

کاربرد روشهای مولکولی در تشخیص عوامل انگلی

حسین نباتی^{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

پذیرش برای چاپ: آبان نود و هفت

دریافت مقاله: شهریور نود و هفت

چکیده

سابقه و هدف: در انگل شناسی، 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 انگل شناسی تمرکز یافته اند. 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 می شود. 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 *ScienceDirect, Google Scholar, PubMed, IranMedex, Scopus, SID, Magiran* و کتابهای مرجع انگل شناسی انتخاب نموده ایم. نهایتا اطلاعات لازم از 92 مقاله جهت مطالعات بیشتر انتخاب شد.

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

نتیجه گیری: روشهای مولکولی ارزیابی جامع تری را در تشخیص، درمان و مطالعات اپیدمیولوژیک بیماریهای انگلی و نهایتا کنترل مرگ و میر ناشی از عفونتهای انگلی فراهم می کنند.

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

مقدمه

روشهای معمول تشخیص آزمایشگاهی در انگل شناسی، مشاهده میکروسکوپی برای شناسایی مرفولوژیکی انگلها است. استفاده از روشهای معمول انگل شناسی نیاز به معرف و تجهیزات گران قیمت نداشته و با یک کاربر آشنا به میکروسکوپ می توان آن را انجام داد. از جمله محدودیتها و مشکلات روشهای میکروسکوپی بعنوان ابتدایی ترین روش تشخیص آزمایشگاهی، وابستگی درستی نتیجه آزمایش به نمونه گیری صحیح، زمان مناسب نمونه گیری و نیاز به 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

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 گونه ای است که در بسیاری از این عفونتها با تکیه بر تظاهرات بالینی نمی توان به تشخیص مناسب و به موقع رسید (1). اگر چه یک پزشک با تجربه ممکن است علائم و نشانه های ویژه برخی بیماریهای انگلی را شناسایی کند ولی این نشانه ها می توانند گمراکنده بوده و هیچ تابلوی بالینی واضحی را نشان ندهند. بطور کلی بسیاری از عفونتهای انگلی نشانه های 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).

آنتی ژنیک و یا قطعاتی از DNA نشان می دهد. در آزمایشهای مولکولی عوامل محیطی که معمولا می توانند 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 RT-PCR (Polymerase chain reaction) (10)، PCR (Real-time polymerase chain reaction) (Amplified fragment length (12،11)، AFLP polymorphism) (13)، LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) (14)، RAPD (Random amplified polymorphic) (15)، DNA (Nucleic acid sequence-based amplification) (16،17)، RFLP (Restriction fragment length polymorphism) (18)، (20-22) Microsatellites، Luminex xmap، (19) است. (23)

شایان ذکر است میزان حساسیت و اختصاصی بودن آزمایشها یکسان نبوده و استفاده از این روشها در مطالعات مختلف و تشخیص بیماری انگلی متفاوت می باشد. در حال حاضر در بین روشهای تکثیر اسیدهای نوکلئیک، روش PCR بیشترین کاربرد را دارد. استفاده از روشهای جدید و نوین در آزمایشگاههای تشخیصی می تواند باعث افزایش دقت و حساسیت آزمونهای تشخیصی شده و با بکارگیری این روشها و استفاده از تستهای مولکولی و بهره گیری از دستگاههای خودکار و پیشرفته امکان شناسایی انواع بیماریهای انگلی میسر می شود (3،12). تشخیص عفونت های انگلی با توجه به اهمیت پزشکی و اقتصادی آن، یکی از مباحث مهم علم انگل شناسی 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 می توان 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 انگل شناسی 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 علمی قابل دسترس نظیر Web of Science، Systematic Review، PubMed، SID، Science، Medline، Google Scholar، Scopus، Iran Medex و Magiran و با استفاده از

