*Original Article*

# A molecular beacon-based real time PCR assay for quantitative detection of *Toxoplasma gondii* in rat

**Norozi R[1], Dalimi-Asl A[1*], Forozandeh-Moghadam M[2], Ghaffarifar F[1]**

1- Department of Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. Iran.
2- Department of Biotechnology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. Iran.

Received December 12, 2011; Accepted May 23, 2012

## Abstract:

**Background:** Application of quantitative real time PCR has evolved as a sensitive, specific, and rapid method for the detection of *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*). The present study aimed to evaluate the efficacy of real time PCR method, using B1 gene, for the diagnosis of toxoplasmosis in the experimentally infected rats.

**Materials and Methods:** Parasites were cultured in peritoneal cavity of mice and then the DNA was extracted in tachyzoite stage. The B1 gene of *T. gondii* was amplified by PCR and detected by real time PCR method based on the molecular beacon probe. Finally, real time PCR was evaluated for the quantization of *T. gondii* in the blood of the experimentally infected rats.

**Results:** The B1 gene of *T. gondii* which was successfully amplified by PCR yielded an amplicon with an approximate length of 116 bp. Using this gene was evaluated highly appropriate for the quantization of *T. gondii* by real time PCR method.

**Conclusion:** Application of real time PCR method is shown to be highly efficient in terms of sensitivity and rapidity for the detection of B1 gene as well as the quantization of *T. gondii* in blood of rat.

**Keywords:** *Toxoplasma gondii*, Real time PCR, B1 gene, Rat

* **Corresponding Author**
**Email**: dalimi_a@modares.ac.ir
**Tel:** 0098 21 828 83838
**Fax:** 0098 21 828 84555

Conflict of Interests: ***No***

***Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences September, 2012; Vol. 16, No 4, Pages 311-316***

***Please cite this article as:*** Norozi R, Dalimi-Asl A, Forozandeh-Moghadam M, Ghaffarifar F. A molecular beacon-based real time PCR assay for quantitative detection of *Toxoplasma gondii* in rat. ***Feyz*** 2012; 16(4): 311-6.

[ Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-04 ]

# ردیابی کمی توکسوپلاسماگوندیی توسط Real time PCR با استفاده از پروب Molecular beacon در موش صحرایی

رقیه نوروزی [۱]، عبدالحسین دلیمی اصل [۲*]، مهدی فروزنده مقدم [۳]، فاطمه غفاری فر [٤]

**خلاصه:**

**سابقه و هدف:** روش کمی Real time PCR روشی سریع و دارای حساسیت و ویژگی بالایی در تشخیص توکسوپلاسموزیس است. هدف از پژوهش حاضر ارزیابی این روش با استفاده از ژن B1 برای تشخیص توکسوپلاسموزیس در آلودگی تجربی موش صحرایی با انگل مذکور است.

**مواد و روش‌ها:** انگل در محوطه صفاقی موش سوری تکثیر شده و DNA آن از مرحله تاکی‌زوئیت استخراج گردید. سپس با استفاده از روش PCR ژن B1 تکثیر گردیده و با تکنیک Real time PCR و پروب Molecular beacon مورد شناسایی قرار گرفت. در نهایت تعدادی موش صحرایی به‌صورت تجربی آلوده شده و انگل در خون آنها به‌صورت کمی ردیابی شد.

**نتایج:** ژن B1 توکسوپلاسما گوندی با موفقیت تکثیر شده و باندی حدود ۱۱٦ جفت بازی را تولید نمود. این ژن برای استفاده در روش Real time PCR جهت ردیابی کمی انگل بسیار مناسب ارزیابی گردید.

**نتیجه‌گیری:** ارزیابی تکنیک Real time PCR نشان داد که این روش برای تشخیص ژن B1 سریع و حساس بوده و جهت ارزیابی کمی توکسوپلاسما در خون موش صحرایی بسیار مناسب است.

