ORIGINAL ARTICLE

# *Comparing Fluorescent Loop-Mediated Isothermal Amplification and PCR in Detecting Salmonella*

Ali Karami[1],
Bita Bagheri[2],
Zeinab Ahmadi[1],
Fatemeh Pourali[3]

[1] Research Center of Molecular Biology, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2] MSc Student of Biotechnology, Research Center of Molecular Biology, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[3] Research Center of Molecular Biology, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received, January 31, 2012; Accepted, October 30, 2012)

## *Abstract*

**Background and purpose:** Salmonella is a group of Enterobacterias that cause infectious diseases in human and animals. Typhoid, bacteremia, enterocolitis and salmonellosis which are caused by this bacterium are considered major health concerns in developing countries, such as Iran. Quick, accurate, reliable and early diagnosis is vital to prevent Salmonella outbreak.

**Materials and methods:** There are various diagnosis methods such as immunoassay and culture, PCR, and Real time PCR for detection of salmonella in contaminated samples. These methods require long time for diagnosis, numerous bacterial colonies, expensive laboratory equipments and expert lab personnel. Therefore, this study used a new method to avoid the disadvantages of previous methods. We used Loop-Mediated isothermal amplification of DNA (LAMP) with two fluorescent probes. Then it was compared with PCR.

**Results:** In this study four Salmonella isolations were used for PCR, LAMP, and LAMP using fluorescent probes. The time to identify Salmonella in PCR method was three hours compared to two hours in LAMP method, while this time reduced to 70 min using LAMP with fluorescent Prob.

**Conclusion:** LAMP with two fluorescent probes is a fast, accurate, economic and practical method with more level of coverage in medical diagnosis laboratories, legal medicine, and agricultural researches. Other advantages of this method are temperature independency and no thermo cycling by replacement of PCR machine with simple and very cheap thermo block instrument. Moreover, detection is more accurate than turbidity detection in simple LAMP.

***Keywords**:* Salmonella, PCR, LAMP, Fluorescent Probe

**J Mazand Univ Med Sci 2012; 22(95): 48-55 (Persian).**

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و دوم شماره ۹۵ آذر سال ۱۳۹۱ (۵۵-۴۸)

# مقایسه دو روش LAMP فلورسنت و PCR در تشخیص مولکولی سالمونلا

علی کرمی[۱]
بیتا باقری[۲]
زینب احمدی[۱]
فاطمه پورعلی[۳]

## چکیده

**سابقه و هدف:** باکتری سالمونلا یکی ازاعضاء خانواده انتروباکتریاسه بوده که باعث ایجاد بیماری‌های عفونی در انسان و حیوان می‌گردد. از جمله بیماری‌های ایجاد شده می‌توان به تب روده‌ای (تیفوئید)، باکتریمی، انتروکولیت، سالمونلوز اشاره نمودکه خود یک معضل بهداشتی محسوب می‌گردد. بنابراین تشخیص سریع، دقیق، مطمئن و به موقع آن برای جلوگیری از اپیدمی و عوارض مخرب این باکتری ضروری به نظر می‌رسد.

**مواد و روش‌ها:** روش‌های مختلفی جهت تشخیص باکتری سالمونلا وجود دارد از ان جمله می‌توان به روش کشت، Immuno assay، PCR و Real-time PCR اشاره نمود که تمام این روش‌ها به زمان طولانی وتعداد زیاد باکتری در نمونه اولیه و تجهیزات گران قیمت آزمایشگاهی و افراد متخصص در این زمینه نیاز دارند به همین دلیل در این مطالعه روشی به‌کار گرفته شد که معایب روش‌های پیشین را به حداقل برساند در این روش از تکثیر تک دمایی وابسته به حلقه یا LAMP (Loop–Meadiated iso thermal Amplification of DNA) همراه با دو پروب فلورسنت استفاده گردید واین روش با PCR که در حال حاضر متداول‌ترین تکنیک تکثیر DNA می‌باشد و روش LAMP مقایسه شد.

**یافته‌ها:** در این مطالعه از ۴ سویه سالمونلا جهت انجام PCR، LAMP و LAMP by Using florescent Prob استفاده گردید که طی انجام PCR جهت شناسایی سالمونلا بالغ بر ۳ ساعت روش LAMP تقریباً ۲ ساعت زمان صرف گردید که این زمان در روش LAMP by Using florescent Prob به ۷۰ دقیقه کاهش یافت با توجه به این‌که کاهش زمانی همراه با افزایش دقت و اختصاصیت در تعیین جواب‌های مثبت می‌باشد لذا از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

**استنتاج:** براساس نتایج به دست آمده روش LAMP by Using florescent Prob جهت شناسایی سالمونلا روش تشخیصی مولکولی سریع‌تر، دقیق‌تر و با اختصاصیت بالاتر وکاربردی گسترده‌تر در آزمایشگاه تشخیص پزشکی، پزشکی قانونی، کشاورزی وتحقیقاتی می‌باشد. مزایای این روش عدم نیاز به چرخه‌های دمایی و دستگاه ترموسایکلر نسبت به روش PCR و استفاده از یک ماده نشاندار در تعیین جواب‌های مثبت در مقایسه با روش LAMP این امکان را می‌دهد که تفسیر نتایج از اطمینان و دقت بیشتری برخوردار باشد.

