مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۲، شماره ۲، تابستان ۹۱، صفحات ۱۳۷ تا ۱۴۲

Original Article

تشخیص سریع کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکولوزیس توسط تکنیک تکثیر هم‌دما به واسطه حلقه

لیلا کهن[۱]، محمد حسن شاه حسینی[۲]، محمد رضا رضوی[۳]، کاظم پریور[۴]، الهام مسلمی[۵]

[۱] دانشجوی دکترای زیست شناسی سلولی و مولکولی، بخش زیست شناسی، عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ارسنجان
[۲] استادیار، دکترای فراورده های بیولوژیک، بخش میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهر قدس
[۳] استادیار، دکترای بیولوژی مولکولی، بخش تحقیقات ریوی، انستیتو پاستور ایران
[۴] استاد، دکترای زیست شناسی سلولی تکوینی، بخش زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران
[۵] استادیار، دکترای زیست شناسی سلولی و مولکولی، بخش زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قیام دشت

چکیده

سابقه و هدف: *تشخیص دقیق و سریع، یکی از مسائل مهم در کنترل بیماری سل می‌باشد. تکثیر هم دما به واسطه حلقه (LAMP)، تکنیکی ساده و سریع برای تکثیر اسید نوکلئیک است. در این مطالعه، به بررسی تکنیک LAMP پایه گذاری شده بر اساس توالی ژنی IS6110 در تشخیص مایکوباکتریوم توبرکولوزیس (MTB) پرداخته شد.*

روش بررسی: *تعداد ۱۵۵ نمونه خلط از بیماران مشکوک به سل جمع‌آوری شد. ۶ پرایمر اختصاصی برای تکنیک LAMP طراحی گردید و واکنش LAMP تحت شرایط بهینه انجام شد. حساسیت و ویژگی تکنیک LAMP جهت تشخیص کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکولوزیس مورد بررسی قرار گرفت.*

یافته‌ها: *واکنش LAMP، در دمای ۶۶ درجه سانتی‌گراد و مدت زمان ۶۰ دقیقه با موفقیت انجام شد. محدودیت تشخیصی LAMP، fg ۵ از DNA معادل یک کپی از ژنوم مایکوباکتریوم توبرکولوزیس بود. حساسیت و ویژگی این روش در نمونه های بالینی به ترتیب ۱۰۰٪ و ۹۵/۹٪ محاسبه گردید.*

نتیجه‌گیری: *تکنیک LAMP روشی سریع، حساس و کم هزینه برای تشخیص مایکوباکتریوم توبرکولوزیس می‌باشد که می‌توان از آن به طور روتین در مراکز تشخیص سل استفاده کرد.*

واژگان کلیدی: *کمپلکس مایکوباکتریوم توبکولوزیس، تشخیص سریع، PCR، تکنیک LAMP*

مقدمه

سل یکی از قدیمی‌ترین بیماری‌های عفونی شناخته شده است که با وجود پیشرفت‌هایی که در ارتباط با پیشگیری و درمان آن صورت گرفته، هنوز به عنوان یکی از معضلات اصلی جهان محسوب می‌شود (۱). سالانه تقریبا ۹ میلیون مورد جدید به تعداد افراد آلوده اضافه می‌شود و بیش از ۱/۷ میلیون نفر جان خود را در اثر این بیماری از دست می‌دهند (۲). تشخیص سریع عفونت مایکوباکتریوم توبرکولوزیس (MTB) در نمونه‌های بالینی، نقش به سزایی در کنترل بیماری دارد (۳). روش‌های سنتی تشخیص سل، پیچیده و زمان‌بر بوده و فاقد حساسیت و ویژگی کافی می‌باشند (۱). در حال حاضر، تهیه اسمیر زیل-نلسون (Ziehl-Neelsen) و کشت باکتری از روش‌های تشخیصی روتین در آزمایشگاه‌ها می‌باشد. روش تهیه اسمیر علی‌رغم سادگی و کم‌هزینه بودن، به تعداد زیادی باکتری (تقریبا 10^4 باسیل اسید

آدرس نویسنده مسئول: ارسنجان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارسنجان، دانشکده علوم پایه، بخش زیست شناسی، لیلا کهن (**email:** Kohan@iaua.ac.ir)
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۸/۲
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۱/۲/۲

