مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان/ دوره شانزدهم/ بهار ۱۳۹۰/ ۶۳-۵۶

بهینه نمودن تکنیک تکثیر هم دما به واسطه لوپ (LAMP) جهت تشخیص ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ و ۲

اسماء بهرامی[۱]، محمدحسن شاه حسینی[۲]، کیهان آزادمنش[۳]، زهرا نور محمدی[۴]، الهام مسلمی[۵]، فرزانه جدلی[۶]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۲- دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر قدس، ایران (مؤلف مسؤول) تلفن: ۲۲۰۶۰۲۰۷- ۰۲۱ shahhosseiny@yahoo.com

۳- استادیار گروه ویروس شناسی، انستیتو پاستور تهران، تهران، ایران

۴- استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۵- استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شرق، تهران، ایران

۶- دانشیار بخش پاتولوژی بیمارستان کودکان مفید، تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف: ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ و ۲ عامل ایجاد عفونت سیستم عصبی مرکزی (آنسفالیت) در انسان می‌باشد. روشهای مولکولی، بهترین روش تشخیص این عامل بیماریزا می‌باشند. در این مطالعه تکنیک مولکولی جدید LAMP جهت تشخیص هر دو تیپ این ویروس مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش بررسی: در یک مطالعه تجربی، ۱۸۴ نمونه مایع مغزی- نخاعی (CSF) از بیمارستان مفید تهران تهیه شد. DNA نمونه‌ها بوسیله کیت DNP سیناژن استخراج شد. یک دسته ۶ تایی پرایمر، ویژه ژن DNA پلیمراز ویروس HSV طراحی و تست‌های حساسیت و ویژگی این تکنیک انجام گردید. محصول واکنش LAMP با افزودن سایبرگرین مورد تایید قرار گرفت. نتایج تکنیک LAMP با نتایج تکنیک PCR بوسیله آزمون مربع کای مقایسه شد.

یافته‌ها: حساسیت تکنیک بهینه شده LAMP تا ۵ پارتیکل ویروس و حساسیت تکنیک PCR تا ۵۰ پارتیکل ویروس تعیین گردید. هر دو تکنیک LAMP و PCR در تشخیص تیپ ۱و ۲ ویروس HSV، از ویژگی ۱۰۰٪ برخوردار بودند. از ۱۸۴ نمونه CSF، تکنیک LAMP ۶۰ نمونه را مثبت تشخیص داد در حالیکه ۴۵ نمونه با تکنیک PCR، مثبت گزارش شدند. حساسیت تکنیک LAMP، ۱۰ برابر بالاتر از تکنیک PCR به دست آمد. مقایسه بین نتایج دو روش با استفاده از آزمون مربع کای نشان داد این دو روش در سطح معنی دار $p< 0.05$ با یکدیگر تفاوت دارند.

نتیجه‌گیری: تشخیص دو تیپ ۱و ۲ ویروسHSV موجود در نمونه‌های CSF، بوسیله تکنیک LAMP از حساسیت و ویژگی بالایی برخوردار است.

کلید واژه‌ها: ویروس هرپس سیمپلکس، LAMP، مایع مغزی - نخاعی

وصول مقاله: ۸۹/۹/۱ اصلاحیه نهایی: ۸۹/۱۱/۶ پذیرش مقاله: ۸۹/۱۱/۲۴

مقدمه

ویروس هرپس سیمپلکس (تیپ ۱ و ۲) از دسته ویروس‌های عصب گرا است که می‌تواند در تمام طول عمر در بدن انسان به صورت نهفته باقی مانده و به دنبال نهفتگی، در نورون‌های حسی گانگلیای انسان فعالیت خود را از سر گیرد (۱). فعال شدن مجدد عفونت HSV می‌تواند به طور خود به خودی یا در ارتباط با فشارهای هیجانی یا فیزیکی و ضعف سیستم ایمنی اتفاق بیفتد (۲). روشهای تشخیص این ویروس به روشهای

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-10]

