مقایسه‌ی روش‌های Polymerase chain reaction (PCR) و Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) برای تشخیص فاسیولا هپاتیکا در نمونه مدفوع جمعیت گوسفندی استان لرستان

سیامک امیری[۱]، بهار شمشادی*[۱]، شیرزاد فلاحی[۲]، سالومه شیرعلی[۳]

چکیده

یکی از بیماری‌های مشترک بین انسان و حیوان فاسیولیازیس می‌باشد. در ایران فاسیولازیس حیوانی تاریخچه‌ای طولانی داشته و همواره به عنوان یک مشکل مهم دامپزشکی مورد توجه بوده است. روش‌های مختلفی برای تشخیص آن استفاده می‌شود که یکی از این روش‌ها، روش LAMP است. این مطالعه برای اولین بار به مقایسه‌ی روش‌های PCR و LAMP برای تشخیص فاسیولا هپاتیکا در نمونه مدفوع جمعیت گوسفندی استان لرستان پرداخت. طی مدت ۳ ماه، مجموعاً ۱۹۵ نمونه مدفوع ازگوسفندان استان لرستان با روش تصادفی کلاسیک جمع آوری شد. نمونه¬های هر بخش جهت تکنیک LAMP تا زمان استخراج DNA در فریزر منفی ۲۰ درجه نگهداری شدند. نمونه‌ها توسط روش‌های LAMP و PCR بررسی شدند. داده¬های این مطالعه توسط روش کای-اسکوار از نرم افزار SPSS نسخه ۱۹، تحلیل شدند و ضریب کاپا برای توافق بین روش‌ها استفاده شد. نتایج نشان داد که تکنیک LAMP اختلاف معنی-داری با تکنیک PCR دارد و تکنیک LAMP به شکل کارآمدتری عفونت با فاسیولا هپاتیکا را تشخیص داد (۱۱ نمونه در روش LAMP و ۷ نمونه در روش PCR). نتایج ضریب کاپا نشان داد که توافق معنی‌داری بین دو روش با ضریب ۰/٦۵ و ارزش معنی‌داری کمتر از ۰/۰۰۱ وجود دارد. همچنین روش LAMP از حساسیت بیشتری برخوردار می‌باشد. در مجموع نتایج نشان داد که روش LAMP از حساسیت و دقت بیشتری در مقایسه با روش PCR برخوردار بود و بنابراین این روش می‌تواند برای تشخیص فاسیولا هپاتیکا بعنوان یک روش کارآمدتر می‌تواند استفاده شود.

واژگان کلیدی: *حساسیت، تشخیص، دیژن، انگل*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/٤/۲۰

مقدمه

یکی از بیماری‌های مشترک بین انسان و حیوان فاسیولیازیس می‌باشد. فاسیولازیس به عفونت ناشی از ابتلای انسان‌ها و دام‌ها به انگل-های جنس فاسیولا (شامل *فاسیولا هپاتیکا* و *فاسیولا ژیگانتیکا*) اطلاق می‌شود. ترماتودهای کبدی شامل *فاسیولا هپاتیکا* و *فاسیولا ژیگانتیکا* عامل ایجاد فاسیولیازیس می‌باشند (۱). انگل‌های فاسیولا کرم‌های برگی شکل از رده ترماتودها می‌باشد که انگل طبیعی حیوانات نشخوار کننده از جمله گوسفند، بز، گاو، گاومیش، خوک، شتر و غیره می-باشند. این کرم‌ها مراحل اولیه رشد خود را در بافت کبد طی کرده و پس از بلوغ جنسی، در مجاری صفراوی کبد مستقر می‌شود و موجب آسیب به آن می‌شود (۲). در ایران فاسیولازیس حیوانی تاریخچه‌ای طولانی داشته و همواره به عنوان یک مشکل مهم دامپزشکی مورد توجه بوده است. این ترماتودهای کبدی در عفونت‌های انسانی سبب التهاب، آسیب به کبد و مجاری صفراوی می‌شوند و با گذشت زمان و ایجاد تغییر در الگوی اپیدمیولوژیک بیماری، اهمیت بهداشتی و درمانی آن برای انسان به‌شکل قابل توجهی افزایش می‌یابد (۱). تقریبا ۲/٤ میلیون نفر در جهان به این انگل مبتلا هستند و ۱۸۰ میلیون نفر در معرض خطر ابتلا هستند. امروزه آلودگی ناشی از انگل *فاسیولا* به وسیله مواد غذایی اهمیت ویژه‌ای یافته است. بالاترین میزان آلودگی انسان از بولیوی، چین، اکوادور، مصر، فرانسه، ایران، پرو و پرتغال گزارش شده است (۳). در سال ۱۹۸۸ میلادی موردی از شیوع بیماری در انسان در استان گیلان اتفاق افتاد که وسیع‌ترین مورد در جهان در نظر گرفته شد. بیماری در فوریه ۱۹۸۸ شروع شده، به مدت ۱۸ ماه به طول انجامید و حدود ۱۰۰۰۰ نفر را مبتلا ساخت (٤).

