Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences

Roshanfar, et al. *Med J Tabriz Uni Med Sciences*. 2025;47(5):539-548.
doi: 10.34172/mj.025.34033
https://mj.tbzmed.ac.ir

TUOMS PRESS

Original Article

Toxoplasma gondii antibodies in anti-nuclear antibody-positive adults may contribute to the pathogenesis of autoimmune diseases

Sima Roshanfar, Elham Yousefi, Arash Aminpour*

Department of Medical Parasitology and Mycology, School of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

ARTICLE INFO

Article History:
Received: 27 Apr 2025
Revised: 11 Aug 2025
Accepted: 16 Aug 2025
ePublished: 27 Oct 2025

Keywords:
- *Toxoplasma gondii*
- Autoimmune Disease
- Anti-Nuclear Antibodies
- Chronic Infection
- Immune Dysregulation

Abstract

Background. *Toxoplasma gondii* is an intracellular parasite with a global prevalence, capable of establishing chronic infections in humans. While *T. gondii* is traditionally considered asymptomatic in immunocompetent individuals, emerging evidence suggests that it may contribute to immune dysregulation, potentially triggering or exacerbating autoimmune processes. Therefore, this study investigated the relationship between *T. gondii* infection and the presence of anti-nuclear antibodies (ANA).

Methods. A total of 284 blood samples, including 142 ANA-positive individuals and 142 healthy controls, were analyzed for the immunoglobulin (Ig) G and IgM antibodies of *T. gondii* using an enzyme-linked immunosorbent assay. Additionally, polymerase chain reaction (PCR) was performed on IgM^- positive samples to confirm the presence of *T. gondii* DNA.

Results. The results demonstrated the significantly higher prevalence of *T. gondii* IgG antibodies in ANA^- positive individuals (47.3%) compared to controls (11.3%) ($P<0.001$), suggesting a potential link between chronic toxoplasmosis and immune dysregulation. While IgM positivity was rare, PCR confirmed the presence of *T. gondii* DNA in an IgM-positive ANA patient.

Conclusion. Overall, these findings support the hypothesis that persistent *T. gondii* infection may influence autoimmune pathways, warranting further investigation into its role as an environmental factor in autoimmunity.

Practical Implications. The findings suggest that chronic *T. gondii* infection may be linked to the increased production of ANA and immune dysregulation. This association could position *T. gondii* as an environmental factor in the onset or exacerbation of autoimmune diseases. In addition, the results highlight the importance of screening and monitoring *T. gondii* infection in individuals with autoimmune markers, such as ANA, and underscore the need for further research into the underlying mechanisms. It is hoped that such insights pave the way for targeted preventive and therapeutic strategies in autoimmune disorders.

How to cite this article: Roshanfar S, Yousefi E, Aminpour A. Toxoplasma gondii antibodies in anti-nuclear antibody-positive adults may contribute to the pathogenesis of autoimmune diseases. *Med J Tabriz Uni Med Sciences*. 2025;47(5):539-548. doi: 10.34172/mj.025.34033. Persian.

Extended Abstract

Background

Toxoplasma gondii is an obligate intracellular parasite with a worldwide prevalence, infecting approximately one-third of the global population. It leads to chronic infections in humans, often remaining latent in tissues such as the brain, muscles, and eyes. Although *T. gondii* is traditionally viewed as asymptomatic in immunocompetent hosts, recent evidence indicates that this parasite may disrupt immune regulation, potentially initiating or

*Corresponding author; Email: Arashaminpour@gmail.com
© 2025 The Authors. This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution CC BY 4.0 License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

exacerbating autoimmune processes through different mechanisms, such as molecular mimicry, chronic inflammation, and Toll-like receptor activation. Anti-nuclear antibodies (ANA) serve as common biomarkers for autoimmunity, present in conditions like systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. Epidemiological studies have linked higher *T. gondii* seropositivity to autoimmune diseases, including systemic lupus erythematosus and multiple sclerosis, with meta-analyses demonstrating increased odds ratios in affected individuals. This study explores the association between *T. gondii* antibodies and ANA positivity in adults, hypothesizing that chronic toxoplasmosis contributes to immune dysregulation and autoimmunity pathogenesis. By comparing seroprevalence in ANA$^-$ positive individuals versus healthy controls, the research aims to elucidate the role of *T. gondii* as an environmental trigger, addressing gaps in understanding infection-induced autoimmunity.

Methods

This cross-sectional descriptive-analytical study was conducted with ethical approval from the Ethics Committee of Urmia University of Medical Sciences (IR.UMSU.REC.1402.177). A total of 284 blood samples were collected from diagnostic laboratories in Tehran, Iran, between April and September 2023. The sample size was calculated to compare immunoglobulin (Ig) G seroprevalence between ANA$^-$ positive and control groups, with an 80% statistical power and a 95% confidence level. Participants were divided into the ANA$^-$positive group (n=142), consisting of individuals with positive ANA results via indirect immunofluorescence, and the healthy control group (n=142), comprising individuals without an autoimmune history and negative ANA tests.

Serological analysis for *T. gondii* exposure involved enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using commercial kits (Pishtaz Teb, Iran) for IgG and IgM antibodies. The blood samples were collected in plain tubes, allowed to clot at room temperature, and centrifuged at 3,000rpm for 10 minutes to separate serum, which was stored at -20°C until testing. Microtiter plates coated with *T. gondii* antigens were used in the ELISA procedure. Diluted serum samples (100µL) were added to wells and incubated at 37°C for 30 minutes. The wells were washed three times with phosphate-buffered saline containing 0.05% Tween-20 to remove unbound antibodies. In addition, enzyme-conjugated anti-human IgG/IgM antibodies (100µL) were added, followed by another 30-minute incubation at 37°C. After washing, the tetramethylbenzidine substrate (100µL) was added and incubated in the dark for 15 minutes. The reaction was stopped with 50µL sulfuric acid, and optical density was measured at 450nm using an ELISA reader. The samples with IgG or IgM levels exceeding 1.1 IU/mL were considered positive, reflecting the kits' high sensitivity and specificity.

