Detection of SARS-CoV-2 by Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) Technique

Ali Haji Esmaili Qomi[1] ,Mahtab Noorifard[2],Ramin Hamidi Farahani[3], Mehdi Shakori Khomartash[4], Abbas Morovvati[5], Ashkan Dirbazian[6], Pegah Shakib[7]

1.Infectious Diseases Research Center, Aja University Of Medical Sciences, Tehran, Iran. com.ORCID ID: 0000-0002-8004-3144

2. Infectious Diseases Research Center, Aja University of Medical Sciences, Tehran, Iran. Tel:021-88337920. Email: Mahtab-noorifard@yahoo.com .ORCID ID: 0000-0002-0635-7401

3.Infectious Diseases Research Center, Aja University of Medical Sciences, Tehran, Iran. ORCID ID: 0000-0002-3215-0948

4. Infectious Diseases Research Center, Aja University of Medical Sciences, Tehran, Iran. ORCID ID: 0000-0002-7446-3265

5.Department of Microbiology, Faculty of Basic Science Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran. ORCID ID : 0000-0002-9221-7084

6.Department of Microbiology, Faculty of Basic Science Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran. ORCID ID: 0000-0002-9221-8019

7.Razi Herbal Researches Center, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran. ORCID ID: 0000-0003-3525-226X

ABSTRACT

Background and Aim: Covid-19 disease is a global health concern that requires rapid quantitative diagnostic testing. The standard technique for diagnosing SARS-CoV-2 is now REAL-TIME PCR. The aim of this study was to design a sensitive Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification method for the early identification of SARS-CoV-2.

Material and Methods: In this laboratory study, specimens were prepared from the patients by laryngeal, pharyngeal, and nasal swabs and after RNA extraction and cDNA synthesis. SARS-CoV-2 virus was evaluated using the RT-LAMP method. Sensitivity of the RT-LAMP method was evaluated by primers targeting *N* and *E* genes.

Results: In this study, 19 SARS-CoV-2 RNA samples were examined. According to the results of this study turbidity or discoloration of fluorescent dye showed that agarose electrophoresis gel is a more sensitive test. Detection limits for the number of *E* gene copy were observed at the dilutions of 10^{-9} and 10^{-8} for gel electrophoresis and fluorescent light, respectively. This means detection of 1 copy and 14 copies for the two above-mentioned methods, respectively. However, in the case of the *N* gene the detection limits, were at the dilutions of 10^{-10} on the gel and 10^{-8} by fluorescent light, which indicated detection of 1 copy and 17 copies, respectively. The calculations were performed using the Chiang formula.

Conclusion: The results of this study showed that the LAMP was a simple, fast, sensitive, and specific method for the diagnosis of SARS-CoV-2 that may improve the diagnostic potential in clinical laboratories.

Keywords: SARS-CoV-2, Covid-19, Reverse transcription loop-mediated isothermal a

Received: Sep 3, 2021 **Accepted:** April 26, 2023

How to cite the article: Ali Haji Esmaili Qomi ,Mahtab Noorifard,Ramin Hamidi Farahani, Mehdi Shakori Khomartash, Abbas Morovvati, Ashkan Dirbazian, Pegah Shakib. Detection of SARS-CoV-2 by Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) Technique.ŚJKU 2023;28(4):66-76.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-02-03]

[DOI: 10.61186/sjku.28.4.66]

شناسایی *SARS-CoV- 2* با تکنیک تکثیر به‌واسطه‌ی حلقه‌ی ایزوترمال معکوس (RT-LAMP)

علی حاجی اسماعیلی قمی [۱]، مهتاب نوری فرد [۲*]، رامین حمیدی فراهانی [۳]، مهدی شکوری خمارتاش [۴]، عباس مروتی [۵]، اشکان دیربازیان [۶]، پگاه شکیب [۷]

۱. مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی آجا، تهران، ایران.کد ارکید ۳۱۴۴-۸۰۰۴-۰۰۰۲-۰۰۰۰

۲. مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی آجا، تهران، ایران. پست الکترونیک:Mahtab-noorifard@yahoo.com . تلفن: ۰۲۱-۸۸۳۳۷۹۲۰. کد ارکید ۷۴۰۱-۰۶۳۵-۰۰۰۲-۰۰۰۰

۳. مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی آجا، تهران، ایران. کد ارکید ۰۹۴۸-۳۲۱۵-۰۰۰۲-۰۰۰۰

۴. مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی آجا، تهران، ایران. کد ارکید ۳۲۶۵-۷۴۴۶-۰۰۰۲-۰۰۰۰

۵ .گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران. کد ارکید ۷۰۸۴-۹۲۲۱-۰۰۰۲-۰۰۰۰

۶. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران. کد ارکید ۸۰۱۹-۹۲۲۱-۰۰۰۲-۰۰۰۰

۷. مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم آباد، ایران. کد ارکید :۲۲۶x-۳۵۲۵-۰۰۰۳-۰۰۰۰

