بررسی کارایی روش LAMP (Loop-mediated isothermal DNA amplification) در تشخیص سالمونلا

علی کرمی*، ابوبکر مرادی، رحیم سروری، زینب احمدی

مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...«عج

تاریخ دریافت: 87/7/1 تاریخ پذیرش:88/6/18

چکیده

مقدمه: سالمونلاها از مهمترین باکتری های بیماری و عامل تیفوئید، باکتریمی، آنتروکولیت و سالمونلوز است که از عفونت های مشترک انسان و حیوانات می باشد. بیماریهای ناشی از این عامل یک معضل بزرگ بهداشتی در جهان به خصوص در کشورهای در حال توسعه از جمله کشور ما می باشد. بنابراین تشخیص سریع، دقیق و به موقع آن برای جلوگیری از اپیدمی و عوارض مخرب این باکتری ضروری به نظر می رسد. برای تشخیص سالمونلا روش های مختلفی وجود دارد که می توان به روش کشت، Immunoassay، و روش های مولکولی PCR، Real-time PCR اشاره نمود. تمام این روش ها به زمان طولانی، تعداد زیاد باکتری درنمونه اولیه، تجهیزات گران قیمت آزمایشگاهی و به افراد متخصص در این زمینه نیاز دارند. هدف از این مطالعه بررسی کارایی روش نوین تشخیص مولکولی LAMP با روش PCRدر تشخیص عامل عفونی سالمونلا تیفی می باشد.

مواد و روش ها: در این تحقیق روش PCR با روش LAMP جهت تشخیص 7 سویه سالمونلای مختلف مورد بررسی و مقایسه قرار گرفتند. ژنوم باکتری ها طبق روش استاندارد استخراج و با پرایمرهای اختصاصی در دستگاه PCR بر اساس برنامه چرخه حرارتی تشخیص داده شدند. و در مقایسه با آن مجموعه پرایمرهای اختصاصی به روشLAMP در یک دمای واحد در بلوک حرارتی ساخته شده در داخل کشور تکثیر و محصولات ایجاد شده در ژل الکتروفورز از طریق بررسی ایجاد کدورت به روش چشمی مورد تشخیص قرار گرفتند.

یافته های پژوهش: بررسی نتایج دو روش در تشخیص مولکولی سالمونلاها نشان داد که روش LAMP سریعتر، ارزان تر و اختصاصی تر است و به جای دستگاه گران قیمت PCR و برنامه چرخه حرارتی چند دمایی آن با استفاده از یک بلوک حرارتی بسیار ساده و ارزان ساخت داخل کشور و در یک دمای واحد 62 درجه سانتی گراد و همچنین با مشاهده کدورت حاصل از فرایند تکثیر ژن ها در روش جدید در مقایسه با روش الکتروفورز در بررسی محصولات PCR در زمان کوتاه تری به تشخیص اختصاصی این سالمونلا ها پرداخت.

بحث و نتیجه گیری: این روش می تواند جهت تشخیص مولکولی سریع، دقیق و ارزان با کاربرد گسترده در آزمایشگاه های تشخیصی و بخصوص تشخیص عوامل عفونی در آزمایشگاه های مناطق محروم و همچنین آزمایشگاه های سیار مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: سالمونلا، تشخیص مولکولی، PCR، DNA، LAMP

*نویسنده مسئول: مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...«عج)

E-mail: Karami@bmsu.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

سالمونلاها دسته بزرگی از باسیل هـــای گرم منفی اند که انـــدازه آن ها به طول 1 تا 3 و عرض 0/5 تا 0/8 میـــکـــرون می باشد.(4-1)

بیماری ناشی از سالمونلا دارای سه حالت اصلی شامل تب روده ای(تیفوئید)، باکتریمی و آنتروکولیت می باشد و هر یک می تواند بـاعث بروز عوارض متعددی از قبیل به تب، سردرد، کندی ضربان قلب، استفراق، اسهال، ازدیاد حجم کبد و طحال، تورم کیسه صفرا، زخم و ضایعات مفصلی گردد.(7-5)

از این رو تشخیص به موقع و درست این باکتری در مواد غذایی و افراد مشکوک به آلودگی ضروری به نظر می رسد. روش های تشخیصی فعلی شناسای این باکتری شامل روش کشت و تایید بیوشیمیایی نیاز به سه تا چهار روز زمان دارند،(8). روش های ایمنولوژیک و مولکولی نیز استفاده می شود اما هنوز مشکلات بسیاری در رابطه با حساسیت و اختصـــاصی بودن این روش ها وجود دارد.(9)

