ORIGINAL ARTICLE

Using Fast PCR Amplification in Identifying Fasciola Species

Azadeh Mizani[1],
Pouria Gill[2],
Shahabedin Sarvi[3],
Ahmad Daryani[4],
Mehdi Sharif[4],
Mohammad Taghi Rahimi[1],
Azar Shokri[1],
Ehsan Ahmadpour[1]

[1] PhD Student in Parasitology, Toxoplasmosis Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Parasitology, Toxoplasmosis Research Center, Faculty of Medical Mycology and Parasitology, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[4] Professor, Department of Parasitology, Toxoplasmosis Research Center, Faculty of Medical Mycology and Parasitology, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received June 26, 2014 ; Accepted March 6, 2015)

Abstract

Background and purpose: *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* are common liver flukes that are the etiological agents of fasciolosis, which affects both domestic livestock and humans worldwide. In the present study we established a rapid, easy and also accurate tool, for differentiation between *F. hepatica* and *F. gigantica* using Fast PCR.

Material and methods: Thirty adults of Fasciola species were isolated from sheep and cattle liver form abattoirs in Mazandaran province. ITS1 rDNA region were amplified by Sapphire Amp® Fast PCR and compared with AccuPower® Taq PCR PreMix from Bioneer. In addition, PCR-RFLP assay using Tsp509I was performed for identification of *F. hepatica* and *F. gigantica*.

Results: A fragment of approximately 463bp was amplified in all of the Fasciola samples using Sapphire Amp® Fast PCR premix in just 34 minutes, while nucleic acid amplification was completed in about 1 hour and 46 minutes by Bioneer PCR master mix. All PCR products were digested with restriction enzyme TasI (Tsp509I). After digestion, *F. hepatica* revealed two fragments of 151 and 312 bp while *F. gigantica* produced three fragments of 93, 151, and 219 bp.

Conclusion: Fast PCR reaction using Sapphire Amp® Fast PCR premix was completed three times faster than the time of conventional premix. The new Fast PCR assay using Sapphire Amp® Fast PCR premix provides a simple, rapid and accurate technique for identification and differentiation of Fasciola species in epidemiological researches on human and domestic animals in endemic regions of fasciolosis.

Keywords: *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantic*a, Fast PCR

J Mazandaran Univ Med Sci 2015; 25(122): 72-80 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و چهارم شماره ۱۲۲ اسفند سال ۱۳۹۳ (۸۰-۷۲)

استفاده از روش Fast PCR جهت تشخیص گونه های فاسیولا

آزاده میزانی[۱]
پوریا گیل[۲]
شهاب الدین سروی[۳]
احمد دریانی[۴]
مهدی شریف[۴]
محمد تقی رحیمی[۱]
آذر شکری[۱]
احسان احمدپور[۱]

چکیده

سابقه و هدف: انگل‌های شایع کبدی فاسیولا هپاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکا از عوامل ایجادکننده فاسیولایازیس بوده، که بیماری جهانی و شایع در انسان و دام می‌باشد. در مطالعه حاضر ما یک روش سریع، آسان و در عین حال دقیق را با استفاده از متد PCR Fast جهت تشخیص افتراقی گونه‌های فاسیولا هپاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکا معرفی نمودیم.

مواد و روش‌ها: ۳۰ ایزوله فاسیولا ی بالغ از کبد گاو و گوسفند از کشتارگاه‌های استان مازندران جدا گردید. ناحیه ژنی ITS1 با استفاده از پره میکس های Amp® Fast PCR، در مقایسه با یکی از پره میکس‌های متداول موجود در بازار (AccuPower® Taq PCR PreMix شرکت Bioneer) تکثیر شدند. به علاوه پروفایل PCR-RFLP جهت تشخیص افتراقی گونه‌های فاسیولا هپاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکا با استفاده از آنزیم اندونوکلئازی Tsp509I) TasI) انجام گرفت.

یافته‌ها: باندی با وزن تقریبی ۴۶۳ جفت باز برای تمامی نمونه‌های فاسیولا با استفاده از پره میکس Sapphire Amp® Fast PCR فقط ظرف مدت ۳۴ دقیقه پس از تکثیر به دست آمد در حالی که تکثیر اسیدهای نوکلئیک با استفاده از پره‌میکس متداول پس از حدود ۱ ساعت و ۴۶ دقیقه کامل شد. تمامی محصولات با آنزیم محدودالاثر (Tsp509I TasI) مورد هضم قرار گرفت. پس از هضم در فاسیولا هپاتیکا دو باند ۱۵۱ و ۳۱۲ جفت باز و در فاسیولا ژیگانتیکا سه باند ۹۳، ۱۵۱ و ۲۱۹ جفت باز تولید شد.

استنتاج: واکنش Fast PCR با استفاده از پره میکس Sapphire Amp® در کم‌تر از ۱/۳ زمان استفاده از سایر پره میکس‌های رایج کامل می‌شود. روش جدید Fast PCR با استفاده از پره میکس. Sapphire Amp® Fast PCR یک متد آسان، سریع و در عین حال دقیق بوده که جهت تعیین و تشخیص افتراقی گونه‌های فاسیولادر مطالعات اپیدمیولوژیک در انسان و دام‌های اهلی در مناطق اندمیک فاسیولیازیس کاربرد دارد.