For molecular confirmation, DNA was extracted from the buffy coat layers of IgM$^-$positive samples using the QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Iran). Blood samples in EDTA tubes were centrifuged at 3,000 rpm for 10 minutes to isolate the buffy coat. Further, lysis buffer (400µL) was added, vortexed, and incubated at 56°C for 10 minutes. Moreover, absolute ethanol (200µL) was added for DNA precipitation, and the mixture was vortexed for 15 seconds before transfer to spin columns. One-minute centrifugation at 8,000rpm bound DNA to the column membrane. Two wash steps with specific buffers followed, and DNA was eluted in a 100µL elution buffer. Then, purity and concentration were assessed via NanoDrop spectrophotometry at 260/280nm. Finally, polymerase chain reaction (PCR) targeted *T. gondii* DNA in these extracts to confirm active or recent infection.

The obtained data were statistically analyzed using SPSS software, version 26. Chi-square tests were used to compare seroprevalence frequencies between groups, with $P<0.05$ considered statistically significant. Demographic data (e.g., age and gender) were summarized as means±standard deviations (SD).

Results

The study cohort included 42 males (14.8%) and 242 females (85.2%). Mean ages were 35.2±1.4 years for males and 33.6±2.6 years for females. No data were

recorded on specific underlying autoimmune diseases, limiting subtype analysis. Serum IgG and IgM antibody levels were quantified, with positivity thresholds set at ≥11 µg/dL and ≥0.1 µg/dL for IgG and IgM, respectively. The mean±SD values for IgG and IgM in ANA$^-$positive versus ANA$^-$negative groups are detailed in Table 1 (as per the original manuscript, though exact numerical means were not provided beyond positivity rates).

Among the 142 ANA$^-$positive individuals, 67 (47.3%) tested positive for *T. gondii* IgG antibodies, indicating prior or chronic exposure. In contrast, only 16 (11.3%) out of the 142 healthy controls were IgG$^-$positive. This difference was statistically significant (P<0.001), supporting a potential association between chronic toxoplasmosis and immune dysregulation. Table 2 presents the frequency distribution. The ANA$^-$positive group showed 67 positives and 75 negatives for IgG, while controls had 16 positives and 126 negatives.

IgM positivity, indicative of recent infection, was rare across both groups. Based on the results (Table 3), only one ANA$^-$positive individual and one control were IgM$^-$positive. PCR analysis confirmed the presence of *T. gondii* DNA in the IgM$^-$positive ANA patient but not in the control, highlighting active infection in the autoimmune marker group. However, due to the low prevalence of IgM, these findings lack statistical power and are observational.

Gender-stratified analysis revealed pronounced differences. Among 242 females, IgG positivity was 50% (62/124) in ANA$^-$positive women versus 9.3% (11/118) in healthy controls, with a significant difference (P<0.001). For the 42 males, 27.8% (5/18) of ANA-positive men were IgG$^-$positive compared to 20.8% (5/24) in controls, which was also significant (P<0.001). Figure 1 compares these frequencies by gender and group, highlighting higher rates in ANA$^-$positive females.

Overall, the results underscore a markedly higher *T. gondii* IgG seroprevalence in ANA$^-$positive adults, particularly females, with molecular evidence in one acute case. No significant differences in IgM distribution were observed beyond the isolated PCR confirmation.

Conclusion

This study provides compelling evidence of a significant association between chronic *T. gondii* infection and ANA positivity, with an IgG seroprevalence of 47.3% in ANA$^-$ positive individuals versus 11.3% in controls (P<0.001). While causality remains unproven, the findings indicated that T. *gondii* may act as an environmental factor in autoimmune pathogenesis through immune dysregulation. Rare IgM positivity and PCR confirmation in one ANA case warrant caution but highlight potential acute contributions. Accordingly, future longitudinal studies should examine mechanisms such as molecular mimicry and genetic predispositions, alongside screening strategies for high-risk populations, to inform preventive interventions in autoimmunity.

روشن‌فر و همکاران. *مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز*. آذر و دی ۱۴۰۴؛ ۴۷(۵): ۵۳۹-۵۴۸.
doi: 10.34172/mj.025.34033
https://mj.tbzmed.ac.ir

مقاله پژوهشی

نقش آنتی‌بادی‌های ضد توکسوپلاسما گوندی در بزرگسالان مبتلا به ANA⁻ مثبت در پاتوژنز بیماری‌های خودایمنی

سیما روشن‌فر، الهام یوسفی، آرش امین‌پور*

گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

اطلاعات مقاله

سابقه مقاله:
دریافت: ۱۴۰۴/۲/۷
اصلاح نهایی: ۱۴۰۴/۵/۲۰
پذیرش: ۱۴۰۴/۵/۲۵
انتشار برخط: ۱۴۰۴/۸/۵

کلیدواژه‌ها:
- توکسوپلاسما گوندی
- بیماری‌های خودایمن
- آنتی‌بادی ضد هسته‌ای
- بیماری‌های مزمن
- اختلال ایمنی

چکیده

زمینه. توکسوپلاسما گوندی یک انگل درون‌سلولی با شیوع جهانی است که می‌تواند منجر به ایجاد عفونت‌های مزمن در انسان شود. شواهد نوظهور نشان می‌دهد که این انگل ممکن است موجب اختلال در تنظیم سیستم ایمنی بدن شده و فرآیندهای خودایمنی را آغاز یا تشدید کند. این مطالعه به بررسی ارتباط بین عفونت توکسوپلاسما گوندی و وجود آنتی‌بادی‌های ضد هسته‌ای (ANA) که یک نشانگر رایج در خودایمنی است، می‌پردازد.

روش‌کار. در مجموع ۲۸۴ نمونه خون، شامل ۱۴۲ فرد ANA⁻ مثبت و ۱۴۲ فرد سالم، با استفاده از آزمایش الایزا از نظر آنتی‌بادی‌های IgG و IgM علیه توکسوپلاسما گوندی مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین، آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) برای تأیید حضور DNA توکسوپلاسما بر روی نمونه‌های IgM⁻ مثبت انجام شد.

