تشخیص زود هنگام توکسوپلاسموز تجربی در خون رت به روش PCR

دکتر محمود شریفیان درچه[1] دکتر عبدالحسین دلیمی اصل[1]* دکتر بهرام کاظمی دمنه[2]

دریافت مقاله: ۲۵ اسفندماه ۱۳۸۱
پذیرش نهایی: ۳۰ تیرماه ۱۳۸۲

هدف: تعیین زمان ظهور و بقای انگل در خون رت هایی که به صورت تجربی به *توکسوپلاسما گوندیی* آلوده شده اند و همچنین تشخیص زودرس آلودگی توکسوپلاسمایی در رت با استفاده از روش PCR.

طرح: مطالعه تجربی.

حیوانات: تعداد پنج سر رت عاری از توکسوپلاسما و ۱۰ سر رت آلوده به *توکسوپلاسما گوندیی* استفاده شدند که زاده های ۵ جفت والدین نسل دوم حاصل از ۳ جفت والدین نسل اول بودند.

روش: ابتدا ده سر رت سالم را با سویه RH *توکسوپلاسما گوندیی* از طریق تزریق داخل صفاقی آلوده کرده سپس برای مدت ۳۰ روز هر ۲۴ ساعت یکبار از رت های آلوده خونگیری شد. از خون رت های آلوده DNA استخراج و با استفاده از پرایمرهای طراحی شده اختصاصی و حساس به نامهای SDKF و SDKR آزمایش PCR انجام گرفت.

نتایج: طبق نتایج به دست آمده ۴۸ ساعت پس از شروع آلودگی انگل در خون با روش PCR قابل شناسایی بود. حضور DNA انگل تا ۱۶ روز بعد ادامه داشت ولی پس از روز هفدهم از خون ناپدید گشت.

نتیجه گیری: دو پرایمر طراحی شده به خوبی قادرند که آلودگی توکسوپلاسمایی (سویه RH) را درخون رت با روش PCR شناسایی نمایند. لذا از این دو پرایمر حساس و اختصاصی برای تشخیص زود هنگام آلودگی می توان استفاده کرد.

مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، (۱۳۸۲)، دوره ۵۸، شماره ۴، ۳۲۷-۳۲۳.

واژه های کلیدی: *توکسوپلاسما گوندیی*، رت، PCR.

Early diagnosis of toxoplasmosis by PCR method in the blood of experimentaly infected rat (*Rattus norvegicus*)

Sharifian Dorcheh, M.,[1] Dalimi, A.,[1] Kazemi Demneh, B.[2]

[1]*Department of Parasitology, Faculty of Medical Science, Tarbiat Modarres University of Tehran, Tehran - Iran.* [2]*Department of Parasitology and Center for Cellular and Molecular Biology, Facutly of Medical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran - Iran.*

Objectives: To determine the time of appearance and persistance of *Toxoplasma gondii* in the blood of experimentaly infected rat and evaluation of the possibility of early diagnosis of toxoplasmosis in rat blood samples by PCR.

Design: Experimental study.

Animals: Five healthy rats and ten *Toxoplasma gondii* infected rats.

Procedure: Ten rats were infected experimentaly with *Toxoplasma gondii* tachyzoites (RH strain) intraperitonealy.As control, 5 toxoplasma free healthy rats were used . Blood was taken from the infected as well as uninfected rats 24 hour intervals for 30 days. Following DNA extraction from blood samples, amplification of DNA of the parasite was done by PCR method, using high sensitive and specific designed primers SDKF and SDKR.

Results: *Toxoplasma gondii* DNA was identified in the blood of rats, 48 hours post infection. The DNA was persist in the blood for 16 days then become undetectable.

Implications: SDKF and SDKR are sensitive and specific primers which can be used for detection of early infection of *Toxoplasma gondii* (RH strain) in rat. ***J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran. 58, 4:323-327, 2003.***

Key words: *Toxoplasma gondii*, Rat, PCR.

