مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و یکم/شماره ۲۶۱/هفته سوم دی ماه ۱۳۹۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۷/۱۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۹/۲۸

بررسی مقایسه‌ای کارایی روش جدید تکثیر هم دمایی به واسطه‌ی حلقه و روش‌های متداول تشخیص هپاتیت C

دکتر محمد کارگر[۱]، اعظم عسکری[۲]، دکتر عباس دوستی[۳]، صادق قربانی دالینی[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: ویروس هپاتیت C یکی از عوامل اصلی بیماری‌های مزمن کبدی و یکی از مشکلات مهم بهداشت جهانی است. بنابراین تشخیص سریع و مدیریت صحیح آن اهمیت قابل توجهی دارد. این پژوهش با هدف مقایسه‌ی کارایی ۳ روش ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)، Nested PCR (Nested polymerase chain reaction) و LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) برای تشخیص عفونت هپاتیت C انجام شد.

روش‌ها: این پژوهش به صورت مقایسه‌ای بر روی ۵۰ نمونه‌ی سرم مشکوک به ویروس هپاتیت C در استان چهارمحال و بختیاری انجام شد. HCV Ab با استفاده از روش ELISA و RNA ژنومی با روش‌های Nested PCR و LAMP مورد ارزیابی قرار گرفتند. سپس کارایی روش‌های ELISA و LAMP در مقایسه با روش Nested PCR ارزیابی شد.

یافته‌ها: از مجموع نمونه‌های مورد بررسی، ۴۵ نمونه (۹۰ درصد) با هر دو روش Nested PCR و LAMP از نظر HCV (Hepatitis C virus) مثبت بودند. تمامی نمونه‌های مورد بررسی (۱۰۰ درصد) با روش ELISA مثبت شناسایی شدند، اما میزان مثبت کاذب آن ۱۰ درصد (۵ مورد) بود. همچنین کارایی روش‌های LAMP و ELISA در مقایسه با Nested PCR به ترتیب ۱۰۰ و ۹۱ درصد محاسبه گردید.

نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که روش LAMP به دلیل کارایی، سرعت بسیار زیاد و هزینه‌ی کمتر، می‌تواند به عنوان یک روش سریع جایگزین برای تشخیص عفونت هپاتیت C به کار رود.

واژگان کلیدی: ویروس هپاتیت C، ELISA، Nested PCR، LAMP

ارجاع: کارگر محمد، عسکری اعظم، دوستی عباس، قربانی دالینی صادق. **بررسی مقایسه‌ای کارایی روش جدید تکثیر هم دمایی به واسطه‌ی حلقه و روش‌های متداول تشخیص هپاتیت C.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۲؛ ۳۱ (۲۶۱): ۱۸۸۴-۱۸۷۶

مقدمه

ویروس هپاتیت C (HCV یا Hepatitis C virus) یک ویروس دارای ژنوم RNA و متعلق به خانواده‌ی فلاوی‌ویریده (Flaviviridae) می‌باشد. این ویروس، عامل اصلی بیماری‌های مزمن کبدی به ویژه سیروز و سرطان سلول کبدی است که حداقل ۱۸۰ میلیون نفر در سراسر جهان به آن آلوده هستند (۲-۱) و با وجود شمار زیاد افراد مبتلا، هنوز هیچ گونه واکسن مؤثری

۱- دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، جهرم، ایران
۲- کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، جهرم، ایران
۳- استادیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران
۴- کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی و باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، جهرم، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: : دکتر محمد کارگر
Email: mkargar@jia.ac.ir

برای آن شناسایی نشده است. مرگ و میر ناشی از عفونت HCV حدود ۲۵۰ تا ۳۵۰ هزار نفر در سال تخمین زده شده است که به نظر می‌رسد در دو دهه‌ی آینده نیز افزایش یابد (۱). بنابراین، تشخیص دقیق و سریع تمامی مراحل بیماری هپاتیت C به منظور شروع هر چه سریع‌تر درمان ضد ویروسی اهمیت زیادی دارد.

