Archive of SID

[DOI: 10.18869/acadpub.jnkums.8.3.497]
Downloaded from journal.nkums.ac.ir at 11:35 IRDT on Tuesday May 30th 2017

مقاله
پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی سال ۹۵؛ دوره ۸ (۳): ۵۰۶-۴۹۷
Journal of North Khorasan University of Medical sciences 2016;8(3):497-506

اثر بخشی اسپیرامایسین جهت درمان توکسوپلاسموزیس تجربی در رت با استفاده از روش Real-time NASBA

رقیه نوروزی[1*]، عبدالحسین دلیمی اصل[2]، مهدی فروزنده مقدم[3]، فاطمه غفاری فر[2]

[1]استادیار، دکترای انگل شناسی پزشکی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
[2]استاد، دکترای بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
[3]استاد، دکترای انگل شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
[*]**نویسنده مسئول**: تبریز، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تبریز
پست الکترونیک: r.norouzi@tabrizu.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: *توکسوپلاسموزیس یکی از بیماری های مهم انگلی می باشد که عوارض غیر قابل جبران در نوزادان به دنیا آمده از مادرانی که در طی دوران بارداری آلوده شده اند و افراد ایمنوساپرس بوجود می آورد. روش های درمانی مشخصی برای توکسوپلاسموزیس ارائه شده است؛ اما آسیب های جنینی بوجود می آورد. بنابراین امروزه استفاده از ماکرولید اسپیرامایسین به عنوان یکی از گزینه های درمانی مورد استفاده قرار می گیرد. مطالعه حاضر با هدف راه اندازی روش Real-time NASBA جهت تشخیص توکسوپلاسموزیس تجربی انجام گرفته است.*

مواد و روش کار: *در این مطالعه تجربی، رت ها در سه گروه ۱۵تایی یعنی تحت درمان با اسپیرامایسین ۴۰۰ mg\kg حدود یک گرم سه بار در روز، پریمتامین-سولفادیازین (به عنوان کنترل داروئی) ۱۵۰ mg\kg یکبار در روز و گروه شاهد تقسیم شدند. ۲۴ ساعت بعد از آلوده سازی رت ها با انگل توکسوپلاسما گوندی، درمان شروع شد و به مدت یک هفته ادامه یافت. خون رت ها به وسیله روش Real-time NASBA قبل و بعد از درمان و یک هفته بعد از قطع دارو از نظر وجود انگل زنده و اثر بخشی داروی مذکور بررسی شد.*

یافته ها: *نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که داروی اسپیرامایسین توانست ۵ روز بعد از آلوده شدن رت‌ها به طور کامل انگل‌ها را از بین برد و تمام منحنی ها را خطی سازد.*

نتیجه گیری: *اسپیرامایسین اثر درمانی خوبی در از بین بردن انگل توکسوپلاسما گوندی در خون رت ها دارد و در زنان باردار استفاده شود.*

واژه های کلیدی: *توکسوپلاسموزیس، اسپیرامایسین، روش Real-time NASBA*

وصول: ۹۴/۹/۱۸
اصلاح: ۹۴/۱۱/۲۶
پذیرش: ۹۵/۲/۱۴

DOI: *10.18869/acadpub.jnkums.8.3.497*
Cite this article as: *Norouzi R, Dalimi A, Forozandeh moghadam M, Ghaffarifar F. Effectiveness of spiramycin for treatment of experimental toxoplasmosis in rats by the Real-time NASBA method. jnkums. 2017; 8 (3) :497-506*

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.18869/acadpub.jnkums.8.3.497]

Downloaded from journal.nkums.ac.ir at 11:35 IRDT on Tuesday May 30th 2017

مقدمه

بیماری عفونی توکسوپلاسموزیس (*Toxoplasmosis*) توسط تک یاخته ای درون سلولی اجباری به نام *توکسوپلاسما گوندی*(*Toxoplasma gondii*) ایجاد می شود [۱،۲]. توکسوپلاسموزیس در افراد دارای ایمنی کامل، معمولاً فاقد علامت است یا به صورت تظاهرات پوستی (بثورات جلدی)، آدنوپاتی (Adenopathy) یا عارضه چشمی بروز می کند ولی در نوزادانی که از طریق مادرزادی آلوده می شوند و بیماران با نقص ایمنی مانند مبتلایان به ایدز (Acquired immunodeficiency syndrome: AIDS) و دریافت کنندگان عضو پیوندی، ممکن است تهدیدکننده زندگی باشد [۳،۴].

