ارزیابی روش مستقیم آگلوتیناسیون به منظور غربالگری توکسوپلاسموزیس در گوسفند

دکترغلامرضا رزمی[۱] دکترصادق رهبری[۲]

مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۴، شماره ۳ ، ۳۳ ـ ۳۱، (۱۳۷۸)

برای ارزیابی کمی و کیفی روش سرولوژی آگلوتیناسیون مستقیم اصلاح شده (DA) در تشخیص پادتنهای ضد توکسوپلاسما در گوسفندان، این روش با روشهای سرولوژی ایمونوفلورسنت غیر مستقیم (IFAT) و تست رنگی (DT) با انجام آزمایش برروی ۱۰۰ سرم انتخابی گوسفندان به طور همزمان مقایسه گردید. نتایج سرمی نشان داد که همبستگی کیفی بین روش آگلوتیناسیون مستقیم اصلاح شده و تست رنگی در ۹۷ درصد موارد، بین روش آگلوتیناسیون مستقیم اصلاح شده و روش ایمونوفلورسنت غیرمستقیم در ۹۶درصد موارد بین روش ایمونوفلورسنت غیر مستقیم و تست رنگی در ۹۹درصد موارد وجود دارد. محاسبه انجام یافته جهت تعیین میانگین هندسی تیترهای سرمی حاکی از آن است که روش آگلوتیناسیون مستقیم بالاترین میزان را در مقایسه با دو روش دیگر نشان می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: توکسوپلاسموزیس گوسفند، آگوتیناسیون مستقیم، غربالگری

استفاده از آزمایشهای تشخیصی ساده وکاربردی که دارای مزیت اختصاصی بودن و حساسیت بالا می‌باشند در تشخیص بیماریها و مطالعات اپیدمیولوژیک ضروری و ایده آل می‌باشد. روش آگلوتیناسیون مستقیم اصلاح شده در مقایسه با سایر روشهای سرولوژی تشخیص توکسوپلاسموزیس واجد چنین خصوصیاتی است. اولین بار این روش در سال ۱۹۵۹ توسط فولتون وتورک ابداع گردید (۵). اما به علت اختصاصی نبودن و همچنین احتیاج به تاکی‌زوئیت زیاد به عنوان آنتی ژن تا دهه هفتاد مورد توجه واقع نگردید. تا اینکه دسمونت و رمینگتون در سال ۱۹۸۰ با استفاده از ۲- مرکاپتواتانل و از بین بردن IgM طبیعی حساسیت و اختصاصی بودن این آزمایش را افزایش دادند و همچنین با تزریق تاکی زوئیت به همراه سلولهای سارکوما ۱۸۰ - tg به داخل صفاق موش امکان تکثیر و تهیه آنتی ژن انبوه را فراهم نمودند (۲). تیترهای آگلوتیناسیون مستقیم اصلاح شده تقریباً مشابه آزمایش رنگی در سرمهای انسانی و حیوانی است (۵).انجام این آزمایش بسیار ساده و تحت هر شرایطی امکان‌پذیر است به همین علت کیت تجاری آن تا به حال در نقاط مختلف جهان در مطالعات سرواپیدمیولوژیک توکسوپلاسموزیس انسان و حیوان استفاده شده است (۵).

