کاربرد آپتامر در شناسایی باکتری‌های بیماریزا

● **دکتر حبیب ضیغمی**
دانشیار باکتری شناسی، گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران

zeighami@zums.ac.ir

● **مژگان خیراندیش**
کارشناسی ارشد میکروب شناسی، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران

❑ چکیده

تشخیص، شناسایی و اندازه گیری کمی پاتوژن های میکروبی برای محافظت از سلامت عمومی حیاتی است. علیرغم این که در حال حاضر تست‌های مبتنی بر کشت میکروبی و تکنیک‌های مولکولی متدوال ترین روش‌های مورد استفاده هستند، این تکنیک‌ها زمان بر بوده و نیاز به ابزار پیچیده و افراد آموزش دیده دارند. در نتیجه، آنالیز این تکنیک‌ها هزینه بر می‌باشد. پیدایش آپتامر، منجر به بر طرف نمودن نواقص سایر روش‌های مولکولی گردید. همچنین، توانایی اتصال اختصاصی آپتامرها به اهداف مختلف، پتانسیل بزرگی در آن‌ها به وجود آورده است که می‌توان از آن‌ها در شناسایی پاتوژن های گوناگون استفاده کرد. آپتامرها توسط یک فرآیند آزمایشگاهی تدریجی به نام SELEX از کتابخانه‌های ترکیبی جدا می‌شوند. مراحل SELEX شامل تکرار مراحل ساخت کتابخانه، اتصال/ جداسازی و تکثیر است. این مطالعه مروری بر روی کاربرد آپتامرها به عنوان عامل شناسایی و درمانی باکتری‌های بیماریزا است. آپتامرها با توجه به پایداری بالا و همچنین میل ترکیبی بالا در استفاده‌های بالینی در درمان و تشخیص باکتری‌های بیماریزا کاربردهای وسیع و گسترده‌ای دارند. قابلیت‌ها و کاربردهای آپتامرها و حسگرهای ساخته شده از آن‌ها در زمینه‌های علوم مختلف به خصوص تشخیص و شناسایی ویروس‌ها، توکسین ها و باکتری‌های بیماریزا اهمیت تحقیق و مطالعه هرچه بیشتر این زمینه را نشان می‌دهد.

کلمات کلیدی: آپتامر، باکتری‌های بیماریزا، تکنیک SELEX

❑ مقدمه

تشخیص، شناسایی و اندازه گیری کمی پاتوژن های میکروبی برای محافظت از سلامت عمومی حیاتی است. تست‌های بر پایه کشت میکروبی و آزمایش‌های مولکولی (تکنولوژی‌های ایمنی شناسی یا نوکلئیک اسید) متدوال‌ترین روش‌هایی هستند که در حال حاضر مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱). این تکنیک‌ها زمان بر بوده و نیاز به ابزار پیچیده و افراد آموزش دیده دارند، بنابراین منجر به افزایش هزینه آنالیز می‌شوند. تکنیک‌های تشخیص سریع باید شناسایی قابل اعتماد، به موقع، با کاربرد آسان و ارزان، همراه با حساسیت، اختصاصیت و قابلیت تکرار پذیری برابر یا بیشتر را فراهم کنند (۲).

شناسایی و تعیین مقدار مولکول‌ها در پیشرفت مطالعات پایه و بررسی‌های کلینیکی نقش حیاتی دارد. تکنولوژی‌هایی که امکان شناسایی اختصاصی و تعیین دقیق مولکول‌ها را فراهم می‌نمایند در پی یافتن آنالیت‌های جدید برای بهبود تکنیک‌های موجود می‌باشد. امروزه این تکنولوژی‌های پیشرفته به محققان این امکان را می‌دهد

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-06-03]

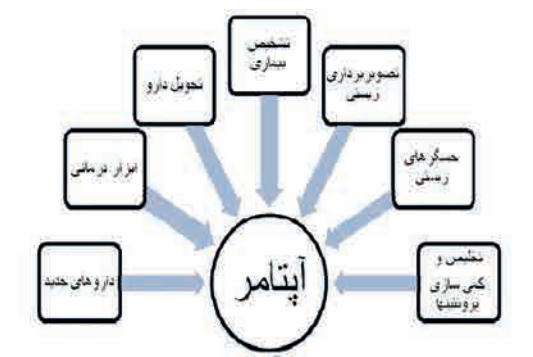
کـــه هویت مولکول‌ها را بنا بر خواســـت خود تغییر دهند و بنابراین مولکول‌های جدیـــدی تولید نمایند که کاربردهای متنوعـــی دارند به گونـــه‌ای که حتی گاهی ایـــن کاربردها می‌تواند کاملاً متفاوت با طبیعت اولیه این مولکول‌ها باشد. برای مثال مولکول‌های آنتی بادی که آنتی ژن‌ها را با تمایل و اختصاصیت بالا شناســـایی می‌کنند در حال حاضر دچار تغییرات درونـــی برای کاتالیز کـــردن واکنش‌های مختلف شده‌اند تا همانند یک آنزیم عمل نمایند (۳).

بر اســـاس مطالعه Lazcka و همکاران در سال ۲۰۰۷، تکنولوژی بیسنســـور [1] یک زمینه با سریع‌ترین پیشرفت در شناســـایی پاتوژن ها اســـت. آپتامرها، الیگونوکلئوتیدهایی از جنـــس مولکول‌های تک رشـــته‌ای RNA و ssDNA یا مولکول‌های پپتیدی هستند که به علت ســـاختار ســـه بعـــدی خاصشـــان می‌توانند بـــا اختصاصیت و تمایل بالا به اهدافشان متصـــل شـــوند (۴).

در آزمون‌های تشـــخیصی، آپتامرهـــا می‌توانند به عنوان یک عامل تشـــخیصی جایگزین برای آنتی بادی‌ها باشـــند. آپتامرهاهـــا از طریـــق فرآیندهایـــی در in vivo انتخاب می‌شوند که هزینه و تنوع کمتری نسبت به آنتی بادی‌های تولید شده در شرایط in vivo نشان می‌دهند. علاوه بر این توکســـین ها و مولکول‌هایی که موجب پاسخ ایمنی خوبی نمی‌شـــوند، می‌توانند برای تولید آپتامر هایی با افینیتی بالا استفاده شوند (۵).

