مجله دنیای میکروب ها
سال دوم، شماره سوم، پاییز ۱۳۸۸
صفحات ۱۹۲-۱۸۳

شناسایی ویروس هپاتیت B در بیماران همودیالیزی با استفاده از روش تکثیر هم‌دمایی به واسطه حلقه (LAMP)

دکتر محمد حسن شاه حسینی*[۱] ، زهره اسماعیلی[۲] ، دکتر الهام مسلمی[۳] ، دکتر پریچهر یغمایی[۴]

[۱]دانشیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهر قدس، گروه میکروبیولوژی
[۲]کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات تهران، گروه زیست شناسی
[۳]استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شرق، گروه زیست شناسی
[۴]دانشیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات تهران، گروه زیست شناسی

چکیده

سابقه و هدف: شناسایی بیماری هپاتیت B یکی از مشکلات اساسی مراکز همودیالیز محسوب می‌شود. هدف از این پژوهش راه‌اندازی و بهینه‌سازی روش مولکولی تکثیر هم‌دمایی به‌واسطه حلقه (LAMP) برای ارزیابی شیوع ویروس هپاتیت B در نمونه‌های سرمی افراد همودیالیزی است.

مواد و روش‌ها: این پژوهش به‌صورت مقطعی ـ توصیفی بر روی سرم ۱۳۶ بیمار مراجعه‌کننده به ۳ مرکز همودیالیز بیمارستان مصطفی خمینی (۵۳ نمونه)، بیمارستان چمران (۵۴ نمونه) و بیمارستان عرفان (۳۱ نمونه) انجام شد. پس از استخراج DNA با استفاده از ۶ پرایمر اختصاصی ژن HBsAg شرایط واکنش و غلظت مواد برای تشخیص HBV بهینه سازی گردید. همچنین محصولات واکنش با استفاده از روش ژل الکتروفورز با استفاده از اتیدیوم بروماید و سایبرگرین ارزیابی گردید.

یافته‌ها: در این مطالعه حساسیت روش بهینه‌سازی شده LAMP، ۴ ذره ویروسی بود. همچنین این روش ویژگی بسیار بالایی داشت. از افراد مراجعه‌کننده به بیمارستان مصطفی خمینی ۱۳ مورد به‌وسیله تکنیک LAMP و ۷ مورد به‌وسیله PCR و از افراد مراجعه‌کننده به بیمارستان چمران ۴ مورد به‌وسیله تکنیک LAMP و ۲ مورد به‌وسیله PCR مثبت بودند. اما میزان شناسایی ویروس در افراد مراجعه‌کننده به بیمارستان عرفان با استفاده از هر دو تکنیک یکسان (۲ مورد) بود.

نتیجه گیری: برای شناسایی ویروس هپاتیت B، روش LAMP در مقایسه با روش PCR معمولی بسیار سریع‌تر، مقرون به صرفه‌تر و دقیق‌تر است.

واژگان کلیدی: هپاتیت B، همودیالیز، LAMP، PCR

دریافت مقاله: مرداد ۸۸ پذیرش برای چاپ: شهریور ۸۸

مقدمه

ویروس هپاتیت B(HBV) یک پاتوژن مهم مسئول هپاتیت حاد و مزمن، سیروز کبدی و سرطان کبد (کارسینومای هپاتوسلولار) است. در حدود دو میلیارد نفر در سراسر جهان با این ویروس مواجه شده‌اند؛ و بیش از ۳۵۰ میلیون نفر حامل این ویروس هستند (۱ و ۲). بیماران همودیالیز به دلیل سابقه تزریق خون مکرر و سابقه پیوند کلیه و حتی تضعیف سیستم ایمنی به میزان زیادی در معرض خطر ابتلا به هپاتیت B می‌باشند (۳ و ۴). این افراد

*) آدرس برای مکاتبه: شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهر قدس، گروه میکروبیولوژی
تلفن: ۰۹۱۲۳۳۰۴۰۶۹
پست الکترونیک: shahhosseiny@yahoo.com

معمولا بدون علامت بوده و افزایش مختصری در فعالیت‌های آمینوترنسفرازهای سرم دارند (۸-۵). فرض بر این است که کاهش کفایت ایمنی در بیماران مزمن اورمیک ممکن است موجب کاهش واکنش‌های التهابی در کبد و درنتیجه کاهش تخریب هپاتوسیت‌ها گردد (۱۰ و ۹).

با وجود اقدامات پیشگیرانه و واکسیناسیون از سال ۱۹۷۰، هنوز هپاتیت B ویروسی یک مشکل مهم در مراکز درمانی با امکانات همودیالیز در برخی از کشورها می‌باشد (۱۱). سرکوب ایمنی طبیعی در بیماران کلیوی، اغلب منجر به مزمن شدن ویروس و فرصت انتشار و عفونت بیمارستانی در بین بیماران دیالیزی را می‌دهد (۱۲). میزان شیوع ناقلین آشکار HBsAg در بین بیماران دیالیزی، درکشورهای توسعه یافته صفر تا ۷ درصد و درکشورهای در حال توسعه بین ۱۰ تا ۲۰ درصد می‌باشد (۱۳). در ایران، درصد مبتلایان به هپاتیت B در بیماران همودیالیزی، از ۳/۸٪ در سال ۱۳۷۸ به ۲/۶٪ در سال ۱۳۸۵ رسیده است (۴ و ۱۴).