Corresponding author email:dalimi4@yahoo.com

توکسو پلاسموز بیماری عفونی ناشی از آلودگی با تک یاخته ای درون سلولی به نام *Toxoplasma gondii* است. در افراد دارای ایمنی کامل توکسو پلاسموز معمولاً فاقد علامت است و یا به صورت تظاهرات پوستی (بثورات جلدی) آدنوپاتی و یا عارضه چشمی بروز می کند. در نوزادانی که از طریق مادرزادی آلوده می شوند و بیماران با نقص ایمنی مانند مبتلایان به ایدز و دریافت کنندگان عضو پیوندی توکسوپلاسموز ممکن است تهدیدکننده زندگی آنها باشد (۶،۹،۱۷). توکسوپلاسموز مادرزادی ممکن است باعث سقط جنین یا ایجاد عوارض شدید در سیستم عصبی نوزاد مانند هیدروسفالی و میکروسفالی و یا کوری شود. با توجه به اینکه عوارض ناشی از توکسوپلاسموز با درمان به موقع قابل کاهش است، بدین منظور تشخیص سریع و زود هنگام توکسوپلاسموز ضروری است. گرچه روشهای تشخیص توکوپلاسموز مبتنی بر آزمونهای سرولوژیکی است ولی این روشها در مواردی کارآیی لازم را ندارد. از جمله این موارد این است که چون پادتن های اختصاصی علیه توکسوپلاسما با تأخیر ظاهر می شوند و بتدریج میزان آنها افزایش می یابد، در ابتدای آلودگی توکسوپلاسموز قابل تشخیص نیست. از طرفی در افراد دچار نقص یا سرکوب ایمنی پادتن ها به حد کافی ظاهر نمی شوند، علاوه بر این، قابلیت انتقال پادتن های نوع IgG از مادر به جنین، تشخیص زود هنگام توکسوپلاسموز را در نوزاد با اشکال مواجه می کند (۷). به همین جهت روشهای مستقیم تعیین حضور انگل در بافتها و مایعات بدن،کارآمدتر هستند (۱۶). از بین روشهای مستقیم روش مشاهده انگل در مقاطع بافتی و مایعات بدن حساسیت کافی را ندارند و روش تشخیص آنتی ژن ها غیر واقعی است. اگر چه روش تلقیح نمونه ها به محیط کشت بافتی و نیز تلقیح نمونه ها به موش آزمایشگاهی اختصاصی و به حد کافی حساس است ولی اثبات آلودگی به زمان زیادی نیاز دارد. از طرف دیگر این روشها فقط در برخی مراکز و آزمایشگاههای اختصاصی قابل اجرا است (۱).

روش PCR که در آن قطعه ای از DNA ژنوم توکسوپلاسما قابل شناسایی است به دلیل حساسیت کافی و اختصاصی بودن آن و نیز حصول سریع نتیجه از سایر روشهای تشخیصی فعلی نتایج بهتری دارد (۵). در تشخیص *توکسوپلاسما گوندیی* به روش PCR معمولاً از ژن B1 یا ژن P30 توکسوپلاسما استفاده می شود که حساسیت آن را معادل ۱۰ ژنوم توکسوپلاسما در تعداد

۱) گروه آموزشی انگل شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تهران، تهران - ایران.
۲) گروه آموزشی انگل شناسی و مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و ملکولی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران - ایران.
*) نویسنده مسؤول dalimi4@yahoo.com

۱۰۵ لوکوسیت انسانی گزارش کرده اند (۲). حساسیت این ژن به وجود تعداد ۳۵ کپی از آن در ژنوم توکسوپلاسما مربوط است. هرچه تعداد کپی های یک ژن یا قطعه ای از DNA در ژنوم توکسوپلاسما بیشتر باشد حساسیت تشخیصی آن به روش PCR بیشتر خواهد بود (۱۶). قطعه ای از DNA در ژنوم توکسوپلاسما شناسایی شده است که بین ۳۰۰-۲۰۰ کپی در ژنوم توکسوپلاسما دارد و برای توکسوپلاسما اختصاصی است. به همین دلیل حساسیت آن چندین برابر حساسیت ژن B1 است. این قطعه DNA از ژنوم توکسوپلاسما هیچ پروتئینی را رمزدهی نمی کند حساسیت پرایمرهای طراحی شده بر اساس این قطعه DNA به اندازه ای است که حتی وجود یک عدد تاکی زوئیت توکسوپلاسما را مشخص می کند (۱۱). تشخیص توکسوپلاسموز در میزبان به روش PCR زمانی ارزش بیشتری می یابد که اولاً از پرایمرهای با حساسیت کافی استفاده شود وثانیاً نمونه بالینی مورد آزمایش به راحتی قابل دسترسی باشد. در تعیین ارزش روش PCR در تشخیص توکسوپلاسموز توصیه می شود از توکسوپلاسموز تجربی استفاده شود. توکسو پلاسموز در رت (Rattus norvegicus) روندی بسیار مشابه توکسوپلاسموز انسان دارد و بنابراین رت مدل مناسبی برای بررسی توکسوپلاسموز است (۴). از طرفی نمونه خون، در دسترس ترین نمونه هم در مدل حیوانی و هم انسانی است . هدف از مطالعه حاضر تشخیص *توکسوپلاسما گوندیی* در نمونه های خون رت های آلوده به توکسوپلاسموز تجربی است.