مطالعات معتبر فراوانی روی آپتامرها انجام گرفت تا این که فرآیند انتخاب در محیط آزمایشگاه اولین بـــار در سال ۱۹۹۰ توســـط گروه محققین Gold و گـــروه Szostak SELEX [2] نامیده شـــد (۷،۶) با گسترش SELEX که امروزه یک تکنیـــک پایه ایی برای جدا سازی آپتامرهاست، بسیاری از آپتامرهـــا مستقیماً به صـــورت in vitro علیـــه اهـــداف مختلـــف از بیومولکول های کوچـــک گرفته تا پروتئین‌ها و حتـــی سلول‌ها انتخاب می‌گردند (۸).

آپتامـــر ها می‌توانند بـــرای تنوع گســـترده‌ای از اهداف، از مولکول‌های کوچک تا ســـلول کامل انتخاب شـــوند. اهداف SELEX شـــامل پروتئین‌هـــا، آنزیم‌هـــا، آنتـــی بادی‌ها، آنتی‌بیوتیک‌ها و توکســـین ها می‌باشـــند. همچنین اهداف کمپلکس شـــامل ســـلول کامل، مولکول‌های سطح سلولی، قطعات غشـــایی، لیزات باکتریایی و ذرات ویروس هستند که می‌توانند به عنوان هدف باشند (۹،۱۰). امـــروزه آپتامرهـــا در دو کـــلاس عمـــده آپتامرهـــای DNA/RNA و آپتامرهای پپتیدی تقسیم بندی می‌شوند (۱۱). آپتامرهای پیشرفته به طور اولیه به عنوان ابـــزار درمـــانی و تشخیصی مطرح شدند. آغاز استفاده از آپتامرهـــا به عنـــوان درمان در سال ۱۹۹۰ بود، اما ۱۵ ســـال طول کشـــید تا اولین آپتامر درمانی بـــه بهـــره بـــرداری بـــالینی برسـد (۱۲). در حـــال حاضـــر آپتامرها بـــرای درمـــان مـــاکولار دجنریشـــن، سندرم کرونری حاد، اخـــتلال مربـــوط به فاکتور ون ویلبراند، لوکمی میلوئید حاد، سرطان سلول کلیوی، ســـرطان ریـــه، پورپورای ترومبوتیـــک ترومبوسیتوپنیک، دیابـــت نـــوع ۲، نفروپاتی، لوپوس و همچنین آپتامرهایی علیه ویروس‌ها در مراحل مختلف توسعه و بـــالین هســـتند، بنـــابراین آینـــده روشنی برای آپتامرها به عنوان عوامل درمانی در پیش اســـت (۴). تکنولوژی آپتامر به عنوان یک تکنولوژی معتبر و مؤثر گسترش یافته و مطالعات زیادی از کاربردهـــای آپتامرهـــا انجام گرفته است و امروزه آپتامرها در جنبه‌های مختلف به عنـــوان یـــک ابـــزار تشخیصـــی و درمـــانی، در گســـترش داروهای جدید و سیستم‌های تحویل دارو و غیره به کار می‌روند (۴) (شکل ۱).



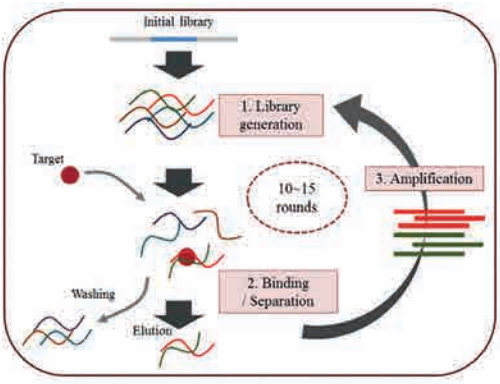
شکل ۱. کاربردهای مختلف آپتامرها

1- biosensor technology
2- Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-06-03]

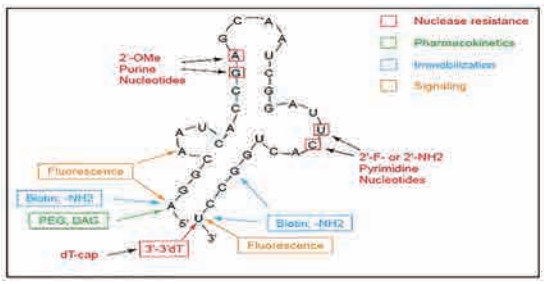
کاربردهای کلینیکی آپتامرها شـامل اسـتفاده آن‌ها به عنـوان عوامل درمانـی (۱۳)، عوامل ضـد عفونی (۱۴) و مولکول‌های تحویل دارو (۱۵) می‌باشد.

آپتامرها طی چرخه‌ای به نام SELEX به طور شیمیایی سـنتز می‌شـوند، در واقع این چرخه یک تکنیک قدرتمند در انتخـاب آپتامر بـا اختصاصیت بالا نسـبت به هدف از میان کتابخانـه‌ای از تعـداد زیـادی الیگونوکلئوتیدهای تصادفی می‌باشـد. در این چرخه ابتدا یک کتابخانه شامل 10^{13}-10^{15} الیگونوکلئوتید به طور شیمیایی سنتز می‌شود. هر یـک از این قطعات دارای یک قسـمت میانی تصادفی اسـت که حدود ۶۰ نوکلئوتید را شامل می‌شوند. در مرحله بعد این کتابخانه در معرض هدف مورد نظر (به عنوان مثال پروتئین تخلیص شـده یا سلول سـرطانی) قرار می‌گیرد. بدین ترتیب آپتامرهای دارای تمایل و اختصاصیت به هدف مورد نظر به آن متصل می‌شـوند. قطعات متصل شـده از متصل نشده جداسازی شـده و سپس قطعات متصل شده تکثیر می‌شوند و به عنوان کتابخانه جدید در معرض هدف قرار می‌گیرد. این چرخه چندین بار تکرار می‌شـود تا نهایتاً قطعه‌ای با بیشترین اختصاصیت انتخاب، تکثیر و توالی یابی می‌شود (۱۶).



شکل ۲. تصویری از سه مرحله فرآیند SELEX

اولیـن آپتامرهـا از کتابخانه‌هـای DNA و RNA ای جدا شـدند که اسیدهای نوکلئیک طبیعی داشتند بنابراین این آپتامرها طول عمر کوتاهی در محیط‌های فیزیولوژیک داشـتند. در سـال‌های بعد اصلاحاتی روی آپتامرها انجام شـد که نه تنها روی مقاومت و پایـداری آن‌ها، بلکه روی عملکرد آن‌ها نیز تأثیر مثبت گذاشت. پایدار سازی می‌تواند با پوشـاندن سـرهایَ ۳ وَ ۵ الیگونوکلئوتیدها و همچنین ایجاد اصلاحات روی قند ریبوز و گروه فسـفات میسر شود (شکل ۳) (۱۷).



