کاربرد تکنیک مولکولی One-step-RT-LAMP در تشخیص ویروس SARS-CoV-2 در نمونه‌های نازوفارنکس جمع‌آوری شده از مراکز درمانی و رفرانس استان تهران

هومن حنیفه پور[1]، شیرزاد فلاحی[2*]، فاطمه اشرفی[3]، الهام سیاسی[3]

۱- دانشجوی دکترا، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

۲- استاد، مرکز تحقیقات هپاتیت، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران

۳- استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

۴- دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

یافته / دوره ۲۶ / شماره ۴ / زمستان ۱۴۰۳ / مسلسل ۱۰۲

چکیده

دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۵/۳ پذیرش مقاله: ۱۴۰۳/۸/۸

مقدمه: تشخیص مولکولی سریع، دقیق و اختصاصی ویروس SARS-CoV-2 در راستای پیشگیری و مبارزه با بیماری کرونا بسیار حائز اهمیت می‌باشد؛ لذا هدف از این تحقیق بررسی ارزش تشخیصی تکنیک مولکولی(Loop-Mediated Isothermal Amplification)LAMP در ارزیابی سریع، کسب نتایج دقیق و کاهش هزینه‌های آزمایش کرونا در مقایسه با دیگر روش‌های مولکولی روتین می‌باشد.

مواد و روش ها: طی این مطالعه مقطعی توصیفی تحلیلی۳۴۲ نمونه نازوفارنکس از مراکز درمانی رفرانس شهر تهران جمع‌آوری شد. در مرحله بعد، استخراج RNA از نمونه‌ها انجام شد. پس از طراحی پرایمر برای ژن N، سنجش RT-LAMP انجام شد. برای تایید نتایج، محصولات LAMP، بر روی ژل آگارز الکتروفورز شدند. همچنین از نظر حساسیت و ویژگی، تکنیک RT-LAMP مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت تجزیه و تحلیل آماری نتایج از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ و آزمون‌های آماری مجذور کای، توافق کاپا و دقیق فیشر استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که ارتباط معناداری بین جنسیت و شدت بیماری وجود دارد (P<۰/۰۰۱)، حال آنکه ارتباط معناداری از نظر متغیر سن وجود نداشت (P<۰/۰۵). از نظر علائم بالینی ارتباط معناداری بین شدت عفونت ویروس با علائم تب، سرفه و سردرد وجود داشت (P<۰/۰۰۱). همچنین از نظر آماری ارتباط معناداری بین بیماری دیابت و شدت بیماری مشاهده شد (P<۰/۰۰۱). از نظر حساسیت و ویژگی تکنیک RT-LAMP، میزان حساسیت در این تکنیک رقت ۱×۱۰۱ و ویژگی ۱۰۰٪ بدست آمد.

بحث و نتیجه‌گیری: تشخیص سریع و به موقع ویروس کرونا بدلیل سرعت سرایت بالای ویروس بسیار حیاتی می‌باشد. لذا نیاز به روش تشخیصی سریع و ارزان و قابل انجام در مکان‌های مختلف و مقرون به صرفه با حساسیت و ویژگی بالا احساس می‌گردد. بر اساس نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر تکنیک RT- LAMP روشی سریع، حساس و مؤثر در تشخیص SARS-CoV-2 می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: SARS-CoV-2 – RT-LAMP – حساسیت و ویژگی.

*آدرس مکاتبه: خرم‌آباد، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، دانشکده پزشکی.