مورفولوژیک، ایمونو مورفولوژیک، سرولوژیک، ویرولوژیک و روشهای مولکولی و جدید تقسیم می‌شوند (۳). از ساده‌ترین روشهای تشخیص این ویروس می‌توان به روش تهیه نمونه از قاعده ضایعات پوستی (Tzanck smear) و همچنین روش مشاهده با میکروسکوپ الکترونی اشاره کرد. روش تشخیصی دیگر کشت ویروس است که یک روش تشخیصی Gold Standard به شمار می‌رود (۴). روشهای تشخیص سرولوژیکی بر مبنای شناخت آنتی بادی‌های gG1 یا gG2 برای تشخیص ویروس مورد استفاده قرار می‌گیرند (۵). از معایب این روشهای تشخیصی می‌توان به زمان بر بودن، عدم قابلیت تشخیص در مراحل اولیه بیماری و همچنین احتمال به دست آمدن جوابهای مثبت و یا منفی کاذب، اشاره کرد (۶). بنابراین، استفاده از روشهای تشخیص مولکولی ضروری می‌باشد (۷). روشهای تشخیص مولکولی بر مبنای جداسازی و تکثیر اسیدهای نوکلئیک ویروس شامل واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، تکثیر هم دما (Isothermal Amplification) و دو رگه سازی (Hybridization) است که حتی در مراحل اولیه آلودگی قادر به تشخیص دقیق عامل بیماریزا می‌باشند (۸ و۷). روشهای آمپلی فیکاسیون علی‌رغم مزایای زیاد دارای اشکالات خاص خود می‌باشند. به عنوان مثال استفاده از تکنیک PCR، که در حال حاضر یک روش تشخیصی Gold standard به حساب می‌آید، با وجود دقت بالا و کاربردهای بسیار آن، به علت نیاز به تجهیزات پیشرفته و گران قیمت مثل ترموسایکلر به صورت عمومی در مراکز تشخیصی استفاده نمی‌شود (۹ و۷). از روشهای تشخیص مولکولی که در آن تکثیر به صورت هم دما صورت می‌گیرد و نیاز به ترموسایکلر ندارد تکنیک تکثیر هم دما به واسطه لوپ (LAMP) می‌باشد که اولین بار در سال ۲۰۰۰ توسط Notomi و همکارانش بهینه شد. در این واکنش از ۶ پرایمر ویژه، تحت عنوان پرایمرهای داخلی FIP(F1C,F2) و BIP(B1C,B2)، پرایمرهای خارجی F3 و B3 و پرایمرهای ویژه لوپ LB(LBP) و LF(LPF) با ویژگی بالا استفاده می‌شود. پرایمر داخلی FIP در رشته DNA الگو به ناحیه مکمل F2(F2C) در رشته الگو متصل می‌شود و سنتز رشته مکمل را آغاز می‌کند و سپس با قرارگیری پرایمرهای خارجی F3 و B3 با کمک آنزیم DNA پلیمراز Bst ، طول این رشته طویل شده که به تولید ساختار DNA دمبلی شکل می‌انجامد. این ساختار ساقه- حلقه DNA به عنوان ماده آغازکننده واکنش LAMP عمل می‌کند، پرایمر FIP به لوپ در ساختار ساقه–حلقه DNA متصل می‌شود و سنتز رشته جانشین را آغاز می‌کند که ساختار DNA حد واسطی به صورت ساقه–حلقه ایجاد می‌کند که در ساقه- حلقه دارای یک کپی وارونه از توالی هدف می‌باشد، که در انتهای دیگر ژن و بوسیله پرایمر BIP تشکیل می‌شود. رشته آزاد شده، ساختاری با حلقه بیرونی ایجاد می‌کند که به عنوان الگو برای پرایمر BIP عمل می‌کند. سرانجام DNA دمبلی شکل تولید می‌شود که به عنوان ماده مرحله چرخه تکثیر LAMP وارد عمل می‌شود. با طراحی اولیگونوکلئوتیدهای پروپ ویژه این ساختارها، می‌توان از این اولیگونوکلئوتیدها در دو رگه سازی استفاده کرد، که در این صورت به دناتوراسیون با گرما بعد از تکثیر نیازی نیست و نشان دهنده این است که تمام مراحل از تکثیر تا تشخیص در یک دما انجام می‌شوند. محصولات نهایی DNA های ساقه–حلقه با چندین توالی معکوس از DNA هدف و ساختارهای شبیه گل کلم با حلقه‌های چند تایی می‌باشند (۱۲-۱۰).