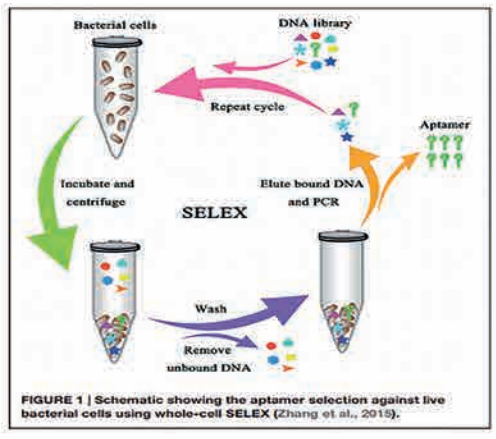
شکل ۳. اصلاحات سرهایَ ۳ وَ ۵ الیگونوکلئوتیدها (۱۲)

از آنجـا که آپتامرها همانند آنتـی بادی‌ها قدرت اتصال بـه مولکول‌های آنتی ژن را دارنـد بنابراین اکثر روش‌های تشخیصی کمی آنتی ژن به کمک آنتی بادی می‌تواند برای آپتامر ها نیز مورد استفاده قرار گیرند. از جمله این روش‌ها می‌توان به الایزا بر پایه آپتامر، فلوسـایتومتری، الکتروفورز لوله موئین، کروماتوگرافی فاز مایع با کارایی بالا (HPLC)، روش‌های اسپکترومتری جرمی مانند (MALDI-TOF) و (LC-MS) اشاره کرد (۱۸، ۱۹).

باکتری‌ها میکروارگانیسم‌هایی هستند که طول آن‌ها چند میکرومتر اسـت و از نظـر مورفولوژیکی به صورت میله‌ای، کروی یا مارپیچ دیده می‌شـوند. آن‌ها می‌توانند به تغییرات دما و pH، گرسنگی تغذیه‌ای یا منابع غذایی جدید، سموم، تنش‌ها و سیگنال‌ها حسـاس باشند. تشخیص و شناسایی پاتوژن های میکروبی برای سـلامت عمومی و ایمنی مواد غذایـی حیاتی اسـت. مناطقی که تشـخیص پاتوژن های میکروبی حیاتی اسـت شـامل تشـخیص بالینی، تجزیه و تحلیل آب و محیط زیست و ایمنی مواد غذایی است (۲۰). در حـال حاضر، آزمایش‌های مبتنی بر کشـت میکروبی و آزمایش‌های مولکولی (تکنولوژی‌های ایمونولوژیک یا اسید نوکلئیک) یکی از روش‌های رایج در تشـخیص و شناسایی پاتوژن های میکروبی هسـتند و یکـی از دلایل اصلی که منجر به دنبال روش جدید می‌شود ممکن است پیچیدگی این روش‌ها باشـد، زیـرا این روش‌ها شـامل تکنیک‌های

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-06-03]

مختلفی در فرآیند تهیه و تشـــخیص نمونه مانند استخراج نمونه، تصفیه، غنی سازی و جداسازی است. به همین دلیل در حال حاضر، روش تشـــخیص مبتنی بـــر آپتامر می‌تواند در ســـلامت عمومی و ایمنی مواد غذایی محدود شود. اکثر آپتامر انتخاب شده در برابر باکتری‌های بیماریزا، با استفاده از روش‌های SELEX معمولی در شکل ۴ نشان داده شده است.



شکل ۴. آپتامر انتخاب شده بر علیه باکتری‌های بیماریزا با استفاده از SELEX

دشـــواری در تشـــخیص زود هنـــگام عفونت‌های خاصی که توســـط باکتری‌ها ایجاد می‌شـــود، نیاز به جســـتجوی تکنیک‌های جدید برای این منظور را به دنبال داشته است، زیرا این فنون‌ها نیاز به درمـــان طولانی با آنتی بیوتیک ها دارند.

پاتـــوژن ها گونه‌های مضـــری از باکتری‌ها هســـتند که باعـــث آلودگی و شـــیوع بیماری‌های واگیردار می‌شـــوند و در نتیجه بسیاری از مشـــکلات جدی را به وجود می‌آورند. از میان این باکتری‌ها می‌توان اشرشـــیا کلی و ســـالمونلا، هلیکوباکترپیلوری، نایسریا گونوره آ، نایسریا منتژیتیدیس، اســـتافیلوکوکوس اورئوس (عامل شـــایع مســـمومیت‌های غذایی، جوش، ســـلولیت، آبسه، عفونت زخم، سندرم شوک سمی، پنومونی) و استرپتوکوک (پنومونی، منتژیت، عفونت گوش و فارنژیت) و غیره را نام برد (۲۱, ۲۲).

بیماری‌هـــای عفونی یکی از علل عمـــده مرگ و میر در سرتاســـر جهان هستند و باعث مرگ میلیون‌ها نفر در سال و بستری شـــدن آن‌ها می‌شوند. ســـازمان بهداشت جهانی (WHO) بیماری‌های عفونی و انگلی را در ســـال ۲۰۰۴ به عنوان دومین علت مرگ در سراســـر جهان شناسایی کرده است. این بیماری‌های عفونی یا مسری و پاتوژن های منتقل شـــده از غذا در کشـــورهای کم درآمد، مانند کشـــورهایی در آفریقـــا، که در آن فاقد تجهیزات پزشـــکی و روش‌های تشخیصی و درمانی اســـت نیز جدی هستند. اشرشیا کلی O157: H7، ســـالمونلا، کمپیلوباکتـــر ژژونی و لیســـتریا مونوسیتوژنز علل اصلی بیماری‌های غذایی باکتریایی و آب هستند (۲۳).