گسترده تر انگلها ابزارهای تشخیصی جدیدتری مورد استفاده قرار می گیرند. تعدادی از جدیدترین آزمایشات بر پایه روشهای سرولوژیکی استوار می باشد که دارای اختصاصیت و حساسیت بالاتری است. اهمیت استفاده از روشهای سرولوژیکی هنگامی محسوس می شود که به دلایلی نتیجه آزمایش مشاهده میکروسکوپی 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 بر تشخیص بیماری، تجویز دارو و یا عمل جراحی کمک کننده است. علاوه بر اینها، در سالهای اخیر در اغلب آزمایشگاههای انگل شناسی جهان سعی می شود 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 می توان به روشهای ELISA مثل (4) FAST-ELISA، Dot-ELISA (6،5)، IFA، Immunoblotting، CIMA، ECLIA و (2،1) RDTS، CLIA و (7) LIPS 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 کیت های تجاری و روشهای استاندارد، نتایج حاصل از تشخیص بیماریهای انگلی از جمله Filariasis، Cryptosporidiosis، Amebiasis، Malaria، Giardiasis، 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 granulosis دارای سویه های مختلفی است که از حیث اختصاصی بودن میزبان، همه گیری شناسی و ویژگیهای ریخت شناسی، بیوشیمیایی، فیزیولوژی و ژنتیک باهم اختلاف دارند. تکنولوژی مولکولی حضور انگل را براساس اجزا

روشهای مبتنی بر PCR انقلابی در مطالعات و در شرایط آزمایشگاهی به دلیل نیاز به مقدار کمی از ماده DNA و تولید حجم بیشتری از آن ایجاد نمود. این روش به علت سریع و ساده بودن و همچنین حساسیت و دقت بالایی که دارد، توانسته در اکثر آزمایشگاه های تشخیص طبی، جایگزین روشهای سنتی تشخیص بیماریها شود. اما یکی از معایب PCR عدم توانایی آن در ، شناسایی عوامل بیماریزای زنده از مرده است (10، 24). بنابراین کارایی آن برای برخی مطالعات از جمله ارزیابی داروها محدود است. روش PCR تکثیر انتخابی از ژنومهای بزرگ و پیچیده را امکانپذیر می سازد. این تکنیک براساس روند باز شدن DNA دو رشته ای با استفاده از حرارت 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 رشته ای جدید می نمایند (24). روشهای مبتنی بر PCR با روشهای دیگری مانند RFLP، RT-PCR و یا Nested PCR جهت ژنوتایپ ارگانسیم ترکیب شده است. حساسیت روش PCR بالاتر از روش میکروسکوپی بوده و برای تشخیص تعداد کم انگل در نمونه مدفوع مفید است و می تواند جایگزینی مناسب برای تشخیص پاتوژنهای خاص در مدفوع و خون باشد (24، 10، 25).

از روش PCR جهت بررسی و تشخیص، تهیه کلون آنتی ژن جهت تهیه واکسن و بیان آن در Vector یوکاریوتی و پروکاریوتی، مطالعات اپیدمیولوژیک و نظارت بر روش درمان انگلهای غیر روده ای از جمله آلودگی به گونه های مختلف *Toxoplasma* (26-28)، *Cryptosporidium* (29)، *Plasmodium* (25، 30)، *Leishmania* مانند *Visceral Leishmaniasis* (31) استفاده می شود. روش PCR در تشخیص انگلها به دلیل عدم امکان به دست آوردن یا ایزوله کردن مقدار کافی انگل در مراحل مختلف چرخه زندگی آنها، می تواند قابل توجه باشد. Costa و همکاران در مطالعه ای در برزیل نشان دادند که تشخیص چندگونه پلاسمودیوم با روش اسمیر ضخیم غیر قابل اعتماد بوده و روش PCR می تواند ابزار مهمی برای تشخیص عفونت باشد (32). با وجود مزایای فناوری مبتنی بر PCR، مانند ویژگی و حساسیت در تشخیص برخی انگلها، وقت گیر بودن و فراهم نکردن داده های 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

