DOI: 10.22100/jkh.v11i4.1512

مجله دانش و تندرستی، دوره ۱۱، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۵

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شاهرود

مقاله پژوهشی

# طراحی و به‌کارگیری روش LAMP در جهت تشخیص مولکولی استرپتوکوک پیوژنز

معصومه معصومی‌کریمی[۱]، مهدی میرزایی[۲]، پیراسته نوروزی[۳]، مژگان فضلی[۴]، ساناز دهباشی[۵]، داود افشار[۶]، مسلم جعفری‌ثانی[۷*]

۱- دانشگاه علوم پزشکی شاهرود- دانشکده پزشکی- گروه علوم پایه- کارشناسی ارشد ایمونولوژی.

۲- دانشگاه علوم پزشکی شاهرود- دانشکده پزشکی- گروه علوم پایه- دکترای تخصصی باکتری‌شناسی.

۳- دانشگاه علوم پزشکی شاهرود- دانشکده پزشکی- گروه علوم پایه- کارشناسی ارشد بیولوژی.

۴- دانشگاه علوم پزشکی شاهرود- دانشکده پزشکی- گروه علوم پایه- کارشناسی ارشد میکروب‌شناسی.

۵- دانشگاه علوم پزشکی همدان- دکترای تخصصی باکتری‌شناسی.

۶- دانشگاه علوم پزشکی زنجان- دانشکده پزشکی- گروه میکروب‌شناسی- دکترای تخصصی باکتری‌شناسی پزشکی.

۷- دانشگاه علوم پزشکی شاهرود- دانشکده پزشکی- گروه علوم پایه- دکترای تخصصی بیوشیمی بالینی.

**تاریخ دریافت:** ۱۳۹۵/۳/۲۱، **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۵/۸/۲۰

## چکیده

***مقدمه:*** *استرپتوکوکوس پیوژنز کلونیزه‌کننده پوست و گلو در بسیاری از انسان‌ها است. این باکتری علاوه بر عفونت‌های چرکی حاد، مسئول عوارض و بیماری‌های خودایمن بعد از عفونت شامل آرتریت واکنشی، گلومرولونفریت و تب روماتیسمی می‌باشد. روش استاندارد طلایی برای شناسایی استرپتوکوکوس پیوژنز، کشت است. اما به‌دلیل زمان‌بر بودن روش مذکور و اهمیت تشخیص سریع آن، استفاده از روش‌های مولکولی مفید است. تکنیک LAMP روش نسبتاً جدیدی است که حساسیت و اختصاصیت بالایی در تشخیص عفونت‌های باکتریایی دارد. هدف از این مطالعه، استفاده از تکنیک LAMP براساس ژن ستوکروم اکسیداز (oxaA) برای شناسایی استرپتوکوکوس پیوژنز است.*

***مواد و روش‌ها:*** *روش LAMP با ۶ پرایمر برای توالی خاص oxaA در استرپتوکوکوس پیوژنز طراحی شد. غلظت‌های مختلفی از سولفات منیزیم، دزوکسی نوکلئوتید تری‌فسفات و پرایمرها برای بهینه‌سازی روش استفاده گردید.*

***نتایج:*** *واکنش LAMP با غلظت‌های ۱۰ uM از هر کدام از پرایمرهای LB، LF، F3 و B3، 40 uM از هر کدام از پرایمرهای FIP و BIP، 0.4mM dNTPs و ۸ mM MgSo4 طی ۱ ساعت و در دمای ۶۳ درجه سانتیگراد راه‌اندازی گردید.*

***نتیجه‌گیری:*** *روش LAMP در مقایسه با PCR روش سریعی برای شناسایی استرپتوکوکوس پیوژنز می‌باشد.*

**واژه‌های کلیدی:** استرپتوکوکوس پیوژنز، Loop mediated isothermal amplification assay، تشخیص اختصاصی.

***نویسنده مسئول:** دانشگاه علوم پزشکی شاهرود. دانشکده پزشکی، گروه علوم پایه، **تلفن:** ۰۹۳۶۵۹۹۸۴۲۶، **نمابر:** ۰۲۳۳۲۳۹۵۰۵۴،

**Email:** moslem.jafarisani@gmail.com

**ارجاع:** معصومی‌کریمی معصومه، میرزایی مهدی، نوروزی پیراسته، فضلی مژگان، دهباشی ساناز، افشار داود، جعفری‌ثانی مسلم. طراحی و به‌کارگیری روش LAMP در جهت تشخیص مولکولی استرپتوکوک پیوژنز. مجله دانش و تندرستی ۱۳۹۵؛۱۱(۴):۱۸-۲۲.

