DOI: 10.22122/jims.v39i635.13752 Published by Vesnu Publications

مجله دانشکده پزشکی اصفهان سال سی و نهم/شماره‌ی ۶۳۵/هفته‌ی سوم مهر ۱۴۰۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۹/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۵/۷ تاریخ چاپ: ۱۴۰۰/۷/۲۱

طراحی و توسعه‌ی Nested PCR سه‌گانه جهت تشخیص هم‌زمان Plasmodium، Babesia و Toxoplasma در فرایند انتقال خون

عباسعلی اسکندریان[۱]، علیرضا نجفی راد[۲]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: تشخیص و رفع عفونت‌های قابل انتقال از طریق انتقال خون از اهمیت به‌سزایی برخوردار می‌باشند. هدف از انجام این مطالعه، تشخیص Plasmodium، Toxoplasma و Babesia به طور هم‌زمان در نمونه‌های خون بود.

روش‌ها: این مطالعه از نوع تجربی و توسعه‌ی روش Triplex nested-Polymerase chain reaction (Triplex nested-PCR) جهت ارتقای سلامت فرایند انتقال خون است که طی سال ۱۳۹۸ در اصفهان انجام گردید. پس از طراحی مطالعه و انتخاب پرایمرها، ابتدا روش مولکولی Nested PCR برای هر انگل در سطح جنس با استفاده از نمونه‌های خون با تعداد معین انگل اعمال شد. سپس، با تجمیع شرایط لازم، Nested PCR چندگانه کارسازی شد.

یافته‌ها: واکنش سه‌گانه‌ی Triplex nested PCR در مقایسه با روش میکروسکوپی و Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)، دارای اعتبار تشخیصی بالاتری بود؛ به گونه‌ای که مقدار حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و منفی برای تشخیص Plasmodium به ترتیب ۱۰۰، ۱۰۰، ۱۰۰ و ۱۰۰ درصد، برای Toxoplasma به ترتیب ۱۰۰، ۹۱، ۹۲ و ۱۰۰ درصد و برای Babesia به ترتیب ۹۴، ۱۰۰، ۱۰۰ و ۸۹ درصد ارتقا یافت. مقادیر اعتبار این آزمون برای Plasmodium، بالاترین میزان در مقایسه با دو انگل دیگر بود.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج این تحقیق، روش سه‌گانه‌ی Nested (TN-PCR) می‌تواند به طور هم‌زمان، یک، دو یا هر سه پاتوژن خطرناک را در نمونه‌های بیولوژیکی و همچنین، نمونه‌ی خون در فرایند انتقال خون را با دقت بالایی شناسایی کند.

واژگان کلیدی: Plasmodium؛ Babesia؛ Toxoplasma؛ Nested polymerase chain reaction؛ انتقال خون

ارجاع: اسکندریان عباسعلی، نجفی راد علیرضا. **طراحی و توسعه‌ی Nested PCR سه‌گانه جهت تشخیص هم‌زمان Plasmodium، Babesia و Toxoplasma در فرایند انتقال خون.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۰؛ ۳۹ (۶۳۵): ۵۶۳-۵۵۶.

مقدمه

انتقال خون، بخش مهمی از فعالیت بالینی روزمره‌ی پزشکی است. خون و فراورده‌های آن، می‌تواند درمان مناسب را برای بیماران به ارمغان آورد، اما نگرانی عمده از نظر سلامتی و با کیفیت بودن خون وجود دارد (۱).

آزمایش‌های غربالگری برای برخی از عوامل شناخته شده و مهم عوامل میکروبی در مراکز انتقال خون به عنوان یک شیوه‌ی معمول انجام می‌شود. بر طبق استانداردهای سازمان انتقال خون ایران (IBTO یا Iranian Blood Transfusion Organization)، آزمایش‌های غربالگری جهت ویروس هپاتیت B و C، HIV، Treponema pallidum بر روی نمونه‌ی تمامی اهدا کنندگان خون صورت می‌گیرد. علاوه بر این، برای کاهش خطر انتقال عفونت، روش لوکوفیلتراسیون مشخص شده است و در حال حاضر، در IBTO قابل دسترسی است. با این حال، به دلایلی، امکان عدم انتقال کامل تمامی عوامل عفونی وجود ندارد (۲).

انتقال خون، در معرض آلودگی با چندین عامل خطرناک عفونی شامل باکتری، ویروس، انگل و قارچ می باشد. به طور خاص، هر عاملی که ممکن است یک چرخه‌ی زندگی داخل سلولی داشته باشد،

۱- دانشیار، گروه قارچ و انگل‌شناسی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه قارچ و انگل‌شناسی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، و سازمان انتقال خون ایران، اصفهان، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: عباسعلی اسکندریان؛ دانشیار، گروه قارچ و انگل‌شناسی پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: dreskandarianstudents98@gmail.com

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 Unported License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

می‌توانـد از طریـق انتقـال خـون منتقـل شـود (۳). بنـابراین، بررسـی واحدهای خون اهـدایی، یـک نیـاز حیـاتی اسـت. بـا ایـن کـه برخـی آزمایش ها روی نمونه‌های خون دریافتی انجام می شـود، امـا تشـخیص انگل‌های بیماری زایی که در خون به صـورت فعـال بـاقی مـی‌ماننـد و عـوارض جبـران ناپـذیری در فـرد گیرنـده بـه دنبـال دارنـد، صـورت نمی گیرد. از این رو، وجود یک آزمایش مناسب که دقیق، سـریع، قابـل اعتماد و در دسترس باشد، ضروری است. امروزه، روش‌های مولکـولی قابل اطمینان‌تر هستند و حتی توجـه محققـین را بـه عنـوان روش‌هـای استاندارد طلایی به خود جلب کرده‌اند (۴).