مواد و روش کار

یکصد سرم به طور تصادفی از گوسفندان مناطق مختلف مازندران انتخاب و در آزمایشگاه رقتهای ترتیبی سرم از رقت $\frac{1}{10}$ الی رقت $\frac{1}{10240}$ تهیه کرده و جهت آزمایش مستقیم آگلوتیناسیون در میکروپلیت به هم حجم سرم مربوطه به ۲۵ میکرولیتر ۲- مرکاپتواتانل به آن اضافه نموده سپس ۵۰ میکرولیتر پادگن رنگی به آن اضافه کرده و روی پلیت را با ورقه پلاستیکی چسب دار پوشانده و به مدت ۵ دقیقه در روی دستگاه تکان دهنده و سپس در درجه حرارت ۲۵ - ۱۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده. پس از ۵ ساعت خواندن تستها امکان‌پذیر خواهد بود. واکنش مثبت آگلوتیناسیون به صورت پرده مشبک در ته گوده میکروپلیت قابل روئیت است (۲). به منظور آزمایش رنگی ابتدا سرمهای مورد آزمایش را در بن‌ماری ۶۰ درجه به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده سپس مطابق روش فوق رقتهای ترتیبی تهیه کرده و به میزان ۱۰ میکرولیتر تاکی‌زوئیت زنده در هر رقت اضافه نموده سپس ورقه پلاستیکی را روی میکروپلیت قرار داده و به مدت ۵ دقیقه برروی دستگاه تکان دهنده قرارداده و در نهایت به مدت یک ساعت تحت شرایط ۳۷ درجه آن را نگهداری نموده و در خاتمه ۱۰ میکرولیتر بلودومتیلن به هرگوده اضافه‌کرده و مجدداً درب پلیت را برروی آن قرار داده و به مدت ۵ دقیقه برروی دستگاه تکان دهنده قرارداده و سپس به مدت ۱۵ دقیقه نیز در انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده سپس یک قطره از ته هر یک از گوده‌های میکروپلیت برداشت نموده و برروی لامل گذاشته و با درشت نمایی ۴۰۰ برابر تاکی‌زوئیت‌های رنگ شده و رنگ نشده را شمارش می‌شوند. در صورتی که بیش از ۵۰ درصد تاکی‌زوئیت‌ها رنگ نگرفته و یا فقط هسته آنها رنگ گرفته باشد این بیانگر حضور پادتن اختصاصی علیه توکسوپلاسما در سرم مورد آزمایش می‌باشد (۶). به منظور آزمایش غیر مستقیم پادتن درخشان از تاکی‌زوئیت کشته شده در فرمالین ۱۰ درصد به عنوان آنتی‌ژن استفاده می‌گردد. میزان ۵ میکرولیتر از تاکی زوئیت برداشت نموده و به صورت لکه‌ای برروی لام قرار داده و اطراف آن را پس از خشک شدن با ماژیک غیر قابل حل در آب مشخص نموده و به منظور تعیین رقت‌ها در یک طرف لام علامت پیکان گذاشته سپس برروی هر لکه پادگن ۵ میکرولیتر از رقتهای ترتیبی تهیه شده قرار داده سپس لام را در اطاقک مرطوب در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده پس از اتمام این مرحله لام را سه بار در بافر نمکی شستشو و در نوبت چهارم به مدت ۱۵ دقیقه در بافر نمکی قرار داده. سپس آن را از بافر نمکی خارج کرده و به کمک کاغذ صافی اضافات بافرنمکی را گرفته و سپس برروی آن به میزان ۵ میکرولیتر کونژوگه اختصاصی ضد IgG گوسفندی با رقت $\frac{1}{80}$ اضافه نموده و مجدداً تحت همان شرایط در اطاقک مرطوب به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده پس از خاتمه عمل مجدداً لام را چهار با شستشو داده و در نهایت دو قطره گلیسیرین بافر برروی آن قرار داده و سپس یک لامل بزرگ را برروی کلیهٔ لکه‌ها قرار داده و با درشت نمایی ۴۰۰ برابر با میکروسکوپ فلورسانت تاکی‌زوئیت‌ها می‌شوند. واکنش پادگن درخشان در اطراف تاکی زوئیت‌ها به رنگ سبز درخشان مشاهده می‌گردد (۷).

نتایج

مقایسه کیفی‌ای که برروی ۱۰۰ سرم گوسفندی با روشهای IFAT، DA و DT انجام شد نشان می‌دهد که نتایج روش DT و DA، در ۹۷ درصد موارد هماهنگ عمل نموده حال آنکه در روش IFAT و DA در ۹۶ درصد موارد همبستگی در پاسخ آزمایش وجود داشته است. در صورتی که در روش IFAT و DT در ۹۹ درصد موارد تطابق در نتایج کسب شده وجود دارد. آزمون مربع کای (جدول ۱) اختلاف در پاسخهای سرمی را فقط در روش IFAT و DA واجد معنی می‌داند ($P < ۰/۰۵$).

