Archive of SID

مقاله مروری

کاربرد روشهای مولکولی در تشخیص عوامل انگلی

حسین ثباتی[1]*

1.مرکز تحقیقات بهداشت و تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی بقیه اله (عج)

***نشانی برای مکاتبه:** تهران ، میدان ونک ، خیابان ملاصدرا، دانشگاه علوم پزشکی بقیه اله(عج)، مرکز تحقیقات بهداشت و تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی بقیه اله (عج)، **sobatih@gmail.com**

دریافت مقاله: شهریور نود و هفت پذیرش برای چاپ: آبان نود و هفت

چکیده

سابقه و هدف: *در انگل‌شناسی، روشهای معمول آزمایشگاهی مانند میکروسکوپ نوری برای شناسایی مرفولوژیک انگلها مورد استفاده قرار می‌گیرد. تحقیقات اخیر بر روی روشهای جایگزین به منظور بهبود بخشیدن روشهای تشخیصی انگل‌شناسی تمرکز یافته‌اند. این روشها شامل تکنیکهایی مثل سرولوژیکی، روشهای پروتئومیکس با استفاده از تکنولوژی طیف‌سنجی و روشهای مولکولی است. از روش مولکولی برای تشخیص ساختار انگلها به منظور افزایش شناسایی و تعیین خصوصیات آنها با حساسیت و اختصاصیت بالا استفاده می‌شود. در این مطالعه روشهای مولکولی رایج و جدید جهت مطالعه و تشخیص انگلها مورد بررسی قرار گرفته است.*

روش کار: *بیش از 400 مقاله در بازه زمانی 2017- 1980 از پایگاه‌های اطلاعاتی قابل دسترس نظیر* ***SienceDirect, Google Scholar, PubMed, IranMedex, Scopus, SID, Magiran*** *و کتابهای مرجع انگل‌شناسی انتخاب نموده‌ایم. نهایتا اطلاعات لازم از 92 مقاله جهت مطالعات بیشتر انتخاب شد.*

یافته‌ها: *روشهای مولکولی رایج و جدید شامل* ***PCR، RT-PCR، LAMP، Luminex xMAP، RAPD، AFLP، RFLP، NASBA*** *و* ***Microsatellites*** *با حساسیت و اختصاصیت بالا می‌توانند در تشخیص عفونتهای انگلی به کار گرفته شوند.*

نتیجه‌گیری: *روشهای مولکولی ارزیابی جامع‌تری را در تشخیص، درمان و مطالعات اپیدمیولوژیک بیماریهای انگلی و نهایتا کنترل مرگ و میر ناشی از عفونتهای انگلی فراهم می‌کنند.*

واژگان کلیدی: عفونتهای انگلی، تشخیص، روش های مولکولی، اپیدمیولوژی مولکولی

مقدمه

در حال حاضر، شناسایی و تشخیص عفونتهای انگلی وابسته به انجام روشهای متعدد آزمایشگاهی، علائم بالینی، محل سکونت، تاریخچه بیماری، سابقه جابجایی و موقعیت جغرافیایی است. غیراختصاصی بودن علائم بالینی در بیشتر عفونتهای انگلی به گونه‌ای است که در بسیاری از این عفونتها با تکیه بر تظاهرات بالینی نمی‌توان به تشخیص مناسب و به موقع رسید(1). اگر چه یک پزشک با تجربه ممکن است علائم و نشانه‌های ویژه برخی بیماریهای انگلی را شناسایی کند ولی این نشانه‌ها می‌توانند گمراکننده بوده و هیچ تابلوی بالینی واضحی را نشان ندهند. بطور کلی بسیاری از عفونتهای انگلی نشانه‌های کم، غیر مشخص و مشابهی داشته و اغلب از نظر بالینی غیرقابل افتراق هستند. لذا تشخیص نهایی و اتخاذ شیوه درمانی صحیح نیاز به شناسایی انگل در آزمایشگاههای مربوطه دارد(2).

روشهای معمول تشخیص آزمایشگاهی در انگل‌شناسی، مشاهده میکروسکوپی برای شناسایی مرفولوژیکی انگلها است. استفاده از روشهای معمول انگل‌شناسی نیاز به معرف و تجهیزات گران قیمت نداشته و با یک کاربر آشنا به میکروسکوپ می‌توان آن را انجام داد. از جمله محدودیتها و مشکلات روشهای میکروسکوپی بعنوان ابتدایی‌ترین روش تشخیص آزمایشگاهی، وابستگی درستی نتیجه آزمایش به نمونه‌گیری صحیح، زمان مناسب نمونه‌گیری و نیازبه وجود نیروهای فنی متبحر آزمایشگاهی است(3). با این حال گاهی مشکلات شناسایی ساختمان انگلها موجب کاهش حساسیت این روشها می شود. در حال حاضر مطالعه مورفولوژیکی انگلها قادر به تشخیص و تمایز عفونتهای قدیمی، پنهان و فعال از یکدیگر نبوده و متعاقب آن برای پاسخ به درمان و پیش آگهی بیماری مفید نیستند. به تازگی برای بهبود شناسایی

www.SID.ir

Archive of SID

گسترده‌تر انگلها ابزارهای تشخیصی جدیدتری مورد استفاده قرار می‌گیرند. تعدادی از جدیدترین آزمایشات بر پایه روشهای سرولوژیکی استوار می‌باشد که دارای اختصاصیت و حساسیت بالاتری است. اهمیت استفاده از روشهای سرولوژیکی هنگامی محسوس می‌شود که به دلایلی نتیجه آزمایش مشاهده میکروسکپی منفی شده و یا اینکه علائم اختصاصی آلودگی انگلی در بیمار مشاهده نشود(2،1). در چنین مواردی اغلب نتایج سرولوژیکی در سرنوشت بیمار مبنی برتشخیص بیماری، تجویز دارو و یا عمل جراحی کمک‌کننده است. علاوه بر اینها، در سالهای اخیر در اغلب آزمایشگاههای انگل‌شناسی جهان سعی می‌شود با استفاده از متدهای دقیق و حساس سرولوژیکی، بیماریهای انگلی را چه در مراحل اولیه آلودگی و چه در مراحل مزمن تشخیص دهند. از جمله روشهای تشخیصی سرولوژیکی رایج در تشخیص بیماریهای انگلی بر پایه واکنشهای آنتی ژنها و آنتی بادیهای مورد نظر می‌توان به روشهای ELISA مثل FAST-ELISA (4)، Dot-ELISA (6،5)، IFA، Immunoblotting ، CIMA، ECLIA و CLIA، RDTS (2،1) و LIPS (7) اشاره کرد.

حساسیت معیاری مهم برای تعیین کیفیت روشهای تشخیصی است. برخی از نتایج سرولوژیکی اختصاصیت نداشته و روشهای مولکولی از اختصاصیت بسیار بالاتری برخوردارند. به علت در دسترس نبودن کیتهای تجاری و روشهای استاندارد، نتایج حاصل از تشخیص بیماریهای انگلی از جمله Amebiasis، Cryptosporidiosis، Filariasis، Giardiasis،Malaria، Cysticercosis، Schistosomiasis و African trypanosomiasis در مناطق مختلف با یکدیگر متفاوت است. از طرفی بروز تغییر در ساختار ژنی انگلها تبعاتی به دنبال دارد که عدم اطلاع از آنها ممکن است با خسارات اقتصادی و بهداشتی زیادی همراه باشد. برای مثال نشان داده شده که Echinococcus granulosus دارای سویه‌های مختلفی است که از حیث اختصاصی بودن میزبان، همه‌گیری شناسی و ویژگیهای ریخت‌شناسی، بیوشیمیایی، فیزیولوژی و ژنتیک باهم اختلاف دارند. تکنولوژی مولکولی حضور انگل را براساس اجزا آنتی‌ژنیک و یا قطعاتی از DNA نشان می‌دهد. در آزمایشهای مولکولی عوامل محیطی که معمولا می‌توانند در نتایج حاصله ایجاد تداخل نمایند نقشی نداشته و در نتیجه حصول اطمینان از نتایج بسیار قابل اعتمادتر خواهد بود (9،8). روشهای مولکولی مورد استفاده جهت شناسایی انگلها شامل PCR (Polymerase chain reaction) (10)، RT-PCR (Real-time polymerase chain reaction) (12،11)، AFLP (Amplified fragment length polymorphism) (13)، LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) (14)، RAPD (Random amplified polymorphic DNA) (16،15)، NASBA (Nucleic acid sequence-based amplification) (17،18)، RFLP (Restriction fragment length polymorphism) (19)، Microsatellites (22-20)، Luminex xmap (23) است.

