



دانشگاه علوم پزشکی فسا

دانشکده پزشکی

پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد

عنوان:

تعیین میزان حساسیت و اختصاصیت روش Nested-LAMP به منظور تشخیص انگل لیشمانیا گونه ماژور با هدفگیری مارکر ژنتیکی ITS۱

نگارنده:

آوا یزدان پناه

اساتید راهنما:

جناب آقای دکتر علی قنبری اسد

جناب آقای دکتر محمود آغولی

اسفندماه-۱۳۹۷

شماره پایان نامه: ۱۳۶

چکیده:

تعیین میزان حساسیت و اختصاصیت روش Nested-LAMP به منظور تشخیص انگل لیشمانیا گونه ماژور با هدفگیری مارکر ژنتیکی ITS^۱

مقدمه: تکنیک LAMP جهت تکثیر قطعه ژنی مشخص در سال ۲۰۰۰ توسعه یافت و امروزه به منظور اهداف مختلف مورد استفاده قرار گرفته و در حال توسعه می‌باشد. توسعه این تکنیک در جهت افزایش حساسیت آن می‌تواند نتایج خیره کننده ای را به دنبال داشته باشد. تا آنجا که برتری خود را نسبت به بسیاری از تکنیک‌های مولکولی از جمله روش Real-Time PCR به نمایش بگذارد. از این رو در پژوهش حاضر توسعه روش LAMP در جهت افزایش حساسیت آن به عنوان هدف اصلی مطالعه در نظر گرفته شد و عملکرد آن در جهت تشخیص بیماری لیشمانیوز جلدی که شایعترین نوع لیشمانیوز در جهان و به ویژه ایران می‌باشد مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش کار: در مطالعه حاضر به منظور بهبود عملکرد واکنش LAMP جهت تشخیص لیشمانیوز پوستی روشی تحت عنوان تکنیک Nested-LAMP با افزودن دو پرایمر اضافی به پرایمرهای واکنش LAMP طراحی شد. در این راستا پس از انتخاب مارکر ژنتیکی ITS^۱ طراحی پرایمر انجام شد و پس از استخراج DNA نمونه استاندارد لیشمانیا ماژور، به دنبال کلونینگ و تهیه سریال دایلوژن از پلاسمید، حساسیت تست‌های مولکولی LAMP، Nested-LAMP، PCR و Real-time با یکدیگر مقایسه گردید.

نتایج: پس از بررسی نتایج به جهت تعیین حساسیت تست‌ها، برای روش مولکولی PCR و Real-time PCR به ترتیب به حد تشخیصی معادل 1×10^6 parasite/ μ l و 100 parasite/ μ l دست یافتیم. نتایج حاصل از واکنش LAMP و Nested-LAMP نیز با افزودن سایبرگرین به ترتیب معادل

$$\approx 1 \times 10^6 \text{ parasite}/\mu\text{l} \text{ و } 1 \text{ parasite}/\mu\text{l} \text{ (افزایش } 100 \text{ هزار برابری) گزارش شد.}$$

نتیجه گیری: نتایج بدست آمده گواه بر برتری تکنیک Nested-LAMP طراحی شده می‌باشد که می‌تواند به عنوان یک روش تشخیصی سریع، دقیق و مقرون به صرفه جهت شناسایی عوامل مختلف عفونی در تمامی مراکز درمانی بکار رود.

واژگان کلیدی: لیشمانیوز پوستی، لیشمانیا ماژور، تشخیص، LAMP، Nested-LAMP

Abstract

Determination of the sensitivity and specificity of the Nested-LAMP method for detecting *leishmania major* by targeting the genetic marker ITS

Summary

Introduction: The LAMP technique was developed in 2000 to amplify a specific gene fragment and is now being used and developed for various purposes. The development of this technique to increase its sensitivity can lead to stunning results. To the extent that it demonstrates its superiority over many molecular techniques, including Real-Time PCR. Therefore, in the present study, the development of LAMP method to increase its sensitivity was considered as the main goal of the study and its performance was evaluated to diagnose cutaneous leishmaniasis, which is the most common type of leishmaniasis in the world, especially in Iran.

Methods: In the present study, we designed a method called Nested-LAMP technique to improve the function of LAMP reaction for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis by adding two additional primers to the LAMP reaction primers. In this regard, primer design was performed after selection of ITS genetic marker and after extraction of standard *Leishmania major* DNA samples, Following cloning and serial dilution of plasmid, sensitivity of LAMP, Nested-LAMP, PCR and Real-time molecular tests was compared with each other.

Results: After examining the results to determine the sensitivity of the tests, we were obtained for the molecular method of PCR and Real-time PCR, to a diagnostic value equal to $\geq 1 \times 10^3$ parasite/ μ l and $\geq 10^4$ parasite/ μ l, respectively. The results of the LAMP and Nested-LAMP reactions also were evaluated After adding a Cyber Green, 1×10^6 parasite/ μ l and 10^7 parasite/ μ l respectively.

Conclusion: The results attest to the superiority of the designed Nested-LAMP technique, which can be used as a rapid, accurate and cost-effective diagnostic method for identifying different infectious agents in all treatment centers.

Key words: Leishmaniasis, *Leishmania major*, Diagnosis, LAMP, Nested-LAMP