کلید واژه های *Molecular Parasite Infection* و *Techniques* و معادلهای فارسی آن به منظور دستیابی به مقالات مورد نظر انتخاب شد. مقالات مناسب و اطلاعات لازم از 92 مقاله جهت نگارش مقاله جمع آوری 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 ارگانسیم یا سلولهای آلوده توسط آنها، در بخشهایی از بدن وجود ندارد. زیرا تهیه نمونه بدون صدمه به میزبان براحتی امکان پذیر 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 می شویم که شناسایی آنها از یکدیگر مشکل است (1). با استفاده از آنتی بادیها گاهی تشخیص میان آلودگیهای جاری و گذشته ناممکن بوده و امکان ایجاد واکنشهای متقاطع بین آنتی ژنهای انگلهای مختلف وجود دارد. اگر فناوریهای ساده سبب برآوردن 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 زیست شناسی مولکولی در محل اجتناب ناپذیر است. در برنامه های ریشه کنی 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 می گیرد.

1- واکنش زنجیره ای پلیمر از PCR: روش تکثیری PCR یکی از شناخته شده ترین روشهای تشخیص مولکولی است و تاکنون بر روی اغلب میکروارگانسیمها بررسی شده است.

استفاده می شود و برخلاف روشهای قبلی با استفاده از این روش می توان 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، مدل های حیوانی، اثر درمانی داروها و ظرفیت ناقلین (35)، مالاریا در تشخیص موارد آلودگی کم و شناسایی چندگونه همزمان در ظرف 3 ساعت و یا درمان دارویی (36)، تریپانوزوما، توکسوپلازما (37) به ویژه در مبتلایان به ایدز، پلاسمودیوم ها (38-40) و دیگر انگلهای بیماریزا از جمله کریپتوسپوریديوم و ژیا ریدیا در فاضلاب و نمونه های مدفوعی صورت گرفته است (11، 13). 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:
روش LAMP 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 کننده ها و مجموعه ای 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 از یک انکوباتور ساده (حمام آب یا بلوک بخاری) ممکن می سازد (42). از مزایای این روش نسبت به سایر روشهای مولکولی مانند PCR، انجام تمام واکنشها در داخل یک میکروتیوب و عدم نیاز به دستگاه ترموسایکلرو-الکتروفورزاست. در صورت واکنش و تکثیر ژن مورد نظر در دمای 65-60 درجه سانتیگراد ماده ای رنگی ایجاد شده که مثبت یا منفی بودن واکنش را نشان می دهد.

این ویژگی منحصر به فرد نه تنها موجب بازده بالاتر آن شده بلکه استفاده از ترموسایکلر حرارتی و چرخه های طولانی دماهای مختلف را مرتفع و در زمان صرفه جویی می شود (43). مهمترین مزیت آن کمتر بودن هزینه و ابزارهای لازم جهت تکثیر می باشد. 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 می شود. در مدت 90-15 دقیقه DNA به میزان 10^{10} برابر

پاتوژنها، بیان پروتئین، تنظیم ژن و جدایی آلی استفاده می شود (32).

2- روش Real-Time PCR: به طور کلی Real-Time PCR تکنیکی برای مشاهده بی وقفه ی پیشرفت واکنش PCR در طول زمان می باشد. با Real-Time PCR می توان مقادیر تولیدات RNA یا PCR (DNA, cDNA) را اندازه گیری نمود. ایده اولیه این روش، ابتدا توسط Higuchi و همکارانش ارائه شد که به مفهوم مشاهده لحظه به لحظه واکنش بر اساس میزان فلورسانت ساطع شده آن از واکنش و مشاهده و ثبت آن در یک Detector است (33).

