

Identification of Live *Toxoplasma gondii* by the NASBA method in Rat

Roghaye Noruzi¹, Abdolhossein Dalimi^{2*}, Mehdi Forouzandeh³, Fatemeh Ghaffarifar⁴

1- Ph.D. Candidate, Department of Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2- Professor, Department of Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3- Associated Professor, Department of Medical Biotechnology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

4- Associated Professor, Department of Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

*Corresponding Address: P.O.Code: 1411713116, Department of Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Email: dalimi_a@modares.ac.ir

Received: 13/Nov/2011, Accepted: 23/Apr/2012

Abstract

Objective: Toxoplasmosis is a worldwide disease, for which different detection methods have been used. The nucleic acid sequence-based amplification (NASBA) method is shown to be highly efficient for diagnosis of live microorganisms. The present research evaluates the molecular isothermal method of NASBA to identify live *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) in rat.

Methods: Tachyzoites of *T. gondii* were inoculated in the peritoneal cavities of mice (*Mus musculus*) and their RNA was extracted. The NASBA method was then used to amplify the tachyzoite B1 rRNA gene. Next, we examined blood samples from 30 experimentally infected case and control rats (*Rattus norvegicus*) by NASBA. Finally, the resultant band was investigated on an agarose gel.

Results: The B1 genes extracted from both the tachyzoites and blood samples were successfully amplified by the NASBA method. This amplified gene yielded an amplicon of approximately 116 bp on gel agarose.

Conclusion: NASBA is highly efficient for the identification of live *T. gondii*. This method can be applied for early diagnosis of active toxoplasmosis in both newborns and immunocompromised individuals.

Keywords: *Toxoplasma gondii*, NASBA method, B1 rRNA gene

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 15, No 1, Spring 2012, Pages: 73-80

تشخیص انگل زنده توکسوپلازما گوندی با روش NASBA در رت

رقیه نوروزی^۱، عبدالحسین دلیمی^{۲*}، مهدی فروزنده^۳، فاطمه غفاری^۴

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

آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه انگل شناسی پزشکی
Email: dalimi_a@modares.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۱/۰۲/۰۳

دریافت مقاله: ۹۰/۰۸/۲۲

چکیده

هدف: توکسوپلازموزیس از بیماری‌های دارای گسترش جهانی است که برای تشخیص آن از روش‌های مختلفی استفاده شده است. روش NASBA به دلیل شناسایی میکروارگانیزم‌های زنده، دارای ویژگی بالایی است. هدف از این مطالعه، ارزیابی روش مولکولی هم‌دمایی (ایزوترمال) NASBA در تشخیص انگل زنده توکسوپلازما در مدل حیوانی رت است. **مواد و روش‌ها:** پس از تکثیر انگل در صفاق موش سوری، RNA از فرم تاکی‌زوئیت تخلیص شد و از روش NASBA برای تکثیر ژن B1 برای تشخیص انگل زنده استفاده شد. در مرحله دوم مطالعه، از روش NASBA برای تشخیص آلودگی تجربی توکسوپلازما در خون ۳۰ سر رت (مورد و شاهد) استفاده شد. باند حاصل از تکثیر این ژن اختصاصی، روی ژل آگارز مطالعه شد.

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

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

کلیدواژگان: توکسوپلازما گوندی، روش NASBA، ژن B1 rRNA

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

مقدمه

تظاهرات پوستی (بثورات جلدی)، آدنوپاتی (Adenopathy) یا عارضه چشمی بروز می‌کند. در نوزادانی که از طریق مادرزادی آلوده می‌شوند و توکسوپلازموزیس در بیماران با نقص ایمنی مانند مبتلایان به ایدز (Acquired Immunodeficiency Syndrome: AIDS) و دریافت کنندگان عضو پیوندی، ممکن

توکسوپلازموزیس (Toxoplasmosis) آلودگی ناشی از ابتلا به تک یاخته‌ای درون سلولی به نام توکسوپلازما گوندی (*Toxoplasma gondii*) است [۱]. توکسوپلازموزیس در افراد دارای ایمنی کامل، معمولاً فاقد علامت است یا به صورت

تشخیص توکسوپلازما گوندی با روش NASBA

آزمایش خون در مرحله حاد آلودگی، بتوان از آن برای مطالعات ارزیابی تأثیر داروها در *In vitro* استفاده نمود.