مواد و روش کار

۱- تهیه رت های عاری از آلودگی: به دلیل حساسیت روش PCR در تشخیص باید در توکسوپلاسموز تجربی رت های عاری از هر نوع آلودگی قبلی به توکسوپلاسما به کار برده شود. برای این منظور ابتدا تعدادی رت نر و ماده جوان انتخاب و از آنها خونگیری شد و سرم خون آنها جدا گردید، نمونه های سرم به روش تست رنگی مورد ارزیابی قرار گرفتند و رت های با عیار سرمی کاملاً منفی انتخاب شدند. برای جلوگیری از وقوع آلودگی جدید، رت های انتخاب شده برای یکدوره ۱۰ روزه با داروی پریمتامین به میزان ۱ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن و داروی سولفادیازین به میزا ن ۴۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن مورد درمان قرار گرفتند. به منظور دریافت دز مناسب دارو توسط رت ها ابتدا داروها را درمحلول ۰/۲۵ درصد کربوکسی متیل سلولز حل نموده و براساس وزن هر حیوان مقدار مناسبی از سوسپانسیون دارو به کمک لوله نازک پلاستیکی و سرنگ انسولین مستقیماً به معده رت ها وارد می شد و همزمان با درمان، آنها را در قفس حاوی بستر اتوکلاو شده قرار داده و فقط با غذای اتوکلاو شده تغذیه شدند. تمام رت ها تا پایان آزمایشها در همین شرایط نگهداری شدند. پس از پایان دوره درمان از رت های نر و ماده، نسل دوم تهیه و از زاده های نسل دوم در آزمایشها استفاده شد.

۲ - آزمون رت های مورد آزمایش از نظر عدم آلودگی: از قلب تعدادی رت ماده ۳ - ۲ ماهه نسل دوم خونگیری شد و سرم آنها به روش تست رنگی و DNA استخراج شده خون آنها با روش PCR مورد بررسی قرار گرفت، تمام آنها کاملاً عاری از آلودگی به توکسوپلاسما بودند.

۳ - آلوده کردن رت ها: ابتدا تاکی زوئیت های سویه RH *توکسوپلاسما گوندیی* در صفاق تعدادی موش سوری کشت داده شد و پس از ۷۲ ساعت مایع صفاق حاوی تاکی زوئیت ها جمع آوری و با استفاده از لام نئوبار تعداد تاکی زوئیت در حجم مایع شمارش گردید. به منظور جلوگیری از عفونت باکتریایی به سوسپانسیون انگل مقدار ۱۰۰۰ واحد در میلی لیتر پنی سیلین و مقدار ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر استرپتوماسین اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد.

تعداد ۱۰ سر رت با تزریق ۶۰ - ۵۰ هزار تا کی زوئیت به روش داخل صفاقی آلوده شدند و در شرایط قفس بستر و غذای مصرفی اتوکلاو شده نگهداری شدند. تعداد ۵ سر رت نیز بدون تزریق به عنوان شاهد در همان شرایط در نظر گرفته شد.

۴ - نمونه گیری از خون رت ها: از قلب رت های آلوده شده و شاهد به طور روزانه به مقدار ۰/۵ میلی لیتر خون گرفته و بلافاصله با ماده ضد انعقاد خون (EDTA) مخلوط می شد. اگر استخراج DNA در همان زمان امکانپذیر نبود نمونه های خون تا زمان استخراج DNA در برودت ۲۰ - درجه سانتیگراد نگهداری می شد.

