تشخیص بیماریها با استفاده از Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) در دامپزشکی

مژگان احمدی

۱_دستیار تخصصی کلینیکال پاتولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد واحد علوم تحقیقات تهران

پست الکترونیکی نویسنده مسئول: **Mojgan.ahmadi@gmail.com**

مقدمه و هدف : نیاز به روشی ساده تر، با کارایی بالاتر، سریعتر و ارزانتر نسبت به روشهای موجود جهت تشخیص بیماریهای دامپزشکی روش واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) ، روشی سریع و حساس می باشد که قادر است تعداد نسخه اندکی از DNA هدف را تا سطحی که توسط ژل الکترفورز قابل تشخیص باشد، تکثیر نماید.بعلت کارایی بالا و قدرت زیاد PCR ، این روش در سالهای اخیر بطور گسترده ای در تشخیص پاتوژن های مختلف بیماریزا اعم از ویروسی، باکتریایی، انگلی و ... بکار گرفته شده است، که اگرچه این روش دارای مزایای بسیاری است اما دارای محدودیت هایی نیز می باشد که از آن جمله میتوان به این موارد اشاره کرد: استفاده از چرخه های حرارتی جهت تکثیر (۳۰ تا ۴۰ چرخه)، استفاده از دستگاه گران ترموسایکلر و ..

روش جدید " تکثیر هم دمای DNA وابسته به حلقه " "Loop-Mediated Isothermal Amplification – LAMP" در سال ۲۰۰۰ معرفی گردید که در آن DNA با ویژگی، کارآیی و سرعت بالا در یک دما تکثیر میشود. در این روش از۶ – ۴ پرایمر استفاده میشود که در مجموع ۸ – ۶ ناحیه ژنی از DNA هدف را مورد شناسایی قرار داده و طی فرآیندی دنباله دار و با تشکیل نواحی سنجاق سری در دمای ۶۰ تا ۶۵ درجه سانتیگراد و استفاده از یک آنزیم DNA پلی مراز مقاوم به حرارت، تکثیر می یابد.

مواد و روش کار: روش LAMP نیازی به مرحله واسرشت سازی (Denaturation) اسید نوکلئیک دو رشته ای به تک رشته ای برای شروع واکنش پلی مریزاسیون ندارد و حتی بدون واسرشت سازی اولیه، واکنش به راحتی انجام میشود و چون در اینجا هیچ زمانی جهت تغییر دما از دست نمی رود و واکنش در دمای بهینه فعالیت آنزیم به شکل پیوسته انجام می گیرد ، ۱۰ تا ۲۰ میلی گرم از DNA هدف در ۲۵ µl از مخلوط واکنش درعرض ۳۰ تا ۶۰ دقیقه تکثیر می یابد. هزینه کلی در این روش بسیار کاهش می یابد چراکه LAMP نیازی به مواد شیمیایی ویژه یا دستگاه های گران قیمت آزمایشگاهی ندارد.

نتایج و بحث: مزایای LAMP باعث گردیده تا بعنوان روشی دقیق و سریع در تشخیص پاتوژنها، در مناطقی که امکان استفاده از آزمایشگاه های روتین وجود ندارد، قابل استفاده باشد.

واژه های کلیدی: DNA ، LAMP، پرایمر، پلی مریزاسیون، واسرشت سازی

بررسی میزان پراکندگی و آنالیز فیلوژنتیکی مایکوپلاسماهای هموتروپیک گربه

سید میلاد واحدی[1*]، رامین مظاهری نژاد فرد[2]، مهشید بلورچیان[3]، شکوفه ابوالقاسم پور[3]، سید جاوید آل داود[4]

۱_دانشجوی دکتری حرفه ای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران ۲_ آزمایشگاه رفرانس دکتر رستگار، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران
۳_ دانشجوی دکتری حرفه ای دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران ۴_ گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران

