Archive of SID

مجله علمی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی
تابستان ۱۳۸۸، دوره یکم، شماره اول، صفحه ۱۳ -۶

مقایسه دو تکنیک تکثیر هم دما به واسطه لوپ LAMP و PCR در تشخیص ویروس هپاتیت B

محمدحسن شاه‌حسینی[۱]، الهام مسلمی[۲]، غلامرضا جوادی[۲]، طاهر نژادستاری[۲]، کاظم پریور[۲]، حسین کیوانی‌امینه[۳]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهر قدس، گروه میکروبیولوژی
۲- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه زیست‌شناسی
۳- آزمایشگاه ویروس‌شناسی کیوان

نویسنده مسؤول: دکتر محمدحسن شاه‌حسینی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهر قدس، گروه میکروبیولوژی. shahhosseiny@yahoo.com

دریافت: ۸۸/۲/۵ پذیرش: ۸۸/۵/۲۵

چکیده

زمینه و هدف: ویروس هپاتیت B (HBV) یکی از عوامل بسیار مهم در پیدایش بیماری‌های کبدی و هپاتوسلولار کارسینوما می‌باشد. روش‌های تشخیص این ویروس (سرولوژیک و مولکولی) هر کدام دارای محدودیت‌هایی هستند به همین دلیل امکان استفاده از آنها در همه مراکز تشخیصی وجود ندارد. در این تحقیق سعی بر راه‌اندازی تکنیک نوین LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification- LAMP) با کمک پرایمرهای اختصاصی طراحی شده ویژه ناحیه HBs و مقایسه با PCR برای تشخیص ویروس از نمونه‌های سرمی شده است.

روش بررسی: در این مطالعه ۱۰٤ نمونه سرمی مثبت با سیستم کوباس، مورد بررسی قرار گرفتند. DNA به روش DNP استخراج شد. پرایمرهای PCR انتخاب و ٦ پرایمر ویژه برای تکنیک LAMP طراحی گردید. آزمون‌های حساسیت و ویژگی بر روی هر دو تست انجام و سپس هر دو آزمون بر روی نمونه‌ها بهینه گردید. محصول PCR به وسیله الکتروفورز و محصول LAMP بوسیله اضافه کردن سایبر گرین و الکتروفورزیس شناسایی شد.

یافته‌ها: از ۱۰٤ نمونه با تعداد پارتیکل مشخص و با تیترهای متفاوت جمع‌آوری شده، ۹۵ مورد (۹۱/۳٤٪) در آزمون PCR این مطالعه مثبت شدند. از این تعداد ۱۰۱ نمونه (۹۷/۱۱٪) LAMP مثبت بودند. ۹ نمونه PCR منفی بودند که از این ۹ نمونه ٦ مورد در تست LAMP مثبت گزارش شدند.

نتیجه‌گیری: مقایسه کاربرد PCR و LAMP بر روی نمونه‌های مرضی با تعداد پارتیکل ویروسی مشخص نشان داد که تکنیک تکثیر هم دما به واسطه لوپ (LAMP) دارای حساسیت، ویژگی و به یک بیان دقت بالاتری می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: هپاتیت B، LAMP، PCR.

مقدمه

ویروس هپاتیت B یکی از اعضای خانواده هپادنا ویریده می‌باشد که در پیدایش بیماری‌های کبدی و هپاتوسلولار کارسینوما نقس به سزایی دارد (۱). در حال حاضر عفونت با ویروس هپاتیت B به صورت یک مشکل جهانی در آمده به طوری که به نظر می‌رسد که ۳۵۰-۴۰۰ میلیون نفر در سراسر دنیا به این عفونت مبتلا هستند (۲). در مرحله اولیه عفونت، مقدار زیادی از ذرات HBV در خون وجود دارد که در این مرحله قدرت انتقال بیماری بسیار بالاست (۳). روش‌های

www.SID.ir

Archive of SID

تشخیص HBV به دو دسته ۱- روش‌های متواتر ۲- روش‌های مولکولی و جدید قابل تقسیم‌بندی است. روش‌های متواتر شامل روش‌های سرودیاگنوستیک، بیوپسی از کبد، تست‌های بررسی فعالیت غیر طبیعی کبد از قبیل ALT، یافته‌های بالینی و پاتولوژیک می‌با شند (۱).

روش‌های تشخیص سرولوژیکی رایج عمدتاً برای شناسایی مهمترین آنتی‌ژن سطحی ویروس (HBsAg) استفاده می‌گردد و به طور کلی بر مبنای واکنش آنتی‌ژن- آنتی‌بادی می‌باشند و به علت ایجاد موتاسیون در ساختمان آنتی‌ژن و یا آنتی‌بادی خیلی قابل اعتماد نیستند (۴ و ۵) به طوری که درصدی از خون‌های HBsAg منفی در انتقال خون سبب انتقال بیماری شده‌اند (۵ و ۶). بنابراین با وجود این که روش‌های سرولوژیکی به خوبی شناخته شده و در دسترس است، اما شاخص مناسبی برای تشخیص به حساب نمی‌آیند و ضرورت استفاده از روش‌های مولکولی دقیق اجتناب‌ناپذیر شده است (۷). به علاوه سایر روش‌های مفید مانند میکروسکوپ الکترونی، ایمونوفلورسان، ایمنوهیستوشیمی و غیره برای تشخیص، غیرقابل استفاده می‌باشند (۱). روش‌های تشخیص بر مبنای آنتی‌بادی و بیوپسی در مراحل اولیه بیماری قابلیت تشخیص نداشته و زمان نسبتاً زیادی بعد از آلودگی قادر به تشخیص عامل بیماریزا می‌باشند (۱). روش‌های تشخیص مولکولی بر مبنای جداسازی و تکثیر اسیدهای نوکلیک ویروس شامل روش‌های واکنش زنجیره‌ایی پلیمراز (Polymerase Chain Reaction-PCR) ، تکثیر هم‌دما (Isothermal amplification)، دو رگه سازی (Hybridization) است که حتی در مراحل اولیه آلودگی قادر به تشخیص دقیق می‌باشند (۸ و ۹).