بیماری‌های عفونی در سرتاســـر جهان تقریباً ۴۰٪ است که ســـالانه ۵۰ میلیون مـــرگ و میر را در بـــر می‌گیرد. با توجه به این آمار، شناســـایی پاتوژن هـــای میکروبی برای ســـلامت عمومی و امنیت غذایی بسیار مهم و حیاتی است. حوزه‌هایی که شناسایی پاتوژن های میکروبی در آن‌ها حائز اهمیت اســـت عبارتند از: تشخیص بیماری‌های درمانگاهی (کلینیکـــی)، آنالیزهای محیطی و آب، امنیت غذایی و دفاع زیستی. تست‌های میکروبی و تجزیه و تحلیل‌های مولکولی (ایمنی شناســـی یـــا تکنولوژی‌های اســـید نوکلئیکی) در میان روش‌های به کار رفته معمولی در شناســـایی و تعیین پاتوژن های میکروبی رایج‌تر است (۲۴). روش‌های معمول تشخیص و شناسایی مبتنی بر آزمایشگاه باکتری‌ها معمولاً زمـــان پردازش طولانی دارند، ممکن اســـت حساســـیت و ویژگی خاصی نداشته باشند و نیاز به تجهیزات تخصصی و کاربردهای آموزشی داشته باشند و در نتیجه هزینه زیادی در پی دارد. به طور مثال، نمونه‌ها (به عنوان مثال خون، بزاق، ادرار یا نمونه غذایی) بـــرای تجزیه و تحلیل میکروبیولوژی باید با اســـتفاده از تکنیک‌های مختلف مانند میکروسکوپ و کشت ســـلولی، آزمایش‌های بیوشـــیمیایی، آزمایش‌های ایمونولوژیک و یا تجزیه و تحلیل ژنتیکی بررســـی شـــوند. مشـــاهده میکروســـکوپی شـــامل رنگ آمیزی باکتری‌ها و الگوی رنگ آمیزی آن‌ها و نســـبتاً سریع است اما مشخص نیست، در حالی که ممکن اســـت کشت باکتری‌ها بر روی محیط‌های کشـــت انتخابی تا چند روز طول بکشـــد. علاوه بر این، تمام باکتری‌ها نمی‌توانند در آزمایشـــگاه کشت داده

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-06-03]

شوند. آزمایش‌های بیوشیمیایی شامل تشخیص آنزیم‌های خاصی است. آزمایش‌های ایمونولوژیکی شامل آنزیم‌های مرتبط با ایمنی بدن می‌باشند (ELISA) و تست‌های آگلوتیناسیون معمولاً برای شناسایی اپی توپ‌های سطحی خاص استفاده می‌شود. این فرآیندها به علت کارکنان فنی و تجهیزات مورد نیاز، تمام وقت و با هزینه زیاد هستند. ظهور تکنیک‌های مولکولی مانند تجزیه و تحلیل ژنتیکی باعث شناسایی سریع‌تر گونه‌های باکتریایی شده است.PCR تکنیک فوق العاده حساس که امکان شناسایی باکتری‌ها را بر اساس مواد ژنتیکی خود فراهم می‌کند، با توجه به حجم نمونه کوچک مورد نیاز، به مرحله کشت باکتری نیاز ندارد. PCR نیاز به پروب های ژنتیکی پیشین دارند تا بتوانند به طور صحیح با دنباله باکتری‌های هدف جفت شوند. جفت شدن اشتباه ممکن است منجر به نتایج مثبت کاذب شود و جهش‌های ژنتیکی جهش یافته ممکن است از تطبیق پروب صحیح فرار کنند. با این حال، این هنوز یک روش طولانی و گران قیمت است که می‌تواند چندین روز طول بکشد. تجزیه و تحلیل واقعی PCR در عرض چند ساعت می‌تواند سریع‌تر انجام شود، اما همچنان نیاز به تجهیزات و واکنش‌های ویژه دارد. به طور بحرانی، تمام این تکنیک‌ها زمان می‌گیرند، نیاز به تهیه نمونه و واکنش دهنده‌های خاص و تجهیزات دارند و از این رو پر هزینه هستند، بنابراین یک تقاضای فوری برای آزمایش سریع‌تر، کارآمد و حساس وجود دارد که می‌تواند کل باکتری‌ها را در حوزه و یا در حین مراقبت شناسایی کند و از پردازش چند مرحله‌ای جلوگیری کند، به ویژه برای تشخیص و درمان بالینی و همچنین تشخیص سریع باکتری‌ها می‌تواند برای نتایج بالینی بسیار حیاتی باشد (۲۳).

❑ روش بررسی

مطالعه بر روی آپتامر و کاربردهای آن به عنوان عامل شناسایی باکتری‌های بیماریزا است. در این مطالعه مروری با استفاده از کلمات کلیدی آپتامر، باکتری‌های بیماریزا، تکنیک SELEX در پایگاه‌های اطلاعاتی Google scholar, Scopus و PubMed جستجوی کاملی انجام گرفت سپس مطالعات مرتبط و معتبر طی بیست سال اخیر گردآوری و مورد بررسی قرار گرفت.

❑ یافته‌ها

کاربرد آپتامر در شناسایی کمپیلوباکتر ژوژنی

Stratis-Cullum و همکاران در سال ۲۰۰۵ (۲۵) استفاده از آپتامرها برای شناسایی سلول کامل کمپیلوباکترژوژنی را گزارش کردند. در این گزارش، ارزیابی اختصاصیت آپتامر نشان داد که هیچ واکنش متقاطعی با سالمونلا تیفی موریوم ندارد، اما واکنش متقاطع محدودی با E.coli O157:H7 دارد. با این حال، برخی واکنش‌های متقاطع با هلیکوباکتر پیلوری و گونه‌های لیستریا در غلظت بالا نشان داده شد. در این مطالعات نه فرآیند SELEX و نه توالی آپتامر کمپیلوباکتر ژوژنی شرح داده شده بودند (۲۶، ۲۷).

❑ کاربرد آپتامر در شناسایی باسیلوس تورینجنسیس

شناسایی باکتری‌ها با استفاده از اپتاسنسور ها یک زمینه نسبتاً جدید است. اخیراً دو استراتژی متفاوت برای شناسایی سلول کامل با استفاده از QDs[3] و CNTs[4]گزارش شده است. QDs برای شناسایی اسپورهای باسیلوس تورینجنسیس استفاده شد. در آن مطالعه، QDs با استفاده از یک آپتامر اختصاصی شده برای باسیلوس تورینجنسیس کاربردی شده بود. بعد از انکوباسیون QD-aptamer با هدف، اسپورها شسته شده بودند و برای اندازه گیری فلورسنس جمع آوری شده بودند. چندین کنترل با QDs و بدون اسپور برای اندازه‌گیری اتصال غیر اختصاصی QDs به اسپور و فلورسانس تست شده بود. حساسیت گزارش شده 10^3CFU/ml بود. برای منظور اختصاصیت، اسپور B.globigii و B.subtilis نیز تست شده بود. این سیستم قادر به تمایز B.thuringiensis از B.globigii در غلظت بالای 10^5CFU/ml بود (۲۸).