چکیده

زمینه و هدف: بیماری کووید-۱۹ یک نگرانی بهداشت جهانی است که نیاز به تست تشخیص سریع کمی دارد. در حال حاضر تکنیک استاندارد برای تشخیصSARS-CoV-2 رونویسی معکوس (qRT-PCR) انجام می‌گیرد. هدف از این مطالعه طراحی روش حساسLAMP (RT-LAMP) برای تشخیص ویروس SARS-CoV-2 بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه آزمایشگاهی نمونه بیماران با استفاده از سواب های حنجره، حلق و بینی تهیه و پس از استخراج RNA و سنتز cDNA، ویروس SARS-CoV-2 با استفاده از روش RT-LAMP مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور از پرایمرهای طراحی شده با هدف قرار دادن ژن‌های *E*و*N* ، حساسیت روش RT-LAMP مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: در این مطالعه ۱۹ نمونه RNA ویروس SARS-CoV-2 مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که برای تشخیص و مشاهده کدورت یا تغییر رنگ فلورسنت و همچنین ژل آگارز الکتروفورز حساسیت بیشتری دارد. برای بررسی تعداد کپی ژن E تست بر روی ژل الکتروفورز آخرین رقت $۱۰^{-۹}$ و بر اساس نور فلورسنت آخرین رقت قابل بررسی $۱۰^{-۸}$ بود که با ژل الکتروفورز ۱ کپی و بر اساس فلورسنت ۱۴ کپی را تشخیص می دهد؛ اما در مورد ژن N بر روی ژل تا رقت $۱۰^{-۱۰}$ و در اثر نور فلورسنت تا رقت $۱۰^{-۸}$ قابل بررسی بود که به ترتیب توان تشخیص ۱ کپی و ۱۷ کپی را داشتند که با فرمول Chiang محاسبه گردید.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که روش LAMP یک روش ساده، سریع، حساس و خاص که برای تشخیص SARS-CoV-2 است که ممکن است پتانسیل تشخیصی را در آزمایشگاه‌های بالینی بهبود بخشد.

کلمات کلیدی: *SARS-CoV-2*، کووید-۱۹، تکثیر به واسطه‌ی حلقه‌ی ایزوترمال معکوس، ویروس.

وصول مقاله:۱۴۰۰/۶/۱۲ اصلاحیه نهایی:۱۴۰۱/۱۰/۲۷ پذیرش:۱۴۰۲/۲/۶

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-02-03]

[DOI: 10.61186/sjku.28.4.66]

مقدمه

کرونا ویروس‌ها، ویروس‌های پوشش‌دار و دارای RNA تک‌رشته‌ای است (۱). بر اساس گزارش اخیر کمیته بین‌المللی طبقه‌بندی ویروس‌ها، متعلق به زیر خانواده‌ی ارتوکروناویرینه از خانواده‌ی کرونا ویرید و راسته‌ی نیدوویرالس هستند و شامل چهار جنس آلفا کرونا ویروس، بتاکرونا ویروس دلتا کروناویروس وگاما کرونا ویروس است. کرونا ویروس ها می توانند مجاری تنفسی، مجاری گوارشی، کبد و سیستم عصبی مرکزی انسان، چارپایان، پرندگان، خفاش، موش و بسیاری از حیوانات وحشی را عفونی کنند(۲-۴). در ۱۲ ژانویه ۲۰۲۰ کروناویروس جدید توسط سازمان جهانی بهداشت2019 novel coronavirus و در ۱۱ فوریه ۲۰۲۰ بیماری ناشی از آن کووید -۱۹ نامگذاری شد(۵, ۶). سپس توسط کمیته بین المللی طبقه‌بندی ویروس‌ها (International Committee on Taxonomy of Viruses; ICTV)و بر اساس ارتباطات تبارزایی و نزدیک بودن این ویروس به پروتوتایپ کرونا ویروس‌های انسانی و خفاشی عامل سندروم تنفسی حاد شدید، کرونا ویروس جدید – SARS CoV2، نامگذاری شد(۷). ظهور و شیوع انواع جدید کرونا ویروس‌ها حاکی از جدی بودن تهدید کرونا ویروس‌ها برای سلامت جهانی است.*SARS-CoV-2* دارای دامنه میزبانی وسیعی است و در حال حاضر در سراسر دنیا گسترش پیدا کرده است (۸). تاکنون هیچ درمان قطعی یا مؤثری برای این بیماری تأیید نشده است.