**واژگان کلیدی:** توکسوپلاسما گوندی، روش Real-time PCR، ژن B1، موش صحرایی

دو ماه‌نامه علمی– پژوهشی فیض، دوره شانزدهم، شماره ٤، مهر و آبان ۱۳۹۱، صفحات ۳۱٦-۳۱۱

**مقدمه**

توکسوپلاسما گوندیی (*Toxoplasma gondii*) تک-یاخته داخل سلولی اجباری است که بیماری عفونی توکسوپلا-سموزیس (Toxoplasmosis) را ایجاد می‌کند. عفونت ناشی از توکسوپلاسما گوندیی یکی از متداول‌ترین عفونت‌های انگلی انسان و دیگر حیوانات خون‌گرم است و بنابراین یک بیماری به-تمام معنا زئونوز (zoonosis) محسوب می‌شود. انتشار این بیماری با مرزهای جغرافیایی محدود نگردیده و در سراسر جهان از آلاسکا تا استرالیا یافت می‌شود [۱]. بر اساس مطالعات سرواپیدمیولوژیک میزان آلودگی انسان به توکسوپلاسموزیس بین ۹۰-۳۰ درصد گزارش شده است [۱]. این بیماری به‌علت ایجاد عفونت مادرزادی و کوری و عقب ماندگی ذهنی در انسان دارای اهمیت می‌باشد. توکسوپلاسموزیس در افراد دارای ایـمنی کامل، معمولا فاقد علامت است یا به‌صورت تظاهرات پوستی (بثورات جلدی)، آدنوپاتی (Adenopathy) یا عارضه چشمی بروز می-کند. ولی در مبتلایان به ایدز و افراد دریافت‌کننده پیوند اعضا و مصرف‌کنندگان داروهای سرکوب‌کننده ایمنی دارای عوارض شدید و عامل مرگ و میر است [۲]. اگرچه تشخیص توکسوپلاسموز بر مبنای آزمون‌های سرولوژیکی است، ولی این روش‌ها در مواردی کارایی لازم را ندارند [٤،۳] و با توجه به عوارض و ضایعات جبران ناپذیر در افراد ایمونوساپرس و در نوزادان متولد شده روش‌های مولکولی کاربرد فراوانی یافته‌اند. روش PCR که در آن قطعه‌ای از DNA ژنومی توکسوپلاسما قابل شناسایی است به‌دلیل حساسیت و ویژگی کافی و نیز حصول سریع نتیجه از سایر روش-های تشخیصی فعلی نتایج بهتری دارد. با مطالعاتی که بر روی ژنوم توکسوپلاسما انجام شد، ژن B1 توکسوپلاسما که حساسیت آن به وجود تعداد ۳۵ کپی از آن در ژنوم توکسوپلاسما مربوط است، انتخاب گردید. حساسیت این در تکنیک Real time PCR می‌توان از Molecular beacon استفاده نمود. این پروب یک توالی اولیگونوکلوتیدی تک رشته بوده و از یک بخش ساقه و حلقه تشکیل می‌شود. در سر '۵ آن یک ماده فلوروفور و در سر '۳ آن یک مولکول خاموش کننده قرار داده می‌شود. در اثر اتصال حلقه که مکمل بخشی از توالی هدف است، ساختار ساقه (که به-صورت مکمل هم می‌باشد) باز شده و بین ماده تولید کننده

[۱] دانشجوی دکترای تخصصی، گروه انگل شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

[۲] استاد، گروه انگل شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

[۳] دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

[۴] دانشیار، گروه انگل شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

***نشانی نویسنده مسئول:**

تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه انگل شناسی

**تلفن:** ۰۲۱ ۸۲۸۸۳۸۳۸ **دورنویس:** ۰۲۱ ۸۲۸۸۴۵۵۵

**پست الکترونیک:** dalimi_a@modares.ac.ir

**تاریخ دریافت:** ۹۰/۹/۲۱ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۹۱/۳/۳

[ Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-04 ]

فلورسانس و خاموش کننده، فاصله افتاده و به این ترتیب نور ساطع می‌شود که توسط دستگاه فلورومتر آشکار می‌گردد. این روش بسیار حساس و دقیق است [٦،٥]. هدف از این پژوهش، راه‌اندازی روشی برای ردیابی کمی آلودگی توکسوپلاسموز در مدل موشی است که از حساسیت و ویژگی کافی برخوردار باشد.

