Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 8:42 +0330 on Friday October 20th 2017

REVIEW ARTICLE

Application of molecular techniques for taxonomic and epidemiological studies of parasitic infections

Samira Dodangeh[1],
Mahdi Fakhar[2],
Elham Kialashaki[1]

[1] PhD Student in Medical Parasitology, Student Research Committee, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Associate Professor, Department of Parasitology, Molecular and Cell Biology Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received Jan 30, 2017 ; Accepted August 14, 2017)

Abstract

Molecular epidemiology refers to the use of molecular tools in assessing the status of a cycle of a disease in a specific population. Currently, easy, fast, and high performance molecular tools are widely used in identifying parasites in clinical and biological samples. The aim of this study was to review molecular tools for better understanding of parasitic infection in taxonomic and epidemiological studies. Many researches have provided a variety of methods and markers for identification and evaluation of genetic diversity and elimination of taxonomic problems, especially at the level of species or subspecies of various parasites. Many of these studies are on the prevalence of concurrent infections with different species and subtypes or strains of a parasite. So far, different pieces of rDNA, mtDNA, and kDNA have been used for identification and phylogenetic analysis. If the purpose of a study is to determine intra-specific variations of the parasite, it is better to use sequencing ribosomal ITS1 and mitochondrial CO1. In addition, SSU rDNA and LSU rDNA are used in phylogenetic analysis and taxonomy. It can be concluded that new molecular tools and markers are good alternatives to traditional methods because in many endemic areas successful treatment depends on rapid and accurate diagnosis.

Keywords: Parasitic infections, Molecular epidemiology, Taxonomy, Genetic markers

J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 27 (153): 163 - 174 (Persian).

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و هفتم شماره 153 مهر سال 1396 (174-163)

کاربرد روش های مولکولی در مطالعات اپیدمیولوژی و تاکسونومی عفونت های انگلی

سمیرا دودانگه[1]
مهدی فخار[2]
الهام کیالاشکی[1]

چکیده

به‌طور کلی مفهوم اپیدمیولوژی مولکولی، استفاده از ابزارهای مولکولی در برآورد وضعیت برقراری چرخه یک بیماری در جمعیت مشخص می‌باشد. در حال حاضر، روش‌های مولکولی آسان، سریع و با کارآیی بالا، جهت شناسایی و تعیین گونه انگل‌ها در نمونه‌های بالینی و بیولوژی به‌طور چشمگیری استفاده می‌شوند. لذا هدف از مطالعه حاضر، مرور ابزارهای مولکولی و نحوه کاربرد آن‌ها به منظور شناخت بیش‌تر عفونت‌های انگلی در تحقیقات تاکسونومی و اپیدمیولوژی می‌باشد. محققین مختلف، به‌منظور شناسایی، بررسی تنوع ژنتیکی و هم‌چنین رفع مشکلات تاکسونومی به ویژه در سطح گونه و یا حتی زیرگونه انگل‌های مختلف، روش‌ها و مارکرهای متنوعی را ارائه نموده‌اند. بسیاری از این مطالعات در مورد اهمیت شیوع عفونت‌های همزمان با گونه‌های مختلف یک انگل و حتی ساب تایپ‌ها و یا سوش‌های آن‌ها می‌باشد. تاکنون قطعات مختلف DNA ریبوزومی، میتوکندریایی و کینتوپلاستی جهت تعیین هویت و آنالیز فیلوژنتیک انواع انگل‌ها استفاده شده‌اند. در صورتی‌که هدف تحقیق، بررسی تنوع درون گونه‌ای و روند تکاملی یک انگل باشد، بهتر است از تعیین توالی قطعه ITS1 ریبوزومی و قطعه COX1 میتوکندریایی استفاده شود. هم‌چنین استفاده از قطعاتی نظیر SSUrDNA و LSUrDNA در آنالیز فیلوژنتیک و تاکسونومی کاربرد بیش‌تری دارند. در مجموع می‌توان نتیجه گرفت که ابزارها و مارکرهای مولکولی جدید، جایگزین مناسبی برای روش‌های سنتی می‌باشند، زیرا در بسیاری مناطق آندمیک، درمان موفقیت‌آمیز به تشخیص سریع و دقیق بستگی دارند.

واژه های کلیدی: عفونت‌های انگلی، اپیدمیولوژی مولکولی، تاکسونومی، مارکرهای ژنتیکی

مقدمه

عفونت‌های انگلی غالباً در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری جهان، شایع بوده و سالانه عوارض اقتصادی و اجتماعی فراوانی بر جوامع تحمیل می‌کنند. علاوه بر این، به دلایل گوناگونی از جمله افزایش مسافرت‌های بین‌المللی، وضعیت سیستم ایمنی افراد، مقاومت‌های دارویی، تغییرات آب و هوایی و فاکتورهایی اقتصادی-اجتماعی مثل فقر و جنگ، میزان بروز و شیوع چنین عفونت‌هایی در جوامع بشری رو به گسترش هستند(1). بنابراین، امروزه انتخاب روش‌های تشخیصی کارآمد، دقیق، ساده، سریع و غیرتهاجمی جهت حمایت از برنامه‌های حذف در مناطق آندمیک و هم‌چنین تشخیص زودرس بیماری در مناطق غیر آندمیک مورد