شایان ذکر است میزان حساسیت و اختصاصی بودن آزمایشها یکسان نبوده و استفاده از این روشها در مطالعات مختلف و تشخیص بیماری انگلی متفاوت می‌باشد. در حال حاضر در بین روشهای تکثیر اسیدهای نوکلئیک، روش PCR بیشترین کاربرد را دارد. استفاده از روشهای جدید و نوین در آزمایشگاههای تشخیصی می‌تواند باعث افزایش دقت و حساسیت آزمونهای تشخیصی شده و با بکارگیری این روشها و استفاده از تستهای مولکولی و بهره‌گیری از دستگاههای خودکار و پیشرفته امکان شناسایی انواع بیماریهای انگلی میسر می‌شود (12،3) تشخیص عفونت- های انگلی با توجه به اهمیت پزشکی و اقتصادی آن، یکی از مباحث مهم علم انگل‌شناسی است. پیرامون این هدف بشر پیوسته در تکاپوی رسیدن به تشخیص صحیح، سریع و با صرفه بوده است. با توجه به مشکلات تشخیصی عوامل عفونی انگلی از طریق روشهای میکروسکوپی و سرولوژیکی می‌توان از روشهای مولکولی به عنوان روشهای استاندارد طلایی تشخیص بیماریهای انگلی استفاده نمود (21). هدف مقاله حاضر مروری بر برخی تکنیکهای مولکولی مورد استفاده در انگل‌شناسی با تاکید بر ارزیابی و مزایای آنها است. برای این منظور با جستجوی جامع بیش از 400 مقاله در بازه 2017-1980 از پایگاه های علمـــــی قابل دسترس نظیر Web of Science، SID، Systematic Review، PubMed، Medline، Google Scholar، Scopus، Iran Medex و Magiran و با استفاده از

www.SID.ir

Archive of SID

کلید واژه‌های Molecular و Parasite Infection Techniques و معادلهای فارسی آن بـــه منظور دستیابی به مقالات مورد نظر انتخاب شد. مقالات مناسب و اطلاعات لازم از92 مقاله جهت نگارش مقاله جمع‌آوری و مورد استفاده قرار گرفت.

بررسی روشهای مولکولی در تشخیص عفونت های انگلی

در تشخیص آلودگیهای انگلی معمولی نیاز به یک میکروسکوپ، چشم مجرب و استفاده از ابزارهای تشخیص ایمنی است. بعضی مواقع امکان مشاهده انگلها توسط میکروسکوپ به دلیل وجود ارگانیسم یا سلولهای آلوده توسط آنها، در بخشهایی از بدن وجود ندارد. زیرا تهیه نمونه بدون صدمه به میزبان براحتی امکان‌پذیر نبوده و یا تعداد انگلها در جریان خون بسیار اندک است. حساسیت معیاری مهم برای تعیین کیفیت روشهای تشخیصی است. گاهی با چندین انگل که در مورفولوژی شباهت دارند مواجه می‌شویم که شناسایی آنها از یکدیگر مشکل است (1). با استفاده از آنتی‌بادیها گاهی تشخیص میان آلودگیهای جاری و گذشته ناممکن بوده و امکان ایجاد واکنشهای متقاطع بین آنتی‌ژنهای انگلهای مختلف وجوددارد. اگر فناوریهای ساده سبب براوردن نیازهای تشخیص گردد، بدیهی است که دلیلی برای استفاده از روشهای پیچیده وجود نخواهد داشت. اما در مطالعات اپیدمیولوژیکی، اغلب بکارگیری و استفاده از روشهای زیست‌شناسی مولکولی در محل اجتناب ناپذیراست. در برنامه‌های ریشه‌کنی یا مطالعات اپیدمیولوژیکی نشان دادن ناقلین، مخازن و میزان عفونت ناقلین حائز اهمیت فراوان است و همه اینها نیازمند تشخیص مستقیم انگلها است (2،1). به این دلیل کسب آگاهی اولیه نسبت به پیشرفتهای اخیر در مورد روشهای تشخیص مولکولی سودمند بوده و منجر به تشخیص اختصاصی آلودگیهای انگلی می شود. امروزه فناوریهای جدید DNA، ابزارهای با ارزشی برای یافتن انگلها و شناسایی آنها است و بر این اساس تلاشهای قابل توجهی تا به حال، جهت توسعه و حل مشکلات مربوط به ویژگی و حساسیت روشهای مولکولی به عمل آمده است (1). در ادامه چند تکنیک مورد استفاده در تشخیص مولکولی انگلها مورد بررسی قرار می‌گیرد.

1- واکنش زنجیره‌ای پلیمر از PCR: روش تکثیری PCR یکی از شناخته شده‌ترین روشهای تشخیص مولکولی است و تاکنون بر روی اغلب میکروارگانیسم‌ها بررسی شده است. روشهای مبتنی برPCR انقلابی در مطالعات و در شرایط آزمایشگاهی به دلیل نیاز به مقدار کمی از ماده DNA و تولیدحجم بیشتری از آن ایجاد نمود. این روش به علت سریع و ساده بودن و همچنین حساسیت و دقت بالایی که دارد، توانسته دراکثر آزمایشگاه های تشخیص طبی، جایگزین روشهای سنتی تشخیص بیماریها شود. اما یکی از معایب PCRعدم توانایی آن در ، شناسایی عوامل بیماریزای زنده از مرده است (24،10). بنابراین کارایی آن برای برخی مطالعات از جمله ارزیابی داروها محدود است. روش PCR تکثیر انتخابی از ژنومهای بزرگ و پیچیده را امکانپذیر می‌سازد. این تکنیک براساس روند باز شدن DNA دو رشته‌ای با استفاده ازحرارت و سپس کاهش آن انجام شده تا پرایمرها به رشته مکمل خود متصل و در هر دو جهت پرایمر با کمک آنزیم DNA پلیمر از مقاوم به حرارت طویل شده و تولید محصول دو رشته‌ای جدید می نمایند (24). روشهای مبتنی برPCR با روشهای دیگری مانند RFLP،RT-PCR و یا Nested PCR جهت ژنوتایپ ارگانیسم ترکیب شده است. حساسیت روش PCR بالاتر از روش میکروسکوپی بوده و برای تشخیص تعداد کم انگل در نمونه مدفوع مفید است و می‌تواند جایگزینی مناسب برای تشخیص پاتوژنهای خاص در مدفوع و خون باشد (25،10،24).

ازروش PCR جهت بررسی و تشخیص، تهیه کلون آنتی ژن جهت تهیه واکسن و بیان آن در Vector یوکاریوتی وپروکاریوتی، مطالعات اپیدمیولوژیک و نظارت بر روش درمان انگلهای غیر روده‌ای از جمله آلودگی به گونه‌های مختلف *Toxoplasma* (28-26)، *Cryptosporidium*(29)، *Plasmodium* (30،25)، *Leishmania* مانند Visceral Leishmaniasis (31) استفاده می‌شود. روش PCR درتشخیص انگلها به دلیل عدم امکان به دست آوردن و یا ایزوله کردن مقدار کافی انگل در مراحل مختلف چرخه زندگی آنها، می‌تواند قابل توجه باشد. Costa و همکاران درمطالعه‌ای در برزیل نشان دادند که تشخیص چندگونه پلاسمودیوم با روش اسمیر ضخیم غیرقابل اعتماد بوده و روش PCR می‌تواند ابزار مهمی برای تشخیص عفونت باشد (32). با وجود مزایای فناوری مبتنی بر PCR، مانند ویژگی و حساسیت در تشخیص برخی انگلها، وقت‌گیر بودن و فراهم نکردن داده‌های کمی از عدم برتری آن است (31). پیشرفتهای اخیر در روش مبتنی بر PCR، تکنیک-RT PCR است که با نتایج مفیدی همراه بوده و برای تشخیص

www.SID.ir

Archive of SID

پاتوژنها، بیان پروتئین، تنظیم ژن و جدایی آللی استفاده می‌شود (32).

2-روش Real-Time PCR : به طور کلی Real-Time PCR تکنیکی برای مشاهده بی‌وقفه‌ی پیشرفت واکنش PCR در طول زمان می‌باشد. با Real- Time PCR می‌توان مقادیر تولیدات RNA یا PCR (DNA,cDNA) را اندازه‌گیری نمود. ایده اولیه این روش، ابتدا توسط Higuchi و همکارانش ارائه شد که به مفهوم مشاهده لحظه به لحظه واکنش براساس میزان فلورسانت ساطع شده آن از واکنش و مشاهده و ثبت آن دریک Detector است (33).

