



بهینه سازی روش HRM-Real Time PCR برای تشخیص کرم قلب

منشوری قایشقورشاق^{۱*}، حسینی، س.ح.^۲، جالوسیان، ف.^۳

خلاصه

مطالعه اکولوژی انگلهای سگ های ولگرد از اهمیت زیادی برخوردار است. با توجه به امکان انتقال انگل های مشترک از سگ های ولگرد به انسان، این انگل ها از جمله خطرات بالقوه جوامع انسانی امروز محسوب می شود که نیاز به مطالعات جامع دارد. دیروفیلاریا ایمیتیس انتشار جهانی دارد و ایران یکی از مناطق اندمیک برای این آلودگی است. از این رو، تحقیق حاضر با هدف بررسی آلودگی به دیروفیلاریا ایمیتیس در سگ های ولگرد استان های گیلان، قزوین و مازندران با استفاده از روش HRM Real -Time PCR و مقایسه آن با روش PCR معمولی انجام شد. مهمترین سوال تحقیق این بود که: آیا روش HRM Real -Time PCR قادر به تفریق گونه های فیلرهای آلوده کننده سگ در ایران و همچنین قادر به تشخیص عفونت مخفی است؟ به این منظور در بررسی حاضر، نمونه خون های حاوی ضد انعقاد از ۱۳۸ قلاده سگهای ولگرد در استانهای گیلان، مازندران و قزوین با روش مولکولی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

در این مطالعه قسمتی از ژن coxI دیروفیلاریا ایمیتیس (به طول ۲۵۶ bp) تکثیر گردید. روش HRM Real -Time PCR با استفاده از دستگاه روتورژن انجام شد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که در مجموع از ۱۳۸ نمونه جمع آوری شده از سه استان گیلان، مازندران و قزوین با روش PCR معمولی و HRM Real -Time PCR ۴۷/۸٪ از نمونه ها مثبت شدند. در مطالعه حاضر حساسیت روش HRM Real -Time PCR ۱۰۰٪ حاصل شد (حساسیت و ویژگی براساس روش استاندارد طلایی PCR و تعیین توالی قطعه های تکثیر شده، محاسبه شد) ویژگی هر دو روش ۱۰۰٪ است. نتایج HRM Real -Time PCR نشان داد که PCR براساس ژن coxI انگل قادر به تشخیص آلودگی است. نمونه هایی که PCR مثبت بودند، دارای میانگین دمای ذوب °C ۷۶/۶۶ بودند، این توالی ها در سطح نوکلئوتید اختلاف ۱-۲٪ داشتند، اما ترجمه این توالی ها به اسید آمینه مشابه ۱۰۰٪ نشان داد، به عبارت دیگر دمای ذوب قادر به تفریق ۱-۲٪ اختلاف در سطح نوکلئوتید بود. اما در نمونه های مورد بررسی در مطالعه حاضر اختلافی در سطح گونه دیروفیلاریا ایمیتیس یا احتمال سویه زایی مشاهده نشد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که به منظور تشخیص آلودگی سگها به دیروفیلاریازیس لازم است روشهای ملکولی بکار گرفته شوند و روش HRM Real -Time PCR که مبتنی بر تغییرات دمای ذوب ناشی از اختلاف در سطح نوکلئوتید ها است، می تواند به منظور تفریق گونه فیلر آلوده کننده استفاده شود.

کلمات کلیدی: بیماری کرم قلب، ژن coxI، روش HRM Real -time PCR، تعیین توالی ژن سیتوکروم اکسیداز ۱

۱. دانشجویی کارشناسی ارشد گروه انگل شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران.

۲. گروه انگل شناسی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران.

*نویسنده مسؤول: fatemeh.manshori@ut.ac.ir



مقدمه

(کرم قلب) که نشاندهنده درگیری اولیه قلب است محل عمده کرمها و اولین آسیب وارده در سرخرگهای ریوی است و بیماری کرم قلب باید بعنوان بیماری ریوی در نظر گرفته شود که در مرحله انتهایی آن فقط حفره راست قلب درگیر می گردد. چند روز بعد از رسیدن کرم قلب به سرخرگهای پشتی ریوی، سلولهای اندوتلیال در اثر تروما ملتهب می شوند. نوتروفیلها به سطح اندوتلیوم می چسبند و به فضای بین سلولها وارد می شوند. با آسیب دیدن سطح سرخرگی آلبومین، مایعات پلاسما و خون به فضای اطراف رگ راه می یابند. با این تغییرات پوشش رگها با مایعات، ضخیم شده و لکوسیتها به دیواره حمله نموده و سلولهای عضلات صاف در سطح رگها تکثیر یافته و به سمت سطح داخل رگی در واکنش به فاکتور رشد آزاد شده از پلاکتها مهاجرت میکنند.

بیماری ریه بطور ثانویه متعاقب تغییرات عروق رخ میدهد. نشت پروتئین و مایعات از دیواره سرخرگ عفونی باعث بروز ادم در پارانشیم میشود. مرگ خودبخودی برخی کرمها می تواند باعث بروز ترومبومبولی و واکنشهای شدید التهابی گردد.

عفونت فیلاریایی در سراسر جهان با عوامل مختلفی گونه های مختلف نماتودها دیده شده است اما دیروفیلاریا ایمیتیس اهمیت بیشتری نسبت به سایر گونه ها در سگ دارد. دلیل اهمیت آن، بیماری شدید و کشنده های به نام بیماری کرم قلب و همچنین نقش آن به عنوان بیماری مشترک می باشد (al et Simón, 2007).

HRM¹ روشی جدید است که آنالیز تغییرات ژنتیکی (انواع موتاسیونها مانند موتاسیونهای تک نوکلئوتیدی و متیلاسیونها) را مقدر می سازد. HRM نمونه های اسید نوکلئیک را بر اساس توالی، طول و درصد GC متمایز میسازند.