با توجه به افزایش قابل ملاحظه تعداد بیماران همودیالیزی خطر ابتلا به HBV در بیماران همودیالیزی و پاسخ اندک به واکسن، شناسایی ویرمی HBV برای کنترل انتقال این عفونت از طریق دستگاه‌های دیالیز بسیار با اهمیت است (۱۵). همچنین با توجه به نبود درمان قطعی در هپاتیت B مزمن و عوارض خطرناکی مانند سیروز کبدی و کارسینومای هپاتوسلولار، تشخیص زود هنگام و دقیق ابتلا به بیماری بسیار ضروری می‌باشد (۱۶).

برای شناسایی مقادیر کم ویروس در خون و فرآورده‌های خونی، تکنیک‌های قدیمی مانند روش‌های سرولوژیک به اندازه کافی حساس نیستند (۱۷). خوشبختانه در سال‌های اخیر روش‌های مولکولی به منظور شناسایی HBV توسعه فراوانی یافته‌اند. یکی از مهم‌ترین این تکنیک‌ها واکنش زنجیره‌ای پلیمراز است که علاوه بر ایجاد سرعت در انجام آزمایش‌های وابسته به اسیدنوکلئیک در موارد متعدد موجب افزایش حساسیت این گونه آزمایش‌ها شده است (۱۸). با وجود مزایای تکنیک‌های تکثیری مانند PCR، این روش محدودیت‌هایی نیز مانند نیاز به دستگاه‌های گران قیمت دارند.

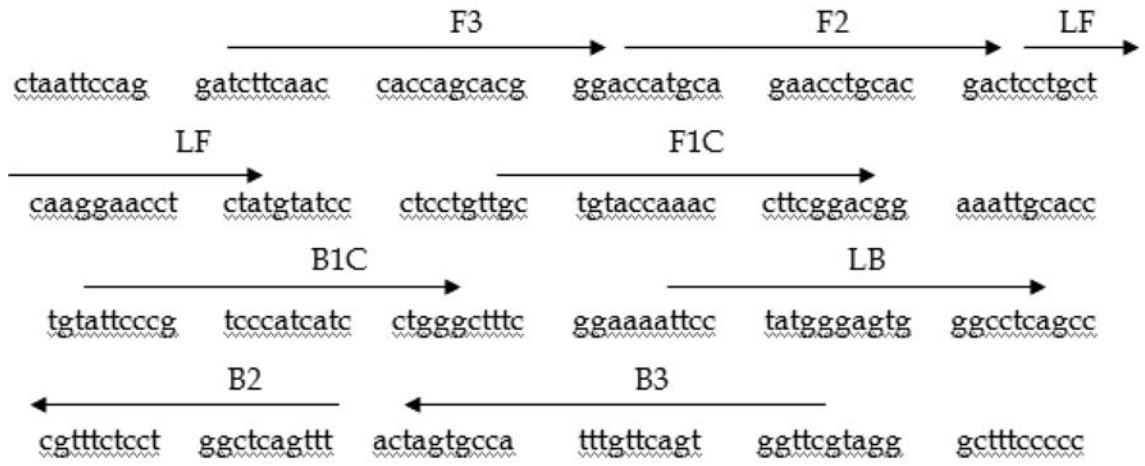
تکنیک تکثیر هم‌دما به واسطه حلقه (LAMP) روشی ساده و بسیار سریع است که توسط نوتومی و همکاران در سال ۲۰۰۰ ابداع گردید. در این تکنیک DNA هدف در شرایط هم‌دما تکثیر می‌یابد و به دلیل صرف نشدن زمان برای تغییر دما، بسیار سریع است (۱۹ و ۲۰). در روش LAMP، مراحل جداسازی و تکثیر هر دو به طور هم‌زمان انجام می‌شوند (۲۱). در این روش از ۴ پرایمر [۲ پرایمر داخلی (BIP و FIP) و ۲ پرایمر خارجی (B3 و F3)] استفاده می‌شود و در مجموع ۶ ناحیه از DNA الگو مورد شناسایی قرار می‌گیرد (۲۰). در ضمن در سال ۲۰۰۲ Nagamin و همکاران، به منظور سرعت بخشیدن به این تکنیک ۲ پرایمر (FLP و BLP) به نام پرایمرهای حلقه (loop) به واکنش اضافه نمودند. این دو پرایمر همراه با ۴ پرایمر قبلی ۸ ناحیه ژنی از DNA هدف را شناسایی می‌نمایند. به دلیل این که باید تمام ۶ یا ۸ ناحیه در DNA هدف به طور صحیح توسط پرایمرها شناسایی شوند، این تست دارای اختصاصیت بسیاربالایی نسبت به سایر روش‌های تکثیر DNA هم‌دمای شناخته شده دارند (۲۳ و ۲۲).

محصول نهایی واکنش، قطعات DNA با ساختار ساقه ـ حلقه به همراه قطعات تکثیر یافته DNA با تکرارهای معکوس متعدد و همچنین ساختارهای گل کلمی با لوپ‌های فراوان می‌باشد (۲۰ و ۲۴)، به‌طوری که مقدار زیادی DNA (۱۰ -۳۰ میکروگرم در ۲۵ میکرولیتر)، می‌تواند در زمان کوتاهی ۶۰-۱۵ دقیقه با حفظ اختصاصیت بالا ساخته شود (۲۶-۲۳).

در این روش می‌توان بجای الکتروفورز محصول واکنش PCR، با افزودن سایبرگرین ۰/۱٪ و مشاهده در زیر نور UV، در زمان کوتاه‌تری عامل عفونی را تشخیص داد. همچنین به دلیل این که این تکنیک نیاز به تجهیزاتی مانند ترموسایکلر و سیستم الکتروفورز ندارد، بنابراین پس از بهینه‌سازی تست، دانش فردی زیادی برای انجام آزمایش لازم ندارد و امکان استفاده از آن حتی در مراکز بهداشتی مناطق دور افتاده و محروم نیز فراهم می‌شود. هدف از این پژوهش، ارزیابی روش LAMP به منظور تشخیص ویروس هپاتیت B در بیماران همودیالیزی است.