یکی دیگر از روش‌های مولکولی، تکنیک هیبریداسیون بر مبنای DNA– شاخه‌دار (bDNA) بوده که با استفاده از پروب‌های DNA شاخه‌دار صورت می‌گیرد و با به کارگیری پروب‌های فلورسنت امکان تشخیص کمی DNA ویروس را در سرم افراد بیمار فراهم نموده است، اما استفاده از آن تاکنون محدود به مراکز تحقیقاتی بوده است. در عین حال حساسیت این تکنیک ۲-۱ لگاریتم کمتر از تکنیک PCR می‌باشد (۱۲ -۱۰). هر یک از روش‌های آمپلی فیکاسیون علی‌رغم نقاط قوت دارای مشکلات خاص خود است، مثلاً تکنیک PCR علی‌رغم توسعه وسیع و دقت بالای واکنش، به علت نیاز به استفاده از تجهیزات پیشرفته مانند ترموسایکلر تاکنون نتوانسته به صورت عمومی در تمام مراکز تشخیصی به بهره‌برداری برسد (۷ و ۱۳). در روش‌های تکثیر هم دما مانند تکثیر حلقه چرخان (Rolling circle amplification -RCA)، تکثیر بر مبنای توالی نوکلئیک اسید (NASBA)، تکثیر به واسطه رونویسی (TMA)، همانندسازی سکانس خود نگهدارنده (3SR)، علی‌رغم این که نیاز به ترموسایکلر مرتفع شده اما به علت دمای پایین واکنش و یا تکثیر توالی‌های غیر اختصاصی حساسیت و دقت لازم برای تشخیص وجود ندارد (۱۴). تکنیک تکثیر هم دما به واسطه لوپ (LAMP) یکی دیگر از روش‌های تکثیر هم دما می‌باشد که در آن تکثیر به صورت هم دما صورت گرفته و در نتیجه به ترموسایکلر نیاز ندارد، به علاوه از دقت و حساسیت بسیار بالایی نیز برخوردار است (۷ و ۱۵).

واکنش بدون نیاز به دناتوراسیون DNA الگو با کمک پلیمراز با قابلیت جانشینی در رشته انجام می‌گیرد. همچنین از ۶ پرایمر ویژه موسوم به پرایمرهای درونی FIP(F1C,F2) و BIP,(B1C,B2) بیرونی (F3,B3) ویژه لوپ LF,LB با اختصاصیت بسیار بالا استفاده می‌شود (۱۶ و ۱۷). پرایمر FIP در رشته DNA الگو به ناحیه مکمل F2 (F2C) در رشته الگو متصل می‌شود و سنتز رشته مکمل را آغاز می‌کند و با جانشینی پرایمرهای خارجی F3,B3 با کمک پلیمراز Bst، طول این رشته طویل می‌شود که منجر به تولید ساختار DNA دمبلی می‌شود که به سرعت با سنتز DNA تبدیل به ساختار ساقه- حلقه می‌شود. این ساختار ساقه- حلقه DNA به عنوان ماده آغاز کننده چرخه LAMP عمل می‌کند،FIP به لوپ در ساختار ساقه- حلقه DNA متصل شده و سنتز DNA رشته جانشین را شروع می‌کند که ساختار DNA حدواسطی به صورت ساقه- حلقه ایجاد می‌کند که دارای یک کپی وارونه، از توالی هدف در ساقه حلقه می‌باشد که در انتهای دیگر ژن و از طریق توالی BIP شکل می‌گیرد. رشته رها شده ساختاری با حلقه بیرونی ایجاد می‌کند که به عنوان الگو برای پرایمر BIP عمل می‌کند. متعاقباً DNA دمبلی شکل تولید می‌شود که به عنوان ماده مرحله چرخه تکثیر LAMP وارد عمل می‌شود (۱۲ و ۱۳). با طراحی اولیگونوکلئوتیدهای پروب ویژه این ساختارها، می‌توان از آنها در دورگه سازی استفاده نمود (۷ و ۱۲). در این حالت نیازی به اعمال دناتوراسیون با گرما بعد از تکثیر وجود ندارد. این بدان معناست که کلیه مراحل از تکثیر تا تشخیص در یک دما انجام می‌پذیرد. همچنین هنگامی که واکنش با رونویسی معکوس همراه شود می‌تواند توالی RNA را نیز تکثیر دهد (۲۰ -۱۸). هدف از این مطالعه مقایسه‌ای است مابین روش PCR و تکنیک تکثیر هم دما و سریع LAMP، جهت تشخیص حضور ویروس HBV در نمونه‌های مرضی و نیز مقایسه بین مزایا و معایب PCR و LAMP در تشخیص HBV که در نهایت منجر به ارایه یک