توکسوپلاسموزیس مادرزادی که حاصل عبور انگل از جفت در هنگام آلودگی اولیه مادری است، می تواند باعث سقط جنین خود به خودی، مرگ جنین در رحم یا نقص های شدید مادرزادی نظیر هیدروسفالی (Hydrocephaly)، میکروسفالی (Microcephaly)، عقب ماندگی ذهنی و کوریورتینیت (Chorioretinitis)شود و در افراد با ایمنی سرکوب شده نظیر افراد مبتلا به AIDS، دریافت کنندگان پیوند و افراد مبتلا به سرطان هایی مثل هوچکین (Hotchkin) و غیره می تواند دوباره فعال شده و باعث ایجاد آنسفالیت توکسوپلاسمایی شده و یکی از علل مرگ و میر این افراد محسوب گردد [۳،۵].

داروهای مختلفی برای درمان توکسوپلاسموزیس در دسترس است. داروی اختصاصی شامل سولفادیازین و پریمتامین می باشد. مصرف این دو دارو به علت عوارض جانبی فقط به عفونت های شدید توکسوپلاسمایی نظیر آنسفالیت یا رتینیت محدود می شوند [۷]. پریمتامین موجب سرکوبی مغز استخوان می شود که نتیجه آن کم خونی، ترومبوسیتوپنی و لکوپنی می باشد [۸،۹] و در دوزهای بالا خاصیت تراتوژن بودن آن در رت ها اثبات شده است [۱۰،۱۱] و نیز تجویز سولفادیازین در ماه های آخر بارداری موجب افزایش احتمال زردی در نوزادان می شود [۱۲]. با توجه به عوارض بالا، در دوران بارداری جهت درمان عفونت، از ماکرولید اسپیرامایسین استفاده می گردد. این دارو به خوبی تحمل شده و خطری را متوجه جنین نمی گرداند. کورئور[1] و همکاران به این نتیجه رسیدند که تجویز اسپیرامایسین در انسان موجب کاهش تعداد انگل‌های جفت و در نتیجه کاهش ابتلای جنین به توکسوپلاسموزیس می شود [۱۳]. اثر بخشی اسپیرامایسین احتمالا به دلیل تجمع دارو در سطح جفت و بوجود آوردن سدی در برابر نفوذ انگل می باشد [۱۵،۱۴]. با توجه به آسیب پذیر بودن کودکان و زنان باردار، نگرانی مادران، کمبود داروهای اختصاصی ضدتوکسوپلاسموز و عوارض جانبی بالای آن‌ها، ضرورت انجام مطالعه بر روی مدل تجربی رت احساس شد و از آنجایی که رت از لحاظ فیزیولوژیک مشابه انسان بوده و سیر بیماری در بدن رت مشابه سیر آن در بدن انسان می باشد از این مدل تجربی در پژوهش استفاده گردید.

روش (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) NASBAروش هم دمایی و بدون نیاز به ترموسایکلر است که در آن RNA مستقیماً در واکنشی سه آنزیمی رونویسی معکوس (Trancriptase:RT Reverse)،H RNAase، RNA T7 پلیمراز و دو پرایمر تکثیر می یابد. در این روش ابتدا بوسیله آنزیم رونویسی معکوس (RT) و پرایمر مناسب متصل به پروموتر T7، یک رشته DNA از روی RNA الگو ساخته می شود. محصول این واکنش یک هیبرید DNA-RNA خواهد بود که نسبت به آنزیم H RNAase حساس است و این آنزیم با خاصیت RNA آزی خود، RNA متصل به DNA را تخریب کرده و به این ترتیب یک DNA تک رشته باقی می ماند که پرایمر دوم در این شرایط به آن متصل می شود. آنزیم RT در این شرایط با فعالیت DNA پلیمرازی وابسته به DNA خود، DNA تک رشته را به DNA دو رشته ای تبدیل می کند. این DNA دو رشته ای در یک سرخود دارای توالی پروموتوری T7 می باشد، در نتیجه آنزیم RNA T7 پلیمراز با شناسایی ناحیه پروموتری خود، کار رونویسی را انجام داده و تعداد زیادی RNA تولید می شود (حدوداً از هر رشته ۱۰۰ الی ۱۰۰۰ RNA ساخته می شود) حال هر کدام از RNA های سنتز شده به عنوان الگو برای چرخه تکراری فرآیند NASBA به کار می رود [۱۶].