در حال حاضر بهترین اقدامات برای کنترل عفونت، تزریق واکسن، تشخیص زودهنگام بیماری، گزارش مستمر از روند بیماری و جداسازی افراد مبتلا (قرنطینه) است. تشخیص بیماریCOVID-19 متکی به یافته‌های رادیولوژی و آزمایشگاهی است .بررسی‌های رادیولوژی، اهمیت بسزایی در تشخیص در اوایل بیماری و مدیریت بیماری COVID-19 دارد. از طرفی روش آزمایشگاهی مولکولی را می‌توان جهت تکثیر اسیدهای نوکلئیک به نام تکثیر هم‌دمای وابسته به حلقه (Loop-Mediated Isothermal Amplification;LAMP) به‌عنوان روشی سریع و دقیق در تشخیص پاتوژن های مختلف در انسان، حیوان و گیاهان و بعلاوه برای تشخیص سریع در مناطقی که امکان استفاده از آزمایشگاه‌های مجهز وجود ندارد بکار برد (۹)؛ لذا در این مطالعه روش RT - LAMP جهت تشخیص ویروس SARS-CoV-2 استفاده شد و هدف از آن معرفی روشی حساس، آسان، سریع، ایمن و ارزان در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی، بیمارستان‌های صحرایی، مراکز تحقیقاتی و قرنطینه‌ای است که بتواند راه را برای تشخیص این ویروس هموارتر سازد و تا حدود زیادی مشکلات روش‌های تشخیصی کنونی مانند تشخیص بر مبنای آنتی‌ژن (غیر قابل اعتماد بودن) در این ویروس را افزایش می‌دهد. کارایی تکثیر در روش LAMP بسیار بالاست و قادر است مقدار اندکی از DNA (حتی کمتر از ۶ کپی در مخلوط) را تا ۱۰ کپی تکثیر نماید (۱۰). روش LAMP ساده، آسان و تنها نیاز به آغاز گر، DNA پلیمراز و مخلوط واکنش دارد. در این روش نیازی به دستگاه ترموسایکلر نبوده و واکنش در یک حمام آبگرم یا بلوک حرارتی قابل انجام است (۱۱)؛ بنابراین هدف از این مطالعه، طراحی یک روش برای تشخیص سریع SARS-CoV-2 بود و ایجاد یک روش حساس LAMP (RT-LAMP) برای تشخیص ویروس SARS-CoV-2 بود.

مواد و روش ها

نمونه‌برداری و نحوه انتخاب نمونه‌ها: طرح تحقیقاتی حاضر با کد اخلاق IR.AJAUMS.REC.1399.140 در سال ۱۳۹۹ در دانشگاه علوم پزشکی ارتش تصویب شد. سپس در همان سال (۱۳۹۹) نمونه‌برداری از بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان ارتش جمهوری اسلامی ایران انجام شد. در مجموع تعداد ۴۰ نمونه مشکوک به ویروس SARS-COV-2 تهیه گردید. سویه‌ها دلتا و مربوط به پیک سوم بود.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-02-03]

[DOI: 10.61186/sjku.28.4.66]

استخراج RNA و سنتز cDNA: استخراج RNA از نمونه‌های جمع‌آوری شده با استفاده از کیت استخراج RNA تهیه شده از شرکت سینا کلون SinaPure-RNA(cell culture. Tissues)-EX6031 و طبق دستورالعمل داخل کیت انجام گرفت. سپس برای تهیه و سنتز cDNA نیز از کیت شرکت سیناکلون SinaClon First Strand cDNA Synthesis Kit استفاده شد.

RT LAMPو RT – PCR: ژن‌های ویروسی که تاکنون برای استفاده در آزمایش‌های مولکولی هدف قرارگرفته اند شامل ژن‌هایS،E،N وژن آنزیم RNA پلیمراز وابسته به RNA (RdRP) و ORF1a / b هستند. در مطالعه حاضر ردیابی ژن‌های *N* و *S* (به دلیل کمبود موادی مثل آنزیم bst و در دسترس نبودن آن در فاز اول) برای تشخیص *SARS-CoV- 2* مورد استفاده قرار گرفت.

توالی آغازگرهای استفاده شده برای ژن‌های *N* و *S* آغازگر حلقوی LB طراحی شد (جدول ۱). طراحی آغازگرها جهت انجام واکنش RT - LAMP برای ژن‌های مورد نظر با استفاده از نرم‌افزارPrimerExplorer موجود در سایت http: / / primerexplore. Jp انجام شد. پرایمر ها بعد از طراحی با استفاده از بخش BLAST بانک اطلاعاتی NCBI از لحاظ اختصاصیت بررسی و سپس برای سنتز ارسال گردید. همچنین بایستی برای بررسی میزان اختصاصیت پرایمر های با ژنوم ویروس‌های مانند SARS، MERS نیز صحت پرایمر های بررسی گردد؛ ولی ژنوم این ویروس‌ها در دسترس نیست. به دلیل طراحی کنترل مانند کیت‌های تجاری نیازی به کنترل داخلی نبود.

- اجزای واکنش و مقادیر مورد استفاده برای واکنش LAMP: Master میکس حاوی بافر bst ۲,۵ میکرولیتر، پرایمر fip و bip با غلظت ۲۰ پیکومول ۲ میکرولیتر، dNTPs ۱ میکرولیتر، پرایمر f3 و b3 با غلظت ۲۰ پیکومول ۱ میکرولیتر، mgso4 ۱ میکرولیتر، بتائین ۲ میکرولیتر، انزیم bst ۱میکرولیتر ژنوم ۳ میکرولیتر حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر رسانده شد.