Archive of SID
www.SID.ir

فست در هر میلی لیتر خلط) برای مثبت شدن نیازمند بوده و حساسیت و ویژگی محدودی دارد (۴). کشت مثبت از MTB، استاندارد طلایی تشخیص سل است که دارای حساسیت و ویژگی بالایی می‌باشد، اما به دلیل کند رشد بودن میکروارگانیزم عامل بیماری، رؤیت کلونی‌ها روی محیط کشت معمولا ۶-۴ هفته طول می‌کشد. در عین حال عواملی نظیر سلامت محیط کشت، نحوه انتقال نمونه به محیط کشت، انتقال آلودگی و حتی مصرف داروهای ضد توبرکولوزیس نیز می‌تواند بر نتیجه کشت موثر باشد (۵). در سال‌های اخیر، روش‌های مولکولی مختلفی بر اساس تکثیر اسید نوکلئیک باکتری پایه‌گذاری شدند که می‌توانند اسید نوکلئیک میکروارگانیزم را در فاصله زمانی کوتاه تکثیر کرده و جایگزین رشد کند مایکوباکتریوم در شرایط طبیعی گردند (۶). رایج‌ترین روش مولکولی برای تشخیص MTB، PCR می‌باشد. اما لزوم تجهیزات و دستگاه‌های دقیق و استفاده از روش‌های پرزحمت برای تشخیص محصولات تکثیر شده از جمله عواملی هستند که استفاده از این روش را به عنوان تکنیکی روتین در مراکز تشخیصی محدود می‌کنند (۷). تکنیک تکثیر هم دما به واسطه حلقه (Loop mediated isothermal amplification: LAMP) روشی سریع، حساس و ساده برای تکثیر اسید نوکلئیک می‌باشد که قادر است DNA هدف را تحت شرایط هم دما و با استفاده از ۶ پرایمر اختصاصی تکثیر کند. استفاده از ۶ پرایمر اختصاصی که ۸ توالی مجزا را روی توالی هدف شناسایی می‌کنند، ویژگی و حساسیت این تکنیک را افزایش می‌دهد. بر خلاف PCR، واکنش LAMP نیاز به ترموسایکلر نداشته و با استفاده از خصوصیت جایگزینی رشته‌ها (strand displacement) توسط DNA پلی‌مراز *Bst* انجام می‌شود. این واکنش قادر است از یک کپی DNA، تعداد 10^9 کپی در کمتر از یک ساعت تولید کند و محصولات تکثیری حاصل با چشم غیر مسلح و بدون نیاز به ژل الکتروفورز قابل مشاهده می‌باشند (۱۰-۸).

با توجه به اهمیت تشخیص سریع MTB، به منظور جلوگیری از شیوع این بیماری و مداوای موثر بیماران و همچنین لزوم تکنیکی حساس، اختصاصی و در عین حال کم هزینه برای تشخیص دقیق این پاتوژن، تحقیق حاضر به راه اندازی این تکنیک برای تشخیص MTB و بررسی قدرت تشخیصی آن می‌پردازد.

مواد و روشها

تعداد ۱۵۵ نمونه خلط افراد مشکوک به سل ریوی از بخش تحقیقات سل مرکز بهداشت انقلاب شیراز، تهیه شد. نمونه‌های خلط با روش استاندارد هموژنیزاسیون و آلودگی زدایی گردید (۱۱). پس از آن، مقداری از هر نمونه جهت بررسی‌های میکروسکوپی، کشت و استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفت. رنگ‌آمیزی و تهیه اسمیر به روش زیل-نلسون و کشت نمونه‌ها روی محیط لوون اشتاین-جانسون انجام شد.

استخراج DNA از نمونه‌های خلط توسط کیت استخراج DNA (DNG کیت سیناژن) صورت گرفت.

پرایمر مورد استفاده در واکنش LAMP، بر اساس توالی ژنی IS6110 (GenBank accession no. X17348) توسط نرم‌افزار Primer Explorer V4 طراحی شد. در این واکنش از ۶ پرایمر اختصاصی شامل دو پرایمر خارجی (F3 و B3)، دو پرایمر داخلی (FIP و BIP) و دو پرایمر لوپ (FLP و BLP) استفاده شد. توالی پرایمرها در جدول ۱ نشان داده شده است.

