فصلنامه علمی پژوهشی

دانش میکروب شناسی

سال اول، شماره ۴، پاییز ۱۳۸۸

مقایسه روش سایبرگرین با کدورت سنجی در شناسایی محصول LAMP در تشخیص ویروس هپاتیت B

محمد حسن شاه حسینی [*۱] و الهام مسلمی [۲]

۱. دانشیار دانشگاه آزاد اسلامی- واحد شهر قدس- گروه میکروبیولوژی shahhosseiny@yahoo.com ۲. استادیار دانشگاه آزاد اسلامی- واحد تهران شرق (قیامدشت)- گروه زیست شناسی

چکیده

ویروس هپاتیت B (HBV) یکی از عوامل بسیار مهم در پیدایش بیماریهای کبدی و کارسینومای هپاتوسلولار می باشد. 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 استفاده از سایبرگرین با کدورت سنجی برای بررسی محصول نهایی واکنش LAMP در تشخیص ویروس هپاتیت B بررسی و مقایسه شده اند. در این مطالعه ۲۰۰ نمونه سرمی مثبت، متشکل از ۳ جمعیت مورد بررسی قرار گرفتند. ۶ پرایمر ویژه برای تکنیک LAMP طراحی گردید. پس از انجام تستهای حساسیت و ویژگی، آزمون بر روی نمونه ها بهینه گردید. محصول LAMP بوسیله الکتروفورز، اضافه کردن سایبرگرین و اسپکتروفتومتری مورد بررسی قرار گرفت. از۲۰۰ نمونه با تعداد پارتیکل مشخص و با تیترهای متفاوت جمع آوری شده، ۱۷۲ نمونه (۸۶٪) LAMP مثبت بودند. مقایسه نتایج نهایی واکنش نشان داد که الکتروفورز، اضافه کردن سایبرگرین و اسپکتروفتومتری همگی دارای نتایج مشابهی می باشند، بطوریکه با افزایش زمان واکنش به دنبال سنتز DNA، منیزیوم پیروفسفات تولید شده نیز افزایش یافته که منجر به افزایش میزان کدورت در واکنش می شود. تکنیک تکثیر هم دما بوسیله لوپ (LAMP) دارای حساسیت و ویژگی بالاتری می باشد بعلاوه مقایسه سه روش تشخیصی نشان داد که تشخیص نهایی با استفاده از سایبرگرین به تجهیزات کمتری نیاز داشته بعلاوه احتمال ایجاد آلودگی نیز به دلیل عدم الکتروفورز از بین می رود .

واژگان کلیدی: هپاتیت B، LAMP، اسپکتروفتومتری.

مقدمه

ویروس هپاتیت B یکی از اعضاء خانواده هپادناویریده است. سالانه حدود ۵۰۰،۰۰۰ تا ۱،۲۰۰،۰۰۰ نفر در اثر عفونت حاد و مزمن با هپاتیت B از بین می روند (۱). در حال حاضر عفونت هپاتیت B همچنان به عنوان یک مشکل مهم بهداشتی در سراسر دنیا باقی مانده است، بطوریکه مطابق آمار سازمان بهداشت جهانی در حال حاضر بیش از ۲ میلیارد نفر (حدود یک سوم جمعیت جهان) به ویروس هپاتیت B مبتلا گشته که شامل ۳۵۰ میلیون ناقل مزمن ویروس می باشند(۲). در ایران نیز طبق آخرین آمار رسمی در حال حاضر ۲/۵ میلیون نفر حامل ویروس هپاتیت B می باشند(۲). به نظر می رسد که۸۰-۷۰ درصد هپاتیت های مزمن توسط ویروس هپاتیت B ایجاد می شوند. می توان بیان کرد که هپاتیت B به تنهائی مهم ترین عامل بیماری کبدی و اصلی ترین علت مرگ و میر ناشی از هپاتیت در ایران به شمار

Archive of SID

www.SID.ir

می رود (۴و۳). HBsAg مهمترین مشخصه سرولوژیک تشخیصی برای عفونت هپاتیت B به حساب می آید. HBsAg معمولاً ۲ تا ۱۰ هفته بعد از اولین تماس با HBV و قبل از افزایش آنزیم های کبدی در سرم بیماران ظاهر می شود. مهمترین مشکل در کشورهای در حال توسعه و توسعه یافته، تأخیر در درمان این بیماران است، بنابراین ایجاد یک روش تشخیص حساس تر، سریع تر و دقیق تر نسبت به روشهای قبلی مدتهاست ضروری به نظر می‌رسد(۵).

