Archive of SID

مجله دنیای میکروب ها
سال دوم، شماره چهارم (پیاپی ۵)، زمستان ۱۳۸۸
صفحات ۲۴۲ - ۲۳۵

Original Article

تشخیص کریپتوکوکوس نئوفورمانس در بیماران ایدزی با روش تکثیر هم‌دمایی به واسطه حلقه (LAMP)

دکتر محمدحسن شاه حسینی[۱]، علیرضا رضائی امیرآبادی*[۲]، دکتر جلیل وند یوسفی[۳]، دکتر محمد قهری[۴]، دکتر کیهان آزادمنش[۵]، دکتر الهام مسلمی[۶]

[۱]دانشیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهر قدس، گروه میکروبیولوژی، [۲]کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، گروه میکروبیولوژی
[۳]استاد پژوهش، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، گروه میکروبیولوژی، [۴]استادیار، دانشگاه امام حسین (ع)، گروه زیست شناسی
[۵]استادیار، انستیتو پاستور ایران، آزمایشگاه ویروس شناسی، [۶]استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شرق/قیامدشت، گروه زیست شناسی

چکیده

زمینه و هدف: کریپتوکوکوس نئوفورمنس بیشتر افراد دچار نقص سیستم ایمنی را درگیر می‌کند و مننژیت یکی از شایع‌ترین عوارض بیماری ناشی از آن می‌باشد. روش‌های متعددی برای تشخیص این عامل کشنده وجود دارد، اما هیچ‌کدام از این روش‌ها، حساسیت، اختصاصیت و سرعت قابل قبولی را ندارند. هدف از این پژوهش، راه اندازی و بهینه نمودن روش LAMP برای تشخیص و ارزیابی میزان شیوع کریپتوکوکوس نئوفورمنس در نمونه‌های سرمی بیماران مبتلا به ایدز بود.

مواد و روش‌ها: تعداد ۳۴ نمونه سرم خون از بیماران فوق جمع آوری گردید. آزمون‌های حساسیت و اختصاصیت بر روی روش انجام و آزمون بر روی نمونه‌ها بهینه گردید. پس از انجام مراحل غیرفعال‌سازی عوامل عفونی موجود در نمونه ها و استخراج DNA، از تعداد ۶ پرایمر طراحی شده ویژه ژن *ura5*، برای به‌کارگیری آزمون LAMP در تشخیص کریپتوکوکوس نئوفورمنس استفاده شد.

یافته ها: تعداد ۳ مورد از ۳۴ نمونه جمع آوری شده با استفاده از LAMP مثبت گزارش گردید. حساسیت و اختصاصیت این روش ۱۰۰٪ ارزیابی شد.

نتیجه‌گیری: تکنیک *LAMP* روشی کاربردی، حساس، سریع و مقرون به صرفه در تشخیص کریپتوکوکوس نئوفورمنس است که در این پژوهش برای اولین‌بار در ایران راه اندازی گردید. همچنین استفاده از این روش در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی با داشتن کم‌ترین تجهیزات قابل انجام است.

واژگان کلیدی: *LAMP*، کریپتوکوکوس نئوفورمنس، ایدز، *ura5*

دریافت مقاله: آبان ۸۸ پذیرش برای چاپ: دی ۸۸

مقدمه

کریپتوکوکوس نئوفورمنس (*Cryptococcus neoformans*) قارچی کپسول دار و شبه مخمر می‌باشد که با روش جوانه زدن تکثیر می‌یابد اما تولید مثل جنسی نیز در آن‌ها دیده می‌شود (۱). این قارچ بر اساس آنتی‌ژن‌پلی ساکاریدی کپسول، به پنج سروتیپ A، D، AD، B و C تقسیم‌بندی شده است. همچنین بر اساس اختلافات مولکولی، بیوشیمیایی، اکولوژیکی و اپیدمیولوژیکی، این‌گونه به

*) آدرس برای مکاتبه: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، گروه میکروبیولوژی
تلفن: ۰۹۱۲۴۶۷۰۹۷۵
پست الکترونیک: alirezarezaei2536@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

دو واریته تقسیم می‌شود: یکی واریته نئوفورمنس دارای سروتیپ‌های A، D و AD واریته گتیی دارای سروتیپ‌های B و C تقسیم‌بندی گردیده است (۲). تغییرات فنوتیپی در سروتیپ‌های A و D در هنگام عفونت مزمن مشاهده می‌شود که موجب مقاومت مخمر در برابر فاگوسیتوز می‌گردد (۳). به تازگی سروتیپ A را کریپتوکوکوس نئوفورمنس واریته گروبیی و سروتیپ D را کریپتوکوکوس نئوفورمنس واریته نئوفورمنس نامیده شده است (۴). مطالعات فیلوژنتیکی حداقل ۶ گونه کریپتوکوکی VNI/II/B، VNIV، VGI، VGII، VGIII و VGIV را معرفی می‌کنند که با عنوان تایپ‌های مولکولی مجموعه گونه‌های بیماری‌زای کریپتوکوکوس مطرح می‌باشند و همه در گروه فیلوبازیدیلا (*Filobasidiella*) و راسته تره ملال‌ها (*Tremellales*) قرار دارند (۵).