از آنجایی که در مطالعات گذشته آلودگی سگهای ولگرد، گله و نگهبان به این انگل از ایران با روش های نات اصلاح شده و پی سی آر معمولی گزارش شده است (حسینی، ۱۳۹۳). لذا ارائه روش تشخیصی سریع که با حساسیت و ویژگی قابل قبول و با رفع کاستی های روش های قبل مانند محدودیت حساسیت روش های نات اصلاح شده و نیاز به تعیین توالی در روش پی سی آر معمولی قادر به تفریق گونه های دیروفیلاریا باشد از مهم ترین اهداف مطالعه حاضر است. روش HRM از طریق کاهش زمان تکثیر، حذف مرحله آشکار سازی پس از تکثیر، عدم نیاز به تعیین توالی، حساسیت بالا و ساده بودن تکنیک می تواند در این زمینه معرفی شود. با توجه به سرعت روش ملکولی فوق و همچنین حساسیت بالای آن در تشخیص تغییرات نوکلئوتیدی بنظر می رسد میتوان از این روش برای شناسایی سریع و با دقت بالای گونه های

1. High Resolution Melting

دیروفیلاریا استفاده کرد.

مواد و روش کار:

در مطالعه حاضر به منظور بررسی آلودگی و تشخیص تفریقی میکروفیلرهای دیروفیلاریا در سگ به شرح زیر انجام گرفت.

روش های ملکولی PCR معمولی جهت تعیین توالی و HRM RealtimePCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی سیتوکروم اکسیداز صورت پذیرفت (جدول ۱-۲-۳-۴-۵).

جمع آوری نمونه ها:

مناطق جمع آوری نمونه ها از سه استان گیلان و قزوین و مازندران انتخاب شدند و نمونه گیری تصادفی از سگ های ولگرد انجام شد. و تعیین حجم نمونه براساس تخمین ۱۰٪ و سطح اطمینان ۹۵٪ آلودگی از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$n = \frac{z^2 \times p(1-p)}{d^2} = \frac{(1.96)^2 \times 0.1(0.9)}{(0.05)^2} = 138 = \text{نمونه}$$

متغیر مورد مطالعه در بررسی حاضر، آلودگی به وجود میکروفیلر یا عدم وجود میکروفیلر است، که یک متغیر کیفی، وابسته و می باشد. (نمونه ها از نظر حضور یا عدم حضور میکروفیلر ارزیابی می شوند).

روش ملکولی

بدین منظور از روشهای PCR معمولی و Real-TimePCR HRM استفاده شد.

استخراج DNA با استفاده از کیت MBST ایران انجام شد.

ارزیابی DNA با روش الکتروفورز افقی

۱. مواد و وسایل مورد نیاز:

قالب، شانه ۸ تایی مخصوص ژل، دستگاه مولد برق، دستگاه UV، Safe Red آگاروز، بافر 0.5xTBE، بافر بارگذاری و مارکر.

روش اجرا: ابتدا جهت تهیه ی ژل ۱ درصد مقدار ۰/۲۵ گرم آگاروز در ۲۵ میلی لیتر بافر 0.5xTBE

0.5xTBE ریخته شد و همراه با یک مگنت روی هیتر قرار داده شد و پس از شفاف شدن محلول، ۱/۲۵ میکرولیتر رنگ Safe Red را داخل آن ریخته سپس محلول حاضر، داخل قالب که شانه ۸ تایی در آن قرار داشت، ریخته شد. پس از انعقاد ژل، مقدار ۸ میکرولیتر از هر نمونه DNA ۲ میکرولیتر بافر بارگذاری مخلوط گردید و به داخل چاهک های ایجاد شده انتقال یافت و به مدت تقریبی ۴۵ دقیقه تحت الکتروفورز با ولتاژ ۱۰۰ قرار گرفت. پس از اتمام الکتروفورز، ژل با استفاده از دستگاه Documentation Gel تحت مشاهده و عکس برداری قرار گرفت (تصویر ۱).

انتخاب پرایمر جهت PCR در مطالعه حاضر از پرایمرهای یونیورسال طبق جدول ۱ استفاده شد.



جدول ۱. مشخصات پرایمرهای یونیورسال

Primer Name	Accession number	Primer sequence	Size bp	Tm	PCR product Length	Journal
COXdirM-HRMF	AM749226.1 AM749234.1	AGTATGTTT-- '5 GTTTGAACTC- '3	20	57.5 C°	256	Parasit Vectors. 2015; 8: .170 Alicia Rojas etal
COXdirM-HRMR	AM749226.1 AM749234.1	AACGATCCT-- '5 TATCAGTCAA- '3	19	57.5 C°	256	Parasit Vectors. 2015; 8: .170 Alicia Rojas etal

بدین منظور از دستگاه ترموسایکلر (شرکت بیوراد، ساخت کشور آمریکا) استفاده شد.

مواد مورد نیاز:

۱. DNA الگو (استخراج شده در مرحله قبل)

۲. پرایمرهای اختصاصی

۳. Mix Master PCR

۴. آب دو بار تقطیر استریل

۵. خلاصه مراحل واکنش زنجیره ای پلی مرز در جداول ۳-۲ شان داده شده است.