واژه های کلیدی: فاسیولا هپاتیکا، فاسیولا ژیگانتیکا، Fast PCR

مقدمه

فاسیولا هپاتیکا (*Fasciola hepatica*) و فاسیولا ژیگانتیکا (*Fasciola gigantica*) از عوامل اتیولوژیک بیماری فاسیولیازیس (Trematoda: Fasciolidae) است که می‌توانند باعث بیماری‌زایی در دام‌ها و انسان در

مولف مسئول: شهاب الدین سروی- ساری: کیلومت ۱۷ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم(ص)، دانشکده پزشکی E-mail:shahabesarvi@yahoo.com
۱. دانشجوی دکتری انگل شناسی، مرکز تحقیقات توکسوپلاسوز، دانشکده انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. استادیار، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. استادیار، گروه انگل شناسی، مرکز تحقیقات توکسوپلاسوز، دانشکده انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۴. استاد، گروه انگل شناسی، مرکز تحقیقات توکسوپلاسوز، دانشکده انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۳/۴/۵ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۳۹۳/۵/۶ تاریخ تصویب : ۱۳۹۳/۱۲/۱۵

تمام نقاط دنیا شوند. فاسیولا درحالی‌که در عفونت‌های انسانی موجب التهاب و آسیب کبد و مجاری صفراوی می‌شوند، در دام‌ها باعث زیان‌های اقتصادی فراوان، شامل مرگ و میر و کاهش شیر، گوشت و پشم می‌شود(۲،۱). طبق مدارک جمع‌آوری شده بین سال‌های ۱۹۷۰ تا ۱۹۹۰ نوع انسانی فاسیولیازیس در تمام دنیا رو به افزایش بوده است. بنابراین با توجه به تغییر چهره اپیدمیولوژیک بیماری امروزه علاوه بر جنبه زئونوز بیماری، آن را از آلودگی‌های مهم انگلی انسانی نیز بر می‌شمارند(۳). بر طبق مطالعات انجام گرفته مشخص گردیده است که حدود ۲/۴ میلیون نفر در بیش از ۶۰ کشور جهان در ۵ قاره به این عفونت مبتلا بوده و ۱۸ میلیون نفر نیز در معرض خطر قرار دارند و خسارات اقتصادی ناشی از ابتلای دام‌ها به این بیماری بیش از ۲ میلیارد دلار در سال برآورد شده است(۵،۴). انسان به عنوان میزبان اتفاقی در مسیر تکاملی انگل قرارگرفته و تعدادی از حلزون‌های جنس لیمنه (Lymnae) به عنوان میزبان واسط فاسیولا عمل می‌نمایند. از نظر گسترش جغرافیایی در حالی که در قاره‌های اروپا، امریکا و اقیانوسیه فقط گونه فاسیولا هپاتیکا دیده می‌شود، در دو قاره آسیا و آفریقا شامل کشورهای آسیای جنوب شرقی، ایران، پاکستان و مصر هر دو گونه فاسیولا هپاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکا مشاهده شده است(۷،۶). از طرف دیگر در بعضی نقاط گونه‌هایی شبیه فاسیولا هپاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکا یافت می‌شوند که نتیجه پدیده‌هایی مانند گامتوژنز غیر طبیعی، پارتنوژنز دیپلودیدی، تری پلوئیدی، میکس پلوئیدی و هیبریداسیون بین ژنوتایپ‌های مختلف است(۹،۸) که موجب مشکلاتی در امر تشخیص دو گونه می‌شوند. فاسیولیازیس در ایران نیز سابقه‌ای طولانی دارد. در دو اپیدمی بزرگی که در استان گیلان رخ داد در هر اپیدمی هزاران نفر از ساکنین این استان آلوده شدند(۱۰).

مطالعات مختلف نشان می‌دهند که امروزه روش‌های مولکولی مبتنی برآنالیز DNA اثرات زیادی در زمینه‌های انگل‌شناسی مانند تعیین سیستماتک انگل‌ها، تشخیص عفونت، بررسی اپیدمیولوژیک انگل‌ها، آنالیز ساختمان ژنتیکی جمعیت‌های انگلی شامل اختلافات ژنتیکی بین جنس‌ها، بیان ژن‌ها، مطالعات مقاومت دارویی و واکسیناسیون داشته، به خصوص که با ظهور تکنیک PCR (Polymerase Chain Reaction) انقلاب بزرگی در علم انگل‌شناسی ایجاد شده است. روش‌های مولکولی در تعیین گونه انگل‌ها کاربرد فراوانی دارند، زیرا حساسیت بالای آن‌ها به محققین اجازه می‌دهد که حتی قطعه کوچکی از ژن را تکثیر دهند که گاهی جداسازی و به دست‌آوردن مقدارکافی آن به علت سیکل زندگی متفاوت انگل‌ها جهت آنالیز مولکولی دشوار می‌باشد(۱۲،۱۱). PCR معایبی نیز دارد که از جمله به زمان بر بودن مدت تکثیر اسیدهای نوکلئیک و همچنین احتمال وقوع جهش‌های ناخواسته در آمپلیکون حاصل از تکثیر ژن به علت استفاده از آنزیم Taq پلی‌مراز می‌توان اشاره نمود که این مسئله ما را بر آن داشت تا با معرفی یک روش PCR سریع، آسان و در عین حال معتبر با استفاده از پره میکس Sapphire Amp® Fast PCR این مشکل را بر طرف نموده و هم‌چنین با استفاده از این روش ناحیه ITS1 از DNA ریبوزومی به تعیین گونه انگل‌های فاسیولای استان مازندران بپردازیم.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه‌ها و استخراج DNA

