



تشخیص کریپتوکوکوس نئوفورمانس در بیماران ایدزی با روش تکثیر هم‌دمایی به واسطه حلقه (LAMP)

دکتر محمدحسن شاه حسینی^۱، علیرضا رضائی امیرآبادی^{۲*}، دکتر جلیل وند یوسفی^۳، دکتر محمد قهری^۴،
دکتر کیهان آزادمنش^۵، دکتر الهام مسلمی^۶

^۱دانشیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهر قدس، گروه میکروبیولوژی، آکارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، گروه میکروبیولوژی
^۲استاد پژوهش، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، گروه میکروبیولوژی، استادیار، دانشگاه امام حسین (ع)، گروه زیست شناسی
^۳استادیار، انستیتو پاستور ایران، آزمایشگاه ویروس شناسی، استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شرق/قیامدشت، گروه زیست شناسی

چکیده

زمینه و هدف: کریپتوکوکوس نئوفورمنس بیشتر افراد دچار نقص سیستم ایمنی را درگیر می‌کند و مننژیت یکی از شایع‌ترین عوارض بیماری ناشی از آن می‌باشد. روش‌های متعددی برای تشخیص این عامل کشنده وجود دارد، اما هیچ‌کدام از این روش‌ها، حساسیت، اختصاصیت و سرعت قابل قبولی را ندارند. هدف از این پژوهش، راه اندازی و بهینه نمودن روش LAMP برای تشخیص و ارزیابی میزان شیوع کریپتوکوکوس نئوفورمنس در نمونه‌های سرمی بیماران مبتلا به ایدز بود.

مواد و روش‌ها: تعداد ۳۴ نمونه سرم خون از بیماران فوق جمع آوری گردید. آزمون‌های حساسیت و اختصاصیت بر روی روش انجام و آزمون بر روی نمونه‌ها بهینه گردید. پس از انجام مراحل غیرفعال‌سازی عوامل عفونی موجود در نمونه‌ها و استخراج DNA، از تعداد ۶ پرایمر طراحی شده ویژه ژن *ura5*، برای به کارگیری آزمون LAMP در تشخیص کریپتوکوکوس نئوفورمنس استفاده شد. یافته‌ها: تعداد ۳ مورد از ۳۴ نمونه جمع آوری شده با استفاده از LAMP مثبت گزارش گردید. حساسیت و اختصاصیت این روش ۱۰۰٪ ارزیابی شد.

نتیجه‌گیری: تکنیک LAMP روشی کاربردی، حساس، سریع و مقرون به صرفه در تشخیص کریپتوکوکوس نئوفورمنس است که در این پژوهش برای اولین بار در ایران راه اندازی گردید. همچنین استفاده از این روش در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی با داشتن کم‌ترین تجهیزات قابل انجام است.

واژگان کلیدی: LAMP، کریپتوکوکوس نئوفورمنس، ایدز، *ura5*

دریافت مقاله: آبان ۸۸ پذیرش برای چاپ: دی ۸۸

مقدمه

قارچی کپسول دار و شبه مخمر می‌باشد که با روش جوانه زدن تکثیر می‌یابد اما تولید مثل جنسی نیز در آن‌ها دیده می‌شود (۱). این قارچ بر اساس آنتی‌ژن پلی ساکاریدی کپسول، به پنج سروتیپ A، D، AD، B و C تقسیم‌بندی شده است. همچنین بر اساس اختلافات مولکولی، بیوشیمیایی، اکولوژیکی و اپیدمیولوژیکی، این گونه به

کریپتوکوکوس نئوفورمنس (*Cryptococcus neoformans*)

(* آدرس برای مکاتبه: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، گروه میکروبیولوژی