در کشورهای غیر آندمیک، غربالگری مناسـب از اهـدا کننـدگان خـون باید با دقت بیشتری صـورت پـذیرد (۵). بسـیاری از بیمـاری هـای انگلـی، مشکوک به انتقال از طریق انتقال خون نیز هستند (۶). نگرانی بزرگ مالاریـا اسـت؛ در حـالی کـه Babesiosis، Leishmaniasis و Toxoplasmosis نیز دارای خطر مشابه در مناطق مختلف جغرافیایی می‌باشد (۷).

Plasmodium که پس از هپاتیت، مهم‌ترین ارگانیسـم ناشـی از انتقـال خون است، تک یاخته‌ای است که اغلب توسط نـیش پشـه‌ی آنوفـل منتقـل می‌شود. در مواردی، عفونت با تزریق مستقیم خون آلوده مانند انتقـال خـون نیز ایجاد می شود (۸). به طور کلی، فرض می شود که در منـاطقی بـا انتقـال بالای مالاریـا کـه در آن افـراد بـه سـرعت ایمنـی کسـب مـی‌کننـد، سـطح عفونت‌های بدون علامت بالا مـی باشـد (۹). بیمـاری مالاریـا، یـک تهدیـد جدی جهت دریافت کنندگان خون اسـت. Plasmodium vivax در خـون در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد تا ۹۶ سـاعت زنـده مـی‌مانـد؛ در حـالی کـه Plasmodium malariae و Plasmodium falciparum قادر بـه ادامـه‌ی حیات بیشتر می‌باشند (۱۰، ۴).

انگل دیگری که ممکن است از طریق انتقال خـون منتقـل شـود، انگـل Toxoplasma gondii می‌باشد. توکسوپلاسموز، عفونـت زئونـوزی اسـت که توسط این انگل در انواع مختلفی از مهره‌داران خون‌گرم مانند انسـان، دام، پرندگان، پستانداران دریایی و غیره ایجاد می‌شود (۱۱).

اگر چه توکسوپلاسموز بیماری های خفیف در افرادی اسـت کـه دارای سیستم ایمنی قوی هستند، اما این بیماری در افراد دارای نقص ایمنی تهدیـد کننده است. همچنین، این بیماری در خانم‌های بـاردار آلـوده، باعـث انتقـال انگل به جنین و سبب وقوع عوارض شدیدی می‌شود (۱۲). نشان داده شـده اسـت کـه Toxoplasma gondii را مـی‌تـوان از طریـق خـون کلیـه یـا ترانسفوزیون لکوسیت انتقال داد و این انگل، می‌توانـد در خـون سـیتراته در دمای ۵ درجه‌ی سانتی گراد برای بیش از ۵۰ روز زنده بماند. بر این اسـاس، تجمع بسته های خون در طول ذخیره‌سازی، نمی توانـد باعـث جلـوگیری از انتقال عفونت باشد (۱۴-۱۳).

انگل دیگری که می تواند توسط خون منتقـل شـود، Babesia نـام دارد. در ایالات متحده، انتقال Babesia از طریق انتقال خـون گـزارش شده است (۱۵). Babesia، انگلی است که از طریق گلبول‌های سفید و پلاکت حاوی انگل داخل سلولی، قابل انتقـال مـی باشـد. نقـش انتقـال خون و فراورده‌های خونی در این زمینه، حایز اهمیت است. ایـن تـک یاختـه، انگـل گلبـول‌هـای قرمـز انسـان و حیوانـات اسـت؛ گونـه‌ی Babesia divergens که انگل گاو است، می‌تواند انسان را نیـز آلـوده نماید. Babesiosis، عفونت انگلی است که به وسـیله‌ی گونـه‌هـایی از جـنس Babesia -بیشـتر Babesia microti و Babesia bovis- کـه توسط نوعی کنه منتقل می‌شود، ایجاد می‌گردد (۱۶).

ایـن مطالعـه، بـا هـدف بررسـی وجـود برخـی انگـل‌هـا (Plasmodium، Toxoplasma و Babesia) در نمونـه‌هـای اهـدا کنندگان خون و دست‌یابی بـه یـک آزمـایش سـریع تشخیصـی بـرای شناسایی چنین عوامل انگلی انجام شد.

روش‌ها

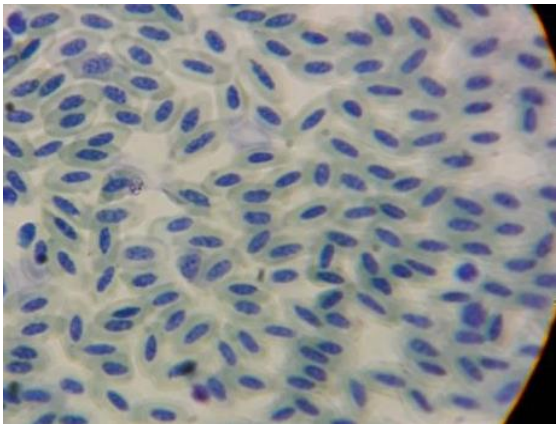
این مطالعه، از نوع ارتقای روش، در سـال ۱۳۹۸ در آزمایشـگاه بخـش انگل و قارچ شناسی دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصـفهان صورت گرفت.