کریپتوکوکوس نئوفورمنس یک پاتوژن فرصت طلب در افراد مبتلا به ضعف سیستم ایمنی می‌باشد و خطر ابتلا به آن در بیماران مبتلا به ایدز وجود دارد. در دهه‌های اخیر با توجه به افزایش افراد مبتلا به ایدز، کریپتوکوکوزیس اهمیت ویژه ای در سطح بهداشت عمومی یافته است (۶-۸). کریپتوکوکوس نئوفورمنس پس از نفوذ به ریه‌ها ابتدا در شش‌ها تکثیر می‌یابد و سپس تمایل به حرکت به سمت سیستم اعصاب مرکزی را نشان می‌دهد (۹). در تشخیص کریپتوکوکوزیس عصبی، ضرورت به کارگیری تکنیک‌های آزمایشگاهی حساس و اختصاصی‌تر به ویژه در معرفی درمان ضد قارچی سریع وجود دارد (۱۰).

اخیراً با وجه به کارایی محدود روش‌های آزمایشگاهی سنتی متداول (مانندکشت، رنگ آمیزی و سرولوژی) و زمان بر بودن روش‌های مولکولی مورد توجه قرار گرفته‌اند، از بین روش‌های مولکولی آزمون تکثیر هم دما به واسطه حلقه (Loop Mediated Isothermal AMPlification) یا LAMP می‌تواند جایگزین مناسبی برای روش‌های سنتی محسوب گردد (۱۱ و ۱۲).

LAMP روشی ساده و بسیار سریع است که توسط نوتومی و همکارانش در سال ۲۰۰۰ میلادی ابداع گردید. در این روش DNA هدف در شرایط هم دما تکثیر می‌یابد. چون زمانی برای تغییر دما صرف نمی‌شود در نتیجه روش LAMP بسیار سریع است (۱۳ و ۱۴). در این آزمون، مراحل باز شدن دو رشته و تکثیر، هر دو به طور هم‌زمان رخ می‌دهد (۱۵). در این روش از ۴ پرایمر [۲ پرایمر داخلی (FIP,BIP) و ۲ پرایمر خارجی(F3,B3)] استفاده می‌شود که در مجموع ۶ ناحیه در DNA الگو را مورد شناسایی قرار می‌دهد (۱۴). در سال ۲۰۰۲ میلادی Nagamin و همکارانش، ۲ پرایمر به نام loop (LF و LB) به واکنش اضافه نمودند و به این ترتیب تکثیر DNA در این واکنش سریع‌تر گردید. این دو پرایمر ویژه لوپ همراه با ۴ پرایمر قبلی ۸ ناحیه ژنی از DNA هدف را شناسایی می‌نمایند. به دلیل این که باید تمامی ۶ یا ۸ ناحیه در DNA هدف به طور صحیح توسط پرایمرها شناسایی شوند، این تست دارای اختصاصیت بسیار بالایی نسبت به سایر روش‌های موجود تکثیر هم دمایی DNA، در حال حاضر می باشد (۱۶ و ۱۷). محصول نهایی واکنش، قطعات DNA با ساختار ساقه ـ حلقه به همراه قطعات تکثیر یافته DNA با تکرارهای معکوس متعدد و هم چنین ساختارهای گل کلمی با لوپ های فراوان می‌باشد (۱۴ و ۱۸)، به طوری که مقدار زیادی DNA (۳۰-۱۰ میکروگرم در ۲۵ میکرولیتر)، می‌تواند در زمان کوتاهی (۶۰-۱۵ دقیقه) با اخذ بسیار زیاد ساخته شود (۱۷ و ۱۹). این روش با افزودن رنگ سایبرگرین ۰/۱٪ و مشاهده در زیر نور UV در زمان بسیار کم قابل ارزیابی است. در این تحقیق توانایی روش LAMP در تشخیص کریپتوکوکوس نئوفورمنس در بیماران ایدزی بررسی گردید.