## مواد و روش‌ها

### تکثیر و نگهداری سویه RH توکسوپلاسما گوندیی

سویه RH توکسوپلاسما گوندیی از بخش انگل شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران تهیه شد. به‌منظور تکثیر و نگهداری سویه از روش تزریق درون صفاقی موش‌های ماده با سن حدود ٤ هفتگی استفاده شد [١]. مایع صفاقی موش که حاوی ١٠٠٠ تاکی‌زوئیت بود به داخل صفاق موش‌ها تزریق شد. پس از ٤ روز موش‌ها با کلروفرم بیهوش شده و سپس مایع صفاقی آن‌ها با سرنگ خارج شد. تاکی‌زوئیت‌های تکثیر یافته با میکروسکوپ نوری (بزرگ‌نمایی X40) قابل مشاهده است. این مایع صفاقی به‌عنوان منبع اصلی برای نگهداری انگل یا تزریق به موش و تکثیر تاکی‌زوئیت‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد.

### انجام واکنش Real time PCR

بعد از استخراج DNA، واکنش PCR به‌منظور تکثیر قطعه ١١٦bp با دو آغازگر PF1 و PR2 در ٣٥ چرخه حرارتی با برنامه ٩٤ درجه سانتی‌گراد برای ٣٠ ثانیه، ٥٨ درجه سانتی‌گراد برای ٣٠ ثانیه، و ٧٢ درجه سانتی‌گراد برای ٣٠ ثانیه انجام شد. علاوه بر تکثیر ناحیه ژنی، در مرحله اتصال (Annealing) توالی هدف با پروب Molecular beacon متصل شده و ناحیه فلورفور از خاموشگر جدا شد. واکنش برانگیخته شده توسط فیلترهای نشری از کانال Fam/syber، آشکار شد و رسم منحنی Real time صورت گرفت.

### آغازگرها و پروب Molecular beacon

آغازگرهای و پروب مورد استفاده در این پژوهش بر اساس قطعه‌ای از ژنوم توکسوپلاسما گوندی به نام B1 به طول ١١٦ طراحی و ساخته شدند. طراحی پروب یکی از مهم‌ترین عوامل تعیین کننده موفقیت در این واکنش است. توالی آغازگرها و پروب در جدول شماره ١ آمده است.

جدول شماره ١- توالی آغازگرها و پروب Molecular beacon

| نام آغازگرها و پروب | توالی |
|---|---|
| PF1 | 5'-GGACTGGCAACCTGGTGTC-3' |
| PR2 | 5'-ACCCGGACCGTTTAGCAG-3' |
| MB | 5'-CAGCGACAGAACAGCTGCAGTC CGGAAATACGCTG-3' |

### بهینه سازی غلظت پروب

کاهش یا افزایش غلظت پروب، تأثیر به‌سزایی در هیبرید شدن پروب با توالی هدف دارد. کاهش پروب موجب کاهش اتصال به محصول PCR می‌شود و در نتیجه کاهش علائم تولیدی از سیستم Real time خواهد شد. افزایش پروب هم باعث افزایش اتصالات غیراختصاصی و در نتیجه عدم اتصال پروب به محصول PCR می‌شود. این قطعه با پروب مخصوص در غلظت‌های ٢٠، ١٠ و ٥ پیکومول مجاور شده و واکنشReal time PCR انجام گردید.