روش Real-Time PCR انقلابی را در راه تشخیص مولکولی آزمایشگاه‌های بالینی باز کرده است. از آنجایی که اسیدنوکلئیک تکثیر یافته و مراحل تشخیص آن در یک محیط بسته انجام می‌شود ریسک آلودگی به عوامل محیطی و واکنشهای بعدی به طور قابل ملاحظه‌ای نسبت به روشهای کلاسیک و معمولی PCR کاهش می‌یابد. سرعت در انجام آزمایش، حذف مرحله ردیابی محصول پس از PCR مشاهده لحظه به لحظه واکنش و قطع آن در هر زمان، حساسیت و اختصاصیت بالا و انجام واکنش کمی و به دست آوردن میزان دقیق ژنوم و الگوی اولیه در روش Real-Time PCR باعث تحول عظیم در تشخیص مولکولی میکرو ارگانیسم‌ها، بررسی بیان ژنها، ارزیابی درمان، تشخیص، موتاسیونها، افتراق آللی و بسیاری از کاربردهای دیگر شده است (33). روش Real-Time PCR قادر به نظارت بر تولید محصول PCR در زمان واقعی است و می‌تواند توالی DNA موجود در نمونه و تعداد کپی‌های آن راشناسایی و تعیین نماید. با استفاده از روش Real-Time PCR می‌توان بار انگلی و شدت آلودگی و تعداد بسیار کم انگل را با دقت بالا تشخیص داد و در موارد پیگیری درمان بسیار مفید است (34،30). برتری روش Real-Time PCR نسبت به روشهای دیگر PCR شامل موارد زیر از جمله کاهش احتمال آلودگی ، سرعت، ویژگی، اندازه‌گیری کمی و استانداردسازی آسان آن است. در این روش از رنگهای فلوروسنت مثل SYBR Green، پروبهای TaqMan و انتقال انرژی رزونانس استفاده می‌شود (12،11). آلودگیهای متقاطعی که در روشهای معمولی PCR رخ می‌دهد با استفاده از Real Time PCR از بین رفته و نتایج دقیق‌تری حاصل می‌شود. با توجه به اینکه در Real-Time PCR از RNA سلول برای تعیین کمیت اسیدنوکلئیک انگلی و شناسایی ژن بیان شده در سلول استفاده می‌شود و برخلاف روشهای قبلی با استفاده از این روش می‌توان تعداد سلولهای زنده را به دقت محاسبه کرد (29). مطالعات تشخیصی زیادی با استفاده از روش Real-Time PCR بر روی لیشمانیا در زمینه تشخیص، مدلهای حیوانی، اثردرمانی داروها و ظرفیت ناقلین (35)، مالاریا در تشخیص موارد آلودگی کم و شناسایی چندگونه همزمان درظرف 3 ساعت و یا درمان دارویی (36)، تریپانوزوما، توکسوپلاسما (37) به ویژه در مبتلایان به ایدز، پلاسمودیوم ها (40-38) و دیگر انگلهای بیماریزا از جمله کریپتوسپوریدیوم و ژیاردیا در فاضلاب و نمونه‌های مدفوعی صورت گرفته است (13،11). علیرغم پاسخ سریع این روش، در حال حاضر به دلیل هزینه بالای آن به عنوان یک مکمل تشخیصی برای عفونتهای انگلی و بیشتر در کارهای تحقیقاتی از آن استفاده می شود.

3 - روش تکثیر هم دمایی به واسطه حلقه LAMP:

روشLAMP یک روش تکثیر اسیدنوکلئیک با حساسیت و ویژگی بسیار بالا برای تشخیص اختلافات تک نوکلئوتیدی است (12). این روش دارای یک DNA پلیمر از با حساسیت کم نسبت به مهار کننده‌ها و مجموعه‌ای از چهار آغازگر ویژه برای تشخیص شش رشته مختلف در ژن هدف، طراحی و تشکیل شده است (41). این روش قادر به تکثیر تعداد کم تا 10^9 نسخه از ماده ژنتیکی در کمتر از یک ساعت است. LAMP تکنیکی است که تکثیر DNA را با ویژگی بالا، حساسیت و سرعت، در شرایط همدمایی و با استفاده ازیک انکوباتور ساده (حمام آب یا بلوک بخاری) ممکن می‌سازد (42). از مزایای این روش نسبت به سایر روشهای مولکولی مانند PCR، انجام تمام واکنشها درداخل یک میکروتیوب و عدم نیاز به دستگاه ترموسایکلرو- الکتروفورزاست. در صورت واکنش و تکثیر ژن مورد نظر در دمای 65-60 درجه سانتیگراد ماده‌ای رنگی ایجاد شده که مثبت یا منفی بودن واکنش را نشان می‌دهد.

این ویژگی منحصر به فرد نه تنها موجب بازده بالاتر آن شده بلکه استفاده از ترموسایکلر حرارتی و چرخه‌های طولانی دماهای مختلف را مرتفع و در زمان صرفه‌جویی می‌شود (43). مهمترین مزیت آن کمتر بودن هزینه و ابزارهای لازم جهت تکثیر می‌باشد. ساختار ویژه پرایمرها و زیاد بودن تعداد آنها و داشتن نقاط آغازین (Priming) بیشتر برای DNA پلیمر از، باعث افزایش ویژگی واکنش و افزایش راندمان و سرعت تکثیر می‌شود. در مدت 90-15 دقیقه DNA به میزان 10^{10} برابر

www.SID.ir

Archive of SID

ازدیاد خواهد یافت و در نتیجه مقدار محصول تولید شده زیادتر می‌شود. محصول تولید شده DNA در میکروتیوبها را می‌توان با استفاده از رنگهای فلورسنس متصل شونده به DNA با تغییر رنگ و یا انباشته شدن محصولات جانبی (پیروفسفات) با ایجاد کدورت نمایان کرد. در این روش نیازی به روش پرزحمت الکتروفورز و استفاده از رنگ سرطانزای اتیدیوم بروماید نبوده و کمتر تحت تأثیر مهار کننده‌های موجود در نمونه- های کلینیکی می‌باشد. و برخلاف PCR لزوما نیازی به استخراج اسید نوکلئیک هدف نیست و مستقیما بر روی نمونه‌های کلینیکی (با حساسیت کمتر) قابل انجام است (43،44). با توجه به این ویژگیها و دسترسی ساده به LAMP به راحتی می‌توان از آن در آزمایشگاه‌های کوچک، به ویژه در مناطق بومی روستایی، استفاده نمود. انگل‌شناسان به تازگی ازاین روش در تشخیص بیماریهای مختلف انگلی از جمله Taenia (44) Cryptosporidium (45)، Entamoeba histolytica، (46) Plasmodium(47-49)، Leishmania، Toxoplasma ، Trypanosoma (50) ، Schistosoma (51)، میراسیدیوم موجود در حلزون میزبان واسط Schistosoma (52)، Fasciola hepatica وFasciola gigantica (53)، انگلهای حیوانی مانند Theileria (54)، Babesia و حتی پشه های حامل انگل Plasmodium (55) و Dirofilaria immitis (56) استفاده و آنها را شناسایی نموده اند. Nkouawa و همکاران در مقایسه LAMP و Multiplex PCR جهت تمایز افتراقی تنیاها در مدفوع بیماران مبتلا به تنیازیس نشان دادند که روشLAMP فاقد نتایج مثبت کاذب و دارای حساسیت بالاتر (88٪/4) نسبت به Multiplex PCR (37/2٪) است که نشان دهنده ارزش بالاتر آن در تشخیص مولکولی بیماری است (57). Ai و همکاران با آنالیز DNA فاسیولادرنرم تنان واسط و مدفوع بیماران نشان دادند که روش LAMP دارای حساسیت حدود ده برابری نسبت به روشهای مرسوم مانند PCR است. این یافته نشان داد که تشخیص و تمایز گونه‌های مختلف فاسیولا به خصوص در مناطق آندمیکی یک ابزار بالقوه کلینیکی است (53). Lau و همکاران نشان دادندکه با روش LAMP امکان تشخیص توکسوپلاسماگوندی درخون انسان با حساسیت بالای 85٪ نسبت به nested PCR 62/5٪ وجود دارد (58). Han و همکاران در رابطه با چهارگونه پلاسمودیوم انسانی (فالسیپاروم، ویواکس، مالاریه، اووالە) براساس ژن 18S rRNA نشان دادند که روش LAMPمی‌تواند این چهارگونه را بدون هیچ گونه واکنش متقاطع تشخیص داده و نسبت به روش nested PCR دارای حساسیت مشابه ولی ویژگی بیشتر و زمان پاسخ‌دهی کمتری است (48). با توجه به مطالعات انجام شده مبنی بر سادگی، بهبود در سرعت و حساسیت و ویژگی به دست آمده از روش LAMP می‌توان از آن به عنوان روش مناسب برای تشخیص معمول عفونت فعال در انسان به خصوص در مناطق روستایی جهت تشخیص بیماریهای عفونی انگلی استفاده نمود.

