جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

دوره ی دوم/ شماره ی ۴/ تابستان ۱۳۸۳

ارزشیابی روش واکنش زنجیره ای پلی مراز دو مرحله ای در شناسایی گونه های انگل لیشمانیا در لام های بایگانی رنگ آمیزی شده با گیمسا

چکیده

دکتر محمد حسین معتضدیان*، مهدی کرمیان**، دکتر سید صدرالدین اردهالی***، دکتر فرهاد هنجنی****،
*دانشیار گروه انگل شناسی و قارچ شناسی،
**دانشجوی Ph.D. انگل شناسی،
***استاد گروه انگل شناسی و قارچ شناسی،
****دانشیار گروه پوست،
دانشگاه علوم پزشکی شیراز

نویسنده مسوول:
دکتر محمد حسین معتضدیان
شیراز، بلوار زند،
دانشکده پزشکی، بخش انگل شناسی و قارچ شناسی
تلفن: ۰۷۱۱-۲۳۰۵۲۹۱
E-mail:
motazedm@sums.ac.ir

مقدمه: لیشمانیوز پوستی در ایران به گونه های لیشمانیوز پوستی خشک (گونه ی شهری) و لیشمانیوز پوستی مرطوب (گونه ی روستایی) مشاهده می شود. کاربردی ترین روش تشخیص آزمایشگاهی این بیماری فراهم کردن اسلایدهای رنگ آمیزی شده با گیمسا از زخم بیمار و مشاهده ی میکروسکوپی آماستیگوت است. اما در این روش تعیین گونه ی انگل امکان پذیر نبوده و برای تشخیص گونه ی انگل، از روش های گوناگون بیوشیمیایی، ایمنی شناختی و مولکولی استفاده می گردد، که این روش ها به کشت انبوه انگل وابسته است. **روش کار**: DNA از ۴۹ عدد لام فراهم شده از ۴۹ بیمار مشکوک به لیشمانیوز تثبیت و رنگ آمیزی شده، با استفاده از بافر هضم کننده استخراج گردید. جهت تعیین گونه، DNA بدست آمده با روش واکنش زنجیره ای پلی مراز دو مرحله ای و با آغازگرهای اختصاصی آزمایش گردید. نمونه های PCR شده، الکتروفورز و باندهای بدست آمده از DNA با نمونه های استاندارد مقایسه و انگل تعیین گونه گردید. **یافته ها:** از ۴۹ لام بررسی شده با میزان گوناگون انگل، ۴۷ لام با واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) مثبت، تعیین گونه گردیدند، که ۲۰ نمونه ی لیشمانیا تروپیکا (*Leishmania tropica*) و ۲۷ نمونه ی لیشمانیا ماژور (*Leishmania major*) تشخیص داده شد. هر دو گونه ی انگل از نواحی گوناگون بدن جدا گردیده بود، اما لیشمانیا تروپیکا بیشتر از زخم های صورت و لیشمانیا ماژور بیشتر از زخم های دست و پا جدا گردید. آسیب های ایجاد شده به وسیله ی لیشمانیا ماژور، در اکثر موارد در یک فرد بیشتر از دو عدد بود در حالی که آسیب های ایجاد شده به وسیله ی

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

لیشمانیا تروپیکا، در اکثر موارد یک یا دو عدد بود. بیست و یک درصد از بیمارانی که لیشمانیا تروپیکا از آنان جدا شده بود، بیشتر از یک سال از زمان بروز زخم در آنها گذشته بود و نشان داده شد که زخم های ایجاد شده به وسیله ی لیشمانیا تروپیکا تمایل بیشتر به مزمن شدن نشان می دهند، هر چند در بررسی آماری معنی دار نبود. بیماران از نظر مقاومت دارویی نیز بررسی شده و پس از درمان با گلوکانتیم، در ۲۹ مورد دوباره در آزمایش میکروسکوپی، انگل مشاهده گردید. مقاومت دارویی بالینی در افرادی که لیشمانیا تروپیکا از آنان جدا گردید، بیشتر از افرادی بود که لیشمانیا ماژور از آنان جدا شد، هر چند این تفاوت نیز در بررسی آماری معنی دار نبود. **نتیجه:** این بررسی نشان می دهد که واکنش زنجیره ای پلی مراز دو مرحله ای، روشی حساس و دقیق است که می تواند در تشخیص و بررسی های همه گیر شناختی بیماری لیشمانیوز پوستی به کار رود.

