مجله پزشکی کوثر
دوره ۱۴، شماره ۳، پاییز ۱۳۸۸
صفحات: ۱۴۲-۱۳۷

استانداردسازی روش NASBA با به‌کارگیری ژن 18s rRNA در تشخیص انگل *لیشمانیا ماژور*

شهناز شیربازو[۱] *MSc*، عبدالحسین دلیمی‌اصل[*] *PhD*، مهدی فروزنده مقدم[۲] *PhD*، فاطمه غفاری‌فر[۱] *PhD*

چکیده

اهداف. *لیشمانیا ماژور* انگل تک‌یاخته‌ای تاژک‌دار، با تنوع بیش از ۲۰ گونه و دارای گسترش جهانی است. این انگل عامل بیماری لیشمانیازیس پوستی (CL) در انسان است. استفاده از روش‌های مولکولی برای تشخیص این بیماری، حساس‌تر از روش‌های میکروسکوپی است. استفاده از روش NASBA به‌دلیل شناسایی انگل زنده، دارای ویژگی بالایی است. هدف از این مطالعه، ارزیابی تکنیک مولکولی ایزوترمال NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) در تشخیص انگل زنده لیشمانیا در شرایط محیط کشت بود.

مواد و روش‌ها. پس از تکثیر انگل در محیط اختصاصی RPMI، تخلیص RNA از مرحله پروماستیگوت به عمل آمد و از تکثیر ژن 18s rRNA برای ارزیابی روش NASBA در تشخیص انگل زنده استفاده شد. باند حاصل از تکثیر این ژن اختصاصی، روی ژل آگارز مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها. RNA تخلیص‌شده از انگل، دارای وزن ۱۲/۵kD و سه باند rRNAهای 24sα و 24sβ و 18s rRNA بود. ژن اختصاصی 18s rRNA انگل لیشمانیا در ناحیه تقریبا ۲۰۰جفت‌بازی برای شناسایی پروماستیگوت انگل *لیشمانیا ماژور* در روش NASBA، قابل استفاده بود.

نتیجه‌گیری. کاربرد تکنیک تکثیری و ایزوترمال NASBA روشی ایده‌آل با اختصاصیت بالا در تشخیص RNA انگل زنده *لیشمانیا ماژور* است. این روش برای ارزیابی دوره و اثربخشی داروهای ضدلیشمانیا و همچنین تشخیص اولیه درمان‌های ناموفق در بیماران مبتلا به لیشمانیای پوستی، جایگزین خوبی برای روش‌های غیرحساس میکروسکوپی و کشت است.

کلیدواژه‌ها: *لیشمانیا ماژور*، روش NABSA، ژن 18s rRNA

دریافت مقاله: ۱۳۸۸/۷/۱۱، پذیرش مقاله: ۱۳۸۸/۸/۲۴

* نویسنده مسئول: گروه انگل‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران dalimi_a@modares.ac.ir
۱ گروه انگل‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲ گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

