دارای رتبه علمی – پژوهشی
از کمیسیون نشریات علوم پزشکی کشور

ارزیابی حساسیت و ویژگی روش تکثیری بر پایه اسید نوکلئیک برای تشخیص عامل لیشمانیوزیس جلدی

علیرضا نیازی
کارشناس ارشدزیست فناوری، دانشکده فن آوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

فرامرز کوهسار
دانشجوی دکترای انگل شناسی، مرکز تحقیقات علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

فاطمه غفاری فر
دانشیار انگل شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

هاجر ضیایی هزار جریبی
استادیار انگل شناسی پزشکی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

فاطمه مسگریان
کارشناس ارشد انگل شناسی پزشکی، مرکز بهداشت گنبد کاووس ، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

اوغل نیاز جرجانی
استادیار انگل شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

نویسنده مسئول: اوغل‌نیاز جرجانی

پست الکترونیک:niaz_jorjani@yahoo.com

تلفن: ۰۱۷۱-۴۴۳۶۱۰۲

آدرس: مرکز تحقیقات علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

دریافت:۹۲/۹/۱۲
ویرایش پایانی:۹۲/۹/۲۶
پذیرش:۹۲/۹/۲۷

چکیده

زمینه و هدف: *روش میکروسکوپی همراه با کشت، روش استاندارد طلایی برای تشخیص انگل لیشمانیا است . استفاده از روش های ملکولی از جمله روش RT-PCR برای تشخیص این بیماری در مقایسه با روش‌های میکروسکوپی از حساسیت و ویژگی بالاتری برخوردار است. اما با توجه به گرانی تجهیزات آن و زمانی که برای انجام آن صرف می‌شود به صورت گسترده مورد استفاده قرار نمی گردد. استفاده از روش تکثیری بر پایه ی اسید نوکلئیک (NASBA) به دلیل عدم نیاز به دستگاه ترموسایکلر و همچنین شناسایی انگل زنده، دارای ارزش بالا یی است. هدف از این مطالعه، بررسی حساسیت و ویژگی NASBA برای تشخیص ملکولی عامل لیشمانیوزیس جلدی می باشد.*

روش بررسی: *از ۲۸ نمونه زخم پوستی مشکوک به لیشمانیوزیس جلدی، RNA انگل استخراج شد. سپس به کمک پرایمرهای اختصاصی طراحی شده برای ناحیه ی 18srRNA لیشمانیا، این ناحیه به وسیله ی واکنش ایزوترمال NASBA مورد تکثیر قرار گرفت و در جهت افزایش حساسیت، محصول واکنش تکثیری به وسیله پروب فلورسانس ملکولی SYBER Gold در بافر TBE(1X) الکتروفورز شد. همچنین با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، بر روی نمونه ها واکنش RT-PCRنیز انجام شد.*

یافته ها: *دراین مطالعه روش NASBA و روش RT-PCR برای تشخیص انگل لیشمانیا در زخم به ترتیب از حساسیت ۸۱ درصد و ۵۱ درصد و ویژگی ۱۰۰ درصد برخوردار بودند.*

نتیجه گیری: *روش ایزوترمال NASBA با حساسیت و ویژگی بالا به منظور شناسایی لیشمانیوز جلدی می توان استفاده کرد.*

واژه های کلیدی: *لیشمانیوزیس جلدی، NASBA، 18S rRNA.*

آدرس مقاله:
نیازی ع، کوهسار ف، غفاری فر ف، ضیایی هزار جریبی ه، مسگریان ف، جرجانی ا" ارزیابی حساسیت و ویژگی روش تکثیری بر پایه اسید نوکلئیک برای تشخیص عامل لیشمانیوزیس جلدی" مجله علوم آزمایشگاهی،تابستان ۱۳۹۳، دوره هشتم(شماره۲): ۲۰-۲۶