نحوه آماده سازی پرایمرها برای انجام PCR

پرایمرها جهت سنتز به شرکت سیناکلون سفارش شدند. طبق دستورالعمل شرکت سینا کلون غلظت میکرومولار ۱۰۰ از هر کدام از پرایمرها تهیه گردید، سپس از این غلظت ۱۰۰ میکرومولار پرایمر با آب مقطر استریل غلظت ۱۰ میکرومولار ساخته شد. در واکنش های PCR معمولا غلظت ۰/۵ تا ۰/۱ میکرومولار پرایمر مورد استفاده قرار می گیرد. ۱ میکرولیتر از استوک ۱۰ میکرومولاری پرایمر در یک واکنش ۲۰ میکرولیتری، غلظت نهایی ۰/۵ میکرومولار پرایمر حاصل می شود. واکنش زنجیره ای پلی مرز

جدول ۲. انجام واکنش PCR برای حجم ۲۵ μl برای ژن COX دیروفلاریا ایمیتیس

Material	Consentration	Totale Volume
MasterMix	2X	12/5 μl
Primer 1F	10 μmol	1/0 μl
Primer 1R	10 μmol	1/0 μl
DNA	-----	3 μl
DDW	-----	7/5 μl

*پرایمرها در این واکنش در غلظت نهایی ۰/۴ میکرومولار استفاده شدند.



جدول ۳. برنامه دمایی، برای تکثیر قطعه ۲۵۶ bp جفت بازی از ژن COX دیروفلاریا ایمیتیس

مرحله (Stage)	واسرشت اولیه (Predenature)	واسرشت (Denature)	اتصال (Anneling)	تکثیر (Extension)	تکثیر نهایی (Final Extension)
دما (درجه سانتیگراد)	۹۴	۹۴	۵۸	۷۲	۷۲
زمان (ثانیه)	۲۴۰	۲۵	۳۰	۴۰	۴۲۰

جدول ۴. انجام واکنش HRM Real Time- PCR برای حجم ۲۰ μl برای ژن COX دیروفلاریا ایمیتیس

Material	Concentration	Total Volume
MasterMix	2X	10 μl
Primer 1F	10 μmol	0/5 μl
Primer 1R	10 μmol	0/5 μl
DNA	-----	4 μl
DDW	-----	4/4 μl
SYTO-9		0/6 μl

*پرایمرها در این واکنش در غلظت نهایی ۰/۲ میکرومولار استفاده شدند.

جدول ۵. برنامه دمایی، برای تکثیر قطعه ۲۵۶ bp جفت بازی از ژن COX در بررسی دیروفلاریا ایمیتیس با روش PCR Time- Real HRM

مرحله (Stage)	واسرشت اولیه (Predenature)	واسرشت (Denature)	اتصال (Anneling)	تکثیر (Extension)	تکثیر نهایی (Final Extension)
دما (درجه سانتیگراد)	۹۵	۹۵	۵۸	۷۲	۷۲
زمان (ثانیه)	۲۴۰	۵	۱۵	۱۰	۲۴۰

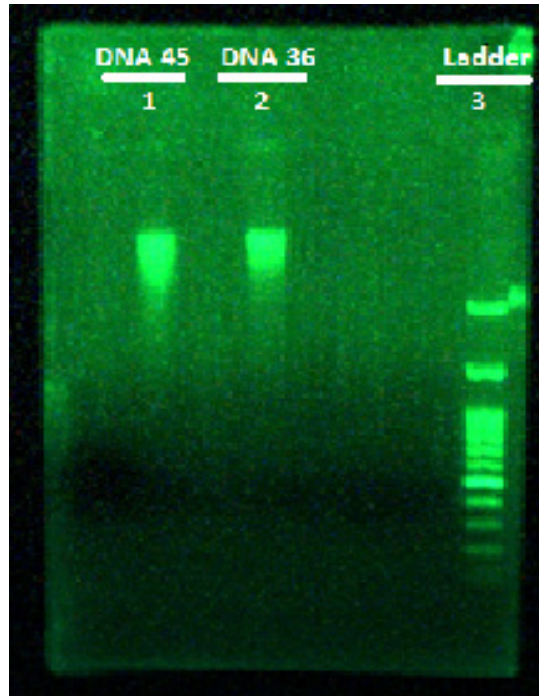
در مطالعه حاضر نتایج بررسی نمونه خون ها با روش PCR معمولی، قطعه ای بطول ۲۵۶ bp از ژن *cox1* دیروفلاریا ایمیتیس را تکثیر نمود. شکل (۳-۲) براساس نتایج PCR و تعیین توالی آلو دگی به میکروفلر دیروفلاریا ایمیتیس با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن *cox1* در استان های گیلان، مازندران و قزوین به ترتیب ۶۱/۳٪، ۵۲/۹٪ و ۲۸/۲٪ گزارش گردید.

بعد از مرحله اول جدا سازی رشته DNA که در دمای ۹۵ درجه به مدت ۴ دقیقه می باشد بقیه سیکلها ۵۰ بار تکرار می شود جدول (۴-۵).

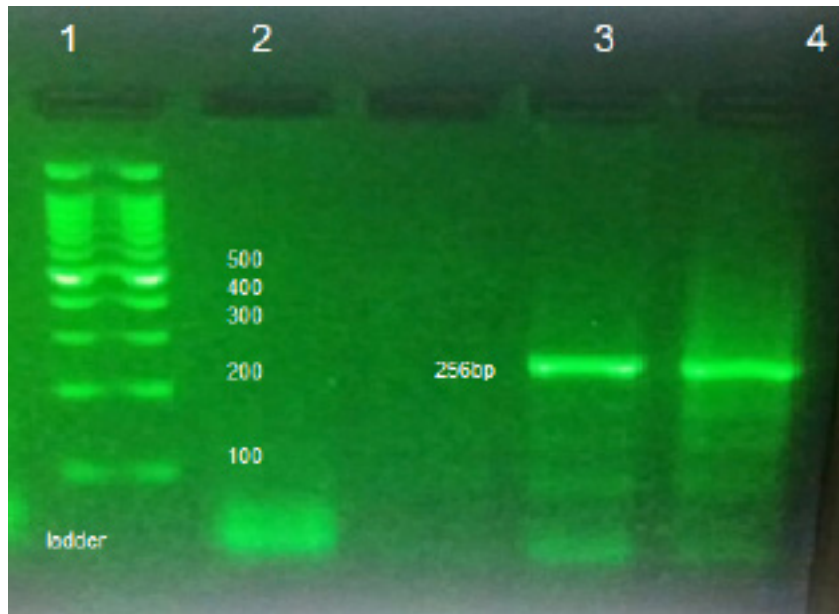
بعد از پایان Real Time - PCR ما دما را از ۷۰ درجه تا ۸۵ درجه به اندازه ۰/۲ درجه افزایش می دهیم تا فلورسانس کاهش یابد.