لیشمانیوزها مجموعه‌ای از بیماری‌ها هستند که توسط انگل‌های داخل‌سلولی اجباری تاژک‌دار متعلق به جنس لیشمانیا ایجاد می‌شوند. حدود ۱۰ گونه مختلف انگل لیشمانیا، از لحاظ پزشکی و دامپزشکی حایز اهمیت هستند [۱]. این بیماری‌ها به‌صورت بومی در اکثر نقاط جهان گزارش شده و سالیانه باعث ۲میلیون و ۳۵۷هزار مورد ناتوانی و ۵۹هزار مورد مرگ‌ومیر می‌شود [۲]. در لیشمانیازیس پوستی (CL)، انگل می‌تواند سبب ایجاد زخم‌های پوستی شود. از نظر جغرافیایی، لیشمانیای پوستی به دنیای قدیم (جنوب اروپا، آفریقا و شرق مدیترانه و جنوب و مرکز آسیا) و دنیای جدید (از جنوب ایالات متحده تا شمال آرژانتین) تقسیم می‌شود. گونه‌های دنیای قدیم سبب ایجاد زخم‌های خودمحدودشونده می‌شوند و گونه‌های دنیای جدید علایم بالینی وسیع‌تری به نام لیشمانیازیس پوستی- مخاطی (MCL) را ایجاد می‌کنند [۳]. به‌طور متداول، تشخیص CL یا MCL مبتنی بر روش‌های میکروسکوپی یا کشت انگل لیشمانیا از نمونه‌های پوست یا آسپیره از زخم‌ها است. این روش‌ها غیرحساس و کشت انگل مستلزم صرف وقت طولانی است [۴]. در مناطق اندمیک، CL اکثرا به‌وسیله ارزیابی همه‌گیرشناختی و بالینی تشخیص داده می‌شود که روش‌هایی غیردقیق هستند، زیرا به لحاظ شباهت و ریخت‌شناسی گونه‌ها و زیرگونه‌ها ارزش تشخیصی پایینی دارد و بایستی از مطالعات تکمیلی مانند آنالیز ایزوآنزیم‌ها یا آنتی‌بادی‌های مونوکلونال یا مولکولی برای شناسایی انگل استفاده شود [۵].

در دهه‌های اخیر، روش‌های PCR برای شناسایی انگل لیشمانیا طراحی و توسعه‌یافته و در کشورهایی که PCR قابل دسترسی است، روش ابزار تشخیصی مهمی هستند [۶]. اما اکثر روش‌های PCR مبتنی بر تکثیر DNA است که اطلاعاتی در مورد زنده بودن پاتوژن را فراهم نمی‌کند. DNA انگل‌های لیشمانیا می‌تواند در زخم‌های بیماران CL حتی ماه‌ها پس از درمان بالینی جدا شود [۷، ۸].

اصولا روش‌هایی که قادر به شناسایی انگل زنده هستند، این امکان را فراهم می‌سازند که محقق بتواند برنامه‌های ارزیابی اثر درمانی داروها را به‌خوبی تحت نظارت قرار دهد. در حال حاضر، برای ارزیابی داروها به‌دلیل اختلاف در گونه‌های لیشمانیا مشکلاتی از قبیل اشکال مختلف بالینی بیماری، عدم پاسخ صحیح به درمان و مقاومت دارویی مشاهده می‌شود [۹]. لذا در حال حاضر استانداردی برای تایید درمان قطعی بیماران وجود ندارد.

تحقیقات متنوع کاربردی، زمینه کاربرد روش "تکثیر مبتنی بر توالی نوکلئیک‌اسید" (NASBA) را با انتخاب ژن مناسب برای تشخیص انگل‌های *لیشمانیا ماژور* فراهم می‌کند. از این روش تاکنون برای شناسایی میکروارگانیزم‌های مختلف از جمله هپاتیت C [۱۰]، مایکوباکتریوم [۱۱]، پلاسمودیوم‌ها [۱۲]، *کاندیدا البیکانس* [۱۳] و تریپانوزوم‌ها [۱۴] استفاده شده است.

در این تکنیک ایزوترمال (بدون نیاز به PCRترموسایکلر)، RNA مستقیما در واکنشی سه آنزیمی شامل وارونویساز (RT)، RNAآز H و T_7 RNAپلیمراز و دو پرایمر تکثیر می‌شود. در روش NASBA، ابتدا یک رشته DNA از روی RNA الگو به‌وسیله آنزیم RT و پرایمر مناسب متصل به پروموتر T_7 ساخته می‌شود. محصول این واکنش هیبرید DNA-RNA است که نسبت به آنزیم RNAآز H حساس است و این آنزیم با خاصیت RNAآزی خود، RNA متصل به DNA را تخریب کرده و به این ترتیب یک DNA تک‌رشته باقی می‌ماند که پرایمر دوم در این شرایط به آن متصل می‌شود. آنزیم RT در این شرایط با فعالیت DNAپلیمرازی وابسته به DNA خود، DNA تک‌رشته را به DNA دورشته‌ای تبدیل می‌کند. این DNA دورشته‌ای در یک سر خود دارای توالی پروموتری T_7 است؛ در نتیجه آنزیم T_7 RNAپلیمراز با شناسایی ناحیه پروموتری خود، کار رونویسی را انجام داده و تعداد زیادی RNA تولید می‌شود (بیش از ۱۰۰ نسخه تنها از یک مولکول الگو). هر یک از مولکول‌های جدید RNA، به‌عنوان الگو برای چرخه تکراری فرآیند NASBA به‌کار می‌رود. هدف از این مطالعه استفاده از روش NASBA با ژن 18s rRNA در تشخیص آلودگی به *لیشمانیا ماژور در شیشه* بود.