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-10]

در طی سال‌های اخیر چند مطالعه در ارتباط با کاربرد این تکنیک در تشخیص ویروس HSV صورت گرفته است (۱۶-۱۳). این مطالعه برای اولین بار در ایران تکنیک LAMP جهت تشخیص ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱و ۲ بهینه سازی و به کار گرفته شد. این تکنیک یکی از روشهای تشخیصی است که با سرعت، حساسیت بالا و هزینه‌های کم می‌تواند استفاده شود. در این بررسی نمونه‌های CSF با این تکنیک آزمایش و نتایج تکنیک LAMP با نتایج بدست آمده از تکنیک PCR مقایسه گردید.

روش بررسی

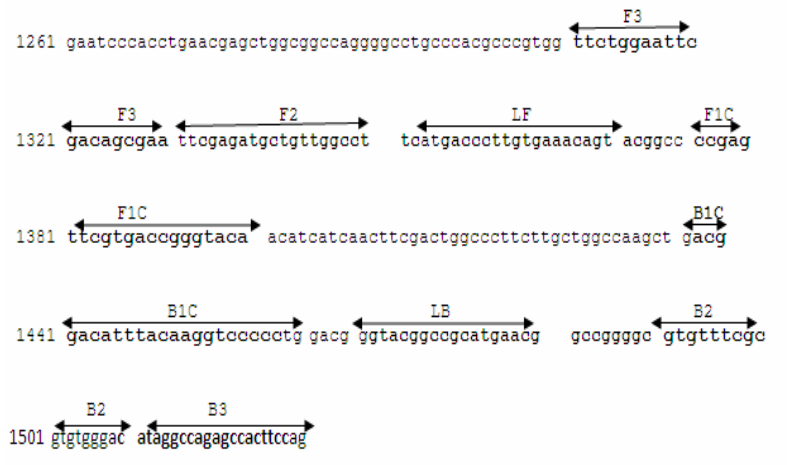
در یک مطالعه تجربی، ۱۸۴ نمونه CSF کودکان ۱۰-۱ ساله مشکوک به وجود HSV، از بیمارستان مفید تهران تهیه شد.

استخراج DNA: DNA ویروس HSV بوسیله کیت DNP سیناژن (Cat:DN811530) از نمونه‌ها استخراج گردید.

طراحی پرایمرهای ویژه LAMP: پرایمرهای LAMP با کمک نرم افزار Primer explorer V4 بر اساس ژن DNA پلیمراز ویروسHSV (Accession Number.AB231460.1) که ژن مشترک بین تیپ ۱و۲ این ویروس می‌باشد، طراحی گردید (جدول و شکل ۱).

جدول ۱: پرایمرهای ویژه LAMP

F3	TTC-TGG-AAT-TCG-ACA-GCG-A-
B3	GGA-AGT-GGC-TCT-GGC-CTA-T
FIP	F2 : CGA-GAT-GCT-GTT-GGC-CTT-C
	F1C : TGT-ACC-CGG-TCA-CGA-ACT-CGG
BIP	B2 : GTC-CCA-CAC-GCG-AAA-CAC
	B1C : -ACG-GAC-ATT-TAC-AAG-GTC
LF	CCG-TAC-TGT-TTC-ACA-AGG-GTC
LB	GTA-CGG-CCG-CAT-GAA-CG



شکل ۱: جایگاه ویژه پرایمرهای LAMP بر روی توالی هدف

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-10]

واکنش PCR: هر واکنش شامل ۵ میکرولیتر DNA استخراج شده، ۲/۵ میکرولیتر از 10X PCR Buffer، ۱ میکرولیتر از هر یک از دو پرایمر جلویی و عقبی 10mM، ۰/۷۵ میکرولیتر از $MgCl_2$ 50mM، ۰/۵ میکرولیتر از dNTP 10mM، ۰/۴ میکرولیتر از Taq DNA Polymerase 5u/µl در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر بود. برنامه دمایی واکنش به صورت دناتوراسیون در دمای ۹۳°C به مدت ۲۰ ثانیه و دمای چسبیدن ۷۰°C به مدت ۲۰ ثانیه و در نهایت پلیمریزاسیون در دمای ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه به تعداد ۴۰ سیکل انجام شد. در این واکنش از دو دسته پرایمر جلویی(Forward) و عقبی (Reverse) با توالی نوکلئوتیدی به شرح زیر استفاده گردید.