روش‌های مختلفی مانند آزمون‌های عملکرد کبدی (بررسی فعالیت ALT یا Alanine aminotransferase و AST یا Aspartate transaminase)، بیوپسی کبد، روش‌های سرولوژی (EIA یا Enzyme immunoassay و RIBA یا Recombinant immunoblot assay) و تکثیر کیفی (Transcription mediated amplification یا TMA و Reverse transcription polymerase chain reaction یا RT-PCR) و کمی اسید نوکلئیک (bDNA یا Branched DNA و Real-time PCR) برای شناسایی HCV توسعه پیدا کرده‌اند (۶-۳). در حال حاضر، روش‌های سرولوژی مبتنی بر شناسایی آنتی‌بادی‌های ضد ویروس هپاتیت C (HCV Ab)، متداول‌ترین و ساده‌ترین راه تشخیص عفونت هپاتیت C می‌باشند. اما با وجود استفاده‌ی گسترده، به دلیل کم بودن ویژگی، واکنش مثبت کاذب در آن بارها گزارش شده است. همچنین با توجه به زمان طولانی تولید HCV Ab در اغلب بیماران (۱۵ هفته)، آزمون‌های سرولوژی در این مدت (دوره‌ی پنجره) و حتی در برخی از مواقع ۳ تا ۶ ماه پس از آلودگی فرد نیز مثبت نخواهند شد (۹-۷).

اصول آزمون‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مانند Nested PCR، RT-PCR و Real-time PCR بر مبنای تشخیص RNA ویروس هپاتیت C می‌باشند. اما با وجود داشتن ویژگی و حساسیت زیاد، به دلیل نیاز به تجهیزات گران قیمت ترموسایکلر و پرسنل ماهر، در بسیاری از مراکز تشخیص پزشکی قابل استفاده نیستند.

Notomi و همکاران یک روش مبتنی بر تشخیص اسید نوکلئیک، به نام تکثیر هم‌دمایی به واسطه‌ی حلقه (Loop-mediated isothermal amplification یا LAMP) را گزارش کردند (۱۰). روش LAMP قادر است به صورت بسیار اختصاصی، توالی اسید نوکلئیک را در دمای ثابت ۶۵-۶۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به کمک تجهیزات ساده و ارزان مانند حمام آب گرم و یا بلوک حرارتی تکثیر کند. در این روش، برای واسرشت شدن و تکثیر DNA نیاز به تغییرات دمایی و دستگاه ترموسایکلر نمی‌باشد، بلکه آنزیمی به نام DNA پلیمراز Bst، به کمک ساختار ویژه‌ی پرایمرها، توالی هدف را به طور همزمان واسرشت و تکثیر می‌کند. بنابراین بازده تکثیر به دلیل کاهش زمان تغییرات دمایی، در مقایسه با روش PCR بیشتر می‌باشد (۱۵-۱۰).

واکنش LAMP توسط ۴ پرایمر اختصاصی (داخلی و خارجی) انجام می‌شود و با توجه به دو قسمتی بودن پرایمرهای داخلی، در مجموع، به ۶ ناحیه‌ی مجزا در توالی هدف متصل می‌شوند (۱۲، ۱۰). علاوه بر این، Nagamine و همکاران نشان دادند که با اضافه کردن دو پرایمر متصل شونده به ساختارهای ساقه- حلقه (Stem-loop) به نام پرایمرهای حلقه (Loop)، سرعت تکثیر و ویژگی واکنش افزایش می‌یابد (۱۶). همچنین به دلیل تولید مقدار بسیار زیادی محصول در واکنش LAMP، امکان تشخیص نتیجه‌ی واکنش با اضافه کردن رنگ فلورسنت سایبر گرین I (SYBR Green I) وجود دارد (۱۵-۱۱).

بنابراین، روش LAMP با توجه به مزایایی مانند

بازده تکثیر سریع، سادگی تشخیص و عدم نیاز به تجهیزات گران قیمت آزمایشگاهی، می‌تواند به عنوان یک ابزار ارزشمند برای تشخیص سریع بیماری‌های عفونی در آزمایشگاه‌های کلینیکی و بیمارستانی به ویژه در کشورهای درحال توسعه به کار برده شود. هدف از این پژوهش، مقایسه‌ی کارایی روش‌های ELISA و LAMP نسبت به روش Nested PCR بود.

