مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال بیست و نهم/شماره ۱۶۹/هفته اول اسفند ماه ۱۳۹۰
مقاله پژوهشی
تاریخ دریافت: ۹۰/۸/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۰/۲۰

تشخیص انگل لیشمانیا در بیماران توسط کشت *NNN* و PCR RFL

نوشین هاشمی[۱]، میترا هاشمی[۲]، دکتر گیلدا سلامی[۳]، لیلا شیرانی بید آبادی[۴]، دکتر سیدحسین حجازی[۵]

چکیده

مقدمه: لیشمانیوز یک بیماری عفونی انگلی با انتشار وسیع در مناطق معتدله و گرمسیری است. هدف این مطالعه به کار گیری دو روش PCR-RFLP و کشت NNNدر نمونه هایی بود که اسمیر مستقیم آن‌ها از نظر وجود آماستیگوت منفی بود.

روش‌ها: این مطالعه جهت بررسی و تعیین گونه‌های Leishmania در منطقه‌ی اصفهان بر روی DNA استخراج شده از انگل‌های حاصل از کشت بیماران اسمیر منفی با روش PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) انجام شد. جهت کشت انگل مقداری ا ز نمونه‌ی برداشت شده از بیمار بر روی محیط NNN و RPMI 1640 برده شد. از مجموع ۱۰۰ نمونه اسمیر منفی ۵۰ نمونه در محیط کشت از نظر پزوماستیگوت‌های انگل Leishmania مثبت شد و DNA حاصل از کشت نمونه‌ها استخراج گردید. بعد از استخراج DNA با استفاده از روشPCR-RFLP تکثیر از توالیITS_1 با پرایمرهای اختصاصی صورت گرفت و بعد از هضم با آنزیم HaeIII ایزوله‌ها در مقایسه با سویه‌های استاندارد تعیین گونه شدند.

یافته‌ها: از مجموع ۵۰ نمونه‌ی اصفهان ۴۶ نمونه L.major و ۴ نمونه L.tropica تشخیص داده شد.

نتیجه‌گیری: مطالعه‌ی حاضر نشان داد که PCR-RFLP روشی حساس و دقیق برای تعیین گونه‌های عامل لیشمانیوز جلدی است و ضایعات مورد مطالعه در منطقه‌ی اصفهان ناشی از L.major و L.tropica می‌باشد.

واژگان کلیدی: PCR-RFLP، لیشمانیوز جلدی، انگل.

مقدمه

لیشمانیوز مجموعه‌ای از بیماری‌های عفونی است که به وسیله ی گونه‌های مختلف تک‌یاخته‌ی Leishmania ایجاد می شود و ناقل آن پشه‌های خاکی خانواده ی فلبوتومینه می‌باشند (بیش از ۳۰ گونه به عنوان ناقل شناخته شده‌اند) (۳-۱). این بیماری که در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری شایع می‌باشد شیوع جهانی حدود ۱۲ میلیون نفر و بروز سالانه ۱/۵ میلیون مورد را دارا است و تظاهرات بالینی آن از ضایعات بدشکل خود به خود بهبود یابنده تا اپیدمی‌های شدید با میزان مرگ و میر بالا متغیر می‌باشد (۶-۴). لیشمانیوز جلدی در دنیای قدیم به طور عمده توسط دو گونه‌ی L. tropica که عامل لیشمانیوز جلدی شهری (خشک) است و L.major که عامل لیشمانیوز جلدی روستایی (مرطوب) است، ایجاد می‌گردد (۲).