مواد و روش‌ها

تکثیر و نگهداری سویه RH توکسوپلازما گوندی

سویه RH توکسوپلازما گوندی از بخش انگل‌شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران تهیه شد. به منظور تکثیر و نگهداری سویه از روش تزریق درون صفاقی موش‌های ماده (*Mus Musculus*) با سن حدود ۴ هفته‌گی استفاده شد [۱]. مایع صفاقی موش، حاوی ۱۰۰۰ تاکی‌زوئیت (*Tachyzoite*) به داخل صفاق موش‌ها تزریق شد. پس از ۳-۴ روز موش‌ها را با کلروفرم بیهوش و کشته و سپس مایع صفاقی آن‌ها با سرنگ خارج شد. تاکی‌زوئیت‌های تکثیر یافته با میکروسکوپ نوری (بزرگنمایی $\times 40$) قابل مشاهده است. این مایع صفاقی به‌عنوان منبع اصلی برای نگهداری انگل یا تزریق به موش و تکثیر تاکی‌زوئیت‌ها استفاده قرار می‌شود.

استخراج RNA

تعداد ۳ تا ۵ میلیون انگل توسط لام نئوبار شمارش و با ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲ دقیقه با دستگاه سانتریفیوژ رسوب داده شد. RNA انگل استخراج (*RNA Xplus*; سیناژن، ایران) و باند آن روی ژل آگارز مشاهده و غلظت آن به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

انجام واکنش NASBA

در واکنش NASBA به‌منظور تکثیر قطعه ۱۱۶ جفت‌بازی از دو آغازگر FN1 و RN2 استفاده شد توالی آغازگرها به شرح زیر بود.

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

است تهدیدکننده زندگی باشد [۱].

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

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

با توجه به این‌که از این روش تاکنون برای تشخیص عوامل عفونی مختلفی استفاده شده است ولی گزارشی در این زمینه در مورد توکسوپلازما وجود ندارد بنابراین این مطالعه، برای راه‌اندازی و استانداردسازی این روش برای تشخیص سریع انگل زنده توکسوپلازما طراحی شد تا علاوه بر تشخیص سریع‌تر و دقیق‌تر توکسوپلاسموزیس از طریق

استرپتومایسین (Streptomycin) به آن افزوده شد [۱]. سپس به محوطه صفاقی هرکدام از رت‌های گروه مورد 5×10^6 عدد تاکی‌زوئیت (مقدار ۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون) و به رت‌های شاهد سرم فیزیولوژی تزریق شد.

خونگیری از رت‌ها

معمولاً ۲ تا ۱۷ روز بعد از تزریق، انگل‌ها در خون حضور می‌یابند بنابراین ۴۸ ساعت بعد از تزریق، خونگیری به اندازه ۱ سی‌سی از قلب تمام رت‌ها انجام گرفت و در تمام مدت تحقیق فقط یک‌بار از حیوانات خونگیری انجام شد و بلافاصله با ماده ضد انعقاد EDTA (Ethylenediaminetetraacetic Acid) به نسبت ۱ به ۱۰ در میکرولوله ۱/۵ میلی‌لیتری مخلوط و در فریزر -80°C درجه سانتی‌گراد به‌منظور استخراج RNA و انجام واکنش NASBA نگهداری شد. پس از استخراج RNA، ۳ میکرولیتر از RNA های استخراج شده از خون رت‌ها (مورد و شاهد) با روش NASBA برای تشخیص آلودگی به توکسوپلازما آزمایش و سپس باندهای حاصل روی ژل آگارز شناسایی شد.

نتایج

طبق نتایج به‌دست آمده RNA تخلیص شده از تاکی‌زوئیت انگل توکسوپلازما گوندی دارای اندازه تقریبی ۲۰۰ الی ۱۰۰۰ جفت‌بازی و سه باند روی ژل بوده است (شکل ۱). محصول ژن تکثیر شده ژن B1 توکسوپلازما گوندی با روش NASBA دارای قطعه‌ای به اندازه تقریبی ۱۱۶ جفت‌باز بر روی ژل آگارز ۲ درصد بود (شکل ۲).

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

ابتدا تمام اجزای مورد نیاز به جز آنزیم‌ها، با غلظت‌های مشخص و تعیین شده وارد مخلوط واکنش شد (جدول ۱). مخلوط حاصل به مدت پنج دقیقه در دمای 65°C درجه سانتی‌گراد، سپس به مدت ۳ دقیقه در دمای 41°C درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد؛ سپس به سرعت مخلوط آنزیمی به مخلوط اولیه افزوده شد و به مدت ۹۰ دقیقه در دمای 41°C درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از گذشت این مدت زمان، محصول NASBA در دمای 65°C درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد و سپس روی ژل آگارز ۲ درصد در تانک الکتروفورز قرار گرفت.