یافته‌ها. نتایج نشان داد که شیوع آنتی‌بادی‌های IgG توکسوپلاسما گوندی در افراد ANA⁻ مثبت (۴۷٪/۳) به‌طور معناداری بالاتر از گروه کنترل (۱۱٪/۳) بود ($P<$۰/۰۰۱)، که این امر نشان‌دهنده ارتباط احتمالی بین توکسوپلاسموز مزمن و اختلال در تنظیم سیستم ایمنی است. اگرچه IgM-مثبت بودن نادر بود، اما آزمایش PCR، حضور DNA توکسوپلاسما را در یک بیمار IgM⁻ مثبت با ANA تأیید کرد.

نتیجه‌گیری. این یافته‌ها از فرضیه تأثیر عفونت پایدار توکسوپلاسما گوندی بر مسیرهای خودایمنی حمایت می‌کنند و لزوم تحقیقات بیشتر در مورد نقش آن به‌عنوان یک عامل محیطی در خودایمنی را توجیه می‌نمایند.

پیامدهای عملی. یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که عفونت مزمن توکسوپلاسما گوندی ممکن است با افزایش تولید ANA و اختلال در سیستم ایمنی مرتبط باشد. این ارتباط می‌تواند به‌عنوان یک عامل محیطی در بروز یا تشدید بیماری‌های خودایمنی در نظر گرفته شود. نتایج این پژوهش اهمیت غربالگری و پایش عفونت *T. gondii* در افراد با نشانگرهای خودایمنی مانند ANA را برجسته می‌سازد و لزوم بررسی بیشتر مکانیسم‌های احتمالی این ارتباط را برای توسعه راهبردهای پیشگیرانه و درمانی هدفمند تایید می‌کند.

مقدمه

بیماری‌های خودایمنی زمانی رخ می‌دهند که سیستم ایمنی بدن به اشتباه بافت‌های خودی را هدف قرار می‌دهد.[۱] اگرچه علل دقیق این اختلالات هنوز به‌طور کامل شناخته نشده‌اند، اما مدت‌هاست که عفونت‌ها به‌عنوان عوامل محرک احتمالی مورد توجه قرار گرفته‌اند. *توکسوپلاسما گوندی* یک انگل تک‌سلولی است که غالباً بدون علامت قابل تشخیص بوده و می‌تواند برای مدت طولانی در بافت‌های انسانی باقی بماند. برخی مطالعات نشان می‌دهند که عفونت‌های مزمن مانند توکسوپلاسموز ممکن است باعث اختلال در تنظیم سیستم ایمنی بدن شده و به‌طور بالقوه واکنش‌های خودایمنی را تحریک کنند.[۲] بیماری‌های انگلی تقریباً در سراسر جهان شیوع دارند و بیش از یک‌چهارم جمعیت جهانی دست‌کم به یکی از انگل‌ها آلوده‌اند.[۳] *T. gondii* یک انگل داخل‌سلولی است که تقریباً یک‌سوم جمعیت جهان را آلوده کرده است. این انگل دارای چرخه زیستی پیچیده‌ای است که گربه‌سانان را به‌عنوان میزبان نهایی و جانوران خون‌گرم مختلف از جمله انسان را به‌عنوان میزبان واسط استفاده می‌کند. انسان‌ها معمولاً از طریق مصرف غذا، آب یا گوشت نپخته آلوده به کیست‌های بافتی، یا تماس مستقیم با اوسیست‌های دفع‌شده در مدفوع گربه به این انگل مبتلا می‌شوند. پس از ورود به بدن میزبان، این انگل به دو

*نویسنده مسؤول؛ ایمیل: Arashaminpour@gmail.com

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی تبریز تحت مجوز کریتیو کامنز CC BY 4.0 (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

فرم اصلی وجود دارد: تاکی‌زوئیت‌ها که در مرحله حاد عفونت به سرعت تکثیر می‌شوند و برادی‌زوئیت‌ها که در مرحله مزمن عفونت، با تشکیل کیست‌های بافتی در مغز، عضلات و چشم، پایداری ایجاد می‌کنند.[4]

انگل توکسوپلاسما گوندی از طریق عوامل پاتوژنیک متعدد، مانند پروتئین‌های ROP و GRA، پروفیلین‌مانند و miRNAها، سیستم ایمنی میزبان را فعال می‌کند و منجر به ایجاد التهاب شدید می‌شود. این التهاب با ترشح سیتوکین‌های پروالتهابی مانند IL-12، TNF-α و IFN-γ همراه است و می‌تواند به آسیب بافتی در ارگان‌هایی مانند مغز، چشم و پانکراس بیانجامد.[5] اگزوزوم‌های مشتق از این انگل نقش کلیدی در این فرآیند ایفا می‌کنند. این ویزیکول‌ها در انتقال بیومولکول‌ها در بین سلول‌ها نقش دارند که باعث اثرات زیادی بر روی سلول‌های هدف می‌شوند.[6, 7] آنها با انتقال مولکول‌های پاتوژن به سلول‌های میزبان، مسیر سیگنالینگ JNK را فعال کرده و پاسخ‌های التهابی را تشدید می‌کنند، در حالی که می‌توانند پاسخ‌های ایمنی را مدوله کرده و به برقراری عفونت مزمن کمک نمایند. این التهاب مزمن نه تنها باعث تخریب بافتی می‌شود، بلکه ممکن است از طریق mimicry مولکولی و فعال‌سازی مداوم گیرنده‌های TLR، منجر به اختلال در تحمل ایمنی و بروز بیماری‌های خودایمنی مانند لوپوس اریتماتوز سیستمیک (SLE) یا آرتریت روماتوئید شود که در آن عفونت توکسوپلاسما با افزایش شانس سروپوزیتیویتی در بیماران خودایمنی مرتبط است.[8]