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده

name	Primer Sequence (5'-3')	Reference Gene
LoBN	GGGCGATTTTGTTAAAGCCAC	*N*
F3N	GAAAAGAAAAAGCTTGATGGC	*N*
B3N	GTAAGTAACCACAAGTAGTGG	*N*
FIN	AGTTGAAAGGCACATTTGGTTGCTTTATGGGTAGAATTCGATCTG	*N*
BIN	GTGGTGAAACTTCATGGCAGACCCTTCTTTAGTCAAATTCTCAGTG	*N*
LoBE	GCTGCAATATTGTTAACGTGAGTC	*E*
F3E	TCATTCGTTTCGGAAGAGA	*E*
B3E	AGGAACTCTAGAAGAATTCAGAT	*E*
FIE	TGTAACTAGCAAGAATACCACGAAACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCG	*E*

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-02-03]

[DOI: 10.61186/sjku.28.4.66]

cDNA تولید شده جهت تکثیر طبق کیت شرکت سیناکلون در داخل دستگاه PCR قرار گرفت. برنامه سنتز cDNA شامل دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، دمای ۴۲ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ دقیقه و دمای۷۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه بود. مقادیر مواد استفاده شده جهت انجام یک واکنش PCR شامل ۴ میکرولیتر 5 X Reaction Buffer، ۲ میکرولیتر M-MuL V Reverse transcriptase (200u/µl)، ۲ میکرولیتر 10 mM dNTP Mix و یک میکرولیتر Ribolock بود. این واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر و ۳۵ چرخه حرارتی انجام شد، کلیه مواد و آنزیم از شرکت سیناکلون تهیه شد، محصولات PCR سپس در آگارز یک درصد الکتروفورز شدند.

ساخت کنترل مثبت:TA کلونینگ و تهیه پلاسمید استاندارد پس از تکثیر PCR ژن *N* و*E* از SARS-CoV-2با استفاده از آغازگرهای F3 وB3 ، TA کلونینگ از محصول انجام شد. برای این منظور، محصول PCR با استفاده از کیت تخلیصPCR (Bioneer) خالص شد. قطعه ژن خالص شده *N* و*E* با طول ۲۱۷ و ۲۰۷ جفت باز به وسیله وکتور *pTZ57R/T* و با کمک آنزیم T4 DNA لیگاز واکنش اتصال انجام گردید و طبق دستورالعمل کاری کیت کلونینگ(sinaclon) ، ترانسفورم به *E. coli JM107* انجام شد. سلول‌های ترانسفورم شده در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت در محیط لوریا-برتانی (مرک ، آلمان) حاوی IPTG۳۸,۴ µg ml^{-1} (ایزوپروپیل بتا) و (Sigma, St. Louis, MO, USA), 40µl/ml^{-1} (isopropyl-beta- D-thiogalactopyranoside) X-gal ug/ml (5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta D-galactoside) (Sigma), ۵۰ نالیدکسیک اسید و ug/ ml ۱۰۰, آمپی سیلین .(Merck) کشت داده شد. کلنی‌های نوترکیب در محیط با غربالگری آبی و سفید مشخص شد کلنی‌های رنگ سفید حاوی وکتور نوترکیب برای ارزیابی بیشتر انتخاب شدند و بر روی این نمونه واکنش colony PCR انجام گرفت. سپس پلاسمیدهای کلنی‌های منتخب توسط کیت AccuPrep Plasmid Mini Extraction (Bioneer) استخراج گردید و ژن‌های *N* و *E* حاوی پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از PCR با آغازگرهای خارجی(F3 وB3) تأیید و به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. پلاسمید تأیید شده *pTZ57R/E* و *pTZ57R/N* نام‌گذاری شد. تست حساسیت از هر کدام از پلاسمید ها از رقت 10^{-1} تا 10^{-10} تهیه و برای هر ژن LOD محاسبه گردید. از پلاسمید ها این رقت ها تهیه و تمامی رقت‌ها مورد بررسی قرار گرفت تا مشخص شود در کدام رقت تست مثبت می شود (۱۲).

انجام واکنشRT – LAMP: ابتدا Master Mix تهیه شد. سپس به مقدار ۳ میکرولیتر از نمونه های cDNA ژنومی به تیوب های حاوی Master Mix اضافه و در بلوک حرارتی قرار گرفتند و طبق برنامه زیر واکنش LAMP انجام شد. نمونه ها به مدت ۴۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سلسیوس جهت انجام واکنش و در ۸۰ درجه سلسیوس ۱۰ دقیقه جهت خاتمه واکنش قرار داده شد. الکتروفورز محصول RT LAMPو RT – PCR: سپس نمونه ها با ولتاژ ۱۰۰ بر روی ژل ۲ درصد الکتروفورز شد. پس از خاتمه الکتروفورز ژل در دستگاه ژل داک بررسی و عکسبرداری شد.

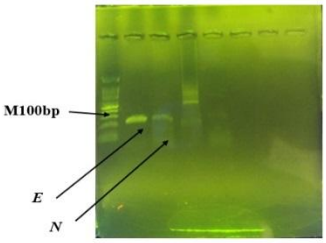
تشخیص ویروس از طریق کدورت سنجی و کلسئین: پس از پایان واکنشRT - LAMP ، کدورت ناشی از رسوب پیروفسفات منیزیم یکی از خصوصیات منحصر به فرد واکنش TR – LAMP نسبت به RT - PCR است که بلافاصله بعد از اتمام واکنش باعث شناسایی مشاهده ایی میکروتیوب واکنش مثبت از منفی می شود، همچنین رنگ آمیزی مقدار بهینه شده ای از کلسئین پس از اتمام واکنش RT – LAMP راه دیگری از شناسایی میکروتیوب های کنترل مثبت و کنترل منفی است. در این روش، برای مشاهده از دستگاه ژل داک تحت نور LED استفاده و سپس عکسبرداری صورت گرفت.