تلفن: ۰۹۱۲۴۶۷۰۹۷۵

پست الکترونیک: alirezazaei2536@gmail.com

۱۴). در این آزمون، مراحل باز شدن دورشته و تکثیر، هر دو به طور هم زمان رخ می دهد (۱۵). در این روش از ۴ پرایمر [۲ پرایمر داخلی (FIP,BIP) و ۲ پرایمر خارجی (F3,B3)] استفاده می شود که در مجموع ۶ ناحیه در DNA الگو را مورد شناسایی قرار می دهد (۱۴). در سال ۲۰۰۲ میلادی Nagamin و همکارانش، ۲ پرایمر به نام loop (LF و LB) به واکنش اضافه نمودند و به این ترتیب تکثیر DNA در این واکنش سریع تر گردید. این دو پرایمر ویژه لوپ همراه با ۴ پرایمر قبلی ۸ ناحیه زنی از DNA هدف را شناسایی می نمایند. به دلیل این که باید تمامی ۶ یا ۸ ناحیه در DNA هدف به طور صحیح توسط پرایمرها شناسایی شوند، این تست دارای اختصاصیت بسیار بالایی نسبت به سایر روش های موجود تکثیر هم دمایی DNA، در حال حاضر می باشد (۱۶ و ۱۷). محصول نهایی واکنش، قطعات DNA با ساختار ساقه - حلقه به همراه قطعات تکثیر یافته DNA با تکرارهای معکوس متعدد و هم چنین ساختارهای گل کلمی با لوپ های فراوان می باشد (۱۴ و ۱۸)، به طوری که مقدار زیادی DNA (۳۰-۱۰ میکروگرم در ۲۵ میکرولیتر)، می تواند در زمان کوتاهی (۶۰-۱۵ دقیقه) با اخذ بسیار زیاد ساخته شود (۱۷ و ۱۹). این روش با افزودن رنگ سایبرگرین ۰/۱٪ و مشاهده در زیر نور UV در زمان بسیار کم قابل ارزیابی است. در این تحقیق توانایی روش LAMP در تشخیص کریپتوکوکوس نئوفورمنس در بیماران ایدزی بررسی گردید.

مواد و روش ها

الف) کشت کریپتوکوکوس نئوفورمنس: در این پژوهش یک سویه از مرکز کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش های علمی و صنعتی و یک سویه دیگر نیز از دکتر قهری در آزمایشگاه رسالت تهران تهیه و بر روی محیط کشت Niger seed agar (Acumedia Co., USA) با کشت به مدت یک هفته در دمای ۳۷ درجه گرم خانه گذاری و گردید. از این دو سویه DNA استخراج و تست LAMP بر روی این دو سویه بهینه گردید.

ب) جمع آوری نمونه: تعداد ۳۴ نمونه سرم خون تازه منجمد از افراد دچار بیماری ایدز با همکاری بخش ایدز انسیتو پاستور ایران از بیمارستان های مختلف تهران جمع آوری گردید.

دو وارپته تقسیم می شود: یکی وارپته نئوفورمنس دارای سروتیپ های A، D و AD وارپته گیتی دارای سروتیپ های B و C تقسیم بندی گردیده است (۲). تغییرات فنوتیپی در سروتیپ های A و D در هنگام عفونت مزمن مشاهده می شود که موجب مقاومت مخمر در برابر فاگوسیتوز می گردد (۳). به تازگی سروتیپ A را کریپتوکوکوس نئوفورمنس وارپته گروبی و سروتیپ D را کریپتوکوکوس نئوفورمنس وارپته نئوفورمنس نامیده شده است (۴). مطالعات فیلوژنتیکی حداقل ۶ گونه کریپتوکوکوسی VGIV و VGIII، VGII، VGI، VNIV، VNI/II/B را معرفی می کنند که با عنوان تایپ های مولکولی مجموعه گونه های بیماری زای کریپتوکوکوس مطرح می باشند و همه در گروه فیلوبازیدیا (*Filobasidiella*) و راسته تره ملالها (*Tremellales*) قرار دارند (۵).

کریپتوکوکوس نئوفورمنس یک پاتوژن فرصت طلب در افراد مبتلا به ضعف سیستم ایمنی می باشد و خطر ابتلا به آن در بیماران مبتلا به ایدز وجود دارد. در دهه های اخیر با توجه به افزایش افراد مبتلا به ایدز، کریپتوکوکوزیس اهمیت ویژه ای در سطح بهداشت عمومی یافته است (۶-۸). کریپتوکوکوس نئوفورمنس پس از نفوذ به ریه ها ابتدا در شش ها تکثیر می یابد و سپس تمایل به حرکت به سمت سیستم اعصاب مرکزی را نشان می دهد (۹). در تشخیص کریپتوکوکوزیس عصبی، ضرورت به کارگیری تکنیک های آزمایشگاهی حساس و اختصاصی تر به ویژه در معرفی درمان ضد قارچی سریع وجود دارد (۱۰).

اخیراً با توجه به کارایی محدود روش های آزمایشگاهی سنتی متداول (مانند کشت، رنگ آمیزی و سرولوژی) و زمان بردن روش های مولکولی مورد توجه قرار گرفته اند، از بین روش های مولکولی آزمون تکثیر هم دمایی به واسطه حلقه (Loop Mediated Isothermal Amplification) یا LAMP می تواند جایگزین مناسبی برای روش های سنتی محسوب گردد (۱۱ و ۱۲).