**واژه های کلیدی:** LAMP، LAMP by Using florescent Prob، PCR، Real-time، DNA

## مقدمه

سالمونلاها دسته بزرگی از باکتری‌های میله‌ای شکل، گرم منفی- هوازی اختیاری متحرک و دارای تاژه‌های پری ترش بوده که در دمای ۳۷°C، PHSV حداکثر رشد را دارا می‌باشند(۱).

**مؤلف مسئول: علی کرمی**- تهران: شیخ بهایی، ملاصدرا، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی E-mail: Karami@bmsu.ac.ir
۱. گروه مولکولار بیولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران
۲. دانشجوی کارشناسی ارشد، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران
۳. مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۰/۱۱/۱۱ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۹۱/۲/۱۷ تاریخ تصویب : ۹۱/۸/۹

این باکتری یکی از شایع‌ترین باکتری‌های قابل انتقال از حیوانات به انسان بوده که به دلیل تنوع مخازن حیوانی یکی از عوامل بیماری‌های قابل انتقال از غذا و یکی از معضلات بهداشتی در سراسر جهان محسوب می‌گردد(۲). طبقه‌بندی این گروه پیچیده است زیرا به جای یک گونه مشخص، مجموعه‌ای از گونه‌های مختلف را تشکیل می‌دهند جنس سالمونلا اساساً بر مبنای اپیدمیولوژی، نوع میزبان، واکنش های بیوشیمیایی و ساختار آنتی ژن O, H, vi (در صورت وجود) طبقه‌بندی می‌شود تاکنون ۲۵۰۰ سروتیپ سالمونلا بر اساس آنتی ژن‌های O و H شناسایی شده است(۴). عفونت سالمونلا در انسان به صورت انتروکولیت تب روده‌ای و باکتریمی بروز می‌نماید از این رو تشخیص به موقع و درست این باکتری در مواد غذایی و افراد مشکوک به آلودگی ضروری به نظر می‌رسد(۵).

روش‌های مختلفی وجود دارد که می‌توان به روش کشت در محیط‌های غیر انتخابی و تأیید کلونی‌های مشکوک از طریق انجام تست‌های افتراقی اشاره نمود که انجام این آزمایشات نیاز به زمان زیادی برای حصول نتیجه مثبت است از دیگر روش‌ها می‌توان به Immuno assay نیز اشاره نمود که حساسیت و اختصاصیت لازم را نداشته، زمان آن نیز بسته به روش مورد انتخاب تا چندین روز متفاوت است به‌همین دلیل از کاربرد گسترده‌ای جهت تشخیص برخوردار نمی‌باشد و در ضمن دقیق‌ترین روش تعیین هویت میکروب سالمونلا کشت می باشد(۶). در این طرح ما از روش تکثیر هم دمایی وابسته به حلقه همراه با پروب‌های فلورسنت استفاده نمودیم که توسط Notomi و همکاران (۲۰۰۰) معرفی گردید که در این روش استفاده از پروب‌های فلورسنت به منظور تشخیص سریع‌تر و مطمئن‌تر با اختصاصیت بالاتر از مزایای این روش نسبت به روش LAMP می‌باشد. بنابراین جهت حصول به نتیجه، نتایج حاصل از PCR و LAMP با روش LAMP فلورسنت مقایسه گردیده پرایمرها و پروب‌های مورد استفاده در این تحقیق به طور کاملاً اختصاصی طراحی شده، توالی‌های بسیار اختصاصی را مورد هدف قرار می دهند. روش تکثیر هم دمای وابسته به حلقه LAMP با استفاده از پروب‌های فلورسنت Notomi و همکاران روشی را در سال ۲۰۰۰ ابداع نمودند که قادر است کپی‌های اندکی از DNA هدف را تا $10^{10}$ کپی در عرض کمتر از یک ساعت تحت شرایط ایزوترمال با اختصاصیت بالایی تکثیر نماید. این روش، تکثیر هم دمای وابسته به حلقه (LAMP) فلورسنت نامیده می‌شود که تکیه بر چرخه‌های خودکاری دارد که رشته DNA سنتز شده به‌وسیله DNA پلیمرازی با فعالیت جابه‌جایی رشته به طور مداوم جایگزین و رشته جدید به طور پیوسته سنتز می‌گردد. LAMP فلورسنت روشی ساده، سریع، اختصاصی و مقرون به صرفه برای تکثیر اسید نوکلئیک می‌باشد و انحصار آن در اختیار کمپانی شیمیایی Eliken ژاپن است. متدولوژی آن بر اساس استفاده از ۴ آغازگر مختلف و دو پروب است که به طور اختصاصی ۸ ناحیه از توالی ژن هدف را شناسایی می‌نمایند و پیشروی واکنش در یک دمای ثابت و پیوسته و استفاده از واکنش جایگزینی رشته صورت می‌گیرد. تکثیر و شناسایی ژن می‌تواند در یک مرحله به‌وسیله گرمخانه گذاری مخلوط نمونه ها،آغازگرها، پروب‌ها و DNA پلیمرازی با فعالیت جانشینی رشته و اجزاء مورد عمل در یک دمای ثابت (حدود $65^{\circ}C$) کامل گردد. این روش، انجام تکثیر را با کارایی بالا میسر می‌سازد به طوری که در طی ۶۰-۱۵ دقیقه DNA $10^{10}$-$10^{9}$ بار تکثیر می‌شود. چون واکنش بسیار اختصاصی است، لذا وجود محصول تکثیر یافته می‌تواند دلالت بر وجود ژن هدف داشته باشد. مشخصات روش LAMP با پروب‌های فلورسنت.