کلید واژه ها: واکنش زنجیره ای پلی مراز دو مرحله ای، لیشمانیوز پوستی، تعیین گونه انگل لیشمانیا، رنگ آمیزی گیمسا

مقدمه

پروتوزوئرهای متعلق به جنس لیشمانیا، انگل هایی هستند با وجوه ریخت شناسی مشترک، که گونه هایی چند از بیماری ها را در انسان ایجاد می کنند. بسته به این که علایم بالینی این بیماری ها به چه شکل و در کدام ناحیه از بدن خود را آشکار سازند، شکل های گوناگون بیماری را، با عنوان کلی لیشمانیوز می نامند. امروزه لیشمانیوز در شماری زیاد از کشورهای مناطق گرمسیر و نیمه گرمسیر جهان به صورت بومی موجود است [۱]. بر پایه ی برآورد، بیشتر از ۱۲ میلیون نفر در جهان به این بیماری مبتلا بوده و دست کم ۳۵۰ میلیون انسان دیگر در معرض ابتلا به آن هستند، که از این میان، سالانه یک تا پنج میلیون نفر به لیشمانیوز پوستی و ۵۰۰ هزار نفر، به لیشمانیوز احشایی مبتلا می گردند [۲]. برپایه ی بررسی های انجام گرفته، لیشمانیوز بطور اندمیک در ۸۸ کشور جهان وجود دارد که از این میان، ۷۲ کشور جزو کشورهای در حال توسعه هستند. برپایه ی همین گزارش، ۹۰ درصد موارد لیشمانیوز احشایی از کشورهای بنگلادش، برزیل، هند، نپال و سودان گزارش گردیده است و ۹۰ درصد موارد گزارش شده ی لیشمانیوز پوستی به افغانستان، برزیل، ایران، پرو، عربستان سعودی و سوریه اختصاص دارد [۳،٤]. با توجه به موارد فراوان بیماری در ایران و ضرورت شناخت ناقل بیماری برای مهار و درمان بهتر، بررسی هایی در باره ی تعیین گونه ی انگل انجام پذیرفته، اما این بررسی ها برپایه ی جدا سازی و کشت انگل استوار بوده است [۵]. از آنجا که جداسازی و کشت انگل دشواری های فراوان داشته و افزون بر صرف هزینه، وقت گیر نیز است، امکان استخراج DNA از لام های رنگ آمیزی شده با گیمسا و انجام واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) بر روی این لام ها بررسی شده، که موفقیت آمیز بوده

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

است. با وجود حساسیت و ویژگی روش مورد اشاره در تشخیص بیماری لیشمانیوز، آغازگر (پرایمر) مورد استفاده، تنها در تعیین جنس لیشمانیا کاربرد داشته، اما در تعیین گونه ی انگل لیشمانیا ناتوان بوده است [٦]. آغازگرهایی بر پایه ی بخش متغیر حلقه های کوچک DNA کینتوپلاست انگل لیشمانیا طراحی شده، که می تواند گونه های مختلف ایجاد کننده ی بیماری در جهان کهن را، با استفاده از PCR از هم جدا سازد [۸،۷]. بنابراین، در این بررسی، از این آغازگر اختصاصی در تشخیص گونه های انگل لیشمانیا استفاده گردید تا افزون بر تشخیص بیماری، گونه ی انگل نیز تعیین گردد.