مقدمه

تشخیص های افتراقی لیشمانیوزیس پوستی از سایر بیماری های مشابه مانند لپروز، سرطان پوست و زخم های توبرکلوزیس در مناطق اندمیک قابل اهمیت است (۱). تشخیص انگل لیشمانیا به وسیله روش میکروسکوپی همراه با کشت، به دلیل ویژگی بالا استاندارد طلایی است. آزمایش های میکروسکوپی با گرفتن نمونه زخم انجام می گیرد. گاهی کشت بیوپسی انجام می شود. میکروسکوپی هنوز هم در مناطق آندمیک به عنوان روشی برای تشخیص لیشمانیوزیس جلدی استفاده می شود زیرا روش های نوین پیچیده، گران و به ندرت قابل دسترس می باشند. روش میکروسکوپی دارای حساسیت کم می باشد، که بستگی به تعداد و پراکندگی انگل در نمونه زخم، نحوه نمونه گیری و مهارت شخص نمونه گیر دارد(۲،۱). روش های ملکولی متفاوتی برای تشخیص لیشمانیازیس بکار می رود، به تازگی روش های مبتنی بر PCR و PCR-RFLP در تشخیص لیشمانیازیس استفاده می گردد(۳-۵). روش PCR در تشخیص افتراقی گونه و جنس انگل لیشمانیا قبل از درمان دارای حساسیت و ویژگی بالایی می باشد. PCR زمانی که بار انگلی کم باشد، بهتر از روش میکروسکپی و کشت است (۶). همچنین این روش در تشخیص لیشمانیا در افرادی که عفونت مشترک با ایدز دارند بکار می رود (۷-۱۰) اندازه گیری انگل در بافت میزبان نیز با روش PCR انجام می گردد (۹) اما زمانی که می خواهیم اثر بخشی داروها و نتایج درمان را بررسی کنیم باید انگل زنده مورد ارزیابی قرار گیرد. در این صورت RNA به DNA ارجحیت دارد زیرا DNA تا مدت طولانی (۲۴ ساعت بعد و یا بیشتر) نیز قابل جداسازی است(۱۱). در دهه های اخیر، برای شناسایی RNA انگل لیشمانیا روش real- Time PCR طراحی و توسعه یافته است (۱۲). اما RT-PCR وابسته به دستگاه گران قیمت ترموسایکلر می باشد، بنابراین در همه مناطق کشور و به ویژه مناطق بومی که از لحاظ اقتصادی ضعیف تر می باشند امکان خرید دستگاه و راه اندازی PCR وجود ندارد. بنابراین هنوز هم از روش های غیرحساس مانند لام مستقیم جهت تشخیص این میکروارگانیسم استفاده می شود. اصولا" روش هایی که قادر به شناسایی انگل زنده هستند، این امکان را برای پزشک بوجود می آورند که برنامه ارزیابی اثر داروها را به خوبی تحت نظارت قرار دهند. در حال حاضر، برای ارزیابی داروها به دلیل اختلافاتی که بین گونه های لیشمانیا وجود دارد، مشکلاتی از قبیل عدم پاسخ صحیح به درمان، اشکال مختلف بالینی بیماری یا مقاومت دارویی مشاهده می شود. در حال حاضر استانداردی برای تایید درمان قطعی بیماران وجود ندارد و بنابراین یک روش تشخیصی سریع، حساس و با ویژگی بالا که قادر باشد حضور انگل های زنده را در بیماران تشخیص دهد مورد نیاز است (۱۳). روش تکثیر بر پایه ی توالی اسیدهای نوکلئیک (NASBA) یکی از معروف ترین روش های ایزوترمال تکثیری می باشد که در آن RNA در شرایط تک دما و بدون نیاز به ترموسایکلر، توسط سه آنزیم رونوشت بردار معکوس(RT)، RNaseH و T7 RNA POL تکثیر می شود. در روش NASBA، ابتدا به کمک فعالیت DNA پلیمرازی وابسته به RNA، آنزیم RT و یک پرایمر، یک رشته DNA مکمل RNA الگو ساخته می شود. سپس RNA موجود در هیبرید DNA-RNA به وسیله RNaseH مورد تجزیه قرار گرفته و این بار به کمک فعالیت DNA پلیمرازی وابسته به DNA آنزیم RT و یک پرایمر مناسب متصل به پروموتر T7، از روی DNA تک رشته، رشته مکمل آن ساخته می شود. به این ترتیب یک DNA دو رشته ای حاصل می شود که به یک سر آن پروموتر T7 متصل می باشد. سپس از روی این DNA دو رشته ای توسط آنزیم RNA T7 پلیمراز تعداد زیادی RNA ساخته می شود و این سیکل تکرار می گردد(۱۴). هدف از این مطالعه، بررسی ویژگی و حساسیت دو روش تکثیری NASBA (nucleic acid sequence-based amplification) و RT-PCR (Reverse Transcriptase-PCR) در شناسایی 18srRNA لیشمانیا ماژور بود.

