تحقیقی

تشخیص سریع مایکوپلاسما پنومونیه به روش تکثیر هم‌دما به واسطه حلقه (LAMP)

فائزه داوودی اصل[۱]، دکتر محمدحسن شاه حسینی*[۲و۳]، فاطمه کشاورز[۱]

۱- کارشناس ارشد زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، گروه سلولی مولکولی، واحد علوم و تحقیقات کردستان، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران.

۲- دانشیار، گروه میکروبیولوژی، واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. ۳- مدیرعامل مؤسسه ایرانیان ژن فناور، تهران.

چکیده

زمینه و هدف : *باکتری مایکوپلاسما پنومونیه یکی از عوامل بسیار مهم در پیدایش عفونت‌های تنفسی است. روش‌های تشخیص سرولوژیکی و مولکولی هر کدام دارای محدودیت‌هایی هستند؛ به همین دلیل امکان استفاده از آنها در همه مراکز تشخیصی وجود ندارد. این مطالعه به منظور تشخیص سریع مایکوپلاسما پنومونیه با کمک پرایمرهای اختصاصی طراحی شده ویژه ناحیه P1 adhesin به روش تکثیر هم‌دما به واسطه حلقه انجام شد.*

روش بررسی : *در این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی ۹۲ نمونه بالینی از بیماران با پنومونی آتیپیک جمع‌آوری گردید. DNA نمونه‌ها با جوشاندن استخراج شد. ٦ جفت پرایمر ویژه برای تکنیک LAMP (loop mediated isothermal amplification) به‌وسیله نرم‌افزار Primer Explorer ver 4 طراحی گردید. محصول LAMP به‌وسیله اضافه کردن سایبرگرین تشخیص داده شد. آزمون‌های حد تشخیص و ویژگی روی تست LAMP بهینه شده انجام شد؛ سپس آزمون بهینه شده بر روی نمونه‌ها انجام گردید.*

یافته‌ها : *تست LAMP با استفاده از قطعه بزرگ آنزیم BST در ٦٦ درجه سانتی‌گراد و زمان یک ساعت بهینه گردید. حد تشخیص آزمون در حد 1 CFU به‌دست آمد و با هیچیک از DNA عوامل مورد آزمون در ویژگی، تکثیری مشاهده نشد. از ۹۲ نمونه بالینی جمع‌آوری شده توسط تکنیک LAMP ۷۳ مورد (۸۰درصد) مثبت و ۱۹ مورد (۲۰درصد) منفی تشخیص داده شدند.*

نتیجه‌گیری : *تکنیک تکثیر هم‌دما به واسطه لوپ روشی ساده، مناسب و در دسترس برای شناسایی مایکوپلاسما پنومونیه است.*

کلید واژه‌ها : *پنومونی آتیپیک ، مایکوپلاسما پنومونیه ، تکثیر هم دما به واسطه حلقه*

* نویسنده مسؤول : دکتر محمدحسن شاه حسینی ، پست الکترونیکی shahhosseiny@yahoo.com

نشانی : تهران، خیابان اشرفی اصفهانی، موسسه ایرانیان ژن فناور(IGF)، تلفن ٤٤٨٤٤٩٤٦- ۰۲۱ ، نمابر ٤٤٨٦١٨٨٩

وصول مقاله : ۱۳۹۳/٤/۲۲ ، اصلاح نهایی : ۱۳۹۳/۱۲/۱۳ ، پذیرش مقاله : ۱۳۹٤/۲/۱۵

مقدمه

مایکوپلاسما پنومونیه برخلاف بقیه گونه‌های مایکوپلاسما، به‌عنوان بخشی از فلور طبیعی حضور ندارد و از میان ده گونه انسانی پذیرفته شده جنس مایکوپلاسما، فقط این گونه به‌طور آشکار در بروز بیماری اثبات شده است. این باکتری یکی از عوامل عفونت بخش فوقانی و تحتانی تنفسی در انسان بوده و تصویر بالینی آن به صورت تراکئوبرونشیت کند پیشرونده، همراه با بیقراری و سرفه‌های خشک است (۱و۲). طیف بیماری‌زایی این باکتری از شکل‌های ملایم فارنژیت و تراکئوبرونشیت تا موارد پنومونی حاد را شامل می‌شود (۳). مطالعات اپیدمیولوژیک نشان داده است که این باکتری مسؤول بیش از ۲۰ درصد پنومونی‌های کسب شده از جامعه است (۴). طیف گسترده‌ای از تظاهرات خارج تنفسی مانند عوارض هماتولوژیک، گوارشی، کلیوی، عضلانی - اسکلتی، قلبی - عروقی، ایمونولوژیک، درماتولوژیک و نورولوژیک در ارتباط با این باکتری گزارش شده است (۵).

