Archive of SID

Arak Medical University Journal (AMUJ)
2017; 19(116): 79-86

Original Article

Fast Method for Diagnosis of Leishmania by PCR and FLASH PCR

Alireza Moradabadi[1], Alireza Farsinejad[2], Maryam Fekri Soofiabadi[3]*

1.MSc in Hematology, Department of Hematology and Laboratpry Sciences, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
2.Assistant Professor, PhD of Hematology, Department of Hematology, Pathology and Stem Cell Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
3.Lecturer, MSc in Biochemistry, Department of Pathology, Pathology and Stem Cell Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

Received: 13 Sep 2016, Accepted: 26 Oct 2016

Abstract

Background: Leishmaniasis is a protozoan parasitic disease and a global health problem. The aim of this study is to diagnose the parasitic infection in humans for epidemiological identification and providing control programs using proprietary co-designed primers in three species of Leishmania.

Materials and Methods: 30 common Leishmania isolates were gathered from different centers in Iran. Having been cultured in RPMI-1640 Medium, DNA was extracted and the gene ITS2-rRNA was amplified by PCR. The amplicons were examined by electrophoresis on agarose gel 2%. Also, in FLASH PCR method, a specific probe and florence colour were used to investigae the amplicon existence on sample.

Results: The results of the investigations by PCR and FLASH PCR methods show that these methods are sensitive and specific for diagnosis of Leishmania

Conclusion: In this study, identification of Leishmania parasite using specific primer pairs was successful and TaqMan could be one of the most sensitive diagnostic methods to identify parasite load for the ITS2 region of Leishmania

Keywords: FLASH PCR, ITS_2-rRNA, Leishmania, PCR

*Corresponding Author:
Address: 22 Bahman Blv, Pazhohesh Square, Afzalipour Medical Faculty, Shahid Bahonar University, Stem Cell Research Center, Kerman, Iran
Email: fekri.m1982@yahoo.com

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:50 +0430 on Tuesday May 30th 2017

www.SID.ir

Archive of SID

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال ۱۹، شماره ۱۱ (شماره پیاپی ۱۱۶)، بهمن ۱۳۹۵، ۸۶-۷۹

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:50 +0430 on Tuesday May 30th 2017

روش تشخیص سریع‌تر عفونت لیشمانیا با استفاده از تکنیک PCR و FLASH PCR

علیرضا مرادآبادی[۱]، علیرضا فارسی نژاد[۲]، مریم فکری صوفی آبادی[۳*]

۱.دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه خون‌شناسی و علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

۲.استادیار، دکترای تخصصی هماتولوژی، گروه هماتولوژی، مرکز تحقیقات پاتولوژی و سلول‌های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

۳.مربی، کارشناس ارشد بیوشیمی،گروه پاتولوژی، مرکز تحقیقات پاتولوژی و سلول‌های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۵/۰۶/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۸/۰۵

چکیده

زمینه وهدف: لیشمانیوز یک بیماری انگلی تک یاخته‌ای است که به عنوان یک معضل بهداشتی در بسیاری از کشورها مطرح است.هدف از این مطالعه، تشخیص عفونت انگل در انسان به منظور شناسایی اپیدمیولوژیک و ارائه برنامه کنترل با استفاده از پرایمر اختصاصی مشترک طراحی شده در سه گونه لیشمانیا است.

مواد و روش‌ها: ۳۰ نمونه ایزوله شایع انگل لیشمانیا از مراکز مختلف در ایران جمع آوری شد. DNA این ایزوله‌ها پس از کشت در محیط Rpmi1640 استخراج و ژن ITS2-rRNA با استفاده از PCRتکثیر یافت. امپلیکون‌ها توسط الکتروفورز در ژل آگارز ۲ درصد مورد بررسی قرار گرفتند. از روش FLASH PCR نیز، یک پروب اختصاصی و رنگ فلورسانس به منظور بررسی وجود یا عدم وجود امپلیکون به کار گرفته شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از روش‌های PCR و FLASH PCR نشان می‌دهند این دو روش دارای دقت و حساسیت قابل قبولی برای شناسایی لیشمانیا هستند.