نمونـه‌هـای مثبـت Plasmodium vivax از آزمایشـگاه غربـالگری مالاریای استان اصفهان و نمونه‌های خون گوسفند آلـوده بـه Babesia ovis از اداره‌ی دامپزشکی شهرضـا کـه بـه دو روش میکروسـکوپی و مولکـولی تأیید می‌گردید، به عنوان شاهد مثبت و همچنین، جهت تهیـه‌ی نمونـه‌هـای لازم با تعداد ۵۰۰، ۵۰ و ۵ در میلی‌لیتر خون، مورد استفاده قرار گرفت.

از آن جایی که هدف اصلی این مطالعه طراحی روشی مناسـب جهـت تشخیص انگل‌های پیش‌گفته بود، تعدادی نمونه‌های خون از سـازمان انتقـال خون اصـفهان و برخـی نمونـه‌هـا از حیوانـات و بیمـاران انسـانی مختلـف جمع‌آوری شد تا عملکرد خوب و توانایی استفاده از ایـن روش در مقایسـه بـا روش اسـتاندارد طلایـی میکروسـکوپی (جهـت Babesia و مالاریـا) و روش مقایسـه‌ای Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) -جهت Toxoplasma- تأیید شود (۱۸-۱۷).

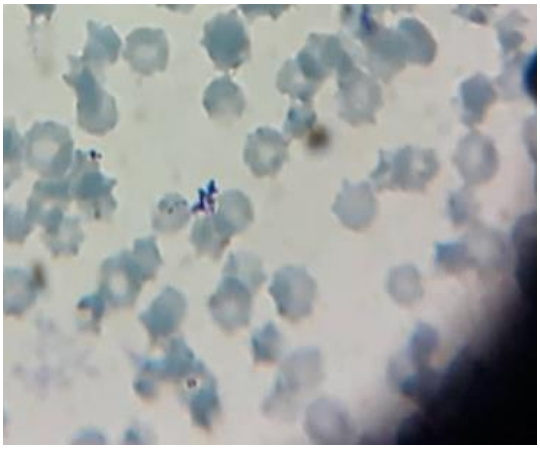
در مجموع، حدود ۱۳۴ نمونه‌ی خون و سـرم شـامل ۶۰ نمونـه از کورد کیسه‌ی خون افراد اهدا کننـده‌ی خـون در سـازمان انتقـال خـون شهرستان اصفهان، ۴۶ نمونه از افراد بیمار و مشکوک بیمـاری انگلـی و ۲۸ نمونه از خون حیوانات در کشتارگاه‌های استان اصفهان، جمع آوری و جهت ارزیابی روش پیش‌گفته مورد بررسی گرفت (جدول ۲).

جهت انجام روش میکروسکوپی از لام و رنگ آمیـزی گیمسـا اسـتفاده شد؛ بـه گونـه‌ای کـه در گسـترش نـازک لام بـه جسـتجوی مراحـل انگـل پرداخته و انگل شناسایی گردید (شـکل‌هـای ۲-۱) (۱۹). همچنـین، جهـت انجـام روش ELISA در آزمایشـگاه‌هـای سـطح شـهر اصـفهان، از کیـت ۹۶ خانه‌ای و دستگاه مربوط جهت خوانش ELISA استفاده گردید (۲۰).



شکل ۱. شیزونت Plasmodium در سیتوپلاسم گلبول قرمز هسته‌دار خون پرنده جمع‌آوری شده در اصفهان (رنگ‌آمیزی گیمسا، بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰ ×)

با توجه به این که نمونه‌های خون مورد استفاده از انتقال خون به صورت تصادفی از کورد خون‌های اهدایی بدون در نظر گرفتن فرد اهدا کننده جمع آوری شد، در زمان انجام این پژوهش دریافت کد اخلاقی ضرورتی نداشت.



شکل ۲. مروزوئیت Babesia در سیتوپلاسم گلبول قرمز خون گاو جمع‌آوری شده در کشتارگاه فساران اصفهان (رنگ‌آمیزی گیمسا، بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰ ×)

استخراج DNA: طبق دستورالعمل ارایه شده توسط شرکت سازنده‌ی کیت (Genetbio, South Korea)، DNA هر نمونه خون حاوی تعداد انگل‌های تعیین شده به تفکیک، استخراج شد. کمیت DNA خالص شده با دستگاه اسپکتروفتومتر NanoDrop ارزیابی و جهت کیفیت از الکتروفورز استفاده شد.

انجام Nested PCR: روش Nested PCR برای هر انگل، ابتدا به طور جداگانه با تعداد انگل معین کارسازی شد و پس از آن که از عملکرد خوب آن اطمینان حاصل شد، Nested PCR سه گانه برای هر سه انگل اعمال شد. آغازگرهای اختصاصی در سطح جنس انگل‌ها در جدول ۱ آمده است (۲۳-۲۱).