### آلوده سازی موش‌های صحرایی

تعداد ٣٠ سر موش صحرائی ماده ٣-٢ ماهه به دو گروه ١٥ تایی (مورد و شاهد) تقسیم شدند. تاکی‌زوئیت‌های استخراج شده از موش سوری توسط لام نئوبار شمارش شدند و با افزودن محلول PBS (Phosphate Buffered Saline)، غلظت نهایی به $10^5$ عدد تاکی‌زوئیت در هر میلی لیتر مایع تنظیم شد. به ازای هر میلی‌لیتر سوسپانسیون، مقدار ١٠٠ واحد پنی‌سیلین G و ١٠٠ میکروگرم استرپتومایسین به آن افزوده شد [٧]. سپس به محوطه صفاقی هر کدام از موش‌های صحرائی گروه مورد $5\times10^5$ عدد تاکی‌زوئیت (در مقدار ٥ میلی‌لیتر از سوسپانسیون) تزریق گردید. حیوانات شاهد بدون تزریق باقی ماندند.

### خونگیری از موش‌های صحرایی

٢ تا ١٧ روز بعد از تزریق، انگل‌ها در خون حضور دارند، بنابراین ٤٨ ساعت بعد از تزریق، خونگیری به اندازه ١ سی سی از قلب تمام حیوانات انجام گرفت و بلافاصله با ماده ضد انعقاد (Ethylene diamine tetra acetic acid; EDTA) نسبت ١ به ١٠ در میکرولوله ١/٥ میلی لیتری مخلوط شده و در فریزر ٨٠- درجه سانتی‌گراد به‌منظور استخراج DNA و انجام PCR نگهداری شد. در تمام مدت تحقیق فقط یک‌بار از حیوانات خونگیری شد. برنامه واکنش Real time PCR در جدول شماره ٢ نشان داده شده است.

[ Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-04 ]

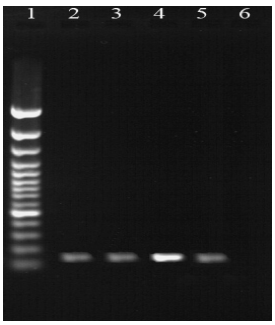
جدول شماره ۲- اجزای لازم برای واکنش Real-time PCR

| ماده شیمیایی | غلظت |
|---|---|
| Master mix | 12.5 µl |
| پرایمر رفت | 10pmol |
| پرایمر برگشت | 10pmol |
| DNA | 100ng |
| پروب | 10pmol |
| آب مقطر | تا 25 µl |

## نتایج

### بهینه سازی شرایط واکنش PCR

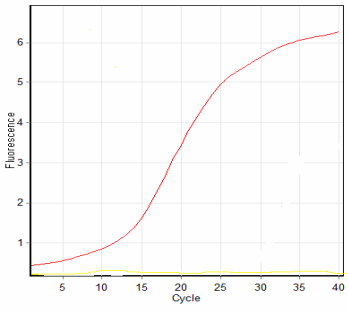
**بهینه‌سازی واکنش با بررسی گرادیان دمایی انجام شد. به‌منظور بهینه‌سازی، دمای واکنش محدوده دمایی بین ٥٤-٦٤ بررسی شده و دمای مناسب اتصال، ٥٨ درجه سانتی‌گراد به‌دست آمد. شکل شماره ۱ باند ۱۱٦ جفت باز ناشی از تکثیر مناسب الگو قابل بررسی است ().**




شکل شماره ۱- نتیجه PCR با دماهای متفاوت اتصال (ستون ۱، نردبان DNA ۱۰۰ جفت بازی؛ ستون ۲، دمای ٥٤ درجه سانتی‌گراد؛ ستون ۳، دمای ٥٦ درجه سانتی‌گراد؛ ستون ٤، دمای ٥٨ درجه سانتی‌گراد؛ ستون ٥، دمای ٦٠ درجه سانتی‌گراد؛ ستون ٦، کنترل منفی)

### انجام واکنش Real time PCR

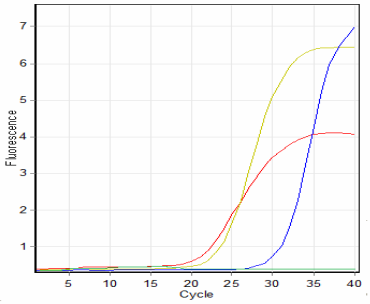
**نتیجه انجام واکنش در شکل شماره ۲ آورده شده است.**