روش PCR روشی سریع و حساس است که دارای مزایای بسیاری است اما دارای محدودیت هایی نیـز می باشد مانند چرخه‌های حرارتی زیاد، استفاده از دستگاه ترموسایکلر گران قیمت و روش های آشکار سازی و تشخیص محصول و به همین دلیل امکان استفاده در آزمایشگاه های صحرایی و سیار را ندارد.(12-10)

روش جدید تکثیر هم دمای DNA وابسته به حلـــقهLAMP روشی ساده با کارایی بالا است که فاقد این محدودیت‌هاست. این روش توسط نوتومی و همکاران در سال 2000 معرفی گردید، در این روش DNA به طور اختصاصی و با کارایی و سرعت بالا در شرایط تک دمایی(Isothermal) تکثیر می یابد.

در این روش از 4 پرایمر(دو پرایمر داخلی و دو پرایمر خارجی) استفاده می گردد، که در مجموع 6 ناحیه ژنی از DNA هدف را مورد شنـاسایی قـــرار می دهد و ناحیه هدف طی فرایندی دنباله دار و با تشکیل نواحی سنجاق سری در دمای 65-60 درجه سانتی گراد و با استفاده از یک آنزیم DNA پلی مراز مقاوم به حرارت تکثیر می یابد،(13). این روش دارای مزایای بسیاری است که به آن ها اشاره می نماییم:

1) LAMP قادر است DNA را با کارایی بالا تحت شرایط تک دمایی (Isothermal) تکثیر نماید و می توان تشخیص را با تعداد اندک DNA شروع نمود. LAMP حتی قادر است DNA را در کمتر از 6 کپی در مخلوط واکنش شناسایی نماید.

2) محصولات واکنش مخلوطی از DNA های ساختار سنجاق سری با اندازه های متفاوت و ساختار گل کلم مانند با حلقه های متعدد می باشد که از انـــیلینگ بین توالی های معکوس تکراری از توالی هدف ایجـــاد می‌گردند، که حتی در زیر میکروسکوپ نوری به راحتی قابل مشاهده‌اند، و امکان تشخیص انتخابی را فراهم می نمایند.

3)LAMP بسیار اختصاصی عمل می کند زیرا با 4 پرایمر قادر است که 6 ناحیه ژنی از توالی هدف را در آغاز واکنش و 4 ناحیه را در طی واکنش LAMP مورد شناسایی قرار دهد.

4) روش LAMP ساده و انجام آن آسان است، و تنها نیاز به پرایمر، DNA پلی مراز و مخلوط واکنش دارد و نیازی به ترمو سایکلر ندارد و واکنش در حمام آب گرم یا بلوک‌های حرارتی قابل انجام است.(13)

5) به وسیله ترکیب با نسخه برداری معکوس LAMP قادر است توالی های RNA را با کارایی بالا تکثیر نماید.(13)

6) امکان آشکارسازی نتیجه نهایی واکنش بر اساس کدر شدن محیط عمل واکنش است که با چشم یا دستگاه قابل مشاهده است.(14)

7) نیاز به واسرشت نمودن DNA اولیه و حتی نیاز به استخـــراج DNA اولیه از بـــرخی نمونه‌های بیـــولـــوژیک (مانند محیـــط کشـــت مـــایع) نمی باشد.(17- 15)

پر واضـــح است که LAMP نیز همانند سایر روش ها دارای محـــــدودیت هـــایی در طراحی پیچیده پرایمر است که البـــته آشنایان با بیوانفـــورماتیک قـــادر به انجام آن هستند،(18). در ایـــن تحقیـــق دو روش PCR و LAMP برای

Archive of SID

www.SID.ir

تشخیص سالمونلا بررسی گردید و نشان داده شد که روش LAMP نسبت به PCR آسان تر، سریع تر و دقیق تر است.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از 7 سویه مختلف سالمونلا که اسامی آن ها ذیلاً بیان شده استفاده گردیده است که از آزمایشگاه رفرانس وزارت بهداشت تهیه شده‌اند.