## مقدمه

استرپتوکوکوس پیوژنز به‌عنوان گروه A استرپتوکوکی (GAS) یکی از ده پاتوژن مهم باکتریایی است که پوست و گلو را کلونیزه می‌کند و مسئول طیف وسیعی از عفونت‌های چرکی و عوارض غیرچرکی است (۳-۱) همچنین، GAS مسئول سندروم شوک توکسیک استرپتوکوکی است و نیز به‌دلیل تهاجم به پوست و بافت‌های نرم به‌نام باکتری گوشت‌خوار یا flesh eating نامیده می‌شود (۴). با وجود درمان‌های آنتی‌بیوتیکی مؤثر و کاهش قابل توجه عفونت‌های GAS در سال‌های اخیر، این پاتوژن همچنان عامل مرگ و میر در سراسر دنیا محسوب می‌شود. علاوه بر آن، استرپتوکوکوس پیوژنز به‌دلیل نقش مهمی که در ایجاد عوارض بعد از عفونت استرپتوکوکی شامل تب روماتیسمی، گلومرولونفریت و آرتریت واکنشی دارد، حائز اهمیت است (۲ و ۵).

روش‌های روتین برای شناسایی استرپتوکوکوس پیوژنز شامل کشت، روش‌های بیوشیمیایی و سرولوژی برای نمونه‌های سواب گلو است. کوکسی‌های گرم مثبت و کاتالاز منفی که تست پیرولیدونیل آریل آمیداز (PYR)آنها مثبت بوده و به باسیتراسین حساس هستند، به‌عنوان استرپتوکوکوس گروه A شناسایی می‌شوند (۶). اگرچه کشت و بررسی‌های بیوشیمیایی برای شناسایی باکتری مطلوب به‌نظر می‌رسد، اما به‌دلیل زمانبر بودن روش‌های مذکور و نیاز به لود بالای باکتری در نمونه برای شناسایی، استفاده از روش‌های مولکولی برای شناسایی DNA یا RNA میکروارگانیسم می‌تواند مفید باشد. یکی از روش‌های مولکولی که در سال‌های اخیر معرفی شده است، تکنیکLAMP است که اختصاصیت و حساسیت بالایی دارد. در این روش چهار پرایمر اختصاصی به‌کار می‌رود که به شش ناحیه در توالی هدف متصل می‌شوند. استفاده از چهار نوع پرایمر (F3, B3, FIP and BIP) موجب افزایش اختصاصیت و حساسیت تست می‌شود (۹-۷). افزودن پرایمرهای Loop کارایی و سرعت واکنش را افزایش می‌دهد. همچنین این پرایمرها موجب کاهش زمان تکثیر به کمتر از ۶۰ دقیقه می‌شود (۱۰). بعد از تکثیر، رسوب سفید رنگی تولید می‌شود که به‌دلیل تشکیل منیزیم پیروفسفات به‌عنوان محصول جانبی است و با چشم غیرمسلح قابل مشاهده است. علاوه‌بر این، تکنیک LAMP تحت تأثیر مواد مهارکننده باقی مانده از استخراج DNA، قرار نمی‌گیرد (۹ و ۱۱). بنابراین باتوجه به ویژگی‌های ذکر شده، تکنیک LAMP برای شناسایی عفونت‌های باکتریایی مختلف می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد.

هدف از این مطالعه، معرفی تکنیک LAMP برای تشخیص استرپتوکوکوس پیوژنز بر اساس توالی اختصاصی ژن oxaA است.

## مواد و روش‌ها

پرایمرهای تکنیک LAMP با استفاده از نرم‌افزار Primer explore V4 که در آدرس اینترنتی https://primerexplorer.jp/e/ قابل دسترسی است، طراحی شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ نشان داده شده است.

**جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده**

| Primer | Sequence |
|---|---|
| F3 | GCTTTTCTAGTATCTTCAAATGAGG |
| B3 | CTTGCAAAACGGTCAATCA |
| FIP | ACCATCGAAAACGATCTTTGATCTAAAAGACTGTTAG GAAGGTCAAGT |
| BIP | AAGACCAGCACCTTAATGTACTGAAATCAGTTTCCTT AGATTATACACTTC |
| LF | CCTCTTGACTCATAATCAATGCGAT |
| LB | ACCCCAAAAAGTTGGACAC |

سویه استاندارد استرپتوکوکوس پیوژنز (ATCC 12344) روی محیط کشت TSA به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. استخراج DNA با استفاده از کیت تجاری (Promega, USA) و طبق دستورالعمل آن انجام شد.

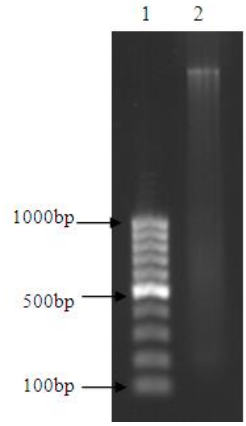
مخلوط واکنش شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر Thermopol(Thermo Scientific-Fermentas, Vilnus, Lithuania)، 10 pmol از پرایمرهای LB، LF، F3 و B3، 40 pmol از پرایمرهای FIP و BIP، غلظت ۰/۴ mM dNTP(Thermo Scientific-Fermentas, Vilnus, Lithuania) و MgSO4(Thermo Scientific-Fermentas, Vilnus, Lithuania)، U8 از Bsm DNA polymerase(Thermo Scientific-Fermentas, Vilnus, Lithuania) و ۱ میکرولیتر از DNA با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر تهیه شد. مخلوط واکنش در ترموبلاک (Thermo Scientific) در زمان‌های مختلف و درجه حرارت متفاوت انکوبه شده و محصول واکنش روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شد. واکنش PCR نیز طبق شرایط استاندارد با استفاده از پرایمرهای F3 و B3 انجام گردید.

## نتایج

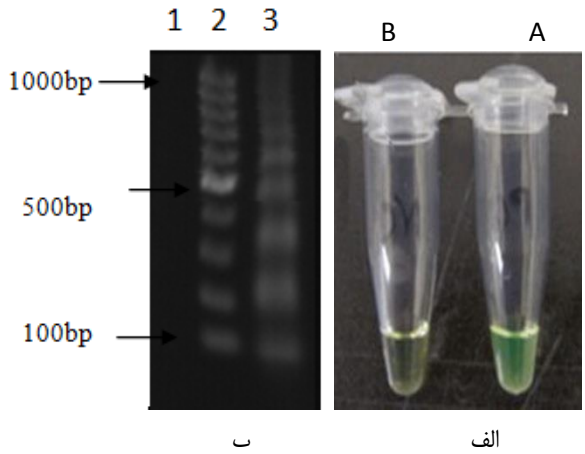
سویه استاندارد استرپتوکوکوس پیوژنز مورد مطالعه روی محیط TSA کشت داده شد و استخراج DNA انجام گرفت (شکل ۱). شکل ۱ چاهک ۱ مارکر DNA (سیناژن، ایران) و چاهک ۲ ژنوم استخراج شده را نشان می‌دهد.

DNA خالص استخراج شده از استرپتوکوکوس پیوژنز برای تنظیم شرایط مطلوب واکنش مورد استفاده قرار گرفت. واکنش LAMP در دماهای مختلف به مدت ۶۰ دقیقه انجام شده و در دمای ۶۳ درجه سانتی‌گراد بالاترین میزان محصول به‌دست آمد. بنابراین دمای مطلوب برای انجام واکنش LAMP در ۶۳ درجه سانتیگراد تنظیم شده و برای واکنش‌های بعدی استفاده شد. همچنین واکنش مذکور در زمان‌های مختلف انجام شده و زمان ۶۰ دقیقه برای واکنش مطلوب تنظیم شد (شکل ۲). علاوه‌براین، غلظت مناسب MgSO4 و dNTPs به‌ترتیب

۸M، ۰/۴ M و ۰/۴ M بهدست آمد. واکنش PCR نیز با پرایمرهای خارجی انجام و باند مدنظر بهدست آمد (شکل ۳).

