مجله دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی
تابستان ۱۳۹۲؛۵(۲):۴۸۵-۴۹۱

Journal of North Khorasan University of Medical Sciences
Summer2013;5(2): 485-491

مقاله پژوهشی

مقایسه روش های PCR-RFLP، مستقیم میکروسکوپی و کشت NNN در تشخیص لیشمانیوز جلدی

نوشین هاشمی[۱]، سیدحسین حجازی[۲]، میترا هاشمی[۳]، سیروس هاشمی[۴]، محمد علی نیلفروش زاده[۵]*

[۱] کارشناس ارشد انگل شناسی و دانشجوی دکتری، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
[۲] دانشیار، مرکز تحقیقات بیماری های پوستی و لیشمانیوز، گروه انگل و قارچشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
[۳] کارشناس ارشد آمار، معاونت پژوهشی، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
[۴] دندانپزشک، مرکز بهداشت شیروان، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
[۵] دانشیار، مرکز تحقیقات بیماری های پوست و سلول های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
***نویسنده‌مسئول:** اصفهان، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده پزشکی، گروه انگل و قارچ شناسی
پست الکترونیک: hejazi@med.mui.ac.ir

وصول: ۹۲/۴/۱۵ اصلاح: ۹۲/۶/۵ پذیرش:۹۲/۶/۱۶

چکیده

زمینه و هدف: *لیشمانیوز، بیماری عفونی انگلی با انتشار وسیع در مناطق معتدله و گرمسیری است. با توجه به اینکه ارتقاء روش های تشخیص صحیح و سریع CL (Cutaneous Leishmaniasis)نقش به سزایی در کاهش عوارض بیماری به خصوص پیشگیری از بروز اسکارهای وسیع دارد، هدف از این مطالعه ارزیابی روش PCR-RFLP با پرایمرهای ITSRL و L5.8S در مقایسه با روش های مستقیم میکروسکوپی و کشت NNN برای تشخیص CL می باشد.*

مواد و روش‌کار: *در این مطالعه از بین افراد دارای ضایعه ی جلدی مشکوک به CL، ۶۰ بیمار با Leishmanin Skin Test (LST) مثبت انتخاب و از هر کدام سه نمونه جهت بررسی میکروسکوپی، کشت در محیط NNN و PCR–RFLP تهیه گردید. لام‌های رنگ‌آمیزی شده با لنز روغنی×۱۰۰ جهت مشاهده اشکال اماستیگوت انگل آزمایش شد. جهت کشت مقداری از مواد برداشت شده از حاشیه ضایعه بیمار به محیط NNN انتقال داده شد پس از استخراج DNA با استفاده از روش PCR-RFLP تکثیر از توالی ITS1 با پرایمرهای اختصاصی صورت گرفت و بعد از هضم با آنزیم HaeIII ایزوله‌ها درمقایسه با سویه‌های استاندارد تعیین گونه شد. داده ها با استفاده از آمار توصیفی و تست حساسیت با استفاده از نرم افزار SPSS15 مورد تجزیه وتحلیل قرار گرفت.*

یافته‌ها: *روش میکروسکوپی در ۳۶ مورد از ۶۰ بیمار (٪۶۰) و نتایج کشت نمونه ها در محیط NNN در ۳۷ مورد (٪۶۲) مثبت شد. در روش PCR-RFLP ۵۵ مورد (٪۹۱)، با این روش مثبت و تعیین گونه شد.*

نتیجه گیری: *با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه و امکان تشخیص گونه ها با روش PCR-RFLP، فراهم نمودن امکانات استفاده از این تکنیک، همراه با روش مستقیم میکروسکوپی و کشت NNN در موارد لازم، در مراکز درمانی پیشنهاد می گردد.*