مواد و روش ها

الف) کشت کریپتوکوکوس نئوفورمنس: در این پژوهش یک سویه از مرکز کلکسیون میکربی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی و یک سویه دیگر نیز از دکتر قهری در آزمایشگاه رسالت تهران تهیه و بر روی محیط کشت Niger seed agar (Acumedia Co., USA) با کشت به مدت یک هفته در دمای ۳۷ درجه گرم خانه گذاری و گردید. از این دو سویه DNA استخراج و تست LAMP بر روی این دو سویه بهینه گردید.

ب) جمع آوری نمونه: تعداد ۳۴ نمونه سرم خون تازه منجمد از افراد دچار بیماری ایدز با همکاری بخش ایدز انسیتو پاستور ایران از بیمارستان‌های مختلف تهران جمع آوری گردید.

www.SID.ir

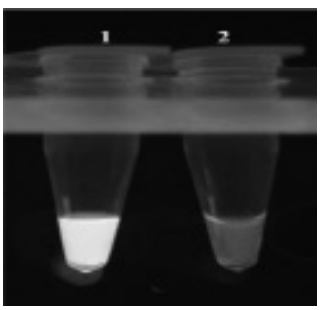
Archive of SID

جدول ۱: پرایمرهای به کار رفته در آزمون.LAMP

نام پرایمر	ترادف پرایمر ('3› 5')
F3(239-256)	5' TCCTTGGCTGCTGTCTCC 3'
B3(438-457)	5' GCCTTGCCAGAGGTAAGAAC 3'
FIP: F2(276-295) F1C(318-339)	5' TGGGACAGACTCACGTCCTTCT-AAACCGGCAAAGATATCGGC 3' F1C F2
BIP B2(403-420) B1C(341-360)	5' CCAGTGCGACAGCGATGAGC-TTCGTCCCTTGAGAGGCG 3' B1C B2
LF(296-317) LB(366-385)	5' TCTCCTTCCTGTTGTAGCAGTA 3' 5' AGCCAGTAGCACGGTGAGGG 3'

ج) استخراج *DNA*: استخراج DNA با دستگاه از کیت DNP سیناژن (cat: DN811540) طبق دستور العمل انجام شد. برای این منظور ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر پلاسما با ۵ میکرولیتر پروتئیناز k مخلوط شدند و پس از نگهداری در حرارت ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه، ۴۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده (DNG) به آن افزوده شد. در مرحله بعد ۳۰۰ میکرولیتر محلول رسوب دهنده (ایزو پروپانول) به آن اضافه گردید. سپس به مدت ۱۰ دقیقه با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) سانتریفیوژ و با تخلیه. محلول رویی ۱ سی سی محلول شستشو (اتانول ۷۰٪) به آن اضافه گردید و ۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس اتانول تخلیه ۵ دقیقه در گرم‌خانه ۶۵ درجه سانتی‌گراد برای خشک شدن کامل نگهداری شد. در نهایت به منظور تهیه محلول DNA، ۳۰µl آب دو بار تقطیر استریل به لوله اضافه و به مدت ۵ دقیقه در ۶۵°C قرار داده شد.

د) طراحی **پرایمر**: پرایمرها با کمک نرم افزار explorer V4 Primer بر اساس ترادف موجود در ژن (ACCESSIONNO *ura5*:EU399581) طراحی گردید (primer explorerV4; http:/primer explorer JP./e/) و ترادف پرایمرهای B3، F3، BIP، FIP، LB و LF برای تولید به شرکت سیناژن ارسال گردید (جدول ۱).



شکل ۱: تست بهینه شده LAMP. لوله ۱ واکنش مثبت و لوله ۲ واکنش منفی.

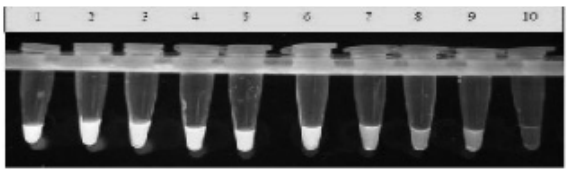
ه) واکنش *LAMP*: مخلوط واکنش در حجم ۲۵µl شامل ۵/۲µl آب دو بار تقطیر، ۲/۵µl بافر آنزیم با غلظت 1X، ۱µl مخلوطی از پرایمرهای خارجی (F3/B3) با غلظت ۰/۲µM و پرایمرهای داخلی (BIP/FIP) با غلظت ۱/۶µM، ۱µl از پرایمرهای loop (LB/LP) با غلظت ۰/۸µM، ۱/۸µl $MgSO_4$ با غلظت ۷/۲mM، ۱µl (8U) آنزیم Bst DNA پلیمراز، ۴µl Betain با غلظت ۰/۸M، ۳/۵µl از dNTPs با غلظت ۱/۴mM و ۵µl از DNA استخراج شده بود. این واکنش به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۶۶ درجه سانتی‌گراد انجام شد. در هر دور واکنش، از کنترل مثبت و منفی استفاده شد.