روشهای تکثیر اسیدهای نوکلئیک هم دما، شامل روشهای مختلفی منجمله تکثیر بر مبنای توالی نوکلئیک اسید، تکثیر به واسطه رونویسی، تکثیر چرخه غلطان و همانند سازی سکانس خود نگهدارنده می شود (۶). در سال ۲۰۰۰، دانشمندی به نام Notomi برای اولین بار تکنیک تکثیر هم دما به واسطه حلقه (LAMP) که از ویژگی، اختصاصیت و سرعت بسیار بالایی برخوردار است را ابداع نمود (۷). تکنیک LAMP یک روش تکثیر ژن منحصر به فرد بوده که در این روش DNA می تواند در شرایط هم دما و تنها با استفاده از یک آنزیم تکثیر یابد و نیازی به اعمال دناتوراسیون DNA الگو ندارد (۸). این تکنیک از ۴ پرایمر ویژه سایت هدف تحت عنوان پرایمرهای داخلی(FIP, BIP) و پرایمرهای خارجی (F3,B3) و نیز DNA پلیمراز با خاصیت جابه جا سازی رشته سنتز شده (Bst large fragment) استفاده کرده و سبب شکل گیری ساختار ساقه- حلقه می شود. غلظت DNA تکثیر یافته را می توان با اندازه گیری کدورت ایجاد شده طی واکنش در اثر تشکیل منیزیوم پیروفسفات، بدست آورد (۹). طراحی دو پرایمر ویژه حلقه سبب افزایش سرعت واکنش LAMP می شود. در واقع وجود این ۶ پرایمر ویژه، سبب شناسایی هشت ناحیه مجزا در ژن هدف می شود. پرایمرهای خارجی (F3 وB3) تنها در مرحله غیر چرخه ایی وارد واکنش می شوند و پرایمر های درونی (FIP وBIP) با دارا بودن هر دو توالی سنس و آنتی سنس، در شکل گیری ساختار ساقه - حلقه کمک می کنند. دو پرایمر ویژه لوپ (FLP وBLP) با اتصال به توالی در ساختار حلقه، سبب تسریع و تسهیل واکنش می شوند(۱۰). تکثیر اسیدهای نوکلئیک در این واکنش با استفاده از DNA پلیمراز با خاصیت جابه جا سازی قطعات سنتز شده صورت می گیرد(۱۱).

در مرحله اول با استفاده از پرایمرهای داخلی، DNAی با ساختار ساقه- حلقه در هر دو انتها شکل می گیرد که به عنوان آغازگر به حساب می آید. در مرحله بعد یک پرایمر داخلی (FIP) به قسمتی از حلقه متصل شده و سنتز رشته DNA جانشین شونده را آغاز می کند که سبب ایجاد یک ساختار ساقه- حلقه جدید می شود که مکمل ساختار آغاز گر است، در حالیکه ساختار ساقه- حلقه اولیه همچنان باقی مانده است. به علاوه در این مرحله ساختارهایی با نواحی دارای تکرارهای وارونه نیز بوجود می آیند. در مرحله آخر این ساختارها طویل می شوند، در نهایت قطعات DNA ی با ساختار ساقه- حلقه به همراه تکرارهای معکوس متعدد و ساختارهای گل کلمی با لوپهای فراوان بوجود می آیند. در طی این واکنش، در کمتر از ۱ ساعت حدود 10^9 کپی از توالی هدف تکثیر می یابد(۱۲و۱۳).