واژه های کلیدی: *PCR-RFLP، مستقیم میکروسکوپی، کشت، لیشمانیوز جلدی*

مقدمه

لیشمانیوز جلدی یکی از بیماری های شایع پوستی مناطق گرمسیری ونیمه‌گرمسیری از جمله ایران است که حدود ۳۵۰ میلیون نفر در جهان در معرض ابتلا به این بیماری هستند[۱]. دو گونه‌ی L.tropica عامل لیشمانیوزجلدی شهری (خشک) وL. major عامل لیشمانیوز جلدی روستایی (مرطوب) عوامل ایجاد کننده لیشمانیوز جلدی در دنیای قدیم می باشند [۲]. در ایران نوع آنتروپونوتیک یا نوع شهری لیشمانیوز جلدی اغلب در شهرهای تهران، شیراز، خراسان، کرمان و نوع روستایی در اصفهان،

گلستان، خوزستان، ایلام، بوشهر و سمنان گزارش شده است[۳،۴]. انتخاب روشی با حساسیت و ویژگی بالا جهت تشخیص انگل های Leishmania از اهمیت بالایی برخوردار است و جهت تشخیص گونه‌های انگل، غیر از روش رایج مستقیم میکروسکوپی ازروش‌های کشت آزمایشگاهی، سرولوژی و مولکولی استفاده می‌شود.

باتوجه به تشابهات شکل شناختی انگل برای تعیین عامل بیماری درسالیان اخیر روش‌های نوین مولکولی مبتنی برتکنیک‌های Real-time-PCR و PCR-RFLPاستفاده شده است. که به راحتی می‌توان غیر از تایید تشخیص انگل گونه‌های انگل را در کوتاه‌ترین زمان تعیین هویت کرد[۵].

اما [1]و همکاران مطالعه ای را با هدف مقایسه روش PCR و کشت در تشخیص CL دنیای جدید و قدیم در سال ۲۰۱۲ انجام دادند. در این مطالعه روش PCR حساس تر از روش کشت گزارش شد[۶]. در بررسی دیگری که توسط Hesham هاشم و همکاران در سال ۲۰۱۲ بر روی ۱۹۵ بیمار در شهر مدینه صورت گرفت، گزارش شد که PCR(kDNA) دارای حساسیت ٪۱۰۰می باشد. در مطالعه آن ها در روش کشت انگل ٪۳۹/۲ از نمونه ها و در بررسی اسمیر ٪۵۵/۳ از نمونه ها مثبت شد[۷].

در مطالعات هاجران[2] و همکاران (۲۰۱۱)، ناصرالدین[3] و همکاران(۲۰۰۸)، جلینیو[4] و همکاران (۲۰۰۳)، اسکونیان[5] و همکاران (۲۰۱۱) مشخص گردیده است که ITS1 PCR-RFLP روشی کارآمد در تشخیص CL می باشد [۸-۱۱]. در تکنیک PCR-RFLP، DNA هدف پس از تکثیر، با آنزیم های محدودکننده اندونوکلئاز هضم می گردد. این تکنیک به طورگسترده‌ای برای تشخیص مولکولی میکروارگانیسم‌ها کاربرد دارد [۱۲].

تعیین مشخصات انگل به منظور برنامه‌ریزی کنترل، پیشگیری و درمان CL از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. بسته به نوع انگل روش درمانی مورد استفاده نیز متفاوت است [۱۳]. با توجه به مقدمه ی پیشگفت، هدف ازانجام مطالعه حاضر مقایسه روش PCR-RFLP در مقایسه با مستقیم میکروسکوپی و کشت در محیط NNN برای تشخیص CL می باشد.

روش کار

مطالعه از نوع مقایسه ای توصیفی است که در اصفهان در سال ۱۳۸۸ انجام شد. بیماران مراجعه کنندگان به آزمایشگاه مرکز تحقیقات بیماری‌های پوستی و لیشمانیوز صدیقه‌ی طاهره اصفهان بوده اند. حجم نمونه بر اساس اطلاعات به دست آمده از مطالعات مشابه، ۶۰ مورد تعیین گردید. پس از تکمیل پرسشنامه و امضاء فرم رضایت نامه توسط بیمار.افراد وارد مطالعه می شدند. از بین افراد دارای ضایعه ی جلدی فعال و مشکوک و دارای واکنش مثبت افزایش حساسیت تاخیری LST، ۶۰ مورد به عنوان مثبت قطعی تلقی گردید. آزمون LST به عنوان روش استاندارد طلایی در نظر بوده است که باتزریق ۰/۱ میلی لیتر آنتی ژن لیشمانین به طور داخل جلدی در سطح رویی ساعد بیمار انجام می شد و نتیجه ی آن پس از ۷۲ ساعت قرائت می گردید.