به منظور ارزیابی محصول واکنش یک میکرولیتر سایبرگرین یک هزارم درصد (Invitrogen lot: 49753A) به هر لوله واکنش افزوده و بر روی دستگاه ترانس ایلومینیتور و با طول موج ۳۰۲ نانومتر بررسی گردید. لوله حاوی واکنش مثبت به رنگ سبز فلورسانس و منفی به رنگ نارنجی مشاهده شد.

و) حساسیت و اختصاصیت واکنش *LAMP*: برای تعیین حساسیت تست LAMP بهینه شده، رقت‌های مختلف از مخمر کریپتوکوکوس نئوفورمنس در آب دیونیزه به کمک روش شمارش

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲: تعیین حساسیت تست LAMP، لوله ۱: کنترل مثبت، ۲ :۱۰ میلیون سلول، ۳ :۱ میلیون، ۴ :۱۰۰۰۰۰، ۵:۱۰۰۰۰، ۶:۱۰۰۰، ۷ :۱۰۰، ۸: ۵۰، ۹: ۵ سلول و ۱۰: کنترل منفی.

مستقیم میکروسکوپی تهیه و از DNA استخراج شده از رقت های مختلف استفاده گردید. برای تعیین اختصاصیت نیز تست LAMP بهینه شده بر روی DNA های انسان، موش، cDNA ی ویروس هپاتیت C، توکسوپلاسما گوندهای، مایکوباکتریوم توبرکیلوسیس، ساکارومیسس سرویزیه، و تعدادی دیگر از عوامل، به همراه کنترل مثبت و منفی مورد ارزیابی قرارگرفت.

نتایج

تست LAMP با معیارهای بهینه شده، حساسیت ۱۰۰٪ را نشان داد، در حدی که ۵ سلول کریپتوکوکوس نئوفورمنس در لوله را تشخیص داد (شکل ۲).

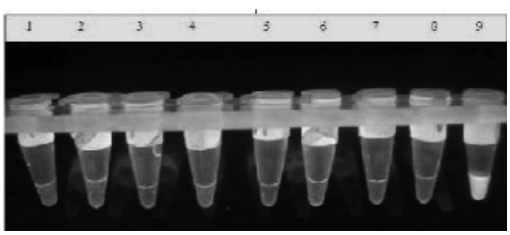
هم چنین تست LAMP از اختصاصیت کامل (۱۰۰درصد) برخوردار بود، زیرا استفاده از ۶ پرایمر ویژه، نشان دادکه واکنش بسیار اختصاصی است، به طوری که فقط با DNA مورد نظر واکنش داشت و با DNA سایر عوامل مورد آزمون، واکنشی صورت نگرفت (شکل ۳).

از تعداد ۳۴ نمونه سرم خون بیماران مبتلا به ایدز، ۳ مورد (۱۱/۳۳٪) کریپتوکوکوس نئوفورمنس با استفاده از تست LAMP شناسایی گردید (شکل ۴).

بحث

بیماری کریپتوکوکوزیس اگرچه کمیاب است، اما به عنوان یک عفونت قارچی بسیار مهم در بیماران دچار ضعف سیستم ایمنی به خصوص افراد دچار عفونت ویروس نقص سیستم ایمنی (HIV) در نواحی اروپا، شمال آمریکا و آفریقا شناخته شده است (۲۰). این بیماری که قبلا بیماری خواب نامیده می‌شد در چند سال اخیر به یک مساله بیدارگر مهم تبدیل شده است و گفته می‌شود از هر میلیون بیمار مبتلا به ایدز ۵۰۰۰۰ الی ۱۰۰۰۰۰ نفر به بیماری کریپتوکوکوزیس دچار می‌شوند (۲۱). طبق تحقیقات انجام شده، تایپ‌های مولکولی VNI و VNIV مهم ترین و بیشترین موارد جدا شده از افراد مبتلا به ایدز بوده‌اند (۲۲ و ۲۳) و کریپتوکوکوزیس که قبلا در کودکان نادر بود اکنون مداوم گزارش می‌شود (۲۴). در افراد HIV مثبت ممکن است به دو صورت مننژیت مزمن و یا کریپتوکوکمیا دیده شود (۲۵). در حالت مننژیت کریپتوکوکی مدیریت درمانی ممکن است شرایط را بهبود دهد اما در حالت کریپتوکوکمیا تجربه نشان داده است که پس از رخداد این حالت، حتی پس از به کارگیری دوز مناسب از داروی ضد قارچی اختصاصی، احتمال زنده ماندن بیماران ضعیف است (۲۶ و ۲۷). میزان ابتلا به این بیماری مرگ بار در افراد مبتلا به ایدز در ایالات متحده و اروپای غربی و استرالیا بین ۶ تا ۱۰ درصد و در صحرای آفریقا بین ۱۵ تا ۳۰ درصد تخمین زده شده است (۲۸).