4- روش Luminex: این روش براساس bead-based xMAP تشکیل شده و ترکیبی از فلوسایتومتری، میکرواسفرهای فلوئورسنت، لیزر و پردازش سیگنالهای دیجیتال است که قابلیت سنجش و اندازه‌گیری تعداد زیادی آنالیت (تا 100) را در یک نمونه به طور همزمان دارد (59). در این روش میکرواسفرها به آنتی‌ژن، آنتی‌بادی و الیگونوکلوتیدها متصل شده و برای تشخیص ارگانیزم مورد نظر تشکیل یک پروب داده و می‌توان در یک واکنش چندین سلول و یا چندین ژنوتیپ یک میکروارگانیزم را بررسی و تنوع آنتی‌ژنتیکی آنها را تعیین نمود. تا به حال از این روش در تشخیص کریپتوسپوریدیوم، ژیاردیا (60،61) و پلاسمودیوم (62) استفاده شده است. دو گونه کریپتوسپوریدیوم هومینیس و پاروم از لحاظ ژنتیکی در ناحیه نوکلئوتید2 (ML-2) دارای تفاوت بوده و قابلیت تشخیص آنها با استفاده از آزمونهای آنتی‌ژنیک و یا سرولوژی امکانپذیر نمی‌باشد. تعیین توالیDNA یکی از ابزارهای تشخیصی است ولی پر هزینه، پرزحمت و وقت‌گیر می‌باشد. روش Luminex قادر است گونه‌های کریپتوسپوریدیوم هومینیس و پاروم را با استفاده از پروبهای اختصاصی اولیگونوکلئوتیدی ناحیه ML-2 هرگونه بدون نیاز به تعیین توالی DNA شناسایی نماید. این روش سریعتر و ارزانتر از PCR و تعیین توالی DNA بوده و حدودا 5 ساعته به نتیجه می‌رسد. روش ایمونوفلورسانس مستقیم به طورروتین جهت شناسایی Cryptosporidium و Giardia مورد استفاده قرار می‌گیرد و قادر به تمایز دو گونه کریپتوسپوریدیوم هومینیس و پاروم نیست ولی Luminex نسبت به آن دارای 100٪ اختصاصیت و بیشترین حساسیت است (59،60). Li و همکاران وMcNamara و همکاران نشان دادند که با روش Luminex می‌توان گونه‌های کریپتوسپوریدیوم و ژیاردیا را در نمونه‌های مدفوع و چهارگونه

www.SID.ir

Archive of SID

پلاسمودیومهای انسانی را به طور همزمان در خون تشخیص داد (60 ،62). این مطالعات نشان داد کهLuminex دارای سرعت، دقت، کم هزینه‌تر و قابل اطمینان‌تر از روشهای دیگر مولکولی از جمله PCR است (60 ،62).

5- روش RAPD : به طور کلی، RAPD روش مورد استفاده برای ترسیم گونه‌های میکروارگانیسم‌ها است. این روش مبتنی بر PCR و بر پایه تکثیر تصادفی توالیهای ژنومی است و به وسیلهٔ آن می‌توان نقشه‌برداری از ژنوم انگل را تهیه کرد(63،62). از مزیت این روش سرعت، سادگی و مقرون به صرفه بودن آن است و نیازی به اطلاعات قبلی از توالی DNA یا هیبریداسیون DNA وجود نداشته و کاربرد زیادی در مطالعات اپیدمیولوژی دارد (65،64). در این روش برخلاف روشهای استاندارد PCR از یک آغازگری به طول 10-9 نوکلئوتید که ردیف بازی آن به طور قراردادی تعیین می‌گردد، استفاده می‌شود (66،63). در این واکنش یک آغازگر منفرد نقاط مکمل خود را روی دو رشته DNA ژنومی نمونه پیدا و خود را در آن نقاط بر روی دو رشته DNA متصل می‌کند (67). از تفاوتهای الگوهای بدست آمده می‌توان برای مطالعات الگوی پلی‌مورفیسم DNA، تعیین روابط فیلوژنتیکی، تهیهٔ نقشه‌های ژنتیکی و غیره استفاده نمود (64). در روش مذکوربا استفاده از الگوی بدست آمده از باندهای DNA بررسی ژنوتیپ‌ها انجام و نیازی به تعیین توالی قطعات جدا شده نمی‌باشد (68). مطالعات نشان داده که با استفاده از این روش می‌توان گونه‌های مختلف انگل لیشمانیا را از یکدیگر افتراق داده و در ضمن مطالعه پلی- مورفیسم انگلهای با اهمیت در پزشکی مانند پلاسمودیوم و تریپانوزوم امکانپذیراست (69). از این تکنیک در میانمار، تایلند، سودان، مکزیک و دیگر کشورهای آسیایی، جهت تمایز گونه‌های بومی Wuchereria bancrofti (65، 16)، سوشهای Leishmania donovani(64) و Taenia solium درخوکها ودیگرانگلهای کرمی استفاده شده است(71-66). در ایران با استفاده از این روش امکان شناسایی ژنوتیپ 112 ایزوله Echinococcus granulosus در گوسفند، بز، گاو و شتر فراهم شد (72).

6-روشAFLP : این روش امکان بررسی پلی‌مورفیسم ایجاد شده در DNA را به محقق می‌دهد و نیازی به تعیین توالی ژن نیست. به دلیل آنالیز همزمان تعداد بسیار زیادی از باندهای اسید نوکلئیک از کارآمدی بالایی برخوردار است(13). این روش همانند PCR بطور انتخابی موجب تقویت قطعاتی اززنوم شده و از 4 مرحله هضم DNA، توسعه، تکثیر و در نهایت الکتروفورز روی ژل پلی‌اکریل آمید تشکیل شده است. مزایای این روش شامل مواردی از جمله توانایی جستجو در کل ژنوم برای بررسی پلی مورفیسم، تکرارپذیری روش، عدم نیاز به پروب، بالابودن دمای اتصال پرایمر به الگواست. با استفاده از این روش امکان شناسایی انگلی که در مورد آن، هیچ اطلاعات ژنتیکی قبلی وجود ندارد میسر می‌شود (74،73). مطالعات انجام شده کاربرد آن را درافتراق و تمایز گونه‌های لیشمانیای متعلق به cutaneous leishmaniasis (CL) و Visceral Leishmaniasis (75) و دو ژنوتیپ Cryptosporidium_parvum نشان داده است (13). اطلاعات بدست آمده از نشانگر AFLP و تجزیه و تحلیل نتایج، تشخیص و تمایز بین Cutaneous Leishmaniasis (CL) و Visceral Leishmaniasis (VL) وتنوع ژنتیکی بالا را در میان ژنوم گونه‌های major Leishmania، Leishmania tropica و Leishmania donovani نشان داده است (75).

7-روش RFLP: در حال حاضر روش RFLP یکی ازرایج‌ترین روشهای مولکولی مورد استفاده برای تشخیص گونه‌ها و ژنوتیپهای انگلهایی مانند توکسوپلاسما گوندی است (19). از این روش برای تشخیص تغییرات درسطح DNA استفاده می‌شود و اساس آن بر هضم محصولات PCR توسط آنزیمهای برشی است. این آنزیمها DNA را به قطعات مختلف شکسته و امکان شناسایی آن را برروی ژل آگاروز فراهم می‌نمایند (77،76). این روش مناسب نمونه‌های محیطی است و امکان تشخیص ژنوتیپهای متعدد را در آن نمونه می‌دهد. با استفاده از روش RFLP وجود الگوهای غیریکسان بر اثر هضم آنزیمی یک ناحیه و خاص از DNA بوسیله آنزیمهای محدودکننده مشخص می‌شود. این الگوهای غیریکسان به علت تفاوت DNA بسته به حضور یا عدم حضور جایگاه آنزیمهای محدودکننده بوجود می‌آید (30).

Molloy و همکاران در بررسی 1623 کودک بیمار، تنوع بالایی از آلودگی به گونه‌های کریپتوسپوریدیوم شامل کریپتوسپوریدیوم هومینیس، پاروووم، مله آگریدیس، ژنوتیپ خرگوش و کنیس را نشان دادند (78). زعیمی و همکاران با استفاده از این روش در ایران نشان دادند که امکان افتراق گونه‌های انگلی حیوانی درگوسفندان ازجمله Theileria lestoquardi

www.SID.ir

Archive of SID

، T. ovis و T. annulata وجود دارد (79).در مطالعات مولکولی مختلفی ازاین روش جهت شناسایی انگلهای Leishmania، Echinococcus، Fasciola، Dicrocoelium و تعدادی دیگرازانگلها استفاده شده است (30).