۱) کل واکنش تکثیر تحت شرایط تک دمایی به شکل پیوسته انجام می‌پذیرد.

۲) در LAMP فلورسنت نیاز به مرحله واسرشت‌سازی اسید نوکلئیک دو رشته‌ای به تک

رشته‌ای برای شروع واکنش پلیمریزاسیون وجود ندارد و حتی بدون واسرشت سازی اولیه واکنش به راحتی انجام می‌پذیرد.

۳) کارایی تکثیر فوق العاده بالا است زیرا در این‌جا هیچ زمانی جهت تغییر دما از دست نمی‌رود و واکنش در دمای بهینه فعالیت آنزیم به شکل پیوسته انجام می‌گیرد و ۱۰ تا ۲۰ میلی‌گرم از DNA هدف در ۲۵ میکرولیتر از مخلوط واکنش در مدت ۶۰- ۳۰ دقیقه تکثیر می‌یابد.

۴) روش LAMP فلورسنت قادر است که ژن هدف را با کارایی بسیار بالا به‌وسیله طراحی ۴ آغازگر و ۲ پروب که ۸ ناحیه توالی را شناسایی می‌نمایند، تکثیر نماید.

۵) هزینه کل بسیار کاهش می‌یابد زیرا روش LAMP فلورسنت نیاز به مواد شیمیایی ویژه یا دستگاه‌های گران قیمت آزمایشگاهی ندارد.

۶) محصولات تکثیر شده دارای ساختار مرکبی از توالی‌های متناوب و معکوس تکراری از توالی هدف روی همان رشته می باشند.

۷) RNA نیز می‌تواند به عنوان الگو با این روش تنها با اضافه نمودن آنزیم نسخه برداری معکوس تکثیر شود، مشابه روشی که DNA به عنوان الگو استفاده می‌شود.

این روش در مقایسه با PCR دارای حساسیت و ویژگی بسیار بالاتر بوده، ضمن عدم استفاده از دستگاه چرخه حرارتی از دقت شناسایی بسیار بالا برای تشخیص عوامل عفونی برخوردار است(۷).

در این تحقیق با توجه به بررسی‌های انجام شده در مقالات اشاره شده و مزایای این روش نسبت به LAMP غیر فلورسانس که برای آشکارسازی نیازمند کدورت سنجی است در حالی که با استفاده از پروب فلورسانس این معضل نیز مرتفع می‌گردد اقدام به مقایسه LAMP با پروب فلورسانس با PCR عادی گردید که نتایج حاصله نشان دهنده مزایای آن در تشخیص عوامل عفونی می‌باشد.

## مواد و روش ها

در این مطالعه توصیفی از ۵ سویه مختلف سالمونلا که اسامی آن‌ها در زیر بیان می شود، استفاده گردید. جهت استاندارد نمودن آزمایش سویه‌های استاندارد سالمونلا از آزمایشگاه رفرانس وزارت بهداشت و انستیتو پاستور تهران تهیه گردید.