در حال حاضر کشت، روش‌های تشخیصی سرولوژیک و تکنیک‌های تکثیر اسید نوکلئیک، سه روش قابل دسترس برای تشخیص روتین عفونت‌های مایکوپلاسما پنومونیه محسوب می‌شوند. تشخیص سنتی مایکوپلاسما عمدتاً در گرو کشت و آزمون‌های سرولوژی (آزمون فیکساسیون کمپلمان) است. روش‌های تشخیص سنتی مایکوپلاسما پنومونیه دارای محدودیت‌هایی از نظر صرف وقت زیاد، حساسیت پایین، رشد کند مایکوپلاسما در روی محیط‌های کشت (۵-۲ هفته وقت برای دیدن کلنی) است. اصولاً روش‌های مبتنی بر کشت، تکنیک‌های وقت‌گیر با حساسیت نسبتاً پایین و نیازمند امکانات و نیز تجربه کافی برای تفسیر نتایج هستند (۶). تست‌های سرولوژیک خصوصاً تست کمپلمان فیکساسیون به‌طور وسیعی استفاده شده است. حساسیت این سنجش‌ها وابسته به زمان جمع‌آوری اولین نمونه سرم (قبل یا بعد از

جدول ۱ : جایگاه پرایمرهای ویژهLAMP بر روی توالی هدف

نام پرایمر	ترادف (5'ì3')
F3	ACAAGCCTTAGCCGTTAT
B3	GGGCTAAGCTTCCATTTGG
FIP	TACTGCCTTAAACTGGTTTTGGTCTTTTTTTGATGCCAACTATAAGGAAC
BIP	CACCCCAATGAGGACGATCTTTTTTCTACCACTTGTTCAGC
LOOP F	AGTCCCGGCACTCAATCC
LOOP B	ACCCATAACTTCGTTGATGCGTCT

تاخت بیماری) و دسترسی به دو نمونه سرمی جمع‌آوری شده با فاصله ۳-۲ هفته دارد. سنجش IgM که دارای حساسیت بیشتری از تست CF توسعه یافته است؛ اما پاسخ IgM غیراختصاصی است و یا نوعاً در بالغین حضور ندارد. روش‌های سرولوژیک هم به دلیل حساسیت نسبتاً کم، واکنش متقاطع و نیاز به سرم‌های فاز حاد و نقاهت روشی ایده‌آل به‌شمار نمی‌روند (۶). هیبریدیزاسیون با پروب‌های DNA به‌عنوان یک روش سریع، ویژه و جایگزین کشت پیشنهاد شده است؛ اما این روش هم دارای حساسیت کمی نسبت به روش‌های آمپلیفیکاسیون است. در سال‌های اخیر برای غلبه بر این مشکلات، روش‌های تکثیر اسیدنوکلئیک مانند واکنش زنجیره‌ای پلیمراز توسعه فراوانی یافته است؛ اما تکنیک PCR علی‌رغم توسعه وسیع و دقت بالای واکنش، به علت نیاز به استفاده از تجهیزات پیشرفته مانند ترموسایکلر تاکنون نتوانسته به صورت عمومی در تمام مراکز تشخیصی به بهره برداری برسد (۷و۸).

در سال ۲۰۰۰ میلادی دانشمندی به نام Notomi و همکاران تکنیکی به نام تکثیر هم دما به واسطه لوپ (LAMP) (loop mediated isothermal amplification) که یکی دیگر از روش‌های تکثیر هم دما است را ابداع نمودند که به ترموسایکلر نیاز نداشت. به‌علاوه از دقت و حساسیت بسیار بالایی نیز برخوردار بود (۹و۱۰). واکنش بدون نیاز به دناتوراسیون DNA الگو با کمک پلیمراز با قابلیت جانشینی در رشته انجام می‌گیرد. همچنین از ۶ پرایمر ویژه موسوم به پرایمرهای درونی (FIP و BIP) و پرایمرهای بیرونی (B3 و F3) و پرایمرهای ویژه لوپ (LB و LF) با اختصاصیت بسیار بالا استفاده می‌شود (۱۳-۱۱).