روش‌ها

۵۰ نمونه‌ی سرم بیماران مشکوک به عفونت هپاتیت C (نمونه‌های $HCV\ Ab^{+}$) از آزمایشگاه‌های مختلف استان چهارمحال و بختیاری در سال ۱۳۹۰ جمع‌آوری گردید. تمامی نمونه‌ها توسط روش ELISA با استفاده از کیت HCV IgG EIA DiaPro ساخت کشور ایتالیا مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین از ۴ نمونه‌ی سرم که از قبل به وسیله‌ی روش RFLP (Restriction fragment length polymorphism) بر روی ناحیه‌ی ۵ UTR ژنوم ویروس هپاتیت C تعیین هویت شده بودند (1a، 1b، ۲ و 3a) به عنوان کنترل مثبت و از سرم‌های آلوده به ویروس‌های سیتومگالوویروس، هرپس سمپلکس I و هپاتیت B، به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

RNA ویروس هپاتیت C، با استفاده از بافر RNX plus (سیناژن، ایران) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده از نمونه‌های سرم استخراج شد. سپس ۵ میکرولیتر از RNA با استفاده از پرایمرهای هگزامر تصادفی و کیت RevertAid, first strand cDNA (شرکت فرمنتاز) به cDNA تبدیل گردید.

برای انجام Nested PCR از پرایمرهای طراحی شده توسط کاظمی و همکاران (۱۷) استفاده شد (جدول ۱). به طور خلاصه، واکنش مرحله‌ی اول PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای خارجی Out-F و Out-R، ۱/۵ واحد آنزیم DNA پلیمراز smar Taq (سیناژن، ایران) و ۲ میکرولیتر cDNA به منظور تکثیر قطعه‌ی ۲۹۶ جفت بازی انجام شد.

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده برای تشخیص ژنوم HCV (Hepatitis C virus) توسط LAMP (Loop-mediated isothermal amplification)

پرایمر	توالی پرایمر ´۳→´۵	موقعیت ژنوم
Out-F	CTGTGAGGAACTACTGTCT	۶-۲۴
Out-R	GGTGCACGGTCTACGAGACCT	۲۸۲-۳۰۲
In-F	TTCACGCAGAAAGCGTCTA	۲۴-۴۲
In-R	GGGCACTCGCAAGCACCCTAT	۲۵۷-۲۷۷
F۳	TCCCGGGAGAGCCATAGTG	۸۸-۱۰۶
B۳	CACTCGCAAGCACCCTATCAG	۲۵۴-۲۷۴
FIP	GATCCAAGAAAGGACCCGG	۱۴۸-۱۶۶
	TTTTTCTGCGGAACCGGTGAGTAC	۱۰۸-۱۲۷
BIP	CCTGGAGATTTGGGCGTGC	۱۷۹-۱۹۷
	TTTTAGTACCACAAGGCCTTTCGC	۲۳۲-۲۵۱
Loop F	TCATCCTGGCAATTCCG	۱۲۹-۱۴۵
Loop B	GCGAGACTGCTAGCCGAG	۲۰۲-۲۲۲

واکنش مرحله‌ی دوم PCR همانند مرحله‌ی اول انجام شد؛ با این تفاوت که در مرحله‌ی دوم از محصول PCR اول به عنوان الگو و از پرایمرهای داخلی In-F و In-R به منظور تکثیر قطعه‌ی ۲۵۳ جفت بازی استفاده شد. برنامه‌ی دمایی هر دو مرحله یکسان و شامل مرحله‌ی واسرشت شدن ابتدایی در ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، سپس ۳۰ چرخه‌ی تکثیر شامل ۱ دقیقه در ۹۴ درجه‌ی

سانتی‌گراد، ۱ دقیقه در ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۱ دقیقه در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد و مرحله‌ی گسترش نهایی در ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه بود (۱۷).

واکنش توسط دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf mastercycler gradient، آلمان) انجام شد. در نهایت، محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد واجد اتیدیوم بروماید الکتروفورز و به کمک نور UV (Ultraviolet) مورد بررسی قرار گرفتند.