ابتدا محل ضایعه با اتانول ٪۷۰ ضدعفونی و برش کوچکی در حاشیه برجسته زخم به وسیله تیغ جراحی یک بار مصرف ایجاد شد و مقداری از بافت همراه با سروزیته از موضع ضایعه برداشت و بر روی لام گسترش تهیه گردید.

اسمیرهای تهیه شده بر روی لام‌ها در مقابل هوا خشک و با متانول چند دقیقه فیکس گردید. برای رنگ‌آمیزی از رنگ گیمسا ٪۱۰ استفاده شد. لام‌های رنگ‌آمیزی شده زیر میکروسکوپ با لنز ×۴۰ مورد بررسی اولیه و لنز روغنی ×۱۰۰ جهت مشاهده اشکال اماستیگوت انگل آزمایش شد.

جهت کشت نمونه‌ها مقداری از مواد برداشت شده از بیمار به طور استریل به محیط کشت NNN برده شد و در دمای $25\pm1C^0$ نگه داری شد. محیط های کشت هر ۳ روز از نظر وجود پروماستیگوت‌ها بررسی می شد.

نمونه های بافتی تهیه شده وارد PBS استریل می شد و به آزمایشگاه انتقال داده می شد. DNA انگل با استفاده از کیت PCR (Roche, high pure template preparation) مورد استخراج قرار گرفت. ناحیهITS1 مربوط به DNA استخراج شده از ایزوله‌ها با استفاده از دو

1 -Emma
2- Hajjaran
3- Nasereddin
4- Gelanew
5 -Schönian

پرایمر زیر و دستگاه ترموسایکلر(Corbet) مورد تکثیر قرار گرفت:

پرایمر۱: L ITS R 5'-CTG GAT CAT TTT CCG ATG 3'

پرایمر۲: TGA TAC CAC TTA TCG CACTT - L 5.8 S 5´3'

ازDNA استخراج شده گونه‌های استاندارد L. tropica (MHOM/IR/yazd1)و L. major (MRHO/IR/75/ER) به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید و اجزاء محلولی زیر جهت انجام واکنش اضافه گردید:

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

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

۹۴ درجه سانتیگراد به مدت۲۰ ثانیه (Denaturation)

۵۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه (Annealing)

۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه.

۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۶ دقیقه.

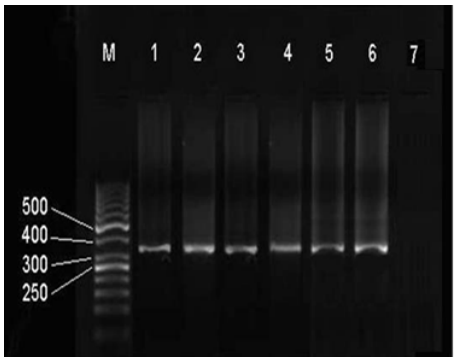
محصول تکثیرشده با افزودن loading buffer بر روی ژل آگاروز ٪۱ الکتروفورز شد.

Digestion با آنزیم (Fermentase Life Sciences HaeIII Germany: مـوادتشکیل‌دهنـده‌ی واکنش هضم شامـل ITS-rRNA (۰/۵ میکرولیتر)، 10X Buffer (۱۰ میکرولیتر)، HaeIII (۱میکرولیتر)، ddH2O (۷/۵میکرولیتر) با هم مخلوط و میکروتیوب در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت قرارگرفت و با افزودن loading buffer الکتروفورز و مشاهده‌ی باندها برروی ژل آگاروز ٪۱/۵ درصد انجام شد و در نهایت داده ها با استفاده از آمار توصیفی و تست حساسیت با استفاده از نرم افزار SPSS 15 مورد تحلیل قرار گرفت.