مواد و روش ها

الف) جمع آوری نمونه: در این پژوهش به صورت توصیفی ـ مقطعی ۱۳۶ نمونه پلاسمای تازه منجمد از بیماران مراجعه کنندگان به ۳ مرکز



شکل ۱- توالی پرایمرها ؛ 'F3 : 5' -CTT-CAA-CCA-CCA-GCA-CGG-3' ،'B3: 5' -ACC-ACT-GAA-CAA-ATG-GCA-CT-3' -GTT-TGG-TAC-AGC-<A>-3'
'F1C: 5' -CGT-CCG-AAG ،'F2: 5' - CCA-TGC-AGA-ACC-TGC-ACG-3' ،'B1C: 5' -ATT-CCC-GTC-CCA-TCA-TCC-TGG-<G>-3' -GCA-GGA-GT-3'
LB: 5' -ATT-CCT-ATG-GGA-GTG-GGC-C-3 ،'B2: 5' -AAA-CTG-AGC-CAG-GAC-AAA-CG-3' LF:5'-GAG-GTT-CCT-TGA

همودیالیز بیمارستان مصطفی خمینی (۵۲ نمونه)، بیمارستان چمران (۵۴ نمونه) و بیمارستان عرفان (۳۱ نمونه) در شهر تهران انجام شد.

ب) استخراج *DNA*: برای استخراج DNA از کیت DNP^{TM} شرکت سیناژن (DN811530) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد.

ج) طراحی پرایمر: در این پژوهش براساس ترادف ژنوتایپ D رایج در ایران (سروتایپ awy2) (شماره دسترسی: AY741794) پرایمرها طراحی گردید (شکل ۱). پرایمرها با کمک نرم افزار Primer explorer V4 ویژه آنتی ژن سطحی ویروس هپاتیت B (HBsAg) طراحی گردید. (http://primer explorer JP. /e/; primer explorer V4).

د) واکنش *LAMP*: واکنش در حجم ۲۵µL شامل: مخلوطی از ۵/۲µL آب مقطر، ۲/۵µL بافر 10X، ۱µL مخلوطی از پرایمرهای خارجی (F3/B3) با غلظت ۰/۲µM و پرایمرهای داخلی (BIP/FIP) با غلظت ۱/۶µM، ۱µL از پرایمرهای loop(LB/LP) با غلظت ۰/۸µM، ۱/۸µL $MgSO_4$ با غلظت ۷mM، ۱µL آنزیم DNA پلیمراز Bst(۸U)، ۴µL Betain با غلظت ۰/۸M، ۳/۵µL از dNTPs با غلظت ۱/۴mM و ۵µL از DNA استخراج شده می‌باشد. این واکنش در مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۶۶ درجه سانتی‌گراد انجام شد. در هر مرحله از واکنش کنترل مثبت و منفی نیز گذاشته شد.

به منظور ارزیابی محصول واکنش یک میکرولیتر سایبرگرین یک هزارم درصد (Invitrogen lot: 49743A) به هر لوله واکنش اضافه گردید و در مرحله بعد با دستگاه ترانس ایلومینیتور با طول موج ۳۰۲ نانومتر بررسی شد. لوله حاوی واکنش مثبت به رنگ سبز و منفی به رنگ نارنجی مشاهده شد. هم چنین محصول واکنش توسط الکتروفورز در ژل آگارز۲٪ حاوی اتیدیوم بروماید (در بافر ۰/۵X TBE) نیز بررسی گردید.

ه) حساسیت و اختصاصیت واکنش *LAMP*: برای تعیین حساسیت تست LAMP، رقت‌های مختلف از ذرات مشخص DNA ویروس تهیه گردید. برای این منظور سرم واجد تعداد ذرات مشخص ویروس (تیتر۴ میلیون) از آزمایشگاه ویروس شناسی کیوان تهیه و سپس رقت‌های متوالی آن تا ۴ ذره ویروسی آماده شد. برای تعیین ویژگی نیز از DNA های انسان، موش، cDNA ویروس هپاتیت C، توکسوپلاسما گوندیی، مایکوباکتریوم توبرکیلوسیس، ساکارومیسس سرویزیه، همراه با نمونه‌های کنترل مثبت و منفی مورد ارزیابی قرار گرفت.

و) واکنش *PCR*: هر واکنش شامل ۵ میکرولیتر الگو (DNA

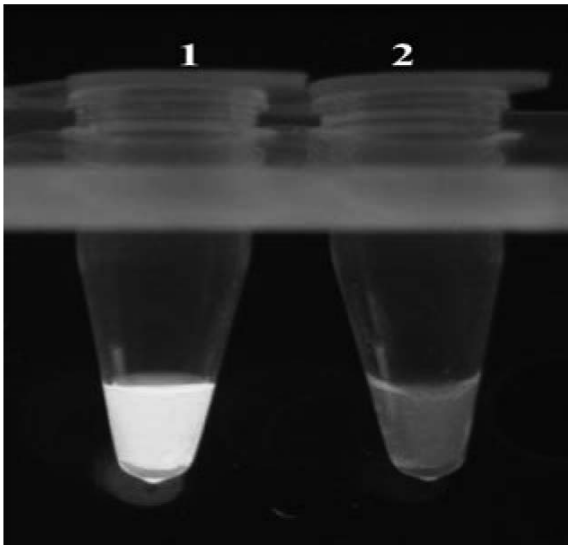
استخراجی از سرم)، ۲/۵ میکرولیتر از بافر PCR ۱۰X، ۱ میکرولیتر از هر یک از دو پرایمر جلویی و عقبی ۱۰mM، ۰/۷۵ میکرولیتر $MgCl_2$ با غلظت ۵۰mM، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs با غلظت ۱۰mM، ۰/۴ میکرولیتر DNA پلیمراز Taq(۵U/mL) در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر بود. برنامه دمایی به صورت واسرشت شدن در دمای ۹۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و دمای اتصال ۶۰ درجه به مدت ۴۰ ثانیه و در نهایت پلی‌مریزاسیون در دمای ۷۲ درجه به مدت ۴۰ ثانیه (۴۰ چرخه) انجام شد. نهایتا محصول PCR در ژل آگارز ۱/۵٪ حاوی اتیدیوم بروماید (سیناژن ۱۰mg/ml) در بافر ۰/۵X TBE الکتروفورز گردید.