هدف این مطالعه طراحی و انجام تشخیص سریع مایکوپلاسما پنومونیه به روشLAMP در نمونه‌های مرضی و نهایتاً ارایه یک روش تشخیصی دقیق، سریع و در عین حال قابل انجام در همه مراکز تشخیصی در سطح کشور، برای تشخیص زود هنگام مایکوپلاسما پنومونیه بود. در این مطالعه سعی بر راه اندازی تکنیک نوین LAMP با کمک پرایمرهای اختصاصی طراحی شده ویژه ناحیه P1 adhesin مایکوپلاسماپنومونیه برای تشخیص سریع آن در نمونه های بالینی گردید.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی آزمایشگاهی ۹۲ نمونه با سواب‌های استریل از ناحیه نازوفارینکس بیماران با پنومونی آتیپیک در محدوده سنی ۸۸-۱۸ سال (۴۱درصد زن و ۵۸درصد مرد) بستری در بیمارستان‌های شهیدبهشتی و کامکار قم طی سال‌های ۹۳-۱۳۹۲ جمع‌آوری گردید.

سواب‌های آغشته شده را به میکروتیوپ‌های ۱/۵ سی‌سی که حاوی ۲۰۰ ماکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر شده منتقل کردیم تا باکتری مورد نظر از سواب جدا شده و در آب مقطر وارد شود.

استخراج DNA از نمونه‌ها : میکروتیوب‌های حاوی نمونه را به مدت ۱۵- ۱۰ دقیقه در داخل حمام آب جوش قرار دادیم. سپس لوله‌ها را به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ کردیم و مایع رویی را دکانته کرده و به میکروتیوپ جدید منتقل نمودیم. این مایع حاوی DNA بود.

پرایمرهای ویژه LAMP : پرایمرهای LAMP با کمک نرم‌افزار primer explorer V4 برای ژن P1 Adhesin مایکوپلاسما پنومونیه طراحی گردید (جدول یک). بخش‌های به‌شدت ثابت موجود در ترادف ژن P1 مایکوپلاسما پنومونیه، آن را از نظر طراحی پرایمرهای مخصوص گونه، جذاب نموده است.

واکنش LAMP : واکنش LAMP در حجم کلی ۲۵ مایکرولیتر حاوی پرایمرهای F3 و B3 هر کدام با غلظت ۰/۲ پرایمرهای FIP و BIP هر کدام به غلظت ۱/۶ mM ، پرایمرهای لوپ LF و LB هر کدام به غلظت ۰/۸ mM ، بافر آنزیم به غلظت ۱x ، dNTP سیناژن به غلظت ۱/۴ mM ، بتایین به غلظت ۰/۸ M و در نهایت ۸ واحد آنزیم Bst بود.

ارزیابی واکنش LAMP : به هر لوله مقدار یک مایکرولیتر سایبرگرین ۰/۱درصد اضافه کردیم. سپس زیر نور UV مشاهده گردید. نمونه‌های مثبت به رنگ سبز و نمونه‌های منفی به رنگ نارنجی کم‌رنگ دیده شدند.

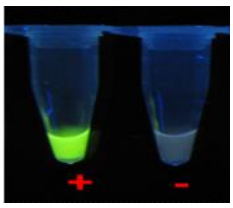
تعیین حد تشخیص و اختصاصیت تست LAMP : برای تعیین حد تشخیص تست، رقت‌های مختلف DNA مایکوپلاسما پنومونیه تهیه گردید. برای این منظور سوسپانسیونی از کشت براث مایکوپلاسما پنومونیه تهیه و DNA آن به روش (Cinaclon) DNG-Plus استخراج و با توجه به اندازه ژنوم این باکتری و استفاده از فرمول Genome Copy Number (GCN) تعداد DNA باکتری در هر میکرولیتر محاسبه گردید.

برای تایید اختصاصیت تست LAMP از DNAهای میکروارگانیسم‌های مایکوپلاسما ارال، مایکوپلاسما آرجینینی، مایکوپلاسما فرمنتاس، مایکوپلاسما هیورینیس، استرپتوکوکوس پنومونیه، هموفیلوس انفلوانزا، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس استفاده گردید.

یافته‌ها

آزمون LAMP با استفاده از آنزیم BST DNA Polymerase (Fermentas) در دمای ۶۶ درجه سانتی گراد و به مدت یک ساعت بهینه گردید. نمونه‌های مثبت LAMP پس از افزودن سایبرگرین ۰/۱ درصد (Invitrogen) در زیر نور UV، سبز رنگ (دارای خاصیت فلوروسانس) مشاهده گردید و نمونه‌های منفی به صورت نارنجی دیده شدند (شکل یک).

حد تشخیص تست LAMP، ۱۰ پارتیکل تعیین شد (شکل ۲). در آزمون ویژگی، تست LAMP ویژگی ۱۰۰درصد نشان داد به نوعی که به جز DNA باکتری مایکوپلاسماپنومونیه با هیچ کدام از عوامل بیماری‌زا و مورد آزمون، واکنش نداد (شکل ۳).