نتایج :

نتایج روش ملکولی (PCR معمولی



شکل ۱. تصویر ژل الکتروفورز، استخراج DNA نمونه های شماره ۳۶ و ۴۵ بر روی ژل آگارز ۱٪ در کنار مارکر bp100



شکل ۲. تصویر ژل الکتروفورز ژن COX دیروفلاریا ایمیتیس، باندی به طول 256bp

۱. مارکر ۱۰۰ bp

۲. نمونه کنترل منفی، نمونه فاقد DNA

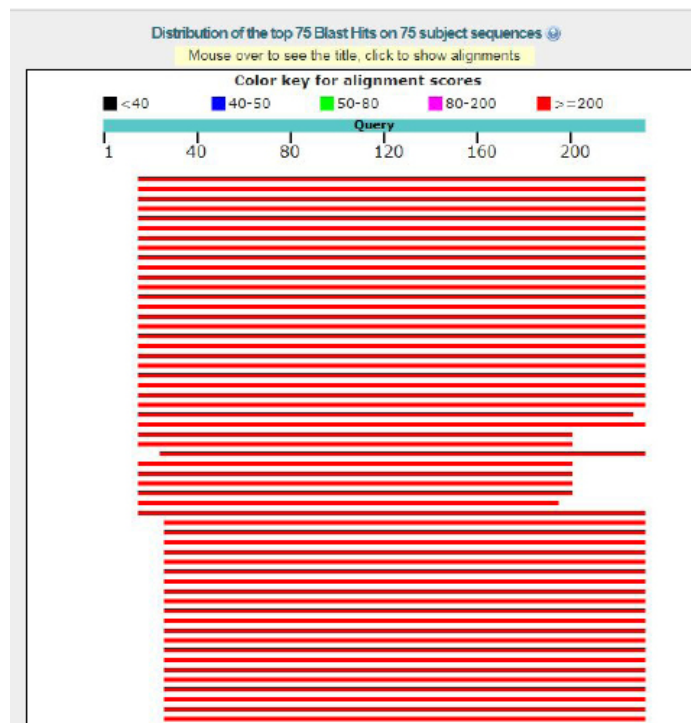
۳. نمونه شماره ۳۶ به عنوان کنترل مثبت

۴. نمونه شماره ۱۸



دیروفلاریا ایمیتیس (ژن COX1) فرانسه ۲۰۱۷		دیروفلاریا ایمیتیس (ژن COX1) ایران ۲۰۱۵		دیروفلاریا ایمیتیس (ژن COX1) اسپانیا ۲۰۱۶		بانک ژن
						مطالعه حاضر
درصد اختلاف	درصد تشابه	درصد اختلاف	درصد تشابه	درصد اختلاف	درصد تشابه	دیروفلاریا ایمیتیس (ژن) سیتوکروم اکسیداز (۱) از مطالعه حاضر با شماره ثبت ۲۰۹۴۳۴۴# دربانک جهانی ژن (این نمونه دارای نتیجه نات منفی و PCR مثبت بود.
1%	KP760184 99%	1%	KT960976.1 99%	1%	Lc107816.1 99%	

جدول ۶ نتایج مقایسه توالی ژن COX1 دیروفلاریا ایمیتیس در مطالعه حاضر با توالی های منتشر شده در بانک جهانی ژن از ایران و سایر نقاط دنیا





Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 0

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Dirofilaria immitis mitochondrial COX1 gene for cytochrome c oxidase subunit 1, partial cds, isolate Dan_Ec-11E2A	394	394	93%	2e-111	99%	LC107816.1
Dirofilaria immitis isolate Mesh-Iran1 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds, mitochondrial	394	394	93%	2e-111	99%	KT980976.1
Dirofilaria immitis voucher 79YT MNHN cytochrome c oxidase subunit I (cox1) gene, partial cds, mitochondrial	394	394	93%	2e-111	99%	KP760184.1
Dirofilaria immitis cytochrome oxidase subunit I gene, partial cds, mitochondrial	394	394	93%	2e-111	99%	K8870344.1
Dirofilaria immitis isolate Mesh-Iran2 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds, mitochondrial	394	394	93%	2e-111	99%	KT318126.1
Dirofilaria immitis isolate D1H01 cytochrome c oxidase subunit 1 (cox1) gene, partial cds, mitochondrial	394	394	93%	2e-111	99%	KT282097.1
Dirofilaria immitis isolate D1Kb01 cytochrome c oxidase subunit 1 (cox1) gene, partial cds, mitochondrial	394	394	93%	2e-111	99%	KT321862.1
Dirofilaria immitis isolate D1Kb55 cytochrome c oxidase subunit 1 (cox1) gene, partial cds, mitochondrial	394	394	93%	2e-111	99%	KT351951.1
Dirofilaria immitis isolate D1Kb54 cytochrome c oxidase subunit 1 (cox1) gene, partial cds, mitochondrial	394	394	93%	2e-111	99%	KT351860.1
Dirofilaria immitis isolate D1Kb40 cytochrome c oxidase subunit 1 (cox1) gene, partial cds, mitochondrial	394	394	93%	2e-111	99%	KT351849.1
Dirofilaria immitis isolate HU236 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds, mitochondrial	394	394	93%	2e-111	99%	KM452826.1
Dirofilaria immitis isolate HU73 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds, mitochondrial	394	394	93%	2e-111	99%	KM452921.1
Dirofilaria immitis isolate HU11 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds, mitochondrial	394	394	93%	2e-111	99%	KM452820.1
Dirofilaria immitis isolate f630 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds, mitochondrial	394	394	93%	2e-111	99%	KF982101.1
Dirofilaria immitis cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds, mitochondrial	394	394	93%	2e-111	99%	KC107302.1
Dirofilaria immitis mitochondrial partial COI gene for cytochrome oxidase subunit I, specimen voucher M18701(1483)	394	394	93%	2e-111	99%	FN091853.1
Dirofilaria immitis mitochondrial partial COI gene for cytochrome oxidase subunit I, specimen voucher M1 IT DI M1	394	394	93%	2e-111	99%	AM749228.1
Dirofilaria immitis mitochondrial partial COI gene for cytochrome oxidase subunit I, specimen voucher M1 IT DI GEN3	394	394	93%	2e-111	99%	AM749228.1