1) Salmonella typhi
2) Salmonella paratyphi A
3) Salmonella paratyphi B
4) Salmonella paratyphi C
5) Salmonella enteritidis
6) Salmonella infantis
7) Salmonella havani

سایر مواد مورد نیاز از شرکت سیناژن تهیه گردید. بلوک حرارتی بسیار ساده استفاده شده در این تحقیق ساخت داخل کشور می باشد.

روش آماده‌سازی نمونه‌ها: از هر یک از نمونه‌های فوق به میزان 50 مایکرولیتر برداشته و در 1/5 سی سی محیط کشت مایع LB کشت داده شدند و به مدت 24 ساعت در گرم خانه37 درجه سانتی گراد قرار گرفتند، و بعد از گذشت این زمان تمام آن ها رشد کردند و آماده استخراج ژنوم شدند.

DNA سالمونلاهای کشت داده شده به روش استاندارد فنل کلروفرم (19،20) استخراج شده و سپس وجود ژنوم آن ها بر روی ژل آگاروز 1 درصد تأیید گردید.

قبل از اقدام به انجام تست LAMP جهت تأیید ژنوم سالمونلا از روش PCR متداول از پرایمرهای زیر و روش بهینه سازی شده PCR جهت تشخیص مولکولی سالمونلا که توسط کرمی و همکاران انجام شده بود استفاده گردید.(21-23)

جدول 1. توالی پرایمرهای استفاده شده برای واکنش PCR

serial	primer	sequence	Size(bp)	Size of PCR product(bp)
1	ST3	5'-CTTGCTATGGAAGACATAACGAACC -3'	25	258
2	ST4	5'-CGTCTCCCATCAAAAGCTCCATAGA -3'	24	
3	ST12	5'- GTATTGTTGATTAATGAGATCCG-3'	23	373
4	ST13	5'- ATATTACGCACGGAAACACGTT-3'	22	

در آزمایش PCR برای تکثیر قطعات مورد نظر، مشخصات آزمایش و مقادیر مواد استفاده شده به شرح زیر است(جداول 2 و3):

جدول 2. پروفایل حرارتی مورداستفاده برای تست

Tempture	Time	Cycle
94 **c**^{o}	1 min	1
94 **c**^{o}	30 Sec	30
57 **c**^{o}	1 min	30
72 **c**^{o}	1 min	30
72 **c**^{o}	5min	1

Archive of SID
www.SID.ir

جدول 3. مقادیر مورد استفاده برای انجام تست PCR

material	Amount(µl)
primer Forward	0.5
primer Reverse	0.5
Buffer 10X PCR	2.5
dNTPs	0.5
Mgcl2	0.5
Taq DNApolymerase	0.5
DNA	1
D2W	14
Total Volume	20

ژنوم‌های استخراج شده فوق الذکر به روش اپتی مایز شده فوق به وسیله PCR تکثیر شدند.

تست LAMP: پرایمرهای مناسب ژن inv A که در تمام سالمونلاها حفاظت شده است، انتخاب و تهیه شد که توالی آن ها مطابق جدول 4 می باشد.

جدول 4. لیست توالی پرایمرهای استفاده شده در تست LAMP

primer	Type	Lenght	Sequence
FIP	Forward-inner (50-F1C-TTTT-F2–30)	46nt(F1C, 22nt; F2, 20nt)	5'-GACGGCTGGTACTGATCGATAGTTTTTCAACGTTTCCTGCGG -3'
BIP	Backward-inner (50-B1C-AAAA-B2–30)	45nt(B1C, 21nt; B2, 20nt)	5'-CCGGTGAAATTATCGCCACACAAAACCCACCGCCAGG -3'
F3	Forward outer	22nt	5'-GGCGATATTGGTGTTTATGGGG -3'
B3	Backward outer	20nt	5'-AACGATAAACTGGACCACGG -3'

تمام فاکتورهای مؤثر در واکنش LAMP بهینه‌سازی شد تا تکثیر قطعه مورد نظر به خوبی انجام شود. بعد از اعمال تمام فاکتورهای مؤثر میزان مواد وسیکل حرارتی در واکنش LAMP به شرح زیر می باشند(جداول 5 و6):

جدول 5. میزان مواد استفاده شده در تست LAMP

material	Amount(µl)	concenteration
D2W	11.5	_
Buffer 10X	2.5	0.2 mM
Betain	2	0.4 mM
dNTPs	0.5	0.2 mM
Bst DNApolymerase	0.5	8 Unit
Primer FIP	2	0.9 pm
Primer BIP	2	0.9 pm
Primer F3	0.5	0.2 pm
Primer B3	0.5	0.2 pm
DNA	3	_
Volume	25	

