مقاله اصیل

تشخیص انگل زنده توکسوپلاسما گوندی با روش NASBA در رت

رقیه نوروزی[1]، عبدالحسین دلیمی[2*]، مهدی فروزنده[3]، فاطمه غفاری‌فر[4]

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه انگل‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- استاد، گروه انگل‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۴- دانشیار، گروه انگل‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه انگل‌شناسی پزشکی
Email: dalimi_a@modares.ac.ir

دریافت مقاله: ۹۰/۰۸/۲۲ پذیرش مقاله: ۹۱/۰۲/۰۳

چکیده

هدف: توکسوپلاسموزیس از بیماری‌های دارای گسترش جهانی است که برای تشخیص آن از روش‌های مختلفی استفاده شده است. روش NASBA به دلیل شناسایی میکروارگانیسم‌های زنده، دارای ویژگی بالایی است. هدف از این مطالعه، ارزیابی روش مولکولی هم دمایی (ایزوترمال) NASBA در تشخیص انگل زنده توکسو پلاسما در مدل حیوانی رت است.

مواد و روش‌ها: پس از تکثیر انگل در صفاق موش سوری، RNA از فرم تاکی‌زوئیت تخلیص شد و از روش NASBA برای تکثیر ژن B1 برای تشخیص انگل زنده استفاده شد. در مرحله دوم مطالعه، از روش NASBA برای تشخیص آلودگی تجربی توکسوپلاسما در خون ۳۰ سر رت (مورد و شاهد) استفاده شد. باند حاصل از تکثیر این ژن اختصاصی، روی ژل آگارز مطالعه شد.

نتایج: از نمونه تاکی‌زوئیت و خون رت‌ها ژن اختصاصی B1 با موفقیت با روش NASBA در ناحیه ۱۱۶ جفت‌بازی تکثیر و شناسایی شد.

نتیجه‌گیری: روش تکثیری هم دمایی NASBA روش ایده‌آل با ویژگی بالا در تشخیص انگل زنده توکسوپلاسما گوندی است. از این روش می‌توان برای تشخیص سریع توکسوپلاسموزیس فعال در نوزادان و بیماران دارای نقص سیستم ایمنی استفاده نمود.

کلیدواژگان: توکسوپلاسما گوندی، روش NASBA، ژن B1 rRNA

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۵، شماره ۱، بهار ۱۳۹۱، صفحات: ۷۳-۸۰

مقدمه

توکسوپلاسموزیس (Toxoplasmosis) آلودگی ناشی از ابتلا به تک یاخته‌ای درون سلولی به نام توکسوپلاسما گوندی (*Toxoplasma gondii*) است [۱]. توکسوپلاسموزیس در افراد دارای ایمنی کامل، معمولاً فاقد علامت است یا به‌صورت تظاهرات پوستی (بثورات جلدی)، آدنوپاتی (Adenopathy) یا عارضه چشمی بروز می‌کند. در نوزادانی که از طریق مادرزادی آلوده می‌شوند و توکسوپلاسموزیس در بیماران با نقص ایمنی مانند مبتلایان به ایدز (Acquired Immunodeficiency Syndrome: AIDS) و دریافت کنندگان عضو پیوندی، ممکن

Archive of SID
www.SID.ir

است تهدیدکننده زندگی باشد [۱].

در دهه‌های اخیر از روش‌های مبتنی بر تکثیر DNA مثل PCR برای شناسایی انگل توکسوپلاسما استفاده شده است ولی این روش‌ها اطلاعاتی در مورد زنده بودن انگل را فراهم نمی‌کند. اصولاً روش‌هایی که قادر به شناسایی انگل زنده است، این امکان را فراهم می‌سازد که محقق بتواند برنامه‌های ارزیابی اثر درمانی داروها را به خوبی تحت نظارت قرار دهد. با توجه به عوارض و ضایعات جبران‌ناپذیر در افرادی با ایمنی سرکوب شده و نوزادان، تشخیص توکسوپلاسموزیس و درمان پس از آن، ضروری است.

NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) روش هم دمایی و بدون نیاز به ترموسایکلر است که RNA مستقیماً در واکنشی سه آنزیمی رونویسی معکوس (Reverse Trancriptase: RT)، H RNAase، RNA T7 پلیمراز و دو آغازگر (Primer) تکثیر می‌شود. در این روش ابتدا یک رشته DNA از روی RNA الگو ساخته می‌شود. آنزیم RNAase متصل به DNA را تخریب کرده و به این ترتیب یک DNA تک رشته باقی می‌ماند که آغازگر دوم در این شرایط به آن متصل می‌شود. آنزیم RT در این شرایط با فعالیت DNA پلیمرازی وابسته به DNA خود، DNA تک رشته را به DNA دو رشته‌ای تبدیل می‌کند. این DNA دو رشته‌ای در یک سر خود دارای توالی پروموتوری T7 است، در نتیجه آنزیم RNA T7 پلیمراز با شناسایی ناحیه پروموتری خود، کار رونویسی را انجام داده و تعداد زیادی RNA تولید می‌شود (حدوداً از هر رشته ۱۰۰ الی ۱۰۰۰ RNA ساخته می‌شود) حال هرکدام از RNA های سنتز شده به‌عنوان الگو برای چرخه تکراری فرآیند NASBA به‌کار می‌رود [۲].

با توجه به این‌که از این روش تاکنون برای تشخیص عوامل عفونی مختلفی استفاده شده است ولی گزارشی در این زمینه در مورد توکسوپلاسما وجود ندارد بنابراین این مطالعه، برای راه‌اندازی و استانداردسازی این روش برای تشخیص سریع انگل زنده توکسوپلاسما طراحی شد تا علاوه بر تشخیص سریع‌تر و دقیق‌تر توکسوپلاسموزیس از طریق آزمایش خون در مرحله حاد آلودگی، بتوان از آن برای مطالعات ارزیابی تأثیر داروها در In vitro استفاده نمود.

مواد و روش‌ها

تکثیر و نگهداری سویه RH توکسوپلاسما گوندی

سویه RH توکسوپلاسما گوندی از بخش انگل‌شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران تهیه شد. به منظور تکثیر و نگهداری سویه از روش تزریق درون صفاقی موش‌های ماده (*Mus Musculus*) با سن حدود ٤ هفتگی استفاده شد [۱]. مایع صفاقی موش، حاوی ۱۰۰۰ تاکی‌زوئیت (Tachyzoite) به داخل صفاق موش‌ها تزریق شد. پس از ۳-٤ روز موش‌ها را با کلروفرم بیهوش و کشته و سپس مایع صفاقی آن‌ها با سرنگ خارج شد. تاکی‌زوئیت‌های تکثیر یافته با میکروسکوپ نوری (بزرگنمایی ٤٠×) قابل مشاهده است. این مایع صفاقی به‌عنوان منبع اصلی برای نگهداری انگل یا تزریق به موش و تکثیر تاکی‌زوئیت‌ها استفاده قرار می‌شود.

استخراج RNA

تعداد ۳ تا ۵ میلیون انگل توسط لام نئوبار شمارش و با ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۲ دقیقه با دستگاه سانتریفوژ رسوب داده شد. RNA انگل استخراج (RNA Xplus؛ (سیناژن، ایران) و باند آن روی ژل آگارز مشاهده و غلظت آن به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

انجام واکنش NASBA

در واکنش NASBA به‌منظور تکثیر قطعه ۱۱٦ جفت‌بازی از دو آغازگر FN1 و RN2 استفاده شد توالی آغازگرها به شرح زیر بود.

FN1:
5'-GGACTGGCAACCTGGTGTC-3'
RN2:
5'-AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAG
AAGGACCCGGACCGTTTAGCAG-3'

Archive of SID
www.SID.ir

ابتدا تمام اجزای مورد نیاز به جز آنزیم‌ها، با غلظت‌های مشخص و تعیین شده وارد مخلوط واکنش شد (جدول ۱). مخلوط حاصل به‌مدت پنج دقیقه در دمای ٦٥ درجه سانتی‌گراد، سپس به‌مدت ۳ دقیقه در دمای ٤١ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد؛ سپس به سرعت مخلوط آنزیمی به مخلوط اولیه افزوده شد و به‌مدت ۹۰ دقیقه در دمای ٤١ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از گذشت این مدت زمان، محصول NASBA در دمای ٦٥ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد و سپس روی ژل آگارز ۲ درصد در تانک الکتروفورز قرار گرفت.

