Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 3:55 +0330 on Saturday September 23rd 2017

ORIGINAL ARTICLE

Rapid Detection and Differentiation of Fasciola hepatica and Fasciola gigantica by Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay

Azadeh Mizani[1,2],
Pooria Gill[3],
Shahabeddin Sarvi[4],
Ahmad Daryani[5],
Mehdi Sharif[5],
Afsaneh Amouei[2]
ALi Bakooie Katrimi[6],
Seyed Abdollah Hosseini[2]

[1] PhD Student in Medical Parasitology, Toxoplasmosis Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] PhD Student in Medical Parasitology, Student Research Committee, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] Associate Professor, Department of Physiology, Pharmacology and Nanotechnology, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[4] Associate Professor, Toxoplasmosis Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[5] Professor, Toxoplasmosis Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[6] MSc in Veterinary Parasitology, Mazandaran Provincial Veterinary Service, Sari, Iran

(Received September 24, 2016 ; Accepted January 23, 2017)

Abstract

Background and purpose: *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* are common liver flukes which affect both human and livestock worldwide. In this study we evaluated the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for detection and discrimination of *Fasciola* species.

Materials and methods: Fifty adults of *Fasciola* worms were isolated from sheep and cattle liver form abattoirs in Mazandaran province. A total of 8 primer sets for LAMP was designed to amplify the 28S ribosomal RNA gene of *Fasciola* sp. Conventional LAMP was carried out in a 20µl reaction mixture under isothermal condition at 60°C for 90 minutes. Amplification result was observed by monitoring the turbidity by naked-eye, using fluorescent dye and gel electrophoresis. The specificity of LAMP method for detecting *Fasciola* sp. was tested by amplification of *Dicrocoelium dendriticum*, *Trichostrongylus colubriformis*, and *Echinococcus granulosus* DNA templates. To evaluate the detection limit of LAMP assay in detecting Fasciola genus, serial dilution of the extracted DNA was used.

Results: A positive LAMP reaction by the specific primers of two species produced many bands of different sizes in 60^{0C} after 90 min. The optimal assay conditions were established with no reaction with other parasites' DNA. The detection limit of this LAMP assay was 1 pg DNA/tube. The result of turbidity and fluorescent dye detection were consistent with agarose gel electrophoresis.

Conclusion: Our results demonstrated that LAMP is a rapid, cost-effective, highly specific, easy, and reliable method for differentiation of *Fasciola* sp. in epidemiological and clinical researches on human and domestic animals in endemic regions of fasciolosis.

Keywords: *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantic*a, loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 26 (145): 45-53 (Persian).

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 3:55 +0330 on Saturday September 23rd 2017

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و ششم شماره ۱۴۵ بهمن سال ۱۳۹۵ (۵۳-۴۵)

تشخیص و افتراق سریع فاسیولا هپاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکا با استفاده از روش loop-mediated Isothermal Amplification

آزاده میزانی[۱و۲]
پوریا گیل[۳]
شهاب الدین سروی[۴]
احمد دریانی[۵]
مهدی شریف[۵]
افسانه عمویی[۲]
علی باکویی کتریمی[۶]
سید عبدالله حسینی[۲]

چکیده

سابقه و هدف: فاسیولا هپاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکا فلوک‌های کبدی شایعی بوده که روی انسان‌ها و دام‌ها در تمام نقاط جهان اثرگذار هستند. در مطالعه حاضر ما تکنیک سریع loop-mediated isothermal amplification (LAMP) را در تشخیص و افتراق گونه‌های فاسیولا ارزیابی نمودیم.

مواد و روش‌ها: تعداد ۵۰ کرم فاسیولا از کبد گاو و گوسفند کشتارگاه‌های استان مازندران جداسازی شدند. تعداد ۸ پرایمر جهت تکثیر ناحیه ژنی 28S ribosomal RNA برای واکنش LAMP برای گونه‌های فاسیولا طراحی گردید. واکنش LAMP در حجم ۲۰ µl تحت شرایط تک دمایی در 60^{0C} به مدت ۹۰ دقیقه انجام گرفت. نتایج تکثیر با دیدن رسوب با استفاده از چشم غیر مسلح، استفاده از رنگ فلوئورسانس و ژل الکتروفورز بررسی شد. اختصاصیت روش LAMP برای فاسیولا با استفاده از DNA انگل‌های دیکروسلیوم دندریتیکم، تریکواسترونژیلوس کالابریفورمیس و اکینوکوکوس گرانولوزوس مورد سنجش قرار گرفت. جهت ارزیابی محدودیت تشخیص روش LAMP برای تعیین جنس فاسیولا رقت سریالی از DNA استخراج شده مورد استفاده قرار گرفت.

یافته‌ها: واکنش مثبت LAMP با استفاده از پرایمرهای اختصاصی دو گونه تعداد زیادی باند در سایزهای متفاوت در دمای 60^{0C} طی مدت ۹۰ دقیقه تولید نمود. شرایط مطلوبی بدون هیچ واکنشی با سایر DNA انگل‌ها ایجاد گردید. محدودیت تشخیص روش LAMP تا ۱ pg تعیین گردید. نتایج تشخیص رسوب و رنگ فلوئورسانس با الکتروفورز با ژل آگارز همخوانی داشتند.