نتیجه‌گیری: تعیین آلودگی انگل لیشمانیا با استفاده از جفت پرایمر اختصاصی موفقیت‌آمیز بود و روش TaqMan می‌تواند یکی از حساس‌ترین روش‌های تشخیصی برای شناسایی کیفی انگل در ناحیه‌ی ITS2 لیشمانیا باشد.

واژگان کلیدی: لیشمانیا PCR، ITS2-rRNA، FLASH PCR

***نویسنده مسئول:** ایران، کرمان، بلوار ۲۲ بهمن، میدان پژوهش، دانشگاه شهید باهنر، دانشکده پزشکی افضلی پور، مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی

Email: fekri.m1982@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:50 +0430 on Tuesday May 30th 2017

مقدمه

لیشمانیوز یکی از ۶ بیماری مهم گرم‌سیری می‌باشد که به اشکال سالک(جلدی)- کالاازار (احشایی) ظاهر می‌شود. جنس لیشمانیا در میزبان مهره‌دار به شکل اماستیگوت(بدون تاژک) و درون یاخته‌ای است. در میزبان بی مهره و محیط کشت به شکل پروماستیگوت(تاژکدار) و برون یاخته‌ای وجود دارد. این بیماری در ۸۸ کشور جهان در قاره‌های آسیا، اروپا، آفریقا دیده می‌شود(۱، ۲). سه گونه از انگل لیشمانیا به عنوان عامل بیماری لیشمانیوز انسانی در ایران شناخته شده‌اند که از نظر اهمیت اپیدمیولوژیکی به ترتیب شامل لیشمانیا ماژور، لیشمانیا تروپیکا و لیشمانیا اینفانتوم می‌باشند(۳، ۴). شناخت گونه‌های عامل بیماری به منظور برنامه ریزی جهت کنترل، پیش‌گیری و درمان اهمیت به سزایی دارد. روش‌های کلاسیک تشخیص انگل و شناسایی گونه شامل ارزیابی مستقیم، تهیه کشت و روش‌های بیوشیمیایی می‌باشد که از معایب این روش‌ها می‌توان به حساسیت کم و وقت گیر بودنآ اشاره کرد(۴). به دلیل تفاوت گونه‌های لیشمانیا در میزان حدت و پاسخ به رژیم درمانی مختلف، تشخیص صحیح، به منظور تعیین پیشگویی‌های بالینی و تجویز رژیم درمانی مناسب واختصاصی، تشخیص گونه ضروری می‌باشد(۵). امروزه جهت شناخت گونه‌های انگل از روش‌های نوین مولکولی نظیر PCR ,Real time PCR استفاده می‌شود. از جمله مزایای روش‌های مولکولی می‌توان نیاز به میزان کم از ماده وراثتی، عدم تاثیر شرایط مخدوش کننده محیط و میزبان و قابلیت بررسی تعداد زیادی نمونه در یک زمان کوتاه وحساسیت تست اشاره نمود(۶). دو قطعه ژنومی از انگل لیشمانیا که بیش‌ترین کاربرد را در مطالعات مولکولی دارند شامل DNA کینتوپلاستی انگل و بخش ITS از DNAریبوزومی است(۷). DNA کینتوپلاستی، با دارا بودن هزاران نسخه DNAحلقوی(minicircles) که هر یک شامل دو بخش conserve و variable است و در حالی که در بخش ITS به واسطه کپی‌های متعدد آن در ژنوم انگل و توالی‌های تکراری هدف خوبی برای مطالعات مولکولی تشخیص و تعیین گونه است.