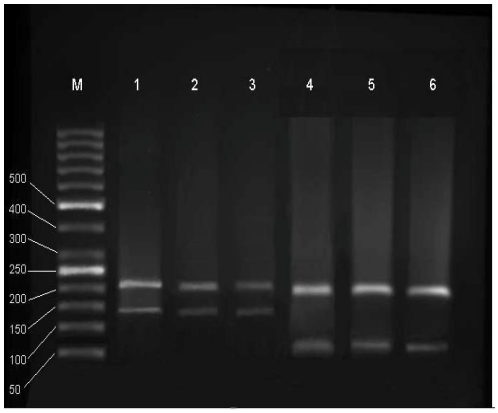
یافته ها

از بین مراجعین دارای ضایعه ی جلدی مشکوک به CL کسانی که در آزمون جلدی LST دارای واکنش ایندوراسیون بالاتر از ۵ میلی متر بودند ۶۰ مورد به عنوان CLمثبت انتخاب شدند. هر سه روش تعیین شده در این مطالعه برای تشخیص CL در مورد بیماران انتخاب شده انجام گرفت. نتایج حا صل از این مرحله در جدول ۱آمده است.

نتایج PCR-RFLP قطعه‌ی ITS-rRNA بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی اصفهان: نتایج الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگاروز ۱ درصد، باند 350 bp را برای نمونه‌های لیشمانیای جدا شده از بیماران اصفهان نشان داد که مطابق با باند به دست آمده از نمونه‌های استاندارد L. tropica و L. major بود. محصول PCR بیماران



شکل ۱: الکتروفورز PCR product نمونه‌های اصفهان همراه با گونه‌های استاندارد بر روی ژل آگاروز ۱ درصد.
M: شناساگر مولکولی، ۱: استاندارد L. major، 2: استاندارد L. tropica،PCR product: 3-6 نمونه‌های اصفهان، ۷: شاهد منفی



شکل ۲: الکتروفورز PCR product نمونه‌های اصفهان بعد از هضم با آنزیمHae III
M: شناساگر مولکولی، ۱: استاندارد L. major، 2 و ۳، نمونه‌های اصفهان، ۴: استاندارد L. tropica، ۵ و۶، نمونه‌های اصفهان.
با استفاده از PCR-RFLP ۵۳ نمونه L.major و۲ نمونه L. tropica تعیین گردید.

جدول ۱: نتایج به دست آمده از مقایسه روش استاندارد طلائی LST با سه روش بررسی میکروسکوپی، کشتNNN و PCR-RFLP

روش	مثبت	منفی	جمع	حساسیت به درصد
بررسی میکروسکوپی با مقایسهLST	۳۶	۲۴	۶۰	۶۰
NNN با کشت LST مقایسه	۳۷	۲۳	۶۰	۶۲
مقایسهLST با PCR-RFLP	۵۵	۵	۶۰	۹۱

لیشمانیوز جلدی خشک(L. tropica) باند مشابه باند استاندارد L. tropica یعنی باند 350 bp را بر روی ژل آگاروز نشان داد که بعد از هضم آنزیم Hae III دو باند 200 bp و ۶۰ به دست آمد (شکل‌های ۱ و ۲). محصول PCR بیماران مبتلا به لیشمانیوز جلدی مرطوب نیز به طور کامل مشابه با نمونه‌ی استاندارد L. major یعنی باند bp350 بود که بعد از هضم آنزیم دو باند bp220 و۱۴۰ به دست آمد (شکل‌های ۱ و ۲).

بحث

این مطالعه نشان داد که حساسیت هر دو روش میکروسکوپی و کشت از روش PCR پائین تر است. با توجه به حساسیت بالای روش PCR-RFLP و امکان تشخیص گونه با این روش نسبت به روش میکروسکوپی و کشت پیشنهاد می گردد این روش به عنوان متدی قاطع همراه با سایر روش ها استفاده گردد. تعیین هویت گونه‌های Leishmania در گذشته عمدتاً بر اساس شکل