مولف مسئول: مهدی فخار -ساری، کیلومتر 17 جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبراعظم، دانشکده پزشکی E-mail: mahdif53@yahoo.com
1. دانشجوی دکتری تخصصی انگل شناسی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
2. دانشیار، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
تاریخ دریافت : 1395/11/11 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : 1396/5/16 تاریخ تصویب : 1396/5/23

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 8:42 +0330 on Friday October 20th 2017

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 8:42 +0330 on Friday October 20th 2017

توجه زیادی قرار گرفته است. به‌طورکلی، روش متداول جهت تشخیص آزمایشگاهی عفونت‌های انگلی، استفاده از میکروسکوپ نوری و شاخص‌های مورفومتریک جهت شناسایی مورفولوژی انگل‌ها می‌باشد که از حساسیت نسبتاً پایینی برخوردارند(2). اگرچه روش‌های مبتنی بر مورفولوژی، ارزان و ساده هستند، ولی شناسایی مورفومتریک انگل بالغ و یا سایر مراحل تکاملی آن (مانند مراحل لاروی و تخم) تا حد گونه و سویه به دلیل شباهت‌های مورفولوژی، روش قابل اعتمادی نیستند. لذا در حال حاضر، به‌دلیل ناکارآمدی نسبی روش‌های میکروسکوپی، روش‌های مولکولی با تنوع زیاد و کاربردهای مختلف تشخیصی جهت شناسایی و تعیین هویت و طبقه بندی انگل‌ها از جایگاه ویژه‌ای برخوردار بوده و رشد چشمگیری داشته اند(2). از طرفی تکنیک‌های مولکولی قادر به شناسایی میکروارگانیسم‌ها و یا قطعاتی از ژنوم آن‌ها تحت عنوان Cell-Free DNA (DNA)بدون سلول (در نمونه‌های مختلف بالینی از جمله بزاق، ادرار، مدفوع، خلط، مایع مغزی نخاعی، مایع آمنیوتیک و غیره می‌باشند، لذا استفاده از این بیومارکر جهت تشخیص و شناسایی عفونت‌های انگلی می‌تواند بسیار راهگشا باشد(2). نکته قابل توجه این است که روش‌های اپیدمیولوژی مولکولی قادر به شناسایی روند تکاملی و میزان قرابت بین انگل‌ها می‌باشند، لذا توانایی محققین را در شناسایی دقیق انگل‌ها، درک صحیحی از پاتوفیزیولوژی بیماری و یافتن ارتباط بین فاکتورهای محیطی و اقلیمی با فراوانی انگل را بهبود می‌بخشند(3، 4).

نکته‌ای که باید به آن اشاره کنیم، کاربرد واژه‌هایی مانند سیستماتیک، تاکسونومی و فیلوژنی در مطالعات اپیدمیولوژی مولکولی می‌باشند که در بسیاری از موارد بجای یکدیگر استفاده می‌شوند. اگرچه تا حدودی مترادف یکدیگر هستند، اما تاکسونومی در واقع علم نامگذاری، توصیف، طبقه بندی و ارائه کننده کلیدهای شناسایی موجودات زنده و اطلاعات پراکندگی آن‌ها می‌باشد. در حقیقت تاکسونومی جزیی از علم گسترده سیستماتیک می‌باشد؛ در سیستماتیک علاوه بر موارد مذکور، تاریخچه تکاملی موجودات و سازگاری‌های محیطی آن‌ها نیز مورد بررسی قرار می‌گیرد. مفهوم واژه فیلوژنتیک نیز بررسی میزان ارتباط بین یک گروه از موجودات و هم‌چنین میزان روند تکاملی آن‌ها از نظر مشخصات فنوتیپی و ژنوتیپی است که معمولاً به صورت درخت‌های فیلوژنی یا فیلوگرام نمایش داده می‌شوند و برای شناسایی تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای و برون‌گونه‌ای ارگانیسم‌ها، به ویژه آن‌هایی که قرابت نزدیکی با هم دارند، استفاده می‌گردد(5).

لذا، مطالعه حاضر با هدف مروری بر روش‌های مولکولی و کاربرد آن‌ها در مطالعات اپیدمیولوژی و تاکسونومی عفونت‌های انگلی و نیز درک بهتر از اهمیت تجزیه و تحلیل آن‌ها انجام شده است.

1. *مطالعات اپیدمیولوژی و بوم شناسی*

اپیدمیولوژی، علم شناخت نحوه توزیع بیماری‌ها و عوامل ایجاد کننده آن‌ها در جوامع می‌باشد که برای بیماری‌های انگلی، نحوه انتقال انگل بین میزبان‌های مختلف را نیز شامل می‌شود (6). بنابراین کنترل یک بیماری انگلی به عوامل مختلفی از جمله آگاهی از ساختار ژنتیکی و اکولوژی انگل، به خصوص راه های انتقال و نحوه برقراری چرخه زندگی آن، وضعیت دموگرافیک افراد مبتلا و در معرض خطر و هم‌چنین عوارض احتمالی ناشی از هر گونه مداخله و اقدام عملی می‌باشد(7).

