مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و یکم/شماره ۲۵۸/هفته چهارم آذر ماه ۱۳۹۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۳/۲۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۷/۲۴

ارزیابی تکنیک مولکولی تکثیر هم‌دما به واسطه‌ی حلقه در تشخیص کراتیت‌های آدنوویروس

مهدخت محمدی[۱]، دکتر محمدحسن شاه حسینی[۲]، معصومه تک روستا[۱]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: آدنوویروس‌ها از مهم‌ترین عوامل ایجاد عفونت‌های چشم می‌باشند. شناسایی سریع و به موقع کراتیت آدنوویروسی برای درمان مناسب و جلوگیری از گسترش بیماری از مسایل عمده در تشخیص این ویروس است. روش‌های تشخیص این ویروس دارای محدودیت‌هایی هستند و امکان استفاده از آن‌ها به راحتی و در همه‌ی مراکز تشخیصی وجود ندارد. در این تحقیق با کمک تکنیک مولکولی تکثیر هم‌دما به واسطه‌ی حلقه (LAMP یا Loop mediated isothermal amplification)، این ویروس در بیماران با دقت، سرعت و سهولت بیشتری تشخیص داده شد.

روش‌ها: پژوهش حاضر یک مطالعه‌ی توصیفی- مقطعی بود که در سال ۱۳۹۱ بر روی ۸۶ بیمار مشکوک به کراتیت آدنوویروسی مراجعه کننده به بیمارستان فارابی و لبافی‌نژاد تهران انجام شد. DNA نمونه‌های بیماران به روش Boiling و DNG-Plus استخراج شد. پرایمرهای ویژه برای تکنیک LAMP به وسیله‌ی نرم‌افزار Primer explorer نسخه‌ی ۴ طراحی گردید. آزمون‌های حساسیت و ویژگی برای تست LAMP انجام شد و سپس بر روی نمونه‌ها بهینه گردید و محصول LAMP به وسیله‌ی اضافه کردن سایبرگرین، بررسی شد.

یافته‌ها: تست LAMP بر اساس پلاسمید حاوی کل ژنوم آدنوویروس اپتیمایز گردید. حساسیت تست در حد یک پارتیکل ویروس ارزیابی شد و هیچ واکنش مثبتی با سایر عوامل در تست ویژگی، ایجاد نشد. از ۸۶ نمونه‌ی مشکوک به کراتیت آدنوویروسی، ۲۸ نمونه (۳۲ درصد) در تست مثبت شدند.

نتیجه‌گیری: استفاده از تکنیک مولکولی LAMP در این تحقیق برای تشخیص کراتیت آدنوویروسی نشان داد که این تکنیک، دارای حساسیت و دقت بالایی می‌باشد و روشی سریع و قابل اعتماد برای تشخیص عفونت‌هایی مانند کراتیت، که برای درمان رضایت‌بخش نیازمند تشخیص سریع است، می‌باشد.

واژگان کلیدی: آدنوویروس، تکثیر هم‌دما به واسطه‌ی حلقه، کراتیت، DNA

ارجاع: محمدی مهدخت، شاه حسینی محمدحسن، تک روستا معصومه. **ارزیابی تکنیک مولکولی تکثیر هم‌دما به واسطه‌ی حلقه در تشخیص کراتیت‌های آدنوویروس.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۲؛ ۳۱ (۲۵۸): ۱۷۲۲-۱۷۱۳

مقدمه

کراتیت (Keratitis) چشمی ازشایع‌ترین بیماری‌های چشم می‌باشدکه علت بسیاری ازمراجعات به مراکزدرمانی راتشکیل می‌دهد. عوامل مختلفی در ایجاد کراتیت چشمی نقش دارند که از جمله‌ی آن‌ها می‌توان به عوامل ویروسی، باکتریایی، قارچی، انگلی، سمی، شیمیایی و بیماری‌های سیستمیک اشاره کرد. از شایع‌ترین عوامل ایجادکننده‌ی کراتیت چشمی آدنوویروس‌ها هستند (۱۰ تا ۷۵ درصد موارد) (۱). به دلیل شیوع بالای این عفونت به ویژه در انسان،

۱- کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
۲- دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهر قدس، تهران، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر محمد حسن شاه حسینی
Email: shahhosseiny@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

تشخیص سریع کراتیت آدنوویروس نقش بسزایی در کنترل و جلوگیری از گسترش بیماری و کاهش بینایی فرد دارد. روش‌های سنتی تشخیص آدنوویروس، پیچیده و زمان‌بر هستند و فاقد حساسیت و ویژگی کافی می‌باشند (۲).

معمول‌ترین روش تشخیص، جداسازی آدنوویروس از محیط کشت سلولی و ردیابی افزایش ۴ برابر یا بیشتر تیتر آنتی‌بادی علیه این ویروس در بدن است (۳). با این حال کشت ویروس زمان‌بر است و دوره‌ی انکوباسیون آن گاهی ممکن است تا ۲۱ روز هم به طول بیانجامد (۴). تست‌های سرولوژیک هم زمان‌بر هستند و هم آنتی‌ژن اختصاصی بسیار زیادی نیاز دارند (۲). از روش هیستوپاتولوژی هم برای تشخیص آدنوویروس استفاده می‌شود، ولی در این روش گاه بر اثر خطای دید انکلوزیون‌های داخل هسته‌ای حاوی آدنوویروس با ویروس‌های کند رشد هرپس، اشتباه تشخیص داده شوند (۵).

