

تشخیص سریع کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکولوزیس توسط تکنیک تکثیر هم دما به واسطه حلقه

لیلا کهن^۱، محمد حسن شاه حسینی^۲، محمد رضا رضوی^۳، کاظم پریور^۴، الهام مسلمی^۵

^۱ دانشجوی دکترای زیست شناسی سلوی و مولکولی، بخش زیست شناسی، عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ارسنجان

^۲ استادیار، دکترای فراورده های بیولوژیک، بخش میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرقدس

^۳ استادیار، دکترای بیولوژی مولکولی، بخش تحقیقات ریوی، انتیتو پاستور ایران

^۴ استاد، دکترای زیست شناسی سلوی تکوینی، بخش زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

^۵ استادیار، دکترای زیست شناسی سلوی و مولکولی، بخش زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قیام دشت

چکیده

سابقه و هدف: تشخیص دقیق و سریع، یکی از مسائل مهم در کنترل بیماری سل می باشد. تکثیر هم دما به واسطه حلقه (LAMP)، تکنیکی ساده و سریع برای تکثیر اسید نوکلئیک است. در این مطالعه، به بررسی تکنیک LAMP پایه گذاری شده بر اساس توالی ژنی IS6110 در تشخیص مایکوباکتریوم توبرکولوزیس (MTB) پرداخته شد.

روش بوردی: تعداد ۱۵۵ نمونه خلط از بیماران مشکوک به سل جمع اوری شد. ۶ پرایمر اختصاصی برای تکنیک LAMP طراحی گردید و واکنش LAMP تحت شرایط بهینه انجام شد. حساسیت و ویژگی تکنیک LAMP جهت تشخیص کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکولوزیس مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: واکنش LAMP در دمای ۶۶ درجه سانتی گراد و مدت زمان ۶۰ دقیقه با موفقیت انجام شد. محدودیت تشخیصی LAMP ۵ از DNA معادل یک کپی از ژنوم مایکوباکتریوم توبرکولوزیس بود. حساسیت و ویژگی این روش در نمونه های بالینی به ترتیب ۱۰۰٪ و ۹۵٪ محاسبه گردید.

نتیجه گیری: تکنیک LAMP روشی سریع، حساس و کم هزینه برای تشخیص مایکوباکتریوم توبرکولوزیس می باشد که می توان از آن به طور روتینی در مراکز تشخیص سل استفاده کرد.

واژگان کلیدی: کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکولوزیس، تشخیص سریع، تکنیک PCR، تکنیک LAMP

مقدمه

تعداد افراد آلوده اضافه می شود و بیش از ۱/۷ میلیون نفر جان خود را در اثر این بیماری از دست می دهند (۲). تشخیص سریع عفونت مایکوباکتریوم توبرکولوزیس (MTB) در نمونه های بالینی، نقش به سزاگی در کنترل بیماری دارد (۳). روش های سنتی تشخیص سل، پیچیده و زمان بر بوده و فاقد حساسیت و ویژگی کافی می باشند (۱). در حال حاضر، تهیه اسمیر زیل نلسون (Ziehl-Neelsen) و کشت باکتری از روش های تشخیصی روتین در آزمایشگاه ها می باشد. روش تهیه اسمیر علی رغم سادگی و کم هزینه بودن، به تعداد زیادی باکتری (تقریباً ۱۰^۴ باسیل اسید

سل یکی از قدیمی ترین بیماری های عفونی شناخته شده است که با وجود پیشرفت هایی که در ارتباط با پیشگیری و درمان آن صورت گرفته، هنوز به عنوان یکی از معضلات اصلی جهان محسوب می شود (۱). سالانه تقریباً ۹ میلیون مورد جدید به

حساس، اختصاصی و در عین حال کم هزینه برای تشخیص دقیق این پاتوژن، تحقیق حاضر به راه اندازی این تکنیک برای تشخیص MTB و بررسی قدرت تشخیصی آن می‌پردازد.

مواد و روشها

تعداد ۱۵۵ نمونه خلط افراد مشکوک به سل رویی از بخش تحقیقات سل مرکز بهداشت انقلاب شیراز، تهیه شد. نمونه‌های خلط با روش استاندارد هموژنیزاسیون و آلودگی زدایی گردید (۱۱). پس از آن، مقداری از هر نمونه جهت بررسی‌های میکروسکوپی، کشت و استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفت. رنگ‌آمیزی و تهیه اسمیر به روش زیل-نلسون و کشت استخراج DNA از نمونه‌های خلط توسط کیت استخراج DNA (DNG) کیت سیناژن) صورت گرفت.