بطوریکه بیان شد یکی از خصوصیات ویژه واکنش LAMP، توانایی آن در سنتز مقدار زیادی DNA است بعلاوه یون پیروفسفات (PPi) بعنوان محصول فرعی در اثر مصرف dNTP به میزان زیادی در طی واکنش بوجود می آید که با منیزیوم موجود در بافر($MgSo_4$) ترکیب شده و رسوب سفید رنگ (منیزیوم پیروفسفات) را تشکیل می دهد. میزان کدورت ایجاد شده در واکنش به میزان DNA سنتز شده بستگی دارد(۱۴). هر چه میزان DNA سنتز شده بیشتر باشد کدورت تولید شده نیز بیشتر خواهد بود. تشکیل این رسوب به حضور DNA الگو وابسته است یعنی اگر DNA الگو در مخلوط واکنش حضور نداشته باشد کدورتی مشاهده نخواهد شد. بنابراین حضور یا عدم حضور رسوب سفید رنگ، می تواند انجام یا عدم انجام واکنش LAMP را بیان کند(۹و۱۴).

نکته قابل توجه در واکنشLAMP این نکته است که ما بین میزان کدورت تولید شده با DNA سنتز شده رابطه خطی وجود دارد، یعنی هر چه میزان DNA بیشتر باشد میزان کدورت نیز بیشتر خواهد بود (۱۰ و۱۳). میزان سنتز DNA در واکنش LAMP حدود 20 µg/25µl است. کدورت مخلوط واکنش حاوی

Archive of SID

www.SID.ir

DNA الگو، ۱۵ دقیقه پس از شروع واکنش به تدریج آغاز شده و به آرامی افزایش می یابد(۱۰و ۱۳و۱۴).

هدف از این مطالعه بررسی مقایسه ای، ما بین روش سایبرگرین با کدورت سنجی در شناسایی محصول **LAMP**، و همینطور بررسی مزایا و معایب این روشها در تشخیص ویروس هپاتیت **B**، و ارائه الگوی مناسب در بکارگیری این تکنیک در روشهای تشخیصی عوامل بیماریزا است.

مواد و روش ها

نمونه ها:

در این مطالعه ۲۰۰ نمونه سرم جمع آوری گردید، نمونه های مورد آزمایش در این مطالعه به ۳ گروه تقسیم شدند. جمعیت اول شامل ۶۶ نمونه های سرمی، که از آزمایشگاه ویروس شناسی کیوان (دارای سیستم Cobas و مورد تایئد FDA آمریکا) جمع آوری شده بودند. لود ویروسی این نمونه ها کاملا مشخص بود. جمعیت دوم شامل ۳۶ نمونه بودند که از آزمایشگاه رسالت و آزادی تهیه گردیده و تست الیزا برای آنتی ژن ویروس هپاتیتB در آنها مثبت گزارش شده بود. گروه سوم هم ۹۸ نمونه (با تعداد پارتیکل مشخص) را شامل می گردید که از آزمایشگاه قلهک جمع آوری شده بودند.

واکنش LAMP:

یکی از مهمترین عوامل در واکنش تکثیر هم دما به واسطه لوپ، پرایمرها می باشند که به عنوان آغازگر واکنش تکثیر در شرایط آزمایشگاهی عمل می کنند. در این مطالعه، پرایمرهای LAMP با کمک نرم افزار Primer explorer V4 ویژه آنتی ژن سطحی ویروس هپاتیت B طراحی گردید. در این مطالعه از ترادف شایع در ایران (ژنوتایپ D ،سروتایپ awy2) موجود در بانک ژن (Accession No. AY741794) استفاده شد. 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، $(NH_4)_2SO_4$(10 mM) ،KCl(10 mM) ,$MgSO_4$(9 mM) و dNTP به غلظت 1.4 mM، بتایین به غلظت 0.8 M و در نهایت ۸ واحد آنزیم Bst(New England BioLabs;Lot:33/110806) بهینه گردید(۱۶).