خوشبختانه در سال‌های اخیر تکنیک‌های مولکولی برای شناسایی آدنوویروس توسعه یافته‌اند. یکی از مهم‌ترین این تکنیک‌ها، PCR (Polymerase chain reaction) است که از سرعت و حساسیت بالایی برخوردار است. ولی این روش محدودیت‌هایی مانند نیاز به دستگاه گران قیمت دارد.

تکنیک تکثیر هم دما به واسطه‌ی حلقه (Loop mediated isothermal amplification یا LAMP) روشی ساده و سریع است که توسط Mori و Notomi (۶) و Notomi و همکاران (۷) ابداع گردید. در این تکنیک DNA هدف در شرایط هم‌دما تکثیر می‌یابد و به دلیل صرف نشدن زمان برای تغییر دما، روشی بسیار سریع است (۷-۶). در روش LAMP مراحل جداسازی و تکثیر هر دو به طور هم‌زمان انجام می‌شود (۸). در این روش از ۴ پرایمر (۲ پرایمر داخلی FIP و BIP) و ۲ پرایمر خارجی (F3 و B3) استفاده می‌شود. Mori و همکاران (۹) و Nagamin و همکاران (۱۰)، ۲ پرایمر ویژه‌ی لوپ (FLP و BLP) را به واکنش اضافه کردند. در مجموع ۸ ناحیه‌ی ژنی از DNA الگو شناسایی می‌شود (۱۰-۹). محصول نهایی واکنش، قطعات DNA با ساختار ساقه- حلقه به همراه قطعات تکثیریافته‌ی DNA با تکرارهای معکوس و ساختارهای گل کلمی با لوپ‌های فراوان می‌باشد (۱۱-۱۰).

در این روش می‌توان به جای الکتروفورز، با افزودن سایبرگرین ۰/۱ درصد و مشاهده در زیر نور ماورای بنفش (Ultraviolet یا UV) در زمان کوتاه‌تری آدنوویروس را تشخیص داد. همچنین این تکنیک نیاز به تجهیزاتی مانند ترموسایکلر ندارد و استفاده از آن آسان و کم هزینه است. هدف از این تحقیق، ارزیابی روش LAMP در تشخیص کراتیت‌های آدنوویروسی بود.

روش‌ها

پژوهش حاضر یک مطالعه‌ی توصیفی- مقطعی بود که در سال ۱۳۹۱ انجام شد. در این مطالعه ۸۶ بیمار مشکوک به عفونت چشمی کراتیت آدنوویروسی که به بیمارستان فارابی و لبافی‌نژاد تهران مراجعه کرده بودند، انتخاب شدند. این انتخاب بر اساس تظاهرات بالینی بیمار در معاینه‌ی پزشک متخصص اتجام گرفت. برای نمونه‌گیری پزشک متخصص با استفاده از سرنگ‌هایی با قطر ۱۴ میلی‌متر، خراش‌هایی در

www.SID.ir
www.mui.ac.ir
Archive of SID

قسمت‌های سطحی قرنیه‌ی بیماران ایجاد شد. نمونه‌ی برداشته‌شده در میکروویال‌هایی حاوی ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل قرار داده شد و نمونه‌های جمع‌آوری‌شده به سرعت به آزمایشگاه منتقل می‌گردند.

پلاسمید حاوی ژنوم آدنوویروس تیپ ۵، که از بخش ویروس‌شناسی انستیتو پاستور تهیه گردید، استخراج شد تا به عنوان شاهد مثبت و DNA الگو استفاده شود. برای استخراج DNA از دو روش جوشاندن (Boiling) و DNG-plus استفاده گردید.

از مراحل بسیار مهم و حساس تکنیک LAMP طراحی پرایمرهای ویژه‌ی سایت هدف می‌باشد که فرایندی پیچیده و دقیق است و به صورت دستی انجام نمی‌شود. این کار با کمک نرم‌افزار ویژه‌ای که توسط Notomi در سایت Eiken قرارداده شده است، انجام می‌شود. در این مطالعه، پرایمرهای LAMP با کمک نرم‌افزار Primer explorer نسخه‌ی ۴، ویژه‌ی قسمت‌هایی از ژن هگزون آدنوویروس تیپ ۵ طراحی شدند.