مواد و روش

روش تهیه نمونه ها:

شمار ٤٩ عدد لام فراهم شده از ٤٩ بیمار مشکوک به لیشمانیوز به روش مستقیم و با رنگ آمیزی گیمسا، مورد استفاده قرار گرفت. نمونه ها از سال ۱۳۷۵ در بخش آسیب شناسی دانشکده ی پزشکی شیراز موجود و همه ی مشخصات بیماران در دسترس بود. این ٤٩ بیمار، در دو مرحله مورد آزمایش قرار گرفته بودند. در مرحله ی نخست، همه ی افراد با روش مستقیم مورد آزمایش قرار گرفته و پس از تشخیص، دارو گرفته بودند. شمار ۲۰ نفر به درمان پاسخ داده و در لام فراهم شده در تشخیص میکروسکوپی، انگل مشاهده نشده بود و ۲۹ نفر به درمان پاسخ نداده و آماستیگوت در لام فراهم شده، مشاهده شده بود و مقاومت دارویی بالینی نشان داده بودند. بر همین پایه، بیماران به دو دسته ی حساس به درمان و مقاوم به درمان بخش گردیدند. دیگر ویژگی ها، مانند شمار زخم، جای زخم بر روی بدن و مدت آشکار شدن زخم نیز، بررسی شد. شمار ۱۰عدد لام از بیماران مشکوک به لیشمانیوز، که منفی گزارش گردیده بودند و نیز، ۲۰ عدد لام فراهم شده از بیماران پوستی غیر از لیشمانیوز، برای مشخص کردن حساسیت و ویژگی بررسی شدند. برای استخراج DNA، لام های فراهم شده از زخم بیماران با رنگ آمیزی گیمسا مورد استفاده قرار گرفتند. استخراج DNA برپایه ی روش Vince و همکاران انجام گردید [۸]. مراحل کار به این قرار بود: در آغاز، گسترش سطح لام ها با تیغ جراحی سترون تراشیده شده و ماده ی به دست آمده در لوله های اپندورف یک و نیم میلی لیتری ریخته شد. به هر لوله ی ۲۰۰ میکرولیتر بافر (0.5% v/v Tween20 و EDTA 1mM pH=8 و 50mM TrisHcl pH=7.6,) دارای پروتئیناز K (۸/۵ میکرولیتر از محلول ۱۹ میلی گرم در میلی لیتر) افزوده گردید. لوله ها به مدت دو ساعت در دمای ٥٦ درجه ی سانتی گراد و یا یک شب در درون انکوباتور ۳۷ درجه ی سانتی گراد در آزمایشگاه گذاشته شدند. سپس، به هر لوله ۲۰۰ میکرولیتر، محلول فنل، کلروفرم و ایزوآمیل الکل افزوده گردید. پس از آن، لوله را با دستگاه Vortex به مدت یک دقیقه به هم زده و سپس، لوله ها به

وسیله ی دستگاه سانتریفوژ یخچال دار و به مدت ۱۰ دقیقه در g ۶۰۰۰ سانتریفوژ گردید.

روش انجام واکنش زنجیره ای پلی مراز دو مرحله ای:

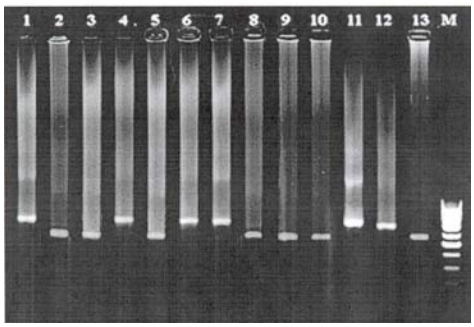
این روش در دو مرحله انجام گردید. مواد لازم برای واکنش زنجیره ای پلی مراز مرحله ی نخست برای هر نمونه، به این قرار بود: Taq DNA Polymerase (سیناژن، ایران) هفتاد و پنج درصد یونیت و بازهای دئوکسی نوکلئوتید ۲/۵ میلی مول (سیناژن، ایران)، کلرومنیزیوم دو میلی مول، بافر PCR (سیناژن، ایران) ۲/۵ میکرولیتر، ومیزان دو تا هفت میکرولیتر DNA و ۴۰ نانوگرم از آغازگرهای (ATTTTTCG/CGA/TTTT/CGCAGA ACG) CSB1XR و (C/GA/GTA/GCAGAAAC/TCCCGT TCA) CSB2XF برای هر نمونه استفاده گردید [۷]. سپس، نمونه ی آماده شده در دستگاه PCR، برای تکثیر قطعه ی خالص DNA با برنامه زیر قرار داده شد:

مرحله ی نخست: دمای ۹۴ درجه ی سانتی گراد به مدت پنج دقیقه در یک مرحله.