جدول ۱ اجزای لازم برای واکنش NASBA

غلظت	ماده شیمیایی	
۴۰ میلی‌مول	Tris-HCl	۱
۵۰ میلی‌مول	KCl	۲
۱ میلی‌مول	(Dithiothreitol) DTT	۳
۴ میلی‌مول	MgCl ₂	۴
۱۰ پیکومول	آغازگر رفت	۵
۱۰ پیکومول	آغازگر برگشت	۶
۰/۴ میلی‌مول	dNTP	۷
۰/۸ میلی‌مول	(Nucleotide Triphosphate) NTP	۸
۵ درصد	(Dimethyl Sulfoxide) DMSO	۹
۱۲ واحد	بازدارنده RNase	۱۰
۸ واحد	M-Mulv RT	۱۱
۲۰ واحد	پلیمراز T7 RNA	۱۲

آلوده‌سازی رت‌ها

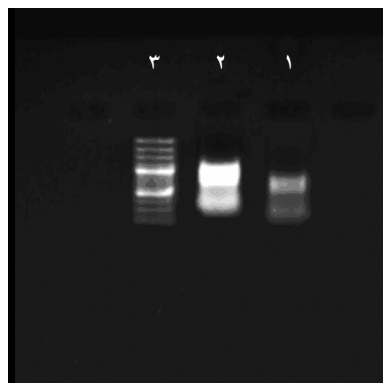
تعداد ۳۰ سر رت (*Rattus norvegicus*) ماده ۲-۳ ماهه از مؤسسه تحقیقات واکنش و سرم‌سازی رازی تهیه و به دو گروه ۱۵ تایی (مورد و شاهد) تقسیم شدند. تاکی‌زوئیت‌های استخراج شده از موش سوری توسط لام نئوبار (Neubauer) شمارش شدند و با افزودن محلول (Phosphate Buffered Saline)، غلظت نهایی به 1.05×10^5 عدد تاکی‌زوئیت در هر میلی‌لیتر مایع تنظیم شد. به ازای هر میلی‌لیتر سوسپانسیون، مقدار ۱۰۰ واحد پنی‌سیلین G (Penicillin G) و ۱۰۰ میکروگرم

بحث

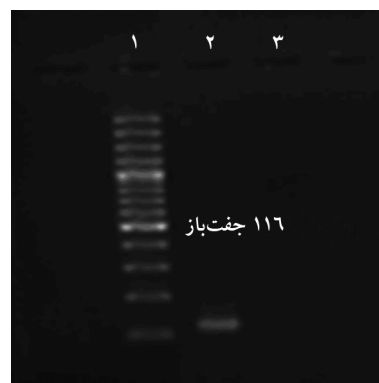
برای تشخیص توکسوپلازما سموزیس از دهه‌های پیش تاکنون، از روش‌های سرولوژی استفاده شده است؛ اما با گسترش عفونت HIV (Human Immunodeficiency Virus)، افزایش پیوند اعضا و استفاده از داروهای سرکوب کننده ایمنی، توکسوپلازما سموزیس به صورت یک بیماری مرگ‌آور مطرح شد. از طرفی عوارض جبران‌ناپذیر توکسوپلازما سموزیس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

روش تکثیر PCR یکی از شناخته شده‌ترین روش‌های تشخیص مولکولی است و تاکنون بر روی اغلب میکروارگانسیم‌ها بررسی شده است. این روش به علت سریع و ساده بودن و همچنین حساسیت و دقت بالایی که دارد، توانسته در اکثر آزمایشگاه‌های تشخیص طبی، جایگزین روش‌های سنتی تشخیص بیماری‌ها شود. اما یکی از معایب PCR عدم توانایی در شناسایی عوامل بیماری‌زا زنده از مرده است [۴، ۵] بنابراین کارایی آن برای برخی مطالعات از جمله ارزیابی داروها محدود است.