در این مطالعه مبنای اولیه‌ی غلظت مواد مورد نیاز در واکنش، مقایسه‌ی روش‌های مطالعات Notomi و همکاران (۷)، Mori و همکاران (۹) و Nagamine و همکاران (۱۰) بود. اما این غلظت‌ها به طور اختصاصی برای واکنش‌های مورد بررسی توسط آن‌ها بیان شده بود. در نتیجه غلظت کلیه‌ی مواد مورد نیاز واکنش مورد مطالعه‌ی ما، باید به طور مجدد بررسی و بهینه می‌گردید. برای به دست آوردن بهترین غلظت مواد مورد استفاده در واکنش ($MgSo_4$، پرایمرها، بتایین، dNTP و DNA الگو)، شیبی از غلظت‌های مختلف آن‌ها با توجه به شرایط آزمایش مورد بررسی قرار گرفت. همچنین زمان و دما با توجه به شرایط آزمایش ارزیابی و بهینه‌سازی شد. برای تعیین بهترین دمای واکنش، شیبی از دماهای نزدیک به یکدیگر در محدوده‌ی دمای فعالیت آنزیم و دماهای چسبیدن پرایمرهای مورد استفاده، بررسی شد. برای این منظور ۹ واکنش در ۹ دمای مختلف (از ۵۸ تا ۶۶ درجه‌ی سانتی‌گراد) انجام شد. به منظور تعیین بهترین زمان برای انجام واکنش، چهار فاصله‌ی زمانی ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ دقیقه بررسی شد. واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل: مخلوطی از ۵/۲ میکرولیتر آب مقطر، ۱ میکرولیتر بافر × ۱۰، ۱ میکرولیتر مخلوطی از پرایمرهای خارجی (F3/B3) با غلظت ۰/۲ میکرومول و پرایمرهای داخلی (FIP/BIP) با غلظت ۱/۶ میکرومول، ۱ میکرولیتر از پرایمرهای loop (LB/LP) با غلظت ۰/۸ میکرومول، ۱/۸ میکرولیتر MgSo4 با غلظت ۷ میلی‌مول، ۱ میکرولیتر آنزیم DNA پلیمراز Bst (۸ واحد)، ۴ میکرولیتر Betain با غلظت ۰/۸ مول، ۳/۵ میکرولیتر از dNTPs با غلظت ۱/۴ میلی‌مول و ۵ میکرولیتر از DNA استخراج‌شده، بود. این واکنش در مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد انجام شد. در هر مرحله از واکنش شاهد مثبت و منفی در نظر گرفته شد.

بعد از استخراج DNA از ۸۶ نمونه‌ی مورد مطالعه، تمامی آن‌ها به وسیله‌ی تکنیک LAMP مورد بررسی قرار گرفتند. به منظور اطمینان از صحت انجام واکنش و عدم ایجاد مثبت کاذب، در هر دور کاری یک شاهد مثبت و یک شاهد منفی نیز قرار داده شد. برای ارزیابی محصول واکنش یک میکرولیتر سایبرگرین به هر لوله‌ی واکنش اضافه گردید و با دستگاه ترانس ایلومینیتور با طول موج ۳۰۲ نانومتر بررسی شد. لوله‌ی

Archive of SID
www.SID.ir

حاوی واکنش مثبت به رنگ سبز فلوئورسانس و لوله‌ی منفی به رنگ نارنجی مشاهده شد.

برای تعیین حساسیت تست LAMP، واکنش بهینه‌شده بر روی رقت‌های مختلف DNA ویروس از 10^7 تا ۱ پارتیکل مورد آزمایش قرار گرفت. برای تعیین ویژگی، تست LAMP بهینه‌شده بر روی DNA موش، انسان، توکسوپلاسما گوندی، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، ساکارومیسس سرویزیه، اشریشیا کلی و cDNA ویروس هپاتیت C به همراه نمونه‌ی شاهد مثبت و منفی مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها

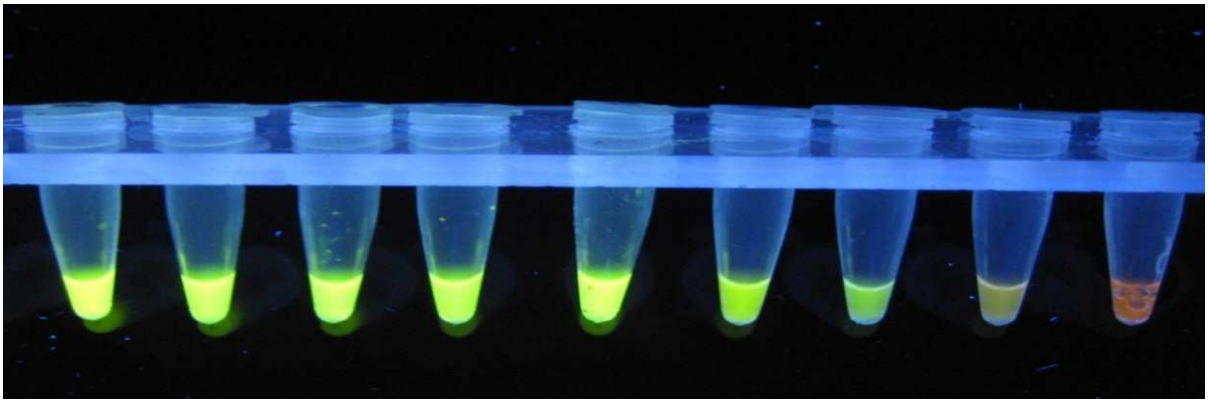
بعد از بهینه‌سازی واکنش LAMP و مشاهده‌ی نتایج، واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل: مخلوطی از ۵/۲ میکرولیتر آب مقطر، ۱ میکرولیتر بافر ×۱۰، ۱ میکرولیتر مخلوطی از پرایمرهای خارجی (F3/B3) با غلظت ۰/۲ میکرومول و پرایمرهای داخلی (FIP/BIP) با غلظت ۱/۶ میکرومول، ۱ میکرولیتر از پرایمرهای loop (LB/LP) با غلظت ۰/۸ میکرومول، ۱/۸ میکرولیتر MgSo4 با غلظت ۷ میلی‌مول، ۱ میکرولیتر آنزیم DNA پلیمراز Bst (۸ واحد)، ۴ میکرولیتر Betain با غلظت ۰/۸ مول، ۳/۵ میکرولیتر از dNTPs با غلظت ۱/۴ میلی‌مول و ۵ میکرولیتر از DNA الگو، انجام شد.