1- Couvreur

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.18869/acadpub.jnkums.8.3.497]

Downloaded from journal.nkums.ac.ir at 11:35 IRDT on Tuesday May 30th 2017

روش‌های آشکارسازی RNA وقت‌گیر و همچنین خطرآفرین هستند بنابراین این اشکالات می تواند توسط تکنیک Real-time مرتفع گردد. برای این منظور از molecular beacon استفاده شد. Molecular beacon یک توالی اولیگونوکلوتیدی تک رشته است. این ساختار مولکولی از یک بخش ساقه و حلقه تشکیل می شود که در سر '۵ آن یک ماده فلوروفور و در سر '۳ آن یک مولکول خاموش کننده قرار داده می شود. در اثر اتصال حلقه که مکمل بخشی از توالی هدف است، ساختار ساقه (که بصورت مکمل هم می باشد) باز شده و بین ماده تولید کننده فلورسانس و خاموش کننده، فاصله می افتد و به این ترتیب نور ساطع می شود که توسط دستگاه فلورومتر آشکار می گردد. این روش بسیار حساس و دقیق است [۱۷]. با توجه به سرعت، حساسیت بالا و نیز کمی بودن، از روش Real-time NASBA برای تکثیر و ردیابی RNA انگل بعد از درمان با اسپیرامایسین استفاده شد و نیز با مطالعاتی که بر روی ژنوم توکسوپلاسما انجام شد؛ ژن B1 توکسوپلاسما به عنوان کاندید مناسب ژنی انتخاب شد.

مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر درمانی داروی اسپیرامایسین خوراکی در رت‌های آلوده به انگل *توکسوپلاسما گوندی* با استفاده از روش Real-time NASBA صورت گرفت و چون فاز حاد بیماری مد نظر بود از رت های غیربردار استفاده شد. این تکنیک روشی حساس با ویژگی بالا می باشد که در داخل و خارج کشور مشابه آن انجام نشده است. با اتکا به نتایج این بررسی مشخص شد که در روز پنجم آثاری از انگل در خون نیست که در هیچ رفرنسی به آن اشاره نشده است و جنبه جدیدی از درمان توکسوپلاسموزیس مادرزادی با اسپیرامایسین مطرح نمود. امید است نتایج این پژوهش قابل تعمیم به انسان بوده و پزشکان و دست‌اندرکاران بهداشت و درمان از نتایج آن بهره جویند.

روش کار

آلوده سازی و درمان رت ها: تعداد ۴۵ سر رت (Rattus norvegicus) ماده ۳-۲ ماهه از مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی تهیه و به سه گروه ۱۵ تایی تقسیم شدند. ۱۵ سر از رت‌ها فقط انگل دریافت کردند؛ ۱۵ سر انگل و داروی اسپیرامایسین و ۱۵ سر دیگر انگل و داروی پریمتامین و سولفادیازین دریافت نمودند. تاکی زوئیت های استخراج شده از موش سوری توسط لام نئوبار (Neubauer) شمارش شده و با افزودن محلول PBS(Phosphate Buffered Saline) غلظت نهایی به 10^5 عدد تاکی زوئیت در هر میلی لیتر مایع تنظیم شد. به ازای هر میلی لیتر سوسپانسیون، مقدار ۱۰۰ واحد پنی سیلین (PenicillinG)G و ۱۰۰ میکروگرم استرپتوماسین (Streptomycin) به آن اضافه شد [۱۳]. سپس به محوطه صفاقی هر کدام از رت‌ها 5×10^5 تاکی زوئیت (مقدار ۵ میلی لیتر از سوسپانسیون) تزریق شد. ۲۴ ساعت بعد از آلوده سازی درمان شروع شد. داروی پریمتامین-سولفادیازین ۱۵۰ میلی گرم یکبار در روز و داروی اسپیرامایسین حدود یک گرم، سه بار در روز و به شکل دهانی تجویز گردید. دارو درمانی به مدت دو هفته ادامه یافت.

خون گیری از رت‌ها: معمولاً ۲ تا ۱۷ روز بعد از تزریق، انگل ها در خون حضور می یابند بنابراین ۴۸ ساعت بعد از تزریق، خونگیری به اندازه ۱سی سی از چشم تمام رت ها انجام گرفت و سپس یک روز در میان خون گیری تکرار گردید و بلافاصله با ماده ضد انعقاد EDTA (Ethylenediaminetetraacetic Acid) ۱ به ۱۰ در میکرولوله ۱/۵مخلوط و در فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد به منظور استخراج RNA نگهداری شد.

استخراج RNA: تعداد ۳ تا ۵ میلیون انگل را توسط لام نئوبار شمارش و با دور ۱۳۰۰۰rpm به مدت ۲ دقیقه با دستگاه سانتریفوژ رسوب داده شد. RNA انگل استخراج (RNA Xplus؛ سیناژن) و باند آن روی ژل آگاروز مشاهده و غلظت آن به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد تا به عنوان کنترل مثبت استفاده شود و از تمام نمونه های نگهداری شده در فریزر ۸۰- RNA انگل استخراج و وارد واکنش Real-time NASBA شد.