ظاهری زخم و منطقه جغرافیایی بوده است که روش های قابل اعتمادی نبوده است [۱۴]. سال‌ها روش مستقیم میکروسکوپی روش استاندارد در تشخیص لیشمانیوز جلدی بوده است که از مزایای این روش می توان به سادگی و ارزان بودن آن اشاره کرد اما روش مستقیم حساسیت پائینی دارد. به خصوص این که توان جداسازی گونه‌های مختلف Leishmania های عامل لیشمانیوز جلدی را ندارد. در این مطالعه حساسیت برای روش میکروسکوپی ٪۶۰ به دست آمد که با توجه به حساسیت پائین برای تشخیص لیشمانیوز از اعتماد کافی برخوردار نیست [۱۵،۱۶]. روش‌های سرولوژی نیز با توجه به سطح پایین آنتی بادی در فرم های جلدی بیماری، در تشخیص اشکال CL کاربردی ندارند. همین طور به علت واکنش‌های متقاطع بین آنتی‌ژن Leishmania و تعدادی از میکروارگانیسم‌ها فاقد حساسیت کافی هستند [۱۷]. از آن جایی که گونه های مختلف علایم مشابه ایجاد می کنند و اغلب لیشمانیوزهای ناشی از گونه های مختلف رژیم های درمانی متفاوتی را می طلبند و علایم پوستی ایجاد شده ممکن است توسط پاتوژن های دیگر(Streptococcus pyogenes و بورلیا) ایجاد شود، تشخیص دقیق و تعیین گونه ها یLeishmania جهت برنامه‌ریزی های کنترل، پیشگیری و درمان بیماری حائز اهمیت است [۱۳-۱۶].

حساسیت برای روش PCR در این مطالعه ٪۹۱ به دست آمد که تقریباً مشابه با نتایج مطالعات دیگر می باشد. اِما و همکاران در مطالعه ای که با هدف مقایسه روش PCR و کشت در تشخیص CL دنیای جدید و قدیم در سال ۲۰۱۲ انجام داده اند گزارش کردند که روش PCR حساس تر از روش کشت می باشد [۶]. در مطالعه براستولونی[1] و همکاران در برزیل که بر روی لام های شده از مغز استخوان بیماران با هدف مقایسه روش های تشخیص لیشمانیوز احشایی انجام شد، میزان حساسیت روش مستقیم۷۹/۱ درصد، کشت ۵۹ درصد و PCR ۹۲/۳ درصد گزارش شده است [۱۸]. الجوابره[2] نیز در مطالعه خود حساسیت ٪۸۷ و ویژگی ٪۱۰۰ را برای PCR منطقه ITS1 گزارش کرده است [۱۹]. در مطالعه مارکوس[3] PCR(kDNA) قادر به تشخیص گونه های عامل لیشمانیوز آمریکایی می باشد و جایگزینی برای بررسی میکروسکوپی و تست پوستی مونته نگرو به ویژه در مواقعی که این تست ها منفی می باشند است [۲۰]. در مطالعه‌ای که توسط استنربن ساسون[4] برای مقایسه روش PCR با روش کشت و بررسی میکروسکوپی در تشخیص لیشمانیوز جلدی انجام شده مشخص شد که(PCR(kDNA دارای حساسیت ٪۹۸/۷ می باشد. روش میکروسکوپی و کشت با هم حساسیت٪۸۳/۳ را داشته اند که با نتایج مطالعه ما همخوانی دارد [۲۱].

اولیوریا[5] و همکاران برای تشخیص لیشمانیوز جلدی با روش PCR از ۳۵ مورد بررسی شده ۳۴ نمونه را مثبت تشخیص دادند [۲۲]. شهبازی و همکاران در مشهد حساسیت برای روش مستقیم، کشت وPCR را به ترتیب۷۹/۳ درصد، ۸۶/۲ درصد و ۱۰۰ درصد گزارش نموده است که با نتایج این مطالعه هم خوانی دارد (۲۳).