توالی پرایمرهای طراحی‌شده به وسیله‌ی نرم‌افزار Primer Explorer نسخه‌ی ۴، ویژه‌ی توالی‌های ژن هگزون آدنوویروس در زیر آمده است:

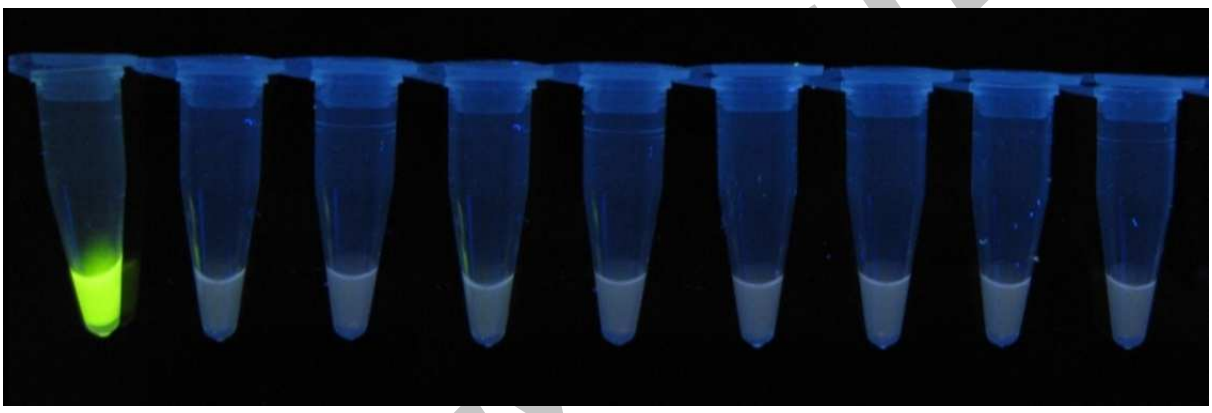
F3ADENO
5'- GCCTCGGAGTACCTGAGC-3'
B3 ADENO
5'-TGAACCGCGCTTTGTACG-3'
FIP ADENO
5'-TGCCACCGTGGGGTTTCTAAAC-CCGGGCTGGTGCAGTT-3'
BIP ADENO
5'-CCTACGCACGACGTAACCACAGAGT ACGCGGTATCCTCGC-3'
LFADENO
5'-AGGCTGAAGTACGTCTCGGT-3'
LB ADENO
5'-TTGACGCTGCGGTTCATCC-3'

این واکنش در مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد انجام شد. در هر مرحله از واکنش کشاهد مثبت و منفی گذاشته شد. بعد از بهینه نمودن دمای واکنش، بهترین نتیجه در دمای ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به دست آمد زیرا در این دما میزان تکثیر DNA افزایش یافت. برای مشخص کردن زمان واکنش LAMP زمان‌های مختلفی (از ۵۸ تا ۶۶ درجه‌ی سانتی‌گراد) به کار برده شد. در دماهای ۵۸ تا ۶۳ درجه‌ی سانتی‌گراد هیچ واکنشی صورت نگرفت، به طوری که بعد از افزودن سایبرگرین به لوله‌ها و مشاهده در زیر نور UV همگی به رنگ نارنجی-بنفش دیده شدند. واکنش در دمای ۶۴ و ۶۶ درجه‌ی سانتی‌گراد به صورت ضعیف انجام گرفت و لوله‌های مربوط به این دماها سبز بسیار کم رنگ دیده شدند. بهترین دما برای انجام واکنش ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به دست آمد. در واقع سبزترین لوله‌ی مربوط به انجام واکنش در دمای ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد بود. بنابراین واکنش LAMP در ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه بهینه‌سازی شد. برای تعیین حساسیت، رقت‌های مختلفی از ژنوم تهیه شد و با آن LAMP انجام شد. رقت اولیه‌ی ژنوم 10^7 بود. این ژنوم اولیه تا یک پارتیکل ویروس رقیق‌سازی شد. با این روش حساسیت تست LAMP بهینه‌شده تا یک پارتیکل ویروس تعیین گردید. (شکل ۱).