برای انجام واکنش LAMP از پرایمرهای اختصاصی HCV بر اساس توالی ناحیه‌ی ۵ UTR (ناحیه‌ی حفاظت شده در بین تمامی ژنوتیپ‌های HCV) طراحی شده در پژوهش قبلی (۱۸) استفاده گردید. برای این منظور، مخلوط واکنش در حجم کلی ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر 10X Thermopol (New England Biolabs، فرانسه)، ۱ میکرولیتر مخلوط dNTP (Deoxynucleotide) (۱۰ Mm)، ۲ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای داخلی (FIP و BIP)، ۰/۵ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای خارجی (F۳ و B۳)، ۱ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای حلقه (Loop F و Loop B)، ۰/۸ M بتائین (Sigma-Aldrich، آمریکا)، ۳ میکرولیتر cDNA تهیه گردید.

مخلوط یاد شده در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه حرارت داده شد و پس از سرد کردن، ۸ واحد آنزیم DNA پلیمراز Bst (New England Biolabs، فرانسه) به آن اضافه گردید. سپس، واکنش LAMP در دمای ۶۲ درجه‌ی سانتی‌گراد و در زمان‌های ۵۰، ۷۰ و ۹۰ دقیقه با استفاده از دستگاه بلوک حرارتی (۱۳۰D Stuart SBH، انگلستان) انجام شد (۱۸).

علاوه بر این، به منظور دستیابی به یافته‌های بیشتر، واکنش فوق با اضافه کردن ۱/۵ واحد آنزیم Smar taq DNA پلیمراز نیز مورد بررسی قرار گرفت.

پس از انجام واکنش LAMP، محصولات تکثیر با استفاده از دو روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز و مشاهده‌ی تغییر رنگ با افزودن ۱ میکرولیتر محلول سایبر گرین I (Invitrogen lot: 49743A) رقیق شده به نسبت ۱:۱۰، به میکروتیوب حاوی محصولات LAMP و سپس با استفاده از نور UV مورد بررسی قرار گرفت.

در نهایت، با استفاده از فرمول زیر، کارایی روش‌های ELISA و LAMP محاسبه گردید و در مقایسه با روش Nested PCR به عنوان استاندارد طلایی ارزیابی شد (۱۹).

$$\text{کارایی} = \frac{100 \times (\text{مثبت حقیقی} + \text{منفی حقیقی})}{\text{منفی حقیقی} + \text{منفی کاذب} + \text{مثبت حقیقی} + \text{مثبت کاذب}}$$

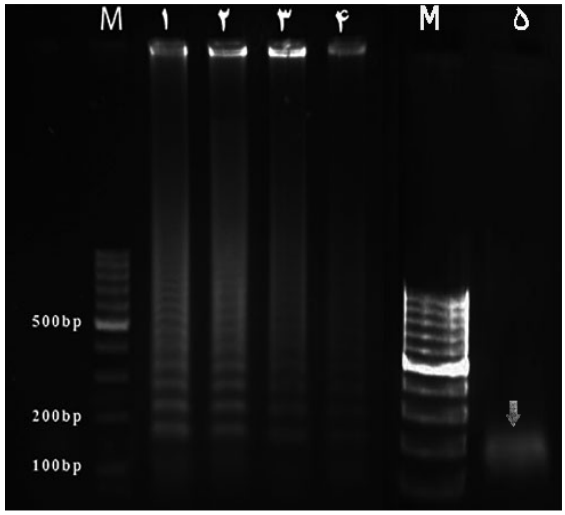
یافته‌ها

با هر ۳ روش مورد بررسی، ویروس هپاتیت C در نمونه‌های کنترل مثبت تشخیص داده شد. همچنین با استفاده از روش‌های یاد شده، نتایج مثبت در نمونه‌های آلوده به ویروس‌های سیتومگالوویروس، هرپس سمپلکس I و هپاتیت B مشاهده نشد. با استفاده از روش ELISA تمامی نمونه‌های مورد بررسی (۱۰۰ درصد) از نظر وجود HCV مثبت شناسایی شدند. اما با استفاده از روش Nested PCR، ۴۵ نمونه (۹۰ درصد) مثبت تشخیص داده شد.