www.SID.ir

Archive of SID

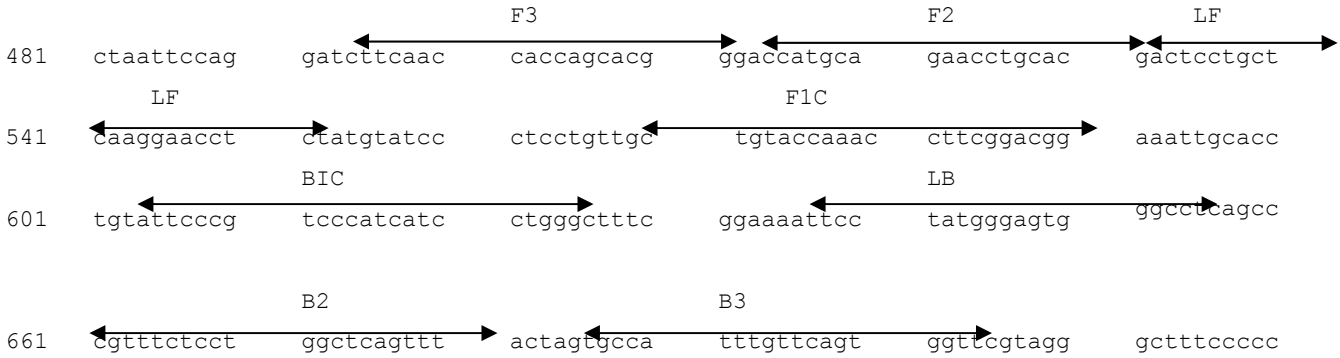
روش تشخیصی دقیق، سریع و در عین حال قابل انجام در کلیه مراکز تشخیصی در سطح کشور، برای تشخیص زودهنگامHBV با هزینه پایین است.

روش بررسی

تهیه نمونه: برای این منظور ۱۰۴ نمونه سرم با تعداد پارتیکل مشخصHBV از آزمایشگاه ویروس‌شناسی کیوان تهیه شد (تعداد پارتیکل‌های ویروس با دستگاه کوباس مدل ۲۴۱ و کیت Cobas Amplicor Monitor تعیین گردیده بود).

استخراج DNA از سرم: DNA با کمک کیت DNP سیناژن (Cat:DN811530) از سرم بیماران استخراج گردید.

پرایمر های ویژه PCR و LAMP: از پرایمرهای PCR ویژه ناحیه آنتی‌زن سطحی ویروس استفاده گردید. پرایمرهای LAMP با کمک نرم‌افزار Primer explorer V4 جهت ژن آنتی‌ژن سطحی ویروس هپاتیت B با استفاده از ترادف شایع در ایران (Accession No. AY741794) طراحی گردید (شکل ۱).



شکل ۱- جایگاه پرایمرهای ویژه LAMP بر روی توالی هدف

```
F3: CTT-CAA-CCA-CCA-GCA-CGG
B3: ACC-ACT-GAA-CAA-ATG-GCA-
F1C: CGT-CCG-AAG-GTT-TGG-TAC-AGC-<A>-
F2: CCA-TGC-AGA-ACC-TGC-ACG
B1C: ATT-CCC-GTC-CCA-TCA-TCC-TGG-<G>
B2: AAA-CTG-AGC-CAG-GAG-AAA-CG
LF: GAG-GTT-CCT-TGA-GCA-GGA-GT
LB: ATT-CCT-ATG-GGA-GTG-GGC-C
```

واکنش PCR: هر واکنش شامل ۵ میکرولیتر الگو (DNA استخراجی از سرم) ، ۲/۵ میکرولیتر از 10X PCR Buffer، ۱ میکرولیتر از هر یک از دو پرایمر جلویی و عقبی 10mM، ۰/۷۵ میکرولیتر از MgCl2 50mM، ۰/۵ میکرولیتر از dNTP 10mM،۰/۴ میکرولیتر Taq DNA Polymerase 5u/µl در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر می‌باشد. پروتکل دمایی به صورت دناتوراسیون در دمای ۹۳ به مدت ۴۰ ثانیه و دمای چسبیدن ۶۰ درجه به مدت ۴۰ ثانیه و در نهایت پلیمریزاسیون در دمای ۷۲ درجه به مدت ۴۰ ثانیه به تعداد ۴۰ سیکل انجام شد.

مشاهده محصول PCR: محصول PCR در ژل آگارز ۱/۵٪ حاوی اتیدیوم بروماید (سینا ژن 10mg/ml) در بافر TBE 0.5X الکتروفورز گردید.

کلونینگ محصول PCR به عنوان کنترل مثبت: بعد از خالص‌سازی محصول PCR با استفاده از کیت T/Acloning فرمنتاس (cat:K1214) در وکتور pTZ57/R کلون گردید.

واکنش LAMP: واکنش LAMP در حجم کلی ۲۵ مایکرولیتر حاوی پرایمرهای F3 و B3 هر کدام به غلظت 0.2 µM، پرایمرهای FIP و BIP هر کدام به غلظت 1.6 µM، پرایمرهای لوپ LF و LB هر کدام به غلظت 0.8 µM، بافر آنزیم به غلظت 1x حاوی Tris-Hcl(20 Mm) Kcl(10 Mm) (NH4)2SO4(10 mM) MgSO4 (9 mM), dNTP سینا ژن به غلظت 1.4 mM، بتایین به غلظت 0.8 M و در نهایت ۸ واحد آنزیم Bst (New England BioLabs;Lot:33/110806) می‌باشد.

تعیین حساسیت و اختصاصیت تست PCR: به منظور بررسی حساسیت، رقت‌های مختلف DNA ویروس از ۴ میلیون تا ۴۰ پارتیکل ویروس تهیه گردید.

جهت ویژگی از DNA های موش (Mouse)، انسان (Human)، توکسوپلاسما گوندی (Toxoplasma gondii)، ویروس هپاتیت C (Hepatitis C virus)، مایکوباکتریوم

www.SID.ir

Archive of SID

توبرکلوزیس (Mycobacterium tuberculosis)، ساکارومیسس سرویزیه (Saccharomyces cerevisiae)، اشرشیا کلی (Escherichia coli) استفاده شد.