Download GenBank Graphics

Dirofilaria immitis isolate Mesh-Iran1 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds, mitochondrial

Sequence ID: [KT980976.1](#) Length: 602 Number of Matches: 1

Range 1: 209 to 514 GenBank Graphics Next Match Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
394 bits(213)	2e-111	215/216(99%)	0/216(0%)	Plus/Plus
Query 16	TTGTAATGACAGTCCCTGTTGGCTGGTCTTATTATTTGTTGGATCGTAA	75		
Sbjct 299	TGTAATGTCAGTCCCTGTTGGCTGGTCTTATTATTTGTTGGATCGTAA	358		
Query 76	TTAATACTCTTTTATGATGCTAATAAGGGGGTAATCCCTATGATCAGCATTTGT	135		
Sbjct 359	TTAATACTCTTTTATGATGCTAATAAGGGGGTAATCCCTATGATCAGCATTTGT	418		
Query 136	TTTGGTTTTTGGACATCCTGAGGTTATGTTATTATTTACCGGTGTTGGGATTGTTA	195		
Sbjct 419	TTTGGTTTTTGGACATCCTGAGGTTATGTTATTATTTACCGGTGTTGGGATTGTTA	478		
Query 196	GTGAATGTGTTTTATTTTGGACTGATAAGGATCGTT	231		
Sbjct 479	GTGAATGTGTTTTATTTTGGACTGATAAGGATCGTT	514		

Download GenBank Graphics

Dirofilaria immitis voucher 79YT MNHN cytochrome c oxidase subunit I (cox1) gene, partial cds, mitochondrial

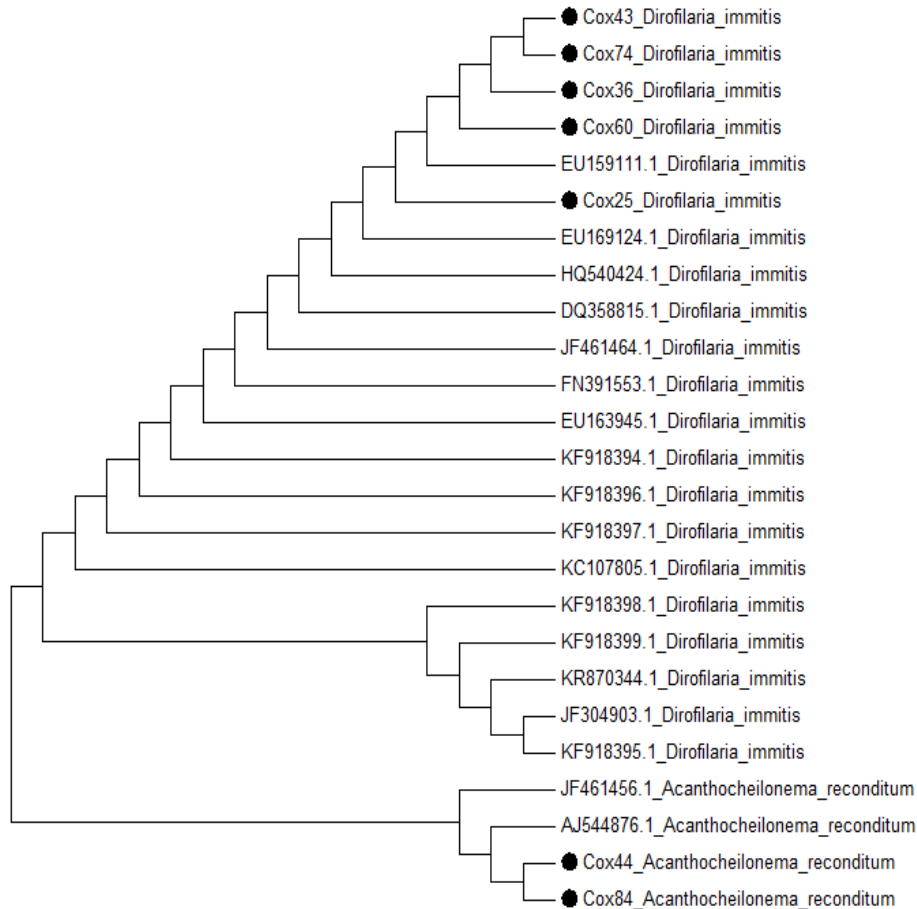
Sequence ID: [KP760184.1](#) Length: 578 Number of Matches: 1