افراد دچار بیماری ایدز به دلیل نقص در سیستم ایمنی سلولی، مستعد ابتلا به عوامل عفونی دیگری نیز می‌باشند. از آن‌جا که راه انتقال کریپتوکوکوس نئوفورمنس از طریق مجاری تنفسی است، در صورتی که این افراد در معرض عامل قرار گیرند، با توجه به انتشار جهانی کریپتوکوکوس نئوفورمنس به راحتی افراد دچار نقص ایمنی به ویژه افراد ایدزی را مورد حمله قرار می‌دهد. کریپتوکوکوزیس در بیماران ایدزی به شدت نواقص ایمونولوژیک بستگی دارد و متعاقب کاهش تعداد سلول‌های T، +CD4 به کمتر از ۱۰۰ سلول در هر میکرولیتر می‌رسد. بیش از ۸۰ درصد از بیماران مبتلا به ایدز در زمان تشخیص عفونت، به مننژیت یا مننگوانسفالیت دچار هستند. در این افراد که علایم مننژیت و تب با فواصل منظم بروز



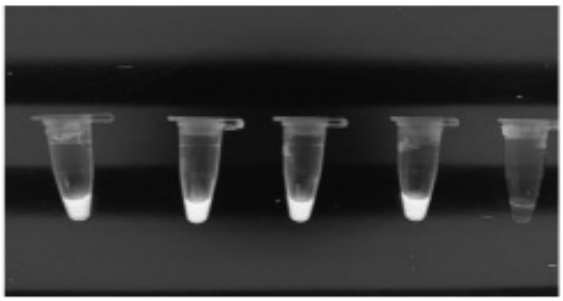
شکل ۳: تعیین اختصاصیت تست LAMP؛ لوله شماره ۱: کنترل منفی، ۲: واکنش LAMP با DNA موش، ۳: DNA انسان، ۴: DNA اشریشیا کلی، ۵: DNA ساکارومیسس سرویزیه، ۶: cDNA ویروس هپاتیت C، ۷: DNA مایکوباکتریوم توبرکیلوسیس، ۸: DNA توکسوپلاسما گوندای و لوله شماره ۹: کنترل مثبت.

www.SID.ir

Archive of SID

می‌کند حتی اگر بررسی‌های اولیه منفی باشد، عفونت کریپتوکوکوس باید مد نظر قرار گیرد.

به منظور تشخیص کریپتوکوکوس نئوفورمنس تا کنون روش‌های مختلفی ارائه شده است که هر کدام مزایا و معایبی داشته‌اند. در سال ۱۹۸۴، Cohen با مقایسه روش‌های تشخیصی رنگ‌آمیزی مرکب‌هندی و رنگ‌آمیزی فلورسانس آکریدین نارنجی و روش سرولوژی آگلوتیناسیون لاتکس روی ۱۶۲ نمونه مشکوک به کریپتوکوکوس نئوفورمنس گزارش نمود که درصد وقوع نتایج منفی کاذب از نتایج مثبت کاذب بیشتر بود استفاده از روشهای یادشده در زمانی که تعداد پایینی از عامل بیماری‌زا در واحد حجم نمونه موجود است، کاربرد تشخیصی صحیحی نخواهند داشت (۲۹). Velegraki و همکاران در سال ۲۰۰۱ میلادی، پس از استخراج DNA از نمونه‌های کلینیکی دارای تست مثبت آگلوتیناسیون لاتکس، که هر کدام ۲±۸ سلول در میلی‌لیتر داشتند، محصولات تکثیر شده مناسبی را برای هیدرولیز آنزیمی AluI و یا MspI و به دنبال آن تکمیل بررسی به کمک RFLP ایجاد نمودند. آن ها گزارش نمودند که انجام تست PCR روی ژن *ura5* و RFLP با به کارگیری یک روش استخراج DNA خانگی (In House) یا تجاری، می تواند برای شناسایی سریع واریته های مختلف کریپتوکوکوس مناسب باشد (۳۰). در سال ۲۰۰۹، Klein و همکاران نتایج حاصل از آزمون مصرف گلیسین روی محیط CGB Agar (ال کاناوانین گلیسین بروموتیمول بلو آگار) را توأم با آزمایش هیدرولیز اوره و تولید ملانین روی ۱۰۲ سویه کریپتوکوکوس نئوفورمنس و گاتیی بررسی نمودند و آن را با نتایج حاصل از روش D2 LSU DNA Sequencing (با rDNA زیرواحد بزرگ ریبوزوم) مقایسه کردند. آن‌ها گزارش نمودند که محیط CGB Agar به همراه آزمون هیدرولیز اوره و ملانین روی Niger seed Agar می‌تواند مانند روش D2 LSU DNA Sequencing برای تشخیص دو گونه فوق نتایج مناسبی ارائه دهند (۳۱).