۵ - استخراج DNA از نمونه های خون: مقدار ۳۰۰ µl از خون مخلوط شده باماده ضد انعقاد را با ۵۰۰ µl محلول بافر لیز کننده (ساکارز ۰/۳۲ مولار، ۱۰ mM Tris HCl، ۵ mM MgCl۲، ۱۰۰ x Triton ۱ درصد) در میکروتیوب ۱/۵ ml مخلوط نموده پس از ۵ دقیقه در دور ۳۰۰۰ RPM سانتریفوژ کرده و مایع رویی دورریخته می شد، به رسوب ۵۰۰ µl بافر لیز کننده اضافه کرده و رسوب را با واژگون کردن ملایم به خوبی سوسپانسیون کرده و سپس با شرایط قبلی سانتریفوژ می شد. این عمل تا شفاف شدن کامل رسوب ادامه می یافت. سپس رسوب حاصل را در ۵۰۰ µl بافر لیز کننده سوسپانسیون نموده و به مدت یک شب در بن ماری ۳۷ درجه سانتیگراد قرارداده می شد تا سلولها کاملاً لیز شود. برای استخراج DNA از روش استاندارد فنل کلروفرم استفاده شد. به این ترتیب که هم حجم محلول لیز شده سلولها فنل اکوئی لیبره اضافه کرده و محکم تکان می دادیم تا حالت شیری ایجاد شود. این محلول را در ۱۲۰۰۰ RPM به مدت ۲ دقیقه سانتریفوژ نموده مایع رویی را به میکروتیوب تمیز منتقل کرده و هم حجم آن کلروفرم اضافه می شد. مخلوط را به ملایمت چندین بار واژگون نموده تا به خوبی مخلوط شوند و سپس مشابه قبل سانتریفوژ می شد. مایع رویی را مجدداً به میکروتیوب تمیز واردکرده و به مقدار ۱/۱۰ حجم آن از محلول استات سدیم ۳ M و دو برابر حجم آن الکل اتیلیک خالص (الکل مطلق) سرد اضافه می کردیم و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ RPM در درجه حرارت ۴درجه سانتیگراد سانتریفوژ می نمودیم. به رسوب ۱۰۰ µl الکل ۷۰ درجه افزوده و مجدداً به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ RPM در درجه حرارت ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ می کردیم. مایع رویی را خارج کرده و میکروتیوب را واژگون روی کاغذ تمیز قرار داده تا رطوبت آن گرفته شود. به رسوب ۵۰ µl آب مقطر تزریقی اضافه کرده و پس ازمخلوط کردن به مدت ۱۵ دقیقه در بن ماری ۳۷ درجه سانتیگراد قرار می دادیم تا رسوب DNA کاملاً حل شود.به منظور تأیید کیفیت DNA استخراج شده، مقدار ۱۰µl از نمونه ها را روی ژل آگارزالکتروفورز می نمودیم و بر این اساس غلظت آنها را برآورد کرده و در صورت لزوم با تغییردادن رقت، غلظت مناسب برای واکنش PCR را تنظیم می کردیم.

۶ - تهیه پرایمرها: پرایمرهای مورد استفاده بر اساس قطعه ای از ژنوم *توکسوپلاسما گوندیی* به طول ۵۲۹ bp مطابق با ترتیب ژنوم توکسوپلاسما با شماره پذیرش AF ۱۴۶۵۲۷ در GeneBank طراحی و ساخته شد. این قطعه هیچ پروتئینی را رمزدهی نمی کند ولی بین ۳۰۰-۲۰۰ بار در ژنوم توکسوپلاسما تکرار دارد و به این دلیل از حساسیت بالایی برخوردار است

(۱۱) .ترتیب پرایمرها به صورت زیراست:

پرایمر رفت (SDKF): ۳'- ctg cag gga gga aga cga aag ttg -۵'

پرایمر برگشت(SDKR): ۳'- ctg cag aca cag tgc atc tgg att -۵'

۷- انجام PCR: تمام نمونه های DNA استخراج شده از خون رت های آلوده شده و شاهد به روش PCR مورد بررسی قرار گرفتند. واکنش PCR در حجم ۳۰ µl انجام شد و مخلوط آن شامل موارد زیر بود:

۱- DNA template، ۵۰۰ - ۵۰ نانوگرم، ۲- MgCl2، ۴ میلی مولار، ۳- dNTP، ۱۰۰ میکرومول، ۴- primers، ۵۰ پیکومول، ۵- Taq DNA polymerase، ۱ واحد، ۶- ۱۰X PCR buffer، ۳ میکرولیتر.

