دانشگاه علوم پزشكي و خدمات بهداشتي درماني فسا

دانشکده پزشکی

پایان نامه برای اخذ درجه کارشناسی ارشد

در رشته بیوتکنولوژی پزشکی

عنوان:

طراحی، توسعه و ارزیابی روش Multiplex lamp بر اساس ناحیه ITS جهت تشخیص سریع گونه‌های لیشمانیا

نگارش:

سحر صمصامی

استاد راهنما:

دکتر علی قنبری اسد

استاد مشاور:

دکتر غلامرضا حاتم

اسفند ۱۳۹۷

شماره پایان نامه: ۱۳۵

چکیده:

مقدمه: تشخیص مطمئن لیشمانیوز احشایی و بررسی عود بیماری نیازمند بررسی میکروسکوپی و نمونه‌برداری تهاجم‌های از مغز استخوان و طحال و گره لنفاوی می‌باشد. تشخیص مولکولی اجازه نمونه‌برداری با تهاجم کمتر و تشخیص با حساسیت بیشتر جهت لیشمانیوز پوستی با ضایعات طولانی‌مدت و لیشمانیوزاحشایی با خطر کشندگی بالا می‌شود. تشخیص مولکولی می‌تواند بر اساس نواحی ITSصورت پذیرد. یکی از این روش‌های مولکولی روش LAMP می‌باشد.

روش کار: مطالعه حاضر توسعه روش LAMP جهت تشخیص لیشمانیا احشایی در نمونه خون محیطی می‌باشد. بر این اساس ۳ سیستم جهت واکنش LAMP طراحی شد. هر سه سیستم بر اساس ناحیه ITS۲می‌باشند که. سیستم LAMP۱جهت تشخیص لیشمانیا اینفانتوم اختصاصی تهیه شد و سیستم LAMP۲ جهت شناسایی هر سه سوش لیشمانیا اینفانتوم و تروپیکا و ماژور طراحی گردید. سیستم Multiplex LAMP که از دو مجموعه پرایمر LAMP۱,۲ به‌صورت همزمان در یک واکنش تک‌مرحله‌ای استفاده می‌کند در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۲۰ دقیقه صورت گرفت. واکنش real-time pcr,nested pcr, pcr نیز روی نمونه‌های استاندارد انجام گرفت و نتایج آن‌ها با همدیگر و با روش LAMP مقایسه گردید.

نتایج: بین روش‌های بر اساس PCR, ابتدا Real-time PCR و سپس Nested PCR نسبت به PCR کلاسیک حساسیت بالاتری داشتند. سیستم LAMP۱ اختصاصی جهت شناسایی لیشمانیا اینفانتوم با حساسیت کمتر نسبت به دو سیستم دیگر بود. سیستم LAMP۲ جهت شناسایی لیشمانیا اینفانتوم و لیشمانیا ماژور و تروپیکاست که لیشمانیا اینفانتوم را با حساسیت بالاتر نسبت به دو سوش دیگر شناسایی می‌کرد. روش توسعه‌یافته Multiplex LAMP به حساسیت بسیار بالاتر نسبت به LAMP۱,۲ با محدوده‌ی تشخیص ۱ عدد از پلاسمید در هر ماکرو لیتر از مخلوط واکنش رسید.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه حاضر نشان‌دهنده این امر می‌باشد که Real time PCR نسبت به Nested PCR, PCR حساسیت بیشتری جهت تشخیص هر سه سوش لیشمانیا دارد و Nested PCRنسبت به PCR جهت تشخیص لیشمانیا اینفانتوم حساس‌تر می‌باشد. LAMP جهت تشخیص انگل لیشمانیا نسبت به سایر روش‌های مولکولی حساسیتی شبیه به Real-time PCR دارد و همچنین واکنش LAMP۲ حساسیت بالاتری نسبت به LAMP۱ داشته و Multiplex LAMP نسبت به LAMP ساده و سایر روش‌های مولکولی از حساسیت بالایی برخوردار است. از این‌رو می‌توان از روش Multiplex LAMP به منظور تشخیص عوامل عفونی دیگر نیز بهره جست.

کلمات کلیدی: لیشمانیوز احشایی، لیشمانیا اینفانتوم، تکثیر هم دمایی به‌واسطه روش حلقه، روش مرکب تکثیر هم دمایی به‌واسطه حلقه

Abstract

Visceral leishmaniasis and the diagnosis of the disease require microscopic examination and bone marrow and spleen and lymph node sampling. Molecular detection allows for less invasive sampling and The diagnosis is more sensitive to leishmaniasis with long-term lesions and high-risk leishmaniasis. Molecular detection can take place based on ITS region. One of these molecular methods is the LAMP method..

this study is to develop a LAMP method for diagnosing visceral leishmaniasis in peripheral blood samples. Accordingly, three systems for LAMP reaction were designed, All three systems are based on the ITS۲ region. The LAMP۱ system was developed to detect Leishmania infantum, The LAMP۲ system was designed to identify all three strains of Leishmania Infantum and Tropica and Major. The Multiplex LAMP system, which uses two primer sets of LAMP۱,۲ simultaneously in a single-phase reaction, was carried out at ٦٥ ° C for ۱۲۰ minutes. The real-time pcr, nested pcr, pcr was performed on standard samples and their results were compared with each other by the LAMP method.

The results of this study showed that Real time PCR is more sensitive than Nested PCR, PCR to detect all three leishmaniasis, Nested PCR is more sensitive than PCR to detect Leishmania infantum, LAMP is similar to Real-Time PCR for diagnosis of Leishmania parasite than other molecular methods. LAMP has a sensitivity similar to that of real-time PCR to detect leishmaniasis in comparison with other molecular methods, and the LAMP۲ response is more sensitive than LAMP۱, and Multiplex LAMP has a high sensitivity to LAMP and other molecular methods. Therefore, the Multiplex LAMP method can be used to identify other infectious agents.

Keywords:Design, development and evaluation of Multiplex LAMP method based on ITS Region for rapid diagnosis of visceral leishmaniasis