ارزیابی واکنش LAMP: به هر لوله نمونه مقدار ۱ مایکرولیتر سایبرگرین 0.1% اضافه کرده، سپس زیر نور UV مشاهده می‌نماییم. لوله‌های مثبت به رنگ سبز و لوله‌های منفی به رنگ نارنجی خیلی کم‌رنگ دیده می‌شوند.

الکتروفورز محصول LAMP: محصول LAMP در ژل آگارز 1% حاوی اتیدیوم بروماید در بافر TBE 0.5X الکتروفورز گردید.

تعیین حساسیت و اختصاصیت تست LAMP: برای تعیین حساسیت تست، رقت‌های مختلف DNA ویروس از ۴ میلیون تا ۴پارتیکل ویروس تهیه شد. برای تأیید اختصاصیت تست LAMP از DNA های موش،انسان، توکسوپلاسما گوندی، ویروس هپاتیت C، مایکوباکتریوم توبرکلوزیز، ساکارومیسس سرویزیه، اشرشیا کلی استفاده شد.

یافته‌ها

محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ لود شد. اندازه قطعه به دست آمده با استفاده از پرایمرهای ویژه ۲۶۲ bp می‌باشد (شکل۱a). محصول PCR در پلاسمید pTZ57/R کلون شد. پس از جداسازی تک کلنی‌های سفید، DNA از آنها استخراج گردید و به وسیله روش PCR تأیید شد(شکل ۱b).

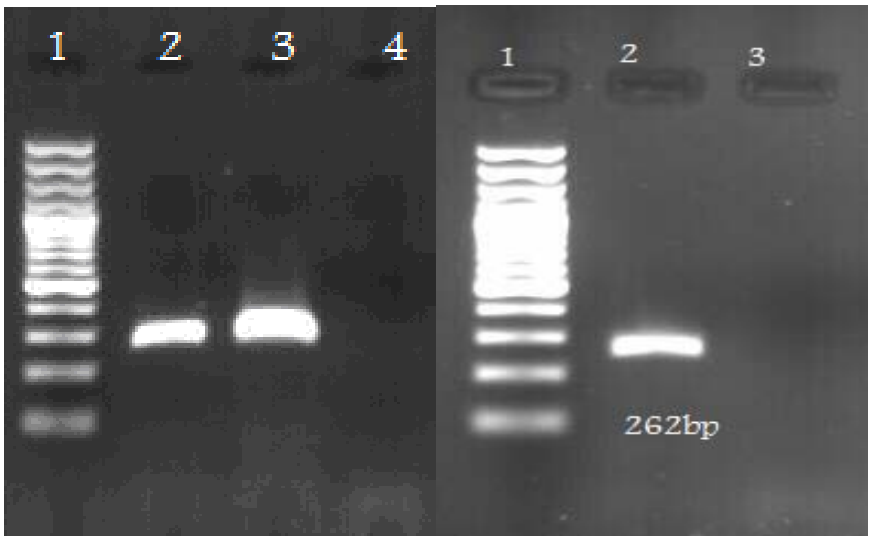
حساسیت PCR تا ۴۰ پارتیکل تعیین شد به طوری که در تیترهای کمتر از ۴۰ پارتیکل باندی مشاهده نشد (شکل ۲a). تست PCR دارای ویژگی بسیار بالایی می‌باشد به طوری که فقط با DNA ویروس هپاتیت B واکنش نشان داد (شکل ۲b).

واکنش LAMP در دمای ۶۶ درجه به مدت ۱ ساعت صورت گرفت. الکتروفورز محصول LAMP اسمیری همراه با چندین قطعه با اندازه های متفاوت را نشان داد (شکل ۳).

تست LAMP دارای ویژگی بسیار بالا بود به طوری که به جز DNA ویروس هپاتیت B با هیچ‌کدام از عوامل بیماریزا واکنش نشان نداد (شکل۴a). حساسیت تست LAMP تا ۴ پارتیکل تعیین شد (شکل۴b).

نمونه های مثبت تست LAMP پس از افزودن سایبر گرین 0.1% در زیر نور U.V دارای خاصیت فلوروسانس بوده و سبز رنگ دیده شدند و نمونه‌های منفی به صورت نارنجی دیده شدند.حساسیت تست LAMP تا ۴ پارتیکل تعیین شد (شکل ۵).

از ۱۰۴ نمونه با تعداد پارتیکل مشخص با تیترهای متفاوت جمع‌آوری شده ۹۵ مورد PCR مثبت شدند. از این تعداد ۱۰۱ نمونه LAMP مثبت بودند. ۹ نمونه PCR منفی بودند که از این ۹ نمونه ۶ مورد در تست LAMP مثبت گزارش شدند. ۳ نمونه در هر دو تست LAMP و PCR منفی بودند.



شکل ۱a شکل ۱b

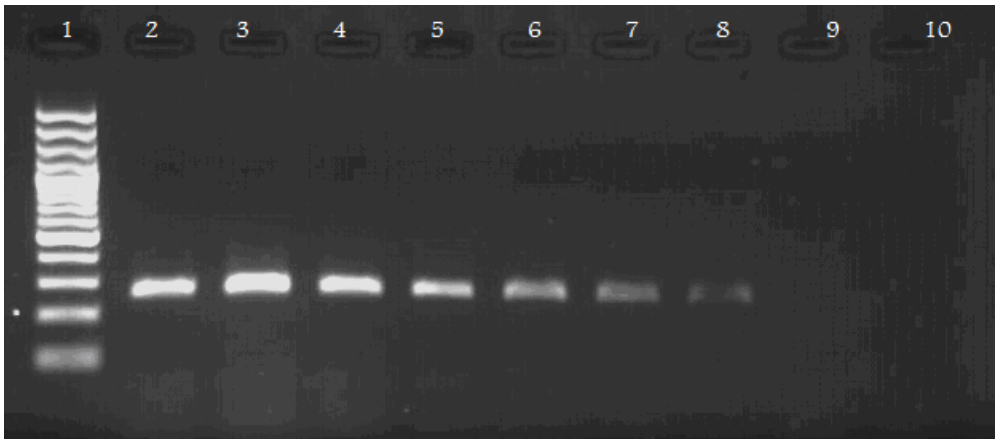
شکل ۱a- لاین ۱: سایز مارکر فرمنتاس 100bp DNA Ladder PLUs، **۲: قطعه تکثیر شده،۳: کنترل منفی**