3- quantum dots
4- carbon nanotubes

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-06-03]

❑ کاربرد آپتامر در شناسایی باسیلوس آنتراسیس

اسپورهای سویه باسیلوس آنتراسیس نیز به عنوان اهداف سلولی کامل در SELEX مورد استفاده قرار گرفته بودند. با روش آپتامر و با استفاده از هدف اسپورهای باکتری توانستند این باکتری را تشخیص دهند (۳۱-۲۹). بهینه‌سازی‌های post- SELEX بیشتر به منظور استفاده از آپتامرهای DNA جدا شده در پلتفرم‌های توسعه تشخیص ضروری است.

❑ کاربرد آپتامر در شناسایی سالمونلا

برخی از اجزای باکتری و همچنین کل سلول‌های باکتریایی می‌توانند به عنوان لیگاند برای انتخاب آپتامر استفاده شود. RNA آپتامر S-PS8.4 به طور خاص پیلی IVB را از نوع سالمونلا انتریکا سروار تیفی با استفاده از یک پروتئین ساختاری پیلین به عنوان هدف انتخابی به دست آمده را شناسایی کرده بود. پیشنهاد شده بود که این آپتامرها به طور بالقوه می‌تواند به عنوان جایگزین برای درمان مبتنی بر آنتی بیوتیکی استفاده شود. آپتامر S-PS8.4بر روی سطح نانو لوله‌های کربنی تک سلولی کربوکسیل شده کوانتومی تحمیل شده به عنوان یک عنصر تشخیصی از یک سنسور پتانسیومتری[5] برای تشخیص باکتری در محلول استفاده شده بود.

برای انتخاب DNA آپتامر در برابر سالمونلا انتریکا سروار تایفی موریوم، مخلوطی از پروتئین غشای خارجی (OMP) به عنوان هدف انتخاب مثبت مورد استفاده قرار گرفته بود. طرح تشخیص بسیار پیچیده بود و شامل چندین مرحله می‌شدند. ابتدا، یک مولکول کایمر ساخته شده از DNA آپتامر و پراکسیداز DNAzyme به صورت ناقص کوانتومی به نانو لوله‌های کربنی تک محور متصل شد. پس از اضافه کردن یک کشت باکتریایی که باید آنالیز شود، آپتامر به هدف متصل می‌شود و از سطح نانو لوله‌ها جدا می‌شود. بعد همین به مخلوط تجزیه، که مولکول DNAzyme را تشکیل می‌دهد و ساختار فعال DNAzyme را ایجاد می‌کند، اضافه می‌شود. در مرحله نهایی، پس از اضافه کردن لومینول، دومی با پراکسید هیدروژن واکنش می‌دهد که یک سیگنال شیمیایی توسط یک اسپکتروفتومتری فلورسنت تشخیص داده می‌شود (۳۲).

❑ کاربرد آپتامر در شناسایی استافیلوکوک اورئوس

استافیلوکوک اورئوس یک باکتری گرم مثبت است که می‌تواند طیف گسترده‌ای از بیماری‌ها را از عفونت‌های خفیف به بیماری‌های خطرناک مانند پنومونی، اندوکاردیت، سپتی سمی و سندرم شوک سمی ایجاد کند. تا به امروز، دو مطالعه در مورد انتخاب DNA آپتامر در برابر استاف اورئوس منتشر شده است. Chang و همکاران در سال ۲۰۱۳ تمام سلول‌های باکتریایی را به عنوان اهداف SELEX مورد استفاده قرار دادند، جایی که هر دور انتخابی شامل مرحله انتخاب منفی علیه استاف اپیدرمیدیس بود.

آپتامرهای ۶۲ نوکلئوتیدی SA17 و SA61 در مقایسه با تعدادی از باکتری‌های دیگر مانند: باسیلوس سوبتیلیس، سیتروباکتر فروندی، اشرشیا کلی، کلبسیلا پنومونیه، لیستریا مونوسیتوژنز، موراکسلا کاتارالیس، سالمونلا انتریکا، شیگلا بویدی، شیگلا فلکسنری، استرپتوکوکوس بوویس، استرپتوکوکوس پنومونیه، استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس و استافیلوکوکوس همولیتیکوس انتخاب شد. با این وجود، اتصال هر چند در حد بسیار پایین‌تر، با S. اپیدرمیدیس و سودوموناس مشاهده شد. جالب توجه است که بی حرکت شدن آپتامرهای SA17 و SA61 روی سطح نانو ذرات طلا منجر به افزایش وابستگی هدف شد. برای توسعه داروهای بالقوه در برابر عفونت‌های استافیلوکوکی، آپتامرها DNA قادر به شناخت یک توکسین از استافیلوکوکوس اورئوس انتخاب شدند. انتروتوکسین B از استاف اورئوس نیز به عنوان یک لیگاند برای انتخاب استفاده شد. با استفاده از روش آپتامر و هدف انتروتوکسین B استاف توانستند این باکتری را تشخیص دهند، همچنین توسط این روش، آپتامر توانست انتروتوکسین B را خنثی کند. در واقع علاوه بر کاربرد تشخیص در این باکتری، کاربرد درمانی نیز داشت (۳۳). انتروتوکسین A از استاف اورئوس همانند

5- potentiometric biosensor

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-06-03]

انتروتوکسین B نیز به عنوان یک لیگاند برای انتخاب استفاده شد و آپتامر برای این انتروتوکسین هم در تشخیص و هم در درمان نیز کاربرد داشت (۳۴).

❑ کاربرد آپتامر در شناسایی اشرشیا کلی

اشرشیا کلی یکی از رایج‌ترین و بی خطرترین باکتری‌های موجود در دستگاه گوارش حیوانات خون گرم است. با این حال، برخی از سویه‌های اکلای پاتوژن های خطرناک غذایی هستند. به عنوان مثال E.coli O157: H7 می‌تواند باعث ایجاد طیف گسترده‌ای از بیماری‌هایی مانند اسهال هموراژیک و غیر هموراژیک، نارسایی ناگهانی کلیه یا سندرم اورمیک همولیتیک شود. به منظور به دست آوردن آپتامرهای جدید علیه اشرشیا کلی، هم کل باکتری و هم اجزای باکتری می‌توانند به عنوان اهداف SELEX استفاده شوند. DNA آپتامر در برابر لیپوپلی ساکارید E.coli O111: B4 انتخاب شد و به عنوان پایه‌ای برای یک اتصال با پروتئین C1qrs انسان است که سیستم کمپلمان مسئول مقاومت غیر اختصاصی به باکتری را فعال می‌کند. اتصال حاصل از آن یک فعالیت ضد باکتریایی را در حضور پروتئین‌های مکمل نشان داد و توانست به عنوان یک داروی ضد باکتریایی در نظر گرفته شود. متأسفانه این رویکرد تاکنون توسعه نیافته است. DNA آپتامر اتصال پروتئین فیمبریه از اکلای انتروپاتوژنیک K88 توسط Lee و همکاران دریافت شد. از آنجایی که این سویه تنها سویه با فیمبریه است، آپتامر به دست آمده می‌تواند برای تشخیص پاتوژن خاص استفاده شود. سویه K88 انتروپاتوژنیک‌اکلای نیز برای سلول SELEX یک آپتامر DNA استفاده شد (۳۵).