پس از مراجعه به کشتارگاه‌های استان مازندران (ساری، بابل و آمل) تعداد ۳۰ انگل فاسیولا از کبدهای آلوده جدا و به تفکیک میزبان به آزمایشگاه انگل‌شناسی گروه انگل‌شناسی و قارچ‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی مازندران منتقل گردید (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: فراوانی نمونه های فاسیولای جدا شده برحسب نوع میزبان

گونه	میزان	تعداد انگل جدا شده
فاسیولا هپاتیکا	گوسفند	۷
	گاو	۱
فاسیولا ژیگانتیکا	گاو	۲۲

در آزمایشگاه مذکور نمونه‌ها با استفاده از معیارهای مورفولوژیک مندرج در متون علمی مورد تشخیص افتراقی قرار گرفتند(۱۴،۱۳). در مرحله بعد نمونه‌ها سه بار با PBS (۰/۱۵ مولار با pH حدود ۷) شستشو داده شدند و سپس برای انجام آنالیز مولکولی به الکل ۷۰ درجه منتقل شدند. جهت استخراج DNA قسمتی از پیکره کرم بین دو لام میکروسکوپی له شده(۱۵) و جهت ادامه کار از روش فنل کلروفورم ایزوآمیل الکل با اندکی تغییرات استفاده گردید(۱۶). سپس DNA های استخراج شده برای مطالعات بعدی به ۲۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شد.

تکثیر ناحیه ژنی ITS1 ریبوزومی

جهت انجام واکنش از آغازگرهای رفت FascF: 5'-ACC GGT GCT GAG AAG ACG-3' و برگشت FascR: 5'-CGACGT ACG TGC AGT CCA-3' جهت تکثیر ناحیه ژنی *ITS1* از DNA ریبوزومی برای هر دو گونه فاسیولا هپاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکا استفاده گردید(۱۵). به این منظور در هر واکنش PCR (حجم کلی ۲۵ میکرو لیتر) شامل ۸/۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه و ۱۲/۵ میکرولیتر پره‌میکس Sapphire Amp® Fast PCR (Takara Bio Inc, Japan)، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر و ۲میکرولیتر از DNA ژنومی بوده است. تکثیر مخلوط واکنش در ترموسایکلر Bio Rad®(USA) تحت برنامه دمایی زیر انجام گرفت: مرحله واسرشتگی اولیه (Initial Denaturation) به مدت ۱ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، در ادامه ۳۲ سیکل شامل مرحله واسرشتگی (Denaturation) به مدت ۵ ثانیه در دمای ۹۸ درجه، مرحله اتصال پرایمرها (Annealing) به مدت ۵ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد، مرحله گسترش(Extention) به مدت ۵ ثانیه در ۷۲ درجه و در آخر پلیمریزاسیون نهایی به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد. جهت مقایسه مدت زمان انجام واکنشPCR، تعداد ۲۵ عدد ازنمونه‌ها با استفاده از پره میکس‌های *AccuPower® Taq* PCR PreMix شرکت کره‌ای Bioneer (Cat No:K – 2012) تحت برنامه دمایی زیر تکثیر گردیدند:

مرحله واسرشتگی اولیه به مدت ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، در ادامه ۳۰ سیکل شامل مرحله واسرشتگی به مدت ۴۵ ثانیه در دمای ۹۴ درجه، مرحله اتصال پرایمرها به مدت ۴۵ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد، مرحله گسترش (به مدت ۱ دقیقه در ۷۲ درجه و در آخر پلیمریزاسیون نهایی به مدت ۷ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد. جهت بررسی نمونه‌های تکثیر یافته، مقدار ۳ میکرولیتر از محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد در بافر TBE با ولتاژ ۹۰ به مدت ۴۰ دقیقه الکتروفورز شد. پس از رنگ‌آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید با استفاده از دستگاه UV doc (Uvitech, Cambridge) از باندهای مشاهده شده عکس گرفته شد.