HSVF 5´acc tac cgg cat aca agc tca-3´

HSVR 5´aag tgg ctc tgg cct atg tcc -3´

مشاهده محصول PCR: محصول PCR در ژل آگارز ۲٪ حاوی اتیدیوم بروماید در بافر TBE 0.5X الکتروفورز شد.

مخلوط واکنش LAMP: مخلوط واکنش در حجم نهایی ۲۵ مایکرولیتر و شامل dNTP سیناژن به غلظت 1.4 mM، بتایین به غلظت 0.8 M، ۸ واحد آنزیم Bst (New England BioLabs;Lot:33/110806)، بافر آنزیم به غلظت 1X حاوی Kcl(10 Tris-Hcl(20mM) (NH4)2SO4(10mM)MgSo4(9mM) mM)، پرایمرهای F3 و B3 هر یک به غلظت 0.2µM، پرایمرهای FIP و BIP هر یک به غلظت 1.6 µM و پرایمرهای لوپ LF و LB هر یک به غلظت 0.8 µM می‌باشد.

ارزیابی واکنش LAMP: واکنش LAMP در دمای ۶۶° C و به مدت ۶۰ دقیقه صورت گرفت. سپس به هر لوله نمونه، مقدار ۱ میکرولیتر از سایبرگرین 0.1% اضافه کرده و در زیر نور UV مشاهده گردید. لوله‌های مثبت به رنگ سبز و لوله‌های منفی به رنگ نارنجی خیلی کم رنگ دیده شدند.

تعیین حساسیت تست LAMP: برای تعیین حساسیت تست LAMP، رقت های مختلف DNA ویروس از یک میلیون تا ۵ پارتیکل ویروس به روش رقیق سازی (Serial- Dilution) یا Kochs Method تهیه و بررسی شد. تهیه رقت‌ها به این صورت انجام شدکه ۱۰µl از لوله حاوی یک میلیون پارتیکل را به ۹۰µl آب مقطر اضافه کرده و رقت ۱۰۰۰۰۰ پارتیکل به دست آمد. در مرحله بعد ۱۰ µl از لوله ۱۰۰۰۰۰ پارتیکل را با ۹۰ µl آب مقطر اضافه کرده و رقت ۱۰۰۰۰ پارتیکل به دست آمد و همین طور تا تهیه رقت ۱۰۰ پارتیکل ادامه داده و سپس ۵۰µl از لوله ۱۰۰ پارتیکل را به ۵۰ µl آب مقطر اضافه کرده تا رقت ۵۰ پارتیکل به دست آید. به همین صورت رقت ۲۵ پارتیکل نیز تهیه گردید و در نهایت ۲۰µl از لوله حاوی ۲۵ پارتیکل را با ۸۰ µl آب مقطر مخلوط کرده و رقت ۵ پارتیکل ویروس بدست آمد.

تایید ویژگی تست LAMP: برای تایید ویژگی تکنیک بهینه شده، DNA های HSV،CMV، VZV، HBV، MTB، Sccharomices، انسان، cDNA ویروس HCV و نمونه کنترل منفی بررسی شدند.

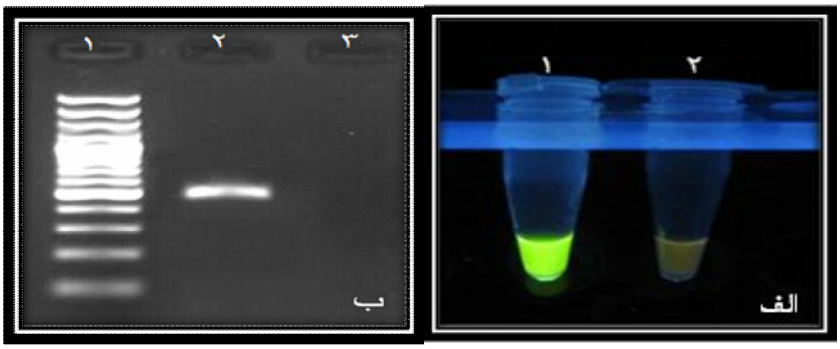
مقایسه نتایج دو تکنیک LAMP و PCR :

نتایج به دست آمده از تکنیک LAMP با نتایج تکنیک PCR توسط نرم افزار SPSS.V 10 با استفاده از آزمون مربع کای مقایسه و مورد بررسی قرار گرفت.