مطالعات اکولوژی یا بوم شناسی در حوزه انگل شناسی، معمولاً با بررسی چرخه زندگی انگل و توصیف فراوانی، شدت عفونت و پراکندگی آن در شرایط محیطی آغاز می‌شود. این داده‌ها اغلب با بررسی‌های آزمایشگاهی و استفاده از مدل‌های حیوانی به منظور بررسی میزان عفونت‌زایی و در نهایت پی بردن به روش‌های اصلی انتقال انگل همراه می‌شوند. در

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 8:42 +0330 on Friday October 20th 2017

سال‌های اخیر، از مدل‌های ریاضی (maximum likelihood and Bayesian) و الگوهای جمعیتی میزبان برای تفسیر مطالعات اکولوژی، چرخه زندگی انگل و اپیدمیولوژی بیماری‌های انگلی استفاده شده است(11، 8). نباید هدف اصلی تحقیقات اپیدمیولوژی را تنها تعیین ژنوتیپ عوامل انگلی دانست، زیرا حضور ژنوتیپ‌های مختلف، الزاماً بیانگر تفاوت‌های فنوتیپی نیست. لذا تحقیق در مورد مارکرهای ژنتیکی به منظور بررسی چالش‌های مهمی مانند مقاومت‌های دارویی و شدت بیماری‌زایی اهمیت زیادی دارند.

2. مطالعات تاکسونومی

استفاده از تکنیک‌های مولکولی جهت شناسایی تنوع ژنتیکی عوامل عفونی به خصوص در سطح درون گونه‌ای، می‌تواند به‌عنوان پایه و اساس بیش‌تر مطالعات اپیدمیولوژی مولکولی قرار گیرد، چرا که تاکسونومی مبتنی بر مورفولوژی یا همان تاکسونومی سنتی به تجربه زیادی نیاز داشته و گاهی به دلایل مختلف با خطاهایی همراه هست(12). استفاده مناسب از ابزارهای مولکولی در تشخیص و پایش عوامل عفونی و هم‌چنین شناسایی منابع عفونت در نمونه‌های محیطی و بالینی بسیار کمک‌کننده خواهد بود(19، 13).

3. انواع روش‌های مولکولی

روش‌های مبتنی بر PCR در انگل‌شناسی کاربرد چشم‌گیری دارد، زیرا در اغلب موارد، جداسازی، کشت و شناسایی یک نمونه انگلی جهت آنالیز کردن غیر ممکن است(22، 20).

Quantity Real time Polymerase Chain Reaction (Q-PCR)

در حال حاضر Q-PCR به عنوان یک روش کمی، قادر است با استفاده از عوامل فلورسنت مختلف که شامل رنگ SYBR Green، پروب Taq Man ، پروب‌های Hybridization و پرایمرهای Scorpion می‌شود، مقدار کمی از نمونه را شناسایی نماید(23).

با استفاده از این روش می‌توان DNA و یا RNA نمونه‌های آلوده محیطی یا بافت‌های آلوده را به منظور برآورد شدت آلودگی یا درصد زنده بودن انگل بررسی نمود(25، 24). در این روش از یک یا دو شناساگر (Probe)نشاندار شده با مواد فلوئورسنت استفاده می‌شود. لذا در طول انجام PCR می‌توان به طور مداوم محصول تولید شده را مشاهده نمود(26).

HRM-PCR (High Resolution Melting)

این تکنیک در واقع یک روش Real time PCR است که از آن به منظور شناسایی جهش‌های نقطه‌ای، پلی مورفیسم‌ها (Single Neuclotid Polymorphism) و غیره استفاده می‌شود. در این روش تفاوت در توالی نوکلئیک اسید مورد نظر با استفاده از تفاوت در منحنی ذوب قابل تشخیص است که ویژگی‌های مختلفی مثل GC content، طول قطعه، توالی و یا هتروزیگوسیتی سبب اختلاف در منحنی ذوب می‌گردد. در ضمن محصولات واکنش HRMرا بدون هیچ تکثیر و خالص‌سازی اضافی، مستقیماً می‌توان تعیین توالی نمود. مطالعات مختلف محققین بر روی انگل‌های مختلف نشان می‌دهد که روش HRM ، روشی سریع، مقرون به صرفه و دارای حساسیت بالا برای تشخیص عفونت‌های انگلی در انسان و دام و به طور همزمان، تفکیک گونه‌ها و ژنوتایپ‌ها، شناسایی انواع ژن‌های مقاوم به دارو و پیگیری بیماران پس از درمان بیماری‌های انگلی می‌باشد(31، 27).

تکنولوژی Luminex

لومینکس (Luminex) تکنولوژی مبتنی بر (Multi-Analyte Profiling) xMAP می‌باشد. این روش مرکب از فلوسایتومتری، میکروسفرهای فلورسنت،

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 8:42 +0330 on Friday October 20th 2017

لیزرها و پردازش سیگنال دیجیتال بوده و قادر به اندازه‌گیری 100 آنالیت مختلف به‌طورهمزمان در تنها یک نمونه می‌باشد(32). هم‌چنین قادر است تا هر کدام از میکروسفرها را با استفاده از معرفی که جهت اندازه‌گیری خاص طراحی شده است، پوشش دهد. این میکروسفرها از طریق پیوند کووالانسی با آنتی‌ژن‌ها، آنتی‌بادی‌ها یا الیگونوکلئوتیدهایی که به‌عنوان پروب هستند، اتصال می‌یابند(33). هم‌چنین در حال حاضر در تحقیقات انگل‌شناسی، Luminex قادر به شناسایی ارگانیسم‌های متعدد یا ژنوتیپ‌های مختلف یک ارگانیسم خاص در طول یک واکنش با حجم بسیار کم نمونه می‌باشد(34). مطالعات محققین بیان‌گر این است که روش Luminex می‌تواند سرعت، دقت و قابلیت سایر روش‌های PCR را بهبود دهد و علاوه بر این، هزینه را نسبت به سایر روش‌های مولکولی کاهش دهد. هم‌چنین با استفاده از این روش می‌توان جهت مطالعه بر روی آنتی‌ژن‌های ایجادکننده مقاومت دارویی استفاده نمود که گزارشاتی در خصوص انگل‌های جنس کریپتوسپوریدیوم، ژیاردیا و پلاسمودیوم فالسی پاروم و تمایز گونه آمیب هیستولیتیکا از دیسپار وجود دارد(35، 23).