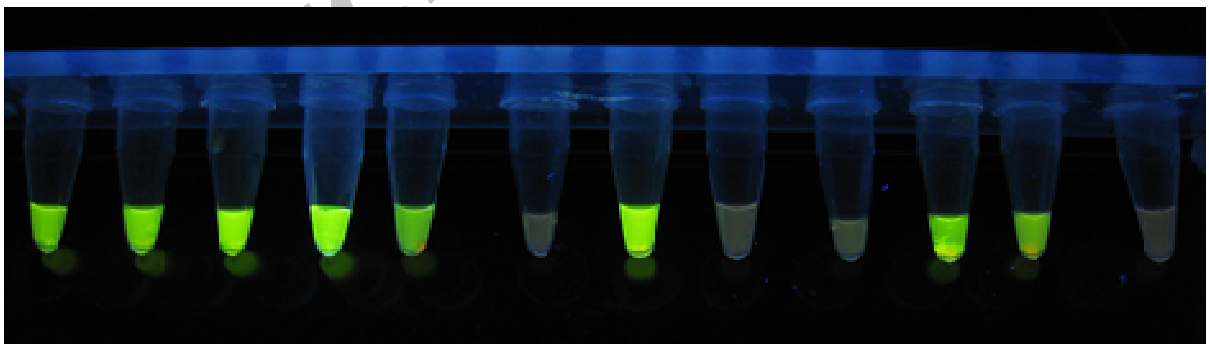
Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۱. نتایج واکنش سایبرگرین برای اندازه‌گیری حساسیت واکنش LAMP (Loop mediated isothermal amplification).
از چپ به راست لوله شماره‌ی ۱: 10^7 پارتیکل، ۲: 10^6 پارتیکل، ۳: 10^5 پارتیکل، ۴: 10^4 پارتیکل، ۵: 10^3 پارتیکل، ۶: 10^2 پارتیکل، ۷: ۱۰ پارتیکل، ۸: ۱ پارتیکل و ۹: شاهد منفی



شکل ۲. تعیین اختصاصیت تست LAMP (Loop mediated isothermal amplification). از چپ به راست لوله شماره‌ی ۱:کنترل مثبت، ۲: واکنش LAMP با DNA موش،۳: با DNA انسان، ۴: با DNA اشرشیا کلی و ۵: با DNA ساکارومیسس سرویزیه



شکل ۳. نتیجه‌ی انجام واکنش LAMP (Loop mediated isothermal amplification)در شناسایی آدنوویروس. از چپ به راست: لوله‌ی شماره‌ی ۱: شاهد مثبت، ۲: نمونه‌ی ۶۱ (مثبت)، ۳: نمونه‌ی ۶۵ (مثبت)، ۴: نمونه‌ی ۶۷ (مثبت)، ۵: نمونه‌ی ۶۸ (مثبت)، ۶: نمونه‌ی ۵۷ (منفی)، ۷: نمونه‌ی ۷۶ (مثبت)، ۸: نمونه‌ی ۷۱ (منفی)، ۹: نمونه‌ی ۸۲ (منفی)، ۱۰: نمونه‌ی ۷۹ (مثبت)، ۱۱: نمونه‌ی ۸۳ (مثبت)، ۱۲: شاهد منفی

www.SID.ir

تست LAMP با استفاده از ۶ پرایمر ویژه، به صورت بسیار اختصاصی عمل کرد، به طوری که به جز DNA آدنوویروس واکنشی با DNA به دست‌آمده از سایر میکروارگانیسم‌ها صورت نگرفت (شکل ۲).

در نهایت با کمک تکنیک LAMP بهینه‌شده، DNAهای استخراج‌شده از نمونه‌های چشمی مشکوک به کراتیت آدنوویروسی، مورد ارزیابی قرار گرفتند و ۲۸ نمونه (۳۲ درصد) جواب مثبت و حضور آدنوویروس را نشان دادند (شکل ۳).

بحث

یکی از بیماری‌های شایع که توسط آدنوویروس در انسان ایجاد می‌شود، عفونت چشمی کراتیت است، به طوری که ۱۰ تا ۷۵ درصد آن به آدنوویروس نسبت داده می‌شود (۱). در مطالعه‌ای که توسط سهرابی و همکاران انجام گرفت، میزان شیوع عوامل میکروبی کراتیت در بیماران بیمارستان فیض اصفهان نشان داد که در ۹۵ مورد (۴۸/۵ درصد) از نمونه‌های مربوط به ملتحمه‌ی چشم بیماران، آدنوویروس وجود داشت، که در ۳۷ مورد آن (۱۸/۹ درصد) آن، آدنوویروس به تنهایی و به عنوان تنها عامل عفونی شناخته شده است (۱۲).