استنتاج: نتایج ما نشان دادند که روش LAMP یک روش سریع، آسان، کم هزینه با اختصاصیت بالا و معتبر جهت افتراق گونه‌های فاسیولا در مطالعات اپیدمیولوژیکی و بالینی فاسیولوزیس انسانی و دامی در مناطق اندمیک می‌باشد.

واژه های کلیدی: فاسیولا هپاتیکا، فاسیولا ژیگانتیکا، loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

مقدمه

بیماری فاسیولیازیس (Trematoda: Fasciolidae) به عنوان یک انگل زئونوز منتقله توسط غذا به وسیله اعضای جنس فاسیولا ایجاد شده و توسط حلزون‌های آبی جنس لیمنه (lymnaeid) منتقل می‌شوند. دو گونه

مولف مسئول: شهاب الدین سروی– ساری: کیلومتر ۱۸ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی E-mail: shahabesarvi@yahoo.com
۱. دانشجوی دکتری انگل شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات توکسوپلاسموز، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. دانشجوی دکتری انگل شناسی پزشکی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. دانشیار، گروه فیزیولوژی، فارماکولوژی و نانوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۴. دانشیار، مرکز تحقیقات توکسوپلاسموز، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۵. استاد، مرکز تحقیقات توکسوپلاسموز، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۶. کارشناسی ارشد انگل شناسی دامپزشکی، اداره کل دامپزشکی استان مازندران، ساری، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۵/۷/۳ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۵/۷/۷ تاریخ تصویب : ۱۳۹۵/۱۱/۴

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 3:55 +0330 on Saturday September 23rd 2017

اصلی شامل فاسیولا هپاتیکا (*Fasciola hepatica*) و فاسیولا ژیگانتیکا (*Fasciola gigantica*) از عوامل اصلی ایجادکننده فاسیولیازیس در نشخوارکنندگان و انسان در سراسر دنیا می‌باشند(۱). در واقع این بیماری در زمره یکی از مهم‌ترین عفونت‌های کرمی در دام‌های اهلی محسوب شده که باعث ایجاد خسارات اقتصادی زیادی در مناطق گرمسیری می‌گردد. از سوی دیگر عفونت انسانی با جنس فاسیولا از قابل تامل ترین مشکلات بهداشتی در بسیاری از کشورها از جمله ایران بوده، که باعث ابتلای میلیون‌ها نفر در سراسر جهان می‌گردد(۲). به صورت معمول، تشخیص این دو گونه با استفاده از روش های مورفومتریک بوده که به علت وجود گونه‌های حد واسط، تشخیص دقیق دو گونه انگل با مشکلاتی مواجه می‌شود. به علت وجود اختلاف در میزبان واسط و خصوصیات اپیدمیولوژیک دو گونه جهت طراحی استراتژی‌های برای کنترل انگل و هم‌چنین الگوی بیماری زایی متفاوت این دو گونه جهت امر تشخیص و درمان، افتراق گونه های فاسیولا امر بسیار مهمی تلقی می‌شود(۳). روش‌های مولکولی مانند PCR و تعیین توالی اسیدهای نوکلئیک شامل نواحی ژنی internal transcribed spacer (ITS-1, ITS-2) و 28S RNA از DNA ریبوزومی و نواحی *NAD*I و *CO*xI از DNA میتوکوندریایی نقش مهمی در افتراق صحیح بین دو گونه ایفا می‌کنند. روش‌های موجود، علیرغم صحت و درستی، در افتراق گونه‌ها دارای نواقص ذاتی می‌باشند. این روش‌ها زمان بر بوده و گاهی بین ۲ تا ۳ ساعت به طول می‌انجامند و هم چنین نیاز به دستگاه‌های گران قیمت و با دقت بالا و گاهی متدهای پیچیده جهت تکثیر اسیدهای نوکلئیک دارند(۴). روش Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) یکی از متدهای نسبتاً جدید است که باعث تکثیر اسیدهای نوکلئیک هدف، تحت شرایط تک دمایی (isothermal) و بدون نیاز به دستگاه ترموسایکلر با حساسیت، اختصاصیت، سرعت و دقت بالا شده و موجب تشخیص بیماری‌ها می‌گردد(۵، ۶). اساس روش LAMP که در سال ۲۰۰۰ توسط Notomi و همکاران ارائه گردید، بر مبنای خاصیت strand displacement اسیدهای نوکلئیک و تشکیل ساختار stem-loop می‌باشد. در این متد از آنزیم Bst DNA polymerase با خاصیت displacement activity و ۲ تا ۳ جفت پرایمر جهت بالا بردن اختصاصیت روش استفاده می‌گردد(۶). روش اصلی و اولیه با گذشت زمان توسعه یافته و برای تشخیص بیماری‌های انگلی، باکتریایی و ویروسی انسانی، حیوانی و گیاهی به کار برده شد. هدف از مطالعه حاضر، توسعه روش ساده و کم هزینه LAMP با استفاده از ناحیه ژنی 28S از rDNA جهت تشخیص و افتراق گونه‌های فاسیولا هپاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکا و ارزیابی حساسیت و اختصاصیت آن می‌باشد.