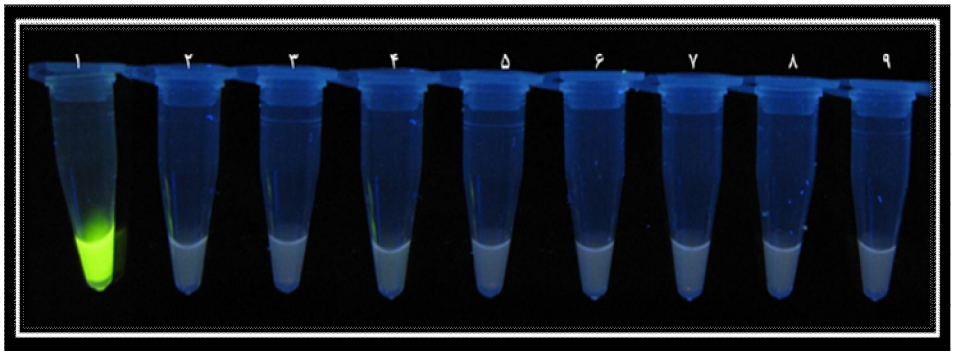
[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-10]

یافته‌ها

بعد از پایان واکنش به دنبال اضافه کردن سایبرگرین، لوله مثبت به رنگ سبز روشن و لوله منفی به رنگ نارنجی خیلی کم رنگ دیده شد (شکل۱- الف). محصول واکنش PCR بوسیله الکتروفورز ژل آگارز ۲٪ مورد تایید قرارگرفت (شکل۲- ب). با توجه به تست ویژگی، تکنیک LAMP به جز با DNA ویروس HSV با هیچ یک از DNA های دیگر عوامل بیماریزای آزمایش شده و DNA انسان واکنش نشان نداد و در تشخیص ویروس HSV دارای ویژگی ۱۰۰٪ بود (شکل ۲). همانطور که در شکل ۳ نشان داده شده، حساسیت تکنیک بهینه شده LAMP تا ۵ پارتیکل ویروس تعیین گردید. تست PCR نیز مانند تکنیک LAMP در تشخیص این ویروس دارای ویژگی ۱۰۰٪ بود، ولی در تعیین حساسیت تکنیک PCR مشخص شد که این تکنیک تا ۵۰ پارتیکل ویروس حساسیت داشت. پس از انجام دو تکنیک بر روی نمونه‌های CSF مشخص شد که از ۱۸۴ نمونه CSF، ۴۵ نمونه با تکنیک PCR مثبت گزارش شدند که از همین تعداد نمونه، تکنیک LAMP ۶۰ نمونه را مثبت تشخیص داد. مقایسه نتایج دو تکنیک با استفاده از آزمون مربع کای نشان داد این دو روش در سطح معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) با یکدیگر تفاوت دارند.

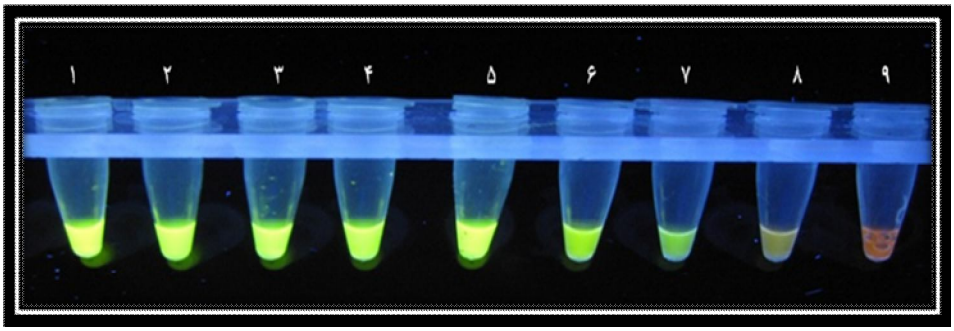


شکل ۱: الف- لوله ۱: کنترل مثبت، لوله ۲: کنترل منفی ; ب- لاین ۱: DNA سایز مارکر bp ۱۰۰ ، لاین ۲: کنترل مثبت ، لاین ۳: کنترل منفی