Range 1: 304 to 519 GenBank Graphics Next Match Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
394 bits(213)	2e-111	215/216(99%)	0/216(0%)	Plus/Plus
Query 16	TTGTAATGACAGTCCCTGTTGGCTGGTCTTATTATTTGTTGGATCGTAA	75		
Sbjct 304	TGTAATGTCAGTCCCTGTTGGCTGGTCTTATTATTTGTTGGATCGTAA	363		
Query 76	TTAATACTCTTTTATGATGCTAATAAGGGGGTAATCCCTATGATCAGCATTTGT	135		
Sbjct 364	TTAATACTCTTTTATGATGCTAATAAGGGGGTAATCCCTATGATCAGCATTTGT	423		
Query 136	TTTGGTTTTTGGACATCCTGAGGTTATGTTATTATTTACCGGTGTTGGGATTGTTA	195		
Sbjct 424	TTTGGTTTTTGGACATCCTGAGGTTATGTTATTATTTACCGGTGTTGGGATTGTTA	483		
Query 196	GTGAATGTGTTTTATTTTGGACTGATAAGGATCGTT	231		
Sbjct 484	GTGAATGTGTTTTATTTTGGACTGATAAGGATCGTT	519		

شکل ۳. نتیجه همردیف سازی توالی ژن سیتوکروم اکسیداز یک دیروفیلاریا ایمیتیس از نمونه شماره ۶۰ با

شماره ثبت # ۲۰۹۴۳۴۴ با بانک جهانی ژن.



شکل ۴. شجره شناسی (فیلوژنی) دیروفیلاریا ایمیتیس

- ایمیتیس ۷۶/۶۵ Tm:
۲. منحنی قرمز پررنگ نمونه شماره ۲۵ ژن COX دیروفیلاریا ایمیتیس به عنوان کنترل مثبت ۷۶Tm/۶۶:
۳. منحنی قهوه‌ای رنگ نمونه شماره ۶۰ ژن COX دیروفیلاریا ایمیتیس ۷۶/۶۵ Tm:
۴. منحنی قرمز رنگ نمونه شماره ۷۲ ژن COX دیروفیلاریا ایمیتیس ۷۶/۶۶ Tm:
۵. منحنی سبزرنگ نمونه شماره ۵۴ ژن COX دیروفیلاریا ایمیتیس ۷۶/۶۳ Tm:
۶. منحنی صورتی رنگ نمونه شماره ۸۱ به عنوان کنترل منفی نمونه شماره ۲۵ که به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد، قبل از انجام HRM برای تایید ژن COX دیروفیلاریا ایمیتیس تعیین توالی شد و بعد از تایید ژن COX به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

براساس توالی ژن سیتوکروم اکسیداز ۱ شماره دستیابی توالی ها در بانک ژن در درخت فیلوژنی آورده شده است.

توالی نوکلئوتیدی جدایه های دیروفیلاریا ایمیتیس در مطالعه حاضر با بانک ژن تشابه ۹۹-۱۰۰٪ نشان دادند، همانطور که در درخت مشاهده می شود تمام توالی ها در یک خوشه قرار گرفته اند.

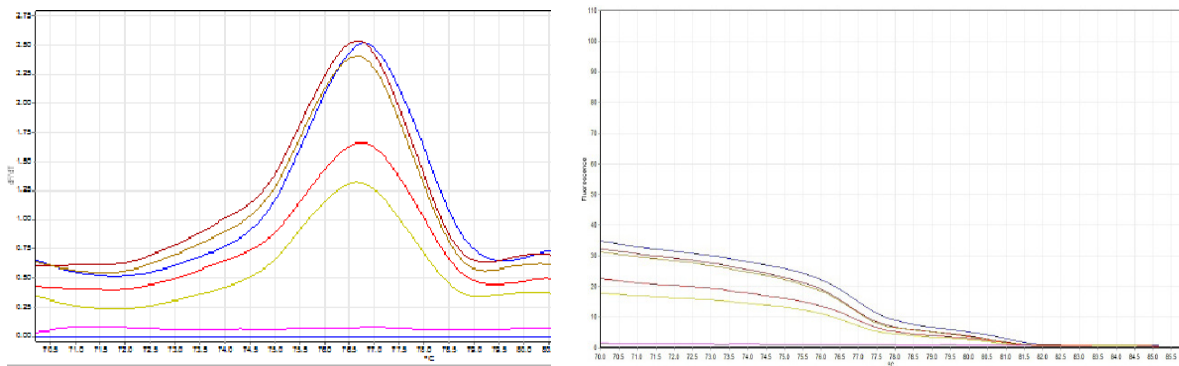
درمطالعه حاضر از روش PCR Time-Real HRM بمنظور تفریق گونه های دیروفیلاریا استفاده شد که نتایج آن کاملا مطابق نتایج PCR معمولی بود و نتایج HRM نیز با نتایج حاصل از تعیین توالی کالیبر گردید و بدین ترتیب تمام نمونه های آلوده که قطعه ای از ژن COX1 دیروفیلاریا ایمیتیس تکثیر شده بود با روش HRM بر اساس دمای ذوب توالی تکثیر شده بررسی شدند شکل (۶و ۷) و جدول (۷و ۸)

۱. منحنی آبی رنگ نمونه شماره ۴۵ ژن COX دیروفیلاریا

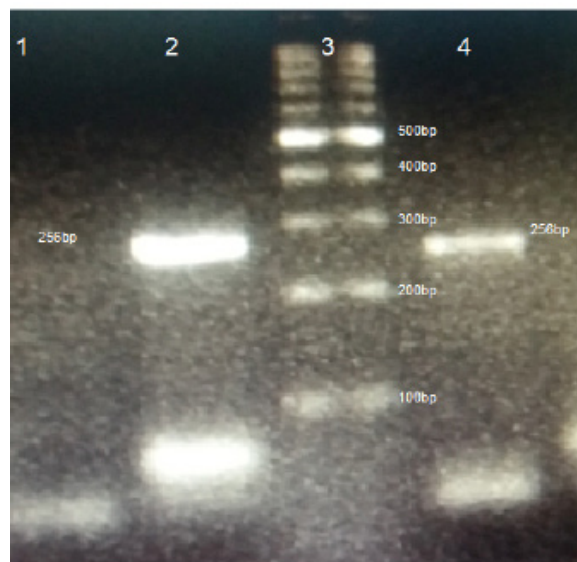


HRM-Tm (Tm median) °C	دمای ذوب (melting Temperature)
°C ۶۶.۷۶/Tm:	نمونه ها
	نمونه های تایید شده از نظر دیروقیلاریا ایمیتیس با روش تعیین توالی (نمونه)