شکل شماره ۲- واکنش Real time PCR با پروب برای انگل توکسوپلاسما گوندیی

### بهینه سازی غلظت پروب

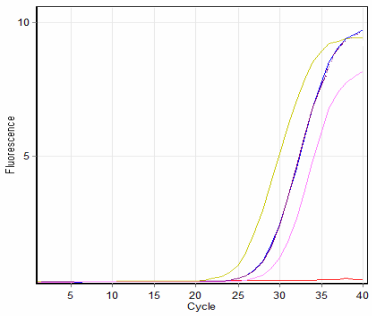
**به‌منظور به‌دست آوردن غلظت مناسب پروب برای واکنش، از غلظت‌های مختلف پروب استفاده شد و بهترین غلظت ۱۰ پیکومول تشخیص داده شد. نتیجه در شکل شماره ۳ به نمایش درآورده شده است.**




شکل شماره ۳- واکنش Real time PCR با غلظت‌های مختلف پروب (خط زرد غلظت ۱۰پیکومول؛ خط آبی غلظت ۲۰ پیکومول؛ خط قرمز غلظت ٥ پیکومول و خط سبز NTC)

### نتایج حاصل از بررسی حساسیت واکنش Real-time PCR با رقت سازی DNA اولیه

**از DNA اولیه با غلظت ۲۱۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر رقت سازی در ۱۰ log انجام شد و هر کدام از رقت‌ها وارد واکنش گردید. نتیجه در شکل شماره ٤ نمایش داده شده است.**

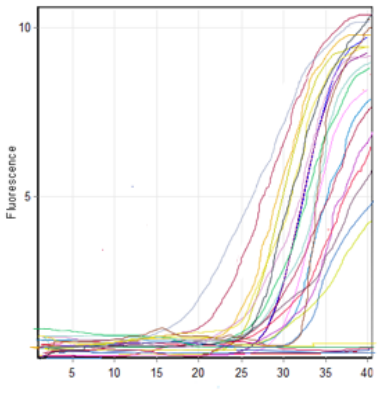



شکل شماره ٤- منحنی استاندارد حاصل از تکثیر رقت‌های متوالی از DNA اولیه

### نتیجه Real time PCR روی نمونه‌های خون موش‌های صحرائی

**۱ میکرولیتر از DNAهای استخراج شده از خون حیوانات (مورد و شاهد) وارد واکنش شد و نتیجه در شکل زیر نشان داده شده است.**

[ Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-04 ]