Archive of SID

www.SID.ir

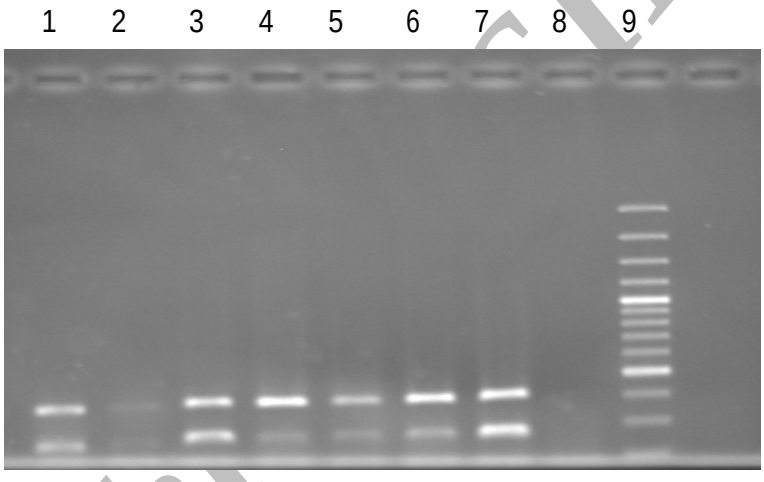
جدول 6. سیکل حرارتی جهت انجام تست LAMP

Tempreture	Time	cycle
65ċ	45 min	1
82ċ	10 min	2

نمونه ژنوم استخراج شده سالمونلا را بر طبق روش بهینه سازی شده LAMP تکثیر شدند. سپس محصول روی ژل آگارز 2 درصد الکتروفورز بررسی شد. برای کسب بهترین نتیجه عوامل مختلف موثر در فرایند تکثیر مانند میزان مواد مختلف و شرایط حرارتی بهینه سازی های مختلفی صورت گرفت.

یافته‌های پژوهش

بعد از انجام تست PCR و تأیید قطعات مورد انتظار از ژنوم سالمونلاهای مختلف بررسی شده آزمایش LAMP صورت گرفت.



شکل 1. الکتروفورز نمونه های تست PCR جهت تایید ژنوم سالمونلا

1- سالمونلاتیفی 2- سالمونلااینتریتدیس 3- سالمونلا پاراتیفیA 4- سالمونلا تیفی B 5- سالمونلا تیفی C 6- سالمونلا havani 7- سالمونلا Infantic 8-کنترل منفی 9-وزن مولکولی (100bp-200bp-300bp-400bp - 500 bp)(پررنگ ترند)

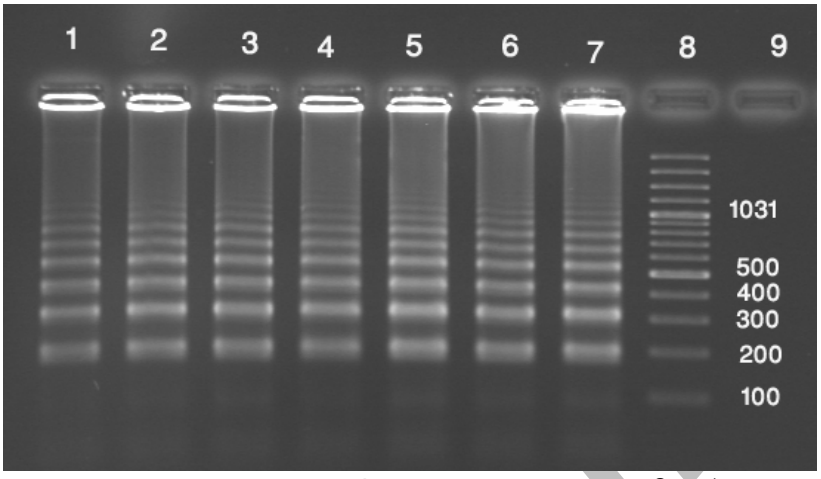
آزمایش LAMP صورت گرفت همچنان که در شکل 2 دیده می شود در الکتروفورز باندهای متعدد نردبانی شکلی که اندازه آن ها از 241bp به بالا می باشد مشاهده می شوند که از مشخصات بارز این روش است و انجام واکنش اختصاصی از این طریق مشخص می شود. در کنترل منفی که فاقد DNA الگو است هیچ باندی قابل رؤیت نیست.