در مطالعه پور محمدی و همکاران بر روی ۲۱۹ بیمار مبتلا به لیشمانیوز پوستی، میزان حساسیت برای روش میکروسکوپی، کشت در محیط NNN و PCR به ترتیب شامل۷۹/۷۱ درصد، ۵۰/۶۵ درصد، ۳۹/۶۱ درصد بوده است [۲۴]. در مطالعه هاشم که بر روی ۱۹۵ بیمار در شهر مدینه صورت گرفته است PCR(kDNA) دارای حساسیت ٪۱۰۰ گزارش شده است. با روش کشت انگل ٪۳۹/۲ نمونه ها و بررسی اسمیر ٪۵۵/۳ نمونه های مثبت تشخیص داده شد [۷].

در مطالعه‌ای که توسط روترو[6] و همکاران با استفاده از PCR-RFLP بر روی Leishmania های 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 [۲۵]. از محدودیت های این مطالعه می توان به جمع آوری نمونه از یک محل یعنی آزمایشگاه مرکز تحقیقات بیماری‌های پوستی و لیشمانیوز صدیقه‌ی طاهره اصفهان اشاره کرد. ضمناً در زخم های با دوام

1 -Brustoloni
2 -Al-Javabreh
3 -Marques
4 -Estnerbensussan
5- Oliveira
6 -Rotureau

عفونت های ثانویه موجب سخت شدن هدف جداسازی و کشت انگل می شود. محدودیت های مالی نیز باعث محدودیت پوشش وسیع تر در این مطالعه گردیده است.

نتیجه گیری

در مجموع جهت هر گونه تصمیم گیری درمانی به نتایج حاصل از بررسی میکروسکوپی نمی توان اعتماد کرد به خصوص در مواردی که آزمایش اسمیر مستقیم از نظر وجود اماستیگوت منفی است و توصیه می گردد از روش های مکمل کشت و PCR نیز برای تشخیص قطعی بیماری استفاده گردد.

تشکر و قدردانی

نگارندگان برخود لازم می‌دانند از زحمات کارکنان گروه انگل شناسی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان ومرکزتحقیقات بیماری‌های پوستی لیشمانیوز صدیقه‌ی طاهره اصفهان به خاطرهمکاری های ارزنده تشکر و قدردانی نمایند.

References

1. Belli A, Rodriguez B, Aviles H, Harris E. Simplified polymerase chain reaction detection of new world Leishmania in clinical specimens of cutaneous leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg. 1998;58(1):102-9.

2. Minodier PH, Parola PH. Cutaneous leishmaniasis treatment. Travel Medicine and Infectious Disease 2007; 5(3): 150-8.

3. 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.

4. 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.

5. HagardsonK . Coamprison of DNA isolation methods to detect Leishmania parasites in blood samples .Athens : Uppsala University ; 2006.

6. Emma C. W , Julie W , Margaret A , Peter L. C , Diana N. Epidemiology of Imported Cutaneous Leishmaniasis at the Hospital for Tropical Diseases, London, United Kingdom: Use of Polymerase Chain Reaction to Identify the Species Am. J. Trop. Med. Hyg., 86(1), 2012, pp. 115–118

7. Hesham A. El-Beshbishy, Khalil H, Ayman A.Molecular characterization of cutaneous leishmaniasis in Al-Madinah Al-Munawarah province, western Saudi Arabia International Journal of Infectious Diseases 17 (2013) e334–e338

8. Hajjaran H, Vasigheh F, Mohebali M, Rezaei S, Mamishi S, Charedar S 2011. Direct diagnosis of Leishmania species on serosity materials punctured from cutaneous leishmaniasis patients using PCR-RFLP. J Clin Lab Anal 25: 20-24.

9. Schönian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig H, Presber W, Jaffe C 2003. PCR diagnosis and characterization of Leishmania in local and imported clinical samples. Diag Microbiol Infect Dis 47: 349-358.

10. Nasereddin A, Bensoussan-Hermano E, Schönian G, Baneth G, Jaffe C 2008. Molecular diagnosis of Old World cutaneous leishmaniasis and species identification by use of a reverse line blot hybridization assay. J Clin Microbiol 46: 2848-2855.

11. Gelanew T, Amogne W, Abebe T, Kuhls K, Hailu A, Schönian G 2010. A clinical isolate of Leishmania donovani with ITS1 sequence polymorphism as a cause of para-kala-azar dermal leishmaniasis in an ethiopian human immunodeficiency virus-positive patient on highly active antiretroviral therapy. Br J Dermatol 163: 870-874.