1) Salmonella Typhi
2) Salmonella Para Typhi A
3) Salmonella Para Typhi B
4) Salmonella Para Typhi C
5) Salmonella entertidis
6) Staphylococcus aureus

و مواد شیمیایی از (شرکت Merck) و بافرونوکلئوتیدها و Taq از ( شرکت های داخلی) و آنزیم‌های BST و پروب‌ها از شرکت (Biorad) تهیه گردید. Masten cycler gradiant (ساخت شرکت اپندروف) جهت چرخه‌های حرارتی در PCR و Thermo block (ساخت شرکت کیاژن) جهت انجام واکنش LAMP و LAMP فلورسنت، از دستگاه الکتروفورز افقی کوچک ساخت (شرکت پایا پژوهش) و منبع تغذیه آن با بافر ۱ درصد TBE جهت الکتروفورز محصولات PCR و جهت بررسی ژل Uvidoc (ساخت شرکت Uviec)، مارکرمولکولی ۱۰۰bp فرمنتاز و دستگاه نانو در آپ جهت بررسی جذب نوری ماده فلورسنت در طول موج‌های قابل انتظار با نام Nano Drop ND-1000 spectro photometer thermo scientific استفاده شده است.

برای انجام PCR از پرایمرهایی که توسط کرمی و همکاران (۱۳۸۶)(۱۰) جهت تشخیص مولکولی سالمونلا طراحی شده بود و توالی آن در زیر ذکر گردیده، استفاده شد.

S12: 5′ – *GTATTGTTGA TTAATGAGAT CCG* – 3′
S13: 5′ – *ATATTACGCA CGGAAACACG TT* – 3′

کشت و استخراج DNA از هر یک از نمونه های باکتریایی فوق به میزان ۵۰ میکرولیتر برداشته، در ۱/۵

سی سی محیط کشت LB کشت داده، به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در گرم خانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده و بعد از گذشت زمان همه آن‌ها رشد کرده، DNA سالمونلاهای کشت داده شده به روش استاندارد فنل کلروفرم استخراج گردید. این روش جهت تأیید سه بار تکرار گردید. انجام PCR بر روی نمونه‌های استاندارد، به مقدار ۲ میکرو لیتر نمونه‌های ژنومی استخراج شده را به لوله‌های حاوی ترکیبات (آب مقطر تزریقی ۱۴ میکرو لیتر، بافر 10x ۲/۵ میکرو لیتر، Mgcl2 ۰/۵ میکرو لیتر، dNTp ۰/۵ میکرو لیتر، Taq، پلیمر از ۰/۵ میکرو لیتر، پرایمر R ۳ میکرو لیتر، پرایمر F ۳ میکرو لیتر، DNA یک میکرو لیتر مجموعاً ۲۵ میکرو لیتر) اضافه کرده، در دستگاه Master Cycler قرار داده، طبق برنامه زیر PCR آن انجام شد: مرحله اول ۱ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و سپس ۳۰ چرخه شامل سه مرحله ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، ۵۷ درجه ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه و مرحله ۱۰- ۵ تا ۱۰ میکرو لیتر از محصول فوق را با ۲- ۱ میکرو لیتر از بافر مخصوص نمونه‌گذاری (GLB) مخلوط کرده، در ژل آگارز ۱ درصد با ولتاژ ۸۰ به مدت ۴۵ دقیقه ران می‌کنیم و پس از پایان الکتروفورز ژل را در محلول حاوی اتیدیوم بروماید (۰/۵ تا ۱ میکرو گرم در میلی‌لیتر) رنگ‌آمیزی و با دستگاه ماوراء بنفش بررسی و عکسبرداری شد. (تصویر شماره ۱).

*انجام LAMP:*

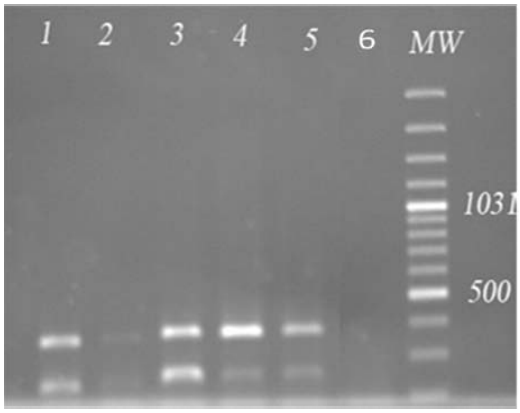
در انجام LAMP از ۴ پرایمر باتوالی‌های زیر که توسط Maeda (2007) (2005) و همکاران جهت تشخیص سالمونلا طراحی شده بود، استفاده گردید.