پست الکترونیک: Falahi.sh@lums.ac.ir

مقدمه

کرونا ویروس‌ها ویروس‌های نسبتاً قدیمی هستند که اولین بار در سال ۱۹۳۰ به عنوان ویروس عامل برونشیت عفونی در پرندگان و در سال ۱۹۴۰ به عنوان عامل گاستروانتریت در خوکها شناسایی شدند. این ویروس‌ها از نظر شکل‌شناسی به علت داشتن زوائد سطحی شبیه به تاج خورشیدی (Solar corona)، به نام کروناویروس نام‌گذاری شدند (۱). ویروس SARS-CoV-2 عضو خانواده کروناویریده از راسته نیدوویرال و در جنس بتاکروناویروس‌ها طبقه‌بندی می‌شود. این ویروس جزء ویروس‌های RNA دار پوشش‌دار، سنس مثبت و تک رشته‌ای با قطر ۱۲۰-۸۰ نانومتراست که دارای بزرگترین ژنوم ویروسی (۲۶-۳۳ کیلو باز) در بین ویروس‌های RNA دار می‌باشد (۲،۳). امروزه کروناویروس انسانی به دلیل سرعت بالای تعویض نوکلئوتید ژنومی و نوترکیبی به عنوان یکی از سریعترین ویروس‌های در حال تغییر شناخته می‌شود. ویروس کرونا توانایی آلوده کردن پستانداران و پرندگان از جمله خفاش، موش، خوک، سگ، گاو، مرغ، اسب و همچنین انسان را دارد (۸-۴). کروناویروس انسانی (HCoVs)با بیماری‌های تنفسی متعدد با شدت متفاوت از جمله سرماخوردگی، ذات‌الریه و برونشیت مرتبط می‌باشد. امروزه کروناویروس انسانی به دلیل سرعت بالای تعویض نوکلئوتید ژنومی و نوترکیبی به عنوان یکی از سریعترین ویروس‌های در حال تغییر شناخته می‌شود (۹،۱۰). در اواخر دسامبر سال ۲۰۱۹ یک مورد پنومونی ناشناس در شهر ووهان استان هوبی در چین گزارش شد که مشخصات بالینی آن بسیار شبیه به پنومونی ویروسی بود. منشاء اولیه این ویروس ظاهرا به بازارچه ساحلی بر می‌گردد که غذاهای دریایی و سایر حیوانات به صورت خام و غیربهداشتی به فروش می‌رسیدند (۱۰). روش‌های تشخیص این ویروس شامل روش‌های مورفولوژیک، سرولوژیک و مولکولی می‌باشد. در روش تشخیص مرفولوژیک از میکروسکپ الکترونی استفاده می‌شود ولی چون این نوع میکروسکپ در همه آزمایشگاهها بدلیل هزینه بالا و احتیاج به نیروی متخصص، یافت نمی‌شود لذا روش تشخیصی روتینی نمی‌باشد. در روش تشخیص سرولوژیک، برمبنای شناخت آنتی‌بادی و آنتی‌ژن می‌باشد که این نوع تست علی‌رغم اینکه در ابتدای شیوع بیماری مورد استفاده و استقبال قرار گرفت، ولی بدلیل تغییرات و موتاسیون‌هایی که در پروتئین سطحی ویروس رخ داد، باعث شد ساختار آنتی‌ژنی ویروس مدام در حال تغییر باشد و متعاقب آن آنتی‌بادی تولید شده متفاوت خواهد بود که این مسئله موجب شد دقت و حساسیت این نوع تست‌ها بسیار کم شده و باعث به دست آمدن جوابهای کاذب شود لذا پیشنهاد سازمان بهداشت جهانی استفاده از روش‌های مولکولی برای تشخیص می‌باشد. تشخیص سریع و به موقع ویروس کرونا بدلیل سرعت سرایت بالای ویروس بسیار حیاتی می‌باشد لذا نیاز به روش تشخیصی مولکولی سریع و ارزان و قابل انجام در مکان‌های مختلف و مقرون به صرفه با حساسیت و ویژگی بالا می‌باشد (۱۱). تکنیک LAMP یکی از روش‌های تشخیص مولکولی می‌باشد که در سال ۲۰۰۰ برای اولین بار توسط نوتومی و همکارانش بهینه گردید و از آن زمان مطالعاتی در ارتباط با کاربرد این تکنیک صورت گرفته است (۱۲). از این تکنیک برای تشخیص بسیاری از پاتوژن‌ها مانند هرپس سیمپلکس ویروس، آنفلانزا، هپاتیت B و دیگر پاتوژن‌ها در مطالعات مختلف استفاده شده است (۱۵-۱۳). یکی از رایج‌ترین روش‌های تشخیص مولکولی SARS-CoV-2 تکنیک Real-time PCR می‌باشدکه علی‌رغم حساسیت و دقت نسبی بالایی که دارد به دلیل نیاز به تجهیزات پیشرفته امکان استفاده عمومی از آن در تمامی مراکز تشخیصی فراهم نشده و محدود به مراکز خاص و معدودی شده است لذا تکنیک LAMP که یکی از روش‌های تشخیصی مولکولی سریع و قابل اعتماد می‌باشد برخلاف تکنیک Real-time PCR، نیازی به دستگاههای گران قیمت ندارد و این تکنیک قابل استفاده در مناطقی با امکانات محدود می‌باشد (۱۶). با

توجه به مطالعات متعددی که توسط محققین انجام شده است، نشان می‌دهد که تکنولوژی LAMP از نظر شناسایی و تشخیص عفونت SARS-CoV-2 در نمونه‌های بالینی بیماران بسیار موفقیت‌آمیز بوده است (۲۲-۱۷). لذا هدف از این تحقیق بررسی ارزش تشخیصی روش مولکولی LAMP در تشخیص افراد مبتلا به SARS-CoV-2 می‌باشد که در نهایت می‌تواند باعث افزایش سرعت جوابدهی و کاهش هزینه‌های تشخیصی می‌گردد.

مواد و روش‌ها

نحوه نمونه‌گیری، آماده سازی و نگهداری نمونه

این پژوهش از نوع مطالعه مقطعی توصیفی تحلیلی می‌باشد که در ابتدا قبل از نمونه‌گیری اهداف طرح برای بیماران مراجعه کننده تشریح شده و در صورت موافقت آنان با شرکت در مطالعه ضمن اخذ رضایت‌نامه کتبی آگاهانه اقدام به تکمیل پرسشنامه و جمع‌آوری نمونه شد. در کل ۳۴۲ نمونه از مراکز درمانی رفرانس شهر تهران پس از هماهنگی‌های لازم و کسب رضایت‌نامه کتبی از افراد مشکوک مراجعه کننده، نمونه نازوفارنکس با استفاده از سواب مخصوص استریل (Dacron tipped) گرفته و بلافاصله در محیط انتقالی مناسب (VTM) منتقل شد که کلیه نمونه‌ها با حفظ زنجیره سرد و رعایت پروتکل‌های حمل و ارسال نمونه به آزمایشگاه مرکز تحقیقات CBC، انتقال داده شد. نمونه‌های انتقال داده شده به آزمایشگاه، بلافاصله در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراید قرار داده شد.