So و همکاران در سال ۲۰۰۸ یک آپتامر F-RNA- 20 را در برابر سلول‌های E.coli DH5a به دست آوردند که بعدها به عنوان یک عنصر شناخته شده باکتری شناخته شد (۳۶). ابتدا سلول‌های باکتری بر روی دانه‌های مغناطیسی پوشانده شده با آنتی بادی‌های خاصی جایگزین شدند، پس از آن آپتامر اضافه شد و پس از دناتوراسیون حرارتی مجتمع‌های هدف آپتامر، آن را با روش RT-PCR شناسایی کرد (۳۷).

❑ کاربرد آپتامر در شناسایی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس

سل[6] (MTB) یک عفونت خطرناک گسترده است، به ویژه به دلیل وجود تعداد زیادی از گونه‌های مقاوم MTB مقاوم به دارو، توسعه عوامل دارویی جدید می‌تواند درمان در این زمینه را بهبود بخشد. مطالعات بیشتر نشان داد که همه آپتامرها دارای وابستگی بالایی نسبت به یکدیگر هستند، در حالی که آپتامر NAP2 موثرترین گیرنده (Kd=31 نانومتر) و توانایی مهار تهاجم MTB به ماکروفاژها است. این آپتامر می‌تواند به عنوان عوامل درمانی امیدوار کننده در نظر گرفته شوند و همچنین برای توسعه پروب های مولکولی برای مطالعه مکانیسم حمله باکتریایی به سلول‌ها مورد توجه است. یکی دیگر از رویکردهای به دست آوردن آپتامرهای ضد توبرکلوزیس توسط Shum و همکاران در سال ۲۰۱۱ توسعه یافت (۳۸). آپتامرهای با کاربر بالقوه درمانی برای مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با استفاده از استراتژی سلول کامل SELEX شناسایی شدند (۳۹). توالی‌های آپتامر انتخاب شده، که ۳۰ درصد مخزن نهایی را تشکیل می‌دادند، به طور اختصاصی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس استرین H37Rv را از مایکوباکتریوم بوویس شناسایی کردند. مولکول‌های هدف اختصاصی با استفاده از یک آنالیز پروتئاز تا اندازه‌ای به عنوان پروتئین‌های غشایی شناخته شده بودند. سلول‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با استفاده از تریپسین و پروتئیناز K قبل از مرحله انکوباسیون با توالی آپتامر تیمار شده بودند. برای واکنش اتصال بین سلول‌های تیمار شده و آپتامر نتایج منفی به دست آمده بود. این مطلب نشان داد که سایت اتصالی به وسیله تیمار پروتئاز برداشته شده بود و به احتمال زیاد این سایت اتصالی پروتئین‌های غشایی می‌باشد. این ارزیابی پروتئازی می‌تواند برای شناسایی اولیه مولکول‌های هدف در رویکردهای سلول کامل SELEX استفاده شود.

آنزیم پلی فسفات کیناز ۲ (PPK2) به عنوان هدف

6- Mycobacterium tuberculosis

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-06-03]

SELEX مورد استفاده قرار گرفت. PPK2 یک نوکلئوتید کیناز دی فسفات وابسته به پلی فسفات است که نقش مهمی در سنتز اسید مایکولیک و دیگر پلی ساکارید سطح برای بقا باکتریایی در طول رشد فعال حیاتی ایفا می‌کند. آپتامر همچنین می‌تواند به عنوان پایه‌ای برای یک سیستم جدید تشخیص MTB استفاده شود. آپتامر L64QA که در این کار انتخاب شده بود بر روی سطح میکروپلیت پلیستیرول[7] برای جابجایی مولکول‌های آنالایزر قرار گرفت و یک آپتامر دیگری M64RA به عنوان یک عامل reporter مورد استفاده قرار گرفت.

این سیستم در ۷ نمونه از فیلترهای کشت شامل مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و سایر گونه‌های مایکوباکتریوم آزمایش شده بود و حساسیت و ویژگی خاصی از آزمون را نشان داد. پروتئین‌های DNA نیز در مقایسه با دیگر نشانگرهای بیولوژیک سل، پروتئین هترودایمر CFP-10.ESAT-6 انتخاب شده بودند.

❑ کاربرد آپتامر در شناسایی هموفیلوس آنفولانزا

هموفیلوس آنفولانزا یک باکتری مهم است که سبب ایجاد طیف بیماری‌های عفونی می‌شود. سوسپانسیون‌های H.influenzae یکی از شش کپسول متمایز ساختاری و آنتی ژنیک (a-f) را تولید می‌کند که Hib[8] یکی از علل مهم بیماری باکتری‌های مهاجم خون در کودکان زیر ۲ سال است. اغلب موارد مرگ و میر ناشی از Hib ناشی از مننژیت و پنومونی است. Hib و ترکیبات پلی‌ساکاریدی کپسول اجزای مهم واکسن هستند. هموفیلوس آنفولانزا، استرپتوکوکوس پنومونیه، استرپ گروه B، لیستریا مونوسیتوژنز، نایسریا مننژیتیدیس و استرپتوکوک آگالاکتیه پاتوژن های شایع مننژیت باکتریال حاد (ABM) هستند. با استفاده از روش آپتامر همانند سایر باکتری‌ها توانستند این باکتری را از سایر باکتری‌ها تشخیص دهند (۴۰).

❑ بحث و نتیجه گیری

یکی از مشکلات بهداشت عمومی، مقاومت در حال رشد داروهای مختلف برای پاتوژن های میکروبی است. انتخاب آپتامرهای ضد میکروبی علیه باکتری‌های بیماریزا نشان دهنده یک راه جدید برای غلبه بر این مشکل است. سیستم‌های تشخیص مبتنی بر آپتامر امکان تشخیص پروتئین‌های بیماریزا یا باکتری‌های کامل را به طور مستقیم در یک ماتریس پیچیده واقعی بدون غلظت اولیه یا تصفیه هدف میکروبی فراهم می‌کنند. این تشخیص مستقیم امکان سنجی زمان و هزینه را کاهش می‌دهد.