جدول ۷. نتایج کالیبراسیون دمای ذوب با روش HRM Real-Time PCR بمنظور تشخیص دیروقیلاریا ایمیتیس،



شکل ۵. تصویر نمودار دستگاه HRM برای تعیین دمای ذوب ژن COX دیروقیلاریا ایمیتیس



شکل ۶. تصویر ژل الکتروفورس نمونه مثبت از محصول HRM Real-Time PCR

۱. نمونه کنترل منفی
۲. نمونه کنترل مثبت
۳. مارکر ۱۰۰ bp
۴. نمونه مثبت



HRM Real-Time PCR دمای ذوب ژن Cox1 با روش			دسته بندی نمونه های مورد بررسی
Tm Range	Tm median	Tm±SD	
C°76/675 - 76/645	C° 76/66	C°0 /015 ± 76/ 66	نمونه های دارای نتیجه پی سی آر مثبت
C°74/96-74/88	C° 92/74	C°0 /04 ± 74 /92	نتایج منتشر شده در مقاله روجاس و همکاران (Rojas etal, 2015)

جدول ۸. نتایج مقایسه دمای ذوب قطعه تکثیر شده ژن سیتوکروم اکسیداز I دیروویلاریا ایمیتیس با روش

HRM PCR Time-Real از نمونه های دارای نتیجه پی سی آر مثبت در مطالعه حاضر با نتایج ارائه شده در مقاله روجاس و همکاران (۲۰۱۵) در مطالعه ای مشابه.

بحث:

بیماری کرم قلب (دیروویلاریازیس) به وسیله دیروویلاریا ایمیتیس ایجاد می شود که به طور اولیه سگ سانان را مبتلا می سازد. دیروویلاریازیس گستره وسیعی در جهان دارد و دامنه انتشار آن رو به افزایش است. دیروویلاریا ایمیتیس انگل مشترک بین انسان و حیوان است و میزان موارد آلودگی انسانی آن در دنیا رو به افزایش است. با توجه به اهمیت این انگل، باید در نواحی که آلودگی شدید است آزمایش سالیانه سگها به اجرا درآید و برای تشخیص، درمان و کنترل آلودگی برنامه ریزی دقیق انجام شود (al et Kramer, 2008).

انگل دیگری در سگ که میکروویلاریا آن در خون مشاهده می شود آکانتوکیلونما رکوندیتوم است. بالغ آن در بافت های همبند، محوطه صفاقی و کلیه زندگی می کند و بیماریزا نمی باشد (اسلامی، ۱۳۸۵)، بنابراین در بررسی فیلاریوز سگ، تشخیص تفریقی این دو میکروویلاریا اهمیت زیادی دارد.

در مطالعه ای که در شمال شرق هند بر روی سگ های ولگرد، سگ های خانگی و سگ های دارای کاربری انجام شد. از روش های تشخیص نات اصلاح شده و لام مستقیم تازه و روش سرولوژی Ag Elisa و روش مولکولی (PCR و تعیین توالی) استفاده شد. نتایج مطالعه نشان داد که با روش نات ۱۱/۳۸٪، با روش الایزا ۱۸/۰۳٪ و با روش PCR ۱۳/۹۳٪ مثبت شدند. در مناطق مختلف و سگ های نر و ماده از نظر آلودگی اختلاف معناداری نداشتند. اما سگ های ولگرد نسبت به سایر گروهها بطور معنی داری بیشتر آلوده بودند. روش الایزا ۲۲/۶۹٪ آلودگی مخفی را در سگ های کاری و روش مولکولی دیروویلاریا پرنس را در ۱٪ موارد از سگهای ولگرد نشان داد. در نتایج این مطالعه ناحیه ITS2 دیروویلاریا ایمیتیس همولوژی نزدیکی با جدایه های جنوب آسیا نشان داد (al et Borthaku, 2016).

در مطالعه ای که Nguyen و همکاران سال ۲۰۱۶ در استرالیا انجام دادند، تعداد ۳۹ سگ با روش تست نات مثبت شده بودند را با روش HRM PCR Time-Real دیروویلاریا ایمیتیس را از آکانتوکیلونما رکوندیتوم تفریق کردند (al et Nguyen, 2016).