مواد و روش ها

جمع آوری انگل فاسیولا و استخراج DNA

در این مطالعه که از نوع ارزش تشخیصی می‌باشد، با مراجعه به کشتارگاه‌های ساری و بابل، تعداد ۵۰ کرم از کبد گوسفند و گاوهای آلوده به فاسیولا پس از جداسازی به آزمایشگاه انگل‌شناسی گروه انگل شناسی و قارچ‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی مازندران منتقل گردید. در آزمایشگاه بر طبق معیارهای مورفومتریک مندرج در متون علمی و با استفاده از میکروسکوپ نوری، نمونه‌های فاسیولا تشخیص داده شدند(۷،۸). سپس نمونه‌ها سه مرتبه با PBS ۰/۱۵ مولار (pH در حدود ۷) شستشو داده شده و جهت انجام آزمایشات مولکولی به ویال حاوی الکل ۷۰ درصد منتقل شدند. برای استخراج DNA ژنومی، تکه انتهایی انگل بین دو لام میکروسکوپی به روش Crushing له شده و جهت ادامه کار از روش فنل کلروفورم ایزوآمیل الکل استفاده گردید(۹). در مرحله آخر، DNA خالص شده در بافر TE حل شده و برای ادامه کار به فریزر -۲۰ درجه سانتی گراد انتقال یافت.

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 3:55 +0330 on Saturday September 23rd 2017

واکنش LAMP

تکثیر موفقیت آمیز DNA هدف در روش LAMP به طراحی دقیق پرایمرهای اختصاصی آن بستگی دارد. برای این کار باید از پرایمرهای اختصاصی گونه از نواحی محافظت شده ژنومی انگل استفاده شود. ناحیه 28S از DNA ریبوزومی هر کدام از انگل های فاسیولا هپاتیکا (accession number GU903890.1) و فاسیولا ژیگانتیکا (accession number JF708022.1) از بانک ژن انتخاب و با استفاده از نرم افزار Primer Explorer V5 (http://primerexplorer.jp/lampv5e/index.html) به صورت آنلاین دو جفت پرایمر (outer forward F3 (primer، B3 (outer backward primer)، FIP (forward inner primer) و (backward inner primer) BIP به صورت جداگانه برای هرگونه طراحی شدند. مشخصات کامل پرایمرها در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

جدول شماره ۱: لیست توالی الیگونوکلئوتیدی پرایمرهای فاسیولا هپاتیکا و فاسیولا ژیگانتیکا در واکنش LAMP استفاده شده در این مطالعه

Parasites	Primer set	Sequence (5' –3')
Fasciola hepatica	F3	CATTACCGACTCAGCTTGCA
	B3	ACCAAACGTTCGGTTAAGGT
	FIP (F1C-F2)	GCCGAATCAACCAGCCCTGAAA-ATGACGGTCCGGTATAGGTC
	BIP (B1C-B2)	AGCGGATTCCAACTTCCATGGC-ACGCGACGCTCATGAGAT
Fasciola gigantica	F3	GGCTGCGAGACACTGAGTC3
	B3	GCACACAAGTCAGTCAAGCA
	FIP	5ACATATATGAGTGCGCCCGCG-ATGATTTGAGGGCACGATC
	BIP	TCGTTGGGTAGTGAACATGGGG-ACACAAACGGACGCAGACA

واکنش LAMP با حجم ۲۰ µl شامل آنزیم Bst DNA polymerase (۸Unit) (New England Biolabs)، بافر ۱۰X آنزیم، بتائین (۵M)، $Mgso_4$ (۱۰۰mM)، داکسی نوکلئوتید تری فسفات (dNTPs) (۲۵mM)، پرایمرهای FIP و BIP (۱/۶mM) F3, و B3(۰/۲ mM)، آب مقطر و DNA ژنومی انگل‌های فاسیولا (۳۰ ng/µl) می‌باشد. ۱ µl آب مقطر به عنوان بلانک و ۱ µl از DNA انگل دیکروسلیم دندریتیکوم به عنوان کنترل منفی استفاده شدند. واکنش‌ها به مدت ۹۰ دقیقه در دستگاه Heat Block (TECHNE,DB.2D) در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد انکوبه شده و سپس جهت ختم واکنش به مدت ۵ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد قرار داده شدند.