۱* گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران (bshemshadi@yahoo.com)

۲ گروه قارچ شناسی و انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران

۳ گروه زیست فناوری، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران

با در نظر گرفتن ضرورت بهداشتی و اقتصادی این بیماری، بررسی دقیق گونه‌های عامل آن برای پیشگیری و بکارگیری روش‌های کنترل این بیماری ضروری می‌باشد. با وجود آن-که *فاسیولا* بر اساس شاخص‌های ظاهری همانند طول و عرض کرم بالغ، طول و عرض مخروط رأسی، طول ناحیه‌ی پشت بیضه‌ها تا انتهای کرم، نسبت طول کرم به عرض آن و غیره قابل تشخیص می‌باشد (۵) ولی به‌علت بودن فرم‌های هیبرید و حدواسط این روش‌ها نمی‌توانند معتبر و دقیق باشند. روش تکثیر هم‌دمای به‌واسطه‌ی حلقه یا Loop-mediated isothermal amplification یکی از متدهای نسبتا جدید است که تحت شرایط تک دمایی و بدون نیاز به دستگاه ترموسایکلر با حساسیت، اختصاصیت، سرعت و دقت بالا، باعث تکثیر اسیدهای نوکلئیک هدف شده و موجب تشخیص بیماری‌ها می‌گردد (٦). اساس روش LAMP که در سال ۲۰۰۰ توسط نوتومی و همکاران ارائه گردید، بر مبنای خاصیت جابه‌جایی رشته‌ی اسیدهای نوکلئیک و تشکیل ساختار ساقه–حلقه می‌باشد. در این روش از آنزیم Bst DNA polymerase با فعالیت جابه‌جایی خاصیت و ۲ تا ۳ جفت پرایمر جهت بالا بردن اختصاصیت روش استفاده می‌گردد (۷). محصولات واکنش LAMP از طریق الکتروفورز بر روی ژل آگاروز رنگ شده با اتیدیوم بروماید و مشاهده باندهای چندگانه با الگوی نردبانی شکل، دیدن فلورسانس سبزرنگ بدلیل وجود سایبر گرین I در لوله های واکنش زیر نور اشعه‌ی فرابنفش و مشاهده چشمی رسوب سفید رنگ منیزیم پیروفسفات در لوله های واکنش قابل تشخیص هستند(۸). به دلیل عدم استفاده گسترده از تکنیک‌های متنوع واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در تشخیص فاسیولیازیس بدلیل هزینه بالای تجهیزات و زمان طولانی واکنش‌ها تصمیم گرفته شد تا با استفاده از تکنیک LAMP، نمونه‌های مدفوع گوسفندان استان لرستان را جهت ردیابی *فاسیولا هپاتیکا* بررسی شود. بنابراین این مطالعه به‌منظور مقایسه‌ی روش‌های PCR و LAMP برای تشخیص *فاسیولا هپاتیکا* در نمونه مدفوع جمعیت گوسفندی استان لرستان انجام شد.

مواد و روش‌کار

جمع آوری نمونه

طی مدت ۳ ماه، مجموعاً ۱۹۵ نمونه مدفوع ازگوسفندان استان لرستان با روش تصادفی کلاسیک جمع آوری شد. کل استان لرستان شامل ۱۱ شهرستان ۲۹ بخش و ۸۵ دهستان است که هر شهرستان یک طبقه محسوب شد و به بخش-های هر شهرستان زیر طبقه اطلاق گردید. از هر بخش (شامل نقاط شهری و دهستان‌های مختلف) بصورت خوشه-ای نمونه‌گیری بعمل آمد، که خوشه‌ها عبارت بودند از دهستان‌ها و مراکز شهری هر بخش. پراکندگی نمونه‌ها در هر خوشه با توجه به نوع چرای دام‌ها نیز رعایت شد. پس از نمونه‌گیری نمونه‌ها بلافاصله به آزمایشگاه انگل شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی لرستان منتقل شدند. نمونه‌های هر بخش جهت تکنیک LAMP تا زمان استخراج DNA در فریزر منفی ۲۰ درجه نگهداری شدند.