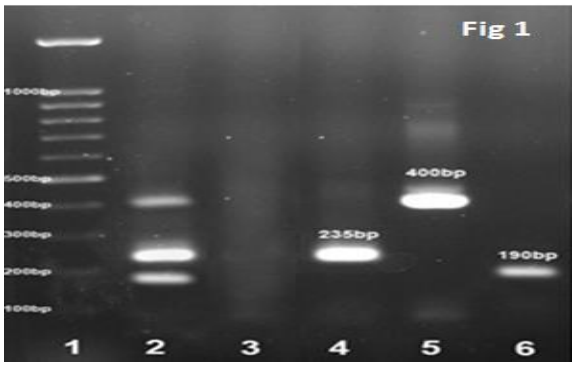
Nested PCR با برنامه‌ی حرارتی زیر برای شناسایی هم‌زمان سه عامل تک یاخته‌ای اعمال گردید:

۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و سپس ۳۰ چرخه (جهت مرحله‌ی اول) به صورت ۱دقیقه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۱ دقیقه در دمای ۵۶/۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد و همچنین، ۲۶ چرخه (جهت مرحله‌ی دوم) به صورت ۴۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی گراد، ۱دقیقه و ۱۰ ثانیه در دمای ۶۱ درجه‌ی سانتی گراد و ۴۵ ثانیه در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی گراد انجام شد. در نهایت، ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی گراد نمونه قرار گرفت. سپس، محصولات حاصل از تکثیر ژن‌ها بر روی ژل آگارز ۲ درصد ارزیابی گردید.

روش تجزیه و تحلیل: داده‌ها با استفاده از جدول توافقی برای مقایسه‌ی صحت روش جدید با روش‌های استاندارد طلایی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

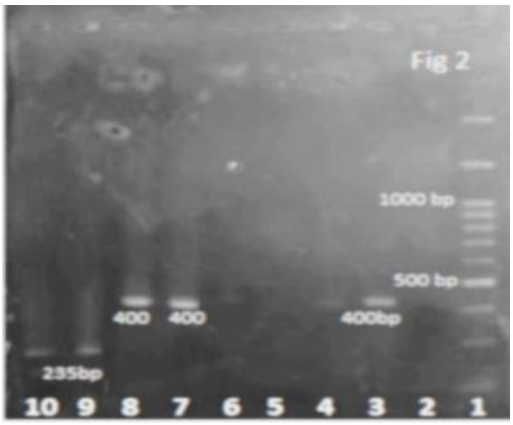
یافته‌ها

با توجه به نوع و هدف این مطالعه، بیشتر روی تنظیم و ارتقای روش Nested PCR و سپس کارسازی روش چندگانه‌ی آن تمرکز شد. در مرحله‌ی اول، PCR به طور خاص برای هر انگلی تنظیم شد و در مرحله‌ی بعد، TN-PCR راه اندازی شد. نتایج در شکل ۳ نشان داده شده است. از آن جایی که آغازگرهای مخصوص برای هر انگل در حد جنس بودند، نمونه های این طرح شامل برخی نمونه‌های خون عادی از انسان و حیوانات (پستانداران و پرندگان) و برخی دیگر از انسان ها و حیوانات بیمار بودند. این نمونه‌ها و داده‌های مربوط به آن‌ها در شکل‌های ۴-۳ و همچنین، جدول ۲ آمده است.



شکل ۳. الکتروفورز محصولات Nested triplex nested polymerase chain reaction (TN-PCR) بر روی ژل آگارز دو درصد

۱- لدر ۱۰۰ جفت باز، ۲- شاهد مثبت (نمایش هر سه باند مربوط به انگل‌ها به صورت هم‌زمان)، ۳- شاهد منفی، ۴- باند مربوط به جنس Plasmodium (۲۳۵ جفت باز)، ۵- باند مربوط به جنس Babesia (۴۰۰ جفت باز)، ۶- باند مربوط به جنس Toxoplasma (۱۹۰ جفت باز)



شکل ۴. الکتروفورز محصولات TN-PCR بر روی ژل آگارز یک درصد

۱- لدر (۱۰۰ جفت باز)، ۲- نمونه‌ی خون پرنده (منفی)، ۶-۳ نمونه‌ی خون گاو (۳ و ۴ برای باند Babesia مثبت و ۵ و ۶ فاقد باند و منفی)، ۸-۷ نمونه‌ی خون گوسفندان آلوده (دارای باند مثبت جهت انگل Babesia)، ۱۰-۹ نمونه‌ی خون بیماران مبتلا به مالاریا (دارای باند مثبت جهت انگل Plasmodium)

از ۶۰ نمونه‌ی خون جمع شده از کورد کیسه‌های خون در IBTO، دو نمونه با این روش مولکولی آلوده به Toxoplasma تشخیص داده شدند. در مورد انگل Plasmodium، مطالعه‌ی حاضر نشان داد که بیشترین توافق (۱۰۰ درصد) بین روش‌های پارازیتولوژی (میکروسکوپی) و مولکولی شامل ۱۶ مورد مثبت و ۱۱۸ مورد منفی وجود داشت و در مورد انگل Babesia، روش TN-PCR در مقایسه با روش انگلی، حداقل توافق را برای ویژگی دارا بود.

جهت ایجاد جدول توافقی و بررسی بین روش توسعه یافته با روش مقایسه‌ای ELISA، تعداد ۲۴ نمونه‌ی سرم خون‌های آزمایش شده‌ی ELISA (از لحاظ +IgM) از آزمایشگاه‌های شهر اصفهان جمع‌آوری و بررسی صورت گرفت.

به طور کلی، ۱۳۴ نمونه‌ی مختلف با استفاده از روش TN-PCR مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و داده‌ها برای هر انگلی به طور جداگانه در جدول احتمالی نشان داده شد. با توجه به آزمایش‌ها و باقی ماندن این عفونت‌ها و بالا بودن خطر آن‌ها جهت انتقال از طریق خون، بررسی آن‌ها در خون افراد اهدایی، به ویژه در مناطق حاوی انگل، امری حیاتی و مهم می‌باشد.