شناسایی محصول:

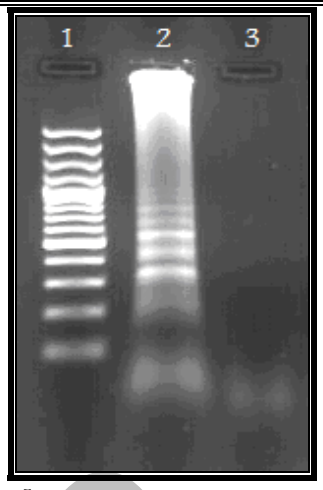
برای تعیین محصول واکنش به روش اضافه کردن رنگهای فلوئورسنت، به هر لوله واکنش مقدار ۱ مایکرولیتر سایبرگرین یک کمپانی INVITROGEN که با آب ده برابر رقیق شده بود اضافه کرده، سپس لوله ها بر روی دستگاه ترانس ایلومینیتور با طول موج اشعه ماوراء بنفش ۳۰۲ نانومتر جهت بررسی خاصیت فلوئورسانس مورد کنکاش قرار گرفت. لوله های مثبت، سبز رنگ و لوله های منفی به رنگ نارنجی خیلی کم رنگ دیده شدند. برای تعیین مقدار منیزیوم پیروفسفات تولید شده در فواصل زمانی مختلف واکنش LAMP، از ابتدای واکنش، جذب نوری نمونه‌ای با تعداد پارتیکل مشخص، و یک نمونه کنترل منفی، با استفاده از دستگاه Spectrophotometer Bio-RAD در طول موج ۴۰۰ نانومتر اندازه گیری شد. میزان DNA تولید شده طی واکنش، به وسیله اندازه گیری جذب نوری نمونه در فواصل زمانی مشخص با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اپندورف و در طول موج ۲۶۰ نانومتر مشخص گردید. بدین ترتیب غلظت DNA تولید شده در طی مراحل مختلف واکنش بدست آمد، در این حالت نیز به منظور مقایسه، واکنشی متشابه با استفاده از کنترل منفی، نیز مورد بررسی قرار گرفت(۱۶).

نتایج و بحث

DNA ویروس هپاتیت B، از سرم تهیه شده از آزمایشگاه ویروس شناسی کیوان با لود ویروسی ۴ میلیون پارتیکل در هر میلی لیتر، با استفاده از کیت DNP، استخراج گردید. با الکتروفورز محصول واکنش LAMP بهینه شده در ژل آگارز ۲٪ ، قطعات DNA با اندازه های مختلف دیده شد (شکل۱).

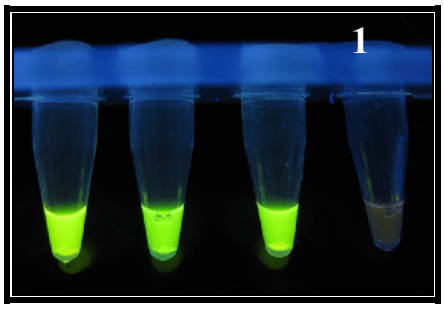
Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱ . الکتروفورز محصول LAMP در ژل آگارز ۲٪ : لاین ۱. سایز مارکر فرمنتاس 100bp DNA Ladder PLUs، ۲ . کنترل مثبت واکنش LAMP، ۳ . کنترل منفی

با افزودن سایبر گرین به لوله واکنش و مشاهده در زیر نور U.V (طول موج ۳۰۲ نانومتر)، واکنش مثبت به رنگ سبز و واکنش منفی به رنگ نارنجی دیده می شود. شکل ۲ نمونه های LAMP مثبت و منفی را در زیر نور U.V نشان می دهد.