انجام واکنش NASBA: واکنش NASBA به منظور تکثیر قطعه ۱۱۶bp با دو پرایمر FN1 و RN2 انجام شد و توالی پرایمرها و Molecular beacon در جدول ۱ نشان داده شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.18869/acadpub.jnkums.8.3.497]

Downloaded from journal.nkums.ac.ir at 11:35 IRDT on Tuesday May 30th 2017

جدول ۱: توالی پرایمرهای FN1 و RN2

پرایمر	توالی
FN1	5'-GGACTGGCAACCTGGTGTC-3'
RN2	5'-AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGACCCGGACCGTTTAGCAG-3' پروموتور T7
Molecular beacon	5'-FAM-cagcgACAGAACAGCTGCAGTCCGGAAATAcgctg-DABCYL-3'

جدول ۲: اجزای لازم برای واکنش NASBA

#	ماده شیمیایی	غلظت
۱	Tris-HCL	۴۰mM
۲	KCL	۵۰mM
۳	DTT	۱mM
۴	Mgcl2	۴mM
۵	پرایمر رفت	۱۰ pmol
۶	پرایمر برگشت	۱۰ pmol
۷	dNTP	۰/۴ mM
۸	NTP	۰/۸ mM
۹	DMSO	۵٪
۱۰	بازدارندهRNase	۱۲ واحد
۱۱	M-Mulv RT	۸ واحد
۱۲	پلیمراز T7 RNA	۲۰واحد
۱۳	Molecular beacon	۲۰pmol

www.SID.ir

Archive of SID

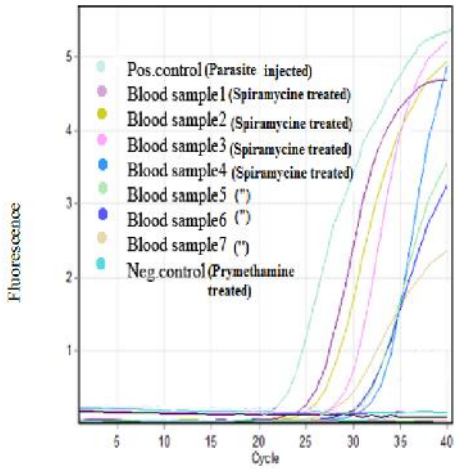
[DOI: 10.18869/acadpub.jnkums.8.3.497]

Downloaded from journal.nkums.ac.ir at 11:35 IRDT on Tuesday May 30th 2017

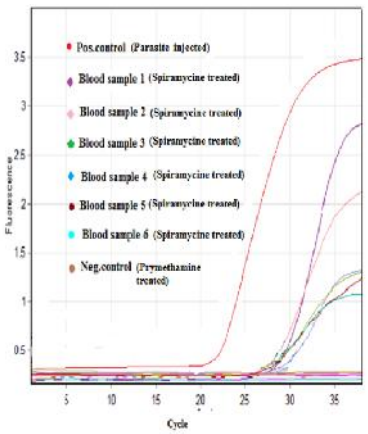
ابتدا تمام اجزای مورد نیاز به جزء آنزیم ها، با غلظت های مشخص و تعیین شده وارد مخلوط واکنش شد (جدول۲). مخلوط حاصل به مدت پنج دقیقه در دمای $65C^{\circ}$، سپس بمدت ۳ دقیقه در دمای $41C^{\circ}$ حرارت داده می شود پس به سرعت مخلوط آنزیمی به مخلوط اولیه افزوده شده و در دستگاه Real-time قرار گرفت.

یافته ها

نتایج ردیابی انگل توکسوپلاسما در نمونه‌های خون رت‌ها، با روش Real-time NASBA در شکل های ۱، ۲ و ۳ آمده است. منحنی‌های بدست آمده از واکنش نشان می دهد که تا ۴ روز بعد از شروع درمان با اسپیرامایسین، انگل در خون قابل ردیابی است ولی از روز پنجم انگلی



شکل ۱: نتایج Real-time NASBA، یک روز بعد از شروع درمان



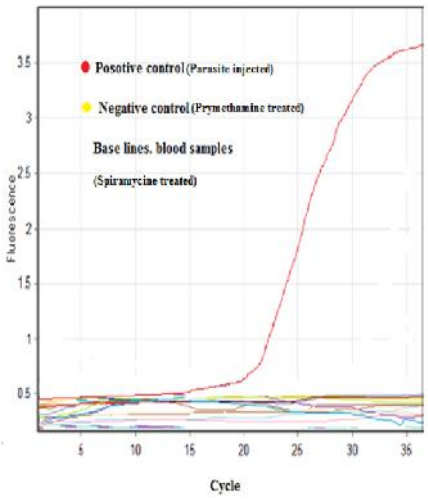
شکل ۲: نتایج Real-time NASBA، سه روز بعد از شروع درمان