تجزیه و تحلیل هر سه انگل در مقایسه با روش‌های استاندارد طلایی در جداول توافقی شماره‌های ۵-۳ آمده است.

بحث

حساسیت روش PCR برای تشخیص، بیشتر از روش میکروسکوپی و همچنین، دارای دقت و کارایی بالاتری می باشد که ارزش تشخیصی این روش را افزایش می‌دهد (۲۴). از طرف دیگر، طراحی روشی که بتواند هر سه انگل را به طور هم زمان با دقت و حساسیت بالا و صرفه‌جویی در وقت و هزینه شناسایی کند و همچنین، در صورت محدود بودن نمونه‌ی انگل، قابل انجام باشد، بسیار مهم است (۲۵).

بر این اساس، در این طرح TN-PCR برای شناسایی هم زمان هر سه عامل انگلی Plasmodium، Babesia و Toxoplasma در نمونه‌های خون توسعه داده شد. حساسیت و ویژگی این روش نیز از روش میکروسکوپی بالاتر بود. از طرفی، در مرحله‌ی اول امکان تشخیص با PCR حدود ۹۱ درصد می‌باشد؛ در حالی که در مرحله‌ی دوم، این احتمال به ۱۰ درصد می‌رسد. این امر، نشان دهنده‌ی اثربخشی و قابلیت اطمینان روش دو مرحله‌ای Nested PCR در مقایسه با PCR معمولی است؛ چرا که این روش، مؤثرتر است و می تواند برای تشخیص هر سه انگل در زمان کوتاه تر، با هزینه‌ی کمتر و با دقت و ویژگی بالاتر، مورد استفاده قرار گیرد.

جدول ۱. پرایمرهای اختصاصی در سطح جنس جهت استفاده در Nested polymerase chain reaction (Nested PCR) سه گانه

انگل	مرحله	نام پرایمر و توالی متعلق به آن	رفرنس
جنس Plasmodium	Nested one	rPLU1(TCAAAGATTAAGCCATGCAAGTGA) rPLU5 (CCTGTTGTTGCCTTAAACTTC)	(۲۱)
	Nested two	rPLU3 (TTTTTATAAGGATAACTACGGAAAAGCTGT rPLU4 (TACCCGTCATAGCCATGTTAGGCCAATACC)	
جنس Toxoplasma gondii	Nested one	F1: 5′-TCAAGCAGCGTATTGTCGAG R1: 5′-CCGCAGCGACTTCTATCTCT	(۲۲)
	Nested two	F2: 5′-GGAACTGCATCCGTTCATGAG R2: 5′-TCTTTAAAGCGTTCGTGGTC	
جنس Babesia	Nested one	Bab5 (5′-AATTACCCAATCCTGACACAGG-3′) Bab8 (5′-TTTGGCAGTAGT TCGTCTTTAACA-3′)	(۲۳)
	Nested two	Bab6 (5′-GACACAGGG AGGTAGTGACAAGA-3′) Bab7(5′-CCCAACTGCTCCTATTAACCATTAC-3’)	

rPLU1&5 جهت دور اول و rPLU3&4 جهت دور دوم Nested PCR متعلق به انگل Plasmodium، F1&R1 جهت دور اول و F2&R2 جهت دور دوم Nested PCR متعلق به انگل Toxoplasma، Bab5&8 جهت دور اول و Bab6&7 جهت دور دوم Nested PCR متعلق به انگل Babesia

جدول ۲. نمونه‌های خون یا سرم از انسان و حیوانات سالم یا بیمار

ردیف	نوع نمونه	تعداد	Plasmodium روش مولکولی (TN-PCR1)		Babesia روش مولکولی (TNP-CR)		Toxoplasma روش مولکولی (TNP-CR)	
			مثبت	منفی	مثبت	منفی	مثبت	منفی
۱	اهدا کنندگان خون	۶۰	۰	۶۰	۰	۶۰	۲	۵۸
۲	خون پرندگان	۳	۱	۲	۰	۳	۰	۳
۴	نمونه‌ی خون انسان‌های مشکوک به توکسوپلاسموز (دریافتی از آزمایشگاه‌های تشخیص طبی شهر اصفهان)	۲۴	۰	۲۴	۰	۲۴	۱۳	۱۱
۵	نمونه‌ی خون انسان‌های مشکوک به مالاریا (دریافتی از آزمایشگاه غربالگری مالاریای اصفهان)	۲۲	۱۵	۷	۰	۲۲	۰	۲۲
۶	نمونه‌ی خون بز،اسب، گاو و گوسفند	۲۵	۰	۲۵	۱۶	۹	۰	۲۵
مجموع		۱۳۴	۱۶	۱۱۸	۱۶	۱۱۸	۱۵	۱۱۹

TN–PCR: Triplex nested polymerase chain reaction

از تعداد ۶۰ نمونه‌ای که از کورد کیسه‌ی خون‌های اهدایی جمع‌آوری گردید، ۲ نمونه دارای باند مشخص Toxoplasma در روش مولکولی مورد نظر بودند. برای نمونه‌های بیماران ۱۶نمونه مثبت از نظر انگل Plasmodium، ۱۶ نمونه مثبت از نظر انگل Babesia و ۱۵ نمونه مثبت از نظر انگل Toxoplasma در روش مولکولی مورد نظر تشخیص داده شد.