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

از تکنیک RAPD معمولاً جهت بررسی پلی مورفیسم ایزوله‌های مختلف یک انگل در مطالعات اپیدمیولوژی استفاده می‌شود(36). اگرچه اخیراً با ظهور تکنیک‌های نوین، بررسی پلی مورفیسم در انگل‌ها با این روش کاهش‌یافته است، اما مزایای این روش مانند ساده بودن، مقرون به صرفه بودن، سرعت زیاد و عدم نیاز به اطلاعات اولیه در مورد ردیف DNA باعث ماندگاری آن شده است(37). در مقابل سایر تکنیک‌های تعیین ژنوتیپ، از روش RAPD برای تکثیر تصادفی قطعات زیادی از ژنوم (1 تا 10 قطعه یا حتی بیش‌تر) استفاده می‌شود. اساس روش RAPD-PCR بر پایه استفاده از تنها یک پرایمر با طول کوتاه و توالی‌های اختیاری است. از آن‌جا که مارکرهای مورد استفاده در این روش، تنوع مناسبی را در داخل و بین گونه‌ها آشکار می‌کنند، برای آنالیزهای فیلوژنتیکی مناسب می‌باشند(37).

Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

تکنیک AFLP روشی است که جهت شناسایی پلی‌مورفیسم DNA بدون اطلاعات اولیه از ژنوم، مورد استفاده قرار می‌گیرد. این روش مبتنی بر تکثیر قطعات برش یافته انتخابی حاصل از هضم کلی DNA ژنومی با روش PCR است. این روش به‌دلیل امکان آنالیز هم‌زمان تعداد زیادی از باندها با پوشش گسترده‌ای از ژنوم، بسیار کارآمد است. این تکنیک شامل 4 مرحله‌ی هضم DNA ، اتصال آداپتورهای الیگونوکلئوتیدی، تکثیر و آنالیز ژل می‌باشد. پلی مورفیسم‌ها بر اساس حضور یا عدم حضور قطعات DNA توسط آنالیز ژل پلی آکریل آمید تشخیص داده می‌شوند. از مزایای این روش می‌توان به توانایی جستجو در کل ژنوم جهت پلی مورفیسم، تکرار پذیری روش و امکان استفاده در مورد انگل‌هایی که اطلاعات ژنتیکی قبلی ندارند، اشاره نمود(40، 38).

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

تکنیک RFLP در حال حاضر یکی از معمول‌ترین روش‌های مولکولی است که جهت تشخیص گونه‌ها و ژنوتیپ انگل‌ها استفاده می‌شود(41). این روش اولین بار جهت شناسایی تنوع در سطح DNA مورد استفاده قرار گرفت(42). این روش بر پایه هضم محصولات PCR توسط آنزیم‌های محدودکننده یا اندونوکلئازها صورت می‌گیرد. این آنزیم‌ها DNA را از طریق قطعات با سایزهای خاصی که نتایج آن بر روی ژل آگارز یا پلی آکریل آمید آنالیز می‌شود، شناسایی می‌کنند. روش

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 8:42 +0330 on Friday October 20th 2017

RFLPبرای نمونه‌های زیست محیطی مناسب است، چرا که قادر به شناسایی ژنوتیپ‌های متعدد در نمونه‌های مشابه می‌باشد(43). هم‌چنین این روش در آنالیزهای فیلوژنتیکی و تاکسونومی انگل‌های مختلف کاربردهای فراوانی دارد(11 ،7، 1)

میکروستلایت‌ها (Microsatellites)

میکروستلایت‌ها، توالی‌های تکرار شونده پشت سر هم متشکل از 6-1 باز هستند(44). میکروستلایت‌ها در ژنوم بیش‌تر یوکاریوت‌ها پراکنده‌اند، به‌طوری‌که تقریباً در هرده کیلو جفت باز (Kbp) از ردیف DNA ، حداقل یک ردیف Microsatellite دیده می‌شود. میکروستلایت‌ها در شناسایی و تعیین هویت بسیاری از انگل‌های انسانی و حیوانی مورد استفاده قرار گرفته‌اند(46 ،44). دلیل استفاده از میکروستلایت‌ها به‌عنوان مارکر ژنتیکی این است که آلل‌های متفاوتی از نظر واحدهای تکرار شونده در هر جمعیت وجود دارد و تنوع تعداد واحدهای تکرار شونده Microsatellites ، منجر به پلی مورفیسم بسیار بالای آن‌ها می‌شود. در ضمن با توجه به قدرت تفکیک بالای این روش در شناسایی گونه‌ها و حتی سوش‌های یک انگل که قرابت ژنتیکی نزدیکی بهم دارند، در حال حاضر این روش به‌عنوان جایگزینی برای روش استاندارد طلایی ایزوآنزیم‌ها (زایمودم‌ها) مطرح می‌باشد. از آن‌جایی‌که کشت تک‌یاخته‌ها و انبوه‌سازی آن‌ها محدودیت‌هایی دارند و از طرفی در این روش نیازی به کشت انگل وجود ندارد، لذا روش مذکور ابزاری کارآمد در مطالعات اپیدمیولوژی مولکولی، تاکسونومی و آنالیز فیلوژنتیک می‌باشد(47).