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.18869/acadpub.jnkums.8.3.497]

Downloaded from journal.nkums.ac.ir at 11:35 IRDT on Tuesday May 30th 2017



شکل ۳: نتایج Real-time NASBA، پنج روز بعد از شروع درمان

ردیابی نشد. با اتکا به نتایج این بررسی مشخص شد که در روز پنجم آثاری از انگل در خون نیست که جنبه جدیدی از درمان توکسوپلاسموزیس مادرزادی با اسپیرامایسین می باشد. از طرفی داروی پریمتامین-سولفادیازین که به عنوان داروی موثر (کنترل دارویی) مورد استفاده قرار گرفته بود از روز اول تمام انگل ها را از بین برده و تمام منحنی های بدست آمده موازی با خط پایه بدست آمد.

بحث

توکسوپلاسموزیس در افرادی که سیستم ایمنی سالمی دارند احتیاج به درمان ندارد با این وجود افراد ایمنوساپرس مبتلا به فرم حاد این بیماری می شوند که باید بلافاصله درمان شوند که برای درمان از داروهای مختلفی مانند اسپیرامایسین، پیریمتامین+سولفادیازین و آزیترومایسین می توان استفاده نمود [۲۱-۱۸]. داروهای پیریمتامین و سولفادیازین هر دو آنتاگونیست اسید فولیک هستند که می توانند ساپرسیون مغز استخوان وابسته به دوز دارو بدهند که نتیجه آن کم خونی، ترومبوسیتوپنی و لکوپنی می باشد. در حیوانات نیز ثابت شده است این داروها در دوزهای بالا تراتوژن می باشند؛ بنابراین کاربرد این داروها محدود بوده ولی ماکرولید اسپیرامایسین داروی بی خطری بوده که در دوزهای بالا در جفت متراکم شده و می تواند مانع انتقال عفونت از مادر به جنین شود [۲۲].

مطالعه بر روی موش ها نشان داد که در طی عفونت حاد با *توکسوپلاسما گوندی*، اسپیرامایسین می تواند انگل را در میزبان ریشه کن نماید[۲۵-۲۳]. کورئور و دسمانتس[1] در سال ۱۹۷۴ اثبات کردند که فراوانی عفونت مادرزادی در مادرانی که اسپیرامایسین مصرف کرده اند کاهش دارد ولی دارو در مورد جنین هایی که تظاهرات شدید نشان داشته باشند تاثیری ندارد [۲۶]. اسکوندرمارک[2] و همکاران در سال ۱۹۹۴ تحقیقی بر روی ۸ میمون که ۱۵۰ روزه باردار بودند انجام دادند؛ بعد از آلوده کردن آنها با *توکسوپلاسما گوندی* دو هفته درمان با اسپیرامایسین انجام دادند و با استفاده از روش PCR انگلی در نوزادان متولد شده نیافتند [۲۷]. بسیاری از مطالعات انجام شده بوسیله روش های سرولوژیک انجام شده است ولی این روش ها در مواردی کارایی لازم را ندارند؛ از جمله این موارد این است که چون پادتن های اختصاصی علیه توکسوپلاسما تأخیر ظاهر می شوند و بتدریج میزان آنها افزایش می یابد؛ در ابتدای آلودگی، توکسوپلاسموز قابل

1 -Desmonts
2 -Schoondermark

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.18869/acadpub.jnkums.8.3.497]

Downloaded from journal.nkums.ac.ir at 11:35 IRDT on Tuesday May 30th 2017

تشخیص نیست علاوه بر این، قابلیت انتقال پادتن ها نوع IgG از مادر به جنین، تشخیص زود هنگام توکسوپلاسموز را در جنین با اشکال مواجه می کند [۲۸]. در دهه های اخیر از روش های مبتنی بر تکثیر DNA مثل PCR برای شناسایی انگل توکسوپلاسما استفاده شد ولی این روش ها اطلاعاتی در مورد زنده بودن پاتوژن را فراهم نمی کند چون DNA تا مدت ها در محیط زنده باقی می ماندو علارغم از بین رفتن میکروارگانیسم نتیجه PCR مثبت می شود بنابراین روش هایی مانند Real-time NASBAکه قادر به شناسایی انگل زنده هستند این امکان را فراهم می سازند که بتوان برنامه های ارزیابی اثر درمانی داروها را به خوبی تحت نظارت قرار داد [۲۹]. نتایج تحقیق شریفیان درچه و همکاران در سال ۲۰۰۴ نشان داد که انگل توکسوپلاسما تا روز ۱۷ در خون حضور دارد و بعد از روز ۱۷ وارد ارگان ها شده و فاز مزمن (خود محدود شوندگی) شروع می شود [۳۰]. نتیجه این مطالعه نشان می دهد که در روز پنجم، عفونت قطع شده است بنابراین نمی توان به خود محدود شوندگی انگل نسبت داد و صد در صد تاثیر اسپیرامایسین بوده است.