ارتباط کمی تیترهای سرمی به دست آمده برروی ۱۰۰ سرم گوسفندی با روشهای DTDA و IFAT نشان می‌دهد که حداکثر همبستگی کمی در تیترهای به دست آمده بین دو روش IFAT و DA مشاهده می‌گردد. حال آنکه حداقل همبستگی کمی در تیترهای به دست آمده DT و IFAT ملاحظه

۱) گروه آموزشی انگل‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی ، مشهد - ایران.
۲) گروه آموزشی انگل‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

جدول ۱ـ پاسخ‌های سرولوژیک در سه روش مورد ارزیابی

آزمایش / موارد	DT & DA	DA & IFAT	DT & IFAT
همخوان در آزمایش	۹۷	۹۶	۹۹
ناهمخوان در آزمایش	۳	۴	۱

می‌گردد. شایان ذکر است اگرچه تا حدودی ارتباط کمی تیترهای سرمی در دو روش DT و DA ملاحظه می‌گردد، لیکن از نظر آزمون آماری معنی دار نمی‌باشد. آزمون آماری انجام گرفته حاکی از آن است که فقط ضریب همبستگی تیترهای به دست آمده در دو روش IFAT و DA معنی‌دار می‌باشد ($P< ۰/۰۰۱$).

نتایج حاصل از تیتراسیون ۱۰۰ سرم انتخابی که با روشهای IFAT، DA و DT به دست آمده نشان می‌دهد حداکثر موارد در روش DA در رقت $\frac{۱}{۱۰۲۴۰}$ و در روش DT در رقت $\frac{۱}{۶۴۰}$ و در روش IFAT در رقت $\frac{۱}{۱۲۸۰}$ مشاهده می‌گردد.

محاسبه انجام یافته جهت تعیین میانگین هندسی (Geometric Mean Titer) تیترهای سرمی حاکی از آن است که روش DA بالاترین میزان را در مقایسه با دو روش دیگر نشان می‌دهد (جدول ۲).

بحث

دسمونت و رمینگتون (Dosmont & Remington) در سال ۱۹۸۰ با اصلاح روش آگلوتیناسیون مستقیم فولتون و تورک (Fulton Truk) روش آگلوتیناسیون مستقیم اصلاح شده را جهت ارزیابی سرمی توکسوپلاسموزیس به دنیا معرفی نمودند. این روش بسیار ساده، کم خطر و ارزان قیمت می‌باشد. با اصلاحات انجام شده بر روی پادگن و افزودن (۲) - مرکاپتواتانل (2-Me) (Mercaptoethanol به سرم تحت آزمایش موجب گردید تا حساسیت و اختصاصی بودن این روش افزوده شود (۳). مطالعات انجام شده توسط این محققین برروی تعداد بسیار زیادی سرم انسانی با روش مزبور و مقایسه آن با تست رنگی نشان می‌دهد که نتایج سرمی این دو روش از لحاظ کیفی تا ۹۸ درصد هماهنگی دارد (۳). مطالعات انجام شده توسط دبی (Dubey) برروی سرم حیوانات نشان می‌دهد که حساسیت و اختصاصی بودن روش اگلوتیناسیون مستقیم بسیار بالا و مشابه تست رنگی است (۴ و ۳). در مطالعه حاضر نتایج به دست آمده برروی ۱۰۰ سرم گوسفندی که به طور اتفاقی انتخاب شده بودند نشان داد که نتایج سرمی به دست آمده بین دو روش آگلوتیناسیون مستقیم اصلاح شده و تست رنگی تا ۹۷ درصد هماهنگی دارد (جدول ۱)، که این نتایج، با نتایج گزارش شده توسط دسمونت و رومینگتون همسو می‌باشد (۳). به علاوه ارتباط کیفی نتایج سرمی بین دو روش ایمونوفلورسنت غیرمستقیم و روش آگلوتیناسیون مستقیم اصلاح شده ۹۶ درصد تعیین گردید. مطالعات والتود (Valtaud) نشان می‌دهد که این دو روش به میزان ۹۷/۴ درصد با یکدیگر هماهنگی دارند (۸).