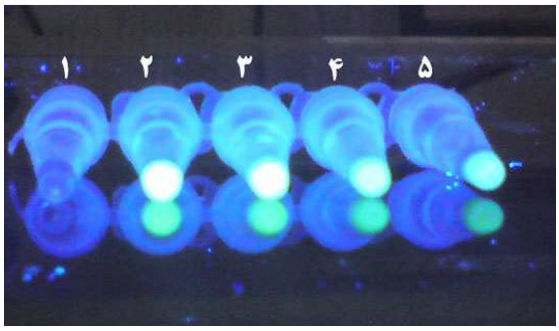
همچنین میزان نتایج مثبت تکنیک LAMP مشابه با روش Nested PCR بود. در تکنیک LAMP

مناسب‌ترین زمان برای انجام واکنش بدون استفاده از پرایمرهای حلقه، ۹۰ دقیقه بود؛ اما با اضافه کردن پرایمرهای حلقه، زمان واکنش به ۷۰ دقیقه کاهش پیدا کرد. نتایج نشان داد که با اضافه کردن ۱/۵ واحد آنزیم DNA پلیمراز Taq، واکنش LAMP پس از ۵۰ دقیقه تکمیل می‌گردد.

پس از ۴۵ دقیقه الکتروفورز محصولات LAMP، یک الگوی نردبانی با باندهایی در اندازه‌های مختلف، از ۱۸۷ جفت بازی تا نزدیک چاهک، مشاهده شد. اما الکتروفوز محصولات Nested PCR یک محصول تک باندی (۲۵۳ جفت بازی) بر روی ژل آگارز را نشان داد (شکل ۱). در روش مشاهده‌ای، پس از اضافه کردن رنگ سایبر گرین I به محصولات LAMP، تغییر رنگ از نارنجی به سبز در نمونه‌های مثبت ایجاد شد. اما در نمونه‌های منفی هیچ‌گونه تغییر رنگی مشاهده نشد (شکل ۲).



شکل ۱. الکتروفورز محصولات LAMP و Nested PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد. M: سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ۱تا ۴: محصولات LAMP با نمونه‌های کنترل مثبت (از قطعه‌ی حدود ۱۸۰ جفت بازی به بالا)، ۵: محصول Nested PCR (۲۵۳ جفت بازی)



شکل ۲. بررسی محصولات LAMP با استفاده از محلول سایبر گرین I. ۱: نمونه‌ی کنترل منفی، ۲ تا ۵: محصولات LAMP نمونه‌های کنترل مثبت

با توجه به قدرت تشخیصی مناسب روش Nested PCR، در این پژوهش از این روش به عنوان استاندارد طلایی برای مقایسه‌ی روش‌های ELISA و LAMP استفاده شد. بر این مبنا، میزان مثبت کاذب روش ELISA، ۵ مورد (۱۰ درصد) شناسایی شد. اما در روش LAMP هیچ‌گونه مورد مثبت کاذبی مشاهده نشد. از این رو، در مقایسه با روش Nested PCR میزان کارایی روش‌های ELISA و LAMP به ترتیب ۹۱ و ۱۰۰ درصد محاسبه گردید.

بحث

با آزمون ELISA می‌توان آلودگی به HCV را تشخیص داد، اما با این روش امکان ارزیابی تکثیر ویروس وجود ندارد. مقدار RNA ویروس در سرم را می‌توان با استفاده از روش‌های کمی PCR تشخیص داد. همچنین در ابتدای بروز علایم بالینی عفونت HCV (که امکان منفی شدن نتایج آزمون ELISA وجود دارد) استفاده از آزمون‌های PCR ارزشمند است.

با توجه به توانایی روش Nested PCR در تشخیص مستقیم نوکلئیک اسید ویروس، بنابراین در زمان حذف ویروس از بدن و مثبت بودن آزمایش

آنتی‌بادی، استفاده از این روش قابل اعتمادتر می‌باشد. از این رو، پژوهشگران زیادی معتقدند که روش Nested PCR می‌تواند به عنوان یک استاندارد طلایی در تشخیص HCV به کار رود (۲۰).