روش Real-Time PCR انقلابی را در راه تشخیص مولکولی آزمایشگاه های بالینی باز کرده است. از آنجایی که اسیدنوکلئیک تکثیر یافته و مراحل تشخیص آن در یک محیط بسته انجام می شود ریسک آلودگی به عوامل محیطی و واکنشهای بعدی به طور قابل ملاحظه ای نسبت به روشهای کلاسیک و معمولی PCR کاهش می یابد. 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 ارگانیسم ها، بررسی بیان ژنها، ارزیابی درمان، تشخیص، موتاسیونها، افتراق آلی و بسیاری از کاربردهای دیگر شده است (33). روش Real-Time PCR قادر به نظارت بر تولید محصول PCR در زمان واقعی است و می تواند توالی DNA موجود در نمونه و تعداد کپی های آن را شناسایی و تعیین نماید. با استفاده از روش Real-Time PCR می توان بار انگلی و شدت آلودگی و تعداد بسیار کم انگل را با دقت بالا تشخیص داد و در موارد پیگیری درمان بسیار مفید است (30، 34). برتری روش Real-Time PCR نسبت به روشهای دیگر PCR شامل موارد زیر از جمله کاهش احتمال آلودگی، سرعت، ویژگی، اندازه گیری کمی و استانداردسازی آسان آن است. در این روش از رنگهای فلوروسنت مثل SYBR Green، پروبهای TaqMan و انتقال انرژی رزونانس استفاده می شود (11، 12). آلودگیهای متقاطع که در روشهای معمولی PCR رخ می دهد با استفاده از Real-Time PCR از بین رفته و نتایج دقیق تری حاصل می شود. با توجه به اینکه در Real-Time PCR از RNA سلول برای تعیین کمیت اسیدنوکلئیک انگلی و شناسایی ژن بیان شده در سلول

اوواله) براساس ژن 18S rRNA نشان دادند که روش LAMP می تواند 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 می توان 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 فلئورسنت، لیزر و پردازش سیگنالهای دیجیتال است که قابلیت سنجش و اندازه گیری تعداد زیادی آنالیت (تا 100) را در یک نمونه به طور همزمان دارد (59). در این روش میکرواسفرها به آنتی ژن، آنتی بادی و الیگونوکلوئیدها متصل شده و برای تشخیص ارگانیزم مورد نظر تشکیل یک پروب داده و می توان در یک واکنش چندین سلول و یا چندین ژنوتیپ یک میکروارگانیزم را بررسی و تنوع آنتی ژنتیکی آنها را تعیین نمود. تا به حال از این روش در تشخیص کریپتوسپوریوم، ژیا ردیا (60، 61) و پلاسمودیوم (62) استفاده شده است. دو گونه کریپتوسپوریوم هومینیس و پارووم از لحاظ ژنتیکی در ناحیه نوکلئوتید 2 (ML-2) دارای تفاوت بوده و قابلیت تشخیص آنها با استفاده از آزمونهای آنتی ژنیک و یا سرولوژی امکانپذیر نمی باشد. تعیین توالی DNA یکی از ابزارهای تشخیصی است ولی پر هزینه، پرهزمت و وقت گیر می باشد. روش Luminex قادر است گونه های کریپتوسپوریوم هومینیس و پارووم را با استفاده از پروبهای اختصاصی اولیگونوکلوئیدی 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 حدوداً 5 ساعته به نتیجه می رسد. روش ایمونوفلورسانس مستقیم به طورروتین جهت شناسایی *Cryptosporidium* و *Giardia* مورد استفاده قرار می گیرد و قادر به تمایز دو گونه کریپتوسپوریوم هومینیس و پارووم نیست ولی Luminex نسبت به آن دارای 100٪ اختصاصیت و بیشترین حساسیت است (59، 60). Li و همکاران و McNamara و همکاران نشان دادند که با روش Luminex می توان گونه های کریپتوسپوریوم و ژیا ردیا را در نمونه های مدفوع و چهارگونه