یافته ها

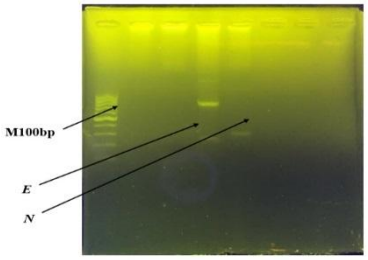
[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-02-03]

[DOI: 10.61186/sjku.28.4.66]

برای تهیه کنترل مثبت با پرایمر های بیرونی بر روی ژن های N و E با محصولی به طول ۲۰۷ bp و ۲۱۷ bp PCR و کلونینگ انجام شد (شکل ۱).

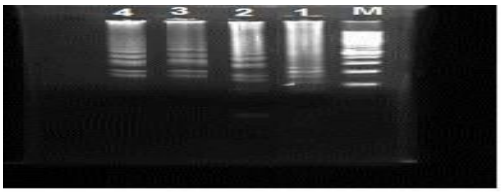


شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR ژن‌های N و E با باندهای به طول ۲۰۷ و ۲۱۷ جفت باز

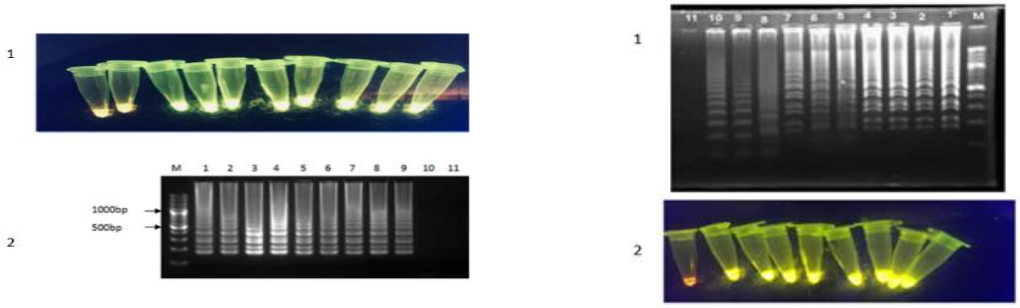


شکل۲- نتایج colony PCR برای هر یک از ژن‌های N و E با باندهای به طول ۲۰۷ و ۲۱۷ جفت باز

نتایج RT-LAMP: LAMP برای ژن‌های E و N برای کلیه نمونه‌ها، مثبت بود.



شکل۳- واکنش LAMP برای ژن‌های E و N نتایج Colony PCR: در مرحله آخر کلونینگ برای اطمینان از تکثیر درست ژن دلخواه و کلنی های رشد شده از کلنی ها به‌صورت مستقیم PCR انجام داده شد (شکل ۲).



(الف) **(ب)**

شکل ۴- الف-(۱): استفاده از کلسئین با رقت های سریال از ژن های E. (۲) : تعیین حساسیت روش Real-time LAMP با روش کدورت سنجی برای ژن E. ب- (۱) : تعیین حساسیت روش Real-time LAMP با روش کدورت سنجی برای ژن N (۲): استفاده از کلسئین با رقت های سریال از ژن های N.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-02-03]

[DOI: 10.61186/sjku.28.4.66]

تجزیه و تحلیل محصولات LAMP و شبیه سازی در میکروتیوب هایی با واکنش مثبت برای تکثیر هم دما، کدورت سفید منیزیم تشکیل شده است. کدورت پیرو فسفات با چشم غیر مسلح مشاهده و علاوه بر این، تغییر رنگ در لوله‌ها تحت نور LED دیده شد، زیرا معرف کلسئین در مخلوط با یون های منیزیم و فلورسانس سبز بیشتری تولید شد. الکتروفورز از محصولات روی ژل آگارز ۲درصد یک تکثیر DNA شبیه نردبان نشان داد (شکل ۴). در واکنش ها بدون آغازگرهای حلقه، زمان بهینه برای تکثیر ایزوترمال ۴۰ دقیقه در حالی که در واکنش حاوی آغازگرهای حلقه، ۳۰ دقیقه زمان به دست آمد. در فرآیند شبیه سازی، سنجش PCR با آغازگرهای خارجی (F3و B3) بر روی پلاسمیدهای استخراج شده از *pTZ57R/E* و *pTZ57R/N* نوترکیب از کلنی های سفید یک نوار واضح روی ژل آگارز ۲درصد ایجاد کرد نتایج پلاسمید مناسب را تأیید کرد (شکل ۴).

نتایج سنجش حساسیت و ویژگی LAMP نشان داد که کمترین غلظت *pTZ57R /E* و *pTZ57R/N* تشخیص داده شده توسط کدورت واقعی برای ژن *E* بر روی ژل الکتروفورز رقت 10^{-9} و بر اساس نور فلورسنت آخرین رقت قابل پیش‌بینی 10^{-8} است که به ترتیب ۱ کپی و ۱۴ کپی را تشخیص می‌دهد؛ اما در مورد ژن *N* بر روی ژل تا رقت 10^{-10} و در اثر نور فلورسنت تا رقت 10^{-8} قابل بررسی بود که به ترتیب توان تشخیص ۱ کپی و ۱۷ کپی را دارا بودند که این اعداد بر اساس فرمول Chiang محاسبه گردید. (مطابق با نتایج کدورت سنج زمان واقعی) برای ژن *E* و *N* تعیین شد (شکل۴).