پرایمر مورد استفاده در واکنش LAMP، بر اساس توالی ژنی (GenBank accession no. X17348) IS6110 پروت نرم افزار Primer Explorer V4 طراحی شد. در این واکنش از ۶ پرایمر اختصاصی شامل دو پرایمر خارجی (F3 و B3)، دو پرایمر داخلی (FIP و BIP) و دو پرایمر لوب (BLP و FLP) استفاده شد. توالی پرایمرها در جدول ۱ نشان داده شده است. واکنش LAMP در حجم کلی $1\text{ }\mu\text{l}$ شامل $25\text{ }\mu\text{M}$ از هر کدام از پرایمرهای F3 و B3، $1/6\text{ }\mu\text{M}$ از پرایمرهای FIP و BIP، $1/8\text{ }\mu\text{M}$ KcL، $20\text{ }\mu\text{M}$ Tris-HcL، BLP و FLP، 0.1 mM dNTP، 9 mM MgSo₄، 10 mM (NH₄)₂SO₄، 10 U M betain، 0.8 U از آنزیم *Bst* و $5\text{ }\mu\text{l}$ از DNA الگو انجام شد. دمای ۶۶ درجه به مدت یک ساعت را به منظور تکثیر قطعات در نظر گرفته و در هر مرحله از کنترل مثبت و منفی به منظور تائید صحت نتایج کمک گرفته شد.

برای تشخیص محصولات LAMP، به هر تیوب حاوی نمونه پس از انجام واکنش LAMP، یک میکرولیتر سایبرگرین ۱٪ اضافه شد

فست در هر میلی لیتر خلط) برای مثبت شدن نیازمند بوده و حساسیت و ویژگی محدودی دارد (۴). کشت مثبت از MTB استاندارد طلایی تشخیص سل است که دارای حساسیت و ویژگی بالایی می‌باشد، اما به دلیل کند رشد بودن میکرورگانیزم عامل بیماری، رؤیت کلونی‌ها روی محیط کشت عموماً ۴–۶ هفته طول می‌کشد. در عین حال عواملی نظیر سلامت محیط کشت، نحوه انتقال نمونه به محیط کشت، انتقال آلودگی و حتی مصرف داروهای ضد توبرکولوزیس نیز می‌تواند بر نتیجه کشت موثر باشد (۵). در سال‌های اخیر، روش‌های مولکولی مختلفی بر اساس تکثیر اسید نوکلئیک باکتری پایه‌گذاری شدند که می‌توانند اسید نوکلئیک میکرورگانیزم را در فاصله زمانی کوتاه تکثیر کرده و جایگزین رشد کند مایکروبکتریوم در شرایط طبیعی گردند (۶). رایج‌ترین روش مولکولی برای تشخیص PCR می‌باشد. اما لزوم تجهیزات و دستگاه‌های دقیق و استفاده از روش‌های پرزحمت برای تشخیص محصولات تکثیر شده از جمله عواملی هستند که استفاده از این روش را به عنوان تکنیکی روتین در مراکز تشخیصی محدود می‌کنند (۷). تکنیک تکثیر هم دما به Loop mediated isothermal amplification: (LAMP) روشی سریع، حساس و ساده برای تکثیر اسید نوکلئیک می‌باشد که قادر است DNA هدف را تحت شرایط هم دما و با استفاده از ۶ پرایمر اختصاصی تکثیر کند. استفاده از ۶ پرایمر اختصاصی که ۸ توالی مجزا را روی توالی هدف شناسایی می‌کنند، ویژگی و حساسیت این تکنیک را افزایش می‌دهد. برخلاف PCR، واکنش LAMP نیاز به ترموسایکل نداشته و با استفاده از خصوصیت جایگزینی رشته‌ها (strand displacement) توسط DNA پلی‌مراز *Bst* انجام می‌شود. این واکنش قادر است از یک کپی DNA. تعداد 10^9 کپی در کمتر از یک ساعت تولید کند و محصولات تکثیری حاصل با چشم غیر مسلح و بدون نیاز به ژل الکتروفورز قابل مشاهده می‌باشند (۸–۱۰).