اگر چه شروع روش LAMP مربوط به سال ۲۰۰۰ است و در ابتدا برای تشخیص DNA ویروس هپاتیت B طراحی گردید، اما پس از سال ۲۰۰۳ و به دنبال ظهور ویروس‌های نیل غربی و سارس، این روش توسعه پیدا کرد. سپس به طور گسترده توسط پژوهشگران مختلف برای تشخیص آزمایشگاهی بیماری‌های باکتریایی، ویروسی و انگلی به کار برده شد. در حال حاضر، این روش برای تشخیص سریع انواع مختلف ویروس‌های RNA دار و DNA دار توسعه یافته است (۲۴-۲۱).

ساختار ویژه و تعداد زیاد پرایمرهای LAMP، نقاط آغازین بیشتری را برای DNA پلیمراز فراهم می‌نماید و از این رو، منجر به افزایش راندمان تکثیر می‌شود (۱۵-۱۰). با توجه به این که طراحی ۶ پرایمر LAMP نیاز به ۸ توالی مجزای حفاظت شده در DNA هدف دارد؛ بنابراین بسیار پیچیده و حساس می‌باشد. اما در صورت طراحی دقیق پرایمرها، توالی هدف با ویژگی بسیار بالا تکثیر خواهد شد.

محققان در پژوهشی موفق به طراحی پرایمرهای اختصاصی LAMP در تشخیص ویروس هپاتیت C شدند (۱۸). **این** پرایمرها تنها به ناحیه‌ی ۵´UTR ژنوم ویروس هپاتیت C متصل می‌شدند و قادر به اتصال با ژنوم ویروس‌های دیگر و ایجاد نتایج مثبت کاذب نبودند. از این رو، همان‌طور که انتظار می‌رفت، این پرایمرها توانستند ژنوتیپ‌های غالب HCV در ایران (۱a، ۱b، ۲ و ۳a) را شناسایی کنند.

تمام مراحل دمایی واکنش LAMP توسط یک بلوک حرارتی انجام می‌شود که هزینه‌ی بسیار کمتری نسبت به دستگاه ترموسایکلر دارد. این مسأله می‌تواند موجب کاهش هزینه‌ی تشخیص شود. واکنش LAMP بدون استفاده از پرایمر حلقه در ۹۰ دقیقه و با استفاده از این پرایمرها در ۷۰ دقیقه تکمیل شد. بدین ترتیب، پرایمرهای حلقه موجب بهبود زمان واکنش و کاهش ۲۰ دقیقه‌ای زمان تکثیر توالی هدف می‌شوند.

همچنین با اضافه کردن آنزیم DNA پلیمراز Taq به مخلوط واکنش LAMP، سرعت واکنش افزایش یافت. احتمال دارد این آنزیم با افزایش تشکیل ساختارهای هدف برای پرایمرهای داخلی در مراحل اولیه‌ی تکثیر (یعنی زمانی که پرایمرهای خارجی به توالی هدف متصل می‌شوند)، موجب افزایش سرعت تکثیر شود. البته در این شرایط، هزینه‌ی اضافی مربوط به آنزیم Taq را در پی خواهد داشت.

در نهایت، محصولات LAMP پس از الکتروفورز بر روی ژل آگارز یک الگوی نردبانی با باندهایی در اندازه‌های مختلف ایجاد کردند که مربوط به حضور محصولات ساقه- حلقه با اندازه‌های متفاوت و ساختارهای ویژه شبیه به گل کلم می‌باشد. علاوه بر این، با اضافه کردن سایبر گرین I به محصول واکنش، نتایج تغییر رنگ از نارنجی به سبز در نمونه‌های مثبت به راحتی با چشم غیر مسلح در کمتر از ۵ دقیقه مشاهده شد. مدت زمان و شدت تغییر رنگ در لوله‌های مختلف تا حدودی متفاوت بود که شاید به دلیل تفاوت در تعداد نسخه‌های RNA ویروس هپاتیت C در نمونه‌های سرم باشد.