8- روش Microsatellites: روش Microsatellite یا قمرهای کوچک اصطلاحاً به توالیهای یکسانی که بر روی ژنوم انگل به صورت پراکنده وجود دارند، گفته می‌شود که با سایر موجودات متفاوت است.از این روش در انگشت نگاری DNA (DNA fingerprinting) استفاده می‌شود (80). Microsatellite ها یا ریزماهواره‌ها توالیهای کوتاهی از DNA (در حدود 300 جفت) است که از یک ردیف تکراری شامل 1 تا 6 نوکلئوتید تشکیل شده و تقریبا 1000 تکرار را در برداشته و در ژنوم یوکاریوتها فراوان بوده و می‌توانند دچار موتاسیون شده و به سرعت واحدهای تکراری خود را افزایش و یا کاهش دهند (80). چون Microsatellite ها چندشکلی بالائی دارند می‌توانند به آسانی در PCR ردیابی شوند. نقشه‌یابی ژن با این مارکر در موجوداتی مانند گاو که بیش از 400 Microsatellite شناخته شده دارند، سریعتر صورت می‌گیرد. باRFLP می‌توان هر دو الل یک مکان ژنی را مورد تجزیه و تحلیل قرار داد ولی با روش Microsatellite بندرت می‌توان یک قطعه خاص در حالت هموزیگوتی یا هتروزیگوتی را تعیین کرد. بعضی از مشکلات استفاده از روش Microsatelliteها یا ریزماهواره ها شامل مواردی از جمله عملیات شناسائی، تعیین توالی بازی، طراحی و ساخت آغازگرها، تهیه پیچیدگی زیاد و وقت و هزینه فوق‌العاده نقشه ژنتیکی آنها است. کاربرد و استفاده از ریز ماهواره‌ها به علت پلی‌مورفیسم بیش ازحد آنها فقط در رده‌بندیهای درون گونه‌ای پیشنهاد شده است. این عوامل در برخی از انگلهای مشترک انسان وحیوانات مورداستفاده قرارمی‌گیرند (20،21). با وجود سودمندی بالقوه Microsatellite های نشانگر، تنها برای بررسی پلی مورفیسم برخی از نما تودهای انگلی ازجمله تریکواسترونژیلوئیدس مورد استفاده قرار گرفته است (81).

9- روش NASBA: روش NASBA یک سیستم حساس تکثیری RNA بوده و برای رونویسی اختصاصی اسیدهای نوکلئیک مناسب است. این روش جهت پیگیری اثربخشی داروها، واکسنها، بیان ژنها و همچنین شناسایی میکرو ارگانیسمهای زنده قابل استفاده می‌باشد (82). واکنش رونویسی در دمای 41 درجه سانتیگراد انجام می‌شود. محصول تک رشته‌ای، هدف ایده‌آلی برای بررسی روشهای مختلف هیبریداسیون (Hybridization) است. در این روش بر خلاف سایر روشها مقادیر محصول RNA در سطح ، بالایی است. سه آنزیم به کار برده شده در این واکنش در شرایط مشابهی فعال می‌شوند. تمام RNA مبتنی بر سیستم NASBAدارای اختصاصیت بالایی است به طوری که در حضور DNAی ژنومی که به طور همزمان از سلول زنده جدا می‌شود، mRNA، به طور اختصاصی تکثیر یافته و بدون تأثیر از توالی می تواند اندازه‌گیری شود. وجود همین مزیتها در روشNASBA باعث شده تا بتواند جایگاه ویژه‌ای در شناسایی میکروارگانیسم‌ها پیدا کند. مزیت این روش نسبت به Real-time PCR در تکثیر مستقیم RNA انگل طی یک واکنش است (81، 83). از مزیتهای دیگراین روش نسبت به PCR عدم نیاز NASBA به دستگاه ترموسایکلر است زیر ا این روش تکثیری نیازی به چرخه‌های حرارتی ندارد (84). NASBA نسبت به PCR به تعداد چرخه های کمتری برای تکثیر نیاز دارد .وقتی از PCR استفاده می‌کنیم در هر مرحله قطعات دو برابر می‌شود و برای تکثیر حدود یک میلیون برابر حداقل 20 چرخه نیاز است اما در NASBA در هر مرحله رونویسی 100-1000 کپی RNA، تولید می‌شود و برای تکثیری حدود یک میلیون برابر حدود 4 تا 5 تکثیر لازم است (85). این روش برای تشخیص و ارزیابی اثربخشی داروهای ضد انگلی یک روش سریع، ارزان و کاربردی است. از این روش برای شناسایی ویروسها، باکتریها، قارچها و انگلها استفاده شده است. درحال حاضر برای تشخیص انگلهایی مانند Plasmodium falciparum(86)، Trypanosoma (87)، Cryptosporidium (88)، Toxoplasma (89) و Leishmania(90) کاربرد یافته است.

بحث

با توجه به اهمیت بیماریهای انگلی درانسان و دام، محققین با استفاده از علوم نوینی چون بیوتکنولوژی، نانوتکنولوژی گامهای بلندی در جهت تشخیص و کنترل بیماریها برداشته‌اند آگاهی از این روشهای تشخیصی اهمیت زیادی در شناسایی، پیشگیری و درمان این بیماریها خواهد داشت (91). از میان روشهای تشخیصی مختلف، روشهای میکروسکوپی علیرغم کاربرد وسیع آنها درمناطق مختلف به دلیل عدم افتراق گونه‌های مختلف انگلها ازجمله آمیبها و روشهای سرولوژیکی به دلایل گوناگون از جمله عدم تفکیک عفونت فعلی از گذشته و واکنشهای متقاطع و غیره کارآیی لازم را ندارند. در

www.SID.ir

Archive of SID

بیماریهای انگلی و درعفونتهای شدید تشخیص داده شده با روشهای سنتی امکان کنترل بیماری با داروهای تک دوز وجود دارد (92).ولی درافراد آلوده غیرحساس به روشهای تشخیصی سنتی امکان افزایش میزان مرگ و میر در آنها وجود داشته و لذا نیاز به روشهای حساستر و کارآمدتر تشخیصی از جمله روشهای مولکولی وجود دارد با توجه به این موارد و به منظور غلبه بر محدودیتهای این آزمایشات، روشهای مولکولی توسعه یافته است (30). مطالعات نشان داده که روشهای مولکولی بسیار موثرتر و حساستری برای تشخیص عفونتهای انگلی، صرفنظر از نوع عفونت و نمونه مورد بررسی وجود دارند. این آزمایشات در مطالعات حیوانی، اثر داروها و ظرفیت حاملها مورد استفاده قرار می‌گیرند (34). روشهای مولکولی بسیار خاص وحساس بوده و جایگزین مناسب روش میکروسکوپی است. هرچند روش میکروسکوپی هنوز به عنوان استاندارد طلایی برای شناسایی انگلها محسوب می‌شود. برخی ازاین روشهای متنوع و با ارزش، روشهای کمک‌کننده به تشخیص و تمایز گونه‌ها و حتی نظارت‌کننده بر درمان بوده و در نتیجه یک ابزار امیدوارکننده‌ای جهت کمک به تشخیص بالینی است. این مطالعه به برخی ازروشهای مولکولی مورداستفاده درشناسایی انگلها و مزایا و معایب آنها اشاره شده است.

روش تکثیری PCR سریع و ساده و دارای حساسیت و دقت بالا و در اکثر آزمایشگاه‌های تشخیص طبی، جایگزین روشهای سنتی تشخیص بیماریها شده است. حساسیت روش PCR بالاتر از روش میکروسکوپی است و برای تشخیص تعداد کم انگل در نمونه مدفوع مفید است (11) از معایب آن می‌توان به عدم توانایی آن در شناسایی عوامل بیماریزای زنده از مرده اشاره نمود (24). بنابراین کارایی آن برای برخی از مطالعات از جمله ارزیابی داروها محدود است. مزایای روش Real-Time PCR سرعت انجام آزمایش، حذف مرحله ردیابی محصول پس از PCR، مشاهده لحظه به لحظه واکنش و قطع آن در هر زمان، حساسیت و اختصاصیت بالا و انجام واکنش کمی و بدست آوردن میزان دقیق ژنوم و الگوی اولیه است (33). این روش قادر به نظارت بر تولید محصول PCR در زمان واقعی است. با استفاده از این روش می‌توان تعداد بسیار کم انگل را با دقت بالا تشخیص داد (30). در این روش توالی DNA موجود در نمونه شناسایی و همچنین تعداد کپی‌های آن تعیین می‌شود. این روش کمی PCR به منظور تعیین بار انگلی و شدت آلودگی مورد استفاده قرار می‌گیرد و در موارد پیگیری درمان بسیار مفید است (33). برتری روش Real-Time PCR نسبت به روشهای دیگر PCR شامل موارد زیر از جمله کاهش احتمال آلودگی، سرعت، ویژگی، اندازه‌گیری کمی و استانداردسازی آسان آن است.