استخراج RNA ویروس

پس از ثبت مشخصات نمونه‌ها، استخراج RNA با استفاده از کیت استخراج استاندارد Mini kit Invitrogen. USA، و مورد تایید مراجع بهداشتی، براساس پروتوکل شرکت سازنده انجام شد و جهت اقدامات بعدی جهت جلوگیری از تخریب RNAهای استخراج شده در دمای ۷۰- ذخیره شد. جهت تعیین خلوص و میزان RNA استخراج شده از روش نانودراپ جهت اندازه‌گیری غلظت نوری (NanoDrop 2000c, Termo Fisher Scientifc, USA) استفاده شد. خلوص RNA براساس نسبت ۲۸۰/۲۶۰ ~ ۲/۰ بود، که کافی و قابل قبول در نظر گرفته شد.

طراحی پرایمرهای تکنیک RT-LAMP

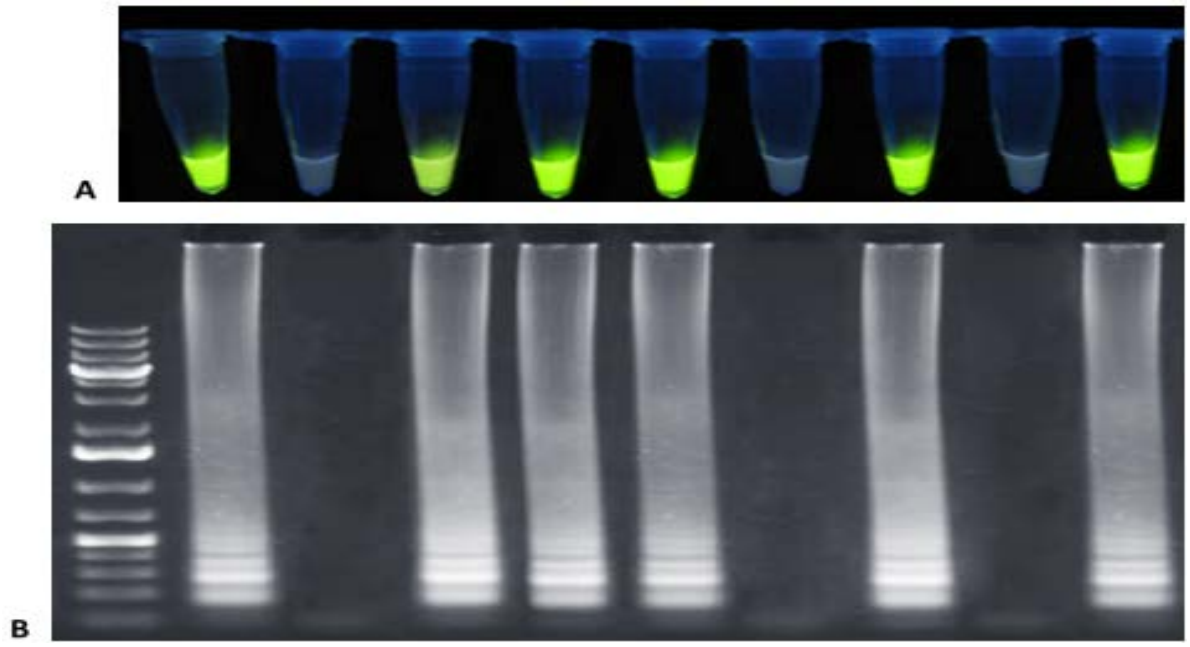
پرایمرهای LAMP جهت ژن نوکلئوکپسید (N) با شماره دسترسی NC_۰۴۵۵۱۲/۲ در NCBI طراحی شد. برای طراحی ست ۶ تایی پرایمر از نرم‌افزار Primer explorer ۵ V. استفاده شد (https://primerexplorer.jp/e/) که شامل یک جفت پرایمر خارجی (F۳، B۳)، یک جفت پرایمر داخلی (FIP و BIP) و یک جفت پرایمر لوپ (LF و LB) می‌باشند که ۸ منطقه را روی سکانس هدف شناسایی می‌کند (جدول۱). در مرحله بعد برای بررسی اختصاصیت پرایمر ویروس SARS-CoV-2، از روش BLAST-Primer در NCBI و نرم‌افزار QIAGEN CLC Genomics workbench 8.5 استفاده شد.

جدول۱. پرایمرهای طراحی شده با نرم‌افزار Primer explorer V.۵

نام پرایمر در موقعیت NC_۰۴۵۵۱۲/۲	(۳´–۵´) سکانس	طول پرایمر(nt)
۳F	GCCATAGGCTTCTACGTC	۱۸
۳B	TTGCTCTCAGGCTGGATCAG	۲۰
FIP	TGCGTACTGCTGCCTGGA - CGCTGACACGCCTCATCTG	۱۹ F2= ۱۸F1C=
BIP	TCTCCAGGTAGTATGCTTGGC - ATGTGTCAAGCAGCAGTATG	۲۰ B2= ۲۱B1C =
LF	TGTTCCGACTACCAGATGAGC	۲۱
LB	ATGATGGTGATGCAGCTGTG	۲۰