جدول ۳. جدول توافقی دو روش میکروسکوپی (به عنوان روش استاندارد طلایی) و Triplex nested polymerase chain reaction (TN-PCR) جهت جنس Plasmodium

TN-PCR (روش مرجع)	روش میکروسکوپی (روش استاندارد طلایی)		
	مثبت	منفی	مجموع
مثبت	۱۵	۰	۱۵
منفی	۰	۷	۷
مجموع	۱۵	۷	۲۲

TN-PCR: Triplex nested polymerase chain reaction

حساسیت = ۱۰۰ درصد، ویژگی = ۱۰۰ درصد، ارزش اخباری مثبت = ۱۰۰ درصد، ارزش اخباری منفی = ۱۰۰ درصد

از تعداد ۲۲ نمونه‌ی دریافتی از آزمایشگاه غربالگری مالاریای اصفهان، ۱۵نمونه‌ی مثبت هم از نظر میکروسکوپی و هم از نظر مولکولی از انگل Plasmodium وجود داشت که توسط جدول توافقی، توافق صد در صد بین این دو روش مشاهده می‌شود. این یافته، بیانگر قابل اعتماد بودن روش مولکولی جدید برای این عامل انگلی می‌باشد.

Poschl و همکاران، حضور Plasmodium falciparum را با استفاده از میکروسکوپ و Nested PCR بر روی ۱۳۰ نمونه‌ی خون از مردم تایلند بررسی کرد. در مطالعه‌ی وی، حساسیت روش مولکولی بالاتر از روش میکروسکوپی بود که دارای توافق خوبی با نتایج این طرح می‌باشد (۲۶).

مطالعه‌ی دیگری نیز در همین موضوع توسط Arifin و همکاران صورت گرفت که هر دو روش میکروسکوپی و مولکولی را برای تشخیص مالاریا در اندونزی مقایسه کرد و گزارش داد که روش مولکولی (۹۷/۵ درصد)، حساسیت بیشتری نسبت به روش میکروسکوپی (۸۸/۲ درصد) و ویژگی کمتری (۴۰/۷ درصد) در مقایسه با روش میکروسکوپی (۷۸/۵ درصد) دارد (۲۷).

جدول ۴. جدول توافقی دو روش میکروسکوپی (به عنوان روش استاندارد طلایی) و Triplex nested PCR (TN-PCR) (به عنوان روش مرجع) جهت جنس Babesia

TN-PCR (روش مرجع)	روش میکروسکوپی (روش استاندارد طلایی)		
	مثبت	منفی	مجموع
مثبت	۱۶	۰	۱۶
منفی	۱	۸	۹
مجموع	۱۷	۸	۲۵

TN-PCR: Triplex nested polymerase chain reaction

حساسیت = ۹۴ درصد، ویژگی = ۱۰۰ درصد، ارزش خبری مثبت = ۱۰۰ درصد، ارزش خبری منفی = ۸۹ درصد

از تعداد ۲۵ نمونه‌ی دریافتی از کشتارگاه های شهر اصفهان ۱۶ نمونه‌ی مثبت از نظر روش مولکولی و ۱۷ نمونه‌ی مثبت از نظر روش میکروسکوپی از انگل Babesia وجود داشت که توسط جدول توافقی، میزان بالای حساسیت و ویژگی و ارزش اخباری مثبت و منفی این روش مشخص شده است. این مقادیر، نشان دهنده‌ی قابل اعتماد بودن این روش مولکولی جدید برای عامل انگلی Babesia می‌باشد.

جدول ۵. جدول توافقی دو روش Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (به عنوان روش مقایسه‌ای) و TN-PCR (به عنوان روش مرجع) جهت جنس Toxoplasma

TN-PCR (روش مرجع)	روش ELISA (روش مقایسه‌ای)		
	مثبت	منفی	مجموع
مثبت	۱۲	۱	۱۳
منفی	۰	۱۱	۱۱
مجموع	۱۲	۱۲	۲۴

TN-PCR: Triplex nested polymerase chain reaction
ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

حساسیت = ۱۰۰ درصد، ویژگی = ۹۱ درصد، ارزش اخباری مثبت = ۹۲ درصد، ارزش اخباری منفی = ۱۰۰ درصد

از تعداد ۲۴ نمونه‌ی دریافتی از آزمایشگاه های سطح شهر اصفهان، ۱۳ نمونه‌ی مثبت از نظر روش مولکولی و ۱۲ نمونه‌ی مثبت از نظر روش میکروسکوپی از انگل Toxoplasma وجود داشت که توسط جدول توافقی، میزان بالای حساسیت و ویژگی و ارزش خبری مثبت و منفی این روش مشخص شد. این مقادیر، نشان دهنده‌ی قابل اعتماد بودن این روش مولکولی جدید برای عامل انگلی Toxoplasma می‌باشد.

مطالعه‌ی حاضر در مقایسه با مطالعه‌ی پیش گفته از حساسیت و ویژگی بالاتری برخوردار بود که این ممکن است به دلیل عملکرد خوب آغازگرهای این طرح باشد. همچنین، در این طرح این انگل‌ها در سطح جنس ارزیابی شدند. از طرف دیگر، تفاوت تعداد نمونه‌ها در مقایسه با مطالعه‌ی پیش‌گفته، ممکن است دلیل این اختلاف باشد.

در مطالعه‌ی کرمی و همکاران، حساسیت روش ELISA با روش مولکولی PCR در انگل Toxoplasma مقایسه و مشاهده شد که روش مولکولی با ارزش‌تر و دارای حساسیت و ویژگی بالاتری نسبت به روش ELISA می‌باشد (۲۰) و این مطالعه نشان می‌دهد که روش مولکولی، روش قابل اعتمادی است و نیازی به افراد با تبحر بالا جهت شناسایی انگل به ویژه زیر میکروسکوپ ندارد.