از طرفی، گونه‌های اکسیژن واکنشی (ROS) در عفونت توکسوپلاسما گوندی نقش کلیدی در ایجاد آسیب بافتی ایفا می‌کنند، زیرا با تولید بیش از حد، منجر به پراکسیداسیون لیپیدها، اکسیداسیون پروتئین‌ها و آسیب DNA در سلول‌های میزبان، به‌ویژه سلول‌های عصبی و گلیال می‌شوند که این امر فرآیند التهاب را تشدید کرده و تخریب بافتی را به دنبال دارد. اهمیت ROS در آسیب بافتی ناشی از این عفونت به دلیل حساسیت بالای سلول‌های عصبی به استرس اکسیداتیو است که می‌تواند به اختلالات نورولوژیک و از دست رفتن عملکرد بافتی بیانجامد. کاهش سطوح ROS با عوامل ضدالتهاب و آنتی‌اکسیدان‌ها، مانند رسوراترول، اهمیت درمانی بالایی دارد، زیرا می‌تواند پاسخ التهابی را تعدیل نماید و آسیب بافتی را به حداقل برساند.[9]

بیماری‌های خودایمنی در اثر پاسخ سیستم ایمنی به آنتی‌ژن‌های خودی اتفاق می‌افتد که شامل عوارض بافتی و سیستمیک بسیاری هستند.[10, 11] سلول‌های B نیز در بروز بیماری‌های خودایمنی نقش دارند و از طریق ترشح سایتوکاین‌ها عملکرد ایمنی-تنظیمی از خود نشان می‌دهند که می‌تواند آغاز و/یا پیشرفت بیماری را محدود کند.[12-14] سایتوکاین‌ها به‌عنوان میانجی‌های شیمیایی، پلی‌پپتیدهایی هستند که در فرآیندهای التهابی، ترمیمی و پاسخ‌های ایمنی نقش دارند.[15, 16]

پژوهش‌ها نشان می‌دهند که عفونت با *T. gondii* ممکن است در بروز یا تشدید بیماری‌های خودایمنی نقش داشته باشد. چندین مطالعه اپیدمیولوژیک، شیوع بالایی از آنتی‌بادی‌های *T. gondii* را در بیماران مبتلا به بیماری‌های خودایمنی نظیر لوپوس، آرتریت روماتوئید (RA) و مالتیپل اسکلروزیس (MS) گزارش کرده‌اند.[17, 18] عفونت مزمن نهفته با این انگل ممکن است با کمبود آهن، ید و اسیدفولیک مرتبط باشد که می‌توانند زمینه‌ساز شروع و/یا پیشرفت بیماری‌های خودایمنی شوند. مسیر دهانی، راه اصلی ورود این انگل به بدن محسوب می‌شود و علائم گوارشی در افراد مبتلا به بیماری‌های خودایمنی به‌طور شایع مشاهده می‌شود. بر این اساس، این مطالعه با هدف بررسی ارتباط احتمالی میان عفونت *T. gondii* و حضور آنتی‌بادی‌های ضد هسته (ANA) در بزرگسالان انجام می‌گیرد. با مقایسه فراوانی نسبی سرمی آنتی‌بادی‌های IgG و IgM علیه *T. gondii* در افراد ANA-مثبت و گروه کنترل سالم، به این سوال که آیا توکسوپلاسموز مزمن در افرادی که نشانگرهای خودایمنی دارند شایع‌تر است یا خیر، پاسخ داده خواهد شد. درک این رابطه می‌تواند به شناخت بهتر اختلالات تنظیم سیستم ایمنی و پیامدهای آن در بروز بیماری‌های خودایمنی کمک کند. اصول مربوط به کاربرد مفهوم واژه های جنس و جنسیت در نگارش این مقاله رعایت شده است.

روش کار

پژوهش حاضر یک مطالعه توصیفی-تحلیلی مقطعی است که با همکاری دانشگاه علوم پزشکی ارومیه و با کسب مجوز از کمیته اخلاق این دانشگاه (کد اخلاق: IR.UMSU.REC.1402.177) انجام شد. در مجموع، ۲۸۴ نمونه خون از مراجعین به آزمایشگاه‌های تشخیصی در تهران، ایران، از فروردین تا شهریور ماه سال ۱۴۰۲ جمع‌آوری شد. حجم نمونه با هدف مقایسه فراوانی نسبی IgG بین دو گروه ANA مثبت و کنترل با توان آماری ۸۰٪ و سطح اطمینان ۹۵٪ محاسبه شد. شرکت‌کنندگان به دو گروه تقسیم شدند: ۱) *گروه مثبت ANA (n=۱۴۲)*: افراد دارای نتیجه مثبتANA با روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم (IF). ۲) *گروه کنترل سالم (n=۱۴۲)*: افراد بدون سابقه بیماری‌های خودایمنی و دارای نتیجه منفی تست ANA.

برای ارزیابی مواجهه با توکسوپلاسما گوندی، از کیت‌های الایزای آنتی‌توکسوپلاسما IgG و IgM (شرکت پیشتازتک، ایران) استفاده شد. نمونه‌های سرم برای شناسایی آنتی‌بادی‌های IgG و IgM علیه توکسوپلاسما گوندی با روش الایزا مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌های خون در لوله‌های معمولی جمع‌آوری شده و پس از لخته شدن در دمای اتاق، به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند تا سرم جدا شود. سرم‌ها در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام آزمایش نگهداری شدند.