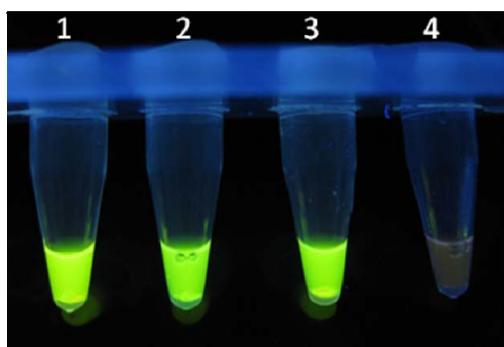
با توجه به اهمیت تشخیص سریع MTB، به منظور جلوگیری از شیوع این بیماری و مداوای موثر بیماران و همچنین لزوم تکنیکی

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده در واکنش‌های LAMP و PCR

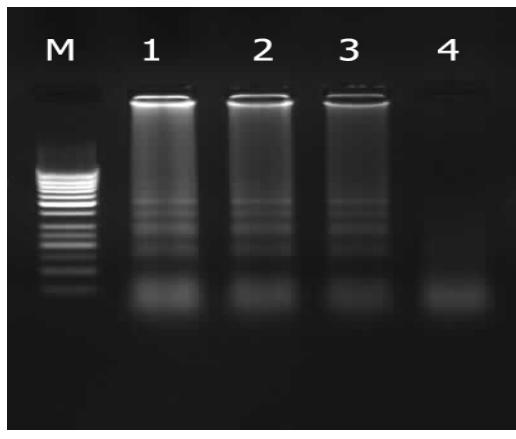
پرایمر	توالی
F3	5' CCTAACCGGCTGTGGTA 3'
B3	5' CGAGTACGCCTTCTTGTTGG 3'
FIP (F1c + F2)	5' GACGTAGGCGTCGGTGACAAAGGCAGACCTCACCTATGTGTC 3'
BIP (B1c + B2)	5' GTCGCTTCCACGATGGCCACGGTCCAGATGGCTTGTCTC 3'
FLP	5' TAGGCGAACCTGCCA 3'
BLP	5' TGGTCCTCGACCGCAGTC 3'
MTB-F	5' CGTGAGGGCATCGAGGTGGC 3'
MTB-R	5' GCGTAGGCGTCGGTGACAAA 3'

یافته‌ها

واکنش LAMP بر روی نمونه‌ها با موفقیت انجام شد. پس از اضافه کردن سایبرگرین، تیوب‌های حاوی DNA تکثیر یافته رنگ سبز و تیوب‌های فاقد DNA رنگ نارنجی را زیر نور UV نشان دادند. الکتروفورز محصولات تکثیر شده الگوی نرdbani شکل از قطعات با اندازه‌های مختلف را روی ژل الکتروفورز نشان داد (شکل ۱).

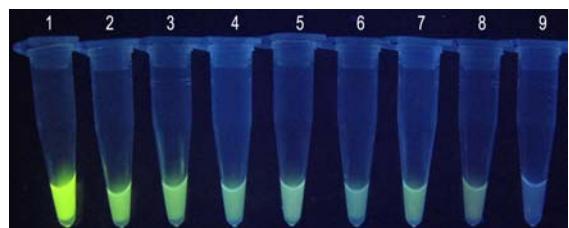


الف



ب

شکل ۱- واکنش LAMP: الف: تشخیص واکنش LAMP زیر نور UV، ب: الکتروفورز محصول LAMP روی ژل آگارز٪/۲، شماره ۱: کنترل مثبت، شماره ۲ و ۳: نمونه‌های مثبت، شماره ۴: کنترل منفی



شکل ۲- تعیین حساسیت LAMP شماره‌های ۱-۹ به ترتیب شامل ۱ ng، ۱۰ pg، ۱۰۰ pg، ۱۰۰۰ pg، ۱ pg، ۱۰ fg، ۱۰۰ fg، ۵ fg و ۵۰ fg از MTB DNA می‌باشد. محدودیت تشخیصی LAMP ۵ fg نشان داده شده است.

و زیر نور UV مشاهده گردید. تأیید ساختار محصولات LAMP به کمک الکتروفورز محصولات تکثیر شده بر روی ژل آگارز٪/۲ صورت گرفت.

