خلاصه این پژوهش به شرح زیر میباشد:

**مقدمه:**

توكسوپلاسما گوندي، تك ياخته اي از شاخه اپي كمپلكسا و عامل عفونت مشترك بين انسان و حیوانات با شيوع جهاني مي باشد. آلودگي به اين تك ياخته، از سراسر دنيا گزارش شده است چنانچه 30 درصد جمعیت جهان داراي آنتي بادی بر عليه اين انگل مي باشند. روش سرولوژی ELISA  و همچنین IgG Avidity ELISA  پرکاربردترین روش سرولوژی بکار رفته در تشخیص عفونت توکسوپلاسما می باشد.  با توجه به اینکه هنوز روش مناسب تشخیصی با حساسیت و ویژگی مطلوب برای این بیماری شناخته نشده است، بیشتر بیماران در مراحل اولیه بیماری شناسایی نمی شوند.

امروزه استفاده از تکنیک های مولکولی در تشخیص عفونت های مختلف جایگاه ویژه ای را به خود اختصاص داده است. می توان از این تکنیک ها همراستا با تست های سرولوژی در تشخیص عفونت های حاد سود جست. تکنیک های مبتنی بر شناسایی DNA انگل به ویژه تکنیک Real-Time PCR از حساسیت و دقت بسیار بالایی در تشخیص برخوردار می باشند.  Real-Time PCR یک روش مولکولی می باشد که هم برای تکثیر و هم برای تعیین کمی مقدار DNA یا RNA در نمونه بیمار مورد استفاده قرار می گیرد. روشی بسیار حساس می باشد و با توجه به اختصاصی بودن پرایمرها و همچنین به کارگیری پروب های اختصاصی از جمله TaqMan MGB probe، از ویژگی بالایی نیز برخوردار است. با توجه به لزوم دستیابی به روش هایی با حساسیت و ویژگی بیشتر در راستای تشخیص زودرس فرم حاد این بیماری، بخصوص افراد در معرض خطر، در این مطالعه به ارزیابی روش Semi-nested Real-Time PCR TaqMan MGB probe در زنان باردار و افراد دارای نقص سیستم ایمنی پرداختیم.

**روش اجرا:**

در فاز مدل حیوانی فرم مزمن عفونت توکسوپلاسمایی، که به مدت 2 ماه در تابستان 1397 در حیوان خانه دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران به طول انجامید، 11 گروه 3 تایی موش BALB/c Inbred تهیه شد، به صورت روزانه از آنها نمونه خون و مغز تهیه گردید. این کار تا روز 28 بعد از ایجاد عفونت در موش ها ادامه یافت. جهت بررسی فاز حاد عفونت توکسوپلاسمایی در موش های BALB/c ، همانند فاز مزمن بیماری موش ها انتخاب شده و در 6 گروه 3تایی مختلف قرار گرفتند و نمونه گیری از خون و مایع صفاقی تا روزی که تمامی موش ها Expire شدند ادامه یافت. جامعه آماری مورد مطالعه در فاز مدل انسانی شامل زنان باردار و بیماران دارای نقص سیستم (بیماران HIV مثبت و گیرنده پیوند) مراجعه کننده به مرکز درمانی و تشخیصی استان تهران، اصفهان، مازندران، خراسان رضوی و لرستان بوده اند که نمونه گیری از دی ماه 1396 تا فروردین 1398 به طول انجامید. با توجه به فرمول محاسبه حجم نمونه، در مجموع دو گروه زنان باردار و افراد دارای نقص سیستم ایمنی، 51 نمونه از افراد بیمار با فاز حاد بیماری و 70 نمونه از افراد با فاز مزمن بیماری جمع آوری شد. در این مطالعه، به منظور جستجوی آنتی‌بادی های سرمی ضد توکسوپلاسما گوندی (IgG, IgM)، از روش الایزا و کیت تولیدی پیشتاز طب استفاده گردید. همچنین تعیین IgG اویدیتی با دستگاه اتوماتیک و به روش کمی لومینسانس انجام شد. استخراج DNA  با استفاده از کیت تجاری (Roche-آلمان) برای کلیه نمونه های بالینی صورت گرفت و واکنش Semi-nested Real-Time PCR TaqMan MGB probe با استفاده از پرایمرها و پروب اختصاصی ژن RE انجام گردید. جهت بررسی حساسیت و ویژگی آنالیتیکال روش های مذکور از DNA استخراج شده از رقت های تهیه شده از تاکی زوئیت انگل توکسوپلاسما (شامل 20000 تا 2/0 تاکی زوئیت) و DNA جدا شده از دیگر انگل ها بترتیب استفاده گردید. همچنین حساسیت و ویژگی تشخیصی، ارزش اخباری مثبت و ارزش اخباری منفی هر تست برای هر دو گروه عفونت حاد و مزمن در مدل حیوانی و انسانی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از روش های سرولوژی و مولکولی با استفاده از نرم افزار SPSS مورد ارزیابی قرار گرفت، همچنین ضریب کاپا به منظور تعیین میزان همخوانی روش ها محاسبه گردید.