ریز آرایه های DNA (DNA microarrays)

یکی از جدیدترین روش‌ها در بررسی بیان ژن، یا تراشه‌های زیستی DNA استفاده از ریز آرایه‌های است که بر خلاف دیگر DNA (DNA biochip) روش‌های مولکولی که بیان یک ژن را بررسی می‌کند، امکان بررسی بیان هزاران ژن به‌طور هم‌زمان را فراهم می‌سازد(48). اساس این روش بر پایه ترکیب دو روش و هیبریداسیون آن با پروب‌های DNA تکثیر الیگونوکلئوتیدی بوده که برای تعداد زیادی از توالی‌های هدف اختصاصی می‌باشند. این ابزار، پیشرفت‌های موفقیت‌آمیزی در شناسایی و تشخیص بسیاری از بیماری‌های انگلی را داشته است(48). روش دیگر، طیف سنجی جرمی با استفاده از لیزر (matrix-assisted laser desorption–ionization time-of-flight) (MALDI TOF) برای شناسایی پاتوژن‌ها بر اساس پروتئین‌های تشخیصی است که به سرعت در حال رشد است. اساس این روش، یونیزاسیون ملایم مولکول‌های بزرگ قطبی بر پایه بمباران نمونه با نور لیزر است که از آن می‌توان برای آنالیز پروتین‌ها حتی در نمونه‌های بالینی استفاده نمود(49). در حال حاضر، کاربرد چنین روش‌هایی با محدودیت‌هایی مانند وجود پایگاه‌های اطلاعاتی مناسب و نیاز به تجهیزات گران قیمت روبرو است و بیش‌تر در آزمایشگاه‌های مرجع مورد استفاده قرار می‌گیرد و در دسترس است(15).

4. انتخاب مارکرهای مناسب

در حال حاضر پیشرفت ابزارهای پروتئومیکس/ ژنومیک جدید مانند cDNA microarrays تا حد زیادی جهت شناسایی جایگاه کاندید مناسب، حتی برای گونه‌هایی که داده‌های ژنومی آن‌ها در دسترس نیست، کمک‌کننده است(50). یکی از نواحی که در تحقیقات مولکولی بسیار مورد مطالعه قرار گرفته است، rDNA (Ribosomal DNA)بوده که در تمام میکروارگانیسم‌ها یافت می‌شود. ژن‌های کدکننده DNA ریبوزومی برای مطالعات تاکسونومی کاربرد فراوانی دارد، زیرا این نواحی شامل مناطق محافظت شده کامل تا متغیر هستند. استفاده از تعیین توالی مستقیم ناحیه

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 8:42 +0330 on Friday October 20th 2017

ITS(Internal Transcribed Spacer)یک تکنیک بسیار مهم در زمینه شناسایی ارگانیسم‌های عفونی بر اساس ژنوتایپ آن‌ها می‌باشد و کمپلکس rDNA به خاطر حفظ توالی‌هایش در کنار توالی‌های شدیداً متغیر ITS1و ITS2 به‌عنوان مناطق مناسبی شناخته شده‌اند(51، 11، 7). توالی هتروژنی اسیدهای نوکلئیک در این ناحیه و در موجودات مختلف می‌تواند به طبقه‌بندی تکاملی میکروارگانیسم‌ها کمک شایانی نماید.

از دیگر مارکرها می‌توان به (mitochondrial DNA) (mtDNA)اشاره نمود که نوعی DNA است که در ژنوم میتوکندری سلول‌های یوکاریوتی یافت می‌شود و در مهره‌داران، حدود 5 تا 10 برابر سریع تر از ژن‌های هسته، ظاهر می‌شوند. لذا یکی از مزایای مهم این مارکر، سرعت ظاهر شدن می‌باشد. این ژنوم کوچک و حلقوی است که به‌صورت مادرزادی و بدون وابستگی به ژنوم هسته به ارث می‌رسد. بنابراین در مطالعات مولکولی با هدف بررسی روند تکاملی یک انگل، می‌توان از ژنوم میتوکندری به‌عنوان مارکر بسیار مناسب استفاده نمود و یکی از محافظت شده‌ترین قطعات فشرده از اطلاعات ژنتیکی است که نوترکیبی ژنتیکی در آن اتفاق نمی‌افتد، به طوری که هیچ اینترونی درون این ژن ها وجود نداشته و ضمنا توانایی کد کردن هم ندارند. از مثال‌های بارز آن می‌توان به مطالعات تاکسونومیک و طبقه‌بندی برخی از کرم‌ها مانند گونه و سوش‌های مختلف اکینوکوکوس و تریکوبیلارزیا (عامل اصلی شیستوزومای پرندگان) اشاره نمود(54، 52)

استفاده از ژن COI(cytochrome c oxidase 1) و ND1 (NADH dehydrogenase-1)، روش مناسبی جهت شناسایی تنوع درون گونه‌ای انگل‌ها می‌باشد(55). علاوه بر این، kDNA (kinetoplastDNA)موجود در انگل‌های جنس لیشمانیا و تریپانوزوم با دارا بودن هزاران نسخه حلقوی (minicircles) که هر یک شامل دو بخش محافظت شده و جهش یافته است، هدف خوبی برای مطالعات مولکولی تشخیصی و تعیین گونه می‌باشد(1).