استفاده از سایبر گرین I برای مشاهده‌ی مستقیم محصولات واکنش LAMP، یک تکنیک ساده است

که نیاز به روش پرزحمت الکتروفورز و استفاده از رنگ سرطان‌زای اتیدیوم بروماید را برطرف می‌سازد (۲۴-۲۳). به دلیل میل ترکیبی زیاد سایبر گرین I به DNA، تغییر رنگ در روش LAMP بر خلاف روش PCR با چشم غیر مسلح قابل تشخیص است. این مسأله به دلیل تشکیل و انباشته شدن مقدار زیادتر محصولات در واکنش LAMP نسبت به PCR (۱۰μg ≥ در واکنش LAMP در مقایسه با ۰/۲ μg در PCR) است. با توجه به این که از ۵۰ نمونه‌ی سرم HCV Ab مثبت، ۵ مورد توسط هر دو روش LAMP و Nested PCR منفی شدند، این مسأله می‌تواند تأیید کننده‌ی حساسیت بیشتر این دو روش تکثیری نسبت به روش ELISA باشد.

هر چند روش LAMP با حساسیت و ویژگی مشابه با Nested PCR ویروس هپاتیت C را تشخیص داد، اما پس از تشکیل cDNA واکنش LAMP در کمتر از ۹۰ دقیقه تکمیل شد؛ در حالی که در Nested PCR بیش از ۴ ساعت به طول انجامید. بنابراین، سرعت و بازده روش LAMP بیشتر از Nested PCR می‌باشد. این مسأله به دلیل تعداد زیاد پرایمرها و ماهیت هم‌دمایی آن می‌باشد؛ زیرا زمان صرف تغییرات دمایی و وقفه‌های ایجاد شده نمی‌گردد. علاوه بر این، در هنگام انتقال از مرحله‌ی اول PCR برای تکثیر مرحله‌ی دوم، احتمال آلودگی و پاسخ مثبت کاذب در روش Nested PCR وجود دارد.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که روش LAMP از لحاظ سادگی، تشخیص آسان و صرفه‌جویی در هزینه و زمان، نسبت به روش Nested PCR برتری دارد و از این رو، می‌تواند به منظور تشخیص عفونت هپاتیت C در آزمایشگاه‌های بیمارستانی و کلینیکی به ویژه در کشورهای در حال توسعه مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از همکاران مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Brass V, Moradpour D, Blum HE. Molecular virology of hepatitis C virus (HCV): 2006 update. Int J Med Sci 2006; 3(2): 29-34.
2. Sy T, Jamal MM. Epidemiology of hepatitis C virus (HCV) infection. Int J Med Sci 2006; 3(2): 41-6.
3. Pawlotsky JM, Prescott L, Simmonds P, Pellet C, Laurent-Puig P, Labonne C, et al. Serological determination of hepatitis C virus genotype: comparison with a standardized genotyping assay. J Clin Microbiol 1997; 35(7): 1734-9.
4. Pawlotsky JM. Molecular diagnosis of viral hepatitis. Gastroenterology 2002; 122(6): 1554-68.
5. Pawlotsky JM, Bouvier-Alias M, Hezode C, Darthuy F, Remire J, Dhumeaux D. Standardization of hepatitis C virus RNA quantification. Hepatology 2000; 32(3): 654-9.
6. Chevaliez S, Pawlotsky JM. Hepatitis C virus serologic and virologic tests and clinical diagnosis of HCV-related liver disease. Int J Med Sci 2006; 3(2): 35-40.
7. Glynn SA, Wright DJ, Kleinman SH, Hirschkorn D, Tu Y, Heldebrant C, et al. Dynamics of viremia in early hepatitis C virus infection. Transfusion 2005; 45(6): 994-1002.
8. Pawlotsky JM. Use and interpretation of virological tests for hepatitis C. Hepatology 2002; 36(5 Suppl 1): S65-S73.
9. Wong T, Lee SS. Hepatitis C: a review for