LAMP روشی ساده و بسیار سریع است که توسط نوتومی و همکارانش در سال ۲۰۰۰ میلادی ابداع گردید. در این روش DNA هدف در شرایط هم دمایی تکثیر می یابد. چون زمانی برای تغییر دما صرف نمی شود در نتیجه روش LAMP بسیار سریع است (۱۳) و

جدول ۱: پرایمرهای به کار رفته در آزمون LAMP.

نام پرایمر	ترادف پرایمر (5' → 3')
F3(239-256)	5' TCCTTGGCTGCTGTCTCC 3'
B3(438-457)	5' GCCTTGCCAGAGGTAAGAAC 3'
FIP: F2(276-295) F1C(318-339)	5' TGGGACAGACTCACGTCCTTCT-AAACCGGCAAAGATATCGGC 3' F1C F2
BIP B2(403-420) B1C(341-360)	5' CCAGTGGACAGCGATGAGC-TTCGTCCCTGAGAGGCG 3' B1C B2
LF(296-317)	5' TCTCCTTCCTGTTGTAGCAGTA 3'
LB(366-385)	5' AGCCAGTAGCACGGTGAGGG 3'

primer explorerV4; طراحی گردید (*ura5*:EU399581 (http://primer explorer JP./e/، F3، B3، FIP، LB و LF برای تولید به شرکت سیناژن ارسال گردید (جدول ۱).

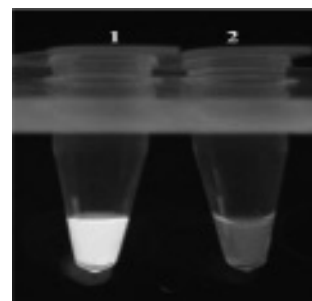
ه) واکنش LAMP: مخلوط واکنش در حجم ۲۵ μl شامل ۵/۲ μl آب دو بار تقطیر، ۲/۵ μl بافر آنزیم با غلظت 1X، ۱ μl مخلوطی از پرایمرهای خارجی (F3/B3) با غلظت ۰/۲ μM و پرایمرهای داخلی (BIP/FIP) با غلظت ۱/۶ μM، ۱ μl از پرایمرهای loop (LB/LP) با غلظت ۰/۸ μM، ۱/۸ μl MgSO₄ با غلظت ۷/۲ mM، ۱ μl (8U) آنزیم Bst DNA پلیمرز، ۴ μl Betain با غلظت ۰/۸ M، ۳/۵ μl از dNTPs با غلظت ۱/۴ mM و ۵ μl از DNA استخراج شده بود. این واکنش به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۶۶ درجه سانتی گراد انجام شد. در هر دور واکنش، از کنترل مثبت و منفی استفاده شد.

به منظور ارزیابی محصول واکنش یک میکرولیتر سایبرگرین یک هزارم درصد (Invitrogen lot: 49753A) به هر لوله واکنش افزوده و بر روی دستگاه ترانس ایلومینیتور و با طول موج ۳۰۲ نانومتر بررسی گردید. لوله حاوی واکنش مثبت به رنگ سبز فلورسانس و منفی به رنگ نارنجی مشاهده شد.

و) حساسیت و اختصاصیت واکنش LAMP: برای تعیین حساسیت تست LAMP بهینه شده، رقت‌های مختلف از مخمر کریپتوکوکوس نئوفورمانس در آب دیونیزه به کمک روش شمارش

ج) استخراج DNA: استخراج DNA با دستگاه از کیت DNP سیناژن (cat: DN811540) طبق دستور العمل انجام شد. برای این منظور ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر پلاسما با ۵ میکرولیتر پروتئیناز k مخلوط شدند و پس از نگهداری در حرارت ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه، ۴۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده (DNG) به آن افزوده شد. در مرحله بعد ۳۰۰ میکرولیتر محلول رسوب دهنده (ایزو پرو پانول) به آن اضافه گردید. سپس به مدت ۱۰ دقیقه با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) سانتریفیوژ و با تخلیه، محلول رویی ۱ سی سی محلول شستشو (اتانول ۷۰٪) به آن اضافه گردید و ۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس اتانول تخلیه ۵ دقیقه در گرم‌خانه ۶۵ درجه سانتی گراد برای خشک شدن کامل نگهداری شد. در نهایت به منظور تهیه محلول DNA، ۳۰ μl آب دو بار تقطیر استریل به لوله اضافه و به مدت ۵ دقیقه در ۶۵°C قرار داده شد.