در این تحقیق تمام مواد مصرفی برای واکنش PCR از شرکت سیناژن خریداری شد. برخی از این مواد ساخت شرکت Fermentase است.

واکنشهای PCR در شرایط زیر با دستگاه ترموسایکلر مدل Eppendorf انجام شد:

۱ - ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه

۲ - ۳۰ بارتکرار سیکل زیر:

۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه

۵۷ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه

۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ ثانیه

۳ - ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه

در تمام دفعات PCR یک نمونه با DNA استخراج شده از تاکی زوئیت ها نیز به عنوان کنترل مثبت قرار داده می شد.

مقدار ۱۰ µl از محصول PCR را با ۳µl از loading buffer (گلیسرول ۴۰ درصد، برومونفل بلو ۰/۲۵ درصد) مخلوط نموده و در کنار مارکر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز می شد. ژل الکتروفورز شده با دستگاه UV transluminator در طول موج ۲۸۰نانومتر مورد مشاهده و بررسی قرار می گرفت.

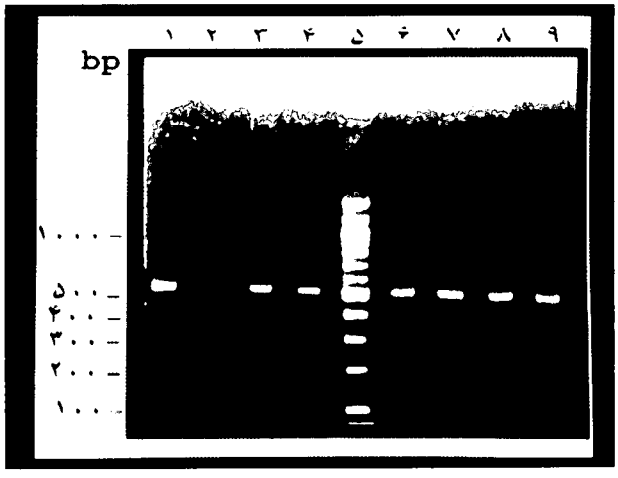
۸ - بررسی مغز رت های آلوده و شاهد: به منظور کنترل رت های مورد آزمایش در آخرین روز نمونه گیری (۳۰ روز پس از آلودگی) تمام رت های آلوده شده و شاهد توسط کلروفرم کشته شدند و مغز آنها خارج شد و قسمتی از آن از نظر وجود انگل به روش مستقیم در زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت. در مغز تمام رت های آلوده شده کیست نسجی مشاهده شد ولی در مغز رت های شاهد هیچ کیست نسجی مشاهده نشد.

نتایج

بررسی مغز رت های شاهد و آلوده نشان داد که تمام رت های مورد تزریق به توکسوپلاسما آلوده شده اند. بررسی نمونه های DNA استخراج شده از نمونه های خون روزانه گرفته شده از رت های آلوده طی یکماه (۳۰ روز) نشان داد که از ۴۸ ساعت پس از آلودگی (روز دوم) انگل در خون ظاهر می شود و به روش PCR با پرایمرهای به کار رفته قابل تشخیص است.

چنان که در تصویر مشاهده می شود طول قطعه تکثیر شده در نمونه شاهد مثبت (ردیف ۱) که حاصل PCR روی DNA استخراج شده از تاکی زوئیت ها است با قطعه تکثیر شده از نمونه های DNA خون گرفته شده از رت های آلوده برابر است و هیچ نوع باند اضافی در آنها دیده نمی شود.

مقایسه تمام قطعات تکثیر شده با مارکر DNA (ردیف ۵) نشان می دهد که قطعه تکثیر شده ، اندکی بیش از ۵۰۰ bp اندازه دارد و این موضوع با طول ۵۲۹ bp قطعه مورد انتظار مطابقت دارد.



تصویر ۱ - باندهای مربوط به قطعه bp ۵۲۹ از DNA ژنومی *توکسوپلاسما گوندیی* سویه RH تکثیر شده با روش PCR. ستون ۱ :نمونه شاهد مثبت، ستون ۲ : نمونه شاهد منفی، ستونهای ۳، ۴، ۶، ۷، ۸ و ۹ : نمونه های تحت آزمایش . ستون ۵ : مارکر (۱۰۰ bp).