استخراج DNA

جهت استخراج DNA از نمونه های مدفوع از کیت اختصاصی مدفوع مؤسسه پژوهشی انتقال سامانه‌های زیست مولکولی (Molecular Biological System Transfer) (ایران، تهران) استفاده شد. برای شکستن لایه‌های مختلف تخم *فاسیولا هپاتیکا* و آسان‌تر نمودن استخراج DNA، رسوبات هر نمونه‌ی مدفوع که از الک عبور داده شده بود، برای ۵ بار و هر بار به‌مدت ۵ ثانیه در معرض ولتاژ ۹۰ ولت قرار گرفت. سپس، ۳۰۰ میکرولیتر از در داخل میکروتیوب ۱/۵۰ میلی لیتری قرار گرفت و استخراج DNA طبق دستور شرکت سازنده‌ی کیت صورت گرفت. بعد از انجام مراحل ۵ ثانیه‌ای، یک قطره از نمونه‌ی مدفوعی برای بررسی میزان تخریب تخم بر روی اسلایدها قرار گرفت. غلظت DNA

توسط دستگاه نانودرآپ ۲۰۰۰ (Thermo Scientific Company, USA) بررسی شد که این نتیجه بین $ng/\mu l$ ۱۴۵–۱۸۰ بود (۹).

بررسی نمونه‌ها توسط تکنیک LAMP

بهینه‌سازی این تکنیک با استفاده از پرایمرهای خاص در سه درجه حرارت ثابت ۶۱، ۶۳ و ۶۲ درجه‌ی سانتی‌گراد و در دو غلظت از Mg^{2+} ۸ و ۱۰ میلی مولار انجام شد. بهینه-سازی دیگر با استفاده از همان پروتکل ولی در سه زمان ۳۰، ۴۵ و ۶۰ دقیقه‌ای در دمای ۶۳ درجه‌ی سانتی‌گراد و با Mg^{2+} ۸ میلی مولار انجام شد. تمام محصولات در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد برای آنالیزهای بعدی ذخیره شدند. این تکنیک در حجم ۲۵ میکرولیتر از مخلوط واکنش حاوی ۱ میکرولیتر DNA الگو، ۴۰ پیکومول پرایمر FIP و BIP و ۲۰ پیکومول از پرایمرهای LF و LB، ۵ پیکومول از هرکدام از پرایمرهای F3 و B3، ۱/۴۰ میلی مولار از دزوکسی نوکلئوزید تری فسفات و ۲× بافر واکنش (بتائین ۱/۶۰ مولار، محصول شرکت سیگما)، ۴۰ میلی مولار Tris–HCl با اسیدیته‌ی ۸/۸۰، ۲۰ میلی مولار پتاسیم کلرید، ۲۰ میلی مولار آمونیوم سولفات، ۱۶ میلی مولار منیزیم سولفات و ۰/۲۰٪ توئین ۲۰ انجام شد. توالی پرایمرها در زیر آورده شده است (۱۰):

F3: CAT TAC CGA CTC AGC TTG CA

B3: ACC AAA CGT TCG GTT AAG GT

FIP: GCC GAA TCA ACC AGC CCT GAA AAT GAC GGT CCG GTA TAG GTC

BIP: AGC GGA TTC CAA CTT CCA TGG CAC GCG ACG CTC ATG AGA T
LF: GAT GGC GCT GGA GCG TCG GA
LB: CAC CGT CCT GCT GTC TGG

سپس، DNA الگو در یک واکنش برای کنترل منفی حذف شد. مخلوط در دماهای ۶۱ تا ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۶۰ دقیقه انکوبه شد و برای مدت ۱۰ دقیقه تا پایان دادن به واکنش در دمای ۸۰ درجه‌ی سانتی‌گراد حرارت داده شد. محصولات این روش با چشم مسلح تحلیل شدند. به محصول واکنش LAMP، ۳ لاندا سایبرگرین ۱ (پارس طوس، ایران) که ۱ به ۱۰ در دی متیل سولفوکساید رقیق شده است، اضافه شده که در صورت مثبت بودن واکنش در زیر نور UV از رنگ نارنجی به رنگ سبز تغییر رنگ مشاهده خواهد شد و در صورت منفی بودن واکنش، تغییر رنگ مشاهده نمی گردد و به همان رنگ نارنجی باقی می‌ماند (۱۱) (نگاره‌های ۲ و ۳ بخش نتایج).

بررسی نمونه‌ها توسط تکنیک PCR

این تکنیک در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر با ۱۲/۵۰ میکرولیتر مستر میکس، ۲ میکرولیتر پرایمرها، ۲ میکرولیتر DNA استخراج شده و ۸/۵۰ میکرولیتر آب مقطر انجام شد. سپس DNA استخراج شده در دستگاه ترموسایکلر (Bio-Rad T100, Life Science Research Comapny, USA) بسط داده شد، همان‌گونه که بحث خواهد شد: دناتوراسیون مقدماتی در ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه‌ی دناتوراسیون در ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد برای یک دقیقه، اتصال در ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۴۵ ثانیه و اکستنشن در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد برای یک دقیقه. اکستنشن نهایی در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد و برای ۵ دقیقه انجام شد. محصولات این تکنیک در ژل آگارز الکتروفورز شدند و با محلول رنگ DNA (یک میکروگرم/میلی لیتر) (شرکت سیناکلون، ایران) رنگ آمیزی شدند (۱۲).