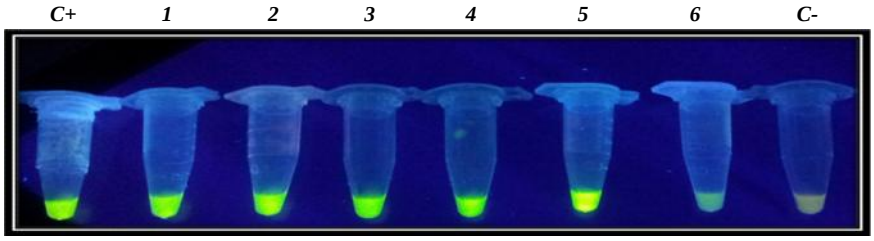


شکل ۱ : آزمون بهینه شده LAMP
C+ : آزمون مثبت با استفاده از DNA مایکوپلاسماپنومونیه
C- : آزمون منفی با استفاده از آب دوبار تقطیر استریل شده

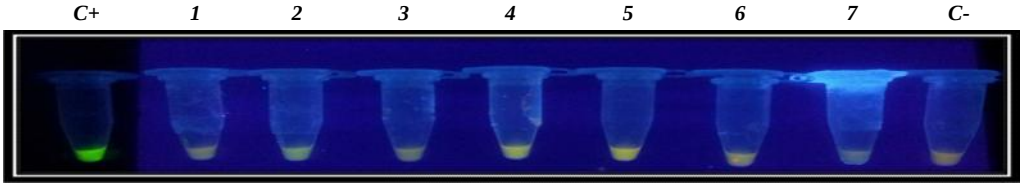
از ۹۲ نمونه بالینی مورد مطالعه، در کنار کنترل‌های مثبت و منفی، تعداد ۷۳ نمونه با تکنیک LAMP مثبت بودند (شکل ۴).

بحث

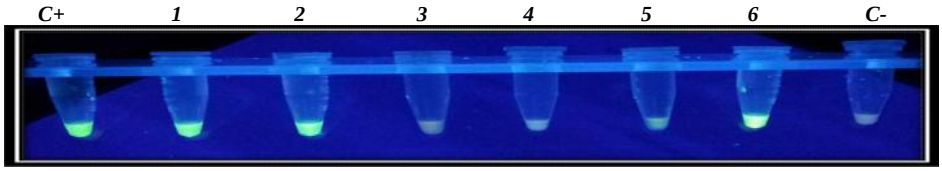
مایکوپلاسماپنومونیه ارگانیسمی غیرقابل رویت با میکروسکوپ نوری و از مهم‌ترین عوامل پنومونی آتیپیک است. این عامل آلوده‌کننده پنهان، به طرق مختلفی همچون شناسایی تغییر رنگ محیط‌های کشت، شناسایی آنتی‌ژن‌های خاص به‌وسیله الایزا، روش‌های بیوشیمیایی، کشت در محیط‌های کشت، رنگ‌آمیزی با



شکل ۲ : آزمون حد تشخیص
C+ : کنترل مثبت (DNA استخراج شده از کشت مایکوپلاسما پنومونیه)، ۱ تا ٦ : ۱۰۰۰۰۰ ، ۱۰۰۰۰ ، ۱۰۰۰ ، ۱۰۰، ۱۰ و ۱ عامل به ازای واکنش، C- : کنترل منفی (آب استریل دو بار تقطیر استریل دیونیزه به عنوان الگو)



شکل ۳ : آزمون ویژگی
C+ : کنترل مثبت (DNA استخراج شده از کشت مایکوپلاسما پنومونیه)، ۱ : مایکوپلاسما ارال، ۲ : مایکوپلاسماآرجینینی ۳: مایکوپلاسمافرمنتاس، ٤: مایکوپلاسماهیورینیس، ٥: استرپتوکوکوس پنومونیه، ٦ :هموفیلوس انفلوانزا، ۷ : مایکوباکتریوم توبرکلوزیس C- : کنترل منفی (آب استریل دو بار تقطیر استریل دیونیزه به عنوان الگو)



شکل ٤ : آزمون انجام شده بر روی نمونه‌ها
C+ : کنترل مثبت (DNA استخراج شده از کشت مایکوپلاسما پنومونیه)، ۱ و ۲ و ٦ : نمونه‌های مثبت ۳ و ٤ و ٥ : نمونه‌های منفی، C- : کنترل منفی (آب استریل دو بار تقطیر استریل دیونیزه به عنوان الگو)

رنگ های فلوروکروم و روش های مولکولی قابل شناسایی است (۱۴). تلفیق نتایج سرولوژیک و بیوشیمیایی اغلب وسیله ای مفید برای تعیین هویت مایکوپلاسماها است. با این حال داده‌های بیوشیمیایی حاصل، اغلب فاقد قدرت شناسایی بوده و واکنش متقاطع سرولوژیکی و حساسیت کم، همیشه یکی از سدهای مهم کاربرد روش‌های سرولوژیک است (۱۴).