پست الکترونیکی نویسنده مسئول: **milad_vahed@ut.ac.ir**

مقدمه و هدف: مایکوپلاسماهای هموتروپیک (سابقا هموبارتونلا) گربه، انگل‌های خارجی گلبول‌های قرمز و شامل سه گونه Mycoplasma haemofelis، Candidatus mycoplasma haemominutum و Candidatus mycoplasma turicensis می‌باشند. مایکوپلاسماهای هموتروپیک می‌توانند موجب آنمی همولیتیک، تب، بی‌حالی و زردی در گربه‌سانان شوند. تشخیص عفونت با این میکروارگانیسم‌ها از طریق روش‌های سیتولوژیک روی گستره خونی صورت می‌گیرد اما با توجه به میزان خطا و نتایج مثبت کاذب بالا در این روش ها، فناوری واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) روشی دقیق تر برای تشخیص عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها می‌باشد.

مواد و روش کار: تعداد ۶۰ نمونه خون حاوی ماده ضد انعقاد جمع آوری شده از درمانگاه‌های دامپزشکی شهر تهران بین سال‌های ۱۳۹۰ تا ۱۳۹۱ مورد ارزیابی قرار گرفت. رنگ‌آمیزی گیمسا برروی گستره‌های‌های خونی انجام شد و همچنین آزمایش CBC برای تمامی نمونه‌های خونی صورت گرفت. نمونه‌های خونی بوسیله میکروسکوپ نوری از لحاظ وجود انگل هموبارتونلا مورد بررسی قرار گرفتند و نمونه‌های مثبت جهت استخراج DNA و آنالیز PCR استفاده شدند. به منظور تفریق سویه‌های C. M. turicensis و M. haemofelis از یکدیگر و نیز بررسی فیلوژنتیکی جدایه‌ها، نمونه‌های PCR مثبت توالی یابی شدند. سپس این توالی ها با سایر توالی‌های پایگاه داده‌های ژنی GenBank مقایسه گردیدند و درخت فیلوژنتیکی رسم شد.

نتایج و بحث: از میان ۶۰ نمونه خونی اخذ شده، ۳۲ نمونه در بررسی‌های میکروسکوپی از نظر مایکوپلاسمای هموتروپیک مثبت تشخیص داده شدند. از ۳۲ نمونه مثبت میکروسکوپی در این مطالعه، تنها دو مورد (۶٫۲۵٪) با استفاده از روش PCR از نظر M. haemofelis مثبت بودند و هیچ نمونه مثبت C. M. hamemominutum یا C. M. turicensis یافت نشد. آنالیز فیلوژنتیکی سویه‌های جدا شده در این مطالعه و سایر توالی‌های ژن 16S rRNA متعلق به سویه‌های M. haemeofelis موجود در GenBank نشان می‌دهد که شباهت این دو سویه با سویه‌های جدا شده از کشور چین و تایلند بیشتر از سایر سویه‌ها می‌باشد. این مطالعه از اولین گزارشات میزان شیوع مایکوپلاسماهای هموتروپیک گربه و اولین گزارش از بررسی فیلوژنتیکی سویه‌های جدا شده در ایران است. تفاوت زیاد در میزان شیوع به دست آمده از تشخیص میکروسکوپی (۵۳٫۳۳٪) و روش PCR (۶٫۲۵٪)، عدم کفایت روش مشاهده مستقیم را در تشخیص این بیماری به اثبات می‌رساند. بر اساس شباهت بالای توالی‌های سویه‌های جدا شده در ایران، چین و تایلند در آنالیز فیلوژنتیکی می‌توان استنباط کرد که احتمالا باکتری‌های جدا شده دارای منشایی مشترک می‌باشند و این احتمال وجود دارد که پراکنش سویه‌های جدا شده در ایران ناشی از ورود گربه‌های آلوده از این کشورها بوده است.

واژه های کلیدی: مایکوپلاسما هموتروپیک، گربه، خون، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، تهران