۹۰ درصد از گزارش‌های مرتبط با لیشمانیوز مربوط به کشورهای افغانستان، الجزایر، برزیل، ایران، عربستان سعودی می‌باشد (۷). در ایران نوع آنتروپونوتیک یا نوع شهری لیشمانیوز جلدی اغلب در شهرهای تهران، شیراز، خراسان، کرمان و نوع

[۱] دانشجوی دکتری ، گروه انگل‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
[۲] کارشناس ارشد، گروه آمار، معاونت آموزشی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
[۳] استادیار، گروه انگل و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی یزد، یزد، ایران
[۴] کارشناس ارشد، گروه حشره‌شناسی، مرکز تحقیقات پوست و سالک، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
[۵] دانشیار، گروه انگل و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر سیدحسین حجازی
Email: hejazi@med.Mui.ac.ir

روستایی در اصفهان، گلستان، خوزستان، ایلام، بوشهر و سمنان دیده می‌شود (۹-۸).

از لحاظ اپیدمیولوژی و اکولوژی، بیماری بسیار متنوع است و به عوامل متعددی مانند انگل، ناقل، میزبان و محیط بستگی دارد (۴). درمان بیماری بسته به نوع انگل متفاوت است و تعیین مشخصات انگل به منظور برنامه‌ریزی‌های کنترل و پیشگیری از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. جهت تشخیص گونه‌های انگل، از روش های کشت آزمایشگاهی، سرولوژی و ایزوآنزیمی استفاده شده است. با توجه به تشابهات مرفولوژیکی زیاد برای تعیین عامل بیماری در نمونه‌های حاصل از کشت در سالیان اخیر روش‌های نوین مولکولی مبتنی بر تکنیک‌های Real-time PCR و PCR-RFL (olymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) جایگزین آن‌ها گردیده است. با کمک این روش ها که از حساسیت و اختصاصیت بالاتری نسبت به روش‌های سنتی برخوردار هستند، به راحتی می‌توان گونه های انگل را در کوتاه‌ترین زمان تعیین هویت کرد (۱۰). تکنیک PCR-RFL که شامل تکثیر DNA هدف، هضم محصول با آنزیم‌های اندونوکلئاز (محدود کننده) و مقایسه‌ی باندهای به دست آمده با شاهد می‌باشد، به طور گسترده‌ای برای تشخیص مولکولی میکروارگانیسم‌ها کاربرد دارد (۱۱).

در این مطالعه دو روش کشت NNN و PCR-RFLP در بیماران لیشمانیوز جلدی که اسمیر مستقیم آن‌ها از نظر وجود آماستیگوت منفی بود به کار گرفته شد و نتایج با همدیگر مقایسه گردید.

روش‌ها

این مطالعه از نوع مقطعی بود که در شهر اصفهان از شهریور ۱۳۸۷ لغایت اسفند ماه ۱۳۸۷ انجام گردید. نمونه‌ها در اصفهان از آزمایشگاه مرکز تحقیقات بیماری‌های پوستی و سالک صدیقه‌ی طاهره اصفهان که از مراکز پذیرش بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی می‌باشد تهیه شد. نمونه هایی که آزمایش مستقیم میکروسکوپی آنان از نظر آماستیگوت منفی بود وارد مرحله‌ی کشت گردید. لام مستقیم ۱۰۰ نمونه از نمونه‌های مورد بررسی از نظر وجود آماستیگوت‌ها منفی بود که ۵۰ نمونه بر روی محیط کشت رشد نمودند. سپس روش PCR-RFLP بر روی DNA استخراج شده از انگل‌های حاصل از کشت بیماران اسمیر منفی انجام شد.

نمونه‌گیری و کشت

ابتدا محل ضایعه با اتانول ۷۰ درصد ضدعفونی و برش کوچکی در حاشیه‌ی برجسته‌ی زخم به وسیله‌ی تیغ جراحی یک بار مصرف ایجاد شد. مقداری از بافت همراه با سروزیته از موضع ضایعه برداشته شد و بر روی لام گسترش تهیه گردید.