شکل ۴: سه لوله وسط نمونه های مثبت، آخرین لوله سمت چپ کنترل مثبت و آخرین لوله سمت راست کنترل منفی.

از آنجاییکه روش‌های تشخیص مولکولی از نظر دقت، حساسیت و سرعت بر روش‌های سنتی برتری دارند، موضوع به کارگیری روش های آزمایشگاهی سریع به منظور تشخیص به موقع عامل و تعیین داروی مناسب برای درمان و کنترل عفونت، نقطه عطف محسوب می گردد.

شواهد به دست آمده از تحقیقات قبلی حاکی از توانمند بودن تکنیک LAMP است. در این تحقیق برای اولین بار در ایران این روش به منظور تشخیص کریپتوکوکوس نئوفورمنس مورد ارزیابی قرار گرفت. در سال ۲۰۰۰ برای اولین بار LAMP توسط دانشمند ژاپنی بنام Notomi و همکارانش معرفی گردید. در مقایسه با PCR، NASBA، 3SR و SDA این روش، مزایای بالاتری دارد (۱۴). در سال ۲۰۰۲، Nagamin و همکارانش، ۲ پرایمر به نام پرایمر loop (FLP و BLP) به واکنش اضافه نمودند و به این ترتیب سنتز DNA در این واکنش سریع تر گردید (۱۶). در سال ۲۰۰۴، Ushikubo ژاپنی ابراز داشت افزودن دو پرایمر لوپ BLP و FLP به LAMP می‌تواند مدت زمان مورد نیاز تست را از یک ساعت به کمتر از نیم ساعت کاهش دهد، و میزان زیادی رسوب سفید پیروفسفات منیزیم به صورت محصول جانبی در آزمایش تولید می شود که تشخیص تست مثبت را حتی با چشم امکان پذیر می کند (۳۲). تکثیر هم دما به واسطه حلقه یک روش تکثیر ژن ویژه است که در آن DNA تنها به وسیله یک آنزیم دارای خاصیت Strand displacemant یا جابه جا کننده رشته DNA (مانند Bst پلی‌مراز) در شرایط تک دمایی تکثیر می‌گردد (۱۴). در این تکنیک پرایمر داخلی جلویی (FIP) شامل قسمت‌های F2 و توالی مکمل F1(F1c) و پرایمر داخلی پشتی (BIP) شامل قسمت‌های B2 و توالی مکمل B1(B1c) می باشند که گاهی در بین این قسمت‌های دوگانه، توالی‌های فاصله اندازی از تیمیدین قرار می‌دهند که البته ضروری نیست (۱۹ و ۳۳) و F3 و B3 با رشته الگوی ابتدایی جفت شده و به کمک خاصیت آنزیم در کنار زدن

www.SID.ir

Archive of SID

رشته، یک دو رشته ای تکمیل و خارج می شود و هم زمان رشته ساخته شده توسط F1c و B1c به طور تک رشته ای برای سیکل‌های متوالی از عملکرد LF، LB، BIP و FIP برجا می‌ماند (۱۴ و ۳۲). پاسخ آزمون LAMP می تواند به سادگی با چشم غیرمسلح دیده شود به طوریکه خواه از طریق ایجاد کدورت با افزودن پلیمرهای کاتیونی یا از طریق افزودن رنگ فلورسانس سایبر گرین به محصولات LAMP، نتیجه قابل مشاهده است (۱۸ و ۱۹).

در این مطالعه به منظور اجرای آزمون LAMP، از هدف ژنی *ura5* که آنزیم اوروتیدین مونوفسفات پیروفسفوریلاز (orotidine- monophosphate pyrophosphorylase) را در کریپتوکوکوس نئوفورمنس کد می‌کند برای تشخیص عامل استفاده شد. از این ژن در تحقیقات اخیر در تعیین تایپ‌های مولکولی این میکروارگانیسم و تشخیص انواع آن‌ها استفاده شده است (۲۳).