تشخیص عامل ایجادکننده‌ی کراتیت چشمی بسیار مهم است، چرا که اگر بیماری کراتیت چشمی زود تشخیص داده نشود و عامل بیماری‌زا به طور دقیق تعیین نگردد و درمان به موقع و صحیح انجام نگیرد، بیماری گسترش پیدا می‌کند تا جایی که ممکن است حتی بینایی فرد هم دچار مشکل گردد (۱۳). برای تشخیص آدنوویروس، روش‌های سنتی، پیچیده و زمان‌بر است و فاقد حساسیت و ویژگی کافی می‌باشند. شناسایی و تکثیر اسید نوکلوئیک آدنوویروس از طریق تکنیک‌های مولکولی از جمله روش‌هایی است که حساسیت و ویژگی بالایی دارد و نسبت به روش‌های سنتی تشخیص آدنوویروس، در مدت زمان کوتاه‌تری قابل انجام است. یکی از معروف‌ترین و رایج‌ترین روش‌های مولکولی، تکنیک PCR است که دارای مزایا و کاربردهای زیادی است. با این حال PCR معایب و مشکلات خاص خود را دارد. یکی از بزرگ‌ترین مشکلات PCR ایجاد آلودگی در نمونه‌های مورد بررسی است. یکی از مهم‌ترین عوامل در ایجاد آلودگی، مراحل بعد از PCR است که منجر به ایجاد مثبت کاذب می‌شوند. به علاوه تکنیک‌های PCR برای تکثیر به تجهیزات پیشرفته نیاز دارند. (۷)

روش LAMP نسبت به PCR یک روش سریع، ساده و یک مرحله‌ای است که می‌تواند با تعداد اندکی DNA، نسخه‌های زیادی (10^9) را در کمتر از یک ساعت در شرایط یکسان دمایی و بدون نیاز به واسرشت شدن DNA الگو ایجاد نماید (۱۴، ۱۰-۹، ۷)، اما مهم‌ترین چالش روش LAMP پیچیدگی پرایمر و استفاده از نرم‌افزارهای پیشرفته می‌باشد (۸). یکی دیگر از فواید استفاده از LAMP، تکثیر ساختارهای ساقه- حلقه می‌باشد که منجر به تجمع مقدار زیادی محصولات با طول‌های مختلف می‌شود. در نتیجه شناسایی DNA تکثیرشده را بسیار آسان می‌سازد (۱۵). حساسیت این روش نسبت به PCR بیشتر است و ویژگی آن برای تشخیص و تکثیر DNA هدف، به دلیل مشارکت ۶ پرایمر اختصاصی LAMP که ۸ توالی را روی ژن شناسایی می‌کنند، بسیار بالا

Archive of SID
www.SID.ir

است. در بسیاری از مطالعات انجام‌شده روش LAMP و نتایج آن با سایر روش‌های دیگر به ویژه PCR مورد مقایسه و ارزیابی قرار گرفت که به برخی از آن‌ها اشاره می‌کنیم.

Reddy و همکاران برای بررسی هرپس سیمپلکس I عامل التهاب شبکیه‌ی چشم از هر دو روش LAMP و RT-PCR (Real time PCR) استفاده کردند. در هر دو روش ۴ نمونه مثبت و ۱۶ نمونه منفی بودند. نتایج این مطالعه تطابق ۱۰۰ درصد این دو روش را نشان می‌دهد. در این تحقیق حساسیت هر دو روش، ۱۰ پارتیکل ویروس و اختصاصیت هر دو ۱۰۰ درصد گزارش گردید. از نظر آنان هر دو روش برای تعیین DNA هرپس سیمپلکس مناسب بود. با این همه با توجه به نیاز PCR به ترموسایکلر و روش‌های تشخیصی بعد از تکثیر ژنوم، LAMP به عنوان روشی ساده، دقیق و بسیار حساس معرفی شد (۱۶).

بهرامی و همکاران برای تشخیص ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ و ۲ از روش LAMP استفاده کردند و نتایج را با روش PCR مقایسه کردند. در این تحقیق از ۱۸۴ نمونه‌ی CSF (Cerebrospinal fluid)، در تکنیک LAMP ۶۰ نمونه مثبت تشخیص داده شد، در حالی که با تکنیک PCR، ۴۵ نمونه مثبت گزارش شدند. به این ترتیب حساسیت تکنیک LAMP ۱۰ برابر بالاتر از تکنیک PCR نشان داده شد، به طوری که حساسیت روش LAMP تا ۵ پارتیکل ویروس و حساسیت PCR تا ۵۰ پارتیکل ویروس ارزیابی شد (۱۷).

اصفهانی و همکاران برای تشخیص سریع و ساده‌ی ویروس هپاتیت C از روش RT-LAMP استفاده کردند و نتایج تحقیق خود را با روش RT-PCR مورد ارزیابی قرار دادند. در این تحقیق حساسیت تست LAMP ۸ پارتیکل ویروس و PCR تا ۸۰ پارتیکل گزارش شد. اختصاصیت هر دو روش ۱۰۰ درصد بیان شد (۱۸).

کهن و همکاران برای تشخیص سریع کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکولوزیس از روش LAMP استفاده کردند. محدودیت تشخیصی LAMP، ۵ fg از DNA معادل یک کپی از ژنوم مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بود در حالی که حساسیت PCR، ۱۰۰ fg از DNA معادل ۲۰ کپی به دست آمد. و اختصاصیت هر دو روش ۱۰۰ درصد گزارش گردید (۱۹).

مرادی و همکاران برای تشخیص سالمونلا دو روش LAMP و PCR را مورد بررسی قرار دادند. در گزارش آنان حساسیت تست LAMP ۱۰۰ برابر PCR گزارش شد. بر اساس نتایج این تحقیق در روش LAMP در عرض کمتر از ۹۰ دقیقه، تشخیص انجام شد، ولی در PCR معمولی، تشخیص بیش از ۳ ساعت به طول انجامید. مزیت دیگر LAMP در این تحقیق، عدم وابستگی به چرخه‌های دمایی و دستگاه ترموسایکلر بیان شد (۲۰).