در سال‌های اخیر، بیوسنسور به عنوان یک تکنیک سریع، حساس، بسیار خاص و کم هزینه برای تشخیص پاتوژن‌ها مورد استفاده قرار گرفته است (۴۰). تشخیص سریع پاتوژن‌های باکتریایی و سموم در مواد غذایی ضروری است تا نتایج در زمان واقعی برای کاهش شیوع بیماری‌های خوراکی ضروری باشد. روش‌های غنی سازی کشت، هر چند که بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرند، زمان گیر هستند و بنابراین برای تشخیص سریع بیماری از نمونه‌های غذا ناکافی هستند. توسعه روش‌های جدید تشخیصی سریع زمان را به طور چشمگیری کاهش داده است.

علیرغم پیشرفت قابل توجه در تشخیص و درمان بیماری‌های عفونی در طول نیم قرن گذشته، هنوز هم بسیاری از مشکلات مربوط به توسعه روش‌های سریع تشخیص هزینه‌ای و جلوگیری از عوارض جانبی عوامل درمانی و مقاومت دارویی پاتوژن وجود دارد. آپتامرها می‌توانند یک ابزار قدرتمند برای توسعه هر دو روش جدید تشخیصی و عوامل درمانی که قادر به مسدود کردن توابع میکرو ارگانیسم‌های بیماریزا هستند را ارائه دهند. امروزه تکنولوژی SELEX شامل تکنیک‌های متنوعی می‌شود و به اندازه کافی قابل انعطاف و قابل تنظیم است تا هر پروتئینی مورد علاقه یا کل یک باکتری یا ذرات ویروسی را هدف قرار دهد. همچنین تعدادی از راه‌های افزایش ثبات بیولوژیکی آپتامرها با استفاده از تغییرات شیمیایی مختلف وجود دارد (۳۷).

RNA و DNA آپتامر که قادر به اتصال به طور خاص به عوامل تعیین کننده میکرو ارگانیسم‌ها و ویروس‌ها می‌توانند

7- polystyrol microplate
8- H influenzae type b

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-06-03]

به عنوان عناصر تشخیص برای سیستم‌های تشخیصی جدید مورد اســتفاده قرار گیرند. چنین خصوصیاتی از آپتامرها به عنــوان پایداری حرارتی و شــیمیایی، هزینه پایین و تنوع کمتــر رویکرد مبتنی بر آپتامــر را جایگزین امیدوار کننده برای روش‌های ایمونولوژیک می‌کند. علاوه بر این، وابستگی بالا به آپتامر اجازه می‌دهد تا اهداف مرتبط بسیار نزدیک را تشخیص دهد (به عنوان مثال ایزوفرم های مختلف پروتئین در بعضــی از مــوارد). آپتامر ها همچنیــن می‌توانند توابع پروتئین‌های هدف را مســدود کننــد و در نتیجه می‌توانند به عنوان پایه‌ای برای توسعه درمان‌های جدید برای درمان عفونت باشند (۳۷).

از مطالــب بیان شــده می‌تــوان چنین اســتنباط نمود کــه توانایی عملکــرد باکتری‌های پاتــوژن در روش آپتامر مزیت‌های قابل توجهی برای آن‌ها دارد، به عنوان مثال آپتامر در باکتری‌هــای پاتوژن آن‌ها را بــرای مقابله با اهداف مهم مجهز می‌سازد. از آنجایی که بسیاری از باکتری‌های پاتوژن از آپتامر اســتفاده می‌کنند، طراحی تکنیک‌هایی به منظور مداخله با آپتامر، راهکار بســیار مناسبی برای پیشگیری از بیماریزایــی پاتوژن هــا و مداوای عفونت‌های ایجاد شــده توسط آن‌ها خواهد بود. از طرفی به علت مقاومت یافتن اکثر باکتری‌ها به آنتی بیوتیک هــا، نیاز به روش درمانی جدید به شــدت احساس می‌شود. تا به امروز آپتامرهای جدا شده بر علیه میکروارگانیسم‌ها برای کاربردهای کلینیکی انتخاب شده‌اند. کاربرد آپتامرها در شناسایی پاتوژن های محیطی و منتقله از راه غذا یک زمینه نوید بخش برای تحقیق است.

همه ایــن داده‌ها نشــان می‌دهد که در آینــده نزدیک تکنولوژی مبتنی بر آپتامــر می‌تواند جایگزین واقعی برای روش‌های ســنتی جهت تشــخیص و درمــان بیماری‌های عفونی شــود. از آنجا که احتمــال مقاومت یافتن باکتری‌ها بــه این روش درمانــی هم وجود دارد، یکــی از زمینه‌های تحقیقاتی بســیار مهم در آینده بررسی این موضوع خواهد بــود که آیا پس از این که مدتــی روش آپتامر به کار رفت، پاتوژن هایی که تحت تشــخیص و درمان با این روش قرار گرفته‌اند نسبت به آن مقاومت حاصل می‌نمایند یا خیر.

Refrencese

1- Lazcka O, Del Campo FJ, Munoz FX. Pathogen detection: a perspective of traditional methods and biosensors. Biosensors and bioelectronics. 2007;22(7):1205-17.

2- Alocilja EC, Radke SM. Market analysis of biosensors for food safety. Biosensors and Bioelectronics. 2003;18 (5-6):841-6.

3- Sun H, Zu Y. A highlight of recent advances in aptamer technology and its application. Molecules. 2015;20(7): 11959-80.

4- Dollins CM, Nair S, Sullenger BA. Aptamers in immunotherapy. Human gene therapy. 2008;19(5):443-50.

5- Proske D, Blank M, Buhmann R, Resch A. Aptamers—basic research, drug development, and clinical applications. Applied microbiology and biotechnology. 2005;69(4):367-74.

6- Ellington AD, Szostak JW. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. nature. 1990;346(6287):818.

7- Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. Science. 1990;249(4968):505-10.

8- Han K, Liang Z, Zhou N. Design strategies for aptamer-based biosensors. Sensors. 2010;10(5):4541-57.

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-06-03]

9- Chu T, Ebright J, Ellington AD. Using aptamers to identify and enter cells. Current opinion in molecular therapeutics. 2007;9(2):137-44.

10- Shamah SM, Healy JM, Cload St. Complex target SELEX. Accounts of chemical research. 2008;41(1):130-8.