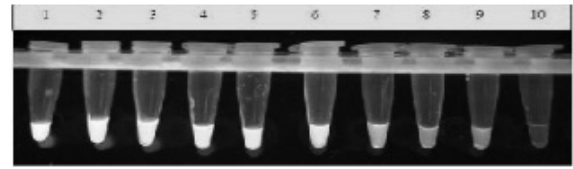
د) طراحی پرایمر: پرایمرها با کمک نرم افزار primer explorer V4 بر اساس ترادف موجود در ژن (ACCESSIONNO)



شکل ۱: تست بهینه شده LAMP. لوله ۱ واکنش مثبت و لوله ۲ واکنش منفی.

میلیون بیمار مبتلا به ایدز ۵۰۰۰۰ الی ۱۰۰۰۰۰ نفر به بیماری کریپتوکوکوزیس دچار می شوند (۲۱). طبق تحقیقات انجام شده، تایپ های مولکولی VNI و VNIV مهم ترین و بیشترین موارد جدا شده از افراد مبتلا به ایدز بوده اند (۲۲ و ۲۳) و کریپتوکوکوزیس که قبلا در کودکان نادر بود اکنون مداوم گزارش می شود (۲۴). در افراد HIV مثبت ممکن است به دو صورت مننژیت مزمن و یا کریپتوکوکمیا دیده شود (۲۵). در حالت مننژیت کریپتوکوکمی مدیریت درمانی ممکن است شرایط را بهبود دهد اما در حالت کریپتوکوکمیا تجربه نشان داده است که پس از رخداد این حالت حتی پس از به کارگیری دوز مناسب از داروی ضد قارچی اختصاصی، احتمال زنده ماندن بیماران ضعیف است (۲۶ و ۲۷). میزان ابتلا به این بیماری مرگ بار در افراد مبتلا به ایدز در ایالات متحده و اروپای غربی و استرالیا بین ۶ تا ۱۰ درصد و در صحرای آفریقا بین ۱۵ تا ۳۰ درصد تخمین زده شده است (۲۸).

افراد دچار بیماری ایدز به دلیل نقص در سیستم ایمنی سلولی، مستعد ابتلا به عوامل عفونی دیگری نیز می باشند. از آن جا که راه انتقال کریپتوکوکوس نئوفورمنس از طریق مجاری تنفسی است، در صورتی که این افراد در معرض عامل قرار گیرند، با توجه به انتشار جهانی کریپتوکوکوس نئوفورمنس به راحتی افراد دچار نقص ایمنی به ویژه افراد ایدزی را مورد حمله قرار می دهد. کریپتوکوکوزیس در بیماران ایدزی به شدت نواقص ایمنولوژیک بستگی دارد و متعاقب کاهش تعداد سلول های T، CD4+ به کمتر از ۱۰۰ سلول در هر میکرولیتر می رسد. بیش از ۸۰ درصد از بیماران مبتلا به ایدز در زمان تشخیص عفونت، به مننژیت یا مننگوانسفالیت دچار هستند. در این افراد که علائم مننژیت و تب با فواصل منظم بروز



شکل ۲: تعیین حساسیت تست LAMP، لوله ۱: کنترل مثبت، ۲: ۱۰ میلیون سلول، ۳: ۱ میلیون، ۴: ۱۰۰۰۰۰، ۵: ۱۰۰۰۰، ۶: ۱۰۰۰، ۷: ۱۰۰، ۸: ۵۰، ۹: ۵ سلول و ۱۰: کنترل منفی.

مستقیم میکروسکوپی تهیه و از DNA استخراج شده از رقت های مختلف استفاده گردید. برای تعیین اختصاصیت نیز تست LAMP بهینه شده بر روی DNA های انسان، موش، cDNA ی ویروس هپاتیت C، توکسوپلازما گونده ای، مایکوباکتریوم توبریکلوسیس، ساکارومیسس سرویزیه، و تعدادی دیگر از عوامل، به همراه کنترل مثبت و منفی مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج

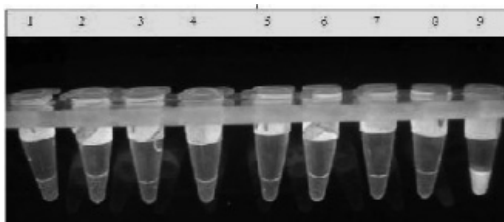
تست LAMP با معیارهای بهینه شده، حساسیت ۱۰۰٪ را نشان داد، در حدی که ۵ سلول کریپتوکوکوس نئوفورمنس در لوله را تشخیص داد (شکل ۲).