ازدیاد خواهد یافت و در نتیجه مقدار محصول تولید شده زیادتر می شود. محصول تولید شده DNA در میکروتیوبها را می توان با استفاده از رنگهای فلورسنت متصل شونده به DNA با تغییر رنگ و یا انباشته شدن محصولات جانبی (پروفسفات) با ایجاد کدورت نمایان کرد. در این روش نیازی به روش پرحمت الکتروفورز و استفاده از رنگ سرطانزای اتیدیوم بروماید نبوده و کمتر تحت تأثیر مهار کننده های موجود در نمونه- های کلینیکی می باشد. و برخلاف PCR لزوماً نیازی به استخراج اسید نوکلئیک هدف نیست و مستقیماً بر روی نمونه های کلینیکی (با حساسیت کمتر) قابل انجام است (43، 44). با توجه به این ویژگیها و دسترسی ساده به LAMP به راحتی می توان از آن در آزمایشگاه های کوچک، به ویژه در مناطق بومی روستایی، استفاده نمود. انگل شناسان به تازگی از این روش در تشخیص بیماریهای مختلف انگلی از جمله *Taenia* (44)، *Cryptosporidium* (45)، *Entamoeba histolytica* (46)، *Plasmodium* (47-49)، *Toxoplasma*، *Leishmania*، *Trypanosoma* (50)، *Schistosoma* (51)، میراسیدیوم موجود در حلزون میزبان واسط *Schistosoma* (52)، *Fasciola hepatica* و *Fasciola 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 تنیها در مدفوع بیماران مبتلا به تنیازیس نشان دادند که روش LAMP 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 گونه های مختلف فاسیولا به خصوص در مناطق آندمیک یک ابزار بالقوه کلینیکی است (53). Lau و همکاران نشان دادند که با روش LAMP امکان تشخیص توکسوپلازماگوندی درخون انسان با حساسیت بالای 85٪ نسبت به nested PCR 62/5٪ وجود دارد (58). Han و همکاران در رابطه با چهارگونه پلاسمودیوم انسانی (فالسپاروم، ویواکس، مالاریه،

این روش همانند PCR بطور انتخابی موجب تقویت قطعاتی از ژنوم شده و از 4 مرحله هضم DNA، توسعه، تکثیر و در نهایت الکتروفورز روی ژل پلی اکریل 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 الگوست. با استفاده از این روش امکان شناسایی انگلی که در مورد آن، هیچ اطلاعات ژنتیکی قبلی وجود ندارد میسر می شود (74،73). مطالعات انجام شده کاربرد آن را در افتراق و تمایز گونه های 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) و تنوع ژنتیکی بالا را در میان ژنوم گونه های *Leishmania* و *Leishmania tropica* و *Leishmania donovani* نشان داده است (75).

7- روش RFLP: در حال حاضر روش RFLP یکی از رایج ترین روشهای مولکولی مورد استفاده برای تشخیص گونه ها و ژنوتیپهای انگلهایی مانند توکسوپلازما گوندی است (19). از این روش برای تشخیص تغییرات در سطح DNA استفاده می شود و اساس آن بر هضم محصولات PCR توسط آنزیمهای برشی است. این آنزیمها DNA را به قطعات مختلف شکسته و امکان شناسایی آن را بر روی ژل آگاروز فراهم می نمایند (77،76). این روش مناسب نمونه های محیطی است و امکان تشخیص ژنوتیپهای متعدد را در آن نمونه می دهد. با استفاده از روش RFLP وجود الگوهای غیریکسان بر اثر هضم آنزیمی یک ناحیه و خاص از DNA بوسیله آنزیمهای محدودکننده مشخص می شود. این الگوهای غیریکسان به علت تفاوت DNA بسته به حضور یا عدم حضور جایگاه آنزیمهای محدودکننده بوجود می آید (30).
Molloy و همکاران در بررسی 1623 کودک بیمار، تنوع بالایی از آلودگی به گونه های کریپتوسپورییدیوم شامل کریپتوسپورییدیوم هومینیس، پارووم، 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 گونه های انگلی حیوانی درگوسفندان از جمله *Theileria lestoquardi*