مرحله ی دوم: ۱- دمای ۹۴ درجه ی سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه. ۲- دمای ۵۵ درجه ی سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه. ۳- دمای ۷۲ درجه ی سانتی گراد به مدت ۹۰ ثانیه، که مرحله ی دوم، ۳۰ بار تکرار گردید. از محصول PCR به دست آمده در مرحله ی نخست برای PCR مرحله ی دوم استفاده گردید، که مواد به کار رفته همانند مرحله ی نخست بود، با این تفاوت که، به جای DNA به دست آمده از بیماران، از محصول PCR مرحله ی نخست با رقت یک به ده استفاده گردید و نیز، از آغازگرهای: (ACTGGGGGTTGGTGTAAAATAG)13Z و LiR (TCGCAGAACGCCCCT) استفاده گردید [۷] و برنامه ی PCR، همانند مرحله ی نخست انجام شد. پس از انجام PCR، محصول برروی ژل آگاروز ۱/۵ درصد الکتروفورز و با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی گردید و سپس، بر روی دستگاه ایلومیناتور گذاشته شده و در صورت مشاهده ی باندهای DNA، از آن عکسبرداری شد و با توجه به شاخص وزنی، گونه های انگل تشخیص داده شدند (۷۵۰ bp لیشمانیاتروپیکا، ۶۸۰ bp لیشمانیا اینفانتوم و ۵۶۰ bp لیشمانیا ماژور) (شکل ۱). مشخصات بیماران در برنامه ی نرم افزاری اکسل ثبت و با یافته های به دست آمده از تعیین گونه ی انگل با نرم افزار SPSS بررسی و با استفاده از آزمون مربع کای، آزمون مطلق فیشر و مجذور کای پیرسون، رابطه ی متغیرها مشخص گردید.

یافته ها

از ۴۹ بیمار مورد بررسی، در ۴۷ مورد، PCR مثبت بود و گونه ی انگل تشخیص داده شد. ده عدد نمونه ی منفی گزارش شده و نیز، ۲۰ عدد



شکل ۱: الکتروفورز نمونه های PCR شده بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪
نمونه های استاندارد شماره های:
۱۱- لیشمانیا تروپیکا ۷۵۰ bp
۱۲- لیشمانیا اینفانتوم ۶۸۰ bp
۱۳- لیشمانیا ماژور ۵۶۰ bp
شماره های ۱ تا ۱۰ نمونه های بیماران: ۱و۴و۶و۷ لیشمانیا تروپیکا
۲و۳و۵و۸و۹و۱۰ لیشمانیا ماژور
M: DNA مارکر

نمونه ی فراهم شده از بیماران پوستی، که به بیماری غیر از لیشمانیوز مبتلا بودند، همگی در آزمایش PCR منفی گردیدند.حساسیت آزمایش ۹۶ درصد و ویژگی آن ۱۰۰ درصد تعیین گردید. همان گونه که، جدول یک نشان می دهد، از ٤٧ مورد مثبت، ۲۰ مورد گونه ی لیشمانیا تروپیکا و ۲۷ مورد گونه ی لیشمانیا ماژور تشخیص داده شدند. از ۲۰ بیماری که به درمان پاسخ مثبت داده بودند، ۱۹ مورد تعیین گونه شدند که شش مورد لیشمانیا تروپیکا و ۱۳ مورد لیشمانیا ماژور تشخیص داده شد. از ۲۸ بیمار دیگر که به درمان پاسخ نداده بودند و همگی تعیین گونه گردیده بودند، ١٤ مورد لیشمانیا تروپیکا و

جدول ۱: وضعیت بیماران مورد بررسی قرارگرفته مبتلا به لیشمانیوز پوستی

وضعیت بالینی	LT	LM	جمع	مقدار P
حساس به دارو	٦	١٣	١٩	NS
مقاوم به دارو	١٤	١٤	٢٨	NS
زخم درصورت وگردن	١٢	٦	١٨	S
زخم دردست و پا	٦	١١	١٧	S
زخم در هردو ناحیه	٢	١٠	١٢	S
شمار زخم یک تا دو عدد	١٨	١٣	٣١	S
شمار زخم بیشتر از یک تا دو عدد	٢	١٤	١٦	S
مدت زمان بیماری بیشتر از یک سال	٥	٥	١٠	NS
مدت زمان بیماری کمتر از یک سال	١٥	٢٢	٣٧	NS
جمع	٢٠	٢٧	٤٧	