هم چنین تست LAMP از اختصاصیت کامل (۱۰۰ درصد) برخوردار بود، زیرا استفاده از ۶ پرایمر ویژه، نشان داد که واکنش بسیار اختصاصی است، به طوری که فقط با DNA مورد نظر واکنش داشت و با DNA سایر عوامل مورد آزمون، واکنشی صورت نگرفت (شکل ۳).

از تعداد ۳۴ نمونه سرم خون بیماران مبتلا به ایدز، ۳ مورد (۱۱/۳۳٪) کریپتوکوکوس نئوفورمنس با استفاده از تست LAMP شناسایی گردید (شکل ۴).

بحث

بیماری کریپتوکوکوزیس اگرچه کمیاب است، اما به عنوان یک عفونت قارچی بسیار مهم در بیماران دچار ضعف سیستم ایمنی به خصوص افراد دچار عفونت ویروس نقص سیستم ایمنی (HIV) در نواحی اروپا، شمال آمریکا و آفریقا شناخته شده است (۲۰). این بیماری که قبلا بیماری خواب نامیده می شد در چند سال اخیر به یک مساله بیدارگر مهم تبدیل شده است و گفته می شود از هر



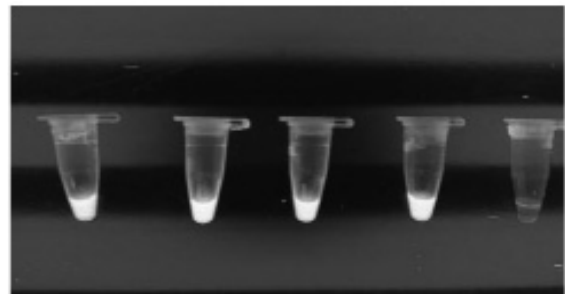
شکل ۳: تعیین اختصاصیت تست LAMP؛ لوله شماره ۱: کنترل منفی، ۲: واکنش LAMP با DNA موش، ۳: DNA انسان، ۴: DNA اشریشیا کلی، ۵: DNA ساکارومیسس سرویزیه، ۶: cDNA ویروس هپاتیت C، ۷: DNA مایکوباکتریوم توبریکلوسیس، ۸: DNA توکسوپلازما گونده ای و لوله شماره ۹: کنترل مثبت.

ریبوزوم) مقایسه کردند. آن ها گزارش نمودند که محیط CGB Agar به همراه آزمون هیدرولیز اوره و ملانین روی Niger seed Agar می تواند مانند روش D2 LSU DNA Sequencing برای تشخیص دو گونه فوق نتایج مناسبی ارائه دهند (۳۱). از آنجاییکه روش های تشخیص مولکولی از نظر دقت، حساسیت و سرعت بر روش های سنتی برتری دارند، موضوع به کارگیری روش های آزمایشگاهی سریع به منظور تشخیص به موقع عامل و تعیین داروی مناسب برای درمان و کنترل عفونت، نقطه عطف محسوب می گردد.

شواهد به دست آمده از تحقیقات قبلی حاکی از توانمند بودن تکنیک LAMP است. در این تحقیق برای اولین بار در ایران این روش به منظور تشخیص کریپتوکوکوس نئوفورمانس مورد ارزیابی قرار گرفت. در سال ۲۰۰۰ برای اولین بار LAMP توسط دانشمند ژاپنی بنام Notomi و همکارانش معرفی گردید. در مقایسه با PCR، NASBA، 3SR و SDA این روش، مزایای بالاتری دارد (۱۴). در سال ۲۰۰۲، Nagamin و همکارانش، ۲ پرایمر به نام پرایمر loop (FLP و BLP) به واکنش اضافه نمودند و به این ترتیب سنتز DNA در این واکنش سریع تر گردید (۱۶). در سال ۲۰۰۴، Ushikubo ژاپنی ابراز داشت افزودن دو پرایمر لوپ BLP و FLP به LAMP می تواند مدت زمان مورد نیاز تست را از یک ساعت به کمتر از نیم ساعت کاهش دهد، و میزان زیادی رسوب سفید پیروفسفات منیزیم به صورت محصول جانبی در آزمایش تولید می شود که تشخیص تست مثبت را حتی با چشم امکان پذیر می کند (۳۲). تکثیر هم دمایی به واسطه حلقه یک روش تکثیر ژن ویژه است که در آن DNA تنها به وسیله یک آنزیم دارای خاصیت Strand displacment یا جابه جا کننده رشته DNA (مانند Bst پلی مرز) در شرایط تک دمایی تکثیر می گردد (۱۴). در این تکنیک پرایمر داخلی جلویی (FIP) شامل قسمت های F2 و F1 (F1c) و پرایمر داخلی پشتی (BIP) شامل قسمت های B2 و B1 (B1c) می باشند که گاهی در بین این قسمت های دوگانه، توالی های فاصله اندازی از تیمیدین قرار می دهند که البته ضروری نیست (۱۹ و ۳۳) و F3 و B3 با رشته الگوی ابتدایی جفت شده و به کمک خاصیت آنزیم در کنار زدن