نتیجه گیری

نتایج نشان می‌دهد که روش LAMP در تشخیص کریپتوکوکوس نئوفورمنس کارآمد بوده و به دلیل عدم نیاز به تجهیزات گران قیمت می‌تواند با داشتن حساسیت و اختصاصیت بالا عامل را شناسایی نموده و بدون استفاده از روش‌های آشکارسازی زمان بر و اقدامات دیگر نتیجه را به طور سریع مشاهده نمود که راه حل مناسبی برای استفاده در آزمایشگاه های تشخیصی کشور می‌باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر قدس به دلیل در اختیار قرار دادن تجهیزات آزمایشگاهی تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References

1. Mitchell AP. Updated view of *Cryptococcus neoformans* mating type and virulence. Infect Immun. 2003;71(9):4829-30.
2. Kwon-Chung KJVA. Do major species concepts support one,two or more species within Cryptococcus neoformans. FEMS Yeast Res. 2006;6:574-84.
3. A. Guerrero NJ, Goldman DL, Fries BC. Phenotypic switching in *Cryptococcus neoformans*. Microbiology. 2006; 152:3-9.
4. Nielsen KDOA, Heitman J. *Cryptococcus neoformans* mates on pigeon guano: implications for the realized ecological niche and globalization. Eukaryot Cell. 2007; 6(6):949-59.
5. Findley KRCM, Metin B, Kroiss J, Fonseca A, Vilgalys R, Heitman J. Phylogeny and phenotypic characterization of pathogenic Cryptococcus species and closely related saprobic taxa in the Tremellales. Eukaryot Cell. 2009; 8(3):353-61.
6. Barreto De Oliveira MTB, Theelen BT. *Cryptococcus neoformans* shows a remarkable genotypic diversity in Brazil. J clin Microbiol. 2004.;42:1356-9.
7. Bialek RW, Bekure-Nemariam KM. Detection of *Cryptococcus neoformans* DNA in tissue samples by nested and Real-Time PCR assays. Clin Diag Lab Immunol. 2002;9:461-9.
8. Pappalardo Mcsnm MSC. Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease. Rev Inst Med trop S Paulo. 2003;45:299-305.
9. D'souza CAH, Boekhout TF. Cox GM, Heitman J. Investigation of the basis of virulence in serotype A strains of *Cryptococcus neoformans* from apparently immunocompetent individuals. Curr Genet. 2004;46:92-102.
10. Paschoal RC, Hirata RC, Melhem MSC, Dias ALT, Paula CR. Neurocryptococcosis: Diagnosis by PCR Method. Rev Inst Med trop S Paulo. 2004; 46(4):203-7.
11. Bahrami A, 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. SJKU. 2011; 16(1):56-63.
12. Shahhosseiny MH, Moslemi E, Yaghmaii P. Loop mediated isothermal amplification of hepatitis B virus in hemodialysis patients. J Microb World. 2009; 2(3):183-92 [In Persian].
13. Mori YNT. Loop-mediated isothermal amplifi cation (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. J Infect Chemother. 2009; 15:62-9.