در روش الایزا، از پلیت‌های میکروتیتر پوشش‌دار شده با آنتی‌ژن توکسوپلاسما استفاده شد. ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از هر نمونه سرم رقیق‌شده به چاهک‌ها اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس چاهک‌ها سه بار با بافر فسفات حاوی ۰/۰۵ درصد از توئین ۲۰ شست‌وشو داده شدند تا آنتی‌بادی‌های متصل‌نشده حذف شوند. در مرحله بعد، ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی مزدوج با آنزیم علیه IgG/IgM انسانی به هر چاهک اضافه و مجدداً به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از شست‌وشوی مجدد، ۱۰۰ میکرولیتر از سوبسترای تترامتیل بنزیدین (TMB) اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی انکوبه شد. سپس واکنش با افزودن ۵۰ میکرولیتر اسید سولفوریک (H_2SO_4) متوقف شد و جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر اندازه‌گیری شد. این آزمون با حساسیت و ویژگی بالا، آنتی‌بادی‌های IgG و IgM علیه توکسوپلاسما را شناسایی می‌کند. نمونه‌هایی با سطح IgG یا IgM بیشتر از ۱/۱ IU/mL به‌عنوان سرم مثبت در نظر گرفته شدند.

DNA از لایه بافی کوت خون با استفاده از کیت QIAamp DNA Blood Mini Kit (شرکت کیاژن، ایران) مطابق دستورالعمل سازنده استخراج شد. به‌طور خلاصه، نمونه‌های خون در لوله‌های حاوی EDTAجمع‌آوری و با دور ۳۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند تا لایه بافی کوت جدا شود. برای استخراج DNA، ۴۰۰ میکرولیتر بافر لیز به نمونه اضافه و پس از ورتکس، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر اتانول مطلق برای رسوب DNA اضافه و مخلوط به مدت ۱۵ ثانیه ورتکس شد. محلول به ستون اسپین منتقل و با دور ۸۰۰۰ rpm به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ شد تا DNA به غشای ستون متصل شود. پس از دو مرحله شست‌وشو با بافر مخصوص، DNA با ۱۰۰ میکرولیتر بافر شویش جدا شد. خلوص و غلظت DNA با دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ در طول موج ۲۸۰/۲۶۰ نانومتر ارزیابی شد.

داده‌ها با نرم‌افزار SPSS تحلیل شدند و از آزمون کای‌دو برای مقایسه فراوانی نسبی آنتی‌بادی‌های توکسوپلاسما بین گروه‌های مثبت ANA و کنترل استفاده شد. مقدار p کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در این مطالعه، از میان ۲۸۴ نمونه مورد بررسی، ۴۲ مورد مرد (۱۴/۸%) و ۲۴۲ مورد زن (۸۵/۲%) بودند. میانگین سنی مردان ۳۵/۲±۱/۴ و زنان ۳۳/۶±۲/۶ به‌دست آمد. اطلاعات مربوط به بیماری زمینه‌ای خاص ثبت نشده است، لذا محدودیت‌هایی در تحلیل نوع بیماری خودایمنی وجود دارد. مقادیر میانگین ± انحراف معیار آنتی‌بادی‌های IgG و IgM سرمی بین گروه‌های ANA مثبت و ANA منفی در جدول ۱ نشان داده شده است. سطح آنتی‌بادی۱۱ ≥ IgG میکروگرم بر دسی‌لیتر و ۰/۱ ≥ IgM میکروگرم بر دسی‌لیتر به‌عنوان مثبت در نظر گرفته شدند.

جدول ۱. مقادیر سرمی آنتی‌بادی‌های IgG و IgM در میان گروه‌های ANA مثبت و منفی

آنتی‌بادی	گروه‌ها	میانگین ± انحراف معیار	کمینه	بیشینه
IgG	ANA مثبت	۷۹/۴۳ ± ۶/۳۷	۳/۵	۹۱/۲۷
	ANA منفی	۱۹/۶۷ ± ۵۱/۴۹	۰/۱	۱۹۷/۴
IgM	ANA مثبت	۰/۰۶ ± ۰/۰۲	۰/۰۴	۰/۲۹
	ANA منفی	۰/۰۵ ± ۰/۰۱	۰/۰۴	۰/۱۹

در میان ۱۴۲ فرد دارای ANA مثبت، ۶۷ نفر (۴۷%/۳) از نظر آنتی‌بادی IgG توکسوپلاسما مثبت بودند که نشان دهنده مواجهه قبلی با این انگل است. در مقابل، تنها ۱۶ نفر (۱۱%/۳) از ۱۴۲ فرد سالم در گروه کنترل مثبت IgG بودند. این تفاوت بین دو گروه از نظر آماری معنی‌دار بود ($P< 0/001$).

جدول ۲. توزیع فراوانی آنتی‌بادی IgG در میان گروه‌های ANA مثبت و منفی

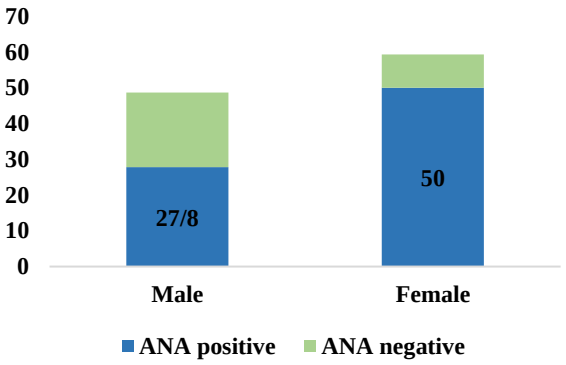
IgG	ANA منفی	ANA مثبت	P
منفی	(۸۸/۷) ۱۲۶	(۵۲/۸) ۷۵	< ۰/۰۰۱
مثبت	(۱۱/۳) ۱۶	(۴۷/۲) ۶۷	

جدول ۳، توزیع فراوانی سطح سرمی IgM مثبت را در بزرگسالان بر اساس وضعیت مثبت/منفی آنتی‌بادی ضد هسته‌ای در نمونه‌های مورد بررسی نشان می‌دهد. این توزیع در هر دو گروه ANAمثبت و ANA منفی مشابه بود و تنها یک بیمار مثبت بود. آنالیز PCR وجود DNA توکسوپلاسما گوندی را در بیمار IgM مثبت دارای ANA تأیید کرد، اما در فرد گروه کنترل مشاهده نشد.