Fip: 5′- GAGGGGTGGTACTGATCGAT AGTT TTTCAACGTTTCCTGGGG -3′

BIP: 5′-CCGGTGAAATTATCGCCACACAA AACCCACCGCCAGG-3′

F3: 5′-GGGGATATTGGTGTTTATGGGG-3′

B3: 5′-AACGATAAACTGGACCAGGG-3′




**تصویر شماره ۱:** الکترو فورز محصولات PCR برای ژن invA با استفاده از آغازگرهای S12 و S13 ۱- سالمونلاتیفی ۲- سالمونلا پاراتیفی A ۳- سالمونلا پاراتیفی B ۴- سالمونلا پاراتیفی C ۵- سالمونلا اینتر یتیدیس ۶- استافیلوکوکوس اورئوس (کنترل منفی) ۷- وزن مولکولی

به مقدار ۱ میکرو لیتر از نمونه‌های ژنومی استخراج شده به لوله‌های حاوی ترکیبات (آب مقطر تزریقی ۱۱/۵ میکرو لیتر، بافر 10x ۲/۵ میکرو لیتر، dNTp ۰/۵ میکرو لیتر، Bst پلیمراز ۰/۵ میکرولیتر، پرایمر Fip ۲ میکرو لیتر، پرایمر Bip ۲ میکرو لیتر، پرایمر F3 ۰/۵ میکرو لیتر، پرایمر B3 ۰/۵ میکرو لیتر، بتائین ۲ میکرو لیتر، DNA ۳ میکرو لیتر و مجموعاً ۲۵ میکرو لیتر) اضافه گردیده، در دستگاه ترموبلوک قرار داده، طبق برنامه (در مرحله اول ۶۰ دقیقه ۶۵ درجه سانتی گراد و در مرحله دوم ۱۰ دقیقه در ۸۲ درجه سانتی گراد) LAMP انجام گردید.

پس از خاتمه برنامه مقدار ۱۰- ۵ میکرولیتر از محصول با ۲- ۱ میکرولیتر بافر نمونه‌گذاری (GLB) مخلوط شده، در ژل آگارز ۲ درصد به مدت ۴۵ دقیقه و با ولتاژ ۸۵ الکتروفورز گردید، پس از خاتمه الکتروفورز ژل در محلول حاوی اتیدیوم بروماید (۰/۵ تا ۱ میکروگرم در میلی لیتر) رنگ آمیزی و پس از شستشو در بافر با دستگاه ماوراء بنفش بررسی و عکسبرداری شد (تصویر شماره ۲).

انجام LAMP با دو پروب فلورسنت = در این روش از ۴ پرایمر با توالی های زیر که توسط Maede و

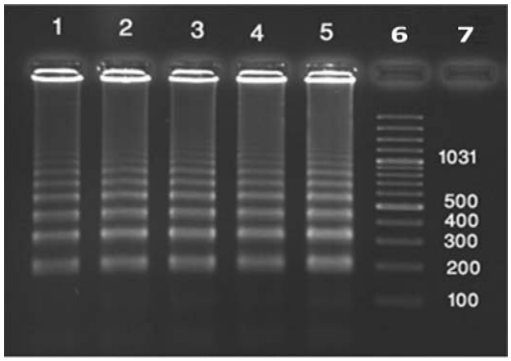
همکاران طراحی و استفاده شد.