آنالیز محصول LAMP

بررسی چشمی محصول تولید شده توسط واکنش LAMP در مرحله اول با استفاده از تشخیص رسوب سفید رنگ حاصل از تولید یون منیزیم پیروفسفات در تیوپ های مثبت و مقایسه آن با تیوپ کنترل منفی و بلانک انجام شد. در مرحله بعد، مقدار ۱ µl رنگ فلورسانس (۱ به ۱۰ رقیق شده) Green Viewer (پارس طوس، ایران) به تیوپ‌های واکنش، کنترل منفی و بلانک آب مقطر اضافه و تغییر رنگ نمونه‌ها بررسی شد. سپس جهت تائید دو روش فوق، مقدار ۳ µl از نمونه‌های تکثیر یافته روی ژل آگارز ۱/۷ درصد در بافر TBE با ولتاژ ۱۰۰ به مدت ۳۵ دقیقه الکتروفورز شد. پس از رنگ‌آمیزی ژل با Safe stain (شرکت سینا کلون، ایران) با استفاده از دستگاه UV doc (Uv.doc, Cambridge) از باندهای مشاهده شده عکس گرفته شد. به منظور تعیین مدت زمان مناسب برای انجام بهترین واکنش، DNA ژنومی انگل فاسیولا هپاتیکا در زمان‌های ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰ و ۹۰ دقیقه تحت واکنش LAMP قرار گرفت.

بررسی حساسیت و اختصاصیت روش LAMP

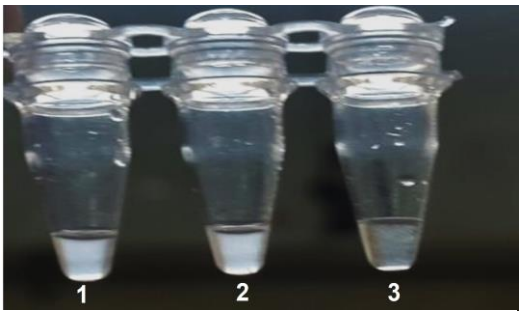
جهت اعتبارسنجی حساسیت یا LOD (limit of detection) روش Conventional LAMP از گونه *F. hepatica* به طور جداگانه رقت‌های ۱۰ng، ۱ng، ۱۰۰pg، ۱۰Pg، ۱Pg، ۱۰۰fg و ۱۰fg تهیه و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تحت واکنش LAMP قرار گرفتند. پس از تکثیر، مقدار ۳µl از محصول به دست آمده در ژل ۱/۷ درصد با ولتاژ ۱۰۰ به مدت ۳۵ دقیقه الکتروفورز شد. به منظور ارزیابی اختصاصیت روش Conventional LAMP مقدار ۱µl از DNA ژنومی انگل *F. hepatica* به عنوان DNA اختصاصی و

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 3:55 +0330 on Saturday September 23rd 2017

مقدار ۱µl از DNA ژنومی انگل‌های *Dicrocoelium dendriticum*، *Trichostrongylus colubriformis* و *Echinococcus granolosus* به عنوان DNA های غیر اختصاصی با استفاده از پرایمرهای LAMP مورد ارزیابی قرار گرفتند. پس از تکثیر، محصول LAMP هر کدام از نمونه‌ها با استفاده از ژل الکتروفورز تائید شدند.

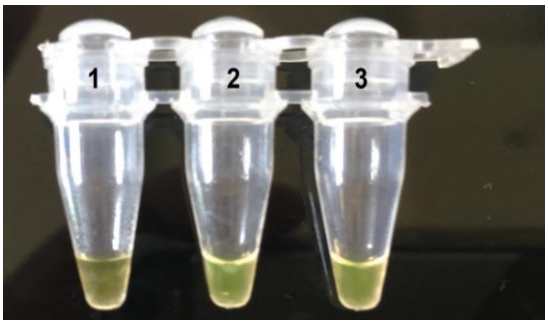
یافته ها

پس از انجام واکنش Lamp تشخیص چشمی و مستقیم نمونه‌ها پس از مرحله توقف واکنش، در تیوپ نمونه‌های استاندارد رسوب سفید منیزیم پیرو فسفات مشاهده شد (تصویر شماره ۱) که به صورت کدورت قابل تشخیص بوده و نمایانگر واکنش مثبت می‌باشد. در تیوپ‌های کنترل منفی و بلانک، رسوب تشکیل شده پس از انجام واکنش بعد از گذشت چند ثانیه از بین رفت.



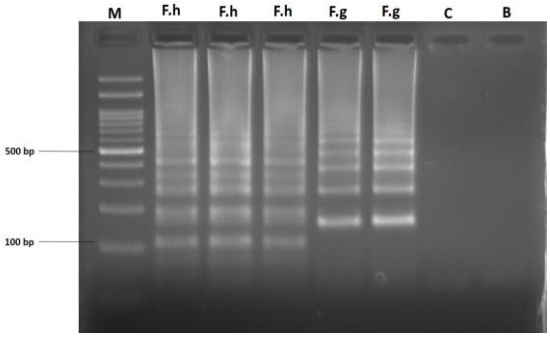
تصویر شماره ۱: تشخیص چشمی واکنش LAMP و مشاهده تولید و عدم تولید رسوب سفید رنگ منیزیم پیروفسفات حاصل از واکنش مثبت و منفی. تیوپ های ۱ و ۲ نشان دهنده واکنش مثبت و تیوپ شماره ۳ نشان دهنده واکنش منفی می باشد

از طرف دیگر پس از اضافه کردن ماده فلورسانس Green Viewer (پارس طوس، ایران) با پایه سایبرگرین به تیوپ‌های واکنش، کنترل منفی و بلانک پس از گذشت چند لحظه تغییر رنگ واکنش به رنگ زرد متمایل به سبز برای نمونه‌ها به منزله واکنش مثبت بود، در حالی که در نمونه‌های کنترل منفی و بلانک، تغییر رنگ به نارنجی نمایانگر واکنش منفی بود (تصویر شماره ۲).