با این وجود روش‌های سنتی بر پایه کشت گرچه در موارد زیادی هنوز به‌عنوان یک استاندارد طلایی مطرح است؛ ولی ویژگی‌های یک روش مطلوب را عموماً در شناسایی میکروارگانیسم‌ها و از جمله مایکوپلاسما پنومونیه ندارند (۱۵). مقایسه بین تکنیک PCR با کشت میکروبی، مؤید آن است که PCR روشی حساس، سریع و کارآمد است (۱۵). در مواردی هم که درمان آنتی‌بیوتیکی پیش از نمونه گیری انجام شود؛ تکنیک کشت دارای نتایج منفی کاذب می گردد. لذا برای تعیین هویت مایکوپلاسماپنومونیه، روش کشت دارای نتایج ضعیفی بوده و بنابراین کاربرد روش های تکثیری همچون PCR و روش مولکولی جدیدتر مثل LAMP در اولویت است.

در این مطالعه سعی گردید تا یک سنجش LAMP بر پایه پرایمرهای مخصوص گونه مایکوپلاسما پنومونیه و هدف ژنی Cytadhesin P1 که مقاصد فوق را مهیا کند؛ توسعه داده شود. براین مبنا با انتخاب ژن فوق، پرایمرهای LAMP طراحی گردید. تکثیر به‌وسیله LAMP و با استفاده از ۶ جفت پرایمر، منتج به تکثیر DNA مایکوپلاسماپنومونیه و عدم تکثیر با هیچ نوع مایکوپلاسمای دیگر گردید و البته در این بررسی، مناسب بودن این پرایمرها و سنجش برای تشخیص مایکوپلاسماپنومونیه در نمونه‌های بالینی ثابت گردید. شرایط اپتیمم شده این مطالعه موجب تولید صرفاً آمپلیکون اختصاصی با درجه بالایی از ویژگی و حد تشخیص مناسب گردید.

بخش‌های مختلفی از ژنوم مایکوپلاسماپنومونیه برای تعیین هویت به‌وسیله روش‌های مولکولی و تحت پروتکل‌ها و تکنیک‌های مختلف تکثیری، مورد استفاده واقع شده است (۵-۱). در این مطالعه نیز به دلیل ویژه بودن و ترادف‌های ثابت و ویژه ژن P1 از آن به‌عنوان هدف تکثیر استفاده گردید. مطالعاتی که در آن روش‌های مختلف مولکولی با تارگت ژن های مختلف با هم مقایسه شده باشند؛ بسیار نادر است (۱۶). در مطالعه Leven و همکاران هدف ژنی P1 Adhesin بهتر از ژن 16 S rRNA ارزیابی شد. شاید علت این نتیجه، کپی‌های متعدد ژن Cytadhesin_P1 باشد (۱۶).

مقایسه روش‌های مختلف PCR به دلایلی نظیر اختلاف در جمع‌آوری نمونه؛ روش‌های استخراج؛ حجم نمونه؛ ژن هدف؛ پرایمر؛ روش‌های مختلف مولکولی؛ روش شناسایی و اختلاف در انتقال نمونه‌ها، دارای مشکلات خاص خود است. اختلافات زیادی در واحدهای به‌کار رفته در اندازه‌گیری حدود حساسیت روش‌ها، به چشم می خورد. بدین معنی که در برخی مطالعات، واحد سازنده کلنی (CFU) و در برخی دیگر واحد تغییر رنگ (Color Changing Units-CCU) و در برخی تعداد سلول یا مقدار DNA مورد استفاده واقع شده و حدود این واحدها، متغیر تعریف شده است (۱۷). بنابراین فقدان یک روش ثابت برای ارزیابی مقتضی روش‌های مختلف به کار رفته، مقایسه بین آنها را مشکل کرده است. در نتیجه نیاز به یک روش استاندارد و فوق‌العاده حساس و ویژه برای ارزیابی روش های مختلف، کاملاً احساس می‌شود.