اسمیرهای تهیه شده بر روی لام‌ها در مقابل هوا خشک و با متانول چند دقیقه فیکس گردید و با گیمسا رنگ آمیزی شد. برای رنگ‌آمیزی از رنگ گیمسا استفاده شد. لام‌های رنگ شده زیر میکروسکوپ با لنز ×۴۰ مورد بررسی اولیه و لنز روغنی ×۱۰۰ جهت مشاهده ی اشکال آماستیگوت انگل آزمایش شد. نمونه هایی که آزمایش مستقیم میکروسکوپی آنان از نظر آماستیگوت منفی بود وارد محیط کشت گردید. جهت کشت نمونه‌ها مقداری از مواد برداشت شده از بیمار به طور استریل به محیط کشت NNN (Novy-Nicol- Mac Neal) برده شد و در دمای ۱ ± ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه و هر ۳ روز از نظر وجود آماستیگوت‌ها بررسی شد. پس از ایزوله شدن پروماستیگوت‌ها در این محیط به منظور تولید انبوه به

محیط RPMI 1640 همراه با سرم جنین گوساله (FCS) ۱۰ درصد به عنوان مکمل منتقل شد. سپس پروماستیگوت‌های رشد یافته جدا و پس از سه بار شستشو با PBS استریل با استفاده از kit template High pure preparation (Roche) PCR مورد استخراج قرار گرفت. DNA استخراج شده سپس بر روی آگاروز ۱ درصد با ولتاژ ۸۰ و در تانک حاوی TBE 1X الکتروفورز شد و در دستگاه ترانس لومیناتور بررسی شد.

تعیین گونه‌ی ایزوله‌ها

ناحیه‌ی ITS1 مربوط به DNA استخراج شده از ایزوله‌ها با استفاده از دو پرایمر زیر و دستگاه ترموسایکلر (corbet) مورد تکثیر قرار گرفت:

پرایمر ۱: L ITS R 5′- CTG GAT CAT TTT CCG ATG 3′ و

پرایمر ۲: L 5.8 S 5- TGA TAC CAC TTA TCG CACTT 3′

تکثیر به وسیله‌ی PCR

از DNA استخراج شده گونه‌های استاندارد L. tropica (MH/IR/yazd1) و L. major (MRHO/IR/75/ER) به عنوان شاهد مثبت استفاده گردید.

مواد تشکیل دهنده ی واکنش PCR به شرح زیر بودند:

dNTP (۲۰۰ میکرومول)، $MgCl_2$ (۲ میکرومول)، Primers each (۲۵ پیکومول)، Template DNA (۱ میکرولیتر)، Taq polymerase enzyme (۰/۵ واحد) که در میکروتیوب ۰/۲ میلی‌لیتری مخلوط و در ترموسایکلر قرار گرفتند.

مراحل انجام PCR به ترتیب زیر است:

یک سیکل مقدماتی دناتوره کردن با دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۰ سیکل و هر سیکل شامل:

۱) ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه (Denaturation)

۲) ۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه (Annealing)

۳) ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه.

۴) ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۶ دقیقه.

محصول تکثیرشده با افزودن loading buffer بر روی ژل آگاروز ۱ درصد الکتروفورز شد.

Digestion با آنزیم Hae III

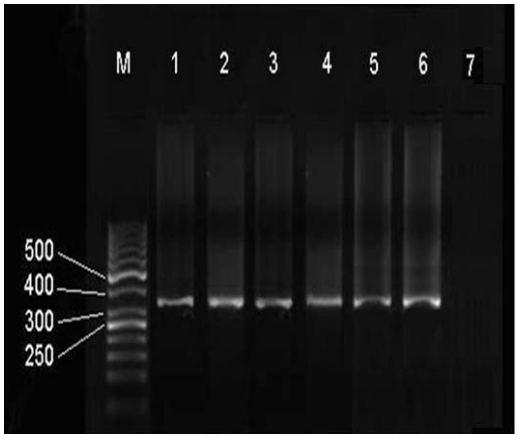
آنزیم Hae III از شرکت فرمنتاز Fermentase Life Sciences Germany خریداری شد. مواد تشکیل‌دهنده‌ی واکنش هضم (digestion) که شامل ITS-rRNA (۵ میکرولیتر)، 10X Buffer (۱۰ میکرولیتر)، Hae III (۱ میکرولیتر)، ddH2O (۷/۵ میکرولیتر) با هم مخلوط و میکروتیوب در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت قرار گرفت. سپس با افزودن loading buffer تفکیک و مشاهده‌ی باندها بر روی ژل آگاروز.٪۱/۵ درصد انجام شد.