جدول ۱ اجزای لازم برای واکنش NASBA

	ماده شیمیایی	غلظت
۱	Tris-HCl	٤٠ میلی‌مول
۲	KCl	٥٠ میلی‌مول
۳	(Dithiothreitol) DTT	۱ میلی‌مول
٤	$MgCl_2$	٤ میلی‌مول
٥	آغازگر رفت	۱۰ پیکومول
٦	آغازگر برگشت	۱۰ پیکومول
۷	dNTP	۰/٤ میلی‌مول
۸	(Nucleotide Triphosphate) NTP	۰/۸ میلی‌مول
۹	(Dimethyl Sulfoxide) DMSO	٥ درصد
۱۰	بازدارنده RNase	۱۲ واحد
۱۱	M-Mulv RT	۸ واحد
۱۲	پلیمراز T7 RNA	۲۰ واحد

آلوده‌سازی رت‌ها

تعداد ۳۰ سر رت (*Rattus norvegicus*) ماده ۲-۳ ماهه از مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی تهیه و به دو گروه ۱۵ تایی (مورد و شاهد) تقسیم شدند. تاکی‌زوئیت‌های استخراج شده از موش سوری توسط لام نئوبار (Neubauer) شمارش شدند و با افزودن محلول PBS (Phosphate Buffered Saline)، غلظت نهایی به ۱۰٥ عدد تاکی‌زوئیت در هر میلی‌لیتر مایع تنظیم شد. به ازای هر میلی‌لیتر سوسپانسیون، مقدار ۱۰۰ واحد پنی‌سیلین G (Penicillin G) و ۱۰۰ میکروگرم استرپتومایسین (Streptomycin) به آن افزوده شد [۱]. سپس به محوطه صفاقی هرکدام از رت‌های گروه مورد 5×10^5 عدد تاکی‌زوئیت (مقدار ٥ میلی‌لیتر از سوسپانسیون) و به رت‌های شاهد سرم فیزیولوژی تزریق شد.

خونگیری از رت‌ها

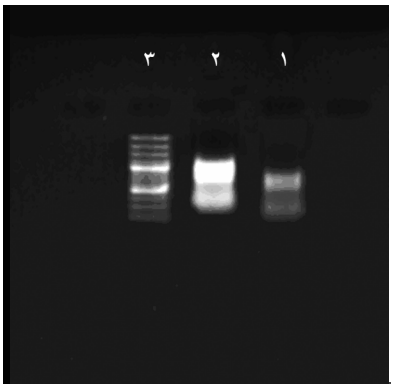
معمولاً ۲ تا ۱۷ روز بعد از تزریق، انگل‌ها در خون حضور می‌یابند بنابراین ٤٨ ساعت بعد از تزریق، خونگیری به اندازه ۱ سی‌سی از قلب تمام رت‌ها انجام گرفت و در تمام مدت تحقیق فقط یک‌بار از حیوانات خونگیری انجام شد و بلافاصله با ماده ضد انعقاد EDTA (Ethylenediaminetetraacetic Acid) به نسبت ۱ به ۱۰ در میکرولوله ۱/٥ میلی‌لیتری مخلوط و در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد به‌منظور استخراج RNA و انجام واکنش NASBA نگهداری شد. پس از استخر اج RNA، ۳ میکرولیتر از RNA های استخراج شده از خون رت‌ها (مورد و شاهد) با روش NASBA برای تشخیص آلودگی به توکسوپلاسما آزمایش و سپس باندهای حاصل روی ژل آگارز شناسایی شد.

نتایج

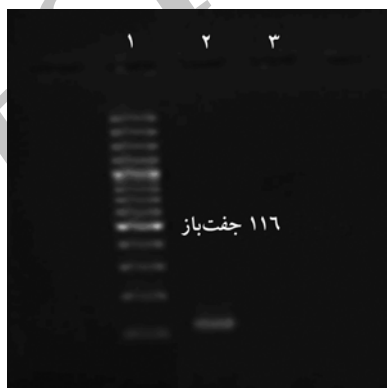
طبق نتایج به‌دست آمده RNA تخلیص شده از تاکی‌زوئیت انگل توکسوپلاسما گوندی دارای اندازه تقریبی ۲۰۰ الی ۱۰۰۰ جفت‌بازی و سه باند روی ژل بوده است (شکل ۱). محصول ژن تکثیر شده ژن B1 توکسوپلاسما گوندی با روش NASBA دارای قطعه‌ای به اندازه تقریبی ۱۱٦ جفت‌باز بر روی ژل آگارز ۲ درصد بود (شکل ۲).

نتایج تشخیص توکسوپلاسما در نمونه‌های خون رت‌ها، با روش NASBA در شکل ۳ آمده است. باندهای حاصل در این شکل نشان داد که در مرحله حاد بیماری می‌توان از طریق آزمایش خون با روش NASBA آلودگی به توکسوپلاسما را به خوبی تشخیص داد.