جدول ۳. توزیع فراوانی آنتی‌بادی IgM در میان گروه‌های ANA مثبت و منفی

IgM	ANA منفی	ANA مثبت
منفی	۱۴۱ (۹۹/۳)	۱۴۱ (۹۹/۳)
مثبت	۱ (۰/۷)	۱ (۰/۷)

از بین ۲۴۲ زن در جامعه مورد مطالعه، سطح آنتی‌بادی IgG به‌ترتیب در ۵۰٪ و ۹/۳٪ از زنان بیمار و سالم مثبت بود (۶۲ و ۱۱ بیمار) و این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار بود ($P<$ ۰/۰۰۱). در گروهی متشکل از ۴۲ مرد از این جامعه، ۲۷/۸٪ از افراد بیمار و ۲۰/۸٪ از افراد سالم از نظر آنتی‌بادی IgG مثبت بودند که در هر گروه ۵ بیمار وجود داشت. این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار بود (۰/۰۰۱ >P) (شکل ۱).



شکل ۱. مقایسه فراوانی آنتی‌بادی IgG بر اساس جنسیت در دو گروه سالم و بیمار

بحث

یافته‌های این مطالعه نشان‌دهنده ارتباط معناداری بین عفونت *T. gondii* و مثبت بودن ANA است که حاکی از ارتباط احتمالی بین توکسوپلاسموز مزمن و فرآیندهای خودایمنی می‌باشد. نتیجه مثبت برای آنتی‌بادی IgG نشان‌دهنده عفونت گذشته یا مزمن بوده، در حالی که مثبت‌بودن IgM بیانگر عفونت اخیر است. فراوانی نسبی بالاتر آنتی‌بادی‌های IgG علیه *T. gondii* در افراد ANA- مثبت (۴۷٪/۳) در مقایسه با گروه کنترل سالم (۱۱/۳٪) نشان می‌دهد که عفونت پایدار انگلی ممکن است در بروز اختلال ایمنی نقش داشته باشد. اگرچه این مطالعه رابطه علّیتی را اثبات نمی‌کند و بایستی با احتیاط تفسیر شود، اما بینش ارزشمندی در مورد نقش احتمالی *T. gondii* در تحریک یا تشدید پاسخ‌های خودایمنی ارائه می‌دهد.

وجود ANA در افراد آلوده به *T. gondii* این پرسش جالب را مطرح می‌کند که آیا توکسوپلاسموز مزمن می‌تواند به‌عنوان یک عامل تسهیل‌کننده در توسعه بیماری‌های خودایمنی عمل کند؟ اگر چنین ارتباطی وجود داشته باشد، می‌تواند پیامدهای مهمی برای درک محرک‌های محیطی خودایمنی و توسعه راهبردهای پیشگیرانه داشته باشد. متاآنالیزها و مرورهای نظام‌مند ارتباط بین *T. gondii* و لوپوس اریتماتوز سیستمیک (SLE) را نشان داده‌اند؛ به‌طوری که شانس سرومثبت *T. gondii* در افراد مبتلا به SLE در مقایسه با افراد سالم ۲/۳۴ برابر بیشتر است.[۱۹] بیماران مبتلا به SLE دارای سلول‌های B خودواکنشی هستند که چندین نوع خودپادتن از جمله ضد DNA دو رشته‌ای (dsDNA)، ضد ریبونوکلئوپروتئین(RNP)، ضد اسمیت(Sm) ، ضد Ro، ضدLa، ضد فسفولیپید و ضد ANA تولید می‌کنند.[۲۰] یافته‌های یک مرور نظام‌مند دیگر نیز نشان داد که آنتی‌بادی IgG علیه *T. gondii* در بیماران SLE شایع‌تر از افراد سالم است، به‌ویژه در مناطقی که عفونت‌های *T. gondii* شیوع بالایی دارند. این موضوع اهمیت در نظر گرفتن عوامل جغرافیایی را در ارزیابی رابطه بین *T. gondii* و بیماری‌های خودایمنی برجسته می‌سازد.[۲۱] شاپیرا و همکاران رابطه بین عفونت *T. gondii* و خودایمنی را بررسی کردند و افزایش فراوانی نسبی آنتی‌بادهای *T. gondii* را در بیماران مبتلا به بیماری‌های خودایمنی، به‌ویژه SLE، نشان دادند.[۲۲] این یافته با نتایج مطالعه حاضر همسو است و نشان‌دهنده نقش احتمالی توکسوپلاسموز مزمن در تولید خودپادتن‌ها می‌باشد. با این حال، مطالعه مذکور بر بیماران مبتلا به بیماری‌های خودایمنی تشخیص‌داده‌شده متمرکز بود، در حالی که مطالعه ما افراد ANA-مثبت بدون تشخیص قطعی بیماری خودایمنی را شامل می‌شد که مرحله ابتدایی‌تری از توسعه بیماری را نشان می‌دهند. در مطالعه دیگری، ابوکمر و همکاران رابطه بین توکسوپلاسموز و بیماری‌های روماتیسمی خودایمنی (ARDs) را بررسی کردند. محققان ارتباط معناداری بین سرومثبت *T. gondii* IgM و SLE، و همچنین بین سرومثبت *T. gondii* IgG و هر دو مورد آرتریت روماتوئید (RA) و SLE یافتند. با این حال، هیچ ارتباطی با اسکلروز سیستمیک (SSc) مشاهده نشد. علاوه بر این، ارتباط قابل‌توجهی بین سرومثبت IgM ضد *T. gondii* و سابقه ناهنجاری‌های مادرزادی جنین شناسایی شد.[۲۳]

علی‌رغم افزایش علاقه به ارتباط احتمالی بین عفونت *T. gondii* و خودایمنی، مطالعات در این زمینه همچنان محدود هستند. بیشتر تحقیقات پیشین بر بیماری‌های خودایمنی خاص نسبت به مثبت‌بودن ANA به‌عنوان نشانگر گسترده‌تری از اختلال ایمنی متمرکز بوده‌اند. درک این موضوع که آیا افراد ANA-مثبت بیشتر در معرض عفونت *T. gondii* هستند، می‌تواند بینش ارزشمندی در مورد نقش عفونت‌های مزمن در خودایمنی ارائه دهد. اگرچه یک مورد مثبت IgM همراه با شناسایی DNA انگل مشاهده شد، اما به دلیل