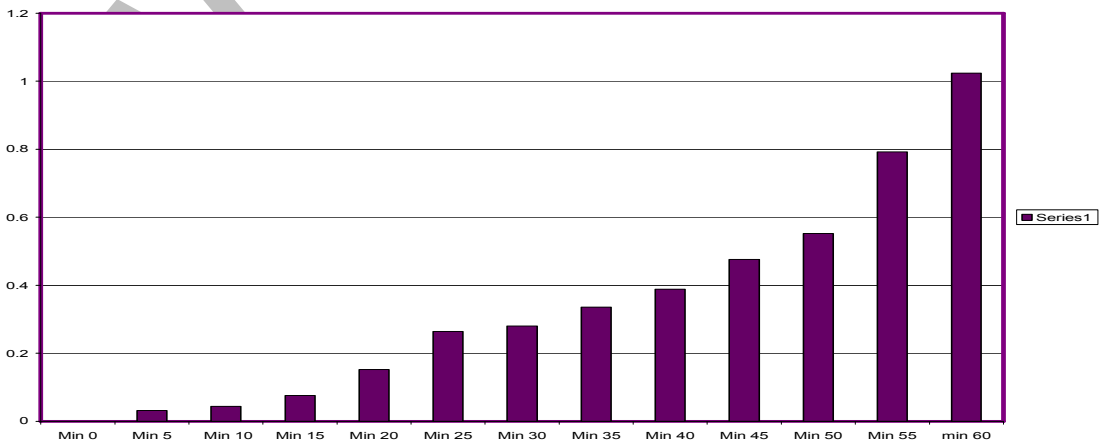
شکل ۲ . نتایج واکنش LAMP . لوله های ۳-۱ : واکنش مثبت. لوله ۴ : واکنش منفی

منیزیوم پیروفسفات ایجاد شده در طی واکنش سبب ایجاد کدورت در لوله واکنش می شود ، کدورت ایجاد شده در فواصل زمانی(۵ دقیقه یکبار) توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مورد اندازه گیری قرار گرفت. با افزایش زمان واکنش میزان تولید منیزیوم پیروفسفات افزایش می یابد تا در پایان واکنش به حداکثر مقدار خود می رسد. جدول ۱ مقدار جذب نوری منیزیوم پیروفسفات تولید شده در واکنش را در طول موج ۴۰۰ نانومتر نشان می دهد.

جدول ۱ . مقدار جذب نوری منیزیوم پیروفسفات در طی واکنش

نمونه	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲
زمان	۵	۱۰	۱۵	۲۰	۲۵	۳۰	۳۵	۴۰	۴۵	۵۰	۵۵	۶۰
جذب نوری در طول موج ۴۰۰ نانومتر	۰/۰۳۲	۰/۰۴۴	۰/۰۷۶	۰/۱۵۲	۰/۲۶۴	۰/۲۸	۰/۳۳۶	۰/۳۸۸	۰/۴۷۶	۰/۵۵۲	۰/۷۹۲	۱/۰۲۴

به تدریج با افزایش زمان بر غلظت منیزیوم پیروفسفات حاصله افزوده گشته، بطوریکه بیشترین میزان منیزیوم پیروفسفات در پایان ۶۰ دقیقه (S12)دیده شد. شکل۳ نمودار میله ای میزان کدورت تولید شده (منیزیوم پیروفسفات تولید شده) در طی ۶۰ دقیقه را نشان می دهد. با افزایش زمان واکنش، بر میزان کدورت ایجاد شده بوسیله کمپلکس های منیزیوم پیروفسفات افزوده می شود.



شکل ۳ . نمودار میله ای میزان کدورت ایجاد شده در طی واکنش.

محور افقی زمان های اندازه گیری، محور عمودی میزان جذب نوری واکنش در طول موج ۴۰۰ نانومتر