همچنین، مطالعه‌ی ساکی و همکاران بر روی نمونه‌های خون اهدا کنندگان از نظر انگل Toxoplasma نشان داد که روش مولکولی، روش ارجح و قابل اعتمادتری نسبت به روش ELISA می‌باشد و با توجه به اینکه موارد مثبت در این مطالعه گزارش شد، بر انجام آزمایش های انگلی به ویژه Toxoplasma بر روی نمونه های خون قبل از تزریق توصیه شد (۲۸).

طبق انجام آزمایش به روش های میکروسکوپی جهت Babesia و Plasmodium (به عنوان روش استاندارد طلایی) و روش ELISA جهت Toxoplasma (به عنوان روش مقایسه‌ای) در مقایسه با روش مولکولی مشخص شد که روش مولکولی از حساسیت و ویژگی بالاتری نسبت به روش های میکروسکوپی و ELISA برخوردار است و همچنین، دارای ارزش اخباری مثبت و منفی بهتری می باشد. در این مطالعه، تشخیص Plasmodium از میزان توافق بالاتری در بین هر سه انگل برخوردار بود. در واقع، جدول توافقی میزان توافق دو روش مورد نظر را نشان می‌دهد؛ بدون این که به طور الزامی، علت عدم توافق را نشان دهد.

نتیجه‌گیری

در مطالعه‌ی حاضر، هر چهار عامل مورد استفاده در جداول توافقی در مورد Plasmodium در دو روش به طور کامل با هم مطابقت داشته‌اند. در مورد Toxoplasma و Babesia، تعدادی از این عوامل چهارگانه با هم توافق بالایی (اما نه ۱۰۰ درصد) نشان داده است که در واقع، به علت بالاتر بودن حساسیت و ویژگی روش Nested PCR سه گانه نسبت به روش استاندارد بوده و باعث عدم توافق شده است. به عبارت دیگر، مقدار جزیی عدم توافق صد درصد نتایج دو روش به دلیل حساسیت و ویژگی بالاتر روش توسعه داده شده نسبت به روش استاندارد بوده است. در نتیجه، استفاده از روشی که بتواند هر سه انگل را به صورت سریع تر و با اطمینان بیشتری پیش از تزریق خون به خصوص به افراد دارای خطر بالا، تشخیص دهد و شناسایی کند، می تواند از عوارض غیر قابل پیش‌گیری در فرد دریافت کننده و حتی مرگ وی جلوگیری به عمل آورد.

تشکر و قدردانی

مقاله‌ی حاضر، برگرفته از نتایج پایان‌نامه‌ای است که با کد ۳۹۶۸۹۲ توسط دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تصویب و منابع مالی اجرای آن، توسط این دانشگاه تأمین شده است. بدین وسیله از همه‌ی دست اندر کاران اجرای پایان‌نامه تقدیر می‌گردد.

References

1. Keng Ho P, Loke J. Clinical blood transfusion. Singapore: Ministry of Health; 2011. p. 23.
2. Karimi G, Mardani A, Zadsar M. Prevalence of Toxoplasma gondii among Iranian blood donors: A narrative review article. Iran J Parasitol 2016; 11(1): 10-8.
3. Karimi G, Gharehbaghian A, Tafti MF, Vafaiyan V. Emerging infectious threats to the blood supply: Seroepidemiological studies in iran - a review. Transfus Med Hemother 2013; 40(3): 210-7.
4. Sputin A. Medical Parasitology for medical students: 1st ed. Tehran, Iran: Khosravi Publications; 2010. [In Persian].
5. World Health Organization. Screening donated