تکنیک NASBA در ابتدا برای تشخیص عفونت های RNA ویروسی کاربرد داشت ولی در دهه های اخیر برای تشخیص عفونت‌های باکتریایی مثل ویبریوکلرا، مایکوپلاسما پنومونیا، مایکوباکتریوم اوویوم، لیستریا منوسایتوژن، پاراتوبرکولوزیس، کامپیلوباکتر ژوژونی و عفونت های قارچی مثل کاندیدا، آسپرژیلوس و غیره مورد استفاده قرار می گرفت [۳۱]. با پیشرفت زمان تکنیک NASBA برای انگل هایی مثل پلاسمودیوم فالسیپاروم [۳۲]، تریپانوزوم [۳۳]، کریپتوسپوریدیوم [۳۴]، لیشمانیا [۳۵] و غیره کاربرد یافت.

واکنش رونویسی در مرحله هم دمای ۴۱ درجه سانتیگراد انجام می شود. محصول تک رشته ای، هدف ایده آلی برای بررسی روش های مختلف هیبریداسیون است. در این روش بر خلاف سایر روش ها، مقادیر محصول RNA در سطح بالایی است. سه آنزیم به کاربرده شده در این واکنش در شرایط مشابهی فعال می شوند. تمام RNA مبتنی بر سیستم NASBA، دارای اختصاصیت بالایی است به طوری‌که در حضور DNAی ژنومی که به طور همزمان از سلول زنده جدا می شوند، mRNA به طور اختصاصی تکثیر یافته و بدون تاثیر از توالی DNA، می تواند اندازه گیری شود. وجود همین مزیت ها در تکنیک NASBA باعث شده تا بتواند جایگاه ویژه‌ای در شناسایی میکروارگانیسم ها پیدا کند [۳۶].

در این تحقیق، توالی ژن B1 برای مطالعه تاکی زوئیت توکسوپلاسما به کار گرفته شده است. روش NASBA بر اساس ژن B1 کارایی بالایی در تشخیص توکسوپلاسموزیس دارد. با مطالعات انجام شده بر روی ژنوم تو تکنیک NASBA با مزایایی نظیر افزایش سرعت از طریق کاهش زمان تکثیر و ساده بودن در تشخیص پاتوژن ها بویژه انگل ها اهمیت ویژه ای یافته است.

هدف از این پروژه، راه اندازی و به کارگیری روش Real-time NASBA برای تشخیص بیماری توکسوپلاسموزیس است. تکنیک Real-time NASBAسیستم حساس تکثیری RNA و برای رونویسی اختصاصی اسیدهای نوکلئیک مناسب است. این روش زمانی به کار برده می شود که پیگیری اثربخشی داروها، واکسن ها، بیان ژن ها و همچنین شناسایی انگل زنده مورد نظر باشد.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که داروی اسپیرامایسین توانست ۵ روز بعد از آلوده شدن رت‌ها به طور کامل انگل‌ها را از بین برد و تمام منحنی ها خطی شدند. بنابراین اسپیرامایسین اثر درمانی خوبی در از بین بردن انگل *توکسوپلاسما گوندی* در خون رت ها دارد.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان نامه ی دوره‌ی دکتری تخصصی نویسنده مسئول می باشد لذا از کلیه اساتید گروه انگل شناسی و بیوتکنولوژی دانشگاه تربیت مدرس بویژه اساتید راهنما و مشاور کمال تقدیر و تشکر به عمل می آید.

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.18869/acadpub.jnkums.8.3.497]