Fip: 5′- GAGGGGTGGTACTGATCGATAGT TTTTCAACGTTTCCTGGGG -3″

BIP: 5′-CCGGTGAAATTATCGCCACACAA AACCCACCGCCAGG-3″

F3: 5′-GGGGATATTGGTGTTTATGGGG-3′

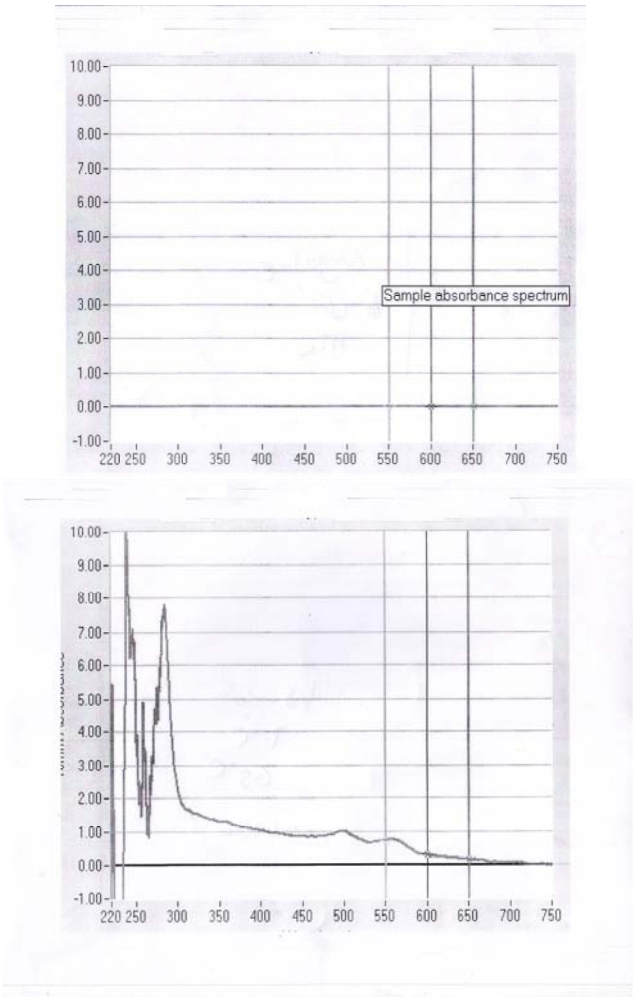
B3: 5′-AACGATAAACTGGACCAGGG-3′




**تصویر شماره ۲:** انجام LAMP با سویه های مختلف سالمونلا با شرایط بهینه سازی شده ۱- سالمونلا تیفی ۲- سالمونلا پاراتیفی A ۳- سالمونلا پاراتیفی B ۴- سالمونلا پاراتیفی ۵- سالمونلا اینتریدیس ۶- وزن مولکولی ۷- استافیلوکوکوس اورئوس (کنترل منفی)

*دو پروب*

probA=[5]GAGGAAAGAGCGTGGTAATTAAC و probB= GGGCAATTCGTTATTGGCGATAG که توسط کرمی و همکاران طراحی استفاده شد. به مقدار 1 µl از نمونه های ژنومی استخراج شده به لوله‌های حاوی ترکیبات (آب مقطر تزریقی ۶/۵ میکرو لیتر، بافر 10x ۲/۵ میکرو لیتر، dNTp ۰/۵ میکرو لیتر، Bst پلیمراز ۰/۵ میکرو لیتر، پرایمر Fip ۲ میکرو لیتر، پرایمر Bip ۲ میکرو لیتر، پرایمر F3 ۰/۵ میکرو لیتر، پرایمر B3 ۰/۵ میکرو لیتر، Prob A ۲/۵ میکرو لیتر، Prob B ۲/۵ میکرو لیتر، بتائین ۲ میکرو لیتر، DNA ۳ میکرو لیتر و مجموعاً ۲۵ میکرو لیتر) اضافه گردیده، در دستگاه ترموبلاک قرارداده شد و طبق برنامه (در مرحله اول ۶۰ دقیقه ۶۵ درجه سانتی گراد و در مرحله دوم ۱۰ دقیقه ۸۲ درجه سانتی گراد) واکنش انجام شد. پس از خاتمه برنامه جذب نوری هر میکروتیوب توسط دستگاه نانو در آب اسپکتروفتومتر اندازه گیری گردید (تصویر شماره ۳) لازم به ذکر است که برای افزایش دقت، آزمایشات سه بار تکرار گردید. جهت بررسی تأثیر نور، زمان، دما و رقت مناسب پروب به‌کار گرفته شده طی مراحل متعددی با غلظت ۲، ۲/۵ و ۳ میکرو لیتر پروب در حضور نور و عدم حضور آن و در دمای ۶۲ و ۶۵ درجه سانتی‌گراد و مدت زمان ۳۰ و ۶۰ دقیقه واکنش را تکرار و جذب نوری را در هر یک از شرایط فوق اندازه‌گیری شد و شرایط بهینه جهت انجام واکنش که همان حضور نور و غلظت ۲/۵ µl پروب و مدت زمان ۶۰ دقیقه دمای ۶۵ درجه سانتی گراد بود به‌دست آمد.




**تصویر شماره ۳:** انجام واکنش با غلظت ۲/۵ میکرو لیتر پروب در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد در طی ۶۰ دقیقه و در عدم حضور نور در طول واکنش

## یافته‌ها

همان‌گونه که در تصاویر شماره ۱، ۲ و ۳ مشخص است نمونه‌ها با دو جفت پرایمرS13 و S12 براساس ژن InvA طراحی شده بود که ایجاد دو باند به اندازه‌های ۳۷۳ bp و ۲۵۸ bp را نشان می‌دهند. پس از انجام PCR طی واکنش LAMP باندهای متعدد نردبانی شکل که اندازه آن‌ها از ۲۴۱ bp به بالا بود مشاهده گردید. در مرحله بعدی واکنش LAMP همراه با دو پروب فلورسنت انجام گردید و جذب نوری نمونه‌ها توسط دستگاه نانو در آپ اندازه‌گیری شد. بعد از بهینه سازی‌های واکنش بهترین نتیجه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به‌دست آمد زیرا در این دما میزان تکثیر DNA افزایش می‌یابد. برای مشخص کردن زمان ۳۰ و ۶۰ دقیقه را انتخاب کرده که در زمان ۶۰ دقیقه میزان جذب نوری که متناسب با حداکثر محصولات تولید شده است، به حداکثر رسید. طی واکنش‌های وجود نور و عدم وجود نور و تأثیر آن بر میزان جذب نوری بررسی گردید و در حضور نور جذب نوری بالاتری مشاهده گردید.