درنمونه شاهد منفی (ردیف ۲) که حاصل انجام PCR روی DNA استخراج شده از خون رت غیرآلوده است، هیچ قطعه ای به طور واضح تکثیر نشده است، این موضوع مبین این مطلب است که پرایمرهای طراحی شده برای قطعه DNA توکسوپلاسما، اختصاصی است و هیچ قطعه ای را در ژنوم رت تکثیر نمی کند.

نتایج نشان داد که از ۴۸ ساعت پس از آلودگی رت ها انگل توکسوپلاسما به طور مداوم در خون حضور دارد و تا روزشانزدهم همچنان قابل تشخیص است و از روز هفدهم به بعد به طور کامل از خون حذف می شود و پس از آن تا تشکیل کامل کیست نسجی در مغز رت ها (۳۰ روز پس از آلودگی) در خون حضور ندارد. نتیجه واکنشهای PCR روی نمونه های DNA در روز دوم پس از آلودگی، اندکی ضعیف است به طوری که حتی با افزایش دادن مقدارمصرف DNA Template نیز شدید نمی شود (ردیف ۳) و سپس از روز سوم تشدید می شود (ردیف ۶) و همچنان تا ۱۳ روز پس از آلودگی شدید است (ردیف های ۷،۸،۹)، ولی پس از آن ضعیف می شود، به طوری که ۱۶ روز پس از آلودگی، هنوز باند ضعیف قابل مشاهده است (ردیف ۴) اما ۱۷ روز پس از آلودگی، باند واضح مشاهده نمی شود.

بحث

در تشخیص توکسوپلاسموز زودهنگام، روشهای سرولوژیک به حدکافی کارآمد نیستند اما روشPCR به دلیل حساسیت بیشتر به سایر روشها ارجح است. نمونه خون، در دسترس ترین نمونه درمدل حیوانی و انسانی است.به همین دلیل یافتن روش مناسب با حساسیت و اختصاصیت کافی برای تشخیص توکسوپلاسموز در خون اهمیت فراوان دارد. بررسیهای انجام شده به روش PCR درتشخیص توکسوپلاسموز از طریق نمونه های خون، نتایج گوناگون نشان می دهند، این تفاوت ها به مدت حضور و دوام انگل در خون و نیز میزان قابلیت تشخیص آن با روش PCR مربوط است. نوع میزبان، سویه انگل، میزان حساسیت پرایمرهای مورد استفاده، دز انگل در آلوده سازی میزبان، شکل آلوده کننده به کار رفته و حتی نحوه آلوده سازی میزبان ازجمله عوامل اصلی متغیر در این رابطه هستند.

نتایج بررسی نمونه های مایع صفاقی موش آلوده به سویه پاتوژن RH توکسوپلاسما و نیز نمونه های خون بیماران نشان داده است که پرایمرهای طراحی شده بر اساس ژن 5s - rDNA نسبت به پرایمرهای طراحی شده از ژن P30 در روش PCR - nested حساستر هستند (۳). در مطالعه