واکنش LAMP در حجم کلی ۲۵ µl شامل ۰/۲ µM از هر کدام از پرایمرهای F3 و B3، ۱/۶ µM از پرایمرهای FIP و BIP، µM ۰/۸ از پرایمرهای FLP و BLP، ۲۰ mM Tris-HcL، mM KcL ۱۰، $(NH4)_2SO4$ ۱۰ mM، ۹ mM MgSo4، ۱/۴ mM dNTP، ۰/۸ M betain، ۸ U از آنزیم *Bst* و ۵ µl از DNA الگو انجام شد. دمای ۶۶ درجه به مدت یک ساعت را به منظور تکثیر قطعات در نظر گرفته و در هر مرحله از کنترل مثبت و منفی به منظور تائید صحت نتایج کمک گرفته شد.

برای تشخیص محصولات LAMP، به هر تیوپ حاوی نمونه پس از انجام واکنش LAMP، یک میکرولیتر سایبرگرین ۱٪ اضافه شد

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده در واکنش‌های LAMP و PCR

پرایمر	توالی
F3	5' CCTAACCGGCTGTGGGTA 3'
B3	5' CGAGTACGCCTTCTTGTTGG 3'
FIP (F1c + F2)	5' GACGTAGGCGTCGGTGACAAAGGCAGACCTCACCTATGTGTC 3'
BIP (B1c +B2)	5' GTCGCTTCCACGATGGCCACGGTCCAGATGGCTTGCTC 3'
FLP	5' TAGGCGAACCCTGCCCA 3'
BLP	5' TGGTCCTCGACGCGATC 3'
MTB-F	5' CGTGAGGGCATCGAGGTGGC 3'
MTB-R	5' GCGTAGGCGTCGGTGACAAA 3'

Archive of SID

www.SID.ir

و زیر نور Uv مشاهده گردید. تائید ساختار محصولات LAMP به کمک الکتروفورز محصولات تکثیر شده بر روی ژل آگارز ۲٪ صورت گرفت.

به منظور مقایسه دو تکنیک LAMP و PCR، قطعه ۲۴۵ bp از توالی ژن IS6110 توسط روش PCR تکثیر شد. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۰/۴ mM از هر کدام از پرایمرهای MTB-F و MTB-R، ۲۰۰ µM dNTP، 1X PCR buffer، ۰/۵ mM MgCl2، ۲/۵U Taq DNA polymerase و ۵ µl از DNA الگو در نظر گرفته شد. برنامه PCR به صورت دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و سپس ۴۰ سیکل PCR شامل دناتوراسیون ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال پرایمر و طویل سازی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه انجام گرفت و در نهایت ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR با استفاده از ژل آگارز ۲٪ و رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید مورد بررسی قرار گرفت. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ آمده است.

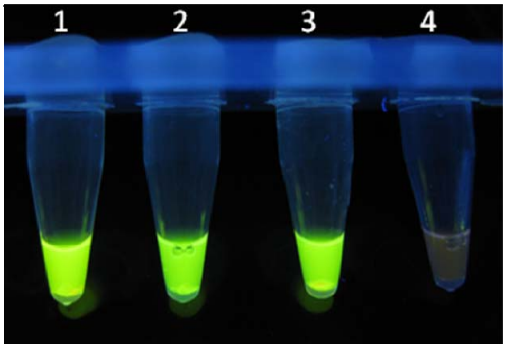
جدول ۲- تعیین ویژگی LAMP و PCR برای کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکولوزیس

گونه باکتری	PCR	LAMP
M. tuberculosis H37Rv M. Bovis BCG	+	+
M. chelonae, M. avium, M. xenopi, M. kansasii, M. szulgai, M. intracellular, M. gordonae	-	-
Escherichia coli, Streptococcus pyogenes, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumonia, Streptococcus pneumonia, Actinomyces pyogene	–	–