انجام تکنیکRT-LAMP

سنجش LAMP یک مرحله‌ای در مخلوط واکنش ۲۵ میکرولیتری حاوی ۵ pmol از پرایمرهای خارجیF۳ و B۳، ۴۰ pmol از پرایمرهای داخلی FIP و BIP و ۲۰ pmol از هر پرایمر LF وLB، انجام شد. ۱ میکرولیتر از Bst DNA پلیمراز ۳ (New England USA)، نسخه جدیدی از آنزیم کلیدی واکنشLAMP، ۲/۵ میکرولیتر بافر [۲۰ میلی مولارTris-HCl ، ۸ میلی‌مولار MgSO۴، ۱۰ میلی‌مولار سولفات آمونیوم ، ۰/۱ درصد توئین ۲۰]، ۱۰ میلی‌مولار KCl، ۰/۸ مولار بتائین (sigma aldrich)، ۱/۴ میلی‌مولار دئوکسی نوکلئوزید تری فسفات (dNTPs) و ۱ میکرولیتر RNA ژنومی سویه استاندارد دلتا و آب مقطر به ترتیب به عنوان کنترل مثبت و منفی در هر اجرا استفاده شد. مخلوط واکنش در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه با استفاده از بن‌ماری دیجیتال انکوبه شد، سپس واکنش با انکوباسیون ۲ دقیقه‌ای در ۸۰ درجه سانتی‌گراد غیرفعال شد. در پایان، تشخیص آمپلیکون‌های حاصل، ۳ میکرولیتر از EVA Green با رقت ۱:۱۰ Invitrogen (Carlsbad, USA)، به لوله‌های واکنش اضافه شد. محلول در حضور محصولات تقویت کننده LAMP سبز شد، در حالی که در غیاب آمپلیکون حالت بی‌رنگ را حفظ کرد. برای تایید نتایج، ۱۰ میکرولیتر از محصولات LAMPبر روی ژل آگارز ۱/۵درصد Biowest (spain) Agarose و رنگ‌آمیزی شده با DNA-Safe (شرکت ندای‌فان، ایران)، الکتروفورز شد.



شکل۱. A. نمونه مثبت (به رنگ سبز) و منفی (بی‌رنگ) B. نمونه مثبت و منفی روی ژل آگاروز

از نظر حساسیت در تکنیک RT-LAMP در شناسایی ویروس SARS-CoV-2 بصورت تریپلیکیت انجام شد که ۱۰ فولد سریال دایلوشن از RNA با غلظت‌های مختلف 10^{-2} تا 10^{+7} جهت بررسی حساسیت تست تهیه شد. صحت نتایج با بررسی محصولات واکنش LAMP از طریق الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ تایید شد. برای بررسی ویژگی تکنیک LAMP یک مرحله‌ای، الگوهای مختلفی از جمله ویروس آنفولانزایA، ویروس آنفلوانزا B، ویروس سنسیشیال تنفسی، آدنوویروس، E.coli و Toxoplasma gondii مورد ارزیابی قرار گرفتند.

کلیه اطلاعات به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS.ver.۲۲ و آزمون‌های آماری مجذور کای، توافق کاپا و دقیق فیشر، تجزیه وتحلیل شد.

یافته‌ها

در این مطالعه، تعداد ۳۴۲ فرد مشکوک به عفونت ویروس کرونا، که به مراکز مرجع تشخیص کووید-۱۹ در تهران مراجعه کرده بودند، وارد مطالعه شدند که از این تعداد ۷۴ نفر (۶/ ۲۱٪) زن و ۲۶۸ نفر (۷۸/۳ ٪) مرد بودند. دامنه تغییرات سنی از ۱ تا ۹۰ سال متغیر و میانگین سنی شرکت کنندگان در مطالعه ۱۷/۲۳±۳۷/۶۸ سال بود. با توجه به نتایج بدست آمده، افراد زیر سن ۱۸ سال (۳۵)۱۰/۲ ٪ ، بین سنین ۱۹-۶۴ سال (۲۵۶)۷۴/۸ ٪ و افراد بالای ۶۵ سال (۵۱)۱۴/۹ ٪ بوده است. از نظر متغیر جنسیت، فراوانی مردان مبتلا (۲۷/۲ ٪)۷۳ و زنان مبتلا (۲۸/۳ ٪)۲۱ بدست آمد. نتایج نمونه‌های بالینی در روش RT-LAMP تک مرحله‌ای جهت تشخیص بیماری در افراد مشکوک به SARS-CoV-2، به تعداد ۹۴ نفر (۷۳ نفر مرد و ۲۱ نفر زن) مثبت گزارش شد.