نتایج

بهینه سازی واکنش LAMP در دمای ۶۶ درجه سانتی‌گراد و مدت زمان یک ساعت انجام شد (شکل ۲).

در الکتروفورز محصول LAMP برخلاف PCR باندهای زیادی با اندازه های متفاوت به شکل اسمیر مشاهده شد اما در کنترل و نمونه‌های منفی، هیچ باندی قابل رویت نبود. بهترین شرایط واکنش مدت ۱ ساعت و حرارت ۶۶ درجه سانتی‌گراد بود. نتایج ارزیابی حساسیت آزمون LAMP نشان داد که حساسیت این روش ۴ ذره ویروسی می‌باشد (شکل ۳ و ۴).

تست LAMP برای تشخیص ویروس هپاتیت B ویژگی بسیار بالایی داشت زیرا با استفاده از ۶ پرایمر ویژه، بصورت بسیار اختصاصی عمل می‌کند، به‌طوری که فقط با DNA ویروس هپاتیت B واکنش نشان داد و با DNA سایر عوامل مورد استفاده،



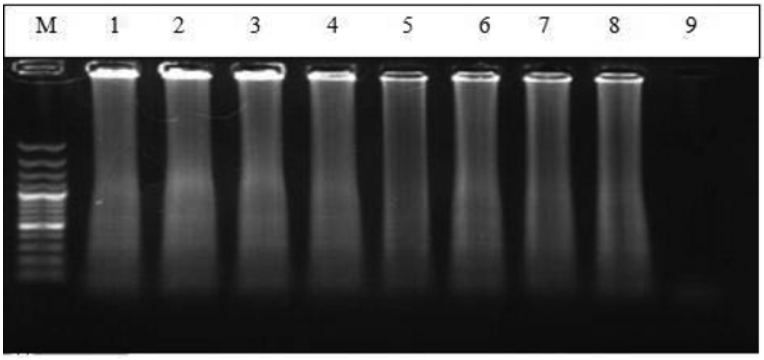
شکل۲ - تست بهینه شده LAMP. لوله (۱) واکنش مثبت و لوله (۲) واکنش منفی.

واکنشی صورت نگرفت (شکل ۵ و ۶).

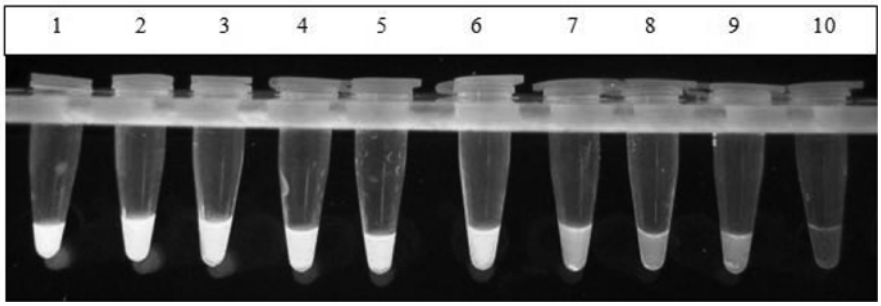
در جمعیت اول (۵۲ نمونه)، ۱۳ مورد توسط تکنیک LAMP مثبت گزارش گردید در حالی که در تست PCR، ۷ مورد مثبت مشاهده شد. در جمعیت دوم (۵۴ نمونه) در روش LAMP، ۴ مورد و در تست PCR، ۲ مورد مثبت گزارش شد. نتایج بدست آمده از دو تکنیک در جمعیت سوم (۳۱ نمونه)، یکسان بود و ۲ مورد مثبت، شناسایی گردید.

بحث

ویروس هپاتیت B یکی از عوامل مهم هپاتیت ویروسی می‌باشد (۱). هپاتیت B، ۱۰۰ بار مسری‌تر از ویروس نقص ایمنی انسان (HIV) است (۲۷). نارسایی کلیه هم یک مشکل مهم در اغلب



شکل ۳- نتایج الکتروفورز برای اندازه‌گیری حساسیت واکنش LAMP؛ (M): سایز مارکر (فرمنتاس 100bp DNA Ladder PLUS)، (۱): کنترل مثبت، (۲): ۴ میلیون، (۳): ۴۰۰ هزار، (۴): ۴۰ هزار، (۵): ۴ هزار، (۶): ۴۰۰، (۷): ۴۰، (۸): ۴ پارتیکل و (۹): کنترل منفی.