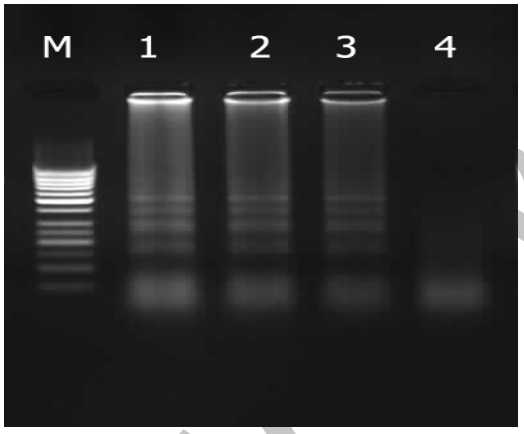
به منظور تعیین ویژگی، استخراج DNA از چندین گونه مختلف مایکوباکتریوم و چند گونه باکتری غیر مایکوباکتریوم صورت گرفته و واکنش LAMP و PCR بر روی آنها انجام شد (جدول ۲). تعیین حساسیت با استفاده از تهیه رقت‌های مختلف از DNA مایکوباکتریوم توبرکولوزیس H37Rv صورت گرفت. بدین منظور رقت‌های مختلف از ۱۰۰ ng/µl تا ۵ fg/µl تهیه شد و واکنش‌های LAMP و PCR بر روی آنها انجام شد. تعداد کپی ژنوم مایکوباکتریوم بر اساس این اصل که هر ۵ fg از DNA معادل با یک کپی ژنوم MTB است (۱۲)، محاسبه گردید.

یافته‌ها

واکنش LAMP بر روی نمونه ها با موفقیت انجام شد. پس از اضافه کردن سایبرگرین، تیوب‌های حاوی DNA تکثیر یافته رنگ سبز و تیوب‌های فاقد DNA رنگ نارنجی را زیر نور Uv نشان دادند. الکتروفورز محصولات تکثیر شده الگوی نردبانی شکل از قطعات با اندازه‌های مختلف را روی ژل الکتروفورز نشان داد (شکل ۱).

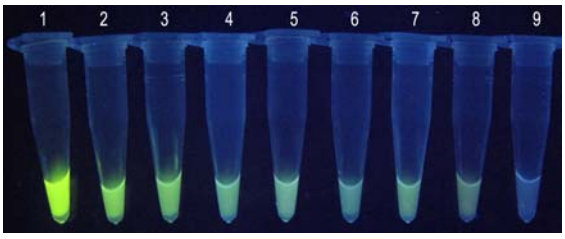


الف



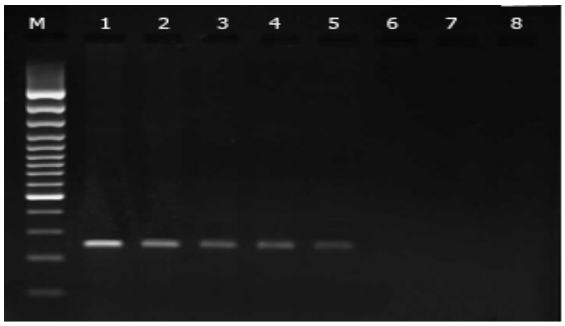
ب

شکل ۱- واکنش LAMP. الف: تشخیص واکنش LAMP زیر نور UV، ب: الکتروفورز محصول LAMP روی ژل آگارز ۲٪. شماره ۱: کنترل مثبت، شماره ۲ و ۳: نمونه‌های مثبت، شماره ۴: کنترل منفی



شکل ۲- تعیین حساسیت LAMP. شماره‌های ۹-۱ به ترتیب شامل ۱ng، ۱۰۰pg، ۱۰pg، ۱pg، ۱۰۰fg، ۵۰fg، ۲۵fg، ۵fg و ۰fg از MTB DNA می باشد. محدودیت تشخیصی LAMP، ۵ fg نشان داده شده است.

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۳- تعیین حساسیت PCR. شماره‌های ۸-۱ به ترتیب شامل ۱ng، ۱۰۰pg، ۱۰pg، ۱pg، ۱۰۰fg، ۵۰fg، ۲۵fg و ۰fg، از DNA MTB بوده و محدودیت تشخیصی PCR، ۱۰۰ fg تعیین شده است.

تعیین ویژگی پرایمرهای جدید طراحی شده با کمک چندین گونه مختلف باکتری صورت گرفت. همان طور که در جدول ۳ نشان داده شده، واکنش‌های LAMP و PCR توانستند به درستی گونه مایکوباکتریوم توبرکولوزیس و مایکوباکتریوم بوویس را تشخیص دهند. حساسیت LAMP برای تشخیص مایکوباکتریوم توبرکولوزیس ۵ fg از DNA بود که معادل یک کپی DNA در هر تیوب می باشد، در حالی که حساسیت PCR، ۱۰۰ fg از DNA معادل ۲۰ کپی به دست آمد (شکل ۲ و ۳).