شکل شماره ۵- نتایج نمونه‌های مورد آزمایش با روش Real time PCR

## بحث

روش رایج برای تشخیص توکسوپلاسموزیس، روش‌های سرولوژیک است، ولی این روش‌ها کارایی لازم را ندارند، زیرا پادتن‌های اختصاصی علیه توکسوپلاسما با تأخیر ظاهر شده و میزان آن‌ها به‌تدریج افزایش می‌یابد. بنابراین توکسوپلاسموزیس در ابتدای آلودگی، قابل تشخیص نیست. از طرف دیگر در افراد دچار نقص یا سرکوب سیستم ایمنی پادتن‌ها به حد کافی ظاهر نمی‌شوند. علاوه بر این، قابلیت انتقال پادتن‌ها نوع IgG از مادر به جنین، تشخیص زود هنگام توکسوپلاسموز را در جنین با اشکال مواجه می‌کند. مثبت بودن فاکتور روماتوئید در اکثر زنان ایرانی و تولید IgM و ایجاد مثبت کاذب در روند تشخیص و مشکلات موجود در تفسیر نتایج آزمون‌های سرولوژی از جمله مشکلات موجود در روش‌های سرولوژیک می‌باشد، ولی روش PCR که در آن قطعه‌ای از DNA ژنومی توکسوپلاسما قابل شناسایی است به‌دلیل حساسیت و ویژگی کافی و نیز حصول سریع نتیجه از سایر روش‌های تشخیصی فعلی نتایج بهتری دارد [۸]. توانایی PCR در تزاید مقادیر اندک DNA به‌عنوان یکی از نقاط ضعف آن محسوب می‌شود، زیرا باید دقت زیادی لحاظ شود تا از ورود هر اسید نوکلئیک ناخواسته به حیطه عملکرد تکنیک جلوگیری شود [۹]. به‌علاوه، هر مرحله از PCR نیازمند بهینه سازی شرایط است وگرنه توالی اشتباهی تکثیر می‌یابد. اگر چنین وقایعی در مراحل مقدماتی این روش به وقوع پیوندد، توالی‌های غیراختصاصی بخش معنی‌داری از محصول نهایی را تشکیل خواهند داد [۷]. بنابراین ردیابی محصول PCR با استفاده از روش‌های اختصاصی مانند Real time که با پروب مخصوص و اختصاصی ( Molecular Beacon) انجام می‌شود از بروز چنین مسائلی جلوگیری می‌کند. افزایش ویژگی تکنیک با به‌کارگیری پروب اختصاصی، حساسیت بالای این روش نسبت به رنگ آمیزی ژل آگارز با اتیدیوم بروماید که ۱۰ تا ۱۰۰ برابر بیشتر است، عدم نیاز به UV ترانس ایلومیناتور و اتاق تاریک، امکان آنالیز نمونه‌ها در مقیاس وسیع، قابلیت تنظیم خودکار دستگاه، امکان آلودگی کم نسبت به روش‌هایی مثل لکه‌گذاری ساترن و عدم استفاده از مواد رادیواکتیو و سرطان‌زا نظیر اتیدیوم بروماید که از ایمنی و سلامت بالایی برخوردار است، برای آشکارسازی محصولات PCR انتخاب شد. نیاز به یک روش آشکارسازی برای محصولات تکثیر واکنش‌های مولکولی که بتواند حساسیت و ویژگی کافی را نیز ارائه نماید، ما را بر آن داشت که از Real time برای ردیابی ژنوم انگل استفاده کنیم. در این روش با وارد کردن یک ساختار مولکولی ویژه مثل Molecular Beacon، به واکنش به‌طور هم‌زمان می‌توان روند واکنش را دنبال کرد. این ساختار مولکولی از یک بخش ساقه (Stem) و حلقه (Loop) تشکیل می‌شود و سر ´5 آن، یک ماده فلوروفور و سر ´3 آن یک مولکول خاموش کننده (Quencher) قرار داده می‌شود. در اثر اتصال این ساختار که مکمل بخشی از توالی هدف است، ساختار ساقه از بین رفته و بین ماده تولید کننده فلورسانس و خاموش‌کننده، فاصله می‌افتد و به این ترتیب نور ساطع می‌شود که توسط دستگاه فلورومتر آشکار می‌گردد [٦]. طراحی پروب یکی از مهم‌ترین عوامل تعیین‌کننده موفقیت یا شکست هیبریداسیون اولیگو نوکلئوتید می‌باشد [۱۰]. در این پژوهش برای کاستن احتمال آلودگی، روش کمی Real time PCR با ژن B1 طراحی و ارائه شده است که حتی قادر به ردیابی مقدار کم انگل نیز می‌باشد. Lin و همکاران در سال ۱۹۹۵ از Real time PCR و ژن B1 برای ردیابی کمی توکسوپلاسما استفاده نمودند [۱۱]. Contini و همکاران در سال ۱۹۹۸ این روش را برای تشخیص آنسفالیت ناشی از عفونت توکسوپلاسمایی در بیماران ایدزی به‌کار بردند [۱۲]. Martins و همکاران نیز از این تکنیک برای تشخیص توکسوپلاسما استفاده نموده‌اند [۱۳]. در سال ۲۰۰۱ این روش توسط Jauregui و همکاران برای ردیابی توکسوپلاسما گوندیی در بافت‌های خوک و موش گسترش داده شد که نتیجه آن ردیابی ۰/۱ پیکوگرم از DNA ژنومی توکسوپلاسما گوندیی بود [١٤]. Thomas و همکاران در سال ۲۰۰٤ دو روش nested-PCR و Real time PCR برای شناسایی توکسوپلاسما گوندیی در بیماران دچار ضعف سیستم ایمنی را مقایسه نمودند که از بین این دو روش، Real time PCR قابلیت ردیابی سریع DNA انگل را دارا بود [۸]. علاوه بر این، ردیابی ژن‌های برادی‌زوئیت انگل، در نمونه‌های خونی بیماران مبتلا به کوریورتینیت توسط Cultrera و همکاران در سال ۲۰۰۲ انجام شد [۵]. تفاوت این پژوهش با تحقیقات دیگر در به‌کارگیری پروب Molecular Beacon است



[ Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-04 ]

که بر حساسیت Real time می‌افزاید و در نوع خود منحصر به‌فرد است.

## نتیجه‌گیری

ارزیابی تکنیک Real time PCR نشان داد که این روش برای تشخیص ژن B1 سریع و حساس بوده و جهت ارزیابی کمی توکسوپلاسما در خون موش صحرایی بسیار مناسب است.

## تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از پایان نامه دکترای تخصصی است که با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس به انجام رسید. نویسندگان از سرکار خانم دکتر شجاعی از گروه انگل شناسی دانشگاه تهران، به‌دلیل در اختیار قرار دادن سوش انگل و هم‌چنین از کارکنان و دانشجویان محترم گروه بیوتکنولوژی دانشگاه تربیت مدرس قدردانی می‌کنند.

## References:

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

[2] Parmley SF, Goebel FD, Remington JS. Detection of *Toxoplasma gondii* in cerebrospinal fluid from AIDS patients by polymerase chain reaction. ***J Clin Microbiol*** 1992; 30(11): 3000–2.

[3] Remington JS, Dosmonts G, Remington JS, Klein (Eds). Infection diseases of fetus newborn infants. 3rd ed. W.B. Saunders company; 1990. p. 89-195.

[4] Garsia LS, Bruckner DA. Diagnotic medical parasitology. 2nd ed. Washington DC: American Society for Microbiology; 1993. p. 92-101.

[5] 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.

[6] Antony T, Subramaniam V. A molecular beacon strategy for real-time monitoring of triplex DNA formation kinetics; ***Antisense Nucleic Acid Drug Dev*** 2002; 12(3): 145-54.

[7] Sharifian-Dorcheh M. Study on life cycle of *Toxoplasma gondii* in the tissue of rat by PCR and RT-PCR methods. [Thesis]. Tehran. Tarbiat Modares University. 2004. [in Persian]

[8] Hierl T, Reischl U, Lang P, Hebart H, Stark M, Kyme P, Autenrieth IB. Preliminary evaluation of one conventional nested and two Real-time PCR assays for the detection of *Toxoplasma gondii* in immunocompromised patients. ***J Clin Micobial*** 2004; 53: 629-32.

[9] Weiss JB. DNA probes and PCR for diagnosis of parasitic infections. ***Clin Micro Rev*** 1995; 8(1): 113–30.

[10] 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 Micobial*** 2006; 44(3): 720-4.

[11] 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.

[12] Contini C, Fainardi E, Cultrera R, Canipari R, Peyron F, Delia S, et al. Advanced laboratory techniques for diagnosing *Toxoplasma gondii* encephalitis in AIDS patients: significance of intrathecal production and comparison with PCR and ECL-western blotting. ***J Neuroimmunol*** 1998; 92(1-2): 29-37.

[13] Martins TB, Hillyard DR, Litwin CM, Taggart EW, Jaskowski TD, Hill HR. Evaluation of a PCR probe capture assay for the detection of *Toxoplasma gondii*. Incorporation of uracil N-glycosylase for contamination control. ***Am J Clin Pathol*** 2000; 113(5): 714-21.

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

[ Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-07-04 ]