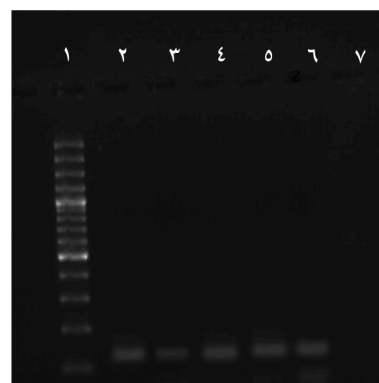
روش NASBA سیستم حساس تکثیر RNA و برای رونویسی اختصاصی اسیدهای نوکلئیک مناسب است. این روش زمانی به کار برده می‌شود که پیگیری اثربخشی داروها، واکسن‌ها، بیان ژن‌ها [۶] و همچنین شناسایی میکروارگانسیم زنده مورد نظر باشد. واکنش رونویسی در دمای ۴۱ درجه سانتی‌گراد انجام می‌شود. محصول تک رشته‌ای، هدف ایده‌آلی برای بررسی روش‌های مختلف هیبریداسیون (Hybridization) است. در این روش برخلاف سایر روش‌ها، مقادیر محصول RNA در سطح بالایی است. سه آنزیم 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،



شکل ۱ RNA تخلیص شده از انگل توکسوپلازما گوندی؛ ستون‌های ۱ و ۲ ناحیه RNA استخراج شده از تکی‌زوئیت انگل توکسوپلازما، ستون ۳ نردبان RNA



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



شکل ۳ نتایج تشخیص توکسوپلازما در نمونه‌های خون رت‌ها، با روش NASBA؛ ستون ۱ نردبان RNA ۱۰۰ جفت‌بازی، ستون ۲-۶ نمونه خون رت، ستون ۷ کنترل منفی

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

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

در این مطالعه ژن B1 توکسوپلازما که حساسیت آن معادل ۱۰ ژنوم در تعداد 10^9 لوکوسیت انسانی گزارش شده است انتخاب شد. حساسیت این ژن به وجود تعداد ۳۵ کپی از آن در ژنوم توکسوپلازما مربوط است. با توجه به ویژگی‌های این قطعه، در این پروژه از قطعه B1 برای تشخیص توکسوپلازموزیس استفاده شد [۱۳].

هدف از تحقیق حاضر راه‌اندازی و به‌کارگیری روش NASBA برای تشخیص توکسوپلازموزیس از طریق آزمایش خون در مرحله حاد آلودگی بود. این حالت در بیماران دارای نقص سیستم ایمنی دیده می‌شود و معمولاً در این مرحله، تاکی‌زوئیت انگل در خون بیمار حضور دارد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که روش NASBA براساس ژن B1، کارایی

بالایی در تشخیص توکسوپلازموزیس از طریق آزمایش خون دارد. روش NASBA با مزایایی نظیر افزایش سرعت از طریق کاهش زمان تکثیر و ساده بودن در تشخیص عوامل بیماری‌زا به‌ویژه انگل‌ها اهمیت ویژه‌ای دارد.

NASBA نسبت به PCR به تعداد چرخه‌های کمتری برای تکثیر نیاز دارد. وقتی از PCR استفاده می‌کنیم در هر مرحله قطعات دو برابر می‌شود و برای تکثیر حدود یک میلیون حداقل ۲۰ چرخه نیاز است، اما در NASBA در هر مرحله رونویسی ۱۰۰-۱۰۰۰ کپی RNA تولید می‌شود و برای تکثیری حدود یک میلیون برابر حدود ۴ تا ۵ تکثیر لازم است [۱۴].

لین (Lin) و همکاران (۱۹۹۵) در ردیابی کمی انگل زنده توکسوپلازما با استفاده از ژن B1 از روش Real-time PCR استفاده نمودند [۱۵]. علاوه بر این از این روش برای ردیابی توکسوپلازما گوندی در بافت‌های خوک و موش گسترش استفاده شده است [۱۶]. هیرل (Hierl) و همکاران (۲۰۰۴) دو روش Nested-PCR و Real-time PCR را برای شناسایی توکسوپلازما گوندی در بیماران دچار ضعف سیستم ایمنی به‌کار برده و مقایسه کردند که از بین این دو روش Real-time PCR قابلیت ردیابی سریع DNA انگل را دارا بوده است [۱۷].

با وجود کارایی خوب این روش‌ها در تشخیص توکسوپلازموزیس، برای راه‌اندازی آن‌ها به دستگاه‌های گران‌قیمت مانند ترموسایکلر نیاز است.

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

تشکر و قدردانی

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

تشخیص توکسوپلازما گوندی با روش NASBA

دانشجویان محترم گروه بیوتکنولوژی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس قدردانی می‌نمایند.