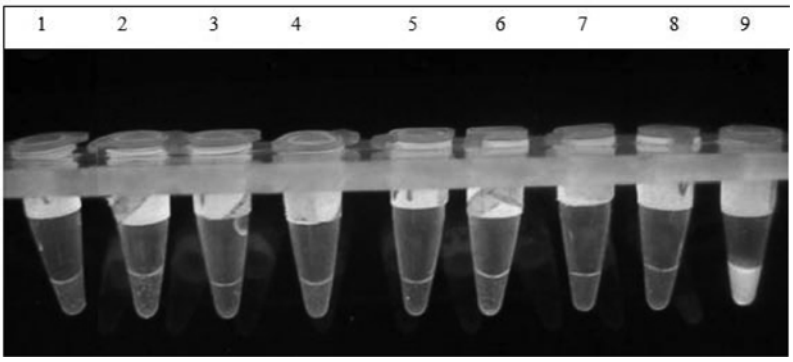
شکل۴- نتایج واکنش سایبرگرین برای اندازه‌گیری حساسیت واکنش LAMP؛ (۱): کنترل مثبت، (۲): ۴ میلیون، (۳): ۴۰۰ هزار، (۴): ۴۰ هزار، (۵): ۴ هزار، (۶): ۴۰۰، (۷): ۴۰، (۸ و ۹): ۴ پارتیکل (نمونه دوبل) و (۹): کنترل منفی.

کشورهاست و شیوع این بیماری به طور قابل ملاحظه‌ای در کشورهای در حال توسعه افزایش یافته است. بیماران همودیالیزی به میزان زیادی در معرض خطر ابتلا به هپاتیت B هستند (۶ و ۲۸). سرکوب ایمنی طبیعی در بیماران کلیوی، اغلب منجر به مزمن شدن ویروس و فرصت انتشار و عفونت بیمارستانی در بین بیماران دیالیزی را می‌دهد (۱۲). همچنین انتقال عفونت از بیمار و کارکنان بخش دیالیز به یکدیگر یک مشکل جدی است (۱۵). در مقایسه با مزمن شدن بیماری هپاتیت B در افراد سالم(۱ تا ۳٪)، مزمن شدن عفونت حاد در بیماران با بیماری نارسایی کلیوی بالاتر از ۸۰٪ می‌باشد (۱۲). همچنین میزان آلودگی به این ویروس در بیماران همودیالیزی، می‌تواند تابلوی بالینی وضعیت آلودگی به ویروس را نشان دهد. انجام یک دوره واکسیناسیون هپاتیت B در افراد سالم جامعه به میزان ۹۵٪ محافظت در برابر بیماری تا آخر عمر ایجاد می‌کند و نیاز به تجویز دوز یادآور نیز وجود ندارد. اما تنها ۵۰-۶۰ ٪ از بیماران همودیالیزی به دنبال تجویز واکسن، سطح مطلوبی از آنتی‌بادی را در خون به دست می‌آورند و پس از مدت کوتاهی، سطح محافظتی آنتی‌بادی در برابر ابتلا به بیماری از دست خواهند داد (۲۹).

روش‌های رادیوایمنواسی و الایزا از حساس‌ترین روش‌های سرولوژیکی می‌باشند، اما ایجاد جهش در این ویروس موجب کاهش حساسیت تشخیصی این روش‌ها می‌گردد. همچنین روش‌های یاد شده مدت زیادی پس از آلودگی قادر به تشخیص عامل بیماری‌زا هستند (۲۰). مطالعات نشان داده‌اند که آزمایش‌های سرولوژیکی به منظور شناسایی HBsAg، حدود ۵۰ تا ۶۰ روز پس از عفونت، مثبت می‌گردد و به این ترتیب عفونت HBV در این مدت قابل انتقال می‌باشد (۲۵ و ۳۰).

اساس روش‌های تشخیص متداول HBV، شناسایی آنتی‌بادی است که به‌همین دلیل خیلی اختصاصی و حساس نیستند (۳۱). اما مهم‌ترین مزیت تکنیک‌های مولکولی، حساسیت و ویژگی بالاتر آن‌ها می‌باشد (۲۲). روش PCR با وجود سرعت و حساسیت مناسب، محدودیت‌هایی مانند چرخه‌های حرارتی زیاد و استفاده از دستگاه‌های گران قیمت ترموسایکلر و زمان‌بر بودن ارزیابی محصولات را دارد (۲۰). روش LAMP یک روش سریع، ساده و یک مرحله‌ای است که می‌تواند با تعداد اندکی DNA نسخه‌های زیادی (10^9) را در کمتر از یک ساعت در شرایط یکسان دمایی بدون نیاز به واسرشت شدن DNA الگو ایجاد نماید (۲۰، ۲۲، ۲۳ و ۳۳). اما مهم‌ترین چالش روش LAMP پیچیدگی پرایمر و استفاده از نرم‌افزارهای پیشرفته می‌باشد (۳۱). یکی دیگر از فواید استفاده از LAMP، تکثیر ساختارهای ساقه ـ حلقه می‌باشد که منجر به تجمع مقادیر زیادی محصولات با طول‌های مختلف شده و در نتیجه شناسایی DNA تکثیر شده را بسیار آسان می‌سازد (۳۴).

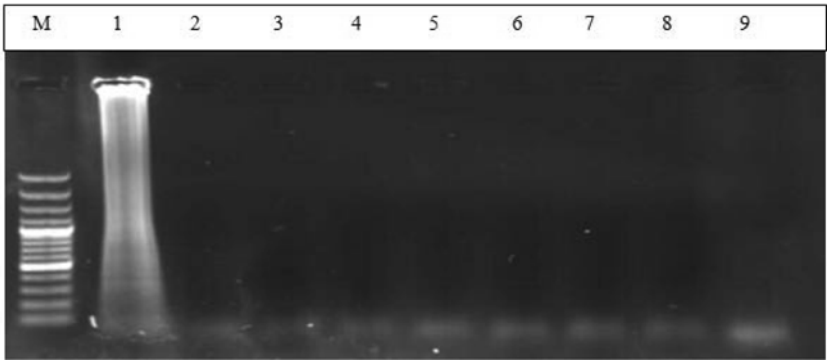
پژوهش‌های گوناگونی در مناطق مختلف دنیا در مورد ارزیابی آلودگی بیماران همودیالیزی به ویروس هپاتیت B انجام شده است. به عنوان نمونه Teles و همکاران در سال ۱۹۹۹ در برزیل با بررسی نمونه‌های سرم ۲۸۲ بیمار همودیالیزی، با بررسی HBsAg میزان شیوع HBV را ۱۲٪ گزارش نمودند (۳۵). Minuk و همکاران در سال ۲۰۰۴ به منظور بررسی عفونت نهفته ویروس