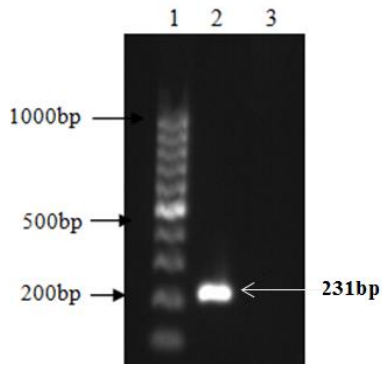



**شکل ۱- الکتروفورز ژنوم استخراج شده استرپتوکوکوس پیوژنز بر روی ژل آگارز ۱ درصد**




**شکل ۲ الف- میکروتیوب مثبت (a) از نظر واکنش LAMP علیه استرپتوکوک پیوژنز و کنترل منفی (b). ب: الکتروفورز محصول واکنش LAMP بر روی ژل آگارز ۲ درصد**

چاهک ۱ کنترل منفی، چاهک ۲ مارکر DNA و چاهک ۳ باندهای ناشی از واکنش LAMP را نشان می‌دهند.




**شکل ۳- الکتروفورز محصول PCR بر روی زل آگارز ۱ درصد**

چاهک ۱ مارکر DNA، چاهک ۲ باندهای ناشی از واکنش LAMP و چاهک ۳ کنترل منفی می‌باشند.

## بحث

استرپتوکوکوس پیوژنز یکی از مهمترین پاتوژن‌های باکتریایی عامل عفونت‌های چرکی است. علاوه‌بر آن این ارگانیسم به‌دلیل عوارض بعد از عفونت نظیر تب روماتیسمی، گلومرولونفریت و آرتریت واکنشی حائز اهمیت است (۱۲). کشت برای شناسایی استرپتوکوکوس گروه A روش استاندارد طلایی محسوب می‌شود (۱۳)، اما از آنجا که این روش نیازمند نمونه‌گیری مطلوب از فارنکس خلفی است؛ به‌طوری که نمونه‌گیری نامطلوب سبب کاهش حساسیت و اختصاصیت تست می‌شود (۱۴)، بنابراین استفاده از تکنیک‌های مولکولی برای شناسایی DNA یا RNA که با حجم نمونه کم قابل انجام است، می‌تواند مفید باشد. تکنیک LAMP، روش نسبتاً جدیدی است که به تشخیص سریع و درمان به موقع عفونت‌های ناشی از استرپتوکوکوس پیوژنز کمک می‌کند (۹، ۱۵ و ۱۶). این روش برای شناسایی استرپتوکوکوس پنومونیه، استرپتوکوکوس‌های گروه میتیس و انواع مختلفی از باکتری‌ها به‌کار برده شده است و اختصاصیت تست بالا گزارش شده است (۱۷). بر این اساس، در این مطالعه روش LAMP برای ژن oxaA استرپتوکوکوس پیوژنز طراحی شده است.

مطالعات مختلفی نشان داده‌اند که تکنیک LAMP حساسیت و اختصاصیت بالایی در شناسایی میکروارگانیسم در نمونه‌های بالینی دارد (۲۰-۱۸). آندرسون در سال ۲۰۱۳ و فیلسنستین در سال ۲۰۱۴ روش مذکور را در مقایسه با Real Time PCR برای شناسایی استرپتوکوکوس پیوژنز در نمونه‌های بالینی به‌کار بردند که نتایج حاصل، حساسیت و اختصاصیت بالای روش LAMP را نشان دادند (۲۱ و ۲۲). در مطالعه دیگری در سال ۲۰۱۳، ژن فسفوترانسفراز برای شناسایی استرپتوکوکوس پیوژنز با روش LAMP مورد استفاده قرار گرفت و در مقایسه با روش کشت و PCR، 100 درصد حساسیت و ۹۹/۲ درصد اختصاصیت نشان داد (۱۳). همچنین، Xhao و همکاران در سال ۲۰۱۵، روش LAMP را برای ژن Spy125 طراحی کرده و نشان دادند که روش مذکور نسبت‌به PCR حساس‌تر، اختصاصی‌تر و ساده‌تر است و در مدت زمان کوتاهی قابل انجام است (۲۳). کاوو و همکاران در مطالعه خود روش تشخیص LAMP علیه ژن speB را برای مطالعه بیماران به‌کارگرفتند. آنها در مقایسه با روش PCR، این روش را سریع‌تر و حساس‌تر نشان دادند (۲۴).