اختصاصیت و حساسیت روش‌های LAMP و PCR

اختصاصیت و حساسیت روش‌ها با استفاده از یک میکرولیتر DNA ژنومیک (۱۰۰ نانوگرم/میکرولیتر) از نمونه‌های کنترل هترولوگ شامل گونه‌های *Leishmania* spp., *Acanthamoeba* spp., *Cryptosporidium* spp., *Blastocystis*, *Toxoplasma gondii* ارزیابی شدند. برای

ارزیابی حساسیت این روش‌ها، هفت رقت سریالی از تخم-های *فاسیولا* در محلول بافر سولفات (۰، ۱، ۵، ۱۰، ۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ تخم/میلی لیتر) تهیه شد. تمام آزمایش‌ها در سری رقت در هر دو تکنیک برای دوبار انجام شد. یک کنترل منفی (بدون DNA) در نظر گرفته شد. محصولات PCR پرایمرهای خارجی F3 و B3 برای تأیید صحت روش‌ها استفاده شدند

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های این مطالعه جمع‌آوری شدند و توسط روش کای-اسکوار از نرم افزار SPSS نسخه ۱۹، تحلیل شدند. ضریب کاپا برای توافق بین روش‌ها استفاده شد.

نتایج

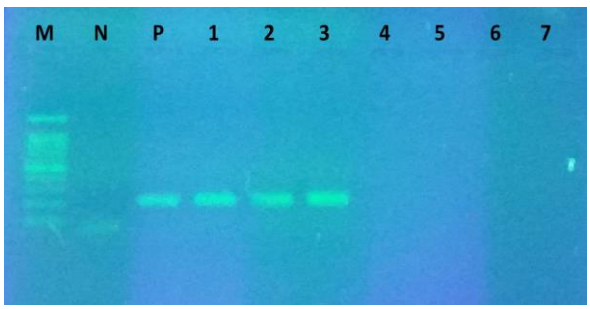
ویژگی‌های دموگرافیک گوسفندان مورد مطالعه در جدول ۱ آورده شده است. همان‌گونه که جدول نشان می دهد، بیشترین نمونه‌ها از خرم آباد (۱۹/۵۰ ٪)، سپس الیگودرز (۱۳/۸۰ ٪) و کمترین تعداد از رومشکان (۳/۶۰٪) بود. بیشترین نمونه‌ها (۴۸/۲۰ ٪) از گله‌های ۹۹-۵۰ رأسی و شیوه سنتی چرا (۷۹/۵۰ ٪) تهیه شدند. بیشترین نمونه‌ها از گوسفندان ماده (۶۲/۶۰٪) و از گوسفندان ۴-۳ ساله (۳۹٪/۵۰) جمع آوری شدند.

نتایج برای روش‌های LAMP و PCR

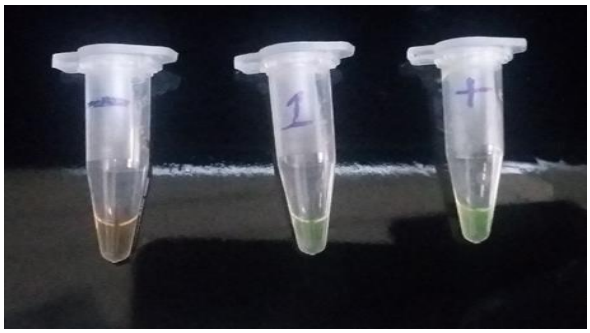
نتایج الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ نشان داد که از بین ۱۹۵ نمونه‌ی بررسی شده توسط این روش، ۷ نمونه (۳/۶۰٪) برای *فاسیولا هپاتیکا* مثبت بودند (نگاره ۱). نتایج برای روش LAMP نشان داد که بعد از پایان دادن واکنش LAMP و افزودن سایبر گرین ۱ به لوله-های آزمایش، ۱۱ لوله (۵/۶۰٪) فلوروسنس سبز را نشان دادند، که نشان دهنده‌ی نتایج مثبت برای عفونت *فاسیولا هپاتیکا* بود (نگاره ۲ و ۳) و سپس جهت تایید بر روی ژل آگارز نتایج نشان داده شد (نگاره ۴).