انجام PCR-RFLP

به منظورطراحی یک پروفایل PCR-RFLP یک توالی فاسیولا هپاتیکا و یک توالی فاسیولا ژیگانتیکا با هم مورد مقایسه قرار گرفتند. با استفاده از نرم‌افزار Web Cutter تمامی آنزیم‌های محدودالاثر موجود روی توالی‌هایی از فاسیولا هپاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکا اثر داده شد تا با مقایسه نقاط برش و قطعات به دست آمده آنزیم مناسب برای انجام مرحله بعد انتخاب شود. سپس به ازای هر نمونه ۵ میکرولیتر از محصول PCR، ۸ میکرولیتر آب مقطر، ۰/۵میکرولیتر آنزیم *Tas*I (*Tsp509*I) (Fermentas) و ۱/۵ میکرولیتر از بافر 10x در ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت انکوبه شدند. محصول واکنش پس از هضم آنزیمی، بر روی ژل آگارز ۲ درصد در بافر TBE جداسازی شده و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید توسط دستگاه UV doc عکس‌برداری شد.

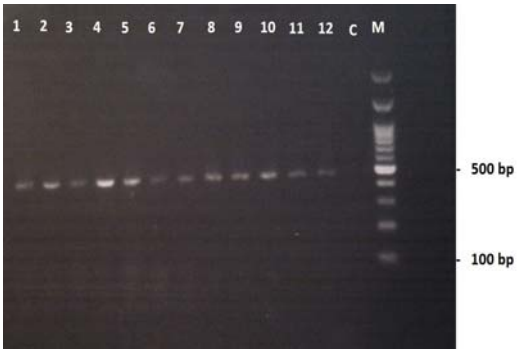
تعیین توالی نمونه‌ها و هضم اندونوکلئازی محصول PCR جهت تشخیص گونه‌ها

جهت تعیین توالی ۱۲ ایزوله از فاسیولا هپاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکا انتخاب شده وبه شرکت فزا پژوه ارسال گردیدند. تعیین توالی با استفاده از ۲۵ میکرولیتر

از محصول PCR و پرایمرهای رفت و برگشت انجام گرفت. نتایج با استفاده از نرم افزار Sequencher 4.1.4 آنالیز گردید و سپس با سایر نمونه‌های موجود در بانک ژن مورد مقایسه و همپوشانی قرار گرفت.

یافته ها

در این مطالعه از ۳۰ ایزوله فاسیولا هپاتیکا و فاسیولای ژیگانتیکای جدا شده از گاو و گوسفند در کشتارگاه‌های استان مازندران استفاد شد (جدول شماره۱). پس از استخراج DNA و انجام واکنش PCR، الکتروفورز محصولات PCR در مورد تمامی گونه‌های فاسیولا مثبت بوده و باندی واضح به اندازه ۴۶۳ جفت باز از ناحیه ITS1 ، DNA ریبوزومی، فقط پس از گذشت ۳۴ دقیقه با استفاده از پره میکس Sapphire Amp® Fast PCR حاصل شد (تصویر شماره ۱).



تصویر شماره۱: الکتروفورز محصول PCR ناحیه rDNA ITS1 از گونه های فاسیولا بر روی ژل آگارز ۱٪. ستون ۱ فاسیولا با میزبان گاوی و ستون های ۱۲-۲ فاسیولا با میزبان گاوی. کنترل منفی (C) و مارکر ۱۰۰bp(M).