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

5- روش RAPD: به طور کلی، RAPD روش مورد استفاده برای ترسیم گونه های میکروارگانیسمها است. این روش مبتنی بر PCR و بر پایه تکثیر تصادفی توالیهای ژنومی است و به وسیله آن می توان نقشه برداری از ژنوم انگل را تهیه کرد (62، 63). 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 (64، 65). در این روش برخلاف روشهای استاندارد PCR از یک آغازگری به طول 9-10 نوکلئوتید که ردیف بازی آن به طور قراردادی تعیین می گردد، استفاده می شود (63، 66). 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 می کند (67). از تفاوت های الگوهای بدست آمده می توان برای مطالعات الگوی پلی مورفیسم DNA، تعیین روابط فیلوژنتیکی، تهیه نقشه های ژنتیکی و غیره استفاده نمود (64). در روش مذکور با استفاده از الگوی بدست آمده از باندهای DNA بررسی ژنوتیپها انجام و نیازی به تعیین توالی قطعات جدا شده نمی باشد (68). مطالعات نشان داده که با استفاده از این روش می توان گونه های مختلف انگل لیشمانیا را از یکدیگر افتراق داده و در ضمن مطالعه پلی-مورفیسم انگلهای با اهمیت در پزشکی مانند پلاسمودیوم و تریپانوزوم امکان پذیر است (69). از این تکنیک در میانمار، تایلند، سودان، مکزیک و دیگر کشورهای آسیایی، جهت تمایز گونه های بومی *Wuchereria bancrofti* (16، 65)، *Leishmania donovani* (64) و *Taenia solium* درخوکها و دیگر انگلهای کرمی استفاده شده است (66-71). در ایران با استفاده از این روش امکان شناسایی ژنوتیپ 112 ایزوله *Echinococcus granulosus* در گوسفند، بز، گاو و شتر فراهم شد (72).

6- روش AFLP: این روش امکان بررسی پلی مورفیسم ایجاد شده در DNA را به محقق می دهد و نیازی به تعیین توالی ژن نیست. به دلیل آنالیز همزمان تعداد بسیار زیادی از باندهای اسید نوکلئیک از کارآمدی بالایی برخوردار است (13).

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 NASBA دارای اختصاصیت بالایی است به طوری که در حضور DNA 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 روش NASBA باعث شده تا بتواند جایگاه ویژه‌ای در شناسایی میکروارگانسیم‌ها پیدا کند. مزیت این روش نسبت به Real-time PCR در تکثیر مستقیم RNA انگل طی یک واکنش است (81، 83). از مزیت‌های دیگر این روش نسبت به PCR عدم نیاز NASBA به دستگاه ترموسایکلر است زیرا 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. در حال حاضر برای تشخیص انگلهایی مانند *Trypanosoma* (86)، *Plasmodium falciparum* (87)، *Cryptosporidium* (88)، *Toxoplasma* (89) و *Leishmania* (90) کاربرد یافته است.

بحث

با توجه به اهمیت بیماریهای انگلی در انسان و دام، محققین با استفاده از علوم نوینی چون بیوتکنولوژی، نانو تکنولوژی گامهای بلندی در جهت تشخیص و کنترل بیماریها برداشت‌اند 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 در مناطق مختلف به دلیل عدم افتراق گونه‌های مختلف انگلها از جمله آمیبها و روشهای سرولوژیکی به دلایل گوناگون از جمله عدم تفکیک عفونت فعلی از گذشته و واکنشهای متقاطع و غیره کارایی لازم را ندارند. در

، *T. annulata* و *T. ovis* وجود دارد (79). در مطالعات مولکولی مختلفی از این روش جهت شناسایی انگلهای *Fasciola*، *Echinococcus*، *Leishmania* و *Dicrocoelium* و تعدادی دیگر از انگلها 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 تقریباً 1000 تکرار را در برداشته و در ژنوم یوکاریوتها فراوان بوده و می‌تواند دچار موتاسیون شده و به سرعت واحدهای تکراری خود را افزایش و یا کاهش دهند (80). چون Microsatellite ها چندشکلی بالایی 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. با RFLP می‌توان هر دو الیل 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 Microsatellite ها 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 از حد آنها فقط در رده‌بندیهای درون گونه‌ای پیشنهاد شده است. این عوامل در برخی از انگلهای مشترک انسان و حیوانات مورد استفاده قرار می‌گیرند (20، 21). با وجود سودمندی بالقوه Microsatellite های نشانگر، تنها برای بررسی پلی‌مورفیسم برخی از نماتودهای انگلی از جمله 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، واکنشها، بیان ژنها و همچنین شناسایی میکرو ارگانیس‌مهای زنده قابل استفاده می‌باشد (82). واکنش رونویسی در دمای 41 درجه سانتیگراد انجام می‌شود. محصول