در مطالعه حاضر، DNA جدا شده از نمونه های خون آلوده به میکروویلاریا ایمیتیس با پرایمرهای اختصاصی تکثیر گردید. نتایج تعیین توالی نشان داد، توالی دیروویلاریا ایمیتیس جدایه ایران با توالی های ثبت شده در بانک جهانی ژن تشابه بیش از ۹۸٪ دارد. میانگین دمای ذوب گزارش شده در مقاله روجاس و همکاران ۲۰۱۵، ۷۴/۹۲°C بود که با دمای حاصل از بررسی مطالعه حاضر اختلاف داشت. بدیهی است این اختلاف دما علاوه بر اختلاف ناشی از توالی نوکلئوتیدی متاثر از طول نقطه تکثیر شده نیز می باشد. روجاس و همکاران در مطالعه خود فقط توالی سیتوکروم اکسیداز I را تکثیر نمودند. در مطالعه حاضر حساسیت و ویژگی روش HRM Real-time PCR ۱۰۰٪ حاصل شد. لازم به ذکر است که حساسیت و ویژگی براساس روش استاندارد طلایی پی سی آر و تعیین توالی محاسبه گردید روش HRM PCR time-Real که براساس آنالیز دمای ذوب اختلاف توالی ها را نیز نشان میدهد، در مطالعه حاضر انجام شد. نتایج HRM PCR time-Real نشان داد که پی سی آر براساس ژن سیتوکروم اکسیداز I انگل قادر به تشخیص آلودگی را دارد که از کارایی بالاتری برخوردار است. نمونه هایی که پی سی آر مثبت بودند، دارای میانگین دمای ذوب ۷۶/۶۶°C بودند، و این توالی ها در سطح نوکلئوتید اختلاف ۱-۲٪ داشتند اما ترجمه این توالی ها به اسید آمینه تشابه ۱۰۰٪ نشان داد، به عبارت دیگر دمای ذوب قادر به تفریق ۱-۲٪ اختلاف در سطح نوکلئوتید است.



باروش HRM Real-time PCR بر روی ژن COXI این انگل در جدایه‌های ایران انجام نشده بود.

اگرچه قبلاً PCR معمولی روی ژنهای COX1 کار شده بود (حسینی و همکاران، ۱۳۹۲). اما در این مطالعه علاوه بر روش PCR معمولی و تعیین توالی، روش HRM Real-time PCR نیز انتخاب گردید تا بتوان تعداد بیشتری از نمونه‌ها را با این روش (HRM Real-Time PCR) با هزینه و وقت کمتر با حساسیت و ویژگی بالاتر تشخیص داد بطوریکه تشخیص تا مرحله تفریق گونه نیز انجام شد.

تشکر و قدردانی:

در نهایت از استاد ارجمند جناب آقای دکتر سید حسین حسینی، سرکارخانم دکتر فاطمه جالوسیان و سرکارخانم دکتر مینوسلطانی تشکر و قدردانی دارم که در اجرای این تحقیق از دانش و تجربه‌های ارزشمند اساتید محترم بهره‌مند شدم. هم‌چنین از معاونت پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران که انجام این مطالعه را یاری نمودند تشکر و قدردانی مینمایم.

از مزایای PCR Time-Real HRM تعیین منحنی ذوب (Analysis Curve Melt Resolution High) است که پس از پایان PCR ترسیم و برای تأیید نتایج استفاده می‌شود و در صورت وجود اختلاف در توالی نوکلئوتیدی دو نمونه شکل منحنی تفاوت می‌کند. با مقایسه منحنی نمونه‌ها با هم یا نمونه‌های استاندارد (تعیین توالی شده) موارد اختلاف مشخص می‌شوند. از دیگر مزایای منحصر به فرد این تست سرعت و دقت بالا و هزینه پایین آن می‌باشد راز آنالیز منحنی ذوب با قدرت تفکیک بالا در بررسی نمودار در زمان واقعی است؛ یعنی آنالیز و تفسیر در حین انجام آن. این اتفاق با استفاده از رنگ‌های فلورسانس اشباع ممکن شده است بنابراین با حرارت دادن نمونه از حالت دو رشته به تک رشته‌ای میزان فلورسانس محیط با آزاد شدن رنگ‌های اشباع از زنجیره دو رشته‌ای DNA، کاهش فلورسانس را انتظار داریم، این نقطه از نمودار HRM، T_m ژن مورد نظر می‌باشد در نهایت T_m ژن به مقدار پیوند GC و طول قطعه بستگی دارد. باند ۲۵۶ bp برای دیروفلاریا ایمیتیس در HRM Real-Time PCR بدست آمد. روش مولکولی روشی تکمیلی در مطالعات تفریقی دیروفلاریا ایمیتیس است. تاکنون مطالعه مولکولی



منابع

حسینی، سیدحسین، حسینی، ماندانا (۱۳۹۲). بررسی آلودگی دیروفیلاریا ایمیتیس در سگ های نگهبان و گله استان همدان، دانشگاه تهران، دانشکده دامپزشکی.

حسینی، سیدحسین، اسلامیان، عهدیه (۱۳۹۳). بررسی آلودگی به گونه های دیروفیلاریا در سگ های گله نگهبان و خانگی استان اصفهان به دو روش مولکولی و انگل شناسی، دانشگاه تهران، دانشکده دامپزشکی.

Borthakur, S. K., Deka, D. K., Islam, S., Sarma, D. K., & Sarmah, P. C. (2015). Prevalence and Molecular Epidemiological Data on *Dirofilaria immitis* in Dogs from Northeastern States of India, 2015.

Utzinger j., Maser P., Kaminsky R (2012). Drug Targets of the **Heartworm, *Dirofilaria immitis*** :12-14

Simón, F., Kramer, L. H., Román, A., Blasini, W., Morchón, R., Marcos-Atxutegi, C., ... & Genchi, C. (2007). Immunopathology of *Dirofilaria immitis* infection. *Veterinary research communications*, **31(2)**, 161-171.

Rojas, A., Segev, G., Markovics, A., Aroch, I., & Baneth, G. (2017). Detection and quantification of *Spirocerca lupi* by HRM qPCR in fecal samples from dogs with spirocercosis, 1–8.

Kramer, L., Grandi, G., Leoni, M., Passeri, B., McCall, J., & Genchi, C. (2008). Wolbachia and its influence on the pathology and immunology of *Dirofilaria immitis* infection, **158**, 191–195

Nguyen, C., Koh, W. L., Casteriano, A., Beijerink, N., Godfrey, C., Brown, G., ... Šlapeta, J. (2016).

Mosquito-borne heartworm *Dirofilaria immitis* in dogs from Australia. *Parasites and Vectors*, **9(1), 1–11**