## بحث

روش‌های متداول تشخیص سالمونلا نیازمند زمان طولانی است که فاقد کارآیی لازم جهت تشخیص سریع این باکتری می‌باشد. محققین جهت تشخیص مولکولی سالمونلا تیفی پرایمرهای مختلفی بر اساس ردیف ژن‌های شناخته شده invA ، invB، fuc-a، fic-dt و int-flom – prt-tyv و SPVC را طراحی و بررسی نموده‌اند انجام PCR با دو جفت پرایمر $S_{12}$ و $S_{13}$ که بر اساس ژن invA طراحی شده اند باندهای به طول ۳۷۳ جفت باز را نشان می‌دهد، ژن invA از ژن های مهم مسئول تهاجم باکتری به سلول اپیتلیال روده است.

Cocolin و همکاران (۱۹۹۸) با استفاده از روش PCR در زمانی بالغ بر ۳ ساعت قادر به تشخیص سالمونلا شدند. همچنین این محققان حساسیت PCR را ۲۴۰ fg DNA/tube از ژنوم سالمونلا برآورد نمودند(۸). نتایج تحقیق حاضر در تشخیص سالمونلا با استفاده از آغازگرهای $S_{12}$ و $S_{13}$ که بر اساس ژن invA طراحی شدند با نتایج سایر محققین در این زمینه انطباق داشت و سالمونلا به طور اختصاصی با این روش در زمانی بالغ بر ۴ ساعت تشخیص داده شد. بنابراین چنین نتیجه گیری می‌شود که استفاده از روش PCR برای تشخیص سالمونلا بالغ بر ۳ ساعت زمان نیاز دارد. اگرچه استفاده از روش Multiplex PCR این زمان را تا حد زیادی کاهش داده است. کرمی و همکاران (۱۳۸۶) با استفاده از روش Multiplex PCR در تشخیص سالمونلا بر اساس ژن‌های invA، prt و tyv فرایند PCR را از ۳ ساعت به ۳۲ دقیقه کاهش دادند و کل زمان لازم جهت تشخیص را به ۹۰ دقیقه تقلیل دادند(۹، ۱۰) اما هنوز مشکل استفاده از دستگاه و روش‌های آشکار سازی به قوت خود باقی است. پس از انجام PCR مبادرت به انجام تست LAMP بر روی سالمونلا نمودیم که پس از انجام واکنش باندهای متعدد نردبانی شکلی که اندازه آن‌ها از ۲۴۱ bp تا ۶۰۰ bp بود، مشاهده گردید که نتایج ما با Wang و همکاران در سال ۲۰۰۸ و سایرین که اقدام به تشخیص سالمونلا با روش LAMP در بقایای مواد غذایی نموده اند و زمان واکنش را ۶۰ دقیقه گزارش کردند، منطبق بود(۱۳-۱۱). آن‌ها همچنین نشان دادند که استفاده از ژن invA جهت طراحی آغازگر و پروب برای تشخیص سالمونلا دارای اختصاصیت بالایی است و سویه‌های دیگر باکتریایی با استفاده از این آغازگرها و پروب ها قابل تشخیص نیستند.

Iwamoto و همکاران (۲۰۰۳) نشان دادند که اضافه کردن SYBR Green به مخلوط واکنش LAMP تشخیص را آسان‌تر می‌کند(۱۲). همچنین Flores و همکاران (۲۰۰۸) با افزودن پروب به روش LAMP جهت تشخیص بیماری‌های قارچی به جواب‌هایی با اطمینان و دقت بالاتری دست یافته و آن را به عنوان

یافته‌ای مهم بیان نموده‌اند(۱۵).