روش بررسی

نمونه های پوستی حاصل از ۲۸ زخم پوستی مشکوک به لیشمانیوزیس جلدی از مرکز بهداشت شهرستان گنبد جمع آوری شد و به روش های میکروسکوپی همراه با کشت، NASBA، RT-PCR بررسی شدند. نمونه استاندارد لیشمانیا ماژور(MRHO/IR/75/ER) برای ساخت کنترل مـثبت از دانشگاه تربیت مدرس تهیه شد. برای انجام واکنش های تکثیری NASBA، RT-PCR نیاز به دو پرایمر Forward و Reverse می باشد، با کمک مطالعات قبلی انجام شده و همین طور با کمک نرم افزارهای Primer3 و همچنین Gene Runner، دو پرایمر Forward و Reverse طراحی شد، و در ابتدای ناحیه '۵ پرایمر Reverse موردنیاز برای واکنش NASBA توالی T7 پروموتر قرار گرفت. بنابراین RNA های تولید شده به وسیله واکنشNASBA، مکمل RNA الگو می باشند.(جدول ۱) نمونه های پوستی به محض جـداسازی از زخم بیماران در درون RNA Later stabilization reagent(QIAGEN) قرار گرفتند. استخراج RNA از نمونه ها، با استفاده از RNeasy plus mini kit(QIAGEN) و بر طبق روش کار کارخانه صورت گرفت. برای ساخت کنترل مثبت کیت، ابتدا DNA از نمونه استاندارد لیشمانیا ماژور کشت داده شده در محیط مایع RPMI 1640دارای ۱۰ تا ۲۰ درصدFBS (۱۰۰ واحد پنی سیلین در mL و ۱۰۰ میکرو گرم استرپتومایسین در چند میلی لیتر)تهیه شد و سپس با استفاده از پرایمر ها بر روی آن PCR انجام شد. بدین ترتیب تمامی محصولات PCR،در یک انتهای خود دارای توالی T7 Promoter می باشند. سپس با استفاده از روش کار زیر در حجم 25µl بر روی آن Invitro Transcription صورت گرفت.

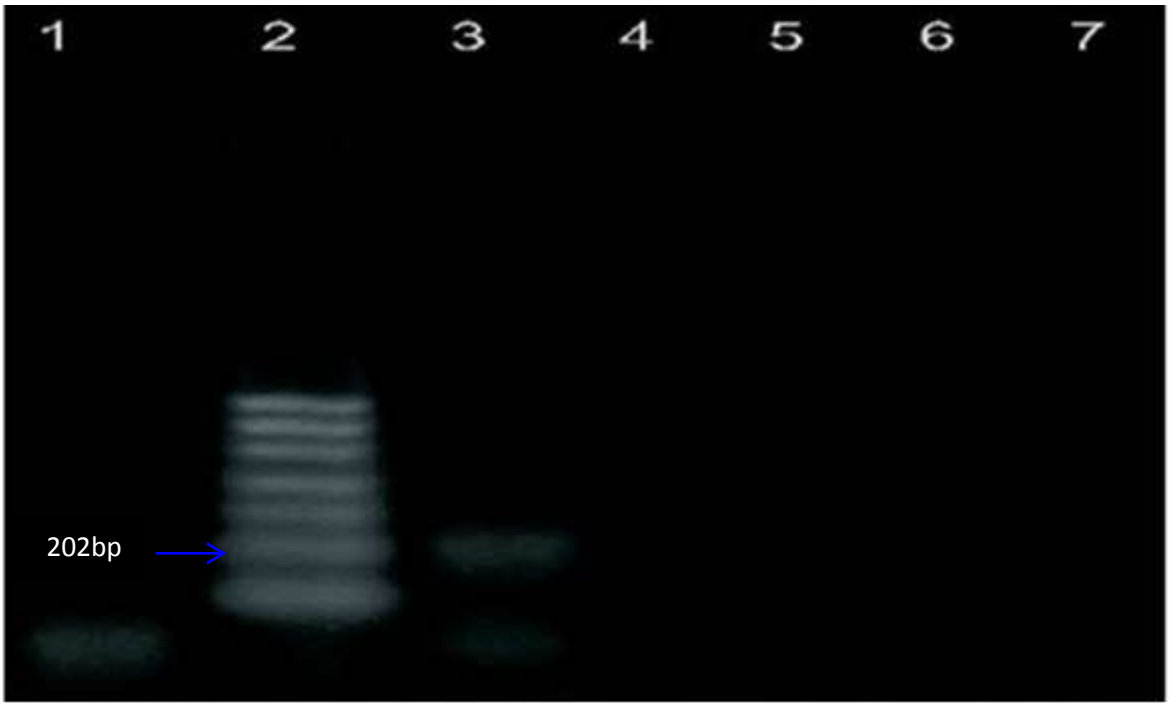
NTP mix (Fermentas) 25uM, Transcription buffer (Fermentase) 10uM, DNA 1ug,T7 RNA Polymerase(Fermentase) 30U و RNase inhibitor 0.5U، که پس از ترکیب مواد به مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه انکوبه شد.