روش LAMP نسبت به سایر روشهای مولکولی مانند PCR دارای مزیتهایی از جمله انجام تمام مراحل واکنش در داخل یک میکروتیوب وعدم نیاز به دستگاه ترموسایکلرو الکتروفورزاست. این ویژگی منحصر به فرد نه تنها موجب بازده بالاتر آن شده بلکه توانسته استفاده از ترموسایکلر حرارتی و چرخه‌های طولانی دماهای مختلف را مرتفع نموده و در زمان صرفه جویی شود (41). با روشLAMP در مدت 90-15 دقیقه میزان DNA دهها برابر افزایش یافته و در نتیجه مقدار محصول تولید شده زیادتر می‌شود. در این روش نیازی به روش پرزحمت الکتروفورز و استفاده از رنگ سرطانزای اتیدیوم بروماید نبوده وکمتر تحت تأثیر مهار کننده‌های موجود در نمونه‌های کلینیکی است. و برخلاف PCR لزوما نیازی به استخراج اسید نوکلئیک هدف نیست و مستقیما بر روی نمونه‌های کلینیکی (با حساسیت کمتر) قابل انجام است.با توجه به این ویژگیها و دسترسی ساده به LAMP به راحتی می‌توان از آن در آزمایشگاههای کوچک موجود، به ویژه در مناطق بومی روستایی، استفاده نمود و این به نظر یک روش و ابزار امیدوارکننده است. مهمترین مزیت آن کمتر بودن هزینه و ابزارهای لازم جهت تکثیر می‌باشد (1). انگل‌شناسان به تازگی از این روش در تشخیص بیماریهای مختلف انگلی استفاده می نمایند.

روش Luminex هم دارای سرعت، دقت، هزینه کمتر و قابل اطمینان تر از روشهای دیگر مولکولی ازجمله PCR است (59). این روش سریعتر و ارزانتر از PCR بوده و می‌توان در حدود 5 ساعت توالی DNA را تعیین نمود. در روش NASBA بر خلاف سایر روشها مقادیر محصول RNA در سطح، بالایی است. تکثیر مستقیم RNA انگل در طی یک واکنش از مزیت این روش نسبت به Real time PCR ، است (80). از مزیتهای دیگر این روش نسبت به PCR عدم نیاز آن به دستگاه ترموسایکلر و چرخه‌های حرارتی زیاد برای تکثیر است(81). درروش PCR در هر مرحله قطعات دو برابر شده و برای تکثیر حدود یک میلیون برابر از محصول، حداقل به 20چرخه نیاز است اما در NASBA در هر مرحله رونویسی 1000 -100 کپی RNA، تولید می شود و برای تکثیر حدود یک میلیون برابر حدود 4 تا 5 چرخه لازم است (82). این روش برای تشخیص و ارزیابی اثربخشی داروهای ضد انگلی یک روش سریع، ارزان و کاربردی است. از این روش می‌توان جهت پیگیری اثربخشی داروها، واکسنها، بیان

www.SID.ir

Archive of SID

ژنها و همچنین شناسایی میکروارگانیسمهای زنده استفاده نمود (78). روشهای مولکولی در مطالعات مهم اپیدمیولوژیکی ازجمله تنوع ژنتیکی جمعیتها، توزیع جغرافیایی بیماریهای انگلی، استعداد ابتلا به عفونت، جهشها، ارتباط بین میزبان و تظاهرات بالینی قابل بررسی است(30). بنابراین امکان درک بهتر از رفتار یک بیماری در بین جمعیت میسر می‌شود.

با استفاده از روش RAPD قابلیت نقشه‌برداری از ژنوم انگل وجود دارد. از مزیت این روش سرعت، سادگی و مقرون به صرفه بودن آن است و به اطلاعات قبلی ازتوالی DNA یا هیبریداسیون DNA نیازی نیست و کاربرد زیادی در مطالعات اپیدمیولوژی دارد (63). روش AFLP شامل مزایایی از جمله امکان توانایی جستجو در کل ژنوم انگل برای بررسی پلی مورفیسم، تکرارپذیری روش، عدم نیاز به پروب و بالابودن دمای اتصال پرایمر به الگو است. با استفاده از این روش می‌توان انگلی را که هیچ اطلاعات ژنتیکی قبلی درباره آن وجود ندارد شناسایی نمود (75،73). از روش RFLP برای تشخیص گونه‌ها و ژنوتیپهای انگلی و تغییرات در سطح DNA استفاده می‌شود (19). اساس این روش بر هضم محصولات PCR توسط آنزیمهای برشی است. این آنزیمها DNA را به قطعات مختلف شکسته وامکان شناسایی آن بر روی ژل آگاروز فراهم می‌شود (76). این روش مناسب نمونه‌های محیطی است و امکان تشخیص ژنوتیپهای متعدد در نمونه فراهم می‌شود. با استفاده از روش RFLP وجود الگوهای غیریکسان بر اثر هضم آنزیمی یک ناحیه خاص از DNA بوسیله آنزیمهای محدودکننده مشخص می‌شود (30). با روش RFLP می‌توان تجزیه و تحلیل هر دو آلل یک مکان ژنی را مورد بررسی قرار داد ولی با روش Microsatellites بندرت امکان تعیین حالت هموزیگوتی یا هتروزیگوتی یک قطعه خاص وجود دارد. از معایب استفاده از روش میکروساتلیت یا ریزماهواره ها می‌توان به روند عملیاتی شناسائی، تعیین توالی بازی، طراحی و ساخت آغازگرها و تهیه نقشه ژنتیکی بسیار پیچیده به دلیل صرف وقت و هزینه فوق‌العاده آنها اشاره نمود (20).

نتیجه گیری

استفاده از دانش مولکولی و ابزارهای آن در تحقیقات انگل‌شناسی اجتناب‌ناپذیر است. آموزش و کاربرد آنها و سایر روشهای جدید باید در سرفصل دروس انگل‌شناسی باشد. با توجه به مطالب ارائه شده می‌توان نتیجه‌گیری نمود که اگرچه هزینه بالا هنوز هم یک عامل محدودکننده جهت استفاده از روشهای مولکولی است. ولی این آزمونها برای تشخیصهای بالینی، نظارتهای درمانی و مطالعات اپیدمیولوژیک بیماریهای انگلی درسرتاسردنیا مورد استفاده قرارمی گیرند. استفاده از آنها اطلاعات دقیقی از مرفولوژی، ویژگیهای ژنتیکی و رفتار بیماریهای انگلی ایجاد شده در جمعیت را فراهم می‌نمایند. لذا به نظر می‌رسد آگاهی از این روشهای تشخیصی مولکولی و توسعه و کاربرد آنها می‌تواند علاوه بر تشخیص صحیح و زودرس عامل عفونت از مصرف بی‌رویه و نادرست دارو و ایجاد سوشهای مقاوم به دارو جلوگیری نموده و در نتیجه در تشخیص، پیشگیری و درمان بیماریها اهمیت زیادی خواهدداشت.

سپاسگزاری

از کلیه اساتید و پژوهشگران دانشگاه علوم پزشکی بقیه اله (عج) که در انجام این مطالعه با ما همکاری نموده‌اند، قدردانی و تشکر می‌نمایم.

www.SID.ir

Archive of SID

REFERENCES

1. Ndao M. Diagnosis of Parasitic Diseases: Old and New Approaches. Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases 2009; 2(15):1-15.
2. .Marti H,Hatz CF.Diagnosis of parasite infections.Significance of serological examinations Internist(Berl)2006;47(8):786-792.
3. Kompalic-Cristo A, Britto C, Fernandes O. Diagnósti¬co molecular da toxoplasmose. J Bras Patol Med Lab. 2005; 41(4): 229-35.
4. Hancock K, Tsang V. C. W. Development and optimization of the FAST-ELISA for detectin antibodies to Schistosoma mansoni. Journal of Immunological Methods1986; 92(2): 167–176.
5. Pappas M. G, Hajkowski R, Hockmeyer W. T, Dot enzyme-linked immunosorbent assay (Dot-ELISA): a microtechnique for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis.Journal of Immunological Methods 1983; 64(1): 205–214.
6. Pappas M. G, Recent applications of the Dot-ELISA in immunoparasitology. Veterinary Parasitology 1988; 29(2): 105–129.
7. Shokoples S. E, Ndao M., Kowalewska-Grochowska K S. K. Yanow.Multiplexed real-time PCR assay for discrimination of Plasmodium species with improved sensitivity for mixed infections. Journal of Clinical Microbiology 2009; 47(4): 975-980.
8. Burbelo P. D, Goldman R, Mattson T.L.A simplified immunoprecipitation method for quantitatively measuring antibody responses in clinical sera samples by using mammalian-produced Renilla luciferase-antigen fusion proteins.BMC Biotechnology 2005; 10.1186/1472-6750-5-22.
9. Andrew Thompson R.C, McManus D.P. Towards a taxonomic revision of the genus Echinococcus. Trends in Parasitol 2002:18(10), 452-457.
10. Jardim EAGV, Linhares GFC, Torres FAG, Araújo JLB, Barbosa SM. Diferenciação específica entre Taenia saginata e Taenia solium porensaiode PCR e duplex- PCR. Ciênc Rural 2006; 36(1): 166-72.
11. Guy RA, Xiao C,Horgen PA.Real-time PCR assay for detection and genotype differentiation of Giardia lamblia in stool specimens.J Clin Microbiol 2004; 42(7) :3317-20.
12. Muldrew K. L.Molecular diagnostics of infectious diseases.Current Opinion in Pediatrics 2009; 21(1): 102–111.
13. Blears MJ, Pokorny NJ, Carreno RA, Chen S, De Grandis SA, Lee H, et al. DNA fingerprinting of *Cryptosporidium parvum* isolates using amplified fragment length polymorphism (AFLP). J Parasitol 2000; 86(4): 838-41.
14. Parida M. M, Sannarangaiah S. Rao Dash P. K, P. V. L. Morita K.Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious Disease. Reviews inMedical Virology 2008; 18(6): 407-421.
15. Gill P, Ghaemi A. Nucleic acid isothermal amplification technologies: a review. Nucleosides Nucleotides Nucleic acids 2008; 27 (3): 224-243.
16. Nuchprayoon S, Junpee A, Poovorawan Y. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) for differentiation between Thai and Myanmar strains of *Wuchereria bancrofti*. Filaria Journal 2007; 6: 6.