محدود بودن تعداد، این یافته فاقد قدرت آماری لازم برای نتیجه‌گیری معنادار بوده و بیشتر به‌عنوان یافته‌های مشاهده‌ای تلقی می‌شود و نباید نتیجه‌گیری قطعی در مورد نقش فعال T. gondii در خودایمنی بر اساس آن صورت گیرد. وجود ANA لزوماً به معنای ابتلا به یک بیماری خودایمنی نیست، بلکه نشان‌دهنده استعداد ابتلا به آن است. در این مطالعه اطلاعات دقیق مربوط به تشخیص بالینی نوع بیماری‌های خود ایمنی در دسترس نبود و ANA مثبت بودن تنها به‌عنوان یک نشانگر غربالگری در نظر گرفته شد. از طرفی، سایر محدودیت‌های مطالعه از جمله عدم کنترل برای تمام عوامل مخدوش‌کننده نظیر وضعیت تغذیه، سطح تحصیلات نیز باید در تفسیر نتایج در نظر گرفته شوند. لذا تحقیقات بیشتری برای تعیین این موضوع مورد نیاز است که آیا عفونت *T. gondii* یک عامل علّیتی در خودایمنی است یا صرفاً یک یافته تصادفی محسوب می‌شود. با روشن‌کردن رابطه بین *T. gondii* و مثبت‌بودن ANA، این پژوهش می‌تواند به درک بهتر عوامل محیطی دخیل در خودایمنی کمک کند و راه را برای مطالعات بیشتر در مورد خودایمنی ناشی از عفونت هموار سازد.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر با نشان دادن ارتباط معنادار بین عفونت *T. gondii* و مثبت‌بودن ANA بیانگر ارتباط احتمالی توکسوپلاسموز مزمن با فرآیندهای خودایمنی است. با توجه به مثبت‌بودن آزمایش IgG *T. gondii* در نزدیک به نیمی از افراد ANA-مثبت در مقایسه با فراوانی نسبی بسیار پایین‌تر در گروه کنترل سالم، یافته‌های ما پرسش‌های مهمی را درباره پیامدهای ایمونولوژیک احتمالی عفونت مزمن *T. gondii* مطرح می‌کند. وجود DNA T. gondii در تنها یک مورد IgM مثبت در میان بیماران ANA مثبت، به‌تنهایی نمی‌تواند دال بر ارتباط علّیتی باشد و صرفاً به‌عنوان یافته‌ای موردی و نیازمند بررسی بیشتر تفسیر می‌شود.

اگرچه این مطالعه شواهد قانع‌کننده‌ای از همبستگی ارائه می‌دهد، اما رابطه علّیتی را اثبات نمی‌کند. مکانیسم‌هایی که از طریق آنها *T. gondii* ممکن است به بیماری خودایمنی منجر شود، هنوز در حد فرضیه است و مواردی مانند تقلید مولکولی، فعال‌سازی مزمن سیستم ایمنی و فعال‌سازی تصادفی سلول‌های ایمنی خودواکنشی مطرح شده‌اند. با توجه به افزایش بار جهانی بیماری‌های خودایمنی و شیوع گسترده *T. gondii*، درک این رابطه از اهمیت بالایی برخوردار است. تحقیقات آینده باید بر مطالعات طولی متمرکز شوند تا مشخص شود آیا عفونت *T. gondii* مقدم بر توسعه بیماری‌های خودایمنی است یا صرفاً با آنها همزیستی دارد. علاوه بر این، بررسی نقش استعداد ژنتیکی، عوامل محیطی و تغییرات پاسخ ایمنی در افراد آلوده می‌تواند بینش بیشتری ارائه دهد. در صورت اثبات رابطه علّیتی، غربالگری *T. gondii* در جمعیت‌های پرخطر و مداخلات هدفمند برای کاهش مواجهه می‌تواند به‌عنوان یک راهبرد پیشگیرانه در مدیریت بیماری‌های خودایمنی مورد توجه قرار گیرد.

قدردانی

این طرح با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه به تصویب رسیده است. مؤلفان مقاله از همکاري کارکنان و اعضاي محترم هیأت علمی گروه انگل شناسی دانشکده پزشکی کمال تشکر و قدردانی را دارند.

ملاحظات اخلاقی

این طرح توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی ارومیه با کد اخلاق IR.UMSU.REC.1402.177 به تصویب رسیده است.

مشارکت پدیدآورندگان

سیما روشن‌فر: طراحی و اجرای مطالعه؛ الهام یوسفی: تحلیل نتایج مطالعه و آرش امین‌پور: تأیید نسخه نهایی مقاله را بر عهده داشتند.

منابع مالی

حمایت مالی از این طرح تحقیقاتی از طرف معاونت تحقیقات و فناوري دانشگاه علوم پزشکی ارومیه صورت پذیرفته است.

منافع متقابل

هیچ‌گونه منافع متقابلی از تألیف یا انتشار این مقاله وجود ندارد.