تصویر شماره ۲: تشخیص چشمی واکنش LAMP و مشاهده تغییر رنگ و عدم تغییر رنگ پس از استفاده از ماده فلوئورسانس Green Viewer. رنگ نارنجی در تیوپ شماره ۱ نشان دهنده واکنش منفی و تغییر رنگ به زرد متمایل به سبز در تیوپ های ۲ و ۳ نمایانگر واکنش مثبت می باشد.

الگوی الکتروفورزی واکنش LAMP بر روی ژل آگارز ۱/۷ درصد پس از ۳۵ دقیقه در ولتاژ ۱۰۰ برای تمام نمونه‌های *F. hepatica* (۱۰۰-۱۸۰ ng/µl) و *F. gigantica* (۱۵۵ ng/µ تا ۲۱۰) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی پس از گذشت ۹۰ دقیقه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد به صورت اسمیرهای نردبانی شکل و فرم مینیاتوری واکنش LAMP تشخیص داده شدند. هیچ گونه واکنشی در نمونه های کنترل منفی و بلانک مشاهده نگردید (تصویر شماره ۳).



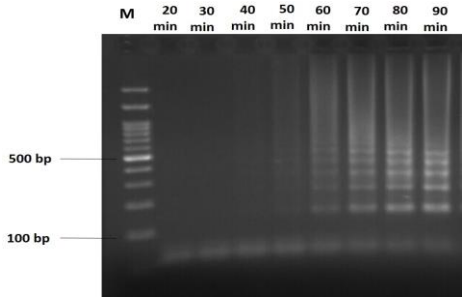
تصویر شماره ۳: الکتروفورز محصول LAMP ناحیه rDNA 28S از گونه های فاسیولا روی ژل آگارز ۱/۷ درصد. ستون های F.h محصول LAMP انگل های فاسیولا هپاتیکا و F.g فاسیولا ژیگانتیکا. کنترل منفی (C)، بلانک (B) و مارکر ۱۰۰ (bp(M.

تعداد ۳۳ ایزوله *F. hepatica* و ۱۷ ایزوله *F. gigantica* شناسایی گردیدند. نتایج زمان‌بندی روش

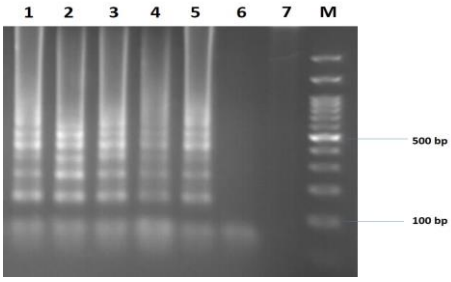
Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 3:55 +0330 on Saturday September 23rd 2017

LAMP نشان داد که از دقیقه ۴۰، واکنش انجام پذیرفته ولی به صورت چشمی به سختی قابل رویت است، در حالی‌که از دقیقه ۶۰ تا ۹۰ هم به‌صورت چشمی رسوب به شکل واضح قابل دیدن بوده و هم در الکتروفورز به وضوح باندهای مینیاتوری نردبانی شکل قابل رویت می‌باشند. تصویر شماره ۴، نتایج تکثیر DNA ژنومی انگل فاسیولا هپاتیکا را از دقیقه ۱۰ تا ۹۰ نشان می‌دهد (تصویر شماره ۴).

نتاج ارزیابی حساسیت یا LOD (limit of detection) روش Conventional LAMP روی گونه *F. hepatica* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی آن نشان دادند که واکنش LAMP در رقت‌های ۱۰ng، ۱ng، ۱۰۰pg، ۱۰pg و ۱pg با موفقیت انجام گرفت. نتایج مشخص نمودند که DNA انگل فاسیولا تا غلظت ۱pg با روش LAMP قابل تشخیص می‌باشد (تصویر شماره ۵).

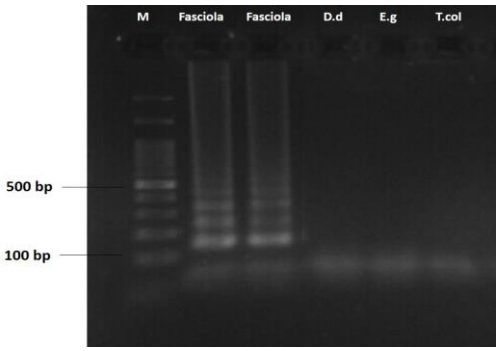


تصویر شماره ۴: واکنش LAMP در زمان های مختلف ۲۰ تا ۹۰ دقیقه. مارکر ۱۰۰ (M)bp. اگرچه واکنش از دقیقه ۴۰ شروع می شود، ولی از دقیقه ۶۰ به بعد، وضوح باندهای مینیاتوری قابل تشخیص است.