www.SID.ir

Archive of SID

17. Chan AB, Fox JD. NASBA and other transcription-based amplification methods for research and diagnostic microbiology. Rev Med Microbiol 1999; 10: 185-196.
18. Deiman B, van Aarle P, Sillekens P. Characteristics and applications of nucleic acid sequence-based amplification (NASBA). Mol Biotechnol 2002; 20(2): 163-7.
19. Quan JH, Kim TY, Choi IU, Lee YH. Genotyping of a Korean isolate of *Toxoplasma gondii* by multilocus PCR-RFLP and microsatellite analysis. Korean J Parasitol 2008; 46(2):105-8.
20. Temperley ND, Webster LM, Adam A, Keller LF, Johnson PC. Cross-species utility of microsatellite markers in Trichostrongyloid nematodes. J Parasitol. 2009; 95(2): 487-9.
21. Gasser RB. Molecular tools – advances, opportunities and prospects Vet Parasitol 2006; 136(2): 69-89.
22. Portela-Lindoso AAB, Shikanai-Yasuda MA. Doença de Chagas crônica: do xenodiagnóstico e hemocultura à reação em cadeia da polimerase. Rev Saúde Pública 2003; 37(1): 107-15.
23. Dunbar SA. Applications of Luminex xMAP technology for rapid, high-throughput multiplexed nucleic acid detection. Clin Chim Acta 2006; 363 (1-2): 71-82.
24. 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.
25. Moody AH,Chiodini PL.Methods for the detection of blood parasites.Clin.Lab.Haem2000;22:189-202.
26. 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.
27. .Sobati H, Dalimi AB, Kazemi B, Ghafarifar F.Production SAG3 antigen surface clone of *Toxoplasma gondii* in eukaryotic expression vector. IRANIAN JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES AND TROPICAL MEDICINE 2011; 16 (52): 7 -13. [Persian].
28. Sobati H, Dalimi AB, Kazemi B, Ghafarifar F.Expression SAG3 antigen surface of *Toxoplasma gondii* in eukaryotic cell. IRANIAN JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES AND TROPICAL MEDICINE 2012; 17 (56): 21-26. [Persian]
29. Sobati H, Jasor H, Honari H.Expression of the protein gp40/15 *Cryptosporidium parvum* in E. coli. FEYZ, Journal of Kashan University of Medical Sciences 2016; 20(1). [Persian]
30. Tavares RG, Staggemeier R, Borges ALP, Rodrigues MT, Castelan LA, Vasconcelos J, Anschau ME , Spalding SM. Molecular techniques for the study and diagnosis of parasite infection The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases 2011; 17(3): 239-248.
31. Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. Rev Bras Epidemiol 2004; 7(3): 338-49.
32. .Costa MRF, Vieira PPR, Ferreira CO, Lacerda MVG, Alecrim WD, Alecrim MGC. Diagnóstico molecular da malária em uma unidade de atenção terciária na Amazônia Brasileira. Rev Soc Bras Med Trop 2008; 41(4): 381-5.
33. Higuchi R,Fockler C,Dollinger G,Watson R. kinetic PCR Analysis:Realtime monitoring of DNA amplification reactions. Biotechnology 1993;11: 1026-1030.
34. .Espy MJ, Uhl JR, Sloan M, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter JDC, et al. Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. Clin Microbiol Rev 2006; 19(1): 165-256.

www.SID.ir

Archive of SID

35. .Mosqueda J, Olvera-Ramírez A, Aguilar-Tipacamú G, Cantó GJ. Current Advances in detection and treatment of Babesiosis. Current Med Chemist 2012; 19(10): 1504-1518.
36. Talmi-Frank D, Nasereddin A, Schnur LF, Schönian G, Töz SO, Jaffe CL, et al. Detection and identification of old world Leishmania by high resolution melt analysis. PLoS Negl Trop Dis 2010; 4(1): e581.
37. 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.
38. Rougemont M, Van Saanen M, Sahli R, Hinrikson HP, Bille J, Jaton K. Detection of four Plasmodium species in blood from humans by 18S rRNA gene subunitbased and species-specific real-time Assay. J Clin Microbiol 2004; 42(12): 5636–5643.
39. Shokoples SE, Ndao M, Kowalewska-Grochowska K, Yanow SK. Multiplexed real-time PCR assay for discrimination of Plasmodium species with improved sensitivity for mixed infections. J Clin Microbiol 2009; 47(4): 975-80.
40.Farcas GA, Soeller R, Zhong K, Zahirieh A, Kain KC. Real-time polymerase chain reaction assay for the rapid detection and characterization of chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in returned travelers. Clin Infec Dis 2006; 42(5): 622-7.
41. Paris DH, Imwong M, Faiz AM, Hasan M, Yunus EB, Silamut K, et al. Loop-mediated isothermal PCR (LAMP) for the diagnosis of falciparum malaria. Am J Trop Med Hyg 2007; 77(5): 972-6.
42. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res 2000; 28(12): E63.
43. Mori Y, Nagamine K, Tomita N, Notomi T. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. Biochem Biophys Res Commun 2001; 289(1):150-4.
44. Nkouawa A, Sako Y, Nakao M, Nakaya K, Ito A. Loop-mediated isothermal amplification method for differentiation and rapid detection of Taenia species. J Clin Microbiol 2009; 47(1): 168-74.
45. Bakheit MA, Torra D, Palomino LA, Thekisoe OM, Mbati PA, Ongerth J, et al. Sensitive and specific detection of Cryptosporidium species in PCR negative samples by loop-mediated isothermal DNA amplification and confirmation of generated LAMP products by sequencing. Vet Parasitol 2008; 158(1- 2): 11-22.
46. Liang SY, Chan YH, Hsia KT, Lee JL, Kuo MC, Hwa KY, et al. Development of loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Entamoeba histolytica*. J Clin Microbiol 2009; 47(6): 1892-5.
47. Poon LLM, Wong BWY, Ma EHT, Chan KH, Chow LMC, Abeyewickreme W, et al. Sensitive and inexpensive molecular test for falciparum malaria: defecting *Plasmodium falciparum* DNA directly from heat-treated blood by loop-mediated isothermal amplification. Clin Chem 2006; 52(2): 303-6.
48. Han ET, Watanabe R, Sattabongkot J, Khuntirat B, Sirichaisinthop J, Iriko H, et al. Detection of four Plasmodium species by genus- and species-specific loop-mediated isothermal amplification for clinical diagnosis. J Clin Microbiol 2007; 45(8): 2521-8.
49. Pöschl B, Waneesorn J, Thekisoe O, Chutipongvivate S, Karanis P. Comparative diagnosis of malaria infections by microscopy, nested PCR, and LAMP in northern Thailand. Am J Trop Med Hyg 2010; 83(1): 56-60.
50. Njiru ZK, Mikosza ASJ, Matovu E, Enyaru JCK, Ouma JO, Kibona SN, et al. African trypanosomiasis: sensitive and rapid detection of the sub-genus Trypanozoon by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of parasite DNA. Int J Parasitol 2008; 38(5): 589-99.