CN = MN/LD

CN: تعداد کپی

M: کمترین غلظت محصول PCR و وکتور که قابل ردیابی باشد بر حسب گرم (برای تبدیل نانوگرم به گرم عدد به دست آمده از دستگاه پیکودراپ در۹- ۱۰ ضرب می شود)

N: عدد آووگادرو۱۰۲۳ ×۶/۰۲۳

L : طول وکتور به همراه نوکلئیک اسید PCR شده بر اساس جفت باز

D: فاکتور متغیری برابر با عدد ۱۰۵× ۶/۶ که جفت باز را به کیلودالتون تبدیل می‌کند.

بحث

روش‌های متداول تشخیص SARS-COV-2 نیازمند زمان طولانی است که فاقد کارایی لازم جهت تشخیص سریع این ویروس می‌باشند .محققین جهت تشخیص مولکولی SARS-COV-2پرایمرهای مختلفی بر اساس *E*،*S*،*M*، *N*ردیف ژن‌های شناخته‌شده را طراحی و بررسی نموده‌اند، انجام PCR با دو جفت پرایمر *N,E* که بر اساس ژن SARS-COV-2طراحی شده (به ترتیب باندهای به طول ۲۱۷ و ۲۰۷ جفت باز) از ژن‌های مهم SARS-COV-2 را نشان می‌دهد؛ بنابراین هدف از مطالعه حاضر طراحی یک روش برای تشخیص سریع SARS-CoV-2 و ایجاد یک روش حساس LAMP (RT-LAMP) برای تشخیص ویروس SARS-CoV-2 بود.

با استفاده از روشRT - LAMP زمان نهایی تشخیص نسبت به RT – PCR بسیار کوتاه‌تر شد. حساسیت بالای RT – LAMPنسبت به RT - PCR از دیگر فاکتورهای قابل توجه بود. همچنین هزینه نهایی RT – LAMP نسبت به RT - PCR بسیار کمتر بود؛ زیرا در LAMP از دستگاه ترموسایکلر یا مواد شیمیایی خاصی استفاده نشده است؛ بنابراین روشRT - LAMP در مقایسه با RT- PCRمی تواند به عنوان روش تشخیص مولکولی سریع‌تر (تقریباً برابر)، دقیق‌تر (تا ۱۰۰ برابر) با کاربرد گسترده در آزمایشگاه‌های تشخیصی مورد استفاده قرار گیرد.

Lamb و همکاران در سال ۲۰۲۰ طی مطالعه‌ای برای تشخیص سریع ویروس کرونا ویروس (COVID-19) توسط حلقه رونویسی معکوس- تکثیر ایزوترمال با واسطه LAMP مناطق طراحی شده برای منطقه پنج ژن *ORF1a* و ژن *N* هر مجموعه آزمایش شدکه توسط RNA مصنوعی انجام و ۱۰۰درصد جواب داد که نتیجه گیری شد

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-02-03]

[DOI: 10.61186/sjku.28.4.66]

که تکنیک پر سرعت، حساس و بسیار دقیق LAMP می تواند برای تشخیص COVID-19 استفاده شود(۱۳). همچنین El-Tholoth و همکاران در سال ۲۰۲۰ با بررسی روش LAMP تک مرحله‌ای و دومرحله‌ای برای ویروس ۲۰۱۹ جدید کرونا SARS-COV-2 ، برای ایجاد یک آزمایش تشخیص غربالگری سریع انجام دادند که می تواند در کمتر از ۳۰ دقیقه انجام شود. نمونه های بیمار شبیه سازی شده با استفاده از سرم، ادرار، بزاق، سواب های حنجره و حلق بود. سواب با بخشی از توالی نوکلئیک SARS-COV-2 با استفاده از qRT-PCR معمولی RT-LAMP مورد بررسی قرار گرفت(۹)؛ بنابراین نتایج ما با سایر محققین در این زمینه همخوانی داشت و SARS-COV-2 به طور اختصاصی با این روش در زمانی بالغ بر ۳۰ تا ۴۵ دقیقه تشخیص داده شد .بر اساس نتایج مطالعات قبلی چنین نتیجه‌گیری می‌شود که تشخیص SARS-COV-2 با روش Real Time PCR بیش از ۳ تا ۴ ساعت زمان نیاز دارد. Iwamoto و همکاران نشان دادند که اضافه کردن SYBR Greenبه مخلوط واکنش LAMP تشخیص را آسان‌تر می‌کند (۱۴). همچنین Flores و همکاران با افزودن پروب به روش LAMP تشخیص بیماری‌های قارچی را با اطمینان و دقت بالاتری را به عنوان یافته‌ای مهم بیان نمودند(۱۵). به طور واضح این روش نیز دارای محدودیت‌هایی است از آن جمله می‌توان به پیچیدگی طراحی آغازگرهای چندگانه و پروب های لازم برای تکثیر هر ناحیه ژنی جدید که برای افراد کم تجربه مشکل است، اشاره کرد .این روش نیز یکی از روش های کاربردی در تشخیص مولکولی عوامل بیولوژیک و بالینی است که آشکارسازی محصول نهایی با استفاده از تکنیک هیبریداسیون با پروب های فلورسنت که به عنوان یک ماده نشاندار نمونه مثبت را نمایان می‌کند باعث آنالیز ساده‌تر، مطمئن‌تر و دقیق‌تر نتایج می‌گردد .همین امر باعث می‌شود که امکان بروز خطا کاهش و اطمینان از حصول نتیجه مثبت افزایش یابد .با استفاده از روشLAMP فلورسنت زمان نهایی تشخیص نسبت PCRبه بسیار کوتاه‌تر می‌گردد که در مقایسه با تلاش‌های دیگری که جهت کوتاه کردن زمان تشخیص ویروس‌های بیماری‌زا از جمله SARS-COV-2که با دستگاه‌های متداول PCR صورت گرفته است، قابل‌توجه است .بنابراین روش ایزوترمال بررسی شده می‌تواند به‌عنوانLAMP فلورسنت در مقایسه باPCR روش تشخیص مولکولی بسیار سریع‌تر (تقریباً ۳ برابر)، دقیق‌تر (تا ۱۰۰ برابر) و ارزان‌تر (تا ۱۰ برابر) با کاربرد گسترده در آزمایشگاه‌های تشخیصی پزشکی قانونی، کشاورزی و تحقیقاتی و حتی آزمایشگاه‌های کوچک و سیار نیز جهت مطالعات همه‌گیرشناسی، تشخیص و شناسایی مورد استفاده قرار گیرد.