مواد و روش‌ها

سویه استاندارد (MRHO/IR/75/ER؛ انسیتو پاستور ایـران) انگل *لیشمانیا ماژور* در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد و در محیط RPMI نگهداری شد. انگـل‌هـا هفتـه‌ای ۲ بـار پاسـاژ داده و

Archive of SID

www.SID.ir

سپس با استفاده از لام نئوبار شمارش شدند. از کشت انگل، با دور ۱۳۰۰۰rpm به‌مدت ۲ دقیقه با دستگاه سانتریفوژ رسوب تهیه شد. تعداد ۳ تا ۵ میلیون انگل از رسوب جدا و RNA آن استخراج (RNA Xplus؛ سیناژن) و غلظت آن به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

برای تخلیص DNA انگل از محیط کشت RPMI 1640 حاوی مرحله لیتومونادی استفاده شد. تخلیص DNA از انگل (Real Genomics) در دو مرحله انجام گرفت.

الف) انجام PCR اول توسط پرایمرهای R798 و R174: PCR براساس تکثیر ناحیه ۶۰۰bp از ژن 18s rRNA انجام گرفت. به‌طور خلاصه، ۵µl از DNA با غلظت ۲۰۰µg/ml در حجم ۲۵µl با دو پرایمر R798 و R174 در ۲۵ چرخه تکثیر شد. تکثیر با برنامه ۷۵ ثانیه دمای ۹۴درجه سانتی‌گراد، ۶۰ ثانیه دمای ۶۰درجه سانتی‌گراد، ۱۲۰ ثانیه دمای ۷۲درجه سانتی‌گراد انجام شد. توالی پرایمرهای R798 و R174 در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱) توالی پرایمرهای R798 و R174

پرایمر	توالی
R174	5'-GGTTCCTTTCCTGATTTACG-3'
R798	5'-GGCCGGTAAAGGCCGAATAG-3'

ب) انجام PCR دوم توسط پرایمرهای Fp1 و Rp2: PCR به‌منظور تکثیر قطعه ۳۰۰bp با دو پرایمر Fp1 و Rp2 در ۲۵ چرخه حرارتی با برنامه ۹۴درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، ۵۸/۷درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، ۷۲درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۱۰ دقیقه انجام شد. توالی پرایمرهای Fp1 و Rp2 در جدول ۲ آمده است.

جدول ۲) توالی پرایمرهای R798 و R174

پرایمر	توالی
Fp1	5'-GATGCAAGGTCGCATATGAGCCAAA GTGTGGAGATCGAAG-3'
Rp2	5'-AATTCTAATACGACTCACTATAGGG AGAAGGGCCGGTAAAGGCCGAATAG-3'