www.SID.ir

Archive of SID

51. Kumagai T, Furushima-Shimogawara R, Ohmae H, Wang TP, Lu S, Chen R, et al. Detection of early and single infections of Schistosoma japonicum in the intermediate host snail, Oncomelania hupensis, by PCR and loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. Am J Trop Med Hyg 2010; 83(3): 542-8.
52. Abbasi I, King CH, Muchiri EM, Hamburger J. Detection of Schistosoma mansoni and *Schistosoma haematobium* DNA by loop-mediated isothermal amplification: identification of infected snails from early prepatency. Am J Trop Med Hyg 2010; 83(2): 427- 32. 50.
53. Ai L,Li C, Elsheikha HM, Hong SJ, Chen JX, Chen SH,et al.Rapid identification and differentiation of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* by a loopmediated isothermal amplification (LAMP) assay. Vet Parasitol 2010; 174(3-4): 228-33.
54. Wang LX, He L, Fang R, Song QQ, Tu P, Jenkins A, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for detection of *Theileria sergenti* infection targeting the p33 gene. Vet Parasitol 2010; 171(1- 2):159-62.
55. Aonuma H, Suzuki M, Iseki H, Perera N, Nelson B, Igarashi I, et al. Rapid identification of Plasmodium-carrying mosquitoes using loop-mediated isothermal amplification. Biochem Biophys Res Commun 2008; 376(4): 671-6.
56. Aonuma H, Yoshimura A, Perera N, Shinzawa N, Bando H, Oshiro S, et al. Loop-mediated isothermal amplification applied to filarial parasites detection in the mosquito vectors: Dirofilaria immitis as a study model. Parasit Vectors 2009; 2(1):15.
57. Nkouawa A, Sako Y, Li T, Chen X, Wandra T, Swastika IK, Nakao M, et al. Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method using fecal specimens for differential detection of Taenia species from humans. J Clin Microbiol 2010; 48(9): 3350-2.
58. Lau YL, Meganathan P, Sonaimuthu P, Thiruvengadam G, Nissapatorn V, Chen Y. Specific, sensitive, and rapid diagnosis of active toxoplasmosis by a loop-mediated isothermal amplification method using blood samples from patients. J Clin Microbiol 2010; 48(10): 3698-702.
59.Luminex Corporation [Internet]. In: xMAP Technology. [cited 2010 Jun 01] Available from: http:// www.luminexcorp.com.
60.Li W, Zhang N, Gong P, Cao L, Li J, Su L, et al. A novel multiplex PCR coupled with Luminex assay for the simultaneous detection of Cryptosporidium spp., *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis*. Vet Parasitol 2010; 173(1-2): 11-8.
61.Bandyopadhyay K, Kellar KL, Moura I, Casaqui Carollo MC, Graczyk TK, Slemenda S, et al. Rapid microsphere assay for identification of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* in stool and environmental samples. J Clin Microbiol 2007; 45(9): 2835-40.
62.McNamara DT, Kasehagen LJ, Grimberg BT, ColeTobian J, Collins WE, Zimmerman PA.Diagnosing infection levels of four human malaria parasite species by a polymerase chain reaction/ligase detection reaction fluorescent microsphere-based assay. Am J Trop Med Hyg 2006; 74(3): 413-2.
63.Jain SK, Neekhra B, Pandey D, Jain K. RAPD marker system in insect study: a review. Indian J Biotechnol 2010; 9(1): 7-12.
64.Alimoradi S, Hajjaran H, Mohebali M, Mansouri F. Molecular identification of Leishmania species isolated from human cutaneous leishmaniasis by RAPD-PCR. Iranian J Publ Health 2009; 38(2): 44-50.
65.Nuchprayoon S, Junpee A, Poovorawan Y. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) for differentiation between Thai and Myanmar strains of *Wuchereria bancrofti*. Filaria J 2007; 6(1): 6.

www.SID.ir

Archive of SID

66.Lupchinski JR E, Vargas L, Ribeiro RP, Moreira HLM, Valentim M, Povh JA. A importancia da utilizacao da técnica RAPD para a identificaçao de dactilogirideos em tilapias do Nilo. (Oreochromis niloticus). Arq Cienc Vet Zool Unipar 2006; 9(1): 49-57.

67.Jobet E, Bougnoux ME, Morand S, Rivault C, Cloarec A, Hugot JP. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) for generating specific DNA probes for oxyuroid species (Nematoda). Parasite 1998; 5(1): 47- 50.
68.Martinez EM, Correia JA, Villela EV, Duarte AN, Ferreira LF, Bello AR. Random amplified polymorphic DNA analysis of DNA extracted from *Trichuris trichiura* (Linnaeus, 1771) eggs and its prospective application to paleoparasitological studies. Mem Inst Oswaldo Cruz 2003; 98 Suppl 1:59-
69.Hajjaran H, Mohebali M, Razavi MR, Rezaei S, Kazemi B, Edrissian GhH. Identification of Leishmania species isolated from human cutaneous Leishmaniasis, using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD-PCR). Irian J Publ Health 2004; 33(4): 8-15.
70.Hamad SH, Khalil EA, Musa AM, Ibrahim ME, Younis BM, Elfaki ME, et al. *Leishmania donovani*: genetic diversity of isolates from Sudan characterized by PCR-based RAPD. Exp Parasitol 2010; 125(4): 389-93.
71.Bobes RJ, Fragoso G, Reyes-Montes Mdel R, Duarte-Escalante E, Vega R, de Aluja AS, et al. Genetic diversity of *Taenia solium* cysticerci from naturally infected pigs of central Mexico. Vet Parasitol 2010; 168(1-2): 130-5.
72.Sharbatkhori M, Mirhendi H, Harandi MF, Rezaeian M, Mohebali M, Eshraghian M, et al. *Echinococcus granulosus* genotypes in livestock of Iran indicating high frequency of G1 genotype in camels. Exp Parasitol 2010; 124(4): 373-9.
73.Buttow MV, Castro CM, Schwartz E, Tonietto A, Barbieri RL. Caracterizacao molecular de populacoes de Butia capitata (Arecaceae) do Sul do Brasil através de marcadores AFLP. Rev Bras Frutic 2010; 32(1): 230-9.
74.Bonin A, Ehrich D, Manel S. Statistical analysis of amplified fragment length polymorphism data: a toolbox for molecular ecologists and evolutionists Mol Ecol 2007; 16(18): 3737-58.
75.Kumar A, Boggula VR, Misra P, Sundar S, Shasany AK, Dube A. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis is useful for distinguishing Leishmania species of visceral and cutaneous forms. Acta Trop 2010; 113(2): 202-6.
76.Carpentieri-Pipolo V, Gallo-Meagher M, Dickson DW, Gorbet DW, Mendes ML, de Souza SGH. Comparacao entre metodos de marcacao da sonda de RFLP R2430E utilizada na selecao de cultivares de amendoim resistente a Meloidogyne arenaria. Cienc Agrár 2008; 29(4): 783-8.
77.Huber F.Caracterizacao genotípica e estudo filogenético de Cryptosporidium spp.obtidos de diferentes hospedeiros [dissertation].Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 2007. 72.
78.Molloy SF, Smith HV, Kirwan P, Nichols RA, Asaolu SO, Connelly L, et al. Identification of a high diversity of Cryptosporidium species genotypes and subtypes in a pediatric population in Nigeria. Am J Trop Med Hyg 2010; 82(4): 608-13.

www.SID.ir

Archive of SID

79.Zaeemi M, Haddadzadeh H, Khazraiinia P, Kazemi B, Bandehpour M. Identification of different Theileria species (*Theileria lestoquardi*, *Theileria ovis*, and *Theileria annulata*) in naturally infected sheep using nested PCR-RFLP. Parasitol Res 2011; 108(4): 837-43.
80.Oliveira EJ, Padua JG, Zucchi MI, Vencovsky R, Vieira MLC. Origin evolution and genome distribution of microsatellites. Genet Mol Biol 2006; 29(2): 294-307.
81.Johnson PC, Webster LM, Adam A, Buckland R, Dawson DA, Keller LF. Abundant variation in microsatellites of the parasitic nematode *Trichostrongylus tenuis* and linkage to a tandem repeat. Mol Biochem Parasitol 2006; 148(2): 210-8.
82.Deiman B, van Aarle P, Sillekens P.Characteristics and applications of nucleic acid sequence-based amplification (NASBA). Mol Biotechnol 2002; 20(2): 163-79.
83.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.
84.Deiman B, Aarle P, Sillekens P. Characteristics and applications of Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA). Mol Biotechnol 2002; 20(2): 163-79.
85.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.
86.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.
87.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.
88.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.
89.Cultrera R, Seraceni S, Contini C. Efficacy of a novel reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for detecting *Toxoplasma gondii* bradyzoite gene expression in human clinical specimens. Mol Cell Probes 2002; 16(1): 31-9.
90.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]
91.Martinez-Palomo A, Martinez-Baez M.Selective primary health care: strategies for control of disease in the developing world. X.Amebiasis. Rev Infect Dis 1983; 5(6): 1093-1102.
92.Gomes LI, Dos Santos Marques LH, Enk MJ, de Oliveira MC, Coelho PM, Rabello A. Development and evolution of sensitive PCR-ELISA System for detection of Schistosoma infection in feces. PLoS Negl Trop Dis 2010; 4(4): e664.

www.SID.ir