Downloaded from journal.nkums.ac.ir at 11:35 IRDT on Tuesday May 30th 2017

References

1. Luinstra K, Petrich A, Macqueen W, Macherson DW, Comparison of Two Extraction Methods for Detection of Toxoplasma gondii in Paraffin-Embedded Tissue by PCR Testing, Mol Cell Probes 2002; (16):31-9.
2. Remington JS, Dosmonts G, Remington JS, Infection diseases of fetus Newborn Infats, 1990; 89-195.
3. Dubey JP, Toxoplasmosis. Microbiology and Microbial infection, Vol: 5, New York, Oxford University Press. 1998: 303-18.
4. Lin MH, Chen TC, Kuo TT, Tseng CC, Tseng CP, Real-Time PCR for quantitative detection of Toxoplasma gondii, J Clin Microbiol 2000; 38(11): 4121-5.
5. Hierl T, Reischl U, Lang P, Hebart H, Stark M, Kyme P, Autenrieth IB, Preliminary evaluation of one conventional nested and two real-time PCR assays for the detection of Toxoplasma gondii in immunocompromised patients, J Med Microbiol 2004; 53(Pt 7): 629-32.
6. Araujo F, Shepard R, Remington J S, In vivo activity of the macrolide antibiotics azithromycin, roxithromycin and spiramycin against Toxoplasma gondii, Eur. J. Clin. Microbiol, Infect. Dis 1991; 10:519-524.
7. Montaya JG, Kovacs JA, Remington JS, Toxoplasma gondii, In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, Principles and Practice of Infectious Diseases.6th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2005. p. 3170-98.
8. Jacobs L, Toxoplasma and toxoplasmosis, Adv. Parasitol, 1967;5:1-37.
9. Moncada PA, Montoya JG, Toxoplasmosis in the fetus and newborn: an update on prevalence, diagnosis and treatment, Rev Anti Infect Ther. 2012 Jul;10(7):815-28
10. Hayama T, Tsunematsu K, himoda MS, Kokue E, Oral folic acid potentiates pyrimethamine teratogenesis in rat, Acta Vet 1991; 87:340-341.
11. Horvath, C, Tangapregassom AM, Trecul M, M, Compagnon A, Petter C, Pathogenesis of limb and facial malformations induced by pyrimethamine in the rat, Acta Morphol, Hung, 1989; 36:53-61.
12. Petersen E, Schmidt DR, Sulfadiazine and pyrimethamine in the postnatal treatment of congenital toxoplasmosis: what are the options? Rev Anti Infect Ther. 2003 Jun; 1(1):175-82.
13. Gratzl R, Sodeck G, Platzer P, Jäger W, Graf J, Pollak A, Thalhammer T, Treatment of toxoplasmosis in pregnancy: concentrations of spiramycin and neospiramycin in maternal serum and amniotic fluid, Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2002 Jan; 21(1):12-6.
14. Valentini P, Annunziata ML, Angelone DF, Masini L, De Santis M, Testa A, Grillo RL, Role of spiramycin/cotrimoxazole association in the mother-to-child transmission of toxoplasmosis infection in pregnancy, Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2009 Mar; 28(3):297-300.
15. Valentini P, Buonsenso D, Barone G, Spiramycin/cotrimoxazole versus pyrimethamine/sulfonamide and spiramycin alone for the treatment of toxoplasmosis in pregnancy, Journal of Perinatology, 2015; 35, 90–94.
16. Loens K, Beck T, Ursi D, Overdijk M, Sillekens P, Goossens H, Ieven M, Development of real-time multiplex nucleic acid sequence-based amplification for detection of Mycoplasma pneumoniae, Chlamydophila pneumonia and Legionella spp. in respiratory specimens, J Clin Microbiol, 2008; 46(1): 185-91.
17. Antony T, Subramaniam V, A molecular beacon strategy for real-time monitoring of triplex DNA formation kinetics; Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 2002; 12(3):145-54.
18. Boyer K, Holfels E, Roizen N, Swisher C, Mack D, Remington J, Risk factors for toxoplasma gondii infection in mothers of infants with congenital toxoplasmosis: implications for prenatal management and screening, Am J Obstet Gynecol 2005; 192: 564- 71.
19. Derouin F, Jacqz-Aigrain E, Thulliez P, Couvreur J, Leport C, Cotrimoxazole for prenatal treatment of congenital toxoplasmosis? Parasitol Today 2000; 16(6): 254-6.
20. Godofsky E. Treatment of presumed cerebral toxoplasmosis with azithromycin, N Engl J Med 1994; 330(8):575-6.
21. Georgiev VS, Management of toxoplasmosis, Drugs 1994; 48(2):179-88.

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.18869/acadpub.jnkums.8.3.497]