محصولات PCR روی ژل آگارز قرار گرفت. پس از اتمام الکتروفورز، قطعه تکثیریافته ۳۰۰bp با دقت از ژل جدا شد. سپس با استفاده از کیت تخلیص DNA از ژل (Fermentase)، DNA خالص به‌دست آمد و محصول به‌دست‌آمده دوباره روی ژل آگارز الکتروفورز شد. در تمام مراحل از نشانگر نردبان DNA ۵۰جفت‌بازی استفاده شد. کلونینگ از قطعه ۳۰۰bp حاوی پروموتر T_7 (کیت T/A Vector Cloning شرکت Fermentase) انجام شد. سپس برای انجام تراریختی از باکتری E. coli استفاده و پلازمید موردنظر به این باکتری منتقل شد. باکتری تراریخت روی پلیت حاوی آمپی‌سیلین برای ۱۶-۱۲ ساعت در ۳۷درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. واکنش PCR روی هر یک از کلونی‌های رشدکرده به‌منظور تایید ورود پلازمید در باکتری E. coli انجام شد. تخلیص پلازمید به‌منظور ورود قطعات موردنظر (۳۰۰bp) در باکتری برای تعیین توالی و تایید قطعات تراریخت باکتری با کیت استخراج پلازمید (MN) انجام شد. چون محصول PCR به‌دست‌آمده حاوی پروموتر T_7 بود، به‌راحتی از آن در فرآیند رونویسی استفاده شد. با استفاده از آنزیم RNA T_7پلیمراز از روی محصول PCR رونویسی صورت گرفت و RNAای ایجاد شد که به عنوان الگو در فرآیند به‌کار آمد.

جدول ۳) اجزای لازم برای واکنش NASBA

ماده شیمیایی	غلظت
Tris-HCL	۴۰ mM
KCL	۵۰ mM
DTT	۱ mM
$MgCl_2$	۴ mM
پرایمر رفت	۱۰ pmol
پرایمر برگشت	۱۰ pmol
dNTP	۰/۴ mM
NTP	۰/۸ mM
DMSO	٪۵
بازدارنده RNase	۱۲ واحد
وارونویساز (RT)	۸ واحد
RNA T_7پلیمراز	۲۰ واحد

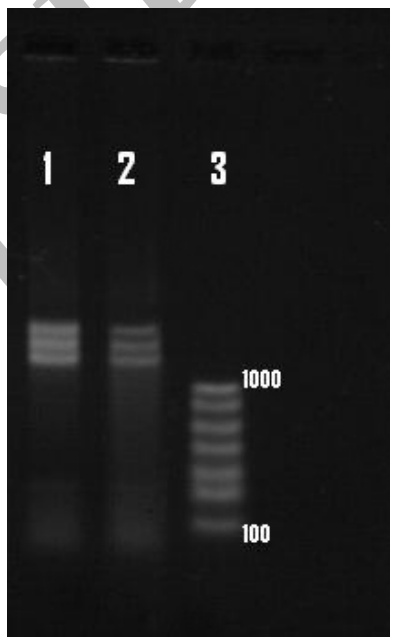
برای انجام واکنش NASBA، ابتدا تمام اجزای موردنیاز با غلظت‌های مشخص و تعیین‌شده وارد مخلوط واکنش شد (به‌جز آنزیم‌ها). مخلوط حاصل به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد و سپس به‌مدت ۳ دقیقه در دمای ۴۱ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. سپس به‌سرعت مخلوط آنزیمی به مخلوط اولیه افزوده و به‌مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۴۱ درجه

Archive of SID
www.SID.ir

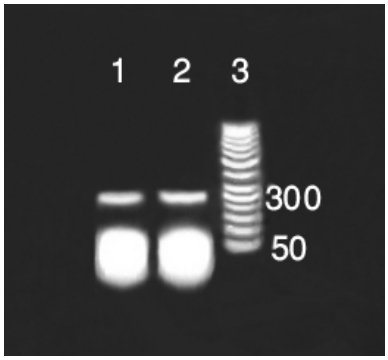
سانتی‌گراد باقی ماند. پس از گذشت این مدت زمان، محصول NASBA یا وارد مرحله شناسایی یا به‌سرعت در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (جدول ۳). ۵میکرولیتر از محصول NASBA در دمای ۶۵درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد و سپس روی ژل آگارز ۲٪ در تانک الکتروفورز قرار گرفت.