در مطالعه حاضر، روش LAMP برای ژن oxaA مورد استفاده قرار گرفت. ژن oxaA در استرپتوکوکوس پیوژنز حفاظت شده بوده و با استفاده از BLAST نشان داده شد که این ژن تنها در سویه‌های

استرپتوکوکوس پیوژنز وجود دارد. بنابراین، ژن oxaA می‌تواند برای شناسایی استرپتوکوکوس پیوژنز با روش LAMP به‌کار برده شود. در این مطالعه نشان داده شد که سرعت تکنیک LAMP نسبت‌به PCR معمولی که حدود ۳ الی ۴ ساعت زمانبر است، بالاتر می‌باشد که این موضوع به تشخیص و درمان سریع کمک می‌کند لذا می‌تواند از بروز عوارض عفونت‌های استرپتوکوکی جلوگیری کند.

واکنش LAMP با حداقل امکانات قابل اجرا بوده و باتوجه به سرعت بالای واکنش نتیجه تست در زمان کوتاهی حاصل می‌گردد لذا برای شناسایی استرپتوکوکوس پیوژنز می‌تواند مفید باشد.

## References

1. Terao Y. The virulence factors and pathogenic mechanisms of Streptococcus pyogenes. Journal of Oral Biosciences 2012;54:96-100. doi: 10.1016/j.job.2012.02.004

2. Ralph AP, Carapetis JR. Group a streptococcal diseases and their global burden. Curr Top Microbiol Immunol 2013;368:1-27. doi: 10.1007/82_2012_280

3. Uchiyama S, Döhrmann S, Timmer AM, Dixit N, Ghochani M, Bhandari T, et al. Streptolysin o rapidly impairs neutrophil oxidative burst and antibacterial responses to group a streptococcus. Front Immunol 2015;6:581. doi: 10.3389/fimmu.2015.00581

4. Fiedler T, Koller T, Kreikemeyer B. Streptococcus pyogenes biofilms-formation, biology, and clinical relevance. Front Cell Infect Microbiol 2015;5:15. doi: 10.3389/fcimb.2015.00015

5. Walker MJ, Barnett TC, McArthur JD, Cole JN, Gillen CM, Henningham A, et al. Disease manifestations and pathogenic mechanisms of group a streptococcus. Clin Microbiol Rev 2014;27:264-301. doi: 10.1128/CMR.00101-13

6. Langlois DM, Andreae M. Group a streptococcal infections. Pediatr Rev 2011;32):423-9. doi: 10.1542/pir.32-10-423

7. 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:e63-e63.

8. Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. Mol Cell Probes 2002;16:223-9.

9. Ranjbar R, Afshar D. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of Yersinia enterocolitica via targeting a conserved locus. Iran J Microbiol 2015;7:185-90.

10. Ranjbar R, Karami A, Farshad S, Giammanco GM, Mammina C. Typing methods used in the molecular epidemiology of microbial pathogens: a how-to guide. New Microbiol 2014;37:1-15.

11. Ushikubo H. Principle of LAMP method--a simple and rapid gene amplification method. Uirusu 2004;54:107-12.

12. Cunningham MW. Pathogenesis of group A streptococcal infections. Clin Microbiol Rev 2000;13:470-511.

13. Henson AM, Carter D, Todd K, Shulman ST, Zheng X, et al. Detection of streptococcus pyogenes by use of illumigene group a streptococcus assay. J Clin Microbiol 2013;51:4207-9. doi: 10.1128/JCM.01892-13

14. Fox JW, Marcon MJ, Bonsu BK. Diagnosis of streptococcal pharyngitis by detection of Streptococcus pyogenes in posterior pharyngeal versus oral cavity specimens. J Clin Microbiol 2006;44:2593-4. doi: 10.1128/JCM.00797-06

15. Dong HJ, Cho AR, Hahn TW, Cho S. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid, sensitive detection of campylobacter jejuni in cattle farm samples. J Food Prot 2014;77:1593-8. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-14-056

16. Kawamura Y, Whiley RA, Shu SE, Ezaki T, Hardie JM, et al. Genetic approaches to the identification of the midas group within the genus streptococcus. Microbiology 1999;145:2605-13. doi: 10.1099/00221287-145-9-2605

17. Seki M, Yamashita Y, Torigoe H, Tsuda H, Sato S, Maeno M. Loop-mediated isothermal amplification method targeting the lytA gene for detection of streptococcus pneumoniae. J Clin Microbiol 2005;43:1581-6. doi: 10.1128/JCM.43.4.1581-1586.2005