جدول ۳- نتایج حاصل از اسمیر، کشت، PCR و LAMP نمونه‌های بالینی

تعداد نمونه ها	اسمیر	کشت	PCR	LAMP
۴۸	+	+	+	+
۷	-	+	+	+
۳	-	-	+	+
۵	-	+	-	+
۲۲			+	+
۷۰	-	-	-	-

نتایج حاصل از کشت، اسمیر، PCR و LAMP بر روی نمونه های بالینی به طور خلاصه در جدول ۳ آورده شده است. حساسیت LAMP در مقایسه با کشت (به عنوان استاندارد) در نمونه‌های بالینی ۱۰۰٪ و ویژگی آن ۹۵/۶٪ (۹۸/۵-۹۱/۳٪=۹۵CI٪) بود. ارزش اخباری مثبت و منفی LAMP به ترتیب ۹۵/۳٪ و ۱۰۰٪ محاسبه گردید.

بحث

علی‌رغم پیشرفت های فراوانی که در امر بهداشت و سلامت عمومی جوامع مختلف صورت گرفته، تعداد مبتلایان به سل در سال‌های اخیر به طور روز افزونی در حال افزایش بوده و این بیماری دومین علت مرگ و میر ناشی از عفونت را به خود اختصاص داده است (۶). یکی از مهم‌ترین دلایل عدم موفقیت در کنترل این بیماری فقدان روش تشخیصی ساده‌ای است که ویژگی و حساسیت بالایی داشته و قابل استفاده متداول در تمامی مراکز تشخیصی باشد. شناسایی و تکثیر اسیدنوکلئیک باسیل سل از طریق تکنیک‌های مولکولی از جمله روش‌هایی است که حساسیت و ویژگی بالایی داشته و نسبت به روش‌های سنتی تشخیص سل، در مدت زمان کوتاه‌تری قابل انجام است (۱۳). از رایج‌ترین تکنیک‌های مولکولی برای تشخیص مایکوباکتریوم توبرکولوزیس، PCR می‌باشد. اما علی رغم سادگی و قابل قبول بودن میزان محصولات تکثیری، دلایلی چون لزوم دستگاه ترموسایکلر و تجهیزاتی چون تانک الکتروفورز و دستگاه Gel documentation برای آنالیز نتایج، پس از PCR و همچنین احتمال آلودگی‌های همراه با این روش، باعث شده که این تکنیک به صورت متداول در آزمایشگاه‌های تشخیصی مورد استفاده قرار نگیرد (۱۴، ۱۵). تکنیک LAMP در مقایسه با PCR روشی ساده‌تر بوده که نیاز به تجهیزات خاص آزمایشگاهی ندارد، به طوری که تمام مراحل واکنش تحت شرایط هم دما (محدوده ۶۵-۶۰ درجه سانتی‌گراد) و به کمک یک بن ماری یا heater ساده صورت می‌گیرد (۱۶). به علاوه تکثیر به وسیله LAMP در زمان کوتاه‌تری نسبت به PCR صورت می‌گیرد به طوری که در PCR برای تکثیر و آنالیز پس از آن، به طور تقریبی ۳ ساعت زمان لازم است، در حالی که واکنش LAMP در مدت زمان کمتر از ۱ ساعت، انجام می‌پذیرد (۱۷). 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 هدف شناسایی می‌کنند، بسیار بالا است (۱۸، ۱۹).

در مطالعه حاضر به منظور تکثیر ناحیه ای از ژنوم MTB و تشخیص بیماری سل از توالی هدف IS6110 استفاده شد. از بین انواع توالی‌های هدف، IS6110 دارای مزیت‌هایی است که آن را جهت تکثیر و تشخیص MTB مناسب می‌سازد. IS6110 یک عنصر ژنتیکی قابل انتقال و تکرار شونده است که خاص گونه‌های کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکولوزیس بوده و بیش از ۲۰ کپی از آن در ژنوم وجود دارد، بنابراین در هنگام استفاده از آن چندین هدف برای تکثیر وجود داشته و این خصوصیت موجب بالا بردن حساسیت تست می‌گردد (۲). این مطالعه نشان داد که LAMP قادر به تشخیص ۵ fg از DNA (معادل