شکل ۲: لوله ۱: DNA ویروس HSV، ۲: DNA ویروس CMV ، ۳: DNA ویروس VZV، ۴: DNA ویروس HBV ، ۵: cDNA ویروس HCV، ۶: DNA باکتری MTB، ۷: DNA ساکارومیسس، ۸: DNA انسان ، ۹: کنترل منفی

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-10]



شکل ۳: از چپ به راست، لوله ۱: سرم حاوی یک میلیون پارتیکل، ۲: سرم حاوی ۱۰۰۰۰۰ پارتیکل، ۳: سرم حاوی ۱۰۰۰۰ پارتیکل، ۴: سرم حاوی ۱۰۰۰ پارتیکل، ۵: سرم حاوی ۱۰۰ پارتیکل، ۶: سرم حاوی ۵۰ پارتیکل، ۷: سرم حاوی ۲۵ پارتیکل، ۸: سرم حاوی ۵ پارتیکل، ۹: سرم حاوی کمتر از ۵ پارتیکل

بحث

ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ و ۲ سبب بروز بیماریهای مختلفی در انسان می‌شود. با وجود اینکه در حال حاضر روشهای تشخیص سرولوژیکیHSV پیشرفتهای بسیاری داشته‌اند، ولی به دلیل معایب این روشها در تشخیص عفونت معیار مناسبی برای تشخیص به حساب نمی‌آیند. از اینرو لازم است روشهای مولکولی جایگزین روشهای سرولوژیکی شوند (۷). تکنیک LAMP یکی از روشهای تشخیص مولکولی می‌باشد که در سال ۲۰۰۰ برای اولین بار توسط Notomi و همکارانش بهینه گردید و از آن زمان مطالعاتی در ارتباط با کاربرد این تکنیک صورت گرفته است. به عنوان مثال با استفاده از این تکنیک تشخیص پاتوژنهایی مانند Human Herpesvirus-6، HBV، ویروس آنفلوآنزای H1N1، Vibrio parahemolyticus و Trypanosoma brucei امکان پذیر می‌باشد (۲۱-۱۷). در طی سال‌های اخیر چند مطالعه نیز در ارتباط با کاربرد تکنیک LAMP در تشخیص ویروس HSV انجام شده که از جمله این مطالعات می‌توان به موارد زیر اشاره نمود. در سال ۲۰۰۵ میلادی Enomoto و همکارانش ژن gG ویروس HSV را به عنوان توالی هدف انتخاب و با بهینه نمودن تکنیک LAMP در تشخیص ویروس HSV-1 و HSV-2 به ترتیب حساسیتی برابر با ۵۰۰ و ۱۰۰۰ پارتیکل ویروس بدست آوردند. Enomoto و همکارانش آزمایش مستقیم ویروس (بدون استخراج DNA) را بکار بردند و بیان داشتند تکنیک LAMP در تشخیص نمونه‌های بدون استخراج DNA نیز از حساسیت بالایی برخوردار است (۲۲). در همین سال نیز Kaneko و همکارانش ژن UL را به عنوان توالی هدف انتخاب و به دنبال بهینه سازی تکنیک LAMP حساسیتی برابر با ۱۰ پارتیکل ویروس را برای این تکنیک بیان کردند (۲۳). در سال ۲۰۱۰ میلادی نیز محققی به نام Reddy با انتخاب ژن gG به عنوان توالی هدف، حساسیت تکنیک بهینه شده خود را در تشخیص ویروس HSV، ۱۰ پارتیکل ویروس به دست آورد و بیان داشت که دو تکنیک LAMP و Real–time PCR از حساسیت یکسانی برخوردار می‌باشند (۲۴). در مطالعه ما ژن DNA پلیمراز ویروسHSV برای اولین بار به عنوان هدف در طراحی پرایمرهای این تکنیک مورد استفاده قرار گرفت و توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای طراحی شده در مطالعه ما با پرایمرهای طراحی شده در دیگر پژوهش‌ها کاملاً متفاوت می‌باشد. همانطور که در این