نتایج

RNA تخلیص‌شده از پروماستیگوت انگل *لیشمانیا ماژور* دارای اندازه تقریبی ۱۲/۵kb و سه باند در ژل (از بالا به پایین rRNAهای 24sα و 24sβ و 18s rRNA) بود (شکل ۱).

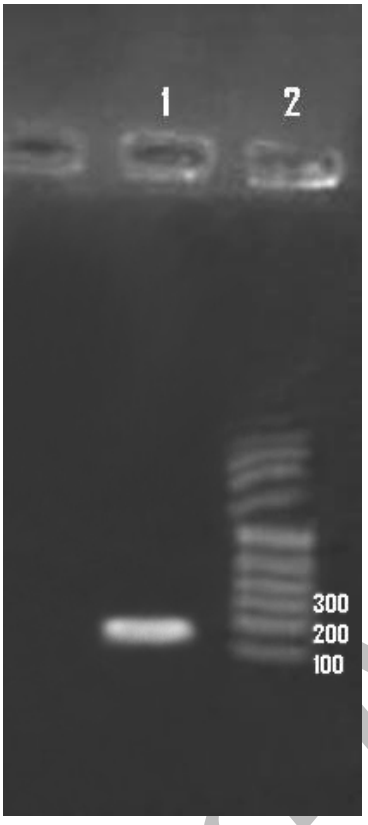


شکل ۱) RNA تخلیص‌شده از انگل *لیشمانیا ماژور* (ستون‌های ۱ و ۲، ناحیه RNA استخراج‌شده از پروماستیگوت انگل لیشمانیا؛ ستون ۳، نردبان RNA)



شکل ۲) ستون ۱ و ۲، قطعه ۳۰۰bp ژن تکثیرشده 18s rRNA *لیشمانیا ماژور* حاوی پروموتر T7؛ ستون ۳، نردبان DNA ۵۰جفت‌بازی

پس از مرحله کلونینگ، قطعه‌ای حدود ۳۰۰bp از ژن تکثیرشده 18s rRNA *لیشمانیا ماژور*، روی ژل آگاروز ۱٪ مشاهده شد (شکل ۲). طبق نتایج واکنش NASBA برای تکثیر ژن 18s rRNAی انگل *لیشمانیا ماژور*، محصول rRNA تکثیریافته از واکنش NASBA روی ژل آگاروز ۲٪ دارای قطعه تقریبی ۲۰۰bp بود (شکل ۳).



شکل ۳) محصول ژن تکثیرشده 18s rRNA *لیشمانیا ماژور* با روش NASBA روی ژل آگاروز ۲٪ (ستون ۱، محصول NASBA؛ ستون ۲، نردبان RNA)

بحث

تشخیص عفونت‌ها یکی از محدودیت‌های اصلی در کنترل بیماری‌هاست. روش‌های میکروسکوپی و کشت، اغلب غیرحساس و متغیر بوده و موارد زیادی از لیشمانیوز پوستی به‌علت پراکندگی و کمی تعداد انگل در نمونه، همچنین عدم مهارت لازم در تشخیص انگل، نمی‌توانند شناسایی شوند. بنابراین، روش تشخیصی حساسی برای رفع این مشکل مورد نیاز است [۱۵]. امروزه روش‌های مولکولی در جهان پیشرفت بسیار کرده و روز به روز روش‌های جدید و با کارآیی بیشتر پا به عرصه