شکل ۵- تعیین ویژگی تست LAMP؛ (۱): کنترل منفی، (۲): DNA موش، (۳): DNA انسان، (۴): DNA اشریشیاکلی، (۵): DNA ساکارومیسس سرویزیه، (۶): cDNA ویروس هپاتیت C، (۷): DNA مایکوباکتریوم توبرکیلوسیس، (۸): DNA توکسوپلاسما گوندای و (۹): کنترل مثبت.

هپاتیت B در بیماران همودیالیزی شمال آمریکا با روش PCR real-time، نشان دادند که حساسیت این روش در قیاس با آزمایش HBsAg، ۴ تا ۵ برابر بیشتر است (۳۶). در سال ۲۰۱۰، Motta و همکاران با روش semi-nested PCR، سرم ۱۰۰ بیمار HBsAg منفی را بررسی نمودند. محققین یاد شده DNA هپاتیت B را در ۱۵ نمونه شناسایی نمودند (۳۷). آقاخانی و همکاران در سال ۲۰۱۰، ارزیابی فراوانی عفونت نهفته ویروس هپاتیت B در بیماران همودیالیزی با روش real-time PCR مورد مطالعه قرار دادند. از ۲۸۹ بیمار همودیالیزی مورد مطالعه، ۱۸ نفر دارای anti-HBc بودند و در ۹ نفر از این ۱۸ بیمار HBV-DNA شناسایی شد. HBV -DNA در پلاسمای کلیه این بیماران کمتر از ۵۰ IU/ml بود (۳۸). در سال ۲۰۰۷، Lee و همکاران از واکنش LAMP برای تشخیص چشمی و تکثیر DNA ویروس HBV استفاده نمودند. در این مطالعه از ۶ پرایمر طراحی شده ویژه ژن پلی مراز HBV استفاده گردید (۳۹). همچنین در سال ۲۰۰۸، Cai و همکاران با استفاده از روش real-time fluoroginic (RtF)، تکنیک LAMP را با استفاده از ۶ پرایمر (BIP، FIP، B3، F3، LoopB، LoopF) ویژه ناحیه Core HBV برای تشخیص و تعیین میزان ویروس در سرم بیماران طراحی نمودند (۴۰).

جمعیت مورد مطالعه در این پژوهش، به ۳ گروه طبقه بندی شد. در گروه اول که شامل ۵۲ نمونه بود، ۶ مورد در تست LAMP نسبت به تست PCR بیشتر مثبت شدند، نمونه‌های منفی PCR که در تست LAMP مثبت شده‌اند، احتمالا دارای مقادیر بسیار کم ویروس بوده و به دلیل پایین بودن میزان ویروس توسط روش‌های کیفی (PCR) قابل شناسایی نبودند. حساسیت تست LAMP بهینه شده در این مطالعه، ۱۰ برابر بیشتر از PCR بود. این روش توانایی انجام واکنش تا ۴ ذره ویروس را داشت اما در روش PCR تا ۴۰ ذره ویروس قابل مشاهده بود. مطالعه Minuk تایید نمود که شیوع ویرمی HBV در بیماران همودیالیزی ۴ تا ۵ برابر بیشتر از تست‌های استاندارد تشخیص HBsAg است. در گروه



شکل ۶: تعیین ویژگی تست LAMP با روش الکتروفورز؛ (M): سایز مارکر (فرمنتاس 100bp DNA Ladder PLUS)، (۱): کنترل مثبت، (۲): DNA موش، (۳): DNA انسان، (۴): DNA اشریشیاکلی، (۵): DNA ساکارومیسس سرویزیه، (۶): cDNA ویروس هپاتیت C، (۷): DNA مایکوباکتریوم توبرکیلوسیس، (۸): DNA توکسوپلاسما گوندای و (۹): کنترل منفی.

دوم که شامل ۵۴ سرم بیمار بود، در تست LAMP، ۴ نمونه مثبت و ۵۰ نمونه منفی شناسایی شد. در تست PCR این گروه، ۲ نمونه مثبت تشخیص داده شد. در این گروه فقط ۱ مورد توسط تست الایزا مثبت گزارش شده بود. نتایج به دست آمده در این جمعیت نیز نشان دهنده حساسیت بالای روش‌های مولکولی نسبت به روش‌های سرولوژیکی می‌باشد. در ضمن یک بار دیگر حساسیت بیشتر تست LAMP نسبت به PCR مورد تایید قرار گرفت.

در گروه سوم که شامل ۳۱ سرم بیمار بود، نتایج PCR و LAMP با هم تطابق کامل داشتند. تایید این نکته ضروری است که PCR نیز یک تست استاندارد دارای ویژگی بالا برای تشخیص ویروس هپاتیت B می‌باشد و به همین دلیل این نتیجه دور از انتظار نبود.