یافته‌ها

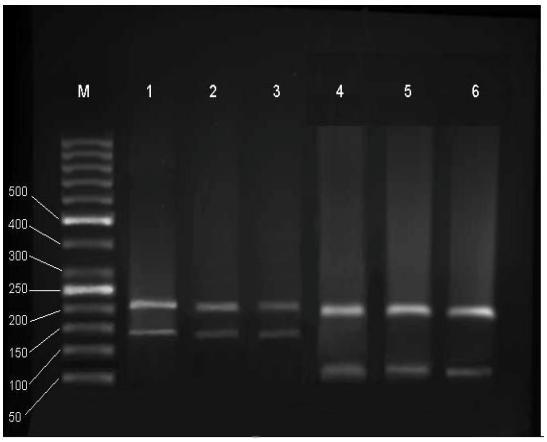
از ۱۰۰ نمونه بیماران که بررسی میکروسکوپی آن‌ها از نظر وجود آماستیگوت منفی بود ۵۰ نمونه در محیط کشت NNN رشد کردند. ۴ نمونه (۸ درصد) در هفته‌ی اول، ۸ نمونه (۱۸ درصد) در هفته‌ی دوم، ۱۲ نمونه (۲۲ درصد) در هفته‌ی سوم، ۲۶ نمونه (۵۲ درصد) در هفته‌ی چهارم از نظر وجود پروماستیگوت‌ها مثبت شدند.

نتایج RFLP-PCR قطعه‌ی ITS-rRNA بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی اصفهان:

نتایج الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگاروز ۱ درصد، باند bp ۳۵۰ را برای نمونه‌های لیشمانیای جدا شده از بیماران اصفهان نشان داد که مطابق با باند



شکل ۱. الکتروفورز PCR product نمونه‌های اصفهان همراه با گونه‌های استاندارد بر روی ژل آگاروز ۱ درصد.
M: شناساگر مولکولی، ۱: استاندارد L. major، ۲: استاندارد L. tropica، ۶-۳: PCR product نمونه‌های اصفهان، ۷: شاهد منفی



شکل ۲. الکتروفورز product PCR نمونه‌های اصفهان بعد از هضم با آنزیم Hae III
M: شناساگر مولکولی، ۱: استاندارد L. major، ۲ و ۳: نمونه‌های اصفهان، ۴: استاندارد L. tropica، ۵ و۶: نمونه‌های اصفهان.

به دست آمده از نمونه‌های استاندارد L. tropica و L. major بوده است. محصول PCR بیماران لیشمانیوز جلدی خشک (L. tropica) باند مشابه باند استاندارد L. tropica یعنی باند ۳۵۰ bp را بر روی ژل آگاروز نشان داد که بعد از هضم آنزیم Hae III دو باند ۲۰۰ bp و ۶۰ به دست آمد (شکل‌های ۱ و ۲). product PCR بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی مرطوب نیز به طور کامل مشابه با نمونه‌ی استاندارد L. major یعنی باند bp ۳۵۰ را بود که بعد از هضم آنزیم دو باند ۲۲۰ bp و ۱۴۰ به دست آمد (شکل‌های ۱ و ۲).

با استفاده از PCR -RFLP ۴۶ ایزوله نمونه L.major و ۴ ایزوله نمونه L.tropica تعیین گونه گردید.