در این بررسی مقایسه روشهای ایمونوفلورسنت غیر مستقیم و تست رنگی نشان می‌دهد تا ۹۹ درصد موارد این دو روش با یکدیگر هماهنگ می‌باشند. این نتایج با نتایج سایر محققین مشابه بوده است (۷ و ۱). بعضی مؤسسات تحقیقاتی آزمایشگاهی روش آگلوتیناسیون مستقیم اصلاح شده را نسبت به روشهای تست رنگی وایمونوفلورسنت غیر مستقیم کمتر مورد استفاده قرار داده‌اند (۱۰). ولی چون روش آگلوتیناسیون مستقیم اصلاح شده، روش ساده، کم‌خطر و کم هزینه می‌باشد و از طرفی حساسیت و اختصاصی بودن آن در ردیف دو روش دیگر قرار دارد (۶ و ۲) بنابراین روش بسیار خوبی برای غربالگری و مطالعات سرواپیدمیولوژیک است (۲).

نتایج سرمی حاصل از این بررسی با استفاده از سه روش فوق مورد بررسی کمّی قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که تیترهای سرمی فقط در دو روش آگلوتیناسیون مستقیم اصلاح شده و ایمونوفلورسنت غیر مستقیم همبستگی معنی داری دارند (جدول ۷ ، ۸ و ۹) مطالعات انجام شده توسط سایر محققین نشان می‌دهد که تیترهای سرمی به دست آمده توسط این سه روش با یکدیگر همبستگی کامل دارند (۷، ۶ و ۲). به علت اختلافاتی که همیشه در اعلام نتایج تیترهای سرمی تست رنگی در آزمایشگاههای مختلف بروز می‌نماید. سازمان بهداشت جهانی در سال ۱۹۶۸ برای رفع این نقیصه تصمیم به تهیه سرم رفرانس استاندارد شده نمود که بر حسب LU/ML بیان می‌گردد (۱). به نظر می‌رسد که عدم همبستگی در نتایج تیترهای سرمی ارائه شده بین تست رنگی و دو روش دیگر به علت عدم دسترسی به سرم مزبور و عدم استاندارد شدن نتایج کمّی به دست آمده توسط تست رنگی بوده باشد که این امر یکی از نقایص عمده در کلیه آزمایشگاههای کشور نیز هست.

در مطالعه حاضر نشان داده شد که میانگین هندسی تیترهای سرمی (Geometric mean titer (G.M.T)) به دست آمده در روش آگلوتیناسیون مستقیم اصلاح شده در مقایسه با روشهای تست رنگی وایمونوفلورسنت غیر مستقیم بیشتر می‌باشد (جدول ۲).

این نتایج کاملاً با نتایج به دست آمده توسط دسمونت و رمینگتون در ارتباط با مقایسه انجام شده بین دو روش تست رنگی و آگلوتیناسیون مستقیم اصلاح شده کاملاً هماهنگی دارند (۲). تحقیقات نشان می‌دهد که روش آگلوتیناسیون مستقیم اصلاح شده و ایمونوفلورسنت غیر مستقیم قادر به

جدول ۲ـ مقایسه مواردتیترهای سرمی به دست آمده در سه روش سرولوژی DT ، DA و IFAT برروی صد سرم انتخابی گوسفند

تیترسرمی / روش سرولوژی	$<\frac{۱}{۲۰}$	$\frac{۱}{۲۰}$	$\frac{۱}{۴۰}$	$\frac{۱}{۸۰}$	$\frac{۱}{۱۶۰}$	$\frac{۱}{۳۲۰}$	$\frac{۱}{۶۴۰}$	$\frac{۱}{۱۲۸۰}$	$\frac{۱}{۲۵۶۰}$	$\frac{۱}{۵۱۲۰}$	$\frac{۱}{۱۰۲۴۰}$	GMT
DT	۴۸	۹	۴	–	–	۱	۲۲	۷	۳	۲	۴	۱۹/۱۲
DA	۴۵	۷	۳	۲	۱	۲	۴	۳	۵	۶	۱۹	۱۵/۰۳
IFAT	۴۹	۳	۸	۶	۴	۱	۳	۹	۵	۵	۷	۹/۷۷