Archive of SID

www.SID.ir

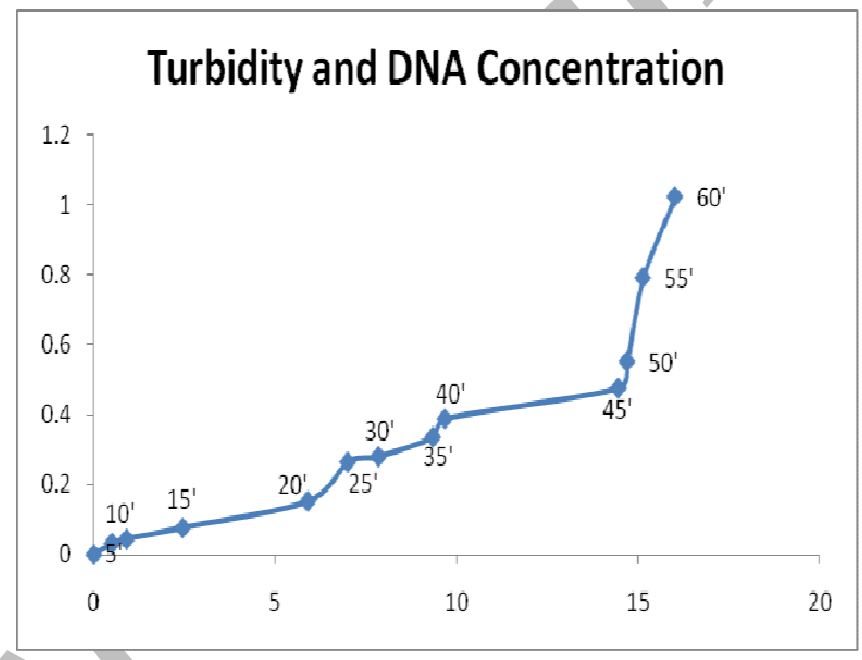
با افزایش زمان، میزان تولید DNA در طی واکنش بصورت تصاعدی افزایش می یابد که با اندازه گیری میزان جذب نوری واکنش در طول موج ۲۶۰ نانومتر در زمان‌های متناوب، غلظت های متفاوت DNA تولید شده، دیده شد.

جدول ۲ میزان DNA تولید شده (میکروگرم در ۲۵ میکرولیتر) در طی واکنش را نشان می دهد. با افزایش زمان واکنش، مقدار DNA تولید شده در واکنش نیز افزایش می یابد.

جدول ۲ . مقدار DNA تولید شده در طی واکنش

نمونه	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲
زمان	۵	۱۰	۱۵	۲۰	۲۵	۳۰	۳۵	۴۰	۴۵	۵۰	۵۵	۶۰
غلظت DNA بر حسب میکروگرم در میکرولیتر	۰/۵	۰/۹	۲/۴۵	۵/۹	۷	۷/۸۵	۹/۳۵	۹/۶۸	۱۴/۴۶	۱۴/۷	۱۵/۱۴	۱۶/۰۲

رابطه میزان کدورت ایجاد شده و غلظت DNA تولید شده در طی واکنش، درشکل ۴ به تصویر کشیده شده است. با افزایش زمان بر غلظت DNA و کدورت افزوده می شود.



شکل ۴ . نمودار خطی رابطه غلظت DNA و کدورت.

محور افقی میزان جذب نوری کدورت ایجاد شده بر اثر کمپلکس منیزیوم پیروفسفات در طول موج ۴۰۰ نانومتر(**IU**)، محور عمودی غلظت **DNA** تولید شده در طی واکنش (میکروگرم بر میکرولیتر)

از ۶۶ نمونه سرم مثبت گرفته شده از آزمایشگاه کیوان، ۶۱ مورد در تست LAMP بهینه شده در این مطالعه مثبت گزارش شدند و ۵ نمونه در این گروه منفی بود. با توجه به نتایج، حساسیت تست LAMP مورد مطالعه در جمعیت اول ۹۲/۴۲٪ محاسبه گردید. از ۳۶ نمونه سرم الیزا مثبت، ۲۴ مورد LAMP مثبت بودند؛ در حالیکه در۱۲ نمونه این گروه نتیجه تست PCR، منفی بود. وجود مثبت کاذب در روشهای سرولوژیکی، انکار ناپذیر بوده و حساسیت تست LAMP در گروه دوم، ۶۶/۶٪ محاسبه گردید. از ۹۸ نمونه سرم مثبت گرفته شده از آزمایشگاه قلهک، ۸۷ مورد در تست LAMP، مثبت گزارش شدند؛ و فقط نتیجه تست ۱۱ نمونه این جمعیت، منفی شد. حساسیت تست LAMP در جمعیت سوم ۸۸/۷٪ محاسبه گردید.