جدول۲. خصوصیات دموگرافیک بیماران مشکوک به SARS-CoV-2

نام متغییر	رده	تعداد (درصد)
جنس	مرد	۲۶۸ (۷۸/۳)
	زن	۷۴ (۲۱/۶)
گروه های	≤۱۸	۳۵ (۱۰/۲)
سنی	۱۹-۶۴	۲۵۶ (۷۴/۸)
	≥ ۶۵	۵۱ (۱۴/۹)
علائم بالینی	تب	۴۶ (۱۳/۴)
	بدن درد	۱۶ (۴/۶)
	سردرد	۲۲ (۶/۴)
	گلودرد	۱۹ (۵/۵)
	سرفه	۲۹ (۸/۴)
	از دست دادن حس چشایی و بویایی	۲۱ (۶/۱)
	اسهال و استفراغ	۶ (۱/۷)
	تنگی نفس	۱۵ (۴/۳)
	بدون علائم	۱۶۸ (۴۹/۱)
بیماری‌های زمینه‌ای	دیابت	۳۹ (۱۱/۴)
	بیماری‌های قلبی و عروقی	۱۶ (۴/۶)
	بیماری‌های کلیوی	۱۲ (۳/۵)
	بیماری‌های ریوی	۱۴ (۴)
	سرطان	۳ (۰/۸)
	بدون بیماری‌های زمینه‌ای	۲۵۸ (۷۵/۴)

جهت بررسی ارتباط بین متغیرهای زمینه‌ای و شدت بیماری از آزمون‌های مجذور کای و دقیق فیشر استفاده شد. براساس نتایج این تحقیق، بین متغیر سن افراد شرکت کننده و شدت عفونت SARS-CoV-2 ارتباط معناداری وجود نداشت (P>۰/۰۵) ؛ در حالی که از نظر متغیر جنسیت، ارتباط معناداری بین این متغیر و شدت عفونت در مردان وجود داشت (P<۰/۰۰۱). صحت نتایج محصولات واکنش LAMP از طریق الکتروفورز بر روی ژل‌آگارز ۱/۵٪ و با استفاده از سیستم ژل‌داک تایید شد (شکل۱). میزان حساسیت در این تکنیک رقت ۱۰۱×۱ در هر واکنش در هر سه کارآزمایی تعیین شد. با توجه به اینکه از ۳ جفت پرایمر داخلی، خارجی و لوپ در تست LAMP استفاده شد، لذا در تشخیص ویروس SARS-CoV-2 کاملا اختصاصی عمل کرده به گونه‌ای که میکروارگانیسم‌های دیگر به جز SARS-CoV-2 شناسایی نشد که با توجه به نتایج، ویژگی ۱۰۰٪ گزارش شد. همچنین براساس پروتکل LAMP یک مرحله‌ای بهینه شده، نتایج ثابتی را در تمام نمونه‌های بالینی مثبت و منفی از بیماران نشان داد، به نحوی که کنترل‌های مثبت به طور مداوم نتایج مثبتی ایجاد کردند، در حالیکه الگوهای غیر SARS-CoV-2 و کنترل‌های منفی بطور مداوم نتایج منفی ایجاد کردند، که نشان می‌دهد این سنجش، دارای ویژگی ۱۰۰٪ است. براساس ضریب کاپا کوهن توافق بین دو آزمایش در نمونه‌های نازوفارنکس ۹۴ درصد بود. لازم به ذکر است که این توافق از نظر آماری معنادار بود (P<۰/۰۰۱) (جدول ۳).

جدول ۳. نتایج میزان توافق دو تکنیک RT-qPCR یک مرحله‌ای و LAMP یک مرحله‌ای در تشخیص SARS-CoV-2

			One-Step RT-qPCR-نازوفارنکس		کل
			مثبت	منفی	
One-Step LAMP نازوفارنکس	منفی	تعداد	۰	۲۴۸	۲۴۸
		درصد	۰	۷۲/۵	۷۲/ ۵
	مثبت	تعداد	۹۳	۱	۹۴
		درصد	۲۷/۱۹	۰/۲	۲۷/۴
	کل	تعداد	۹۳	۲۴۹	۳۴۲
		درصد	۲۷/۱۹	۷۲/۷۱	۱۰۰