در ستون مربوط به کنترل منفی هیچ گونه باند اضافی مشاهده نگردید. مدت زمان واکنش PCR با استفاده از پره‌میکس *AccuPower® Taq* PCR PreMix شرکت Bioneer حدود ۱ ساعت و ۴۶ دقیقه به طول انجامید. در بررسی نتایج حاصل از تعیین توالی نمونه‌ها هیچ گونه تغییرات درون گونه‌ای درایزوله‌های فاسیولا دیده نشد و نتیجه این که ناحیه ITS1 در گونه‌های فاسیولا به شدت محافظت شده می‌باشد. اما در مقایسه توالی‌های فاسیولا هپاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکا اختلافات کمی (تصویر شماره ۲) مشاهده شد که اساس انتخاب آنزیم محدودالاثر *TasI (Tsp509I)* و افتراق بین دو گونه بر پایه آن بنا گردید. آنزیم اندونوکلئازی *Tas*I با برش DNA در نقاط aa!tt فاسیولا هپاتیکا را در نوکلئوتید ۱۵۱ و فاسیولا ژیگانتیکا را در نوکلئوتیدهای ۱۵۱ و ۳۷۰ برش داده (تصویر شماره ۳) در نتیجه در فاسیولاهپاتیکا دو باند به وزن ۱۵۱ و ۳۱۲ و در فاسیولا ژیگانتیکا سه باند به اندازه‌های ۱۵۱، ۳۱۲ و ۹۰ جفت باز ایجاد شد.

```
Fasciola hepatica      1 GAG-AGACGACCAAACTTGATCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAG
                         GAG|AGACGACCAAACTTGATCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAG
Fasciola gigantica     1 GAGAAGACGACCAAACTTGATCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAG

Fasciola hepatica     60 GTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCTGAAAATCTACTCTCACACAAGCGATACACGTGTG
                         GTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCTGAAAATCTACTCT|ACACAAGCGATACACGTGTG
Fasciola gigantica    61 GTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCTGAAAATCTACTCTTACACAAGCGATACACGTGTG

Fasciola hepatica    120 ACCGTCATGTCATGCGATAAAAATTTGCGGACGGCTATGCCTGGCTCATTGAGGTCACAG
                         ACCGTCATGTCATGCGATAAAAATTTGCGGACGGCTATGCCTGGCTCATTGAGGTCACAG
Fasciola gigantica   121 ACCGTCATGTCATGCGATAAAAATTTGCGGACGGCTATGCCTGGCTCATTGAGGTCACAG

Fasciola hepatica    180 CATATCCGAACACTGATGGGGTGCCTACCTGTATGATACTCCGATGGTATGCTTGCGTCT
                         CATATCCGA|CACTGATGGGGTGCCTACCTGTATGATACTCCGATGGTATGCTTGCGTCT
Fasciola gigantica   181 CATATCCGATCACTGATGGGGTGCCTACCTGTATGATACTCCGATGGTATGCTTGCGTCT

Fasciola hepatica    240 CTCGGGGCGCTTGTCCAAGCCAGGAGAACGGGTTGTACTGCCACGATTGGTAGTGCTAGG
                         CTCGGGGCGCTTGTCCAAGCCAGGAGAACGGGTTGTACTGCCA|GATTGGTAGTGCTAGG
Fasciola gigantica   241 CTCGGGGCGCTTGTCCAAGCCAGGAGAACGGGTTGTACTGCCATGATTGGTAGTGCTAGG

Fasciola hepatica    300 CTTAAAGAGGAGATTTGGGCTACGGCCCTGCTCCCGCCCTATGAACTGTTTCATTACTAC
                         CTTAAAGAGGAGATTTGGGCTACGGCCCTGCTCCCGCCCTATGAACTGTTTCATTACTAC
Fasciola gigantica   301 CTTAAAGAGGAGATTTGGGCTACGGCCCTGCTCCCGCCCTATGAACTGTTTCATTACTAC

Fasciola hepatica    360 ATTTACACTGTTAAAGTGGTACTGAATGGCTTGCCATTCTTTGCCATTGCCCTCGCATGC
                         A|TTACACTGTTAAAGTGGTA|TGAATGGCTTGCCATTCTTTGCCATTGCCCTCGCATGC
Fasciola gigantica   361 AATTACACTGTTAAAGTGGTATTGAATGGCTTGCCATTCTTTGCCATTGCCCTCGCATGC

Fasciola hepatica    420 ACCCGGTCCTTGTGGCTGGACTGC 443
                         ACCCGGTCCTTGTGGCTGGACT
Fasciola gigantica   421 ACCCGGTCCTTGTGGCTGGACT-- 442
```

تصویر شماره ۲: مقایسه توالی های فاسیولا هپاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکا

تصویر شماره ۳: مقایسه الگوهای PCR-RFLP ناحیه rDNA ITS1 در دو گونه فاسیولا هپاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکا با استفاده از آنزیم محدودالاثر *Tas*1 پس از الکتروفورز با ژل آگارز ۲ ٪. ستون ۳ و ۱۲-۶ فاسیولا هپاتیکا و ستون های ۲-۱ و ۵-۴ فاسیولا ژیگانتیکا. مارکر ۱۰۰bp(M).

بحث

علی‌رغم تمامی اقدامات انجام شده در زمینه بیماری‌های انگلی و مبارزه با آن‌ها، این عفونت‌ها هنوز هم یکی از مهم‌ترین مشکلات بهداشتی در دنیا به خصوص کشورهای در حال توسعه محسوب می‌شوند. یکی از این بیماری‌ها فاسیولیازیس بوده که به صورت اندمیک در دام‌های مناطق جنوبی کشور و موارد آلودگی انسان به آن در شمال کشور بیشتر یافت می‌شوند. دو گونه فاسیولا هپاتیکا و ژیگانتیکا علاوه برتفاوت در خصوصیات مورفولوژیک، در میزبان واسط، راه‌های انتقال، الگوی پاتولوژیک، کنترل و پیشگیری، خصوصیات اپیدمیولوژیک و بیماری‌زایی نیز با هم اختلاف دارند(۳). تشخیص رایج و سنتی دو گونه بر اساس خصوصیات مورفولوژیک کرم بالغ و تخم استوار می‌باشد. در هر حال تمایز این دو ترماتود کبدی براساس علائم بالینی، پاتولوژیکی، روش‌های ایمونولوژیک و مدفوعی دقیق نمی‌باشد. آزمایشات مرسوم انگل شناسی و یافته‌های بالینی و هم‌چنین روش‌های ایمونولوژیک نمی‌توانند باعث افتراق دقیق این دو گونه از یکدیگر شوند(۱۵). شاید همین عدم وجود یک روش افتراقی مناسب توجیه قابل قبولی برای تعداد کم موارد ثبت شده از فاسیولا ژیگانتیکا باشد. به همین علت روش‌های مولکولی نوین جایگزین روش‌های افتراقی سنتی گردیدند. اما از طرف دیگر این روش‌ها در کنار مزایای زیادی که دارند دارای یک سری معایبی بوده که مهم‌ترین آن مدت زمان زیادی است که واکنش PCR در طی آن موجب تکثیر قطعه ژنی مورد نظر می‌گردد.