Archive of SID
www.SID.ir

یک کپی از ژنوم مایکوباکتریوم) بوده و حساسیت بالینی آن، ۱۰۰٪ می‌باشد. این حساسیت تشخیصی نسبت به PCR که قادر به تشخیص fg ۱۰۰ از DNA بود، ۲۰ برابر بیشتر می‌باشد. دلیل افزایش حساسیت LAMP نسبت به PCR را می‌توان استفاده از ۶ پرایمر اختصاصی که ۸ ناحیه مجزا را روی ژن هدف شناسایی می‌کنند و عدم نیاز به چرخش دمایی در هر دور تکثیر بیان کرد. در طی واکنش LAMP همواره از یک دمای ثابت که مناسب فعالیت پلی‌مراز است، استفاده می‌شود و فعالیت آنزیم در حین دورهای متعدد ثابت است (۲). در مطالعه‌ای، Boehme و همکارانش تکنیک LAMP را بر اساس توالی ژن gyr B راه‌اندازی کرده و حساسیت این روش را ۸۸/۲٪ (۹۲/۵٪-۸۳/۹ :CI ۹۵٪) گزارش کردند (۲۰). به دنبال آن Pandy و همکاران نیز با استفاده از ژن 16S rRNA روشی از LAMP را پایه گذاری کرده و گزارش کردند که حساسیت بالینی این روش ۱۰۰٪ و ویژگی آن ۹۴/۲٪ می‌باشد (۱۲).

علاوه بر حساسیت بالینی، در چندین مطالعه حساسیت آنالیتیک LAMP نیز مورد ارزیابی قرار گرفته است. Iwamoto و همکاران با استفاده از توالی ژن gyr B تکنیک LAMP را راه‌اندازی کرده و نشان دادند که حد تشخیص این تکنیک ۵۰-۵ کپی از ژنوم MTB می‌باشد (۱۵). گروه دیگر از محققین نیز در چین بر اساس توالی هدف rimM روشی از LAMP را ابداع کردند که قادر بود حداقل ۲۰۰ کپی از DNA MTB را تشخیص دهد (۱۷).تکنیک LAMP بر اساس توالی IS6110 نیز برای اولین بار در دنیا توسط یک گروه ایرانی به نام Aryan و همکاران جهت تشخیص MTB راه اندازی و ارزیابی شد. این گروه گزارش کردند که حساسیت آنالیتیک LAMP معادل یک کپی از ژنوم MTB می باشد که ۲۰ برابر حساس‌تر از روش PCR می‌باشد (۲). نتایج حاصل از این مطالعه با وجود استفاده از پرایمر های متفاوت برای ناحیه IS6110 با نتایج حاصل از مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد، با این تفاوت که در مطالعه Aryan و همکاران ارزش تشخیصی تکنیک LAMP تنها بر روی ۱۵ نمونه بالینی مورد بررسی قرار گرفته است و مقایسه‌ای از حساسیت روش‌های روتین تشخیصی نظیر اسمیر و کشت با تکنیک LAMP در این مطالعه انجام نگرفته است.

از آنجایی که اساس مبارزه در برنامه کنترل سل، تشخیص سریع بیماری است، دست‌یابی به روش‌های دقیق و سریع تشخیصی می‌تواند راه‌گشای مناسبی در جلوگیری از این بیماری و مداوای موثر بیماران باشد. در این مطالعه، تکنیک LAMP بر اساس توالی ژن IS6110 برای تشخیص مایکوباکتریوم توبرکولوزیس در نمونه‌های بالینی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که LAMP علاوه بر سادگی و کم هزینه بودن، دارای حساسیت و ویژگی بالایی بوده و بنابراین می‌تواند به عنوان روشی روتین در مراکز تشخیصی سل مورد استفاده قرار گیرد. با وجود اینکه در طی انجام این تحقیق، مشکلات مرتبط با آلودگی به دلیل رعایت مسائل ایمنی مشاهده نشد، اما مساله اصلی در ارتباط با LAMP، خطر بالای تولید محصولات ثانویه LAMP و آلودگی محیطی به دلیل کارایی بسیار زیاد این روش در تکثیر است. برای غلبه بر این مساله، پیشنهاد می‌شود که از دست‌کاری‌های غیرضروری تیوب‌های واکنش برای آماده‌سازی مخلوط تا حد امکان جلوگیری شود و مخلوط‌های واکنش در حجم زیاد تهیه گردد و همچنین تشخیص محصولات LAMP در نواحی مجزا حتی در مکان‌های مجزا و توسط افراد متفاوت انجام گیرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از کارکنان محترم بخش سل و تحقیقات ریوی مرکز بهداشت شهدای انقلاب شیراز به دلیل فراهم آوردن نمونه‌های بالینی مورد نیاز کمال تقدیر و تشکر را دارند. هم‌چنین از تلاش‌های معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارسنجان جناب آقای دکتر قره داغی و مسئول فنی شرکت ندای فن تهران جناب آقای دکتر تهرانی به منظور فراهم آوردن امکانات و تجهیزات مورد نیاز و حمایت‌های مالی قدردانی می‌شود.