Dong و همکاران برای شناسایی کرونا ویروس به روش RT-LAMPکه یک روش سریع و قوی برای تشخیص COVID-19 را در کمتر از 30 دقیقه ارائه نمود، به طوری که این روش می‌تواند توسط افراد بدون آموزش تخصصی یا تجهیزات خاص و گران قیمت انجام شود و یک تشخیص جدید برای مبارزه با گسترش COVID-19باشد(۱۶). Yu و همکاران برای تشخیص سریع رنگ سنجی SARS-CoV-2 با استفاده از یک تقویت کننده ایزوترمال ایزوترمال حلقوی معکوس رونویسی معکوس (RT-LAMP) و بسترهای تشخیصی استفاده کردند (۱۷). Rodelو همکاران در سال ۲۰۲۰ مطالعه‌ای تحت عنوان استفاده از variplex ™ *SARS-CoV-2* RT-LAMP به عنوان یک روش مولکولی سریع برای تکمیل روش RT-PCRبرای تشخیصCOVID-19 را بررسی کردند (۱۸). در این مطالعه ژن E به عنوان مرجع نمونه ترشحات تنفسی از بیماری عفونت کرونا ویروسCOVID-19 و بیماران شاهد منفی توسط واریپلکس ™ بدون استخراج RNA و به موازاتRT-PCR مورد تجزیه و تحلیل قرار داد. یافته ها نشان داد که RNAجدا شده با استفاده RT- ™ variplex LAMP ژن *E* باحساسیت ۷۵ درصد در مقایسه باRT- PCR LightMix بود نتیجه مثبت کاذب گزارش نشد و نتیجه گیری شد که variplex RT-LAMP می‌تواند به عنوان یک آزمایش سریع همراه با یک روش

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-02-03]

[DOI: 10.61186/sjku.28.4.66]

RT-PCR برای افزایش دقت تشخیصی در بیماران مشکوک به عفونت COVID-19 باشد (۱۸). Osterdahl و همکاران در سال ۲۰۲۰ با مقایسه حلقه واسطه تکثیر هم دما (LAMP) با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(PCR) برای تشخیص SARS-CoV-2 دریافتند که RT-LAMP برای تشخیص SARS-CoV-2 امیدوارکننده، سریع و حساس و دقیق است (۱۹).

Jiang و همکاران تحقیقی تحت عنوان توسعه و اعتبار معکوس یک مرحله‌ای و دقیق تکنیک تقویت حرارتی واسطه‌ای حلقه واسطه (RT-LAMP) برای شناسایی سریع SARS-CoV-2 نسبت به تجاری معکوس ترانس کریپتاز - سایپرز، سنجش Real Time PCR (qRT-PCR)برای تشخیص سریع مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت، در نهایت ویژگی تحلیلی و حساسیت این تکنیک ۱۰۰درصد و ویژگی ۹۹/۵٪ بود (۲۰). با توجه به حساسیت و دقت بالای LAMP پیشنهاد می شود این روش جایگزین روش‌های تشخیصی معمول در آزمایشگاه مانند تست الایزا و حتی جایگزین RT- PCR گردد. همچنین با توجه به اینکه RNA ویروس *SARS-COV-2* پس از جدا شدن از فرد بیمار بسیار کم ثبات است، از روش RT – LAMP برای شناسایی سریع این ویروس استفاده شود. بعلاوه به خاطر قدرت تشخیصی بالا، روش انجام آسان و هزینه اندک این تکنیک در پاندمیک ویروس مورد استفاده قرار گیرد. از محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌توان به در دسترس نبودن آنزیم *Bst* اشاره نمود. همچنین نبودن کیت‌های تشخیصی مجوز دار بر پایه تکنیک LAMP به عنوان یک محدودیت مهم دیگر بشمار می رود.