بدین وسیله از سرکار خانم دکتر شجاعی از گروه انگل‌شناسی دانشگاه تهران، به دلیل در اختیار قرار دادن سوش انگل و

منابع

- [1] Dubey JP. Toxoplasmosis. Microbiology and microbial infection. Vol 5, New York: Oxford University Press, 1998; p: 303-18.
- [2] Loens K, Beck T, Ursi D, Overdijk M, Sillekens P, Goossens H, Ieven M. Development of real-time multiplex nucleic acid sequence-based amplification for detection of *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae*, and *Legionella spp.* in respiratory specimens. J Clin Microbiol. 2008; 46(1): 185-91.
- [3] Grover CM, Thulliez P, Remington JS, Boothroyd JC. Rapid prenatal diagnosis of congenital *Toxoplasma* infection by using polymerase chain reaction and amniotic fluid. J Clin Microbiol 1990; 28(10): 2297-301.
- [4] Jones CD, Okhravi N, Adamson P, Tasker S, Lightman S. Comparison of PCR detection methods for B1, P30, and 18S rDNA genes of *T. gondii* in aqueous humor. Invest Ophthalmol Vis Sci 2000; 41 (3): 634- 44.
- [5] Cassaing S, Bessières MH, Berry A, Berrebi A, Fabre R, Magnaval JF. Comparison between two amplification sets for molecular diagnosis of toxoplasmosis by real-time PCR. J Clin Microbiol 2006; 44(3): 720-4.
- [6] Greijer AE, Adriaanse HM, Dekkers CA, Middeldorp JM. Multiplex real-time NASBA for monitoring expression dynamics of human cytomegalovirus encoded IE1 and pp67 RNA. J Clin Virol 2002; 24(1-2): 57-66.
- [7] Deiman B, van Aarle P, Sillekens P. Characteristics and applications of nucleic acid sequence-based amplification (NASBA). Mol Biotechnol 2002; 20(2): 163-79.
- [8] Zhao Y, Park S, Kreiswirth BN, Ginocchio CC, Veyret R, Laayoun A, Troesch A, Perlin DS. Rapid real-time nucleic acid sequence-based amplification-molecular beacon platform to detect fungal and bacterial bloodstream infections. J Clin Microbiol 2009; 47(7): 2067-78.
- [9] Schneider P, Schoone G, Schallig H, Verhage D, Telgt D, Eling W, Sauerwein R. Quantification of *Plasmodium falciparum* gametocytes in differential stages of development by quantitative nucleic acid sequence-based amplification. Mol Biochem Parasitol 2004; 137(1): 35-41.
- [10] Mugasa CM, Laurent T, Schoone GJ, Kager PA, Lubega GW, Schallig HDFH. Nucleic acid sequence-based amplification with oligochromatography for detection of *Trypanosoma brucei* in clinical samples. J Clin Microbiol 2009; 47(3): 630-5.
- [11] Baeumner AJ, Humiston MC, Montagna RA, Durst RA. Detection of viable oocysts of *Cryptosporidium parvum* following nucleic acid sequence based amplification. Anal Chem 2001; 73(6): 1176-80.
- [12] Cultrera R, Seraceni S, Contini C. Efficacy of a novel reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for detecting *Toxoplasma*

- gondii* bradyzoite gene expression in human clinical specimens. Mol Cell Probes 2002; 16(1): 31-9.
- [13] Shirbazou SH, Dalimi A, Foruzandeh Moghaddam M, Ghaffarifar F. Standardization of NASBA method by using 18s rRNA gene for identification of *Leishmania major* parasite. Kowsar Med J 2009; 14(3): 137-42. (Persian)
- [14] Candotti D, Richetin A, Cant B, Temple J, Sims C, Reeves I, Barbara JA, Allain JP. Evaluation of a transcription-mediated amplification-based HCV and HIV-1 RNA duplex assay for screening individual blood donations: a comparison with a minipool testing system. Transfusion 2003; 43(2): 215-25.
- [15] Lin MH, Chen TC, Kuo TT, Tseng CC, Tseng CP. Real-time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*. J Clin Microbiol 1995; 38(11): 4121-5.
- [16] Jauregui LH, Higgins J, Zarlenga D, Dubey JP, Lunney JK. Development of a real-time PCR assay for detection of *Toxoplasma gondii* in pig and mouse tissues. J Clin Microbiol 2001; 39(6): 2065-71.
- [17] Hierl T, Reischl U, Lang P, Hebart H, Stark M, Kyme P, Autenrieth IB. Preliminary evaluation of one conventional nested and two real-time PCR assays for the detection of *Toxoplasma gondii* in immunocompromised patients. J Clin Microbiol 2004; 53(Pt 7): 629-32.