به‌طورکلی اگر هدف، بررسی اختلافات درون گونه‌ای باشد، به ویژه در مورد گونه‌های نزدیک به هم و نیز در مواردی که احتمال ظهور سوش‌ها یا حتی گونه‌های جدیدی در بین گونه‌های قبلی می‌رود، بهتر است از تعیین توالی قطعاتی استفاده کرد که اختلافات درون گونه‌ای بیش‌تری دارند که در این زمینه به ویژه از تعیین توالی قطعه ITS1 ریبوزومی و توالی قطعه CO1 میتوکندریایی استفاده می‌شود. گرچه ویژگی‌های بالقوه DNAمیتوکندریایی مانند میزان بالاتر تکامل نسبت به rDNA، احتمال تشخیص گونه‌های ناشناخته را در گروه کرم‌های پهن افزایش می‌دهد، اما با توجه به یافته‌های محققین بر روی کرم‌های پهن، CO1تنوع کم‌تری نسبت به ND1 نشان داده است. با این وجود CO1 نسبت به ITS1 و ITS2 تنوع درون گونه‌ای بیش‌تری را نشان می‌دهد. لازم به توضیح است که ITS1 نسبت به ITS2تنوع درون گونه ای بالاتری را بیان می کند. نتایج مطالعات نشان می‌دهد DNA میتوکندریایی کرم‌های پهن نسبت به ITS تکامل یافته‌تر هستند. در مجموع انتخاب مارکرهای تشخیصی بر اساس میزان و روند تکاملی ارگانیسم اهمیت زیادی خواهد داشت. قطعاتی نظیر SSU rDNA(small subunit rDNA) و LSU rDNA(large subunit rDNA)عمدتاً در آنالیز فیلوژنتیک کاربرد دارند(57، 55).

اخیراً کاربرد ابزارهای مولکولی در حوزه نسبتاً جدید باستان انگل شناسی (Paleoparasitolog) به ویژه در انگل‌های کرمی اهمیت ویژه‌ای یافته است. در این خصوص استفاده از فسیل‌ها و اجساد مومیایی شده توانسته در طبقه‌بندی و شناسایی انگل‌های تک یاخته‌ای و کرمی و هم‌چنین منشا احتمالی و روند تکاملی آن‌ها تاثیرگذار باشد(59، 58).

در پایان می‌توان نتیجه گرفت که در مجموع یکی از چالش‌های پیش رو، یافتن مارکرهای ژنتیکی مناسب در

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 8:42 +0330 on Friday October 20th 2017

موارد پیچیده‌ی اپیدمیولوژیکی به خصوص در مورد کرم ها مانند شناسایی منبع عفونت، عفونت‌های زئونوز، مقاومت‌های داروئی و میزان بیماری زایی عفونت‌های انگلی در میزبان‌های مختلف می‌باشد. هم‌چنین استفاده از ابزارهای مولکولی نوین و رایج می‌تواند در حوزه نسبتاً جدید باستان انگل‌شناسی و به روزرسانی طبقه‌بندی انگل‌ها و حتی ناقلین و مخازن آن‌ها با استفاده از فسیل‌های به جای مانده در مناطق جغرافیایی مختلف جهان بسیار موثر باشد. از سوی دیگر، استفاده از بعضی ابزارهای نوین مانند حسگرهای زیستی (biosensors) و ابزارهای متکی بر تراشه‌ها (chips) و روش‌های متکی بر طیف سنجی جرمی با لیزر (مانند روش MALDI TOF) هنوز مراحل تکاملی خود را می‌گذرانند(49) و ابزارهای گران قیمت هستند، اما در آینده نزدیک با تجاری شدن آن‌ها، بسیاری از سوالات پیشرو محققین پاسخ داده خواهند شد.

References

1. Fakhar M, Mohebali M, Ahmadpoor E. Visceral Leishmaniosis (kala-azar). 1th ed. Gorgan, Nouroozi Pub.2014.(Persian)
2. Weerakoonand KG, McManus DP. Cell-Free DNA as a diagnostic tool for human parasitic infections. Trends Parasitol. 2016; 32(5).378-391.
3. CrisioneCD, PoulinR, Blouin MS. Molecular ecology of parasites: elucidating ecological and evolutionary processes. Mol Ecol. 2005;14(8):2247–2257.
4. Archie EA, Luikart G, Ezenwa VO. Infecting epidemiology with genetics: a new frontier in disease ecology. Trends Ecol Evol 2008;24(1):21–30.
5. Wilkins JS. What is systematics and what is taxonomy? Available at: http://evolvingthoughts.net/. Accessed Feb 5 ,2011
6. Hide G, Tait A. The molecular epidemiology of parasites. Experientia. 1991;47:128–142.
7. LymberyAJ, ThompsonRCA. The molecular epidemiology of parasite infections: Tools and applications. Mol Biochem Parasitol. 2012;181(2):102-116.
8. Anderson RM, May RM. Infectious diseases of humans: dynamics and control. Oxford:OUP Oxford; 1992.
9. Morgan ER, Milner-Gulland EJ, Porgerson PR, Medley GF. Ruminating on complexity: macroparasites of wildlife and livestock. Trends Ecol Evol. 2004;19(4):181–188.
10. Cornell S. Modelling nematode populations: 20 years of progress. Trends Parasitol 2005;21(11):542–545.
11. Tavares RG, Staggemeier R, Borges ALP, Rodrigues MT, Castelan LA, Vasconcelos J, et al. Molecular techniques for the study and diagnosis of parasite infection. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 2011; 17(3): 239-248.
12. Thompson RCA. Molecular epidemiology: applications to problems of infectious disease. In: Thompson RCA, editor. The molecular epidemiology of infectious diseases. London: Arnold; 2000. p: 1–4.
13. Groth DM, Wetherall JD. Molecular tools in epidemiological investigations. In: Thompson RCA, editor. The molecular epidemiology of infectious