به منظور مقایسه دو تکنیک PCR و LAMP، قطعه ۲۴۵ bp از توالی ژن IS6110 توسط روش PCR تکثیر شد. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۰/۴ mM dNTP، ۰/۰۰ μM dNTP، MTB-R و MTB-F کدام از پرایمرهای ۱X PCR، ۰/۵ mM MgCl₂، ۰/۵U Taq DNA polymerase buffer و ۵ μl از DNA الگو در نظر گرفته شد. برنامه PCR به صورت دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و سپس ۴۰ سیکل PCR شامل دناتوراسیون ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال پرایمر و طویل سازی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه انجام گرفت و در نهایت ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR با استفاده از ژل آگارز٪/۲ و رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید مورد بررسی قرار گرفت. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ آمده است.

جدول ۲- تعیین ویژگی PCR و LAMP برای کمپلکس مایکوباتریوم توبرکولوزیس

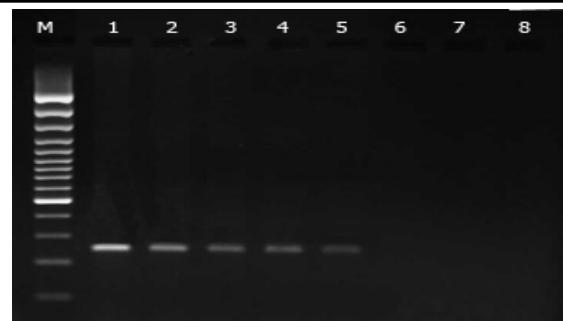
LAMP	PCR	گونه باکتری
+	+	M. tuberculosis H37Rv
		M. Bovis BCG
+	+	
-	-	M. chelonae, M. avium, M. xenopi, M. kansasii, M. szulgai, M. intracellular, M. gordonae
		Escherichia coli, Streptococcus pyogenes, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumonia, Streptococcus pneumonia, Actinomyces pyogene
-	-	

به منظور تعیین ویژگی، استخراج DNA از چندین گونه مختلف مایکوباتریوم و چند گونه باکتری غیر مایکوباتریوم صورت گرفته و واکنش LAMP و PCR بر روی آنها انجام شد (جدول ۲). تعیین حساسیت با استفاده از تهیه رقت‌های مختلف از DNA مایکوباتریوم توبرکولوزیس H37Rv صورت گرفت. بدین منظور رقت‌های مختلف از ۵ fg/μl تا ۱۰۰ ng/μl تهیه شد و واکنش‌های LAMP و PCR بر روی آنها انجام شد. تعداد کمی ژنوم مایکوباتریوم بر اساس این اصل که هر ۵ fg از DNA معادل با یک کپی ژنوم MTB است (۱۲)، محاسبه گردید.

تشخیص مایکوباکتریوم توبرکولوزیس با تکنیک تکثیر هم‌دما

در سال‌های اخیر به طور روز افزونی در حال افزایش بوده و این بیماری دومین علت مرگ و میر ناشی از عفونت را به خود اختصاص داده است (۶). یکی از مهم‌ترین دلایل عدم موفقیت در کنترل این بیماری فقدان روش تشخیصی ساده‌ای است که ویژگی و حساسیت بالایی داشته و قابل استفاده متداول در تمامی مراکز تشخیصی باشد. شناسایی و تکثیر اسیدینوکلئیک باسیل سل از طریق تکنیک‌های مولکولی از جمله روش‌هایی است که حساسیت و ویژگی بالایی داشته و نسبت به روش‌های سنتی تشخیص سل، در مدت زمان کوتاه‌تر قابل انجام است (۱۳). از رایج‌ترین تکنیک‌های مولکولی برای تشخیص مایکوباکتریوم توبرکولوزیس، PCR می‌باشد. اما علی‌رغم سادگی و قابل قبول بودن میزان محصولات تکثیری، دلایلی چون لزوم دستگاه ترموسایکلر و تجهیزاتی چون تانک الکتروفورز و دستگاه Gel documentation برای آنالیز نتایج، پس از PCR و همچنین احتمال آلودگی‌های همراه با این روش، باعث شده که این تکنیک به صورت متداول در آزمایشگاه‌های تشخیصی مورد استفاده قرار نگیرد (۱۴، ۱۵). تکنیک LAMP در مقایسه با PCR روشی ساده‌تر بوده که نیاز به تجهیزات خاص آزمایشگاهی ندارد، به طوری که تمام مراحل واکنش تحت شرایط هم دما (حدوده ۶۰-۶۵ درجه سانتی‌گراد) و به کمک یک بن ماری یا heater LAMP در زمان می‌گیرد (۱۶). به علاوه تکثیر به وسیله PCR صورت می‌گیرد به طوری که در کوتاه‌تری نسبت به PCR صورت می‌گیرد به طوری که در PCR برای تکثیر و آنالیز پس از آن، به طور تقریبی ۳ ساعت زمان لازم است، در حالی که واکنش LAMP در مدت زمان کمتر از ۱ ساعت، انجام می‌پذیرد (۱۷). حساسیت این روش نسبت به PCR بیشتر است و ویژگی آن برای تشخیص و تکثیر DNA هدف به دلیل مشارکت ۶ پرایمر اختصاصی LAMP که ۸ توالی را روی ژن هدف شناسایی می‌کنند، بسیار بالا است (۱۸، ۱۹).