تکنیک نوظهور LAMP یکی از روشهای تکثیر ژن بسیار ساده است که از آغاز تا پایان در یک دما صورت

www.SID.ir

می گیرد. این تکنیک علی رغم سادگی دارای حساسیت و دقت بسیار بالایی بوده، بعلاوه از آنجایی که نیاز به سخت افزارهایی مانند ترموسایکلر ندارد با حداقل هزینه انجام می گیرد(۷). شاید بتوان گفت که تکنیک LAMP یکی از بهترین روشهای تشخیص عوامل بیماریزا به ویژه در کشورهای در حال توسعه می باشد. این تکنیک که بسیار هوشمندانه طراحی شده، با بکار گیری ۶ پرایمر ویژه، توانست بر مشکلاتی که در مورد سایر روشهای تکثیر هم دما وجود داشت (مانند تکثیر توالی غیر اختصاصی، نتایج کاذب و ایجاد ماده زمینه ای) فایق آید. یکی از مهمترین عوامل بازدارنده توسعه روشهای تکثیر هم دمای موجود، نتایج غیر اختصاصی است که دراثر دمای پایین انجام تکثیر هم دما، بوجود می آید(۱۵). اما در تکنیک تکثیر هم دما به واسطه لوپ، با طراحی ۶ پرایمر سبب افزایش اختصاصیت واکنش شده و بنابراین نتایج غیر اختصاصی بوجود نمی آید(۱۷و۱۶). با بررسی میزان کدورت ایجاد شده به وسیله منیزیوم پیروفسفات و غلظت DNA تولید شده‌درطی واکنش، می‌توان متوجه شدکه رابطه مستقیمی ما بین سنتز DNA و ایجاد کدورت در طی واکنش وجود دارد. بطوریکه با افزایش سنتز DNA در طی واکنش، با مصرف dNTP یونهای PPi آزاد می شوند. افزایش سنتز DNA با افزایش میزان PPi آزاد شده در واکنش همراه است. به دنبال افزایش میزان PPi برغلظت کمپلکس‌های منیزیوم پیروفسفات افزوده می‌شود، افزایش غلظت منیزیوم پیروفسفات باعث افزایش کدورت در واکنش می شود که با اندازه گیری جذب نوری کدورت ایجاد شده در طول موج ۴۰۰ نانومتر این امر تایید می گردد(۲۰ - ۱۸). مطالعات نشان می دهد که تکنیک تکثیر هم دما علی رغم سادگی و عدم نیاز به تجهیزات پیشرفته از حساسیت بسیار بیشتری نسبت به واکنش PCR برخوردار بوده بطوریکه می تواند جایگزین مناسبی برای آن محسوب شود(۲۲-۲۰).

نتایج این مطالعه نشان داد که تکنیک LAMP قادر به شناسایی ویروس حتی در نمونه های قدیمی با کمترین لود ویروس در خون بوده، در عین حال علی رغم دقت بالا و حساسیت زیاد، این تکنیک به تجهیزات پیشرفته نیاز نداشته و واکنش با استفاده از یک Dry-Plate ساده قادر به انجام است. انجام واکنش با افزودن سایبر گرین و مشاهده در زیر نور U.V به سادگی بدون نیاز به الکتروفورز در زمان بسیار کوتاهی تایید گردید و نیاز به مراحل Post Amplification در این تکنیک بطور وسیعی مرتفع شده است. بعلاوه از آنجایی که نتایج کدورت سنجی، موید نتایج بدست آمده از سایبر گرین بود، بدین ترتیب می توان بیان کرد با کمک این تکنیک، امکان تشخیص مولکولی با دقت و حساسیت بسیار بالا برای تشخیص زود هنگام ابتلا به ویروس هپاتیت B بدون نیاز به تجهیزات پیشرفته با حداقل قیمت، در تمامی مراکز تشخیصی فراهم خواهدگردید.

مقایسه سه روش تشخیصی در آزمون LAMP نشان داد هر سه روش دارای حساسیت نزدیکی می باشند ولی تشخیص محصول با استفاده از روش اضافه کردن سایبرگرین، به تجهیزات کمتری نیاز داشته بعلاوه احتمال ایجاد آلودگی نیز به دلیل عدم الکتروفورز از بین می رود.