تصویر شماره ۵: بررسی Limit of Detection روش LAMP در تشخیص انگل‌های فاسیولا. ستون ۱ رقت ۱۰ ng; ستون ۲ رقت ۱ng; ستون ۳ رقت ۱۰۰ pg; تون ۴ رقت ۱۰ pg; ستون ۵ رقت ۱ pg; ستون ۶ رقت ۱۰۰fg از انگل فاسیولا هپاتیکا; ستون ۷ بلانک آب مقطر; ستون M مارکر ۱۰۰ bp.

پس از انجام بررسی اختصاصیت روش LAMP هیچ کدام از DNA های غیر اختصاصی گونه های *D. dendriticum* (۱۲۶ ng/µI)، *T. colubriformis* (۳۰ng/µI) و *E. granolosus* (۱۹۵ng/µI) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای انگل فاسیولا پس از انجام Conventional LAMP و الکتروفورز تکثیر نیافتند، در حالی که نمونه *F. hepatica* با استفاده از پرایمرهای مذکور با موفقیت انجام شده ایجاد رسوب سفید منیزیم پیروفسفات و باندهای نردبانی پس از الکتروفورز ایجاد واکنش مثبت را تائید نمودند (تصویر شماره ۶).



تصویر شماره ۶: بررسی اختصاصیت روش LAMP. ستون Fasciola مربوط به انگل های فاسیولا هپاتیکا; ستون D.d دیکروسلیوم دندریتیکوم; ستون E.g اکینوکوکوس گرانولوزوس; ستون T.col تریکواسترونژیلوس کالابریفرمیس; ستون M مارکر ۱۰۰ bp.

بحث

تحقیات انجام شده در زمینه اپیدمیولوژی بیماری نشان می‌دهند که حدود ۴/۲ میلیون نفر در ۵ قاره به این انگل مبتلا بوده و در حدود ۱۸ میلیون نفر نیز در معرض خطر ابتلا به این انگل قرار دارند. زیان‌های اقتصادی ناشی از ابتلای دام های اهلی به فاسیولازیس شامل مرگ و میر و کاهش محصولات دامی شامل شیر، گوشت و پشم در حدود ۲ میلیارد دلار در سال تخمین زده شده است. به طور اندمیک، انگل های جنس فاسیولا در مناطق جنوبی کشور در دام‌های اهلی دیده می‌شود در حالی که موارد انسانی آن در مناطق شمالی

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 3:55 +0330 on Saturday September 23rd 2017

ایران به کرات گزارش شده است. دو مورد اپیدمی شایع شده در رشت و بندرانزلی که هزاران نفر را آلوده ساخت، تائیدی بر این وضعیت می‌باشد(۱۰). گونه‌های فاسیولا در موارد زیادی دارای اختلاف بوده که از آن‌ها می‌توان به خصوصیات مورفولوژیک، وضعیت اپیدمیولوژیک، میزبان واسط، راه‌های انتقال عفونت، بیماری‌زایی، پیشگیری و کنترل اشاره نمود. تشخیص معمول این دو گونه بر پایه خصوصیات مورفولوژیک کرم بالغ و تخم صورت می‌گیرد. بسیاری از محققین بر این باورند که نه روش‌های انگل شناسی و نه متدهای ایمونولوژیک قادر به تمایز دقیق دو گونه نمی باشند. متدهای مولکولی مبتنی بر اسیدهای نوکلئیک در تشخیص انگل‌ها به صورت صریح می‌توانند برای تائید روش‌های سنتی انگل شناسی به کار رفته و تشخیص و افتراق گونه‌های مختلف را تسریع می‌بخشند(۱۰). در سال‌های گذشته روش‌های مختلف تکثیر اسیدهای نوکلئیک جهت غلبه بر نواقص روش‌های تشخیصی کلاسیک توسعه یافته و بسیاری از آن‌ها به صورت روش‌های روتین تشخیصی تحت عنوان تست‌های تکثیر اسیدهای نوکلئیک یا NATs (Nucleic Acid Amplification Tests) به صورت کیت‌های تجاری تولید شدند. اما بیش‌تر این روش‌ها اگرچه به طور گسترده در تشخیص پزشکی، آزمایشگاهی و حوزه بیوتکنولوژی مورد استفاده قرار می‌گیرند(۱۲،۱۱)، دارای یک سری معایب شامل نیاز به تجهیزات گران قیمت مانند ترموسایکلر در PCR، حساسیت و اختصاصیت ناکافی و کارایی پایین در تکثیر می‌باشند. به علت همین محدودیت‌ها، روش‌های جدید و آسان تکثیر اسیدهای نوکلئیک معرفی شدند که در صدر این روش‌ها متد Loop-mediated Isothermal Amplification یا LAMP قرار دارد(۱۳).