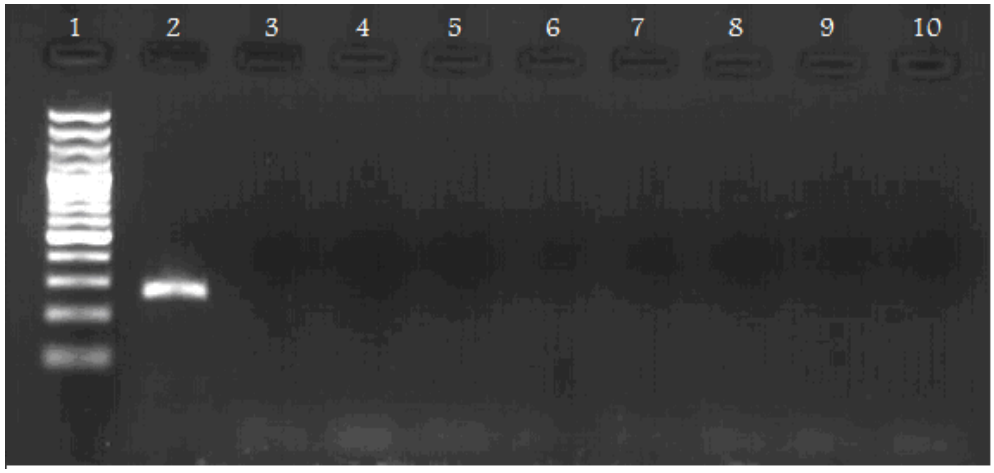
شکل ۱b- لاین ۱: سایز مارکر فرمنتاس 100bp DNA Ladder PLUs، **۲: کنترل مثبت،۳: قطعه تکثیریافته از پلاسمید،۴: کنترل منفی**

www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۲a

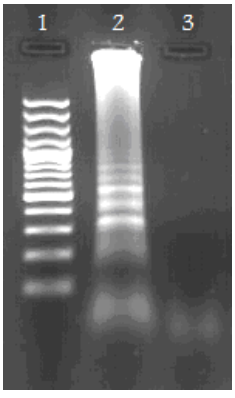




شکل ۲b

شکل ۲a- لاین ۱: سایز مارکر فرمنتاس 100bp DNA Ladder PLUs، **۲: کنترل مثبت، ۳: سرم حاوی۴ میلیون پارتیکل، ۴: سرم حاوی ۴۰۰۰۰۰ پارتیکل، ۵ : سرم حاوی ۴۰۰۰۰ پارتکل، ۶: سرم حاوی ۴۰۰۰ پارتکل، ۷: سرم حاوی ۴۰۰ پارتیکل، ۸: سرم حاوی ۴۰ پارتیکل، ۹:سرم حاوی ۴ پارتیکل، ۱۰: کنترل منفی**

شکل ۲b- لاین ۱: سایز مارکر فرمنتاس 100bp DNA Ladder PLUs، **۲:کنترل مثبت، ۳:** DNA **موش، ۴:** DNA **انسان، ۵:** DNA **اشرشیا کلی، ۶:** DNA **ساکارومیسس سرویزیه، ۷:** DNA **ویروس هپاتیت C، ۸:** DNA **مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، ۹:**DNA **توکسوپلاسما گوندی، ۱۰: کنترل منفی**

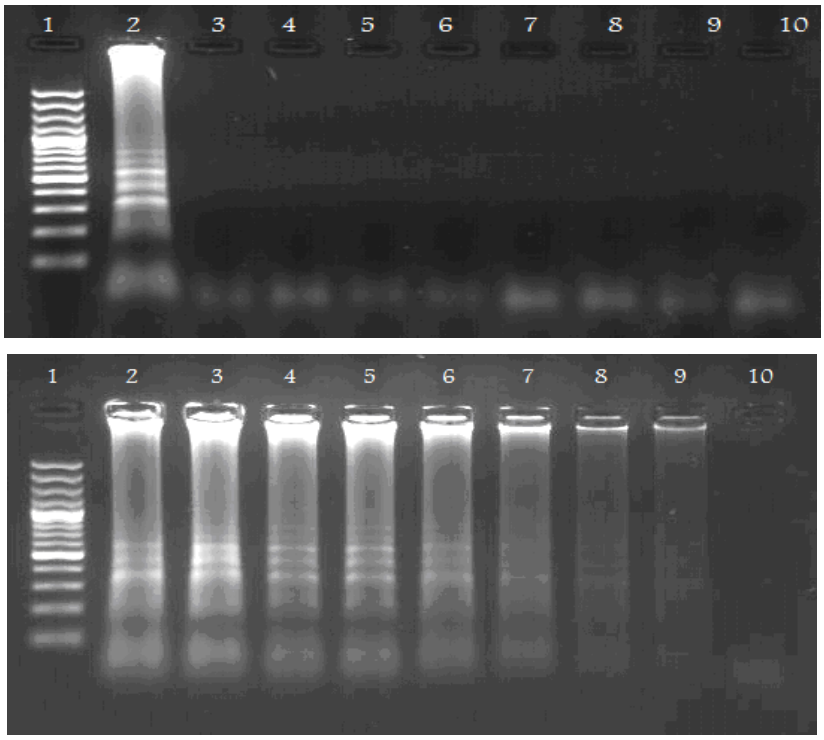


شکل ۳- لاین۱: سایز مارکر فرمنتاس 100bp DNA Ladder PLUs، **۲: کنترل مثبت، ۳: کنترل منفی**