بحث

از آن جایی که علایم پوستی ایجاد شده ممکن است توسط پاتوژن‌های دیگر (استرپتوکوک پیودرم و بورلیا) ایجاد شود، گونه های مختلف Leishmania ممکن است علایم مشابه ایجاد کنند و اغلب لیشمانیوزهای ناشی از گونه های مختلف رژیم های درمانی متفاوتی را می‌طلبند؛ تعیین گونه‌های Leishmania دارای اهمیت می‌باشد (۱۳-۱۲). داروهای مورد استفاده در درمان لیشمانیوز علاوه بر عوارض سمی هزینه های زیادی را بر بیمار تحمیل می‌کنند، سفرهای متعدد و طولانی‌مدت از جمله عواملی هستند که می تواند باعث گسترش لیشمانیوز در مناطق غیراندمیک بیماری شود و تعیین گونه‌های Leishmania به دلایل بالینی و اپیدمیولوژی اهمیت دارد.

تشخیص گونه های Leishmania به طور عمده بر اساس علایم بالینی و منطقه‌ی جغرافیایی است. تشخیص بر این اساس با توجه به مطالعات انجام شده و گزارش تنوع گونه‌ها از یک منطقه‌ی خاص جغرافیایی قابل اعتماد نمی‌باشد (۱۴). سال ها آزمایشات مستقیم میکروسکوپی روش استاندارد در تشخیص لیشمانیوز جلدی بوده است. این روش به نسبت ساده و ارزان است، اما از نظر حساسیت فاقد کارایی روش های جدید مولکولی می‌باشد به خصوص این که توان جداسازی گونه‌های مختلف لیشمانیاهای عامل لیشمانیوز جلدی را ندارد (۱۲، ۱۱). روش‌های

سرولوژی نیز به علت واکنش های متقاطع بین آنتی‌ژن Leishmania و تعدادی از میکروارگانیسم‌ها فاقد حساسیت کافی هستند و اغلب در اشکال لیشمانیوز جلدی این روش‌ها کاربردی ندارند (۱۵).

در سال‌های اخیر به دلیل تفاوت میزان پاسخ به رژیم‌های درمانی مختلف و همین طور به کار بردن روش درمانی مؤثر و تشابهات مورفولوژیکی زیاد گونه‌های عامل بیماری در کشت، از روش‌های مولکولی از جمله PCR استفاده شده است و مشخص گردیده است که روش PCR حساسیت و ویژگی بالایی دارد (۱۳، ۱۰). همچنین، در این روش جهت تعیین ویژگی ایزوله‌ها می‌توان از DNA کینتوپلاستی، ریبوزومی، gp63، hsp70، miniexon، β-tubulin و یا ژن‌های rRNA استفاده کرد (۱۷-۱۶).

با توجه به آزمایشات PCR-RFLP بیماران مورد مطالعه در این تحقیق که بر روی DNA تکثیر شده‌ی ایزوله ها با استفاده از دو پرایمر L5.8S و LITSR انجام شد (۱۸-۱۷)، مشخص شد که می‌توان ایزوله های انگل را از کشت نمونه‌ی بیماران در محیط‌های NNN و RPMI در حد کافی به دست آورد و تعیین مشخصات نمود. این اطلاعات در استراتژی کنترل بیماری، درمان و اپیدمیولوژی بیماری کمک می کند. نتایج الکتروفورز محصول PCR باند ۳۵۰ bp را نشان داد که مطابق نمونه های استاندارد بود (۱۸-۱۷). به علاوه نتایج نشان داد که ضایعات مورد مطالعه در منطقه‌ی اصفهان L. tropica و L. major می‌باشد.

در مطالعه‌ای که توسط Rotureau و همکاران با استفاده از PCR-RFLP بر روی لیشمانیاهای جلدی دنیای جدید صورت گرفت، مشخص شد که می‌توان با استفاده از برش یک آنزیم محدود کننده در محصول PCR مبادرت به تعیین گونه نمود (۱۲). همین طور در مطالعه‌ای که توسط Estner bensussan برای تعیین گونه‌ی Leishmania با استفاده از (ITS) PCR-RFLP با دو پرایمر L5.8S و LITSR انجام شد مشخص گردید که PCR-RFLP قادر به تشخیص ۷۴ درصد از نمونه‌های مثبت می‌باشد (۱۹).