Downloaded from journal.nkums.ac.ir at 11:35 IRDT on Tuesday May 30th 2017

22.Giannoulis C, Zournatzi B, Giomisi A, Diza E, Tzafettas I, Toxoplasmosis during pregnancy: a case report and review of the literature, hippokratia 2008; 12(3): 139-143.
23.Araujo F. G., R. M. Shepard, and J. S. Remington, 1991, In vivo activity of the macrolide antibiotics azithromycin, roxithromycin and spiramycin against Toxoplasma gondii, Eur. J. Clin. Microbiol, Infect. Dis. 10:519-524.
24.Jeffrey D , Federman D, Toxoplasmosis in pregnancy, The American Journal of Medicine Volume 118, Issue 3, March 2005, Pages 212–216
25.Nguyen, B.T, Stadtsbaeder S, Comparative effects of cotrimoxazole (trimethoprim-sulphamethoxazole), pyrimethamine-sulphadiazine and spiramycin during avirulent infection with Toxoplasma gondii (Beverley strain) in mice, Br. J. Pharmacol, 1983; 79:923-928.
26.Desmonts G, J. Couvreur, Congenital toxoplasmosis: a prospective study of 378 pregnancies, N. Engl. J. Med. 1974; 290:1110-1116.
27.Schoondermark V, Melchers W, Camps W, Eskes T, Meuwissen J, Effectiveness of spiramycin for treatment of congenital Toxoplasma gondii infection in Rhesus monkeys, Antimicrobial agents and chemotherapy 1994; 1930-1936.
28.Filisetti D, Gorcii M, Pernot-Marino E, Villard O, Candolfi E, Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis Comparison of Targets for Detection of Toxoplasma gondii by PCR, J Clin Microbiol, 2003; 41(10): 4826-4828.
29.Astrid E, Henrie¨tte M.A, Chantal A.J, Jaap M. Multiplex real-time NASBA for monitoring expression dynamics of human cytomegalovirus encoded IE1 and pp67 RNA, J Clin Virology, 2002; 24, 57–66.
30.Sharifian-Dorcheh M, Study on life cycle of Toxoplasma gondii in the tissue of rat by PCR and RT-PCR methods, 2004, [Thesis]. Tehran,Tarbiat Modares University[Persian].
31.Yanan Z, A Rapid Real-Time Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA)-Molecular Beacons Platform to Detect Fungal and Bacterial Bloodstream Infections, J Clin Microbiol, 2009; 24, 57–66.
32.Schneider P, Schoone G, Schallig H, Verhage D, Telgt D, Eling W, Sauerwein R, Quantification of Plasmodium falciparum gametocytes in differential stages of development by quantitative nucleic acid sequence-based amplification, Molecular & Biochemical Parasitology 2004; 35–41.
33. Claire M, Laurent T, J. Schoone G, Kager P, George W, Nucleic Acid Sequence-Based Amplification with Oligochromatography for Detection of Trypanosoma brucei in Clinical Samples, J Clin Microbiol 2009; 630–635.
34. Antje J, Michele CH, Montagna R, Detection of Viable Oocysts of Cryptosporidium parvum Following Nucleic Acid Sequence Based Amplification 2001; 73:1176-1180.
35.Shirbazou Sh, Dalimi Asl A, Foruzandeh M, Ghaffarifar F, Standardization of NASBA method by using 18s rRNA gene for Identification of Leishmania major parasite, Kowsar Medical Journal 2009; Volume 14, Issue 3[Persian].
36.Deiman B, Aarle P, Sillekens P, Characteristics and applications of Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA), Mol Biotechnol , 2002;20(2):163-79

www.SID.ir

Archive of SID

[DOI: 10.18869/acadpub.jnkums.8.3.497]

Downloaded from journal.nkums.ac.ir at 11:35 IRDT on Tuesday May 30th 2017

Effectiveness of spiramycin for treatment of experimental toxoplasmosis in rats by the Real-time NASBA method

*Norouzi R[1] *, Dalimi A[2], Forozandeh moghadam M[3], Ghaffarifar F[2]*

[1]Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
[2]Department of Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University , Tehran, Iran.
[3] Department of biotechnology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University , Tehran, Iran.
***Corresponding Author**: Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine , Tabriz University, Tabriz, Iran
Email**:**r.norouzi@tabrizu.ac.ir

Abstract

Background and Objective: *Toxoplasmosis is a main parasitic disease and may cause significant damage to the developing fetus and is a life-threatening opportunistic infection in immunocompromised persons. There are definite drugs available for the treatment of T. gondii infections. These drugs regimen, however, can cause side effects, however the macrolide antibiotic spiramycin is also used as a drug against T. gondii. This study tried to study the effectiveness of spiramycin in the treatment of toxoplasmosis.*

Materials and Methods: *The experiments in the present study, fifteen rats received spiramycin 400mg/kg thrice, 15 rats received pyrimethamine-sulfadiazine 150mg/kg once treatment for only one week and 15 rats untreated any drug and were evaluated as the control group. The effectiveness of spiramycin for the treatment of rats experimentally infected with Toxoplasma gondii before and after treated, were analyzed by Real-time NASBA method.*

Results:*Result of this study showed that spiramycin could be eliminating parasites after 5 days after initiation of treatment in infected rats.*

Conclusion: *Spiramycin is effectiveness drug in eliminating Toxoplasma gondii in rat's blood and use in pregnant woman.*

Keywords: *Toxoplasmosis, spiramycin, Real-time NASBA method*

Original Article

Journal of North Khorasan University of Medical sciences 2016;8(3):497-506

Received: 9 Dec 2015
Revised: 15 Feb 2016
Accepted: 3 May 2016

www.SID.ir