www.SID.ir

Archive of SID

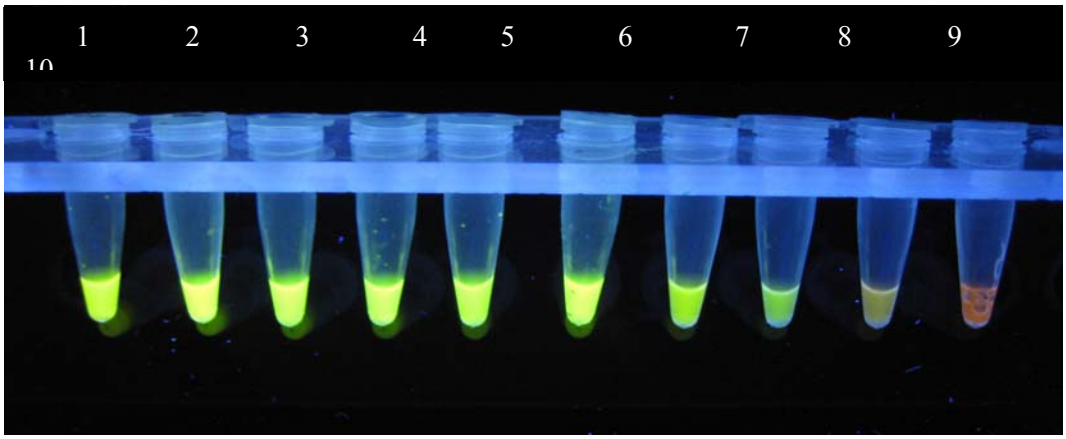
شکلa ۴



شکل b ۴

شکل ۴a- لاین ۱: سایز مارکر فرمنتاس 100bp DNA Ladder PLUs، ۲: کنترل مثبت، ۳: DNA موش، ۴: DNA انسان، ۵: DNA اشرشیا کلی، ۶: DNA ساکارومیسس سرویزیه، ۷: DNA ویروس هپاتیت C، ۸: DNA مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، ۹: DNA توکسوپلاسما گوندی، ۱۰: کنترل منفی

شکل b ۴- لاین ۱: سایز مارکر فرمنتاس 100bp DNA Ladder PLUs، ۲: کنترل مثبت، ۳: سرم حاوی۴ میلیون پارتیکل، ۴: سرم حاوی ۴۰۰۰۰۰ پارتیکل، ۵: سرم حاوی ۴۰۰۰۰ پارتکل، ۶: سرم حاوی ۴۰۰۰ پارتکل، ۷: سرم حاوی ۴۰۰ پارتیکل، ۸: سرم حاوی ۴۰ پارتیکل، ۹: سرم حاوی ۴ پارتیکل، ۱۰: کنترل منفی



شکل ۵- لوله ۱: کنترل مثبت، ۲: سرم حاوی۴ میلیون پارتیکل، ۳: سرم حاوی ۲۰۰۰۰۰۰ پارتیکل، ۴: سرم حاوی ۴۰۰۰۰۰ پارتکل ۵: سرم حاوی ۴۰۰۰۰ پارتیکل، ۶: سرم حاوی ۴۰۰۰ پارتیکل، ۷ : سرم حاوی ۴۰۰ پارتیکل، ۸: سرم حاوی۰ ۴ پارتیکل، ۷: سرم حاوی ۴ پارتیکل، ۱۰: کنترل منفی

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

امروزه ابتلاء به ویروس هپاتیت B به صورت یک مشکل جهانی درآمده در ایران نیز طبق آخرین آمار رسمی در حال حاضر ۲/۵ میلیون نفر به ویروس هپاتیت B مبتلا می‌باشند (۲). اگرچه روش‌های تشخیص سرولوژیکی HBV در حال حاضر به خوبی شناخته شده‌اند اما شاخص خوبی برای تشخیص عفونت ویروسی به حساب نمی‌آیند. بنابراین برای تشخیص دقیق عفونت، روش‌های مولکولی باید جایگزین روش‌های سرولوژیکی شوند (۹). یکی از رایج‌ترین روش‌های مولکولی تکنیک PCR می‌باشد که علی‌رغم حساسیت و دقت نسبی بالایی که دارد به دلیل نیاز به تجهیزات پیشرفته مانند ترموسایکلر امکان استفاده عمومی از آن در تمامی مراکز تشخیصی فراهم نشده و محدود به مراکز خاص و معدودی شده است (۷).

تکنیک نوظهور LAMP یکی از روش‌های تکثیر ژن بسیار ساده می‌باشد که از آغاز تا پایان در یک دما صورت می‌گیرد. این تکنیک علی‌رغم سادگی دارای حساسیت و دقت بسیار بالایی می‌باشد و به علاوه از آنجایی که نیاز به دستگاه و سخت‌افزارهایی مانند ترموسایکلر ندارد با حداقل هزینه انجام می‌گیرد (۷). در تکنیک LAMP از پرایمرهای خارجی (F3,B3) و نیز پرایمرهای داخلی (FIP,BIP) که هر کدام دو ناحیه مجزا در الگو را شناسایی می‌کنند و نیز دو پرایمر ویژه لوپ استفاده می‌شود به طوری که همزمان به ۸ ناحیه در DNA الگو متصل می‌شوند (۱۲ و ۱۴ و ۱۵). محصول نهایی واکنش مخلوطی از DNA با ساختار ساقه- حلقه به همراه تکرارهای معکوس از DNA الگو و ساختارهای مشابه گل کلم با لوپ‌های فراوان می‌باشد.