LM: Leishmania major
LT: Leishmania tropica
S: Significant
NS: Nonsignificant

١٤ مورد لیشمانیا ماژور شناخته شدند. از نظر آماری، رابطه ای معنی دار میان گونه ی انگل و مقاومت دارویی مشاهده نگردید. از ۲۰ بیماری که انگل لیشمانیا تروپیکا از آنان جدا شده بود، ٦٠ درصد موارد زخم در صورت و گردن، ۳۰ درصد موارد در دست و پا و ۱۰ درصد موارد، در هر دو

ناحیه زخم داشتند. از ۲۷ بیماری که از آنها لیشمانیا ماژور جدا شد ۲٦ درصد موارد زخم در صورت و گردن، ٤۱ درصد موارد زخم در دست و پا و ۳۳ درصد موارد، در هر دو ناحیه زخم داشتند. از نظر آماری، رابطه ای معنی دار میان گونه ی انگل وجای زخم وجود داشت. شمار زخم های ایجاد شده در افرادی که لیشمانیا تروپیکا از آنان جدا شد، در ۹۰ درصد موارد یک تا دو عدد بود و در افرادی که لیشمانیا ماژور ایجاد کننده ی زخم ها بود، در بیشتر از ۵۰ درصد موارد بیشتر از دو عدد ضایعه مشاهده گردید. از نظر آماری رابطه ای معنی دار میان گونه ی انگل و شمار زخم وجود داشت. مدت پایداری آسیب پوستی در افرادی که لیشمانیا تروپیکا از آنان جدا شد، در ۲۱ درصد موارد، بیشتر از یک سال و در لیشمانیا ماژور، ۷/۵ درصد موارد، بیشتر از یک سال بود. از نظر آماری، رابطه ای معنی دار میان گونه ی انگل ومدت زمان پایداری زخم مشاهده نگردید.

بحث

تشخیص بیماری لیشمانیوز پوستی هر چند با فراهم کردن گسترش از زخم بیمار و رنگ آمیزی گیمسا به راحتی امکان پذیر است، اما در مواردی که زخم مزمن بوده و شمار انگل اندک باشد، تشخیص را با دشواری های فراوان رو به رو می کند. افزون بر آن در تشخیص مستقیم، امکان تعیین گونه ی انگل وجود ندارد و برای تشخیص گونه، به کشت انگل و تولید انبوه آن برای تزریق به حیوان آزمایشگاهی یا استفاده از روش ایزوآنزیم نیاز است.

روش های متکی بر DNA درتشخیص بیماری لیشمانیوز و شناسایی گونه های انگل درسال های اخیر رواج فراوان یافته است [۹]. نشان داده شده که، PCR روشی حساس در تشخیص بیماری، به ویژه درموارد مزمن است [۱۰،۱۱]. این روش ها، امروز جایگاه خود را، به عنوان روش هایی حساس و دقیق باز کرده اند. در این بررسی، با انجام روش دو مرحله ای PCR، حساسیت آزمایش بالا رفته و نه تنها تشخیص بیماری امکان پذیر می گردد، که تشخیص گونه ی انگل نیز، همزمان ممکن می شود. البته، در این روش، میزان انگل باید بیشتر از ۲۰ عدد در هر لام باشد. از ٤۹ بیمار مورد بررسی، در دو مورد، PCR آنها منفی بود که علت آن شمار اندک انگل (کمتر از ۲۰ عدد) بود. در این موارد بهتر است از روش پیشنهاد شده ی پیشین با آغازگرهای 13A, 13B استفاده گردد [٦]. Noyes در یک بررسی با همین روش اعلام کرده است که، این روش می تواند در حدود ۱۰۰ عدد کینتوپلاست حلقوی را (5×10^7 bp) شناسایی کند. با توجه به بکار بردن لام های ثابت شده و رنگ آمیزی گردیده، به نظر می آید حساسیت PCR و میزان استخراج DNA کاهش یافته و DNA به دست آمده در حالت ثابت شده، به خوبی نتواند تکثیر یابد. در بررسی دیگر، که به تازگی با آغازگرهای ITS1 و