برای واکنش NASBA بر روی RNA استخراج شده از نمونه ها و کنترل مثبت، مطابق روش کار زیر در حجم 20µlانجام گرفت.

TRIS-HCL(PH 8.6) 50Mm,Mgcl2 6mM,KCL 70mM,RNase inhibitor 20U,DTT 10mM,DMSO 13%,NTP 0.5mM, dNTP 1mM,each primer 0.5mM,BSA 5mM,RT 10U,RNaseH 0.4U,T7 RNA POL 10U,sorbitol 1.7%,RNA 1uM. پس از تهیه مخلوط واکنش، به مدت ۵ دقیقه در ۶۵ درجه و سپس به مدت ۹۰ دقیقه در ۴۱درجه انکوبه شد، تا واکنش انجام گیرد. پس از انجام واکنش، محصول RNA بدست آمده بر روی ژل آگـاروز ۲درصد الکتـروفورز شد و پس انجام آن، به وسیله ی سایبرگلد (Invitrogene) رنگ آمیزی شد. واکنش RT-PCR با استفاده از کیتcDNA synthesis شرکت فرمنتاز، از روی RNAها، cDNA ساخته شد و سپس با استفاده از کیت SapphireAmp Fast PCR شرکت تاکارا، بر روی cDNA ها، PCR انجام شد.

جدول ۱-پرایمرهای مورد استفاده در واکنش NASBA و RT-PCR.

نام توالی	توالی
F primer NASBA/RT-PCR	5'-CCAAAGTGTGGAGATCGAAG-3'
R Primer RT-PCR	5'-AGGGCCGGTAAAGGCCGAATAG-3'
R primer NASBA	5'AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGGCCGGTAAAGGCCGAATAG-3'



شکل۱-روشNASBA در شناسایی و تکثیر RNA لیشمانیا ماژور . نمونه شماره ۱،کنترل منفی واکنش NASBA ، نمونه شماره ۲،شاخص وزن ملکولیRNA ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ ، نمونه ۳، محصول NASBA(202bp)

یافته ها

نتایج این بررسی نشان داد که از ۲۸ نمونه مشکوک به زخم لیشمانیوزیس جلدی، ۲۷ مورد به روش میکروسکوپی همراه با کشت مثبت و ۱ نمونه منفی شد و با روش RT-PCR تعداد ۱۴ مورد مثبت و بقیه منفی گزارش شدند همچنین با روش NASBA ۲۲ مورد مثبت و بقیه منفی شدند. نتایج نشان داد که NASBA و RT-PCR به ترتیب از حساسیت ۸۱ درصد و ۵۱ درصد و اختصاصیت ۱۰۰ درصد برخوردار است.که این نتایج نشانه ی اختصاصیت و حساسیت قابل قبول NASBA در مقایسه با RT-PCR است.