علی‌رغم مراقبت‌های زیاد و فضاسازی مناسب برای تکنیک‌های تکثیری، باز امکان آلودگی با DNA در سیستم تشخیص مولکولی وجود دارد که در نتیجه باعث مثبت‌های کاذب می گردد. البته تجربه نشان داده با اختصاص فضاها و تجهیزات مناسب در زون‌های پیش‌بینی شده، این امکان به صفر نزدیک می گردد. لذا کاربست کنترل‌های مناسب (کنترل مثبت، منفی و یا نوعاً کنترل درونی) در مراحل مختلف استخراج DNA، تکثیر و مرحله تشخیص، کمک شایانی به کاهش آلودگی و نشان دادن آن می‌نماید (۱۸).

تعیین مقدار DNA مایکوپلاسماپنومونیه در نمونه‌های بالینی به‌طور قابل توجهی با ورود تکنیک Real time PCR بهبود یافته و این تکنیک، توانایی زیادی در تعیین مقدار DNA دارد. به‌دلیل عدم نیاز به مراحل بعد از تکثیر (الکتروفورز) احتمال ایجاد آلودگی به حداقل می‌رسد. علی‌رغم تمام این توانایی‌ها از آنجایی که دستگاه و مواد مصرفی مورد نیاز در Real time PCR بسیار گران قیمت است؛ تاکنون امکان استفاده عمومی از این تکنیک در مراکز تشخیصی به‌طور وسیع فراهم نشده است (۱۹).

در روش های تکثیر اسیدهای نوکلئیک به صورت هم‌دما (تکثیر بر مبنای توالی اسید نوکلئیک NASBA ، 3SR و TAS) واکنش تکثیر در دمای ثابت صورت گرفته و در نتیجه در این روش ها نیازی به استفاده از ترموسایکلر وجود ندارد. اگرچه این واکنش ها، هم‌دما تلقی می‌شوند؛ اما در آغاز واکنش نیاز به اعمال یک مرحله دناتوراسیون وجود دارد تا DNA دناتوره شود (۲۰).

با استفاده از تکنیک LAMP نیاز به ترموسایکلر مرتفع شده و در عین حال نیاز به دناتوراسیون اولیه نیست. تکنیک نوظهور LAMP یکی از روش های تکثیر ژن بسیار ساده است که از آغاز تا پایان در یک دما صورت می گیرد. این تکنیک علی‌رغم سادگی دارای حساسیت و دقت بسیار بالایی است. به علاوه از آنجایی که نیاز به سخت افزارهایی مانند ترموسایکلر ندارد؛ با حداقل هزینه انجام می گیرد (۹). در تکنیک LAMP از پرایمرهای بیرونی (F3, B3)،

پرایمرهای درونی(FIP, BIP) که هرکدام دو ناحیه مجزا در الگو را شناسایی می‌کنند و همچنین دو پرایمر ویژه لوپ استفاده می‌شود. به‌طوری که همزمان به ۸ ناحیه در DNA الگو متصل می‌شوند. محصول نهایی واکنش مخلوطی از DNA دارای ساختار ساقه – حلقه به همراه تکرارهای معکوس از DNA الگو و ساختارهای مشابه گل کلم با لوپ‌های فراوان است (۲۱).

در کشورهای در حال توسعه، به دلیل عدم وجود امکانات مالی و آموزشی، بهره‌وری از این تکنیک برای عموم آزمایشگاه‌ها مقدور نیست. به‌علاوه سیستم Real time PCR بسیار گران‌قیمت بوده و تجزیه و تحلیل نتایج آن نیاز به دانش فردی بالایی دارد.

اولین بار Saito و همکاران بر روی توالی ژن P1 Adhesin مایکوپلاسماپنومونیه با استفاده از دو روش LAMP و Real time PCR مطالعه کردند و به این نتیجه رسیدند که تطابق بین این دو تکنیک ۱۰۰ درصد است؛ اما روش Real time PCR یک روش بسیار گران‌قیمت و مستلزم فراهم کردن تجهیزاتی است که در عین حال تجزیه و تحلیل نتایج آن بسیار دشوار و برای تفسیر نتایج حاصله نیازمند به کارکنان با تخصص کافی دارد. برای هر دو تکنیک LAMP و Real time PCR محدوده تشخیص ۲×۱۰^{۲} کپی در ۶۰ دقیقه بود (۱۹).