به طور واضح این روش نیز دارای محدودیت‌هایی می باشد از آن جمله می‌توان به پیچیدگی طراحی آغازگرهای چندگانه و پروب‌های لازم برای تکثیر هر ناحیه ژنی جدید که برای افراد کم تجربه مشکل است، اشاره کرد. این روش نیز یکی از روش‌های کاربردی در تشخیص مولکولی عوامل بیولوژیک و بالینی می باشد که آشکارسازی محصول نهایی با استفاده از تکنیک هیبریداسیون با پروب های فلورسنت که به‌عنوان یک ماده نشاندار نمونه مثبت را نمایان می‌کند باعث آنالیز ساده‌تر، مطمئن‌تر و دقیق تر نتایج می‌گردد. همین امر باعث می‌شود که امکان بروز خطا کاهش و اطمینان از حصول نتیجه مثبت افزایش یابد. با استفاده از روش LAMP فلورسنت زمان نهایی تشخیص نسبت به PCR بسیار کوتاه‌تر می‌گردد که این عمل در مقایسه با تلاش‌های دیگری که جهت کوتاه کردن زمان تشخیص باکتری‌های بیماری زا از جمله سالمونلا که با دستگاه‌های متداول PCR صورت گرفته است، قابل توجه می‌باشد. بنابراین روش ایزوترمال بررسی شده LAMP فلورسنت در مقایسه با PCR می‌تواند به عنوان روش تشخیص مولکولی بسیار سریع‌تر (تقریباً ۳ برابر)، دقیق‌تر (تا ۱۰۰ برابر) و ارزان تر ( تا ۱۰ برابر) با کاربرد گسترده در آزمایشگاه‌های تشخیصی پزشکی قانونی، کشاورزی و تحقیقاتی و حتی آزمایشگاه‌های کوچک و سیار نیز جهت مطالعات همه‌گیرشناسی، تشخیص و شناسایی مورد استفاده قرار گیرد.

## سپاسگزاری

بدینوسیله از همکاران محترم پژوهشگاه بقیه‌اله (عج)- مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی تشکر می‌نمایم. این مقاله حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی پزشکی خانم بیتا باقری می‌باشد.

## References

1. Sherries RK. Mdical Microbiology. 4th ed. New York: Mc Graw-Hill; 2006. p. 343-373.
2. Herboid JR. What you and your clients need to know about zoonotic Diseases: Rabies lyme Disease and salmonellosis. North American veterinary conference: 2000. p. 883-834.
3. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Jawetz Melikick & Adelberg's Medical Micro biology. 23th ed. The United State of America: Mc Graw-Hill; 2004. p. 256-261.
4. Pelayo JS, Delicato ER, Mikcha JMG, Fernendas SA. Resistance profile to antimicrobials of Salmonella spp. isolated from human infections. Braz Arch Biol Technol 2004; 47(2): 193-197.
5. Nuruzi H. Medical Bacteriology. 4th ed. Tehran: Chehr Publication; 1966. p. 219-227.
6. Andrews WH, June GA, Sherrod TS. FDA Bacteriological Analytical Manual. 8th ed. Salmonella AOAC International (chapter 5).
7. Tomita N, Mori Y, Kanda H, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. Nat Protoc 2008; 3(5): 877-882.
8. Cocoline L, Manzano M, Astori G, Botta GA. Cantoni C, Comi G.A highly sensitive and fast non-radioactive method for the detection or polymerase chain reaction products from Salmonella serovars such as Salmonella typhi, in blood specimens. FEMS Immunol Med Microbiol 1998; 22(3): 233-239.
9. Karami A, Ranjbar R, Ahmadi Zand Safiri Z. Rapid Detection of Different Serovares of

Salmonella entrica by Multiplex PCR. Iranian J Pub l Health 2007; 36(2): 38-42.

10. Karami A, Morrovati S, Ahmadi Z, Safiri Z. Khalilpour A. Development of an ultra rapid and Simple multiplex polymerase chain Reaction technique for detection of Salmonella Typhi. Saudi Med J 2006; 27(8): 1134-1138.
11. Wang L, Shi L, Alam MJ, Geng Y. Specific and Rapid Detection of food borne Salmonella by loop-Mediated isothermal amplifiation Method. Food Research International 2008; 41(1): 69-74.
12. Iwamoto T, Sonobe T, Hayashi K. Loop-Mediated isothermal amplification for direct detection of Mycobacterium Tuberculosis Complex, M. avium, and M. intracellulare in Sputum Samples. J Clin Microbial 2003; 41(6): 2616-2622.
13. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Masubuchi H. Yonekawa T. loop-Mediated isothermal amplification of DNA. Nucliec Acids Res 2000; 28(12): E 63.
14. Hara-kudo Y, Yoshino M, Kojima T, Ikedo M. loop-Mediated isothermal Amplification for the rapid detection of Salmonella. FEMS Microbiology Letter 2005; 253(1): 155-161.
15. Flores O, Inacio J, Spencer-Martins I. Efficient Identification of clinically Relevant Candida Yeast Species by use of an Assay Combining Pana fungual loop-Mediated Isothermal DNA Amplification Hybridization to Species-Specific Oligonucleotide Probes. J Clin Microbiology 2008; 46(2): 713-720.