در مطالعه حاضر به منظور تکثیر ناحیه ای از ژنوم MTB و تشخیص بیماری سل از توالی هدف IS6110 استفاده شد. از بین انواع توالی‌های هدف، IS6110 دارای مزیت‌هایی است که آن را جهت تکثیر و تشخیص MTB مناسب می‌سازد. IS6110 یک عنصر ژنتیکی قابل انتقال و تکرار شونده است که خاص گونه‌های کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکولوزیس بوده و بیش از ۲۰ کپی از آن در ژنوم وجود دارد، بنابراین در هنگام استفاده از آن چندین هدف برای تکثیر وجود داشته و این خصوصیت موجب بالا بردن حساسیت تست می‌گردد (۲). این مطالعه نشان داد که LAMP قادر به تشخیص ۵ fg از DNA (معادل



شکل ۳- تعیین حساسیت PCR شماره‌های ۱-۸ به ترتیب شامل DNA ۱۰۰ fg، ۲۵ fg، ۵ fg، ۱ pg، ۱۰۰ pg، ۱ ng، ۱۰ pg و ۱۰۰ pg بوده و محدودیت تشخیصی PCR ۱۰۰ fg تعیین شده است.

تعیین ویژگی پرایمرهای جدید طراحی شده با کمک چندین گونه مختلف باکتری صورت گرفت. همان طور که در جدول ۳ نشان داده شد، واکنش‌های LAMP و PCR توانستند به درستی گونه مایکوباکتریوم توبرکولوزیس و مایکوباکتریوم بوویس را تشخیص دهند. حساسیت LAMP برای تشخیص مایکوباکتریوم توبرکولوزیس ۵ fg از DNA بود که معادل یک کپی در هر DNA می‌باشد، در حالی که حساسیت PCR از ۱۰۰ fg معادل ۲۰ کپی به دست آمد (شکل ۲ و ۳).

جدول ۳- نتایج حاصل از اس‌میر، کشت، PCR و LAMP نمونه‌های بالینی

تعداد نمونه‌ها	اس‌میر	کشت	PCR	LAMP
۴۸	+	+	+	+
۷	+	+	-	+
۳	+	-	-	+
۵	+	+	-	-
۲۲	+	+	-	-
۷۰	-	-	-	-

نتایج حاصل از کشت، اس‌میر، PCR و LAMP بر روی نمونه‌های بالینی به طور خلاصه در جدول ۳ آورده شده است. حساسیت LAMP در مقایسه با کشت (به عنوان استاندارد) در نمونه‌های بالینی ۱۰۰٪ و ویژگی آن ۹۵٪ (۹۵٪/۹۱٪) بود. ارزش اخباری مثبت و منفی LAMP به ترتیب ۹۵٪/۳ و ۱۰۰٪ محاسبه گردید.

بحث

علی‌رغم پیشرفت‌های فراوانی که در امر بهداشت و سلامت عمومی جوامع مختلف صورت گرفته، تعداد مبتلایان به سل

تشخیصی نظری اسمیر و کشت با تکنیک LAMP در این مطالعه انجام نگرفته است.