روش LAMP یک ابزار تشخیصی ساده است که واکنش آن در یک لوله واحد صورت می گیرد و برای این منظور بافر، پرایمر و DNA پلیمراز با هم مخلوط شده و سپس این مخلوط را در بلوک حرارتی که یک درجه حرارت ثابت را ایجاد می‌کند؛ قرار می‌دهند. تکنیک تکثیر به‌واسطه لوپ یک تکنیک به ظاهر ساده و در عین حال بسیار دقیق و حساس است که در واقع مرحله طراحی پرایمر در آن بسیار مهم و حساس بوده و انتخاب بهترین پرایمر از بین پرایمرهای طراحی شده با توجه به عوامل مختلف از اهمیت زیادی برخوردار است. در مطالعه Gotoh و همکاران روی تشخیص LAMP مایکوپلاسما پنومونیه، این روش، تکنیکی سریع برای تشخیص این عامل و نهایتاً درمان آنتی بیوتیکی بدون تأخیر کودکان شناخته شد (۲۰). LAMP یک روش بسیار آسان و مقرون به صرفه است که با چشم غیرمسلح می توان به نتایج پی برد و به راحتی نتایج آن را تفسیر کرد و در نتیجه از این روش می‌توان در آزمایشگاه بیمارستان‌ها به راحتی استفاده و به آسانی به نتایج مورد نظر دست یافت و در نتیجه سریعاً به عفونت مایکوپلاسماپنومونیه در بیماران مورد نظر پی برد و درمان را برای آنان شروع کرد (۱۹و۲۰).

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که تکنیک LAMP روش ویژه، حساس و نسبتاً کم هزینه نسبت به سایر روش‌های مولکولی همچون PCR است. این تکنیک روشی سریع و با حساسیت بالا برای تشخیص مایکوپلاسماپنومونیه است و می‌توان از این روش در آزمایشگاه‌ها به راحتی استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل پایان‌نامه خانم فائزه داودی اصل برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته زیست شناسی سلولی و مولکولی از دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات کردستان بود. بدین‌وسیله سپاس خود را از کارکنان محترم مؤسسه دانش بنیان ایرانیان ژن‌فناور به خصوص خانم سارا بستان ابراز می‌نماییم.

References

1. Yamazaki T, Narita M, Sasaki N, Kenri T, Arakawa Y, Sasaki T. Comparison of PCR for sputum samples obtained by induced cough and serological tests for diagnosis of Mycoplasma pneumoniae infection in children. Clin Vaccine Immunol. 2006 Jun; 13(6):708-10.

2. Pitcher D, Chalker VJ, Sheppard C, George RC, Harrison TG. Real-time detection of Mycoplasma pneumoniae in respiratory samples with an internal processing control. J Med Microbiol. 2006 Feb; 55(Pt 2):149-55.

3. Dumke R, Luck PC, Noppen C, Schaefer C, Baum HV, Marre R, Jacobes E. Culture-independent molecular subtyping of Mycoplasma pneumoniae in clinical samples. J Clin Microbiol. 2006; 44(7):2567-70.

4. Morozumi M, Nakayama E, Iwata S, Aoki Y, Hasegawa K, Kobayashi R, et al. Simultaneous detection of pathogens in clinical samples from patients with community-acquired pneumonia by real-time PCR with pathogen-specific molecular beacon probes. J Clin Microbiol. 2006 Apr;44(4):1440-6.

5. Beersma MF, Dirven K, van Dam AP, Templeton KE, Claas EC, Goossens H. Evaluation of 12 commercial tests and the complement fixation test for Mycoplasma pneumoniae-specific immunoglobulin G (IgG) and IgM antibodies, with PCR used as the "gold standard". J Clin Microbiol. 2005 May;43(5):2277-85.

6. Shuvy M, Rav-Acha M, Izhar U, Ron M, Nir-Paz R. Massive empyema caused by Mycoplasma pneumoniae in an adult: a case report. BMC Infect Dis. 2006 Feb; 6:18.

7. Falguera M, Nogues A, Ruiz-Gonzalez A, Garcia M, Puig T. Detection of Mycoplasma pneumoniae by polymerase chain reaction in lung aspirates from patients with community-acquired pneumonia. Chest. 1996 Oct; 110 (4): 972-6.

8. Honda J, Yano T, Kusaba M, Yonemitsu J, Kitajima H, Masuoka M, et al. Clinical use of capillary PCR to diagnosis Mycoplasma pneumoniae. J Clin Microbiol. 2000 Apr; 38(4): 1382-84.

9. Saharan P, Dhingolia S, Khatri P, Singh Duhan J, Gahlawat S. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) based detection of bacteria: a review. Afr J Biotechnol. 2014; 13(19):1920-8.

10. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res. 2000 Jun; 28(12): E63.

11. 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 Nov; 289(1):150-4.