مهم‌ترین خصوصیت LAMP سرعت بالای تکثیر اسیدهای نوکلئیک تحت شرایط تک دمایی بین رنج دمای ۶۰^{0C} تا ۶۵^{0C} می‌باشد. این خصوصیت باعث استفاده آسان و مقرون به صرفه از این روش می‌گردد چرا که نیاز به دستگاه‌های گران قیمت سایر روش‌ها رفع می‌شود. خصوصیت دیگر این روش، اختصاصیت و کارایی بالای آن به علت استفاده از ۴ تا ۶ پرایمر اختصاصی (F3, B3, FIP, BIP) بوده که ۶ ناحیه روی DNA هدف شناسایی می‌نمایند(۱۴،۱۳). ایجاد کدورت ناشی از تولید رسوب سفید منیزیم پیروفسفات در واکنش‌های مثبت با چشم غیر مسلح نیز دیده می‌شود و نیاز به تشخیص‌دهنده‌های پیشرفته و یا Reagent ندارد(۱۳). هر چند با اضافه کردن یک ماده فلورسانس مانند سایبرگرین یا اتیدیوم بروماید بدون نیاز به تجهیزات گران قیمت مانند دستگاه فوتومتر یا UV.doc تشخیص به راحتی میسر می‌گردد، اما جهت تایید تشخیص نهایی همانند روش PCR می‌توان از الکتروفورز روی ژل آگارز نیز سود جست(۱۳،۶). طبق مطالعه‌ای که اخیراً انجام گرفته است، با استفاده از ماده فلوئورسانس کلسئین (Calcein) که در همان ابتدا به مخلوط واکنش اضافه می‌گردد، طی واکنش به یون منیزیم متصل شده و فلوئورسانس روشنی ایجاد می‌گردد که بدین صورت به راحتی نمونه‌های مثبت قابل تشخیص می‌گردند(۱۵). آنزیم Bst DNA polymerase مورد استفاده در این روش از سایر DNA polymerase های رایج مانند آنزیم Taq DNA polymerase مقاوم‌تر بوده و فعالیت آن در دمای بالا (۶۲ درجه سانتی‌گراد) باعث کاهش پرایمرهای غیراختصاصی می‌شود(۱۷،۱۶). روش LAMP نسبت به PCR حساسیت کم‌تری به مواد مهارکننده موجود در نمونه‌های بیولوژیکی دارد که موجب صرفه‌جویی در زمان و هزینه‌ها در مرحله پردازش نمونه‌ها می‌گردد(۱۸). سهولت در انجام کار، وضوح و شفاف بودن متد، حساسیت و اختصاصیت بالای آن روش LAMP را به یک روش پرکاربرد در جهان جهت حوزه تشخیصی حتی در آزمایشگاه‌های مناطق روستایی در کشورهای در حال توسعه که امکانات آزمایشگاهی کمی دارند، تبدیل نموده است(۱۹).

Ai و همکاران در سال ۲۰۱۰ روش مذکور را روی نمونه های فاسیولای بالغ از نقاط مختلف جهان مانند

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 3:55 +0330 on Saturday September 23rd 2017

نیجریه، اسپانیا آمریکا و فرانسه و نمونه‌های تخم و حلزون آلوده به انگل از چین روی ناحیه ژنی ribosomal intergenicspacer (IGS) انجام دادند. نتایج نشان دادند روش LAMP قابلیت کاربرد بالینی در تشخیص و افتراق گونه‌های فاسیولا به خصوص در مناطق اندمیک را دارا می‌باشد(۴). با استفاده از روش Reverse Transcriptase-LAMP در سال ۲۰۱۰، Adams و همکاران اقدام به جداسازی انگل لیشمانیا روی نمونه‌های بالینی نمودند. حساسیت RT-LAMP برای نمونه‌های خون بیماران مبتلا به لیشمانیوز احشایی در مقایسه با روش میکروسکوپی (آسپیره مغز نخاع و غدد لنفاوی) ۸۳ درصد و برای نوع پوستی ۹۸ درصد گزارش شد(۲۰).

رافتی و همکاران در سال ۲۰۱۴ متد Microfluidic LAMP را با استفاده از capillary tubes جهت تشخیص سریع *Mycobacterium tuberculosis* معرفی نمودند. نتایج مطالعه نشان داد که این روش فقط ظرف مدت ۱۵ دقیقه با LOD حدود ml-۱۱ pg و حساسیت و اختصاصیت به ترتیب ۹۰ و ۹۵ درصد قادر به تشخیص این ارگانیسم می‌باشد(۲۱).