نمونه های خون موشهای آلوده شده به روش خوراکی و کاربرد پرایمر های ژن B1 توانسته اند ژنوم انگل را از روز دوم تا روز بیست و یکم پس از آلودگی به طور پیوسته با روش PCR شناسایی کنند، اما نتیجه بررسی همزمان همین نمونه ها با روش تلقیح به کشت بافت، منفی بوده و این روش درتشخیص توکسوپلاسموز ناموفق گزارش شده است (۱۴). زمانی که سویه انگل، نحوه آلوده سازی و نوع پرایمرها تغییر کرده است، تشخیص ژنوم توکسوپلاسما در خون و مغز موشها فقط در روزهای نهم و دوازدهم پس از آلودگی خوراکی امکانپذیر گزارش شده است (۱۵). با پرایمرهای طراحی شده از ژن P30 توکسوپلاسما و تلقیح داخل صفاقی تاکی زوئیت های سویه RH، ژنوم انگل از ۲۴ ساعت تا ۹۴ ساعت پس از آلودگی با روش PCR در نمونه های خون قابل شناسایی بوده است ولی در مقایسه با آن در موشهایی که با تلقیح کیست نسجی سویه غیر پاتوژن Beverly آلوده شده بوده اند با کاربرد زوج پرایمر های یکسان، نمونه های خون از ۴روز پس از آلودگی مثبت بوده اند و پیوسته تا ۱۷ روز پس از آلودگی مثبت باقی مانده اند (۱۳). این موضوع بر این نکته تأکید می کند که حضور و دوام توکسوپلاسما در خون میزبان به سویه و شکل تزریق شده انگل بستگی دارد. آلوده سازی حیوان با تاکی زوئیت، برادی زوئیت و اسپوروزوئیت برروی زمان ورود انگل به خون و میزان دوام آن، تأثیر مشهود دارد. درنمونه های سرم خون موشهایی که به روش داخل صفاقی به سویه RH توکسوپلاسما آلوده شده اند، ۱۸ ساعت پس از تزریق انگل با روش PCR قابل تشخیص است (۸). تشخیص توکسوپلاسموز در انسان، امروزه در مبتلایان به ایدز و دریافت کنندگان پیوند مغزاستخوان اهمیت زیاد یافته است اما نتایج بررسیهای نمونه خون آنها به روش PCR متفاوت بوده است. علت اصلی این موضوع، مشخص نبودن زمان دقیق آلوده شدن بیماران است. در تحقیق حاضر، ما روش آلوده سازی تجربی را به کار بردیم تا زمان آلودگی مشخص باشد و بر این اساس از رت به عنوان میزبان تجربی استفاده کرده ایم که رت ها نسبت به توکسوپلاسموز مقاومت زیادی دارند و بنابراین پارازیتمی در خون آنها خفیف و کم دوامتر از سایر میزبانان است. بنابراین، نتایج مثبت بیانگرحساسیت زیاد پرایمرهای به کار رفته درتشخیص مقدارکم انگل خواهد بود. پرایمرهای SDKF وSDKR که در این تحقیق به کاربرده شده اند، براساس قطعه ای از ژنوم توکسوپلاسما با ۲۰۰الی ۳۰۰ بار تکرار در ژنوم آن انتخاب و طراحی شده اند که درمقایسه با ۳۵ بار تکرار ژن B1 و ۱۰۵ بار تکرار ژن 5s-rDNA، از تکراربیشتری برخوردار است و لذا حساسیت بیشتری در تشخیص خواهد داشت.

براساس نتایج به دست آمده از این تحقیق، با زوج پرایمرهای به کاررفته، تشخیص توکسوپلاسما در خون رت ها به طور پیوسته از روز دوم آلودگی تا ۱۶ روز پس از آن به خوبی امکانپذیر است. هیچ نوع واکنش منفی و مثبت کاذب و یا تکثیر قطعه ای غیراختصاصی در آن دیده نشد و در مقایسه با سایر پرایمرها ی به کار رفته توسط محققین دیگر در تشخیص توکسوپلاسما، حساسیت و اختصاصیت قابل قبولی دارد. بین نتایج این تحقیق و نتایج حاصل از بررسیهای تجربی روی سویه های غیرپاتوژن در موش، هماهنگی مطلوبی دیده می شود.

حساسیت واختصاصیت پرایمرهای SDKF و SDKR به اندازه کافی بالاست که حضور توکسوپلاسما را در خون رت ها از روزدوم تا حداقل دو هفته پس از آلودگی به خوبی نشان دهد و این، برای تشخیص زودهنگام توکسوپلاسموز در رت ها از طریق نمونه های خون، مناسب و کافی به نظر می رسد. از طرف دیگر، در این تحقیق مشخص شدکه از نمونه های خون می توان به عنوان نمونه های قابل قبول برای تشخیص توکسوپلاسموز زودهنگام استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

نگارندگان از تمام اساتید و کارکنان گروه انگل شناسی دانشگاه تربیت مدرس و گروه انگل شناسی و مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و ملکولی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی که درانجام این تحقیق همکاری داشته اند صمیمانه تشکر و قدردانی می نمایند.