primary care physicians. CMAJ 2006; 174(5): 649-59.
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; 28(12): E63.
11. Askari A, Kargar M, Ghorbani-Dalini S, Doosti A. Loop-mediated isothermal amplification: Rapid and cost-effective method for detection of pathogens. Journal of Microbial World 2012; 5(1-2): 7-22. [In Persian].
12. 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; 18(6): 407-21.
13. Mori N, Motegi Y, Shimamura Y, Ezaki T, Natsumeda T, Yonekawa T, et al. Development of a new method for diagnosis of rubella virus infection by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. J Clin Microbiol 2006; 44(9): 3268-73.
14. Ihira M, Sugiyama H, Enomoto Y, Higashimoto Y, Sugata K, Asano Y, et al. Direct detection of human herpesvirus 6 DNA in serum by variant specific loop-mediated isothermal amplification in hematopoietic stem cell transplant recipients. J Virol Methods 2010; 167(1): 103-6.
15. Eiken Chemical Co. L. Eiken genome site [Online]. [cited 2005]; Available from: URL: http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/
16. Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. Mol Cell Probes 2002; 16(3): 223-9.
17. Kazemi B, Tafvizi F, Bandehpour M. Determination of HCV Genotypes in Iran. Biotechnology 2005; 4(2): 139-43.
18. Kargar M, Askari A, Doosti A, Ghorbani-Dalini S. Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Rapid Detection of Hepatitis C virus. Indian J Virol 2012; 23(1): 18-23.
19. Kargar M, Baghernejad M, Doosti A. Compression of three methods of polymerase chain reaction, culture and rapid urease test in diagnosis of Helicobactr pylori in gastric biopsy specimen. Koomesh 2010; 11(3): 198-203. [In Persian].
20. Swellam M, Mahmoud MS, Ali AA. Diagnosis of hepatitis C virus infection by enzyme-linked immunosorbent assay and reverse transcriptase-nested polymerase chain reaction: a comparative evaluation. IUBMB Life 2011; 63(6): 430-4.
21. Parida MM. Rapid and real-time detection technologies for emerging viruses of biomedical importance. J Biosci 2008; 33(4): 617-28.
22. Parida M, Horioke K, Ishida H, Dash PK, Saxena P, Jana AM, et al. Rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes by a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay. J Clin Microbiol 2005; 43(6): 2895-903.
23. 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(1): 150-4.
24. Parida MM, Santhosh SR, Dash PK, Tripathi NK, Saxena P, Ambuj S, et al. Development and evaluation of reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and real-time detection of Japanese encephalitis virus. J Clin Microbiol 2006; 44(11): 4172-8.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 02.10.2013
Vol. 31, No. 261, 3rd Week, January 2014
Accepted: 19.12.2013

A Comparative Study of the Efficiency of the New Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay and Routine Procedures for Diagnosis of Hepatitis C Virus

Mohammad Kargar PhD[1], Azam Askari MSc[2], Abbas Doosti PhD[3], Sadegh Ghorbani-Dalini MSc[4]

Original Article

Abstract

Background: Hepatitis C virus (HCV) is a major cause of chronic liver disease and a public health problem. Therefore, rapid detection and management is important. This study aimed to compare the efficiency of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), nested polymerase chain reaction (nested PCR), and loop mediated isothermal amplification assay (LAMP) for detection of HCV.

Methods: This experimental study conducted on 50 serum samples suspected to HCV in Chaharmahal-va-Bakhtiari province, Iran. HCV Ab detected by ELISA and genomic RNA evaluated by nested PCR and LAMP techniques. Then, efficiency of ELISA and LAMP was calculated in comparison with nested PCR.

Findings: Out of total samples, 45 (90%) samples were positive for HCV by nested PCR and LAMP. All samples (100%) were positive by ELISA, but 10% (5 samples) was false positive. In addition, in comparison with nested PCR, efficiency of LAMP and ELISA were 100% and 91%, respectively.

Conclusion: Our results demonstrate that based on high efficiency, speed and cost effectiveness of LAMP assay, it could be used as a fast alternative method for diagnosis of HCV.

Keywords: Hepatitis C virus (HCV), Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Nested polymerase chain reaction (Nested-PCR), Loop mediated isothermal amplification (LAMP)

Citation: Kargar M, Askari A, Doosti A, Ghorbani-Dalini S. **A Comparative Study of the Efficiency of the New Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay and Routine Procedures for Diagnosis of Hepatitis C Virus.** J Isfahan Med Sch 2013; 31(261): 1876-84

1- Associate Professor, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Jahrom Branch, Jahrom, Iran
2- Department of Microbiology, Islamic Azad University, Jahrom Branch, Jahrom, Iran
3- Assistant Professor, Biotechnology Research Center, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran
4- Department of Microbiology AND Young Researcher's Club, Islamic Azad University, Jahrom Branch, Jahrom, Iran
Corresponding Author: Mohammad Kargar PhD, Email: mkargar@jia.ac.ir