www.SID.ir

Archive of SID

14. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res. 2000; 15:28(12):E63.
15. Parida MS, Dash PK, Tripathi NK, Lakshmi V, Mamidi N, Shrivastva A, Gupta N, Saxena P, Pradeep J. Rapid and realtime detection of chikungunya virus by reverse transcription loop mediated isothermal amplifi cation assay. J clin Microbiol. 2007; 45:351-7.
16. Nagamine KH, Ta NT. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplifcation using loop primers. Molecular and Cellular Probes. 2002; 16:223-9.
17. Mori YNK, Tomita N, Notomi T. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. J Biochem Biophys Res Commun. 2001; 289:150-4.
18. Parida MSS, Kumar Dash P, Rao PVL, Morita K. Loop mediated isothermal amplification (LAMP) : a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. Rev Med Virol. 2008; 18:407-21.
19. Mori Y, Hirano T, Notomi T. Sequence specific visual detection of LAMP reactions by addition of cationic polymers. BMC Biotechnol. 2006; 6:3.
20. Blevins LB, J. Fenn, H. Segal, P. Newcomb-Gayman, K. C. Carroll. False-positive cryptococcal antigen latex agglutination caused by disinfectants and soaps. J Clin Microbiol. 1995; 33:1674-167.
21. Kauffman LBS. Cryptococcosis: A wakening giant. In: The black and white yeasts Proceedings of the 4 th International Conference on mycosis; 1978; Washington DC: Pan American Health Organisation and Science publication.p. 176-187.
22. Ellis DMD, Hajjeh RA, Warnock D, Meyer W, Barton R. Epidemiology: surveillance of fungal infections. Med Mycol 2000; 38:173-82.
23. Meyer WKS, Castañeda A, Jackson S, Huynh M, Latouche GN. Global molecular epidemiology offers hints towards ongoing speciation within *Cryptococcus neoformans*. In: Abstracts of the 5th International Conference on Cryptococcus and Cryptococcosis; 2002 March 3-7, 2002; South Australian Postgraduate Medical Education Association,Adelaide, Australia.
24. Banerjee UKJ, Sethi S, Gupta K. Sudden spurt of Cryptococcosis at a tertiary care hospital at New Delhi between. Indian J Med Res. 1995;102:272-4.
25. Kaur RRD, Kakkar M, Monga R, Sharma VK. Cryptococcal meningitis in pediatric AIDS. J Trop Ped. 2003; 49(124-125).
26. BanerjeeU JN, Sethi S. Lets be aware: Cryptococcoccosis is no more away from children. Indian Association of Medical Microbiologist. Aug 2003;Delhi Chapter Annual meeting:Safdarjung Hospital, New Delhi.
27. Khanna NCA, Desai A, Ravi V, Santosh V, Shankar SK, Satishchandra P. Cryptococcosis in the immunocompromised host with special reference to AIDS. Indian J Chest Dis Allied Sci. 2000; 42(4):311-5.
28. Powderly WG. Cryptococcal meningitis andAIDS. Clin Infect Dis. 1993; 17:837-42.
29. Cohen J. Comparison of the sensitivity of three methods for the rapid identification of *Cryptococcus neoformans*. J Clin Pathol. 1984; 37(3):332-4.
30. Velegraki AKVG, Kansouzidou A, Smilakou S, Mitroussia-Ziouva A, Legakis NJ. prospective use of RFLP analysis on amplified *Cryptococcus neoformans* URA5 gene sequences for rapid identification of varieties and serotypes in clinical samples. Medical Mycology. 2001; 39(5):409-17.
31. Klein KRHL, Deml SM, Rysavy JM, Wohlfiel SL, Wengenack NL. Identification of Cryptococcus gattii by use of L-canavanine glycine bromothymol blue medium and DNA sequencing. J Clin Microbiol. 2009; 47(11):3669-72.
32. Ushikubo H. The principle of LAMP method. Uirusu. 2004; 54:107-12.
33. Hong TCMQ, Cuong DV, Parida M, Minekawa H, Notomi T, Hasebe F, Morita K. Development and evaluation of a novel loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus. J Clin Microbiol. 2004; 42:1956-61.

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Microbial World
Volume 2, No. 4, February 2010

LAMP detection of Cryptococcus neoformans in AIDS patients

Mohammad Hassan Shahhosseiny[1], Alireza Rezaei Amirabadi[2], Jalil Vand Yousefi[3], Mohammad Ghahri[4], Kayhan Azadmanesh[5], Elham Moslemi[6]

[1]Associate Professor, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Qods branch, Tehran, Iran
[2]M.Sc., Department of Microbiology, Islamic Azad University, Karaj branch, Alborz, Iran
[3]Assistant Professor, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Karaj branch, Alborz, Iran
[4]Assistant Professor, Department of Biology, Imam Hossein University, Tehran, Iran
[5]Assistant Professor, Department of Virology, Pasteur Institute, Tehran, Iran
[6]Assistant Professor, Department of Biology, Islamic Azad University, Tehran east Branch, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objective: Cryptococcus neoformans is opportunistic capsulated yeast that infects immunocompromised individuals. Infection occurs due to inhalation of the agent and common infection form is meningitis. Several methods are common to detect this life threthening agent but none of them have well accepted in sensitivity, specificity and rapidness. In this research the effort has been on installation and optimizing the LAMP assay in order to detect the agent itself and its distribution importance of Cryptococcus neoformans in serum specimens of AIDS patients.

Material and methods: A total number of 34 serum specimens were collected from 34 AIDS patients. After applying sensitivity and specificity tests for the installed technique, optimization of the assay was performed on the specimens. The specimens got inactivated and after steps of DNA extraction, 6 designated primers for the target gene (ura5) were applyed for detection of Cryptococcus neoformans by using the LAMP method.

Results: In this study 3 specimens of the total number of 34 AIDS patients were reported positive by using LAMP technique. This it reveals the importance of Cryptococcal infection in AIDS patients.

Conclution: Loop-mediated isothermal amplification is an applicable, sensitive, quick and lucrative method for detection of Cryptococcus neoformans. Diagnostic laboratory can use this method without requiring any special instruments.

Keywords: LAMP, Cryptococcus neoformans, AIDS

Correspondence to: Alireza Rezaei Amirabadi
Tel: (+98)9124670975
Email: alirezarezaei2536@gmail.com
Journal of Microbial World 2010, 2(4).- 235-242

www.SID.ir