Poschl و همکاران برای تشخیص عفونت‌های مالاریا، روش‌های میکروسکوپی، Nested PCR و روش LAMP را با هم مقایسه کردند. در این تحقیق میکروسکوپ از ۴۸ نمونه‌ی Plasmodium falciparum، ۴۴ نمونه را آلوده نشان داد (حساسیت ۹۲ درصد). در روش Nested PCR و LAMP هر ۴۸ نمونه جواب مثبت را نشان دادند یعنی حساسیت هر دو تست ۱۰۰ درصد اعلام شد. تمام نمونه‌های غیر Falciparum با LAMP جواب

Archive of SID

www.SID.ir

منفی نشان دادند (اختصاصیت ۱۰۰ درصد). اما با روش PCR بار اول ۵ نمونه جواب مثبت نشان داد (اختصاصیت ۹۱ درصد) و با تکرار تست و بار دوم همه‌ی نمونه‌ها منفی شدند. این نتیجه نشان‌دهنده‌ی آلودگی در تست اول بود که باعث جواب مثبت کاذب شده بود. با میکروسکوپ ۴ نمونه جواب مثبت کاذب داشتند (اختصاصیت ۹۳ درصد). به علاوه در مطالعه‌ی Poschl و همکاران همین تست‌ها برای Plasmodium vivax انجام شد. از ۲۲ نمونه، با کمک میکروسکوپ ۱۵ نمونه مثبت شد (حساسیت ۶۸ درصد)، با روش Nested PCR و LAMP هر ۲۲ نمونه مثبت شدند (حساسیت ۱۰۰ درصد). از ۸۳ نمونه‌ی غیر Plasmodium vivax با میکروسکوپ ۲ نمونه مثبت (اختصاصیت ۹۸ درصد)، با Nested PCR یک نمونه مثبت (اختصاصیت ۹۹ درصد) و با روش LAMP تمام نمونه‌ها منفی (اختصاصیت ۱۰۰ درصد) شدند. در این تحقیق حساسیت و اختصاصیت بالای LAMP در مقایسه با سایر روش‌های تشخیصی به طور کامل مشهود بود (۲۱).

نتیجه‌گیری

تکنیک LAMP با وجود سادگی نسبت به روش‌های روتین و کلاسیک تشخیص آدنوویروس از سرعت و حساسیت بالایی برخوردار است. با توجه به این که این تکنیک نیاز به تجهیزات خاص و پیشرفته ندارد، در مقایسه با روش PCR، روشی مطمئن، حساس و کم هزینه است و جایگزین خوبی برای تست PCR به شمار می‌آید. در این مطالعه، تکنیک LAMP قادر به شناسایی ویروس حتی در کمترین مقدار یعنی یک پارتیکل نیز بود. این تحقیق با استفاده از یک Heater-Block انجام گرفت. انجام واکنش با افزودن سایبرگرین و مشاهده در زیر نور UV به سادگی بدون نیاز به الکتروفورز در زمان بسیار کوتاهی تأیید شد و نیاز به استفاده‌ی وسیع از مراحل Post amplification مرتفع گردید. با توجه به این نتایج، با استفاده از این تکنیک، تشخیص مولکولی زود هنگام ابتلا به عفونت کراتیت آدنوویروسی با دقت و حساسیت بسیار بالا در تمامی مراکز تشخیصی، بدون نیاز به تجهیزات پیشرفته و با حداقل قیمت فراهم می‌آید.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مؤسسه‌ی ایرانیان ژن فناور و پرسنل محترم آن، که امکانات علمی و آزمایشگاهی انجام این پروژه را فراهم نمودند تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1. Aoki K, Tagawa Y. A twenty-one year surveillance of adenoviral conjunctivitis in Sapporo, Japan. Int Ophthalmol Clin 2002; 42(1): 49-54.
2. Weitgasser U, Haller EM, El-Shabrawi Y. Evaluation of polymerase chain reaction for the detection of adenoviruses in conjunctival swab specimens using degenerate primers in comparison with direct immunofluorescence. Ophthalmologica 2002; 216(5): 329-32.
3. Jawetz E, Melnick J. Medical Microbiology. New York, NY: McGraw-Hill Medical; 1980.
4. Van RG, Klepper L, Peperkamp E, Schaap GJ. Immune electron microscopy and a cultural test in the diagnosis of adenovirus ocular infection. Br J Ophthalmol 1982; 66(5): 317-9.
5. Roberts AW, Whitenack DL, Carter GR. Recovery of adenoviruses and slow herpesviruses from horses having respiratory tract infection. Am J Vet Res 1974; 35(9): 1169-72.