blood for transfusion-transmissible infections: Recommendations. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2010.
6. Sundar P, Mahadevan A, Jayshree RS, Subbakrishna DK, Shankar SK. Toxoplasma seroprevalence in healthy voluntary blood donors from urban Karnataka. Indian J Med Res 2007; 126(1): 50-5.
7. Seed CR, Kitchen A, Davis TM. The current status and potential role of laboratory testing to prevent transfusion-transmitted malaria. Transfus Med Rev 2005; 19(3): 229-40.
8. Singh G, Sehgal R. Transfusion-transmitted parasitic infections. Asian J Transfus Sci 2010; 4(2): 73-7.
9. Lima GFMC, Arroyo Sanchez MC, Levi JE, Fujimori M, Da Cruz CL, Sanchez AR, et al. Asymptomatic infections in blood donors harbouring Plasmodium: an invisible risk detected by molecular and serological tools. Blood Transfus 2018; 16(1): 17-25.
10. Verra F, Angheben A, Martello E, Giorli G, Perandin F, Bisoffi Z. A systematic review of transfusion-transmitted malaria in non-endemic areas. Malar J 2018; 17(1): 36.
11. Hill DE, Dubey JP. Toxoplasma gondii as a Parasite in Food: Analysis and Control. Microbiol Spectr 2016; 4(4).
12. Ghadamgahi F, Bahadoran M, Shariat-Bahadori E, Ahmadi-Ahvaz N, Ghadrdoost B, Hejazi SH. Study of serological toxoplasmosis and risk factors associated with infection in women referred to labs of northern Tehran, Iran. J Isfahan Med Sch 2013; 31(248): 1257-66. [In Persian].
13. Siegel SE, Lunde MN, Gelderman AH, Halterman RH, Brown JA, Levine AS, et al. Transmission of toxoplasmosis by leukocyte transfusion. Blood 1971; 37(4): 388-94.
14. Alishahi A, Fallahian M, Fallahian F. Medical Parasitology. 1st ed. Tehran, Iran: Jameah Negar Publications; 2014. [In Persian].
15. Tonnetti L, Townsend RL, Deisting BM, Haynes JM, Dodd RY, Stramer SL. The impact of Babesia microti blood donation screening. Transfusion 2019; 59(2): 593-600.
16. Leiby DA. Babesiosis and blood transfusion: Flying under the radar. Vox Sang 2006; 90(3): 157-65.
17. Mukry SN, Saud M, Sufaida G, Shaikh K, Naz A, Shamsi TS. laboratory diagnosis of malaria: Comparison of manual and automated diagnostic tests. Can J Infect Dis Med Microbiol 2017; 2017: 9286392.
18. Ghasemi FS, Hooshyar H. Laboratory diagnosis of Toxoplasmosis and its importance. J Med Counc I R Iran 2014; 32(1): 65-77. [In Persian].
19. Nahravanian H, Eskandarian AA. Malaria and malaria parasites. 1st ed. Tehran, Iran: Khosravi Publications; 2005. [In Persian].
20. Karami M, Mahbod SAA, Shad Del M. Comparison between IFA and ELISA technique with PCR method in the diagnosis of Toxoplasma gondi parasite in infants admitted at taleghani hospital. Annals of Military and Health Sciences Research 2007; 5(1): 1141-9. [In Persian].
21. Yentur DN, Yildiz ZF, Seyrek A. Detection of Plasmodium using filter paper and nested PCR for patients with malaria in Sanliurfa, in Turkey. Malar J 2016; 15(1): 299.
22. Mousavi M, Saravani R, Jafari MM, Shahrakipour M, Sekandarpour S. Detection of Toxoplasma gondii in diabetic patients using the nested PCR assay via RE and B1 genes. Jundishapur J Microbiol 2016; 9(2): e29493.
23. Kim JY, Cho SH, Joo HN, Tsuji M, Cho SR, Park IJ, et al. First case of human babesiosis in Korea: Detection and characterization of a novel type of Babesia sp. (KO1) similar to ovine babesia. J Clin Microbiol 2007; 45(6): 2084-7.
24. Zakeri S, Najafabadi ST, Zare A, Djadid ND. Detection of malaria parasites by nested PCR in south-eastern, Iran: Evidence of highly mixed infections in Chahbahar district. Malar J 2002; 1: 2.
25. Lam WY, Yeung AC, Tang JW, Ip M, Chan EW, Hui M, et al. Rapid multiplex nested PCR for detection of respiratory viruses. J Clin Microbiol 2007; 45(11): 3631-40.
26. Poschl 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.
27. Arifin S, Fitri LE, Sujuti H, Hermansyah B, Endharti AT, Burhan N, et al. Sensitivity and specificity of nested PCR for diagnosing malaria: Cases in several areas of Indonesia. J Trop Life Sci 2018; 8(21): 172-6.
28. Saki J, Foroutan M, Khodkar I, Khodadadi A, Nazari L. Seroprevalence and molecular detection of Toxoplasma gondii in healthy blood donors in southwest Iran. Transfus Apher Sci 2019; 58(1): 79-82.

DOI: *10.22122/jims.v39i635.13752* *Published by Vesnu Publications*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 39, No. 635, 3rd Week, October 2021**

Received: 08.12.2020 Accepted: 29.07.2021 Published: 19.10.2021

A Triplex Nested Polymerase Chain Reaction for Simultaneously Diagnosis of Plasmodium, Babesia, and Toxoplasma in Blood to Promote Safety of Blood Transfusion

Abbasali Eskandarian[1], Alireza Najafirad[2]

Original Article

Abstract

Background: Diagnosis and remove of blood transmittable infections has a vital importance in blood transfusion. The aim of this study was to concurrently assess the presence of protozoan parasites plasmodium, toxoplasma, and babesia in samples of blood transfusion.

Methods: In this experimental study, the development of a triplex nested-Polymerase chain reaction (PCR) for extol of blood transfusion process at 2020 in Isfahan City, Iran, was done. After selecting the genus specific primers, at the first step, nested PCRs were set up for each parasite specifically at the genus level using blood samples with a determined number of each parasite, and then multiplex nested PCR was set up.

Findings: The nested PCR triple reaction (TN-PCR) has a higher diagnostic validity compared to the microscopic and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) methods. Sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values were as 100%, 100%, 100%, and 100%, respectively, for detection Plasmodium, 100%, 91%, 92%, and 100%, for Toxoplasma, and 94%, 100%, 100%, and 89% for Babesia. The validity of this test for Plasmodium was the highest compared to the other two parasites.

Conclusion: Based on the results of this study, the TN-PCR method can simultaneously identify one, two or all three dangerous pathogens in biological samples as well as blood samples in the blood transfusion process.

Keywords: Plasmodium; Babesia; Toxoplasma; Nested polymerase chain reaction; Blood transfusion

Citation: Eskandarian A, Najafirad A. **A Triplex Nested Polymerase Chain Reaction for Simultaneously Diagnosis of Plasmodium, Babesia, and Toxoplasma in Blood to Promote Safety of Blood Transfusion.** J Isfahan Med Sch 2021; 39(635): 556-63.

1- Associate Professor, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- MSc Student, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences AND Isfahan Blood Transfusion Organization, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Abbasali Eskandarian, Associate Professor, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; Email: dreskandarianstudents98@gmail.com