نتیجه گیری

با توجه به قدرت تشخیصی بالا، روش انجام آسان و هزینه اندک این تکنیک در بیمارستان‌های صحرایی و آزمایشگاه‌های بدون تجهیزات می‌توان از روش RT - LAMP به‌عنوان روش تشخیصی دقیق و سریع در بخش قرنطینه و بازرسی ورودی و خروجی کشورها و استان‌ها جهت شناسایی و تشخیص SARS-COV-2 استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر برگرفته از طرح تحقیقاتی مصوب در دانشگاه علوم پزشکی ارتش با کد اخلاق IR.AJAUMS.REC.1399.140 است. بدین وسیله نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارتش کمال تشکر و قدردانی را دارند.

منابع

1.Flint SJ, Racaniello VR, Rall GF, Hatziioannou T, Skalka AM. Principles of virology, Volume 2: pathogenesis and control: John Wiley & Sons; 2020.

2.Smith EC, Blanc H, Vignuzzi M, Denison MR. Coronaviruses lacking exoribonuclease activity are susceptible to lethal mutagenesis: evidence for proofreading and potential therapeutics. PLoS pathog. 2013;9(8):e1003565.

3.Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. Medical microbiology: Elsevier health sciences. 2015.

4.Nal B, Chan C, Kien F, Siu L, Tse J, Chu K, et al. Differential maturation and subcellular localization of severe acute respiratory syndrome coronavirus surface proteins S, M and E. J gen virol. 2005;86(5):1423-34.

5.DeDiego ML, Álvarez E, Almazán F, Rejas MT, Lamirande E, Roberts A ,et al. A severe acute respiratory syndrome coronavirus that lacks the E gene is attenuated in vitro and in vivo. J virol. 2007;81(4):1701-13.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-02-03]

[DOI: 10.61186/sjku.28.4.66]

6.Cui L, Wang H, Ji Y, Yang J, Xu S, Huang X, et al. The nucleocapsid protein of coronaviruses acts as a viral suppressor of RNA silencing in mammalian cells. J virol. 2015;89(17):9029-43.

7.Woo PC, Lau SK, Lam CS, Lau CC, Tsang AK, Lau JH, et al. Discovery of seven novel Mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus. J virol. 2012;86(7):3995-4008.

8.Su S, Wong G, Shi W, Liu J, Lai AC, Zhou J, et al. Epidemiology, genetic recombination, and pathogenesis of coronaviruses. Trends microbiol. 2016;24(6):490-502.

9.El-Tholoth M, Bau HH, Song J. A single and two-stage, closed-tube, molecular test for the 2019 novel coronavirus (COVID-19) at home, clinic, and points of entry. ChemRxiv. 2020.

10.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(1):150-4.

11.Sohrab M, Majidzadeh K,Morovvati A, Soleimani M. Real-Time Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Method for Quantitative Salmonella Typhi Detection Based on ViaB Gene. J Adv Med Biomed Res.2021;2(12).

12.Soleimani M, Morovvati A, Majidzadeh k. Molecular Design Real Time Loop-mediated Isothermal Amplification Method for Rapid Detection of Neisseria Meningitidis. Folia med. 2020; 63(2):221-7.

13.Lamb LE, Bartolone SN, Ward E, Chancellor MB. Rapid detection of novel coronavirus (COVID19) by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. PLoS One. 2020; 15(6): e0234682.

14.Iwamoto T, Sonobe T, Hayashi K. Loop-mediated isothermal amplification for direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex, M. avium, and M. intracellulare in sputum samples. J clin microbiol. 2003;41(6):2616-22.

15.Inácio J, Flores O, Spencer-Martins I. Efficient identification of clinically relevant Candida yeast species by use of an assay combining panfungal loop-mediated isothermal DNA amplification with hybridization to species-specific oligonucleotide probes. J Clin Microbiol. 2008;46(2):713-20.

16.Dong Y, Wu X, Li S, Lu R, Li Y, Wan Z, et al. Comparative evaluation of 19 reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assays for detection of SARS-CoV-2. Sci rep. 2021;11(1):1-11.

17.Yu L, Wu S, Hao X, Dong X, Mao L, Pelechano V, et al. Rapid detection of COVID-19 coronavirus using a reverse transcriptional loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) diagnostic platform. Clin Chem. 2020;66(7):975-7.

18.Rödel J, Egerer R, Suleyman A, Sommer-Schmid B, Baier M, Henke A, et al. Use of the variplex™ SARS-CoV-2 RT-LAMP as a rapid molecular assay to complement RT-PCR for COVID-19 diagnosis. J Clin Virol. 2020;132:104616.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-02-03]

[DOI: 10.61186/sjku.28.4.66]

19.Osterdahl M, Lee K, Ni Lochlainn M, Wilson S, Douthwaite S, Horsfall R, et al. Detecting SARS-CoV-2 at point of care: preliminary data comparing loop-mediated isothermal amplification (LAMP) to PCR. BMC Infect Dis. 2020;20(1):783.

20.Jiang M, Pan W, Arasthfer A, Fang W, Ling L, Fang H, et al. Development and validation of a rapid, single-step reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP (system potentially to be used for reliable and high-throughput screening of COVID-19. Front Cell Infect Microbiol. 2020;10:331.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-02-03]

[DOI: 10.61186/sjku.28.4.66]