بحث و نتیجه‌گیری

تکنیک LAMP یکی از روش‌های تشخیص مولکولی است که برای اولین بار در سال ۲۰۰۰ توسط Notomi و همکارانش بهینه‌سازی شد و از آن زمان مطالعات گوناگونی در رابطه با کاربردهای این تکنیک انجام شده است (۱۲). این تکنیک برای شناسایی بسیاری از پاتوژن‌ها مانند ویروس هرپس سیمپلکس، آنفولانزا، تک‌یاخته‌ها، قارچها و سایر عوامل بیماریزا در مطالعات مختلف مورد استفاده قرار گرفته است (۱۳، ۱۵). تکنیک Real-time PCR یکی از رایج‌ترین روشهای تشخیص مولکولی برای SARS-CoV-2 است. اگرچه نسبتاً حساس و دقیق است، اما بسیاری از مراکز تشخیصی فاقد تجهیزات پیشرفته مورد نیاز برای استفاده از آن می‌باشند. در نتیجه استفاده از آن به مراکز تخصصی محدود می‌شود. بنابراین، روش LAMP، یک روش تشخیص مولکولی سریع و قابل اعتماد، در حال محبوبیت است. برخلاف تکنیک Real-time PCR، این روش نیازی به تجهیزات گران قیمت ندارد و می‌توان از این تکنیک در مناطقی با امکانات محدود استفاده کرد (۱۶). با توجه به مطالعات و تحقیقات بسیاری در سطح دنیا، تکنیک LAMP، یک تکنیک تقویت هم‌دما، ساده، سریع و حساس می‌باشد که موفقیت‌های بزرگی را در شناسایی و تشخیص عفونت SARS-CoV-2 در نمونه‌های بالینی بیماران نشان داده است (۱۹، ۲۰). در این مطالعه از ۳ جفت پرایمر دقیق برای شناسایی ژن N استفاده شد. ژن N، در میان انواع مختلف ویروس کرونا بسیار حفظ شده است. این بدان معنی است که تغییرات ژنتیکی در این ژن نسبت به سایر بخش‌های ژنوم ویروس کمتر است. در نتیجه، طراحی پرایمر و پروب برای تشخیص این ژن به صورت دقیق‌تر و حساس‌تر امکان‌پذیر است. همچنین ژن N در هر ویروس کرونا به تعداد بسیار زیادی تکرار می‌شود. این فراوانی بالا، باعث می‌شود که تشخیص این ژن با استفاده از روش‌های مولکولی بسیار حساس‌تر شود. با توجه به مطالعات انجام شده، پروتئین N نقش مهمی در بسته‌بندی ژنوم ویروس و تشکیل کپسید ویروسی دارد، لذا این پروتئین به طور مستقیم با RNA ویروسی برهمکنش می‌کند و برای تکثیر و عفونت‌زایی ویروس ضروری است. بنابراین، تشخیص این پروتئین می‌تواند به عنوان یک نشانگر قوی برای وجود ویروس در نمونه باشد و باعث می‌شود به دلیل فراوانی بالا و حفظ‌شدگی ژن N، آزمایش‌هایی که بر اساس این ژن طراحی شده‌اند، حساسیت و اختصاصیت تشخیصی بسیار بالایی داشته باشند و احتمال واکنش‌های متقاطع با سایر ویروس‌ها یا مواد ژنتیکی میزبان را کاهش دهند. لذا، ژن نوکلئوکپسید (N) اغلب در آزمایش‌های تشخیص مولکولی عفونت‌های ویروسی، از جمله ویروس SARS-CoV-2 به تایید وجود ویروس در نمونه بیمار و کمک به تشخیص عفونت، گنجانده می‌شود. در این مطالعه نشان داده شد که تکنیک One-Step LAMP

توانست به میزان ۱۰^۱ کپی از RNA استاندارد از ویروس SARS-CoV-2 را شناسایی کند که نشان دهنده میزان حساسیت بالای این تکنیک می‌باشد که نتایج این تحقیق با مطالعه خانی‌زاده و همکاران مطابقت داشت (۲۳). در این مطالعه ارتباط معنی‌داری بین متغیر سن با عفونت SARS-CoV-2 مشاهده نشد که نتایج در مطالعه حاضر با نتایج در مطالعات خانی‌زاده و همکارانش (۲۳) و نتایج مطالعه نووساد و همکارانش مطابقت داشت (۲۴). در حالیکه در مطالعه سو و همکارانش ارتباط معنی‌داری بین متغیر سن با عفونت SARS-CoV-2 دیده شد (۲۵). همچنین از نظر متغیر جنسیت در مطالعه حاضر، اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ($P<۰/۰۰۱$) که شیوع عفونت در مردان بیشتر از زنان گزارش شد که علت این اختلاف معنی‌دار را می‌توان به علل مختلف ژنتیکی، فیزیولوژیکی و هورمونی در زنان و مردان دانست. نتایج در مطالعه حاضر از نظر جنسیت، مطابق با نتایج در مطالعه پاسکو و همکارانش بود (۲۶). براساس آزمون کاپا کوهن، میزان توافق بین تست‌های LAMP و RT-qPCR در نمونه نازوفارنکس ۹۴٪ بود (به ترتیب ۲۷/۴٪ و ۲۷/۱٪ مثبت). نتایج با مطالعه خانی‌زاده و همکاران (۲۳) از نظر تطابق بین دو تکنیک مطابقت داشت که نشان‌دهنده دقت بالا و قابل اعتماد بودن نتایج تکنیک LAMP یک مرحله‌ای در مقایسه با تکنیک تک مرحله‌ای RT-qPCR می‌باشد. با توجه به محدودیت‌های طرح تحقیقاتی، هیچ تست اختصاصی برای SARS-CoV و Mers-Coronavirus به دلیل دسترسی محدود انجام نشد.

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج در مطالعه حاضر، تکنیک One-step LAMP روشی سریع و مؤثر برای تشخیص SARS-CoV-2 درافراد مشکوک به عفونت، به ویژه در کشورهای با منابع محدود یا توسعه نیافته می‌تواند بسیار مفید باشد. این تکنیک مزایایی نسبت به تکنیک‌های دیگر مانند RT-qPCR دارد که شامل سادگی، مقرون به صرفه بودن، حساسیت و ویژگی آن می‌باشد. در نتیجه، تکنیک LAMP دارای پتانسیل قابل توجهی به عنوان یک ابزار تشخیصی ارزشمند برای کنترل شیوع بیماری، اطمینان از درمان به موقع، و حفاظت از سلامت عمومی، به ویژه در محیط‌های کم منابع می‌باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از کلیه کارکنان مرکز تحقیقات زیست پزشکی و سرطان (CBC)، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال و شرکت دارویی دلتا به دلیل همکاری محبت‌آمیز در جمع‌آوری نمونه‌های بالینی و مشارکت در پژوهش قدردانی می‌نمایند.