Archive of SID
www.SID.ir

تشخیص بیماری‌ها و مطالعات مولکولی می‌گذارند. تکنیک NASBA هم از جمله این روش‌ها است. تکنیک NASBA سیستم حساس تکثیری RNA و برای رونویسی اختصاصی اسیدهای نوکلئوتیک مناسب است. این روش زمانی به‌کار برده می‌شود که پیگیری اثربخشی داروها و همچنین شناسایی انگل زنده مورد نظر باشد. واکنش رونویسی در مرحله هم‌دمای ۴۱درجه سانتی‌گراد انجام می‌شود. محصول RNAی تک‌رشته‌ای، هدف ایده‌آلی برای بررسی روش‌های مختلف هیبریداسیون است. در این روش بر خلاف سایر روش‌ها، مقادیر محصول RNA در سطح بالایی است. سه آنزیم به‌کاربرده‌شده در این واکنش در شرایط مشابهی فعال می‌شوند. تمام RNA مبتنی بر سیستم NASBA، دارای اختصاصیت بالایی است، به‌طوری‌که در حضور DNAی ژنومی که به‌طور همزمان از سلول زنده جدا می‌شوند، mRNA به‌طور اختصاصی تکثیر یافته و بدون تاثیر از توالی DNA، می‌تواند اندازه‌گیری شود. وجود همین مزیت‌ها در تکنیک NASBA باعث شده تا بتواند جایگاه ویژه‌ای در شناسایی میکرواورگانیزم‌ها پیدا کند. از مزیت‌های این روش نسبت به real-time PCR، عدم نیاز NASBA به دستگاه گران‌قیمت real-time است. زیرا این روش تکثیری نیازی به سیکل‌های حرارتی ندارد [۱۶].

در این تحقیق، توالی ژن 18s rRNA (ژن اختصاصی لیشمانیا) برای مطالعه پروماستیگوت انگل *لیشمانیا ماژور* در محیط کشت به‌کار گرفته شد. روش NASBA براساس توالی ژن 18s rRNA است که کارآیی بالایی در تشخیص لیشمانیا دارد و براساس مطالعات انجام‌شده، هر انگل شامل تعداد زیادی (حدود ۱۶۰) نسخه از این ژن است [۱۷]. مطابق تحقیقات، تعداد نسخه‌های rRNA در سیتوپلاسم انگل 10^4 است [۱۷].

ژن 18s rRNA در تمام گونه‌های لیشمانیا وجود دارد. استفاده از این ژن در مطالعات این اطمینان را ایجاد می‌کند که می‌توان به اندازه‌گیری مقادیر مختلف انگل در تمام گونه‌ها پرداخت [۱۷]. معمولا ژن‌هایی که 18s rRNA را رمز می‌کنند، برای تعیین گروه تاکسونومیک ارگانیزم‌ها، محاسبه ارتباط گروه‌ها و تخمین میزان طبقه‌بندی گونه‌ها به‌کار می‌روند. به‌کارگیری شیوه جدید NASBA در این مطالعه برای شناسایی و اندازه‌گیری انگل در محیط آزمایشگاه زمینه را برای مطالعات براساس روش‌های تکثیر اسیدنوکلوئیک که دارای حساسیت و اختصاصیت بالایی هستند، فراهم می‌کند. طبق نتایج حاصل از کاربرد این روش در سایر مطالعات، میزان اختصاصیت این روش بالا است، زیرا هیچ واکنش متقاطعی با سایر پاتوژن‌ها یا اسیدهای نوکلوئیک انسانی ندارد. این روش قادر به شناسایی اختصاصی RNA انگل در نمونه‌ها بوده و در مقایسه با روش متداول PCR به‌دلیل تکثیر اختصاصی، حساسیت بالایی دارد. مزیت این روش نسبت به real-time PCR در تکثیر مستقیم RNA انگل طی یک واکنش است [۱۸].

از این تکنیک تاکنون برای ارزیابی اثر داروها در برنامه‌های درمانی استفاده شده است. در تحقیق عمر و همکاران، اثر داروی سولفادوکسین- پریمتامین بر بیماران مبتلا به مالاریا، با استفاده از NASBA مورد بررسی قرار گرفت [۱۹]. همچنین *وندرمید* حساسیت روش QT-NASBA را در ارتباط با درمان‌های ناموفق و تاخیری لیشمانیوز پوستی مورد مطالعه قرار داد [۲۰]. برخی از محققین در زمینه طراحی و ارزیابی روش نوین NASBA برای تشخیص و تعیین دوره و اثر درمان بر لیشمانیوز پوستی حساسیت ۹۷/۵٪ و اختصاصیت ۱۰۰٪ را گزارش کرده‌اند [۲۱]. استفاده از روش NASBA در نظارت و کنترل درمان بیماران مبتلا به هپاتیت C مزمن، حساسیت بهتری نسبت به روش‌های DNA دارد [۲۲].