در مطالعه حاضر با استفاده از پره‌میکس Sapphire Amp® Fast PCR این مشکل بر طرف شده و مدت زمان انجام واکنش PCR به ۳۴ دقیقه تقلیل یافته که این زمان حداقل ۱/۳ زمان تکثیر با استفاده از پره میکس‌های معمول PCR می‌باشد. پره میکس Sapphire Amp® Fast PCR حاوی آنزیم hot start PCR، بافر مناسب، dDNTPs و آنزیم DNA Taq پلیمراز Z بوده که موجب گردیده واکنش در زمان کم‌تری نسبت به Taq پلیمرازهای معمول کامل شود. از طرف دیگر احتمال وقوع جهش‌های ناخواسته اسیدهای نوکلئیک در محصول PCR به علت استفاده از آنزیم Taq پلی مراز Z کاهش می‌یابد(۱۸،۱۷). جدول شماره ۲ مقایسه سیکل زمانی مطالعه حاضر با تعدادی از پژوهش‌های انجام شده در این زمینه را نشان می‌دهد.

در سال ۲۰۱۳، Zasada و همکاران سه گونه پرسینیا پستیس (*Yersinia pestis*)، باسیلوس آنتراسیس (*Bacillus anthracis*) و فرانسیسلا تولارنسیس (Francisella tularensis) را بر پایه conventional PCR سریع تعیین گونه نمودند. در این مطالعه ۵ پلیمراز سریع شامل Hot start II DNA Polymeres (Finnzymes)، PyroStart Fast PCR Master Mix (Fermentas)، AmpliTaq Gold Fast PCR Master Mix (Applied biosystem)، Sapphire Amp Fast PCR Master Mix (Takara)، Qiagen Fast Cycling PCR (Qiagen) مورد بررسی و مقایسه قرار گرفتند. نتایج این مطالعه نشان داد جهت تعیین این سه گونه Sapphire Amp Fast PCR Master Mix با استفاده از ترموسایکل Bio-Rad C1000 با مدت زمان۳۶ دقیقه و Hot start II DNA Polymeres با ترموسایکل Eppendorf Mastercycler به مدت ۶۳ دقیقه (هر دو تعداد ۳۰ سیکل) کوتاه‌ترین و سریع‌ترین زمان تکثیر

جدول شماره ۲: مقایسه برنامه زمانی PCR با استفاده از پره میکس Sapphire Amp® Fast PCR با سایر مطالعات انجام گرفته

نویسنده	سال	Initial Denaturation	Denaturation	Annealing	Extention	Final Extention	cycle	رفرنس
مطالعه حاضر	۲۰۱۴	۱ min	۵ sec	۵ sec	۵ sec	۵ min	۳۲	
Marcilla et al	۲۰۰۲	۳ min	۳۰ sec	۳۰ sec	۶۰ sec	۵ min	۳۰	۳
Rahimi et al	۲۰۰۸	۵ min	۱ min	۱ min	۱ min	۷ min	۳۵	۲
Rokni et al	۲۰۱۰	۵ min	۴۵ sec	۴۵ sec	۱ min	۷ min	۳۰	۱۵
Mahami-Oskouei et al	۲۰۱۱	۵ min	۳۰ sec	۳۰ sec	۳۰ sec	۷ min	۳۰	۲۷

DNA را دارا می‌باشند(۱۹).

فاسیولیازیس در ایران قدمت زیادی دارد. شیوع این انگل در دام‌های مناطق شمالی و جنوبی کشور و به تبع آن موارد انسانی در این مناطق بالا می باشد. فاسیولیازیس انسانی در ایران تا سال ۱۳۶۶ به صورت تک گیر دیده می‌شد، تا اولین اپیدمی آن در این سال در استان گیلان در دو شهر رشت و بندرانزلی ۱۰۰۰۰ نفر را آلوده کرد. پس از گذشت ۱۰ سال دومین اپیدمی آن در این دو شهر باعث ابتلای بیش از هزاران نفر گردی(۲۰،۱۰). با توجه به سابقه طولانی فاسیولازیس در ایران و شیوع بالای آن در استان های شمالی کشور(۲۱) به خصوص استان مازندران این امربدیهی است که برای تدوین برنامه‌هایی جهت کنترل و پیشگیری بیماری در منطقه شناسایی و تعیین گونه انگل در منطقه امری ضروری می‌باشد. در مطالعه ما با استفاده از ناحیه ژنی ITS1 از DNA ریبوزومی مشخص گردید که هر دو گونه فاسیولا هپاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکا در استان مازندران حضور دارند. لازم به ذکر است که در این بررسی هیچ‌گونه حدواسطی از جنس فاسیولا یافت نشد. متد PCR-RFLP در بسیاری از مطالعات جهت تعیین گونه فاسیولا مورد استفاده قرار گرفته است(۲۲،۱۵). توالی نواحی ژنی ITS1 و ITS2 از DNA ریبوزومی ابزار ژنتیکی مناسبی جهت مطالعات مولکولار سیستمیاتیک جهت بررسی انگل‌ها و اختلافات درون گونه‌ای آن‌ها می‌باشد. این مارکرها برای تعیین گونه انگل‌های فاسیولا در مطالعات مختلف به کرات استفاده شده است(۲۴-۲۶).