شونیان وهمکارانش و نیز گادیسا و همکارانش با هدف قرار دادن ژن ITS1 و تعیین توالی آن توانستند گونه‌های مختلف لیشمانیا را در نمونه‌های بالینی که به شکل گسترش یا بیوپسی تهیه شده بودند، شناسایی کنند(۱۵، ۱۶). بقایی و همکاران نسبت به تشخیص و تمایز گونه‌های لیشمانیا در نمونه‌های بالینی تهیه شده به صورت گسترش مستقیم، استخراج شده از محیط کشت اقدام کردند(۱۷). این مطالعه به منظور تعیین روش نوین در شناسایی انگل‌های شایع لیشمانیا با استفاده از تکنیک PCR با طراحی یک جفت پرایمر از نواحی ITS2 از ژن rRNA انجام شد که در مطالعات بعدی بتوانیم از این جفت پرایمر در نمونه‌های انسانی، جهت تشخیص کمیت بار انگلی با روش Real time PCR استفاده گردد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های استاندارد

در این مطالعه نمونه‌های استاندار از ایزوله‌ی ذخیره شده در نیتروژن مایع از گونه‌های شایع انگل لیشمانیا(L. major, L. infantom, L. tropica) دریافت شده از مرکز تحقیقات لیشمانیوز کرمان تهیه شد. انگل‌ها در محیط RPMI1640 حاوی پنی سیلین واسترپتومایسین و FCS کشت داده شد و به انکوباتور ۲۲ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. فلاسک‌های کشت هر روز در زیر میکروسکوپ معکوس بررسی شدند تا از وضعیت رشد انگل‌ها و عدم وجود آلودگی اطمینان حاصل شود.

نمونه‌ها نیز از ایزوله‌های موجود در مراکز تحقیقاتی لیشمانیوز تهیه شد. نمونه‌های ایزوله در این مراکز از بیماران مراجعه کننده بیوپسی تهیه و مورد کشت قرار گرفته‌اند و انگل لیشمانیا از این نمونه‌ها در محیط کشت جدا شده است. ایزوله‌های موجود در این مراکز کشت شده و برای تشخیص، مورد استفاده قرار گرفت. جهت تایید وجود انگل در نمونه‌های بیماران نیز رنگ آمیزی هماتوکسیلین

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:50 +0430 on Tuesday May 30th 2017

ائوزین و بررسی میکروسکوپی مقاطع بافتی در تایید وجود انگل در نمونه‌های بافتی مورد استفاده قرار گرفته است.

استخراج DNA

استخراج DNA بر طبق پروتکل کیت QiaAmp DNA Mini kit (QIAGEN Germany) انجام شد. تعیین غلظت DNA به وسیله دستگاه نانودراپ در طول موج ۲۶۰ انجام شد و نسبت جذب یک نمونه خالص DNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰نانومتر (A 260/280) به دست آمد.

PCR با هدف قرار دادن ژن ITS2-rRNA

روش PCR: با پرایمرهای اختصاصی طراحی شده جنس لیشمانیا با سکانس پرایمر

L.ITSF:**5'CAAATACACGCATGCACT CTC 3'**
L.ITSR:**5'TTTAATAATCCTGGTCAC AGCC3'**

قطعه‌هایی حدود 200bp از گونه‌های شایع لیشمانیا تکثیر گردید. مواد و حجم به کار رفته برای آزمایش 25µl شامل master mix 12.5µl (amplicon)، primer forward 1µl، primer reverse 1µl، DNA 1µl و H2O 9.5µl می‌باشد و در ادامه نمونه‌ها داخل دستگاه ترمال سایکلر (c1000 touch bio Rad) قرار داده شد. برنامه دمایی برای تکثیر به این صورت برنامه ریزی شد: مرحله پیش دناتوراسیون ۹۵درجه به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل از: دناتوراسیون ۹۴ درجه به مدت ۲۰ ثانیه، آنلینگ ۶۰ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله گستردگی پرایمرها ۷۲ درجه به مدت ۳۰ثانیه. در پایان مرحله گستردگی نهایی ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه انجام شد. سپس نمونه‌ها همراه کنترل آلودگی و مثبت روی ژل اگارز ۲ درصد حاوی ۰.۱ میکروگرم رنگ سایبر سیف به ازای هر میلی‌لیتر ژل الکتروفورز و با استفاده از مارکر (CatNo:#SMO323) 100bp مورد بررسی قرار گرفتند.