انجام بهینه سازی ها مشخص نمود که بهترین نتیجه در دمای 65 درجه سانتی گراد است زیرا در این دما میزان تکثیر DNA افزایش می یابد، بهینه سازی زمان واکنش مشخص نمود که از زمان های مختلف واکنش LAMP شامل30، 45 و60 دقیقه که در زمان 30 دقیقه هیچ محصولی تولید نشد. در 45 دقیقه محصول اندکی تولید شد و در 60 دقیقه میزان محصولات به حداکثر رسید،

بنابراین مشخص گردید که واکنش LAMP را در 65 درجه سانتی گراد به مدت 60 دقیقه اپتی بهترین نتیجه را می دهد ولی تجربه نشان داد که در صورت ادامه واکنش به مدت 10 دقیقه در 82 درجه سانتی گراد. نتایج بهتر خواهد بود و این نتایج با تحقیق Maeda et al. (2005) و Li et al. (2007) (24،25) مطابقت دارد. با به کارگیری هر یک از

www.SID.ir

پرایمرهای (FIP,BIP,F3&B3) به طور مجزا یا جفت و حتی استفاده از 3 پرایمر هیچ محصولی تولید نشد، بنابراین برای انجام واکنش وجود هر دوجفت پرایمر الزامی است.



شکل 3. الکتروفورز نمونه ها تست LAM جهت تایید ژنوم سالمونلا
1-ژنوم باکتری سالمونلاتیفی 2-ژنوم باکتری سالمونلااینتریتدیس 3-ژنوم باکتری سالمونلا پاراتیفیA 4-ژنوم باکتری سالمونلا تیفی B 5-ژنوم باکتری سالمونلا تیفی C 6-ژنوم باکتری سالمونلا havani 7- ژنوم باکتری سالمونلا Infantic 8-وزن مولکولی (100 bp-200 bp- 300 bp- 400 bp - 500 bp)(پررنگ ترند) 9-کنترل منفی

در مقایسه LAMP و PCR (شکل1و3) در LAMP تنها ژن invA در از اندازهای متفاوت از 241bp به بالا تکثیر می یابد ولی در PCR برای هر جفت پرایمر تنها یک باند مشاهده می گردد. برای پرایمرهای S3 و S4 باند 258bp و پرایمرهای S12 و S13 باند 373bp مشاهده می شود. در LAMP پرایمرهای طراحی شده تنها قادر به تکثیر ژن invA هستند و با این پرایمرها تنها قادر به تشخیص سالمونلا می باشیم. از نظر حساسیت در تشخیص LAMP نسبت به PCR 10 برابرحساستر است. (25)

بحث و نتیجه‌گیری

روش های متداول تشخیص سالمونلا نیازمند زمان طولانی است که فاقد کارایی لازم جهت تشخیص سریع این باکتری می باشد،(19). از روش PCR معمولی جهت تشخیص، شناسایی و تفکیک سالمونلا از سایر انتروباکتریاسه ها استفاده شده است.

روش LAMP روش تشخیصی سریع تر و مقرون به صرفه تری است،(12). محققین جهت تشخیص مولکولی سالمونلا تیفی پرایمرهای مختلفی را بر اساس ردیف ژن های شناخته شده، int-،prt ،tyv ،fiC-dT ،fiC-a ،invB ،invA flom و spvC طراحی و بررسی نموده اند،(25). بررسی روش های PCR فوق سریع موسوم به روش Real-time در تشخیص سریع سالمونلا نشان داده است که این روش ها کارایی مناسبی داشته و لیکن دستگاه استفاده شده بسیار گران قیمت است. در روش LAMP برای تشخیص سریع سالمونلا از دو جفت پرایمر طراحی شده بر اساس ژن invA که قادر به شناسایی انواع سالمونلا می باشد استفاده شده است و تشخیص بسیار سریع و دقیق انجام می گیرد،(22،24). این روش دارای مزایای بسیاری است و قادر است DNA را با کارایی بالا تحت شرایط تک دمایی(Isothermal) تکثیر نماید و تشخیص را می توان با تعداد اندک DNA شروع نمود. LAMP حتی قادر است DNA را در کمتر از 6 کپی در مخلوط واکنش شناسایی نماید، بسیار اختصاصی عمل می کند زیرا با 4 پرایمر قادر است که 6 ناحیه ژنی از توالی هدف را در آغاز واکنش و 4 ناحیه را در خلال واکنش اصلی LAMP مورد شناسایی قرار دهد. انجام آن آسان است، و تنها نیاز به پرایمر، DNA پلیمراز و مخلوط واکنش دارد و نیازی به ترموسایکلر ندارد و واکنش در حمام آب گرم یا بلوک های حرارتی