جهت افتراق گونه‌های فاسیولا روی نمونه‌های آمریکای جنوبی، اروپا و آفریقا با استفاده ازروش RFLP، ناحیه ژنی 28S از RNA ریبوزومی و آنزیم‌های محدودالاثر *Ava*II و *Dra*II مشخص گردید که تفاوت نوکلدوتیدی کمی بین دو گونه وجود دارد در حالی که تفاوت درون گونه‌ای اصلاً مشاهده نشد(۳). مطالعه مشابهی توسط رکنی و همکاران در سال ۲۰۱۰ با استفاده از ناحیه ژنی ITS1، PCR-RFLP و آنزیم محدوالاثر *Tas*I روی نمونه‌های فاسیولای استان تهران، آذربایجان غربی و خوزستان انجام گرفت. آنزیم *Tas*I برای فاسیولا هپاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکا به ترتیب قطعاتی به اندازه ۱۵۱، ۳۱۲ و ۲۱۹، ۹۳،۱۵۱ جفت باز تولید می‌کند. نتایج نشان دادند که اولا ناحیه مذکوردارای توالی‌های ۱۰۰ درصد محافظت شده بوده و ثانیا هیچ تغییرات درون گونه‌ای در این ناحیه دیده نشد(۱۵). در سال ۲۰۱۱ نمونه‌های فاسیولای استان خراسان، آذربایجان شرقی و فارس با استفاده از هردو ناحیه ژنی ITS1 و ITS2 مورد مطالعه قرار گرفتند. باند ۱۰۰۰ جفت بازی گونه‌های فاسیولا با استفاده از آنزیم *Tsp*509I مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. با این روش از ۹۰ گونه فاسیولا ۷۰ عدد فاسیولا هپاتیکا و ۲۰ فاسیولا ژیگانتیکا شناسایی شد(۲۷). در مطالعه اشرفی و همکاران متغیرهای مورفومتریک فاسیولا هپاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکای جدا شده از دام‌های استان گیلان تفاوت‌های آماری معنی‌داری را در اکثر پارامترهای مورفومتریک نشان داد. نتایج بررسی‌های مولکولی مطالعه مذکور مشخص نمود که سکانس‌های نوکلئوتیدی ناحیع Its2 در فاسیولا هپاتیکای گیلان به گونه اروپایی و فاسیولا ژیگانتیکای گیلان به گونه بورکینافاسو شباهت دارد(۷). در مطالعه حاضر ما با استفاده از ناحیه ژنی rDNA ITS1، پره‌میکس Sapphire Amp® Fast PCR، آنزیم محدودالاثر *Tas*I (*Tsp509*I) و روش PCR-RFLP یک روش سریع و معتبر جهت تعیین گونه انگل‌های فاسیولا معرفی نمودیم. مقایسه ناحیه ITS1 نمونه‌های ایران و بانک ژن نشان دادند که ناحیه مورد نظر دارای توالی‌های ۱۰۰ درصد محافظت شده در سطح گونه بوده و از طرف دیگر تغییرات درون گونه‌ای در این ناحیه یافت نشد. با این روش سریع ظرف مدت کوتاهی می‌توان روی حجم بالایی از نمونه‌ها کار کرد در حالی که نیاز به خالص سازی نمونه‌ها نیز حذف می‌گردد. این روش جهت بررسی‌های تشخیصی، کنترل عفونت، تعیین گونه و بررسی‌های اپیدمیولوژیک در نواحی اندمیک بیماری و

مناطقی که افتراق انگل از نظر مورفولوژیک، بالینی و ایمونولوژیک دشوار بوده بسیار مفید می‌باشد.

سپاسگزاری

این پژوهش قسمتی از طرح مصوب ۶۹-۹۲ بوده که با حمایت مالی معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران انجام گردیده است. از معاونت محترم پژوهشی این دانشگاه و تمامی اعضای محترم گروه انگل‌شناسی کمال تشکر و قدردانی را دارد.