ssu-rDNA انجام گرفته است، هر چند تشخیص گونه در همه ی نمونه های ثابت شده و به ویژه قدیمی امکان پذیر نبوده است [۱۲]، ولی با وجود ۹۵ درصد حساسیت و ۱۰۰ درصد ویژگی، به کارگیری این روش همچنان پیشنهاد شده است. به کار بردن روش استخراج DNA از لام های گیمسا و شناخت گونه ی انگل این امکان را فراهم می سازد تا بتوان، افزون بر تشخیص سریع بیماری، به تشخیص گونه ی انگل نیز پرداخت و نیاز به کشت انبوه انگل را از میان برد. کاربرد این روش در بررسی های همه گیر شناختی، به ویژه بر روی حشره ی ناقل، می تواند کمکی بزرگ در تشخیص سریع ناقلان کرده و نیاز به تشریح تک تک آنها را از میان ببرد. این روش می تواند به تشخیص مخازن بیماری و شیوه ی نمونه گیری از این جانداران نیز، کمک کند. از ٤٧ بیمار مورد بررسی، ۲۰ مورد لیشمانیا تروپیکا و ۲۷ مورد، لیشمانیا ماژور جدا گردید، که این امر از منطقه ی جنوب ایران و با توجه به کانون نبودن لیشمانیا ماژور جالب توجه است و نشان دهنده ی آلودگی مناطق گوناگون به این انگل است. علل افزایش و ایجاد کانون های جدید را بزرگ شدن شهرها و گسترش آنها و نزدیکی به کانون های جوندگان وحشی و نیز، جا به جایی جمعیت و مهاجرت می دانند [۵]. در بررسی این بیماران مشخص گردید که، ۲۰ نفر از آنان به درمان با گلوکانیتم پاسخ داده اند، که از ۱۳ نفر آنان، انگل لیشمانیا ماژور و از شش نفر، انگل لیشمانیا تروپیکا جدا شده است. از ۲۸ بیماری که، به درمان پاسخ ندادند، هر دو گونه ی انگل به گونه ای برابر جدا شده است، که نشان دهنده ی مقاومت بیشتر لیشمانیا تروپیکا و حساسیت بیشتر لیشمانیا ماژور به درمان با گلوکانیتم در این ناحیه از کشور است.

درباره ی جای زخم، از ٦٠ درصد از بیمارانی که در صورت و گردن آنها زخم وجود داشت، لیشمانیا تروپیکا جدا شد و مواردی کمتر از این انگل، زخم در دست و پا ایجاد کرده بود. این امر، احتمالاً نشان دهنده ی تفاوت ناقلان و عادت خونخواری و گزش ناقلان است. در حالی که از ۲۷ بیماری که لیشمانیا ماژور جدا شده بود، ٤١ درصد موارد، زخم در دست و پا و مواردی کمتر، در صورت و گردن بود. شمار زخم ها نیز بیشتر از دو عدد بود، که با همه گیر شناسی بیماری در دیگر مناطق، همخوانی دارد. البته، این به آن معنا نیست که بتوان از ناحیه ی درگیری گونه ی انگل را تشخیص داد. به نظر می رسد نوع پوشش افراد، در این جا نقشی مهم نداشته باشد، چون معمولاً بیماران از نظر عادات رفتاری در یک منطقه یکسانند اما به نظر می آید، زمان خونخواری نقشی بیشتر داشته باشد که احتمالاً به تفاوت ناقلان دو گونه ی انگل مرتبط است.

سپاسگزاری

پژوهش انجام یافته برپایه ی طرح پژوهشی مصوب شماره ی ۸۰-۷۸ دانشگاه علوم پزشکی

شیراز بوده است، که به ایـن وسـیله، از مـسؤولان مربوط قدردانی می گردد.