بحث

به طور متداول، تشخیص لیشمانیوزیس جلدی مبتنی بر روش های میکروسکوپی انگل لیشمانیا از نمونه های پوست یا آسپیره زخم هاست. این روش ها غیر حساس بوده و کشت انگل نیز مستلزم صرف وقت طولانی است (۱۵). از سوی دیگر، هنوز از روش های غیرحساس میکروسکوپی و طولانی مدت کشت، برای شناسایی لیشمانیا ماژور استفاده می شود. روش میکروسکوپی اگرچه روش تشخیصی سریعی می باشد، اما از حساسیت بسیار پایینی برخوردار است و در مواردی که میزان انگل در اسمیر مورد مطالعه کم باشد یا در مواردی که تکنسین از تخصص کافی برخوردار نباشد، می تواند منجر به مثبت کاذب یا منفی کاذب در گزارش گردد. از سوی دیگر، به وسیله روش میکروسکوپی مواردی همچون بررسی حیات میکروارگانیسم و بررسی سیر پاسخ به درمان، قابل مطالعه نیست. از طرف دیگر، اگرچه روش کشت از حساسیت بسیار بالایی برخوردار است، ولی همانطور که گفته شد زمان زیادی را جهت تشخیص میکروارگانیسم می طلبد. در دهه های اخیر، روش های RT-PCR برای شناسایی انگل لیشمانیا طراحی و توسعه یافته است و در کشورهایی که PCR قابل دسترسی است، ابزار تشخیصی مهمی هستند(۱۶-۱۸). اما RT-PCR وابسته به دستگاه گران قیمت ترموسایکلر می باشد، بنابراین در همه مناطق کشور و خصوصا" مناطق بومی که از لحاظ اقتصادی ضعیف تر می‌باشند امکان خرید دستگاه و راه اندازی PCR وجود ندارد. روش هایی که قادر به شناسایی انگل زنده هستند، این امکان‌را برای پزشک بوجود می آورد که برنامه ارزیابی

اثر داروها را به خوبی تحت نظارت قرار دهد. Mary و همکاران در سال ۲۰۰۴ در بررسی روی بیماران مبتلا به لیشمانیا اینفانتوم نشان دادند که حساسیت روش real- PCR time برای تعیین کمیت لیشمانیا اینفانتوم ۰/۰۱۲۵ انگل در میلی لیتر است بنابراین این روش برای بررسی اپیدمیولوژیک و اهداف تشخیصی، به ویژه برای تعریف از Parasitemia در سطوح پایین در طول پیگیری پس از درمان بسیار مفید می باشد(۲۰). در سال ۲۰۰۸ Van der Meide و همکاران در یک بررسی بر روی ۸۵ بیمار (با سن۱۶ تا ۶۵ سال) که مبتلا به لیشمانیوزیس جلدی بودند روش های RT-PCR و PCR را برای تشخیص لیشمانیوزیس مقایسه کردند و نشان دادند که حساسیت و ویژگی روشPCR (۶۲٪ تا ۷۱٪) برای تشخیص کمتر از روش RT-PCR (۸۲٪ تا ۸۵٪) می باشد (۲۱)Mugasa و همکاران در یک بررسی بر روی ۵۰ نمونه خونی و ۷۵ نمونه بیوپسی پوست بیماران، روش NASBA را برای تشخیص لیشمانیوزیس استفاده کردند و گزارش کردند که حساسیت و ویژگی این روش برای نمو نه های خون بیماران مبتلا به لیشمانیوزیس به ترتیب ۹۳/۳ درصد و ۱۰۰درصد و بر روی نمونه های بیوپسی پوست بیماران مبتلا به ترتیب ۹۸/۶ درصد، ۱۰۰درصد می باشد (۲۲). همچنین Saad و همکاران روش NASBA را بر روی نمونه های بیماران مشکوک و تأیید شده به لیشمانوزیس احشایی، جلدی و PKDL(Post-kala-azar dermal leishmaniasis) و افراد سالم ارزیابی کردند. حساسیت و ویژگی این روش را برای تشخیص لیشمانیوزیس بر روی نمونه های لنف، خون و بافت بسیار بالا گزارش کردند (۲۳). نتایج این مطالعه نیز نشان داد که روش NASBA از حساسیت ۸۱ درصد و ویژگی ۱۰۰درصد برخوردار است. این نتایج حاکی از حساسیت قابل قبول روش NASBA در مقایسه با روش RT-PCR است. به کارگیری روش حساس NASBA، می تواند برای ارزیابی و تاثیر برنامه های درمانی و تشخیص اولیه درمان های ناموفق، تاثیر زیادی داشته باشد. با استاندارد شدن روش های ایزوترمال از جمله NASBA، در تشخیص اولیه عفونت های باکتریایی، ویروسی و انگلی از جمله لیشمانیا می توان این روش را جایگزین روش های غیرحساس از جمله روش های میکروسکوپی و روش های طولانی مدت از جمله کشت شود.