آزمایش FLASH PCR با هدف تشخیص سریع لیشمانیوز

روش FLASH PCR با پرایمرهای روش PCR و همراهی پروب اختصاصی ژن ITS2 انجام می‌شود و توالی پروب اختصاصی به صورت زیر می‌باشد:

ITS-P:FAM 5'AGCGTCGAAACTCCTCTCTGGT GC3' BHQ1

در این روش همان پرایمرهای روش PCR موجب تکثیر قطعه 200bp شد. اما در این روش طی واکنش زنجیره‌ی پلی‌مراز پروب مورد استفاده تجزیه می‌شود. تجزیه شدن پروب باعث جدا سازی FAM از BHQ1 و ایجاد رنگ قابل اندازه‌گیری فلورسانس را بعد از تکثیر ناحیه اختصاصی بین پرایمرهای اختصاصی به همراه داشت. افزایش رنگ فلو رسانس با استفاده از اشکار ساز FD-12 (DNA technology-Russian) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته‌ها

در این مطالعه ۳۰ نمونه ایزوله انگل لیشمانیا مورد آزمایش واکنش زنجیره پلی مراز (PCR) قرار گرفتند. پس از انجام الکتروفورز مشخص شد که باندهای ایجاد شده در محدوده 200bp می‌باشند.

www.SID.ir

Archive of SID

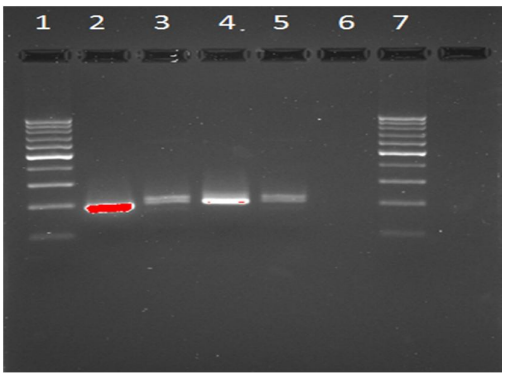
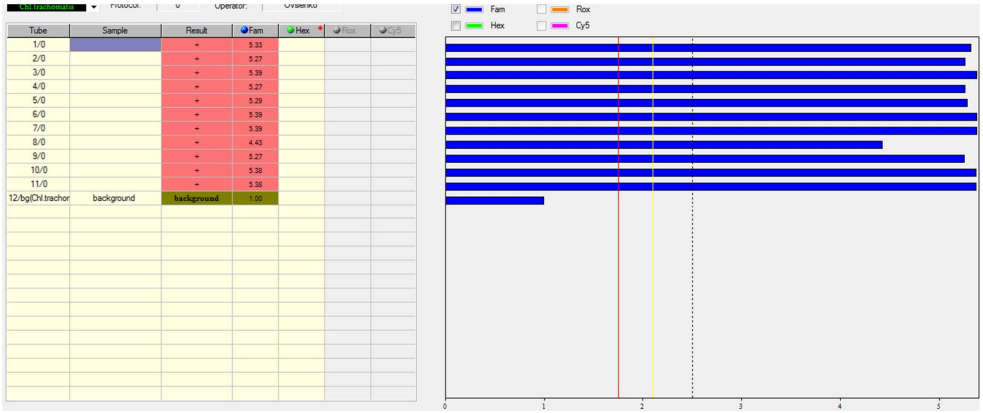


Figure2.Electrophoresis of ITS2-rRNA showed gene PCR product in the common species ofLeishmania on the 2% agarose gel.
column 1:molecular marker 100bp
column2: fragment length for Leishmania ..infantum 192bp
column3: fragment length for Leishmania .major 220bp
column 4:fragment length for Leishmania. tropica 200bp
column 5:positive control of Leishmania .major
column 6: contamination control
column 7:molecular marker 100bp