References

1. Aristeu, V.S. and Helio, L.(2001): The detection of *Toxoplasma gondii*, by comparing cytology, histology, bioassay in mice and the polymerase chain reaction (PCR).Vet. Parasitol. 97: 191- 198.
2. Burg, J.L., Grover, C.M., Poueletty, P. and Boothroyd, J.C. (1989): Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, *Toxoplasma gondii*, by polymerase chain reaction. J.Clin. Microbiol, 27: 1787-1792.
3. Cresti, S., Ciacci, C., Donati.E., Giordano, I., Tordini, G. and Barberi, A. (2001): Evaluation of PCR methods for 5s- r DNA and P30 genes to detect *Toxoplasma gondii* in blood and other clinical samples. New Microbiol. 24, 2: 171 - 174.
4. Dubey, J.P. and Frankel, J.K.(1998): Toxoplasmosis of rats: a review, with considerations of their value as animal model and their possible role in epidemiology. Vet. Parasitol, 77: 1- 32.
5. Greg, S.J., Vitali, G.S., Daivid, J.D. and Gwendolyn, L.G. (1996): Comparison of cell cuture, mouse inoculation and PCR for detection of *Toxoplasma gondii*: Effects of storage conditions on sensitivity. J.Clin. Microbiol. 34: 1572- 1575.
6. Gregory, A.F., John, A.H, Charles, D.M., Mark, B.S. and Scott, W.S. (1993): Diagnosis of Toxoplasma parasitemia in patients with AIDS by gene detection after amplification with polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 31: 2327- 2331.
7. Grover, C.M., Thulliz,P., Remington, J.S. and Boothroyd, J.C. (1990): Rapid prenatal diagnosis of congenital Toxoplasma infection by using palymerase chain reaction and amniotic fluid. J. Clin. Microbiol. 28: 2297- 2301.
8. Hafid, J., Guichard, D., Flori, P., Bouriet, T., Raberin, H., Genin, C. and Tran, M.S. R. (2000): Detection of *Toxoplasma gondii* by polymerase chain reaction in sera of acutely infected mice. J. Parasitol. 86: 857- 859.
9. Held, T.K., Kruger, D., Suitana, A.R., Beyer, J., Busemann, C., Janitschke, k. and Siegert, W. (2000): Diagnosis of toxoplasmosis in bone marrow transplant recipients: comparison of PCR- based results and immunohistochemistry. Bone Marrow Transplantation, 25: 1257-1262.

10. Hitt, J.A. and Filice, G.A. (1992): Detection of *Toxoplasma gondii* parasitemia by gene amplification, cell culture, and mouse inoculation. J.Clin.Microbiol. 30: 3181- 3184.

11. Homan, W.L., Vercamen, M., De Braekeleer, J. and Verchueren, H. (2000): Identification of a 200 - 300 fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. Inter. J. Parasitol. 30: 69 - 75.

12. Lamoril, J., Molina, J.M., de Gouvello, A., Garin, Y. J., Deybach, J.C., Modai, J. and Derouin, F. (1996): Detection by PCR of *Toxoplasma gondii* in blood in the diagnosis of cerebral toxoplasmosis in patients with AIDS. J.Clin. Pathol. 49: 89- 92.

13. Nguyen, T.D., Kesei, M.D.E., Bigaignon, G., Hoet, P., Pazzaglia, G. and Lammens, M. (1996): Detection of *Toxoplasma gondii* tachyzoits and bradyzoites in blood, urine and brains of infected mice. Clini and Diag Lab Immunol. 3: 635 - 639.

14. Paugam, A., Dupouy-Camet, J., Sumuyen, M.H., Romand, S., Lamoril, J. and Derouin, F. (1995) : Detection of *Toxoplasma gondii* parasitemia by polymerase chain reaction in perorally infected mice. Parasite, 2: 181- 184.

15. Shibata, H., Rai, S.K., Satoh, M., Murakoso, K., Sumi, K., Uga S., Matsumura, T. and Matsuoka, A. (1995): The use of PCR in detecting toxoplasma parasite in the blood and brains of mice experimentally infected with *Toxoplasma gondii*. Kansenshogaku Zasshi, 69: 158- 163.

16. Stephen, F. P., Frank, D.G. and Jack, S.R. (1992): Detection of *Toxoplasma gondii* in cerebrospinal fluid from AIDS patients by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 30: 3000 - 3002.

17. Van de Ven, E., Melchers, W., Galama, J., Camps, W., and Meuwissen, J. (1991): Identification of *Toxoplasma gondii* infections by B1 gene amplification. J. Clin. Microbiol. 29: 2120- 2124.