معتضدیان در شیراز DNA حاصل از ۴۷ لام بیماران لیشمانیوز جلدی را با PCR-RFLP تعیین گونه نمود که از این تعداد ۲۰ نمونه L. tropica و ۲۷ نمونه L. major تشخیص داده شد (۲۰).

در مطالعه‌ی کاظمی‌راد و همکاران که PCR-RFLP را بر روی DNA استخراج شده از لام‌های رنگ‌آمیزی شده با دو پرایمر L5.8S و LITSR انجام شد، برای گونه‌ی L. tropica دو باند ۲۰۰ bp و ۶۰ و L. major دو باند ۲۲۰ bp و ۱۵۰ به دست آمد که نتایج باندهای به دست آمده از ایزوله‌ها مطابق با نتایج مطالعه‌ی حاضر بود و به نظر می‌رسد PCR-RFLP روش مؤثری در تشخیص جنس های Leishmania از نمونه های انسان عفونی یا حیوانات مخزن در ایران باشد (۲۱). نتایج این مطالعه نشان داد که PCR-RFLP روشی حساس و دقیق در تعیین گونه ی عامل لیشمانیوز جلدی است و این روش حتی در مطالعات اپیدمیولوژیک کاربرد دارد.

نتیجه‌گیری

مطالعه‌ی حاضر نشان داد که PCR-RFLP روشی حساس و دقیق برای تعیین گونه‌های عامل لیشمانیوز جلدی به ویژه در مناطق آندمیک بیماری می‌باشد.

تشکر و قدردانی

نگارندگان بر خود لازم می‌دانند از زحمات کارکنان گروه انگل شناسی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و کارکنان مرکز تحقیقات بیماری های پوستی و سالک صدیقه ی طاهره اصفهان به خاطر همکاری ارزنده تشکر و قدردانی نمایند.

References

1. Schlein Y, Warburg A, Schnur LF, Gunders AE. Leishmaniasis in the Jordan Valley II. Sandflies and transmission in the central endemic area. Trans R Soc Trop Med Hyg 1982; 76(5): 582-6.
2. Minodier PH, Parola PH. Cutaneous leishmaniasis treatment. Travel Medicine and Infectious Disease 2007; 5(3): 150-8.
3. Oumeish OY. Cutaneous leishmaniasis: a historical perspective. Clin Dermatol 1999; 17(3): 249-54.
4. Bailey MS, Lockwood DNJ. Cutaneous leishmaniasis. Clinics in Dermatology 2007; 25(2): 203-11.
5. Control of the leishmaniases. Report of a WHO Expert Committee. World Health Organ Tech Rep Ser 1990; 793: 1-158.
6. The leishmaniasis. World Health Organization, Technical ReportSeries 1984; 701: 2-4.
7. Desjeux P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. Clin Dermatol 1996; 14(5): 417-23.
8. Tashakori M, Ajdary S, Kariminia A, Mahboudiand F, Alimohammadian MH. Characterization of Leishmania Species and L. major Strains in Different Endemic Areas of Cutaneous Leishmaniasis in Iran. Iranian Biomedical Journal 2003; 7(2): 43-50.
9. Tashakori M, Kuhls K, Al-Jawabreh A, Mauricio IL, Schonian G, Farajnia S, et al. Leishmania major: genetic heterogeneity of Iranian isolates by single-strand conformation polymorphism and sequence analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer. Acta Trop 2006; 98(1): 52-8.
10. Hagardson K. Comparison of DNA isolation methods to detect Leishmania parasites in blood samples. Athens: Uppsala University ; 2006.
11. Yang ZH, Huang J, Yao Y. Autoscreening of Restriction Endonucleases for PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Identification of Fungal Species, with Pleurotus spp. as an Example. Appl Environ Microbiol 2007; 73(24): 7947-58.
12. Rotureau B, Ravel C, Couppie P, Pratlong F, Nacher M, Dedet JP, et al. Use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis to identify the main new world Leishmania species and analyze their taxonomic properties and polymorphism by application of the assay to clinical samples. J Clin Microbiol 2006; 44(2): 459-67.
13. Berman JD. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. Clin Infect Dis 1997; 24(4): 684-703.
14. Tai NOE, Osman OF, Fari ME, Presber W, Schönian G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of Leishmania donovani spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 2000; 94(5): 575-9.
15. Marfurt J, Nasereddin A, Niederwieser I, Jaffe CL, Beck HP, Felger I. Identification and differentiation of Leishmania species in clinical samples by PCR amplification of the miniexon sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis. J Clin Microbiol 2003; 41(7): 3147-53.
16. Singh S, Sivakumar R. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. J Postgrad Med 2003; 49(1): 55-60.
17. Vega-Lopez F. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. Curr Opin Infect Dis 2003; 16(2): 97-101.
18. Azani S, Rasi Y, Oshaghi MA, Ershadi MR, Mohebali M, Abaei MR, et al. Diagnosis and characterization of leishmania species in patients and rodents giemsa-stained slides by pcr-rflp in damghan district, iran. Scientific Journal of Hamadan University of Medical Sciences and Health Services Winter 2011; 17(4): 5-9.
19. Bensoussan E, Nasereddin A, Jonas F, Schnur LF, Jaffe CL. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. J Clin Microbiol 2006 Apr; 44(4): 1435-9.
20. Motazedian M. Study of glucantime resistance in cutaneous leishmaniasis by PCR-RFLP method in Shiraz, Iran. 2004.
21. kazemi–Rad E, Mohebali M , Hajjaran E, Rezaei S, Mamishi S. Diagnosis and characterization of leishmania species in giemsa–stains lides by PCR-RFLP. Iranian J Publ Health 2008; 37(1): 54-60