نتایج FLASH PCR با استفاده از دستگاه FD-12 مورد ارزیابی قرار گرفتند(DNA technology. russia) نیز در این مطالعه با روش PCR هم‌خوانی داشت و تمامی این نمونه‌ها به عنوان روش استاندارد با استفاده از روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین ائوزین مورد تایید قرار گرفتند. در این روش با استفاده از پروب اختصاصی و ایجاد رنگ در طی واکنش رنجیره پلی مراز تکثیر ناحیه اختصاصی مورد ارزیابی قرار گرفت. در این ارزیابی نمونه‌ای نیز به عنوان کنترل منفی نیز مورد آزمون بوده که این نمونه به عنوان رنگ زمینه یا Back ground در نظر گرفته نمیشود. تمامی نمونه هایی که در آنها رنگ فلورسانس تولید شده توسط پروب اختصاصی بیش از نمونه back ground بود به عنوان مثبت در نظر گرفته شدند و نتایج الکتروفورز نمونه‌ها بعد از ارزیابی با دستگاه FD-12 این تکثیر اختصاصی را تایید می‌کرد.



نمودار FD-12. حاصل از شناسایی میزان فلورسانس نمونه‌های لیشمانیوز که در آن نمودار ۱۲ حاصل از نمونه NTC بوده که به عنوان Back ground استفاده می‌شود. نمودارهای حاصل از نمونه‌های مثبت بالاتر از حد آستانه مشخص شده توسط دستگاه می‌باشد

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:50 +0430 on Tuesday May 30th 2017

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:50 +0430 on Tuesday May 30th 2017

بحث

یکی از اصول مهم در پیش‌گیری و کنترل لیشمانیوز شناسایی و تعیین گونه‌ی آن می‌باشد شناسایی سریع عفونت لیشمانیا جهت کنترل بیماری و درمان سریع‌تر بیماری ضروری است(۸) نوع گونه آلوده کننده با نوع بیماری ایجاد شده در بیمار و درمان آن در ارتباط است و گونه‌ی آلوده کننده بیماران در مناطق اندمیک با سوش غالب در منطقه ارتباط دارد(۸).

از طرفی روش‌های مولکولی به دلیل ساده بودن در اجرا و دقت بسیار بالا خیلی مورد توجه هستند این روش‌ها در تعیین گونه و تعیین بار عفونت در خیلی از بیماری‌ها کاربرد دارند به علاوه این روش‌ها توانایی انجام بر روی اسلایدهای بایگانی شده بیماران را نیز دارند. برخی از روش‌های مولکولی به دلیل ارزان بودن حتی جهت غربال بیماران مشکوک نیز به کار گرفته می‌شوند و سرعت تشخیص با استفاده از این روش‌ها بسیار سریع‌تر است. در روش‌های مولکولی طراحی پرایمر اختصاصی مهم‌ترین بخش کار بوده که این پرایمر تعیین کننده اختصاصیت این روش است.

ناحیه ژنی ITS که ناحیه حفاظت شده از ژن RNA ریبوزوم در کروموزوم ۲۷ است که در کل کروموزوم ۲۷ ، ۶ تا ناحیه ITS1 و ۶ تا ناحیه ITS2 وجود دارد(۹، ۱۰). قطعات ژنی دو ناحیه ITS1 و ITS2 از این رو اهمیت دارد که با سرعت بیش‌تری تکامل یافته و لذا توالی آن‌ها حتی در بین گونه‌های یک جنس متفاوت است بدین ترتیب پلی مورفیسم این منطقه ژنی می‌تواند کمک شایانی جهت شناسایی جنس‌ها و حتی گونه‌های مختلف باشد. در مطالعات قبلی با استفاده از روش‌های ملکولی از جمله pcr,rlfp-pcr هدف قرار دادن ژن its1 گونه‌های مختلف لیشمانیا را شناسایی کردند.