اندازه‌گیری پادتن کلاس‌های ۱ ، ۲، ۳، ۴ بوده در صورتی که تست رنگی به علت غیر فعال نمودن سیستم کمپلمان طی عمل آزمایش قادر به اندازه‌گیری پادتن کلاس ۴ نمی‌باشد. از طرف دیگر مشخص گردیده است که در چند هفته اول عفونت حاد توکسوپلاسمایی تیتر سرمی تست رنگی از روش آگلوتیناسیون مستقیم اصلاح شده بیشتر است. ولی پس از مزمن شدن عفونت این نتیجه برعکس می‌گردد و تیتر سرمی اندازه‌گیری توسط روش آگلوتیناسیون مستقیم اصلاح شده حتی پس از ثابت شدن تیتر سرمی تست رنگی باز هم افزایش می‌یابد و برای زمان طولانی‌تری نسبت به تیتر سرمی تست رنگی. تیتر سرمی بالاتری نشان می‌دهد (۲). مطالعات انجام یافته نشان داده است که تیترهای سرمی به دست آمده توسط ایمونوفلورسنت غیر مستقیم نسبت به تست رنگی نیز به میزان اندکی بیشتر است (۱). بنابراین توصیه می‌گردد مؤسسات تحقیقاتی کشور در ساخت و توسعه استفاده از روش آگلوتیناسیون مستقیم اصلاح شده در آزمایشگاههای پزشکی و دامپزشکی اقداماتی را آغاز نمایند تا این روش بتواند به عنوان یک روش استاندارد مورد قضاوت همگان در ایران قرار گیرد.

References

1 . Cohen, S. and Sadun, E. Immunology of Parasite Infections. Blackwell Scintific Publication Inc., London, England. PP: 65-106, 236-267, (1976).

2 . Desmont, G. and Remington, J.S. Direct agglutination test of diagnosis of Toxoplasma Infectiion: Method for Increasing sensitivity and specificity. Journal of Clinical Microbiolgoy 11 (6) 562-568, (1980).

3 . Dubey, J.P. and Adams, D.S. Serologic diagnosis of toxoplasmosis in experimentally infected pregnant goats and transplacentally infected kid. American Journal of Veterinary Research 46 (5): 1137- 1140, (1985).

4 . Dubey, J.P., Emond, J.P., et al. Serodiagnosis of postnatally and prenatally Induced toxoplasmosis in sheep. American Journal of Veterinary Research 48(8): 1239-1242, (1987).

5 . Dubey, J.P. and Beattie, C.P. Toxoplasmosis of animal and man. CRC Press, INC. Bocaraton, Florida, U.S.A. PP: 158-190, (1988).

6 . Feldman, H.A. A micro modification of toxoplasma Dye Test. J. Para. (25): 451-417, (1966).

7 . Suzuki, K., Suto, T. and Fujite, J. Serological diagnosis of toxoplasmosis by the Indirect Immunoflurescent staining. The national Institue of animal health quarterly 5(2): 73-75, (1965).

8 . Valtaud, E, et al. Critical study of Elisa technique and high sensitivity directed agglutination test for the screening of antitoxoplasma IgG. Ann. biol. clin (Paris) 49 (7) 397-400, (1991).

9 . Warren, K.S. and Mahmoud. A.A.F. Tropical and geographical medicine. Macgraw hill, Inc, Newyork. U.S.A. PP: 309 - 319, (1990).

10 . Wilson, M., Ware, D.A. and Juranek, D.D. Serological aspect of toxoplasmosis. Journal of American Veterinary Medical Association. 196 (2): 277-280, (1990).

An assessment of direct agglutination test for screening of ovine toxoplasmosis

Razmi, G.R.[1]**, Rahbari, S.**[2]

[1]*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdoosi University. Mashhad - Iran.* [1]*Department of parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran - Iran.*

Comparison of serological results on 100 select sera of sheep showed that qualitative correlation between direct agglutination test (DA) and dye test (DT), direct agglutination test (DA) and indirect immunoflurescent test (IFAT) were 97%, 96% and 99% respectively. Thus, in present study it is concluded that maximal quantitative correlatiton was between direct agglutination test (DA) and indirect immunoflurescent antiboy test (IFAT) and minimal quantitative corelation was between dye test (DT) and indirect immunoflurescent test (IFAT). Titration results of 100 sheep sera showed that the most frequent titers in direct agglutination test (DA), dye test (DT) and indirect immunoflurescent (IFAT) were $\frac{1}{10240}$, $\frac{1}{640}$, $\frac{1}{1280}$, respectively. In this study , the geometric mean titers in direct agglutination test (DA) was higher that two other serologic methods.

Key words: Toxoplasmosis , Ovine, Direct agglutination, Screening.