Journal of Isfahan Medical School Original Article

Vol 29, No 169, 1st week, March 2012 Received: 8.11.2011 Accepted: 10.1.2012

Detection of *Leishmania* Parasites from Cutaneous Leishmaniasis Patients with Negative Direct Microscopy using NNN and PCR-RFLP

Noushin Hashemi MSc[1], Mitra Hashemi MSc [2], Guilda Eslami PhD[3], Leila Shirani Bidabadi MSc[4], Seyed Hossein Hejazi PhD[5]

Abstract

Background: Leishmaniasis is a parasitic infectious disease caused by a protozoan parasite from trypanosomatidae family with a wide spectrum in tropical and subtropical areas. The purpose of the study was to characterize various species of *Leishmania* isolates from Isfahan, Iran with negative direct smears.

Methods: This study used culture methods and PCR-RFLP to detect cutaneous leishmaniasis (CL) in patients who referred to the Center for Research in Skin Disease and Leishmaniasis, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan Iran, with negative direct smears. Samples taken from the lesions of patients were cultured on NNN and RPMI1640 mediums. Out of 100 smear negative samples, 50 turned positive for leishmania promastigotes whose DNA was extracted. The amplified ITS1 region of DNA was then analyzed through PCR-RFLP. After digesting the isolates by HaeIII enzyme, the species were determined according to standard strains.

Findings: Among 50 isolates from Isfahan region, 46 isolates were identified as *L. major* and 4 as *L. tropica*.

Conclusion: The present research showed that PCR-RFLP is an accurate method for specifying agent species of CL. It was also found that *L. major* and *L. tropica* were the main two species responsible for various kinds of skin involvement in the region.

Keywords: PCR-RFLP, Cutaneous leishmaniasis, Isfahan, Parasite.

[1] PhD Student, Department of Medical Mycology, School of Medicine, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnourd, Iran
[2] Department of Statistics, Vice-Chancellery for Education, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnourd, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Medical Mycology, School of Medicine, Yazd University of Medical Sciences, Yazd, Iran
[4] Department of Medical Entomology, Skin Diseases and Leishmaniasis Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
[5] Associate Professor, Department of Medical Mycology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Seyed Hossein Hejazi PhD, Email: hejazi@med.Mui.ac.ir