11- Bock LC, Griffin LC, Latham JA, Vermaas EH, Toole JJ. Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. Nature. 1992;355(6360):564.

12- Bunka DH, Stockley PG. Aptamers come of age–at last. Nature Reviews Microbiology. 2006;4(8):588.

13- Ng EW, Shima DT, Calias P, Cunningham Jr ET, Guyer DR, Adamis AP. Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. Nature reviews drug discovery. 2006;5(2):123.

14- Ulrich H, Magdesian MH, Alves MJM, Colli W. In vitro selection of RNA aptamers that bind to cell adhesion receptors of Trypanosoma cruzi and inhibit cell invasion. Journal of Biological Chemistry. 2002.

15- Xiao Z, Shangguan D, Cao Z, Fang X, Tan W. Cell-specific internalization study of an aptamer from whole cell selection. Chemistry–A European Journal. 2008;14(6):1769-75.

16- I Hernandez L, Machado I, Schafer T, J Hernandez F. Aptamers overview: selection, features and applications. Current topics in medicinal chemistry. 2015;15(12):1066-81.

17- Kusser W. Chemically modified nucleic acid aptamers for in vitro selections: evolving evolution. Reviews in Molecular Biotechnology. 2000;74(1):27-38.

18- Richards SL, Cawley AT, Cavicchioli R, Suann CJ, Pickford R, Raftery MJ. Aptamer based peptide enrichment for quantitative analysis of gonadotropin-releasing hormone by LC-MS/MS. Talanta. 2016;150:671-80.

19- Toh SY, Citartan M, Gopinath SC, Tang TH. Aptamers as a replacement for antibodies in enzyme-linked immunosorbent assay. Biosensors & bioelectronics. 2015;64:392-403.

20- Teng J, Yuan F, Ye Y, Zheng L, Yao L, Xue F, et al. Aptamer-based technologies in foodborne pathogen detection. Frontiers in microbiology. 2016;7:1426.

21- Yoo SM, Lee SY. Optical Biosensors for the Detection of Pathogenic Microorganisms. Trends in biotechnology. 2016;34(1):7-25.

22- Li Y, Yang L, Fu J, Yan M, Chen D, Zhang L. Microbial pathogenicity and virulence mediated by integrons on Gram-positive microorganisms. Microbial pathogenesis. 2017;111:48. 1-6.

23- Ahmed A, Rushworth JV, Hirst NA, Millner PA. Biosensors for whole-cell bacterial detection. Clinical microbiology reviews. 2014;27(3):631-46.

24- Torres-Chavolla E, Alocilja EC. Aptasensors for detection of microbial and viral pathogens. Biosensors & bioelectronics. 2009;24(11):3175-82.

25- Stratis-Cullum DN, Wade KL, Pellegrino PM, editors. Development of a rapid method for the detection of biological threats in water. Chemical and Biological Sensors for Industrial and Environmental Security; 2005: International Society for Optics and Photonics.

26- Stratis-Cullum DN, McMasters S, Sooter LJ, Pellegrino PM, editors. Investigation of synthetic molecular recognition for biosensing applications. Chemical and Biological Sensing VIII; 2007: International Society for Optics and Photonics.

27- McMasters S, Stratis-Cullum DN, editors. Evaluation of aptamers as molecular recognition elements for pathogens using capillary electrophoretic analysis. Smart Medical and Biomedical Sensor Technology IV; 2006: International Society for Optics and Photonics.

28- Ikanovic M, Rudzinski WE, Bruno JG, Allman A, Carrillo MP, Dwarakanath S, et al. Fluorescence assay based on

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-06-03]

aptamer-quantum dot binding to Bacillus thuringiensis spores. Journal of Fluorescence. 2007;17: (29-193).

29- Bruno JG, Kiel JL. In vitro selection of DNA aptamers to anthrax spores with electrochemiluminescence detection. Biosensors and Bioelectronics. 1999;14(5):457-64.

30- Zhen B, Song Y-J, Guo Z-B, Wang J, Zhang M-L, Yu S-Y, et al. In vitro selection and affinity function of the aptamers to Bacillus anthracis spores by SELEX. Sheng wu hua xue yu sheng wu wu li xue bao Acta biochimica et biophysica Sinica. 2002;34(5):635-42.

31- Kiel JL, Holwitt EA, Parker JE, Vivekananda J, Franz V, editors. Nanoparticle-labeled DNA capture elements for detection and identification of biological agents. Optically Based Biological and Chemical Sensing for Defence; 2004: International Society for Optics and Photonics.

32- Zelada-Guillén GA, Bhosale SV, Riu J, Rius FX. Real-time potentiometric detection of bacteria in complex samples. Analytical chemistry. 2010;82(22):9254-60.

33- DeGrasse JA. A single-stranded DNA aptamer that selectively binds to Staphylococcus aureus enterotoxin B. PloS one. 2012;7(3):e33410.

34- Huang Y, Chen X, Xia Y, Wu S, Duan N, Ma X, et al. Selection, identification and application of a DNA aptamer against Staphylococcus aureus enterotoxin A. Analytical Methods. 2014;6(3):690-7.

35- Lee H-J, Kim BC, Kim K-W, Kim YK, Kim J, Oh M-K. A sensitive method to detect Escherichia coli based on immunomagnetic separation and real-time PCR amplification of aptamers. Biosensors and Bioelectronics. 2009;24(12):3550-5.

36- So HM, Park DW, Jeon EK, Kim YH, Kim BS, Lee CK, et al. Detection and titer estimation of Escherichia coli using aptamer-functionalized single-walled carbon-nanotube field-effect transistors. Small. 2008;4(2):197-201.

37- Davydova A, Vorobjeva M, Pyshnyi D, Altman S, Vlassov V, Venyaminova A. Aptamers against pathogenic microorganisms. Critical reviews in microbiology. 2016;42(6):847-65.

38- Rotherham LS, Maserumule C, Dheda K, Theron J, Khati M. Selection and application of ssDNA aptamers to detect active TB from sputum samples. PloS one. 2012;7(10):e46862.

39- Chen F, Zhou J, Luo F, Mohammed A-B, Zhang X-L. Aptamer from whole-bacterium SELEX as new therapeutic reagent against virulent Mycobacterium tuberculosis. Biochemical and biophysical research communications. 2007;357(3):743-8.

40- Bitaraf F, Rasooli I, Gargari SM. DNA aptamers for the detection of Haemophilus influenzae type b by cell SELEX. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. 2016;35(3):503-10.

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2026-06-03]