حساسیت روش FLASH PCR در مطالعات گذشته به اثبات رسیده است. در مطالعه ابرامورا و همکارانش از روش flash pcr برای تشخیص قارچ‌های Septoria tritici و Stagonospora nodorum به صورت مولکولی استفاده کردند در این مطالعه تکثیر ناحیه ژنی ITS1 مورد بررسی قرار گرفت و برای تایید گونه قارچ از روش استاندارد کشت استفاده کردند(۱۱). هم‌چنین ریازانتسف و همکارانش از روش FLASH-PCR برای تشخیص قارچ بیماری‌زای Fusarium graminearu , F. sporotrichioides, ,F. poae F. culmorum F. , and F. avenaceum , F. langsethiae tricinctum استفاده کردند در این مطالعه از تکثیر ژن tef-1α برای شناسایی در ۳۸ ایزوله مختلف از قارچ‌ها استفاده شد(۱۲) در مطالعه دیگری که بر روی مایکوباکتریوم توسط عباس علی ایمانی فولادی و همکارانش روی انواع نمونه‌های ریوی و خارج ریوی بیماران مبتلا به سل، روش FLASH-PCR را با روش‌های مرسوم کشت و رنگ آمیزی اسمیر به روش اسید فست مقایسه کردند. در مطالعه وی، حساسیت و ویژگی تست FLASH-PCR به ترتیب ۹۳/۳۳ درصد و ۹۲/۵ درصد به دست آمد(۱۳) .این نشان می‌دهد که روش FLASH-PCRدارای حساسیت بالا نسبت به روش‌های مرسوم برای تشخیص دارد و هم‌چنین می‌تواند طی زمانی کوتاه اجرا شود(۱۴). دراین مطالعه طراحی پرایمر از ناحیه ژنی ITS انجام شده و سعی بر ان بود که طراحی پرایمر به گونه‌ای باشد تا به طور اختصاصی بتوان از انواع روش‌های مولکولی جهت غربال بیماران مشکوک استفاده کرد. از جمله این موارد می‌توان به روش PCR همرا با الکتروفورز و روش FLASH PCR نام برد. از جمله مزیت‌های این روش‌ها سرعت در اجرا دارند و نیاز کمتر به کار آزمایشگاهی است. ویژگی مهم‌تر روشFLASH PCR نیز تنها وجود پروب و عدم نیاز به ژل است. در این روش به دلیل عدم باز شدن تیوب مخلوط واکنش بعد از انجام واکنش زنجیره پلی مراز آلودگی محیطی کم‌تری در آزمایشگاه ایجاد می‌کند. از دیگر مزیت‌های این روش و طراحی پرایمر و پروب در آن کاربرد آنها در روش‌های مختلف از قبیل Real-time PCR است که علاوه بر سرعت دادن به تشخیص می‌تواند در کاهش هزینه‌های آزمایشگاهی کمک کننده باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:50 +0430 on Tuesday May 30th 2017

با توجه به صرفه اقتصادی بیشتر در استفاده از این پرایمر در FLASH PCR به دلیل کارایی این روش مولکولی در شناسایی تکثیر و به علاوه عدم نیاز این روش به الکتروفورز می‌توان این روش را روشی برای تشخیص سریع تر با حساسیت بالا در بیماران با استفاده از یک جفت پرایمر معرفی کرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از زحمات پرسنل مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی و گروه پاتولوژی دانشگاه علوم پزشکی کرمان که نقش مهمی در به ثمر رسیدن این تحقیق داشتند تشکر و قدر دانی می‌شود.