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-10]

مطالعه نشان داده شده این تکنیک نسبت به تکنیک PCR از حساسیت و دقت بالاتری برخوردار بود به طوریکه از ۱۸۴ نمونه CSF مورد مطالعه، ۴۵ نمونه با استفاده از PCR مثبت گزارش شدند در حالیکه از این تعداد نمونه CSF، ۶۰ نمونه با استفاده از LAMP مثبت تشخیص داده شدند. به عبارتی دیگر ۱۵ نمونه‌ای که با PCR منفی گزارش شدند با استفاده از تکنیک LAMP جهت وجود ویروس HSV تیپ ۱و ۲ مثبت تشخیص داده شدند. با توجه به حساسیت ۱۰ برابر بیشتر تکنیک LAMP نسبت به تکنیک PCR، اختلاف در نتایج دو تکنیک قابل توجیه می‌باشد. مقایسه نتایج دو تکنیک با استفاده از آزمون مربع کای نشان داد این دو روش در سطح معنی‌دار $p<۰/۰۵$ با یکدیگر تفاوت دارند. در مطالعه ما روش جدید تکثیر اسید نوکلئیک LAMP برای اولین بار در دنیا بر اساس ژن DNA پلیمراز ویروس HSV بهینه و بکار گرفته شد. با توجه به گزارش‌های منتشر شده، در این مطالعه تکنیک LAMP جهت تشخیص ویروسHSV در ایران، برای اولین بار بهینه سازی و به کار برده شد. با مقایسه مطالعه کنونی ما و مطالعات انجام شده در ارتباط با روش LAMP در تشخیص ویروس HSV ، می‌توان بیان کرد که روش LAMP بهینه شده در این مطالعه نسبت به مطالعات گذشته از حساسیت بالاتری (۵ پارتیکل ویروس) برخوردار بود که این اختلاف می‌تواند به دلایل مختلف از جمله روش استخراج DNA، انتخاب توالی هدف و توالی نوکلئوتیدی متفاوت به کار برده در این مطالعه نسبت به مطالعات پیشین باشد. بنابراین با توجه به مطالعات گذشته و نتایج بدست آمده از مطالعه کنونی می‌توان بیان کرد که تکنیک LAMP نسبت به تکنیک PCR در تشخیص HSV حساسیت بالاتری دارد و علی‌رغم دقت بالا و حساسیت زیاد، نیازی به تجهیزات گران قیمت از جمله ترموسایکلر نداشته و واکنش فقط با استفاده از یک Dry plate ساده انجام می‌شود.

نتیجه‌گیری

تکنیک تکثیر هم دما به واسطه لوپ (LAMP) با وجود سادگی، سرعت بالا و عدم نیاز به تجهیزات گران قیمت، نسبت به PCR از حساسیت و دقت بالاتری برخوردار است و می‌تواند جایگزین مناسبی برای تکنیک PCR باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از جناب آقایان دکتر زارع، دکتر اعتمادزاده و مهندس سهرابی ابراز می‌دارند.

References

1. Kimura K, Ihira M, Enomoto Y, Kawada J, Ito Y, Morishima T and et al. Rapid detection of herpes simplex virus DNA in cerebrospinal fluid: comparison between loop-mediated isothermal amplification and real-time PCR. Med Microbiol Immunol 2005; 194: 181-185.
2. Whitley R, Roizman B. Herpes simplex virus infections. Lancet 2001; 357: 1513-18.
3. Solomon AR. New diagnostic tests for herpes simplex and varicella zoster infections. J Am Acad Dermatol 1988; 18: 218-21.
4. Singh A, Frcpc BM, Preiksaitis S, Frcpc MD, Ferenczy A, Romanowski B, and et al. The laboratory diagnosis of herpes simplex virus infections .Can J Infect Dis 2005; 22: 92-98.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-10]