12. Mori Y, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method

for infectious diseases. J Infect Chemother. 2009 Apr;15(2):62-9. doi: 10.1007/s10156-009-0669-9.

13. Parida M, Sannarangaiah S, Dash PK, Rao PV, 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 Nov-Dec; 18(6):407-21. doi: 10.1002/rmv.593.

14. Abele-Horn M, Busch U, Nitschko H, Jacobs E, Bax R, Pfaff F, et al. Molecular Approaches to Diagnosis of Pulmonary Diseases Due to Mycoplasma pneumonia. J Clin Microbiol. 1998 Feb; 36(2): 548-51.

15. Razin S. DNA probes and PCR in diagnosis of mycoplasma infections. Mol Cell Probes. 1994 Dec;8(6):497-511.

16. Ieven M, Ursi D, Van Bever H, Quint W, Niesters HG, Goossens H. Detection of Mycoplasma pneumoniae by two polymerase chain reactions and role of M. pneumoniae in acute respiratory tract infections in pediatric patients. J Infect Dis. 1996 Jun; 173(6):1445-52.

17. Loens K, Ursi D, Goossens H, Ieven M. Molecular diagnosis of Mycoplasma pneumoniae respiratory tract infections. J Clin Microbiol. 2003 Nov;41(11):4915-23.

18. Shahhosseiny MH, Tehrani M. [Polymerase Chain Reaction (PCR)]. 2nd. Tehran: Islamic Azad University shahr-E-Qods. 2005; pp:45-68. [Persian]

19. Saito R, Misawa Y, Moriya K, Koike K, Ubukata K, Okamura N. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection ofMycoplasma pneumoniae. J Med Microbiol. 2005 Nov;54(Pt 11):1037-41.

20. Gotoh K, Nishimura N, Ohshima Y, Arakawa Y, Hosono H, Yamamoto Y, et al. Detection of Mycoplasma pneumoniae by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay and serology in pediatric community-acquired pneumonia. J Infect Chemother. 2012 Oct; 18(5):662-7. doi: 10.1007/s10156-012-0388-5.

21. Nagamine K, Watanabe K, Ohtsuka K, Hase T, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification reaction using a nondenatured template. Clin Chem. 2001 Sep;47(9):1742-3.

Original Paper

Rapid detection of *Mycoplasma pneumonia* by Loop mediated isothermal amplification (LAMP)

Davudi-Asl F (B.Sc)[1], Shahhosseiny MH (Ph.D)*[2,3], Keshavarz F (B.Sc)[1]

[1]M.Sc Student in Cell and Molecular Biology, Science and Research Branch (Kordestan), Islamic Azad University, Sanandaj, Iran. [2]Associate Professor, Department of Microbiology, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. [3]Iranian Gene Fanavar Institute (IGF), Tehran, Iran.

Abstract

Background and Objective: *Mycoplasma pneumoniae* bacteria, is one of the most important factor in causing of respiratory infections. Serological and molecular detection methods have their own limitation. Due to this limitation, the application of these methods in all diagnostic laboratories is not possible. Therefore this study was done to determine the rapid detection of *Mycoplasma pneumonia* by loop mediated isothermal amplification (LAMP).

Methods: In this descriptive laboratory study, nasopharynx samples were collected from 92 patients with atypical pneumonia. DNA sample were extracted by boiling method. Six specific primer pairs were designed for LAMP technique by *primer explorer ver 4* software. LAMP product identified by adding SYBR Green. Limit of detection and specificity tests have been done for optimizing LAMP test and optimized test carry out for each sample.

Results: The LAMP test was optimized using the large Bst enzyme fragment at 66 degree temperature for 1 hour. The detection limit of the test obtained 1 CFU and the DNA replication does not observed in non of the examined pathogenic factors. Out of 92 clinical samples using LAMP technique, 73 cases were negative (80%) and 19 cases were positive (20%).

Conclusion: The loop-mediated isothermal amplification technique is simple, convenient and available method for detection of *Mycoplasma pneumoniae*.

Keywords: Atypical pneumonia, *Mycoplasma pneumoniae*, Loop mediated isothermal amplification

*** Corresponding Author: Shahhosseiny MH (Ph.D), E-mail: shahhosseiny@yahoo.com**

Received 13 Jul 2014 **Revised** 4 Mar 2015 **Accepted** 5 May 2015

Cite this article as: Davudi-Asl F, Shahhosseiny MH, Keshavarz F. [Rapid detection of *Mycoplasma pneumonia* by Loop mediated isothermal amplification (LAMP)]. J Gorgan Uni Med Sci. 2015; 17(3): 127-133. [Article in Persian]