منابع

1.Cupolillo, E., et al., Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of Leishmania. Molecular and biochemical parasitology, 1995. 73(1): p. 145-155.
2.Edrissian, G.H., Visceral leishmaniasis in Iran and the role of serological tests in diagnosis and epidemiological studies. Parasitology for 21st Century. ICOPA VIII, Izmir, Turkey: CAB International, 1996: p. 63-78.
3.Parvizi, P., M. Akhoundi, and H. Mirzaei, Distribution, fauna and seasonal variation of sandflies, simultaneous detection of nuclear internal transcribed spacer ribosomal DNA gene of Leishmania major in Rhombomys opimus and Phlebotomus papatasi, in Natanz District in Central Part of Iran. Iranian biomedical journal, 2012. 16(2): p. 113.
4.Mahmoudvand, H., et al., Epidemiological aspects of visceral leishmaniasis in Baft District, Kerman province, southeast of Iran. Iranian journal of parasitology, 2011. 6(1): p. 1.
5.Robati, R.M. and F. Abdollahimajd, Cutaneous Leishmaniasis: Report of Two Atypical Cases. Journal of Clinical Medicine Research Updates, 2015. 2: p. 1-3.
6.Berman, J., Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. Clinical infectious diseases, 1997. 24(4): p. 684-703.
7.Marfurt, J., et al., Identification and differentiation of Leishmania species in clinical samples by PCR amplification of the miniexon sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis. Journal of clinical microbiology, 2003. 41(7): p. 3147-3153.
8.Edrissian GH. Visceral leishmaniasis in Iran and the role of serological tests in diagnosis and
epidemiological studies. J Kerman Univ Med Sci 1996; 3(2): 78 63.
9.Schulz, A., et al., Detection, differentiation, and quantitation of pathogenic Leishmania organisms by a fluorescence resonance energy transfer-based real-time PCR assay. Journal of clinical microbiology, 2003. 41(4): p. 1529-1535.
10.Parvizi, P. and P. Ready, Nested PCRs and sequencing of nuclear ITS-rDNA fragments detect three Leishmania species of gerbils in sandflies from Iranian foci of zoonotic cutaneous leishmaniasis. Tropical Medicine & International Health, 2008. 13(9): p. 1159-1171.
11.Abramova S, Ryazantsev D, Voinova T, Zavriev S. Diagnostics of phytopathogen fungi; Septoria tritici and Stagonospora nodorum by fluorescent amplification-based specific hybridization (FLASH) PCR. Bioorg Khim 2008; 34: 97-102.
12.Ryazantsev D, Abramova S, Evstratova S, Gagkaeva T, Zavriev S. FLASH-PCR diagnostics of toxigenic fungi of the genus & lt; i & gt; Fusarium & lt;/i & gt. Bioorg Khim 2008; 34: 716-24.
13.Cave MD, Eisenach KD, Templeton G, Salfinger M, Mazurek G, Bates JH, et al. Stability of DNA fingerprint pattern produced with IS6110 in strains of Mycobacterium tuberculosis. J Clin Microbiol 1994; 32: 262-266.
14.Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, vanSoolingen D, Kuijper S,

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 9:50 +0430 on Tuesday May 30th 2017

et al. Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium tuberculosis for diagnosis and epidemiology. J Clin Microbiol 1997; 35: 907-914

15.Gadisa E, Genetu A, Kuru T, Jirata D, Dagne K, Aseffa A, et al. Leishmania (Kinetoplastida): Species typing with isoenzyme and PCR–RFLP from cutaneous leishmaniasis patients in Ethiopia. Experimental parasitology. 2007;115(4):339-43.

16.Schönian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HD, Presber W, et al. PCR diagnosis and characterization of Leishmania in local and imported clinical samples. Diagnostic microbiology and infectious disease. 2003;47(1):349-58.

17.Baghaei A, Parvizi P, Amirkhani A, Honarvar M, Badiei F. Identification of Leishmania using microscopic and molecular methods in suspected patients of Cutaneous Leishmaniasis by targeting ITS-rDNA gene, Golestan province, Iran (2009-10). Journal of Gorgan University of Medical Sciences.۸۱-۷۲:(۳)۱۴;۲۰۱۲ .

www.SID.ir