ دوم. ۱۳۶۵فصل ۹ ص:۶۲-۲۳۹

۸ـ کاظم محمد، ملک افضلی حسین، نهاتیپیان واترکس. روش آماری و شاخص بهداشتی. چاپ صلاحی. ۱۳۶۳ فصل ۶ ص:۹۴

9- Piergili FD. Problems and limitations of Conventional and innovative method for the diagnosis of Toxoplasmosis in humans and animals. Parasitologia 2004; 46 (1-2) : 177-81.

10- Davies NW, Brown LJ, Conde. J, Irish D, Robinson. Ro, Swan. A V, Banatvala. J, Howard. RS, Sharief. MK, Muir. P. Factors in flouncing PCR detection of Viruses in cerebrospinal fluid of Patients with Suspected CNS infections. J- Neurol Neurosurg Psychiatry 2005; 76(1) :82-7.

11- Go to M, Takahashi T, kanda T, Iwamoto A. Detection of Toxoplasma gondii by Polymerase Chain reaction in Cerebrospinal fluid from human immunodeficiency Virus -]- in fected Japanese Patients with focal neurological Signs. J Int Med Res 2004; 32(6) : 665 -70.

12- Vidal JE, Colombo FA, De oliyiera AC, Focaccia R, Pereira - Chioccola V. PCR assay asing cerebrospinal fluid for diagnosis of Cerebrat toxoplasmosis in Brazilian AIDS Patients. J Clin Microbial 2004; 42(10) : 4765-8.

13- Lappalainen M, Hedman K, Serodiagnosis of Toxoplasmosis. The impact of measurement of IgG avidity. Ann Ist Super San ita 2004; 40(1):81-8.

14- Kompalic Cristo A, Nogueira SA, Guedes AL, Frota C, Gonzales LF, Brando A, Amendoeira MR, Britto C,Fernandes O. Lack of technical Specificity in the molecular diagnosis of toxoplasmosis. Trans R Soc Trop Med Hyg 2004; 98 (2) : 92-5.

www.SID.ir

Archive of SID

Comparison Between IFA and ELISA Technique with PCR Method in the Diagnosis of Toxoplasma gondi Parasite in Infants Admitted at Taleghani Hospital

*Karami M; MSc[1], Mahbod AA; PhD[2], Shaddel M; MSc[3]

Abstract

Background: There are some methods to detect toxoplasma in infected patients. In this survey we compared sensitivity of two methods of IFA & ELISA.

Material & methods: In this survey the sera of 106 newborn infants from 1 day to 1 month age who were suspected to congenital toxoplasmosis and were hospitalized in infants' ward of Taleghani hospital were evaluated for IgM and IgG specific antibodies with ELISA and IFA techniques respectively. At the same time blood/CSF or both of them were evaluated for genome of this parasite by PCR techniques in 115 suspected infants.

Results: Results of PCR were positive in 6 infants (%5.22) which suggested congenital Toxoplasmosis. The 1/100 titer of IgM specific antibodies was positive in 5 or them by IFA technique. If we suggest that PCR is gold standard technique for Toxoplasmosis diagnosis so the sensitivity of 1/100 titer of IgM antibodies by IFA technique would be 83.3 percent and because no other infants had a positive result so the specificity of this test would be 100 percent.

Conclusion: All 6 infected infants had a positive result from ELISA technique for IgM specific antibodies so the sensitivity of this test was 100 percent .Because no other infants had a positive result, so the specificity of this test was 100 percent. 41 infants had 1/200 titer of specific IgG antibodies by IFA technique. With deletion of 6 infected infants, the prevalence of chronic toxoplasmosis between the mothers whose infants was confined in Taleghani hospital was 34 Percent. This prevalence was 30.2 percent by ELISA technique. Therefore IFA method is more sensitive than ELISA method in detection of toxoplasma gondi.

Keywords: ELISA, IFA, Toxoplasma gondi

1- (*Corresponding Author) Instructor, Army University of Medical Sciences, Facutly of Medicine, Department of Biochemistry
Tel: +9821-88028350

2- Associate Professor, Army University of Medical Sciences, Facutly of Medicine, Department of Parasitology and Mycology

3- Instructor, Army University of Medical Sciences, Facutly of Medicine, Department of Parasitology and Mycology

www.SID.ir