از آنجایی که اساس مبارزه در برنامه کنترل سل، تشخیص سریع بیماری است، دستیابی به روش‌های دقیق و سریع تشخیصی می‌تواند راه‌گشای مناسبی در جلوگیری از این بیماری و مداوای موثر بیماران باشد. در این مطالعه، تکنیک LAMP بر اساس توالی ژن IS6110 برای تشخیص مايكوباکتریوم توپرکولوزیس در نمونه‌های بالینی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که LAMP علاوه بر سادگی و کم هزینه بودن، دارای حساسیت و ویژگی بالایی بوده و بنابراین می‌تواند به عنوان روشی روتین در مراکز تشخیصی سل مورد استفاده قرار گیرد. با وجود اینکه در طی انجام این تحقیق، مشکلات مرتبط با آلودگی به دلیل رعایت مسائل LAMP اینمی مشاهده نشد، اما مساله اصلی در ارتباط با خطر بالای تولید محصولات ثانویه LAMP و آلودگی محیطی به دلیل کارایی بسیار زیاد این روش در تکثیر است. برای غلبه بر این مساله، پیشنهاد می‌شود که از دستکاری‌های غیرضروری تیوب‌های واکنش برای آماده‌سازی مخلوط تا حد امکان جلوگیری شود و مخلوط‌های واکنش در حجم زیاد تهیه گردد و همچنین تشخیص محصولات LAMP در نواحی مجرزا حتی در مکان‌های مجرزا و توسط افراد متفاوت انجام گیرد.

تشکر و قدردانی

نویسندها از کارکنان محترم بخش سل و تحقیقات ریوی مرکز بهداشت شهداي انقلاب شیراز به دلیل فراهم آوردن نمونه‌های بالینی مورد نیاز کمال تقدير و تشکر را دارند. همچنین از تلاش‌های معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارسنجان جناب آفای دکتر قره داغی و مسئول فنی شرکت ندای فن تهران جناب آفای دکتر تهرانی به منظور فراهم آوردن امکانات و تجهیزات مورد نیاز و حمایت‌های مالی قدردانی می‌شود.

REFERENCES

1. Greenaway C, Menzies D, Fanning A, Grewal R, Yuan L, FitzGerald JM; Canadian Collaborative Group in nosocomial Transmission of Tuberculosis. Delay in diagnosis among hospitalized patients with active tuberculosis--predictors and outcomes. Am J Respir Crit Care Med 2002; 165: 927-33.
2. Aryan E, Makvandi M, Farajzadeh A, Huygen K, Bifani P, Mousavi SL, Fateh A, Jelodar A, Gouya MM, Romano M. A novel and more sensitive loop-mediated isothermal amplification assay targeting IS6110 for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex. Microbiol Res 2010; 165: 211-20.
3. Su WJ. Recent advances in the molecular diagnosis of tuberculosis. J Microbiol Immunol Infect 2002; 35: 209-14.

یک کپی از ژنوم مايكوباکتریوم) بوده و حساسیت بالینی آن، ۱۰۰٪ می‌باشد. این حساسیت تشخیصی نسبت به PCR که قادر به تشخیص ۱۰۰ fg DNA از ۲۰ برابر بیشتر می‌باشد. دلیل افزایش حساسیت LAMP نسبت به PCR را می‌توان استفاده از ۶ پرایمر اختصاصی که ۸ ناحیه مجرزا را روی ژن هدف شناسایی می‌کنند و عدم نیاز به چرخش دمایی در هر دور تکثیر بیان کرد. در طی واکنش LAMP همواره از یک دمای ثابت که مناسب فعالیت پلیمراز است، استفاده می‌شود و فعالیت آنزیم در حین دوره‌های متعدد ثابت است (۲). در مطالعه‌ای، Boehme و همکارانش تکنیک LAMP را بر اساس توالی ژن B gyr راهاندازی کرده و حساسیت این روش را ۸۸/۲٪ (۲۰/۹۵٪ CI: ۸۳/۹-۹۲/۵٪) گزارش کرده‌اند (۲۰). به دنبال آن Pandy و همکاران نیز با استفاده از ژن 16S rRNA روشی از LAMP را پایه گذاری کرده و گزارش کرده‌اند که حساسیت بالینی این روش ۹۴/۲٪ و ویژگی آن ۱۰۰٪ می‌باشد (۱۲).