18. Abdeldaim G, Herrmann B, Mölling P, Holmberg H, Blomberg J, Olcén P, et al. Usefulness of real-time PCR for lytA, ply, and Spn9802 on plasma samples for the diagnosis of pneumococcal pneumonia. Clin Microbiol Infect 2010;16:1135-41. doi: 10.1111/j.1469-0691.2009.03069.x

19. Xia Y, Guo XG, Zhou S. Rapid detection of Streptococcus pneumoniae by real-time fluorescence loop-mediated isothermal amplification. J Thorac Dis 2014;6:1193-9. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2014.07.29

20. Kim DW, Kilgore PE, Kim EJ, Kim SA, Anh DD, Dong BQ, et al. The enhanced pneumococcal LAMP assay: a clinical tool for the diagnosis of meningitis due to Streptococcus pneumoniae. PLoS One 2012;7:e42954.

21. Anderson NW. Multicenter clinical evaluation of the illumigene group A streptococcus DNA amplification assay for detection of group A streptococcus from pharyngeal swabs. J Clin Microbiol 2013;51:1474-7.

22. Felsenstein S, Faddoul D, Sposto R, Batoon K, Polanco CM, Dien Bard J. Molecular and clinical diagnosis of group A streptococcal pharyngitis in children. J Clin Microbiol 2014;52:3884-9. doi: 10.1128/JCM.01489-14

23. Zhao X, He X, Li H, Zhao J, Huang S, Liu W, et al. Detection of streptococcus pyogenes using rapid visual molecular assay. FEMS Microbiol Lett 2015;362:fnv148. doi: 10.1093/femsle/fnv148

24. Cao C, Zhang F, Ji M, Pei F, Fan X, Shen H, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of streptococcal pyrogenic exotoxin B. Toxicon 2016;117:53-8. doi: 10.1016/j.toxicon.2016.03.019

Journal of Knowledge & Health 2017; Vol 11, No 4
Shahroud University of Medical Sciences

DOI: 10.22100/jkh.v11i4.1512
Original Article

# Development of LAMP Assay For Molecular Detection of Streptococcus Pyogenes

**Massomeh Masoomikarimi (M.Sc.)[1], Mehdi Mirzaei (Ph.D.)[1], Pirasteh Norouzi (M.Sc.)[1], Mojgan Fazli (M.Sc.)[1], Sanaz Dehbashi (Ph.D.)[2], Davoud Afshar (Ph.D.)[3], Moslem Jafarisani (Ph.D.)[1*]**

1- Dept. of Basic Science, School of Medicine, Shahroud University of Medical Science, Shahroud, Iran.
2- Dept. of Basic Science, School of Medicine, Hamadan University of Medical Science, Hamadan, Iran.
3- Dept. of Basic Science, School of Medicine, Zanjan University of Medical Science, Zanjan, Iran.

**Received:** 10 June 2016**, Accepted:** 10 November 2016

**Abstract:**

***Introduction:*** *Streptococcus pyogenes is the leading cause of suppurative infections and the non suppurative sequela as acute rheumatic fever, acute glomerulonephritis, and reactive arthritis. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay is a rapid and sensitive method to detect bacterial infections. Therefore, we developed a LAMP assay for rapid detetion of S.pyogenes infections based on cytochrome oxidase gene(oxaA).*
***Methods:*** *The LAMP assay was established using six primers targeting cytochrome oxidase gene in S.pyogenes. The performance of assay was evaluated with different concentration of MgSo4, dNTPs and primers.*
***Results:*** *LAMP assay was developed with concentrations of 10 uM from F3, B3, LB ad LF primers, 40 uM of each FIP and BIP primer, 0.4mM of dNTPs and 8mM of MgSo4 at 63°C for 1h.*
***Conclusion:*** *The LAMP assay to detect S.pyogenes is rapid method in comparison to PCR.*

**Keywords:** Streptococcus pyogenes, Loop mediated isothermal amplification assay, Specific detection.

Conflict of Interest: No
***Corresponding author:** M. Jafarisani**, Email:** moslem.jafarisani@gmail.com*

**Citation:** Masoomikarimi M, Mirzaei M, Norouzi P, Fazli M, Dehbashi S, Afshar D, Jafarisani M. Development of LAMP assay for molecular detection of streptococcus pyogenes. Journal of Knowledge & Health 2017;11(4):18-22.