Archive of SID

www.SID.ir

قابل انجام است امکان آشکارسازی نتیجه نهایی واکنش بر اساس کدر شدن محیط عمل واکنش که به واسطه آزاد شدن پیرو فسفات از dNTP ها و ترکیب آن ها با یون های منیزیم در حین واکنش ایجاد می گردد، و امکان آنالیز نتایج را آسان می نماید که این مورد در بین تمام روش های مولکولی تکثیر DNA بی نظیر است.

مقایسه نتایج این تحقیق با تحقیقات مشابه نشان داد که استفاده از پرایمرهایی که بر اساس ژن invA (invA invasion protein) هستند کارایی بالایی در تشخیص سالمونلا به روش LAMP دارند، زیرا این ژن از ژن های مهم مسؤل تهاجم باکتری به سلول های اپیتلیال است. در این تحقیق با بهینه سازی های انجام شده در طی واکنش LAMP زمان نهایی تشخیص نسبت به PCR بسیار کوتاه گردید، جهت انجام این کار فاکتورهای مؤثر در واکنش از قبیل آنزیم، dNTP، پرایمرها، بتائین، DNA الگو و زمان انجام واکنش بهینه سازی شدند که نسبت به تلاش هایی که جهت کوتاه نمودن زمان تشخیص باکتری های بیماری زا از جمله سالمونلا که با دستگاه های متداول PCR صورت گرفته است قابل توجه می باشد.

References

1-Zahraei-sallehi T. Salmonella. Tehran Univercity Publication 1986. p. 86. (Persian)

2-Collier L, Balows A, Sussman M. Topley and Wilson's microbiology and microbial infections. 9th ed. London, Edward Arnold, 1998. Vol. 2. p. l969-97.

3-Soltani MJ, Shahhosseiny MH, Shahbazzadeh D. Selective amplification of prt, tyv and inv A genes by multiplex PCR for rapid detection of salmonella typhi. J Iranian Biomedical 2005; 9:135-8.

4-Guthrie KR. Salmonella .Bocan Rotan Ann Arbor London 1991. 23-40.

5-Abhyankar A. Salmonellosis and its laboratory diagnosis[online].(cited 2002). Available from: *URL:http/ / bacteriology. Htrn. www.Geoities.Com/ avinash abhyankar*

6-Watson PM, Paulin AP. Characterization of intestinal invasion by salmonella typhimurium and salmonella dublin and effect of a mutation in the invH gene. Infect Immun 1995; 63: 2743-54.

7-Bell c, Kyriakides A. Salmonella, a practical approach to the organism and its control in food. Blackwell Science. 2000.p. 1-25.

8-Moore P. Replicating success. J Nature 2005; 435: 235-8.

9-Hoorfar P, Radstro M. Automated nuclease PCR assay for identification of Salmonella enterica. J Cli Microbiology 2000: 3429–35.

10-Morel G, Raccurt M. PCR in situ light and electron I microscopy 2005; 5.0I.E. Manual of standards for diagnosis tests and vaccines 1992.p.408-25.

11-Figueroa-Bossi N, Bossi L. Inducible prophages contribute to salmonella virulence in mice.J Mol Microbiogy 1999; 33: 167-76.

12-Ashwani K, Vineet Aa, Anu B, Sher A. Detection of Salmonella typhi by polymerase chain reaction: implications in diagnosis of typhoid fever Infection. J Genetics and Evolution 2002; 2: 107–10.

13-Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. J Nuc Acids Res 2000; 28: 63.

14-Mori Y, Magamine K, Tomita N, Notomi T. Detection of loop-mediated isothermal amplification by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. Biochem Biophys Res Commun 2001; 289: 150-4.

