

## بررسی سرواپیدمیولوژی عفونت توکسوپلاسمایی به روشهای IFA و ELISA در خانم های

### باردار استان قم

احمد مردانی<sup>۱</sup>، دکتر حسین کشاورز<sup>۲</sup>

#### 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 سرولوژیک 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 اووسیست ( *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 اوسیستهایی 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 سرولوژی ( *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.

بهداشتی به روش IgG - IFA 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 اندازه‌گیری و تعیین تیتراژ آنتی بادی IgG سرم‌های 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 ژن‌های اختصاصی توکسوپلازما گوندی را به حفره‌های میکروپلیت متصل می‌کنند. سپس با اضافه کردن نمونه سرم، در صورت وجود آنتی بادی ضد توکسوپلازما گوندی به آنتی ژن متصل می‌گردد. پس از انجام شستشو به مجموعه فوق آنتی هیومن IgG (IgG کونژوگه) که با آنزیم HRP (Horserdih peroxidase) نشاندار شده است، افزوده می‌شود. در ادامه پس از افزودن محلول سوبسترا - کروموژن مناسب، در صورت وجود آنتی بادی اختصاصی تغییر رنگ حاصل می‌گردد که نشانه مثبت بودن واکنش می‌باشد.

ج: آزمایش ایمنوفلورسانت آنتی بادی غیر مستقیم ( IFA )

برای اندازه‌گیری و تعیین تیتراژ آنتی بادی IgG سرم‌های مادران روش IgG - IFA 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 می‌کنند. در مرحله بعد با افزودن رقت‌های مختلف تهیه شده از سرم (رقت‌های ۱/۲۰، ۱/۱۰۰ و ۱/۲۰۰) در صورت وجود آنتی بادهای اختصاصی در سرم به آنتی ژن فیکس شده روی لام باند می‌شود. پس از انکوباسیون و انجام شستشو، آنتی هیومن آنتی بادی (Anti-IgG) محصول شرکت حاب تک (نشاندار شده با ماده فلوروسئین افزوده می‌شود. 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

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

### مواد و روش کار

الف: جمع آوری و آماده نمودن نمونه‌ها

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 مرحله‌ای از زایشگاه‌های الزهرا (س) و ایزدی شهرستان قم که بزرگترین زایشگاه‌های دولتی استان هستند و اکثر زایمانها در آنها صورت می‌گیرد، تقریباً ۴ ماه به طول انجامید. نمونه‌گیری شامل کلیه خانم‌هایی می‌شد 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 پرسشنامه‌های 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.

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

اندازه‌گیری و تعیین تیتراژ آنتی بادی IgG به روش Antibody Sandwich ELISA در پایگاه منطقه‌ای انتقال خون استان قم و سپس در بخش سرولوژی بیماریهای تک یاخته‌ای گروه انگل شناسی و قارچ شناسی پزشکی دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات

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 (۵۰ IU/ML) 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 تیتر آنتی بادی مشخص شده است.

نمونه سرم مادرانیکه در آزمایش IgG-IFA دارای تیتر 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 ( $p = ۰/۰۰۰۰۱$ )، 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 ویژه ای 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 تیتر آنتی‌بادیهای اختصاصی ضد توکسوپلازما گوندی به روش ELISA مورد ارزیابی قرار دادند که ۴۳/۶٪ (۱۵۹ نمونه) دارای تیتر 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 توجیه 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

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

### پیشنهادات :

۱- اندازه گیری 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 بیماریهای تک

یاخته ای گروه انگل شناسی پزشکی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم

پزشکی تهران و همکاران محترم آزمایشگاههای پایگاه منطقه ای

انتقال خون استان قم

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

در این مطالعه از دو روش سرولوژی ELISA و IFA جهت شناسایی و اندازه گیری 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 نمی توان 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 گوشت های آلوده به صورت

### منابع :

- 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 گوندی در زنان حامله بوشهر. خلاصه مقالات سومین کنگره سراسری انگل شناسی پزشکی ایران، ساری اسفند ماه ۱۳۷۹.
- ۴- کشاورز، ح. و همکاران (۱۳۷۷) . بررسی سروایدیولوژی 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.

## HCCOM

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)

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

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)

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

## IICCOM

جدول ۳: میزان همخوانی آنتی بادی IgG ضد توکسوپلاسما گوندیی 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