Characterization of Leishmania Parasites from Archived Geimsa-stained Slides Using Nested Polymerase Chain Reaction

*M.H. Motazedian, Ph.D. *, M. Karamian, M.Sc. **, S. Ardehali, Ph.D. ***, F. Handjani, M.D. ****, *Associate Professor of Parasitology, **Ph.D. Student of Parasitology, ***Professor of Parasitology, ****Associate Professor of Dermatology, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran*

Background: In Iran, the clinical presentation of cutaneous leishmaniasis is mainly in the form of dry type (urban form) or wet type (rural form). The microscopic finding of amastigotes in Giemsa-stained smears is the most practical laboratory test for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis. However, determination of parasite species is not possible when using this method. Parasite characterization is made by various biochemical, immunological and molecular methods based on massive culture of the parasites**. Materials and Methods:** In this study nested PCR was used both for diagnosis as well as species identification. Giemsa-stained slides from forty-nine patients, that had been included in a drug resistance survey, were used in this study. **Results:** From the available slides, forty-seven were diagnosed as having leishmaniasis using the nested PCR technique. Twenty of these were *Leishmania tropica* (*L. tropica*) and the remaining were *Leishmania major (L. major*). Amastigotes were recovered from twenty-nine of these patients after standard treatment. This study revealed that clinically drug-resistant cases are more likely to be infected with L. tropica than with *L. major,* although this difference was not statistically significant. *L. tropica* was mostly present in facial lesions while *L. major* was mostly detected in hand and foot lesions. In patients with more than two lesions, *L. major* was the predominant cause. *L. tropica* was the cause of a more prolonged duration of disease. None of the above findings were, however, statistically significant. **Conclusion:** It can be concluded that nested PCR is a useful technique for studying the molecular epidemiology of leishmaniasis in the field.

Correspondence:
M.H. Motazedian
Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine,Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
Tel: *+98-711-2305291*
E-mail:
motazedm@sums.ac.ir

Keywords: Nested PCR, Cutaneous leishmaniasis, Parasite species, Giemsa staining

منابع

[۱] اردهالی ص، رضایی ح، ندیم ا: انگل لیشمانیا و لیشمانیوزها. ویرایش دوم، تهران، مرکز نشر دانشگاهی. (۱۳۷۳):۳۷-۱۸.

[2]Desjeux P: Global control and Leishmania HIV co-infection. ***Clin Dermatol*** 1997;17:317–25.

[3]Heinzel F: From oriental sore to kala azar. ***Clin Microbiol*** 1997;19:121-6.

[4]Giamarellou H: AIDS and the skin parasitic diseases. ***Clin Dermatol*** 2000; 18:433-9.

[5]Motazedian H, Noamanpoor B, Ardehali S: Characterization of leishmania parasites isolated from different provinces of Iran. ***East Mediterr Health J*** 2002; 8:338-44.

[6]Motazedian H, Karamian M, Noyes H, Ardehali S: DNA extraction and amplification of Leishmania from archived, Giemsa-stained slides for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis by PCR. ***Ann Trop Med Parasitol*** 2002; 96: 31-4.

[7]Noyes H, Reyburn AH, Bailey WJ, Smith D: A nested- PCR-based schizoderme method for identifying Leishmania kinetoplast minicircle classes directly from clinical samples. ***J Clin Microbiol*** 1998; 36: 2877-81.

[8]Vince A, Poljak M, Seme K: DNA extraction from archival Giemsa-stained bone marrow slides: Comparison of six rapid methods. ***Br J Haematol*** 1998; 101: 349-51.

[9]Salman SM, Rubeiz NG, Kibbi AG: Cutaneous leishmaniasis: Clinical features and diagnosis. ***Clin Dermatol*** 1999;17:291-6.

[10]Banuls AL, Tibayrenc M: Molecular epidemiology and evolutionary genetics of leishmania parasites. ***Inter J Parasitol*** 1999;29:1137-47.

[11]Pinero J, Martinez E, Pacheco R, et al.: PCR-Elisa for diagnosis of mucocutaneous leishmaniasis. ***Acta Trop*** 1999; 73:21-9.

[12]Schonian G, Nasereddin A, Dinse N, et al.: PCR diagnosis and characterization of leishmania in local and imported clinical samples. ***Diag Microbiol Infect Dis*** 2003;47: 349-58.