در مطالعه حاضر با استفاده از روش Conventional LAMP تعداد ۳۳ ایزوله فاسیولا هپاتیکا و ۱۷ ایزوله فاسیولا ژیگانتیکا شناسایی و تعیین گونه شدند. در آخر شایان ذکر است که روش معرفی شده در مطالعه حاضر جهت افتراق گونه‌های فاسیولا یک روش قابل اطمینان با حساسیت و اختصاصیت بالا و در عین حال ساده و آسان بوده که بدون نیاز به تجهیزات گران قیمت، قابلیت انجام کار در محیط‌های فیلدی را دارا می‌باشد. به علت برتری بالای روش LAMP نسبت به سایر روش‌های مولکولی و روش‌های کلاسیک انگل‌شناسی می‌توان از این روش به عنوان یک روش تشخیصی جایگزین جهت کاربردهای بالینی، تشخیصی و تعیین گونه انگل‌های فاسیولا و شناسایی و افتراق سایر عوامل عفونی نیز استفاده کرد. این روش قابلیت استفاده در مطالعات اپیدمیولوژیکی، تشخیص بالینی، کنترل بیماری و تعیین گونه در زمینه فاسیولیازیس انسانی و حیوانی به خصوص در مناطق اندمیک بیماری را دارا می‌باشد.

سپاسگزاری

این پژوهش قسمتی از طرح مصوب ۹۶-۹۲ بوده که با حمایت مالی معاونت تحقیقات و فن آوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران انجام شده است. از معاونت محترم پژوهشی این دانشگاه، تمامی اعضای محترم گروه انگل شناسی و مدیریت و کارکنان کشتارگاه میانکاله (نیکپور) شهرستان جویبار کمال تشکر و قدردانی را دارد.

References

1. Khalifa RMA, Hassanin ASA, Monib MESMM, Yones DA, EL-Ossily NAA, Abdel-Rahman AS. Molecular and Phylogenic Characterization of Fasciola hepatica from Assiut, Egypt based on nuclear ribosomal DNA sequences. J Med Sci Clin Res 2016; 4(1): 9007-9016.
2. Hayashi K, Ichikawa-Seki M2, Mohanta UK, Singh TS3, Shoriki T, Sugiyama H, et al. Molecular phylogenetic analysis of Fasciola flukes from eastern India. Parasitol Int 2015; 64(5): 334-338.
3. 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.
4. Ai L, Li C, Elsheikha HM, Hong SJ, Chen JX, Chen SH, et al. Rapid identification and differentiation of Fasciola hepatica and Fasciolagigantica by a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. Vet Parasitol

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 3:55 +0330 on Saturday September 23rd 2017

2010; 174(3-4): 228-233.

5. Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. Mol Cell Probes 2002; 16(3): 223-229.
6. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res 2000; 28(12): E63.
7. Sahba GH, Arfaa F, Farahmandian I, Jalali H. Animal fascioliasis in Khuzestan, southwestern Iran. J Parasitol 1972; 58(4): 712-716.
8. Muller R, Wakelin D. Worms and Human Diseases, 2nd ed. New York: CABI International; 2002.
9. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual/J, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
10. Mizani A, Gill P, Sarvi Sh, Daryani A, Sharif M, Rahimi M, et al. Using Fast PCR Amplification in Identifying Fasciola Species. Mazandaran Univ Med Sci 2015; 24(122): 72-80 (Persian).
11. Mori Y, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. J Infect Chemother 2009; 15(2): 62-69.
12. Versalovic J, Lupski JR. Molecular detection and genotyping of pathogens: more accurate and rapid answers. Trends Microbiol 2002; 10(10 Suppl): 15-21.
13. Mori Y, Nagamine K, Tomita N, Notomi T. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. Biochem Biophys Res Commun 2001; 289(1): 150-154.
14. Kalinina O, Lebedeva I, Brown J, Silver J. Nanoliter scale PCR with TaqMan detection Nucleic Acids Res 1997; 25(10): 1999-2004.
15. Tomita N, Mori Y, Kanda H, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. Nat Protoc 2008; 3(5): 877-882.
16. Nagamine K, Kuzuhara Y, Notomi T. Isolation of single-stranded DNA from loop-mediated isothermal amplification products. Biochem Biophys Res Commun 2002; 290(4): 1195-1198.
17. Karami A, Gill P, Motamedi M, Saghafinia M. A review of the current isothermal amplification techniques: Applications, advantages and disadvantages. J Global Infect Dis 2011; 3(3): 293.
18. Kaneko H, Kawana T, Fukushima E, Suzutani T. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. J Biochem Biophys Methods 2007; 70(3): 499-501.
19. Mori Y, Kanda H, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): recent progress in research and development. J Infect Chemother 2013; 19(3): 404-411.
20. Adams ER, Schoone GJ, Ageed AF, Safi SE, Schallig HD. Development of a reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the sensitive detection of Leishmania parasites in clinical samples. Am J Trop Med Hyg 2010; 82(4): 591-596.
21. Rafati A, Gill P. Microfluidic method for rapid turbidimetric detection of the DNA of Mycobacterium tuberculosis using loop-mediated isothermal amplification in capillary tubes. Microchimica Acta 2015; 182(3): 523-530.