**نتایج:**

نتایج اندازه گیری  IgG ELISA testفاز مزمن عفونت توکسوپلاسمایی در موش های BALB/c بیانگر آن بود که آنتی بادی IgG از هفته دوم تلقیح در سرم موش های BALB/c قابل ردیابی بود. بدین شکل که تا روز D14 سطح انتی بادی پایین تر از cut-off تعیین شده در طراحی تست بود. در بررسی پاتولوژی نشان داد که کیست های نسجی از روزD14  به بعد در مغز قابل روئیت بودند. به عبارتی نتایج 2 هفته پایانی مطالعه مثبت گردید و در روز های D14, D21, D28 کیست ها قابل مشاهده بودند. نتایج اندازه گیری  IgG ELISA testفاز حاد توکسوپلاسموز در موش های BALB/c بیانگر آن بود که آنتی بادی IgG در تمامی روز های D1-D4 و همچنین گروه کنترل منفی گزارش شد. بررسی های مولکولی فاز مزمن مدل حیوانی با استفاده از تکنیک Semi-nested Real-Time PCR TaqMan MGB probe بیانگر آن است که در نمونه های خون کامل موش ها (WB) در روز اول DNA انگل توکسوپلاسما شناسایی شد و مجددا از روز D4-D28، بوضوحDNA  انگل قابل ردیابی بود. نتایج حاصل از این تکنیک در بررسی نمونه های مغز موش های آلوده (BT) بیانگر آن است که از روز D1-D28 ، DNA انگل در مغز قابل ردیابی بود. در بررسی های پارازیتولوژی فاز حاد مدل حیوانی در تمامی روزها و در تمامی نمونه ها تاکی زوئیت های توکسوپلاسما قابل روئیت بود. نتایج حاصل از تکنیک semi-nested Real-Time PCR TaqMan MGB probe نیز در تمامی روزها و تمامی نمونه های تحت بررسی DNA انگل در نمونه ها قابل ردیابی بود. در مدل انسانی، بررسی سرولوژی بیماران نشان می دهد در بین مواردی که در گروه زنان باردار قرار داشتند، مجموعا در هر دو گروه فاز حاد و مزمن، 5/28 درصد دارایIgG   اویدیتی در سطح پایین بوده و همچنین 7/60 درصد از افراد این گروه دارای IgG Avidity در سطح بالا بودند و تنها 7/10 درصد افراد این گروه دارای IgG Avidity در سطح متوسط بودند. در گروه افراد دچار نقص سیستم ایمنی، مجموعا در هر دو گروه فاز حاد و مزمن، 07/43 درصد دارایIgG   اویدیتی در سطح پایین بوده و همچنین 3/52 درصد از افراد این گروه دارای IgG Avidity در سطح بالا بودند و تنها 61/4 درصد افراد این گروه دارای IgG Avidity در سطح متوسط بودند. از مجموع 121 نمونه بالینی (56 زن باردار و 65 بیمار دارای نقص سیستم ایمنی) آزمایش شده با روش Semi-nested Real-Time PCR TaqMan MGB probe تعداد 62 ( 23/51 درصد ) نمونه مثبت گزارش گردید. نکته قابل توجه در این آزمون این است که از میان 65 نفر گروه کنترل منفی در میان افراد دارای نقص سیستم ایمنی، 3نفر (61/4 درصد) نتیجه مثبت تست مبتنی بر پایه Real-Time  گزارش شد. قابل ذکر است که جواب آزمون های سرولوژیک این افراد منفی گزارش گردید. نتایج حاصل از بررسی های آماری نشان می دهد که در میان زنان باردار در مرحله حاد بیماری،  با بکارگیری IgG avidity به عنوان استاندارد طلایی، ضریب کاپا برای این روش 728/0 بدست آمده است. میزان حساسیت این روش در مقایسه با استاندارد طلایی (IgG avidity test)، 100 و  میزان ویژگی نیز 80 درصد گزارش شد. ارزش اخباری مثبت این تست 72 درصد و  ارزش اخباری منفی تست 100 درصد گزارش گردید. نتایج حاصل از بررسی های آماری در میان بیماران دچار نقص سیستم ایمنی در مرحله حاد بیماری با بکارگیری IgG avidity به عنوان استاندارد طلایی، ضریب کاپا برای این روش 790/0 بدست آمده است.

میزان حساسیت این روش در مقایسه با استاندارد طلایی (IgG avidity test)، 100 درصد و میزان ویژگی این روش نیز 83 درصد گزارش گردید. همچنین ارزش اخباری مثبت 79 درصد و ارزش اخباری منفی 100 درصد گزارش شد.

**نتیجه گیری:**

تکنیک Semi-nested Real-Time PCR TaqMan MGB probe بر پایه ژن RE می تواند به عنوان یک روش تشخیصی سریع با حساسیت و ویژگی بالا در تشخیص فرم حاد توکسوپلاسموز در نمونه های بالینی مورد استفاده قرار گیرد. نتایج اندازه گیری IgG و IgM به روش الیزای معمولی و تست IgG avidity دارای همبستگی قابل قبولی با یکدیگر می باشند و می توانند در تمایز عفونت فعال و اولیه و عفونت غیر فعال مفید مورد استفاده قرار گیرند. با توجه به نتایج فوق می توان با به کارگیری تکنیک های مولکولی بر پایه Real-Time PCR همراستا با تکنیک های سرولوژی به تشخیص زودرس فرم حاد عفونت توکسوپلاسمایی دست یافت.