جدول ۱ ویژگی‌های دموگرافیک گوسفندان مورد مطالعه

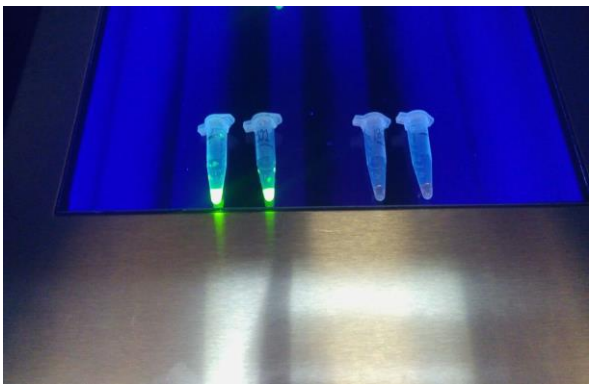
ویژگی‌ها		تعداد	درصد
شهر	خرم آباد	۳۸	۱۹/۵۰
	الیگودرز	۲۷	۱۳/۸۰
	پل‌دختر	۲۲	۱۱/۳۰
	دلفان	۲۲	۱۱/۳۰
	کوهدشت	۱۸	۹/۲۰
	سلسله	۱۵	۷/۷۰
	ازنا	۱۳	۶/۷۰
	بروجرد	۱۲	۶/۲۰
	چگنی	۱۲	۶/۲۰
	دورود	۹	۴/۶۰
	رومشکان	۷	۳/۶۰
تعداد (رأس)	زیر ۵۰ رأس	۶۰	۳۰/۸۰
	۹۹-۵۰ رأس	۹۴	۴۸/۲۰
	۱۰۰ رأس و بالاتر	۴۱	۲۱/۰۰
شیوه‌های چرا	سنتی	۱۵۵	۷۹/۵۰
	صنعتی	۴۰	۲۰/۵۰
جنس گوسفندان	نر	۷۳	۳۷/۴۰
	ماده	۱۲۲	۶۲/۶۰
سن گوسفندان	۲-۱ سال	۷۲	۳۶/۹۰
	۴-۳ سال	۷۷	۳۹/۵۰
	۶-۵ سال	۴۶	۲۳/۶۰



نگاره ۱ الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز رنگ آمیزی شده با 100bp- DNA safe stain مارکر:M ، کنترل منفی :N، کنترل مثبت :P، ۱-۳ نمونه های مثبت، ۷-۴ نمونه های منفی

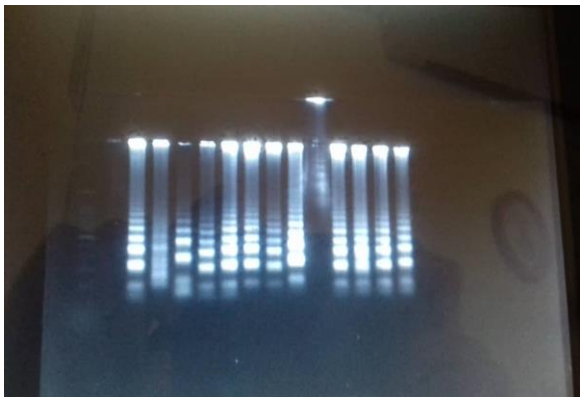


نگاره ۲ نتایج محصولات LAMP در زیر نور مرئی



نگاره ۳ نتایج محصولات LAMP در زیر نور UV

نگاره ۳ نتایج محصولات LAMP در زیر نور UV



نگاره ٤ نتایج الکتروفورز محصولات LAMP بر روی ژل آگارز رنگ شده با اتیدیوم بروماید

نتایج برای مقایسه‌ی این دو روش در جدول ۲ آورده شده است و همان‌گونه که نتایج نشان می‌دهد تکنیک LAMP اختلاف معنی‌داری با تکنیک PCR دارد و تکنیک LAMP به‌شکل کارآمدتری عفونت با *فاسیولا هپاتیکا* را تشخیص می‌دهد.

جدول ۲ مقایسه‌ی روش‌های PCR و LAMP

روش	تعداد	درصد	ارزش معنی‌داری
PCR	۷	۳/٦۰	۰/۰۳۵
LAMP	۱۱	۵/٦۰	

حساسیت و اختصاصیت روش‌های LAMP و PCR

اختصاصیت آنالیتیکی روش‌های LAMP و PCR با استفاده از نمونه‌های DNA (۱۰۰ میکروگرم/میکرولیتر) دیگر پارازیت‌ها بررسی شد و نمونه‌هایی از DNA این پارازیت‌ها مشاهده نشد که این اختصاصیت این روش‌ها برای تشخیص *فاسیولا هپاتیکا* را نشان می‌دهد. برای ارزیابی حساسیت آنالیتیکی، هفت رقت سریالی از تخم‌های *فاسیولا هپاتیکا* در بافر فسفات (۰، ۱، ۵، ۱۰، ۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ تخم/میلی لیتر) از استخراج DNA تهیه شد. محدوده‌ی تشخیص برای روش‌های LAMP و PCR، یک و ۱۰ تخم به ترتیب بود، که نشان می‌دهد روش LAMP از حساسیت بزرگتری برخوردار می‌باشد.