نتیجه گیری

روش ایزوترمال NASBA با حساسیت و ویژگی بالا به منظور شناسایی لیشمانیوز جلدی می توان به کار برد. این روش در همه آزمایشگاه ها و مناطق کشور با امکانات ساده آزمایشگاهی، قابل انجام است.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح مصوب (شماره۳۵/۲۶۳۱- تاریخ ۹۰/۱۱/۱۹)در معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی گلستان و همچنین پایان نامه کارشناسی ارشد رشته زیست فناوری پزشکی می باشد. در اینجا از خانم ساره ژند کارشناس آزمایشگاه زیست فناوری و مرکز بهداشت شهرستان گنبد تقدیر و تشکر می شود.

References

1.Faber WR, Oskam L, Gool T, Kroon NCM, Knegt-Junk KJ, Hofwegen H, et al. *Value of diagnostic techniques for coetaneous Leishmaniasis*. J Am Acad Dermatol. 2003; 49(1): 70-4.

2. Mendonça MG, Brito MEF, Rodrigues EHG, Bandeira V, Jardim ML, Abath FGC. *Persistence of Leishmania parasites in scars after clinical cure of American coetaneous Leishmaniasis: Is there a sterile cure?* J Infect Dis. 2004; 189: 1018-23.

3. Schallig HD, Oskam L. *Molecular biological applications in the diagnosis and control of Leishmaniasis and parasite identification*. Trop Med Int. 2002; 7(8): 641-51.

4. Aransay AM, Scoulica E, Tselentis Y. *Detection and identification of Leishmania DNA within naturally infected flies*. Appl Environ Microbiol. 2002; 66(5): 1933-8.

5. Singh S, Dey A, Sivakumar R. *Applications of molecular methods for Leishmania control*. Exp Rev Mol. Diagn. 2005; 5(2): 251–265.

6.Cruz I, Morales MA, Noguer I, Rodríguez A, Alvar J. Alvar. *Leishmania in discarded syringes from intravenous drug users*. Lancet. 2002; 359(1):1124-1125.

7. Garcia AL, Kindt A, Quispe-Tintaya KW, Bermudez H, Llanos A, Arevalo J, Bañuls AL, De Doncker S, Le Ray D, Dujardin JC. *American tegumentary leishmaniasis: antigen-gene polymorphism, taxonomy and clinical pleomorphism*. Infect Genet Evol. 2005; 5(2): 109-116.

8. De Doncker S, Hutse V, Abdellati S, Rijal S, Singh Karki BM, Decuypere S, et al. *A new PCR-ELISA for diagnosis of visceral leishmaniasis in blood of HIV-negative subjects*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2005; 99(6): 25–31 .

9. Bossolasco S, Gaiera G, Olchini D, Gulletta M, Martello L, Bestetti A, et al. *Real-time PCR assay for clinical management of human immunodeficiency virus-infected patients with visceral leishmaniasis*. J Clin Microbiol. 2003; 41(2): 5080–5084.

10. Schubach A, Haddad F, Oliveira-Neto MP, Degrave W, Pirmez C, Grimaldi G Jr, et al. *Detection of Leishmania DNA by polymerase chain reaction in scars of treated human patients.* J Infect Dis. 1998; 178(3): 911-914.

11. Laskay T, Mikó TL, Negesse Y, Solbach W, Röllinghoff M, Frommel D. *Detection of cutaneous Leishmania infection in paraffinembedded skin biopsies using the polymerase chain reaction*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1995; 89(1): 273-275.

12. Faber WR, Oskam L, Gool T, Kroon NCM, Knegt-Junk KJ, Hofwegen H, et al. *Value of diagnostic techniques for coetaneous Leishmaniasis*. J Am Acad Dermatol. 2003; 49(1): 70-4.

13.Croft SL. *Monitoring drug resistance in Leishmaniasis*. Trop Med Int Health. 2001; 6(11): 899-905.

14.Gill P, Ghaemi A. *Nucleic Acid Isothermal Amplification Technologies - a Review.* Nucleosids, Nucleotides & Nucleic Acids. 2008; 27(3): 224-243.

15.Schallig HD, Oskam L. *Molecular biological applications in the diagnosis and control of Leishmaniasis and parasite identification*. Trop Med Int. 2002; 7(8): 641-51.

16.Mendonça MG, Brito MEF, Rodrigues EHG, Bandeira V, Jardim ML, Abath FGC. *Persistence of Leishmania parasites in scars after clinical cure of American coetaneous Leishmaniasis: Is there a sterile cure?* J Infect Dis. 2004; 189: 1018-23.