موارد زیر از جمله کاهش احتمال آلودگی، سرعت، ویژگی، اندازه گیری کمی و استانداردسازی آسان آن است. روش LAMP نسبت به سایر روشهای مولکولی مانند PCR دارای مزیت هایی از جمله انجام تمام مراحل واکنش در داخل یک میکروتیوب وعدم نیاز به دستگاه ترموسایکلرو الکتروفورز است. این ویژگی منحصر به فرد نه تنها موجب بازده بالاتر آن شده بلکه توانسته استفاده از ترموسایکلر حرارتی و چرخه های طولانی دماهای مختلف را مرتفع نموده و در زمان صرفه جویی شود (41). با روش LAMP در مدت 15-90 دقیقه میزان DNA دهها برابر افزایش یافته و در نتیجه مقدار محصول تولید شده زیادتر می شود. در این روش نیازی به روش پرزحمت الکتروفورز و استفاده از رنگ سرطانزای اتیدیوم بروماید نبوده و کمتر تحت تأثیر مهار کننده های موجود در نمونه های کلینیکی است. و برخلاف PCR لزوما نیازی به استخراج اسید نوکلئیک هدف نیست و مستقیما بر روی نمونه های کلینیکی (با حساسیت کمتر) قابل انجام است. با توجه به این ویژگیها و دسترسی ساده به LAMP به راحتی می توان 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 می باشد (1). انگل شناسان 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 از جمله PCR است (59). این روش سریعتر و ارزانتر از PCR بوده و می توان 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 مزیت های دیگر این روش نسبت به PCR عدم نیاز آن به دستگاه ترموسایکلر و چرخه های حرارتی زیاد برای تکثیر است (81). در روش PCR در هر مرحله قطعات دو برابر شده و برای تکثیر حدود یک میلیون برابر از محصول، حداقل به 20 چرخه نیاز است اما در NASBA در هر مرحله رونویسی 100-1000 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 می توان جهت پیگیری اثربخشی داروها، واکنشها، بیان

بیماریهای انگلی و در عفونتهای شدید تشخیص داده شده با روشهای سنتی امکان کنترل بیماری با داروهای تک دوز وجود دارد (92). ولی در افراد آلوده غیر حساس 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 می گیرند (34). روشهای مولکولی بسیار خاص و حساس بوده و جایگزین مناسب روش میکروسکوپی است. هرچند روش میکروسکوپی هنوز به عنوان استاندارد طلایی برای شناسایی انگلها محسوب می شود. برخی از این روشهای متنوع و با ارزش، روشهای کمک کننده به تشخیص و تمایز گونه ها و حتی نظارت کننده بر درمان بوده و در نتیجه یک ابزار امیدوارکننده ای جهت کمک به تشخیص بالینی است. این مطالعه به برخی از روشهای مولکولی مورد استفاده در شناسایی انگلها و مزایا و معایب آنها اشاره شده است.

روش تکثیری PCR سریع و ساده و دارای حساسیت و دقت بالا و در اکثر آزمایشگاه های تشخیصی 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 می توان 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 می توان تعداد بسیار کم انگل را با دقت بالا تشخیص داد (30). در این روش توالی DNA موجود در نمونه شناسایی و همچنین تعداد کپی های آن تعیین می شود. این روش کمی PCR به منظور تعیین بار انگلی و شدت آلودگی مورد استفاده قرار می گیرد و در موارد پیگیری درمان بسیار مفید است (33). برتری روش Real-Time PCR نسبت به روشهای دیگر PCR شامل

هموزیگوتی یا هتروزیگوتی یک قطعه خاص وجود دارد. از معایب استفاده از روش میکروساتلایت یا ریزماهواره ها می توان به روند عملیاتی شناسائی، تعیین توالی بازی، طراحی و ساخت آغازگرها و تهیه نقشه ژنتیکی بسیار پیچیده به دلیل صرف وقت و هزینه فوق العاده آنها اشاره نمود (20).