References

1. Orooji N, Fadaee M. NETosis: A bridge between cancer and autoimmunity. Rheumatology & Autoimmunity. 2025 Jun. doi: 10.1002/rai2.12163.
2. Goldberg-Murow M, Cedillo-Peláez C, Concha-del-Río LE, Cheja-Kalb R, Salgar-Henao MJ, Orozco-Velasco E, et al. Autoantibodies against ubiquitous and

confined antigens in patients with ocular, neuro-ophthalmic and congenital cerebral toxoplasmosis. Frontiers in Immunology. 2021;12:606963. doi: 10.3389/fimmu.2021.606963.
3. Mohammadzadeh A, Spotin A, Mikaeili Galeh T, Fadaee M. The prevalence of intestinal parasites in staff working at the restaurants of Tabriz city. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2018;40(4):60-6. https://mj.tbzmed.ac.ir/Article/22864.
4. Smith NC, Goulart C, Hayward JA, Kupz A, Miller CM, van Dooren GG. Control of human toxoplasmosis. International journal for parasitology. 2021;51(2-3):95-121. doi: 10.1016/j.ijpara.2020.11.001.
5. Cao H, Lin J, Yuan H, Yang Z, Nie M, Pathak JL, et al. The emerging role of Toxoplasma gondii in periodontal diseases and underlying mechanisms. Frontiers in Immunology. 2024;15:1464108. doi: 10.3389/fimmu.2024.1464108.
6. Karimzadeh H, Aghaei R, Jourabchi A, Shoorei H, Abdi M. Novel therapeutic aspects of stem cell-derived extracellular vesicles in female reproductive disorders. Journal of Drug Targeting. 2025;26:1-9. doi: 10.1080/1061186X.2025.2540853.
7. Arabi S, Fadaee M, Kazemi T, Rahmani M. Advancements in colorectal cancer immunotherapy: from CAR-T cells to exosome-based therapies. Journal of Drug Targeting. 2025;33(5):749-60. doi: 10.1080/1061186X.2024.2449482.
8. Delogu LG, Deidda S, Delitala G, Manetti R. Infectious diseases and autoimmunity. The Journal of Infection in Developing Countries. 2011;5(10):679-87. doi: 10.3855/jidc.2061.
9. Abdi M, Karimzadeh H, Jourabchi A, Seghinsara AM, Khodaie L. Protective effects of Tribulus Terrestris extract on cisplatin-induced ovarian damage: Antioxidants and anti-inflammatory insights. Human & Experimental Toxicology. 2025;44:09603271251353492. doi: 10.1177/09603271251353492.
10. Fadaee M, Aghaei R, Orooji N, Mahdavi S, Lahouty M, Babaei S, Shahizare M, Mobayen G, Ghahremanzadeh A. NETosis in hypersensitivity disorders. Molecular Biology Reports. 2025;52(1):574. doi: 10.1007/s11033
11. Babaei S, Fadaee M. NETosis in autoimmunity: cell-mediated vs. Ab-mediated. Iranian Journal of Public Health. 2025;54(5):1113-5. doi: 10.18502/ijph.v54i5.18648.
12. Asgharzadeh M, Jigheh ZA, Kafil HS, Farhoudi M, Oskouei DS, Khaki-Khatibi F, et al. Association of interleukin-1 and inteleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms with multiple sclerosis in azeri population of Iran. Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders). 2020;20(7):1110-6. doi: 10.2174/1871530320666200309142541.
13. Asgharzadeh M, Najafi-Ghalehlou N, Poor BM, Asgharzadeh V, Pourostadi M, Vegari A, et al. IFN-γ and TNF-α gene polymorphisms in multiple sclerosis patients in Northwest Iran. Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders). 2021;21(3):520-5. doi: 10.2174/1871530320666200505123443.
14. Abdi M, Karimzadeh H, Jourabchi A, Azarhoosh S, Ghavifekr HA, Pazoki H, et al. Impact of mesenchymal stem cells and quercetin on protection of testis against cyclophosphamide-related damage. Crescent J Med Biol Sci. 2019;12(2):89. doi: 10.34172/cjmb.2025.3802.
15. Asgharzadeh M, Fadaee M, Leylabadlo HE, Poor BM, Rashedi J, Asgharzadeh V, et al. TNF-α gene polymorphism in Iranian Azeri population. Gene Reports. 2020;19:100651. doi: 10.1016/j.genrep.2020.100651.
16. Asgharzadeh M, Fadaee M, Mahdavipoor B, Sheykhsaran E, Rashedi J, Pourostadi M, et al. Polymorphism of the IFN-ɣ gene in the Azeri population of Iran. Gene Reports. 2020;19:100596. doi: 10.1016/j.genrep.2020.100596.
17. Cicero CE, Allibrio FE, Giuliano L, Luna J, Preux PM, Nicoletti A. Toxoplasma gondii and multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. European Journal of Neurology. 2021;28(12):4251-7. doi: 10.1111/ene.15055.
18. Fischer S, Agmon-Levin N, Shapira Y, Porat Katz BS, Graell E, Cervera R, et al. Toxoplasma gondii: bystander or cofactor in rheumatoid arthritis. Immunologic research. 2013;56(2):287-92. doi: 10.1007/s12026-013-8402-2.
19. Bassett P, Zabriskie BN, Catchpole A, Hedges D. Association between Toxoplasma gondii and systemic lupus erythematosus: A systematic review and meta-analysis. Journal of Translational Autoimmunity. 2022;5:100163. doi: 10.1016/j.jtauto.2022.100163.
20. Lou H, Ling GS, Cao X. Autoantibodies in systemic lupus erythematosus: From immunopathology to therapeutic target. Journal of autoimmunity. 2022;132:102861. doi: 10.1016/j.jaut.2022.102861.
21. Ranjan S, Panda AK. Seroprevalence of Toxoplasma gondii immunoglobulins and its association with

systemic lupus erythematosus: A systematic review and meta-analysis. Lupus. 2024;33(11):1212-9. doi: 10.1177/09612033241273048.

22. Shapira Y, Agmon-Levin N, Selmi C, Petríková J, Barzilai O, Ram M, et al. Prevalence of anti-Toxoplasma antibodies in patients with autoimmune diseases. Journal of autoimmunity. 2012;39(1-2):112-6. doi: 10.1016/j.jaut.2012.01.001.

23. Aboukamar WA, Habib S, Tharwat S, Nassar MK, Elzoheiry MA, Atef R, et al. Association between toxoplasmosis and autoimmune rheumatic diseases in Egyptian patients. Reumatologia clinica. 2023;19(9):488-94. doi: 10.1016/j.reuma.2023.03.001.