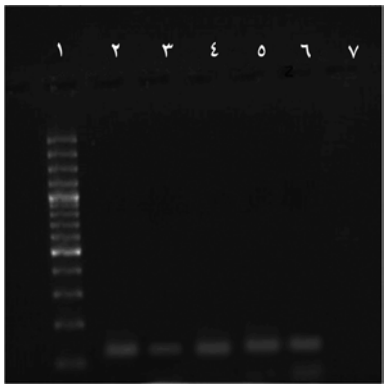
Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۱ RNA تخلیص شده از انگل توکسوپلاسما گوندی؛ **ستون‌های ۱ و ۲)** ناحیه RNA استخراج شده از تاکی‌زوئیت انگل توکسوپلاسما، **ستون ۳)** نردبان RNA



شکل ۲ محصول ژن تکثیر شده ژن B1 توکسوپلاسما گوندی با روش NASBA روی ژل آگارز ۲ درصد؛ **ستون ۱)** نردبان RNA ۱۰۰ جفت‌بازی، **ستون ۲)** محصول NASBA، **ستون ۳)** کنترل منفی



شکل ۳ نتایج تشخیص توکسوپلاسما در نمونه‌های خون رت‌ها، با روش NASBA؛ **ستون ۱)** نردبان RNA ۱۰۰ جفت‌بازی، **ستون ۲-٦)** نمونه خون رت، **ستون ۷)** کنترل منفی

بحث

برای تشخیص توکسوپلاسموزیس از دهه‌های پیش تاکنون، از روش‌های سرولوژی استفاده شده است؛ اما با گسترش عفونت HIV (Human Immunodeficiency Virus)، افزایش پیوند اعضا و استفاده از داروهای سرکوب کننده ایمنی، توکسوپلاسموزیس به‌صورت یک بیماری مرگ‌آور مطرح شد. از طرفی عوارض جبران‌ناپذیر توکسوپلاسموزیس مادرزادی محققین را بر آن داشت که از روش‌های حساس و اختصاصی‌تری نسبت به روش‌های سرولوژی استفاده نمایند [۳]. روش‌های مولکولی از ابتدا نیز به‌عنوان روش‌هایی حساس برای تشخیص عفونت در افرادی که با روش‌های سرولوژیک قابل تشخیص نیستند پایه‌گذاری شد.

روش تکثیری PCR یکی از شناخته شده‌ترین روش‌های تشخیص مولکولی است و تاکنون بر روی اغلب میکروارگانیسم‌ها بررسی شده است. این روش به علت سریع و ساده بودن و همچنین حساسیت و دقت بالایی که دارد، توانسته در اکثر آزمایشگاه‌های تشخیص طبی، جایگزین روش‌های سنتی تشخیص بیماری‌ها شود. اما یکی از معایب PCR عدم توانایی در شناسایی عوامل بیماری‌زا زنده از مرده است [٤، ٥] بنابراین کارایی آن برای برخی مطالعات از جمله ارزیابی داروها محدود است.

روش NASBA سیستم حساس تکثیری RNA و برای رونویسی اختصاصی اسیدهای نوکلئیک مناسب است. این روش زمانی به‌کار برده می‌شود که پیگیری اثربخشی داروها، واکسن‌ها، بیان ژن‌ها [٦] و همچنین شناسایی میکروارگانیسم زنده مورد نظر باشد. واکنش رونویسی در دمای ٤١ درجه سانتی‌گراد انجام می‌شود. محصول تک رشته‌ای، هدف ایده‌آلی برای بررسی روش‌های مختلف هیبریداسیون (Hybridization) است. در این روش برخلاف سایر روش‌ها، مقادیر محصول RNA در سطح بالایی است. سه آنزیم به‌کار برده شده در این واکنش در شرایط مشابهی فعال می‌شوند. تمام RNA مبتنی بر سیستم NASBA، دارای اختصاصیت بالایی است به‌طوری که در حضور DNA ی ژنومی که به‌طور همزمان از سلول زنده جدا می‌شود، mRNA

Archive of SID
www.SID.ir

به‌طور اختصاصی تکثیر یافته و بدون تأثیر از توالی DNA، می‌تواند اندازه‌گیری شود. وجود همین مزیت‌ها در روش NASBA باعث شده تا بتواند جایگاه ویژه‌ای در شناسایی میکروارگانیسم‌ها پیدا کند. از مزیت‌های این روش نسبت به PCR عدم نیاز NASBA به دستگاه ترموسایکلر است زیرا این روش تکثیری نیازی به چرخه‌های حرارتی ندارد [۷].