نتیجه گیری

بررسی نتایج دو روش LAMP و PCR در این مطالعه نشان داد که روش LAMP یک تست هم دما با سرعت و حساسیت بالایی است و به جای نیاز داشتن به دستگاه‌ها و تجهیزات پیشرفته و گران قیمت، با استفاده از یک بلوک حرارتی بسیار ساده و با افزودن سایبرگرین ۰/۱٪ و مشاهده در زیر نور UV در مقایسه با روش الکتروفورز در ارزیابی محصول واکنش PCR در زمان کوتاه‌تری به تشخیص هپاتیت B می‌پردازد. در این واکنش نیاز به مراحل پس از ازدیاد DNA (Post Amplification) به طور گسترده‌ای برطرف گردیده است. بنابراین می‌تواند جایگزین مناسبی برای تست PCR باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از مدیریت بخش پاتولوژی بیمارستان عرفان جناب آقای دکتر زارع و آقای نظافت، به دلیل همکاری ارزنده در انجام این پژوهش کمال سپاس را دارند.

References

1. World Health Organization. Hepatitis B. World Health Organization Fact Sheet 2004 (Revised October 2000) WHO website, 2000; http://who.int/inf-fs/en/fact204.html.
2. Kew MC. Epidemiology of chronic hepatitis B virus infection, hepatocellular carcinoma,and hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. Patbio-2868; 2010. [Article in press].
3. Carrilho FJ, Moraes CR, Pinho JR, et al. Hepatitis B virus infection in Haemodialysis Centres from Santa Catarina State, Southern Brazil. Predictive risk factors for infection and molecular epidemiology. BMC Public Health, 2004; 4: 13.
4. Mahdavimazdeh M, Hosseini-Moghaddam SM, Alavian SM, Yahyazadeh H. hepatitis B infections in haemodialysis Patients in Tehran Province. Iran Hepatitis Monthly, 2009; 9(3): 206-210.
5. Harrion's (2005) Principles of Internal Medicine. 16th edition; Vol. 2. p.102-3.
6. Fabrizi F, Martin P. Hepatitis B virus infection in dialysis patients, Am J Nephrol, 2000; 20: 1-11.
7. Fallon MB, McGuire BM, Abrams GA, Arguedas MR.(2001) Cecil essentials of medicine, 5th ed, Philadelphia, W B Saunders; 376-84.
8. Saha D, Agarwal SK. Hepatitis and HIV infection during hemodialysis, J Indian Med Assoc, 2001; 99: 194-9.
9. Fabrizi F, Lunghi G, Martin P. Hepatitis B virus infection in hemodialysis: recent discoveries. J Nephrol, 2002; 15: 463-468.
10. Paraskevi M, Georgiadou SP, Rizos C, Dalekos GN, Rigopoulou EI. Prevalence of occult hepatitis B virus infection in haemodialysis patients from central Greece World J Gastroenterol; 2010; 16(2): 225-231.

11. Hilleman MR. Critical overview and outlook: pathogenesis, prevention, and reatment of hepatitis and hepatocarcinoma caused by hepatitis B virus. Vaccine, 2003; 21: 4626-4649.
12. Hollinger FB, Habibollahi P, Daneshmand A, Alavian SM. Occult Hepatitis B Infection in Chronic Hemodialysis Patients: Current Concepts and Strategy Hepat Mon; 2010; 10(3): 199-204.
13. Marzano A, Angelucci E, Andreone P, Brunetto M, Bruno R, Burra P, Caraceni P, Daniele B, Marcoh VD, Fabrizi F, Fagiuoli S, Grossi P, Lampertico P, Meliconim R, Mangia A, Puoti M, Raimondo G, Smedile A. Prophylaxis and treatment of hepatitis B in immunocompromised patients. Digestive and Liver Disease, 2007; 39: 397-408.
14. Alavian, S.M., et al. Hepatitis B and C in dialysis units in Iran: changing the epidemiology. Hemodial Int, 2008; 12(3): 378-82.
15. Grob P, Jilg W, Bornhak H, Gerken G, Gerlich W, Gunther S, et al. Serological pattern "anti-HBc alone" Report on a workshop. J Med Virol, 2000; 62: 450-455.
16. Urdea M, Penny LA, Olmsted SS, Giovanni MY, Kaspar P, Shepherd A, et al. Requirements for high impact diagnostics in the developing world. Nature, 2006; 444(Suppl 1): 73-9.
17. Tsai TH, Huang CF, Wei JCC, et al. The study of IgG subclass profiles of anti-HBs in populations with different HBV infection status. Viral Immunol, 2006; 19(2): 277-84.
18. Fallahi s, Ravanshad M, Kenarkuhi O. Designing of a highly sensitive nested PCR procedure using a single closed tube for detection of Hepatitis C Virus. The j Modarres: Biopathology, 2010; 13(2): 33-42.
19. Mori Y, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplifi cation (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. J Infect Chemother, 2009; 15: 62-69.
20. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T, Loop-mediated isothermal amplification of DNA, Nucleic Acids Research, 2000; 28(12): e63.
21. Parida MM., Santhosh SR., Dash PK., Tripathi NK., Lakshmi V., Mamidi N., Shrivastva A., Gupta N., Saxena P., and Pradeep J. Rapid and realtime detection of chikungunya virus by reverse transcription loop mediated isothermal amplifi cation assay. J. Clin. Microbiol, 2007; 45: 351-357.
22. Nagamine K, Hase T and Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplifcation using loop primers. Molecular and Cellular Probes, 2002; 16: 223-229.
23. Mori Y, Nagamine K, 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: 150-154.
24. Parida M, Sannarangaiah S, 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: 407-421.
25. Mori Y., Kitao M., Tomita N., Notomi T. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. J. Biochem. Biophys Methods, 2004; 59: 145-157.
26. Mori Y., Hirano T., Notomi T. Sequence specific visual detection of LAMP reactions by addition of cationic polymers. BMC Biotech. 2006; 6:3; [Online]. http://www. biomedcentral.com/1472-6750/6/3.
27. Ott MJ, Aruda M. Hepatitis B vaccine. J Pediatr Health Care, 1999; 13: 211-6.
28. Mahdavi-Mazdeh M, Zamyadi M, Nafar M. Assessment of management and treatment responses in haemodialysis patients from Tehran province, Iran. Nephrol Dial Transplant;