5. Burbelo PD, Hoshino Y, Leahy H, Karogmann T, Hornung RL, Iadarola MJ, and et al. Serological diagnosis of human HSV-1 and HSV-2 infection luciferase immunoprecipitation systems (LIPS) assay. Clin Vaccine Immunol 2009; 21: 1054-59.
6. Conrady CD, Drevets DA, Carr DJ. Herpes simplex type-1 (HSV-1) infection of the nervous system: Is an immune response a good thing? Journal of Neuroimmonulogy 2009; 220:1-9.
7. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, and et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Research 2000; 28: 63-66.
8. Shahhosseiny MH. Basic molecular diagnosis Tehran: Islamic azad University. 2005. p. 12-35.
9. Zhang D, Zhang W, Li X, Konomi Y. Detection of rare DNA targets by isothermal ramification amplification. Gene 2001; 274: 209-216.
10. Nagamine K, Kuzuhara Y, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. Molecular and Cellular Probes 2002; 16: 223-229.
11. Nagamine K, Hase T, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification reaction using a nondenatured template. Clinical Chemistry 2001; 47: 1742-1743.
12. Mori Y, Hirano T, Notoma T. Sequence specific visual detection of LAMP reactions by addition of cationic polymerase. BMC Biotechnology 2006; 6: 3.
13. Kimura K, Ihira M, Enomoto Y. Kawada J, Ito Y, Morishima T, and et al. Rapid detection of herpes simplex virus DNA in carberospind fluid:comparison between loop-mediated isothermal amplification and real-time PCR. Med Microbiol Immunol 2005; 194: 181-185.
14. Enomoto Y, Yoshikava T, Ihira M, Akimoto M, Miyak F, Usui C, and et al. Rapid Diagnosis of herpes simplex virus infection by a loop-mediated isothermal amplification method. Journal of Clinical Microbiology 2005; 26: 951-955.
15. Sugiyama H, Yoshikawa T, Ihira M, Enomoto Y, Kawana T, and Asano Y. Comparison of Loop-Mediated isothermal amplification, Real-time PCR, and virus isolation for the detection of herpes simplex virus in genital lesions. Journal of Medical Virology 2005; 75: 583-587.
16. Zhi-xiang Z, Hua J, Ji-ping W, Wang Liu, Wang Li-zhen, Zhang Li-juan, et al. Detection of Herpes simplex virus type 2 DNA with loop-mediated isothermal amplification assay. Journal of University of South China 2010- 02.
17. Ihira M, Yoshikawa T, Enomoto Y. Rapid diagnosis of human herpesvirus 6 infection by a novel DNA amplification method, loop-mediated isothermal amplification. J Clin Microbiol 2004; 42: 140-145.
18. Moslemi E, Shshhosseiny MH, Javadi GR, Nejsd sattari T and Amini HK. Loop mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid detection of HBV in Iran. African Journal of Micribiology Research 2009; 3: 439-445.
19. Postel A, Letzel T, Frischmanu S, Grund C, Beer M and Harder T. Evaluation of two commercial loop-mediated isothermal amplification assays for detection of avian influenza H5 and H7 hemaglutinin genes. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 2010; 22: 61-66.
20. Chen S, Ge B. Development of a tox R-based loop-mediated isothermal amplification assay for detecting Vibrio parahaemolyticus. BMC Microbiology 2010; 10: 41-47.
21. Njiru ZK, Nikosza AS, Armstrong T, Eyaru JC, Ndung'u JM, Thompson AR. Loop – mediated isothermal amplification (LAMP) method for rapid detection of trypanosoma brucei rhodesiense . PLoS Negl Trop Dis 2008; 2 :147-151.
22. Enomoto Y, Yoshikava T, Ihira M, Akimoto M, Miyak F, Usui C, and et al. Rapid diagnosis of herpes simplex virus infection by a loop-mediated isothermal amplification method. Journal of Clinical Microbiology 2005; 26: 951-955.
23. Kaneko H, Iida T, Aoki K, Ohno S and Suzutani T. Sensitive and rapid detection of herpes simplex virus and varicella-zoster virus DNA by loop-mediated isothermal amplification. Journal of Clinical Microbiology 2005; 43: 3290- 3296.
24. Reddy AK, Balne PK, Reddy RK, Mathai A, Kaur I. Loop-mediated isothermal amplification assay for the diagnosis of retinitis caused by herpes simplex virus-1. Clin Microbiol Infect 2010; 34: 434-440.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-10]