References

1. Mas-Coma S, Bargues MD, Valero MA. Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. Int J Parasitol 2005; 35(11-12): 1255-1278.
2. Rahimi P, Ghavami MB, Haniloo A, Nourian AA, Biglari AR. Identification of Fasciola Species by PCR-RFLP Assay. The scientific Journal of Zanjan University of Medical Sciences 2009; 16(65): 41-48.
3. Marcilla A, Bargues MD and Mas-Coma S. A PCR-RFLP assay for the distinction between *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*. Mol Cell Probes 2002; 16: 327-333.
4. Mas-Coma S, Valero MA, Bargues MD. *Fasciola*, lymnaeids and human fascioliasis with global overview on disease transmission, epidemiolog evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. Adv Parasitol 2009; 69: 41-146.
5. Ai L, Chen MX, Alassad S, et al. Genetic characterization, species differentiation and detection of *Fasciola* spp. by molecular approaches. Parasites Vectors 2011; 10(4): 101.
6. Inoue K, Kanemasa H, Inoue KA, Matsumoto M, Kajita Y, Mitsufuji S, et al. A case of human fasciolosis :discrepancy between egg size and genotype of *Fasciola* sp. Parasitol Res 2006;100(3): 665-667.
7. Ashrafi K, Valero MA, Panova M, Periago MV, Massoud J, Mas-Coma S. Phenotipic analysis of adults *Fasciola* from the endemic region of Gilan, Iran. Parasit Int 2006; 55(4): 249-260.
8. Itagaki T, Sakaguchi K, Terasaki K, Sasaki O, Yoshihara S, Van Dung T. Occurrence of spermic diploid and aspermic triploid forms of *Fasciola* in Vietnam and their molecular characterization based on nuclear and mitochondrial DNA. Parasitol Int 2009; 58(1): 81-85.
9. Raina OK, Jacob SS, Sankar M, Bhattacharya D, Bandyopadyay S, Varghese A, et al. Genetic characterization of *Fasciola gigantica* from different geographical regions of India by ribosomal DNA markers. J Parasit Dis 2015; 39(1): 27-32.
10. Assmar M, Milaninia A, Amir-Khani A, Yadegari DA, Forganparast K, Nahravanian H, et al. Seroepidemiological investigation of fascioliasis in northern Iran. Medical Journal of the Islamic Republic of Iran 1991; 5(1): 23-27.
11. Gasser RB. PCR-based technology in veterinary parasitology. Vet Parasitol 1999; 84(3-4): 229-258.
12. Gasser RB, Newton SE. Genomic and genrtic research on burst nematode: significance, implication and prospects. Intl J parasitol 2000; 30(4): 509-534.
13. Sahba GH, Arfaa F, Farahmandian I, Jalali

H. Animal fascioliasis in Khuzestan, southwestern Iran. Journal of Parasitology 1972; 58(4): 712-716.

14. Muller R. Worms and Human Diseases. Wallingford, Oxon, UK: CABI International; 2002.
15. Rokni MB, Mirhendi H, Mizani A, Mohebali M, Sharbatkhori M, Kia EB, et al. Identification and differentiation of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* using a simple PCR-restriction enzyme method. Exp Parasitol 2010; 124(2): 209-213.
16. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press; Plainview. 1989.
17. Huang L, Hu E, Lackovich J, Park K, Lee J, Rashtchian A. AccuPrime Taq: A next generation DNA polymerase for PCR. Focus 2002; 24: 10-13.
18. Keohavong P, Thilly WJ. Fidelity of DNA polymerases in DNA amplification. Proc Natl Acad Sci 1989; 86(23): 9253-9257.
19. Zasada AA, Forminska K, Zacharczuk K. Fast identification of Yersinia pestis, Bacillus anthracis and Francisella tularensis based on conventional PCR. Pol J Microbiol 2013; 62(4): 453-455.
20. Periago MV, Valero MA, El-Sayed M, Ashrafi K, El Wakeel A, Mohamed MY, et al. First phenotypic descibtion of F.hepatica/ F.gigantica intermediate forms from the human endemic area of the Nile Delta, Egypt. Infect Genet Evol 2007; 8(1): 51-58.
21. Rokni MB. The present status of human helminthic diseases in Iran. Ann Trop Med Parasitol 2008; 102(4): 283-295.
22. Lin RQ, Dong SJ, Nie K, Wang CR, Song HQ, Li AX. Sequence analysis of the first internal transcribed spacer of rDNA supports the existence of the intermediate *Fasciola* between *F. hepatica* and *F. gigantica* in mainland China. Parasit Res 2007; 101(3): 813-817.
23. Itagaki T, Kikawa M, Terasaki K, Shibahara T, Fukuda K. Molecular characterization of parthenogenic Fasciola sp. in Korea on the basis of DNA sequences of ribosomal ITS1 and mitochondrial NDI gene. J Vet Med Sci 2005; 67(11): 1115-1118.
24. Iwen PC, Hinrichs SH, Rupp ME. Utilization of the Internal Transcribed Spacer region as molecular target to detect and identify human fungal pathogens. Med Mycol 2002; 40(1): 87-109.
25. Hung GC, Jacobs DE, Krecek RC, Gasser RB, Chilton NB. Strongylus asini (nematode, strongyloi-dea): genetic relationship with other strongylus species determinded byribosomal DNA. Int J Parasitol 1996; 26(12): 1407-1411.
26. McKened JB. Molecular diagnosis of parasitic nematode. Parasitology 1998; (suppl 117): S 87-96.
27. Mahami-Oskouei M, Dalimi A, Forouzandeh-Moghadam M, Rokni MB. Molecular Identification and Differentiation of Fasciola Isolates Using PCR- RFLP Method Based on Internal Transcribed Spacer (ITS1, 5.8S rDNA, ITS2). Iran J Parasitol 2011; 6(3): 35-42.