توافق بین دو روش LAMP و PCR

نتایج ضریب کاپا نشان داد که توافق معنی‌داری بین دو روش با ضریب ۰/٦۵ و ارزش معنی‌داری کمتر از ۰/۰۰۱ وجود دارد

بحث

یکی از بیماری‌های مشترک بین انسان و حیوانات فاسیولیازیس می‌باشد، که ترماتودهای منتقل شده از غذا به‌نام *فاسیولا* عامل آن می‌باشند (۱). این انگل تقریبا در سراسر دنیا، خصوصا در کشورهایی که دامپروری در آن‌ها به‌شکل چشم‌گیری وجود دارد، شایع می‌باشد. میزان آلودگی انسان نسبت به آلودگی در دام‌ها بسیار کمتر می‌باشد، ولی تاکنون گزارش‌های زیادی مبنی بر ابتلاء انسان به این انگل از نقاط مختلف جهان منتشر شده است (۱۳). این بیماری در ایران

عمدتا در مناطق معتدل و نیمه گرمسیری وجود دارد و انتشارش به‌طور کلاسیک و به‌صورت نقطه‌ای است. دو گونه مهم انگل *فاسیولا* دارای هم‌پوشانی هستند، با این‌حال *فاسیولا هپاتیکا* در مناطق مرتفع و معتدل و *فاسیولا ژیگانتیکا* در مناطق نیمه گرمسیری بیشتر وجود دارد (۵).

آسان‌ترین شیوه برای جستجوی تخم انگل‌های *فاسیولا* در مدفوع، استفاده از روش مستقیم است، با این‌حال روش مستقیم حساسیت بسیار پایینی دارد. به‌منظور دست‌یابی به نتایج بهتر و دقیق‌تر، از روش متراکم سازی که از حساسیت بالاتری برخوردار می‌باشد، استفاده می‌شود. برای بهره‌گیری از این روش، از شناورسازی و یا روش های رسوبی استفاده می‌شود. همچنین روش‌های سرولوژی برای تشخیص آلودگی به‌کار می‌رود که حساس‌ترین آن‌ها روش الکتروفورز کانتر و روش الایزا می باشند (۷). تکنیک LAMP تکنیکی است که در بخشی از اسید نوکلئیک در یک دمای ثابت تکثیر می‌یابد و دارای اختصاصیت و حساسیت بالایی می‌باشد. این روش تقریبا در حدود 10^5 برابر حساسیت بیشتری نسبت به PCR معمولی دارد و نیاز به تجهیزات آزمایشگاهی ساده‌ای دارد و تکنیکی مناسبی برای انجام آزمایش در شرایط مزرعه‌ای و در مناطق اندمیک می‌باشد (۸).