علاوه بر حساسیت بالینی، در چندین مطالعه حساسیت آنالیتیک LAMP نیز مورد ارزیابی قرار گرفته است. ایامamoto و همکاران با استفاده از توالی ژن B gyr تکنیک LAMP را راهاندازی کرده و نشان دادند که حد تشخیص این تکنیک ۵-۵ کپی از ژنوم MTB می‌باشد (۱۵). گروه دیگر از محققین نیز در چین بر اساس توالی هدف rimM روشی از LAMP را ابداع کرده‌اند که قادر بود حداقل ۲۰ کپی از DNA را تشخیص دهد (۱۷). تکنیک LAMP بر اساس توالی IS6110 نیز برای اولین بار در دنیا توسط یک گروه ایرانی به نام Aryan و همکاران جهت تشخیص MTB راه اندازی و ارزیابی شد. این گروه گزارش کرده‌اند که حساسیت آنالیتیک LAMP معادل یک کپی از ژنوم MTB می‌باشد که ۲۰ برابر حساس‌تر از روش PCR می‌باشد (۲). نتایج حاصل از این مطالعه با وجود استفاده از پرایمرهای متفاوت برای ناحیه IS6110 با نتایج حاصل از مطالعه حاضر هم خوانی دارد، با این تفاوت که در مطالعه Aryan و همکاران ارزش تشخیصی تکنیک LAMP تنها بر روی ۱۵ نمونه بالینی مورد بررسی قرار گرفته است و مقایسه‌ای از حساسیت روش‌های روتین

4. Green C, Huggett JF, Talbot E, Mwaba P, Reither K, Zumla AI. Rapid diagnosis of tuberculosis through the detection of mycobacterial DNA in urine by nucleic acid amplification. *Lancet Infect Dis* 2009; 9:505- 11.
5. Pfyffer GE, Brown-Elliott BA, Wallace RJ JR. *Mycobacterium*: general characteristics, isolation, and staining procedures. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Yolken RH, Eds. *Manual of clinical microbiology*. 8th ed. Washington: District of Columbia; 2003. p.532-59.
6. Mortier E, Pouchot J, Girard L, Boussougant Y, Vinceneux P. Assessment of urine analysis for the diagnosis of tuberculosis. *BMJ* 1996; 312: 27-28.
7. Podzorski RP, Persing DH. PCR: the next decade. *Clin Microbiol Newslett* 1993; 15: 137-44.
8. Parida M, Sannarangaiah S, Paban KD, Morita K. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspective in clinical diagnosis of infectious diseases. *Rev Med Virol* 2008; 18: 407-421.
9. Nagamine KT, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes* 2002; 16: 223-29.
10. Mori Y, Notomi T. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infection diseases. *J Infect Chemother* 2009; 15: 62-69.
11. Bartelt M A. Diagnostic bacteriology- " a study guide". Philadelphia, USA: Davis Company; 2000. p.22-23.
12. Pandey B D, Poudel A, Yoda T, Tamaru A, Oda N, Fukushima Y, et al., Development of an in-house loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and evaluation in sputum samples of Nepalese patients. *J Med Microbiol* 2008; 57: 439-43.
13. Nahid P, Pai M, Hopewell PC. Advances in the diagnosis and treatment of tuberculosis. *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3: 103-10.
14. Nagamine K, Watanabe K, Ohtsuka K, Hase T, Notomi T. Loop mediated isothermal amplification reaction using nondenatured template. *Clin Chem* 2001; 47: 1742-43.
15. Iwamoto T, Sonobe T, Hayashi. Loop mediated isothermal amplification for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *M. avium*, and *M. intracellular* in sputum samples. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 2616-22.
16. Mori Y, Nagamine K, Tomita N, Notomi T. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 289: 150-54.
17. Zhu RY, Zhang KX, Zhao MQ, Liu YH, Xu YY, Ju CM, et al., Use of visual loop mediated isothermal amplification of rimM sequence for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*. *J Microbiol Methods* 2009; 78: 339-43.
18. Parida MM, Horioke K, Ishida H. Rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes by a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2895-903.
19. Parida MM, Guillermo P, Inoue S. Real-time reverse transcription loop mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile Virus. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 257-63.
20. Boehme CC, Nabeta P, Henostroza G, Raqib R, Rahim Z, Gerhardt M. Operational feasibility of using loop mediated isothermal amplification for diagnosis of pulmonary tuberculosis in microscopy center of developing countries. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 1936-40.