مشارکت های نویسندگان

هومن حنیفه پور: مفهوم‌سازی، بررسی، نگارش - بررسی و ویرایش. فاطمه اشرفی: تحقیق، روش‌شناسی، نگارش - بررسی و ویرایش. الهام سیاسی: مفهوم‌سازی، روش‌شناسی، بررسی، نگارش - بررسی و ویرایش. شیرزاد فلاحی: مفهوم‌سازی، روش‌شناسی، بررسی، نگارش- پیش‌نویس اصلی، نگارش- بررسی و ویرایش، نظارت.

حمایت مالی

این مطالعه با حمایت مالی شرکت داروسازی دلتا و دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال انجام شد.

ملاحظات اخلاقی

کد اخلاق (IR.IAU.TNB.REC.1401.042) درمطالعه حاضر، توسط دانشگاه آزاد واحد تهران شمال ثبت و تایید شد. در این مطالعه طبق اصول اخلاقی از بیماران رضایت‌نامه کتبی آگاهانه اخذ و پرسشنامه تکمیل و در نهایت نمونه‌ها جمع‌آوری شد. همچنین نتایج تحقیق نزد مجری طرح به صورت محرمانه نگهداری خواهد شد.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ منافع مالی یا روابط شخصی شناخته شده‌ای ندارند که برکارگزارش شده

در این مقاله تأثیر بگـذارد. همچنـین در رابطـه بـا انتشـار مقاله ارائه شده بـه طـور کامـل از اخـلاق نشـر، از جملـه سرقت ادبی، سوء رفتار، جعل داده‌ها و یا ارسـال و انتشـار دوگانه، پرهیز شده است و منـافعی تجـاری در ایـن راسـتا وجود ندارد.

References

1. Fung TS, Liu DX. Human Coronavirus: Host-Pathogen Interaction. Annual review of microbiology. 2019;73:529-57. https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-115759
2. Feikin DR, Alraddadi B, Qutub M, Shabouni O, Curns A, Oboho IK, et al. Association of Higher MERS-CoV Virus Load with Severe Disease and Death, Saudi Arabia, 2014. Emerging infectious diseases. 2015;21(11):2029-35. https://doi.org/10.3201/eid2111.150764
3. Yang X, Yu Y, Xu J, Shu H, Liu H, Wu Y, et al. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China: a single-centered, retrospective, observational study. The lancet respiratory medicine. 2020;8(5):475-81. https://doi.org/ doi: 10.1016/S2213-2600(20)30079-5.
4. Wang L, Wang Y, Ye D, Liu Q. Review of the 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) based on current evidence. Int J Antimicrob Agents. 2020;55(6):105948. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105948
5. Xu X, Chen P, Wang J, Feng J, Zhou H, Li X, et al. Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission. Science China Life sciences. 2020;63(3):457-60. https://doi.org/ 10.1007/s11427-020-1637-5
6. Drosten C, Günther S, Preiser W, van der Werf S, Brodt HR, Becker S, et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. The New England journal of medicine. 2003;348(20):1967-76. https://doi.org/10.1056/NEJMoa030747
7. Maier HJ, Bickerton E, Britton P. Preface. Coronaviruses. Methods in molecular biology (Clifton, NJ). 2015;1282:v. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2438-7
8. Woo PCY, Huang Y, Lau SKP, Yuen KY. Coronavirus genomics and bioinformatics analysis. Viruses. 2010;2(8):1804-20. https://doi.org/ 10.3390/v2081803
9. Banerjee A, Kulcsar K, Misra V, Frieman M, Mossman K. Bats and coronaviruses. Viruses. 2019;11(1):41. https://doi.org/ 10.3390/v11010041
10. Zhang SF, Tuo JL, Huang XB, Zhu X, Zhang DM, Zhou K, et al. Epidemiology characteristics of human coronaviruses in patients with respiratory infection symptoms and phylogenetic analysis of HCoV-OC43 during 2010-2015 in Guangzhou. PLoS One. 2018;13(1):e0191789. https://doi.org/ 10.1371/journal.pone.0191789
11. Wang W, Xu Y, Gao R, Lu R, Han K, Wu G, et al. Detection of SARS-CoV-2 in different types of clinical specimens. Jama. 2020;323(18):1843-4.
12. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic acids research. 2000;28(12):E63.