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که تکنیک LAMP از حساسیت بیشتری نسبت به روش PCR برخوردار بود و توانست به‌شکل کارایی عفونت با *فاسیولا هپاتیکا* را تشخیص دهد. در مطالعه‌ای، Nei و همکارانش (۱٤) در مطالعه‌ای از روش LAMP برای شناسایی سگ‌های آلوده شده با *Echinococcus multilocularis* استفاده نمودند. برای این کار ۱۸۹ نمونه مدفوع سگ را از مناطق اندمیک بیماری از چین جمع آوری کردند و ۳۰ نمونه مدفوع سگ‌هایی که تحت کنترل شدید برنامه ضد کرمی قرار گرفته بودند (به‌عنوان کنترل منفی) نیز جمع آوری کردند. در این بررسی از روش میکروسکوپی به‌منظور تایید وجود تخم *E. multilocularis* در مدفوع نیز استفاده کردند. درصد آلودگی بدست آمده در نمونه‌های مدفوع سگ‌های مناطق اندمیک به روش LAMP و PCR به ترتیب ۱٦/٤ ٪و ۵/۳ ٪ به‌دست آمد و تمام نمونه مدفوع سگ‌های کنترل، نیز منفی شد. در سگ‌هایی که به‌طور تجربی به این انگل آلوده شدند و روش LAMP توانست DNA *اکینوکوکوس مولتی لوکولاریس* را ۱۲ روز بعد از آلودگی، ردیابی نماید. در حالی که روش PCR، ۱۷ روز بعد از آلودگی مثبت شد و با روش میکروسکوپی اولین تخم ها ٤٤ روز بعد از آلودگی در مدفوع دیده شدند. در مجموع، نتایج این مطالعه نشان داد که روش LAMP روشی مناسب جهت تشخیص این انگل، در نواحی اندمیک برای اکینوکوکوزیس می‌باشد، که همخوان با یافته‌های این مطالعه می‌باشد. همخوان با یافته‌های مطالعه‌ی حاضر، کاظمی و همکاران (۱۵) به شناسایی و تعیین گونه‌های *توکسوکارا* با استفاده از روش‌های فلوتاسیون، LAMP و PCR در خاک پارک‌های شهر اهواز پرداختند. در این مطالعه، ۲٦۰ نمونه خاک به‌طور تصادفی از پارک‌های مختلف شهر اهواز جمع آوری شد. پس از انجام روش فلوتاسیون سولفات روی و به‌دنبال نمونه‌های DNA از نمونه تخم گونه‌های *توکسوکارا* استخراج شد. در نهایت، DNA استخراج شده برای تشخیص مولکولی مبتنی بر PCR و LAMP استفاده شد. نتایج نشان داد که بر اساس روش فلوتاسیون، از ۲٦۰ نمونه جمع آوری شده، ۱۹٦ نمونه آلوده بودند که از این بین، ۷٦ مورد برای گونه های *توکسوکارا* مثبت بودند. ۵۷ نمونه با استفاده از روش PCR برای آلودگی به گونه‌های *توکسوکارا* مثبت بودند. با این حال با روش LAMP، ۸۱ نمونه به گونه‌های *توکسوکارا* آلوده بودند، که نشان دهنده‌ی دقت بیشتر روش LAMP بود. نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که بین دو روش مورد استفاده توافق وجود دارد. همخوان با یافته‌های این مطالعه، میزانی و همکاران (۱۱) به بررسی تشخیص و افتراق سریع *فاسیولا هپاتیکا* و

فاسیولا ژیگانتیکا با استفاده از روش LAMP **پرداختند.** 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. نتایج تشخیص رسوب و رنگ فلوئورسانس با الکتروفورز با ژل آگارز همخوانی داشتند. همان‌گونه که نتایج نشان می‌دهد، روش LAMP از حساسیت بیشتری برخوردار بود. در مطالعه‌ای پازوکی قوهه و همکاران (۱۶) به بررسی روش های رایج و نوین تشخیص آزمایشگاهی و شناسایی عوامل لیشمانیوز پوستی را مرور کردند و به بررسی مقالات مختلف پرداختند و نشان دادند که روش‌های معمول استاندارد طلایی برای تشخیص لیشمانیوز می‌باشند و در صورت امکان می‌توان از روش‌های نوین همانند LAMP استفاده نمود که دارای حساسیت قابل توجهی می‌باشند. در مطالعه‌ای دیگر، کودیبا و همکاران (۱۷) در مطالعه‌ای به ارزیابی *مالاریا* با استفاده از روش LAMP در پست‌های سلامت در ایالت رورایمای برزیل پرداختند. در این مطالعه ۹۱ شرکت کننده ثبت نام کردند. میانگین حساسیت و اختصاصیت برای این روش در این مطالعه به‌ترتیب ۹۰ و ۹٤ درصد بود. با این حال حساسیت و اختصاصیت برای روش میکروسکوپی به‌ترتیب ۸۳ و ۱۰۰ درصد بود که نشان دهنده‌ی حساسیت بالای این روش می-باشد که به‌نوعی همخوان با یافته‌های مطالعه‌ی حاضر می-باشد. در مجموع تمام مقالات نشان می‌دهند که روش LAMP روش مناسبی برای تشخیص گونه‌های بیماری‌زای مختلف می‌باشد و نتایج این مطالعه نیز این موضوع را تأیید می‌کند. در مطالعه ای که توسط عزت پور و همکاران در سال ۲۰۱٤ انجام شد، مشخص شد که کبدها ی معدوم شده از نظر بیماری فاسولیازیس و دیکرولیازیس در کشتارگاه های لرستان در طی یه دوره سه ساله به تعداد ۳۹٦۱۳ (۱۱/۱ ٪) می باشد و از کل کبدهای معدوم شده به میزان ٦/۳ ٪ به فاسیولیازیس آلوده بوده اند. آلودگی در گوسفند نسبت به بز هم بیشتر بود. *فاسیولا* در گوسفند، در فصول بهار و پاییز شایع بود (۱۸). این مطالعه و مطالعه حاضر اهمیت بیماری را از نظر خسارات اقتصادی نشان می دهد.

نتایج این مطالعه نشان داد که روش LAMP از حساسیت و دقت بیشتری در مقایسه با روش PCR برخوردار بود و بنابراین این روش می‌تواند برای تشخیص *فاسیولا هپاتیکا* به‌عنوان یک روش کارآمدتر می‌تواند استفاده شود.