2008; 23(1): 288-93.
29. Peces R, Laures AS. Persistence of immunologic memory in long-term hemodialysis patients and healthcare workers given hepatitis B vaccine: role of a booster dose on antibody response. Nephron, 2001; 89; 172-6.
30. Ulrich PP, Bhat RA, Seto B, Mack D, Sninsky J, Vvas Gn. Enzymatic amplification of hepatitis B virus in serum compared with infectivity testing in chimpanzees. J Infec Dis, 1989; 160: 37-43.
31. Parida MM. Rapid and real-time detection technologies for emerging viruses of biomedical importance. J Biosci, 2008; 33(4): 617-628.
32. Ganem D and Alfred M. mechanisms of disease Hepatitis B Virus Infection-Natural History and Clinical Consequences. N Engl J Med, 2004; 350: 1118-29.
33. Yoshida A, Nagashima S, Ansai T, Tachibana M, Kato H, Watari H, Notomi T, and Takehar T. Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Rapid Detectionof the Periodontopathic Bacteria Porphyromonas gingivalis, Tannerella forsythia and Treponema denticola. Journal of Clinical Microbiology; 2005; 43(5): 2418-2424.
34. Aonuma H, Yoshimura A, Perera N, Shinzawa N, Bando H, Oshiro S, Nelson B. Loop-mediated isothermal amplification applied to filarial parasites detection in the mosquito vectors: Dirofilaria immitis as a study model. Parasit Vectors, 2009; 2: 15.
35. Teles SA, Martins RM, Vanderborght B, Stuyver L, Gaspar AM, Yoshida CF. Hepatitis B virus: genotypes and subtypes in Brazilian hemodialysis patients. Artif Organs; 1999; 23(12): 1074-8.
36. Minuk GY, Sun DF, Greenberg R, Zhang M, Hawkins K, Uhanova J, et al. Occult hepatitis B virus infection in a North American adult hemodialysis patient population. Hepatology, 2004; 40(5): 1072-7.
37. Motta JS, Mello FC, Lago BV, Perez RM, Gomes SA, Figueiredo FF. Occult hepatitis B virus infection and lamivudine-resistant mutations in isolates from renal patients undergoing hemodialysis. J Gastroenterol Hepatol, 2010; 25(1): 101-6.
38. Aghakhani A, Banifazl M, Kalantar E, Eslamifar A, Ahmadi F, Razeghi E, Atabak S, Amini M, Khadem-Sadegh A, Ramezani A. Occult hepatitis B virus infection in hemodialysis patients with isolated hepatitis B core antibody: a multicenter study. Ther Apher Dial, 2010; 14(3): 349-53.
39. Lee SY, Lee CN, Mark H, Meldrum DR, Lin CW. Efficient, specific, compact hepatitis B diagnostic device: Optical detection of the hepatitis B virus by isothermal amplification. Sensors and Actuators B; 2007; 127: 598-605.
40. Cai T, Lou GQ, Yang J, Xu D, Meng ZH. Development and evaluation of real-time loop-mediated isothermal amplification for hepatitis B virus DNA quantification: A new tool for HBV management. Journal of Clinical Virology, 2008; 41: 270-276.

Journal of Microbial World
Volume 2, No. 3, 2009

Loop mediated isothermal amplification of hepatitis B virus in hemodialysis patients

Mohmmad hasan Shahhosseiny[1], Zohre Esmailii[2], Elham Moslemi[3], Parichehre Yaghmaii[4]

[1]Associate Professor, Department of Microbiology, Shahr -e- Qods branch, Islamic Azad University, Shahr -e- Qods, Iran
[2]M.Sc. Department of Biology, Science and Research branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[3]Assisstant Professor, Department of Biology, East-Tehran branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[4]Associate Professor, Department of Biology, Science and Research branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract:

Background and Objectives: Infections with Hepatitis B virus in hemodialysis centers still remain as a major problem. The propose of this study is optimization and development of LAMP technique for assessment of HBV infection in serum of hemodialysis patients.

Material and Methods: This cross sectional study was performed on totally, 136 serum samples were obtained from the patients how referred to hemodyalis center in Tehran as: 52 serum samples from Mastafa khomaini hospital, 54 serum samples from Chamran hospital and 31 serum samples from Erfan hospital. After DNA extraction, 6 HBsAg specific primers were used for optimizing of reaction conditions and material concentration for LAMP. LAMP products were evaluated by adding 1% SYBER Green and electrophoresis stained by Ethidium-Bromide.

Results: LAMP sensitivity was determined as 4 particles in this study. In addition, LAMP technique Showed a high specify for detecting the viruses. Totally, 13and 7 cases of the serum samples of Mastafa khomaini were positive by LAMP and PCR respectfully. Also, 4 and 2 samples for second group and 2 and 2 samples for third group were positive respectfully by LAMP and PCR.

Conclusion: The LAMP technique is a more sensitive and cost friendly system to detect HBV in comparison to conventional PCR.

Key words: Hepatitis B, Hemodialysis, LAMP, PCR

Correspondence to: Dr. Mohammad hassan Shahhosseiny
Tel: (+98)912-3304069
E-mail: Shahhosseiny@yahoo.com
Journal of Microbial World 2009, 2(3). 183-192