منابع

1- WHO/CDS/CSR/LYO 2002.2: Hepatitis B.
2- Alavian SM; Hajarizadeh B; Ahmadzad-Asl M; Kabir A; Bagheri-Lankarani K, (2008). Hepatitis B Virus Infection in Iran: A Systematic Review. Hepatitis Monthly. **8**(4): 281-294.
3- zali MR; Mohammad K; Farhadi S, (1996). Epidemiology of hepatitis B in the Islamic Repaublic of Iran. East Mediterr Health. **2**(2): 290-8.
4- Alavian SM; Keyvani H; Rezai M; Ashayeri N; Sadeghi HM, (2006). Preliminary report of hepatitis B virus genotype prevalence in Iran. World J Gastroenterol. **12**: 5211-3.
5- Gilbert GL; James GS; Sintchenko V, (1999). Molecular methods for diagnosis of infectious diseases. Med J. **171**: 536-40.
6- Compton J, (1991). Nucleic acid sequence-based amplification. Nature. **350**: 91–92.
7- Notomi T; Okayama H; Masubuchi H; Yonekawa T; Watanabe K; Amino N; Hase T, (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Research.**28** (12): E63-e63.

Archive of SID

www.SID.ir

8- Nagamine K; Hase T; Notomi T, (2001). Loop-mediated Isothermal Amplification Reaction Using a Nondenatured Template. Clinical Chemistry. **47**:1742-1743.
9- Nagamine K; Kuzuhara Y; Notomi T, (2002). Accelerated reaction by loop-mediated isotherma Amplification using loop primers. Molecular and Cellular Probes: 223-229.
10- Mori Y; Nagamine K; Tomita N; Notomi T, (2001). Detection of Loop-Mediated Isothermal Amplification Reaction by Turbidity Derived from Magnesium Pyrophosphate Formation. Biochemical and Biophysical Research Communications. **289**:150–154.
11- Walker GT; Little MC; Nadeau JG; Shank DD. (1992). Strand displacement amplification an isothermal, in vitro DNA amplification technique. Nucleic Acids Research. **20**: 1691-6.
12- Ushikubo H, (2004). Principle of LAMP method, a simple and rapid gene amplification method. Uirus. **54**(1): 107–112.
13- Parida M; Posadas G; Inoue Sh; Hasebe F; Morita K, (2004). Real-Time Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification for Rapid Detection of West Nile Virus. J Clin Microbiol. **42**(1): 257-263.
14- Mori Y; Notomi T, (2009). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. J Infect Chemother**.** **15**:62–69.
15- Parida M, (2008). Rapid and real-time detection technologies for emerging viruses of biomedical importance. J Biosci. **33**(4):617-28.
16- Mori Y; Kitao M; Tomita N; Notomi T, (2004). Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. J Biochem Biophys Methods. **59**:145–57.
17- Mori Y; Hirano T; Notomi T, (2006). Sequence specific visual detection of LAMP reactions by addition of cationic polymers. BMC Biotechnology: 3-6.
18- Nagamine K; Kuzuhara Y; Notomi T, (2002). Isolation of Single-Stranded DNA from Loop-Mediated Isothermal Amplification Products. Biochemical and Biophysical Research Communications. **290**:1195–1198.
19- Parida M; Horioke K; Ishida H; Kumar Dash P; Saxena P, Mukul Jana A, (2005). Rapid Detection and Differentiation of Dengue Virus Serotypes by a Real-Time Reverse Transcription–Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay. J. Clin. Microbiol: 2895–2903.
20- Parida M; Santhosh SR; Dash PK; Tripathi NK; Lakshmi V; Mamidi N; Shrivastva A, (2007). Rapid and Real-Time Detection of Chikungunya Virus by Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay. J. Clin. Microbiol: 351-357.
21- Kurosaki Y; Sakuma T; Fukuma A; Fujinami Y; Kawamoto K; Kamo N; Makino SI,(2009). A simple and sensitive method for detection of Bacillus anthracis by loop-mediated isothermal amplification. J Appl Microbiol. E pub ahead of print.
22- Zhang H; Thekisoe OM; Aboge GO; Kyan H; Yamagishi J; Inoue N; Nishikawa Y; Zakimi S; Xuan X,(2009). Toxoplasma gondii: sensitive and rapid detection of infection by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. Exp Parasitol. **122**(1):47-50.

Archive of SID

www.SID.ir