REFERENCES

1. Greenaway C, Menzies D, Fanning A, Grewal R, Yuan L, FitzGerald JM; Canadian Collaborative Group in nosocomial Transmission of Tuberculosis. Delay in diagnosis among hospitalized patients with active tuberculosis--predictors and outcomes. Am J Respir Crit Care Med 2002; 165: 927-33.

2. Aryan E, Makvandi M, Farajzadeh A, Huygen K, Bifani P, Mousavi SL, Fateh A, Jelodar A, Gouya MM, Romano M. A novel and more sensitive loop-mediated isothermal amplification assay targeting IS6110 for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex. Microbiol Res 2010; 165: 211-20.

3. Su WJ. Recent advances in the molecular diagnosis of tuberculosis. J Microbiol Immunol Infect 2002; 35: 209-14.

Archive of SID

www.SID.ir

4. Green C, Huggett JF, Talbot E, Mwaba P, Reither K, Zumla AI. Rapid diagnosis of tuberculosis through the detection of mycobacterial DNA in urine by nucleic acid amplification. Lancet Infect Dis 2009; 9:505- 11.

5. Pfyffer GE, Brown-Elliott BA, Wallace RJ JR. Mycobacterium: general characteristics, isolation, and staining procedures. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Yolken RH, Eds. Manual of clinical microbiology. 8th ed. Washington: District of Columbia; 2003. p.532-59.

6. Mortier E, Pouchot J, Girard L, Boussougant Y, Vinceneux P. Assessment of urine analysis for the diagnosis of tuberculosis. BMJ 1996; 312: 27-28.

7. Podzorski RP, Persing DH. PCR: the next decade. Clin Microbiol Newslett 1993; 15: 137-44.

8. Parida M, Sannarangaiah S, Paban KD, Morita K. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspective in clinical diagnosis of infectious diseases. Rev Med Virol 2008; 18: 407-421.

9. Nagamine KT, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. Mol Cell Probes 2002; 16: 223-29.

10. Mori Y, Notomi T. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infection diseases. J Infect Chemother 2009; 15: 62-69.

11. Bartelt M A. Diagnostic bacteriology- " a study guide". Philadelphia, USA: Davis Company; 2000. p.22-23.

12. Pandey B D, Poudel A, Yoda T, Tamaru A, Oda N, fukushima Y, et al., Development of an in-house loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and evaluation in sputum samples of Nepalese patients. J Med Microbiol 2008; 57: 439-43.

13. Nahid P, Pai M, Hopewell PC. Advances in the diagnosis and treatment of tuberculosis. Proc Am Thorac Soc 2006; 3: 103-10.

14. Nagamine K, Watanable K, Ohtsuka K, Hase T, Notomi T. Loop mediated isothermal amplification reaction using nondenaturated template. Clin Chem 2001; 47: 1742-43.

15. Iwamoto T, Sonobe T, Hayashi. Loop mediated isothermal amplification for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *M. avium*, and *M. intracellular* in sputum samples. J Clin Microbiol 2003; 41: 2616-22.

16. 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: 150-54.

17. Zhu RY, Zhang KX, Zhao MQ, Liu YH, Xu YY, Ju CM, et al., Use of visual loop mediated isothermal amplification of rimM sequence for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*. J Microbiol Methods 2009; 78: 339-43.

18. Parida MM, Horioke K, Ishida H. Rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes by a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay. J Clin Microbiol 2005; 43: 2895-903.

19. Parida MM, Guillermo P, Inoue S. Real-time reverse transcription loop mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile Virus. J Clin Microbiol 2004; 42: 257-63.

20. Boehme CC, Nabeta P, Henostroza G, Raqib R, Rahim Z, Gerhardt M. Operational feasibility of using loop mediated isothermal amplification for diagnosis of pulmonary tuberculosis in microscopy center of developing countries. J Clin Microbiol 2007; 45: 1936-40.

Archive of SID

www.SID.ir