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 8:42 +0330 on Friday October 20th 2017

diseases. London: Arnold; 2000. p. 5–19.

14. Thompson RCA, Lymbery AJ. Genetic variability in parasites and host parasite interactions. Parasitology .1996;112(s1):7–22.
15. Monis PT, GiglioS, KeeganAR, ThompsonRCA. Emerging technologies for the detection and genetic characterisation of parasites. Trend Parasitol .2005;21(7):340–346.
16. Gordon CA, Gray DJ, Gobert GN, McManus DP. DNA amplification approaches for the diagnosis of key parasitic helminth infections of humans. Mol Cell Probes. 2011;25(4):143–152.
17. Thompson RCA, Constantine CC, Morgan UM. Overview and significance of molecular methods: what role for molecular epidemiology? Parasitology. 1999;117:S161–S175.
18. Jex AR, Smith HV, Monis PT, Campbell BE, Gasser RB. Cryptosporidium – biotechnological advances in the detection, diagnosis and analysis of genetic variation. Biotechnol Adv. 2008;26(4):304–317.
19. Siripattanapipong S, Leelayoova S, Mungthin M, Thompson RCA, Boontanom P, Saksirisamphant W, et al. Determination of discriminatory power of genetic markers used for genotyping Giardia duodenalis. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2011;42(4):764–771.
20. Gasser RB. Molecular tools – advances, opportunities and prospects. Vet Parasitol. 2006;136(2):69-89.
21. Guy RA, XiaoC, Horgen PA. Real-time PCR assay for detection and genotype differentiation of Giardia lamblia in stool specimens. J Clin Microbiol. 2004;42(7):3317-3320
22. 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):622-627.
23. Ndao M. Diagnosis of parasitic diseases: old and new approaches. Interdiscip Perspect Infect Dis. 2009;2009:1-15.
24. ShokoplesSE, NdaoM, 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):975-980.
25. 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):4121-4125.
26. Blessmann J, Buss H, Nu P, Dinh B, Ngo Q, Van A, et al. Real-time PCR for detection and differentiation of Entamoeba histolytica and Entamoeba dispar in fecal samples. J Clin Microbiol. 2002; 40(12): 4413-4417.

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 8:42 +0330 on Friday October 20th 2017

27. Wittwer CT. High resolution DNA melting analysis: advancements and limitations. Hum Mutat. 2009; 30(6):857-859.
28. Zampieri RA, Laranjeira-Silva MF, Muxel SM, de Lima AC, Shaw JJ, Floeter-Winter LM. High resolution melting analysis targeting hsp70 as a fast and efficient method for the discrimination of Leishmania species. PLoS Negl Trop Dis. 2016;10(2):e0004485.
29. Héritier L, Verneau O, Breuil G, Meistertzheim AL. The high resolution melting analysis (HRM) as a molecular tool for monitoring parasites of the wildlife. Parasitology. 2017;144(5):563-570.
30. Pazoki-ghohe H, Haghparast-kenari B, Fakhar M. Current and novel laboratory diagnostic methods and identification of causative agents for cutaneous leishmaniasis. J Mazandaran Univ Med Sci. 2016;25(132):350-366.(Persian)
31. Fakhar M, Taghavi M, Kalani H, Montazeri M, Ziaei H. Current and novel laboratory diagnostic methods for amebiasis. J Mazandaran Univ Med Sci. 2015;24(122):440-455 .(Persian)
32. Dunbar SA. Applications of Luminex xMAP technol¬ogy for rapid, high-throughput multiplexed nucleic acid detection. Clin Chim Acta. 2006;363(1-2):71-82.
33. Cowan LS, Diem L, Brake MC, Crawford JT. Transfer of a Mycobacterium tuberculosis genotyping method, spoligotyping, from a reverse line-blot hybridization, membrane-based assay to the Luminex multianalyte profiling system. J Clin Microbiol. 2004;42(1):474-477.
34. Monis PT, Andrews RH. Molecular epidemiology: assumptions and limitations of commonly applied methods. Int J Parasitol. 1998;28(6):981-987.
35. Santos HLC, Bandyopadhyay K, Bandea R, Peralta RHS, Peralta JM, Da Silva AJ. LUMINEX®: a new technology for the simultaneous identification of five Entamoeba spp. commonly found in human stools. Parasit Vectors. 2013;6(1):69.
36. Oliveira RP, Macedo AM, Chiari E, Pena SD. An alternative approach to evaluating the intraspecific genetic variability of parasites. Parasitol Today. 1997;13(5):196-200.
37. Jain SK, Neekhra B, Pandey D, Jain K. RAPD marker system in insect study: a review. Indian J Biotechnol. 2010;9(1):7-12.
38. Bonin A, EhrichD, Manel S. Statistical analysis of amplified fragment length polymorphism data: a toolbox for molecular ecologists and evolutionists. Mol Ecol. 2007;16(18):3737-3758.
39. ButtowMV, Castro CM, Schwartz E, ToniettoA, BarbieriRL. Molecular characterization of Butia capitata populations (Arecaceae) in Southern Brazil estimated by AFLP analysis AFLP. Rev Bras Frutic. 2010;32(1):230-239.
40. Blears MJ, Pokorny NJ, Carreno RA, Chen S, De Grandis SA, LeeH, et al. DNA