نتیجه‌گیری

به‌کارگیری روش حساس و قابل اندازه‌گیری از قبیل NASBA می‌تواند برای ارزیابی دوره و تاثیر برنامه‌های درمانی و تشخیص اولیه درمان‌های ناموفق، اهمیت زیادی داشته باشد. NASBA به‌عنوان ابزار تشخیصی، ممکن است قادر به طراحی آزمایشات بالینی جدیدی برای پیگیری درمان بیماران با لیشمانیای پوستی باشد. نتایج کاربرد تکنیک NASBA در این بررسی، با مطالعات انجام‌شده هم‌خوانی دارد. با استاندارد شدن روش NASBA، در آینده نزدیک می‌توان منتظر ظهور روش ایده‌آلی برای تشخیص اثرات داروهای مختلف (ضدانگلی، ضدباکتریایی و ضدویروسی) و همچنین مطالعات مربوط به مقاومت‌های دارویی بود.

تشکر و قدردانی: از خانم فاطمه نعمت‌پور و آقای مهدی پریانی نوغانی، دانشجویان دوره دکتری بیوتکنولوژی از مؤسسه

Archive of SID
www.SID.ir

انستیتو پاستور، به جهت همکاری و پیگیری‌های مداوم در این مطالعه، قدردانی می‌شود.

منابع

1- Bates PA. Transmission of Leishmania metacyclic promastigote by Phlebotomine sand flies. Int J Parasitol 2007;37(10):1097-9.

2- Who.int [homepage on the Internet]. World Health Organization; c1995-2010 [updated 2009 Dec 23; cited 2002 Jun 12]. Available from: http://www.who.int/tdr.

3- Meide WF, Schoone GJ, Faber WR, Zeegelaar JE, Vries HJC, Ozbel Y, et al. Quantitative nucleic acid sequence-based assay as a new molecular tool for detection and quantification of Leishmania parasites in skin biopsy samples. J Clin Microbiol. 2005;43(11):5560-6.

4- 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.

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

6- 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.

7- 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.

8- Schubach AF, Haddad MP, Oliveira-Neto W. Detection of Leishmania DNA by PCR in scars of treated human patients. J Infect Dis. 1998;178:911-4.

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

10- Francoise L, Pascale C, Damien V, Christopher P. Comparative evaluation of hepatitis C virus RNA quantitation by branched DNA, NASBA and monitor assays. Hepatology. 2003;29(2):528-35.

11- Vliet GM, Cho SN, Kampirapap K, Leeuwen J, Schukkink RA, Gemen B, et al. Use of NASBA RNA amplification for detection of Mycobacterium leprae in skin biopsies from untreated and treated leprosy patients. J Lepr Assoc. 1996;64(4):396-403.

12- Omar SA, Mens PF, Schoone GJ, Yusuf A. Plasmodium falciparum: Evaluation of a quantitative nucleic acid sequence-based amplification assay to predict the outcome of sulfadoxine-pyrimethamine treatment of uncomplicated malaria. Exp Parasitol. 2005;110(1):73-9.

13- Loeffler J, Dorn C, Hebart H, Cox P, Magga S, Einsele H. Development and evaluation of the nuclides basic kit NASBA for the detection of RNA from Candida species frequently resistant to antifungal drugs. Diagn Microbiol Infect Dis. 2003;45(3):217-20.

14- Mugasa CM, Schoone GJ, Ekangu RA, Lubega GW, Kager PA, Schallig HD. Detection of Trypanosoma brucei parasites in blood samples using real-time nucleic acid sequence-based amplification. Diagn Microbiol Infect Dis. 2008;61(4):440-5.