15-Kaneko H, Kawana T, Fukushima E, Suzutani T. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. J Biochem Biophys Methods 2007; 70: 499-501.

16-Nagamine K, Watanabe K, Ohtsuka K, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification reaction using a nondenatured template. J Clin Chem 2001; 47: 1742-3.

17-Mori Y, Hirano T, Notomi T. Sequence specific visual detection of LAMP reactions

Archive of SID
www.SID.ir

by addition of cationic polymers. J BMC Biotechnol 2007; 6: 1-10.
18-Demidov VV. A new use for old stuff: DNA hairpins in DNA amplification. J TRENDS in Biotechnol, 2002; 20: 189-90.
19-Kochl S, Niederststter H, Parson W. DNA extraction and quntitation of forensic samples using the phenol-chloroform method and real-time PCR. J Methods Mol BIol 2005; 297: 13-30.
20-Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim van, Dillen PM. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J Clin Microbiol 1990; 28: 495-503.
21-Karami A, Ahmadi Z, Safiri Z. [Rapid detection of thyphoid agent with multiplex PCR bases of tyv,invA,prt genes and compairing of isolated sequence from Iran with gene bank sequence]. J Kaosar Med 2006;11: 1-12. (Persian)
22-Karami A, Ranjbar R, Ahmad Z, Safari Z. [Rapid detection of different serovares of Salmonell antrica by multiplex PCR]. Iranian J Pub Health 2007; 36: 38-42. (persian)
23-Karami A, Morrovati S, Ahmadi Z, safari Z, khalilpour A. [Devlopment of an ultra rapid and simple multiplex polymerase chin reaction technique for detection of salmpnella typhi]. Sci Med J 2006; 27: 1134-8.(persian)
24-Maeda H, Kokeguchi S, Fujimoto C, Tanimoto. Detection of periodontal pathogen Porphyromonas gingivalis by loop-mediated isothermal amplification method. FEMS Immuno and Med Microbiology 2005; 43: 233–9.
25-Wang Li, Lei Shi, Alam MJ, Geng y, Lin Li. Specific and rapid detection of foodborne Salmonella by loop-mediated isothermal amplification method. Food Research International 2007; 10: 1016.

Archive of SID

www.SID.ir

Evaluation of LAMP (Loop-mediated isothermal DNA amplification) for Molecular Detection of Salmonella

Karami A, Moradi A, Sorouri R, Ahmadi Z*

(Received: 22 Sep, 2008 Accepted: 7 Sep, 2009)

Abstract

Introduction: Salmonella Bacterium is not only a causative factor of typhoid fever, enterocolitis, and salmonellosis, but it is also a zoonotic infection. This bacterium is a major health problem throughout the world, and is especially prevalent in developing countries. Therefore, rapid diagnosis of salmonella can prevent its outbreak. Different techniques are used for the diagnosis of Salmonella bacteria, such as; culture, biochemical, serological, ELISA, Widal, immunofluorescence and molecular methods like PCR and Real time PCR,all of which are difficult, time-consuming, and expensive. Thus, our study was designed to evaluate the LAMP (Loop-mediated isothermal DNA amplification method) for detection of salmonella bacteria.

Materials & Methods: In this study, we examined 7 different strains of salmonella. The DNA was extracted by standard methods and amplified with specific primers by PCR and set of primers for LAMP in single temperature in very simple thermal block made in Iran. The amplified products were detected by gel electrophoresis and LAMP products were visualized by their turbidity with naked eye.

Findings: Conventional PCR method for detection of Salmonella needs standard thermocylcer and takes 3 hours, but using LAMP method, we were able to amplify and detect salmonella in simple thermoblock, taking much less time. After optimization of the process, it was, soon, possible to detect and identify Salmonella typhi bacteria within 90 minutes. This method is also 10 times more sensitive than that of the PCR.

Discussion & Conclusion: According to the results, comparing LAMP method for detection and identification of Salmonella with conventional PCR, we have been able to determine the simplicity, speed and the superior sensitivity of the LAMP method. This Method is more simple, faster and cheaper. Non-dependence of cycle's temperature and thermo-cycling and replacement with one thermo block which is very simple, inexpensive and made inside the country, can be considered another advantage of the LAMP method.

Key Words: Salmonella, molecular detection, PCR, DN, LAMP

Research Center of Molecular Biology, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
**(corresponding author)*

Archive of SID

www.SID.ir