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 8:42 +0330 on Friday October 20th 2017

fingerprinting of Cryptosporidium parvum isolates using amplified fragment length polymorphism (AFLP). J Parasitol. 2000;86(4):838-841.

41. QuanJH, 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):105-108.
42. Carpentieri-Pípolo V, Gallo-Meagher M, Dickson DW, Gorbet DW, Mendes ML, de Souza SGH. Comparison between methods of demarcation of probe of RFLP R2430E used in the selection of resistance of peanut to Meloidogyne arenaria. Semin: Cien Agrar.2008;29(4):783-388
43. HuberF.Caracterização genotípica e estudo filogenético de Cryptosporidium spp. obtidos de diferentes hospedeiros [dissertation]. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 2007.
44. OliveiraEJ, Pádua JG, Zucchi MI, VencovskyR, Vieira MLC. Origin evolution and genome distribution of microsatellites. Genet Mol Biol. 2006;29(2):294-307.
45. Temperley ND, Webster LM, Adam A, Keller LF, Johnson PC. Cross-species utility of microsatellite markers in Trichostrongyloid nematodes. J Parasitol. 2009;95(2):487-489.
46. Johnson PC, Webster LM, AdamA, Buckland R, Dawson DA, Keller LF. Abundant variation in microsatellites of the parasitic nematode Trichostrongylus tenuis and linkage to a tandem repeat. Mol BiochemParasitol. 2006;148(2):210-218.
47. Fakhar M, Motazedian MH, Daly D, Lowe CD, Kemp SJ, Noyes HA. An integrated pipeline for the development of novel panels of mapped microsatellite markers for Leishmania donovani complex, Leishmania braziliensis and Leishmania major. Parasitology.2008;135(5):567-574.
48. Trevino V, Falciani F, Barrera-Saldaña HA. DNA microarrays: a powerful genomic tool for biomedical and clinical research. Mole Med. 2007;13(9-10):527-541.
49. Duncan R . DNA microarray analysis of protozoan parasite gene expression: outcomes correlate with mechanisms of regulation. Trend Parasitol .2004;20(5): 211-215.
50. Singhal N, Kumar M, Virdi JS. MALDI-TOF MS in clinical parasitology: applications, constraints and prospects. Parasitology. 2016;143(12):1491-1500.
51. FitzpatrickMJ, Ben-Shahar Y, Smid HM, Vet LEM, Robinson GE, Sokolowski MB. Candidate genes for behavioral ecology. Trends Ecol Evol 2005;20(2):96–104.
52. Fakhar M, Pazoki Ghohe H, Rasooli SA, KaramianM, Mohib AS, Ziaei Hezarjaribi H, et al. Genetic diversity of Leishmania tropica strains isolated from clinical forms of cutaneous leishmaniasis in rural districts of Herat province, Western Afghanistan, based

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 8:42 +0330 on Friday October 20th 2017

on ITS1-rDNA. Infect Genet Evol. 2016;41:120-127.

53. Vilas R, Criscione CD, Blouin MS. A comparison between mitochondrial DNA and the ribosomal internal transcribed regions in prospecting for cryptic species of platyhelminth parasites. Parasitology.2005; 131(6): 839-846.
54. Thompson RCA, Lymbery AJ, Constantine CC. Variation in Echinococcus: towards a taxonomic revision of the genus. Adv Parasitol 1995;35:145–176.
55. Brant SV, Loker ES. Molecular systematics of the avian schistosome genus trichobilharzia (trematoda: schistosomatidae) in North America. J Parasitol 2009;95(4):941–963.
56. Fakhar M, Karamian M, Ghobaditara M A practical guideline for the identification of cercarial dermatitis agents in Iran. First ed. Gorgan, Nouroozi Pub ; 2017.(Persian)
57. Stentiford GD, Feist SW, Ston DM, Peeler EJ, Bass D. Policy, phylogeny, and the parasite. Trend Parasitol 2014;14(6): 274-281.
58. Fakhar M, Ghobaditara M, Brant SV, Karamian M, Gohardehi S, Bastani R. Phylogenetic analysis of nasal avian schistosomes (Trichobilharzia) from aquatic birds in Mazandaran Province, northern Iran. Parasitol Int . 2016; 65(2):151-158.
59. Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, Sereno D. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of Leishmania parasites and sandflies. PLoS Negl Trop Dis. 2016;10(3):e0004349.
60. Chai JY, Seo M, Shin DH. Preface for Special Section on Paleoparasitology. Korean J Parasitol. 2016;54(5):553-554.