روش NASBA در ابتدا برای تشخیص عفونت‌های RNA ویروسی استفاده شد ولی در دهه‌های اخیر برای تشخیص عفونت‌های باکتریایی مثل ویبریو کلرا (*Vibrio cholera*)، مایکوپلاسما پنومونیا (*Mycoplasma pneumoniae*)، مایکوباکتریوم اوویوم (*Mycobacterium avium*)، لیستریا منوسایتوژن (*Listeria monocytogenes*)، پاراتوبرکولوزیس (*Paratuberculosis*)، کامپیلوباکتر ژوژونی (*Campylobacter jejuni*) و عفونت‌های قارچی مثل کاندیدا (*Candida*)، آسپرژیلوس (*Aspergillus*) استفاده شد [۸]. با پیشرفت زمان، روش NASBA برای انگل‌هایی مثل پلاسمودیوم فالسیپاروم (*Plasmodium falciparum*) [۹]، تریپانوزوم (*Trypanosoma*) [۱۰]، کریپتوسپوریدیوم (*Cryptosporidium*) [۱۱]، لیشمانیا (*Leishmania*) [۱۲] کاربرد یافت. در مورد استفاده از این روش برای تشخیص توکسوپلاسما گزارشی وجود ندارد و شاید این اولین گزارش در این زمینه است.

در این مطالعه ژن B1 توکسوپلاسما که حساسیت آن معادل ۱۰ ژنوم در تعداد 10^5 لوکوسیت انسانی گزارش شده است انتخاب شد. حساسیت این ژن به وجود تعداد ۳۵ کپی از آن در ژنوم توکسوپلاسما مربوط است. با توجه به ویژگی‌های این قطعه، در این پروژه از قطعه B1 برای تشخیص توکسوپلاسموزیس استفاده شد [۱۳].

هدف از تحقیق حاضر راه‌اندازی و به‌کارگیری روش NASBA برای تشخیص توکسوپلاسموزیس از طریق آزمایش خون در مرحله حاد آلودگی بود. این حالت در بیماران دارای نقص سیستم ایمنی دیده می‌شود و معمولاً در این مرحله، تاکی‌زوئیت انگل در خون بیمار حضور دارد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که روش NASBA براساس ژن B1، کارایی بالایی در تشخیص توکسوپلاسموزیس از طریق آزمایش خون دارد. روش NASBA با مزایایی نظیر افزایش سرعت از طریق کاهش زمان تکثیر و ساده بودن در تشخیص عوامل بیماری‌زا به‌ویژه انگل‌ها اهمیت ویژه‌ای دارد.

NASBA نسبت به PCR به تعداد چرخه‌های کمتری برای تکثیر نیاز دارد. وقتی از PCR استفاده می‌کنیم در هر مرحله قطعات دو برابر می‌شود و برای تکثیر حدود یک میلیون حداقل ۲۰ چرخه نیاز است، اما در NASBA در هر مرحله رونویسی ۱۰۰–۱۰۰۰ کپی RNA تولید می‌شود و برای تکثیری حدود یک میلیون برابر حدود ٤ تا ٥ تکثیر لازم است [١٤].

لین (Lin) و همکاران (۱۹۹۵) در ردیابی کمّی انگل زنده توکسوپلاسما با استفاده از ژن B1 از روش Real-time PCR استفاده نمودند [۱۵]. علاوه بر این از این روش برای ردیابی توکسوپلاسما گوندی در بافت‌های خوک و موش گسترش استفاده شده است [١٦]. هیرل (Hierl) و همکاران (۲۰۰٤) دو روش Nested-PCR و Real-time PCR را برای شناسایی توکسوپلاسما گوندی در بیماران دچار ضعف سیستم ایمنی به‌کار برده و مقایسه کردند که از بین این دو روش Real-time PCR قابلیت ردیابی سریع DNA انگل را دارا بوده است [۱۷]. با وجود کارایی خوب این روش‌ها در تشخیص توکسوپلاسموزیس، برای راه‌اندازی آن‌ها به دستگاه‌های گران‌قیمت مانند ترموسایکلر نیاز است.