می کند حتی اگر بررسی های اولیه منفی باشد، عفونت کریپتوکوکوس باید مد نظر قرار گیرد.

به منظور تشخیص کریپتوکوکوس نئوفورمانس تا کنون روش های مختلفی ارائه شده است که هر کدام مزایا و معایبی داشته اند. در سال ۱۹۸۴، Cohen با مقایسه روش های تشخیصی رنگ آمیزی مرکب هندی و رنگ آمیزی فلورسانس آکریدین نارنجی و روش سرولوژی آگلوتیناسیون لانتکس روی ۱۶۲ نمونه مشکوک به کریپتوکوکوس نئوفورمانس گزارش نمود که درصد وقوع نتایج منفی کاذب از نتایج مثبت کاذب بیشتر بود استفاده از روشهای یاد شده در زمانی که تعداد پایینی از عامل بیماری زا در واحد حجم نمونه موجود است، کاربرد تشخیصی صحیحی نخواهند داشت (۲۹). Velegarki و همکاران در سال ۲۰۰۱ میلادی، پس از استخراج DNA از نمونه های کلینیکی دارای تست مثبت آگلوتیناسیون لانتکس، که هر کدام 8 ± 2 سلول در میلی لیتر داشتند، محصولات تکثیر شده مناسبی را برای هیدرولیز آنزیمی AluI و یا MspI و به دنبال آن تکمیل بررسی به کمک RFLP ایجاد نمودند. آن ها گزارش نمودند که انجام تست PCR روی ژن *ura5* و RFLP با به کارگیری یک روش استخراج DNA خانگی (In House) یا تجاری، می تواند برای شناسایی سریع واریته های مختلف کریپتوکوکوس مناسب باشد (۳۰). در سال ۲۰۰۹، Klein و همکاران نتایج حاصل از آزمون مصرف گلیسین روی محیط CGB Agar (ال کاناوانین گلیسین بروموتیمول بلو آگار) را توأم با آزمایش هیدرولیز اوره و تولید ملانین روی ۱۰۲ سویه کریپتوکوکوس نئوفورمانس و گاتیی بررسی نمودند و آن را با نتایج حاصل از روش D2 LSU DNA Sequencing (با rDNA زیر واحد بزرگ



شکل ۴: سه لوله وسط نمونه های مثبت، آخرین لوله سمت چپ کنترل مثبت و آخرین لوله سمت راست کنترل منفی.

نتیجه گیری

نتایج نشان می دهد که روش LAMP در تشخیص کریپتوکوکوس نئوفورمانس کارآمد بوده و به دلیل عدم نیاز به تجهیزات گران قیمت می تواند با داشتن حساسیت و اختصاصیت بالا عامل را شناسایی نموده و بدون استفاده از روش های آشکارسازی زمان بر و اقدامات دیگر نتیجه را به طور سریع مشاهده نموده راه حل مناسبی برای استفاده در آزمایشگاه های تشخیصی کشور می باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر قدس به دلیل در اختیار قرار دادن تجهیزات آزمایشگاهی تشکر و قدردانی می نمایند.

رشته، یک دو رشته ای تکمیل و خارج می شود و هم زمان رشته ساخته شده توسط F1c و B1c به طور تک رشته ای برای سیکل های متوالی از عملکرد LF، LB، BIP و FIP برجا می ماند (۱۴ و ۳۲). پاسخ آزمون LAMP می تواند به سادگی با چشم غیرمسلح دیده شود به طوریکه خواه از طریق ایجاد کدورت با افزودن پلیمرهای کاتیونی یا از طریق افزودن رنگ فلورسانس سایبر گرین به محصولات LAMP، نتیجه قابل مشاهده است (۱۸ و ۱۹). در این مطالعه به منظور اجرای آزمون LAMP، از هدف ژنی *ura5* که آنزیم اوروتیدین مونوفسفات پیروفسفوریلاز (orotidine- monophosphate pyrophosphorylase) را در کریپتوکوکوس نئوفورمانس کد می کند برای تشخیص عامل استفاده شد. از این ژن در تحقیقات اخیر در تعیین تایپ های مولکولی این میکروارگانیسم و تشخیص انواع آن ها استفاده شده است (۲۳).