در حال حاضردر سراسر دنیا مطالعات متعددی برای استفاده از این تکنیک برای تشخیص عوامل بیماریزا صورت گرفته به طوری که تشخیص عوامل بیماریزایی مانند: Chikungunya Virus (۲۰)، M.Pneumoniae (۲۱)، Newcastle disease virus (۲۲)، تریپانوزومای آفریقایی (۲۳)، Ebola Virus (۲۴)، West Nile Virus (۱۸)، هرپس ویروس(۲۵)، ویروس برگ زرد گوجه فرنگی (۲۶)، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (۲۷)، به وسیله تکنیک LAMP امکان‌پذیر شده است. در ایران نیز مطالعاتی چند در ارتباط با تکنیک LAMP صورت گرفته ولی تاکنون مقاله‌ایی در مورد استفاده از تکنیک LAMP برای تشخیص HBV منتشر نشده است. در این مطالعه ما با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده ویژه ناحیه HBs قادر به بهینه‌سازی تکنیک LAMP برای تشخیص ویروس هپاتیت B شدیم. در سال ۲۰۰۰ برای اولین بار Notomi و همکاران تکنیک LAMP را برای تشخیص آنتی‌ژن اختصاصی پروستات (PSA) و HBV بهینه نمود که در مطالعه‌ایی که در حال حاضر صورت گرفته از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده ویژه ناحیه HBs ویروس هپاتیت B ژنوتایپ D سروتایپ awy2 رایج در ایران استفاده شده که پرایمرهای فوق قابلیت تشخیص HBV بومی را داشته و به طور کلی با پرایمرهای Notomi متفاوت می‌باشند. این تکنیک در حال حاضر برای تشخیص ویروس هپاتیت B بومی ایران بهینه گردیده و توانایی آن به اثبات رسیده است.

این تکنیک در مقایسه با تکنیک PCR از حساسیت و دقت بسیار بالایی برخوردار بوده به طوری که از ۱۰۴ نمونه با تعداد پارتیکل مشخص شده با کیت Cobas مورد مطالعه، ۹۵ مورد در تست PCR مثبت شدند در حالی که ۱۰۱ مورد در تست LAMP مثبت دیده شدند. ۹ نمونه PCR منفی بودند که این نمونه‌ها دارای تیتر ویروس پایین بوده و زمان نسبتاً زیادی نگهداری شده بودند. در کل تنها ۳ نمونه در تست LAMP نتیجه منفی نشان دادند که این ۳ نمونه دارای لود ویروسی پایین (۱۲۹،۱۲۰۰،۱۶۰۰) بودند و همچنین از تاریخ جمع‌آوری آنها زمان نسبتاً زیادی می‌گذشت. احتمالاً علت منفی شدن این ۳ نمونه در هر دو آزمون PCR و LAMP پایین آمدن تیتر ویروس در سرم با توجه به تیتر اولیه پایین، زمان نگهداری زیاد و فریز و ذوب شدن آنها می‌باشد.

نتیجتاً در ۶ نمونه‌ای که دارای تیتر پایین و زمان نگهداری طولانی بودند با توجه به حساسیت بسیار بالای تست LAMP، امکان تشخیص وجود داشت حال آن که PCR از این دقت برخوردار نبود. بنابراین می‌توان این طور بیان نمود که در مطالعه حاضر تکنیک LAMP قادر به شناسایی ویروس حتی در نمونه‌های قدیمی با کمترین لود ویروس در خون می‌باشد. و در عین حال علی‌رغم دقت بالا و حساسیت زیاد، این تکنیک به تجهیزات پیشرفته نیاز نداشته و واکنش با استفاده از یک-Dry Plate ساده انجام گرفت. انجام واکنش با افزودن 0.1% سایبر گرین و مشاهده در زیر نور U.V به سادگی بدون نیاز به الکتروفورز در زمان بسیار کوتاهی تأیید شد و نیاز به مراحل Post Amplification به طور وسیعی مرتفع گردید. بدین ترتیب می‌توان بیان کرد با کمک این تکنیک امکان تشخیص مولکولی با دقت و حساسیت بسیار بالا برای تشخیص زودهنگام ابتلاء به ویروس هپاتیت B در تمامی مراکز تشخیصی بدون نیاز به تجهیزات پیشرفته با حداقل قیمت فراهم خواهدگردید.

www.SID.ir

Archive of SID

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج و مقایسه تست PCR با تست LAMP می‌توان بیان کرد که تست تکثیر هم دما علی‌رغم سادگی و عدم نیاز به تجهیزات پیشرفته از حساسیت بسیار بالاتری نسبت به واکنش PCR برخوردار می‌باشد به طوری که می‌تواند جایگزین مناسبی برای آن محسوب شود.

تشکر و قدردانی

از جناب آقای دکتر محمد قهری، دکتر سیدرضا تهرانی و سرکار خانم دکتر اکرم عیدی سپاسگزاری می‌شود.

References

1- Dienstag JL. *Hepatitis B Virus Infection*. The New England journal of medicine. 2008; 359.1486-1500.

2- Alavian SM, Hajarizadeh B, Ahmadzad-Asl M, Kabir A, Bagheri-Lankarani K. *Hepatitis B Virus Infection in Iran: A Systematic Review*. Hepatitis Monthly. 2008; 8(4): 281-294.