اما این روش به دستگاه ترموسایکلر نیاز ندارد و برای تشخیص عفونت توکسوپلاسمایی و همچنین ارزیابی اثربخشی داروهای ضد انگلی یک روش سریع، ارزان و کاربردی است. روش تکثیری هم دمایی NASBA روش ایده‌آل با ویژگی بالا در تشخیص RNA انگل زنده توکسوپلاسما گوندی در خون است؛ بنابراین از این روش برای تشخیص سریع توکسوپلاسموزیس فعال در نوزادان و افراد دارای نقص ایمنی می‌توان استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از پایان‌نامه دکتری تخصصی است که با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس به انجام رسید. نویسندگان

Archive of SID
www.SID.ir

بدین‌وسیله از سرکار خانم دکتر شجاعی از گروه انگل‌شناسی دانشگاه تهران، به دلیل در اختیار قرار دادن سوش انگل و دانشجویان محترم گروه بیوتکنولوژی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس قدردانی می‌نمایند.

منابع

[1] Dubey JP. Toxoplasmosis. Microbiology and microbial infection. Vol 5, New York: Oxford University Press, 1998; p: 303-18.

[2] 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 pneumoniae*, and *Legionella spp*. in respiratory specimens. J Clin Microbiol. 2008; 46(1): 185-91.

[3] Grover CM, Thulliez P, Remington JS, Boothroyd JC. Rapid prenatal diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection by using polymerase chain reaction and amniotic fluid. J Clin Microbiol 1990; 28(10): 2297–301.

[4] Jones CD, Okhravi N, Adamson P, Tasker S, Lightman S. Comparison of PCR detection methods for B1, P30, and 18S rDNA genes of *T. gondii* in aqueous humor. Invest Ophthalmol Vis Sci 2000; 41 (3): 634- 44.

[5] Cassaing S, Bessières MH, Berry A, Berrebi A, Fabre R, Magnaval JF. Comparison between two amplification sets for molecular diagnosis of toxoplasmosis by real-time PCR. J Clin Microbiol 2006; 44(3): 720-4.

[6] Greijer AE, Adriaanse HM, Dekkers CA, Middeldorp JM. Multiplex real-time NASBA for monitoring expression dynamics of human cytomegalovirus encoded IE1 and pp67 RNA. J Clin Virol 2002; 24(1-2): 57-66.

[7] Deiman B, van Aarle P, Sillekens P. Characteristics and applications of nucleic acid sequence-based amplification (NASBA). Mol Biotechnol 2002; 20(2): 163-79.

[8] Zhao Y, Park S, Kreiswirth BN, Ginocchio CC, Veyret R, Laayoun A, Troesch A, Perlin DS. Rapid real-time nucleic Acid sequence-based amplification-molecular beacon platform to detect fungal and bacterial bloodstream infections. J Clin Microbiol 2009; 47(7): 2067-78.

[9] 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. Mol Biochem Parasitol 2004; 137(1): 35-41.

[10] Mugasa CM, Laurent T, Schoone GJ, Kager PA, Lubega GW, Schallig HDFH. Nucleic acid sequence-based amplification with oligochromatography for detection of *Trypanosoma brucei* in clinical samples. J Clin Microbiol 2009; 47(3): 630-5.

[11] Baeumner AJ, Humiston MC, Montagna RA, Durst RA. Detection of viable oocysts of *Cryptosporidium parvum* following nucleic acid sequence based amplification. Anal Chem 2001; 73(6): 1176-80.

[12] Cultrera R, Seraceni S, Contini C. Efficacy of a novel reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for detecting *Toxoplasma*

Archive of SID

www.SID.ir

gondii bradyzoite gene expression in human clinical specimens. Mol Cell Probes 2002; 16(1): 31-9.

[13] Shirbazou SH, Dalimi A, Foruzandeh Moghaddam M, Ghaffarifar F. Standardization of NASBA method by using 18s rRNA gene for identification of *Leishmania major* parasite. Kowsar Med J 2009; 14(3): 137-42. (Persian)

[14] Candotti D, Richetin A, Cant B, Temple J, Sims C, Reeves I, Barbara JA, Allain JP. Evaluation of a transcription-mediated amplification-based HCV and HIV-1 RNA duplex assay for screening individual blood donations: a comparison with a minipool testing system. Transfusion 2003; 43(2): 215-25.

[15] Lin MH, Chen TC, Kuo TT, Tseng CC, Tseng CP. Real-time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*. J Clin Micobial 1995; 38(11): 4121-5.

[16] Jauregui LH, Higgins J, Zarlenga D, Dubey JP, Lunney JK. Development of a real-time PCR assay for detection of *Toxoplasma gondii* in pig and mouse tissues. J Clin Micobial 2001; 39(6): 2065-71.

[17] 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 Clin Micobial 2004; 53(Pt 7): 629-32.

Archive of SID

www.SID.ir