15- Reithinger R, Claude Dujardin J. Molecular diagnosis of Leishmaniasis: Status and future applications. J Clin Microbiol. 2007;45(1):21-5.

16- Deiman B, Aarle P, Sillekens P. Characteristics and applications of Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA). Mol Biotechnol. 2002;20(2):163-79.

17- Eys GJJM, Schoone GJ, Kroon NCM, Ebeling SB. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of Leishmania parasites. Mol Biochem Parasitol. 1992;51(1):133-42.

18- Schneider P, Wolterr L, Schoone G, Schallig H, Hermsen R. Real-time nucleic acid sequence-based amplification is more convenient than real-time PCR for quantification of Plasmodium falciparum. J Clin Microbiol. 2004;43(1):402-5.

19- Omar SA, Mens PF, Schoone GJ, Yusuf A, Mwangi J, Kaniaru S. Plasmodium falciparum: Evaluation of a quantitative nucleic acid sequence-based amplification assay to predict the outcome of sulfadoxine-pyrimethamine treatment of uncomplicated malaria. Exp Parasitol. 2005;110(1):73-9.

20- Vliet GM, Kampirapap K, Leeuwen J, Schukkink RA, Gemen B, Das PK, et al. Use of NASBA RNA amplification for detection of Mycobacterium leprae in skin biopsies from untreated and treated leprosy patients. Int J Lepr Mycobact Dis. 1996;64(4):396-403.

21- Schallig S. Development and evaluation of new tools for the diagnosis coetaneous Leishmaniasis and for the determination of the duration and efficacy of treatment, performed in endemic (Brazil and Surinam) and non-endemic (Netherlands) regions, 2003-2007. Amsterdam: Royal Tropical Institute; 2009.

22- Lunel F, Cresta P, Vitour D, Payan C, Dumont B, Frangeul L. Comparative evaluation of hepatitis C virus RNA quantitation by branched DNA, NASBA and monitor assays. Hepatology. 2003;29(2):528-35.

Archive of SID

www.SID.ir

Kowsar Medical Journal
Volume 14, Issue 3, Fall 2009
Page: 23

Standardization of NASBA method by using 18s rRNA gene for Identification of *Leishmania major* parasite

Shirbazou Sh.[1] ***MSc*****, Dalimi Asl A.**[*] ***PhD*****, Foruzandeh Moghaddam M.**[2] ***PhD*****, Ghaffarifar F.**[1] ***PhD***

Abstract

Aims. *Leishmania major* is a flagellated protozoan parasite, with more than 20 species and global distribution. This parasite can cause skin disease cutaneous leishmaniasis (CL) in humans. In diagnosis of the parasite, molecular methods are more sensitive and convenient than microscopic methods. Application of NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) method is shown to be high efficient for diagnosis of live parasite. In the present work, molecular isothermal method of NASBA was evaluated to identify live leishmania *In vitro*.

Materials & Methods. Parasites were cultured in RPMI and then their RNA was purified from promastigote stage. For evaluation of NASBA method in diagnosis of live parasite, the 18s rRNA gene of *Leishmania major* was amplified. The result band was investigated on agarose gel.

Results. Extracted RNA from parasite was 12.5kD and showed 3 bands of 24sα-, 24sβ rRNA and 18s rRNA. 18s rRNA gene of leishmania was appropriate for identification of *Leishmania major* in NASBA in the area of approximately 200bp.

Conclusion. The application of NASBA method is suitable for diagnosis of live *Leishmania major*. This method is relevant for evaluating effectiveness of course and treatment of anti leishmania drugs as well as early diagnosis of leishmania.

Keywords: *Leishmania major*, NASBA Method, 18s rRNA Gene

Archive of SID

Submission Date: 17/2/2009, Acceptation Date:12/7/2009
* Correspondence address: Department of Medical Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran dalimi_a@modares.ac.ir
1 Department of Medical Parasitology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2 Department of Medical Biotechnology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

www.SID.ir