References

1. Mitchell AP. Updated view of *Cryptococcus neoformans* mating type and virulence. *Infect Immun.* 2003;71(9):4829-30.
2. Kwon-Chung KJVA. Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast Res.* 2006;6:574-84.
3. A. Guerrero NJ, Goldman DL, Fries BC. Phenotypic switching in *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology.* 2006; 152:3-9.
4. Nielsen KDOA, Heitman J. *Cryptococcus neoformans* mates on pigeon guano: implications for the realized ecological niche and globalization. *Eukaryot Cell.* 2007; 6(6):949-59.
5. Findley KRCM, Metin B, Kroiss J, Fonseca A, Vilgalys R, Heitman J. Phylogeny and phenotypic characterization of pathogenic *Cryptococcus* species and closely related saprobic taxa in the Tremellales. *Eukaryot Cell.* 2009; 8(3):353-61.
6. Barreto De Oliveira MTB, Theelen BT. *Cryptococcus neoformans* shows a remarkable genotypic diversity in Brazil. *J clin Microbiol.* 2004;42:1356-9.
7. Bialek RW, Bekure-Nemariam KM. Detection of *Cryptococcus neoformans* DNA in tissue samples by nested and Real-Time PCR assays. *Clin Diag Lab Immunol.* 2002;9:461-9.
8. Pappalardo Mscnm MSC. Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease. *Rev Inst Med trop S Paulo.* 2003;45:299-305.
9. D'souza CAH, Boekhout TF, Cox GM, Heitman J. Investigation of the basis of virulence in serotype A strains of *Cryptococcus neoformans* from apparently immunocompetent individuals. *Curr Genet.* 2004;46:92-102.
10. Paschoal RC, Hirata RC, Melhem MSC, Dias ALT, Paula CR. Neurocryptococcosis: Diagnosis by PCR Method. *Rev Inst Med trop S Paulo.* 2004; 46(4):203-7.
11. Bahrami A, Azadmanesh K, Noormohamadi Z, Moslemi E, Jadali F. Optimization of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) method for detection of herpes simplex virus type 1 and 2. *SJKU.* 2011; 16(1):56-63.
12. Shahhosseiny MH, Moslemi E, Yaghmaei P. Loop mediated isothermal amplification of hepatitis B virus in hemodialysis patients. *J Microb World.* 2009; 2(3):183-92 [In Persian].
13. Mori YNT. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *J Infect Chemother.* 2009; 15:62-9.

14. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000; 15:28(12):E63.
15. Parida MS, Dash PK, Tripathi NK, Lakshmi V, Mamidi N, Shrivastva A, Gupta N, Saxena P, Pradeep J. Rapid and realtime detection of chikungunya virus by reverse transcription loop mediated isothermal amplification assay. *J Clin Microbiol.* 2007; 45:351-7.
16. Nagamine KH, Ta NT. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and Cellular Probes.* 2002; 16:223-9.
17. Mori YNK, Tomita N, Notomi T. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *J Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 289:150-4.
18. Parida MSS, Kumar Dash P, Rao PVL, 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; 18:407-21.
19. Mori Y, Hirano T, Notomi T. Sequence specific visual detection of LAMP reactions by addition of cationic polymers. *BMC Biotechnol.* 2006; 6:3.
20. Blevins LB, J. Fenn, H. Segal, P. Newcomb-Gayman, K. C. Carroll. False-positive cryptococcal antigen latex agglutination caused by disinfectants and soaps. *J Clin Microbiol.* 1995; 33:1674-167.
21. Kauffman LBS. Cryptococcosis: A wakening giant. In: *The black and white yeasts Proceedings of the 4 th International Conference on mycosis; 1978; Washington DC: Pan American Health Organisation and Science publication.* p. 176-187.
22. Ellis DMD, Hajjeh RA, Warnock D, Meyer W, Barton R. Epidemiology: surveillance of fungal infections. *Med Mycol* 2000; 38:173-82.
23. Meyer WKS, Castañeda A, Jackson S, Huynh M, Latouche GN. Global molecular epidemiology offers hints towards ongoing speciation within *Cryptococcus neoformans*. In: *Abstracts of the 5th International Conference on Cryptococcus and Cryptococcosis; 2002 March 3-7, 2002; South Australian Postgraduate Medical Education Association, Adelaide, Australia.*
24. Banerjee UKJ, Sethi S, Gupta K. Sudden spurt of Cryptococcosis at a tertiary care hospital at New Delhi between. *Indian J Med Res.* 1995;102:272-4.
25. Kaur RRD, Kakkar M, Monga R, Sharma VK. Cryptococcal meningitis in pediatric AIDS. *J Trop Ped.* 2003; 49(124-125).
26. Banerjee UJN, Sethi S. Lets be aware: Cryptococcosis is no more away from children. *Indian Association of Medical Microbiologist.* Aug 2003; Delhi Chapter Annual meeting: Safdarjung Hospital, New Delhi.
27. Khanna NCA, Desai A, Ravi V, Santosh V, Shankar SK, Satishchandra P. Cryptococcosis in the immunocompromised host with special reference to AIDS. *Indian J Chest Dis Allied Sci.* 2000; 42(4):311-5.
28. Powderly WG. Cryptococcal meningitis and AIDS. *Clin Infect Dis.* 1993; 17:837-42.
29. Cohen J. Comparison of the sensitivity of three methods for the rapid identification of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Pathol.* 1984; 37(3):332-4.
30. Velegraki AKVG, Kansouzidou A, Smilakou S, Mitroussia-Ziouva A, Legakis NJ. prospective use of RFLP analysis on amplified *Cryptococcus neoformans* URA5 gene sequences for rapid identification of varieties and serotypes in clinical samples. *Medical Mycology.* 2001; 39(5):409-17.
31. Klein KRHL, Deml SM, Rysavy JM, Wohlfiel SL, Wengenack NL. Identification of *Cryptococcus gattii* by use of L-canavanine glycine bromothymol blue medium and DNA sequencing. *J Clin Microbiol.* 2009; 47(11):3669-72.
32. Ushikubo H. The principle of LAMP method. *Uirusu.* 2004; 54:107-12.
33. Hong TCMQ, Cuong DV, Parida M, Minekawa H, Notomi T, Hasebe F, Morita K. Development and evaluation of a novel loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Clin Microbiol.* 2004; 42:1956-61.



LAMP detection of *Cryptococcus neoformans* in AIDS patients

Mohammad Hassan Shahhosseiny¹, Alireza Rezaei Amirabadi²,
Jalil Vand Yousefi³, Mohammad Ghahri⁴, Kayhan Azadmanesh⁵, Elham Moslemi⁶

¹Associate Professor, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Qods branch, Tehran, Iran

²M.Sc., Department of Microbiology, Islamic Azad University, Karaj branch, Alborz, Iran

³Assistant Professor, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Karaj branch, Alborz, Iran

⁴Assistant Professor, Department of Biology, Imam Hossein University, Tehran, Iran

⁵Assistant Professor, Department of Virology, Pasteur Institute, Tehran, Iran

⁶Assistant Professor, Department of Biology, Islamic Azad University, Tehran east Branch, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objective: *Cryptococcus neoformans* is opportunistic capsulated yeast that infects immunocompromised individuals. Infection occurs due to inhalation of the agent and common infection form is meningitis. Several methods are common to detect this life threatening agent but none of them have well accepted in sensitivity, specificity and rapidness. In this research the effort has been on installation and optimizing the LAMP assay in order to detect the agent itself and its distribution importance of *Cryptococcus neoformans* in serum specimens of AIDS patients.

Material and methods: A total number of 34 serum specimens were collected from 34 AIDS patients. After applying sensitivity and specificity tests for the installed technique, optimization of the assay was performed on the specimens. The specimens got inactivated and after steps of DNA extraction, 6 designated primers for the target gene (*ura5*) were applied for detection of *Cryptococcus neoformans* by using the LAMP method.

Results: In this study 3 specimens of the total number of 34 AIDS patients were reported positive by using LAMP technique. This it reveals the importance of Cryptococcal infection in AIDS patients.

Conclusion: Loop-mediated isothermal amplification is an applicable, sensitive, quick and lucrative method for detection of *Cryptococcus neoformans*. Diagnostic laboratory can use this method without requiring any special instruments.

Keywords: LAMP, *Cryptococcus neoformans*, AIDS

Correspondence to: Alireza Rezaei Amirabadi

Tel: (+98)9124670975

Email: alirezarezaei2536@gmail.com

Journal of Microbial World 2010, 2(4):- 235-242