17. Faber WR, Oskam L, Gool T, Kroon NCM, Knegt-Junk KJ, Hofwegen H, et al. *Value of diagnostic techniques for coetaneous Leishmaniasis*. J Am Acad Dermatol. 2003; 49(1):70-4.

18. Mary C, Faraut F, Lascombe L, Dumon H. *Quantification of Leishmania infantum DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity*. J Clin Microbiol. 2004; 42(7): 5249–5255.

19. Khosravi S, Hejazi SH, Hashemzadeh M, Eslami G, Darani HY. *Molecular diagnosis of Old World leishmaniasis: real-time PCR based on tryparedoxin peroxidase gene for the detection and identification of Leishmania spp*. J Vector Borne Dis. 2012; 49(1): 15-8.

20. Mary C, Faraut F, Lascombe L, Dumon H. *Quantification of Leishmania infantum DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity*. J Clin Microbiol. 2004; 42: 5249-5255.

21. Van der Meide W, Guerra J, Schoone G, Farenhorst M, Coelho L, Faber W, et al. *Comparison between quantitative nucleic acid sequence-based amplification, real-time reverse transcriptase PCR, and real-time PCR for quantification of Leishmania parasites*. J Clin Microbiol. 2008; 46(1): 73-8.

22. Mugasa CM, Laurent T, Schoone GJ, Basiye FL, Saad AA, El Safi S, et al. *Simplified molecular detection of Leishmania parasites in various clinical samples from patients with leishmaniasis.* Parasit Vectors. 2010; 3(1): 1-6.

23. Saad AA, Ahmed NG, Osman OS, Al-Basheer AA, Hamad A, Deborggraeve S, et al. *Diagnostic Accuracy of the Leishmania OligoC-TesT and NASBAOligochromatography for Diagnosis of Leishmaniasis in Sudan*. PLoS Negl Trop Dis. 2010; 4(8):1-5.

Sensitivity and Specificity of Nucleic Acid Sequence-Based Amplification Method for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis

Niazi, A. (MSc)
MSc of Medical Biotechnology, Faculty of Advanced Medical Technologies, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

Koohsar, F. (MSc)
PhD Student of Parasitology, Laboratory Science Research Center, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

Ghaffarifar, F. (PhD)
Associate Professor of Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Ziaei-Hezarjaribi, H. (PhD)
Assistant Professor of Parasitology, Deo of Parasitology, School of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

Mesgarian, F. (MSc)
MSc of Parasitology, Gonbad Health Center, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

Jorjani, O. (PhD)
Assistant Professor of Parasitology, Laboratory Science Research Center, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

Corresponding Author: Jorjani, O.
Email: niaz_jorjani@yahoo.com

Received: 3 Dec 2013
Revised: 17 Dec 2013
Accepted: 18 Dec 2013

Abstract

Background and Objective*:* Culture, microscopic method is a gold standard method for identification of *Lishmania* parasite. The use of Molecular methods such as RT- PCR compared to microscopic methods has a higher sensitivity and specificity; however, it is not widely used due to its expensive equipment and the time requested. The use of nucleic acid sequence based amplification (NASBA) method is highly valuable for diagnosis of live parasite because there is no need for to use Thermo cycler. We aimed to assess sensitivity and specificity of NASBA for molecular detection of cutaneous Leishmaniasis.

Material and Methods: First, the RNA was extracted from 28 skin biopsies suspected cutaneous Leishmaniasis. Then, by means of specific primers designed for 18srRNA region, this region was amplified using NASBA isothemal amplification. To increase the sensitivity, the product was electroforesed in TBE (IX) buffer, using Syber Gold Flourecent probes. Using specific primers, RT- PCR was conducted on the samples too.

Result: For diagnosis of Leishmania parasites, NASBA and RT-PCR had the sensitivity of 81% and 51%, respectively, and specificity of 100%.

Conclusion: NASBA isothermal method with high sensitivity and specificity can be applied for identification of cutaneous leishmaniasis.

Keywords: Cutaneous Leishmanisis, NASBA, 18S rRNA

This paper should be cited as: Niazi A, Koohsar F, Ghaffarifar F, Ziaei-Hezarjaribi H, Mesgarian F, Jorjani O. [Sensitivity and Specificity of Nucleic Acid Sequence-Based Amplification Method for Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis]. MLJ. 2014; 8(2):20-26 [Article in Persian]