فهرست منابع

1- Hosseini-Safa A. Rokni MB. Mosawi SH. Heydarian P. Azizi H. Davari A. et al. High-resolution melting analysis as an appropriate method to differentiate between Fasciola hepatica and F. gigantica. Iranian Journal of Public Health. 2019; 48: 501-507.

2- John BC. Davies DR. Williams DJL. Hodgkinson JE. A review of our current understanding of parasite survival in silage and stored forages, with a focus on Fasciola hepatica metacercariae. Grass Forage Science. 2019; 74: 211–217.

3- Chen MG. Mottm KE. Progress in assessment of morbidity due to Fasciola hepatica infection: a review of recent literature. Tropical Disease Bulletin. 1999; 87: 1-38.

4- Zooghi E. Yousefivand J. Hajikhani R. Human fasioliasis in some countries. Ghalamestan Honar. 2004; P 12-15 [in persian].

5- Lotfy WM. El-Morshedy HN. Abou El-Hoda, M. El-Tawila, M.M. Omar,

E.A. & Farag, H.F. Identification of the Egyptian species of Fasciola. Veterinary Parasitology. 2002;103(4):323–32.Mercer DK, Stewart CS. Keratin hydrolysis by dermatophytes. Medical Mycology. 2019;57(1):13-22.

6- Martínez-Valladares M. Rojo-Vázquez FA. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the diagnosis of fasciolosis in sheep and its application under field conditions. Parasites & Vectors. 2016; 9:73.

7- Notomi T. Okayama H. Masubuchi H. Yonekawa T. Watanabe, K. Amino, N. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Research. 2000; 28(12): E63.

8- Krasteva D. Toubiana M. Hartati S. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) as a diagnostic tool of toxoplasmosis. Veterinary Parasitology. 2009; 162: 327–331.

9- Kialashaki E. Sharif M. Fakhar M. Daryani A. Paghe AS. Assessing Different Methods of DNA Extraction from Giardia Lamblia Cysts. Journal Mazandaran University Medical Sciences. 2013; 23(98): 67-74. [in persian].

10- Ai L. Li C. Elsheikha HM. Hong SJ. Chen JX. Chen SH. et al. Rapid identification and differentiation of Fasciola hepatica and Fasciola gigantica by a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. Veterinary Parasitology. 2010; 174(3-4): 228-233.

11- Mizani A. Gil P. Sarvari Sh. Daryani A. Sharif M. Amooei A. et al. Detection and differentiation of Fasiola hepatica and Fasiola gigantica by loop-mediated Isothermal Amplification. Mazandaran Medical University Journal. 2016; 145:45-53. [in persian].

12- Mizani A. Gill P. Sarvi Sh. Daryani A. Sharif M. Rahimi MT. et al. Journal Mazandaran University Medical Sciences. 2015; 25(122): 72-80. [in persian].

13- Dalton JP. Robinson MW. Mulcahy G. O'Neill SM. Donnelly S. Immunomodulatory molecules of Fasciola hepatica: Candidates for both vaccine and immunotherapeutic development. Veterinary Parasitology. 2013; 195: 272–285. https ://doi.org/10.1016/j. vetpar.2013.04.008.

14- Ni XW. McManus DP. Lou ZZ. Yang JF. Yan HB. Li L. et al. A comparison of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) with other surveillance tools for Echinococcus granulosus diagnosis in canine definitive hosts. Parasites & Vectors. 2014; 9(7): 254.

15- Kazemi F. Arjmand R. Tavalla M. Prevalence of toxocara species in park soils of Ahvaz City, southwest of Iran. Asian Pacific Journal of Tropical Disease. 2017; 7(12): 705-707. https://doi.org/10.12980/apjtd.7.2017D7-173

16- Pazooki Ghoohe H. Haghparast B. Fakhar M. Common and novel methods for laboratory detection and identification of Leishmaniosis. Mazandaran Medical University Journal. 2015; 132; 345-361.

17- Kudyba HM. Louzada J. Ljolje D. Kudyba K. Muralidharan V. Oliveira‐Ferreira J. et al. Field evaluation of malaria malachite green loop‐mediated isothermal amplification in health posts in Roraima state, Brazil. Malaria Journal. 2019; 18: 98-105. https://doi.org/10.1186/s12936-019-2722-1.

18- Ezatpour B. Hasanvand A. Azami M. Anbari Kh. Ahmadpour F. Prevalence of liver fluke infections in slaughtered animals in Lorestan Iran. Journal of Parasitic Disease. 2015; 39, 725–729. https://doi.org/10.1007/s12639-014-0428-4