12. 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.

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 NO, Osman OF, el Fari M, Presber W, Schonian 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. Trans R Soc Trop Med Hyg 2000; 94(5): 575-9.
15. 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.
16. 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 ClinMicrobiol 2006; 44(2): 459-67.
17. 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 ClinMicrobiol 2003; 41(7): 3147-53.
18.Brustoloni YM, Lima RB, da Cunha RV, et al. Sensitivity and specificity of polymerase chain reaction in Giemsa-stained slides for diagnosis of visceral leishmaniasis in children. Mem Inst Oswaldo Cruz2007; 102(4): 497-500.
19.Al-Jawabreh A, Schoenian G, Hamarsheh O, et al. Clinical diagnosis of cutaneous
20.leishmaniasis: a comparison study between standardized graded direct microscopy and
21.ITS1-PCR of Giemsa-stained smears. Acta Trop 2006; 99(1):55-61.
22.Marques MJ, Volpini AC, Machado-Coelho GL, et al. Comparison of polymerase chain reaction with other laboratory methods for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis: Diagnosis of cutaneous leishmaniasis by polymerase chain reaction. Diagn Microbial Infect Dis 2006; 54(1): 37-43.
23.BensoussanE, Nasereddin A, Jonas F, Schnur LS and Charles L. Jaffee W. Comparison of PCR Assays for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis.Journal of Clinical Microbiology. 2006; 1435–1439
24.Oliveira JG, Novais FO, de Oliveira CI, et al. Polymerase chain reaction (PCR) is highly
25.sensitive for diagnosis of mucosal leishmaniasis. Acta Trop 2005; 94:55-59.
26.Shahbazi F, Shahabi S, Kazemi B, et al. Evaluation of PCR assay in diagnosis and identification of cutaneous leishmaniasis: A comparison with the parasitological methods. Parasitol Res 2008; 103: 1159-62.
27.Pourmohammadi B, Motazedian MH, Hatam GR, et al.Comparison of three methods for diagnosis of cutaneous Leishmaniasis. Iran J Parasitol 2010; 5(4): 1-8.
28.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 ClinMicrobiol 2006; 44(2): 459-67.

Original Article

Comparison of PCR-RFLP, direct microscopy and NNN culture methods in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis

Hashemi N[1], Hejazi SH[2] , Hashemi M[3], Hashemi S[4], Nilforoushzadeh MA[5]*

[1] Northern Khorasan University of Medical Sciences, Khorasan-Iran.
[2]Skin Diseases and Leishmaniasis Research Center, Department of Parasitology&Mycology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
[3]Deputy of Research, Northern Khorasan University of Medical Sciences, Khorasan-Iran.
[4]Northern Khorasan University of Medical Sciences, Khorasan-Iran.
[5]Skin and Stem Cell Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

***Corresponding Author**: School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Email: hejazi@med.mui.ac.ir

Abstract

Background & Objectives*: Leishmaniasis is a parasitic infectious disease with a wide clinical spectrum in tropical and subtropical areas. The aim of this study was to assess the PCR-RFLP method using two primers, ITSRL and L5.8S compared with direct microscopy and NNN culture methods for the diagnosis of cutaneous leishmaniasisis.*

Material & Methods*: In this study among CL suspected patients, 60 patients with positive LST were selected and three samples were taken from each. To detect CL via direct microscopy, NNN culture and PCR-RFLP methods.*

Result*:The results showed that 60%, 62% and 91% of specimens from suspected cases were positive using direct microscopy, NNN culture,and.PCR RFLP methods respectively.*

Conclusion*:Due to high sensitivity of the PCR-RFLP method for detection and speciation of etiologic agent of CL, to establish an accurate and rapid method for detection of Leishmania parasites in medical centers, it is suggested the method is utilized along with NNN culture and direct microscopy.*

Keyword*: PCR-RFLP, direct microscopy, Cutaneous Leishmaniasis, culture*

Submitted:2013 July 6
Revised:2013 Aug 27
Accepted: 2013 Sep 7