13. Ahn SJ, Baek YH, Lloren KKS, Choi WS, Jeong JH, Antigua KJC, et al. Rapid and simple colorimetric detection of multiple influenza viruses infecting humans using a reverse transcriptional loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) diagnostic platform. BMC infectious diseases. 2019;19(1):676.
14. Vanhomwegen J, Kwasiborski A, Diop A, Boizeau L, Hoinard D, Vray M, et al. Development and clinical validation of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay to diagnose high HBV DNA levels in resource-limited settings. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2021;27(12):1858.e9-.e15.
15. Vergara A, Vendrell R, Alejo-Cancho I, Rodríguez C, Vila J, Marcos MA. Rapid detection of herpes simplex virus-1 from bronchoalveolar lavage fluids using loop-mediated isothermal amplification (LAMP). Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (English Edition). 2019;37(5):353-4.
16. Lamb LE, Bartolone SN, Ward E, Chancellor MB. Rapid detection of novel coronavirus/Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. PloS one. 2020;15(6):e0234682.
17. Park G-S, Ku K, Baek S-H, Kim S-J, Kim SI, Kim B-T, et al. Development of Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Assays Targeting Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). The Journal of Molecular Diagnostics. 2020;22(6):729-35.
18. Lu R, Wu X, Wan Z, Li Y, Jin X, Zhang C. A Novel Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Rapid Detection of SARS-CoV-2. International journal of molecular sciences. 2020;21(8).
19. Yan C, Cui J, Huang L, Du B, Chen L, Xue G, et al. Rapid and visual detection of 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) by a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2020;26(6):773-9.
20. Fowler VL, Armson B, Gonzales JL, Wise EL, Howson ELA, Vincent-Mistiaen Z, et al. A highly effective reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay for the rapid detection of SARS-CoV-2 infection. The Journal of infection. 2021;82(1):117-25.
21. Zhu X, Wang X, Han L, Chen T, Wang L, Li H, et al. Multiplex reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with nanoparticle-based lateral flow biosensor for the diagnosis of COVID-19. Biosensors & bioelectronics. 2020;166:112437.
22. Bokelmann L, Nickel O, Maricic T, Pääbo S, Meyer M, Borte S, et al. Point-of-care bulk testing for SARS-CoV-2 by

combining hybridization capture with improved colorimetric LAMP. Nature Communications. 2021;12(1):1467.
23. Khanizadeh S, Malekshahi A, Hanifehpour H, Birjandi M, Fallahi S. Rapid, sensitive, and specific detection of SARS-CoV-2 in nasopharyngeal swab samples of suspected patients using a novel one-step loop-mediated isothermal amplification (one-step LAMP) technique. BMC Microbiology. 2023;23(1):63.
24. Novosad P, Jain R, Campion A, Asher S. COVID-19 mortality effects of underlying health conditions in India: a modelling study. BMJ open. 2020;10(12):e043165.
25. Xu B, Gutierrez B, Mekaru S, Sewalk K, Goodwin L, Loskill A, et al. Epidemiological data from the COVID-19 outbreak, real-time case information. Scientific data. 2020;7(1):106.
26. Paschou SA, Psaltopoulou T, Halvatsiotis P, Raptis A, Vlachopoulos CV, Dimopoulos M-A. Gender differences in COVID-19. Maturitas. 2022;161:72.
27. Shi Q, Zhang X, Jiang F, Zhang X, Hu N, Bimu C, et al. Clinical Characteristics and Risk Factors for Mortality of COVID-19 Patients With Diabetes in Wuhan, China: A Two-Center, Retrospective Study. Diabetes care. 2020;43(7):1382-91.
28. Sarker A, Lakamana S, Hogg-Bremer W, Xie A, Al-Garadi MA, Yang Y-C. Self-reported COVID-19 symptoms on Twitter: an analysis and a research resource. Journal of the American Medical Informatics Association. 2020;27(8):1310-5.

Application of One-step-RT-LAMP molecular technique in SARS-CoV-2 virus detection in nasopharyngeal samples collected from medical and reference centers of Tehran province

Hanifehpour H[1], Fallahi Sh[2*], Ashrafi F[1], Siasi E[1]

1. Ph.D. Student, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2. Professor, Hepatitis Research Center, School of Medicine, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran, Falahi.sh@lums.ac.ir

3. Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

4. Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received: *2024/7/24* Accepted: *2024/10/29*

Abstract

Background: Rapid, accurate, and specific molecular diagnosis of SARS-CoV-2 virus is essential to prevent and fight against corona disease, therefore, the purpose of this research is to investigate the diagnostic value of LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) molecular technique in rapid evaluation and obtaining accurate results and reducing the costs of corona testing compared to other routine molecular methods.

Materials and Methods: The results showed, 342 nasopharyngeal samples were collected from reference medical centers in Tehran. In the next step, RNA was extracted from the samples. After designing the primer for the N gene, an RT-LAMP assay was performed. To confirm the results, LAMP products were electrophoresed on agarose gel. Also, the RT-LAMP technique was evaluated in terms of sensitivity and specificity. SPSS version 22 software was used for statistical analysis of the results.

Results: In the present study, the statistical analysis of the data showed that there is a significant difference between the gender variable and the severity of the disease (P>0.001, while there was no significant difference in terms of the age variable (P>0.05). In terms of clinical symptoms, the relationship There was a substantial difference between the severity of the virus infection with the symptoms of fever, cough and headache (P>0.001. Also, statistically, a significant difference was observed between diabetes and the severity of the disease (P>0.001) in terms of the sensitivity and specificity of the RT-LAMP technique., the sensitivity of this dilution technique was 101x1 and the specificity was 100%.

Conclusion: Fast and timely diagnosis of the Corona virus is very important due to the high rate of spread of the virus. Therefore, there is a need for a fast and cheap diagnostic method that can be

performed in different places and is affordable with high sensitivity and specificity. Based on the results obtained from the present study, the RT-LAMP technique is a fast, sensitive, and effective method for diagnosing SARS-CoV-2.

Keywords: SARS-CoV-2 – RT-LAMP – Sensitivity & Specificity.

Citation: Hanifehpour H, Fallahi Sh, Ashrafi F, Siasi E. Application of One-step-RT-LAMP molecular technique in SARS-CoV-2 virus detection in nasopharyngeal samples collected from medical and reference centers of Tehran province. Yafte. 2024; 26(4):13-25.