3- Pawlotsky JM, Bastiec A, He´zodec Ch , Lonjon I, Darthuy F, Re´mire´ J, Dhumeaux D. *Routine detection and quantification of hepatitis B virus DNA in clinical laboratories: performance of three commercial assays*. Journal of Virological Methods. 2000; 85. 11–21.

4- Weber B, Berge A. *Molecular detection of hepatitis B virus: recent developments*. J Lab Med.2005;29(1).33–43.

5- Behbahani AB, Mafi-Nejad SZ, Tabei KB, Lankarani A, Torab A. *Anti-HBc & HBV-DNA detection in blood donors negative for hepatitis B virus surface antigen in reducing risk of transfusion associate HBV infection*. Indian J Med Res.2006; 123. 37-42.

6- Pourazar A, Salehi M, Jafarzadeh A, Kazemi Arababadi M, Oreizi F, Shariatinezhad K. *Detection of HBV DNA in HBsAg Negative Normal Blood Donors*. IJI. 2005; 2 (3). 172-176.

7- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. *Loop-mediated isothermal amplification of DNA*. Nucleic Acids Research.2000; 28(12). E63-e63.

8- Vernet G. *Molecular diagnostics in virology*. Journal of Clinical Virology. 2004; 31. 239–247.

9- Shahhosseiny MH. *Basic Molecular diagnosis*. 430 pages, Publisher: Islamic Azad University.2005; 12-35.

10- Shahhosseiny MH, Rahimi AA. Molecular *Genetics: concepts & applications*. 380 page, Publisher: Islamic Azad University. 2007; 180-210

11- Shahhosseiny MH, Tehrani R. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. 165 page, Publisher: Islamic Azad University. 2005; 45-68.

12- Nagamine K, Kuzuhara Y, Notomi T. Accelerated *reaction by loop-mediated isothermal Amplification using loop primers*. Molecular and Cellular Probes.2002; 223-229.

13- Zhang D, Zhang W, Li X, Konomi Y. *Detection of rare DNA targets by isothermal ramification amplification*. Gene.2001; 274 .209–216.

14- Nagamine K, Hase T, Notomi T. *Loop-mediated Isothermal Amplification Reaction Using a Nondenatured Template*. Clinical Chemistry. 2001; 47.1742-1743.

15- Mori Y, Nagamine K, Tomita N, Notomi T. *Detection of Loop-Mediated Isothermal Amplification Reaction by Turbidity Derived from Magnesium Pyrophosphate Formation*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2001; 289.150–154.

16- Mori Y, Hirano T, Notomi T. *Sequence specific visual detection of LAMP reactions by addition of cationic polymers* . BMC Biotechnology. 2006; 3-6.

17- Nagamine K, Kuzuhara Y, Notomi T. *Isolation of Single-Stranded DNA from Loop-Mediated Isothermal Amplification Products*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2002; 290. 1195–1198.

18- Parida M, Posadas G, Inoue Sh, Hasebe F, Morita K. *Real-Time Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification for Rapid Detection of West Nile Virus*. J Clin Microbiol. 2004; 42 (1). 257-263.

19- Parida M, Horioke K, Ishida H, Kumar Dash P, Saxena P, Mukul Jana A, Islam MA, et al. *Rapid Detection and Differentiation of Dengue Virus Serotypes by a Real-Time Reverse Transcription–Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay*. J Clin Microbiol.2005; 2895–2903.

20- Parida M, Santhosh SR, Dash PK, Tripathi NK, Lakshmi V, Mamidi N, Shrivastva A, et al. *Rapid and Real-Time Detection of Chikungunya Virus by Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay*. J Clin Microbiol.2007; 351-357.

21- Saito R, Misawa Y, Moriya K, Koike K, Ubukata K, Okamura N. *Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of Mycoplasma pneumoniae.* J Med Microbiol. 2005; 54. 1037-1041.

22- Pham HM, Nakajima C, OACI K, Onuma M. *Loop-Mediated Isothermal Amplification for Rapid Detection of Newcastle Disease Virus*. J Clin Microbiol.2005; 1646–1650.

23- Kuboki A, Inoue N, Sakurai T, Di Cello F, Grab D, Suzuki H, Sugimoto C, etal. *Loop-Mediated Isothermal Amplification for Detection of African Trypanosomes*. J Clin Microbiol. 2003; 5517–5524.

24- Kurosak Y, Takada A, Ebihara H, Grolla A, Kamo N, Feldmann H, etal. Rapid *and simple detection of Ebola virus by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification*. Journal of Virological Methods. 2007; 141.78-83.

25- Enomoto Y, Yoshikawa T, Ihira M, Akimoto Sh, Miyake F, Usui C, et al. *Rapid Diagnosis of Herpes Simplex Virus Infection by a Loop-Mediated Isothermal Amplification Method*. J Clin Microbiol.2005; 951–955.

26- Fukuta Sh, Kato Sh, Yoshida K, Mizukami Y, Ishida A, Ueda J. *Detection of tomato yellow leaf curl virus by loop-mediated isothermal amplification reaction*. Journal of Virological Methods.2003; 112.35-40.

27- Iwamoto T, Sonobe T, Hayashi K. *Loop-Mediated Isothermal Amplification for Direct Detection of Mycobacterium tuberculosis Complex, M. avium, and, M. intracellulare in Sputum Samples*. J Clin Microbiol.2003; 2616–2622.

28- Yoshida A, Nagashima Sh, Ansai T, Tachibana M, Kato H, Watari H, et al. *Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Rapid Detection of the Periodontopathic Bacteria Porphyromonas gingivalis,Tannerella forsythia, and Treponema denticola*. J Clin Microbiol.2005; 2418–2424.

www.SID.ir