www.mui.ac.ir
www.SID.ir
Archive of SID

6. 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): 62-9.
7. 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.
8. Parida MM, Santhosh SR, Dash PK, Tripathi NK, Lakshmi V, Mamidi N, et al. Rapid and real-time detection of Chikungunya virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. J Clin Microbiol 2007; 45(2): 351-7.
9. 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): 150-4.
10. Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. Mol Cell Probes 2002; 16(3): 223-9.
11. Mori Y, Hirano T, Notomi T. Sequence specific visual detection of LAMP reactions by addition of cationic polymers. BMC Biotechnol 2006; 6: 3.
12. Sohrabi N, Tebianian M, Moeini H. Analyzing bacterial agents of keratoconjunctivitis in patients referred to ophthalmology ward of Feiz hospital in Isfahan. J Fasa Univ Med Sci 2011; 2(1): 37-42. [In Persian].
13. Kinchington PR, Turse SE, Kowalski RP, Gordon YJ. Use of polymerase chain amplification reaction for the detection of adenoviruses in ocular swab specimens. Invest Ophthalmol Vis Sci 1994; 35(12): 4126-34.
14. Yoshida A, Nagashima S, 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; 43(5): 2418-24.
15. Aonuma H, Yoshimura A, Perera N, Shinzawa N, Bando H, Oshiro S, et al. Loop-mediated isothermal amplification applied to filarial parasites detection in the mosquito vectors: Dirofilaria immitis as a study model. Parasit Vectors 2009; 2(1): 15.
16. Reddy AK, Balne PK, Reddy RK, Mathai A, Kaur I. Development and evaluation of loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and inexpensive detection of cytomegalovirus DNA in vitreous specimens from suspected cases of viral retinitis. J Clin Microbiol 2010; 48(6): 2050-2.
17. Bahrami A, Shahhosseiny MH, Azadmanesh K, Noormohamadi Z, Moslemi E, Jadali F. Optimization of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) method for detection of herpes simplex virus type 1 and 2. Sci J Kurdistan Univ Med Sci 2011, 16(1): 56-63. [In Persian].
18. Esfahani SH, Shahhosseiny MH, Yaghmai P, Parivar K, Moslemi E, Keyvani Amini H. Rapid and simple detection of Hepatitis C virus by reverse transcriptase-loop-mediated isothermal amplification method. African Journal of Microbiology 2010; 4(23): 2580-6.
19. Kohan L, Shahhosseiny MH, Razavi MR, Parivar K, Moslemi E, Werngren J. Evaluation of loop mediated isothermal amplification for diagnosis of Mycobacterium tuberculosis complex in clinical samples. African Journal of Biothechnology 2011; 10(26): 5096-101.
20. Moradi A, Karami A, Hagh Nazari A, Ahmadi Z, Soroorizanjani R, Javadi SM. Comparison of the PCR and LAMP techniques in the diagnosis of Salmonella infection. J Zanjan Univ Med Sci 2009; 17(67): 66-77. [In Persian].
21. Poschl B, Waneesorn J, Thekisoe O, Chutipongvivate S, Karanis P. Comparative diagnosis of malaria infections by microscopy, nested PCR, and LAMP in northern Thailand. Am J Trop Med Hyg 2010; 83(1): 56-60.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Isfahan Medical School Received: 18.06.2013

Vol. 31, No. 258, 4th Week, December 2013 Accepted: 16.10.2013

The Diagnostic Value of a Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Technique for the Detection of Adenovirus Keratitis

Mahdokht Mohamadi MSc[1], Mohammad Hassan Shahhosseiny MD[2], Masumeh Takrusta MSc[1]

Original Article

Abstract

Background: Adenovirus keratitis is an important ocular infection. Quick and timely detection of adenovirus keratitis can help to prevent the spread of disease. Virus detection methods (serological and molecular) have limitations. We evaluated the diagnostic value of a loop-mediated isothermal amplification (lamp) technique for the detection of adenovirus keratitis.

Methods: In this descriptive cross-sectional study, 86 suspected patients to keratitis referred to Farabi and Labbafinejad Hospitals (Tehran, Iran) were enrolled in 2012. DNA samples of patients were extracted using boiling and DNG-Plus. Then, specific primers were designed for LAMP technique. First, sensitivity tests were done and then, optimized for the samples. At the end, LAMP production was examined adding cyber-green.

Findings: The LAMP test was optimized regard to extracted DNA from adenovirus. The sensitivity test suggested the sensitivity about one particle per virus and no result was obtained during specification test by any of tested DNA. The results of 28 samples (32%) with specific particle and different titers were positive.

Conclusion: Using LAMP technique to diagnose adenovirus showed that isothermal proliferation technique by loop (LAMP) has more sensitivity and precision. In addition, this technique provides a faster and more trusting method for diagnosing infections such as keratitis as an emergency case to be diagnosed and cured.

Keywords: Adenovirus, Loop-mediated isothermal amplification (LAMP), Keratitis, DNA

Citation: Mohamadi M, Shahhosseiny MH, Takrusta M. **The Diagnostic Value of a Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Technique for the Detection of Adenovirus Keratitis.** J Isfahan Med Sch 2013; 31(258): 1713-22

Archive of SID

1- Department of Biology, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran
2- Associate Professor, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Shahr-e-Qods Branch, Tehran, Iran
Corresponding Author: Mohammad Hassan Shahhosseiny MD, Email: shahhosseiny@yahoo.com

www.SID.ir