نتیجه گیری

استفاده از دانش مولکولی و ابزارهای آن در تحقیقات انگل شناسی اجتناب ناپذیر است. آموزش و کاربرد آنها و سایر روشهای جدید باید در سرفصل دروس انگل شناسی باشد. با توجه به مطالب ارائه شده می توان نتیجه گیری 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 در سرتاسر دنیا مورد استفاده قرار می گیرند. استفاده از آنها اطلاعات دقیقی از مرفولوژی، ویژگیهای ژنتیکی و رفتار بیماریهای انگلی ایجاد شده در جمعیت را فراهم می نمایند. لذا به نظر می رسد آگاهی از این روشهای تشخیصی مولکولی و توسعه و کاربرد آنها می تواند علاوه بر تشخیص صحیح و زودرس عامل عفونت از مصرف بی رویه و نادرست دارو و ایجاد سوشهای مقاوم به دارو جلوگیری نموده و در نتیجه در تشخیص، پیشگیری و درمان بیماریها اهمیت زیادی خواهد داشت.

سپاسگزاری

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

ژنها و همچنین شناسایی میکروارگانیسیمهای زنده استفاده نمود (78). روشهای مولکولی در مطالعات مهم اپیدمیولوژیکی از جمله 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 می شود. با استفاده از روش RAPD قابلیت نقشه برداری از ژنوم انگل وجود دارد. از مزیت این روش سرعت، سادگی و مقرون به صرفه بودن آن است و به اطلاعات قبلی از توالی 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، تکرار پذیری روش، عدم نیاز به پروب و بالابودن دمای اتصال پرایمر به الگو است. با استفاده از این روش می توان انگلی را که هیچ اطلاعات ژنتیکی قبلی درباره آن وجود ندارد شناسایی نمود (75،73). از روش RFLP برای تشخیص گونه ها و ژنوتیپهای انگلی و تغییرات در سطح DNA استفاده می شود (19). اساس این روش بر هضم محصولات PCR توسط آنزیمهای برشی است. این آنزیمها DNA را به قطعات مختلف شکسته و امکان شناسایی آن بر روی ژل آگاروز فراهم می شود (76). این روش مناسب نمونه های محیطی است و امکان تشخیص ژنوتیپهای متعدد در نمونه فراهم می شود. با استفاده از روش RFLP وجود الگوهای غیریکسان بر اثر هضم آنزیمی یک ناحیه خاص از DNA بوسیله آنزیمهای محدودکننده مشخص می شود (30). با روش RFLP می توان تجزیه و تحلیل هر دو آلل یک مکان ژنی را مورد بررسی قرار داد ولی با روش Microsatellites بندرت امکان تعیین حالت

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. Diagnóstico 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 detecting antibodies to *Schistosoma mansoni*. *Journal of Immunological Methods* 1986; 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 Parasitology* 2002; 18(10), 452-457.
10. Jardim EAGV, Linhares GFC, Torres FAG, Araújo JLB, Barbosa SM. Diferenciação específica entre *Taenia saginata* e *Taenia solium* por meio de 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 in Medical 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.

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. Haem* 2000; 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.

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, Jatón 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, Mbatí 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: detecting *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.

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 loop-mediated 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](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, Casaquei 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, Hajjarian H, Mohebbali 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.

- 66.Lupchinski JR E, Vargas L, Ribeiro RP, Moreira HLM, Valentim M, Povh JA. A importancia da utilizacao da técnica RAPD para a identificação 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, Mohebbali 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, Mohebbali 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.

- 79.Zaeemi M, Haddadzadeh H, Khazrainia 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.Baumner 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.